

**Sema ŞULEKOĞLU**

**RAPD-PZR ANALİZİNDE, PRİMER BAĞLANMA DERECEŚİ VE  
DNA KONSANTRASYON PARAMETRELERİNİN  
OPTİMİZASYONU İLE FARKLI CANLI VE DOKU TİPLERİNDE  
DNA DEĞİŞİKLERİNİN TESPİTİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

Sema ŞULEKOĞLU

**Haziran - 2011**

Haziran 2011

**RAPD-PZR ANALİZİNDE, PRİMER BAĞLANMA DERECEŚİ VE  
DNA KONSANTRASYON PARAMETRELERİNİN  
OPTİMİZASYONU İLE FARKLI CANLI VE DOKU TİPLERİNDE  
DNA DEĞİŞİKLERİNİN TESPİTİ**

Sema ŞULEKOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 2011  
İstanbul, TŐrkiye

## ONAYLAMA SAYFASI

Bu tezin şekil ve içerik açısından Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tez Yazım Kılavuzunda belirtilen kurallara uygun formatta yazıldığını onaylıyorum.

Yrd. Doç. Dr. Sevim IŞIK

Anabilim Dalı Başkanı

Biyoloji Anabilim Dalı 50230808 numaralı öğrencisi Sema ŞULEOĞLU tarafından hazırlanan bu tezin Yüksek Lisans Tezinde bulunması gereken yeterliliğe, kapsama ve niteliğe sahip olduğunu onaylıyorum.

Yrd. Doç. Dr. İ. İrem UZONUR

Tez Danışmanı

Tez Sınavı Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Mustafa PETEK

\_\_\_\_\_

Yrd. Doç. Dr. İ. İrem UZONUR

\_\_\_\_\_

Yrd. Doç. Dr. Lokman ALPSOY

\_\_\_\_\_

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tez Yazım Kılavuzunda belirtilen kurallara uygun formatta yazıldığını onaylıyorum.

Doç. Dr. Nurullah ARSLAN

Müdür

Haziran 2011

**RAPD-PZR ANALİZİNDE, PRİMER BAĞLANMA DERECESESİ  
VE DNA KONSANTRASYON PARAMETRELERİNİN  
OPTİMİZASYONU İLE FARKLI CANLI VE DOKU TİPLERİNDE  
DNA DEĞİŞİKLERİNİN TESPİTİ**

Sema ŞULEKOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2011

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. İ.İrem UZONUR

**ÖZET**

RAPD-PZR yöntemi DNA değişikliklerini çeşitli açılardan tespit için 1990'dan beri kullanılan moleküler bir tekniktir. Birçok avantajı olan ve genomik dizileri bilmeden de sadece kısa rastgele dizayn edilmiş primerler kullanılarak elde edilen DNA parçalarının doğru şekilde analiz edilmesi esasına dayalı çok verimli, ucuz bir metottür. Ancak PZR parametrelerinin bu tür çalışmaların sağlıklı yürütülmesi için optimizasyonu çok önemlidir. Hem deneylerin tekrarlanabilirliği, hem güvenilirliği açısından özellikle DNA konsantrasyonu ve primer bağlanma sıcaklığı (AT: Annealing Temperature) ile ilgili optimizasyonlar çok önemlidir. Ancak literatürde bilginiz dahilinde deneysel olarak bu parametrelerle ilgili kapsamlı bir çalışma mevcut değildir. Bütün araştırmacılar bu tip optimizasyonların farkında olduklarını bildirseler de metodun optimizasyonu ile ilgili bu tür genel bir araştırma yapmaksızın çalıştıkları canlı sistemin deneysel optimizasyonuna yönelik çalışmışlardır. Bu eksikliklerden yola çıkarak metodun geliştirilmesinde çeşitli canlı ve dokuların DNA'sında var olan ya da sonradan oluşmuş DNA değişikliklerini tespit ederken, primer AT ve DNA konsantrasyonlarındaki değişikliklerin etkisinin gösterilmesi için ısı gradyan PZR cihazı kullanılarak yapılmıştır. Isı gradyanlı sistem sayesinde 96 örnek kapasiteli PZR bloğu ve uyumlu tabak yardımıyla RAPD-PZR yönteminde hem primer bağlanma derecesinin,

hem de DNA konsantrasyonlarının her çalışmanın amaç ve kapsamı doğrultusunda çok ciddi bir şekilde optimizasyonunun şart olduğu aksinin, yani varolan optimize edilmiş ve RAPD-PCR kullanıcıları tarafından kabul görmüş optimize şartlarla çalışmanın hatalı sonuçlar verebileceği gösterilmiştir. Çalışmamız sonuçları açısından bundan sonra yapılacak RAPD-PZR çalışmaları için ciddi bir prosedüral katkıda bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** RAPD-PCR optimizasyonu, ısı gradyanlı PZR, primer bağlanma sıcaklığı, DNA konsantrasyonu.

**ANNEALING TEMPERATURE AND DNA CONCENTRATION  
PARAMETER OPTIMIZATIONS IN RAPD-PCR ANALYSIS TO  
DETECT DNA VARIATIONS IN VARIOUS ORGANISMS AND  
TISSUE TYPES**

Sema ŞULEKOĞLU

M. S. Thesis - Biology

June 2011

Supervisor: Assist. Prof. I. Irem UZONUR

**ABSTRACT**

Despite having potential for many applications, the arbitrary nature of the RAPD method has drawn criticism owing to the low stringency conditions and dependance on DNA quality and concentration. Relatively low annealing temperatures (34–36°C) are used in RAPD to ensure a maximal number of primer binding events and consequent generation of a large number of amplified DNA fragments for analytical purposes. However, the low stringency of the accompanying DNA hybridisation can result in the formation of spurious, unpredictable amplifications. HAT-RAPD applications are also not enough to provide reliable, efficient and effective amplified DNA fragments. In this thesis aim is to show there is a need for right AT optimizations suitable for primer type, primer melt temperature, sample DNA type, quality and quantity and to provide a methodology to make more feasible, reliable, reproducible, repeatable assay designs.

A thermal cycler with a gradient temperature property has been used to show the necessary optimizations in RAPD-PCR AT's for different assay design parameters like DNA type, quality, quantity, primer type and primer T<sub>m</sub>. The results are evaluated to provide a methodology for efficient RAPD assay designs with AT and DNA concentration parameters in focus.

**Keywords:** RAPD-PCR optimization, gradient PCR, annealing temperature, AT, DNA concentration.

## İTHAF

Gönlümde yer yapmışlara...

## TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, tecrübesi ile bilgi birikimini benden esirgemeyen kıymetli hocam ve danışmanım Yrd. Doç. Dr. İ.İrem UZONUR' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında ve eğitimim sırasındaki tüm katkılarından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Yrd. Doç. Dr. Sevim IŞIK'a, bölümümüzün değerli hocaları Prof. Dr. Fahrettin GÜCİN, Prof. Dr. Fatih ÖZKARAGÖZ, Yrd. Doç. Dr. Lokman ALPSOY, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Serdal SAKÇALI, araştırma görevlileri Cemile Ümran CEYLAN, Esmâ Banu ÖZSOY' a, sınıf arkadaşım Gamze AKDENİZ' e ve tüm biyoloji personeline teşekkürü bir borç bilirim.

Lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren tüm 18 Mart Üniversitesi Biyoloji bölümü öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Her konuda yanımda olan ablalarım Şule, Şükran, Şengül'e ve anneme, babama desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma, Fatih Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından P50031006\_2 proje numarası ile desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Fatih Üniversitesi yönetimine teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
İTHAF .....	vi
TEŞEKKÜR SAYFASI.....	vii
İÇİNDEKİLER TABLOSU.....	viii
TABLolar LİSTESİ .....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
KISALTMALAR .....	xiv
BÖLÜM 1 - GİRİŞ.....	1
1.1    Amaç ve Kapsam .....	1
1.2    PZR ve RAPD-PZR Yöntemi .....	2
1.2.1    Tarihçe.....	5
1.2.2    RAPD-PZR Kullanım Alanları.....	7
1.2.3    RAPD-PZR'ın Avantajları ve Dezavantajları .....	9
1.2.3.1    Avantajları .....	9
1.2.3.2    Dezavantajları .....	9
1.2.4    RAPD-PZR Optimizasyonuna İlişkin Parametreler .....	10
1.2.5    RAPD Konulu Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	13
1.2.6    RAPD-PZR' da Primer Bağlanma Sıcaklığı (AT).....	13
1.2.7    RAPD-PZR' da DNA Kalitesi ve Konsantrasyonu .....	14
BÖLÜM 2 - MATERYAL ve METOD .....	17
2.1    Materyal.....	17
2.1.1    Çalışmada Kullanılan DNA Örnekleri .....	17
2.1.2    RAPD-PZR Cihaz ve Sarfları.....	18
2.1.3    RAPD-PZR' da Kullanılan Kimyasal ve Primerler .....	18
2.1.4    Jel Elektroforezi ve Görüntüleme Cihazı, Kimyasal ve Sarfları .....	19
2.2    Metod .....	21

2.2.1	DNA Örneklerinin Kalitatif ve Kantitatif Değerlendirmesi.....	21
2.2.2	RAPD-PZR Optimizasyonları Stratejisi.....	21
2.2.2.1	Primer Seçimi.....	22
2.2.2.2	Gradyanlı RAPD-PZR.....	23
2.2.2.3	Primer Bağlanma Derecesi Denemeleri Sistematiği .....	26
2.2.2.4	DNA Konsantrasyon Denemeleri Sistematiği .....	26
2.2.2.5	Farklı Doku ve Canlı Denemeleri Sistematiği .....	26
2.2.3	Jel Elektroforezi, Görüntüleme ve Dökümantasyon .....	26
BÖLÜM 3 - BULGULAR.....		28
3.1	DNA Örneklerinin Kalitatif ve Kantitatif Değerlendirme Bulguları .....	28
3.1.1	DNA Örneklerinin Kalitatif Değerlendirme Bulguları .....	28
3.1.2	DNA Örneklerinin Kantitatif Değerlendirme Bulguları .....	29
3.2	DNA Örneklerinde RAPD-PZR Uygunluğu Açısından Primer Tarama Bulguları .....	29
3.3	Gradyan PZR'ı ile Primer Bağlanma Derecesi Optimizasyon Bulguları....	31
3.3.1	İnsan DNA'sı ile.....	31
3.3.2	Balık ( <i>Sparus auratus</i> ) doku DNA'sı ile .....	38
3.4	RAPD-PZR ile DNA Konsantrasyon Farklılık Etkilerini Göstermeye ait Bulguları .....	39
3.5	Farklı DNA Konsantrasyonlarının Değişik AT'lerde Etkisini Gösteren Sonuçlar .....	43
3.6	Primer AT'larına Göre AT Optimizasyon Bulguları .....	44
3.7	Gradyanlı RAPD-PZR ile Aynı Türe Ait Farklı/Benzer Doku Karşılaştırmaları.....	46
BÖLÜM 4 - TARTIŞMA .....		47
SONUÇ ve ÖNERİLER .....		51
REFERANSLAR .....		52

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.1: RAPD-PZR yönteminin yaygın olarak kullanım alanlar.....	7
Tablo 1.2: Moleküler markör tekniklerinin avantaj ve dezavantajları.....	8
Tablo 2.1: DNA örnekleri ve konsantrasyonları.....	17
Tablo 2.2: Cihazlar.....	18
Tablo 2.3: Oligonükleotid primerler, T <sub>m</sub> ve GC (%) değerleri.....	19
Tablo 2.4: Yüksek primer bağlanma sıcaklığında kullanılan PZR optimizasyon şartları.....	22
Tablo 2.5: RAPD-PZR koşulları.....	23
Tablo 2.6: RAPD-PZR bileşenleri.....	23
Tablo 2.7: Gradyanlı RAPD-PZR yapılırken seçilen AT değerleri.....	23
Tablo 2.8: Gradyanlı RAPD-PZR koşulları.....	24
Tablo 3.1: DNA örneklerinin Qubit florometrik konsantrasyon ölçümleri.....	29

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: RAPD-PZR metodunun anlatımı.....	4
Şekil 1.2: Web Of Science' da 1991'den 2011 yılına kadar yapılan PZR ve RAPD-PPZR araştırmalarının sayısal değer grafiği.....	5
Şekil 1.3: Web Of Science' da yayınlanan makalelere göre 1991'den 2011 yılına kadar yapılan PZR ve RAPD-PZR araştırmaları detayları.....	6
Şekil 1.4: AT ve $T_m$ değerlerinin ilişkisinin grafiksel gösterimi.....	12
Şekil 2.1: DNA ölçü standardı band boy karşılıkları.....	20
Şekil 2.2: Gradyanlı RAPD-PZR cihazı bloğunun sıcaklık dağılımı.....	24
Şekil 2.3: Gradyan hesaplanmasını gösterimi.....	25
Şekil 2.4: 96'lık PZR tabağı.....	25
Şekil 3.1: DNA örneklerinin kalitatif değerlendirme fotoğrafı.....	28
Şekil 3.2a: Tox11 ve Tox12 örnekleri için uygun primer belirleme sonuçları .....	30
Şekil 3.3b: Tox11 ve Tox12 örnekleri için uygun primer belirleme sonuçları .....	31
Şekil 3.4: Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPA9 ve OPB1 primerleri gradyan AT çalışması primeri kullanılarak normal prosedürde yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonucu.....	32
Şekil 3.5: Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPB6 ve OPB8 primerleri gradyan AT çalışması primeri kullanılarak normal prosedürde yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonucu.....	33
Şekil 3.6: Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPA18, OPB5 ve OPB7 primerleri ile gradyan AT çalışması .....	34
Şekil 3.7: Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPB10, OPB11 ve OPB12 primerleri ile gradyan AT çalışması.....	35
Şekil 3.8: Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPA8, OPA14 primerleri ile gradyan AT çalışması .....	38
Şekil 3.9: Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPB17, OPB18 ve OPB20 primerleri ile gradyan AT çalışması.....	39

Şekil 3.10: 1-SA1 ve 2-SA1 örnekleri OPA8 ve OPA9 primeri kullanılarak yapılan gradyan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçları.....	38
Şekil 3.11: 1-SA1 ve 2-SA1 örnekleri OPB5 primeri kullanılarak yapılan gradyan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçları.....	38
Şekil 3.12: Tox11 ve Tox12 örnekleri OPA8 primeri kullanılarak, 1/1000µl, 1/100µl, 1/10 µl, 1µl, 2µl ve 3µl konsatrasyon ile yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçları.....	39
Şekil 3.13: OPA8 primeri kullanılarak, 1/100µl ve 1µl Tox11 ve Tox12 DNA'sı ile X8 tekrarlı yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçları.....	39
Şekil 3.14: 1-SA1 ve 2-SA1 örnekleri OPA8 ve OPA9 primerleri kullanılarak, farklı konsantrasyon ile yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçları.....	40
Şekil 3.15: OPA8 primeri kullanılarak, 1/100µl ve 1µl 1-SA1 ve 2-SA1 DNA'sı ile X8'li yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçları.....	41
Şekil 3.16: OPA9 primeri kullanılarak, 1/100µl ve 1µl 1-SA1 ve 2-SA1 DNA'sı ile X8'li yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçları.....	41
Şekil 3.17: 1-SA1 ve 2-SA1 örnekleri OPB5 primeri kullanılarak, farklı konsatrasyon ile yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçları.....	42
Şekil 3.18: 1-SA1 ve 2-SA1 örnekleri OPB5 primeri kullanılarak, 1/100µl ve 1µl konsatrasyonları ile yapılan gradyan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçları.....	43
Şekil 3.19: Tox12 örneği OPB5 primeri kullanılarak yapılan gradyanlı x3 tekrarlı RAPD-PZR amplifikasyon sonuçları.....	44
Şekil 3.20: Tox12 örneği OPB11 primeri kullanılarak yapılan gradyanlı x3 tekrarlı RAPD-PZR amplifikasyon sonuçları.....	44
Şekil 3.21: Tox12 örneği OPB11 primeri kullanılarak yapılan gradyanlı x3 tekrarlı RAPD-PZR amplifikasyon sonuçları.....	45
Şekil 3.22: UD-8 ve UD-9 örnekleri ile OPB12 primeri kullanılarak yapılan gradyanlı RAPD-PZR ile aynı türe ait farklı/benzer doku karşılaştırmaları amplifikasyon sonuçları.....	46

## KISALTMALAR

<b>AT</b>	: Annealing Temperature, Primer Bağlanma Sıcaklığı
<b>Bç.</b>	: Baz Çifti
<b>BLAST</b>	: Basic Local Alignment Search Tool,
<b>C</b>	: Sitozin
<b>G</b>	: Guanin
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RAPD</b>	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
<b>Tm</b>	: Erime Sıcaklığı

# BÖLÜM 1

## GİRİŞ

### 1.1 Amaç ve Kapsam

RAPD-PZR yöntemi DNA değişikliklerini çeşitli açılardan tespit için 1990'dan beri kullanılan moleküler bir tekniktir. Birçok avantajı olan ve genomik dizileri bilmeden de sadece kısa rastgele dizayn edilmiş primerler kullanılarak elde edilen DNA parmak izlerinin doğru şekilde analiz edilmesi esasına dayalı çok verimli, ucuz bir metottur. Ancak PZR parametrelerinin bu tür çalışmaların sağlıklı yürütülmesi için optimizasyonu çok önemlidir. Hem deneylerin tekrarlanabilirliği, hem güvenilirliği açısından özellikle DNA konsantrasyonu ve primer bağlanma sıcaklığı (AT: Annealing Temperature) ile ilgili optimizasyonlar çok önemlidir. Ancak literatürde bilginiz dahilinde deneysel olarak bu parametrelerle ilgili kapsamlı bir çalışma mevcut değildir. Bütün araştırmacılar bu tip optimizasyonların farkında olduklarını bildirseler de metodun optimizasyonu ile ilgili bu tür genel bir araştırma yapmaksızın çalıştıkları canlı sistemin deneysel optimizasyonuna yönelik çalışmışlardır. Bu eksikliklerden yola çıkarak metodun geliştirilmesinde çeşitli canlı ve dokuların DNA'sında var olan ya da sonradan oluşmuş DNA değişikliklerini tespit ederken, primer AT ve DNA konsantrasyonlarındaki değişikliklerin etkisinin gösterilmesi ve bu gösterimler çerçevesinde yapılacak optimizasyonlara yönelik bir çalışma amaçlanarak, planlanmıştır.

Bu tür optimizasyon çalışmaları birçok farklı çalışmanın altyapısı için son derece önemlidir. Bu sebeple yapılan her optimizasyon denemesinin detaylı anlatımı yapılarak metodun doğru ve en verimli şekilde kullanılabilmesi düşünülmüştür.

## 1.2 PZR ve RAPD-PZR Yöntemi

PZR, bir çeşit "*in vitro* klonlama" tekniğidir. PZR, DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklık ile birbirinden ayrılması (denaturation=denatürasyon), daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (annealing=bağlanma), ve son olarak zincirin uzaması (extension=uzama) (çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ile bu siklusların belirli sayıda (25-60 kez) tekrarlanması esasına dayanır. Bu üç basamak (denatürasyon/bağlanma/uzama) bir PZR siklusunu oluşturur. Her basamak farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir (Sırasıyla 94-98°C; 37-65°C; 72°C). PZR tekniği tek veya çift iplikçikli DNA'yı ya da RNA'yı hedef olarak kullanabilir.

PZR yaygın olarak tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında kalıtsal hastalıkların teşhisi, genetik parmak izlerinin oluşturulması, babalık testi, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genlerin klonlanması gibi değişik konularda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu teknikle, bir DNA hedefini  $2^{30}$  tane çoğaltmak mümkündür. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen DNA bölgesinin iki ucuna özgü, bu bölgelerdeki baz dizilerini tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (20 bç.) kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan DNA bölgesinin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır.

PZR tekniği, çok az miktarda örnekten DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır. Laboratuvar tanısında çok büyük bir hız ve kesinlik kazanılmış; birçok durumda radyoaktivite kullanımı gereksiz hale gelmiştir. *Thermus aquaticus*'dan elde edilen *Taq* DNA Polimerazın kullanılmaya başlanması ve gerekli olan reaksiyon bileşenleri içeren tek bir tüp içerisinde, reaksiyonu gerçekleştiren, basit ve kendi kendine çalışan "Thermalcyclers" denilen cihazın geliştirilmesiyle PZR'da çok büyük gelişmeler olmuştur. *Taq* DNA Polimeraz ile sentezlenen ürünlerin uzunlukları yaklaşık 10 kb kadar olabilmektedir (Erich ve ark., 1991).

PZR tekniğinin uygulanabilmesi için, bir thermalcyclere yerleştirilen reaksiyon tüpünde cihazda temel olarak aşağıda sıralanan bileşenler olmalıdır:

- Çoğaltılacak (amplifiye edilecek) olan kalıp DNA,
- Bu DNA'da çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki (5'→3') DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan oligonükleotid primerler,



- Primerlere bağlanarak bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapabilecek olan *Taq* DNA Polimeraz,
- Sentezde kullanılacak olan deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP'ler),
- *Taq* DNA Polimeraz enziminin çalışması için gerekli olan tampon maddeler ve tuzlar,
- Enzimin çalışması için önemli bir kofaktör olan  $Mg^{+2}$  tuzu.

PZR 'ın keşfi ile farklı amaçlar için DNA' daki polimorfizimleri araştıran yeni belirteç sistemleri ortaya konulmuştur. Bunlardan birisi olan RAPD belirteçleri, Williams ve ark. (1990) ve Welsh ve Mc Clelland (1990) tarafından geliştirilen, rastgele kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın uygun segmentlerinin enzimatik amplifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. 6–10 nükleotid uzunluğundaki başlatıcı DNA primerler kullanılarak genom üzerinde ilgili bölgelerin DNA amplifikasyonu gerçekleştirilir. Polimorfik DNA'nın PZR tabanlı çoğaltımı (RAPD-PZR), bir genomik DNA üzerinde rastgele belirlenmiş primerler kullanılarak, yani belli bir hedef bölge tanımlanmaksızın yapılmaktadır. Karşılıklı iki zincir üzerine nispeten yakın (10kb) şekilde bağlanabilen primerlerle, DNA dizileri çoğaltılmaktadır. Bütün bu işlemlerde primer dizayn ve PZR koşullarının ayarlanması sırasında, çalışılan canlının genomu hakkında ön bir DNA dizi bilgisine ihtiyaç yoktur. RAPD-PZR bantlarının var olup olmaması ya da bu bantların konsantrasyonlarının farklılığı vasıtası ile polimorfizm, monomorfizm, mutasyon ve hatta tipleri ile ilgili yorumlar yapılabilmektedir (Atienzar ve ark., 2006).

Bantların çoğaltılıp çoğaltılamaması, primerlerin bağlanma bölgesine ait DNA'daki olası değişikliklerin bir işaretidir. Amplifikasyon yoğunluklarındaki farklılıklar ise DNA'daki genetik değişikliklerden çok epigenetik değişikliklere işaret edebilmektedir. Bütün bu değişikliklerin gerçek mahiyetinin belirlenebilmesi için ise DNA dizi analizi gibi ileri metodları gerekmektedir (Atienzar ve ark., 2006).

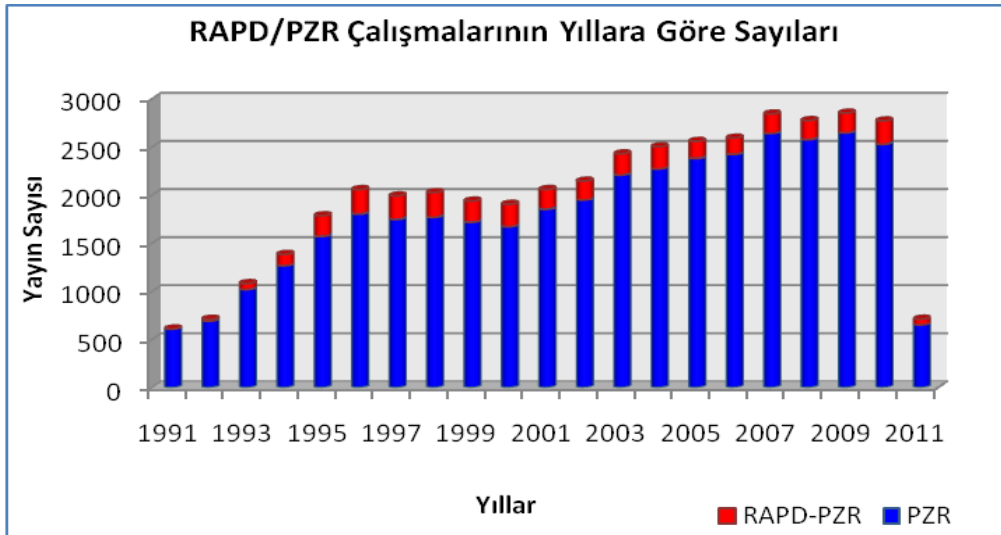
RAPD-PZR metodunu anlatan Şekil 1.1'de DNA'nın, 2 no' lu bağlanma bölgesinde oluşan bir DNA değişikliğinin, ürün A'nın amplifikasyonunu nasıl engellendiği gösterilmektedir.



### 1.2.1 Tarihçe

1985'de bilim dünyasına sunulduğundan itibaren polimeraz zincir reaksiyonu (PZR); hem araştırmada hem de klinik tanı uygulamalarında yeni bir çığır açmıştır. Bu buluşundan dolayı Kary Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülü'ne hak kazanmıştır. Yöntem ABD'de Cetus Corporation'da çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir.

RAPD-PZR yöntemi PZR temelli bir yöntemdir ancak PZR yönteminin yaygın kullanımının aksine RAPD 1991' den 2011 yılları arasında yapılan ve Web Of Science' da yayınlanan makalelere göre, Şekil 1.2' de gösterildiği şekliyle PZR çalışmalarının ancak %10' unu kapsamaktadır. Buradan anlaşıyor ki araştırmacılar RAPD-PZR çalışmalarını faydalı şekilde ve üretken olarak kullanamamaktadırlar.



**Şekil 1.2:** ■ Web Of Science' da yayınlanan makalelere göre 1991'den 2011 yılına kadar yapılan PZR araştırmalarının sayısal değer grafiği. ■ Web Of Science' da yayınlanan makalelere göre 1991'den 2011 yılına kadar yapılan RAPD-PZR araştırmalarının sayısal değer grafiği.

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup> DISCOVER the

Web of Science Additional Resources

Search | Cited Reference Search | Advanced Search | Search History | Marked List (0)

Web of Science® – with Conference Proceedings

Results Title=(PCR)  
Timespan=All Years, Databases=SCI-EXPANDED.

Results: **38.430**

**Refine Results**

Search within results for

**Subject Areas**

- BIOCHEMICAL RESEARCH METHODS (3,856)
- BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY (4,911)
- BIOTECHNOLOGY & APPLIED MICROBIOLOGY (5,390)
- GENETICS & HEREDITY (2,817)
- HEMATOLOGY (2,429)

[more options / values...](#)

**Document Types**

- ARTICLE (26,138)
- CORRECTION (300)
- LETTER (869)
- MEETING ABSTRACT (8,369)
- NOTE (1,009)

[more options / values...](#)

**Publication Years**    Sort these by: Alphabetical

The first 100 Publication Years (by record count) are shown. For advanced refine options, use [Analyze results](#).

<input type="checkbox"/> 1970 (1)	<input type="checkbox"/> 1985 (16)	<input type="checkbox"/> 1994 (1,267)	<input type="checkbox"/> 2003 (2,209)
<input type="checkbox"/> 1976 (2)	<input type="checkbox"/> 1986 (8)	<input type="checkbox"/> 1995 (1,571)	<input type="checkbox"/> 2004 (2,273)
<input type="checkbox"/> 1977 (1)	<input type="checkbox"/> 1987 (7)	<input type="checkbox"/> 1996 (1,804)	<input type="checkbox"/> 2005 (2,381)
<input type="checkbox"/> 1979 (2)	<input type="checkbox"/> 1988 (22)	<input type="checkbox"/> 1997 (1,749)	<input type="checkbox"/> 2006 (2,424)
<input type="checkbox"/> 1980 (1)	<input type="checkbox"/> 1989 (105)	<input type="checkbox"/> 1998 (1,770)	<input type="checkbox"/> 2007 (2,642)
<input type="checkbox"/> 1981 (2)	<input type="checkbox"/> 1990 (238)	<input type="checkbox"/> 1999 (1,719)	<input type="checkbox"/> 2008 (2,577)
<input type="checkbox"/> 1982 (4)	<input type="checkbox"/> 1991 (608)	<input type="checkbox"/> 2000 (1,672)	<input type="checkbox"/> 2009 (2,648)
<input type="checkbox"/> 1983 (2)	<input type="checkbox"/> 1992 (691)	<input type="checkbox"/> 2001 (1,853)	<input type="checkbox"/> 2010 (2,529)
<input type="checkbox"/> 1984 (1)	<input type="checkbox"/> 1993 (1,019)	<input type="checkbox"/> 2002 (1,950)	<input type="checkbox"/> 2011 (653)

Sort these by: Alphabetical

a)

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>

Web of Science Additional Resources

Search | Cited Reference Search | Advanced Search | Search History | Marked List (0)

Web of Science® – with Conference Proceedings

Results Title=(RAPD)  
Timespan=All Years, Databases=SCI-EXPANDED.

Results: **3.743**

**Refine Results**

Search within results for

**Subject Areas**

- AGRONOMY (789)
- BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY (412)
- BIOTECHNOLOGY & APPLIED MICROBIOLOGY (525)
- GENETICS & HEREDITY (752)
- HORTICULTURE (693)

[more options / values...](#)

**Publication Years**    Sort these by: Alphabetical

The first 100 Publication Years (by record count) are shown. For advanced refine options, use [Analyze results](#).

<input type="checkbox"/> 1979 (1)	<input type="checkbox"/> 1995 (216)	<input type="checkbox"/> 2001 (207)	<input type="checkbox"/> 2007 (203)
<input type="checkbox"/> 1981 (1)	<input type="checkbox"/> 1996 (255)	<input type="checkbox"/> 2002 (197)	<input type="checkbox"/> 2008 (199)
<input type="checkbox"/> 1991 (2)	<input type="checkbox"/> 1997 (245)	<input type="checkbox"/> 2003 (222)	<input type="checkbox"/> 2009 (206)
<input type="checkbox"/> 1992 (20)	<input type="checkbox"/> 1998 (253)	<input type="checkbox"/> 2004 (231)	<input type="checkbox"/> 2010 (244)
<input type="checkbox"/> 1993 (63)	<input type="checkbox"/> 1999 (221)	<input type="checkbox"/> 2005 (179)	<input type="checkbox"/> 2011 (56)
<input type="checkbox"/> 1994 (118)	<input type="checkbox"/> 2000 (234)	<input type="checkbox"/> 2006 (170)	

Sort these by: Alphabetical

b)

**Şekil 1.3:** Web Of Science’ da yayınlanan makalelere göre 1991’den 2011 yılına kadar yapılan a) PZR araştırmaları. b) RAPD-PZR araştırmaları toplam sayı, basım yılına göre sayı, konu başlıklarına ve doküman tiplerine göre kategorize edilmişlerini gösteren Web Of Science sayfa görüntüsü.

### 1.2.2 RAPD-PZR Kullanım Alanları

PZR temelli bir yöntem olan RAPD-PZR ile yapılan çalışmaların Web of Science tabanlı değerlendirilmesi Şekil 1.2' de yapılmıştır. Bu karşılaştırılmalı grafik, RAPD-PZR' in optimizasyon ve yorumlama zorunlulukları yüzünden, çok rahat uygulanabilir bir metot olduğu halde yaygınlaşamadığını göstermektedir.

RAPD yönteminin kabul gördüğü ve yaygın olarak kullanıldığı alanlar Tablo 1.1' de gösterilmiştir. Yerli kaynaklar özellikle Türkiye' de uygulanabilirliği açısından ağırlıklı olarak verilmiştir.

**Tablo 1.1:** RAPD-PZR yönteminin yaygın olarak kullanım alanları.

<b>RAPD-PZR'İN KULLANIM ALANLARI:</b>	<b>REFERANSLAR:</b>
Genetik çeşitlilik araştırmalarında,	(Balcıoğlu ve ark., 2010)
Polimorfizmin belirlenmesinde,	(Bharmauria ve ark., 2009)
Soy ağacı çıkarılmasında (akrabalık ilişkilerinde),	(Mestev ve ark., 2007)
Genetik haritalamada,	(Erdem ve ark., 2007)
Genotipik farklılaşmada,	(Yüksekkaya ve ark., 2011)
Moleküler taksonomide,	(Babaoğlu ve ark., 2004)
Zararlı genlerin belirlenmesinde,	(Martínez ve ark., 2006)
Cinsiyet belirteçinde,	(Akhan ve ark., 2005)
Organizmanın farklı doku, organ ve kısımları arasında farklılaşma ve farklılaşma kapasitesinde,	(Şenel, 2010)
Parmak izi belirleme ve çeşit tanımlamada,	(Cambazoğlu, 2008)
Taksonomik ve filogenetik çalışmalarda,	(El-Fadly ve ark., 2008)
Genomik kararsızlığa sahip kanser hücrelerini bulma ile ilgili çalışmalarda,	(Uzonur ve ark., 2004)
Bitki ıslahı çalışmalarda,	(Yesbek, 2007)
Ekotoksikolojik çalışmalarda,	(Koyuncu ve ark., 2010)

Canlılardaki genetik polimorfizm çeşitliği saptamak için çok sayıda DNA belirteçleri geliştirilmiştir. PZR ile DNA çoğaltımına dayalı olan DNA analiz tekniklerinin en önemlileri arasında gelen ve diğer bazı metotlar olan RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), STS (Sequence Tagged Site; Dizisi Etiketlenmiş Alanlar), STR

(Short Tandem Repeats; Basit Dizi Tekrarları), mikrosatellit analizi ve SNP (Single Nucleotide Polymorphism; Tek Nükleotid Polimorfizmi) (Binbaş 2006)' ın Budak ve ark., (2004), avantaj ve dezavantajlarını Tablo 1.2 karşılaştırılmıştır.

**Tablo 1.2:** Moleküler markör tekniklerinin avantaj ve dezavantajları.

<b>MARKÖR ADI</b>	<b>AVANTAJLARI</b>	<b>DEZAVANTAJLARI</b>
<b>Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bol genetik bilgi verir.</li> <li>2. Ko-dominant markör</li> <li>3. Yüksek tekrarlanabilirlik</li> <li>4. Genomu iyi ifade eder</li> <li>5. Bütün türlerde uygulanabilir</li> <li>6. DNA dizi bilgisi gerektirmez</li> <li>7. Güvenli tabanlı klonlama için kullanılabilir</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Yüksek kalite ve miktarda DNA gerektirir</li> <li>2. RAPD'de göre zor.</li> <li>3. Otomasyonu zor</li> <li>4. Radyoaktif etiketleme gerektirir.</li> <li>5. Probların klonlanması ve tanımlanması gerekir</li> </ol>
<b>Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bol genetik bilgi verir.</li> <li>2. Genomu iyi ifade eder.</li> <li>3. DNA dizi bilgisi gerektirmez.</li> <li>4. Otomasyon için uygun.</li> <li>5. Az miktar ve orta kalitede DNA gerektirir.</li> <li>6. Radyoaktif işaretleme gerektirmez.</li> <li>7. Göreceli olarak kolay</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dominant markör.</li> <li>2. Düşük tekrarlanabilirlik.</li> <li>3. Karışık türler için uygulanamaz</li> </ol>
<b>Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Yüksek genetik bilgi verir</li> <li>2. Yüksek polimorfizm.</li> <li>3. DNA dizi bilgisi gerektirmez.</li> <li>4. Bütün türlerde uygulanabilir.</li> <li>5. Küçük RFLP parçacıkları ile çalışabilir.</li> <li>6. Kontig haritaları hazırlamaya uygun</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Çok hassas olması, bant desenlerini etkileyebilir.</li> <li>2. Kararlı haritalar oluşturmaz.</li> <li>3. İyi seçilmiş primerler gerektirir.</li> </ol>
<b>İzo Enzimler</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. İzolasyonu, DNA izolasyonundan kolay.</li> <li>2. Bütün türlerde uygulanabilir.</li> <li>3. Radyoaktif işaretleme gerektirmez.</li> <li>4. DNA dizi bilgisi gerektirmez</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tekniğin uygulaması zor</li> </ol>

### **1.2.3 RAPD-PZR'in Avantajları ve Dezavantajları**

#### **1.2.3.1 Avantajları**

PZR temelli çalışmaların en büyük avantajları: seçicilik, duyarlılık/hassasiyet ve hız yönleri ilelerdir.

Bu çalışmalarda çok küçük miktarlardaki DNA örnekleri veya ham, işlenmemiş hücre lizatları da mükemmel kalıplar olarak is görmektedir (Olgun, 2007).

RAPD-PZR yöntemi diğer PZR temelli çalışmalara göre kolay uygulanabilir ve çok daha ucuz bir yöntemdir.

RAPD-PZR yönteminin en önemli avantajı çalışılan canlıların DNA dizisinin önceden bilinmesine ihtiyaç olmamasıdır. Bundan dolayı rastgele seçilen RAPD primeri, canlının DNA'sını amplifiye etmek için kullanılabilir. RAPD primerleri deneysel olarak seçilebilir ve çalışılan taksonlar arasında polimorfik olan RAPD bantlanma modelini bulmak için deneysel olarak test edilebilir. RAPD yöntemi türlerin ayırt edilmesinde, popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik çeşitlilik tespitinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008).

#### **1.2.3.2 Dezavantajları**

Diğer yöntemlere göre daha kolay uygulanmasına rağmen, RAPD analizinin bazı dezavantajlar olabilir. Örneğin standart reaksiyon koşulları uygulanmasına rağmen, aynı RAPD şablonlarının oluşturulması ve bunların güvenilirliği açısından farklı laboratuvarlardan elde edilen sonuçlar her zaman uyumlu olmayabilir (Sharon ve ark., 2006). Tekrarlanabilirliği düşüktür. Ayrıca RAPD ile DNA çoğaltımında, saf DNA kalıbına ihtiyaç duyulması nedeniyle, karışık numuneden istenilen örneğin belirlenmesi amacıyla kullanılamaz (Majer ve ark., 1996; Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008).

### 1.2.4 RAPD-PZR Optimizasyonuna İlişkin Parametreler

RAPD-PZR, PZR temelli bir çalışma olduğundan birçok parametre optimizasyonu PZR ile aynı parametrelerdir. Ancak primerlerin durumu ve AT ayarlanması daha farklı olmaktadır. Başarılı bir PZR için en kritik parametre primer tasarımıdır. Tüm koşulların uygun olduğu durumda, sadece zayıf tasarlanmış bir primer PZR reaksiyonunun çalışmamasına neden olabilir. Primer sekansı ürünün gen üzerindeki pozisyonunu ve gen uzunluğu, erime sıcaklığı ve nihayetinde PZR verimi dahil pek çok parametreyi etkiler. Zayıf tasarlanmış bir primer, ürün oluşumunu bastırarak rakip olabilen primer-dimer oluşumu ve/veya özel olmayan amplifikasyon sonucu çok az veya hiç ürün üretilmemesine neden olabilir (Querci ve ark., 2010).

#### Primer Seçimi

- Primer uzunluğu
- Specificity (Özgünlük)
- Erime Sıcaklığı ( $T_m$ )
- Primer Dizilerinin Eşlenik Oluşturma Potansiyeli
- G/C içeriği
- 3'- ucu

Bu parametrelerden aşağıda belirtilenleri RAPD-PZR optimizasyonuna yönelik çalışmamızda daha detaylı değerlendirildiği için bu bölümde daha geniş bilgiye yer verilmiştir.

#### **a. Primer uzunluğu**

PZR hassasiyeti, bağlanma sıcaklığı ve bağlanma süresi primer uzunluğuna bağlı olduğundan bu parametre başarılı bir PZR için çok önemlidir. Genel olarak, bağlanma sıcaklığı uygun olduğunda 18 ve 24 bazlık oligonükleotidler belli bir sekansla özel olarak bağlanırlar. Primer uzunluğu aynı zamanda bağlanma verimi azalır. Her basamakta daha az ana molekül primerle bağlandığından çoğaltılan üründe önemli derecede azalmaya neden olur.

Uygulama özellikle gerekmedikçe, primerler çok kısa olmamalıdır. Amaç uygun bağlanma sıcaklığına sahip bir primer tasarlanmaktır. Bağlanma sıcaklığı ile erime



sıcaklığı arasındaki bağlantı PZR'nin kara kutularından biridir. Genel kural bağlanma sıcaklığını erime sıcaklığından 5<sup>0</sup>C daha düşük olarak kullanmaktır.

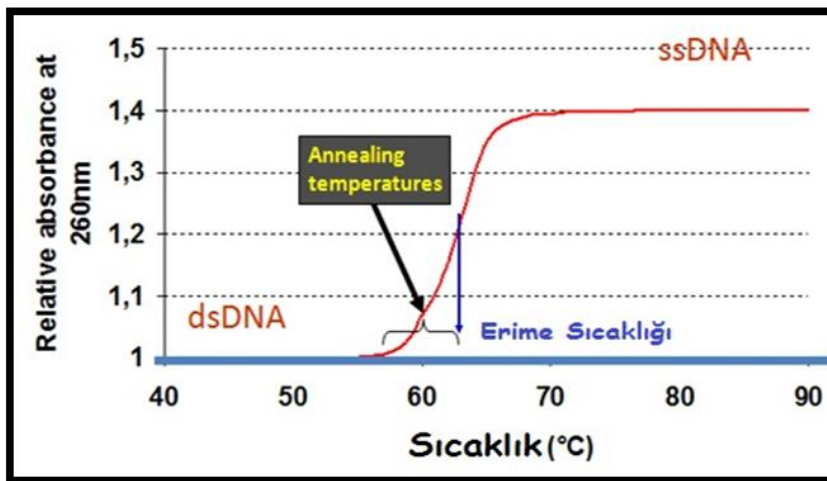
### b. Specificity (Özgünlük)

Primer hassasiyeti, primer uzunluğuna bağlıdır. 24 bazlık oligo sekansları 15 bazlık oligo sekanslarından daha hassastır. Primer kısmi olarak çoğaltılacak hedef DNA içinde özgün bir sekans taşıyacak biçimde tasarlanmalıdır. Tekrarlanan sekanslar içeren primer ile genomic DNA çoğaltılması bulanıklık ile sonuçlanacaktır (birden fazla ürün türü). Taq polimeraz geniş bir sıcaklık aralığında aktif olduğu için primer uzaması düşük bağlanma sıcaklıklarında meydana gelebilir. Sıcaklık çok düşük olduğunda primer ile özgün olmayan sıcaklık gerçekleşebilir. Eğer 3' ucunda kısa da olsa homoloji varsa polimeraz bu noktadan çalışmaya devam eder.

### c. Erime Sıcaklığı (T<sub>m</sub>)

Hedef/bölge yönlü PZR reaksiyonunda kullanılan her iki oligonükleotid primerde benzer erime sıcaklıklarına sahip olacak şekilde tasarlanmalıdır. Eğer primerler T<sub>m</sub> nedeni ile yanlış bağlanırsa, amplifikasyon daha az verimli olacaktır. düşük sıcaklıkta T<sub>m</sub>'ye sahip primer yüksek sıcaklıkta, yüksek sıcaklıkta T<sub>m</sub>'ye sahip primer düşük sıcaklıkta çalışmayacaktır.

#### Hyperchromic adım & Erime Sıcaklığı (T<sub>m</sub>) ve Primer Bağlanma Sıcaklığı (AT)



Şekil 1.4: AT ve T<sub>m</sub> değerlerinin ilişkisinin grafiksel gösterimi.

Oligoların erime sıcaklığı en yakın yakın komşu termodinamik hesaplamaları kullanılarak hesaplanabilir.

$$T_m^{\text{primer}}: \Delta H[\Delta S + R \ln(c/4)] - 273,15^\circ\text{C} + 16,6 \log_{10}[K^+]$$

Primer tasarımı yazılım paketleri kullanılarak yapılabilir. Bu değerin iyi çalışan yaklaşık hesabı (genellikle 18-24 baz aralığında oligolar için) aşağıdaki formül kullanılabilir.

$$T_m = 4x (\#C + \#G) + 2x (\#A + \#T) \text{ } ^\circ\text{C}$$

Genel olarak, 100-600 bç. arasındaki ürünler PZR reaksiyonlarında etkili olarak çağaltılabilir. Eğer kuşku varsa ürünün  $T_m$ 'i aşağıdaki formül ile hesaplanmalıdır.

$$T_m: 81,5 + 16,6(\log_{10}[K^+] + 0,41(\%G/C) - 675/\text{uzunluk})$$

#### **d. Primer Dizilerinin Eşlenik Oluşturma Potansiyeli**

Primerler 3 bazdan daha fazla iç primer homolojisine sahip olmayacak şekilde dizayn edilmelidir. Primer kendi içinde homolojiye sahip olursa, “snap back” veya “hairpin” (saç tokası) tabir edilen, primerin homolog sekansları sebebiyle kendi üzerine katlanarak çift zincir oluşturması görülebilir. Bu da primerin hedef DNA'ya bağlanmasını etkileyecektir. Diğer bir tehlike primer arası homolojidir. İki primerin orta bölümündeki kısmi homoloji hibridizasyonu engelleyebilir. Eğer homoloji primerlerden birinin 3' ucuna karşılık geliyorsa primer-dimerleri (birbirine bağlanmış iki primer molekülü) oluşur. Bu da elde etmek istenen ürünle yarışacağı için istenilen ürünün oluşmasını engelleyecektir.

#### **e. G/C içeriği**

Primerlerin baz kompozisyonu %45 ile %55 arasında GC taşıyacak şekilde olmalıdır. Primer sekansı özel olmayan bağlantıları arttıracığı poliG ve poliC uzamaları olmayacak şekilde seçilmelidir. Primer-hedef kompleksinde gevşemeye yol açacak poliA ve poliT uzantılarından da kaçınılmalıdır. Bu amplifikasyonun verimini düşürebilir. Polipirimidin (T,C) ve polipurin (A,G) uzantılarından da kaçınılmalıdır. İdeal olarak bir primer %50 GC içeriği taşıyan 20 bç. uzunluğunda nükleotidlerin rastgele karışımına sahiptir. Bu yapı erime sıcaklığı  $T_m$ 'yi 56-62<sup>0</sup>C'lik aralıkta tutar.

#### f. 3'- ucu

3' terminal pozisyonu yanlış bağlanmayı control için çok önemlidir. Primerlerin 3' ucuna G ve C bazlarının eklenmesidir. Bu GC kıskacı G/C nükleotidlerinin daha kuvvetli hidrojen bağlarla bağlanması nedeni ile 3' ucun sonuna doğru bağlanmayı garanti eder. Bu aynı zamanda primer-hedef kompleksinde gevşemelere bağlı olarak reaksiyon hızının yavaşlamasının önüne geçerek süre kaybını azaltır ve reaksiyon arttırır.

#### 1.2.5 RAPD Konulu Optimizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

RAPD-PZR yöntemi tekrarlı olarak yapılamamasından dolayı çok ciddi eleştiriler almaktadır. Bu sebepten optimizasyona yönelik çok çalışmalar yapılsa da çok başarılı sonuçlar ve yaygın kullanımı destekleyici alt yapı oluşturulmamıştır. Metodun keşfi ile başlayan süreç içerisinde metodun sıkıntılarını giderecek yönde optimizasyon çalışmaları erken dönemde başlamıştır. Williams ve Welsh makalelerle 1992 yılında yapılan çalışmada, metodun çok uzun sürebilmesi dezavantajı ortadan kalkması amaçlı optimizasyonla 5 saatlik RAPD-RZR protokolü 2,5 saate indirilmiştir (Yu ve Paul, 1992). Bu optimizasyonların çoğunluğu; belli bir tür üzerinden (Shalin ve ark., 2007; Harini ve ark., 2008), belli bir metodoloji (Harini ve ark., 2008), belli bir PZR kiti (Harini ve ark., 2008; Das ve ark., 2009) ve belli farklılıkların veya benzerliğin gösterilmesi ve PZR' de kimyasalların etkilerinin gösterilmesi ve kimyasal etkinin DNA üstünde gösterimi kullanılan (Butovskaya ve ark., 2007; Butovskaya ve ark., 2009; Cambiera ve ark. 2010; Alpsoy ve ark., 2010) yönünden çok kapsamlı olmayan çalışmalardır (Shalin ve ark., 2007).

#### 1.2.6 RAPD-PZR' da Primer Bağlanma Sıcaklığı (AT)

Primer Bağlanma Sıcaklığının (AT), RAPD profilleri üzerinde çok büyük etkisi vardır. RAPD metodundaki geleneksel olarak düşük AT (34-38°C) kullanımı maksimum sayıda primer bağlanabilmesi destekleyen, ancak gerçek olmayan amplikasyonları deneylerin tekrarlanabilirliğinin olmasını beraberinde getirir. Bu sebepten şartların zorlaştırılması AT yükseltilerek amplikasyon ürünlerinin daha kararlı

olmasıyla sonuçlanacaktır. Bu durum PZR ve RAPD-PZR' de bilinen ve uygulanan bir optimizasyon şeklidir (Atienzar ve ark., 2006; Rychlik ve ark., 1990).

Her ne kadar standart olarak düşük AT (34-38°C) Williams' ın da önerdiği şekilde yaygın olarak kullanılsa da 2000 yılı itibarı ile HAT-RAPD yöntemini ve 48°C üzeri AT kullanılmasının avantajlı olduğunu ortaya koyan çalışmalar yapılmıştır (Atienzar ve ark., 2000; Anuntalabhochai ve ark.,2000; Wangspaa ve ark., 2005).

Daha sonra araştırmacıların kimileri yüksek sıcaklıkta, kimileri düşük sıcaklıkta çalışarak, herhangi bir farklı optimizasyonuna gitmeksizin, RAPD çalışmalarını tamamlamışlardır (Sripalwit ve ark., 2007).

En doğru uygulama şekillerden biri ise çalışılan canlı ve yapılması istenilen tespiti yönelik her PZR parametresi açısından ve dolayısı ile de AT optimizasyonu da yapılmıştır. Burada elde edilen sonuçlar ise, o laboratuvar için kullanılan malzeme ve şartlarla sınırlıdır (Padmalatha ve ark., 2006; Vural ve Dağeri, 2009).

### **1.2.7 RAPD-PZR' da DNA Kalitesi ve Konsantrasyonu**

DNA' nın saflığı ve konsantrasyonu, başarılı bir PZR için çok önemlidir. Kirletici başka makro moleküllerin olması ve olası PZR inhibitörü olan kirleticiler; temiz güzel ve teşhise yönelik RAPD profili eldesini zorlaştırmaktadır.

Amplifikasyonun yoğun ve saf olmayan bir DNA kullanımı başlangıç adımlarında, primer ve genomik DNA dizisinin uygun şekilde de bağlantısını zorlaştıracığı için, eğer DNA uygun şekilde pürifiye edilmediyse, saflaştırılmadıysa, PZR reaksiyonu çok olumsuz bir şekilde sonuçlanacaktır. Bu durumda DNA'nın izolasyon aşamasındaki metotlar, kimyasallar ve hazır kitlerle ilgili optimizasyonlar çok önemlidir. Ancak bu tarz çalışmalar da çok az sayıdadır ve tabii ki kullanılmakta olan her tip DNA için ayrı olarak düşünülmesi gerekir (Atienzar ve ark., 2006; Padmalatha ve ark., 2006; Vural ve Dağeri, 2009).

DNA konsantrasyonu da tekrarlanabilirlik, genomik profil eldesi açısından çok önemli kontrol edilmesi gereken bir parametredir. Atienzar' ın RAPD ile alakalı review çalışmasında PZR reaksiyonlarının tekrarlanabilirliğini teyit için deneylerin her zaman

iki farklı konsatrasyon ile yapılmasının ve bunlar içinde teklif edilen değerlerin 5-20ng olduğu söylenmiştir. (Padmalatha ve ark., 2006) aslında en optimal aralığın 0.05-100ng olsa da uygulanabilirliği açısından 5-20ng uygulanılmasını önermektedir.

## BÖLÜM 2

### MATERYAL ve METOD

#### 2.1 Materyal

##### 2.1.1 Çalışmada Kullanılan DNA Örnekleri

Çalışmamızda kullandığımız örnek DNA'lar daha önceki çalışmalar kapsamında DNA izolasyonları yapılmış ve konsantrasyon tayinleri Tablo 2.1' de bilgileri verilen arşiv örnekleridir.

**Tablo 2.1:** Çalışmamızda kullanılan ve daha önceki çalışmalar kapsamında izole edilen DNA örneklerine ait bilgiler.

Örneğin Alındığı Canlı:	Kod:	Doku:	DNA Konsantrasyonu ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ):	Açıklama:
İnsan DNA'sı	Tox 11	Kan	20,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$	$\text{CCl}_4$ 'e maruz kalmış lenfosit hücre kültürü
İnsan DNA'sı	Tox 12	Kan	5,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Normal kontrol (hiçbir şeye maruz kalmamış) lenfosit hücre kültürü
<i>Sparus auratus</i>	1-SA1	Böbrek	54,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Bodrum Sonbaharda Tutuldu
<i>Sparus auratus</i>	2-SA1	Böbrek	220 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Bodrum Kışda Tutuldu
<i>Urtica dioica</i>	UD-8	Kök	23,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Mersin'den İlkbaharda toplandı
		Gövde	0,010 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
		Yaprak	23,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
<i>Urtica dioica</i>	UD-9	Kök	10,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Tokat' dan İlkbaharda toplandı
		Gövde	4,65 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
		Yaprak	32,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$	

### 2.1.2 RAPD-PZR Cihaz ve Sarfları

#### i. Cihazlar:

**Tablo 2.2:** RAPD-PZR denemeleri yapılırken kullanılan cihazlar.

Termal Döngü Cihazı (Gradyan)	TC-512(UK), TECHNE
Santrifüj	Mikro 22, Hettich
Derin Dondurucu	BEKO
Buzdolabı	Philips, (+4°C, -20°C)
Elektroforez	Mupid-One
Translüminatör	GelDoc 2000, Bio-Rad
Hassas Terazı	Scaltec SPB 54, Sartorius,
Pipetler	Electron Corporation CH57666-4500, Thermo,
Pipet Uçları (Sarflar)	BT brand barrier tips, Neptune
Isıtıcı	WiseStir Wisd Laboratory Instruments MSH- 20A

### 2.1.3 RAPD-PZR' da Kullanılan Kimyasal ve Primerler

#### Kimyasal:

- **Fermentas DreamTaq™ PZR Mastermix (2X)**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için gerekli DNA Polimeraz enzimi (hot start), tampon çözelti, MgCl<sub>2</sub> ve dNTP'leri içeren formülasyona sahip solüsyondur. Çalışmamızda RAPD-PZR protokolünde kullanılmıştır.

#### Primerler:

RAPD-PZR yöntemi için kullanılan 10 bç. uzunluğundaki primerler ve ilgili bilgiler Tablo 2.3' deki gibidir.

Primerlerin T<sub>m</sub> ve GC(%) değerlerini bulabilmek için, sürekli güncellenen NCBI veri tabanı primer-blast programı kullanılmıştır.

**Tablo 2.3:** Çalışmada kullanılan 10 bç.'lik oligonükleotid primerler, Tm ve GC (%) değerleri. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)

Primer	Sekans (5'→3')	Uzunluk	Tm	GC (%)
OPA-08	GTGACGTAGG	10	24.27	60
OPA-09	GGGTAACGCC	10	29.70	70
OPA-14	TCTGTGCTGG	10	26.71	60
OPA-18	AGGTGACCGT	10	28.14	60
OPB-01	GTTTCGCTCC	10	26.79	60
OPB-05	TGCGCCCTTC	10	33.27	70
OPB-06	TGCTCTGCCC	10	31.40	70
OPB-07	GGTGACGCAG	10	30.85	70
OPB-08	GTCCACACGG	10	29.83	70
OPB-10	CTGCTGGGAC	10	28.61	70
OPB-11	GTAGACCCGT	10	25.03	60
OPB-12	CCTTGACGCA	10	28.68	60
OPB-17	AGGGAACGAG	10	25.47	60
OPB-18	CCACAGCAGT	10	27.28	60
OPB-20	GGACCCTTAC	10	22.06	60

#### 2.1.4 Jel Elektrofrez ve Görüntüleme Cihazı, Kimyasal ve Sarfları

- **Görüntüleme Cihazı**

Elektrofrezde (10 volt/cm'de) yürütülen DNA'ları görüntülemek için bir UV ışık kaynağı kullanılmaktadır. Fotoğraflar Geldoc 2000 sistemi ile çekilmiştir.

- **Jel Elektrofrez Kimyasal ve Sarfları**

- Agaroz**

Sigma, Prona marka agarozlar kullanılmıştır.

- 10X TBE Tampon Çözeltisi**

Her litre için 108 g Tris base, 55 g Borik Asit, 40 ml 0.5M EDTA (pH 8.0) dH<sub>2</sub>O'da çözülmüştür.

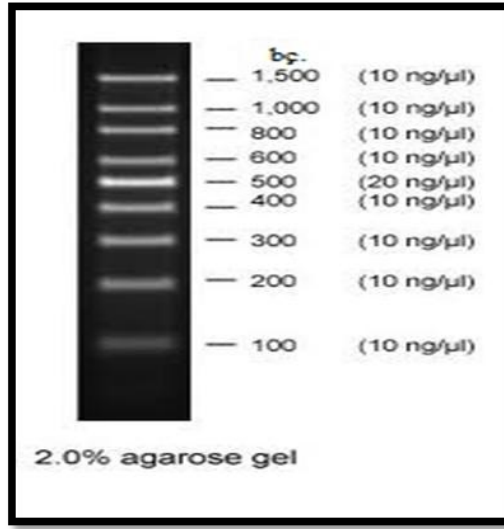


### iii. 6X Yükleme Boyası

0.5 mM Tris-HCl (pH 7.6), % 0.03 bromofenol mavi, % 0.03 xylene cyanol FF, % 60 gliserol, 1 mM EDTA.

### iv. GeneRuler™ 100 bp DNA Ölçü Standardı

100 - 1000 bp. ölçü aralığında (100 µl, 0.5 µg/µl), 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA.



Şekil 2.1: DNA ölçü standardı band boy karşılıkları.

### v. SafeView™ DNA Boyası

SafeView™, agaroz jel görüntülemeye ssDNA (tek zincirli DNA), dsDNA (çift zincirli DNA) ve RNA tespit etmeye yarayan yeni ve güvenli nükleik asit boyasıdır. Etidyumbromür (EtBr) yerine kullanılacak, karsinojenik olmayan, daha hassas yeni bir görüntüleme boyasıdır. SafeView™ agaroz jel görüntülemeye bağlandığı nükleik asitten (ssDNA, dsDNA, RNA) yeşil floresan ışık yayılmasını sağlar.

## 2.2 Metod

### 2.2.1 DNA Örneklerinin Kalitatif ve Kantitatif Değerlendirmesi

Qubit™ Fluorometer ve Quant-iT™ analiz kitleri kullanılarak daha önceki çalışmalarda kullanılan DNA örneklerinin kantitatif değerlendirmeleri teyit edilmiştir, kalitatif değerlendirmeler de %1'lik agoroz jel elektroforezi yapılmıştır.

### 2.2.2 RAPD-PZR Optimizasyonları Stratejisi

Çalışmamızda başarılı RAPD-PZR sonuçları için hangi parametrelerin optimizasyonunun yapılması gerektiği netleştirilmiştir. Atienzar' ın RAPD ile alakalı review çalışmasına göre Tablo 2.4' deki parametrelerden, uygun primerlerin, daha sonra bu primerlere göre AT' lerin belirlenmesi, daha sonra DNA konsantrasyon parametrelerin önceki listeye eklenmesi yapılmıştır.

Bu çalışmada 3 farklı grup örnek ile çalışılmıştır.

- Birinci grup örneğimiz; insan lenfosit kan kültür örneğinde aynı kişinin CCl<sub>4</sub>' e maruz kalmış DNA'sı ile kontrol DNA'sının farklılıklarını gösteren grup (Kimyasallara maruziyetin DNA üstündeki etkisi, genotoksisite çalışmaları için).

- İkinci grup örneğimiz, iki farklı *Sparus auratus* (Çupra) örneğinin böbrek doku DNA'sının farklılığının gösterildiği (Çevresel toksikoloji, ekotoksikoloji ve genetik, epigenetik etkilerin hayvanlar açısından değerlendirilmesi için).

- Üçüncü grup örneğimiz ise; *Urtica dioica* (Isırgan Otu) bitkisinin 2 farklı bölgeden toplanan 2 örneğin kök, gövde ve yaprak DNA'sının farklılıklarını göstermeye yöneliktir (Taksonomi, sistematik, çevresel toksikoloji, ekotoksikoloji ve genetik, epigenetik etkilerin bitkiler açısından değerlendirilmesi için).

Bu örnekler kullanılarak primerlerin bağlanma sıcaklıklarının önemi ve kullanılan DNA'ların konsantrasyondaki rolü gösterilmiştir.

Gradyanlı kalite ve miktarlarını optimizasyonlardaki PZR cihazı kullanılmıştır. Bu sayede değişik sıcaklıktaki kuyucuklar ile bir deney aşamasında birden farklı sıcaklık denemesi yapılabilmiştir.

**Tablo 2.4:** Yüksek primer bağlanma sıcaklığında iyi kalitede RAPD ürün profilleri üretmek için gereken optimizasyon şartlarının tablosu (Atienzar ve ark., 2006).

HAT RAPD-PZR parametreleri	Optimizasyon şartları
Primer bağlanma sıcaklığı (AT)	50-54 °C (50)
Mg <sup>++</sup> konsantrasyonu	3-6 mM (3)
dNTP konsantrasyonu	0.33-0.44 mM (0.33)
Primer konsantrasyonu (10-mer)	1.0-4.0 µM (2.0)
<i>Taq</i> DNA polimerazın birimleri	2.0-3.0 U (2.0)
DNA miktarı	0.005-100 ng (1-2)
DNA buffer	1x(25 <sup>0</sup> C'de 10m tris-HCl pH8.8, 50Mm KCl,%0.08 Nonidet P40)
Bovin serum albumin	2.5 µg
Sıcaklık döngü koşulları	1. döngü: 95 °C'de 4 dak., 39. döngü: 95°C'de 1 dak., 50 °C'de 1 dak., 74 °C'de 1 dak.,

### 2.2.2.1 Primer Seçimi

2006 yılında yayınlanan Atienzar' ın RAPD ile alakalı review çalışmasındaki çeşitli canlılarda iyi çalışan ve daha önce yapılan çalışmalarımızda teyit edilen primerler seçilerek, çalışmaya başlanmıştır. İlk aşamada OPA8, OPB5, OPB6, OPB7, OPB18 VE OPB20 primerleri daha sonra OPA9, OPA14, OPA18, OPB1, OPB8, OPB10, OPB11, OPB12 ve OPB17 primerleri kullanılmıştır. Primer deneleri yapılırken Tablo 2.5' deki genel protokole uygun RAPD-PZR yapılmıştır ve Tablo 2.6'da bileşenler belirtilen hacimlerde kullanılmıştır.

**Tablo 2.5:** RAPD-PZR koşulları.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	5 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	40
Bağlanma	36	30 saniye	
Uzama	72	20 saniye	
Sonlanma	72	5 dakika	1

**Tablo 2.6:** RAPD-PZR bileşenleri

RAPD-PZR Bileşenleri	Son Hacim
DreamTaq™ PCR Mastermix(2X)	12.5 µl
Primer (12,5 µM)	4.0 µl
Örnek DNA'sı	0.5 µl
Taq DNA Polimeraz (ekstra)(Fermentas)	0.1 µl
ddH <sub>2</sub> O	7.9 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>25 µl</b>

### 2.2.2.2 Gradyanlı RAPD-PZR

Primer denemelerin sonucunda çalışan primerlerin yanı sıra çalışmayan primerlerin tespiti gradyanlı RAPD-PZR' da sıcaklık ayarlaması yapılarak yapılmıştır. Gradyan PZR' de 12 sütun arasında Tablo 2.7 'de ki gibi 5 sıcaklık derecesi seçilmiş ve Tablo 2.8' de gösterilen prosedüre uygun PZR yapılmıştır.

**Tablo 2.7:** Çalışmamızda gradyanlı RAPD-PZR yapılırken seçilen sıcaklık değerleri.

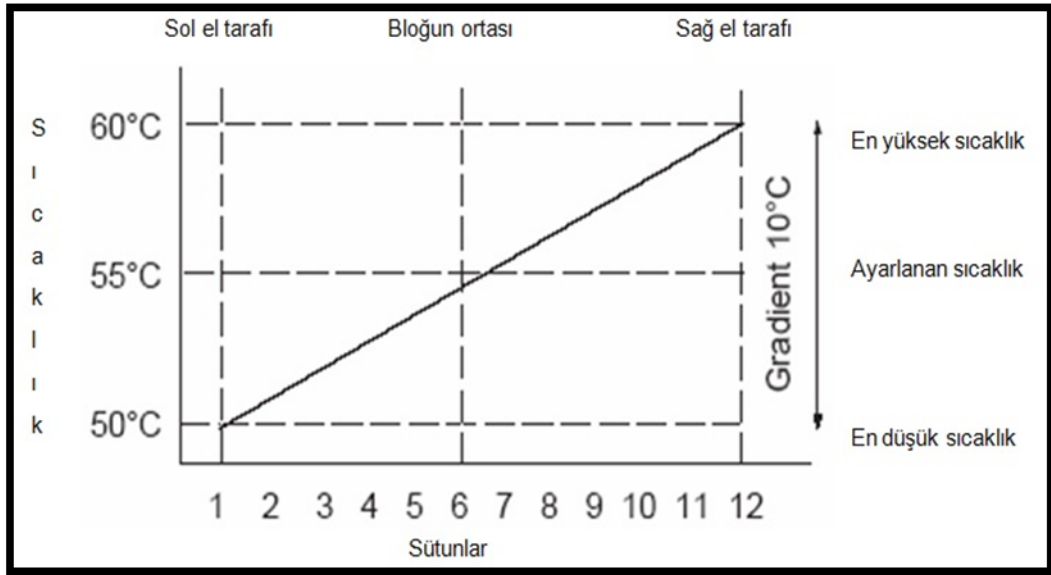
Sıcaklık:	Derece:	Kuyucuk
1. Sıcaklık	34,6 °C	2. Kuyucuk
2. Sıcaklık	38,2 °C	4. Kuyucuk
3. Sıcaklık	42,4 °C	7. Kuyucuk
4. Sıcaklık	46,3 °C	9. Kuyucuk
5. Sıcaklık	50,3 °C	12. Kuyucuk

Şekil 2.2' de olduğu gibi normal prosedürden farklı olarak bağlanma derecesi 36°C' den 42 °C' ye çıkarılmış ve gradient aralığı 20 °C'dir.

**Tablo 2.8:** Gradyanlı RAPD-PZR koşulları.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	5 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	40
Bağlanma	36.6-42-50.3	30 saniye	
Uzama	72	1 dakika	
Sonlanma	72	1 dakika	1

Gradyan RAPD-PZR yapılırken ayarlanacak sıcaklık bloğun ortasındaki sıralar için gereken sıcaklık olmalıdır. Şekil 2.2' de olduğu gibi gradyan, bloğun iki ucu arasındaki örnekler arasındaki değişimin dağılımıdır; cihazın ön yüzüne göre sol alt bölümü en soğuk, sağ üst bölümü en sıcak kısım olmaktadır.



**Şekil 2.2:** Gradyanlı RAPD-PZR cihazı bloğunun sıcaklık dağılımı.

Örneklerimiz için çoğu zaman; 20°C gradyan ile blok ortası sıcaklık 42°C 'ye ayarlandığında en düşük sıcaklık 30°C ve en yüksek sıcaklık 50°C şeklinde bir ayarlama Şekil 2.3' e göre yapılmıştır.

Gradient Calculator

Temperature 42
Gradient 20°C

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

34.6°C
38,2°C
42,4°C
46,3°C
50.3°C

Gradient

Print

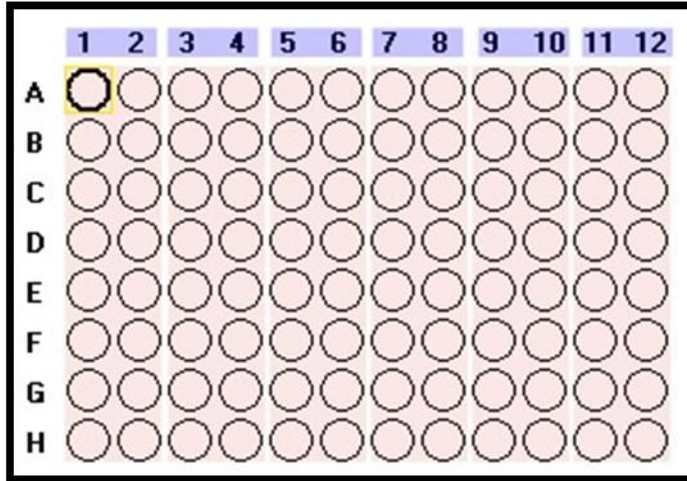
Exit

Temperature

**Şekil 2.3:** Gradyan hesaplanmasını gösterimi.

96 kuyucuklu tabak (Şekil 2.4) kullandığımızda, A' den H' ye kadar sıcaklık her sütun boyunca 8 örnek için aynıdır. A sırasında 1. ve 12. Örnekler arasında verilen gradyan doğrultusunda bir sıcaklık artışı olacaktır.

Aynı primerleri aynı sıcaklıkta farklı canlı türlerinde kullanabiliriz.



**Şekil 2.4:** 96'lık PZR tabağı.

### 2.2.2.3 Primer Bağlanma Derecesi Denemeleri Sistematiği

Ön primer seçimi sonrasında, primer bağlanma derecelerini termal döngü cihazı (gradyan) RAPD-PZR Tablo 2.7' de gösterildiği gibi sıcaklık ayarlanması yapılarak deneyler yapılmıştır.

Primer AT optimizasyon denemelerinde çalışmayan primelerin gradyanlı PZR' de çalışmaya başladığı AT' ler belirlenmiştir.

### 2.2.2.4 DNA Konsantrasyon Denemeleri Sistematiği

Primer denemeleri ve primer bağlanma sıcaklıkları, optimizasyonları ve uygun AT tespiti sonrasında Tablo 2.1' deki örnekler ile 1/1000 µl, 1/100 µl, 1/10 µl, 1 µl, 2 µl ve 3 µl seyreltme ve konsantrasyonlarında Tablo 2.5'deki prosedür ile RAPD-PZR yapılmıştır.

### 2.2.2.5 Farklı Doku ve Canlı Denemeleri Sistematiği

Optimizasyon çalışmamızda, AT ve konsantrasyon denelerinde önceki çalışmalarda kullanılan, insan DNA'sı (Tox11 ve Tox12), balık DNA'sı (*Sparus auratus* – 1-SA1 ve 2-SA1) ve bitki DNA'sı (*Urtica dioica* – UD8 ve UD9) kullanılmıştır.

## 2.2.3 Jel Elektroforezi, Görüntüleme ve Dökümantasyon

- **Agaroz Jel Hazırlanması ve Jel Elektroforezi**

PZR ürünlerin incelenebilmesi için % 2'lik agaroz jel hazırlanır. Bunun için 2 g Agaroz 100 ml 1xTBE konsantrasyonunda tampon çözeltisi içerisinde çözünür ve manyetik karıştırıcı ile beraber ısıtıcı yardımıyla homojen halde erimesi sağlanır. Hazırlanan solüsyon kaynama derecesine geldiğinde ısıtıcıdan alınır ve 65-70 °C' ye soğuması beklenir. Birkaç dakika sonra içine 12,5 µl/100 ml konsantrasyonunda SafeView floresan boyası karıştırılır. SafeView floresan boyası DNA bazları arasına girebilen ve bu sayede DNA'yı UV ışığı altında görebilmemizi sağlayan, bilinen kanserojenik ve mutajenik boyalara göre insan sağlığı açısından güvenli olduğu iddia edilen bir boyadır.

Sıcaklığı 65-70 °C' ye düşürülen jel hazırlanan kalıba dökülür ve soğuması beklenir. Soğuma sırasında dökülen kalıbın şeklini alan jele, yerleştirilen tarak sayesinde örneklerin yüklenebileceği 20–22 kuyu açılması sağlanmıştır. Örnekler bu kuyulara yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenir. Bu tampon örneklerin yüklenebilmesini, örneklerin yürümesinin takibini yapabilmemizi sağlarken, hem de yerine göre bir çeşit standart boy markörü gibi kullanılmaktadır.

Yürütme işlemi 10 v/cm' de örnekler uygun şekilde gözlenene kadar yapılır. Örneklerin gözlenmesi için Gel Doc 2000 cihazından ve cihazın UV illüminatöründen faydalanılmış ve yine aynı cihazın UV filtreli fotoğraf makinesi ile sonuçların dokümantasyonu yapılmıştır.



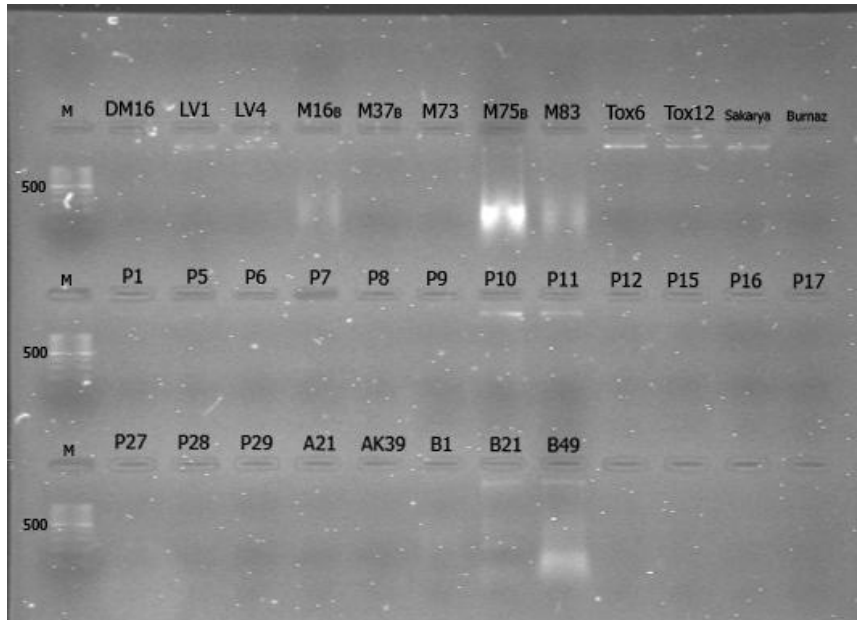
## BÖLÜM 3

### BULGULAR

#### 3.1 DNA Örneklerinin Kalitatif ve Kantitatif Değerlendirme Bulguları

##### 3.1.1 DNA Örneklerinin Kalitatif Değerlendirme Bulguları

Önceki çalışmalar sırasında izole edilmiş DNA örneklerinin (Şekil 3.1) Tox6, Tox12, Sakarya, P10 ve P11 adlı örnekler kalitatif bir değerlendirme için %1' lık agaroz jelde yürütülmesi yapılmış ve ilgili görüntüden deneyin diğer aşamasında kullanılabilirliği düşünülen belirgin ve keskin bant verenler belirlenmiştir.



**Şekil 3.1:** Çalışılması düşünülen DNA örneklerinin %2'lik agaroz jel ile kalitatif değerlendirme fotoğrafı.

### 3.1.2 DNA Örneklerinin Kantitatif Değerlendirme Bulguları

Çalışılan örneklerin Qubit florometrik ölçüm sonuçları Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1:** Çalışılan DNA’ların, ait oldukları canlılar ve kodları ve DNA örneklerinin Qubit florometrik konsantrasyon ölçümleri.

Örnek Adı:	Örnek Kodu:	Doku:	DNA Konsantrasyonu:
İnsan DNA’sı	Tox 11	Kan	20.6 µg/mL
İnsan DNA’sı	Tox 12	Kan	5.25 µg/mL
<i>Sparus auratus</i>	1-SA1	Böbrek	54.1 µg/mL
<i>Sparus auratus</i>	2-SA1	Böbrek	220 µg/mL
<i>Urtica dioica</i>	UD-8	Kök	23.7 µg/mL
		Gövde	0.010 µg/mL
		Yaprak	23.7 µg/mL
<i>Urtica dioica</i>	UD-9	Kök	10.8 µg/mL
		Gövde	4.65 µg/mL
		Yaprak	32.7 µg/mL

### 3.2 DNA Örneklerinde RAPD-PZR Uygunluğu Açısından Primer Tarama Bulguları

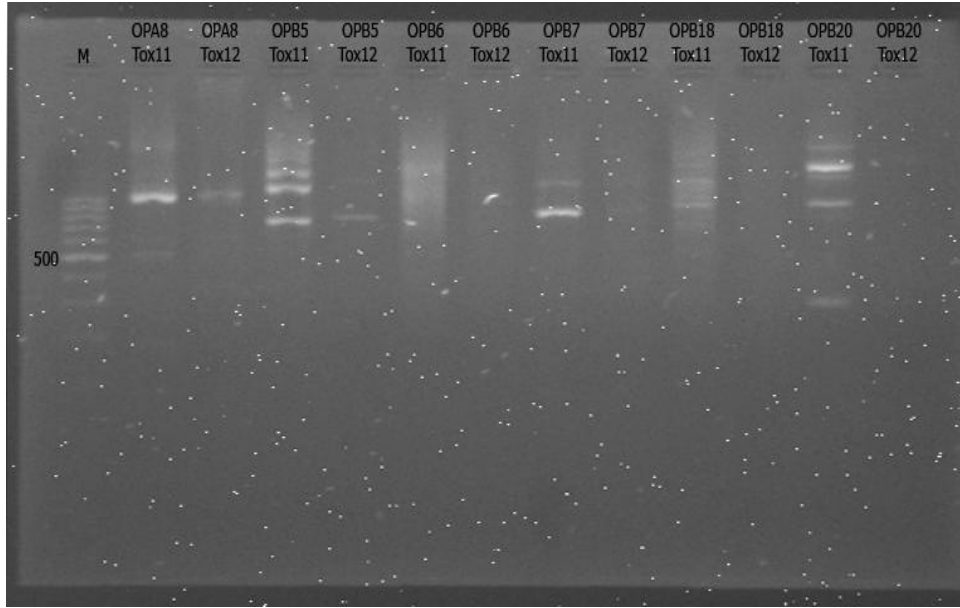
RAPD-PZR yöntemi, aynı canlının DNA’sını farklı maruziyetler açısından değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır; yapılan bu deneylerle aynı kişinin belli doz kimyasala maruz lenfosit kan kültür hücre DNA’sı (Tox 11) ve maruz kalmamış kontrol DNA’sının (Tox12) birbirinden farklılaşan motiflerini yakalayabilmek için gereken optimizasyonların yapılacağı her iki örnek için de cevap veren primerlerin ilk etapta belirlenmesi sonuçlarıdır.

Çalışmaya başlanırken Tox11 ve Tox12 örnekleri, Atienzar’ ın RAPD ile alakalı review çalışmasında kullanılan OPA8, OPB5, OPB6, OPB7, OPB18 VE OPB20 primerleri kullanılarak RAPD-PZR’si yapılmıştır. RAPD-PZR sonucu Şekil 3.2a’ de gösterildiği gibidir.

Bu primerler, Atienzar’ ın RAPD ile alakalı review çalışmasında belirlendiği gibi birçok canlıda iyi sonuç vermişlerdir bu sebepten daha az ön

deneme yaparak hedef primerler seçilmiş tekrarlı ve teyit edilmiş primerlerden rastgele kalmadan başlanmıştır.

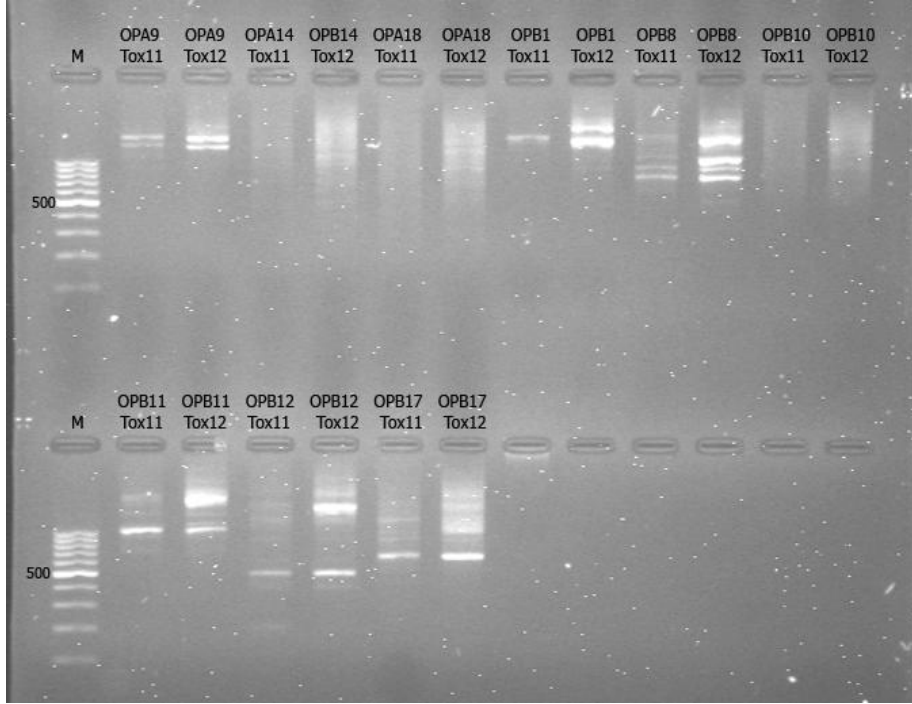
Her iki örnekte de çalış primerler OPA8, OPB5'dir. OPB7 ve OPB20 yalnızca Tox11 için çalışsa da en güzel an Tox12 için çalışmamıştır. OPB6 ise her iki örnek için çalışmamıştır. Bu ilk denemeler 42°C AT' de yapılmıştır.



**Şekil 3.2a:** Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPA8, OPB5, OPB6, OPB7, OPB18 ve OPB20 primerleri kullanılarak yapılan RAPD-PZR sonuçları. İlk kuyu (M) boy markörünü göstermektedir.

Önceden belirlediğimiz primerlere ilave olarak, DNA çalışma ekibimizin daha önce çalışmalarında kullanılan OPA9, OPA14, OPA18, OPB1, OPB8, OPB10, OPB11, OPB12 ve OPB17 primerleri kullanılmıştır.

Her iki örnek için 42°C AT' da çalışan primerler OPA9, OPB1, OPB8, OPB11, OPB12 ve OPB17 dir. Çalışmayan primerler ise OPA14, OPA18 ve OPB10 dir (Şekil 3.3b).



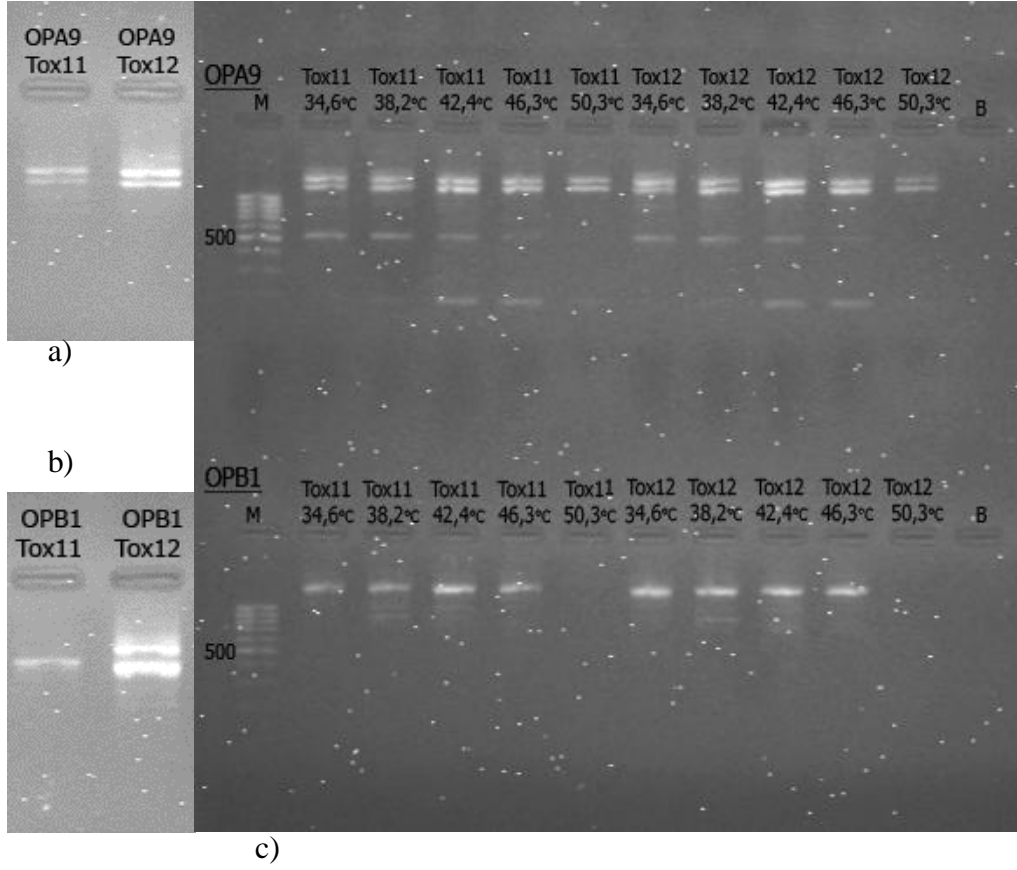
**Şekil 3.3b:** Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPA9, OPA14, OPA18, OPB1, OPB8, OPB10, OPB11, OPB12 ve OPB17 primerleri kullanılarak yapılan RAPD-PZR sonuçları. İlk kuyu (M) boy markörünü göstermektedir.

### 3.3 Gradyan PZR'ı ile Primer Bağlanma Derecesi Optimizasyon Bulguları

#### 3.3.1 İnsan DNA'sı ile

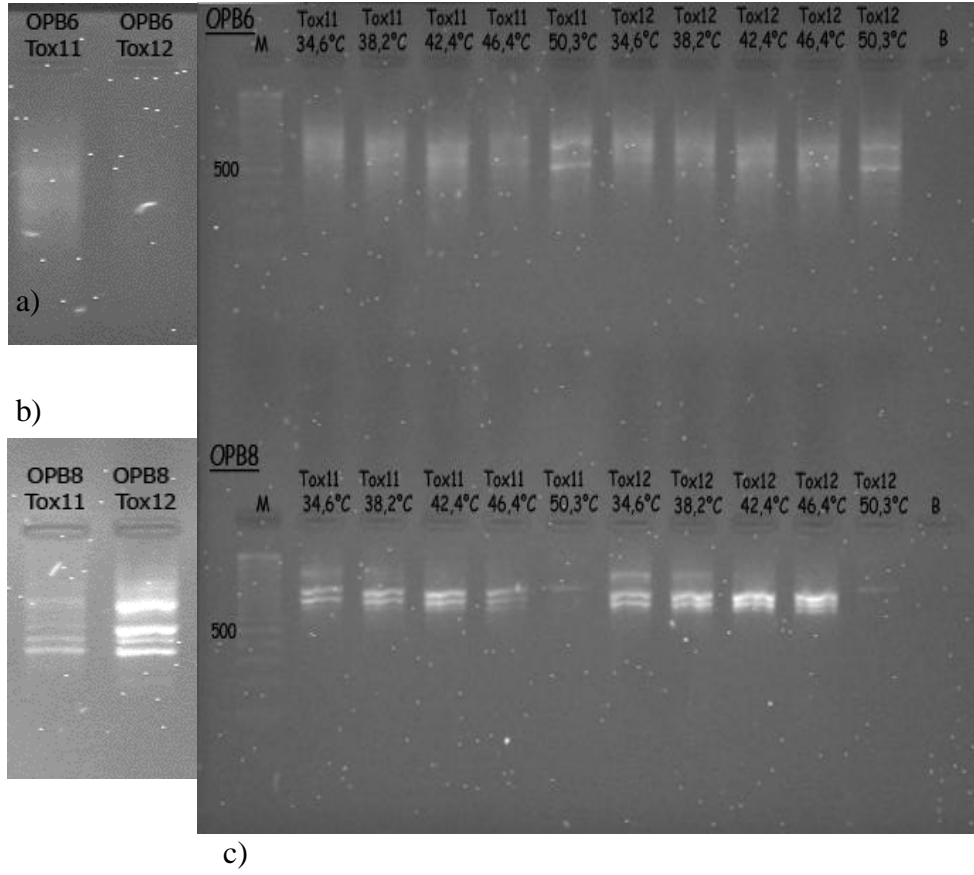
Tox11 ve Tox12 örnekleriyle 36°C yapılan primer denemelerinde bazı primerler çalışmamıştır. Yani bant profili gözlenmemiştir (Şekil 3.2 – 3.3). Bunun devamında Gradyan RAPD-PZR yapılarak çalışmayan primerlerin farklı AT'de çalışma durumlarının tespiti yapılmıştır. Şekil 3.4 – 3.10 bu deneme sonuçlarını ilgili primeler ve ilk AT 36°C denemesi karşılaştırılmalı olarak göstermektedir. Şekiller deney yapılış sırasındadır.

Şekil 3.4, 3.5, 3.8'de 3.6, 3.7, 3.9 a, b diye gösterilen küçük kısımlar c'de AT gradyan çalışması yapılan primerlerin 36°C AT ilk deneme derecesini gösterirken Şekil 3.6, 3.7 ve 3.9'daki a,b,c küçük pencereleri d şeklindeki sıralara tekabül eden primerlerin AT gradyan sonuçlarını göstermektedir.



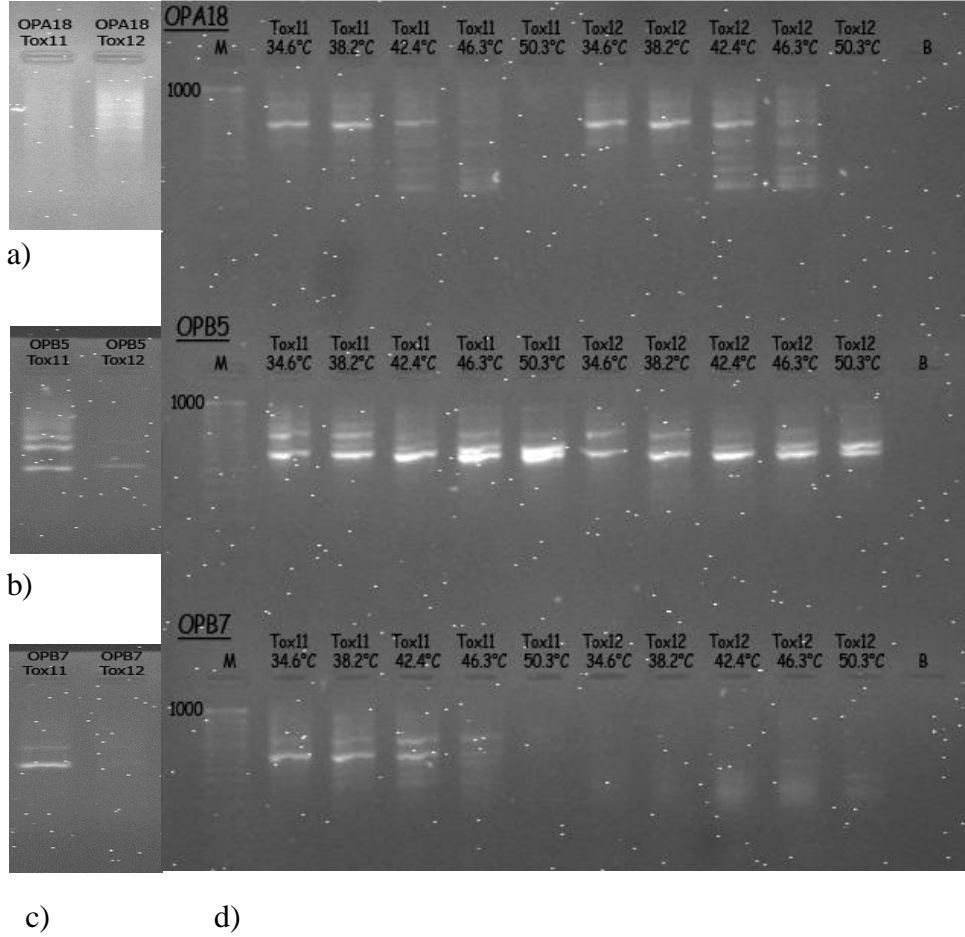
**Şekil 3.4:** Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPA9 ve OPB1 primerleri gradyan AT çalışması primeri kullanılarak normal prosedürde yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonucunu gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyu (M) boya markörünü, son kuyu (B) DNA'sız negatif kontrol.

İkinci deneme OPB6 ve OPB8 ile yapılmış olup OPB6 normal prosedürlü PZR'de çalışmazken gradyan PZR de 50°C' de çalışmıştır.



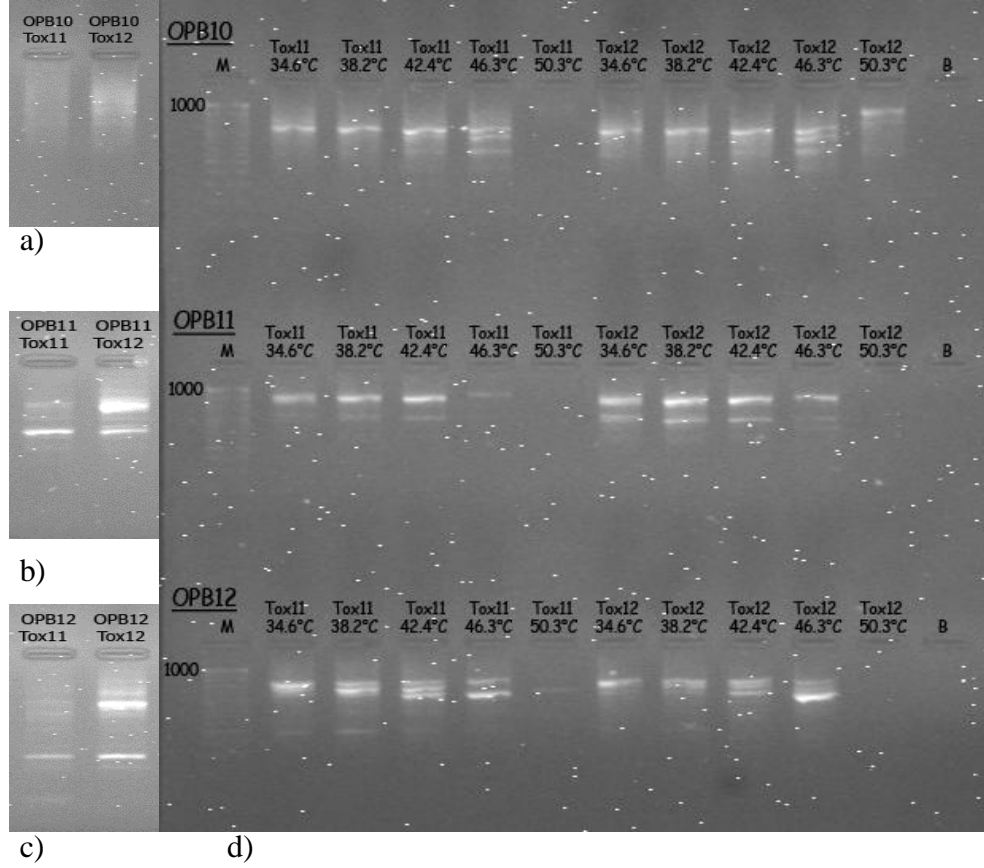
**Şekil 3.5:** Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPB6 ve OPB8 primerleri gradyan AT çalışması primeri kullanılarak normal prosedürde yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonucunu gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyu (M) boya markörünü, son kuyu (B) DNA'sız negatif kontrol.

Üçüncü deneme OPA18, OPB5 ve OPB7 ile yapılmıştır. POA18 normal prosedür PZR' de çalışmazken gradienli PZR' nin düşük derecelerde çalışmıştır. OPB5 ise Tox12 örneğinde normal prosedürde çalışmazken gradienli PZR' de çalışmıştır.



**Şekil 3.6:** Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPA18, OPB5 VE OPB7 primerleri gradyan AT çalışması primeri kullanılarak normal prosedürde yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonucunu gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyu (M) boya markörünü, son kuyu (B) DNA'sız negatif kontrol.

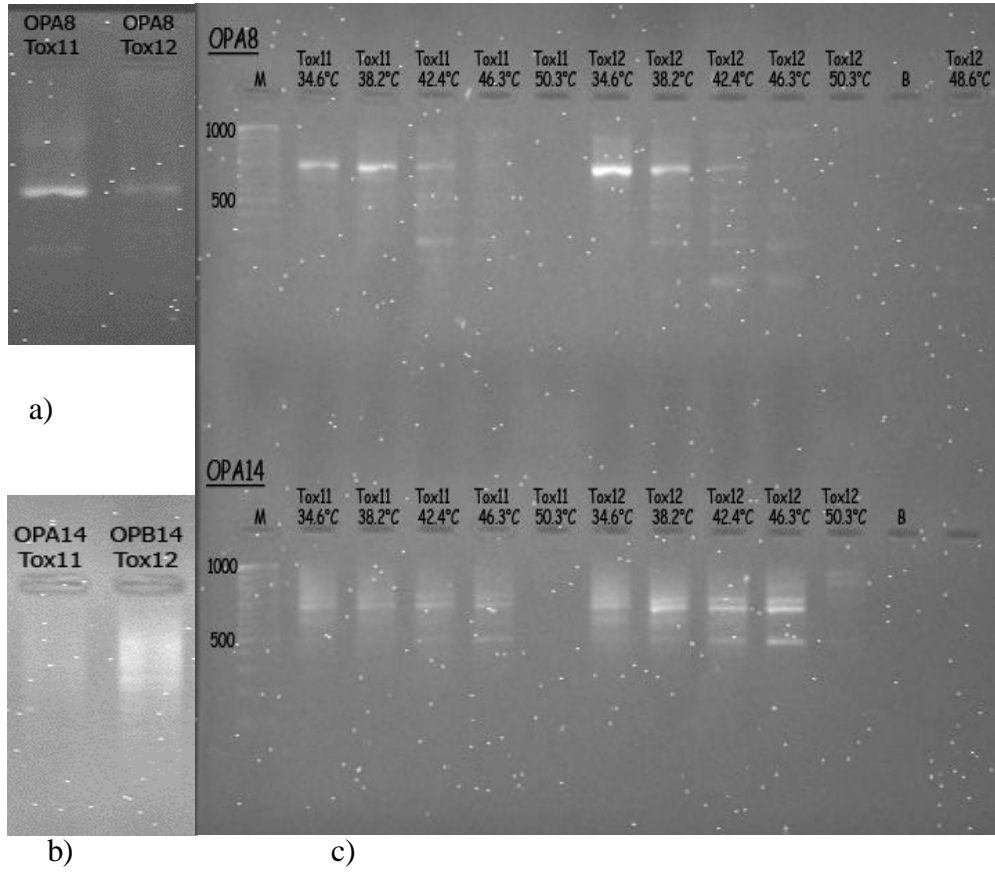
Dördüncü denemede OPB10, OPB11 ve OPB12, Tox11 ve Tox12 örnekleri ile denenmiştir. OPB10 normal prosedürde çalışmazken gradyan PZR'nin yüksek derecesi 50°C hariç çalışmıştır.



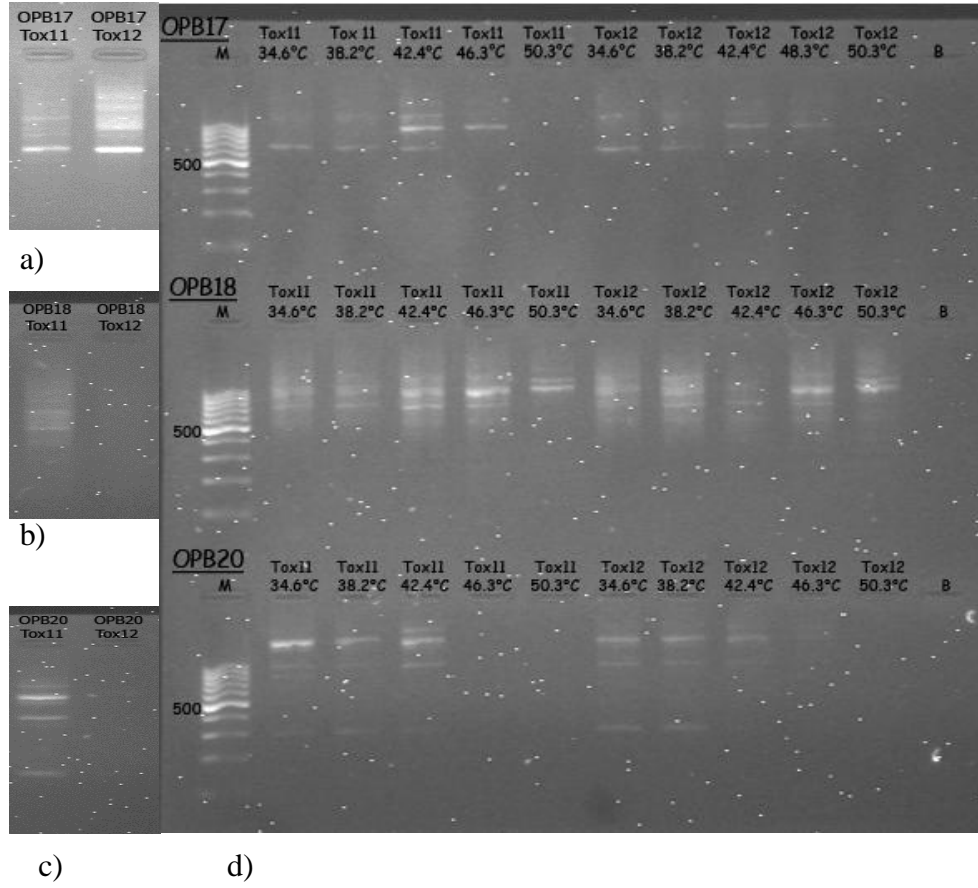
**Şekil 3.7:** Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPB10, OPB11 VE OPB12 primerleri gradyan AT çalışması primeri kullanılarak normal prosedürde yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonucunu gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyu (M) boya markörünü, son kuyu (B) DNA'sız negatif kontrol.



Beşinci deneme Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPA8 ve OPA14 primeri kullanılarak gradyan PZR yapılmıştır.



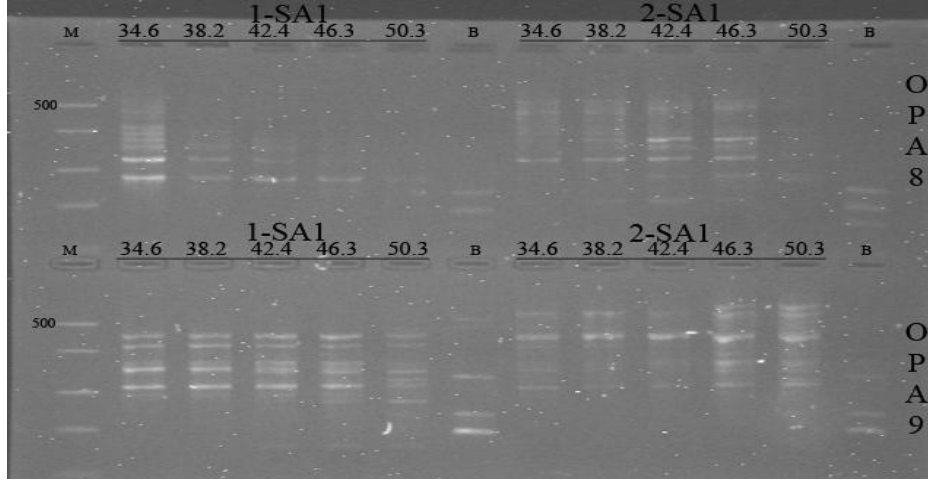
**Şekil 3.8:** Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPA8, OPA14 primerleri gradyan AT çalışması primeri kullanılarak normal prosedürde yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonucunu gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyu (M) boya markörünü, son kuyu (B) DNA'sız negatif kontrol.



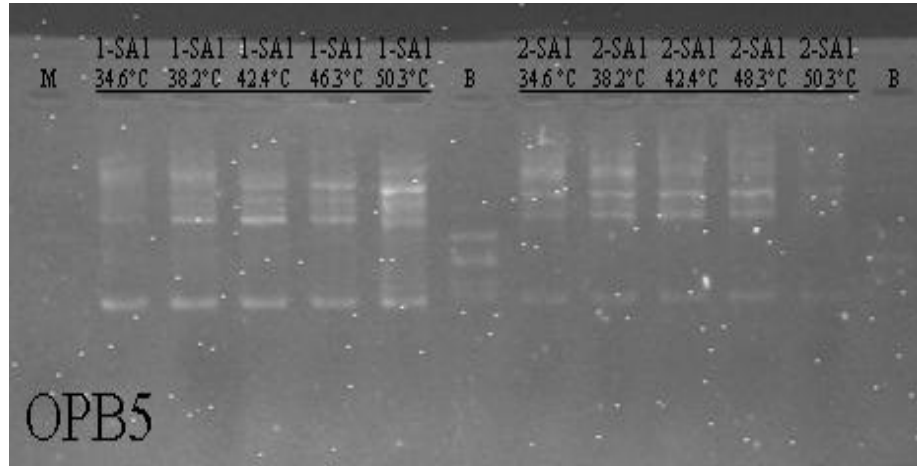
**Şekil 3.9:** Tox11 ve Tox12 örnekleri ile OPB17, OPB18 ve OPB20 primerleri gradyan AT çalışması primeri kullanılarak normal prosedürde yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonucunu gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyu (M) boya markörünü, son kuyu (B) DNA'sız negatif kontrol.

### 3.3.2 Balık (*Sparus auratus*) doku DNA'sı ile

İki farklı *Sparus auratus* örneğinin (1-SA1 ve 2-SA1) böbrek doku DNA'sı ile OPA8, OPA9 ve OPB5 primerlerinin gradyan AT deneme sonuçları Şekil 3.11 – 3.12'de verilmiştir.



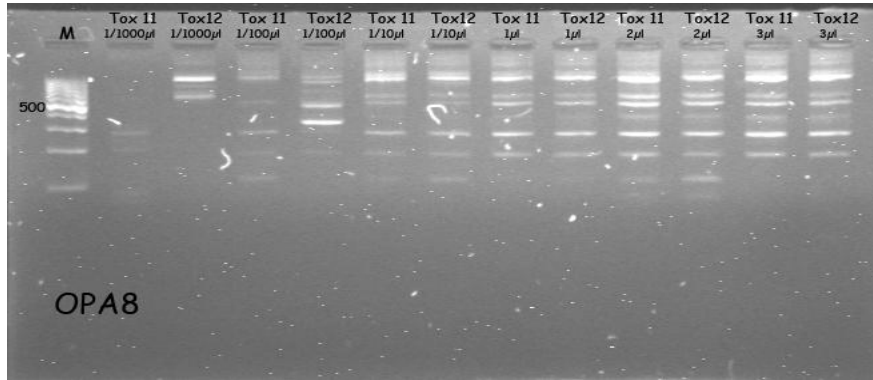
**Şekil 3.10:** 1-SA1 ve 2-SA1 örnekleri OPA8 ve OPA9 primeri kullanılarak yapılan gradyan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. 1-SA1 ve 2-SA1 örneklerinin belirtilen pirmere, hangi sıcaklıkta çalışıp çalışmadığını göstermek. İlk kuyu (M) boy markörünü, son kuyu (B) DNA'sız negatif kontrol.



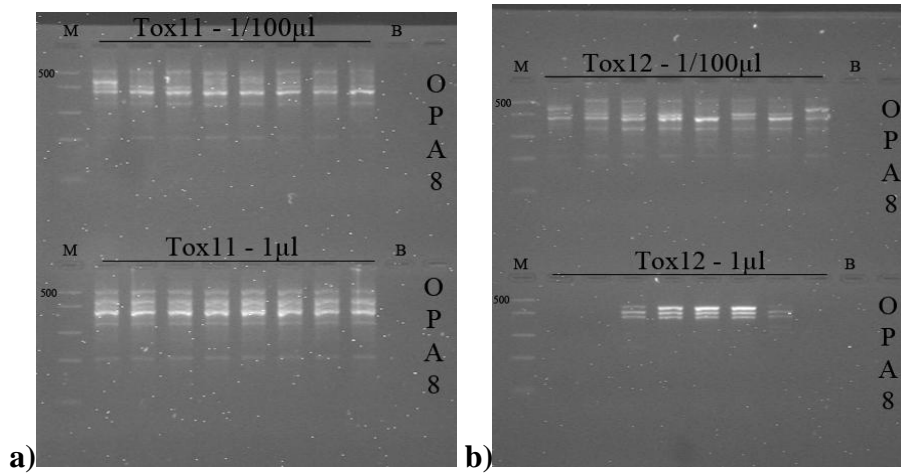
**Şekil 3.11:** 1-SA1 ve 2-SA1 örnekleri OPB5 primeri kullanılarak yapılan gradyan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. 1-SA1 ve 2-SA1 örneklerinin belirtilen pirmere, hangi sıcaklıkta çalışıp çalışmadığını göstermek. İlk kuyu (M) boy markörünü, son kuyu (B) DNA'sız negatif kontrol.

### 3.4 RAPD-PZR ile DNA Konsantrasyon Farklılık Etkilerini Göstermeye ait Bulguları

Primer OPA8 ile Tox11 ve Tox12 DNA'ları arasındaki farklılığı en iyi gösteren AT olarak seçilmişti (Şekil 3.9). Bu grup DNA konsantrasyonu etkisi değerlendirme denememizde Tox11 ve Tox12 DNA'larının 1/10, 1/100 ve 1/1000 µl dH<sub>2</sub>O seyreltileri ve daha önce çalışan konsantrasyonlarının x2 ve x3 katları çalışmış ve elde edilen profillerdeki değişim şekli Şekil 3.12'de gösterilmiştir.



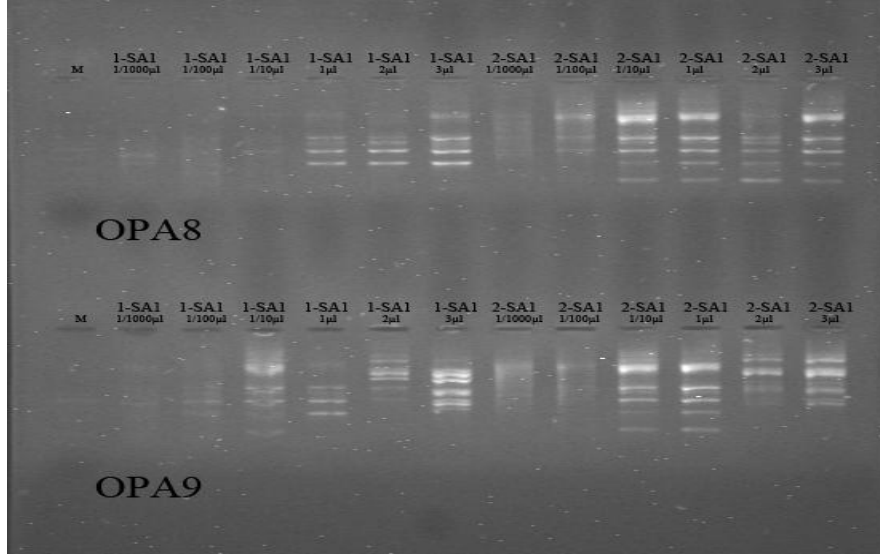
**Şekil 3.12:** Tox11 ve Tox12 örnekleri OPA8 primeri kullanılarak, 1/1000µl, 1/100µl, 1/10 µl, 1µl, 2µl ve 3µl konsantrasyon ile yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. Tox11 ve Tox12 örneklerinin belirtilen primerde, konsantrasyon farkına göre çalışıp çalışmadığını göstermek. İlk kuyu (M) boy markörünü örneğini göstermektedir.



**Şekil 3.13:** a) OPA8 primeri kullanılarak, 1/100µl ve 1µl Tox11 DNA'sı ile X8tekrarlı yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonucunu gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. b) Aynı deneyin Tox12 DNA'sı ile sonuçları. İlk kuyular (M) boy markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.

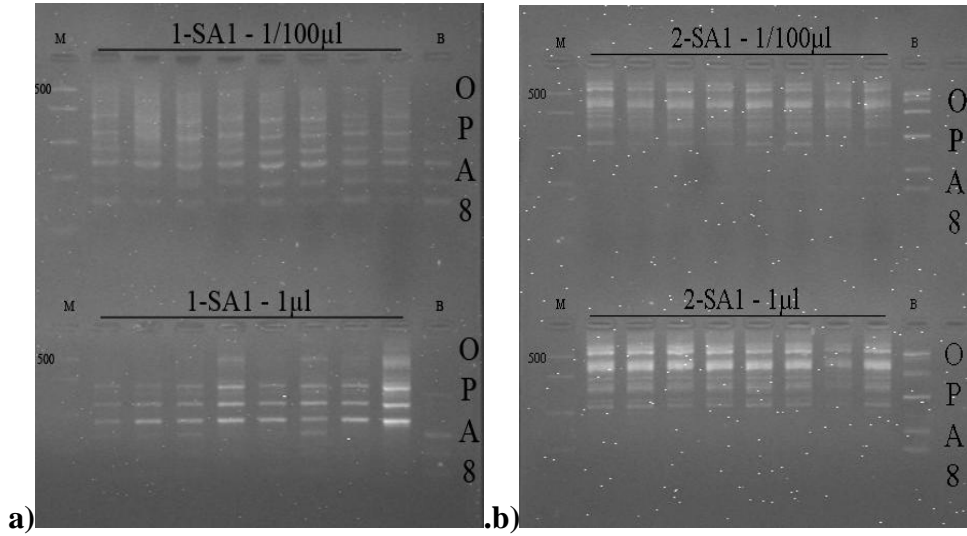
DNA konsantrasyonunun RAPD-PZR deneyler de tekrarlanabilir sonuçlar vermesi ile ilgili denemelerde aynı DNA'ları tamamen aynı şartlarda verdiği değişik profiller gözlenmektedir.

DNA konsantrasyon farklılıkları kaynaklı RAPD-PZR profillerini tespit için iki farklı *Sparus auratus* balığının böbrek doku DNA'sı çalışma sonuçları da OPA8 ve OPA9 primerleri ile Şekil 3.14'de verilmiştir.



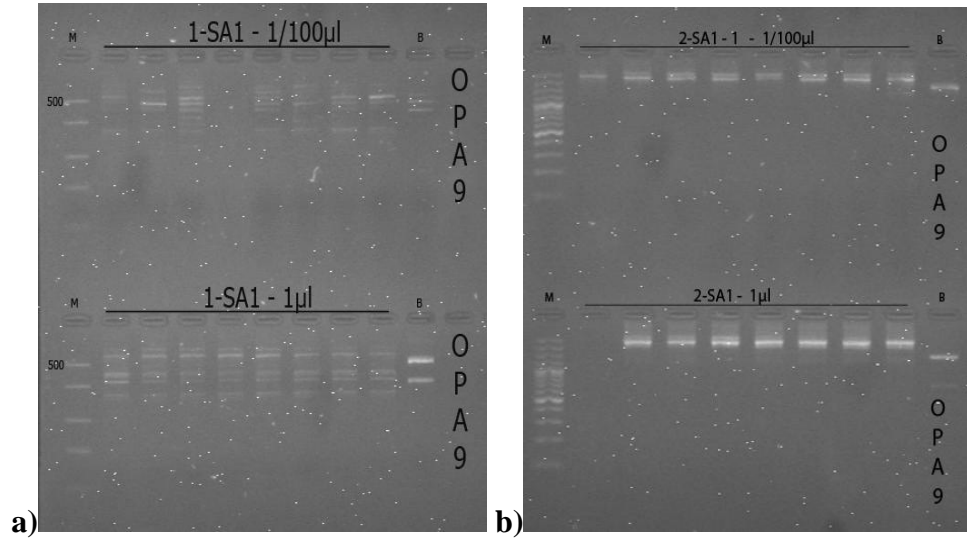
**Şekil 3.14:** 1-SA1 ve 2-SA1 örnekleri OPA8 ve OPA9 primerleri kullanılarak, 1/1000µl, 1/100µl, 1/10 µl, 1µl, 2µl ve 3µl konsantrasyon ile yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. 1-SA1 ve 2-SA1 örneklerinin belirtilen primerde, konsantrasyon farkına göre çalışıp çalışmadığını göstermek. İlk kuyu (M) boya markörünü örneğini göstermektedir.

DNA konsantrasyonunun RAPD-PZR deneylerindeki tekrarlanabilirliği üzerine etkisini gösteren 2 balığın böbrek doku DNA'larının 1/100 µl ve 1µl koyularak x8 tekrarlı yapılan (OPA8) sonuçları Şekil 3.15'de verilmiştir.

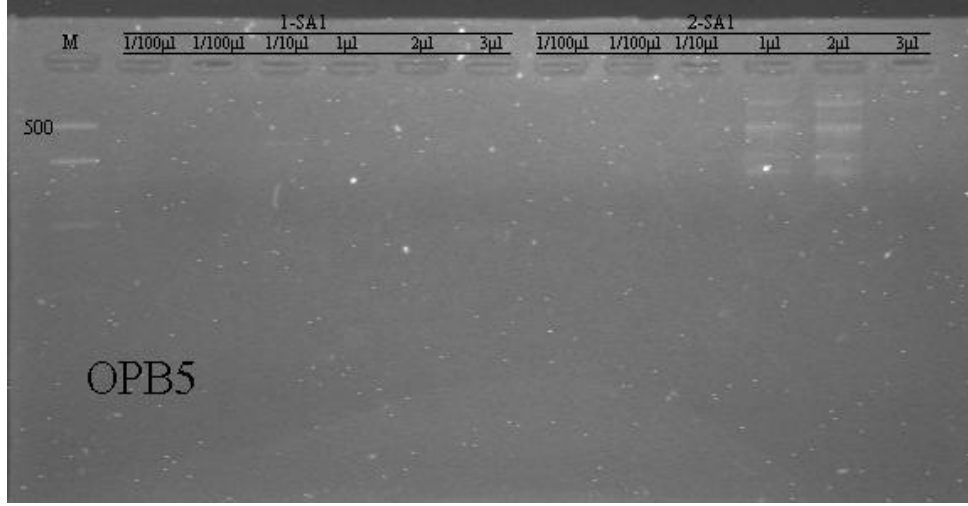


**Şekil 3.15:** a) OPA8 primeri kullanılarak, 1/100µl ve 1µl 1-SA1 DNA'sı ile X8'li yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonucunu gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. b) Aynı deneyin 2-SA1 DNA'sı ile sonuçları. İlk kuyular (M) boy markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.

Farklı primer (OPA) ile aynı tip deney sonuçlarının gösterilmesi



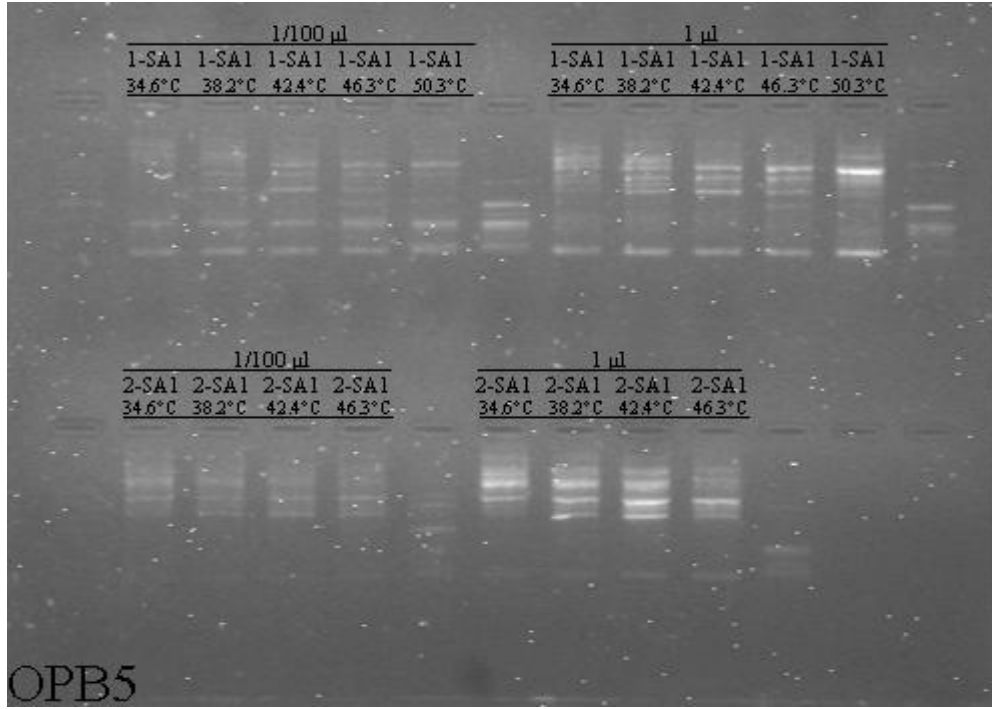
**Şekil 3.16:** a) OPA9 primeri kullanılarak, 1/100µl ve 1µl 1-SA1 DNA'sı ile X8'li yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonucunu gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. b) Aynı deneyin 2-SA1 DNA'sı ile sonuçları. İlk kuyular (M) boy markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.



**Şekil 3.17:** 1-SA1 ve 2-SA1 örnekleri OPB5 primeri kullanılarak, 1/1000µl, 1/100µl, 1/10 µl, 1µl, 2µl ve 3µl konsantrasyon ile yapılan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. 1-SA1 ve 2-SA1 örneklerinin belirtilen pürmerde, konsantrasyon farkına göre çalışıp çalışmadığını göstermek. İlk kuyu (M) boya markörünü örneğini göstermektedir.

### 3.5 Farklı DNA Konsantrasyonlarının Değişik AT'lerde Etkisini Gösteren Sonuçlar

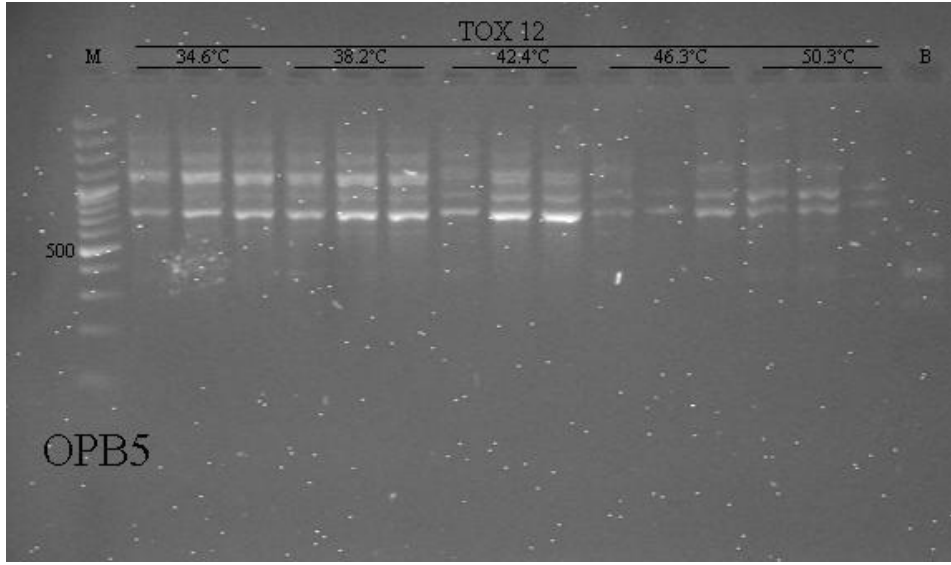
1-SA1 ve 2-SA1 örnek DNA'larının belirtilen primere ve konsantrasyonlarda değişen AT'lara göre ne şekilde çalıştığı için yapılan çalışma sonuçları Şekil 3.18' de verilmiştir.göstermek.



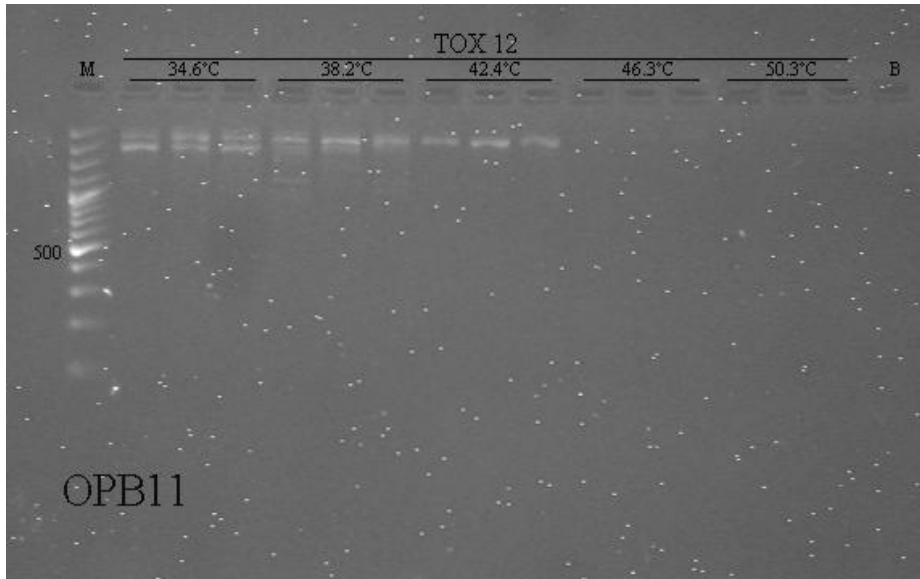
**Şekil 3.18:** 1-SA1 ve 2-SA1 örnekleri OPB5 primeri kullanılarak, 1/100µl ve 1µl konsantrasyonlar ile yapılan gradyan RAPD-PZR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. 1-SA1 ve 2-SA1 örneklerinin belirtilen primerde, konsantrasyon farkını değişen sıcaklık derecelerine göre çalışıp çalışmadığını göstermek. İlk kuyu (M) boya markörünü örneğini göstermektedir.



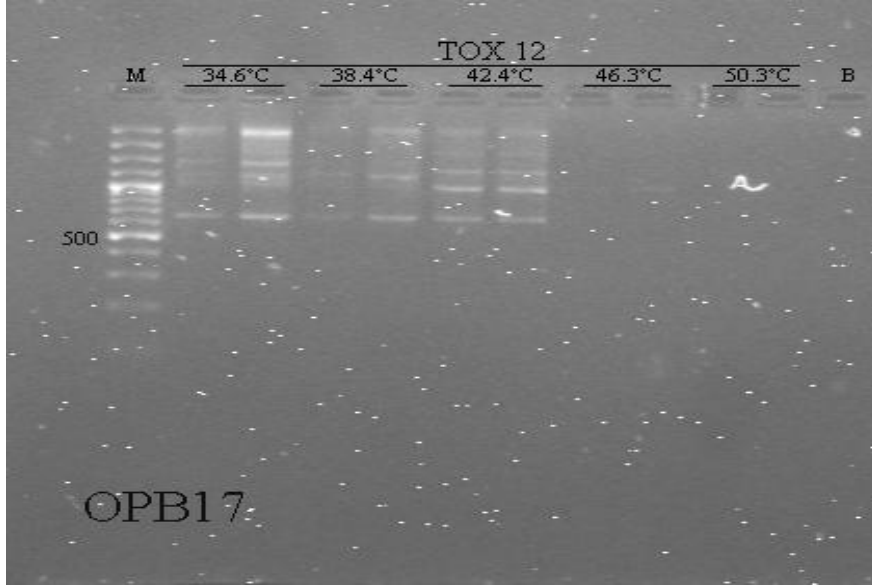
### 3.6 Primer AT'larına Göre AT Optimizasyon Bulguları



**Şekil 3.19:** Tox12 örneği OPB5 primeri kullanılarak yapılan gradyanlı x3 tekrarlı RAPD-PZR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyular (M) boya markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.

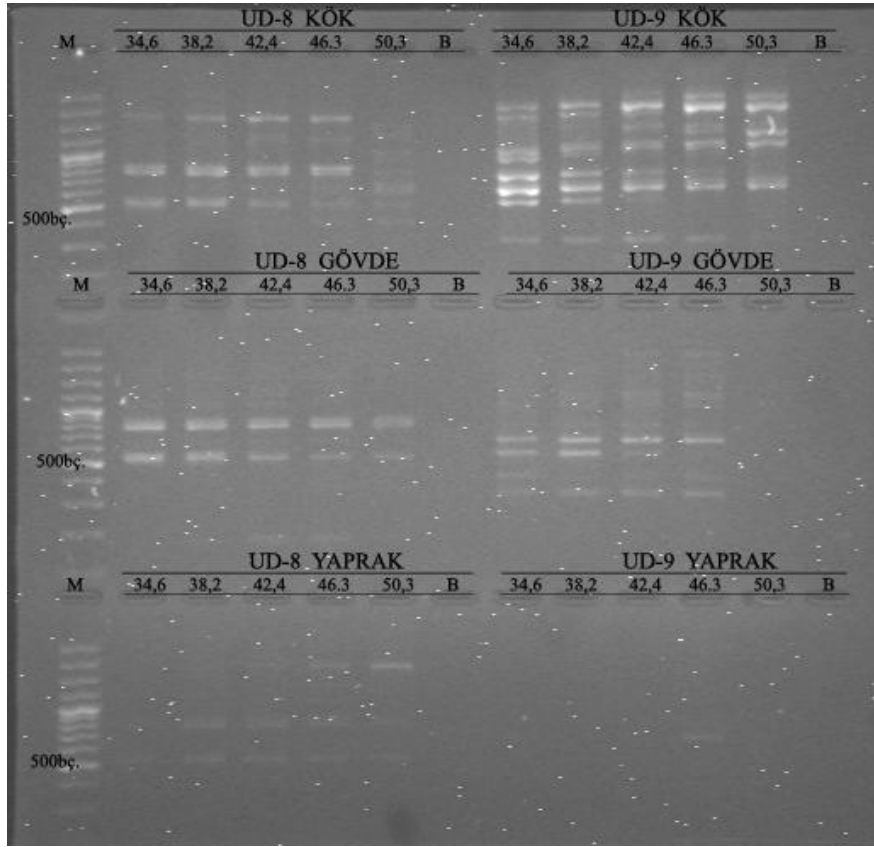


**Şekil 3.20:** Tox12 örneği OPB11 primeri kullanılarak yapılan gradyanlı x3 tekrarlı RAPD-PZR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyular (M) boya markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.



**Şekil 3.21:** Tox12 örneği OPB11 primeri kullanılarak yapılan gradyanlı x3 tekrarlı RAPD-PZR amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyular (M) boya markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.

### 3.7 Gradyanlı RAPD-PZR ile Aynı Türe Ait Farklı/Benzer Doku Karşılaştırmaları



**Şekil 3.22:** UD-8 ve UD-9 örnekleri ile OPB12 primeri kullanılarak yapılan gradyanlı RAPD-PZR ile aynı türe ait farklı/benzer doku karşılaştırmaları amplifikasyon sonuçlarını gösteren %2'lik agaroz jel fotoğrafı. İlk kuyular (M) boya markörünü, son kuyu negatif kontrol örneğini göstermektedir.

## BÖLÜM 4

### TARTIŞMA

SCI (Science Citation Index) kapsamında yaptığımız bir araştırmada 39 000'e yaklaşan PZR başlıklı çalışmanın yanında veya içinde yer alan sadece 3800 RAPD-PZR başlıklı çalışma olduğunu gördük. Bu tespit RAPD-PZR gibi çok farklı uygulamalarda kullanılabilen, çok az ekipman ve ucuz bir bedel karşılığı bol veri üretilebilecek bir metodun ne gibi sebeplerden bu derece geri planda kaldığının araştırılmasını gerektirmektedir. Üstelik yapılan yayınların çoğunluğunun da impact faktörü düşük (<2.0) dergilerde yer alması da ikinci önemli bir tespit olup yaptığımız bu tez çalışması ile sebepleri biraz olsun netleştirilmiştir (Aydın ve ark., 2004).

RAPD-PZR yöntemi maalesef çoğu araştırmacının sadece adına bakarak hüküm verdiği bir metod olarak tarihe geçmiştir diyebiliriz, en büyük dezavantajı random yani rastgele manasına gelen başharfinden kaynaklanmaktadır. Metodu sadece teorik bilgi kapsamında değerlendiren birçok araştırmacı maalesef son derece yüzeysel ve şekilci yaklaşarak sadece adında yer alan rastgele kelimesine dayanarak metodu “tu kaka” hale getirmektedirler. Rastgele kelimesindeki rastgelelik çok komik ve bilimsel doğruluktan uzak şekillerle ifade bulmaktadır. Primerlerin rastgele bağlanması, rastgele bölgeleri çoğaltması ve neredeyse yapılan çalışmanın rastgele olmasına kadar değişik ve yanlış rastgele açıklamaları vardır. Bazen bizzat araştırmayı yapan araştırmacılar bile ne yaptıklarını bilmez bir şekilde bu yanlış rastgele ifadelerini kullanmışlardır ve metodu yanlış ifade etmenin yanı sıra hakkını da veremedikleri için hak ettiği yeri bulmasına engel olmuşlardır. Aslında rastgele olan sadece primerlerin başlangıç aşamasında hedef bir bölgeye yönelik değil de hazır dizayn edilmiş bir grup primer içinden rastgele bir seçimle başlanıyor olmasıdır. Bunun sebebi de çoğu zaman çalışılan canlının genom dizisine dair ya hiçbir ön bilginin olmayışı ya da çok az ve yetersiz bilgilerin oluşudur.

Bu metod aslında böyle bir ön dizi bilgisi gerektirmeden araştırmacıların bir canlının moleküler derinliklerine gidebilmesini sağlaması açısından eşsizdir. Metod optimizasyonları sırasında özellikle çalışılması gereken parametreler primer seçimi, primer bağlanma derecesi (AT), DNA konsantrasyonu' dur, ancak bunlar da çoğu çalışma için gerçekten asli ihtiyaçlar ve durum tespiti yapılmadan, optimizasyon değil de tamamen ezberci yaklaşımlarla günü kurtarmak yönelişli şekillerde sabitlenmiş ve çalışılmıştır. Çünkü yle ya da böyle bu yöntem çok verimli niceliksel ve niteliksel sonuçlara döndürülebilir. Her ne kadar bu sonuçlar çoğu zaman gerçek anlamda bir şey ifade etmese de istatiksels birtakım değerlendirmelere çevrilebilecek veri yoğunluğu içinde araştırmacı bir şey ürettiğini düşünerek tatmin olur, tabi çoğu zaman bu kuru veri kalabalığı ile ilgili yayınlar altı dolu olmadığı ve ne işe hizmet ettiği bilinmeyen bir halde olduğu için impact faktörü yüksek dergilerce kabul görmez, bu da metodun tercih edilmeyen bir metoda dönüşmesine sebep olur. Bu tür haksızlıklar metodu hakkıyla değerlendirmeye çalışan az sayıda bilim adamının da nn kapamaktadır çünkü birçok dergi editörü bu tarz bir metodu önyargılarıyla kapsam ve faaliyet alanları dışına çoktan almıştır ve daha ilk değerlendirmede bu metodu kullanma red sebebi olmaktadır. Primer tayin aşaması birçok yayında sanki denenen primer sayısının çok olması içi bilimsel açıdan daha değerli kılıyor gibi lanse edilmekte hatta çoğu hakem bu tür bir zihniyeti yayın aşamasında bir çeşit kabul gören kritere dönüştürmektedir. Oysaki denenen primer sayısının çokluğu değil bu primerlerle elde edilen profillerin bize ne göstermesi ile ilgili doğru kararın verilmesidir önemli olan, bazen tek bir primer de sizin aradığınız profili daha ilk denemenizde verebilir. Ama çoğu bilim adamı yanlış ve önyargılı yönlendirmelerle hiç gerek yokken yüzlerce primer denemesi yapmakta ve bunlar içinde en uygun profili (en çok bant oluşturan) veren ve tekrarlı veren gibi yayınların çoğunda kabul görmüş ifadelerle çalışmalarının devamında kullanacakları primere/primerlere karar vermektedirler. Bu arada her primerin aslında uygun bir bağlanma ısısı optimizasyonu ile göstermek istedikleri her şeyi gösterebileceğini, hatta hiçbirşey göstermediğini düşündükleri ve ilk etapta eledikleri primerlerin aslında uygun AT' lerde çok şey gösterebileceğini yaptığımız bu çalışmada ortaya koyduk. Yine alışılan DNA'nın konsantrasyonunun optimizasyonunun da çalışmada gösterilmek istenilenin ne olduğu doğrultusunda çok önemli olduğu ve gerekirse konsantrasyon değiştirilerek gösterilmek istenen değişiklerin ve korunmuşlukların aynı primer ve DNA rneği ile gösterilebileceği yine çalışmamızda ispatlanmıştır.

Tm ve AT arasındaki geçişle ilgili literatürde belirsizlikler taşımaktadır. Bu konuya yönelik optimizasyon çalışmaları yapılmakla beraber, yetersizdir. Bu durum genel olarak PZR çalışmaları içinde zorlanılan, ancak gradient olarak sıcaklık ayarlanabilirliği PZR cihazlarında önlenilecek bir durumdur (Rychlik ve ark.,1990). AT' nin çok düşük olması özgün olmayan ve istenmeyen DNA fragmanlarının çoğaltılmasına sebep oluyor ve agoroz jellerde çok fazla sayıda bant şeklinde göstermektedir. RAPD-PZR için bu şekilde fazla bantlaşma çoğu zaman bir avantaj gibi değerlendirilse de bu bantların çoğunluğu gerçek bir primer temlate bağlantısı ile gerçekleşmemektedir.

RAPD konulu optimizasyon çalışmalarının AT açısından değerlendirdiğimizde, J. Welsh ve M.McClelland, aynı derginin aynı sayısında farklı çalışmaları ile bağımsız olarak genomik parmakizi çalışmalarında rastgele primer dizileri kullanılarak RAPD metodolojisini ortaya koymuşlardır (Williams ve ark.,1990). RAPD-PZR nin adının konulduğu bu çalışma 1990 yılında yapılmış, geçen 21 sene bu konudaki çalışmaların gerçekten net bir AT ilgili bilgi birikimi oluşturmadığını ve gerçekten bu durumun yol gösterme şekliyle bile doğru şekilde tartışılmadığını bu tez sırasında yaptığımız literatür değerlendirmeleri ortaya koymuştur.

Literatür araştırmalarının sonucunda RAPD-PZR konulu çalışmalarda AT 36 derece sabit tutularak;

- Farklı cinslerin ikili şekilde farklı türlerini gösteren profillerde,
- Farklı bireylerini farklı bir primer ile gösteren profillerde,
- Bakteri türlerinin aynı primer ile gösteren profillerde,
- Primer dizilimindeki her bir baz değişikliğinin iki farklı tür DNA'sında ortaya çıkarttığı farklılaşmayı tespiti yönelik profiller de,
- 3' ucundan primerler kısaltılarak yapılarak, primer uzunluğunun oluşan RAPD-PZR profillerindeki gidişat gösteren profillerde,
- Primer G+C içeriği miktarına göre çıkan sonuçlar değerlendirilmesinde G+C içeriğinin %0 ile 100/100 olduğu primer dizaynı çalışmaları şekilde gösterilen profillerde çalışmalar yapılmıştır.

1992 yılında yapılan başka bir çalışmada ise; yine AT 36 derecede sabit tutularak, denaturasyon zamanına, primer/DNA bağlanma zamanına, primer ve G+C içeriklerine,

DNA uzama süresine ve PCR döngü sayısına yönelik optimizasyonlar yapılmıştır (Yu ve Paul, 1992).

1999'dan itibaren birkaç grup araştırmacı HAT-RAPD adı altında veya yeni bir terminolojiye gitmeden yeni bir yaklaşımla daha kararlı ve özgün RAPD bantları elde etmek için daha zor şartlarda primer bağlanmasının sağlanmasının gerekliliğinden yola çıkarak 48 derece ve üstü AT'lerde RAPD yapmışlardır, bu da başka bir takım kabuldür ve bazen çalışmakla birlikte diğer AT derece kabulünden çok daha anlamlı ve optimizasyonlar açısından faydalı değildir (Atienzar ve ark., 2006). Araştırmacı yaptığı çok çeşitli RAPD-PCR temelli çalışmasında RAPD'in durumunu çok iyi kavramış ve bu konuda 2006 yılında kapsamlı bir değerlendirme makalesi çıkartmıştır. Bu review makalede yüksek AT sıcaklığında (50-54) iyi kalitede RAPD profilleri elde etmek için gerekli olan optimize şartlarını değerlendirmiştir. Ancak bu tabi ki çokça tarafgir tamamen kendi HAT-PCR çalışmalarındaki başarıları odaklı bir değerlendirmedir.

2009 yılında yapılan başka bir çalışmada ise, bir parazitin çeşitli türlerini belirlemede kullanımına yönelik bir uygulamada yüksek AT'de, 48 derecede kabulüyle çalışılmıştır (Wongsawada ve ark., 2009).

2011 yılında yapılan çalışmalarda ise, bir optimizasyona gidilmeksizin önceki çalışmaların ışığından gidilerek AT 32 dereceden başlayarak 40 dereceye kadar farklı farklı çalışmalar yapılmıştır (Dhakshanamoorthy ve ark., 2011; Gültekin ve ark., 2011; Lee ve ark. 2011; Kesaria ve Rangan, 2011; Prasanthi ve ark., 2011; Raturi ve ark., 2011; Reginensi ve ark., 2011; Sarmast ve ark., 2011; Sharmaa ve ark., 2011; Zhou ve ark., 2011).

## SONUÇ ve ÖNERİLER

- RAPD çalışmalarına ısı gradyanlı bir PZR ile başlamak ve AT optimizasyonu ve konsantrasyon optimizasyonları yapmak çalışmaların doğru şekillendirilmesi açısından çok önemlidir.
- İyi bir RAPD çalışması için ısı gradyan özelliği gösteren PZR cihazı çok gereklidir.
- Gradyanlı PZR cihazı, her türlü parametrenin özellikle AT'a bağlı değişimlerini göstermek ve çalışma açısından en uyumlu koşulları oluşturacaktır.
- RAPD ile çok farklı pencereler açarak genom değerlendirmeleri yapılabilir, bunun farkında olmak ve gradyanlı PZR çalışmaları ile yapılabilecek optimizasyonları doğru değerlendirmek çok önemlidir.
- Bir gradyan bloğunda A dan H'a
  - o Aynı derecede farklı PZR bileşenleri,
  - o Farklı primerler
  - o Farklı canlı aynı primerler
  - o Aynı canlı farklı bireyler
  - o Aynı DNA farklı konsantrasyonlar ve daha birçok parametre optimizasyonu uygun AT'ler için yapılabilir.
- Bütün bu denemeler için multichannel ve multistep pipet kullanımı çok avantajlı olacaktır.
- Bütün bu ürünlerin uygun bir jel düzeninde gösterilmesi de çok anlamlı olacağı için sonuçları en güzel şekilde görebilmek ve gösterebilmek için çok detaylı düşünmek ve deney organizasyonu yapmak gereklidir.



## REFERANSLAR

Akhan, S., Canyurt, M.A., Üç Farklı Kuluçkahanedeki Damızlık Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Stokları Arasında Genetik Çeşitliliğin RAPD-PZR Yöntemiyle Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 22, 25–30, 2005.

Alpsoy, L., Uzonur, I., Sakçalı, M. S. and Karaman, S., Antioxidant and antimutagenic activities of *Viscum album* fruit ethanolic extract in human lymphocytes. African Journal of Biotechnology, 9, 17, 2539-2543, 2010.

Anuntalabhochai, S., Chundet, R., Chiangda, J., Apavatjrut, P., Genetic diversity with in *Lychee* (*Litchi chinensis* Sonn.) Based on RAPD analysis, International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits, 2000.

Atienzar, F., Evenden, A., Jha, A., Savva, D., Depledge, M., Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature, Biotechniques, 28(1), 52-4, 2000.

Atienzar, F. A. and Jha, A. N., The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. Mutat Res 613, 76-102, 2006.

Aydın, S., Kılıç, S.S., Dergilerin İmpakt Faktörlerinin Kullanımları için İki Öneri, Turk J Biochem, 29 (4); 290-292, 2004.

Babaoğlu, S., Açık, L., Çelebi, A., Adıgüzel, N., Molecular Analysis Of Turkish *Alyssum L.* (Brassicaceae) Species By Rapd-PZR And Sds-Page Methods, G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 17(3):25-33, 2004.

Balcıoğlu, M. S., şahin, E., Karabağ, K., Karşlı, T., Alkan, S., Türkiye Yağlı Kuyruklu Koyun Irklarında DNA Parmak İzinin RAPD-PZR Yöntemi Kullanılarak Saptanması, Tarım Bilimleri Dergisi, 2010.

Bharmauria, V., Narang, N., Verma, V., Sharma, S., Genetic variation and polymorphism in the Himalayan nettle plant *Urtica dioica* based on RAPD marker. Journal of Medicinal Plants Research 3(3), 166-170., 2009.

Binbaş, P., Çine Çaparı Koyunlarda Genetik Çeşitliliğin RAPD Yöntemi ile Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Aydın, 2006.

Budak, H., Bölek, Y., Dokuyucu, T., Akkaya, A., Potential uses of molecular markers in crop improvement. KSU Journal of Science and Engineering 7(1): 75–79, 2004.

Butovskaya, P. R., Martirosyan, I. A., Baranov, V. S., Egorova, A. A., Kiselev, A. V., Pavlova, G. V., Korochkin L. I., Detection of Somatic Mosaicism in Humans Using Polymerase Chain Reaction with Random Primers, Russian Journal of Genetics, 43, 12, 1423–1427, 2007.

Butovskaya, P.R., Pavlova, G.V., Martirosyan, I. A., Sukhikh, G. T., Ryskov, A. P., Somatic Mosaicism in Mice Revealed by the RAPD-PCR Method, Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 24, 1–6, 2009.

Cambazoğlu, S., Ankara Keçilerinin RAPD-PCR Yöntemi İle DNA Parmak İzlerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Zootekni Anabilim Dalı, 2008.

Cambiera, S., Gonzalez, P., Durrieua, G., Bourdineaud, J.P., Cadmium-induced genotoxicity in zebrafish at environmentally relevant doses, Ecotoxicology and Environmental Safety, 73, 312-319, 2010.

Das, B.K., Jena, R. C., Samal K.C., Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of banana / plantain (*Musa spp.*), International Journal of Agriculture Sciences, 1, 21-25, 2009.

Dhakshanamoorthy, D., Selvaraj, R., Chidambaram, A.L., Induced mutagenesis in *Jatropha curcas* L. using gamma rays and detection of DNA polymorphism through RAPD marker, C R Biol, 334(1), 24-30, 2011.

El-Fadly, G.B., El-Kazzaz, M.K., Hassan, M.A.A., El-Kot, G.A.N., Identification of some *Fusarium spp.*, Egypt. J. Phytopathol.. 36, 1-2, 71-80, 2008.

Erdem, B., Tekeli, A., Şahin, F., Koyuncu, E., Bayramova, M., Karasartova, D., Türkiye’de İzole Edilen *Salmonella enterica* Serotip Typhimurium Suşlarının Plazmit Profilleri Ve Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analizi, İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection), 21 (3): 105-11, 2007.

Erlich H.A., Gelfald D. ve Sninsky L., Recent advances in the polymerase chain reaction, Science, 252, 1643-1650, 1991.

Gültekin, B., Eyigör, M., Tiryaki, Y., Kırdar, S., Aydın, N., Investigation of antifungal susceptibilities and some virulence factors of candida strains isolated from blood cultures and genotyping by RAPD-PCR, Mikrobiyol Bul., 45(2), 306-17, 2011.

Kekeç, G., Sakçalı, M. S., ve Uzonur, I., Assesment of genotoxic effects of boron on wheat (*Triticum aestivum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using RAPD analysis, Bulletin of Environmental Contaminaton & Toxicology, 84: 759-764, 2010.

Kesaria, V., Rangan, L., Genetic diversity analysis by RAPD markers in candidate plus trees of *Pongamia pinnata*, a promising source of bioenergy, Biomass and Bioenergy, 35, 3123-3128, 2011.

Kılıçoğlu, M. Ç., Özkoç, İ., Fungal sistemattteki moleküler gelişmeler. OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 23(1), 65-72, 2008.

Koyuncu, F., Taş, S., Uzonur, İ., Mikro-Alglerin Aşırı Üremeleri Sonucu Oluşan Zararlı Etkilerin *Prorocentrum minimum* Türünde Meydana Getirdiği Genetik Çeşitliliğin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Kullanılarak Tespi ", 1. Ulusal Palandöken Toksikoloji Sempozyumu, Erzurum/Türkiye, 2010.

Lee, J., Kwon, G.H., Park, J.Y., Park, C.S., Kwon, D.Y., Lim, J., Kim, J.S., Kim, J.H., A RAPD-PCR method for the rapid detection of *Bacillus cereus*, J Microbiol Biotechnol, 21(3),274-6, 2011.

Martínez, R., Añíbarro, C., Fernández, S., Genetic variability among *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium minutum* strains studied by RAPD banding pattern analysis, 5, 599-607, 2006.

Majer,D., Mithen, R., Lewis, B.G., Vos, P., Oliver, R.P., The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. Mycological Research 100, 1107-1111, 1996.

Mestev, H.O., Dalkılıç, z., Bazı Erkek İncir Çeşitlerinin Belirteçleri ile Tanımlanması, ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 4(1-2):49-58, 2007.

Olgun, G., Türkiye’de Yayılış Gösteren Kayalık Faresi, *Apodemus mystacinus* (Danford and Alston, 1877) (Mammalia: Rodentia) Populasyonlarının RAPD-PZR Analizi, Ankara,2007.

Padmalatha, K, Prasad, M.N.V, Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India, African Journal of Biotechnology, 5 (3), 230-234, 2006.

Prasanthi L., Bhaskara, R.B.V., Rekha, R.K., Mehala, D.R., Geetha B., Siva, P.Y., Raja, R.K., Development Of Rapd/Scar Marker for Yellow Mosaic Disease Resistance in Blackgram, Legume Research, An International Journal, 34, 2, 2011.

Querci, Maddelena, Marco Jermini ve Guy Van de Eede, Gıda örneklerinde genetiği değiştirilmiş organizma analizi, Bölüm 6, European Commission, 2010.

Raturi, A., Singh, S.K., Sharma, V., Pathak, R., Molecular characterization of *Vigna radiata* (L.) Wilczek genotypes based on nuclear ribosomal DNA and RAPD polymorphism, *Mol Biol Rep*, 2011.

Reginensi, S.M., González, M.J., Olivera, J.A., Sosa, M., Juliano, P., Bermúdez, J., RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk, *Int J Food Microbiol*, 15, 148(1), 36-41, 2011.

Rychlik, W., Spencer, W.J., Rhoads, R.E., Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro, *Nucleic Acids Research*, 18, No. 21, 1990.

Sarmast, M.K., Salehi, H., Ramezani, A., Abolmoghadam, A.A., Niazi, A., Khosh-Khui, M., RAPD Fingerprint to Appraise the Genetic Fidelity of In Vitro Propagated *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca* Plantlets, *Mol Biotechnol*, 2011.

Sharma, S., Pamidimarri, D.V.N.S., Ananda, K.G.V., Reddy, M.P., Assessment of genetic stability in micropropagules of *Jatropha curcas* genotypes by RAPD and AFLP analysis, *Industrial Crops and Products*, 34, 1003-1009, 2011.

Shalini, Tiwari, S., Gupta, R.J., Pabbi, S., Dhar, D.W., Protocol Optimization for RAPD in Cyanobacteria, *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 549-552, 2007.

Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., Sneh, B., The advancing identification and classification of *Rhizoctonia spp.* Using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. *Mycoscience* 47, 299-316, 2006.

Sripalwit, P., Wongsawad, C., Wongsawad, P., Anuntalabhojai, S., High annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) analysis of three paramphistome flukes from Thailand, *Experimental Parasitology*, 115, 98-102, 2007.

Şenel, T., Detection Of Somatic And Gonadal Mosaicism In *Sparus auratus* And *Dicentrarchus labrax* Using Polymerase Chain Reaction With Random Primers, Yüksek Lisan Tezi, 2010.

Uzonur, I., Abasıyanık, M. F., Cam, S., Çobanlı, K., Elmas, A., Erdoğan, H., Hizal, S., Karabulut, D. S., Özdemir, M., Yeşil, F. A., ve Petek, M., A preliminary report on target organ genotoxicity biomonitoring by an 'Improved Random Amplified Polymorphic DNA Assay', Fres. Environ, 13, 12a, 1453-1456, 2004.

Uzonur, İ., Erimez, H., Kılınç, D., Sadoglu, N., Marakoglu, K., Petek, M., Sıcak Tesirli DNA Tahribatının RAPD-PZR Yöntemi ile Takibi, II. Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyu, 2004.

Vural, H.C., and Dağeri, A., Optimization of DNA isolation for RAPD-PCR analysis of selected (*Echinaceae purpurea* L. Moench) medicinal plants of conservation concern from Turkey, Journal of Medicinal Plants Research, 3(1), 016-019, January 2009.

Wangspaa, R., Cutlerb, R. W., Sitthiproma, S., Chundeta, R., Dumampaic, N., Anuntalabhochaia, S., DNA Fingerprint Database of Some Economically Important Thai Plants: *Litchi chinensis* Sonn, *Dimocarpus longan* Lour, and *Peuraria sp*, ScienceAsia 31, 145-149, 2005.

Welsh, J., Mc Clelland, M., Fingerprinting genome-using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res., 18, 7213-7218, 1990.

Williams, J. G. K., Kublik, A. R., Lıvak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18, 6531-6535, 1990.

Wongsawada, C., Wongsawada, P., Chaib, J.Y., Anuntalabhochaia, S., *Haplorchis taichui*, Witenberg, 1930: Development of a HAT-RAPD marker for the detection of minute intestinal fluke infection, 123, 158-161, 2009.

Yesbek, A., *T. dicoccoides* ve *T. dicoccon* türleri arasındaki genetik çeşitliliğin RAPD-PCR tekniği ile belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2007.

Yu, K., Pauls, K.P., Optimization of the PCR program for RAPD analysis, *Nucleic Acids Research*, 20, 10, 1992.

Yüksekkaya, Ş., Fındık, D., Arslan, U., Yoğun Bakım Ünitesinde Yatan Hastaların İdrarlarından İzole Edilen *Candida* Türlerinin Moleküler Epidemiyolojisi ve Antifungal Duyarlılıkları, *Mikrobiyol Bul*, 45(1): 137-149, 2011.

Zhou, L., Li, J., Lin, X., Al-Rasheid, K.A., Use of RAPD to detect DNA damage induced by nitrofurazone in marine ciliate, *Euplotes vannus* (Protozoa, Ciliophora), *Aquat Toxicol*, 103(3-4), 225-32, 2011.