DNA Marker Yöntemleri ve Hayvancılıkta Kullanımı[1]

Taki KARSLI[2] Kemal KARABAĞ2 Emine ŞAHİN[2]

Giriş

Hayvanlar arasındaki genetik farklılıklar, farklı genler taşımalarından kaynaklanmaktadır. Aileler içi, türler içi ve popülasyonlar arası genetik varyasyon genetik markerlerle değerlendirilmektedir. Genetik marker, bağlantılı bir lokustaki allelleri tanımlamak için kullanılan saptanabilir gen ya da DNA parçasıdır.

Genetik marker tipleri; morfolojik marker, protein markerleri ve DNA markerleri gibi üç gruba ayrılabilir. Bunlardan DNA markerleri; farklı genotiplere ait DNA nükleik asit diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan markerlerdir.

Tüm dünyada moleküler ve genetik alanında yapılan çalışmalar baş döndürücü bir hıza erişmiştir. Böylece tür içi ve türler arası genetik farklılıklar bireylerin DNA'larının karşılaştırılmasıyla moleküler düzeyde araştırılabilmektedir. Baz sıraları aralarındaki bu farklılıklar aynı zamanda genom haritalarının oluşturulmasında, kalıtsal hastalıkların teşhisinde, popülasyon genetiği çalışmalarında, bitki ve hayvan ıslahı çalışmalarında önemli rol oynamaktadır. Bu makalede PCR, RAPD, AFLP, RFLP, Microsatellit, Mikroarray yöntemleri açıklanmaya çalışılacaktır.

PCR (Polymerase Chain Reaction), (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR; spesifik bir DNA veya RNA olan genetik materyallerin spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler yardımıyla enzimatik olarak sayısal çoğalmasını içeren in vitro bir tekniktir. Bu yöntemin uygulanabilmesi için yok denecek kadar az miktarda DNA bile yeterlidir. PCR reaksiyonunda üç temel basamak vardır.

a)İlk adımda çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Bunun için çift zincirli DNA, tek zincirli hale getirilene kadar ısıtılır (90–95 °C' de yaklaşık 5 dk.).

b)Primerlerin bağlanması; sıcaklık 30–70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş olan DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler yapay oligonükleotidlerdir (18–30 nükleotid uzunluğunda) ve çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır. Bu primerler kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yapar.

c)Polimeraz enzimi ile zincirin uzaması; DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir şekli (Taq polimeraz) reaksiyon karışımına ilave edilir ve DNA sentezi 70–75°C arasındaki sıcaklıkla da gerçekleşir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5'den 3'e doğru ekleyerek primerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur.

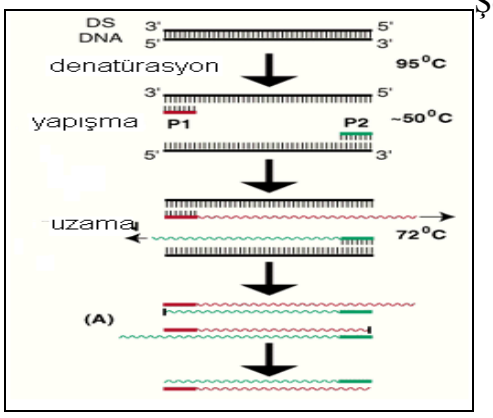
Bu üç aşama bir döngü olarak kabul edilir ve 25–35 döngü uygulanır.

---

[1]. 25–26 Mayıs 2006'da 100. Yıl Üniversitesinde yapılan II. Ulusal Zootekni Öğrenci Kongresi'nde birincilik ödülü alan poster makalenin özetidir.

[2]. Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, Antalya

Şek

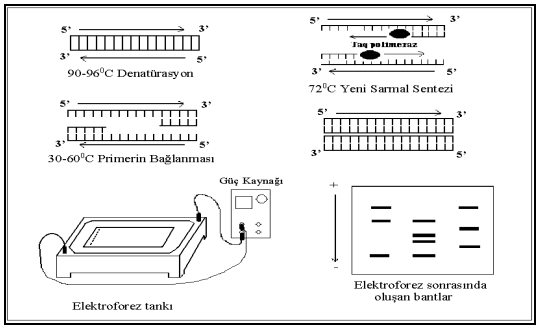


il 1. PCR'ın Çalışma Prensibi.

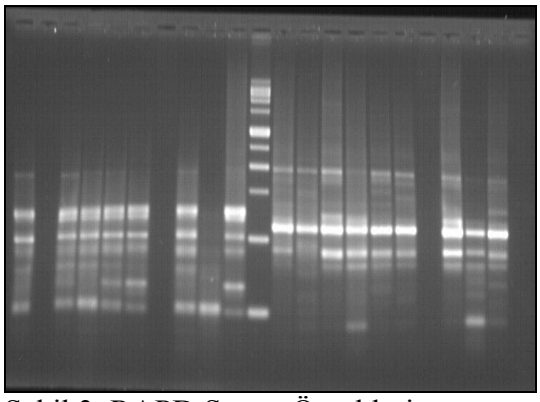
RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), (Rasgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı)

RAPD yöntemi; nükleotid sırası rasgele belirlenen kısa zincirli oligonükleotidlerin kullanıldığı, PCR ile genomik DNA'da ilgili bölgelerin çoğaltıldığı bir polimorfizm belirleme yöntemidir. Bu teknikte 6–10 nükleotid uzunluğunda başlatıcı DNA'lar kullanarak genom üzerinde rasgele bölgelerin DNA çoğaltımı yapılır. Başlatıcı DNA'ların hazırlanmasında belirli bir DNA sırasına ait bilgi gerekmemektedir.

RAPD tekniği; çabuk sonuç vermesi, ucuz olması, az işgücü gerektirmesi, az miktarda ve düşük kalitede DNA'ya ihtiyaç duyulması bakımından popüler hale gelmiştir. Ayrıca polimorfizm oranı da çok yüksektir. Tekniğin dezavantajları ise güvenirliliğin çok sınırlı olması, tekrarlanabilirliğin düşük olması ve dominant kalıtım göstermesidir.



Şekil 2. RAPD Analizinin Aşamaları.



Şekil 3. RAPD Sonuç Örnekleri.

RFLP (Restriction Fragment Lengt Polymorphism), (Kesme Fragment Uzunluk Polimorfizmi)

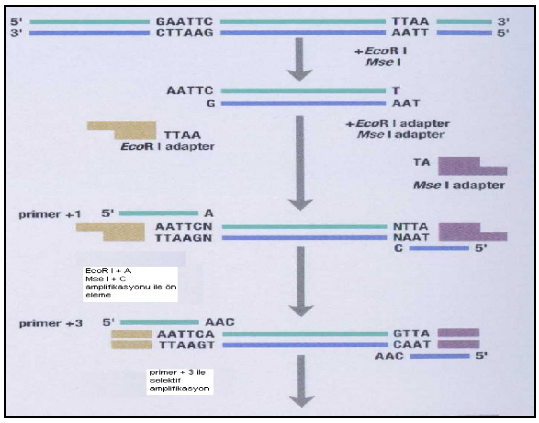
RFLP analizi, dokulardan izole edilmiş genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince özel olarak kesilmesi ve prob esasına dayanmaktadır.

Bir DNA parçasının yaklaşık her 100 nükleotid çiftinde nükleotid dizisi bireylerde değişiklik gösterir. Sonuç olarak; bir kromozom üzerinde bulunan bir kesme enzimi tanıma dizisi, diğerinde bulunmayabilir. Bu durumda, kesme parçası büyüklükleri bu bölge için farklıdır. Bu yöntemde, özütleme ve saflaştırmadan sonra elde edilen DNA kesme enzimleri ile kesilir, oluşan parçalar daha sonra molekül büyüklüklerine göre jel elektroforezinde ayrılırlar. Bir RFLP DNA'nın nükleotid sıralanışındaki varyasyonla oluşur. Bu varyasyonun sebebi bir nokta mutasyonu, kaybolma (delesyon) ya da eklenme (insersiyon) olabilir. Elektroforez sonucu büyüklüklerine göre ayrılan bantlar, RFLP analizinin diğer aşamalarında kullanılmak üzere southern emdirimi metodu kullanılarak taşıyıcı bir yüzeye aktarılır ve orada sabitlenebilir. Alkali solüsyon uygulamasıyla tek eksenli hale getirilen fragmentlerden bazıları etiketli sondalarla eşleşerek görülebilir hale getirilir, eşleşmemiş sondalar yıkanarak uzaklaştırılır.

AFLP (Amplified Fragment Lengt Polymorphism), (Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi)

Bu yöntemde DNA kesme endonükleazları ve PCR tekniği bir arada kullanılır. DNA EcoRI gibi 6 bp'lik tanıma sırasına sahip nadir kesim yapan ve 4 bp'lik MseI gibi tanıma sırasına sahip daha sık kesim yapan iki enzimle kesilir. Bu şekilde meydana gelen kesme parçacılarının kesim yerlerine, adaptör olarak adlandırılan kesme enzimi için özgün sıralar takılır. Daha sonra iki aşamalı PCR uygulanır. Adaptör sırasına ve bu kesim yerine komplementer ayrıca 3' ucundaki seçiciliği artırmak için ekstra bir bnükleotid taşıyan +1 primer eklenir. Bu nedenle DNA şablonunda çoğaltım sadece primerin ekstra seçici bazının kesme fragmentinin buna karşılık gelen bazına komplementer olması halinde mümkündür. İki +1 primerin kullanılmasıyla çoğaltılan fragmentlerin sayısı teorik olarak, orijinal fragmentlerin 1/16'sı kadar azalır. Bu aşama preamplifikasyon olarak adlandırılır. Daha sonra seçici çoğaltım olarak tanımlanan 2. PCR uygulanarak primerin seçiciliği artırılır. Bu amaçla, kesim yerine adaptöre komplementer olacak ekstra iki baz içeren bir primer eklenir (+2 primer).

Sayısı primerin seçici bazıyla ve nadir kesim yapan enzimin katıldığı fragmentlerin gösterilmesiyle önemli ölçüde azalan fragmentler, jel elektroforezinde ayrılırlar, röntgen filmi ya da florans boya kullanılmasıyla görünür hale getirilirler.



Şekil 4. AFLP Metodunun Çalışma Sistemi.

Mikrosatellit DNA Analizi (Basit Sıra Tekrarları)

SSR veya STR olarak da adlandırılan mikrosatellit DNA 2–9 baz çiftlik, ardışık olarak tekrarlanan birimlerden oluşmuştur. Mikrosatellit polimorfizmi ya da tekrarlanma sayısındaki farklılıklar, bu lokusların iki tarafındaki korunmuş sıralara komplementer olan özgün primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılması ve daha sonra fragmentlerin elektroforetik ayrımı temelinde saptanabilir.

Daha sonra bu fragmentler poliakrilamid jelde görünür hale getirilir. Mikrosatellit DNA markerleri; popülasyon düzeyindeki araştırmalarda son derece kullanışlıdırlar. Şimdiye kadar değinilen yöntemlerden farklı olarak, bir mikrosatellit lokusun çoğaltılabilmesi için bu sıranın etrafındaki sıraların bilinmesi gerekmektedir. Mikrosatellitlerin genetik marker olarak kullanılmasındaki en zor aşama bu sıraların belirlenmesi aşamasıdır.

Mikrosatellitlerde polimorfizm oranı ile sonuçların tekrarlanabilirliği çok yüksektir. Bir diğer avantajı ise kodominant marker olduğundan heterezigotlarla homozigotların ayırt edilebilmesidir.

Mikroarray

Son yıllarda birçok organizmanın DNA baz dizileri belirlenmiş olmasına rağmen bu DNA baz dizileri kendi başlarına bir şey ifade etmezler.

Mikroarray tekniği sayesinde DNA baz dizileri belli olan genlerin hücredeki fonksiyonları araştırılmaktadır. Bir array, nükleik asit örneklerinin düzgün bir şekilde sıralanması ile oluşmaktadır. Bilinen ve bilinmeyen DNA örneklerinin baz eşleşmesi özelliğine göre hibridizasyonu için uygun bir ortam sağlayarak bilinmeyen DNA'ların tanımlanabilmesi için kullanılır.

Bu teknolojide ilk olarak iki farklı koşulda tutulan iki ayrı örnekten izole edilen mRNA'lardan RT yöntemi ile cDNA'lar sentezlenir. Sonra bu örneklerin biri cyanine, Cy3 ve diğeri cyanine, Cy5 boyasıyla işaretlenerek iki farklı probu oluşturur. Cy5 ve Cy3 iki farklı boya (dyes) olup farklı emme ve uyarılma (excitation) özelliğine sahip olmalarından dolayı iki farklı renk, kırmızı ve yeşil, üretirler. Bu iki farklı boyayla etiketlenip işaretlenen ve iki farklı örnekten elde edilen cDNA'lar karıştırılır ve oligonükleotidleri veya cDNA baz dizilerini içeren ve binlerce geni ifade eden DNA mikroarrayleriyle hibridizasyon için kullanılır. Daha sonra boyaların ışıkla uyarılmasıyla oluşan kırmızı ve yeşil renkteki Cy3 ve Cy5 sinyalleri array tarayıcıları yardımıyla farklı dalga boylarında okunur. İki farklı dalga boyunda elde edilen Cy3 ve Cy5 sinyallerinin oranları bir cDNA parçacığının iki farklı probdaki yoğunluğunu ifade eder. Bu sinyallerin yoğunluklarını karşılaştırmak ve analiz sonuçlarını sayısal olarak belirlemek için bu amaçla hazırlanmış bilgisayar programları kullanılır.

Elde edilen bu görüntüde kırmızı renk, herhangi bir mRNA'nın prob 1'de prob 2'ye göre fazla olduğunu, sarı renk, mRNA'nın iki farklı probda da eşit miktarlarda bulunduğunu, yeşil renk ise, mRNA'nın prob 2'de prob 1'e göre daha fazla olduğunu ifade eder. Daha sonra her bir sinyalin ortalaması alındıktan sonra mikroarrayde kendiliğinden oluşabilecek sinyal çıkartılıp ve her bir değer için normalizasyon işlemi farklı koşullarda ekspresyonu değişmeyen temel bir genle (housekeeping gene) veya sinyal yoğunluğu bilinen herhangi bir mRNA kullanılarak yapılır. Normalleştirilen bu veriler gen ekspresyon görüntülerinin belirlenmesinde kullanılır.

DNA Marker Yöntemlerinin Hayvancılıkta Kullanımı

1. Özellikle ekonomik öneme sahip hayvanların genetik yapısının ortaya çıkarılması ve iyileştirilmesinde birçok marker teknik ve yöntemlerinden yararlanılmaktadır.
2. Ekonomik önemi olan karakterlerin iyileştirilmesinde öncelikle genetik haritalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu haritaların yapımında markerler kullanılmaktadır.
3. Haritalamada yeni teknik ve yöntemlerin kullanımı hayvanların performansını etkileyen genetik yapının daha iyi anlaşılmasını ve marker destekli seleksiyonun uygulamalarını kolaylaştırmaktadır.
4. Çiftlik hayvanlarında genlerin yapılarının ve farklı türlerdeki evrimsel sürecin aydınlatılmasında da DNA marker yöntemleri kullanılmaktadır.

Sonuç

Tarımsal üretim sistemlerinde, sürdürülebilirliğin en önemli unsurlarından biri de genetik kaynaklardır. Ülkemiz, sahip olduğu gen kaynakları yönünden dünyanın en zengin ülkelerinden biridir. Sahip olduğumuz genetik potansiyelin ortaya

çıkarılması ve korunması kaçınılmaz bir zorunluluktur.

Gen kaynaklarının yönetimi ve gelecekte ıslah programlarında çiftlik hayvanlarına ilişkin popülasyonların değerlendirilebilmesi için genetik yapıların ve mevcut ırklar arasındaki genetik benzerlik ve farklılıkların çok iyi araştırılması gerekmektedir.

Tüm dünyada doğal gen kaynaklarının hızlı bir şekilde genetik erozyona uğraması ve dünya gündemindeki yerli gen kaynaklarının korunmasına yönelik çalışmaların son derece önem kazanması bizimde bu konularda daha yoğun çalışmamızı zorunlu hale getirmiştir.