

**NÜKLEER TRANSFER İLE ELDE
EDİLEN KLON SIĞIR VE
YAVRULARININ mtDNA VE
MİKROSATELLİT BELİRTEÇLERLE
KARAKTERİZASYONU**

**Emel TÜTEN SEVİM
Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT
2016**

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**NÜKLEER TRANSFER İLE ELDE EDİLEN KLON SIĞIR
VE YAVRULARININ mtDNA VE MİKROSATELLİT
BELİRTEÇLER İLE KARAKTERİZASYONU**

Emel TÜTEN SEVİM

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Sezen ARAT

TEKİRDAĞ-2016

Her hakkı saklıdır.

Bu tez çalışması Namık Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından NKUBAP.03.YL.16.017 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Prof. Dr. Sezen ARAT danışmanlığında, Emel TÜTEN SEVİM tarafından hazırlanan “ Nükleer Transfer İle Elde Edilen Klon Sığır Ve Yavrularının mtDNA Ve Mikrosatellit Belirteçler İle Karakterizasyonu” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Sezen ARAT

İmza:

Üye: Doç. Dr. Fulya ÖZDİL

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Serdar GENÇ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof.Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NÜKLEER TRANSFER İLE ELDE EDİLEN KLON SIĞIR VE YAVRULARININ
mtDNA VE MİKROSATELLİT BELİRTEÇLERLE KARAKTERİZASYONU

Emel TÜTEN SEVİM

Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT

Klonlama teknolojisi; erişkin bir hücre çekirdeğinin yumurta hücresi içerisine konulup geriye programlanarak embriyonal döneme geri döndürülmesi prensibine dayanmaktadır. Ancak bu geri programlamayı etkileyen faktörler tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle elde edilen klonlar ve klonların yavrularının daha detaylı bir şekilde tanımlanması ile klonlama teknolojisi daha anlaşılır ve kontrol edilebilir hale getirilebilir. Bu tez çalışmasının amacı da bir ırkın bireylerinin farklı bir ırka ait yumurta kaynağı kullanılarak klonlanması sonucu elde edilen klonların normal bir ırk popülasyonu oluşturmasının mümkün olup olmadığını ortaya koymak adına klon ve jenerasyonlarını moleküler olarak karakterize etmek ve böylece ileride bu teknolojinin nesli tükenmiş bir ırkın geriye getirilmesindeki muhtemel potansiyelini daha iyi anlamaya çalışmaktır. Bu amaçla çalışmada daha önce bir TÜBİTAK-TOVAG-104O360- projesi ile üretilmiş 5 klon boz sığır (1 erkek, 4 dişi) ve bu klonların yavruları (2 erkek, 4 dişi) materyal olarak kullanılmıştır. Öncelikle klonlar, onların yavruları ve klonların üretilmesinde kullanılan verici hücreden elde edilen genomik DNA'da 10 mikrosatellit belirteç kullanılarak klonların genomik DNA açısından verici hücrelerin birebir kopyası olduğu ve yavrularında bu klonlara ait olduğu teyit edilmiş ve mtDNA D-loop bölgesi dizi analizi ile de klonların mtDNA'larının yumurta kaynaklı olduğu ve dolayısıyla verici hücreden farklı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu farklı mtDNA varlığı klonların yavrularında da izlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Klonlama, boz sığır, mtDNA D-Loop, mikrosatellit

2016, 80 Sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

CHARACTERIZATION OF CLONED CATTLE PRODUCED BY NUCLEAR TRANSFER AND THEIR OFFSPRINGS BY USING mtDNA AND MICROSATELLIT MARKERS

Emel TÜTEN SEVİM

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor : Prof. Dr. Sezen Arat

Cloning technology is based on principle of turning back to embryonic period by reprogramming of that an adult cell nucleus was putting into the oocyte cell. However, affecting factors of this reprogramming has not been clarified completely. Therefore, cloning technology can be made more understandable and controllable with a more detailed manner identifying of obtained clones and their offspring. The purpose of the study of Postgraduate is to molecularly characterize clone and generations to reveal whether it is possible or not that creation of a normal race population through clones which acquired as a result of cloning individuals of one race by using ovular source which belongs to a different race, and thus to trying understand better that possible potential of this technology to reinstate an extincted race. For this purpose, 5 clone grey cattles (1 male, 4 female) and their offsprings (2 male, 4 female) which generated with a TÜBİTAK TOVAG-104O360- project had been used as material. Firstly by using 10 microsatellite markers on genomic DNA obtained from clones, their offspring and donor cells which were used for producing of clones, it has been confirmed that the clones are copy of donor cells and all offspring belong to the clones and by sequencing of D-Loop region of mtDNA, it has been determined that the origin of mtDNA from clones are eggs and therefore are different than donor cell. In addition the presence of mtDNA difference has been observed in offspring of clones.

Key words: Cloning, Grey Cattle, mtDNA D-Loop, microsatellite

2016, 80 Page

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1 Klonlama	3
2.1.2 Nükleer Transferde Kullanılan Hücre Kaynakları ve Tipleri	3
2.2 Klonlamanın Temel Basamakları	4
2.3 Hücrelerin Sinkronizasyonu	5
2.4 Genetik Karakterizasyon	6
2.4.1 Mikrosatellit Belirteçleri.....	7
2.4.2 Klonlarda Mikrosatellitler	8
2.5 Hayvanlarda Mitokondriyel Genomun (mtDNA) Yapısı	10
2.5.1 Doğal Üremede mtDNA Geçişi	10
2.5.2 Moleküler Genetik Çalışmalarda mtDNA'nın Kullanıldığı Yerler	11
2.6 Klon Hayvanlarda mtDNA	12
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1 Materyal	15
3.1.1 Kullanılan Materyallerin Özellikleri	16
3.1.2 Kullanılan Cihaz Ve Aletler	17
3.1.3 Kullanılan Kimyasallar	18
3.2 Yöntem	18
3.2.1 DNA İzolasyonu Yapılacak Materyalin Toplanması	19
3.2.1.1 Kan ve sperma örneklerinin alınması	19
3.2.1.2 Hücre Kültürü	19
3.2.2 DNA İzolasyonu	20
3.2.3 DNA Kalitesinin Kontrolü	21
3.2.4 Çalışmada Kullanılan Mikrosatellit Belirteçler	22
3.2.5 Çalışmada Kullanılan mtDNA Belirteci	32
3.2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Elde Edilen DNA Bantlarının Görüntülenmesi	33
3.2.7 Fargment Analizi ve Dizi Analizi	34
4. BULGULAR	35
4.1 DNA İzolasyonu	35
4.2 Mikrosatellit Belirteçleri İle Gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonları	36
4.3 Fragment Analizi	41
4.4 mtDNA Belirteci İle Gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu	45
4.5 Dizi Analizi	45

4.5.1 Erkek Klonun ve Erkek Klonun Spermasının Verici Hücre İle Karşılaştırması	45
4.5.2 Dişi Klonların Verici Hücre İle Karşılaştırması	48
4.5.3 Dişi Klonların Birbiri İle Karşılaştırması	54
4.5.4 Dişi Klonlar ve Yavrularının Birbiri ile Karşılaştırılması	59
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
6. KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ.....	80

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Klon hayvanların moleküler karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan mikrosatellit belirteçler	9
Çizelge 3.1: Çalışmada kullanılan klonlar, hücre kaynakları ve hücre tipleri	15
Çizelge 3.2: Çalışmada kullanılan klon yavruları ve ebeveynleri	15
Çizelge 3.3 : Çalışma da Kullanılan Cihaz ve Aletler	17
Çizelge 3.4: Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	18
Çizelge 3.5: Hücre Kültürü Çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	18
Çizelge 3.6: Çalışmada kullanılan mikrosatellit belirteçleri	22
Çizelge 3.7: TGLA122 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler	22
Çizelge 3.8: TGLA122 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri	23
Çizelge 3.9: TGLA122 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları	23
Çizelge 3.10: ETH225 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler	23
Çizelge 3.11: ETH225 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri	24
Çizelge 3.12: ETH225 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları	24
Çizelge 3.13: ETH10 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler	24
Çizelge 3.14: ETH10 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri	25
Çizelge 3.15: ETH10 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları	25
Çizelge 3.16: TGLA227 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler	25
Çizelge 3.17: TGLA227 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri	26
Çizelge 3.18: TGLA227 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları	26
Çizelge 3.19: BM1824 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler	26
Çizelge 3.20: BM1824 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri	27
Çizelge 3.21: BM1824 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları	27
Çizelge 3.22: INRA23 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler	27
Çizelge 3.23: INRA23 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri	28
Çizelge 3.24: INRA23 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları	28
Çizelge 3.25: SPS115 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler	28
Çizelge 3.26: SPS115 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri	29
Çizelge 3.27: SPS115 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları	29
Çizelge 3.28: ETH3 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler	29
Çizelge 3.29: ETH3 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri	30
Çizelge 3.30: ETH3 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları	30
Çizelge 3.31: BM1818 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler	30
Çizelge 3.32: BM1818 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri	31
Çizelge 3.33: BM1818 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları	31
Çizelge 3.34: INRA63 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler	31
Çizelge 3.35: INRA63 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri	32
Çizelge 3.36: INRA63 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları	32
Çizelge 3.37: D-Loop mtDNA Bölgesinin PZR Bileşenleri	33
Çizelge 3.38: D-Loop mtDNA Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları	33
Çizelge 4.1: Çalışmada kullanılan bireyler ve örnek numaraları	35
Çizelge 4.2: Klon hayvanlar ve hücre vericilerine ait fragment analiz sonuçları	41
Çizelge 4.3: Yavru K1.K3.1, Yavru K1.K3.2 ve ebeveynlerine ait fragment analiz sonuçları	42
Çizelge 4.4: Yavru H1.K4.1 ve ebeveynlerine ait fragment analiz sonucu	42
Çizelge 4.5: Yavru K1.K4.1 ve ebeveynlerine ait fragment analiz sonuçları	43
Çizelge 4.6: Yavru K5.1 ve ebeveynlerine ait fragment analiz sonuçlar	43
Çizelge 4.7: Yavru K1.K5.1 ve ebeveynlerine ait fragment analiz sonuçları	44
Çizelge 4.8: Yavrular ve ebeveynlerine ait fragment analiz sonuçları	44

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Doğal klon ikizler (Anonim,2015)	3
Şekil 2.2: Blastomer ve Embriyonik Kök Hücre Transferi ile klonlama (Arat 2010).....	4
Şekil 2.3: Klonlamanın temel basamakları (Anonim,2012)	5
Şekil 2.4: Hücre siklusun da hücrenin G0 fazında durdurulması ve enükle MII yumurta ile füzyonu (Anonim,2010)	6
Şekil 2.5: mtDNA yapısı (Anonim,2011).....	10
Şekil 2.6: mtDNA D-loop bölgesi 16050,16062,16135 pozisyonlarındaki baz çiftleri (Tae Do ve ark. 2002)	13
Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan 4 dişi, 1 erkek klon ve hücre vericisi hayvanlar	16
Şekil 3.2: Çalışmada kullanılan klonlar ve yavruları	16
Şekil 4.1: DNA örneklerinin jel görüntüsü	35
Şekil 4.2: TGLA122 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü	36
Şekil 4.3: ETH225 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü	36
Şekil 4.4: ETH10 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü	37
Şekil 4.5: TGLA227 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü	37
Şekil 4.6: BM1824 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü	38
Şekil 4.7: INRA23 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü	38
Şekil 4.8: SPS115 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü	39
Şekil 4.9: ETH3 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü	39
Şekil 4.10: BM1818 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü	40
Şekil 4.11: INRA63 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü	40
Şekil 4.12: mtDNA belirteci (D-loop) ile yapılan PZR sonrası jel görüntüsü	45
Şekil 4.13: Klon 1, Klon 1 sperma ve hücre vericisi 1’de gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık	46
Şekil 4.14: Klon 1, Klon 1 sperma ve hücre vericisi 1 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık	46
Şekil 4.15: Klon 1, Klon 1 sperma ve hücre vericisi 1 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15868. Nükleotidde gözlemlenen farklılık	47
Şekil 4.16: Klon 1, Klon 1 sperma ve hücre vericisi 1 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. Nükleotidde gözlemlenen farklılık	47
Şekil 4.17: Klon 1, Klon 1 sperma ve hücre vericisi 1 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15983. nükleotidde gözlemlenen farklılık	48
Şekil 4.18: Klon 2, Klon 3 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık	48
Şekil 4.19: Klon 2, Klon 3 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15791. nükleotidde gözlemlenen farklılık	49
Şekil 4.20: Klon 2, Klon 3 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık	49
Şekil 4.21: Klon 2, Klon 3 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık	50
Şekil 4.22: Klon 2, klon 3 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15937. nükleotidde gözlemlenen farklılık	50
Şekil 4.23: Klon 4 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık	51
Şekil 4.24: Klon 4 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık	51

Şekil 4.25: Klon 4 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık	52
Şekil 4.26: Klon 5 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık	52
Şekil 4.27: Klon 5 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık	53
Şekil 4.28: Klon 5 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık	53
Şekil 4.29: Klon 4 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık	54
Şekil 4.30: Klon 4 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık	54
Şekil 4.31: Klon 4 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık	55
Şekil 4.32: Klon 2, Klon 3 ve Klon 4 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15791. nükleotidde gözlemlenen farklılık	55
Şekil 4.33: Klon 2, Klon 3 ve Klon 4 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15937. nükleotidde gözlemlenen farklılık	56
Şekil 4.34: Klon 2, Klon 3 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık	56
Şekil 4.35: Klon 2, Klon 3 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15791. nükleotidde gözlemlenen farklılık	57
Şekil 4.36: Klon 2, Klon 3 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık	57
Şekil 4.37: Klon 2, Klon 3 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık	58
Şekil 4.38: Klon 2, Klon 3 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15937. nükleotidde gözlemlenen farklılık	58
Şekil 4.39: Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık	59
Şekil 4.40: Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15711. nükleotidde gözlemlenen farklılık	60
Şekil 4.41: Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15791. nükleotidde gözlemlenen farklılık	60
Şekil 4.42: Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık	61
Şekil 4.43: Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık	61
Şekil 4.44: Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15937. nükleotidde gözlemlenen farklılık	62
Şekil 4.45: Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15983. nükleotidde gözlemlenen farklılık	62
Şekil 4.46: Yavru K1.K3.1, Yavru K1.K3.2 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15711. nükleotidde gözlemlenen farklılık	63
Şekil 4.47: Yavru K1.K3.1, Yavru K1.K3.2 ve hücre vericisi 2 bireylerinde gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15983. nükleotidde gözlemlenen farklılık	63

KISALTMALAR

A	: Adenin nükleotidi
ATP	: Adenozin trifosfat
Bç	: Baz çifti
C	: Sitozin nükleotidi
CO ₂	: Karbondioksit
dH ₂ O	: Distile su
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DPBS	: Dulbecco'nun fosfat içeren tuz tamponu
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FBS	: Fetal buzağı serumu
G	: Guanin nükleotidi
GC	: Granülosa
ISAG	: Uluslararası Hayvan Genetik Derneği
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimol
mtDNA	: Mitokondriyel DNA
NaCl	: Sodyum klorür
nDNA	: Çekirdek DNA
ng	: Nanogram
NT	: Nükleer Transfer
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyumdedosilsülfat
SSR	: Basit dizi tekrarları
STR	: Ardışık basit tekrarlar
T	: Timin nükleotidi
TBE	: Tris-borik asit-EDTA tampon çözeltisi
TE	: Tris-EDTA
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
VNTR	: Değişken ardışık nükleotid tekrarları
µM	: Mikromol
µL	: Mikrolitre

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam boyunca bilgi ve desteğini esirgemeyen, bana bu konuda çalışma imkanı sağlayan, tez çalışmanın her aőamasında yol gösterici olan danışman hocam Sayın Prof.Dr. Sezen ARAT'a, çalıőmam boyunca moleküler genetik tekniklerin uygulanmasında, sonuçların değerlendirilmesi ve yorumlanmasında desteklerini gördüğüm ve bilgilerini benimle paylaőan Sayın Hocalarım Doç.Dr. Fulya ÖZDİL ve Doç.Dr. Emel ÖZKAN NAL ve Yrd.Doç.Dr.Behiye Banu BİLGEN'e, ve bugünlere gelmem de emekleri olan, beni yetiőtiren Namık Kemal Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü hocalarıma sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalıőmalarım boyunca yanımda olan, gerektiği zaman bana yardımcı olan ve çalışma aralarını daha eğlenceli hale getiren sevgili arkadaőlarım Ceren ELİBOL, A.Kubilay BARUT ve diğer arkadaőlarıma teşekkür ederim.

Son olarak, tez çalıőmamın gerek uygulama aőamasında gerekse yazım aőamasında bana yardımcı olan, desteklerini esirgemeyen ve birçok fedakarlık gösteren sevgili eőim Turan SEVİM'e ve en önemlisi çalıőmamın uygulama ve tez yazımının her anında benimle olan çok yakında kuağıma alacağım minik kızım Nil SEVİM'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Emel TÜTEN SEVİM

Temmuz, 2016

1.GİRİŞ

Klon, bir bireyden fertilizasyon olmaksızın elde edilen ve onunla genetik olarak özdeş olan yavru olarak tanımlanabilir. Biyologlar, klonlama kelimesini genellikle genetiksel olarak birden çok identikal bireyin üretimini ifade etmek için kullanırlar. Tek yumurta ikizleri (veya üçüzler vs.) genetik açıdan doğal klonlardır ve bugünkü klonlama teknolojisinin keşfinde araştırmacılar için ilham kaynağı olmuşlardır (Arat 2010).

Elli yılı aşkın bir süredir, gelişim biyolojisinin en önemli sorularından birisi, farklılaşmamış bir hücredeki genlerin başka yönde farklılaşmış bir hücredeki genlere özdeş olup olmadığı ve farklılaşmış bir hücre nükleusunun, zigot nükleusu ile yerleri değiştirildiğinde, bunun normal bir embriyonik gelişmeyi başlatıp başlatmayacağı olmuştur. Bu sadece embriyonik ve ekstra embriyonik tüm hücre ve dokuları oluşturabilme potansiyeline sahip totipotent bir nükleusun, nükleusu çıkartılmış metafaz II aşamasındaki olgun yumurtanın içerisine transferini gerektiren nükleer transfer ya da nükleer transplantasyon (NT) denilen yöntem kullanılarak test edilebilmiştir.

Nükleer transfer sonucu bir canlının klonlanması yani genetik kopyasının oluşturulması modern biyoteknolojinin günümüzdeki en uç noktası ve yardımcı üreme tekniklerinin en gelişmişidir. Bu teknoloji üstün genetik yapıya sahip veya hastalıklara dirençli bireylerin sayısını artırmak için kullanılabileceği gibi aynı zamanda sayıları gittikçe azalan lokal ırkların yok olma sınırından kurtarılması için de kullanılabilecektir. Bu yüzden Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) gen kaynaklarının korunması için ülkeleri belli zamanlarda bir araya getirmekte ve bu toplantılarda gelecekte yok olacak türleri geriye getirmek için hücre bankalarının kurulmasının gerekliliğini tartışmaktadır. Kurulacak hücre bankalarının etkin bir şekilde kullanılabilmesi, teknolojinin sorunlarının çözülmesine bağlıdır. Bu nedenle hala bu teknolojiyi kullanabilen ülkeler yoğun olarak araştırmalarına devam etmektedirler (Campbell 2002).

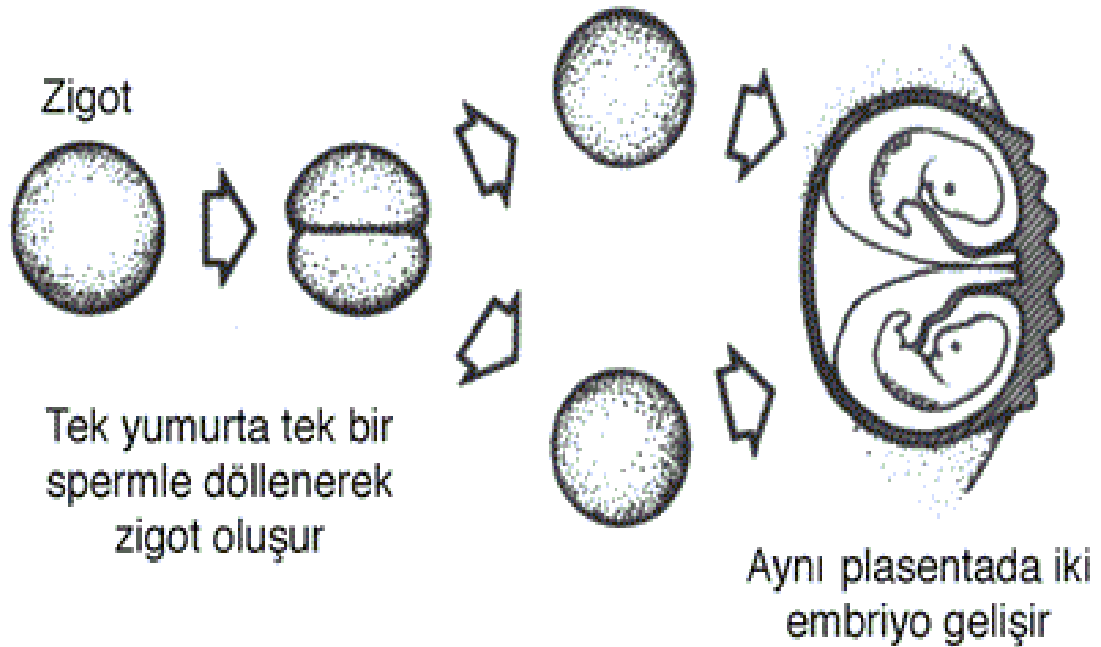
Erişkin bir canlının başarı ile klonlanması sonucu doğan ilk klon koyun “Dolly” nin (Wilmot ve ark. 1997) ardından sığır (Cibelli ve ark.1998, Kato ve ark. 1998, Vignon ve ark. 1998),fare (Wakayama ve ark. 1998), keçi (Baguisi ve ark. 1999), domuz (Onishi ve ark. 2000, Polejaeva ve ark. 2000), tavşan (Chesne´ ve ark. 2002), kedi (Shin ve ark. 2002), sıçan (Zhou ve ark. 2003), at (Galli ve ark. 2003), katır (Woods ve ark. 2003), köpek (Lee ve ark. 2005), gelincik (Li ve ark. 2006), manda (Shi ve ark. 2007) ve deve (Wani ve ark. 2010) gibi birçok memeli türü aynı yöntem ile klonlanmıştır. İlk klonun üretilmesinden bu yana birçok

Çalışma yapılarak teknoloji iyileştirilmeye çalışılmış olsa da, başarı yüzdesi halen istenilen seviyede değildir. Bu bağlamda üretilen klonların ve onların yavrularının daha ayrıntılı tanımlanması teknolojinin daha anlaşılır ve kontrol edilebilir hale gelmesinde faydalı olacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Klonlama

Klonlama eşeysiz üreme yöntemiyle bir bitki veya hayvanın genetik olarak özdeş kopyalarını yapmak anlamına gelmektedir. Tek yumurta ikizleri, tüm genom bakımından birebir aynıdır ve doğanın ürettiği klonlardır (Şekil 2.1). İlk klonlama çalışmaları bu doğal olayın taklit edilmesiyle başlamıştır. Ancak bugünkü anlamıyla klonlama, erişkin bir canlıdan elde edilen vücut hücresinin o türe ait genetik materyali çıkartılmış bir yumurta hücresi içerisine konulması olarak ifade edilmektedir. Bu işleme nükleer transfer denir. Bunun sonucu olarak hücre kaynağı ile aynı genetik yapıda ve başka bir ifade ile onun kopyası olan yeni bir birey oluşturulur.

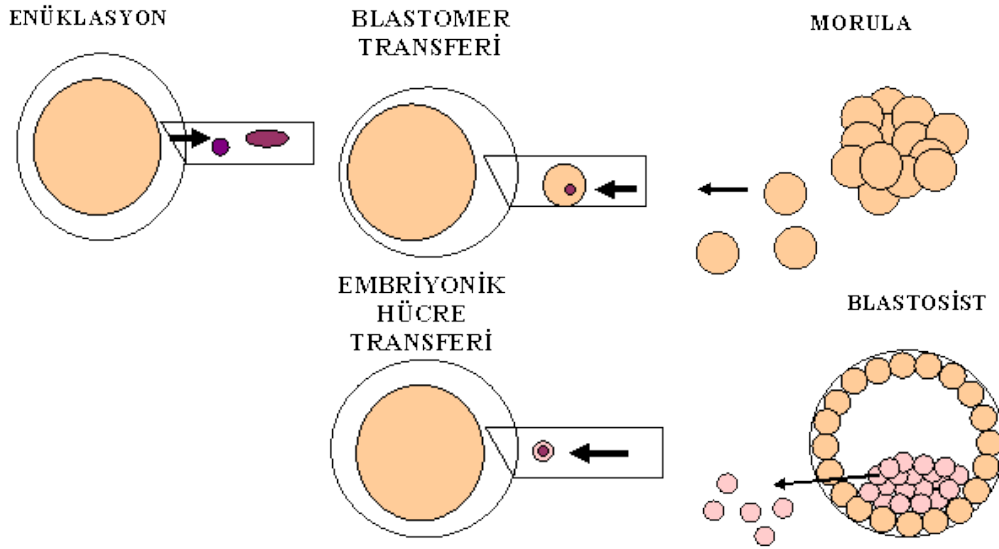


Şekil 2.1. Doğal klon ikizler (Anonim, 2015)

2.1.2. Nükleer Transferde Kullanılan Hücre Kaynakları ve Tipleri

Nükleer transfer embriyonik hücreler (blastomer veya embriyonik kök hücre), (Şekil 2.2) fetal ve erişkin (Şekil 2.3) olmak üzere vücut hücreleri kullanılarak yapılmaktadır. Erişkin bir canlının klonlanmasının ardından yapılan birçok çalışma incelendiğinde vücut hücrelerinin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Başarı ile kullanılan vücut hücrelerine meme bezi epitel (Wilmurt ve ark. 1997), fibroblast (Cibelli ve ark. 1998, Yang ve ark. 2008), granüloza

(Steinborn ve ark. 2002, Arat ve ark. 2001b), ve kıkırdak (Arat ve ark. 2011), hücreleri örnek gösterilebilir. Bunların yanı sıra kumulus hücresi, lokosit, kas hücresi, ovidukt hücresi karaciger ve böbrek hücresinin kullanıldığı çalışmalara da rastlanmaktadır (Brem ve Kuhholzer 2002).



Şekil 2.2. Blastomer ve Embriyonik Kök Hücre Transferi ile klonlama (Arat 2010)

2.2.Klonlamanın Temel Basamakları

Teknoloji temel olarak Şekil 2.3' de gösterildiği şekilde aşağıdaki basamakları içerir.

1.Olgun yumurtanın (metafaz II yumurtanın) metafaz kromozomları uzaklaştırılır (enüklasyon).

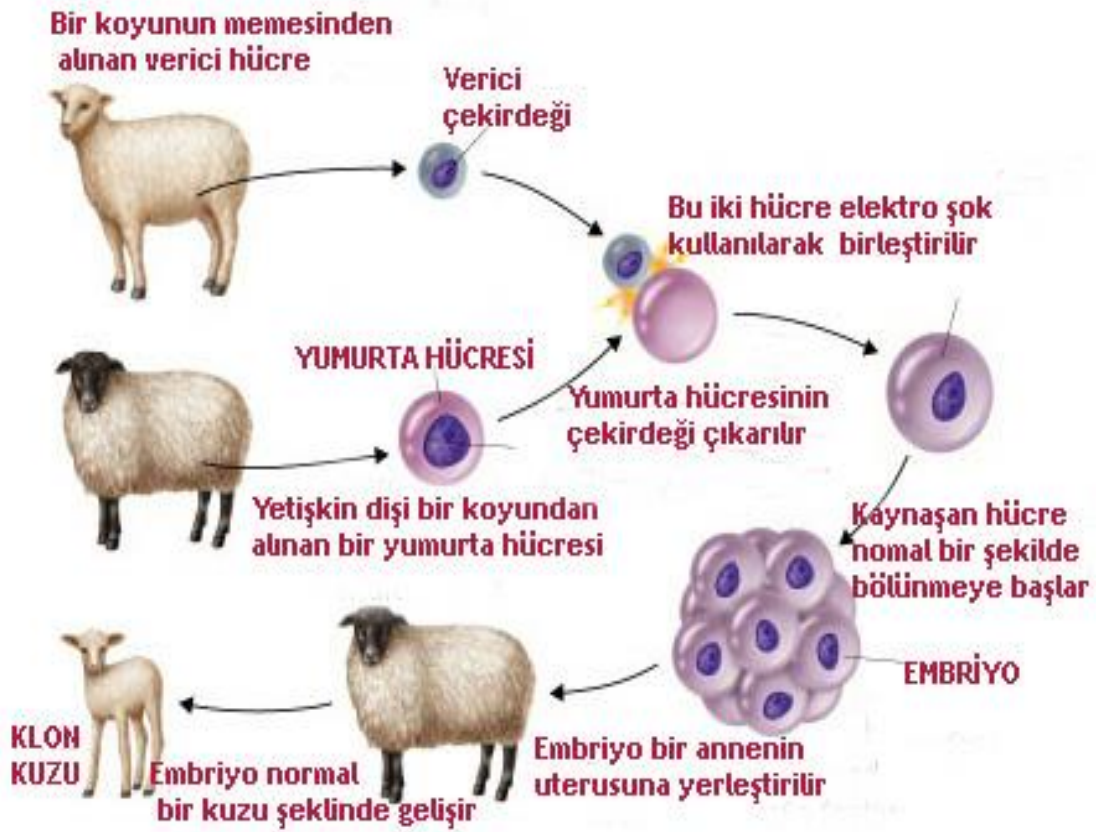
2.Kültüre edilen G0-G1 fazındaki verici hücre enükle edilmiş MII yumurtaların zonası altına yani perivitellin boşluğuna yerleştirilir.

3.Kaynaşmaları için yumurta ve verici hücre füzyona tabi tutulur.

4.Kimyasallar veya elektrik akımı ile hücre bölünmesi aktive edilir.

5.Başarıyla gelişen klon embriyolar taşıyıcı dişilere transfer edilir.

Doğacak klon yavrular verici hücre ile tamamen aynı nükleer genlere sahiptir.



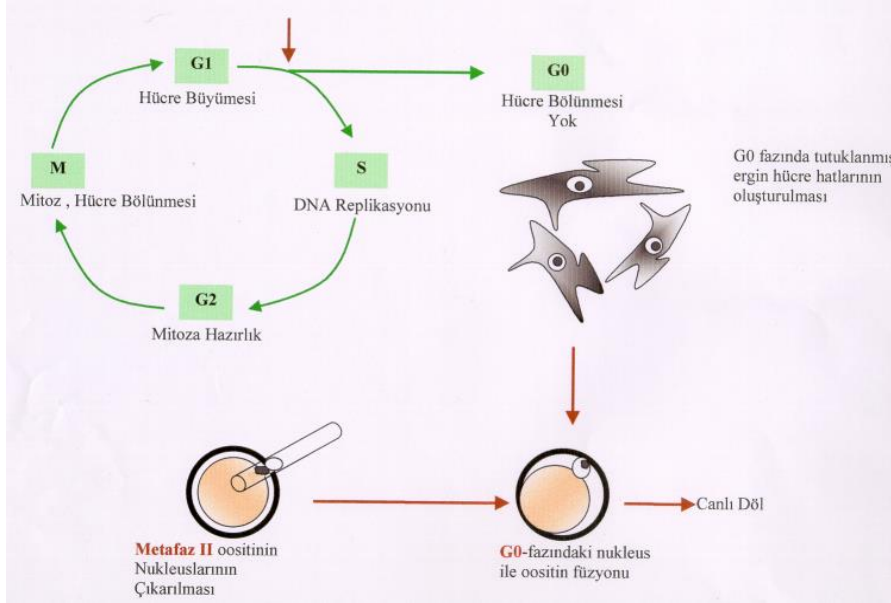
Şekil 2. 3. Klonlamanın temel basamakları (Anonim, 2012)

2.3. Hücrelerin Sinkronizasyonu

Nükleer transfer çalışmalarında çoğunlukla G1/G0 fazındaki hücreler seçilir. Bu dönemdeki hücreler geriye programlanmaya daha uygundur ve daha yüksek oranda normal embriyo gelişimi ile sonuçlanırlar.

Hücreler G1/G0 fazına değişik şekillerde getirilebilirler. Kumulus hücreleri elde edildikleri anda bu dönemdedirler ve hemen NT için kullanılabilirler. Eğer hücreler kültüre ediliyorsa bölünen hücre popülasyonunda çok değişik dönemlerde hücre vardır. Bu hücreleri istenen döneme getirmek için serum starvasyonu (düşük serum varlığında kültür) uygulanabilir ve böylece hücreler yeteri kadar beslenemedikleri için dinlenme fazına yani G0 fazına geçerler. İlk başarılı NT çalışmasında bu yöntem kullanılmıştır (Wilmot ve ark.1997). Diğer yöntemde hücreler kültür kaplarını kapladıklarında birbirleri ile temas ettikleri için (kontakt inhibisyon) S fazına geçemezler ve G1'de kalırlar. Bazı NT çalışmalarında bu yöntem kullanılmıştır (Cibelli ve ark.1998, Arat ve ark. 2001b, Arat ve ark. 2011). Bir başka yöntem ise siklin kinaz inhibitörü gibi (roskovitin, dimetil sulfoksit (DMSO), siklohekzimid) bazı kimyasallar kullanılarak hücrelerin G1 fazında bloklanmasıdır ve bazı NT çalışmalarında da

bu yöntem kullanılmıştır (Arat ve ark. 2001a, Gibbons ve ark. 2002, Goissis ve ark. 2007, Hashem ve ark. 2006).



Şekil 2.4. Hücre siklusunda hücrenin G0 fazında durdurulması ve enükleer MII yumurta ile füzyonu (Anonim, 2010)

2.4. Genetik Karakterizasyon

Genetik karakterizasyon çalışmaları, ırklar arası ve ırk içi genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve ırkların tanımlanması amacıyla önemli bir yere sahiptir. Dünyada ve Türkiye’de 1980’li yıllarda yerli ırkların genetik yapıları ve bazı verim özellikleri ile olan ilişkileri kan ve süt protein polimorfizmi (Ceriotti ve ark. 2003, Ibeagha-Awemu ve Erhardt 2005) kullanılarak incelenirken en son gelişmelerle birlikte mikrosatellit belirteçler ve SNP’ler (Cañón ve ark. 2001, Li ve ark. 2006, McKay ve ark. 2008, Kang ve ark. 2009, Molae ve ark. 2009) daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Genetik karakterizasyon çalışmalarında mikrosatellitler, insan (Bowcock ve ark. 1994, Deka ve ark. 1995), sığır (MacHugh ve ark. 1997, Loftus ve ark. 1999, Edwards ve ark. 2000, Cañón ve ark. 2001), keçi (Luikart ve ark. 2001, Maudet ve ark. 2002), koyun (Mukesh ve ark. 2006, Lawson Handley ve ark. 2007, Molae ve ark. 2009), köpek (Boyko ve ark. 2009, Kang ve ark. 2009), at (Luís ve ark. 2007), eşek (Aranguren-Méndez ve ark. 2002), domuz (Behl ve ark. 2006, Sollera ve ark. 2009), manda (Flamand ve ark. 2003) ve diğer birçok hayvan türlerinde (Cosse ve ark. 2007, Vijn ve ark. 2007, Li ve ark. 2009) kullanılmaktadır.

Genetik karakterizasyon çalışmalarında mikrosatellitler dışında farklı biyokimyasal belirteç sistemleri de (Moazami-Goudarzi ve ark. 1997, Kantanen ve ark. 1999-2000, Ceriotti ve ark. 2003, Ibeagha-Awemu ve Erhardt 2005) kullanılmıştır. AFLP (Negrini ve ark. 2007), mtDNA (Loftus ve ark. 1994, Bradley ve ark. 1996, Finnilä ve ark. 2001, Mannen ve ark. 2004), Y kromozomuna özgün mikrosatellitler (Edwards ve ark. 2000, Cai ve ark. 2006, Li ve ark. 2007, Kantanen ve ark. 2009) ağırlıklı olarak kullanılmakla birlikte SNP (Li ve ark. 2006, McKay ve ark. 2008) belirteçleri de kullanılmaya başlanmıştır.

2.4.1. Mikrosatellit Belirteçleri

Genomda bir lokusta arka arkaya gelen rastgele tekrar dizilerine kısa ardışık tekrarlar (STR-“Short Tandem Repeat”) denilmektedir. STR’lerin 1–6 bç tekrarlarından oluşmuş belirteçlere mikrosatellit belirteçler veya basit dizi tekrarları (SSR-“Simple Sequence Repeat”) denilmektedir (Weber ve ark. 1989, Liu 1998). Genomda 9– 100 bç arasında değişen rastgele dizi tekrarları ise minisatellit belirteçler veya değişken ardışık nükleotid tekrarları (VNTR-“Variable Number of Tandem Repeats) olarak tanımlanmaktadır. Mikrosatellitlerin tekrar sayısı genelde 100’den, minisatellitlerin tekrar sayısı ise 1000’den daha azdır (Liu 1998). Mikrosatellitler prokaryot ve ökaryot genomun herhangi bir bölgesinde bulunabilmektedir. Prokaryotlarda birçok biyolojik fonksiyona sahip olduğu halde ökaryot hücrelerde rolü tam olarak bilinmemektedir (Bennett 2000). Mikrosatellit belirteçler, yaygın olarak 2 nükleotidli tekrarlardan [(CA)_n] oluşmakla birlikte farklı formlarda da (AC, AT, AAC, AAT, CCG vb) bulunabilmektedir (Ellegren ve ark. 1997, Orti ve ark. 1997, Bruford ve ark. 2003).

STR belirteçleri, PZR teknolojisinin yardımıyla genetik çalışmalarda en çok tercih edilen belirteç sistemini oluşturmaktadır (Weber ve ark. 1989, Liu 1998). Mikrosatellitler, genomda yaygın olarak bulunmaları, polimorfizm oranının yüksek olması ve kullanımının kolay olması nedeniyle birçok moleküler biyoloji çalışmasında rahatlıkla kullanımı tercih edilmektedir.

Mikrosatellit belirteçlerin kullanım alanları ise kısaca şöyle sıralanabilir;

1. Genetik haritalama (Vaiman ve ark. 1996, Batendse ve ark. 1997, Mohler ve ark. 2005)
2. Ebeveyn tayini (paternity test) ve pedigri çalışmaları (Marklund ve ark. 1994, Glowatzki-Mullis ve ark. 1995, Talbot ve ark. 1996, Luikart ve England 1999, Visscher ve ark. 2002, Gao ve Wu 2005, Bolormaa ve ark. 2008)

3. Akrabalı yetiştirmelerin (inbreeding) seviyesi ve etkisinin belirlenmesi (Zajc ve ark. 1997, Rooney ve ark. 1999, Canon ve ark. 2000, Karhu 2001, Mateus ve ark. 2004).
4. Populasyonların evrim tarihi alışmaları (Buchanan ve ark. 1994, Loftus ve ark. 1999)
5. Gen kaynaklarının korunması alışmaları (Glowatzki-Mullis ve ark. 2008, Kumar ve ark. 2009, Ligda ve ark. 2009)
6. Genetik çeşitliliğin araştırılması (Ganai ve Yadav 2001, Li ve ark. 2002, Ivankovic ve ark. 2005, Sollero ve ark. 2009).
7. Biyolojik materyallerin adli amaçlı kimliklendirilmesi (Schneider ve ark. 1999, Padar ve ark. 2001).

2.4.2. Klonlarda Mikrosatellitler

Mikrosatellitler genomda yaygın olarak bulunmaları, polimorfizm oranının yüksek olması nedeniyle birçok moleküler biyoloji çalışmasında tercih edilmektedir. Klonlama alışmalarında Uluslararası Hayvan Genetiği Derneği (ISAG) ve FAO tarafından bireysel tanımlamada kullanılabileceği belirtilen mikrosatellit belirteçlerden yararlanılmaktadır. alışmalar incelendiğinde klon ve verici hayvanın genomik özdeşliğini belirlemek amacıyla farklı sayılarda mikrosatellitlerin kullanıldığı görülmektedir.

Bir çalışmada; klon buzağılar, taşıyıcı inek ve nükleer verici hücre 17 mikrosatellit belirteci ile incelenmiştir (Inoue ve ark. 1997). Bu çalışmada genomik DNA klon buzağı, alıcı inek ve verici somatik hücrelerden elde edilmiş ve mikrosatellit allelleri bakımından örnekler karşılaştırılmıştır. Analiz sonucu tüm klon buzağıların genomu verici hücreye özdeş ve taşıyıcı anneden farklı olarak bulunmuştur (Kato ve ark. 2000).

Bir başka çalışmada fetal fibroblast hücre hattı kullanılarak klonlanmış buzağı ile hücre hattı arasındaki genetik kimliğin doğrulanması amacıyla genomik DNA, buzağının periferel kan hücrelerinden ve fetal fibroblast hücrelerinden izole edilmiş ve 11 mikrosatellit belirteci (BM2113, TGLA122, BM1818, RM067, ETH10, INR023, TGLA126, SPS115, ETH225, BM1824, RM006) kullanılarak analiz edilmiştir (Mello ve ark. 2003). Analiz sonuçları tüm klon buzağıların kendi verici hayvanları ile özdeş genotipleri olduğunu ortaya koymuştur.

Benzer şekilde Theoret ve ark. (2006),verici hücre olarak fetus dermal fibroblast hücresini kullanarak oluşturdukları  klon sığırdan, onların oluşturulmasında kullanıldıkları verici hücrelerden ve kontrol hayvanların genomlarında 12 mikrosatellit belirteç (BM1824,

BM2113, CSSM36, ETH10, ETH225, ETH3, HEL1, INRA0123, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227) ile analiz yaparak üç klon ve NT’de kullanılan fetal verici fibroblast hücre hattı arasındaki benzerliği doğrulamışlardır.

Tek bir yetişkin Yerli Kore sığır ırkında (Hanwoo); on tane klonunun oluşturulduğu bir çalışmada klonlanmış ve klonlanan sığır ile onun on klonunun genetik özdeş olup olmadığını belirlemek için 6 mikrosatellit belirteç (BM1824, BM2113,ETH10, ETH225, ETH3, SPS115) kullanılmıştır. Bu mikrosatellit belirteçler ile gerçekleştirilen analize klonların taşıyıcı anneleri de dahil edilmiştir. Analizde kullanılan genomik DNA, verici inek, alıcı inek ve on klonlanmış hayvanlardan elde edilen kan örneğinden ekstrakte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar klonlanmış hayvanların genomlarının verici ile aynı ancak taşıyıcı annelerden farklı olduğunu göstermiştir (Yang ve ark. 2012).

DNA örneklerinin klon buzağular ve verici fibroblastlarının aynı genotipe sahip olup olmadığını belirlemek için mikrosatellit analizi kullanılarak karşılaştırıldığı bir başka çalışmada; mikrosatellit analizi, 9 mikrosatellit lokusuna (TGLA57, TGLA73, MGTG4B, AGLA293, TGLA48, TGLA48, TGLA122, TGLA263, TGLA53) dayalı olan “ Sığırlar için babalık testi” kiti (StockMarks™ kit) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mikrosatellit analiz sonuçları, tüm klonların fetal fibroblast hücre hattından geldiğini doğrulamıştır (Zakhartchenko ve ark. 1999).

Klon hayvanların mikrosatellit belirteçler ile moleküler karakterizasyonunun yapıldığı çalışmalar incelendiğinde; ISAG ve FAO tarafından tavsiye edilen belirteçlerden 11 tanesinin yaygın olarak kullanıldığı görülmüştür. Kullanılan bu belirteçler aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 2.1).

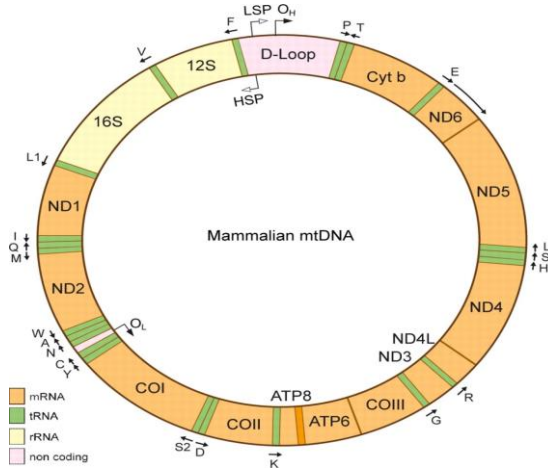
Çizelge 2.1. Klon hayvanların moleküler karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan mikrosatellit belirteçler

BM2113	TGLA126
TGLA122	SPS115
BM1818	ETH225
ETH10	ETH3
INRA23	BM1824

2.5. Hayvanlarda Mitokondriyel Genomun (mtDNA) Yapısı

Genel olarak ökaryotik canlıların sahip oldukları toplam genetik materyal, çekirdek içinde yer alan ve genomik DNA ya da çekirdek DNA (nDNA) olarak ifade edilen kromozomlara ilave olarak mitokondri (mtDNA) ve kloroplast (cpDNA) organellerinde yer alan DNA moleküllerinin tamamından meydana gelmektedir. Hayvan hücrelerinde sadece mitokondriyel DNA, bitki hücrelerinde ise hem mitokondriyel DNA ve hem de kloroplast DNA molekülleri ekstra kromozomal yapılar olarak bulunmaktadır. Sitoplazmik kalıtım materyalleri olarak da tanımlanan mtDNA ve cpDNA molekülleri anaya ait kalıtım modeline sahip olup yumurtanın sitoplazması vasıtasıyla generasyonlar boyunca aktarılmaktadır. Mitokondri bulunduğu hücre bölündüğünde buna bağlı olarak kendi kendine çoğalabilen bir organeldir. Mitokondri iki hücre membranına sahip, kendine özgü DNA molekülü (mtDNA) ve ribozomları olan, çeşitli enzimleri sentezleyebilen ve adenzin trifosfat (ATP) formunda enerji sentezini gerçekleştiren bir organeldir (Ozdil 2007).

Hayvanlarda mtDNA 16.5 kb büyüklüğünde küçük, dairesel ikili sarmal bir DNA molekülüdür (Rokas ve ark. 2003). Mtdna molekülünün dairesel, ikili sarmal bir DNA molekülünden oluşması, bu molekülün yapı olarak prokaryotik genetik materyaline olan benzerliğini açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 2.5. mtDNA yapısı (Anonim, 2011)

2.5.1 Doğal Üremde mtDNA Geçişi

MtDNA'nın anne orjinli olduğunun düşünülmesinin birkaç sebebi vardır. Bunlardan ilki anne ve babadan gelen mtDNA miktarındaki büyük farklılıktır. Sığır yumurtasındaki mtDNA moleküllerinin sayısı yaklaşık olarak 9.5×10^5 (Smith ve ark. 2005) dir. Buna karşılık sperma 10 adet mtDNA kopyasına sahiptir (May-Panloup ve ark. 2003). İkincisi;

embriyogenezisin blastosist (100 hücre) dönemine kadar mtDNA replikasyonu olmaması böylece blastosistin fetusu yapacak olan 20 hücreden oluşan iç hücre kitlesindeki her bir hücrede mtDNA miktarı 1000 kopya kadar olmasıdır (Piko ve Taylor 1987). Üçüncüsü ise babaya ait mtDNA'nın sperm ile yumurtaya girdikten kısa bir süre sonra hızla elimine edilmesidir (King ve Attardi 1989).

Buna karşın baba orjinli mtDNA varlığı ilk olarak türler arası hibridlerde tespit edilmiştir. Tür içi yapılan çalışmalar ise babadan gelen mtDNA'nın elimine edildiğini göstermektedir. Bu çalışmalar baba orjinli mtDNA'nın yumurta içinde dışlanma mekanizmasının mtDNA'dan ziyade sperma mitokondrisinin o türe spesifik proteininin tanınması sonucu mitokondrinin degrades edilmesi olduğunu göstermiştir (Sutovsky ve ark. 1999).

Ancak 2002 yılında bazı hastalarda baba orjinli mtDNA varlığının kas dokularında tespiti, türe özel anasal orjinli mtDNA kalıtımı inancını sarsmıştır (Schwartz ve Vissing 2002). Yapılan ilave analizler mtDNA rekombinasyonunun iskelet kasında yaygın olduğunu göstermektedir. MtDNA kalıtımı ile ilgili hala çelişkili sonuçlar bildirilmektedir ve bu konu henüz tam olarak netlik kazanmamıştır.

2.5.2. Moleküler Genetik Çalışmalarda mtDNA'nın Kullanıldığı Yerler

Populasyon genetiği, filogenetik çalışmalar, tür içi ve türler arasındaki genetik benzerlik/farklılıkların ortaya konulması amacıyla yapılan araştırmalarda mtDNA molekülünün iki önemli özelliğinden yararlanılmaktadır. Bu özellikler; mtDNA molekülünde yeni kombinasyonların oluşmaması, mtDNA molekülünün anaya ait kalıtım modeline sahip olmasıdır (Avisé 2004).

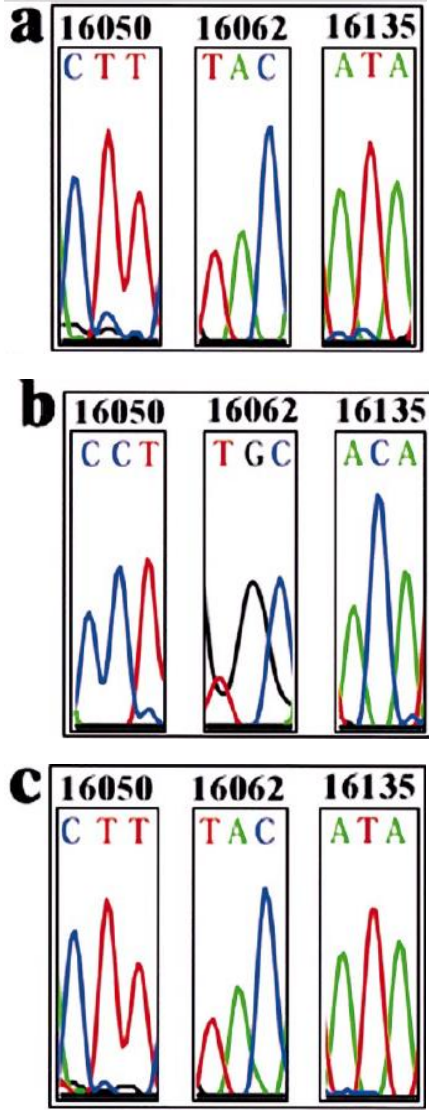
Genel olarak mtDNA belirteçleri; populasyonların tanımlanması, populasyon ve ekotiplerin orijinlerinin belirlenmesi, populasyonların coğrafi dağılımlarının ortaya konması, alttür içerisindeki haplotiplerin belirlenmesi, populasyonlar arasındaki gen akışı ve hibritlenme seviyelerinin tahmin edilmesi, anaya ait (maternal) kalıtım modellerinin izlenmesi, populasyonlar içi/arası genetik varyasyon düzeylerinin hesaplanması ve populasyonların genetik benzerlik ve farklılıklarından yararlanılarak filogenetik ilişkilerin tespit edilmesi, çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. mtDNA, rekombinasyon eksikliğinin tespiti ve genetik olarak klonlanan canlıların kalıtımının tespit edilmesinde de yaygın kullanılmaktadır (Rokas ve ark. 2003).

mtDNA'nın D-loop bölgesi mevcut herhangi bir gen üretmediği için kodlanmamakta; bu nedenle bu bölgede gerçekleşen dizi varyasyonun metabolik zincir üniteleri olan özel aminoasit dizilerini değiştirmemesi beklenmektedir. mtDNA'nın ağır ve hafif zincirlerinin replikasyon orjinlerine ilave olarak transkripsiyon için gerekli promoterler de D-loop bölgesi içinde uzanmaktadır. Bu sebeple mtDNA'daki herhangi bir dizi farklılığı replikasyon ve transkripsiyon üzerine etkisiyle kendisini gösterir. Ayrıca bazı özelliklerin fenotipe yansımaları doğrudan etkileyen genlerin kodlanma bölgesinde oluşacak böyle bir D-loop polimorfizmi marker olarak kullanılabilir (Schutz ve ark. 1994).

2. 6. Klon Hayvanlarda mtDNA

Klonlar özel hayvanlar oldukları için mtDNA yapıları ile ilgili çeşitli sonuçlar bildirilmiştir. Yetişkin somatik hücre hattından klonlanan ilk hayvan "Dolly" ve fetal hücre hattından nükleer transfer ile türetilmiş koyunların mtDNA kökenini rapor etmek amacıyla yapılan bir çalışmada; elde edilen koyunların mtDNA'sına somatik hücre vericisinin hiçbir katkısı olmadığı saptanmış ve mtDNA'nın yumurta kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Bu koyunlar özgün nükleer klonlar olmalarına rağmen, aslında somatik hücre kökenli nükleer DNA fakat yumurta kökenli mtDNA içeren genetik kimeralar olarak tanımlanmıştır (Evans ve ark. 1999).

Klonların mtDNA'sının araştırıldığı çoğu çalışmada mtDNA D-loop bölgesinin sekans analizleri yapılarak klon ve verici hücrelerin mtDNA'ları karşılaştırılmıştır. Örneğin; sığırlarda nükleer transfer sonrası preimplantasyon gelişimi sırasında hücre vericisi mtDNA'sının akıbetinin incelendiği bir çalışmada; dondurulup-çözdürülmüş kumulus hücreleri nükleer transfer işleminde verici hücre olarak kullanılmıştır. Nükleer transfer ile türetilmiş blastosistlerde, alıcı yumurta ve verici hücrelerde mtDNA D-loop bölgesi dizi analizi yapılarak karşılaştırılmıştır. Mitokondriyal D-Loop bölgesinde 16050, 16062 ve 16135 pozisyonlarında verici hücre ile yumurta arasında farklılıklar tespit edilmiştir. Hücre vericisinin mitokondriyal DNA'sında 16050, 16062 ve 16135 pozisyonlardaki nükleotidler sırasıyla sitosin (C), guanin (G), ve C iken (Şekil 2.6 (b)) alıcı yumurta ve NT blastosistlerin mtDNA'sında aynı pozisyonlarda nükleotidlerin sırasıyla timin (T), adenin (A) ve T olduğu görülmüştür (Şekil 2.6 (a) , (c)).



Şekil 2.6. mtDNA D-loop bölgesi 16050, 16062, 16135 pozisyonlarındaki nükleotidler (Tae Do ve ark. 2002)

NOT: a)alıcı yumurta, b)verici hücre, c)NT ile üretilmiş blastosist

Nesli tehlike altında olan türlerin, türler arası nükleer transfer işlemi ile korunup korunamayacağını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada; nesli tehlike altındaki “*Bos Gaurus*” somatik hücre kaynağı ve “*Bos Taurus*” yumurta kaynağı olarak kullanılarak nükleer transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Nükleer transfer işlemi ile elde edilen fetüslerde mtDNA’nın kökeni polimorfik belirteç analizleri ile tespit edilmiştir. Bu analizler 11 farklı doku tipinde (beyin, karaciğer, kas, göz, gonad, kalp, bağırsak, akciğer, deri, dil ve böbrek) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar tüm doku tiplerinde mtDNA kökeninin yumurta kaynaklı yani “*Bos Taurus*” ırkıdan olduğunu göstermiştir (Steinborn ve ark. 2000).

Benzer bir çalışmada “*Bos Taurus*” yumurta içine “*Bos Indicus*” hücresinin transferi ile oluşturulmuş klon “*Bos Indicus*” buzağısında, mtDNA’nın yumurta kökenli olduğu ve “*Bos Indicus*” mtDNA’sının erken embiyonik gelişim sırasında elimine edildiği rapor edilmiştir (Meirelles ve ark. 2001).

Plante ve ark. (1992) yaptıkları mtDNA analizinde 4 klon boğa arasında mtDNA polimorfizmi tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar klonların her birinin farklı bireylerden alınan yumurtalar kullanılarak oluşturulmuş olması nedeniyle farklı mtDNA genotipleri gösterdiklerini ve tüm klonların mtDNA’sının yumurta kaynaklı olduğunu öne sürmüşlerdir. Benzer şekilde bir başka çalışmada da nükleer transfer ile elde edilen sığırların her birinde verici hücrenin değil sadece alıcı yumurtanın mtDNA genotipinin tespit edildiği ve klonların mtDNA’larının alıcı yumurta kökenli olduğu belirlenmiştir (Takeda ve ark. 1999).

3.MATERYAL VE METOD

3.1.Materyal

Çalışmada daha önce “TÜBİTAK-TOVAG-104O360-Anadolu Yerli Sığır Irklarının Klonlanması” projesi (Anonim, 2010) ile üretilmiş 5 klon boz sığır (1 erkek, 4 dişi) ve bu klonların yavruları (2 erkek, 4 dişi), klonların üretilmesinde kullanılan 3 hücre hattı (kıkırdak, fibroblast, granüloza) kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Dişi klonların hepsi tek bir boz sığırın farklı hücreleri (kıkırdak, granuloza) kullanılarak elde edilmiştir. Tüm klonların üretilmesinde alıcı stoplazma olarak holstain sığırların yumurtaları kullanılmıştır. Klon yavrularının hepsinin anneleri klondur ancak bir tanesinin babası erkek klonun hücre vericisi olan asıl boğa, diğer bir tanesinin ise babası bir holstain boğadır. Diğer yavruların ise hem annesi hem babası klondur. Yavrular ve ebeveynleri ile ilgili bilgi Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Klon hayvanlar ve yavrularından alınan kan örnekleri ile klonlanan hayvanların asıllarına ait hücre örnekleri ve Klon 1 (EFE)’den alınan sperm örneğinden DNA izolasyonu yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan klonlar, hücre kaynakları ve hücre tipleri

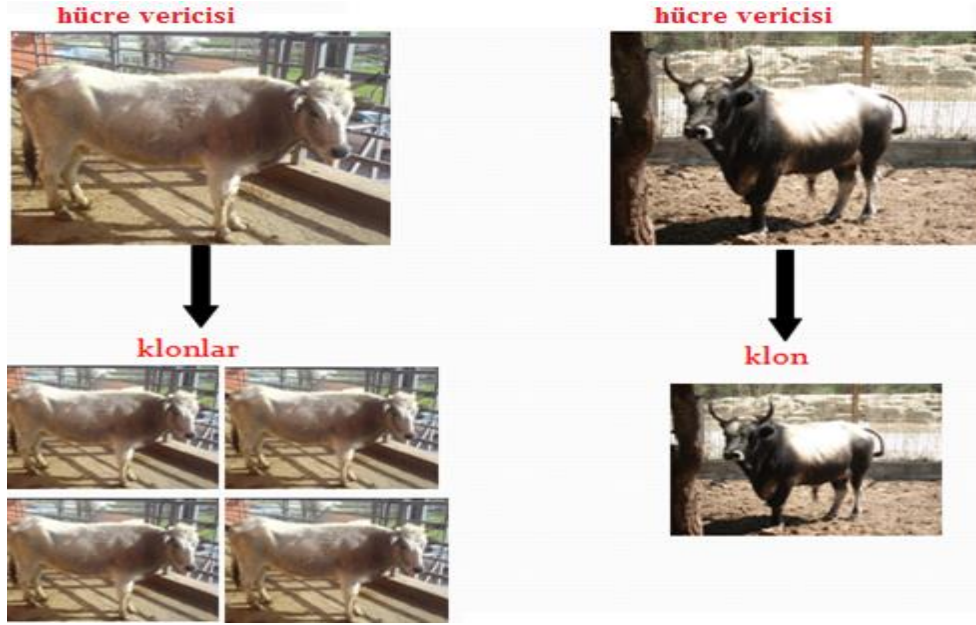
Klonlar	Hücre Kaynağı	Hücre Tipi
Klon 1	Hücre Vericisi 1	Fibroblast
Klon 2, 3, 4	Hücre Vericisi 2	Granüloza
Klon 5	Hücre Vericisi 2	Kıkırdak

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan klon yavruları ve ebeveynleri

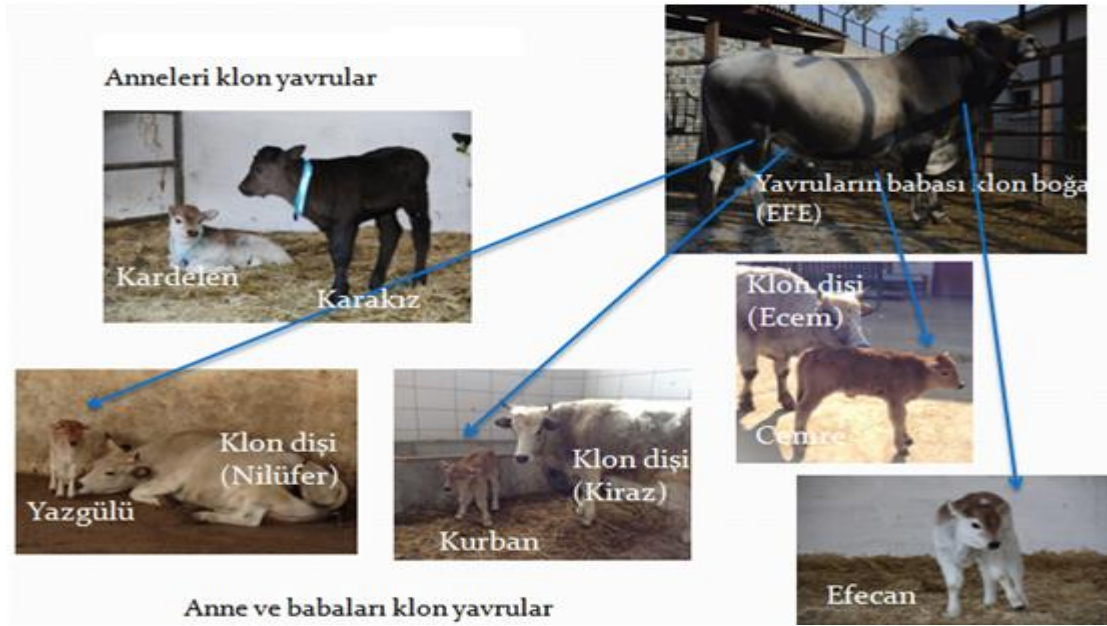
Yavrular	Ebeveynleri
Cemre (K1.K3.1):	Klon 1 (Efe) ve Klon 3 (Ecem) ’ün 1. yavrusu
Efecan (K1.K3.2)	Klon 1 (Efe) ve Klon 3 (Ecem) ’ün 2. yavrusu
Kardelen (H1.K4.1)	Hücre vericisi 1 ve Klon 4 (Nilüfer)’ün 1. yavrusu
Yazgülü (K1.K4.1)	Klon 1 (Efe) ve Klon 4 (Nilüfer)’ün 1. yavrusu
Karakız (K5.1)	Klon 5 (Kiraz)’in 1. Yavrusu (baba holstain)
Kurban (K1.K5.1)	Klon 1 (Efe) ve Klon 5 (Kiraz)’in 1. yavrusu

3.1.1. Kullanılan Materyallerin Özellikleri

Bu yüksek lisans çalışmasında karakterizasyonu yapılacak klonların üretilmesinde de üç farklı hücre tipi kullanılmıştır. Bu hücre tipleri fibroblast, kıkırdak ve granuloza hücreleridir. Bunlardan kıkırdak hücresi ilk kez klonlama işleminde kullanılmıştır (Şekil 3.1 ve 3.2).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan 4 dişi, 1 erkek klon ve hücre vericisi hayvanlar



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan klonlar ve yavruları

3.1.2.Kullanılan Cihaz Ve Teçhizat

Tez çalışmasının değişik aşamalarında kullanılan cihaz ve teçhizat genel olarak Çizelge 3.3.'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışma da Kullanılan Cihaz ve Aletler

Cihaz	Model
Buzdolabı +40C	Profilo, Türkiye
Hassas terazi	AND GF-600, Hollanda
Otoklav	Alp CL40M, ABD
Ph Metre	Jenco 6173, ABD
Ultra saf su cihazı	Millipor Direct-Q 3 UV, ABD
Soğutmalı Santrifüj (+4°C)	Hettich 320R, Almanya
Mikrodalga fırın	Beko, Türkiye
PZR Isısal Döngü Cihazı (Thermal Cycler)	Applied Biosystem, Veriti, Profilex, ABD
Vorteks	Biosan, Letonya
Jel görüntüleme sistemi	Vilber Lourmart Avustralya
Laminar Flow Kabin	Healforce HF Safe 1200, Çin
-80 oC Derin dondurucu	Hettich, Almanya
Su banyosu,	DAIHAN WB-11, Kore
Santrifüj	Hettich Universal 320, Almanya
CO ₂ İnkübatör	Panasonic, Japonya
Ters Mikroskop	BOECO-BAB DCM 510, Almanya

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar

Moleküler ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve hazırlanan çözeltiler çizelge 3. 4. ve çizelge 3.5'te özetlenmiştir.

Çizelge 3.4. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

<u>NETS LYSIS BUFFER</u> 0,01M NaCl 1µM EDTA 0,01 M Tris (pH=8.0) % 0,05 SDS	<u>10XTBE</u> 108 g Tris 55 g Borik Asit 9,3 g EDTA-Na2	<u>10XLYSIS BUFFER</u> 770 mM NH4Cl 46 mM KHCO3 10 mM EDTA
<u>Digestion Buffer</u> (pH=8.0) 10 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 1 mM EDTA	<u>TE</u> (pH=7.5) 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA	<u>SALT EDTA</u> 75 mM NaCl 25 mM EDTA
<u>Proteinaz K</u> (10 mg/ml) 100 mg Proteinaz K 10 ml dH ₂ O	<u>SDS</u> (% 10) 10 gr SDS 100 ml dH ₂ O	<u>SDS</u> (% 20) 20 gr SDS 100 ml dH ₂ O

Çizelge 3.5. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

<u>STOK DMEM/F12</u> (pH:7,2-7,4) 12 g DMEM 2,438 g sodyum bikarbonat 1000 ml dH ₂ O	<u>DMEM/F12</u> % 10 FBS % 1 antibiyotik % 79 stok DMEM	<u>Dondurma Medyumu</u> % 20 DMSO % 80 FBS
--	--	--

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA İzolasyonu Yapılacak Materyalin Toplanması

3.2.1.1. Kan ve sperma örneklerinin alınması

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde barındırılan 3 klon boz sığır (1 erkek, 2 dişi) ve 2 yavru'dan toplam 10 ml olacak şekilde kan örnekleri K₃EDTA'lı tüplere alınmış ve DNA izolasyonunun yapılacağı zamana kadar -20 °C'de saklanmıştır. Ayrıca 1 erkek klon boz sığırın dondurulmuş halde ki sperm örneği alınmıştır.

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde bakılan klon boz sığır (2 dişi) ve 4 yavru'dan toplam 10 ml olacak şekilde kan örnekleri K₃EDTA'lı tüplere alınmış ve DNA izolasyonunun yapılacağı zamana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.1.2. Hücre kültürü

Klonların üretilmesinde kullanılan hücre hatları ise; Tübitak-Marmara Araştırma Merkezi'nden temin edilmiş, üniversitemiz "Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü" Hayvan Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda çoğaltılmış ve dondurulmuştur.

Hücreler %10 fetal buzağı serumu (FBS), %1 antibiyotik içeren hücre kültür medyumunda (DMEM-F12) % 5 CO₂ 'li inkübatörde 37°C'de kültüre edilmistir. Hücreler konfluent olduktan sonra petrilereki medyum çekilerek petrilere Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Tuzu (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS) ile yıkanmış, % 0,25 tripsin-EDTA solusyonu eklenerek 5 dakika boyunca 37° C ve % 5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır. İnkübasyon sonrası konulan tripsinin inaktive olması için kullanılan tripsin miktarının 2 katı kadar %10 fetal buzağı serumu (FBS), %1 antibiyotik içeren DMEM/F12 eklenerek hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş, ardından %10 FBS, %1 antibiyotik içeren DMEM/F12 ile sulandırılarak 60 mm'lik kültür petrilere ekilmiştir. Aynı zamanda bir kısım hücreler dondurularak saklanmıştır. Kültür kaplarını kaplayan hücreler tripsinlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirildikten sonra %80 FBS ve %20 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren ve +4° C'de saklanan dondurma medyumuna ve DMEM/F12 içinde süspanse olarak bulunan hücreler 1:1 oranında karıştırılarak dondurma tüplerine aktarılmıştır. Hücreleri içeren dondurma tüplerindeki son konsantrasyon %40 FBS, %10 DMSO ve %50 DMEM/F12 olmuştur. Tüpler sıcaklığı 1°C/dk düşüren dondurma kabı içerisine yerleştirilmiş ve dondurma kabı -80° C derin dondurucuya konmuştur.

3.2.2. DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden DNA izolasyonu; standart fenol/kloroform yöntemi (Sambrook ve ark. 1989) kullanılarak yapılmıştır. 50 ml'lik falkon tüplere 10 ml kan örneği konulduktan sonra üzerine 2X Lysis buffer çözeltisi ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Tüpler ters düz edilerek nazikçe 10 dakika (dk) karıştırıldıktan sonra gece boyunca buz içerisinde +4 °C'de bekletilmiştir. Sonraki gün buzdan alınan tüpler 10-15 dk. rotatorda karıştırılmıştır. 3000 rpm'de +4 °C'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpün süpernatant fazı dökülüp (tüpdeki tüm solüsyonlar dökülür) ve tüpteki pellet üzerine 3 ml Tuz / EDTA solüsyonu, 300 µl %10'luk SDS ve 150 µl proteinaz K (10 mg / ml) eklenip vortekste iyice karıştırılmıştır. Vorteksleme işlemi sonrası 55 °C'de 3 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda alınan tüplerin üzerine 3 ml fenol (pH 8,0) eklenmiştir. Tüpler vorteksledikten sonra 15 dk. rotatorda karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra 3000 rpm de +4 °C de 15 dk. santrifüj edilip süpernatant kısmı yeni steril tüplere alınmıştır. Üzerine 3 ml fenol: kloroform: isoamil alkol (25:24:1) eklenerek tüpler tekrar vortekslenip 15 dk. rotatorda karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler 3000 rpm de +4 °C de 15 dk santrifüje bırakılmıştır. Oluşan yeni üst faz (süpernatant kısmı) cam tüplere alınıp üzerine soğuk haldeki (-20°C) % 96'lık etanol eklenerek DNA peleti görünür hale getirilmiştir. Görünür hale gelen DNA pipet yardımı ile çekilerek ependorf içerisine aktarılmıştır. Daha sonra 9670 rpm'de 6,5 dk +4 °C de santrifüj edilmiştir. Üstteki alkol döküldükten sonra pellet kurutulup 400 µl TE ile sulandırılmıştır.

Hücre örneklerinden DNA izolasyonu işleminde ilk olarak dondurulmuş haldeki hücreler +37°C'deki su banyosunda çözdürüldükten sonra DMEM-F12 hücre kültür medyumu ile sulandırılıp 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant vakum aracılığıyla çekildikten sonra pelet 200 µl PBS ile sulandırılmıştır. Üzerinde 30 µl proteinaz K (20 mg/ml), 30 µl RNAse (5 mg/ml) ve 400 µl NETS buffer eklenerek 65°C' de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 600 µl fenol: kloroform: isoamil alkol (25:24:1) eklenerek 13.000 rpm'de 7 dk. santrifüj edilmiştir. Üst faz alınıp yeni bir ependorf tüp içerisine aktararak üzerine 600 µl kloroform : isoamil alkol (24:1) eklenip 13.000 rpm'de 7 dk. santrifüj edilmiştir. Üst faz alınıp yeni tüpe aktararak üzerine alınan fazın %10'u kadar sodyum asetat (3M), 2,5 katı kadar soğuk saf alkol eklenerek gece boyu -20°C'de bekletilmiştir. Tüpler 13.000 rpm'de 7 dk. santrifüj edilerek üst faz atılarak 2 kez %70'lik etanol ile yıkanmıştır. Daha sonra alkol dökülerek pelet kurumaya bırakılmış, kuruduktan sonra 100 µl TE ile sulandırılmıştır.

Sperm örneğinden DNA izolasyonu iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada ilk olarak 2 ml'lik ependorfa yaklaşık 300 µl "high vacuum grase jel" konulmuştur. 1,5 ml'lik ependorf tüpe, vial içerisindeki sperm boşaltılmış ve 1dk. 13000 rpm de santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüpten süpernatant atılmış ve pelet 500 µl digestion buffer ile sulandırılmıştır. Bufferla resüspanse edilen bu karışım içerisinde "high vacuum grase jel" bulunan 2 ml'lik tüpe aktarılmış ve bu karışım üzerine 25 µl %20 lik SDS eklenmiştir. Daha sonra 50 µl (10 mg/ml) proteinaz K eklenip ve son olarak 25 µl (1M) DTT (dithiothreitol) eklenmiştir. Bu karışım el ile baş aşağı ederek karıştırılmış ve 37°C de 180 rpm de çalkalayıcı da 13-15 saat inkübe edilmiştir. İkinci aşama da inkübe edilen karışım üzerine 500 µl fenol eklenmiş ve karışım 10 dk. el ile aşağı yukarı edilerek çalkalanmıştır. Üzerine 500 µl kloroform : izoamil alkol (24:1) eklenmiş ve karışım 10dk el ile aşağı yukarı edilerek çalkalanmıştır. Daha sonra karışım 15 dk 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpteki üst faz alınarak yeni bir 1,5ml'lik ependorfa aktarılmıştır. Alınan üst faz üzerine 800 µl soğuk izopropanol eklenmiş ve 3 dk. 13000 rpm de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpteki izopropanol dökülmüş ve pelet 2 kez %70 lik etanol ile yıkanmıştır (Her bir yıkama sonrası 3dk. Santrifüj edilmiş ve etanol dökülmüştür). Etanol döküldükten sonra yaklaşık 15 dk hava ile peletin kuruması beklenmiş ve pelet kuruduktan sonra 100 µl TE ile sulandırılmıştır.

3.2.3 DNA Kalitesinin Kontrolü

DNA örneklerinin miktar kontrolleri Qubit 2,0 Fluorometer (Invitrogen) kullanılarak kontrol edilmiştir. DNA örneklerinin kalitesi ve miktarının kontrolünde agaroz jel elektroforez sistemi de kullanılmıştır. DNA bantları %0,8'lik agaroz jellerde gözlemlenmiştir. Mini agaroz tankının kullanıldığı durumda 0,800 gr agaroz 100 ml (1X) TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritilerek hazırlanmıştır. Daha sonra bu karışım içerisine DNA bantlarının UV ışık altında görünür hale getirebilmek için 2,5 µl Red-Safe (10mg/ml) ilave edilmiştir. Karışım tarak içeren jel tepsisine dökülerek oda sıcaklığında donması için beklenmiş, ardından tarak dikkatlice alınmıştır. Daha sonra 3 µl DNA örneğine 3 µl loading dye solusyonu ile 7 µl dH₂O (distile su) ilave edilmiştir. Karışımın tamamı jelin kuyucuklarına yüklenmiş ve jel 100 V voltajda ve 500 A akımda 30 dakika yürütülmüştür. Elektroforez içerisindeki tampon 1X TBE tamponudur. Jel UV ışığında gözlemlenmiş ve görüntüleme sisteminde elde edilen jel görüntüleri bilgisayara kaydedilmiştir.

3.2.4 Çalışmada Kullanılan Mikrosatellit Belirteçler

Çalışmada 10 farklı mikrosatellit belirteci (TGLA122, ETH225, ETH10, TGLA227, BM1824, INRA23, SPS115, ETH3, BM1818) ile çalışılmıştır (Çizelge 3.6). Bu 10 sığır mikrosatellit belirteci Uluslar arası Hayvan Genetiği Derneği (ISAG-International Society of Animal Sciences) ve FAO MoDAD (Measurement of Domestic Animal Diversity) tarafından tavsiye edilen belirteç listesinden (Hoffmann ve ark. 2004) seçilmiştir.

Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan mikrosatellit belirteçleri

Mikrosatellit Belirteci	Allel Uzunluğu	Bağlanma Sıcaklığı	Bulunduğu Kromozom	Literatür
TGLA122	134-193	58 °C	21	Georges ve Massey 1992
ETH225	135-165	52 °C	9	Steffen ve Eggen 1993
ETH10	198-234	55 °C	5	Solinos Tolda ve Fries 1993
TGLA227	64-115	56 °C	18	Barendse ve ark. 1994
BM1824	170-218	59 °C	1	Bishop ve Kappes 1994
INRA23	193-235	57 °C	3	Vaiman ve Mercie 1994
SPS115	235-265	50.7 °C	15	Mommens ve ark. 1998
ETH3	90-135	62 °C	19	Solinos Tolda ve Fries 1993
BM1818	248-278	55 °C	23	Slate 2000
INRA63	174-190	57.6 °C	18	Vaiman ve Mercie 1994

A) TGLA122 İsimli Mikrosatellit Bölgesi

Ticari ismi TGLA122 olan mikrosatellit DNA bölgesinin primer dizilimleri ve kromozom sayısı aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. TGLA122 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler

Kromozom :	21. Kromozom
Allel Uzunluğu :	134-193 bp
Primer (ileri)	CCCTCCTCCAGGTAATCAGC
Primer (geri)	AATCACATGGCAAATAAGTACATAC

Bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler ve yükseltgenme koşulları aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.8, Çizelge 3.9). Bu bileşenlerin tümü belirtilen miktarlarda 200 µl'lik PZR ependorf tüpüne konulmuştur.

Çizelge 3.8. TGLA122 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri

Bileşenler	PZR Karışımına Konulan Miktar	Stok Konsantrasyonlar
DNA	1,5 µl	
1XPZR buffer	2 µl	10X
0,25 mM dNTP	0,5 µl	10 mM
1,5 mM MgCl ₂	1,2 µl	25 mM
0,2 µM primer (ileri ve geri)	0,4 µl	10 µM/ µl
0,5 u Taq Polimeraz	0,1 µl	5 u/ µl
Yukarıdaki bileşim dH ₂ O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır.		

Çizelge 3.9. TGLA122 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	94 °C (denatürasyon sıcaklığı)	5 dakika	1 döngü
2. Basamak	94 °C 'de 58°C'de(primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı) 72 °C'de	30 saniye 30 saniye 2 dakika	30 döngü
3. Basamak	72 °C'de	15 dakika	1 döngü

B) ETH225 İsimli Mikrosatellit Bölgesi

Ticari ismi ETH225 olan mikrosatellit DNA bölgesinin primer dizilimleri ve kromozom sayısı aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. ETH225 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler

Kromozom :	9. Kromozom
Allel Uzunluğu :	135-165 bç
Primer (ileri)	GATCACCTTGCCACTATTTCT
Primer (geri)	ACATGACAGCCAGCTGCTACT

Bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler ve yükseltgenme koşulları aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.11, Çizelge 3.12) . Bu bileşenlerin tümü belirtilen miktarlarda 200 µl'lik PZR ependorf tüpüne konulmuştur.

Çizelge 3.11. ETH225 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri

Bileşenler	PZR Karışımına Konulan Miktar	Stok Konsantrasyonlar
DNA	2 µl	
1XPZR buffer	2 µl	10X
0,25 mM dNTP	0,5 µl	10 mM
1,5 mM MgCl ₂	1,2 µl	25 mM
0,2 µM primer (ileri ve geri)	0,5 µl	10 µM/ µl
0,5 u Taq Polimeraz	0,1 µl	5 u/ µl
Yukarıdaki bileşim dH ₂ O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır.		

Çizelge 3.12. ETH225 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	95 °C (denatürasyon sıcaklığı)	3 dakika	1 döngü
2. Basamak	94 °C 'de 52°C'de(primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı) 72 °C'de	20 saniye 20 saniye 40 saniye	35 döngü
3. Basamak	72 °C'de	20 dakika	1 döngü

C) ETH10 İsimli Mikrosatellit Bölgesi

Ticari ismi ETH10 olan mikrosatellit DNA bölgesinin primer dizilimleri ve kromozom sayısı aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.13. ETH10 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler

Kromozom :	5. Kromozom
Allel Uzunluğu :	198-234 bç
Primer (ileri)	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA
Primer (geri)	CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC

Bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler ve yükseltgenme koşulları aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.14, Çizelge 3.15). Bu bileşenlerin tümü belirtilen miktarlarda 200 µl'lik PZR ependorf tüpüne konulmuştur.

Çizelge 3.14. ETH10 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri

Bileşenler	PZR Karışımına Konulan Miktar	Stok Konsantrasyonlar
DNA	1,5 µl	
1XPZR buffer	2 µl	10X
0,25 mM dNTP	0,5 µl	10 mM
1,25 mM MgCl ₂	1 µl	25 mM
0,2 µM primer (ileri ve geri)	0,4 µl	10 µM
0,5 u Taq Polimeraz	0,1 µl	5 u/ µl
Yukarıdaki bileşim dH ₂ O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır.		

Çizelge 3.15. ETH10 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	94 °C (denatürasyon sıcaklığı)	3 dakika	1 döngü
2. Basamak	94 °C 'de 55°C'de(primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı) 72 °C'de	30 saniye 30 saniye 2 dakika	30 döngü
3. Basamak	72 °C'de	15 dakika	1 döngü

D) TGLA227 İsimli Mikrosatellit Bölgesi

Ticari ismi TGLA227 olan mikrosatellit DNA bölgesinin primer dizilimleri ve kromozom sayısı aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.16) .

Çizelge 3.16. TGLA227 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler

Kromozom :	18. Kromozom
Allel Uzunluğu :	64-115 bç
Primer (ileri)	CGAATTCAAATCTGTTAATTTGCT
Primer (geri)	ACAGACAGAAACTCAATGAAAGCA

Bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler ve yükseltgenme koşulları aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.17, Çizelge 3.18) . Bu bileşenlerin tümü belirtilen miktarlarda 200 µl'lik PZR ependorf tüpüne konulmuştur.

Çizelge 3.17. TGLA227 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri

Bileşenler	PZR Karışımına Konulan Miktar	Stok Konsantrasyonlar
DNA	2 µl	
1XPZR buffer	2 µl	10X
0,25 mM dNTP	0,5 µl	10 mM
1,8 mM MgCl ₂	1,44 µl	25 mM
0,4 µM primer (ileri ve geri)	0,8 µl	10 µM
0,5 u Taq Polimeraz	0,1 µl	5 u/ µl
Yukarıdaki bileşim dH ₂ O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır.		

Çizelge 3.18. TGLA227 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	94 °C (denatürasyon sıcaklığı)	4 dakika	1 döngü
2. Basamak	94 °C 'de 56°C'de(primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı) 72 °C'de	1 dakika 1 dakika 2 dakika	30 döngü
3. Basamak	72 °C'de	10 dakika	1 döngü

E) BM1824 İsimli Mikrosatellit Bölgesi

Ticari ismi BM1824 olan mikrosatellit DNA bölgesinin primer dizilimleri ve kromozom sayısı aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.19).

Çizelge 3.19. BM1824 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler

Kromozom :	1. Kromozom
Allel Uzunluğu :	170-218 bç
Primer (ileri)	GAGCAAGGTGTTTTCCAATC
Primer (geri)	CATTCTCCAACCTGCTTCCTTG

Bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler ve yükseltgenme koşulları aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.20, Çizelge 3.21) . Bu bileşenlerin tümü belirtilen miktarlarda 200 µl'lik PZR ependorf tüpüne konulmuştur.

Çizelge 3.20. BM1824 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri

Bileşenler	PZR Karışımına Konulan Miktar	Stok Konsantrasyonlar
DNA	2 µl	
1XPZR buffer	2 µl	10X
0,25 mM dNTP	0,5 µl	10 mM
2 mM MgCl ₂	1,6 µl	25 mM
0,25µM primer (ileri ve geri)	0,5 µl	10 µM/ µl
0,5 u Taq Polimeraz	0,1 µl	5 u/ µl
Yukarıdaki bileşim dH ₂ O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır.		

Çizelge 3.21. BM1824 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	94 °C (denatürasyon sıcaklığı)	4 dakika	1 döngü
2. Basamak	94 °C 'de 59°C'de(primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı) 72 °C'de	1 dakika 1 dakika 2 dakika	30 döngü
3. Basamak	72 °C'de	10 dakika	1 döngü

F) INRA23 İsimli Mikrosatellit Bölgesi

Ticari ismi INRA23 olan mikrosatellit DNA bölgesinin primer dizilimleri ve kromozom sayısı aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.22) .

Çizelge 3.22. INRA23 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler

Kromozom :	3. Kromozom
Allel uzunluğu:	193-235 bç
Primer (ileri)	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC
Primer (geri)	TAACTACAGGGTGTAGATGAACTCA

Bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler ve yükseltgenme koşulları aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.23, Çizelge 3.24) . Bu bileşenlerin tümü belirtilen miktarlarda 200 µl'lik PZR ependorf tüpüne konulmuştur.

Çizelge 3.23. INRA23 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri

Bileşenler	PZR Karışımına Konulan Miktar	Stok Konsantrasyonlar
DNA	2 µl	
1XPZR buffer	2 µl	10X
0,25 mM dNTP	0,5 µl	10 mM
1,75 mM MgCl ₂	1,4 µl	25 mM
0,25µM primer (ileri ve geri)	0,5 µl	10 µM/ µl
0,5 u Taq Polimeraz	0,1 µl	5 u/ µl
Yukarıdaki bileşim dH ₂ O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır.		

Çizelge 3.24. INRA23 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	94 °C (denatürasyon sıcaklığı)	4 dakika	1 döngü
2. Basamak	94 °C 'de 57°C'de(primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı) 72 °C'de	1 dakika 1 dakika 2 dakika	30 döngü
3. Basamak	72 °C'de	10 dakika	1 döngü

G) SPS115 İsimli Mikrosatellit Bölgesi

Ticari ismi SPS115 olan mikrosatellit DNA bölgesinin primer dizilimleri ve kromozom sayısı aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.25) .

Çizelge 3.25. SPS115 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler

Kromozom :	15. Kromozom
Allel Uzunluğu :	235-265 bç
Primer (ileri)	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG
Primer (geri)	AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG

Bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler ve yükseltgenme koşulları aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.26, Çizelge 3.27). Bu bileşenlerin tümü belirtilen miktarlarda 200 µl'lik PZR ependorf tüpüne konulmuştur.

Çizelge 3.26. SPS115 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri

Bileşenler	PZR Karışımına Konulan Miktar	Stok Konsantrasyonlar
DNA	2,5 µl	
1XPZR buffer	2 µl	10X
0,5 mM dNTP	1 µl	10 mM
1,8 mM MgCl ₂	1,5 µl	25 mM
0,5 µM primer (ileri ve geri)	1 µl	10 µM/ µl
0,5 u Taq Polimeraz	0,1 µl	5 u/ µl
Yukarıdaki bileşim dH ₂ O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır.		

Çizelge 3.27. SPS115 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	94 °C (denatürasyon sıcaklığı)	5 dakika	1 döngü
2. Basamak	94 °C 'de 50,7°C'de(primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı) 72 °C'de	30 saniye 30 saniye 1 dakika	30 döngü
3. Basamak	72 °C'de	15 dakika	1 döngü

H) ETH3 İsimli Mikrosatellit Bölgesi

Ticari ismi ETH3 olan mikrosatellit DNA bölgesinin primer dizilimleri ve kromozom sayısı aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.28).

Çizelge 3.28. ETH3 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler

Kromozom :	19. Kromozom
Allel Uzunluğu :	90-135
Primer (ileri)	GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG
Primer (geri)	ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG

Bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler ve yükseltgenme koşulları aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.29, Çizelge 3.30). Bu bileşenlerin tümü belirtilen miktarlarda 200 µl'lik PZR ependorf tüpüne konulmuştur.

Çizelge 3.29. ETH3 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri

Bileşenler	PZR Karışımına Konulan Miktar	Stok Konsantrasyonlar
DNA	2,5 µl	
1XPZR buffer	2 µl	10X
0,25 mM dNTP	0,5 µl	10 mM
1,8 mM MgCl ₂	1,5 µl	25 mM
0,5 µM primer (ileri ve geri)	1 µl	10 µM/ µl
0,5 u Taq Polimeraz	0,1 µl	5 u/ µl
Yukarıdaki bileşim dH ₂ O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır.		

Çizelge 3.30. ETH3 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	94 °C (denatürasyon sıcaklığı)	5 dakika	1 döngü
2. Basamak	94 °C 'de 62°C'de(primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı) 72 °C'de	30 saniye 1 dakika 1 dakika	35 döngü
3. Basamak	72 °C'de	15 dakika	1 döngü

I) BM1818 İsimli Mikrosatellit Bölgesi

Ticari ismi BM1818 olan mikrosatellit DNA bölgesinin primer dizilimleri ve kromozom sayısı aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.31).

Çizelge 3.31. BM1818 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler

Kromozom :	23. Kromozom
Allel Uzunluğu :	248-278 bç
Primer (ileri)	AGCTGGGAATATAACCAAAGG
Primer (geri)	AGTGCTTTCAAGGTCCATGC

Bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler ve yükseltgenme koşulları aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.32, Çizelge 3.33). Bu bileşenlerin tümü belirtilen miktarlarda 200 µl'lik PZR ependorf tüpüne konulmuştur.

Çizelge 3.32. BM1818 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri

Bileşenler	PZR Karışımına Konulan Miktar	Stok Konsantrasyonlar
DNA	2 µl	
1XPZR buffer	2 µl	10X
0,25 mM dNTP	0,5 µl	10 mM
1,5 mM MgCl ₂	1,2 µl	25 mM
0,25µM primer (ileri ve geri)	0,5 µl	10 µM/ µl
0,5 u Taq Polimeraz	0,1 µl	5 u/ µl
Yukarıdaki bileşim dH ₂ O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır.		

Çizelge 3.33. BM1818 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	94 °C (denatürasyon sıcaklığı)	5 dakika	1 döngü
2. Basamak	94 °C 'de 55°C'de(primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı) 72 °C'de	30 saniye 45 saniye 1.5 dakika	30 döngü
3. Basamak	72 °C'de	15 dakika	1 döngü

İ) INRA63 İsimli Mikrosatellit Bölgesi

Ticari ismi INRA63 olan mikrosatellit DNA bölgesinin primer dizilimleri ve kromozom sayısı aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.34) .

Çizelge 3.34. INRA63 İsimli Mikrosatellit DNA Bölgesi İle İlgili Tanımlayıcı Bilgiler

Kromozom :	18. Kromozom
Allel uzunluğu:	174-190 bç
Primer (ileri)	ATTGACACAAGCTAAATCTAACC
Primer (geri)	AAACCACAGAAATGCTTGGAAG

Bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler ve yükseltgenme koşulları aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.35, Çizelge 3.36). Bu bileşenlerin tümü belirtilen miktarlarda 200 µl'lik PZR ependorf tüpüne konulmuştur.

Çizelge 3.35. INRA63 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin PZR Bileşenleri

Bileşenler	PZR Karışımına Konulan Miktar	Stok Konsantrasyonlar
DNA	2 µl	
1XPZR buffer	2 µl	10X
0,5 mM dNTP	1 µl	10 mM
2 mM MgCl ₂	1,8 µl	25 mM
0,5µM primer (ileri ve geri)	1 µl	10 µM/ µl
0,5 u Taq Polimeraz	0,1 µl	5 u/ µl
Yukarıdaki bileşim dH ₂ O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır.		

Çizelge 3.36. INRA63 İsimli Mikrosatellit Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	95 °C (denatürasyon sıcaklığı)	5 dakika	1 döngü
2. Basamak	94 °C 'de 57,6°C'de(primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı) 72 °C'de	30 saniye 45 saniye 1.5 dakika	35 döngü
3. Basamak	72 °C'de	20 dakika	1 döngü

3.2.5 Çalışmada Kullanılan mtDNA Belirteci

mtDNA analizi için D-loop ileri (5'-CCATACACAGACCACAGAATGA-3') ve geri (5'-AGTCCAAGCATCCCCCAAATA-3') (Takeda ve ark. 2008) primer çifti kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonları yapılmıştır.

Bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile çoğaltılmasında kullanılan bileşenler ve yükseltgenme koşulları aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.37, Çizelge 3.38). Bu bileşenlerin tümü belirtilen miktarlarda 200 µl'lik PZR ependorf tüpüne konulmuştur.

Çizelge 3.37. D-Loop mtDNA Bölgesinin PZR Bileşenleri

Bileşenler	PZR Karışımına Konulan Miktar	Stok Konsantrasyonlar
DNA	1,5 µl	
1XPZR buffer	3 µl	10X
0,2 mM dNTP	6 µl	1 mM
1,5 mM MgCl ₂	1,8 µl	25 mM
0,25µM primer (ileri ve geri)	3 µl	10 µM/ µl
0,5 u Taq Polimeraz	0,3 µl	5 u/ µl
Yukarıdaki bileşim dH ₂ O ile 30 µl'ye tamamlanmıştır.		

Çizelge 3.38. D-Loop mtDNA Bölgesinin Yükseltgenme Koşulları

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
1. Basamak	94 °C (denatürasyon sıcaklığı)	5 dakika	1 döngü
2. Basamak	94 °C 'de 59°C'de(primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı) 72 °C'de	30 saniye 30 saniye 1 dakika	35 döngü
3. Basamak	72 °C'de	4 dakika	1 döngü

3.2.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Elde Edilen DNA Bantlarının Görüntülenmesi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile elde edilen DNA bantlarının görüntülenmesinde %2'lik agaroz jeller kullanılmıştır. Kullanılan tankın boyutuna göre; %2'lik olacak şekilde agaroz (gram); 1XTBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritilerek hazırlanmıştır. Daha sonra bu karışımın içerisine uygun miktarda Red-Safe ilave edilmiştir. Karışım tarak içeren jel tepsinde dökülerek oda sıcaklığında polimerize olması için beklenmiştir. Jeli yırtmamak için tarak dikkatlice çıkarılmıştır. Daha sonra 5 µl PZR ürününe 3 µl yükleme boyası (loading dye) ilave edilmiştir. Jel donduktan sonra, jelle örnekleri yükleyip 110 voltta 30-40 dakika örnekler yürütülmüştür. Daha sonra jel ultraviyole ışığına tabii tutularak görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. PZR ürünlerinin allel büyüklüklerinin kontrolü ve PZR reaksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği standart merdiven (ladder) yardımıyla hazırlanan bu %2'lik agaroz jellerle kontrol edilmiştir.

3.2.7 Fragment Analizi ve DNA Analizi

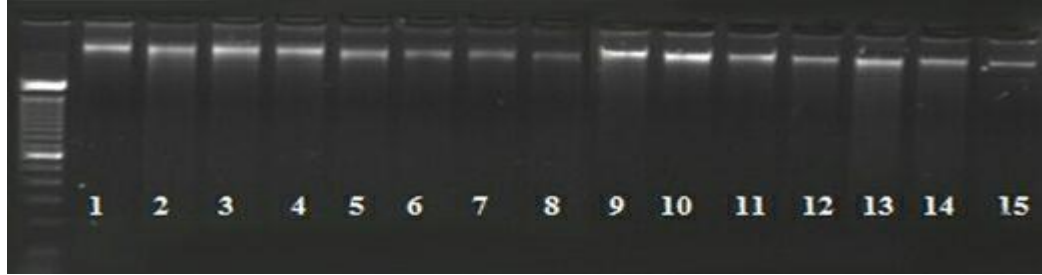
Mikrosatellit belirteçleri ile polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirilen örneklerin fragment analizleri (ABI 310 Genetik Analiz aleti) hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

MtDNA belirteçler ile polimeraz zincir reaksiyonları gerçekleştirilen örneklerin dizi analizleri Medsantek Laboratuar Malzemeleri San. Ve Tic. Ltd. Şti. firması tarafından (Applied Biosystems 3500XL Genetic Analyzer) hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

4.BULGULAR

4.1. DNA İzolasyonu

Çalışmada 11 adet klon hayvandan alınan kan, 1 adet klondan alınan sperma örneği ve klonların üretilmesinde kullanılan 3 farklı hücre tipi örneğinden DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA örneklerinin kalitesi %0,8'lik agaroz jel elektroforez ile kontrol edilmiştir (Şekil.4.1.). DNA örneklerinin genotipleme ve sekans analizlerinde kullanılabilir kalitede olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.1. DNA örneklerinin jel görüntüsü (1-11 kandan izole edilen genomik DNA'lar; 12 spermden izole genomik DNA; 13-15 hücreden izole edilen genomik DNA'lar)

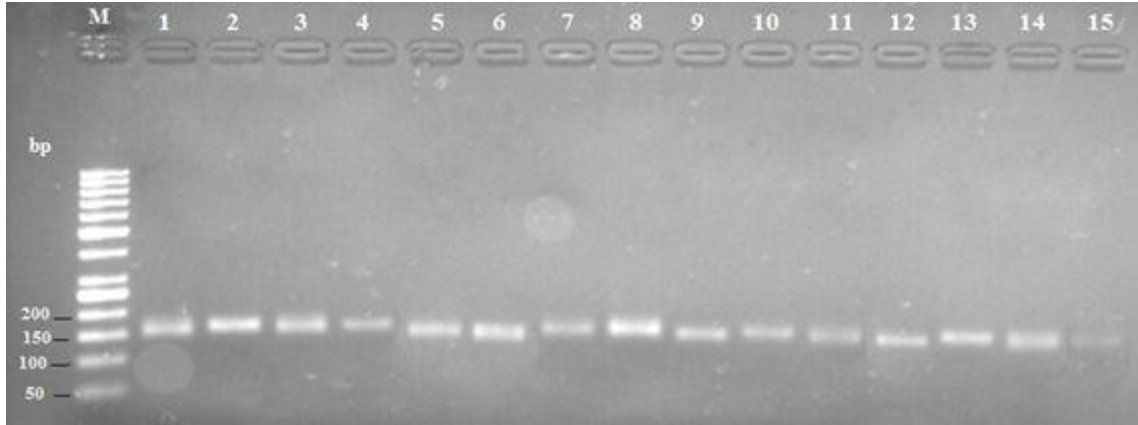
Örnek numaralarının hangi bireyi temsil ettiği aşağıdaki çizelge de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan bireyler ve örnek numaraları

Örnek Numarası	Birey	DNA İzolasyon Kaynağı
1	ECEM – Klon 3	Kan
2	CEMRE – Yavru K1.K3.1	Kan
3	ECE – Klon 2	Kan
4	EFE – Klon 1	Kan
5	EFECAN – Yavru K1.K3.2	Kan
6	NİLÜFER – Klon 4	Kan
7	KİRAZ – Klon 5	Kan
8	KARDELEN – Yavru H1.K4.1	Kan
9	KARAKIZ – Yavru K5.1	Kan
10	YAZGÜLÜ – Yavru K1.K4.1	Kan
11	KURBAN – Yavru K1.K5.1	Kan
12	EFE – Klon 1	Sperm
13	FİBROBLAST –Hücre vericisi 1	Hücre
14	KIKIRDAK – Hücre vericisi 2	Hücre
15	GRANÜLOSA – Hücre vericisi 2	Hücre

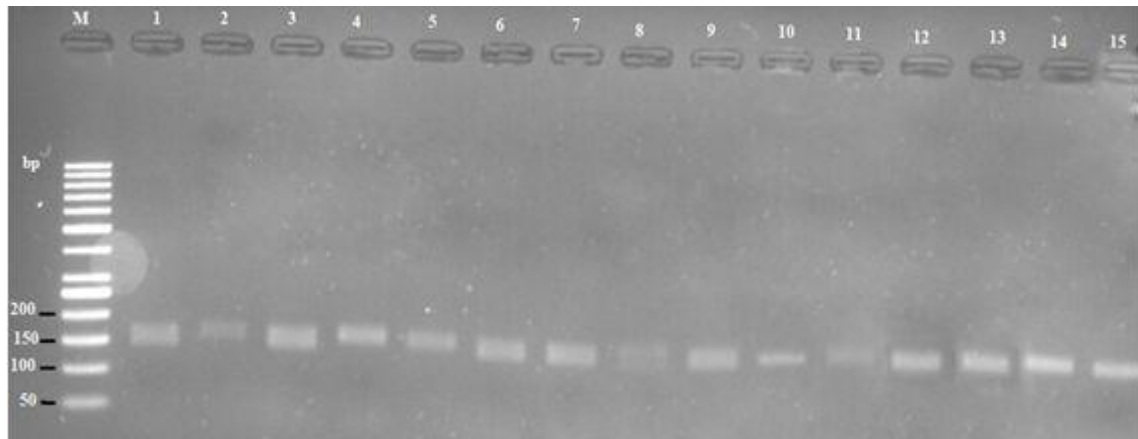
4.2. Mikrosatellit Belirteçleri İle Gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonları

Klonlar ve yavrularının karakterizasyonu amacıyla 10 farklı mikrosatellit belirteci ile yapılan polimeraz zincir reaksiyonlarının gerçekleşip-gerçekleşmediği ve polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin allel büyüklüklerinin kontrolü % 2'lik agaroz jeller ile yapılmıştır. Agaroz jel ile yapılan kontrollerde polimeraz zincir reaksiyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştikleri gözlenmiştir.



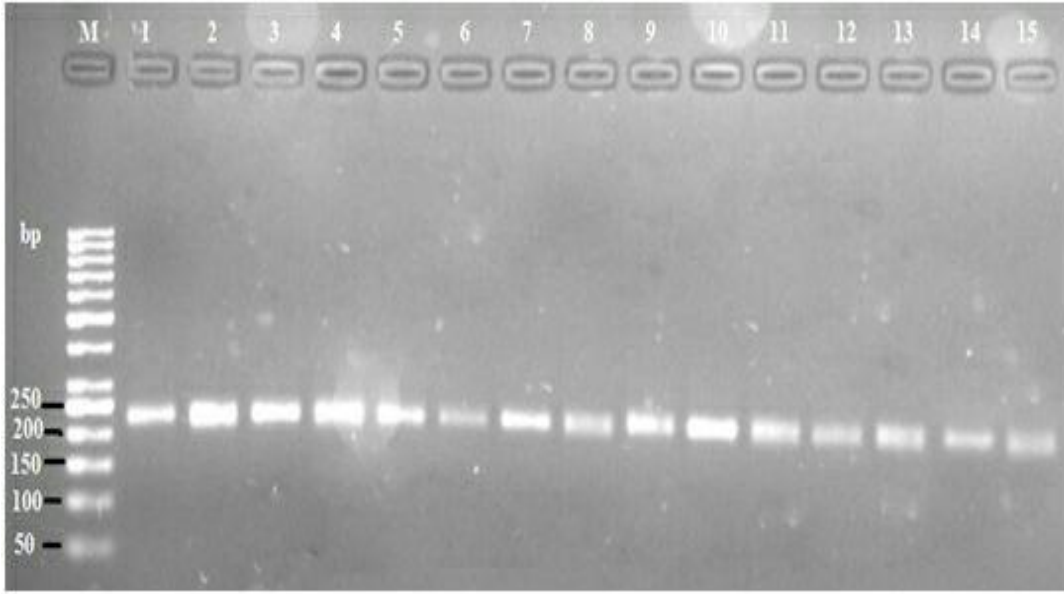
Şekil 4.2. TGLA122 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü

Not:M, GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific); (1-11 klonlar ve yavrularının kandan izole genomik DNA'sı;12 Klon 1'in spermden izole genomik DNA'sı; 13 hücre vericisi 1'in hücreden izole genomik DNA;14-15hücre vericisi 2'nin hücreden izole genomik DNA)



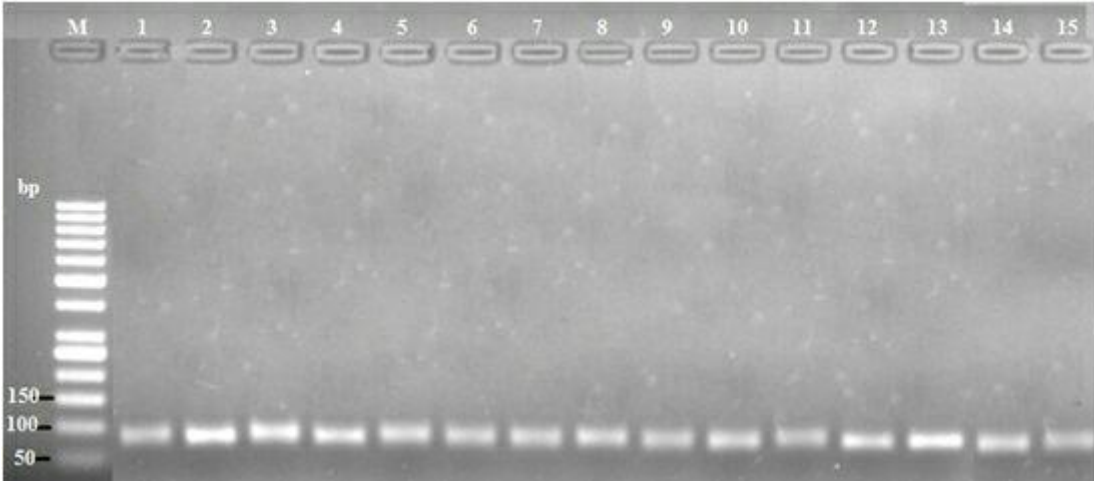
Şekil 4.3. ETH225 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü

Not:M, GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific); (1-11 klonlar ve yavrularının kandan izole genomik DNA'sı;12 Klon 1'in spermden izole genomik DNA'sı; 13 hücre vericisi 1'in hücreden izole genomik DNA;14-15hücre vericisi 2'nin hücreden izole genomik DNA)



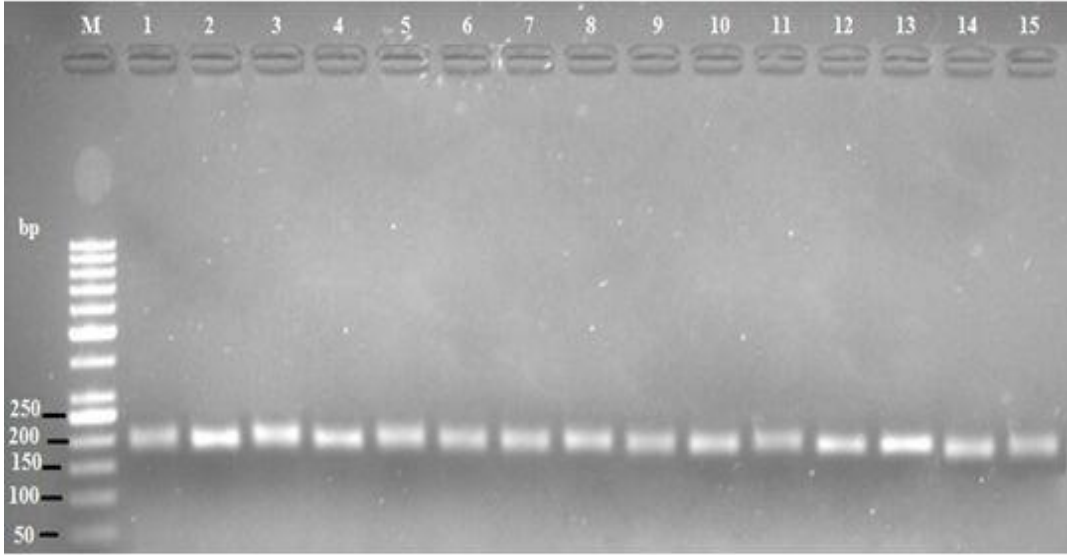
Şekil 4.4. ETH10 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü

Not:M, GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific); (1-11 klonlar ve yavrularının kandan izole genomik DNA'sı;12 Klon 1'in spermden izole genomik DNA'sı; 13 hücre vericisi 1'in hücreden izole genomik DNA;14-15hücre vericisi 2'nin hücreden izole genomik DNA)



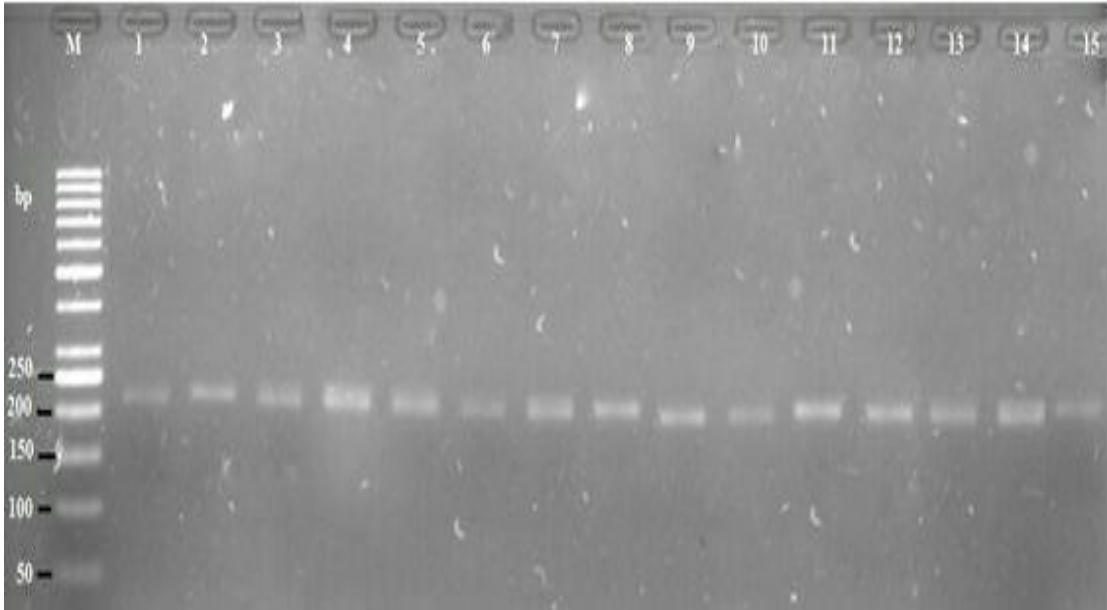
Şekil 4.5. TGLA227 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü

Not:M, GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific); (1-11 klonlar ve yavrularının kandan izole genomik DNA'sı;12 Klon 1'in spermden izole genomik DNA'sı; 13 hücre vericisi 1'in hücreden izole genomik DNA;14-15hücre vericisi 2'nin hücreden izole genomik DNA)



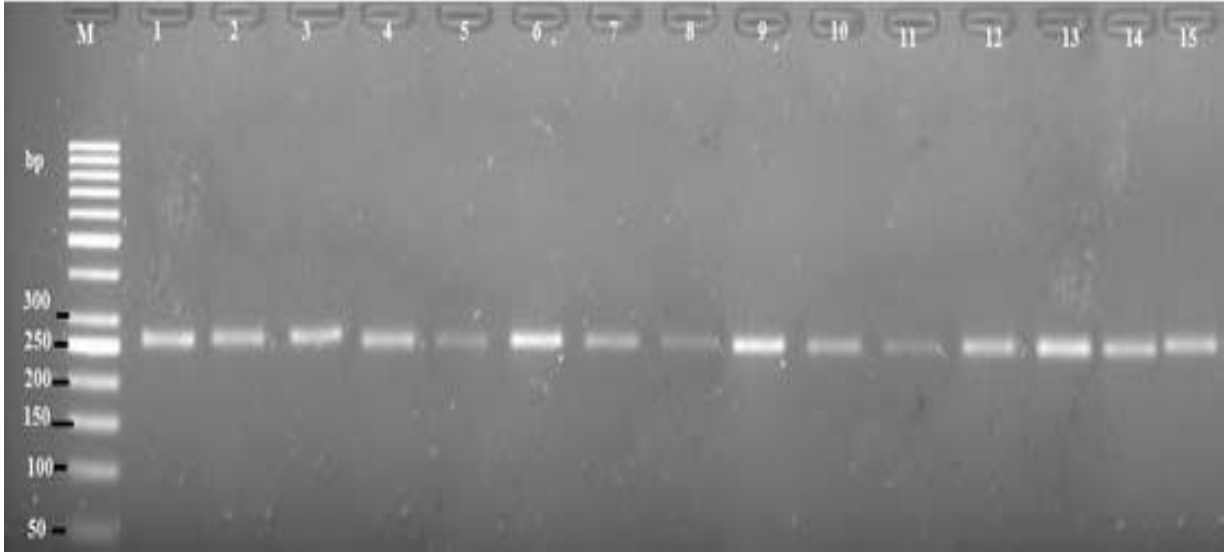
Şekil 4.6. BM1824 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü

Not:M, GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific); (1-11 klonlar ve yavrularının kandan izole genomik DNA'sı;12 Klon 1'in spermden izole genomik DNA'sı; 13 hücre vericisi 1'in hücreden izole genomik DNA;14-15hücre vericisi 2'nin hücreden izole genomik DNA)



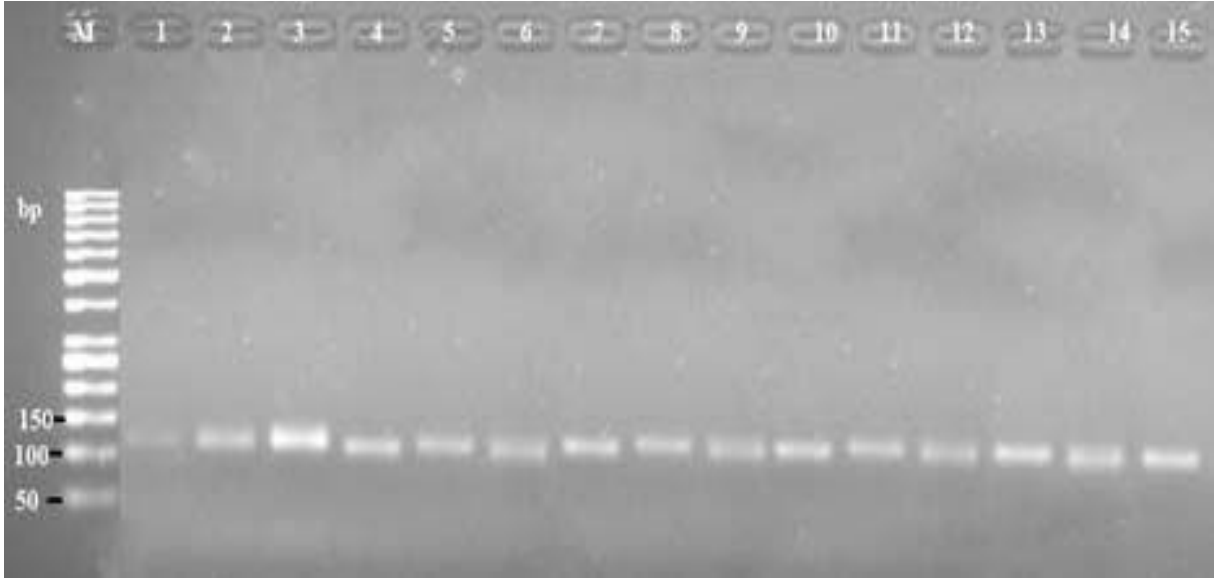
Şekil 4.7. INRA23 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü

Not:M, GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific); (1-11 klonlar ve yavrularının kandan izole genomik DNA'sı;12 Klon 1'in spermden izole genomik DNA'sı; 13 hücre vericisi 1'in hücreden izole genomik DNA;14-15hücre vericisi 2'nin hücreden izole genomik DNA)



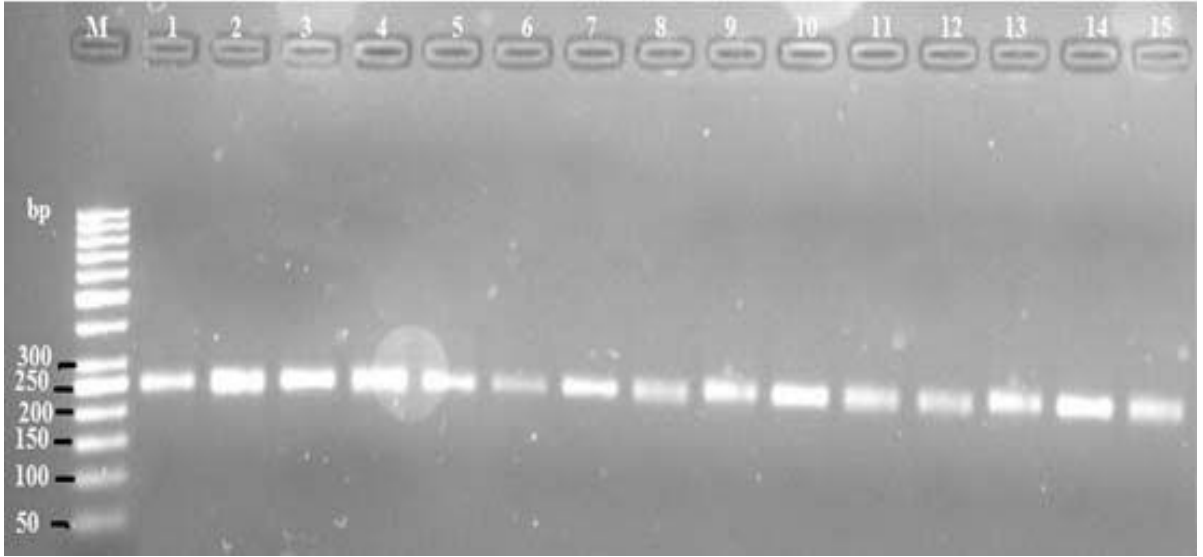
Şekil 4.8. SPS115 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü

Not:M, GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific); (1-11 klonlar ve yavrularının kandan izole genomik DNA'sı;12 Klon 1'in spermden izole genomik DNA'sı; 13 hücre vericisi 1'in hücreden izole genomik DNA;14-15hücre vericisi 2'nin hücreden izole genomik DNA)



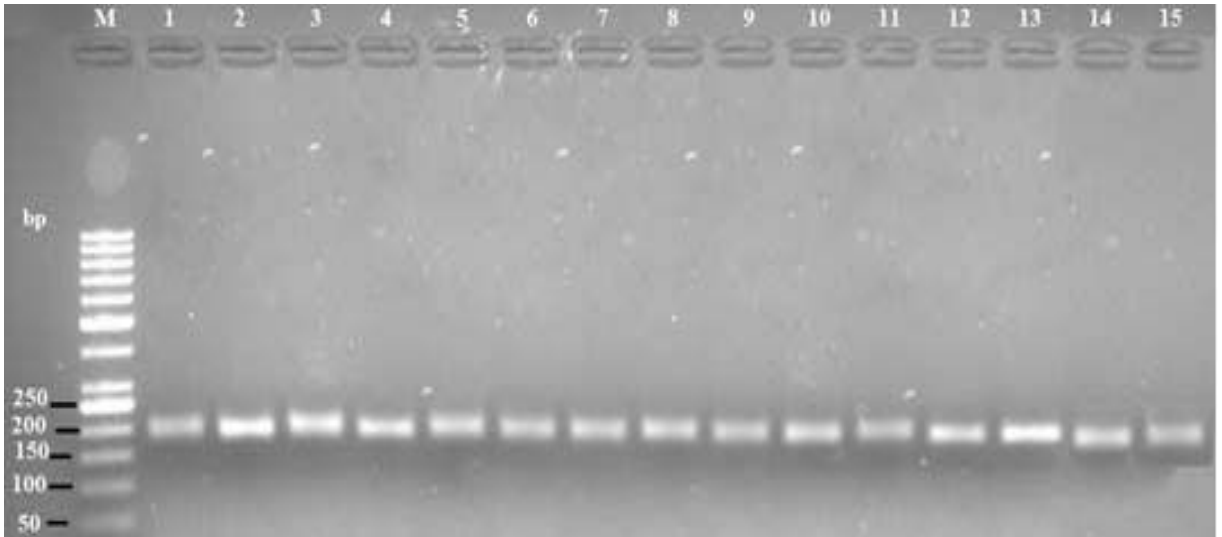
Şekil 4.9. ETH3 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü

Not:M, GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific); (1-11 klonlar ve yavrularının kandan izole genomik DNA'sı;12 Klon 1'in spermden izole genomik DNA'sı; 13 hücre vericisi 1'in hücreden izole genomik DNA;14-15hücre vericisi 2'nin hücreden izole genomik DNA)



Şekil 4.10. BM1818 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü

Not:M, GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific); (1-11 klonlar ve yavrularının kandan izole genomik DNA'sı;12 Klon 1'in spermden izole genomik DNA'sı; 13 hücre vericisi 1'in hücreden izole genomik DNA;14-15hücre vericisi 2'nin hücreden izole genomik DNA)



Şekil 4.11. INRA63 isimli mikrosatellit bölgesinin PZR sonrası jel görüntüsü

Not:M, GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific); (1-11 klonlar ve yavrularının kandan izole genomik DNA'sı;12 Klon 1'in spermden izole genomik DNA'sı; 13 hücre vericisi 1'in hücreden izole genomik DNA;14-15hücre vericisi 2'nin hücreden izole genomik DNA)

4.3. Fragment Analizi

Klonlar ve yavrularının karakterizasyonu amacıyla 10 farklı mikrosatellit belirteci ile yapılan polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin uzunluklarının belirlenmesinde kapiller jel elektroforezi (ABI 310 Genetic Analyzer) kullanılmıştır. Bu analiz Refgen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Laboratuvar'ı tarafından yapılmıştır. Firmadan gelen sonuçlar mikrosatellit bölgesi bant uzunluklarının belirlenmesi amacıyla Peak Scanner adlı program kullanılarak incelenmiştir.

Fragment analizi sonucunda klon hayvanlar hücre vericileri ile karşılaştırılmış ve birbirleriyle özdeş oldukları gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Klon hayvanlar ve hücre vericilerine ait fragment analiz sonuçları

	Hücre Vericisi 1	Klon 1	Hücre Vericisi 2	Klon 2, 3, 4, 5
TGLA122	152-152	152-152	164-164	164-164
ETH225	144-154	144-154	134-144	134-144
ETH10	206-214	206-214	206-212	206-212
TGLA227	78-98	78-98	116-126	116-126
BM1824	180-182	180-182	178-188	178-188
INRA23	196-196	196-196	216-218	216-218
SPS115	248-254	248-254	248-248	248-248
ETH3	114-124	114-124	114-126	114-126
BM1818	262-264	262-264	248-264	248-264
INRA63	186-188	186-188	186-196	186-196

Fragment analizi sonucunda klon hayvanların yavruları ebeveynleri ile karşılaştırılmış ve birbirleriyle uyumlu oldukları gözlemlenmiştir.

Tüm yavrular ve ebeveynlerine ait sonuçlar aşağıda çizelgeler ile gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Yavru K1.K3.1, Yavru K1.K3.2 ve ebeveynlerine ait fragment analiz sonuçları

	Baba	Anne	Yavru	Yavru
	Klon 1	Klon 3	Yavru K1.K3.1	Yavru K1.K3.2
TGLA122	152-152	164-164	152-164	152-164
ETH225	144-154	134-144	144-154	144-154
ETH10	206-214	206-212	206-212	206-214
TGLA227	78-98	116-126	98-116	98-116
BM1824	180-182	178-188	178-180	180-188
INRA23	196-196	216-218	196-216	196-216
SPS115	248-254	248-248	248-254	248-254
ETH3	114-124	114-126	114-126	124-126
BM1818	262-264	248-264	248-264	262-264
INRA63	186-188	186-196	186-196	188-196

Çizelge 4.4. Yavru H1.K4.1 ve ebeveynlerine ait fragment analiz sonucu

	Baba	Anne	Yavru
	Hücre Vericisi 1	Klon 4	Yavru H1.K4.1
TGLA122	152-152	164-164	152-164
ETH225	144-154	134-144	134-154
ETH10	206-214	206-212	206-212
TGLA227	78-98	116-126	98-116
BM1824	180-182	178-188	180-188
INRA23	196-196	216-218	196-216
SPS115	248-254	248-248	248-248
ETH3	114-124	114-126	114-126
BM1818	262-264	248-264	264-264
INRA63	186-188	186-196	186-186

Çizelge 4.5. Yavru K1.K4.1 ve ebeveynlerine ait fragment analiz sonuçları

	Baba	Anne	Yavru
	Klon 1	Klon 4	Yavru K1.K4.1
TGLA122	152-152	164-164	152-164
ETH225	144-154	134-144	134-144
ETH10	206-214	206-212	206-214
TGLA227	78-98	116-126	98-116
BM1824	180-182	178-188	178-182
INRA23	196-196	216-218	196-216
SPS115	248-254	248-248	248-254
ETH3	114-124	114-126	114-126
BM1818	262-264	248-264	248-262
INRA63	186-188	186-196	186-196

Çizelge 4.6. Yavru K5.1 ve ebeveynlerine ait fragment analiz sonuçları

	Anne	Yavru
	Klon 5	Yavru K5.1
TGLA122	164-164	164-164
ETH225	134-144	134-144
ETH10	206-212	206-214
TGLA227	116-126	114-126
BM1824	178-188	178-188
INRA23	216-218	216-216
SPS115	248-248	248-248
ETH3	114-126	114-114
BM1818	248-264	264-264
INRA63	186-196	186-186

Çizelge 4.7. Yavru K1.K5.1 ve ebeveynlerine ait fragment analiz sonuçları

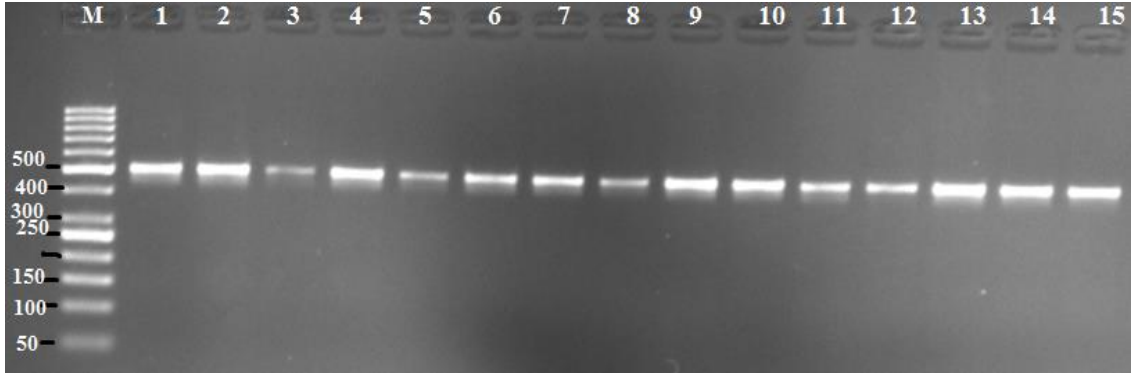
	Baba	Anne	Yavru
	Klon 1	Klon 5	Yavru K1.K5.1
TGLA122	152-152	164-164	152-164
ETH225	144-154	134-144	144-154
ETH10	206-214	206-212	206-212
TGLA227	78-98	116-126	78-116
BM1824	180-182	178-188	182-188
INRA23	196-196	216-218	196-216
SPS115	248-254	248-248	248-254
ETH3	114-124	114-126	114-126
BM1818	262-264	248-264	248-254
INRA63	186-188	186-196	186-196

Çizelge 4.8. Yavrular ve ebeveynlerine ait fragment analiz sonuçları

	Baba	Anne	Yavrular					
	Klon 1 ve Hücre Vericisi 1	Klon 2, 3, 4, 5	Yavru K1.K3.1	Yavru K1.K3.2	Yavru H1.K4.1	Yavru K1.K4.1	Yavru K5.1	Yavru K1.K5.1
TGLA122	152-152	164-164	152-164	152-164	152-164	152-164	164-164	152-164
ETH225	144-154	134-144	144-154	144-154	134-154	134-144	134-144	144-154
ETH10	206-214	206-212	206-212	206-214	206-212	206-214	206-214	206-212
TGLA227	78-98	116-126	98-116	98-116	98-116	98-116	114-126	78-116
BM1824	180-182	178-188	178-180	180-188	180-188	178-182	178-188	182-188
INRA23	196-196	216-218	196-216	196-216	196-216	196-216	216-216	196-216
SPS115	248-254	248-248	248-254	248-254	248-248	248-254	248-248	248-254
ETH3	114-124	114-126	114-126	124-126	114-126	114-126	114-114	114-126
BM1818	262-264	248-264	248-264	262-264	264-264	248-262	264-264	248-254
INRA63	186-188	186-196	186-196	188-196	186-186	186-196	186-186	186-196

4.4 mtDNA Belirteci İle Gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Klonlar ve yavrularının karakterizasyonu amacıyla mtDNA belirteci (D-loop) ile yapılan polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleşip-gerçekleşmediği ve polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin allel büyüklüklerinin kontrolü % 2'lik agaroz jeller ile yapılmıştır. Agaroz jel ile yapılan kontrollerde polimeraz zincir reaksiyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştikleri gözlenmiştir.



Şekil 4.12. mtDNA belirteci (D-loop) ile yapılan PZR sonrası jel görüntüsü

Not: M, GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo Scientific) ; (1-11., kuyular klonlar ve yavrularına ait örnekler – 12.,kuyu Klon 1'in spermden izole örneği - 13., kuyu hücre vericisi 1'e ait örnek - 14., 15., kuyu hücre vericisi 2'e ait hücreden izole örnekler)

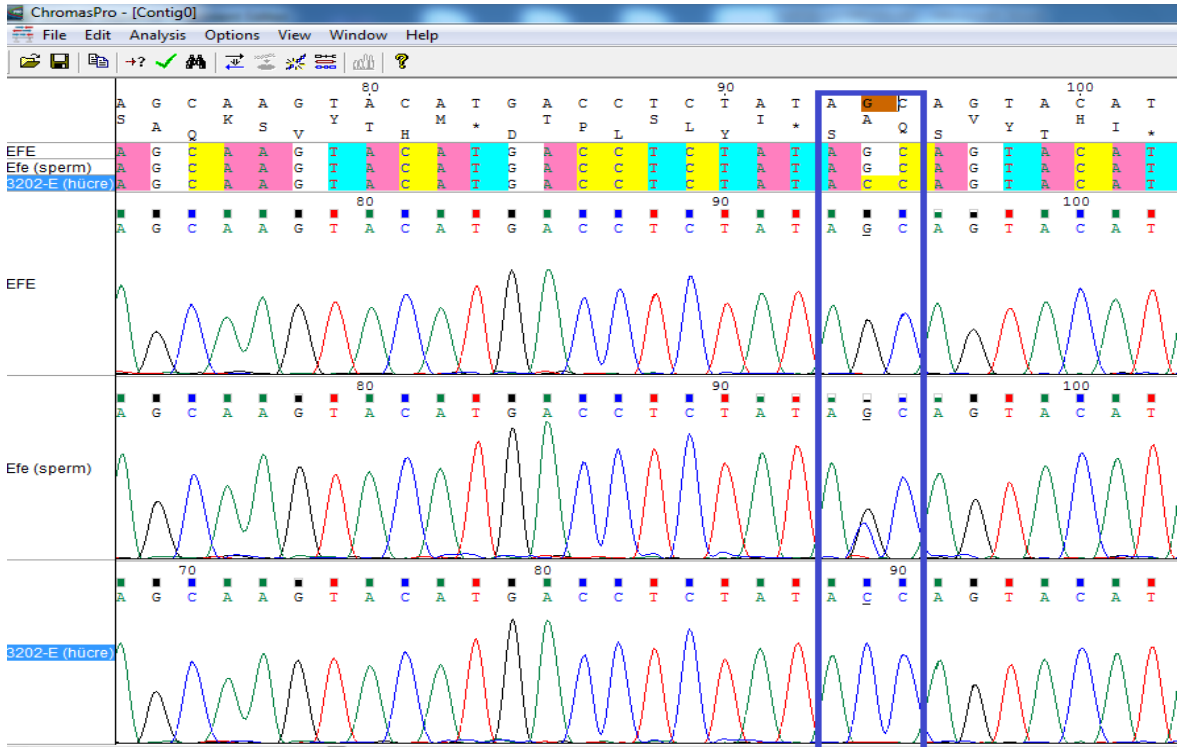
4.5. Dizi Analizi

Klonlar ve yavrularının karakterizasyonu amacıyla mtDNA belirteci (D-loop) ile yapılan polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin dizi analizleri MEDSANTEK firması tarafından yapılmıştır. Analiz sonuçlarının incelenmesinde ChromasPro ve Bioedit programları kullanılmıştır. Ayrıca sekans okuma sonuçlarının doğruluğunun belirlenmesi için gen bankasında AF492351.1 numarası ile kayıtlı sığır mtDNA genom sekansından yararlanılmıştır.

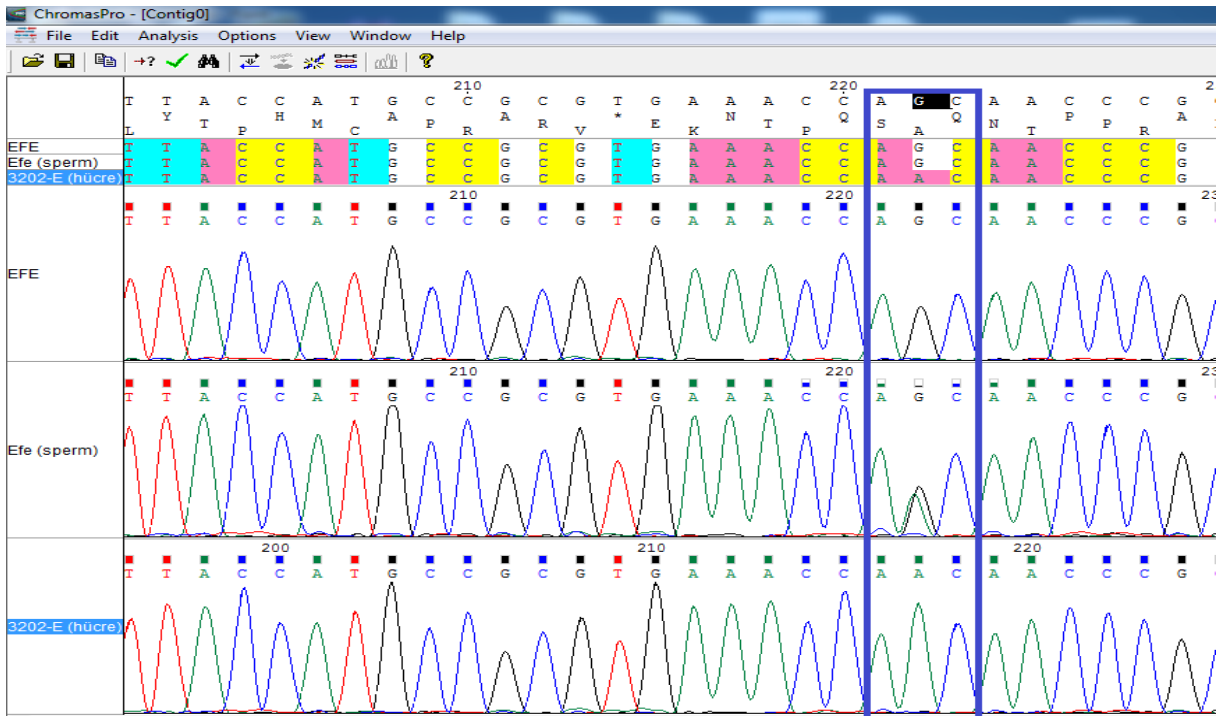
mtDNA dizi analizinde klonlar, hücre vericileri ve klonların yavruları arasındaki farklılıklar tespit edilerek klon bireyler ve yavrularının mtDNA kaynakları belirlenmiştir.

4.5.1 Erkek Klonun ve Erkek Klonun Spermasının Verici Hücre İle Karşılaştırması

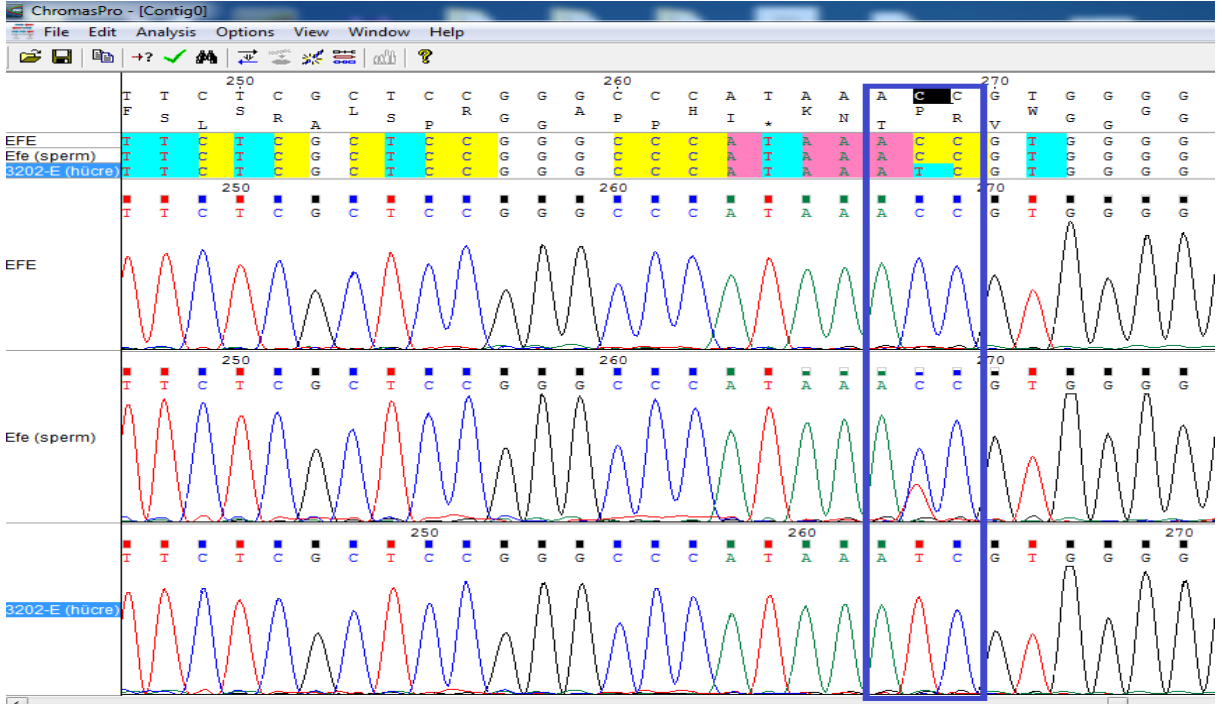
Klon 1 (EFE) ve Klon 1'in sperması ile verici hücre (3202-E) arasında gen bankasında kayıtlı sekansa göre 15694, 15821, 15868, 15892 ve 15983 numaralı pozisyonlarda olmak üzere 5 nükleotidde farklılık tespit edilmiştir.



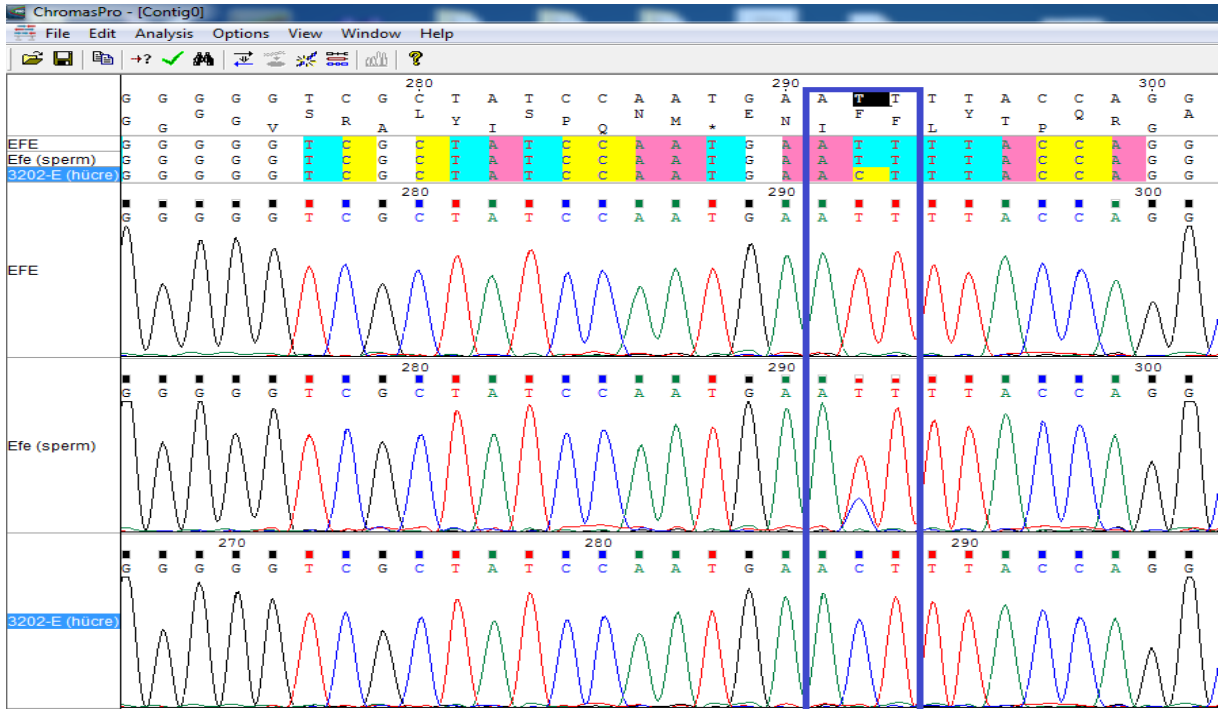
Şekil 4.13. Klon 1, Klon 1 sperma ve hücre vericisi 1 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.14. Klon 1, Klon 1 sperma ve hücre vericisi 1 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.15. Klon 1, Klon 1 sperma ve hücre vericisi 1 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15868. Nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.16. Klon 1, Klon 1 sperma ve hücre vericisi 1 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. Nükleotidde gözlemlenen farklılık

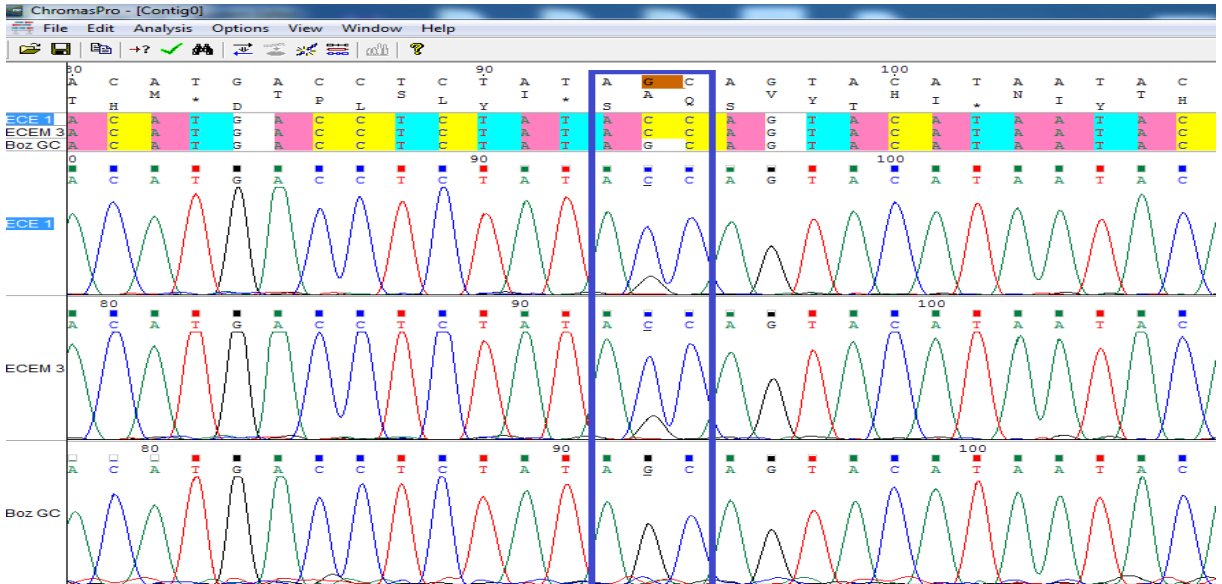


Şekil 4.17. Klon 1, Klon 1 sperma ve hücre vericisi 1 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15983. nükleotidde gözlemlenen farklılık

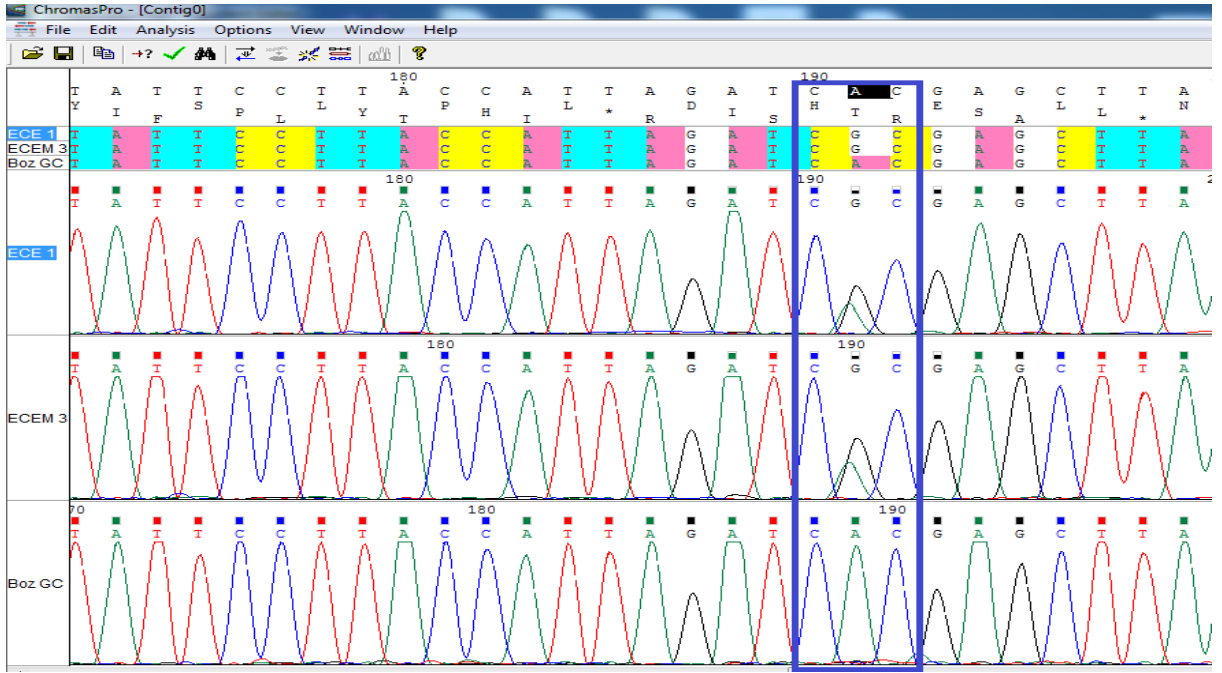
Klon 1 (Efe) ile Efe sperma arasında mtDNA’da hiçbir farklılık tespit edilmemiştir.

4.5.2 Dişi Klonların Verici Hücre İle Karşılaştırması

Klon 2 (ECE), Klon 3 (ECEM) ile hücre vericisi 2 hücresi (GC) arasında gen bankasında kayıtlı sekansa göre 15694, 15791, 15821, 15892, 15937 numaralı pozisyonlarda olmak üzere 5 nükleotidde farklılık tespit edilmiştir.



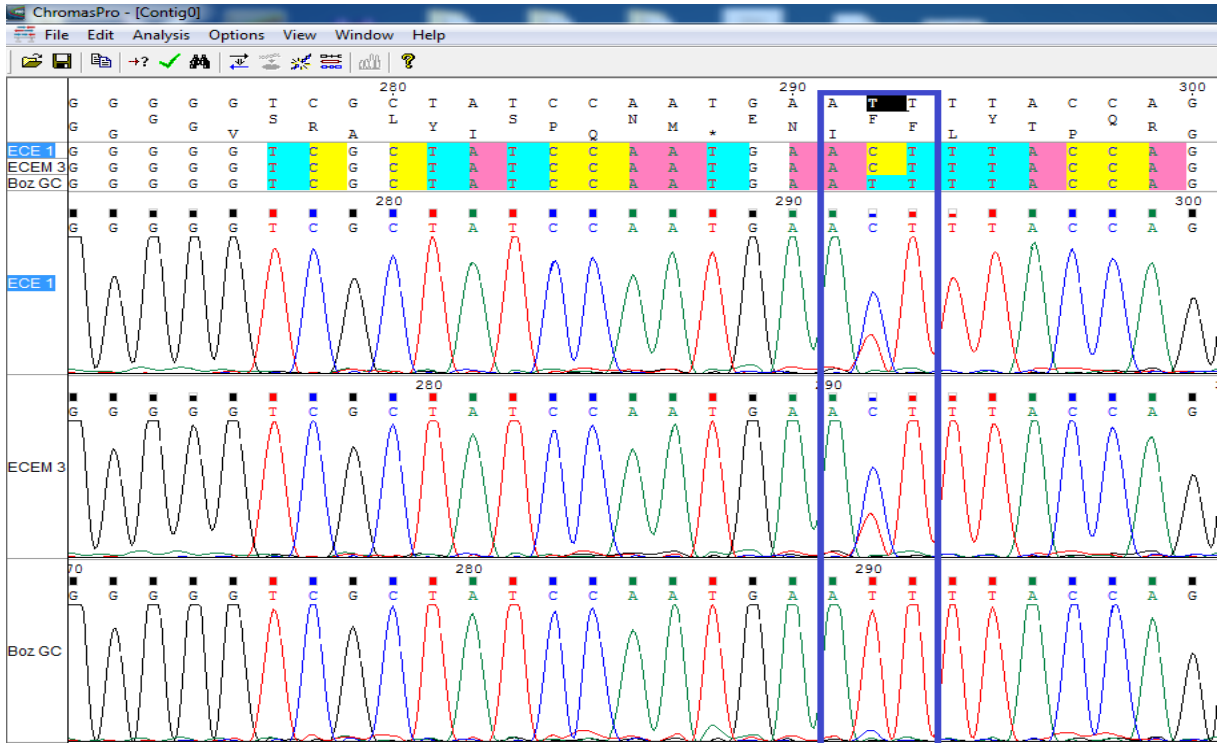
Şekil 4.18. Klon 2, Klon 3 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık



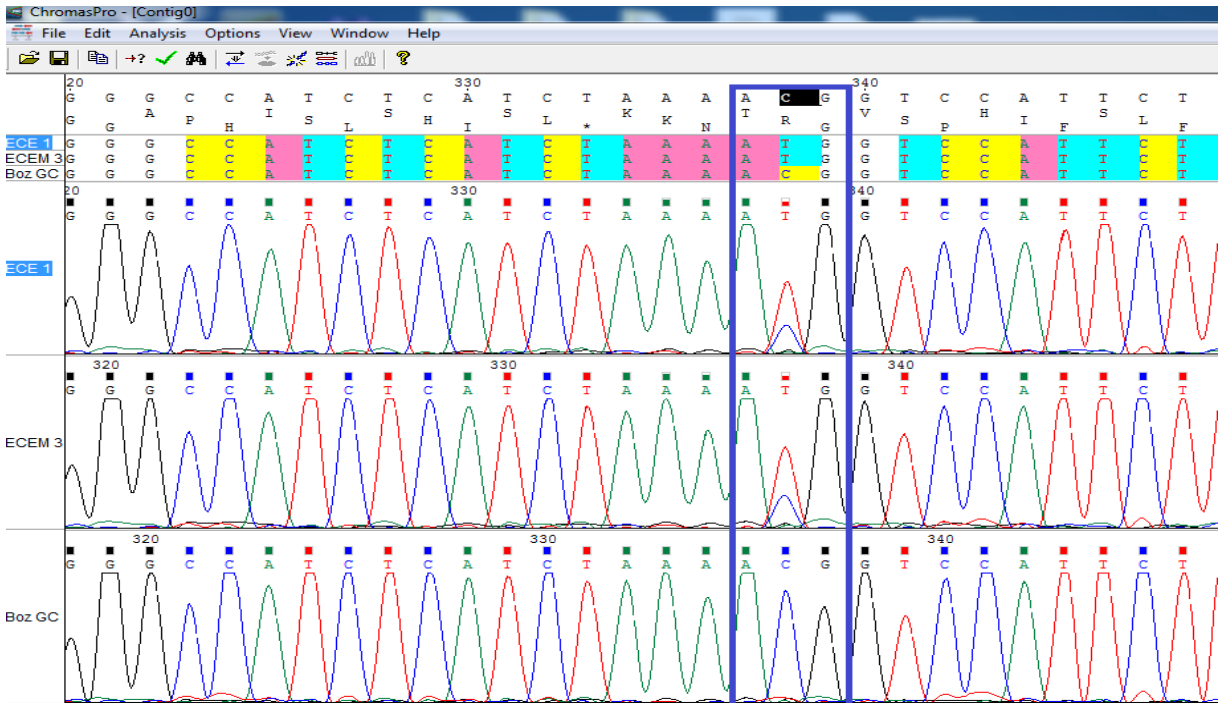
Şekil 4.19. Klon 2, Klon 3 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15791. nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.20. Klon 2, Klon 3 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık

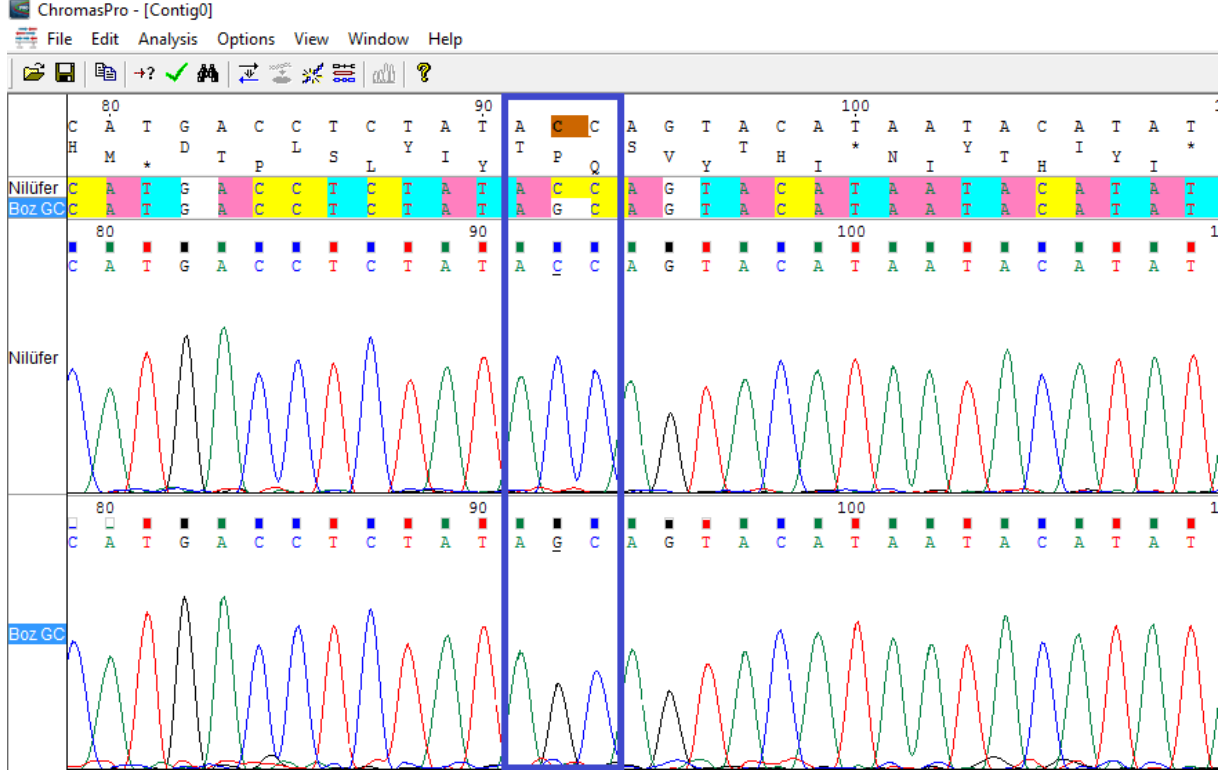


Şekil 4.21. Klon 2, Klon 3 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık

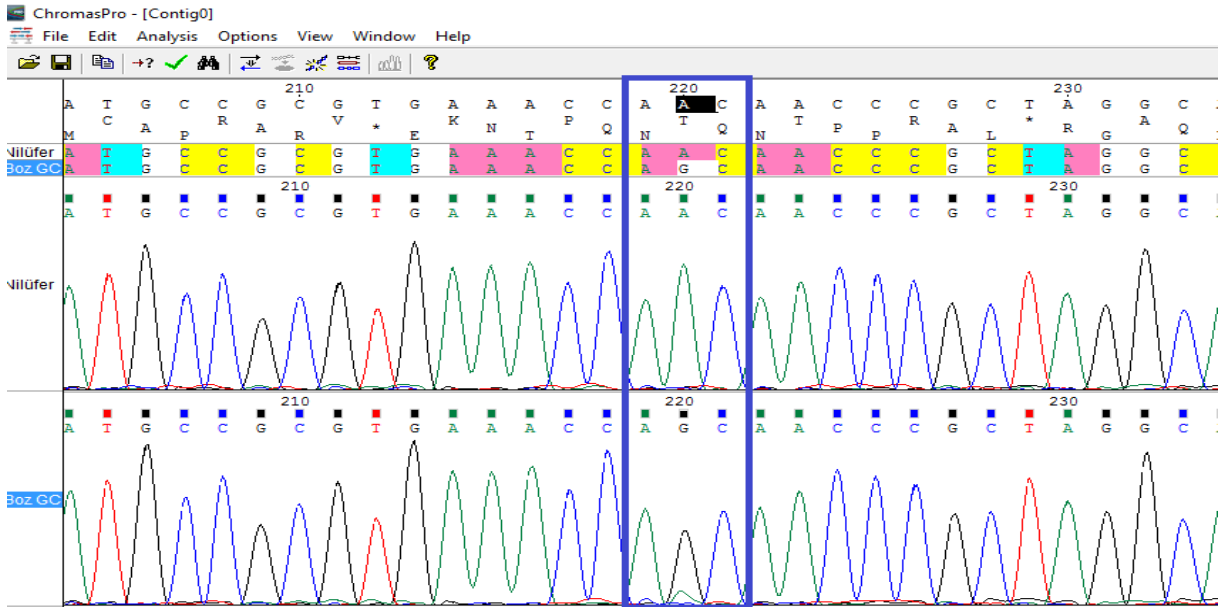


Şekil 4.22. Klon 2, klon 3 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15937. nükleotidde gözlemlenen farklılık

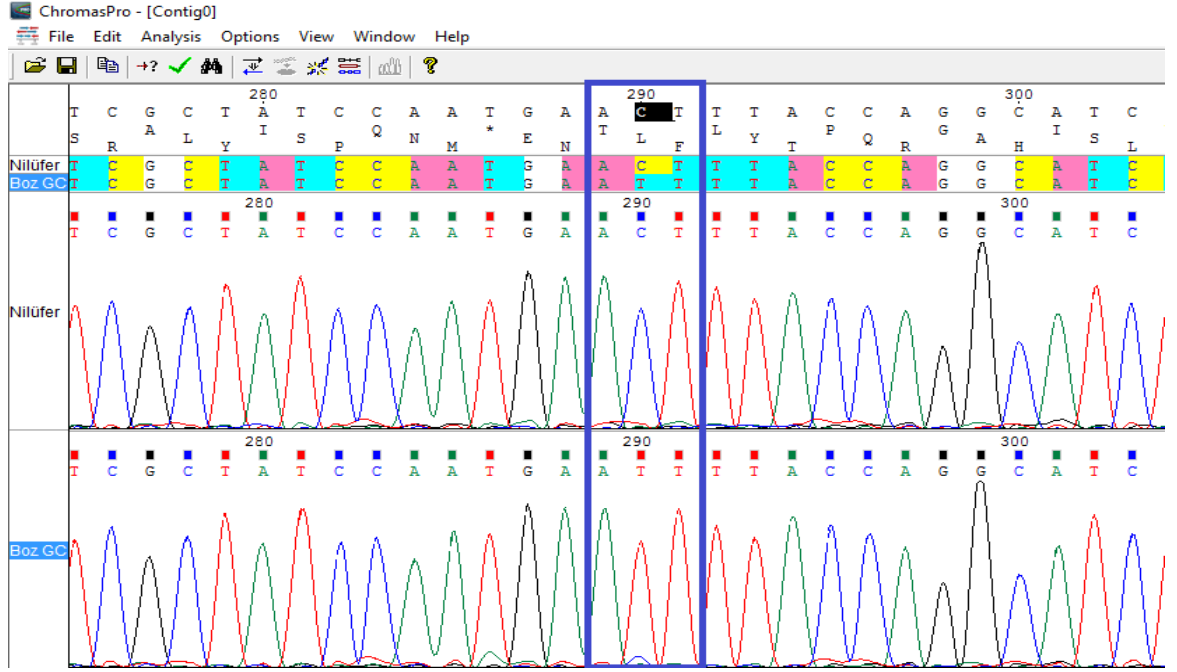
Klon 4 (Nilüfer) ile hücre vericisi 2 (GC hüresi) arasında gen bankasında kayıtlı sekansa göre 15694, 15821 ve 15892 numaralı pozisyonlarda olmak üzere 3 nükleotidde farklılık tespit edilmiştir.



Şekil 4.23. Klon 4 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık

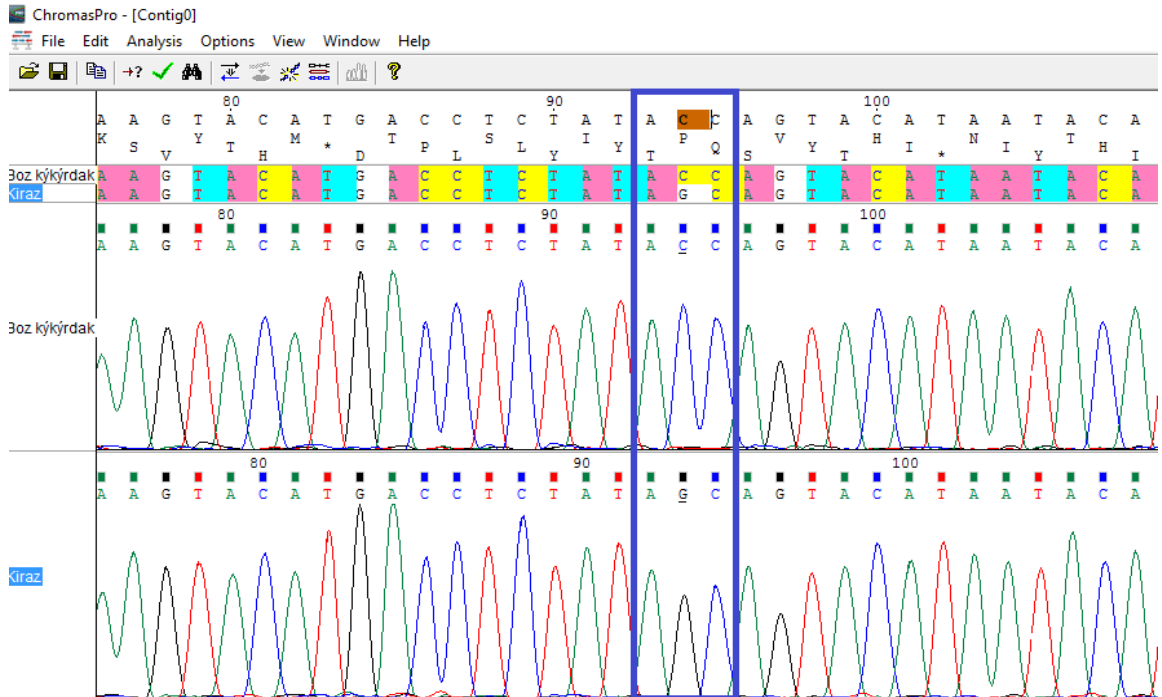


Şekil 4.24. Klon 4 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık

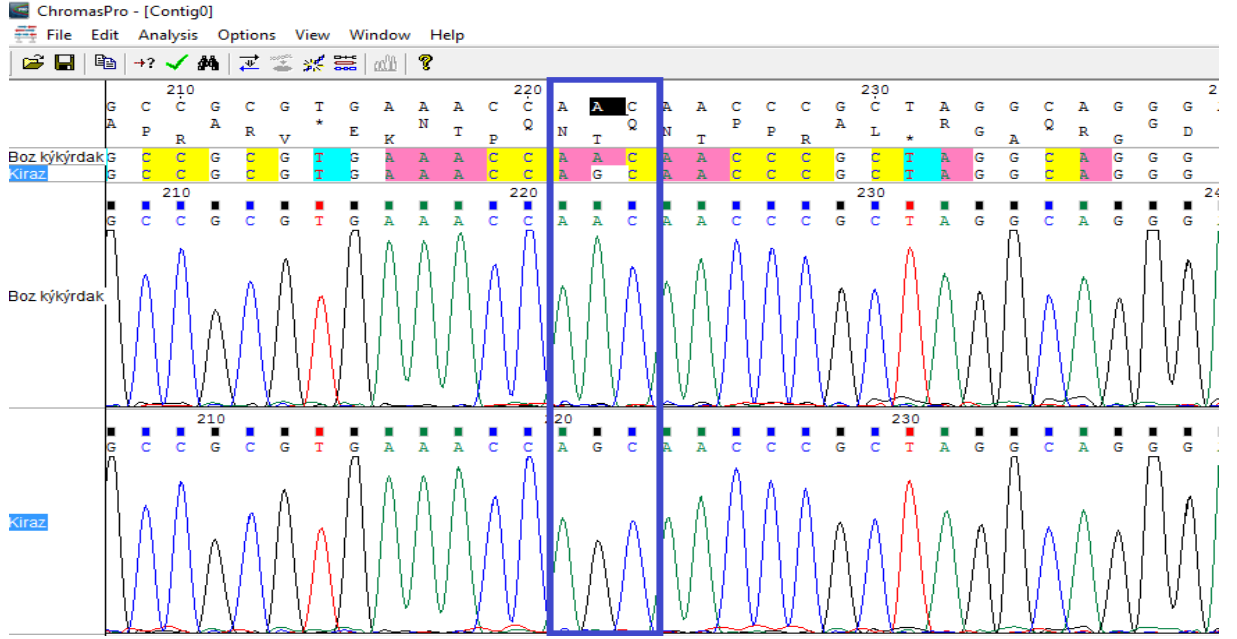


Şekil 4.25. Klon 4 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık

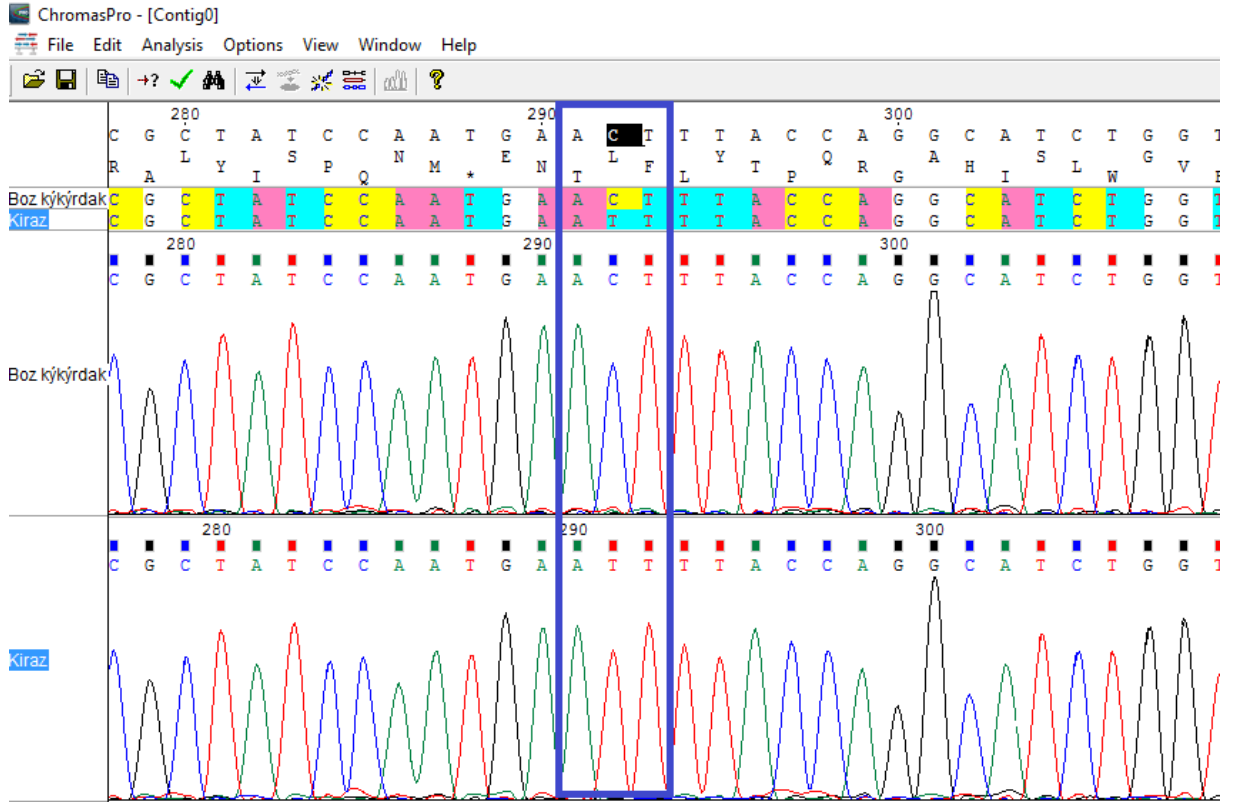
Klon 5 (Kiraz) ile hücre vericisi 2 (Kıkırdak hücresi) arasında gen bankasında kayıtlı sekansa göre 15694, 15821 ve 15892 numaralı pozisyonlarda olmak üzere 3 nükleotidde farklılık tespit edilmiştir.



Şekil 4.26. Klon 5 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.27. Klon 5 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık



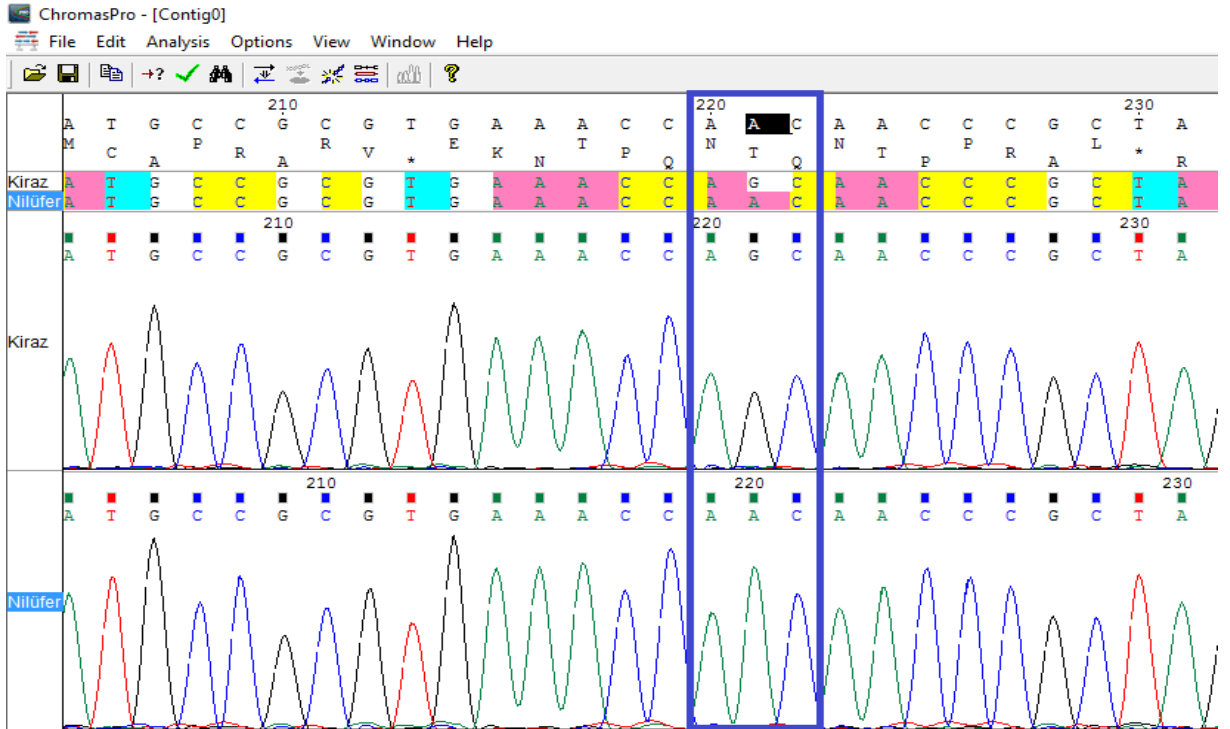
Şekil 4.28. Klon 5 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık

4.5.3. Dişı Klonların Birbiri İle Karşılaştırması

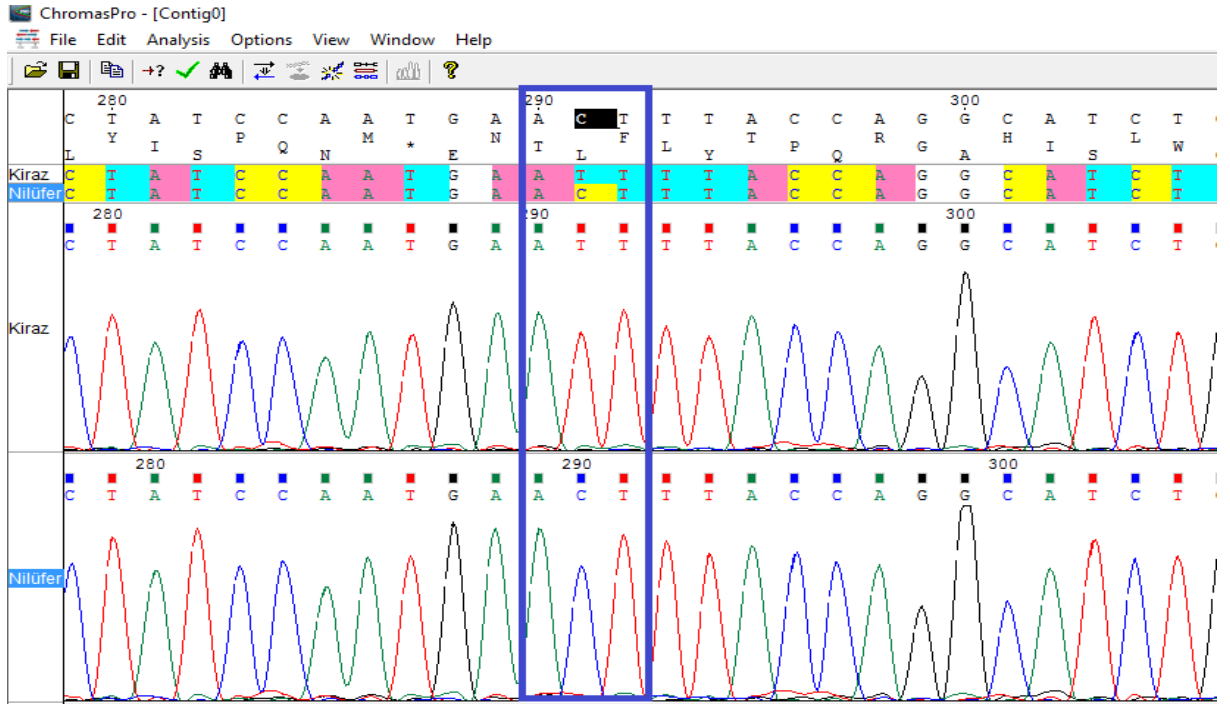
Klon 4 (Nilüfer) ve Klon 5 (Kiraz) arasında gen bankasında kayıtlı sekansa göre 15694, 15821 ve 15892 numaralı pozisyonlarda olmak üzere 3 nükleotidde farklılık tespit edilmiştir.



Şekil 4.29. Klon 4 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.30. Klon 4 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık

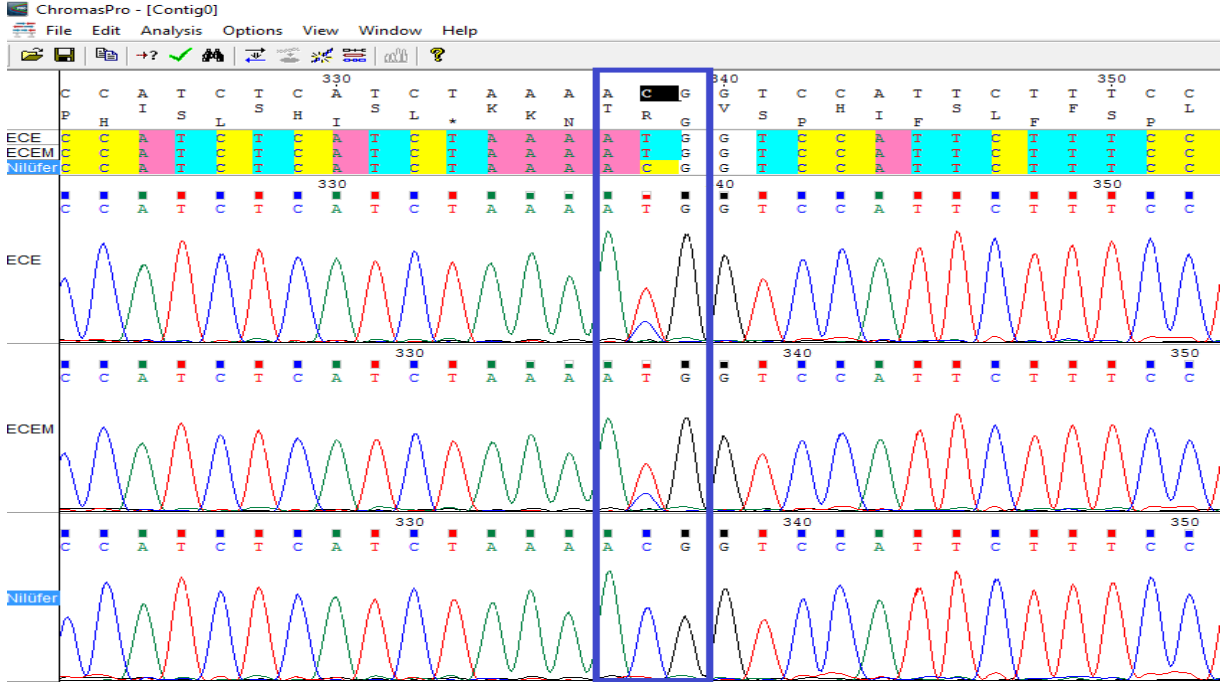


Şekil 4.31. Klon 4 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık

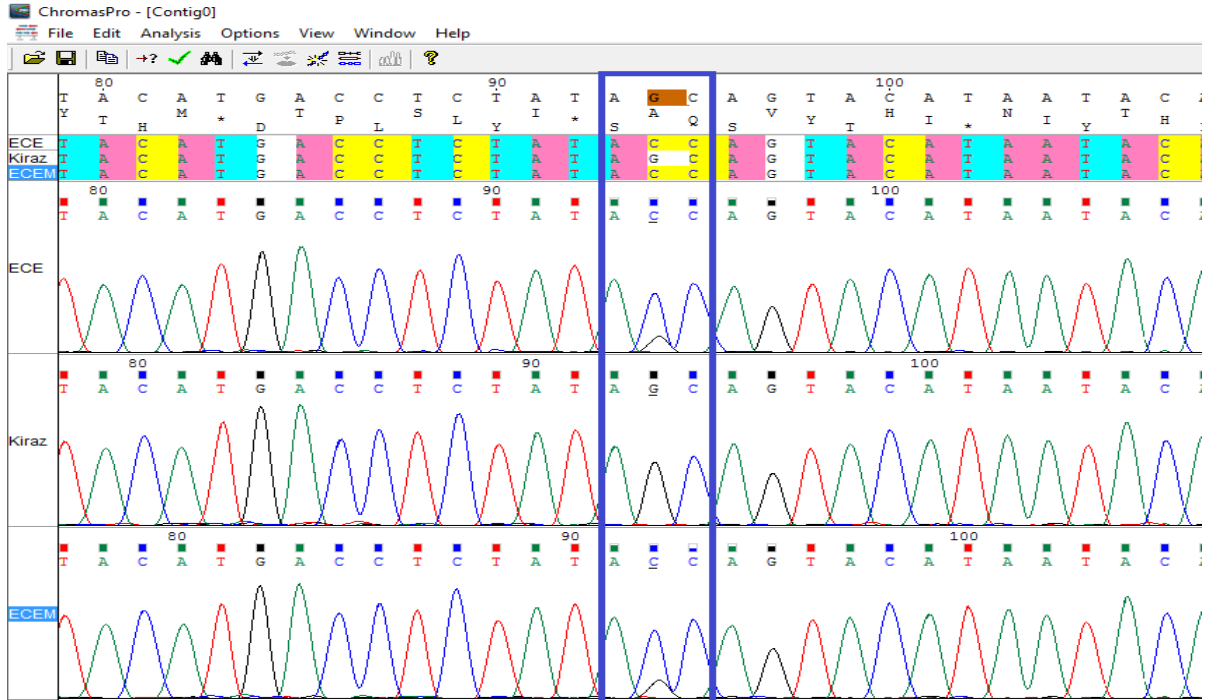
Klon 2 (Ece), Klon 3 (Ecem) ve Klon 4 (Nilüfer) bireyleri arasında gen bankasında kayıtlı sekansa göre 15791 ve 15937 numaralı pozisyonlarda olmak üzere 2 nükleotidde farklılık tespit edilmiştir.



Şekil 4.32. Klon 2, Klon 3 ve Klon 4 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15791. nükleotidde gözlemlenen farklılık

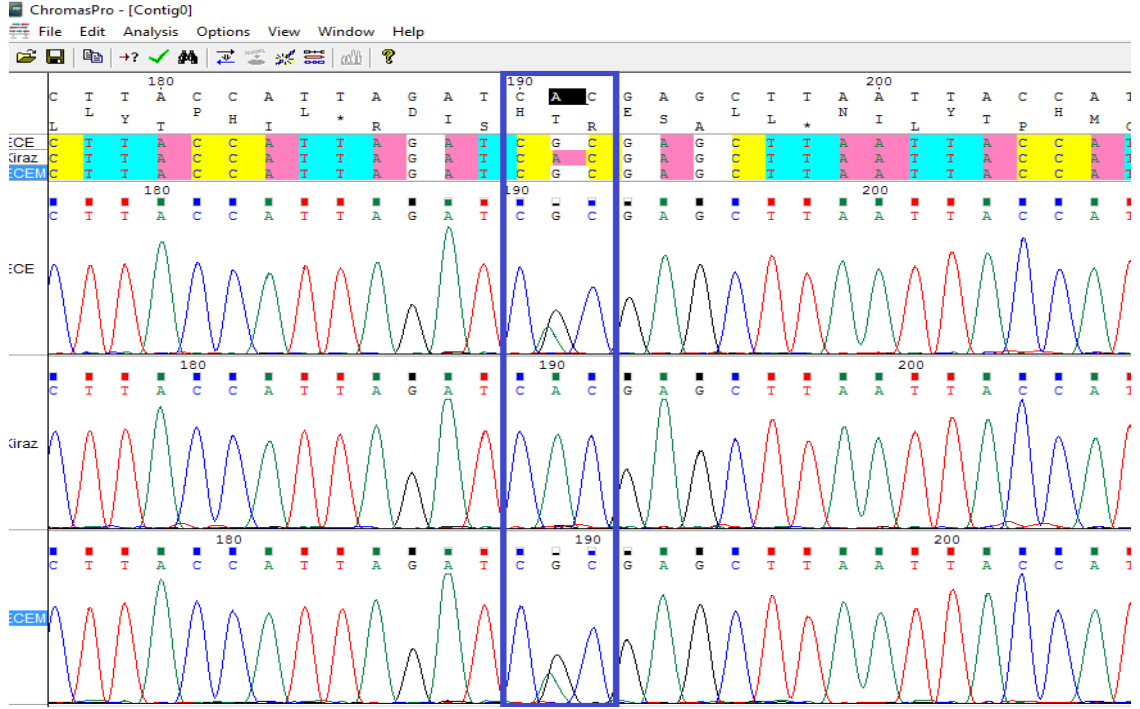


Şekil 4.33. Klon 2, Klon 3 ve Klon 4 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15937. nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.34. Klon 2, Klon 3 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık

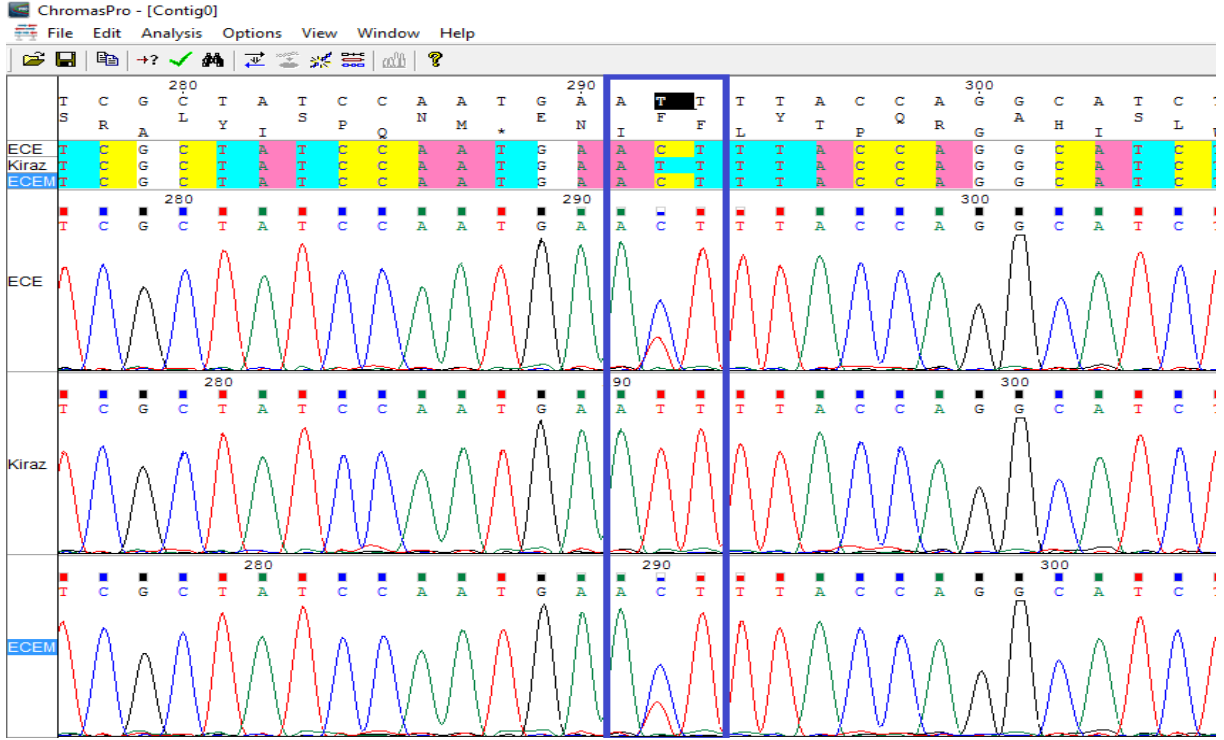
Klon 2 (Ece), Klon 3 (Ecem) ve Klon 5 (Kiraz) bireyleri arasında gen bankasında kayıtlı sekansa göre 15694, 15791, 15821, 15892 ve 15937 numaralı pozisyonlarda olmak üzere 5 nükleotidde farklılık tespit edilmiştir.



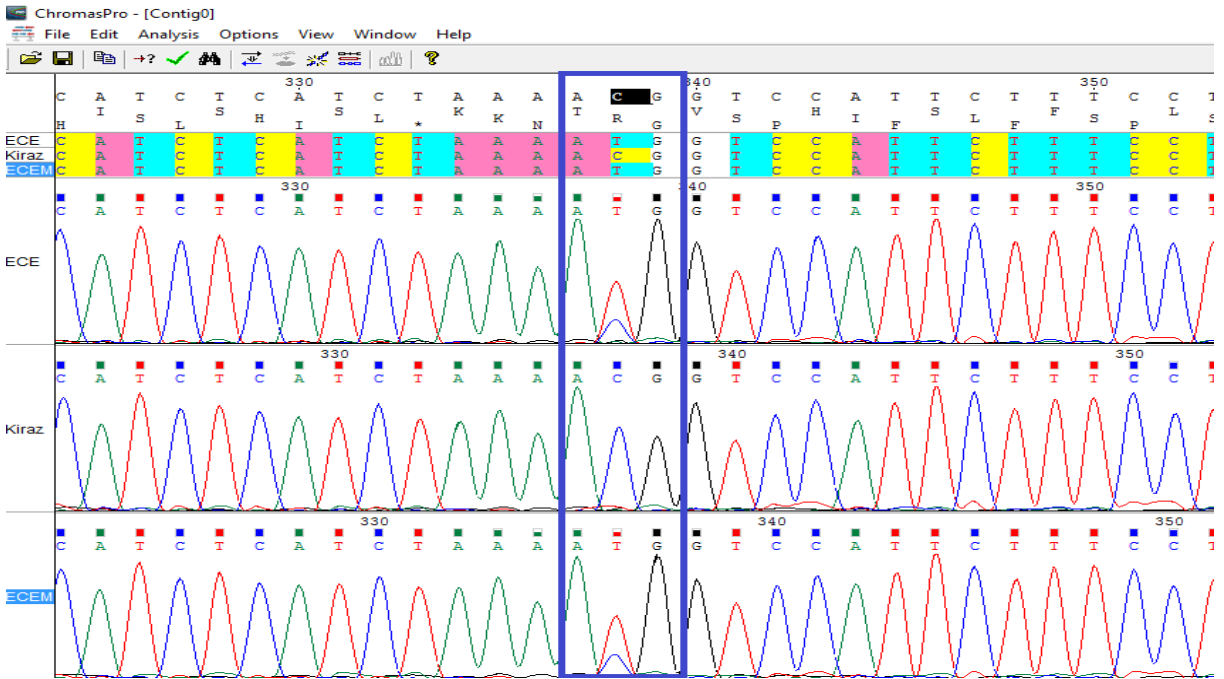
Şekil 4.35. Klon 2, Klon 3 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15791. nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.36. Klon 2, Klon 3 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.37. Klon 2, Klon 3 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.38. Klon 2, Klon 3 ve Klon 5 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15937. nükleotidde gözlemlenen farklılık

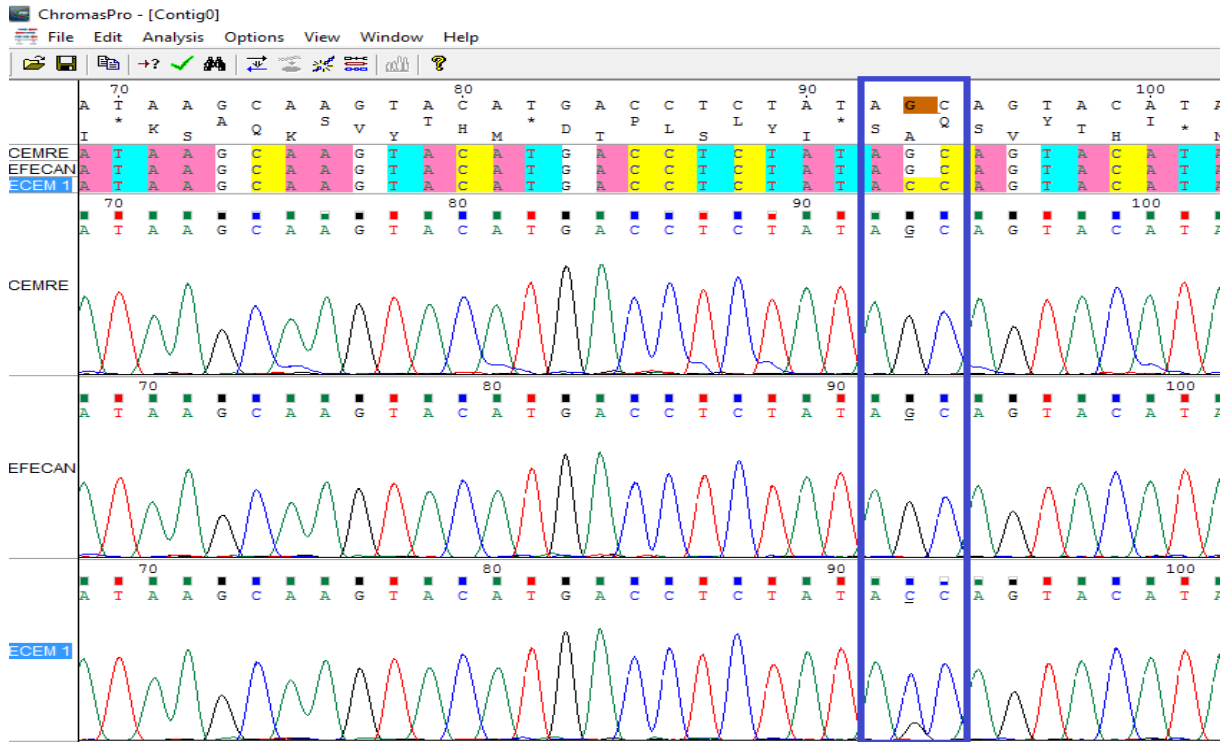
Klon 2 (Ece) ve Klon 3 (Ecem) karşılaştırıldığında; iki bireyin mtDNA' ları arasında hiçbir fark tespit edilmemiştir.

4.5.4. Dişi Klonlar ve Yavrularının Birbiri ile Karşılaştırılması

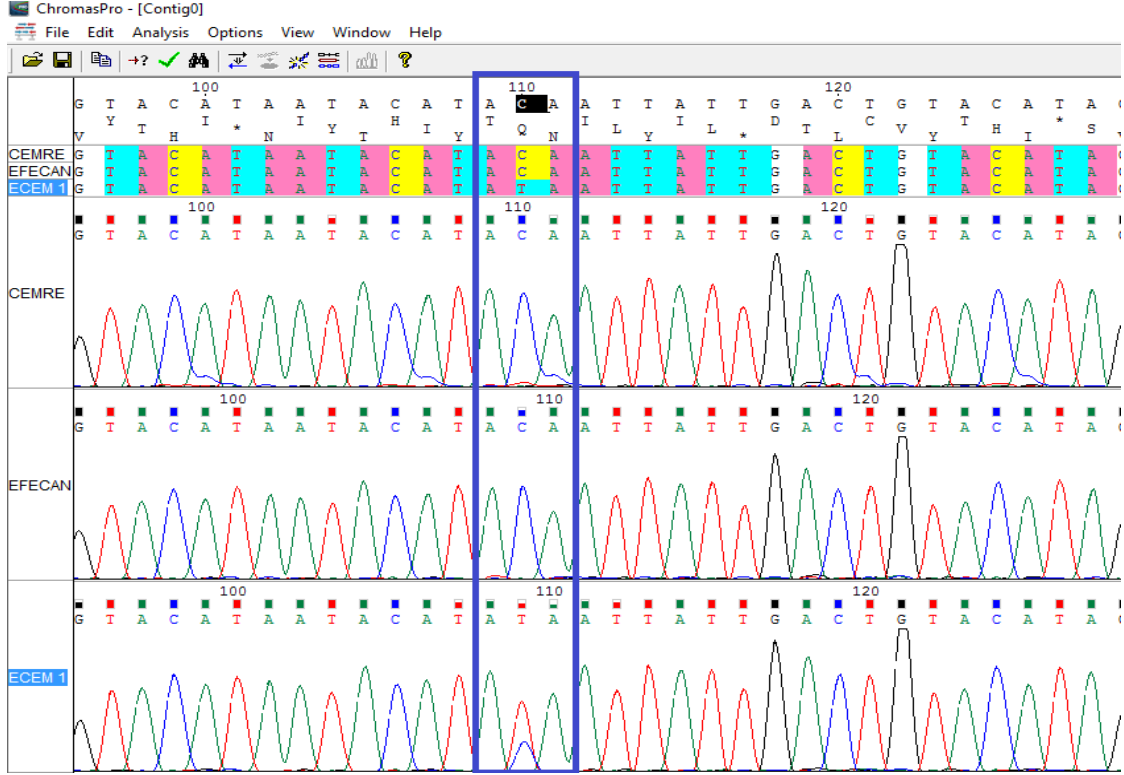
Anne Klon 5 (Kiraz) ve yavruları; Yavru K5.1 (Karakız) ve Yavru K1.K5.1 (Kurban) ile karşılaştırıldığında; bireylerin mtDNA'sı arasında hiçbir fark tespit edilmemiştir.

Anne Klon 4 (Nilüfer) ve yavruları; Yavru H1.K4.1 (Kardelen) ve Yavru K1.K4.1 (Yazgülü) ile karşılaştırıldığında; bireylerin mtDNA'sı arasında hiçbir fark tespit edilmemiştir.

Klon 3 (Ecem) ve yavruları K1.K3.1 (Cemre) ve K1.K3.2 (Efecan) arasında gen bankasında kayıtlı sekansa göre 15694, 15711, 15791, 15821, 15892, 15937 ve 15983 numaralı pozisyonlarda olmak üzere 7 nükleotidde farklılık tespit edilmiştir.



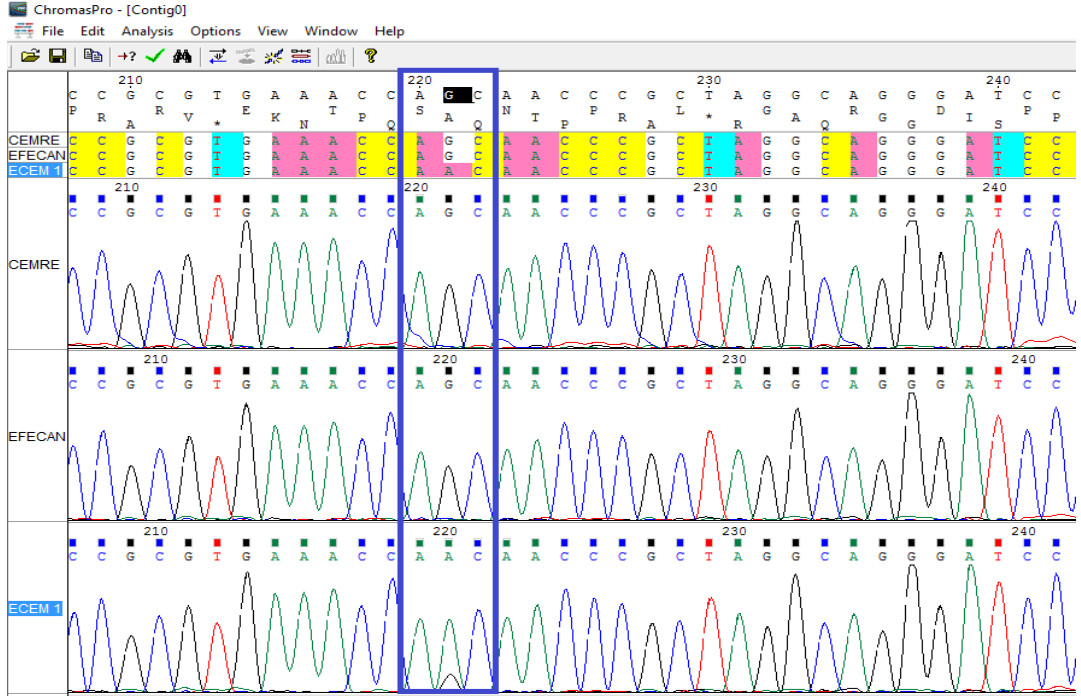
Şekil 4.39. Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15694. nükleotidde gözlemlenen farklılık



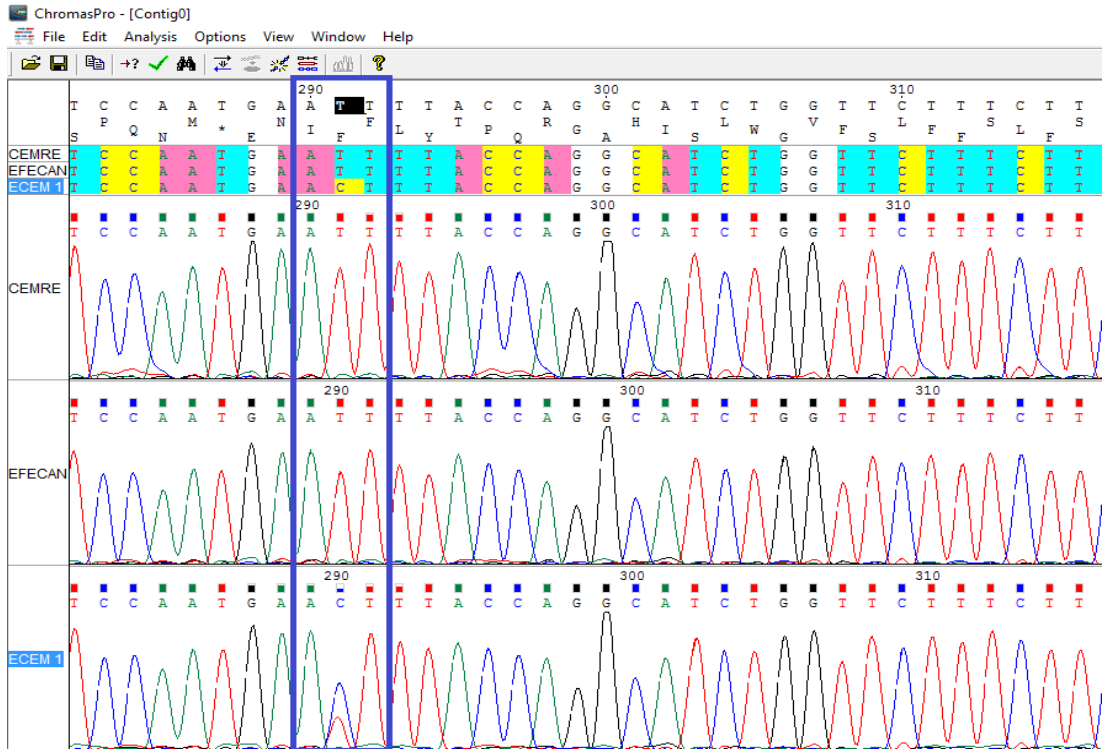
Şekil 4.40. Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15711. nükleotidde gözlemlenen farklılık



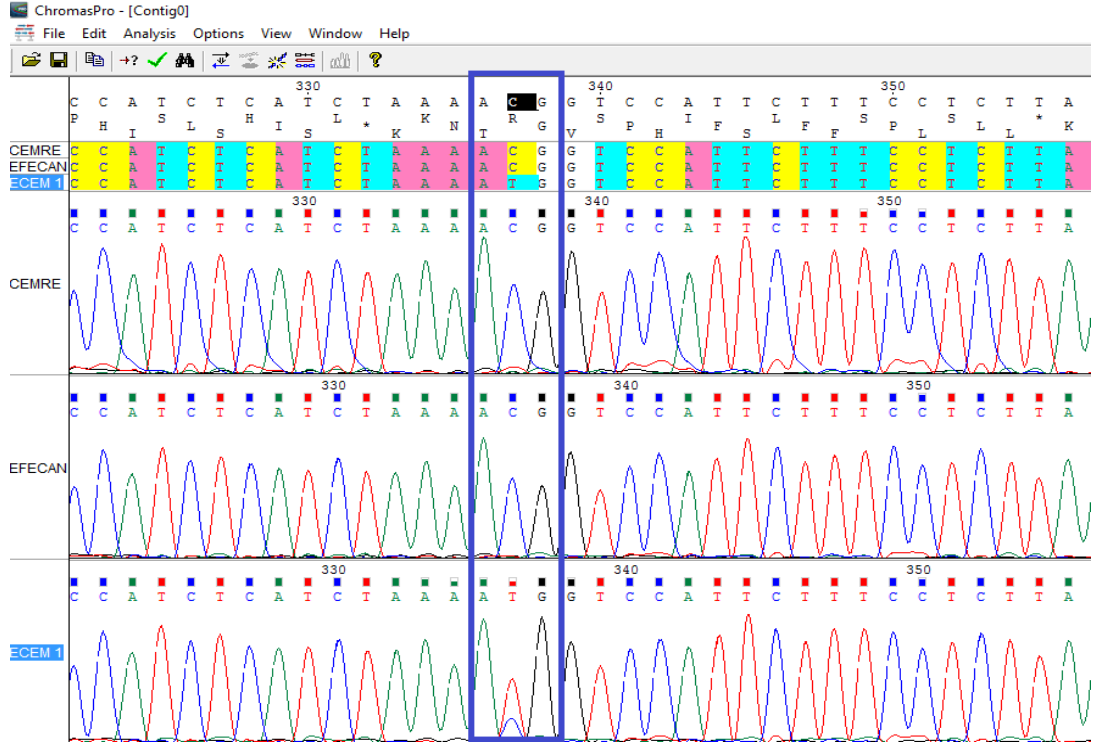
Şekil 4.41. Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15791. nükleotidde gözlemlenen farklılık



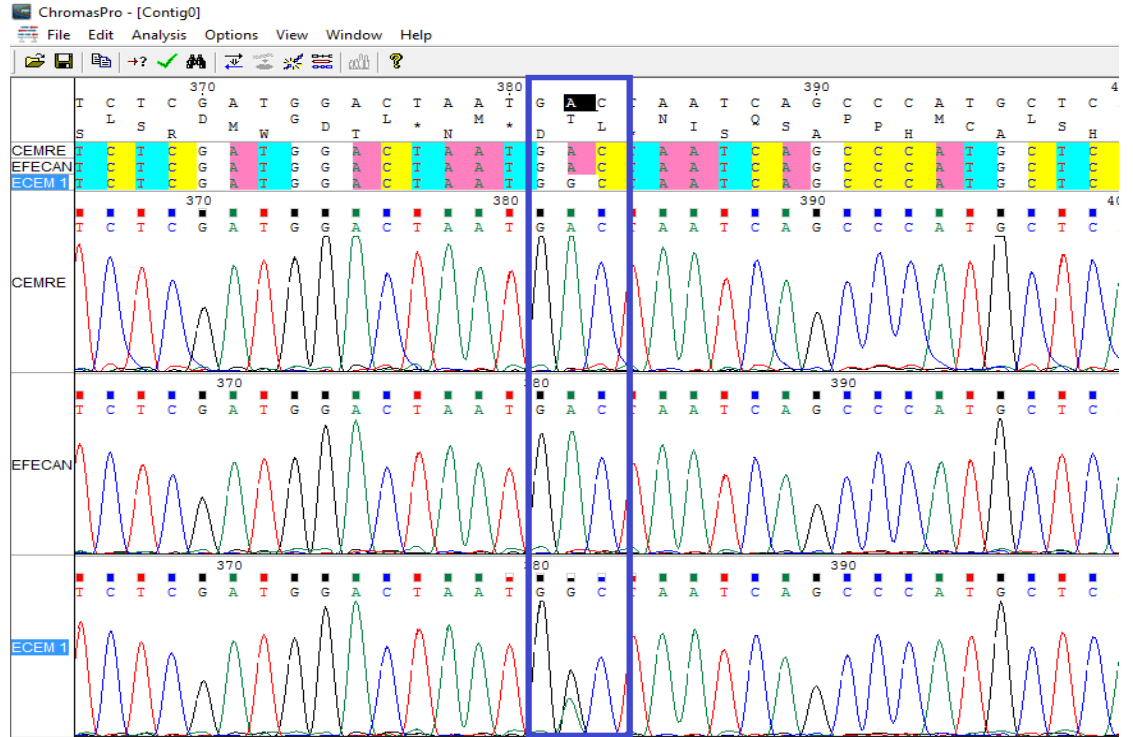
Şekil 4.42. Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15821. nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.43. Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15892. nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.44. Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15937. nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.45. Klon 3, Yavru K1.K3.1 ve Yavru K1.K3.2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15983. nükleotidde gözlemlenen farklılık

Yavru K1.K3.1 (Cemre) ve Yavru K1.K3.2 (Efecan) bireyleri ile hücre vericisi 2 (GC hücresi) arasında gen bankasında kayıtlı sekansa göre 15711 ve 15983 numaralı pozisyonlarda olmak üzere 2 nükleotidde farklılık tespit edilmiştir.



Şekil 4.46. Yavru K1.K3.1, Yavru K1.K3.2 ve hücre vericisi 2 arasında gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15711. nükleotidde gözlemlenen farklılık



Şekil 4.47. Yavru K1.K3.1, Yavru K1.K3.2 ve hücre vericisi 2 bireylerinde gen bankasına kayıtlı sekansa göre 15983. nükleotidde gözlemlenen farklılık

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Klonlama, erişkin bir canlıdan elde edilen vücut hücresinin o türe ait genetik materyali çıkartılmış bir yumurta hücresi içerisine konulması ile bir bireyin genetik kopyasının oluşturulması anlamına gelmektedir. Bu zamana kadar bu teknolojinin kullanılması ile birçok memeli türü klonlanmış ve teknoloji iyileştirilmeye çalışılmıştır. Ancak yapılan çalışmalarda elde edilen başarılar teknolojinin aydınlatılmasında yeterli olmamıştır. Bu sebeble klonlama teknolojisi ile elde edilen hayvanlar ve yavrularının detaylı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir. Bu sayede teknoloji daha anlaşılır hale getirilebilir. Bu amaç doğrultusunda klonlar ve yavrularının moleküler karakterizasyon sonuçlarının elde edilen klonların normal bir ırk popülasyonu oluşturmasının mümkün olup olmadığı ve bu teknolojinin nesli tükenmiş bir ırkın geriye getirilmesindeki muhtemel potansiyeli ile ilgili ipuçları vereceği düşünülmektedir.

Mikrosatellit belirteçler; polimorfizm oranının yüksek olması nedeniyle genetik haritalama, ebeveyn tayini (paternity test) , pedigri çalışmaları, akrabalı yetiştirmelerin (inbreeding) seviyesi ve etkisinin belirlenmesi, popülasyonların evrim tarihi çalışmaları, gen kaynaklarının korunması çalışmaları, genetik çeşitliliğin araştırılması, biyolojik materyallerin adli amaçlı kimliklendirilmesi için kullanılmaktadır. Bu belirteçler klon hayvanlarda ise; klonlar, onların yavruları ve klonların üretilmesinde kullanılan verici hücreden elde edilen genomik DNA'da mikrosatellit analizi yapılarak klonların genomik DNA açısından verici hücreler ile özdeş olduğu ve yavrularında bu klonlara ait olduğunu teyit etmek için kullanılmaktadır. Bu analizler FAO ve ISAG tarafından tavsiye edilen mikrosatellit belirteçler kullanılarak yapılmaktadır. FAO tarafından sığırlar popülasyonlarının araştırıldığı çalışmalarda kullanılacak 30 adet belirteç tavsiye edilmektedir (<http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.html>). Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde 6 (Yang ve ark. 2012), 9 (Zakhartchenko ve ark. 1999), 12 (Theoret ve ark. 2006) , 17 (Kato ve ark. 2000) adet mikrosatellit belirteç kullanılarak klon sığırların genomik DNA açısından karakterizasyonlarının yapıldığı görülmüştür. Yapılan bu yüksek lisans çalışmasında ise 10 adet mikrosatellit belirteç kullanılarak klon hayvanlar ve yavrularının genomik DNA karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar klon hayvanların verici hücreleri ile özdeş olduklarını ve yavruların bu klonlara ait olduğunu ortaya koymuştur. Ancak dişi klonların hepsinin tek bir hayvanın genetik kopyası, dolayısıyla genomik DNA'sının aynı olması sebebiyle yavruların annelerinin klon dişilerden hangisi olduğunu belirlemek mikrosatellit belirteçler ile mümkün değildir. Aynı şekilde babası Klon 1 ve Verici

Hayvan 1 olan yavruların da babalarının özdeş olması sebebiyle hangi babadan geldiklerinin ayırt etmek mümkün değildir. Klonlar için özel bir durum olarak her bir klonun farklı yumurta kaynağından gelmiş olması mtDNA analizi ile annelerin tespit edilmesini sağlayabilir. Ancak bu durum mtDNA'nın anne kaynaklı olması sebebiyle babalar için geçerli değildir.

mtDNA belirteçleri genel olarak; populasyonların tanımlanması, populasyon ve ekotiplerin orijinlerinin belirlenmesi, populasyonların coğrafi dağılımlarının ortaya konması, alttür içerisindeki haplotiplerin belirlenmesi, populasyonlar arasındaki gen akışı ve hibritlenme seviyelerinin tahmin edilmesi, anaya ait (maternal) kalıtım modellerinin izlenmesi, populasyonlar içi/arası genetik varyasyon düzeylerinin hesaplanması ve populasyonların genetik benzerlik ve farklılıklarından yararlanılarak filogenetik ilişkilerin tespit edilmesi, çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Genel kanı normal seksüel üreme esnasında mitokondrinin (ve mtDNA'lar) anneden geçtiği yönündedir. Babadan kaynaklı mitokondri yumurta içine girer ancak ilk bölünmeler ile oluşan az sayıdaki embriyonik hücrelerde bilinmeyen bir mekanizma ile hızla elimine edilir (Giles ve ark. 1980, Kaneda ve ark. 1995) .

Klonlama teknolojisi ile elde edilen hayvanlarda mtDNA geçişi incelendiğinde ise; mtDNA'nın normal seksüel üremede olduğu gibi genellikle alıcı yumurta kaynaklı olduğu görülmektedir (Plante ve ark. 1992, Steinborn ve ark. 2000, Evans ve ark. 1999, Steinborn ve ark. 2000, Tae Do ve ark. 2002, Burgstaller ve ark. 2007). Yapılan yüksek lisans çalışmasında moleküler karakterizasyonu yapılan 1 erkek ve 4 dişi klonun mtDNA'sının hücre vericilerinden farklı olduğu bulunmuş ve mtDNA'ların yumurta kaynaklı olduğu belirlenmiştir. Bu klonlardan Klon 2 ve 3 (Ece, Ecem)'ün analiz sonuçları incelendiğinde mtDNA'larının birbirleri ile aynı oldukları görülmüştür. Diğer 2 dişi klonun (Klon 4-Nilüfer ve Klon 5-Kiraz) ise hem birbirinden hem de Klon 2,3'ten farklı olduğu tespit edilmiştir. mtDNA geçişi generasyonlarda incelendiğinde Klon 4 ve 5'in mtDNA'ları yavruları ile aynı ancak Klon 3'ün yavrularından farklı olduğu görülmüştür.

Tek anneden bir batında doğan iki dişi klonun (Klon 2 ve 3) mtDNA analizlerinde hiçbir farklılığın tespit edilemesinin çeşitli sebepleri olabilir. Klonlama işleminde bir ovaryumdan iyi kaliteli 4 yumurta elde edildiğini ve günde 50 ovaryumdan (25 dişiye ait) yaklaşık 200 yumurta hücresi ile çalışıldığı düşünülürse aynı hayvana ait yumurtalardan gelişen embriyoların transfer edilmiş olma ihtimali %3 gibi düşük bir ihtimaldir. Bir başka ihtimal ise klon embriyonun transfer sonrası ikiye bölünerek iki ayrı embriyo olarak gelişmesidir. İki klon embriyonun transferi sonrası ultrason muayenelerinde sadece tek yavru

kesesinin fark edilmiş olması ve ikizliğin ancak doğum sırasında anlaşılması böyle bir ihtimalin de olabileceğini düşündürmektedir. Bunlara ilave olarak intaruterin gelişimi boyunca embriyolar arasında karşılıklı hücre değişimi ve vasküler anostomozdan kaynaklanan kan lenfosit hücreleri ve üreme hücreleri kimerizmi ikiz sığırlarda iyi bilinen bir olgudur. Bu tip kimerizm aynı zamanda at, koyun, insan, lama gibi diğer memeli türlerinde de görülmüştür (Hiendleder ve Wolf 2003). Bir çalışmada iki farklı yumurta kaynağından üretilen in vitro embriyoların aynı anneye transferi sonrasında ikiz fetusların kan ve karacigerinde kimerizm tespit edilmiştir (Hiendleder 2007). Bu durumda iki embriyo farklı yumurtadan gelmiş olsa dahi embriyolar arası hücre geçişi sebebiyle ikizlerin kanında iki ayrı yumurtadan kaynaklı hücrelerin bir arada varlığı görülebilir. Ancak bu durum diğer dokularda olmayabilir. Dolayısıyla kan hücrelerindeki kimerizme bağlı olarak yavrularından farklı mtDNA'ya sahip olduğu görülen dişi klonun (Klon 3-Ecem) yumurta hücrelerinde tek tip mtDNA tespit edilebilir. Yavrularda anneden farklı mtDNA varlığı görülmesi dişi klonun üreme hücreleri de dahil olmak üzere kan dışındaki diğer dokularında tek bir yumurtadan gelen mtDNA varlığının mümkün olabileceğini düşündürmektedir. Ancak tüm mtDNA analizleri kan örneklerinde yapıldığı için bu çalışmada kesin bir şey söylemek mümkün değildir. Ayrıca klon dişinin dizi analiz sonuçlarında bazı nükleotidlerde görülen çift bantın kirlilikten mi yoksa kimerizden mi kaynaklandığı ayırt edilememektedir. Görülen ikinci bandın gerçek olup olmadığı farklı bir yöntemle teyit edilmelidir.

Bu konuda sunulan birçok rapora rağmen mitokondriyal DNA geçişi klonlamada hala bir sorun veya en azından bir bilinmeyen olarak değerlendirilmektedir. Teknolojinin uygulanışının bir sonucu olarak klonların MtDNA varlığının yumurtadan geleceği öngörülür. Bunu teyit eden birçok çalışmaya rağmen bazı raporlarda tam açıklanamayan bulgulara rastlanması ırklar arası nükleer transferde farklı genetik materyallerin birbiri ile uyumu konusunu gündeme getirmektedir. Bu konuda çok az çalışma vardır. Bu nedenle klonların moleküler karakterizasyonu ile ilgili her çalışma teknolojinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Mevcut çalışmada incelenen klonlar iki farklı ırkın materyalinin bir araya getirilmesi ile oluşturulmuş ırklar arası klonlardır. Çalışmanın sonuçları da diğer birçok çalışmada rapor edildiği gibi mtDNA'nın yumurta kaynaklı olduğunu göstermiştir. Klonların halen sağlıklı olması ve sağlıklı yavrular vermesi mtDNA ve genomik DNA farklılığının klonlar ve jenerasyonlarında zararlı etkisinin olmadığını düşündürmektedir.

Klonlardaki mtDNA varlığı ile ilgili olarak tam tersi bir görüş klon evcil hayvanların üretilmesinde mtDNA farklılığının getirebileceği avantajlarla ilgilidir. MtDNA polimorfiktir

ve spesifik ana hattındaki bazı polimorfizmler süt üretimi ve büyüme performansı ile alakalıdır. Klonlama teknolojisi istenen genomik DNA ile arzu edilen polimorfizmi taşıyan mtDNA'nında bir araya getirilmesini ve böylece daha mükemmel bireylerin ortaya çıkmasını da sağlayabilir. Ancak bütün bu öngörülerin araştırmalarla desteklenmeye ihtiyacı vardır.

Klonlama, hayvancılık açısından baktığımızda gerek üstün genetik yapıya sahip, hastalıklara dirençli hayvanların sayısı artırmak gerekse sayıları azalan veya yok olan ırkları tekrar doğaya kazandırmak için başlı başına üretim amacıyla kullanılabilmesi gibi aynı zamanda gelişim biyolojisinde henüz çözülemeyen birçok mekanizmanın aydınlatılması için model organizmalar oluşturmak amacıyla da kullanılabilir. Her ne amaçla üretilmiş olursa olsun klonlar özel hayvanlardır ve halen birçok bilinmeyen bünyelerinde barındırmaktadırlar. Bu nedenle klonlar üzerinde yapılan her çalışma hem teknolojinin daha iyi anlaşılacak şekilde kontrol edilebilir hale gelmesine hem de bilinmeyen birçok mekanizmanın aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

Bu çalışma ırklar arası nükleer transfer sonucu oluşturulmuş klon sığır ve jenerasyonları üzerinde yürütülmüş moleküler karakterizasyon bulgularını içermektedir. Çalışma bulguları mikrosatellit belirteçlerin klonların özellikle köken aldığı birey ile genomik DNA açısından özdeş olduğunu tespit etmek amacıyla kullanılabilmesini, ancak genomik DNA bakımından özdeş klonların yavrularının hangi ebeveyne ait olduğunu belirlemede yetersiz olduğunu göstermiştir.

Klonlama çalışmalarında mtDNA geçişi halen bir bilinmeyen olarak gizemini sürdürmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalar gelişim biyolojisinden bildiğimiz "mtDNA anne orjinlidir" temel bilgisinin gerçek temellerini ve mekanizmanın işleyişini aydınlatma da şaşırtıcı ipuçları sunarken her bulgunun bir öncekini desteklemeyebildiği ve birbirinden farklı sonuçların ortaya çıkabileceği de görülmektedir. Mevcut çalışma da klonların hepsinin mtDNA'ları klonlandıkları hayvandan farklı bulunmuştur. Dolayısıyla tüm klonlar genomik DNA bakımından identikal ancak mtDNA bakımından birbirinden farklıdır. Bu daha önce yapılmış birçok çalışma ile uyumludur ancak iki dişi klonun klonlandıkları hayvandan farklı mtDNA'ya sahip olmalarına rağmen aralarında hiçbir fark görülmemesi düşündürücü bulunmuştur. Yine genel bilgi olarak yavruların mtDNA'larının anneleri ile aynı olması gerekir. Oysa iki dişi klonun yavrularının mtDNA'sı anneleri ile aynı iken bir dişi klonun yavrularının mtDNA'sı annelerinden farklı bulunmuştur. MtDNA geçişinin daha iyi aydınlatılması amacıyla klonların daha çok sayıda yavrusu ile çalışılması önerilebilir. Yine

Özellikle birbirinin aynı mtDNA'ya sahip tek taşıyıcı anneden doğan ikiz klon dişilerin mtDNA varlığı kan dışındaki dokularda da araştırılabilir. MtDNA profili dizi analizine ilave olarak farklı moleküler yöntemler kullanılarak incelenebilir ve sonuçların dizi analiz sonuçları ile nasıl örtüştüğü değerlendirilebilir.

Bir diğer konu farklı mtDNA geçişi ile oluşturulan klon sürünün süt verimi veya büyüme performansının ırk ortalamasından farklı olup olmadığının araştırılmasıdır. Elde edilen sonuçlar teknolojinin iyi yönde bir ilerlemeyi de sağlama da muhtemel potansiyelini görmek açısından faydalı olabilir.

6. KAYNAKLAR

- Anonim (2010). <http://www.turkhaygen.gov.tr/anadolu/proje.html> Erişim Tarihi: 10.11.2014
- Anonim (2011). <http://jcb.rupress.org/content/193/5/809.figures-only> Erişim Tarihi: 06.10.2015
- Anonim (2012). <http://evrenbilgisi.blogspot.com.tr/2012/05/klonlama-klonlama-nedir-klonlama.html> Erişim Tarihi: 12.08.2015
- Anonim (2015). <http://www.harbiforum.net/konu/kalitima-giris.51557/> Erişim Tarihi: 20.11.2015
- Aranguren-Méndez J, Jordana J, Gomez M (2002). Genetic conservation of five endangered Spanish donkey breeds. *J Anim Breed Genet*, 119(4): 256–263.
- Arat S, Gibbons J, Rzucidlo SJ, Miyoshi K, Venable A, Waltenburg R, Stice SL (2001a). Bovine cloning using adult donor cells treated with roscovitine. *Biol. Reprod*, 64(1):173.
- Arat S, Rzucidlo SJ, Gibbons J, Miyoshi K, Stice SL (2001b). Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulose cells into enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev*, 60: 20-26.
- Arat S (2010). “Hayvan Klonlama Teknolojileri”, “Modern Biyoteknoloji ve Uygulamaları” Editör: Dündar M, Bağış H, Erciyes Üniversitesi Matbaası, 56-98.
- Arat S, Çaputcu A, Akkoç T, Pabuccuoğlu S, Sağırkaya H, Cirit U, Nak Y, Koban E, Bağış H, Demir K, Nak D, Senunver A, Kılıçaslan R, Tuna B, Çetinkaya G, Denizci M, Aslan Ö (2011). Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 23:1012-1023.
- Avise JC (2004). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2nd Ed. Chapman and Hall, New York, 684 p.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol*, 17, 456–461.
- Barendse W, Armitage S.M (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics*, 6: 227-235.
- Batendse W, Vaiman D, Kemp S.L (1997). A medium density Genetic linkage map of the bovine genome. *Mammalian Genome*, 8: 21-28.
- Behl R, Sheoran N, Behl J, Vijn RK (2006). Genetic analysis of Ankamali pigs of India using microsatellite markers and their comparison with other domesticated Indian pig types. *J Anim Breed Genet*, 123(2): 131–135.

- Bennett P (2000). Demystified Microsatellites. *Journal of Clinical Pathology*. Mol Pathol, 53: 177–183.
- Bishop M.D, Kappes S.M (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136: 619-639.
- Bolormaa S, Ruvinsky A, Walkden-Brown S, Van Derwerf J (2008). DNAbased parentage verification in two Australian goat herds. *Small Ruminant Research*, 80: 95–100.
- Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368(6470): 455–457.
- Boyko AR, Boyko RH, Boyko CM, Parker HG, Castelhana M, Corey L, Degenhardt JD, Auton A, Hedimbi M, Kityo R, Ostrander EA, Schoenebeck J, Todhunter RJ, Jones P, Bustamante CD (2009). Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(33): 13903–13908.
- Bradley DG, MacHugh DE, Cunningham P, Loftus RT (1996). Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(10): 5131–5135.
- Brem G, Kuhholzer B (2002). The recent history of somatic cloning in mammals. *Cloning Stem Cells*, 4:57–63.
- Bruford MW, Bradley DG, Luikart G (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat Rev Genet*, 4(11): 900–910.
- Buchanan F.C, Adams L.J, Little John R.P (1994). Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics*, 22(2): 397-403.
- Burgstaller J P, Schinogl P, Dinnyes A, Müller M, and Steinborn R, (2007). “Mitochondrial DNA heteroplasmy in ovine fetuses and sheep cloned by somatic cell nuclear transfer” *BMC Developmental Biology* 7:14.
- Cai X, Chen H, Wang S, Xue K, Lei C (2006). Polymorphisms of two Y chromosome microsatellites in Chinese cattle. *Genet Sel Evol*, 38: 525–534.
- Campbell KHS (2002). A background to nuclear transfer and its applications in agriculture and human therapeutic medicine. *J Anat*, 200:267-275.
- Canon J, Checa M L, Carleos C, Vega-pla JL, Vallejo M, Dunner S (2000).The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Anim. Genet*, 31: 39-48.
- Cañón J, Alexandrino P, Bessa I, Carleos C, Carretero Y, Dunner S, Ferran N, Garcia D, Jordana J, Laloë D, Pereira A, Sanchez A, Moazami-Goudarzi K (2001). Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genet Sel Evol*, 33(3): 311–332.

- Ceriotti G, Caroli A, Rizzi R, Crimella C (2003). Genetic relationships among taurine (*Bos taurus*) and zebu (*Bos indicus*) populations as revealed by blood groups and blood proteins. *J Anim Breed Genet*, 120: 57–67.
- Chesne' P, Adenot P.G, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard J. P (2002). Cloned rabbits production by nuclear transfer from adult somatic cells.
- Cibelli J.B, Stice S.L, Golueke P. J, Kane J.J, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon F. A, Robl J.M (1998). Cloned transgenic calves from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280: 1256–1258.
- Cosse M, González S, Maldonado JE (2007). Crossamplification tests of ungulate primers in the endangered Neotropical pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Genet Mol Res*, 6(4): 1118–1122.
- Deka R, Jin L, Shriver MD, Yu LM, DeCruo S, Hundrieser J, Bunker CH, Ferrell RE, Chakraborty R (1995). Population genetics of dinucleotide (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms in world populations. *Am J Hum Genet*, 56(2): 461–474.
- Edwards CJ, Gaillard C, Bradley DG, MacHugh DE. Y-specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. *Anim Genet*, 31: 127–130, 2000.
- Ellegren H, Moore S, Robinson N, Byrne K, Word W, Sheldons B.C (1997). Microsatellite Evolution A Reciprocal Study of Repeated Lengths at Homologous Loci In Cattle and Sheep. *Mol. Biol. Evol*, 14(8):854-860.
- Evans MJ, Gurer C, Loike JD, Wilmut I, Schnieke A.E, Schon E.A (1999). Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep, *Nat Genet*, 23:90-93.
- Finnilä S, Lehtonen MS, Majamaa K (2001) Phylogenetic Network for European mtDNA. *Am J Hum Genet*, 68: 1475– 1484.
- Flamand JRB, Vankan D, Gairhe KP, Duong H, Barker JSF (2003). Genetic identification of wild Asian water Buffalo in Nepal. *Anim Cons*, 6: 265– 27.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G.A (2003). Cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 424:635.
- Ganai N.A, Yadav B.R (2001). Genetic variation within and among three Indian breed of goat using heterologous microsatellites makers. *Animal Biotechnology*, 12(2) :121- 136.
- Gao Ai-Bao, Wu Deng-Jun (2005). Microsatellite marker for paternity testing of Liangshan semi-fine wool sheep. *Hereditus (Beijing)*, 27 (1) : 85-90.
- Georges M. and Massey J (1992). Polymorphic DNA markers in Bovidae, (World Intellectual Property Org, Geneva) WO Publ. No. 92/13120.

- Gibbons J, Arat S, Rzucidlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respass D, Venable A, Stice SL (2002). Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol. Reprod*, 66: 895-900.
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:6715–6719.
- Glowatzki-Mullis M.L, Gaillard C, Wigger G, Fries R (1995). Microsatellitebased parentage control in cattle. *Anim. Genet*, 26: 7-12.
- Glowatzki-Mullis M.L, Muntwyler J, Baumle E, Gaillard C (2008). Genetic diversity measures of Swiss goat breeds as decision-making support for conservation policy. *Small Ruminant Research*, 74:202–211.
- Goissis MD, Caetano HV, Marques MG, de Barros FR et al (2007). Effects of serum deprivation and cycloheximide on cell cycle of low and high passage porcine fetal fibroblasts. *Reprod. Domest. Anim*, 42: 660-663.
- Hashem MA, Bhandari DP, Kang SK, Lee BC, et al. (2006). Cell cycle analysis of in vitro cultured goral (*Naemorhedus caudatus*) adult skin fibroblasts. *Cell Biol. Int*, 30: 698-703.
- Hiendleder S. Wolf E (2003). The mitochondrial genome in embryo Technologies. *Reprod Domest Anim*, 38:290-304.
- Hiendleder S (2007). Mitochondrial DNA Inheritance after SCNT, Somatic Cell Nuclear Transfer, Ed: P. Sutovsky, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, 103-116.
- Hoffmann I, Marsan PA, Barker JSF, Cothran EG, Hanotte O, Lenstra JA, Milan D, Weigend S, Simianer H (2004). New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: Recommendations of a joint ISAG/FAO working group. 29th ISAG (International Society of Animal Genetics) Congress, Tokyo.
- Ibeagha-Awemu EM, Erhardt G (2005). Genetic structure and differentiation of 12 African *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds, inferred from protein and microsatellite polymorphisms. *J Anim Breed Genet*, 122(1): 12–20.
- Inoue MM, Hirano T, Watanabe T, Mizoshita K, Yamakuchi H, Nakane S and Sugimoto Y (1997). Individual identification and paternity control of Japanese black cattle based on microstellite polymorphism. *Animal Science and Technology (Japan)*, 68:443–449.
- Ivankovic A, Dovc P, Kavar T, Caput P, Mioc B, Pavic V, Stuhec V, Leto J (2005). Genetic characterisation of the Pag island sheep breed based on microsatellite and mtDNA data. *Small Ruminant Res*, 57:167-174.
- Kaneda H, Hayashi J, Takahama S, Taya C, Lindahl K F, and Yonekawa H (1995). Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:4542–4546

- Kang BT, Kim KS, Min MS, Chae YJ, Kang JW, Yoon J, Choi J, Seong JK, Park HC, An J, Lee MH, Park HM, Lee H (2009). Microsatellite loci analysis for the genetic variability and the parentage test of five dog breeds in South Korea. *Genes Genet Syst*, 84(3): 245–251.
- Kantanen J, Olsaker I, Adalsteinsson S, Sandberg K, Eythorsdottir E, Pirhonen K, Holm LE (1999). Temporal changes in genetic variation of North European cattle breeds. *Anim Genet*, 30(1): 16–27.
- Kantanen J, Olsaker I, Holm LE, Lien S, Vilkki J, Brusgaard K, Eythorsdottir E, Danell B, Adalsteinsson S (2000). Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. *J Hered.* 91(6): 446–457.
- Kantanen J, Edwards CJ, Bradley DG, Viinalass H, Thessler S, Ivanova Z, Kiselyova T, Cinkulov M, Popov R, Stojanović S, Ammosov I, Vilkki J (2009). Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*). *Heredity.* 103(5): 404–415.
- Karhu A (2001). Evolution and applications of pine microsatellites. Academic Dissertation, Faculty of Science, University of Oulu, Finland.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurosawa K, Kato J.Y, Doguchi H, Yasue H, and Tsunoda Y (1998). Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282, 2095–2098.
- Kato Y, Tani T, Tsunoda Y (2000). Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120, 231-237.
- King MP, Attardi G (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, 246:500–503.
- Kumar S, Dixit S.P, Verma N.K, Singh D.K, Pande A, Kumar S, Chander R, Singh L.B (2009). Genetic Diversity Analysis of the Gohilwari Breed of Indian Goat (*Capra hircus*) Using Microsatellite Markers. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 4(3): 49-57.
- Lawson Handley L-J, Byrne K, Santucci F, Townsend S, Taylor M, Bruford MW, Hewitt GM (2007). Genetic structure of European sheep breeds. *Heredity.* 99: 620–631.
- Lee B.C, Kim M.K, Jang G, Oh H.J, Yuda F, Kim H.J, Shamim M.H, Kim J.J, Kang S.K, Schatten G, and Hwang W.S (2005). Dogs cloned from somatic cells. *Nature*, 436, 641.
- Li J, Wang G, Bai Z (2009). Genetic variability in four wild and two farmed stocks of the Chinese freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) estimated by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 287: 286–291.
- Li MH, Zhao SH, Bian C, Wang HS, Wei H, Liu B, Yu M, Fan B, Chen SL, Zhu MJ, Li SJ, Xiong TA, Li K (2002). Genetic relationships among twelve Chinese indigenous goat populations based on microsatellite analysis. *Genet. Sel. Evol*, 34:729–744.

- Li MH, Adamowicz T, Switonski M, Ammosov I, Ivanova Z, Kiselyova T, Popov R, Kantanen J (2006). Analysis of population differentiation in North Eurasian cattle (*Bos taurus*) using single nucleotide polymorphisms in three genes associated with production traits. *Anim Genet*, 37(4): 390–392.
- Li MH, Zerabruk M, Vangen O, Olsaker I, Kantanen J (2007). Reduced genetic structure of north Ethiopian cattle revealed by Ychromosome analysis. *Heredity*, 98: 214–221.
- Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely S.M, Zhou Q, Renard J.P, Leno G.H, and Engelhardt J.F (2006). Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev. Biol*, 293: 439–448.
- Ligda CH, Altarayhb J, Georgoudisb A (2009). The Econogene Consortium, Genetic analysis of Greek sheep breeds using microsatellite markers for setting conservation priorities *Small Ruminant Research*, 83: 42–48.
- Liu BH (1998). *Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis*. CRC Press LLC, Boca Raton, New York.
- Loftus R.T, MacHugh D.E, Bradley D.G, Sharp P.M and Cunningham P (1994). Evidence for two independent domestication of cattle. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 91: 2757-2761.
- Loftus RT, Ertuğrul O, Harba MH, El- Barody AA, MacHugh DE, Park SDE, Bradly DG (1999). A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: The Near East. *Mol Ecol*, 8: 2015–2022.
- Luikart G, England P.R (1999). Statistical Analysis of Microsatellite DNA Data *Trends Ecol Evol*, 14(7): 253-56.
- Luikart G, Gielly L, Excoffier L, Vigne JD, Bouvet J, Taberlet P (2001). Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(10): 5927–5932.
- MacHugh D.E, Shriver M.D, Loftus R.T, Cunningham P and Bradley D.G (1997). Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of Taurine and Zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics*, 146:1071-1086.
- Mannen H, Kohno M, Nagata Y, Tsuji S, Bradley DG, Yeo JS, Nyamsamba D, Zagdsuren Y, Yokohama M, Nomura K, Amano T (2004). Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Mol Phylogenet Evol*. 32(2): 539–544.
- Marklund S, Ellegren H, Eriksson S, Sandberg K, Andersson L (1994). Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim. Genet*, 25: 19-23.

- Mateus J.C, Penedo M.C, Alves V.C, Ramos M, Rangel-Figueiredo T (2004). Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites. *Anim. Genet*, 35: 106-113.
- Maudet C, Miller C, Bassano B, Breitenmoser- Würsten C, Gauthier D, Obexer-Ruff G, Michallet J, Taberlet P, Luikart G (2002). Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: Applications in Alpine ibex [*Capra ibex(ibex)*]. *Mol Ecol*, 11(3): 421–436.
- May-Panloup P, Chrétien MF, Savagner F, Vasseur C, Jean M, Malthiery Y, Reynier P (2003). Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Hum Reprod.*, 18(3):550-6.
- McKay SD, Schnabel RD, Murdoch BM, Matukumalli LK, Aerts J, Coppieters W, Crews D, Dias Neto E, Gill CA, Gao C, Mannen H, Wang Z, Van Tassell CP, Williams JL, Taylor JF, Moore SS (2008). An assessment of population structure in eight breeds of cattle using a whole genome SNP panel. *BMC Genetics*, 9:37. From <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/9/37>
- Meirelles FV, Bordignon V, Watanabe Y, Watanabe M, Dayan A, Lobo R B, Garcia J M and Smith LC (2001). Complete Replacement of the Mitochondrial Genotype in a *Bos indicus* Calf Reconstructed by Nuclear Transfer to a *Bos taurus* Oocyte. *Genetics*, 158: 351–356.
- Mello M.R.B, Caetano H.V.A, Marques M.G, Garcia J.F, Milazzotto M.P, Mendes C.M, Oliveira V.P, Visintin J.A (2003). Production of a cloned calf from a fetal fibroblast cell line . *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36:1485-1489.
- Moazami-Goudarzi K, Laloë D, Furet JP, Grosclaude F (1997). Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Anim Genet*, 28(5): 338–345.
- Mohler V, Zeller F.J, Wenzel G, Hsam S.L.K (2005). Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L.em Thell.).9. Gene MIZec1 from the *Triticum dicoccoides*-derived wheat line Zecoi-1. *Euphytica* 142:161-167.
- Molae V, Osfoori R, Eskandari Nasab MP, Qanbari S (2009) Genetic relationships among six Iranian indigenous sheep populations based on microsatellite analysis. *Small Rum Res*, 84: 121–124.
- Mommens G, Van Zeveren A, Peelman L J (1998). "Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity cases in American bison, *Bison bison* L." *Animal genetics*, 29 (1): 12-8.
- Mukesh M, Sodhi M, Bhatia S (2006). Microsatellite-based diversity analysis and genetic relationships of three Indian sheep breeds. *J Anim Breed Genet*, 123(4): 258–264.
- Negrini R, Nijman IJ, Milanese E, Moazami- Goudarzi K, Williams JL, Erhardt G, Dunner S, Rodellar C, Valentini A, Bradley DG, Olsaker I, Kantanen J, Ajmone-Marsan P,

- Lenstra JA (2007). European Cattle Genetic Diversity Consortium. Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting. *Anim Genet*, 38(1): 60–66.
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, and Perry A.C.F (2000). Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289:1188–1190.
- Orti G, Pearse DE, Avise JC (1997). Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94(20): 10745–10749.
- Ozdil F (2007). Mitokondriyel dna PZR-RFLP (restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) markerleri kullanılarak Türkiye'nin farklı yörelerine ait bal arılarının tanımlanması. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ozkan E (2005). Türkiye'de yetiştirilen yerli ve kültür sığır ırklarının genetik yapılarının mikrosatellitler ile incelenmesi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Padar Z, Angyal M, Egyed B, Füredi S, Woller J, Zöldag L, Fekete S (2001). Canine microsatellite polymorphisms as the resolution of an illegal animal death case in a Hungarian Zoological Gardens. *International Journal of Legal Medicine*, 115:79-81.
- Piko L, Taylor KD (1987). Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev Biol*, 123:364–374.
- Plante Y, Schmutz SM, Lang KDM (1992) Restriction fragment length polymorphism in the mitochondrial DNA of cloned cattle. *Theriogenology*, 38: 897-904.
- Polejaeva I.A, Chen S.H, Vaught T.D, Page R.L, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares D.L, Colman A, and Campbell K.H.S (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407:86–90.
- Rokas A, Ladoukakis E, and Zouros E (2003). Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (8); 411-417.
- Rooney A.P, Merritt D.B, Derr J.N (1999). Microsatellite diversity in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Hered*, 90: 228-231.
- Sambrook J, Fritsch E.F. and Maniatis T (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed.), 3 vol, Cold-Spring Harbor, New York.
- Schneider P.M, Seo Y, Rittner C (1999). Forensic mtDNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident. *Int J Legal Med*, 112:315–316
- Schutz M.M, Freeman A.E, Lindberg G.L, Koehler C.M and Beitz D.C (1994). The effect of mitochondrial DNA on milk production and health of dairy cattle. *Livest. Prod. Sci*, 37: 283-95.
- Schwartz M, Vissing J (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*. 22;347(8):576-80.

- Shi D, Lu F, Wei Y, Cui K, Yang S, Wei J, and Liu Q (2007). Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol. Reprod*, 77:285–291.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L and Westhusin M (2002). A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 415:859.
- Slate J.T, Marshall and Pemberton J (2000). A retrospective assessment of the accuracy of the- paternity inference program CERVUS. *Molec. Ecol*, 9: 801-808.
- Smith LC, Thundathil J, Filion F (2005). Role of the mitochondrial genome in preimplantation development and assisted reproductive technologies. *Reprod Fertil Dev*, 17:15–22.
- Solinas Toldo S, Fries R (1993). Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. *Mamm. Genome*, 4:720-727.
- Sollera BP, Paiva SR, Faria DA, Guimarães SEF, Castro STR, Egito AA, Albuquerque MSM, Piovezan U, Bertani GR, Mariante AD (2009). Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. *Livest Sci*, 123: 8–15.
- Steffen P, Eggen A (1993). Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Anim. Genet*, 24: 121-124.
- Steinborn R, Schinogl P, Zakhartchenko V et al (2000). Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nat Genet*, 25:255-257.
- Steinborn R, Schinogl P, Wells DN et al (2002). Coexistence of *Bos taurus* and *B.indicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones. *Genetics*, 162:823-829.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature.*, 25;402(6760):371-2.
- Tae Do J, Lee JW, Lee BY, Kim SB, Ryoo ZY, Lee HT, Chung KS (2002). Fate of Donor Mitochondrial DNA in Cloned Bovine Embryos Produced by Microinjection of Cumulus Cells. *Biology of Reproduction*, 67; 555-560.
- Takeda K, Takahashi S, Onishi A, Goto A (1999). Miyazawa A. Imai H. Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116:253-259.
- Takeda K, Kaneyama K, Tasai M, Akagi S, Takahashi S, Yonai M, Kojima T, Onishi A, Tagami T, Nirasawa K, Hanada H (2008). Characterization of a donor mitochondrial DNA transmission bottleneck in nuclear transfer derived cow lineages. *Mol Reprod Dev*, 75(5):759-65.
- Talbot J, Haigh J, Plante Y (1996). A parentage evaluation test in North American Elk (Wapiti) using microsatellites of ovine and bovine origin. *Anim. Genet*, 27:117- 119.

- Theoret C.L, Dore M, Mulon P, Desrochers A, Viramontes F, Filion F, Smith L.C (2006). Short-and long-term skin graft survival in cattle clones with different mitochondrial haplotypes. *Theriogenology*, 65:1465-1479.
- Vaiman D, Mercie, D (1994). A set of 99 cattle microsatellites: characterisation, synteny mapping, and polymorphism. *Mamm. Genome*, 5:288-297.
- Vaiman D, Schibler L, Bourgeois F, Oustry F, Amigues Y, Crihiu E.P (1996). A genetic linkage map of the male goat genome. *Genetics*, 144: 279-305.
- Vignon X, Chesne P, Le Bourhis D, Flechon J.E, Heyman Y, and Renard J.P (1998). Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C. R. Acad. Sci, III* 321:735–745.
- Vijh RK, Tantia MS, Mishra B, Kumar ST (2007). Genetic diversity and differentiation of dromedarian camel of India. *Anim Biotechnol*, 18(2): 81–90.
- Visscher P.M, Woolliams J.A, Smith D, Williams J.L (2002). Estimation of pedigree errors in the UK dairy population using microsatellite markers and the impact on selection. *J Dairy Sci*, 85:2368-2375.
- Wakayama T, Perry A.C.F, Zuccotti M, Johnson K.R, and Yanagimachi R (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369–374.
- Wani N.A, Wernery U, Hassan F.A.H, Wernery R, and Skidmore J.A (2010). Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod*, 82:373–379.
- Weber JL, May PE (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, 44: 388–396.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ & Campbell KH (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385: 810–813.
- Woods G.L, White K.L, Vanderwall D.K, Li G.P, Aston K.I, Bunch T.D, Meerdo L.N and Pate B.J (2003). A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, 301:1063.
- Yang B.C, Im G.S, Kim D.H, Yang B.S, Oh H.J, Park H.S, Seong H.H, Kim S.W, Ka H.H and Lee C.K (2008). Development of vitrified-thawed bovine oocytes after in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci*, 103:25-37.
- Yang B, Lee S, Hwang S, Lee H, Im G, Kim D, Lee D, Lee K, Jeon I, Oh S, Park S (2012). Phenotypic characterization of Hanwoo (native Korean cattle) cloned from somatic cells of a single adult BMB reports, 45(1):38-43.
- Zajc I, Mellersh C.S, Sampson J (1997). Variability of canine microsatellites within and between different dog breeds. *Mamm. Genome*, 8:182–185.
- Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, Schernthaner W, Prella K, Steinborn R, Müller M, Brem G, Wolf E (1999). Effects of serum starvation and re-cloning on the

efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts *Journal of Reproduction and Fertility*, 115:325-331.

Zhou Q, Renard J.P, Le Friec G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A and Cozzi J (2003). Generation of fertile cloned rates by regulating oocyte activation. *Science*, 302:1179:

ÖZGEÇMİŞ

Emel TÜTEN SEVİM; 25.11.1990 tarihinde Kahramanmaraş'ta doğdu. İlköğrenimini ve ortaöğrenimini Şehit Yusuf Çavuş İlköğretim okulunda, lise öğrenimini Erdem Beyazıt Anadolu Lisesi'nde (EBAL) tamamladı. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nden 2014 yılında bölüm 3.'sü olarak mezun oldu. Aynı yıl Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı.2014 yılından günümüze yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.