

# MOLEKÜLER MARKER TEKNİKLERİ

## ► RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

İlk olarak 1990'lı yıllarda kullanılmaya başlanmıştır

- RFLP'de DNA bir restriksiyon enzimi (kesim enzimi) ile parçalara ayrılarak incelenir
- Bakteriyel restriksiyon enzimleri DNA'yı her zaman aynı yerden keserler
- Ancak bazen mutasyonlar sonucu bireylerde bazı bölgeler bulunmayabilir
- Mutasyon bir gen içerisinde de olabilir genler arası bölgede de olabilir

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP'de DNA bir restriksiyon enzimi ile parçalara ayrılarak incelenir



# RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

## Aşamaları:

1. DNA İzolasyonu
2. DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi
3. Kesilen DNA'ların radyoaktif proflarla işaretlenmesi
4. Görüntülenmesi

# Dezavantajları

- İş gücü fazla
- Radyoaktif işaretleme gerektiriyor

# PCR (Polymerase Chain Reaction) =Polimeraz Zincir Reaksiyonu NEDİR???

- ▶ Belli bir DNA dizisinin çoğaltılması amacıyla uygulanan bir tüpte test yöntemidir
- ▶ Bakteriyel, viral, bitkisel veya hayvansal herhangi bir kaynaktan gelen DNA dizileri PCR ile çoğaltılabilir

# PCR'a dayalı tekniklerden bazıları

## RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

**Williams ve ark. (1990) tarafından geliştirilen ve genellikle 10 bazlık rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı teknik, çeşit ve tip tanımlama çalışmalarında sıkça tercih edilmektedir**

RAPD yöntemi, 9-10 baz uzunluğundaki rastgele primerlerin, kalıp (template) DNA'nın iki iplikçiği üzerinde, birbirine karşıt iki farklı noktada tamamlayıcılarını (komplementlerini) bularak, bu ara bölgenin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) esas alan polimorfizminden oluşmaktadır



DNA  
MgCl<sub>2</sub>  
dNTP  
Su  
Primer **AATGCATT**  
Taq polimeraz



**RAPD-Tekniđi moleküler analizlerde geniş bir kullanım alanı bulmuştur.**

**-Tür ve çeşitlerin moleküler tanımlanması (Büscher *et al.* 1994, Tschammer und Zyprian 1994, Moreno *et al.* 1995, Ye *et al.* 1998, Vidal *et al.* 1998, 1999, Ulanowsky *et al.* 2001),**

**-Somaklonal varyasyonların tespiti (Schneider *et al.* 1996),**

**- Marköre Dayalı Seleksiyon (Striem *et al.* 1996, Dalbó 1998, Luo *et al.* 2001)**

**- Genetik haritalama (Lodhi *et al.* 1995, Dalbó *et al.* 2000, Doligez *et al.* 2002, Grando *et al.* 2003, Fischer *et al.* 2004)**

**Bunlardan bazılarıdır.**

# AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

- ▶ **Teknik temel olarak aşağıdaki şekilde uygulanmaktadır.**

(AFLP tekniğı PCR aşaması öncesi)

- ▶ DNA'nın spesifik restriksiyon enzimleri ile (ECoR1/Mse I) kesimi ve bu enzim sistemlerine uygun adaptörlerin (primerlerin) kesim bölgelerine DNA ligaz enzimi ile birleřtirilmesi,
- ▶ Ligaz edilen bu bölgelere (adaptörlere) uygun primerler ile restriksiyon fragmentlerinin ön çoğaltımı (pre-amplifikasyonu)

(AFLP tekniğı PCR aşaması)

- ▶ Bu fragmentlerin özel oluşturulan ve değışik şekillerde (radyoaktif veya biotin vb) işaretlenmiş primerlerle DNA bölgelerinin çoğaltımının (amplifikasyonunun) sağlanması ve sonuçların poliakrikamid jel elektroforezinde görüntülenmesi, aşamalarından oluşmaktadır.



❖ **AFLP-Tekniđi iki PCR amplifikasyon aşaması (Ön ve selektif PCR) ve RAPD tekniğine göre daha uzun primer kullanıldığından tekrarlanabilir ve genomu daha selektif bir şekilde tarayabilme özelliğine sahiptir.**

❖ **Poliakrilamit jel elektroforezi ile çok daha küçük DNA bantları incelenebilir**

❖ **Florasın işaretli primer kullanıldığında otomasyona uygun bir tekniktir.**

**Bu özellikleri sayesinde teknik genetik haritalama çalışmalarında (Dalbó *et al.* 1998, Doligez *et al.* 2003, Grando *et al.* 2003, Fischer *et al.* 2004), *Vitis vinifera*-çeşitlerinin moleküler tanımlanması ve genetik ilişkilerinin belirlenmesinde (Martinez-Zapater *et al.* 1998), marköre dayalı seleksiyonda (Pauquet *et al.* 2001) ve asma klonlarının ayrımında (Ergül 2001) kullanılmıştır.**