

Bir Holştayn Sığır Populasyonunda Bazı Genomik Lokusların Allel Frekanslarının Belirlenmesi ve Birey Tanımlanmasındaki Önemi*

Harun CERİT

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootečni Anabilim Dalı, Genetik Bilim Dalı, İstanbul - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 17.08.2001

Özet: Son yıllarda DNA dizilerinin değişik moleküler genetik teknikleri ve özgün DNA polimorfizmlerinin genetik marker olarak kullanımları hızla gelişmektedir. Bu çalışmada sığır genomunda bulunan 7 değişik polimorfik lokusun allel ve genotip frekanslarının İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Öğretim, Araştırma ve Uygulama Çiftliği'ndeki sığır populasyonuna ait dağılımları incelenmiştir. Buna bağlı olarak çalışmanın hedefi araştırmada ele alınan 7 lokusun heterozigotluk oranı dışlama gücü, uyuşma olasılığı ve ayırtılma gücü açısından değerlendirilmesi ve ilgili lokusların hayvanların kimlik tayininde kullanılabilirliklerinin araştırılması olmuştur.

Hayvanlardan alınan kan örneklerinden fenol-kloroform-izoamil alkol ve chelex yöntemi kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Spektrofotometre ile, DNA'nın miktarı ve saflık derecesi belirlendikten sonra 7 DNA lokusu için PCR yöntemine dayalı amplifikasyon yapılmıştır. Amplifikasyon ürünlerinin varlığı EtBr ile boyanarak % 1,5 agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. Denatüre edilmiş poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak ve gümüş boyama yapılarak PCR ürünleri değerlendirilerek allellerin fenotipleri belirlenmiştir.

Araştırma sonunda BMS1822 lokusu dışında Hardy-Weinberg dengesine uyumsuzluk gözlenmemiştir. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Öğretim, Araştırma ve Uygulama Çiftliği genelinde yapılan bu çalışmada 7 STR/mikrosatellit lokusu içinde en yüksek heterozigotluk değeri % 83,3 ile BMS2270 lokusunda gözlenirken en düşük değer % 31,4 ile BMS2721 lokusunda görülmüştür. En yüksek dışlama olasılığı 0,662 ile BMS2270 lokusunda gözlenirken en düşük değer 0,066 ile BMS2721 lokusunda gözlenmiştir. En yüksek ayırtılma gücü 0,947 ile BMS2270 lokusunda gözlenirken en düşük değer 0,504 ile BMS2721 lokusunda gözlenmiştir. Uyuşma (karşılaşma) olasılığında ise en yüksek değeri veren lokuslar BMS3019 ve BMS2721 olurken en düşük değerler BMS2270 ile BMS1822 lokuslarında saptanmıştır. Bu çalışmada kullanılan lokusların kombine ayırtılma ve dışlama gücü değerlerinin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla bu sistemlerin DNA profillemeye analizlerinde kullanılacak markerler olabileceği söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Heterozigotluk derecesi, genetik markerler, dışlama gücü, mikrosatellit, polimorfizm

Determination of the Allele Frequency of Some Genomic Loci in a Holstein Cattle Population and its Importance in Individual Identification

Abstract: Nowadays, the use of DNA sequences with genetic techniques and DNA polymorphism as genetic markers is increasing very rapidly. In this study, we examined the frequencies of seven different polymorphic loci in the cattle population of İstanbul University Veterinary Medicine Research and Application Farm. Thus, our aim was to examine and calculate the power of exclusion, match probability and power of discrimination of the seven loci, and examine the usefulness of the involved loci in identification tests.

For DNA extraction, Chelex and Phenol-Chloroform-Isoamil alcohol methods were applied to the blood taken from animals. After measuring the amount and purity degree of DNA with a spectrophotometer, seven DNA loci were amplified by PCR. The amplification products were stained with EtBr and examined with 1.5% Agarose gel electrophoresis. Using denaturated polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining, PCR products were evaluated and phenotypes of the alleles were determined.

At the end of the study, a mismatch to the Hardy-Weinberg equilibrium was observed in all loci but BMS1822. The highest heterozygosity ratio was 83.3% for BMS2270, and the lowest ratio was 31.4% for BMS2721 among the seven STR/mikrosatellite loci we studied. The highest exclusion probability was 0.662 for BMS 2270, and the lowest was 0.066 for BMS2721. The highest power of discrimination was 0.947 for BMS2270, and the lowest was 0.504 for BMS2721. The highest matching probability was for BMS3019 and BMS2721, and the lowest was for BMS2270 and BMS1822. It was observed that the loci in this study have very high power of discrimination and power of exclusion values when combined. Thus, these systems may be useful as markers in DNA profiling.

Key Words: Heterozygosity, genetic markers, exclusion probability, mikrosatellite, polymorphism

* Bu araştırma TÜBİTAK tarafından desteklenen VHAG-1471 nolu projenin bir bölümüdür.

Giriş

Çiftlik hayvanlarının ebeveyn kontrolleri, son yıllara kadar uluslararası standardizasyonu yapılmış olan kan grupları yöntemi ile global olarak belirlenmekteydi (1). Buna rağmen bu gibi geleneksel metotların yerini moleküler biyolojik yöntemlerin alması yönünde çabalar vardır. Çünkü kan grupları ile herhangi bir şüpheli ebeveynlik durumunun doğruluğu ispatlanamaz, fakat yanlış tespit edilmiş ebeveynlik durumları meydana çıkarılabilir (2). Bununla beraber, sadece yavru ile ebeveynlerin kan tipleri uygunsa ebeveynliğin büyük bir olasılıkla doğru tespit edilmiş olduğu söylenebilir. Böyle bir olasılığa rağmen, kan grupları ile ebeveyn testi, şüphelilerin tespit edilmesi şeklinde değil, uygun olmayanların dışlanması esasına dayanmaktadır.

Kros-hibridizasyon yapan bir prob kullanılmak sureti ile genomik DNA'nın uygun enzimlerle kesilerek çoklu polimorfik parçalar halinde mini veya mikrosatellit dizilimi içeren bireysel-spesifik DNA bant örneklerinin analizi DNA fingerprint (parmak izi) olarak terimselleştirilmiştir. Bu yöntem ilk olarak insanlarda (3,4,5), daha sonra bitki (6,7) ve sonunda da evcil hayvanlarda kullanılmıştır (8,9,10). DNA parmak izi her kişi için özeldir ve bu izlerin yarısı anneden, diğer yarısı da babadan gelmektedir. DNA parmak izi adli tıpta doku örneklerinin kaynağını ortaya çıkarmak bakımından çok önemli ve kesin bir uygulama alanı bulmuştur. Ayrıca bu örneklerin babalık kuşkuvarında ve göçler nedeniyle ortaya çıkan karışıklıkların önlenmesinde çok büyük bir yardımı olmaktadır.

Son yıllarda DNA polimorfizmleri birey tanımlanmasında genetik marker (işaretleyici) olarak kullanılmaktadır. Çünkü bu polimorfizmler döden döle klasik Mendel kalıtımı ile aktarılabilmektedir. Özellikle de bir populasyon içerisinde polimorfik lokustaki DNA dizisinin iki kromozomda farklı olma olasılığı ne kadar yüksekse o lokus genetik çalışmalar için o kadar değerlidir. Aynı lokusta nükleotid dizileri ile oluşturulan iki yada daha çok genotipin aynı toplumda belirli bir sıklıkta bulunan DNA polimorfizmleri, DNA molekülünün yapısında yer alan ve bireyler arasında farklılık gösteren nükleotid değişimleridir. Herhangi bir hastalıkla ilgili olmayan bu değişimler genlerin ekson ya da intron bölgeleri ile gen dışı bölgelerde bulunmaktadır. Ancak DNA dizisindeki bu farklılara intron bölgelerde ekson bölgelere göre daha sıklıkla rastlanmaktadır (11,12). Ana-baba tayini, doğada yaşayan türlerin tanısı, bu türler

arasındaki polimorfizm hesaplamaları, evolüsyon ve haritalama çalışmaları, bitki ve hayvan türlerinin saflığının belirlenmesi ve şüphelilerin saptanması gibi çok geniş alanlarda kullanımı olan DNA parmak izi yönteminin temelini Polymerase Chain Reaction (polimeraz zincir reaksiyonu) tekniği oluşturmaktadır (13).

PCR yöntemine dayalı uzunluk varyasyon sistemleri VNTR (variable number of tandem repeat: değişken sayıda tekrar eden dizinler) ve STR (short tandem repeat: kısa tekrar eden dizinler) polimorfizmidir. Kısa ardışık tekrarlanan dizinler tüm ökaryot genomda bulunabilen polimorfik lokuslardır. Tekrarlanan bu baz dizinleri 2-6 baz çifti uzunluğundadır. Herhangi bir STR lokusunda, söz konusu tekrarların sayısı farklı kromozomlarda farklı olabileğinden, ebeveyn tayininde kullanılacak bir polimorfizm şekli ortaya çıkmaktadır. Değişken sayıda tekrar eden ve minisatellit olarak adlandırılan VNTR'ların bir alt grubu, kısa tekrar eden dizinler STR'lardır ve mikrosatellit olarak adlandırılırlar (3,8,14). Mikrosatellitler genom içerisinde mono, di, tri, tetra nükleotid permutasyonların herhangi biri şeklinde ardışık olarak tekrarlanan kısa DNA segmentleridir. Mikrosatellitlerin en önemli özellikleri polimorf olmalarıdır. Mikrosatellitler tüm populasyon içerisinde benzer özellikler göstermelerine rağmen bireyden bireye 2-6 nükleotidlik gibi çok küçük farklılıklar göstermektedirler ve genom içerisinde rasgele dağılmışlardır (15,16,17).

Araştırmalarında dinükleotid tekrar dizilerini içeren STR/mikrosatellitleri kullanan Bowling ve ark. (14) atlarda babalık tayini için, heterozigotluğu düşük olarak buldukları lokuslarda dışlama gücüne ilişkin daha düşük değer bildirmişlerdir. Buna karşılık heterozigotluk derecesini yüksek olarak buldukları lokuslarda daha yüksek bir dışlama gücü bulmuşlardır. Aynı çalışmada tüm lokusları kullanarak yaptıkları değerlendirmelerinde ise kombine dışlama gücünü % 99'luk doğrulukla saptamışlardır. Mikrosatellitlerin, keçi babalık testi ve populasyon polimorfizmi analizinde kullanıldığı bir başka çalışmada ise genetik farklılıkların saptanmasında çok kullanışlı olduğu belirtilmiş ve kombine dışlama gücü için yine % 99'luk bir değer bildirilmiştir (18).

Heyen ve ark. (19) ebeveyn testinde, yarı otomatik floresan genotipleme tekniği için 6 multipleks geliştirmişlerdir. Bu multipleksler, 17 sığır otozomunda 22 mikrosatellitin çoğaltılması için gereken primer parçalarını içermektedir. Araştırmacılar, çalışmalarında

dışlama tahminlerini 5 ayrı ırka ait 1022 Holstein ve 311 et sığırının genotipleriyle yapmış ve iki durum planlamışlardır. Birinci durumda muhtemel ebeveynlerden biri ve yavru için genotipler bilinmekte fakat gerçek ebeveyn için genotip bilinmemektedir. İkinci durumda ise her üçü için de genotipler bilinmektedir. Eğer muhtemel hayvan gerçek ebeveyn değilse 22 marker birinci durumda $>0,9986$, 2. durumda $0,9999$ olasılıkla onu dışlama olasılığı saptamışlardır. Benzer bir başka çalışmada Luikart ve ark. (20) çeşitli keçi ırklarında multipleks (çoklu) lokusları kullanarak babalık tayininde dışlama gücünü $0,9999$ doğrulukla saptayabildiklerini ve bunun keçilerde populasyon yapısını, tarihsel gelişimi ve yaban Capra türleri ile evcil keçi türleri arasındaki genetik ilerlemeyi göstermesi açısından da önemini vurgulamışlardır.

Mikrosatellitler, evcil hayvanlarda pedigrî kontrolü ve populasyon genetiği çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (20). Bu bağlamda mikrosatellitlerin birey tanımlanmasında ve akrabalık ilişkilerinin saptanmasında kullanılabilmesi için ilgili populasyonların allel frekanslarını belirlemek ve söz konusu lokusların istatistikî parametrelerini hesaplamak gerekmektedir. Çünkü bu testler değerlendirilirken kullanılan hesaplamalarda ilgili populasyonların gen frekansları yer almaktadır. Dolayısıyla gen sıklıkları populasyonlar arasında farklılık gösteriyorsa mutlaka bireyin ait olduğu populasyonun gen sıklığı ele alınmalıdır. Aksi takdirde yapılan test bireyin aleyhine sonuçlanabilir.

Bir genetik markerin birey tanımlanmasında kullanılabilirliğini ölçmek için dışlama gücü, uyuşma olasılığı, ayırtılma gücü, heterozigotluk oranı vb. çeşitli parametreler kullanılmaktadır (16). Hangi sistemlerin birey tanımlanmasında kullanılmasının daha yararlı olacağı konusunda tüm sistemlerin ölçülen parametrelerine bakılarak karar verilebilmektedir. Bu parametreleri hesaplayabilmek için söz konusu sistemin ilgili populasyonda hangi şekilde ve ne sıklıkla rastlandığının bilinmesi gerekmektedir.

Son yıllarda, sığır, koyun ve keçi DNA'sında birçok yeni genetik polimorfizm gösteren bölge bulunmuştur. Bu araştırmada lokus başına yüksek ve düşük sayıda allel içeren DNA bölgeleri seçilmiştir. Böylece yüksek ve düşük allelli lokuslar arasındaki farkın (genetik çeşitliliğin) gözlenilebileceği düşünülmüştür. Bu doğrultuda 7 adet dinükleotid tekrar dizilerine sahip STR/mikrosatellit lokusu seçilmiş (21) ve babalık tayininde kullanılabilirleri

açısından değerlendirmeleri yapılmıştır (Tablo 1). Değerlendirmede ampirik ve teorik yaklaşımların her ikisi de kullanılmıştır. Sonuçlar dışlama gücü, uyuşma olasılığı, ayırtılma gücü, heterozigotluk oranı ve babalık indeksi açısından değerlendirilmiştir. Araştırmanın temel amacı babalık tayini olduğundan, elde edilen gen sıklıkları, Hardy- Weinberg dengesine uyumu açısından da değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada sığır genomunda bulunan 7 değişik polimorfik lokusun allel ve genotip frekanslarının İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Öğretim, Araştırma ve Uygulama Çiftliği'ndeki sığır populasyonuna ait dağılımları incelenmiştir. Buna bağlı olarak çalışmanın hedefi araştırmada ele alınan 7 lokusun heterozigotluk oranı dışlama gücü, uyuşma olasılığı ve ayırtılma gücü açısından değerlendirilmesi ve ilgili lokusların hayvanların kimlik tayininde kullanılabilirliklerinin araştırılması olmuştur. Araştırmanın temel amacı sığırlara ait ebeveyn tayininde kullanılacak olan populasyon genetiği standartlarının belirlenmesi ve çeşitli lokusların, uygun deneysel koşulların oluşturularak hayvanların kimlik tayininde kullanılabilirliklerinin araştırılması olmuştur.

Materyal ve Metot

Araştırmada, materyal olarak İ.Ü. Veteriner Fakültesi Eğitim Öğretim Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nde bulunan Holştayn sığır populasyonuna ait 125 adet sığırdan alınan periferik kan örnekleri kullanılmıştır. Tüm örneklerden oluşturulabilecek yapay anne-çocuk-baba üçlüleri meydana getirilmiştir.

DNA izolasyon yöntemleri

DNA izolasyonunda kullanılacak yöntemlerden ilki, fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi olmuştur. Bu yöntemde DNA izolasyonunda, önce proteinler fenol-kloroform kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra yalnız kloroform kullanılarak, bütünüyle saf DNA eldesi amaçlanmıştır. Bu işlemin en büyük avantajı, diğer inorganik çözücülerden daha saf ve verimli DNA elde edilmesidir. Yöntemin uygulanmasında Sambrook ve ark. (22)'nin bildirdiği standart işlem basamakları kullanılmıştır. İkinci yöntem ise Chelex®100 ile DNA izolasyonu olmuştur. Sığır kan hücrelerinden DNA ekstraksiyonu için Walsh ve ark. (23)'nden modifiye edilmiş Chelex yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemin esası, proteinlerin denatürasyonunu ve reçine ile daha sıkı bağlanıp çökmesini sağlamaktır. Son olarak da her iki

yöntem için de, spektrofotometre ile karışımın üst kısmında yer alan DNA'nın miktarı ve saflık derecesi O.D._{260/280} (Optik Densite) oranında belirlenmiştir. Elde edilen DNA ekstraktları su altı agaroz jelde yürütülmüş ve UV ışığı altında DNA'nın varlığı tespit edilmiştir. DNA izolasyonu gerçekleştirilemeyen sığırlardan yeniden kan alınmış ve bütün işlem tekrarlanmıştır. DNA'nın başarılı şekilde izole edildiği ekstraktlardan PCR ürünleri hazırlanmıştır.

PCR (Polymerase Chain Reaction) Şartları

Bu çalışmada lokus başına yüksek ve düşük sayıda allel içeren DNA bölgeleri seçilmiştir. Böylece yüksek ve düşük allelli lokuslar arasındaki farkın (genetik çeşitliliğin) gözlenmesi gerçekleştirilebilir. Çalışmada kullanılan lokuslar ile bu lokusların çoğaltımında kullanılan PCR primerlerinin oligonükleotid ve PCR çoğaltma şartları Tablo 1'de verilmiştir (23).

PCR karışımı her bir örnek için son hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Her steril PCR tüpüne 16,45 µl steril distile su, 2,5 µl 10X tampon, 2,5 µl 0,8 µM primer çifti, 0,05 µl Taq DNA Polimeraz (0,25U), 1,0 µl dNTP (100 µM) konulmuştur. Örnek sayısı kadar 0,5 ml steril PCR tüpü etiketlenmiş ve spora dizilmiştir. Her PCR tüpüne 22,5 µl PCR karışımı pipetlenmiş ve üzerine 2,5 µl kalıp DNA (100 ng) eklendikten sonra buharlaşmayı ve

karışımın hava ile temasını önlemek amacıyla, karışımın üzerine 2 damla mineral yağ eklenmiştir. Tüpler, ısı döngü aletine yerleştirilmiştir. Isı döngü şartları; başlangıç denatürasyonu için 3 dakika 94 °C, denatürasyon için 30 saniye, 94 °C'de, primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması (yapışması=annealing) için 30 saniye 58 °C'de, yeni sentezlenecek DNA zincirlerinin uzaması (=extension) için 1 dakika 72 °C'de 30 döngü, son uzama için 4 dakika 72 °C olarak belirlenmiştir. Yaklaşık 1,5 saat sonra DNA'nın istenilen bölgelerinin çoğaltılması (amplifiye olması) gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin çoğaltılması (amplifikasyonu) işleminden sonra PCR ürünleri su altı agaroz jel elektroforezinde görünürleştirme işlemine tabi tutulmuştur. Hemen incelenmeye alınmayan örnekler -20 °C'de saklanmıştır.

PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görünürleştirilmesi

1.5 g agaroz tartıldıktan sonra üzerine 100 ml 0.5xTBE (Tris Buffer EDTA) tamponu ilave edilmiştir. Isıtıcıda sürekli karıştırılarak kaynaması beklenmiş ve homojen bir karışım elde edildikten sonra oda ısısında 50-60 °C'ye kadar soğutulmuştur. Karışıma 10 mg/ml ethidium bromide (EtBr) çözeltisinden 5 µl eklenmiştir. Daha sonra jel, bir elektroforez kasetine dökülmüş ve polimerize olması beklenmiştir. Her bir PCR örneği,

Tablo 1. Araştırmada çalışılan lokuslar ile bu lokusların çoğaltımında kullanılan PCR primerlerinin oligonükleotid ve PCR çoğaltma şartları.

Lokuslar (Genbank erişim no)	Primer dizinleri 5'→3'	Allel Sayısı	Tekrar Dizinleri	Baz çifti Sayısı
<i>BMS1822</i> (<i>G19022</i>)	AAAGGCTTCTATTTGTGGTGG TTGATGCTTTATTGTTTTCTCT	17	(TG) ₁₉	70-108
<i>BMS2270</i> (<i>G18937</i>)	CTGCGTTAACACCCACC GCAGGAAGGCTGATGCAC	11	(CA) ₂₃	70-98
<i>BMS2658</i> (<i>G18943</i>)	TCCCTGGACTTCTTGACAGAG CTGGCCCCAGACACAATC	9	(TG) ₁₃	114-134
<i>BMS2572</i> (<i>G18952</i>)	ATGTTGCAGGCTTGTGGAG TCGACCCGACCGTAAAAG	8	(TG) ₁₄	103-127
<i>BMS2842</i> (<i>G18986</i>)	GAAACTGCCTGCAAAAGTAATC AACTGGTTTTTCAGAAGGAGACA	4	(CA) ₁₁	110-116
<i>BMS3019</i> (<i>G18991</i>)	AATATGCAGCATCAGTCCTTCC GACACGACTGAGCGACTAAGC	2	(ACC) ₁₁	103-126
<i>BMS2721</i> (<i>G19113</i>)	GTTCTCTGGGATTTGTGTCAAT ATCCATGCAATAAAATTTAAAAGTG	3	(CA) ₁₀	138-142

(TG: Timin Guanin; CA: Sitozin Adenin)

yüklemeye tamponu ile karıştırılarak 5 µl olarak jel kuyularına yüklenmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin varlığı EtBr ile boyanarak, % 1,5 agaroz jelde güç kaynağı 100 volt ve 0,50 amper serbest akım altında, 20 dakika olacak şekilde ayarlandıktan sonra incelenmiştir (16).

Poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş boyama sonrası PCR ürünleri değerlendirilerek allellerin fenotipleri belirlenmiştir (24). Bu çalışmada 33 cm x 42 cm x 0,4 mm boyutlarında dikey denatüre poliakrilamid jel, Promega (24)'nin bildirdiği protokole uygun şekilde hazırlanmıştır.

STR/mikrosatellit lokuslarına ait allellerin adlandırılmasında kullanılan en uygun yöntemlerden biri her allelin kendi baz uzunluğuna göre adlandırmak, diğeri ise her allelin içerdiği tekrar sayısına göre adlandırmaktır. Bu çalışmada da kullanılan lokuslara ait allellerin taşıdıkları ardışık tekrar dizinlerinin sayısına göre adlandırma yapılmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan istatistiksel hesaplamalar

Araştırmada, her lokustan elde edilen allellerin sıklıkları, heterozigotluk oranı, dışlama gücü, uyuşma olasılığı ve ayırlama gücü hesaplanmıştır. Çünkü bir genetik markerin bireyin tanımlanmasında (identifikasyonunda) kullanılabilirliğini ölçmek için çeşitli parametreler (dışlama gücü, uyuşma olasılığı, ayırlama gücü, heterozigotluk oranı vb.) kullanılmaktadır. Hangi sistemlerin bireyin tanımlanmasında kullanılmasının daha yararlı olacağı konusunda, tüm sistemlerin ölçülen parametrelerine bakılarak karar verilmektedir. Bu parametreleri hesaplayabilmek için söz konusu sistemin ilgili popülasyonda hangi şekilde ve ne sıklıkla rastlandığını bilmek gerekmektedir. Bu değerlerin hesaplanmasında aşağıdaki istatistiksel işlemler kullanılmıştır (16,19,25,26,27).

1. Gen Frekanslarının saptanması için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır (16).

$$P = 2x + y / 2n$$

x = Homozigot allel sayısı

y = Heterozigot allel sayısı

n = Denek sayısı

2. Standart hata için kullanılan formül (16);

$$sh = \sqrt{P(1-P)/2n}$$

3. Lokuslara ait sonuçların Hardy Weinberg dengesine uygunluğu belirlenmiştir (16). Beklenen değerlerin hesaplanması:

Homozigot fenotipler için p^2N , q^2N , r^2N , s^2N ; Heterozigot fenotipler için $2pqN$ denklemi kullanılmıştır.

p ve q: allel frekansı

N: allel sayısı

4. Gözlenen ve beklenen frekanslar arasındaki bağlantıyı bulmak için standart χ^2 analizi uygulanmıştır.

$$\chi^2 = (\text{Gözlenen} - \text{Beklenen})^2 / \text{Beklenen}$$

Formülü kullanılarak $\Sigma\chi^2$ değeri hesaplanmıştır (25).

5. Serbestlik derecesi (SD) için genotip sayısı ile allel sayısı arasındaki fark alınmıştır (25).

$$S.D = \text{Genotip sayısı} - \text{allel sayısı}$$

6. Her bir lokus için beklenen heterozigotluğun hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır (19,26,27).

$$h = (1 - \Sigma P_i^2)$$

P_i = allel sıklığı

7. Gözlenen heterozigotluk için, gözlenen heterozigot sayısının toplam denek sayısına oranı alınarak hesaplanmıştır (27).

8. Dışlama olasılığı (exclusion probability=PE) Tipik bir babalık testi için rasgele seçilmiş bir bireyin DNA profilinden farklı bir bireyin kesimini vermektedir. Dışlama olasılığı için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır (27).

$$PE = h^2 (1 - 2hH^2)$$

h = Heterozigotların sayısı; H = Homozigotların sayısı

9. Birden fazla lokusun dışlama olasılığı için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır (27).

$$PE = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - PE_i)$$

10. Karşılaşma (uyuşma) olasılığı: Aynı DNA profilini bulduran birey sayısının saptanmasını sağlayan karşılaşma olasılığı (Probability of Matching = pM) için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır (27).

$$pM = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

i ve j = allel sıklığı; P_{ij}^2 beklenen genotip sıklığı

11. Ayırlama gücü (power of discrimination = P_d) karşılaşma olasılığının 1'den farkı alınarak hesaplanmıştır.

12. Birden fazla lokusun ayırlama gücü için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır (16,27).

$$P_d \text{ kombine} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - P_{di})$$

Kombine ayırlama için formülün açılımı = 1 - (P₁xP₂...xP₃...x...P_n)

n = Lokus sayısı

13. Babalık indeksi (PI=Paternity index; babalık oranı): Biyolojik baba olması için test edilen bireyin rasgele seçilmiş bireyden kaç kere daha güçlü baba olduğunu yansıtmaktadır. Tipik bir babalık indeksi bireyin durumundan çok kullanılan lokus ile ilgilidir. Genel olarak 1'den daha küçük bir değer akraba olmamanın bir göstergesidir. Babalık indeksinin belirlenmesi için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır (27).

$$PI = 1 / 2H$$

H: Homozigotluk derecesi

Bulgular

Bu çalışmada materyal olarak İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Öğretim Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nde yer alan, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, her iki cinsiyetten, Holştayn sığır populasyonuna ait sağlıklı 125 adet sığırdan alınan kan örneklerinde BMS1822, BMS2270, BMS2658, BMS2572, BMS2842, BMS3019 ve BMS2721 lokuslarının gen sıklıkları saptanarak ebeveynlik testindeki etkinlikleri açısından değerlendirilmiştir.

Araştırmada kullanılan 7 mikrosatellit lokusa ait allel sıklıkları, deneklerin gözlenen her bir genotipin sayısal dağılımından hesaplanmıştır. Elde edilen sıklıklar Hardy-Weinberg (HW) dengesine uyum, heterozigotluk oranı, dışlama gücü, uyuşma olasılığı ve babalık indeksi oluşturmak üzere kullanılmıştır. Her lokus, kendi aralarında karşılaştırılmış ve farklılık istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan populasyonda saptanan gen sıklıkları BMS1822 lokusu için, en sık rastlanan 11. allel (0,285), en düşük rastlanan 15. ve 18. alleller (0,004) ve en sık gözlenen fenotip % 21,30 ile 10-11; BMS2270 lokusu için, en sık rastlanan 12. allel (0,245), en düşük rastlanan 15. ve 16. alleller (0,005) ve en sık gözlenen fenotip % 10,784 ile 11-13; BMS2658 lokusu için, en sık rastlanan 10. allel (0,421), en düşük rastlanan 14. allel (0,06) ve en sık gözlenen fenotip % 17,073 ile 10-10 ve 10-12; BMS2572 lokusu için, en sık rastlanan 12. allel (0,464), en düşük rastlanan 8. allel (0,015) ve en sık gözlenen fenotip % 21,649 ile 12-13; BMS2842 lokusu için, en sık rastlanan 7. allel (0,627), en düşük rastlanan 9. allel (0,085) ve en sık gözlenen fenotip % 42,254 ile 7-7; BMS3019 lokusu için, en sık rastlanan 7. allel (0,713), en düşük rastlanan 8. allel (0,288) ve en sık gözlenen fenotip % 52,500 ile 7-7; BMS2721 lokusu için, en sık rastlanan 8. allel (0,806), en düşük rastlanan 9. allel (0,028) ve en sık gözlenen fenotip % 66,667 ile 8-8 alleli olmuştur (Tablo 2 ve 3). Her lokusun Hardy-Weinberg'e uyum bilgisi Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 2. Araştırmada kullanılan 7 STR lokusunun gözlenen allel sıklıkları

Allel	BMS1822	BMS2270	BMS2658	BMS2572	BMS2842	BMS3019	BMS2721
6	0,000	-	0,012	-	0,092	-	-
7	0,066	-	0,025	-	0,627	0,713	0,167
8	0,087	0,054	0,019	0,015	0,197	0,288	0,806
9	0,157	0,044	0,185	0,046	0,085	-	0,028
10	0,244	0,191	0,432	0,124	-	-	-
11	0,285	0,196	0,148	0,119	-	-	-
12	0,120	0,245	0,136	0,469	-	-	-
13	0,033	0,162	0,037	0,196	-	-	-
14	0,000	0,098	0,006	0,031	-	-	-
15	0,004	0,005	-	0,000	-	-	-
16	0,000	0,005	-	-	-	-	-
17	0,000	0,000	-	-	-	-	-
18	0,004	0,000	-	-	-	-	-
19	0,000	-	-	-	-	-	-
20	0,000	-	-	-	-	-	-
21	0,000	-	-	-	-	-	-
22	0,000	-	-	-	-	-	-

Tablo 3. 7 STR lokusunun genotip dağılımı ve HW dengesine uyumu.
(Gözlenmeyen genotipler tabloya alınmamıştır)

Genotip	BMS1822			BMS2270			BMS2658			BMS2572			BMS2842			BMS3019			BMS2721		
	GD	%	BD	GD	%	BD	GD	%	BD	GD	%	BD	GD	%	BD	GD	%	BD	GD	%	BD
6-6	-	-	-	-	-	-	0	0,0	0,0	-	-	-	1	1,4	0,6	-	-	-	-	-	-
6-7	-	-	-	-	-	-	0	0,0	0,0	-	-	-	4	5,6	8,1	-	-	-	-	-	-
6-8	-	-	-	-	-	-	0	0,0	0,0	-	-	-	5	7,0	2,6	-	-	-	-	-	-
6-9	-	-	-	-	-	-	0	0,0	0,4	-	-	-	2	2,8	1,1	-	-	-	-	-	-
6-10	-	-	-	-	-	-	2	2,5	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-11	-	-	-	-	-	-	0	0,0	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-12	-	-	-	-	-	-	0	0,0	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-7	1	0,8	0,5	-	-	-	0	0,0	0,0	-	-	-	30	42,3	27,9	21	52,5	20,3	1	2,8	1,0
7-8	2	1,7	1,4	-	-	-	0	0,0	0,1	-	-	-	19	26,8	17,5	15	37,5	16,4	9	25,0	9,7
7-9	3	2,5	2,5	-	-	-	1	1,2	0,7	-	-	-	6	8,5	7,5	-	-	-	1	2,8	0,3
7-10	4	3,3	3,9	-	-	-	2	2,5	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-11	5	4,1	4,6	-	-	-	1	1,2	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-12	0	0,0	1,9	-	-	-	0	0,0	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-13	0	0,0	0,5	-	-	-	0	0,0	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-8	2	1,7	0,9	1	1,0	0,3	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	1	1,4	2,8	4	10,0	3,3	24	66,7	23,4
8-9	4	3,3	3,3	2	2,0	0,5	1	1,2	0,6	0	0,0	0,1	2	2,8	2,4	-	-	-	1	2,8	1,6
8-10	2	1,7	5,1	2	2,0	2,1	1	1,2	1,3	0	0,0	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-11	6	5,0	6,0	2	2,0	2,2	0	0,0	0,4	0	0,0	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-12	2	1,7	2,5	3	2,9	2,7	1	1,2	0,4	2	2,1	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-13	1	0,8	0,7	-	-	-	0	0,0	0,1	1	1,0	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-14	0	0,0	0,0	-	-	-	0	0,0	0,0	0	0,0	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-9	5	4,1	3,0	0	0,0	0,2	2	2,5	2,8	1	1,0	0,2	1	1,4	0,5	-	-	-	0	0,0	0,0
9-10	8	6,6	9,3	3	2,9	1,7	11	13,6	13,0	1	1,0	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-11	9	7,4	10,8	4	3,9	1,8	7	8,6	4,4	2	2,1	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-12	3	2,5	4,6	0	0,0	2,2	4	4,9	4,1	4	4,1	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-13	1	0,8	1,3	0	0,0	1,5	2	2,5	1,1	0	0,0	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-14	0	0,0	0,0	0	0,0	0,9	0	0,0	0,2	0	0,0	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-10	5	4,1	7,2	3	2,9	3,7	14	17,3	15,1	2	2,1	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-11	23	19,0	16,8	6	5,9	7,6	8	9,9	10,4	2	2,1	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-12	9	7,4	7,1	10	9,8	9,6	14	17,3	9,5	11	11,3	11,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-13	2	1,7	2,0	7	6,9	6,3	3	3,7	2,6	5	5,2	4,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-14	0	0,0	0,0	5	4,9	3,8	1	1,2	0,4	1	1,0	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-15	-	-	-	0	0,0	0,2	-	-	-	0	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-18	1	0,8	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11-11	8	6,6	9,8	3	2,9	3,9	3	3,7	1,8	2	2,1	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11-12	7	5,8	8,3	7	6,9	9,8	1	1,2	3,3	10	10,3	10,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11-13	2	1,7	2,3	11	10,8	6,5	1	1,2	0,9	5	5,2	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11-14	0	0,0	0,0	4	3,9	3,9	0	0,0	0,1	0	0,0	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11-15	1	0,8	0,3	0	0,0	0,2	-	-	-	0	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12-12	3	2,5	1,7	7	6,9	6,1	1	1,2	1,5	20	20,6	21,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12-13	2	1,7	1,0	6	5,9	8,1	0	0,0	0,8	21	21,6	17,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12-14	0	0,0	0,0	9	8,8	4,9	0	0,0	0,1	3	3,1	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12-15	0	0,0	0,1	1	1,0	0,2	-	-	-	0	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13-13	-	-	-	3	2,9	2,7	0	0,0	0,1	2	2,1	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13-14	-	-	-	2	2,0	3,2	0	0,0	0,0	2	2,1	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13-16	-	-	-	1	1,0	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14-14	-	-	-	-	-	-	0	0,0	0,0	0	0,0	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	121	100	121	102	100	102	81	100	81	97	100	97	71	100	71	40	100	40	36	100	36
$\sum X^2$	21,114*			18,784**			16,032**			11,195**			7,689**			0,287**			1,656**		
SD	10			12			13			11			6			1			2		

- * p < 0,05 ** p > 0,05
- GD: Gözlenen Değer; BD: Beklenen Değer SD: Serbestlik Derecesi

Hardy-Weinberg dengesi gösteren bir populasyonda alleller rasgele kalıtıma uğramaktadır. Araştırmada kullanılan kısa tekrar dinükleotid dizilerine sahip 7 lokusa ait allel sıklıklarının Hardy-Weinberg eşitliğine (HWE) göre uygunluğu, gözlenen genotip sıklıkları ile aynı genotiplerin beklenen sayısal değerleri dikkate alınarak standart X^2 analizi ile ($p>0,05$) kontrol edilmiştir (Tablo 3).

Her lokus için beklenen ve gözlenen heterozigotluk oranı, dışlama gücü, ayırlama gücü ve uyuşma olasılığı hesaplanmıştır (Tablo 4). Bu çalışmada 7 STR/mikrosatellit lokusu içinde en yüksek heterozigotluk değeri % 83,3 ile BMS2270 lokusunda gözlenirken en düşük değer % 31,4 ile BMS2721 lokusunda görülmüştür. En yüksek dışlama olasılığı 0,662 ile BMS2270 lokusunda gözlenirken en düşük değer 0,066 ile BMS2721 lokusunda gözlenmiştir. En yüksek ayırlama gücü 0,947 ile BMS2270 lokusunda gözlenirken en düşük değer 0,504 ile BMS2721 lokusunda gözlemlenmiştir. Uyuşma (karşılaşma) olasılığında ise en yüksek değeri veren lokuslar BMS3019 ve BMS2721 olurken en düşük değerler BMS2270 ile BMS1822 lokuslarında saptanmıştır (Tablo 4).

Bu çalışmada kullanılan lokusların kombine ayırlama ve dışlama gücü değerleri 7 lokusun tamamı kullanıldığında sırası ile 0,977 ve 0,999 olarak gözlenmiştir (Tablo 5).

DNA ekstraksiyonu ile ilgili bulgular

Bu araştırmada sığır kan hücrelerinden DNA ekstraksiyonunda, Chelex®100 kelatlaştırıcı reçinenin ve fenol-kloroform-izoamil yöntemlerinin kullanıldığı işlem basamakları uygulanmıştır. Chelex ve fenol-kloroform-

Tablo 5. Araştırmada kullanılan/lokusun Kombine dışlama gücü ve kombine ayırlama gücü.

Lokus	Kombine Dışlama Gücü (CPE)	Kombine Ayırlama Gücü (CPD)
7 Lokus	0,977	0,999

izoamil yöntemleri ile elde edilen DNA'nın saflığını saptamak amacı ile 100 örnek için DNA miktarı değerinin $O.D._{260}/O.D._{280}$ dalga boylarının birbirine oranı sırası ile 1,250 ve 1,959 olarak saptanmıştır.

Tartışma

Bu araştırmada kan örneklerinden chelex (kelatlaştırıcı reçine) yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu yöntemin tercih edilmesinin nedeni diğer izolasyon yöntemlerine göre çok daha hızlı olması, çok az miktarda örneğe ihtiyaç duyulması, işlem basamaklarının az olması, maliyetinin çok düşük olması ayrıca izolasyon tek tüpte yapıldığı için, tüp transferi ve pipetlemekten oluşabilecek kontaminasyon riskinin az olmasıdır. Buna karşın bu yöntemle kaynatmadan dolayı düşük moleküler ağırlıklı DNA elde edilmektedir. Ancak STR/mikrosatellit lokusları kısa dizinli olduklarından kaynatma aşamasından zarar görmemektedirler (23,28,29).

PCR işlemlerinden sonraki elektroforez aşamasında, denatüre dikey jel elektroforezi kullanılmış ve bu uygulamayı gümüş boyamaya dayalı görünürleştirme yöntemi izlemiştir. Araştırmada kullanılan bu yöntemin en büyük avantajı düşük maliyetli oluşudur. Ancak jelin bir kez kullanılması ve jel gümüş birikimine maruz kaldığı için bantlar dışında yüzeyde de yer yer boyanmalar belirmesi gibi bazı dezavantajları da gözlemlenmiştir.

Tablo 4. Araştırmada kullanılan her lokusun istatistiksel analizi ^a.

	BMS1822	BMS2270	BMS2658	BMS2572	BMS2842	BMS3019	BMS2721
<i>Ho</i>	0,801	0,821	0,753	0,722	0,535	0,375	0,306
<i>He</i>	0,802	0,833	0,727	0,702	0,545	0,399	0,314
<i>P</i>	0,020 ^b	0,094	0,247	0,427	0,262	0,592	0,496
<i>PD</i>	0,937	0,947	0,898	0,881	0,756	0,568	0,504
<i>PE</i>	0,602	0,662	0,515	0,463	0,220	0,099	0,066
<i>MP</i>	0,063	0,053	0,102	0,118	0,244	0,432	0,496
<i>PI</i>	2,507	2,793	1,832	1,796	1,076	0,800	0,720

^a *Ho*: Gözlenen heterozigotluk, *He*: Beklenen Heterozigotluk, *P*: HW dengesine uyum testi, *PD*: Ayırlama gücü, *PE*: Dışlama gücü, *MP*: Uyuşma (karşılaşma) olasılığı, *PI*: Babalık indeksi

^b $p<0,05$

Allel sıklıklarının Hardy-Weinberg eşitliğine göre uyumluluğu, gözlenen genotip sıklığı ile aynı genotiplerin beklenen sayısal değerleri dikkate alınarak χ^2 testi ile ($P < 0.05$) kontrol edilmiştir. BMS2270, BMS2658, BMS2572, BMS2842, BMS3019, BMS2721 lokuslarına ait allel dağılımlarının Hardy-Weinberg eşitliğine göre uyumlu olduğu ($p > 0.05$) (Tablo. 4), BMS1822 lokusuna ait allel dağılımının Hardy-Weinberg eşitliğine göre uyumlu olmadığı ($p < 0.05$) gözlemlenmiştir (Tablo 3). Bunun nedeni incelenen örnek sayısının yetersiz oluşuna, akrabalı yetiştirmeye ve/veya göç olabileceğine bağlanabilir.

Babalık indeksi değeri ne kadar yüksekse ilgili allelin babadan yavruya geçme şansı da o oranda yüksek olacaktır. Babalık indeksi değerleri incelendiğinde en yüksek değer sırası ile BMS2270, BMS1822, BMS2658 ve BMS2572 lokuslarında 2,793 ve 1,796 değerleri arasında gözlenmiştir. Karşılaşma (uyuşma) olasılığı ise bireylerin birbirine olan yakınlığının bir göstergesi olmaktadır. Bireylerin akrabalık derecesi ne kadar yüksek olursa aynı alleli taşıma olasılığı o kadar yüksek olacaktır. Bu değerlerin düşük bulunması allellerin ilgili popülasyonda bir araya gelmesinin düşük sıklıkta olacağını ifade etmektedir (27). Bu çalışmada karşılaşma olasılığı en düşük lokuslar sırası ile BMS2270, BMS1822, BMS2658 ve BMS2572 iken en yüksek değerlere sahip lokuslar sırası ile BMS2842, BMS3019 ve BMS2271 olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada, BMS1822, BMS2270, BMS2658 ve BMS2572 lokusları için hesaplanan heterozigotluk ve dışlama gücü değerleri, Heyen ve ark. (19)'nın yaptığı benzer bir çalışmada sığırlarda babalık belirlenmesi amacıyla 22 mikrosatellit kullanıldığı MGTG4B, TGLA53, TGLA122, TGLA227, URB037 ve URB038 lokusları için elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında uyumlu olduğu görülmüştür. Ancak bu çalışmada elde edilen kombine ayırtılma gücü çok az da olsa yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni, BMS1822, BMS2270, BMS2658 ve BMS2572 lokuslarının allel sayılarının yüksek oluşuna bağlanabilir.

Heterozigotluk oranı, dışlama gücü, ayırtılma gücü, babalık indeksi yüksek ve karşılaşma olasılığı düşük olan sistemler ebeveyn tayini ya da babalık belirlenmesi açısından yararlı olabileceğinden bu tip çalışmalarda tercih edilen sistemlerdir. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Öğretim, Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nde yetiştirilen Holştayn sığır popülasyonu için

hesaplanan istatistiksel parametrelerin öncülüğünde yararlılık derecelerine göre bu lokuslar BMS2270, BMS1822, BMS2658, BMS2572, BMS2842, BMS3019, BMS2721 şeklinde sıralanabilir. Ancak bu lokuslar arasında bir multipleks sistem hazırlanacak olursa sırasıyla BMS2270, BMS1822, BMS2658, BMS2572 lokuslarının seçilmesi isabetli olacaktır. Çünkü heterozigotluk oranı çok düşük olan lokusların seçilmesi babalık testlerinde gerçekleşmesi gereken doğruluk derecesindeki isabetlilik oranını oldukça düşürecek ve daha az bilgi verecektir. Bu çalışmada elde edilen bulgular Bowling ve ark. (14)'nin bildirdikleri ile aynı paralelliktedir. Bu çalışmada heterozigotluk oranı yüksek olan lokuslarda daha yüksek dışlama gücü bulunmuştur. Babalık tayininde tek bir lokusun kullanılması da ebeveyn dışlanmasında çok büyük dikkat gerektirmektedir. Bu görüşü araştırmalarında yüksek polimorfizm yetenekleri nedeni ile babalık tayini testlerinde mikrosatellitleri kullanan Heyen ve ark. (19)'nın bildirdikleri de destekler niteliktedir. Bu polimorfizm genelde mikrosatellitlerin tekrar eden dinükleotid dizilerinin sayılarındaki mutasyonla oluşmakta ve bu da tekrar eden dizi sayılarında farklılaşan yeni allellerin meydana gelmesine neden olmaktadır (30). Örneğin, sitozin adenin (CA)_n'in mutasyon oranları insanda 5×10^{-4} kere tekrar ettiği (31, 32) ve domuzda yaklaşık 7×10^{-5} (30) defa olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir.

Bu çalışmada kullanılan lokusların kombine ayırtılma ve dışlama gücü değerlerinin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 4). Dolayısıyla bu sistemlerin DNA profillemeye analizlerinde kullanılabilecek markerler olabileceği söylenebilir. Ancak düşük allel sayısına sahip BMS2842, BMS3019 ve BMS2721 lokuslarının yerine yine yüksek dışlama gücüne sahip lokusların seçilmesi babalık testlerinde arzu edilen isabetlilik derecesine ulaşılabilmesini daha da artıracaktır. Çünkü kabul edilen babalık yüzdesi % 99,73'dür. % 99,73'lük bir sonuca ulaşılmadıkça kesin bir babalık tayinine karar verilememektedir (12). Bu nedenle farklı lokuslarla ilgili örnekleme sayısını artırarak bu yüzdeye ulaşılmaya çalışılmalıdır.

Bu çalışmada hesaplanan parametrelerin ışığında ebeveyn belirlenmesinde allel sayıları yüksek olan lokusların ideal değerlere ulaştığı gözlenmektedir. Allel sayıları düşük olan BMS2842, BMS3019, BMS2721 lokuslarının ilgili parametreler yönünden ebeveyn dışlama ve belirleme olasılığı diğer dört lokus kadar güçlü olmadığı gözlenmektedir. Gelecekte yapılacak benzer

çalışmalarda allel sayısı yüksek olan lokusların seçilmesi heterozigotluk oranı, dışlama gücü, ayırtılma gücü, karşılaşma olasılığı ve babalık indeksi yönünden arzu edilen değerlere ulaşılmasını sağlayacaktır.

Bir babalık testinin başarısı, testin doğru olmayan bir babalığı ortaya çıkarma kapasitesine bağlıdır. Bu araştırmada elde edilen veriler, bir babalık testinin değerlendirilmesinin isabetlilik derecesinin başlıca iki faktörle tespit edilebileceğini karşımıza çıkarmıştır. Birincisi, değerlendirilen genetik markerlerin sayısıdır. Kullanılan lokuslardan 3 veya 4'ü bir genetik marker olarak ele alınacak olursa babalık tayininde isabetlilik derecesi artabilmektedir, ancak lineer olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Çünkü şüpheli ebeveyn veya yavru sayısı arttıkça seçilen lokusların babalık dışlama olasılığını da düşürmektedir. Az sayıda genetik markerler ancak bir veya iki şüpheli inceleniyorsa başarılı olabilmektedir. İkincisi, her genetik markerin heterozigotluk derecesinin (varyasyon derecesinin) yüksek oluşuna bağlıdır. Eğer kullanılan genetik markerler yüksek derecede heterozigotluk gösteriyorsa daha başarılı bir babalık testi yapılabilecektir.

STR/mikrosatellit lokuslarının birey tanımlamasında ve akrabalık ilişkilerin saptanmasında kullanılabilmesi için ilgili populasyonların allel dağılımlarının belirlenmesi ve bundan yararlanarak söz konusu lokusların istatistikî parametrelerinin hesaplanması gerekmektedir. Çünkü sözü edilen testleri değerlendirirken kullanılan matematiksel bağıntılarda ilgili populasyonların gen sıklıkları yer almaktadır. Dolayısıyla gen sıklıkları populasyonlar arasında farklılık gösteriyorsa mutlaka kişinin ait olduğu populasyonun gen sıklığı ele alınmalıdır. Aksi takdirde yapılan test bireyin aleyhine sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle, Türkiye genelinde, sayıları da artırılarak çeşitli STR/mikrosatellit lokuslarının gen sıklığının saptanarak istatistikî parametrelerinin belirlenmesi, ebeveyn tayinindeki isabetliliğin derecesini artıracığı düşünülmektedir. Böylece elde edilen verilerin

yerel populasyonlarla yapılmış veya yapılacak çalışmalarla karşılaştırılmasına olanak sağlayacaktır. Ayrıca populasyonların DNA verisi oluşturulduğu zaman DNA profilinin değişim derecesinin saptanmasında ve populasyonların orijini ve yapısı hakkında da bize fikir vereceği de söylenebilir (16).

Bu çalışmada tek lokus (monopleks) sistemler kullanılmıştır. Bu lokuslar içerisinde BMS2270, BMS1822, BMS2658, BMS2572 lokusları yüksek ayırtılma ve dışlama gücüne sahiptirler ve kolaylıkla tiplenebilmeleri açısından akrabalık ilişkilerinin saptanmasında kullanılmaları önerilebilir. Ancak bu çalışma İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim, Öğretim, Araştırma ve Uygulama Çiftliği genelinde sınırlı kalmıştır. Bu çalışmanın devamı niteliğinde Türkiye genelinde sığır populasyonu üzerinde yapılacak olursa farklı lokuslar da kullanılarak standardize edilmiş multipleks bir sistem oluşturulabilir.

Söz konusu sistemler yüksek derecede polimorfizm göstermekte ve iyi bir amplifikasyon potansiyeline sahiptirler. Ancak dinükleotid tekrar dizilerine sahip oldukları için elektroforez sonucu elde edilen bantların birbirine yakın olması ya da kayma göstermesi hatalı tiplemeye neden olabilmektedir. Özellikle üçlü yada dördü tekrar dizilerine sahip lokusların seçilmesi ebeveyn belirlenmesindeki standardizasyonu hem kolaylaştıracak hem de isabetlilik derecesini daha da artıracaktır.

Teşekkür

Bu çalışmayı destekleyen TÜBİTAK Veteriner Hayvancılık Araştırma Grubu'na, çalışma süresince her türlü desteği sağlayan İ.Ü. Veteriner Fakültesi dekanı Prof. Dr. Ahmet Altınel'e, TÜBİTAK VHAG genel sekreteri Doç. Dr. Sevinç Türker'e, laboratuvarlarının tüm olanaklarının kullanılmasına izin veren İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü müdürü Prof. Dr. Sevil Atasoy'a teşekkür ederim.

Kaynaklar

1. Margan, U.: Prospects of the methods of bovine parentage control. Tierarztl. Wschr. 1996; 109: 1-5.
2. Yalçın, B.C.: İmmunogenetik ve hayvan yetiştiriciliği yönünden önemi. Lalahan Zoot. Araşt. Enst. Derg., 1969; 9 (1-2): 15-18.
3. Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L.: Individual-specific fingerprints of human DNA. Nature, 1985; 316: 76-79.
4. Jeffreys, A.J., Brookfield, J.F.Y., Semenov, R.: Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. Nature, 1985; 317: 818-819.
5. Nakamura, Y., Lepper, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kummlin, E., White, R.: Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science, 1987; 235: 1616.

6. Dallas, F.J.: Detection of DNA fingerprints of cultivated rice by hybridisation with a human minisatellite DNA probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 6831.
7. Tzuri, G., Hillel, J., Lavi, U., Haberfeld, A., Vainstein, A.: DNA fingerprints analysis of ornamental plants. *Plant Sci.*, 1991; 76: 91-97.
8. Georges, M., Lequarre, A.S., Castelli, M., Hanset, R., Vassart, G.: DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenet. Cell Genet.* 1988; 47: 127-131.
9. Kashi, Y., Lipkin, E., Darvasi, A., Nave, A., Gruenbaum, Y., Beckmann, J.S., Soller, M.: Parentage identification in the bovine using Deoxyribonucleic Acid Fingerprints. *J. Dairy Sci.* 1990; 73: 3306-3311.
10. Vassart, G., Georges, M., Monsieur, R., Brocas, H., Lequarre, A.S., Christophe, D.: A sequence in M13-phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science*, 1987; 235: 683-684.
11. Lewin, B.: *Genes V*. Oxford University Press, 1997.
12. Vural, B.: Bazı Genomik Lokusların allel ve genotip frekanslarının Türk toplumunda belirlenmesi ve adli amaçlı kullanımı (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, 1995.
13. White, T.J., Arnheim, N., Erlich, H.A.: The polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 1989; 5 (6): 185-189.
14. Bowling, A.T., Eggleston-Stott, M.L., Byrns, G., Clark, R.S., Dileanis, S., Wictum, E.: Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim. Genet.* 1997; 28: 247-257.
15. Ün, C., Wimmers, K., Ponsuksili, S., Schmoll, F., Schellander, K.: Mikrosatellitler ve kullanım alanları. *Hayv. Üret. Derg.*, 2000; 41: 9-14.
16. Filoğlu, G.: 7 Tetramerik STR lokusunun kriminal identifikasyonundaki önemi (Doktora Tezi). 1999; İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı.
17. Gill, P., Jeffreys, A.J., Werret, D.J.: Forensic application of DNA fingerprints. *Nature* 1985; 318: 577-579.
18. Pepin, L., Amigues, Y., Lepingle, A., Berthier, J.L., Bensaid, A., Vainman, D.: Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity*, 1995; 74: 53-61.
19. Heyen, D.W., Beever, J.E., Da, Y., Evert, R.E., Green, C., Bates, S.R.E., Ziegler, J.S., Lewin, H.A.: Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semi-automated parentage testing. *Anim. Genet.*, 1997; 28: 21-27.
20. Luikart, G., Biju-Duval, M-P., Ertuğrul, O., Zagdsuren, Y., Maudet, C., Taberlet, P.: Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Anim. Genet.*, 1999; 30: 431-438.
21. Stone, R.T., Kappes, S.M., Keele, J.W., Beattie, C.W.: Characterisation of bovine microsatellites. *Anim. Genet.* 1997; 28: 62-66.
22. Sambrook, J., Frisch, F.F., Maniatis, T.: *Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNA Appendix E: Commonly Used Techniques in Molecular Cloning. Molecular Cloning: 3A Laboratory Manual, Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
23. Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R.: Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 1991; 10 (4): 506-513.
24. Promega: Silver Stain Detection. Technical Manual. Printed in USA, 1989.
25. Guo, S.W., Thompson, E.A.: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 1992; 48: 361-372.
26. Jamieson, A., Taylor St.C.S.: Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim. Genet.*, 1997; 28: 397-400.
27. Kimberly A.H.: Statistical analysis of STR data profiles in DNA. 2001. "http://www.promega.com/profiles/103/103_14"
28. Desquesnes, M.: Application of the Polymerase Chain Reaction to the Diagnosis of Trypanosomiasis. The 10th International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology, Salsomaggiore Parma/Italy, 2001; pp: 14-15.
29. Yükseloğlu, E.H.: HLA-DQA1 Lokusunun polimeraz zincir tepkimesine (PCR) dayanan 2 farklı teknik ile tiplenmesinin adli bilimler açısından değerlendirilmesi (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü 1996.
30. Ellegren, H.: Mutation rates at porcine microsatellite loci. *Mam. Genome*, 1995; 6: 376-377.
31. Weber, J.L., Wong, C.: Mutation of human short tandem repeat. *Hum. Mol. Genet.*, 1993; 2: 1123-1128.
32. Weissenbach, J., Gyapay, G., Dip, C.: A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*, 1992; 359: 794-801.