

ANALİZ RAPORU

Kırmızı Kaliforniya Solucanlarının COI gen Bölgesine dayalı Genetik Analizi

İçindekiler

- 1) AREKLİS FARM SOLUCAN ÇİFTLİĞİ Şirketinden Solucan Örneklerinin Temini
- 2) Laboratuvar Analizleri
 - a. Solucanlarının DNA izolasyonlarına hazır hale getirilmesi
 - b. Genomik DNA İzolasyonları
 - c. İzole edilen DNA'ların Kalite ve Miktar Belirlenmesi
 - d. *Eisenia fetida*-COI genine özgü primer tasarımı
 - e. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)
 - f. Agaroz Jel'den Amplikonların Saflaştırılması
 - g. DNA Dizi Analizi
- 3) Sonuç
- 4) Ek: DNA Dizi Sonuçları

20.11.2017

Araş.Gör.Dr. Vahap ELDEM
İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Moleküler Zooloji ve Sistematik Araştırma Laboratuvarı

1. AREKLİS FARM SOLUCAN ÇİFTLİĞİ Şirketinden Solucan Örneklerinin Temini

Örnekköy Küme Evleri, Orkide Antrepo yanyol Kemalpaşa/İzmir/Türkiye adresinde faaliyet gösteren **AREKLİS FARM SOLUCAN ÇİFTLİĞİ** firmasından, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü bünyesinde yer alan “*Moleküler ve Sistemik Zooloji*” laboratuvarına solucan maması içerisinde canlı 37 solucan örneği sağlıklı bir şekilde kargo yoluyla ulaştırılmıştır.

2. Laboratuvar Analizleri

a. Solucanlarının DNA izolasyonlarına hazır hale getirilmesi

Genomik DNA izolasyonu yapılacak organizmanın (solucan örneklerinin) laboratuvara canlı ve bütün olarak getirilmesi, DNA izolasyon işleminin kalite ve miktarı açısından önem taşımaktadır. Bu bağlamda, laboratuvara getirilen solucanların canlılığını kaybetmesini önlemek üzere solucanlar doğal yaşam ortamı (toprak+mama) ile birlikte laboratuvarımıza getirilmiştir. Solucan ile birlikte gelebilecek olan diğer organizmaların (parazitik canlılar) DNA izolasyonunu yapmamak için, seçilen solucanlar öncelikle 5-10 defa distile su ile yıkanmıştır ve **1X PBS** (Phosphate Buffered Saline) tamponunda 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Ayrıca, DNA izolasyonu için seçilen solucan örneklerinin her biri steril bistüri ile kesilmiş ve bağırsak kısmı topraktan arındırılarak 15 dakika boyunca **1X PBS** (Phosphate Buffered Saline) tamponunda bekletilmiştir.

b. Genomik DNA İzolasyonu

Tüm çalışmalar steril kabin içinde gerçekleştirilmiş ve izolasyon için gerekli pipet, mikrosantrifüj tüpleri gibi ekipmanlar otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Genomik DNA izolasyonu, “**High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)**” kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Bu protokole göre, sıvı azot kullanılarak toz haline getirilen yaklaşık 250 mg'lık kas dokusu üzerine 500 µl doku lizis tamponu (tissue lysis buffer) ve 50 µl Proteinaz

K (20 µg/ml) eklenmiştir. Daha sonra, örnekler 8 saat boyunca 55 °C'de inkübasyona bırakılmış ve proteinlerin kimyasal olarak parçalanması sağlanmıştır. İnkübasyon sonrası etüvden alınan örneklerle pipetaj yapılarak üzerlerine 500 µl bağlanma tamponu ve 500 µl absolut izopropanol (Merck) eklenmiştir. Eppendorf marka tüpler içinde yer alan örnekler 13,000 g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası DNA içere supernatant kısmı filtrelili tüpler içindeki rezervuarlara alınmış ve tekrar 8,000 g'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Böylece, DNA'nın filtreye tutunması sağlanmıştır. Filtreye tutulu halde bulunan DNA sırasıyla inhibitör temizleyici tampon (500 µl) ve yıkama tamponu (500 µl) ile 8,000 g'de 1 dakika santrifüjlenerek temizlenmiştir. Filtreye tutulmuş halde bulunan temizlenmiş DNA üzerine 50 µl elüsyon tamponu eklenmiş ve 8,000 g'de 1 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüştür. İzolasyonu gerçekleştirilen genomik DNA RNAz enzimi ile muamele edilmiş ve – 26 °C'de saklanmıştır.

c. İzole edilen Genomik DNA'ların Kalite ve Miktar Belirlenmesi

İzolasyonu gerçekleştirilen genomik DNA örneklerin kalite ve miktar tayinleri, spektrofotometrik olarak **NanoDrop 2000c** (Thermo Scientific, USA) cihazı ile belirlenmiştir. A260/A280 absorpsiyon oranı ~1.8 civarında olan ve miktar bakımından en az 50 ng/µl olan kaliteli örnekler deneysel reaksiyon için seçilmiştir.

Tablo 1. Solucan DNA örnekleri NanoDrop 2000c sonuçları (ng: nanogram, µl: mikrolitre)

Örnek Adı	DNA Konsantrasyonu (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230
<i>Are-Efetida-1</i>	157,1	3,143	1,687	1,86	1,18
<i>Are-Efetida-2</i>	112,7	2,254	1,17	1,93	0,61
<i>Are-Efetida-3</i>	133	2,661	1,38	1,93	1,07
<i>Are-Efetida-4</i>	57,9	1,158	0,606	1,91	0,19
<i>Are-Efetida-5</i>	61,7	1,234	0,659	1,87	0,23
<i>Are-Efetida-6</i>	89,6	1,792	0,953	1,88	0,54
<i>Are-Efetida-7</i>	93	1,14	0,616	1,85	0,68
<i>Are-Efetida-8</i>	139,3	2,785	1,473	1,89	0,89
<i>Are-Efetida-9</i>	100,1	2,002	1,118	1,79	0,59
<i>Are-Efetida-10</i>	60,8	1,216	0,687	1,77	0,33

Tablo 1’de görüldüğü gibi, 10 örneğin hepsinin DNA sonuçları PCR reaksiyonu için yeterlidir (*Are-Efetida* DNA > ~1.8 (260/280 Absorbsiyon) ve ~60 ng/μl).

d. *Eisenia fetida*-COI genine özgü primer tasarımı

Eisenia fetida-COI türüne özgü primer çifti **Primer3** (<http://primer3.ut.ee/>) yazılımı ile tasarlanmıştır. *Eisenia fetida*-COI dizisi NCBI-GenBank veri tabanından alınmıştır, GenBank erişim numarası: “FJ214228.1”. Primer3 programı ve *Eisenia fetida*-COI dizisi kullanılarak tasarlanan ve sentezi gerçekleştirilen primer çifti (Micro synth, The Swiss DNA Company, Sipariş No: 533647) aşağıdaki tabloda sunulmuştur.

Tablo 2. *Eisenia fetida*-COI genine özgü primer çifti

Primer	Primer Dizisi (5'→3')	Baz Uzunluğu	Tm Derecesi	Moleküler Ağırlık
Efetida-F	AAGTGGGCTTCGACTAGAAC	20	54.8	6165.4 g/mol
Efetida-R	TTGATTTTGGACCCATGAAG	20	52.3	6121.8 g/mol

Liyofilize halde gelen primerler öncelikle mikrolitresinde 100 μM olacak şekilde ultrasaf su ile seyreltilmiştir. Daha sonra PCR 'da kullanılmak üzere bu stok mikrolitresinde 10 μM olacak şekilde seyreltilmiştir.

e. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PCR için gerekli olan kimyasal bileşikler Thermo-Scientific firmasından temin edilmiştir. Kimyasal içeriği; 10X PCR Tamponu (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), dNTP karışımı, Taq DNA polimeraz enzimi, MgCl₂, DNA ve ultrasaf sudur (Tablo 3).

Tablo 3. PZR Bileşenleri ve Protokolü

PCR Bileşenleri ve Miktarları	PCR Protokolü
Tampon Çözelti (10X).....5 μl	94°C 4' (Ön Denatürasyon evresi)
MgCl ₂ (2,5 mM).....7μl	
dNTP karışımı (2.5 mM).....5 μl	
Primer F (10 pmol).....2 μl	94°C 1'
Primer R (10 pmol).....2 μl	54°C 1' (30 Döngü- Uzama evresi)
Taq DNA polimeraz (5U)..... 0.4 μl	72°C 1'
DNA(50ng/ μl).....3 μl	72°C 10' (Son Uzama evresi)
Distile su.....25.6 μl	
Total Hacim.....50 μl	

PZR işlemi sonucunda oluşan hedef ürünlerin (amplikonların) tespiti için %1,5-2'lik agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. Yaklaşık 400 baz uzunluğundaki amplikon boyutunun belirlenmesi için 100 bp'lik moleküler ağırlık merdiveni (ing. DNA ladder) kullanılmıştır.

f. Agaroz Jel'den Amplikonların Saflaştırılması

Jelden geri kazanım işlemi “**High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)**” yoluyla gerçekleştirilmiştir. Bu protokole göre, 1.5 ml'lik tüplerde bulunan yaklaşık 100 mg olan jel üzerine 300 µl Bağlanma tamponu eklenmiş, 56°C'de 10 dakika kadar çalkalamalı ısıtıcı blokta tutularak agaroz jelin erimesi sağlanmıştır. Daha sonra üzerine 150 µl izopropanol eklenip, kuvvetlice vorteksenerek karıştırılmıştır. İnkübasyon sırasında kit ile birlikte gelen filtreli tüpler, toplama tüplerinin içine yerleştirilmiştir ve eriyen jel ve isopropanol içeren karışım filtreli tüpün içine pipet vasıtasıyla aktararak 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü içerisine çöken sıvı uzaklaştırılmıştır. Filtreli tüp tekrar toplama tüpü içine yerleştirilip PCR ürününün temizlenmesini sağlamak için 500 µl yıkama solüsyonu eklenir, 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir ve toplama tüpü içerisine çöken sıvı tekrar uzaklaştırılır. Çoğaltılan hedef DNA ürününün kazanılması için 50-100 µl elüsyon tamponu filtreli tüpe eklenip 14000 rpm 'de 1 dakika santrifüj edilerek hedef DNA'nın kazanılması sağlanmıştır.

g. DNA Dizi Analizi

Jelden saflaştırılarak elde edilen ve kontrolü yapılan ~400 baz çiftlik *Eisenia fetida*-COI DNA dizilenmesi yapılmak üzere servise yollanmıştır. Dizileme reaksiyonu sonucu gelen diziler NCBI veri tabanına “Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)” algoritması ile (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) hizalanmıştır. Analiz sonucu aşağıdaki Tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo 4. *Eisenia fetida*-COI DNA dizilerinin BlastN sonuçları (E-değeri: 1e-10).

Organizma Kodu	Hedef Organizma ID	Benzerlik Oranı (%)	Hizlama Uzunluğu	E-değeri	Bit Skoru
<i>Are-Efetida-1</i>	FJ214228.1	98	427	0.0	756
<i>Are-Efetida-2</i>	FJ214228.1	97	427	0.0	736
<i>Are-Efetida-3</i>	FJ214228.1	97	445	0.0	774
<i>Are-Efetida-4</i>	FJ214228.1	98	425	0.0	747
<i>Are-Efetida-5</i>	FJ214228.1	98	443	0.0	782
<i>Are-Efetida-6</i>	FJ214228.1	97	424	0.0	737
<i>Are-Efetida-7</i>	FJ214228.1	96	424	0.0	704
<i>Are-Efetida-8</i>	FJ214228.1	98	438	0.0	769
<i>Are-Efetida-9</i>	FJ214228.1	99	437	0.0	787
<i>Are-Efetida-10</i>	FJ214228.1	99	411	0.0	752

3. Sonuç

Laboratuvarımıza gelen solucan örneklerinin COI gen bölgesine dayalı gerçekleştirilen DNA dizi analiz sonucunda, çalışılan solucanlara ait dizilerin ~ %98 oran ile Kırmızı Kaliforniya Solucanları ile benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca, Tablo 4'te görüldüğü üzere, E-değerinin "0.0" olması, karşılaştırmalarının şansa bağlı olamayacağını göstermektedir. Diğer bir ifadeyle, çalışılan söz konusu türün Eisenia fetida olduğuna işaret etmektedir.

4. Ek: DNA Dizi Sonuçları

<i>Are-Efetida-1</i>
GAGCTGTAGTTATTACCGTGGTGTACTACTTTTATCTCTTCCAGTACTTGCGGGAGCCATCACTATACTATTGACAGATCGAAACCTAAACACCTCATTCTTTGACCCTGCTGGAGGTGGCGACCCTATTCTCTACCAACACTTATTCTGATTTTTTTGGGCATCCCGAAGTCTACATTCTCATCTTACCTGGATTTGGAGCAATCTCACATATCGTTAGTCATTATACTGCAAACTGGAACCATTTGGGGCTCTCGGGATAATTTATGCCATGCTCGGAATTGCTGTATTGGGATTTATTGTGTGAGCACATCACATATTCACAGTAGGACTTGATGTAGATACACGAGCATACTTCACGGCAGCTACCATAATTATCGCAGTACCCACAGGTATTAAAGTATTTAGATGGTTGGCTACCTTCATGGGTCAA
<i>Are-Efetida-2</i>
GTGGGTTGCGACTAGAACGAATCCCTCTCTTTGTATGAGCTGTAGTTATTACCGTGGTGTACTACTTTTATCTCTTCCAGTACTTGCGGGAGCTATCACTATATTATTGACAGATCGAAACCTAAATACCTCATTCTTTGACCCTGCTGGAGGTGGGGATCCTATTCTCTACCAACATTTATTCTGATTTTTTTGGACACCCTGAAGTTTACATTCTCATCTTACCTGGATTTGGAGCAATCTCACATATCGTTAGTCATTATACTGCAAACTGGAACCATTCGGGGCTCTCGGGATAATCTACGCTATGCTAGGAATTGCTGTATTGGGATTTATTGTGTGAGCACATC

ATATATTCACAGTAGGACTTGATGTAGATACACGAGCATACTTCACGGCAGCTACCATAATTATTGCAGT ACCCACAGGTATTAAAGTAT
<i>Are-Efetida-3</i>
GCATGATTTGTCTGAGCTGTAGTTATTACCGTGGTGTTACTACTTTTATCTCTTCCAGTACTTGCGGGAG CTATCACTATACTATTGACAGATCGAAACCTAAACACCTCATTCTTTGACCCGTGCTGGAGGTGGCGACCC TATTCTCTACCAACATTTATTCTGATTTTTTTGGACACCCTGAAGTCTACATTCTCATCTTACCTGGATTT GGAGCAATCTCACACATCGTTAGCCATTACACCGCAAACTGGAACCATTGGGGCTCTCGGGATAATCT ATGCCATGCTCGGAATTGCTGTATTGGGATTTATTGTGTGAGCCCACCACATATTCACAGTAGGACTTGA TGATAGATACACGAGCATACTTCACGGCAGCTACCATAATCATCGCAGTACCCACAGGTATTAAAGTATTT AGATGGTTGGCCACCCTTCATGGGTCAAAAATCAAAAATGAGA
<i>Are-Efetida-4</i>
TGAAGTGGGGCTTCGACTAGAACGAATCCCCCTATTTGTATGAGCTGTAGTTATTACCGTGGTGTTACTA CTTTTATCTCTTCCAGTACTTGCGGGAGCTATCACTATACTACTGACAGATCGAAACCTAAATACCTCAT TCTTTGACCCGTGCTGGAGGTGGGGACCCTATTCTCTACCAGCATTATTCTGATTTTTTTGGACACCCTGA AGTTTACATTCTCATCTTACCTGGATTTGGGGCAATCTCACACATCGTTAGTCATTATACTGCAAACTG GAACCATTTGGGGCTCTCGGGATAATTTATGCCATGCTCGGAATTGCTGTATTGGGATTTATTGTGTGAG CCCATCACATATTTACAGTAGGACTTGATGTAGATACACGAGCATACTTCACGGCAGCTACCATAAATTAT CGCAGAACCCACAGGATAAGATGCCAT
<i>Are-Efetida-5</i>
TTATCGGTTGTATGAGCTGTAGTTATTACCGTGGTGTTACTACTTTTATCTCTTCCAGTACTTGCGGGAG CTATCACTATACTATTGACAGATCGAAACCTAAATACCTCATTCTTTGACCCGTGCTGGAGGTGGGGACCC TATTCTCTACCAGCATTATTCTGATTTTTTTGGGCACCCTGAAGTTTACATTCTCATCTTACCTGGATTT GGGGCAATCTCACATATCGTTAGTCATTACACTGCAAACTGGAACCATTGGGGCTCTCGGGATAATTT ATGCCATGCTCGGAATTGCTGTATTGGGATTTATTGTGTGAGCCCATCACATATTTACAGTAGGACTTGA TGATAGATACACGAGCATACTTCACGGCAGCTACCATAAATTATTGCAGTACCCACAGGTATTAAAGTATTT AGATGGTTGGCCACCCTTCATGGGTAAAAAATCAAAATATG
<i>Are-Efetida-6</i>
TAGCAGGTGGCTGTAGTTATTACCGTGGTGTTACTACTTTTATCTCTTCCAGTACTTGCGGGAGCTATCA CTATACTATTGACAGATCGAAACCTAAATACCTCATTCTTTGACCCGTGCTGGAGGTGGGGACCCTATTCT CTACCAGCATTATTCTGATTTTTTTGGGCACCCTGAAGTCTACATTCTCATCTTACCTGGATTTGGGGCA ATCTCACATATCGTTAGTCATTATACTGCAAACTGGAACCATTGGGGCTCTCGGGATAATTTATGCCA TGCTCGGAATTGCTGTATTGGGATTTATTGTGTGAGCCCACCACATATTTACAGTAGGACTTGATGTAGA TACACGAGCATACTTCACGGCAGCTACCATAAATTATTGCAGTACCCACAGGTATTAAAGTATTTAGATGG TTGGCCACCCTTCATGGTAAAAAATCAAA
<i>Are-Efetida-7</i>
TGAAGTGGGGCTTGACTAGAACGAATCCCCCTATTTGTATGAGCTGTAGTTATTACCGTGGTGTTACTAC TTTTATCTCTTCCAGTACTTGCTGGAGCCATCACTATACTACTAACAGATCGAAACCTAAACACCTCATT CTTTGACCCGTGCTGGAGGTGGGGACCCTATTCTCTACCAACATTTATTCTGATTTTTTTGGACACCCTGAA GTCTACATTCTCATCTTACCTGGATTTGGAGCAATCTCACACATCGTTAGCCATTACACCGCAAACTGG AACCATTTGGGGCTCTCGGGATAATTTATGCCATGCTCGGAATTGCTGTATTGGGATTTATTGTGTGAGC CCACCACATATTTACAGTAGGACTTGATGTAGATACACGAGCATACTACACGGCAGCTACCATAATCATT GCAGTACCCACAGGTATAAAAGTA
<i>Are-Efetida-8</i>
CCTATTTGTGTGAGCTGTAGTTATTACCGTGGTGTTACTACTTTTATCTCTTCCAGTACTTGCGGGAGCT ATCACTATACTATTAAACAGATCGAAACCTAAATACCTCATTCTTTGACCCGTGCTGGAGGTGGCGACCCTA TTCTCTACCAACATTTATTCTGATTTTTTTGGACACCCTGAAGTCTACATTCTCATCTTACCTGGATTTGG AGCAATCTCACATATCGTTAGCCATTACACCGCAAACTGGAACCATTGGGGCTCTCGGGATAATTTAT GCCATGCTCGGAATTGCTGTATTGGGATTTATTGTGTGAGCACATCACATATTCACAGTAGGACTTGATG TAGATACACGAGCATACTTCACGGCAGCTACCATAAATTATTGCAGTACCCACAGGTATTAAAGTATTTAG ATGATTAGCCACCCTTCATGGGTAAAAAAT
<i>Are-Efetida-9</i>
GGGCTTCGACTAGAACGAATCCCCCTATTTGTATGAGCTGTAGTTATTACCGTGGTGTTACTACTTTTAT CTCTTCCAGTACTTGCGGGAGCTATCACTATACTATTGACAGATCGAAACCTAAATACCTCATTCTTTGA CCCTGCTGGAGGTGGCGACCCCTATTCTCTACCAACATTTATTCTGATTTTTTTGGACACCCTGAAGTTTAC ATTCTCATCTTACCTGGATTTGGAGCAATCTCACACATCGTTAGTCATTATACTGCAAACTGGAACCAT TTGGGGCTCTCGGGATAATTTATGCCATGCTCGGAATTGCTGTATTGGGATTTATTGTGTGAGCACACCA CATATTCACAGTAGGACTTGATGTAGATACACGAGCATACTTCACGGCAGCTACCATAAATTATCGCAGTA CCACAGGTATAAAGATATTTTCG
<i>Are-Efetida-10</i>
AACCCCCCTATTTGTATGAGCTGTAGTTATTACCGTGGTGTTACTACTTTTATCTCTTCCAGTACTTGCG

GGAGCTATCACTATACTATTGACAGATCGAAACCTGAATACCTCATTCTTTGACCCTGCTGGAGGTGGCG
ATCCTATTCTCTACCAACATTTATTCTGATTTTTTGGACACCCTGAAGTTTACATTCTCATCTTACCTGG
ATTTGGAGCAATCTCACATATCGTTAGTCACTATACTGCAAACTGGAACCATTTGGGGCTCTCGGGATA
ATTTATGCCATGCTCGGAATTGCTGTATTGGGATTTATTGTGTGAGCACATCACATATTTACAGTAGGAC
TTGATGTAGATACACGAGCATATTTACGGCAGCTACCATAATTATCGCAGTACCCACAGGTACAACGAT
TAGATTTT