Gammarus pulex (CRUSTACEA: AMPHİPODA)'TE BAZI DNA VE PROTEİN ANALİZLERİ

Merve ARICI

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Bilim Dalı

Ağustos–2010

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Merve ARICI'nın **"*Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda)'te Bazı DNA ve Protein Analizleri "** başlıklı Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı Yüksek lisans tezi 01.07.2010 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı Soyadı	**İmza**
Üye (Tez Danışmanı)	**: Yard. Doç. Dr. Filiz ALANYALI**	**…….**
Üye	**: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA**	**...…….**
Üye	**: Yard. Doç. Dr. Sevil ŞENTÜRK**	**……**

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun.....tarih ve .....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Gammarus pulex (CRUSTACEA: AMPHİPODA)'TE BAZI DNA VE PROTEİN ANALİZLERİ

Merve ARICI

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Filiz ALANYALI

2010, 40 sayfa

Gammarus'lar hem ekonomik hem de sucul indikatör özelliği olan canlılardır. Bu çalışmada *Gammarus* cinsine ait *Gammarus pulex*'te çeşitli moleküler teknikler kullanılması bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Bu amaçla öncelikli olarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen genomik DNA'nın kalitesini ve saflığını belirlemek için spektrofotometrik ve elektrofotometrik yöntemlerle analizi yapılmıştır. Bu analizler örneklerin PCR için kullanılabilirliğini göstermiştir. Evrensel primerler kullanılarak kurulan PCR reaksiyonunda bantlaşmaların olduğu görülmüştür. Ayrıca *Gammarus pulex*'ten protein izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen proteinler SDS-Page ile görüntülenmiştir. Protein izolasyonları sonucunda 9 *Gammarus pulex*'in aynı protein konformasyonunu gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç DNA ve proteinlerin türler arasındaki ilişkiyi ortaya koyabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Gammarus pulex*, DNA, SDS-Page,

ABSTRACT

Master of Science Thesis

SOME DNA AND PROTEIN ANALYSIS FOR *Gammarus pulex* (CRUSTACEA: AMPHIPODA)

Merve ARICI

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Department Biology

Molecular Biology Programme

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Filiz ALANYALI

2010, 40 pages

Gammarus has both economical and aquatic indicator properties. The aim of this study was to use different molecular tecniques for *Gammarus pulex* belonging to *Gammarus* species. First of all, genomic DNA was isolated. Spectrophotometric and electrophotometric methods were used to analyse quality and purification of isolated DNA. This analyses showed that these samples could be used for PCR. DNA band pattern was obtained with universal primers by PCR. Furthermore, protein isolation was also performed for *Gammarus pulex*. Isolated protein samples were analysed by SDS-PAGE. 9 *Gammarus pulex* individuals had the same protein conformation. These results showed that DNA and protein can be used to detect the relationship between species.

Keywords: *Gammarus pulex*, DNA, SDS-Page,

TEŞEKKÜR

1986 yılından beri yanımda olan, üniversiteye girdiğim 2004 yılından beri çalışmalarımda her zaman yanımda olan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile araştırmamın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde bana her zaman yol gösteren, ilgisini benden esirgemeyen, bana bir çok alanda bir çok şey kattığına inandığım ve manevi desteğini her zaman hissettiğim ve bundan sonraki hayatımda da her zaman yanımda olacak olan hocam ve teyzem, Yard. Doç. Dr. Filiz SUSUZ ALANYALI'ya sonsuz teşekkür eder, minnetlerimi sunarım. Laboratuar çalışmaları ve araştırmalarımda yanımda olan, güler yüzünü, sabrını, tecrübelerini, bilgilerini benden esirgemeyen ve tezimin her aşamasında bana olan desteğinden ve yardımlarından dolayı Araş. Gör. Cem ÖZİÇ'e sonsuz teşekkür ederim.

Bütün hayatım boyunca özelliklede üniversite hayatım boyunca benden yardımlarını, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve her zaman yanımda olacak olan ananem Nazmiye SUSUZ, dedem Yaşar SUSUZ, teyzelerim Nalan SUSUZ ve Nesrin SUSUZ, eniştem Asım ALANYALI, doğduğum günden beri benden hiçbir şeylerini esirgemeyen annem Berrin ARICI ve babam Cengiz ARICI'ya ve kardeşim Ecem ARICI'ya minnettarım. Bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen herkese sonsuz teşekkür ederim.

Merve ARICI

Haziran 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET…..... i
ABSTRACT..... ii
TEŞEKKÜR..... iii
İÇİNDEKİLER..... iv
ŞEKİLLER DİZİNİ..... vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... vii

1. GİRİŞ 1
1.1.Biyoteknoloji..... 1
1.1.1. DNA ve RNA izolasyonları 3
1.1.1.1. Spektral yöntemler 3
1.1.1.2. Elektroforetik yöntemler 3
1.1.2. PZR 7
1.1.2.1. DNA'nın PZR ile çoğaltılması 9
1.1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu oluşum mekanizması...10
1.1.2.3. PZR'ın Temel Bileşenleri 11
1.1.2.4. PZR'ın İşleyişi 12
1.1.3. Protein izolasyonu 13
1.1.3.1. Protein saflaştırma yöntemleri 14
1.2. Araştırma organizması *Gammarus pulex*..... 17
1.2.1. *Gammarus pulex* sistematiği 17
1.2.2. *Gammarus pulex* biyolojik yapısı 19
1.2.3. *Gammarus pulex*' in önemi 20
1.3. Amaç… 21

2. MATERYAL VE YÖNTEM 22
2.1.Materyal 22
2.1.1. Çalışma organizması: *Gammarus pulex* 22
2.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar 22
2.1.3. Çalışmada kullanılan cihazlar 23

2.1.4. Çalışmada kullanılan kitler 23
2.1.5. Çalışmada kullanılan DNA polimeraz seti..... 23
2.2.Yöntemler..... 24
2.2.1. *Gammarus pulex*'ten genomik DNA izolasyonu 24
2.2.2. DNA'ların spektrofotometrede ölçümü 26
2.2.3. PZR Reaksiyonu 26
2.2.4. Agaroz jel analizi ve jel görüntüleme işlemi 27
2.2.5. *Gammarus pulex*'e ait proteinlerin izolasyonu ve analizi..... 27

3. BULGULAR 29
3.1. *Gammarus pulex*'ten genomik DNA izolasyonu..... 29
3.2. DNA'ların spektrofotometrede ölçümü 29
3.3. DNA'nın kullanılabilirliğinin PZR reaksiyonu belirlenmesi..... 30
3.4. *Gammarus pulex*'e ait proteinlerin izolasyonu ve
SDS-Page ile analizi..... 30

4. TARTIŞMA VE SONUÇ 32
4.1. Sonuç..... 37
4.2. Öneriler 37
KAYNAKLAR 38

ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1. *Gammarus pulex* genomik DNA'sının agaroz jelden görüntüsü. 29
3.2. *Gammarus pulex* genomik DNA'sı kullanılarak kurulan PCR reaksiyonunun agaroz jelden görüntüsü..... 30
3.3. *Gammarus pulex* protein izolasyonlarının SDS-Page görüntüsü..... 31

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	: Deoksiribonükleikasit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
gDNA	: Genomik DNA
RNA	: Ribonükleikasit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	: N,N,N,N-Tetrametil etilendiamin
OD	: Optik Dansite
PFGE	: Pulsed-Field Jel Elektroforezi
Mb	: Milibaz
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
dNTP	: deoksiribonükleozid trifosfat
cDNA	: komplementer DNA
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi

1. GİRİŞ

Artan dünya nüfusunun temel ihtiyaçlarının karşılanmasında yaşanılan zorluklar, insanlara ulaşan gıda zincirindeki olumsuzluklar çağımız bilim adamlarını arayışlara itmiştir. Gün geçtikçe azalan doğal kaynakların en iyi şekilde değerlendirilmesi mümkün olsa bile, dünya nüfusunun artış hızı karşısında yetersiz kalmaktadır. Bu durumda mevcut potansiyelin rasyonel kullanımı yanında yeterli ve dengeli beslenme için uygun gıda maddelerinin sağlanması insanlığın geleceği için vazgeçilmez bir şart olmuştur. Günümüzde pek çok ülkede çok daha acı bir şekilde hissedilse bile gıda maddelerinin sağlanması insanların temel sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Son yıllarda adından sık sık bahsedilen "Uygulamalı Hayat Bilimleri" olarak tarif edilen "Biyoteknoloji" ye başta gıda ve sağlık olmak üzere birçok meseleyi çözebileceği ümidiyle bakılmaktadır. Yirmi birinci asrın başlarında 6.5 milyar olacak dünya nüfusunu beslemek için, gıda üretiminin bugünkünün 1.7 kat artırılması gerekmektedir. Tarım alanında basit biyoteknolojik uygulamalarla sağlanan önemli üretim artışlarının, çağımızdaki teknolojiye uygun metotlarla daha da artırılabileceği tahmin edilmektedir. Biyoteknoloji alanındaki uygulamaların tarım alanındaki artışları insanların açlık sorununa kalıcı çözümler getirecektir. İnsan gıdalarının çoğu yaklaşık 30 çeşit tarımsal üründen sağlanmakta, bunları da tahıllar, şekerli bitkiler, baklagiller, yağlı tohumlar, meyve ve sebzeler oluşturmaktadır. Bütün bunlar göz önüne alındığında, insanların temel gıdalarını oluşturan, tarımsal ürünlerin üretiminde olduğu kadar, ürünlerin işlenmesi ve istenilen özellikte gıdalar elde edilmesi gibi birçok sahada uygulama imkânı bulan biyoteknolojinin önemi kendiliğinden ortaya çıkmaktadır (Anonim 2008).

1.1. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji, yaşayan doku ve organları kullanarak, uygun yöntem ve tekniklerle istenilen ürünün elde edilmesi anlamına gelir. Biyoteknoloji birçok bilim dalıyla ilgilidir.

Biyoteknolojik çalışmalara bazı örnekler verirsek;

-İnsan sağlığına yönelik olarak proteinlerin üretilmesi

-Bazı hormon, antikor, vitamin ve antibiyotik üretilmesi

-Çok zor şartlara sahip çevrelerde (sıcak, kurak, tuzlu...) yaşayan organizmaların enzimlerini ve biyomoleküllerini saflaştırarak bunların sanayide kullanılması

-Yeni sebze ve meyve üretimi

-İnsandaki zararlı genlerin elemine edilmesi

-Aşı, pestisit ve tıbbi bitki üretimi.

Biyoteknolojik uygulamalar J.Watson-F.Crick adlı araştırıcıların canlılardaki karakterlerin dölden döle aktarılmasında rol oynayan DNA (Deoksiribonükleikasit) molekülünün yapısını belirlemeleriyle hayata geçmiştir. Bu molekülün yapısındaki değişmelerle canlılardaki karakterlerin farklılaştığının anlaşılması bu tür uygulamalarla istenilen özellikte bitki ve hayvan elde etmeyi planlayan Gen Mühendisliği bilim dalının doğmasını sağlamıştır. Teorik olarak sınırsız uygulama alanı olan biyoteknolojik yöntemlerle grip, tetanoz, kuduz, kızamık gibi aşılar yanında istenilen özelliklere sahip bitkiler, hayvanlar ve yararlı mikroorganizmaların da üretilmesi mümkündür. Biyoteknolojik uygulamalarla gelecek yıllarda bol, ucuz, kaliteli ve besleyici özelliği daha çok olan gıda maddeleri elde edilebilecektir. Bunların hayata geçirilebilmesi için genetik mühendisliği ile biyoteknolojinin tamamen örtüşecek şekilde uyuşması gerekir. Çünkü biyoteknolojinin ortaya çıkmasında en önemli faktör, hücrenin yapı ve kimyasal, fiziksel sinyallere tepki verme biçimleri üzerinde gittikçe artan bilgi birikimleri olmuştur. Biyoteknolojik uygulamaları sağlık, tarım, enerji sağlama ve çevre alt başlıklarıyla gruplandırmak mümkündür (Anonim 2008).

Biyoteknolojinin önemli bir alanıda Rekombinant DNA teknolojisidir. Rekombinant DNA teknolojisi uygulamasıyla elde edilen ve canlı tarafından sentez edilemeyen yada yetersiz üretilen protein ve enzimlerin yerine geçebilecek yapay ürünlerle hastalıkların tedavisi kolaylaşmaktadır.

Rekombinant DNA teknolojisi için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları;

- DNA izolasyonları,
- PCR analizleri,
- Protein analizleri

1.1.1. DNA ve RNA İzolasyonları

Hücrenin karmaşık moleküler süreçlerinin nasıl işlediğinin anlaşılması, hızla gelişme gösteren ileri moleküler biyoloji yöntemleri sayesinde olmuştur. Son zamanlarda moleküler biyoloji tekniklerindeki gelişmeler, hücredeki RNA ve proteinlerin büyük çaplı analizlerini yapma ve hatta tüm genomun nükleotit dizilerini belirlemeye olanak sağlamıştır. Çok sayıda organizmaya ait tüm genom dizilerinin saptanmasıyla, genomun kodlama yapan ve yapmayan bölgelerinin büyük çapta karşılaştırılması mümkün olmuştur (Yıldırım A. et.al. 2006).

1.1.1.1. Spektral Yöntemler

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm. dalga boyundaki ışığı max. emme özelliği taşıdığından, bu dalga boyundaki emme derecesi nükleik asitlerin miktarının bir ölçüsüdür. Buna göre DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm. dalga boylarında elde edilecek değerlerden belirlenebilir. 1 optik dansite (OD) çift iplikli DNA için 50 µg/ml tek iplikli DNA veya RNA için 40 µg/ml ve oligonükleotidler için ise 20 µg/ml'ye karşılık gelmektedir (Yıldırım A. et.al. 2006).

1.1.1.2. Elektroforetik Yöntemler

Elektroforez farklı büyüklükte, yükte ya da konformasyonda olan makromolekülleri, özellikle protein ve nükleik asitleri, ayırmak, saflaştırmak ve molekül ağırlıklarını saptamak amacıyla biyokimya ve moleküler biyolojide en yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Yüklü moleküller bir elektrik alanına maruz bırakıldığında, yüklerine göre ya pozitif (anot) ya da negatif (katot) kutba doğru göç ederler. Net negatif ya da net pozitif yüke sahip olan proteinlerin aksine, nükleik asitler fosfat omurgaları iyonize olduğundan, negatif bir yüke sahiptirler

ve bu yüzden anota doğru göç ederler. Bununla beraber, uzun zincirlerden oluşan nükleik asit molekülleri, uzunlukları ne olursa olsun hemen hemen özdeş yük-kütle oranlarına sahiptirler. Hatta yapı ve kütlece farklı olan nedenle, basitçe bir çözelti içinde gerçekleştirilen nükleik asit ve proteinlerin elektroforezi değişik büyüklükteki moleküllerin az ya da hiç ayrılmaması ile sonuçlanabilir. Bununla beraber, DNA moleküllerinin büyüklüğü elektroforetik olarak ayrılmaları için bir faktör olmaktadır (Yıldırım A. et.al. 2006).

Elektroforez DNA moleküllerini sadece molekül ağırlıklarına göre değil, aynı zamanda yapısal ve topolojik özelliklerine göre de ayırır. Örneğin halkasal bir DNA molekülü eşit kütledeki doğrusal bir DNA'dan daha yavaştır. Hatta süper kıvrımlı DNA molekülleri daha sıkı ve küçük bir efektif hacme sahip olduğu için, elektroforez sırasında eşit kütlede olan daha az süper kıvrımlı ve gevşek halkasal DNA moleküllerinden çok daha hızlı hareket eder (Yıldırım A. et.al. 2006).

Elektroforez RNA moleküllerini ayırmada da kullanılır. Bilindiği gibi doğrusal çift iplikli DNA molekülleri muntazam bir ikincil yapıya sahiptir ve elektroforez sırasındaki hareketleri molekül ağırlıklarıyla orantılıdır. Ancak RNA molekülleri genellikle tek iplikli olduğu için, elektroforetik hareketlerini etkileyen, yaygın ikincil ve üçüncül yapı alırlar. Bunun için elektroforez öncesi RNA ipliğinin kendi içinde baz eşleşmelerini önlemek için RNA ile reaksiyona giren glioksal (bazlardaki amino gruplarına eklenerek baz eşleşmelerini önler) gibi bir ajanla muamele edilir. Glioksal ile muamele edilmiş DNA ikincil ve üçüncül yapılar oluşturamadığından, elektroforez sırasında yaklaşık olarak molekül ağırlıklarına oranla hareket ederler. Elektroforez benzer şekilde proteinleri de ayırmada kullanılmaktadır (Yıldırım A. et.al. 2006).

İlk elektroforez, analiz edilecek bileşenlerin serbest olarak bir çözelti içindeki hareket-sınırlı (moving-boundary) elektroforezdir. Daha sonra, yoğunluk kademeleri kullanılarak (sukroz kademesi gibi) konveksiyonu ve difüzyonu düşürmek yoluyla, bileşenlerin daha keskin bir şekilde ayrılmaları sağlanmıştır. Moleküllerin daha iyi ayrılmalarını sağlamak için, kağıt ve daha sonra selüloz asetat ve nişasta gibi destek maddelerin kullanılmasıyla, farklı jel elektroforezleri geliştirilmiştir. Günümüzde en yaygın olarak kullanılanlar ise agaroz ve poliakrilamit jel elektroforezleridir (Yıldırım A. et.al. 2006).

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz ortalama molekül ağırlığı 12000 olan doğrusal bir polisakkarittir ve kırmızı bir alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilir. Birbiri ardına gelen galaktoz ve 3,6-anhidrogalaktoz birimleri agarobiyozi (agarobiose), agarobiyoz da agarozu oluşturur. Yüksek sıcaklılarda suda çözünmesi ve soğutulduğunda bu polimerde çapraz bağların oluşması sonucu jel yapısı oluşur. Bu olay geri dönüşümlüdür. Agaroz orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için en yaygın destek ortamdır (Yıldırım A. et.al. 2006).

Ticari olarak farklı amaçlar için kullanılabilecek agarozlar üretilmektedir. Örneğin, DNA'nın jelden geri kazanılması için oda sıcaklığında eriyebilen agaroz kullanılmaktadır. Ayrıştırılacak moleküllerin büyüklüğüne bağlı olarak genelde %0,3 ila 2,0 agaroz konsantrasyonları kullanılır.

En çok 50kb'a kadar olan nükleik asitler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılabilir. Agaroz konsantrasyonu ayarlanarak jelde moleküllerin hareket ettiği porların çapı değiştirilebilir. Jelin konsantrasyonu arttıkça, porların çapı küçülür. Böylece küçük DNA parçaları için yüksek, büyük DNA parçaları için ise düşük agaroz konsantrasyonları kullanılarak nükleik asitlerin en iyi şekilde ayrılmaları sağlanır. Pratikte jel içeriği, ayrıştırılacak olan DNA moleküllerinin büyüklüğünü belriler. Nispeten büyük porları olan 0,5 cm kalınlığındaki %0,5'lik agaroz jel 1-30 kb (10-12 kb büyüklüğündeki moleküller rahatlıkla ayrışır) büyüklüğündeki DNA moleküllerini ayırmada kullanışlıdır.

Agaroz jeller genellikle floresan bir boya olan etidyum bromür ile boyanır ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir. DNA'nın jelde görünür hale gelmesi, etidyum bromürün DNA'nın iki zinciri arasına girerek 300 ve ya 360 nm dalga boyundaki ışığı soğurması sonucu floresan etki göstermesi ile gerçekleşir. Bu boya floresan bir boya olduğundan, ancak UV ışığı yardımıyla görülebilir. Etidyum bromür kanserojen bir madde olup, mutsyonlara neden olmaktadır. Yapısı itibariyle eşleşmiş bir pürin ve pirimidin bazına benzeyen ve bu özelliği ile de bir baz analoğu olarak hareket edip çift zincirli DNA parçaları arasına rahatlıkla yerleşir (Yıldırım A. et.al. 2006).

Poliakrilamit Jel Elektroforezi

Poliakrilamit jeller, vinil polimerizasyonuyla akrilamit monomerlerinin uzun poliakrilamit zincirleri ve genellikle ortama belli miktarda 'bis' olarak bilinen N,N'-metilen-bis-akrilamit ilavesiyle çapraz bağlanmalar yaparak oluşur. Akrilamit/bis karışımı polimerleşmeyi katalizleyen amonyum persülfat ile TEMED (N,N,N,N-Tetrametil etilendiamin) varlığında polimerleşerek jel yapısı kazanır. Çapraz bağlanmalar sonucu oluşan porların büyüklüğü akrilamit ve bis-akrilamitin başlangıç konsantrasyonlarına bağlıdır. Poliakrilamit jel elektroforezi nispeten küçük DNA moleküllerini (genellikle 20-1000 bç büyüklüğündeki parçaları) ayırmak için uygundur. Ayrıca, çok ince (0,3 mm kalınlığında) olan %40'lık son derece küçük porları olan poliakrilamit jel, çok küçük DNA moleküllerini (büyüklüğü 1-300 bç aralığındaki) ayırmakta kullanılır. Bu jeller DNA dizi analizini çıkarmak için ve sadece birkaç tekrarlı dizi bakımından farklı olan mikrosatellit DNA moleküllerini ayırmak için kullanışlıdır.

Standart poliakrilamit jeller genellikle gümüş nitrat veya etidyum bromür ile boyanarak nükleik asitlerin görüntülenmesi sağlanır. Ancak jeldeki her bant için DNA miktarı 10 ng'dan az ise, bu durumda boyama görüntüleme için çok etkili olmaz bunun için çok daha hassas olan otoradyografik yöntemler kullanılır. Bunun için elektroforez öncesi DNA molekülleri radyoaktif olarak işaretlenir (Yıldırım A. et.al. 2006).

Atımlı-Alan (Pulsed-Field) Jel Elektroforezi (PFGE)

Standart elektroforezlerde elektrik akımı jelin uzunluğu boyunca verilir ve DNA molekülleri pozitif kutba doğru düz bir hat üzerinde hareket eder. Ancak göç hızındaki farklılık büyük moleküller için artan bir şekilde düşmesinden dolayı, bu yolla ancak belli bir büyüklük aralığında olan moleküller ayrılabilir. Pratikte büyüklükleri 50 kb'den daha büyük moleküller standart jel elektroforezi ile etkili bir şekilde ayrıştırılamaz.Yaklaşık 1 megabazdan daha büyük doğrusal çift iplikli DNA molekülleri agaroz jelde aynı hızda göç ederler. Bunun nedeni jelin por büyüklüğünün doğrusal DNA'nın jelde göç edebilmesi için yeterli

olmamasıdır. Por büyüklüğü konsantrasyonu % 0,1 olan agaroz kullanılarak arttırılabilir. Fakat bu durumda jel çok kırılgan ve dayanıksız olacağından kullanımı güçleşir. Bu problem 1984'te geliştirilen ve 1-10 Mb boyutundaki DNA parçalarını da ayırabilen pulse field jel elektroforez tekniği ile ortadan kaldırılmıştır. Bu sistemde elektroforetik göç bir yöne doğru başlayıp, bir süre durur ve sonra 90°'lik bir açıyla ya da zıt yönde birbiri ardına uygulanır. Bu uzun moleküller akım verildiğinde ve gevşemesi için kesildiğinde elektrik alanı boyunca dizilmeye eğilimlidirler. Gevşeme zamanı jeldeki porlara bağlıdır. Uzun moleküllerin gevşemeleri kısa olanlara göre daha uzun zaman alır ve bu yüzden zincirlerin ayrılmalarını sağlayan akımın açılıp kapatılmasına daha geç tepki verir. Bu teknik çok uzun DNA moleküllerinin saflaştırılması için çok önemlidir. Atımlı jel elektroforezi molekül büyüklüğü birkaç Mb uzunluğunda olan tüm bakteriyel kromozomları ve mantar gibi tek hücreli ökaryotların kromozmlarını ayırma ve büyüklüklerini saptamada kullanılabilir (Yıldırım A. et.al. 2006; Anonim 2006).

Kapiler Elektroforez

Kapiler elektroforez oldukça yeni bir tekniktir ve geliştirme çabaları hala devam etmektedir. Bu tip elektroforez çapı 20-100 mm olan küçük kapiler boru içinde gerçekleştirilir. Bu yöntemin avantajı diğer elektroforetik yöntemlerde oluşan ısının ortadan kaldırılmış olmasıdır. Normal jeller için kullanılan max voltaj 15-40 V/cm iken, kapiler elektroforezde 800 V/cm gibi yüksek bir akım uygulanabilir. Böylece DNA'yı jelde yürütme süresi saatlerden dakikalara düşer ve oldukça önemli bir zaman kazancı sağlanır.

Kapiler elektroforezde DNA'lar lazerle indüklenen fluoresan saptama sistemi ile görüntülenmektedir. Bu teknikle 500-23000 baz çifti arasındaki DNA fragmentleri ayrılabileceği gibi 3-5 Mb arasındaki kromozomların da birbirinden ayrılması mümkün olmaktadır (Anonim 2006).

1.1.2. PZR

Belli bir DNA dizisini özgün olarak çoğaltmak için kullanılan yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) Kary Mullis tarafından 1980'lerin ortalarında keşfedilmiş ve genlerin analizine tamamen yeni bir yaklaşım getirmiştir. PZR,

klonlama yapmaya gerek kalmadan, bir genomdan özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasını çıkarma olanağı sağlamıştır. Bu işlem tamamen in vitro koşullarda DNA sentezidir.

Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (*Polymerase Chain Reaction* - PZR), DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Metod basitçe tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. Bir çeşit "*in vitro* klonlama" olarak da tanımlanan PZR; 94°C-98°C aralığında gerçekleştirilen denatürasyon, 37-65°C aralığında gerçekleştirilen bağlanma ve 72°C'de gerçekleştirilen uzama aşamalarından oluşur ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır (Yıldırım A. et.al. 2006; Temizkan G.ve ark. 2007)

PZR, tek iplikli DNA'yı kalıp alan ve deoksiribonükleotitleri substrat olarak kullanan DNA polimeraz enzimi ile gerçekleştirilir. DNA polimeraz, bütün diğer polimerazlar gibi 5'→3' yönünde sentez yapar ve senteze başlaması için mutlaka serbest 3'-OH grubuna gereksinim duyar. PZR'da kullanılan oligonükleotitler (primerler), enzimin senteze başlaması için bu 3'-OH grubunu sağlar. Özetle kalıp DNA, DNA polimeraz, deoksiribonükleotitler ve oligonükleotitlerin bulunduğu bir karışım, uygun koşullar sağlandığında, primerler kalıp DNA üzerinde kendilerine komplementer olan bölgelerle eşleşerek enzimin senteze başlaması için başlatıcı görev yaparlar. Daha sonra DNA polimeraz, primerlerin ucuna serbest deoksiribonükleotitleri ekleyerek komplementer DNA ipliğini sentezler. Bu karışım, enzimin verimli çalışması amacıyla en uygun koşulları sağlamak için tampon bir çözeltide genellikle 20-100 µl hacimde hazırlanır.

PZR ile DNA sentezinde kullanılan enzim kaplıca sularında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen yüksek sıcaklıklarda uzun süre kararlı olan Taq DNA polimerazdır. Bu enzimin sayesinde, in vitro DNA çoğaltılmasında otomasyona geçilmiş ve ardışık sentez reaksiyonlarıyla kısa sürede yüksek miktarlarda elde edilmesi mümkün olmuştur.

Genelde PZR ile çoğaltılacak DNA parçasının büyüklüğünün 3 kb'dan fazla olmaması, tercihen 1 kb'dan daha kısa olması gerekir. Öte yandan, standart

PZR tekniği ile 10 kb'a kadar olan DNA parçalarının çoğaltılması mümkündür. Çok daha büyük DNA parçalarının (40 kb'a kadar) çoğaltılması ise özel DNA polimeraz enzimleri sayesinde mümkündür (Yıldırım A. et.al. 2006).

1.1.2.1. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması

İn vitro koşullarda DNA çoğaltılmasının başlıca nedenleri; özgün bir DNA parçasının bol miktarda elde edilmesi, moleküler analizinin yapılması ve genetik mühendisliği amaçları doğrultusunda rekombinant organizmaları elde etmek üzere gen aktarımı için kullanılmasıdır. Hücrelerde doğal olarak DNA, replikasyon ile çoğalır. DNA çift sarmalında birbirinden ayrılan ipliklerin tamamlayıcıları sentezlenerek bir DNA molekülü onunla aynı 2 molekül meydana gelir ve tüm genler yeni oluşan hücrelere aynen geçer. Her yeni jenerasyonda kopya sayısı 2 katına çıkar ve DNA miktarı üssel olarak artar. 30 jenerasyon sonra hücre ve gen sayısında milyonlarca kez artış olur. İn vitro koşullarda istenen gen yada özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilmesi için rekombinant DNA yöntemleri ile DNA klonlanmasına ek olarak 80'li yıllardan itibaren PZR'da kullanılmaya başlanmıştır.

PZR ile istenilen genlerin yada DNA dizilerinin jenerasyonlara bağlı replikasyonu, hızlandırılmış bir şekilde gerçekleştirilir. Polimeraz zincir reaksiyonu; spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir. 80'li yıllarda Cetus firması tarafından geliştirilmesinin ardından; Moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi, DNA haritalanması gibi) ve bir çok hastalığın (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, AIDS, lösemi vb) DNA temeline dayalı tanısı için de klinik tıpta hızla kullanılmaya başlanmıştır.

PZR ile insan genomik DNA'sı gibi kompleks DNA kalıplarından spesifik DNA parçalarının sentezinin birkaç saat içinde gerçekleştirilebilir hale gelmesi, bu teknolojinin yaygınlaşmasında başlıca neden olmuştur. Ayrıca günümüzde PZR; Allellik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi, doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi, analık-babalık tayini gibi tıbbın diğer kollarında ve

tarımda, sistematik ve evolüsyon çalışmaları gibi bir çok alanda kullanılmaktadır (Temizkan G.ve ark. 2007).

1.1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Oluşum Mekanizması

Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere 2 oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. "*amplimer*" olarak da adlandırılan oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecesinde denatüre edildikten sonra tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle melezlenirler. Primerlerin bağlanması düşük sıcaklıkta olur. DNA polimeraz enzimi uygun tampon ve 4 çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3'OH ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur.

Bir PZR döngüsü; denatürasyon, primerlein bağlanması ve uzaması olarak 3 aşamadan oluşur. Bu 3 aşamanın birbirini izlemesi ile DNA fragmentleri üssel olarak artar. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucunda sentezlenen ürünün ardışık döngüde diğer primer için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her seferinde 2 katına çıkar. Matematiksel olarak amplifikasyon ; $(2^n\text{-}2n)x$ formülü ile ifade edilir.

n; döngü sayısı

2n; 1 ve 2. döngü sonundaki boyları bilinmeyen ürünler

x; orijinal kalıbın kopya sayısı

PZR verimini etkileyen önemli bir faktör; DNA polimeraz enzimidir. 25-30 PCR döngüsü sonucu hedef dizi artışı ve termal denatürasyon nedeniyle sınırlayıcı bir etken olur. Verimliliği azaltan diğer faktörde konsantrasyonu artan hedef dizilerin primer ile bağlanma yarışıdır (Temizkan G.ve ark. 2007).

1.1.2.3. PZR'ın Temel Bileşenleri

Kalıp DNA:

PZR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA'lar amaca göre cDNA(komplementer DNA) , genomik DNA vb olarak araştırma laboratuarları ve kliniklerde ticari olarak elde edilir.

Polimerazlar:

DNA polimeraz enzimleri kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orjinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak 4 çeşit dNTP'den uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primer) gerek duyarlar. Sentez 5'→3' doğrudur. Primerlerin serbest 3'OH ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. Termostabil DNA polimeraz enziminin PZR'da kullanılması büyük çığır açmıştır. Önceleri kullanılan *E. coli*'nin DNA polimeraz I enziminin Klenow fragmenti sıcaklığa dayanıklı olmadığından her döngüde denatürasyondan sonra yeniden enzim eklenmesi gerekiyordu. Günümüzde termostabil DNA polimerazların kullanılması ile bu sorun ortadan kaldırılmıştır. Termostabil enzimlere örnek, *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Tag DNA polimerazdır. *P.aquaticus*→ Amplitaq, *T. Flavis* →Hot Tub ve Pyrotase, *Thermococcus libralis*→ Vent örnek olarak verilebilir. Taq DNA polimerazın bazı özellikleri arasında; optimum sıcaklıkta (70-80ºC) saniyede 35-100 nükleotid polimerizasyonu yapması ve 5'→3' ekzonükleaz aktivitesine sahip olmasıdır.

Primerler:

Oligonükleotid primerler, bazı laboratuarlardan ticari olarak temin edilebilir. PCR'ın bir çok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere gereksinim vardır. Genelde primerler 20-30 nükleotid uzunluğundadır. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin 2 ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır, tasarım yapılırken mümkün olduğunca dört bazın eşit sayıda kullanımına dikkat edilir.

dNTP Karışımı:

Deoksirinonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) tek yada 4'lü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100µM) kalıba uygun doğru bazları seçerken, normal koşullarda PZR 100µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Ayrıca optimal dNTP konsantrasyonu; $MgCl_2$ konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna, çoğaltılmış ürünün boyuna ve PZR döngü sayısına bağlıdır.

Tamponlar ve $MgCl_2$:

PCR'da en çok kullanılan tampon Taq/Amplitaq enzimlerine özgü tampondur ve genelde 10X konsantrasyonunda enzimle beraber temin edilir. $MgCl_2$'ün reaksiyon karışımındaki final konsantrasyonu değişmekle birlikte 0,5-5mM arasındadır. Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve çift iplikli DNA'nın Tm değerini arttırırlar, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar (Tm değeri, çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına neden olan sıcaklık). Bu nedenle $MgCl_2$'ün PZR'ın özgüllüğü ve ürün verimi üzerinde önemli etkisi vardır. Genellikle optimum $MgCl_2$ konsantrasyonu olarak 1-1,5 mM'lık değerler tercih edilir. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonu, ürün oluşumunda azalmayan, yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün birikimine yol açar (Temizkan G.ve ark. 2007).

1.1.2.4. PZR'ın İşleyişi

Verimli bir PZR için;

1. Denatürasyon
2. Primer bağlanması
3. Primerin uzaması
4. Döngü sayısı
5. PCR makinesinin sıcaklık iniş ve çıkış süreleri önemlidir.

Polimeraz zincir reaksiyonu mikrotüplerde gerçekleştirilir. Amaca göre farklı tüp ve sıcaklık dereceleri kullanılabilir.

Başlangıç denatürasyonu için genomik DNA gibi kompleks kalıpların denatürasyonu için yüksek sıcaklık (95-100ºC) kullanılır. Ancak PZR'da optimum sıcaklık 92-95ºC'dir. Primer bağlanması aşamasında Tm/bağlanma sıcaklığı oranının doğru olarak hesaplanması PZR'ın gerçekleşmesinde çok önemlidir. Primerlerin Tm değerinin hesaplanmasında en çok kullanılan formül; [(A+T'lerin sayısı)x2ºC + (G+C'lerin sayısı)x4ºC] çoğu zaman bu formülle hesaplanan Tm değerinin 3-5ºC altındaki sıcaklıklar bağlanma sıcaklığı olarak seçilir ve optimum sıcaklık denenerek belirlenir. Yukarıdaki formül boyu en fazla 20 nükleotid olan primerler içindir. Daha uzun olanlar için başka formüller kullanılır.

Primerlerin uzaması aşamasında genellikle Tqa/amplitaq DNA polimerazların polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan 72ºC kullanılır. Bu aşama için genelde 2 dakika yeterlidir. Eğer uzun amplikonlar (PZR ile çoğaltılan DNA parçası) çoğaltılıyorsa süre uzatılır. PZR'da son döngünün uzama süresi uzun (10-15 dakika) tutulur. Bunun nedeni tüm moleküllerdeki reaksiyonların kesin olarak tamamlanmış olmalarını sağlamaktır. Toplam döngü sayısı 25-35 arasındadır. Döngü sayısının arttırılması halinde istenmeyen ürünler fazlalaşırken, istenen ürünlerde herhangi bir artış olmaz. Bu yüzden 40'dan fazla sayıda döngüden oluşan PZR reaksiyonları genellikle başarılı sonuçlar vermez (Temizkan G.ve ark. 2007).

1.1.3. Protein İzolasyonu

Proteinler, canlıda en çok bulunan biyolojik makromoleküllerdir. Tek bir hücrede bile, biyolojik işlevleri aşırı çeşitlilik gösteren binlerce farklı özellikte ve büyüklükte protein bulunur. Ayrıca proteinler genetik bilginin ifadelendiği en önemli son ürünlerdir. Proteinlerin hücre veya canlıdaki yapı ve işlevlerinin açıklanabilmesi için, moleküler yapılarının, biyokimyasal ve fiziksel özelliklerinin çok iyi bir şekilde aydınlatılması gerekir. Bunun için doku veya hücrelerdeki binlerce protein veya biyolojik molekülden, ilgili proteinin saflaştırılması gerekir. Bir hücre ve dokudan istenilen bir proteinin saf halde izole edilmesi oldukça güç bir olaydır. Bu proteinin konsantrasyonu düşük ise binlerce farklı protein arasından ayırmak ve saf halde elde etmek için bu proteine uygun olan saflaştırma

tekniklerinin seçilmesi gerekir. Proteinlerin saflaştırılmasında bugün kullanılan yöntemler oldukça gelişmiştir. Saflaştırma yapıldıktan sonra, proteinlerin biyokimyasal özellikleri belirlenerek hücredeki biyolojik işlevleri ve diğer moleküllerle olan ilişkileri aydınlatılabilir. Protein saflaştırması denilince, akla ilk olarak hücrede bütün biyokimyasal olayların katalizinde önemli rol oynayan enzimler gelmektedir (Yıldırım A. et.al. 2006; Turner, P.C. et.al. 2004).

Proteinlerin yapısının çözümlenmesi birçok hastalığın teşhis ve tedavisi ve ilaç üretimi için çok önemlidir. Bir doku ve hücre gurubundan proteinleri izole edebilmek için öncelikle yapılması gereken bazı işlemler vardır. İlk safhada çalışmak istediğimiz proteinin en fazla bulunduğu doku veya hücre grubu seçilir. İlgilendiğimiz proteini dayanıklı tutacak tampon çözeltiler kullanılarak doku ve hücreler homojenize edilir. Hücre membranının ve çekirdek membranının parçalanması gerekir. Daha sonra bu homojenat belirli hızlarda santrifügasyona tabi tutularak hücre partiküllerinden arındırılır. Böylece elde edilen protein karışımı süpernatant halinde alınarak saflaştırma yöntemlerinden biri veya birkaçı kullanılarak proteinlerin saf halde izole edilmesi sağlanır. Jel filtrasyon kromotografisi ebatlarına göre ayırır. İyon değişim kromotografisi, izoelektrik fokuslama ve elektroforez proteinlerin farklı iyonik yüklerinden faydalanma avantajına sahiptir. Hidrofobik interaksiyon kromatografisi, hidrofobisitedeki farklılıkları ortaya çıkarır. Afinite kromatografisi enzimler veye reseptörler, ve substratlar veya inhibitörler gibi ligandlar arasındaki spesifik afiniteye bağlıdır (Turner, P.C. et.al. 2004).

1.1.3.1. Protein Saflaştırma Yöntemleri

1.Kromatografik Yöntemler
   a. Jel Filtrasyonu
   b. Ion-Exchange (İyon Değiştirici) Kromatografisi
   c. Affinite Kromatografisi
2.Santrifügasyon Yöntemleri
   a. Densiti Gradient (Zonal) Santrifügasyon
   b.Differansiyel Santrifügasyon

3. Dializ ve Ultrafiltrasyon

4. Elektroforez

a. Kağıt Elektroforezi

b. Selüloz Asetat

c. Jel Elektroforez

d. Nişasta Jel Elektroforezi

e. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

f. SDS-PAGE

g. Agar ve agaroz.

h. Disk Elektroforez

ı. İzoelektrik Odaklama (IEF)

i. İki Boyutlu Elektroforez

k.Kapiller Elektroforez

SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Denatüre Edici Elektroforez:

En yaygın kullanım alanı olan elektroforez tipidir. Proteinlerin doğal yapılarını bozucu ajanlar kullanmadan yapılan PAGE daha çok çözünebilen proteinlerin enzimatik ve biyolojik özelliklerini de koruyarak incelenmesi için kullanılır. Saflık derecesinin tayini için kullanıldığı gibi, doğrudan saflaştırma işlemi olarak da kullanılabilir. Ayrıca saflaştırma sürecinin gelişimini göstermek ve ilgilenilen proteini içeren fraksiyonları belirlemek için de kullanılır.

Jel sentetik bir madde olan akrilamid ile akrilamid türevi olan N-N'-metilen bis-akrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulur ve örnekler bu jel üzerinde yürütülür. Polimerleşme reaksiyonunda akrilamid molekülleri yan yana bağlanarak düz zincirler oluştururlar. Bisakrilamid molekülleri ise iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluşturur. Böylece ağımsı bir yapı meydana gelir. Polimerleşme derecesi sıcaklık, pH, amonyum persülfat (APS) ve N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) miktarına göre farklılık gösterir. Polimerleşme için serbest radikal oluşumuna sebep olan APS reaksiyon başlatıcı, TEMED ise katalizör olarak rol oynar. PAGE proteinler için çok uygun olduğu gibi DNA ve RNA elektroforezleri için de kullanılabilir. Akrilamid miktarı ve

akrilamid/bisakrilamid oranı jelin ayrıştırma kapasitesini belirler. Akrilamid/bisakrilamid oranı yükseldikçe elektroforez sırasında jellerde ısı yükselir, kırılganlık artar ve daha kolay yıkanır. Şeffaf, hazırlaması basit ve mekanik gücü daha fazladır. Boyutları ayarlanabilen gözenekli yapıları nedeniyle proteinleri molekül ağırlıkları veya kütleleri ile orantılı olarak moleküllerin göçünü yavaşlatan bir "moleküler elek" olarak davranır. Bu nedenle ayrım hem moleküler eleme hem de elektroforetik mobilite temeline dayanmaktadır. Düşük derişimde hazırlanan jellerin gözenekleri daha büyük olup, daha büyük molekül ağırlıklı biyomoleküllerin ayrımlanmasında kullanılır. PAGE sisteminde uygulanan (proteinler için) jel yüzdesi ve molekül ağırlığına göre ayrılma kapasitesi sınırları %5'lik jel için 60-212 kDa, %10'luk jel için 18-75 kDa ve %15'lik jel için 15-45 kDa arasındadır.

Poliakrilamid jel iki cam levha arasına dökülür, polimerleşme tamamlandıktan sonra cam levhalar tanka yerleştirilir ve elektroforez tamponu tanka boşaltılır. Protein çözeltisi jele üzerindeki kuyucuklara 15-20µL olacak şekilde uygulanır. Jel başına 20-25 mA sabit akım verilerek elektroforez başlatılır. Elektroforez tamamlandığında jeller cam levhalardan çıkartılır. Eğer jelde enzim aktivitesi görüntülenecekse örnek ya iki jelde koşturulur veya bir jel üzerinde iki ayrı kuyucukta koşturularak iki eşit parçaya bölünür. Jellerden biri aktif enzim bandının görüntülenmesinde, diğeri ise protein bantlarının boyanmasında kullanılır. Aktif enzim bandının görüntülenmesi için jel uygun bir tamponda yıkandıktan sonra, enzime özgü substrat çözeltisinde belirli bir süre inkübasyona bırakılır. Daha sonra jel substrat çözeltisinden çıkarılarak distile su ile birkaç kez yıkanır ve oluşan ürüne özgü renk veren bir boya ile muamele edilir. Enzimin jel üzerinde bulunduğu bant boyamadan sonra belirgin bir şekilde görülür. Bu işleme ise zimografi denir. Elektroforez sonrasında proteinler, jele bağlanmayan fakat proteinlere bağlanan, Coomasie mavisi gibi bir boyayla görüntülenir. Ayrıca Coomiasie mavisi ile boyamaya göre 100 kat daha hassas olan, gümüş boyamada kullanılabilir. Jellerin boyanmasından sonra, boya çözeltisinden alınan jeller uygun boya giderici çözeltiler ile yıkanarak bantların açığa çıkması sağlanır.

Saflaştırma işleminin her adımında alınan protein çözeltileri PAGE uygulandığında, saflaştırma sürecinin gelişimi izlenir ve saflaştırmanın ne derece

doğru yapıldığı da kontrol edilir. Çünkü her saflaştırma adımında boyanan protein bandının sayısı azalacaktır. Ayrıca, proteinlerin boyanması ile oluşan bant veya bantlar ile zimografi sonucunda elde edilen aktif enzim bandı karşılaştırılarak ilgilenilen protein bandı saptanır.

SDS-PAGE yöntemi proteinlerin saflığının kontrolü ve molekül ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılmaktadır. Aynı zamanda SDS-PAGE proteinin birden fazla alt birime sahip olup olmadığını saptamada önemlidir. SDS-PAGE, PAGE den farklı olarak protein karışımına tiyol ayracı olan merkaptoetanol ve SDS ilave edilerek 100°C'de ısıtılarak denatüre edilir. Merkaptoetanol, proteindeki disülfüt bağlarını koparır. Denatüre edici bir deterjan olan SDS proteine bağlanır (bir molekül SDS yaklaşık iki amino asit kalıntısı bağlar) ve proteini net negatif yük ile kaplar, bu durumda proteinin kendi yükü ihmal edilir. Proteinin doğal konformasyonu değişir, proteinler eşit yük yoğunluğuna sahip olurlar ve poliakrilamid jel içerisinde sadece molekül ağırlığına göre ayrılırlar. Buna göre büyük moleküller jel matriksinde tutulurken küçükler daha hızlı göç eder. Molekül ağırlığı bilinen protein standartları, ilgili protein örnekleriyle birlikte yürütülerek saflaştırılmış proteinin veya enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak hesaplanır. Protein standartlarının Rf değerleri ile molekül ağırlığı molekül ağırlıklarının logaritması alınarak grafiği çizilir. Elde edilen grafikten Rf değeri bilinen ilgili proteinin molekül ağırlığı hesaplanır (Turner, P.C. et.al. 2004; Yıldırım A. et.al. 2006).

1.2. Araştırma organizması *Gammarus pulex*

1.2.1. *Gammarus pulex* sistematiği

Crustacea (Kabuklular) büyük çoğunluğu su içerisinde, küçük bir kısmı da sucul ortamlara bağımlı olarak yaşarlar. Özellikle küçük kabuklular, su içerisindeki yaşamın, besin zinciri bakımından çok önemli bir halkasını oluşturmaları nedeniyle oldukça önemlidirler. Kabuklular, eklembacaklıların birincil olarak suda yaşayan tek sınıfıdır. Karasal yada yarı karasal yaşayanlar bu uyum için çok büyük bir yapısal değişiklik göstermezler. Kabuklular iki büyük

gruba ayrılırlar: Entomostraca daha çok küçük kabukluları, Malacostraca ise daha büyük kabukluları kapsamaktadır (Demirsoy, A., 1998).

Gammaridae familyası, Amphipoda ordosu içinde yaşayan en ilkel üyeleri de içine alan büyük bir grubu temsil etmektedir (Barnard, J.L. ve ark. 1983). Tatlı su birikintilerinde, derelerde, su bitkileri üzerinde veya taşların altında yaşayan *Gammarus* türleri, Malacostraca alt sınıfının Amphipoda ordosunun, Gammaridae familyasının, Crustacea sınıfındandır (Demirsoy, A., 1998). Bu grup dünya genelinde 210'dan fazla cins ve 1350'den fazla türle temsil edilir ve bu türler genellikle tatlısularda dağılım göstermektedirler (Barnard, J.L. ve ark. 1983).

Amphipoda'ya ait cinsler göz önünde tutulduğunda, *Gammarus* cinsi yüzey sularında (yer altı suları hariç) yasayan en fazla tür sayısına sahip cins olarak dikkati çekmektedir (Karaman, G.S. ve ark. 1977). Ülkemizde bugüne kadar Gammaridae familyasına ait 7 cins altında 48 takson tespit edilmiştir. Ülkemizde bulunan *Gammarus* türlerinden birkaçı şunlardır; *Gammarus abscicus, G. accolae, G. angarius, G. anatoliensis, G. argaeus, G. dorsosetosus, G. effultus, G. inopinatus, G. longipedis, G. mladeni, G. obnixus, G. odetta, G. osellai, G. pageti, G. pavo, G. pseudanatoliensis, G. ustaoglui, G. vignai* (Özbek, M. ve ark. 2006).

Gammarus cinsi, Kuzey yarımkürede Avrupa ve Kuzey Afrika'da fazla sayıda taksa ile geniş bir alana yayılmış durumdadır. Bu da taksonomik problemlere neden olmaktadır. Şimdiye kadarki morfolojik gözlemler, Karaman ve Pinkster'in yaptığı sınıflandırılmış türlerin taksonomik konumlarını açıklamak için kullanılan başlıca anahtarlardır. Taksonomik durumlarının tam ve doğru olarak ortaya konulabilmesi için dikkatli bir morfolojik inceleme ve belirli sayıda karakterlerin belirlenmesi gerekmektedir. *Gammarus* cinsi üyelerinde türler arasında morfolojik farklar çok çarpıcı ve ayırt edici bir biçimde görülmediğinden, *Gammarus* türlerinin taksonomisi için yalnızca morfolojik karakterlerin kullanımı yeterli olmayabilir. Uygulanacak bazı moleküler tekniklerle bu gibi sorunlar önlenebilir (Karaman, G.S. ve ark. 1977a,1977b,1977c)

1.2.2. *Gammarus pulex*'in biyolojik yapısı

Amphipodların üremelerinin genel olayları çeşitli araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır. Ergin erkek, oviposit döneminden bir süre önce dişiyi tutar ve çift precopula evresinde bu şekilde bu evrede kalırlar. Kopulasyon kendine özgü bir şekilde birkaç kez gerçekleşir. Erkek dişiyi çevirir ve spermlerini onun ventral yüzeyine yerleştirir. Daha sonra dişi erkekten ayrılır, 4 parça osteogitesten yapılmış olan kuluçka kesesine kütikil yumurtaları sertleştirmeden önce yerleştirir. İlk başta yavaşça çözünme özelliğine sahip jelatin bir kese ile çevrilidir ve bu sırada fertilizasyon gerçekleşir. Birkaç gün sonra yavrular yumurtadan çıkar ve yavrular 1 yada 2 gün sonra annelerinin kesesinden ayrılırlar (Hynes, H.B.N. 1955). Gelişme kuluçka boşluğu içerisinde gerçekleşmektedir. Senede bir defa döl meydana getirme eğilimi vardır. Tatlı sularda yaşayan türler her defasında 15-50, denizde yaşayan türler ise 2-750 yumurta bırakırlar. Gelişme doğrudan doğruyadır. Yumurtalardan çıkan yavrular ana hatları ve üye sayısı bakımından ergin hayvanlara benzerler. Yalnız anten parçalarının sayısı ve üyelerin şekilleri erginlerde farklıdır (Demirsoy, A., 1998). Diğer tatlı su omurgasızlarından farklı olarak larval safhaları yoktur fakat yumurtalardan tamamen gelişmiş olarak çıkarlar. Bunlar ayrıca hem olgundur ve de yılda 2 jenerasyona kadar çok hızlı ürerler (Pollock, S., 2005).

*Gammarus*lar genellikle alglerin ve sucul bitkilerin bulunduğu nehirlerde, kayaların üstünde ya da akarsu yataklarında bulunur. Taşların ve yosunların serbest, dağınık olduğu yerlerde rastlanabilir. Nehirlerde gömülü taşların altında taş ve bitkilerin gövde ve kökleri arasında bulunmalarına rağmen bitklerin üst kısımlarına beslenmek için yönelirler. Zamanlarının çoğunu sığınak olarak kullandıkları kayalarda ve bitkilerde geçirirler, yeni yiyecek kaynaklarına ulaşmak için akıntıya karşı yüzmek zorundadırlar. Bacaklarını hareket ettirerek taze, oksijen yönünden zengin olan suyu solungaçlarına doğru sirküle ederler. Tüm amphipodlarda olduğu gibi *Gammaruslar* da kandaki oksijeni, bakır içeren solunum pigmenti olan hemosiyanin ile taşırlar (Pollock, S., 2005).

Ergin bir *Gammarus pulex* yaklaşık 11mm uzunluğunda (erkeklerde 20 mm'ye kadar ulaşabilir), kıvrık ve kahverengi-sarı bir vücuda sahiptir (Pollock,

S., 2005). Vücutları yanlardan basılmıştır. Genel görünüşleriyla tıknaz yapılıdırlar; daha çok tesbih böceklerine benzerler (onlardan en önemli farkları yanlardan basık olmaları, kalplerinin ve solıngaçlarının abdomende değil göğüste olmasıdır); çoğu saydamdır, bazıları gri, kahverengi, krımızı, yeşil ya da mavimsi yeşil renkli olabilir; bunun yanı sıra birkaç planktonik türü tamamen saydamdır. Baş, göğsün ilk 1. ya da 2. (Caprellidae'de) segmenti ile kaynaşmıştır. Sefalotoraksın arkasında, eklemli olarak birbirine bağlanmış 7 ya da 5 segment bulunmaktadır. Karapaks yoktur. Abdomen, göğüsten belirli bir şekil ve büyüklük bakımından ayrılmaz. Abdomende, üyelerinin yapısı ile ilgili olarak, her biri 3 segmentten oluşmuş iki kısım (metasom, urosom) ayırt edilebilir. Telson her zaman son segmentten ayrılmaktadır (Demirsoy, A., 1998).

Baş kısmında predatörleri ve bütün çevreyi daha iyi görmelerini sağlayan bileşik gözleri vardır, yemek bulmak için tatma ve dokunma duyu organlarını içeren kamçı şeklinde iyi gelişmiş antenleri vardır. (1. ve 2. çift) Toraksta 7 çift eklemli bacak bulunur. 2 çift tutmak için pençe şeklinde gnathopodları vardır, 5 çift ise sürünmek ve yüzmek içindir. Toraksta ayrıca solungaçta bulunur. Karapaks olarak bilinen toraksı ve başı kaplayan sert bir dış iskeletleri (exoskeleton) vardır. Abdomende 3 çift yüzme ve su sirkülasyonunu sağlayan pleopod olarak bilinen uzantıları bulunur iken üç çiftte yüzmek için üropodları vardır. Abdomenini kaplayan dış iskelet hareketi kısıtlamamak için esnektir (Pollock, S., 2005).

1.2.3. *Gammarus pulex*'in önemi

Gammarus pulex kireçli sularda bulunan yaygın bir organizmadır. Daha çok akarsuları tercih ederler fakat ayrıca göl ve göletlerde de suyun kenarlarında bulunurlar. Kirlenmiş ve oksijeni azalmış sulara karşı toleransları yoktur. Bu yüzden suyun kalitesini belirlemede indikatör türler olarak kullanılırlar (Pollock, S., 2005). Yüzerek hareket ederler. Çoğu acı yada tatlı sularda yaşarlar. *Gammarus* türlerinin bir kısmı denizde, bir kısmı tatlı sularda yaşamaktadır (Yeşilmen, T.Ö. ve ark. 1996).

Ölü bitki ve hayvan materyalleri ve biyofilmlerle beslenen detritivatörlerdir (Pollock, S., 2005). Antenleriyle detritusu karıştırır ve besin maddelerini maksillipet ya da diğer ağız üyelerinin kılları ile süzerler (Demirsoy, A., 1998). *Gammarus*lar kısmen ayrışmış, çürümüş ve biyofilmle kaplı yaprakları tercih ederler. En çok enerjiyi aşınmış materyallerden çok ölü yaprakları kaplayan mikrobiyal biomasstan elde ettikleri bundan yola çıkılarak bulunmuştur. Buna rağmen en çok ilgiyi öğütücü olmaları görmektedir. *Gammarus*lar ayrıca küçük organizmaları ve birbirlerini yerler ayrıca kireçli sularda koprofaji ile beslenenleri de görülmüştür ki bu tarz habitatlarda organik materyallerin geri dönüşümü için çok önemli bir yol oluşturmaktadır (Pollock, S., 2005).

*Gammarus*ların ayrıca ekonomik açıdan da önemleri vardır, kaplumbağalar ve amphibiler için komple bir yemdir. *Gammarus* kalsiyum açısından zengin bir doğal içerik olduğundan, özellikle kaplumbağaların kabuklarının sağlıklı kalmasını destekler ve yumuşamasını engeller. Bütün kurutulmuş karidesten oluşan bu yem içeriğindeki protein, yağ, lif ve nemli yapısı ile oldukça besleyicidir (Anonim 2010).

Tatlı su Amphipodları akut toksisite testlerinde, toksik maddeler için en duyarlı organizma olarak tanımlanmıştır. Bu grup, kimyasal kirlilikten ve ağır metal birikiminden en fazla etkilenen grup olarak tespit edilmiştir. Amphipodların çevresel stres faktörlerine ve toksikantlara verdikleri cevapları hakkında yapılan çalışmalar da yeterli değildir (Arthur, J.W. 1980; Malıns, D.C. 1991).

Gammarus üyeleri, sulara karışan çevresel kirleticilere karşı balıklardan daha duyarlı organizmalardır. Çeşitli kirleticilere olan hassasiyetlerinden, çabuk üretilebilmelerinden, çok sayıda toplanabilmelerinden dolayı bu cinsin toksikolojik çalışmalardaki kullanımı giderek artmaktadır (Arthur, J.W. 1980; Graney, L.R. 1986).

1.3. Amaç

Bu çalışmanın amacı, kirlenmiş ve oksijeni azalmış sulara karşı toleransları olmayan, bu yüzden suyun kalitesini belirlemede indikatör türler olarak kullanılabilen *Gammarus pulex*'in DNA ve protein analizlerini ortaya koymaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışma organizması: *Gammarus pulex*

Çalışmada, *Gammarus pulex* türü kullanılmıştır. Kullanılan *Gammarus pulex*'ler Eskişehir Porsuk çayından toplanmıştır.

2.1.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar

- **Etidyum bromür:** 10 mg/ml stok solüsyonu hazırlandı.(SİGMA Katalog no: E 8751)
- **Tris :** MERCK Katalog no: 1.08387
- **Tris HCL:** SİGMA Katalog no:05432
- **EDTA:** FLUKA Katalog no: 03620
- **İzopropanol:** Riedel de haen Katalog no: 24137
- **NaOAc (Sodyum orta asetat):**
- **TE:** Tris ve EDTA
- **Etanol** (Riedel de haen Katalog no:071029): Farklı konsantrasyonlarda etanoller kullanıldı (% 70, % 75, % 90 ve % 100).
- **DNaz**: PROMEGA Katalog no:M610A RQI 1U/µL
- **Fenol-Kloroform-İzoamilalkol:** SİGMA
- **Kloroform:** Sigma, Katalog no:C2432
- **RNaz:** SİGMA Katalog no: 103K7660
- **10X TBE:** 108 gr trizma base (Sigma katalog no: 114K5415) ve borik asit (Fluka) 600 ml H_2O da iyice çözülür. Daha sonra üzerine 40 ml 0.5M EDTA (FLUKA Katalog no: 03620) eklenir. Toplam hacim 1 lt' ye tamamlanır.

2.1.3 Çalışmada kullanılan cihazlar

- **Etüv**: GENHART firmasına ait THERMO SHAKER THO 220 etüvü kullanıldı.
- **Santrifüj**: THERMO IC santrifüj, BECKMAN COULTER firmasına ait microfuge 22R türü soğutmalı santrifüj ve BECKMAN COULTER Avanti J 30I kullanıldı.
- **Otoklav**: Eastern Medical firmasına ait Vertical Autoclave tip otoklav kullanıldı.
- **PZR Aleti**: BİORAD firmasına ait iCycler thermal model PZR aleti kullanıldı.
- **Agaroz Jel Elektroforezi:** Thermo EC25090
- **UV Jel Görüntüleme:** Uvitec M02 4611
- **pH Metre:** Orion
- **Vortex:** IKA MS2
- **Su banyosu:** Memmmert D-91126
- **Isı bloğu:** Thermoblock Clifton B11
- **Nanodrop spektofotometre:** Metek ND-100
- **Spektofotometre**: UV-2101 PC Shimadzu
- **Terazi**: Ohaus pro AV812

2.1.4 Çalışmada kullanılan kitler

- Wizard**(R)** Genomic DNA **Purification Kit Technical Manual TM050**

2.1.5 Çalışmada kullanılan DNA polimeraz setleri

Fermantas Taq polimeraz seti (5u/µl)

2.2 Yöntemler

2.2.1 *Gammarus pulex*'ten genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu protokolü:

1) *Gammarus pulex*'ler homojenizatör ile parçalanmıştır. .
2) Parçalanmış örnekler 10 mM Tris-HCl (pH:7.5) ile yıkanmıştır.
3) Yıkanmış örnekler 7000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
4) 0.5 ml süpernat tüpte bırakılarak geri kalan süpernatant uzaklaştırılmıştır.
5) Pelet kalan sıvı içerisinde yavaş bir biçimde çalkalanarak homojenize edilmiştir.
6) Hücre süspansiyonuna kendi hacmi kadar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve yavaşça ters-düz edilmiştir.
7) 15 dk. 3500 rpm'de santrifüj edilmiştir.
8) Üstteki sıvı tabaka pastör pipetiyle (veya ağzı jiletle kesilen 1000 µl'lik mikropipetle) alınmış ve yeni bir tüpe aktarılmıştır.
9) Aktarılan sıvı miktarı kadar tekrar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve yavaşça ters-düz edilmiştir (ikinci phenol:chloroform saflaştırması).
10) 15 dk. 3500 rpm'de santrifüj edilmiştir.
11) Üstteki sıvı tabaka pastör pipetiyle alınmış ve yeni bir tüpe aktarılmıştır.
12) Aktarılan sıvı miktarı kadar tekrar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve yavaşça çalkalanmıştır (üçüncü fenol:kloroform saflaştırması).
13) 15 dk. 3500 rpm'de santrifüj edilmiştir.
14) Üstteki sıvı tabaka pastör pipetiyle alınmış ve yeni bir tüpe aktarılmıştır.
15) Eşit hacimde izopropil alkol ilave edilmiştir.
16) 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.

17) Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet kurumaya bırakılmıştır.

18) Kurutulduktan sonra pelet 100 µl TE ile çözülmüştür.

19) Elde edilen genomik DNA; sırasıyla spektrofotometrik ölçüm ve % 0.8'lik agaroz jeldeki görüntüsüne göre; kalitesi, RNA kontaminasyonu ve bütünlüğü açısından kontrol edilmiştir.

Kit Genomik DNA İzolasyon protokolü:

1) Hücreler alınır ve 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılır. Yapışan hücreler var ise bu işlemden önce tripsin eklenir.

2) 13.000-16.000 x g hızında 10 saniye boyunca hücreleri çöktürmek için santrifüjlenir.

3) Süpernatant kısmı uzaklaştırılır, 10-50µl kadar kalan sıvı çökelti (pelet) tüpte bırakılır.

4) Hücreleri yıkamak için 200 µl PBS eklenir ve b.'deki gibi santrifüjlenir ve PBS ayrılır. Hücreleri yeniden süspansiyon haline gelmesi için vortekslenir.

5) 600µl Nüclei Lysis Solüsyonu eklenir ve pipetle hücreler iyice parçalanır.

6) Oda sıcaklığındaki örneğe 200µl Protein Precipitation solüsyonu eklenir ve çok hızlı bir şekilde 20 saniye vortekslenir. Buzda 5 dakika bekletilerek örnek soğutulur.

7) 13.000-16.000 xg'de 4 dakika santrifüjlenir. Çöken protein yoğun beyaz bir pelet oluşturacaktır.

8) DNA'yı içeren süpernatant dikkatlice ayrılır (protein pelet kalacak) ve temiz 1,5 ml'lik içinde oda ısısında 600µl isopropanol bulunan mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.

9) Solüsyonu dikkatli bir şekilde beyaz bir DNA kütlesi görünene kadar altüst ederek yavaşça karıştırılır.

10) Oda sıcaklığında 13.000-16.000 x g'de 1 dakika santrifüjlenir. DNA küçük beyaz bir pelet olarak gözükecektir. Süpernatant dikkatlice ayrılır.

11) Oda sıcaklığında 600µl %70'lik ethanol eklenir ve dikkatlice tüp birkaç kez DNA'yı yıkamak için karıştırılır. Oda ısısında 13.000-16.000g'de 1 dakika santrifüjlenir.

12) Dikkatli bir şekilde ethanol aspire edilir, buharlaştırılır. Bu noktada DNA peleti çok seyrek olacağından peletin buharlaşmamasına dikkat edilmelidir.

13) Tüpü temiz emici bir kağıdın üstüne ters çevirerek koy ve peleti kuruması için 10-15 dakika beklet.

14) 100µl DNA Rehidrasyon Solüsyonu eklenir ve DNA'yı 65°C'de 1 saat inkübe ederek DNA dehidre edilir. Periyodik olarak tüpe yavaşça vurularak solüsyon karıştırılır. Alternatif olarak oda sıcaklığında yada 4°C de solüsyonu 1 gece inkübe ederek DNA rehidre edilir.

15) DNA'yı 2-8°C'de sakla.

2.2.2 DNA'ların spektrofotometre'de ölçümü

DNA örneklerinin nanodrop'ta 260 ve 280 nm (nanometre) dalga boylarında ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümlerde DNA örneklerinin peletleri hangi tampon ile çözülmüş ise o tampon kör olarak kullanılmıştır. Spektrofotometrede okunan değerler ile aşağıdaki formüller kullanılarak DNA miktarı saptanmıştır.

DNA miktarı= OD_{260} x dilüsyon katsayısı x 50 µl/ml

2.2.3 PZR Reaksiyonu

PZR reaksiyonunda kaynak DNA olarak *Gammarus pulex* genomik DNA'sı kullanılmıştır. PZR reaksiyonu evrensel primerlerle kurulmuştur; 2.5 µl 10X tampon, 2.5 µl 25 mM $MgCl_2$, 2 µl 2.5 µM dNTP karışımı, 2.5 µl F, 2.5 µl R, 0.5 µl genomik DNA (1.220 ng/µl) , 0.2 µl Taq DNA Polimeraz enzimi (5u/µl) üzerine son hacmi 25 µl olacak biçimde 12.3µl dH_2O eklenmiştir.

Ürün için kullanılan PZR programı: 94ºC'de 2 dk., 94ºC'de 1 dk., 67ºC'de 1 dk., 72ºC'de 1 dk., 72ºC'de 4 dk. ve 4ºC'de ∞ olacak şekilde kullanılmıştır.

2.2.4 Agaroz jel analizi ve jel görüntüleme işlemi

Agaroz jelde yürütülen DNA parçaları UVP transillimunator cihazında kontrol edilmiş ve UV-Photometer jel dökümantasyon cihazı (UviTec) ile veriler kaydedilmiştir.

2.2.5 *Gammarus pulex*'e ait proteinlerin izolasyonu ve SDS-Page ile analizi

Protein izolasyonu:

- *Gammarus pulex'*ler homojenizatörde parçalanmıştır.
- Hücreler 6,000 rpm'de 15 dk. peletlenmiş ve 1 ml TES (100mM TrisHCL (pH: 7.5), 100mM EDTA ve 100mM NaCl ile 50 ml hazırlanmıştır) tamponu eklenerek yıkanmışlardır.
- Hücreler yıkamadan sonra 6,000 rpm'de 15 dk. yeniden peletlenmiş ve 180 µl TES ile çözülmüştür.
- Üzerlerine 10 mg/ml lizozim (0.02 gr lizozim ve 50 mM TrisHCL (pH:8) ile çözülüp, dH_2O ile 2 ml tamamlanır)'den 2 µl ve 10 µl deterjan kokteyli (150 µl Tween 20 ile 150 µl TritonX100 Not: Burada kullanılacak deterjanlar non-iyonik olmalıdır) eklenmiş ve 20 dk. buzda inkübe edilmiştir.
- Süre sonunda 50 µl 50 mM TrisHCL (pH:8) , 0.8 µl Endonükleaz (Sigma kat.no:E-1014) ve 1.5 µl 1 M $MgCl_2$ eklenmiş ve 20 dk. oda ısısında bekletilmiştir.
- Süre sonunda kaışım -86˚C'de 20-25 dk bekletilerek, tekrar oda ısısına alınmış ve çözünmüştür. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.
- Karışım 14,000 rpm'de 15 dk. (+4˚C) santrüfüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir tüpe alınarak protein izolasyon işlemi tamamlanmıştır.

SDS Page:

Bio-RAD firmasına ait jel sistemi kullanılmıştır. Burada iki farklı tampon kullanılmıştır. Bunlar ;

- Koşturma tamponu (Running buffer): 3.3 ml %30 Bis-akrilamid, 2.5 ml 1.5 M Tris HCl (pH:6,8), 0.1 ml %10 SDS, 4.1 ml dH_2O, 5 µl TEMED ve 50 µl amonyom persülfat ile hazırlanmıştır (%10 olacak şekilde hazırlanmıştır).
- Ayırma tamponu (Stacking buffer): 1.7 ml %30 Bis-akrilamid, 2.5 ml 0.5 M Tris HCl (pH:6,8), 0.1 ml %10 SDS, 5.7 ml dH_2O, 10 µl TEMED ve 50 µl amonyom persülfat ile hazırlanmıştır (%10 olacak şekilde hazırlanmıştır).

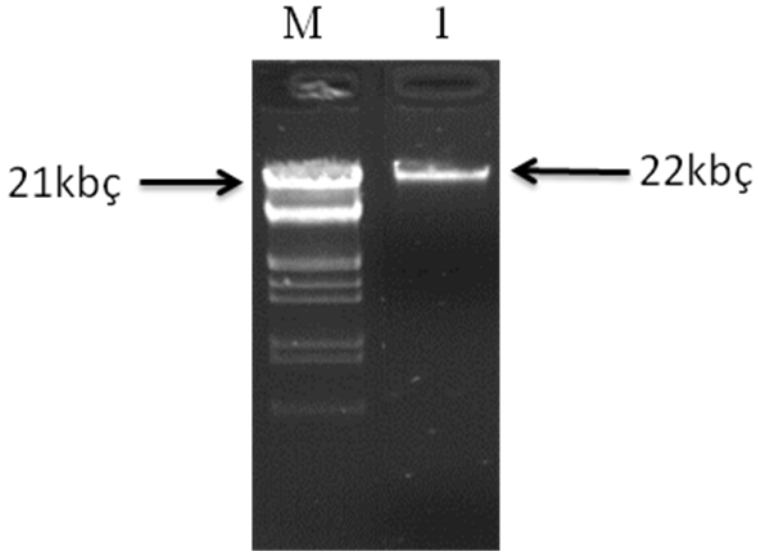
Tamponlar kullanılarak hazırlanmış olan jele örneklerden µl10 yüklenmiş ve 80 V'da 2 saat yürütülmüştür.

3. BULGULAR

Gammarus cinsi üyelerinde türler arasında morfolojik farklar çok çarpıcı ve ayırt edici bir biçimde görülmediğinden, *Gammarus* türlerinin taksonomisi için yalnızca morfolojik karakterlerin kullanımı yeterli olmayabilir. Uygulanacak bazı moleküler tekniklerle bu gibi sorunlar önlenebilir. Aşağıda bu tez çalışması esnasında kullanılan moleküler teknikler sonucu elde edilen bulguların tanımlaması yapılmıştır.

3.1 *Gammarus pulex*'ten genomik DNA izolasyonu

Gammarus pulex'ten genomik DNA izolasyonu deneyleri bölüm 2.2.1'de belirtilen protokollerde değişiklik yapılmadan uygulanmıştır. Buna göre elde edilen deney sonuçları Şekil 3.1'de belirtilmiştir.



Şekil 3.1. *Gammarus pulex* genomik DNA'sının agaroz jelden görüntüsü. **M**) λDNA EcoRI/Hind III Marker, **1)** *Gammarus pulex* genomik DNA'sının agaroz jelden görüntüsü (% 0.8' lik agaroz jel'e 3µl λDNA EcoRI/Hind III marker ile birlikte yüklenmiş ve 90 V 45dk. yürütülmüştür).

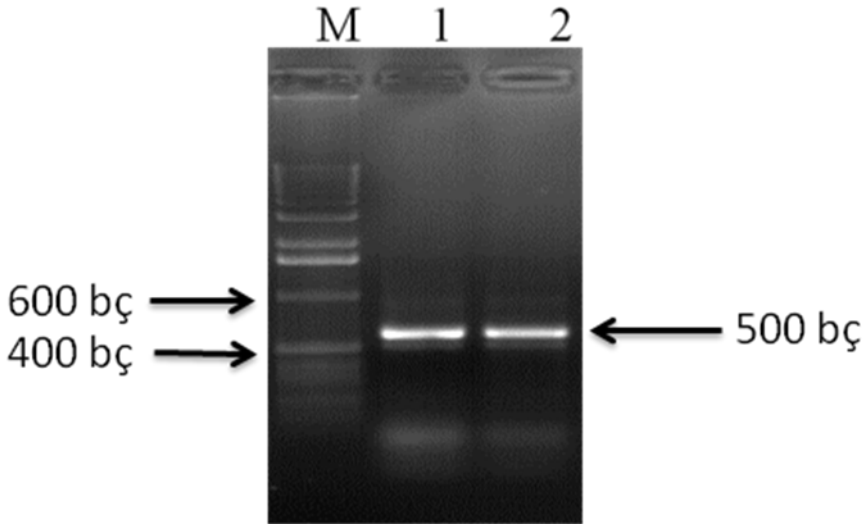
3.2 DNA'ların spektrofotometrede ölçümü

İzolasyonu yapılan DNA'ların kalite ve saflığını belirlemek için spektorofotometrik analizi yapılmıştır. Bu sonuçlar içinde elde edilen genomik

DNA izolasyon ürününün spektrofotometrik ölçümleri yapıldığında örneğin 213 ng/µl yoğunlukta DNA içerdiği belirlenmiştir (Şekil 3.1).

3.3 DNA'nın kullanılabilirliğinin PZR reaksiyonu ile belirlenmesi

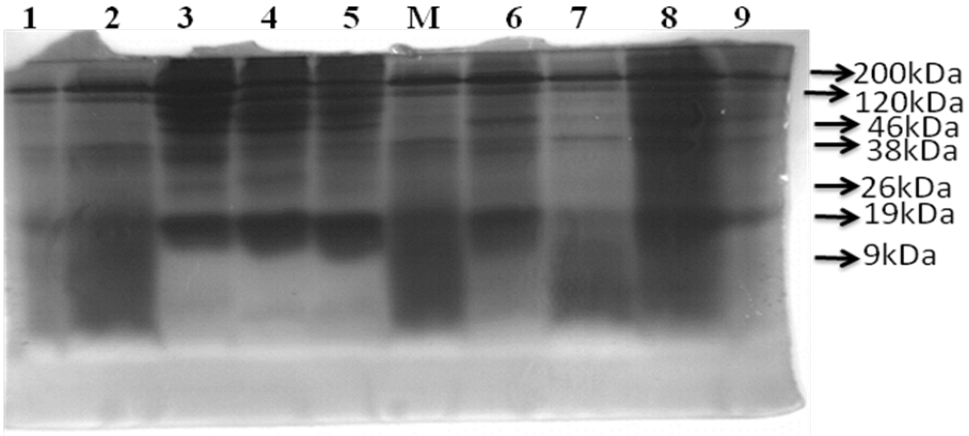
Gammarus pulex'ten genomik DNA'larının verimliliği ve kullanılabilirliğinin belirlenmesi için evrensel primerler kullanılarak PZR reaksiyonu kurulmuş ve reaksiyon ürünü agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.2). Beklenen büyüklük olan 500 bç'lik ürün elde edilmiştir.



Şekil 3.2. *Gammarus pulex* genomik DNA'sı kullanılarak kurulan PCR reaksiyonunun agaroz jelden görüntüsü. **M**) 50bp Marker, **1ve 2)** *Gammarus pulex* genomik DNA'sından ITS1-ITS4 bölgesini agaroz jelden görüntüsü (% 0.8' lik agaroz jel'e 3µl λDNA EcoRI/Hind III marker ile birlikte yüklenmiş ve 90 V 45dk. yürütülmüştür).

3.4 *Gammarus pulex*'e ait proteinlerin izolasyonu ve SDS-Page ile analizi

*Gammarus pulex'*ten protein izolasyonu deneyleri bölüm 2.2.5'de belirtilen protokollerde değişiklik yapılmadan uygulanmıştır. Buna göre elde edilen deney sonuçları Şekil 3.3'de belirtilmiştir.



Şekil 3.3. *Gammarus pulex* protein izolasyonlarının SDS-Page görüntüsü. **M**) Broad Range Marker, **1-9)** *Gammarus pulex* proteinlerin SDS-Page görüntüsü (% 10 SDS-Page 10µl Broad Range Marker ile birlikte yüklenmiş ve 80 V 90dk. yürütülmüştür).

Protein izolasyonu sonucu, 9 farklı *Gammarus pulex*'in hepsinde 200 kDa büyüklüğünde bantlar görülmüş ve bu bantların Miyosin proteinine denk geldiği görülmüştür. Aynı şekilde sırasıyla; 120, 46, 38 ve 19 kDa büyüklük , bu büyüklüklerin denk geldiği proteinler β-Galaktosidase, Ovalbumin, Karbonik anhidraz ve Lizozim olarak belirlenmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

*Gammarus*lar doğa ekonomisi açısından, özellikle detritus ve çürümekte olan bitkisel artıklardan hayvansal proteine geçişte rol oynadıkları gibi ekolojik problemlerle ilgili deneysel çalışmalarda da obje olarak kullanılmaktadır (Yeşilmen, T.Ö. ve ark. 1996). *Gammarus'ta* yapılacak çalışmaların temel bilimlere ve özellikle gelişmekte olan biyoteknoloji, biyoinformatik ve genetik mühendisliği gibi bilim dallarına destek olabileceğini düşündürmektedir. Moleküler çalışmalara destek olabileceği düşünülen DNA ve proteinlerin analizi bu çalışmanın hedeflerini oluşturmaktadır.

Bu amaçlarla izole edilen DNA'ların (Şekil 3.1)'de moleküler araştırmalarda kolaylıkla kullanılabileceği, yapılan literatür taramalarında belirlenmiştir. Literatürler incelendiğinde Zhonge Hou ve ark., mitokondrial ve nükleer DNA dizilerini kullanarak, *Gammarus* örneklerinde çalışmalar yapmışlardır. *Gammarus fabricius'*un mitokondriyal COI geni ve 16S, ayrıca 18S ve 28S genleri DNA dizi verileri kullanılarak filogenisini elde etmişlerdir. Hipotezleri *Gammarus* cinsinin monofilini , Avrupa-Kuzey Amerika *Gammarus* cinsinin parafili ve Asya *Gammarusl*arının monofili olduğunu desteklemektedir (Zhonge, H et.al. 2007). Filipe O. Costa ve ark., RAPD DNA parmakizi yöntemini kullanarak çoğaltılan DNA bantlarıyla *Gammarus* türlerinin tespit edilebileceğini göstermişlerdir. 10 farklı RAPD primer kullanılarak *G. chevreuxi*, *G. İnsensibilis* ve *G. Locusta* türlerinin profilleri ortaya konulmuştur (Costa, F. O et.al. 2003). Ayla Düzen'in 2002 yılında yaptığı çalışmada RAPD-PCR tekniği ile *Gammarus* türlerinin filogenetik ilişkisini belirlenmiştir. Bu çalışmada bazı türlerin hem sistematik hem de genetik çalışmaları için bazı moleküler markırlar geliştirilmiştir. Bunlar izozim, restriksiyon uzunluk poliformizmi (RFLP) ve rastgele çoğaltılmış polimeraz DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) dur. RAPD-PCR ekonomik olması ve genomik bilgiye ihtiyaç duyulmaması nedeniyle genetik polimorfizmin belirlenmesi için tercih edilmiştir. Bu çalışmada Eskişehir, Porsuk Çayı'nın Regülatör ve Kanlıkavak istasyonlarından *Gammarus pulex* örnekleri toplanmış, bu örneklerin DNA'larının 19 primerle amplifikasyonu denenmiştir. Denenen primerlerden 3 tanesinin verdiği amplifikasyon sonuçlarına

göre; *Gammarus pulex*'de tür içi polimorfizm olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma RAPD-PCR tekniğinin tür içi varyasyonların belirlenmesinde faydalı olabileceğini göstermiştir (Düzen, A. 2002).

Bu çalışmada elde edilen belirlenen proteinlerinde moleküler çalışmalar için ön hazırlık olabileceği literatürce desteklenmiştir. 2002 yılında Mehmet Erdem tarafından çeşitli çevresel kirleticilerin *Gammarus pulex*'deki Se-bağımlı ve Se-bağımsız Glutatyon proksidaz enzim aktivitelerine olan etkileri ve enzimin bazı kimyasal özellikleri araştırılmıştır. Glutatyon peroksidaz (EC1.l1.l.9) redükte glutatyon'un okside glutayon'a hidrojen peroksit etkisi altında oksidasyonunu katalizIer. Selenyum bağımlılığı açısından Glutatyon peroksidaz iki forma ayrılır: Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz ve Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz. Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz hem sitozolde hem mitokondride bulunan tetramer yapıda, 84000 D molekül ağırlığında hem hidrojen peroksitle hem de organik hidroperoksitlerle yüksek aktivite gösteren bir enzimdir. Enzim hücreyi, hücre membranında organik hasara karşı korur. Se-bağımsız glutatyon peroksidazlar Glutatyon S-transferazlardır: GST (EC 2.5.1.18). Bunlar merkapturik asit oluşumunun ilk basamağının katalizinde gözlenmiştir. Enzim dimer yapıdadır ve molekül ağırlığı yaklaşık 50000 D, yedi farklı formda alt üniteden meydana gelmiş ve sekiz izozimi vardır. Bu çalışmada, omurgasız canlılardan *Gammarus spp.*'de enzimin kurşun ile olan inhibisyonu ve bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. EC50 değeri *Gammarus spp.*'lara uygulanarak, kurşunun *in vivo*'da Glutatyon peroksidazlar üzerine olan geciktirici etkisi saptanmış ve zamana göre değişimi incelenmiştir. Glutatyon peroksidaz geciktirmesinin zamana ve kurşun miktarına bağlı olarak arttığı bulunmuştur. Bu çalışmada, *Gammarus spp.* Se-bağımlı Glutatyon pcroksidaz'ın optimum aktivitesinin 7.2-8.5 arasında, Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz'ın optimum aktivitesinin ise 7-8 arasında olduğu bulunmuştur. *Gammarus spp.* Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz aktivitesinin Cu^{+2} ve Zn^{+2} iyonları ile azaldığı gözlenmiştir. Buna ilave olarak *Gammarus spp.* Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz aktivitesinin Cu^{+2} ve Zn^{+2} iyonları ile azaldığı gözlenmiştir. Kinetik analizler sonucu Se-bağımlı Glutatyon peroksidaz için Km=4, Vmax=0,016 olarak bulunurken Se-bağımsız Glutatyon peroksidaz için bu değerler Km=0,56, Vmax=0,009 olarak bulunmuştur (Erdem, M. 2002)

Ayrıca *Gammarus*'lar ile ilgili yapılan moleküler çalışmalar sadece protein ve DNA düzeyinde değil aynı zamanda sitotoksik yönden de incelenmiştir. V. Felten ve ark., Kadmiyumun *Gammarus* fizyolojisi ve davranışları üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda ozmolalite ve lokomotor aktivitenin *Gammarus pulex* üzerinde ekofizyolojik/davranışsal markerların tatlı su ekosistemi ve organizmanın reaksiyonlarının gösterilmesinde kullanılabileceği ortaya konmuştur (Charmantıer, V.F., 2008). 2007 yılında Fatma Özgül Özalp tarafından Talyum toksisitesinin *Gammarus pulex*'de meydana getirdiği ince yapı değişikliği incelenmiştir. Talyum elementi, yerkabuğunda maden damarlarında bulunan, yumuşak, dövülebilir, mavimsi beyazlıkta bir metaldir. Talyum sulu çözeltilerinde çok tehlikeli toksik bir elementtir. Aquatik toksikoloji için yıllar boyunca tatlı su omurgasızları kullanılmıştır. *Gammarus* da bunlardan birisidir. Bu çalışmada, histolojik değişimler ve E vitamininin etkileri bir tatlı su amphipodu olan *Gammarus pulex* de çalışılmıştır. *Gammarus pulex*'de talyum asetat için EC50 değeri 0,240 µl olarak bulunmuştur. Bu değer *Gammarus pulex*'lere uygulanarak talyum asetatın hepatopankreatik sekansında toksik etkisi ışık ve elektron mikroskobundaki histolojik değişikler gözlenmiştir. Yapılan histolojik çalışmalar sonucunda hücre zarında zar bütünlüğünü bozucu değişimler, mitokondrilerde krista kayıpları gibi değişimler gözlenmiştir. Çekirdekte de belirgin büzülme ve bozulma gözlenmiştir. Hayvanlara verilen ilk E vitamini dozlarında (2ml, 0,5ml ve 0,25ml) iyileştirmekten çok talyumun zararlı etkisini arttırdığı görülmüştür. Dozları azaltılarak verildiğinde E vitamini (0,25 ml, 0,125 ml, 0,0625ml ve 0,03125 ml) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında etkili olmuş hücre zarında kısmen iyileşme gözlenmiştir. Ayrıca mitokondri iç ve dış zarları ile granüllü endoplazmik retikulumda doku bozukluklarında da azalma belirlenmiştir. Hepotositteki lipid damlacıklarında da azalış gözlenmiştir. Yapılan çalışmada talyumun *Gammarus pulex*'in hepatopankreatik sekasında yarattığı bozuklukları E vitaminin iyileştirici etkisi gözlemlenmiştir (Özalp, F. Ö. 2007).

Literatürlerde görüldüğü üzere, eksiklikler söz konusudur ve eksiklikler gelişmekte olan bilim dallarının etkin kullanımıyla kapatılacaktır. Gelişmekte olan alanlar içerisinde en başta biyoteknoloji gelmektedir.

Biyoteknoloji, bitkisel ve hayvansal üretim alanında da önemli uygulama alanı bulmuştur. Sağlıklı bir ürünün iyi ve kaliteli hammaddelerden elde edilebileceği düşünülürse biyoteknolojik yöntemlerle yetiştirilen soğuğa, sıcağa, kuraklığa ve fazla tuza dayanıklı bitkilerin ürünleri hem üretim kaybını en aza indirecek hem de tüketicinin istediği tipteki gıdanın yapımını sağlayacaktır. Sözgelişi dünya nüfusunun çoğunun temel gıda maddesi olarak kullandığı patatesin protein oranının artırılması yapay bir DNA parçası aktarılarak sağlanmış, aynı tür uygulamalarla hastalık ve zararlılara dayanıklı patates bitkisi elde edilmiştir (Anonim 2008).

Günümüzde değişik hastalıklar nedeniyle tonlarca hayvansal gıdanın çöplere döküldüğü kuş gribi ve deli hastalıkları ile hafızamızdaki tazeliğini korumaktadır. Biyoteknolojik yöntemlerle hayvan hastalıklarına etkili aşılar yapılması kullandığı yemlerden daha çok faydalanabilen verimli ve kısa sürede gelişen hayvan ırkları geliştirilmiştir. Söz gelişi bir araştırmada, embriyosuna gelişme artırıcı gen aktarılan sazan balıkları, atalarına göre %30 oranına daha fazla ağırlık oluşturmuşlar. Bu şekilde özellikle hayvan ırklarının yetiştirilmesi konusunda biyoteknolojik metotlar oldukça başarılı olmuştur (Anonim 2008).

Şeker kamışı ve mısır gibi yakıt alkol (etanol) üretimi için uygun bitkilerin devreye sokulması, biyogazların işlenir hale getirilmesi, petrol kaybının engellenmesinde mikro organizmaların kullanılması ile gerçekleşmektedir.

Gen tekniği ile biyolojik maddelerin süper silahlara dönüştüğü de bilinen bir gerçektir. Biyolojik silah olarak tarif edilen gözle görünemeyen bu yaratıklar kısa sürede çok çabuk çoğalır ve 24 saat içinde sadece bir mikroptan 281 trilyon öldürücü virüs üreyebilir. Biyolojik silah olarak gelecekte kullanılabilecek bir tüp içerisindeki tek hücreli canlıların insanlar arasında ayırım yapmadan bütün insanlığı kırıp geçireceği gözden ırak tutulmamalıdır.

Görüldüğü üzere,biyoteknolojik bilgi çağı olarak adlandırılacak 21 asra damgasını vurmaya aday bilim dalı hüviyetindedir. Teknolojik yenilikler uluslararası ilişkilerde çok önemli bir güç kaynağı durumundadır. Biyoteknoloji şüphesiz geleceğin çehresini çizen unsurlardan biri olacak ve özellikle tarım, gıda, sağlık ve bilgisayar endüstrilerinde büyük atılımların gerçekleşmesine imkan sağlayacaktır. Bu çerçevede ülkemizin de biyoteknolojiyle ilgili gelişme ve

araştırmaları yakından izlemesi gereği açık olmakla birlikte biyoteknoloji imkanlarından doğru şekilde yararlanmak için acilen öncelik vermemiz gereken başka noktalar da mevcuttur. Özellikle tıbbi ve tarımsal uygulamaları açısından biyoteknoloji doğada mevcut genetik çeşitlilik temeli üzerinde yapılanır. Daha güçlü, daha verimli, daha ucuz maliyetli, daha bol ürün ya da ilaç ham maddesi elde etmek için gerek duyulan madde ya da canlıların biyolojisinin ve tabii ki genetiğinin çok iyi araştırılmış olması gerekir. Ülkemiz biyolojik çeşitlilik açısından dünyada en ayrıcalıklı yerlerden birinde bulunmasına rağmen, doğal ya da kültüre alınmış canlı türlerinin genetik özelliklerinin araştırılması şöyle dursun, tam dağılım haritasını dahi yapabilmiş değiliz. Doğal türlerin arşivlenmesindeki zorluklar nedeni ile dikkatimizi sadece kültüre alınmış türlere çevirirsek, ülkemiz topraklarının yerli tahıl, sebze ve meyve türleri ile bunların farklı coğrafyalarda ve farklı amaçlar için elde edilmiş kültür formlarının çeşitliliği dikkatimizi çeker. Biyoteknolojinin hammaddesi "biyo", ürünü "teknolojidir". Bir sonraki yüzyılda biyoteknoloji konusunda tüketici değil de üretici olmak istiyorsak mutlaka kendi sermayemizi iyi tanımak ve değerlendirmek zorundayız. Bu hedefe ulaşmak için öncelik iki noktaya verilmelidir: Birinci olarak biyoteknoloji için gerekli bilimsel ve teknolojik alt yapı anlaşılmalı ve kullanılabilmelidir; İkinci olarak da kendi topraklarımızda mevcut doğal canlılar ve kültür canlıları tespit edilmeli ve üstünlükleri-zayıflıkları araştırılmalıdır.

4.1 Sonuç

Bu çalışmada sucul bir indikatör olan *Gammarus pulex*'ten genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen genomik DNA'nın kalitesini ve saflığını belirlemek için spektrofotometrik ve elektrofotometrik yöntemlerle analizi yapılmıştır. Genomik DNA'nın saflığı ve kalitesi, PZR reaksiyonlarında rahatlıkla kullanılabileceğini göstermiş ve evrensel primerler kullanılarak kurulan PZR reaksiyonunda bantlaşmaların olduğu görülmüştür. Ayrıca *Gammarus pulex*'ten protein izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen proteinler SDS-Page ile görüntülenmiştir. Protein izolasyonları sonucunda 9 farklı *Gammarus pulex*'in aynı protein konformasyonunu gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç proteinlerin türler arasındaki ilişkiyi gösterebileceğini göstermiştir.

Yapılan literatür taramasında *Gammarus pulex* ile ilgili çok fazla moleküler biyolojik çalışmaya rastlanmamıştır.

4.2 Öneriler

Çalışmamızda elde edilen verilerde, DNA kullanılarak farklı genlerin, proteinler kullanılarak spesifik enzimlerin izole edilebilirliğinin araştırılmasının çalışma açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Anonim (2006) http://www.menacam.com/dna-izolasyon-yontemleri-t20850.html

Anonim (2008) http://www.stu.inonu.edu.tr/~hbezek/proje.htm

Anonim (2010). http://www.seragroup.com.tr/pinfo.asp?pid=984

Arthur, J.W. (1980), "Review of freshwater bioassay procedure for selected Amphipods" Astm Stp **715**, 98-108

Barnard, J.L., Barnard, C.M. (1983), "Freshwater Amphipoda of the World" *Hayfield Ass., Mt.Vernon, Va., U.S.A.* I. Evalutionary Patterns, I-VIII, IX-XVIII, 1-358; II. Handbook and Bibliography, XIX, 359- 830.

Charmantıer, V.F., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garrıcand, J. And Geffard, O., (2008) "Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium", *Aquatic Toxicology* **86(3),** 413-425

Costa, F. O., Cunha, M. R., Neuparth, T., Theodorakıs, C. W., Costa, M. H. and Shugart, L. R., (2004), "Application of RAPD DNA fingerprinting in taxonomic identification of amphipods: a case-study with *Gammarus* species (Crustacea: Amphipoda) *Journal of the Marine Biological Association*. **84(1)**,171-178

Demirsoy, A.(1998) "Yaşamın Temel Kuralları, omurgasızlar=invertebrate (böcekler dışında), Cilt I-Kısım I, İkinci baskı,

Düzen, A. *RAPD-PCR tekniği ile Gammarus türlerinin filogenetik ilişkisinin belirlenmesi* Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2002.

Erdem, M. *Çeşitli çevresel kirleticilerin gammarus pulex'deki Se-bağımlı ve Se-bağımsız Glutatyon proksidaz enzim aktivitelerine olan etkileri ve enzimin bazı kimyasal özellikleri*. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2002.

Graney, L.R. (1986), "Effects of long term exposure to pentachlorophenol on the free aminoacid pool and energy reserves of the freshwater Amphipod Gammarus pseudolimnaeus Bousfield (Crustacea, Amphipoda)" Ecotox and Environ. Safety, **12,** 233-251

Hynes, H.B.N.(1955). "The Reproductive Cycle of Some British Freshwater Gammaridae" *Journal of Animal Ecology* **24,** 352-357

Karaman, G.S., Pınkster, S. (1977a), "Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda), Part I Gammarus pulex- group and related species" Bijdragen Tot de Dierkunde, **47**: 1-97.

Karaman, G.S., Pınkster, S. (1977b), "Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda), Part II Gammarus roeseli-group and related species, Bijdrajen Tot de Dierkunde (Constribution to Zoology)" The Art. Lib. Comm. Plant. Midd.

Karaman, G.S., Pınkster, S. (1977c), "Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda), Part I Gammarus balkanicus-group and related species, Bijdrajen Tot de Dierkunde (Constribution to Zoology)" The Art. Lib. Comm. Plant. Midd.

Malıns, D.C. (1991). "Perspectives in aquatic toxicology" Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 31, 371-399

Özbek, M., Ustaoğlu, M.R.(2006), "Check-list of Malacostraca (Crustacea) species of Turkish Inland Waters" *E.Ü.Su Ürünleri Dergisi*, vol. **23** (1-2): 229-234.

Özalp, F. Ö. *Talyum toksisitesinin Gammarus Pulex'de Meydana Getirdiği ince yapı değişikliği*. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2007.

Pollock, S. (2005). Dorling Kindersley Publishing, Inc.*Eyewitness Ecology*.

Temizkan G., Arda N. (2007) Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler Nobel Yayınları

Turner, P.C. , Mclennan, A.G., Bates, A.D. ve Whıte M.R.H. (2004). *Moleküler Biyoloji Önemli Notlar*

Yeşilmen, T.Ö., Kırgız, T.(1996), "Kırklareli ili tatlı su Gammarus (Gammaridae-Amphipoda) türleri" Tr. J. Of Zool.,20,315-318

Yıldırım A., Bardakcı F., Karataş M., Tanyolaç B. (2006) *Moleküler Biyoloji, Nobel Yayınevi*,

Zhonge, H., Jınzhong, F., Shuqıang, L. (2007), "A Molecular Phylogeny of the Genus Gammarus (Crustacea:Amphipoda) based on Mitochondrial and Nuclear Gene Sequences" Molecular Phylogenetics and Evolution **45**,596–611