

RAPD Tekniği ve Biyokimya Alanında Kullanımı

Alparslan Kadir DEVRİM *

Necati KAYA*

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

Yayın Kodu: 2005/22-D

Özet

Günümüzde, moleküler genetik teknikler sayesinde genomun biyokimyasal yapısı ve gösterdiği polimorfizm ortaya konabilmektedir. Genetik polimorfizmi araştıran tekniklerden biri olan RAPD, araştırılan genom hakkında herhangi bir ön dizilim bilgisine ihtiyaç göstermeden, yüksek oranda polimorfik bant verimi ve düşük maliyetiyle PCR metoduna dayalı diğer DNA parmak izi teknikleri arasında önemli bir yer tutmaktadır. Bu derlemede; RAPD tekniğinin temel prensibi, mekanizması ve biyokimya alanında kullanımı hakkında bilgi sunulmaktadır.

Anahtar sözcükler: RAPD, Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA, DNA parmak izi, Genetik polimorfizm.

RAPD Technique and It's Usage in the Biochemistry

Summary

Recently by means of molecular genetic technics the biochemical structure and polymorphism of the genome can be put forward. RAPD which is a molecular biologic technique that investigates genetic polymorphism reserves an important place among other DNA fingerprint technics since it has a high proportion of polymorphic band profile and a low cost and doesn't feel the need for prior knowledge of the genome under investigation. This review gives information about basic principle, mechanism and biochemical usage of the RAPD technique.

Keywords: RAPD, Random amplified polymorphic DNA, DNA fingerprint, Genetic polymorphism.

İletişim (Correspondence)

Mobile Phone: +90 505 8148156

e-mail: akdevrim@hotmail.com

GİRİŞ

DNA temelinde dayalı polimorfizm araştırmaları, hayvan türlerinin genetik analizlerinde ilerleme kaydedilmesini sağlamaktadır¹. Hayvan populasyonlarında birbirini tamamlayıcı nitelikte olan mikrosatelit, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) gibi farklı moleküler işaretleyiciler kullanılmakla birlikte günümüzde RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği de kullanılmaktadır¹⁻³.

Bu tekniği ilk kez Williams ve ark⁴, rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA olarak tanımlamış ve genetik polimorfizmi belirleyen, yeni bir teknik olarak ortaya koymuşlardır. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) metoduna dayalı olan bu teknikte; rasgele dizilimdeki kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA üzerinde belirlenen parçacıklar çoğaltılmakta olup reaksiyonun gerçekleşmesi için araştırılan genomun baz dizilimi hakkında herhangi bir ön bilgiye ihtiyaç yoktur⁵.

RAPD tekniği kullanılarak belirlenen DNA polimorfizmi; agaroz jelde RAPD bandının varlığı veya yokluğu ile kendini göstermekte ve genomda şekillenen delesyon, inzersiyon veya primerlenme bölgelerindeki ya da bölgeler arasındaki nükleotid dizilim farkını yansıtmaktadır⁶. Rasgele primerlerin genomdaki sayısız bölgeyi çoğaltabilme potansiyeli ve çoğalan DNA parçacıklarının genetik sınıflara özgü tabiatı RAPD tekniğini genetik uzaklık ve filogenik araştırmalar için tercih edilir hale getirmiştir^{6,7}. Bu derlemede; RAPD tekniğinin temel prensibi, mekanizması ve biyokimya alanında kullanımı hakkında bilgi sunulması amaçlanmıştır. Tekniğin aşamaları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1. PCR işleminde kullanılacak olan primerlerin, nükleotid dizileri belli bir kriter olmaksızın rasgele seçilir ve sentezi yapılır.

2. Rasgele seçilen bu primerler kullanılarak araştırılan genomik DNA'da PCR uygulamasına başlanır. PCR işlemi esnasında primerler genomik DNA'da simetriği olan bölgelere yapışır ve bu bölgeler geometrik olarak çoğalır.

3. Çoğalan bu DNA parçacıkları, elektroforez işlemiyle agaroz jelde yürütülür.

4. Etidyum bromid ya da radyoaktif maddelerle boyanarak molekül büyüklüklerine göre sıralanan ve

bantlaşma gösteren DNA parçacıkları değerlendirilerek DNA üzerindeki genetik polimorfizm belirlenir^{4,8-10}.

RAPD'in MEKANİZMASI

Standart bir PCR'da, genellikle her biri 18-25 baz uzunluğunda, DNA iplikçesine spesifik primerler kullanılmaktadır. Primerlerdeki baz diziliş sıraları, hedef dizinin yan bölgelerindeki DNA dizi bilgisine dayalıdır. Ayrışarak tek iplikçiğe dönüşmüş DNA kalıbındaki bu spesifik bölgelere, PCR'ın yapışma fazında primerler bağlanırlar ve çoğalacak bölgeleri tanımlarlar.

RAPD tekniğinin PCR aşamasında ise, rasgele dizilimdeki primerler kullanılmaktadır. Rasgele seçilmiş olan primer, RAPD'in yapışma fazı boyunca tamamlayıcısı olan bölgelere bağlanmaktadır. Eğer primerlerden ikisi karşılıklı iplikçiklerdeki kalıba uygun bölgede ve çoğalabilecek mesafede (yaklaşık 2500 veya daha az baz uzunluğu) bağlanırlarsa, bu durumda farklı bir parçacık çoğalabilmektedir. Her bir RAPD primeri aynı PCR esnasında, farklı lokuslardan farklı sayılarda (1-10 veya daha fazla) DNA parçacıklarını çoğaltma potansiyeline sahiptir¹. Diğer bir ifadeyle farklı primerler farklı RAPD polimorfizmlerini üretmektedir¹¹. Amplifikasyon sonucunda oluşan DNA ürünü, agaroz jel elektroforezi işlemine tabi tutulur. Örneklerin hepsinde bulunan RAPD bantları monomorfik olarak kabul edilmektedir. Bazı bireylerde bulunmayanlar veya değişken mobiliteye sahip olanlar ise polimorfik olarak kabul edilmektedir¹². Elde edilen RAPD bantlarında gözlemlenen polimorfizmlerin, genetik ilişkilerin belirlenmesinde önemli olduğu kabul edilmiştir. Gen haritalarının çıkarılmasında RAPD bantlarının çok sayıda olması arzulanmaktadır¹³.

RAPD polimorfizmleri, primer yapışmasını önleyen bir veya her iki primerlenme bölgesindeki dizi farklılığından kaynaklanmaktadır. RAPD polimorfizmleri primer bağlanma bölgesinin varlığını veya bulunduğu bölgeyi etkileyen ve bu bölgeler arası kısmın ölçüsünü değiştiren mutasyonlardan kaynaklanabildiği gibi, amplifikasyonu önleyen mutasyonlardan (delesyon, inzersiyon ve inversiyon gibi) da kaynaklanabilmektedir. Tekniğin, primer ve kalıp arasındaki tek baz yanlış eşleşmelerini belirlemedeki duyarlılığı da kanıtlanmıştır¹. RAPD polimorfizmleri, varyasyon oluşumunda ve nokta mutasyonlarında olduğu gibi, primer bağlayan bölgeler arasındaki alanların farklılıklarından kaynaklanmaktadır¹¹. Bu bölgelerdeki mutasyonlar, sekonder yapıların şekillenmesini sağlayabilmekte veya bozabilmekte olup, RAPD polimorfizmleri ile sonuç-

lanabilmektedir¹⁴. RAPD tekniğindeki ana güçlük, sonuçta oluşan bant profillerinin reaksiyon şartlarındaki varyasyonlara, DNA kalitesine ve PCR ısı profiline çok duyarlı olmasıdır¹⁵. Tablo 1’de, RAPD ile RFLP ve mikrosatelit yöntemlerinin karşılaştırılması gösterilmektedir.

Tablo 1. RAPD ile RFLP ve mikrosatelit yöntemlerinin karşılaştırılması^{1,16}.

Table 1. The comparison of RAPD with RFLP and microsatellite techniques^{1,16}.

Kriterler	RAPD	RFLP	Mikrosatelit
DNA hakkında ön bilgi gereksinimi	-	+	+
Restriksiyon enzimleriyle muamele	-	+	+
PCR uygulaması	+	-	+
Southern hibridizasyonu ve transferi	-	+	-
Agar-jel elektroforezi	+	+	+
Elde edilen polimorfik bant sayısı	Yüksek	Orta	Yüksek
Elde edilen bant özelliği	Dominant	Ko-dominant	Ko-dominant
Maliyet	Düşük	Orta	Orta

RAPD bantlarının Mendel kalıtım yolunu izlediği ve çeşitli türlerin gen haritalarının yapılmasında kullanıldığı bildirilmiştir⁹. Amplifikasyon ürünlerinin ölçü ve sayısı, primere ve kalıp dizilerinin uyumuna bağlıdır. RAPD ile belirlenen varyasyon düzeyi türden türe değişmektedir. Örneğin kullanılan primerlerden; domateste (*Lycopersicon esculentum*) %63’ü, bal arısında (*Apis mellifera*) %20’si bireyler arası polimorfizm gösterirken, kızıl çamda 121 primerden sadece 2’si polimorfizm göstermektedir. RAPD polimorfizmlerinin doğası henüz tam olarak bilinmese de, en önde gelen sebebin primerin bağlandığı bölgedeki nükleotid değişikliklerinin ve yapısal farklılıkların olduğu düşünülmektedir¹⁷.

RAPD TEKNİĞİNİN BİYOKİMYADAKİ KULLANIM ALANLARI

Genetik işaretleyiciler kullanılarak uygulanan seleksiyon stratejileri, babalık testi, ırk akrabalığı, türlerin genetik kimliklendirilmesi ve populasyon genetiği gibi konulardaki bilgiler her geçen gün artmakta-

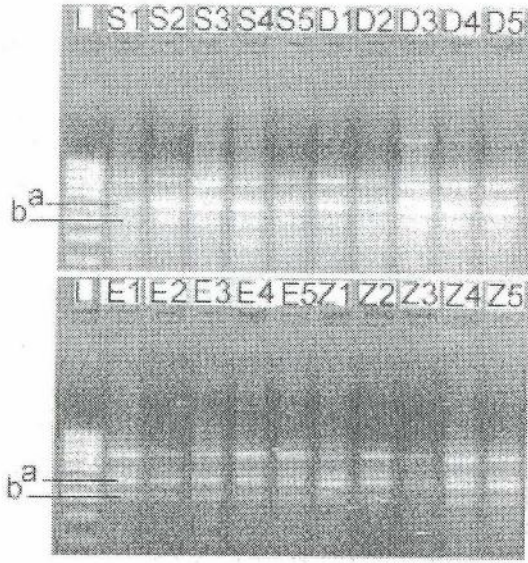
dır^{1,3,18,19}. Bu polimorfizm araştırmaları, genetik haritaların oluşturulmasına temel teşkil etmekte ve verim özelliklerindeki gelişmeyi hızlandırmaktadır¹. Gen haritalarının yapılması çalışmaları ilk olarak çiftlik hayvanlarında^{20,22} yapılmaya başlanmış daha sonra fare²³ ve insan²⁴ üzerinde yoğunlaşmıştır. Tavuklarda yapılan otozomal²⁵ ve Z kromozomu²¹ haritalarının belirlenmesinde RAPD’in uygulanabilir olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Ayrıca sığır ve koyun türlerinde gerçekleştirilen araştırmalar neticesinde elde edilen RAPD parmak izleri de haritalama çalışmalarında kullanılmış olup bu tür çalışmaların ekonomik olarak önem taşıyan lokusların belirlenmesi bakımından ciddi katkıları vardır^{20,22}.

Genomdaki biyokimyasal polimorfizm araştırmaları RAPD’in en çok kullanıldığı alanların başında gelmektedir. Tür, ırk ve hatta populasyonlar arasındaki genetik ilişkiler ve tür, ırk ve cinsiyete özgü DNA bantlarının belirlenmesi çalışmaları RAPD analizleri ile gerçekleştirilebilmektedir^{18,26-28}.

İrk karakterizasyonu; populasyon içi ve populasyonlar arasında nükleer ve mitokondriyal DNA polimorfizmini yansıtan genetik varyasyon bilgisini gerektirmektedir¹¹. Gwakisa ve ark¹¹ sığır ırkları arasındaki genetik farklılıkların tespitinde RAPD’in oldukça kullanışlı bir yöntem olduğunu ileri sürmüşlerdir. Aşağıdaki jel fotoğrafında, Kars yöresinde yetiştirilen sığır ırklarından RAPD tekniği kullanılarak elde edilen bazı DNA bant profilleri (Şekil 1) gözlenmektedir.

Cinsiyete özgü DNA bantlarının belirlenmesi, hem birey hem de embriyonun cinsiyet tayini açısından önem arz etmektedir. RAPD tekniği kullanılarak yapılan araştırmalar sayesinde kanatlılarda^{21,29}, sığırlarda^{11,27}, farede³⁰ ve koyunda³¹ cinsiyete özgü markırlar belirlenebilmiştir.

DNA analiz tekniklerindeki hızlı ilerleyiş sayesinde günümüzde türler arasındaki genetik ilişki moleküler düzeyde ortaya konabilmektedir. Birbirine yakın olan türler arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesi hayvanların verim özelliklerini kodlayan genleri araştıran moleküler biyolojik çalışmalar bakımından önem arz etmektedir. RAPD tekniği kullanılarak yapılan araştırmalarla; manda, sığır, koyun ve keçi gibi çiftlik hayvanlarına¹⁸ ve tavuk, ördek, hindi ve kaz gibi kümes hayvanlarına³² ait türe özgü DNA bantları ortaya konabilmektedir.



Şekil 1. Kars yöresinde yetiştirilen sığır ırklarındaki bazı RAPD bant profilleri. Fotoğraftaki jelde, L: DNA ölçüğü, yaklaşık 1000 bp'den başlayarak 100 bp'lik aralıklarla azalan bantları göstermektedir. D: Doğu Anadolu Kırmızısı, S: Simmental, Z: Zavot ve E: Esmer ırklarını, rakamlar ise bu ırklardaki farklı örnekleri simgelemektedir. a bandı tüm ırklarda, b bandı ise Zavot hariç tüm ırklarında monomorfiktir²⁶.

Figure 1. Some RAPD band profiles of the cattle breeds reared in the province of Kars. In the gel photograph L: DNA marker exhibits DNA bands which starts from 1000 bp and reduces by 100 bp intervals. D (East Anatolian Red), S (Simmental), Z (Zavot) and E (Turkish Brown Swiss) letters are representing the breeds and the numbers are representing the different samples in the breeds. a is monomorphic in the all cattle breeds and b is also monomorphic in all breeds except Zavot²⁶.

KAYNAKLAR

- 1 **Cushwa WT, Medrano JF:** Applications of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for genetic analysis of livestock species. *Anim Biotechnol*, 7(1): 11-31, 1996.
- 2 **Beuzen ND, Stear MJ, Chang KC:** Molecular markers and their use in animal breeding. *Vet J*, 160, 42-52, 2000.
- 3 **Rincon G, D'Angelo M, Gagliardi R, Kelly L, Llambi S, Postiglioni A:** Genomic polymorphism in Uruguayan Creole cattle using RAPD and microsatellite markers. *Res Vet Sci*, 69: 171-174, 2000.
- 4 **Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV:** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18(22): 6531-6535, 1990.
- 5 **Bowditch B.M, Albright DG, Williams JGK, Braun MJ:** Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. *Methods Enzymol*, 224, 294-309, 1993.
- 6 **Clark AG, Lanigan CMS:** Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Mol Biol Evol*, 10, 1096-1111, 1993.

- 7 **Borowsky RL, Mc Clelland M, Cheng R, Welsh J:** Arbitrarily primed DNA fingerprinting for phylogenetic reconstruction in vertebrates: The Xiphophorus model. *Mol Biol Evol*, 12(6): 1022-1032, 1995.
- 8 **Morgan UM, Constantine CC, Greene WK, Thompson RC:** RAPD analysis of Giardia DNA and correlation with isoenzyme data. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87(6): 702-705, 1993.
- 9 **Rothuizen J, Van Wolferen M:** Randomly amplified DNA polymorphism in dogs are reproducible and display Mendelian transmission. *Anim Genet*, 25, 13-18, 1994.
- 10 **Scott MP, Haymes KM, Williams SM:** Parentage analysis using RAPD PCR. *Nucleic Acids Res*, 20, 5493, 1992.
- 11 **Gwakisa PS, Kemp SJ, Teale AJ:** Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. *Anim Genet*, 25, 89-94, 1994.
- 12 **Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ:** PCR Strategies. Academic Press, 39-67, San Diego, 1995.
- 13 **Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW:** RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio/Technol*, 7, 257-264, 1989.
- 14 **Asakura N, Nakamura C, Ohtsuka I:** RAPD markers linked to the nuclear gene from Triticum timopheevi that confers compatibility with Aegilops squarrosa cytoplasm on alloplasmic durum wheat. *Genome*, 40, 201-210, 1997.
- 15 **Hoelzel AR:** Molecular Genetic Analysis of Populations. 2nd Edition. Oxford University Press, 229-235, Oxford, 1998.
- 16 **Güneren G:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Parmak izi Yöntemi'nin (RAPD-PCR) Türkiye Yerli Sığır Irklarında Uygulanma Olanakları. Doktora Tezi. Ankara Üniv Sağlık Bil Enst, 1999.
- 17 **Kantanen J, Vilkki J, Elo K, Mäki-Tanila A:** Random amplified polymorphic DNA in cattle and sheep: Application for detecting genetic variation. *Anim Genet*, 26, 315-320, 1995.
- 18 **Appa Rao KBC, Bhat KV, Totey SM:** Detection of species-specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Genet Anal: Biomol Eng*, 13, 135-138, 1996.
- 19 **Dieffenbach CW, Dveksler GS:** PCR Primer: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1-287, New York, 1995.
- 20 **Barendse W, Armitage SM, Kossarek LM, Shalom A, Kirkpatrick BW, Ryan AM, Clayton D, Li L, Neiberghs HL, Zhang N:** A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics*, 6, 227-235, 1994.
- 21 **Levin I, Crittenden LB, Dodgson JB:** Genetic map of the chicken Z chromosome using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genomics*, 16, 224-230, 1993.
- 22 **Cushwa WT, Dodds KG, Crawford AM, Medrano JF:** Identification and genetic mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to the sheep genome. *Mamm Genome*, 7(8):580-585, 1996.
- 23 **Dietrich WF, Miller JC, Steen RG, Merchant M, Damron D, Nahf R, Gross A, Joyce DC, Wessel M, Dredge RD:** A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms. *Nature Genetics* 7, 220-245, 1994.
- 24 **Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau p, Marc S, Bernardi G, Lathrop M, Weissenbach J:** The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat Genet*, 7(2): 246-339, 1994.
- 25 **Levin I, Santangelo L, Cheng H, Crittenden LB, Dodgson JB:** An autosomal genetic linkage map of the chicken. *J Heredity*, 85, 79-85, 1994.

- 26 **Devrim AK, Kaya N:** An investigation on DNA polymorphism of the cattle breeds in the province of Kars by RAPD-PCR technique. *Revue Méd Vét.* 157(2): 88-91, 2006.
- 27 **Antoniou E, Urdaci M, Skidmore C:** Isolation of bovine Y specific markers by RAPD. Proc. 5th World Congress. *Genet Appl Livestock Prod.* 21:117-119, 1994.
- 28 **Sharma D, Appa Rao KBC, Totey SM:** Measurement of within and between population genetic variability in quails. *Bri Poult Sci.* 41, 29-32, 2000.
- 29 **Griffiths R, Tiwari B:** The isolation of molecular genetic markers for the identification sex. *Proc Natl Acad Sci.* 90, 8324-8326, 1993.
- 30 **Wardell B, Sudweeks J, Meeker N, Estes S, Woodward S, Teuscher C:** The identification of Y chromosome-linked markers with random sequence oligonucleotide primers. *Mamm Genome.* 4, 109-112, 1993.
- 31 **Cushwa WT, Medrano JF:** Identification of RAPD genetic markers in sheep. Proc. 5th World Congress Genet Appl Livestock Prod, 21, 133-136, 1994.
- 32 **Calvo JH, Zaragoza P, Osta R:** Random amplified polymorphic DNA fingerprints for identification of species in poultry pâté. *Poult Sci.* 80, 522-524, 2001.