

Keçi Sütü Somatik Hücrelerinden Genomik DNA İzolasyonunda Fenol-Kloroform ve Chelex® 100 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması*

Fulya ÖZDİL¹

Ensar BAŞPINAR¹

Geliş Tarihi: 22.06.2004

Öz: Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölüm İşletmesinde yetiştirilen Saanen–Kilis melezi Akkeçi'lerden ve Konya–Ermenek yöresi özel işletmelerdeki Kıl keçi'lerden temin edilen toplam 30 adet süt örneğinden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Genomik DNA izolasyonu, fenol–kloroform ile Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Her iki yöntemle elde edilen genomik DNA'nın konsantrasyonu ve saflık derecesi, 260 ve 280 nm UV ışığı altında absorbans değerlerinden hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Fenol–kloroform ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen DNA konsantrasyonu ortalama, 2406 ± 322 µg/mL ve saflık derecesi A_{260}/A_{280} oranında ortalama, 1.816 ± 0.038 olarak bulunmuştur. Bu durum fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemiyle genomik DNA'nın saf olarak elde edildiğini göstermektedir. Chelex® 100 ekstraksiyon yönteminde ise DNA konsantrasyonu ortalama, 590.0 ± 54.9 µg/mL ve elde edilen genomik DNA'nın saflık derecesi ortalama, 1.311 ± 0.012 olarak bulunmuştur. Bu sonuç Chelex® 100 ekstraksiyonu ile elde edilen DNA örneklerinde protein kontaminasyonu olduğunu göstermekte ve DNA'ların çok saf elde edilemediğini ifade etmektedir. Fenol–kloroform ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen genomik DNA, % 1.0 'lik agaroz jelinde tek bant olarak görülmüştür. Ancak Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen DNA miktarı az olduğu için agaroz jelinde görüntü alınamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Genomik DNA izolasyonu, süt, somatik hücre, Chelex® 100, fenol–kloroform ekstraksiyonu

The Comparison of Phenol-Chloroform and Chelex® 100 Extraction Methods for the Isolation of Genomic DNA From Goat Milk Somatic Cells

Abstract: In this study, the isolation of genomic DNA was carried out by using a total of 30 Akkeçi and native hair goat milk samples that were collected from Konya–Ermenek region and University of Ankara, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science. The isolation of genomic DNA was performed by using phenol–chloroform and Chelex® 100 extraction methods. The concentration and the purity of genomic DNA obtained with both methods, were determined by spectrophotometric absorption of UV light at 260 nm and 280 nm wave length and the results were compared. The mean DNA concentration obtained from phenol–chloroform extraction method was 2406 ± 322 µg/mL and the mean purity of genomic DNA (A_{260}/A_{280} ratio) was 1.816 ± 0.038 . These results indicate good deproteinisation in phenol–chloroform extraction method. The mean DNA concentration obtained from Chelex® 100 extraction method was 590.0 ± 54.9 µg/mL and the mean purity of genomic DNA was 1.311 ± 0.012 . These results showed that there were some protein contaminations in DNA samples by using Chelex® 100 extraction method. The genomic DNA obtained from phenol–chloroform extraction method, appeared to be a single band on 1 % agarose gel but due to the less amount of genomic DNA obtained in Chelex® 100 extraction method, there was no signal on agarose gel.

Key Words: Genomic DNA isolation, milk, somatic cells, Chelex® 100, phenol–chloroform extraction

Giriş

Genetik, biyoteknoloji, moleküler biyoloji ve biyokimya alanlarında, genetik materyal üzerine yapılan araştırmaların ön çalışması olarak DNA izolasyonu, büyük öneme sahip bir aşamadır. DNA yapısının analizi, DNA hibridizasyonu, DNA sıra analizi, PCR 'a (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) dayanan metotlarla, polimorfizm çalışmaları ve gen klonlanması gibi genetik araştırmalarda öncelikle büyük moleküler ağırlıktaki, saflaştırılmış genomik DNA'nın elde edilmesi gerekmektedir.

Genel olarak genomik DNA izolasyon protokolleri; hücrelerin lize edilmesi ile başlar, ardından deoksinükleoproteinler ve RNA'lar ortamdaki uzaklaştırılır ve DNA'nın endonükleazlar tarafından parçalanmasını engellemek için; şelatlama yapan maddeler, yüksek tuz

konsantrasyonu, deterjanlar ve kimyasal denatürantların kullanılması ile son bulur (Chrispeels 1973, Silhavy ve ark. 1984).

Çeşitli kaynaklardan DNA izolasyonu yapılabilmekte özellikle havyan materyallerinde yaygın olarak kan hücreleri kullanılmaktadır (Jeanpierre 1987, Ciulla ve ark. 1988, Johns ve Paulus-Thomas 1989, Montgomery ve Sise 1990, Mullenbach ve ark. 1989). Bunun dışında süt, sperm, kıl, kemik, deri vb. hücrelerden de DNA elde etmek mümkündür (Goossens ve Kan 1981, Brown 1991).

Süt örneklerinin toplanması, diğer bazı biyolojik materyallere göre kolay ve masrafsız olduğu için, genomik DNA'nın süttten izolasyonu için geliştirilmiş olan yöntemler

* Yüksek Lisans Tezi'nden özetlenmiştir.

¹ Ankara Üniv. Ziraat Fak. Zootekni Bölümü–Ankara

daha çok tercih edilmektedir. Örneğin kan örneklerinin temin edilebilmesi için, bu konuda eğitilmiş personele ve ekipmana ihtiyaç vardır ve kanın alınması hayvanlarda önemli bir stres faktörüdür. Bu nedenle verimlerde önemli ölçüde gerilemeler saptanmıştır (Lipkin ve ark. 1993). DNA izolasyonunda kaynak olarak süt örneklerinin kullanılması ile bu sorun büyük ölçüde aşılabılır. Çünkü sütün temin edilmesi günlük işlerden biridir ve eğitilmiş personel, özel ekipman ya da yardım gerektirmemektedir (Lipkin ve ark. 1993).

Sütte yüksek ancak değişken sayıda (keçi sütünde yaklaşık 10^6 - 10^7 /ml; inek sütünde 10^4 - 10^7 /ml) somatik hücre bulunmaktadır. Bu sayı sütün elde edildiği hayvanın durumuna bağlı olarak (mevsim, laktasyon dönemi, hastalık vb.) farklılık göstermektedir. Sütteki somatik hücreler; nötrofiller, makrofajlar, lenfositler gibi lökositlerden ve daha az oranda da (< % 2) epitel hücrelerinden oluşmaktadır (Kehri ve Shuster 1994). Bu hücrelerin kullanımı ile süttten genomik DNA örneklerinin elde edilmesi mümkün olmaktadır (Lipkin ve ark. 1993, De ve ark. 2000).

Bu çalışmada keçi sütü somatik hücrelerinden genomik DNA elde etmek amacıyla, günümüzde en yaygın olarak kullanılmakta olan fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile maliyetinin az olması ve daha az iş gücü gerektirmesi gibi avantajlara sahip olan ve giderek yaygınlaşmakta olan Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Son yıllarda geliştirilen yeni gen teknolojileri, birçok alanda olduğu gibi tarımsal araştırmalarda da büyük önem kazanmıştır. Bu tip çalışmaların ilk aşaması olarak da genetik materyalin izole edilmesi önem kazanmaktadır. Belirli özellikleri tayin eden genlerin izolasyonundan sonra, bunların söz konusu özelliklerin kalıtımına ilişkin bilgilerin elde edilmesinde ve diğer genetik uygulamalarda kullanılabilmesi söz konusu olmaktadır.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada materyal olarak Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölüm İşletmesinde yetiştirilen Saanen-Kilis melezi 15 adet Akkeçi ve Konya-Ermenek yöresindeki 15 adet Kıl keçi olmak üzere toplam 30 adet keçi kullanılmıştır.

Örneklerin toplanması ve hazırlanması: Süt örnekleri her hayvandan 10-15 ml olmak üzere koruyucu olarak sodyum azid içeren kapaklı cam tüplere alınmış ve buz kutularında laboratuara getirilmiştir. Örnekler (yaklaşık 1.5 ml) eppendorf tüplere bölünmüş ve kullanıma kadar -20 °C'da saklanmıştır.

Keçi sütü somatik hücrelerinden genomik DNA izolasyonu, Chelex® 100 ve fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemleri ile yapılmıştır.

Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemi: Keçi sütü somatik hücrelerinden genomik DNA izolasyonunda ilk olarak Amills ve ark. (1997)'nin bildirdiği Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem aşağıda özetlenmiştir;

10 µl süt, steril su ile 1000 µl'ye tamamlanıp, oda sıcaklığında tüpler ters çevrilerek 15-20 dakika karıştırılmıştır. Bu karışım 12.000 devir/dk.'da santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüplerin alt kısmında toplanan pelet (tortu), somatik hücreleri ve kazeinleri içermektedir. Bu pelet, 200 µl Chelex® 100 reçine (50 g/l) + 4 µl proteinaz K (10 mg/ml;) ile tekrar süspansiyon edilmiş ve protein partiküllerinin reçineye bağlanmasını sağlamak için 30 dakika 56 °C'da inkübe edilmiştir. Son olarak proteinlerin denatürasyonu ve reçine ile daha sıkı bağlanıp çökmesini sağlamak amacıyla bu karışım, su banyosunda 100 °C'da 8 dakika daha inkübe edilmiştir. DNA örnekleri, vortekste yüksek hızda 5-10 saniye karıştırıldıktan sonra 10.000-15.000 devir/dk.'da santrifüj edilmiştir. Elde edilen genomik DNA örnekleri kullanıma kadar -20 °C'da saklanmıştır. Her kullanımdan önce örnekler, 10.000-15.000 devir/dk.'da santrifüj edilmiştir.

Fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi: Keçi sütü somatik hücrelerinden genomik DNA izolasyonu için ikinci yöntem olarak Lipkin ve ark. (1993)'nin bildirdiği fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi bu çalışmada modifiye edilerek uygulanmıştır.

Daha kısa süren fenol-kloroform ekstraksiyon protokolleri olmakla birlikte bu çalışmada uygulanan fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi, 3 gün sürmektedir.

1. gün: Yaklaşık 2-3 ml süt, eşit hacimde NaCl (% 0.9) ile seyreltilmiş ve 4 °C'da 10 dakika 2.000 devir/dk.'da santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet, tekrar 10 ml NaCl (% 0.9) ile çözdürülmüş ve aynı şartlarda santrifüj edilmiştir. Daha sonra önceden ısıtılmış 2 ml liziz tamponunda (10 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, % 0.5 SDS, % 2 β-merkaptotanol) pelet süspansiyon edilmiş ve 50 °C'da 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Her bir örnek için son konsantrasyon 0.2 mg/ml olacak şekilde tüplere Proteinaz K (10mg/ml) ilave edilmiş ve örnekler gece boyu çalkalanarak 42 °C'da su banyosunda bırakılmıştır.

2. gün: Örnekler eşit hacimde fenolle hazırlanmış Tris-EDTA (TE) tampon çözeltisi (10 mM Tris, pH 7.5 ve 1 mM EDTA) ile ekstrakte edilmiştir. Bunun için her bir tüpte bulunan 2 ml liziz tampon çözeltisinin üzerine 2 ml TE çözeltisi ile hazırlanmış fenol ilave edilmiş; tüpler alt üst edilerek fazların karışması sağlanmıştır. Karışan fazların ayrılması için 5 dakika beklenmiş ve daha sonra tüplerin üstündeki sulu fazlar yeni tüplere alınmıştır. Daha sonra fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ile ve son olarak da 24:1 kloroform:izoamil alkol ile ekstraksiyon aşamaları tekrarlanmıştır. Ekstraksiyondan sonra DNA'nın çöktürülmesi için tüplere 2.5-3 hacim saf etanol ve 1M sodyum asetat ilave edilmiş ve tüpler ters çevrilerek karıştırılmıştır. Örnekler derin dondurucuda -20 °C'da gece boyu bekletilmiştir.

3. gün: Derin dondurucudan alınan örnekler, 4 °C'da 12.000 devir/dk.'da 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Her bir tüpe yaklaşık 3-4 ml % 70'lik etanol ilave edilmiş ve tüpler oda sıcaklığında 5-10 dakika daha inkübe edilmiştir. Etanol ilave edilmiş DNA

örnekleri, 12.000 devir/dk.'da 5 dakika daha santrifüj edilmiş, süpernatant dökülmüş ve tüpler kağıt peçete üzerinde ters olarak kurutulmuştur. Tüplerin dibinde tortu şeklinde DNA iplikçikleri görülmüştür. Oda sıcaklığında kurutulduktan sonra genomik DNA, yaklaşık 100 µl 10:0.1 TE tampon çözeltisi içinde çözündürülmüştür.

Genomik DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra örnekler % 1'lik agaroz jelinde kontrol edilmiş ve jelin UV görüntüleme sisteminde fotoğrafı çekilmiştir. Her bir kuyuya 9 µl DNA örneği + 1 µl DNA yükleme tamponu (DNA loading buffer) ilave edilmiştir. (Şekil 1). Bazı örneklerde elde edilen DNA konsantrasyonu yüksek olduğu için jele daha az miktarda örnek yüklemek yeterli bulunmuştur. Bu nedenle agaroz jelinde 16. kuyuya 3 µl DNA + 1 µl DNA yükleme tamponu yüklenmiştir.

Çalışmada kullanılan yöntemlere göre elde edilen genomik DNA konsantrasyonu ve saflık derecelerine ilişkin ortalamalar t-testi ile karşılaştırılarak aralarındaki farkın istatistik olarak önemli olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Bulgular

Çalışmada ele alınan her iki yöntemle DNA izolasyonu yapıldıktan sonra örneklerin UV spektrofotometre'de 260 ve 280 nm dalga boylarında absorban değerleri ölçülmüş ve DNA miktarları ile saflık dereceleri saptanmıştır.

Fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen örneklerin UV Spektrofotometre'de okunan değerlerine göre ortalama DNA konsantrasyonu 2406±322 µg/ml ve ortalama A_{260}/A_{280} oranı 1.816± 0.038 olarak bulunmuştur.

Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen örneklerin UV Spektrofotometre'de okunan değerlerine göre ortalama DNA konsantrasyonu 590.0±54.9 µg/ml ve ortalama A_{260}/A_{280} oranı 1.311±0.012 olarak bulunmuştur. Bu oranlar, genomik DNA'larda protein kontaminasyonu olduğunu göstermekte ve DNA'ların çok saf olmadığını ifade etmektedir.

Fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen genomik DNA örnekleri, %1.0'lik agaroz jelinde yatay elektroforeze tabi tutulmuş ve UV görüntüleme sisteminde jelin fotoğrafı çekilmiştir. Genomik DNA'nın beklediği üzere tek bant oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 1).

Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen genomik DNA miktarı az olduğu için agaroz jelinde görüntü alınamamıştır. Çeşitli araştırmacılar Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemi ile genomik DNA'yı izole ettikten sonra, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile genomik DNA'nın üzerinde durulan hedef bölgelerini başarıyla çoğaltmışlar ve çoğalttıkları bu DNA parçacıklarını agaroz jelinde görüntülediklerini bildirmişler (Singer-Sam ve ark. 1989, Amills ve ark. 1997).

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada fenol-kloroform ve Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemleri ile genomik DNA elde etme ve her iki yöntemle elde edilen DNA'ların miktar ve saflık derecesi bakımından karşılaştırılması ele alınmıştır.

Fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen genomik DNA'nın miktarı ve saflık derecesi bu konuda çalışan araştırmacıların bildirdiği sonuçlara benzerdir (Sambrook ve ark. 1989, Lipkin ve ark. 1993). Gen klonlanması ya da PCR'a dayanan RAPD, RFLP, AFLP, SSR ve microsatellite gibi moleküler marker analizi çalışmalarında DNA saflık derecesi için A_{260}/A_{280} oranının 1.8–2.0 arasında olması istenmektedir (Miller ve ark. 1988, Sambrook ve ark. 1989). Bu çalışmada elde edilen ortalama saflık derecesi (1.816±0.038) literatürde bildirilen ideal saflık derecesi (1.8–2.0) ile karşılaştırılmış ve istatistik olarak önemli bir fark bulunamamıştır. Dolayısıyla fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile bu çalışmada bulunan DNA saflık derecesinin ideal olduğu söylenebilir. Ancak fenol-kloroform ekstraksiyon yönteminin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Fenol oldukça zehirli ve aşındırıcı bir maddedir. Dolayısıyla laboratuvar ortamında fenolle çalışırken oldukça dikkatli olunması gerekmektedir. Ayrıca bu çalışmada uygulanan fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi üç gün süren, uzun bir yöntemdir ve ekstraksiyon



Şekil 1. Fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen genomik DNA ve 1 kb DNA Ladder'ın % 1.0'lik agaroz jelindeki görünümü. 1. kuyuda 1 kb DNA Ladder (Sigma D 0428) bulunmaktadır

aşamalarında çok sayıda tüp transferleri yapılmaktadır. Bu durum fazla sayıda DNA örneği ile çalışılırken problem yaratmaktadır. Bu gibi zorluklarının yanında fenol-kloroform ekstraksiyon yönteminde fazla miktarda ve saf DNA elde edildiği için günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemine alternatif olarak Chelex® 100 kullanımına dayanan yeni bir yöntem de denenmiştir. Bu yöntemin uygulanması oldukça kolaydır, 1-2 saat içinde DNA izolasyonu yapılabilmekte ve izolasyonda zehirli maddeler ile çalışılmamaktadır. Ancak bu çalışmada elde edilen genomik DNA'nın miktarı ve saflık derecesi bu konuda çalışan araştırmacıların bildirdiklerine benzer şekilde oldukça düşük bulunmuştur (Walsh ve ark. 1991, Yükseloğlu 1996). Araştırmacılar Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemi ile DNA saflaştırması yaptıktan sonra bu DNA preperasyonlarının PCR için uygunluğunu test etmek amacıyla çeşitli lokusları çoğaltmışlar ve PCR'da yaklaşık 45-65 döngü sonunda bütün hedef DNA'ların çoğaltıldığını bildirmişlerdir. Bu sonuçla PCR'la DNA düzeyinde polimorfizm araştırmalarında, Chelex® 100 ekstraksiyon metodunun kullanılabilirliğini ve çeşitli ekonomik özellikler ile aralarında ilişkiler kurulabileceğini bildirmişlerdir (Amills ve ark. 1997).

Bu çalışmada UV Spektrofotometre'de okunan sonuçlara göre Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen genomik DNA'nın ortalama saflık derecesi 1.311 ± 0.012 , fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ortalama saflık derecesi 1.816 ± 0.038 ile karşılaştırılmış ve aralarında istatistik olarak önemli fark bulunmuştur. Dolayısıyla Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen genomik DNA'ların çok saf olmadığı söylenebilir. Ancak bu saflıktaki genomik DNA'ların ebeveyn analizleri ve babalık testlerine ilişkin DNA tiplendirme çalışmalarında kullanılabilirlikleri bildirilmektedir. Bu tip çalışmalarda kullanılacak genomik DNA'ların saflık derecelerinin 1.2-1.8 arasında olması istenmektedir (Walsh ve ark. 1991, Yükseloğlu 1996, Cerit ve Demir 1999). Ancak AFLP, RFLP, RAPD gibi çalışmalarda daha saf DNA örnekleri ile çalışılması gerektiğinden Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemi, bu tip analizler için önerilmemektedir. Ayrıca Chelex® 100 ekstraksiyonu sırasında örnekler 100°C ısıya maruz bırakıldıklarından, DNA örnekleri denatüre olabilmektedir. Bundan dolayı Chelex® 100 ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen DNA örneklerinin RFLP analizleri için uygun olmayacağı bildirilmektedir (Singer-Sam ve ark. 1989, Walsh ve ark. 1991).

Genomik DNA izolasyonu için hangi yöntemin kullanılacağı, doğrudan DNA izolasyonundan sonra elde edilen genomik DNA'nın hangi amaç ve/veya amaçlar için kullanılacağına bağlıdır. Uygun genomik DNA izolasyon yöntemlerini belirlemek için laboratuvar koşulları ve kullanılan kimyasal maddeler de dikkate alınmalıdır. Ayrıca elde edilen genomik DNA'nın miktarı ve saflık derecesi de DNA izolasyon yöntemini belirlemede önemli parametrelerdir. Bu nedenle araştırmacılar daha sonra yapılacak olan çalışmalar temelinde hangi yöntemi kullanacaklarına karar vermelidirler.

Kaynaklar

- Amills, M., O. Francino, M. Jansa and A. Sanchez, 1997. Isolation of genomic DNA from milk samples by using Chelex® resin. *Journal of Dairy Research*, 64: 231-238.
- Brown, T. A. 1991. *Essential Molecular Biology Vol: 1 A Practical Approach*. Oxford University Press, p.47-68. New York.
- Cerit, H., H. Demir, 1999. Sığırlarda kan hücrelerinden DNA ekstraksiyonu için Chelex® 100'ün kullanım olanakları. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.* 25 (2): 239-244.
- Chrispeels, M. J. 1973. *Molecular techniques and approaches in developmental biology*. California University Press, p.128-150. USA.
- Ciulla, T. A., R. M. Sklar and S. L. Hauser, 1988. A simple method for DNA purification from peripheral blood. *Analytical Biochemistry*, 174: 485-488.
- De, S., R. K. Singh, P. K. Gupta, S. Palia and G. Butchaiah, 2000. Genotyping of dairy animals using DNA from milk somatic cells. *Indian Journal of Animal Sciences*, 70 (9): 944-946.
- Goossens, M., Y. Kan, 1981. DNA Analysis in the diagnosis of hemoglobin disorders. *Methods in Enzymology*, Vol: 76.
- Jeanpierre, M. 1987. A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Research*, 15 (22): 9611.
- Johns, M. B., J. E. Paulus-Thomas, 1989. Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol. *Analytical Biochemistry*, 180: 276-278.
- Lipkin, E., A. Shalom, H. Khatib, M. Soller and A. Friedmann, 1993. Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Sci.*, 76: 2025-2032.
- Kehrli, M. E., D. E. Shuster, 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 77: 619-627.
- Miller, S. A., D. D. Dykes and H. F. Polesky, 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16 (3): 1215.
- Montgomery, G. W., J. A. Sise, 1990. Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 33: 437-441.
- Mullenbach, R., P. J. L. Lagoda and C. Welter, 1989. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trends in Genetics*, 5 (12): 391.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual Appendixes 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.6.4-6.20 USA.
- Silhavy, T. J., M. L. Berman and L. W. Enquist, 1984. *Experiments with Gene Fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 301, p.177-183. USA.
- Singer-Sam, J., R. L. Tanguay and A. D. Riggs, 1989. Use of chelex to improve the PCR signal from a small number of cell. *Amplifications A Forum for PCR Users*, 3: 11.

Walsh, P. S., D. A. Metzger and R. Higuchi, 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10 (4): 506-513.

Yükseloğlu, E. H. 1996. HLA – DQA1 Lokusunun Polimeraz Zincir Tepkimesine (PCR) Dayanan 2 Farklı Teknik ile Tiplenmesinin Adli Bilimler Açısından Deđerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış), İstanbul Üniv. Adli Tıp Enstitüsü.

İletişim adresi:

Fulya ÖZDİL
Ankara Üniv. Ziraat Fak. Zootečni Bölümü-Ankara
Tel: 0 312 317 05 50/1502
e-mail: fulyaozdil@hotmail.com