

## RFLP Yönteminin Parazitolojide Uygulama Alanları

Zeynep KOLÖREN<sup>1\*</sup> , Elif ÇİL<sup>2</sup> , Emine AYAZI<sup>1</sup> , Ülkü KARAMAN<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Ordu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ordu

<sup>2</sup>Ordu Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilgisi Eğitimi Bölümü, Ordu

<sup>3</sup>Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Ordu

(Geliş Tarihi/Recived Date: 14.04.2017; Kabul Tarihi/Accepted Date: 19.09.2017)

### Öz

Restriksiyon endonükleazlar, çift iplikli kısa DNA dizilerini özgül bölgelerden keserek hedef gen bölgesinin çıkartılmasını sağlayan multifonksiyonel enzimlerdir. Moleküler makaslar olarak da bilinen bu enzimler tip-I, tip-II, tip-III ve homing endonükleazlar olmak üzere dört genel grupta incelenir. Bugün kullanılan enzimlerin çoğu tam hedef bölgeden kesim yapabilen ve özellikle klonlama çalışmalarında tercih edilen tip-II endonükleazlardır.

RFLP tekniği ise restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA molekülünün farklı büyüklükteki fragmentlere ayrılması ve görüntülenmesi işlemidir. Rekombinat DNA elde edilmesinde, restriksiyon haritalarının oluşturulmasında, popülasyon polimorfizmlerinin belirlenmesinde ve genetik hastalıkların teşhisinde yaygın olarak kullanılan popüler bir yöntemdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, protozoonların tanısında ve tür ayrımında da basit, hızlı ve güvenilir bir teknik olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmeye başlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** RFLP yöntemi, Parazitoloji, Restriksiyon endonükleazlar

## The Application Fields in Parasitology of RFLP Technique

### Abstract

Restriction endonucleases which cut the short double-stranded DNA sequence at their specific regions and remove the target genes from these regions are multifunctional enzymes. These enzymes also known as molecular scissors are examined including four general groups such as type I, type II, type III and homing endonuclease. Tip-II endonucleases that fully capable of cutting from the target zone are the most preferred enzymes in especially cloning studies. RFLP technique is the process for separation of different-sized fragment DNA molecule by using restriction enzymes. This technique is a popular method widely used for obtaining recombinant DNA, the creation of restriction map, identification of population polymorphism, the diagnosis of genetic diseases. In recent studies, this technique often has been preferred for diagnosis of protozoa and differentiation of species due to simple, fast and reliable a technique.

**Keywords:** RFLP technique, Parasitology, Restriction endonucleases

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: zeynep.koloren@yahoo.com

## Giriş

Restriksiyon endonükleazlar, çift iplikli kısa DNA dizilerini özgül bölgelerden tanıyan ve bu dizimler içindeki spesifik bölgelerden keserek, DNA'dan bir genin veya gen taşıyan DNA dizisinin çıkarılmasında etkin rol alan enzimlerdir (Bulut ve Doymaz 2001; Eroğlu 2008).

Büyük bir kısmı bakterilerden izole edilen bu enzimlere ait genlerin, kromozom veya plazmid DNA'sı üzerindeki modifikasyon genleri ile birlikte bulunması nedeniyle oluşan sistem restriksiyon modifikasyon sistemi olarak adlandırılmaktadır. Bakterilerin kendilerini yabancı DNA'dan korumak için kullandığı bu sistem; yabancı DNA'yı özgül bölgelerden kesen restriksiyon enzimleri ve kendi genomunun kesilmemesi için ona metil grupları ekleyen metilaz enzimlerinden oluşmaktadır (Murray 2000; Özcel 2009).

Bu metilasyon sitozin ve adenin üzerinde 4-metilsitozin, 5-metilsitozin, 5-hidroksimetilsitozin veya 6-metiladenin şeklinde olmaktadır (Bulut & Doymaz 2001). Bilinen bakterilerin yaklaşık yarısının restriksiyon modifikasyon sistemi vardır (Demirbağ 2008).

Arber ve Dussoix (1965) çalışmalarında, konak-kontrol restriksiyon modifikasyonunu açıklayabilmek için geliştirdikleri moleküler bir metotla, bazı bakteriyel suşların DNA'yı kesebilen endonükleazlara ve bu arada kendi DNA'larını koruyabilmek için, suş-spesifik modifikasyon sistemine sahip olduklarını ortaya koymuşlardır. İlk olarak, Arber ve Linn (1968) tarafından *EcoB* restriksiyon endonükleazların nükleaz aktivitesi gösterilmiştir. Aynı yıl Meselson ve Yuan *E. coli* K'da benzer bir enzimi elde etmişler ve daha sonraki yıllarda, bu enzimlerin tipI restriksiyon endonükleazlar belirlemiştir. 1970'de Smith ve arkadaşları 1970'de *HindII*'yi saflaştırıp, kesim ve tanıma bölgelerini karakterize etmişlerdir. Bu tarihten sonra pek çok restriksiyon enzimi saf olarak elde edilmiştir (Bulut & Doymaz 2001; Murray 2000; Özcel 2009).

## İsmlendirme

1970'li yıllardan bu yana çeşitli bakterilerden elde edilen binlerce restriksiyon enzimi, Smith ve Nathans tarafından belirlenen basit bir sisteme bağlı olarak isimlendirilir. Bu sisteme göre; önce enzimin elde edildiği bakteri cinsinin ilk harfi, daha sonra bakteri türünün ilk iki harfi ve son olarak da soya ait bir harfle ilk izolasyondan başlayarak romen rakamı ile enzimin izolasyon sırası belirlenip adlandırılma yapılmaktadır. Enzimlerin isimleri, yalnızca enzimlerin orijinleri hakkında bilgi vermekte, kestiği dizilimler hakkında bilgi sağlamamaktadır (Demirbağ 2008). Restriksiyon endonükleazların isimlendirilmesi **Tablo 1.**'de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.** Restriksiyon endonükleazların isimlendirilmesi

<i>EcoRI</i> adının türetilmesi		
<i>E</i>	Cins (genus)	<i>Escherichia</i>
<i>co</i>	Tür (species)	<i>coli</i>
R	İrk (strain)	RY 13
I	Bu türden elde edilen ilk restriksiyon enzimi	

### Sınıflandırma

Restriksiyon endonükleazlar; metilaz aktivitelere, alt ünite yapılarına, kesim özgüllüklerine ve kofaktör ihtiyaçlarına göre tip I, tip II, tip III ve homing endonükleazlar olmak üzere 4 genel grupta sınıflandırılırlar. Hepsi ayrı ayrı hem restriksiyon (kesme) hem de modifikasyon (metilasyon) aktivitesi gösterebilen multifonksiyonel (iki fonksiyonlu) enzimlerdir (Demirbağ 2008).

Tip I ve tip III restriksiyon endonükleazlar, tanıma sekanslarına bağlanmalarına rağmen, kesimlerini sekans dışında gerçekleştirmektedir. Bunun sonucu olarak da tesadüfi kesme motifleri oluşturduklarından gen klonlama çalışmaları için kullanışlı değildirler. Tip II restriksiyon endonükleazlar ise genomda iki yönlü simetri oluşturan palindromik dizileri tanıyan ve bu dizilimler içindeki özel bölgelerden kesim yapan homodimerik enzim grubudur. Tam hedef bölgeden kesim yapabilme özellikleri nedeniyle de gen klonlama ve moleküler biyoloji çalışmaları için kullanılan ve izole edilen restriksiyon endonükleazların büyük bir çoğunluğu bu grupta yer almaktadır. Ayrıca tip II endonükleazlar, DNA dizisi üzerinde meydana getirdikleri kesim sonucu 5' ve 3' yönlerinde oluşan uçların motiflerine göre kabaca iki alt gruba ayrılmaktadır. Bunlardan *EcoRI* ve *BamHI* gibi enzimler bağlandıkları dizi üzerinde asimetric (zigzaglı) kesim yapabilirler. Asimetric kesim sonucunda oluşan tek zincirli komplementer uçlar ile aynı tanıma dizisine sahip farklı DNA fragmenti üzerinde oluşan tek zincirli komplementer uçlar birbirlerine hidrojen bağı ile bağlanabildiğinden bunlara yapışkan (sarkık/kohesif) uçlar denir. Yapışkan uç oluşturan enzimlerin ligasyon yeteneği oldukça yüksek olduğu için klonlama çalışmalarında daha fazla tercih edilmektedir. *SmaI* ve *EcoRV* gibi diğer tip II endonükleazlar ise bağlandıkları çift zincirli dizi üzerinde simetric kesim yaparak küt (blunt) uçların meydana gelmesine sebep olmaktadır. Bunun sonucu olarak da DNA'nın kesilen uçlarında komplementer dizi bulunmadığından ligasyon yeteneği oldukça düşüktür ve klonlama çalışmaları için tercih edilmemektedirler. Homing endonükleazlar ise diğer endonükleazlardan farklı olarak daha az tanıma özgüllüğü

göstermekte ve tanıma bölgelerindeki tek baz değişimini tolere edebilmektedirler (Bulut & Doymaz 2001; Demirbağ 2008; Allison 2014).

## Genel bilgiler

DNA tanıma bölgesi ve katalitik alan olmak üzere iki fonksiyonel alt birimden oluşan restriksiyon endonükleazlar, çift zincirli DNA'ya tanıma bölgelerinden bağlanabildikleri gibi tanıma bölgelerinin dışında bir yere gevşek bir şekilde de bağlanabilmektedirler. Tanıma sekansı dışında bağlanma gösteren enzimler çizgisel DNA boyunca kayma hareketi gösterirken DNA ile enzim arasında meydana gelen boşlukları su molekülleri doldurmaktadır. DNA tanıma bölgesi spesifik bağlanma bölgesini bulduğu zaman katalitik alanı buraya sıkıca yerleştirmekte ve su molekülleri uzaklaştırılmaktadır. Tanıma sekansına yerleşen katalitik alanın heliksin fosfodiester bağlarını kırmasıyla ortamda oluşan ısı hareketinden doğan enerjiyle de hidrojen bağları kendiliğinden kırılmakta ve endonükleaz aktivitesi ile zincir kesilmektedir (Allison 2014).

## Restriksiyon Endonükleaz Enzimlerinin Reaksiyon Şartları

Enzimler uzun süre saklanırken yada çalışma sırasında her enzim için aynı olmayan optimal şartlara ihtiyaç duymaktadır. Restriksiyon endonükleazların başarısını etkileyen bu önemli parametrelere, pH, Mg<sup>2+</sup>, metal iyonlarının varlığı (Mn<sup>2+</sup>), BSA, gliserol ve etanol gibi maddelerin bulunması ve kesilen DNA ile enzim arasındaki ilişkiler örnek olarak verilebilir. Ayrıca çoğu enzim maksimum aktivitesini 37°C de gösterirken bazı enzimler daha düşük ya da daha yüksek sıcaklıkta aktivite göstermektedir. Bu durum genellikle enzimlerin izole edildikleri bakterilerin üreme özellikleri ile ilgilidir (Demirbağ 2008).

## RFLP Nedir?

Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA molekülünün farklı büyüklükteki fragmentlere ayrılması ve elde edilen DNA parçalarının jel elektroforez tekniği ile görüntülenmesi işlemi RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism/Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) olarak adlandırılır. İlk restriksiyon haritası Simian Virüs 40 (SV40) DNA'sının *HindIII* enzimi ile kesilmesi sonucu oluşturulmuş ve analiz sonucunda elde edilen 11 özgül parça sayesinde virüs DNA'sı üzerinde biyolojik öneme sahip bölgeler belirlenebilmiştir. Bu çalışma ile birlikte RFLP tekniği ökaryotik hücre genom analizlerinde ve birçok genetik hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Klug et al 2011; Özerdem 2009; Yağcı 2001).

RFLP tekniği uygulaması kolay bir yöntem olmasına rağmen çalışılan gen bölgesine uygun enzimin seçilmesi çok önemli bir basamaktır. Çalışılan bölgeye uygun olmayan enzim kullanıldığında çok sayıda ya da birbirine çok yakın bantlar görülebilir. Bu durumda da meydana gelen bantların sayısı ve büyüklükleri arasında kıyaslama yapmak ve değerlendirmek mümkün olmayabilir. Bu amaçla, çalışılan organizmaya göre elde

edilen PZR ürünlerini belirli bölgelerden kesen enzimlere, restriksiyon enzimlerine ait bilgilerin değerlendirilmesinde kullanılan birçok program mevcuttur. Örneğin, pDRAW32 programı kullanılarak amplifiye edilmesi düşünülen bölgenin baz dizilimi bu programa yapıştirılarak enzimlerin hedef gen bölgesini kesip kesmedikleri kontrol edilebilir. Böylece seçilen organizmaya ait hedef gen bölgesinde kullanılacak restriksiyon enziminin seçiminde yapılacak hata azaltılmış olur. Her bir test için mutlaka pozitif ve negatif kontroller kullanılmalıdır. RFLP tekniği uygulandıktan sonra elde edilen ürünler baz uzunluğuna uygun por çapına sahip agaroz jele yüklenip, ethidium bromidle boyandıktan sonra jel elektroforezde yürütülerek, UV ışık altında görüntülenmektedir. Elde edilen RFLP ürünleri -20°C'de kullanılıncaya kadar saklanabilmektedir.

### **Restriksiyon Endonükleazlar Nerelerde Kullanılır?**

Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin 1970'li yıllarda kullanılmaya başlanmasıyla birlikte Rekombinant DNA teknolojisinin ilk adımları atılmıştır. Rekombinant DNA, doğada kendiliğinden oluşması mümkün olmayan farklı türlerden elde edilen DNA moleküllerinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonucunda elde edilen DNA fragmentlerinin DNA ligaz enzimi ile birleştirilmesi sonucunda üretilen yeni DNA molekülüdür. Özellikle klonlama çalışmalarında sıklıkla kullanılan bu yöntem sayesinde seçilen hedef gen bölgesinin çoğaltılması, genin kodladığı proteinin üretilmesi ve DNA sekansının belirlenmesi mümkün kılınmıştır (Campell et al 2010; Yağcı 2001).

Rekombinant DNA molekülü elde edebilmek için önce, doku ya da hücrelerden izole edilen DNA molekülü üzerinde istenilen özelliklere sahip gen bölgesi belirlenmektedir. Daha sonra türe özgü kesici enzimler kullanılarak bu hedef gen bölgesi kesilip DNA fragmentleri elde edilmektedir. Aynı restriksiyon enzimi ile kesilen farklı türe ait DNA fragmentleri ile hedef gen bölgesini taşıyan DNA fragmentleri invitro ortamda DNA ligaz enzimi yardımıyla birleştirilerek rekombinant DNA molekülü elde edilmektedir. İstenilen özelliklere sahip bu rekombinant DNA molekülü vektör olarak adlandırılan diğer DNA moleküllerine eklenerek konak hücreye sokulmaktadır. İstenilen özelliklere sahip bu vektör DNA konak hücrede, konak genomunun replikasyonundan bağımsız olarak replike olabilmektedirler. Böylece yeni oluşturulan rekombinant DNA molekülleri konak hücre içinde klon adı verilen özdeş kopyalar halinde üretilmektedir (Allison 2014; Campell et al 2010).

Restriksiyon haritası, klonlanmış bir DNA parçası üzerindeki restriksiyon enzimi kesim bölgelerinin sayısını, sıralanışını ve aralarındaki uzaklıklar hakkında bilgi sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Yağcı 2001). Klonlanmış DNA molekülü içeren karışıma restriksiyon enzimleri eklenerek DNA dizisinin küçük parçalara ayrılması sağlanır ve daha sonra elde edilen restriksiyon parçaları jel elektroforezi ile büyüklüklerine göre ayrıştırılır. Jelde görüntülenen bantların sayısı ve uzunluklarına göre teorik modeller oluşturulur. Bu modeller oluşturulurken klonlanmış DNA molekülü restriksiyon enzimleri ile tek tek ve iki enzim ile birlikte kesilerek oluşturulur. Modeller çift enzim kesim sonuçlarına göre test edilir ve tahmini parçaların büyüklükleri ile jelde görüntülenen parçaların büyüklükleri karşılaştırılarak yorum yapılır. Bu sayede harita

boyunca farklı uzunluklara sahip DNA fragmentlerinin arasındaki uzaklıklar ölçülebilir (Allison 2014; Yağcı 2001).

Bu haritalar sayesinde DNA'nın kodlanmayan bölgelerinde görülen polimorfizmler belirlenebilmektedir. Bazen bir polimorfizm restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim bölgelerinde meydana gelmekte ve enzimin tanıdığı palindromik diziyi bozmaktadır. Böylece restriksiyon endonükleazın tanıma dizisinde meydana gelebilecek mutasyonal bir değişim, verilen baz çifti bölgesinin kesilmesini önleyecektir. Örneğin: GAATTC tanıma dizisi *EcoRI* tarafından kesilir ama GTATTC kesilmez. Polimorfik bölge, palindromik diziyi bozduğu için tanıma sekansına bağlanamayan enzim kesim yapamaz ve DNA parçasının uzunluğu kesilen fragmentlere göre büyük olur. Bu büyük DNA parçası meydana gelen mutasyonu tespit etmede kullanılır (Allison 2014; Çimen 2010).

RFLP tek nokta mutasyonu gibi genetik hastalıkların tanısında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Nükleotit dizisinde herhangi bir nokta mutasyonları ile meydana gelen restriksiyon tanıma noktalarındaki değişikliği bu yöntemle tespit etmek mümkündür. Hedef gen bölgesi üzerinde mutasyona uğramış nükleotit dizisi uygun primerler kullanılarak PZR reaksiyonu ile amplifiye edilir ve daha sonra mutasyonlu bölgeyi kesebilecek bir enzim seçilerek değerlendirme yapılmaktadır. Örneğin: Orak hücre anemisi hastalarında, hemoglobinin bir polipeptit zincirini sentezleyen  $\beta$ -globin geninde meydana gelen bir nokta mutasyonu (GAG→GTG) sonucunda gendeki *MstII* enziminin tanıma bölgesinden birinin dizisi bozulmaktadır. Kalıp DNA zincir üzerindeki tek bir nükleotiddeki değişime anormal protein üretilmesine neden olmaktadır. Hasta bireyin genomik DNA'sı *MstII* enzimi ile kesildiğinde 1,35 kb'lık DNA fragmenti oluştururken, normal bireylerin genomik DNA'sı 1,15 kb'lık DNA fragmenti oluşturmaktadır (Allison 2014, Yağcı 2001).

### **RFLP Tekniği Kullanılarak Parazitoloji Alanında Yapılan Bazı Örnek Çalışmalar**

*Nosema* türlerinin belirlenmesi için yapılan çalışmada türe özgü primerler kullanarak çoğaltılan 16S rRNA'nın 400 bp'lik bölgesine *PacI*, *NdeI* ve *MspI* restriksiyon enzimlerini kullanarak PZR-RFLP tekniğini uygulanmıştır. Sonuç olarak; *PacI* enziminin sadece *N. ceranae*'nin, *NdeI* enziminin sadece *N. apis*'in, *MspI* enziminin ise *N. ceranae*, *N. apis* ve *N. bombi*'nin elde edilen PZR ürünlerini kestiği ve PZR-RFLP tekniğinin *Nosema* türlerinin sebep olduğu hastalıkların teşhisinde ve hastalığa neden olan türlerin ayırımında, oldukça hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu tespit edilmiştir (Klee et al 2007).

Brezilya'nın Sao Paulo eyaletinde serebral toxoplazmosisli AIDS hastalarında multilokus PZR-RFLP markırları kullanılarak *Toxoplasma gondii*'nin varlığı araştırılmıştır. Serolojik yöntemlerle pozitif 87 serebral toxoplazmosis tanısı konulan örneklerde 4 hedef gen (5'-SAG2→*Sau3AI*, 3'-SAG2 →*HhaI*, SAG3 →*NciI*, GRA6 →*MseI*) seçilerek PZR ile çoğaltılmış ve restriksiyon enzimleriyle kesime tabi tutulmuştur. Yapılan incelemeler sonucunda 4(%4) hasta *Toxoplasma* tip-I, 13(%15) hasta tip-III ve 6 hastanın ise *Toxoplasma* tip-I ve tip-II tarafından enfekte edildiği tespit edilmiştir (Ferreira et al 2008).

Moğalistan Tuv-aimak bölgesinde *Cryptosporidium* ookistleri varlığı açısından 460 örnek IFT metodu ile incelenmiştir. Sığırlarda 116 *Cryptosporidium* ookisti bulunduğudur. IFT ile pozitif bulunan 116 örneğin, 47'si IMS yöntemiyle saflaştırılmış ve 11 tanesi PZR ile pozitif olarak bulunmuştur. SSU rRNA gen bölgesinde Nested PZR ile çoğaltılmış ve elde edilen PZR ürünleri *VspI*, *SspI* ve *MboII* enzimleri kullanılarak kesilmiştir. Örneklerin sekans analizinde iki örnekte yaygın enfeksiyon *C. bovis* ve *C. andersoni* varlığını göstermiştir. Koyun ve keçilerden toplanan dışkı örneklerinin hiçbirinde *Cryptosporidium* ookisti bulunmamıştır (Burenbaatar et al 2008).

Singapur'da çeşitli hastanelerden alınan ve 276 fekal örnekte *Blastocystis* tanısı konulan izolatlar arasındaki alt tip-3'ün varlığı araştırılmıştır. İki farklı primer seti ile 18S rRNA gen bölgesi çoğaltılmıştır. *AluI*, *HindI* ve *RsaI* enzimleri kullanılarak kesim yapılmış, %3'lük agarda yürütülerek görüntülenmiştir. 276 örnekten 9 örneğin (%3.3) *Blastocystis* ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. Pozitif sonuç veren 9 örneğin 7'sinin alt tip-I, 2'sinin alt tip-II, alt tip-III 'ün ise baskın genotip olduğu belirlenmiştir (Wong et al 2008).

Güneybatı Nijerya'daki 4 beyaz Fulani sürüsünden rastgele seçilmiş 12-24 haftalık 4 ishalleri buzağında *Cryptosporidium* spp.'nin varlığını tespit etmek için SSU rRNA gen bölgesine PZR ve RFLP analizleri yapılmıştır. Örneklerin 34 tanesi (%52.3) *Cryptosporidium* için pozitif sonuç vermiştir. PZR ürünlerinin RFLP analizleri sonucunda, *SspI* ve *MboII* enzimleri kullanılarak 18 örnek (%27.7) *C. bovis*, 5 örnek *C. ryanae* için pozitif sonuç vermiştir (Ayinmode et al 2010).

Brezilya, Sao Paulo eyaletinde köpeklerden toplanan 300 fekal örnek mikroskopik olarak incelendikten sonra pozitif örneklere DNA izolasyonu yapılmıştır. SSU-rDNA ve *GDH* gen bölgeleri PZR ile çoğaltılmış ve elde edilen PZR ürünleri *NlaIV* enzimi ile kesime tabi tutulmuştur. PZR tekniğiyle pozitif olarak bulunan 36 örneğin 20 tanesi *Giardia duodenalis* grup A, 11 tanesi grup D, 5 tanesi de grup C-D karışık kombinasyonlarında bulunmuştur (Silva et al 2012).

Batı Fransa' da henüz süttten kesilmemiş 2-21 aylık buzağılardan *Cryptosporidium* türlerini genetik karakterizasyonu belirlemek için 182 fekal örnek toplanmıştır. DNA izolasyonları yapıldıktan sonra 18S rRNA geni PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. PZR ürünleri *SspI* ve *MboII* enzimleri ile kesilerek *Cryptosporidium* türlerini genetik karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 84 pozitif örneğin 61'i RFLP analizi ile başarılı bir şekilde genotiplendirilmiştir. Bunlardan 14 tanesi *C. parvum*, 15 örnek *C. bovis*, 22 örnek *C. ryanae*, 10 örnekte ise *C. bovis* ve *C. parvum* karışık kombinasyonlarda tespit edilmiştir (Rieux et al 2013).

Morfolojik olarak ayırt edilemeyen 3 farklı *Entamoeba* türünün (*E. histolytica*, *E. dispar* ve *E. moshkovskii*) teşhis edilmesinde PZR-RFLP yöntemi kullanılarak türler arasındaki farklılık gösterilmiştir. *E. dispar* (Accession# AB282661), *E. histolytica* (NCBI Accession# AB608092) ve *E. moshkovskii* (Accession# AF149906) numaralı 18S rRNA gen bölgeleri (867 bp) PZR tekniği ile çoğaltılarak *DdeI* ve *HinfI* enzimleriyle kesime tabi tutulmuştur. Bu çalışma sayesinde amebiazise neden olan *E.*

*histolytica* türünün doğru teşhis edilmesinde PZR-RFLP tekniğinin yararlı olabileceği tespit edilmiştir (Fontecha et al 2015).

İran'da yapılan bir çalışmada, çocuklarda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun varlığını belirlemek için 12 yaşından küçük diyareli çocuklardan toplanan dışkı örnekleri asit-fast boyama yöntemiyle incelenmiş ve pozitif örnekler DNA izolasyonu uygulanmıştır. Daha sonra TRAP-C2 geni türe özgül primerler kullanılarak Nested PZR yöntemiyle çoğaltılmış 12 örnek pozitif olarak tespit edilmiştir. Elde edilen ürünlere (266-366 bç) *BstEII* ve *HaeIII* enzimleri kullanılarak RFLP tekniği uygulanmıştır. Nested-PZR amplifikasyonu sonucunda pozitif bulunan 12 örneğinin 10 tanesi *C. parvum* (%83.3), 1 tanesi *C. hominis* (%8.3) ve 1 izolatta miks enfeksiyon olduğu görülmüştür (Mojarad et al 2011).

İzmir'de tıp fakültesine başvuran hastalarda *Cryptosporidium* spp.'nin belirlenmesi ve tür ayrımının yapılması için 162 ishali dışkı örneğinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Kinyoun asit-fast yöntemiyle pozitif olarak belirlenen 18 örneğin 15'i PZR yöntemi ile de pozitif olarak bulunmuştur. Boyama yöntemiyle pozitif saptanmayan 144 örneğin 6'sı ise PZR ile pozitif sonuç vermiştir. Daha sonra COWP gen bölgesine ait PZR ürünlerinin *RsaI* enzimiyle kesilimi sonucunda 1 örnek *Cryptosporidium meleagridis*, 20 örnek ise *Cryptosporidium parvum* olarak tespit edilmiştir (Usluca & Aksoy 2011). Manisa'da yapılan bir çalışmada *Giardia lamblia* izolatlarına ait gen bölgesi PZR-RFLP tekniği ve sekans analizi ile araştırılmış ve saptanan genotipler ile hastalardaki klinik semptomlar arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Hastalardan elde edilen 63 DNA örneğinin 54'üne *Xho I* restriksiyon enzimi kullanılarak RFLP analizi uygulanmış ve 54 örneğin 38'inin (%70.37) A, 16'sının ise (%29.63) B genotipine ait olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak *G. lamblia*'ya ait *Tpi* gen bölgesi üzerinde A ve B (B1 ve B) genotiplerine özgü bölgeler tespit edilmiştir (Balcıoğlu et al 2012).

Kars yöresinde *Cryptosporidium parvum* subtiplerini belirlemek için yapılan bir çalışmada, sığırlardan elde edilen 13 adet (10'u buzağı, 3'ü inek) *C. parvum* izolatına DNA izolasyonu yapılmıştır. Primer ve sekonder PZR ile GP60 gen bölgesi çoğaltılmış ve sekonder PZR ürünleri *SspI*, *VspI* ve *MboII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek RFLP analizi uygulanmıştır. Daha sonra sekans analizi yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara göre; *Cryptosporidium parvum*'un IIA (12/13) ve IID (1/13) subtip familyası ile IIA15G2R1 (10/13), IIA16G3R1 (2/13) ve IID15G1 (1/13) subtipleri tespit edilmiştir. Buzağılarda *C. parvum* IIA15G2R1 (9/10), IIA16G3R1 (1/10), ineklerde *C. parvum* IIA16G3R1 (2/3) ve IID15G1 (1/3) subtipleri belirlenmiştir. İshali buzağılarda *C. parvum* IIA subtip familyası (8/8) ve IIA15G2R1 (7/8) subtipi yaygın olarak saptanmıştır. Sonuç olarak Türkiye'de sığırlarda *C. parvum* subtipleri ilk defa bu çalışma ile bildirilmiştir (Arslan & İtik Ekinci 2012).

Ankara'da yapılan bir olgu sunumunda *Leishmania infantum*'un varlığını tespit etmek için 64 yaşındaki erkek hastanın parmağında görülen yara dokusundan alınan materyal Giemsa ile boyanarak incelenmiştir. NNN besiyerinde *Leishmania* promastigotları üretilmiş ve DNA izolasyonu yapılmıştır. Türe özgül primerler kullanılarak PZR yöntemiyle çoğaltılan 420 bç bölgeye RFLP tekniği uygulanmış ve hastalık etkeninin etken *L. infantum* olduğu tespit edilmiştir (Dinçer et al 2012).



Samsun ve Giresun illerinde yapılan çalışmada ise *G. intestinalis*'in sudaki varlığı tespit etmek için 420 çevresel, 120 içme suyu örnekleri toplanmıştır. Mikroskopik incelemelerden sonra pozitif saptanan örnekler DNA izolasyonu uygulanmıştır. *G. intestinalis*'in GDH gen bölgesi, Semi Nested PZR yöntemiyle çoğaltılmış ve pozitif olduğu belirlenen 30 örneğe ait PZR ürünleri *NlaIV* restriksiyon enzimi ile Read ve ark.(2004)'nın (26) uyguladıkları protokol kullanılarak kesilmiştir. PZR-RFLP tekniği uygulanan örneklerin hepsinin kesim sonucunda 123 bç ve 291 bç'lik gen ürünlerinin gözlenmesi *Giardia* pozitif örneklerin BIII ve BIV alt gruplarına ait olduğunu tespit edilmiştir (Seferoğlu 2014).

## Sonuç

RFLP ilk DNA profillemeye tekniği olup maliyeti oldukça düşüktür. Bilim alanındaki kabul edilebilirlik oranı ve popüleritesi oldukça yüksek olup kullanımı çok yaygındır. RFLP tekniği ile PCR ürününün DNA sekansı yapılmadan popülasyon ve türlerdeki; genetik varyasyon değerleri hesaplanarak mevcut gen kaynakları tespit edilebilir, soy ağacı oluşturularak genetiksel açıdan benzerlikleri hesaplanabilir. Morfolojik olarak birbirine çok benzer türlerin ayırımında kullanılarak moleküler taksonomiye katkı sağlar. Her ne kadar DNA sekans analizlerinin tercih edilmesi bu yöntemin kullanımını azalmasına neden olsa da, basit, hızlı ve güvenilir bir metot olması nedeniyle hala birçok araştırmacı tarafından özellikle rutin tetkiklerin yapıldığı laboratuvarlarda ekonomik ve zaman kazancı göz önüne alınarak tercih edilmektedir.

## Kaynakça

1. Allison L A (2014). Temel moleküler biyoloji (Çeviri Ed: Prof. Dr. Ali Osman Beldüz), Palme Yayıncılık, Ankara
2. Arslan Ö M & İtik Ekinci A 2012. Kars Yöresinde Sığırlarda *Cryptosporidium parvum* Subtiplerinin Belirlenmesi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 18: (Suppl-A): A221-A216
3. Ayinmode A B, Olakunle F B & Xiao L 2010. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. In native calves in Nigeria. Parasitology Research, 107: 1019-1021
4. Balcioglu, C, Tetik A., Turgay N, Kurt O, Ergunay K, Ozensoy Toz S, Sevil N, Dağcı H, Tetik A, Yereli K & Ozbilgin A (2012). Genotyping of *Giardia lamblia* in a Cohort of Turkish Patients: A Search for a Relationship between Symptoms and Genotypes. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 18: (Suppl-A): A125-A131
5. Bulut Y & Doymaz MZ (2001). Uygulamalı moleküler Biyoloji. (Ed: Durmaz R), Restriksiyon endonükleaz enzimleri ve mikrobiyolojideki önemi, Nobel Tıp Kitapevi, Ankara s. 109-122
6. Burenbaatar B, Bakheit M A, Plutzer J, Suzuki N, Igarashi I, Ongerth J, & Karanis P (2008). Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* species from farm animals in Mongolia. Parasitology research, 102(5): 901-905

7. Campbell N A, Reece J B, Urry L A, Cain M L, Wasserman S A, Minorsky P V, & Jackson R B 2010. Biyoloji (Çeviri Ed: Prof. Dr. Ertunç Gündüz, Prof Dr. İsmail Türkan) Palme Yayıncılık, Ankara
8. Çimen C 2010. Sitogenetik ve moleküler tekniklerin klinikte uygulama alanları. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne
9. Demirbağ Z (2008). Genetik Mühendisliği. Trabzon s. 43-55
10. Dinçer D, Arca E, Koç E, Topal Y, T Özkan A & Çelebi B 2012. Ülkemizin Endemik Olmayan Bir İlinde (Ankara) Saptanan *Leishmania infantum*'a Bağlı Bir Kütanöz Leyşmanyazis Olgusu. Mikrobiyoloji Bülteni, 46(3):499-506
11. Eroğlu F (2008). Kutanöz leyişmanyozlu hastalarda etken türlerin PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana
12. Ferreira I M, Vidal J E, Costa-Silva T A, Meira C S, Hiramoto R M, de Oliveira A C P & Pereira-Chiocola V L (2008). *Toxoplasma gondii*: Genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. Experimental parasitology, 118(2): 221-227
13. Fontecha G A, Garcial K, Rueda M M, Sosa-Ochoa W, Sanchez A L & Leiva B 2015. A PCR-RFLP method for the simultaneous differentiation of three *Entamoeba* species. Experimental Parasitology, 151, 80-83
14. Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam D Q, Chinh T X, Puerta F, Ruz J M, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S, Fries I & Paxton R J 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. Journal of Invertebrate Pathology, 96: 1-10
15. Klug W S, Cummings M R & Spencer, C A (2011). Genetik kavramlar, (Çeviri Ed: Prof Dr. Cihan Öner, Prof. Dr. Sibel Sümer, Prof. Dr. Reyhan Öner, Prof. Dr. Ay Ögüş, Prof. Dr. Leyla Açık), Palme Yayıncılık, Ankara
16. Mojarad N E, Keshavarz A, Taghipour N, Haghghi A, Kazemi B & Athari A 2011. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. In clinical samples: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C2 gene. Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench, 4(1): 29-33
17. Murray N E (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 412-434
18. Özcel M A (2009). Moleküler parazitoloji. (Ed.Özcel M.A, Tanyüksel M, Eren H. ), Restriksiyon Endonükleazlar, Türkiye Parazitoloji Derneği yayın No:22, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, s. 376-367.
19. Özerdem D N (2009) Kala-Azarlı hastalarda etken türlerin PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana Read C M, Monis P T & Thompson R C A 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PZR-RFLP. Infection Genetics and Evolution, 4: 125-130

20. Rieux A, Paraud C, Pors I & Chartier C 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in western France in relation to age. *Veterinary parasitology*, 197: 7-12
21. Seferoğlu O 2014. Samsun ve Giresun illerinden alınan su örneklerinde *Giardia intestinalis* 'in moleküler teknikler kullanılarak tespit edilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu
22. Silva F M P, Monobe M M, Lopes R S & Araujo Jr J P 2012. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. *Parasitology Research*, 110: 325-334
23. Usluca A & Aksoy Ü 2011. Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic stools by PCR/RFLP analyses. *Turkish Journal of Medical Science*, 41(6): 1029-1036
24. Wong K H, Ng G C, Lin R T, Yoshikawa H, Taylor M B & Tan K S (2008). Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitology research*, 102(4): 663-670
25. Yağcı A 2001. Uygulamalı moleküler Biyoloji (Ed: Durmaz R). Restriction fragment length polymorphism ve polimeraz zincir reaksiyon bazlı tiplendirme yöntemleri, Nobel Tıp Kitapevi, Ankara, s. 121-109