

MİKROBİYAL SİSTEMATİKTE MOLEKÜLER TANIMLAMA YÖNTEMLERİ

Öznur BİLGİN, Fadime ÖZDEMİR KOÇAK***

Mikrobiyal Sistematik

Canlıların sınıflandırılması, insanlık tarihi kadar eski olmasıyla birlikte bilimsel bir yaklaşım kazanması Darwin'in evrim teorisiyle birlikte gerçekleşmiş ve canlı organizmalar filogenetik olarak, evrimsel gelişmelerine göre sınıflandırılmaya başlanmıştır. 18. yüzyılda İsveçli doğa bilimci Linnaeus tarafından popüler hale getirilen Latin binomları (ikili adlandırma), biyoloji genelinde istikrarlı, açık ve akılda kalıcı bir isimlendirme sistemi sağlama konusunda halen geçerliliğini korumaktadır. Fakat mikrobiyal dünyanın aralıksız ve giderek daha derinlemesine araştırılması ve analizi, Archaea ve Bacteria için çok sayıda yeni isme ihtiyaç duyulmasına neden olmuştur. Bu tür adların manuel olarak oluşturulması hala zor ve yavaştır ve genellikle uzman odaklı terminoloji kalite kontrolüne dayanmaktadır. Sistematik, Yunanca "systēmatikos" "düzenleme" kelimesinden köken almaktadır (44).

Sistematik, geçmişte yaşamış ve günümüzde yaşayan canlıların çeşitlenmelerini, evrimlerini ve canlıların zaman içindeki ilişkilerini inceleyen, organizma çeşitliliğinin bilimidir. Bu alan, canlılar için bilimsel adlandırmaları, sınıflandırmaları ve tanımlanmaları için gerekli çalışmaları yapar. Bakteriyel sistematik ise mikroorganizmaların taksonomik pozisyonlarını belirlemek amacıyla, genetik özellikleri ile fenotipik karakterizasyonlarını yapmak için çok farklı disiplinleri kullanan bir bilim dalıdır. Yeni prokaryotik taksonları tanımlama, sınıflandırma ve adlandırma disiplini olan prokaryotik sistematik, tarımsal, ekolojik, endüstriyel, tıbbi ve veterinerlik açısından önem taşıyan tüm mikrobiyolojik araştırmalara temel sağlamaktadır. Morfolojik, biyokimyasal ve kemotaksonomik karakterizasyon, DNA-DNA hibridizasyonu (DDH) ve 16S rRNA gen dizisindeki varyasyonun filogenetik analizini içeren çok fazlı taksonomi, son on yılda tüm genom dizilimi uygun maliyetli hale gelene kadar prokaryotik sistematikte altın standart olmuştur (40). Son yıllarda özellikle dizileme analizleri ve biyoinformatik alanındaki gelişmeler mikrobiyal sistematik alanında çığır açmıştır. Tüm genom analizleri ile dijital homoloji dönemine geçilmiş ve yeni türlerin tanımlanmasında kullanılan vazgeçilmez bir teknik haline gelmiştir. Bir prokaryotik organizmanın taksonomik yerini belirleyebilmek amacıyla güvenilir bir çalışmada mutlaka polifazik bir

yaklaşımın uygulanması gerekmektedir. Polifazik taksonomi olarak isimlendirilen çok sayıda farklı tekniğin kullanılmasına dayanan ve nümerik, kemotaksonomi ve moleküler taksonomi olarak ayrılan yöntemler bütünü benimsenmiştir (40).

Moleküler sistematik, organizmalar arasındaki genetik yapıları ve farklılıkları açıklamakta, ayrıca evrimsel süreçlerin ve türler arasındaki genetik yapıların tahmini için istatistiksel veriler de sağlamaktadır.

Moleküler Tanımlama Yöntemleri

Teknolojinin ilerlemesi ile farklı moleküler tekniklerin gelişmesi sayesinde moleküler tanımlama yöntemleri özellikle mikrobiyoloji alanına önemli yenilikler ve kolaylıklar sağlamıştır. Özellikle son otuz yılda moleküler çalışmalarındaki gelişmeler, mikroorganizmaların tanımlanmasında 16S rRNA gen bölgesi dizi analizlerinden tüm genom dizileme analizlerinin kullanımına olanak sağlamıştır.

16S rRNA Gen Dizisi Analizleri

Prokaryotlarda ribozomal RNA (rRNA) molekülleri büyüklüklerine göre 5S, 16S ve 23S'tir. Bu üç rRNA molekülü içerisinde, 16S ribozomal RNA (rRNA), prokaryotik ribozomun 30S alt biriminde yer alır ve protein sentezinde görev aldığı için yüksek oranda korunmuştur. Carl Woese, 1977 yılından itibaren filogenetik analizler için 16S rRNA gen dizisinin kullanılmasında öncülük etmiştir. Bu gen dizisinin ulaşılabilir olması, büyüklüklerinin uygun (-1550 bp) olması, genel olarak tüm bakterilerde bulunması ve mevcut veri tabanlarında nükleotit dizilerinin bulunması tercih edilme nedenlerindedir. Muhtemel türlerin belirlenmesinde (cins veya aile düzeyinde) 16S rRNA dizi analizleri kullanılmaktadır. Küresel mikrobiyal çeşitliliğin kapsamı yoğun tartışmalara ve birbirinden oldukça farklı spekülasyonlara konu olmaya devam etmektedir. Bu tartışma büyük ölçüde mevcut tahminlerin ya ampirik ölçeklendirme yasalarına (32), teorik biyoçeşitlilik modellerine (12), küresel çeşitliliğin yalnızca küçük bir kısmını kapsayan veri setlerine (30) ya da çoğunlukla kültüre alınmış veya özellikle tıbbi/endüstriyel öneme sahip organizmaları içeren taksonomik veritabanlarına dayanmaktadır (50). SILVA veri tabanındaki dizi veri istatistiklerine dayanarak birkaç milyon bakteriyel ve arkel ("prokaryotik") organizma olduğunu tahmin etmiştir. Genellikle kültüre edilebilir mikroorganizmaların izolasyon ve tanımlaması yapıldığı için tanımlanan tür sayısı oldukça azdır (33). Prokaryotlar, tahminen 2,2-4,3 milyon türle doğada bol miktarda bulunur ve bunların yalnızca 21.000'i karakterize edilmiş ve geçerli bir şekilde yayınlanmıştır (40). rRNA dizilerini kullanarak yapılan ilk filogenetik analizde canlılar Eubacteria, Archaeobacteria, Eukaryotes şeklinde gruplandırılmışlardır. 16S rRNA bölgeleri dizilenecek bu dizileme

sonuçları biyoinformatik analizler kullanılarak daha anlamlı hale getirilmiştir.

16S rRNA genleri bakteri türleri arasında korunmuş olan bölgelere ek olarak değişik bakteriler arasında önemli sekans farklılıkları olan 9 adet bölge (V1-V9) içermektedir (7). Bu bölgeler yüksek oranda değişkenlik gösterdiği için çeşitli bakterilerin tanımlanmasında, sınıflandırılmasında ve filogenetik analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. 16S rRNA gen dizilimi, bakteri sınıflandırması için yararlı olmasına rağmen, yakın ilişkili türleri çözümlmek için yeterli olmayabilir. Suşların aynı tür olarak kabul edilmesi için 16S rRNA sekanslamasında %97 veya daha fazla oranda benzerlik göstermesi beklenir (33). *Geodermatophilaceae* familyası ve *Mycobacterium* cinsi içindeki çeşitli türler, 16S rRNA gen sekanslarında %99'dan fazla benzerlik gösterebilmektedir. Ayrıca, birden fazla bakteri türünde 16S rRNA geninin yatay transferi rapor edilmiştir, bu da türlerin tanımlanmasında 16S rRNA genindeki varyasyonun dikkatli bir şekilde ele alınmasını gerektirmektedir (2).

İlk olarak, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile genomik DNA'dan 16S rRNA'yı kodlayan gen bölgesi çoğaltılır. Çoğaltılan PCR ürünü Sanger metodu ile dizilir. Bu prosedürün yapılması ve çalışması hızlı ve spesifikdir. Dizileme için 16S rRNA'lardaki korunmuş dizilere komplementer (tamamlayıcı) PCR primerleri kullanarak, az sayıda bulunan materyalden yüksek miktarda DNA ürünü oluşturulabilir. Dizileme tamamlandıktan sonra dizi verileri bilgisayar analizi için hazır hale getirilerek daha önce sekansı yapılmış binlerce spesifik diziyile karşılaştırılabilir (7).

16S rRNA gen dizi analizinin amacı DNA – RNA 'nın kimyasal ve yapısal özelliklerinin anlaşılmasına dayanmaktadır. RNA'lar görev olarak proteinleri, farklı enzimleri ve hücre metabolizması için gereken enzimleri reaktörlere benzer şekilde görev alarak sentezler. Aynı zamanda genetik kodları açıklayarak bunların anlaşılmasını sağlar (11).

Çoklu Lokus Dizileme Analizleri (MLST)

Prokaryotların filogenetik ilişkilerini belirleyebilmek amacıyla farklı gen bölgesi dizi analizleri kullanılmaktadır. Tür düzeyindeki tanımlamalarda 16S rRNA gen bölgesi yaygın olarak kullanılmasına rağmen bazı cinslerde ayırt ediciliği neredeyse yok denecek kadar az olması nedeniyle farklı analizlerle desteklenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır (57). 16S rRNA gen bölgesinin yetersiz olduğu durumlarda DNA-DNA hibridizasyonu, tekrarlayan ekstragenik palindromik PCR ve güçlendirilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP) analizi ve housekeeping gen bölgelerinin analizi dahil üzere genomik analizlerin uygulanmasını gerektirmektedir (57). Ribozomal genler filogenetik çalışmalarda önemli bir yer tutmasına rağmen farklı protein kodlayan gen bölgelerinin de kullanılması ile ayırt

edicilik düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Housekeeping (multilokus) genler farklı cinslerde değişkenlik göstermesine rağmen özellikle geniş çaplı çalışmalarda her taksonda mevcut olan gen bölgelerinin varlığı tercih edilmektedir. *Vibrionaceae* cinsine ait türlerin tanımlanması için 23S rRNA, *gabA*, *gyrB*, *hsp60* ve *recA* gibi farklı multilokus gen bölgeleri kullanılmıştır (57). *fusA*, *pyrG*, *leuS*, *gyrB* ve *rpoB* genlerinin kısmi dizilerine dayanan MLSA analizi, fitat hidrolize eden izolatların *Pantoea* cinsine ait olduğunu göstermiştir (55). Yeni türlerin tanımlanmasında o cinse özgü multilokus genlerin kullanımı özellikle son yıllarda istenilen bir analiz haline gelmiştir (43)

Housekeeping genler, yaşamsal fonksiyonları kontrol eden gen bölgeleri olup horizontal gen transferinden etkilenmemesi, universal olması, primer dizaynına uygun bölgelerinin olması ve tek kopya olarak genomda yer alması gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir (28). MLST' nin başarısı korunan çoklu gen lokuslarındaki farklılıkları hedefleyerek karakterize etmesine dayanmaktadır. Bu yöntem ile çok yakın akrabaların suşları da ayırt edilebilir, böylelikle organizmaları tür seviyesine kadar tanımlamada oldukça verimli bir yöntem olarak kullanılmaktadır (26).

Bu yöntemde, housekeeping genlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılarak oluşan PCR ürünlerinin dizi analizleri yapılmaktadır. Genomun tamamının dizi analizinin yapılmasına gerek olmaması bu teknik için avantajdır. Her bir lokus, farklı dizilim ve farklı bir alel numarası ile gösterilmektedir. Bir gen için birbirine benzer özellikteki dizilere sahip suşların, bulunan gende aynı alele sahip olduğu kabul edilir ve aynı sayı verilir. Bir gen farklı alellere sahip olabilir. Belirlenen alel profilleri, MLST' nin veri bankasında yer alan aleller ile karşılaştırılabilir (26).

Tüm Genom Dizileme (WGS)

1970 – 1980 yılları arasında yapılan manuel dizileme yöntemleri, teknolojinin gelişmesiyle 1990'lı yıllarda yerini daha hızlı, otomatik ve daha uzun genomların dizilenmesine bırakmıştır. 1976' da ilk kez bir virüs (*Bacteriophage MS2*) genomunun tamamı dizilenmiştir. 1992'de maya kromozomu III' ün genomunun tamamının dizilenmesi ile ilk kez bir organizmanın kromozomu dizilenmiştir. 1995 yılında ise 1.830.140 baz DNA çiftinden oluşan *Haemophilus influenzae* ile ilk kez bir organizmanın tüm genomu dizilenmiştir. 2003 yılında İnsan Genom Projesi ile insan genomunun tamamlanmış şekli yayınlanmıştır (35).

Tüm genom analizleri bakteriyal sistematikte tek gen bölgesi kullanılarak yapılan sistematik çalışmalar için güçlü bir alternatif oluşturmuştur. Bakterilerin doğru şekilde sınıflandırılmasında tüm genom analizleri gelişen dizileme analizleri ve güçlü biyoinformatik araçlar sayesinde günümüzde rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Son dönemde yapılan tür ta-

nımlamalarında özellikle tüm genom analizlerine dayalı dijital DNA-DNA homolojileri geçerli hale gelmiştir (10, 42).

Ayrıca tüm genom analizleri, bakterilerin ikincil metabolit yapılarını belirlemeyi ve biyosentetik gen kümelerini, direnç bölgeleri ile biyoaktif bileşikler açısından değerlerini ortaya koymayı da sağlamaktadır (22). *Limosilactobacillus reuteri*'nin psikobiyotik ve teknolojik genomik özelliklerini daha iyi anlamak için tüm genom dizilemesi gerçekleştirilmiştir (58). Farklı metabolik yolların aydınlatılması amacıyla da tüm genom analizleri kullanılmaktadır (17).

G + C İçeriği

Bir organizmada bulunan Guanin (G) ve Sitozin (S) oranı sınıflandırmalarda kullanılabilen bir kriterdir. G + C miktarlarının toplamı, tüm DNA'nın (adenin, timin ve RNA' da ki urasil dahil) miktarına oranı her tür için sabittir. G + C oranı moleküler uzunluğuna bağlı olarak, DNA'nın erime sıcaklığının ölçülmesiyle veya kromatografi yöntemleri gibi çeşitli yöntemlerle belirlenebilmektedir. Organizmanın GC oranı, belirli durumlar için veri olarak kullanılabilir. GC oranı aynı ya da birbirine çok yakın olan bakterilerin taksonomik gruplandırılmada aynı grupta yer aldığı bilinmektedir. Tür tanımlamalarında mutlaka G + C oranı belirlenmektedir (10, 42).

DNA – DNA İlişkili Metotlar

DNA-DNA ilişkili teknikler pek çok alanda kullanılsa da mikrobiyal sistematikte de çoğunlukla prokaryotların sınıflandırılması için kullanılmaktadır.

DNA – DNA Hibridizasyonu

DNA – DNA yeniden birleşme teknikleri olarakta bilinir ve iki tür arasındaki genetik benzerlik oranlarını ölçerek sınıflandırmaya yardımcı olan bir moleküler tekniktir. Tekniğin öncüleri Charles Sibley ve Jon Ahlquist, kuşların (Sibley-Ahlquist taksonomisi) ve primatların filogenetik ilişkilerini incelemek için DNA-DNA hibridizasyonunu kullanmıştır (53). DNA dizilimi ve dizilerin hesaplamalı karşılaştırmaları yaparak genetik mesafeyi belirleme yöntemi olup bakterilerin tanımlanmasında da kullanılan önemli tekniklerden biridir (53).

Karşılaştırılmak istenen iki türün DNA'sı elde edilir, saflaştırılır ve kısa baz çiftleri (600 – 800) şeklinde kesilir. Bir organizmanın DNA'sı etiketlenir, karşılaştırılması yapılacak etiketlenmemiş DNA ile karıştırılır. Karışım, DNA ipliklerinin ayrılıp yeniden birleşmesi ve hibrit şekilde çift iplikli DNA oluşturması için inkübe edilir. Yüksek derecede benzerliğe

sahip melezleştirilmiş diziler daha sıkı şekilde bağlanır. Yüksek derecede benzerlik gösteren diziler düşük sıcaklığa maruz kaldıklarında birbirinden ayrılmazken, benzerlik göstermeyen diziler daha yüksek sıcaklıklarda birbirinden ayrılırlar; bu işlem “DNA Erimesi” olarak bilinir (53).

Hibritleşmiş DNA'nın erime profilini değerlendirmek için çift sarmallı DNA bir kolona bağlandıktan sonra karışım kademeli olarak ısıtılır. Devam eden her adımda ilk olarak kolon yıkanır, eriyen diziler tek sarmallı hale gelir ve sütun yıkanır. Etiketli DNA'nın kolondan ayrıldığı sıcaklıklar, diziler arasındaki benzerlik miktarını gösterir. Bu sonuçlar organizmalar arasındaki genetik benzerliğin derecesini belirlemek için değerlendirilir (53).

DNA – DNA Homolojisi

Homoloji, 1656 yılında aynı ve ilişkili kelimelerinden türetilen Yunanca bir kelimedir. Farklı taksonlarda bulunup, benzer biyolojik özellik gösteren yapılar ortak atadan türemişse homologdur. Homoloji ile birbirinde farklı görülen canlıların evrimsel süreçte değişiklik gösterdiği, ortak atadan geldiği tespit edilebilir. Aynı şekilde gen benzerliğine bakılmak istendiğinde ise genellikle homolog genlere ya da genlerin nükleotit kıyaslamalarına bakılır.

DNA Fingerprinting Teknikleri

DNA dizilerini saf biçimde elde etmek ve görüntülemek için kullanılan yöntemdir. Alec Jeffreys tarafından, 10 Eylül 1984'te minisatellitleri fark etmesiyle geliştirilmiştir (Corey Harbison). Minisatellitler, genomun diğer bölümlerine göre bir kişiden diğerine daha fazla çeşitlilik gösterir, 2-100 nükleotitten uzunluğundadır ve bir türün DNA'sındaki %GC oranının yoğunluğunu belirtir. DNA fingerprint, minisatellit tekrar dizilerinin sayısındaki farklılıktan meydana gelir. İntronlar tekrarlayan baz çifti dizileri içerirler. Bu diziler, Variable Number Tandem Repeats (VNTRs), yani değişken sayıda sıralı tekrarlar olarak adlandırılır. Temel olarak ilk önce DNA içeren (kan, tükürük, kıl, vücut dokusu vb.) örnek ele alınıp bu örnekten DNA izolasyonu ve saflaştırılma işlemi yapılır. Daha sonra VNTR dizileri, restriksiyon enzimleri ile kesilir. Çeşitli uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur, oluşan bu fragmentler elektroforez sisteminde uzunluklarına göre ayrılırlar. Southern Blotlama yöntemi ile görüntülenir ve bantlardan oluşan bir profil meydana gelir. Bu profil, DNA parmak izi olarak adlandırılır.

Bakteriler çeşitlilik ve geniş yaşam alanına yayılım gösterirler. DNA fingerprint teknikleri bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında kullanılan moleküler bir tekniktir. Bakteriler, tekrarlayan DNA sekansları bulundurlar. Bu sekanslar çok sayıda kopya şeklinde yayılmış halde

konumlanmışlardır. Tekrarlanan sekansların tanımlanması zordur ve fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Bu tekrar sekansların varlığı ile bakterilerin DNA parmak izlerinin belirlenmesi sağlanmaktadır (31).

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP): 1984' te Alec Jeffreys'in kalıtsal hastalıklar üzerine yaptığı çalışmalar sırasında icat ettiği bir tekniktir. Değişken sayıda sıralı tekrarlar (VNTR)'ların analizleri için kullanılır. Hem tür içi hem de türler arası varyasyonu tanımak ve incelemek için DNA dizilerindeki farklılıklardan yararlanır. RFLP, DNA parmak izi için kullanılan ilk tekniklerden birisidir. Özellikle ilk dönemlerde RFLP analizleri bakterilerin sınıflandırılmasında yaygın olarak kullanılabilen bir teknik olup farklı gen bölgelerinin çoğaltılarak analiz edilmesi temeline dayanmaktadır (23,62). Günümüzde de farklı izolatların çeşitliliğini belirleyebilmek amacıyla halen kullanılmaktadır (36, 46). Öncelikle, elde edilen saflaştırılmış DNA, kısıtlama endonükleazları (REaz, ENaz, restriksiyon) kullanılarak parçalanır. Oluşan DNA fragmanları jel elektroforezi kullanılarak uzunluklarına göre ayrılır ve analiz edilir. DNA bantlarını görünür hale gelmesi için jel, lüminesans boyalar ile boyanır. Geleneksel RFLP tekniğinin çözünürlüğü düşük olduğundan küçük restriksiyon parçaları tanımlanamamaktadır. Nu nedenle, geleneksel RFLP tekniğinin yerine RFLP'nin temel adımlarına dayanan T-RFLP tercih edilmektedir (23). Bu yöntem, çeşitli bakterilerden oluşan bir numunenin karşılaştırmalı bir bakteri profilinin sağlanmasında avantajlıdır. Buna ek olarak, bu teknik, karışık bir bakteri popülasyonundan bir bakteri türünün tiplenmesi için önceden bakteri kültürü yapılmasını gerektirmez (51). RFLP keşfinden sonra yaygın olarak kullanılan bir genomik analiz tekniği olsa da daha sonra geliştirilen ve nispeten daha basit ve ucuz olan tekniklerden dolayı günümüzde daha az tercih edilen bir teknik haline gelmiştir. Ayrıca RFLP tekniği, izolasyonu zahmetli olan büyük ve kaliteli bir DNA örneği gerektirir, bu da tekniğin dezavantajlarından (8).

Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD): Bu yöntem 1990 yılında planlanmadan rastgele alınmış şekilde kullanılan primer ile PCR'ı temel alan bir teknik olarak bulunmuştur. Bu primer, polimorfizmleri tespit etmek için bakteriyel genomunkine en yakın homolojiyi gösteren kromozomal DNA dizilerinin farklı lokasyonlarına rastgele hibritlenir (51). Primerin uzunluğuna, annealing sıcaklığına ve protokolün uzunluğuna dayanan RAPD çeşitleri arasında DNA amplifikasyon parmak izi ve isteğe bağlı olarak prime edilmiş PCR bulunur. Agaroz jel elektroforezi, bakteriyel suşları tanımlamak ve karakterize etmek için kullanılan bakteriyel bir parmak izi oluşturmak için amplifikasyon ürünlerini ayırır. Yeni izole edilen suşların dizi bilgisine ulaşamadığında suşa özgü primerlerin geliştirilmesi için öncelikle RAPD analizi uygulanır (51). RAPD'nin avantajları arasında iyi bir ayırım gücü, uygulanabilirlik, hızlı, ucuz ve kolay

performans sayılabilir. Ayırıcı güç, primerlerin sayısı arttırılarak sağlanabilir. Ayrıca bu teknik, hedef DNA dizisi hakkında önceden bilgi gerektirmez ve amplifikasyon için sınırlı miktarda bakteriyel DNA gerektirir (51). Tekrarlanabilirliğin zayıf olması bu tekniğin en büyük dezavantajıdır. Tekrarlanabilirlik, DNA'nın miktarı ve kalitesi, PCR tamponu, primer konsantrasyonu ve annealing sıcaklığı gibi birçok faktöre bağlıdır. Ayrıca spesifik olmayan lokasyonlardaki primer hibridizasyonu yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir. Mikrobiyal sistematiğede farklı mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan bir tekniktir (5,13, 37).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)/ Real Time PCR: 1983 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir. Amacı sınırlı miktarda bulunan DNA'nın, in vitro koşullarda çoğaltılması işlemidir. Yani ilgilenilen bir DNA dizisinin veya geninin kontrollü bir şekilde kopyalanmasıdır. PCR uygulaması, DNA'nın 94 °C'de ısıtılarak çift sarmallı yapısından iki ayrı tek sarmal haline ayırmak için yapılan denatürasyon evresi, 50 – 65 °C'de ısı düşürülerek primerlerin, hidrojen bağı yoluyla tek sarmallı şablon DNA üzerindeki belirli bir yere bağlanmasını sağlayan bağlanma evresi ve 72 °C'de sıcaklığın artması ile aktifleşmeye başlayan taq polimeraz enzimi yeni bazlar eklenmesi ve yeni oluşan DNA ipliğinin uzamasından oluşan uzama evresi olmak üzere 3 evrede gerçekleşir (25).

PCR uygulamasındaki en önemli buluş, floresans emisyonuna dayalı DNA amplifikasyonunun gerçek zamanlı olarak gözlemlenmesidir. Gerçek zamanlı PCR çalışmanın amacına bağlı olarak mutlak (standart eğri) veya bağıl (karşılaştırmalı eşik yöntemi) nicelik belirleme kullanılabilir. Mutlak nicelik belirleme, ilgili klonlanmış geni, sentetik bir oligonükleotidi (tek duyu), genomik DNA'yı, cDNA'yı, toplam RNA'yı veya in vitro transkriptleri içeren bir plazmit dahil olmak üzere, bilinen konsantrasyonlardaki seyreltilmiş şablon numuneleri kullanılarak standart bir eğrinin hazırlanmasına bağlıdır. Standart eğri yaklaşımı, viral yükü veya numunelerdeki DNA şablonunun tam seviyesini ölçmek için kullanılır. Göreli nicelik belirleme, bir hedefin bir kontrole kıyasla göreceli ifadesini ölçmek için kullanılan matematiksel hesaplamalara dayanır. Gen ifadesini ve karşılaştırmalı DNA miktarını analiz etmek için kullanılır (51). PCR temelli çalışmalar mikrobiyal sistematiğin gelişiminde oldukça önemli olmuştur.

Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP): AFLP başlangıçta bitki genomlarının karakterizasyonu için kullanılmasına rağmen zamanla mikrobiyal tiplere alanında daha yaygın hale gelmiştir. AFLP, RFLP ve PCR'nin bir kombinasyonudur. Genomik DNA'nın kısıtlama enzimleriyle sindirilmesini ve ardından aynı adaptörlerle parçalar oluşturmak için çift sarmallı adaptörlere ligasyonu içeren PCR bazlı bir DNA parmak izi tekniğidir. Adaptörlere özel primerler daha sonra bireysel fragmanları amplifiye etmek için kullanılır ve bunlar daha sonra elektroforez yoluyla

analiz edilir (56).

AFLP'nin avantajları arasında daha yüksek tekrarlanabilirlik, duyarlılık ve hedeflenen genom ile ilgili önceden bilgi gerektirmemesi sayılabilir. Bu yöntem kullanılarak, kısıtlama fragman setleri, nükleotid sekansı bilgisi olmadan PCR ile görselleştirilebilir. AFLP verileri polimorfizmin varlığına veya yokluğuna göre analiz edilir. Bu, polimorfizmler için tüm genomun hızlı bir şekilde taranmasına olanak tanır. Bu tekniğin sınırlamaları arasında zayıf hedef DNA kalitesi, çok sayıda adım içeren karmaşık prosedür, pahalı süreç ve otomatik bir DNA sıralayıcının ön koşulu yer alır. AFLP, cins veya türler içindeki genetik çeşitliliği değerlendirmek, akrabalığı belirlemek ve genetik haritalar oluşturmak gibi çeşitli uygulamalarda kullanılır (51).

Tek sarmallı konformasyon polimorfizmi (SSCP): Tek iplikli konformasyon polimorfizm (SSCP) analizi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonundan sonra 16S rRNA gen havuzunun doğrudan analizine, denatüre olmayan elektroforezde ayırmaya ve genescan software kullanılarak yapılan analize dayanır. Genescan software, herhangi bir genin veya DNA segmentinin tek iplikçik konformasyonunu analiz ederek söz konusu özel ipliğe özgü bir profil oluşturur. Çiğ sütün bakteri çeşitliliğinin ayırt edilmesi ve sınıflandırılmasında SSCP yöntemi kullanılmaktadır. SSCP yöntemi hızlı, basit ve uygun maliyetli olması nedeniyle avantajlıdır. Ayrıca, yüksek oranda tekrarlanabilir olduğu, RFLP'den daha fazla ayırmacı olduğu, AFLP ve DNA diziliminden daha az ayırmacı olduğu bulunmuştur. SSCP analizi ile birleştirilmiş RFLP, AFLP veya DNA dizilimine kıyasla ayırt edici güce sahip daha basit bir tekniktir (56).

Bu tekniğin dezavantajı, mutasyon, DNA fragmanının boyutu, G ve C içeriği, jel matrisinin gözenekliliği, DNA konsantrasyonu gibi farklı parametreler altında bir DNA fragmanının tam konformasyonunu tahmin etmek için şu anda teorik bir modelin bulunmamasıdır (56).

DNA Çoğaltılmış Parmak İzi (DAF): Organizmaların birbirleri arasında bulunan genetiksel farklılıkları belirlemek için kullanılır. DNA amplifikasyon parmak izi (DAF), genomik DNA'nın kısa segmentlerini amplifiye etmek ve bir dizi DNA uzatma ürünü oluşturmak için genellikle rastgele sekanslı bir kısa (≥ 5 bp) oligonükleotid primeri tarafından yönlendirilen termostabil bir DNA polimeraz kullanılarak gerçekleşir. Bu ürünler poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş boyama ile analiz edilebilir. DAF hızlı, hassas, klonlamadan ve önceki genetik karakterizasyondan bağımsızdır (9).

Yüksek teknolojiye, gelişmiş ve pahalı aletler gerektirmediğinden sınırlı kaynaklı laboratuvarlarda da kullanılabilen bir tekniktir. Bu yöntemlerin erişilebilirliği, bunların çeşitli ortamlarda ve filogenetik olarak farklı

popülasyonların incelenmesinde uygulanmasına olanak sağlamıştır (38).

Dizileme Analizleri

DNA molekülündeki adenin, timin, guanin ve sitozin bazlarının sıralanması işlemine DNA dizilemesi denir. Genetikçi Ray Wu tarafından DNA dizisi belirlemek amacıyla Erken DNA Dizileme Yöntemleri olarak 1970 yılında ortaya çıkmıştır. Daha sonra 1996 yılında Mustafa Ronagi vd. ikinci nesil DNA dizilemenin çıkışı olarak kabul gören yeni bir DNA dizileme tekniği ortaya koymuşlardır. İkinci Nesil Dizileme, yüksek verimli dizileme tekniği olarak kabul görmüştür. Dizinin moleküler yapısını, genetik çeşitliliği ve evrimin anlaşılmasına katkıda bulunur. Biyoinformatik bilimi ile birlikte kullanılarak bir organizmanın genomunun analiz edilmesi sağlanmıştır. DNA dizileme teknolojisinin geliştirilmesi ile birlikte biyolojik keşifler de oldukça hız kazanmıştır. Mutasyonların saptanması, sağlıklı ve mutasyona uğramış DNA dizilerinin karşılaştırılması ile tıbbi tanı koyulması, adli tıp gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Sanger Dizileme Analizleri: 1977’de Frederick Sanger tarafından geliştirilen ve 1980 yılında kimya alanında nobel ödülü alan bu yöntem ile Sanger, ikinci nobel ödülünü almıştır. 1986 yılında Applied Biosystems tarafından ticarileştirilmiştir (2). İnsan Genom Projesinin 2003 yılında sonuçları paylaşılmış ve projenin büyük bir kısmının Sanger dizileme teknolojisi kullanılarak tamamlandığı bilinmektedir (15). Zincir sonlandırma yöntemini temel alan bu teknik, dideoksiribonükleotidler (ddNTP’ler) adı verilen değiştirilmiş nükleotidlerin (dNTP’ler) eklenmesi ile standart PCR’den ayrılır. Uygulanan teknikte PCR için hazırlanan örnekte fazla oranlarda dNTP ve dizi sonlandırmak için yine farklı renklerde floresan boyalarla işaretlenmiş ddNTP’lerin bulunmasına dikkat edilmektedir. Zinciri uzatmak için DNA polimeraz I kullanılır. DNA parçaları, restriksiyon enzimleriyle kesilir ve denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Denatürasyona uğramış bu parçalar bu işlemde sonra reaksiyon tüplerine aktarılır ve bu tüpler içerisine primerler eklenir. Ayrıca tüplere parçalanmış DNA ve primerler dışında dNTP, ddNTP ve DNA Polimeraz I eklenir. Reaksiyon 4 ayrı tüpte gerçekleşir. Her tüpte, düşük konsantrasyonlardaki farklı ddNTP’ler bulunur. Kullanılan tüplerde gerçekleşen PCR reaksiyonunda kullanılan dNTP’ler de eklenir ve reaksiyon böylece devam eder. 3’ OH grubu buldurmeyen ddNTP’ler zincire eklendiği zaman reaksiyon durur. Reaksiyon, ddNTP’lerin bağlandığı farklı konumlara göre sonlandığı için farklı uzunluklarda DNA fragmanları oluşur. PCR sonrasında oluşan ampliconlar jel elektroforezinde görüntülenir (52).

Maxam – Gilbert Dizilemesi: 1976-1977’de Harvard Üniversitesi’nden Allan Maxam ve Walter Gilbert tarafından ilk kez DNA’nın sekanslanması gerçekleştirilmiştir ve bu yöntem Maxam-Gilbert olarak isimlendiril-

miştir. Bu yöntemde DNA bazları kimyasallar ile değiştirilir. Değişikliğe uğrayan bu bazlar bulunduğu noktalardan zinciri denatüre eder. Yöntemin esası DNA'nın kimyasallar ile uğradığı modifikasyon ve sonrasında onun spesifik bazlardan kesilmesine dayanır (63). Safılaştırılmış DNA'nın doğrudan dizilenebilmesi, Maxam–Gilbert yöntemini, DNA kalıbının çoğaltılmasına ihtiyaç duyulmadığı için Sanger yönteminden iki yıl sonra bulunmuş olmasına rağmen daha popüler hale getirmiştir. Ancak zaman ilerledikçe zincir sonlandırma yönteminin iyileştirilmesi, yavaş ve karmaşık olması, zararlı kimyasalların kullanılması, büyük genom dizilemeleri için kullanışlı olmaması Maxam-Gilbert dizilemesini gözden düşmesine neden olmuştur (16).

Yeni Nesil Dizileme (NGS): 2005 yılında ticari kullanıma sunulan bu yöntem, genomik araştırmalarda önem taşıyan bir DNA dizileme teknolojisidir. Oldukça hızlı sonuç alınabilen, bir gün içerisinde tüm insan genomunun sıralanabildiği bir yöntemdir. Ayrıca elde edilen sonuçlar yüksek oranda doğruluk gösterirken, bu teknikte oluşan mikrobiyal genom dizisi daha fazla ve özgün bilgi verir. Yapılan bir çalışmada *Escherichia coli* genomu dört kere, her bir koşmada 400.000 okuma yapılarak de novo dizilenmiş ve sekanslamaların %99.997 ile %99.999 arasında doğrulukla yapıldığı tespit edilmiştir (34).

Yeni nesil DNA dizileme teknolojisi kullanılarak, DNA dizisi hakkında daha önce elde edilmiş bilgiler gerekmeden de novo dizileme yöntemi ile farklı organizmaların genomlarının ve bakteri yapay kromozomlarının da dizilenmesi mümkündür.

NGS yöntemi, paralel birçok dizileme reaksiyonu ile aynı anda yapılabilirken diğer dizileme yöntemlerinde bu mümkün değildir. Tipik bir NGS deneyi, cihazlara çok bakılmaksızın benzer olay akışı ile gerçekleşir. İlk olarak, dizilenecek olan DNA parçalanarak, kütüphane oluşturulur. Oluşan parçaların uçlarına adaptör ve barkod dizileri eklenir. Adaptörler, DNA fragmentlerini katı faza bağlarken, fragmentlere seri numarası da verir. Fragmentler adaptörlere bağlandıktan sonra, katı faza yıkama işlemi uygulanarak, adaptöre bağlanmamış fragmentler uzaklaştırılır. Katı faza bağlandıktan sonratek zincir halinde bulunan DNA parçalarına işaretlenen bazlar eklenir ve diğer zincirin sentezi gerçekleşir. Böylelikle, birbirinin aynısı olan çok sayıda DNA fragmenti üretilebilir. Fragmentler çift zincirli hale gelerek eşlenip, çoğaltılır (3).

Yapılan tüm bu aşamaların sonunda biyoinformatik analizler yapılır. Aynı bölgede bulunan 10-20 adet dizi reaksiyonu üst üste getirilerek nükleotid değişiklikleri referans dizisiyle kontrol edilir. Mutasyon analizleri ve kromozomda meydana gelen sayı değişiklikleri aynı anda eş zamanlı olarak tespit edilebilir (59).

Protein Dizilerinde Filogenetik Analizler

Filogenetik, Yunanca kökenli, “kabile, ırk” anlamına gelen *file* ve doğum anlamına gelen *genetikos* kökünden gelen bir terimdir. Bireyler, türler ve genler vb. arasındaki evrimsel ilişkilerin araştırılması ile ilişkili olup çeşitli organizma grupları arasındaki evrimsel akrabalıkların araştırılmasında kullanılmaktadır.

Filogenetik analizde DNA ya da protein dizileri yoluyla ortaya çıkan genetik materyale dayanarak genom benzerlikleri bulunur. Genleri kodlayan nükleotid dizileri ya da proteinleri kodlayan aminoasit dizileri sınıflandırılmada temel alınır. Dizi benzerliğinin derecesi, evrimsel ilişkinin derecesi ile doğrudan ilişkilidir. Bu geçmişte oluşan evrimsel olaylar hakkında tahminler yapmamızı sağlayarak bize evrimsel süreçler hakkında bilgi verir. Protein dizisi verileri bağlamında filogenetik analiz, karşılaştırmalı dizi analizinin temel taşlarından biridir ve protein evrimi ve işlevi çalışmalarında birçok uygulamaya sahiptir. Bu nedenle, türlerin filogenetiğini analiz etmek için protein dizilerini kullanmak, DNA dizilerini kullanmaktan daha mantıklıdır (14). Protein dizisi analizi ile, proteinlerin evrimsel tarihinin, değişiminin ve işlevlerinin incelenmesine imkân sağlar. Proteinler, genetik mutasyonlar ve doğal seçim faktörlerinden etkilenir. Bu faktörlerden farklı proteinler farklı oranda ve hızda evrimleşme gösterirler. İşlevsel olarak önemli proteinler daha yavaş değişime uğrar. Eğer bir proteinin işlevi, hücrenin canlılığını devam ettirmesi için gerekli ise ve temel bir fonksiyonu kapsıyorsa bu proteinin dizisi uzak akrabaları ile karşılaştırdığında da oldukça korunmuş olduğu görülür (4).

Farklı organizmalar arasındaki ilişkiler araştırılırken kullanılacak proteinin seçimi önemlidir. İyi bilinen ve kullanılabilir birkaç homolog gen seçilerek, analizlere bunlar üzerinden devam edilmelidir. Bilim adamları, günümüze kadar proteinlerin gelişim oranları hakkında tahmin ve bilgi edinebilmek için genellikle çoklu türlere ait hemoglobin ve sitokrom c amino asit dizilerini kullanmışlardır. Protein olarak sitokrom c'nin kullanılmasının nedeni tüm aerobik organizmaların sitokrom c'yi ilk kullanan ortak bir atadan evrimleşmiş olmasıdır (24). Akrabalık derecelerine göre sitokromların amino asit dizilerinde değişiklikler görülür. Sitokrom c'nin aktif merkezlerinde mutasyon geliştiğinde, o hücre canlılığını yitirir ve gelecek nesillere aktarılamaz.

Filogenetik analiz için kullanılan protein dizilerinin veri kaynakları çeşitlidir. Protein ya da peptidin amino asit dizisini belirlemek günümüzde gelişen teknoloji ile kolaydır. Kütle spektrometrisi ve bir protein dizileyici kullanarak Edman bozunması uygulanır. Kütle spektrometresi daha yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin sonuçlarını yorumlanması, dizilerinin karşılaştırılması ve veri tabanlarının araştırılmasına yardımcı ol-

mak için biyoinformatik araçlar kullanılır. Edman degradation yönteminde ise analiz için sadece N-terminal amino asidi kullanılır. Geri kalan peptid ise olduğu gibi korunarak kalır. Peptid ilk olarak bir polimere tutturulur, Edman sekans analizi böylelikle tamamen otomatik olarak yapılabilir. Bu yöntemin dezavantajı yapısında 50'dan fazla amino asit içeren peptitler bu yöntem kullanılarak anlaşılabilir. Bu yüzden daha büyük proteinlerin dizi analizi için, önce protein özel yöntemlerle daha küçük parçalara ayrılması gerekir (39).

Çevresel Nükleik Asit Temelli Mikrobiyal Filogenetik Çeşitliliğin Belirlenmesinde Metagenomik Analizler

Çok sayıda yapılan araştırmalar ile çevre örneklerinde bulunan mikrobiyal kompozisyonların farklılıkları anlaşılmasına çalışılmıştır. Bunun temel sebebi doğada bulunan bakteriyel farklılıkların bilinmesi ile ekolojik sistemlerin çalışma prensiplerinin daha iyi anlaşılması olarak bunun olumlu anlamda geliştirilmesine katkı sağlanabileceği olmasıdır. Kullanılan teknikler ile mikroflora ve ekosistemlerin ilişkisini araştırma çalışmaları, bakterinin kültüre edilebilir olmasına bağlı kalmış ve kültüre edilemeyen bakterilerin ekosisteme etkileri tam olarak belirlenememiştir. Bir yaşam alanında bulunan mikrobiyal topluluğunu klasik mikrobiyoloji yöntemlerini kullanarak incelemek zordur. Yakın zamana kadar da dünyada bulunan mikroorganizmaların çok küçük bir oranı kültürleme yoluyla teşhis edilebilmiştir. Geride kalan kültürlenmemiş mikroorganizmalar ise, mikrobiyal çeşitliliğin büyük bir kısmını oluşturmaktadır (60). Günümüzde gelişen metagenomik teknolojisi ile kültürlenemeyen mikroorganizmaların DNA temelli genomları çıkarılabilmiştir. Böylece ilk defa çevresel verilerden elde edilen örneklerin genomları incelenebilmiş ve bir habitatın bütün genetik bileşenlerinin analizi elde edilebilmiştir.

Metagenomik temellerinin mikrobiyal sistematik ve evrim çalışmalarına, bu alanların öncüsü olan Carl Woese'e dayandığı düşünülmektedir. Ancak metagenomik terimi, ilk kez 1998'de Jo Handelsman, Robert M. Goodman, Michelle R. Rondon, Jon Clardy ve Sean F. Brady tarafından bir yayında kullanılmıştır (21).

Mikrobiyal sistemleri tanımlamada bir habitatın toplam genetik çeşitliliğinin tanımlanması istenmiştir, bu yüzden çevresel örneklerden elde edilen DNA'ların dizilimini sağlayan metagenomik analizlerinin üzerine gidilmiştir. Metagenomik analizler, Sanger dizileme yöntemiyle, 16S rRNA geni hedef alınarak başlamıştır. Yapılan ilk çalışmalarda, kısa ve genellikle bir tür içinde korunan 16S rRNA dizilerine odaklanılmıştır. 1990'lı yıllarda çevresel sistemlere 16S rRNA gen dizilemesi gibi moleküler yöntemler uygulanmış ve dikkate değer bir organizma çeşitliliği ortaya çıkmaya başlamıştır (6). Metagenomik verilerin analizleri için filogenetik

marker olarak kullanılan 16S ribozomal RNA dizilerinin analizleri ile karşılaştırmalı olarak yapılmaktadır. Birçok metagenomik analiz çalışmasında, uygun büyüklükte olması, bütün bakterilerde bulunması, fonksiyonel olarak korunmuş olması, değişken bölgelerinin tür analizinde belirleyici olması ve veri tabanında mevcut dizilere ulaşılarak karşılaştırma yapılabilmesi, 16S rRNA geninin metagenomik analizlerinde kullanılmak üzere seçilme nedenlerindedir.

Metagenomik, mikrobiyal çalışmaları ve sistematığı biyoinformatik ile birleştirmektedir. Elde edilen örneklerin, DNA'sı sekanslandıktan sonra ardışık iki yöntemin kullanıldığı biyoinformatik analiz yöntemi kullanılmaktadır. Yani bir habitattaki tüm genetik materyal yeni nesil dizileme ile sekanslayıp, biyoinformatik yöntemler ile analiz edilmektedir. Bu analizde ilk olarak genom dizileri birleştirilir, daha sonra birleştirilen dizilerin sınıflandırılması yapılmaktadır. Günümüze kadar birçok çalışmada metagenomik analizler kullanılmıştır (27).

Venter vd. tarafından 2004'te yapılan çalışma ile Bermuda açıklarında bulunan subtropik Kuzey Atlantik okyanusundan (Sargasso Denizi) elde edilen toplam mikrobiyal genomik DNA örneklerini kullanarak, yüksek oranda verime sahip DNA dizilerinin analizleri ve bilgisayar destekli genomik teknikleri ile fazla miktarda yeni DNA verisi elde edilmiştir. Bu çalışmada 1500 L yüzey suyundan elde edilen DNA örnekleri ile çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda 1,2 milyondan fazla gen, 1800 yeni kültüre edilemeyen prokaryotik tür ve 48 yeni bakteriyel filotip keşfedilmiştir. Bu çalışma ile denizel ekosistemde ilk geniş çaplı metagenomik araştırma yapılmıştır (61).

2002'de yapılan farklı bir çalışmada topraktan alınan örneklerde kültürlenmemiş *crenarchaeote* genomunun analizi yapılmıştır. Bu çalışma ile topraktan işlenmemiş mikroorganizmaların karakterizasyonu için genomik bir yaklaşım başlatılmıştır. Metagenomik analiz, 16S rRNA problemleri kullanılarak yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda protein kodladığı düşünülen 17 gen izole edilmiştir (45).

Array Teknolojileri

Yaygın olarak biyoçip ve mikro dizi olarak bilinen bu teknoloji, çok sayıda hedef genin tanısını DNA ve RNA çalışmaları ile aynı anda gerçekleştirebilir. Edwin Southern tarafından, DNA'nın substrata bağlanarak daha önce keşfedilmiş bir gen veya fragment kullanılıp, prob hazırlanması prosedüründe gerçekleştirilen Southern blotting tekniğinden yararlanılarak geliştirilmiştir. İlk olarak 1995 yılında Mark Schane vd. tarafından yayınlanan çalışmada array teknolojisinin kullanımıyla birçok genin ifadesinin paralel olarak nasıl izlenebileceğini açıklayan 'mikro dizi' kelimesi kullanılmıştır. Bir zar veya cam yüzeye cDNA'ların bir düzen içinde yerleştiril-

lerek incelendiği ilk başarı elde edilen çalışma bir bitki olan *Arabidopsis*'in 45 farklı geninin ifadesinin toplu olarak incelendiği çalışmadır (49). Bu yapılan deneyde *Arabidopsis*'in toplam genlerinin küçük bir kısmı temsil edilmiş olsa da bu teknik ilerleme gen dizisinin daha geniş incelemesinin yapılabileceğini göstermiştir. 1997 yılında, tüm maya genomu bir mikro dizi üzerine yerleştirilerek gen ekspresyonuna ilişkin ilk tam genom çalışması yayınlanmıştır.

Bu teknolojinin sağladığı en büyük kolaylıklardan biri, tüm genomun sadece bir çip üzerinde görüntülenmesi ve gen ifadesindeki farklılıkların ölçülebilmesidir. Prensipten bilinen nükleik asit fragmanından oluşan bir diziyi, cam, plastik veya silikon çip olarak adlandırılan katı yüzeye bağlanmasını içerir. Genleri veya genomları analiz etmek için, karmaşık numuneler söz konusu hücrelerden veya dokulardan izole edilerek etiketlenir ve daha sonra bir biyoçip kullanılarak araştırılır.

Array teknolojileri, sensör görevi görerek, mutasyon analizlerinde, gen ifadelerinin profillerinin çıkarılmasında, ilgili genin transkripsiyonu ve ekspresyonunda, polimorfizm analizlerinde, DNA dizi analizlerinde, evrim ve sistematik çalışmalarında bilgi edinilmesini sağlar. Tek bir dizi deneyi ile çok sayıda veri noktası oluşturabildiğinden, verileri anlamlandırmak kolay değildir. Bunun için firmalar görüntü analiz yazılımları sağlarlar. Ayrıca birçok dizi üreticisi, dizilerinin analizi için özel olarak yazılımlar sunmaktadır. Spesifik dizilerin ekspresyonundaki farklılıklar, RT-PCR, Northern analizi veya nükleaz koruma analizleri gibi analiz yöntemiyle karşılaştırılarak doğrulanırlar (29).

*Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik A.B.D., Bilecik

**Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bilecik

Kaynakça

- 1- **Açıl M.** (2018). "Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Bakteri İzolatlarının Metagenomik Analizi" İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi,
- 2- **Adams, J.** (2008). DNA sequencing technologies. *Nature Education*, 1(1), 193.
- 3- **Akyol, İ., Yıldız, M. A., & Tutar, E.** (2017). Yeni nesil nükleotid dizileme metodlarının biyokimyasal temelleri. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 20(1), 1-15. DOI: 10.18016/ksujns.76089
- 4- **Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al.** (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; *Analyzing Protein Structure and Function*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26820/>
- 5- **Araújo, W. L., Angellis, D. A. D., & Azevedo, J. L.** (2004). Direct RAPD evaluation of bacteria without conventional DNA extraction. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 375-380. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000300006>
- 6- **Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., & Pace, N. R.** (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(5), 1609-1613. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1609>
- 7- **Bose, N., & Moore, S. D.** (2023). Variable Region Sequences Influence 16S rRNA Performance. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e01252-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01252-23>
- 8- **Bretting, P.K. & Widrlechner, M.P.** (1995). Genetic markers and horticultural germplasm management. *Hort. Sci.*, 30(7); 1349-1356.
- 9- **Caetano-Anollés, G., Bassam, B. J., & Gresshoff, P. M.** (1991). DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, 294-307.
- 10- **Chhetri, G., Kim, I., Park, S., Jung, Y., & Seo, T.** (2023). *Planobacterium oryzisoli* sp. nov., a novel bacterium isolated from roots of rice plant. *Archives of Microbiology*, 205(9), 324. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03657-y>
- 11- **Clarridge III, J. E.** (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840-862. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.4.840-862.2004>
- 12- **Curtis, T. P., Sloan, W. T., & Scannell, J. W.** (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10494-10499. <https://doi.org/10.1073/pnas.142680199>
- 13- **Daniel, A. A., Egbebi, A. O., & Onasanya, A. A.** (2023). Isolation and

- identification of lactic acid bacteria from spontaneously fermented kunun-zaki using RAPD-PCR Analysis. *ABUAD International Journal of Natural and Applied Sciences*, 3(1), 34-42. <https://doi.org/10.53982/ajjnas.2023.0301.07-j>
- 14- **Dey, G., & Meyer, T.** (2015). Phylogenetic profiling for probing the modular architecture of the human genome. *Cell systems*, 1(2), 106-115. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.08.006>
 - 15- **Doğan, M., Eröz, R., Yüce, H. & Özmerdivenli, R.** (2017). Yeni Nesil Dizileme (YND) Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması). *Duzce Medical Journal*, 19 (1) , 27-30 . Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/dtfd/issue/36206/411472>
 - 16- **El-Metwally, S., Ouda, O. M., Helmy, M., El-Metwally, S., Ouda, O. M., & Helmy, M.** (2014). Next-generation sequencing platforms. *Next Generation Sequencing Technologies and Challenges in Sequence Assembly*, 37-44.
 - 17- **Frantsuzova, E., Bogun, A., Solomentsev, V., Vetrova, A., Streletskii, R., Solyanikova, I., & Delean, Y.** (2023). Whole Genome Analysis and Assessment of the Metabolic Potential of *Gordonia rubripertincta* Strain 112, a Degrader of Aromatic and Aliphatic Compounds. *Biology*, 12(5), 721. <https://doi.org/10.3390/biology12050721>
 - 18- **Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., & Saito, M.** (2016). Molecular approaches to studying microbial communities: targeting the 16S ribosomal RNA gene. *Journal of UOEH*, 38(3), 223-232. <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>
 - 19- **Güçlü, S., Albayrak, G., Deveci, A., & Ekmekçi, A.** (2014). Evrimin Moleküler İzleri Ve Kanıtları. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, 77(2), 31-36. <https://doi.org/10.18017/iuitfd.13056441.2015.77/2.31-36>
 - 20- **Gürsoy, N.C., & Barış, O.T.L.U.** (2017). Mikrobiyota çalışmalarında moleküler tanı yöntemleri. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 1, 56-67.
 - 21- **Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M.** (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*, 5(10), R245-R249. doi : 10.1016/S1074-5521(98)90108
 - 22- **He, H., Huang, J., Zhao, Z., Du, P., Li, J., Xin, J., ... & Zheng, X.** (2023). Whole genome analysis of *Streptomyces* sp. RerS4, a *Rehmannia glutinosa* rhizosphere microbe producing a new lipopeptide. *Heliyon*, e19543. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19543>
 - 23- **Horz, H. P., Rotthauwe, J. H., Lukow, T., & Liesack, W.** (2000). Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of amoA PCR products. *Journal of Microbiological Methods*, 39(3), 197-204. <https://doi.org/10.1016/S0167->

7012(99)00119-0

John Kimball has written an online biology textbook called ‘Taxonomy: Classifying Life’ that includes a chapter on ‘Phylogenetic trees’.

- 24- **Kahya, S., Buyukcangaz, E., & Carlı, K. T.** (2013). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) optimizasyonu. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 32(1), 31-38 Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/uluvfd/issue/13516/163496>
- 25- **Kanchanasin, P., Sriprechasak, P., Suriyachadkun, C., Rueangsawang, K., Tanasupawat, S., & Phongsopitanun, W.** (2023). *Streptomyces cylindrosporus* sp. nov. and *Streptomyces spinosisorus* sp. nov.: two new endophytic actinobacteria isolated from the roots of *Barleria lupulina* Lindl. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 73(5), 005926. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005926>
- 26- **Kocak, F. O., Tanir, S. G. E., Cetin, A. K., & Degirmenci, L.** (2023). Simultaneous evaluation of composting experiments and metagenome analyses to illuminate the effect of *Streptomyces* spp. on organic matter degradation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 39(3), 70. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03516-4>
- 27- **Koçak, F. Ö.** (2011). Bazı Nocardioform izolatların 16S rRNA, rpoB ve gyrB gen dizi analizleri ile moleküler sistematigi (Doctoral dissertation, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi).
- 28- **Komurcu-Bayrak, E., & Erginel-Ünaltuna, N.** (2011). Gen anlatımı analiz yöntemlerine genel bakış. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi, 1(2), 28-35. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/iudtaed/issue/8971/111896>
- 29- **Larsen, B. B., Miller, E. C., Rhodes, M. K., & Wiens, J. J.** (2017). Inordinate fondness multiplied and redistributed: the number of species on earth and the new pie of life. The Quarterly Review of Biology, 92(3), 229-265. <https://doi.org/10.1086/693564>
- 30- **Li, W., Raoult, D., & Fournier, P.E.** (2009). Bacterial strain typing in the genomic era. FEMS Microbiology Reviews, 33, 892-916. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x>
- 31- **Locey, K.J., & Lennon, J.T.** (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(21), 5970-5975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113>
- 32- **Louca, S., Mazel, F., Doebeli, M., & Parfrey, L. W.** (2019). A census-based estimate of Earth’s bacterial and archaeal diversity. PLoS biology, 17(2), e3000106. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000106>
- 33- **Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., ... & Rothberg, J. M.** (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature, 437(7057), 376-380. [|doi:10.1038/nature03959](https://doi.org/10.1038/nature03959)

- 34- **Moraes, F., & Góes, A.** (2016). A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 44(3), 215-223. <https://doi.org/10.1002/bmb.20952>
- 35- **Mulyawati, A. I., Jatmiko, Y. D., Mustafa, I., & Ardyati, T.** (2019). Diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented mare's milk products based on PCR-RFLP analysis. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 230(1), 012104. IOP Publishing. 10.1088/1755-1315/230/1/012104
- 36- **Mustopa, A. Z., Fatimah, F., & Budiarto, B. R.** (2020). Genetic diversity of lactic acid bacteria isolated from Sumbawa horse milk, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(7).<http://orcid.org/0000-0001-6614-5518>
- 37- **Muyzer, G.** (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 2(3), 317-322. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80055-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80055-1)
- 38- **Nehete, J. Y., Bhambar, R. S., Narkhede, M. R., & Gawali, S. R.** (2013). Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. *Pharmacognosy reviews*, 7(14), 107. DOI: 10.4103/0973-7847.120508
- 39- **Nouioui, I., & Sangal, V.** (2022). Advanced prokaryotic systematics: the modern face of an ancient science. *New Microbes and New Infections*, 49, 101036. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2022.101036>
- 40- **Opperdoes, F. R.** (2003). Phylogenetic analysis using protein sequences. *The phylogenetics handbook a practical approach to DNA and protein phylogeny*, 207-235.
- 41- **Osdaghi, E., Taghavi, S. M., Hamidizade, M., Fazliarab, A., Hajian Maleki, H., Li, X., ... & Portier, P.** (2023). *Clavibacter lycopersici* sp. nov.: a peach-colored actinobacterium isolated from symptomless tomato plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(9), 006022. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006022>
- 42- **Ozdemir-Kocak, F., Saygin, H., Saricaoglu, S., Cetin, D., Guven, K., Spröer, C., ... & Isik, K.** (2017). *Kribbella soli* sp. nov., isolated from soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110, 641-649. DOI 10.1007/s10482-017-0830-x
- 43- **Pallen, M. J., Telatin, A., & Oren, A.** (2021). The next million names for Archaea and Bacteria. *Trends in microbiology*, 29(4), 289-298. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.10.009>
- 44- **Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Klenk, H. P., Kletzin, A., Treusch, A. H., Meurer, G., ... & Schleper, C.** (2002). First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil. *Environmental Microbiology*, 4(10), 603-611. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00345.x>
- 45- **Ramanaiah, S. V., Cordas, C. M., Matias, S. C., Reddy, M. V., Leitao,**

- J. H., & Fonseca, L. P.** (2021). Bioelectricity generation using long-term operated biocathode: RFLP based microbial diversity analysis. *Biotechnology Reports*, 32, e00693. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00693>
- 46- **Rudi, K., Zimonja, M., Trosvik, P., & Naes, T.** (2007). Use of multivariate statistics for 16S rRNA gene analysis of microbial communities. *International journal of food microbiology*, 120(1-2), 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.004>
- 47- **Sarıçam, S., & Müştak, H. K.** (2015). Filogenetik ağaçlandırma metodları. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 26(2), 58-64. <https://doi.org/10.35864/evmd.513389>
- 48- **Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., & Brown, P. O.** (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235), 467-470. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.467>
- 49- **Schloss, P. D., Girard, R. A., Martin, T., Edwards, J., & Thrash, J. C.** (2016). Status of the archaeal and bacterial census: an update. *MBio*, 7(3), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mbio.00201-16>
- 50- **Sharma, A., Lee, S., & Park, Y. S.** (2020). Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review. *Food science and biotechnology*, 29, 1301-1318. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00802-x>
- 51- **Shen, C. H.**, (2019). Gene Expression: Transcription of the Genetic Code, *Diagnostic Molecular Biology* (pp.59-86), DOI:10.1016/B978-0-12-802823-0.00003-1
- 52- **Sibley, C. G., & Ahlquist, J. E.** (1984). The phylogeny of the hominoid primates, as indicated by DNA-DNA hybridization. *Journal of molecular evolution*, 20, 2-15.
- 53- **Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C., Martin, L., Haffajee, J. A., Uzel, N. G., & Goodson, J. M.** (2004). Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral microbiology and immunology*, 19(6), 352-362. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.2004.00168.x>
- 54- **Suleimanova, A. D., Itkina, D. L., Pudova, D. S., & Sharipova, M. R.** (2021). Identification of *Pantoea* phytate-hydrolyzing rhizobacteria based on their phenotypic features and multilocus sequence analysis (MLSA). *Microbiology*, 90, 87-95. DOI: 10.1134/S0026261721010112
- 55- **Tabit, F. T.** (2016). Advantages and limitations of potential methods for the analysis of bacteria in milk: a review. *Journal of food science and technology*, 53, 42-49. DOI 10.1007/s13197-015-1993-y
- 56- **Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., ... & Swings, J.** (2005). Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and*

- environmental microbiology, 71(9), 5107-5115. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5107-5115.2005>
- 57- **Tyagi, A., Chen, X., Shan, L., Yan, P., Chelliah, R., & Oh, D. H.** (2023). Whole-genome analysis of gamma-aminobutyric acid producing Psychobiotic *Limosilactobacillus reuteri* with its Untargeted metabolomics using UHPLC-Q-ToF MS/MS. *Gene*, 858, 147195. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147195>
- 58- **Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S. & Çakiris, A.** (2011). Yeni Nesil DNA Dizileme Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi, 1(1), 11-18. <https://dergipark.org.tr/en/pub/iudtaed/issue/8970/111884>
- 59- **Vakhlu, J., Sudan, A. K., & Johri, B. N.** (2008). Metagenomics: future of microbial gene mining. *Indian journal of microbiology*, 48, 202-215.
- 60- **Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., ... & Smith, H. O.** (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304(5667), 66-74. DOI: 10.1126/science.1093857
- 61- **Waleron, M., Waleron, K., Podhajska, A. J., & Łojkowska, E.** (2002). Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a recA gene fragment. *Microbiology*, 148(2), 583-595. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-583>
- 62- **Wang, X., & Weber, G. F.** (2021). Quantitative Analysis of Protein Evolution: The Phylogeny of Osteopontin. *Frontiers in Genetics*, 12, 700789. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.700789>
- 63- **Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J.** (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>