

**BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GDO ANALİZLERİNDE KULLANILAN CRM İZOLATLARININ  
KONTROLLÜ MUHAFAZA KOŞULLARINDA  
TEKRAR KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ayşe DAĞDELEN**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**MAYIS 2020**



**BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GDO ANALİZLERİNDE KULLANILAN CRM İZOLATLARININ  
KONTROLLÜ MUHAFAZA KOŞULLARINDA  
TEKRAR KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ayşe DAĞDELEN  
(171083105)**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL**

**MAYIS 2020**



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere göre uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından TAGEM/GYKMAE/A/19/A3/P7/01 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

## İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Ayşe DAĞDELEN





*Eşime ve çocuklarıma,*

## ÖNSÖZ

Katkılarından dolayı danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL'a, tezim süresince laboratuvar çalışmalarında emeğini ve tecrübesini esirgemeyen mesai arkadaşım Nihal AKMAN'a ve her zaman yanımda olan, desteğini hissettiğim değerli eşim Adnan Fatih DAĞDELEN'e teşekkür ederim.

Çalışmanın gerçekleşmesinde Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Bölümü Laboratuvar alt yapısı kullanılmıştır. Ayrıca tez çalışması Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nün TAGEM/GYKMAE/A/19/A3/P7/01 numaralı "GDO Analizlerinde Kullanılan CRM İzolatlarının Kontrollü Muhafaza Koşullarında Tekrar Kullanım Olanaklarının Araştırılması" adlı TAGEM projesi olarak desteklenmiştir.

Mayıs 2020

Ayşe DAĞDELEN  
(Gıda Mühendisi)

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	v
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	vi
<b>KISALTMALAR</b> .....	viii
<b>SEMBOLLER</b> .....	x
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	xi
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	xii
<b>ÖZET</b> .....	xiii
<b>SUMMARY</b> .....	xiv
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Sertifikalı Referans Maddeler (CRM).....	3
1.2 GDO Analizleri.....	5
1.2.1 Protein temelli yöntemler.....	6
1.2.2 Nükleik asit temelli yöntemler.....	7
1.2.2.1 PCR teknikleri.....	7
1.2.2.2 Sensörler.....	11
1.2.2.3 Mikrodizilimler.....	10
1.3 DNA'nın Yapısı ve DNA Kararlılığını Etkileyen Faktörler.....	12
1.4 DNA Muhafazasının Metodolojisini Belirleyen Faktörler.....	14
1.4.1 DNA'nın kaynağı.....	14
1.4.2 DNA'nın depolama sıcaklığı ve süresi.....	14
1.4.3 DNA'nın saflığı.....	15
1.5 DNA'nın Bozunma Kinetiği Üzerine Araştırmalar.....	15
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>19</b>
2.1 Materyal.....	19
2.1.1 Sertifikalı referans malzemeler.....	19
2.1.2 DNA izolasyon kiti.....	20
2.1.3 Rnase A çözeltisi.....	20
2.1.4 Reaktif çözeltisi.....	20
2.1.5 Primer ve proplar.....	21
2.2 Yöntem.....	21
2.2.1 DNA izolasyon basamağı.....	22
2.2.2 DNA miktar analiz basamağı.....	23
2.3 Denemenin kurulması ve istatistiki değerlendirme.....	25
<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>27</b>
3.1. Metot Verifikasyon Bulguları.....	27
3.2. Nanodrop Spektrofotometresi Ölçüm Bulguları.....	27
3.3. Real Time PCR'da GDO Miktar Analiz Bulguları ve Tartışma.....	28



3.3.1 Soya CRM'ine ait % GDO miktar bulguları.....	29
3.3.2 Mısır CRM'ine ait % GDO miktar bulguları.....	33
3.3.3 Soya ve mısır bulgularının tartışılması.....	36
<b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>38</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>39</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>45</b>



## KISALTMALAR

<b>A</b>	: Adenin
<b>C</b>	: Sitozin
<b>CRM</b>	: Sertifikalı Referans Madde (Certified Reference Material)
<b>Ct</b>	: Eşik döngüsü (Cycle threshold)
<b>dk.</b>	: Dakika
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit (Dimethyl sulfoxide)
<b>DNA</b>	: Deoksiribo nükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleosid trifosfat (Deoxynucleoside triphosphate)
<b>dsDNA</b>	: Çift sarmal DNA
<b>dUTP</b>	: Deoksiurasil trifosfat (Deox uracil triphosphate)
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik asit (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
<b>ELİSA</b>	: Enzime Bağlı İmmünosorban Deneyi
<b>ERM</b>	: Avrupa Referans Materyalleri (European Reference Materials)
<b>EURL</b>	: Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı (European Union Reference Laboratory)
<b>G</b>	: Guanin
<b>GD</b>	: Genetiği Değiştirilmiş
<b>GDO (GMO)</b>	: Genetiği Değiştirilmiş Organizma (Genetically Modified Organisms)
<b>ISO</b>	: Uluslararası Standardizasyon Örgütü (International Organization for Standardization)
<b>IUPAC</b>	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (The International Union of Pure and Applied Chemistry)
<b>HCV</b>	: Hepatit C Virüsü
<b>Hmg</b>	: Mısıra özgü olan ve GDO analizlerinde referans olarak kullanılan bir dizilim
<b>JRC</b>	: Ortak Araştırma Merkezi (Joint Research Centre)
<b>Le1</b>	: Soyaya özgü olan ve GDO analizlerinde referans olarak kullanılan bir dizilim
<b>LOD</b>	: Tespit Limiti (Limit of Detection)
<b>LOQ</b>	: Ölçüm Limiti (Limit of Quantification)
<b>LSD</b>	: En az önemli fark (Least Significant Difference)

<b>P</b>	: Önemlilik derecesi
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
<b>qPCR</b>	: Kantitatif PCR (Quantitative PCR)
<b>RNA</b>	: Ribo nükleik asit
<b>RNase</b>	: Ribonükleaz
<b>ROX</b>	: Rodamin X (Rhodamine X)
<b>ssDNA</b>	: Tek sarmal DNA
<b>T</b>	: Timin
<b>UNG</b>	: Urasil DNA Glikozilaz (Uracil DNA glycosylase)
<b>UV</b>	: Ultraviyole



## SEMBOLLER

<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>dk</b>	: Dakika
<b>g</b>	: Gram
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>nM</b>	: Nanomolar
<b>pg</b>	: Pikogram
<b>rcf</b>	: Bağıl Santrifüj Kuvveti (Relative Centrifugal Force)
<b>rpm</b>	: Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions per Minute)
<b>R<sup>2</sup></b>	: Determinasyon katsayısı (coefficient of determination)
<b>T<sub>m</sub></b>	: Erime sıcaklığı

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : Çalışmada kullanılan CRM'ler .....	19
Çizelge 2.2 : İzolasyon kimyasalları .....	20
Çizelge 2.3 : Reaksiyon çözeltisine ait bilgiler .....	20
Çizelge 2.4 : Primer ve problara ait bilgiler .....	21
Çizelge 2.5 : Basamaklarda kullanılan cihazlara ait bilgiler .....	21
Çizelge 2.6 : DNA izolasyon basamağı aşamaları .....	22
Çizelge 2.7 : Kalibrasyon eğrisi için standart hazırlığı.....	24
Çizelge 2.8 : Soya ve mısıra ait referans ve hedef kısımların amplifikasyonu için nihai reaksiyon karışımı .....	24
Çizelge 2.9 : Real Time-PCR cihazında analiz döngü parametreleri .....	25
Çizelge 2.10 : Kantitatif metodlar için metot verifikasyon parametreleri ve performans kriterleri .....	25
Çizelge 2.11 : Çalışmaya ait deneme deseni .....	26
Çizelge 3.1 : Metot verifikasyon parametreleri, performans kriterleri ve soya-mısır için verifikasyon verileri.....	27
Çizelge 3.2 : Soya CRM izolatlarına ait Nanodrop Spektrofotometre ölçüm bulguları .....	28
Çizelge 3.3 : Mısır CRM izolatlarına ait Nanodrop Spektrofotometre ölçüm bulguları.....	28
Çizelge 3.4 : Real time PCR'da soyaya ait kalibrasyon verileri ve kriterlere uygunluğu .....	29
Çizelge 3.5 : Real Time PCR'da soyaya ait % GDO miktar bulguları.....	29
Çizelge 3.6 : Real Time PCR'da mısıra ait kalibrasyon verileri ve kriterlere uygunluğu.....	33
Çizelge 3.7 : Real Time PCR'da mısıra ait % GDO miktar bulguları.....	33

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 : PCR’da DNA’nın üssel çoğalması.....	9
Şekil 1.2 : Farklı PCR prensipleri: 1. SYBR Green; 2. FRET (Floresan Rezonans Enerji Transferi); 3. TaqMan (5`-3`- degradasyon problemleri).....	11
Şekil 2.1 : Çalışmada kullanılan CRM'ler .....	19
Şekil 2.2 : GDO analiz basamakları .....	22
Şekil 3.1 : %10'luk Soya CRM'e ait kalibrasyon eğrileri, a: Referans kısım, b: Hedef kısım .....	30
Şekil 3.2 : %1'lik Soya CRM'e ait kalibrasyon eğrileri, a: Referans kısım, b: Hedef kısım .....	31
Şekil 3.3 : %1'lik soya ve mısır CRM'lere dondur-çözdür uygulamasının etkisi .....	32
Şekil 3.4 : %10'luk soya ve mısır CRM'lere dondur-çözdür uygulamasının etkisi .....	32
Şekil 3.5 : %10'luk Mısır CRM'e ait kalibrasyon eğrileri, a: Referans kısım, b: Hedef kısım .....	34
Şekil 3.6 : %1'lik Mısır CRM'e ait kalibrasyon eğrileri, a: Referans kısım, b: Hedef kısım .....	35

# GDO ANALİZLERİNDE KULLANILAN CRM İZOLATLARININ KONTROLLÜ MUHAFAZA KOŞULLARINDA TEKRAR KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

## ÖZET

Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) avantaj ve dezavantajları tartışılmakla beraber potansiyel yararları nedeniyle halen yaygın olarak üretilen ürünlerdir. Ürünlerde GDO varlığının tespiti kalitatif tarama ve tiplendirme analizleri ile belirlenirken, miktar analizleri kantitatif testlerle yapılmaktadır. GDO analizlerinden tiplendirme analizlerinde pozitif kontrol olarak ve miktar analizlerinde kalibrasyon eğrisi hazırlamada sertifikalı referans maddeler (CRM) kullanılmaktadır.

Analizlerde kullanılan CRM'ler her seferinde taze olarak hazırlanmaktadır. Ancak bu materyallerin çok pahalı olması ve hazırlanan miktarın tek seferde kullanılamaması bu analizi yapan laboratuvarlar için önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu soruna çözüm olarak analizlerden geriye kalan CRM izolatlarının tekrar kullanılabilme olanaklarının belirlenmesi önem arz etmektedir. Deoksiribo nükleik asit (DNA)'e uygulanan dondur-çözdür işlemlerinde DNA'nın degrade olup olmadığı ile ilgili bitkisel ürünlerde yeterli bilimsel veri bulunmadığı fark edilmiş olup çalışmaların ise daha çok parazit, virüs ve kan örnekleri ile sınırlı olduğu görülmüştür.

Planlanan bu çalışma ile bitkisel ürünlerde GDO miktar analizlerinde kullanılan CRM'lerden elde edilen DNA izolatlarında kontrollü muhafaza koşullarında dondur-çözdür uygulaması ile meydana gelebilecek degradasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla soya (DP-305423-1) ve mısır (DAS-40278-9) genini içeren CRM'lerden Eurofins Genespin Kit Metodu ile DNA izolasyonu yapılmış, elde edilen izolatlara belirli sıklıklarla dondurma ( $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) ve laboratuvar koşullarında ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) çözdürme işlemleri uygulanmıştır. Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı (EURL) metodları kullanılarak Applied Biosystems 7500 Fast Real time PCR System cihazında GDO miktar analizi yapılmış, elde edilen veriler SPSS paket programına göre istatistiki olarak değerlendirilerek dondur-çözdür uygulamasının çalışılan CRM izolatları üzerinde etkisi önemsiz bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** GDO, DNA, CRM, Analiz, Muhafaza, Dondur-Çözdür

## **INVESTIGATION OF REUSE CAPABILITIES OF CRM ISOLATES USED IN GMO ANALYSIS IN THE CONTROLLED STORAGE CONDITIONS**

### **SUMMARY**

Although the advantages and disadvantages of genetically modified organisms (GMOs) are discussed, they are still widely produced due to their potential benefits. Detection of the presence of GMO in the products is determined by qualitative screening and typing analyzes, while quantity analyzes are carried out by quantitative tests. Certified reference materials (CRM) are used as positive controls in typing analyzes from GMO analyzes and in calibration curves in quantity analyzes. The CRMs used in the analyzes are prepared fresh each time.

However, the fact that these materials are very expensive and that the prepared amount cannot be used at one time poses an important problem for the laboratories performing this analysis. As a solution to this problem, it is important to determine the possibilities of reuse of the CRM isolates remaining from the analyzes. In the freeze-thaw processes applied to deoxyribo nucleic acid (DNA), it was found that there was not enough scientific data on plant products about the degradation of DNA and the studies were found to be mostly limited to parasites, viruses and blood samples.

The aim of this study was to determine the degradation of freeze-thaw application of DNA isolates obtained from CRMs used in GMO quantity analysis of plant products under freeze-thaw application under controlled storage conditions. For this purpose, DNA isolation was performed by using Eurofins Genespin Kit Method from CRMs containing soy (DP-305423-1) and corn (DAS-40278-9) gene, and freeze ( $-20\pm 2$  °C) thawing ( $22\pm 2$  °C) processes were applied to the obtained isolates at certain frequencies. GMO Quantitative analysis was performed on Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System using the European Union Reference Laboratory (EURL) methods. The obtained data were evaluated statistically according to SPSS package program and the effect of freeze-thaw application on the CRM isolates studied was insignificant.

**Keywords:** GMO, DNA, CRM, Analysis, Storage, Freeze-Thaw



## 1. GİRİŞ

Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) modern biyoteknolojik yöntemler kullanmak suretiyle gen aktararak elde edilmiş, insan dışındaki canlı organizmalardır [1]. Modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilen bu genetiği değiştirilmiş organizmalar ve ürünleri dünyada güvenirlilik kontrolleri devam eden ürün grupları arasında yer almaktadır. Avantaj ve dezavantajları halen dünyada tartışılmakla beraber bazı potansiyel yararları yaygın olarak üretilmelerini gerektirmektedir. Tarımsal biyoteknolojide böcek direnci, herbisit toleransı, antibiyotik stres toleransı, ürün verimliliği, ürün kalitesi, kuraklık ve tuzluluğa direnç, hastalık direnci ve tozlaşma kontrol sistemi nedeniyle tercih edilmektedir. Uluslararası Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamalarını Edinme Servisi (International Service for the Acquisition of AgriBiotech Applications - ISAAA)'nin verilerine göre dünyada 32 adet bitki türünde 526 tip genetik modifikasyon yapılmıştır. Bu 526 tip içerisinde en çok çalışma yapılanları ise sırasıyla mısır (238), pamuk (67), patates (49), kanola (42), soya (41) oluşturmaktadır. Dünyada yaklaşık 200 milyon hektar alanda GDO'lu bitki ekimi yapılmaktadır ve elde edilen ürünlerin %50'sini soya, %31'ini mısır, %13'ünü pamuk, %5'ini kanola ve %1'ini de diğerleri oluşturmaktadır [2].

Dünyada GDO politikaları ABD ve AB'nin farklı tutumları nedeni ile iki yönde gelişmiş ve Türkiye bu kapsamda Avrupa Birliği (AB) ile uyum sürecinde olduğundan risk esaslı ihtiyatilik ilkesini benimsemiştir [3]. Ülkemizde bilimsel ve teknolojik gelişmeler çerçevesinde, modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilen genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerinden kaynaklanabilecek riskleri engellemek, insan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevrenin ve biyolojik çeşitliliğin korunması, sürdürülebilirliğinin sağlanması amacıyla biyogüvenlik sisteminin kurulması ve uygulanması, bu faaliyetlerin denetlenmesi, düzenlenmesi ve izlenmesi ile ilgili usul ve esaslar 5977 sayılı Biyogüvenlik Kanunu ile belirlenmiştir [1].

Ülkemizde GDO ürünlerinin resmi analizleri Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı kamu ve özel gıda kontrol laboratuvarları tarafından yapılmaktadır. Ülkemizde GDO'ların gıda amaçlı kullanılması yasak olduğundan gıda bileşeni olarak ithalatına

izin verilmemektedir. Bakanlık tarafından onay verilen genleri içeren yem ve yem hammaddelerinin ithalatı ise etikette belirtmek şartıyla serbesttir. Yem amaçlı onaylanan gen çeşitleri için GDO'lu olarak etiketlenmesini gerektiren eşik değer % 0,9 olarak uygulanmaktadır [3].

GDO analizlerinin ilk aşaması DNA'nın ekstraksiyon ve saflaştırılmasını içeren DNA izolasyonu olup analizin en uzun süren kısmını oluşturmaktadır. GDO analizlerinde numunede saptanan GDO varlığının doğrulanması (tiplendirme analizlerinde pozitif kontrol) ve miktarının belirlenmesi (kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında) sertifikalı referans maddeler (Certificate Reference Material - CRM) ile gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle analizlerde kullanılan CRM'lerden izolasyon sonrası elde edilen nükleik asitlerin kalitesi ve saflığı PCR analizi için çok önemlidir.

Buna ilaveten DNA ekstraktlarının eldesinde kullanılan ekstraksiyon metodu, kullanılan çözeltiler, saflıklar (özellikle bulaşma kaynaklı safsızlıklar), iyon gücü, tüp materyali kalitesi, UV ışığın zararları, depolama boyunca sıcaklık ve nem oranı da analizleri etkileyen faktörlerdendir [4]. PCR sinyallerini etkileyen hatalar ancak analiz sonrasında fark edilebilmekte ve analizin tekrarlanmasına neden olmaktadır. Dondurulup çözödürölen izolatların miktar analizi gibi yüksek hassasiyet ve maliyet gerektiren bir analiz için kullanılması durumunda ise DNA'nın degrade olup olmadığının bilinmesi gerekmektedir.

İzolasyon sonrası elde edilen DNA izolatlarının tekrar kullanılabilme olanakları düşünöldüğünde, DNA'nın degrade olup olmadığı ile ilgili bitkisel ürünlerde yapılmış çalışmaya rastlanmamıştır. DNA'nın muhafaza yöntemleri ile ilgili çalışmalar incelendiğinde dondur-çözödür uygulamasının DNA degradasyonu üzerine etkileri parazit, bakteri, virüs, kan ve doku örnekleri ile sınırlı kalmaktadır.

Bitki DNA'sında yapılmış bu çalışma ile dondur-çözödür işleminin izolat haldeki DNA'nın degradasyonuna neden olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Böylece CRM izolatlarının etkin şekilde kullanılabileceği zaman diliminin belirlenmesi ve analiz tekrarının ortadan kaldırılması ile zaman ve maliyet açısından avantajlar sağlanacağı düşünölmüştür.

Bu kapsamda GDO rutin analizlerinde en sık karşılaşılan DP-305423-1 soya ve DAS-40278-9 mısır genini içeren CRM'ler kullanılmıştır. GDO içeren bu CRM'lerden izolatlar hazırlanmıştır. Bu izolatlara belirli sıklıklarla  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de dondurma ve

laboratuvar koşullarında ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) çözdürme işlemleri uygulanmıştır. DNA düzeyinde meydana gelen değişimler Real Time PCR'da izlenmiştir.

### **1.1 Sertifikalı Referans Maddeler (CRM)**

Avrupa Komisyonu'nun 1829/2003 sayılı yönetmeliği gereğince gıda ve yemde % 0,9 üzerinde GDO bulunması durumunda etikette belirtilmesi gerektiği vurgulanmaktadır [5]. Onay sürecindeki % 0,1 düzeyinde GDO içeren yemlere de etikette belirtilmek koşuluyla izin verilmektedir. Bu yasal düzenlemelerin uygulanması sertifikalı referans maddelerin ve valide edilmiş metodların kullanılmasını gerektirmektedir [6]. Gıda veya yem ürünlerinde GDO içeriğinin miktarının belirlenmesi, esasen iyi tanımlanmış DNA sekanslarının saptanmasına, çoğaltılmasına ve nispi olarak ölçülmesine dayanır. Spesifik bir DNA sekansının ölçülen miktarının başka bir DNA sekansının ölçülen miktarıyla ilişkilendirilmesi sonucunda bir DNA fragman oranı ortaya çıkar. Ölçülen bir floresan sinyali için çalışılan DNA fragmanının miktarı veya kütlesi için karakteristik bir miktara dönüştürmek için qPCR'nin kalibre edilmesi gerekir [7]. Bu amaçla farklı formlarda elde edilmiş referans maddeler kullanılır.

CRM'ler; laboratuvarlar tarafından elde edilen test sonuçlarına güveni artıran kalite güvence araçlarıdır. Kesin referans değerleri ve veriler sağlayarak laboratuvar cihazlarının kalibrasyonunda anahtar rol oynarlar [6].

Ölçülmekte olan analitin tanımlanması ve ölçüm biriminin standart, basit ve uluslararası kabul görmüş bir dilde anlaşılması önemlidir. Ayrıca, laboratuvarlar ve metodlar arasındaki uyumu doğrulamak, metod validasyonu ve doğrulaması için sertifikalı referans materyallerinin kullanılması önemlidir [8].

Analizlerde kullanılacak referans materyallerin farklı formları mevcuttur. Bunlar: bilinen bir analiti içeren sertifikalı materyal, bilinen bir analiti içeren bir numuneden ekstrakte edilmiş DNA, hedef analitin plazmid kopyaları, hedef analitin PCR ampliconu ya da hedef analit olarak dizilimi bilinebilen sentetik oligamerler olabilmektedir [8].

Dünyada CRM üretimi konusunda öne çıkan firmalar AB'deki Referans Malzemeler ve Ölçümler Enstitüsü (IRMM), Amerikan Petrol Kimyagerleri Derneği (AOCS) ve Japonya'daki NipponGene'dir. CRM'lerin toz, ekstrakt ve plazmid halinde üretimi yapılabilmektedir. IRMM ağırlıklı olarak kütle fraksiyonu olarak ifade edilen toz

CRM'leri ve plazmid CRM'leri geliştirirken AOCS ekstrakt ve toz halde CRM'ler geliştirmektedir [9].

Üretilen CRM'lerin geçerli kılınmasında (validasyon) kullanılan metot performans parametreleri Ortak Araştırma Merkezi (Joint Research Centre, JRC)'nin 2015 teknik raporunda ayrıntılı olarak belirtilmiştir. Bu parametreler arasında doğruluk, kesinlik, özgüllük, dinamik aralık, R<sup>2</sup> katsayısı, amplifikasyon verimliliği, tespit limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ), vb. yer almaktadır. Rapor yöntem geliştiren ve optimizasyon yapan kurumlar ile validasyon belirleme yöntemleri geliştirmek ve teklif etmek isteyen başvuru sahipleri için hazırlanmıştır [10].

CRM'lerin varlığına dayanarak bir çok ülke geçtiğimiz yıllarda kendi izlenebilirliği ve etiketleme yasal düzenlemelerini kendi ihtiyaçlarına göre ayarlamışlardır. Avrupa Birliği için izin alınacak bir GDO durumu söz konusu ise CRM'ler ön koşulu oluşturmaktadır. Trapmann (2002)'de CRM'lerin üretim, sertifikasyon ve kullanım işlemlerinin Uluslararası Standardizasyon Örgütü (International Organization for Standardization, ISO) ve Referans Topluluk Bürosu (Community Bureau of Reference, BCR) rehberlerine uyumlu bir şekilde gerçekleştirildiğini bildirmiştir (Ünal, 2019'da atıfta bulunulduğu gibi). Üretim ve sertifikalandırma işlemlerini de Avrupa Komitesi Ortak Araştırma Merkezi- Referans Materyal ve Ölçümleri Enstitüsü (EC-JRC-IRMM) yapmaktadır [11].

Ülkemizde GDO analizi yapan kurumlar için onaylanmış metodların doğrulaması (verifikasyon) yapılırken JRC'nin 2011 "Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods" ve 2015 "Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing" rehberleri esas alınarak hazırlanmış ve 2018'de Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü tarafından yayınlanmış "GDO Analizlerinde Verifikasyon Rehberi" kullanılmaktadır.

CRM'ler her bir GD çeşit için bitkinin tohum ya da meyve kısımlarından elde edilir. Bu amaçla GD ve GD olmayan bitki kısımları gravimetrik olarak karıştırılarak 0-1000g/kg aralığında CRM'ler üretilir. Kuru toz formunda elde edilen bu CRM'lerin üretim aşamaları aşağıdaki gibi sıralanabilir [11];

Temel malzeme karakterizasyonu

1. Tanenin yüzey kısımlarının temizlenmesi
2. Öğütme

3. Gravimetrik karıştırma
4. Argon gazı altında şişelerin kapatılması
5. Etiketleme
6. Son ürün kontrolü.

2017 yılında yayımlanan JRC Teknik Raporları'nda "GDO analiz sonuçlarının ifade edilmesinde kullanılan ölçüm birimi ilgili kalibrantın onaylandığı ölçüm birimidir." ifadesi yer almaktadır. CRM'lerin ölçü biriminin ifadesinde; kalibrant kütle kesri için CRM sertifikasına sahipse, sonuçların kütle kesri olarak, kalibrant DNA kopya numarası oranı için onaylanmışsa sonuçların DNA kopya numaralarının bir oranı olarak ifade edilmesi gerektiği; (AB) 619/2011 sayılı Tüzük uyarınca, ikinci sonuçların bir dönüşüm faktörü uygulanarak GD kütle fraksiyonuna dönüştürülmesinin önemi vurgulanmıştır (Wu, 2019'da atıfta bulunulduğu gibi) [9].

Kaltenboeck ve diğ. (2005) nükleik asit hedeflerinin tespitinin, tıbbi, biyolojik, çevresel ve gıda ile ilgili teşhis uygulamalarda önemli bir araç olduğunu vurgulamışlardır (Röder ve diğ., 2010'da atıfta bulunulduğu gibi) [12]. Çeşitli metodik parametreler arasında güvenilir ve ölçülebilir verileri sağlamak için kararlı standartlar sorunu en büyük öneme sahiptir. Bu DNA standartları ölçülür, seri olarak seyreltilir ve daha sonra kalibrasyon çizgisi için kullanılır. Bu üretim prosedürü ayrıntılı olduğu için DNA standartlarının depolanması arzu edilir. Standartların uzun süreli depolanması maliyet ve zamandan tasarruf sağlarken, DNA çözeltileri bozulmaya eğilimlidir [12]. Hedef analit bozulmasını en aza indirmek için referans materyallerin üretici tarafından belirtilen doğru koşullar altında depolanması önemlidir. Örneğin, matriks biçimindeki veya ekstrakte DNA'daki referans malzeme ideal olarak -20°C'de saklanabilir. Referans maddeler, diğer reaktifler gibi, laboratuvarında her yeni lot kullanıldığında güvenilirlik açısından test edilmelidir [8].

## **1.2 GDO Analizleri**

Küresel tarım ve gıda sektöründe karşılaşılan zorlukların ortadan kaldırılması amacıyla genetiği değiştirilmiş organizmalar ve transgenik bitkilerin sayısında her geçen gün artış gözlenmektedir. Yemlerde kullanılan GDO'nun gıda zincirine de girmesi beraberinde birçok tartışma ve endişeye neden olmuştur. Bu endişelere yanıt olarak, birçok ulusal ve uluslararası otorite, GDO'ların ve ürünlerinin kullanımını ve nakilini yönetip kontrol etmek için kurallar ve düzenlemeler getirmiştir. Bu

düzenlemelerin uygulanmasını garanti altına almak için GDO'ların doğru ve hassas bir şekilde belirlenmesini sağlayan analitik metodların geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir [13, 14].

GDO analizinde kullanılan referans metodların onaylanması ISO ya da Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (The International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) gibi uluslararası bir kuruluş tarafından valide edilmelerini gerektirir. Avrupa Birliği Genetiği Değiştirilmiş Gıda ve Yem Referans Laboratuvarı (The European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, EU-RL GMFF) tarafından da yasal düzenlemelere uyum çerçevesinde doğrulamaları yapılarak ilgili kurumların hizmetine sunulur [13].

GDO analizleri hakkında yol gösterici bilgi sağlayan aşağıda yer alan veritabanları bulunmaktadır.

- GDO Analizleri İçin Referans Metotların Özetleri (Compendium of reference methods for GMO analysis)
- GDO Metotları (GMOMETHODS)
- CropLife Uluslararası Tespit Yöntemleri Veritabanı (CropLife International Detection Methods Database)
- Çin GDO Tespit Yöntemi Veritabanı (Chinese GMO Detection Method Database-GMDD) [15].

Bugüne kadar uygulanmış GDO tespit yöntemleri arasında iki temel yöntem karşımıza çıkmaktadır. Bunlar genin ifade edildiği proteini saptayan proteine dayalı yöntemler ve değiştirilen gen dizilimini saptayan nükleik asite dayalı yöntemlerdir [16].

### **1.2.1 Protein temelli yöntemler**

Genellikle immünojenik testler olarak adlandırılan protein bazlı saptama yöntemleri, bitki dokularında ve bunların türevi ürünlerde spesifik bir proteinin varlığını veya miktarını belirlemede kullanılır. Proteinin tanımlanması o proteine özgü antikorlar ile mümkündür. Mevcut kullanımları sıklıkla enzime bağlı bir immünosorban testi (ELISA) veya yatay akış şeritleri (Lateral Flow Strips) şeklindedir.

Protein bazlı saptama yöntemleri genellikle ticari olarak kit formatında bulunur ve tohum matrislerinde yaygın olarak kullanılır. Protein bazlı saptama yöntemleri, aynı proteini ifade eden biyoteknolojiden türetilen farklı ürünler arasında ayırım yapamaz.

Ayrıca, proteinler genellikle işleme ile denatüre edildiğinden, protein bazlı tespit yöntemleri işlenmemiş veya az işlenmiş ürünler (örn., tahıl, un) üzerinde kullanım için daha uygundur. Bununla birlikte, belirli işlenmiş ürünler için de metodlar zaman zaman geliştirilmiştir [17].

## **1.2.2 Nükleik asit temelli yöntemler**

Nükleik asit temelli tespit metodları arasında sensörler, mikrodizilimler ve farklı şekillerde modifiye edilmiş PCR'lar yer almaktadır.

### **1.2.2.1 PCR teknikleri**

Belirli bir biyoteknolojik ürün içeren spesifik bir DNA sekansını saptamanın en yaygın tekniği polimeraz zincir reaksiyonudur (PCR). Bu teknik, bir sekansın varlığını veya yokluğunu belirlemek için kalitatif olabilir veya biyoteknolojik olarak türetilmiş bir üründen DNA miktarını belirlemek için kantitatif olabilir. “Çeşide özgü PCR yöntemleri (Event-Spesifik Methods)”, belirli bir biyoteknoloji türevi ürüne özgü DNA dizilerini tespit etmek için tasarlanmıştır. Birçok çeşitte ortak olarak bulunan DNA dizilerini tespit eden yöntemlere ise “tarama yöntemleri” denir.

Bugüne kadar modifikasyonlar yapılmış PCR'lar arasında Geleneksel PCR, Ters Transkriptaz PCR (reverse transcriptase), İç içe PCR (Nested), Çoklu PCR (Multiplex), Hot Start PCR, In situ PCR, Ters PCR (Inverse), Kantitatif PCR ve Dijital PCR yer almaktadır [11].

Proteinlere kıyasla nükleik asitlerin daha stabil olması PCR kullanımının yaygınlaşmasına neden olmuştur. Hassas, spesifik ve güvenilir olması, işlenmiş ürünlerde bile düşük düzeydeki GDO miktarının tespit edilebiliyor olması PCR'ın başlıca avantajlarıdır [18, 19]. Ancak, PCR'ın avantajı olarak görülen yüksek hassasiyet özelliği kimi zaman kullanıcılar için dezavantaja dönüşebilmektedir. İz miktarda DNA kontaminasyonunda bile kontaminant, hedef DNA (çoğaltılmak istenen gen bölgesi) olarak algılanıp çoğalabilir. Bu da “yanlış pozitiflere” (yani, bir numunede bir ürünün bulunduğu dair hatalı işaret) ve dolayısıyla yanıltıcı sonuçlara neden olabilmektedir [17]. Bu sebeple analiz için kullanılan alanların DNA'dan arındırılmış ortamda yapılması önem taşımaktadır. Fiziki ayrımın yapıldığı ortamlarda çalışmanın kontaminasyon riskini azalttığı bilinmektedir. Dekontaminasyonun

engellenmesi ise yanlış pozitif sonuçların minimuma indirilmesi açısından zorunlu hale gelmiştir [20].

PCR in vitro bir tekniktir. Bir nükleik asit zincirine ait özel bir bölümünün enzim kullanılarak çoğaltılması ve oluşan ürünlerin miktarına paralel olarak artan floresan sinyalin ölçülmesi prensibine dayanır. Metottaki sıcaklıklar DNA'nın denatürasyonu (çift zincirin ayrılması), primer eşleşmesi (primerlerin bağlanması) ve primer uzaması (zincirin uzaması) sırasında gerekli ısıya göre belirlenmiştir. Denatürasyon sırasında yüksek sıcaklık gerekmektedir. Bu nedenle; reaksiyonda kullanılacak enzim uygulanacak sıcaklıklara dayanıklı olmalıdır. Taq/AmpliTaq DNA Polimeraz yüksek sıcaklıklarda çalışabilmesi sebebiyle reaksiyon için en uygun enzim olarak kullanılmaktadır.

Denatürasyon, bağlanma ve uzamadan oluşan reaksiyonlar 'Bir döngü' olarak kabul edilir. Her döngü sonunda oluşan DNA zinciri, kendisinden sonraki döngünün kalıbı olabileme özelliğindedir. Başarılı bir amplifikasyon sonrası oluşan ilk ürünler, iki primer bağlanma bölgesi arasındaki uzaklıktan daha fazla uzunluğa sahip, boyut olarak farklı DNA molekülleridir. Bir sonraki döngü ise istenen uzunluktaki DNA zincirlerinin oluştuğu döngüdür. Bu döngünün ürünleri diğer amplifikasyon döngülerinde doğrusal bir şekilde çoğaltılarak reaksiyon için temel çıktı oluşturulur. Amplifikasyon, reaksiyon başlangıcındaki ana zincirin reaksiyon sonundaki kopya sayısı olarak aşağıdaki formülle ifade edilir:

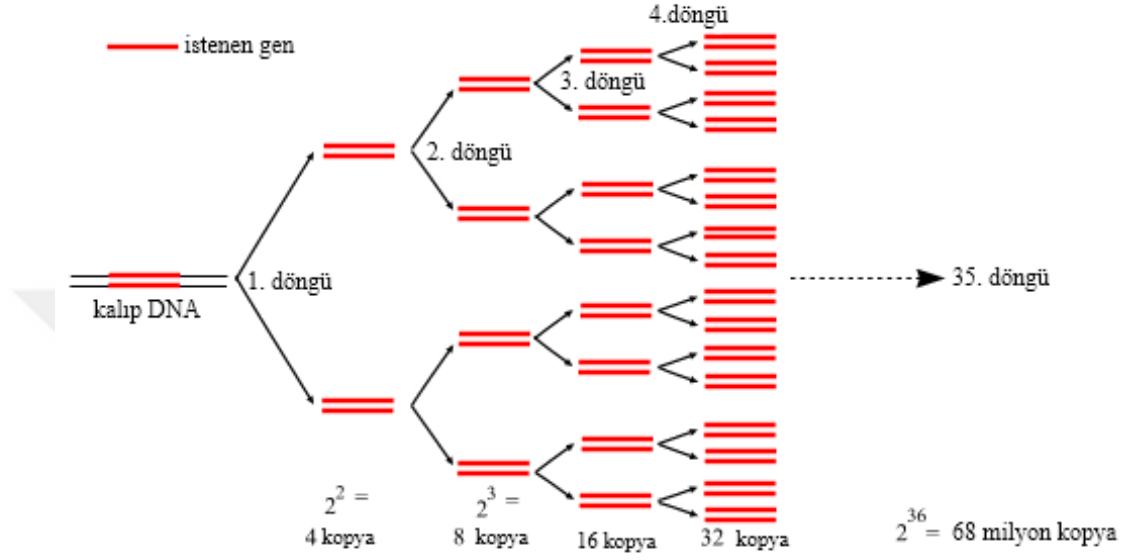
$$(2^n - 2n)x \quad (1.1)$$

Formüldeki n; Döngü sayısı, 2n; İlk ve ikinci döngüden sonra elde edilen uzunluğu bilinmeyen ürünler, x; DNA ana zincirinin kopya sayısıdır. 2n değeri 2<sup>n</sup> ile karşılaştırıldığında önemsizdir [20].

Template Denatürasyonu: Denatürasyon yaklaşık 93-96°C sıcaklıklarda, bütün enzimatik reaksiyonların durduğu, DNA'nın çift sarmal yapısını oluşturan iki eş zincir arasındaki kuvvetli hidrojen bağlarının çözülerek eşleşmemiş bazların sayısında artışın meydana geldiği bir aşamadır. Reaksiyonun tamamlanabilmesi için çift sarmal (ds) DNA'nın tamamının tek sarmal (ss) DNA'ya dönüşmesi gerekir. Başlangıçtaki dsDNA'nın yarısının (ss) DNA'ya dönüştüğü sıcaklığa T<sub>m</sub> (erime sıcaklığı) adı verilir. Denatürasyon, reaksiyon için hazırlanan çözücüler, kullanılan tuzların derişimleri ve pH'dan etkilenen bir aşamadır. Tuz derişiminin düşük, pH'nın yüksek



olması ve formaldehit benzeri organik çözücülerin ortamda bulunması  $T_m$  değerini düşürür. DNA'yı oluşturan nükleotid çiftlerinin oranı yani G/C ve T/A oranları da  $T_m$  değerini etkiler. G/C oranının T/A oranına göre yüksek olması  $T_m$  değerinin daha yüksek olmasına neden olur. Örneğin %60 G/C'ye sahip *Serratia marcescens* 94°C  $T_m$ 'e sahipken, %40 G/C içeren *Pneumococcus* 85°C  $T_m$ 'e sahiptir.



**Şekil 1.1** : PCR'da DNA'nın üssel çoğalması [20].

**Primer Eşleşmesi:** Bu aşamada sıcaklığın düşmesiyle (genellikle 55-65°C) beraber iki eş ssDNA zinciri arasında yeniden bağlanma gerçekleşerek dsDNA oluşur. Tek zincir primerler ile tek zincir hedef DNA arasında hidrojen bağları oluşur ve kırılır. Primerler hedef DNA'ya tam olarak eşleştiğinde primer ile ana zincir arasındaki bağlar daha sağlam ve uzun süreli olur. Primer-template ikilisi olarak bilinen bu küçük dsDNA'ya DNA polimeraz bağlanır ve ana zinciri kopyalar. Yeni bazlar eklenerek primer-template ikilisi arasındaki iyonik bağ kuvvetlenerek kırılmayacak düzeye gelir.

**Primer Uzaması:** DNA polimerazın reaksiyona girmesi ve dNTP'lerin ortamda olması ile primer uzaması gerçekleşir. Böylece başlangıç kopya sayısı iki katına çıkar. Bu aşamada kullanılan enzimin sıcaklığa dayanıklı olması gerekir. Bu nedenle Taq Polimeraz enzimi kullanılır. Taq DNA Polimerazın optimum çalışma sıcaklığı 72°C'dir. Primerler uzadıkça, yapı oluşan iyonik çekim kuvveti nedeniyle geri dönüşümsüz hale gelir. Başarılı bir uzama olabilmesi için primerlerin tam eşleşmesi gerekir. Primerler tam olarak eşleşemezse (uyuşmama) yüksek sıcaklık,

gevşemelerine neden olur ve uzama gerçekleşmez. Ana DNA'nın eşi olan bazlar primere 3' ucundan bağlanır. DNA polimeraz enzimi ana zinciri 3'-5' yönünde okurken, 5'-3' yönünde de dNTP (ATP,GTP,TTP,CTP) ekler. Bu aşama için 1 dakikalık bir zaman yeterli iken çoğaltılacak DNA'nın uzun olması durumunda bu süre daha fazla olabilir [20].

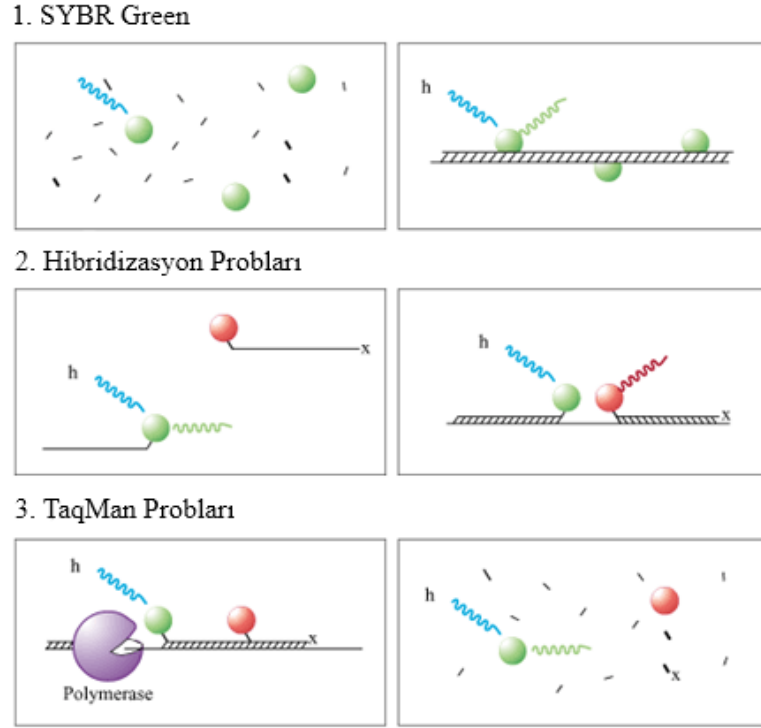
Real Time PCR'da kantitatif analizler yapılabilmektedir. Gerçek zamanlı PCR ile DNA ölçümü ilkesine göre, elde edilen Ct değerleri ile reaksiyon tüplerindeki başlangıç şablon miktarının logaritması arasında doğrusal bir ilişki olduğu bildirilmiştir [21]. Holst-Jensen ve diğ. (2003), GDO'ların nispi miktarının belirlenmesi için delta Ct yöntemi ya da standart eğri yönteminin kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Delta Ct yöntemlerinin gerektirdiği niceliksel kalibrantlar, standart eğri yönteminden farklıdır. Livak ve diğ.'ne (2001) göre delta Ct metodunda standart bir eğri oluşturmak için, belirli GDO yüzdelere (% 10, % 5, % 2, % 1) sahip bir dizi referans materyale ihtiyaç duyulur ve bu materyallerle delta Ct değerlerine karşı % GDO grafiği çizdirilir (Wu, 2019'da atıfta bulunulduğu gibi) [9].

Standart eğri metodu ise rutin analizlerde en çok kullanılan yöntemdir. Standart eğri yönteminde, seri seyreltmeler için kalibrant olarak en yüksek GDO yüzdesine sahip tek bir CRM yeterlidir. Kalibrasyon grafiği ilk hedef kopya sayısının logaritmasına karşı Ct değerleri çizdirilerek elde edilir. Hedef ve referans gen kısımları için standart eğriler elde edilir. Hedef ve referans kısımların kopya sayıları karşılaştırılarak % GDO içeriği belirlenir. [9, 22].

Gerçek zamanlı PCR yönteminin özgülüğü, hem amplifikasyon reaksiyonunu oluşturmak ve izlemek için kullanılan yapıya hem de sinyali izlemek için kullanılan cihaza bağlıdır. Bu amaçla çeşitli yapılar geliştirilmiştir. Bunlardan SYBR Green I, kullanılarak yapılan PCR analizlerinde boya dsDNA'ya bağlandığından spesifik olmayan bağlanmalar da gerçekleşebilir. Bu problemin üstesinden gelmek için erime eğrisi analizi gereklidir [22].

qPCR'da izlenen sinyaller için daha spesifik stratejiler de mevcuttur. Bu bir hibritlenme yoluyla (bir moleküler işaret) olabileceği gibi (örn. FRET problemleri) hidroliz problemleri ile de olabilir (örneğin Taqman® problemleri) [23]. FRET problemleri eşleşme fazında DNA parçacığının (amplikon) merkezi bölgesi ile hibritleşir. Hibritleşme sonrası verici söndürülerek alıcının hassasiyeti artırılır. Hidroliz probu

teknğinde probun bir ucu söndürücü molekül diğer ucu ise florofor ile etiketlenmiştir. Prob amlikon ile eşleşir ve uzama fazında polimeraz enzimi probu hidrolize ederek floresan emisyonu oluşur [24].



**Şekil 1.2 :** Farklı PCR prensipleri: 1. SYBR Green; 2. FRET (Floresan Rezonans Enerji Transferi); 3. TaqMan (5`-3` - degradasyon probları) [22].

Hibridizasyon tabanlı yaklaşımlar (ör. mikroarraylar ve biyosensörler); genellikle geleneksel PCR veya izotermal sistemlerle amplifikasyondan sonra, spesifik yöntemler seçilen hedeflerle hibridizasyonuna bağlı olduğundan, yüksek özgüllük seviyeleri göz önüne alındığında GDO izleme için yaygın olarak geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde tespit genellikle optik, piezoelektrik ve elektrokimyasal tekniklere dayanır [25, 26].

### 1.2.2.2 Sensörler

Biyosensörler biyolojik bir olayı ölçülebilir bir sinyale çeviren analitik cihazlardır [27]. Biyosensörler, spesifik biyomoleküllerin (proteinler veya DNA) gıda kontrolü ve biyogüvenlikte basit, hızlı ve ekonomik bir şekilde değerlendirilmesi için uygun bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır. Proteinleri (immunosensörler) veya DNA'yı (genosensörler) tespit etmeyi amaçlayan biyosensörler, optik, elektrokimyasal veya piezoelektrik transdüksiyona dayanmaktadır. Kolay minyatürleştirilmesi ve basit

enstrümantasyonu nedeniyle çok uygundur. Ayrıca, biyosensörler yüksek hassasiyet, özgülük ve hızlı olmalarından dolayı ticari cihaz olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Biyosensörlerin içinde yer alan Gen Sensörleri (Genosensörler) ise; belirli bir çeşidin (event) hibridizasyon reaksiyonundan oluşturulan DNA biyosensörleridir [28].

### **1.2.2.3 Mikrodizilimler**

Mikrodiziler (DNA çipleri) biyomoleküllerin yüksek verimli analizi için önemli araçlardır [29, 30]. Nükleik asit ve protein profillerinin paralel taranması için mikrodizilerin kullanımı son zamanlarda ilaç keşfi ve biyobelirteç tanımlaması için bir endüstri standardı haline gelmiştir. DNA çiplerinin başarısı, DNA problemlerinin hareketsizleştirilmesi için kullanılan kimyaya bağlıdır. Ayrıca yüzeye bağlı problemlerin iyi erişilebilirliği ve işlevselliği, bağlantı yoğunluğu ve bağlantı kimyasının tekrar üretilebilirliği de önem taşımaktadır [31, 32]. DNA'ların hareketsiz hale getirilme (immobilizasyon) şekli bir mikrodizinin özelliğini belirler. Genel olarak, uygun bir immobilizasyon stratejisinin seçimi, hem yüzeyin kendisi hem de yüzeyin fizikokimyasal özellikleri ile belirlenir. Farklı stratejilerle geliştirilen DNA mikrodizilerinin, yüzeydeki DNA problemlerinin hareketsizleştirilmesi için ortak bir kritik adımı vardır. Bugüne kadar geliştirilen immobilizasyon teknikleri arasında fiziksel adsorpsiyon; kovalent immobilizasyon; ve streptavidin-biyotin immobilizasyonu yer almaktadır [33].

### **1.3 DNA'nın Yapısı ve DNA Kararlılığını Etkileyen Faktörler**

DNA, yapısında fosforik asit ve deoksiriboz bulunduran iki paralel zincirin, pürin ve pirimidin bazları ile çapraz olarak bağlanması sonucu oluşan sağ el sarmal özelliğinde yapısı olan bir moleküldür. Sahip olduğu bilgi nükleotidlerin diziliminde saklanır. Ökaryot bir hücrede DNA'nın büyük bir kısmı çekirdek içindedir ve bu kromozomal DNA olarak adlandırılır. Çift katlı bir zar ile çevrilmiş, sitoplazmadan bu şekilde ayrılmıştır. Bunun dışında, mitokondri ve kloroplast içinde de ekstra kromozomal DNA bulunabilmektedir [20].

DNA çift zincirli sarmal yapısı nedeniyle bilinen en kararlı moleküllerden biridir. Bu yapısal özelliğinden dolayı omurgalı bir hayvanın milyonlarca yıllık DNA'sı bile korunabilmektedir [34]. Ancak DNA çekirdek ya da organelden çıkarıldığında aynı durum söz konusu değildir. DNA kullanımında kritik nokta, kendisine zarar veren bir

maddeye maruz kalan izole edilmiş DNA'nın bilgisinin bütünlüğünü korumaktır. DNA kararlı bir molekül olmasına rağmen, DNA'nın bütünlüğü çevresel faktörlere ve özellikle de zamana bağlıdır [35].

DNA'nın transferi sırasında karşılaştığı mekanik, çevresel ve fiziksel faktörler, DNA'yı sıklıkla parçalar halinde bırakması sonucu potansiyel olarak genomik analiz için kritik olan uzun vadeli bilgilerin kaybedilmesine neden olmaktadır. DNA bilgilerinin korunmasına yönelik mevcut yöntemler çoğunlukla DNA'nın çürümmesini geciktirir, ancak zamanla, özellikle parçalanma meydana geldiğinde, DNA hasarına karşı çok az koruma sağlar [35]. Bonnet ve diğ. (2010) tarafından su ve oksijenin varlığının DNA'nın hidroliz ve oksidasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Lee, 2010'da atıfta bulunulduğu gibi) [4]. Bu nedenle, DNA'yı kolay ve ekonomik olarak etkin bir şekilde korumak zordur. DNA'nın muhafazası sırasındaki tehditlerin varlığı DNA'da depürinasyon (büyük bir bozunma işlemi), deprimidinyasyon ve deaminasyon, baz veya şeker oksidasyonu, çapraz bağlama ve tek zincirli DNA kopmaları olarak ortaya çıkmaktadır. Nihayetinde DNA analizinde yaygın olarak kullanılan amplifikasyon prosedürleri sırasında sürdürülen zengin bir hata kaynağı oluşmaktadır [36].

Rice ve diğ. (2018) "degradasyon" tanımı içerisinde enzimatik olmayan nükleik asit hasarından veya enzim/organizma kontaminasyonuna bağlı nükleik asit bozulması gibi spesifik olmayan nükleik asit hasarından bahsetmişlerdir. Genel olarak, "degradasyon" nükleik asit bölünmesini, nükleik asit manipülasyonu veya nükleik asit kütüphanesi formasyonu uyarınca kasıtlı, sekansa spesifik veya başka şekilde oluşturulmuş diğer modifikasyonları hariç tutar. DNA degradasyonu, hidroliz, oksidasyon, enzimlerin verdiği hasar, parçalanma, bozunma, çürüme, mekanik kuvvetler, ultraviyole ışık ve buz kristalleri tarafından kesilme olaylarından herhangi biri veya daha fazlası ile meydana gelebilir. DNA hasarı zaman içinde, örneğin depolama sırasında meydana gelebilir veya alternatif olarak, DNA'nın depolanması sırasında saklama sıcaklığından bağımsız olarak DNA degradasyonu meydana gelebilir [35].

Nükleik asit degradasyonu, çeşitli nedenlerle olabilir. Depolanan nükleik asit örneklerinde zamanla meydana gelen veya oda sıcaklığında depolanan örneklerde meydana gelen enzimatik olmayan DNA bozunması özellikle önemlidir. Enzimatik olmayan nükleik asit degradasyonu, UV radyasyonu, oksidasyon, hidroliz, kesme veya

karışıklık gibi fiziksel stresi veya serbest bir 3 'hidroksil grubu tarafından bir nükleik asit molekülünün bir iç bağı üzerine moleküler parçalanacak veya bir kement oluşturacak nükleofilik bağlanmayı içerir. Ayrıca, spesifik olmayan endonükleaz aktivitesi, tek zincirli çentiklenme veya çift zincirli kopma, toparlanma endonükleaz aktivitesi, transpozaz aktivitesi, DNA uyuşmazlığı onarımı veya baz eksizyonu veya diğer enzimatik aktivitelerden kaynaklanan nükleik asit hasarı, faz bilgisi kaybı ve / veya fiziksel bağlantı bilgisi kaybı gibi nükleik asit hasarı ile sonuçlanır [35].

Enzimatik degradasyon ise eksojeniktir. Numunenin toplanması, taşıma sırasındaki steril olmayan koşullar ya da izolasyon sırasındaki steril olmayan çevreden kaynaklanır [35].

#### **1.4 DNA Muhafazasının Metodolojisini Belirleyen Faktörler**

DNA muhafazasının metodolojisini belirleyen başlıca faktörler arasında DNA'nın kaynağı, sıcaklık, süre ve saflık en belirleyici faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır.

##### **1.4.1 DNA'nın kaynağı**

Ökaryotik organizmalar gerek hücre yapıları gerekse içerdikleri kalıtım materyalleri açısından prokaryotik organizmalara göre çok daha karmaşık yapıda canlılardır. Ökaryotlarda hücreyi oluşturan organeller membranlar ile birbirlerinden ayrılmış durumdadır. Birden fazla sayıda çift zincirli DNA moleküllerinden oluşan kalıtım materyalleri membranlarla sınırlanmış nükleus içerisinde yer alır. Ökaryotik organizmalarda nükleus içerisinde yer alan genom DNA'ları dışında organellerinden mitokondri ve kloroplastlarda da kendilerine özgü DNA molekülleri bulunur [37].

CRM'ler arasında DNA kaynağına dayalı karşılaştırma yapıldığında; Allnutt ve diğ. (2017) tarafından plazmid CRM'lerinde yapılan saflık ve miktar tespitinin teorik olarak bitki materyallerine dayanan CRM'lerde yapılanlardan daha kolay olduğu bildirilmiştir [38].

##### **1.4.2 DNA'nın depolama sıcaklığı ve süresi**

DNA muhafazasında 4 farklı sıcaklığa bağlı yöntem bulunmaktadır. Bunlar -20°C, -80°C, -196°C ve kurutma yöntemiyle oda sıcaklığında muhafaza yöntemleridir. Bunlardan süre olarak orta vadede (aylarca) saklamak için -20°C ve -80°C uygun sıcaklıklardır. Kurutulmuş DNA ise oda koşullarında uzun vadede (yıllarca) muhafaza

edilebilmektedir. Kısa süreli (haftalar) depolamalar için ise 4°C’de porsiyonlanarak muhafaza edilebileceği bildirilmiştir [34].

### **1.4.3 DNA’nın saflığı**

İzole edilen DNA’lar içerdikleri bulaşan miktarına göre farklı saflıklarda olabilmektedir. Her ne kadar DNA izolasyon sırasında saflaştırma işlemlerinden geçirilse de kimi zaman istenilen saflık elde edilememektedir.

DNA’nın muhafazasında major tehditlerden birisi nükleaz kontaminasyonunun varlığıdır [35]. DNA molekülü nükleazlara karşı duyarlı olduğundan bu bulaşanlardan kolayca etkilenebilmektedir. Bununla beraber Schuster and Appleby (1983) tarafından iyi saflıktaki DNA’nın muhafaza sırasındaki dondur-çözdür döngülerinden etkilenmediği bildirilmiştir (Gaikwad, 1998’de atıfta bulunulduğu gibi) [34].

### **1.5 DNA’nın Bozunma Kinetiği Üzerine Araştırmalar**

GDO analizlerinde numunede saptanan GDO varlığının doğrulanması (tiplendirme analizlerinde pozitif kontrol) ve miktarının belirlenmesi (kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında) sertifikalı referans maddeler (CRM) ile gerçekleştirilmektedir.

Analizlerde kullanılan CRM’lerde yer alan nükleik asit kalitesi ve saflığı PCR analizini etkileyebilmektedir [39]. Buna ilaveten DNA ekstraktlarının eldesinde kullanılan ekstraksiyon metodu, kullanılan çözeltiler, saflıklar (özellikle bulaşma kaynaklı safsızlıklar), iyon gücü, tüp materyali kalitesi, UV ışığın zararları, depolama boyunca sıcaklık ve nem oranı da analizleri etkileyen faktörlerdendir [4]. PCR sinyallerini etkileyen bu hatalar ancak analiz sonrasında fark edilebilmekte ve analizin tekrarlanmasına neden olmaktadır.

Belle ve diğ. (2003) tarafından DNA’nın dondur-çözdür uygulamasına karşı dayanımı ile ilgili yapılan bir çalışmada farklı saklama hacimleri ve kopya sayıları da ele alınmış, 21 kez dondur-çözdür uygulaması yapılan izolatlardan 0,1 mL’lik izolatların 3 kez, 1 mL’lik izolatların ise 14 kez dondur-çözdür uygulamasından sonra stabil kalmadığı bildirilmiştir. Bu durum daha düşük hacimlerde saklanan örneklerde büyük hacimdekilere göre daha hızlı bir donma gerçekleştiğinden, degradasyona yol açan nükleik asit kesilmelerinin daha fazla olacağı ile açıklanmıştır. Ancak çalışma sadece parazit DNA’sında yapılan dondur-çözdür uygulamalarını içermektedir [40].

Al-Warid (2014) tarafından fekal kaynaklardan elde edilen *Cryptosporidium* oocysts DNA'sında dondur-çözdürün etkileri üzerine yapılan bir çalışmada, örnekler lysis enzimi ilavesinden hemen sonra derin dondurucu ve sıvı nitrojen ile 2 farklı dondur-çözdür döngüsüne tabi tutulup elektroforez kullanılarak görüntüleme yapılmıştır. Çalışma sonunda sıvı nitrojen ile yapılan uygulamanın DNA bozunumunda daha az etkili olduğu bildirilmiştir [41].

Cömert ve diğ. (2013) tarafından Hepatit C virüs (HCV) RNA'sının saklama koşullarının stabilite üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada, HCV taşıyan plazma örnekleri hem oda sıcaklığında hem de 10 kez dondur-çözdür uygulanarak Real Time PCR ile amplikasyona bırakılmıştır. HCV RNA stabilitesinin EDTA/sitrat içinde korunduğu ve 10 kez dondur-çözdür işleminden sonra HCV RNA konsantrasyonlarında istatistiki olarak önemli bir fark oluşturmadığı bildirilmiştir. Ancak arşivdeki numunelerle ilgili herhangi bir çalışma planlanırken araştırmacıların çoklu dondur-çözdür döngülerinin viral yüklerin stabilitesi üzerine etkilerini bilmeleri gerektiğini savunmuşlardır [42].

Şanlıdağ ve diğ. (2005) tarafından hepatit B virüsü DNA'sında 10 kez dondur-çözdür yapılan örneklerde sadece 7 pg/mL olan örnek haricinde diğerlerinin DNA düzeylerinde istatistiki olarak değişiklik olmadığı bildirilmiştir [43].

İnfluenza RNA'sında uzun süre depolamanın ve dondur-çözdür uygulamasının etkilerinin Real Time qPCR ile incelendiği bir başka çalışmada ise; 100 µL olarak hazırlanan RNA transkriptleri -80 °C, -20 °C, 4 °C ve 25 °C de 84 gün boyunca muhafaza edilmiştir. RNA kopya sayısının -80 °C ve -20 °C'de 56 gün, 4 °C'de 21 gün ve 25 °C'de 7 gün değişmediği görülmüştür. -80 °C'de yapılan dondur-çözdür çalışmalarında ise RNA transkriptlerinin 9 kez dondur-çözdür döngüsüne kadar stabil olduğu yani kopya sayısında istatistiksel olarak önemli bir değişme gözlemlenmediği, 10. döngüden itibaren kopya sayısının önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Uzun süren depolama çalışmalarında ise 3 yıl boyunca -80 °C'de muhafaza sonucu viral yükte değişiklik gözlemlenmemiştir. 3 yıl -80 °C'de muhafaza edilen orijinal örneklerle ve izolatlara ayrı ayrı dondur-çözdür işlemi uygulanmış ve izolat olarak uzun süre muhafaza edilen örneklerin orijinal örneklerle göre daha fazla kayıba uğradığı tespit edilmiştir. RNA stabilitesini gösteren en iyi belirleyicinin RNA kopya sayısı olduğu kabul edilerek başlangıç RNA konsantrasyon değerleri düşük olan ( $\leq 3$  kopya) örneklerin zaman içinde en çok değişen örnekler olduğu sonucuna varılmıştır [44].



Tam kan örneklerinde yapılan başka bir çalışmada, dondur-çözdür uygulamalarının sayısı arttıkça genomik DNA 'nın degradasyon düzeyinin artış gösterdiği belirtilmiştir. Çoklu dondur-çözdür uygulamalarının amplifikasyonunun başarısını olumsuz yönde etkileyebileceği miktar sonucunu değiştirebileceği ileri sürülmüştür [45].

Kenneth ve diğ. (1990) kan örneklerinde DNA çoklu dondur-çözdür uygulamasının etkilerini araştırdıkları çalışmada, DNA ekstraksiyonundan sonra 1, 5, 10, 20, 40 kez uygulanan dondur-çözdür uygulamalarının ardından elektroforezle yapılan görüntüleme bant numarasında bir değişiklik olmadığını ancak DNA veriminde azalmanın olduğunu gözlemlemişlerdir [46].

Referans malzemelerin DNA temelli yapılan analizlerin hassasiyetini belirlediği bilinmektedir. Bu malzemelerle ilgili çalışmalar incelendiğinde 2007'de Schaudien ve diğ. tarafından üç farklı DNA standardında Real Time PCR ile yapılan bir çalışmaya rastlanmıştır. İki farklı muhafaza yöntemi (su içinde ve % 50 gliserolde) ile 16 kez dondur-çözdür uygulanan standartlarda su içinde muhafaza edilenler 4 dondur-çözdüre dayanırken gliserol içinde bu sayı 16'ya çıkmıştır [47]. Fakat çalışma bitkisel standartları içermemektedir.

Farklı çalışma alanlarındaki araştırmacılar tarafından DNA'nın stabilitesi üzerine hangi mekanizmaların nasıl etki ettiği konusunda bir çalışma da 2010'da Rossmanith ve diğ. tarafından yapılmıştır. Bakteri standardında (*L. monocytogenes* ve *Salmonella typhimurium*'a ait) yapılmış bu çalışmada dondur-çözdür uygulamaları da ele alınmış ve 20 dondur-çözdür sonrasındaki  $\Delta$  Ct değerleri değerlendirilmiştir. Uzun genomik DNA'larda dondurup çözdürmenin etkisi varken, kısa zincirli oligo-nükleotitlerde ise herhangi bir değişimin olmadığı bildirilmiştir. Ct değerlerindeki artışa neden olan mekanizmanın dondur-çözdür sırasındaki buz kesmelerinden kaynaklandığı ileri sürülerek DNA düzeyindeki degradasyon Ct değerleri ile ilişkilendirilmiştir [48]. Kanser alanındaki çalışmalarda da DNA'nın stabilitesine önem verilmiş yakın zamanda Fan ve diğ. tarafından kanser dokusundan elde edilen DNA, RNA ve protein örneklerinde benzer bir çalışma yapılmıştır. Dondur-çözdür dizaynı -80 °C'de 1, 3, 5, 7, 9 kez şeklinde oluşturulan bu çalışmada 9 kez dondur-çözdür uygulamasından sonra bile DNA/RNA'nın bütünlüğünün bozulmadığı sonucuna varılmıştır [49]. Dört farklı doku örneğinde yapılan başka bir çalışmada ise farklı doku tiplerinde farklı sonuçlar alınmış, bazı dokular için artan dondur-çözdür ile RNA degradasyonu ve düzensiz gen ekspresyonu oluştuğu belirlenmiştir [50].

Serum, kan ve HCV örneklerinde çoklu dondur-çözdür uygulamalarının RNA ya da DNA düzeylerinde belirgin bir kayıba neden olmadığı bildirilmiştir [51, 52, 53].

Başka çalışmalarda ise kan ve HCV örneklerinde çoklu dondur-çözdür uygulamasının DNA ya da RNA'da degradasyona neden olduğu bildirilmiştir [54, 55, 56].

DNA'nın muhafazasında kullanılan dondur-çözdür döngüsü uzun yıllardır kullanılan ancak dezavantajlarının tam olarak belirlenemediği bir problemdir. Bu döngünün kabul değerleri aslında nihai kullanım amacına ve ekstraksiyon tipine bağlıdır. Dondur-çözdür uygulamalarının DNA degradasyonu üzerine etkisini azaltmak için EDTA gibi gliserol/DMSO içeren bir solüsyon içerisinde, düşük iyon dayanımlı, hafif alkalın tamponlu bir ortamda depolanması önerilmiştir. Buna rağmen DNA degradasyonu oluşabilmektedir [57].

Bütün bu çalışmalar incelendiğinde, çoklu dondur-çözdür uygulamasının DNA ve/veya RNA üzerinde herhangi bir degradasyona neden olmayacağı veya olabileceği ile ilgili farklı sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Bu farklılığının numunenin kaynağından (virüs, bakteri, parazit), numune matriksinden (kan, doku, referans madde), nükleik asit çeşidinden (DNA, RNA), ekstraksiyon yönteminden (klasik, kit) analiz yönteminden (PCR, Elektroforez, Real Time PCR), dondur-çözdür uygulama parametrelerinden (sıcaklık, süre, sayı) veya ilave koruyucu maddelerin (gliserol, EDTA gibi) kullanımından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda bitkisel kaynaklı numunelerde DNA'nın dondur-çözdür uygulamalarına dayanımı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmaması önemli bir eksikliğe neden olmaktadır.

Bu çalışma ile özellikle bitkisel kaynaklı numunelerle çalışan laboratuvarların GDO analiz prosedürlerinde yer alan dondur-çözdür uygulamalarında DNA'nın stabilitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Sertifikalı referans malzemeler (CRM)

Çalışmada GDO analizlerinde en sık karşılaşılan bitki spesifik türlerden soya ve mısır CRM'leri kullanılmıştır. Avrupa Referans Materyallerinden (European Reference Materials - ERM) den temin edilen CRM'lere ait bilgiler Çizelge 2.1 ve Şekil 2.1'de verilmiştir. CRM'ler analize alınıncaya kadar karanlıkta ve 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2.1 : Çalışmada kullanılan CRM'ler.

Türü	CRM bilgileri		Sertifika değeri		
			Konsantrasyon	Belirsizlik	
	Sertifika ismi		g/kg	%	(g/kg)
Soya	DP-305423-1	ERM-BF426c	10,0	1	±1,0
	DP-305423-1	ERM-BF426d	100	10	±7
Mısır	DAS-40278-9	ERM-BF433c	10,0	1	±0,9
	DAS-40278-9	ERM-BF433d	100	10	±8



Şekil 2.1 : Çalışmada kullanılan CRM'ler.

Çalışmada kullanılan CRM'lerden soyaya ait DP305423-1 tipi A.B.D'de yüksek oleik asit içeriği kazandırmak amacıyla *Agrobacterium* aracılı genetik modifikasyonla geliştirilmiştir. DAS40278-9 mısır tipi ise İngiltere'de herbisit toleransı amacıyla direkt DNA transferi ile geliştirilmiştir [58, 59].

### 2.1.2 DNA izolasyon kiti

Çalışmada kullanılan izolasyon kiti Eurofins GENESpin'den temin edilmiştir [60]. İzolasyonda kullanılan kimyasallara ait bilgiler Çizelge 2.2'de verilmiştir. Bu kitler analize alınıncaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

**Çizelge 2.2 : İzolasyon kimyasalları.**

Bileşen	Etki/Amaç
Lysis Buffer	Hücre ve çekirdek duvarlarının parçalanarak genomik DNA'nın ekstraksiyonu (Kimyasal parçalama)
Proteinaz K	Proteinlerin parçalanması
Binding Buffer	DNA'nın kolona bağlanması
CQW	Nükleik asitlerin deterjanlardan yıkanarak saflaştırılması
Etanol	DNA'nın kolona bağlanması
Yıkama Çözeltileri (Wash Buffer-W1 ve W2)	Nükleik asitlerin deterjanlardan yıkanarak saflaştırılması
Elution Buffer	DNA'nın kolondan ayrılması

### 2.1.3 RNase A çözeltisi

DNA izolasyonunda RNase inhibisyonu için Sigma-Aldrich marka R6513 RNase enzim çözeltisi kullanılmıştır. Çalışma süresi boyunca -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### 2.1.4 Reaktif çözeltisi

Miktar analizlerinde kullanılmak üzere Thermo Fisher Scientific marka reaktif çözeltisi (TaqMan Universal PCR Master Mix) kullanılmıştır. Çözeltiye ait bilgiler Çizelge 2.3'te verilmiştir ve analize alınıncaya kadar karanlıkta ve 4°C'de muhafaza edilmiştir.

**Çizelge 2.3 : Reaksiyon çözeltisine ait bilgiler.**

Reaktif çözeltisi içeriği (TaqMan)	Etki/Amaç	Soya için	Mısır için
AmpliTaq Gold® DNA Polimeraz, UP (Ultra Saf)	Primer uzamasında	X	X
Urasil-N glikozilaz (UNG)	PCR ürünlerinden sonraki yeniden amplifikasyonu önlemek		X
dNTPler ve dUTP	Primer uzamasında	X	X
ROX™ Pasif referans	Rox boyasına dayalı iç referans olarak	X	X
Optimize edilmiş tampon bileşenleri	DNA'nın etkin denatürasyonunda	X	X

## 2.1.5 Primer ve problemler

Miktar analizinde kullanılan primer ve problemlere ait bilgiler Çizelge 2.4 te verilmiştir.

**Çizelge 2.4 : Primer ve problemlere ait bilgiler.**

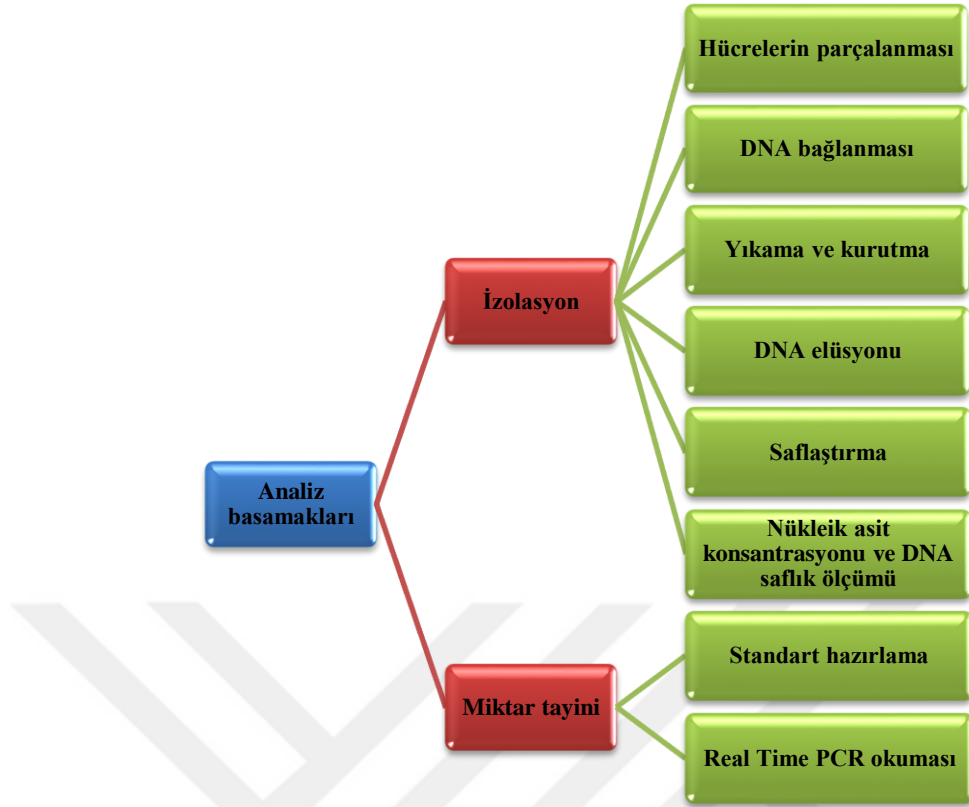
Primer	Oligonükleotidler	Adı	DNA dizilimi (5' to 3')
<b>DAS-40278-9 hedef dizilim</b>	Forward primer	DAS-40278-9_5'-f1	5' CAC gAA CCA TTg AgT TAC AAT C 3'
	Reverse primer	DAS-40278-9_5'-r3	5' Tgg TTC ATT gTA TTC Tgg CTT Tg 3'
	Probe	DAS-40278-9_5'-S2	5' 6FAM- CgT AgC TAA CCT TCA TTg TAT TCC g -TAMRA 3'
<b>HMG referans dizilim</b>	Forward primer	MaiJ-F	5' TTg gAC TAg AAA TCT CgT gCT gA 3'
	Reverse primer	mhm-g-R	5' gCT ACA TAg ggA gCC TTg TCC T 3'
	Probe	mhm-g-P	5' 6FAM- CAA TCC ACA CAA ACg CAC gCg TA -TAMRA 3'
<b>DP-305423-1 hedef dizilim</b>	Forward primer	DP305-f1	5' - CGT GTT CTC TTT TTG GCT AGC - 3'
	Reverse primer	DP305-r5	5' - GTG ACC AAT GAA TAC ATA ACA CAA ACT A - 3'
	Probe	DP305-p	6-FAM 5' - TGA CAC AAA TGA TTT TCA TAC AAA AGT CGA GA - 3' TAMRA
<b>Le1 referans dizilim</b>	Forward primer	Le1 for2	5' - CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC - 3'
	Reverse primer	GMO3-126 Rev	5' - GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC - 3'
	Probe	Le1 Probe	6-FAM 5' - CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC - 3' TAMRA

## 2.2 Yöntem

GDO miktar analizleri 2 basamaktan oluşur. Bunlar numunenin parçalanıp DNA izolatlarının hazırlanıp ve saflıklarının kontrol edildiği İzolasyon Basamağı ile GDO miktarının belirlendiği Miktar Tayini Basamağıdır. Bu basamakların içeriği ve basamaklarda kullanılacak cihazlara ait bilgiler Şekil 2.2 ve Çizelge 2.5'de verilmiştir.

**Çizelge 2.5 : Basamaklarda kullanılan cihazlara ait bilgiler.**

Basamaklar	Basamak aşamaları	Cihaz	Marka / Model / Resim
<b>İzolasyon</b>	Hücrelerin parçalanması	Santrifüj	Hettich/Mikro 22r
		Vorteks	Ika/MS1
		Çalkalamalı kuru blok ısıtıcı	Biosan/Ts-100
	DNA bağlanması	Vorteks	Ika/MS1
		Santrifüj	Hettich/Mikro 22r
	Yıkama ve kurutma	Santrifüj	Hettich/Mikro 22r
	DNA elüsyonu	Santrifüj	Hettich/Mikro 22r
	Saflaştırma	Vorteks	Ika/MS1
		Santrifüj	Hettich/Mikro 22r
	Nükleik asit konsantrasyonu ve DNA saflık ölçümü	Nanodrop	Thermo Scientific/Nanodrop 2000
<b>Miktar tayini</b>	Nihai reaksiyon karışımı hazırlığı	Santrifüj	Sigma/1-14K
		Plate santrifüj	VWR/PCR Plate Spinner
		Vorteks	Ika/MS1
	Realtime PCR okuması	Realtime PCR	Applied Biosystems/ 7500 Fast Real time PCR



Şekil 2.2 : GDO analiz basamakları.

### 2.2.1 DNA izolasyon basamağı

Çalışmada numune ve standart hazırlığında kullanılacak izolatlar için izolasyon basamağı 6 aşamadan oluşmaktadır ve her bir aşamaya ait bilgiler Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6 : DNA izolasyon basamağı aşamaları.

Aşama	İçeriği
1. Hücrelerin parçalanması	<p>1.1. Kapaklar gevşetilir, homojenize numuneden 0,2 g 2 mL'lik santrifüj tüpüne tartılır.</p> <p>1.2. 550 µL Lysis Buffer ve 10 µL Proteinaz K eklenerek vortekslenir. 65°C'de 30 dk. tutulur</p> <p>1.3. 20 µL Rnase enzimi eklenerek oda sıcaklığında 30 dk. tutulur.</p> <p>1.4. 14000 rcf'de 10 dk. santrifüj yapılır.</p>
2. DNA bağlanması	<p>2.1. Alınabildiği kadar temiz ve berrak kısım yeni 2 mL'lik tüpe alınır.</p> <p>2.2. Alınan kısım kadar Binding Buffer ve etanol ilave edilir ve 30 sn vortekslenir.</p> <p>2.3. Karışım filtreli tüpe aktarılır. 11000 rpm'de 1 dk. santrifüj yapılır.</p>

**Çizelge 2.6 (devamı) : DNA izolasyon basamağı aşamaları.**

<b>Aşama</b>	<b>İçeriği</b>
<b>3. Yıkama ve kurutma</b>	<b>3.1.</b> Alta geçen kısım dökülerek filtreye 400 µL CQW eklenir. 11000 rpm’de 1 dk. santrifüj yapılır. <b>3.2.</b> Alta geçen kısım dökülerek filtreye 700 µL W1 eklenir. 11000 rpm’de 1 dk. santrifüj yapılır. <b>3.3.</b> Alta geçen kısım dökülerek filtreye 200 µL W2 eklenir. 11000 rpm’de 2 dk. santrifüj yapılır. <b>3.4.</b> Filtreye yeniden 200 µL CQW eklenir. 11000 rpm’de 2 dk. santrifüj yapılır.
<b>4. DNA Elüsyonu</b>	<b>4.1.</b> Filtre 1,5 mL’lik tüpe yerleştirilir. Filtreye 100 µL 70 °C sıcaklığında Elution Buffer ilave edilir. <b>4.2.</b> Oda sıcaklığında 5 dk. inkübasyona bırakılır. 11000 rpm’de 1 dk. santrifüj yapılır. Filtre atılır.
<b>5. DNA Saflaştırma</b>	<b>5.1.</b> Kolonlar vortekslenir, uçları kırılır. <b>5.2.</b> Kapaklar gevşetilir, kapaksız tüplere alınır. 800 ref’de 2 dk. santrifüj yapılır. <b>5.3.</b> Kolonlar 1,5 mL’lik kapaklı tüplere alınır. Numune kolona pipetlenir. <b>5.4.</b> 800 ref’de 2 dk. santrifüj yapılır. Kolon atılır.
<b>6. Nükleik asit konsantrasyonu ve DNA saflığının belirlenmesi</b>	<b>6.1.</b> İzolasyon sonucu elde edilen 100 µL izolattan 1,5 µL pipetle alınır. <b>6.2.</b> Nanodrop Spektrofotometrede 260/280 nm dalga boyunda okunan saflık ve ng/µL düzeyinde okunan nükleik asit miktarı kaydedilir.

### **2.2.2 DNA miktar analiz basamağı**

Çalışmada soya için “Event -specific Method for the Quantification of Soybean Event DP-305423-1 Using Real Time PCR” ve mısır için “Event -specific Method for the Quantification of Maize DAS-40278-9 Using Real Time PCR” EURL metotları kullanılarak Real time PCR cihazında GDO miktar analizleri yapılmıştır [61, 62, 63].

Çizelge 2.6’dan elde edilen %10 GDO’lu taze izolatlardan, Çizelge 2.7’de belirtilen kopya sayılarında saf su ile standartlar hazırlanmıştır.

Amplifikasyonda ise öncelikle reaksiyon karışım çözeltisi hazırlanır. Bunun için Çizelge 2.8’de belirtilen bileşenler (numune/standart içermeyen) 2 mL’lik mikrosantrifüj tüplerinde birleştirilerek önce düşük hızda vortekslenip sonra kısa süre santrifüj edilir. Bu karışımdan ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne 60 µL alınarak üzerine 15 µL numune/standart eklenip 10 saniye vortekslenip sonra kısa süre santrifüj edilir. Daha sonra bu 75 µL’lik karışımdan plate kuyucuklarına (her kuyucuk 1 reaksiyonu temsil etmektedir) otomatik pipetlerle her kuyucuğa 25 µL olacak şekilde

pipetlenmiştir (75 µL / 3 = 25 µL). Optik filmler ile kapatılan kuyucuklar plate santrifüjde 3000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.

Son olarak Real Time PCR cihazına yerleştirilerek Çizelge 2.9’da belirtilen şartlarda miktar analizi Kopya Sayısı Metodu (Standart Eğri Metodu)’na göre gerçekleştirilerek hedef ve referans kısımlar için kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. GDO Analizlerinde Verifikasyon Rehberinde yer alan (Çizelge 2.10) doğrusallık, doğruluk ve kesinlik parametrelerine göre standart eğrilerin uygunluğu değerlendirildikten sonra elde edilen kopya sayılarından % GDO miktarları aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ GDO} = (\text{Hedef Kopya Sayısı} / \text{Referans Kopya Sayısı}) \times 100 \quad (2.1)$$

**Çizelge 2.7:** Kalibrasyon eğrisi için standart hazırlığı [61, 62, 63].

CRM	Kalibrasyon noktaları	İçerik	Kopya sayısı
Soya	S1	ERM-BF426d	86580 kopya / 8658 kopya
	S2	9 µL S1 + 36 µL su	17316 kopya / 1732 kopya
	S3	9 µL S2 + 36 µL su	3463 kopya / 346 kopya
	S4	7 µL S3 + 28 µL su	693 kopya / 69 kopya
Mısır	S1	ERM-BF433d	73394 kopya / 7339 kopya
	S2	8µL S1 + 32µL su	14679 kopya / 1468 kopya
	S3	8µL S2 + 32µL su	2936 kopya / 294 kopya
	S4	6µL S3 + 30µL su	489 kopya / 49 kopya

**Çizelge 2.8 :** Soya ve mısıra ait referans ve hedef kısımların amplifikasyonu için nihai reaksiyon karışımı [61, 62, 63].

Bileşen türü	Bileşen adı	Nihai Konsantrasyon		Hacim (µL/reaksiyon)			
		Soya	Mısır	Soya	Mısır		
Referans	Reaktif çözeltisi	TaqMan	TaqMan (UNG var)	1x	1x	12,5	12,5
	Referans primer-probe	GMO3-126 Rev	MaiJ-F	550 nM	300 nM	1,375	0,75
		Le1 for2	mhm-g-R	550 nM	300 nM	1,375	0,75
		Le1 probe	mhm-g-P	100 nM	180 nM	0,25	0,45
	Numune/Standart	Nuclease free water	Nuclease free water	#	#	4,5	5,55
Hedef	Reaktif çözeltisi	TaqMan	TaqMan (UNG var)	1x	1x	12,5	12,5
	Hedef primer-probe	DP305-f1	DAS-40278-9_5'-f1	800 nM	350 nM	2	0,875
		DP305-r5	DAS-40278-9_5'-r3	500 nM	350 nM	1,25	0,875
		DP305-p	DAS-40278-9_5'-S2	220 nM	150 nM	0,55	0,375
	Numune/Standart	Nuclease free water	Nuclease free water	#	#	3,7	5,375
Numune/Standart	DNA (max 100 ng)	DNA (max 200 ng)	#	#	5	5	



**Çizelge 2.9** : Real Time-PCR cihazında analiz döngü parametreleri [61, 62].

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	600	1
Primer bağlanması ve primer uzamasını içeren amplifikasyon	95	15	45
	60	60	

**Çizelge 2.10** : Kantitatif metodlar için metod verifikasyon parametreleri ve performans kriterleri [64].

Parametreler	Performans Kriteri
Doğrusallık	$-3,1 \geq \text{Eğim} \geq -3,6$ ve $R^2 \geq 0,98$
Doğruluk	$-25 \leq \% \text{hata} \leq 25$
Keskinlik ( $n \geq 16$ )	$\% \text{RSDr} \leq \%25$
Ölçüm Limiti (LOQ)	Kopya sayısının RSD'sinin $\leq \%25$ 'i sağladığı en düşük konsantrasyondur.

### 2.3. Denemenin kurulması ve istatistiki değerlendirme

Çizelge 2.6'daki aşamalardan geçirilerek elde edilen Soya ve Mısır CRM izolatları her iki konsantrasyon düzeyleri (%1 ve %10) için de dondur-çözdür uygulamalarından önce EURL metodlarında belirtilen düzeyin (soya için 20 ng/μl ve mısır için 40 ng/μl olmalı) üzerinde olacak şekilde nükleik asit konsantrasyonu 60 ng/μl'ye ayarlanmıştır. Ayarlanan bu izolatdan her biri 100 μL olacak şekilde 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtılarak Çizelge 2.11'deki deneme desenine göre  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$  ve  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  sıcaklık koşullarında 5, 10, 15, 20 kez dondur-çözdür uygulamalarına tabi tutulmuştur.

Dondur-çözdür uygulamaları 1 gün süreyle dondurma, 1 saat süresince çözdürme şeklinde kontrollü sıcaklık koşulları sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Her 5 dondur-çözdür uygulamasında dondur-çözdür işlemleri bitenler tekrar çözdürülmeksizin diğerlerinden ayrılarak son dondur-çözdür uygulamasına kadar muhafaza edilmiştir. Toplam 20 gün süren dondur-çözdür işleminin sonunda tamamı dolaptan çıkarılıp çözdürülerek taze izole edilen CRM'lerle beraber madde "2.2.2 DNA miktar analiz basamağı"nda belirtildiği şekilde PCR'da % GDO miktar analizi yapılmıştır.

**Çizelge 2.11 : Çalışmaya ait deneme deseni.**

<b>Dondur-çözdür sayısı</b>	<b>Paralel</b>	<b>Tekerrür</b>	<b>CRM</b>	<b>Konsantrasyon (%)</b>
<b>Kontrol</b>				
<b>5</b>				
<b>10</b>	2	3	Soya (DP-305423-1) Mısır (DAS-40278-9)	1 ve 10
<b>15</b>				
<b>20</b>				

Dondur-çözdür uygulamalarının DNA üzerine etkilerinin istatistiki açıdan değerlendirilmesi için SPSS istatistik paket programı (SPSS, Inc., Chicago, IL, A.B.D) kullanılmıştır. Bulgular, varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve elde edilen veriler bağımsız değişkenlerin önemliliğini belirlemek için LSD çoklu karşılaştırma testine göre %99 güven aralığında değerlendirilmiştir.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. Metot Verifikasyon Bulguları

Çalışmada öncelikle soya ve mısır için kullanılan EURL metotlarının laboratuvar koşullarında verifikasyonu yapılmış olup, elde edilen verilerin performans kriterlerine uyumu Çizelge 3.1’de ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Buna göre elde edilen verifikasyon verileri performans kriterleri ile uyumlu bulunmuştur.

**Çizelge 3.1 :** Metot verifikasyon parametreleri, performans kriterleri ve soya-mısır için verifikasyon verileri [64].

Parametreler	Verifikasyon verileri		Performans Kriteri	Değerlendirme			
Doğrusallık	Analist 1	Referans:	Soya (DP-305423-1) R <sup>2</sup> : 0,98 Eğim: -3,19	Mısır (DAS-40278-9) R <sup>2</sup> : 0,99 Eğim: -3,43	-3,1 ≥ Eğim ≥ -3,6 R <sup>2</sup> ≥ 0,98 Uygun		
		Hedef:	R <sup>2</sup> : 0,99 Eğim: -3,58	R <sup>2</sup> : 0,98 Eğim: -3,43			
	Analist 2	Referans:	R <sup>2</sup> : 0,99 Eğim: -3,54	R <sup>2</sup> : 0,99 Eğim: -3,35			
		Hedef:	R <sup>2</sup> : 0,9985 Eğim: -3,45	R <sup>2</sup> : 0,98 Eğim: -3,12			
	Doğruluk	% hata:	% 13,3-16,6	% 2,2-9,0		-25 ≤ %hata ≤ 25	Uygun
	Keskinlik	% RSDr:	% 15,8-17,4	% 9,4-13,6		% RSDr ≤ % 25	Uygun
Ölçüm Limiti		% 0,08	% 0,08	≤ % 0,1	Uygun		

Kriterlere uyumlu olduğu belirlenen metotlar kullanılarak Çizelge 2.11’deki deneme desenine göre dondur-çözdür işlemleri tamamlanmış soya ve mısır izolatlarında % GDO miktar analizleri yapılmıştır.

#### 3.2. Nanodrop Spektrofotometresi Ölçüm Bulguları

Nanodrop Spektrofotometresinde 260 ve 280 nm dalga boylarında CRM’lerden elde edilen izolatlarda yapılan absorbans ölçümleri sonucunda elde edilen başlangıç verileri Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3’de verilmiştir. Eurofins GENESpin kit protokolüne göre 260 nm/280 nm’deki absorbansların oranı 1,6-1,9 arasında olmalıdır [60]. Buna göre ölçüm sonuçları soya ve mısırın her iki konsantrasyon düzeyi içinde uygun olduğu

görülmüştür. Bu durum izolasyonun istenilen verim ve kalitede gerçekleştirildiğini göstermektedir.

**Çizelge 3.2 : Soya CRM izolatlarına ait Nanodrop Spektrofotometre ölçüm bulguları.**

<b>Soya CRM (DP-305423-1)</b>				
<b>İzolat</b>	<b>% 10'luk için</b>		<b>%1'lik için</b>	
	<b>Nükleik asit konsantrasyonu (ng/µl)</b>	<b>Saflık (260nm/280nm)</b>	<b>Nükleik asit konsantrasyonu (ng/µl)</b>	<b>Saflık (260nm/280nm)</b>
1	137,6	1,88	116,0	1,78
2	71,2	1,88	92,7	1,74
3	87,4	1,85	66,1	1,77
4	96,2	1,83	60,6	1,66
5	101,3	1,80	101,8	1,71
6	140,2	1,84	119,2	1,78
7	71,4	1,86	74,8	1,70
8	176,5	1,82	96,5	1,78

**Çizelge 3.3 : Mısır CRM izolatlarına ait Nanodrop Spektrofotometre ölçüm bulguları.**

<b>Mısır CRM (DAS-40278-9)</b>				
<b>İzolat</b>	<b>% 10'luk için</b>		<b>%1'lik için</b>	
	<b>Nükleik asit konsantrasyonu (ng/µl)</b>	<b>Saflık (260nm/280nm)</b>	<b>Nükleik asit konsantrasyonu (ng/µl)</b>	<b>Saflık (260nm/280nm)</b>
1	215,3	1,86	217,7	1,88
2	92,2	1,78	157,0	1,85
3	108,7	1,78	154,3	1,88
4	97,1	1,71	154,2	1,87
5	94,4	1,77	207,0	1,86
6	100,6	1,76	140,3	1,85
7	60,1	1,66	112,9	1,84
8	102,3	1,64	120,7	1,86

### 3.3. Real Time PCR'da % GDO Miktar Analiz Bulguları ve Tartışma

Soya ve mısır CRM'leri için Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'de elde edilen izolatlar her iki konsantrasyon düzeyleri (%1 ve %10) için nükleik asit konsantrasyonu yaklaşık 60 ng/µl'ye ayarlanıp 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtılmıştır. Daha sonra Çizelge 2.11'deki deneme deseninde belirtildiği şekilde dondur-çözdür

uygulamalarından geçen izolatlar Real Time PCR'da % GDO miktar analizi yapılmıştır. Buna göre;

### 3.3.1. Soya CRM'ine ait % GDO miktar bulguları

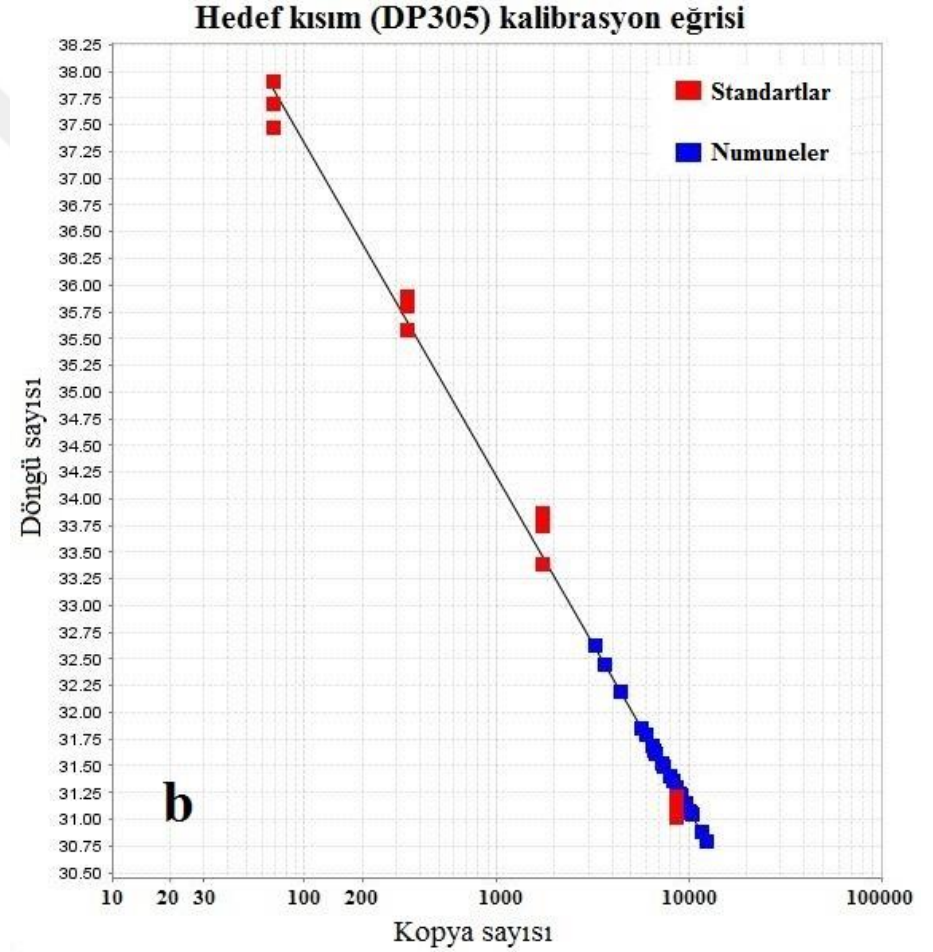
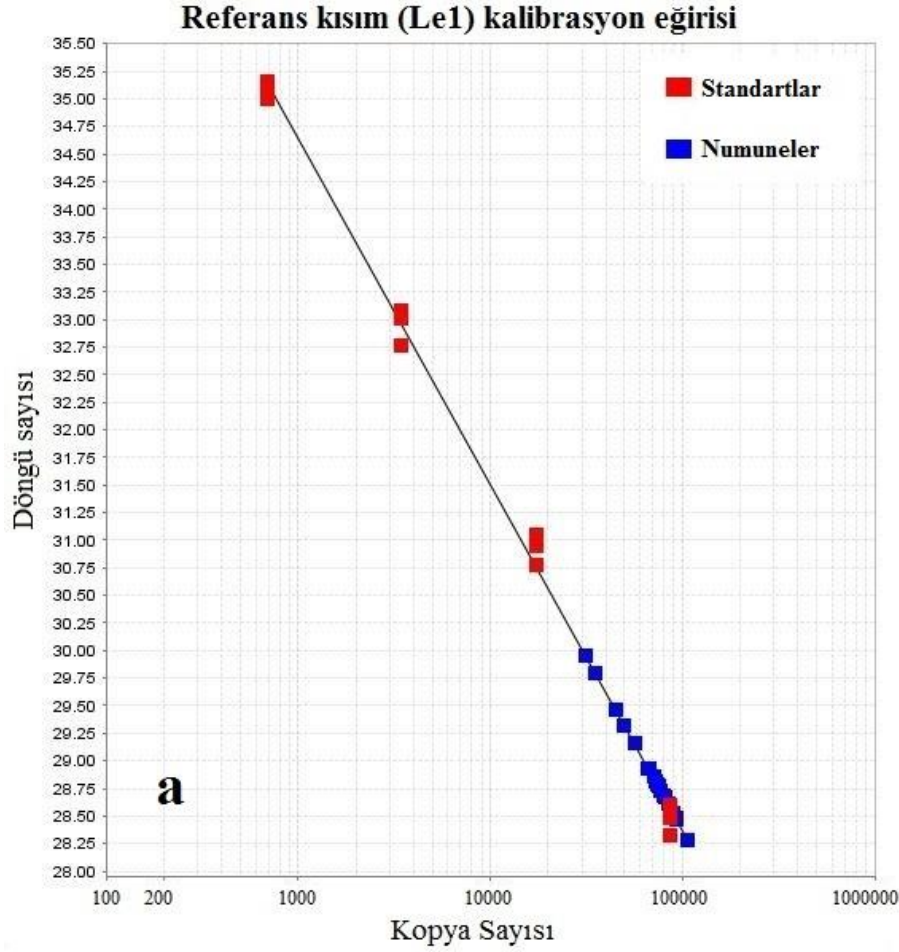
Soya CRM'lerine ait % GDO miktar analizleri sonucunda hesaplanan kalibrasyon eğrileri Şekil 3.1 ve 3.2'de verilmiştir. Bu kalibrasyon verilerinin Çizelge 2.10'da yer alan kriterlere uygunluğu Çizelge 3.4'de, Soya CRM izolatlarının dondur-çözdür uygulamaları sonrası Real Time PCR'da yapılan % GDO miktar bulguları da Çizelge 3.5, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de verilmiştir.

**Çizelge 3.4 :** Real Time PCR'da soyaya ait kalibrasyon verileri ve kriterlere uygunluğu

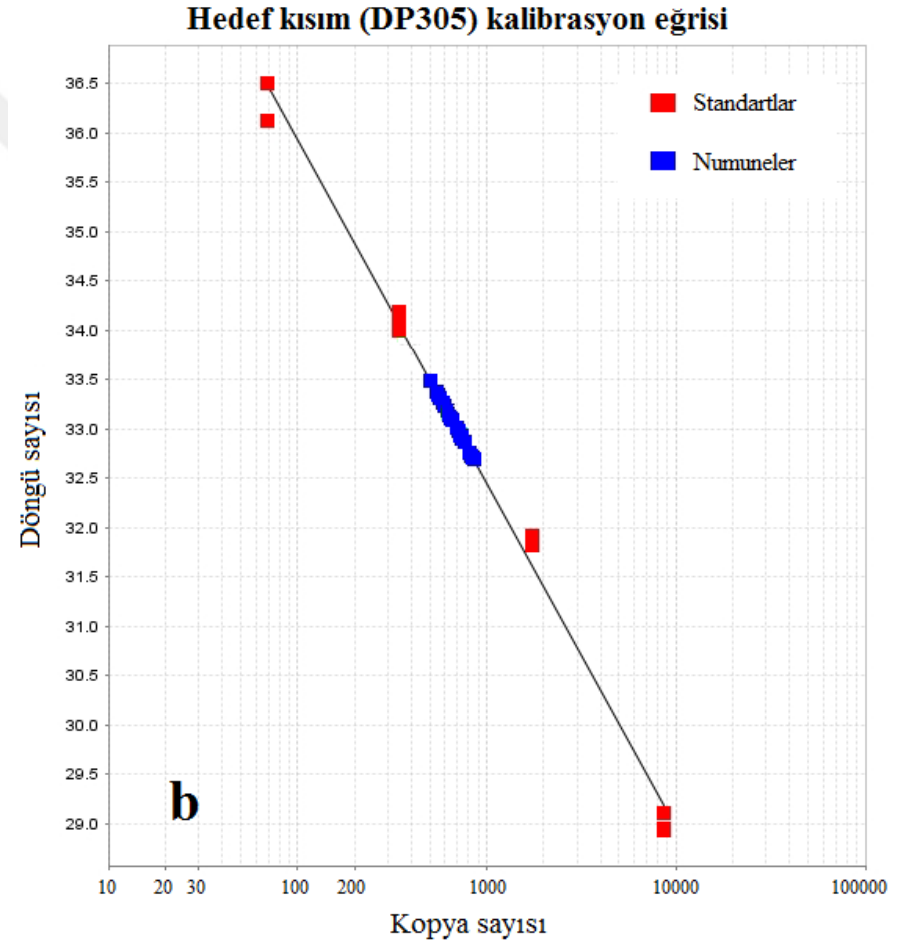
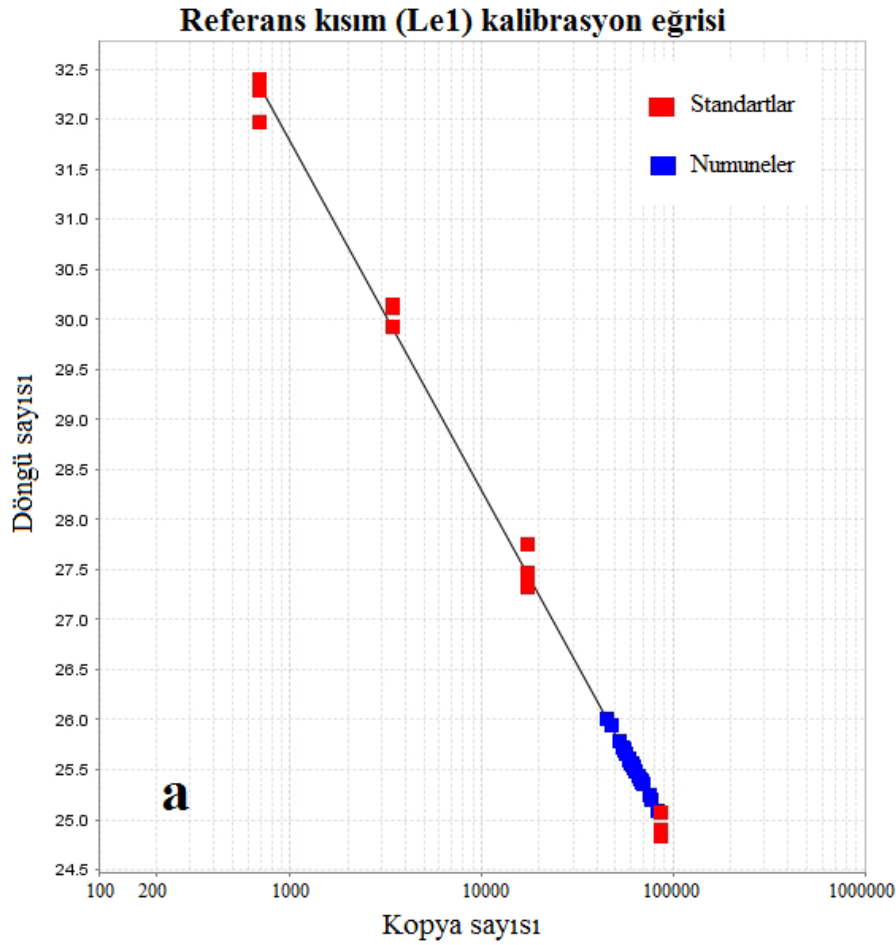
% GDO miktarı	Doğrusallık parametreleri	Referans kısım	Hedef kısım	Kriter	Değerlendirme
10	Eğim (m)	-3.13	-3.12	$-3,1 \geq m \geq -3,6$	Uygun
	R <sup>2</sup>	0.99	0.99	$R^2 \geq 0,98$	Uygun
1	Eğim (m)	-3.49	-3.48	$-3,1 \geq m \geq -3,6$	Uygun
	R <sup>2</sup>	0.99	0.99	$R^2 \geq 0,98$	Uygun

**Çizelge 3.5 :** Real Time PCR'da soyaya ait % GDO miktar bulguları

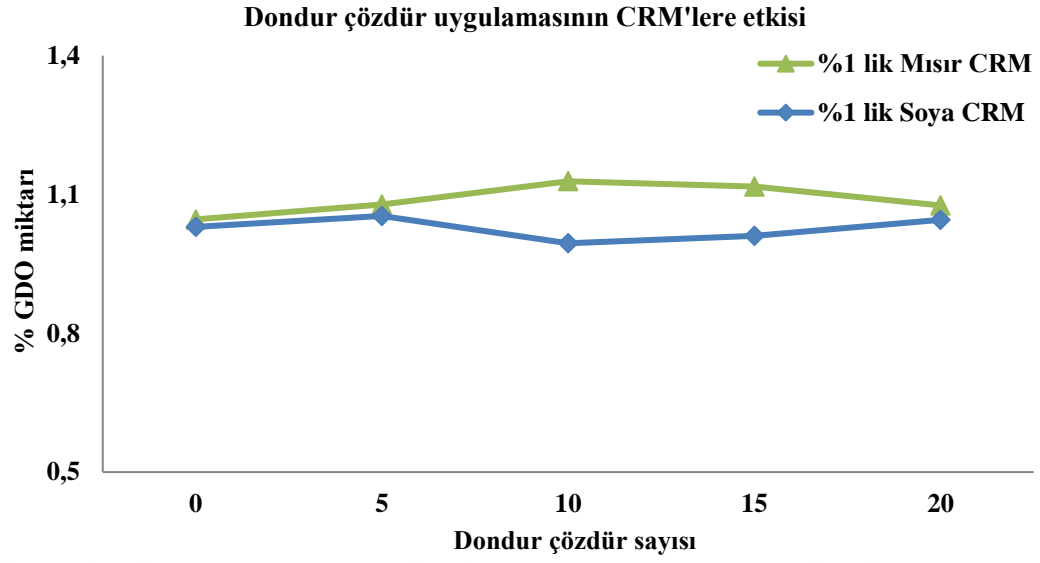
Dondur-çözdür sayısı	n	Soya	
		%10'luk için	%1'lik için
<b>Kontrol</b>	6	10,65±0,29	1,03±0,04
<b>5</b>	6	10,23±0,56	1,05±0,06
<b>10</b>	6	10,34±0,38	0,99±0,07
<b>15</b>	6	9,95±0,68	1,01±0,06
<b>20</b>	6	9,72±0,48	1,04±0,05
<b>Önemlilik derecesi (p&lt;0,01)</b>		Önemsiz	Önemsiz



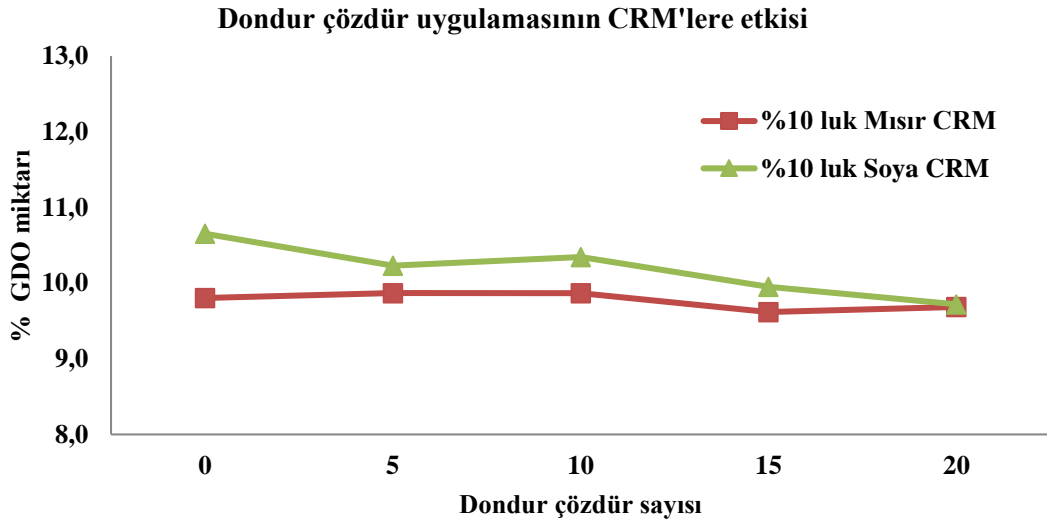
**Şekil 3.1:** %10'luk Soya CRM'e ait kalibrasyon eğrileri, **a:** Referans kısım, **b:** Hedef kısım.



**Şekil 3.2:** %1'lik Soya CRM'e ait kalibrasyon eğrileri, **a:** Referans kısım, **b:** Hedef kısım.



**Şekil 3.3 :** %1'lik soya ve mısır CRM'lere dondur-çözür uygulamasının etkisi.



**Şekil 3.4:** %10'luk soya ve mısır CRM'lere dondur-çözür uygulamasının etkisi.

Kalibrasyon bulguları kabul edilebilir performans kriterleri (eğim ve korelasyon katsayısı) açısından değerlendirildiğinde, Çizelge 3.4'de görüldüğü gibi soya CRM numunelerinde her iki konsantrasyon düzeyi (%1 ve %10) için de uygun bulunmuştur. Bu kalibrasyona göre yapılan ölçümler sonucunda, Çizelge 3.5'de görüldüğü gibi %10'luk soya CRM numunesinin 20 dondur-çözür uygulaması sonucunda %10,6'dan %9,7 düzeyine düştüğü, %1'lik CRM'de ise bu değişimin olmadığı saptanmıştır. Ancak her iki konsantrasyon için de değişimin istatistiksel olarak %1 düzeyinde önemsiz olduğu görülmüştür.



### 3.3.2. Mısır CRM'ine ait % GDO miktar bulguları

Mısır CRM'lerine ait % GDO miktar analizleri sonucunda hesaplanan kalibrasyon eğrileri Şekil 3.5 ve 3.6'da verilmiştir. Bu kalibrasyon verilerinin kriterlere uygunluğu Çizelge 3.6'da ve Mısır CRM izolatlarının dondur-çözdür uygulamaları sonrası Real Time PCR'da yapılan % GDO miktar bulguları da Çizelge 3.7, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de verilmiştir.

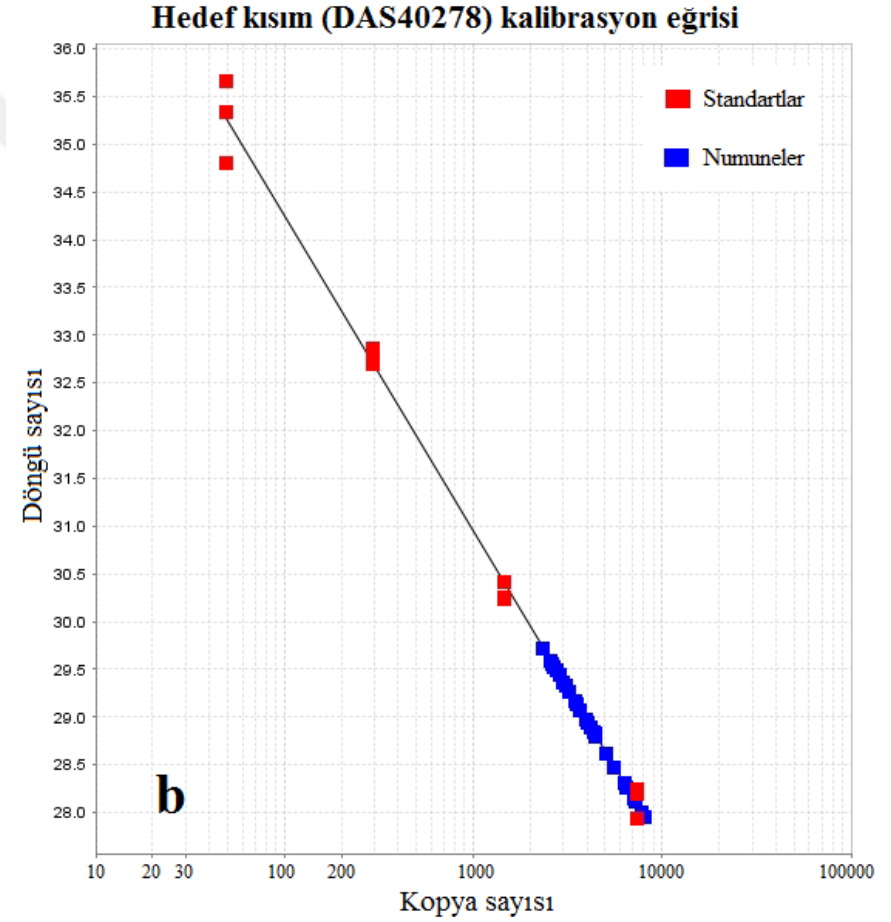
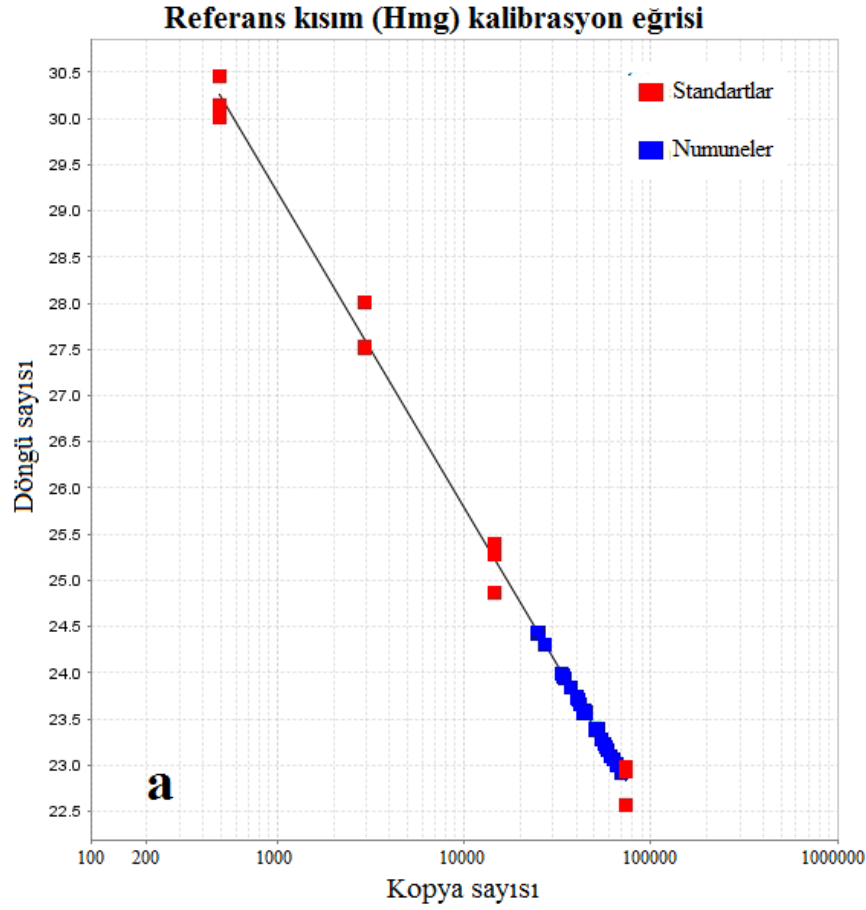
**Çizelge 3.6 :** Real Time PCR'da mısıra ait kalibrasyon verileri ve kriterlere uygunluğu

% GDO miktarı	Doğrusallık parametreleri	Referans kısım	Hedef kısım	Kriter	Değerlendirme
10	Eğim (m)	-3.41	-3.31	$-3,1 \geq m \geq -3,6$	Uygun
	R <sup>2</sup>	0.99	0.99	$R^2 \geq 0,98$	Uygun
1	Eğim (m)	-3.43	-3.47	$-3,1 \geq m \geq -3,6$	Uygun
	R <sup>2</sup>	0.99	0.99	$R^2 \geq 0,98$	Uygun

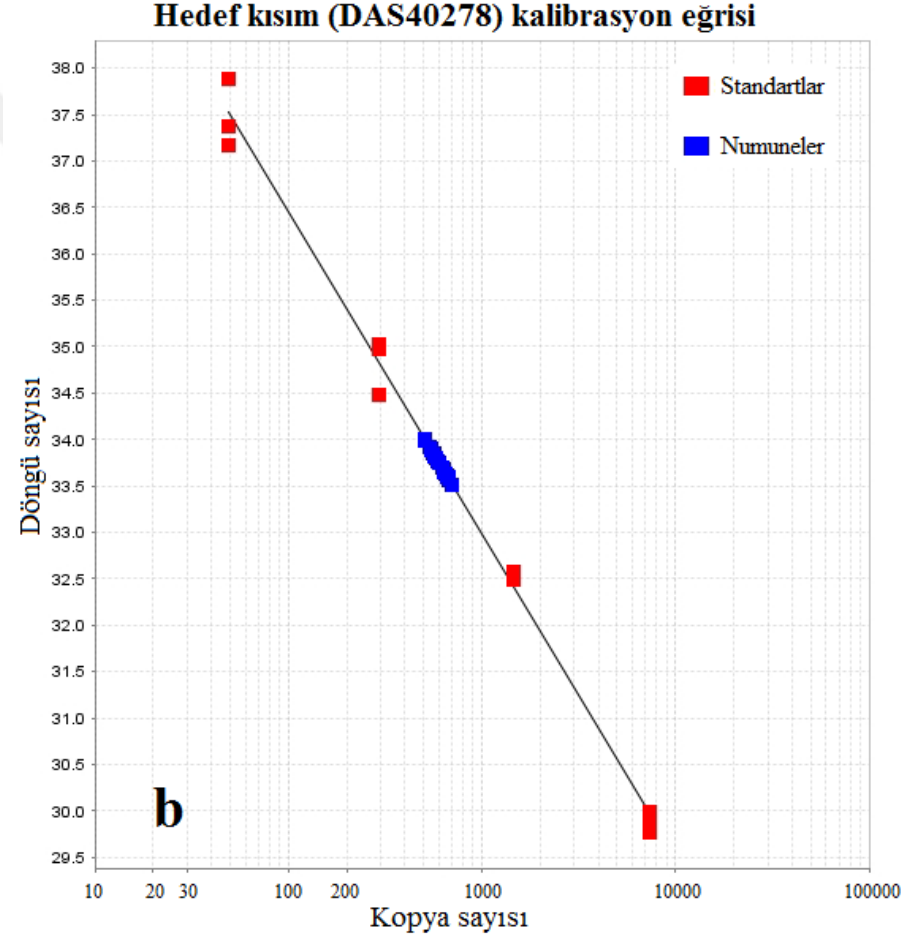
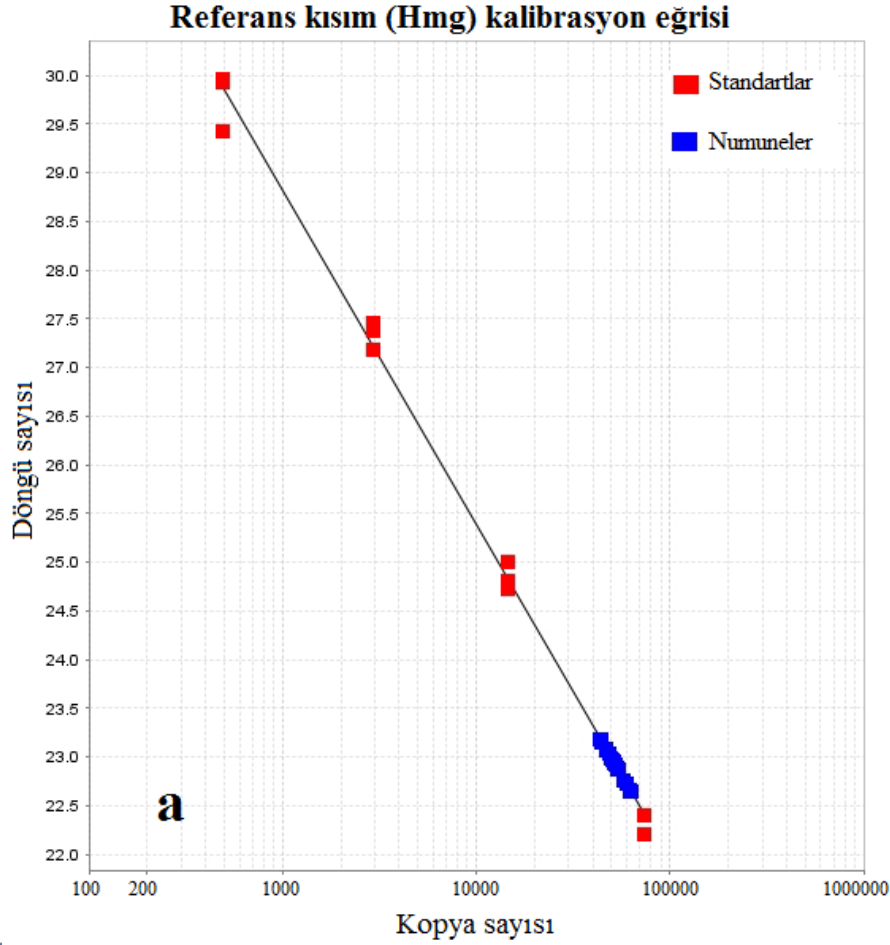
**Çizelge 3.7 :** Real Time PCR'da mısıra ait % GDO miktar bulguları

Dondur-çözdür sayısı	n	Mısır	
		%10'luk için	%1'lik için
<b>Kontrol</b>	6	9,80±0,50	1,05±0,03
<b>5</b>	6	9,87±0,54	1,08±0,04
<b>10</b>	6	9,87±0,44	1,13±0,04
<b>15</b>	6	9,62±0,29	1,12±0,04
<b>20</b>	6	9,68±0,40	1,08±0,06
<b>Önemlilik derecesi (p&lt;0,01)</b>		Önemsiz	Önemsiz

Kalibrasyon bulguları kabul edilebilir performans kriterleri (eğim ve korelasyon katsayısı) açısından değerlendirildiğinde, Çizelge 3.6'da görüldüğü gibi mısır CRM numunelerinde her iki konsantrasyon düzeyi (%1 ve %10) için de uygun bulunmuştur. Bu kalibrasyona göre yapılan ölçümler sonucunda, Çizelge 3.7'de görüldüğü gibi mısır CRM numunelerinde 20 dondur-çözdür uygulaması sonucunda her iki konsantrasyon için de değişimin istatistiksel olarak %1 düzeyinde önemsiz olduğu görülmüştür.



**Şekil 3.5:** %10'luk Mısır CRM'e ait kalibrasyon eğrileri, **a:** Referans kısım, **b:** Hedef kısım.



**Şekil 3.6:** %1'lik Mısır CRM'e ait kalibrasyon eğrileri, **a:** Referans kısım, **b:** Hedef kısım.

### 3.3.3. Soya ve mısır bulgularının tartışılması

Nükleik asitlerin, dondur-çözdür uygulamasına dayanımı ile ilgili literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde bir çok açıdan farklılıklar (numune kaynağı, matriksi, analiz yöntemi, uygulama parametreleri gibi) içerdiği görülmektedir. Ayrıca DNA ve RNA'nın muhafaza yöntemlerine karşı dayanımlarının da farklı olması göz önüne alındığında çalışmamızda elde edilen bulgular sadece DNA içeren çalışmalar ile kıyaslanabilmiştir. Buna göre;

DNA'nın dondur-çözdür uygulamalarına karşı dayanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda, degradasyonun olduğu ile olmadığını gösteren bulgulara rastlanılmıştır. Bu farklılığın nedenlerinin; numunenin kaynağından, numunenin direkt veya izolat halinde uygulamalara alınmasından, uygulama parametrelerinin (sıcaklık, süre, sıklık, ilave muhafaza kimyasalı kullanımı) ve analiz metotlarındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

DNA, hücre içerisinde molekül olarak kararlı bir yapıya sahip iken izolat haline getirildiğinde DNA'nın dış etkenlere (sıcaklık, süre, ışık, pH, kesme kuvveti gibi) karşı dayanımı oldukça azalmaktadır [34, 35]. Numune izolatlarında yapılmış çalışmalara bakıldığında ise;

Schaudien ve diğ. (2007) tarafından, Real Time PCR ile üç farklı DNA standardında ilave muhafaza kimyasalı kullanılarak yapılan dondur-çözdür uygulamasının DNA degradasyonuna etkisinin araştırıldığı çalışmada, su içinde muhafaza edilen standartların DNA düzeyinde 4 dondur-çözdür işleminden sonra azalma olduğu, % 50 gliserol içerisinde ise 16 kez dondurup çözdürmenin bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir [47]. DNA kaynağının bitkisel standart olmaması ve ilave muhafaza kimyasalı (gliserol) kullanılması ile ancak DNA'nın dondur-çözdür uygulamasına dayanabildiği bu çalışmada belirtilmesine rağmen, bizim çalışmamız ilave kimyasal koruyucusu olmadan da bitkisel DNA izolatlarının dayanabildiği gösterilmiştir.

Rossmann ve diğ. (2011) tarafından, Real Time PCR ile iki farklı bakteri DNA standardında farklı uygulamaların DNA'da meydana getireceği değişimin araştırıldığı çalışmada, uzun genomik DNA'larda dondurup çözdürmenin etkisi varken, kısa zincirli oligo-nükleotitlerde ise herhangi bir değişimin olmadığı bildirilmiştir. Uzun genomik DNA izolatlarındaki değişimin nedeninin, dondurulma sırasında meydana gelen fiziksel degradasyon olarak tanımlanan buz kristallerinin kesmelerinden

kaynaklandığı bildirilmiştir [48]. DNA kaynağının bitkisel standart olmaması, ilave muhafaza kimyasallarının (gliserol, tampon çözelti) kullanılması ve kullanılan analiz metodunun farklı ( $\Delta$ -Ct metodu) olması gibi nedenlerden dolayı bizim çalışmamızdan farklılık göstermekle beraber dondur-çözdür uygulaması ile DNA'da degradasyonunun meydana gelebileceği de bildirilmiştir.

DNA'nın muhafazasında major tehditlerden birisi nükleaz kontaminasyonu olduğu bilinmektedir [35]. DNA molekülü nükleazlara karşı duyarlı olduğundan bu bulaşanlardan kolayca etkilenebilmektedir. Bununla beraber Schuster and Appleby (1983) tarafından iyi saflıktaki DNA'nın muhafaza sırasındaki dondur-çözdür döngülerinden etkilenmediği bildirilmiştir (Gaikwad, 1998'de atıfta bulunulduğu gibi) [34]. Çalışmamızdaki izolasyon bulguları dikkate alındığında sonuçlar bu görüşü desteklemektedir.

DNA'nın muhafaza yöntemlerinden dondurmanın enzimatik reaksiyonları inhibe etmesi, böylece oksidatif ve hidrolitik degradasyonu engellemesi sebebiyle muhafazada en iyi yöntem olduğu bilinmektedir [65]. Bu bağlamda çalışmamızda çıkan sonuçlar bu görüşü destekler niteliktedir.

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ GDO miktar analizleri Real time PCR cihazı ile yapılmıştır.
- ✓ Analizlerde kullanılan EURL metotlarının laboratuvar içi verifikasyonu yapılmış olup, ölçümler sonucunda soya ve mısır için her iki konsantrasyon (%1 ve %10) düzeyi için metot performans kriterlerine (eğim ve korelasyon katsayısı) uygun kalibrasyon verileri elde edilmiştir.
- ✓ Soya ve mısır DNA'larının her iki konsantrasyon (%1 ve %10) düzeyi için 20 dondur-çözdür uygulamasının istatistiksel olarak ( $p < 0.01$ ) herhangi bir etkisinin bulunmadığı görülmüştür.
- ✓ Konsantrasyona bağlı herhangi bir farklılık ortaya çıkmamıştır.
- ✓ Literatürde bitki dışındaki kaynaklardan (parazit, bakteri ve virus) elde edilen DNA ve RNA'nın stabilitesi üzerine yapılan çalışmalarda dondur-çözdür uygulamasının etkisinin olduğu ve olmadığı çalışmalara rastlanılmıştır.
- ✓ Çalışma ile GDO miktar analizi yapan laboratuvarların bu analizlerde her seferinde taze olarak hazırladıkları CRM izolatlarını 20 kez dondur-çözdür döngüsüne kadar DNA degradasyonu olmadan kullanabileceği görülmüştür.
- ✓ Elde edilen bulguların sadece çalışma kapsamında kullanılan bitkiler ve çeşitleri için geçerli olduğunu, bundan sonra yapılacak çalışmaların diğer bitki spesifik türler ve bunlara ait çeşitler üzerinden doğrulanarak yapılması gerektiği önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] **5977 Sayılı Biyogüvenlik Kanunu.** (2010). *T. C. Resmi Gazete*, 27533, 28 Mart 2010.
- [2] **Url-1** <<http://www.isaaa.org>>, erişim tarihi: 20.04.2020.
- [3] **Erdoğan, S. M.** (2015). *Dünya’da GDO mevzuatı, ticareti ve uygulamalarının karşılaştırılması ve Türkiye* (AB uzmanlık tezi). T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Avrupa Birliği ve Dış İlişkiler Genel Müdürlüğü, Ankara.
- [4] **Lee, S. B., Crouse, C. A. & Kline, M. C.** (2010). Optimizing storage and handling of DNA extracts. Retrieved from <http://books.google.com/books> (Original work published 2010)
- [5] **Commission Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed.** (2003). *Official Journal of the European Union*, L 268/1, 18 October 2003.
- [6] **Url-2** <<https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/reference-materials-gmoanalysis>>, erişim tarihi: 04.03.2020
- [7] **European Union.** (2017). *Recommendation for the unit of measurement and the measuring system to report traceable and comparable results expressing GM content in accordance with EU legislation* (JRC106032 EUR 28536 EN). Luxembourg: Publications Office of the European Union
- [8] **Url-3** <[https://bch.cbd.int/onlineconferences/portal\\_detection/discussions.shtml](https://bch.cbd.int/onlineconferences/portal_detection/discussions.shtml)> erişim tarihi: 04.03.2020
- [9] **Wu, Y., Li, J., Li, X., Zhai, S., Gao, H., Li, Y., ... & Wu, G.** (2019). Development and strategy of reference materials for the DNA-based detection of genetically modified organisms, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411(9), 1729-1744.
- [10] **ENGL.** (2015). *Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing* (JRC95544). Italy: Joint Research Centre
- [11] **Ünal, T.T.** (2019). *Gıda Ve Yem Ürünlerinde GDO Tespiti İçin Yeterlilik Test Kiti Geliştirilmesi.* (Yüksek lisans tezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [12] **Röder, B., Frühwirth, K., Vogl, C., Wagner, M. & Rossmanith, P.** (2010). Impact of Long-Term Storage on Stability of Standard DNA for Nucleic Acid-Based Methods, *Journal Of Clinical Microbiology*, 48(11), 4260–4262
- [13] **Mahgoub, Salah E. O., Nollet, Leo M.L.** (2019). *Testing and Analysis of GMO-containing Foods and Feed.* CRC Press.

- [14] **Fernandes, T. J., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P., & Mafra, I.** (2014). A survey on genetically modified maize in foods commercialised in Portugal, *Food Control*, 35(1), 338-344.
- [15] **Žel, J., Milavec, M., Morisset, D., Plan, D., Van den Eede, G., & Gruden, K.** (2012). *How to reliably test for GMOs*. London, CA.: Springer.
- [16] **Mazzara, M., Paoletti, C., Corbisier, P., Grazioli, E., Larcher, S., Berben, G., ... & Hougs, L.** (2013). Kernel lot distribution assessment (KeLDA): a comparative study of protein and DNA-based detection methods for GMO testing, *Food Analytical Methods*, 6(1), 210-220.
- [17] **Url-4** <<http://www.detection-methods.com/detection-methods-basics>>, erişim tarihi 06.03.2020.
- [18] **Gryson, N.** (2010). Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2003-2022.
- [19] **Mafra, I., Ferreira, I. M., & Oliveira, M. B. P.** (2008). Food authentication by PCR-based methods, *European Food Research and Technology*, 227(3), 649-665.
- [20] **The analysis of food samples for the presence of Genetically Modified Organisms.** (2020). JRC Technical Report User Manuel, Session 6.
- [21] **Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M.** (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research* 6(10), 986-994.
- [22] **The analysis of food samples for the presence of Genetically Modified Organisms.** (2020). JRC Technical Report User Manuel, Session 10.
- [23] **Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J. & Solera, J.** (2015). Real-time PCR detection chemistry, *Clinica Chimica Acta* 439, 231-250.
- [24] **Manzanares Palenzuela, C. L.** (2018). Electrochemical DNA biosensors and sensing platforms for the detection and quantification of genetically modified soybean in food and feed (Doctoral dissertation). Universidad Complutense Madrid, Facultad Farmacia, Madrid.
- [25] **Elenis, D.S., Kalogianni, D.P., Glynou, K., Ioannou, P.C., Christopoulos, T.K.** (2008). Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392(3), 347-354.
- [26] **Arugula, M.A., Zhang, Y., Simonian, A.L.** (2014). Biosensors as 21st Century Technology for Detecting Genetically Modified Organisms in Food and Feed, *Analytical Chemistry* 86(1), 119-129.
- [27] **Manzanares-Palenzuela, C.L., Martín-Fernández, B., López, M.S.P., & López-Ruiz, B.** (2015). Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 66, 19-31.



- [28] Sousa, J.B., Ramos-Jesus, J., Fonseca, R.A.S., Delerue-Matos, C., Barroso, M. F., & Santos Jr, J.R. (2018). Genetically Engineered Foods. In A.M. Holban and A.M. Grumezescu (Eds.), *Biosensors as Advanced Device for the Transgenic Plants and Food and Detection* (pp. 221-245). Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128115190000091>
- [29] Pollack, J.R., Perou, C.M., Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Pergamenschikov, A., Williams, C.F., Jeffrey, S.S., Botstein, D. & Brown. P.O. (1999). Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays, *Nature Genetics* 23, 41–46.
- [30] Krylov, A.S.; Zasedateleva, O.A.; Prokopenko, D.V.; Rouviere-Yaniv, J. Mirzabekov, A.D. (2001). Massive parallel analysis of the binding specificity of histone-like protein HU to single- and double-stranded DNA with generic oligodeoxyribonucleotide microchips, *Nucleic Acids Research* 29, 2654–2660.
- [31] Sassolas, A., Leca-Bouvier, B.D. & Blum, L.J. (2008). DNA biosensors and microarrays, *Chemical reviews*, 108(1), 109-139.
- [32] Kumar, P., Agrawal, S. K., Misra, A., & Gupta, K. C. (2004). A new heterobifunctional reagent for immobilization of biomolecules on glass surface, *Bioorganic & Medicinal chemistry letters*, 14(5), 1097-1099.
- [33] Nimse, S. B., Song, K., Sonawane, M. D., Sayyed, D. R., & Kim, T. (2014). Immobilization techniques for microarray: *Challenges and Applications, Sensors*, 14(12), 22208-22229.
- [34] Gaikwad, A.B. (1998). DNA storage methodologies: Principles and Protocols. <http://www.nbpgr.ernet.in/>. Retrieved March 8, 2020, from [http://www.nbpgr.ernet.in/Portals/6/DMX/GENOMIC\\_RESOURCES/DNA%20storage%20methods-principles%20and%20protocols.pdf](http://www.nbpgr.ernet.in/Portals/6/DMX/GENOMIC_RESOURCES/DNA%20storage%20methods-principles%20and%20protocols.pdf)
- [35] Rice, B. J., & Haussler, D. (2018). *U.S. Patent Application No. 15/561,447*. Retrieved from Google Patents
- [36] Muller, R., Betsou, F., Barnes, M. G., Harding, K., Bonnet, J., Kofanova, O., & Crowe, J.H. A Review from the International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) Biospecimen Science Working Group. (2016). Preservation of biospecimens at ambient temperature: Special focus on nucleic acids and opportunities for the biobanking community, *Biopreservation and biobanking*, 14(2), 89-98.
- [37] Eken, B. (2017). *Thermus Aquaticus Dna Polimeraz I Enziminin Rekombinant Dna Teknolojisi İle Üretilmesi, Saflaştırılması Ve Analizi* (Yüksek lisans tezi). Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [38] Allnut, T., Chisholm, J., Hird, H., Oehlschlager, S., & Henry, C. (2017). Final Report Plasmid Standards for Real Time PCR and GM Enforcement Testing.
- [39] **The analysis of food samples for the presence of Genetically Modified Organisms.** (2020). JRC Technical Report User Manuel, Session 4.

- [40] Belleste, B., Flori, P., Hafid, J., Raberin, H. & Tran Manh Sung, R. (2003). Influence of the quantity of nonspecific DNA and repeated freezing and thawing of samples on the quantification of DNA by the Light Cycler, *Journal of Microbiological Methods*, 55, 213–219.
- [41] Al-Warid, H. S. (2014). The Effect Of Freezing-Thawing On Dna Extraction From Cryptosporidium Oocysts In Fecal Samples. Retrieved March 8, 2020 from [https://www.ijpbs.com/ijpbsadmin/upload/ijpbs\\_52f98de2e3214.pdf](https://www.ijpbs.com/ijpbsadmin/upload/ijpbs_52f98de2e3214.pdf)
- [42] Comert, F., Aktas, E., Terzi, A. H., Kulah, C., Ustundag, Y., Kokturk, F. ve Aydemir, S. (2013). Evaluation of hepatitis C virus RNA stability in room temperature and multiple freeze-thaw cycles by COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75, 81–85.
- [43] Sanlidag, T., Akcali, S. & Ozbakkaloglu, B. (2005). Serum hepatitis B DNA: stability in relation to multiple freeze–thaw procedures, *Journal of virological methods*, 123 (1), 49-52.
- [44] Granados, A., Petrich, A., McGeer, A. & Gubbay, J. B. (2017). Measuring influenza RNA quantity after prolonged storage or multiple freeze/thaw cycles, *Journal of Virological Methods*, 247, 45–50.
- [45] Shao, W., Khin, S. & Kopp, W. C. (2012). Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis, *Biopreservation and biobanking*, 10(1), 4-11.
- [46] Ross, K. S., Haites, N. E. & Kelly, K. F. (1990). Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity, *Journal of medical genetics*, 27(9), 569-570.
- [47] Schaudien, D., Baumgärtner, W., & Herden, C. (2007). High preservation of DNA standards diluted in 50% glycerol, *Diagnostic molecular pathology*, 16(3), 153-157.
- [48] Rossmanith, P., Röder, B., Frühwirth, K., Vogl, C., & Wagner, M. (2011). Mechanisms of degradation of DNA standards for calibration function during storage, *Applied microbiology and biotechnology*, 89(2), 407-417.
- [49] Fan, X. J., Huang, Y., Wu, P. H., Yin, X. K., Yu, X. H., Fu, X. H., ... & Yin, J. X. (2019). Impact of cold ischemic time and freeze-thaw cycles on RNA, DNA and protein quality in colorectal cancer tissues biobanking, *Journal of Cancer*, 10(20), 4978.
- [50] Ji, X., Wang, M., Li, L., Chen, F., Zhang, Y., Li, Q., & Zhou, J. (2017). The Impact of Repeated Freeze–Thaw Cycles on the Quality of Biomolecules in Four Different Tissues. *Biopreservation and biobanking*, 15(5), 475-483.
- [51] Widell, A., Månsson, A. S., Sundstrom, G., Hansson, B. G. & Nordenfelt, E. (1991). Hepatitis C virus RNA in blood donor sera detected by the polymerase chain reaction: comparison with supplementary hepatitis C antibody assays, *Journal of medical virology*, 35(4), 253-258.

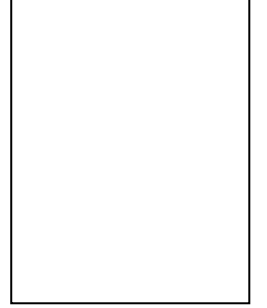
- [52] **Griffith, B. P., Rigsby, M. O., Garner, R. B., Gordon, M. M. & Chacko, T. M.** (1997). Comparison of the Amplicor HIV-1 monitor test and the nucleic acid sequence-based amplification assay for quantitation of human immunodeficiency virus RNA in plasma, serum, and plasma subjected to freeze-thaw cycles, *Journal of clinical microbiology*, 35(12), 3288-3291.
- [53] **Damen, M., Sillekens, P., Sjerps, M., Melsert, R., Frantzen, I., Reesink, H. W. & Cuypers, H. T. M.** (1998). Stability of hepatitis C virus RNA during specimen handling and storage prior to NASBA amplification, *Journal of virological methods*, 72(2), 175-184.
- [54] **Lahiri, D. K. & Schnabel, B.** (1993). DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl<sub>2</sub>, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality, *Biochemical genetics*, 31(7-8), 321-328.
- [55] **Halfon, P., Khiri, H., Gerolami, V., Bourliere, M., Feryn, J. M., Reynier, P. & Cartouzou, G.** (1996). Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA, *Journal of hepatology*, 25(3), 307-311.
- [56] **Gessoni, G., Barin, P., Frigato, A., Fezzi, M., de Fusco, G., Arreghini, N. & Marchiori, G.** (2000). The stability of hepatitis C virus RNA after storage at +4 °C, *Journal of viral hepatitis*, 7(4), 283-286.
- [57] **Brunstein, J.** (2015). Freeze-thaw cycles and nucleic acid stability: what's safe for your samples?. Retrieved March 8, 2020 from <https://www.mlo-online.com/freeze-thaw-cycles-and-nucleic-acid-stability-whats-safe-for-your-samples.php>
- [58] **European Commission** (2007). Certification of Reference Materials of Soya Seed Powder with different Mass Fractions of Genetically Modified 305423 Soya. Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection Molecular Biology and Genomics Unit.
- [59] **European Commission** (2012). The certification of different mass fractions of DAS-40278-9 in maize seed powder. Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection Molecular Biology and Genomics Unit.
- [60] **Eurofins GENESpin** (2016). Kit for isolation of high-quality DNA from food and feed samples.
- [61] **European Commission** (2009). Event-specific Method for the Quantification of Soybean Event DP-305423-1 Using Real-time. Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection Molecular Biology and Genomics Unit.
- [62] **European Commission** (2013). Event-specific Method for the Quantification of Soybean Event DP-305423-1 Using Real-time PCR v. 1.01. Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection Molecular Biology and Genomics Unit

- [63] **European Commission** (2012). Event-specific method for the quantification of maize line DAS40278-9 using real-time PCR Protocol. Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection Molecular Biology and Genomics Unit.
- [64] **GDO Analizlerinde Verifikasyon Rehberi.** (2018). T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Nisan 2018.
- [65] **Bus', M.M., & Allen, M.** (2014). Collecting and Preserving Biological Samples from Challenging Environments for DNA Analysis, *Biopreservation and biobanking*, 12(1), 17-22.



## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Ayşe DAĞDELEN  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 1981 Ankara  
**E-posta** : aysedagdelen02@gmail.com



## ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2000-2004, Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2017 - ...., Bursa Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

## MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- **2011- devam ediyor** : Araştırmacı Personel / Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Bölüm Başkanlığı
- **2004-2011** : Kontrolör / Bursa Tarım ve Orman İl Müdürlüğü

## TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- TAGEM Projesi

## DİĞER ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Güngör B. F, Akman N, **Dağdelen A**, Er H. Çeşitli Gıda Ürünlerinde GDO Analizleri İçin DNA İzolasyonlarının Optimizasyon Çalışması, TAGEM, TAGEM/HSGYAD/Ü/19/A3/P1/1021, 2019, 2 yıl, (Araştırmacı)
- Akman N, Güngör B. F, **Dağdelen A**, Tosunoğlu H, Er H. Balda DNA İzolasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve Metot Optimizasyonu, TAGEM, TAGEM/HSGYAD/Ü/19/A3/P1/1044, 2019, 2 yıl, (Araştırmacı)
- **Dağdelen A**, Çağal M. M, Akman N, Güngör B. F. GDO Analizlerinde Kullanılan CRM İzolatlarının Kontrollü Muhafaza Koşullarında Tekrar Kullanım Olanaklarının Araştırılması, TAGEM, TAGEM/GYKMAE/A/19/A3/P7/01, 2019, 1 yıl, (Yürütücü)