

**AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE
DNA GÖRÜNTÜLEME İÇİN
ETİDYUM BROMÜRE ALTERNATİF BOYALARIN İNCELENMESİ**

Kerime ÖZKAY

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Yrd. Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

Ekim – 2014

TEZ ONAYI

Kerime ÖZKAY tarafından hazırlanan “Agaroz Jel Elektroforezinde DNA Görüntüleme için Etidyum Bromüre Alternatif Boyaların İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Yrd. Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU


Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet YILDIRIM

Doç. Dr. Muhammad AASIM

Yrd. Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

İmza:



Tez Savunma Tarihi: 27/10/2014

Yukarıdaki Sonucu Onaylarım

Prof. Dr. Fevzi KILIÇEL

Enstitü Müdürü

T.C.
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AGAROS JEL ELEKTROFOREZİNDE DNA GÖRÜNTÜLEME İÇİN
ETİDYUM BROMÜRE ALTERNATİF BOYALARIN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kerime ÖZKAY

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

KARAMAN- 2014

TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Kerime ÖZKAY

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE DNA GÖRÜNTÜLEME İÇİN ETİDYUM BROMÜRE ALTERNATİF BOYALARIN İNCELENMESİ

Kerime ÖZKAY

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

Ekim, 2014, 63 Sayfa

Etidyum bromür (EtBr), DNA ve PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılan temel bir jel boyasıdır. Ancak çevre ve sağlık açısından kanserojen ve mutajenik etkilerinden dolayı farklı alternatif boyalar araştırılmaktadır.

Bu çalışmada Etidyum bromür boyasına alternatif olarak elektroforez jellerinin boyanmasında altı farklı boyanın kullanımının araştırılması ve EtBr ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla; SYBR® Safe, SYBR® Green I, GelRed™, Metilen Blue ve Kristal Viyole boya kullanılmış ve bu boya türlerinin bitki DNA'sı ve PZR ürünlerinde boyama etkinliğine bakılmıştır. Ayrıca, görünür boya türlerinden N719 olarak bilinen organik boya da DNA görüntüleme için kullanılmıştır. Boyama işlemi jel içi ve elektroforez sonrası jel boyanması şeklinde yapılmıştır. Çıkan sonuçlar EtBr boyası sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda jel içi ve elektroforez sonrası boyamada GelRed, SYBR Safe ve N719 boya türlerinin EtBr yerine başarı ile kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Agaroz Jel Elektroforezi, DNA, EtBr, GelRed, Organik Boya, SYBR Green I, SYBR Safe

ABSTRACT

Ms Thesis

THE EVALUATION OF ALTERNATIVES DYES TO ETHIDIUM BROMIDE FOR DNA IMAGING IN AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS

Kerime ÖZKAY

**Karamanoğlu Mehmetbey University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOğLU

October, 2014, 63 pages

Ethidium bromide (EtBr), a basic gel dye has been widely used for imaging of DNA and PCR fragments in the agarose gel electrophoresis. However, hazardous effects to environment and health due to carcinogenic and mutagenic activity, there is need to work out for alternative dye.

The study was designed to investigate to check six different dyes for staining of electrophoresis as an alternative to Ethidium bromide and to compare it with Ethidium bromide. For this purpose, SYBR® Safe, SYBR® Green I, GelRed™, Methylene Blue and Crystal Violet dye were used and staining activity in plant DNA and PCR products were analyzed. Furthermore, a kind of visible organic dye known as N719 being was also used for DNA imaging. The staining process were used as precast in gel and post-stain electrophoresis. The results were compared with the results of EtBr dye. GelRed™, SYBR® Safe and N719 dyes could be used for post-stain electrophoresis and precast in gel instead of EtBr.

Keywords: Agarose Gel Electrophoresis, DNA, EtBr, GelRed, Organic Dye, SYBR Safe, SYBR Green I

ÖN SÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında bana bilgisi, görüş, öneri, yardımlarıyla büyük katkı sağlayan ve beni sabırla destekleyen değerli tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU'na ve laboratuvar çalışmalarım sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Gökhan SADI, Doç. Dr. Muhammad AASIM ve Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ'a ve değerli arkadaşlarım Leyla Nurefşan GÜNDÜZ, Ramazan ÖZBEY, İbrahim SAVRAN ve Begüm TERZİ'ye teşekkür ederim. Bu tez çalışmasını

Ayrıca, öğrenim hayatım boyunca bana destek olan aileme ve sevgili halam Fatma ÖZKAY'a da teşekkür ederim.

Bu çalışma 06-YL-13 numaralı proje kapsamında Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Kerime ÖZKAY

Ekim - 2014

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
3. MATERYAL VE METOD	12
3.1. DNA İzolasyonu	12
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	14
3.3. Jel İçi Boyama Protokolü	16
3.4. Elektroforez Sonrası Jel Boyama İşlemi	18
3.4.1. Etidyum Bromür Boyasıyla Elektroforez Sonrası Boyama Protokolü	18
3.4.2. GelRed™ Boyasıyla Elektroforez Sonrası Boyama Protokolü	18
3.4.3. SYBR® Safe Boyasıyla Elektroforez Sonrası Boyama Protokolü	19
3.4.4. SYBR® Green I Boyasıyla Elektroforez Sonrası Boyama Protokolü	19
3.4.5. Metilen Blue Boyasıyla Elektroforez Sonrası Boyama Protokolü	20
3.4.6. Kristal Viyole Boyasıyla Elektroforez Sonrası Boyama Protokolü	20
3.4.7. N719 Organik Boyasıyla Elektroforez Sonrası Boyama Protokolü	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	22
4.1. Etidyum Bromür İle Boyama	22
4.2. GelRed™ İle Boyama	26
4.3. SYBR® Safe İle Boyama	32
4.4. SYBR® Green I İle Boyama	37
4.5. Metilen Blue İle Boyama	42
4.6. Kristal Viyole İle Boyama	45
4.7. N719 Organik Boyası İle Boyama	48
5. SONUÇ	52
6. KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 :	N719 boyasının kimyasal yapısı	11
Şekil 3.1 :	Agaroz jel elektroforezi	14
Şekil 3.2 :	PZR’de kullanılan thermal cycler	15
Şekil 3.3 :	Elektroforez görüntüleme cihazı	16
Şekil 4.1.a:	Etidyum Bromür’ün agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü	23
Şekil 4.1.b:	Etidyum Bromür ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları	24
Şekil 4.1.c:	Etidyum Bromür ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyama görüntüsü	25
Şekil 4.2.a:	GelRed TM ’in agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü	28
Şekil 4.2.b:	GelRed TM ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları	29
Şekil 4.2.c:	GelRed TM ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyama görüntüsü	30
Şekil 4.3.a:	SYBR® Safe’in agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü	33
Şekil 4.3.b:	SYBR® Safe ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları	34
Şekil 4.3.c:	SYBR® Safe ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyama görüntüsü	35
Şekil 4.4.a:	SYBR® Green I’in agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü	38
Şekil 4.4.b:	SYBR® Green I’in % 1’lik agaroz jel içine seyreltilerek eklendiği jel görüntüsü.	39
Şekil 4.4.c:	SYBR® Green I boyası ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları (A) % 2’lik agaroz jel görüntüsü ve (B) % 1’lik agaroz jel görüntüsü	40
Şekil 4.4.d:	SYBR® Green I ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyanma görüntüsü	41
Şekil 4.5.a:	Metilen Blue’nun agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü	42
Şekil 4.5.b:	Metilen Blue ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları	43
Şekil 4.5.c:	Metilen Blue ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyanma görüntüsü (A) DNA ve PZR ürünleri (B) Yükleme miktarı artırılmış DNA ve PZR ürünleri	44
Şekil 4.6.a:	Kristal Viyole’nin agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü	45
Şekil 4.6.b:	Kristal Viyole ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları	46
Şekil 4.6.c:	Kristal Viyole ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyanma görüntüsü (A)DNA ve PZR ürünleri (B) Yükleme miktarı artırılmış DNA ve PZR ürünleri	47
Şekil 4.7.a:	N719 organik boyasının agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü	49
Şekil 4.7.b:	N719 organik boyası ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları	50
Şekil 4.7.c:	N719 organik boyası ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyama görüntüsü	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

bç	Baz çifti
g	Gram
M	Molar
MA	Moleküler ağırlık
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
ng	Nanogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
V	Volt

Açıklama

Kısaltmalar

BME	β-mercaptoethanol
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
DAPI	4,6-Diamidino-2-Pheylindole
DMSO	Dimetil Sülfoksit
dNTP	Deoksi Nükleozin Trifosfat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dsDNA	Double-stranded DNA
EtBr	Ethidium Bromür
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
NaCl	Sodyum klorür
MgCl₂	Magnezyum Klorür
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Revolutions per minute
sn	Saniye
RCRA	Resource Conservation and Recovery Act
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
ssDNA	Single-stranded DNA
TBE	Tris/ Borik Asit/ EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA

1. GİRİŞ

Moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği çalışmalarında nükleik asitlerin saptanması için elektroforez yöntemi kullanılmaktadır. Nükleik asitlerin jellerde görüntülenmesinde hızlı, hassas, etkili ve kısmen ucuz bir teknik olması nedeniyle Etidyum Bromür (EtBr) ile boyama kullanılmaktadır. Ancak Etidyum Bromürün mutajen ve kanserojen olması nedeniyle gerek sağlık açısından gerekse çevresel açıdan önemli dezavantajları bulunmaktadır. Etidyum Bromür DNA'ya bağlandığında yandaki baz çiftlerini kaydırmaya ve çift zincirin uzamasına neden olmaktadır. Bu durum DNA replikasyonu sırasında ekstra baz hatalarına neden olabilir ve ayrıca EtBr ile DNA'yı görüntüleyebilmek için zararlı olan kısa dalga boylu UV ışığı gerekmektedir (Lunn ve Sansone, 1987).

Laboratuvarın bir alanında Etidyum Bromür ile çalışılıyorsa kolaylıkla geniş alanlara kontamine olabilir. Laboratuvarı bu kontaminasyondan arındırmak oldukça dikkat ve çaba gerektirmektedir. Bu nedenle özel ekipmanlarla tehlikeli atık olarak imha edilmesi gerekmekte bu da çalışma sonrasında ayrı bir maliyete neden olmaktadır. Atıkları imha teknikleri yüksek maliyet yanında yoğun bir iş gücü gerektirmektedir.

Bu dezavantajları gidermek için bilim insanları çalışmalarının güvenli ve sağlıklı olabilmesi için farklı nükleik asit jel boyası arayışına girmişlerdir. Günümüzde EtBr dışında jel elektroforezlerinde kullanılmaya başlanmış güvenli ve hassas görüntü veren floresan boya çeşitleri bulunmaktadır. Bu boyalar son zamanlarda biyoloji, tıp ve ilaç sanayisinde hücre düzeyinde floresans etiketleme ve problama işlemlerinde; yapısal çalışmalarda floresans enerji aktarımının saptanmasında; jel elektroforezi ile nükleik asitlerin ölçümünde; proteinlerin saptanmasında ve DNA dizi analizi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Hilal ve Taylor, 2007).

GelRed™ yüksek derecede toksik olan Etidyum Bromürün yerine geçmek için geliştirilmiş yeni bir floresans nükleik asit boyasıdır. GelRed™ boyasının düşük toksik konsantrasyonu, yüksek hassasiyeti ve stabilitesi ile Etidyum Bromür ve diğer alternatiflerinden daha üstün olduğu bildirilmiştir. Genomik DNA, PZR ampikonları ve

metilasyona duyarlı PZR ürünleri ile restriksiyon enzimleriyle kesilmiş genomik DNA'nın GelRed™ ile etkin boyama aktivitesi bulunmaktadır. Ames testi ile de GelRed'in jel boyamada kullanılan konsantrasyonunun mutajenik olmadığı saptanmıştır (Anonim, 2012a).

SYBR® Safe agaroz ve poliakrilamid jellerde DNA'yı görüntülemek için üretilmiş bir boyadır. EtBr'den daha hassas ve alternatif bir boya olduğu ileri sürülmektedir. Bu boyanın üretiminde ki amaç; EtBr'nin yüksek mutajenik etkilerinin azaltılması, UV ışınlarına maruz kalma süresinin azaltılması, spesifik olmayan arka planın floresans özelliğinin azaltılıp duyarlılığının artırılması ve RNA da dahil olmak üzere bütün boyamalarda EtBr'e alternatif olmasıdır (Anonim, 2006a, 2011a). Ames testinin de bulunduğu pek çok mutajenite testi ile *Salmonella typhimurium* SYBR® Safe boyasının mutajen riski açısından Etidyum Bromür'den daha güvenli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca SYBR® Safe boyası RCRA (Resource Conservation and Recovery Act) tarafından tehlikeli atık olarak sınıflandırılmamıştır (Anonim, 2006a).

SYBR® Green I nükleik asit jel boyası ise siyanin grubu bir boya olup, agaroz ve poliakrilamid jellerde, dsDNA'nın hassas bir şekilde tespitinde kullanılmaktadır (Anonim, 2007a, 2011b). Ayrıca Ames testi sonuçlarına göre de EtBr'den daha az mutajenik olduğu saptanmıştır (Anonim, 2008).

Metilen blue boyası, Etidyum Bromür'e alternatif olarak kullanılan en yaygın boyalardan biridir. Ancak Metilen Blue, EtBr ile karşılaştırıldığında daha az hassasiyete sahiptir ve Metilen Blue ile boyanacak DNA örneklerinin 2-3 kat fazla kullanılması önerilmektedir. Ekonomik anlamda EtBr'den daha ucuz bir madde olup toksisitesi azdır (Herrin ve Schmidt, 1988; Anonim, 2000, 2006b, 2011c; Soto ve Draper, 2012).

Etidyum Bromür ile Kristal Viyole DNA'ya benzer şekilde bağlanmaktadır. Kristal Viyole'nin hassasiyeti düşüktür ve çok fazla miktarda bağlanacak DNA gerektirmektedir. Kristal Viyole gün ışığında görünebildiği için (zararlı UV ışığının gerektirmediği için) Etidyum Bromür kadar tehlikeli bir mutajen değildir (Rand, 1996).

Bu çalışmada; bitki DNA'sının görüntülenmesi için yaygın olarak kullanılan ancak kanserojen ve mutajen özellikleri olan Etidyum Bromür boyasına alternatif olarak

elektroforez jellerinin boyanmasında altı farklı boyanın kullanımının araştırılması ve Etidyum Bromür ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla; SYBR® Safe, SYBR® Green I, GelRed™, Metilen Blue ve Kristal Viyole boya ile N719 organik boyası kullanılmıştır. Boyar maddelerden hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki boyalar ile bitki DNA'larının ve PZR ürünlerinin yüklendiği elektroforez jelleri boyanmış ve her bir boya için optimum konsantrasyonlar belirlenerek çalışmada kullanılmıştır. Boyama işlemi elektroforez işlemi bitiminde jelin boyanması ve boyanın agaroz jel içine katılması olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmıştır. Aynı örneklerin yüklendiği agaroz jeller farklı boya ile boyanmış ve Etidyum bromür boyası ile boyanmış olan kontrol jeli ile karşılaştırılmıştır. Böylece çalışmada kullanılan boyar maddelerin DNA bantlarının gözlenmesi için elektroforez jellerinin boyanmasındaki kullanılabilirliği ve bitki biyoteknolojisindeki kullanım olanakları tespit edilmiştir. Kullanılan boyaların görüntü kalitesindeki etkinliğinin yanı sıra jel başına boya maliyeti de incelenmiş ve bu kapsamda da bir karşılaştırma yapılmıştır. Böylece bitki biyoteknolojisi çalışmalarında EtBr yerine kullanılacak alternatif boyaların avantaj ve dezavantajları ortaya konularak daha sonraki çalışmalara bir önveri hazırlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Elektroforez yönteminde en yaygın kullanılan boya Etidyum Bromürdür (EtBr9-8). Etidyum Bromür ($C_{21}H_{20}BrN_3$) interkalator bir boyadır, pozitif yüklü bir bileşik olup DNA'nın baz çiftleri arasına yerleşerek DNA'ya bağlanır (Sharp ve ark., 1973; Turner ve ark., 2005). Etidyum Bromür ile boyanan DNA'ların ultraviyole ışık altında parlaması nükleik asit bantlarının görüntülenmesini ve tanımlanmasını sağlamaktadır. EtBr nükleik asit bantlarının görüntülenmesinde kısmen ucuz olduğu için çok kullanılan bir boya olmasına karşın oldukça mutajenik ve kanserojenik bir maddedir. DNA bantlarının agaroz jellerde görüntülenebilmesi amacıyla birçok laboratuarda rutin olarak kullanılmaktadır.

Etidyum Bromür etkili ve kısmen ucuz bir teknik olmasına karşın önemli dezavantajları vardır (Cerutti, 1985; Marks, 1995). DNA bantlarının arasına eklenmesinden dolayı cilt tarafından absorbe edilebilir, göz, ağız ve üst solunum yollarını tahriş edebilir. Bu nedenle Etidyum Bromür tehlikeli bir mutajendir. Etidyum Bromür DNA'ya bağlandığında yandaki baz çiftlerini kaydırır ve çift zinciri uzatır. Bu durum DNA replikasyonu sırasında ekstra baz hatalarına neden olarak EtBr boyasının mutajenik etkisine neden olur. Ayrıca EtBr ile DNA'yı görüntüleyebilmek için zararlı olan kısa dalga boylu UV ışığı gereklidir (Cerutti, 1985; Marks, 1995). Yapılan bir çalışmada EtBr ve UV ışığın bulunduğu ortama konulan *E. coli* hücrelerinde kimyasal mutagenез ile genotoksisitenin arttığı saptanmıştır (Ohta ve ark., 2001).

Laboratuarda Etidyum Bromür ile çalışılıyorsa kolaylıkla geniş alanlara kontamine olabilir. Laboratuarı bu kontaminasyondan arındırmak oldukça dikkat ve çaba gerektirmektedir. Ayrıca EtBr ile boyanan jellerin imha edilmesi özel işlemleri gerektirmektedir. Etidyum Bromür'ün toprağa gömülmesi veya çöpe atılması kanserojen etkinin yayılmasına neden olabilir. Bu nedenle özel ekipmanlarla tehlikeli atık olarak imha edilmesi gerekmekte bu da çalışma sonrasında ayrı bir maliyete neden olmaktadır. Atıkları imha teknikleri yüksek maliyet yanında yoğun bir iş gücü gerektirmektedir.

Tüm bu dezavantajlarından dolayı DNA’da istenmeyen mutasyonlara neden olan EtBr yerine alternatif boyaların denenmesi ve kullanılması gerektiği bildirilmiştir (Lunn ve Sansone, 1987; Anonim, 2012b; Saeidnia ve Abdollahi, 2013).

Günümüzde EtBr’den sonra yaygın olarak kullanılan diğer nükleik asit boya örneklerinden bazıları şunlardır; SYBR® Green I, GelStar, DAPI, SYBR® Gold, SYBR® Safe, GelGreen™, GelRed, GoldView™, GeneFinder® ve PicoGreen boyalarıdır (Tuma ve ark., 1999; Diggle ve ark., 2003). Ayrıca agaroz ve poliakrilamid jellerde DNA saptanması için Metilen blue, Brilliant cresyl blue, Kristal viyole (Yang ve ark., 2001), Etil viyole (Cong ve ark., 2010) ve Nil mavisi boyaları kullanılarak çeşitli protokoller denenmiştir (Adkins ve Burmeister, 1996). Bu çalışmada EtBr’e alternatif olarak kullanılan GelRed™, SYBR® Green I, SYBR® Safe, Kristal Viyole, Metilen Blue ve N719 organik boyasına ait genel bilgiler aşağıda verilmiştir.

GelRed™ ve GelGreen™ yüksek derecede toksik olan Etidyum Bromür’ün yerine geçmek için geliştirilmiş yeni birer floresans nükleik asit boyasıdır. GelRed™ ve GelGreen™’in düşük toksik konsantrasyonu, yüksek hassasiyeti ve stabilitesi ile Etidyum Bromür ve diğer alternatiflerinden daha üstün olduğu ileri sürülmüştür (Anonim, 2012a). Ames testi ile de GelRed™ ve GelGreen™’in jel boyamada kullanılan konsantrasyonunun mutajenik olmadığı saptanmıştır. Ayrıca çevresel güvenlik testleri de akuatik yaşam için tehlikesiz ve toksik olmadığını ortaya koymuştur (Anonim, 2012a). GelRed™ ve GelGreen™ elektroforez öncesi ve sonrası boyamalarda başarıyla kullanılmaktadır. 312/302 nm dalga boyunda UV görüntüleme cihazında kullanım için tasarlanan GelRed™’in Etidyum Bromür’den daha hassas olduğu ifade edilmiştir. Genellikle kullanılan jel boyama prosedürlerinde GelRed™ boyasının elektroforez sonrası kullanımının, bant boyanmasında daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (Anonim, 2007b, 2012b).

SYBR® Green I nükleik asit jel boyası dsDNA’nın hassas bir şekilde tespitinde kullanılan, siyanin grubu bir boyadır. Özellikle dsDNA’ya yüksek afiniteyle bağlanır ve ortamdaki RNA-ssDNA kalıntılarında etkilenmez (Anonim, 2007a). Ayrıca SYBR® Green I boyası hücre içinde DNA etiketlenmesinde de kullanılmaktadır (Anonim, 2014a). Genellikle elektroforez sonrası jel boyamada kullanılması tavsiye edilir

(Anonim, 2007a, 2011b). Nükleik asitlere bağlanan SYBR® Green I boyası 497 nm’de maksimum bir emisyonu ve 284-302 nm’de ise maksimum floresans uyarıma sahiptir (Anonim, 2007a, 2011b, 2014a). Ayrıca Ames testi sonucunda, SYBR® Green I’in EtBr’den daha az kanserojen ve alternatif olarak kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir.

Etidyum Bromür gibi interkalatörler temel DNA reaksiyonlarını birkaç yolla etkilerler. Örneğin EtBr’nin RecA proteininin çift zincirli DNA’ya hızlı bağlanmasını azalttığı, tek zincirli DNA’ya bağlanmasını ise inhibe ettiği saptanmıştır (Thresher ve Griffith, 1990; Nath ve ark., 2000). Bu dezavantajları gidermek için yapılan bir çalışmada PZR ürünlerinin koşullu olduğu jellerde SYBR® Green I boyası EtBr ile karşılaştırılmış ve EtBr’den daha az mutajenik olan SYBR® Green I boyasının Etidyum Bromür’ün PZR ürünleri üzerindeki olumsuz etkilerini göstermediği ve DNA saptanmasında EtBr’den daha hassas ve etkili olduğu ifade edilmiştir (Nath ve ark., 2000).

SYBR® Safe DNA jel boyası EtBr yerine kullanılacak alternatif ve güvenli bir boyadır (Anonim, 2006a). SYBR® Safe boyası ile boyanan DNA bantları standart bir UV Transillüminatör kullanılarak tespit edilebilir. Nükleik asitlere bağlanan SYBR® Safe boyası 530 nm’de maksimum bir emisyonu ve 280 ve 502 nm’de ise maksimum floresans uyarıma sahiptir. Ames testinin de bulunduğu pek çok mutajenite testi ile SYBR® Safe boyasının mutajen riski açısından Etidyum Bromür’den daha güvenli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca SYBR® Safe boyası RCRA (Resource Conservation and Recovery Act) tarafından tehlikeli atık olarak sınıflandırılmamıştır (Anonim, 2006a).

Etidyum Bromür’e alternatif olarak kullanılan en yaygın boyalardan biri de Metilen Blue ve Azure A, B ve C, Toluidine blue O, Thionin ve Brilliant cresyl blue gibi Metilen Blue’nun oksidasyon ürünleridir (Yung-Sharp ve Kumar, 1989; Flores ve ark., 1992; Santillán Torres ve Ponce-Noyoia, 1993). Bu boyaların gerçek fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber nükleik asitlerin dış yüzeyleriyle (negatif yüklü fosfat gruplarıyla) doğrudan iyonik bağ kurmaktadır. Bu nedenle hem DNA’nın hem de RNA’nın tespitinde kullanılabilirler. Ancak Metilen Blue EtBr ile karşılaştırıldığında daha az hassasiyete sahip olduğu ifade edilmekte ve Metilen Blue ile boyanacak DNA örneklerinin 2-3 kat fazla kullanılması önerilmektedir. Ayrıca Metilen Blue ekonomik

anlamda EtBr'den daha ucuz bir madde olup toksisitesi azdır (Herrin ve Schmidt, 1988; Anonim, 2000, 2006b, 2011c; Soto ve Draper, 2012).

Kristal Viyole DNA'ya Etidyum Bromür ile benzer şekilde bağlanır ve gün ışığında görünebildiği için (zararlı UV ışığının gerektirmediği için) Etidyum Bromür kadar tehlikeli bir mutajen değildir (Rand, 1996). Ancak jelin görüntülenmesinde yeterli netlikte görüntü vermediği için günümüzde pek tercih edilen bir boya değildir.

Etidyum Bromür yerine kullanılacak alternatif boyaların denenmesi ve kullanılmasına ilişkin literatür çalışmaları aşağıda verilmiştir.

Müller ve Gautier (1975), nükleik asitler ile heteroaromatik bileşiklerin etkileşimini belirlemek için sekiz boyanın (p-Fuchsin, Malahit Yeşili, Metil Green, Auramine, Di-*t*-butylproflavine Monoacetate, Di-*t*-butyl-acriflavine ve Kristal Viyole) kullanıldığı bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda Kristal Viyole ve Höchst 33258 boyalarının DNA'nın dışına bağlanarak, görüntülemeye imkân sağladığını belirtmişlerdir.

Jin ve Choi (2004), elektroforezde protein ve DNA'nın boyanması için yeni yöntemler geliştirmek için bir dizi deneme yapmışlardır. Denemelerinde DNA'nın boyanmasında karşı-iyon boyama mekanizması geliştirmişlerdir. Bunun için Kristal Viyole ve Metil Orange kullanılmıştır. Sonuç olarak Kristal Viyole-Metil Orange karşı-iyon boyama mekanizması, EtBr kadar hassas sonuç vermediği ortaya konulmuştur.

Kristal Viyole ve Metil Orange boyasının birlikte kullanıldığı bir diğer çalışmada, agaroz jel üzerinde güvenilir ve hassas sonuçlar elde edilmiştir (Yang ve ark., 2001).

Farklı bir araştırmada Etidyum Bromür'ün DNA'ya bağlanma ve ayrılma özellikleri Acridine Orange ve Metilen Blue boylarıyla karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda Metilen Blue boyasının Etidyum Bromür'e alternatif olabileceği ifade edilmiştir (Nafisi ve ark., 2007).

Tsui ve Law (2012), insan genomu üzerinde yaptıkları DNA parmak izi analizi çalışmalarında agaroz jel elektroforezinde Metilen Blue ve SYBR® Safe boylarını

karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak her iki boyamada da DNA bantları boyanmış olup, SYBR® Safe boyasında bantların daha belirgin olduğu tespit edilmiştir.

Huang ve ark. (2010), agaroz jel üzerinde daha basit ve pratik boyama yapabilmek için GelRed™, SYBR® Gold ve SYBR® Green I boyalarının karşılaştırıldığı bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmada GelRed™ boyasının çalışmada kullanılan diğer boyalardan daha etkili ve Etidyum Bromür boyasından daha güvenli olduğu tespit edilmiştir.

HIV taşıyan Ruanda kadınlarında anemi bulaşımı ve ferroportin polimorfizmi etkileri üzerine yapılan bir araştırmada ise Etidyum Bromür ve GelRed™ boyaları karşılaştırılmıştır (Breman 2011). Araştırma sonucunda EtBr'nin, GelRed™ boyasına göre agaroz jeli daha iyi ve hassas boyadığı tespit edilmiştir.

GelRed™ boyası birçok çalışmada DNA ve RNA bantlarının görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılmıştır. Dong ve ark. (2012), yeni geliştirdikleri hassas RTL-P (düşük deoksiribonükleosid trifosfat) konsantrasyonlarında RT-PZR (ters transkripsiyonun takibi) yöntemi ile RNA moleküllerinde 20-0-metilasyon bölgelerinin tespitinin görselleştirilmesinde, GelRed™ boyasını tercih etmişlerdir.

Birbirine eklenen (spliced) ve eklenmeyen (unspliced) viral RNA ve konak U6 - 7SL RNA virüsü partikülleri içinde HIV-1 RNA'sı ve proteinlerinin belirleyici rolü üzerine yapılan çalışmada GelRed™ boyası başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Didierlaurent ve ark., 2011).

Chappell ve ark. (2013), sentetik biyoloji için DNA düzenleyici elemanların hızlı prototiplenmesi için tamamen in vitro bir yaklaşımın doğrulanması üzerine yaptıkları çalışmada ürettikleri DNA şablonlarının görüntülenmesinde GelRed™ boyasından etkin bir şekilde faydalanmışlardır.

Couto ve ark. (2013), DNA fragmanlarını agaroz jelde boyamak için GelRed™ ve EtBr boyama tekniklerini karşılaştırmışlardır. Bunun için *Cryptosporidium* numunelerini kullanarak DNA ekstraksiyonu yapmışlardır. Sonuç olarak GelRed™ boyasının DNA bantlarını EtBr'den daha hassas bir şekilde boyadığını tespit etmişlerdir.

Mikrosatellit DNA'ların izolasyon sonrası poliakrilamid jelde görüntülenmesi için iki görüntü tekniği (Floresans görüntüleme tekniği ile Gümüş boyama tekniği) karşılaştırılmıştır. İki görüntüleme sisteminin karşılaştırılmasında GelRed™ ve GelGreen™ boyalarından etkin bir şekilde faydalanılmıştır (Mengpei ve ark., 2011).

Yapılan bir diğer çalışmada da Etidyum Bromür'e karşı DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ve SYBR® Green I boyaalarının güvenlik ve hassasiyetleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda SYBR® Green I'in, Etidyum Bromür'den daha hassas sonuç verdiği saptanmıştır (Bourzac ve ark., 2003).

Huang ve Fu (2005), SYBR® Gold, SYBR® Green I, GoldView™, GeneFinder® ve GoldStar® boyaalarının Etidyum Bromür'e karşı verimliliğini araştırdıkları bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda SYBR® Gold ve SYBR® Green I boyaalarının güvenlik ve hassasiyet açısından Etidyum Bromür'den daha güvenilir olduğunu tespit etmişlerdir.

Singer ve ark. (1999), SYBR® Green I ve EtBr'yi mutajenitelerine göre karşılaştıran bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda SYBR® Green I'in EtBr'ye göre yüklenen DNA'da nokta mutasyonlarını daha başarılı bir şekilde engellediğini saptamışlardır.

Bir diğer araştırmada çerçeve kayması mutasyonunda SYBR® Green I'in zayıf bir mutajen olduğu, ama UV nedeniyle oluşan DNA hasarının (ekleme-çıkarma) tamirinde EtBr'den daha fazla engelleyici olduğu belirlenmiştir (Ohta ve ark., 2001).

Kiltre ve Ryan (1997), değişken alanlı (pulsed field) jel elektroforezinde kullandıkları SYBR® Green I'in EtBr'ye göre daha basit ve doğru kantitatif sonuçlar ortaya koyduğunu belirtmişlerdir.

Zipper ve ark. (2004), SYBR® Green I'in tek mi yoksa çift iplikli DNA'da mı daha iyi bir performans gösterdiğini araştırmak için yürüttükleri çalışma sonucunda SYBR® Green I'in çift iplikli DNA'ya daha iyi bağlandığını ve bu sayede DNA'nın özellikleri hakkında daha iyi veriler elde edildiğini ifade etmişlerdir.

Toprak ve su sedimentlerinde bulunan DNA'ların analizi için H 33258, PicoGreen ve SYBR® Green I'in karşılaştırıldığı bir çalışmada, DNA'nın geri kazanımında, standartlar ve çevresel numune konsantrasyonlarının belirlenmesinde SYBR® Green I'in performansının daha iyi olduğu saptanmıştır (Zipper ve ark., 2003).

Martineau ve ark. (2008), SYBR® Safe boyama tekniğinin geliştirilmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda SYBR® Safe boyasının Etidyum Bromür boyasından daha güvenli ve daha hassas olduğunu ifade etmişlerdir.

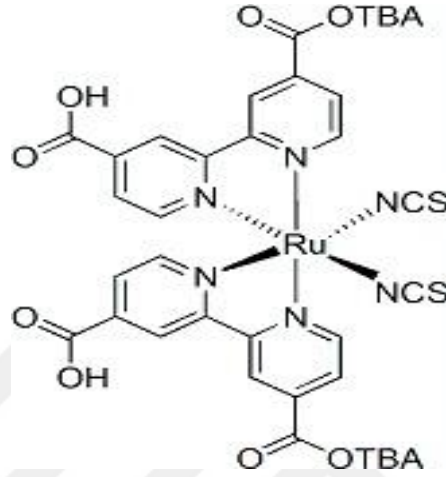
Gibson ve ark. (2010), multipleks PZR ürünlerinin düzgün bir şekilde yürütülmesi ve yeniden izole edilip, saflaştırılması üzerine geliştirdikleri yeni jel teknolojisini de, SYBR® Safe boyasını kullanmışlardır. Araştırmacılar SYBR® Safe boyasının multipleks PZR çalışmalarında başarı ile kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

DNA origami nano yapılarının rate-zonal santrifüjle saflaştırılması sonucu elde edilen DNA yapılarının agaroz jel elektroforezinde boyanmasında SYBR® Safe boyasından etkin bir şekilde yararlanılmıştır (Lin ve ark., 2012).

Organik boya temelli güneş pillerinde (DSCC) çok çeşitli sınıfa ait boyalar kullanılmaktadır. Polipiridiller, porfirinler, ftalosiyeninler, kumarinler, indolinler, trifenilaminler, konjüge polimerler, perilenler bu sınıflar içinde yer almaktadır. En yüksek verim rutenyum polipiridil türevleri yapılarıdır.

Rutenyum boyaları, organometalik kompleks grubuna bağlı güneş pilinde yüksek verimlilikle kullanılan organik boya grubunu oluşturmaktadır (Tekoğlu, 2009; Karmakar ve Ruparelia, 2011). Rutenyum polipiridil boyaları, sentezlerinin zor olması ve çıkış maddelerinin pahalı olması gibi dezavantajlara sahip olmasına rağmen (Anonim, 2013) bu yapılar, metalden liganda yük transfer (MLCT - metal to ligand charge transfer) özellikleri sayesinde geniş soğurma aralığı, yüksek ışık soğurma kapasitesi ve kararlı yapı gibi özelliklerinden dolayı başta güneş pili yapımı olmak üzere pek çok endüstriyel alanda önemli bir yere sahiptir (Tekoğlu, 2009; Ryan, 2009; Ludin ve ark., 2013).

Rutenyum bazlı polipiridil boyaların N-3, N-719 ve Z-907 olarak adlandırılan üç çeşidi bulunmaktadır (Anonim, 2014b). Bunların içerisinde N-719 ($C_{58}H_{86}N_8O_8RuS_2$) boyası, N-3 boyasının *bis(tetrabutylamonyum)* tuzu olup üç tane TBA (*tetrabutylamonyum*) yapısı ile bir tane H^+ karşı iyonuna sahiptir (Şekil 2.1) (Tekoğlu, 2009; Ito, 2011).



Şekil 2.1. N719 boyasının kimyasal yapısı

N719 boyası diğer rutenyum bazlı boyalar ile karşılaştırıldığında; i) çok düşük pH değerlerinde DNA yüzeyine elektrostatik bağlanma aktivitesinin yüksek olması, ii) soğurulan boya birimleri arasındaki elektrostatik itme kuvveti zayıf olduğu için yoğun boyama aktivitesi göstermesi ve iii) su bazlı yapısı ile yüzeyden kopmaya (desorpsiyona) karşı kararlılığının (stabilitesinin) güçlü olması gibi önemli avantajlara sahiptir (Anonim, 2014b). Ayrıca, N719 organik boyasının, 313 nm'de yüksek soğurma piki verirken, 393 ile 533 nm'deki ölçümlerde zayıf soğurma pikleri verdiği belirlenmiştir (Anonim, 2014b).

Gill ve ark. (2009), rutenyum (II) polipiridil kompleksini ışıldayan prob şeklinde kullanarak canlı hücre DNA yapısını geçirimli (transmission) elektron mikroskopunda görüntüleme çalışması gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda nükleer DNA başarılı bir şekilde görüntülenmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada Etidyum Bromür (Sigma Aldrich, E7637) boyasına alternatif olarak, GelRed™ (10.000 x DMSO'lu, Biotium, 41002), SYBR® Safe (10.000 x DMSO'lu Invitrogen, S33102), SYBR® Green I (10.000 x DMSO'lu Sigma Aldrich, S9430), Kristal Viyole (Merck, 42555) ve Metilen Blue (Merck, 52015) boya ile N719 [Di-tetrabutylammonium cis-bis (isothiocyano) bis (2,2'-bipyridyl-4,4' dicarboxylato) ruthenium(II)] organik boyası kullanılmıştır. Elektroforez öncesi ve elektroforez sonrası boyama işlemi her bir boya ve yöntem için üç tekerrürlü olarak yapılmıştır.

3.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için buğday ve mısır tohumları petrilere ekilerek iki yapraklı döneme kadar büyütülmüş, yaprak örnekleri alınmış ve genç yapraklarda DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bazı değişikliklerle standardize edilerek çalışmada kullanılan DNA ekstraksiyonu metodu aşağıda verilmiştir (Doyle ve Doyle, 1990).

1. 1,5 cm boyunda bir yaprak önce ependorf tüpte sıvı azotla içinde öğütülür ve daha sonra üzerine 500 µl buffer ilave edilir.

* 100 ml buffer hazırlamak için

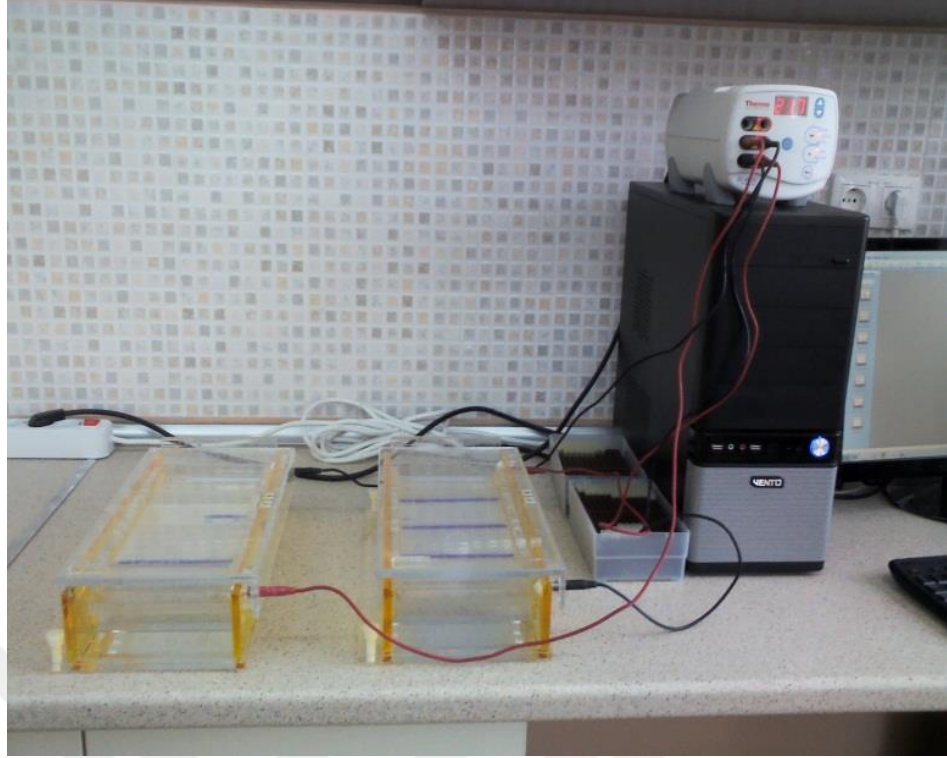
- 65 ml saf su,
- 10 ml 1 M Tris (pH: 7,5),
- 14 ml 5 M NaCl ve
- 10 ml 0,5 M EDTA (pH: 8,0) karıştırılarak 65 °C'de ısıtılır ve buna
- 1 gr CTAB ile
- 1 ml 14 M Beta MerkaptOEtanol (BME) eklenir.

2. Bir ünite Proteinase K eklendikten sonra (bir ünite 5 µl konsantrasyon) vortekste karıştırılır.

3. 80 µl % 10 SDS eklenerek 65 °C'deki su banyosunda 3 saat tutulur ve ara sıra alt üst edilerek karıştırılır.

4. Su banyosundan çıkarılan tüplere 2 / 3 hacim (400 µl) kloroform:isoamil alkol (24:1) eklenir. 10-15 dakika alt üst edilerek karıştırılır.
5. 10,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir.
6. Süpernatant 2 / 3 hacim yani 400 µl 2-propanol içeren yeni bir tüpe alınır. Alt üst edilerek DNA gözle görülür hale getirilir.
7. 15 dakika 10,000 rpm'de santrifüj edilir.
8. Sıvı dökülür. Pelet kurduktan sonra 400 µl 1 x TE eklenir. Peleti eritmek için tüpler 65 °C'deki su banyosunda 2 saat tutulur ve ara sıra alt üst edilerek karıştırılır.
9. 1 µl RNase (10 mg / ml) eklenir. DNA 60 °C'deki su banyosunda 1 saat eritilir.
10. 400 µl kloroform:isoamil alkol (24:1) eklenir. Tüpler 10-15 dakika alt üst edilerek karıştırılır.
11. 15 dakika 10,000 rpm'de santrifüj edilir.
12. Süpernatant 26 µl 5 M NaCl içeren yeni bir ependorf tüpe alınır. Hafifçe karıştırılır.
13. 800 µl % 96 soğuk etil alkol ilave edilir. Alt üst edilip karıştırılarak DNA çökeltilir.
14. 10,000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir ve sıvı dökülür.
15. Pelet 1200 µl % 70 soğuk etil alkol ile dikkatlice yıkanır. Ters çevrilmiş halde 2 saat kurutulur.
16. Kuruyan pelet 100 µl 1 x TE' de çözülür. Toplam 20 µg civarında DNA elde edilebilir.

Bu çalışmada DNA örneklerinin yürütülmesinde Şekil 3.1'deki jel elektroforez sistemi (Thermo Scientific Owl™ A1 Large Gel System) kullanılmıştır. Jel içi boyama protokollerinde 220 ml'lik % 1'lik agaroz jel [2,25 g agaroz, 44 ml 5 x TBE buffer ve 176 ml dH₂O] kullanılmıştır. Elektroforez sonrası boyama protokollerinde ise 100 ml'lik % 1'lik agaroz jel [1 g agaroz, 20 ml 5 x TBE ve 80 ml dH₂O] kullanılmıştır. Tüm boya denemelerinde DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi için 5 x Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu [54 g Tris-base, 27,5 g Borik Asit ve 20 ml 0,5 M EDTA (pH:8,0)] kullanılmıştır.

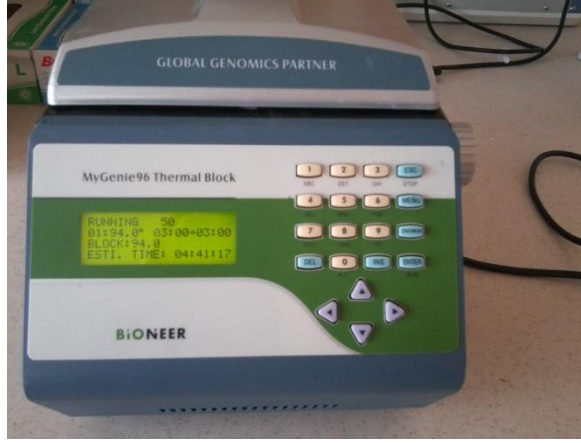


Şekil 3.1. Agaroz jel elektroforezi

Genomik DNA'nın miktarını ve saflığını belirlemek için spektrofotometre (Optizen 3220UV, Kore) ile örneklerin absorbanans (A_{260} / A_{280}) değerleri ölçülmüştür.

3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA izolasyonunun tamamlanmasından sonra Xwmc 312 ve Xwmc 93 primerleri (Somers ve ark., 2004) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonları (PZR) yapılmıştır. PZR işleminin gerçekleştirildiği Thermal Cycler (Bioneer MyGenie 96 Thermal Block) Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. PZR’de kullanılan thermal cycler

Her bir reaksiyonda; 250 nM primer, deoksinükleotidlerin her birinden 0.2 mM, 2.0 mM MgCl₂, bir ünite *Taq* Polimeraz enzimi ve 50-100 ng kalıp DNA kullanılmıştır. Kalıp DNA olarak her iki primer için de sırasıyla T1, T2, T3, Gediz, UC1113 makarnalık buğday çeşit ve hatlarına ait DNA’lar kullanılmıştır. Bir PZR işlemi; 94 °C’ de 5 dakika ön denatürasyondan sonra; 37 sirkülasyondan (cycle) oluşan 94 °C’ de bir dakika denatürasyon, 61 °C’de bir dakika primerlerin bağlanması (annealing), 72 °C’ de bir dakika uzatma (ekstensiyon) basamağını takiben 72 °C’ de beş dakika son uzatma aşamalarından oluşmaktadır. Elde edilen PZR ürünleri Etidyum Bromür, GelRed™, SYBR® Safe, SYBR® Green I, Kristal Viyole, Metilen Blue ve N719 organik boyasıyla boyanan agaroz jellerde yürütülmüş ve jel imaj sisteminde (Biorad ChemiDoc MP) görüntülenmiştir (Şekil 3.3).

Jeller UV transillüminatörde (Bio Rad, ChemiDoc™ MP Imaging System) Etidyum Bromür, SYBR® Safe, SYBR® Green I, GelRed™ ve Organik boya için floresans absorbanslarına göre, Kristal Viyole ve Metilen Blue boyalarında kolorimetrik ve fast blast olarak görüntülenmiştir.



Şekil 3.3. Elektroforez görüntüleme cihazı

3.3. Jel İçi Boyama İşlemi

Hazırlanan 220 ml % 1'lik agaroz jelin, jel içi (precast stain) boyanması için; 10 mg/ml şeklinde hazırlanan Etidyum Bromür boyasından 14 µl, GelRed™ (10.000 x DMSO) boyasından 13.2 µl (Zafrin, 2013), SYBR® Safe (10.000 x DMSO) boyasından 11 µl (Anonim, 2011d), SYBR® Green I (10.000 x DMSO) boyasından 22 µl (Anonim, 2011b) kullanılmıştır. Kristal Viyole ve Metilen Blue boyasının jel içi boyanmasıyla ilgili yeterli literatür bulunmadığından jel içinde bulunan 5 x TBE ve dH₂O toplam miktarına boya miktarı oranlanarak jel içine boya eklenmiştir. Buna göre, Kristal Viyole (% 0.025 Kristal Viyole boya solüsyonu; 100 ml dH₂O, 0.025 g Kristal Viyole) boya solüsyonundan 22 µl ve Metilen Blue (% 0.025 Metilen Blue boya solüsyonu; 100 ml dH₂O, 0,025 g Metilen Blue) boya solüsyonundan 22 µl jel içine eklenmiştir. Boyama işlemi her bir boya için üç tekerrürlü olarak yapılmıştır.

N719 [Di-tetrabutylammonium cis-bis (isothiocyano) bis (2,2'-bipyridyl-4,4' dicarboxylato) ruthenium(II)] organik boyasının agaroz jellerde kullanımına dair literatür bilgisi bulunamadığı için ön deneme çalışmaları yapılmıştır. Bunun için % 1'lik agaroz jel kullanılmıştır. Jel içi boyamada 25 - 150 µl arasında değişen miktarlarda organik boya denenmiştir.

Jel içi boyamada bazı makarnalık buğday çeşitleri ve mısır DNA'ları kullanılmıştır. Tüm jel içi boyamalarda kullanılan jel yükleme sıralaması şu şekilde düzenlenmiştir: İlk tarak için; 1-8 nolu kuyucuklara makarnalık buğday hat ve çeşitleri (1: T1, 2: UC1113, 3: Gediz, 4: T3, 5: T1, 6: Gdem, 7: Sarıçanak, 8: Salihli), 9-12 nolu kuyucuklara ise mısır bitkisi DNA'ları yüklenmiştir. İkinci tarakta ilk kuyucuğa 50 bç (baz çifti) ladder (Thermo Scientific, SM0373) sonraki kuyucuklara ise PZR ürünleri yüklenmiştir. Xwmc 312 primeriyle üretilen PZR ürünleri jelde ilk 7 kuyucuğa, Xwmc 93 primerleriyle üretilen PZR ürünleri ise son 6 kuyucuğa yüklenmiştir.

Ayrıca her boya için hazırlanan % 2'lik mini jellere (45 ml) sırasıyla 2,5 - 2,0 - 1,5 - 1,0 - 0,5 ve 0,2 µl miktarlarda 50 bç ladder (Thermo Scientific, SM0371) yüklenerek boyaların boyama kalitesinin DNA miktarlarına göre de değişimide incelenmiştir.

Elektroforez sonrası boyamalarda ise yine bazı makarnalık buğday çeşit ve hatlarının DNA'ları kullanılmıştır. Yüklemede 15 kuyucuklu tek tarak tercih edilmiştir. Yükleme sırası şu şekildedir; 1-6 numaralı kuyucuklara makarnalık buğday hat ve çeşitleri, 7. kuyucuğa 50 bç ladder sonraki 5 kuyucuğa ise Xwmc 93 primerleriyle üretilen PZR ürünleri yüklenmiştir.

3.4. Elektroforez Sonrası Jel Boyama İşlemi

3.4.1. Etidyum Bromür Boyasıyla Elektroforez Sonrası Boyama Protokolü

1. DNA örnekleri ve PZR ürünleri % 1'lik agaroz jele yüklenir ve elektroforez işlemi 100 voltta 1 saat gerçekleştirilir.
2. 200 ml dH₂O içine 20 µl EtBr eklenerek boyama solüsyonu hazırlanır. Elektroforez işleminden sonra yatay şeffaf plastik bir kaba jel alınır ve üstüne boya solüsyonu dökülür. Üzeri ışık görmemesi için alüminyum folyo ile kapatılır.
3. Yarım saat çalkalayıcı (Labnet ORBIT 1000) üzerinde 50 rpm'de çalkalamaya bırakılır.
4. Bir saat sonra jel, UV transillüminatörde (Bio Rad, ChemiDoc™ MP Imaging System) 360 nm'de görüntülenir.

3.4.2. GelRed™ Boyasıyla Elektroforez Sonrası Boyama Protokolü

Bu boyama işleminde GelRed™ boyasını üreten Biotum şirketinin önerdiği boyama protokolü optimize edilerek kullanılmıştır (Anonim, 2012c).

1. % 1'lik agaroz jel hazırlanır. Daha sonra DNA örnekleri ve PZR ürünleri yüklenerek, 100 V'de 1 saat elektroforez işlemi başlatılır.
2. Elektroforez işleminin bitimine yakın 3 x GelRed™ Boya solüsyonu; 250 ml dH₂O'ya 76 µl GelRed™ boyası olacak şekilde hazırlanır.
3. Jel bir cam kaba alınır ve üstüne 3 x Gelred™ boya solüsyonu dökülür.
4. Jeli ışıktan korumak amacıyla üzeri alüminyum folyo ile kapatılır ve kap oda sıcaklığında 50 rpm'de 30 dakika çalkalanmaya bırakılır.
5. Boyama işlemi sonunda jel, distile suya batırıp çıkarılarak, UV transillüminatörde (Bio Rad, ChemiDoc™ MP Imaging System) 300 nm'de görüntülenir.

3.4.3. SYBR® Safe Boyasıyla Elektrophrez Sonrası Boyama Protokolü

Bu boyama işleminde SYBR® Safe boyasını üreten İnvitrogen şirketinin önerdiği boyama protokolü modifiye edilerek kullanılmıştır (Anonim, 2006a).

1. SYBR® Safe boyası 1:10.000 sulandırılarak; 250 ml 5 x TBE tampon [1 litre için; 54 g Tris-Base, 27,5 Borik Asit, 20 ml 0,5 M EDTA (pH:8,0)] içine 25 µl SYBR Safe boyası olacak şekilde, boyama solüsyonu hazırlanır.
2. DNA örnekleri ve PZR ürünleri hazırlanan % 1'lik jele yüklenir ve 100 V'de 1 saat elektrophrezde yürütülür.
3. Elektrophrez sonrası jel şeffaf plastik bir kaba alınır ve üstüne hazırlanan boya solüsyonu dökülür.
4. Boya solüsyonunu ışıktan korumak amacıyla, kabın üstü alüminyum folyo ile kapatılır.
5. Daha sonra oda sıcaklığında 50 rpm'de 30 dakika çalkalanmaya bırakılır.
6. Yıkama işlemine gerek olmadığından direk jel kaptan alınıp UV transillüminatör (Bio Rad, ChemiDoc™ MP Imaging System) kullanılarak 530 nm'de görüntülenir.

3.4.4. SYBR® Green I Boyasıyla Elektrophrez Sonrası Boyama Protokolü

Bu boyama işleminde SYBR® Green I boyasını üreten Sigma-Aldrich firmasının önerdiği boyama protokolü optimize edilerek kullanılmıştır (Anonim, 2011b).

1. SYBR Green I boyası 1:10.000 kez seyreltilerek; 20 µl SYBR® Green I boyası ve 200 ml 5 x TBE olacak şekilde hazırlanır.
2. % 1'lik agaroz jele yüklenen DNA örnekleri ve PZR ürünleri, 100 voltta 1 saat elektrophrez edilir.
3. Yürütme sonrası jel plastik yatay bir kaba alınır ve üstüne 200 ml boya solüsyonu dökülür. Kabın üstü alüminyum folyo ile kapatılır.
4. 30 dakika oda sıcaklığında 50 rpm'de çalkalanmaya bırakılır.
5. Yıkama yapılmadan, UV transillüminatörde (Bio Rad, ChemiDoc™ MP Imaging System) 520 nm'de görüntülenir.

3.4.5. Metilen Blue Boyasıyla Elektrophorez Sonrası Boyama Protokolü

Bu boyama işleminde Southern Biological firmasının önerdiği protokol optimize edilerek kullanılmıştır (Anonim, 2010).

1. Metilen Blue'nun % 0,025'lik solüsyonu; 200 ml dH₂O içinde 0,05 g Metilen Blue ile hazırlanır.
2. DNA örnekleri ve PZR ürünleri, önceden hazırlanan % 1'lik agaroz jele yüklenir.
3. Elektrophorez sonrası jel plastik yatay bir kaba alınır ve üstüne 200 ml'lik % 0,025'lik boya solüsyonu dökülür.
4. Işıktan solüsyonu korumak için kabın üstü alüminyum folyo ile kapatılır. Jel boya solüsyonunda 6 saat bekletilir.
5. Daha sonra jel yıkama işlemi için distile su dolu ayrı bir yatay kaba alınır. Kap, çalkalayıcı (Labnet ORBIT 1000) üzerinde 40 rpm'de bırakılır ve her 30 dakikada bir distile su tazelenir. Yıkama işlemi 1 gün sürdürülür.
6. Yıkama işleminden sonra UV transillüminatörde beyaz zemin üzerinde jelin Fast Blast ölçümü yapılarak görüntülenir.

3.4.6. Kristal Viyole Boyasıyla Elektrophorez Sonrası Boyama Protokolü

Bu boyama işleminde Southern Biological firmasının önerdiği protokol optimize edilerek kullanılmıştır (Anonim, 2010).

1. Kristal Viyole'nin önce % 0,025'lik solüsyonu; 200 ml dH₂O içinde 0,05 g Kristal Viyole ile hazırlanır.
2. DNA örnekleri ve PZR ürünleri, önceden hazırlanan % 1'lik agaroz jele yüklenir.
3. Elektrophorez sonrası jel plastik yatay bir kaba alınır ve üstüne 200 ml'lik % 0,025'lik boya solüsyonu dökülür.
4. Solüsyonu ışıktan korumak için kabın üstü alüminyum folyo ile kapatılır. Jel boya solüsyonunda 6 saat bekletilir.

5. Daha sonra jel yıkama işlemi için distile su dolu ayrı bir yatay kaba alınır. Kap çalkalayıcı (Labnet ORBIT 1000) üzerinde 40 rpm’de bırakılır ve her 30 dakikada bir distile su tazelenir. Yıkama işlemi 1 gün sürdürülür.
6. Yıkama işleminden sonra UV transillüminatörde beyaz zemin üzerinde jelin Fast Blast ölçümü yapılarak görüntülenir.

3.4.7. N719 Organik Boyası ile Elektroforez Sonrası Boyama Protokolü

Bu boya DNA görüntülemeye ilk defa kullanıldığı için literatür bulunamamıştır. Farklı optimizasyon denemelerinden jelin hacmine bağlı olarak kullanılacak olan boya miktarı belirlenerek elektroforez sonrası boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

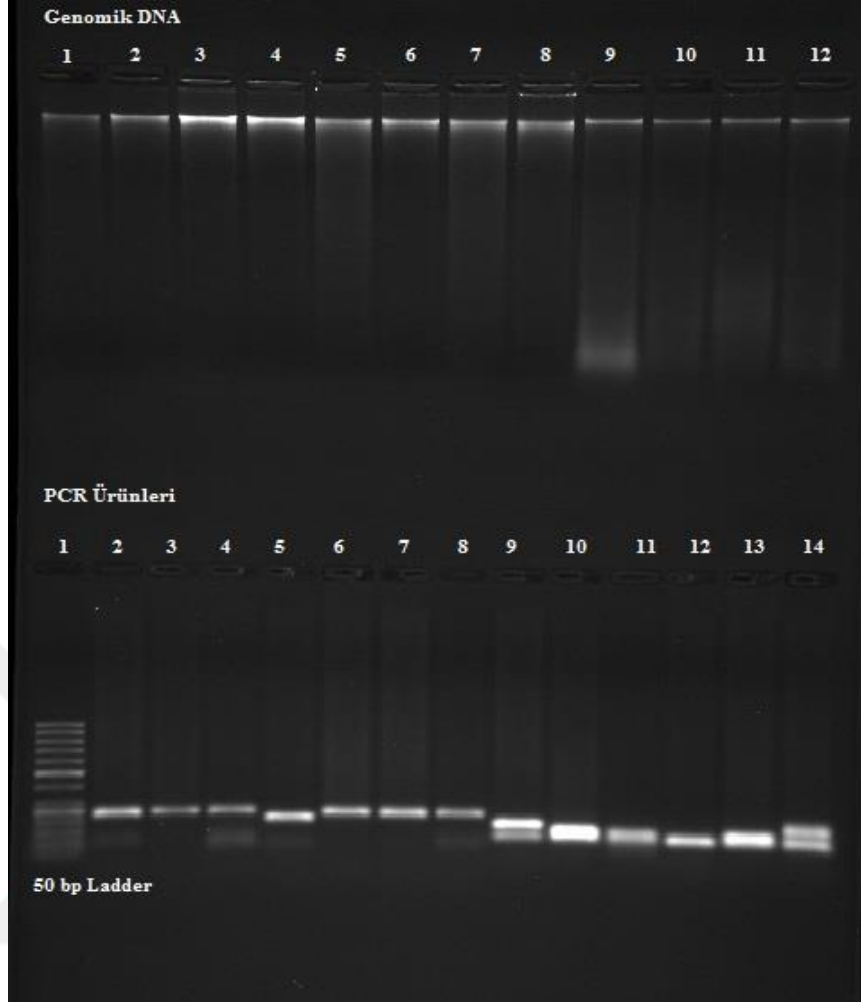
1. Organik boya solüsyonu hazırlanır ve çalkalamaya bırakılır; 100 ml dH₂O içine 60 µl Organik boya eklenir.
2. Hazırlanan % 1’lik agaroz jele DNA ve PZR örnekleri yüklenir ve 100 V’da 1 saat elektroforezde yürütülür.
3. Elektroforez sonrası jel 100 ml boya solüsyonu bulunan yatay plastik kaba alınır. Kabın ağzı alüminyum folyo ile kapatılır.
4. 30 dakika 50 rpm’de çalkalanmaya bırakılır.
5. Daha sonra jel kaptan alınarak UV transillüminatörde 312 nm absorbansta görüntülenerek fotoğrafı çekilir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada bitki DNA'sının ve PZR ürünlerinin görüntülenmesi için agaroz jellerin boyanmasında Etidyum Bromür boyasına alternatif olarak SYBR® Safe, SYBR® Green I, GelRed™, Metilen Blue ve Kristal Viyole boyaları ile N719 organik boyası kullanılmıştır. Boyama işlemleri elektroforez öncesi ve sonrası olarak iki şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.1. Etidyum Bromür İle Boyama

EtBr boyası jel içine ilave edilmiş ve 2 saatlik elektroforez sonrası jel fotoğrafı UV transillüminatör de (Bio Rad, ChemiDoc™ MP Imaging System) 360 nm'de çekilmiştir (Şekil 4.1.a). EtBr ile boyanan jelde DNA ve PZR ürünleri hassas ve net bir şekilde görüntülenmiştir. Ayrıca konsantrasyonu yüksek DNA'ların bantlarının daha parlak olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak jeldeki DNA miktarı ne kadar fazla ise EtBr'nin bağlanma aktivitesi o kadar fazla olmuştur.



Şekil 4.1.a. Etidyum Bromür'ün agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü

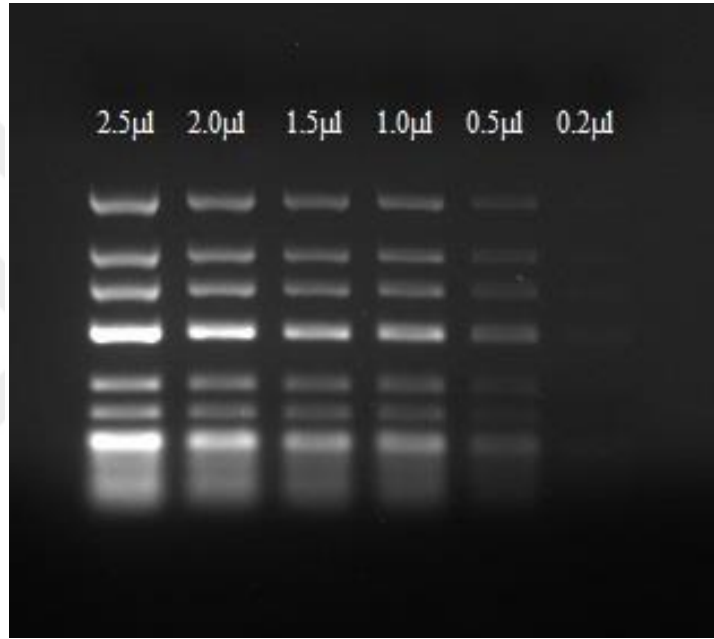
Matselyukh ve ark. (2003) EtBr ile 15 polimetil siyanin boyasının, DNA boyama etkinliklerini karşılaştıran bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonunda EtBr'nin daha küçük miktarlardaki DNA'ları daha hassas boyadığı, ancak 15 polimetil siyanin boyasının daha fazla DNA miktarında boyama gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir.

Başka bir çalışma da ise çift iplikli DNA'nın saptanması için 23 adet siyanin boya denenmiş ve EtBr ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak beş siyanin boyasının EtBr'den daha fazla hassasiyet göstererek çift iplikli DNA'yı boyadıkları bildirilmiştir (Hilal ve Taylor, 2007).

Cong ve ark. (2013), agaroz ve poliakrilamit jellerde DNA saptanması için yeni sentezlenen organik boya olan Victoria Pure Blue BO (VPBBO) boyasını, EtBr ve Nil

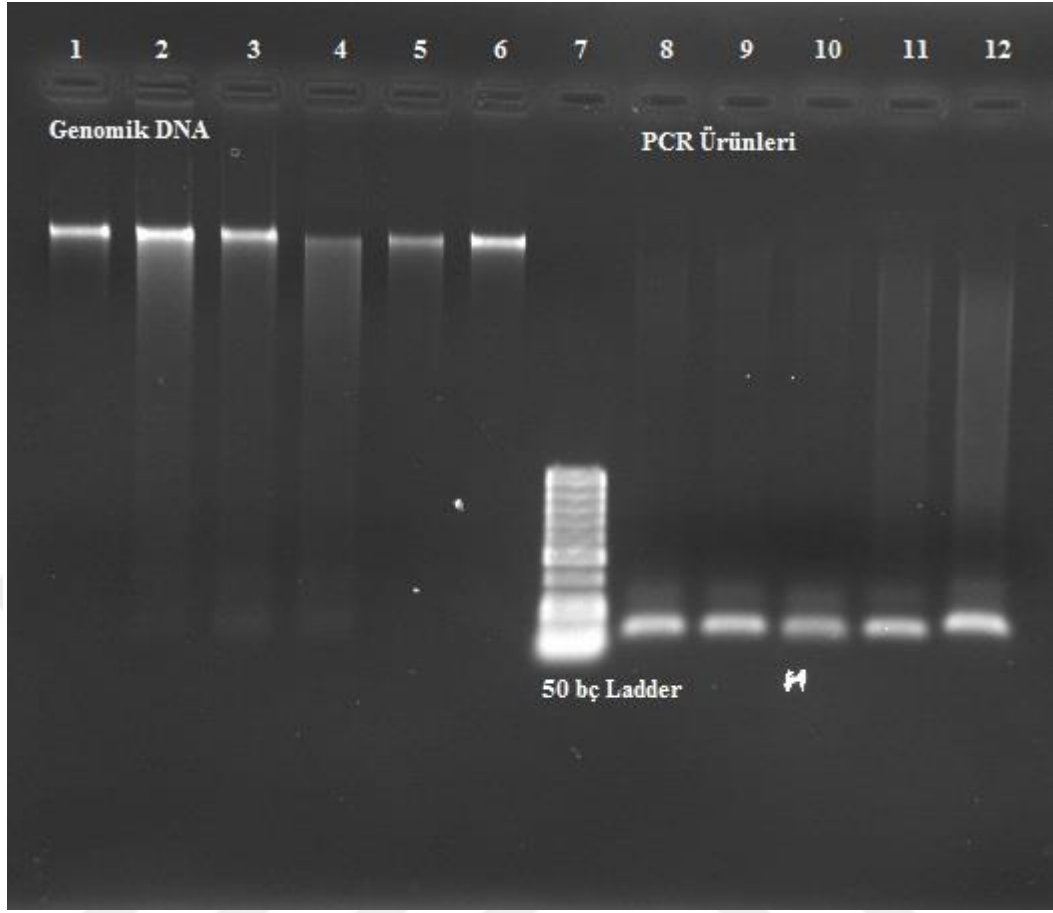
Mavisi ile karşılaştırıldığı bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda VPBBO boyasının DNA tespit duyarlılığının EtBr ile eşdeğer olduğu tespit edilmiştir.

Etidyum Bromür boyasının ortamdaki DNA miktarı arttıkça aktivitesinin arttığı 25 bç ladder ile yapılan miktar denemesi ile bir kez daha tespit edilmiştir (Şekil 4.1.b). EtBr'ün 2,5 µl ladderı daha iyi boyarken, 0,2 µl ladderı yeterli netlikte boyamadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.1.b. Etidyum Bromür ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları

EtBr ile yapılan elektroforez sonrası boyamada DNA bantları ve PZR ürünleri net bir şekilde boyanmıştır (Şekil 4.1.c). Ayrıca yine DNA yoğunluğu fazla olan örneklerde boyama aktivitesi fazla gerçekleşmiştir. Boyama süresi uzatıldıkça DNA bantlarına bağlanan EtBr'nin floresans parlaklığının da arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1.c. Etidyum Bromür ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyama görüntüsü

4.2. GelRed™ İle Boyama

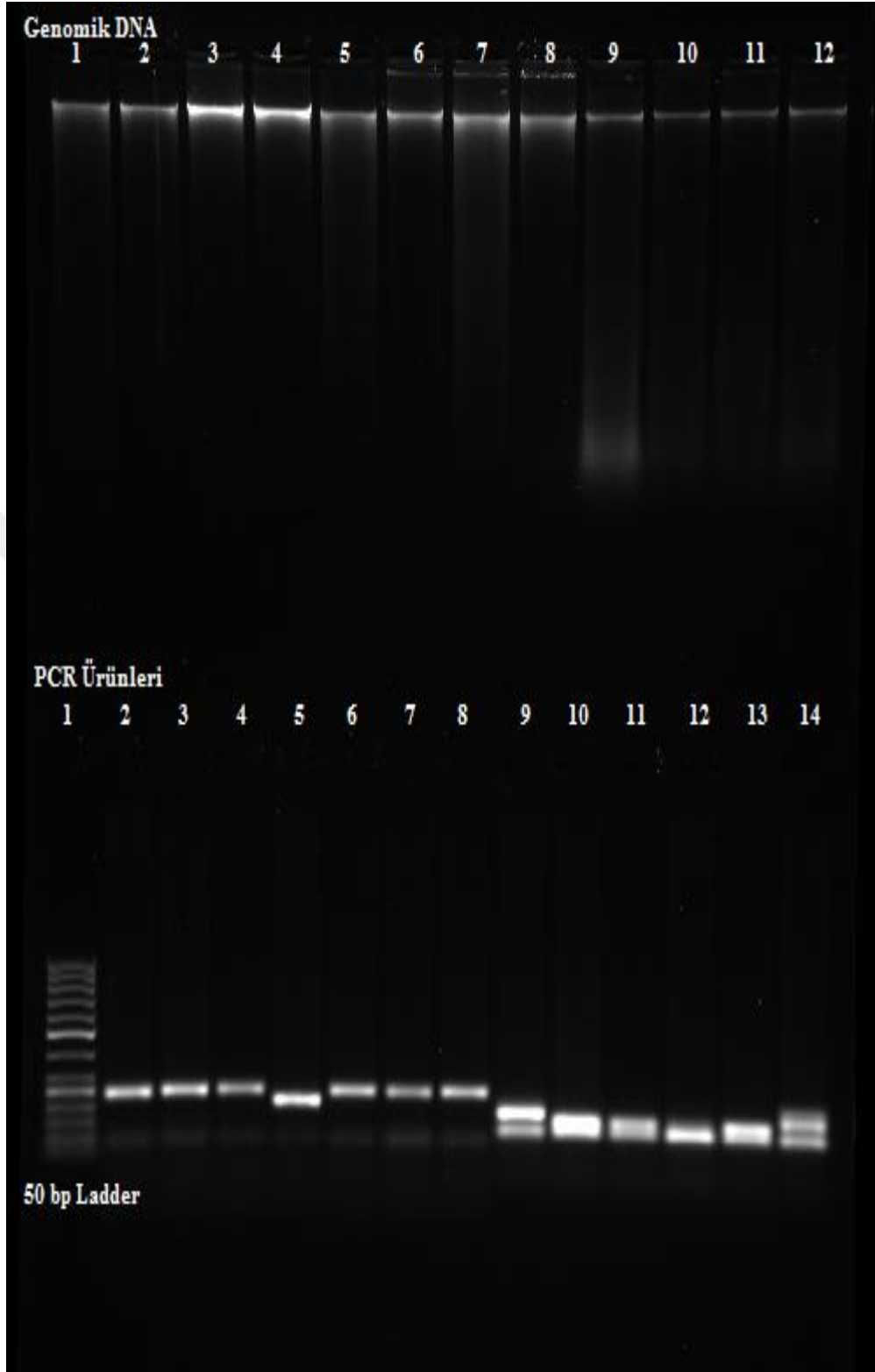
Dimetil sülfoksit (10.000 x DMSO) içinde gelen GelRed™ boyası, hiçbir seyreltme işlemine tabi tutulmadan, jel içinde kullanılmıştır. Üretici firma (Biotium) tarafından GelRed™ boyasının elektroforez sonrası jel boyamada kullanılması ürün protokolünde özellikle tavsiye edilmiştir (Anonim, 2012c). Ancak bu çalışmada yapılan jel içi boyamada da izole edilen bitki genomik DNA'ları ve PZR ürünleri, başarılı bir şekilde boyanmıştır (Şekil 4.2.a). GelRed™ boyasının da boyama aktivitesi, EtBr gibi ortamdaki DNA yoğunluğuna göre artmış ya da azalmıştır. Sonuç olarak GelRed'in bant boyama duyarlılığı, EtBr ile benzer özellikleri göstermiş; görüntü netliği bakımından EtBr'den daha üstün olduğu saptanmıştır.

GelRed™ ile yapılan diğer çalışmalarda benzer sonuçlarla karşılaşılmıştır. Örneğin, Couto ve ark. (2013), *Cryptosporidium* örnekleri üzerinde uyguladıkları farklı DNA izolasyonu protokollerini, EtBr ve GelRed™ boyalarıyla birlikte jel içi boyama yaparak karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak GelRed™ boyasının, EtBr'den daha hassas ve bantları daha yoğun bir şekilde görüntülediğini tespit etmişlerdir. Diğer bir çalışmada mikrosatelit DNA'ları GelRed™ görüntüleme teknolojisi ile en iyi şekilde görüntüleyebilmek için jel içi boyama (Precasting Gel), örnek boyama (Staining Sample) ve batık jel (Immersion Gel) yöntemleri olmak üzere üç boyama yöntemi kullanılmıştır (Yue ve ark., 2012). Sonuç olarak agaroz jel elektroforezinde DNA bantlarının GelRed™ ile en iyi görüntü verdiği protokolün jel içi boyama protokolü olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte polyacrylamide jeller (PAGE) için batık jel (Immersion Gel) yöntemiyle GelRed™ ile boyamanın daha avantajlı olduğu ifade edilmiştir.

Huang ve ark. (2010), agaroz jel elektroforezinde DNA bantlarının görüntülenmesinde GelRed™ boyasını EtBr, SYBR® Gold ve SYBR® Green I boyaları ile karşılaştıran bir araştırma yapmışlardır. Çalışma sonucunda GelRed™ boyasının kullanılan diğer boyalara göre boyut belirlemede daha duyarlı bir alternatif boya olduğunu belirtmişlerdir.

Bununla birlikte, Breman (2010), Ruanda kadınlarında Ferroportin polimorfizmi ve anemi HIV bulaşımının etkileri üzerine yürüttüğü doktora tezinde GelRed™ ile EtBr'yi karşılaştırmış, GelRed™ boyasının jel içi boyamada başarılı ancak EtBr'e göre yetersiz bir boyama gerçekleştirdiğini belirtmiştir.

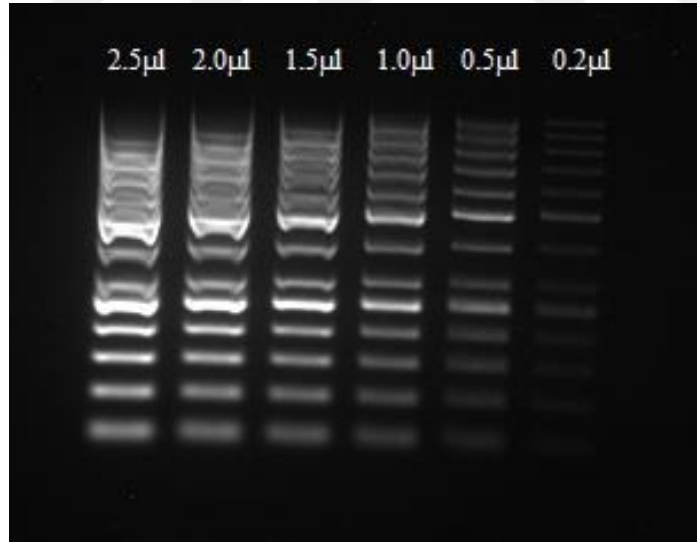




Şekil 4.2.a. GelRed™ 'in agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü

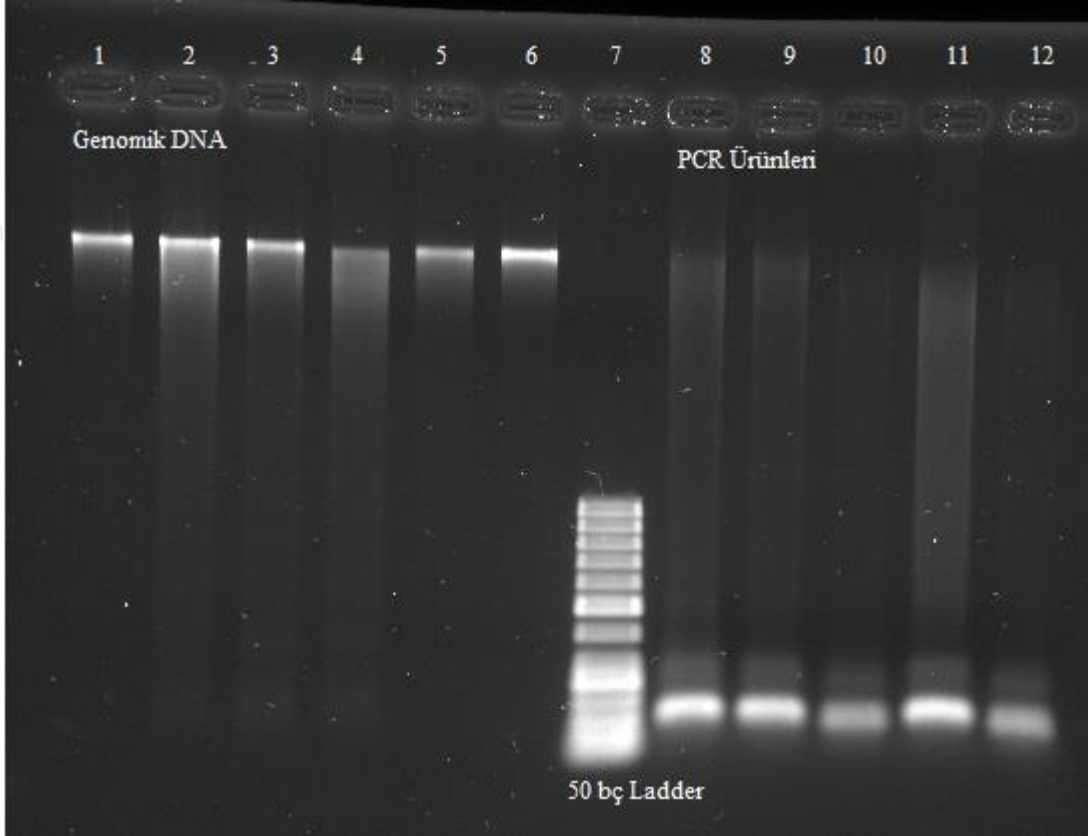
DNA miktarı ve boyama aktivitesi arasındaki ilişkiyi göstermek amacıyla 50 bç ladder ile çeşitli miktarlarda % 2'lik jele yükleme yapılmış ve elektroforeze tabi tutulmuştur (Şekil 4.2.b). Sonuç olarak GelRed™ boyasının da aynı EtBr gibi yüklenen DNA miktarı arttıkça boyama etkinliğinin arttığı tespit edilmiştir. Fakat Candace Breman'in (2010), elde ettiği verilerin aksine hassasiyet bakımından GelRed™ boyası 0,2 µl'lik yüklenen DNA'yı (Şekil 4.2.b), EtBr boyasına göre daha net boyamıştır (Şekil 4.1.b).

Ayrıca jel içi agaroz miktarı arttıkça, GelRed™ ile boyanan jellerde bant yapılarının DNA miktarı yoğunluğuna göre bozulduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.a ve Şekil 4.2.b). % 2 lik jele yüklenen ladderda; 1,0 - 0,5 - 0,2 µl yüklenen DNA bantlarının gayet düzgün boyandığı saptanırken, 1,5 - 2,0 - 2,5 µl yüklenen DNA bantlarının yapılarının bozulduğu saptanmıştır (Şekil 4.2.b). Ancak Şekil 4.2.a'da görüntülenen % 1'lik jele yüklü olan 2 µl'lik ladder bantlarında bozulma meydana gelmemiştir. Sonuç olarak agaroz miktarı arttıkça yüklenen DNA miktarının azaltılması ile net boyanan bant görüntülerinin elde edilebileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.2.b. GelRed™ ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları

GelRed™ boyası ile elektroforez sonrası jel boyama çalışmasında DNA ve PZR ürünleri başarılı bir şekilde boyanmıştır (Şekil 4.2.c). Gelred™ boyasının zaman içindeki aktivitesi 30 dakika ve 1 saat olacak şekilde karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak iki zaman diliminde de boyama aktivitesi değişiklik göstermemiştir. Ancak boyama süresi arttıkça bantların solüsyon içinde görüntüsünün bozulmaya başladığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2.c. GelRed™ ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyama görüntüsü

GelRed™ boyasının jel içi (precast boyama) ve elektroforez sonrası (post boyama) boyama aktivitesini karşılaştırdığımız da ise; genomik DNA ve PZR ürünlerine ait jel içindeki bant sürüklenmeleri ve istenmeyen (non-spesifik) bant yapıları hafif boyanmıştır. Ayrıca asıl bantlar net bir şekilde boyanmıştır. Elektroforez sonrası boyama da ise genomik DNA'lar net boyanmıştır ancak elektroforez sırasında oluşan sürüklenmeler de bantla birlikte belirgin bir şekilde boyanarak görüntüleme kalitesini azaltmıştır. Ladder'ın yüklendiği jelde ise yoğun ve dejenere bir boyama gözlemlenmiştir. Sonuç olarak GelRed™ boyasının jel içi boyamada daha başarılı

olduğu ve en kucuk DNA miktarlarını bile EtBr'ye göre daha hassas boyadığı tespit edilmiştir.

Yapılan literatür araştırmalarında da GelRed™ için jel içi boyama, elektroforez sonrası boyamaya göre daha fazla tercih edildiği gorlmuştur (Huang ve ark., 2010; Dong ve ark., 2012; Couto ve ark., 2013). Hem zamandan tasarruf etmek için hem de boyama kalitesi ve hassasiyeti açısından GelRed™ boyasının jel içi boyama aktivitesi daha başarılı bulunmuştur.

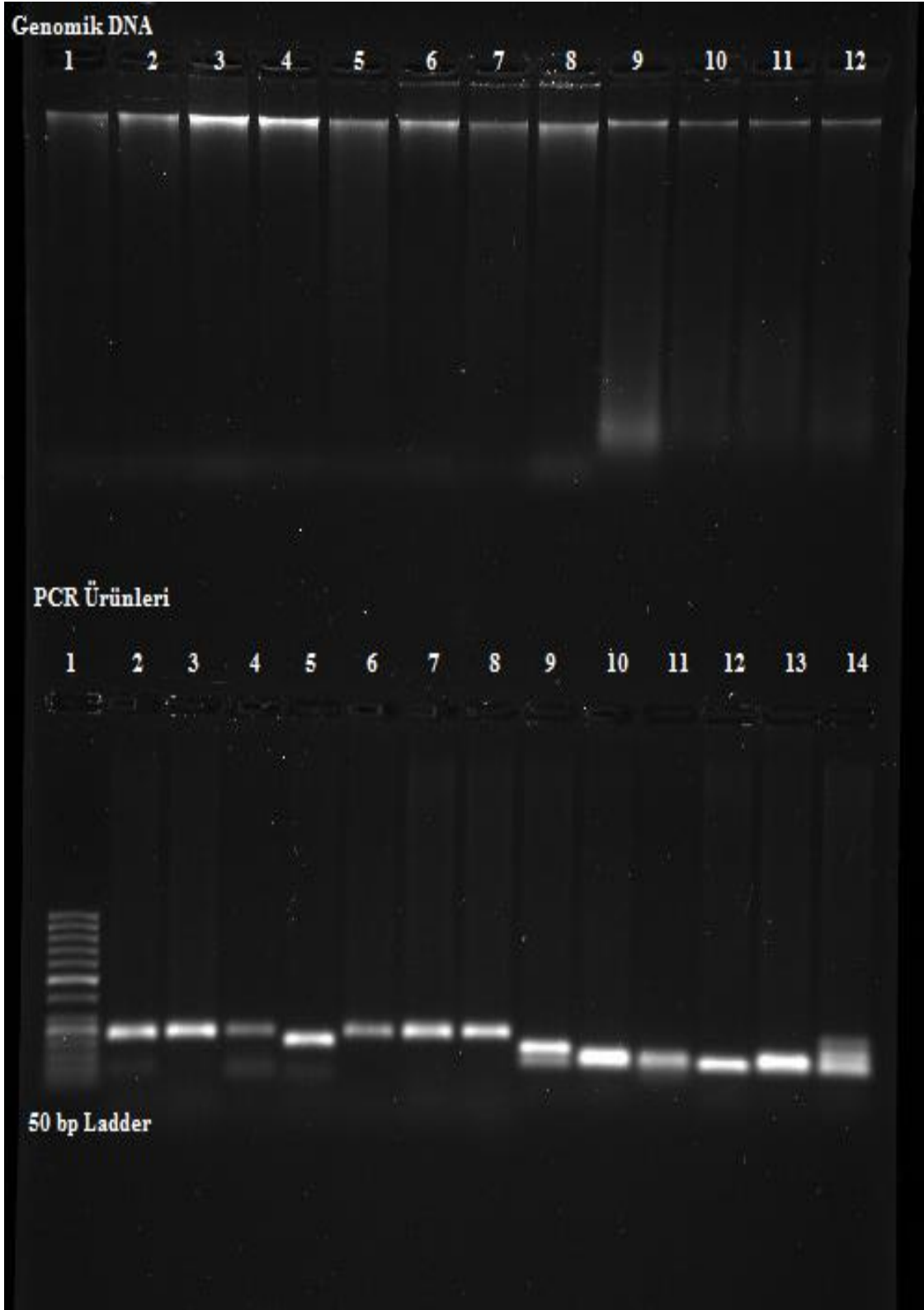
Holloway ve ark. (2011) Friedreich ataksi hastalığına sebep olan FXN genindeki GAA trinükleotid tekrar dizilerinin inhibesi üzerine yürüttükleri çalışmalarında elde ettikleri PZR ürünlerini agaroz jel içinde EtBr ve GelRed™ boyalarını kullanarak gorntulemişlerdir. Çalışma sonucunda GelRed boyasının PZR rnlerini EtBr'den daha yoğun ve net boyadığını ifade etmişlerdir.

4.3. SYBR® Safe İle Boyama

SYBR® Safe boyası, 10.000 x DMSO (Dimetil sülfoksit) içinde çözülmüş şekilde, (Invitrogen) temin edilmiş ve boya jel içine seyreltilmeden ilave edilmiştir. Yüklene bitki genomik DNA'sı ve PZR ürünlerine 100 voltta iki saatlik elektroforez işlemi uygulanmıştır. Jel fotoğrafı UV transillüminatörde (Bio Rad, ChemiDoc™ MP Imaging System) çekilmiştir. Yapılan boyama sonucunda SYBR® Safe boyasının DNA ve PZR ürünlerini, EtBr kadar başarılı bir şekilde boyadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.a). SYBR® Safe ile yoğun DNA barındıran bantların görünümü daha parlak, az DNA barındıran bantların görünümü daha mat boyanmıştır. Yani SYBR® Safe boyasının ortamdaki DNA miktarı arttıkça, bağlanma ve floresans aktivitesinin arttığı sonucuna varılmıştır.

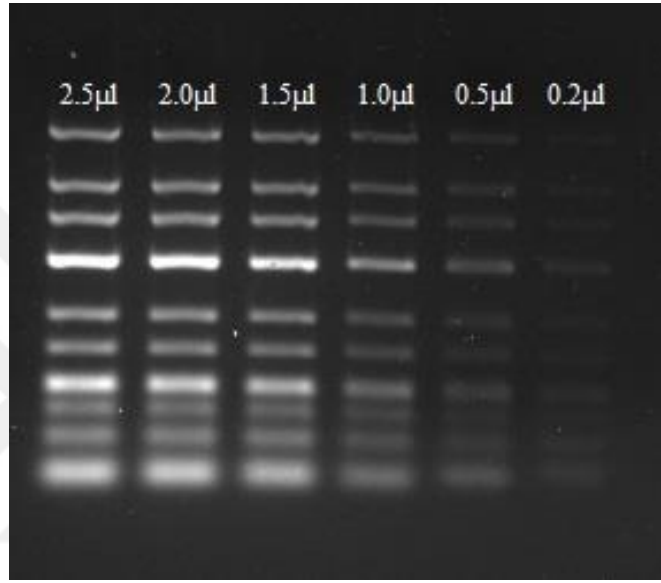
Yapılan diğer araştırmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. MIT (Massachusetts Institute of Technology) Üniversitesi bilim adamları lisans laboratuvarlarında EtBr yerine SYBR® Safe boyasının kullanımının avantajları üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. SYBR® Safe boyasının DNA bantlarını EtBr'den daha iyi boyadığını, ancak RNA boyamada yeterli olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca maliyet açısından da pahalı bir boya olduğunu belirtmişlerdir (Anonim, 2006c).

Martineau ve ark. (2008), SYBR® Safe boyama tekniğinin geliştirilmesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda SYBR® Safe boyasının Etidyum Bromür boyasından daha hassas boyama gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir.



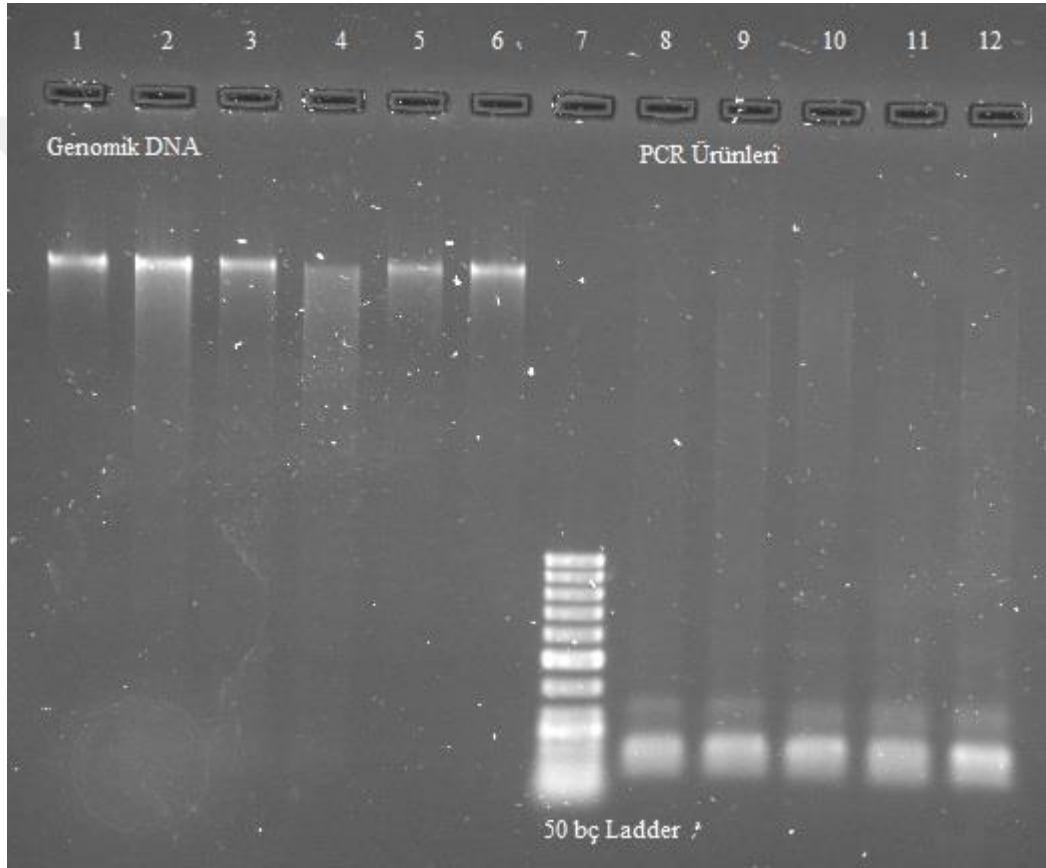
Şekil 4.3.a. SYBR® Safe'in agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü

SYBR® Safe boyasının ilave edildiği jellere farklı miktarlarda yüklenen 25 bç ladder'ın bağlanma aktivitesini karşılaştıran bir çalışma yapılmıştır. Çalışma sonucunda DNA miktarı arttıkça SYBR Safe'in boyama etkinliğinin de arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3.b). Ayrıca SYBR® Safe boyası 0.2 µl yüklenen 25 bç ladder'ı EtBr'ye göre daha belirgin bir şekilde boyamıştır. Bu sonuç SYBR® Safe boyasının EtBr boyasına göre daha hassas olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.3.b. SYBR® Safe ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları

SYBR® Safe boyası ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyama yöntemi de denenmiştir. Yüklenen DNA ve PZR ürünleri net bir şekilde boyanmıştır (Şekil 4.3.c). Ayrıca 30 dakika ile 1 saat boyama aktivitesi karşılaştırılması da yapılmış olup netlik bakımından fark gözlenmemiştir. Aksine boya solüsyonunda jelin daha uzun süre durmasının boyanan DNA bantlarının bozulmasına neden olduğu saptanmıştır. Elektroforez sonrası boyama da DNA sürüklenmeleri ve non-spesifik DNA bantların da net bir şekilde boyandığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.3.c. SYBR® Safe ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyama görüntüsü

SYBR® Safe boyasının jel içi ve elektroforez sonrası boyama aktiviteleri karşılaştırıldığında, jel içi boyama da hem genomik DNA hem de PZR rnleri başarılı bir şekilde boyanırken, elektroforez sonrası boyama da genomik DNA numuneleri net bir şekilde boyanmış, PZR ürünlerine ait bant yapıları net boyanmamıştır. Sonuç olarak SYBR® Safe jel içi boyama etkinliği, elektroforez sonrası boyamadan daha başarılı olduğu saptanmıştır. EtBr ile karşılaştırıldığında jel içi boyama aktiviteleri aynı olup, elektroforez sonrası boyama da ise EtBr boyası daha net boyama gerçekleştirmiştir.



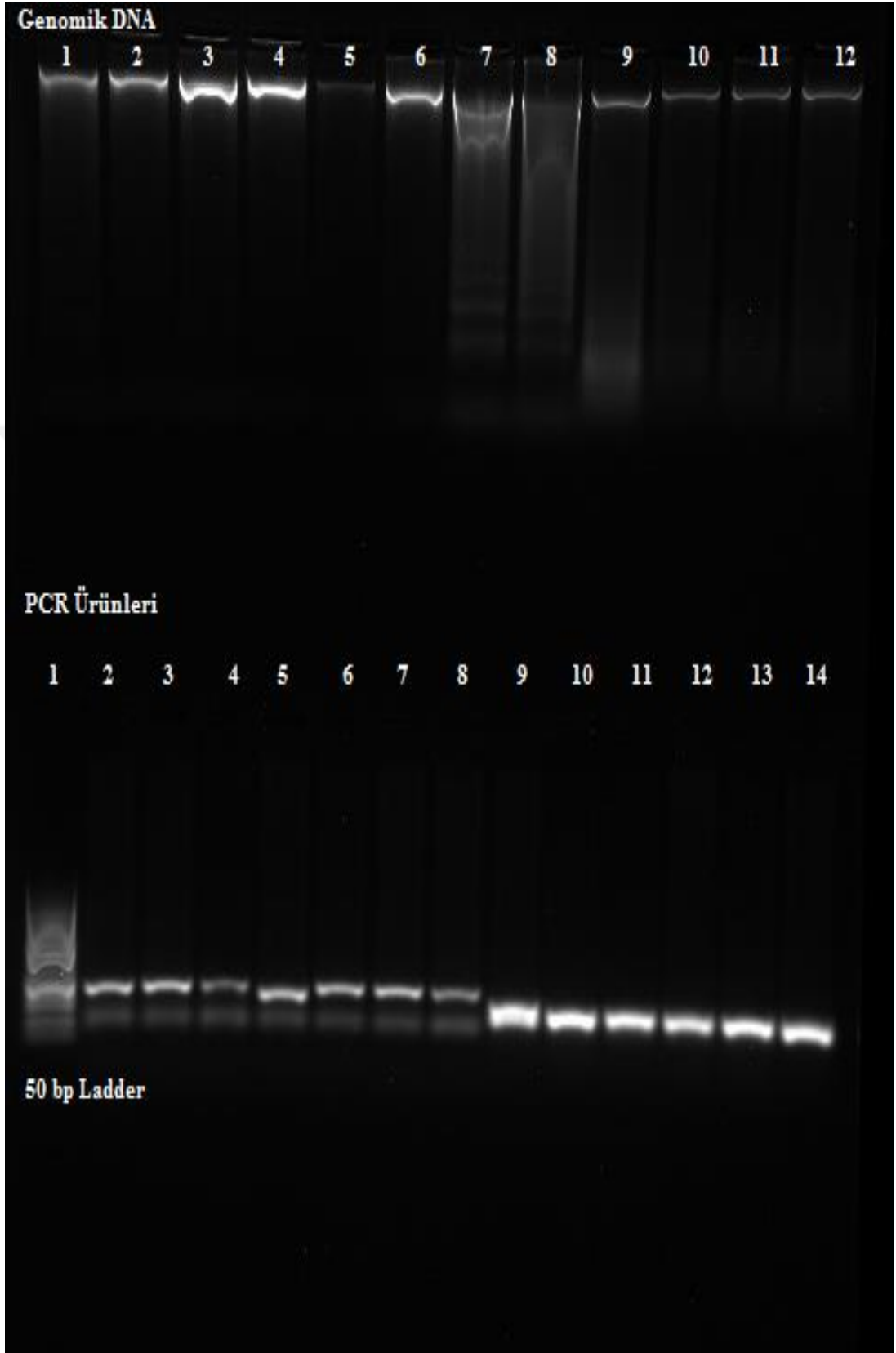
4.4. SYBR® Green I İle Boyama

Temin edilen SYBR® Green I boyası jel içinde seyreltilmeden kullanılmıştır. Jel fotoğrafı 2 saatlik elektroforez sonrası UV transillüminatörde (Bio Rad, ChemiDoc™ MP Imaging System) çekilmiştir. SYBR® Green I boyasıyla yapılan jel içi boyama sonucunda (Şekil 4.4.a) DNA ve PZR ürünleri boyanmıştır. Ancak SYBR® Green I boyama sırasında DNA bantlarının şeklini değiştirmiş ve bantların düzgün ilerlemesini engellemiştir. Bunun sebebinin SYBR® Green I'in DNA'ya bağlanma afinitesinin çok yüksek olması olduğu ifade edilmiştir (Anonim, 2011a). Boyanın jel içi kullanımında seyreltilmesi gerektiği ürün protokolünde bildirilmiştir. Jel fotoğrafında (Şekil 4.4.a) görüldüğü üzere, DNA yoğunluk derecesine göre bantlar ya çok parlak ya da mat bir şekilde görüntü vermiştir. DNA bantları düz ve uçları çıkıntılı olması gerekirken bantlar basık ve dağınık şekilde gözlemlenmiştir.

Huang ve Fu (2005), SYBR® Green I, SYBR® Gold, GoldView™ boyalarını Etidyum Bromür ile karşılaştıran bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda SYBR® Green I ve SYBR® Gold boyalarının en küçük DNA parçalarını bile tespit etmede EtBr'den daha hassas oldukları saptanmıştır. Bir diğer çalışmada da SYBR® Green I'de dsDNA ve ssDNA parçalarını boyaması yanında RNA elektroforezinde de kullanılan hassas ve güvenilir boyalar arasında gösterilmiştir (Farrell, 2010).

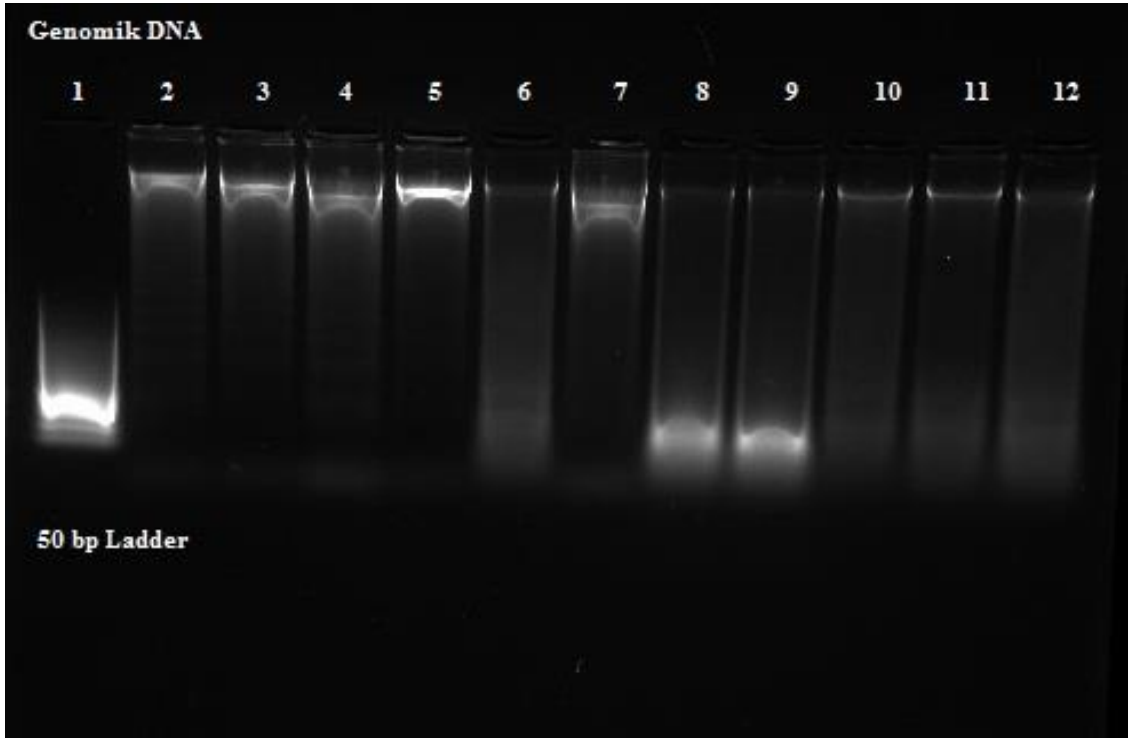
Yapılan bir diğer çalışmada da Etidyum Bromüre karşı DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ve SYBR® Green I boyalarının güvenlik ve hassasiyetleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda SYBR® Green I'in, Etidyum Bromür'den daha hassas sonuç verdiği saptanmıştır (Bourzac ve ark., 2003).

Kiltre ve Ryan (1997), değişken alanlı (pulsed field) jel elektroforezinde kullandıkları SYBR® Green I'in EtBr'ye göre daha basit ve doğru kantitatif sonuçlar ortaya koyduğunu belirtmişlerdir. Zipper ve ark. (2004), SYBR® Green I'in tek mi yoksa çift iplikli DNA'da mı daha iyi bir performans gösterdiğini araştırmak için yürüttükleri çalışma sonucunda SYBR® Green I'in çift iplikli DNA'ya daha iyi bağlandığını ve bu sayede DNA'nın özellikleri hakkında daha iyi veriler elde edildiğini ifade etmişlerdir.



Şekil 4.4.a. SYBR ® Green I'in agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü

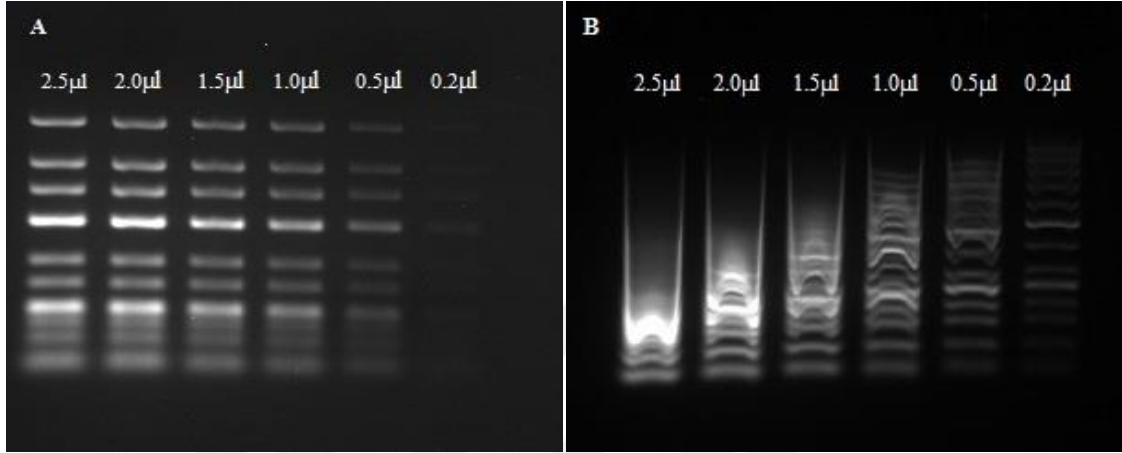
SYBR® Green I boyası 1/3 oranında seyreltilip jel içinde tekrar kullanılmıştır. Elektroforez sonrası çekilen jel fotoğrafında DNA bantlarının boyandığı ancak yine DNA göçünde boya tarafından engellenmenin ve şekil bozukluklarının devam ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.4.b.).



Şekil 4.4.b. SYBR® Green I'in % 1'lik agaroz jel içine seyreltilerek eklendiği jel görüntüsü

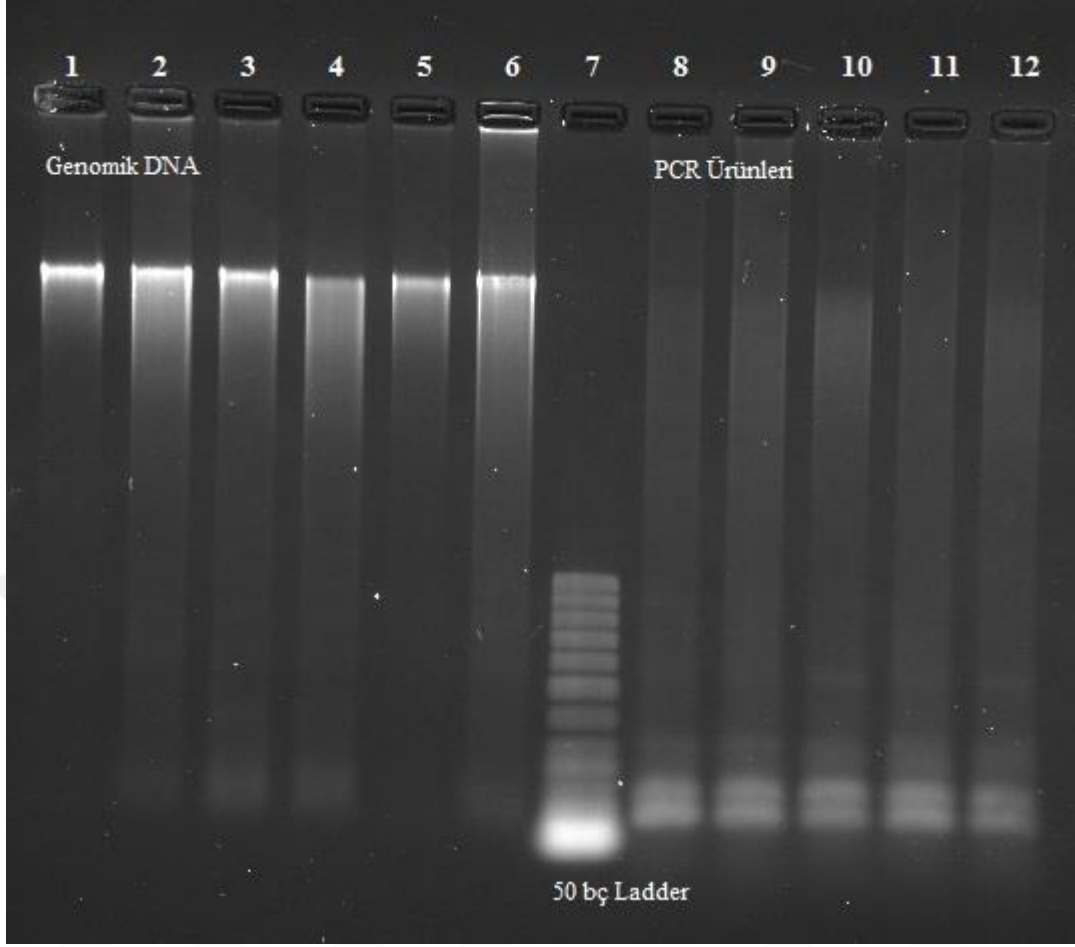
SYBR® Green I boyası ile yapılan DNA boyama çalışmasında % 2'lik agaroz jelle 25 bp ladder ile belirli oranlarda yükleme yapılarak, DNA miktarı ile boyama aktivitesi karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak EtBr'ye benzer şekilde SYBR® Green I'in de DNA miktarı arttıkça boyama aktivitesi artmıştır. Ayrıca bu çalışmada % 2'lik jelde, boya DNA bantlarının yapısını bozmamış olup düzgün bir boyama göstermiştir (Şekil 4.4.c. A). Boyanın afinitesinin jel içi artan agaroz miktarıyla dengelenip, DNA bantlarının daha sağlıklı boyanmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Aynı çalışma % 1'lik agaroz jelde tekrar edilmiş olup, DNA miktarı arttıkça, boyanın yüksek afinitesi bant yürütmesini engellemiş ve DNA bantlarının bozuk boyanmasına neden olmuştur (Şekil 4.4.c. B). DNA miktarı en az olan 0,2 mikrolitrelik DNA bantları daha net ve düzgün boyandığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak % 1'lik agaroz jeli yerine % 2'lik agaroz jelinin SYBR® Green I ile DNA boyama işlemlerinde kullanılabileceği sonucuna

varılmıştır. Ayrıca SYBR® Green I boyası 0,2 mikrolitre DNA bantlarını % 1'lik jelde daha net boyarken, % 2'lik jelde daha hafif boyamıştır. EtBr boyasıyla karşılaştırıldığında SYBR® Green I boyası (% 2'lik agaroz jel görüntüsüne göre) aynı hassasiyeti göstermiştir.



Şekil 4.4.c. SYBR® Green I boyası ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları (A) % 2'lik agaroz jel görüntüsü ve (B) % 1'lik agaroz jel görüntüsü

Bir diğer boyama tekniği ise SYBR® Green I ile elektroforez sonrası agaroz jel boyama çalışması olmuştur. Jele yüklenen genomik DNA'lar ve PZR ürünleri boyanmıştır. SYBR® Green I boyası elektroforez sonrası boyamada jel içi boyamada gözlemlenmesinin aksine DNA bantlarının şeklinde değişikliğe sebep olmamıştır. Ancak elektroforez sonrası boyamada EtBr kadar net bir boyama performansı da göstermemiştir (Şekil 4.4.d). Ayrıca diğer boyalarda elektroforez sonrası boyamada uygulanan zaman aralığı (30 dakika – 1 saat) SYBR® Green I boyasına da uygulanmıştır. Boya solüsyonunda uzun süre jelin durması sonucu bantların deforme olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak agaroz jelin uzun süre boya solüsyonunda tutulmasının boyama aktivitesinde olumlu bir değişiklik sağlamadığı saptanmıştır. Elektroforez sonrası boyamada jel içi boyamaya kıyasla non-spesifik bantlar ve sürüklenmeler daha net gözlemlenmiştir.

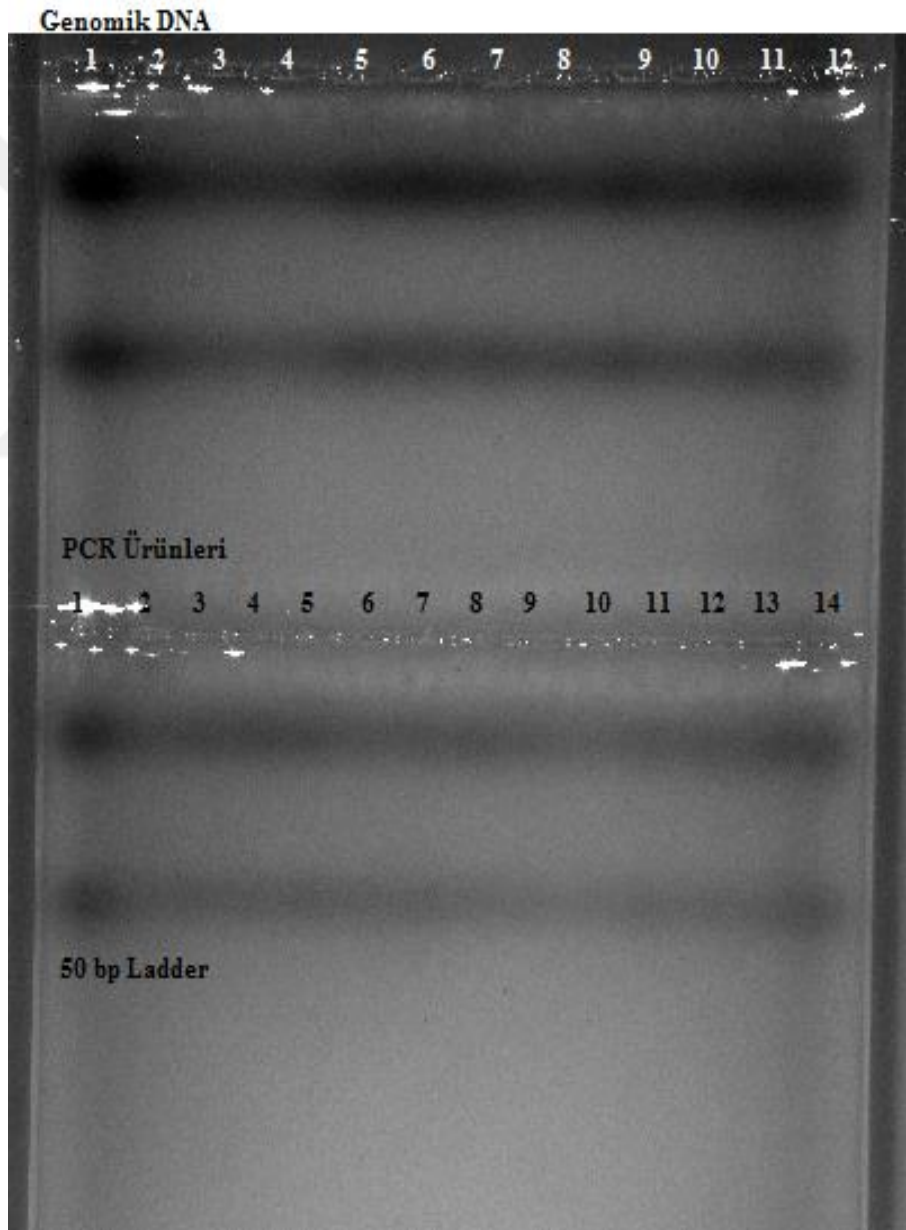


Şekil 4.4.d. SYBR® Green I ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyanma görüntüsü

SYBR® Green I boyasının jel içi ve elektroforez sonrası boyama çalışma görüntüleri incelendiğinde, jel içi boyama aktivitesi daha başarılı olmuştur. Ama jel içi boyamada kullanılan boya miktarının daha da azaltılması gerektiği 1/3 oranında seyreltilerek hazırlanan jel görüntüsünde (Şekil 4.4.b) ortaya konulmuştur. SYBR® Green I boyasının EtBr boyası ile karşılaştırıldığında boyama aktivitelerinin aynı olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak EtBr elektroforez sonrası boyamada SYBR® Green I boyasından daha başarılı ve net boyama gerçekleştirmiştir.

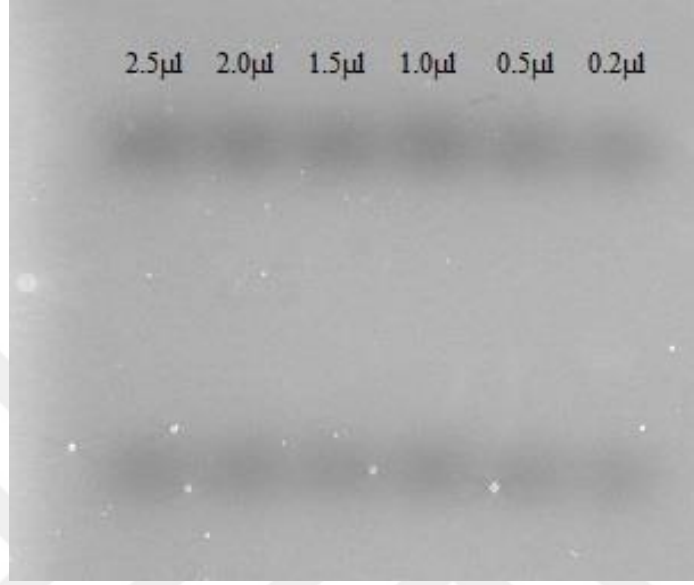
4.5. Metilen Blue İle Boyama

Metilen Blue'nun % 0.025 olacak şekilde seyreltilmiş boya solüsyonundan jel içine eklenmiştir. Elektroforez 2 saat gerçekleştirilmiş olup, kolorimetrik çekimle jel fotoğrafı görüntülenmiştir. Sonuç olarak Metilen Blue ile boyanan jelde DNA ve PZR ürün bantlarının boyanmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5.a). Yapılan literatür taramasında da jel içi boyamayla ilgili bir literatür bulunamamıştır.



Şekil 4.5.a. Metilen Blue'nun agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü

Metilen Blue boyası farklı miktarlardaki 25 bç'lik ladder'ın yüklendiği jelde de jel içi boyamada (Şekil 4.5.a) olduğu gibi herhangi bir bantı boyamamış ve görüntü alınamamıştır (Şekil 4.5.b).

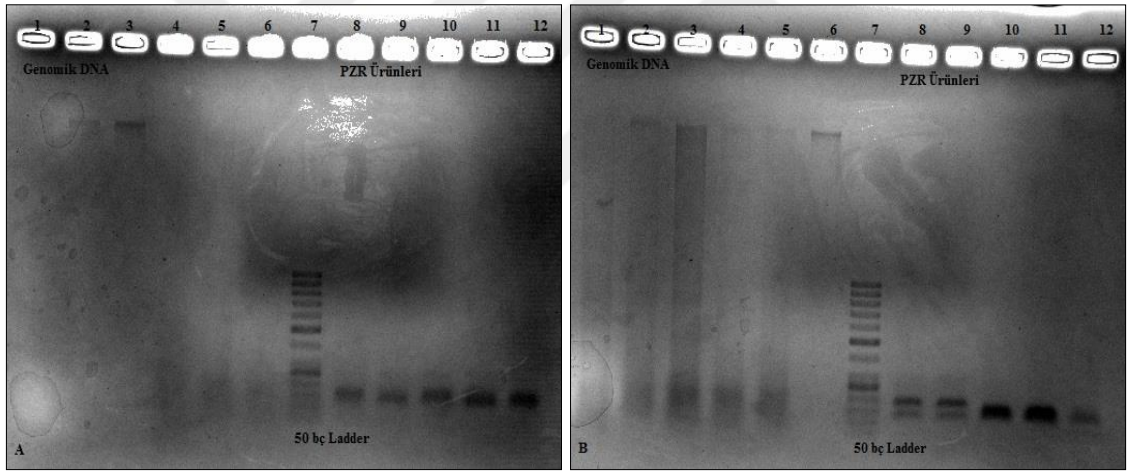


Şekil 4.5.b. Metilen Blue ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları

Elektroforez sonrası boyama da diğer boyamalardaki miktarlarda DNA (4 µl) ve PZR ürünleri (15 µl) yüklenmiştir. Boyama ve yıkama işlemleri sonrası çekilen jel fotoğrafında DNA bantlarının hafif boyandığı ve yoğun olan PZR ürünlerinin (Xwmc 93 primeri) daha net boyandığı saptanmıştır (Şekil 4.5.c.A). Bu sonuca göre tekrar agaroz jel hazırlanmış ve bu defa DNA miktarı 2.5 kat (10 µl) ve PZR ürünlerinin miktarları 5 µl artırılarak (toplam 20 µl) jele yüklenmiştir. Elektroforez sonrası boyama ve yıkama işlemlerinden geçirilen jelin fotoğrafı çekilmiştir. Sonuç olarak DNA bantları biraz daha belirgin hale gelirken, elektroforez sırasında oluşan sürüklenmelerde boyanmıştır (Şekil 4.5.c.B). Miktarı artırılan PZR ürünleri daha belirgin ve non-spesifik bantlar da daha net boyanmıştır. Metilen Blue boyasının DNA miktarı arttıkça boyama etkinliğinin arttığı bu deneme ile tespit edilmiştir.

Metilen Blue boyasının her iki boyama çalışması (jel içi ve elektroforez sonrası boyama) karşılaştırıldığında elektroforez sonrası jel boyama çalışması daha başarılı olmuştur. EtBr boyası ile karşılaştırıldığında ise boyama hassasiyeti, görüntü kalitesi yetersizliği, yükleme için fazla miktarda DNA gerektirmesi ve uzun zaman alan boyama prosedürü gibi dezavantajlara sahiptir.

Jel görüntüleri incelendiğinde boyama ve yıkama işlemleri sonrası sağlıklı yorum yapılacak bir görüntü ortaya çıkmamıştır. Floresans boyalarda olduğu gibi net bir bant yapısı görülememiştir. Ayrıca tam boyanmış bir DNA bant yapısı için fazla miktarda DNA kullanılması gerekmektedir. Çalışmanın bütününe bakıldığında harcanan zaman, iş gücü ve hassasiyet düşünüldüğünde Metilen Blue boyası diğer floresans boyaların çok gerisinde kalmıştır.

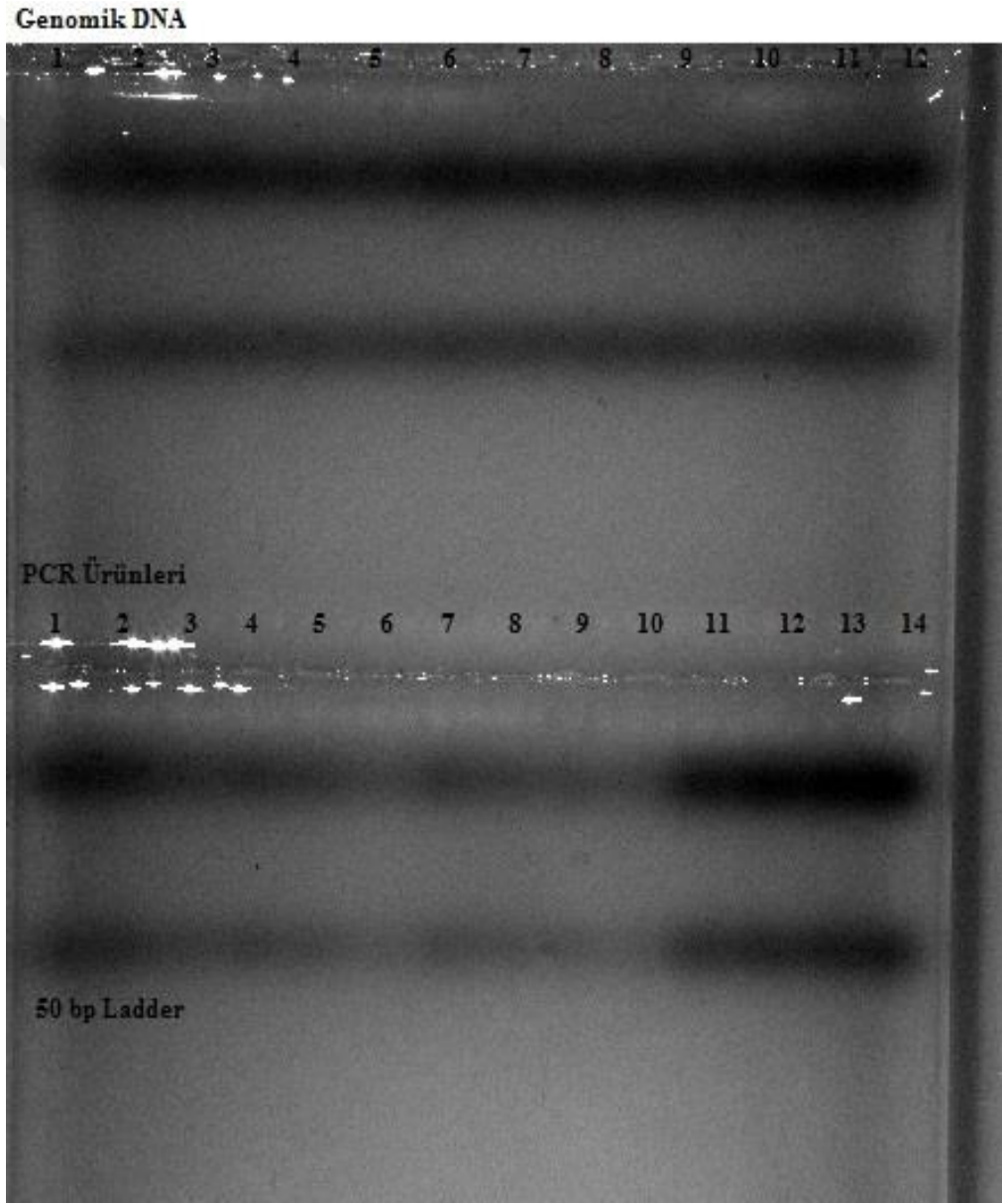


Şekil 4.5.c. Metilen Blue ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyanma görüntüsü
(A) DNA ve PZR ürünleri (B) Yükleme miktarı arttırılmış DNA ve PZR ürünleri

Tsui ve Law (2012), insan genomu üzerinde yaptıkları DNA parmak izi analizi çalışmalarında agaroz jel elektroforezinde Metilen Blue ve SYBR® Safe boyalarını karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak her iki boyamada da DNA bantları boyanmış olup, SYBR® Safe boyasında bantların daha hassas ve belirgin olduğu tespit edilmiştir.

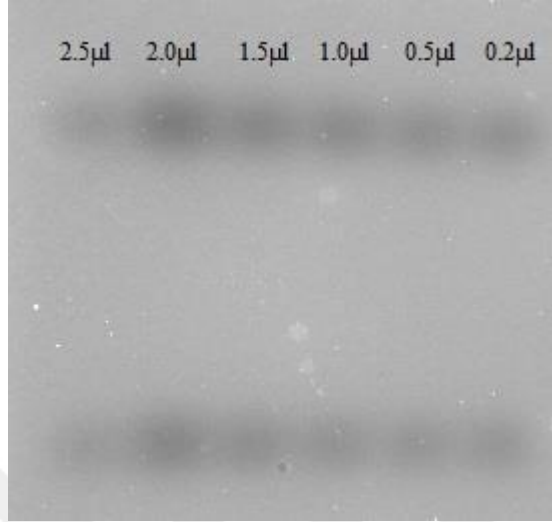
4.6. Kristal Viyole İle Boyama

Kristal Viyole'nin % 0.025 olacak şekilde seyreltilmiş boya solüsyonundan jel içine eklenmiştir. İki saatlik elektroforez sonrası kolorometrik çekimle jel görüntülenmiştir. Sonuç olarak DNA ve PZR ürün bantlarının boyanmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6.a). Literatür araştırmasında Kristal Viyole'nin jel içi boyaması ile ilgili literatüre rastlanmamıştır.



Şekil 4.6.a. Kristal Viyole'nin agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü

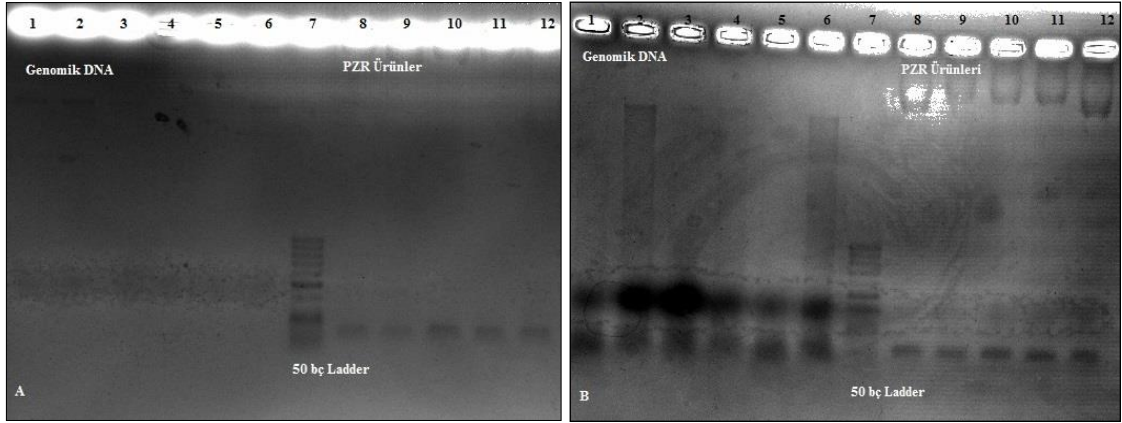
Kristal Viyole ile boyanan farklı miktarlardaki 25 bç'lik ladder'ın yüklendiği jelde de (Şekil 4.6.b) DNA ve PZR ürünlerinin yüklendiği jel içi boyamada olduğu gibi bantların boyanmadığı ve görüntülenmediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.6.b. Kristal Viyole ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları

Elektroforez sonrası boyama çalışmasında ise öncelikle diğer boya denemelerinde kullanılan miktarlarda DNA (4 µl) ve PZR ürünleri (15 µl) yüklenmiştir (Şekil 4.6.c.A). Bir günlük yıkama işleminden sonra jel görüntüsü incelenmiştir. Genomik DNA örnekleri hafif boyanırken, yüklenen PZR ürünleri daha iyi boyanmıştır. Daha sonra tekrar % 1'lik jel hazırlanmış, DNA (10 µl) ve PZR (20 µl) ürünlerinin miktarları artırılarak jele yüklenmiştir (Şekil 4.6.c.B). Elektroforez ve boyama işlemlerinden sonra bir günlük yıkamaya bırakılmıştır. Yıkama sonrası genomik DNA'lar biraz daha görünür hale gelmiş, ancak EtBr gibi net bir bant yapısı gözlemlenemmiştir. Miktarı artırılan PZR ürünlerinin bant boyamalarında ise değişiklik olmamıştır.

Rand (1996) tarafından yürütölen Kristal Viyole ile jel elektroforezi sırasında DNA bantlarını görselleştirmek ve klonlama verimini geliştirmeye yönelik çalışmada, Kristal Viyole'nin DNA bantlarının görüntülenmesinde EtBr kadar hassas olmadığı, bununla birlikte jelden DNA'nın zarar görmeden izolasyonu ve klonlanmasında EtBr'den daha verimli olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.6.c. Kristal Viyole ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyanma görüntüsü
(A) DNA ve PZR ürünleri (B) Yükleme miktarı arttırılmış DNA ve PZR ürünleri

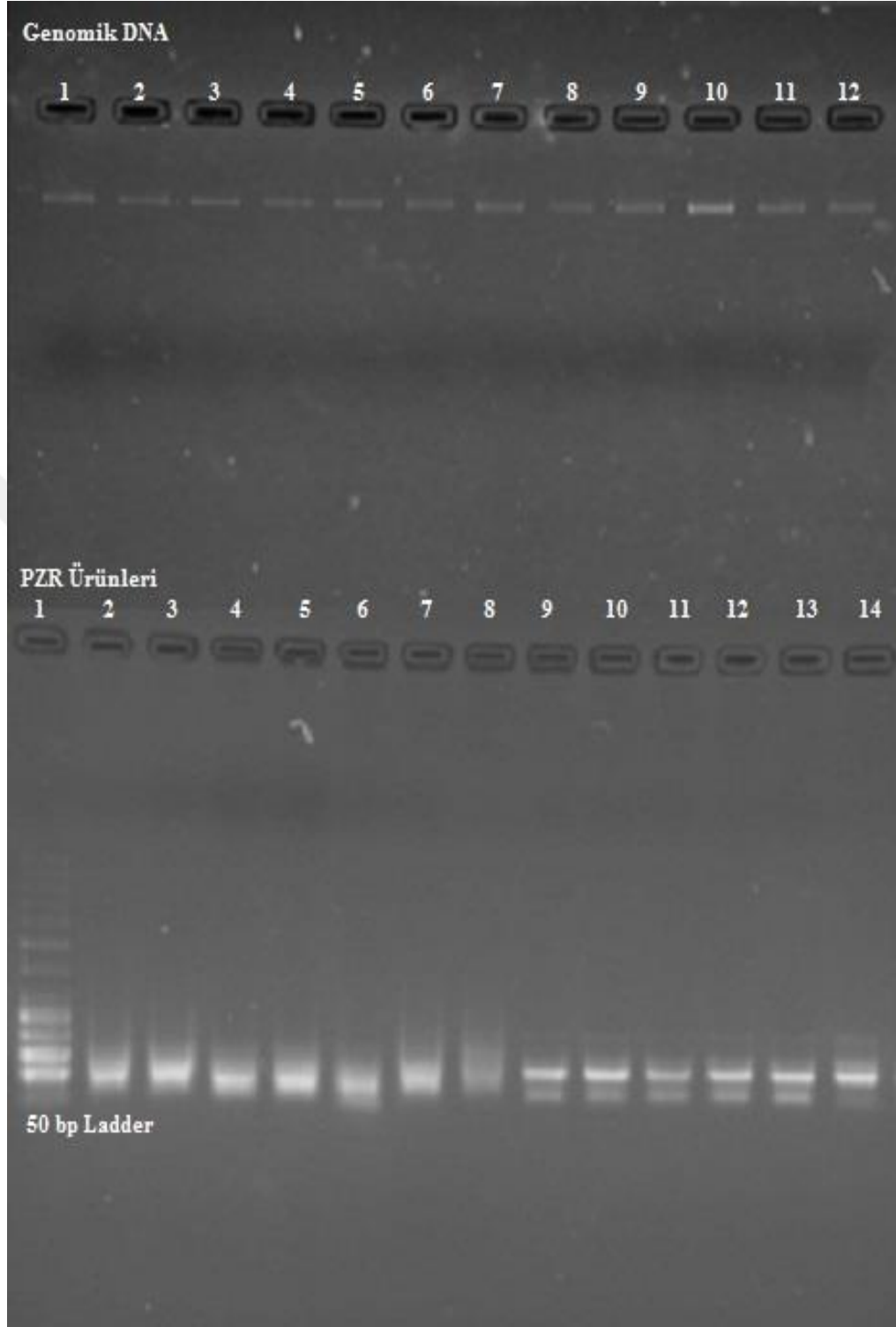
Müller ve Gautier (1975), nükleik asitler ile heteroaromatik bileşiklerin etkileşimini belirlemek için sekiz farklı boyanın (p-Fuchsin, Malahit Green, Metil Green, Auramine, Di-t-butyl proflavine Monoacetate, Di-t-butyl acriflavine ve Kristal Viyole) kullanıldığı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda Kristal Viyole ve Höchst 33258 boyalarının DNA'nın dışına bağlanarak, görüntülemeye imkân sağladığını belirtmişlerdir.

Jin ve Choi (2004), elektroforezde protein ve DNA'nın boyanması için yeni yöntemler geliştirmek için bir dizi deneme yapmışlardır. Denemelerinde DNA'nın boyanmasında karşı-iyon boyama mekanizması geliştirmişlerdir. Bunun için Kristal Viyole ve Metil Orange kullanılmıştır. Çalışma sonucunda Kristal Viyole-Metil Orange karşı-iyon boyama mekanizması, EtBr kadar hassas sonuç vermediği ortaya konulmuştur. Kristal Viyole ve Metil Orange boyasının birlikte kullanıldığı bir diğer araştırmada ise agaroz jel üzerinde güvenilir ve hassas sonuçlar elde edilmiştir (Yang ve ark., 2001).

Kristal Viyole boyası ile jel içi ve elektroforez sonrası yapılan jel boyama çalışmaları karşılaştırıldığında, Kristal Viyole ile elektroforez sonrası jel boyama başarılı bir sonuç vermiştir. Etidyum Bromür boyası ile yapılan karşılaştırılmadaise; hassasiyeti düşük ve görüntü kalitesinin kötü olması, fazla miktarda DNA gerektirmesi ve boyama çalışmasının iki gün sürmesi Kristal Viyole boyasının, EtBr boyası karşısındaki dezavantajları olmuştur.

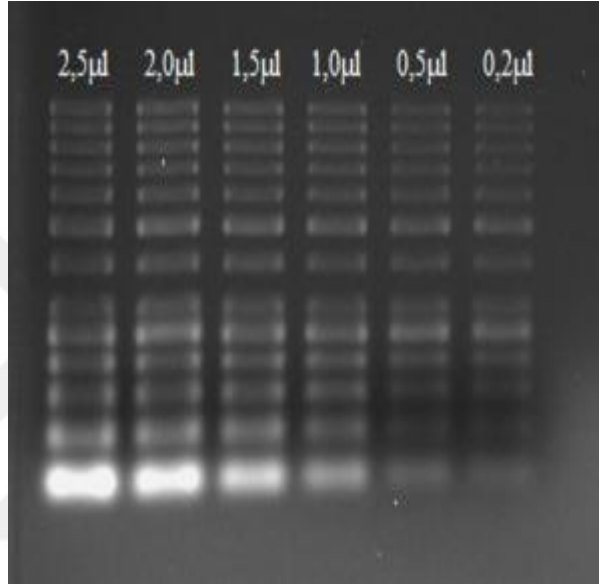
4.7. N719 Organik Boyası İle Boyama

Organik boyanın miktar denemeleri % 1'lik jel içinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda 220 ml'lik % 1'lik jel içine 60 µl organik boya ilave edilmesinin yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Yüklenen DNA örnekleri net bir şekilde boyanmış olup, DNA yoğunluğu fazla olan örnekler daha başarılı boyanırken, DNA yoğunluğu az olan örnekler hafif boyanmıştır. Organik boyanın yüklenen DNA örneklerini ve PZR ürünlerini net bir şekilde boyadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.a). En son yüklenen Xwmc 93 primerine ait PZR ürünleri çok yoğun olduğu için biraz daha net boyanırken, Xwmc 312 primerine ait PZR ürünleri yoğun DNA barındırmadığından hafif bir boyama aktivitesi göstermiştir.



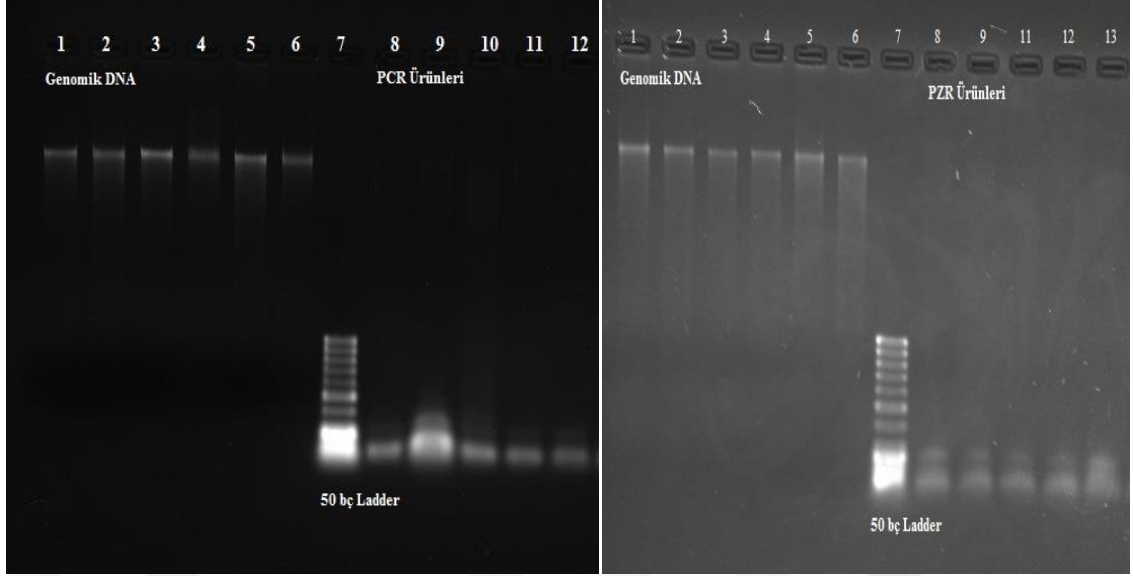
Şekil 4.7.a. N719 organik boyasının agaroz jel içine eklendiği jel görüntüsü

Farklı miktarlarda ladder'ın yüklendiği % 2'lik jel içine eklenen organik boyanın boyama aktivitesine bakılmıştır (Şekil 4.7.b). Organik boya, boyama etkinliği göstermiş ve ayrıca ladder miktarının artması organik boyanın boyama aktivitesinde olumlu yönde etkilemiştir. Bütün bantlar net bir şekilde boyanmıştır (Şekil 4.7.b). Ayrıca en küçük miktarda yüklenen 0,2 µl ladder bantı N719 organik boyasıyla EtBr'den daha net bir şekilde boyanmıştır.



Şekil 4.7.b. N719 organik boyası ile boyanan farklı miktarlardaki ladder bantları

Elektroforez sonrası boyama işleminde ise diğer boyalarda olduğu gibi organik boya distile su ile seyreltilip jeli sonradan boyamada kullanılmıştır. Çalışma sonucunda organik boyanın elektroforez sonrası da bantları net bir şekilde boyadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.c.). Elektroforez sonrası boyamada EtBr ile benzer görüntü netliği alınmıştır.



Şekil 4.7.c. N719 organik boyası ile agaroz jelin elektroforez sonrası boyama görüntüsü

Organik boyanın jel içi ve elektroforez sonrası boyama aktivitesi karşılaştırıldığında, jel içi boyama aktivitesinin daha başarılı olduğu sonucuna varılmıştır. Etidyum Bromür boyası ile karşılaştırıldığında ise kullanılan N719 organik boyasının EtBr'ye alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, bitki DNA'sının görüntülenmesi için yaygın olarak kullanılan ancak kanserojen ve mutajen özellikleri olan Etidyum Bromür boyasına alternatif olarak elektroforez jellerinin boyanmasında; GelRed™, SYBR® Safe, SYBR® Green I, Metilen Blue, Kristal Viyole boyaları ile N719 organik boyasının kullanımının araştırılması ve Etidyum Bromür ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada materyal olarak kullanılan boyalar hem elektroforez öncesi (jel içi boyama) hem de elektroforez sonrası agaroz jellerin boyanmasında kullanılmıştır. Elektroforez öncesi boyama çalışmalarında SYBR® Green I, SYBR® Safe, GelRed™ ve N719 boyaları DNA ve PZR ürünlerini EtBr ile aynı netlikte boyamışlardır. Ancak SYBR® Green I, DNA'lara ait bant şekillerini değiştirmiştir. Yapılan literatür araştırmasında bu durumun SYBR® Green I'in DNA'ya yüksek afinitesinden kaynaklandığı ve bu nedenle jel içi kullanımlarda fazla oranda seyreltilmesi gerektiği bildirilmiştir (Anonim, 2011b). İkinci kez hazırlanan jele, ilk kullanılan SYBR® Green I boya miktarının 1/3'i kadar boya ilave edilerek seyreltilmiştir. Elektroforez işlemi sonrası görüntülenen jel fotoğrafında yine boya tarafından DNA göçünün engellendiği tespit edilmiştir. Metilen Blue ve Kristal Viyole boyaları ile boyanan jelerde DNA ve PZR ürün bantları görüntülenememiştir. Bu iki boyanın jel içi boyama literatürü de bulunamamıştır.

Ayrıca SYBR® Safe, SYBR® Green I ve GelRed™ boyalarının, ortamda bulunan DNA miktarına göre floresan aktivitesinin değiştiği tespit edilmiştir. Jelde koşulan DNA'nın konsantrasyonu yüksekse boyama aktivitesi artmakta, daha az miktarda DNA varsa düşük bir bağlanma aktivitesi olduğu saptanmıştır. Bunun sonucunda jelde bantlar daha parlak ya da mat bir bant şeklinde gözlemlenmiştir. EtBr başta olmak üzere SYBR® Safe (Şekil 4.3.b), SYBR® Green I (Şekil 4.4.c), GelRed™ (Şekil 4.2.b) ve N719 (Şekil 4.7.b) boyaları ile yapılan farklı miktarlarda yüklenen ladder denemesinde, örnek miktarının artışıyla birlikte boyama aktivitesinin de arttığı daha kesin bir şekilde tespit edilmiştir. Ladder'ın yüklendiği jelerde, 0,2 µl yüklenen ürünler N719, GelRed™ ve SYBR® Safe boyaları tarafından net boyanırken, SYBR® Green I ve EtBr boyaları ile

net boyanmamıştır. Sonuç olarak bu çalışmada yapılan deneylerle boyama hassasiyeti en yüksek olan boyaların GelRed™ ve N719 olduğu belirlenmiştir.

Uygulanan jel içi boyama protokollerinden GelRed™, SYBR® Safe ve N719 boyama protokollerinin bitki DNA'sı boyamasında, EtBr'ye alternatif olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. SYBR® Green I boyasının da seyreltme optimizasyonu belirlendikten sonra EtBr'ye alternatif olarak bitki DNA'larının görüntülenmesinde kullanılabilceği saptanmıştır.

Ekonomik anlamda bu boyaları karşılaştırdığımızda, jel başına (220 ml'lik % 1'lik jel için) maliyetleri; SYBR® Green I boyasının 47 Lira, GelRed™ boyasının 10 Lira, SYBR® Safe boyasının 8 Lira, N719 organik boyasının 0.0544 Kuruş ve EtBr boyasının 0.006 Kuruş olduğu hesaplanmıştır. Sonuç olarak seyreltilmeden kullanılan bu üç boyanın maliyet açısından ekonomik olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak bu boyaların kanserojen olmamaları nedeniyle tekrar kaynatılıp kullanılabilme imkanı vardır. Jellerin bu şekilde tekrar kullanımıyla bu boyaların maliyetleri düşürülerek, ekonomik açıdan dezavantajlarının azaltılabileceği düşünülmektedir.

Elektroforez sonrası jellerin boyanmasında kullanılan altı boya maddesi de DNA ve PZR ürünlerinin boyama işlemini gerçekleştirmiştir. Floresans boyalarla yapılan boyama işlemlerinde EtBr'den sonra net boyama yapan GelRed boyası olmuştur. Bunu sırası ile SYBR® Safe, N719 ve SYBR® Green I boyası izlemiştir. Metilen Blue ve Kristal Viyole boyalarının aktivitelerini iyi gösterebilmesi için yüklenen DNA miktarının fazla olması gerektiği saptanmıştır. Ancak Metilen Blue ve Kristal Viyole, EtBr ile karşılaştırıldıklarında hassas bir boyama aktivitesi göstermemişlerdir. Çalışmada kullanılan bütün boyaların jel boyamalarında DNA yoğunluğu ne kadar fazla ise boyama aktivitelerinde arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca SYBR® Green I boyasının elektroforez sonrası boyamada DNA bant yapılarını bozmadığı saptanmıştır.

Elektroforez sonrası boyamalarda kullanılan boya miktarları ekonomik açıdan incelendiğinde ise; GelRed™ boyasının (250 ml solüsyon için) 60 Lira, SYBR Green I boyasının (200 ml solüsyon için) 43 Lira, SYBR Safe boyasının (250 ml solüsyon için) 18 Lira, Metilen Blue boyasının (200 ml solüsyon için) 0.106 Kuruş, Kristal Viyole

(200 ml boya solüsyonu için) boyasının 0.06 Kuruş, Organik boyanın (200 ml boya solüsyonu için) 0.0748 Kuruş ve EtBr boyasının (200 ml boya solüsyonu için) 0.0086 Kuruş olduğu hesaplanmıştır. Maliyet açısından bakıldığında, EtBr ve Organik boyanın diğer boyalardan avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak hazırlanan boyama solüsyonu tekrar kullanılarak maliyet açısından gözüken dezavantajın giderilebileceği düşünülmektedir.

Organik boya incelendiğinde ise jel içi boyama aktivitesinin yeterli olduğu ve DNA miktarı arttıkça kısmen arttığı gözlemlenmiştir. Elektroforez sonrası boyama çalışmasında ise DNA boyamada başarılı olduğu gözlenmiştir. Rutin elektroforez uygulamalarında EtBr yerine kullanılabilineceği tespit edilmiştir. Kullanılan organik boyanın kimyasal yapısının geliştirilip, DNA bağlanma aktivitesinin arttırılabileceği sonucuna varılmıştır.

Jel içi ve elektroforez sonrası boyama protokollerini hassasiyet, netlik, hız, zaman ve iş gücü bakımından karşılaştırdığımızda jel içi boyama protokollerinin daha verimli ve daha sağlıklı bilgiler verdiği tespit edilmiştir. Her iki yöntem içinde boyalar karşılaştırıldığında ise GelRed™, SYBR Safe ve N719 boya ları çalışmada kullanılan diğer boyalar içinde öne çıkmıştır.

Yapılan analizler sonucunda bitki biyoteknolojisi çalışmalarında EtBr yerine kullanılacak alternatif boyaların avantaj ve dezavantajları ortaya konularak daha sonraki çalışmalara bir önveri hazırlanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Adkins, S. ve Burmeister, M., 1996. Visualization of DNA in Agarose Gels as Migrating Colored Bands: Applications for Preparative Gels and Educational Demonstrations. *Anal Biochem.*, 240 (1), p. 17-23.
- Anonim, 2000. Methylene Blue Staining of DNA. <http://www.sciencegateway.org/protocols/cellbio/cloning/mblue.htm> (Erişim Tarihi: 09.03.14).
- Anonim, 2006a. SYBR Safe™ DNA Gel Stain. *Molecular probes, invitrogen detection Technologies*. MP 33100, p. 1-6. <https://bio.as.uky.edu/sites/default/files/SYBR%20safe%20DNA%20stain.pdf> (Erişim Tarihi: 09.04.14).
- Anonim, 2006b. Double Helix 1953-2003, Staining DNA. <http://www.ncbe.reading.ac.uk/dna50/stainingtable.html> (Erişim Tarihi: 15.04.14).
- Anonim, 2006c. Replacing Ethidium Bromide in an Undergraduate Laboratory: SYBR Safe Case Study. *MIT Green Chemistry Case Study*, p. 1-4. <https://ehs.mit.edu/site/sites/default/files/files/SYBR.pdf> (Erişim Tarihi: 17.10.13).
- Anonim, 2007a. SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain. http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_SYBR_Green_I_Nucleic_Acid_Gel_Stain_Protocol.pdf (Erişim Tarihi: 15.03.14).
- Anonim, 2007b. GelRed Fluorescent Nucleic Acid Dye. www.geneon.net/gelred-fluorescent-nucleic-acid-dye-566.html (Erişim Tarihi: 01.04.14).
- Anonim, 2008. Sybr® Green I dsDNA Assay, Protocol. <http://www.nanodrop.com/Library/Sybr%20Green%20I%20protocol.pdf> (Erişim Tarihi: 05.03.14).
- Anonim, 2010. Staining Your Agarose Gel to Reveal DNA. *Southern Biological*. http://www.subsport.eu/wp-content/uploads/2012/04/methylenebluDNA_Agarose_Gels.pdf (Erişim Tarihi: 03.10.13).
- Anonim, 2011a. SYBR Safe DNA Gel Stain. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/S33102> (Erişim Tarihi: 05.05.14).
- Anonim, 2011b. SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain. Product Information And Sigma-Aldrich, October 2011, p.1-3. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/s9430dat.pdf> (Erişim Tarihi: 11.11.13).

- Anonim, 2011c. Methylene Blue Stain. <http://www.mrcgene.com/met-blue.htm> (Erişim Tarihi: 25.12.13).
- Anonim, 2011d. Gel Electrophoresis. Barrick Lab and Protocol List, 17 June 2011. <http://barricklab.org/twiki/bin/view/lab/ProceduresStandardAgaroseGel> (Erişim Tarihi: 24.09.13).
- Anonim, 2012a. GelRed™ and GelGreen™, Environmentally Safe And Ultra-sensitive Nucleic Acid Gel Stains For Replacing EtBr. http://www.biotium.com/product/product_info/Newproduct/GelStains.asp (Erişim Tarihi: 02.07.2013).
- Anonim, 2012b. Ethidium Bromide. <http://www.ed.ac.uk/schools-departments/health-safety/guidance/hazardous-substances/ethidium-bromide> (Erişim Tarihi: 28.01.14).
- Anonim, 2012c. GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10.000x in DMSO. Product Information And Biotium, p. 1-2. https://us.vwr.com/stibo/hi_res/9301259.pdf (Erişim Tarihi: 22.12.13).
- Anonim, 2013. Boya İle Duyarlı Hale Getirilmiş Güneş Pilleri Nasıl Çalışır? <http://www.elektrikport.com> (Erişim Tarihi: 25.09.14).
- Anonim, 2014a. SYBR Green I. http://en.wikipedia.org/wiki/SYBR_Green_I (Erişim Tarihi: 15.03.14).
- Anonim, 2014b. Ruthenium-based dyes for Dye Solar Cells. <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/organic-electronics/dye-solar-cells.html> (Erişim Tarihi: 20.09.14).
- Bourzac, K.M., LaVine, L.J. ve Rice M.S., 2003. Analysis of DAPI and SYBR Green I as Alternatives to Ethidium Bromide for Nucleic Acid Staining in Agarose Gel Electrophoresis. *J. Chem. Educ.*, 80 (11), p. 1292.
- Breman, C., 2011. Ferroportin Polymorphism And Anemia in HIV Infected Rwandese Women. *Universiteit Gent, Master In De Geneeskunde*, p. 19-21. http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/787/699/RUG01-001787699_2012_0001_AC.pdf (Erişim Tarihi: 29.08.13).
- Cerutti, P.A., 1985. Prooxidant States and Tumor Promotion. *Science*, 227 (4685) p. 375–381.

- Chappell, J., Jensen K., ve Freemont, P.S., 2013. Validation of an Entirely in Vitro Approach for Rapid Prototyping of DNA Regulatory Elements for Synthetic Biology. *Nucleic Acids Research*, 41(5), 3471-3481.
- Cong, W.T., Zhu, Z.X., He, H.Z., Jin, Y., Jiang, C.X., Choi, J.K., Jin, L.T. ve Li, X.K., 2010. A Visible Dye-Based Staining Method for DNA in Polyacrylamide Gels by Ethyl Violet. *Anal Biochem.*, 402(1), 99-101.
- Cong, W., Chen, M., Zhu, Z., Liu, Z., Nan, J., Ye, W., Ni, M., Zhaoa, T. ve Jin, L., 2013. A Shortcut Organic Dye-Based Staining Method For the Detection of DNA Both in Agarose And Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Analyst*, 138 (4), p. 1187-1194.
- Couto, M.C.M., Sudre, A.P., Lima, M.F. ve Bomfim, T.C.B., 2013. Comparison of Techniques for DNA Extraction and Agarose Gel Staining of DNA Fragments Using Samples of *Cryptosporidium*. *Veterinari Medicina*, 58(10), 535-542.
- Didierlaurent, L., Racine, P.J., Houzet, L., Chamontin, C., Berkhout, B. ve Mougel, M., 2011. Role of HIV-1 RNA and Protein Determinants for The Selective Packaging of Spliced and Anspliced Viral RNA and Host U6 and 7SL RNA in Virus Particles. *Nucleic Acids Research*, 39(20), 8915-8927.
- Diggle, C.P., Bentley, J. ve Kiltie, A.E., 2003. Development of a Rapid, Small-Scale DNA Repair Assay For Use on Clinical Samples. *Nucleic Acids Research*, 31(15), 83.
- Dong, Z.W., Shao, P., Diao, L.T., Zhou, H., Yu, C.H. ve Qu, L.H., 2012. RTL-P: a Sensitive Approach for Detecting Sites of 20-O-Methylation in RNA Molecules. *Nucleic Acids Research*, 40 (20), 1-10.
- Doyle, J.J. ve Doyle, R.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Farrell, R.E., 2010. Chapter 9 – Electrophoresis of RNA. *RNA Methodologies (Fourth Edition)*, p. 179-219.
- Flores, N., Valle, F., Bolivar, F. ve Merino, E., 1992. Recovery of DNA From Agarose Gels Stained With Methylene Blue. *Biotechniques*, 13, 203-205.
- Gibson, J.F., Kelso, S. ve Skevington, J.H., 2010. Band-Cutting no More: A Method for The Isolation and Purification of Target PCR Bands From Multiplex PCR Products Using New Technology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56 (3), 1226-1228.

- Gill, M.R., Lara, J.G., Foster, S.J., Smyth, C., Battaglia, G. ve Thomas, J.A., 2009. A Ruthenium(II) Polypyridyl Complex for Direct Imaging of DNA Structure in Living Cells. *Nature Chemistry* 1, 1 (8), 662–667.
- Herrin, D.L. ve Schmidt, G.W., 1988. Rapid, Reversible Staining of Northern Blots Prior to Hybridization. *Biotechniques*, 6, 196-200.
- Hilal, H. ve Taylor J.A., 2007. Cyanine Dyes for The Detection of Double Stranded DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70(6), 1104–1108.
- Holloway, T.P., Rowley, S.M., Delatycki, M.B. ve Sarsero, J.P., 2011. Detection of Interruptions in the GAA Trinucleotide Repeat Expansion in the *FXN* Gene of Friedreich Ataxia. *BioTechniques*, 50(3), 182-186.
- Huang, Q. ve Fu, W.L., 2005. Comparative Analysis of the DNA Staining Efficiencies of Different Fluorescent Dyes in Preparative Agarose Gel Electrophoresis. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*, 43(8), 841-842.
- Huang, Q., Baum, L. ve Fu, W.L., 2010. Simple and Practical Staining of DNA With GelRed in Agarose Gel Electrophoresis. *Clin Lab.*, 56 (3-4), 149-52.
- Ito, S., 2011. Investigation of Dyes for Dye-Sensitized Solar Cells: Ruthenium-Complex Dyes, Metal-Free Dyes, Metal-Complex Porphyrin Dyes and Natural Dyes. *Solar Cells - Dye-Sensitized Devices-2 Book*. November 2011, 20-35.
- Jin, L.T. ve Choi, J.K., 2004. Usefulness of Visible Dyes for the Staining of Protein or DNA in Electrophoresis. *Electrophoresis*, 25, 2429-2438.
- Karmakar, A.S. ve Ruparelia, J.P., 2011. A Critical Review on Dye Sensitized Solar Cells. *Institute of Technology, Nirma University, Ahmedabad*, 08-10 december 2011, p. 1-6.
- Kiltie, A.E. ve Ryan, A.J., 1997. SYBR Green I Staining of Pulsed Field Agarose Gels is a Sensitive and Inexpensive Way of Quantitating DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells. *Nucleic Acids Research*, 25(14), 2945-2946.
- Lin, C., Perrault, S.D., Kwak, M., Graf, F. ve Shih, W.M., 2012. Purification of DNA-Origami Nanostructures by Rate-Zonal Centrifugation. *Nucleic Acids Research*, 41(2), 1-6.
- Ludin, N.A., Karim, N.A., Mat-Teridi, M.A., Ibrahim, M.A., Sepeai, S., Sopian, K., Sulaiman, M.Y. ve Asim, N., 2013. Absorption Spectrum of N719 and SQ1

dye on TiO₂ Surface of Dyesensitized Solar Cell. *Latest Trends in Renewable Energy and Environmental Informatics*. 2-4 April 2013, p. 255-258.

Lunn, G. ve Sansone, E.B., 1987. Ethidium Bromide: Destruction and Decontamination of Pollutions. *J. Analytical Biochemical*, 162, 453-458.

Marks, R., 1995. An Overview of Skin Cancers. *Cancer*, 75(S2), 607-612.

Martineau, C., Whyte, L.G. ve Greer, C.W., 2008. Development of a SYBR safe™ Technique for the Sensitive Detection of DNA in Cesium Chloride Density Gradients for Stable Isotope Probing Assays. *Journal of Microbiological Methods*, 73(2), 199–202.

Matselyukh, B.P., Yarmoluk, S.M., Matselyukh, A.B., Kovalska, V.B., Kocheshev, I.O., Kryvorotenko, D.V. ve Lukashov, S.S., 2003. Interaction of Cyanine Dyes With Nucleic Acids: XXXI. Using of Polymethine Cyanine Dyes for the Visualization of DNA in Agarose Gels. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 57, 35-43.

Mengpei, L., Dali, F., Jianmin, F. ve Min, T., 2011. A New DNA Band Display Technology of Microsatellite DNA. *African Journal of Biotechnology*, 21 10(83), 19276-19279.

Müller, W. ve Gautier, F., 1975. Interactions of Heteroaromatic Compounds with Nucleic Acids, A - T-Specific Non-Intercalating DNA Ligands. *European Journal of Biochemistry*, 54(2), 385-394.

Nafisi, S., Saboury, A.A., Keramat, N., Neault, J.F. ve Riahi, H.A.T., 2007. Stability and Structural Features of DNA Intercalation With Ethidium Bromide, Acridine Orange and Methylene Blue. *Journal of Molecular Structure*, 827(1-3), 35–43.

Nath, K., Sarosy, J.W., Hahn, J. ve Di Como, C.J., 2000. Effects of Ethidium Bromide and SYBR Green I on Different Polymerase Chain Reaction Systems. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 42, 15-29.

Ohta, T., Tokishita, S. ve Yamagata H., 2001. Ethidium Bromide and SYBR Green I Enhance the Genotoxicity of UV-Irradiation and Chemical Mutagens in *E. Coli*. *Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, 492(1-2), 91-97.

Rand, N.K., 1996. Crystal Violet Can be Used to Visualise DNA Bands During Gel Electrophoresis and to Improve Cloning Efficiency. Elsevier Trends Journals Technical Tips Online, T40022.

- Ryan, M., 2009. Progress in Ruthenium Complexes for Dye Sensitised Solar Cells. *Platinum Metals Rev.*, 53(4), 216-218.
- Saeidnia, S. ve Abdollahi, M., 2013. Are Other Fluorescent Tags Used Instead of Ethidium Bromide Safer? *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 21-71.
- Santillán Torres, J., ve Ponce-Noyoia, P., 1993. A Novel Stain for DNA in Agarose Gels. *Trends in Genetics*, 9 (2), 40.
- Sharp, P.A., Sugden, B. ve Sambrook, J. 1973. Detection of Two Restriction Endonuclease Activitiesin *Haemophilus parainfluenzae* Using Analytical Agarose. *Biochemistry*, 12(16), 3055-3063.
- Singer, V.L., Lawlor, T.E. ve Yue, S., 1999. Comparison of SYBRw Green I Nucleic Acid Gel Stain Mutagenicity and Ethidium Bromide Mutagenicity in the *Salmonella* Mammalian Microsome Reverse Mutation Assay (Ames test). *Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, 439(1), 37-47.
- Somers, D.J., Isaac, P. ve Edwards, K., 2004. A High-Density Wheat Microsatellite Consensus Map for Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1105-1114.
- Soto, A.M. ve Draper, D., 2012. White Gels: An Easy Way to Preserve Methylene Blue Stained Gels. *Analytical Biochemistry*, 421, 345–346.
- Tekoğlu, S., 2009. Güneş Pili Uygulamaları İçin Görünür Bölgede Absorpsiyon Yapan Yeni Organik Boyar Maddelerin Sentezi. *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi> (Erişim Tarihi: 20.09.14).
- Thresher, R.J. ve Griffith, J.D., 1990. Intercalators Promote the Binding of RecA Protein to Double-Stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci*, 87, 5056-5060.
- Tsui, S. K.W. ve Law, P., 2012. DNA Fingerprinting and Agarose Gel Electrophoresis. *The Chinese University of Hong Kong School of Life Sciences Biochemistry Program CUGEN Ltd.*, p.1-8. http://www.bch.cuhk.edu.hk/workshopdna/DNA_final_20120912.pdf (Erişim Tarihi: 30.04.14).
- Tuma, R.S., Beaudet, M.P., Jin, X., Jones, L.J., Cheung, C.Y., Yue, S. ve Singer, V.L., 1999. Characterization of SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain: A Dye Optimized For Use With 300-nm Ultraviolet Transilluminators. *Anal. Biochem.*, 268(2), 278–288.

- Turner, P.C., McLennan, A.G. ve Bates, A.D., 2005. Instant Notes in Molecular Biology. 3 rd ed., p. 49.
- Yang, Y., Jung, D.W., Bai, D.G., Yoo, G.S. ve Choi, J.K., 2001. Counterion-Dye Staining Method for DNA in Agarose Gels Using Crystal Violet and Methyl Orange. *Electrophoresis*, 22(5), 855–859.
- Yue, Q., Da-li, F., Meng-pei, L., Yu-qin, L. ve Shuo, W., 2012. Optimization of Microsatellite DNA Gelred Fluorescence Imaging Technology. *African Journal of Biotechnology*, 11, 14749-14754.
- Yung-Sharp, D. ve Kumar, R., 1989. Protocols for the Visualisation of DNA in Electrophoretic Gels by a Safe and Inexpensive Alternative to Ethidium bromide. *Technique*, 1(3), 183-187.
- Zafrin, S., 2013. Olson Lab Protocol: Agarose Gel Electrophoresis Using GelRed. *Gel Electrophoresis*, p. 1-3. http://www.olsonlab.com/resources/Data-Files/OlsonLabProtocol.Gel_Electrophoresis.pdf (Erişim Tarihi: 06.01.14).
- Zipper, H., Brunner,H., Bernhagen, J. ve Vitzthum, F., 2004. Investigations on DNA Intercalation and Surface Binding by SYBR Green I, Its Structure Determination and Methodological Implications. *Nucleic Acids Research*, 32(12), 1-10.
- Zipper, H., Buta, C., LaÈmmle, K, Brunner,H., Bernhagen, J. ve Vitzthum, F., 2003. Mechanisms Underlying the Impact of Humic Acids on DNA Quantification by SYBR Green I and Consequences for the Analysis of Soils and Aquatic Sediments. *Nucleic Acids Research*, 31(7), 1-16.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Kerime ÖZKAY
Doğum Tarihi ve Yeri : 25.03.1989, Karaman
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
e-mail : kerimeozkay@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Tarih
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2012-2014
Lisans	Kastamonu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2008-2012
Lise	Yunus Kent Lisesi	2003-2006

Yapılan Çalışmalar

a. TÜBİTAK Çalışmaları

ALTUNER, E.A., ÇETER, T., DEMİRKAPI, D., **ÖZKAY, K.**, HAYAL, U. ve ESER, G., **2010.** Kastamonu Yöresine Ait Bazı Liken Türlerinin Antimikrobiyal Etkilerinin İncelenmesi Adlı Çalışma, 2209 Nolu TÜBİTAK Programı Tarafından Desteklenmiştir (Yardımcı Araştırmacı).

ÖZKAY, K., ve ALTUNER, E.A., **2012.** Kastamonu Yöresinde Yayılış Gösteren *Rhododendron sp.*'den Elde Edilen Balın Antioksidan Etkilerinin İncelenmesi Adlı Çalışma, 2209 Nolu TÜBİTAK Programı Tarafından Desteklenmiştir (Proje Yürütücüsü).

b. Bilimsel Araştırma Projeleri

Ö., ATEŞ SÖNMEZOĞLU ve K., ÖZKAY, 2014. Agaroz Jel Elektroferezinde DNA Görüntüleme için Ethidium Bromide'e Alternatif Boyaların İncelenmesi. KMÜ BAP, Proje No: 06-YL-13 (Yardımcı Araştırmacı).

c. Katıldığı Ulusal Kongreler

ÖZKAY, K., BAYAR, E., GÜLER, S., ATAK, F., ÇETER, T. ve ALTUNER, E.M., 2010. Doğada Kolay Çözünebilir Plastik (Derleme). *Ekoloji 2010 Sempozyumu*, Aksaray, Poster Sunumu, s. 108.

ÖZKAY, K., ÇETER, T. ve ALTUNER, E.M., 2010. Bizden Biri Tehlike Altında: Anadolu Sığılası (*Liquidambar orientalis*) (Derleme). *Ekoloji 2010 Sempozyumu*, Aksaray, Poster Sunumu, s. 156.

ESER, G., DEMİRKAPI, D., ÖZKAY, K., HAYAL, U., ALTUNER, E.A., ÇETER, T., YILDIRIM, İ., ve KARAKAYA, S.S., 2010. *Maclura pomifera* Meyvesinin Antimikrobiyal Etkisi (Laboratuar Çalışması). *20. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Denizli, Poster Sunumu, s. 551.

DEMİRKAPI, D., ALTUNER, E.A., ÇETER, T., ÖZKAY, K., HAYAL, U. ve ESER, G., 2011. Kastamonu Yöresine Ait Bazı Liken Türlerinin Antimikrobiyal Etkilerinin İncelenmesi (Laboratuar Çalışması). *Ekoloji 2011 Sempozyumu*, Düzce, Poster Sunumu, s. 225.

ÖZKAY, K., ÖZTÜRK, G., ALTUNER, E.A., ve ÇETER, T., 2012. Türkiye'nin Üç Farklı Yöresinden Alınan Balların Fiziksel ve Kimyasal Analizleri (Laboratuar Çalışması). *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Poster Sunumu.

d. Yayınlar

ALTUNER, E.A., ÇETER, T., DEMİRKAPI, D., ÖZKAY, K., HAYAL, U. and ESER, G., 2011. Investigation on Antimicrobial Effects of Some Lichen Species Collected From Kastamonu Region. *Commun. Fac. Sci. Univ. Ank. Series C*, 23, 21-31.