KAPİLER JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİYLE
***SALVIA* TÜRLERİNDE DNA TAYİNİ**

Elif Mine Öncü Kaya

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Ocak-2013

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 091046

JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Elif Mine Öncü Kaya'nın **"Kapiler Jel Elektroforez Yöntemiyle *Salvia* Türlerinde DNA Tayini"** başlıklı **Kimya** Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 25.12.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı Soyadı	**İmza**
Üye (Tez Danışmanı)	**: Doç. Dr. ÜLKÜ DİLEK UYSAL**	**…….....**
Üye (2. Tez Danışmanı)	**: Doç. Dr. NİLGÜN ÖZTÜRK**	**…….....**
Üye	**: Prof. Dr. YÜCEL ŞAHİN**	**…….....**
Üye	**: Prof. Dr. DİLEK AK**	**…….....**
Üye	**: Doç. Dr. SÜLEYMAN CENKÇİ**	**…….....**

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ……tarih ve ……sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

KAPİLER JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİYLE *SALVIA* TÜRLERİNDE DNA TAYİNİ

Elif Mine ÖNCÜ KAYA

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ülkü Dilek UYSAL
İkinci Danışman: Doç. Dr. Nilgün ÖZTÜRK
2013, 143 sayfa

Bu çalışmada, Türkiye Florasında geniş yayılış gösteren ve pek çok endemik türe sahip olan Lamiaceae familyasına ait 10 farklı *Salvia* (adaçayı) türünün agaroz jel elektroforez ve kapiler jel elektroforez yöntemleri ile DNA parçalarının tayini yapılmıştır. Bu amaçla, öncelikle Eskişehir bölgesinden toplanan *Salvia* L. türlerinin yapraklarından genomik DNA'lar izole edilmiştir. Genomik DNA'ların bazı bölgeleri OPA−03, OPA−04, OPA−05 ve OPA−15 oligonükleotit primerleri kullanılarak RAPD yöntemi ile çoğaltılmıştır. DNA parçaları agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve bu DNA bantları UV ışık kaynağı kullanılarak görüntülenmiştir. *Salvia* L. türleri için filogenetik ilişki belirlenmiştir. Bu sonuçlar genetik olarak en uzak türlerin *S. fruticosa* ve *S. dichroantha* olduğunu, buna karşın en yakın türlerin ise *S. bracteata* ve *S. fruticosa* olduğunu göstermektedir.

Kapiler jel elektroforez ile DNA ayırımları için hidroksietil selüloz kullanılarak dinamik kaplama yöntemi geliştirilmiştir. 14 farklı büyüklükteki standart DNA parçası için bu yöntem kullanılarak etkili bir ayırım ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir. *Salvia* L. türlerinden seçilen DNA parçaları kapiler jel elektroforez ile tayin edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar agaroz jel elektroforez sonuçlarıyla karşılaştırılmış ve birbiriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kapiler Jel Elektroforez, Agaroz Jel Elektroforez, Bitki DNA'sı, *Salvia*, RAPD, Filogenetik Ağaç.

ABSTRACT

PhD Dissertation

DETERMINATION OF DNA IN *SALVIA* SPECIES BY CAPILLARY GEL ELECTROPHORESIS

Elif Mine ÖNCÜ KAYA

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemistry Program

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ülkü Dilek UYSAL
Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK
2013, 143 pages

In this study, DNA fragments of ten different *Salvia* (sage) species from Lamiacea family, which have a wide range in Turkey Flora and many of the endemic species, were determined by using agarose gel electrophoresis and capillary gel electrophoresis. For this purpose, the genomic DNAs were firstly isolated from the leaves of *Salvia* species collected from Eskişehir region. Some parts of genomic DNAs were amplified using OPA-03, OPA-04, OPA-05 and OPA-15 oligonucleotide primers by RAPD method. The DNA fragments were seperated by agarose gel electrophoresis, and these DNA bands were visualized by irradiating with a UV light source. Phylogenetic relation for these *Salvia* L. species were investigated. The results indicate that the furthest genetically species are *S. fruticosa* and *S. dichroantha*, while the most genetically similar species are *S. bracteata* and *S. fruticosa*.

Dynamic coating method was developed using hydroxyethyl cellulose by capillary gel electrophoresis for DNA separation. An effective separation and reproducible results were obtained for 14 different size of standard DNA fragments by the method. DNA fragments selected from *Salvia* L. species were determined by capillary gel electrophoresis. The obtained results were also compared with those results by the agarose gel electrophoresis and they were consistent with each other.

Keywords: Capillary Gel Electrophoresis, Agarose Gel Electrophoresis, Plant DNA, *Salvia*, RAPD, Phylogenetic Tree.

TEŞEKKÜR

Tezin konu seçiminde ve deneysel çalışmalarımda beni yönlendiren danışman Hocalarım Doç. Dr. Ülkü Dilek UYSAL ve Doç. Dr. Nilgün ÖZTÜRK'e,

Tez konusunun belirlenmesinde beni cesaretlendiren ve desteğini her zaman hissettiğim değerli Hocam Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL'e,

Elektroforez yöntemleri konusunda kendilerinden çok şey öğrendiğim Hocalarım Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a ve deneysel çalışmalardaki yardım ve verdiği fikirlerden ötürü Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ'ye,

Tezimin yönlendirilmesinde verdiği fikirlerden ötürü Prof. Dr. Yücel ŞAHİN'e

Doktora tez projesinde gerekli olan maddi desteği sağlayan AÜ-BAP Komisyonu'na,

Sevgisini ve manevi desteğini her zaman hissettiğim, sevgili eşim Serkan'a,

Annem Handan, babam Nihat, kardeşim Erhan ve dedem Osman ERMEZ'e manevi destekleri ve her zaman yanımda oldukları için,

İlkay ÖNCÜ'ye tezin şekil düzenlemelerindeki yardımlarından ötürü,

Bilgilerini benimle paylaşan, moral kaynağım olan Hocam Doç. Dr. Meral YILMAZ'a,

PCR ve elektroforez deneyimlerini paylaşan Uzm. Biyolog Gizem ARIK'a,

Laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağladıkları için Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. Adnan ÖZCAN'a ve Biyoloji Bölümündeki Hocam Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a,

Bitkilerin toplanması ve tanımlanmasındaki emeklerinden ötürü Öğr. Grv. Dr. Onur KOYUNCU, Uzm. Biyolog Ö. Koray YAYLACI ve Öğr. Grv. Dr. İlham E. POYRAZ'a,

Cihaz teknik destek yardımları için Yard. Doç. Dr. Erol ŞENER'e,

Destekçim, çok değerli dostum Kimya Yüksek Mühendisi Özlem Yılmaz'a,

Kimya bölümündeki çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Elif Mine ÖNCÜ KAYA
Ocak-2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **x**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK BİLGİSİ **4**
2.1. Deoksiribonükleik Asit (DNA) 4
2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 7
2.2.1. PCR'nin temel bileşenleri 10
2.2.2. PCR'ın oluşum mekanizması 10
2.2.2.1 DNA zincirinin açılması 10
2.2.2.2 Primerlerin açılan DNA zincirlerine bağlanması 10
2.2.2.3 Primer uzaması 11
2.2.3. PCR'ın üstünlükleri ve eksiklikleri 12
2.2.4. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA yöntemi 13
2.3. Elektroforez 15
2.3.1. Tabaka (agaroz) jel elektroforez 15
2.3.2. Kapiler elektroforez (CE) 19
2.3.2.1 Kapiler elektroforezin üstünlükleri 22
2.4. Kapiler Elektroforezde Ayırım İlkeleri 24
2.4.1. Elektroozmotik akış (EOF) 25
2.4.2. Elektroforetik göç (EF) 29
2.5. Kapiler Elektroforez Türleri 31
2.5.1. Kapiler zon elektroforez (CZE) 32
2.5.2. Kapiler izotakoforez (CITP) 35

2.5.3. Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF) 35
2.5.4. Miselli elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC) 36
2.5.5. Kapiler elektrokromatografi (CEC) 38
2.5.6. Kapiler jel elektroforez (CGE) 39
2.5.6.1 Kovalent duvar kaplaması 41
2.5.6.2 Dinamik duvar kaplaması 45
2.6. CGE ve DNA Tayinleri 52
2.7. Botanik Bilgiler 58
2.7.1. Lamiaceae familyasının genel özellikleri 58
2.7.2. *Salvia* L. cinsinin genel özellikleri 59
2.7.3. Çalışılan *Salvia* türlerinin genel özellikleri 60
2.7.3.1 *S. bracteata* 60
2.7.3.2 *S. candidissima* 60
2.7.3.3 *S. ceratophylla* 61
2.7.3.4 *S. dichroantha* 61
2.7.3.5 *S. forskahlei*. 61
2.7.3.6 *S. fruticosa* 62
2.7.3.7 *S. sclarea* 62
2.7.3.8 *S.tomentosa* 63
2.7.3.9 *S. verticillata* 63
2.7.3.10 *S.viridis* 63
2.7.4. Sistematik analiz ve moleküler sistematik 64
2.7.5. Filogenetik ağaç 66
2.7.6. *Salvia* L. türleri üzerine yapılan moleküler çalışmalar 68

3. GEREÇ VE YÖNTEM 70
3.1. Gereç 70
3.1.1. Bitki örneklerinin toplanması 70
3.1.2. Kullanılan kimyasallar 78
3.1.2.1 Genomik DNA izolasyon kiti 80
3.1.2.2 RAPD−PCR'de kullanılan primerler ve özellikleri 79
3.1.2.3 Çalışmada kullanılan DNA standartları 79

3.1.2.4 PCR saflaştırma kiti 80
3.1.3. Kullanılan alet ve ekipmanlar 80
3.2. Yöntem 82
3.2.1. RAPD yöntemi 82
3.2.1.1 Fermentas kiti ile bitkilerden genomik DNA izolasyonu 82
3.2.1.2 DNA miktarı ve kalitesinin NanoDrop spektrofotometrik yöntem ile tayini 83
3.2.1.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyon. 83
3.2.1.4 PCR saflaştırma kiti ile saflaştırma 84
3.2.1.5 Agaroz jel elektroforez deneyleri 85
3.2.1.6 RAPD ürünlerinin analizi 86
3.2.2. CGE deneyleri 86
3.2.2.1 CGE'de kullanılan ayırma tamponu 86
3.2.2.2 Yıkama programı 87
3.2.2.3 Kapiler elektroforez cihazının koşulları 87
3.2.2.4 CGE'de kullanılan DNA standardının hazırlanması 87

4. BULGULAR VE TARTIŞMA 88

4.1. *Salvia* L. Türlerinden İzole Edilen Genomik DNA'ların Agaroz Jel ile Görüntüleri 88
4.2. Genomik DNA'ların Miktarı ve Kalitesinin NanoDrop Spektrofotometrik Yöntem ile Tayini 89
4.3. PCR Reaksiyonu için En İyi Koşulların Belirlenmesi 91
4.4. *Salvia* L. Türlerinin RAPD Profilleri ve Değerlendirmesi 91
4.5. CE Deneyleri 100
4.5.1. CE'de DNA ayırımları için yapılan ön denemeler 100
4.5.2. Hazır CEP kaplı kapiler kolon ile yapılan CGE deneyleri 104
4.5.3. Çıplak silika kolon kullanılarak DNA standardı için belirlenen en iyi CGE yöntemi 105

4.5.3.1 CGE tekrarlanabilirlik deneyleri 106
4.5.3.2 Bitki PCR ürünleri için en iyi CGE yöntem koşullarının belirlenmesi 108
4.5.3.3 PCR saflaştırma kolonunun geri kazanımı 108
4.5.3.4 Geliştirilmiş CGE yöntemi ile bitkilerde DNA tayini 110

5. SONUÇ ve ÖNERİLER **125**

KAYNAKLAR 128

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Çift iplikli DNA'nın kimyasal yapısını gösteren şematik (sağda) ve model gösterimi 5
2.2. Tipik bir PCR reaksiyonunun şematik gösterimi 9
2.3. RAPD reaksiyonunun şematik gösterimi 14
2.4. Tabaka Jel Elektroforezi çalışma prensibi 18
2.5. Kapiler elektroforez sisteminin şematik gösterimi 19
2.6. Eritilmiş silika kapiler kolonun boyuna kesiti 20
2.7. Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri a, b ve c) Hidrodinamik enjeksiyon, d) Elektrokinetik enjeksiyon 21
2.8. Kapiler içinde elektroozmotik akışın gösterimi 25
2.9. EOF'nin katyonik yüzey aktif madde eklenerek azaltılması ve tersine çevrilmesi 29
2.10. Elektroozmotik akış varlığında iyonların hızlarının şematik gösterimi 33
2.11. Kapiler zon elektroforez sisteminde iyonların çıkış sırasının şematik gösterimi 34
2.12. Kapiler izotakoforez yönteminde ayırımın şematik gösterimi 35
2.13. Kapiler izoelektrik odaklama yönteminde ayırımın şematik gösterimi 36
2.14. Anyonik ve katyonik misellerin gösterimi 37
2.15. Miselli elektrokinetik kromatografi yönteminde anyonik misel kullanılarak ayırımın şematik gösterimi 37
2.16. CEC yönteminde ayırımın şematik gösterimi 38
2.17. CGE yönteminde ayırımın şematik gösterimi 41
3.1. *S. bracteata* 73
3.2. *S. candidissima* 73
3.3. *S. ceratophylla* 74
3.4. *S. dichroantha* 74
3.5. *S. forskahlei* 75
3.6. *S. fruticosa* 75
3.7. *S. sclarea* 76
3.8. *S. tomentosa*. 76

3.9. *S. verticillata*. 77
3.10. *S. viridis* 77
3.11. a) GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder ve b) Lambda DNA/HindIII standartlarının parça profili 80
4.1. Çalışılan *Salvia* L. türlerinden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü 88
4.2. Çalışılan *Salvia* L. türlerinin genomik DNA'larından OPA−03 primeri ile elde edilen RAPD profili 93
4.3. Çalışılan *Salvia* L. türlerinin genomik DNA'larından OPA−04 primeri ile elde edilen RAPD profili 93
4.4. Çalışılan *Salvia* L. türlerinin genomik DNA'larından OPA−05 primeri ile elde edilen RAPD profili 94
4.5. Çalışılan *Salvia* L. türlerinin genomik DNA'larından OPA−15 primeri ile elde edilen RAPD profili 94
4.6. Çalışılan *Salvia* L. türlerine ait RAPD verilerinin genetik akrabalığını gösteren kümeleme analizi 99
4.7. 89 mM Tris, 332 mM borat, 2 mM EDTA, % 1,5 (k/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyon ve −11 kV ayırma gerilim koşullarındaki CEP−coated kapiler kolonunda a) DNA standardının ve b) *S. fruticosa* türünün OPA−4 primeri kullanılarak çoğaltılmış olan PCR ürününün enjeksiyonuna ait elektroferogram 105
4.8. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyon ve −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda DNA standardının enjeksiyonuna ait elektroferogram 106
4.9. Bazı *Salvia* L. türlerinin genomik DNA'larından OPA−05 primeri ile elde edilen RAPD profilleri 111
4.10. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, ve −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. tomentosa* türünün OPA−05 primeri

ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram 112
4.11. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. candidissima* türünün OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram 112
4.12. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. sclarea* türünün OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram 113
4.13. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. ceratophylla* türünün OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram 113
4.14. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. viridis* türünün OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram 114
4.15. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. bracteata* türünün OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram 114

4.16. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. verticillata* türünün OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram 115
4.17. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. forskahlei* türünün OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram 115
4.18. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. fruticosa* türünün OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram 116
4.19. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. dichroantha* türünün OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram 116
4.20. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, ve −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardının −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. tomentosa* c) *S. candidissima* d) *S. sclarea* e) *S. ceratophylla* f) *S. viridis* g) *S. bracteata* h) *S. verticillata* i) *Salvia forskahlei* L. j) *S. fruticosa* k) *S. dichroantha* türlerinin OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürünlerinin −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonlarına ait üst üste alınmış elektroferogramları 117

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. DNA ayırımları için agaroz derişimleri 17
2.2. Tabaka jel elektroforez, μ−LC, HPLC ve CE yöntemlerinin karşılaştırılması 24
2.3. Kapiler elektroforez türlerinin sınıflandırılması, yaygın kullanılan kısaltmaları ve ayırım esası 32
2.4. CGE'de kullanılan jel maddelerinin özellikleri 40
2.5. Çıplak silika kolonun etkisizleştirilmesi için kullanılan kaplamalar ve özellikleri 43
2.6. CGE ile DNA ayırımlarında kullanılan bazı polimerlerin, özellikleri, çözeltideki derişimleri ve deneylerde kullanılan tampon çözelti ortamları 53
3.1. Eskişehir çevresinden toplanan *Salvia* L. türlerinin lokaliteleri ve herbaryum numaraları 71
3.2. RAPD−PCR reaksiyonlarında test edilen primerler, nükleotit dizileri ve diğer özellikleri 79
3.3. Kullanılan PCR programı 84
4.1. Çalışmalarda kullanılan *Salvia* L. bitki örneklerine verilen numaralar 89
4.2. Çalışılan *Salvia* L. türlerinden izole edilen genomik DNA'ların NanoDrop spektrofotometrik yöntemi ile belirlenen miktarları ve saflıkları 90
4.3. OPA−03 primeri ile yapılan RAPD analizinin bant sayım sonuçları 95
4.4. OPA−04 primeri ile yapılan RAPD analizinin bant sayım sonuçları 96
4.5. OPA−05 primeri ile yapılan RAPD analizinin bant sayım sonuçları 97
4.6. OPA−15 primeri ile yapılan RAPD analizinin bant sayım 98
4.7. Çalışılan *Salvia* L. türleri çiftleri arasındaki Jaccard's uzaklık değerleri .. 100
4.8. DNA standardındaki her bir baz çiftine ait farklı günlerdeki tekrarlanabilirlikleri 107
4.9. CGE yöntemi ile DNA standardındaki her bir baz çifti için hesaplanan PCR saflaştırma kolonunun ortalama % geri kazanım değerleri 109

4.10. PCR saflaştırma kiti içerisindeki kitapçıkta verilen farklı büyüklükteki DNA parçaları için % geri kazanım değerleri 110
4.11. OPA−05 primeri ile yapılan RAPD analizinin CGE'den elde edilen pik sayım sonuçları 119

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cP : Santipoiz

T_a : Bağlanma sıcaklığı, ^oC

T_m : Erime sıcaklığı, ^oC

Kısaltmalar

A : Adenin

AFLP : Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi

bç : Baz çifti

C : Sitozin

CAPs : Kesilmiş amplifiye polimorfik dizi

CE : Kapiler elektroforez

CEC : Kapiler elektrokromatografi

CGE : Kapiler jel elektroforez

CIEF : Kapiler izoelektrik odaklama

CITP : Kapiler izotakoforez

CTAB : Setiltrimetilamonyum bromür

CZE : Kapiler zon elektroforez

DAD : Diyot dizisi dedektörü

DAMD : Yönlendirilmiş minisatellitli DNA çoğaltımı

DDDMA : Didodesildimetilamonyum bromür

DGGE : Denatüre gradient jel elektroforezi

DMA : N,N−dimetilakrilamit

DNA : Deoksiribonükleik asit

dNTP : Deoksiribonükleotit trifosfat

EF : Elektroforetik göç

EST : Yaygın dizilim etiketi, DNA'nın kısmi dizilişinin patenti

EOF : Elektroozmotik akış

G : Guanin

HEC : Hidroksietil selüloz
HPC : Hidroksipropil selüloz
HPLC : Yüksek performans sıvı kromatografisi
HRM : Yüksek çözünürlüklü erime noktası analizi
HPMC : Hidroksipropilmetil selüloz
ISSR : Basit dizi tekrarları arası
kb : Kilobaz
LIF : Lazer kaynaklı floresans
LPA : Lineer poliakrilamit
MC : Metil selüloz
MEKC : Miselli elektrokinetik kapiler kromatografi
PA : Poli(arjinin)
PB : Polibren
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
PDMA : Poli(N,N−dimetilakrilamit)
PDMAC : Poli(dimetildiallilamonyum klorür)
PEG : Poli(etilen glikol)
PEI : Poli(etilenimin)
PEO : Poli(etilen oksit)
PHEA : Poli−*N*−hidroksietilakrilamit
PNIPAM : Poly(N−isopropilakrilamit)
PVA : Poli(vinil alkol)
PVP : Poli(vinilpirolidon)
RAPD : Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RFLP : Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RNA : Ribonükleik asit
SCARs : Amplifiye edilmiş karakterize dizi bölgesi
SDS : Sodyum dodesil sülfat
SDS−PAGE : Sodyum dodesil sülfat−poliakrilamit jel elektroforezi
SSCP : Tek zincir konformasyonel polimorfizm
SSR : Basit dizi tekrarları
SNP : Tek nükleotit polimorfizmi

T	: Timin
Taq	: Thermus aquaticus
TEMED	: N,N,N´,N´−tetrametiletilendiamin
TTAB	: Tetradesiltrimetilamonyum bromür
UV	: Ultraviyole ışık
µ−LC	: Mikro sıvı kromatografisi

1. GİRİŞ

Tüm canlılar hücrelerden oluşur. Hücreyi oluşturan temel organik moleküller, küçük moleküller ve makromoleküller olmak üzere başlıca iki kümede toplanabilir. Küçük moleküller basit şekerler, yağ asitleri, aminoasitler ve nükleotitlerdir. Bu moleküller hücrenin temel kimyasal yapı taşlarının sentezinde ve enerji eldesinde kullanılırlar. Makromoleküller ise hücrelerdeki bütün biyolojik olayları yöneten, genetik bilgileri taşıyarak bunların nesillere aktarılmasında önemli işlevleri bulunan ve küçük moleküllerin birbirlerine bağlanarak yinelenmesiyle oluşan zincir biçimindeki yapısal işlevli polimerlerdir. Makromoleküller; protein, nükleik asit (DNA ve RNA), yağ ve polisakkaritlerden oluşurlar. Canlılık olaylarının karmaşıklığı makromoleküllerin molekül ağırlıklarının 10.000−1.000.000 Da arasında olmasındandır. Makromoleküller arasında özellikle nükleik asitler (DNA ve RNA) ve proteinler hücrenin dolayısıyla canlının yapısal oluşumu ve canlılık işlevleri açısından çok önemlidir (Watson ve Crick 1953; White ve ark. 1978).

Yeni yüzyılda insan hayatının geleceğini belirleyecek başlıca alanların arasında moleküler biyoloji, genetik ve biyoteknoloji yer almaktadır. İnsan genom projesinin ön görülen zamandan önce tamamlanması, 3 milyar civarında birbirinden farklı nükleotit dizisinin tanımlanması, moleküler tanı uygulamalarının hızla gelişmesine neden olmuştur (Anonim, 2012a). Bu nedenle günümüzde DNA analizleri son derece önemlidir.

DNA kalitesi ve/veya miktar tayinleri genellikle spektrofotometri (Huang ve ark., 2001a), sıvı kromatografisi (Sahin ve ark., 2007), agaroz jel elektroforezi (Stellwagen ve Stellwagen, 2009), kapiler elektroforez (Righetti ve Gelfi 1999; Salmanowicz 2000; Mitchelson ve Cheng 2001a; Mitchelson ve Cheng 2001b; Minunnia ve ark. 2005; Piergiovanni ve Taranto 2005; Sang ve Ren 2006; Liu ve ark. 2007; Sahin ve ark. 2007; Schmitt−Kopplin 2008), mikroçip elektroforezi (Xu ve ark. 2002; Zhang ve ark. 2006), LC−MS (Liu ve ark., 2009) ve elektrokimyasal (Wang ve ark. 1997; Li ve ark. 2009; Jang ve ark. 2011) yöntemlerle yapılmaktadır.

Bu yöntemler arasından agaroz jel elektroforez yöntemi en yaygın kullanılan yöntem olmasına rağmen, bu tip elektroforetik ayırma yavaş, otomasyonu zor ve kesin kantitatif bilgi vermemektedir (Skoog ve ark. 1998; Stellwagen ve Stellwagen 2009).

Kapiler elektroforez (CE) yöntemi yüksek ayırma gücü, hız, on−line teşhis, az miktarda örnek ve tampona ihtiyaç duyulması gibi önemli üstünlükleri nedeniyle son yıllarda biyomoleküllerin ayırım ve analizinde, ilaçlarda, kozmetiklerde ve gıdalarda uygulama alanı bulmuştur (Shintani ve Polonsky 1997; Brandolini ve ark. 1998; Amini 2001; García−Cañas ve ark. 2004; Dolnik 2005 ve Stellwagen ve Stellwagen 2009).

Son yıllarda biyoloji alanındaki teknolojik ilerlemeler sayesinde, insan ve hayvanlarda olduğu gibi, bitkilerle ilgili olarak moleküler biyoloji yöntemlerinin de kullanıldığı çok sayıda araştırma bulunmaktadır (Salmanowicz 2000; Bleuyard ve ark. 2006; Cenkci ve ark. 2010). Benzer veya değişik birçok yöntem, çeşitli bitkiler üzerinde de denenmekte ve her gün yeni gelişmeler elde edilmekte olup (Dilsiz, 2004), özellikle tıbbi veya endemik bitkilerle ilgili çalışmalar dikkat çekmektedir. Bu yüzden bu tez çalışmasında da halk arasında hem çay hem de tedavi edici özellikleri nedeniyle yoğun olarak kullanılan Lamiaceae familyasına ait bazı *Salvia* türleri seçilmiştir. Ayrıca yapılan kaynak taramalarına göre bu türlerin CE ile DNA tayin çalışmalarına rastlanılmamıştır. DNA tayinleri için öncelikle Eskişehir çevresinde doğal olarak yetişen 10 farklı *Salvia* (Lamiaceae) türünün yaprakları uygun zamanlarda toplanmış ve sonrasında yapraklardan genomik DNA'lar izole edilmiştir. Bu DNA'ların saflık ve miktarları belirlendikten sonra rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA yöntemi (RAPD−PCR) ile 4 farklı (OPA−03, OPA−04, OPA−05 ve OPA−15) primer kullanılarak her bir bitki türüne ait PCR ürünleri çoğaltılmıştır. Bu ürünler agaroz jel elektroforezinde görüntülendikten sonra elde edilen bantlar yardımı ile dendogram (filogenetik ağaç) çıkarılmış ve türler arasında var olan taksonomik ilişki belirlenmiştir. Aynı zamanda DNA standardı için %4,5 (ağırlık/hacimce; a/h)'lik lineer bağlı hidroksietil selüloz (HEC) içeren ayırma tamponu ile dinamik kaplama yapılan kapiler jel elektroforez (CGE) yöntemi geliştirilmiştir. Daha sonra geliştirilmiş olan bu CGE yöntemi ile *Salvia* L. türlerinin OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan

DNA'larının, PCR saflaştırma kiti ile saflaştırıldıktan sonra tayinleri yapılarak çalışılan türler arasındaki farklılıklar/benzerlikler belirlenmeye çalışılmıştır. Buradan alınan sonuçlar agaroz jel elektroforezinden elde edilen sonuçlarla doğrulanmaya çalışılmıştır.

Bitki DNA'larının kapiler elektroforez yöntemi ile tayinleri konusunda değişik uygulamalar içeren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak bitkilerle ilgili bu tezde yapıldığı gibi bitki türleri arasındaki bağlantıyı bulmaya yönelik DNA'larla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Günümüzde botanikçiler ve taksonomistlerin kullandığı bitki tayin yöntemleri cinslerden türlere, hatta alttür ve varyetelere doğru inildikçe oldukça zorlaşmaktadır. Bu nedenle, şimdiye kadar kapiler elektroforez yöntemiyle gerçekleştirilmemiş bu tür bir çalışmanın kemotaksonomik açıdan önemli bir boşluğu dolduracağı söylenebilir. Günümüzde moleküler biyoloji çalışmalarının öneminin giderek arttığı düşünülürse kapiler elektroforez yöntemi ile yapılan bu çalışmanın daha pek çok başka çalışmaya da ışık tutacağı düşünülmektedir. Tüm bunların yanı sıra bu tez çalışmasında kullanılan CE yönteminin, DNA ayırımları için biyologların yıllardır başvurduğu bir yöntem olan agaroz jel elektroforezine göre daha hassas bir yöntem olduğu ve agaroz jel elektroforezinde miktarı az olduğu için görüntülenemeyen bazı bantların belirlenebilmesinde bu yöntemin daha iyi sonuç verdiği gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında CE yönteminin DNA tayinlerine yönelik farklı ve özgün bir uygulaması gösterilmiş olmaktadır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

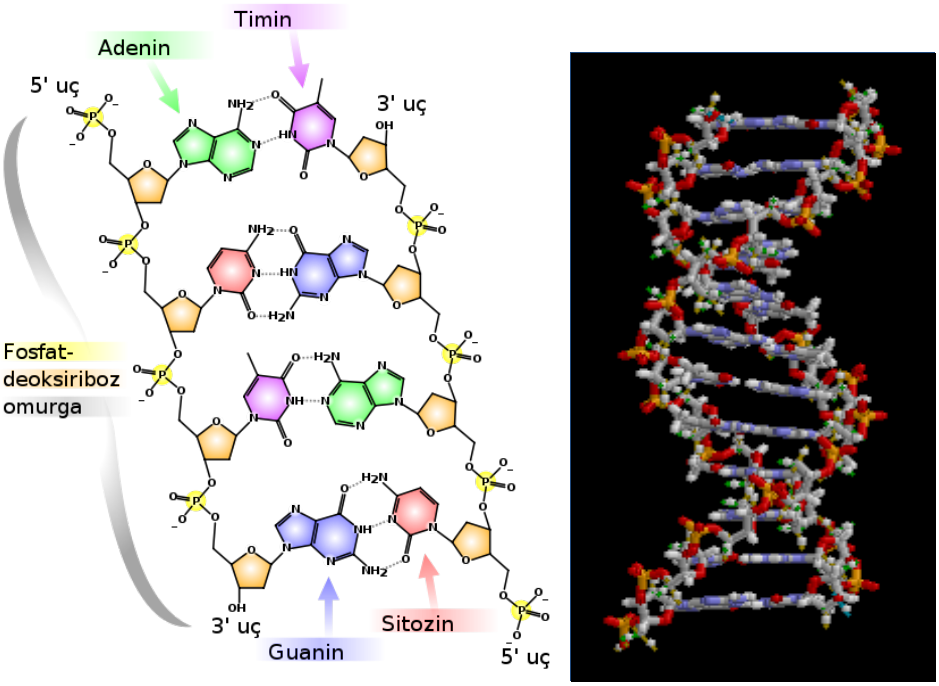
2.1. Deoksiribonükleik Asit (DNA)

Hücrelerdeki bütün biyolojik olayları yöneten, genetik bilgileri taşıyarak bunların nesillere aktarılmasında önemli işlevleri bulunan nükleik asitler, hücrelerde bir merkezi yönetici görevine sahiptir. Genetik bilgiyi taşıyan bu yapılar, ilk olarak hücre çekirdeğinden izole edilmiş olduğundan dolayı nükleik asitler olarak isimlendirilmişlerdir. Ancak, daha sonraki çalışmalarda mitokondri ve kloroplastlarda da nükleik asitlerin varlığı saptanmıştır. Bu makromoleküller, Deoksiribonükleik Asit (DNA) ve Ribonükleik Asit (RNA) olmak üzere başlıca iki karakter taşımaktadır (White ve ark., 1978).

Nükleik asitler, ilk kez İsviçre'li bir bilim adamı olan Friederic Mischer tarafından, 1869 yılında tanımlanmıştır. İrin içindeki akyuvarlarda proteinlerden ayrı olarak asit karakterde kimi maddelerin varlığını saptayan araştırıcı bunlara nüklein adını vermiştir. Çalışmalarını daha sonra, *salmon* spermlerinin çekirdeği üzerinde yoğunlaştıran Mischer'in araştırmaları 1874 yılında duyulmuştur. Benzer konularda incelemelerini sürdüren diğer bir bilim adamı Richard Altman (1889), asit karakterleri nedeniyle nükleinleri "nükleik asit" olarak adlandırmıştır. Daha sonra Alman kimyacı olan Robert Fuelgen (1920), nükleik asitleri, kendi adı ile anılan özel bir boyama yöntemi (feulgen) ile boyamayı başarmış, aynı dönemde Rockefeller Enstitüsü'nde Phoebus Levine, nükleik asitlerin yapısında 5 karbonlu bir şeker olan pentozun bulunduğunu ortaya koymuştur. 1940'lı yılların sonunda Erwin Chargaff ve arkadaşları farklı organizmalardan elde ettikleri DNA'ların nükleotit bazlarının oranlarını inceleyerek DNA'nın yapısı ile ilgili ayrıntılı bilgi vermiştir. DNA yapısını aydınlatmak için, 1950 yılında Rosalind Franklin ve Maurice Wilkins DNA kristallerini incelerken, güçlü bir yöntem olan X─ışınları kırınımı yöntemini kullanarak molekülün çift sarmal yapısı hakkında önemli ipuçları elde etmişlerdir. Bu çalışmalardan sonra biyolog James Watson ve fizik mühendisi Francis Crick (1953), DNA materyalinin çift sarmallı bir yapıya sahip olduğunu ortaya koymuş ve yapılan araştırmalar sonunda, nükleik asitlerin

yapısına ilişkin çok değerli bilgiler elde edilmiştir (Dilsiz 2004; Güler 2006; Yıldırım ve ark. 2007).

DNA molekülü, iki uzun DNA ipliğin bir eksen üzerinde birbirleri etrafına sarılarak çift sarmal yapı meydana getirmesi ile oluşan moleküldür. DNA molekülünü oluşturan her bir iplik nükleotit birimlerinin peş peşe dizilmesi ile meydana gelmektedir (Watson ve Crick, 1953). Bir nükleotit, heterosiklik halka yapısı gösteren beş karbonlu bir şeker (pentoz), heterosiklik C ve N atomları içeren organik bir baz (pürin veya pirimidin) ve bir fosfat grubundan oluşur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Çift iplikli DNA'nın kimyasal yapısını gösteren şematik (sağda) ve model gösterimi (Anonim, 2012b)

DNA'nın yapısındaki şeker deoksiriboz olarak adlandırılır. DNA'da bulunan pürin bazları adenin (A) ve guanin (G), pirimidin bazları ise sitozin (C) ve timin (T) olarak tanımlanır. Nükleotit yapısında, bir glikozidik bağla birbirine bağlanmış baz ve şeker kısmına nükleozid adı verilir. Birden çok nükleotitin birbirine bağlı haline ise polinükleotit denir. Nükleotitler birbirlerine bir nükleotitin pentozunun 5' (beş üssü) pozisyonundaki fosfat (PO_4^{-3}) grubu ile onu

izleyen nükleotitin pentozunun 3' pozisyonundaki hidroksil (OH^-) grubu arasında kovalent fosfodiester bağı ile bağlanır. Canlıların büyük çoğunluğunda çift zincirli olan DNA molekülü iki polinükleotit zincir bazları arasında oluşan hidrojen bağları ile bir arada bulunur. Bazlar arasında H bağları oluşumunun özgünlüğü, iki polinükleotit zincirdeki fosfodiester bağlarının birbirine göre ters yönde olmasına yol açar. Bu nedenle iki zincir birbirine zıt yönde paraleldir (3'→5'). DNA ipliklerin asimetrik olan uçları 5' ve 3' olarak adlandırılır, 5' uç bir fosfat grubu, 3' uç ise bir hidroksil grubu taşır (Watson ve Crick 1953; Berg ve ark. 2002; Temizkan ve Arda 2008).

En basit hücre bile karmaşık bir yapıya sahiptir ve binlerce farklı çeşitteki molekülden oluşur. Bu nedenle, genetik materyalle yapılacak çeşitli çalışmalarda öncelikle yüksek molekül ağırlıklı DNA molekülünün saf bir şekilde elde edilmesi gerekmektedir. DNA izolasyon yöntemlerinde birbirini izleyen 3 temel aşama bulunmaktadır (Temizkan ve Arda, 2008).

- Hücrenin parçalanması ile yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın açığa çıkarılması,
- Denatürasyon veya proteoliz ile DNA−protein kompleksinin ayrılması ve DNA'nın çözünür duruma getirilmesi,
- DNA'nın basit enzimatik ve/veya kimyasal yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makromoleküllerden ayrılması (saflaştırma).

Pek çok bitki türünde başarıyla uygulanan değişik DNA izolasyon yöntemleri bulunmaktadır (Dellaporta ve ark. 1983; Doyle ve Doyle 1987; Bokszczanin ve Prazybyla 2006; Krizman ve ark. 2006; Sarwat ve ark. 2006). Bu DNA izolasyon yöntemleri ile bitkilerden az miktarda fakat yüzlerce polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için yeterli genomik DNA elde etmek olasıdır (Bertea ve ark., 2006). DNA izolasyonu yaprak ve kök gibi taze bitki dokularından, sıvı azotta dondurulmuş ve derin dondurucuda (−20^{o}C) saklanmış dokulardan, silika jelde kurutulmuş ya da NaCl/Setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) çözeltisinde saklanmış dokulardan yapılabilmektedir (Storchova ve ark., 2000). Bununla

birlikte en uygun olan yöntem taze bitki dokularından DNA izolasyonu yapmaktır.

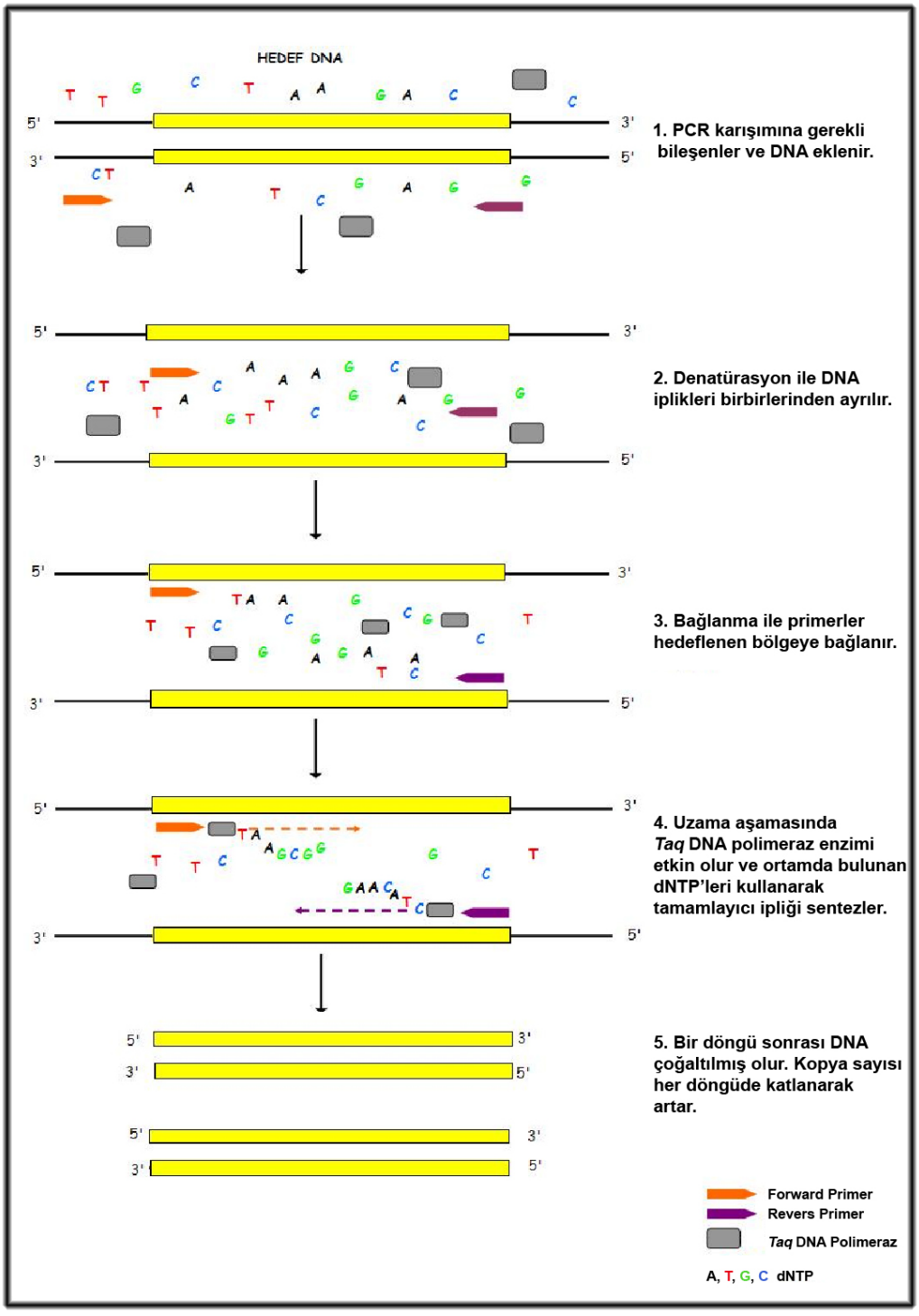
2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Yüzyılın en önemli buluşlarından olan "*Polimeraz Zincir Reaksiyonu*" (Polymerase Chain Reaction, PCR) ilk kez 1985 yılında kullanılmaya başlanmıştır (Saiki ve ark., 1985). Moleküler biyoloji alanında oldukça fazla kullanılan bu in vitro yöntem, belirli bir DNA bölgesinin kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Bu yöntem sayesinde çok az miktardaki bir DNA'yı çabuk ve basit bir şekilde çoğaltmak olasıdır. Temel olarak bu yöntem, PCR karışımına Bölüm 2.2.1'de anlatılan bileşenler ve hedef DNA eklendikten sonra DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), daha sonra sentetik oligonükleotitler olan primerlerin hedef DNA'ya bağlanması ve 72^{o}C'da *Tag* DNA polimeraz enziminin etkinleşmesi ile ortamda bulunan dNTP'leri kullanarak zincirin uzamasından oluşan döngünün belirli bir sayıda tekrarlanmasına dayanır (Şekil 2.2). Böylece DNA çoğaltılmış olur. DNA'nın çoğaltılması ısıl−döngü adı verilen özel bir PCR aleti kullanılarak gerçekleştirilir. Bu cihaz, PCR örneğinin programlanan sıcaklık ve sürelerde tutulmasını sağlamaktadır (Mullis ve ark. 1986; Mullis ve Faloona 1987; Yıldırım ve ark. 2011).

Günümüzde PCR'ın genel kullanım amaçlarından bazıları aşağıda verilmektedir.

- Hedef DNA'nın çoğaltılması,
- DNA'daki mutasyonların belirlenmesi,
- Dizi analizi için DNA'nın çoğaltılması,
- Genetik mühendisliği amaçları doğrultusunda rekombinant organizmalar elde edilmesinde gen aktarımı için kullanılması,
- Laboratuvar şartlarında kontrollü mutasyon oluşturulması,
- Moleküler marker olarak kullanılması (RAPD, AFLP, SSR ve ISSR yöntemleri gibi)

- Allelik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku nakli için doku tipinin belirlenmesi,
- Adli tıpta, zan altında bulunan kişinin doğrulanmasında ve analık−babalık tayini,
- Tarımda tohum saflığının belirlenmesi,
- Mikrobiyolojik teşhislerde, genetik kaynaklı hemofili, kistik fibrosis, kanser gibi hastalıkların tespitinde ve iyileştirilmesinde (Erlich ve ark. 1991; Dilsiz 2004; Viljoen ve ark. 2005, Temizkan ve Arda 2008).



Şekil 2.2. Tipik bir PCR reaksiyonunun şematik gösterimi (Anonim, 2012c)

2.2.1. PCR'nin temel bileşenleri

Reaksiyon karışımında kullanılan temel bileşenler kalıp DNA, primerler, dört çeşit dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), DNA polimeraz enzimi, tampon çözelti ve magnezyumdan ($MgCl_2$ veya $MgSO_4$) oluşmaktadır. Kullanılan bu temel bileşenlerin miktarı ve kalitesi reaksiyon sonucunu önemli ölçüde etkilemektedir. Temel bileşenlerin yanı sıra kullanılan PCR aleti ve primer hatta mikrosantrifüj tüpünün de sonucu etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle kullanılan bileşenlerin miktarı deneylerle optimize edilerek en uygun koşul belirlenmelidir. Optimizasyon yapılmadığı durumda özgül olmayan amplifikasyon, PCR ürününün zayıf olması, daha önce gerçekleşen reaksiyonun oluşmaması ve beklenmedik ürünlerin elde edilmesi gibi sorunlar ortaya çıkabilir. Herhangi bir bileşenin fazla ya da eksik eklenmesi yanıltıcı sonuçların elde edilmesine neden olabilir (Erlich ve ark. 1991; Yıldırım ve ark. 2011).

2.2.2. PCR'ın oluşum mekanizması

2.2.2.1 DNA zincirinin açılması

Kalıp DNA'nın 92−95^{o}C'da 1−2 dk tutulmasıyla çift sarmal yapıdaki DNA iplikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda sarmalları bir arada tutan hidrojen bağlarının ayrılması ile DNA denatüre olur. DNA zincirini ayırmak için bazı durumlarda 5−10 dk ön ısıtma yapmak gerekebilir (Kumar 1989; Watson ve ark. 1992; Hadidi ve ark. 1995).

2.2.2.2 Primerlerin açılan DNA zincirlerine bağlanması

Reaksiyon sıcaklığının 37−65^{o}C'a düşürülerek oligonükleotit primerlerin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye bağlanması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30−60 saniyede gerçekleşmektedir. Bağlanma sıcaklığı (T_a) için primer %GC içeriğinden yola çıkılarak hesaplama yapılmaktadır. Primerlerin bağlanması aşamasında erime

sıcaklığı (T_m)'nın, T_a'ya oranının saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından büyük öneme sahiptir. Primerlerin T_m değerinin hesaplanması için kullanılan çeşitli denklemler arasında en yaygın olanı aşağıda verilmiştir (Denklem 2.1).

$$T_m = 2(A+T\ sayısı) + 4(G+C\ sayısı) \quad (2.1)$$

Çoğu zaman bu denklem ile hesaplanan T_m değerinin 3−5^oC altındaki sıcaklıklar bağlanma sıcaklığı olarak seçilir ve daha sonra en uygun sıcaklık değeri denenerek saptanır. Denklem (2.1) boyu en fazla 20 nükleotit olan primerler için geçerlidir. 20 nükleotitden daha uzun olanlar için geliştirilmiş farklı denklemler kullanılır.

RAPD reaksiyonlarında 10 nükleotitten oluşan rastgele primerler kullanıldığından bağlanma sıcaklığı için genellikle 37^oC kullanılır. Primerin bağlanma sıcaklığının doğru belirlenmesi başarılı bir PCR gerçekleşebilmesi açısından büyük öneme sahiptir (Kumar 1989; Innis ve Gelfand 1990; Temizkan ve Arda 2008).

2.2.2.3 Primer uzaması

DNA zincirleri üzerine bağlanan primerlerin DNA polimeraz enzimi (*Taq* DNA) aracılığı ile uzatılmasıdır. Primerlerin uzaması aşamasında tamamlayıcı diziyle birleşen primer hibritleştiği sarmalın karşılığını sentezler. *Taq* DNA polimeraz enzimi 72^oC sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır (Erlich ve ark., 1991). Uzama aşaması için çoğunlukla 2 dk yeterlidir ancak uzun bir DNA parçası PCR ile çoğaltılacaksa süre arttırılmalıdır. PCR ürünü olan tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanmasını garanti altına almak amacıyla son döngünün uzama süresi genellikle uzun (10−15 dk) tutulur.

3 basamaktan oluşan işlem, bir PCR döngüsünü temsil eder. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa yinelenerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılır. PCR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz

veya poliakrilamit jellerde yürütüldükten sonra, etidyum bromür (EtBr) veya gümüş nitrat ile boyanarak gözlenmektedir (Kumar 1989; Hadidi ve ark. 1995).

2.2.3. PCR'ın üstünlükleri ve eksiklikleri

PCR yönteminin en önemli üstünlüğü çok küçük miktarda DNA veya RNA'nın, belirli bir bölgesinin kısa süre içerisinde, milyarlarca defa çoğaltılabilmesidir. Bu yöntem, aynı zamanda çok hassas, kendine has ve güvenilirdir. Elde edilen ürünlerdeki hata payı diğer yöntemlerle (örneğin serolojik yöntemler) karşılaştırıldığında daha düşüktür.

Diğer biyokimyasal işlemlerde olduğu gibi PCR yöntemi ile DNA çoğaltılmasında da istenmeyen hatalar oluşabilmektedir. Hatalı bir nükleotitin DNA zincirine yerleşmesi mutasyona sebep olmaktadır. Bu tip hata oranı genelde milyarda bir olarak ortaya çıkmaktadır. Reaksiyon sırasında hatalı nükleotit bağlanma oranı ise $3x10^{-4}$–$3x10^{-6}$ arasında değişmektedir. Buna karşılık son zamanlarda hatalı nükleotit bağlanma oranı $2x10^{-7}$ olan *Pfu* DNA polimeraz enzimi kullanılmaya başlanmıştır. Bir reaksiyon ile yaklaşık 10 kb uzunluğuna kadar olan DNA bölgelerinin amplifikasyonu yapılabilir ancak ideal olanı 0,1−1,0 kb'a kadar olan DNA bölgeleridir. Ayrıca amplifikasyonun verim oranı hedef DNA'nın saf olarak elde edilmiş olmasına bağlıdır.

PCR yöntemi için başlangıçta pahalı laboratuvar donanımlarına ihtiyaç olması, çok iyi eğitilmiş eleman gerekliliği, kullanılan sarf malzemelerin pahalılığı ve zaman zaman kontaminasyonlar veya diğer faktörlerden dolayı hatalı sonuçlar alınabilmesi yöntemin en önemli olumsuzluklarıdır (Dilsiz 2004; Yılmaz ve Devran 2004).

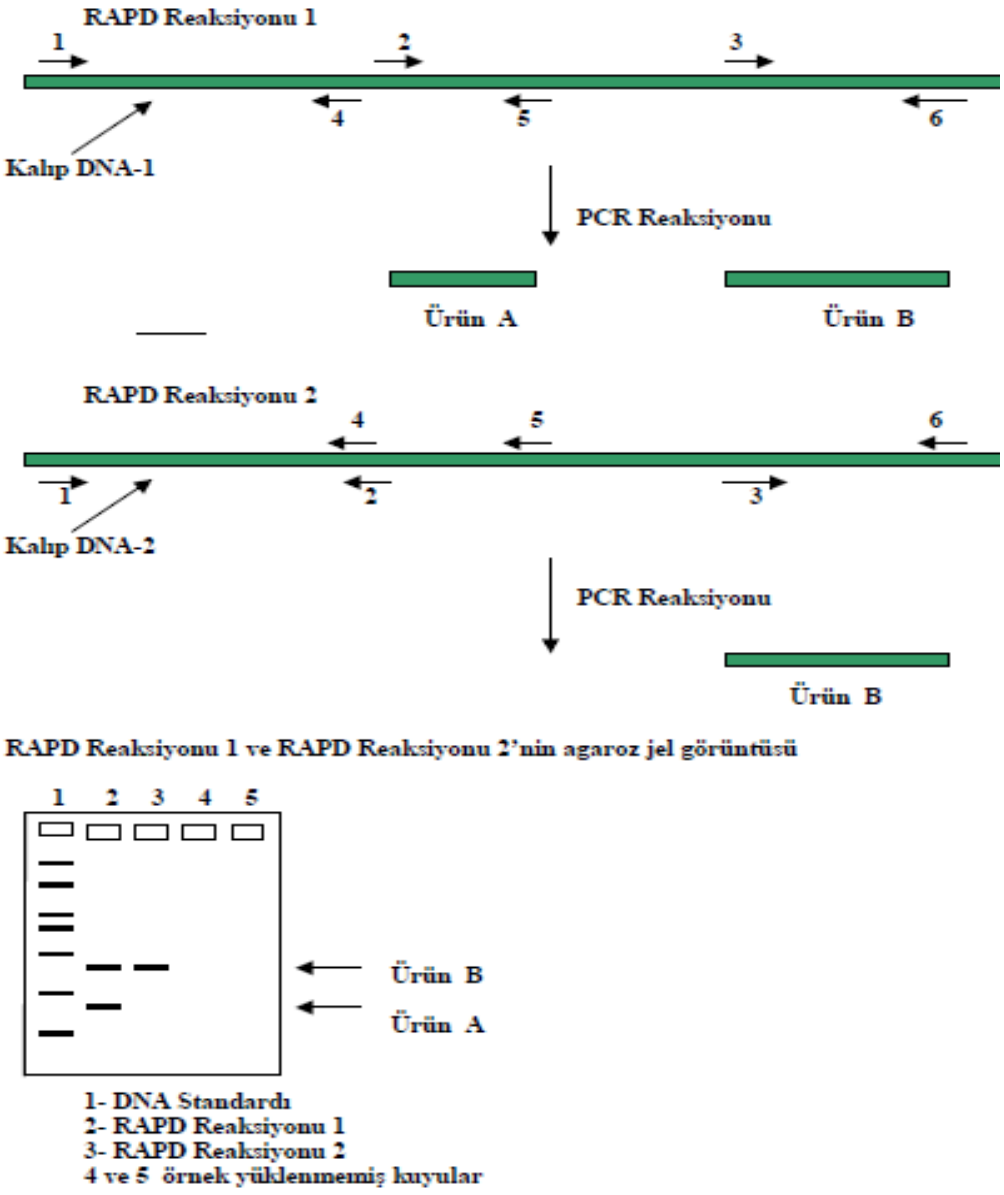
PCR yönteminin bulunmasından bu yana teknolojide çok hızlı gelişmeler olmuş ve buna bağlı olarak da çeşitli amaçlar için çok farklı PCR yöntemleri geliştirilmiştir.

2.2.4. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA yöntemi (random amplified polymorphic DNA; RAPD−PCR)

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) yöntemi ilk defa 1990 yılında rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve PCR'ı temel alan bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır (Williams ve ark., 1990).

Bu yöntem, nükleotit dizi bilgisine sahip olmaksızın polimorfizmin belirlenmesini sağlar. RAPD'nin temeli yaklaşık 10 nükleotitlik ve nükleotit dizilimi rastgele seçilmiş tek çeşit primerlerin kullanımına dayanır. Bu primerler tasarlanırken primerlerin GC/AT oranlarının %50 ya da daha büyük olmasına özen gösterilir. RAPD yönteminde çoğaltma, kullanılan primerin uzunluğuna ve primer dizisindeki tek bir nükleotitin yerine duyarlıdır. Bu primerlerin çoğaltılacak DNA'da kendine uygun bölgelere bağlanabilmelerini kolaylaştırmak için primer bağlanma sıcaklığının düşürülmesi de önemlidir. Bakterilerden insana kadar çoğu organizmanın genomu 10 nükleotitlik kısa rastgele primerler için yeteri kadar birbirine ters konumlu bağlanma yeri taşırlar. Böylece primerlerin birbirlerine birkaç bin baz çifti uzaklıkta farklı yerlere, birbirlerine ters konumlu şekilde bağlanmalarıyla primer bağlanma bölgeleri arasındaki kısımlar çoğaltılır. Farklı bireylerde nükleotit dizilimi de değişik olduğundan, bireylerden birinde bir primer bağlanma yerinin kaybı ya da değişmesi çoğalan PCR ürünleri arasında özgül bant/bantların kaybolmasına yol açar. RAPD−PCR yöntemiyle elde edilen ve agaroz jelde elektrik akımı altında saptanan görüntüye RAPD profili adı verilir. PCR ile elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi ile analiz sonucu EtBr ile boyandıktan sonra oluşan bantların görüntülerinin benzerlik dereceleri belirlenerek polimorfizm hakkında fikir edinilebilir. DNA parmak izi olarak da adlandırılan bu yöntem tıpta adli olayların incelenmesinde, kalıtsal hastalıklarla enfeksiyon hastalıklarının tanısında, tarımda tohum saflığının ve seçilmiş genotiplerin belirlenmesinde, tür tanısında, yine benzer amaçlar için hayvancılıkta, evrim ve arkeoloji gibi çeşitli temel ve uygulamalı çalışma alanlarında her geçen gün artan şekilde kullanılmaktadır (Williams ve ark. 1990;

Öz Aydın 2004; Temizkan ve Arda 2008). Şekil 2.3'de RAPD yöntemi şematik olarak verilmektedir.



Şekil 2.3. RAPD reaksiyonunun şematik gösterimi (Öz Aydın, 2004)

Şekil 2.3'de görüldüğü gibi RAPD−1 ve RAPD−2 reaksiyonlarında bir tane primer ve iki tane farklı kalıp DNA kullanılmıştır. Oklar reaksiyona katılmış olan aynı diziye sahip primerin kopyaları olup okların yönü DNA sentez yönünü

göstermektedir. RAPD−1 reaksiyonundan A ve B ürünleri elde edilirken RAPD−2 reaksiyonu ile B elde edilmiştir.

RAPD−PCR yönteminde çalışılan bitkilere özgü olarak $MgCl_2$, dNTP ve *Taq* DNA polimeraz bileşenlerinin en uygun olan derişimlerinin belirlenmesi reaksiyonun tekrarlanabilirliği açısından gereklidir (Öz Aydın, 2004).

2.3. Elektroforez

Elektroforez, yüklü parçacık veya moleküllerin sıvı iletken bir ortamda elektrik alan etkisiyle hareket etmeleridir.

Elektroforez ile ayırma, ince bir tüp içindeki veya düz gözenekli bir destek ortamındaki (örneğin, kağıt veya katı jel) sulu bir tampon çözeltiye analiz edilecek örneğin küçük bir bant halinde uygulanması ile gerçekleştirilmektedir. Tampon çözeltiye, her iki ucundaki elektrotlar aracılığı ile yüksek bir doğru akım gerilimi uygulanır. Uygulanan bu gerilim, örnekteki iyonların elektrotlardan birine veya diğerine göç etmesini sağlar. Örnekteki çeşitli analitlerin ayrılması göç hızlarına ve taneciklerin yük/boyut oranlarındaki farka bağlıdır. Bu oranın büyük olması, elektrik alanda ilgili iyonun daha hızlı hareket etmesini sağlar (Skoog ve ark., 1998).

Elektroforez iki şekilde gerçekleştirilir;

- Tabaka (agaroz) jel elektroforez
- Kapiler elektroforez (CE)

2.3.1. Tabaka (agaroz) jel elektroforez

Yıllarca karmaşık, yüksek molekül ağırlıklı biyolojik ve biyokimyasal moleküllerin ayırımında kullanılan klasik bir yöntem olan tabaka jel elektroforezinde ayırma, gözeneklerinde sulu tampon çözelti bulunan yarı−katı bir ince jel tabakası kullanılarak yapılmaktadır. Bu jel tabakası birkaç cm genişliğindedir ve aynı anda birden fazla örnekle çalışılabilir. Analiz edilecek örnek bir leke ya da ince bir bant şeklinde jele uygulanır, belli bir süre doğru akım

gerilimi uygulanır. Ayırma işlemi tamamlandıktan sonra uygun boyama yöntemleri ile boyanarak yürüyen moleküller belirlenir. Katı jel desteği ile ayırımı yapılacak moleküllerin hareketi, moleküllerin yüküne, boyutuna, biçimine, kimyasal içeriğe ve uygulanan elektriksel alana bağlıdır (Skoog ve ark. 1998; Temizkan ve Arda 2008).

Tabaka jel elektroforezinde kullanılan destekleyici madde mekaniksel etkiyi engellemek ve molekülleri büyüklüklerine göre ayırmak için kullanılır. Destekleyici madde nişasta, poliakrilamit, agaroz veya agaroz−akrilamit karışımı olabilir. Poliakrilamit jeller genellikle küçük DNA parçaları (5−500 baz çifti) ve RNA moleküllerinin ayırımında kullanılır. Bu tip jeller, ayırım güçleri çok fazla olduğundan, boyut bakımından birbirine çok yakın küçük DNA parçalarının analizleri için daha uygundur. Ancak poliakrilamit jelleri hazırlamak zordur ve uzun süre alır. Ayrıca uygulanacak DNA'nın yüksek derişimde olması gerektiğinden bu tip jellerin kullanılması pratik değildir. Geliştirilmiş elektroforez yöntemleri içinde nükleik asit (DNA ve RNA) parçalarının tanımlanması, saflaştırılması ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntem agaroz jel elektroforezidir (Yıldız ve Yıldız 2007; Temizkan ve Arda 2008).

Agaroz, bir kırmızı alg türü olan Agar'dan izole edilen bir polisakkarittir. Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. Yüksek sıcaklıkta çözünen agaroz çözeltisi ~50^{o}C'a kadar soğutulduktan sonra (dikey sistemde) jel kasetleri arasına veya (yatay sistemde) jel tepsilerine dökülür. %0,5 (a/h)'den daha düşük agaroz içeren jeller çok kırılgan olduğundan yatay sistem tercih edilir. Ayırımı yapılacak örnek taraklarla oluşturulmuş kuyucuklara konur ve ayırım tamamlanıncaya kadar gerilim uygulanır.

Çizelge 2.1'de DNA ayırımı için agaroz derişimleri verilmektedir.

Çizelge 2.1. DNA ayırımları için agaroz derişimleri

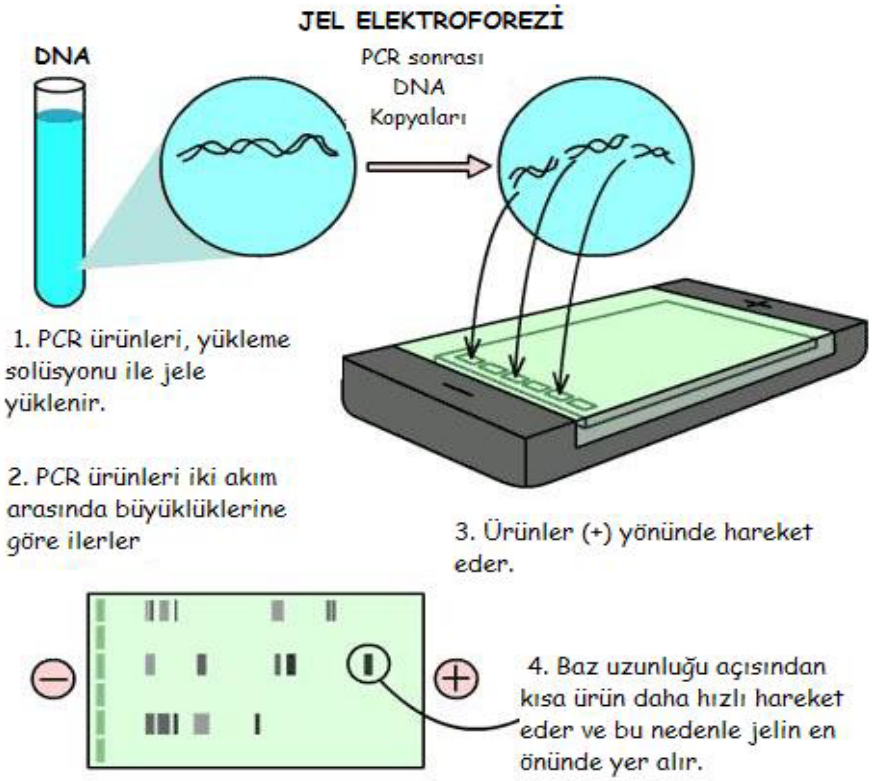
Agaroz % (a/h)	Lineer DNA Büyüklüğü (baz çiftleri)
0,3	1.000−30.000
0,7	800−12.000
1,0	500−10.000
1,2	400−7.000
1,3	300−3.000
1,4	250−3.000
1,5	200−3.000
2,0	50−2.000

Çizelge 2.1'de görüldüğü gibi agaroz derişimi %0,3−2 (a/h) arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Böylece, küçük DNA parçaları için yüksek, büyük DNA parçaları için düşük agaroz derişimi kullanılarak DNA'nın jelde en uygun bir şekilde ilerlemesi sağlanabilir. Analiz edilen moleküllerin ağırlıkları aynı jelde molekül ağırlıkları bilinen standart nükleik asit parçalarının yürütülmesiyle tayin edilebilir (Viljoen ve ark., 2005).

DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi EtBr boyasının DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorplaması sonucu UV ışığı altında floresan etki göstermesi ile olur. Bu etki DNA derişimine bağlı olarak kuvvetli ya da zayıf olabilir (Temizkan ve Arda, 2008).

Moleküllerin büyüklüklerine göre ayırabilme özellikleri tabaka jel elektroforezinin pek çok amaç için kullanımına olanak sağlamıştır. Bu nedenle, farklı amaçlar için izole edilen DNA ve RNA'ların tanımlanabilmesi, temizliğinin kontrolü, hangi formda olduğunun belirlenmesi, büyüklüğünün saptanabilmesi ve özellikle genetik mühendisliği yöntemleri ile DNA yapısında oluşturulan değişikliklerden sonra elde edilen yeni formların incelenmesi yönünden agaroz jel elektroforez yöntemi, moleküler genetik alanında önemli bir deneysel sistem oluşturmaktadır (Yıldız ve Yıldız, 2007). Yöntemin üstünlükleri basit ve hızlı olması, ayrıca diğer yöntemlerle yeterli düzeyde ayrılamayan DNA parçalarının ayrılabilmesini sağlamasıdır (Temizkan ve Arda, 2008).

Şekil 2.4'de tabaka jel elektroforez yönteminin çalışma prensibi verilmektedir.



Şekil 2.4. Tabaka jel elektroforezi çalışma prensibi (Anonim, 2012c)

Yapısındaki fosfat gruplarından dolayı negatif yüklü olan DNA molekülleri Şekil 2.4'den de görüldüğü gibi oluşturulan elektrik akımı sayesinde agaroz jel elektroforez içinde negatif kutup olan katottan, pozitif kutup olan anoda doğru hareket ederler (Viljoen ve ark., 2005).

DNA'nın elektroforetik hareketini etkileyen ana faktörler şunlardır:

- ***DNA'nın moleküler büyüklüğü:*** Büyük molekül ağırlıklı DNA, küçüğüne göre geride kalır.
- ***Tampon derişimi:*** Aynı moleküler ölçülere sahip DNA'lar farklı derişimlerdeki tamponlarda, farklı ilerleme hızına sahiptirler.
- ***DNA'nın konformasyonu:*** Aynı molekül ağırlığına sahip olan kapalı dairesel, kesik dairesel ve doğrusal DNA moleküllerinin kapiler

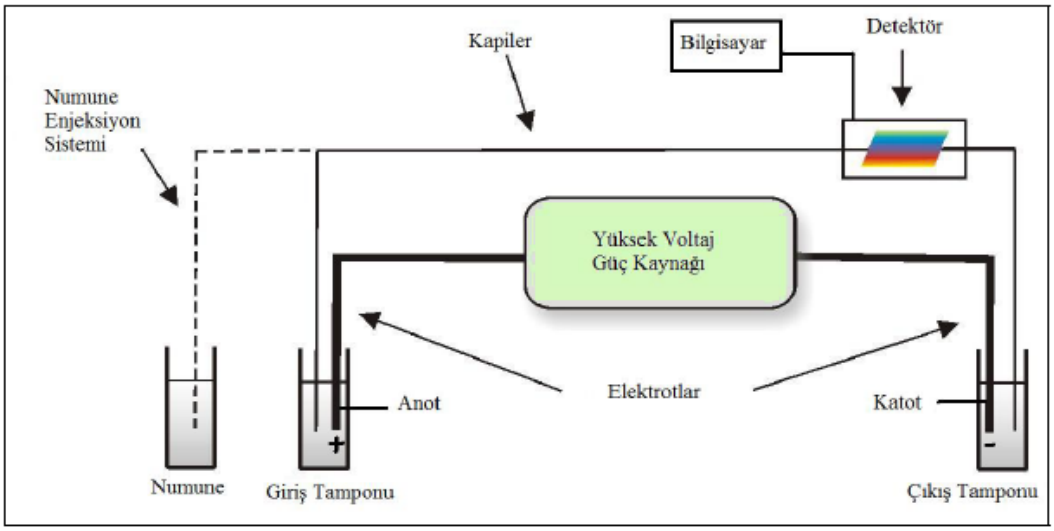
elektroforezde aynı koşullardaki hareket hızları birbirinden farklıdır. Halkasal DNA, doğrusal olana göre daha yavaş ilerler.

- ***Uygulanan akım:*** Uygulanan akıma bağlı olarak elektriksel alanın büyüklüğü arttırıldıkça DNA'nın büyük molekül ağırlığına sahip parçalarının hareket hızları da artar (Yıldız ve Yıldız, 2007).

2.3.2. Kapiler elektroforez

Kapiler elektroforez (CE), kapiler bir kolon içindeki bileşenlerin, kolonun her iki ucundan uygulanan yüksek doğru akım gerilimi ile ayrılması üzerine kurulmuş bir ayırma yöntemidir.

Kapiler elektroforez sisteminin şematik gösterimi Şekil 2.5'de verilmektedir.

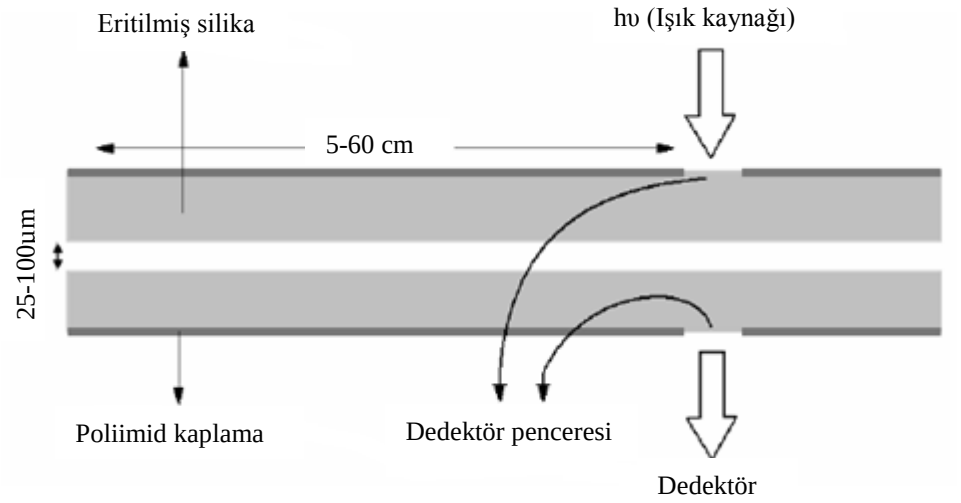


Şekil 2.5. Kapiler elektroforez sisteminin şematik gösterimi (Anonim, 2009)

CE'de elektrolit veya çalışma tamponu denilen sulu bir tamponla doldurulmuş olan kapiler kolonun iki ucu aynı tamponla dolu kaplarla bağlantı halindedir. Her iki tampon çözeltisinde ±30 kV'a kadar kullanılabilen yüksek gerilim güç kaynağına bağlanmış elektrotlar bulunur ve bu güç kaynağından elektrik alan uygulanır (Şekil 2.5). Giriş ve çıkış kapları ile kapiler, tampon

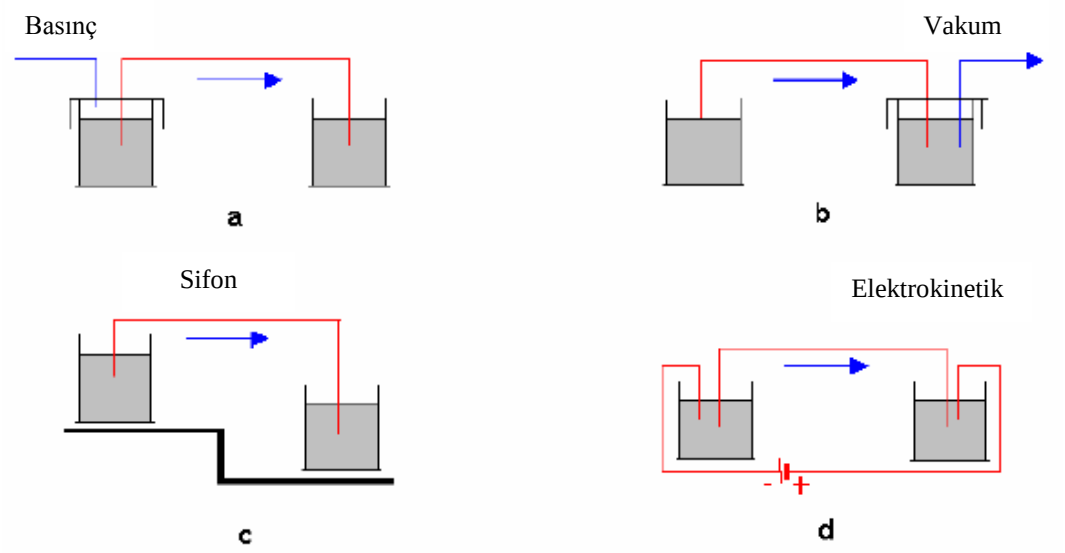
çözeltisi ile doldurulur. Örnek enjeksiyonu için, kapilerin giriş ucu örnek kabına daldırılır. Tekrar giriş kabına alınarak giriş ve çıkış kaplarına elektrik alanı uygulanır ve bileşenlerin ayırımı sağlanır. Bileşenler dedektör önünden geçerken bir sinyal oluşturarak tayin edilirler. Zamana karşı dedektör sinyalinin oluşturduğu grafiğe elektroferogram denir (Landers, 1994).

Kapiler kolonların boyları 30−100 cm, iç çapları 25−100 μm ve dış çapları 350−400 μm olup eritilmiş silikadan yapılmışlardır. Kapilerin esnekliğini sağlamak için kapiler kolonun üzeri poliimid tabakasıyla kaplanmıştır. Dedektörün ışık yolunu kapatmaması için poliimid kaplama bu bölgeden kaldırılır. Bunun için erimiş silika kapilerin dış kısmındaki poliimid koruyucu kaplamanın bir kısmı yakma, çözme ve kazıma ile uzaklaştırılır (Şekil 2.6). Tampon çözeltiye daldırılan elektrotlar, uygulanan gerilimden etkilenmemeleri için, platinden yapılmışlardır (Baker 1995; Marina ve ark. 2005).



Şekil 2.6. Eritilmiş silika kapiler kolonun boyuna kesiti (Yardımcı, 2006)

Kapiler içine örnek enjeksiyonu hidrodinamik veya elektrokinetik olarak yapılabilir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri a, b ve c) Hidrodinamik enjeksiyon, d) Elektrokinetik enjeksiyon

Örnek enjeksiyonu için en yaygın kullanılan yöntem hidrodinamik enjeksiyondur. Bu yöntemde enjekte edilen miktar, basınca ve basıncın uygulanma süresine bağlıdır. Hidrodinamik enjeksiyonda yüklenen örnek miktarı örnek ortamından hemen hemen bağımsızdır. Bu yöntemle yapılan enjeksiyonda, iyon yükünden dolayı hareketlilikte herhangi bir fark meydana gelmez. Genellikle uygulanan enjeksiyon süresi 0,5−10 s ve enjeksiyon basıncı 25−100 mbar'dır. Hidrodinamik enjeksiyon uygulamasının 3 yolu vardır. Bunlardan birincisi, kapilerin giriş tarafına konulan örnek kabına basınç uygulanmasıdır (Şekil 2.7a). Hidrodinamik enjeksiyonun ikinci yolu, örnek viali kapilerin giriş kısmındayken, çıkış kısmındaki elektrolit vialine vakum uygulanmasıdır (Şekil 2.7b). Üçüncü hidrodinamik enjeksiyon yönteminde ise sifon etkisinden yararlanılır. Kapilerin giriş kısmına takılan örnek kabı, çıkıştaki elektrolit kabından daha yükseğe yerleştirilir ve örnek, yerçekiminin etkisiyle kapilerin içine girer (Şekil 2.7c). Hidrodinamik enjeksiyonların ardından örnek kabı çıkarılıp çalışma elektrolit kabı takılır ve gerilim uygulanarak analize devam edilir.

Elektrokinetik enjeksiyonda, örnek bileşenlerinin kapiler içine göç etmelerini sağlayacak şekilde, kapilerin giriş kısmına örnek kabı yerleştirildikten sonra örnek kabıyla çıkış kısmındaki çalışma elektrolit kabı arasında elektrik alanı uygulanır. Oluşan elektrik alanın etkisiyle örnekteki iyonlar kapiler içine göç

etmeye başlar. Bileşikler elektroozmotik akış ve elektroforetik hareketlilik ile kapilere taşınır. Örnek kabı tarafı anot (+), çıkış kabı tarafı katot (−) olduğundan, ilk önce örnekteki anyonlar kapilere göç eder; ardından nötral bileşikler oluşan akış nedeniyle kapilere girer ve en son katyonlar girer. Bu enjeksiyon yönteminde hızlı hareket eden iyonlar, yavaş hareket eden iyonlara göre daha fazla oranda kapilere alınmaktadır. Örnek, gerilim uygulanarak kapiler kolona alındıktan sonra örnek kabı çıkarılıp tampon kabı takılır ve gerilim uygulanarak analize devam edilir. Jel ile doldurulmuş kapilerler kullanıldığında genellikle elektrokinetik enjeksiyon tercih edilir (Skoog ve ark. 1998; Heiger 2000). İyonik şiddeti düşük olan örneklerdeki DNA'ların enjeksiyonunda en etkili yöntem elektrokinetik enjeksiyondur (Schans, 1997).

İyi bir ayırım için enjekte edilen örnek hacminin, kapilerin hacminden daha küçük olması gerekir. Örneğin, 1 m uzunluğunda 75 μm çapında kapiler bir kolonun hacmi 5 μL'dir. Böyle bir kolona enjekte edilecek örnek 5−50 nL olmalıdır. Aksi halde kolon aşırı yüklenmiş olur.

Kapiler elektroforezde UV, floresans, elektrokimyasal, lazer indükleyici floresans (LIF), kütle spektrometresi, iletkenlik ve kırılma indisi gibi pek çok dedektör kullanılabilir. Absorbans dedektörleri CE'ye uygulanabilirlikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılırlar. Gözlenebilme sınırı genellikle 10^{-5}–10^{-7} M aralığındadır (Baker 1995; Shintani ve Polonsky 1997).

2.3.2.1. Kapiler elektroforezin üstünlükleri

- Küçük çaplı çıplak silika kapilerler (25–150 μm çaplı) ile çalışma verimi arttırılmaktadır.
- Kapiler boyunca yüksek gerilim (10−30 kV) ve yüksek elektrik alan (100−1000 V cm^{-1}) uygulanabilmesi nedeniyle hızlı ayırım yapılabilir.
- Akıma ve iç ısınmaya karşı kapilerin yüksek dayanım gücü vardır.
- Bileşenlerin ayırımı iyidir ve analiz süresi kısadır.
- Yüksek verimlilikte ve dar pikler elde edilebilir.
- Bileşenlerin teşhisi kapiler içinde gerçekleşir.

- Kapiler elektroforezde kullanılan hacimlerin çok az miktarda (nL düzeyinde) olması nedeniyle kullanılan örnek ve reaktifler de az miktarda harcanmaktadır.
- Farklı seçicilik türleri ve geniş uygulama alanı bulunmaktadır.
- Sulu ortamda çalışılabilir.
- Kapiler elektroforez ile düşük derişimlerdeki bileşenler (10^{-7} M) tayin edilebilir. Farklı dedektörler kullanıldığında daha düşük derişimler de tayin edilebilir.
- Kapiler elektroforezin çeşitli tipleri sayesinde polar, apolar, iyonize veya yüksek molekül ağırlıklı pek çok örnek tipi tayin edilebilir.
- Yöntem geliştirmesi kolaydır (Baker 1995; Heiger 2000).

Kapiler elektroforez yöntemi tabaka jel elektroforezi ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemlerini birleştiren oldukça yeni bir ayırma teknolojisidir. CE yönteminde aynı kapiler ile polar, apolar, kiral bileşiklerin ve proteinler gibi makromoleküllerin, oda sıcaklığında ve bir sıvı pompasına gerek duyulmaksızın düşük basınçta ayırım ve analizleri yapılabilmektedir. HPLC kolonları ile karşılaştırıldığında kapiler kolonlar daha ucuz, kullanımı kolay ve daha uzun ömürlüdür. Geleneksel tabaka jel elektroforezden farklı olarak ayırımlar genellikle jel gerektirmeksizin çözelti içerisinde gerçekleştirilir. Kapiler elektroforez, tabaka jel elektroforezin aksine aletsel bir yöntemdir (Cunico ve ark. 1998; Skoog ve ark. 1998). Küçük hacimlerdeki (10 ile 100 nL) örneklerde yüksek ayırma gücüne sahiptir. Ayrılan maddeler kapiler kolonun çıkışında bulunan dedektör tarafından algılanarak kalitatif ve kantitatif analiz yapılabilir. Aynı zamanda tabaka jel elektroforezinde kullanılan boyama işlemi kapiler elektroforezde kullanılmaz. Ayrıca geleneksel tabaka jel elektroforezinde boya ile yeterince işlem görmeyen ya da derişimi az olan DNA'ların silik bantlar oluşturmaları nedeniyle güçlüklerle karşılaşılmaktadır. Kapiler elektroforez bu açıdan küçük hacimde örneklerde ya da parçalanmış DNA'larla yapılan çalışmaların sonucunda derişimi az olan PCR ürünü bulunduğu durumlarda daha iyi sonuç vermektedir. Yüksek gerilim kullanımı geleneksel jel elektroforezine göre çok daha hızlı ayırım yapabilmeyi sağlar (Aşıcıoğlu ve ark., 2002).

Ayrıca tabaka jel elektroforez, son yıllarda kullanılmaya başlayan yeni bir yöntem olan mikro düzeyde analizlerin yapıldığı mikro sıvı kromatografisi (μ−LC), HPLC ve CE yöntemleri karşılaştırmalı olarak Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Tabaka jel elektroforez, μ−LC, HPLC ve CE yöntemlerinin karşılaştırılması (Weinberger, 2000)

	Tabaka Jel Elektroforez	**μ−LC**	**HPLC**	**CE**
Hız	yavaş	orta	orta	hızlı
Cihaz Maliyeti	düşük	yüksek	orta	orta
Hassasiyet:				
CLOD*	az	az	çok iyi	az
MLOD*	az	iyi	az	çok iyi
Verimlilik	orta	orta	orta	yüksek
Otomasyon	az	var	var	var
Kesinlik	az	iyi	çok iyi	iyi
Miktar Tayini	zor	kolay	kolay	kolay
Seçicilik	orta	orta	orta	yüksek
Yöntem Geliştirme	yavaş	orta	orta	hızlı
Reaktif Sarfiyatı	düşük	düşük	yüksek	çok az
Preperatif Kullanım	iyi	orta	çok iyi	düşük
Sağlamlık	iyi	iyi	çok iyi	iyi
Ayırımlar:				
DNA	çok iyi	orta	orta	çok iyi
Proteinler	çok iyi	İyi	İyi	çok iyi
Küçük Moleküller	zayıf	çok iyi	çok iyi	çok iyi

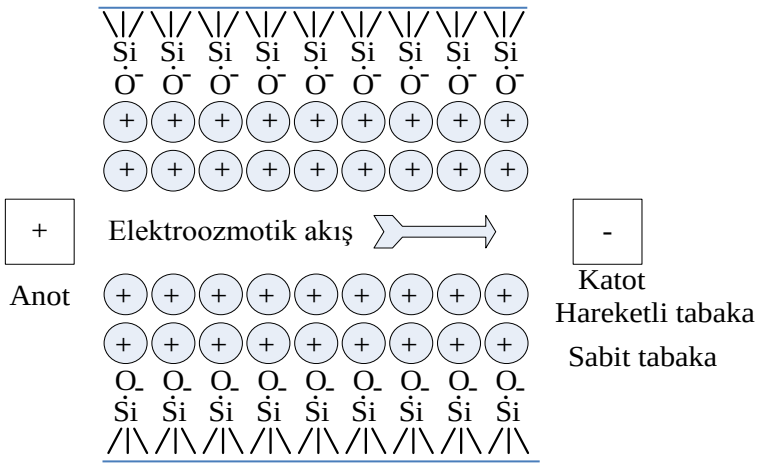
* CLOD: Derişim tayin sınırı; MLOD: Kütle tayin sınırı

2.4. Kapiler Elektroforezde Ayırım İlkeleri

Kapiler elektroforezde parçacıkların göç hızları üzerine iki kuvvet etki etmektedir. Birincisi, iyonun bulunduğu tamponun akışından kaynaklanan elektroozmotik akış, ikincisi de uygulanan gerilimden kaynaklanan ve elektrik alanın iyon üzerinde oluşturduğu elektroforetik etkidir.

2.4.1. Elektroozmotik akış (EOF)

Elektroozmotik akış kapiler duvarındaki sabit yüklü kapilerdeki çözeltiye elektrik alan uygulandığında oluşan akıştır. Eritilmiş silika kapilerin iç yüzeyi silanol grupları (SiOH) ile kaplıdır ve kapilerin iç yüzeyi SiOH gruplarının iyonlaşması ile eksi yüklü hale gelir. Silanol grupları zayıf asidiktir ve pH 3'den büyük olduğunda silanoat (SiO^-) gruplarına iyonize olurlar. Bu, kapilerin NaOH veya KOH ile muamele edilmesi ile sağlanır. Çalışma tamponundaki pozitif yüklü iyonlar, kapiler çeperine yaklaşarak iyonlaşmış SiO^- gruplarının etrafında bir elektriksel tabaka oluşturur. Bu katyonlar tüm negatif yükü nötralleştirecek yoğunlukta değildir ve bu yüzden katyonların ikinci bir tabakası oluşur. İlk oluşan tabaka sabit tabakadır ve silanoat grupları tarafından sıkıca tutulur. Dış tabaka ise hareketli tabakadır. Bir elektrik alan uygulandığında, bu dış tabaka negatif yüklü elektroda (katot) doğru hareket ederken tampon çözeltiyi de sürükler ve böylece elektroozmotik akışa (EOF) neden olur (Şekil 2.8). Bu iki tabaka, elektriksel çift tabaka olarak adlandırılır. Bu iki tabaka arasında ayırıcı bir düzlem vardır ve burada, iki tabaka arasındaki gerilim farkından doğan elektriksel bir dengesizlik söz konusudur. Buna Zeta (ζ) Potansiyeli denir (Denklem 2.2).



Şekil 2.8. Kapiler içinde elektroozmotik akışın gösterimi (Baker, 1995)

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\varepsilon} \tag{2.2}$$

ζ: Zeta potansiyeli, V

δ: Elektriksel çift tabakanın kalınlığı, m

ε: Tamponun dielektrik sabiti, C/V m

e: Birim alan başına yük, C/m^2

Elektroozmotik akış hızı (2.3)'de gösterilebilir.

$$\upsilon_{eof} = \frac{\varepsilon\zeta E}{4\pi\eta} \tag{2.3}$$

υ_{eof}: Elektroozmotik akış hızı, m/s

ε: Tamponun dielektrik sabiti, C/V m

ζ: Zeta potansiyeli, V

η: Tamponun viskozitesi, N s/m^2

E: Uygulanan elektrik alan, N/C

İstenilen hızda iyonik göçü ve ayırmayı sağlamak için yüksek bir elektrik alan uygulanmalıdır. Hızlı ayırmanın yanında en önemli amaç yüksek bir ayırım gücü elde etmektir. Bunun için, elektroforezde ayırma gücünü etkileyen hareketli faz bileşimi, pH, tampon derişimi, enjeksiyon hacmi gibi faktörlerin incelenmesi gerekir (Baker, 1995).

Elektroozmotik akışı etkileyen etkenler:

Gerilim: Gerilim değiştirilerek, uygulanan elektrik alan değiştirilebilir. Gerilim arttırıldığında elektroozmotik akış artar ve göç zamanları düşer. Mümkün olan en yüksek gerilimin kullanılması önerilir, fakat yüksek gerilim yüksek akım oluşmasına ve kapilerin ısınmasına (Joule ısınması) neden olur. Joule ısınması istenmeyen bir durumdur ve eğer kapilerdeki ısınma çabuk soğutulamazsa, sıcaklık kapiler içinde artar ve bu artış da pik genişlemesine, tekrarlanamayan göç

zamanına, örnek bozunması ya da içeriğinin değişmesine veya tampon kaynamasına yol açarak elektriksel iletkenliğin önlenmesine neden olabilmektedir. Uygun gerilimi seçmek için gerilim−akım eğrisinin doğrusallıktan saptığı maksimum nokta alınabilir.

pH: Yüksek pH'larda kapiler iç duvarında SiOH'ın SiO^-'a iyonizasyonu yüksek miktarda olduğu için pH arttıkça elektroozmotik akış artar. Daha yüksek pH'larda daha fazla SiO^- iyonizasyonu, bu da yüksek zeta potansiyeline ve sonuçta da elektroozmotik akış hızının artmasına neden olur.

Tampon Derişimi (İyonik Şiddeti): Kapiler sıcaklığı kontrol edildiğinde, tamponun iyonik şiddetinin veya derişiminin arttırılması, elektroozmotik akışı azaltarak zeta potansiyelinin düşmesine neden olur. Kapiler sıcaklığı kontrol edilemiyorsa iyonik şiddet ya da derişimdeki artış akım artışına, viskozitenin azalmasına ve dolayısıyla elektroozmotik akışta bir artışa neden olur. Genel kural olarak tampon derişimi, örnek derişiminin en az 100 katı büyüklükte olmalıdır. Düşük tampon derişiminde kısa analiz süresi elde edilir, ancak çok seyreltik tamponlarda pik şekillerinin bozulma olasığından dolayı bu durumdan kaçınılmalıdır. 10 mM−100 mM derişim aralığındaki çalışma tamponları kullanılır.

Sıcaklık: Sıcaklık artışı, tamponun viskozitesini düşürdüğü için elektroozmotik akışı arttırır. Sıcaklık artışı aynı zamanda dielektrik sabitini de düşürür. Dielektrik sabitinin düşmesi elektroozmotik akışı azaltır ancak bu durum tamponun viskozitesinin düşmesi yanında önemsizdir. Bu nedenle, genellikle yüksek sıcaklık tercih edilir. Fakat sıcaklık artışı zon yayılmasına, örneğin bozulmasına veya tamponun kaynamasına neden olabilir.

Organik Çözücü Etkisi: Tampona organik çözücü eklenmesi viskozite, dielektrik sabiti ve zeta potansiyeli üzerinde etkili olabilmektedir. Organik çözücünün etkisi, eklenen çözücünün cinsine ve miktarına göre değişir. Örneğin, suya %0−50 arasında metanol eklenmesi çözeltinin viskozitesinin artmasına neden olurken %50'den fazla metanol ilavesinde ise viskozite azalır. Buna karşılık %100'e kadar asetonitril eklenmesinde çözelti viskozitesi azalır. Ayrıca çalışma tamponuna hacimce %20'ye kadar gliserol eklenerek de çözelti viskozitesi arttırılabilir.

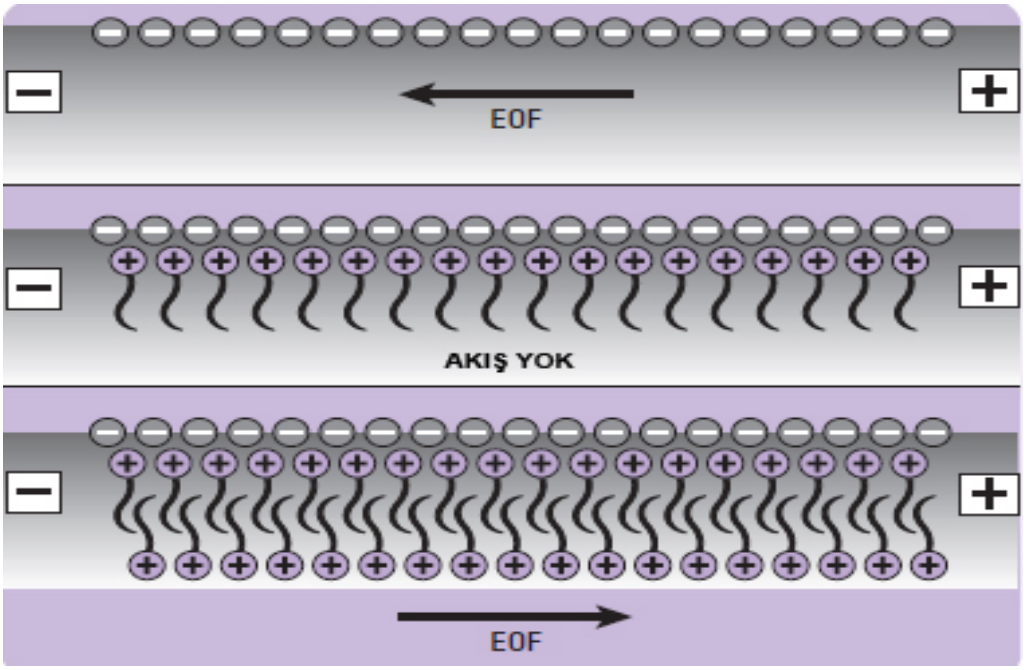
Kapiler Duvarının Değiştirilmesi: EOF, kapiler yüzeyinin silanol gruplarının iyonlaşmasını önleyen bir madde ile azaltılabilir veya önlenebilir. Bu da çalışma tamponu içerisine kapiler duvarına hidrofobik etkileşimlerle fiziksel olarak adsorbe olan nötral hidrofilik bir polimer eklenerek "dinamik kaplama" yöntemi ile veya kapiler duvarının kimyasal bir grupla bağlanması "kovalent kaplama" yöntemi ile yapılabilir. Böylece kapilerin yüzey yükü baskılanarak zeta potansiyeli azaltılır veya ortadan kaldırılır.

Tampon Katkı Maddeleri: Tampon çözeltisine farklı katkı maddeleri eklenerek EOF kontrol edilebilir. Bu amaçla tampon çözeltisi içine sodyum dodesil sülfat (SDS), CTAB, BRIJ, TWEEN gibi anyonik, katyonik ya da nötral yüzey aktif maddeler eklenebilir. Katyonik yüzey aktif maddeler tampona az miktarda eklenince EOF yavaşlamakta, katyonik yüzey aktif madde derişimi arttırılınca EOF durmakta, daha fazla eklenince de EOF ters yöne dönmektedir (Şekil 2.9). Örneğin, tampon çözeltisine bir katyonik yüzey aktif madde olan (CTAB veya tetradesiltrimetilamonyum bromür (TTAB)) eklenerek normal elektrozmotik akış yönünü ters çevirmek mümkündür. Bu durumda yüzey aktif madde kapilerin iç yüzeyinde adsorplanır ve kapilerin yüzeyini pozitif yükle yükler. Böylece, tamponun anyonları kapilerin iç yüzeyine yakın yerlerde birikir ve katoda doğru hareket ederler. Bu işlem anyonların ayrılmalarını hızlandırmak için sıkça kullanılır.

Ayrıca zwitter iyonik (MES, Tris, CHAPS, CHAPSO gibi) maddeler eklenerek iletkenlik arttırılmaksızın iyon şiddeti arttırılarak EOF değiştirilebilir.

Bütün bu etkenlerin yanı sıra EOF ters (negatif) polarite uygulanarak da tersine çevrilebilir.

EOF'yi ölçmenin en kolay yolu, yüksüz bir bileşiğin sisteme enjekte edilmesidir. Bunun için çalışma tamponu pH'ında yüksüz olan ve çözünebilen, kullanılan dedektörle tanımlanabilen, saf, kapiler duvarı ile etkileşmeyen bir bileşik (metanol, mesitil oksit, formamid, fenol gibi) seçilmelidir (Baker 1995; Weston ve Brown 1997; Heiger 2000).



Şekil 2.9. EOF'nin katyonik yüzey aktif madde eklenerek azaltılması ve tersine çevrilmesi (Heiger 2000)

2.4.2. Elektroforetik göç (EF)

Elektroforetik göç yüklü taneciklerin hareketliliklerinin farklı olmasından kaynaklanır. Elektrostatik kuvvet (F_e), iyonun zıt yüklü elektrot boyunca çekilmesini sağlar. Parçacık üzerinde harcanan elektrostatik kuvvet (F_e), parçacığın net yüküyle (q) ve çözeltideki elektrik alan gücü (E) ile orantılıdır.

$$F_e = qE \tag{2.4}$$

Kuvvetin yönü, parçacığın yükünün tersi yönündedir. Yüklü parçacık sabit bir hız elde edene kadar hızlanır. Bu hareket, çözeltinin viskozite kuvveti ile önlenmeye çalışılır.

Viskozite kuvveti parçacığın hızının artmasıyla artar. Küresel parçacıklar için viskozite kuvveti Stokes denklemi ile verilir;

$$F = -6\pi\eta r\upsilon \tag{2.5}$$

η: Çözeltinin viskozitesi, N s/m^2

r: Parçacığın yarıçapı, m

υ: Parçacığın hızı, m/s

π: Pi sabiti

F: Viskozite kuvveti, N

Kısa bir hızlanmadan sonra karşı koyucu kuvvetler (elektrostatik kuvvet ve viskozite kuvveti) denk olurlar. Elektrostatik kuvvet her durumda viskozite kuvvetinden büyük olduğundan; elektrostatik kuvvetin yönünde sabit bir hız artışı olur.

$$qE = 6\pi\eta r\upsilon \tag{2.6}$$

$$\upsilon = \frac{qE}{6\pi\eta r} \tag{2.7}$$

Denklem (2.7)'ye göre elektroforetik hareketlilik analitin iyonik yükü ile doğru ve sürtünme katsayısı ile ters orantılıdır. Elektrik alan sadece iyonlar üzerinde etkilidir. Eğer iki farklı tür hem farklı iyon yüküne hem de tampondan geçerken farklı sürtünme kuvvetine sahipse, bu iki madde birbirlerinden ayrılabilir. Nötral türler ayrılamazlar. Analit iyonunun sürtünme kuvveti, o iyonun yüküne, şekline ve içinde göç ettiği ortamın viskozitesine bağlıdır. Aynı boyuttaki iyonlar için, yük ne kadar büyükse, yürütücü kuvvet ve göç hızı da o kadar büyük olur. Aynı yükteki iyonlar için ise, iyon küçüldükçe sürtünme kuvveti küçülür ve göç hızı artar.

Bir elektriksel alandaki (E, V cm^{-1}) elektroforetik hız (υ, cm s^{-1}) ile elektroforetik hareketlilik (μ_{ef}, cm^2 V^{-1} s^{-1}) arasındaki ilişki aşağıdaki denklemle verilmiştir.

$$\upsilon = \mu_{ef} E \tag{2.8}$$

Herhangi bir pH ortamında iyonun elektroforetik hareketliliği ise aşağıdaki denklem ile verilmiştir.

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi\eta r} \tag{2.9}$$

Aynı zamanda elektroforetik hız, kapilerin etkin uzunluğu (başlangıçtan detektöre kadar olan uzunluğu) ve maddenin göç zamanından da hesaplanır.

$$\upsilon = \frac{L}{t_m} \tag{2.10}$$

$E = \frac{V}{L_t}$ ve $\upsilon = \mu_{ef} E$ olduğundan elektroforetik hareketlilik (μ_{ef});

$$\mu_{ef} = \left(\frac{L}{t_m}\right)\left(\frac{L_t}{V}\right) \tag{2.11}$$

denklemi ile belirtilir.

L: Etkin uzunluk (kolon girişinden dedektöre kadar olan kısım), cm

t_m: Analitin göç zamanı, s

L_t: Kolonun toplam uzunluğu, cm

V: Uygulanan gerilim, V (Lunte ve Radzik, 1996)

2.5. Kapiler Elektroforez Türleri

Kapiler elektroforez geliştikten sonra iyonik türlerin ve makromoleküllerin hızlı, etkin bir şekilde ayırımları ve analizleri için çeşitli yöntemler geliştirilmiş olup Çizelge 2.3'de verilmektedir.

Çizelge 2.3. Kapiler elektroforez türlerinin sınıflandırılması, yaygın kullanılan kısaltmaları ve ayırım esası (Frazier ve ark., 2000)

CE Türleri	Kısaltma	Ayırım Esası
Kapiler Zon Elektroforez	CZE	Analitlerin serbest çözeltideki hareketlilik farklılıkları
Kapiler İzotakoforez	CITP	Sürekli olmayan tampon çözelti içinde, iki çözücü arasında aynı hızlarda ilerleyen bir dizi bitişik örnek bölgelerinde çözünenlerin elektroforetik hareketlilikleri esasına göre ayrılma
Kapiler İzoelektrik Odaklama	CIEF	Protein ve peptitlerin izoelektrik noktalarındaki farklılıkları esasına göre ayrılma
Miselli Elektrokinetik Kapiler Kromatografi	MEKC	Yüzey aktif misel kullanarak hidrofobik ve iyonik bileşiklerin kromatografik etkileşimi
Kapiler Elektrokromatografi	CEC	Analitlerin sabit faz ve hareketli faz arasındaki dağılma katsayıları ve elektroforetik hareketlilik farklılıkları
Kapiler Jel Elektroforez	CGE	Makromoleküllerin büyüklüklerine göre ayrılması

2.5.1. Kapiler zon elektroforez (CZE)

Kapiler zon elektroforez (CZE), basit olması ve çok amaçlı uygulanabilirliği nedeniyle oldukça yaygın kullanılan CE yöntemlerinden birisidir. CZE'de tampon çözeltisinin bileşimi ayırma bölgesinin her yerinde aynıdır. Uygulanan gerilim ile karışımı oluşturan parçacıklar kendi iyonik hareketliliklerine göre zonlara ayrılırlar. Bu yöntemde moleküller, yük/kütle oranlarına göre farklı hızlarda göç ederek birbirlerinden ayrılırlar. Bu oranın büyük olduğu iyonlar elektrik alanda daha hızlı hareket ederler ve böylece daha erken ayrılırlar. Yük/kütle oranının küçük olduğu iyonlar ise daha yavaş hareket ederek, kapileri daha geç terk ederler. Elektrik alan uygulandığında, iyonlar elektroforetik olarak yüklerine ters

işaretteki elektroda doğru yol alırlar. İyonların net hızı, elektroforetik ve elektroozmotik hızlarına bağlıdır.

Çözeltideki taneciklerin hareket hızları pozitif ve negatif iyonlar ile nötral tanecikler için sırasıyla (2.12), (2.13) ve (2.14)'de verilmektedir.

$$v_i = (\mu_{eof} + \mu_i)E \quad (2.12)$$

$$v_i = (\mu_{eof} - \mu_i)E \quad (2.13)$$

$$v_i = (\mu_{eof})E \quad (2.14)$$

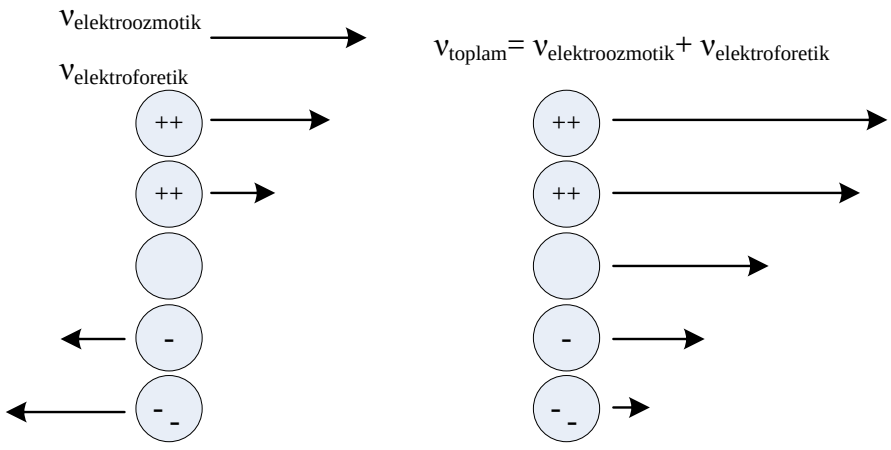
Burada;

μ_i : İyonik hareketliliği

μ_{eof} : Elektroozmotik hareketliliği

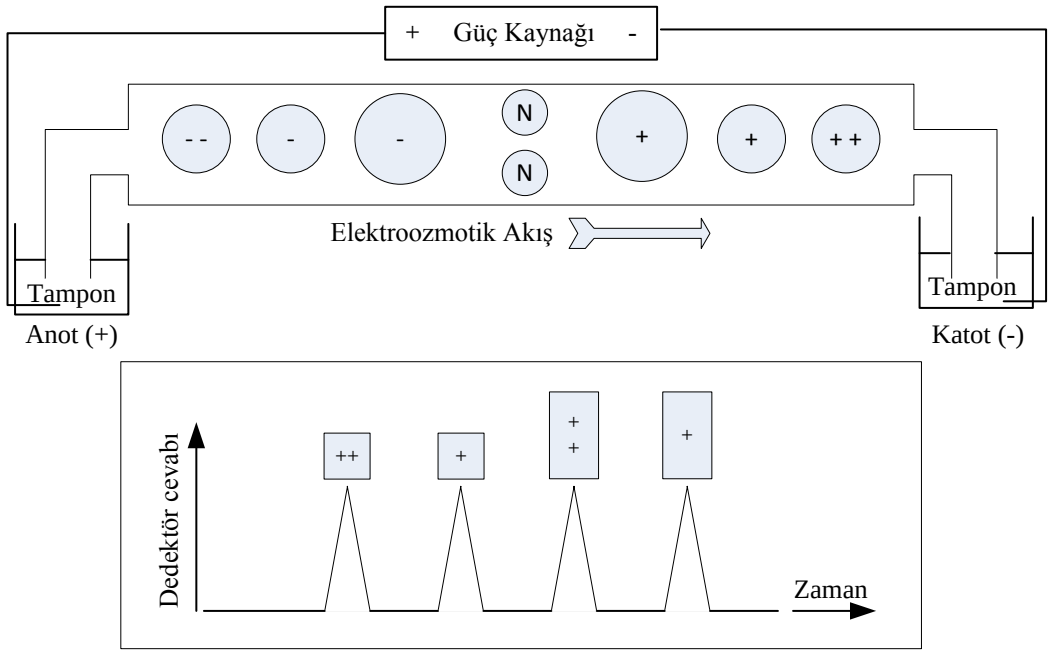
ifade etmektedir (Baker 1995; Skoog ve ark. 1998).

Elektroozmotik akış varlığında iyon hızlarının şematik gösterimi Şekil 2.10'da verilmektedir.



Şekil 2.10. Elektroozmotik akış varlığında iyonların hızlarının şematik gösterimi (Skoog ve ark., 1998)

Eğer analit anottan enjekte edilirse (+) yüklü katyonlar elektroforetik olarak katoda gitme eğiliminde olacaklarından yük/kütle oranlarına bağlı olarak önce kolonu terk ederler. Anyonlar anoda doğru hareket etmek isteseler de çok kuvvetli elektroozmotik güce karşı harekete maruz kalırlar ve elektroozmotik akışla katoda doğru taşınırlar. Böylece anyonlar katyonlardan daha sonra kolonu terk ederler. Nötral maddeler elektroforetik etkileşime girmeyeceklerinden elektroozmotik akışla birbirlerinden ayrılmadan sürüklenirler. Bu nedenle nötral maddeler bu yöntemle ayrılamazlar. Şekil 2.10'da da görüldüğü gibi toplam hızı daha büyük olduğu için aynı büyüklükteki iki değerlikli katyon, aynı büyüklükteki bir değerlikli katyondan daha hızlı hareket eder (Marina ve ark., 2005). Şekil 2.11'da kapiler zon elektroforez sisteminde iyonların çıkış sırası şematik olarak gösterilmiştir.



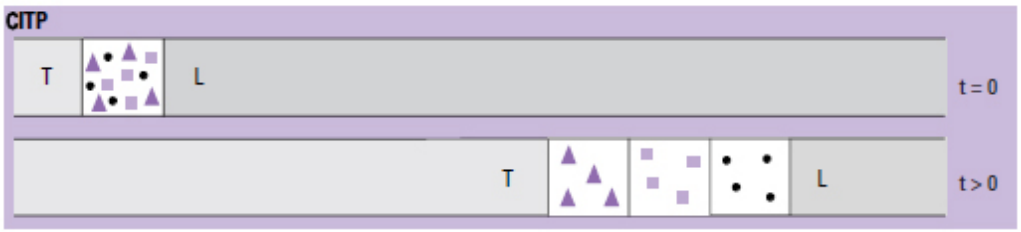
Şekil 2.11. Kapiler zon elektroforez sisteminde iyonların çıkış sırasının şematik gösterimi

Kapiler zon elektroforez ile anyon ve katyonların ayırımı tek bir analizle gerçekleştirilebilir. Çeşitli küçük moleküllü pestisit ve ilaçlar veya bunların iyonlaşabilen türevleri CZE ile ayrılabilirler. Aynı şekilde proteinler, aminoasitler ve karbonhidratların hepsi CZE ile tayin edilebilirler. Nötral karbonhidratlar ise

negatif yüklü borat kompleksleri oluşturularak ayrılır (Baker 1995; Skoog ve ark. 1998).

2.5.2. Kapiler izotakoforez (CITP)

Kapiler izotakoforezde (CITP) tüm analitler zonlar halinde ve aynı hızda göçer, bu yüzden yöntemin adı izo (aynı) ve tach (hız) kelimelerinden meydana gelmektedir. Bu yöntemin kullanıldığı herhangi bir uygulamada anyonlar ve katyonlar aynı anda ayrılamaz. Genellikle CITP yöntemi anyon analizinde kullanılır. Bu ayırma işleminde örnek iki tampon arasına enjekte edilir ve ayırım basamaklar halinde gerçekleşir. Öndeki tampon (Leading electrolyte, L) hareketliliği örnekteki en hızlı iyondan daha hızlı iyonları, sonraki (Trailing electrolyte, T) ikinci tampon ise hareketliliği örnek iyonlarından daha düşük iyonları içerir (Şekil 2.12) (Skoog ve ark. 1998; Frazier ve ark. 2000).



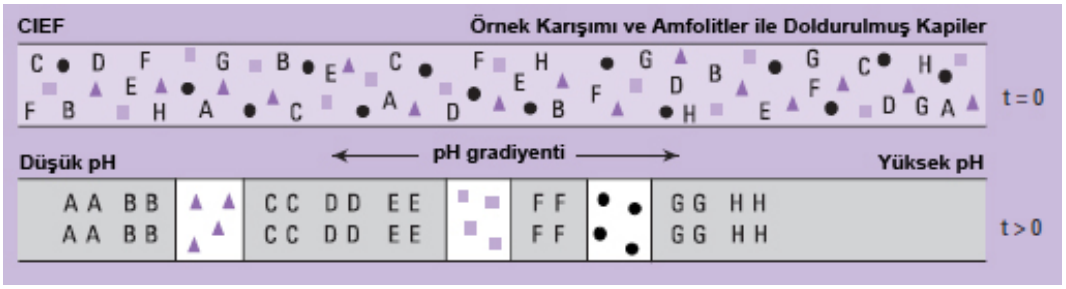
Şekil 2.12. Kapiler izotakoforez yönteminde ayırımın şematik gösterimi (Heiger, 2000)

Kapiler izotakoforez, eser miktardaki maddelerin derişik hale getirilerek diğer kapiler elektroforez analizlerinden önce kullanılmasına olanak verir (Marina ve ark., 2005).

2.5.3. Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF)

Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF) yöntemi, genellikle proteinlerin izoelektrik noktalarına (pI) göre ayrılmasında kullanılır. Kapiler amfolitlerle doldurulur. Amfolitler, amfoterik maddelerdir. İzoelektrik noktadaki pH'ın üstünde anyonik, altında ise katyonik özellik gösterirler. Bir amfolit çözeltisi,

çeşitli pI değerleri içeren bir bileşime sahiptir ve bir pH gradiyenti oluşturabilir (amino ve karboksil grubu içerirler). Böylece bir zayıf karboksilik asit grubu ve bir zayıf bazik amino grubu içeren protein ve aminoasitler gibi amfiprotik türler ayrılabilir (Şekil 2.13) (Skoog ve ark. 1998; Frazier ve ark. 2000).



Şekil 2.13. Kapiler izoelektrik odaklama yönteminde ayırımın şematik gösterimi (Heiger, 2000)

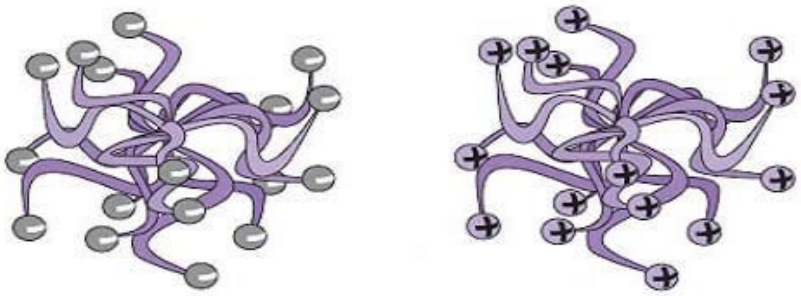
2.5.4. Miselli elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC)

Miselli elektrokinetik kapiler kromatografi **(**MEKC) yöntemi, örneğin tampon ile miseller arasında dağılmasına dayanır. Sıvı−sıvı partisyon kromatografisine benzer yapıdadır. Bu yöntem ile yüksüz çözünen maddelerin ayrılması mümkündür. Aynı zamanda iyonik yapıdaki maddeler de ayrılabilir. Bu, hareket eden tampon içerisine yüzey aktif maddelerin eklenmesi ile gerçekleşmektedir.

Yüzey aktif maddeler (veya deterjanlar), bir uçları suda çözünen (hidrofilik), diğer uçları ise suda çözünmeyen (hidrofobik) maddelerdir. Bazı deterjanların hidrofilik ucunda bir iyonik grup bulunur. Deterjanlar anyonik (SDS, sodyum dodesil sülfat gibi), katyonik (CTAB, setiltrimetilamonyum bromür gibi), zwitteriyonik (CHAPSO gibi) veya noniyonik (Triton X−100 gibi) olabilir.

Misel oluşması için gereken en düşük yüzey aktif madde derişimine bu yüzey aktif maddenin "kritik misel derişimi" (CMC) denir. Bir deterjan, bir çözeltide kritik misel derişiminden (CMC) daha fazla miktarda bulunuyorsa miseller oluşur. Kaç molekülün bir araya gelerek misel oluşturacağı ve CMC değeri, maddeden maddeye değişir. 40−100 molekülün bir araya gelerek oluşturduğu bu yapıya "misel" adı verilir. Miseller genellikle hidrofobik kısmı iç

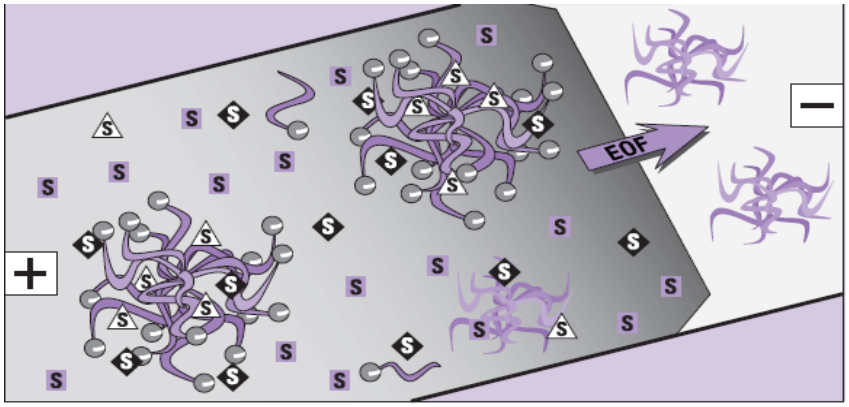
tarafta ve iyonik kısımları su moleküllerine dönük olmak üzere küre şeklinde bir araya gelirler. Şekil 2.14'de anyonik ve katyonik miselerin gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 2.14. Anyonik ve katyonik misellerin gösterimi (Heiger, 2000)

Miselli elektrokinetik kapiler kromatografide iki faz vardır. Bunlar sulu ve miselli fazlar olup her ikisi de hareketlidir.

Hidrofilik moleküller, tüm zamanlarını tampon içinde geçirirler ve misellerle etkileşmeyerek önce (t_0) elüe olurlar. Çok hidrofobik moleküller ise, tüm zamanlarını misel içinde geçirirler ve en son (t_{mc}) elüe olurlar. Misel içinde kısmen çözünen maddeler ise tamponla misel arasında dağılıma uğrarlar ve t_0 ile t_{mc} arasında elüe olurlar (Şekil 2.15). t_0 ve t_{mc} zamanlarını belirlemek için sırasıyla metanol ve Sudan III boyası kullanılabilir (Baker 1995; Skoog ve ark. 1998).

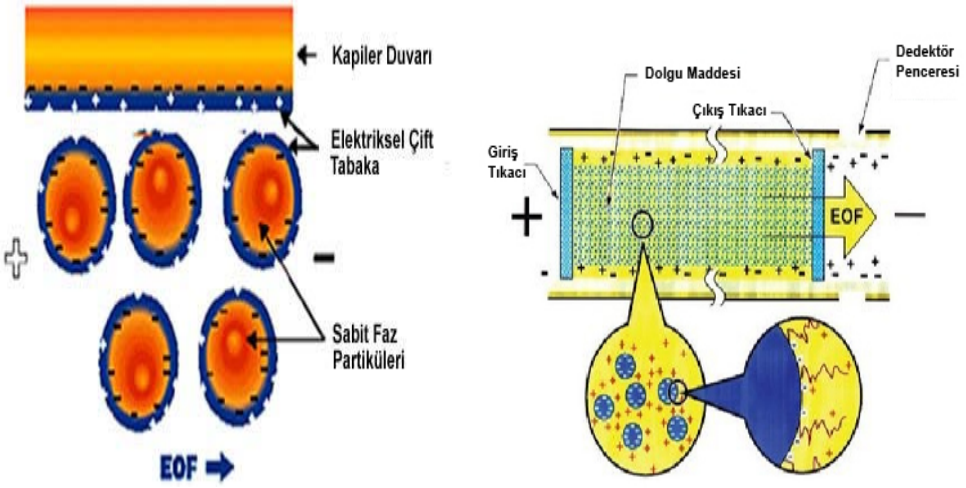


Şekil 2.15. Miselli elektrokinetik kromatografi yönteminde anyonik misel kullanılarak ayırımın şematik gösterimi (s= çözünen madde) (Heiger, 2000)

2.5.5. Kapiler elektrokromatografi (CEC)

Kapiler elektrokromatografi (CEC), CE ve HPLC'nin iyi özelliklerini birleştiren bir hibrit yöntemdir. CEC'in üstünlükleri; HPLC'deki gibi mekanik pompa kullanılmadığı için CE'de olduğu gibi sistemin basitleştirilmesi, HPLC'deki gibi yüksüz moleküllerin ayrılmaları ve küçük moleküllerin tayinlerinin sınırlandırılmamasıdır. Ayrıca, basınç uygulanan HPLC sistemlerinde parabolik akışın yerini CE'deki gibi bayrak şeklindeki akış alır ve böylece verimlilik de artar. CEC, bu iki yöntemin bileşiminden oluştuğu için ayırma gücü artmaktadır. CEC, elektrik alan etkisi altında bir kromatografik kolon boyunca sabit faz üzerinden bileşenlerin bir tampon ya da hareketli faz akışı ile sürüklenmesiyle hareket hızlarının farklılığına dayanan bir ayırma yöntemidir (Şekil 2.16). CEC' de kolon boyunca analitlerin göçü 3 adımda incelenebilir.

- Tamponun elektroozmotik akışı ile analitlerin göçü,
- Analitlerin elektroforetik mobiliteleri (yük/yarıçap oranına bağlı olarak) farklılığına bağlı olarak bileşenlerin göçü,
- Analitlerin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılmasına bağlı olarak bileşenlerin göçüdür.



Şekil 2.16. CEC yönteminde ayırımın şematik gösterimi (Gürsoy, 2007)

CEC'de HPLC kolonlarındaki sabit faz maddeleri ile doldurulan kapilerler kullanılır. Kolonun, hareketli fazın girdiği ve çıktığı uçlarında kolon dolgu maddelerinin sürüklenmemesi için iki tıkaç (frit) bulunur. Genellikle silika dolgulu kapilerler kullanılır ve böylece büyük negatif yük yoğunluğuna sahip olurlar (Frazier ve ark. 2000, Gürsoy 2007). Bu durum ayırımı sürükleyen önemli bir EOF'ın üretimine izin verir. CEC'de ters faz sıvı kromatografisinde kullanılan polar hareketli fazın yanı sıra ortama elektrik iletkenliği sağlamak amacıyla 1−10 mM'lık Tris, borat ya da fosfat gibi seyreltik tampon eklenmelidir (Weinberger, 2000).

2.5.6. Kapiler jel elektroforez (CGE)

Kapiler jel elektroforez (CGE), tabaka jel elektroforezin prensipleriyle, kapiler zon elektroforezin küçük çaplı kapilerleri ve cihaz düzeneğini birleştirir. CGE yöntemi özellikle proteinler ve nükleik asitler gibi makro moleküllerin boyut esasına dayalı ayırımlarında kullanılmaktadır. CGE'nin makromoleküllerle ilgili ilk uygulaması, 1938 yılında Hjerten tarafından proteinlerin kapiler sodyum dodesil sülfat−poliakrilamit jel elektroforezi (SDS−PAGE) yöntemini kullanarak ayrılması ile gerçekleştirilmiştir. Bu yüzden CGE, hem biyoteknoloji endüstrisi hem de insan genom projesi tarafından keşfedilmeye başlanmış ve CE türlerinin arasında giderek daha çok ilgi gören bir yöntem olmaya başlamıştır (Lunte ve Radzik 1996; Weston ve Brown 1997).

Kapiler jel elektroforezde temel ayırma mekanizması; moleküllerin jelle doldurulmuş kapilerdeki gözeneklerden geçerek göç etmesi ile büyüklüklerine göre ayrılması temeline dayanır. Jeller, çoğunlukla katı ve sıvı arasında davranış gösteren yapılardır. CE ile yapılan çalışmalarda jel ortamını tanımlamak için genellikle "polimer çözeltileri", "polimer ağları", "dolaşık (entangled) polimer çözeltileri", "kimyasal jeller", "fiziksel jeller" ve "sıvı jeller" gibi terimler kullanılmaktadır. Genel olarak CGE'de kullanılan jel ortamı iki kısma ayrılır:

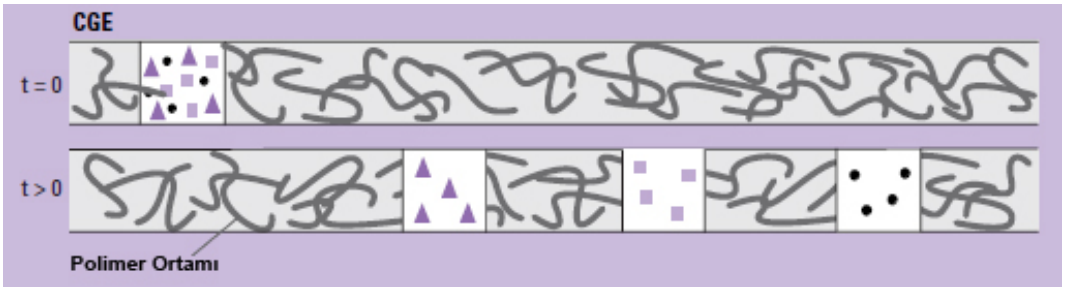
- "Kimyasal jeller" (Kovalent Duvar Kaplaması) oldukça yüksek viskoziteli, çapraz bağlı jellerdir ve bu jeller kapiler duvarına kimyasal olarak kalıcı bir şekilde bağlanırlar.
- "Fiziksel jeller" (Dinamik Duvar Kaplaması) oldukça düşük viskoziteli ve adsorpsiyon etkileşimleri ile ilgili olan polimer çözeltileri. Çizelge 2.4'de bu jellerin arasındaki temel farklılıklar özetlenmiştir (Schwartz ve Guttman 1995; Horvath ve Dolnik 2001).

Çizelge 2.4. CGE'de kullanılan jel maddelerinin özellikleri (Schwartz ve Guttman, 1995)

Kimyasal Jeller	**Fiziksel Jeller**
Kapiler duvarına çapraz ve/veya kimyasal bağlarla bağlıdır	Kapiler duvarına bağlanmaz
Por yapısı iyi tanımlanmıştır	Dinamik (değişken) por yapısına sahiptir
Por büyüklüğü polimerizasyondan sonra farklılık göstermez	Por büyüklüğü değişebilir
Isıya duyarlıdırlar	Isıya duyarsızdırlar
Oldukça yüksek ayırım gücü sağlar (örneğin, oligonükleotitlerin ayırımı)	Tanecikler kolaylıkla uzaklaştırılabilir
Genellikle viskoziteleri yüksektir, değiştirilemezler	Oldukça düşük viskoziteye sahip maddeler kullanılırsa jeller değiştirilebilir

Gözenekli bir yapıya sahip olan jeller, tabaka jel elektroforezinde olduğu gibi "moleküler elek" gibi davranırlar ve yüklü maddeler jel dolu kapilerden göç ederken boyutlarına göre ayrılırlar. CGE'de ayırımın esası büyüklük olmasına rağmen bu yöntem özellikle sabit yük/büyüklük oranlarına sahip ve zincir uzunluklarından bağımsız farklı büyüklükteki yüklü moleküllerin ayırımları için uygundur. Bu yöntemde küçük boyutlu moleküller jel maddesi tarafından daha az alıkonurlar ve büyük boyutlulara göre ortamdan daha önce ayrılırlar (Şekil 2.17). Genellikle jeli oluşturan polimerin derişimi, ayrılacak molekülün büyüklüğüyle ters orantılıdır. Ayrıca jeller, kapiler duvarına analizi yapılan molekül veya türlerin yapışmasını engellerler. En önemlisi elektroozmotik akışın ortadan kaldırılmasını ya da kontrol altına alınmasını sağlar. Elektroozmotik akış

kaldırılırsa anyonlar anoda, katyonlar katoda yönelir. Nötral maddeler ise enjeksiyon yerinde kalır (Li 1992; Schwartz ve Guttman 1995; Frazier ve ark. 2000; Heiger 2000).



Şekil 2.17. CGE yönteminde ayırımın şematik gösterimi (Heiger, 2000)

CE ile çıplak silika kapiler kolon ve dolgulu kolonlar kullanarak DNA tayinleri yapılabilmektedir. Ancak çıplak silikada DNA molekülleri kapiler duvarına adsorbe olduğundan tekrarlanabilirlik düşüktür ve piklerde kuyruklanma meydana gelebilmektedir (Wu ve ark., 2006).

Tekrarlanabilirliği arttırmak, etkin ayırma sağlamak ve elektroozmotik akışı kontrol altına almak amacıyla kapiler kolonların kovalent veya dinamik olarak kaplanmasına gerek görülmüştür (Stellwagen ve Stellwagen, 2009). Ayrıca bu amaçla hem kovalent hem de dinamik kaplamaların her ikisini de içeren birleşik sistemler de kullanılmaktadır (Horvath ve Dolnik, 2001).

2.5.6.1. Kovalent (kalıcı) duvar kaplaması

Kalıcı duvar kaplaması, ayırım yapılan kapilerde EOF'ı ve duvar−analit etkileşimini ortadan kaldırmanın en etkili yoludur. Ayırma verimleri esas alındığında yaygın olarak kullanılan çapraz bağlı poliakrilamit kaplı kapiler kolonlar, başka tür kolon kaplamalarına göre üstündür ve bu kaplamalar adsorpsiyon yöntemleri ile hazırlanamazlar (Horvath ve Dolnik, 2001). Çapraz bağlı poliakrilamit jel oluşturmak üzere bir grup (vinil grubu gibi), akrilamit monomeri ve bis−akrilamit ile N,N,N′,N′−tetrametiletilendiamin (TEMED) ve amonyum persülfat varlığında tepkimeye sokulur. Jelin ayırma gücünü akrilamitin

toplam miktarı (%T) ve çapraz bağlayıcının (%C) oranı belirler. 10−60 baz aralığındaki oligonükleotitlerin ayırımında %5 T, % 5C jel yüzdesi uygun bir ayırım sağlarken, 100−1000 baz çifti aralığındaki çift sarmal DNA için ise %3 T, %3 C jel yüzdesi tavsiye edilmektedir. Bu tip kolonların hazırlanmaları oldukça dikkat gerektirir. Çok hızlı polimerizasyon, gazlardan arındırılmamış çözeltilerin ya da safsızlık içeren kimyasalların kullanılması genellikle bu kolonlarda kabarcık ya da sağlam olmayan kararsız jel oluşumuna neden olur. Çapraz bağlı poliakrilamitin en büyük eksikliği esnek olmayan yapısıdır. Kirli örnekler, kapiler kolonun uçlarını tıkar ya da kullanım sırasında hava kabarcığı olması bu tip kolonları kullanılamaz hale getirir. Sentetik oligonükleotitler gibi temiz örnekler ile çalışıldığında 100'den fazla analiz yapmak olasıdır. Biyolojik örneklerle çalışıldığında jel, örnek ortamında bulunan proteinler gibi bileşenlerle kirlenir. Ayrıca eğer bu tip kolonlar kullanılmadan önce düşük sıcaklıklarda saklanmışlarsa, jelin sıcaklığa bağlı olarak bozulmasını engellemek amacıyla soğutma işlemleri yavaş yavaş yapılmalıdır. Jelin kapiler uçlarında kuruması jel maddesinin bozulmasına neden olacağından kapilerin uçları her zaman ıslak tutulmalıdır. Bu oluşumları engellemek için bu tip kolonlarla mutlaka dikkatlice çalışılmalıdır. Bu tip kolonlar doğru kullanıldığında tek bir kapiler kolon ile çok sayıda enjeksiyon yapmak olasıdır. Çapraz bağlı poliakrilamit kolonlar kullanıldığında, jelin esnek olmayan yapısı hidrodinamik örnek enjeksiyonunu engeller (Cunico ve ark. 1998; Heiger 2000).

DNA'ların fiziksel özelliklerini belirlemede, çok düşük EOF hareketlilik sağlamaları nedeniyle kovalent kaplı kapiler kolonlarını kullanmak daha yararlıdır. Ancak bu kaplamaların ömrü siloksan (Si−O−Si) köprülerinin hidrolize uğrayarak kırılmaları nedeniyle oldukça kısadır (Stellwagen ve Stellwagen, 2009). Bu yüzden, farklı ayırım amaçları için hidrolize karşı kararlı ve tekrarlanabilir sonuçlar veren kovalent bağlı kapiler kolonların hazırlanması önem kazanmıştır. Kalıcı duvar kaplaması genellikle 3 aşamayı içerir: kapiler kolonun ön işlemi, kapiler duvarına çift bağların yerleştirilmesi (arada bulunan tabaka) ve polimerin bu aradaki tabakaya bağlanmasıdır.

En iyi kaplama sonuçlarını elde etmek için kapiler kolonun yüzeyi mutlaka temizlenmeli ve kaplama işlemi öncesinde sodyum hidroksit ve/veya hidroklorik

asit gibi çözeltilerle etkinleştirme ön işlemi uygulanmalıdır. Bir sonraki silanlama reaksiyonu ürününü arttırmak için, kolon 160^{o}C'da bir gece bekletildikten sonra yüzeyde kalan suyun hepsinin uzaklaştırılması sağlanır. Daha sonra polimer kaplamanın kolon duvarına kolayca bağlanmasını sağlamak amacıyla ortama iki fonksiyonel grup içeren γ−metakriloksi propil trimetoksi silan gibi bir reaktif eklenir. Kolon yüzeyindeki silanol grupları, bu reaktifte bulunan silan grupları ile etkileşir ve sonrasında reaktifte bulunan diğer fonksiyonel grup monomerlerin bağlanması ve polimerleşmesini sağlamak amacıyla kullanılır (Horvath ve Dolnik, 2001).

Silika yüzeyinin kimyasal bağlanma yoluyla etkisizleştirilmesi değişik şekillerde yapılabilir. Çizelge 2.5'da silika yüzeyinin etkisizleştirilmesinde kullanılan kaplama kimyasalları ve özellikleri verilmiştir (Lunte ve Radzik 1996; Horvath ve Dolnik 2001). Seçicilikteki herhangi bir etki, bağlı fazın yapısı ile ilgilidir (Liu, 2001).

Çizelge 2.5. Çıplak silika kolonun etkisizleştirilmesi için kullanılan kaplamalar ve özellikleri (Lunte ve Radzik 1996; Horvath ve Dolnik 2001)

Kaplama	**Özellikleri**
Poliakrilamit	Düşük pH'da kullanışlı
(çapraz bağlanmamış)	Sınırlı kararlılık
Diol	Düşük pH'da kullanışlı
	Düşük verimlilik, sınırlı kararlılık
Maltose	pH 7'ye kadar kullanışlı
	Sınırlı kararlılık, düşük verimlilik
Gliseroglisidoksi Propil	Düşük pH'da ayırımlar
	Sınırlı kararlılık
Polivinilpirolidinon	pH 5'ye kadar kullanışlı
	Bazı proteinlerin adsorpsiyonu
Aril Pentafloro	Orta iyonik şiddette çalışma
	Nötral pH'da ayırım
	Geniş pH aralığında kullanışlı
	Gün içi %7'lik bağıl standart sapma

Çizelge 2.5. (Devam) Çıplak silika kolonun etkisizleştirilmesi için kullanılan kaplamalar ve özellikleri (Lunte ve Radzik 1996; Horvath ve Dolnik 2001)

Kaplama	**Özellikleri**
Polietilen Glikol	Düşük pH'da ayırım
	Nötral pH'da düşük verimlilik
Polietilenimin	Pozitif yüklü kaplama
	pH aralığı üstünde EOF seviyelendirilmesi
İyonik Olmayan Yüzey Aktif	Yüksek protein geri kazanımı
Madde/Alkilsilan	pH aralığı üstünde EOF seviyelendirilmesi
	Kaplama yenilenebilir
	İyi tekrarlanabilirlik, kararlılık
Vinil Bağlı Poliakrilamit	Si−C bağlarında artan kararlılık
	Düşük ve yüksek pH'da ayırımlar
	İyi tekrarlanabilirlik
Aminopropil	Düşük pH'da pozitif yüklü
	Birkaç hafta kararlılık
İmmobilize Laktalbumin	pH'a bağlı yük
	Düşük EOF
	Nötral pH'da ayırım
Poly(metilglutamat)	Nötral pH'da çalışma
	Nötral pH'da makul verimlilik
Poliakrilamit	Büyük ölçüde çapraz bağlı, kararlı kaplama
(alken yoluyla)	Düşük ve yüksek pH'da çalışma
	İyi verimlilik ve tekrarlanabilirlik
Çapraz Bağlı Epoksitler	pH aralığı üstünde EOF seviyelendirilmesi
	150 saat kararlılık
	Birden çok sentez basamağı
Polioksietilen	Bir basamakta sentez
	pH aralığı üstünde EOF seviyelendirilmesi
	İki haftaya kadar kararlılık
Polieterler	Birden üçe kadar sentez basamağı
	>80 saate kadar kararlılık
	Kaplama yenilenebilir
Polivinil Alkol	Geniş pH aralığı
	Yüksek pH değerlerinde bile EOF'nin baskılanması
	Kaplamada bir seri analizden sonra kararlılık

Çizelge 2.5. (Devam) Çıplak silika kolonun etkisizleştirilmesi için kullanılan kaplamalar ve özellikleri (Lunte ve Radzik 1996; Horvath ve Dolnik 2001)

Kaplama	Özellikleri
Selüloz	pH (3–10) arasında kararlılık
	İzoelektrik odaklama koşullarında kullanıma uygun
Dekstran	Azaltılmış EOF
	İyi kimyasal kararlılık
	Asidik ve bazik proteinlerin ve mono−oligosakkaritlerin yüksek ayırım gücü

2.5.6.2. Dinamik duvar kaplaması

Dinamik duvar kaplaması, kapiler kolon içinde tekrarlanabilir ve homojen kimyasal türevlendirme tepkimelerinin yürütülmesinde ortaya çıkan zorlukların üstesinden gelinmesinde ilgi çekici bir kaplama yöntemidir. Kovalent kaplamaya göre daha yaygın olarak kullanılan dinamik kaplamada genellikle çözelti içerisine kaplama ajanı olarak polimer ya da küçük molekül ağırlıklı bileşik eklenerek bu çözelti kapiler kolondan geçirilir. Genellikle ayırma ortamına eklenen az miktardaki ajan kapiler duvarı yüzeyine adsorpsiyon temeline göre bağlanır. Dinamik kaplı kapiler kolonların ömrü, ara sıra ve basit yenileme işlemleri kullanılarak uzatılabilir. Dinamik kaplamada, polimerik ya da küçük molekül ağırlıklı tampon katkı maddelerinin birçok türü kullanılır (Horvath ve Dolnik, 2001).

Amin türevleri (trietilamin, propil amin, morfolin, putreskin, spermidin gibi), selüloz türevleri, sıvılaştırılmış agaroz, dekstran, lineer poliakrilamit (LPA) ve türevleri, poli(etilen oksit) (PEO), poli(etilen glikol) (PEG), poli(vinilpirolidon) (PVP), kopolimerler (akrilamit−dimetilakrilamit), poli(N,N−dimetilakrilamit) (PDMA) ve çeşitli yüzey aktif maddeler (nötral özellikteki Brij−35, katyonik didodesildimetilamonyum bromür (DDDMA), tetrabütilamonyum bromür (TBAB) ve CTAB gibi) de yine adsorpsiyonu önlemek, elektroozmotik akışı kontrol etmek veya azaltmak ve çözünürlüğü arttırmak amacıyla çalışma tamponuna eklenerek kullanılabilmektedir. Ayrılacak

DNA'lara bağlı olarak bu maddelerin duvar kaplama özellikleri için derişimleri ve molekül ağırlıkları ile ilgili en iyi koşulların belirlenmesi gerekmektedir (Cunico ve ark. 1998; Lin ve Chang 2006; Schmitt−Kopplin 2008; Olmo 2008; Stellwagen ve Stellwagen 2009; Zhang ve ark. 2011).

Ayrıca CGE yöntemi kiral seçiciler, iyon çifti reaktifleri (sülfobetainler gibi) ya da diğer kompleksleştirici ajanların (örneğin DNA için EtBr ve proteinler için SDS gibi) eklenmesi ile değiştirilerek de uygulanabilir. Bu türler jele kovalent olarak bağlanır ya da sadece tampon çözeltisine eklenir (Heiger 2000; Olmo 2008).

Düşük viskoziteli polimer çözeltileri ile hidrodinamik örnek enjeksiyon kullanılabilir ve bu çözeltiler derişim ve viskozitelerine bağlı olarak kapiler kolona defalarca doldurulabilir. Ayrıca bu çözeltiler kabarcık oluşumuna daha az duyarlıdırlar. Bu açılardan bu çözeltiler daha fazla kararlılık sağlamalarına rağmen, sistemin duvar kaplama doğruluğunu daha çok etkilerler (Heiger, 2000).

DNA ayırımlarında kullanılan polimerlerin uygun jel maddesi olarak kullanılabilmesi için suda çözünebilir olmalarının yanı sıra aşağıdaki özelliklere de sahip olmaları gerekir:

- Yüksek derişimlerde kullanılsalar da düşük ya da orta derecede viskoziteye sahip,
- Yüksek ayırma kapasitesine sahip,
- Bazik pH'larda yüksek kimyasal kararlılık,
- Hazırlanması kolay,
- Ucuz,
- Geniş tampon derişim aralığında uygulanabilir olmalıdır (Chiari ve Melis 1998; Lucy ve ark. 2004).

Polimer elek esasına dayanarak dinamik kaplama yöntemi ile yapılan ayırımların işleyişi CZE ayırımlarına çok benzerdir. Kapiler kolon polimer çözeltisi ile doldurulur, örnek enjeksiyonu yapılır ve gerilim uygulanır. Polimer çözeltisi her ayırımın başında yenilenir. Bu yüzden, bu ayırımların tekrarlanabililiği çok iyidir ve genellikle tek bir kapiler kolon ile yüzlerce analiz

yapılabilir. Polimer çözeltileri düşük UV bölgesinde oldukça geçirgendirler ve bu çözeltilerin kullanımı 260 nm'de DNA analizlerinin yanı sıra 200 nm'de protein ayırımlarına da olanak sağlar.

Polimer çözelti sisteminin en iyi koşullarının belirlenmesi için analite uygun bileşimde polimer ve zincir uzunluğu seçilmelidir. Genellikle zincir uzunluğu, analitin molekül büyüklüğüne benzer. Polimer derişimi, istenen ayırma gücü seviyesine göre ayarlanır. Güçlü ayırma polimer derişiminin arttırılması ile elde edilir. Fakat bu noktada çözeltinin viskozitesi kapiler kolonun içine girişini zorlaştıracaktır. Viskoz olan polimer çözeltileri kapiler kolona ve elektrot yüzeyine yapışabilir ve polimerin taşınmasında sorunlara yol açar. Bu durumda polimer değiştirme aşamasından sonra kapilerin ve elektrotun su ya da tampon ile yıkanması tavsiye edilmektedir (Cunico ve ark., 1998).

Dinamik Duvar kaplamasında kullanılan polimerler:

Aşağıda CGE yönteminde dinamik duvar kaplamasında ayırma ortamı olarak en çok kullanılan polimerlerden bazıları kısaca açıklanmıştır.

Yüklü polimerler

Yüklü polimerlerin kapiler yüzeyine adsorpsiyonu yüzeyin pozitif ya da negatif yüklenmesini sağlar ve bu sayede analit−duvar etkileşiminin yanı sıra EOF'nin gücü ve/veya yönü değiştirilir. EOF, poliamin (örneğin eCAP^{TM}), poli(dimetildiallilamonyum klorür) (PDMAC), poli(etilenimin) (PEI), polibren (PB), poli(arjinin) (PA) ve katyonik siklodekstran gibi güçlü katyonik polimerler ile tersine çevrilebilir. Katyonik kapiler kaplamaları kullanılarak pozitif yüklü proteinler, peptitler ve ilaç örnekleri etkili bir şekilde ayrılır. PEI hem immobilize hem de fiziksel adsorplanan tabaka olarak kullanılabilir. Adsorplanmış PEI kapiler kolonlar hızlı ve kolay bir şekilde hazırlanabilir ve pH 3 ile 11 arasında çok iyi bir kararlılığa sahiptirler. PB ve PA kolonlar kıyaslandığında PA kolonlar daha yüksek verimlilik sağlamalarına karşın PB kolonların kararlılıkları daha iyidir. PDMAC kaplı kapilerle kıyaslandığında ise PB kolonların

tekrarlanabilirlikleri daha düşük olup kaplama maddesinin daha sık uygulanmasını gerektirirler.

Anyonik dekstran sülfat ile doldurulan kapiler kolonlar pH 2 ve 11 arasında pH'dan bağımsız EOF oluştururlar ve böylelikle asidik proteinlerin ve amino asitlerin ayırımları sağlanır (Horvath ve Dolnik, 2001).

Lineer poliakrilamit (LPA)

CGE'de DNA ile ilk yapılan çalışmalarda çapraz bağlı poliakrilamit çözeltiler kullanılmıştır. Ancak böyle çözeltilerin kapilerde homojen jel hazırlanma zorluğu, kapilere yüksek elektriksel alan uygulandığında kırılganlığın fazla olması nedeniyle kısa ömür ve her analizden sonra ayırma matriksinin değiştirilme gerekliliği gibi olumsuzlukları vardır (Schmitt−Kopplin, 2008). Çapraz bağlı polimer jel doldurulmuş kapiler kolonlar ile karşılaştırıldığında çapraz bağlı olmayan (LPA) polimer çözeltileri basit, esnek ve değiştirmesi kolay olduğundan CGE'de ayırma ortamı olarak daha çok kullanılır (Liu ve ark., 2007).

LPA, diğer polimerler (PEG, PEO, PVA gibi) arasında 100−1000 baz büyüklük arasındaki PCR ürünlerinin analizleri ve genetik bozuklukların taranmasında oldukça popülerdir. LPA çözeltileri özellikle tek sarmal DNA'nın denatüre edilmesi ile tek−baz ayırımlarının yapıldığı DNA dizileme analizlerinde geniş uygulama alanı bulmuştur. Dizileme analizlerinde okuma uzunluğunu genişletmekte hem polimer derişimi hem de molekül ağırlığı önemlidir. 1000 baza kadar olan DNA dizileme reaksiyon ürünlerinin %2 LPA (9 mDa) ve %0,5 LPA (50 kDa) karışımı ile 1 saatten kısa bir sürede ayırımları gerçekleştirilir. %2 LPA (16 mDa) ve %0,5 LPA (250 kDa) karışımı kullanılarak 125 V cm^{-1}'de 1300 bazın okuma süresi 2 saate uzatılabilir. LPA ile yapılan analizlerdeki asıl problem, lineer zincirlerinin molekül ağırlığının yüksek olması nedeniyle bu çözeltilerin viskozitesinin fazla olmasıdır (Chiari ve Melis 1998; Weinberger 2000). Polimer zincir uzunluğu kısaldıkça LPA viskozitesi de azalır. Bu yüzden çalışmalarda ayrılacak maddenin büyüklüğüne bağlı olarak uygun özelliklerde LPA çözeltileri kullanılmalıdır (Xu ve Baba, 2004). Ayrıca LPA çözeltilerinin diğer bir eksikliği

de PDMA, PEO ve PVP ile kıyaslandığında EOF'yi azaltmada daha az etkili olmasıdır (Dolnik, 1999).

Selüloz Türevleri

Selüloz, 1,4−D−glukopiranoz birimlerinden oluşan doğal bir lineer polimerdir. Tampon katkı maddesi olarak selüloz türevlerinden; metil selüloz (MC), hidroksietil selüloz (HEC), hidroksipropil selüloz (HPC) ve hidroksipropilmetil selüloz (HPMC) kullanılmaktadır (Chiari ve Melis, 1998). Yapılan kaynak taramalarında, ayrılacak olan maddelerin büyüklüklerine bağlı olarak ve selüloz türevlerinin molekül ağırlıkları ve viskoziteleri de göz önünde bulundurularak bu çözeltilerin çok değişik yüzdelerinin jel ortamları olarak kullandıkları görülmüştür. Örneğin, küçük DNA parçalarının ayırımında molekül ağırlığı 1.300.000 g mol^{-1} olan HEC'un %0,8−2,5 derişim aralığı ve molekül ağırlığı 1.000.000 g mol^{-1} olan HPC'un %1,9−3,4 derişim aralığı kullanılmaktadır (Huang ve ark., 2001b).

Poli(vinil alkol) (PVA)

Poli(vinil alkol) (PVA), HEC'a göre silika yüzeyine daha kuvvetli bağlarla bağlanır ve kolonların PVA ile kaplanmasıyla kararlılık arttırılmaktadır. PVA kaplı kapiler kolonlar ile ayırma ortamı olarak HEC ve LPA kullanıldığında DNA restriksiyon parçalarının iyi bir ayırımı sağlanabildiği halde birkaç ayırımdan sonra homojen olmayan ağların oluşumu nedeniyle PVA eleme ortamı olarak kullanılamamaktadır (Horvath ve Dolnik, 2001). PVA çözeltileri %12 (a/h)'lik derişimlerde de oldukça düşük viskoziteye sahiptirler. Ancak PVA polimeri sahip olduğu güçlü hidrojen bağları nedeniyle kolayca kendi kendine polimerize olur ve çözeltilerinin saklanması sırasında ayırma verimliliği azalır (Xu ve Baba, 2004).

Poli(etilen oksit) (PEO)

PEO kendi kendini kaplama özelliğine sahiptir ve kapiler duvarıyla adsorpsiyon esasına göre etkileşir. Kaplama özelliklerinin iyileştirilmesi için silanol gruplarının tümüyle protonlanması gerekmektedir. Bu nedenle kapiler kolonların kaplama işleminden önce ve deneyler arasında hidroklorik asidin ardından PEO çözeltisiyle yıkanması gerekmektedir. PEO kaplı sistemlerin en önemli eksikliği her 30 çalışmanın ardından bu kapiler kolonların 1 saat şartlandırılması zorunluluğudur. PEO, DNA örneklerinin ayırımında çok önemli bir polimer eleme ortamı sağlar. Küçük molekül ağırlıklı PEO karışımları küçük DNA parçalarının ayırımında yüksek verimlilik sağlarken, büyük DNA parçalarının ayırımında büyük molekül ağırlıklı PEO çözeltileri kullanılır. Örneğin, 400 kDa'luk çeşitli derişimlerdeki PEO çözeltileri ile 82 baz çifti (bç)/88 bç DNA parçaları ayrılabilirken, 8000 kDa'luk çeşitli derişimlerdeki PEO çözeltileri ile 506 bç/517 bç ve 7 kbç/10 kbç DNA parçaları ayrılabilmektedir. Çeşitli uzun ve kısa PEO zincirlerinin bir arada bulunduğu çözelti karışımları (%1,4'lük 600 kDa PEO ve %1,5'luk 8000 kDa PEO gibi) kullanılarak da uygun viskozitenin elde edilmesi ile geniş aralıktaki DNA parçalarının ayırımı sağlanabilmektedir. Viskozitesi 1200 cP olan PEO çözeltisi ile, viskozitesi 4900 cP olan LPA çözeltisinden daha iyi ayırım ve daha kısa analiz süresi elde edilmiştir. Ayrıca PEO'in çeşitli kopolimerleri kullanılarak da ayırma ortamlarının oluşturulması ile etkili bir şekilde dinamik kaplamalar yapılabilmektedir (Horvath ve Dolnik 2001; Xu ve Baba 2004).

Poli(vinilpirolidon) (PVP)

Diğer polimerler arasında poli(vinilpirolidon) PVP, düşük viskozitesi, aynı karbon ve molekül ağırlıktaki diğer polimerlere kıyasla mükemmel bir dinamik kaplama kabiliyeti, kısa hazırlanma süresi, uzun ömür ve yüksek tekrarlanabilirlik gibi sebeplerden ötürü pahalı olan hazır kaplı kapiler kolonların yerine tercih edilir. Çünkü yüksek viskoziteli polimer çözeltileri yüksek basınç ve daha uzun doldurma süresi gerektirir, yıkama ve doldurma zorluğu olur bu da verimliliği

azaltır (Schmitt−Kopplin, 2008). Kaplanmamış kapiler kolonlarda kullanılan PVP, genotipleme ve dizileme uygulamalarında etkili bir eleme ortamı sağlar. Analizler arasında da basit kolon yenileme basamağı kullanılır. PVP kaplama, PEO kaplama ile karşılaştırıldığında, EOF'ın daha etkili bir şekilde azalmasını ve daha kısa yenileme süresi sağlamaktadır (Horvath ve Dolnik, 2001). Ayrıca LPA ve PVP karışımları çift sarmal DNA için ayırma ortamı olarak başarılı bir şekilde uygulanabilmektedir (Xu ve Baba, 2004).

Agaroz

Agaroz jeller büyük por büyüklüğüne sahip, yüksek dayanıklılıkta olup biyolojik olarak inert özelliğe sahiptirler. Tabaka jel elektroforezinde olduğu gibi CE'de de agaroz oldukça büyük DNA'ların ayırımlarında orta derecede tercih edilir. Kapiler içerisinde istenmeyen EOF'tan kaçınmak için özel saflık derecesinde agaroz kullanılmak zorundadır ve agaroz çözeltileri 260 nm'de optik olarak temiz olmalıdır. 40^{o}C'da %0,3 (a/h) ve %2,6 (a/h) arasındaki agaroz derişimleri kullanılarak CGE ile DNA kesim parçaları tayin edilebilmektedir. Sıvılaştırılmış agarozun jelleşme sıcaklığı üzerinde çalışmanın üstünlükleri, kapiler içerisinde değiştirilebilmesi, kolay doldurulabilmesi, temizlenmesi ve tekrar doldurulabilmesidir. Bu tip agarozun diğer bir üstünlüğü ise ng düzeyinde düşük DNA tayinleri için 254 nm'den 260 nm'ye kadar olan absorbans değerlerinin yeterli olmasıdır. Ayırma ortamı olarak agaroz kullanıldığında kapiler kolonların iç yüzeyleri lineer poliakrilamit gibi uygun bir polimer ile kaplanmalıdır. Bu yöntem kullanılarak çift sarmal DNA'nın ayırımı için etkin büyüklük aralığı yaklaşık 12 kb olarak sınırlandırılmış olur (Schwartz ve Guttman, 1995).

Dekstran

Dekstranlar bazı bakteriler tarafından sükrozdan üretilen, suda çözündüklerinde yapışkan ve viskoz olan polisakkaritlerdir. Dekstran, proteinlerin ayırımında LPA'in çok sayıda olan sınırlamalarının üstesinden gelmektedir.

Dekstran çözeltileri kolaylıkla pompalanabilir, değiştirilebilir, çözeltileri düşük UV absorbansına sahiptir ve hassas tayin sağlarlar. %6−15 (a/h) arasında değişen dekstran yüzdeleri kullanılarak farklı büyüklüklerdeki proteinler, oligonükleotitler ve DNA dizileri ayrılabilmektedir (Heiger 2000; Weinberger 2000). Dekstranın yanı sıra glukomannan ve pullulan polisakkaritler kullanılarak da ayırma jel ortamları hazırlanabilmektedir (Chiari ve Melis, 1998).

Polietilen Glikol

Lineer bir polimer olan polietilen glikol (PEG)'ün 100.000 molekül ağırlıklı %3'lük çözeltisi kullanılarak 14−94 kDa büyüklüğündeki SDS−proteinler 214 nm'de ayrılabilir. PEG ile yapılan protein ayırımları dekstranlarla kıyaslandığında analiz süreleri biraz daha uzundur. Her bir analizden sonra PEG çözeltileri değiştirildiğinde göç zamanlarının bağıl standart sapmaları %0,4−0,5 olarak bulunmuştur. Bu polimer bozulmadan 300 enjeksiyondan daha fazla analiz verimli bir şekilde yapılabilmektedir (Weinberger, 2000).

2.6. CGE ve DNA Tayinleri

DNA molekülleri sabit yük/büyüklük oranına sahip olduğundan onların çözeltideki elektroforetik hızları zincir uzunluklarına bakılmaksızın eşittir (Schmitt−Kopplin, 2008). Kapiler elektroforez ile DNA ayırımları, DNA moleküllerinin negatif yük özelliği ve çift sarmal yapılarına zarar vermeyen nötral pH'ta veya yakın bir pH'ta gerçekleştirilir (Konuk ve ark. 2009; Stellwagen ve Stellwagen 2009).

Çizelge 2.6'de CGE ile DNA ayırımlarında dinamik kaplama jel ortamı olarak sıklıkla kullanılan bazı polimerlerin, molekül ağırlıkları ve/veya viskoziteleri, çözeltideki derişimleri ve deneylerde kullanılan tampon çözelti ortamları verilmektedir (Quesada 1997; Xu ve Baba 2004).

Chen ve ark. (2009) bir kan hastalığı olan akdeniz anemisi (α−talasemi) delesyonlarının genetik özelliklerini çoklu PCR tepkimelerini kullanarak dinamik kaplı PVP kaplı kapiler kolonu ve ticari DB−17 kapiler kolonu kullanarak

araştırmışlardır. Bu çalışmada altın parçacık ve PEO (Ma 8.000.000 g mol^{-1}) içeren glisin tamponu, ayırma ortamı olarak kullanılmıştır.

Çizelge 2.6. CGE ile DNA ayırımlarında kullanılan bazı polimerlerin, özellikleri, çözeltideki derişimleri ve deneylerde kullanılan tampon çözelti ortamları

Polimer	**Molekül Ağırlığı (kDa) ve/veya Viskozitesi (cP)**	**Derişim (% a/h)**	**Tampon**
LPA	9000 kDa 27400 cP (25 °C)	2	50 mM Tris−TAPS, 2 mM EDTA, 7 M Üre
LPA	339 kDa	6,2	220 mL su, 40 mL metanol, 5,6 g Tris, ağırlıkça % 85'lik fosforik asit ile titre edilir
pDMA	200 kDa 1200 cP (30 °C)	6,5	100 mM TAPS, 8 M Üre, pH 8
pDMA	98 kDa 75 cP (30 °C)	6,5	100 mM TAPS, 8 M Üre, pH 8
PEG	35 kDa 10 000 cP (ortam sıcaklığı)	6	100 mM TAPS, 6 M Üre
PEO	8000 + 600 kDa 1200 cP (ortam sıcaklığı)	1,5 + 1,4	89 mM Tris−borat, 2 mM EDTA, 3,5 M Üre, pH 8,2
PVP	1000 kDa 27 cP	4,5	89 mM Tris−borat, 2 mM EDTA, pH 8,0
HEC	97 kDa 5000 cP (25 °C)	2	89 mM Tris−borat, 2 mM EDTA, 6 M Üre, % 10 formamid
HPMC−4000	4390 cP (ortam sıcaklığı)	2	50 mM Tris−borat, 2,5 mM EDTA, pH 8,3
HPMC−50	40 cP (25 °C)	50	89 mM Tris−borat, 2 mM EDTA, pH 8,3, polihidroksi
HPMC−5	5,7 cP (20 °C)	5	100 mM Tris−borat, 2 mM EDTA, pH 8,0, mannitol
MC−4000	4390 cP (20 °C)	2	50 mM Tris−borat, 2,5 mM EDTA, pH 8,3
MC−8000	7980 cP (20 °C)	2	50 mM Tris−borat, 2,5 mM EDTA, pH 8,3
HPC−11000	11,000 cP (20 °C)	2	50 mM Tris−borat, 2,5 mM EDTA, pH 8,3

Farklı molekül ağırlıklarındaki PEO polimerinin (600.000 ile 8.000.000 g mol^{-1} veya ikisinin karışımı olarak) değişik yüzdelerde katkı maddesi olarak kullanıldığı ve çıplak silika kapiler kolonda DNA ayırımlarının yapılması konusunda da pek çok çalışma bulunmaktadır (Fung ve Yeung 1995; Chen ve Chang 1999; Huang ve ark. 2001c, Geoun ve ark. 2002; Chiou ve ark. 2004).

CE yöntemi ile ticari eCAP nötral kapiler kolonu kullanılarak da DNA'larla ilgili değişik çalışmalar yapılmıştır (McIntosh ve ark. 2000; Stellwagen ve Stellwagen 2002a; Stellwagen ve Stellwagen 2002b). Palm ve Marko–Varga (2004) tarafından aynı tip kapiler kolon (eCAP) kullanılarak bu çalışmalardan farklı olarak çalışma tamponuna %16 (a/h) dekstran (Ma 464,000) eklenmiş ve insan plazmasındaki oligonükleotitler ayrılmıştır.

Moritani ve ark. (2003) kapiler kolonunun iç yüzeyini PVA ile 3 değişik yöntem ile kaplayarak 8–589 baz çifti arasında 22 adet DNA parçası içeren standardı ayırarak bu kaplamaların verimliliklerini kıyaslamışlardır.

Nutku ve Erim Berker (2003) tarafından 11 farklı büyüklükteki DNA parçaları (72−1353 bç arasında) polietilenimin kaplı kapiler kolon ile ayrılmıştır. Bu çalışmada ayırma ortamı olarak 89 mM Tris, 89 mM borik asit, 5 mM EDTA, pH 8,2 içeren tampon çözeltisine orta viskozitedeki HEC (438.000 g mol^{-1}) %0,5 ve %0,8 (a/h) eklenerek 260 nm'de UV dedektör ile tayinler yapılmıştır.

Zhou ve ark. (2005) DNA standardı ve plazmid DNA'sını, farklı tampon çözeltiler içerisine (89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA veya 50 mM MES pH 6,0−7,3) jel maddesi olarak farklı yüzdelerde poli(N−izopropilakrilamit) (PNIPAM) ekleyerek ve değişik yüzdelerdeki mannitolun etkisini de inceleyerek çıplak silika kapiler kolonunda ayırmışlardır.

Gao ve ark. (2011) farklı biçimdeki PDMA polimerleri tasarlayıp sentezlemişler ve bu polimerleri TBE (100 mM Tris, 90 mM borik asit, 1 mM EDTA, pH 8,3) tamponuna ekleyerek çift sarmal DNA parçalarını (72–1353 bç) CE'de lazer kaynaklı floresans (LIF) dedektör kullanarak ayırmışlardır. Elektrokinetik örnek enjeksiyonu (−4 kV, 3 s) yöntemini kullanarak ayırma gerilimi olarak −8 kV uygulamışlardır.

Albarghouthi ve ark. (2002) farklı poli−*N*−hidroksietilakrilamit (polyDuramide, PHEA) derişimlerini kullanarak en iyi koşulları belirledikten

sonra adsorpsiyon esasına göre dinamik kaplanmış kapiler kolonda DNA dizileme analizi yaparak DNA'daki baz sıralarını tayin etmişlerdir.

Song ve ark. (2009) sentezledikleri farklı molekül ağırlıklarındaki lineer poliakrilamit maddelerini ve N,N−dimetilakrilamit (DMA) kullanarak bu maddelerin polimerlerinden elde ettikleri farklı sözde−kaplama ağ örgüsü (quasi−IPN) polimerleri ile DNA parçalarını ve bazı bazik proteinleri CE yöntemini kullanarak ayırmışlardır.

Song ve ark. (2001) uygun polimerizasyon yöntemini kullanarak akrilamit ve PVP ile hazırladıkları polimer karışımını içeren tampon çözeltisi ortamında CE yöntemi ile farklı büyüklükteki çift sarmal DNA parçalarını ayırmışlardır. Bu çalışmada, kapiler iç duvarının kimyasal olarak kaplanması yapılmadan oldukça yüksek tekrarlanabilirlikte ayırımlar gerçekleştirilmiştir.

Wu ve ark. (2006) çift sarmal DNA ve Çin'de bulunan bazı bitkisel ilaçlardaki aktif bileşen olan berberin arasındaki etkileşimi, hem çıplak silika kapiler kolonu ile hem de poliakrilamit ile kaplanmış kapiler kolonu kullanarak tayin etmişlerdir.

Lee ve ark. (2010) CE yöntemi ile DNA'nın farklı derişimlerdeki Hg^{2+} iyonları ile kompleks oluşum etkisini tampon çözeltisine (100 mM Tris−borik asit, pH 9), %2,0 (a/h)'lik PEO (8.000.000 g mol^{-1}) ekleyerek LIF dedektör kullanarak araştırmışlardır.

Sang ve Ren (2006) CE ile poliakrilamit kaplı kapiler kolonu kullanarak ve gerçek zamanlı PCR yöntemi ile insan kan serumundaki dolaşımdaki serbest DNA'nın miktar tayinini yaparak bu yöntemleri birbiriyle kıyaslamışlardır.

CGE ile DNA karışımlarının, oligonükleotitlerin, dizi oluşturan ürünlerin, restriksiyon parçacıklarının, PCR ürünlerinin ayırımında, metil selüloz, hidroksi propil selüloz, hidroksi etil selüloz gibi birçok farklı polimer çözeltilerinin ayırma ortamı olarak kullanılması ile çok yüksek ayırıcılıkla analizlenmesinde başarılı sonuçlar alınmıştır (Barron ve ark. 1993; Ruiz−Martinez ve ark. 1993).

Jin ve ark. (2001) 16 adet DNA parçası içeren (100 bç−2027 bç aralığındaki) standart kullanarak poliakrilamit kaplı kapiler kolonu ile 100 mM Tris, 100 mM borik asit, 2 mM EDTA, pH 8,3 içeren tampon çözeltisine değişik

yüzdelerde (%0,20–1,61 (a/h) arasında) HPMC (Ma 86.000 g mol^{-1}) ekleyerek ayırım yapmışlardır.

Wang ve Morris (2001) EOF'ı en aza indirmek için lineer poliakrilamit kaplı kapiler kolonu kullanmışlar ve TBE tampon çözeltisine (89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA) %0,17 (a/a) HEC (90.000–105.000 g mol^{-1}) ve %3 (a/a) dekstran (2.000.000 g mol^{-1}) ekleyerek 1 kbç'lik (1016–12216 baz çifti arası 13 parça) DNA standart parçalarını ayırmayı başarmışlardır. Bu çalışmada DNA ayırımlarında polimer esnekliğinin etkisi video mikroskopisi yöntemi ile araştırılmıştır.

Barron ve ark. (1996) tarafından çeşitli baz parçaları içeren DNA standart çözeltisi kullanılarak UV dedektörü ile 260 nm'de çıplak silika kapiler kolonda deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada çapraz bağlı olmayan değişik molekül ağırlıktaki HEC katkı maddeleri (Ma 90.000−105.000 ve Ma 24.000−27.000 g mol^{-1}), 89 mM Tris, 89 mM borat ve 5 mM EDTA (pH 8,15) içeren tampon çözeltisine eklenerek ayırma ortamı olarak kullanılmıştır.

Han ve ark. (1999) 8–587 bç arasında 22 parça içeren DNA standardını ayırabilmek için poliakrilamit kaplı kolon kullanarak değişik yüzdelerde ve viskozilerde olan %4 HPMC−5, %2 HPMC−50, %1,8 HPMC−100 ve %1,2 HPMC−4000 maddelerini 0,1 M Tris, 0,1 M borik asit, 2 mM EDTA tampon çözeltisine ekleyerek çeşitli deneyler yapmışlardır.

Du ve ark. (2003) ayırma ortamı olarak 0,1 M Tris, 0,1 M borik asit, 2 mM EDTA (pH 8,00) tamponuna HPMC−50 (%2 a/h) ve mannitol (%6 a/h) ekleyerek mutasyona uğramış DNA'ların tayinlerini LIF detektör (eksitasyon dalga boyu, λ_{ex}= 488 nm ve emisyon dalga boyu λ_{em}= 520 nm) kullanarak yapmışlardır. Ayrıca bu çalışmada PDMA adsorpsiyonu ile dinamik kaplama yapılmış kapiler kolon ve kovalent bağlanmış poliakrilamit ile sabit kaplanmış kapiler kolonu arasında kıyaslama yapılmıştır.

Chiu ve Chang (2002) büyük DNA parçalarını (5−40 kbç) yüksek pH'da EOF varlığında ve yokluğunda metilamin, dimetilamin ve piperidin çözeltilerine %0,05 ve 1,5 (a/h) HEC (Ma 1.300.000 g mol^{-1}) ekleyerek ayırmışlardır.

Genellikle CGE ile yapılan çalışmalar içerisinde DNA sekanslama (Dolnik, 1999), DNA ilaç etkileşimleri (Araya ve ark., 2007), DNA−protein etkileşimleri

(Singhal ve Otim, 2000), DNA hasarı (Fattorini ve ark. 2004), DNA ve RNA aptamerleri (Ravelet ve ark., 2006) ve enzim−DNA (Li ve ark., 2009) çalışmaları bulunmaktadır.

Yapılan kaynak araştırmalarında CGE yöntemi ile bitki DNA tayinlerine yönelik çok az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bu tez kapsamında CE yöntemi ile gerçekleştirilmesi düşünülen Lamiaceae familyasından olan *Salvia* L. türlerinin DNA'ları arasında taksonomik bir ilişki olup olmadığının araştırılması konusunda kaynak taraması yapılmış ancak herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. CE ile yapılan çalışmaların çoğunlukla standart DNA (Liu ve ark., 2007), bakteri (Zhou ve ark., 2005), veya insan DNA'sı (Sang ve Ren 2006; Zhang ve ark. 2006) üzerine olduğu görülmüştür. Bitkilerle yapılan çalışmalardan bir tanesi CE ile tıbbi bitki ekstrelerinde DNA temelli biyosensör (Minunnia ve ark., 2005) geliştirilmesidir. Farklı bir çalışmada genetiği değiştirilmiş, sabit yağ üretiminde kullanılan Kanola bitkisinde DNA tayini CE yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Chen ve ark., 2007). Başka bir çalışmada bitkilerden 2S albumin sınıfı proteinlerin CE ile farklı çalışma tamponları kullanılarak ayrılabileceği gösterilmiştir (Salmanowicz, 2000). Diğer bir çalışmada ise bu tezde DNA ile yapılması istenen tarzda, fakat proteinler yardımıyla CE ile bitkilerdeki tür tayini yapılmıştır (Piergiovanni ve Taranto, 2005). Ayrıca HPLC yöntemi ile tıbbi bir bitki olan Plantago (sinirli otu) cinslerinde DNA'lar belirlenerek tür sınıflandırması yapılmıştır (Sahin ve ark., 2007). Garcia−Canas ve ark. (2002a), Garcia−Canas ve ark. (2002b) ile yine aynı çalışma grubundan Sanchez ve ark. (2007) genetiği değiştirilmiş mısır örneklerinden elde edilen PCR ürünlerini, çıplak silika kapiler kolonu kullanarak ayırma tamponuna (20 mM Tris, 9,5−10 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, pH 7,3) %4 veya 4,5 (a/h)'luk nötral bir polimer olan HEC (Ma 90.000 g mol^{-1}) ekleyerek kapiler jel elektroforezi yöntemi ile başarılı bir şekilde tayin etmişlerdir. Bu çalışmalarda hem 254 nm UV dalga boyunda hem de LIF dedektör kullanılarak λ_{ex}= 488 nm ve λ_{em}= 520 nm dalga boylarında analizler gerçekleştirilmiştir. Bu doktora tez çalışmasında da, CGE ile yapılan deneylerde bu çalışma grubunun yayınlarından yararlanılarak en iyi koşullar belirlenmiş ve tekrarlanabilirliği yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada CGE'de ayırma tamponunda kullanılan selüloz türevlerinden olan HEC

piyasada kolay bulunduğundan, diğer polimerlere kıyasla suda daha kolay çözündüğünden ve kapilere kolay pompalanma özelliğinden dolayı önemli kolaylıklar sağlamıştır.

2.7. Botanik Bilgiler

Ülkemiz gerek farklı coğrafi ve iklim yapısına sahip olması, gerekse 3 gen merkezinin kesişim noktasında bulunmasından dolayı bitki türü çeşitliliği bakımından dünyada önemli bir konuma sahiptir. Türkiye'nin bitki türü sayısı son yıllarda yapılan teşhislerle 12000'e yaklaşmış olup, bunun yaklaşık 3800 tanesini endemik türler oluşturmaktadır (Davis 1965−1988; Erik ve Tarıkahya 2004; Anonim 2012d). Komşu ülkeler ile kıyaslandığında tür zenginliği ve endemik türler bakımından Türkiye ilk sırada gelmektedir. Avrupa Kıtası'nın toplam tür sayısı 12500 civarında olup, bunun 2500 kadarı endemiktir (İpek ve Gürbüz, 2010). Türkiye tek başına Avrupa'dan daha fazla endemik türe sahiptir. Avrupa Kıtası'nın yüzölçümü Türkiye'nin 15 katı büyüklüğünde olduğu düşünülürse, ülkemizdeki endemizm oranının ne kadar önemli olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında Lamiaceae familyasına ait bazı *Salvia* türleri kullanıldığından, bu türlerin ait olduğu Lamiaceae familyası ve *Salvia* cinsi aşağıda açıklanmıştır.

2.7.1. Lamiaceae familyasının genel özellikleri

Dünyada çok geniş yayılışa sahip bir familya olan Lamiaceae, 264 cins ve yaklaşık 7000 kadar tür ile temsil edilmektedir (Moon ve ark. 2008; De Mattia ve ark. 2011). Ülkemizde ballıbabagiller olarak bilinen Lamiaceae familyasına ait 200 cins ve 3200 tür bulunmaktadır (Yıldız ve Aktoklu, 2010). Başlıca Akdeniz havzasında yaygın olan, otsu veya çalı şeklindeki türlerin çoğu aromatik olup, uçucu yağ içerir. Peyzaj düzenlemesi ve ekonomik açıdan önemli olan bu familya *Tectona grandis* gibi kerestecilikte önemi olan ağaçlara, çok sayıda aromatik, tıbbi ve baharat olarak kullanılan *Salvia* (adaçayı), *Thymus* (kekik), *Mentha* (nane), *Origanum* (mercanköşk), *Rosmarinus* (biberiye), *Lavandula* (lavanta) ve *Ocimum* (fesleğen) gibi cinslere sahiptir (Anonim 2011; Tanker ve ark. 2007).

2.7.2. *Salvia* L. (Adaçayı) cinsinin genel özellikleri

Lamiaceae familyasının önemli bir üyesi olan *Salvia* L. cinsi, merkez ve orta Amerika (300 takson), batı Asya (200 takson) ve doğu Asya (100 takson)'da yayılış gösterir. Bu üç bölge temel olmak üzere, dünyada bu cinse ait tür sayısı 1000'e ulaşmıştır (Kahraman ve ark., 2010a).

Türkiye'de *Salvia* L. cinsine ait 95 tür bulunmaktadır. Bu türlerden 48'i endemik olup, endemizm oranı %51'dir (Davis ve ark., 1982). *Salvia* cinsi dünyada ve ülkemizde halk arasında tedavi amaçlı antibakteriyel, antivirütik, antifungal, spazm önleyici ve kan basıncı düşürücü olarak, ayrıca parfümeri sanayisinde uçucu yağ kaynağı ve dekoratif bitkilere sahip olması nedeniyle dikkat çekicidir (Saeidnia ve ark. 2009; Eröz Poyraz ve Koca 2006; Kintzios 2000).

Salvia cinsi yaprakları, %2−3 uçucu yağ, %5 rosmarinik asit, tanen bileşikleri, flavonlar (salvigenin, luteolin, hispidulin) ile karnosol (pikrosalvin) gibi diterpenler, ursolik asit ve benzeri triterpenler içerir. Uçucu yağ, %60−64 civarında ökaliptol (1,8-sineol), %8,2 kafur ve %5'in altında tuyon türevleri taşımaktadır (Kopar, 2010). Bu nedenle bu cinse şifa verici özelliğinden dolayı Latince'de 'iyileştirmek, kurtarmak' anlamına gelen *Salveo* kelimesinden türetilmiş *Salvia* ismi verilmiştir (Baytop, 1999). Adaçayı genel olarak deride antiseptik ve koku giderici olarak, solunum sistemlerinde boğaz ve bademcik iltihaplarında, endokrin sistemlerinde hormon düzenleyici ve antispazmatik olarak ve ayrıca genel sistemde ateş düşürücü ve sinir sistemi bozukluklarında çeşitli kullanım alanları bulmaktadır (Lawless, 1995).

Adaçayı, ilaç bitkisi olarak kullanılan bitkilerin arasında en uzun tarihe sahip olan bitkilerden birisidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Salvia* L. türlerinden elde edilen bazı diterpenoidlerin kanser tedavisinde, tümör oluşumunu engelleyen özelliklerinin olduğu bulunmuştur (Yücel, 2000).

2.7.3. Çalışılan *Salvia* türlerinin genel özellikleri

Bu kısımda çalışılan *Salvia* türlerinin botanik ve morfolojik özellikleri verilmiştir. Bu türler, *Salvia bracteata* Banks & Sol., *Salvia candidissima* Vahl. subsp. *occidentalis* Hedge, *Salvia ceratophylla* L., *Salvia dichroantha* Stapf., *Salvia forskahlei* L., *Salvia fruticosa* Miller (syn. *S. triloba* L.), *Salvia sclarea* L., *Salvia tomentosa* Miller, *Salvia verticillata* L. subsp. v*erticillata* L. ve *Salvia viridis* L.'dir. Bu türlerden *Salvia dichroantha* Stapf. endemiktir.

2.7.3.1 *S. bracteata*

Çok yıllık, otsu bir bitkidir, çiçeklenme zamanı Mayıs−Temmuz ayları arasındadır. Bu türe volkanik ve kalkerli yamaçlar, nadas tarlaları ve bağ kenarlarında olmak üzere 50─2000 m yüksekliklerde rastlanır. Türkiye'de özellikle Anadolu'da yaygın olan bu türe Tekirdağ, Bilecik, Kalecik ve Çankırı arası, Amasya, Tokat, Sivas, Erzurum, Kütahya, Afyon, Ankara, Nevşehir, Sivas, Elazığ, Erzurum, Denizli, Burdur, Konya, Gaziantep, Urfa ve Diyarbakır bölgelerinde rastlanmaktadır (Davis ve ark. 1982; Anonim 2012e). Bu tür, çay olarak soğuk algınlığında kullanılmaktadır (Koyuncu ve ark., 2010).

2.7.3.2 *S. candidissima*

Çok yıllık ve otsu olan bu bitki türü 1 m'ye kadar boylanabilmektedir. Dipte sık yapraklıdır ve yapraklar oldukça iridir. Seyrek dallanan bitki beyaz çiçeklere sahiptir. Çiçeklenme zamanı Mayıs−Eylül ayları arasındadır. 190−800 m yüksekliklerinde kayalık volkanik ve kireçtaşı yamaçlar, tebeşir tepeler ve tarla kenarlarında görülür. Türkiye'de başlıca Antalya, Kastamonu, Amasya, Kütahya, Eskişehir, Ankara, Yozgat, Muğla, Isparta, Konya, Niğde ve İçel bölgelerinde rastlanmaktadır. (Davis ve ark. 1982; Tan 2008; Anonim 2012e). Bu tür, çay olarak soğuk algınlığında kullanılmaktadır (Koyuncu ve ark., 2010).

2.7.3.3 *S. ceratophylla*

Çok yıllık ömür uzunluğuna sahip otsu bir bitkidir ve 60 cm'ye kadar boylanabilir. Gövde üst tarafta belirgin dallanır. Çiçeklenme zamanı Nisan−Haziran ayları arasındadır. Çiçek rengi sarı veya beyaz olan bu bitki kireçtaşı, volkanik ve alçıtaşı yamaçlar, mısır ve nadas tarlaları ve çorak yerlerde 300─2150 m yüksekliklerinde bulunur. Türkiye'de karasal iklim ve İç Anadolu bölgelerinde yaygın olarak rastlanmaktadır. Bu türe, Ankara, Kastamonu, Erzurum, Kars, Eskişehir, Kayseri, Malatya, Diyarbakır, Erzincan, Van, Burdur, İçel, Niğde, Adıyaman, Urfa, Siirt, Hakkari ve Afyon illerinde rastlanmıştır (Davis ve ark. 1982; Davis ve ark. 1988; Tan 2008; Anonim 2012e). Bağcı ve Koçak (2007) tarafından *S. ceratophylla* türünün tat ve aroma endüstrisi ile ilaç sektöründe kullanılabileceği belirtilmiştir.

2.7.3.4 *S.dichroantha*

Çok yıllık, otsu bitkidir, çiçeklenme zamanı Temmuz−Eylül ayları arasındadır ve endemiktir. Bu tür, bozkır ormanlardan ağaçsız yerlerde, nadas tarlaları, yol kenarlarında ve 810−1800 m yüksekliklerde bulunur. Bu türe Kuzeybatı, Güneybatı ve İç Anadolu bölgelerinde olmak üzere Bolu, Kastamonu, Kütahya, Eskişehir, Konya, Niğde, Sivas, Muğla, Isparta, Antalya ve Konya illerinde rastlanmaktadır (Davis ve ark. 1982; Anonim 2012e). *S. dichroantha* yapraklarından hazırlanan infüzyon, haricen yara ve çıbanların tedavisinde kullanılır (Baytop, 1999).

2.7.3.5 *S. forskahlei*

Çok yıllık, otsu, gövdeler 15−120 cm, dik, basit veya dallanmış, salgı ve basit tüylere sahip olabilmektedir. Yapraklar geniş, uzun saplı, kenarları testere dişli ve çiçekleri menekşe−mavi renkten eflatunsu renklere kadar değişir. Haziran−Eylül aylarında çiçeklenir. Geniş ve iğne yapraklı ormanlar, çayırlar, dik kenarlarda (10−1900 m) rastlanır. Türkiye'nin Kuzey bölgelerinde yaygın

olmakla birlikte Tekirdağ, Kırklareli, İstanbul, Yalova, Bursa, Bolu, Sakarya, Zonguldak, Kastamonu, Sinop, Amasya, Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize ve Çoruh illerinde rastlanmaktadır (Davis ve ark. 1982; Tan 2008; Anonim 2012e). Bu türün yaprakları çay olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1997).

2.7.3.6 *S. fruticosa*

Bitki 1 m'ye kadar boylanabilmektedir. Çalı formunda ve çok yıllık ömür uzunluğuna sahiptir. Yapraklar basit veya üç loblu, 2−5 cm boyunda, alt yüzeyi yoğun beyaz tüylüdür. Çiçekler dal uçlarında, leylak renginde bazen beyaz renklidir. Çiçeklenme zamanı Mart−Mayıs aylarında ve bulunduğu yükseklik 0−700 m'dir. Maki ya da firigana kireçtaşı kayalıklar arasında yetişir. Yayılış alanı Kuzeybatı Türkiye, Batı ve Güney Batı Anadolu'dur. Balıkesir, Muğla (Milas, Ören, Fethiye ve Kalkan yakınları), Aydın (Didim), İzmir, Denizli (Tavas) ve Antalya (Beldibi ve Göynük arası) illerinde rastlanmaktadır (Davis ve ark. 1982; Tan 2008; Anonim 2012e). Türkiye'nin yıllık adaçayı ihracatının büyük çoğunluğunu *S. fruticosa* oluşturmaktadır (İpek ve Gürbüz, 2010). Bu türün yapraklarından hazırlanan infüzyonlar çay yerine geniş miktarda kullanılmaktadır (Baytop, 1999).

2.7.3.7 *S. sclarea*

Ot formunda ve çok yıllık ömür uzunluğuna sahiptir. Mayıs−Ağustos aylarında çiçeklenir. Gövde dik olarak gelişir ve 1 m'yi geçebilir. Kayalık volkanik yamaçlar, karışık iğne yapraklı ve yaprak döken korular, gölgelik alanlar, eğimli yamaçlar, tarlalar ve yol kenarlarında yayılış gösterir. Bulunduğu yükseklik 0−700 m'dir. Bu türe, Anadolu (Batı hariç) başta olmak üzere İstanbul, Kocaeli, Bolu, Ankara, Samsun, Trabzon, Gümüşhane, Kütahya, Eskişehir, Niğde, Kayseri, Kahramanmaraş, Tunceli, Van, Muğla, Antalya, İçel, Niğde, Gaziantep ve Hakkari illerinde rastlanmaktadır (Davis ve ark. 1982; Tan 2008; Anonim 2012e). Misk adaçayı olarak da bilinen pembe−beyaz çiçekleriyle koku verici özelliğe sahip olan bu tür, kurutulup öğütülerek baharat olarak ve sıcak su

ile yapılan çay içilerek hemoroid tedavisinde kullanılmaktadır (Polat 2004; Koyuncu ve ark. 2010).

2.7.3.8. *S. tomentosa*

Odunsu ot formunda ve çok yıllık ömür uzunluğuna sahiptir. Nisan−Ağustos aylarında çiçeklenir. Maki ve kireçtaşı yamaçlarda ve 90−2000 m yükseklikte yayılış gösterir. Başlıca Anadolu'da yaygın olan bu türe, özellikle İstanbul, Bursa, Zonguldak, Ankara, Sinop, Ordu, Gümüşhane, Trabzon, İzmir, Kütahya, Uşak, Eskişehir, Antalya, Isparta, Konya, Adana, Hatay, Muğla ve Balıkesir illeri çevrelerinde rastlanmaktadır (Davis ve ark. 1982; Davis 1988 ve ark.; Anonim 2012e). Bu türün sıcak su ile yapılan çayı mide ve karın ağrılarında kullanılmaktadır. Ayrıca romatizma, iltihaplı yaralar, soğuk algınlığı, astım, göğüs yumuşatıcı ve öksürük kesici olarak kullanıldığı bilinmektedir (Eröz 2001; Koyuncu ve ark. 2010).

2.7.3.9 *S. verticillata*

Çok yıllık, otsu, gövdeleri dik veya eğik gelişen, 15−70 cm boyda, çok dallı, salgı ve örtü tüylerine sahiptir. Yapraklar geniş, çiçekler menekşe−mavi, leylak, nadiren beyaz olmaktadır. Haziran−Ağustos aylarında çiçeklenir. Dağ meraları, çayırlar, çakıllı dere yatakları ve yol kenarlarında yayılış gösterir. Bulunduğu yükseklik 0−2300 m'dir. Kuzey ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde bulunmaktadır. Bu türe, İstanbul, Bursa, Sinop, Giresun, Trabzon, Rize, Çoruh, Muş, Van, Bitlis ve Hakkari illeri çevresinde rastlanmaktadır (Davis ve ark. 1982; Tan 2008; Anonim 2012e). Bu türün yapraklarından yapılan çay, mide ağrılarına ve soğuk algınlığına iyi gelmektedir (Koyuncu ve ark., 2010).

2.7.3.10 *S. viridis*

Bir yıllık, otsu, 40 cm boylanabilen, salgılı veya salgısız uzun yumuşak tüylü, dip kısmına toplanmış rozetsi yapraklar, basit, saplı ve dişli kenarlıdır.

Çiçekler aralıklı, 4−6 çiçekli, morumsu veya beyaz, meyvesi fındıksıdır. Mart−Temmuz aylarında çiçeklenir. 0−1300 m yükseklikte kayalık yamaçlar, makilik alanlar, tarlalar ve çorak yerlerde yayılış gösterir. Trakya, Dış, İç ve Güneydoğu Anadolu'da olmak üzere Tekirdağ, Çanakkale, İstanbul, Bolu, Zonguldak, Çorum, Samsun, Sivas, Çoruh, Artvin, İzmir, Ankara, Adana, Muğla, Antalya, İçel, Urfa, Siirt ve Mardin illeri çevresinde rastlanmaktadır (Davis ve ark. 1982; Tan 2008; Anonim 2012e). Bu tür, çay olarak soğuk algınlığında kullanılmaktadır (Koyuncu ve ark., 2010).

2.7.4. Sistematik analiz ve moleküler sistematik

Bitki sistematiğinin amacı, bitkileri birbirleriyle olan doğal akrabalık derecelerini göz önünde tutarak ve filogenetik gelişimlerine dayanarak inceleyip, büyük ve küçük topluluklar halinde gruplandırmak, taksonomide belli kurallara göre bir sınıflandırma içerisine sokmaktır (Anonim, 2012f). M.Ö. 3. yüzyılda Aristo ile başlayan sistematik, temel olarak büyük ölçüde morfolojik karakter temeline dayanmaktadır. Farklı etkiler gösteren farklı karakterlerdeki türlerin sistematik olarak tanımlanması ya da bitki türleri arasındaki evrimsel bağlantıyı saptamak amacıyla sistematikçiler morfolojik yöntemin yanı sıra geleneksel olarak anatomik, sitolojik, kesit alma sistemleri, çapraz uyum, sekonder bileşikler (örneğin flavonoidler) ve farklı biyokimyasal belirteçlerin kullanıldığı izoenzim gibi çeşitli yaklaşımlar kullanmaktadırlar. Bu geleneksel yaklaşımlar bazı değişimlerle günümüzde de halen kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin her birinin bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Örneğin, izoenzimler çeşitlilik analizinde ve birbiriyle yakın ilişkili olan türler arasında faydalı olmalarına rağmen bunlar genellikle taksonomik olarak uzak akrabalık çalışmalarında uygulanamaz. Tam tersine, morfolojik karşılaştırmalar oldukça farklı türler arasında yapılabilir fakat sistematikçilerin morfolojik benzerlik mekanizmasının temelindeki bilgi eksikliği, evrimsel ilişkilere doğrudan yansır. Yani bitki sistematikçileri morfolojik olarak birbirine benzer iki türü ayırmada kuşkuya düşebilmektedirler. Örneğin, *S. fruticosa* ve *S. officinalis* türlerinin birbirlerinden morfolojik olarak ayrılmasında karışıklık olabilmektedir. Ayrıca tür sınırlarının tanımlanmasında sadece

morfolojik verilerin yeterli olmadığı değişik durumlar mevcuttur. İşte bu nedenle bu durumdaki sorunları ve sistematik problemleri çözmek, yeni ve daha güvenilir sonuçlar elde edebilmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Phillips ve Vasil 1994, Öz Aydın 2004; Karaca ve ark. 2008). Bu çalışmaların başında DNA temelli moleküler genetik yöntemleri gelmektedir (Bertea ve ark., 2006). Sistematik problemlerin çözümündeki en son gelişmeler farklı DNA temelli belirteç sistemleriyle genotipin doğrudan ya da dolaylı olarak belirlenmesi üzerinde olmuştur. Bu DNA temelli farklı analizler, pek çok sorunun çözümünde umut verici görülmektedir. Türlerin belirlenmesi, filogenetik ilişkiler, evrimsel süreçler, akrabalık seviyesi, soy ağaçları ve kimliklendirme için yapılacak DNA temelli bu yöntemler; RAPD, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Çoğaltılmış Parça Polimorfizm (AFLP), Basit Dizi Tekrarı Mikrosatellit (SSR), Basit Dizi Tekrarları Arası (ISSR), Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizm (SSCP), Denatüre Gradient Jel Elektroforezi (DGGE), Kesilmiş Amplifiye Polimorfik Dizi (CAPs), Yüksek Çözünürlüklü Erime Noktası Analizi (HRM) ve Amplifiye Edilmiş Karakterize Dizi Bölgesi (SCARs)'dir (Phillips ve Vasil 1994; Öz Aydın 2004; Weising ve ark. 2005; Cenkci ve ark. 2008; Cenkci ve ark. 2009; Mader ve ark. 2010).

Bu yöntemler arasında RAPD yöntemi dünyada son yıllarda pek çok bitki türünün sistematik probleminin çözümünde başarıyla kullanılmaktadır (Henry, 1997). Atienzar ve Jha (2006) tarafından 1990 ve 2005 yılları arasında RAPD yöntemi ya da bununla bağlantılı yöntemlerin kullanıldığı 9000'den fazla makale yayınlandığı bildirilmiştir. Genel olarak bu yöntemlerle karşılaştırıldığında RAPD yönteminin en büyük üstünlüğü ilgilenilen taksonun DNA sekans bilgisi genleriyle ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir. Çoğaltmada tüm organizmalar için aynı oligonükleotit primer seti kullanılabilmektedir ve bu oligonükleotit özel bölgelere rastgele bağlanarak çoğaltma yapmaktadır. Bir primerle, farklı bitkilerin genomik DNA'ları farklı olacağından oluşacak RAPD ürünleri de farklı olacaktır. Bu farklılık organizmaların karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca radyoaktiviteye, Southern transferlere veya DNA hibridizasyonuna gerek duyulmamaktadır. Olası RAPD karakterlerinin sayısı sınırsızdır. RAPD yönteminde kullanılan primer sayısı arttırıldıkça elde edilen

bant sayısı da artacağından, yakın türleri ayırma konusunda izoenzim gibi birçok yöntemden daha duyarlıdır (Mathieu−Daude ve ark., 1997). Farklı araştırmacılar tarafından kodominant veriler gerektirmeyen sistematik sorunların çözümünde RAPD belirteçlerin kullanımı güçlü bir şekilde savunulmaktadır. Bununla birlikte yöntemin sınırlılıkları da vardır. RAPD kullanım açısından kolay olmasına karşılık, belirteçleri dominanttır ve heterezigot karakterleri teşhis etmek zordur. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilmektedir. Bunun için diğer karşılaştırmalı analizlere girmeden önce yöntemin en iyi koşullarının belirlenmesi oldukça önemlidir (Öz Aydın, 2004). Bunun amacı özgünlüğü ve tekrarlanabilirliği kontrol etmektir. Tüm bunlara rağmen, RAPD eğer iyi optimize edilmiş ise güvenli bir şekilde uygulanabilen bir yöntemdir (Atienzar ve Jha, 2006).

2.7.5. Filogenetik ağaç

Evrim, bir dallanma süreci olarak düşünülürse; topluluklar zaman içinde değişime uğrar ve bunun sonucunda farklı dallar halinde türleşir, birbiriyle melezlenir veya tükenerek son bulur. Bu süreçler bir filogenetik ağaç olarak gösterilebilmektedir (Anonim, 2012g). Soy ağaçları da denilen filogenetik ağaçların oluşturulması ile mevcut olan karakterlerin değişik kriterler kullanılarak değerlendirilmesi sonucu taksonlar arasındaki akrabalık ilişkileri ortaya çıkarılmaktadır. Filogenetik ağaç, bir grubun evrimsel tarihinin grafiksel özetidir. Filogenetik ağaç;

- Dallanma olaylarının modelini, bazı durumlarda zamanını ve zaman aralığını tanımlar,
- Türleşme sırasını kaydeder,
- Hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını gösterir.

Filogenetik bir ağaçta; dallar; türlerin atasal populasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterir. Düğümler; bir populasyonun (taksonun) iki veya

daha fazla türev populasyona ayrıldığı noktalardır. Dal uçları ise; soyu tükenmiş veya bugün yaşayan türleri ifade eder (Freeman ve Herron, 1998).

Filogenetik ağaç oluşturmakta kullanılan yöntemler temel olarak iki ana başlık altında incelenir:

1) Karakter temelli yöntemler;

- Maximum parsimony
- Maximum likelihood
- Mr. Bayes

2) Mesafe temelli yöntemler;

- Deney çiftlerinin ağırlıksız aritmetik ortalamaları (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means, UPGMA)
- Neighbour joining
- Minimum evrim metodu
- En az kareler metodu

Karakter temelli yöntemler; üzerinde çalışılan taksonlar arasındaki değişken, kalıtsal ve biri diğerinden bağımsız her bir özellik ya da karakter için hangi taksonun hangisiyle yakın akraba olduğunu göstermektedir. Bu karakterler; DNA dizisi, belli iskelet elementleri, çiçek kısımlarının varlığı ya da yokluğu, embriyonik veya larval gelişmenin şekli gibi özellikler olabilir.

Mesafe temelli yöntemler; dizi hizalanması sonucu elde edilen evrimsel mesafelerle bir veri matriksi oluşturularak daha sonra matriksteki mesafe skorlarına göre tüm taksonlar için bir filogenetik ağaç oluşturulması esasına dayanmaktadır. Ağacın dalları boyunca ortaya çıkan değişiklik sayısı diziler arasındaki uzaklığı gösterir. Tercih edilen ağaçlar, taksonlar arasındaki mesafeyi en aza indirgeyen ağaçlardır (Şahin, 2011).

Filogenetik ağaçların oluşturulmasında PAUP, PHYLIP, MrBayes, POPGENE ve NTSYSpc gibi çeşitli bilgisayar programları kullanılabilmektedir. Bu paket programlar kullanılarak her bir örneğin diğer bir örnekle genetik uzaklık veya yakınlığını gösteren tablolar oluşturulur ve bu programlar sayesinde tüm

örneklerin matematiksel olarak ilişkilerini bir dendogramla göstermek mümkündür (Anonim, 2012h).

2.7.6. *Salvia* L. türleri üzerine yapılan moleküler çalışmalar

Saeidnia ve ark. (2009) tarafından dört farklı *Salvia* türü (*S. macrosiphon, S. aethiopis, S. brachyantha* ve *S. sclarea*) ve bir adet *Nepeta* türü (*N. saccharata*) arasındaki genetik ilişki 10 farklı 10−merlik primerler ile RAPD yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve kümeleme analizi yapılarak bu türler için dendogram çıkarılmıştır. RAPD−PCR sonuçlarına göre *S. macrosiphon* ve *S. aethiopis* türlerinin genetik olarak birbirlerine çok yakın olduğu bulunmuştur. Ancak *S. brachyantha* türünün ise bu çalışmada incelenen diğer *Salvia* türlerinden genetik olarak daha uzak olduğu belirlenmiştir.

Skoula ve ark. (1999) ise Girit adasındaki 3 farklı lokaliteden (Vrysses, Kapsa ve Kavoussi) toplanan 48 adet *S. fruticosa* klonlarındaki genetik farklılığı 10 farklı oligonükleotit primerleri (OPA−01, OPB−01, OPB−02, OPB−03, OPB−04, OPB−05, OPB−07, OPB−08, OPB−12, OPB−14) kullanarak RAPD yöntemiyle belirlemişler ve bu sonuçları türlerin içerdikleri uçucu yağ bileşenleri ile de karşılaştırmalı olarak kıyaslamışlardır. Sonuç olarak, farklı primerler arasında DNA bant profillerinde geniş bir çeşitlilik ve çok sayıda polimorfik bantlar belirlenmiştir. Bu çalışmada coğrafi konum olarak da birbirine yakın olan Kapsa ve Kavoussi bölgelerinden toplanan populasyonların genetik olarak birbiriyle daha çok bağlantılı olduğu bulunmuştur. Bu iki bölgeden toplanan bitki populasyonlarının Vrysses bölgesinden toplananlardan oldukça farklı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada her bir populasyon içerisinde de genetik farklılıkların olduğu belirtilmiştir.

Karaca ve ark. (2008) ise türlere özgü 14 adet evrensel kloroplast ve mitokondriyal DNA primer çiftlerini kullanarak hem PCR−RFLP yöntemi ile hem de 12 farklı tek primer kullanarak minisatellite veya yönlendirilmiş minisatellitli DNA çoğaltımı (Directed Amplification of Minisatellite DNA polymerase chain reaction, DAMD−PCR) yöntemi ile *S. tomentosa, S. sclarea, S. virgata, S. fruticosa* ve *S. dichroantha* türleri arasındaki genetik akrabalıklarını

belirlemişlerdir. Bu çalışmada, türlere özgü DNA markerları ile sonuçlanan PCR−RFLP yönteminin uygulanmasının ve tekrar edilebilir DNA düzenlemeleri ile sonuçlanan DAMD−PCR'ın kullanımının *Salvia* genetik çalışmalarında kullanışlı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada *Salvia* türlerinin tüm genom diziliminin şu ana kadar hiçbir çalışmada aydınlatılmadığı belirtilmiştir. Bu çalışmada, kümeleme analizi ve basit koordinat analizleri değerlendirildiğinde, türlerdeki DNA marker bant profilleri ve uçucu yağ ürünleri arasında bağlantı olduğu bulunmuştur. Deney sonuçları *Salvia* türlerindeki genetik çeşitliliğin çok geniş olduğunu göstermiştir.

De Mattia ve ark. (2011) *S. rutilans*, *S. uliginosa*, *S. officinalis* ve *S. sclarea* türlerinin de aralarında bulunduğu Lamiacaea familyası üyelerinden olan toplam 64 bitki türünü 4 farklı (rpoB, rbcL, matK ve trnH−psbA) evrensel DNA barkodlama markerları kullanarak tanımlanmışlardır. Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan DNA barkodlama yaklaşımı Lamiacaea familyası içerisindeki hibritleşme durumlarının izlenmesi ve taksonomik olarak belirlenemeyen ticari türlerin tanımlanmasına açıklık getirmiştir. Bu çalışmada morfolojik ve moleküler yaklaşımlar ile tanımlanmış aromatik bitki türleri için farklı DNA barkodlama markerları kullanılarak veritabanı oluşturulması hedeflenmiştir.

Mader ve ark. (2010) *S. fruticosa* türünün DNA'nın kısmi dizilişinin patenti (EST) diziliminden yararlanılarak geliştirilen SSR ve tek nükleotit polimorfizmi (SNP) markerları ile 19 farklı bölgeden temin edilen *S. officinalis* türlerinin genetik yapılarını analiz etmişlerdir. Bu analizler HRM ile yapılmıştır. Bu çalışmada *S. fruticosa* türünün gen dizilimi ile ilgili Gen bankasına (Anonim, 2012ı) 1400'den fazla giriş yapıldığı ve bu türle yakından akraba olduğu için bu türün dizilerinin, hakkında oldukça sınırlı sayıda gen dizisi bilgisi olan *S. officinalis* türü için de kullanıldığı bildirilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen genetik verilerin aynı örnekler için yayınlanmış olan fitokimyasal sonuçlarla yüksek derecede uyumlu olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada kullanılan HRM yönteminin orta aralıktaki populasyon taramaları için hızlı, kolay ve ucuz bir araç olduğu belirtilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu bölümde gereçler, kullanılan kimyasallar ve deneysel çalışmaların yöntemleri hakkında bilgi verilmektedir.

3.1. Gereç

3.1.1. Bitki örneklerinin toplanması

Tez kapsamında çalışılan *Salvia* L. (Lamiaceae) türlerinin taze yaprakları Eskişehir civarından Haziran−Temmuz 2009 ve 2010 tarihlerinde toplanmış, lokaliteleri ve toplanma tarihleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Toplanan türlerin yaprak yüzeyleri %70 (h/h) etil alkol ile temizlendikten sonra sıvı azotta şoklanmış ve genomik DNA izolasyonu gerçekleşinceye kadar –20°C'da derin dondurucuda saklanmıştır. Ayrıca, doğal ortamlarından toplanan ve preslenerek kurutulan bu türlere ait herbaryum örnekleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu (OUFE) ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumunda (ESSE) saklanmaktadır. Herbaryum numaraları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Bitki örneklerinin sekiz tanesinin tür tayinleri Öğr. Grv. Dr. Onur KOYUNCU ve Uzman Biyolog Ömer Koray YAYLACI (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından Davis ve ark. (1982)'ye göre yapılmıştır. Bitki örneklerinin iki tanesinin tür tayinleri Öğr. Grv. Dr. İlham ERÖZ POYRAZ (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Farmasötik Botanik Anabilim Dalı) tarafından Davis ve ark. (1982)'ye göre yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Eskişehir çevresinden toplanan *Salvia* L. türlerinin lokaliteleri, toplama zamanları ve herbaryum numaraları

Örnek No	Tür	Lokalite	Enlem−Boylam, Yükseklik	Herbaryum Numarası	Toplandığı Tarih
1	*S. tomentosa*	B3 Eskişehir: Dinek−Gürleyik arası, Yol kenarları, Mihalıççık	N 39º 56' 37,1"−E 31º 23' 17,2", 1240 m	OUFE: 16436	01.07.2010
2	*S. candidissima*	B3 Eskişehir: Gürleyik Köyü, Gürleyik deresi kaynak bölgesi, Mihalıççık	N 39º 59' 30,4"−E 31º 19' 44,6", 688 m	OUFE: 16437	01.07.2010
3	*S. sclarea*	B3 Eskişehir: Kızılinler Köyü girişi, Yol Kenarları, Merkez	N 39º 43' 11,1"−E 30º 24' 54,9", 850 m	OUFE: 16438	15.07.2009
4	*S. ceratophylla*	B3 Eskişehir: Gürleyik Köyü, Gürleyik deresi kaynak yolu, Mihalıççık	N 39º 59' 30,4"−E 31º 19' 44,6", 688 m	ESSE: 14579	06.06.2010
5	*S. viridis*	B3 Eskişehir: Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Deneme Tarlaları, Merkez	N 39º 43' 11,1"−E 30º 40' 22,7", 815 m	OUFE: 16440	30.06.2010
6	*S. bracteata*	B3 Eskişehir: Dinek−Gürleyik arası, Gürleyik Köyü girişi, yol kenarları, taşlık−kayalık yamaçlar, Mihallıççık	N 39° 59' 31,2"−E 31° 20' 56,2", 622 m	ESSE: 14550	05.06.2010

Çizelge 3.1. (Devam) Eskişehir çevresinden toplanan *Salvia* L. türlerinin lokaliteleri, toplama zamanları ve herbaryum numaraları

Örnek No	Tür	Lokalite	Enlem− Boylam, Yükseklik	Herbaryum Numarası	Toplandığı Tarih
7	*S. verticillata*	B3 Eskişehir: Sorkun−Dinek arası, yol kenarları, Mihalıççık	N 39º 58' 05,4"−E 31º 22' 47,9", 990 m	OUFE: 16442	01.07.2010
8	*S. forskahlei*	B3 Eskişehir: Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Deneme Tarlaları, Merkez	N 39º 43' 11,1"−E 30º 40' 22,7", 815 m	OUFE: 16443	30.06.2010
9	*S. fruticosa*	B3 Eskişehir: Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Deneme Tarlaları, Merkez	N 39º 43' 11,1"−E 30º 40' 22,7", 815 m	OUFE: 16444	30.06.2010
10	*S. dichroantha* (Endemik)	B3 Eskişehir: Bozan Ağaçlandırma Sahası, Bozan	N 39º 48' 56,7"−E 31º 08' 36,2", 850 m	OUFE: 16445	01.07.2010



Şekil 3.1. *S. bracteata*



Şekil 3.2. *S. candidissima*



Şekil 3.3. *S. ceratophylla*



Şekil 3.4. *S. dichroantha* (Endemik)



Şekil 3.5. *S. forskahlei*



Şekil 3.6. *S. fruticosa*



Şekil 3.7. *S. sclarea*



Şekil 3.8. *S. tomentosa*



Şekil 3.9. *S. verticillata*



Şekil 3.10. *S. viridis*

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Tris bazı (Biotech. Performance Certified), HEC (Hidroksietil selüloz, Ma: 90.000), PVA (Poly(vinyl alcohol) Ma: 30.000−70.000), sodyum asetat (%99), ve etidyum bromür Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Amerika) firmasından temin edilmiştir. EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) disodyum tuzu dihidrat (Moleküler biyoloji saflıkta) Applichem (Darmstadt, Almanya), *o*−fosforik asit (Puriss %85, 1,71 g mL^{-1}) Riedel−de Haen (Seelze, Almanya), glasiyel asetik asit (%99,5, 1,05 g mL^{-1}) ve kloroform (%99) Carlo Erba (Milan, İtalya), etanol (HPLC saflıkta) Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından satın alınmıştır.

Çalışmalarda, moleküler biyolojik saflıkta agaroz (Prona Basica LE, İspanya) kullanılmıştır.

Çözeltilerin hazırlanmasında ultra saf su (Millipore, Amerika) ve PCR deneylerinde moleküler biyolojik saflıkta su (DNaz, RNaz ve Proteaz içermeyen, HyClone HyPure, Thermo, South Logan, Utah, Amerika) kullanılmıştır.

PCR reaksiyonlarında kullanılan 200 µM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 25 mM $MgCI_2$, 10X *Taq* DNA Polimeraz enzimi (5 U/µL) ve 10X Taq DNA tamponu (KCl'lü) Fermentas (Vilnius, Litvanya) firmasından temin edilmiştir.

Deneylerde kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Amerika) veya Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

Fermentas kiti ile bitkilerden genomik DNA izolasyonu deneylerinde kullanılan 10 mM Tris bazı ve 1 mM EDTA (TE) tamponunu hazırlamak için; 0,0303 g Tris bazı ve 0,0093 g EDTA tartılarak bir miktar ultra saf suda çözündükten sonra pH 8,00 olacak şekilde 5 M HCl çözeltisi eklenir ve son hacim ultra saf su ile 25 mL'ye seyreltilmiştir.

PCR saflaştırma işleminde kullanılan 3 M, 25 mL asetat tamponu 6,1523 g sodyum asetat katısı kullanılarak hazırlanmıştır. Bu çözeltiye pH 5,00 olacak şekilde uygun hacimde 5 M HCl çözeltisi eklenmiştir.

3.1.2.1 Genomik DNA izolasyon kiti

Bitki materyallerinin genomik DNA'ları Fermentas Genomic DNA Purification Kit (Vilnius, Litvanya) ile tedarikçi firmanın protokolü doğrultusunda izole edilmiştir.

3.1.2.2 RAPD−PCR'de kullanılan primerler ve özellikleri

Bu çalışmada PCR reaksiyonlarında toplam 5 adet 10 mer oligonükleotit Operon A (OPA) serisi primer (QIAGEN Operon GmbH, Cologne, Almanya) kullanılmıştır. Kullanılan primerler, nükleotit dizileri ve diğer özellikleri Çizelge 3.2'de listelenmiştir. Primerlerden stok çözelti hazırlamak için öncelikle yaklaşık 15 s 12.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra çökelek üzerine 500 µL su eklenerek çökelek çözünmüş ve primer stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan primerler −20ºC'da saklanmıştır.

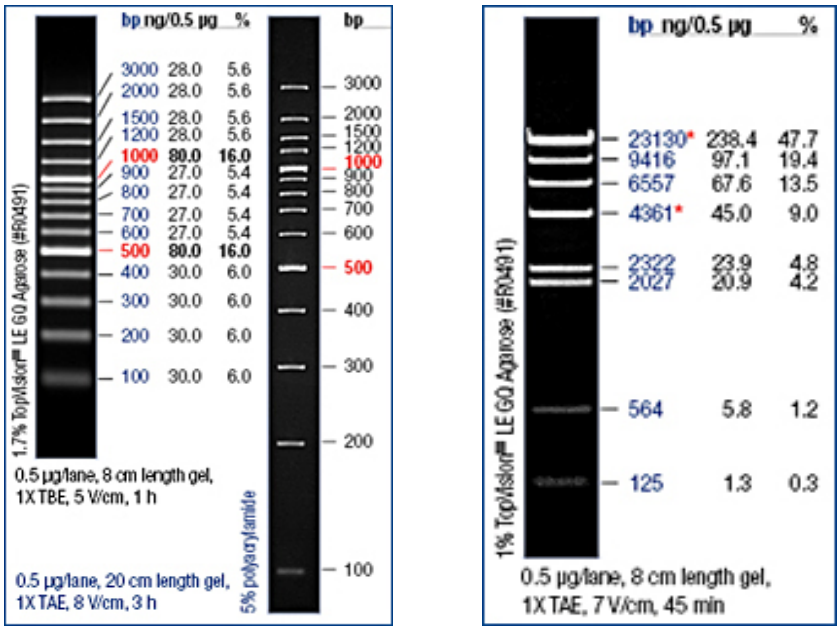
Çizelge 3.2. RAPD−PCR reaksiyonlarında test edilen primerler, nükleotit dizileri ve diğer özellikleri

Primer Kodu	Primer Nükleotit Dizisi (5'→3')	GC (%)	Moleküler Ağırlık (g moL^{-1})	Mol Sayısı (nmol)
OPA−03	AGTCAGCCAC	60	2997	94,7
OPA−04	AATCGGGCTG	60	3068	101,8
OPA−05	AGGGGTCTTG	60	3099	110,1
OPA−08	GTGACGTAGG	60	3108	92,0
OPA−15	TTCCGAACCC	60	2947	95,5

3.1.2.3 Çalışmada kullanılan DNA standartları

Deneylerde RAPD−PCR'dan elde edilen DNA örnekleri ile birlikte 100 bç DNA standardı (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder 50 µg, Fermentas, Vilnius, Litvanya) (Şekil 3.2a) ve genomik DNA örneklerinin kontrol edildiği

jelde ise daha büyük baz çiftleri içeren Lambda DNA/HindIII Marker (50 µg, Fermentas, Vilnius, Litvanya) (Şekil 3.2b) standardı kullanılmıştır.



a) **b)**

Şekil 3.11. a) GeneRuler™ 100 bç Plus DNA Ladder ve b) Lambda DNA/HindIII Marker standartlarının parça profili (Anonim, 2012j)

3.1.2.4 PCR saflaştırma kiti

PCR ürünlerini saflaştırma amacıyla Amersham Biosciences GE Healthcare (Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Buckinghamshire, UK) kiti kullanılmış ve saflaştırma işlemi tedarikçi firmanın protokolü dikkate alınarak yapılmıştır.

3.1.3. Kullanılan alet ve ekipmanlar

CGE deneyleri, Diode Array (Diyot Dizisi) Dedektör (DAD) içeren CE (G−1600 Model, Agilent Technologies, Waldbronn, Almanya) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

CGE'de ayırım, 75 μm iç çaplı, 375 μm dış çaplı, etkin uzunluğu 40,0 cm ve toplam uzunluğu 48,5 cm olan çıplak silika kapiler kolon (Agilent Technologies, Oregon, Amerika) kullanılarak yapılmıştır.

Agaroz jel elektroforez deneyleri için Yatay Jel Elektroforez Sistemi (Thermo, Amerika) ve Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo, EC300XL2 Model, Amerika) kullanılmıştır.

Amplifikasyon reaksiyonu PCR aleti (Techne, TC−5000, Amerika) ile yapılmıştır.

DNA örneklerinin saflık ve miktar tayinleri için NanoDrop (BioSpec−nano, Model, Shimadzu&Biotech, Japonya) aleti kullanılmıştır.

Çözeltilerin pH'sı, pH metre (WTW 315i, Almanya) ve pH cam elektrodu (WTW, SenTix 41, Almanya) kullanılarak ölçülmüştür.

Tartım işlemlerinde hassas terazi (Shimadzu AX 120, Tokyo, Japonya) kullanılmıştır.

Çözeltilerdeki çözünmüş gazlar ultrasonik banyo (Sonorex, Bandelin, Berlin, Almanya) kullanılarak uzaklaştırılmıştır.

Santrifüjleme işlemleri, santrifüj cihazı (MPW−251 Model, MPW Med. instruments, Warsaw, Polonya) ile yapılmıştır.

Deneylerde sıcaklığı ayarlanabilir sirkülasyonlu su banyosu (Clifton, NE4−P Model, İngiltere) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. RAPD yöntemi

3.2.1.1 Fermentas kiti ile bitkilerden genomik DNA izolasyonu

Bu tez çalışmasında bazı çözeltileri içeren yarı hazır izolasyon kiti kullanılarak bu örneklerden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Hazır DNA izolasyon kiti kullanılması, zamandan tasarruf ve deneylerde kolay uygulanabilirlik sağlamıştır.

Yöntemin aşamaları;

1. Yaklaşık 50−100 mg bitki dokusu sıvı azotla havanda ezilerek eppendorf tüpe alınmıştır. Üzerine 200 µL TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH yaklaşık 8,0) tamponu eklenmiştir.
2. 200 µL örnek çözelti 400 µL lizis çözeltisi ile karıştırılmış ve 5 dk 65°C'da inkübe edilmiştir.
3. Tüpe 600 µL kloroform eklenerek emülsiyon haline getirilmiş ve 2 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
4. DNA içeren üst faz yeni tüpe alınarak üzerine 800 µL seyreltik çöktürme çözeltisi (Bir örnek için: 720 µL dH_2O ve 80 µL 10X derişik çözelti olacak şekilde) eklenmiştir. Tüp oda sıcaklığında 1−2 dk ters düz edildikten sonra 2 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
5. Doygun çözelti uzaklaştırılmış ve DNA peletinin 100 µL 1,2 M NaCl çözeltisinde yavaşça vortekslenerek iyice çözünmesi sağlanmıştır.
6. RNA uzaklaştırılması için RNaz A (son derişim 0,2 mg mL^{-1} olacak şekilde) ile 10 dk 37°C'da inkübe edilmiştir.
7. Tüplere 300 µL soğuk etanol eklenerek 10 dk −20°C'da DNA çöktürülmüş ve sonrasında 3−4 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
8. Etanol dökülerek DNA peleti %70 soğuk etanol ile yıkanmıştır. DNA peleti 100 µL TE tamponunda yavaşça vortekslenerek çözünmüştür.

Genomik DNA'lar, NanoDrop spektrofotometrik miktar tayini ve agaroz jel elektroforezde kontrolü yapıldıktan sonra −20°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.1.2 DNA miktarı ve kalitesinin NanoDrop spektrofotometrik yöntem ile tayini

Genomik DNA örnekleri, aletteki optik alt yüzeye mikropipet ile 2'şer µL eklenerek 260 ve 280 nm dalga boylarında doğrudan ölçüm alınmıştır. Alet yazılımından nükleik asitlerle ilgili ölçüm seçildikten sonra yazılım otomatik olarak DNA miktarı ve saflık oranlarını hesaplamıştır. DNA saflığı, 260 ve 280 nm'lerdeki absorbans değerlerindeki sonuçların A_{260}/A_{280} oranı ile verilmiştir (Leninger ve ark., 1975). Genomik DNA örnekleri TE tamponunda çözüldüğü için çalışmada kör çözelti olarak TE tamponu kullanılmıştır.

3.2.1.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyon

Elde edilen *Salvia* L. türlerinin genomik DNA'larından RAPD primerleri kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonu, 0,2 mL ependorf tüplerde toplamda 50 µL'lik bir reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyonu için ön denemelerle en iyi koşullar belirlenmiştir. Her bir polimeraz zincir reaksiyonu karışımı; 5 µL (OPA−5 için; 4,54 picomol μL^{-1}, 4,54 µM) primer, 5 µL 8 mM dNTP karışımı (her birinden 2 mM), 5 µL 25 mM $MgCl_2$, 0,8 µL *Taq* DNA Polimeraz enzimi (5 U/µL), 5 µL 10X Taq DNA tamponu (KCl içeren) ve 15 µL kalıp DNA'dan (5 ng μL^{-1}) üzerine son hacmi 50 µL olacak biçimde su eklenmiştir (Cenkci ve ark., 2009). PCR karışımlarını bulunduran tüpler PCR ısıl−döngü aletine yerleştirildikten sonra Çizelge 3.3'de verilen programa göre amplifikasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. RAPD−PCR deneylerinde kullanılan PCR programı

Basamak	**Sıcaklık (^{o}C)**	**Zaman (sn)**	**Döngü Sayısı**
Başlangıç Denatürasyonu	94	240	1
Denatürasyon	94	45	40
Primerlerin Bağlanması	37	45	
Uzama	72	60	
Son Uzama	72	480	1
Son Bekletme Süresi	4	90000	

3.2.1.4 PCR saflaştırma kiti ile saflaştırma

CGE'deki analizler için RAPD−PCR ürünleri, Amersham Biosciences GE Healthcare PCR saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.

Saflaştırma ile ilgili işlem basamakları şu şekildedir:

1. 50 µL'lik reaksiyonu kurulmuş olan PCR ürününün bir kısmı agaroz jel elektroforezinde görüntülemede kullanıldıktan sonra kalan (~37 µL) miktar saflaştırılmıştır. PCR ürününe proteinleri denatüre etmek ve DNA'nın silika membranına bağlanması için gereken en uygun pH'ı (pH ≤ 7,5) sağlamak amacıyla kit içerisinde bulunan ve içerisinde pH belirteci içeren 500 µL tampon çözeltisinden eklenmiştir. Renk sarı veya açık turuncu olmalıdır. Eğer renk koyu pembe ya da kırmızı olursa çözelti üzerine yaklaşık 10 µL 3 M sodyum asetat pH 5,0 tamponu eklenerek karıştırılmalıdır.

2. Kit içerisinde bulunan mikrospin kolonu yine kit içerisindeki bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Örnekteki DNA'nın bağlanması için örnek ve tampon içeren çözelti toplama tüpü üzerindeki mikro spin kolonuna yüklenmiştir.

3. 30 s süre ile bir mikrosantrifüjde 13.200 rpm'de santrifüjlenmiştir.

4. Toplama tüpü boşaltılmış ve mikrospin kolonu boş olan toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.

5. Kolona kitte bulunan 500 µL etil alkol içeren "yıkama tamponu" eklenmiş ve 13.200 rpm'de 30 s santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.

6. Toplama tüpü atılmış ve mikrospin kolonu 1,5 mL'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiştir.

7. Mikrospin kolonu içerisindeki silika membran üzerine 50 µL kitte bulunan tampon (veya nükleaz içermeyen steril su) eklenmiştir.

8. Örnek 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

9. 1 dk 13.200 rpm santrifüj yapılmış ve saf DNA elde edilmiştir.

3.2.1.5 Agaroz jel elektroforez deneyleri

Agaroz jel elektroforezinde, jelin hazırlanması ve DNA'ların yürütülmesi için 1X'lik TAE (Tris bazı, glasiyel asetik asit, Na_2EDTA, pH 8,5) kullanılmıştır. 1X'lik TAE hazırlamak için ise hazırlanan 50X TAE (242,0 g Tris bazı, 57,1 mL glasiyal asetik asit, 37,2 g $Na_2EDTA.2H_2O$, 1 L ultrasaf su ve pH 8,5) çözeltisi seyreltilmiştir.

Agaroz 1X TAE tampon içinde süspanse edilmiştir. Çözelti agaroz çözününceye kadar ısıtılmıştır. Sıcaklık 60ºC'a ulaştığında plastik tepsi içerisine dökülmüş ve 40 dk süre ile polimerizasyona bırakılmıştır.

Genomik DNA'ların analizi için %1,0 (a/h)'lik 1X TAE ile hazırlanan agaroz jel ve PCR ürünleri için %2,0 (a/h)'lik agaroz jel kullanılmıştır. Genomik DNA'lara ve PCR ürünlerine DNA standartlarının yanında verilmiş olan 6X yükleme tamponu (10 mM Tris−HCl pH 7,6, %0,03 bromofenol blue, %0,03 ksilen siyanol FF, %60 gliserol, 60 mM EDTA) karıştırılmıştır. Genomik DNA örnekleri agaroz jele Lambda DNA/HindIII Marker (10 mM Tris−HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA) ile birlikte yüklenmiştir. PCR ürünleri agaroz jele 100 bç DNA ladder (10 mM Tris−HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA) ile birlikte yüklenmiştir. Genomik DNA örnekleri yürütücü tampon çözeltisi (1X TAE) bulunan jel tankı içerisinde 100 voltta 90 dk yürütülmüştür. PCR örnekleri ise aynı yürütücü tampon çözeltisinde 90 voltta 4 saat süre ile yürütülmüştür. Agaroz jel, daha sonra 10 µL (0,625 mg/mL) etidyum bromür eklenmiş 200 mL saf su içinde 15 dk

bekletilerek boyamaya bırakılmıştır. Saf su ile durulandıktan sonra ultraviyole ışık altında renkli kamera ile jeldeki bantlar görüntülenmiştir.

3.2.1.6 RAPD ürünlerinin analizi

RAPD profillerinde gözlenen PCR ürünü bantların tümü değerlendirilmiştir. Tüm bantların moleküler ağırlıkları marker DNA bantlarına göre Uvigen paket programı kullanılarak belirlenmiştir. *Salvia* L. türlerinden elde edilmiş RAPD bantlarının varlığı "1" ve yokluğu "0" belirlendikten sonra her bir primer için "0" ve "1" matriks tabloları hazırlanmıştır. Değerlendirmesi güç olan DNA bantları üreten primerler değerlendirmeye alınmamıştır. Uygulama grupları arasındaki genetik benzerlik katsayıları Nei (1978)'nin taraflı ölçüm metoduna göre POPGENE v 1.31 paket programı kullanılarak hesaplanmıştır. Kümeleme analizi gerçekleştirilmiş ve genetik benzerlik katsayısı deney çiftlerinin ağırlıksız aritmetik ortalamaları (unweighted pair group method with arithmetic means, UPGMA) kullanılarak POPGENE 2.1v programında bir dendogram oluşturulmuştur.

3.2.2. CGE deneyleri

3.2.2.1 CGE'de kullanılan ayırma tamponu

Çıplak silika kapiler kolonu ile yapılan CGE deneylerinde ayırma tamponu olarak, %4,5 (a/h) HEC içeren TPE (20 mM Tris, 9,5 mM o-fosforik asit, 2 mM EDTA, pH 7,4) çözeltisi kullanılmıştır.

Bu çözeltinin hazırlanması sırasında içerisinde parçacık bulunmaması için süzülmüş, çözelti içindeki çözünmüş gazlar ultrasonik banyo kullanılarak uzaklaştırılmıştır.

3.2.2.2 Yıkama programı

Çıplak silika kapiler kolon her bir analizden önce 0,1 M HCl çözeltisi ile 30 dk yıkanmıştır. Her iki analiz arasında su (15 dk), 0,1 M HCl (10 dk), %1'lik PVA (5 dk) ve ayırma tamponu (TPE ve %4,5 HEC pH 7,6; 15 dk) çözeltileri ile yıkanmıştır. Deneylerin bitiminde kapiler kolon su ile yıkanarak bırakılmıştır.

3.2.2.3 Kapiler elektroforez cihazının koşulları

Kapiler Tipi: Çıplak silika kapiler kolon
Enjeksiyon Tipi: Elektrokinetik enjeksiyon (−5 kV, 4 s)
Ayırma Gerilimi: −9 kV
Sıcaklık: 20°C
Dedektör ve Dalga Boyu: DAD, 258,8 nm

3.2.2.4 CGE'de kullanılan DNA standardının hazırlanması

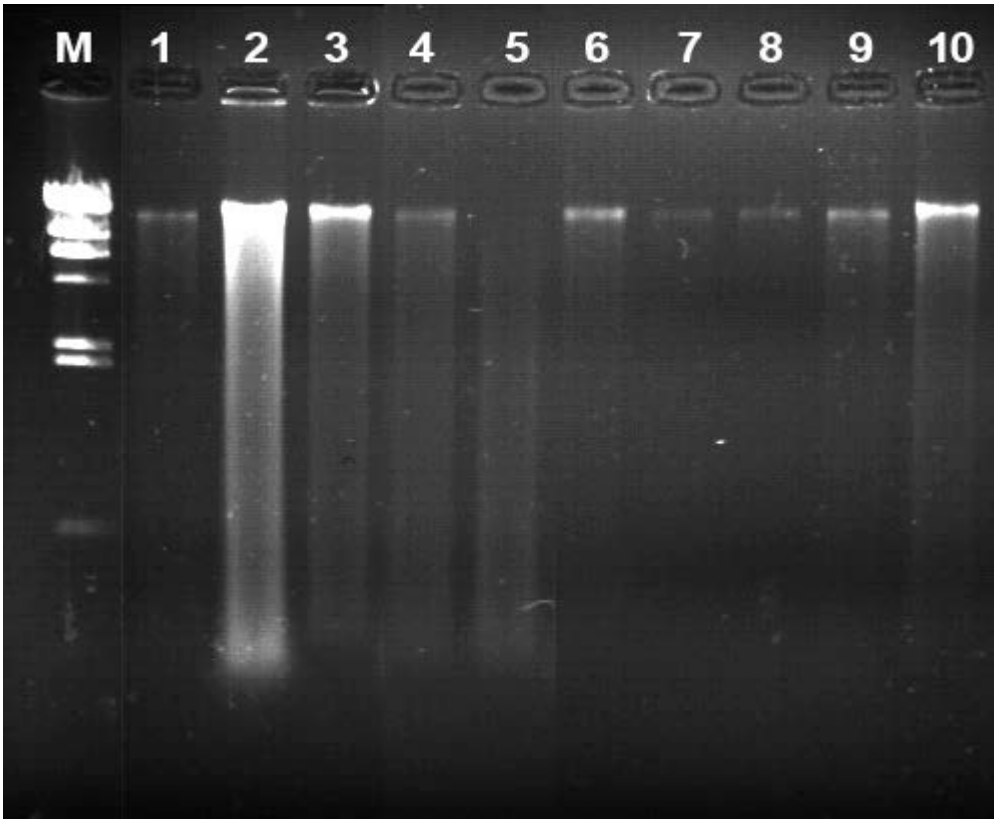
CGE deneylerinde, PCR ürünlerindeki bantların büyüklüklerine göre seçilmiş olan 100−3000 baz çifti aralığındaki (14 adet bant içerdiği bilinen) 100 bç DNA standardı kullanılmıştır. Derişimi 0,5 μg μL^{-1} olan bu DNA standardı, derişimi 5 ng μL^{-1} olacak şekilde su ile seyreltilerek CGE deneylerinde kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde *Salvia* L. türleri ile yapılan çalışmaların sonuçları verilmektedir.

4.1. *Salvia* L. Türlerinden İzole Edilen Genomik DNA'ların Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntüleri

Çalışmada kullanılan *Salvia* L. cinsine ait 10 tür Çizelge 3.1'de belirtilen lokalitelerden toplanmıştır. Bitki örneklerinin genomik DNA'ları Fermentas genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir. Bu *Salvia* L. türlerine ait genomik DNA'ların agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir. Şekil 4.1'den de görüldüğü gibi genomik DNA'lar başarılı bir şekilde izole edilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışılan *Salvia* L. türlerinden izole edilen genomik DNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü **M:** Lambda DNA/HindIII Marker, **1:** *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*

Çalışmalarda kolaylık sağlaması açısından her bir *Salvia* L. türü veya alt türüne birer numara verilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan *Salvia* L. türlerine verilen numaralar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmalarda kullanılan *Salvia* L. bitki örneklerine verilen numaralar

Örnek No	Tür
1	*S. tomentosa*
2	*S. candidissima*
3	*S. sclarea*
4	*S. ceratophylla*
5	*S. viridis*
6	*S. bracteata*
7	*S. verticillata*
8	*S. forskahlei*
9	*S. fruticosa*
10	*S. dichroantha*

4.2. Genomik DNA'ların Miktarı ve Kalitesinin NanoDrop Spektrofotometrik Yöntem ile Tayini

Salvia L. türlerinden elde edilmiş genomik DNA'ların kontrolü agaroz jel elektroforezi ile yapıldıktan sonra genomik DNA'ların saflığı (A_{260}/A_{280}) ve miktarları (ng μL^{-1}) NanoDrop spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Çalışılan *Salvia* L. türlerinden izole edilen genomik DNA'ların NanoDrop spektrofotometrik yöntemi ile belirlenen miktarları ve saflıkları

Örnek No*	Derişim (ng μL^{-1})	Absorbans (A_{260}/A_{280})
1	20,9	1,90
2	346,4	1,90
3	38,9	1,83
4	28,0	1,71
5	33,5	1,77
6	23,0	1,60
7	54,8	1,68
8	15,9	1,61
9	55,5	1,72
10	68,0	1,74

***1:** *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*

DNA çözeltisindeki protein ve RNA kirlilik düzeyi DNA saflığını belirlemektedir. A_{260}/A_{280} oranının 1,8 çıkması DNA çözeltisinin saf olduğunu gösterir. Bu değer 2 veya fazla ise RNA, 1,6 ve daha aşağısı ise protein kontaminasyonunu gösterir (Leninger ve ark., 1975). Elde edilen genomik DNA'ların saflığı (A_{260}/A_{280}) 1,60−1,90 aralığında değişmiştir. Bu durumda genel olarak Çizelge 4.1'deki değerlere bakıldığında *Salvia* L. türlerinden izole edilen genomik DNA'ların genel olarak RNA ve protein kirliliği içermedikleri yani saf oldukları söylenebilir. Elde edilen genomik DNA miktarları 15,9−346,4 ng μL^{-1} arasında değişmektedir. Genomik DNA'ların derişimleri 5 ng μL^{-1} olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile seyreltildikten sonra PCR reaksiyonu kurulumunda kullanıldıkları düşünüldüğünde yaklaşık 100 mg bitki dokusundan çok sayıda PCR reaksiyonu kurulabilecek kadar genomik DNA izole edilebildiği söylenebilir.

1−2 µL gibi çok az örnek ve kör çözelti miktarları ile çalışılabilmesi, seyreltme yapma gereksiniminin ortadan kalkması, ilgilenilen analize ait miktar,

saflık gibi sonuçların aletin yazılımından seçilerek doğrudan alınabilmesi ve ayrıca bir hesaplama yapmaya gerek kalmaması gibi üstünlükleri nedeniyle literatürde de yaygın olarak kullanılan NanoDrop spektrofotometresi tercih edilmiştir (Boesenberg Smith ve ark., 2012). Böylece daha kolay ve kısa sürede tayinler yapılarak daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmiştir.

4.3. PCR Reaksiyonu için En İyi Koşulların Belirlenmesi

PCR reaksiyonları için kalıp DNA'lardan alınacak miktarlar optimize edilmiştir. Ayrıca PCR reaksiyonlarında kullanılan diğer bileşenlerin derişimleri (primer, $MgCl_2$, *Taq* Polimeraz enzimi) ve döngü sayısı ile ilgili en iyi koşullar da belirlenmiştir. 25 µL'lik PCR reaksiyonunda en iyi koşulların belirlenmesi için farklı genomik DNA derişimleri (son derişimleri 0,5; 1,0 ve 1,5 ng), farklı $MgCl_2$ derişimleri (son derişimleri 1,5; 2,0 ve 2,5 mM) ve 3 farklı *Taq* DNA polimeraz derişimi (son derişimleri 0,5; 1,0 ve 2,0 U) ile optimizasyon yapılmıştır. PCR reaksiyonu ile ilgili en iyi koşullar belirlendikten sonra deneysel PCR reaksiyonlarına geçilmiştir. Bu sayede en kaliteli PCR ürünleri elde edilmiştir. PCR ile ilgili en iyi koşullar yöntem kısmında ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. PCR uygulamalarında olası bir kontaminasyonun olup olmadığını anlayabilmek amacıyla her uygulamada, genomik DNA içermeyen negatif kontroller kullanılmıştır. DNA'nın varlığını ve çoğaldığını saptamak amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Deneylerde kullanılan bütün bitki türleri için öncelikle 1 adet primerle PCR reaksiyonları kurularak bu PCR ürünlerinin jel görüntüleri alındıktan sonra tüm bitkilerde PCR reaksiyonlarının çalışıp çalışmadığı belirlenmiştir. Daha sonra aynı deneyler farklı primerler kullanılarak tüm bitki türleri için yapılmıştır.

4.4. *Salvia* L. Türlerinin RAPD Profilleri ve Değerlendirmesi

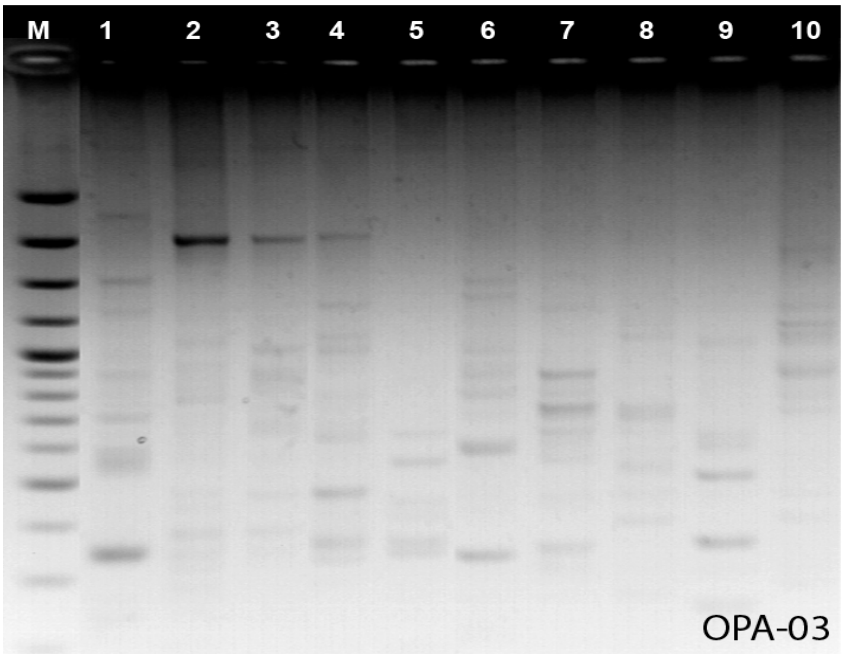
Salvia L. türleri ve primerler arasındaki farklılıkların olup olmadığı ön çalışmalar ile belirlendikten sonra deneyler yapılmıştır. Bu çalışmada, GC oranı

%60 olan Operon A (OPA) serisi 5 adet primer ön denemelerde kullanılmıştır. Bu primerlerden 4 tanesi değerlendirilebilir ve bilgi verici RAPD profilleri üretmiştir.

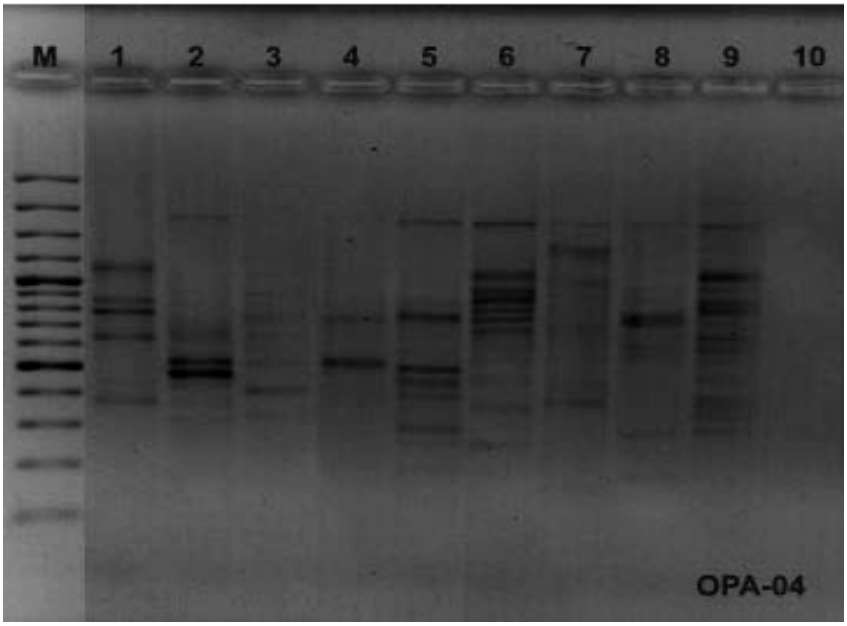
Bu primerlerle elde edilen agaroz jel görüntüleri Şekil 4.2−4.5'de görülmektedir. Toplam 10 farklı *Salvia* L. türü ile RAPD−PCR deneyleri gerçekleştirilerek bu türlere ait bant profilleri değerlendirmeye alınmıştır.

Her bir agaroz jelin birinci hattında RAPD profillerine ait DNA bantlarının moleküler ağırlığını belirlemek için bu ürünlerin büyüklüklerine uygun 100 bç DNA ladder standardı yürütülmüştür. Böylece DNA standardına ait bantlarla bitki türleri için farklı primerler ile elde edilen PCR ürünlerine ait bantlar kıyaslanarak PCR ürünlerindeki bantların hangi baz çifti büyüklüklerine karşılık geldiği hesaplanmıştır. Agaroz jel elektroforez fotoğraflarında yukarıdan aşağıya doğru DNA standardına (M) ve PCR ürünlerine ait bantlar moleküler büyüklüklerine göre büyükten küçüğe doğru yer almaktadır. Çünkü küçük moleküler ağırlıklı DNA parçaları büyüklerine göre daha hızlı hareket ettiklerinden dolayı agaroz jelin daha aşağı kısmında bulunurlar. Şekil 4.2−4.5'de farklı primerler ile çalışılan bitki türleri için yaklaşık 100−3000 baz çifti aralıklarında farklı DNA bantları elde edildiği ve her bir primer için bitki türleri arasında ortak DNA bantlarının olduğu görülmektedir.

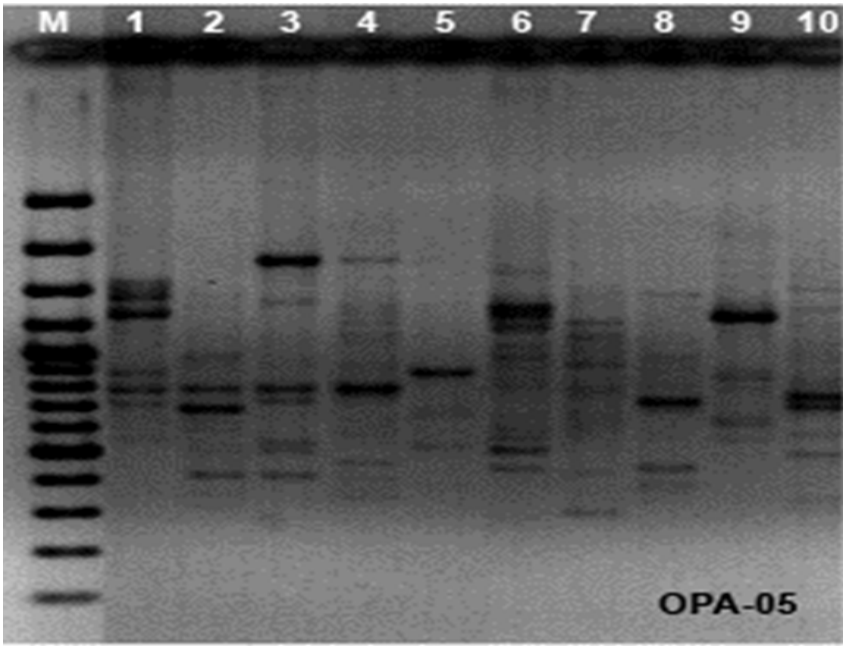
Agaroz jel fotoğraflarında görüntülenen PCR ürünlerine ait bantların okunmasında sadece net görünen bantlar değerlendirmeye alınmış ve bu bantlardan yararlanılarak sonuç çizelgeleri oluşturulmuştur. Dört primerin kullanımıyla her bir uygulama grubundan elde edilen DNA bantlarının varlığı "1" ve yokluğu "0" olarak belirtilmiş ve Çizelge 4.3−4.6'de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. Buna göre, çalışılan 10 farklı *Salvia* L. türü için her bir primerin PCR sonucu oluşturduğu farklı PCR bant sayısı OPA−03 için 13, OPA−04 için 16, OPA−05 için 16 ve OPA−15 için 11 olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla primer başına çoğalan ortalama farklı DNA bandı sayısı 14 olarak hesaplanmıştır. Değerlendirmeye alınan 4 primer ile toplamda 131 adet DNA bandı çoğaltılmıştır ve bu bantların boyutları 161 (OPA−15) ve 2610 (OPA−03) baz çifti aralığında değişmiştir.



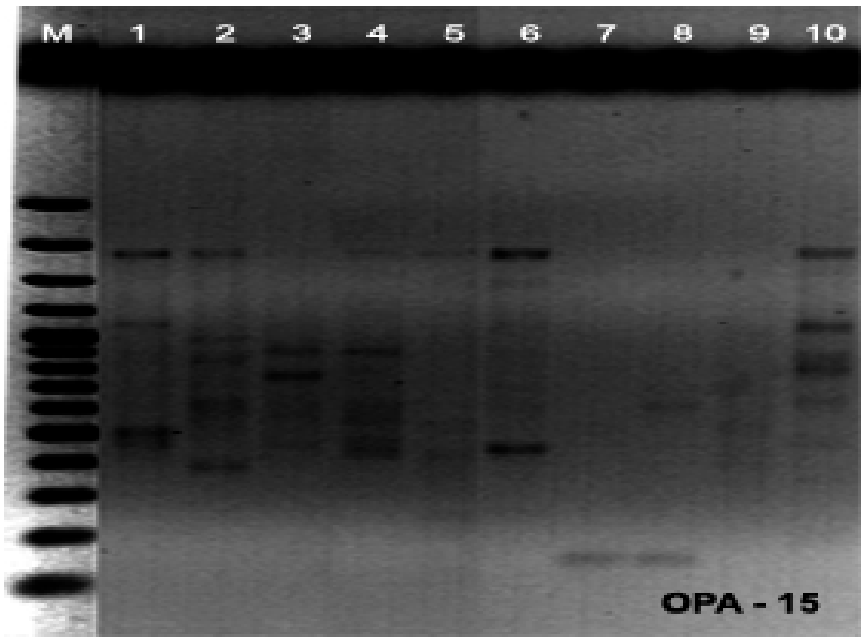
Şekil 4.2. Çalışılan *Salvia* L. türlerinin genomik DNA'larından OPA−03 primeri ile elde edilen RAPD profili **M:** GeneRuler™ 100 bç Plus DNA Ladder, **1:** *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*



Şekil 4.3. Çalışılan *Salvia* L. türlerinin genomik DNA'larından OPA−04 primeri ile elde edilen RAPD profili **M:** GeneRuler™ 100 bç Plus DNA Ladder, **1:** *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*



Şekil 4.4. Çalışılan *Salvia* L. türlerinin genomik DNA'larından OPA−05 primeri ile elde edilen RAPD profili **M:** GeneRuler™ 100 bç Plus DNA Ladder, **1:** *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*



Şekil 4.5. Çalışılan *Salvia* L. türlerinin genomik DNA'larından OPA−15 primeri ile elde edilen RAPD profilleri **M:** GeneRuler™ 100 bç Plus DNA Ladder, **1:** *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*

Fotoğraflar üzerinde (Şekil 4.2−4.5) agaroz jellerdeki monomorfik (tüm çeşitlerde bulunan bant) ve polimorfik (bazı çeşitlerde bulunup bazı çeşitlerde bulunmayan) bantlar saptanmıştır. Tüm primerler değerlendirmeye alındığında, tüm uygulama grupları için elde edilen DNA bantlarının hepsinin polimorfik olduğu görülmüştür. Tüm primerler ile elde edilen bantlar kıyaslandığında baz çiftlerinin birbirine çok yakın boyutlarda olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.3. OPA−03 primeri ile yapılan RAPD analizinin bant sayım sonuçları

		Örnek No*									
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
PCR Sonucu Oluşan Bant Büyüklüğü	**2610**	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2168	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1
	1553	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	1305	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1
	1194	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1086	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1
	1034	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
	915	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1
	788	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1
	643	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
	565	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0
	478	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	354	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0

***1:** *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*

OPA−03 primeri ile elde edilen bantların moleküler boyutları 354 ile 2610 baz çifti arasında değişmektedir. 2610 baz çifti sadece *S. tomentosa* türünde ve 1194 baz çifti ise sadece *S. dichroantha* türünde gözlenmiştir. 354 baz çifti (*S. sclarea*, *S. forskahlei* ve *S. dichroantha* türleri hariç) 7 türde de monomorfik banttır (Çizelge 4.3).

OPA−04 primeri ile elde edilen bantların moleküler boyutları 278 ile 1845 baz çifti arasında değişmektedir. 1388 baz çifti sadece *S. verticillata*'da ve 332 baz çifti ise sadece *S. fruticosa*'da elde edilmiştir. 854 baz çifti (*S. candidissima*, *S. sclarea* ve *S. dichroantha* türleri hariç) 7 türde de monomorfik bant üretmiştir.

Aynı şekilde 783 boyutlu baz çifti de (*S. forskahlei* ve *S. dichroantha* türleri hariç) 8 türde de monomorfik bant üretmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. OPA−04 primeri ile yapılan RAPD analizinin bant sayım sonuçları

		Örnek No*									
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
PCR Sonucu Oluşan Bant Büyüklüğü	**1845**	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
	1388	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	1191	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0
	1152	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
	915	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
	854	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
	783	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
	708	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
	631	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
	519	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0
	467	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
	390	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
	361	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
	332	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	283	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
	278	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0

***1:** *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*

OPA−05 primeri ile elde edilen bantların moleküler boyutları 294 ile 1893 baz çifti arasında değişmektedir (Çizelge 4.5). 647 baz çifti sadece *S. fruticosa*'da, 467 baz çifti sadece *S. ceratophylla* ve 294 baz çifti ise sadece *S. verticillata*'da elde edilmiştir. 800 baz çifti (*S. viridis* ve *S. forskahlei* hariç) 8 türde de monomorfik bant üretmiştir. Bu primerle elde edilen bantlar her bir bitki türü için tek tek incelendiğinde; *S. tomentosa* türü için toplam 7 tane (1637, 1472, 1344, 895, 800, 706 ve 538) bant, *S. candidissima* türü için toplam 4 tane (1015, 800, 706 ve 441) bant, *S. sclarea* türü için toplam 7 tane (1637, 1344, 800, 706, 561, 538 ve 441) bant, *S. ceratophylla* türü için toplam 6 tane (1893, 1344, 1224, 467 ve 441) bant, *S. viridis* için toplam 2 tane (895 ve 538) bant, *S. bracteata* için toplam 10 tane (1637, 1224, 1087, 1015, 895, 800, 561, 538 ve 441) bant, *S.*

verticillata için toplam 6 tane (1224, 1087, 895, 800, 441 ve 294) bant, *S. forskahlei* türü için toplam 4 tane (1472, 1087, 706 ve 441) bant, *S. fruticosa* için toplam 5 tane (1224, 895, 800, 647 ve 561) bant ve *S. dichroantha* için toplam 4 tane (1472, 1344, 800 ve 706) bant gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. OPA−05 primeri ile yapılan RAPD analizinin bant sayım sonuçları

PCR Sonucu Oluşan Bant Büyüklüğü	Örnek No*									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1893	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1637	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1472	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1344	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1
1224	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
1087	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
1015	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
895	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0
800	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
706	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1
647	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
561	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
538	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
467	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
441	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0
294	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

***1:** *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*

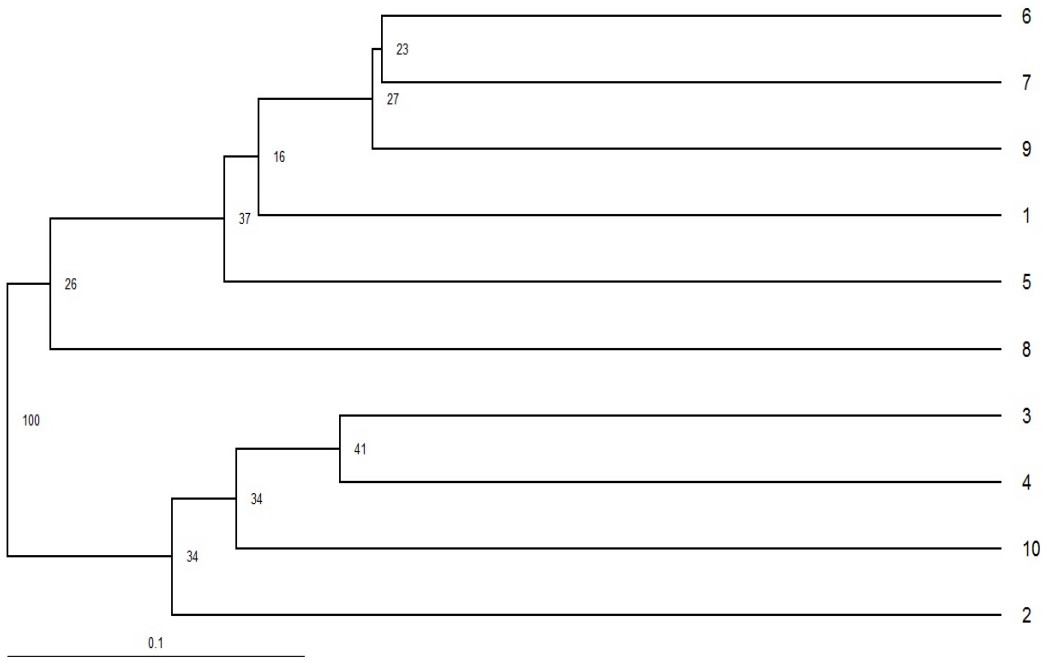
OPA−15 primeri ile elde edilen bantların moleküler boyutları 161 ile 1876 baz çifti arasında değişmektedir (Çizelge 4.6). 1005 baz çifti sadece *S. candidissima*, 508 baz çifti sadece *S. tomentosa*, 393 baz çifti ise sadece *S. candidissima* ve 250 baz çifti ise sadece *S. viridis* türünde bulunmuştur. Elde edilen bantlar arasında en fazla monomorfik bandı 1876 boyutlu baz çifti (*S. sclarea, S. verticillata, S. forskahlei* ve *S. fruticosa* türleri hariç) üretmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. OPA−15 primeri ile yapılan RAPD analizinin bant sayım sonuçları

PCR Sonucu Oluşan Bant Büyüklüğü	Örnek No*									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1876	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
1095	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1005	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
879	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
762	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
603	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
508	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
446	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
393	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
250	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
161	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0

***1:** *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*

Bu çalışmada filogenetik ağaç oluşturmakta genetik benzerlik katsayısı deney çiftlerinin ağırlıksız aritmetik ortalamaları (UPGMA) kullanılarak POPGENE programında bir dendogram oluşturulmuştur. Bu yöntemde bir takson için uzaklık matriksi gözden geçirilirken, en küçük uzaklık matriksi baz alınmaktadır. Bu yöntem geniş veri setlerini hızlı bir şekilde analiz edebilmektedir (Şahin, 2011).



Şekil 4.6. Çalışılan *Salvia* L. türlerine ait RAPD verilerinin genetik akrabalığını gösteren kümeleme analizi. Çatallardaki rakamlar bootstrapt yüzde değerlerini göstermektedir. Diyagramın sol köşesindeki skala Çizelge 4.7'de verilen uzaklık değerlerine göredir. ***1:** *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*

Genotipler arasında genetik uzaklığın hesaplanmasında RAPD bantlarının oluşturduğu veri matriksinden yararlanılarak POPGENE 2.1v programı kullanılmış ve çeşitler arasındaki genetik uzaklık tablosu oluşturulmuştur.

Çizelge 4.7. Çalışılan *Salvia* L. türleri çiftleri arasındaki Jaccard's uzaklık değerleri

1	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
2	0,4103								
3	0,4103	0,4706							
4	0,3415	0,4444	0,5556						
5	0,4103	0,3529	0,2353	0,3889					
6	0,5714	0,4091	0,3636	0,4783	0,5000				
7	0,5116	0,4211	0,3158	0,4500	0,4737	0,5714			
8	0,3158	0,3636	0,1818	0,1714	0,3030	0,3721	0,4324		
9	0,4186	0,3684	0,3158	0,4000	0,5263	**0,5833**	0,5714	0,3784	
10	0,4615	0,4118	0,4706	0,5000	0,1177	0,3182	0,2105	0,3030	**0,1579**

***1:** *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*

Şekil 4.6'daki dendogramlara ve Çizelge 4.7'ye göre birbirlerine genetik olarak en az benzeyen türler *S. fruticosa* ve *S. dichroantha*, birbirlerine genetik olarak en yakın türler ise *S. bracteata* ve *S. fruticosa*'dır. Türlerin birbirleri ile olan ilişkilerini gösteren dendogramda *S. tomentosa*, *S. viridis*, *S. bracteata*, *S. verticillata*, *S. forskahlei* ve *S. fruticosa*'nın kendi aralarında bir grup oluşturduğu; *S. candidissima*, *S. sclarea*, *S. ceratophylla* ve *S. dichroantha*'nın ise kendi aralarında ayrı bir grup oluşturduğu görülmektedir.

4.5. CE Deneyleri

Bu bölümde kapiler elektroforez ile gerçekleştirilen deneysel sonuçlar verilmektedir.

4.5.1. CE'de DNA ayırımları için yapılan ön denemeler

PCR örneklerindeki DNA parçalarının tayinleri için kapiler jel elektroforez ile yöntem geliştirilmesi ve en iyi koşulların belirlenmesi amacıyla farklı tampon çözeltiler ve bu çözeltilere eklenen farklı polimer ve jel katkı maddeleriyle çıplak silika kapiler kolonda ön denemeler yapılmıştır. Bu denemelerde DNA'nın maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu olan 258,8 nm'de DAD dedektör ile

analizler gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalarda 100−3000 baz çifti aralığındaki (14 adet DNA bandı içeren) DNA standardı (M) kullanılmıştır. Bu deneylerde kullanılan DNA standardına ait baz çifti büyüklükleri bantlara verilen numaralara göre sırasıyla **(1)** 100 bç, **(2)** 200 bç, **(3)** 300 bç, **(4)** 400 bç, **(5)** 500 bç, **(6)** 600 bç, **(7)** 700 bç, **(8)** 800 bç, **(9)** 900 bç, **(10)** 1000 bç, **(11)** 1200 bç, **(12)** 1500 bç, **(13)** 2000 bç, **(14)** 3000 bç şeklindedir.

Öncelikle çıplak silika kapiler kolonda ayırma tamponuna herhangi bir polimer eklenmeden sadece 20 mM Tris + 1 mM EDTA (pH= 7,6) tampon çözeltisi kullanılarak DNA standardının −15 kV'da 10 s hidrodinamik enjeksiyonu yapıldığında çok küçük pikler görülmüş, beklenilenden (14 pik) daha fazla pik ortaya çıkmış ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememiştir. Bunun, çıplak silikada DNA moleküllerinin kapiler duvarına adsorbe olmasından kaynaklandığı ve bu nedenle tekrarlanabilirliğin düştüğü ve piklerde kuyruklanma meydana geldiği düşünülmüştür (Wu ve ark., 2006). Bu yüzden daha sonraki ön denemelere, tampona çeşitli polimer ve jel katkı maddeleri eklenerek devam edilmiştir.

Aşağıda farklı tampon çözelti ve katkı maddeleriyle çıplak silika kolonda CE ile yapılan denemeler verilmiştir. CE'de yapılan bu deneyler enjeksiyon modülü ve güç kaynağını içeren CE−L1 (CE Resources, Pte Ltd, Ayer Rajah Crescent, Singapur) model kapiler elektroforez cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Sinyaller SPD−M10 A model VP Diode Array Dedektör (DAD) ile kaydedilmiştir. Alınan veriler, Class VP (Shimadzu, Kyoto, Japonya) veri işletim programı ile işlenmiştir. Bu CE aleti çalışmalar sırasında arızalandığı için en iyi koşullar belirlendikten sonra yapılan tüm deneyler tekrar Bölüm 3.1.3'de belirtilen (Agilent) CE aletine uyarlanmıştır.

1. PVP ile deneme: Diğer polimerler arasında, düşük viskozitesi, daha iyi dinamik kaplama kabiliyeti, uzun ömür ve yüksek tekrarlanabilirlik gibi özelliklerinden ötürü polivinil pirolidon (PVP) katkı maddesi olarak denenmiştir. TBE (89 mM TRİS, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA, pH= 7,1) tamponuna %5,5 (a/h) olacak şekilde PVP ilave edilerek DNA standardı enjekte edilmiştir. PVP jel sistemi ile DNA'ları farklı gerilimlerde (+15 kV, −10 kV ve −15 kV), farklı

pH'larda (8,5 ve 7,1) ve farklı enjeksiyon modlarında [hidrodinamik (0,3 psi) ve elektrokinetik (2 kV)] 5 s enjeksiyon yapılarak kapiler kolona verilmiştir. Ancak bu sistemle pik morfolojisi iyi olan pikler elde edilememiştir.

2. CTAB ile deneme: Yeni değiştirilmiş olan çıplak silika kolonda 5/50 oranında (10 mM Tris ve 1 mM EDTA, pH= 7,6 çözeltisi ile) seyreltilmiş olan 100 bç DNA markerı 8 s hidrodinamik enjeksiyon yapılarak −4 kV gerilim uygulanarak kapiler kolona verilmiştir. Bu analizlerde ayırma tamponu olarak TAE (89 mM TRİS, 89 mM Asetat, 2 mM EDTA, pH= 7,1) tampon çözeltisinde 8,9 mM CTAB içeren çözelti kullanılmıştır. Bu gerilimde 4 dk su, 8 dk 0,1 M NaOH, 7 dk su ve 10 dk tampon ile ara yıkama yapılarak ikinci enjeksiyon yapılmıştır. Ancak tekrar edilebilir pikler elde edilememiştir. Ayrıca emin olmak için yine aynı koşullarda ama −6 kV ayırma gerilimi kullanılarak DNA standardının iki enjeksiyonu daha yapılmıştır. Tampon çözeltideki CTAB miktarı 0,89 mM yapılarak denendiğinde de yine uygun sonuçlar elde edilememiştir. Yapılan deneylerde farklı yıkama programları da (Perklorik asit ile, sadece su ve tampon ile, potasyum hidroksit ve metanol ile ve süreler vs. değiştirilerek) denenmiş ancak iyi sonuç alınamamıştır.

3. PEO ile deneme: Yeni değiştirilmiş olan çıplak silika kolonda 5/50 oranında (10 mM Tris ve 1 mM EDTA, pH= 7,6 çözeltisi ile) seyreltilmiş olan 100 bç DNA standardı; −5 kV, 8 s elektrokinetik enjeksiyon yapılarak −15 kV ayırma gerilimi uygulanarak kapiler kolona verilmiştir. Bu analizlerde ayırma tamponu olarak %0,5 (a/h) PEO (600.000 ortalama molekül ağırlığı, Ma_{ort}) içeren TAE (89 mM TRİS, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA, pH= 8,3) kullanılmıştır. Bu çalışmada enjeksiyon yapılmadan önce ve ara yıkamalarda 4 dk 0,1 M HCl; 4 dk %1(a/h)'lik PVA (30.000−70.000 Ma_{ort}) ve %0,5 (a/h) PEO içeren TBE ayırma tamponu kullanılarak kolon yüzeyinin kaplanması sağlanmıştır.

%0,5 (a/h) PEO kullanılarak yapılan deneylerde farklı elektrokinetik enjeksiyon gerilimleri (−10 kV), farklı yıkama koşulları ve farklı tampon pH'ı (pH 7,2) denenmiştir. Ancak tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememiştir.

%0,5 (a/h) PEO (600.000 Ma_{ort}) içeren ayırma tamponu kullanılarak yapılan deneylerde başarılı olunamadığı için deneylere PEO (600.000 Ma_{ort}) miktarı %1,5 (a/h)'a çıkarılarak devam edilmiştir. Bu denemelerde de yine TBE (pH= 8,3) tamponu ile −10 kV, 12 s elektrokinetik enjeksiyon, −15 kV ayırma gerilim koşullarında farklı ara yıkama programları kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Ancak bu çalışmalar sonucunda da tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememiştir.

4. Dekstran ile deneme: Bu deneylerde farklı yüzdelerde ve molekül ağırlıklarında olan ve literatürde az sayıda çalışmaya rastlanan dekstran katkı maddesi denenmiştir. Deneylerde 20 mM Tris, 9,5 mM Fosfat ve 2 mM EDTA içeren tampon çözeltisi içerisine %10 (a/h) 2.000.000 molekül ağırlıklı dekstran eklenerek farklı ayırım gerilimleri (−8 kV, −13 kV, −25 kV ve −30 kV) uygulanarak DNA standardına ait pikler elde edilmiştir. Ancak bu deneylerde çok küçük pikler elde edilmiştir. Bu yüzden bu sonuçları geliştirmek amacı ile CE'de aynı tampon çözeltiler içerisindeki 2.000.000 molekül ağırlıklı dekstranın miktarı %15 (a/h) yapılarak (−20 kV ayırma geriliminde), %15 (a/h)'lik 500.000 Ma'lı dekstran (−20 kV ayırma geriliminde) kullanılarak, % 10 (a/h)'luk 500.000 Ma'lı dekstran (−15 kV ayırma geriliminde) ve %10 (a/h)'luk 70.000 Ma'lı dekstran (−15 kV ayırma geriliminde) ile deneyler yapılmıştır. Bu katkı maddesinin uygulanan koşullarda etkili bir ayırım ortamı sağlamadığı ve hassasiyetin düşük olduğu gözlenmiştir.

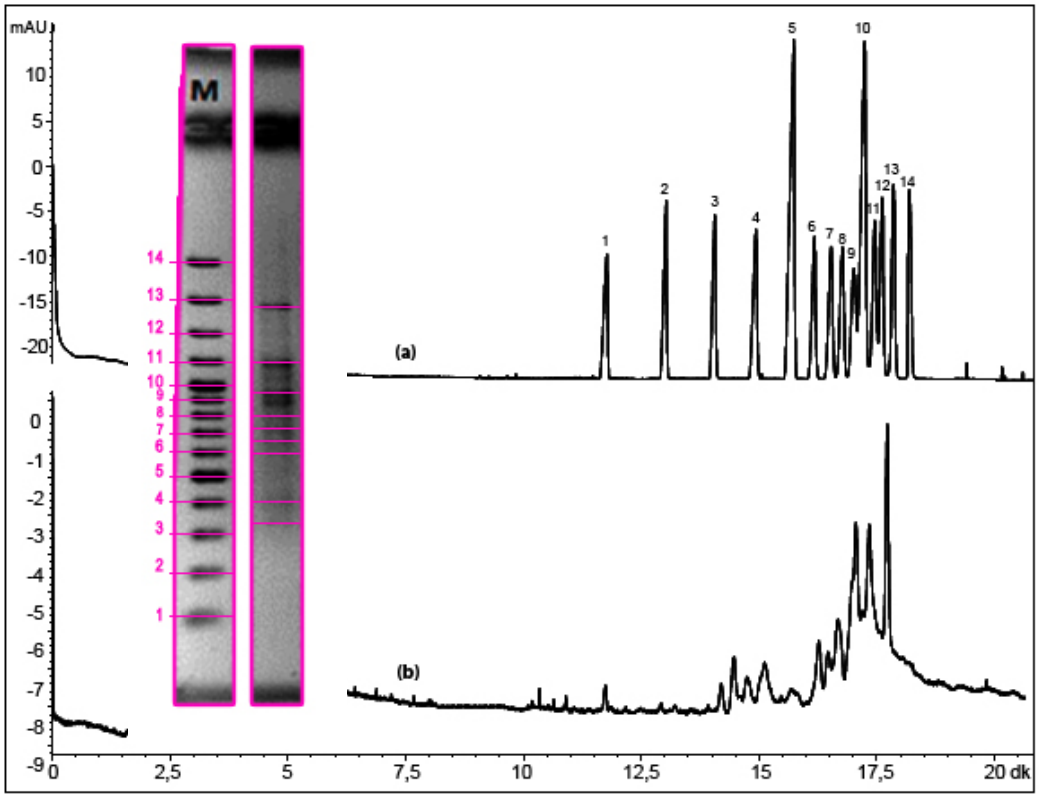
5. HEC ile deneme: Yeni değiştirilmiş kapiler kolonda (75 cm toplam uzunluk, 50 cm etkin uzunluk) tampon katkı maddesi olarak %4,5 (a/h) HEC (90.000 Ma_{ort}) eklenmiş olan ve 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA (pH= 7,450) içeren ayırma tamponu ile −10 kV 12 s elektrokinetik enjeksiyon, −12 kV ayırma gerilim koşullarında 1/100 oranında su ile seyreltilmiş olan DNA standardı enjekte edildiğinde bu standarda ait 14 adet pikin iyi bir şekilde ayrıldığı gözlenmiştir. Ayrıca bu standardın ardarda 3'er kez enjeksiyonunda tekrar edilebilir sonuçlar elde edilmiştir. Ara yıkama programı olarak 15 dk su, 10 dk 0,1 M HCl ve 15 dk ayırma tamponu kullanılmıştır. Ayrı

günlerde ve yeni kolonda da standarda ait analizler yine tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir.

Ayrıca HEC kullanılarak DNA standardı ile yapılan bu analizlerde farklı ayırma gerilimleri (−13 kV, −12,5 kV), farklı tampon derişimleri (30 mM Tris ve 100 mM Tris), farklı HEC miktarları (%3,5 (a/h) HEC ve %1,5 (a/h) HEC) denenerek en uygun koşullar belirlenmeye çalışılarak pikler daha öne alınmaya çalışılmıştır. Ancak bu koşullarda pikler birbirleriyle karışmıştır.

4.5.2. Hazır CEP kaplı kapiler kolon ile yapılan CGE deneyleri

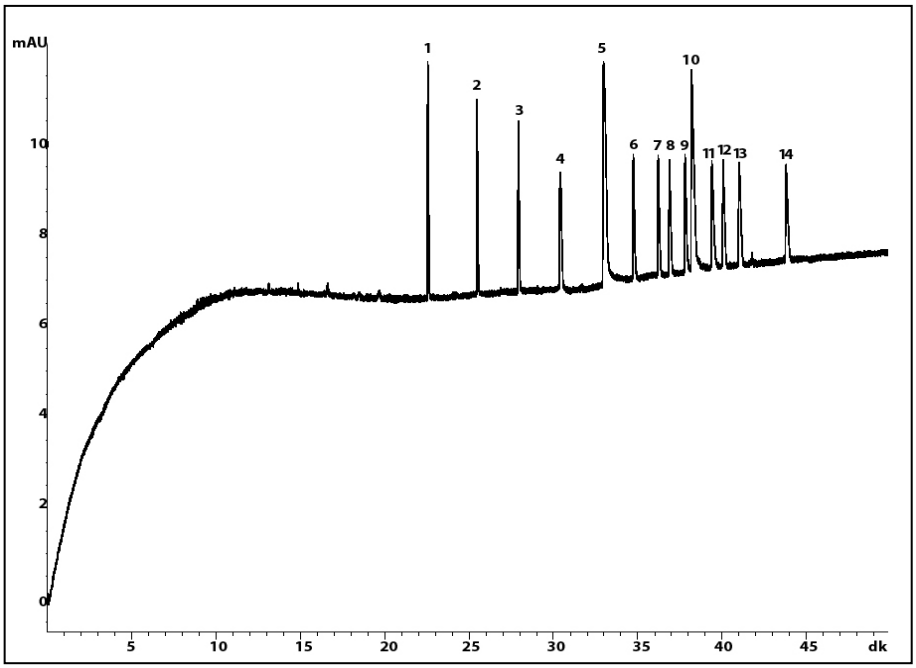
Hazır polietilen glikol (PEG) polimer kaplanmış olarak temin edilen polimer kapiler kolonda (CEP−coated column) DNA standardı ile deneyler yapılmıştır. Bu kaplı kapiler kolon ile yapılan deneylerde kolonun alındığı firmanın önerdiği analiz yöntemi kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. CEP kapiler kolonda (48,5 cm toplam uzunluk, 40 cm etkin uzunluk) tampon katkı maddesi olarak %1,5 (a/h) HEC (90.000 Ma_{ort}) eklenmiş olan ve 89 mM Tris, 332 mM borik asit, 2 mM EDTA (pH= 7,60) içeren ayırma tamponu kullanılmıştır. Analiz, −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyon ve −11 kV ayırma gerilim koşullarında gerçekleştirilmiştir. Kapiler kolona 1/100 oranında ultra saf su ile seyreltilmiş olan DNA standardı enjekte edilmiş ve bu standarda ait 14 adet pik 20 dk gibi çok kısa bir süre içerisinde ayrılmıştır. Ayrıca aynı koşullarda bu kolona *S. fruticosa* türünün OPA−4 primeri kullanılarak çoğaltılmış olan PCR ürünü de enjekte edilmiştir (Şekil 4.7). Ayrıca bu PCR örneğinin ve aynı koşullardaki DNA standardının (M) agaroz jel fotoğrafları da Şekil 4.7'deki elektroferogramda yer almaktadır. Yeni kapiler kolon ilk açılışta 10 dk ultra saf su ve 20 dk ayırma tamponu ile yıkanmıştır. İki enjeksiyon arası yapılan ara yıkamalarda ise kolon 10 dk ayırma tamponu ile yıkanmıştır. Agaroz jeldeki bant sayıları ile CGE'deki pikler birbiri ile uyumludur. Ancak bu kolonda DNA standardının art arda yapılan enjeksiyonlarında tekrar edilebilir sonuçlar elde edilememiştir. Bunun nedeninin de kolon yüzeyinden veya yıkama koşullarından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Çıplak kapiler kolonla yapılan deneyler, bu hazır kapiler kolon ile (CEP−coated) yapılan deneylerden daha iyi ve tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir.



Şekil 4.7. 89 mM Tris, 332 mM borat, 2 mM EDTA, % 1,5 (k/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyon ve −11 kV ayırma gerilim koşullarındaki CEP−coated kapiler kolonunda a) DNA standardının ve b) *S. fruticosa'nın* OPA−4 primeri kullanılarak çoğaltılmış olan PCR ürününün enjeksiyonuna ait elektroferogram

4.5.3. Çıplak silika kolon kullanılarak DNA standardı için belirlenen en iyi CGE yöntemi

Şekil 4.8'de 100 bç DNA standardına ait en iyi koşullardaki elektroferogram görülmektedir. Çıplak silika kapiler kolon (48,5 cm toplam uzunluk, 40 cm etkin uzunluk) ile yapılan bu CGE deneylerinde ayırma tamponu olarak, %4,5 (a/h) HEC içeren TPE (20 mM Tris, 9,5 mM *o*-fosforik asit, 2 mM EDTA, pH 7,4) çözeltisi kullanılmıştır. DNA standardına ait farklı büyüklüklerdeki 14 adet pik 45 dk içerisinde ayrılmıştır.



Şekil 4.8. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, %4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyon ve −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda DNA standardının enjeksiyonuna ait elektroferogram

4.5.3.1 CGE tekrarlanabilirlik deneyleri

DNA standart çözeltisi aynı analiz şartlarında (%4,5 (a/h) HEC içeren TPE tamponu, −9 kV ayırım, −5 kV 4 s enjeksiyon, 258,8 nm) farklı günlerde 6 defa enjekte edilmiştir (n=6). Piklerin göç zamanları ve alanları kullanılarak geliştirilen metodun kesinliği kontrol edilmiştir.

CGE ile tekrarlanabilirlik deneylerinde 100−3000 baz aralığındaki (14 adet bant içerdiği bilinen) DNA standardı kullanılmıştır. CE cihazında DNA standardındaki her bir baz çiftine ait tekrarlanabilirlik (n=6) sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir. Her bir baz çiftinin elektroferogramdaki göç zamanlarına göre hesaplanan bağıl standart sapma değerlerine bakıldığında oldukça yüksek tekrarlanabilirlikte sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.8. DNA standardındaki her bir baz çiftine ait farklı günlerdeki tekrarlanabilirlikleri (n= 6) (1) 100 bç, (2) 200 bç, (3) 300 bç, (4) 400 bç, (5) 500 bç, (6) 600 bç, (7) 700 bç, (8) 800 bç, (9) 900 bç, (10) 1000 bç, (11) 1200 bç, (12) 1500 bç, (13) 2000 bç, (14) 3000 bç

Bant No	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
Ortalama t_m (dk)*	22,60	25,55	28,08	30,57	33,18	34,97	36,45	37,18	38,10	38,51	39,69	40,44	41,39	44,16
SS*	0,10	0,12	0,21	0,31	0,34	0,38	0,43	0,50	0,55	0,59	0,65	0,62	0,66	0,64
% BSS*	0,45	0,47	0,73	1,01	1,04	1,07	1,17	1,34	1,45	1,54	1,64	1,54	1,60	1,45

***t_m:** Göç Zamanı

***SS:** Standart Sapma : $$SS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}(X_i - \overline{X})^2}{N-1}}$$

***% BSS:** Bağıl Standart Sapma: $$\%BSS = \frac{SS}{\overline{X}}\, x\, 100$$

4.5.3.2 Bitki PCR ürünleri için en iyi CGE yöntem koşullarının belirlenmesi

100 bç DNA standardı kullanılarak CGE yöntemi geliştirilerek tekrar edilebilir sonuçlar alındıktan ve tez çalışmasında kullanılmış olan standarda ait 14 adet farklı boyutlardaki DNA bantları belirlendikten sonra PCR kiti ile saflaştırılmamış olan bitki PCR örneği aynı koşullarda doğrudan kapiler kolona verilmiştir. Bu bitki PCR örneğinde var olan bantların sayısı, agaroz jel elektroforezinde kontrol edilerek belirlenmiştir. Ancak CGE'de yapılan deneyler sonucunda bitki PCR örneğine ait piklerle DNA standardına ait piklerin aynı sürelerde gelmediği saptanmıştır. PCR ürünündeki tüm piklerin aynı koşullarda verilmiş olan DNA standardındaki en küçük bant olan 100 bç'nin göç zamanından bile daha kısa sürede geldiği ve beklenen bant sayısından daha az sayıda bant olduğu belirlenmiştir. Yapılan çeşitli deneyler sonrasında bu problemin PCR reaksiyonundaki tuz vs. gibi bileşenlerden gelen safsızlıklardan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Bu sorun, agaroz jel elektroforezi ile çoğaldığı kesinleşen PCR ürünlerinin PCR saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılmasıyla çözümlenmiştir. Bu aşamada CGE'de tayin edilebilecek en uygun örnek derişiminin belirlenmesi için farklı miktarlarda PCR reaksiyonları (25 µL, 50 µL ve 100 µL) kurulmuştur. Bu deneyler sonucunda en uygun miktarın 50 µL'lik PCR reaksiyonu olduğu belirlenmiştir. Bu 50 µL'lik miktarın 12 µL'si agaroz jel elektroforezinde görüntülemede kullanılmış ve kalan kısım PCR saflaştırma kolonundan geçirilmiştir. Enjeksiyon işlemleri tamamlandıktan sonra mikro vial içindeki PCR ürünleri −20°C'da saklanmıştır. CGE'de alınan sonuçların doğruluğunu göstermek amacıyla PCR saflaştırma kolonunun % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır**.**

4.5.3.3 PCR saflaştırma kolonunun geri kazanımı

Geri kazanım deneylerinde 5 ng μL^{-1} olacak şekilde hacimce 1/100 oranında su ile seyreltilmiş olan 100 µL 100 bç DNA standardı kullanılmıştır. Bu standart 3 kez doğrudan CE'e enjekte edilmiştir. Ayrıca bu standardın 3 ayrı

çözeltisi hazırlanarak 3 ayrı PCR saflaştırma kolonundan geçirilerek 100 µL su ile elüsyon yapılmış ve aynı gün içinde CE'de analiz edilmiştir. Böylelikle çözeltilerin son derişimleri aynı olmuş ve HEC kullanılarak en iyi koşulların belirlendiği CGE yöntemi ile DNA standardındaki piklerin alanlarından yararlanılarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş, her bir baz çifti için PCR saflaştırma kolonu için ortalama % geri kazanım değerleri bulunmuştur (Çizelge 4.9). Çizelge 4.9'dan görülebileceği gibi % geri kazanım değerleri oldukça yüksek olup %(83,9-98,8) arasındadır.

Çizelge 4.9. CGE yöntemi ile DNA standardındaki her bir baz çifti için hesaplanan PCR saflaştırma kolonunun ortalama % geri kazanım değerleri

Baz Çifti Büyüklüğü	**Geri Kazanım* %**
100	83,9
200	92,6
300	98,8
400	98,7
500	89,2
600	94,5
700	96,0
800	91,3
900	87,9
1000	85,4
1200	84,8
1500	87,4
2000	87,8
3000	85,0

$$* \% \, GeriKazanım = \left[\frac{C1}{C2}\right] x\, 100$$

C1: DNA standardı PCR saflaştırma kolonundan geçirildikten sonra CE'den belirlenen alan

C2: DNA standardı doğrudan verildiğinde CE'den belirlenen alan

Çizelge 4.10'da PCR saflaştırma kiti içerisindeki kitapçıkta yer alan farklı büyüklükteki DNA parçaları için % geri kazanım değerleri verilmiştir. Aynı büyüklükteki bantlar için % geri kazanım değerlerine bakıldığında sonuçların bu çalışmada CGE ile deneysel olarak belirlenen % geri kazanım değerleri (Çizelge 4.9) ile uyumlu olduğu görülmektedir. Çizelge 4.10'a göre baz çifti büyüklüğü arttıkça % geri kazanım değeri de düşmektedir. PCR saflaştırma kolonunun % geri kazanımı PCR ürünlerinin derişimlerinin geliştirilen bu yöntemle ne kadar doğru bulunduğunun belirlenmesi amacı ile hesaplanmıştır.

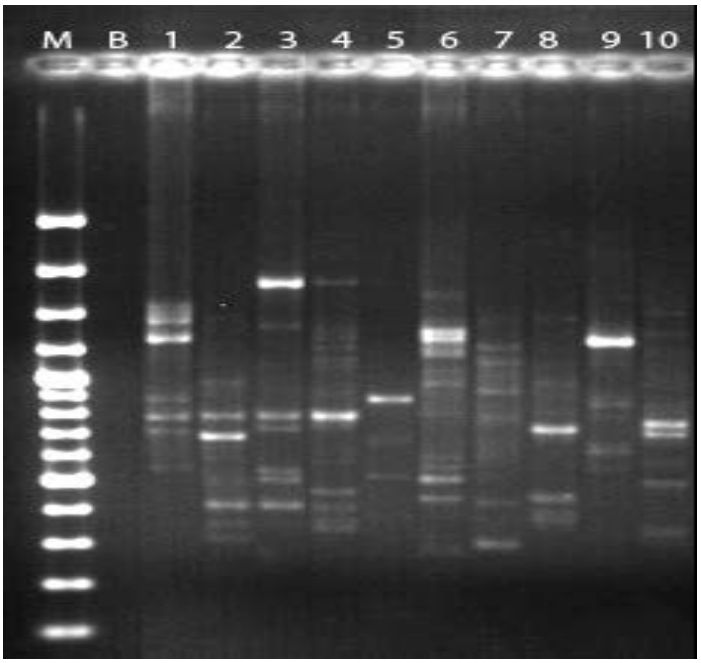
Çizelge 4.10. PCR saflaştırma kiti içerisindeki kitapçıkta verilen farklı büyüklükteki DNA parçaları için % geri kazanım değerleri (Vogelstein ve Gillespie 1979; Marko ve ark. 1982)

Baz Çifti Büyüklüğü	Geri Kazanım %
250	83,7
500	84,7
1000	94,7
1500	91,8
2000	91,1
3000	95,4
4000	86,4
6000	68,1
10000	42,6

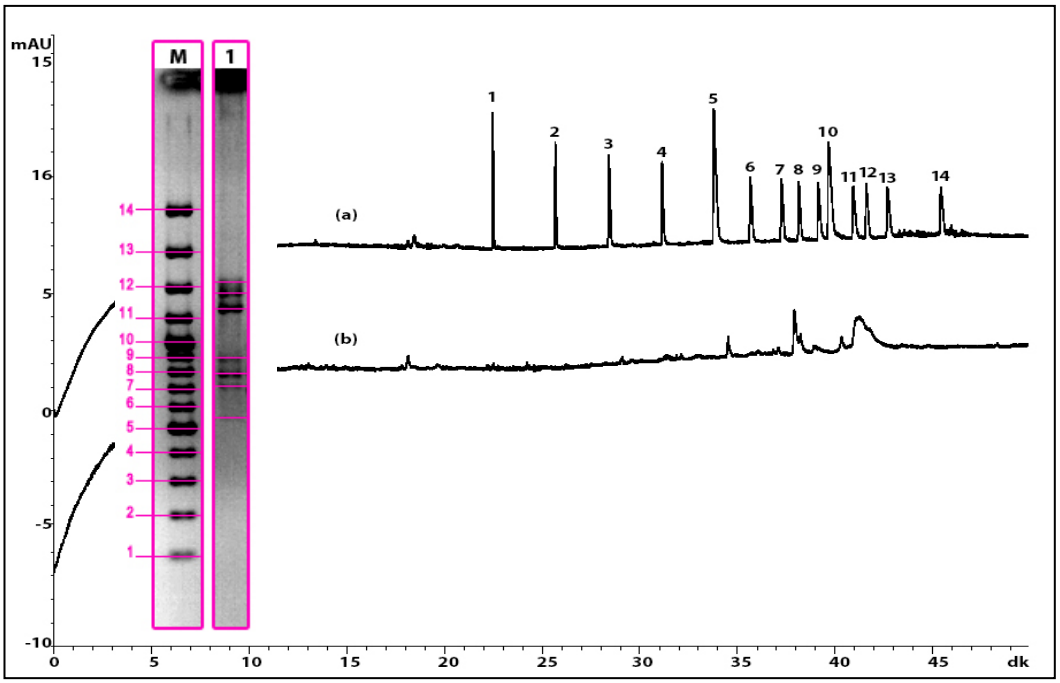
4.5.3.4 Geliştirilmiş CGE yöntemi ile bitkilerde DNA tayini

RAPD deneylerinde kullanılan OPA−03, OPA−04, OPA−05 ve OPA−15 primerlerinin arasından jellerdeki bant büyüklükleri, bantların birbirlerine olan yakınlığı ve miktarları açısından CGE'de analiz için en uygun olan OPA−05 primeri ile elde edilen bantlar olduğu için deneylerde bu primer tercih edilmiştir. CGE yöntemi ile OPA−05 primeri kullanılarak RAPD−PCR ile çoğaltılmış olan 10 farklı *Salvia* L. türündeki DNA'lar tayin edilmiştir. Buradan elde edilen sonuçlar agaroz jel elektroforezdeki bantlarla (Şekil 4.9) kıyaslanmıştır. Agaroz

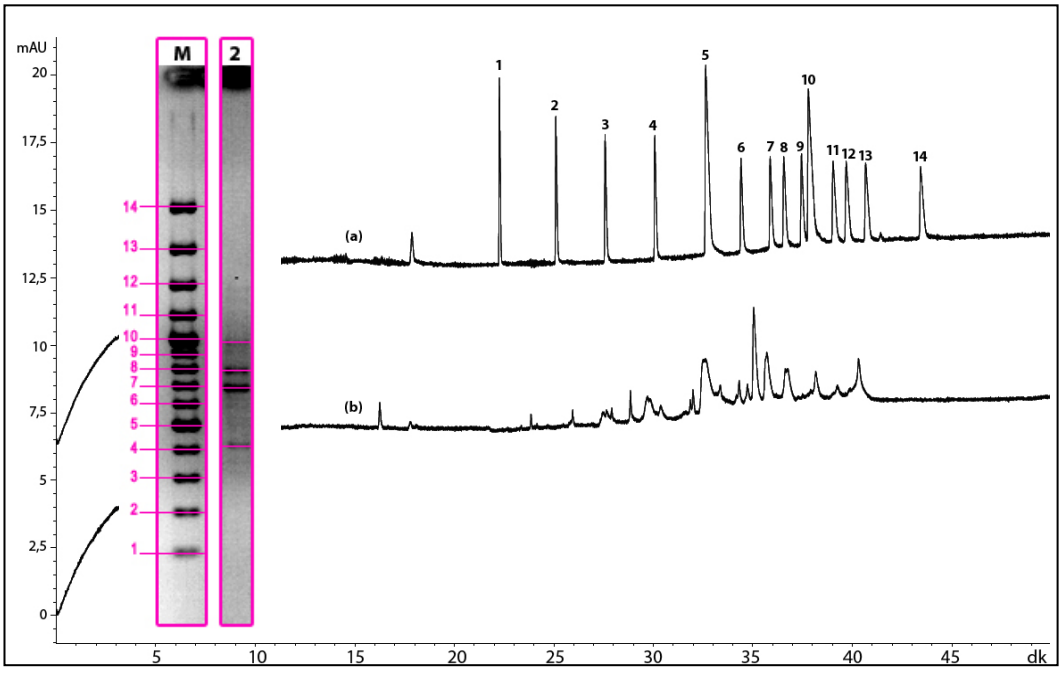
jel elektroforezindeki çok silik bantlar değerlendirmeye alınmamıştır. CE cihazında daha doğru sonuçlar alabilmek için PCR ürünlerinin art arda ikişer tekrarları yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Şekil 4.10−4.19'da çalışılan her bir *Salvia* L. türü ile ilgili olan elektroferogramlar ve bu türlerin PCR örneklerinin enjekte edilmesinden hemen önce kontrol amaçlı verilen DNA standartları görülmektedir. Ayrıca bu elektroferogramların üzerinde DNA standardı ve ilgili bitki PCR örneğine ait agaroz jel elektroforez fotoğraflarının negatifleri de yer almaktadır. Şekil 4.20'de ise farklı ve ortak bantların daha iyi görünebilmesi amacıyla tezde çalışılan 10 farklı *Salvia* L. türünün CGE'de üst üste alınmış elektroferogramları verilmiştir.



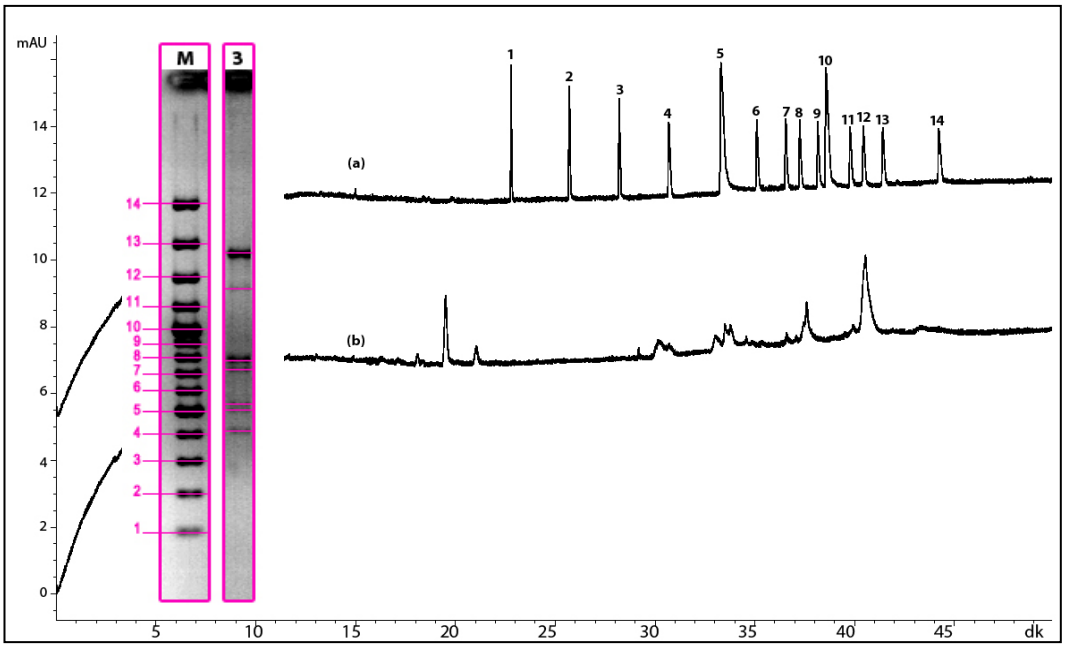
Şekil 4.9. *Salvia* L. türlerinin genomik DNA'larından OPA−05 primeri ile elde edilen RAPD profilleri **B:** Blank, **M:** GeneRuler™ 100 bç Plus DNA Ladder, **1:** *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*



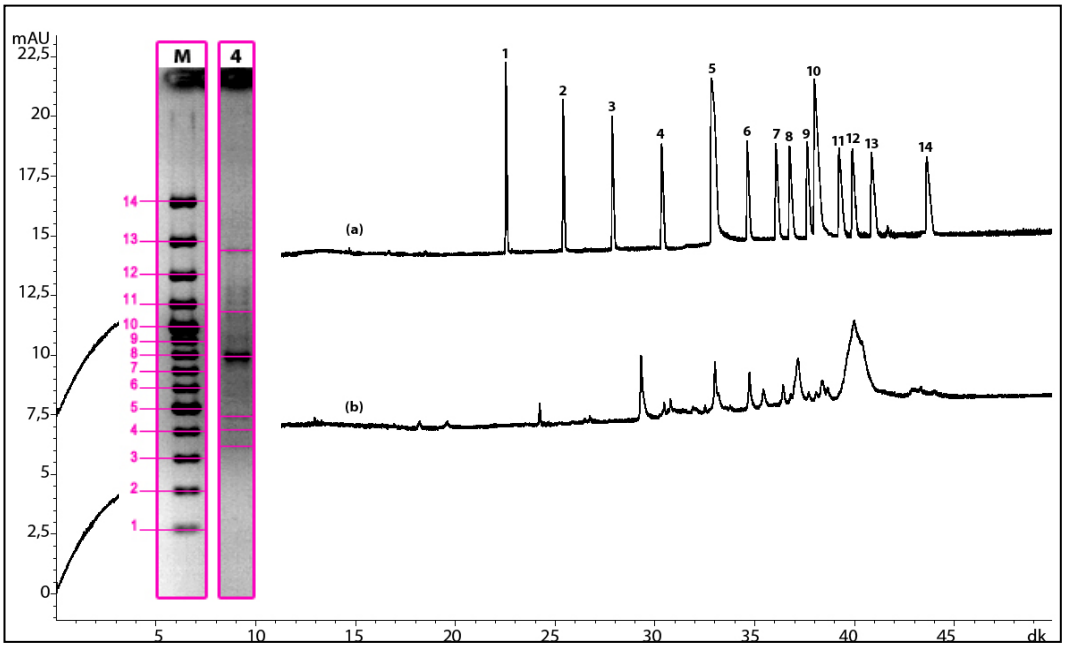
Şekil 4.10. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, ve −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. tomentosa*'nın OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram



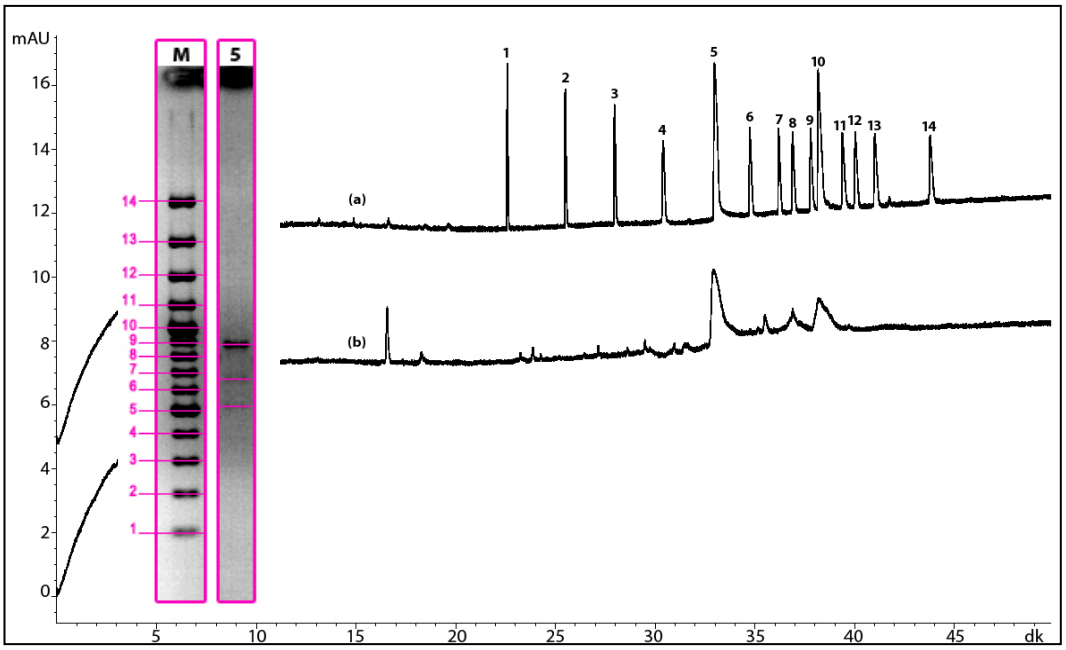
Şekil 4.11. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. candidissima*'nın OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram



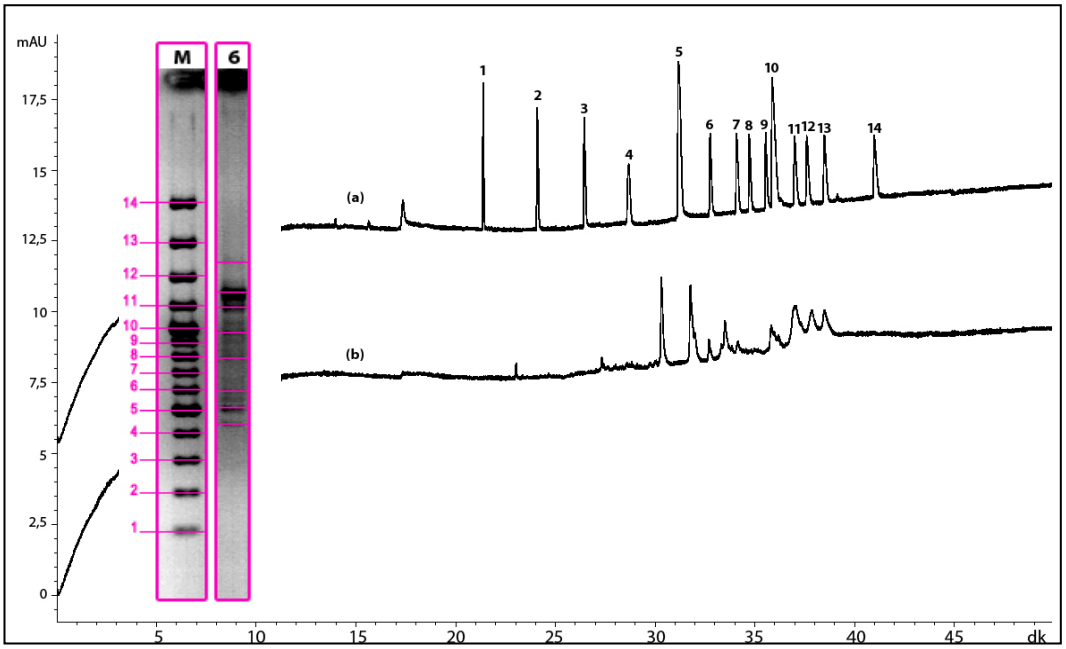
Şekil 4.12. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. sclarea*'nın OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram



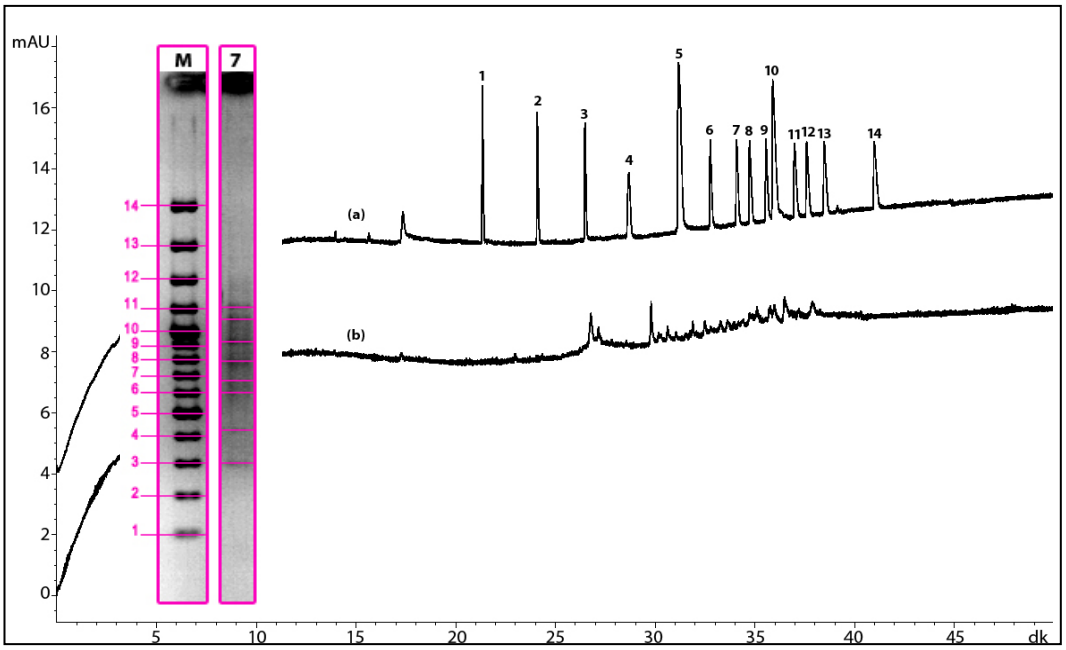
Şekil 4.13. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. ceratophylla*'nın OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram



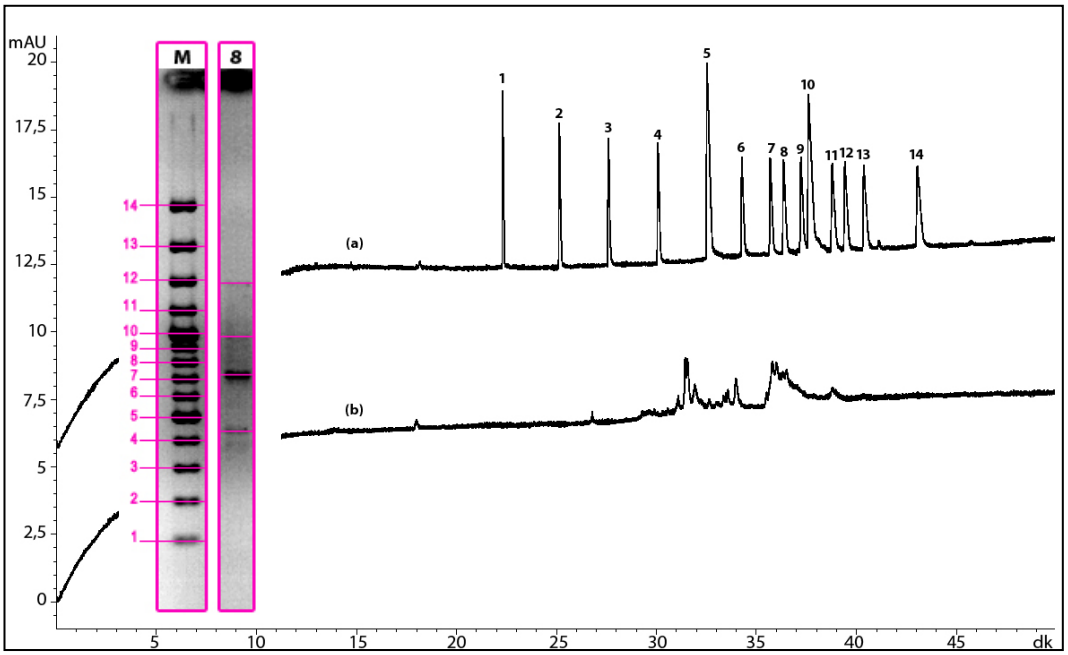
Şekil 4.14. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. viridis*'in OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram



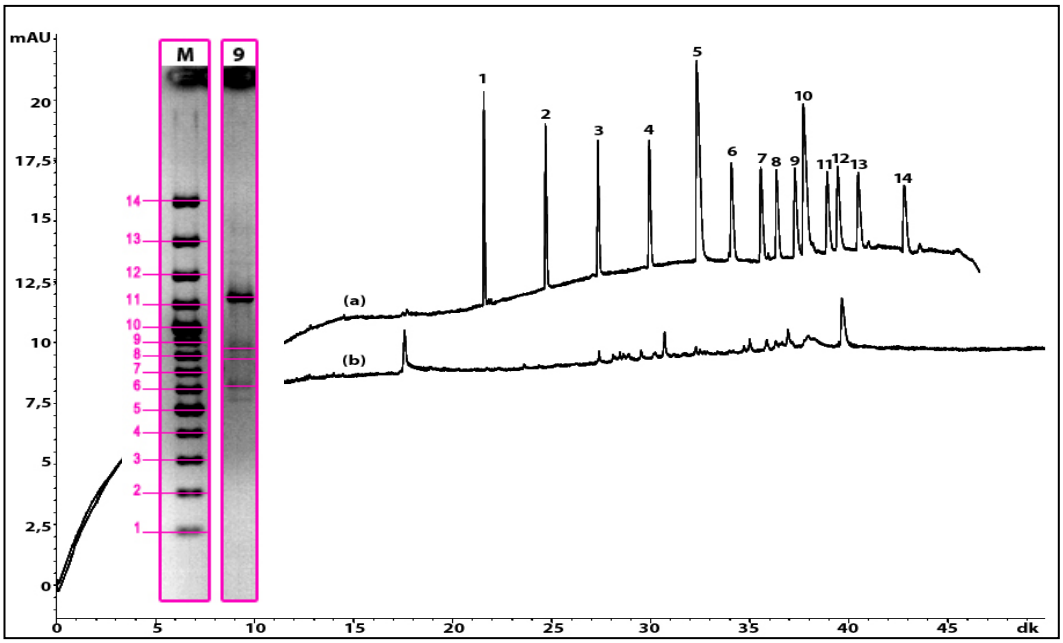
Şekil 4.15. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. bracteata*'nın OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram



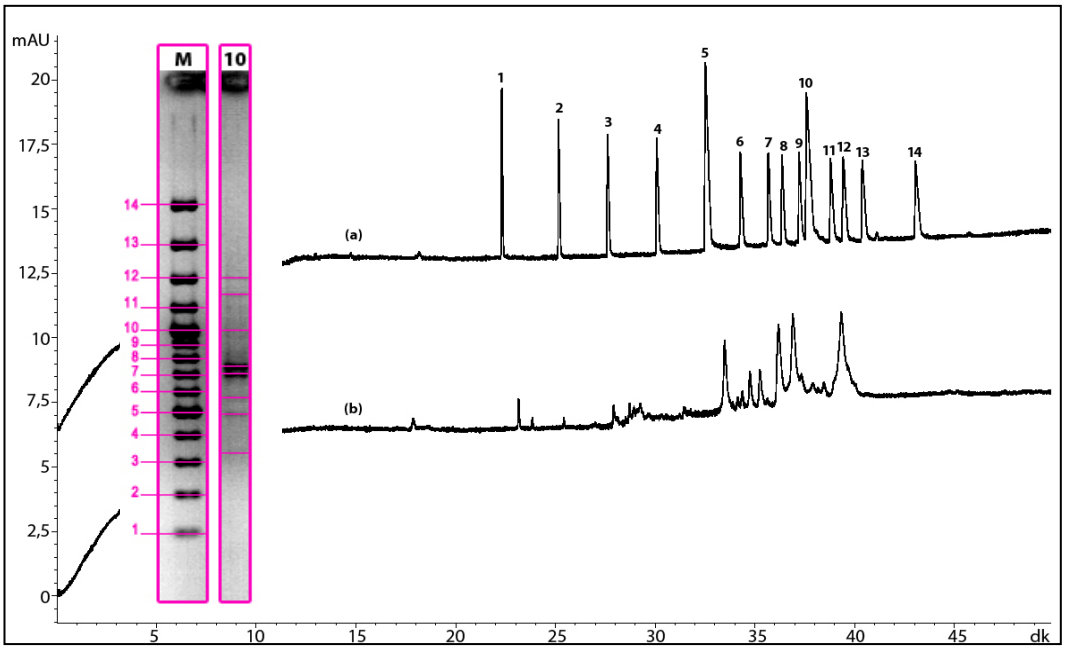
Şekil 4.16. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. verticillata'nın* OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram



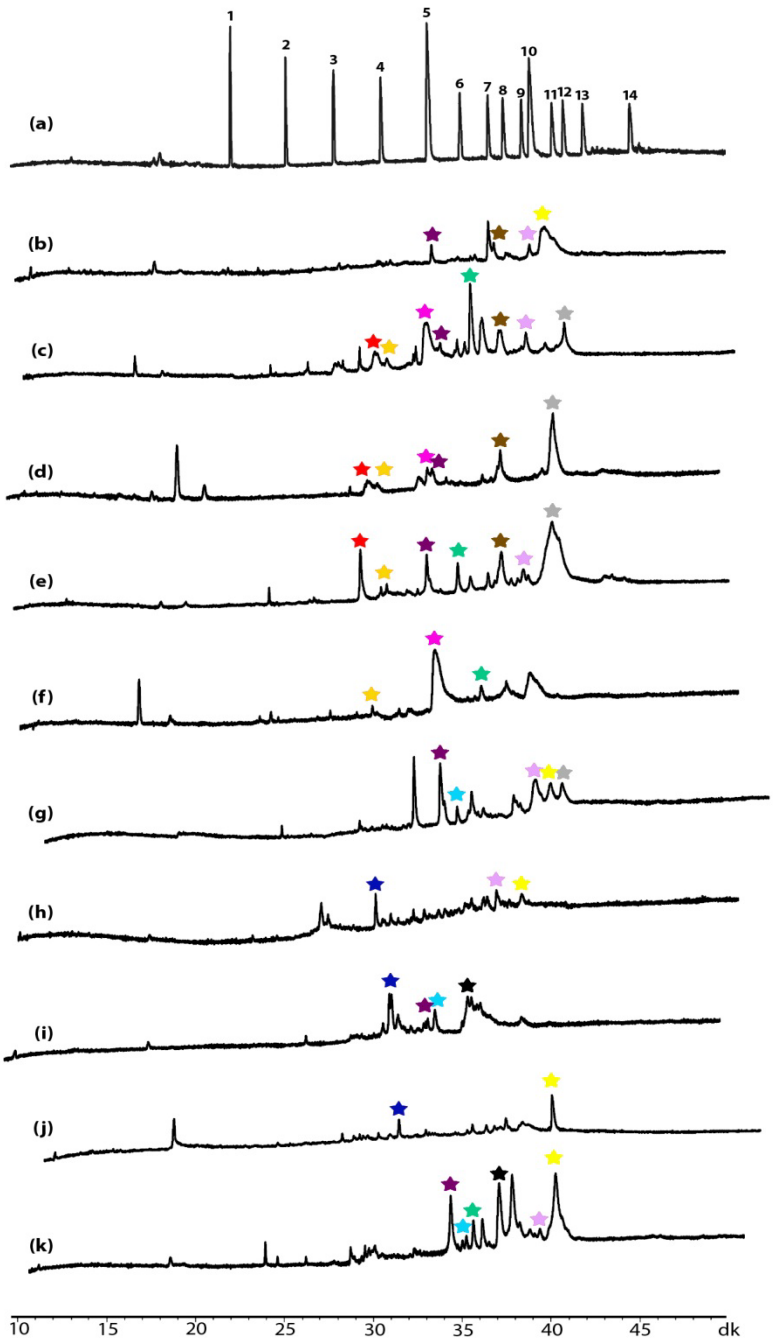
Şekil 4.17. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. forskahlei*'nin OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram



Şekil 4.18. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. fruticosa*'nın OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram



Şekil 4.19. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardı için −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. dichroantha*'nın OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürününün −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonuna ait elektroferogram



Şekil 4.20. 20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, % 4,5 (a/h) HEC pH= 7,60 tamponunda, ve −9 kV ayırma gerilim koşullarındaki çıplak silika kapiler kolonunda a) DNA standardının −5 kV, 4 s elektrokinetik enjeksiyonu b) *S. tomentosa* c) *S. candidissima* d) *S. sclarea* e) *S. ceratophylla* f) *S. viridis* g) *S. bracteata* h) *S. verticillata* i) *S. forskahlei* j) *S. fruticosa* k) *S. dichroantha*'nın OPA−05 primeri ile çoğaltılmış olan PCR ürünlerinin −5 kV, 6 s elektrokinetik enjeksiyonlarına ait üst üste alınmış elektroferogramları

Şekil 4.20'de a–h elektroferogramlarındaki pikler üzerinde yer alan farklı renkteki yıldızlara karşılık gelen DNA baz çiftlerinin büyüklükleri aşağıda verilmiştir. Şekil 4.20'de pikler üzerinde yer alan aynı renkteki yıldızlar ortak bantları göstermektedir.

★ : 2000–1500 bç
★ : 1500–1200 bç
★ : 1200–1000 bç
★ : 850–800 bç
★ : 700 bç
★ : 650–600 bç
★ : 600–550 bç
★ : 550–500 bç
★ : 500 bç
★ : 450–400 bç
★ : 400 bç
★ : 400–350 bç

Bitki PCR örneklerinin agaroz jel elektroforezindeki fotoğrafları ve CGE'den alınan sonuçlar karşılaştırıldığında büyük ölçüde uyumlu oldukları görülmüştür. Farklı olarak agaroz jel elektroforezinde görüntülenemeyen bazı bantlar CGE'de saptanmıştır. Bu yüzden OPA–05 primeri ile çoğaltılmış olan her bir bitki türünün PCR ürününe ait CGE'de elde edilen pikleri tek tek değerlendirilmiştir (Çizelge 4.11). Bu değerlendirmede, her bir PCR ürünü analizinden önce aynı günde enjekte edilen DNA standardındaki her bir bant büyüklüğüne karşılık gelen göç zamanlarından kontrol amaçlı yararlanılmıştır. Her bir PCR ürününün göç zamanlarından yararlanılarak PCR ürünlerindeki yaklaşık baz çifti büyüklükleri ve baz çifti büyüklük aralıkları belirlenmiştir. Baz çifti büyüklükleri ile ilgili sonuçların değerlendirilmesi amacı ile DNA standartları ve PCR ürünleri için logaritmik vb gibi farklı ilişkiler denenmiş olmasına rağmen her baz çifti için aynı ve uyumlu ilişki elde edilememiştir.

Çizelge 4.11. *Salvia* L. türlerinin OPA−05 primeri ile yapılan RAPD analizinin CGE'den elde edilen pik sayım sonuçları

PCR Sonucu Oluşan Bant Büyüklüğü	Örnek No*									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
3000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3000−2500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2500−2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000−1500	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
1500	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500−1200		1	1	0	0	1	1	0	1	1
1200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1200−1000		1	0	1	0	1	1	0	0	1
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1000−900	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
900	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
900−850	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
850−800	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
800	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
800−750	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
750−700	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
700	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
700−650	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1
650	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
650−600	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
600	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
600−550	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
550−500	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
500	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
500−450	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
450	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
450−400	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0
400	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0
400−350	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
350−300	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
300	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
300−250	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
250−200	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200−150	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
150−100	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1: *S. tomentosa*, **2:** *S. candidissima*, **3:** *S. sclarea*, **4:** *S. ceratophylla*, **5:** *S. viridis*, **6:** *S. bracteata*, **7:** *S. verticillata*, **8:** *S. forskahlei*, **9:** *S. fruticosa*, **10:** *S. dichroantha*

CGE'de elde edilen sonuçlara göre (Şekil 4.10 ve Çizelge 4.11) *S. tomentosa*'da toplam 6 tane pik, agaroz jelde (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.5) ise toplam 7 adet bant bulunmuştur. CGE'deki sonuçlara bakıldığında 1200−2000 baz çifti arasında geniş bir pik görünmektedir. Burada art arda beklenen piklerin bir arada gelerek karıştığı, bu nedenle CGE'de daha az bant göründüğü gözlenmektedir.

Şekil 4.11 ve Çizelge 4.11'de elde edilen 2 pikin CGE sonuçlarına göre *S. candidissima*'da toplam 17 tane pik, agaroz jelde (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.5) ise toplam 4 adet bant bulunmuştur. Bu örnekte 500 baz çiftindeki bant agaroz jelde belli belirsiz bir şekilde görünmesine rağmen CGE'de çok belirgin bir şekilde görünmektedir. CGE'de belirlenen en belirgin pikler; 500 baz çifti, 650−600 baz çifti arasındaki, 650−700 baz çifti arasındaki, 850−800 baz çifti arasındaki, 1200−1000 baz çifti arasındaki ve 2000−1500 baz çifti arasında olanlardır. Bu örnek için CGE'nin daha hassas sonuç verdiği düşünülmektedir.

Şekil 4.12 ve Çizelge 4.11'de elde edilen CGE sonuçlarına göre *S. sclarea*'da toplam 10 tane pik, agaroz jelde (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.5) ise toplam 7 adet bant bulunmuştur. CGE'de en büyük pik 2000−1500 baz çifti arasında olandır, agaroz jelde de aynı şekilde en parlak bant bu baz çiftine aittir. Bu pikten sonra en belirgin pik 800−850 baz çifti arasında olandır. Bunun yanı sıra 550−500 baz çifti, 500 baz çifti, 500−450 baz çifti, 400 baz çifti, 400−350 baz çifti ve 350−300 baz çifti arasında da küçük pikler görünmektedir.

S. ceratophylla türüne ait CGE sonuçlarından (Şekil 4.13 ve Çizelge 4.11) toplam 11 tane pik, agaroz jelde (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.5) ise toplam 6 adet bant bulunmuştur. Bu örnekte 2000−1500 arasında diğer piklere göre çok belirgin olan bir pik yer almaktadır. Diğer ana pikler sırasıyla, 400−350 baz çifti arasındaki, 550−500 baz çifti arasındaki, 650−600 baz çifti arasındaki ve 850 baz çifti arasındaki piklerdir. Elektroferograma bakıldığında ise 1200−1000 baz çifti arası agaroz jelde çok silik olan bantların çok küçük pikler halinde belirdiği görünmektedir.

CGE'de elde edilen sonuçlara göre (Şekil 4.14 ve Çizelge 4.11) *S. viridis*'de toplam 9 tane pik, agaroz jelde (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.5) ise toplam 2 adet belirgin bant bulunmuştur. CGE'deki elektroferograma göre en belirgin pik 500

baz çiftine karşılık gelmektedir. Ancak agaroz jel elektroforeze bakıldığında bu baz çiftine ait bant agaroz jel fotoğrafında daha silik bir şekilde görünmektedir. Elektroferogramdaki diğer belirgin pik 900 baz çiftinde gelen piktir. 800 baz çifti ve 550−500 baz çiftinde de daha belirgin pikler yer almaktadır. Bunun yanı sıra elektroferogramda 100 ve 450 baz çifti arası alanı çok küçük olan 5 adet pik görünmektedir.

S. bracteata türüne ait CGE sonuçlarından (Şekil 4.15 ve Çizelge 4.11) toplam 10 tane pik, agaroz jelde (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.5) ise toplam 10 adet belirgin bant bulunmuştur. CGE'deki en büyük pikler 450 baz çifti, 550−500 baz çifti arasındaki ve 1200−1000 baz çifti arasında olanlardır. Yaklaşık 600−550 baz çifti, 650 baz çifti, 650−700 baz çifti, 900−1000 baz çifti, 1200−1500 baz çifti, 1500−2000 baz çifti büyüklüklerinde pikler görünmektedir. CGE'deki pikler ile agaroz jeldeki bantların çoğu birbiri ile uyumlu bulunmuştur. Ancak agaroz jelde belirlenen 800 baz çifti ve 895 baz çiftine karşılık gelen bantlar CGE'de biraz daha küçük olarak belirmiştir. Agaroz jelden farklı olarak ise CGE'de 200−150 baz çifti arasında alanı küçük olan bir pik de belirlenmiştir.

S. verticillata türüne ait CGE sonuçlarından (Şekil 4.16 ve Çizelge 4.11) toplam 8 tane pik, agaroz jelde (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.5) ise toplam 6 adet belirgin bant bulunmuştur. Ayrıca CGE'deki elektroferogramda 450−800 baz çifti arasında Çizelge 4.5'e eklenmeyen çok sayıda (6 adet) küçük pik belirlenmiştir. Bu baz çiftleri arasında agaroz jelde de silik bantlar görülmektedir. CGE'deki en belirgin pikler 300 baz çifti, 450−400 baz çifti ve 1200−1000 baz çiftine karşılık gelen piklerdir.

S. forskahlei için CGE sonuçlarından (Şekil 4.17 ve Çizelge 4.11) toplam 8 tane pik, agaroz jelde (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.5) ise toplam 4 adet belirgin bant belirlenmiştir. CGE'deki en belirgin pikler 450−400 baz çifti, 600−550 baz çifti ve 700 baz çiftine karşılık gelen piklerdir. Bu bitkiye ait CGE elektroferogramında (Şekil 4.17) agaroz jel elektroforezdeki bantlara kıyasla daha çok pik tayin edilebilmiştir.

CGE'de elde edilen sonuçlara göre (Şekil 4.18 ve Çizelge 4.11) *S. fruticosa*'da toplam 12 tane pik, agaroz jelde (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.5) ise toplam 5 adet belirgin bant belirlenmiştir. CGE'deki en belirgin pik 1500−1200 baz

çiftine karşılık gelen piktir ve bu da agaroz jel elektroforezde en parlak banta karşılık gelmektedir. CGE'de tayin edilen 650−600 baz çifti ve 950−900 baz çiftlerine ait pikler de agaroz jel elektroforezinde belirlenmiş olan diğer bantlardır. Ayrıca CGE'de 300−400 baz çifti arasında alanları çok küçük olan pikler görünmektedir.

CGE sonuçlarına göre (Şekil 4.19 ve Çizelge 4.11) *S. dichroantha* türünde toplam 14 tane pik, agaroz jelde (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.5) ise toplam 4 adet belirgin bant belirlenmiştir. CGE'deki en belirgin pikler 550−500 bç, 700 baz çifti, 800 baz çifti ve 1500−1200 baz çiftine karşılık gelen piklerdir. Bu pikleri 650−600 baz çifti ve 700−650 baz çiftine karşılık gelen pikler takip etmektedir. Agaroz jel elektroforezde 600−800 baz çifti arasında görülmekte olan koyu bantların aslında daha fazla sayıda banta ait olduğu CGE'deki piklerden kolayca görünmektedir.

CGE'de PCR ürünleri ile yapılan bu deneyler sonucunda; agaroz jel elektroforezinde daha koyu görünen bazı bantların CGE'de daha küçük pikler halinde veya tam tersi olarak agaroz jelde silik olan bantların CGE'de daha büyük pik olarak göründüğü gözlenmiştir. Bu durumun nedeninin de PCR ürünlerinin safsızlıklarından ve/veya PCR saflaştırma kitinin bazı PCR örneklerinde yetersiz kalmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

CGE'den elde edilen sonuçlara göre Çizelge 4.11'de 2000−3000 baz çifti arasında, 100 baz çifti ve 200 baz çiftinde tüm bitki türlerinin RAPD−PCR ürünleri için herhangi bir pike rastlanmamıştır. *S. candidissima*, *S. sclarea*, *S. ceratophylla* ve *S. bracteata* bitki türlerinde 2000−1500 baz çifti arasında pik elde edilmiştir. 1500 baz çifti sadece *S. tomentosa*'da belirlenmiştir. 1500−1200 baz çifti arasındaki pik, *S. tomentosa*, *S. candidissima*, *S. sclarea*, *S. bracteata*, *S. verticillata*, *S. fruticosa* ve *S. dichroantha* türleri için ortak piktir. 1200 baz çiftinde *S. tomentosa* ve *S. forskahlei* türlerinde pik belirlenmiştir. 1200−1000 baz çifti arasında *S. tomentosa*, *S. candidissima*, *S. ceratophylla*, *S. bracteata*, *S. verticillata* ve *S. dichroantha*'da pik belirlenmiştir. 1000 baz çiftinde *S. fruticosa* ve *S. dichroantha*'da pik belirlenmiştir. 1000−900 baz çifti arasında *S. bracteata* ve *S. verticillata* türlerinde pik elde edilmiştir. 900 baz çiftinde *S. tomentosa*, *S. viridis* ve *S. verticillata* türlerinde ortak pik vermiştir. 900−850 baz çifti arasında

sadece *S. fruticosa* pik vermiştir. 850−800 baz çifti arasında *S. tomentosa, S. candidissima, S. sclarea* ve *S. ceratophylla* türlerinde pik belirlenmiştir. 800 baz çifti büyüklüğünde *S. viridis, S. verticillata, S. fruticosa* ve *S. dichroantha* türlerinde pik bulunmaktadır. 800−750 baz çifti arasında sadece *S. tomentosa* ve *S. ceratophylla*'da pik elde edilmiştir. 750−700 baz çifti arasında *S. sclarea, S. forskahlei* ve *S. fruticosa*; 700 baz çiftinde *S. forskahlei* ve *S. dichroantha*; 700−650 baz çifti arasında *S. candidissima, S. ceratophylla, S. bracteata, S. fruticosa* ve *S. dichroantha*; 650 baz çiftinde sadece *S. bracteata*; 650−600 baz çifti arasında *S. candidissima, S. ceratophylla* ve *S. dichroantha*; 600 baz çiftinde sadece *S. candidissima*; 600−550 baz çifti arasında *S. bracteata, S. forskahlei* ve *S. dichroantha*; 550−500 baz çifti arasında *S. tomentosa, S. candidissima, S. sclarea* L., *S. ceratophylla, S. viridis, S. bracteata, S. forskahlei* ve *S. dichroantha*; 500 baz çiftinde *S. candidissima, S. sclarea* ve *S. viridis*; 500−450 baz çifti arasında *S. candidissima, S. sclarea, S. forskahlei* ve *S. fruticosa*; 450 baz çiftinde sadece *S. bracteata*; 450−400 baz çifti arasında *S. candidissima, S. ceratophylla, S. viridis, S. verticillata, S. forskahlei* ve *S. fruticosa*; 400 baz çiftinde *S. candidissima, S. sclarea, S. ceratophylla, S. viridis* ve *S. fruticosa*; 400−350 baz çifti arasında *S. candidissima, S. sclarea, S. ceratophylla, S. viridis, S. fruticosa* ve *S. dichroantha*; 350−300 baz çifti arasında *S. candidissima, S. sclarea, S. verticillata, S. fruticosa* ve *S. dichroantha*; 300 baz çiftinde *S. candidissima* ve *S. verticillata*; 300−250 baz çifti arasında *S. forskahlei* ve *S. fruticosa*; 250−200 baz çifti arasında *S. candidissima, S. viridis* ve *S. dichroantha*; 200−150 baz çifti arasında *S. ceratophylla, S. bracteata* ve *S. dichroantha* ve 150−100 baz çifti arasında *S. candidissima, S. viridis* ve *S. dichroantha* türlerinde pikler belirlenmiştir.

Genel olarak PCR ürünlerinin CGE'den elde edilen sonuçları Çizelge 4.11'den yararlanılarak yorumlandığında CGE'de agaroz jel elektroforezindeki bantlardan daha fazla sayıda pik saptanmıştır. Bu da CGE ile agaroz jel elektroforezine göre daha hassas tayinlerin yapılabildiğini göstermektedir. CGE'de hassasiyet kullanılan detektörün türüne bağlıdır ve deneylerde DAD dedektör kullanılması nedeniyle $3x10^{-4}$ ng nL^{-1} arasındaki örnek miktarları saptanabilmektedir (Schwartz ve Guttman, 1995). Agaroz jel elektroforezinde

EtBr ile boyama yapıldığında bant başına yaklaşık 1−5 ng miktardaki DNA parçaları belirlenebilirken daha az miktarda olan DNA'ları EtBr boyama ile saptamak zordur (Karsten ve Wollenberger, 1977).

CGE'de sadece OPA−05 primeri ile çalışıldığından yeterli veri olmaması nedeniyle bu sonuçlar için ayrıca bir dendogram çıkarılmamıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kapiler elektroforez, son yıllarda basit, hızlı, az miktarda örnek gerektirmesi, ucuz, otomasyonu kolay, duyarlı, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması gibi nedenlerle analitik kimyada önem kazanmış bir yöntemdir.

Bu tez çalışmasında Türkiye Florasında oldukça geniş yayılış gösteren ve pek çok endemik türe sahip, ayrıca halk arasında hem çay hem de tedavi edici özellikleri nedeniyle yoğun olarak kullanılan Lamiaceae familyasına ait bazı *Salvia* türlerinin DNA tayinleri yapılmıştır. Bu çalışmada Eskişehir çevresinden toplanan 10 farklı *Salvia* L. türünün akrabalık ilişkilerini ortaya koymak amacıyla RAPD−PCR yöntemi kullanılarak rastgele DNA bölgeleri çalışılmıştır. Çalışma iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada OPA−03, OPA−04, OPA−05 ve OPA−15 primerleri ile elde edilen PCR ürünleri ise öncelikle klasik bir yöntem olan agaroz jel elektroforez ile belirlenerek bu 4 primer ile elde edilen bantlar yorumlanmış, var─yok çizelgeleri oluşturulmuş ve dendogram çıkarılarak türler arasındaki genetik akrabalık belirlenmeye çalışılmıştır. Agaroz jel elektroforezinde 4 farklı primer ile çoğaltılan bantlar değerlendirilerek dendogramlar oluşturularak filogenetik ağaç çıkarılmış ve buna göre birbirlerine genetik olarak en az benzeyen türlerin *S. fruticosa* ve *S. dichroantha* olduğu, birbirlerine genetik olarak en yakın türlerin ise *S. bracteata* ve *S. fruticosa* olduğu belirlenmiştir.

İkinci aşamada ise deneyler, agaroz jel elektroforez ve CGE yöntemi ile birlikte yürütülmüştür. Bu amaçla tek bir primer kullanılarak (OPA−05) ilgili PCR ürünleri çoğaltılmış ve PCR saflaştırma kiti ile saflaştırılmıştır. Daha sonra agaroz jel elektroforezinde görüntülendikten sonra aynı örnekler CGE'de analiz edilmiştir. PCR örneklerindeki DNA parçalarının tayinleri için kapiler jel elektroforez ile yöntem geliştirilmesi ve en iyi koşulların belirlenmesi amacıyla farklı tampon çözeltiler ve bu çözeltilere eklenen farklı polimer ve jel katkı maddeleriyle çıplak silika kapiler kolonda çeşitli ön denemeler yapılmıştır. Ayrıca CGE deneylerinde hazır polimer kaplı (CEP−coated) kapiler kolon ile de deneyler gerçekleştirilmiştir. Ancak CEP−coated kapiler kolonu ile yapılan bu deneyler sonucunda DNA standardına ait çok keskin pikler elde edilmiş olmasına ve 20 dk

gibi kısa bir sürede ayırımlar yapılabilmesine karşın tekrarlanabilirlik sorunları ortaya çıkmıştır. Bu nedenle DNA ayırımları çıplak silika kapiler kolonun en uygun ayırma ortamı sağlayan %4,5 (a/h) HEC içeren TPE (20 mM Tris, 9,5 mM *o*−fosforik asit, 2 mM EDTA, pH 7,4) tamponu ile dinamik kaplanmasıyla yapılmıştır. CGE deneylerinde, çalışılan PCR ürünlerindeki bantların büyüklüklerine göre seçilmiş olan 100−3000 baz çifti aralığında 14 farklı parça içeren DNA standart piklerinin göç zamanları baz alınarak *Salvia* L. türlerindeki DNA'larla ilgili var─yok çizelgeleri hazırlanmıştır. OPA−05 primeri ile çoğaltılan bitki PCR ürünlerinin agaroz jel fotoğraflarına ve aynı primer için CGE'de alınan sonuçlara bakıldığında büyük ölçüde uyumlu sonuçlar alınmıştır. Ancak agaroz jelde görüntülenemeyen bazı bantlar CGE'de görülebilmiştir. Bu da CGE yönteminin agaroz jel elektroforezine göre daha duyarlı olmasının bir sonucudur. CGE'de sadece tek bir (OPA−05) primer ile çalışıldığından buradan elde edilen sonuçlarla dendogram çıkarılması mümkün olmamıştır. Bu nedenle CGE'deki türler, 4 farklı primer ile elde edilerek agaroz jel elektroforez sonuçlarına göre çizilen dendogramla kıyaslanamamıştır. Ancak CGE'deki var─yok çizelgesine bakıldığında aynı familyaya ait *Salvia* L. türlerininin beklenildiği üzere birbirleriyle genetik olarak benzedikleri görülmektedir.

Bu tez çalışmasında kullanılmış olan PCR saflaştırma kiti sayesinde, PCR ürünlerindeki DNA'lara ait daha saf ve dolayısıyla daha büyük pikler elde edilmiş olup bu da, daha fazla miktarda PCR reaksiyonu kurulması, CGE'de miktar arttırma amaçlı gereken diğer kimyasal maddelerin kullanılması gibi gereklilikleri ortadan kaldırarak zamandan kazanç sağlamıştır. Ayrıca yapılan kaynak taramalarında da CGE ve PCR ürünleri ile yapılan DNA tayinlerinde PCR saflaştırma kolonu kullanılması ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu bakımdan, PCR saflaştırma kolon kullanımı bu tez çalışmasının diğer çalışmalara kıyasla farklılıklarından biri olarak söylenebilir.

Günümüzde botanikçiler ve taksonomistlerin kullandığı bitki tayin yöntemleri cinslerden türlere, hatta alt tür ve varyetelere doğru inildikçe oldukça zorlaşmaktadır. Bu nedenle, şimdiye kadar kapiler elektroforez yöntemiyle gerçekleştirilmemiş böyle bir çalışmanın olması bu alandaki önemli bir boşluğu dolduracaktır.

Ayrıca yapılan kaynak taramalarına göre ülkemizde yetişen *Salvia* L. türlerinin taksonlarına ait daha önce CE ile yapılmış böyle bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması ile CGE'in DNA tayinlerine yönelik başarılı bir uygulaması da gerçekleştirilmiş olmaktadır.

Bütün bu üstünlükleri düşünüldüğünde, DNA tayinleri için bu tez çalışmasında geliştirilen CGE yöntemi, kolay uygulanabilir olduğundan, toplam maliyeti düşük ve daha hassas sonuçlar alınabildiğinden, rutin analiz laboratuvarlarında kullanılan agaroz jel elektroforezine alternatif olarak önerilebilir. Ayrıca geliştirilen bu CGE yönteminin farklı biyolojik örneklerdeki DNA'ların hassas tayinleri için de kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Albarghouthi, M.N., Buchholz, B.A., Huiberts, P.J., Stein, T.M. ve Barron, A.E. (2002), "Poly−*N*−hydroxyethylacrylamide (polyDuramide): A novel, hydrophilic, self−coating polymer matrix for DNA sequencing by capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, **23**, 1429−1440.

Amini, A. (2001), "Recent developments in chiral capillary electrophoresis and applications of this technique to pharmaceutical and biomedical analysis," *Electrophoresis*, **22**, 3107−3130.

Anonim (2009), Zacharis, C., Capillary Electrophoresis SciTopics. http://www.scitopics.com/Capillary_Electrophoresis.html

Anonim (2011), KEW Royal Botanic Gardens Lamiaceae (Labiatae). http://www.kew.org/science/lamwhat.html

Anonim (2012a), Abbott Türkiye, Moleküler Tanı. http://www.abbott.com.tr/diagnostik/molekuler_tani.aspx

Anonim (2012b), DNA. http://tr.wikipedia.org/wiki/DNA#cite_note-berg-5

Anonim (2012c), Dr. Zeydanlı Hayat Bilimleri LTD. ŞTİ. Moleküler Genetik. http://www.drzeydanli.com.tr/index.php?page=icerikgoster&menuID=30

Anonim (2012d), Fermentas Molecular Biology Tools. www.fermentas.com

Anonim (2012e), Bitki Sistematiği. http://yunus.hacettepe.edu.tr/~okumus04/bitki%20sistemati%F0i.html

Anonim (2012f), Türkiye Florası, Dokuz Eylül Üniversitesi Fauna Flora Araştırma ve Uygulama Merkezi Resmi Web Sitesi. http://web.deu.edu.tr/famer/canlilar_dunyasi.htm

Anonim (2012g), Filogenetik. http://tr.wikipedia.org/wiki/Filogenetik

Anonim (2012h), Phylogeny Programs. http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html

Anonim (2012ı), Türkiye Bitkileri Veri Servisi (TÜBİVES). http://turkherb.ibu.edu.tr/index.php

Anonim (2012j), Gen Bankası, National Center for Biotechnology Information. http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Araya, F., Huchet, G., McGroarty, I., Skellern, G.G. ve Waigh R.D. (2007), "Capillary electrophoresis for studying drug–DNA interactions," *Methods*, **42**, 141–149.

Aşıcıoğlu, F., Tarak Koluaçık, S., Çetinkaya, Ü. ve Akyüz, F. (2002), "Kapiller Elektroforez Teknolojisinin Klinik ve Adli Amaçlı DNA Analizlerinde Kullanımı: Geleneksel jel elektroforez yöntemi ile karşılaştırma," *Adli Tıp Derg.*, **16**, 88−93.

Atienzar, F.A. ve Jha, A.N. (2006), "The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review," *Mutat. Res.*, **613**, 76–102.

Bağcı, E. ve Koçak, A. (2007), "İki Salvia L. (*S. ceratophylla* L., *S. aethiopis* L.) Türü Uçucu Yağlarının Analizi ve Değerlendirilmesi Üzerine Bir Çalışma," *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi*, **19**, 435−442.

Baker, D.R. (1995), Capillary Electrophoresis, John Wiley & Sons, Inc., A.B.D..

Barron, A.E, Soane, D.S ve Blanch, H.W. (1993), "Capillary electrophoresis of DNA in uncross−linked polymer solutions," *J. Chromatogr. A*, **652**, 3−16.

Barron, A.E., Sunada, W.M. ve Blanch, H.W. (1996), "Capillary Electrophoresis of DNA in Uncrosslinked Polymer Solutions: Evidence for a New Mechanism of DNA Separation," *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 259−270.

Baytop, T. (1997), Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Türk Dil Kurumu Yayınları, No: 578, Türk Tarih Kurumu Basımevi, Ankara.

Baytop, T. (1999), Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Tıp Kitabevleri (ikinci baskı), İstanbul.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L. ve Stryer, L. (2002), Biochemistry, W. H. Freeman and Company, New York, A.B.D..

Bertea, C.M., Luciano, P., Bossi, S., Leoni, F., Baiocchi, C., Medana, C., Azzolin, C.M.M., Temporale, G., Antonietta Lombardozzi, M. ve Maffei, M.E. (2006), "PCR and PCR–RFLP of the 5S−rRNA−NTS region and salvinorin A analyses for the rapid and unequivocal determination of *Salvia divinorum*," *Phytochemistry*, **67**, 371–378.

Bleuyard, J.−Y., Gallego, M.E. ve White, C.I. (2006), "Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants," *DNA Repair*, **5**, 1–12.

Boesenberg Smith, K.A., Pessarakli, M.M. ve Wolk, D.M. (2012), "Assessment of DNA Yield and Purity: an Overlooked Detail of PCR Troubleshooting," *Clin. Microbiol. Newsletter*, **34**, 3−6.

Bokszczanin, K. ve Prazybyla A.A. (2006), "Copper (II) acetate improves the quality of pear (*Pyrus*) DNA during extraction," *Plant Mol. Biol. Rep.*, **24**, 249a−249d.

Brandolini, V., Menziani, E., Zanotti, F., Bader, S. ve Guarneri, M. (1998), "Capillary electrophoresis as analytical method for active ingredient determination in cosmetic matrices," *Int. J. Cosmetic Sci.*, **20**, 69−72.

Cenkci, S., Yıldız, M., Konuk, M. ve Eren, Y. (2008), "RAPD Analyses of Some Wild *Triticum* L. and *Aegilops* L. Species and Wheat Cultivars in Turkey," *Acta Biol. Cracov. Series Bot.*, **50**, 35–42.

Cenkci, S., Yıldız, M., Ciğerci, I.H., Konuk, M. ve Bozdağ, A. (2009), "Toxic chemicals−induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings," *Chemosphere*, **76**, 900–906.

Cenkci, S., Yıldız, M., Ciğerci, İ.H., Bozdağ, A., Terzi, H. ve Arıkan Terzi, E.S. (2010), "Evaluation of 2,4 D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays," *Ecotox. Environ. Safe.*, **73**, 1558–1564.

Chen, H.–S. ve Chang, H.–T. (1999), "Electrophoretic Separation of Small DNA Fragments in the Presence of Electroosmotic Flow Using Poly(ethylene oxide) Solutions," *Anal. Chem.*, **71**, 2033−2036.

Chen, H., Wu, Y.–H., Song, D.–Y., Zhang, W., Dong, X.–Y., Li, P.–W. ve Lu, C.–M. (2007), "On-line pre-concentration and UV determination of DNA fragments by dynamic coating capillary electrophoresis and its application to detection of genetically modified oilseed rape based on PCR," *Microchem. J.*, **86**, 17–22.

Chen, Y.–L., Shih, C.–J., Ferrance, J. ve Chang, Y.–S. (2009), "Genotyping of α–thalassemia deletions using multiplex polymerase chain reactions and gold

nanoparticle–filled capillary electrophoresis," *J. Chromatogr. A*, **1216**, 1206–1212.

Chiari, M. ve Melis, A. (1998), "Low viscosity DNA sieving matrices for capillary electrophoresis," *TrAC*., **17**, 623−632.

Chiou, S.–H., Huang, M.–F. ve Chang, H.–T. (2004), "Separation of double–stranded DNA fragments by capillary electrophoresis: Impacts of poly(ethyleneoxide), gold nanoparticles, ethidium bromide, and pH," *Electrophoresis*, **25**, 2186−2192.

Chiu, T.–C. ve Chang, H.–T. (2002), "Comparison of the separation of large DNA fragments in the presence and absence of electroosmotic flow at high pH," *J. Chromatogr. A*, **979**, 299–306.

Cunico, R.L., Gooding, K.M. ve Wehr, T. (1998), Basic HPLC and CE of Biomolecules, Bay Bioanalytical Laboratory Richmond, CA, A.B.D..

Davis, P.H. (1965−1988), Flora of Turkey and the East Aegean Islands, University Press, Edinburgh, **1−11**.

Davis, P.H, Mill, R.R. ve Tan, K. (1982), Flora of Turkey and the East Aegean Islands, University Press, Edinburgh, **7**, 400–461.

Davis, P.H, Mill, R.R. ve Tan, K. (1988), Flora of Turkey and the East Aegean Islands, University Press, Edinburgh, **10**, 374–376.

De Mattia, F., Bruni, I., Galimberti, A., Cattaneo, F., Casiraghi, M. ve Labra, M. (2011), "A comparative study of different DNA barcoding markers fort he identification of some members of Lamiacaea," *Food Res. Int.*, **44**, 693–702.

Dellaporta, S.L.,Wood, J. ve Hicks, J.B., (1983), "A Plant DNA Mini Preparation: Version II," *Plant Mol. Biol. Reptr.*, **1**, 19−21.

Dilsiz, N. (2004), Moleküler Biyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara.

Dolnik, V. (1999), "DNA sequencing by capillary electrophoresis (review)," *J. Biochem. Biophys. Methods*, **41**, 103–119.

Dolnik, V. (2005), "Capillary electrophoresis of proteins 2003–2005," *Electrophoresis*, **26**, 1−16.

Doyle, J.J. ve Doyle, J.L. (1987), "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue," *Phytochem. Bull.*, **19**, 11–15.

Du, M., Flanagan, J.H., Lin, B. ve Ma, Y. (2003), "Rapid separation and laser–induced fluorescence detection of mutated DNA by capillary electrophoresis in a self–coating, low–viscosity polymer matrix," *Electrophoresis*, **24**, 3147–3153.

Erik, S. ve Tarıkahya, B. (2004), "Türkiye Florası Üzerine," *Kebikeç*, **17**, 139–163.

Erlich, H.A., Gelfand, D. ve Sninsky, J.J. (1991), "Recent advences in polymerase chain reaction," *Science*, **252**, 1643–1651.

Eröz, İ. (2001), Eskişehir Çevresinde Yetişen Tıbbi Bazı *Salvia* L. Türleri Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Eröz Poyraz, İ. ve Koca, F. (2006), "Eskişehir'de Yetişen Bazı Tıbbi *Salvia* L. Türleri Üzerinde Morfolojik Araştırmalar," *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **7**, 443−450.

Fattorini, P., Tomasella, F., Albertini, E., Grignani, P. ve Previdere, C. (2004), "Capillary electrophoresis reveals DNA damage in aged forensic samples," *Int. Congr.*, **1261**, 559–561.

Flair, M.N. (1997), "DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring-A review," *Anal. Chim. Acta*, **347**, 1–8.

Frazier, R.A., Ames, J.M. ve Nursten, H.E. (2000), Capillary Electrophoresis for Food Analysis, Method Development, The Royal Society of Chemistry, İngiltere.

Freeman, S. ve Herron, J.C. (1998), Evolutionary analysis, 2nd ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, A.B.D..

Fung, E.N. ve Yeung, E.S. (1995), "High−Speed DNA Sequencing by Using Mixed Poly(ethylene oxide) Solutions in Uncoated Capillary Columns," *Anal. Chem.*, **67**, 1913–1919.

Gao, F., Tie, C., Zhang, X.–X., Niu, Z., He, X. ve Ma, Y. (2011), "Star−shaped polymers for DNA sequencing by capillary electrophoresis," *J. Chromatogr. A*, **1218**, 3037−3041.

Garcia−Canas, V., Gonzalez, R. ve Cifuentes, A. (2002a), "Highly reproducible capillary gel electrophoresis (CGE) of DNA fragments using uncoated

columns. Detection of genetically modified maize by PCR−CGE," *J. Sep. Sci.*, **25**, 577–583.

Garcia−Canas, V., Gonzalez, R. ve Cifuentes, A. (2002b), "Ultrasensitive Detection of Genetically Modified Maize DNA by Capillary Gel Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Using Different Fluorescent Intercalating Dyes," *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4497–4502.

García−Cañas, V., González, R. ve Cifuentes, A. (2004), "The combined use of molecular techniques and capillary electrophoresis in food analysis," *TrAC*, **23**, 637–643.

Geoun, M.B., Choi, K.S., Lee, Y.–III ve Kim, Y. (2002), "Characterization of single–stranded DNA separation by capillary gel electrophoresis," *Microchem. J.*, **72**, 305−313.

Güler, D.A. (2006), Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayını, No: 870, Eskişehir.

Gürsoy, E. (2007), Kapiler Elektroforez ve Potansiyometrik Belirleme, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

Hadidi, A., Levy, L. ve Podleskis, E.V. (1995), Polymerase chain reaction technology in plant pathology. In: Molecular Methods in Plant Pathology, (Eds. R. P. Singh, U. S. Singh), CRC Press, Boca Raton, Florida, A.B.D., 167–187.

Han, F., Huynh, B.H., Ma, Y. ve Lin, B. (1999), "High−Efficiency DNA Separation by Capillary Electrophoresis in a Polymer Solution with Ultralow Viscosity," *Anal. Chem.*, **71**, 2385−2389.

Heiger, D. (2000), An introduction High performance capillary electrophoresis, Agilent Technologies, Almanya.

Henry, R. J. (1997), Practical Applications of Plant Molecular Biology, Chapman and Hall, London, İngiltere.

Horvath, J. ve Dolnik, V. (2001), "Polymer Wall coatings for capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, **22**, 644–655.

Huang, C.Z., Li, Y.F. ve Feng, P. (2001a), "A spectrophotometric study on the interaction of neutral red with double-stranded DNA in large excess," *Talanta*, **55**, 321–328.

Huang, M.−F., Hsu, C.−E., Tseng, W.−L., Lin, Y.−C. ve Chang, H.−T. (2001b), "Separation of dsDNA in the presence of electroosmotic flow under discontinuous conditions," *Electrophoresis*, **22**, 2281–2290.

Huang, C.–C., Hsieh, M.–M., Chiu, T.–C., Lin, Y.–C. ve Chang, H.–T. (2001c) "Maximization of injection volumes for DNA analysis in capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, **22**, 4328–4332.

Innis, M.A. ve Gelfand, D.H. (1990), Optimization of PCRs (Innis, M.A, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J.and White T.J (eds.)), PCR protocols A guide to methods and applications, Academic Press, New York, A.B.D..

İpek, A. ve Gürbüz, B. (2010), "Türkiye Florasında Bulunan *Salvia* Türleri ve Tehlike Durumları," *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **19** (1-2), 30–35.

Jang, Y.−C., Jha, S.K., Chand, R., Islam, K. ve Kim, Y.−S. (2011), "Capillary electrophoresis microchip for direct amperometric detection of DNA fragments" *Electrophoresis*, **32**, 913–919.

Jin, Y., Lin, B. ve Fung, Y.−S. (2001), "Electrophoretic migration behavior of DNA fragments in polymer solution," *Electrophoresis*, **22**, 2150–2158.

Karsten, U. ve Wollenberger, A. (1977), "Improvements in the ethidium bromide method for direct fluorometric estimation of DNA and RNA in cell and tisiue homogenates," *Anal. Biochem.*, **77**, 464–470.

Kahraman, A., Celep, F., Doğan, M. ve Bagherpour, S. (2010a), "A taxonomic revision of *Salvia euphratica* sensu lato and its closely related species (sect. Hymenosphace, Lamiaceae) using multivariate analysis," *Turk. J. Bot.*, **34**, 261–276.

Karaca, M., Ince, A.G., Tugrul Ay, S., Turgut, K. ve Onus, A.N. (2008), "PCR-RFLP and DAMD-PCR genotyping for *Salvia* species," *J. Sci. Food Agric.*, **88**, 2508–2516.

Kintzios, S.E. (2000), SAGE The Genus *Salvia*, Harwood academic publishers, Amsterdam, Hollanda.

Konuk, M., Yıldız, M., Cenkçi, S. ve Ciğerci, İ.H. (2009), Elektroforez Teknikleri ve Uygulamaları Çalıştayı, AKÜ Biyoloji, Afyonkarahisar.

Kopar, N. (2010), *Salvia fruticosa* Bitki Ekstraktının Metabolik Aktivatör Varlığında ve Yokluğunda İnsan Lenfositlerinde Genotoksik ve Anti-Genotoksik Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Koyuncu, O., Yaylacı, Ö.K., Öztürk, D., Potoğlu Erkara, İ., Savaroğlu, F., Akcoşkun, Ö. ve Ardıç, M. (2010), "Risk categories and ethnobotanical features of the Lamiaceae taxa growing naturally in Osmaneli (Bilecik/Turkey) and environs," *BioDiCon*., **3/3**, 31−45.

Krizman, M., Jakse, J., Baricevic, D., Javornik, B. ve Prosek, M. (2006), "Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction," *Acta Agric. Slovenica*, **87**, 427–433.

Kumar, R. (1989), "The Technique of Polymerase Chain Reaction," *Technique*, **1**, 133–152.

Landers, J.P. (1994), Handbook of Capillary Electrophoresis, CRC Press, Boca Raton, A.B.D..

Lawless, J. (1995), The Illustrated Encylopedia of Essential Oils, Element Books Limited, Great Britain, İngiltere, 21−69.

Lee, K.−H., Huang, M.–F., Liu, C.–W. ve Chang, H.–T. (2010), "Analysis of DNA complexes with small solutes by CE with LIF detection," *Electrophoresis*, **31**, 1101−1107.

Leninger, A.L., Nelson, D.L. ve Cox, M.M. (1975), "Lenninger's principles of biochemistry," W.H. Freeman and Co., New York, A.B.D..

Li, S.F.Y. (1992), Capillary electrophoresis−principles, practice and applications (Journal of Chromatography Library, **52**), Elsevier, Amsterdam, Hollanda.

Li, X., Zhan, Z., Zhang, S. ve Chen, H. (2009), "Enzyme enhanced quantitative determination of multiple DNA targets based on capillary electrophoresis," *J. Chromatogr. A*, **1216**, 2567–2573.

Lin, Y.−W. ve Chang, H.−T. (2006), "Analysis of double-stranded DNA by capillary electrophoresis using poly(ethylene oxide) in the presence of

hexadecyltrimethylammonium bromide," *J. Chromatogr. A*, **1130**, 206–211.

Liu, C.−Y. (2001), "Stationary phases for capillary electrophoresis and capillary electrochromatography," *Electrophoresis*, **22**, 612−628.

Liu, C., Xu, X., Wang, Q. ve Chen, J. (2007), "Mathematical model for DNA separation by capillary electrophoresis in entangled polymer solutions," *J. Chromatogr. A*, **1142**, 222–230.

Liu, Z., Wu, J., Xie, Z., Liu, S., Fan-Havard, P., Huang, T.H.–M., Plass, C., Marcucci, G. ve Chan, K.K. (2009), "Quantification of regional DNA methylation by liquid chromatography/tandem mass spectrometry," *Anal. Biochem.*, **391**, 106−13.

Lucy, C.A., Baryla, N.E. ve Yeung, K.K.C. (2004), in M.A.L. Strege, A.L. (Editor), Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides, Humana Press, Totowa, N.J., A.B.D..

Lunte, S.M. ve Radzik, D.M. (1996), Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis Volume 2, 1st edition PERGAMON, Tarrytown, N.Y., A.B.D..

Mader, E., Lohwasser, U., Börner, A. ve Novak, J. (2010), "Population structures of genebank accessions of *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) revealed by high resolution melting analysis," *Biochem. Syst. Ecol.*, **38**, 178–186.

Marina, M.L., Rios, A. and Valcarcel, M. (2005), Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis (Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry), Elsevier, Amsterdam, Hollanda.

Marko, M.A., Chipperfield, R. ve Birnboim, H.C. (1982), "A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder," *Anal. Biochem.*, **121**, 382.

Mathieu−Daude, F., Ralph, D. ve McClelland, M. (1997), Arbitrarily Primed PCR Fingerprints: Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA, ed. Taylor, G.R., CRS Pres, Boca Raton, New York, A.B.D..

McIntosh, S.L., Nunnally, B.K., Nesbit, A.R., Deligeorgiev, T.G., Gadjev, N.I. ve McGown, L.B. (2000), "Fluorescence Lifetime for On−the−Fly Multiplex

Detection of DNA Restriction Fragments in Capillary Electrophoresis," *Anal. Chem.*, **72**, 5444−5449.

Minunnia, M., Tombelli, S., Macsini, M., Bilia, A.R., Bergonzi, M.C. ve Vincieri, F.F. (2005), "An optical DNA-based biosensor for the analysis of bioactive constituents with application in drug and herbal drug screening," *Talanta*, **65**, 578–585.

Mitchelson, K.R. ve Cheng, J. (2001a), Methods in Molecular Biology Volume 162−Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids Volume I Introduction to the Capillary Electrophoresis of Nucleic acids, Humana Press, Totowa, New Jersey, A.B.D..

Mitchelson, K.R. ve Cheng, J. (2001b), Methods in Molecular Biology Volume 163−Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids Volume II Practical Applications of Capillary Electrophoresis, Humana Press, Totowa, New Jersey, A.B.D..

Moon, H.K., Vinckier, S., Walker, J.B., Smets, E. ve Huysmans, S. (2008), "A search for phylogenetically informative pollen characters in the subtribe Salviinae (Mentheae: Lamiaceae)," *Int. J. Plant Sci.*, **169**, 455–471.

Moritani, T., Yoon, K., Refailovich, M. ve Chu, B. (2003), "DNA capillary electrophoresis using poly(vinylalcohol). I. Inner capillary coating," *Electrophoresis*, **24**, 2764−2771.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. ve Erlich, H. (1986), "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.***, 51**, 263–73.

Mullis, K. ve Faloona, F. (1987), "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction," *Methods Enzymol.*, **155**, 335–350.

Nei, M. (1978), "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals," *Genetics*, **89**, 583−590.

Nutku, M.S. ve Erim Berker, F.B. (2003), "Polyethyleneimine−Coated Capillaries for the Separation of DNA by Capillary Electrophoresis," *Turk J. Chem.*, **27,** 9−14.

Olmo, S. (2008), Capillary coatings in Capillary Electrophoresis (CE) analysis of Biomolecules, Doktora Tezi, Università di Bologna, Scienze Farmaceutiche, Italy.

Öz Aydın, S. (2004), RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimofik DNA) Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği, DPÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, **6**, 113–130.

Palm, A.K. ve Marko–Varga, G. (2004), "On−column electroextraction and separation of antisense oligonucleotides in human plasma by capillary gel electrophoresis," *J. Pharmaceut. Biomed.*, **35**, 415−423.

Phillips, R.L. ve Vasil, I.K. (1994), DNA-Based Markers in Plants Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants, Vol.1, Kluwer Academic Publishers, London, İngiltere.

Piergiovanni, A.R. ve Taranto, G. (2005), "Specific differentiation in *Vicia* genus by means of capillary electrophoresis," *J. Chromatogr. A*, **1069,** 253–260.

Polat, R., (2004), Balıkesir yöresinde yayılış gösteren *Salvia* L. türleri üzerinde anotomik, morfolojik, ve ekolojik araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

Quesada, M.A. (1997), "Replaceable polymers in DNA sequencing by capillary electrophoresis," *Curr. Opin. Biotech.*, **8**, 82−93.

Ravelet, C., Grosset, C. ve Peyrin, E. (2006), "Liquid chromatography, electrochromatography and capillary electrophoresis applications of DNA and RNA aptamers- Review," *J. Chromatogr. A,* **1117,** 1−10.

Righetti, P.G. ve Gelfi, C. (1999), "Review: Capillary electrophoresis of DNA in the 20–500 bp range: recent developments," *J. Biochem. Biophys. Methods*, **41**, 75–90.

Ruiz−Martinez, M.C., Berka, J., Belenkii, A., Foret, F., Miller, A.W. ve Karger, B.L. (1993), "DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and induced fluoresence detection," *Anal. Chem*., **65**, 2851–2858.

Saeidnia, S., Sepehrizadeh, Z., Gohari, A.R., Jaberi, E., Amin, G.R. ve Hadjiakhoondi, A. (2009), "Determination of Genetic Relations among Four *Salvia* L. Species Using RAPD Analysis," *WASJ*, **6**, 238−241.

Sahin, F.P., Yamashita, H., Guo, Y., Terasaka, K., Kondo, T., Yamamoto, Y., Shimada, H., Fujita, M., Kawasaki, T., Sakai, E., Tanaka, T., Goda, Y. ve Mizukami, H. (2007), "DNA Authentication of Plantago Herb Based on Nucleotide Sequences of 18S−28S rRNA Internal Transcribed Spacer Region," *Biol. Pharm. Bull.*, **30,** 1265−1270.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. ve Arnheim, N. (1985), "Enzymatic amplification of B−globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia," *Science*, **230**, 1350−1354.

Salmanowicz, B.P. (2000), "Capillary electrophoresis of seed 2S albumins from *Lupinus* species," *J. Chromatogr. A*, **894,** 297–310.

Sanchez, L., Gonzalez, R., Crego, A.L. ve Cifuentes, A. (2007), "A simple capillary gel electrophoresis approach for efficient and reproducible DNA separations. Analysis of genetically modified soy and maize," *J. Sep. Sci.*, **30**, 579–585

Sang, F. ve Ren, J. (2006), "Comparisons between capillary zone electrophoresis and real-time PCR for quantification of circulating DNA levels in human sera," *J. Chromatogr. B*, **838**, 122–128.

Sarwat, M., Negi, M.S., Lakshmikumaran, M., Tyagi, A.K., Das, S. ve Srivastava, P.S. (2006), "A standardized protocol for the genomic DNA isolation from Terminalia arjuna for genetic diversity analysis," *Elec. J. Biotech.*, **9**, 86−91.

Schans, M.J. (1997), Capillary Electrophoresis of DNA Theory and Methodological aspects, Proefschrift (Doktora Tezi), Technische Universiteit Eindhoven, Netherland.

Schmitt−Kopplin, P. (2008), Methods in Molecular Biology−Capillary Electrophoresis Methods and Protocols, Humana Press, A.B.D.

Schwartz, H. ve Guttman, A. (1995), Separation of DNA by Capillary Electrophoresis, BECKMAN, A.B.D..

Shintani, H. ve Polonsky, J. (1997), Handbook of Capillary Electrophoresis Applications, Blackie Academic & Professional, London, İngiltere.

Singhal, R.P. ve Otim, O. (2000), "DNA Annealing and DNA−Protein Interactions by Capillary Electrophoresis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **272**, 251−258.

Skoog, D.A., Holler, F.J. ve Nieman, T.A. (1998), Principles of Instrumental Analysis, Saunders College Publishing, A.B.D..

Skoula, M., Hilali, I.E. ve Makris, A.M. (1999), "Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles," *Biochem. Syst. Ecol.*, **27,** 559−568.

Song, L., Liu, T., Liang, D., Fang, D. ve Chu, B. (2001), "Separation of double−stranded fragments by capillary electrophoresis in interpenetrating networks of polyacrylamide and polyvinylpyrrolidone," *Electrophoresis*, **22**, 3688−3698.

Song, W., Zhou, D., Peng, S. ve Wang, Y. (2009), "Effect of quasi−interpenetrating network of polyacrylamide and poly(N,N−dimethylacrylamide) on separation of dsDNA fragments and basic protein using CE," *J. Sep. Sci.*, **32**, 671−680.

Stellwagen, E. ve Stellwagen, N.C. (2002a), "The free solution mobility of DNA in Tris−acetate−EDTA buffers of different concentrations, with and without added NaCl," *Electrophoresis*, **23**, 1935−1941.

Stellwagen, E. ve Stellwagen, N.C. (2002b), "Determining the electrophoretic mobility and translational diffusion coefficients of DNA molecules in free solution," *Electrophoresis*, **23**, 2794−2803.

Stellwagen, N.C. ve Stellwagen, E. (2009), "Review: Effect of the matrix on DNA electrophoretic mobility," *J. Chromatogr. A*, **1216**, 1917–1929.

Storchova, H., Hrdlickova, R., Chrtek, J., Tetera, M., Fitze, D. ve Fehrer, J. (2000), "An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution," *Taxon*, **49**, 79−84.

Şahin, N. (2011), Türkiye'de Yetişen *Serratula* L. (Asteraceae) Cinsine Ait Taksonların ITS nrDNA ve *TR*NL-F cpDNA Dizileriyle Moleküler

Sistematik Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

Tan, M., Koç, A. ve Zengin, H. (2008), Türkiye'nin Çayır ve Mera Bitkileri (Ed. Y. Serin), T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, Ankara, 466 s.

Tanker, N., Koyuncu, M. ve Coşkun, M. (2007), Farmasötik Botanik, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, **3**, 301−302, Ankara.

Temizkan, G. ve Arda, N. (2008), Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, 3. Baskı, İstanbul.

Viljoen, G.J., Nel, L.H. ve Crowther, J.R. (2005), Molecular Diagnostic PCR Handbook, Springer, Hollanda.

Vogelstein, B. ve Gillespie, D. (1979), "Preparative and analytical purification of DNA from agarose," *Proc. Natl. Acad. Sci*. U.S.A., **76,** 615−619.

Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., Farias, P.A.M., Valera, F.S., Grant, D.H., Ozsoz, M. ve Flair, M.N. (1997), "DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring−A review," *Anal. Chim. Acta*, **347**, 1−8.

Wang, S.–C. ve Morris, M.D. (2001), "Mechanistic Studies of DNA Separations by Capillary Electrophoresis in Ultradilute Polymer Solutions: Effects of Polymer Rigidity," *JSAC.*, **17**, i173−i176.

Watson, J.D. ve Crick, F.H.C. (1953), "A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid," *Nature*, **171,** 737–738.

Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. ve Zoller, M. (1992), The polymerase chain reaction In: Recombinant DNA, Second Edition, New York, A.B.D., 79−98.

Weinberger, R. (2000), Practical Capillary Electrophoresis, Academic Press, 2nd Ed., San Diego, CA, A.B.D..

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. ve Kahl, G. (2005), DNA Fingerprinting in Plants Principles, Methods, and Applications, Second Edition, CRC Press Taylor&Francis Group, Boca Raton, A.B.D..

Weston, A. ve Brown, P.R. (1997), HPLC and CE Principles and Practice, Academic Press, A.B.D..

White, A., Handler, P., Smith, E.L., Hill, R.L. ve Lehman, I.R. (1978), Principles of Biochemistry, Sixth Edition, New York: McGraw-Hill, A.B.D..

Williams, J.G.K., Kubelik, K., Livak, J.A., Rafalsky, J.A. ve Tingey, S.V. (1990), "DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers," *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531−6535.

Wu, J.−F., Chen, L.−X., Luo, G.−A., Liu, Y.−S., Wang, Y.−M. ve Jiang, Z.−H. (2006), "Interaction study between double-stranded DNA and berberine using capillary zone electrophoresis," *J. Chromatogr. B*, **833**, 158–164.

Xu, F., Jabasini, M. ve Baba, Y. (2002), "DNA separation by microchip electrophoresis using low−viscosity hydroxypropylmethylcellulose−50 solutions enhanced by polyhydroxy compounds," *Electrophoresis*, **23**, 3608−3614.

Xu, F. ve Baba, Y. (2004), "Polymer solutions and entropic-based systems for double−stranded DNA capillary electrophoresis and microchip electrophoresis," *Electrophoresis*, **25**, 2332−2345.

Yardımcı, C. (2006), Rosiglitazon ve Metformin'in Kapiler Elektroforez ve Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Yöntemleri ile Farmasötik Preparatlardan ve Biyolojik Materyalden Aynı Anda Analizi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Yıldırım, A., Bardakcı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B. (2007), Moleküler Biyoloji, Nobel Yayın, Ankara.

Yıldırım, A., Kandemir, N., Sönmezoğlu, A., Ö. ve Güleç, T. (2011), "Buğdayda Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Olası Sorunların Optimizasyonu," *Anadolu Tarım Bilim. Derg.*, **26**, 36−39.

Yıldız, B. ve Aktoklu, E. (2010), Bitki Sistematiği, İlkin Karasal Bitkilerden Bir Çeneklilere, Palme Yayıncılık, 307, Ankara.

Yıldız, M. ve Yıldız, H. (2007), Biyolojide Laboratuvar Teknikleri ve Uygulamaları, Tıpkı Basım, Afyonkarahisar.

Yılmaz, S. ve Devran, Z. (2004), "Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları," *Derim.*, **20**, 31−42.

Yücel, E. (2000), “Effects of Different Salt (NaCl), Nitrate (KNO_3) an Acid (H_2SO_4) Concentrations on the Germination of Some *Salvia* Species Seeds,” *Seed Sci. & Technol.*, **28**, 853−860.

Zhang, L., Dang, F., Kaji, N. ve Baba, Y. (2006), “Fast extraction, amplification and analysis of genes from human blood,” *J. Chromatogr. A*, **1106,** 175–180.

Zhang, S., Jiang, C. ve Jia, L. (2011), “Tetrabutylammonium phosphate-assisted separation of multiplex polymerase chain reaction products in non-gel sieving capillary electrophoresis,” *Anal. Biochem.*, **408**, 284–288.

Zhou, P., Yu, S., Liu, Z., Hu, J. ve Deng, Y. (2005), “Electrophoretic separation of DNA using a new matrix in uncoated capillaries,” *J. Chromatogr. A*, **1083**, 173–178.