

Araştırma Makalesi

**CANLILARDA “TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZ” YÖNTEMİ İLE
DNA HASAR ANALİZİ (TEKNİK NOT): COMET ANALİZ YÖNTEMİ***Murat DİKİLİTAŞ^{1*}Abdurrahim KOÇYİĞİT²

Yayın Geliş Tarihi: 14.02.2010

Yayına Kabul Tarihi: 18.05.2010

ÖZET

Comet analiz yöntemi olarak da bilinen tek hücre jel elektroforez yöntemi son yıllarda genişleyen uygulama alanı, güvenilirliği ve uygulaması kolay olması bakımından kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkilerin bir göstergesi olan DNA hasar seviyelerinin ölçülmesini sağlayan önemli bir metottür. Bu metot, izole edilen DNA içeren tek hücrelerin DNA'larının lam üzerinde hazırlanan agar jel içerisinde elektroforetik ortamda yürütülmesi ve hasar seviyesine göre göç eden farklı yük ve molekül ağırlıklarına sahip DNA parçalarının DNA spesifik floresan boya ile boyandıktan sonra, floresan mikroskop altında değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Metot, oksidatif stres, toksik ağır metaller, kimyasal ajanlar, ilaçlar ve ultraviyole gibi çeşitli genotoksik ajanların DNA sarmalları üzerinde oluşturduğu tek veya çift zincir kırıklarını doğru, hassas, hızlı, ucuz ve az bir örnek hacmi kullanarak ölçen bir yöntem olup, tüm canlı hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Alkali Tek Hücre Jel Elektroforezi, Comet Analizi, SCGE, DNA Hasarı, DNA Tamiri.

**ANALYSIS OF DNA DAMAGE IN ORGANISMS VIA “SINGLE CELL GEL
ELECTROPHORESIS” (TECHNICAL NOTE): COMET ASSAY METHOD****ABSTRACT**

Single cell gel electrophoresis known also as the comet assay is an important method which enables to measure DNA damage and the evaluation of mechanisms of genotoxic and cytotoxic effects of physical and chemical agents on organisms. The method is reliable, easily applicable and has been widely used in recent years. This method depends on the isolated DNA of single cells running in agarose gel on a microscopy slide in an electrophoretic condition and the migration of damaged DNA fragments with different polarity and molecular weights and the evaluation of DNA fragments following the use of DNA specific fluorescence dyes under a microscopy. The assay method determines the single or double-strand breaks caused by the agents such as oxidative stress, chemical agents, drugs, heavy metal toxicity and ultraviolet lights with fast, sensitive, reliable and cheap way as well as requiring the little amount of cell samples. The method is commonly applied in all living cells.

Key Words: The Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis, Comet Assay, SCGE, DNA Damage, DNA Repair.

¹Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ş. Urfa, 63040.

²Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Bölümü, Ş. Urfa, 63040.

*Sorumlu Yazar: m.dikilitas@gmail.com

*Uluslararası literatürde anlam karmaşası yaratmamak için metin boyunca comet analizi ya da comet metodu terminolojileri kullanılmıştır.

GİRİŞ

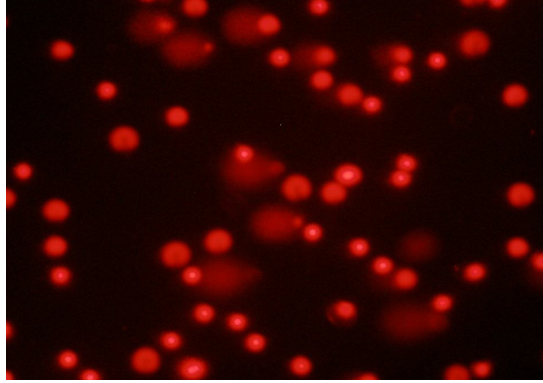
Günümüzde kimyasallar ve çevreden kaynaklanan çeşitli kirlenmeler canlılar üzerinde toksik etki yapmakta ve onları strese sokmanın yanı sıra genetik yapılarını da bozmaktadırlar. Canlılar, doğal olarak tepkilerini fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik olarak göstermekte ve bu tepkiler laboratuvarında veya doğada ölçülebilmektedir (Gichner ve ark., 2009). Ancak, etkinin genetik boyutu ya kullanılacak tekniklerin masraflı veya yorucu oluşu ya da biyokimyasal mekanizmaların iyi anlaşılmasından dolayı çoğu zaman ihmal edilmektedir. Örneğin, faydalı etkileri için kullandığımız pestisitlerin doğaya ve insan sağlığına olan yan etkileri ciddi endişeye yol açmaktadır (WHO, 1988; Ecobichon, 2001), hatta çevre dostu olarak bilinen çoğu kimyasalların da genotoksitesi henüz net bir kesinlik kazanmamıştır. Örneğin, metil karbamatlılar insanlarda mutasyona yol açmazken, carbendazim ve benomyl türü pestisitler yüksek dozlarda genotoksik etkiye sahiptirler (WHO, 1986; Ündeğer ve Başaran, 2005). Ancak her iki pestisit türünün de etkileri detaylı olarak araştırılmak durumundadır. Genel olarak, kimyasal, biyolojik ve çeşitli fiziksel stres faktörlerinin canlılar üzerinde hormon, enzim, karbohidrat ve protein metabolizmalarını etkilediği, fizyolojik ve morfolojik değişikliklere yol açtığı, dolayısı ile organizmanın bunlara verdiği tepkilerin savunma mekanizması hakkında bilgi verdiği bilinmektedir. Fakat, biyokimyasal mekanizmaların kodlandığı yer olan DNA üzerinde stres faktörlerinin hasar oluşturup oluşturmadığı, eğer hasar oluşturuyor ise hasar derecesinin belirlenmesi, çevreye ve doğaya duyarlılık açısından önemli olduğu gibi hedef organizmanın geleceği açısından da önemlidir.

Şimdiye kadar DNA hasarının belirlenmesi ile ilgili çok sayıda teknikler kullanılmış bunların birçoğunun pahalı ve uzun çalışma süresi gerektirmesi ve kimi zaman da birçok laboratuvar veya üniversitelerin sahip olmadığı radyoaktif çalışmalarını içermesi ve hatta çalışma sonunda beklenen başarının elde edilememesi bu alanda çalışma yapılmasını güçleştirmiştir (Tice ve ark., 2000; Gichner ve ark., 2009). Ancak, son 10 yıl içinde tıp ve biyoloji alanlarında yukarıda belirtilen sorunlara cevap verebilecek “tek hücre jel elektroforez” veya “Comet Analizi” adında yeni bir moleküler test sistemi geliştirilmiş, bu

metot sayesinde DNA’da hasar olup olmadığına, varsa hasar seviyelerinin anlaşılması ile farklı bir boyut kazanmıştır (Kocyiğit ve ark., 2005; Lin ve ark., 2007; Gichner ve ark., 2008a). Aslında bu teknik, ilk olarak hayvan ve insan hücreleri üzerinde uygulanmasına rağmen (kan ve sperm hücreleri) son yıllarda bitkiler ve funguslar üzerinde de denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Vajpayee ve ark., 2006; Gichner ve ark., 2009; Rank ve ark., 2009). Hayvan ve bitki hücrelerinin yapısal olarak farklı oluşu bu tekniğin uygulanmasında bazı farklılıkları beraberinde getirmiş ancak yapılan bazı değişiklikler ile bu sorun çözülmüştür (Lin ve ark., 2007; Gichner ve ark., 2009; Dikilitaş ve ark., 2009).

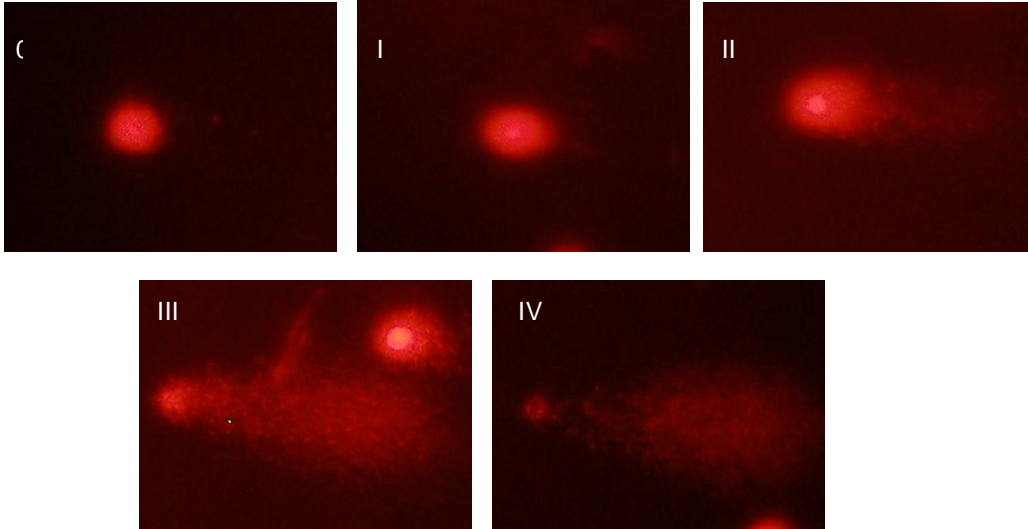
Comet yönteminin temel prensibi kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreleri üzerindeki etkilerini, hücrelerin DNA’larını tek tek inceleyerek tespit etmektir. Genel olarak, canlı dokulardan izole edilen çekirdek içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine fikse edilir ve elektroforetik ortamda yürütülür. Eğer çeşitli genotoksik ajanlarla hasarlanan DNA’lar tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş, tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalar oluşmuş ise kırılan farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip kırılmış DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. DNA molekülleri ethidium bromid gibi DNA spesifik boyalarla boyanıp floresan mikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre DNA’lar dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluşturduklarından yöntemine İngilizce “kuyruklu yıldız” anlamına gelen “Comet Assay” adı verilmiştir (Şekil 1).

Daha hassas fakat oldukça pahalı olan YOYO-1 (benzoxazolium-4-quinolinum oxazole yellow homodimer), DAPI (4,6-diamid-ino-2-phenylindole) gibi boyalar ve bazı preparat hazırlama teknikleri ve ortamları, kullanılan tekniğin hassasiyetini ve güvenilirliğini arttırmak ve çok daha düşük düzeyde seyreden DNA hasarlarını tespit etmek için kullanılmıştır (Angelis ve ark., 1999). Bununla birlikte, Gichner ve ark. (2006) ethidium bromidin etkinliğinin yukarıda bahsedilen boyalardan farklı olmadığını rapor etmişlerdir.



Şekil 1. Çeşitli Derecelerde DNA Hasarının Floresan Mikroskop Altındaki Görüntüsü.

Hasarlanan hücre DNA'ları hasarın derecesine göre beş kategoride değerlendirilmektedir. Dairesel şekilde hiç kuyruk oluşturmamış DNA görüntülerinden hiç hasarlanmamış DNA lar "O", çok az hasarlanmış DNA lar "I", az hasarlı DNA lar "II", hasarlı DNA lar "III" ve çok hasarlı DNA lar "IV." derece hasar olarak değerlendirilir (Şekil 2).



Şekil 2. Tek hücre jel elektroforez yöntemi ile agaroz jel üzerinde elektroforetik ortamda negatif kutuptan pozitif kutuba (soldan sağa) doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri. 0- Hasarsız DNA; I-Çok az hasarlanmış DNA; II-Az hasarlanmış DNA; III-hasarlanmış DNA; IV- tümüyle hasarlanmış DNA.

Tek hücre jel elektroforez veya comet analiz yöntemi ilk kez Östling ve Johansson (1984) tarafından temelleri oluşturulmuş daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından günümüze kadar modifiye edilmiş ve yeni teknikler ile birlikte sunulmuştur (Singh ve ark., 1988; Gichner ve ark., 2008a). Metot öncelikle alkali ortamlarda uygulandığı için alkali comet analizi ya da alkali tek hücre jel elektroforez şeklinde kullanılmıştır. Ancak son yıllarda, N/N (Nötr gevşeme/Nötr elektroforez) ve A/N (Alkali gevşeme/Nötr elektroforez) şeklinde de uygulanmaya başlanmıştır (Lin ve ark., 2007). Metodun alkali versiyonu, A/A (Alkali gevşeme/Alkali elektroforez, pH 13) DNA'nın çift ve tek sarmal yapıda olan hasarlarını ölçmek için kullanılmaktadır (Gichner ve Plewa, 1998; Lin ve ark., 2007). Sadece genotoksik ve mutajenik maddeler değil, aynı zamanda oksidatif stres de DNA üzerinde hasar oluşturduğundan, bu çalışma konuları içinde de yer alabilecek önemli bir yöntemdir (Achary ve ark., 2008; Dikilitaş ve ark., 2009).

Comet Metodunun Kullanım Alanları

Çevre sağlığını tespit etmede:

Özellikle, trafik, fabrika atıklarının çevreye verdiği zarar, kimyasal atıklar, zehirli gazlar vb. gibi bir çok konularda DNA hasarının olduğu kanıtlanmıştır. Ancak, bu etkilerin moleküler düzeyde etkileri ve yol açtıkları hasar dereceleri daha iyi analiz edilmek durumundadır. Birçok durumlarda çevre sağlığı veya insan üzerinde oluşan stresin etkisi kimi zaman indiktor bitki kullanarak kimi zaman da kobay hayvanlar kullanarak belirlenmiştir. Ancak strese maruz kalan organizmanın kendisinin incelenmesi daha akılcı bir yoldur (Sriussadaporn ve ark., 2003).

Canlının bütün genetik bilgilerini DNA molekülü ihtiva ettiğinden DNA'da meydana gelen olumsuz değişiklikler kendisinden sonra gelen nesillere aktarılan genetik bilgiyi de değiştirebilmektedir. İçinde bulunduğumuz ortamda meydana gelen olumsuzluklar, canlılara ait DNA moleküllerinde hasara, oluşan hasar tamir edilemediği takdirde kontrollü hücre ölümüne veya kansere kadar giden hastalıklara neden olabilmektedir. DNA hasarını oluşturan nedenlerin en başında, çevresel şartlar, sürekli artan sanayi ve teknolojik atıklar, eksoz dumanı, sigara gibi

faktörler gelmektedir. Canlının her bir hücresinde günde onbinlerce DNA molekülü hasara uğramakla birlikte oluşan hasar DNA tamir mekanizmaları ile tamir edilmektedir. Normalde hasar ve tamir denge halindedir. Denge hasar lehine bozulduğunda tamir mekanizmaları yetersiz kalmakta, neticede kontrollü hücre ölümü olarak nitelendirilen "Apoptozis", veya mutasyon, delesyon insersiyon, kanser oluşumu gibi DNA molekülünde kalıcı değişiklikler oluşmaktadır. Bazı durumlarda ise stres faktörlerinin olumsuz etkileri ancak organizmanın hayat evresinin son aşamasında açığa çıkmaktadır. Dolayısı ile, organizmada kalıcı hücre hasarların oluşmadan önlenmesi için DNA'nın durumu hakkında kaliteli bilgi veren bir test, kaliteli bir test olma özelliği taşıyacaktır. Bazı durumlarda ise bakteri veya fungus gibi stres etmenleri de konukçu organizmada strese neden olurken kendileri de strese maruz kalabilmektedirler böyle durumlarda ise mikroorganizmalar ya daha virulent olabilmekte ya da stres koşullarından bitkiler kadar etkilenmemektedirler (Dikilitaş, 2003). Bu gibi koşullarda tek hücre jel elektroforez metodu ile canlılar üzerinde olumsuz etki yaratan mikroorganizmaların moleküler düzeyde incelenmesi ile o mikorganizmanın dayanıklılığı hakkında bilgi alınabilecektir.

Pestisit çalışmalarında:

Pestisitlerin birçok faydalarının yanı sıra, aşırı veya bilinçsiz kullanımı neticesinde insan, çevre ve hedef olmayan organizmalar üzerindeki negatif etkileri gözümüze çarpmakta, ancak etkileri genellikle kantitatif olarak belirlenmekte olup buna karşın toksisite dereceleri dayanıklılık mekanizmaları ile açıklanabilmektedir. Ayrıca "çevre dostu" olarak bilinen pestisitlerin çoğunun doğru miktarlarda ve uygun kullanım periyotlarında zarar oluşturmadığı şeklinde bilgiler verilmesine rağmen bu kimyasalların uzun kullanımı süresi içinde organizmada DNA hasarına yol açtığı ve dolayısı ile metabolizmayı etkilediği düşünülmektedir. Bu gibi durumlar comet analiz yöntemi ile hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlenebilmektedir (Piperakis ve ark. 2003; Ündeğer ve Başaran, 2005).

Ayrıca stres faktörlerinin etkilerinin azalması ile canlıların verdiği tepkiler de değişmekte ve dolayısı ile organizmada görülen iyileşmenin DNA düzeyinde olup olmadığının belirlenmesi, stresin kalıcı bir etki bırakıp bırakmadığının belirlenmesi açısından

çok önemlidir. Dolayısı ile organizma üzerinde iyileştirici etkilere veya direnci arttırıcı özelliğe sahip kimyasalların DNA üzerinde tamir oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi kullanılacak kimyasalların etkinliğini belirlemek açısından önemlidir.

Kısaca bu metot, bakteriler, funguslar, algler, teorik olarak tüm yüksek bitkiler, deniz canlıları, insanlar, böcekler, omurgalılar ve hayvanlar üzerinde çok rahat uygulanabilen onları hem çevre sağlığı açısından monitor etmede hem de hedef organizmaların savunma potansiyelleri ve gelecekteki sağlık durumları hakkında bilgi vermede kullanılan önemli bir metottür (Dhawan ve ark., 2009). Bu teknik not ile araştırmacılara metodun nasıl uygulandığı ve farklı organizmalarda hangi tip değişiklikler ile kullanıldığı ve bunlara ilişkin temel protokoller ile bilgisayarlı analiz sisteminde kullanılan parametrelerin hesaplanmaları sunulmuştur. Ayrıca, genetiksel düzeyde pahalı ve yorucu olan çalışmaların daha kısa sürede ve düşük maliyetle yapılabileceği kanaati oluşturulmaya çalışılmıştır. Yazarlar, bu alanda yayınlanan makalelerin hepsinin yabancı dillerde olması ve Türkçe kaynaklardan bu konu ile ilgili bilgi edilememesi yüzünden, konuları kendi tecrübeleri ile sadeleştirmiş ve bu alanda çalışma yapmak isteyen araştırmacıların hizmetine sunmuştur.

MATERYAL VE YÖNTEM

Denemede kullanılacak bitki ve hayvan hücreleri yapısal olarak farklılık gösterdiklerinden (bitki hücresi selulozdan oluşan hücre duvarına sahip iken hayvan hücresi sadece membran ile çevrilidir) insan ve hayvan hücrelerinden DNA elde edilmesi yüksek tuz ve deterjan kullanarak lysis ile olurken buna karşılık bitki hücrelerinden çekirdek elde edilmesi ya protoplastlardan ya da mekanik yollardan olmaktadır (De Pinto ve ark., 1999; Gichner ve ark., 2009; Dikilitaş ve ark., 2009).

DNA hasarı için kullanılacak model bitkiler:

Teorik olarak bütün bitkiler comet analizi için kullanılabilir olmasına rağmen hem kolay temin edilmesi hem de yetiştirme

kolaylığı bakımından, patates (*Solanum tuberosum*), tütün (*Nicotiana tabacum*), soya fasülyesi (*Vicia faba*), soğan (*Allium cepa*) ve *Arabidopsis thaliana* üzerindeki çalışmalar kayıtlarda daha fazla yer almıştır (Gichner ve ark., 2006; Mancini ve ark., 2006; Lin ve ark., 2008).

Genotoksik veya mutajenik etkilere sahip olan fiziksel veya kimyasal maddelerin (pestisitler, gamma veya UV ışıklar) hedef organizma üzerinde belirli bir periyot ve konsantrasyonda DNA hasarı oluşturup oluşturmadığı aşağıdaki aşamalar yapıldıktan sonra belirlenebilmektedir.

Bitkiler, genellikle 4-5 yapraklı hale gelince kök ve gövdeleri test için kullanılmalıdır. Kök bölgesinde oluşan DNA hasarını ölçmek için, fideler 1-48 saat arasında değişen periyotlarda su içinde çözünen test solusyonlarına maruz bırakılırlar. Ekstra DNA hasarı oluşturmamak için kökler karanlıkta oda sıcaklığında hasat edilmelidirler. Bitkiler eğer 1 haftaya kadar uzanan sürelerde test solusyonlarında tutulacaklar ise solusyon hem havalandırılmalı hem de besin solusyonu ile zenginleştirilmelidir. Yapraklarda oluşan DNA hasarının tespit edilmesi için ise kullanılan test maddesinin yapraklara eşit olarak dağılabilmesi için fidelerin kökleri en az 18 saat test solusyonunda tutulmalıdır (Gichner ve ark., 2009).

In Situ koşullarında bitkilerin kullanılması:

Tarla, bahçe ya da doğada yabani olarak yetişen bitkilere comet analizi uygulanacak olursa, kontrol grubu olarak kirlenmemiş bölgelerden seçilen bitkilerin çekirdekleri izole edilmelidir. Ayrıca negatif kontrol olarak kirlenmemiş bölgelerden alınan bitkiler farklı konsantrasyonlarda en az 18 saat süre ile EMS (ethyl methanesulfonate) veya H₂O₂ ile muamele edilmelidirler. Elde edilen sonuçlar EMS veya H₂O₂ solusyonuna maruz bırakılmayan yapraklardan elde edilen DNA hasar sonuçları ile karşılaştırılmalıdır.

Bütün biyokimyasal çalışmalarda olduğu gibi tampon ve reaksiyona giren çözeltilerin taze olarak hazırlanması önemlidir. Ancak burada hazırlanacak birçok kimyasal iki hafta süreyle kullanılabilir. DNA hasarı çalışırken hemen hemen bütün aşamaların sarı ya da loş ışık altında devam etmesi ve çalışmaların bazı aşamalarının 4 °C'de yapılması alınacak sonuçların güvenilirliği açısından çok önemlidir.

Bitki dokularından DNA izolasyonu: Bitki hücrelerinden DNA ya mekanik yollardan ya da protoplastlardan izole edilir.

Protoplastlardan DNA izolasyonu: Selulaz ve pektinaz enzimleri ile hücre duvarı sindirilir ve protoplastlar lam üzerine yayılmış agaroz içine gömülerek lysis solusyonuna maruz bırakılır (De Pinto ve ark., 1999; Bhanoori and Venkateswerlu, 1998; Abas ve ark., 2007). Çekirdeklerin bu yolla izole edilmesi oldukça pahalı bir yöntem olup yorucu ve titizlik gerektiren bir yöntemdir. Ayrıca, izolasyon sırasında DNA'nın zarar görmeye ihtimali de çok yüksektir (Hahn and Hock, 1999).

Hücre Duvarının mekanik olarak elemine edilmesi sonucu hücre & kallus kültüründen, yaprak & köklerden çekirdek izolasyonu:

Eğer hücre veya kallus kültürlerinden DNA izole edilmek isteniyorsa, 0.4 g hücre veya kallus çok katlı absorbant filtre kağıtlarının üzerine dökülür ve 0.4 M potasyum fosfat çözeltisi ile yıkanır ve oradan bir spatula yardımı ile mikrosantrifuj tüplerinin içine alınır, üzerine 0.1 g yıkanmış deniz kumu ve 0.5 ml soğuk 0.4 M fosfat tampon çözeltisi (pH 10) ilave edilir ve hafifçe çalkalanır. Kum, tüpün dibine çökeldikten sonra, hücreler, naylon filtre (53-µm) aracılığı ile buz içinde tutulan yeni bir tüpe alınır (Stavreva ve Gichner, 2002).

Eğer, çekirdek kök veya yapraklardan direkt olarak izole edilecekse, 2 x 2 cm boyutlarında yaprak veya kök saçakları steril bir bistüri veya jilet yardımı ile nazikçe parçalara ayrılır. 6-9 cm çapında bir Petri kabına 300-400 µl 0.4 M Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 7.5) konarak, yaprak veya kök parçacıkları hafifçe çalkalanmaya bırakılan Petri kabına konarak, tampon çözelti içine hücrelerin toplanması sağlanır (Gichner ve ark., 2009). Bazı çalışmalarda PBS (Tuzlandırılmış fosfat tamponu) çözeltisi de tercih edilmiştir (Lin ve ark., 2007). Burada önemli olan husus; yaprakları veya kökleri doğramak yerine onları çok nazik ve hassas şekilde dilimlemektir, böylece hem kontrol hem de muamele gruplarına ekstra zarar vermeden en az yapay DNA hasarı oluşturularak izolasyon aşaması tamamlanmış olacaktır. Hücre duvarı, tuz, deterjan ve enzimler ile çok zor parçalandığı için mekanik olarak çekirdek izolasyonu daha sağlıklı bir yoldur (Gichner ve ark., 2006).

Fungus hücrelerinin DNA hasarını

incelemek için gerekli olan aşamalar preparat hazırlama bölümünde verilmiştir.

Çalışmaların daha sağlıklı ve güvenilir olması için preparat hazırlama aşamasından önce hücrelerin Evan's blue ya da Trypan blue ile canlılık testine tabi tutulması faydalı olacaktır. Bunun için kök, yaprak veya hücreler 0.25% (w/v) solusyonda 5-15 dakika arasında inkube edilir, yaklaşık 30 dakika boyunca distile su ile yıkandıktan sonra mikroskop altında canlılık testi heamocytometer'da yapılır ya da kök, yaprak veya hücreler 4 ml N,N-dimethylformamide içinde 1 saat bekletilir, açığa çıkan boyanın absorban değeri 600 nm de okunur (Mohan ve ark., 2008; www.sigmaaldrich.com, 2010). Çalışmada eğer fungus kullanılacaksa, fungal konidiler Eppendorf mikrosantrifuj tüplerinde düşük hızda çökeltilir ve steril su ile yıkanır sonra büyüme ortamında veya 0.4 M Tris-HCl, pH 7.5, tampon çözeltisinde osmotik şoktan kaçınmak için yeniden suspanse edilirler ve boyama için yukarıdaki aşama takip edilir.

Bitkiler için preparatların hazırlanması:

Burada asıl amaç, uniform ve stabil bir jel hazırlayarak içinde bulunan örneği deney aşamasının sonuna kadar bozulmadan tutabilmek ve örneklerin arka plan görüntüsüne etki edebilecek faktörleri ortadan kaldıran bir preparat hazırlamaktır. Comet analizi için "kenarları buzlandırılmış lamalar" jel stabilitesini arttırmak amacı ile kullanılmakla birlikte (Tatlı ve ark. 2008), ticari olarak bu amaca uygun lam ve lameller de kullanıma sunulmuştur (Trevigen Inc., 2000).

Çalışmada kullanılacak lamalar en az bir gün süre ile etanol içinde tutulduktan sonra etüvde kurutularak kullanıma hazır hale getirilmelidir. Lamlar üzerine 50 °C'de distile su içerisinde çözünmüş %1 lik normal erime noktalı (NMP) agarozdan 100 µL kadar pipetle bırakılır ve hemen üzeri lamel ile kapatılarak tabakalandırılır. Jelin çabuk donması için lamlar buzdolabında 5 dakika kadar bekletilir. (Kocyiğit ve ark., 2005; Gichner ve ark., 2009). Bu aşamada lamlar, agaroz-kaplı lamlar olarak adlandırılırlar ve nomenclendirilmiş kutularda elektroforez işlemlerine kadar uzunca bir süre saklanabilirler. İkinci tabaka ise %1 lik düşük erime noktalı (LMP) agaroz ve yeni izole edilmiş hücre süspansiyonu karışımından oluşur. Hücre süspansiyonu yine

distile su içerisinde 40 °C'de LMP agaroz ile 1/8 oranında ya bir mikrosantrifuj tüpü içinde ya da bir lam üzerinde pipet yardımı ile karıştırılır ve yaklaşık 100 µl lik karışım 1. tabaka üzerine yayılır ve hemen lamel ile kapatılır. Preparat daha sonra buzdolabında 5 dakika kadar bırakılır ve lameller bunun ardından kaldırılır (Gichner ve ark., 2004). Preparatlar bu noktada bir sonraki aşama için hazır sayılır. Aslında son yıllara kadar yapılan birçok çalışmada 3. tabaka olarak, 100 µl erimiş %1 lik LMP agaroz ikinci tabaka üzerinde oluşan boşlukları doldurmak için kullanılmakta idi, fakat, son yıllarda Koçyiğit ve ark., 2005; Gichner ve ark. (2008a & b) gibi bazı araştırmacılar en üst tabakanın çok gerekli olmadığını rapor etmişlerdir.

Funguslar için preparat hazırlanması:

Funguslar üzerinde oluşan DNA hasarları için bugüne kadar çok az çalışma yayınlanmıştır (Hahn ve Hock, 1999; Miloshev ve ark., 2002). Protoplast izolasyonunda olduğu gibi fungal hücrelerin enzimler yolu ile izole edilmesi, çalışmaları hem zorlaştırmış hem de arzu edilen sonucun alınmasına engel olmuştur. Burada funguslar için hazırlanmış protokollerden ortak olarak hazırlanmış detaylı bir protokol sunulmuştur.

Bitkiler için hazırlanan preparatların 1. aşamasında olduğu gibi, mikroskop lamaları %1 lik NMP agaroz ile kaplandıktan sonra üzerine 100-150 µl hacminde fungal büyüme ortamı içinde hazırlanan %0.8 lik LMP agaroz yayılır ve üzeri lamel ile kapatılır ve jel oluşması için 4 °C'de 15 dakika bekletilir. Lameller kaldırıldıktan sonra iyi gelişmiş bir fungal koloniden elde edilen fungal hifler jel içine inokule edilir ve fungal gelişim için optimum sıcaklıkta belli bir süre Petri kabında inkubasyona bırakılırlar (Hahn ve Hock, 1999). Bu aşamadan sonra fungus üzerine test edilecek kimyasallar veya diğer test maddeleri istenilen konsantrasyonlarda yaklaşık 90 µl olacak şekilde tatbik edilir ve lamel ile üzeri kapatılır ve muamele isteğine göre inkubasyona bırakılır ve daha sonra preparatlar sterile su ile yıkanır. Eğer preparatlar ışık stresine (UV gibi) maruz bırakılacak ise lamel kapatılmamış lamlar istenilen doz ve sürede ışık stresine maruz bırakılırlar. Bu aşamadan sonra preparatlar, soğuk lysis solusyonunda (0.3 M NaOH, 0.03 M Na₂EDTA, %0.1 SDS) 50 dakika kadar bekletilir (Hahn ve Hock, 1999). Son zamanlarda mayalar ile yapılan bir DNA hasar çalışmasında (Rank ve ark. 2009), 0.5 ml fungal hücre süspansiyonu (1x10⁶ hücre

ml⁻¹) santrifuj ile çöktüldükten (1000g, 5 dakika, 4 °C) sonra PBS tampon çözeltide (pH 7.4) süspanse edilmiş, tekrar santrifuj edildikten sonra elde edilen pellet, 125 µl, 2 mg ml⁻¹ Zymolase 20T ya da Zymolase 100T içeren %0.70 lik LMP agaroz ile karıştırılmış, bu karışımdan elde edilen 100 µl lik bir karışım %0.8 NMP agaroz kaplı lamalar üzerine yayılmıştır. Kullanılan enzimlerin mayaların hücre duvarını parçalaması için, lamalar oda sıcaklığında 20 dakika inkube edilmiş, daha sonra preparatlar jel katmanının katılması için 15 dakika buz üzerinde tutulmuş sonra lysis solusyonunda (2.5 M NaCl, 0.1 M Na₂EDTA, 10 mM TRIS, %1 Triton X-100, pH 10) 4 °C'de 90 dakika bekletilmiştir.

DNA nın çözülmesi, elektroforezi ve nötralizasyonu:

Bu aşamada sarmal yapıda olan DNA nın çözülüp gevşemesi için preparatlar elektroforez tankına konulmuş tampon çözeltiye daldırılır ve inkube edilir. İnkubasyon süresi kullanılacak bitkinin veya fungusun türüne bağlı olarak 20-40 dakika arasında değişir. Eğer bu aşamalar alkali (pH 12.4) bir ortamda gerçekleştirilirse çift ve tek bağlardaki kırıklar belirlenmekte, eğer pH değerleri hem çözülme hem de elektroforez aşamalarında 13 den daha büyük ise yukarıdaki DNA simptomlarının yanı sıra çapraz bağlardaki hasarlar ile baz hasarları da belirlenebilmektedir. Toksikite çalışmaları için Comet protokolünün alkali versiyonu hem çözülme hem de elektroforez aşamalarında uygulanmaktadır (Gichner ve ark., 2009). Genel olarak çözülme ve elektroforez solusyonları soğuk olarak tatbik edilmeli ve süreleri kullanılacak bitki ve fungal türlerine göre araştırmacılar tarafından optimize edilmelidir. Optimizasyon kontrol gruplarında en az DNA göçünü hedef alırken muamele gruplarında DNA göçünün maksimum düzeyde olmasını sağlayan çözülme ve elektroforez şartları olarak kabul edilir (Gichner ve ark., 2009; Dikilitaş ve ark., 2009). Ayrıca, elektroforez süresince sıcaklığı sabit tutarak örnekler arasındaki olabilecek varyasyonların önüne geçilmelidir. Elektroforez aşamasında Voltaj V cm⁻¹, amper mA olarak tanımlanmalıdır. Örneğin, patates için bu değerler, DNA çözülmesi 10 dakika, elektroforez 15 dakika (26V, 300 mA, 0.74 V cm⁻¹, pH>13) olarak belirlenirken (Gichner ve ark., 2008b), *Sordaria macrospora* fungusu için çözülme ve elektroforez 10 ar dakika, 1.2

V cm⁻¹, 10-20 mA, pH 8 olarak yapılmış (Hahn ve Hock, 1999), *Saccharomyces cerevisiae* için ise çözülme 20 dakika, elektroforez 10 dakika, 28V, 300 mA, 0.8 V cm⁻¹, pH>13 olarak gerçekleştirilmiştir (Rank ve ark., 2009).

Preparatlar, elektroforezi takiben oluşan alkali ortamı nötrleştirmek ve lamaların mikroskop altında net görüntü alınmasını sağlamak için 0.4 M Tris-HCl (pH 7.5) ile oda sıcaklığında üç kez 5 er dakika yıkanmalıdır (Gichner ve ark., 2008b; Rank ve ark., 2009).

Nötralizasyon aşamasından sonra, lamalar boyanmalı ve 6 saat içinde analiz edilmelidir. Eğer vakit hemen analiz için uygun değilse preparatlar, 10-15 dakika soğuk su içinde tutulmalı takiben %100 lük etanol içinde dehidrasyona maruz bırakılmalı ve kurumaya bırakılmalıdır (Kocyiğit ve ark., 2005; Gichner ve ark., 2008a & b). Bu şekilde lamalar temiz bir ortamda birkaç ay kadar kuru koşullarda saklanabilir.

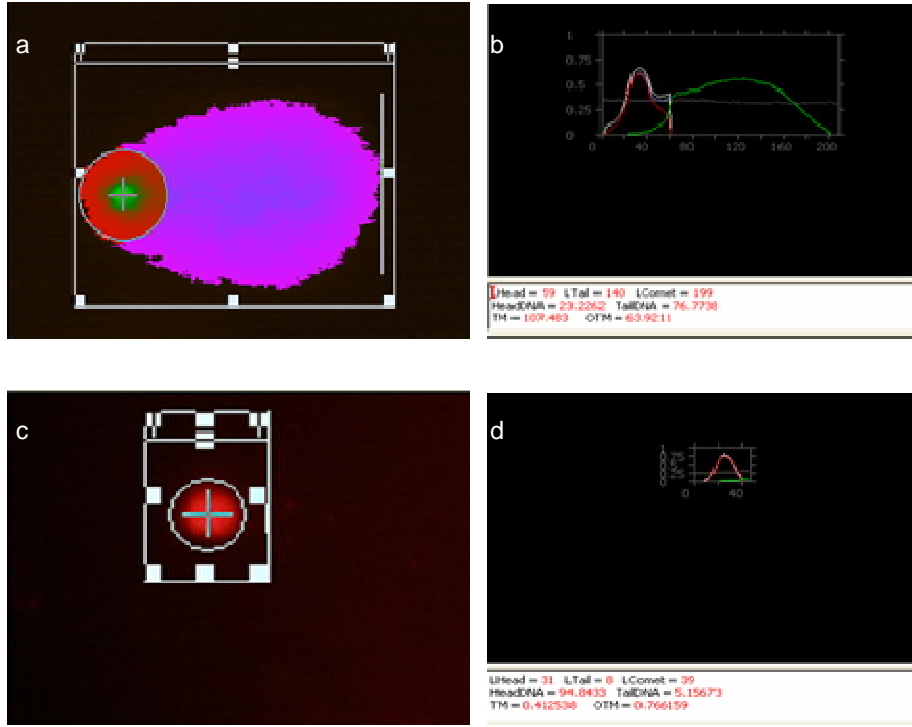
Preparatların boyanması ve analiz edilmesi

DNA çalışmalarında en çok kullanılan boyalar ethidium bromid (Lin ve ark., 2007), DAPI, ve YOYO-1 gibi floresans renk veren boyalardır (Gichner ve ark., 2006). YOYO-1 çok pahalı ve unstabil olduğundan çok yaygın kullanıma sahip değildir. Lamalar, genellikle 80-100 µl ethidium bromid (20 µg ml⁻¹) ile boyandıktan sonra üzeri lamel ile kapatılıp mikroskop alanları taranarak en az 100 kadar hücre 2 tekerrürlü olacak şekilde floresans mikroskop altında sayılmalıdır (bitkiler için kullanılan değerler, excitation filter BP 546/10

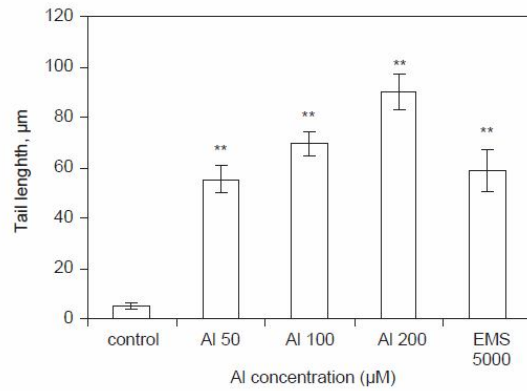
mm ve barrier filter of 590 nm). Bazı şirketler mikroskopa bağlı tam otomatik analiz programları ile (CASP, www.casp.of.pl; Komet IV, www.scorecomets.com) preparatlar içindeki tüm DNA'ları analiz etmekte, jel üzerindeki yürütülmeden elde edilen DNA parçaları baş ve kuyruk olarak iki ana bölüme ayrılmakta ve baş ve kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi sırası ile, % H-DNA ve % T-DNA olarak ifade edilmektedir (Şekil 3). Ayrıca kuyruk uzunluğu [TL, µm] ve Tail Moment [TM, µm olarak ifade edilir, % T-DNA ile TL'nin çarpımının 100 e bölünmesi ile edilen bir değerdir] ve Olive Tail Moment [OTM, baş kısmının merkezi ile kuyruk kısmının merkezinin arasındaki mesafe farkının % T-DNA ile çarpımının 100'e bölünmesi ile elde edilen değerdir] kullanılan parametreler arasındadır (Şekil 4). Özellikle, % T-DNA, oluşan hasarın derecesi ile doğru orantılı olup stres kaynağının şiddeti hakkında bilgi vermektedir, Şekiller 1, 2, 3 ve 4 (Konca ve ark., 2003; Gichner ve ark., 2008a).

Ayrıca çok pahalı olan comet analiz programları olmadan da DNA hasarını incelemek mümkündür. Kuyruk bölgesine göç eden DNA yüzdesini esas alan görsel değerlendirme skalasına göre, cometler 0 dan 4'e kadar sınıflandırılmakta (0=hasarsız DNA, IV=en yüksek düzeyde hasara uğramış DNA) ve çok hızlı bir şekilde DNA analizi yapılmaktadır (Kocyiğit ve ark., 2005), Şekil 2.

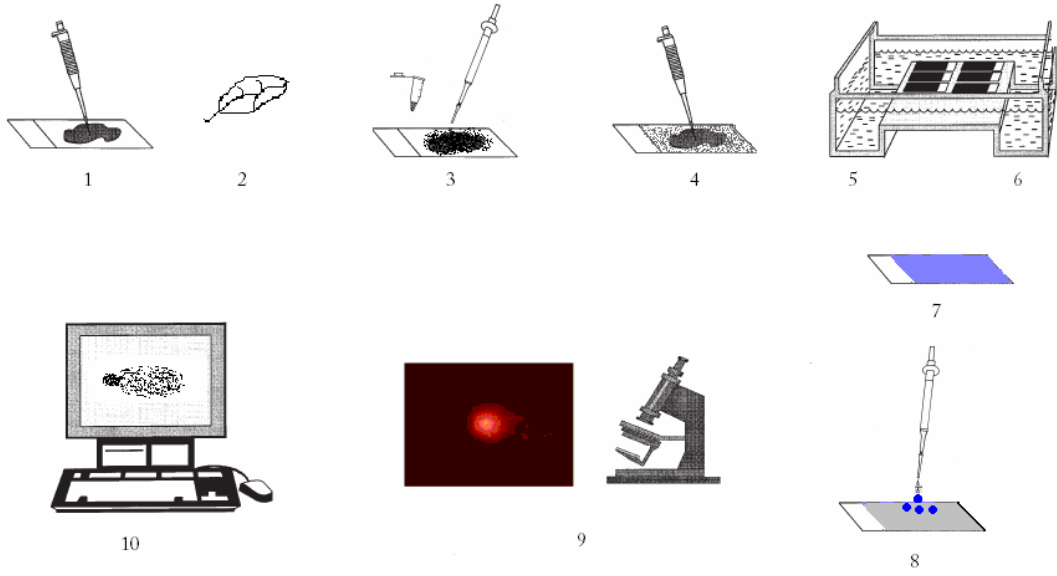
Comet analizinin aşamaları Şekil 5'de gösterilmiş; çalışmada kullanılan bazı kimyasallara dair özellikler Çizelge 1'de sunulmuştur



Şekil 3. CASP Analiz programı ile DNA comet analizi; (a & c) hasar görmüş DNA ile kontrol grubuna ait DNA'ların mikroskop altında yapısal şekilleri; (b & d) hasar görmüş DNA ile kontrol grubuna ait DNA'ların bilgisayar analizi sonucu elde edilen mikrografları.



Şekil 4. Alüminyum ve EMS (Ethyl methanesulfonate) tarafından *Allium cepa*'nın köklerinde oluşan DNA hasarının alkali comet analizi metodu ile ölçümü. (Kuyruk uzunluğu x Al konsantrasyonu) [Elsevier Yayınevinin izni ile Achary ve ark. (2008)'nin çalışmasından uyarlanmıştır].



Şekil 5. Comet analiz çalışmasının aşamaları.

(1) Lam üzerinde %1 lik NMP Agaroza hazırlanması, (2) Mutajenik ya da genotoksik teste tabi tutulmuş yaprak veya misellerden DNA izolasyonu, (3) 1:1 oranında hücre karışımı ile %1 lik LMP karışımının 1. aşamadaki agaroz kaplı lamın üzerine tatbiki, (4) Duruma ve isteğe bağlı olarak 0.5% lik LMP tabakası, (5) Preparatlar üzerlerindeki lamellerin kaldırılması ve elektroforez tankında DNA gevşemesi için soğuk ortamda bekletilmesi, (6) Elektrik akımı altında elektroforez uygulaması, (7) Preparatlar en az üç kez Tris-HCl ile yıkılarak nötralize edilmesi ve kurutulması, (8) preparatlar soğuk suda 10 dakika kadar bekletilip ve 5 dakika 100 µl Ethidium bromid ile ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) ile boyanır, (9) Comet şekilleri floresan mikroskopta incelenir, (10) DNA hasarı görsel ya da bilgisayar yardımı ile analiz edilir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin hazırlanması ve saklanma koşulları (Hahn ve Hock, 1999; Gichner ve ark., 2009; Dikilitaş ve ark., 2009).

Kullanılan Kimyasallar	Hazırlanışı
Elektroforez solusyonu DNA çözülmesi ve elektroforezi için kullanılır. (Bitkiler)	2 litre tampon çözelti için; 60 ml 10 M NaOH (300 mM NaOH, final konsantrasyon), 10 ml 200 mM Na ₂ EDTA (1 mM EDTA final konsantrasyon), 1930 ml H ₂ O, pH>13. Taze olarak hazırlanmalıdır. <i>Stok Solusyonlar:</i> 10 M NaOH: 200g NaOH 500 ml içinde çözülür ve oda sıcaklığında saklanır. 200 mM Na ₂ EDTA.2H ₂ O (Sigma, ED2SS): 14.89 g kimyasal 180 ml içinde çözülür, hafifçe ısıtılır, karıştırılır ve pH 10 N NaOH kullanarak 10'a ayarlanır ve solusyon 200 ml suya tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.
Elektroforez solusyonu DNA çözülmesi ve elektroforezi için kullanılır. (Funguslar)	DNA çözülmesi ve elektroforezi için TBE tampon çözeltisi kullanılır; 50 mM Tris-boric acid, 10 mM EDTA, pH 8.0
Ethyl methanesulfonate (EMS; Sigma M-0880).	10 mM EMS için; 100 ml içinde 106 µl EMS hazırlanmalıdır. Taze olarak hazırlanmalıdır.
Tris tampon çözeltisi (DNA izolasyonu ve Nötralizasyon için kullanılır)	0.4 M Tris için; 9.7 g Tris (Sigma USA, T-1378) 180 ml H ₂ O içinde hazırlanır, ve pH, konsantre HCl kullanarak 7.5'e ayarlanır. Sonra 200 ml suya tamamlanır. Oda sıcaklığında 2 hafta saklanabilir.
NMP (Normal Melting Point) Agaroz	% 1 lik NMP agaroz için; 1 g NMP (ROTH Germany, 2267, Sigma A9539) 100 ml kaynayan su içinde çözülür. Buzdolabında saklanır.
LMP (Low Melting Point) Agaroz	% 1 lik LMP agaroz için; 250 mg LMP (ROTH Germany, 6351, Sigma, A9414) 25 ml kaynama noktasına kadar ısıtılmış veya mikrodalgaya konulmuş PBS içinde çözülür, buradan 5 ml fraksiyonlar alınarak buzdolabında kullanıma kadar saklanır. Yeniden kullanırken küçük viallerde depolanan solusyonlar 70 °C ya ısıtıcı bloklarda ya da sıcak su banyosunda ısıtılarak eritilmelidir.
PBS (Phosphate buffered saline)	PBS için; 50 mg KCl, 50 mg KH ₂ PO ₄ , 2 g NaCl, 720 mg Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O 250 ml H ₂ O içinde çözülür ve pH 7.4'e ayarlanır. Kullanılmadan önce filtre edilmelidir. Buzdolabında kullanıma kadar saklanır. 20 µg ml ⁻¹ ethidium bromid boyaması için; 1 ml stok solusyon 9 ml H ₂ O ile karıştırılır.
Ethidium bromid	<i>Stok solusyon:</i> 10 mg ethidium bromid (Sigma USA, E-8751) 50 ml su içinde çözülür. Gerekli görülürse Millipore filtre (0.22µm) kullanarak kristal yapılı uzaklaştırılır. Oda sıcaklığında karanlıkta saklanmalıdır.

Sonuç

Bu çalışmada temel amaç, canlı organizmada çeşitli ajanların genetik yapıda hasar oluşturup oluşturmadığını, tek hücre DNA larının elektroforetik ortamdaki göçlerine göre analiz etmektir. Yöntem ile eğer hücre DNA ları sağlam ve kırılmamış ise elektroforetik ortamda tek bir yük ve molekül ağırlığına sahip olacaklarından birlikte göç edeceklerdir. Ancak, hasarlı DNA'larda bütünlük korunmadığından, kırılan DNA parçacıkları farklı yük ve molekül ağırlıklarına sahip olacaklar, elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç edecekler ve dolayısı ile DNA spesifik boyalarla boyandıklarında kuyruklu yıldız benzer bir görüntü oluşturacaktır. Burada önemli olan husus, yöntemin sağlıklı çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için negatif ve pozitif kontrol çalışmalarının da yapılmasıdır. Negatif kontrolde DNA hasarı görülmemesi gerekirken özellikle hidrojen peroksit ile oluşturulan pozitif

kontrollerde DNA hasarının oluşması gerekir. Kontrollerde beklenen sonuç alınmaz ise ise DNA izolasyonun ve DNA'nın çözülmesi sırasında uygulanan kimyasal tekniklerin ve elektroforez için kullanılan elektrik akımının gözden geçirilmesi gerekir.

Teşekkür ve Açıklama

Bu çalışmanın yazımı aşamasında fikirlerini bizimle paylaşan ve yazılı materyal sağlayan Prof. Tomas Gichner'e ve bilgisayar programlarında yardımlarından dolayı Araş. Gör. Kaan Erden'e ve çalışmada kullanılan grafiğin telif hakkını vermesinden dolayı Elsevier Yayınevine şükranlarımızı arz ederiz.

Yazarlar, burada bahsedilen kimyasallar ve çalışmada kullanılan teknik donanımların bahsedilmesi ile ilgili olarak herhangi bir çıkar sağlamamışlar, burada bahsedilmeyen ve aynı işlevlere sahip kimyasal ve teknik donanımlar ile ilgili olarak herhangi bir olumsuz görüşe sahip değillerdir.

KAYNAKLAR

- Abas, Y., Touil, N., Kirsch-Volders, M., Angenon, G., Jacobs, M. ve Famelaer, I.D.H. 2007. Evaluation of UV damage at DNA level in *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts using single-cell gel electrophoresis. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 91: 145-154.
- Achary, V. M. M., Jena, S., Panda, K. K. ve Panda, B. B. 2008. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70: 300-310.
- Angelis, K.J., Dusinska, M. ve Collins, A.R. 1999. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis*, 20:2133-2138.
- Bhanoori, M., Venkateswerlu, G., 1998. The alkaline single cell gel electrophoresis: a new test for assessing DNA single strand breaks in *Neurospora crassa*. *Mutation Research*, 405:29-34.
- De Pinto, M.C., Francis, D. ve De Gara, L. 1999. The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, 209: 90-97.
- Dhawan, A., Bajpayee, M. ve Parmar, D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology Toxicology*, 25:5-32.
- Dikilitaş, M., Kocuyigit, A. ve Yigit, F. 2009. A molecular-based fast method to determine the extent of DNA damages in higher plants and fungi. *African Journal of Biotechnology*, 8 (14): 3118-3127.
- Dikilitaş, M. 2003. Effect of salinity & its interactions with *Verticillium albo-atrum* on the disease development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and lucerne (*Medicago sativa* & *M. media*) plants. Ph.D. Thesis, University of Wales, Swansea
- Ecobichon, D.J. 2001. Toxic effects of pesticides. In: Klaassen CD(ed.) Casarett and Doull's toxicology. The basic science of poisons. McGraw-Hill, New York, pp 763-810.
- Gichner, T. ve Plewa, M.J. 1998. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutation Research*, 401:143-152.
- Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., Demnerova, K. 2004. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombinations in tobacco leaves. *Mutation Research*, 559:49-57.
- Gichner, T., Mukherjee, A. ve Veleminsky, J. 2006. DNA staining with the fluorochromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the comet assay with tobacco plants after treatment with ethyl methanesulphonate, hyperthermia and DNase-I. *Mutation Research*, 605:17-21.
- Gichner, T., Znidar, I. ve Szakova, J. 2008a. Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutation Research*, 652:186-190.
- Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., Znidar, I. ve Mukherjee, A. 2008b. DNA damage in potato

- plants induced by cadmium, ethyl methanesulfonate and γ -rays. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 113-119.
- Gichner, T., Znidar, I., Wagner, E.D. ve Plewa, M.J. 2009. The use of higher plants in the comet assay. In: *The Comet Assay in Toxicology* Edited by Alok Dhawan and Diana Anderson. Royal Society of Chemistry, p: 98-119.
- Hahn, A. ve Hock, B. 1999. Assessment of DNA damage in filamentous fungi by single cell gel electrophoresis, comet assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18 (7): 1411-1424.
- Koçyigit, A., Keles, H., Selek, S., Guzel, S., Celik, H. ve Erel, O. 2005. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with *Cutaneous leishmaniasis*. *Mutation Research*, 585:71-78.
- Konca, K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gozdz S, Koza, Z. ve Wojcik, A. 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutation Research* 534: 15-20.
- Lin, A., Zhang, X., Chen, M., Cao, Q. 2007. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Science*, 19:596-602.
- Lin, A., Zhang, X., Zhu, Y.G. ve Zhao, F.J. 2008. Arsenate-induced toxicity: effects on antioxidative enzymes and DNA damage in *Vicia faba*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (2): 413-419.
- Mancini, A., Buschini, A., Restivo, F.M., Rossi, C. ve Poli, P. 2006. Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. *Plant Science* 170:845-852.
- Miloshev, G., Mihaylov, I. ve Anachkova, B. 2002. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. *Mutation Research*, 513: 69-74.
- Mohan Murali Achary, V., Jena, S., Panda, K.K. ve Panda, B.B. 2008. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 70: 300-310.
- Östling, O., Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 123:291-298.
- Piperakis, S.M., Petrakou, E., Tsilimigaki, S., Sagnou, M., Monogiudis, E., Haniotakis, G., Karkaseli, H. ve Sarikaki, E. 2003. Biomonitoring with the comet assay of Greek greenhouse workers exposed to pesticides. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 41:104-110.
- Rank, J., Syberg, K., ve Jensen, K. 2009. Comet assay on tetraploid yeast cells. *Mutation Research* 673: 53-58.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. ve Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175:184-91.
- Sriussadaporn, C., Yamamoto, K., Fukushi, K. ve Simazaki, D. 2003. Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environments. *Mutation Research*, 541:31-44.
- Stavreva, D.A. ve Gichner, T. 2002. DNA damage induced by hydrogen peroxide in cultured tobacco cells is dependent on the cell growth stage. *Mutation Research*, 514:147-152.
- Tatli, M.M., Minnet, C., Koçyigit, A., Karadag, A. 2008. Phototherapy increases DNA damage in lymphocytes of hyperbilirubinemic neonates. *Mutation Research*, 654 (1): 93-95.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H. 2000. The single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 35:206-21.
- Trevigen Inc. 2000. TREVIGEN™ Instructions for Comet Assay™.
- Ündeğer, Ü. ve Başaran, N. 2005. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Archives of Toxicology* 79: 169-176.
- Vajpayee, P., Dhawan, A. ve Shanker, R. 2006. Evaluation of the alkaline comet assay conducted with the wetlands plant *Bacopa monnieri* L. as a model for ecogenotoxicity assessment. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47: 483-489.
- WHO 1986. Environmental Health Criteria 64. Carbamate pesticides: a general introduction. World Health Organisation, Geneva.
- WHO 1988. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to the classification 1988-1989. World Health Organisation, Geneva.
- www.sigmaaldrich.com. 2010. Use of trypan blue stain and the hemocytometer to determine total cell counts and viable cell number.