



## The Comparison of Various Real Time PCR Chemistries Used in Detection and Quantification of Genetically Modified Organisms<sup>#</sup>

Leyla Bener<sup>1,a,\*</sup>, Mustafa Ersal<sup>1,b</sup>, Berkant İ. Yıldız<sup>1,c</sup>

<sup>1</sup>Institute of Science, Akdeniz University, 07058 Antalya, Turkey

\*Corresponding author

### ARTICLE INFO

<sup>#</sup>This study was presented as an oral presentation at the 4th International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress (Afyonkarahisar, TARGID 2019)

### Review Article

Received : 27/06/2019

Accepted : 06/11/2019

### Keywords:

Real-time PCR  
Quantitative polymerase  
Detection GMOs  
q-PCR chemistries  
Intercalation paints

### ABSTRACT

Real-time quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) is an advanced molecular method for determining the amount of nucleic acid in both gene expression analysis and routine Deoxyribo Nucleic Acid (DNA) measurement. An accurate measurement method is essential given that the labelling threshold for genetically modified organisms (GMO) residues in food and feed products is 5% in Japan and 0,9% in the European Union. Determination of GMO components, quantification of exact amount and determination of trace amounts in food matrices are possible in q-PCR. Various q-PCR chemicals are used for this purpose. These; intercalation dyes, primary based, chemicals and probe based chemicals. With the increasing number of GMO products in the grocery stores, the number of analyses performed per sample and thus the cost of analysis increase. For this purpose, in GMO studies, improved detection methods are needed to determine the presence of GMOs in order to perform fast and economically feasible scans. In this study, q-PCR chemistries were compared in terms of cost, efficiency and applicability.

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(sp1): 133-137, 2019

## Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların Tespiti ve Ölçümünde Kullanılan Farklı Gerçek Zamanlı PCR Kimyasallarının Karşılaştırılması

### MAKALE BİLGİSİ

### Derleme Makale

Geliş : 27/06/2019

Kabul : 06/11/2019

### Anahtar Kelimeler:

Gerçek zamanlı PCR  
Kantitatif polimeraz  
GDO'ların tespiti  
q-PCR kimyasalları  
İnterkalasyon boyaları

### ÖZ

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (q-PCR), hem gen ekspresyonu analizinde hem de rutin Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) ölçümünde nükleik asit miktarının belirlenmesi için kullanılan ileri moleküler bir yöntemdir. Gıda ve yem ürünlerinde genetiği değiştirilmiş organizma (GDO) kalıntıları için etiketleme eşliğinin Japonya'da %5, Avrupa Birliği'nde ise %0,9 olduğu göz önüne alındığında, doğru bir ölçüm metodu şarttır. GDO bileşenlerinin tespiti, kesin miktar tayini ve besin matrislerinde eser miktardaki kalıntısının tespit edilmesi q-PCR'da mümkündür. Bu amaçla çeşitli q-PCR kimyasalları kullanılmaktadır. Bunlar; interkalasyon boyaları, primer bazlı kimyasallar ve prob bazlı kimyasallar olarak üç gruba ayrılmaktadır. Marketlerde GDO ürünlerinin artan sayısı ile birlikte, her örnek için gerçekleştirilen analiz sayısı ve bu nedenle analiz maliyetleri artmaktadır. Bunun için GDO çalışmalarında, GDO'ların varlığının miktarını belirlemede hızlı ve ekonomik olan uygulanabilir taramalar yapılabilmesi için geliştirilmiş tespit yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, q-PCR kimyasalları ekonomikliği, verimliliği ve uygulanabilirliği açısından karşılaştırılmıştır.

<sup>a</sup> [leyla.bener022@gmail.com](mailto:leyla.bener022@gmail.com)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6329-5350>

<sup>b</sup> [ersal.m@yahoo.com](mailto:ersal.m@yahoo.com)

<sup>c</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2401-1201>

<sup>c</sup> [berkantildiz@gmail.com](mailto:berkantildiz@gmail.com)

<sup>c</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8965-6361>



## Giriş

Genomik faaliyetlerin yürütülmesinde anahtar rol oynayan transkripsiyon metabolizması *in vitro* taklit edilerek polimeraz zincir tepkimesi (PCR: polimerase chain reaction) yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde, hücre içerisinde gen ifadesi için gerekli reaksiyon olması için PCR tüpü içerisinde gerekli reaktiflerden yararlanılarak başarılabilmektedir. Bu yöntemde temel amaç; hedef DNA dizisini yeterli seviyede çoğaltmaktır. Hedef dizi, DNA taq polimeraz enzimi kullanılarak spesifik DNA parçasının çoğaltılmasına imkân vermektedir. İlk kez 1985 yılında restriksiyon enzimlerinin keşfi ile (Roberts, 1985), PCR'ın temelleri atılmış; daha sonra Kary Mullis ve arkadaşları tarafından PCR ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Mullis ve ark., 1986; Lee ve ark., 2019). Bu yöntem ile kalıtsal hastalıkların tanısı, prenatal tanı, klinik örneklerde patojen organizmaların belirlenmesi, adli tıp, filogenetik araştırmalar, nokta mutasyonlarının belirlenmesi ve DNA dizi analizi gibi birçok amaç için tercih edilmektedir (Cockerill, 2003; Kahya ve ark., 2013). Gelişen teknoloji ile birlikte birçok organizma üzerinde genetik modifikasyon çalışmaları hızla devam etmekte (James, 2011) ve besin zinciri boyunca GDO ürünlerinin izlenebilirliği ve/veya etiketlenmesi önem kazanmıştır. Genetiği değiştirilmiş organizmalarda (GDO: Genetic Modified Organisms) hedef genlerin varlığı ve gen ifadesinin belirlenmesi için kantitatif PCR (q-PCR) kullanılmaktadır (Huang ve Pan 2005; Lee ve ark., 2019). İnsan gıdası ve hayvan yemi için genetiği değiştirilmiş bitkisel ürünlerin kabul sınırı dünya genelinde belli oranlarda standartlaştırılmıştır. Örneğin Japonya'da %5, Avrupa Birliği üye ülkelerinde %0,9 (Zhang ve Guo, 2011) ve ülkemizde ise %0,9 (Arslanhan, 2010; Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011) GDO kabul üst sınırı olarak kabul edilmiştir. Genetiği değiştirilmiş ürünün tüketimini tüketicinin tercihine bırakmak için ürün paketlerinin üzerine oran yazılmalıdır. Ancak, birçok numunede GD materyali belirleyebilmek için tam nicelik ve yeterlilik gerekmektedir. Ürünlerin içerdiği oranı belirlemek için ELISA, Southern -Western blot, LUC ve GFP gibi biyokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Aynı zamanda ürünlerde GDO miktarının belirlenmesi için q-PCR kimyasalları kullanılmakta ve büyük kolaylıklar sunmaktadır (James, 2005). q-PCR, GDO oranının belirlenebilmesi, tarama ve izlenebilmesi için kullanılmaktadır (Holst-Jensen, 2003; Holst-Jensen 2007; Gašparič ve ark., 2010). Analizler için geliştirilmiş yaklaşık 20 farklı q-PCR bileşeni bulunmaktadır. Ancak uluslararası geçerliliği olan sadece birkaç bileşeni bulunmasına rağmen (Deisingh ve Badrie, 2005) TaqMan/MGB problemleri ve SYBR Green en çok tercih edilen bileşenlerdendir (Hernandez ve ark., 2004; Taverniers ve ark., 2004; Terry ve ark., 2002). GDO miktar tayini sürecinde q-PCR'da; SYBR Green, ampliflor, uzatma, florojenik primerler, TaqMan ve MGB problemleri, moleküler işaretçiler, LNA ve CPT problemleri kullanılan kimyasallardandır (Holland ve ark., 1991; Koshkin ve ark., 1998; Kutayin ve ark., 2000; Nazarenko ve ark., 2002; Costa ve ark., 2004; Andersen ve ark., 2006; Gasparic ve ark., 2008).

## İnterkalasyon Boyaları

Kantitatif PCR uygulamalarında ilk zamanlarda PCR bileşenlerine etidium bromür eklenerek floresan ışımaya sağlanmıştır (Higuchi ve ark., 1993). Genetiği değiştirilmiş ürünlerde GDO miktarını belirlemek için SYBR Green interkalasyon boyama işleminden faydalanılarak yapılmaktadır (Schneeberger ve ark., 1995). Herhangi çift zincirli DNA ölçümüne olanak sağlayan SYBR Green (Peng ve ark., 2018), spesifik olmayan amplikonlardan spesifik olanları ayırma işleminde kullanılabilir (Schneeberger ve ark., 1995). SYBR Green, moleküler çalışmalarda hassasiyet gerektiren düşük konsantrasyonlar da iyi sonuçlar vermesine rağmen (Gasparic ve ark., 2008), yüksek konsantrasyonlardaki PCR reaksiyonlarını inhibe etme eğilimi ve spesifik DNA dizilerine belirli bölgelerinden bağlanma gibi dezavantajlara sahiptir (Gasparic ve ark., 2008) (Tablo 1). Tek iplikçikli DNA'ya düşük ilişki gösterebilmekte ve DNA erime eğrilerinin yorumlanması her zaman kolay olmamaktadır.

## Primer Bazlı Kimyasallar

Primer bazlı kimyasallar, GDO'yu belirlemede interkalasyon boyalarına göre daha güvenilirdir (Nazarenko ve ark., 2002). Bu yöntemde doğrudan karışıma ilave edilen reaksiyon boyası yerine floresan etiketli PCR primerleri kullanılabilir. Bu kimyasalların çalışması ve tasarımı oldukça ekonomik ve kolaydır (Tablo 1). Bunlardan Pleksor ve lux teknolojileri ayırma eğrilerinin analiz edilmesini spesifik veya spesifik olmayan amplikonların ayırt edilmesine imkân sağlamaktadır (Nazarenko ve ark., 1997; Nazarenko ve ark., 2002). Lux teknolojisinde primerlerden biri DNA 3' tarafından florofor ile işaretlenmesi (Nazarenko ve ark., 2002) primerin PCR ürününe entegrasyonu ile saç tokası yapısından dolayı floresan ışımada artış gösterebilmektedir (Nazarenko ve ark., 2002). Lxor teknolojisi ise amplifikasyon sırasında PCR ürünlerinin sayısındaki artışına bağlı olarak floresan sinyalinde azalma (Tablo 1). Primerlerden biri, 5' ucunda florofora bağlı sentetik bir baz olan izositozin içerir. Amplifikasyon sırasında, bu izositozin, tepkime çözeltisinden iso-dGTP'ye eşleşir ve böylece yeni sentezlenen diziyeye dahil edilmiş olur (Sherrill ve ark., 2004). Lux ve Lxor teknolojileri prob içermezler, primer yerine floresan işaret kullanılmaktadır (Gasparic ve ark., 2008).

AmpliFluor, üç primere dayanmaktadır. Bu primerlerden ikisi hedefe özgü spesifik ve çift etiketli saç tokası primeridir. Bu spesifik primerlerden birincisi de 5' ucunda Z sekans olarak adlandırılan bir diziyeye sahiptir ve bu dizi aynı zamanda saç tokası ucunda bir kuyruk olarak bulunmaktadır. PCR ürünleri oluşturulduğunda ve Z dizilerinin tamamlayıcı dizisi sentezlendiğinde, saç tokası primer kuyruğu yeni oluşan amplikonlara bağlanabilir ve uzatılabilmektedir. Böyle uzatılmış saç tokası primer kuyruğunun tamamlayıcı ipliği sentezlendiğinde hedefe özgü bir primerin saç tokası yapısı açılarak engelleyici (quenching) ortadan kaldırılabilir (Huang ve Pan 2005; Gasparic ve ark., 2010).

Tablo 1 Genetiği değiştirilmiş organizmaların belirlenmesinde kullanılan (q-PCR) kimyasallarının karşılaştırılması  
 Table 1 Comparison of (q-PCR) chemicals used to identify genetically modified organisms

Özellikleri	Prob Bazlı Kimyasallar					Primer Bazlı Kimyasallar			İnterkalasyon Boyaları
	TaqMan	MGB	MB	LNA	CPT	Plexor	LUX	AmpliFlour	SYBR Green
Kolay Tasarlanabilme	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Uygulama Kolaylığı	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Deney Uygulama Maliyeti	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Orta	Orta	Orta	Düşük
Kantitatif Analiz Uygunluğu	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Kalitatif Analiz Uygunluğu	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Uygulanabilirlik ve Maliyet Etkinliği	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Çalışma Süresi(dk)	120	120	120	120	84	87	144	140	120

### Prob Bazlı Kimyasallar

Genetiği değiştirilmiş ürünün analizinin duyarlılığı arttırmak için, PCR primerleri arasında uzanan hedef dizinin tamamlayıcısı olan bir üçüncü oligonükleotid olan, floresan prob kullanılabilmektedir. Her probun bir ucuna kovalent olarak eklenmiş bir bildirici (raportör) florofor ve diğeri ucuna eklenmiş engelleyici bulunmaktadır. Her iki boyama yakın mesafede kaldığı süre boyunca bir sinyal oluşmaz ve boyalar sadece fiziksel olarak ayrıldığında serbest kalmaktadırlar (Holland ve ark., 1991).

TaqMan prob tasarımı, minör oyuk bağlama (MGB; Minor Groove Binding) ve kilitli nükleik asit (LNA; Locked Nucleic Acid) gibi problemleri içerecek şekilde genişletilmiştir. LNA probu, taqman' dan modifiye nükleik asit analoglarıdır. Bunlar, bağlandıktan sonra metilen köprüleri oluşturarak hedef DNA'nın yapısını kilitlemektedir. Buna bağlı olarak problemlerin erime sıcaklığı önemli ölçüde artmakta; böylece daha kısa olacak şekilde tasarlanabilmesi mümkün olmaktadır (Kutyavin ve ark., 2000). TaqMan, LNA ve MGB problemlerinin uygulanabilirlik bakımından aralarında önemli bir fark bulunmaması nicel analizlerin tasarlama aşamasında diğer problemlerin TaqMan'a alternatif olarak düşünülebilmektedir (Gasparic ve ark., 2010). MGB problemlerinde, küçük bir oyuk bağlama grubu ile konjugasyon yapıldığında yüksek erime sıcaklığına ulaşmaktadır. LNA nükleotidleri bir 2'-O, 4'C metilen köprüsü ile modifiye edilmiş riboz parçasına sahiptirler. LNA nükleotidleri, hedef prob üzerine kilitlenmesinden dolayı LNA ile modifiye edilmiş problemlerin, tamamlayıcı DNA'ya karşı gelişmiş hibridizasyon afinitesi gösterdiği bildirilmiştir (Koshkin ve ark., 1998; Costa ve ark., 2004; Gasparic ve ark., 2008). LNA ve MGB problemleri çok daha kısa tasarlanabildikleri için, hedef sekansta istenmeyen eşleşmelere karşı hassas olduklarından yüksek özgüllük için kullanılmasının uygun olduğu bildirilmiştir (Gasparic vd. 2010).

Prob döngü teknolojisi (CPT; cycling probe technology), hibridizasyondan sonra RNA-DNA

dupleksini oluşturan modifiye edilmiş RNA nükleotidini içermektedir. Reaksiyon sırasında bu dupleks, RNaz H (Ribonuclease H) tarafından algılanır ve kesilir, böylece bir floresans artışı eşliğinde engelleyicinin rapörtörden ayrılması sağlanmaktadır. Bu durumda, sinyalde bir artış elde etmek için Taq DNA polimerazının eksonükleaz aktivitesine ihtiyaç duyulmamaktadır (Duck ve ark., 1990; Gasparic ve ark., 2008; Gasparic ve ark., 2010). CPT problemleri daha kısa olarak tasarlanabilirler, ancak ekonomik olmamasından dolayı rutin kullanımı uygun olmamaktadır (Tablo 1). Moleküler beaconların uygulanabilirliği CPT'ye benzerdir ve her ikisinin de q-PCR ile karşılaştırıldığında izotermal koşullar altında ve düşük sıcaklıklarda nükleik asit belirlenmesinde avantajlı olmaktadır (Gasparic vd. 2010). Moleküler beaconlar (MB) ise hidroliz problemleri değil hibridizasyon problemleridir. Bir saç tokası yapısı oluşturan iki ters çevrilmiş tekrarı çevrili bir diziyeye özgü saç tokası bölgesinden oluşmaktadır. Tamamlayıcı bir hedef diziyeye bağlanmak için işaretçi fluoroforun engelleyiciden ayrılmasına ve floresan ışımaya neden olmaktadır (Tyagi ve Kramer 1996; Andersen ve ark., 2006). Genetiği değiştirilmiş bitki DNA'sı arasındaki bazı bağlantıların tespitinde daha fazla olasılık sunabilmektedir (Gasparic vd. 2010). Ayrıca prob bazlı AllGlo ve EasyBeacons teknolojileri geliştirilmiştir. EasyBeacons kendi floresan engelleyici yeteneğine sahip boyaları içermektedir. Probu enzimatik bozunmasından sonra, prob başına iki florofor salındığından AllGlo problemleri geleneksel tek-etiketli problemlerden daha parlak olması beklenmektedir. EasyBeacons, normal ve interkalasyon psödo nükleotidlerinden oluşmakta ve tek nükleotid polimorfizm (SNP) tespiti için özellikle uygun olduğu düşünülmektedir. Bütün bu problemlerin verimliliği, dinamik aralığı ve tekrarlanabilirliği, Avrupa GMO Laboratuvarları Ağı (ENGL) tarafından belirlediği "kabul kriterlerine" göre yapılmaktadır (Broeders ve ark., 2014).

## Sonuç

Dünyada her geçen gün gıda güvenliği ve gıdaların içerdiği genetiği değiştirilmiş ürünler hakkında birçok tartışma yaşanmaktadır. Bu bağlamda ürünlerdeki GDO miktarının ölçülmesinde güvenilir ve etkin bir sonuç elde edebilmek için q-PCR' da kullanılan kimyasallar oldukça önem arz etmektedir. q-PCR'a başlarken hem nitel hem de nicel analiz için prob bazlı kimyasalların kullanım sürecinde optimizasyonun iyi yapılması ve reaksiyon için gereken sürenin ayarlanması hassasiyet gerektirmektedir. Reaksiyon sırasında kullanılan kimyasallar çalışmalara özgün, duyarlı, tekrarlanabilir ve dinamik özellikte olmalıdır. Kullanılan prob bazlı kimyasallar arasında kantitatif ve kalitatif analize olanak sağlaması, kolay dizayn edilebilmesi ve iyi performans göstermesi bakımından TaqMan diğer problemlere göre daha üstün olarak değerlendirilmektedir. Rutin teşhisler yapılırken hem performans hem de maliyet bakımından Plexor teknolojisi tercih edilirken, interkalasyon boyama sağlayan SYBR Green rekombinant olan hedef DNA'nın belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılabilir. Genetiği değiştirilmiş organizmaların teşhisi ile ilgili ürünleri kontrol etmek için daha ayrıntılı deneysel değerlendirmelere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyaçlar doğrultusunda her geçen gün gelişen moleküler genetik teknolojisi yakın gelecekte çok daha farklı ve efektif yöntemlerin ortaya çıkışına olanak sağlayacaktır.

## Kaynaklar

Andersen CB, Holst-Jensen A, Berdal KG, Thorstense T, Tengs T. 2006. Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26): 9658-9663. DOI: org/10.1021/jf061987c.

Arslanhan S. 2010. Türkiye, GDO ile Ekonomik ve Sosyal Açından Nasıl Getiri Sağlar? TEPAV Politika Notu. [https://www.tepav.org.tr/upload/files/1271313864r1670.Turkiye\\_GDO\\_ile\\_Ekonomik\\_ve\\_Sosyal\\_Acidan\\_Nasil\\_Getiri\\_Saglar.pdf](https://www.tepav.org.tr/upload/files/1271313864r1670.Turkiye_GDO_ile_Ekonomik_ve_Sosyal_Acidan_Nasil_Getiri_Saglar.pdf).

Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara, Morisset, D. 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2): 115-126. DOI: org/10.1016/j.tifs.2014.03.008.

Cockerill III, FR. 2003. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 127(9): 1112-1120. Volume 127, Issue 9 (September 2003).

Costa JM, Ernault P, Olivi M, Gaillon T, Arar K. 2004. Chimeric LNA/DNA probes as a detection system for real-time PCR. *Clinical biochemistry*, 37(10): 930-932. DOI: org/10.1016/j.clinbiochem.2004.05.020.

Deisingh AK, Badrie N. 2005. Detection approaches for genetically modified organisms in foods. *Food Research International*, 38(6): 639-649. DOI: org/10.1016/j.foodres.2005.01.003.

Duck P, Alvarado-Urbina G, Burdick B, Collier B. 1990. Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. *Biotechniques*, 9(2): 142-148. PMID:2400595.

Gašparič MB, Cankar K, Žel J, Gruden K. 2008. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC biotechnology*, 8(1): 26. DOI:10.1186/1472-6750-8-26.

Gašparič MB, Tengs T, La Paz JL, Holst-Jensen A, Pla M, Esteve T, Gruden K. 2010. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6): 2023-2029. DOI: 10.1007/s00216-009-3418-0.

Hernández M, Esteve T, Prat S, Pla M. 2004. Development of real-time PCR systems based on SYBR® Green I, Amplifluor™ and TaqMan® technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. *Journal of Cereal Science*, 39(1): 99-107. DOI: org/10.1016/S0733-5210(03)00071-7.

Higuchi R, Fockler, C, Dollinger G, Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, 11(9): 1026. DOI:10.1038/nbt0993-1026.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand, DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16): 7276-7280. DOI: org/10.1073/pnas.88.16.7276.

Holst-Jensen A. 2007. Sampling, detection, identification and quantification of genetically modified organisms (GMOs). In *Food Toxicants Analysis* (pp. 231-268). Elsevier.

Holst-Jensen A, Rønning S B, Løvseth A, Berdal KG. 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375(8): 985-993. DOI:10.1007/s00216-003-1767-7.

Huang CC, Pan TM. 2005. Event-specific real-time detection and quantification of genetically modified Roundup Ready soybean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10): 3833-3839. DOI: org/10.1021/jf048580x.

James C. 2011. *Global status of commercialized biotech/GM crops, 2011* (Vol. 44). Ithaca, NY: ISAAA. ISBN:978-1-892456-52-4.

James CA. 2005. *Preview: global status of commercialized biotech/GM crops*. ISAAA brief.

Kahya S, Buyukcangaz E, Carlı KT. 2013. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine/Veteriner Fakültesi Dergisi*, 32(1): Erişim Adresi: <https://dergipark.org.tr/pub/uluvfd/issue/13516/163496>. 27.09.19.

Kıran F, Osmanağaoğlu Ö. 2011. Gıdalarda Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmaların (GDO) Belirlenmesi. *GIDA*, 36(5): 295-302. Erişim Adresi <https://dergipark.org.tr/pub/gida/issue/6914/92402> 27.09.19.

Koshkin AA, Singh S K, Nielsen P, Rajwanshi VK, Kumar R, Meldgaard M, Wengel J. 1998. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron*, 54(14): 3607-3630. DOI: org/10.1016/S0040-4020(98)00094-5.

Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Dempsy R. 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic acids research*, 28(2): 655-661. DOI: org/10.1093/nar/28.2.655.

Lee SI, Kim SA, Park SH, Ricke SC. 2019. Molecular and New-Generation Techniques for Rapid Detection of Foodborne Pathogens and Characterization of Microbial Communities in Poultry Meat. In *Food Safety in Poultry Meat Production* (pp. 235-260). Springer, Cham.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki RK, Horn GT, Erlich H. 1986, January. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press. DOI:10.1101/SQB.1986.051.01.032.

- Nazarenko I, Pires R, Lowe B, Obaidy M, Rashtchian A. 2002. Nucleic Acids Res 30: 2089–2195. DOI: org/10.1093/nar/30.9.2089.
- Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ. 1997. Nucleic Acids Res 25: 2516–2521. DOI: org/10.1093/nar/25.12.2516.
- Roberts RJ. 1985. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. Nucleic acids research, 13(Suppl), r165. DOI: 10.1093/nar/13.suppl.r165.
- Peng X, Nguyen A, Ghosh D. 2018. Quantification of M13 and T7 bacteriophages by TaqMan and SYBR green qPCR. Journal of virological methods, 252: 100-107. DOI: org/10.1016/j.jviromet.2017.11.012.
- Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R. 1995. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. Genome Research, 4(4): 234-238. ISSN: 1054-9803/9.
- Sherrill CB, Marshall DJ, Moser MJ, Larsen CA, Daude-Snow L, Jurczyk S, Shapiro G, Prudent JR. 2004. J Am Chem Soc 126: 4550–4556. DOI: org/10.1021/ja0315558.
- Taverniers I, Van Bockstaele E, De Loose M. 2004. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different real-time duplex quantitative PCR methods. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378(5): 1198-1207. DOI: 10.1007/s00216-003-2372-5.
- Terry CF, Shanahan DJ, Ballam LD, Harris N, McDowell DG, Parkes HC. 2002. Real-time detection of genetically modified soya using Lightcycler and ABI 7700 platforms with TaqMan, Scorpion, and SYBR Green I chemistries. Journal of AOAC International, 85(4): 938-944.
- Tyagi S, Kramer FR. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nature biotechnology, 14(3): 303. DOI:10.1038/nbt0396-303.
- Zhang D, Guo J. 2011. The development and standardization of testing methods for genetically modified organisms and their derived products F. Journal of Integrative Plant Biology, 53(7): 539-551. DOI: org/10.1111/j.1744-7909.2011.01060.x.