T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Blaptica dubia (SERVILLE, 1838) (BLATTIDAE, BLABERINAE) TÜRÜNDE GERÇEK ZAMANLI RT-QPCR NORMALİZASYONU İÇİN ENDOJEN REFERANS GENLERİN TANIMLANMASI VE EKSPRESYON STABİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emin Ufuk KARAKAŞ
(20199247004)

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK

SİVAS
AĞUSTOS 2022

Emin Ufuk KARAKAŞ 'ın hazırladığı ve **" *Blaptica dubia* (SERVILLE, 1838) (BLATTIDAE, BLABERINAE) TÜRÜNDE GERÇEK ZAMANLI RT-QPCR NORMALİZASYONU İÇİN ENDOJEN REFERANS GENLERİN TANIMLANMASI VE EKSPRESYON STABİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ "** adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı	**Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK** Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	……
Jüri Üyesi	**Doç. Dr. Necati ÖZPINAR** Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi	……..……
Jüri Üyesi	**Doç. Dr. Savaş KAYA** Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	……..……..

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nevcihan GÜRSOY
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

Bütün hakları saklıdır.
Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Emin Ufuk KARAKAŞ, 2022

Çalışma sırasında bana destek olan aileme ve tüm arkadaşlarıma...

ETİK

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

19.08.2022

Emin Ufuk KARAKAŞ

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi ŞEYDA BERK' e çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Öğr. Gör. Ayşe Nur PEKTAŞ' a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her konuda yanımda olan sevgili annem Ayşe KARAKAŞ, bana her zaman yol gösteren sevgili babam Enver KARAKAŞ ve biricik ablam Esnur KARAKAŞ' a teşekkür ederim.

Ayrıca her anımda yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen papatyam Kübra ÖZCAN' a teşekkür ederim.

ÖZET

Blaptica dubia (SERVILLE, 1838) (BLATTIDAE, BLABERINAE) TÜRÜNDE GERÇEK ZAMANLI RT-QPCR NORMALİZASYONU İÇİN ENDOJEN REFERANS GENLERİN TANIMLANMASI VE EKSPRESYON STABİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Emin Ufuk KARAKAŞ

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi ŞEYDA BERK

2022, 39+xv sayfa

Blaptica dubia (Serville, 1838) blaberidae ailesine ait Blaptica cinsi bir böcek türüdür. Bu böcek türü genellikle Dubia hamamböceği, Guyana benekli hamam böceği veya turuncu benekli hamam böceği olarak bilinmektedir. *Blaptica dubia (B. dubia)* Kosta Rika'dan başlayarak Orta ve Güney Amerika'da bulunmaktadır. Fransız Guyanası ve Brezilya'dan Arjantin'e kadar yaygındır. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) gen ekspresyonunu ölçmek için en güçlü ve en güvenilir tekniklerden biridir. Gen ekspresyon analizindeki duyarlılığı, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. İyi bir qPCR analizinin merkezinde doğru yapılmış normalizasyon işlemi bulunmaktadır; aynı zamanda bu analiz izolasyon, ters transkripsiyon ve amplifikasyonun verimliliğindeki mevcut değişiklikleri gözlemleme imkanı sunmaktadır. Bu sayede farklı örnekler arasındaki mRNA konsantrasyonlarının karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Doğru ve güvenilir normalizasyon sonuçları kararlı referans genlerin kullanımına bağlıdır. Bununla birlikte yaygın olarak kullanılan bazı referans genlerinin ekspresyonu farklı deneysel çalışmalarda değişiklik gösterebilmektedir. Referans genler, genel olarak tüm hücrelerde evrensel olarak ifade edilen ve ürünleri *Actin, Tubulin, EF1-α* (Uzama faktörü 1-alfa) ve *GADPH* (Gliseraldehit-3-fosfat) gibi hücre yapısı veya bazal metabolizma için gerekli temel genler olarak bilinmektedir**.** Bu çalışmada, *B. dubia* hamamböceğinin ergin bireylerinde seçilmiş housekeeping genlerinin (*GADPH, RPS18, α-TUB, EF1α, ArgK* ve *ACTB*) ekspresyon stabilitesini değerlendirmek amacıyla beş farklı algoritma (ΔCt yöntemi, geNorm, Bestkeeper, Normfinder ve RefFinder) kullanılarak validasyon

çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çalışmada yer alan altı housekeping gen arasında *GADPH* en kararlı housekeping gen olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda *RPS18* GeNorm ve BestKeeeper algoritmaları tarafından en kararlı gen olarak önerilmiştir. *ACTB*'nin tüm algoritmalar arasında en az seviyede kararlı olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar, beş algoritmaya göre *GADPH* ve *RPS18* genlerinin, *B. dubia* ergin bireylerinde transkript seviyelerinin normalizasyonu için kullanılabileceğini, *ACTB*'nin ise *B. dubia* hamamböceğinin transkript seviyelerinin normalizasyonu için uygun olmadığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Kantitatif RT-PCR, *Blaptica dubia,* Normalizasyon, Referans gen

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF ENDOGENIC REFERENCE GENES FOR REAL TIME RT-QPCR NORMALIZATION IN *Blaptica dubia* (SERVILLE, 1838) (BLATTIDAE, BLABERINAE) AND ASSESSMENT OF EXPRESSION STABILITY

Emin Ufuk KARAKAŞ

Master of Science Thesis

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi ŞEYDA BERK

2022, 39+xv pages

Blaptica dubia (Serville, 1838) is an insect species of the genus Blaptica, belonging to the family Blaberidae. This insect species is commonly known as the Dubia cockroach, the Guyana spotted cockroach, or the orange spotted cockroach. *Blaptica dubia* is found in Central and South America, starting with Costa Rica. It is common from French Guiana and Brazil to Argentina. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is one of the most powerful and reliable techniques for measuring gene expression. It is widely used because of its sensitivity, accuracy and reproducibility in gene expression analysis. Correct normalization is at the heart of a good qPCR analysis; at the same time, this process offers the opportunity to observe current changes in the efficiency of isolation, reverse transcription and amplification. In this way, it allows the comparison of mRNA concentrations between different samples. Accurate and reliable normalization results depend on the use of stable reference genes. However, the expression of some commonly used reference genes may vary in different experimental studies. Reference genes are generally known as essential genes that are universally expressed in all cells and required for cell structure or basal metabolism, such as *Actin, Tubulin, EF1-α* (Elongation factor 1-alpha) and *GADPH* (Glyceraldehyde-3-phosphate). In this study, a validation study was conducted using five different algorithms (ΔCt method, geNorm, Bestkeeper, Normfinder and RefFinder) to evaluate the expression stability of selected housekeeping genes (*GADPH, RPS18, α-TUB, EF1α, ArgK* and *ACTB*) in adult individuals of *B. dubia* cockroaches. According to the results, *GADPH* was determined

as the most stable housekeping gene among the six housekeping genes included in the putative study. Furthermore, *RPS18* was suggested as the most stable gene by GeNorm and BestKeeeper algorithms. *ACTB* has been shown to be the least stable of all algorithms. The results showed that *GADPH* and *RPS18* genes can be used for normalization of transcript levels in *B. dubia* adult individuals, whereas *ACTB* is not suitable for normalization of transcript levels in *B. dubia* cockroaches according to the five algorithms.

Key Words: RT-qPCR, *Blaptica dubia*, Reference genes, Normalization

İÇİNDEKİLER

ETİK ..... **vi**
KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR ..... **vii**
ÖZET ..... **viii**
ABSTRACT ..... **x**
İÇİNDEKİLER ..... **xii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xiii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xiv**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xv**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Hamam Böcekleri (Brunner von Wattenwyl, 1882) 1
1.1.1. İlkin zamanlar 1
1.1.2. Taksonomi 1
1.1.3. Morfoloji, üreme ve gelişme özellikleri 3
1.1.4. Blaberidae ailesi bilinen en büyük hamam böceği türlerini içerir 5
1.2. *Blaptica dubia* (Serville, 1838)- Arjantin Hamam Böceği 6
1.2.1. Genel özellikleri 7
1.2.2. Yaşadığı coğrafya 7
1.2.3. *B. dubia* ile ilgili yapılan güncel çalışmalar 8
1.3. RT-qPCR 9
1.3.1. RT-qPCR ve normalizasyon 14
1.3.2. Böceklerde RT-qPCR verilerinin normalizasyonu için referans genlerin seçimi 16
1.3.3 Gen ekspresyonunun stabilite verifikasyonu için yardımcı programlar 17
1.4. Amaç 19
2. MATERYAL VE METOD **20**
2.1. Örnek Bildirimi 20
2.2. Total RNA İzolasyonu 20
2.2.1 RNA izolasyonu için aşağıdaki adımlar izlenmiştir: 20
2.3. cDNA sentezi ve Real- Time PCR 21
2.3.1. cDNA sentezi 21
2.3.2. cDNA dilüsyonlarının hazırlanması 22
2.3.3. RT-qPCR analizi 22
2.4. Veri Analizi ve İstatistiksel Yöntem 23
3. BULGULAR **25**
3.1. Total RNA'nın Kalitesi 25
3.2. Seçilen Referans Genlerin Ekspresyon Kararlılığı 25
4. TARTIŞMA ve SONUÇ **31**
KAYNAKLAR **34**
ÖZGEÇMİŞ **39**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Morfolojik ve yaşam öyküsü karakterinin kladistik analizine dayanan hamamböceği filogenisi 3
Şekil 2. Yetişkin ve Nimf *Blaptica dubia* Hamamböcekleri 7
Şekil 3. TaqMan ve SYBR Green raportörlerinin iş akışı 13
Şekil 4. Altı aday referans genin standart eğri grafiği (R^2) 26
Şekil 5. Aday housekeeping genlerinin amplifikasyon profilleri. B. dubia' daki housekeeping genleri için qPCR eşik döngüsü değerlerinin (Cq) kutu grafiği. 27
Şekil 6. Genorm, Normfinder, Bestkeeper, ΔCt metod, RefFinder tarafından değerlendirilen altı housekeeping geninin ekspresyon stabilitesi ve sıralaması. 30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1. *Blaptica dubia* (Serville, 1838) turuncu benekli hamam böceğinin taksonomik sıralaması (Schoch vd., 2020). 6
Tablo 2. cDNA sentez bileşenleri.....21
Tablo 3. cDNA inkübasyon süreleri.....22
Tablo 4. RT-qPCR Bileşenleri 23
Tablo 5. RT-qPCR Koşulları.....23
Tablo 6. RT-qPCR analizinde değerlendirilen altı aday housekeeping genine genel bakış 24
Tablo 7. *B. dubia* erişkin bireylerinde aday referans genlerin ifade kararlılığı.....27

KISALTMALAR DİZİNİ

α- TUB	Alfa-tubulin
ACTB	B-aktin
ArgK	Arjinin Kinaz
B. dubia	*Blaptica dubia*
cDNA	Komplementer Deoksiribo Nükleik Asid
Cq	Döngü Eşiği
DNA	Deoksiribo nükleik asid
DTT	Dithiothreitol
EF1α	Uzama Faktörü 1-Alfa
FRET	Floresan rezonans enerji transferi
GADPH	Gliseraldehit-3-fosfat
HKG	Housekeeping Gen
HSP	Isı Şoku Proteinleri
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asid
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asid
RP	Ribozomal protein
RPL	Ribozomal Protein L
RPL32	Ribozomal Protein L32
RPS	Ribozomal protein S
RPS3	Ribozomal protein S3
RPS11	Ribozomal protein S11
RPS15	Ribozomal protein S15
RPS18	Ribozomal protein S18
RPS24	Ribozomal protein S24
RT-qPCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDHA	Süksinit Dehidrojenaz Kompleksi

1. GİRİŞ

1.1. Hamam Böcekleri (Brunner von Wattenwyl, 1882)

Blattodea takımının üyeleri genellikle "Hamamböceği" olarak bilinmektedir. "Hamamböceği" adı İspanyolca "Cucaracha" kelimesinden türetilmiştir. Hamamböcekleri tropikal ve subtropikal iklimlerde gelişmektedir ve ticari ürünlerin taşınması yolu ile dünyaya yayılmaktadır (Gupta ve Chandra, 2019). Hamamböcekleri (Insecta: Blattodea) hemen hemen her karasal habitatta bulunur ve aşırı koşullarda hayatta kalmalarını sağlayan çeşitli morfolojik, fizyolojik ve davranışsal adaptasyonlar göstermektedir (Bohn vd., 2010).

1.1.1. İlkin zamanlar

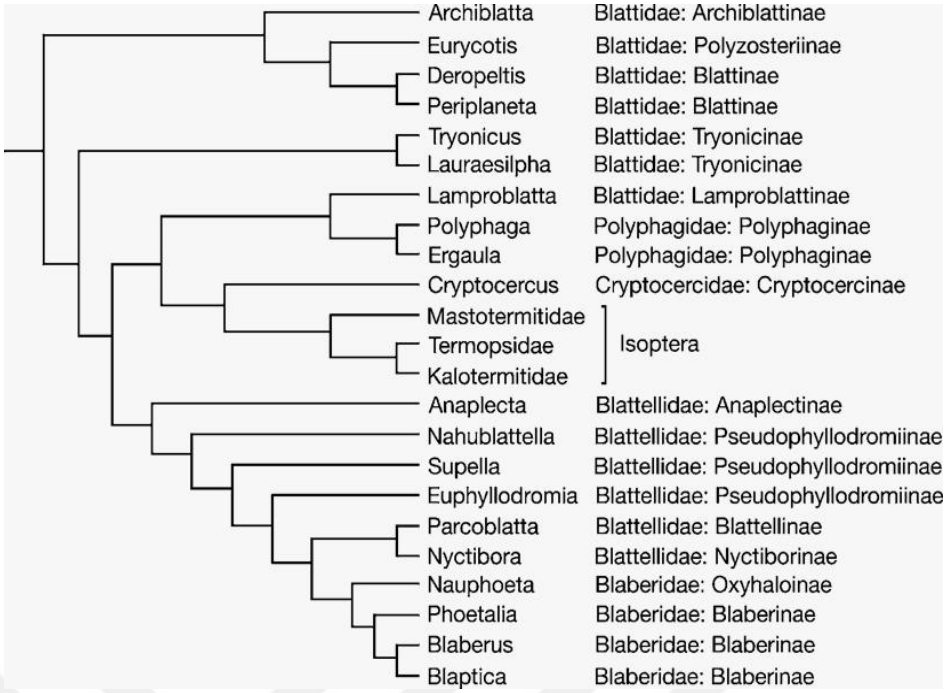
Hamamböcekleri, böcek yaşamının eski ve oldukça başarılı bir formudur. Pensilvaniyen (Üst Karbonifer) zamanlarından beri var olmuşlardır. Fosil kayıtları, evrimsel tarihlerinin başlarında optimum bir vücut formuna ulaştıklarını ve o zamandan beri çok istikrarlı bir grup olarak kaldıklarını göstermektedir (Cochran, 1999). Yaklaşık 359.2 milyon yıl önce Karbonifer'de ortaya çıkmışlardır. Modern hamamböceklerinin ise yaklaşık 100 milyon yıl önce Kretase'de ortaya çıktığına inanılmaktadır (Grimaldi, 2005).

1.1.2. Taksonomi

Hamamböcekleri bazen Blattaria olarak bilinir. Peygamberdeveleri (Mantodea) ile yakından ilişkilidirler ve genellikle Dictyoptera takımını oluşturmak için onlarla (alt takımlar olarak) gruplandırılırlar. Termitler (Isoptera) Dictyoptera sırasına yerleştirilebilir ve bazıları tarafından sosyal hamamböceği olarak kabul edilir. Çoğu hamamböceği türü tropikal ve subtropikal bölgelerde yaşar ve dünya çapında yaklaşık 4000 türü olduğu tahmin edilmektedir. Bunlardan çok azı (yaklaşık 30 tür) başarılı bir şekilde kentsel yaşama girmektedir. Kentsel yaşama adapte olanlar ise çoğunlukla gizlenen ve esas olarak geceleri ortaya çıkan böceklerdir (Grimaldi, 2005). McKittrick 1964' te, çok çeşitli türlerde dış genital organları, yumurtlama davranışını ve mahsul yapısını incelemiştir (McKittrick, 1964). Hamamböceği evriminin biri Blattoidea üst familyasına (Cryptocercidae ve Blattidae familyaları) ve diğeri Blaberoidea üst familyasına (Polyphagidae, Blattellidae ve Blaberidae familyaları) yol açan iki hatta ilerlediğini öne sürmüştür. Roth (Roth, 2003) McKittrick'in (McKittrick, 1964)

çalışmasına dayanarak, altı hamamböceği ailesini tanımlamıştır: Polyphagidae, Cryptocercidae, Nocticolidae, Blattidae, Blattellidae ve Blaberidae; hamamböceklerinin çoğunluğu son üç aileye girmektedir (Wu, 2013).

Buna karşın bazı araştırmacılar üçü haşere türlerinin çoğunu içeren beş hamamböceği ailesi vardır görüşünü ortaya atmışlardır (Atkinson, 1991). Haşere türleri: Blattidae, Blattellidae ve Blaberidae' dir**.** Cryptocercidae familyasındaki türler, termitlerde bulunanlara benzer bağırsak simbiyontlarına sahip olmaları ve çürüyen kütüklerde aile grupları halinde yaşamaları bakımından sıra dışıdır. Polyphagidae ailesinin üyeleri ise kumda hızla hareket edebildikleri kurak bölgelerde yaşayanları içerir. Bu iki ailedeki türler nadiren zararlıdır. Blattidae ailesi, dünyanın büyük bölümünde en yaygın peridomestik zararlılar olan nispeten büyük hamamböceklerini içerir (Şekil 1.). Blattellid hamamböceklerinin uzunlukları 25 mm'den kısa (örneğin, Supella ve Blattella) ile 35-40 mm (örneğin, Periplaneta ve Parcoblatta spp.) arasında değişir. Parcoblatta türleri vahşidir, ara sıra evleri işgal eder, ancak nadiren iç mekanlarda ürerler. Blaberid hamamböceklerinin boyutları büyük ölçüde değişkenlik gösterir ve bir yetişkin olan yeşil Küba Hamamböceği ve Kuzey Amerika'da partenogenetik olan Surinam hamamböceği gibi daha sıra dışı türlerden bazılarını içerir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ortaya çıkan neredeyse tüm blaberidler subtropikal bölgelerle sınırlıdır ve küçük tıbbi veya veterinerlik önemi vardır. Yetişkinler için taksonomik sınıflandırma McKittrick (McKittrick, 1964), Cornwell (Cornwell, 1968), Roth ve Helfer (Helfer, 1963) tarafından sağlanmıştır (Brenner ve Kramer, 2019).



Şekil 1. Morfolojik ve yaşam öyküsü karakterinin kladistik analizine dayanan hamamböceği filogenisi (Bell vd., 2007)

1.1.3. Morfoloji, üreme ve gelişme özellikleri

Hamamböcekleri temel ata biçimlerini korumuşlardır. Blattodea, hamamböceği ve termitleri içerir. Ancak hamamböcekleri kanat büyüklüğü ve damar yapısı, ısıran-çiğneyen ağız parçaları ve belirgin cerci gibi morfolojik karakterlerle termitler ve diğer böcek takımlarından ayırt edilir(Brenner ve Kramer, 2019). Genişletilmemiş arka femora, tipik olarak sekiz veya daha fazla segmentli cerci, dorsoventral olarak düzleştirilmiş ve genellikle oval bir gövdeye ve nispeten büyük bir pronotum tarafından yukarıdan büyük ölçüde gizlenmiş bir kafaya sahip olmaları ile diğer ortopteroid böceklerden farklıdırlar. Hamamböcekleri paurometabolous böceklerdir. Olgunlaşmamış olanlar, gelişmemiş cinsel organları ve tam gelişmiş kanatları olmaması dışında, genel olarak yetişkinlere benzer görünümdedir (Brenner ve Kramer, 2019).

Hamamböcekleri, tamamlanmamış bir metamorfoza sahip böceklerdir. Bu, yaygın olarak karşılaşılacak üç aşama olduğu anlamına gelir; yumurta, nimf ve yetişkin. Nimfler, büyüklükleri ve kanatlarının ve cinsel organlarının gelişmemiş olması dışında genellikle yetişkinlere benzer. Birkaç türde partenogenez bildirilmesine rağmen, hamamböceklerinde üreme tipik olarak cinseldir (Brenner ve Kramer, 2019). Hamamböceği yumurtaları gruplar halinde bırakılır ve etrafı az çok sert koruyucu bir örtü ile çevrilidir. Tüm yapıya ooteka veya yumurta kesesi denir. Ooteka dişi tarafından

oluşturulur ve tamamlandıktan sonra uygun bir yerde biriktirilir, dişi tarafından dışarıdan taşınır (yumurtlayan türler) veya dişinin vücudu içinde taşınır (canlı türler). Dişinin bu konuda izlediği yol, bir tür özelliğidir ve ootekanın formu üzerinde bir etkiye sahiptir. Canlı türler, omurganın olmadığı veya gelişmediği esnek, ince duvarlı yumurtalıklar üretme eğilimindedir. Yumurtlayan türler, tam olan ve birçok durumda kurumaya karşı oldukça dirençli olan ooteka üretirler. Doğal dış ortamlarda yumurtalarını bırakan türler, yumurtayı almak için toprakta, çürüyen ahşapta veya diğer substratlarda delikler hazırlayabilir. Bir ootekanın bırakılmasından sonra, dişi genellikle açıklığı uygun bir malzeme ile kaplar. Bununla birlikte, kullanılabilir substrat malzemelerinin sınırlı olduğu durumlarda, normal olarak ootekanın bir yüzeye gevşek bir şekilde birikmesi veya yapışması meydana gelir (McKittrick, 1964). Bu yumurta keselerinde serbest yaşayan aktif nimfler ortaya çıkar. Yetişkin aşamasına ulaşmadan önce bir dizi evre ve tüy dökme yoluyla büyürler. Bu dönemde meydana gelen en göze çarpan değişiklik kanatların görünümüdür. Ancak bazı türlerde kanatlar ya küçülür ya da yoktur (Cochran, 1999).

Çoğu tür, tüm Periplaneta türleri ile Doğu ve kahverengi bantlı hamamböcekleri dahil olmak üzere yumurtacıdır (Brenner ve Kramer, 2019). Alman hamam böceği de yumurtlayıcıdır, ancak dişi, yumurtadan çıkmadan birkaç saat öncesine kadar genital odadan çıkıntı yapan ootekayı taşır. Ooteka, Periplaneta sp.'den daha yumuşaktır ve genital keseden su ve besinlerin alınmasına izin verir. Blaberus sp. gibi birkaç hamamböceğinin dişileri ve Surinam hamamböceği, ekstrüde edilen, döndürülen ve daha sonra genital keseye geri çekilen bir ooteka üretir. Yumurtalar, yumurtadan çıkana kadar dahili olarak kuluçkaya yatırılır. Hawaii'de bir haşere türü olan Diploptera punktata, yumurtaların henüz genital kese içindeyken yumurtadan çıktığı tek hamamböceğidir. Embriyogenez, türe bağlı olarak 1-8 hafta sürer (Brenner ve Kramer, 2019).

Nimf dönemlerinin sayısı, türe, besin kaynaklarına ve mikro iklime bağlı olarak 5 ila 13 arasında değişir. Periplaneta türleri ve diğer büyük hamamböcekleri için Alman hamamböcekleri için 1 yıldan uzun süre, nimf stadia yoluyla zararlı türlerin gelişimi için 6-7 hafta gerekir. Tipik olarak nimfler, büyük ölçüde kümelenme feromonları tarafından yönetilen güçlü kümelenme eğilimleri sergiler(Brenner ve Kramer, 2019). Bu feromonlar lokomotor inhibitörleri olarak hareket ederler; hamamböcekleri feromonu algıladıklarında nispeten sabit hale gelirler. Çeşitli türler üzerinde yapılan araştırmalar, nimfler tek başına değil, gruplar halinde yetiştirildiklerinde yetişkin aşamasına gelişimin daha hızlı olduğunu göstermiştir. Ancak, toplamanın biyolojik bir maliyeti vardır; gruplar

halinde yetiştirilenler tipik olarak daha küçüktür ve yamyamlık meydana gelebilir. Hamamböceklerinin ömrü birkaç haftadan 1 yıla kadar değişir (Brenner ve Kramer, 2019).

Hamamböceklerinde çiftleşme, genellikle seks feromonları tarafından kolaylaştırılan kur yapma davranışından önce gelir. Bazı türlerde, erkekleri çekmek ve yönlendirmek için bakire dişiler tarafından uçucu bileşiklerin bir karışımı üretilir (örneğin, Periplaneta sp. ve kahverengi bantlı hamamböceği)(Brenner ve Kramer, 2019). Alman hamamböceğinde, seks feromonu, dişinin derisinin erkeğin antenleri tarafından palpasyonundan sonra erkeklerin kur yapmasını sağlayan uçucu olmayan ve uçucu kütikül bileşenlerinin bir karışımıdır(Brenner ve Kramer, 2019). Erkekte flört başladığında, dişiden uzaklaşır ve sırt tergal bezlerini açığa çıkarmak için kanatlarını kaldırır; Dişi bu bezlerden gelen feromonlarla beslenirken, erkek bir çift kaudal kıskaçla onun cinsel organını kavrar. Çoğu tür, uçtan uca bir konumda çiftleşir. Takip eden bir saat içinde, bir spermatofor oluşur ve erkekten dişinin genital odasına geçer. İlk gonotropik döngüden sonra dişilerin sadece %20'si yeniden çiftleşir(Brenner ve Kramer, 2019). Hamamböcekleri ekolojik olarak evcil, peridomestik veya vahşi olarak kategorize edilebilir. Evcil türler neredeyse sadece iç mekanlarda yaşar ve hayatta kalabilmek adına bazı kaynaklara (yiyecek, su ve barınak) ihtiyaç duyarlar ve bu yüzden büyük ölçüde insanlara bağımlıdırlar. Nadiren kendilerini dışarıda tutabilirler. Bu grup en az tür içermesine rağmen insan sağlığı için en büyük endişeyi oluşturmaktadır(Brenner ve Kramer, 2019). Yerli türler arasında Alman ve kahverengi bantlı hamamböcekleri bulunur. Peridomestik türler, insan yerleşimi içinde veya çevresinde hayatta kalan türlerdir(Brenner ve Kramer, 2019). Hayatta kalmak için insanlara ihtiyaç duymasalar da, uygarlığın olanaklarından yararlanmada ustadırlar. Bu grup, Amerikan, Avustralya, kahverengi ve dumanlı kahverengi hamamböceği (tümü Periplaneta sp.), doğu hamamböceği ve Florida orman hamamböceği ile temsil edilir. Yabani türler, hayatta kalmanın insanlardan bağımsız olduğu türlerdir. Bu grup dünyadaki tüm türlerin %95'inden fazlasını içerir (Brenner ve Kramer, 2019).

1.1.4. Blaberidae ailesi bilinen en büyük hamam böceği türlerini içerir

Blaberidae ailesi (1020 tür), en son gelişen hamamböceği ailesidir ve en kapsamlı adaptif radyasyona maruz kalandır(Wu, 2013). Grup öncelikle tropikaldir ve en büyük hamamböceği türlerini içerir. Üyeleri genellikle kütüklerin altında, humusta vs. bulunur,

ancak bazı türler ağaçta yaşar. *Pycnoscelis surinamensis* Linnaeus (Surinam hamamböceği), *Rhyparobia maderae* Fabricius (Madeira hamamböceği) ve *Nauphoeta cinerea* Olivier (ıstakoz hamamböceği) gibi birkaç tür zaman zaman insanlarla ilişkilendirilir. *P. surinamensis* seralarda, daha sıcak iklimlerde veya ekin köklerine ciddi şekilde zarar verebileceği açık havada bulunabilir; tavuk kümeslerinde de bulunur ve tavuk göz kurdu nematodu için bir ara konak olduğu bilinmektedir (Gillott, 2005). Blaberidae'de çok popüler evcil hamamböceği türleri (*B. dubia* dahil olmak üzere*)* vardır. Tıslayan hamamböceği olarak da bilinen Madagaskar tıslayan hamamböceği (*Gromphadorhina portentosa Schaum*) de Blaberidae ailesi üyesidir ve yetişkin olarak 5,1-7,6 cm'ye ulaşan en büyük hamamböceği türlerinden biridir (Wu, 2013).

1.2. *Blaptica dubia* (Serville, 1838)- Arjantin Hamam Böceği

Blaptica dubia (Serville, 1838) Blaberidae ailesine ait *Blaptica* cinsi bir böcek türüdür (Tablo 1.).

Tablo 1. *Blaptica dubia* (Serville, 1838) turuncu benekli hamam böceğinin taksonomik sıralaması (Schoch vd., 2020).

TİP	**Canlılık** (Biota)
ALAN	Ökarya
ALEM	Metazoa Linnaeus,1758- **Hayvan**
KLAD	Opisthokonta
KLAD	Eumetazoa Bütschli,1910
KLAD	Bilateria Haeckel,1874
KLAD	Protostomia Grobben,1908
KLAD	Ecdysozoa Aguinaldo, Turbeville, Linford, Rivera, Garey, Raff and Lake, 1997
KLAD	Panarthropoda Nielsen,1995
ŞUBE	Arthropoda Latreille,1829-**Eklem Bacaklılar**
KLAD	Mandibulata
KLAD	Pancrustacea Zrzavy and Stys,1997
ALT ŞUBE	Hexapoda Blainville,1816-**Altı ayaklılar**
SINIF	Insecta Linnaeus,1758- Böcek
KLAD	Dicondylia Henning,1953
ALT SINIF	Pterygota Brauner,1885- Kanatlı **böcekler**
İNFRA SINIF	Neoptera Martynov,1923- **Modern, kanat katlayan böcekler**
KOHORT	Polyneoptera
ÜST TAKIM	Dictyoptera
TAKIM	Blattodea Brunner von Wattenwyl,1882- Hamam **böcekleri, termitler**
ÜST AİLE	Blaberoidea
AİLE	Blaberidae Brunner von Wattenwyl,1865 **Dev Hamam Böceği**
ALT AİLE	Blaberinae Saussure, 1864
CİNS	Blaptica Stal, 1874
TÜR	*Blaptica dubia* (Serville, 1838) **Turuncu benekli hamam böceği, Guyana benekli hamam böceği veya Arjantin odun hamam böceği**

1.2.1. Genel özellikleri

Blaptica dubia, yaklaşık 4,0-4,5 cm'ye kadar büyüyen orta büyüklükte bir hamam böceği türüdür (Wu vd., 2017). Cinsel olarak dimorfiktirler; yetişkin erkeklerin vücutlarını kaplayan tam kanatları varken, dişilerin sadece küçük kanat sapları vardır, tegminaları (ön kanatları) vücut uzunluklarının dörtte biri kadardır. Yetişkinler koyu kahverengiden siyaha, biraz daha açık turuncu nokta ya da şerit desenine sahiptir (Şekil 2.) ve bazen sadece parlak ışıkta görülebilmektedir. Renklenme, çevreye ve beslenme koşullarına göre bir koloniden diğerine biraz farklılık gösterir. *B. dubia* sık yumurtlamaya yatkın bir canlıdır, erken yaşam evrelerinde doğum yapar ve uygun koşullar altında ayda 20-40 nimf doğurabilir (Wu, 2013; Yi vd., 2013; Bosch vd., 2014).

1.2.2. Yaşadığı coğrafya

Bu böcek türü Kosta Rika'dan başlayarak Orta ve Güney Amerika'da bulunmaktadır. Dubia hamamböceği Fransız Guyanası ve Brezilya'dan Arjantin'e kadar yaygındır. Belgelendirilmiş kayıtlı örneklerde Brezilya, Arjantin ve Uruguay'da bulunmuştur. Tür, Orta Asya, Kafkas Dağları, Kuzey-Doğu Afrika'da bulunur ve dağılımı şu ülkeleri içerir: Afganistan, Azerbaycan, Mısır, Hindistan, İran, Irak, İsrail, Ürdün, Keşmir, Libya, Filistin, Pakistan, Suudi Arabistan, Sudan, Birleşik Arap Emirlikleri ve Amerika Birleşik Devletleri (Mariod vd., 2017).

Blaptica dubia Serville (yaygın olarak Dubia hamamböceği, Guyana benekli hamamböceği veya Turuncu benekli hamamböceği olarak bilinir), genellikle evcil hayvan olarak işlenen bir hamamböceğidir (Wu vd., 2017).

Şekil 2. Yetişkin ve Nimf *Blaptica dubia* Hamamböcekleri(Mariod vd., 2017)

Diğer böceklerle karşılaştırıldığında, bu böcek türü yumuşak gövdelidir ve cırcır böcekleri gibi birçok böceğe kıyasla daha fazla et oranına (Alamer, 2013) sahiptir. Aynı zamanda diğerlerine benzer veya daha yüksek oranda protein içeriğine sahiptir. Ancak daha düşük seviyelerde esansiyel amino asitler içermektedir (Yi vd., 2013). Bu özelliğinden dolayı *B. dubia*, amfibi ve sürüngen meraklıları arasında giderek daha popüler bir yiyecek haline gelmişlerdir (Wu vd., 2013).

1.2.3. *B. dubia* ile ilgili yapılan güncel çalışmalar

Yapılan bir çalışmada *B. dubia*'nın toplam lipid içeriği %7.6, ham protein içeriği ise %19.3 bulunmuştur(Tzompa-Sosa vd., 2014). *B. dubia*'nın ölçülen bu protein içeriği sığır eti (%18.4), tavuk (%22.0) ve balık (%18.3) ile karşılaştırılabilir olmakla birlikte kuzu (%15.4) ve domuz (%14.6)'dan daha yüksek bulunmuştur. Ancak soya (%36,5) ile karşılaştırıldığında daha düşük miktarda olduğu gözlenmiştir (Tzompa-Sosa vd., 2014). Doymuş yağ asitlerine (%23.30) göre yüksek miktarlarda doymamış yağ asitleri (%76.31) bulunmuştur (Rumpold ve Schlüter, 2013). *B. dubia* lipid ekstraktlarında en bol bulunan doymamış yağ asitleri C18:1 cis9 ve C18:2 cis9,12 idi; en bol bulunan doymuş yağ asitleri C16:0 olarak rapor edilmiştir. Bu üç yağ asidi sırasıyla 51.4, 17.4 ve 18.1 g/100 g olarak bulunmuştur; Sağlığa yararlı olan w-3 yağ asitleri, sulu ekstraksiyondan elde edilen lipidlerde en bol bulunanlar olarak rapor edilmiştir. Ayrıca ekstraksiyon yöntemi, lipitlerin miktarını, türlerini ve böcek lipit ekstraktlarının yağ asitleri profilini etkilediği gözlemlenmiştir. Daha yüksek omega-6/omega-3 yağ asitleri oranları Folch yöntemi ile ekstrakte edilirken, sulu ekstraksiyon en düşük orana sahip olduğu için en yüksek omega-3 yağ asitleri içeriğine sahip olduğu bulunmuştur (Tzompa-Sosa vd., 2014).

Diğer bir çalışmada ise *B. dubia*'nın farklı büyüme evrelerinde besin bileşimini belirlemek için bir çalışma hazırlanmış ve yem olarak *B. dubia* kullanılarak hayvan modelinde bir ön sindirilebilirlik testi yapılmıştır (Yee vd., 2015). Hazırlanan *B. dubia* yem peletlerinde ham proteinin görünür sindirilebilirliğini değerlendirmek için üç evcil kedi kullanılarak bir ön protein sindirilebilirlik denemesi yapılmıştır Sonuç olarak yüksek ham protein sindirilebilirliği (%81.57 ± %3.30) sonucunu elde etmişlerdir. Bu nedenle, *B. dubia* test edilmiş yem peletleri, özellikle evcil hayvan endüstrisinde hayvan yemi olarak alternatif bir protein kaynağı olarak kullanılabilir olduğunu önermişlerdir (Yee vd., 2015).

Pürüzsüz yüzeylere zıplayamamaları veya tırmanamamaları, nispeten yavaş hareket etmeleri ve uçmalarının nadir olması böceğin kolaylıkla tutulması veya üremesini

kolaylaştırmaktadır (Friederich ve Volland, 2004). Ayrıca, cırcır böceklerinin aksine sessizdirler ve tropikal çevresel gereksinimleri daha soğuk ve daha kuru iklimlerden kaçışların oluşma olasılığını azaltmaktadır (Friederich ve Volland, 2004). *B. dubia* , birçok hamamböceğine kıyasla nispeten daha az koku üretmesine rağmen insanlarda alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir (Friederich ve Volland, 2004; Alamer, 2013)..

Sıcaklık en önemli çevresel faktörlerden biridir. Böceklerin coğrafi dağılımını ve yerel oluşumları etkilemektedir. Sıcaklığın ektotermlerin gelişimi ve büyümesi üzerindeki etkisi ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır (Dixon vd., 2009). *Blaptica dubia'*nın gelişme oranını kontrol etmek ve belirli bir durumda optimum yetiştirme sıcaklığını ayarlamak için *B. dubia'nın* sıcaklığa bağlı gelişimi ve termal hassasiyeti araştırılmıştır (Wu vd., 2017). Buna ek olarak bu çalışmanın sonucunda *açık* bir şekilde *B. dubia'nın* en hızlı büyüme ve gelişmeyi 30°C'de gösterdiği, sonucunu elde etmişlerdir (Wu vd., 2017).

Bir diğer çalışmada ise *B. dubia* insanlar da dahil olmak üzere çok çeşitli konakçı hayvanda ciddi hastalığa neden olan zoonotik bir bakteriyel patojen *F. tularensis* patogenezinin biyomedikal araştırmalarında, memelilerin kullanımıyla ilişkili yasal gereklilikler olmadan daha fazla deneysel verime izin veren, uygun maliyetli bir alternatif olarak kullanılmıştır (Eklund vd., 2017). Geçmişte çalışılmış böcek konukçularının sıcaklık kısıtlaması, kısa yaşam süreleri ve immünolojik durumu ile ilgili endişeler sebebiyle çalışmalardaki verimleri sınırlı olmuştur. Ancak bu çalışmada, turuncu benekli hamam böceği (*Blaptica dubia*), bu sınırlamaların üstesinden gelir niteliktedir ve deneyin bir aşamasında *F. tularensis* tarafından kolayca enfekte edilebilmiştir. Daha sonra ilgili yöntem ve tekniklerle laboratuvar çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanmayı başarmışlardır (Eklund vd., 2017).

1.3. RT-qPCR

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) gen ekspresyonunu ölçmek için en güçlü ve en güvenilir tekniklerden biridir. Gen ekspresyon analizindeki duyarlılığı, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qPCR), mRNA'nın tespiti ve nicelleştirilmesi için tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir (Bustin, 2000). Özellikle tek bir genin mRNA ekspresyon seviyelerinde küçük sapmalar belirlenirken genellikle altın standart olarak tanımlanmıştır(Scharlaken vd., 2008; Strube vd., 2008).

Bununla birlikte, gerçek zamanlı PCR (qPCR) tekniği, diğer yöntemlerle elde edilen verileri doğrulamaya hizmet eden en doğru ve en güvenilir yöntem olarak kabul edilir. Hassasiyeti, reaksiyon ilerlemesini gerçek zamanlı algılanması, analiz hızı ve numunede incelenen materyalin hassas ölçümü RT-qPCRr ile çalışmayı avantajlı hale getirmiştir (Gachon vd., 2004). Ayrıca, bazı genler için ekspresyon seviyesi o kadar küçüktür ki, qPCR bu kadar az sayıda mRNA kopyasını tespit edebilen tek teknik haline gelmiştir (Kozera ve Rapacz, 2013).

Polimeraz zincir reaksiyonu 1983 yılında Kary Mullis ve meslektaşları tarafından geliştirilmiştir (Saiki vd., 1988). Matrikse ve ona bağlanan tasarlanmış primerlere dayalı olarak genetik materyalin logaritmik amplifikasyonunu içerir. Reaksiyon, ilgili sıcaklıklarında döngüsel olarak tekrarlanan üç reaksiyon yoluyla ilerler. Bunlar: matris denatürasyonu, primer hibridizasyonu ve uzama döngüsüdür (Gachon vd., 2004). Bu çalışmalar için, gen ekspresyonunun kantitatif analizinden önce, ters transkriptazın (kısaltılmış RT-ters transkripsiyon) PCR reaksiyonunun uygun bir aşaması ve ardından genetik bilginin izole edilmiş mRNA'dan cDNA'ya transkripsiyonu gelmektedir (Bustin, 2000).

RT-qPCR'nin ilk aşamasında en yavaş adım DNA replikasyonudur, çünkü şablon miktarı sonraki aşamalara kıyasla nispeten küçüktür ve başlatıcıların tamamlayıcı bölgeleri bulmak için daha fazla zamana ihtiyacı vardır (Studzińska vd., 2008). Reaksiyon, logaritmik olarak adlandırılan bir sonraki aşamaya ne kadar hızlı ulaşırsa, örnekte hedef dizinin daha fazla şablonu bulunur. Floresansın arka plan seviyesini aşmaya başladığı döngü, döngü eşiği (Ct) olarak adlandırılır ve sonraki logaritmik fazın başlangıcıdır (Kozera ve Rapacz, 2013).

RT-qPCR'de, floresan boyaların PCR ürünü ile bağlanmasıyla tetiklenen floresandaki artış ölçülerek, reaksiyon sırasında amplifikasyon ürünlerinin birikimi sürekli olarak belirlenmektedir (Rodríguez vd., 2015). Floresan sinyali, PCR ürün birikimi ile orantılı olarak artar. Daha sonra döngü sayısına karşı floresan grafiğini çizen standart bir eğri oluşturulabilmektedir. Eşik döngüsü (Ct) olarak da adlandırılan niceleme döngüsü (Cq), reaksiyonun floresan sinyalinin eşiği geçmesi için gereken döngü sayısıdır (Rodríguez vd., 2015).

Gerçek Zamanlı RT-PCR testlerinde, numune tüpünde bulunan floresan boyalardan sinyal elde edilir ve DNA amplifikasyonuna bağlı olması beklenir. Floresan sinyalinin

temelindeki algılama kimyaları, tasarımları, hedef uygulamaları ve özellikleri bakımından çok çeşitli olabilir (Thellin vd., 2009).

2005 yılında Wong ve Medrano 7 ana tespit kimyasını inceledi ve tartıştı:

1. DNA interkalasyon boyaları (SYBR Green)
2. Hibridizasyon probları (LightCycler, FRET: Floresan Rezonans Enerji Transferi)
3. Hidroliz probları (TaqMan probu, Scorpion ve moleküler boncuklar)
4. 4 tip firkete probları (moleküler işaretçiler, akrepler, Sunrise™ primerleri ve LUX™ florojenik primerler (Wong ve Medrano, 2005; Thellin vd., 2009).

Her tespit kimyası kendi içinde teknolojiye, ihtiyaç duyulan primer ve probların sayısına, multipleks yeteneklerine, spesifik oligonükleotit ihtiyacına, alelik ayrım olasılığına ve maliyetine göre değerlendirilmiştir. Daha yakın zamanda VanGuilder ve ark. tartışmalarını şu kimyalardan 5'ine odakladılar: DNA interkalasyon boyaları, hibridizasyon probları, hidroliz probları, moleküler işaretçiler ve LUX™ florojenik primerler. Diğer özelliklerin yanı sıra, özellikle erime eğrisi analizi ihtiyacını dikkate aldılar (VanGuilder vd., 2008). Tutulabilecek olan, elimizdeki floresan kimyalarının gerçek seçiminin bize farklı yeteneklere sahip çeşitli teknolojik seçenekler sağladığıdır. Bu nedenle, Real-Time RT-PCR testleri planlanırken kullanılacak saptama kimyası dikkatle düşünülmelidir. (Thellin vd., 2009). RT-qPCR sırasında floresan izleme, SYBR Green veya Eva Green dahil spesifik olmayan boyalar veya hidroliz probları, floresan rezonans enerji transferi (FRET) probları, moleküler işaretçiler ve Scorpion primerleri (Rodriguez-Lázaro) dahil olmak üzere floresan boyalarla etiketlenmiş diziye özgü primerler veya problar kullanmaktadır (Rodríguez-Lázaro ve Hernández, 2013).

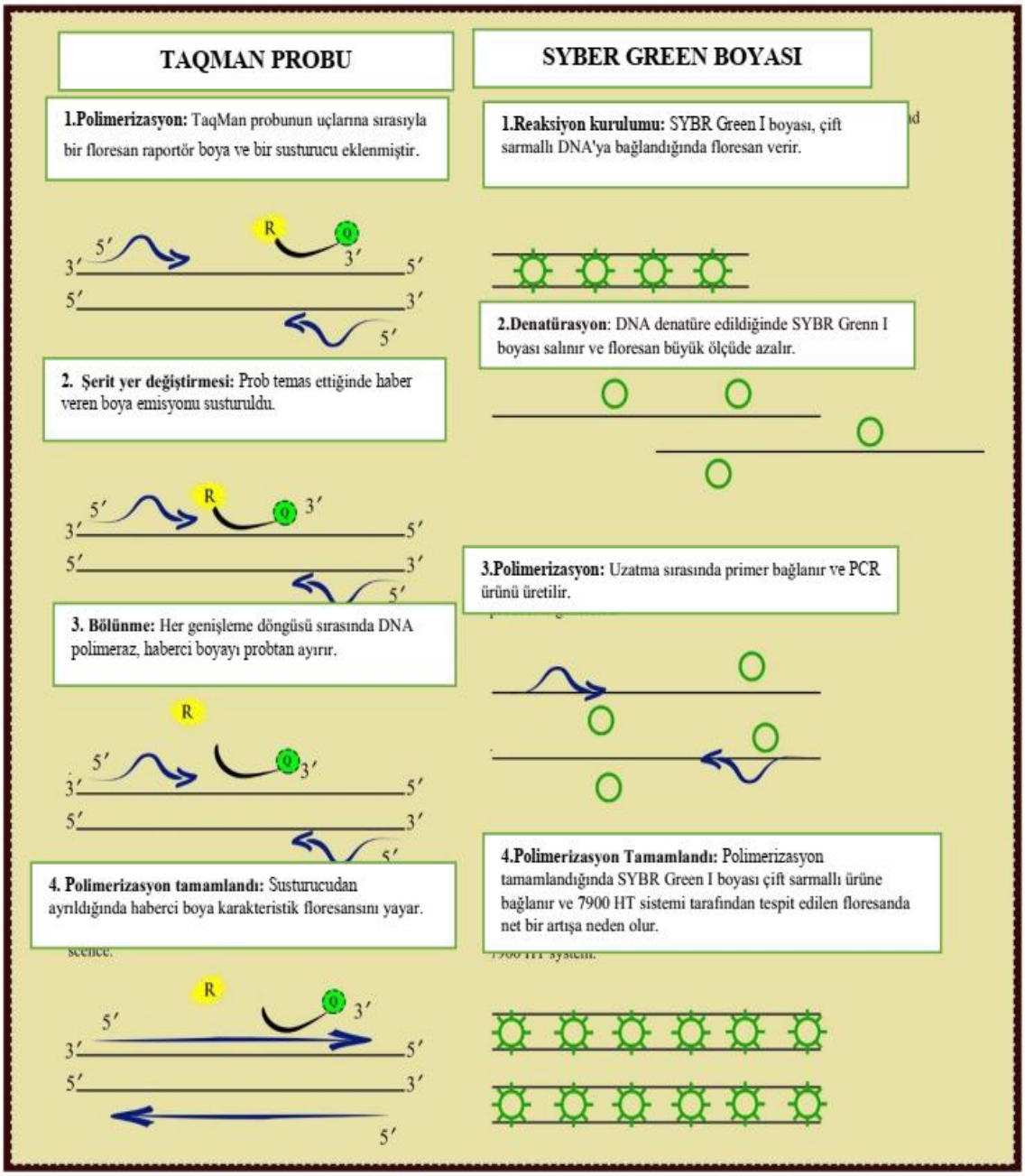
SYBR Green ve TaqMan metodolojileri RT-qPCR' de en sık kullanılanlardır(Şekil 3.). Spesifik olmayan SYBR Green boyası, çift sarmallı DNA ile bağlanır (Kubista vd., 2006), TaqMan tahlillerinde, etiketli prob spesifik olarak tamamlayıcı hedef dizisine bağlanmaktadır. SYBR Green'in amplikona spesifik bağlanması, son PCR döngüsünden sonra elde edilen amplifiye PCR ürünlerinin erime eğrisinin analizi ile doğrulanmalıdır. SYBR Green yöntemi TaqMan yönteminden daha basittir bu sayede rutin analizlerde maliyetleri azaltabilir (Rodríguez vd., 2011).

SYBR Green Floresan Boya

Yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar kullanılarak, amlifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan "cyber green" miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. SYBR green çift zincirli DNA'nın minor oluğuna bağlanır. Maliyet düşüktür ve genellikle tarama amacıyla kullanılır. Spesifik değildir. Bir primer seti ya da prob seti için bütün PCR ürünlerinin aynı erime sıcaklığına sahip olması beklenir. Kontaminasyon, spesifik olmayan bir çoğalma ve primer dimer oluşumu gibi kalıntılar farklı erime sıcaklığına sahiptirler. Ayrıc primer dimerlerinin engellenebilmesi icin dikkatli primer tasarımı yapılmalıdır. DNA'ların erime sıcaklığı grafiklerinden faydalanarak spesifik olmayan bağlanmaları ve primer dimerleri saptamak mümkündür. (Rodríguez vd., 2015)

Taqman probu

Thermus aquaticus'den izole edilmiş ısıya dayanıklı bir enzimdir. 5u/µl konsantrasyona sahiptir, DNA'yı 72°C'de çoğaltma özelliğindedir. Enzim ortamda magnezyum iyonlarının varlığında 5'-3' yönünde aktivite göstermektedir, ayrıca 5'-3' ekzonukleaz aktivitesine de sahiptir. Öncelikle Taqman problar bağlanır, sonra PCR evrelerinden biri olan bağlanma (annealing) evresinde primerler bağlanır ve Taq polimeraz ile uzama gerçekleşir. Taq polimerazın 5'ekzonükleaz aktivitesi sayesinde proba bağlı florofor kesilir ve floresan açığa çıkar. TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Prob'un 5' ucunda raportör florokrom (6-karboksifloresin =6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6- karboksitetrametil-rodamin =TAMRA) bulunur. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (Thellin vd., 2009).



Şekil 3. TaqMan ve SYBR Green raportörlerinin iş akışı (Shakeel vd., 2018)

RT- qPCR'da Önemli hususlar:

1. Primer Tasarımı
2. Çoğalma verimi (SYBR Green veya TaqMan probu gibi)
3. Referans Gen Seçimi (*GADPH*, *ACTB* gibi)

RT-qPCR ile gen ekspresyonunun analiz edilmesindeki başarı, kullanılacak tasarlanan primerlerin ve probların uygunluğuna bağlıdır. Tekniğin özgüllüğü, primerlerin tamamlayıcı hedeflerine bağlanmasıyla yakından alakalıdır. unun için uygun hedef nükleik asit dizilerinin seçimi, RT-qPCR için primerlerin ve probların tasarlanmasında önemli bir adımdır (Sobhy ve Colson, 2012). Primer tasarımı, RT-qPCR'nin bir veya iki adımda gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğine bağlıdır ve mutlak veya göreceli olabilen RT-qPCR verilerini analiz etmek için seçilen yöntem hakkında bilgi verir. RT-qPCR'de kullanılmak üzere tasarlanan primerler ve problar, yalnızca RNA dizilerinin amplifikasyonuna ve saptanmasına izin verecek şekilde bir ekzon-ekzon bağlantı birleşimini kapsamalı veya herhangi bir genomik DNA kontaminasyonunu önlemek için aynı ekzonu kapsamalıdır (Wang ve Seed, 2003). Primerlerin RT-qPCR'de kullanılmadan önce karşılaması gereken diğer kriterler arasında amplikon uzunluğu (tercihen <80 bp), erime sıcaklığı (optimum değerler: 55–60 °C), primer ve prob uzunluğu (tercihen 20 bp) ve GC içeriği (%30-80) yer alır. Ek olarak, kendini tamamlayıcı dizilerin varlığı tavsiye edilmez ve primer-dimer ve firkete oluşumu en aza indirilmelidir. Ayrıca dejenere nükleotitler, primerlere ve problara dahil edilmemelidir (Rodríguez vd., 2015).

1.3.1. RT-qPCR ve normalizasyon

RT-qPCR son 10 yılda böcek türlerinde genom/transkriptom ekspresyon çalışmalarında giderek daha fazla kullanılmaktadır. Ayrıca, birçok böcek türünde çeşitli biyotik ve abiyotik deney koşullarında uygun referans genlerin tanımlanması ve doğrulanması için önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Referans genlerin karakterizasyonunun, iyi tasarlanmış moleküler deneyler ve ardından ayrıntılı hesaplama analizleri gerektiren zahmetli bir görev olduğu iyi bilinmektedir(Andersen vd., 2004). İyi bir qPCR analizinin merkezinde doğru yapılmış normalizasyon işlemi bulunmaktadır; aynı zamanda bu işlem izolasyon, ters transkripsiyon ve amplifikasyonun verimliliğindeki mevcut değişiklikleri gözlemleme imkanı sunmaktadır ve bu sayede farklı örnekler arasındaki mRNA konsantrasyonlarının karşılaştırılabilmesini sağlamaktadır(Kozera ve Rapacz, 2013). Güvenilir sonuçlar elde etmek için referans genlerle normalizasyon sürecini yürütmek ve bunları rasyonel olarak yorumlamak gerekir (Kozera ve Rapacz, 2013). Gen transkriptlerinin miktarının analizi, mutlak veya göreceli hesaplamalara dayanabilir (Tyburski vd., 2008). Mutlak yöntemde numunedeki şablon kopya sayısının belirlenmesi, test dizisinin bilinen konsantrasyon çözeltisinin seri dilüsyonları ile hazırlanan standart bir eğriye dayanır. Göreceli yöntemde, eğri yalnızca reaksiyon verimliliğini hesaplamak

için kullanılır ve sonuç kalibratöre göre verilir. Genellikle transkript sayısı, önceden tanımlanmış referans genlerin miktarına göre verilir. Bu normalizasyon, karşılaştırılan örnekler arasındaki farkları etkin bir şekilde düzeltebilir (Kozera ve Rapacz, 2013).

Housekeeping gen ekspresyonları belirli hücre tiplerinde veya deneysel koşullarda sabittir ancak değişebilir ve laboratuvarlardaki rutin uygulamalar için yararlı olmayabilir. Sonuç olarak, iç kontrol olarak housekeeping genlerinin kullanımı, hücre tipleri ve hücre metabolizması ile ilgili olarak dikkatli bir şekilde incelenmelidir. Pek çok makale, farklı koşullarda, farklı organizmalar ve hatta dokular için birçok gen için ifadenin sabit seviyesinin korunmadığın bildirmektedir (Kozera ve Rapacz, 2013). Geçmişte, doğrulama sürecinden sıklıkla kaçınılırdı ve koşullar ve kökenleri ne olursa olsun sabit ifade düzeyi ile karakterize edildiklerine dair yaygın bir inanç nedeniyle aynı HKG'ler kullanılırdı. Hücre fonksiyonundaki karmaşık ifade düzenleme ağlarının farkındalığı arttıkça, bu ifade zayıflatılmaya başlandı ve aday genlerin stabilitesinin deneysel olarak doğrulanması artık standart bir gereklilik haline geldi (Kozera ve Rapacz, 2013). Gen ekspresyonu incelenirken, biyolojik olmayan varyasyonları ortadan kaldırmak için bir normalizasyon işleminin gerçekleştirilmesi esastır. Referans genler, hedef gen ekspresyonunu normalizasyonu için kullanılsa da bu genlerin stabilitesinin dokular, gelişim aşamaları, türler ve abiyotik faktörlere bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bu nedenle normalizasyon çalışmalarında çoklu referans genlerin kullanımı ve doğrulanması gereklidir (Thellin vd., 2009).

Referans genler, hücrelerin işlevsel rollerinden bağımsız bir şekilde bir hücrenin varoluşu için mühim olan genler olarak bilinmektedir (Eisenberg ve Levanon, 2003). Bu sebeple; bir organizmanın hücrelerinin tamamında, gelişim evresine, hücre döngüsüne, doku tipine veya dış sinyallerinden bağımsız bir şekilde normal koşullar altında da ifade edilmektedirler (Sikand vd., 2012). Referans genlerler bu avantajlı yönlerinden dolayı birçok bilimsel araştırmada kullanılmaktadır (Sikand vd., 2012; Tilli vd., 2016)

Doğru ve güvenilir normalizasyon sonuçları kararlı referans genlerin kullanımına bağlıdır. Bununla birlikte yaygın olarak kullanılan bazı referans genlerinin ekspresyonu farklı deneysel çalışmalarda değişiklik gösterebilmektedir (Marchal vd., 2013). Doğru gen kantifikasyon analizi için qPCR verilerinin normalizasyonu, ilk numune miktarı, mRNA geri kazanımı, mRNA bütünlüğü, mRNA saflığı, ters transkripsiyon verimliliği ve pipetleme hataları sonucu oluşabilecek varyasyonlar nedeniyle numuneler arasındaki

değişkenlikleri ortadan kaldırmak gerekmektedir (Livak ve Schmittgen, 2001; Janzen vd., 2009). Normalizasyonu gerçekleştirmenin en yaygın yolu, ilgili genin mRNA seviyesini hücre tipine bakılmaksızın çeşitli deneysel koşullar karşısında ekspresyon seviyesi stabil olduğu düşünülen bir referans geninin mRNA'sı ile ilişkilendirmekten geçmektedir (Jiang vd., 2010).

1.3.2. Böceklerde RT-qPCR verilerinin normalizasyonu için referans genlerin seçimi

Referans genler, genel olarak tüm hücrelerde evrensel olarak ifade edilen ve ürünleri, *Actin, Tubulin,, EF1-α* ve *GAPDH* gibi hücre yapısı veya bazal metabolizma için gerekli olan (Bustin, 2002; Xu vd., 2011) temel genlerdir**.** Farklı omurgasız türlerinde (Van Hiel vd., 2009; Chapuis vd., 2011) referans genler için birkaç doğrulama çalışması olmasına rağmen, böceklerdeki birçok ekspresyon çalışması için yalnızca bir referans geni kullanılmıştır (Marchal vd., 2013). Hamam böceklerindeki ekspresyon çalışmalarının çoğunda rutin olarak *ß-aktin* kullanılmıştır (Marchal vd., 2013).

Bilimsel bir araştırmada pubmed, https://scholar.google.com/, https://link.springer.com/, http://onlinelibrary.wiley.com/ ve https://www.sciencedirect. com/ gibi sitelerden, ("iç kontrol genleri" veya "referans genler" veya "housekeeping genleri") ve ("qPCR" veya "kantitatif PCR"veya "qRT-PCR" veya "RT-qPCR") arama terimleri kullanılarak yapılan taramada 36 dergide yayınlanmış 90 temsili makale bulunmuştur. Bu makaleler ağırlıklı olarak 2013 ve 2017 yılları arasında yayınlanmıştır ve son 5 yılda ortalama 14 makale yayınlanmıştır. Gözden geçirilen 90 makale, 100 ayrı deneyde 78 böcek türünde gen ekspresyonu çalışmalarının sonuçlarını bildirmiştir (Lü vd., 2018).

Bu çalışmada (Lü vd., 2018) *Actin, RPL, Tubulin, GAPDH, RPS, 18S, EF1A, TATA, HSP* ve *SDHA* dahil olmak üzere en sık kullanılan 10 referans genin kullanıldığı deneylerin yüzdesi sırasıyla %13,08- %12,13- %11,06- %9,39- %6,42- %5,35- %3,45- %3,21- %2,62- %2,14 tür. Büyük bir yapısal proteini kodlayan *Aktin* birçok hücre tipinde çeşitli düzeylerde ifade edilir (Lü vd., 2018). RT-qPCR analizi için ideal referans gen olarak kabul edilmektedir (Lü vd., 2018). Ribozomların temel bir bileşeni olan ribozomal protein (RP), tüm yaşam formlarında en yüksek düzeyde korunmuş proteinler arasındadır (Yang vd., 2016). *RPL* ve *RPS* familyası genlerinin ekspresyon seviyesinin referans olarak kullanıldığı çalışmaların oranı %18,55'tir (Yang vd., 2016). Bu genler birlikte, son 10 yılda böceklerde ekspresyon çalışmaları için en çok seçilen referans genler olmuştur

(Yang vd., 2016). Bu çalışmaların çoğunda, RP kodlayan genler, kararlı referans genler olarak bulunmuştur. Örneğin, *RPS24* ve *RPS18, C. maculata*'nın farklı gelişim evreleri ve cinsiyet tedavileri boyunca stabil referans genler olarak bulunmuştur (Yang vd., 2016). Hücre iskeleti yapı proteinlerini kodlayan Tubulin (α-tubulin, β-tubulin ve γ -tubulin), en çok araştırılan üçüncü referans gen olarak sıralanmıştır. *GAPDH*, yaygın olarak kullanılan bir başka referans gendir ve en yaygın olarak kullanılan dördüncü referans gen olarak sıralanmıştır (Yang vd., 2016). *GAPDH* ekspresyonunun stabilitesi, aynı tür içinde farklı çalışmalarda zaman zaman değişkenlik göstermiştir (Pan vd., 2015). Ribozomal RNA'nın bir parçası olan 18S ribozomal RNA, en yaygın olarak araştırılan altıncı referans gen olarak sıralanmıştır (Yang vd., 2016). İfade seviyesini referans olarak kullanan çoğu çalışmada biyotik ve abiyotik koşulların büyük çoğunluğunda stabil bir şekilde ifade edilmektedir. Toplamda, *EF1A, TATA, HSP* ve *SDHA* genlerinin ekspresyon seviyesi, deneylerin %11.42'sinde referans olarak kullanılmıştır (Yang vd., 2016). Bu dört gen, farklı böcek türlerinde farklı deneyler altında geçici olarak değişken ekspresyon sergilemiştir (Lü vd., 2018).

1.3.3 Gen ekspresyonunun stabilite verifikasyonu için yardımcı programlar

Gen ekspresyonunun stabilitesi, analiz edilen numunelerin ardışık stabilite seviyelerindeki en küçük varyasyon olarak tanımlanır. Bu nedenle, bu kararlı genlerin çoğunluğunu tanımlamak için programlar geliştirilmiştir (Galiveti vd., 2010). Bu programlar arasında GeNorm(Vandesompele vd., 2002), BestKeeper (Pfaffl vd., 2004), NormFinder(Andersen vd., 2004), ΔC_t (Silver vd., 2006) ve RefFinder (http://www.leonxie.com/) bulunmaktadır. Bu programlarla ilgili bazı detaylar aşağıda verilmiştir.

GeNorm algoritması, her bir aday referans geninin diğer test edilmiş aday referans genleri ile ortalama ikili varyasyonu olan gen ekspresyon stabilitesini (M) belirler. Daha sonra, daha düşük M değerine sahip (daha kararlı) referans gen korunurken, daha yüksek M değerine (daha az kararlı) sahip olan gen, kümeden çıkarılmaktadır. Kalan referans genlerin ekspresyon stabilitesi değerlerinin hesaplanması, en stabil iki referans gen kalana kadar tekrarlanmaktadır (Vandesompele vd., 2002).

NormFinder, aday referans genlerindeki değişiklikleri ve analiz edilen referans genlerin grup içi ve gruplar arası ekspresyon varyasyonunu tahmin etmek için model tabanlı bir yöntem kullanmaktadır. GeNorm gibi, NormFinder da her referans gene bir kararlılık

değeri vermektedir Düşük stabilite değerlerine sahip referans genler, en az grup içi varyasyona sahiptir ve bu nedenle NormFinder tarafından daha yüksek sıralarda yer almaktadır (Andersen vd., 2004).

BestKeeper, referans genleri, Cq veya ham geçiş noktası (CP) değerlerine dayalı ikili korelasyonlar kullanarak değerlendirilmektedir. BestKeeper, kararlı bir şekilde kopyalanan genlerin birbirleriyle yüksek oranda ilişkili olması gerektiğini varsaymaktadır. Ayrıca tüm aday genlerin tekrarlanan ikili korelasyon analizlerini gerçekleştirmektedr. Son olarak, birbirleriyle yüksek ve anlamlı korelasyonlar gösteren aday referans genlerin Ct değerlerinin geometrik ortalamaları bir indeks olarak hesaplanmaktadır. Daha düşük indeks puanlarına sahip aday referans genlerin oldukça stabil olduğu ve referans genler olarak kullanılmaya uygun olduğunu temel almaktadır (Pfaffl vd., 2004).

ΔC $_t$ yöntemi, uygun housekeeping genlerini belirlemek için her numune içindeki gen çiftlerinin nispi ekspresyonunun bir karşılaştırması ile ilişkilidir. ΔCt değerindeki bir varyasyon, bir veya her iki genin eksprese edildiğini göstermektedir. Karşılaştırma sırasında üçüncü, dördüncü veya beşinci genin eklenmesi, test edilen numuneler arasında hangi çiftlerin daha az değişken veya kararlı olduğunu gösterir ve bu genler bu duruma göre seçilebilir veya atılabilir. Eleme işlemiyle, nispeten büyük gen panellerinin üyeleri birbirleriyle karşılaştırılabilir ve ΔC t seçimine dayalı olarak genlerin ortadan kaldırılması önerilebilmektedir. Son olarak, istenen deneylerde kullanılmak üzere bir veya daha fazla uygun housekeeping geni seçilebilir (Silver vd., 2006).

Kapsamlı bir web tabanlı algoritma olan **RefFinder**, mevcut dört ana algoritmadan oluşur ve karşılaştırmadan sonra, analiz edilen varsayılan referans genlerine farklı sıralar atar. Tüm algoritmalardan sıralamalar elde edildikten sonra, her bir gene uygun bir ağırlık atanır ve kapsamlı bir nihai sıralama için gen ağırlıklarının geometrik ortalamaları hesaplanır. Daha düşük ortalama ağırlıklara sahip aday genler, stabil genler olarak kabul edilir ve ideal referans genler olarak kullanılabilir (http://www.leonxie.com/referencegene.php).

Bu programlar, özellikle böceklerde referans genlerin ekspresyon stabilitesinin kapsamlı bir değerlendirmesi için kullanılmıştır. Bu programlar referans gen çalışmalarında geniş çapta benimsenmiş olsa da, muhtemelen kullanılan farklı analitik yöntemlerden dolayı elde edilen sıralamalarda bazı farklılıklar olabilmektedir (Yang vd., 2014).

GeNorm ve NormFinder, referans genlerin ilk çalışmaları için en iyi iki program olarak yaygın şekilde kullanılmıştır (Scharlaken vd., 2008; de Boer vd., 2009). Normalizasyon için gerekli gen sayısını belirleyebildiği için GeNorm çalışmalarda sıklıkla tercih edilebilir; bu çoğunlukla iki veya üç referans genine dayanır ve bu durumda da hata potansiyelinin önemli ölçüde azalmasına neden olmaktadır (Vandesompele vd., 2002).

1.4. Amaç

Literatüre bakıldığında *B. dubia'*nın RT-qPCR için uygun referans genlerinin araştırılmadığı görülmüştür. Bu çalışmada RT-qPCR çalışması için *B. dubia'*nın uygun referans genlerinin araştırılması hedeflenmiştir. RT-qPCR pahalı, zahmetli ve zaman alan bir yöntemdir. Bu durum göz önüne alındığında ilk olarak normalizasyon işlemi sonucunda *B. dubia'*nın en uygun referans geni bulunması amaçlanmaktadır. Bunun ışığında ise çalışmamızın, *B. dubia* veya Blattodea ailesi üyeleriyle çalışacak olan bilim insanlarına projelerinde önemli bir basamak eksilterek (zaman, sarf malzeme vb.) büyük bir kolaylık sağlaması hedeflenmektedir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Örnek Bildirimi

Blaptica dubia (Serville, 1838)- (Blattodea, Blaberidae) Türkiye'nin Antalya (Antalya Çekirge, https://www.antalyacekirge.net/) şehrinden ticari bir satıcıdan satın alınmıştır (n=5). *Blaptica dubia* ergin bireyleri, RNA stabilizasyon reaktifinde muhafaza edildikten sonra laboratuvara aktarılmıştır. RNAlater® (Qiagen, Kat. No: 76106) ve sonraki deneysel analizler için -20 ° C'de muhafaza edilmiştir.

2.2. Total RNA İzolasyonu

Total RNA, hızlı ve aynı zamanda yüksek kalitede ürün eldesi için üreticinin talimatlarına uygun şekilde GeneAll® Hybrid-R ™ kiti (Kat. No: 315-150) (GeneAll Biotechnology, Seul, Kore) kullanılarak izole edilmiştir. RNA bütünlüğü, nanodrop kullanılarak 260/280 nm'lik absorbans oran ölçümü ile doğrulanmıştır.

2.2.1 RNA izolasyonu için aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

- Ergin bireylerden yaklaşık 100 mg doku örneği alınmıştır ve 1 ml RiboExTM içinde homojenleştirici kullanılarak homojenize edilmiştir.
- Homojenat oda sıcaklığında (23 ± 2 °C) 5 dakika inkübe edilmiştir.
- Daha sonra 4 ° C'de 10 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüj edilmiş ve süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- 1 ml RiboExTM için 0,2 ml kloroform ilave edilmiştir.
- 15 saniye kuvvetli bir şekilde çalkalanıp 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Ardından 4 ° C'de 15 dakika 12.000 x g'de santrifüj edilip sulu faz yeni bir tüpe aktarılmıştır. Numuneye 1 hacim tampon RB1 ilave edilmiştir ve ters çevirerek karıştırılmıştır. Bu kısımda santrifüj işlemi yapılmamıştır.
- 750 µl'ye kadar karışım mini döndürme kolonuna aktarılmıştır.
- Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca ≥ 10.000 x g'de santrifüj edilmiştir.
- Mini döndürme kolonuna 500 µl tampon SW1 ilave edilmiştir.
- Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca ≥ 10.000 x g'de santrifüj edilmiştir.
- Mini döndürme kolonuna 500 µl tampon RNW ilave edilmişitir.
- Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca ≥ 10.000 x g'de santrifüj edilmiştir.

2.3. cDNA sentezi ve Real- Time PCR

2.3.1. cDNA sentezi

1500 ng/µL RNA ile cDNA ürünü elde etmek amacıyla GeneAll® HyperScript ™ ilk sarmal sentez kiti (Kat. No: 605-005) (GeneAll Biotechnology, Seul, Kore) kullanılmıştır.

İzole edilen RNA'nın kalitesi ve elde edilen miktarı belirlendikten sonra, cDNA sentez kullanılarak, böceklerden izole edilen 1500 ng/µl toplam RNA ve üreticinin önermiş olduğu protokole göre aşağıdaki adımlar kullanılarak sentezlenmiştir.

- İlk iplik sentez kitine göre 20 µl reaksiyon karışımı için 1 µl RNA kalıbı, 1 µl oligo, 2 µl dNTPs ve 10 µl nükleaz içermeyen su ependorf tüpüne aktarılmıştır ve 65º C'de 5 dakika inkübe edilip ardından 1 dakika da buz üzerinde bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından 2 µl 10^X RTase buffer, 2 µl (0.1M) DTT, 1 µl RNase inhibitör ve son olarak 1 µl RTase eklenmiştir (Tablo 2.). 55º C'de bir saat inkübasyona bırakılmıştır ve ardından 85 º C'de 5 dk buzda bekletilmiştir (Tablo 3.).

Tablo 2. cDNA sentez bileşenleri

Bileşen		**Miktar**
RNA kalıbı		1 µl
Primer	Oligo dt	1 µl
dNTPs		2 µl
Nükleaz içermeyen su		10 µl
65 ° C'de 5 dakika inkübe edildi, sonrasında minimum 1 dakika buz üzerine konuldu.		

- İnkübasyonun sonrasında aşağıdaki bileşenler karışıma ilave edilmiştir.

Bileşen	**Miktar**
10^X RTase buffer	2 µl
0.1 M DTT	2 µl
HyperScriptTM Reverse Transcriptase	1 µl
RNase İnhibitör	1 µl

- Aşağıdaki koşullarda inkübe edilmiştir.

Tablo 3. cDNA inkübasyon süreleri

Primerler	İnkübasyon Süresi	Reaksiyon Sıcaklığı
Oligo dT veya gen-spesifik primer	30-60 min	42-60 ºC (önerilen 55 ºC)
	5 min	25ºC
Random hekzamer	30-60 min	42-60ºC (önerilen 55 ºC)

5 dakika 85 ° C'de inkübe edilip ardından reaksiyonu sonlandırılmıştır. Daha sonra ise buz üzerinde soğutulmuştur.

2.3.2. cDNA dilüsyonlarının hazırlanması

Standart eğriler (Standard curve analysis), RT-qPCR analizinde kullanılacak ve tablo 6 da bilgileri verilen her primer çifti için 5 kat seyreltilmiş bir cDNA serisi (1, 1/5, 1/25, 1/125 ve 1/625) kullanılarak oluşturulmuştur.

5 kat seyreltilmiş bir cDNA serisi için yapılan seyreltmeler:

- D1 tüpü 1 oranı için seyreltme yapılmadan doğrudan 2 µl cDNA eklenmiştir.
- D2 tüpü için 1/5 oranında seyreltme için 5 µl cDNA üzerine 20 µl dH_2O eklenmiştir.
- D3 tüpü için 1/25 oranında seyreltme için D2 tüpünden 5 µl cDNA alınmıştır üzerine 20 µl dH_2O eklenmiştir.
- D4 tüpü için 1/125 oranında seyreltme için D3 tüpünden 5 µl cDNA alınmıştır üzerine 20 µl dH_2O eklenmiştir.
- D5 tüpü için 1/625 oranında seyreltme için D4 tüpünden 5 µl cDNA alınmıştır üzerine 20 µl dH_2O eklenmiştir.

2.3.3. RT-qPCR analizi

RT-qPCR reaksiyonları, iGreen 2X qPCR Master Mix kullanılarak 96 kuyucuklu reaksiyon plakalarında deneyleri gerçekleştirmek için bir StepOnePlusTM Gerçek Zamanlı PCR sistemi (Applied Biosystems, ABD) kullanılmıştır (Biomatik, Kanada). Reaksiyonların tamamı, her cDNA kalıbında son hacim 20 µL'lik iki kopya halinde

getirilmiştir. 10 µL 2X iGreen Master Mix, 1 µL her bir spesifik primerden (10 µM), 2 µL seyreltilmiş tek iplik cDNA kalıbı (1, 1/5, 1/25, 1/125 ve 1/625) ve 6 µL nükleaz içermeyen su kullanılmıştır (Tablo 4). RT-qPCR programı, 95° C'de 3 dakika süreyle başlangıç denatürasyonu, ardından 10 saniye boyunca 95°C'de 40 döngü denatürasyon, 58°C'de 30 saniye bağlanma ve 72° C'de 15 saniye uzatma basamaklarını içermektedir. Erime eğrisi analizi için bir ayrışma adımı döngüsü (1 dakika 58°C ve ardından 0,5°C'den 95°C'ye kadar 10 sn) eklenmiştir (Tablo 5). Her PCR reaksiyonunun sonunda, tek bir piki doğrulamak ve primer-dimer ve spesifik olmayan ürün oluşumu olasılığını ortadan kaldırmak için bir erime eğrisi oluşturulmuştur.

Tablo 4. RT-qPCR Bileşenleri

20^{X}	**Tek örnek**
2X iGreen Master Mix	10 µl
Reverse Primer	1 µl
Forward Primer	1 µl
cDNA	2 µl
Nükleaz içermeyen su	6 µl

Tablo 5. RT-qPCR Koşulları

PCR koşulları			
İlk denatürasyon	95 ºC	3 dk	
Denatürasyon	95 ºC	10 sn	40 döngü
Primer bağlanması (Annealing)	58-60 ºC	30 sn	
Uzama-Sentez (Extension)	72 ºC	15 sn	
Erime Eğrisi			
58 ºC	1 dk		
95 ºC	10 sn		

2.4. Veri Analizi ve İstatistiksel Yöntem

Her bir aday referans genin kararlılığı geNorm (Vandesompele vd., 2002), NormFinder (Andersen vd., 2004), BestKeeper (Pfaffl vd., 2004) ve ΔCt yöntemi algoritmalarıyla değerlendirilmiştir (Silver vd., 2006). Test edilen tüm genler kapsamlı web tabanlı analiz aracı olan RefFinder'a (https://www.heartcure.com.au/reffinder/?type=reference) göre karşılaştırılmıştır ve sıralanmıştır. Bu araç, her bir gene uygun bir ağırlık atar ve her programdan elde edilen sonuçlar açısından toplam nihai sıralama için ağırlıklarının geometrik ortalamasını hesaplamaktadır. Çalışmalardan elde edilen veriler Graphad Prism v6 (Graphpad, ABD) istatistiksel programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 6. RT-qPCR analizinde değerlendirilen altı aday housekeeping genine genel bakış

Sembol	Gen adı	Tanım	Primer dizisi(5'→3')	GenBank erişim numarası	Amplikon Uzunluğu (bp)	R^2	Referans
ACTB	B-aktin	Hücre iskeleti	F:5'TCCATCATGAAGTGCGATGT-3' R:5'CCACATCTGTTGGAATGTCG-3'	NM_001172 372	228	0.872	Sang vd., 2015
RPS18	Ribozomal protein S18	Ribonükleoprotein; Ribozomal protein; RNA bağlanması; rRNA bağlayıcı	F:5'-TACACCTTTGATCGCTGTGAG-3' R:5'GGCTCTGGTCATTCCAGATAAG-3'	XM_045615 265	108	0,914	Yang vd., 2015
EF1α	Uzama faktörü 1-a	Translasyon uzama faktörü aktivitesi; GTPase	F:5'-ACCAGATTTGATGGCTTTGG-3' R:5'-CACCCAGAGGAGCTTCAGAC-3'	XM_003705 302	194	0,957	Rodrigues vd., 2014
ArgK	Arjinine kinaz	Fosfotransferaz aktivitesi	F:5'-CTCGTGTGGTGCAACGAAGA-3' R:5'-GGTGGCTGAACGGGACTCT-3'	NT_037436	130	0,972	García-Reina vd., 2018
GADPH	Gliseraldehit-3-fosfat	Glikoliz ve Glukoneogenezde oksidoredüktaz	F:5'-GCCAAGGTGATCCATGACAA-3' R:5'GTCTTCTGAGTGGCAGTTGTAG-3'	NC_007420	80	0,965	Pan vd., 2015
α- TUB	Alpha-tubulin	Mikrotübül yapılarında yer alır	F:5'- TCA AAT GCG ACC CAC GTC AT-3' R:5'- GGC AAT AGC CGC GTT GAC AT-3'	XM_970811	191	0,978	Altincicek vd., 2008

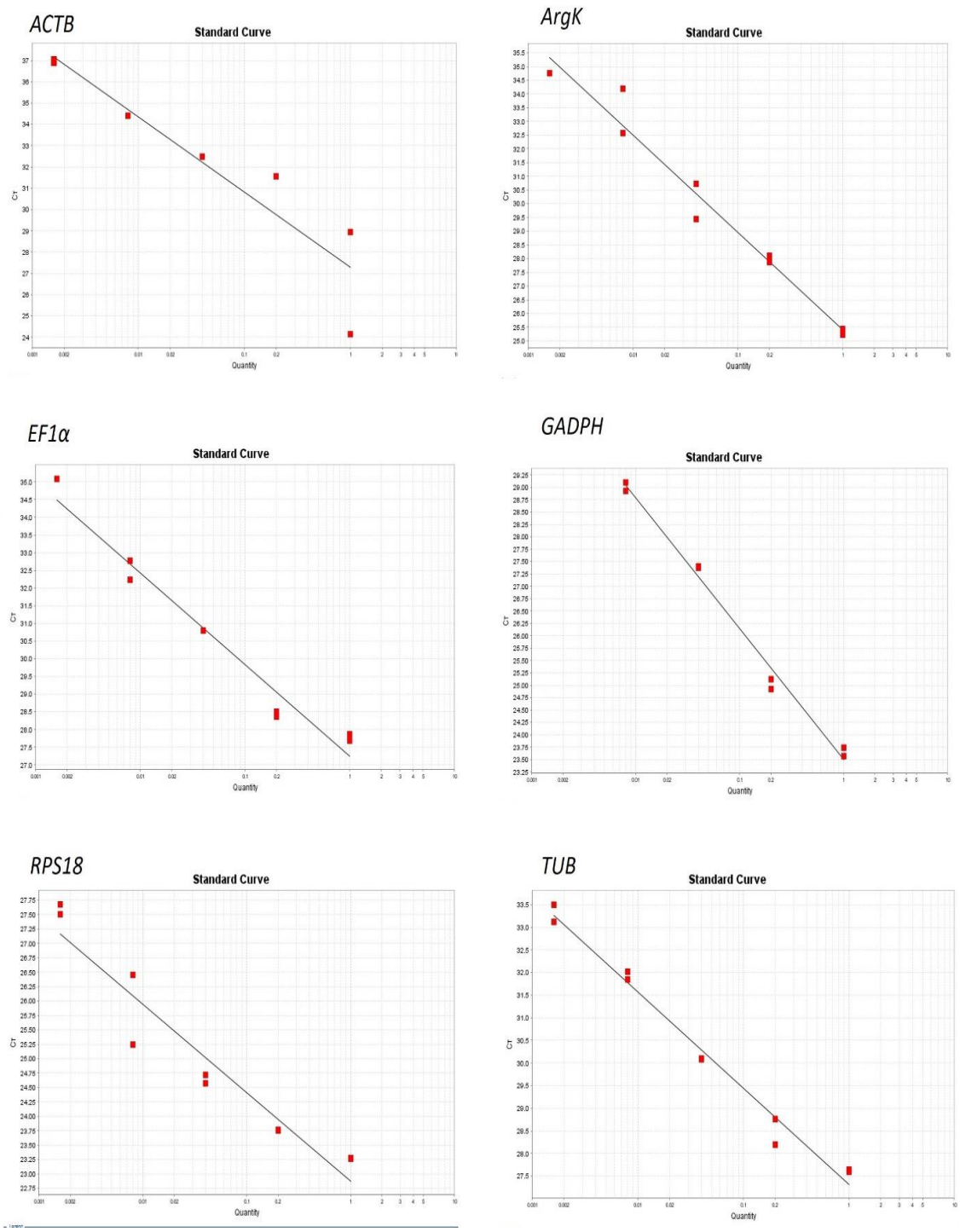
3. BULGULAR

3.1. Total RNA'nın Kalitesi

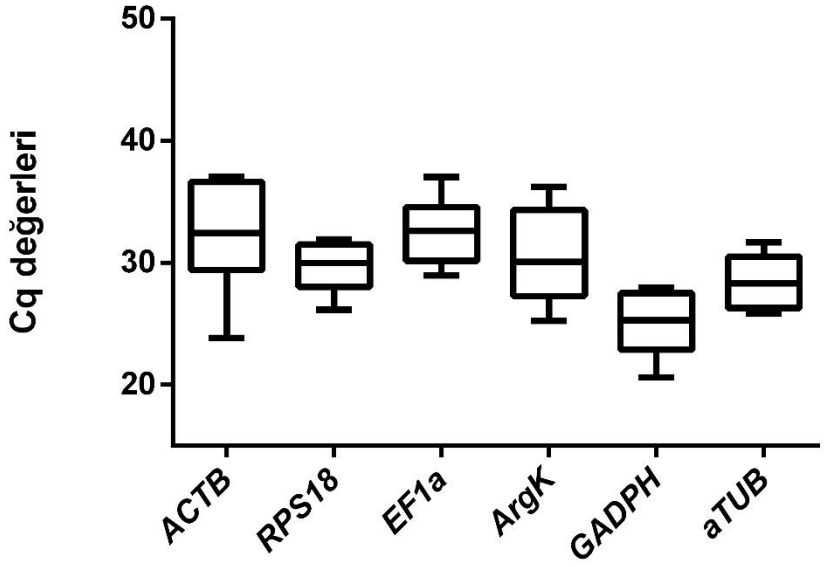
Bu çalışmada, *B. dubia* erişkin bireylerinden alınan toplam RNA'nın A260/A280 oranı 1,90 ile 2,12 arasında değişirken, A260/A230 oranı 1,90'ın üzerinde bulunmuştur. Bu durum ürünün organik tuz ve protein kontaminasyonu içermediğini gösterir. Toplam RNA konsantrasyonu 1210 ng/uL ile 2000 ng/uL arasında gözlemlenmiştir ve bu değer aralığı cDNA şablonunun ifadesi için uygun kabul edilmiştir.

3.2. Seçilen Referans Genlerin Ekspresyon Kararlılığı

Her primer PCR amplifikasyonu, erime eğrisi analizlerinde sadece bir tepe noktası oluşturulması ile onaylanmıştır. Bu çalışmada değerlendirilen tüm primerlerin 0,89 ile 0,98 arasında değişen korelasyon katsayısına (R^2) sahip olduğu bulunmuştur (Tablo 6) ve standart eğri grafikleri Şekil 4'de verilmiştir. Ayrıca %90 ile %110 arasında primer verimlilik değeri vermiştir Negatif kontrolde floresan sinyal amplifikasyonu gözlemlenmemiştir. Bu RNA izolasyon sürecinin adımlarının etkili olduğunu göstermiştir. *B. dubia* erişkinlerinden altı aday referans geninin amplifikasyonundan elde edilen döngü eşiği (Cq) değerleri çizilmiştir (Şekil 5). *B. dubia'da* altı gen için Cq değerleri 20,92 ila 36,67 arasında değişkenlik göstermiştir. *GADPH, B. dubia* 'daki en düşük Cq değerlerini temsil etmektedir (24.95 ± 2.70, ortalama Cq ± std. dev.). *α-TUB, RPS18, ArgK, ACTB ve EF1α*'nın amplifikasyonunda ortalama Cqs sırasıyla: 28.49 ± 2.23, 29.64 ± 1.12, 30.45 ± 2.59, 32.28 ± 4.18 ve 32.45± 2.59 olarak gösterilmiştir.



Şekil 4. Altı aday referans genin standart eğri grafiği (R^2)



Şekil 5. Aday housekeeping genlerinin amplifikasyon profilleri. B. dubia' daki housekeeping genleri için qPCR eşik döngüsü değerlerinin (Cq) kutu grafiği.

Analiz edilen örneklerin ardışık stabilite seviyelerindeki en küçük varyasyon, gen ekspresyonunun stabilitesi olarak tanımlanır. Bu çalışmada, *B. dubia* erişkinlerinde optimal referans genleri tanımlamak ve altı referans genin stabilitesini değerlendirmek amacıyla dört istatistiksel Excel makro programı (geNorm, BestKeeper, NormFinder ve Δ-Ct yöntemi) ve web tabanlı analiz aracı RefFinder kullanılmıştır. (Tablo 7 ve Şekil 6).

Tablo 7. B. dubia erişkin bireylerinde aday referans genlerin ifade kararlılığı

Referans genler	Genorm		Bestkeeper			Normfinder		Delta Ct		RefFinder	
	M	Sıra	SD	r	Sıra	SV	Sıra	SD	Sıra	Stabilite	Sıra
ACTB	1.755	6	3.24	0.936*	6	2.245	6	2.47	6	6.000	6
RPS18	0.699	1	1.70	0.972*	1	1.050	3	1.54	3	1.730	2
EF1α	1.058	4	2.00	0.906*	2	1.307	4	1.80	4	3.360	4
ArgK	1.397	5	3.20	0.969*	5	1.486	5	1.95	5	5.000	5
GADPH	0.699	1	2.20	0.987*	4	0.350	1	1.32	1	1.410	1
α-TUB	0.715	3	2.00	0.966*	3	0.772	2	1.45	2	2.450	3

SD, standart sapma; **SV**, stabilite değeri; **r**, Pearson korelasyon katsayısı; *p≤0,001

geNorm

geNorm programı, referans genlerin birlikte düzenlenmediği varsayımındadır. Normalde test edilen her referans geni için M değerini (gen ekspresyonunun stabilite değeri) o gen için diğer referans genleriyle ortalamasını alıp çift varyasyon olarak hesaplamaktadır. M değeri düştükçe, referans genin ifadesinin kararlılığı o oranda artar. Bu yüzden düşük M değerli genler sabit ekspresyona sahip olarak tanımlanırken, genler arasından en yüksek

M değeri olanlar çıkarılır ve bu işlem en stabil iki gen kalana kadar devam eder. Nihayetinde bu son gen çifti optimal referans gen çifti olarak tanımlanır. Tüm bunlardan yola çıkıldığında geNorm'da doğru normalizasyonu sağlamak için en az iki referans gen kullanılması önerilir. geNorm *B. dubia* erişkinlerinde, aday referans gen setini şu şekilde sıralamıştır: *RPS18, GADPH>α-TUB>EF1a >ArgK>ACTB. B. dubia* erişkin bireylerde bu algoritma verilerine dayanarak hem *RPS18* hem de GAPDH için M değeri 0.699 olarak belirlenmiş ve her iki genin de en stabil iki gen olduğu sonucuna varılmıştır. *ACTB* ise 1.755 M değeri ile en az stabil ekspresyona sahip gen olarak belirlenmiştir (Şekil 6 ve Tablo 7).

NormFinder

Normfinder, örnek alt kümeleri arasındaki sistematik farklılıkları dikkate alan bir analiz aracıdır. Tüm örneklerde en az ekspresyon varyasyonuna sahip genleri tanımlayan bir ANOVA (varyans analizi) modelidir. *B. dubia* yetişkinlerinde, Normfinder altı referans geni şu şekilde sıralamıştır: *GADPH> α-TUB> RPS18> EF1α> ArgK> ACTC*, stabilite değeri (SV) ise sırasıyla 0.350, 0.772, 1.050, 1.307, 1.486, 2.245 dir. *GADPH* 0.350 stabilite değeri ile en kararlı, *ACTB* ise 2.245 stabilite değeri ile en az kararlı olduğu bulunmuştur (Tablo 7 ve Şekil 6).

BestKeeper

Aday genlerin stabilitesini hesaplayabilen BestKeeper analizine göre en düşük standart sapmayı (SD) sergileyen referans genler en kararlı genler olarak alınır. Ayrıca, eşik değeri (SD < 1) aşan değerler tüm numunelerde kararsız olarak kabul edilir. Bu analiz sistemine göre tüm housekeeping genleri [*RPS18* (SD: 1.70), *EF1α* (SD: 2.0), *α-TUB* (SD: 2.0), *GADPH*, (SD: 2.20), *ArgK* (SD: 3.20), *ACTB* (SD: 3.24)] *B. dubia* yetişkinlerinde eşik değerini aşmıştır (Tablo 7 ve Şekil 6).

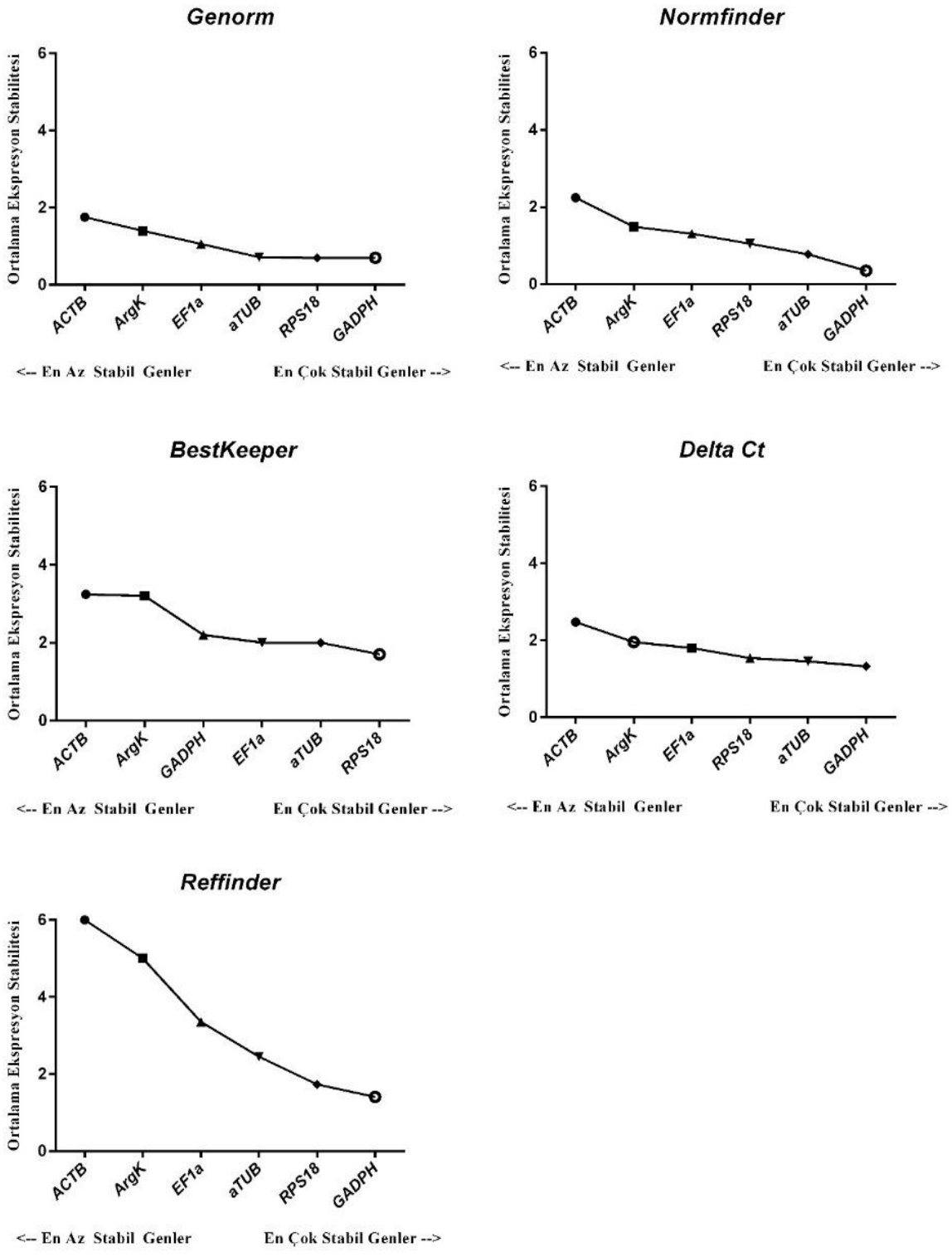
ΔC$_T$ method

Rölatif çift karşılaştırma prensibine dayanan ve ham Ct değerlerini kullanarak her gen kümesinin ortalama SD' sini hesaplayabilen ΔCt yönteminde, SD değeri gen ekspresyon stabilitesi ile ters orantılıdır. Standart sapması 1' in altındaki değerler uygun stabiliteyi işaret etmektedir. Her gen setinin ortalama SD' si 1'in üzerinde olduğundan, buradaki housekeeping genlerinin hiçbirinin ΔCT yöntemine göre *B. dubia* yetişkinleri için yeterince stabil olmadığı bulunmuştur. Referans genlerin ΔCt yöntemine dayanan genel

sıralama*:* *GADPH* (SD: 1.32), *α-TUB* (SD: 1.45), *RPS18* (SD: 1.54), *EF1a* (SD: 1.80), *ArgK* (SD: 1.95), *ACTB* (SD: 2.47) şeklindedir (Tablo 7 ve Şekil 6).

RefFinder

RefFinder, varsayılan housekeeping genlerinin stabilitesini sıralayabilmek için dört yazılım aracını (BestKeeper, geNorm, NormFinder ve Δ-Ct yöntemi) birleştiren kapsamlı bir algoritmadır. *B. dubia*'daki referans genlerin RefFinder' a göre yapılan genel sıralaması: *GADPH*, *RPS18*, *α-TUB*, *EF1α*, *ArgK* ve *ACTB* şeklindedir (Tablo 7 ve Şekil 6).



Şekil 6. Genorm, Normfinder, Bestkeeper, ΔCt metod, RefFinder tarafından değerlendirilen altı housekeeping geninin ekspresyon stabilitesi ve sıralaması.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

RT-qPCR'nin duyarlılığı, bu analiz yöntemini mRNA miktarlarının göreceli ekspresyonu için en önemli teknik haline getirmiştir. Ancak RT-qPCR normalizasyon çalışmalarının geçerliliği çalışmaya dahil edilen referans genlere bağlıdır ve bu referans genlerin ekspresyon stabilitesi incelenen dokulardaki varyanslardan, fizyolojik veya deneysel durumlardan etkilenebilir (Vandesompele vd., 2002). Öte yandan, çeşitli deneysel vakalar altında tüm hücre ve doku tipleri için sürekli olarak ifade edilen ve uygulanabilir tek bir "evrensel" housekeeping geni yoktur (Fu vd., 2013; Li vd., 2013; Liang vd., 2014; Pan vd., 2015). Bu nedenle birkaç rapor, birden fazla kararlı şekilde eksprese edilmiş housekeeping genlerinin kullanılması gerektiğini öne sürmüştür. Çünkü bu tür genlerin deney düzeni için önceden ve uygun doğrulama adımlarının sağlanmadan kullanılması hedef genlerin ekspresyon seviyelerinin yanlış belirlenmesine ve dolayısıyla verilerin yanlış yorumlanmasına neden olabilmektedir (Vandesompele vd., 2002; Yuan vd., 2014; Lu vd., 2015).

Lü ve ark. tarafından böcekler üzerinde yapılan kontrol geni ekspresyon çalışmalarının meta-analizinin sonucunda aktin, *RPL, GADPH, Tub, 18S, TATA, RPS, EF1A, HSP* ve *SDHA*' nın en çok kullanılan Housekeeping genleri arasında yer aldıkları sonucuna varılmıştır (Lü vd., 2018). *Liposcelis bostsrychophila, Diabrotica virgifera virgifera, Chilo supressalis ve Spodoptera exigua* gibi çeşitli böcek türlerinde referans genlerin stabilitesini değerlendiren birçok çalışmada, aktinin çeşitli gelişim aşamalarında yüksek stabilite gösterdiği bildirilmiştir (Jiang vd., 2010; Teng vd., 2012; Rodrigues vd., 2014); Aktinin ayrıca *Liposcelis bostsrychophila* (insektisit) (Jiang vd., 2010), *Hippodamia convergens* (diyet) (Pan vd., 2015)'de çok sayıda abiyotik durum altında oldukça stabil bir ifadeye sahip olduğu belirlenmiştir. Öte yandan, bazı böcek türlerinde *ACTB* ekspresyonunun daha az kararlı olduğu bildirilmiştir (Pan vd., 2015; Yang vd., 2015). Ribozomal protein S genlerinin (*RPS18, RPS15, RPS11* ve *RPS3*), *C. maculata, S. inferens, N. lugens, M. domestica* ve *H. armigera'nın* çeşitli gelişim evrelerinde yüksek ekspresyon stabilitesine sahip oldukları bulunmuştur (Lu vd., 2015; Yang vd., 2015; Zhang vd., 2015). En çok çalışılan bir başka referans gen olan sitoiskelet yapısı proteinlerini kodlayan Tubulin (α-, β-, γ-tübülin), *Sogatella furcifera, Coleomegilla maculata, Bactrocera dorsalis, Liposcelis bostsrychophila, Drosophila suzukii* (Jiang vd., 2010; Zhai vd., 2014; An vd., 2016) ve *Nilaparvata lugens*'te sıcaklık, fotoperiyot, insektisit ve diyet gibi abiyotik durumlar gibi çeşitli biyotik durumlar altında yüksek

stabiliteye sahip olduğu bulunmuştur. *Helicoverpa armigera, Bemisia tabaci* (Liang vd., 2014; Yuan vd., 2014; An vd., 2016). Benzer şekilde, *GAPDH* ekspresyonu *Schistocerca gregaria, Tenebrio molitor, Rhodnius prolixus, Diabrotica virgifera virgifera, Hippodamia convergens, Bombyx mori, Chilo suppressalis, Sesamia inferens, Spodoptera litura*' nın farklı doku ve gelişim aşamalarında yüksek stabilite göstermiştir (Van Hiel vd., 2009; Teng vd., 2012; Rodrigues vd., 2014; Lu vd., 2015; Pan vd., 2015; BERK, 2020)

Ek olarak, *GADPH*'nin *Sogatella furcifera'*da viral enfeksiyon, *Liposcelis bostsrychophila*'da insektisid, Hippodamia konvergenlerinde fotoperiyot, *Danaus plexippus*'ta diyet, *Helicoverpa armigera*' da mekanik yaralanma ve viral enfeksiyon dahil olmak üzere abiyotik koşullar altında stabil referans gen olduğu bulunmuştur (Jiang vd., 2010; Pan vd., 2015; Zhang vd., 2015; An vd., 2016). Öte yandan, bazı böcek türlerinde *GADPH* ekspresyonunun daha az kararlı olduğu bildirilmiştir (Jiang vd., 2010; Li vd., 2013; Zhai vd., 2014; Pan vd., 2015). Ayrıca, *EF1A* geni, *Cimex lectularius* ve *Bombus lucorum*'un farklı gelişim aşamaları ve dokuları altında yüksek stabilite gösterirken, *EF1A* geni, farklı sıcaklıklarda ve gelişim aşamalarında *A. craccivora*'da en az sabit housekeeping geni olarak seçilmiştir (Yang vd., 2015). Açlık koşulları altında *N. lugens* için *ArgK, EF1A, RPS11* önerilmiştir (Yuan vd., 2014). Özetle, çoğunlukla kullanılan referans genlerin ekspresyonu çok sayıda deneysel durum altında değişebilmektedir. Bu nedenle farklı biyotik ve abiyotik olgularda gen ekspresyon profillerinin yaygın olarak değerlendirilmesi ve gen stabilitesinin belirlenmesinde fayda vardır.

Bu çalışmada, seçilmiş Housekeeping genlerinin ekspresyon stabilitesini değerlendirmek için beş farklı algoritma (ΔCt yöntemi, geNorm, Bestkeeper, Normfinder ve RefFinder) kullanılarak hamamböceği türü *B. dubia* yetişkinlerinde referans genler (*GADPH, RPS18, α-TUB, EF1α, ArgK ve ACTB*) için bir validasyon çalışması yapılmıştır. Altı varsayılan housekeping geni arasında *GADPH* geNorm, Normfinder ΔCt yöntemi ve RefFinder algoritmalarına göre *B. dubia* yetişkinlerinde en kararlı housekeping geni olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda, *RPS18* GeNorm ve BestKeeeper tarafından en kararlı gen olarak önerilmiştir. *ACTB*'nin tüm algoritmalar arasında en az kararlı olduğu gösterilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, hamamböceklerinde bugüne kadar sadece bir doğrulama çalışması (Marchal vd., 2013) bildirilmiştir. Bu çalışmada, *Diploptera punctata*'nın çeşitli gelişim aşamalarında sekiz housekeping geninin stabilitesini (*β-aktin, GAPDH, EF1α, RpL32, Arm, AnnIX, α-Tub* ve *SDHα*) değerlendirmek için sadece iki algoritma (Normfinder ve geNorm) kullanılmıştır. *A-Tub, EF1a* ve *RpL32* genleri, *D.*

punktata için en kararlı genler olarak önerilmiştir. Öte yandan, *Actin* ve *AnnIX*'in en az kararlı genler olduğunu ve transkript seviyelerini normalleştirmek için kullanılmaması gerektiğini öne sürmüşlerdir. Sonuçlarımız, beş algoritmaya göre *GADPH* ve *RPS18* genlerinin, *B. dubia* yetişkinlerinde transkript seviyelerinin normalizasyonu için kullanılabileceğini, *ACTB*'nin ise Marchal ve ark. (Marchal vd., 2013) tarafından yapılan çalışmada önerildiği gibi, hamamböceği *B. dubia* için transkript seviyelerinin normalizasyonu için kullanılmaması gerektiğini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmanın gelecek planlamasında, diğer böcek türlerinde olduğu gibi, özellikle hamamböceklerinin gelişim evresi, açlık, sıcaklık, pestisit, diyet gibi birçok biyotik ve abiyotik koşul altında araştırılması planlanmaktadır. Ayrıca hamamböceklerinde referans genler için validasyon çalışmaları literatürde çok azdır. Bu nedenle mevcut çalışmamız ve literatürde yer alan çalışmalar göz önüne alındığında hamamböceklerinde RT-qPCR çalışmalarında biyotik ve abiyotik koşullar altında referans genlerin doğrulanmasına yönelik çalışma sayısının artırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Alamer, A. H. (2013). *Endocrine control of fat body composition and effects of the insect growth regulators methoprene and pyriproxyfen on the development and reproduction of the Argentinian cockroach, Blaptica dubia Serville (Blattaria: Blaberidae), Bayreuth, Universität Bayreuth, Diss., 2013.*

An, X., Hou, M. ve Liu, Y. (2016). "Reference gene selection and evaluation for gene expression studies using qRT-PCR in the white-backed planthopper, Sogatella furcifera (Hemiptera: Delphacidae)." *Journal of Economic Entomology 109*(2): 879-886.

Andersen, C. L., Jensen, J. L. ve Orntoft, T. F. (2004). "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets." *Cancer Res 64*(15): 5245-5250.

Atkinson, T. H. (1991). "Catalog and atlas of the cockroaches (Dyctioptera) of North American north of Mexico." *Misc. Publ. Ent. Soc. Amer*.

Bell, W. J., Roth, L. M. ve Nalepa, C. A. (2007). "Cockroaches: ecology, behavior, and natural history." *The Johns Hopkins University*: 230.

BERK, Ş. P., A. (2020). "Selection and Validation of Reference Genes for Quantitative Real-time PCR in the Mealworm Beetle, Tenebrio molitorL. (Coleoptera: Tenebrionidae)." *IOSR-JAVS*.

Bohn, H., Picker, M., Klass, K.-D. ve Colville, J. (2010). "A jumping cockroach from South Africa, Saltoblattella montistabularis, gen. nov., spec. nov.(Blattodea: Blattellidae)." *Arthropod Systematics Phylogeny 68*(1): 53-69.

Bosch, G., Zhang, S., Oonincx, D. G. ve Hendriks, W. H. (2014). "Protein quality of insects as potential ingredients for dog and cat foods." *Journal of nutritional science 3*.

Brenner, R. J. ve Kramer, R. D. (2019). Cockroaches (Blattaria). *Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)*. G. R. Mullen and L. A. Durden, Academic Press: 61-77.

Bustin, S. (2002). "INVITED REVIEW Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *Journal of molecular endocrinology 29*: 23-39.

Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *Journal of molecular endocrinology 25*(2): 169-193.

Chapuis, M.-P., Tohidi-Esfahani, D., Dodgson, T., Blondin, L., Ponton, F., Cullen, D., Simpson, S. J. ve Sword, G. A. J. B. m. b. (2011). "Assessment and validation of a suite of reverse transcription-quantitative PCR reference genes for analyses of density-dependent behavioural plasticity in the Australian plague locust." *BMC Molecular Biology 12*(1): 1-11.

Cochran, D. G. (1999). *Cocroaches Their Biology Dıstrubition And Control.*

Cornwell, P. B. (1968). "The cockroach. Volume 1. A laboratory insect and an industrial pest."

de Boer, M. E., de Boer, T. E., Mariën, J., Timmermans, M. J., Nota, B., van Straalen, N. M., Ellers, J. ve Roelofs, D. (2009). "Reference genes for QRT-PCR tested under various stress conditions in Folsomia candida and Orchesella cincta (Insecta, Collembola)." *BMC Molecular Biology 10*(1): 1-11.

Dixon, A. F., Honěk, A., Keil, P., Kotela, M. A. A., Šizling, A. L. ve Jarošík, V. (2009). "Relationship between the minimum and maximum temperature thresholds for development in insects." *Functional Ecology*: 257-264.

Eisenberg, E. ve Levanon, E. Y. (2003). "Human housekeeping genes are compact." *TRENDS in Genetics 19*(7): 362-365.

Eklund, B. E., Mahdi, O., Huntley, J. F., Collins, E., Martin, C., Horzempa, J. ve Fisher, N. A. (2017). "The orange spotted cockroach (Blaptica dubia, Serville 1839) is a permissive experimental host for Francisella tularensis." *Proc W Va Acad Sci 89*(3): 34-47.

Friederich, U. ve Volland, W. (2004). *Breeding food animals: live food for vivarium animals*, Krieger publishing company.

Fu, W., Xie, W., Zhang, Z., Wang, S., Wu, Q., Liu, Y., Zhou, X., Zhou, X. ve Zhang, Y. (2013). "Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in Plutella xylostella (Lepidoptera: Plutellidae)." *International Journal of Biological Sciences 9*(8): 792.

Gachon, C., Mingam, A. ve Charrier, B. (2004). "Real-time PCR: what relevance to plant studies?" *Journal of experimental botany 55*(402): 1445-1454.

Galiveti, C. R., Rozhdestvensky, T. S., Brosius, J., Lehrach, H. ve Konthur, Z. (2010). "Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR." *Rna 16*(2): 450-461.

Gillott, C. (2005). *Entomology*, Springer Science & Business Media.

Grimaldi, D. E., M. S. (2005). "Evolotion of the ınsects." *Cambridge University Press*.

Gupta, S. K. ve Chandra, K. (2019). "An annotated checklist of cockroaches (Blattodea) from India." *Zootaxa 4614*(3): zootaxa 4614 4613 4613.

Helfer, J. R. (1963). "How to know the grasshoppers, cockcroaches [sic] and their allies."

Janzen, D. H., Hallwachs, W., Blandin, P., Burns, J. M., Cadiou, J. M., Chacon, I., Dapkey, T., Deans, A. R., Epstein, M. E., Espinoza, B., Franclemont, J. G., Haber, W. A., Hajibabaei, M., Hall, J. P. W., Hebert, P. D. N., Gauld, I. D., Harvey, D. J., Hausmann, A., Kitching, I. J., Lafontaine, D., Landry, J. F., Lemaire, C., Miller, J. Y., Miller, J. S., Miller, L., Miller, S. E., Montero, J., Munroe, E., Green, S. R., Ratnasingham, S., Rawlins, J. E., Robbins, R. K., Rodriguez, J. J., Rougerie, R., Sharkey, M. J., Smith, M. A., Solis, M. A., Sullivan, J. B., Thiaucourt, P., Wahl, D. B., Weller, S. J., Whitfield, J. B., Willmott, K. R., Wood, D. M., Woodley, N. E. ve Wilson, J. J. (2009). "Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity." *Molecular Ecology Resources 9*: 1-26.

Jiang, H. B., Liu, Y. H., Tang, P. A., Zhou, A. W. ve Wang, J. J. (2010). "Validation of endogenous reference genes for insecticide-induced and developmental expression profiling of Liposcelis bostsrychophila (Psocoptera: Liposcelididae)." *Mol Biol Rep 37*(2): 1019-1029.

Kozera, B. ve Rapacz, M. (2013). "Reference genes in real-time PCR." *J Appl Genet 54*(4): 391-406.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B. ve Strömbom, L. (2006). "The real-time polymerase chain reaction." *Molecular aspects of medicine 27*(2-3): 95-125.

Li, R., Xie, W., Wang, S., Wu, Q., Yang, N., Yang, X., Pan, H., Zhou, X., Bai, L. ve Xu, B. J. P. o. (2013). "Reference gene selection for qRT-PCR analysis in the sweetpotato whitefly, Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae)." *PloS one 8*(1): e53006.

Liang, P., Guo, Y., Zhou, X. ve Gao, X. J. P. O. (2014). "Expression profiling in Bemisia tabaci under insecticide treatment: indicating the necessity for custom reference gene selection." *PloS one 9*(1): e87514.

Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D. J. m. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method." *Methods 25*(4): 402-408.

Lu, Y., Zheng, X., Liang, Q., Xu, H., Yang, Y., Tian, J., He, X. ve Lu, Z. (2015). "Evaluation and validation of reference genes for SYBR Green qRT-PCR normalization in Sesamia inferens (Lepidoptera: Noctuidae)." *Journal of Asia-Pacific Entomology 18*(4): 669-675.

Lü, J., Yang, C., Zhang, Y. ve Pan, H. (2018). "Selection of Reference Genes for the Normalization of RT-qPCR Data in Gene Expression Studies in Insects: A Systematic Review." *Front Physiol 9*: 1560.

Marchal, E., Hult, E. F., Huang, J. ve Tobe, S. S. (2013). "Sequencing and validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR during the gonadotrophic cycle of Diploptera punctata." *BMC Research Notes 6*(1): 237.

Mariod, A. A., Saeed Mirghani, M. E. ve Hussein, I. (2017). Blaptica dubia Cockroaches. *Unconventional Oilseeds and Oil Sources*: 337-340.

McKittrick, F. A. (1964). "Evolutionary Studies of cockroach." *Cornell Univ. Agr.* : 389. 197 p.

Pan, H., Yang, X., Siegfried, B. D. ve Zhou, X. (2015). "A Comprehensive Selection of Reference Genes for RT-qPCR Analysis in a Predatory Lady Beetle, Hippodamia convergens (Coleoptera: Coccinellidae)." *PLoS One 10*(4): e0125868.

Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. ve Neuvians, T. P. (2004). "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations." *Biotechnology letters 26*(6): 509-515.

Rodrigues, T. B., Khajuria, C., Wang, H., Matz, N., Cunha Cardoso, D., Valicente, F. H., Zhou, X. ve Siegfried, B. (2014). "Validation of reference housekeeping genes for gene expression studies in western corn rootworm (Diabrotica virgifera virgifera)." *PLoS One 9*(10): e109825.

Rodríguez-Lázaro, D. ve Hernández, M. (2013). "Real-time PCR in food science: introduction." *Current issues in molecular biology 15*(2): 25-38.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J. ve Andrade, M. J. (2015). Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *PCR primer design*, Springer: 31-56.

Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M. I., Justesen, A. F. ve Córdoba, J. J. (2011). "Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR methods." *International Journal of Food Microbiology 149*(3): 226-235.

Roth, L. M. (2003). "Systematics and phylogeny of cockroaches (Dictyoptera: Blattaria)." *Oriental Insects 37*(1): 1-186.

Rumpold, B. A. ve Schlüter, O. K. (2013). "Nutritional composition and safety aspects of edible insects." *Molecular nutrition & food research 57*(5): 802-823.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. ve Erlich, H. A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science 239*(4839): 487-491.

Scharlaken, B., de Graaf, D. C., Goossens, K., Brunain, M., Peelman, L. J. ve Jacobs, F. J. (2008). "Reference gene selection for insect expression studies using

quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, Apis mellifera, after a bacterial challenge." *Journal of insect Science 8*(1): 33.

Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S. ve Karsch-Mizrachi, I. (2020). "NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools." *Database : the journal of biological databases and curation 2020*: baaa062.

Shakeel, M., Rodriguez, A., Tahir, U. B. ve Jin, F. (2018). "Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: an overview in insects." *Biotechnol Lett 40*(2): 227-236.

Sikand, K., Singh, J., Ebron, J. S. ve Shukla, G. C. (2012). "Housekeeping gene selection advisory: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β-actin are targets of miR-644a." *PLoS One 7*(10): e47510.

Silver, N., Best, S., Jiang, J. ve Thein, S. L. (2006). "Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR." *BMC molecular biology 7*(1): 1-9.

Sobhy, H. ve Colson, P. (2012). "Gemi: PCR primers prediction from multiple alignments." *Comparative and functional genomics 2012*.

Strube, C., Buschbaum, S., Wolken, S. ve Schnieder, T. (2008). "Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR to investigate protein disulfide isomerase transcription pattern in the bovine lungworm Dictyocaulus viviparus." *Gene 425*(1-2): 36-43.

Studzińska, A., Tyburski, J., Daca, P. ve Tretyn, A. (2008). "Real Time PCR. The idea of the method and strategies of reaction monitoring." *Biotechnologia 80*(1): 71-85.

Teng, X., Zhang, Z., He, G., Yang, L. ve Li, F. (2012). "Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in four lepidopteran insects." *Journal of Insect Science 12*(1).

Thellin, O., ElMoualij, B., Heinen, E. ve Zorzi, W. (2009). "A decade of improvements in quantification of gene expression and internal standard selection." *Biotechnology Advances 27*(4): 323-333.

Tilli, T. M., Castro, C. d. S., Tuszynski, J. A. ve Carels, N. (2016). "A strategy to identify housekeeping genes suitable for analysis in breast cancer diseases." *BMC Genomics 17*(1): 639.

Tyburski, J., Studzińska, A., Daca, P. ve Tretyn, A. (2008). "PCR in real time. The methods of data analysis." *Biotechnologia, vol. 80, 1 -. 80*(1): 86-96.

Tzompa-Sosa, D. A., Yi, L., van Valenberg, H. J., van Boekel, M. A. ve Lakemond, C. M. (2014). "Insect lipid profile: aqueous versus organic solvent-based extraction methods." *Food research international 62*: 1087-1094.

Van Hiel, M. B., Van Wielendaele, P., Temmerman, L., Van Soest, S., Vuerinckx, K., Huybrechts, R., Broeck, J. V. ve Simonet, G. (2009). "Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust Schistocerca gregaria under different developmental conditions." *BMC molecular biology 10*(1): 1-10.

Van Hiel, M. B., Van Wielendaele, P., Temmerman, L., Van Soest, S., Vuerinckx, K., Huybrechts, R., Broeck, J. V. ve Simonet, G. (2009). "Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust Schistocerca gregaria under different developmental conditions." *BMC Mol Biol 10*: 56.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. ve Speleman, F. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR

data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome biology 3*(7): 1-12.

VanGuilder, H. D., Vrana, K. E. ve Freeman, W. M. (2008). "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis." *Biotechniques 44*(5): 619-626.

Wang, X. ve Seed, B. (2003). "A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis." *Nucleic acids research 31*(24): e154-e154.

Wong, M. L. ve Medrano, J. F. (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation." *Biotechniques 39*(1): 75-85.

Wu, H. (2013). *Biology of Blaptica dubia (Blattodea: Blaberidae)*, *Auburn University*.

Wu, H., Appel, A. G. ve Hu, X. P. (2013). "Instar determination of Blaptica dubia (Blattodea: Blaberidae) using Gaussian mixture models." *Annals of the Entomological Society of America 106*(3): 323-328.

Wu, H., Hu, X. P. ve Appel, A. G. (2017). "Temperature-Dependent Development and Thermal Sensitivity of Blaptica dubia (Blattodea: Blaberidae)." *J Econ Entomol 110*(2): 546-551.

Xu, M., Zhang, B., Su, X., Zhang, S. ve Huang, M. (2011). "Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in Populus." *Analytical biochemistry 408*(2): 337-339.

Yang, C., Pan, H., Noland, J. E., Zhang, D., Zhang, Z., Liu, Y. ve Zhou, X. (2015). "Selection of reference genes for RT-qPCR analysis in a predatory biological control agent, Coleomegilla maculata (Coleoptera: Coccinellidae)." *Scientific Reports 5*(1): 18201.

Yang, C., Preisser, E. L., Zhang, H., Liu, Y., Dai, L., Pan, H. ve Zhou, X. (2016). "Selection of reference genes for RT-qPCR analysis in Coccinella septempunctata to assess un-intended effects of RNAi transgenic plants." *Frontiers in plant science 7*: 1672.

Yang, Q., Li, Z., Cao, J., Zhang, S., Zhang, H., Wu, X., Zhang, Q. ve Liu, X. (2014). "Selection and assessment of reference genes for quantitative PCR normalization in migratory locust Locusta migratoria (Orthoptera: Acrididae)." *PLoS One 9*(6): e98164.

Yee, L., Kumara, K., Binti, N., Latif, A. ve Rao, P. (2015). "Dubia cockroach (Blaptica dubia) as an alternative protein source for animal feed." *Journal of Biochemical Biopharmaceutical Biomedical Science 1*: 31-39.

Yi, L., Lakemond, C. M., Sagis, L. M., Eisner-Schadler, V., van Huis, A. ve van Boekel, M. A. (2013). "Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species." *Food chemistry 141*(4): 3341-3348.

Yuan, M., Lu, Y., Zhu, X., Wan, H., Shakeel, M., Zhan, S., Jin, B.-R. ve Li, J. (2014). "Selection and evaluation of potential reference genes for gene expression analysis in the brown planthopper, Nilaparvata lugens (Hemiptera: Delphacidae) using reverse-transcription quantitative PCR." *PloS one 9*(1): e86503.

Zhai, Y., Lin, Q., Zhou, X., Zhang, X., Liu, T. ve Yu, Y. (2014). "Identification and validation of reference genes for quantitative real-time PCR in Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae)." *PloS one 9*(9): e106800.

Zhang, S., An, S., Li, Z., Wu, F., Yang, Q., Liu, Y., Cao, J., Zhang, H., Zhang, Q. ve Liu, X. (2015). "Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae)." *Gene 555*(2): 393-402.