



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ HASTALIĞI TESPİTİ İÇİN İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL
ÇOĞALTMA YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYONU

Hasan SAĞCAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Haziran, 2018

İSTANBUL

Bu çalışma, 22.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Jürisi



Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ
Trakya Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Özgür ÇAKIR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Dr. Öğr. Üyesi Çağatay TARHANI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 25795 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenim hayatım ve tez çalışmalarım boyunca bana destek olup her alanda ışık tutan değerli danışman hocam Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA'ya en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Berber çalışma fırsatı bulduğum, her türlü bilgi ve tecrübelerini paylaşarak emeklerini esirgemeyen, her konuda yol gösterici olan Dr. H. Esra AĞEL ile Serkan SAVSAR, Fuat ARSLAN ve Şaban YILMAZ abilerime ve TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca aynı laboratuvarı paylaştığımız bilgi ve yardımlarını esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü GDO laboratuvarındaki değerli bilim insanı arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İstanbul Ziraat Karantina Müdürlüğü yönetimi ve çalışanlarına, fikirleri ve çalışma materyali desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her anında ve aldığım her kararda beni destekleyen, varlıklarının ve sevgilerinin hayatımı özel kıldığı sevgili annem Zahide SAĞCAN, değerli babam Z. Abidin SAĞCAN, biricik kardeşim Gizem SAĞCAN'a ve bütün aileme teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Hayatımı paylaştığım, tanıdığım ilk andan itibaren dünyamı değiştiren sevgili eşim Nihan SAĞCAN'a varlığından, sevgisinden, desteğinden ve yardımlarından dolayı sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2018

Hasan SAĞCAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. BİTKİ PATOJENLERİNE GENEL BAKIŞ.....	3
2.1.1. Mantarlar	4
2.1.2. Nematodlar	4
2.1.3. Virüsler	5
2.1.4. Bakteriler	5
2.1.4.1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	6
2.2. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> TANI YÖNTEMLERİ	7
2.3. İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL AMPLİFİKASYON	9
2.3.1. LAMP Primerleri	10
2.3.2. LAMP Çalışma Prensibi	11
2.3.3. LAMP Ürünlerinin tespiti.....	13
2.3.3.1. Jel Elektroforez Yöntemi	13
2.3.3.2. SYBR Green Yöntemi	13
2.3.3.3. Bulanıklılık Tespit Yöntemi	14
2.3.3.4. Kalsein Boyama Yöntemi	15
2.3.3.5. Yanal Akışlı Test Strip Yöntemi.....	16
2.3.3.6. Kolorimetrik LAMP Yöntemi	16
2.4. YANAL AKIŞLI TEST STRİBİ.....	17
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	20
3.1. LAMP PRİMER TASARIMI.....	20
3.2. DNA İZOLASYON YÖNTEMİ	20

3.3. İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL AMPLİFİKASYON REAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU	22
3.4. LAMP ÜRÜNLERİNİN ANALİZİ	23
3.4.1. LAMP Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrez ile Analizi	23
3.4.2. LAMP Ürünlerinin Yanal Akışlı Test Stribi ile Analizi.....	23
3.4.3. LAMP Ürünlerinin Kolorimetrik Yöntem ile Analizi	24
3.5. LAMP PRİMERLERİNİN HASSASLIK VE ÖZGÜLLÜK ÇALIŞMALARI.....	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. LAMP REAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU	25
4.1.1. Sıcaklık ve dNTP Optimizasyonu	25
4.2. LAMP PRİMERLERİNİN ÖZGÜLLÜĞÜ	28
4.3. LAMP REAKSİYONUNUN HASSASİYETİ	30
4.4. SONUÇLARIN GÖRÜNTÜLENMESİ	31
4.4.1. Jel Elektrofrez Yöntemi ile Görüntüleme.....	31
4.4.2. Yanal Akışlı Test Stripleri ile Görüntüleme.....	32
4.4.3. Kolorimetrik Görüntüleme	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
KAYNAKLAR.....	38
EKLER	43
EK.1 Yetki Belgesi.....	43
ÖZGEÇMİŞ	45

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** EPPO'nun *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* tanı şeması (OEPP ve EPPO, 2006) 8
- Şekil 2.2:** LAMP Hedef dizisi ve primerleri 11
- Şekil 2.3:** LAMP çalışma prensibi şeması 12
- Şekil 2.4:** Jel elektroforez yöntemi ile LAMP ürünlerinin gösterimi..... 13
- Şekil 2.5:** SYBR Green yöntemi ile LAMP ürünlerinin gösterimi 14
- Şekil 2.6:** Bulanıklılık tespit yöntemi ile LAMP ürünlerinin gösterimi 15
- Şekil 2.7:** Kalsein boyama yöntemi ile LAMP ürünlerinin gösterimi 16
- Şekil 2.8:** Kolorimetrik LAMP yöntemi ile reaksiyon ürünlerinin görüntülenmesi 17
- Şekil 2.9:** Yanal akışlı test stribi 18
- Şekil 2.10:** LAMP ürünlerinin LFD ile tespiti 19
- Şekil 3.1:** LAMP Primerlerinin hedef dizisi (Genbank: AF001266.1), F3 ve B3: yeşil, F1c ve B1c: mavi, F2 ve B2: sarı. 20
- Şekil 4.1:** Sıcaklık optimizasyonu sonucu örneklerin jel görüntüsü. 65.6 °C; 1: *Cms* 30 ng/µl, 2: *Cms* 10 ng/µl, 3: negatif kontrol (n.k.), 67 °C; 4: *Cms* 30 ng/µl, 5: *Cms* 10 ng/µl, 6: n.k., 68.8 °C; 7: *Cms* 30 ng/µl, 8: *Cms* 10 ng/µl, 9: n.k., 71.4 °C; 10: *Cms* 30 ng/µl, 11: *Cms* 10 ng/µl, 12: n.k., ladder: 50 bp 26
- Şekil 4.2:** Sıcaklık ve dNTP optimizasyonu sonucu örneklerin jel görüntüsü. Ladder: 50 bp, 68 °C; 0.4 mM dNTP, 1: *Cms* 10 ng/µl, 2: n.k., 3: n.k, 1.0 mM dNTP, 4: *Cms* 10 ng/µl, 5: n.k., 6: n.k., 1.5 mM dNTP, 7: *Cms* 10 ng/µl, 8: n.k., 9: n.k., 69.2 °C; 0.4 mM dNTP, 10: *Cms* 10 ng/µl, 11: n.k., 12: n.k, 1.0 mM dNTP, 13: *Cms* 10 ng/µl, 14: n.k., 15: n.k., 1.5 mM dNTP, 16: *Cms* 10 ng/µl, 17: n.k., 18: n.k., 70 °C; 0.4 mM dNTP, 19: *Cms* 10 ng/µl, 20: n.k., 21: n.k, 1.0 mM dNTP, 22: *Cms* 10 ng/µl, 23: n.k., 24: n.k., 1.5 mM dNTP, 25: *Cms* 10 ng/µl, 26: n.k., 27: n.k. 27
- Şekil 4.3:** Optimize reaksiyon çalışma sonucu jel görüntüsü. Ladder: 50 bp, 1: *Cms* 10 ng/µl, 2: *Cms* 10 ng/µl, 3: *Solanum tuberosum* 10 ng/µl, 4: *Solanum tuberosum* 10 ng/µl, 5: n.k., 6: n.k. 29
- Şekil 4.4:** LAMP primerlerinin özgüllük çalışması sonucunun jel görüntüsü. 1: *Cms* 10 ng/µl, 2: *Cms* 10 ng/µl, 3: *Solanum tuberosum* 10 ng/µl, 4: *Solanum tuberosum* 10 ng/µl, 5: *Escherichia coli* 10 ng/µl, 6: *Escherichia coli* 10 ng/µl, 7: *Salmonella*

spp. 10 ng/μl, 8: <i>Salmonella</i> spp. 10 ng/μl, 9: <i>Listeria monocytogenes</i> 10 ng/μl, 10: <i>Listeria monocytogenes</i> 10 ng/μl, 11: <i>Clostridium perfringens</i> 10 ng/μl, 12: <i>Clostridium perfringens</i> 10 ng/μl, 13: <i>Staphylococcus aureus</i> 10 ng/μl, 14: <i>Staphylococcus aureus</i> 10 ng/μl, 15: n.k., 16: n.k.....	30
Şekil 4.5: LAMP primerlerinin hassasiyeti çalışması sonucunun jel görüntüsü. Ladder: 50 bp, 1: <i>Cms</i> 10 ng/μl, 2: <i>Cms</i> 1 ng/μl, 3: <i>Cms</i> 100 pg/μl, 4: <i>Cms</i> 10 pg/μl, 5: <i>Cms</i> 1 pg/μl, 6: <i>Cms</i> 0.1 pg/μl.....	31
Şekil 4.6: <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> 'un LAMP yöntemiyle tanısında ampliconların jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmesi. Ladder: 50 bp, 1: <i>Cms</i> 10 ng/μl, 2: <i>Cms</i> 10 ng/μl, 3: n.k., 4: n.k.	32
Şekil 4.7: <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> 'un LAMP yöntemiyle tanısında ampliconların LFD ile görüntülenmesi. 1: <i>Cms</i> 30 ng/μl, 2: <i>Cms</i> 10 ng/μl, 3: n.k.	33
Şekil 4.8: <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> 'un LAMP yöntemiyle tanısında ampliconların kolorimetrik olarak tespiti. 1: <i>Cms</i> 30 ng/μl, 2: <i>Cms</i> 10 ng/μl, 3: n.k., 4: n.k.	34

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: LAMP ve PZR yönteminin karşılaştırılması.....	10
Tablo 3.1: <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> 16-23S rDNA IGS'ye özgü tasarlanan LAMP primerleri.....	20
Tablo 3.2: LAMP reaksiyon içeriği.....	22
Tablo 3.3: Kolorimetrik LAMP çalışması reaksiyon içeriği	24
Tablo 4.1: LAMP çalışması reaksiyon içeriği	25
Tablo 4.2: LAMP optimizasyonu sonucu elde edilen son reaksiyon içeriği	28

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
ml	: Mililitre
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
n.k.	: Negatif Kontrol
nm	: Nanometre
g	: Gram
pg	: Pikogram
U	: Unit
V	: Volt

Kısaltmalar Açıklama

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
B3	: Geri Dış Primer
BIP	: Geri İç Primer
bp	: Baz çifti
CFU	: Koloni Oluşturan Birim, 'Colony Forming Unit'
CMS	: <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EPPO	: Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonu, 'European and Mediterranean Plant Protection Organization'
F3	: İleri Dış Primer

FAM	: 6-Carboxyfluorescein
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü, 'Food and Agriculture Organization of United Nation'
FIP	: İleri İç Primer
FISH	: Floresanlı Yerde Hibritleşme, 'Fluorescence In Situ Hybridization'
FITC	: Fluorescein Isothiocyanate
xg	: Rölatif Santrifüj Kuvveti, 'RCF'
IFAs	: İndirekt Floresan Antikor Boyama, 'Immunofluorescence Assays'
IGS	: Genler Arası Bölge, 'Intergenic Spacer'
LAMP	: İlmige Dayalı İzotermal Amplifikasyon, 'Loop Mediated Isothermal Amplification'
LFD	: Yanal Akışlı Test Stribi, 'Lateral Flow Dipstick'
LFIA	: Yanal Akışlı İmmüno Testler, 'Lateral Flow Immüno Assay'
n.k.	: Negatif Kontrol
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu, 'Polymerase Chain Reaction'
PoC	: Hasta Başı Uygulamalar, 'Point of Care'
rDNA	: Ribozomal DNA
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı, 'Rotation per minute'
T.C.	: Türkiye Cumhuriyeti
UV	: Ultra Viyole

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ HASTALIĞI TESPİTİ İÇİN İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL ÇOĞALTMA YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYONU

Hasan SAĞCAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Bitki hastalıkları, dünya genelinde düşük tarımsal verimliliğin en önemli nedenlerinden biridir. Bu hastalıkların yayılma oranları göz önünde bulundurulursa, gıda arzının sürdürülebilirliğinin önemli bir tehdit altında olduğu görülmektedir. Küresel tarım verimliliğindeki %40'a yakın kayba doğrudan patojenler, hayvanlar ve yabancı otlar neden olmaktadır. Bitkilerin hastalıklara karşı tepkileri birbirlerinden farklıdır ve gösterdikleri tepkilerde çoğu zaman enfeksiyonu almalarından çok sonra ortaya çıkar. Bu nedenle enfeksiyonları henüz semptomlar oluşmadan tespit etmek büyük salgınların dolayısıyla da ekonomik kayıpların önüne geçecektir.

Bitki hastalıklarını tespit edebilmek için yaygın olarak kullanılan laboratuvar bazlı birçok nükleik asit ve protein tanı yöntemi mevcuttur. Ancak çoğu tanı yönteminin uygulanması için kompleks cihazlara ve uzman kişilere gereksinim duyulmaktadır. Bu durum, bitki hastalıklarının hızlı ve sahada tanısına yönelik geliştirilecek yöntemlerin önünde engel oluşturmaktadır.

2000 yılında yayınlanan bir çalışma ile nükleik asit tabanlı tanı yöntemleri yeni bir boyut kazanmıştır. İlmige dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) olarak adlandırılan bu yöntemde, primerlerin tasarım biçimi ve kullanılan *Bst* DNA polimeraz enzimi nedeniyle bütün reaksiyon izotermal olarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu da yöntemin, sahada kullanıma uygun tanı yöntemlerinin gelişmesi için son derece uygun olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, patates bitkisi üretimine, küresel boyutlarda zarar veren *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* patojeninin tespiti için LAMP metodunun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

LAMP ürünlerinin tespiti için, jel elektroforez yöntemi, SYBR green yöntemi, bulanıklık tespit yöntemi, kalsein boyama yöntemi, yanal akışlı test stripleri (LFD), kolorimetrik LAMP yöntemi gibi birçok yöntem kullanılabilir. Bu tez çalışmasında ise jel elektroforez yöntemi, yanal akışlı test stripleri ve kolorimetrik LAMP yöntemi kullanılmıştır. Süre ve kullanım kolaylığı açısından yanal akışlı test stripleri ve kolorimetrik LAMP yönteminin, saha çalışmalarına daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Yöntemin optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra, *Solanum tuberosum*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* ve *Staphylococcus aureus* DNA örneklerinde LAMP primerlerinin özgüllüğü test edilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda tasarlanan primerlerin farklı bir patojen varlığında pozitif sonuç vermediği belirlenmiştir. Tanı konulması amacıyla kullanılması gereken en düşük DNA miktarının ya da diğer bir deyişle yöntemin hassasiyetinin 10 pg/µl DNA olduğu belirlenmiştir.

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*'un tanısı için optimizasyonu yapılan LAMP yönteminin, gerekli validasyon ve sertifikasyon çalışmalarının ardından saha çalışmalarında aktif olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Haziran 2018, 60 sayfa.

Anahtar kelimeler: İlmiğe Dayalı İzotermal Çoğaltma, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Yanal Akışlı Test Stripi, Hasta Başı-Yerinde Tanı, Bitki Hastalıkları.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

OPTIMIZATION OF LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION ASSAY FOR PLANT DISEASE DETECTION

Hasan SAĞCAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA

The most important causes of low agricultural productivity worldwide are plant diseases. Considering spread rate of these diseases, sustainability of food supply is a serious threat. Loss about 40% of global agricultural productivity is because of pathogens, animals and weeds. Reactions of plants to diseases are different from each other, and their first reactions are generally seemed much later than their first exposure to infection. For this reason, detecting of infections before symptoms are formed will prevent major outbreaks and economic losses.

There are many laboratory-based methods of nucleic acid and protein diagnosis in order to detect plant diseases. On the other hand most of these diagnosis methods need complex equipments and experts. This situation is an obstacle to the methods to be developed for rapid diagnosis in the field of plant diseases.

Nucleic acid based diagnosis methods got a new dimension with a study that published in 2000. In this method, called loop-mediated isothermal amplification (LAMP), whole reaction can be performed in isothermal conditions because of design features of primers and *Bst* DNA polymerases enzyme. This situation shows that, LAMP method has an important role in development of diagnostic methods suitable for using in the field studies.

In this thesis, the LAMP method has been optimized for the detection of pathogenic microorganism *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* that damages potato plants in global dimensions.

In order to detect LAMP products, gel electrophoresis method, SYBR Green method, turbidity detection method, calcein staining method, lateral flow test strips and colorimetric LAMP method are being used. In this thesis study, gel electrophoresis method, lateral flow test strips and colorimetric LAMP method have been used. In terms of time and ease of use, lateral flow test strips and colorimetric LAMP method are considered to be more suitable for field studies.

After optimization of the method, the specificity of LAMP primers has been tested with DNA samples of *Solanum tuberosum*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus*. In the direction of the results, it has been determined that the designed primers do not give a positive result in the presence of a different pathogen. It has been determined that the minimum amount of DNA to be used for diagnosis, or in other words the sensitivity of method, is 10 pg/μl.

The LAMP method that is optimized for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, is considered to be actively used in field studies after necessary validation and certification studies.

June 2018, 60 pages.

Keywords: Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Lateral Flow Dipstick (LFD), Point of Care (PoC) diagnostic, Plant Disease

1. GİRİŞ

Patojen kaynaklı bitki hastalıkları, canlı bir organizmanın, bitkilerde neden olduğu yapısal veya fizyolojik anormallik olarak tanımlanabilir. Hastalığa sebep olan canlıya patojen, hastalığa maruz kalan bitkiye ise konak denilmektedir. Patojen kaynaklı bitki hastalığının oluşması için, duyarlı bir konak, uygun çevresel koşullar ve canlı bir patojen gibi 3 koşulun aynı anda gerçekleşmesi gerekmektedir. Bitki patojenleri, farklı ekosistemlerde yetiştirilen ekinlere farklı ölçeklerde zarar verebilir. Bitki hastalıklarının, küresel anlamda % 15'lik bir oranda verim kaybına sebep olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda gelişmekte olan ülkelerde bitki hastalıklarının sebep olduğu hasat kayıplarının gelişmiş ülkelere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Hasat kayıplarının büyüklüğü, bitki hastalıklarının tanısının olabildiğince hızlı yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Bitki hastalıklarına sebep olan patojenler, bakteri, mantar, virüs ve nematodlar olarak 4 farklı canlı grubundan oluşmaktadır. Bitki patojeni olan bakteriler, patojen mantarlara göre daha küçük ve daha basit yapılıdır. Bitki hastalıklarına sebep olan 200 kadar bakteri türü bilimsel olarak tanımlanmıştır.

Dünya çapında son derece önemli bir gıda ürünü olan patates, 130'dan fazla ülkede yetiştirilmektedir. Dünya bankası ve FAO, patatesi dünyanın en önemli dördüncü gıda ürünü olarak sıralamaktadır. Gelişmiş tarımsal uygulamalar sayesinde patates neredeyse tüm iklim koşullarında yetiştirilebilmektedir. Patates, tohumundan ve küresel üretiminin büyük bir kısmında olduğu gibi patates üzerinden çıkan yumrulardan yapılabilmektedir. Yumrulardan gerçekleştirilen üretim ile patates zararlılarının sonraki hasatlara aktarımı daha kolay olmakta ve ciddi maddi kayıplara yol açabilmektedir.

Patates halka çürüğü, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* patojeninin sebep olduğu büyük ekonomik kayıplara neden olan bir karantina hastalığıdır. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, patates üretiminde kullanılan ekipman ve malzemelerin yüzeyinde uzun süre yaşayabildiği için kontrol edilmesi oldukça zor bir patojendir. Bu nedenle *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 'un tespit edileceği güvenilir ve hassas yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Nükleik asit amplifikasyonu, bulaşıcı hastalıkların ve genetik farklılıkların tespiti için kullanılabilen en etkin yöntemlerden biridir. Yaygın olarak kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tabanlı tanı yöntemlerine ek olarak çeşitli amplifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlardan biri de Natomi ve diğ. (2000) yayınladığı ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) yöntemidir. Bu yöntem, yüksek iplik açma aktivitesine sahip DNA polimeraz enzimi ve kendine özgü tasarıma sahip hedef dizisinde 6 farklı bölgeyi tanıyan 4 primerin kullanıldığı sabit sıcaklıkta yapılan DNA sentezine dayanır. LAMP yöntemi, uygulaması nispeten basit, hızlı, yüksek özgüllüğe sahip bir yöntem olması ve ayrıca uygulama sırasında kompleks laboratuvar cihazlarına ihtiyaç duymaması sebebiyle bu tez çalışmasında patojen tanısında kullanılmak üzere tercih edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında, öncelikle *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*'un LAMP yöntemiyle tanısı için özgül LAMP primerleri tasarlanmıştır. Bunun için *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*'a özgü 16 ve 23s rDNA genler arası bölgenin (IGS) 224 bç'lik bölgesi hedef olarak seçilerek, PrimerExplorer V5 programında primerler tasarlanmıştır. Yöntemin optimizasyonu için dNTP konsantrasyonları ve primer bağlanma sıcaklığı üzerinde çalışılmıştır. LAMP ürünlerinin tespiti için, jel elektroforez yöntemi, yanal akışlı test stripleri ve kolorimetrik LAMP yöntemi kullanılmıştır. Yöntemin optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra primerlerin özgünlüğü için, *Solanum tuberosum*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* ve *Staphylococcus aureus* DNA örnekleri kullanılmıştır. Yöntemin hassasiyeti için ise 10 ng/μl'den 0.1 pg/μl'ye kadar 6 farklı dilüsyon serisi kullanılmıştır.

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*'un tanısı için optimizasyonu yapılan LAMP yöntemi için ulusal patent başvurusu yapılmış olup, bir sonraki aşamada sahada aktif olarak kullanımı için belgelendirme çalışmalarının yapılması planlanmaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİTKİ PATOJENLERİNE GENEL BAKIŞ

Canlı bir organizmanın bitkilerde ortaya çıkardığı yapısal veya fizyolojik değişiklikler patojen kaynaklı bitki hastalıkları olarak adlandırılabilir. Yapısal veya fizyolojik değişikliğe sebep olan canlıya patojen, değişikliğe maruz kalan bitkiye ise konak denmektedir. Bitkide hastalığın oluşması için çevresel koşulların uygun olması, canlı bir patojenin varlığı ve bu patojene duyarlı konak bitkinin aynı anda bulunması gerekmektedir. Patojenin konak bitkiyi enfekte etmesiyle konakta bazı belirtiler meydana gelir. Bu belirtiler çoğunlukla bitkilerin görünümündeki değişikliklerdir (Moore ve diğ. 2011).

Patojenler uygun bir konak bitki bulduklarında ve uygun çevresel şartlar oluştuğunda hızlıca gelişip çoğalarak konak organizmanın çeşitli fizyolojik işlevinin bozulmasına ve sonuç olarak karakteristik makroskopik belirtilerin ortaya çıkmasına neden olurlar. Patojen, konağa ulaşmasıyla konaktaki doğal hastalık direnç metabolizmasını, enzim ve toksik maddeleri üreterek baskılar (Narayanasamy, 2001). Bu enzim ve toksik maddeler özellikle programlanmış hücre ölümü yolağını, hücre duvarı tabanlı savunma mekanizmasını, jasmonik asit sinyalini ve savunma genlerinin ekspresyonu gibi bitki direncinin temel bileşenlerini hedef alarak bitki savunmasını zayıflatır. Bitki savunmasının zayıflamasıyla konak organizmada doku nekrozları ve hücre ölümleri görülmeye başlar (Abramovitch ve Martin, 2004).

Dünya genelinde sürekli artan nüfus ve buna bağlı olarak artan gıda talebi miktarının karşılanmasında bitki hastalıklarına karşı olan ürünlerin korunması önemli bir role sahiptir. Patojen, hayvan ve yabancı ot nedeniyle tarımsal verimlilik %40 oranına kadar azalmaktadır. Özellikle bitki patojenlerinin yayılma oranları ve insidansı dünya gıda arzının sürdürülebilirliği için önemli bir tehdit haline gelmiştir (Savary ve diğ., 2012).

Genel olarak bitki patojenleri, insan ve hayvanları etkilemezler. Bitki patojenleri, hasta bitkilerden sağlıklılarına yayılmalarına göre ve etkiledikleri bitkide, büyüme ve çoğalma yeteneklerine göre karakterize edilirler (Wilkinson ve diğ., 2011).

Bitki hastalıklarına sebep olan patojenler birçok farklı şekilde gruplandırılabilir. En sık kullanılan gruplandırılmaya göre, mantarlar (fungi), nematodlar, virüsler ve bakteriler olarak 4 farklı gruptan bahsedilmektedir (Horst, 2008).

2.1.1. Mantarlar

Mantarlar, bitki patojeni olarak ön plana çıkmaktadır ve bitki hastalıklarının yaklaşık % 70'inden sorumludurlar (Deacon, 2006). En önemli örneklerden biri patatestte görülen ve 1840'lı yıllarda İrlanda'da büyük kıtlığa sebep olan *Phytophthora infestans* (Oomycota) patojenidir. Bu sebeple o dönemde yarım milyondan fazla insanın açlıktan öldüğü ve yarım milyona yakın insanın da bölgeden göç ettiği tahmin edilmektedir. Bu patojen hala patates ekilen bölgeler için alınan önlemlere ve mantar ilaçlarına rağmen ciddi bir risk oluşturmaktadır (Deacon, 2006a). Yaklaşık 2 milyon kişinin açlıktan ölmesiyle sonuçlanan Büyük Bengal Kıtlığı'nda, pirinç mahsullerinin zarar görmesine neden olan diğer fungal patojen ise yaprak lekeli patojeni *Helminthosporium oryzae*'dir (Sunder ve diğ., 2014). Mantarlar aynı zamanda peyzaj bitkilerinde de ciddi hastalıklara sebep olmaktadır. Örnek olarak, *Ophiostoma ulmi* patojeninin neden olduğu, Hollanda karaağaç hastalığı sebebiyle geçen yüzyılda Kuzey Amerika, İngiltere ve Avrupa kıtasında neredeyse karaağaç popülasyonları yok olmuştur. Benzer olarak, *Cryphonectria parasitica*'nın neden olduğu kestane kırması hastalığı nedeniyle, yerli Amerikan kestane ağaçları harap olmuştur. Bu hastalık görülmeye başladıktan kısa süre sonra ABD'nin doğusunda büyük bir hızla yayılmıştır (Rigling ve Prospero, 2018).

20. yüzyılın ilk yarısı boyunca, fungal fizyoloji büyük ilgi konusu olmuştur. Fungal patojenler tarafından üretilen birçok enzim tanımlanmış olmasına rağmen, fizyolojik veya biyokimyasal teknikler kullanılarak bu enzimlerin patojenideki ve patojen virulansındaki rolü halen tam olarak belirlenememiştir.

Başarılı fungal patojenlerde, bitki patojen tespit sistemlerinden kaçınmalarına yardımcı olan ve bitki savunma sistemlerinin müdahalesini önleyen mekanizmalar geliştiği görülmektedir. Örnek olarak, *Colletotrichum spp.*'de bulunan CLTA1 ve CIH1 genleri, patojenin biyotrofik fazda kalmasını sağlayarak konak savunma sistemlerinin ortaya çıkmasını önlediği belirtilmiştir (Narayananamy, 2008a).

2.1.2. Nematodlar

Nematodlar dünyadaki en eski ve çeşitli canlı gruplarından biridir. Çoğu nematod mikroskobik olup bakteri, mantar veya diğer nematodlarla beslenirken, yaklaşık %15'lik kısmı bitki parazitidir. Bitki paraziti olan nematodlar basit canlılar olup genelde 1000'den az hücreye sahiptir. Farklı şekil ve büyüklüklerde görülebilmektedir. Genel olarak uzun ince bir

yapıdayken olgunlaştıklarında, solucan benzeri ve şişmiş durumda olabilirler. Bu organizmalar küçük olmasına karşın, karmaşık bir sinir sistemi ve duyu organı ağına sahiptirler. Bu sayede ihtiyaç duydukları konağı kolaylıkla bulabilmekte ve eşlenip çoğalabilmektedirler. Bitki dokularını delen ve bitkinin enfekte olmasına yol açan maddeleri üreten bir tür ağız bölümüne sahiptirler. Çoğu nematod türü bitkinin yaprak, tohum, çiçek gibi farklı kısımlarıyla beslenebilmekte olmasına rağmen genel olarak toprakta oldukları için bitkinin kök kısımlarıyla beslenmektedir. Bu sebeple nematodlar bitkide, besin eksikliği, solgunluk, bodur kalma ve bazen bitki ölümüne kadar ağır patolojilere neden olmaktadır (Perry ve Moens, 2011).

2.1.3. Virüsler

Virüsler, büyümek ve çoğalmak için bir konağa ihtiyaç duydukları için zorunlu parazit olarak ifade edilmektedir. Hücrede, virüs kendi protein kılıfını saklar. Uygun şartlarda nükleik asiti, kendisinin ve ilgili proteinin çoklu kopyalarını oluşturarak yeni virüslerin oluşumuna yol açar (Thomas, 2004). Virüslerin, hücreden hücreye iletimi plazmodezmata adı verilen köprüler aracılığıyla gerçekleşir ve enfekte bitkilerde floem aracılığıyla hareket eder (Kumar ve diğ., 2014). Virüslerin çoğalması kompleks mekanizmalar olmasının yanı sıra genel olarak, bitkilerin normal süreçlerine engel olması yoluyla hastalıklara neden olduğu söylenebilir. Ancak, birçok bitki virüsler tarafından enfekte olmasına karşın herhangi bir belirti göstermemektedir (latent evre) (Roossinck, 2010).

Bitki virüsleri, birçok önemli bitki hastalığına neden olur ve dünyanın her yerinde bitki üretiminde ve kalitede büyük kayıplardan sorumludur. Enfekte olan bitkiler hastalığa bağlı olarak farklı belirtilere sebep olabilir ancak genel olarak yaprak sararması, yaprakta şekil bozuklukları ve diğer büyüme bozuklukları görülmektedir (Roossinck, 2015).

2.1.4. Bakteriler

Bakterilerin çoğu insan ve doğal yaşam için yararlı ve vazgeçilmez canlılardır. Özellikle insanlar ve diğer canlılar tarafından üretilen büyük miktarlardaki organik atıkların ayrıştırılarak doğaya kazandırılmasında önemli rol oynarlar. Buna karşın yaklaşık 150 kadar farklı bakteri türü bitkileri enfekte ettikleri için bitki patojeni olarak adlandırılmaktadır. Bu bitki patojenlerinin çoğu gram negatif ve besi ortamında çoğalabilecek özelliktedir (Kannan ve diğ., 2016).

Bakterilerdeki hızlı çoğalma ve kısa sürelerde yüksek popülasyona ulaşabilme yeteneği bitki patojenleri konusunda özellikle dikkate alınması gereken bir konudur (Pfeilmeier ve diğ., 2016).

Bitki patojeni olan bakterilerin konak canlı olmadan uygun olmayan koşullarda canlılıklarını sürdürmeleri neredeyse olanaksızdır. Bu bakterilerin canlılıklarını sürdürmeleri için bitki artıkları ve hastalıklı bitkilerin yaralı dokuları gibi uygun koşullara ihtiyaçları vardır (Vidaver ve Lambrecht, 2004).

Patojen bakteriler, konak dokularında çoğalmak ve bitki içerisindeki besinlere erişerek hayatlarını sürdürmek amacıyla, bitkilere girmek ve bitki savunmalarının üstesinden gelmek zorundadır. Ancak bitkilerde enfeksiyonu başlatabilmek için, fungal patojenlerde olduğu gibi özel yapılar geliştiremezler. Patojenez için doğal açıklıklarından veya yaralanmış bitki yüzeylerinden konak canlıya girerler (Baarlen ve diğ., 2007).

Diğer bitki patojenlerinde olduğu gibi patojen bitki bakterilerinin de özgül hastalık belirtileri vardır. Bitki patojeni bakterilerinin de tespiti için öncelikle bu belirtilerin önceden tanımlanmış olması gerekmektedir. Genel olarak bu belirtiler, leke ve nekroz, kanser ve geri ölüm, iletim demeti solgunluğu, yumuşak çürüklük, tümör ve fitoplazma hastalıkları olarak gruplandırılmaktadır (Bastas ve Kannan, 2016). Patates halka çürüklüğü hastalığına neden olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* bakterisi de patatesten iletim demeti solgunluğuna sebep olmaktadır (Beckhoven ve diğ., 2002).

2.1.4.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Patates halka çürüklüğü hastalığı ilk olarak 1906 yılında Almanya'da Appel tarafından tanımlanmıştır (Küdela, 2007). Hastalığa neden olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckermann ve Kotthoff, 1914) Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonu'nun (EPPO) A2 listesinde yer alan bitki patojenidir (OEPP ve EPPO, 2006). *Cms*, EPPO bölgesi yanı sıra, ABD patates üreticileri ve ABD'den tohumluk patates ithal eden ülkeler içinde endişe verici bir patojendir (Wolf, ve diğ., 2005). Doğal olarak enfeksiyona sebep olduğu tek canlı patatestir. Bakterinin bulunduğu tohumluk patatesler ekildikten sonra bakteri hızlıca çoğalmaya başlar. İletim demeti aracılığıyla bitkinin diğer kısımlarına da geçer. Tohumluk yumrulara geçen bakterinin, hastalığın devamı için önemli rolleri vardır. Normal şartlarda kış koşulları bakterinin hayatını sürdürmesi için uygun değildir. Fakat tohumluk

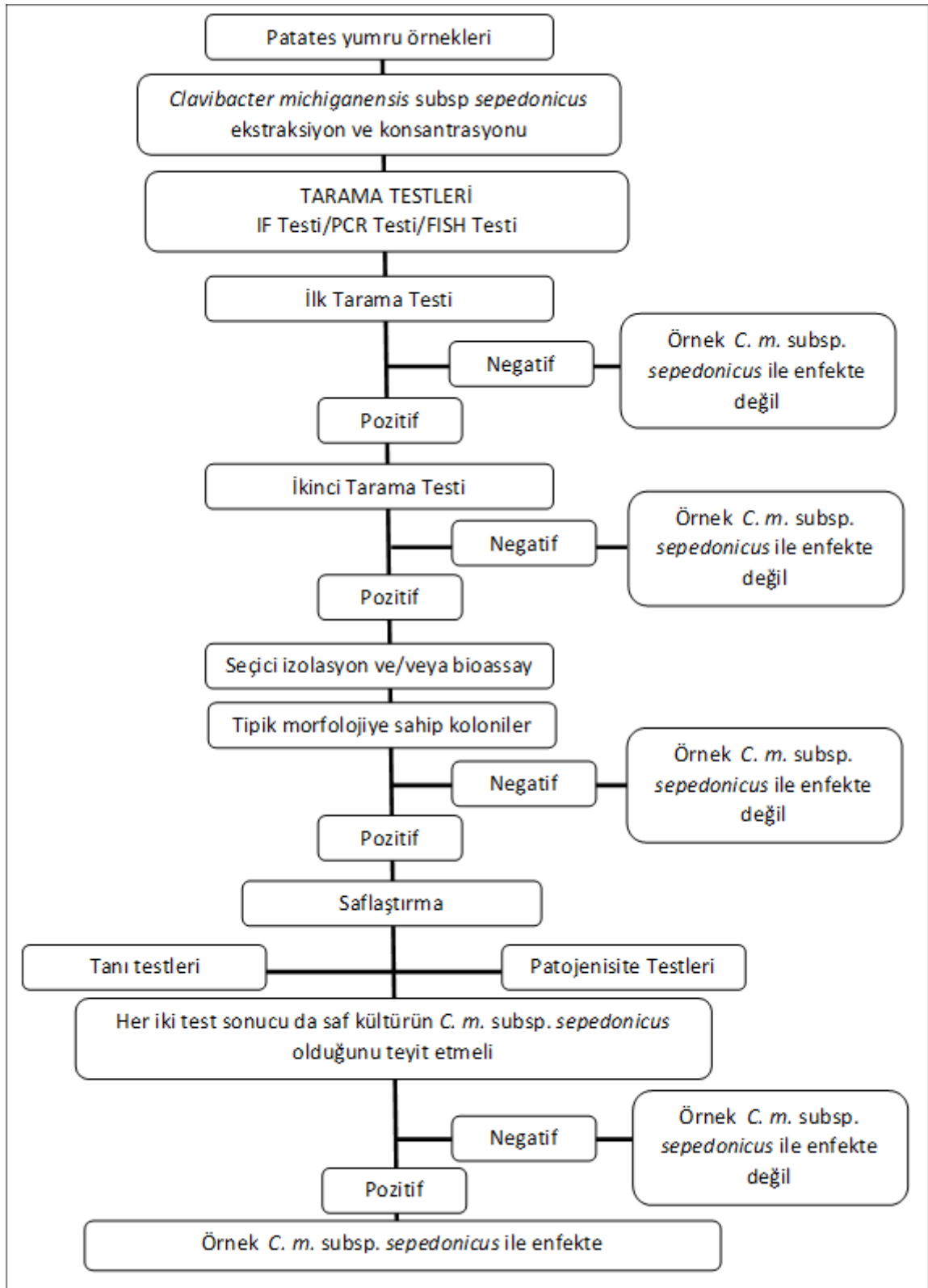
yumruların saklandığı ortamlarda, çuvalarda, tarım makinalarında ve ambarlarda canlılıklarını sürdürebilirler (Pankova ve diğ., 2007). EPPO bölgesinin güneyi bu bakteri için uygun koşullara sahip değilken, kuzeyi ve doğusunda varlığını sürdürmektedir. Patojen ülkemizde ilk kez 2009 yılında tespit edilmiştir (Altundağ ve diğ., 2009).

Hastalığın belirtileri genel olarak yetiştirme döneminin sonlarında ortaya çıkmaktadır. İlk belirtiler alt yapraklarda görülmektedir. Yapraklar önce açık yeşil renge, sonrasında ise gri ve kahverengine dönüşür ve nekrotik yapılar oluşur. Yumruların üzerinde ise kenarları kırmızı olan kahverengi çatlaklar oluşur (Wale, 2008).

Belirtilerinin değişken olmasından ve bazı durumlarda farklı hastalıkların belirtilerinin varlığı nedeniyle tespit edilememesinden dolayı *Cms* tanısı için laboratuvar testleri geliştirilmiştir.

2.2. CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SUBSP. SEPEDONICUS TANI YÖNTEMLERİ

Tohumluk patateslerde halka çürüklüğü hastalığının farkına varılması büyük ölçüde belirtilerin ortaya çıkmasına bağlıdır. Ancak bakteri varlığını anlamak için kullanılan erken tanı yöntemleri de mevcuttur. EPPO tarafından *Cms* tanısına yönelik izlenmesi gereken adımlar Şekil 2.1'de ayrıntılı olarak verilmiştir. İndirekt floresan antikor boyama (IFAS), ELİSA ve lateks aglütinasyon yöntemleri kullanılan serolojik yöntemlerdendir. Doğrulama çalışmaları ise gram boyama ve alternatif konak olarak kullanılan patlıcan üzerinde tahlil ile yapılmaktadır. Ancak serolojik yöntemlerle kesin olarak belirlenmesi için 10000 CFU/gr'ın üzerinde bakteri bulunması gerekmektedir (Schaad ve diğ., 1999).



Şekil 2.1: EPPÖ'nun *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* tanı şeması (OEPP ve EPPÖ, 2006).

DNA amplifikasyonunu içeren DNA tabanlı tanı yöntemi olan PZR'nin kullanımını mevcut olmasına rağmen hala istenilen ölçüde yaygınlaşmamıştır. Ancak özellikle tanı limitinin serolojik yöntemlere göre daha düşük olması, yaygınlaşmasına olumlu katkı sağlamaktadır. Ayrıca gerçek zamanlı PZR ve Nested PZR'nin kullanılması da hassasiyeti artırmaktadır (Fournier ve Raoult, 2003).

Ancak yukarıda bahsedilen bütün tanı yöntemleri, kompleks cihazlara, uzman kişilere ve gelişmiş bir laboratuvar alt yapısına ihtiyaç duymaktadır. Bütün bu metodlar, uzun süreler almakta ve sonuçlar elde edilinceye kadar geçen sürede patojenin ülke içinde yayılma ihtimali artmaktadır. Yine bu süre boyunca gümrüklerde tonlarca patatesin bekletilmesi ciddi maddi kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle özellikle karantina etmeni bitki patojenlerinin tanısı için, uzman personel, kompleks cihaz ve laboratuvar alt yapısı gerektirmeyen tanı yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.3. İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL AMPLİFİKASYON

Bitki patojenlerinin erken tanısı ve tedavisi, patojenlerin yayılmasının önlenmesinde ve olası maddi kayıpların önüne geçilmesinde önemli bir role sahiptir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki kırsal bölgelerde veya gümrük kontrolü yapılan alanlarda tam donanımlı laboratuvarların bulunması çok düşük ihtimaldir. Kontrollerin belirli merkezlerde yapılması gerekmektedir. Ancak bu, olası bir karantina etmeninin ülke içerisine alınması, yayılması için tespitin yeterince uzun sürelerde yapılması anlamını taşımaktadır. Her bölgede ayrı birer laboratuvar kurulamayacağı ve yeterince uzman personel görevlendirilemeyeceği için, uzmanlar patojenlerin tanısını hızlı ve doğru bir şekilde yapabilecek daha ucuz, kullanımı kolay ve sahaya uygun yerinde tanı (point of care) hizmetleri üzerine çalışmaktadır. Özellikle bitki patojeni tanısı için kullanılacak yerinde tanı sistemlerinin yaygınlaşabilmesi için, farklı çalışma koşullarında tutarlı sonuçlar veren, kullanımı basit, taşınabilir ve ucuz olması gerekmektedir.

PZR'nin geliştirilmesiyle düşük miktarlardaki DNA varlığında dahi patojenlerin tespiti mümkün hale gelmiştir (Garibyan ve Avashia, 2013). Ancak 21. yüzyıla gelinceye kadar DNA tabanlı patojen tespiti PZR yöntemiyle kompleks cihazlara ve tam donanımlı laboratuvarlara bağımlı olmuştur. Ancak 2000 yılında Notomi ve çalışma arkadaşlarının geliştirmiş olduğu basit, hızlı, özgül ve düşük maliyetli ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP) yöntemi DNA tabanlı tanı araştırmalarına farklı bir boyut kazandırmıştır (Notomi ve diğ., 2000). Ayrıca

LAMP yönteminin izotermal koşullarda yapılması ve reaksiyon ürünlerinin cihaza gereksinim duymadan değerlendirilmesine olanak sağlayan yöntemlerin varlığı ile saha çalışmalarına uygun, basit tanı sistemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunmuştur (Arifin, 2016) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: LAMP ve PZR yönteminin karşılaştırılması.

Özellik	LAMP	PZR
Aşama	Tek aşamalı	Çok aşamalı
Hız	≤60 dakika	> 60 dakika
Isı gereksinimi	Sabit sıcaklık (izotermal)	3 farklı sıcaklık
Denatürasyon basamağı	Gerektirmez.	Gerektirir.
Primer sayısı	4 veya 6	2
Hassasiyet	Çok yüksek	Düşük
Özgüllük	Yüksek	Düşük
Maliyet	Uygun maliyetli	Pahalı
Çok yönlülük	Düşük (sadece tanı amaçlı)	Fazla (tanı, klonlama, diğer.)
Primer tasarımı	Zor	Kolay
Çoklu çalışma (multipleks)	Zor	Mümkün

Geliştirilen bu teknolojiye, hedef gen üzerindeki farklı altı bölgeyi tanıyan 4 farklı primer tasarlanmaktadır. Bu nedenle yöntem yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahiptir. Sarmal yer değiştirme (strand displacement) aktivitesi olan DNA polimeraz (*Bst*) ve özel tasarımı primerler sayesinde amplifikasyon tek aşamada ve sabit bir sıcaklıkta gerçekleşmektedir. Böylece çok kısa sürelerde yüksek miktarlarda reaksiyon ürünü elde edilebilmektedir (Notomi ve diğ., 2015). LAMP yönteminin geliştirildiği andan günümüze kadar birçok bitki patojeni için tanı yöntemi geliştirilmiştir (Korus, 2011; Ward ve Harper, 2012; Caldera, 2014; King ve diğ., 2018).

2.3.1. LAMP Primerleri

LAMP yönteminde hedef DNA üzerinde 6 farklı bölgeyi tanıyan, iki adet iç, iki adet dış olmak üzere toplam 4 primer bulunmaktadır. Bu primerler, ileri iç primer (FIP), ileri dış primer (F3), geri iç primer (BIP) ve geri dış primer (B3) olarak isimlendirilmektedir.

FIP primeri F1c ve F2 olarak adlandırılan iki kısımdan oluşur. F2 kısmı hedef DNA'da bulunan F2c kısmının tamamlayıcısıdır ve genelde 22-24 baz boyutlarındadır. Aynı şekilde BIP primeri de B1c ve B2 olarak adlandırılan iki kısımdan oluşur. B2 kısmı hedef DNA'da bulunan B2c kısmının tamamlayıcısıdır.

Dış primer F3, hedef üzerinde bulunan F3c kısmının tamamlayıcısı iken, dış primer B3 ise B3c kısmının tamamlayıcısıdır. Şekil 2.2’de primer yapıları ayrıntılı olarak görülmektedir (Notomi ve diğ., 2000)

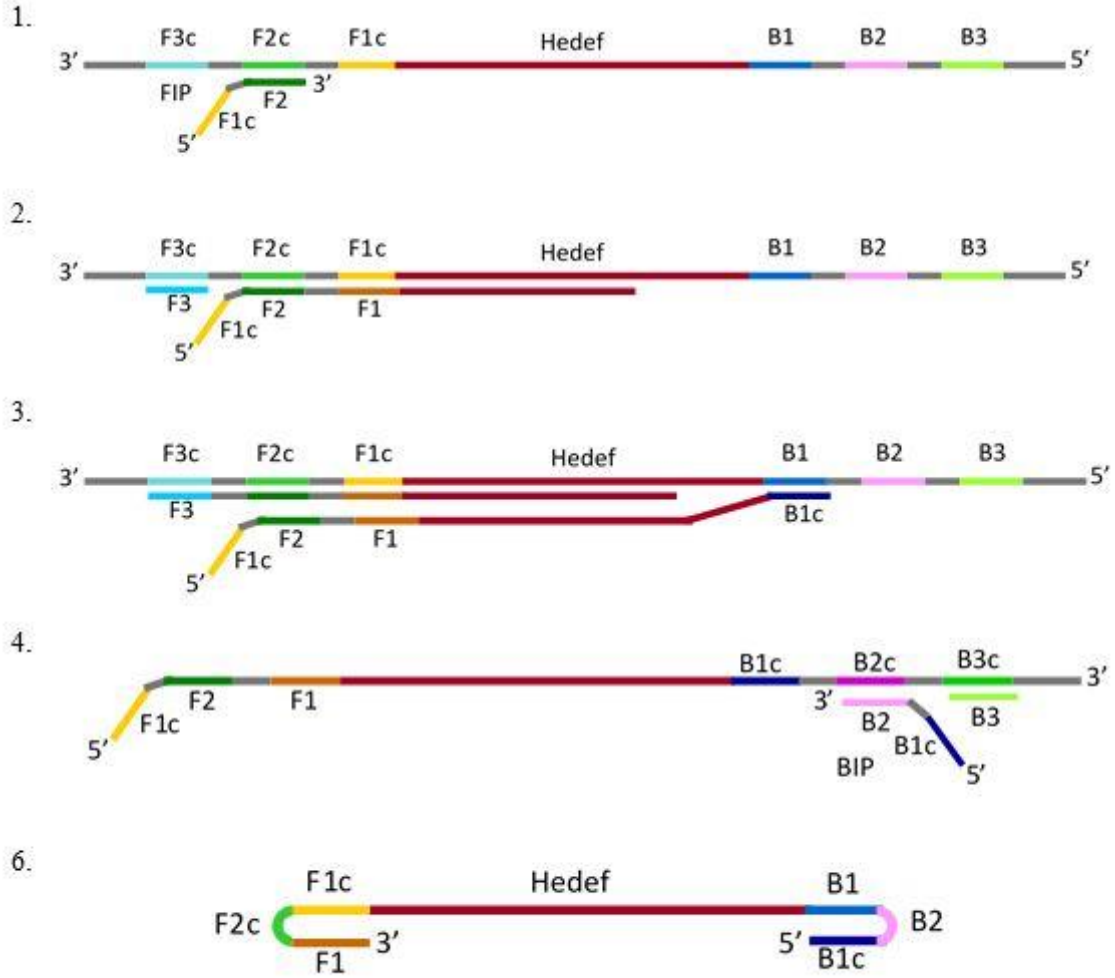


Şekil 2.2: LAMP Hedef dizisi ve primerleri.

2.3.2. LAMP Çalışma Prensibi

LAMP metodu, *Bst* enziminin özelliğine bağlı olarak sarmal yer değiştirme ile 4 veya 6 farklı primerin kullanıldığı oto-döngülü izotermal bir DNA sentezi yöntemidir (Notomi, 2000). Şekil 2.3’de verilen LAMP reaksiyonu aşamaları aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

1. İleri iç primer (FIP), hedef dizide eşleştiği kısma bağlanır ve *Bst* DNA polimeraz yardımıyla hedef dizinin birinci zincir sentezini gerçekleştirmeye başlar.
2. İleri dış primer (F3), hedef dizide eşleştiği, 1. Adımın başladığı noktanın önüne F3c kısmına bağlanır ve polimeraz yardımıyla sentezi başlatır.
3. F3 primeri ile başlayan sentez devam ettikçe FIP ile başlayan sentezin yerini alır ve FIP ile gerçekleşen sentez serbest kalır.
4. Serbest kalan zincir BIP ve B3 primeri için kalıp görevi görür ve sentez devam eder.
5. Aynı şekilde BIP ve B3 primerleri ile de diğer uçtan sentez başlar ve devam eder.
6. FIP ve BIP ile başlayan sentez sonucu oluşan zincirler, iki ucu ilmek şeklindeki yapıyı oluşturur. Yeni FIP ve BIP primerlerinin bu ilmeklere bağlanmasıyla yeni hedef zincirleri oluşur ve oluşan yeni ilmek yapıları sayesinde sıcaklık döngüsü gerekmeden amplifikasyon reaksiyonu sürekli olarak tekrarlanır.



Şekil 2.3: LAMP çalışma prensibi şeması.

İki ucu ilmek yapısındaki ürün (dumbbell-like) LAMP yönteminin izotermal olarak gerçekleşmesi için şarttır. Çünkü ilmekteki sekans her zaman FIP ve BIP'ler tarafından eşlenerek amplifikasyon devamlı kılınır. Diğer bir deyişle ilmek kısımları geleneksel PZR'deki denatürasyon aşamasının ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır.

İki ucu ilmek olan yapı ile onun tamamlayıcısı arasında iç primerler kullanılarak döngü reaksiyonları meydana gelir. Sonuç olarak ürün, farklı uzunluklarda, aynı zincirin hedef dizisinin dönüşümlü olarak ters çevrilmiş tekrarlarından oluşur.

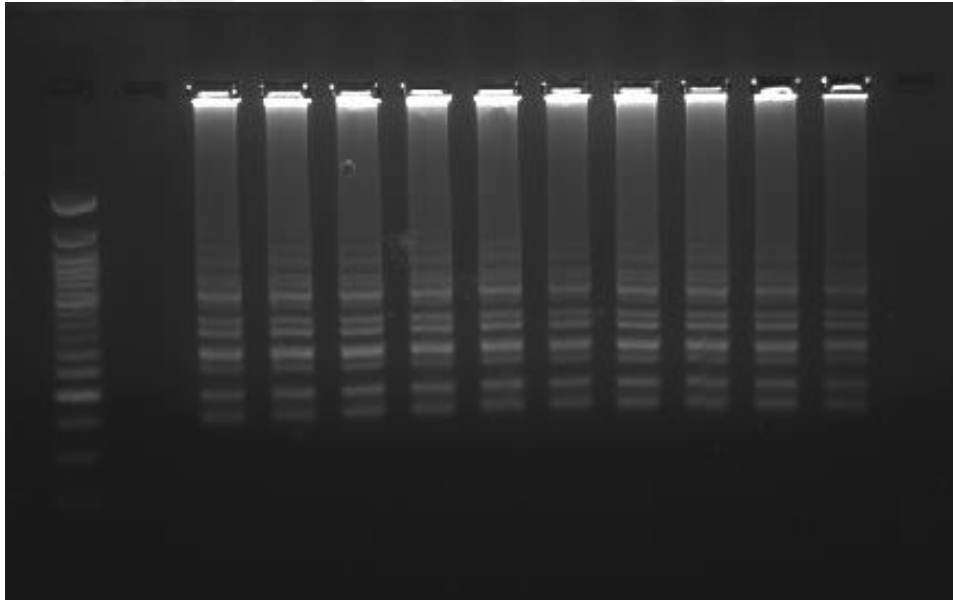
Amplifikasyon tamamlandığı anda hedef DNA'nın farklı sayıdaki kopyalarını içeren farklı boyutlarda DNA zincirleri oluşur. Bu da jel görüntülenmesi sırasında hedef DNA uzunluğunda bant olarak değil DNA ladder benzeri bir görüntü olarak görülmesine neden olur (Zhou ve diğ.,

2015). Ayrıca reaksiyon sırasında yüksek miktarda açığa çıkan pirofosfat iyonları ile ortamda bulunan magnezyum iyonları yan ürün olarak oluşan magnezyum pirofosfatı oluşturur. Amplifikasyon sonrası oluşan yüksek miktardaki magnezyum pirofosfat beyaz bir çökelti olarak tespit edilebilir (Mori ve diğ., 2001).

2.3.3. LAMP Ürünlerinin tespiti

2.3.3.1. Jel Elektroforez Yöntemi

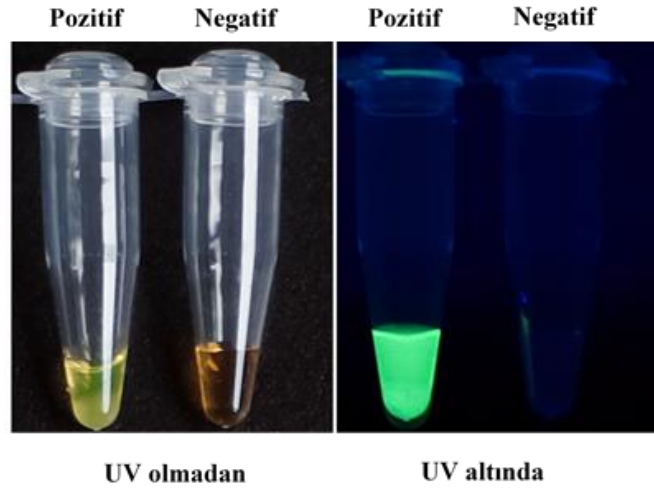
Agaroz jel elektroforez yöntemi PZR ürünlerinin tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır. Aynı şekilde LAMP ürünlerinin tespitinde de agaroz jel elektroforez yöntemi amplifikasyon ürünü ile özgül olmayan bantlaşma ve primer dimerlerinin tespiti için kullanılmaktadır. Daha önce de bahsedildiği gibi LAMP reaksiyonu sonucu farklı boyutlarda ve yüksek miktarlarda ürün oluşmaktadır. Bu nedenle jel elektroforeziyle yapılan tespitite pozitif örneklerde DNA ladder benzeri bir bantlaşma beklenmektedir (Şekil 2.4) (Zhou ve diğ., 2015).



Şekil 2.4: Jel elektroforez yöntemi ile LAMP ürünlerinin gösterimi.

2.3.3.2. SYBR Green Yöntemi

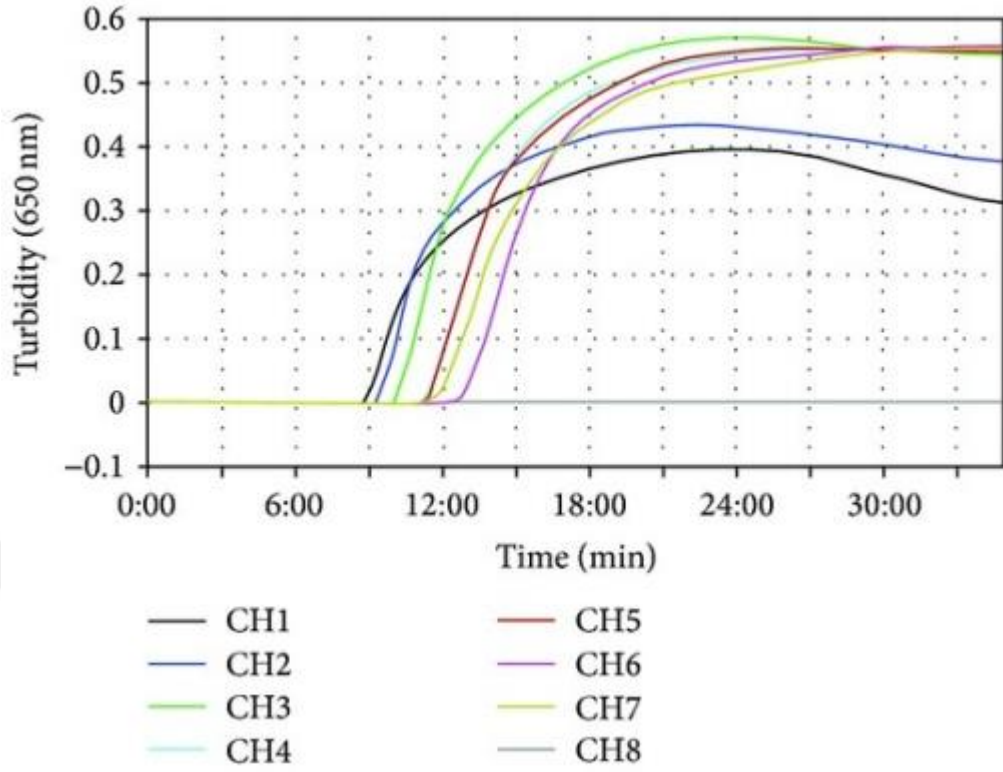
Nükleik asit boyalarından biri olan SYBR Green, reaksiyonun sonucunu görüntülemek için LAMP ürünü içerisine katılır ve SYBR Green, çift zincirli DNA'ya bağlandıktan sonra UV ışık altında uyarılarak ışımaya sebep olur. LAMP reaksiyonu gerçekleşmeyen örneklerde ışımaya gerçekleşmeyeceği için pozitif ve negatif reaksiyonlar arasında ayırım yapılmış olur (Şekil 2.5) (Parida ve diğ., 2006)



Şekil 2.5: SYBR Green yöntemi ile LAMP ürünlerinin gösterimi.

2.3.3.3. Bulanıklık Tespit Yöntemi

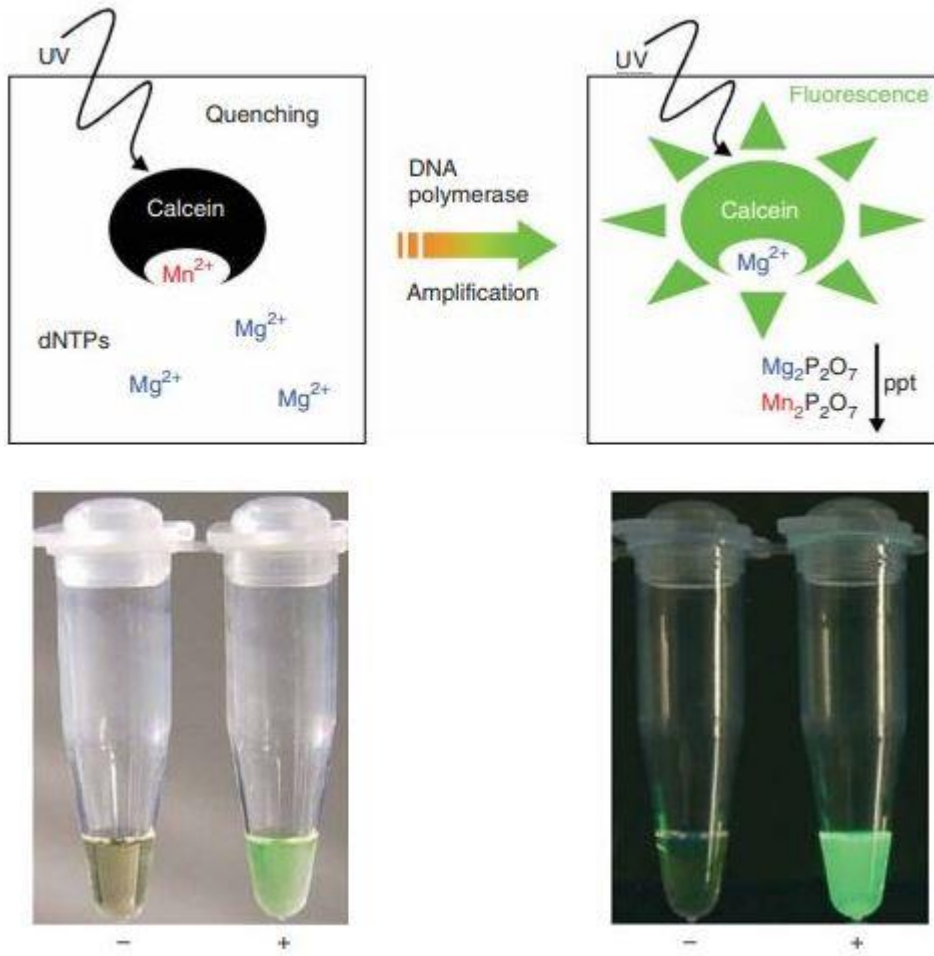
LAMP reaksiyonlarında son ürünün bulanıklığı, pozitif DNA'nın tespiti için kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, bulanıklığın tespit edilmesi için DNA miktarının 4 μg seviyelerinde olması gerektiği ortaya konmuş ve geleneksel PZR ile 2 μg civarında DNA oluşumu tespit edilmişken, LAMP yönteminde 10 μg 'dan fazla DNA olduğu görülmüştür. Türbidimetre cihazı yardımıyla LAMP reaksiyonlarında gerçekleşen bulanıklık gerçek zamanlı olarak tespit edilebilmektedir (Şekil 2.6) (Mori ve diğ., 2001).



Şekil 2.6: Bulanıklılık tespit yöntemi ile LAMP ürünlerinin gösterimi.

2.3.3.4. Kalsein Boyama Yöntemi

Kalsein, uyarımı 495 nm, emisyonu ise 515 nm dalga boyunda olan floresan bir boyadır. Kalsein reaksiyona eklenmeden önce manganez ile söndürülmüş “quenched” haldedir. LAMP reaksiyonu yan ürünü olarak oluşan pirofosfat iyonları manganezi kalseinden ayırarak kompleks oluşturur ve diğer bir yan ürün olan magnezyum iyonları ise kalseinle kompleks oluşturur. Kalsein son durumda aktif hale geldikten sonra UV ışığında parlak floresan üreterek hedef DNA varlığını göstermiş olur (Şekil 2.7) (Mansour ve diğ., 2014).



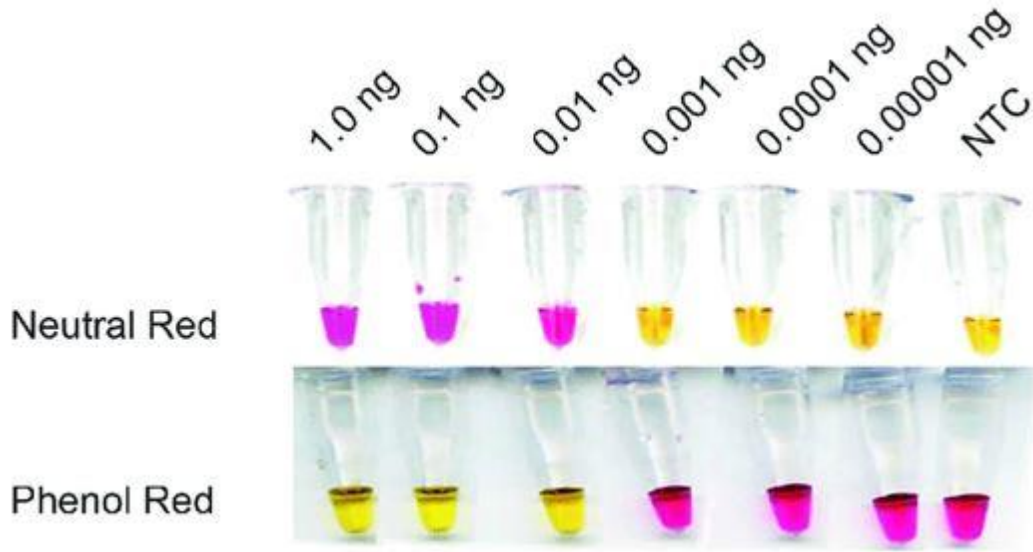
Şekil 2.7: Kalsein boyama yöntemi ile LAMP ürünlerinin gösterimi.

2.3.3.5. Yanal Akışlı Test Strip Yöntemi

LAMP ürünlerinin bir diğer tespit yöntemi de yanıl akışlı striplerin kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Herhangi bir cihaz gereksinimi duymadan sonuçların değerlendirilmesini sağlayan bu yöntem ayrıntılı olarak Bölüm 2.4'de anlatılacaktır (Lalle ve diğ., 2017).

2.3.3.6. Kolorimetrik LAMP Yöntemi

DNA polimeraz enzimi, sentez sırasında DNA'ya her bir dNTP eklediğinde bir pirofosfat ve bir de hidrojen iyonu serbest bırakılır. DNA konsantrasyonu arttıkça ortamdaki hidrojen artarken, buna bağlı olarak da ortamın asitliğinde artış meydana gelir. Bu asitliğin değişiminden faydalanarak pH duyarlı indikatör boyaların kullanılmasıyla amplifikasyon reaksiyonları çıplak gözle değerlendirilebilmektedir (Şekil 2.8) (Tanner ve diğ., 2015).

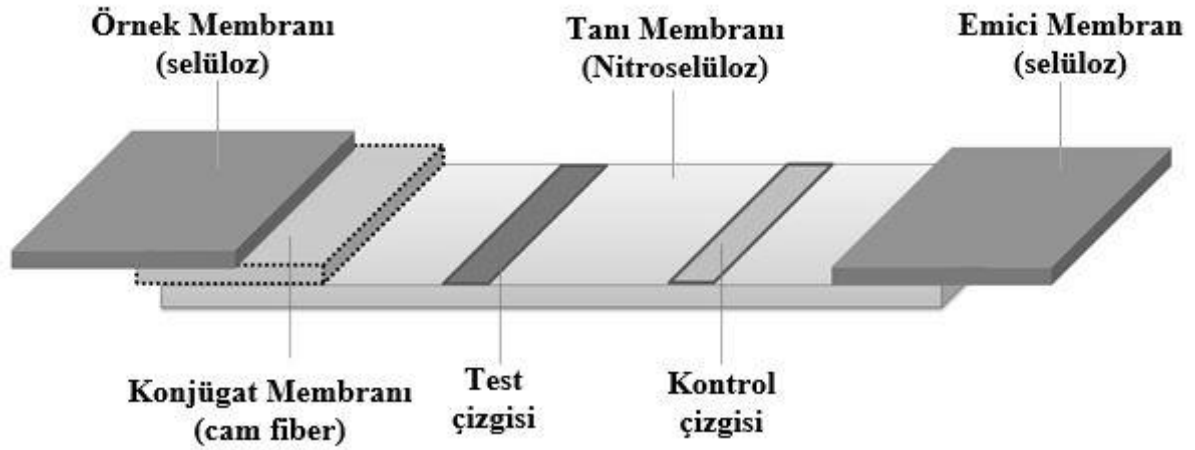


Şekil 2.8: Kolorimetrik LAMP yöntemi ile reaksiyon ürünlerinin görüntülenmesi.

2.4. YANAL AKIŞLI TEST STRİBİ

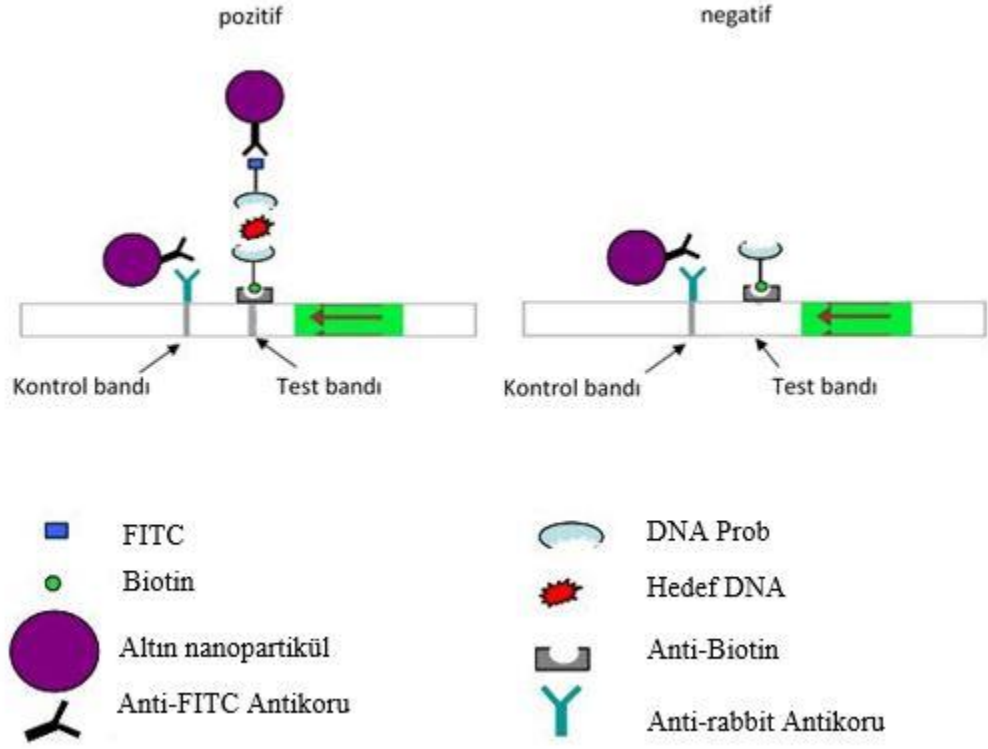
Son yıllarda, tanı teknolojileri yüksek hassasiyette ve doğrulukta ancak ciddi bir laboratuvar altyapısı ve kompleks cihazlar gerektiren testlerden, nispeten daha düşük hassasiyetteki ancak hasta başı uygulamalarında kullanılabilecek tespit yöntemlerine doğru yönelim içerisinde. Laboratuvar alt yapısı gerektiren tanı teknolojilerinin pahalılığı, testlerin uzman ekipler gerektirmesi ve sonuç verme sürelerinin uzun olması gibi sebepler nedeniyle daha az tercih edilmektedir (Broadhurst ve diğ. 2016). Ancak hasta başı uygulamalarda kullanımı uygun olan yanıl akışlı immüno testlerinin (LFIA), gelişen tanı ve biosensör teknolojileriyle hassasiyet ve doğruluklarının artması yaygınlaşmasına katkıda bulunmuştur. Bu son gelişmeler, yanıl akışlı immüno testlerin, tanı teknolojilerinde merkezi bir konuma ulaştırmıştır. Tanı teknolojisine öncülük eden ülke ve kurumlardaki uygulamalar ile, yanıl akışlı immüno testler, özel olarak tasarlanmış numune taşıma cihazları, yanıl akışlı test kartları gibi kolaylaştırıcı teknolojik gelişmelerle neredeyse laboratuvar temelli sistemler haline dönüşmüşlerdir. Yanıl akışlı immüno testlerin diğer uygulamalarında ise yüksek performans ve mobil cihazlarla bağlantılı, sahada kullanımı destekleyen teknolojilerle kolay kullanımlı olmasına odaklanılmaktadır. Kısaca, yanıl akışlı immüno testler çok yönlülüklerinden dolayı giderek daha fazla yaygınlaşmaktadır. Yanıl akışlı immüno testler genel olarak, tıp, veterinerlik, gıda gibi alanların yanı sıra, biyolojik silahlara karşı biyolojik ajanların ve patojenlerin tespitinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (O'Farrell, 2009).

Yanal akışlı stripler, LFIA'lardaki son gelişmelerle ortaya çıkmış, ve genel olarak DNA ve RNA tanısında kullanılabilen yeni tanı teknolojisi ürünleridir. Genel olarak şekilde görüldüğü gibi dört farklı membrandan oluşmaktadır. Bunlardan ilki selülozdan yapılmış örnek membrandır ve tanısı yapılacak DNA/RNA'nın konulduğu kısımdır. İkincisi cam fiberden yapılan ve konjüгат sıvısının yedirildiği konjüгат membrandır. Diğer bir membran nitroselülozdan yapılan ve tanı işleminin gerçekleştiği üzerinde kontrol ve test çizgilerini içeren tanı membrandır. Son olarak yine selülozdan yapılan ve akışı sağlayan emici membranı içerir (Şekil 2.9) (Liu ve diğ. 2006).



Şekil 2.9: Yanal akışlı test stribi.

LAMP ürünlerinin görüntülenmesinde kullanılan yan akışlı test striplerinde test çizgisi olarak biotin ligandı kullanılırken, kontrol çizgisine anti-rabbit antikoruna eklenmiştir. Tespit için tasarlanan LAMP primerlerinden FIP biotin ile işaretlenir. Ayrıca FAM/FITC işaretli bir de prob tasarlanır. LAMP reaksiyonu gerçekleştikten sonra prob hibridizasyonu gerçekleştirilir, ve yan akışlı test tamponu yardımıyla görüntüleme gerçekleştirilir. Pozitif örnekler sonucu reaksiyon ürünlerinin bir kısmı biotin işaretli, diğer kısmı ise FAM/FITC işaretli olmaktadır. Böylece pozitif örnekler biotin ligandı sayesinde test çizgisine tutunurken, çıplak gözle görmemizi sağlayan anti-FAM/FITC antikoruna tutturulan altın nanopartiküller pozitif DNA'nın diğer kısmına tutunmaktadır. Böylece LAMP ürünleri 10 dakika içerisinde basit bir şekilde görüntülenmiş olur (Şekil 2.10) (Jaroenram ve diğ., 2009).



Şekil 2.10: LAMP ürünlerinin LFD ile tespiti.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. LAMP PRİMER TASARIMI

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*'a özgü LAMP primerleri için daha önce konvensiyonel PZR tanısında kullanılan 16-23S rDNA IGS'nin 224 bç'lik bir bölgesi seçildi. Tasarım için PrimerExplorer V5 programından yararlanıldı. Tasarlanan primerler Tablo 3.1' de gösterilmektedir.

```

CCGGAGCGCGATAGAAGAGGAACTCTTTGTCAATAATGCTGATA
ACGTGATCAAGGAAGTCGTCCGATGAAGATGCGACATGGCTCCT
CGGTCCTTGAATGTCCGCGGCTTTT GCCAGATT CAGGTCACCACG
GTA CTGAGC GATGCTCTGCCAAGTGATGACCCCGTG CATATTTT
CTTGTGTTGCTCAGGACTGGCACCTGAGAGATGTCCTTCATGAT
  
```

Şekil 3.1: LAMP Primerlerinin hedef dizisi (Genbank: AF001266.1), F3 ve B3: yeşil, F1c ve B1c: mavi, F2 ve B2: sarı.

Tablo 3.1: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 16-23S rDNA IGS'ye özgü tasarlanan LAMP primerleri.

Primer	Dizi (5'-3')
F3	GCGCGATAGAAGAGGAACTC
B3	GGACATCTCTCAGGTGCCA
FIP(F1c-F2)	GCGGACATTCAAGGACCGAGG-CGTGATCAAGGAAGTCGTCG
BIP(B1c-B2)	CAGGTCACCACGGTACTGAGC-GTCCTGAGCAACGACAAGAA

Ayrıca yanıl akışlı analiz yöntemi için Biotin işaretli FIP primeri ve 5'-FAM-GGCTTTT GCCAGATT-3' probu tasarlandı.

3.2. DNA İZOLASYON YÖNTEMİ

Tez kapsamında EPPO tarafından karantina etmeni sayılan *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* patojeni ile çalışıldı. Konu ile ilgili mevzuatlar gereği İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü GDO Laboratuvarına T.C. Gıda, Tarım ve

Hayvancılık Bakanlığı tarafından yetki belgesi verildi (Sayı:22789349-320.03.05-E.1493177, Ek.1). Buna rağmen patojenin yayılımını engellemek amacıyla İstanbul Zirai Karantina Müdürlüğü'nden patojenin kendisini değil sadece DNA'sı temin edildi. DNA'ların konsantrasyonları nanodrop spektrofotometre (Thermo scientific, nanodrop 2000) cihazı ile 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülerek belirlendi. Örneğin DNA konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$), 260 nm'deki absorbans değeri, dilüsyon katsayısı ve 50 $\mu\text{g/ml}$ sabiti ile çarpımı sonucu bulundu. *Cms* DNA izolasyonları İstanbul Zirai Karantina Müdürlüğü patojen laboratuvarı tarafından "QIAamp DNA Mini Kit" (QIAGEN, 51306) ile protokolüne uygun olarak yapıldı.

Negatif kontrol olarak kullanılan patates (*Solanum tuberosum*)'in DNA izolasyonu SureFood PREP Advanced Kit (CONGEN, S1053) ile protokolüne uygun olarak yapıldı. Bu doğrultuda, 2.0 mL'lik santrifüj tüplerine blenderden geçirilmiş 250 mg patates örneği, 580 μl lizis tamponu ve 20 μl proteinaz K konularak iyice karıştırıldı ve 65 °C'de 30 dakika inkübe edilerek 12000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Temiz bir toplama tüpüne yeşil spin filtre konuldu ve üzerine 400 μl süpernatant eklenerek 12000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Yeşil spin filtre uzaklaştırılarak toplama tüpü içerisine 250 μl bağlama tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı. Temiz bir toplama tüpüne spin filtre konuldu ve üzerine bağlama tamponu eklenmiş örneğin tamamı aktarıldı. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpü atılarak spin filtre yeni bir toplama tüpüne alındı. Üzerine 550 μl ön yıkama tamponu eklenerek 12000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpü değiştirildikten sonra 550 μl yıkama tamponu eklenerek 12000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpü tekrar değiştirilerek 12000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi. Spin filtre temiz 1.5 mL'lik santrifüj tüpünü alındı ve üzerine 50 μl önceden ısıtılmış elüsyon tamponu eklenerek 65 °C'de 3 dakika bekletildi. Son olarak tüpler 10000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek DNA'lar elde edildi.

Escherichia coli, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* patojenlerinin DNA izolasyonları QIAamp DNA Mini Kit ile protokolüne uygun olarak yapıldı. Protokole göre, 1.5 mL'lik santrifüj tüplerine 1 mL bakteri süspansiyonundan alındı. Örnekler 5000 $\times g$ 'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant kısmı atıldı. Pellet üzerine 180 μL ATL lizis tamponu ve 20 μL proteinaz K solüsyonu eklendi. Karışım 1 dk vortekslenerek 56 °C'de pellet kayboluncaya kadar inkübe edildi. Kısa santrifüj

sonrası tüp üzerine 200 µL AL lizis tamponu eklenerek 15 s vorteks yapıldı ve 70 °C’de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 200 µL saf etanol eklenerek 15 s vorteks yapıldı ve karışım spin kolona alındı. Kolonlar 6000 *xg*’de 1 dakika santrifüjlendi ve yeni toplama tüpüne yerleştirildi. Kolon üzerine 500 µL AW1 yıkama tamponu eklenerek 6000 *xg*’de 1 dakika santrifüjlendi ve yeni toplama tüpüne yerleştirildi. Yine kolon üzerine 500 µL AW2 yıkama tamponu eklenerek 14000 *xg*’de 3 dakika santrifüjlendi ve yeni toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonlar boş bir şekilde 14000 *xg*’de 1 dakika santrifüjlendi ve 1.5 mL’lik santrifüj tüplerine alındı. Son olarak üzerlerine 200 µL AE elüsyon tamponu eklenerek 1 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 6000 *xg*’de 1 dakika santrifüjlenerek DNA’lar elde edildi.

3.3. İLMİĞE DAYALI İZOTERMAL AMPLİFİKASYON REAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU

LAMP reaksiyonları toplam hacim 25 µL olacak şekilde *Bst* 3.0 DNA polimeraz enzim kiti (NEB, M0374L) kullanılarak Biorad (T100) ve Amplyus (miniPCR) cihazlarında gerçekleştirildi. LAMP reaksiyonu, 2.5 µL 10X izotermal amplifikasyon tamponu (2 mM MgSO₄ içeren), 2 U *Bst* polimeraz enzimi, 0.4 mM dNTP (NEB, N0447L), 4 mM MgSO₄, 0.8 µM FIP ve BIP primerleri, 0.2 µM F3 ve B3 primerlerini, 5 µL DNA örneği içerecek şekilde kuruldu. LAMP reaksiyonunun optimizasyonu için 0.4 mM, 1 mM ve 1.5 mM dNTP konsantrasyonları denendi.

Tablo 3.2: LAMP reaksiyon içeriği.

İçerik	Konsantrasyon/miktar
10 X izotermal amplifikasyon tamponu	1X
<i>Bst</i> 3.0 polimeraz enzimi	2U
dNTP	0.4-1.5 mM
MgSO ₄	4 mM
F3-B3 primerleri	0.2 µM
FIP-BIP primerleri	0.8 µM
DNA (30 ng/µl)	5 µl
Distile Su	25 µl’ye tamamlandı.

Sıcaklık optimizasyonunda LAMP çalışması için 65.6 °C, 67 °C, 68 °C, 68.8 °C, 69.2 °C, 70 °C ve 71.4 °C sıcaklıklar denendi. 60 dakika amplifikasyon sonrasında 80 °C de 10 dakika enzim inhibisyonu gerçekleştirildi. Ürünler %2 (w/v)'lik agaroz jelde 90 V'da 60 dakika yürütüldü.

3.4. LAMP ÜRÜNLERİNİN ANALİZİ

Genel olarak LAMP ürünlerinin değerlendirilmesi konvensiyonel yöntemlerde de sıklıkla kullanılan agaroz jel elektroforez, LFD ve kolorimetrik yöntemler kullanıldı.

3.4.1. LAMP Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Analizi

LAMP ürünlerinin değerlendirilmesi için %2 (w/v)'lik agaroz jel elektroforezi kullanıldı. LAMP ürünlerinin jelde yürümesi için 1X TAE tamponu kullanıldı. 1 litre 5X konsantrasyonda TAE tamponu hazırlamak için 242 g Tris-base (Sigma, T-8524) 500 ml dH₂O'da çözdürüldükten sonra 57.1 ml glasiyel asetik asit (Merck, 101830) ve 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) (Merck, 324503) eklenerek son hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlandı.

Agaroz jel, Lee ve diğ. (2012) tarafından belirtildiği gibi hazırlandı. 40 ml 1X TAE içerisine 0.8 g agaroz (Sigma, A5073) tartılarak mikrodalga fırın yardımıyla eritildi ve jel yaklaşık 50°C'ye geldiğinde üzerine 2.5 µl EtBr (10 mg/ml) (Sigma, E1510) eklendi. Jel karışımı jel kasetine (Thermo, EC 320) dökülerek soğuması amacıyla bekletildi. Katılaşmış olan jel, içerisinde 1X konsantrasyonda TAE tamponu bulunan yürütme tankına yerleştirildi ve LAMP ürünlerinden 10 µl alınarak üzerine 2 µl 6X yükleme boyası (NEB, B7025S) eklenerek kuyulara yüklendi. Daha sonra örnekler 90 V'da 60 dakika yürütüldü ve jel görüntüleme cihazında (Avegene-Xlite 30R) jelin görüntüsü alındı.

3.4.2. LAMP Ürünlerinin Yanal Akışlı Test Stribi ile Analizi

LAMP ürünlerinin analizi için saha kullanımına uygun olması nedeniyle yanal akışlı test stripleri de kullanıldı. LFD kullanılarak LAMP ürünlerinin analizi Milenia biotec (Hybridetect) firmasının kit protokolünü göre yapıldı. Protokole göre, 25 µl LAMP ürünü üzerine 20 pmol prob (Bölüm 3.1) eklenerek 65 °C de 5 dakika inkübasyon gerçekleştirilerek hibridizasyon işlemi yapıldı. Hibridize üründen 8 µl alınarak üzerine kit içerisindeki altın nanopartikül içeren reaksiyon tamponundan 100 µl eklendi. Son olarak kit içeriğindeki stripler, tüplere daldırılarak 5 dakika içerisinde sonuçlar değerlendirildi.

3.4.3. LAMP Ürünlerinin Kolorimetrik Yöntem ile Analizi

LAMP ürünlerinin herhangi bir cihaz kullanmadan değerlendirilmesi amacıyla 2X Kolorimetrik LAMP Kiti (NEB, M1800L) kullanıldı. Reaksiyon içeriği Tablo 3.3'deki gibi hazırlandı.

Tablo 3.3: Kolorimetrik LAMP çalışması reaksiyon içeriği.

İçerik	Konsantrasyon/miktar
2X kolorimetrik LAMP tamponu (NEB)	1X
F3-B3 primerleri	0.2 μ M
FIP-BIP primerleri	0.8 μ M
DNA (10 ng/ μ l)	5 μ l
Distile Su	25 μ l'ye tamamlandı.

Reaksiyon kitte belirtildiği gibi 65°C'de 30 dakika inkübasyon koşulunda gerçekleştirildi. Sonuçlar renk oluşumuna göre değerlendirildi.

3.5. LAMP PRİMERLERİNİN HASSASLIK VE ÖZGÜLLÜK ÇALIŞMALARI

LAMP primerlerinin hassasiyetini ölçmek amacıyla *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* DNA örneğinin seri dilüsyonları hazırlandı. DNA'lar 10 ng/ μ l'dan başlayarak 1 ng/ μ l, 100 pg/ μ l, 10 pg/ μ l, 1 pg/ μ l ve 0.1 pg/ μ l'ye kadar 6 farklı dilüsyon olarak çalışıldı. LAMP hassasiyet çalışması jel elektroforez yöntemiyle %2 (w/v)'lik agaroz jel kullanılarak değerlendirildi.

LAMP primerlerinin özgüllüğü çalışması için *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* DNA örneği dışında, patates (*Solanum tuberosum*), *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* ve *Staphylococcus aureus* DNA örnekleri kullanıldı. LAMP özgüllük çalışması jel elektroforez yöntemiyle %2'lik agaroz jel kullanılarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. LAMP REAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU

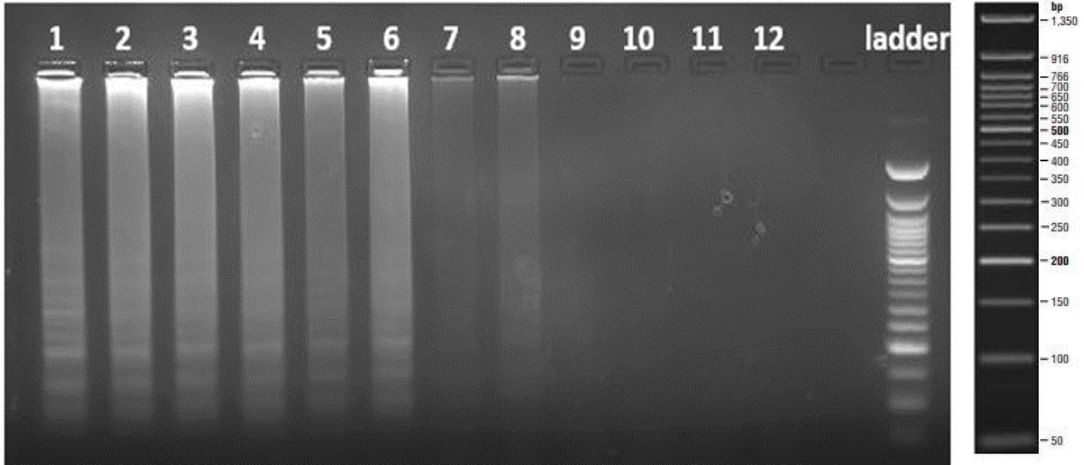
İlk olarak İstanbul Zirai Karantina Müdürlüğü'nden alınan *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* DNA'larının konsantrasyonları 30 ng/μl olarak belirlendi. Bu doğrultuda 30 ng/μl ve 10 ng/μl olmak üzere iki farklı DNA konsantrasyonu hazırlandı. Çalışmada kullanılan reaksiyon içeriği ise Tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1: LAMP çalışması reaksiyon içeriği.

LAMP bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Son Konsantrasyon	Miktar
10X Master Mix	10X	1X	2.5 μl
dNTP	10 mM	0.4 mM	1 μl
Bst 3.0	8000U/ml	2U	0.25 μl
MgSO ₄	100 mM	4 mM	1 μl
Primer F3	10 μM	0.2 μM	0.5 μl
Primer B3	10 μM	0.2 μM	0.5 μl
Primer FIP	10 μM	0.8 μM	2 μl
Primer BIP	10 μM	0.8 μM	2 μl
DNA	30 ng/μl-10 ng/μl	150 ng	5 μl
Su	-	-	10.25 μl
Toplam:			25 μl

4.1.1. Sıcaklık ve dNTP Optimizasyonu

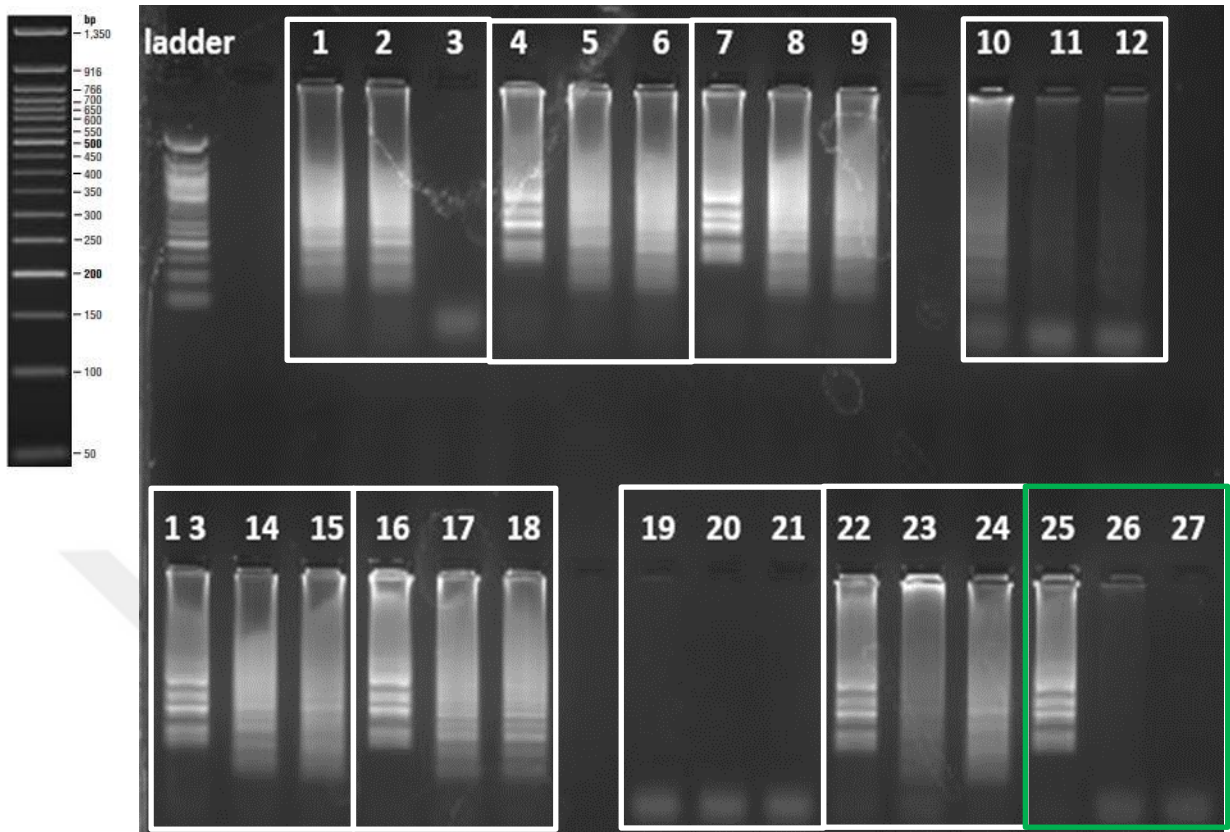
Sıcaklık optimizasyonu kapsamında 30 ng/μl ve 10 ng/μl konsantrasyonlarda iki farklı DNA örneği 65.6 °C, 67 °C, 68.8 °C ve 71.4 °C olmak üzere 4 farklı sıcaklıkta Tablo 4.1'de verilen içeriğe göre çalışıldı.



Şekil 4.1: Sıcaklık optimizasyonu sonucu örneklerin jel görüntüsü. 65.6 °C; 1: *Cms* 30 ng/μl, 2: *Cms* 10 ng/μl, 3: negatif kontrol (n.k.), 67 °C; 4: *Cms* 30 ng/μl, 5: *Cms* 10 ng/μl, 6: n.k., 68.8 °C; 7: *Cms* 30 ng/μl, 8: *Cms* 10 ng/μl, 9: n.k., 71.4 °C; 10: *Cms* 30 ng/μl, 11: *Cms* 10 ng/μl, 12: n.k., ladder: 50 bp.

Reaksiyon belirtilen sıcaklıklarda 1 saat ve enzim inhibisyonu için de 80 °C’de 10 dakika inkübe edildi. LAMP ürünleri %2 (w/v)’lik agaroz jelde 90V’da 1 saat yürütüldü. Agaroz jele LAMP ürünleriyle beraber 50 bp’lik ladder (NEB, N0473) yüklendi.

Şekil 4.1’de de görülebileceği gibi 65.6 °C ve 67.0 °C çalışmaları sonucunda negatif örneklerde yanlış pozitif sonuçlar görülmektedir. 71.4 °C’de ise herhangi bir kuyuda bant oluşumu gözlenmedi. Ancak 68.8 °C’de pozitif örneklerde çok silik olmakla beraber bant oluşumu gerçekleşti.



Şekil 4.2: Sıcaklık ve dNTP optimizasyonu sonucu örneklerin jel görüntüsü. Ladder: 50 bp, 68 °C; 0.4 mM dNTP, 1: *Cms* 10 ng/µl, 2: n.k., 3: n.k., 1.0 mM dNTP, 4: *Cms* 10 ng/µl, 5: n.k., 6: n.k., 1.5 mM dNTP, 7: *Cms* 10 ng/µl, 8: n.k., 9: n.k., 69.2 °C; 0.4 mM dNTP, 10: *Cms* 10 ng/µl, 11: n.k., 12: n.k., 1.0 mM dNTP, 13: *Cms* 10 ng/µl, 14: n.k., 15: n.k., 1.5 mM dNTP, 16: *Cms* 10 ng/µl, 17: n.k., 18: n.k., 70 °C; 0.4 mM dNTP, 19: *Cms* 10 ng/µl, 20: n.k., 21: n.k., 1.0 mM dNTP, 22: *Cms* 10 ng/µl, 23: n.k., 24: n.k., 1.5 mM dNTP, 25: *Cms* 10 ng/µl, 26: n.k., 27: n.k.

68.8 °C’de negatif kontrol örneğinde ise herhangi bir bant oluşumu gözlenmedi. Ayrıca 30 ng/µl ile 10 ng/µl olarak kullanılan örnekler arasında herhangi bir farklılık olmadığı için 10 ng/µl konsantrasyondaki örnek miktarının yeterli olduğuna karar verildi. Bu doğrultuda en uygun sıcaklık koşulunun bulunabilmesi için 68.8 °C civarında (68, 69.2 ve 70°C) gradient çalışması yapıldı. Aynı zamanda LAMP ürününün miktarını arttırmak amacıyla da üç farklı dNTP konsantrasyonu (0.4, 1 ve 1.5 mM) denendi.

Reaksiyon belirtilen sıcaklıklarda 1 saat ve enzim inhibisyonu için de 80 °C’de 10 dakika süresince gerçekleştirildi. LAMP ürünleri %2 (w/v)’lik agaroz jelde 90V’da 1 saat yürütüldü. Agaroz jele LAMP ürünleriyle beraber 50 bp’lik ladder yüklendi (Şekil 4.2).

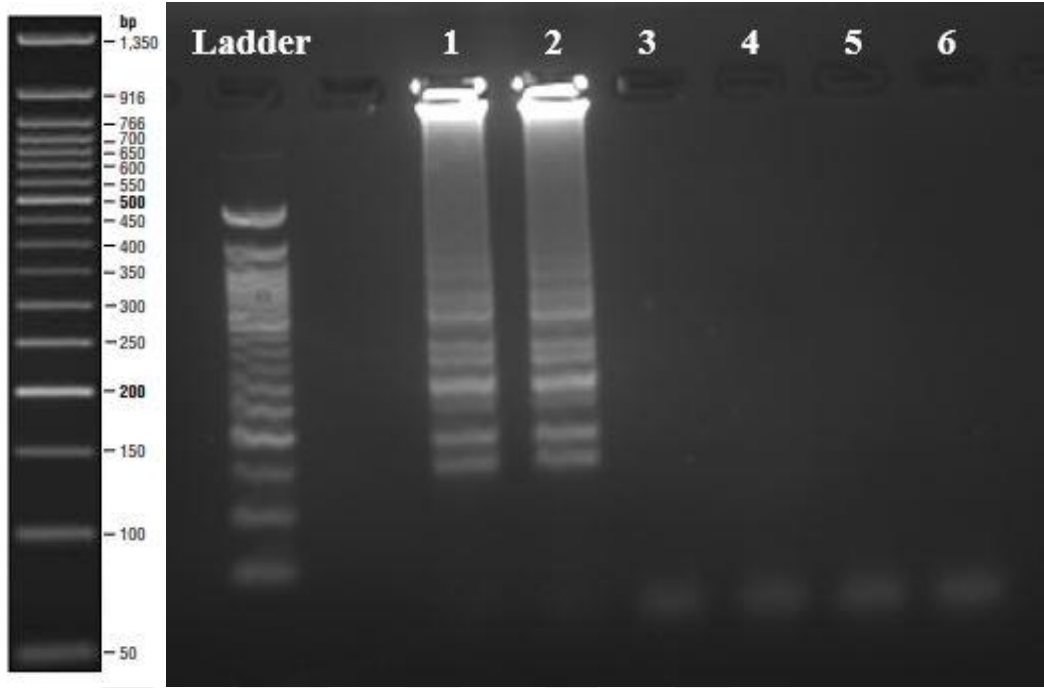
Şekil 4.2’de 25, 26 ve 27 numaralı kuyularda görüldüğü gibi 25 numaralı kuyudaki pozitif örnekte ladder benzeri bantlaşma görülürken, 26 ve 27 numaralı kuyulardaki negatif örneklerde bantlaşma oluşmadığı görüldü. Bu doğrultuda reaksiyon için en uygun sıcaklığın 70 °C ve en uygun dNTP konsantrasyonu 1.5 mM olduğu belirlendi. Optimizasyon sonrası reaksiyon içeriği Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2: LAMP optimizasyonu sonucu elde edilen son reaksiyon içeriği.

LAMP	Stok Konsantrasyonu	Son Konsantrasyon	Hacim
10X Master Mix	10X	1X	2.5 µl
dNTP	10 mM	1.5 mM	3.75 µl
Bst 3.0	8000U/ml	2U	0.25 µl
MgSO ₄	100 mM	4 mM	1 µl
Primer F3	10 µM	0.2 µM	0.5 µl
Primer B3	10 µM	0.2 µM	0.5 µl
Primer FIP	10 µM	0.8 µM	2 µl
Primer BIP	10 µM	0.8 µM	2 µl
DNA	30 ng/µl-10 ng/µl	150 ng	5 µl
Su	-	-	6.5 µl
<i>Toplam:</i>			25 µl

4.2. LAMP PRİMERLERİNİN ÖZGÜLLÜĞÜ

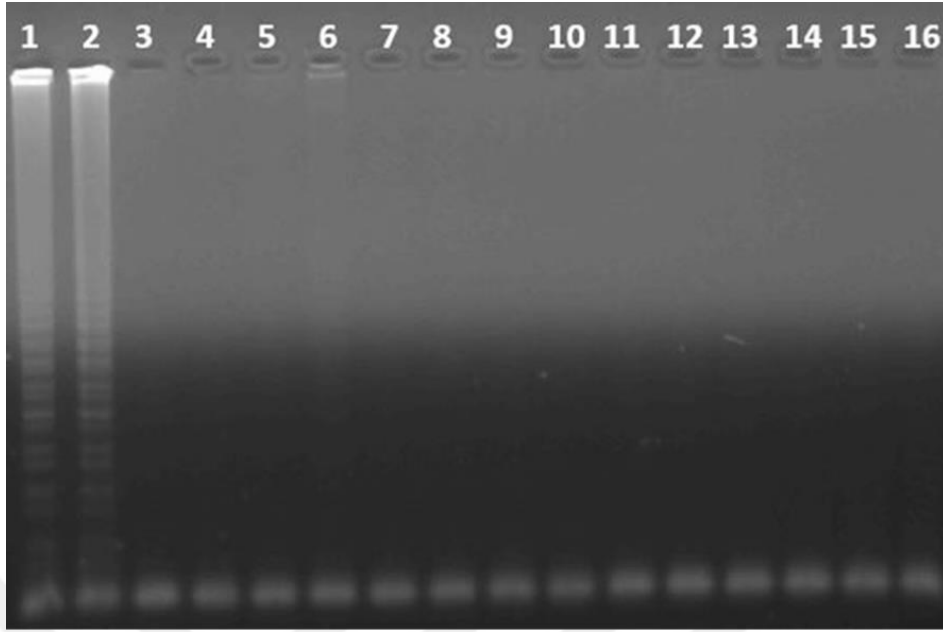
LAMP primerlerinin özgüllüğü için öncelikle patates DNA’sı ile (*Solanum tuberosum*) yanlış pozitifliğe neden olup olmadığı belirlendi. Yapılan çalışma sonrası Şekil 4.3’te görüldüğü gibi primerler *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* DNA örneklerinde pozitif sonuç verirken *Solanum tuberosum* DNAsı ve negatif kontrol (su) örneklerinde herhangi bir bant oluşumunu gerçekleştirmediği belirlendi.



Şekil 4.3: Optimize reaksiyon çalışma sonucu jel görüntüsü. Ladder: 50 bp, 1: *Cms* 10 ng/µl, 2: *Cms* 10 ng/µl, 3: *Solanum tuberosum* 10 ng/µl, 4: *Solanum tuberosum* 10 ng/µl, 5: n.k., 6: n.k.

Reaksiyon 70 °C'de 1 saat ve enzim inhibisyonu için de 80 °C'de 10 dakika koşulunda gerçekleştirildi. LAMP ürünleri %2 (w/v)'lik agaroz jelde 90V'da 1 saat yürütüldü. Agaroz jele LAMP ürünleriyle beraber 50 bp'lik ladder yüklendi (Şekil 4.3).

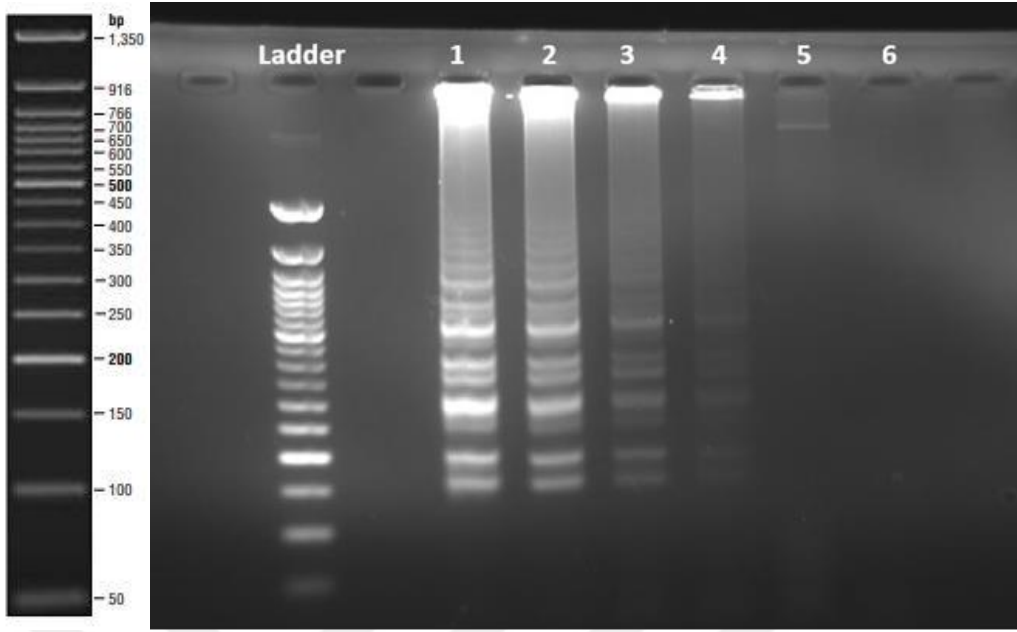
Yine primerlerin özgüllüğü için farklı gıda patojenleriyle eşleşme yapıp yapmadığı aynı reaksiyon koşullarında kontrol edildi. Bu doğrultuda *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve *Solanum tuberosum* yanında *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* ve *Staphylococcus aureus* patojenleri kullanılmıştır. Sonuç olarak Şekil 4.4'te de görüldüğü gibi primerlerin *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* dışında pozitif sonuç vermediği tespit edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: LAMP primerlerinin özgüllük çalışması sonucunun jel görüntüsü. 1: *Cms* 10 ng/µl, 2: *Cms* 10 ng/µl, 3: *Solanum tuberosum* 10 ng/µl, 4: *Solanum tuberosum* 10 ng/µl, 5: *Escherichia coli* 10 ng/µl, 6: *Escherichia coli* 10 ng/µl, 7: *Salmonella* spp. 10 ng/µl, 8: *Salmonella* spp. 10 ng/µl, 9: *Listeria monocytogenes* 10 ng/µl, 10: *Listeria monocytogenes* 10 ng/µl, 11: *Clostridium perfringens* 10 ng/µl, 12: *Clostridium perfringens* 10 ng/µl, 13: *Staphylococcus aureus* 10 ng/µl, 14: *Staphylococcus aureus* 10 ng/µl, 15: n.k., 16: n.k.

4.3. LAMP REAKSİYONUNUN HASSASİYETİ

LAMP primerlerinin hassasiyetini ölçmek amacıyla *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* DNA örneğinin seri dilüsyonları hazırlandı. DNA'lar 10 ng/µl'den başlayarak 0.1 pg/µl'ye kadar 6 farklı dilüsyon olarak çalışıldı. Şekil 4.5'te de görüldüğü gibi bantlaşmanın olduğu son dilüsyon 10 pg/µl olduğu tespit edildi. Sonuç olarak LAMP primerlerinin, minimum 10 pg/µl *Cms* DNA'sında agaroz jelde değerlendirilebilir olduğu belirlendi (Şekil 4.5).

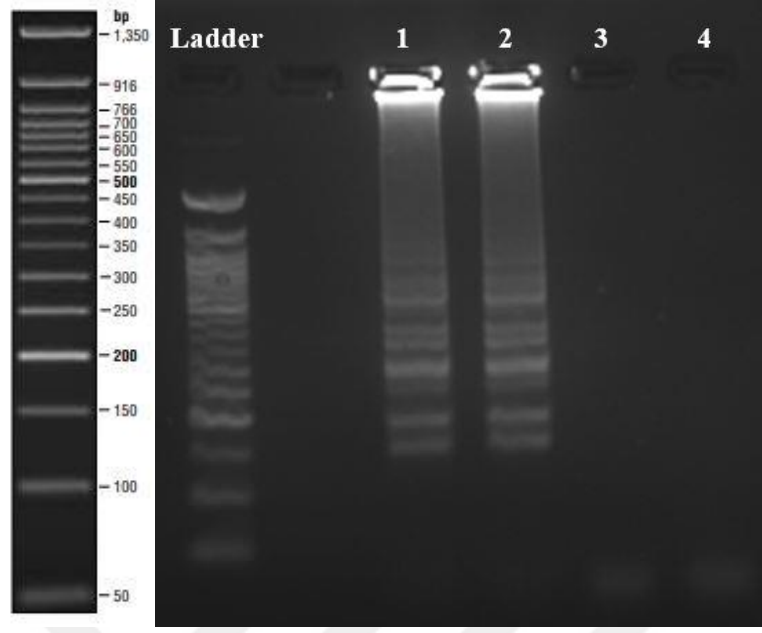


Şekil 4.5: LAMP primerlerinin hassasiyeti çalışması sonucunun jel görüntüsü. Ladder: 50 bp, 1: *Cms* 10 ng/µl, 2: *Cms* 1 ng/µl, 3: *Cms* 100 pg/µl, 4: *Cms* 10 pg/µl, 5: *Cms* 1 pg/µl, 6: *Cms* 0.1 pg/µl.

4.4. SONUÇLARIN GÖRÜNTÜLENMESİ

4.4.1. Jel Elektroforez Yöntemi ile Görüntüleme

Konvensiyonel PZR başta olmak üzere birçok DNA amplifikasyon yönteminde jel elektroforez yöntemi kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında da LAMP ürünlerinin görüntülenmesinde jel elektroforez yöntemi kullanıldı.

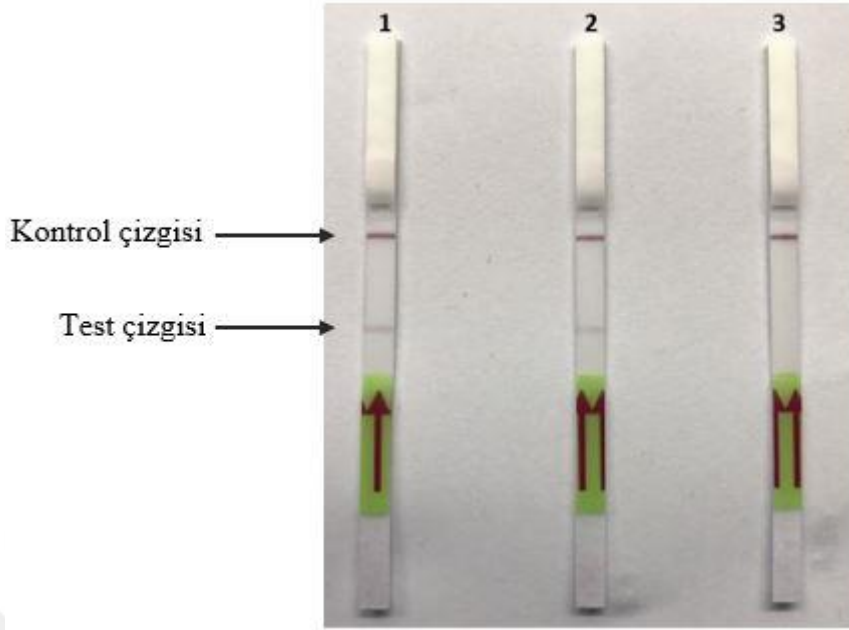


Şekil 4.6: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*'un LAMP yöntemiyle tanısında ampliconların jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmesi. Ladder: 50 bp, 1: *Cms* 10 ng/µl, 2: *Cms* 10 ng/µl, 3: n.k., 4: n.k.

LAMP ürünleri %2 (w/v)'lik agaroz jel kullanılarak 90V'da 1 saat yürütüldü. Agaroz jele LAMP ürünleriyle beraber 50 bp'lik ladder yüklendi. Sonuç olarak LAMP yönteminde pozitif ürünlerin görüldüğü ladder benzeri bant oluşumu *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* örneklerinde gözlenirken negatif kontrol örneklerinin yüklendiği kuyuda ladder benzeri bant oluşumu gözlenmedi (Şekil 4.6).

4.4.2. Yanal Akışlı Test Stripleri ile Görüntüleme

LAMP ürünlerinin görüntülenmesinde herhangi bir cihaz gerektirmeyen ve çıplak gözle değerlendirme olanağı sağlayan yanıl akışlı test stripleri de kullanıldı. Böylece *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* tanısı için geliştirilen yöntemin sahada basitçe uygulanabilir olması test edilmiş oldu.

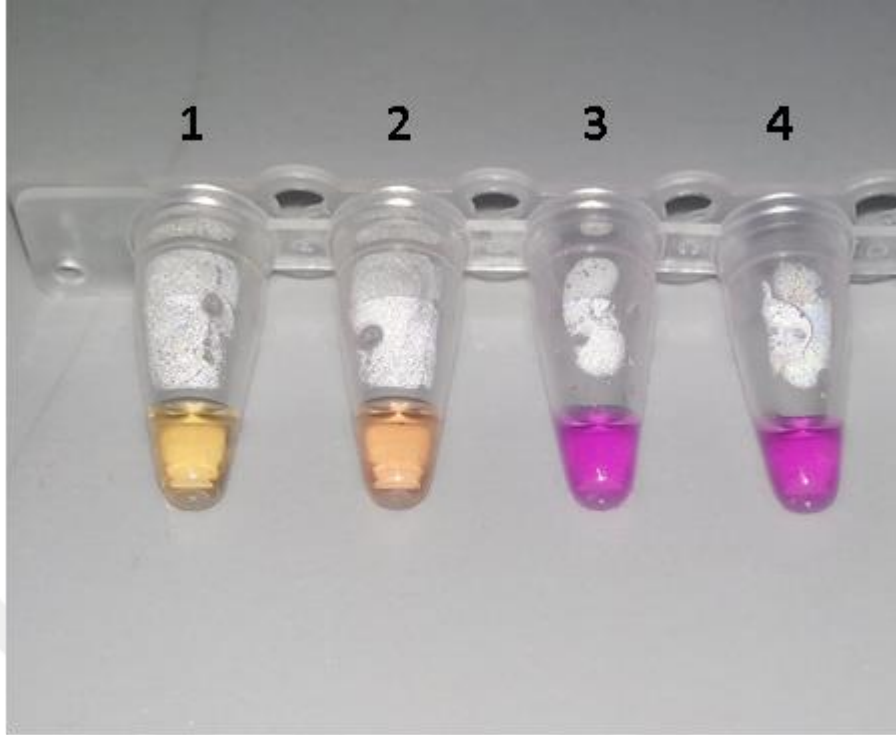


Şekil 4.7: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*'un LAMP yöntemiyle tanısında amplikonların LFD ile görüntülenmesi. 1: *Cms* 30 ng/μl, 2: *Cms* 10 ng/μl, 3: n.k.

25 μl LAMP ürünü üzerine 20 pmol prob eklenerek 65 °C de 5 dakika inkübe edilmesi ile hibridizasyon işlemi yapıldı. Hibridize üründen 8 μl alınarak üzerine 100 μl kit içerisindeki tampondan eklendi. Son olarak kit içeriğindeki stripler, tüplere daldırılarak 5 dakika içerisinde sonuçlar değerlendirildi. Sonuç olarak *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* örneklerinde test çizgisi oluşurken negatif kontrolde test çizgisi oluşmadığı tespit edildi. LAMP ürünlerinden 30 ng/μl'ye ait pozitif bandın 10 ng/μl'ye göre daha belirgin olduğu görüldü. Son olarak bütün örneklerde kontrol çizgilerinin oluşması, yanal akışlı test striplerinin sorunsuz çalıştığını gösterdi (Şekil 4.7).

4.4.3. Kolorimetrik Görüntüleme

LAMP reaksiyonunda pozitif-negatifliğin renk oluşumuna dayalı yorumu kolorimetrik yöntem ile test edildi. Ürünlerini herhangi bir cihaz olmadan görüntülemenin diğer yolu olan kolorimetrik LAMP yöntemi kullanıldı. New England Biolabs firmasının geliştirdiği 2X kolorimetrik LAMP kiti (M1800) yardımıyla LAMP sonucu çıplak gözle değerlendirildi. Sonuç Şekil 4.8'de görülmektedir.



Şekil 4.8: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*'un LAMP yöntemiyle tanısında amplikonların kolorimetrik olarak tespiti. 1: *Cms* 30 ng/μl, 2: *Cms* 10 ng/μl, 3: n.k., 4: n.k.

NEB Kolorimetrik 2X kitinde örneklerde DNA amplifikasyonu gerçekleştikçe renk mordan sarıya doğru değişmektedir. Bu renk değişimi LAMP reaksiyonun yan ürünlerinden olan magnezyum pirofosfat'ın artmasıyla gerçekleşmektedir. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi *Cms* örneklerinde renk sarıya dönerken negatif kontrollerde herhangi bir renk değişimi gerçekleşmediği tespit edildi. LAMP ürünlerinden 30 ng/μl ve 10 ng/μl örnekleri arasında renk farkı olduğu görüldü. Bu da 30 ng/μl örneğinde daha fazla LAMP ürünü ve daha fazla magnezyum pirofosfat'ın oluştuğunu ispatlamaktadır. Sonuç olarak pozitif örnekteki DNA miktarının artması reaksiyon tüpündeki rengin sarıya daha yakın olduğunu gösterdi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İlmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (LAMP), izotermal koşullarda yani sabit bir inkübasyon sıcaklığında hedef nükleik asit dizisini hızlıca çoğaltan bir yöntemdir. LAMP yöntemi hedef genin 6 ile 8 ayrı bölgesini özgül olarak tanıyan 4 veya 6 farklı primer kullanılması sebebiyle, diğer PZR türlerine göre daha özgüldür (Notomi ve diğ., 2015). Genellikle, LAMP yönteminde diğer PZR türlerine göre 50 kat daha fazla amplikon üretilmektedir. LAMP dışında birçok farklı izotermal amplifikasyon yöntemi olmasına rağmen, bu yöntemlerin çoğu büyük DNA dizilerinin amplifikasyonu için uygun değildir. Bununla beraber LAMP yöntemi büyük bir DNA hedefini daha iyi özgül ve hassas bir şekilde çoğaltabilir. Üstelik LAMP yöntemi mikroçip tanı cihazlarına (Lab-on-a-chip), sensör bazlı cihazlara ve hasta başı tanı cihazlarına kolayca entegre edilebilmektedir (Sun ve diğ., 2015). Bu durum geçen 20 yılda olduğu gibi önümüzdeki yıllarda da LAMP yönteminin birçok çalışmaya konu olacağını göstermektedir.

LAMP yönteminin, PZR yöntemlerine göre en önemli avantajlarından biri, sabit sıcaklıkta hedef DNA'yı çoğaltabilmesidir. Bu da yönteme herhangi bir basit ısıtıcıda, istenilen ortamda ve çok daha kısa sürelerde yapılabilme kolaylığı sağlamaktadır (Thiong'O, 2011). Buradan, reaksiyonun gerçekleştirileceği en uygun sıcaklığın tespiti, yöntemin optimizasyonu için yapılması gereken ilk basamak olduğu söylenebilir.

Li ve diğ. (2018), GDO analizi için geliştirdikleri LAMP yönteminde amplifikasyon sıcaklığı olarak 63 °C kullanılmıştır. Yine aynı çalışmada 2 mM konsantrasyonda dNTP kullanılarak LAMP reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Chen ve diğ. (2017) yaptığı, mısır klorotik benek virüsü tespiti amaçlı LAMP yöntemi optimizasyon çalışmasında 60 ile 65 °C aralığında 6 farklı amplifikasyon sıcaklığı denenmiş ve en uygun amplifikasyon sıcaklığının 63 °C, sürenin ise 60 dakika olduğu belirlenmiştir. Güney domates virüsünün LAMP yöntemi ile tanısı için gerçekleştirilen bir çalışmada ise amplifikasyon sıcaklığı 68 °C olarak belirlenmiştir (Gonzalez ve diğ., 2017). Peng ve diğ. (2017) elma klorotik yaprak lekesi virüsünün tespiti için yaptıkları çalışmada optimum amplifikasyon sıcaklığını bulmak için farklı sıcaklıklar denemiş ve 64 °C'yi LAMP ürünlerinin çoğalması için en uygun sıcaklık olarak belirlemiştir.

Bu tez çalışmasında patates halka çürüklüğü hastalığına sebep olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* patojeninin LAMP yöntemi ile tanısında en uygun amplifikasyon sıcaklığını bulmak için ilk olarak 65.6 °C, 67 °C, 68.8 °C ve 71.4 °C'ler, sonrasında ise 68 °C, 69.2 °C ve

70.0 °C'ler denendi. Yapılan çalışmalar sonunda amplifikasyon için en uygun sıcaklık 70 °C olarak belirlenmiştir.

LAMP yönteminde, hedef gende 6 farklı bölgeye özgül 4 farklı primer kullanılmaktadır. Bu nedenle geliştirilen yöntemler, PZR tabanlı diğer tanı yöntemlerine göre daha özgüldür. Bu tez çalışmasında LAMP primerlerinin özgülüğü için patates (*Solanum tuberosum*), *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* ve *Staphylococcus aureus* DNA örnekleri de kalıp olarak kullanıldığında tasarlanan primerlerin özgülüğünün %100 olduğu belirlendi. Ayrıca geliştirilen yöntemin doğrulanması amacıyla İstanbul Zirai Karantina Müdürlüğü'nde gerçek numuneler üzerinde çalışma yapılmış olup sonuçların tutarlı olduğu görüldü.

LAMP yönteminde, kullanılan primerlerin yapısı gereği, yöntemin hassasiyeti de PZR tabanlı diğer yöntemlere göre yüksektir. Yapılan bir çalışmada, mısır klorotik benek virüsü tespiti için geliştirilen LAMP yönteminin hassasiyeti 2.5 pg/μl olarak belirlenmiştir (Chen ve diğ., 2017). Bu tez çalışmasında *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* patojeninin LAMP yöntemi ile tanısı için geliştirilen yöntemin hassasiyeti ise 10 pg/μl olarak tespit edildi. Buna karşın Johansen ve diğ. (1989) yaptığı çalışmada ise *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* patojeninin PZR tabanlı yöntem ile tespiti yapılmış ve hassasiyet 500 pg/μl olarak bulunmuştur. Yapılan bu çalışmalar ile karşılaştırıldığında, tez çalışmasıyla geliştirilen yöntemin PZR tabanlı yöntemlere göre 50 kat daha hassas olduğunu ortaya koymaktadır.

LAMP yönteminde, reaksiyon için gerekli ısı su banyosuyla dahi karşılanabildiği için diğer PZR yöntemlerine göre daha uygun maliyetli ve pratiktir. Ayrıca LAMP reaksiyonunun ısı döngü gerektirmediği için amplifikasyon süresi 30 dakikaya kadar düşmektedir. LAMP ürünlerinin tespiti elektroforez aşaması gerektirmeden, doğrudan bulanıklık, renk değişimi ve floresans temelinde gerçekleştirilebilmektedir. Bu da tanı süresini elektroforez gerektiren diğer PZR yöntemlerine göre daha hızlı olmasını sağlamaktadır (Yoo ve diğ., 2012). Benzer bir şekilde, Li ve diğ. (2017) LAMP yönteminin geleneksel PZR yöntemine göre 1 saate yakın zaman kazandırdığını bildirmiştir. Bu tez çalışmasında LFD kullanılarak *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* patojeninin tespiti 75 dakika sürdüğü, kolorimetrik LAMP kiti kullanılarak ise tanı süresinin 30 dakikaya kadar indiği tespit edilmiştir. Ayrıca tez kapsamında geliştirilen LFD ve kolorimetrik tespit yöntemleri, jel elektroforez yöntemine olan ihtiyacı ortadan kaldırarak, olası etidyum bromür kullanımının önüne geçmektedir.

LAMP yönteminin birçok olumlu özelliği olmasının yanında olumsuz özellikleri de bulunmaktadır. Birçok çalışmada PZR yöntemine göre daha hassas ve özgül olduğu bildirilmişse de, kan gibi kompleks ve birçok inhibitör içeren örneklerde daha düşük hassasiyette olduğu belirlenmiştir. LAMP yöntemi sadece tanı amacıyla kullanılmakta olup, birçok farklı amaç için kullanılan PZR yöntemine göre çok yönlülüğü kısıtlıdır. Uygun primerlerin tasarımı zor ve bu yöntem için kısıtlayıcı etmendir. En az 4 farklı primer kullanımı ve iç primerlerin uzun yapıda olmaları multipleks çalışmayı zorlaştırmaktadır. Yine primerlerin çok sayıda olması, LAMP yönteminde primerlerin kendi içinde bağlanma ihtimalini arttırmaktadır (Sahoo ve diğ., 2016).

Sonuç olarak, bitki hastalıklarının hızlı ve hassas tanısı ciddi hasat kayıplarının önüne geçilmesi için oldukça önemlidir. Mevcut tanı yöntemlerinin hızlı olmaması, hızlı olan yöntemlerin ise yeterince hassas olmaması nedeniyle yeni bir yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Bu tez çalışması ile bitki hastalıklarının tanısında mevcut yöntemlere göre daha hassas ve daha hızlı bir yöntem olan ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyonu *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* için optimize edilmiş ve ilgili patent başvurusu yapılmıştır. LAMP ürünlerinin görüntülenmesinde jel elektroforez yönteminin yanında yanıl akışlı test strip yöntemi ve kolorimetrik LAMP yöntemi kullanılarak bitki hastalıklarının tespitinin laboratuvar alt yapısından bağımsız olarak yapılabilirliği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Abramovitch, R.B., Martin, G.B., 2004, Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses, *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 356-364.
- Altundağ, Ş., Karahan, A., Kılınç A.O., Özakman, M., 2009, First report of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* causing bacterial ring rot of potato in Turkey, *Plant Pathology*, 58, 794.
- Appel O., 1906, Neuere Untersuchungen über Kartoffel und Tomatenerkrankungen. *Jahresbericht der Vereinigung für angewandte Botanik*, 3, 132–135.
- Arifin, M.I., 2016, *Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and a polymerase chain reaction (PCR) assays for diagnosis of Fasciola hepatica in animal faeces and comparison with traditional diagnostic methods*, Yüksek Lisans Tezi, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Baarlen, P.V., Belkum, A.V., Summerbell, R.C., Crous, P.W., Thomma, B., 2007, Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps?, *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 239-277.
- Bastas, K.K. ve Kannan, V.J., 2016, *Pathogenesis of Plant Pathogenic Bacteria*, Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria, In: Kannan, V.R. ve Bastas, K.K. (ed.), 2. Bölüm, CRC Press, Florida, ABD, 1-17.
- Beckhoven, J.R.C.M., Stead, D.E., Wolf, J.M., 2002, Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by AmpliDet RNA, a new technology based on real time monitoring of NASBA amplicons with a molecular beacon, *Journal of Applied Microbiology*, 93, 840–849.
- Broadhurst, M.J., Brooks, T.J.G., Pollock, N.R., 2016, Diagnosis of Ebola Virus Disease: Past, Present, and Future, 2016, *Clinical Microbiology Reviews*, 29 (4), 773-793.
- Caldera, M.A., 2014, *Development of a Loop-mediated Isothermal Amplification for the Detection of Burkholderia glumae*, Yüksek Lisans Tezi, Louisiana State University.
- Chen, L., Jiao, Z., Liu, D., Liu, X., Xia, Z., Deng, C., Zhou, T., Fan, Z., 2017, One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Maize chlorotic mottle virus* in maize, *Journal of Virological Methods*, 240, 49-53.
- Deacon, J., 2006, *Introduction: the fungi and fungal activities*, Fungal Biology, 4. Baskı, 1. Bölüm, Blackwell Publishing, ISBN-13: 978-1-4051-3066-0, 1-15.
- Deacon, J., 2006a, *Fungi as a plant pathogens*, Fungal Biology, 4. Baskı, 14. Bölüm, Blackwell Publishing, ISBN-13: 978-1-4051-3066-0, 279-308.
- Fournier, P.E. ve Raoult, D., 2003, Comparison of PCR and Serology Assays for Early Diagnosis of Acute Q Fever, *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (11), 5098-5098.

- Gariyban, L. ve Avashia, N., 2013, Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR), *Journal of Investigative Dermatology*, 133 (3), e6.
- Gonzalez, L.E., Puchades, A.V., Carpino, C., Fernandez, A.A., Font-San-Ambrosio, M.I., Rubio, L., Galapienso, L., 2017, Fast detection of *Southern tomato virus* by one-step transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP), *Journal of Virological Methods*, 241, 11-14.
- Horst, R.K., 2008, *Classification of Plant Pathogens*, Westcott's Plant Disease Handbook, 7. Baskı, 2. Bölüm, Springer, New York, ABD, ISBN: 978-1-4020-4585-1, 43-45.
- Jaroenram, W., Kiatpathomchai, W., Flegel, T.W., 2009, Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick, *Molecular and Cellular Probes*, 23 (2), 65-70.
- Johansen, I.E., Rasmussen, O.F., Heide, M., 1989, Specific Identification of *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* by DNA-Hybridization Probes, *Phytopathology* 79:1019-1023.
- Kannan, V.R., Bastas, K.K., Antony, R., 2016, *Plant Pathogenic Bacteria: An Overview, Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria*, In: Kannan, V.R. ve Bastas, K.K. (ed.), 1. Bölüm, CRC Press, Florida, ABD, 1-17.
- King, K.M., Krivova, V., Canning, G.G.M., Hawkins, N.J., Kaczmarek, A.M., Perryman, S.A.M., Dyer, P.S., Fraaije, B.A., West, J.S., 2018, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection of *Pyrenopeziza brassicae* (light leaf spot of brassicas), *Plant Pathology*, 67, 167-174.
- Korus, K.A., 2011, *Evaluating commercially available diagnostic tests for the detection of Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis, cause of Goss's bacterial wilt and leaf blight in corn*, Yüksek Lisans Tezi, University of Nebraska-Lincoln.
- Kumar, D., Kumar, R., Hyun, T.K., Kim, J.Y., 2014, Cell-to-cell movement of viruses via plasmodesmata, *Journal of Plant Research*, 128 (1), 37-47.
- Küdela, V., 2007, History of Bacterial Ring Rot of Potato in the Czech Lands and a Proposal for Relaxation of Strict Quarantine Measures, *Plant Protection Science*, 43 (2), 35-46.
- Lalle, M., Possenti, A., Dubey, J.P., Poizo, E., 2017, Loop-Mediated Isothermal Amplification-Lateral-Flow Dipstick (LAMP-LFD) to detect *Toxoplasma gondii* oocyst in ready-to-eat salad, *Food Microbiology*, 70, 137-142.
- Li, R., Shi, J., Liu, B., Zhang, D., Zhao, X., Yang, L., 2018, International collaborative ring trial of four gene-specific loop-mediated isothermal amplification assays in GMO analysis, *Food Control*, 84, 278-283.
- Li, Y., Fan, P., Zhou, S., Zhang, L., 2017, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens, *Microbial Pathogenesis*, 107, 54-61.

- Liu, J., Mazumdar, D., Lu, Y., 2006, A Simple and Sensitive “Dipstick” Test in Serum Based on Lateral Flow Separation of Aptamer-Linked Nanostructures, *Angewandte Chemie International Edition*, 45 (47), 7955-7959.
- Mansour, S.M.G., Ali, H., Chase, C.C.L., Cepica, A., 2014, Loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of 18 World Organization for Animal Health (OIE) notifiable viral diseases of ruminants, swine and poultry, *Animal Health Research Reviews*, 1-18.
- Moore, D., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., 2011, *Fungi as pathogens of plants*, 21st Century Guidebook to Fungi, 14. Bölüm, Cambridge University Press, Cambridge ve New York, İngiltere ve ABD, ISBN 978-1-107-00676-8.
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., Notomi, T., 2001, Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289 (1), 150-154.
- Narayanasamy, P., 2001, *Characteristics of pathogenic microbes*, Plant pathogen detection and disease diagnosis, Bölüm 2, Marcel Dekker, New York, ABD, ISBN: 0-8247-0591-2, 5.
- Narayanasamy, P., 2008, *Molecular Biology of Plant Disease Development*, Molecular Biology in Plant Pathogenesis and Disease Management: Disease development, 2. Cilt, 2. Bölüm, Springer, Hollanda, ISBN 978-1-4020-8244-3, 7-10.
- Narayanasamy, P., 2008a, *Introduction*, Molecular Biology in Plant Pathogenesis and Disease Management: Disease development, 2. Cilt, 2. Bölüm, Springer, Hollanda, ISBN 978-1-4020-8244-3, 1-4.
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., Kanda, H., 2015, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects, *Journal of Microbiology*, 53 (1), 1-5.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Research*, 28 (12), e63.
- O’Farrell, B., 2009, *Evolution in Lateral Flow–Based Immunoassay Systems*, *Lateral Flow Immunoassay*, Wong, R.C. ve Tse, H.Y., (ed.) 1. Bölüm, Humana Press, New York, ABD, ISBN: 978-1-58829-908-6.
- OEPP ve EPPO, 2006, *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 36, 99–109.
- Pankova, I., Krejzar, V., Celp, J., Kúdela, V., 2007, Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in Daughter Tubers of Volunteer Potato Plants, *Plant Protection Science*, 43 (4), 127-134.
- Parida, M.M., Santhosh, S.R., Dash, P.K., Tripathi, N.K., Saxena, P., Ambuj, S., Sahni, A.K., Lakshmana Rao, P.V., Morita, K., 2006, Development and Evaluation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Real-Time Detection of *Japanese Encephalitis Virus*, *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (11), 4172-4178.

- Peng, D., Xie, J., Qiang, W., Ling, K.S., Guo, L., Fan, Z., Zhou, T., 2017, One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Journal of Virological Methods*, 248, 154-158.
- Perry, R.N. ve Moens, M., 2011, *Introduction to Plant-Parasitic Nematodes; Modes of Parasitism*, Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions, In: Jones, J. Gheysen, G., Fenoll, C. (ed.) 1. Bölüm, Springer, Dordrecht, Hollanda, ISBN: 978-94-007-0434-3, 3-20.
- Pfeilmeier, S., Caly, D.L., Malone, J.G., 2016, Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective, *Molecular Plant Pathology*, 17 (8), 1298-1313.
- Rigling, D. ve Prospero, S., 2018, *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control, *Molecular Plant Pathology*, 19 (1), 7-20.
- Roossinck, M.J., 2010, Lifestyles of plant viruses, *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 365, 1899-1905.
- Roossinck, M.J., 2015, Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism, *Virology*, 479-480, 271-277.
- Sahoo, P.R., Sethy, K., Mohapatra, S., Panda, D., 2016, Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases, *Veterinary World*, 9 (5), 465-469.
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J.N., Hollier, C., 2012, Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security, *Food Security*, DOI 10.1007/s12571-012-0200-5.
- Schaad, N.W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A., Knorr, D., 1999, Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system, *Plant Disease*, 83, 1095-1100.
- Spieckermann A. ve Kotthoff P., 1914, Untersuchungen über die Kartoffelpflanze und ihre Krankheiten. I. Die Bakterienringfäule der Kartoffelpflanze. *Landwirtschaftliche Jahrbücher*, 46, 659-732.
- Sun, Y., Quyen, T.L., Hung, T.Q., Chin, W.H., Wolff, A., Bang, D.D., 2015, A lab-on-a-chip system with integrated sample preparation and loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative detection of *Salmonella* spp. in food samples, *Lab on a Chip*, 15 (8), 1898-1904.
- Sunder, S., Singh, R., Agarwal, R., 2014, Brown spot of rice: an overview, *Indian Phytopathology*, 67 (3), 201-215.
- Tanner, N.A., Zhang, Y., Evans Jr, T.C., 2015, Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes, *Biotechniques*, 58 (2), 59-68.

- Thiong'O, S.W., 2011, *Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification as a Point-Of-Care Diagnostic Tool for Mycobacterium tuberculosis*, Yüksek Lisans Tezi, University of Nairobi.
- Thomas, P., 2004, *Introduction, Bacteria and Viruses*, 1. Bölüm, Lucent, ABD, ISBN: 1-59018-438-6, 7-10.
- Vidaver, A.K. ve Lambrecht, P.A, 2004, Bacteria as Plant Pathogens, *The Plant Health Instructor*, On-line DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0809-01.
- Wale, S., 2008, *Bacterial Diseases, Diseases, Pests and Disorders of Potatoes – A Colour Handbook*, Wale, S., Platt, H.W., Cattlin, N., (ed), 1. Bölüm, Manson Publishing, Londra, Birleşik Krallık, ISBN 978-1-84076-021-7.
- Ward, L.I. ve Harper, S.J., 2012, *Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of Plant Pathogens*, Plant DNA Fingerprinting and Barcoding: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Sucher, N.J., Hennell, J.R., Carles, M.C. (ed.) 13. Bölüm, Springer, New York, ABD, ISBN 978-1-61779-608-1.
- Wilkinson, K., Grant, W.P., Green L.E., Hunter, S., Jeger, M.J., Lowe, P., Medley, G.F., Mills P., Phillipson, J., Poppy G.M., Waage, J., 2011, Infectious diseases of animals and plants: an interdisciplinary approach, *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 366, 1933-1942.
- Wolf, J.M., Elphinstone, J.G., Stead, D.E., Metzler, M., Müller, P., Hukkanen, A., Karjalainen, R., 2005, *Dissemination*, Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot, *Plant Research International*, 4. Bölüm, Report 95, 15-16.
- Yoo, M.S., Noh, J.H., Yoon, B.S., Reddy, K.E., Kweon, C.H., Jung, S.C., Kang, S.W., 2012, Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for sensitive and rapid detection of Korean sacbrood virus, *Journal of Virological Methods*, 168, 147-151.
- Zhou, J., Liao, Y., Li, H., Lu, X., Han, X., Tian, Y., Chen, S., Yang, R., 2015, Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of *Trichosporon asahii* in Experimental and Clinical Samples, *BioMed Reseach International*, 1-9.

EKLER

EK.1 Yetki Belgesi



T.C.
GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü

Sayı : 22789349-320.03.05-E.1493177
Konu : Yetki Belgesi
(*Clavibacter michiganensis* supsp.
sepedonicus)

14.06.2017

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE
(Fen Fakültesi Dekanlığı)

İlgi : 30.05.2017 tarihli ve 69871371-302.08.01.05.01/91707 sayılı yazınız.

Üniversiteniz Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerinden Doç.Dr. Neslihan TURGUT KARA tarafından "Bitki Patojeni Tespiti İçin İlimiğe Dayalı İzotermal Çoğaltma (LAMP) Temelli Yanal Akış Analiz Yönteminin Geliştirilmesi" konulu tez çalışması kapsamında *Clavibacter michiganensis* supsp. *sepedonicus* isimli bitki patojeninin ülke içinde dolaşımını için düzenlenen yetki belgesi ekte gönderilmektedir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

 e-imzalıdır

Dr. Yunus BAYRAM
Bakan a.
Genel Müdür Yardımcısı V.

Ek : Yetki Belgesi (1 sayfa)

BELGENİN ASLI ELEKTRONİK İMZALIDIR

Yasemin DEMİR
Büro

Öyü
16/06/2017
ylek



Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Evrak Doğrulama Kodu : FWHLLRVCPUVKUZRKFTVA Evrak Takip Adresi: <https://www.turkiye.gov.tr/gida-tarim-hayvancilik-bakanligi-ebys>
Eskişehir Yolu 9. Km. Lodumlu Mevkii 06800 Çankaya/ Ankara

Tel: (0312) 287 33 60 Faks:

Bilgi için: Gülten ANDIÇI
Mühendis
Telefon No:(312) 258 74 54

EK.1 (Devam)

EK-3

Bilimsel Çalışma, Deneme ve Çeşit İslahı Amacıyla Bitki, Bitkisel Ürün ve Diğer Maddeler ile Zararlı Organizmaların Ülkeye Girişi ve/veya Ülke İçinde Dolaşımı İçin Yetki Belgesi (Model Letter of Authority for the introduction and/or movement of harmful organisms, plants, plant products and other objects for trial or scientific purposes and for work on varietal selections)

YETKİ BELGESİ

LETTER OF AUTHORITY

<p>1. Gönderenin / Menşei ülkenin bitki koruma organizasyonunun isim ve adresi (Name and address of consignor/plant protection organisation of the country of origin)</p> <p>İstanbul Zirai Karantina Müdürlüğü İSTANBUL</p>	<p>Bilimsel Çalışma, Deneme ve Çeşit İslahı Amacıyla Bitki, Bitkisel Ürün ve Diğer Maddeler ile Zararlı Organizmaların Ülkeye Girişi ve/veya Ülke İçinde Dolaşımı Hakkında Tebliğ'e göre düzenlenmiştir. (for the introduction and/or movement of harmful organisms, plants, plant products and other objects for trial or scientific purposes and for work on varietal selections)</p>	
<p>2. Onaylanmış faaliyetlerden sorumlu kişinin adı ve adresi (Name and address of person responsible for the approved activities)</p> <p>Doç.Dr. Neslihan TURGUT KARA İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Vezneciler/İST.</p>	<p>3. Belgeyi düzenlemekten sorumlu resmi kurumun ismi (Name of the responsible official body of the Member State of issue)</p> <p>Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü</p>	
<p>4. Karantinaya yönelik bitki sağlığı tedbirlerinin alındığı özel yer veya yerlerin adres ve tanımı (Address and description of the specific site or sites for quarantine containment)</p> <p>İstanbul Üni. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Vezneciler/İSTANBUL</p>	<p>5. Menşei Belgesi (üçüncü ülke menşei materyal için) (Place of origin (documentary evidence attached for material originating in a third country))</p>	
<p>7. Üçüncü ülke menşei materyalin ihracatçı ülkeye giriş noktası (Declared point of entry for material introduced from a third country)</p>	<p>6. Bitki Pasaport Numarası: (Plant passport number)</p> <p>veya (or)</p> <p>Bitki Sağlık Sertifikası Numarası: (Phytosanitary certificate number)</p>	
<p>8. İlgili zararlı organizmalar dahil, materyalin bilimsel ismi (isimleri) (Scientific name(s) of the material, including the harmful organisms concerned)</p> <p><i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i></p>	<p>9. Materyal miktarı (Quantity of material)</p> <p>1 adet tüp içinde</p>	
<p>10. Materyalin çeşidi (Type of material)</p>		
<p>11. Ek deklarasyon (Additional declaration)</p> <p>Bu materyalin ülkeye girişi/ülkede dolaşımı ⁽¹⁾no'lu Tebliğ dâhilindedir. (This material is [introduced into]/[moved within]⁽¹⁾ the Community under 2014/59 numbered communique.)</p> <p>(1) Uygun değilse siliniz. (Delete if not applicable)</p>		
<p>12. Ek bilgi (Additional information)</p>		
<p>13. Gönderen ülkenin sorumlu resmi kurumu tarafından onayı (Endorsement by the responsible official body of the country of origin of the material)</p> <p>Onay yeri (Place of endorsement)</p> <p>Tarih (Date)</p> <p>Yetkilinin ismi ve imzası: (Name and signature of authorised officer)</p>	<p>14. Düzenleyen sorumlu resmi kurumun mührü (Stamp of the responsible official body of issue)</p> <p>ANKARA 13.06.2017</p> <p>Düzenleme yeri (Place of issue)</p> <p>Tarih (Date)</p> <p>Dr.Yunus BAYRAM</p> <p>Yetkilinin ismi ve imzası (Name and signature of authorised officer)</p>	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Hasan Sağcan
Doğum Yeri	Merkez/ADIYAMAN
Doğum Tarihi	29.03.1990
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0534 730 1477
E-Posta Adresi	sagcanhasan@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Teknik Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Mezuniyet Yılı	05.07.2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Üniversitesi
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı
Mezuniyet Tarihi	22.06.2018