

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)'NUN
Plasmodium VE *Leishmania* MODELLERİNDE
UYGULANMASI ÜZERİNE
DENEYSEL ARAŞTIRMALAR

54847

Parazitoloji Programı
DOKTORA TEZİ

Tıp Doktoru Metin ATAMBAY

Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. M. Ziya ALKAN

İZMİR - 1996

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I

A. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
B. KAYNAK BİLGİLER.....	2
1. PARAZİT HASTALIKLARINDA TANI YÖNTEMLERİ.....	2
1.1 MUAYENE VE GENEL LABORATUVAR BULGULARI.....	2
1.2 PARAZİTOLOJİK LABORATUVAR YÖNTEMLERİ.....	2
1.2.1 DİREKT YÖNTEMLER.....	3
1.2.2 İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLER.....	5
1.2.3 GENETİK MOLEKÜLER YÖNTEMLER.....	7
1.2.3.1 KLASİK YÖNTEMLER.....	8
1.2.3.2 AMPLİFİKASYON YÖNTEMLERİ.....	9
1.2.3.3 PROBE AMPLİFİKASYON YÖNTEMLERİ.....	13
1.2.3.4 SİNYAL AMPLİFİKASYON TEKNİKLERİ.....	13
1.2.4 İŞARET MOLEKÜLLERİ.....	14
2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR).....	15
2.1 PCR ÖNCESİ YAPILAN İŞLEMLER.....	15
2.2 PCR'DA KULLANILAN MADDELER.....	16
2.3 AMPLİFİKASYONUN UYGULANMASI.....	25
2.4 AMPLİFİYE ÜRÜNÜN İNCELENMESİ.....	27
2.5 PCR'DA KULLANILAN MALZEMELER VE LABORATUVAR ŞARTLARI.....	33
2.6 PCR'DA KONTAMİNASYONA KARŞI ÖNLEMLER.....	34

BÖLÜM II

A. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
1. KULLANILAN TAMPON VE SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI.....	36
2. <i>Plasmodium vivax</i> İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	39
2.1. AMPLİFİKASYON.....	41
2.2. DİĞER SERİLERİN İNCELENMESİ.....	43
3. <i>Leishmania</i> PROMASTİGOTLARI İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	44
3.1. KLASİK SAFLAŞTIRMA YÖNTEMİNİN MODİFİKASYONLARININ DENENMESİ.....	44
3.1.1. KONTROL ÇALIŞMASI.....	46
3.2. DUYARLILIK ÇALIŞMASI.....	46
3.2.1. SDS ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI.....	47
3.2.3. CHELEX VE FENOLLÜ EKSTRAKSİYON METODLARININ DUYARLILIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI.....	47
4. LİTYUM TUZLU NÜKLEOTİD SOLÜSYONLARININ KULLANILMASI.....	49
4.1. NÜKLEOTİD SOLÜSYONLARININ UYGUN KONSANTRASYONDA BİRLEŞTİRİLMESİ.....	49
4.2. KONSANTRASYONLARIN AMPLİFİKASYONDA DENENMESİ.....	49
4.3. KONSANTRASYONLARIN VE BİRLEŞİMLERİN DENENMESİ.....	49
4.4. TİMİN'Lİ VE URACİL'Lİ dNTP'LERİN İKİ FARKLI DNA ÖRNEĞİ KULLANILARAK KARŞILAŞTIRILMASI.....	50

5. MgCl ₂ KONSANTRASYONLARININ DENENMESİ.....	52
5.1. AMPLİFİYE LEİSHMANİA DNA'SI İLE YAPILAN ÇALIŞMADA TE'NİN MgCl ₂ KONSANTRASYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.....	52
5.2. CHELEX YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN ÖRNEKDE MgCl ₂ KONSANTRASYONLARININ DENENMESİ.....	52
6. <i>Plasmodium yoelii</i> İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	53
6.1. ÖRNEKLERİN ALINMASI.....	53
6.2. CHELEX YÖNTEMİ KULLANILARAK DUYARLILIK VE MgCl ₂ KONSANTRASYONLARININ İNCELENMESİ.....	53
6.2.1. % 10 PARAZİTEMİLİ ÖRNEKLERLE YAPILAN ÇALIŞMA...	53
6.2.2. %0,04 PARAZİTEMİLİ ÖRNEKLERLE YAPILAN ÇALIŞMA..	54
6.3. FENOL / ETANOL YÖNTEMİ İLE TE'NİN ETKİSİNİN VE DUYARLILIĞIN ARAŞTIRILMASI.....	54
6.4. FENOL / ETANOL YÖNTEMİ İLE DUYARLILIĞIN ARAŞTIRILMASI.....	54
BÖLÜM III	
A. BULGULAR.....	56
1. <i>Plasmodium vivax</i> İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	56
1.1. DİĞER SERİLERİN İNCELENMESİ.....	56
2. <i>Leishmania</i> PROMASTİGOTLARI İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	56
2.1. KLASİK SAFLAŞTIRMA YÖNTEMİNİN MODİFİKASYONLARININ DENENMESİ.....	56
2.1.1. KONTROL ÇALIŞMASI.....	57
2.2. DUYARLILIK ÇALIŞMASI.....	57
2.2.1. SDS ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI.....	58
2.2.2. CHELEX VE FENOLLÜ EKSTRAKSİYON METODLARININ DUYARLILIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI.....	58
3. LİTYUM TUZLU NÜKLEOTİD SOLÜSYONLARININ KULLANILMASI	59
3.1. KONSANTRASYONLARIN AMPLİFİKASYONDA DENENMESİ...	59
3.2. KONSANTRASYONLARIN VE BİRLEŞİMLERİN DENENMESİ....	59
3.3. TİMİN'LI VE URACİL'LI dNTP'LERİN İKİ FARKLI DNA ÖRNEĞİ KULLANILARAK KARŞILAŞTIRILMASI.....	59
4. MgCl ₂ KONSANTRASYONLARININ DENENMESİ.....	60
4.1. AMPLİFİYE <i>Leishmania</i> DNA'SI İLE YAPILAN ÇALIŞMADA TE'NİN MgCl ₂ KONSANTRASYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.....	60
4.2. CHELEX YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN ÖRNEKDE MgCl ₂ KONSANTRASYONLARININ DENENMESİ.....	61
5. <i>Plasmodium yoelii</i> İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	62
5.1. CHELEX YÖNTEMİ KULLANILARAK DUYARLILIK VE MgCl ₂ KONSANTRASYONLARININ İNCELENMESİ.....	62
5.1.1. % 10 PARAZİTEMİLİ ÖRNEKLERLE YAPILAN ÇALIŞMA...	62
5.1.2. %0,04 PARAZİTEMİLİ ÖRNEKLERLE YAPILAN ÇALIŞMA	62
5.2. FENOL / ETANOL YÖNTEMİ İLE TE'NİN ETKİSİNİN VE DUYARLILIĞIN ARAŞTIRILMASI	62

5.3. FENOL / ETANOL YÖNTEMİ İLE DUYARLILIĞIN ARAŞTIRILMASI	62
BÖLÜM IV	
A. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
B. ÖZET	72
C. KAYNAKLAR	74
D. ÖZGEÇMİŞ	80



GİRİŞ VE AMAÇ

Genellikle öldürücü olmayan, kronik seyirli hastalıklara yol açtığı bildirilen parazitlerin erişkinlerde iş gücü kaybı, çocuklarda zihinsel ve bedensel gelişmeyi geciktirmesi nedeni ile toplumsal tahribata ve büyük ekonomik kayıplara etken olduğu belirtilmektedir. Son yıllarda sık karşılaşılan immün yetersizlik olgularında parazit hastalıklarının ölümlere neden olmasıyla önemi daha iyi anlaşılan parazitoloji konusunda tıp dünyasındaki yeniliklerden ve gelişmelerden yararlanılması zorunlu hale gelmiştir.

Bir erişkinin verimli, başarılı yaşayabilmesi, bir çocuğun sağlıklı gelişebilmesi için parazit hastalıklarının en kısa sürede tedavi edilmesi gerekmektedir. Tedavi için doğru ve hızlı tanıya ulaşmak önemli olup, bu yolda hekimin karşısına çeşitli alternatif yöntemler sunulmaktadır. Tanı, hastanın klinik durumunun, sosyo-ekonomik düzeyinin, yaşadığı ekolojik çevrenin değerlendirilmesi sonrasında hekimin belirleyeceği uygun yöntemlerin uygulanması ile mümkündür. Zamanında ve doğru konamayan tanı ile hasta mağdur olduğu gibi eradikasyon çalışmalarında da başarısızlıklara yol açmaktadır.

Duyarlılığı ve özgünlüğü yüksek metodların geliştirilmesine yönelik çalışmalarla etkene ait genetik materyali saptamayı hedefleyen hatta bu genetik materyali çoğaltarak ortaya çıkaran yöntemlerle oldukça etkileyici sonuçlara ulaşılmıştır.

Genetik moleküler yöntemlerin bir çoğu gibi polimeraz zincir reaksiyonu da güçlü ve yeni bir yöntem olarak parazitoloji alanında kullanılmaktadır.

Çalışmamızda Polimeraz Zincir Reaksiyonunun parazit hastalıklarının tanısında kullanılmasına olanak sağlamak üzere anabilim dalımızda da uygulanabilmesi hedeflenmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu gibi ileri bir teknolojiyi uygulamama olanak sağlayan ve çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteğini de esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. M. Ali Özcel'e ve anabilim dalımızın yardımlarını unutamayacağım tüm öğretim üyelerine, tez danışmanım sayın Doç. Dr. M. Ziya Alkan'a, birlikte çalışma şansını yakaladığım sayın Uz. Bio. Aylin Babaoğlu'na içten teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAK BİLGİLER

1. PARAZİT HASTALIKLARINDA TANI YÖNTEMLERİ

1.1 MUAYENE VE GENEL LABORATUVAR BULGULARI

Parazit hastalıklarının tanısına giden yolda, hastanın yakınmalarının yeterince belirgin ve özgün olmaması nedeni ile, bu bilgilerin klinik bulgularla birleştirilmesi halinde dahi kesin tanı konulamayacağı bildirilmiştir(12). Bu zorluğun nedenleri arasında birçok parazit hastalığında prodrom döneminin uzun sürmesi, eklenen süper enfeksiyonların klinik tabloyu saptırması, poliparazitizm hali ve immün yetersizlik gibi faktörler gösterilmekte ancak, nadir de olsa Romano belirtisi, çivi arazi gibi patognomik bulguların varlığından bahsedilmektedir (12, 48).

Kan tetkiklerinde anemi, eosinofili; idrar tetkikinde hematüri; gaitada gizli kan; ultrasonda organomegaliler, kistik yapılar, mikrosefali ve makrosefaliler; röntgende serebral kalsifikasyonlar, kalsifiye kistik yapılar, kontrast radyografide barsak lümeninde bulunan oluşumlar; rektosigmoidoskopik incelemede zımba ile delinmiş görünümü veren ülserasyonlar; bilgisayarlı tomografi ve magnetik rezonans görüntülemeye yine organomegaliler, kistik oluşumlar genel kontrol amacı ile veya bazı hastalıkların tanısı ya da tedavisi esnasında uygulanan basit ve ileri tetkiklerin sonuçları olarak hekimi, bir parazit hastalığına yönlendirebilecek bulgular arasında gösterilmiştir(12, 17, 30, 48).

1.2 PARAZİTOLOJİK LABORATUVAR YÖNTEMLERİ

Parazitolojide tanı yöntemleri direkt ve indirekt yöntemler başlığı altında incelenmekte, direkt yöntemlerde, etkeni görmeye veya etkene ait antijen ve genetik materyali saptamaya yönelik, indirekt yöntemlerde ise allerjik, serolojik incelemelerle, allerjik reaksiyonları ve antikorları tespit etmeyi hedefleyen metodlar tanımlanmıştır(12, 17, 30, 48). Son yıllarda antijen veya antikorların arandığı immünolojik yöntemler spesifik

nükleik asit saptanması amacıyla geliştirilen genetik yöntemler ayrı başlıklar altında incelenmeye başlanmıştır(32).

1.2.1 DİREKT YÖNTEMLER

Direkt yöntemlerde muayene materyalinin alınış zamanının, laboratuvara ulaştırma süresinin, incelemeye kadar geçen sürede muhafaza etme şeklinin önemi üzerinde hassasiyetle durulmaktadır(6, 32).

Genellikle dışkı muayeneleri için uygulanması gereken makroskobik bakı ile, gaitanın kokusu, kıvamı, kan içerip içermediği incelenerek fikir edinileceği gibi, bazı helmintlerin görülerek tanıya gidilebileceği de bildirilmiştir(48).

Özellikle, canlı, hareketli trofozoidleri görmek amacı ile uygulanan tuzlu su preparasyonu ile, protozoon kistlerinin, helmint yumurta ve larvalarının da görülebileceği, muayene materyali olarak gaita, idrar, balgam, beyin omurilik sıvısı, vaginal akıntı, mide duodenum sıvısı, perianal bölge materyali, deri kazıntısı, deri lezyonu, dalak, karaciğer, akciğer, mide, intestinal sistem, mesane, kemik iliği, lenf bezi, kas, biopsisi ile alınan doku örneklerinin incelenebileceği belirtilmektedir(6).

Gaita için uygulanan sık olarak Modifiye d'Antoni ve Lugol yöntemlerinin kullanıldığı basit boyamalı direkt bakı metodunda, trofozoidlerin bozulacağı için görülemeyeceği, ancak nükleuslarının belirgin hale gelmesiyle protozoon kistlerinin, daha kolay tanınacağı vurgulanmaktadır(32). Bu yöntemler dışında mertiolat-iyot-formaldehit (MİF) ve Nair'in metilen mavisi solüsyonu da kullanılan uygulamalar arasında tanımlanmıştır(6).

Yumurtalarını perianal bölgeye bırakan *Enterobius vermicularis* infeksiyonunun tanısında etkili ve pratik bir yöntem olarak anal bant metodu gösterilmiştir(19). Direkt inceleme ile tespit edilemeyecek kadar az sayıdaki parazitlerin veya bunların larva, kist ve yumurtalarının özgül ağırlıklarının farklı olmasından kaynaklanan çökme veya yüzme özelliklerinden yararlanılarak uygulanan çoklaştırma yöntemleri, yüzdürme ve çöktürme metodları başlıkları altında incelenmektedir(6, 12, 17, 30, 48).

Çöktürme yöntemlerinin kist ve abselerden alınan biopsi materyali, idrar, kan, balgam; gaita örneklerinde uygulanabileceği bildirilmiştir(17, 30). Kan tetkikleri için mikrohematokrit tüpü, filtre kağıdı gibi araçlar kullanılarak geliştirilen çeşitli yöntemler de yayımlanmıştır.(14, 27)

Dışkı için kullanılan yüzdürme yöntemleri arasında doymuş tuzlu su, şeker, çinko sülfat yardımı ile uygulanan metodlar bildirilmiştir(12, 48).

Direkt metodlar ile tanımlanamayan organizmalar için veya parazitlerin yapılarının daha ayrıntılı incelenmesi amacı ile geliştirilen birçok boyama yöntemi belirtilmiştir(6, 30).

Bu yöntemler arasında gaita incelemesinde özellikle barsak protozoonları için sık kullanılan trichrome, demir hematoksilin, asit-fast boyama yöntemleri ve bunların çeşitli modifikasyonları tanımlanmıştır(18, 21, 46, 55). Organ ve dokulardan alınan biopsi materyalleri, vücut salgıları ve kan preparatlarının incelenmesi için Giemsa, Wright, trichrome, Papanicolaou, methenamin-gümüş gibi boyama yöntemleri tanımlanmış ve bu yöntemlerin de çeşitli doku ve parazitlere yönelik modifikasyonları bildirilmiştir(6, 10, 17, 30, 50).

Etkenin canlı ve cansız ortamlarda çoğaltılmasına yönelik kültür yöntemlerinin pratik olmamaları nedeni ile birçok laboratuvarında rutin uygulamada kullanılmadığı, moleküler yöntemlerin gelişmesi ile, tanı amaçlı kültür yöntemlerine daha az gereksinim duyulduğu belirtilmiştir(19).

Genellikle fare, sıçan, hamster gibi kemirgenlerin kullanıldığı in vivo kültür yönteminin de tanı amacı ile kullanılabilmesi, ancak, konakta paraziteminin tespit edilebilecek düzeye ulaşması için belli bir sürenin gerekli olduğu vurgulanmıştır(6, 17).

İn vitro kültür metodlarının kullanılmasıyla, nematod larvalarının sayılarının artırılarak, yumurtalardan çıkan larvaların incelenerek, birinci evre larvaların ikinci evrede morfolojilerinin gözlenerek tanıya gidilebileceği, *Entamoeba histolytica*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp. *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma*

cruzi ve *Leishmania*'lar için geliştirilen özel kültür yöntemlerinin de kullanılabileceği bildirilmiştir(17, 19).

Xenodiagnosis yönteminin *Trypanosoma cruzi* ve *Trichinella spiralis* infeksiyonlarının tanısı için kullanıldığı, bir çok laboratuvar için pratik olmadığı belirtilirken, Chagas hastalığında duyarlılığı %67 olarak saptanmıştır(6, 17).

1.2.2 İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLER

İmmünolojik yöntemler içinde, antijen ve antijene özgün antikorun birleşmesi esasına dayanan, özgün antikorlar kullanılarak antijeni veya saflaştırılmış antijen kullanılarak özgün antikorları saptanmaya çalışan çeşitli metodlar incelenmektedir(5, 6, 17, 30, 32).

İmmünolojik yanıtın sadece parazitin türüne göre değil, hastanın biyolojik yapısına, infeksiyonu oluşturan suşa, hastalığın evrelerine göre de değiştiği vurgulanmıştır(17). Özellikle antikor düzeyini saptamaya yönelik metodlar üzerinde yoğunlaşan gayretlerle çeşitli modifikasyonlar araştırılarak daha özgün ve daha duyarlı yöntemlerin geliştirilmeye çalışıldığı belirtilmiştir(32).

Sık kullanılan metodlardan,

- a) Kültürden elde edilmiş parazitlerin çeşitli serum dilüsyonları ile kümelenmesiyle serumda antikor olup olmadığını saptayan direkt aglütinasyon testi (DAT),
- b) Antijen antikor kompleksine bağlanan komplemanın hemoliz yapamamasına dayalı kompleman fiksasyon testi (CF),
- c) Antijen ve antikorun jel içinde pasif yayılımı sırasında en yoğun olarak karşılaştıkları bölgelerde presipitasyon çizgisi oluşmasından yararlanan jel difüzyon yöntemi, agarda double difüzyon (DDA), immün difüzyon (ID), Ouchterlony yöntemleri,
- d) Antikorların jel içinde elektrik akımı yardımı ile yürütülmesinden sonra hareket yönüne paralel olacak şekilde eklenen antijenin dağılması sırasında yürütülmüş antikorlarla karşılaştığı bölgede presipitasyon çizgisi oluşması prensibiyle uygulanan immün elektroforez (IE),

- e) Antijen kaplanmış koyun eritrositlerinin antikor varlığında aglütine olması prensibine dayalı indirekt hemaglütinasyon tekniği (IHA),
- f) Bilinen partikül antijen ve fluoresan işaretli konjuge yardımı ile antikor varlığını gösteren indirekt fluoresan antikor tekniği (IFAT),
- g) Fluoresan işaretli antikorların bağlanması ile antijen saptayan direkt fluoresan antikor tekniği (DFIT),
- h) Partikül aracılığı ile antijen varlığında aglütinasyon görülmesi ilkesine dayanan bentonite flokülasyon (BF) ve latex aglütinasyon (LA) testleri,
- i) Zıt yüklü proteinlerin elektrik akımı yardımı ile yürütülmesi yolu ile gerçekleşen antijen-antikor birleşmesinin kullanıldığı ters yönlü immün elektroforez (Counter immunoelectrophoresis) (CIE),
- j) Radyoaktif izotop ile işaretlenmiş antijen veya antikorla yapılan radio immünoassay (RIA),
- k) Belirli bir antijene karşı oluşmuş immünglobülin E (IgE) ve immünglobülin G (IgG) ölçümü için kullanılan, sorbente bağlanmış antijenle antikorların tutulup, radyoaktif olarak işaretlendiği radioallergosorbent test (RAST),
- l) Antijen antikor kompleksinin enzim ve substrat yardımı ile boyanarak antijen veya antikor düzeyinin renk ölçümü ile saptandığı, birçok modifikasyonu geliştirilen enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemleri bildirilmiştir(6, 17,30, 32, 49).

Bazı protozoon hastalıklarında antijen aranması ile uygulanan tesler tablo 1’de, yine aynı hastalıklarda antikor aranması için kullanılan testler tablo 2’de gösterilmiştir(17).

HASTALIKLAR	KULLANILABİLEN YÖNTEMLER
Amobiasis	IFAT, ID, CIE, ELISA
Chagas	ELISA
Giardiasis	ID, DFAT, ELISA
Leishmaniasis	
Malaria	DFAT,
Pneumocystosis	CIE, ELISA, IFAT
Toxoplasmosis	DFAT, ELISA

Tablo 1: Bazı protozoon hastalıklarında serumda, vücut sıvılarında ve biopsi materyallerinde antijen aranması için kullanılacak yöntemler.

HASTALIKLAR	TANIDA DEĞERLİ YÖNTEMLER	DENEYSEL OLARAK UYGULANABİLECEK YÖNTEMLER	DENENMİŞ DİĞER YÖNTEMLER
Amobiasis	CF, BF, IHA, LA, IFA, ID, IE, CIE, ELISA		
Chagas	CF, IHA, LA, DAT, IFAT CIE,	IE, ELISA	ID
Giardiasis		IFAT, ELISA	ID
Leishmaniasis	CF, IHA, LA, DAT, IFAT,	ELISA	ID, IE, CIE, RIA
Malaria	IHA, IFAT, ID, ELISA	CF, LA, CIE	IE, RIA
Pneumocystosis	CF, IFAT		LA
Toxoplasmosis	CF, IHA, LA, IFAT, ELISA		RIA

Tablo 2: Bazı protozoon hastalıklarında serumda özgün antikor aranması için kullanılacak yöntemlerin sınıflandırılması (Kısaltmalar metin kısmında açıklanmıştır).

Antijenin deri içine verilmesinden sonra gelişen allerjik yanıtın değerlendirildiği testlerden Leishmanin (Montenegro) ve Casoni testlerinin antikor oluşumuna neden olması ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarına yol açması nedenleri ile önemlerini kaybettiği belirtilmiştir(17).

1.2.3 GENETİK MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Genetik materyalin araştırıldığı moleküler yöntemlerin, serolojik ve kültür yöntemlerinden farklı olarak aranan organizmanın sadece nükleik asitlerinin varlığını ortaya koyduğu önemle vurgulanmaktadır(32).

Moleküler yöntemler amplifikasyonsuz klasik ve amplifikasyon yöntemleri başlıkları altında incelenmektedir, bu yöntemlerin duyarlılıkları arasında önemli farklar saptanmıştır (Tablo 3), (32).

UYGULANAN YÖNTEMLER	DUYARLILIKLARI
Ethidium Bromide ile Direkt Boyama	10^8
Radioaktif Kısa Prob Yöntemleri	10^6
Radioaktif Uzun Prob Yöntemleri	10^4
Enzime Bağlı Prob Yöntemleri	10^4
Işık Veren Kimyasal Maddelere Bağlı Prob Yöntemleri	10^4
Birleşik ve Dallı Prob Yöntemleri	10^4
Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemleri	≤ 10

Tablo 3: Çeşitli Yöntemlerin Nükleik Asit Kopya Sayısı Cinsinden Duyarlılıkları.

1.2.3.1 KLASİK YÖNTEMLER

Klasik yöntemler olarak herhangi bir çoklaştırma tekniği uygulanmayan, problemlerin (Nükleik asit zincirinin belirli bir bölümündeki nükleotidleri karşılayabilecek şekilde uygun sırada dizilmiş, iki ucu nükleotid bağlantısına uygun olmayan, çeşitli uzunluklarda zincirler) hibridizasyonu (Problemlerin nükleik asit zincirinde spesifik olduğu nükleotid dizisine bağlanması) sonrasında bu problemlerin işaretlenerek işaretin görülür hale getirildiği metodlar bildirilmiş ise de duyarlılığın artırılması amacıyla bu yöntemlere uygulanabilecek işaret amplifikasyon teknikleri de tanımlanmıştır(32).

Klasik (Amplifikasyonsuz) yöntemler:

- a) Sıvı faz hibridizasyonu,
- b) Katı faz hibridizasyonu,
- c) İn-situ hibridizasyon başlıkları altında incelenmiştir(32).

Denatüre (Karşılıklı zincirlerin birbirinden ayrılması) edilmiş deoksiribonükleik asitin (DNA) sıvı ortam içinde prob ile hibridizasyonundan sonra, ya hibridize olmamış DNA'nın S1 nükleaz enzimi ile etkilenerek sadece hibridize olmuş, yani ikili zincir haline dönüşmüş DNA'nın triklorasetik asit ile presipitasyonu, ya da doğrudan sadece hibridize DNA'ya tutunan hidroksiapatit kolonları ile işaretlenmesi esasına dayalı sıvı faz hibridizasyonu yönteminin rutin uygulamada en popüler modifikasyonu olarak, proba, alkali ortamda peroksitlerin eklenmesi ile ışık yayan acridinium ester bağlayarak yürütülen hybridization protection assay (HPA) yöntemi tanımlanmıştır(32).

Sıvı faz hibridizasyonu yöntemlerinin avantajları arasında hızlı hibridizasyon nedeni ile test süresinin kısa olması ve hibridize olmamış DNA veya problemleri uzaklaştırmak için uygulanan yıkama aşamalarını gerektirmemesi gösterilmiştir(32).

Slot blot veya dot blot hibridizasyonu olarak adlandırılan katı faz hibridizasyon yönteminde, hücreler parçalanıp, DNA'nın denaturasyonundan sonra vakum yardımı ile bir membrana aktarılması, bu membranın işaretli problemler içeren bir solüsyonda hibridizasyon için inkubasyonunu takiben uygulanan yıkama ile bağlanmamış problemlerin

uzaklaştırılması şeklinde yürütüldüğü belirtilmiştir(32). Bu yöntemin biri DNA'yı katı ortama yapıştıran, diğeri ise işaretleyen iki prob ile geliştirilen modifikasyonu sandviç hibridizasyonu olarak adlandırılmıştır(31). Safılaştırılan DNA'nın endonükleaz enzimleri ile belirli yerlerden kesilerek uzunluklarına göre agaroz jel elektroforezinde ayrıştırıldıktan sonra, nitrosellüloz tabakaya aktarılması ve spesifik proplar ile işaretlenmesi Southern blot, bu yöntemin ribonükleik aside (RNA) enzim kullanmadan uygulanması Northern blot adıyla tanımlanmıştır(32, 45).

Katı faz hibridizasyon yöntemlerinin bir test içinde birçok örneği inceleme fırsatı vermesine rağmen, bol nükleik asit gerektirmesi, karmaşık olması ve uzun sürmesi gibi dezavantajları da belirtilmiştir(32).

İnfeksiyonun dokularda bulunduğu yerleri ortaya koyabilen in situ hibridizasyon metodu DNA prob yöntemlerinin en verimli uygulama şekli olarak iddia edilmektedir(32). Formalin ile fikse edilerek parafinlenmiş dokuların hassaslaştırılmasıyla nükleik asit denatürasyonundan sonra, probun bütünlüğü bozulmamış hücre içinde hibridizasyonu prensibine dayalı bu yöntemin, kısa proplar kullanılmasıyla daha başarılı olduğu bildirilmiştir(32).

1.2.3.2 AMPLİFİKASYON YÖNTEMLERİ

Nükleik asit amplifikasyon tekniklerinin bir tanısı yöntemi olmayıp, sadece çoğaltma yöntemleri olduğu, amplifikasyon teknikleri konusunda unutulmaması gereken önemli bir ayrıntı olarak nitelenmektedir(32, 43, 47).

Hedef nükleik asit amplifikasyon tekniklerinin duyarlılığının çok yüksek olması sayesinde, işaretli propların kullanımına gerek kalmadan basit boyama yöntemleri ile sonuca gidilebileceği, ancak karmaşık olmaları nedeni ile standardizasyonun güçleştiği vurgulanmıştır(32).

Hedef nükleik asit amplifikasyon teknikleri:

a) Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR),

1. Nested PCR,

2. Multiplex PCR gibi modifikasyonları,

b) Self-Sustaining Sequence Replication (3SR)

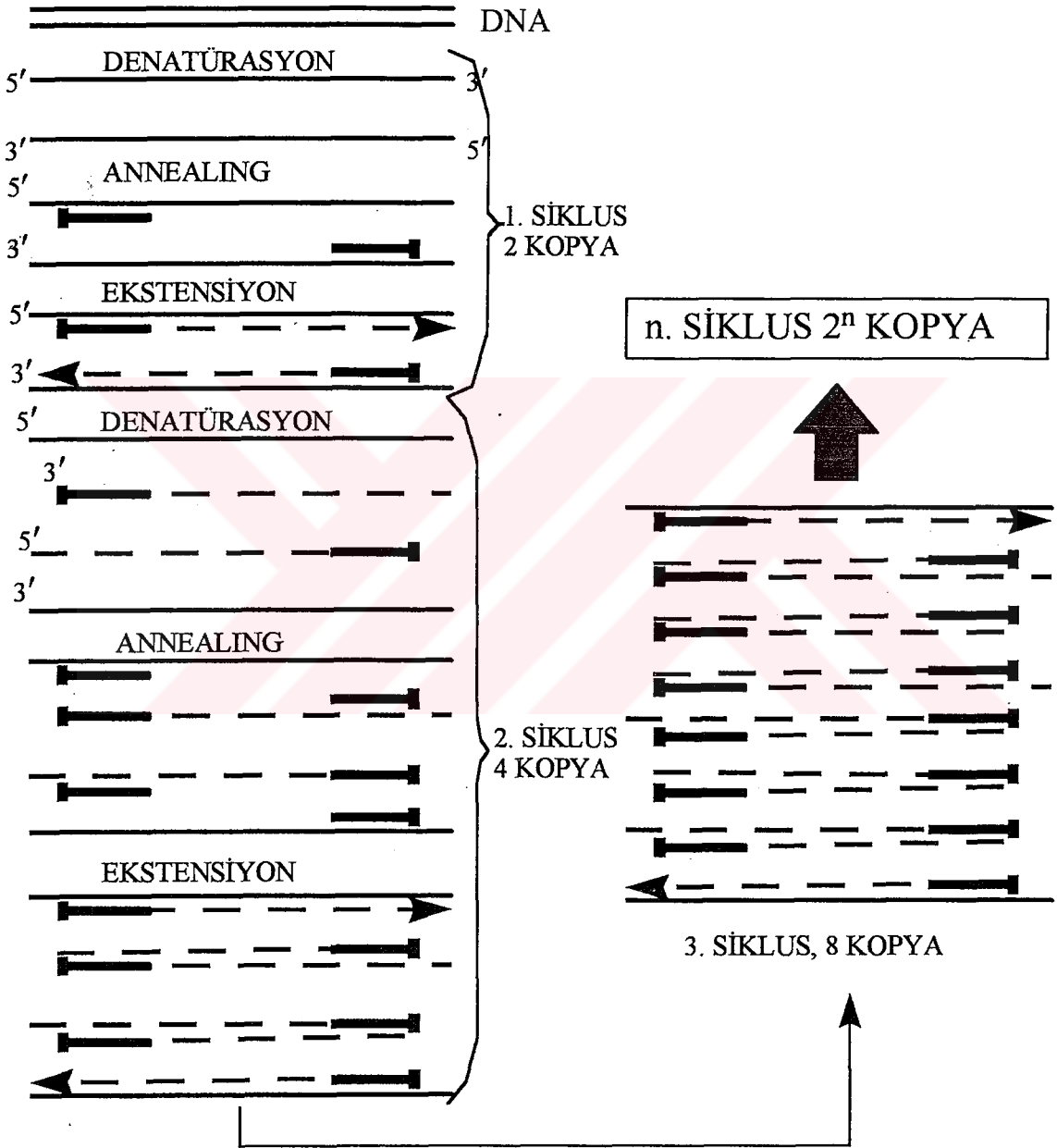
c) Strand Displacement Amplifikasyon (SDA) başlıkları altında incelenmektedirler (32).

İlk kez 1983 yılında Kary Mullis tarafından düşünülen, örnekteki tek bir nükleik asidi bile gösterebilecek kadar güçlü olan PCR çoğaltma yönteminin tanımlanması, belirli bir nükleik asit dizisinin, in vitro şartlarda, enzimatik olarak çoğaltılması şeklinde yapılmaktadır(3, 7, 42). Bu işlemler için belirlenen nükleik asit kısmının her bir zincirinin 3' ucuna tutunacak ve 5' istikametinde uzayacak iki kısa nükleotid dizisi (primer), uzamayı sağlayacak olan DNA polimeraz enzimi ile yeni zincirlerin yapısında yer alacak nükleotidler ve reaksiyon için gerekli tuzu içeren tampon solüsyonlardan yararlandığı bildirilmiştir(7, 42). Standart bir PCR uygulamasının sonucunda 100 µl reaksiyon sıvısında 10^{12} kopya nükleik asit bulunduğu ve bu miktarın olimpik ölçülerde bir yüzme havuzuna karıştırılması sonucu havuz suyunun her 100 µl'sinde ortalama 400 adet nükleik asit kopyasının bulunacağı, ayrıca kullanılan bir pipet ucunda kalan 0.1 µl örnekte bile 10^9 adet kopya bulunacağı belirtilerek, PCR'in gücünün, kontaminasyon riskini arttırmasından söz edilmiştir(26).

PCR'in tanı metodu olmayıp sadece bir amplifikasyon yöntemi olması nedeni ile PCR öncesi ve sonrası işlemlerden bahsedilmekte, PCR öncesinde, materyalin protein gibi PCR için inhibitör maddelerden arındırılması ve nükleik asidin saflaştırılması (ekstraksiyon), PCR sonrasında ise amplifiye olmuş nükleik asidin analizinin yapıldığı, bu aşamaların güvenli olarak uygulanabilmesi için en az üç ayrı oda gerektiği, bu odalar arası izolasyonun yeterli kalitede olması, kontaminasyona karşı zorunluluk olarak gösterilmiştir(47).

PCR aşamasında DNA'nın çift sarmal yapısını bozup, tek zincir haline getirmek (denatürasyon) için 92-95°C, primerlerin hedef bölgelere tutunmaları (annealing, priming) için 37-72°C, primerlerin 3' yönüne doğru uzayarak (ekstensiyon) tutundukları tek zincir

DNA'nın karşılığını (komplementer) oluşturmaları için 72°C ısı gerektiği ve bu üç farklı ısının ardarda uygulanmasından oluşan siklusun 25-45 tekrarlanmasının termal blok (thermocycler) adı verilen cihazla sağlanabileceği bildirilmiştir (Şekil 1), (7, 26, 42, 43).



Şekil 1 : PCR'in denaturasyon, annealing ve ekstensiyon aşamalarından oluşan siklusları ile "n" kez tekrarlanan sikluslar sonucu 2^n sayısına ulaşan DNA miktarı.

- Asıl DNA zinciri.
- - - - Üretilen DNA zinciri.
- , ——— Primerler.

Birinci PCR sonrası ürünün ikinci PCR için örnek olarak kullanıldığı Nested PCR yönteminde, son üründe bulunan nükleik asit miktarının direkt boyama ile tespit edilebilecek kadar bol olduğu, tek tüp veya iki tüp kullanılarak uygulanabileceği iki yöntem tanımlanmıştır(15, 32). Kontaminasyon riskinin az olduğu, daha karmaşık olan tek tüp uygulamasının ikinci PCR aşamasında, ilk PCR'a ait primerlerin aktif hale gelmesi ihtimalinin bulunduğu, daha basit olan, inhibitör faktörlerin de dilüe olarak etkisini azaltması avantajını taşıyan iki tüp yönteminde ise kontaminasyon sorunu olduğu gösterilmiştir. Tek tüp yönteminde iki komponent arasında mineral oil ile fiziksel bir ayırım sağlanmakta ve birinci aşamadan sonra santrifüj ile iki komponent birleştirilmekte, veya yapışma ısıları farklı primer grupları kullanılarak önce birinci gruba ait ısı, sonra ikinci gruba ait ısı uygulanarak çalışıldığı belirtilmiştir(15, 32).

Aynı anda yapışma ısıları birbirine yakın, hedefleri farklı, birden fazla primer grubu ile aynı nükleik asidin farklı bölgelerinin veya farklı patojen organizmaların nükleik asitlerinin amplifikasyonuna gidildiği Multiplex PCR yönteminin karşılaştırmalı PCR olarak tanımlanan modifikasyonunda, bilinen konsantrasyonda DNA'nın referans kabul edilmesi ile diğer DNA'nın miktarı saptanmaya çalışılmış ve amplifikasyon ürünleri arasında saptanabilir bir uzunluk farkının olması gerektiği vurgulanmıştır(32, 38).

Transkripsiyona dayalı amplifikasyon sisteminden yola çıkılarak geliştirilen 3SR yönteminde kuşlara ait, myeloblastosis virüs reverse transkriptaz, Rnase H ve bakteriofaj T7 DNA'ya bağlı RNA polimeraz enzimleri ve bir primer çifti kullanılarak, bir nükleik asidin ilk on dakika boyunca her 2,5 dakikada on kat, 1-2 saat sonunda ise 10 milyon kat çoğalabileceği bildirilmiştir(41, 32).

RNA için daha uygun olduğu belirtilen bu yöntemde, DNA'ya uygulanması halinde saflaştırma işlemi gerekmemesi, 37-42°C arasında ısıyı kontrol edecek bir sistemden başka donanım gerektirmemesi, çok hızlı olması gibi avantajların yanında birden fazla enzim içermesi ve tek aşamalı olması dezavantaj olarak gösterilmiştir(32).

Yine izotermal şartlarda yürütülen SDA yöntemi ile, spesifik primerler, DNA polimeraz ve kesici endonükleaz kullanarak, bir nükleik asidin, iki saatte, yaklaşık 10^7 katına kadar çoğaltılabileceği belirtilmiştir(31, 32).

1.2.3.3 PROBE AMPLİFİKASYON YÖNTEMLERİ

Probe amplifikasyon teknikleri ise

- a) QB Replicase Yöntemi,
- b) Ligaz Chain Reaction (LCR) olmak üzere iki grupta incelenmektedir(32).

QB replicase enziminin, 200 nükleotidlik bir zinciri, 10^{12} katına sadece 13 dakikada ulaştırabilme hızından yararlanarak, probe amplifikasyonu yapılan bu sistemde serbest ve nonspesifik bağlanan problemlerin uzaklaştırılmamasından kaynaklanan sorunlarla karşılaşıldığı vurgulanmıştır(32).

Tek zincir DNA üzerine yanyana hibridize olan iki probun, DNA ligaz enzimi ile birbirine bağlanması ve bu problemlerin primerlerle çoğaltılması sonucu lineer, DNA'nın her iki zinciri için ayrı problemler ve bu problemlere göre primerler kullanılması ile logaritmik amplifikasyon sağlayabilen LCR yönteminin, problemlerin birleşme yerinde tek nükleotidlik uyumsuzluğu tespit edebilme yeteneğinde olduğu bildirilmiştir(8, 32).

1.2.3.4 SİNYAL AMPLİFİKASYON TEKNİKLERİ

Klasik amplifikasyonsuz yöntemlerin duyarlılığını arttırmak amacı ile prob ve nükleik asit dışında, işaretli probdan elde edilen sinyalin çoğaltılması yoluna gidilerek geliştirilen çeşitli metodlarda kontaminasyon riskinin artmadığı ve duyarlılığın 10^3 - 10^5 nükleik asidi saptayabilecek düzeye ulaştığı bildirilmiştir(16, 32).

Sinyal amplifikasyon tekniklerinin, nükleik asidin farklı bölgelerine bağlanan çok sayıda problemlerle işaretlerin sayısının artırılması şeklinde basit olabileceği gibi, çeşitli enzimlere bağlanmış, kombine problemlerin kullanıldığı metodlardaki gibi karmaşık da olabileceği,

nonspesifik hibridizasyondan kaynaklanan yaygın sinyal yoğunluğunun azaltılması için de çeşitli uygulamalar içerdiği açıklanmıştır(16, 23, 32).

Hedef nükleik aside tutunan işaretli probun bir kısmı ile hibridizasyon yaparak ağ şeklinde bir yapı oluşturan, çok sayıda işaretli küçük problemlerin kullanıldığı sistem birleşik probe ağı yöntemi adıyla tanımlanmıştır(32).

Bu yöntemlerin en güçlü modifikasyonu olarak gösterilen dallanmış DNA (Branched DNA), (bDNA) prob sisteminde, işaretli probun bir kısmı hedef nükleik aside bağlanırken diğer kısmına, bDNA (Bir oligonükleotid omurga boyunca düzenli aralıklarla birleştirilmiş işaretli problemlerin hibridizasyonuna uygun dallar içeren yapı) tutunarak bir işaretli proba üçyüze yakın işaretli probun bağlanmasının sağlandığı, özgül olmayan hibridizasyonların çok nadir olduğu, hedef nükleik asidin değişik bölgelerine duyarlı çeşitli yakalayıcı problemlerle mutasyonların sonuca etkisinin azaltıldığı ancak, sinyal amplifikasyonu başlamadan önce yakalayıcı ve işaretli problemlerin hibridizasyonunun gerçekleşmiş olması gerektiği de belirtilmiştir(32).

1.2.4 İŞARET MOLEKÜLLERİ

Hedef nükleik aside tutunmuş problemlerin varlığının tespiti için, gözle veya cihazlarla tespit edilebilir sinyaller yayan çeşitli moleküllere bağlı problemler kullanıldığı belirtilerek, en duyarlı sonuçların ise radyoaktif izotop moleküllerle (^{32}P , ^{35}S , ^{125}I) elde edildiği gösterilmiştir(32, 54). Radyoaktivitenin sakıncaları nedeni ile, biotin, digoksinin, horseradish peroksidase (HRP) molekülleri geliştirilmiş, bu moleküllerin, konjuge yardımıyla renk değiştirdiği veya HRP'ın katalizasyonu sonucu ışık salınımına neden olduğu bildirilmiştir(32, 54)

2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

2.1 PCR ÖNCESİ YAPILAN İŞLEMLER

PCR için kullanılacak her türlü materyalin içerebileceği çeşitli maddeler amplifikasyon aşamasında inhibisyona neden olacağından DNA'nın saflaştırılması için çeşitli yöntemler yayımlanmıştır(7, 40, 42). Bu yöntemlerin örnek materyale, aranan nükleik asidin büyüklüğüne ve yapısına göre farklı uygulamalarından bahsedilirken, Gross-Bellard ve arkadaşlarının 1973'de buldukları yöntemin 1976'da Blin ve Stafford tarafından proteinaz K, sodyum dodecilsulfat (SDS), fenol kullanılarak geliştirilen modifikasyonu, Kupiec ve arkadaşlarının 1987'deki proteinaz K, formamid ve dializ işlemi içeren yöntemi, Bowtell'in 1987'de bildirdiği guanidin HCL kullanılan metodu örnek gösterilmiştir(42).

Saflaştırma işleminin, bu iş için ayrılmış bir laboratuvarında, kontaminasyona karşı alınmış önlemler altında, eppendorf tüpler kullanılarak, solüsyonların küçük miktarlarda bölünüp, tüpler, eldivenler ve pipet uçları gibi steril edilerek yapılması, bazı maddelerin mutlaka maske takılarak çeker ocak içinde kullanılması önemli noktalar olarak vurgulanmıştır(7, 26, 42, 47).

Fenol ekstraksiyon etanol presipitasyon metodu Blin ve Stafford yönteminin çeşitli modifikasyonları şeklinde yaygın olarak uygulanmakta ve klasik yöntem olarak tanımlanmakta, örnek, deterjan ve proteinaz enzim ile muamele edildikten sonra, fenol, kloroform, izoamil alkol yardımı ile ayrıştırılıp, etanol ile presipite edilmektedir. 260 nm'de absorbans değeri 1 olan solüsyonun her mililitresinde yaklaşık 50 µg DNA olduğu belirtilmiştir(42).

Snounou ve arkadaşları tarafından Plasmodium türlerinin tanısı amacı ile geliştirilen yöntem de klasik yöntemin modifikasyonu olup, çeşitli araştırmalarda başarıyla uygulandığı görülmüştür(36, 44).

Wataya tarafından *Pl. falciparum* tanısı için double PCR tekniğinde kullanılmak üzere uygulanan saflaştırma yönteminde deterjan ile yıkama aşamalarından sonra proteinaz enzim

kullanılmamıştır(51). Wataya metodunun referans olarak gösterildiği diğer bir çalışmada proteinaz enzimin kullanıldığı bildirilmiştir(29).

Geniş saha çalışmalarında kolaylık sağladığı bildirilen Chelex metodunun filtre kağıtlarına emdirilmiş kan örneklerinde de uygulanabileceği, muayene materyalinde bulunan ve PCR'ı inhibe eden demir gibi metalleri bağlayabilen Chelex 100 kullanıldığı görülmektedir(4, 24, 25, 34).

Heparinli kemik iliği aspirasyon materyalinde leishmaniasis tanısı için yapılan bir çalışmada da Chelex 100 kullanılmıştır(37).

Yine *Pl. falciparum* tanısı için yapılan bir çalışmada, sodyum fosfat ve kaynatma işlemi ile saflaştırma yapıldığı görülmüştür(34).

Örneğin -20°C'de bekletilip, dondurulularak, oda ısısında çözülmesi ve bu işlemin üç kez tekrar edilmesine dayalı yöntem ise, dondurma çözme metodu olarak tanımlanmıştır(9).

Saflaştırma işlemi için, kullanılacak örneğin, türü, muhafaza edilme şekli, aranılan parazitin türü, uygulanacak PCR modeline göre yukarıdaki metodların bazı aşamalarının birlikte kullanıldığı yöntemlerden ve çeşitli firmalara ait kitlerden de bahsedilmiştir(3, 34, 53).

2.2 PCR'DA KULLANILAN MADDELER

Primerlerin tekrarlanan dizilerden oluşmayan, uzunluğu bilinen spesifik bir DNA kesitini amplifiye edecek şekilde seçilmesi gerektiği, birbirlerinin 3' uçlarına tutunamayacak şekilde dizayn edilerek istenilmeyen reaksiyonların (primer-dimer, self-priming) önlenilebileceği, en az 16, tercihan 20-24 nükleotid uzunluğunda olmasının uygun olacağı belirtilirken, arzu edilen sıraya göre nükleotidleri birleştirerek primer sentezleyen cihazlardan da söz edilmektedir(32, 41, 42, 47).

Her primer steril distile su ile 50pmol/μl konsantrasyonda hazırlanıp -20°C'de muhafaza edilerek, amplifikasyonda 1'er μM konsantrasyonun en az 30 siklus için yeterli olacağı,

yüksek konsantrasyonların primerlerin spesifik olmayan bölgelere yapışmasına yol açacağı, amplifikasyon ürünüde spesifik olmayan sekansların fazlalığı veya istenilen sekansın azlığı halinde bir dizi test yapılarak minimum primer konsantrasyonunun saptanması gerektiği bildirilmiştir(7, 42).

Plasmodium'ların tanısında 21-bp (base pair) tekrar kısmı, circumsporozoite (CS) proteini kodlayan kısımları (CS ve SSP2DNA), 18S ribozomal ribonükleik asiti (rRNA) kodlayan DNA segmenti, small subunit ribozomal RNA'yı (ssrRNA) kodlayan gen, dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) sentezleyen gen gibi çeşitli spesifik sekanslar kullanılmıştır(24, 34, 39, 44, 51, 53).

Leishmania'ların tanısında her ne kadar rDNA gibi hedefler amplifiye edilmiş ise de kinetoplast DNA'sının (kDNA) bir hücrede birçok kopyası olması nedeni ile tercih edilen sekans olduğu bildirilmiştir(28, 53).

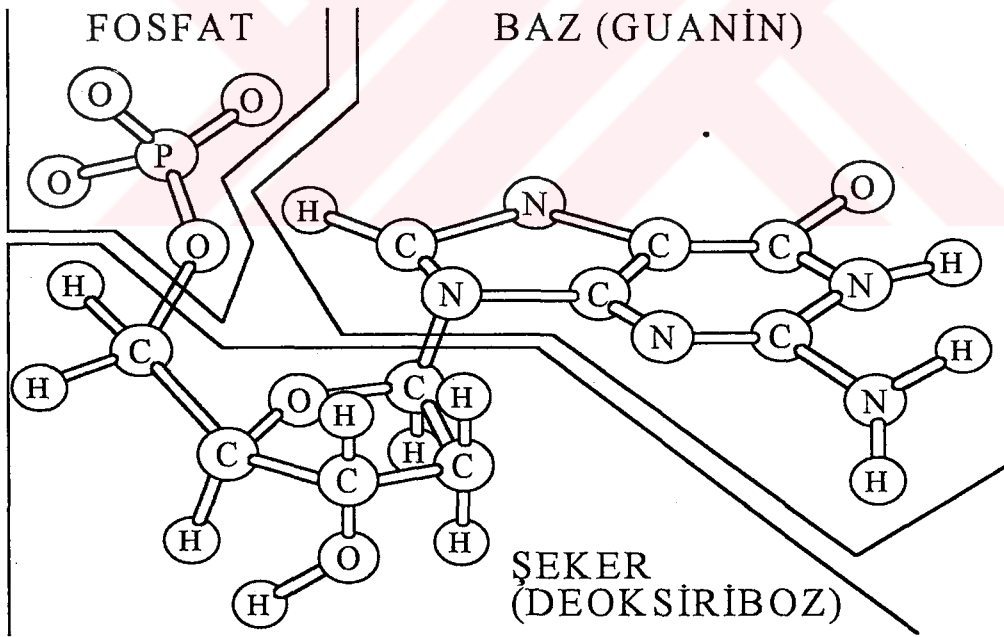
Mullis ve Saiki tarafından yapılan ilk PCR uygulamalarında *Escherichia coli* DNA polimeraz I enziminin Klenow fragmanının kullanıldığı, denaturasyon ısısının enzimi etkilediği ve her siklusda tekrar enzim ilavesi gerektiği, 200 bp'den kısa sekanslarda daha iyi sonuçlar alındığı belirtilmiştir(42).

Thermus aquaticus adlı termofilik bir bakteriden saflaştırılan veya *Escherichia coli*'ye sentezletilen DNA polimeraz enzimi (*Taq* DNA polimeraz) kullanılması ile hem her siklusda enzim ekleme sorununun çözülmüş, hem de spesifik olmayan ürünlerin azaldığı gösterilmiştir(42).

Sadece 5' ucundan 3' istikametine doğru polimerizasyon yeteneği olan *Taq* DNA polimeraz enziminin 72°C'de maksimum aktivasyon gösterdiği, ancak annealing ısısında da zayıf bir etkinliği olduğu, 70-80°C'de 30-60 baz/saniye olan ekstensiyon hızının 55°C'nin altında ve 85°C'nin üstünde önemli oranda düştüğü, aktivitesinin yarılanma ömrünün 100°C'de 5 dakikanın altında iken 95°C'de 40 dakikaya çıktığı, çalışması için ortama MgCl₂ eklenmesi gerektiği bildirilmiştir(3, 42).

Piyasada mevcut olan *Taq* DNA polimerazların %50 gliserol içinde genellikle 5 U/ μ l konsantrasyonunda, dilüsyon tamponu ile birlikte satıldığı ve -20°C 'de muhafaza edilmesinin önemli olduğu vurgulanmaktadır(42).

1 ünite *Taq* DNA polimerazın 74°C 'de 30 dakikada 10 nmol dezoksinükleotidtrifosfat (dNTP) bağlayarak ekstensiyon yapabildiği, 100 μ l PCR hacminde 2,5 ünite enzimin 25-30 siklus için yeterli olacağı, belli bir konsantrasyonun üstünde ise istenilmeyen ürünlerin ortaya çıkmasına yol açtığı saptanmıştır(2, 3, 42). Diğer bir termofilik bakteri olan *Thermus thermophilus*'dan elde edilen *Tth* DNA polimerazın yarılanma ömrünün kısa olduğu ve MnCl_2 varlığında 3' den 5' yönüne ekstensiyon yapabildiği, *Pyrococcus woesei*'den elde edilen *Pwo* DNA polimerazın MgSO_4 varlığında daha etkili olduğu ve 95°C 'de aktivitesinin %95'ini bir saatten fazla koruyabildiği, bu enzimlerin çeşitli PCR modifikasyonlarında kullanıldığı belirtilmiştir(3, 32).

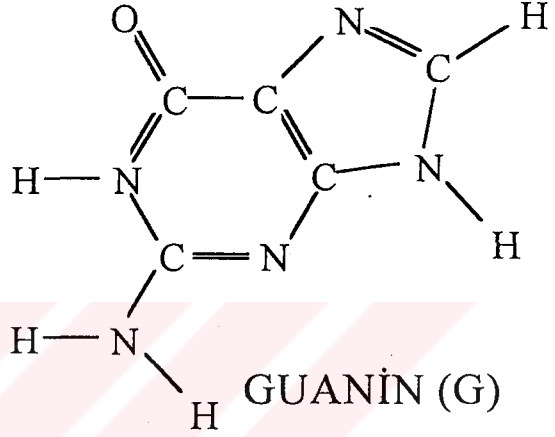
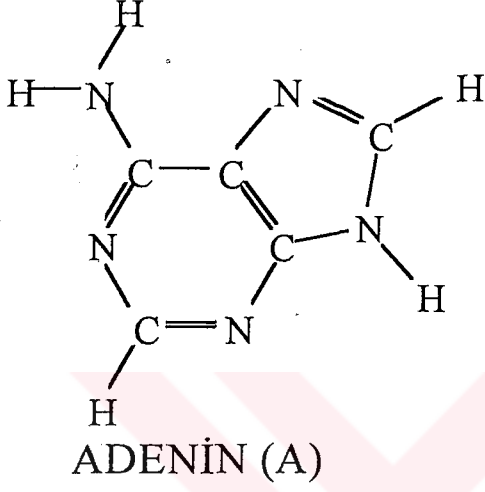


Şekil 2 : Baz grubu guanin olan bir nükleotid.

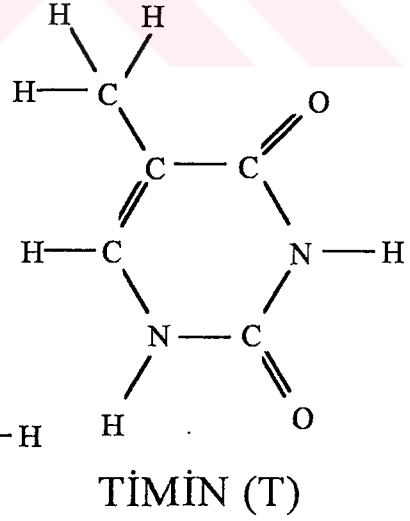
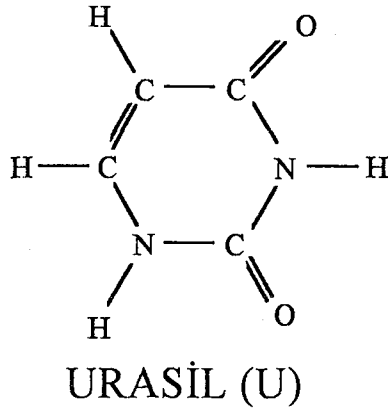
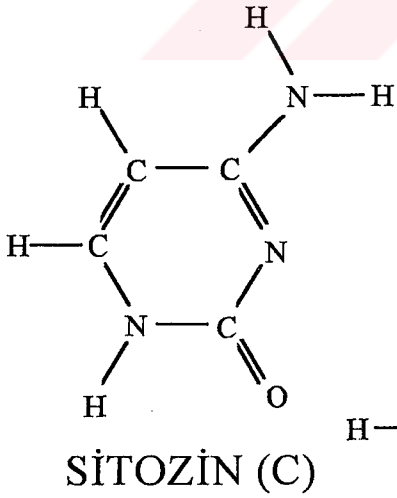
Bir nükleotidin, bir baz, bir şeker, bir de fostatdan oluştuğu (Şekil 2), baz grubunun pürin veya pirimidin yapısında olduğu, pürinlerin, Adenin (A) ve Guanin (G) olarak adlandırılmış iki farklı şekli, pirimidinlerin ise, Sitozin (C), Timin (T), Urasil (U) adları ile tanınan üç farklı

molekülü tanımladığı bildirilmiştir (Şekil 3). Şeker grubunun da riboz ve deoksiriboz adıyla iki şekli tanımlanmıştır(52).

PÜRİNLER



PİRİMİDİNLER



Şekil 3 : Bazlar.

Fosfat grubu olarak trifosfat ve şeker olarak deoksiriboz içeren her türlü baz için, deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) adı kullanılmaktadır(7, 42). Baz grubunun yapısına göre her bir dNTP için ayrı isimler kullanılmaktadır (Tablo 4), (42).

FOSFAT	ŞEKER	BAZ	ADI	KISALTMASI
Trifosfat	2'-Deoksiriboz	Adenin	2'-Deoksiadenozin 5'-trifosfat	dATP
		Guanin	2'-Deoksiguanozin 5'-trifosfat	dGTP
		Sitozin	2'-Deoksisitidin 5'-trifosfat	dCTP
		Timin	2'-Deoksitimidin 5'-trifosfat	dTTP
		Urasil	2'-Deoksiuridin 5'-trifosfat	dUTP

Tablo 4 : Nükleotidlerin yapılarına göre adlandırılışları.

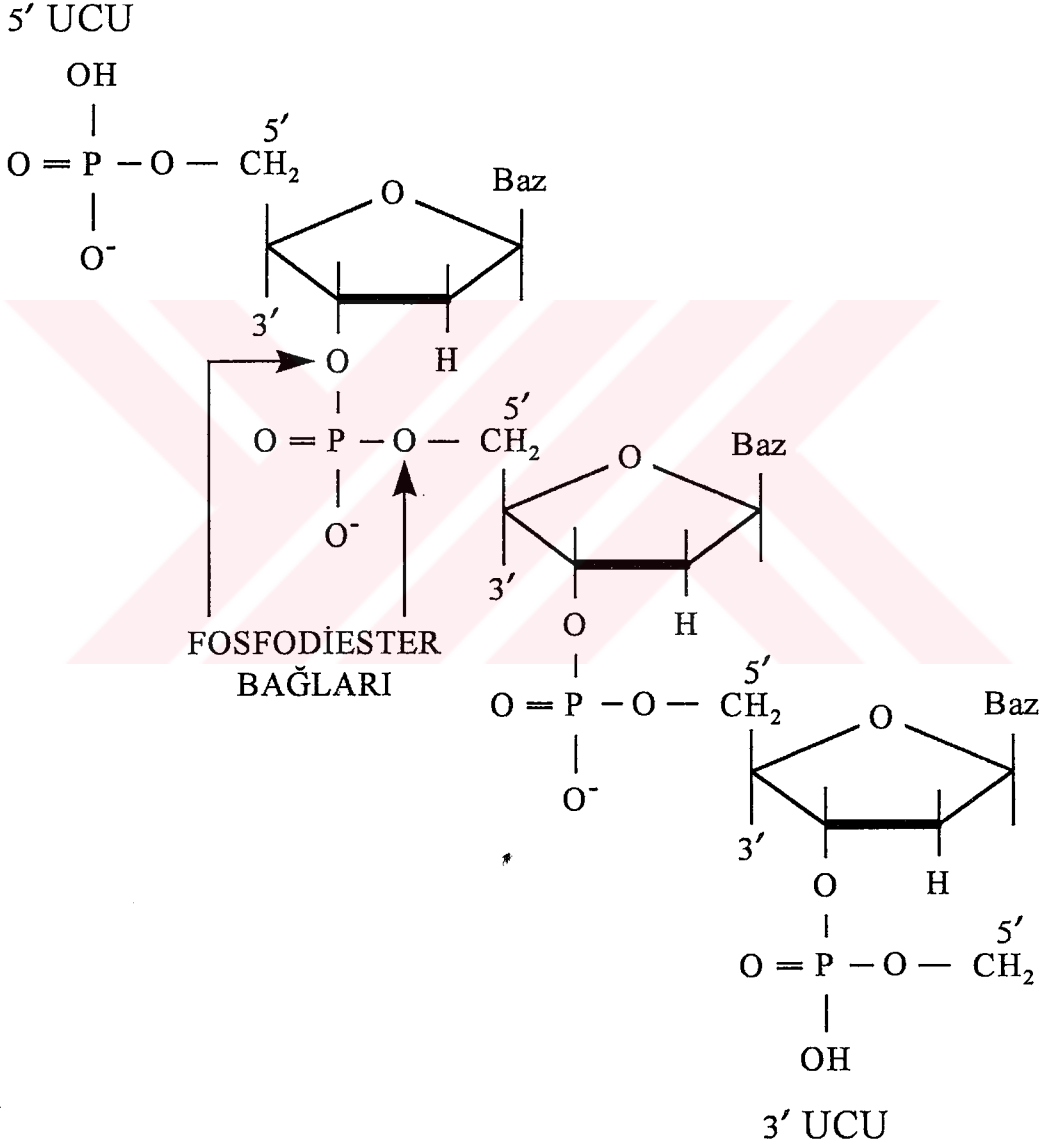
PCR'da her bir dNTP'nin son konsantrasyonunun 200 μ M olması gerektiği, dUTP'nin kullanıldığı modifikasyonlarda ise farklı olarak bu nükleotidin 600 μ M konsantrasyonunda olacak şekilde kullanılmasının gerektiği belirtilmiştir(1, 7, 42). Kullanılacak dört dNTP'nin karışımından oluşan stok solüsyonların genellikle asiditesinin ayarlanmadan piyasaya sürüldüğü ve 1N NaOH ile pH'ın 7.0'a ayarlanması gerektiği belirtilmiştir(42).

Standart tampon çözelti olarak 50mM KCl, 10mM Tris Cl (pH 8,3), %0,001 (w/v) jelatin, 1,5mM MgCl₂, kullanılmasına rağmen çeşitli modifikasyonlara rastlanmakta, özellikle farklı primerlerin veya dNTP'lerin kullanılması durumunda Mg⁺⁺ iyon konsantrasyonunun 0,05-5mM arasında 0,5mM hassasiyette bir seri test yapılarak tekrar optimize edilmesi gerektiği üzerinde önemle durulmaktadır(42).

Ek olarak C ve G'den zengin zincirlerin amplifikasyonunda %3-5 konsantrasyonda dimetilsülfoksid (DMSO) ile daha iyi sonuçlar alındığını, ancak %10 oranında DMSO'in *Taq* DNA polimeraz enzimini yarıyarıya inhibe ettiğini bildiren, tetrametilamonyum klorid (TMAC) varlığında ise istenmeyen amplifikasyonların önlendiğini ve inhibisyon olmadığını gösteren çalışmalar yayımlanmıştır(22, 40).

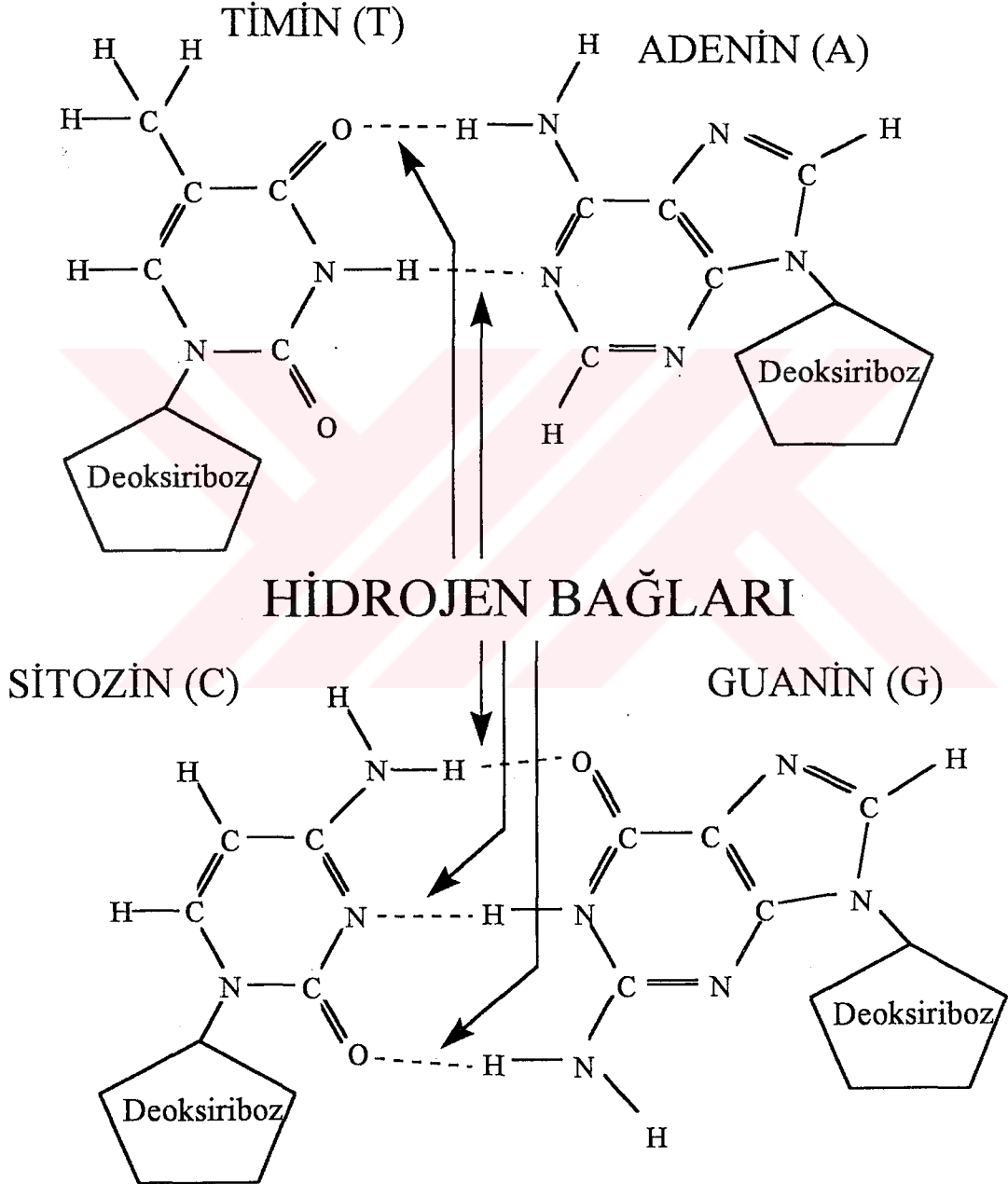
Tampon solüsyonun on kat konsantre olarak hazırlanıp, steril olarak -20°C'de muhafaza edilmesi gerektiği, hazır olarak satılan kitlerde bulunan solüsyonların da bu konsantrasyonda hazırlandığı belirtilmektedir(1, 2, 3, 7, 42).

DNA'nın yapısında bulunan nükleotidlerde, bazlardan U bulunmazken, RNA'da T bulunmadığı, Gerek DNA, gerekse RNA'nın yalnızca dört farklı baz kullanan nükleotidlerden oluşacağı, şeker olarak DNA'da deoksiriboz, RNA'da riboz bulunduğu, fosfat grubunun fosfodiester bağlarıyla iki nükleotidi birleştirdiği (Şekil 4), şeker grupları arasındaki farkın nükleik asitlerin isimlendirilmesinde kullanıldığı bildirilmiştir(52).



Şekil 4 : Bir DNA zincirinde fosfat ve şeker grupları arasında fosfodiester bağları.

DNA'nın iki zincirden oluştuğu, iki zincirin birbirine bir pürin ve bir pirimidin arasında oluşan hidrojen bağlarıyla tutunduğu, A ve T arasında iki, C ve G arasında üç hidrojen bağı bulunması nedeni ile C/G baz çiftlerinin daha dayanıklı olduğu saptanmıştır (Şekil 5), (52).



Şekil 5 : Adenin ve timin arasındaki iki, guanin ve sitozin arasındaki üç hidrojen bağının yerleri.

Örnek DNA'nın çok uzun olması halinde bazı enzimlerle belirli yerlerden kesilerek kullanılmasının daha uygun olacağı, çeşitli testlerle PCR'in tanıyabileceği minimum DNA miktarının saptanabileceği bildirilmiştir(42).

Tanı amacı ile aranılacak DNA segmentini içeren materyalin saflaştırılma metodlarında belirtilen yöntemlerin uygulanması ile bir çok inhibitör faktörden arınarak PCR'da kullanılabilir hale getirilebileceği ve 50µl PCR hacmi için 5µl örneğin kullanıldığı görülmektedir(7, 40, 42, 47).

Denaturasyon, annealing ve ekstensiyon için kullanılacak ısılar PCR sıvısında bulunan maddelerin cinslerine ve konsantrasyonlarına göre değişmekle birlikte *Taq* DNA polimeraz enziminin optimal aktivasyon ısı 72°C olarak belirlendiğinden ekstensiyon aşaması için *Taq* DNA polimeraz kullanıldığında 72°C'nin tercih edildiği görülmektedir(24, 25, 33, 34, 36, 44, 51).

Annealing ısısının düşük olması istenilmeyen kısımların amplifikasyonuna, yüksek olması ise yetersiz amplifikasyona neden olduğundan en uygun annealing ısısının (t_a) kullanılmasının önem taşıdığı, t_a değerinin, erime (melting) ısı olarak tanımlanan, komplementer nükleotidlerin % 50'sinin birbirinden ayrıldığı t_m değerine bağımlı olduğu bildirilmiştir(41, 54).

Termodinamik yasalara ait formüller ile hesaplanabilen t_a ve t_m değerleri için geliştirilmiş çeşitli bilgisayar programlarından da bahsedilmekle birlikte t_a 'nın hesaplanması için primer ve ürüne ait iki t_m değerinin kullanıldığı bir formül deneysel olarak geliştirilmiştir(41). Buna göre,

$$t_a = 0,3t_m(\text{primer}) + 0,7t_m(\text{ürün}) - 14,9$$

olarak hesaplanabilmekte, $t_m(\text{primer})$ ve $t_m(\text{ürün})$ değişkenleri için aşağıdaki formüller kullanılmaktadır(41).

$$t_m(\text{primer}) = \Delta H / [\Delta S + R \times \ln(c/4)] - 273,15 + 16,6 \log [K^+]$$

[(ΔH =entalpi değeri, ΔS =entropi değeri, R =molar gaz sabiti (1,987 cal / °C X mol),
c=primer konsantrasyonu (genellikle c=250 pM olarak kullanılmaktadır)]

$$t_m(\text{ürün}) = 0,41 (\%G + \%C) + 16,6 \log [K^+] - 675 / l$$

(l = ürünün nükleotid cinsinden uzunluğu)

Bu formüllerde annealing ısısının K iyon konsantrasyonuna, C ve G yoğunluğuna, primer konsantrasyonuna bağlı olduğu gösterilmekle birlikte, primer-dimer oluşturmayacak primerlerin seçilmesi üzerinde önemle durulmuştur(41).

Her siklusda primer konsantrasyonunun azalması dikkate alınarak yapılan hesaplamada farklı annealing ısıları ortaya çıkacağı, 1 kb'den kısa ürünlerin amplifikasyonunda değişken annealing ısıları kullanılmasıyla % 33 oranında daha iyi sonuç alındığı da belirtilmiştir(41).

Nükleotid çiftlerinin % 50'sinin birbirlerinden ayrıldığı t_m ısısında reversibl denaturasyon sağlanabildiği t_m değerinin üzerindeki ıslarda denatürasyonun sabit olduğu belirtilmekle birlikte farklı değerler yerine 94°C'nin denaturasyon ısısı için yaygın olarak kullanıldığı görülmüştür(4, 7, 25, 33, 36, 42, 44, 54).

Denaturasyon, annealing ve ekstensiyon aşamalarından oluşan siklulara uzun süreli bir denaturasyon ısısı uygulanarak öncelikle tam bir denaturasyon oluşmasının hedeflendiği, sonuncu siklusun son aşaması olan ekstensiyonun süresinin de uzatılarak polimerizasyonun ve hibridizasyonun sağlanmasının amaçlandığı belirtilmiştir(42).

Siklusların 25-45 kez tekrarlanabileceği bildirilmekle birlikte, çeşitli çalışmalarda, genellikle 30 siklusun tekrarlandığı, 120-800 bp arasında ürün amplifikasyonu için uygulanan siklusların her üç aşamasında kullanılan ısılar için farklı sürelerin tercih edildiği görülmüştür, (Tablo 5), (4, 24, 36, 51).

SİKLUSLAR	DENATURASYON(dak.)	ANNEALİNG(dak.)	EKSTENSİYON(dak.)
İlk Siklus	1-5,5	0,5-3	2-5
Ara Sikluslar	0,5-1	0,5-3	2-5
Son Siklus	0,5-1	0,5-3	2-10

Tablo 5 : PCR'da 120-800 bp arasında ürün amplifikasyonu için uygulanan siklusların çeşitli aşamaları için tercih edilen sürelerin en kısa ve en uzunları.

2.3 AMPLİFİKASYONUN UYGULANMASI

Amplifikasyon için 0,5 ml hacminde düz ve ince cidarlı özel PCR tüpleri kullanılması gerektiği belirtilmiştir(3). DNA'dan arındırılmış bir odada, laminer akımlı kabin içinde PCR tüpü içine, steril şartlar altında, toplam hacmin 50 veya 100 μ l olmasını sağlayacak miktarda, deiyonize ve steril, bidistile su, 10X stok solüsyondan 1X konsantrasyonda olacak miktarda tampon solüsyon, tampon solüsyonda yoksa gerekli konsantrasyonu (genellikle 1,5mM) sağlayacak kadar MgCl₂, 1 μ M son konsantrasyonda olacak şekilde 1 veya 2 μ l primer 1, eşit konsantrasyonda primer 2, 100 μ l toplam hacim için 2,5 ünite (0,5 μ l) *Taq* DNA Polimeraz, sikluslar sırasında buharlaşmayı önlemek amacı ile 50 μ l mineral oil eklenerek, tüplerin kapaklarının kapatılmasından sonra saflaştırılmış muayene materyalinin ilavesi için saflaştırmanın yapıldığı odaya alınması gerektiği bildirilmiştir(3, 7, 42, 47).

Bu aşamaya kadar, bidistile su ve mineral oil dışında kullanılan her maddenin bir buz kabı içinde muhafaza edilerek, işleri biter bitmez derhal -20°C'lik derin dondurucuya aktarılmasının özellikle *Taq* DNA polimeraz için son derece önemli bir zorunluluk olduğu, amplifikasyon öncesi ve sonrası çalışmaların yapıldığı odalardan hiç bir malzemenin temiz odaya taşınmaması üzerinde durulmuştur(47).

Saflaştırılmış örnek, saflaştırmanın yapıldığı laboratuvarında, bazı çalışmacılar tarafından 100°C'de 5 dakika süre ile denatüre edilerek, bazılarınca da doğrudan mineral oil tabakasının altına pipet yardımı ile eklenmekte, tanı amaçlı çalışmalarda 50 μ l toplam hacimde 5 μ l'lik miktarın tercih edildiği görülmektedir(4, 24, 47).

Birden fazla örnekle çalışılan testlerde PCR tüplerinin öncelikle numaralanması, saflaştırılacak örneklere pozitif kontrol ve belirli aralıklarla negatif kontroller eklenmesi, örneklerin bulunduğu tüplerin kısa bir santrifüje tabi tutulması, tüplerin kapaklarının açık bırakılmaması, kapakların açılması sırasında sıçrama olmamasına dikkat edilmesi, örneklerin eklenmesi aşamasında her örnek için ayrı eldiven kullanılması, saflaştırma işlemine eklenen pozitif kontrol dışında amplifikasyonun çalışmasını denetlemek için ayrı bir pozitif kontrol (genellikle amplifikasyon sonrası ürün kullanılmaktadır) eklenmesi gibi önlemlerle kontaminasyonlara engel olunması gerektiği bildirilmiştir (26, 47).

PCR tüplerindeki karışımın sağlanması için termal bloğa konmadan önce tüplerin kısa bir santrifüj edilmesi önerilmektedir(47). Termal bloğun, arzu edilen ısılarda ve sürelerde programlanarak sağlıklı ve pratik bir amplifikasyonu gerçekleştirecek şekilde düzenlendiği belirtilmiştir(3, 42).

PCR'ın özgünlüğünü ve duyarlılığını arttırmak amacı ile geliştirilen yöntemlerden sıcak başlama yöntemi ve urasil N-glikosilaz (UNG) ile dekontaminasyon metodunun en sık kullanılan modifikasyonlar olduğu görülmektedir(33, 51).

PCR sıvısı içeren tüplerin 70°C'ye kadar ısıtılıp, denatüre edilmiş örneğin tüpe eklenmesiyle yürütülen sıcak başlama yöntemi, amplifikasyon öncesi ısıtma tanımı ile yayımlanmış olup, düşük miktarda amplifikasyon ürünlerinde % 400 artış sağladığı gösterilmiştir(13).

Sıcak başlama yönteminin geliştirilmiş bir şekilde, primerlerin üzeri parafin ile örtülerek enzim ve nükleotidlerden fiziksel olarak ayrılmakta, ısının 95°C'ye çıkarılmasından sonra örnek DNA eklenmesi sırasında parafinin de erimesi sonucu tüm komponentlerin denaturasyon ısısında karışmasının sağlandığı bildirilmektedir(3).

UNG'nin urasil ve şeker arasındaki bağı hidrolize ederek bazik ortamda ısı etkisiyle kolayca kopabilecek hale getirdiği, 20°C'de maksimum aktivite göstererek 2 ünite ile 10 dakikada 10⁶ kopya urasil içeren DNA'yı etkileyebildiği, 55°C'nin üzerinde etki göstermediği, 95°C'de 10 dakikada inaktive edilebileceği belirtilmiştir(3).

dTTP yerine dUTP kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu oluşan ürünlerde, adenin'in karşılığı olarak timin yerine urasil geçmesiyle, örnek DNA ve amplifikasyon ürünü olan DNA arasında fark olduğu belirtilerek, daha önceki amplifikasyon ürünleri ile kontamine olmuş örneğin içerdiği hedef DNA'nın korunarak UNG yardımı ile sadece kontamine eden DNA'nın parçalanmasının mümkün olduğu belirtilmiştir(3).

50µl PCR hacmi için 1 ünite UNG eklenerek 20°C'de 1-10 dakika inkübasyonun yeterli olacağı ancak bu ısının primer-dimer oluşumunu arttıracığı, önlem olarak primerlerin üzerinin parafinle kapatılmasından sonra diğer maddelerin UNG ile inkübasyonu önerilmiştir(3).

UNG'nin 95°C'de 10 dakika sürede tamamen etkisiz hale gelemeyebileceği nedeni ile annealing ısısının 55°C'nin altına düşmemesi ve amplifikasyon sonunda PCR tüplerinin -20°C veya 72°C'de muhafaza edilmesi gerektiği vurgulanmıştır(1, 3).

2.4 AMPLİFİYE ÜRÜNÜN İNCELENMESİ

PCR'ın, örnek DNA'yı, genellikle daha ileri görüntüleme yöntemlerinin uygulanmasına gerek duyulmadan, direkt boyama yöntemi ile görülebilecek miktarda çoğaltabildiği bildirilmiştir (Tablo 3), (7,32, 42).

Primerlerin sınırladığı sekansın uzunluğu bilindiğinden, amplifiye ürünün uzunluklarına göre ayrıştırılması amacı ile uygulanan jel elektroforezinin, agaroz ve poliakrilamid olmak iki farklı şekli tanımlanmıştır(42).

Poliakrilamid jelin genellikle düşük konumda kullanıldığı, hazırlanmasının daha zor ancak, 5-500bp arasında kullanışlı olduğu ve 1bp'i dahi ayırabildiği bildirilirken, agaroz jelin de yatay konumda kullanılması, 200-50000bp arasında uygun olması, 4-30°C gibi geniş bir ısı diliminde uygulanabilmesi gibi özelliklerinden söz edilmiştir(42).

Elektrik akımı uygulandığında negatif yüklü DNA'nın nötral pH'da anoda doğru hareketi esasına dayandığı belirtilen elektroforezde kullanılmak üzere üretilen saf agarın

elektroforez kalitesini önemli ölçüde arttırdığı ve hareket hızının, çeşitli faktörlerin etkisi altında olduğu saptanmıştır(42).

Hareket hızının, uzun zincirlerin jel içinde yol bulabilmesinin zorluğu nedeni ile, DNA'nın büyüklüğüne yoğun ortamda hareketin zorlaşması nedeni ile agaroz konsantrasyonuna, uygulanan voltaja (Düşük voltajda, hareket hızı uygulanan voltajla orantılı olarak, yüksek voltajda ise farklı olarak artmaktadır), tampon solüsyonun konsantrasyonuna (Tamponda iyon yetersizliğinde iletkenlik azalarak hız düşmekte, fazlalığında iletkenlik artarak ısı oluşmaktadır) göre değiştiği belirtilirken, ısının 4-30°C arasında hızı etkilememesi agaroz jel elektroforezi için avantaj olarak gösterilmiştir(42).

Agaroz jel elektroforezinde Tris-asetat (TAE), tris-fosfat (TPE), tris-borat (TBE), ve alkalın gibi EDTA içeren tampon solüsyonlar en sık kullanılanlar olarak tanımlanmıştır (Tablo 6) (42).

SOLÜSYONLAR	ÇALIŞMA KONSANTRASYONU	STOK KONSANTRASYONU VE HAZIRLANIŞI (1 LİTRE)
Tris-asetat (TAE)	1X: 0,04M Tris-asetat 0,001M EDTA	50X: 242g Tris base 57,1m Glacial asetik asit 1 0,5M EDTA(pH 8,0) 10ml
Tris-fosfat (TPE)	1X: 0,09M Tris-fosfat 0,002M EDTA	10X: 108g Tris base 15,5m %85 Fosforik asit (1,679g/ml) 1 0,5M EDTA(pH 8,0) 40ml
Tris-borat (TBE)	0,5X 0,045M Tris-borat : 0,001M EDTA	5X: 54g Tris base 27,5g Borik asit 20ml 0,5M EDTA(pH 8,0)
Alkalın	1X: 50mN NaOH 0,001M EDTA	TAZE OLARAK HAZIRLANIP KULLANILMALIDIR

Tablo 6 : En sık kullanılan tampon solüsyonların çalışma ve stok konsantrasyonları ile hazırlanma şekilleri.

TAE'nin tercih edilen solüsyon olmasına rağmen, uzun süreli elektroforezde tükenerek anodun bazik, katodun ise asidik hale geldiği, TAE'den biraz daha pahalı olan TPE ve TBE'nin uzun süreli elektroforeze dayanıklı olduğu gibi, hızlarının da %10 oranında fazla olduğu belirtilmiştir(42).

Agaroz jel konsantrasyonlarında yapılacak değişikliklerle oldukça farklı uzunluklarda DNA ayrışmasının sağlıklı olarak yapılabileceği bildirilmiştir (Tablo 7) (42).

DNA UZUNLUKLARI (bp)	% (w/v) AGARUZ KONSANTRASYONU
5000-60000	0,3
1000-20000	0,6
800-10000	0,7
500-7000	0,9
400-6000	1,2
200-3000	1,5
100-2000	2,0

Tablo 7 : Ayrıştırılacak DNA uzunluklarına göre tercih edilmesi gereken agaroz konsantrasyonları

Seçilen konsantrasyona göre tartılan elektroforez agarının, elektroforezde hangi tampon solüsyon kullanılacak ise o solüsyondan hazırlanan çalışma konsantrasyonunda eritilmesi gerektiği, çok düşük düzeyde de olsa pH ve iyon konsantrasyonu değişikliklerinin DNA hareketlerini önemli oranda etkileyebileceği üzerinde önemle durulmuştur(42).

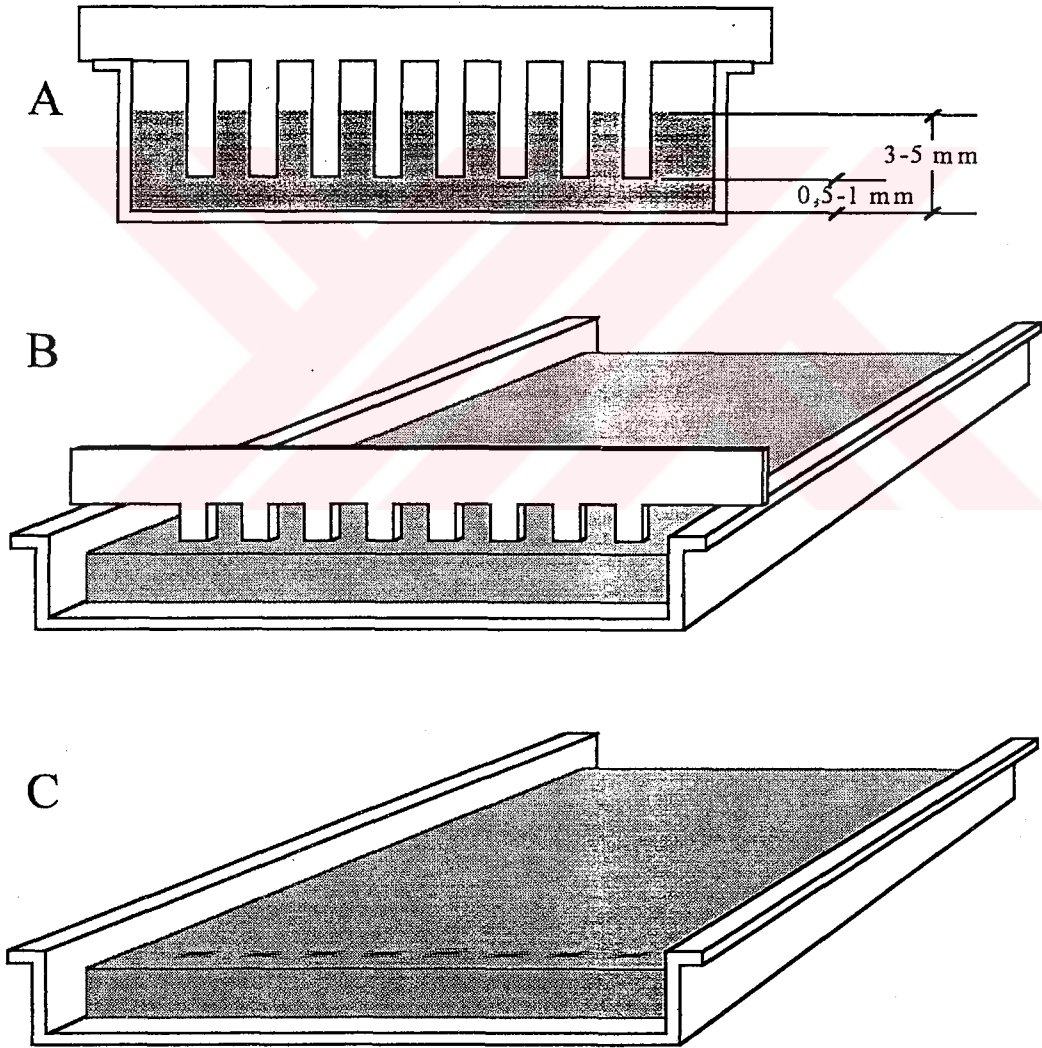
Eritilme işleminin, agaroz hacminin iki katından fazla hacimli, gevşek kapaklı bir cam kap kullanılarak, kaynar su banyosu veya mikrodalga fırında yapılabileceği, arasıra karıştırılarak erimenin kolaylaştırılabileceği, erimemiş agar taneciklerinin kalmaması gerektiği, yüksek ısılarda uzun süre kaynamamasının önemli olduğu vurgulanırken, erimiş agarozun 60°C'ye soğutulularak hazırlanan jel tablasına dökülmesi sırasında oluşabilecek hava kabarcıklarının pastör pipeti yardımı ile alınabileceği belirtilmiştir(42).

Tabla tamamen yere paralel bir konumda iken dişleri ile jelde belirli hacimde delikler oluşturacak biçimde imal edilen tarak, tabla ile arasında 0,5-1 mm boşluk kalacak şekilde tablanın üzerine bırakıldıktan sonra 3-5mm kalınlığında bir tabaka oluşturacak şekilde agarozun dökülmesi gerektiği bildirilmiştir(42).

Agar konsantrasyonunun %2 olduğu durumda jel içinde erken katılaşan bölümlerin oluşmaması için eriyen agarın hızla 70°C'ye soğutulularak bekletilmeden tablaya dökülmesi şeklinde bir değişiklik önerilmiştir(42).

Jelin tamamen kuruması için 30-45 dakika geçmesi gerektiği, bu süre sonunda jeli destekleyen kısımların ve tarağın jele zarar vermeden çıkartılmasının önemli olduğu belirtilmiştir(42).

Agaroz jel elektroforezinin daha hızlı yürütülmesi için dizayn edilen ve minijel adı ile tanınan çeşitli minyatür jel düzeneklerinin varlığından bahsedilmiştir(42). Bu minijellerin jel dökmek üzere tablasının ve jelde istenilen hacimde delikler oluşturmak amacı ile tablaya uygun taraklarının kullanılabileceği bildirilmiştir(Şekil 6) (42).



Şekil 6: Bir minijel aparatının tabla, tarak kısımları ve agaroz jelin uygulanışı. A: Tarak hizasından kesit görünümü, tarak yüksekliği ve jel kalınlığı. B: Jel donduktan sonraki görünüm. C: Tarak çıkarıldıktan sonra kullanılmaya hazır agaroz jel.

Jelin, elektroforez tankına, delikli kısmı katoda gelecek biçimde yerleştirilmesinden sonra, seviyesi, jelin, yaklaşık 1mm üstünde olacak miktarda tampon solüsyonun tankın içine eklenmesi gerektiği belirtilmiştir(42).

Amplifikasyon ürünlerinin jeldeki çukurlara yerleştirilmesinden önce yoğunluklarının artırılması, boyanması ve jelde ilerleme hızının görülmesi amacı ile karıştırıldıkları solüsyon, yükleme tamponu adıyla tanımlanmıştır(42).

5 farklı tip yükleme tamponu tanımlanmış olup, beşinci tip tamponun alkalın solüsyonda kullanılmak üzere geliştirildiği belirtilerek stoklarının hazırlanma şekilleri ve muhafaza edilme ısıları tablo 8’de gösterilmiştir(42).

TİP NO	6 X STOK SOLÜSYON	KORUNMA ISILARI
1	%0,25 bromofenol blue %0,25 ksilen siyanol FF %40 (w/v) sükröz (suda)	4°C
2	%0,25 bromofenol blue %0,25 ksilen siyanol FF %15 fikol (suda)	
3	%0,25 bromofenol blue %0,25 ksilen siyanol FF %30 gliserol (suda)	4°C
4	%0,25 bromofenol blue %40 (w/v) sükröz (suda)	4°C
5	300mN NaOH 6mM EDTA %18 fikol (suda) %0,15 bromocresol green %0,25 ksilen siyanol FF	4°C

Tablo 8 : Yükleme tamponlarının 6 X stok konsantrasyonda içerikleri ve saklama koşulları.

Bromofenol blue’nun, ksilen siyanole oranla 2,2 kat hızlı olduğu (0,5 X TBE tampon solüsyonda, bromofenol blue 300bp, ksilen siyanol 2kb uzunluğunda DNA hızı ile ilerlemektedir), yükleme tamponlarının %0,5-1,4 arasında değişen agar konsantrasyonundan etkilenmediği bildirilmiştir(42).

Amplifiye örneklerin içinden alınacak 10µl ürün ile 2µl yükleme tamponu (6 X) bir tüp içinde veya parafin tabakası üzerinde karıştırılarak, bu karışımdan alınacak 10µl'lik miktarın jel üzerindeki çukura aktarılması sırasında, amplifikasyon tüplerinin kapaklarının açılmadan önce santrifüj edilmesi, örneğin yan çukurlara taşırılmaması, bütün bu işlemlerin amplifikasyon ve saflaştırma işlemlerinin yapıldığı odaların dışında bir yerde yapılması önerilmiştir(26, 47).

Jelin genellikle iki kenar çukuru, bilinen uzunluklarda band oluşturan ve "size marker" adı verilen çeşitli enzimlerle kesilmiş DNA parçalarını içeren işaretleyiciler için kullanılmakta olup, bu ürünler "DNA'nın tanımı / kullanılan enzim" (λDNA/HindIII) kısaltması ile tanımlanmışlardır(3 ,42).

İçinde örneklerin yerleştirilmiş olduğu jel ve jelin üstünü örtecek miktarda elektroforez tampon solüsyonu bulunan elektroforez tankının kapağı kapatılarak, elektrodalara doğru akım veren güç kaynağı bağlanması sırasında hareket yönünün anoda doğru olacağı, akım gücünün iki elektrod arası uzaklığın her santimetresi için 1-5 volt olarak hesaplanması belirtilirken, diğer bir kaynakta bu değer 1-10 V/cm. olarak gösterilmiştir(7, 42). Minijel kullanılması halinde voltajın 5-20 V/cm olarak uygulanabileceği, bromofenol blue'nun jelin 2/3'üne ulaşmasıyla akımın durdurularak elektroforez işleminin tamamlanması, tankın kapağının açılıp jelin dışarı alınmasından önce güç kaynağının devreden çıkartılması gerektiği bildirilmiştir(7, 42).

Boyama işleminde floresan boya olan ethidium bromide kullanıldığı, bu boyanın DNA zincirindeki bazların arasına girerek etkili olduğu, 254nm dalga boyunda morötesi ışınların DNA tarafından absorbe edilerek ethidium bromide'a aktarıldığı, 302 ve 366nm dalga boyundaki ışınların ise doğrudan boyayı etkilediği, sonuçta boyanın 590nm dalga boyunda (kırmızı-turuncu renkte) ışın yaydığı belirtilmiştir(42).

Ethidium bromide'ın 10mg/ml konsantrasyonda stok solüsyonu hazırlanarak ışık geçirmeyen bir cam kapta, oda ısısında muhafaza edilmesi, boyama için jelin 30-45 dakika 0,5µg/ml (suda) konsantrasyonda ethidium bromide içinde bekletilmesinin yeterli

olacağı, fazla boyanın genellikle sorun olmadığı, boya giderme işlemi için su veya 1mM MgSO₄ içinde 20 dakika bekletmenin yeterli olacağı bildirilmiştir(42).

Son konsantrasyonu 0,5µg/ml olacak miktarda ethidium bromide'in 60°C'ye soğutulmuş jel içinde karıştırılmasıyla elektroforez sırasında boyanmanın sağlanması sık kullanılan bir yöntem olarak gösterilmiştir(42). Ethidium bromide'in jel içine eklenmesiyle bazların arasına girdiği, DNA'nın uzunluğunu ve kırılmasını arttırdığı böylece hareket hızının yaklaşık %15 azalmasına yol açtığı, ayrıca elektroforez sırasında ethidium bromide'in DNA'nın ters yönünde (katoda doğru) hareket ettiği belirtilmiştir(42).

Ethidium bromide'in ileri derecede karsinogen olması nedeni ile kullanılırken mutlaka eldiven giyilmesi üzerinde durulmuş, atılımından önce uygulanması gereken çeşitli inaktivasyon metodları tanımlanmıştır(42).

Boyama işleminden sonra jelin bir morötesi ışık kaynağı (transillüminatör) üzerine yerleştirilmesiyle jel içinde bulunan boyanmış DNA'ların görünmesinin mümkün olduğu belirtilmiş, görüntünün fotoğraf filmine aktarılması için bu amaçla dizayn edilmiş polaroid fotoğraf makineleri geliştirilmiştir(42).

2.5 PCR'DA KULLANILAN MALZEMELER VE LABORATUVAR ŞARTLARI

Bir PCR laboratuvarının, DNA'nın saflaştırılması işlemlerinin yapıldığı amplifikasyon öncesi odası, PCR karışımının hazırlandığı temiz oda ve DNA'nın analizinin yapıldığı amplifikasyon sonrası odası adı verilen aralarında izolasyon sağlanmış üç farklı odadan oluşması gerektiği belirtilirken, odalarda bulunması gereken malzemeler tablo 9'da gösterilmiştir(47).

Malzemeler	Amplifikasyon öcesi	Temiz oda	Amplifikasyon sonrası
Otomatik pipet seti	X	X	X
Buzdolabı	X	X	X
Mikrosantrifüj	X	X	
Derin dondurucu	X	X	
Vorteks	X	X	
Su banyosu	X		
Çeker ocak	X		
Bek	X		
Laminer akımlı kabin		X	
Termal blok			X
Mikrodalga fırın			X
Transillüminatör			X
Fotograf makinası			X

Tablo 9 : PCR laboratuvarında bulunması gereken başlıca malzemeler ve yerleri.

Özellikle temiz odaya, diğer odalardan malzeme taşınmaması, odaların arasında direkt geçiş olmaması önemli ayrıntılar olarak gösterilmiş olup, PCR laboratuvarının dizaynında en büyük sorun olan kontaminasyonun engellenmesinin amaçlandığı belirtilmiştir(47).

2.6 PCR'DA KONTAMİNASYONA KARŞI ÖNLEMLER

PCR'da hatalı pozitif sonuçların temel kaynağını amplifikasyon ürününün oluşturduğu, alınan önlemlerin çoğunluğunun ve çalışma şartlarının düzenlenmesinin kontaminasyonu engellemek amacı taşıdığı bildirilmiştir(26).

Gerek amplifiye ürün kontaminasyonunu, gerekse örneklerin arasında oluşabilecek kontaminasyonu önlemek amacı ile:

- Tüm solüsyonların ufak hacimlere bölünerek steril edilmiş şekilde muhafaza edilmesi,
- Pipet uçlarının ve diğer kapların otoklavlanması,
- Her odada bir önlük bulunması ve bu önlüklerin dışarı çıkartılmaması,
- Pipetleme işleminde sıçratma yapılmaması,

- e) Tüplerin kapağı açılmadan kısa bir santrifüj uygulanması, bir tüpün işi bitip kapağı kapatılmadan diğer tüpün açılmaması,
- f) Saflaştırma işleminde filtre kağıdına emdirilmiş örnekler kullanılıyorsa, her örneğin kesiminden sonra kullanılan aletin kızarıncaya kadar ateşte tutulması, boş kağıtlara kesim yapılması,
- g) Her 3-5 örnek arasına bir negatif kontrol yerleştirerek saflaştırma işlemine başlanması,
- h) Amplifikasyon aşamasında DNA içermeyen negatif kontrol ilave edilmesi,
- i) Saflaştırılmış DNA'nın tüplere eklenmesinin en sona bırakılması ve bu işlem sırasında her tüp için yeni eldiven kullanılması,
- j) Seçilecek pozitif kontrolün zayıf olması,
- k) Hiç bir odaya diğerinden malzeme taşınmaması önerilirken UNG kullanımının da oldukça etkili olduğu gösterilmiştir(3, 26, 47).

GEREÇ VE YÖNTEM

1. KULLANILAN TAMPON VE SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI

PBS: NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,24g

800 ml distile su içinde çözülerek, pH 7,4'e ayarlanıp distile su ile 1 lt'ye tamamlandıktan sonra sterilize edilmiştir(42).

1M TRİS CL (TRİS HCL): 121,1 g Tris base (5504UA, Bethesda Research Lab.) tartılarak 800 ml distile su eklenmiş, pH 7,4'e ayarlanıp, distile su ile 1 lt'ye tamamlandıktan sonra sterilize edilmiştir(42).

0,5 M EDTA: 186,1 g disodyum etilendiamintetraasetat·2H₂O (E-5143, Sigma), 20 g NaOH tablet, 800 ml distile su içinde, manyetik karıştırıcı üzerinde pH 8.0'a ayarlanarak karıştırılıp, distile su ile 1 lt'ye tamamlandıktan sonra sterilize edilmiştir(42).

TRİS EDTA (TE) (10mM Tris ·Cl, 1mM EDTA):

1M Tris ·Cl (pH 7,4)	10ml
0,5M EDTA (pH 8,0)	2,0ml

karıştırılıp, distile su ile 1 lt'ye tamamlandıktan sonra sterilize edilmiştir(42).

LİZİS BUFFER (50mM NaCl, 50mM Tris Cl, 10mM EDTA)(10X stok)

1M Tris Cl	50ml
0,5M EDTA (pH:8,0)	20ml
NaCl	2,9g

eritilerek distile su ile 100ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavlanarak 4°C'de muhafaza edilmiştir(42).

SDS: %10'luk konsantrasyon için 10 g SDS tartılarak 90ml distile su içinde çözüldükten sonra pH 7,2'ye ayarlanarak hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır(42).

FENOL: 65°C'lik su banyosu içinde eritilen 100g kristalize fenol (Sigma, P1037) üzerine eşit miktarda 1M Tris Cl (pH 8,0) eklenerek karıştırılmış ve 4 °C'de bekletilerek iki fazın ayrışması sağlanmıştır. Üst sıvı atılarak tekrar Tris Cl eklenmiş, karıştırılmış ve iki fazın ayrışması beklenmiş, üst fazın asiditesinin (pH 7,8) yeterli görülmesiyle küçük hacimlere ayrılmış, -20 °C'de muhafaza edilmiştir(42).

FENOL / KLOROFORM / İZOAMİLALKOL: 25 birim fenol, 24 birim kloroform, 1 birim izoamilalkol karıştırılarak hazırlanmıştır(42).

3M SODYUM ASETAT: 40,81g Sodyum Asetat (6267, Merck) tartılarak 80ml distile su içinde 3M Asetik asit ile pH 5,2'ye ayarlanıp, distile su ile 100ml'ye tamamlandıktan sonra sterilize edilmiştir(42).

%70 ETANOL: 70ml saf etanol alınarak steril distile su ile 100ml'ye tamamlanmıştır(42).

%5 CHELEX 100 : 0,5g Chelex 100 (142-2832, Bio-Rad) tartılıp, steril distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak oluşturulmuştur(42).

%10 STOK SAPONİN: 1g Saponin (Merck 7695) tartılarak 10ml PBS içinde eritilmiştir(42).

PROTEİNAZ K: 20mg Proteinaz K (P-2308, Sigma) tartılıp, 1ml steril distile suda eritilerek stok solüsyon oluşturulmuştur(42).

Amplifikasyon aşamasında PCR Core Kit Plus kullanılmıştır. PCR tüplerine konulmuş sıralarına göre maddeler ve özellikleri tablo 10'dadır(42).

MADDE	İÇERİĞİ	KULLANIM MİKTARI (µl)
Urasil DNA glikosilaz	1 ünite/µl yoğunlukda 50mM Tris-HCl(pH 8,0), 0,3M KCl, 1mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 0,1 mg/ml bovin serum albümin, %50 (v/v) gliserol	1
Taq DNA polimeraz	5 ünite/µl yoğunlukda 20mM Tris-HCl(pH 8,0), 0,1mM KCl, 0,1mM EDTA, 20mM dithiothreitol, %0,5 (v/v) Nonidet P40, %0,5 (v/v) Tween 20, %50 (v/v) gliserol	0,25 (1,25 Ünite)
dNTP karışımı	10mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP, 30mM dUTP,	1
PCR reaksiyon tamponu MgCl ₂ 'lü 10X	100mM Tris-HCl(pH 8,9), 500 mM KCl, 25mM MgCl ₂	5
PCR reaksiyon tamponu MgCl ₂ 'süz 10X*	100mM Tris-HCl(pH 8,9), 500 mM KCl	5
MgCl ₂ *	25mM MgCl ₂	-

Tablo 10: PCR Core Kit Plus'da bulunan maddelerin özellikleri ve 50µl toplam hacim için kullanım miktarları.

(*) 2,5mM dışında bir konsantrasyonda MgCl₂'e ihtiyaç duyulduğunda MgCl₂'lü tampon yerine kullanılmışlardır. Konsantrasyon MgCl₂ miktarı değiştirilerek ayarlanmıştır.

Pl. vivax'a AİT PRİMERLERİN ŞEÇİMİ VE KONSANTRASYONLARININ AYARLANMASI: AL60 adı verilen primer 5'-GTC GGA ATT CAT GAA GAA CTT CAT TCT C-3' dizininden oluşan, 30,3nmol miktarda olup, 606µl TE (10mM Tris Cl, 1mM EDTA) eklenerek 50pmol/µl konsantrasyon elde edilmiştir. AL61 ikinci primer olup 5'-CAG CGG ATC CTT AAT TGA ATA ATG CTA GG-3' dizininden oluşmakta, 50,2nmol miktar 1004µl TE ile dilüe edilerek eşit konsantrasyon sağlanmıştır.

TBE (0,5X : 45mM Tris, 1mM EDTA, 45mM borik asit): 5X stok konsantrasyon için 54g Tris, 27,5g borik asit, 20 ml 0,5M EDTA distile su ile 1t'ye tamamlanmıştır.

YÜKLEME TAMPONU 25mg bromofenol blue, 25 mg ksilen siyanol FF tartılarak, 3 ml gliserol eklenmiş ve distile su ile 10ml'ye tamamlanmıştır.

ETHİDİUM BROMİDE 10mg/ml konsantrasyonda stok için 20mg ethidium bromide (E-7637, Sigma) tartılarak 2ml distile su içinde eritilmiştir.

2. *Plasmodium vivax* İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Mikroskopik olarak *Pl. vivax* tespit edilmiş 5 hastadan EDTA'lı tüplere alınıp -20°C'de muhafaza edilmekte olan ve sağlıklı üç kişiden yine EDTA'lı tüplere alınan kanlar veya bu sekiz kişinin parmak uçlarından filtre kağıdına (Whatman 3mm, 3030917) damlatılıp kuruduktan sonra 4°C'de bekletilen kan örnekleri kullanılmıştır. Oluşturulan seride 1, 4, 8 No.lu kanlar negatif, 2, 3, 5, 6, 7 No.lu kanlar pozitif olacak şekilde düzenlenmiştir.

EDTA'lı kanlar kullanılarak Wataya metodu (51) ile yapılan saflaştırma işleminde,

Her örnekden 500µl'lik miktar eppendorf tüplere alınarak üzerlerine 8µl %10'luk saponin (son konsantrasyon %0,016) eklenmiştir.

Vorteks yardımı ile hücreler parçalanarak, 10 dakika 10000 d/dak. hızda santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır.

Dipte kalan pellet 1ml PBS ile sulandırılarak, vortekslendikten sonra, 5 dakika 10000 d/dak. hızda santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmış, PBS ilavesi, vorteks, santrifüj üst sıvının atılması aşamaları tekrar edilerek dipte kalan kısım -20°C'de muhafaza edilmeden önce tüpler (W1-W8) numaralandırılmıştır.

Chelex metodu (4) ile yapılan saflaştırmada, %5'lik Chelex 100, 5 dakika süreyle kaynar su banyosunda tutulmuş, daha sonra her EDTA'lı kan örneğinden 20 µl konmuş olan tüplere 100'er µl eklenerek vortekslenmiş ve 10 dakika daha kaynar su banyosunda bekletilmiştir. 10000 devirde 10 dakika santrifüj edilen tüplerden üst sıvı çekilerek yeni tüplere alınmış ve renklerinin koyu, bulanık olmaları nedeniyle Chelex 100'le kaynatma, santrifüj, üst sıvıyı yeni tüpe alma aşamaları tekrar edilmiştir. Tüpler numaralandırılarak

(C1-C8) kullanılıncaya kadar -20°C 'de muhafaza edilmişlerdir. Örnekler amplifikasyondan önce 1,5 saat 60°C 'de inkübe edilmişlerdir.

Snounou metoduna (36) göre, $200\mu\text{l}$ EDTA'lı kan $600\mu\text{l}$ lizis buffer ile karıştırılarak 3 dakika çalkalanmış, 10 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Tüpler 1500 d/dakika hızla 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılmış, dipteki pellet üzerine $141\mu\text{l}$ TE, $1,5\mu\text{l}$ proteinaz K, $7,5\mu\text{l}$ SDS (son konsantrasyonları, SDS: %0,5 ; proteinaz K: $200\mu\text{g/ml}$) eklenerek vortekslendikten sonra 37°C 'de bir gece inkübe edilmişlerdir.

İnkübasyonu tamamlanan tüpler üzerine 25 birim fenol, 25 birim kloroform, 1 birim izoamilalkol karışımından $300'$ er μl eklenerek 10 dakika çalkalanmış, 20 dakika süreyle 5000 d/dakika hızla santrifüj edildikten sonra geniş ağızlı uç takılmış pipetle üst sıvılar yeni tüplere aktarılmıştır. Fenol / kloroform / izoamilalkol ekleme, çalkalama ve santrifüj işlemleri bir kez daha uygulandıktan sonra yine aynı tip pipetle üst sıvılar, içlerinde $20'$ şer μl 3M sodyum asetat bulunan tüplere alınmıştır. Üzerlerine $600'$ er μl soğuk, saf etanol eklenen bu tüpler hafifçe karıştırılarak bir gece -20°C 'de bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda 13000d/dakika hızla 20 dakika santrifüj edilen tüplerin üst sıvıları dökülerek dipte kalan pellet %70'lik soğuk etanol ile karıştırılıp aynı hız ve sürede santrifüj uygulanmış, üst sıvıları dökülmüş, pelletin kuruması için tüpler filtre kağıdı üzerine ters çevrilerek bırakılmışlardır. Kuruyan pelletler $50'$ şer μl TE ile sulandırıldıktan sonra numaralandırılarak (TB1-TB8) -20°C 'de muhafaza edilmişlerdir.

Fenol / Etanol yöntemi (42) modifikasyonu için her örneğe ait kan damlatılmış filtre kağıtlarından 1cm çapında daire şeklinde bir parça kesilerek tüplere yerleştirilmiştir.

2ml lizis buffer içine $20\mu\text{l}$ Triton-X 100 (son kons.:%1), $20\mu\text{l}$ stok proteinaz K (son kons.: $200\mu\text{g/ml}$) ilave edilerek karıştırılmış ve her tüpe bu karışımdan $250'$ şer μl eklendikten sonra 3 saat 60°C 'de inkübe edilmişlerdir. Tüplere $250'$ şer μl fenol eklenip 10 dakika çalkalanmış, 10 dakika 12000 devirde santrifüj edilmişlerdir. Yeni tüplere aktarılan üst sıvıların üzerlerine $250'$ şer μl kloroform eklenerek çalkalama santrifüj ve üst

sıvıları yeni tüpe aktarma işlemleri tekrar edilmiştir. Her tüpe 25µl 3M sodyum asetat ilave edilerek karıştırıldıktan sonra 550µl soğuk saf etanol eklenip bir gece -20°C'de bekletilmişlerdir.

13000 d/dakika hızla 20 dakika santrifüjden sonra üst sıvıları dökülen tüpler kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek pelletin kuruması sağlanmıştır. Kuruyan pelletler üzerine 50'şer µl TE eklenerek vortekslelendikten sonra numaralandırılıp (Y1-Y8) -20°C'de muhafaza edilen tüpler amplifikasyondan hemen önce 1,5 saat 60 °C'de inkübe edilmişlerdir.

Chelex metodu modifikasyonu uygulaması amacı ile 1cm çapında filitre kağıtları bulunan tüplere 1'er ml %0,5'lik saponin eklenerek filtre kağıtları ezilmiş, hava kabarcığı kalmayacak şekilde 37 °C'de 1 saat inkübe edilmişlerdir. 12000 d/dakika hızla 5 dakika santrifüj edilen tüplerdeki üst sıvılar atılmış dipteki kısım üzerine 1ml PBS ilave edilerek hafifçe çalkalanıp 4 °C'de 20 dakika bekletildikten sonra aynı hız ve sürede santrifüj edilip üst sıvıları atılmış, bu PBS ile yıkama aşaması iki kez daha tekrarlanmıştır. Dipteki kağıtlar üzerine 200'er µl ısıtılmış %5'lik Chelex 100 eklenip pipet ucu ile kağıtlar ezildikten sonra vortekslenmiş ve 10 dakika 100 °C'de inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda 10000 d/dakika hızla 5 dakika santrifüj edilen tüplerdeki üst sıvılar yeni tüplere aktarılarak tekrar santrifüj edilmiş ve üst sıvıları yeni tüplere alınmıştır. Tüpler numaralandırılıp (S1-S8) buzdolabında veya derin dondurucuda muhafaza edilmişlerdir.

2.1 AMPLİFİKASYON

Amplifikasyon için temiz odada bulunan laminar akımlı kabin içinde saflaştırma aşamalarında oluşturulan serilere uygun şekilde numaralandırılmış steril PCR tüplerine Tablo: 11'de gösterilen maddeler (örnek hariç) sırası ile konularak tüplerin kapakları kapatılmış ve saflaştırmanın yapıldığı odada tüplere, üzerindeki numara ile uyumlu örneklerden 5'er µl eklenmiştir. PCR komponentlerinin eklenmesi işleminde, tüpler buz kabı içinde muhafaza edilirken, örnek ilavesi sırasında örnek tüpleri kısa bir santrifüj

yapılmış, bir tüpten örnek alınarak kapağı kapatılıp PCR tüpüne eklenmiş ve o PCR tüpünün kapağı kapatıldıktan sonra diğer tüpler için aynı uygulama sürdürülmüştür. Amplifikasyonun çalışmasının kontrolü amacı ile pozitif kontrol olarak bir ticari kit (Perkin Elmer N801-0055) içinde bulunan lambda DNA ve bu örneğe spesifik primerlerden oluşan kontrol grubu (Perkin Elmer, N808-008) kullanılmıştır.

No	MADDELER	MİKTARLARI (µl)	
		ÖRNEK	KONTROL
1	Bidistile su	36,75	37,75
2	PCR reaksiyon tamponu MgCl ₂ 'lü 10X	5	5
3	Primer 1	1	2,5
4	Primer 2	1	2,5
5	dNTP karışımı	1	1
6	Taq DNA polimeraz	0,25	0,25
7	Örnek	5	1
TOPLAM		50	50

Tablo 11: Amplifikasyon için PCR tüplerine konulan maddeler ve miktarları sırasına göre gösterilmiştir.

Maddelerin eklenmesinden sonra vortekslenen tüpler kısa bir santrifüj yapılarak termal bloğa (Biometra, 050-100) konmuştur. Termal Blok 94 °C'de 2 dakika, 25 siklus 94°C'de 1dakika, 55 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 3 dakika, son olarak 72 °C'de 7 dakika olacak şekilde programlanmıştır.

Agaroz jel elektroforezi için stok TBE'den 30ml alınıp distile su ile 300ml'ye tamamlanarak agar eritmek ve elektroforez tankı için yeterli miktarda, 0,5X TBE elde edilmiştir.

500mg agar tartılarak, 50ml 0,5X TBE içinde mikrodalga fırın kullanılarak eritilmiş, yaklaşık 60°C'ye kadar soğuması beklendikten sonra 8'li tarak konulmuş, minijel (Biometra, 020-000) tablasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülmüştür. %1'lik agarın tamamen donmasından sonra jele zarar vermemeye dikkat edilerek tarak ve tamponlar çıkarılmıştır.

Tabla, jelin delikli tarafı katoda gelecek şekilde tankın içine yerleştirildikten sonra kalan 0,5X TBE ile tank doldurulmuştur.

Bir parafin film üzerinde 3 no.lu yükleme tamponu (%0,25 bromofenol blue, %0,25 ksilen siyanol FF, %30 gliserol (suda)) ile oluşturulan 2 şer μ l'lik sekiz damlanın ilki 8 μ l markır (DNA Molecular Weight Marker II, 236250, Boehringer Mannheim) ile, ikincisi, pozitif kontrolden, diğerleri EDTA'lı kanlarla Chelex yönteminin denendiği "C" serisinin 2-7 no.lu PCR tüplerinden sırasıyla alınan 10 μ l amplifiye ürünlerle çekip bırakmak suretiyle karıştırılmış, bu karışımlardan alınan 10 μ l'lik miktar jeldeki çukurlara sırasıyla yerleştirilmiştir.

Güç kaynağı (Biometra, 040-800) ile 30 V doğru akım uygulanmış ve yaklaşık 3 saat sonra bromofenol blue'nun jelin 2/3'lük kısmına ulaştığı görülerek elektroforez durdurulmuştur.

Boyama işlemi, 200ml distile suya 10 μ l stok ethidium bromide karıştırılıp, içinde tabladan çıkartılan jeli 10 dakika bekletmek şeklinde uygulanmış, fazla boyanın yıkanması için, jel 5 dakika distile suda bekletilmiştir. Boyanan jel morötesi ışık kaynağında incelenmiştir.

2.2 DİĞER SERİLERİN İNCELENMESİ

Agaroz jel elektroforezi daha sonra fenol/etanol yönteminin modifikasyonunun denendiği "Y" serisi tüpler için (2-7 nolu) uygulanmış ve boyanan jel morötesi ışık kaynağında incelenmiştir.

Markır, pozitif kontrol ve her serinin 2nolu tüpleri ile bir yürütme daha yapılmış, boyanan jel morötesi ışık kaynağında incelenmiştir.

3. *Leishmania* PROMASTİGOTLARI İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda RPMI besiyerinde devamlılığı sağlanan *Leishmania infantum* suşundan alınan promastigotlar ve Kraliyet Tropikal Hastalıklar Enstitüsü Hollanda'dan temin edilen primerler kullanılmıştır.

Primer 1, R174 5'-GGT TCC TTT CCT GAT TTA GG-3' ve

Primer 2 R798 5'-GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG-3' dizinlerinden oluşmakta, ssrRNA'yı kodlayan gen üzerinde 650bp'lik bir sekansı hedeflemektedirler.

3.1 KLASİK SAFLAŞTIRMA YÖNTEMİNİN MODİFİKASYONLARININ DENENMESİ

İçinde 3×10^6 promastigot bulunan 5 tüp santrifüj edilerek hücreler dipte toplanmış, üst sıvılar atılarak 250'şer μ l lysis buffer + %1 Triton-X 100 + 200 μ g/ml proteinaz K eklenip 3 saat 60 °C'de inkübe edilmişlerdir. Her tüpe 250 μ l fenol eklenerek 10 dakika çalkalanmış ve 8000 d/dakika hızla 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvılar yeni tüplere aktarılmıştır. Bu aşamadan itibaren her tüp için fenol ekstraksiyon etanol presipitasyon metodunun farklı varyasyonları uygulanmış, çalkalama süresi 10 dakika, santrifüj 8000 d/dakika ile 5 dakika olarak sabit tutulmuştur. Kloroform ve fenol/kloroform/izoamilalkol (F/C/İ) miktarları 250 μ l, 3M sodyum asetat (NaAc) miktarlar eklenen sıvının 1/10'u (25 μ l), soğuk saf etanol miktarları ise eklenen sıvının iki katı (550 μ l) olarak ayarlanmıştır. Bu uygulamanın tüplere göre farklılıkları tablo:12'de gösterilmiştir.

AŞAMALAR	TÜPLER				
	1	2	3	4	5
Lyzis buffer eklenmesi ve inkübasyon	X	X	X	X	X
Fenol eklenmesi çalkalama santrifüj üst sıvının alınması	X	X	X	X	X
Fenol eklenmesi çalkalama santrifüj üst sıvının alınması (Tekrar)		X	X	X	X
F/C/İ eklenmesi çalkalama santrifüj üst sıvının alınması		X	X		
Klorofom eklenmesi çalkalama santrifüj üst sıvının alınması			X	X	
NaAc eklenmesi	X	X	X	X	X
Etanol eklenmesi	X	X	X	X	X
-20°C'de bir gece inkübasyon	X	X	X	X	X

Tablo 12: Fenol ekstraksiyon etanol presipitasyon yönteminin tüplere göre uygulanan farklı aşamaları.

İnkübasyonun sonunda tüpler iki kez %70'lik etanol ile yıkandıktan sonra ağızları toplu iğne ile birkaç delik açılmış parafilmle kapatılarak kuruması beklenmiş, kuruyan tüpler 100µl TE ile süspansiyon edilip -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

Bu örnekler amplifikasyondan önce 60 °C'de 2 saat bekletilmişlerdir.

Amplifikasyonda tüplere pozitif kontrol kitinin kullanıldığı bir tüp daha eklenmiştir.

Tüplerde bulunan maddelerin miktarları tablo:13'de gösterilmiştir.

No	MADDELER	MİKTARLARI (µl)	
		ÖRNEK(1-5)	KONTROL(6)
1	Bidistile su	36,75	37,75
2	PCR reaksiyon tamponu MgCl ₂ 'lü 10X	5	5
3	Primer 1	1	2,5
4	Primer 2	1	2,5
5	dNTP karışımı	1	1
6	Taq DNA polimeraz	0,25	0,25
7	Örnek	5	1
TOPLAM		50	50

Tablo 13: Amplifikasyon hazırlığında tüplere sırasıyla eklenen maddeler ve miktarları.

Amplifikasyona 94 °C'de 10 dakika ile başlanmış ve 94 °C'de 75 saniye, 60 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakikadan oluşan 38 sikludan sonra 72 °C'de 6 dakika tutularak tamamlanmıştır.

Elektroforezde 0,5 X TBE ile %1'lik agaroz jel 8'li tarakla hazırlanmış, ilk çukura DNA Molecular WM V (821705, Boehringer Mannheim), 2-6. çukurlara sırasıyla örnekler, 7. çukura pozitif kontrol, 8. çukura DNA Molecular WM II yükleme tamponu ile karıştırılıp yerleştirilmiştir.

Elektroforez sonunda jel çıkarılarak boyandıktan sonra transluminatörde incelenip, fotoğrafı çekilmiştir. Fotoğraf çekimi polaroid makina (Polaroid DS-34) ile enstantanesi 1/15sn, diaframı 4,8'e ayarlanarak yapılmıştır.

3.1.1 KONTROL ÇALIŞMASI

Bu aşamada yeni bir jel hazırlanarak amplifiye olmamış, ancak saflaştırma işlemi tamamlanmış olan 5 örnekten 1'er µl alınmış, distile su ile 10µl'ye tamamlanmış ve yükleme tamponuyla karıştırılarak çukurlara yerleştirilmiş, bir çukura da 10µl lysis buffer ile inkübe edilmiş promastigotlar yükleme tamponu ile karıştırılarak yerleştirilmiş son olarak markır da eklenerek yürütme işlemi yapılmıştır. Örneklerin yeterli mesafeye ulaşmasıyla jel çıkarılarak boyanmış ve incelenmiştir.

3.2 DUYARLILIK ÇALIŞMASI

Kullanılmakta olan *Taq*DNA polimeraz tükendiğinden yenisi temin edilerek çalışmalara devam edilmiştir. *Taq*DNA polimeraz enzimi (1418 432, Boehringer Mannheim) 5 Ü/µl konsantrasyonda olduğundan, kitin içinde bulunan enzim gibi 0,25µl miktarda kullanılmıştır.

Bu çalışmada yeni bir seri oluşturularak 400000, 4000 ve 40 promastigot içerecek şekilde üç dilüsyon elde edilmiş ek olaral visceral leishmaniasis'li bir hastanın kemik iliği aspirasyon materyalinin ve kanının filtre kağıdına emdirilmiş örnekleri kullanılmıştır.

Beş örnekden oluşan yeni seriye bir önceki çalışmada denenen yöntemlerden iki kez fenollü ekstraksiyonu takiben F/C/İ ve kloroformlu şekil uygulanmış, amplifikasyonda pozitif kontrol tüpü seriye eklenmiş. Amplifikasyon sonrası ürünler %1 ve %2'lik agaroz jellerde iki kez yürütülmüş, usulüne uygun boyanan jeller morötesi ışık kaynağında incelenmişlerdir.

3.2.1 SDS ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Bir önceki çalışma lizis buffera eklenen %1 Triton-X 100 yerine son konsantrasyon %1 olacak şekilde SDS kullanılarak tekrarlanmıştır.

Şu ana kadar yapılan çalışmalardan sonra kullanılan tüm maddelerin asiditeleri ölçülmüş ve bazı maddelerin niteliklerinin değiştiğinin anlaşılması üzerine kullanılan distile sular iki kez daha damıtılarak tridistile su elde edilmiş, fenol, EDTA, TE, TBE stok solüsyonları tridistile su ile yeniden hazırlanmıştır.

3.2.2 CHELEX VE FENOLLÜ EKSTRAKSİYON METODLARININ DUYARLILIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

RPMI besiyerinde üretilmiş promastigotlar serum fizyolojikle yıkanarak sayılmış ve yine serum fizyolojikle 10^6 promastigot/ml olacak şekilde dilüe edilmiştir. Örnek, ml'de 10^5 , 10^4 , 10^3 ve 10^2 promastigot içerecek şekilde onar kez dilüe edilerek beş farklı konsantrasyon oluşturulmuştur. Her tüpten 100'er μ l alınarak 1'den 5'e kadar numaralandırılmış tüplere konulmuştur. Böylece 1 nolu tüpte 10^6 , 2 nolu tüpte 10^5 , 3 nolu tüpte 10^4 , 4 nolu tüpte 10^3 , 5 nolu tüpte 10^2 promastigot olması sağlanmıştır. Bu beş tüp, Triton-X 100 ve proteinaz K içeren lizis bufferla inübasyonu takiben fenol, F/C/İ,

kloroform, sodyum asetat, etanol aşamaları ile devam eden fenollü ekstraksiyon yöntemi ile saflaştırılarak son inkübasyonla amplifikasyona hazır hale getirilmiştir. Pelletlerin resüspansiyonu için 50'şer µl TE kullanılmıştır. Diğer taraftan ilk beş tüple aynı miktarlarda promastigot içeren ikinci bir beş tüp hazırlanarak Chelex yöntemi ile saflaştırılmıştır. Her iki serideki tüplerden 5'er µl alınarak, 5mM MgCl₂ son konsantrasyonu oluşturulan PCR tüplerinde amplifiye edilmiştir.

12'li tarak kullanılarak hazırlanan %1'lik agaroz jelin 1. ve 12. çukurlarına 650 bp'de bant görünümü veren amplifiye *Leishmania* DNA'sı, 2-5. çukurlara Chelex yöntemi ile saflaştırılan seri, 7-11. çukurlara fenol yöntemi ile saflaştırılan grup yerleştirilirken, 6. çukur boş bırakılmış, Chelex yöntemi uygulanan 5. tüp (10⁵ promastigot içeren) kullanılmamıştır. Tablo 14'de çukurlara konulan amplifiye örneklerin kaynakları gösterilmiştir.

ÇUKURLAR	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
SAFLAŞTIRILAN PROMASTİGOT SAYISI	M	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	BOŞ	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	M
UYGULANAN SAFLAŞTIRMA YÖNTEMİ	-	CHELEX				-	FENOL/ETANOL					-

Tablo 14: Çukurlarda bulunan amplifikasyon ürünlerine amplifikasyon öncesi uygulanan metodlar ve promastigot miktarları (M: markır).

Boyanan jelin morötesi ışık kaynağı üzerinde 8 enstantane, 4,5 diafram ayarı ile fotoğrafı çekilmiştir.

4. LİTYUM TUZLU NÜKLEOTİD SOLÜSYONLARININ KULLANILMASI

4.1 NÜKLEOTİD SOLÜSYONLARININ UYGUN KONSANTRASYONDA BİRLEŞTİRİLMESİ

Kullanılmakta olan dNTP solüsyonu tükendiğinden yenileri temin edilerek çalışmalara devam edilmiştir. Nükleotidlerin lityum tuzlu solüsyon formlarından, dATP (1051 440, Boehringer Mannheim), dCTP (1051 458, Boehringer Mannheim) ve dGTP'den (1051 466, Boehringer Mannheim) 25 μ mol içeren 250 μ l'lik birer tüp, dUTP'den (1420 470, Boehringer Mannheim) üç katı konsantrasyonda kullanıldığından 25 μ mol içeren 250 μ l'lik üç tüp alınmıştır. 10 μ l dATP, 10 μ l dCTP, 10 μ l dGTP, 30 μ l dUTP bir tüpte toplanarak 40 μ l tridistile su ile 100 μ l'ye tamamlanmıştır. Böylece yeni dNTP karışımında dATP, dCTP ve dGTP'nin 10mM konsantrasyonda, dUTP'nin ise 30mM konsantrasyonda olması sağlanmıştır.

4.2 KONSANTRASYONLARIN AMPLİFİKASYONDA DENENMESİ

Yeni dNTP karışımı ile pozitif kontrol kiti kullanılarak yapılan çalışmada 1, 2,5, 5 ve 10 μ l dNTP miktarları denenmiş, amplifikasyon sonrası ürünlerin yürütüldüğü jel boyanarak morötesi ışık kaynağında incelenmiştir.

4.3 KONSANTRASYONLARIN VE BİRLEŞİMLERİN DENENMESİ

Yeni bir beşli seri oluşturularak amplifikasyon denenmiş olup, bu serideki tüplerin içerdikleri maddeler ve konsantrasyonları tablo :15'de gösterilmiştir.

	1. TÜP	2. TÜP	3. TÜP	4. TÜP	5. TÜP
dATP*	1µl(100nmol)				1µl(100nmol)
dCTP*	1µl(100nmol)				1µl(100nmol)
dGTP*	1µl(100nmol)				1µl(100nmol)
dUTP*	3µl(300nmol)				3µl(300nmol)
dNTP**		10µl	20µl	30µl	
Tampon solüsyon***	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl
TaqDNA polimeraz	0,25µl	0,25µl	0,25µl	0,25µl	0,25µl
Su					
Primer 1****	2,5µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl	
Primer 2****	2,5µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl	
Örnek DNA****	1µl	1µl	1µl	1µl	
Primer 1*****					1µl
Primer 2*****					1µl
Örnek DNA*****					1µl
TOPLAM	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl

Tablo 15: dNTP konsantrasyonlarının kontrol kiti ile (1.-4. tüp) ve amplifiye *Leishmania* DNA'sı (5. tüp) kullanılarak denenmesi.

- (*) Dilüe edilmeden, tüplerden alınmıştır.
(**) 100nmol dATP+100nmol dCTP+100nmol dGTP+300nmol dUTP/10µl
(***) 25mM MgCl₂ içermektedir
(****) Kontrol kitine ait maddelerdir.
(*****) Leishmania DNA'sının amplifikasyon ürünü, spesifik primerleri ile örnek olarak kullanılmıştır.

Amplifikasyon ve elektroforezden sonra boyanan jel morötesi ışık kaynağında incelenmiştir.

4.4 TİMİN'LI VE URACİL'LI dNTP'LERİN İKİ FARKLI DNA ÖRNEĞİ KULLANILARAK KARŞILAŞTIRILMASI

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A. D.'ndan temin edilen 4'er mM konsantrasyonda dATP, dCTP, dGTP ve dTTP içeren karışım ve İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Merkezinden alınan plazmid DNA ve spesifik primerleri ile yapılan çalışmada dTTP'li ve dUTP'li karışımlar karşılaştırılmıştır.

Plazmid DNA'nın 1µl kullanıldığı 2. ve 3. tüplerden 2. sine 4mM dNTP'den (dTTP'li) 2,5µl, 3.süne 10/30mM konsantrasyonda hazırladığımız dUTP'li solüsyondan 1µl konulmuştur. 1. tüpte yine 4mM dNTP kullanılmış, ancak örnek olarak amplifiye *Leishmania* DNA'sı denenmiştir. Diğer maddeler standartlara uygun şekilde hazırlanmıştır (Toplam hacimler 50'şer µl, MgCl₂ konsantrasyonu 2,5mM, *Taq*DNA polimeraz 1,25Ü).

Amplifikasyondan sonra %2'lik agaroz jel 0,5X TBE ile hazırlanmış 1. çukura daha önce amplifiye edilmiş *Leishmania* DNA'sından 10µl, 2. çukura 1. tüpten 10µl, 3. çukura 1. tüpe koyulan örneğin 1/50'si, 4. çukura 2. tüpten 10µl, 5. çukura 3. tüpten 10µl, 6. çukura 2. ve 3. tüplere koyulan örneğin (plazmid DNA) 1/50'si yükleme bufferleri ile karıştırılarak yerleştirilmiştir. Jele yerleştirilen amplifikasyon ürünlerine ait detaylar tablo 16'da özetlenmiştir.

ÇUKURLAR	1.	2.	3.	4.	5.	6.
TÜPLER	MARKIR 564bp	1. TÜP	NEGATİF KONTROL	2. TÜP	3. TÜP	NEGATİF KONTROL
dNTP	-	TIMIN	-	TIMIN	URACIL	-
DNA	<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania</i>	Plazmid	Plazmid	Plazmid

Tablo 16: Çukurlara yerleştirilen markırın, amplifikasyon ürünlerinin ve negatif kontrollerin özellikleri. Negatif kontrol olarak PCR tüpüne konulan DNA miktarının jele yansıyan oranı (1/50) kullanılmıştır.

1 saat süre ile yürütülen amplifikasyon ürünleri boyanarak mor ötesi ışık kaynağı üzerinde 30 enstantane, 5,6 diafram ayarı ile fotoğrafı çekilmiştir.

5. MgCl₂ KONSANTRASYONLARININ DENENMESİ

5.1 AMPLİFİYE *Leishmania* DNA'SI İLE YAPILAN ÇALIŞMADA TE'NİN MgCl₂ KONSANTRASYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Örnek olarak 2µl amplifiye edilmiş *Leishmania* DNA'sının 3µl TE ile karıştırılarak kullanıldığı 8 tüpte MgCl₂ son konsantrasyonları 1-8 mM arasında değiştirilmiş, 9. tüpte ise 2µl DNA, TE ile karıştırılmadan 2,5 mM MgCl₂ konsantrasyonuyla denenmiştir. Diğer komponentleri standartlara uygun yürütülen amplifikasyon elektroforez ve boyama aşamalarından sonra jel morötesi ışık kaynağında incelenmiştir.

5.2 CHELEX YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN ÖRNEKDE MgCl₂ KONSANTRASYONLARININ DENENMESİ

Leishmania promastigotları Chelex yöntemi ile saflaştırılarak MgCl₂ son konsantrasyonları 1-8 mM arasında 1mM aralıklarla değişen 8 tüp içinde amplifiye edilmişlerdir. %1 agaroz jel 12'li tarak kullanılarak hazırlanmış, 1., 11. ve 12. çukurlar boş bırakılmış, 2. çukura DNA M WM II, 3-10. çukurlara sırası ile 1-8. tüplerden alınan ürünler yükleme tamponları ile karıştırılarak yerleştirilmiştir. Jele yerleştirilen amplifikasyon ürünlerine ait özellikler tablo 17'de gösterilmiştir.

ÇUKUR NO	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
TÜP NO	DNA	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
MgCl ₂ KONS.	M WM II	1mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	7mM	8mM

Tablo 17: Jeldeki çukurlara yerleştirilen örneklerin numaraları ve amplifikasyonlarında kullanılan MgCl₂ konsantrasyonları. Gösterilmeyen çukurlar boş bırakılmıştır.

Elektroforez sonrası boyanan jelin transluminatörde 4 enstantane, 5,6 diafram ayarı ile fotoğrafı çekilmiştir.

6. *Plasmodium yoelii* İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Plasmodium yoelii'ye ait primerler Birleşik Devletler Deniz Kuvvetleri Tıbbi Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiş,

Primer 1, PyDx1, 5' -GCC CAA AGA AAC TTA AAC G-3' ve

Primer 2, PyDx2, 5' -GCC ACT ACT GGT TGA TTC-3' dizininden oluşmakta çircumsporozid proteini kodlayan gen üzerinde 300bp'lik bir sekans hedeflemektedirler.

6.1 ÖRNEKLERİN ALINMASI

Ege Üniversitesi Parazitoloji A. D.'nda, farenden fareye pasajlarla sürdürülen *Pl. yoelii* kültüründen, %15, %10 ve %0,04 parazitemisi giemsa ile boyanmış ince yayma preparatta tespit edilen 3 farenin kuyruklarından, filtre kağıtlarına damlatılmak suretiyle alınan kan örnekleri kullanılmıştır. Filtre kağıtları 5 cm çapında daire şeklinde kesilerek kullanılıncaya kadar 4°C'de muhafaza edilmişlerdir.

6.2 CHELEX YÖNTEMİ KULLANILARAK DUYARLILIK VE MgCl₂ KONSANTRASYONLARININ İNCELENMESİ

6.2.1 % 10 PARAZİTEMİLİ ÖRNEKLERLE YAPILAN ÇALIŞMA

İlk çalışmada sadece %10 parazitemili örnekler kullanılmış, 3 tüpe sırası ile 1, 2 ve 3 adet filtre kağıdı koyularak Chelex yöntemi ile saflaştırma işlemi yapılmıştır.

Amplifikasyonda her tüp için 2,5 ve 5 mM MgCl₂ son konsantrasyonları çalışılmış, ürünlerin elektroforezi yapıp, boyanarak incelenmiştir.

6.2.2 %0,04 PARAZİTEMİLİ ÖRNEKLERLE YAPILAN ÇALIŞMA

Parazitemisi %0,04 olan örneklerden 3 filtre kağıdı bir tüpe konulmuş ve Chelex yöntemi ile saflaştırılarak $MgCl_2$ konsantrasyonları 2-6 mM arasında değişen 6 tüp hazırlanarak amplifiye edilmişlerdir. Elektroforez ve boyama aşamaları tamamlandıktan sonra jel morötesi ışık kaynağında incelenmiştir.

6.3 FENOL / ETANOL YÖNTEMİ İLE TE'NİN ETKİSİNİN VE DUYARLILIĞIN ARAŞTIRILMASI

1. ve 2. tüpe %0,04 parazitemili, 3. ve 4. tüpe ise %15 parazitemili örneklerden 2'şer filtre kağıdı konularak fenol ekstraksiyon, etanol presipitasyon yöntemi ile DNA'lar saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminde fenol aşaması bir kez uygulanmış, F/C/I ve kloroform uygulanmış, presipitasyondan sonra kurutulan pelletlerin süspanse edilmesi için 1. ve 3. tüplerde 50'şer μ l TE, 2. ve 4. tüplerde 50'şer μ l tridistile su kullanılmıştır.

Örnekler, $MgCl_2$ son konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde amplifiye edilmiş, elektroforez ve boyama işlemlerinden sonra jel morötesi ışık kaynağında incelenmiştir.

6.4 FENOL / ETANOL YÖNTEMİ İLE DUYARLILIĞIN ARAŞTIRILMASI

Giemsa ile boyanan ince yayma preparatın immersiyon objektifle yapılan incelenmesinde her sahada ortalama 2 parazit görülmüş, aynı kanın damlatıldığı filtre kağıdından 1 cm çapında daire şeklinde kesilen örnekte bulunan kan miktarı 20 μ l olarak değerlendirilmiş ve filtre kağıdında bulunan parazit sayısı 2×10^4 olarak hesaplanmıştır(20).

Fenol, F/C/İ, kloroform aşamalarıyla fenollü ekstraksiyon ve etanollü presipitasyon uygulanan örnek, 100µl TE ile resüspanse edilmiş, 1µl örneğin 200 parazit DNA'sı içerdiği kabul edilmiştir.

6 adet PCR tüpü hazırlanarak 1. tüpe 5, 2. tüpe 4, 3. tüpe 3, 4. tüpe 2, 5. tüpe 1, 6. tüpe 0,5µl örnek konulmuş, her tüpün toplam hacminin 50µl olması su miktarları değiştirilerek sağlanmıştır.

Amplifikasyondan sonra %2'lik agaroz jel 0,5XTBE ile hazırlanmış, 50 ml hacmindeki jele 2.5µl ethidium bromide eklenerek karıştırılmıştır. 8'li tarak kullanılarak dökülen jelin 1. çukuruna DNA M WM II, 2.-7. çukurlara 1.-6. tüpler, 8. çukura DNA M WM V yükleme tamponları ile karıştırılarak yerleştirilmiştir. Böylece 2. sırada 1000, 3. sırada 800, 4. sırada 600, 5. sırada 400, 6. sırada 200, 7. sırada 100 parazit DNA'sına ait amplifikasyon ürünleri bulunmaktadır. Elektroforezden sonra doğrudan morötesi ışık kaynağında incelenen jelin 8 enstantane, 4,5 diyafram ayarı ile fotoğrafı çekilmiştir.

BULGULAR

1. *Plasmodium vivax* İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

EDTA'lı kanların Chelex yöntemi ile saflaştırıldığı "C" serisinin yürütüldüğü jelde ilk sırada markıra ait bantlar, ikinci sırada pozitif kontrol kitine ait 500bp'lik bant görülmüş, 3-8. sıralarda bulunan örneklere ait bantlar görülmemiştir.

1.1 DİĞER SERİLERİN İNCELENMESİ

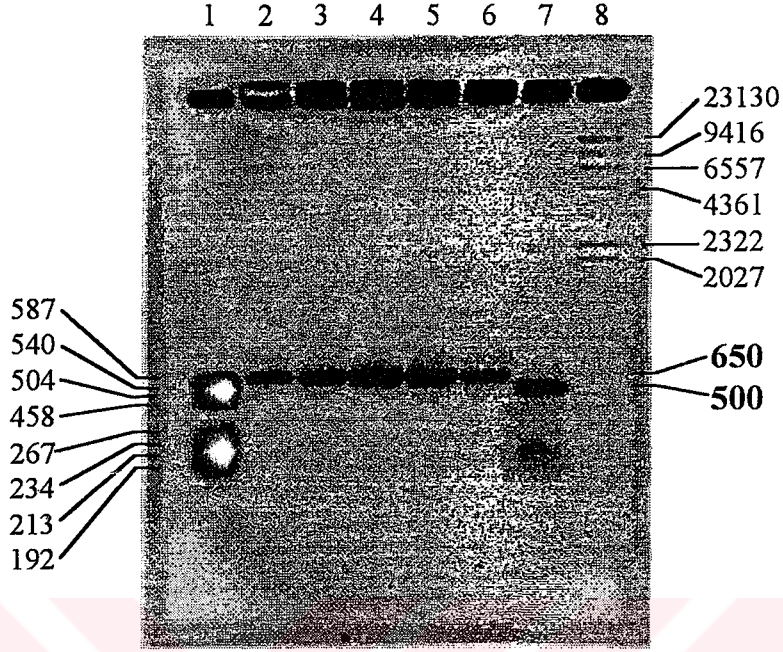
Filtre kağıtlarında bulunan örneklerin fenol/etanol metodu modifikasyonu ile saflaştırıldığı "Y" serisinin yürütüldüğü jelde markır, pozitif kontrol kitine ait bant görülmüş, "Y" serisine ait bant gözlenmemiştir.

Marker, pozitif kontrol ve her serinin 2 nolu tüplerinin yürütüldüğü jelde markırlara ait bantlar, pozitif kontrol kitine ait 500bp'de bant gözlenmiş, örneklere ait bant görülmemiştir.

2. *Leishmania* PROMASTİGOTLARI İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1 KLASİK SAFLAŞTIRMA YÖNTEMİNİN MODİFİKASYONLARININ DENENMESİ

Leishmania promastigotlarının saflaştırılmasında fenol / etanol metodunun farklı uygulamalarının karşılaştırıldığı çalışmanın sonunda 1 ve 8. sıralarda markırlara ait bantlar, 7. sırada pozitif kontrole ait 500bp'lik bant, 2-6. sıralarda örneklere ait 650bp'lik bantlar gözlenmiştir(Fotograf 1).



Fotograf 1 : *Leishmania* promastigotları ile klasik saflaştırma yönteminin modifikasyonları (1:Marker II, 2-6:örnekler, 7:pozitif kontrol, 8: Marker V)

2.1.1 KONTROL ÇALIŞMASI

Kontrol çalışmasının yapıldığı jelde markıra ait bantlar görülmüş, saflaştırılmış örneklerin bulunduğu sıralarda ve saflaştırıldıktan sonra inkübe edilen örneğin bulunduğu sıralarda bant görülememiştir.

2.2 DUYARLILIK ÇALIŞMASI

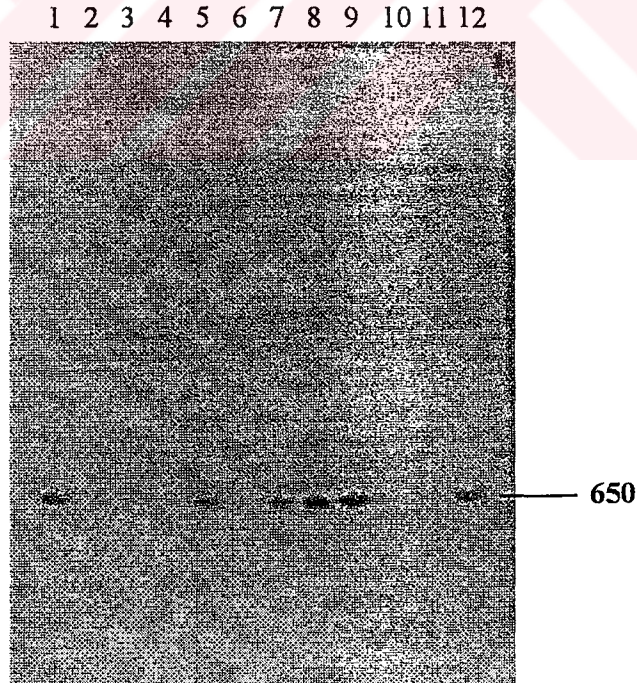
Üç farklı miktarda *Leishmania* promastigotu ile kan ve kemik iliği örneklerinin kullanıldığı duyarlılık çalışmasından sonra %1'lik ve %2'lik jellerde 500bp'lik kontrol bandı dışında bant görülememiştir.

2.2.1 SDS ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Triton-X 100 yerine SDS'in kullanıldığı saflaştırma metodunun denendiği çalışma sonunda sadece pozitif kontrole ait bant görülebilmektedir.

2.2.2 CHELEX VE FENOLLÜ EKSTRAKSİYON METODLARININ DUYARLILIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Chelex ve fenollü ekstraksiyon metodlarının karşılaştırıldığı duyarlılık çalışması sonucunda görülen bantlar fotoğraf 2'dedir. Markırlara ait 1. ve 12. çukurların kulvarlarında, Chelex metodu uygulanan tüplere ait çukurlardan sadece 10^4 promastigotun saflaştırıldığı çukurun (5. çukur) kulvarında, fenollü metodun uygulandığı tüplere ait çukurlardan 10^5 , 10^4 , 10^3 promastigotun bulunduğu tüplere ait sıralarda (7., 8., 9. sıralar) bant görünümü oluşmuştur.



Fotograf 2 : Promastigotlarla yapılan Chelex ve Fenol/Etanol yöntemlerinin duyarlılıklarının karşılaştırılması. (1, 12: Marker olarak kullanılan amplifiye promastigot DNA'sı, 2-5: Chelex ile 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 promastigot, 6: boş, 7-11: Fenol/Etanol ile 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 promastigot)

3. LİTYUM TUZLU NÜKLEOTİD SOLÜSYONLARININ KULLANILMASI

3.1 KONSANTRASYONLARIN AMPLİFİKASYONDA DENENMESİ

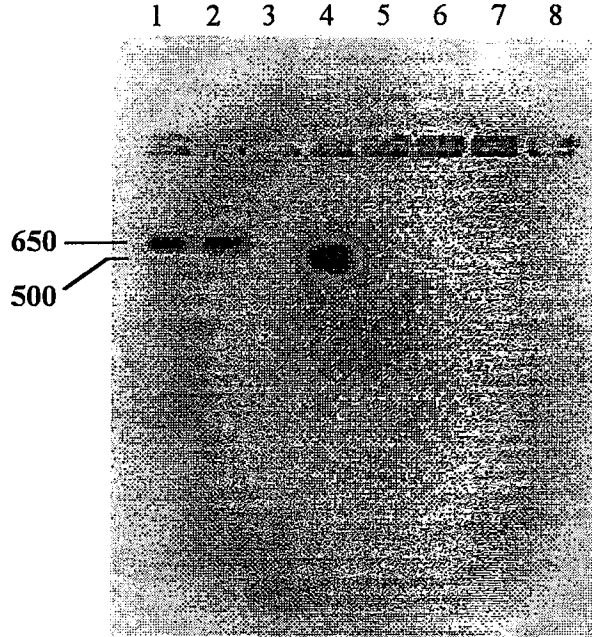
Pozitif kontrol kitinin kullanılarak dNTP konsantrasyonlarının denendiği çalışmanın sonucunda 1, 2,5, 5 ve 10µl dNTP karışımı ile amplifiye edilen örnekler jelde bant görünümü vermemiştir.

3.2 KONSANTRASYONLARIN VE BİRLEŞİMLERİN DENENMESİ

dNTP konsantrasyonlarının ve birleşimlerinin kontrol kiti ve amplifiye *Leishmania* DNA'sı ile denendiği çalışmaya ait jelde örneklere ait bant görünümü oluşmamıştır.

3.3 TİMİN'Lİ VE URACİL'Lİ dNTP'LERİN İKİ FARKLI DNA ÖRNEĞİ KULLANILARAK KARŞILAŞTIRILMASI

Timinli ve Uracilli dNTP'lerin iki farklı DNA örneği kullanılarak karşılaştırıldığı çalışmada, 1. (markır), 2. (timin/*Leishmania*), 4. (timin/plazmid) çukurlara ait kulvarlarda bant görülmüş, 3., 6. (negatif kontroller) ve 5. (uracil/plazmid) çukurlara ait bantlar görülememiştir (Fotograf 3).



Fotograf 3 : Timin ve Uracil kullanılarak iki farklı örnekle yapılan çalışma (1:Marker olarak kullanılan amplifiye promastigot DNA'sı, 2:Timin/promastigot 3:Negatif kontrol, 4:Timin/plazmid, 5:Uracil/plazmid, 6:Negatif kontrol, 7, 8:Boş)

4. MgCl₂ KONSANTRASYONLARININ DENENMESİ

4.1 AMPLİFİYE *Leishmania* DNA'SI İLE YAPILAN ÇALIŞMADA TE'NİN MgCl₂ KONSANTRASYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

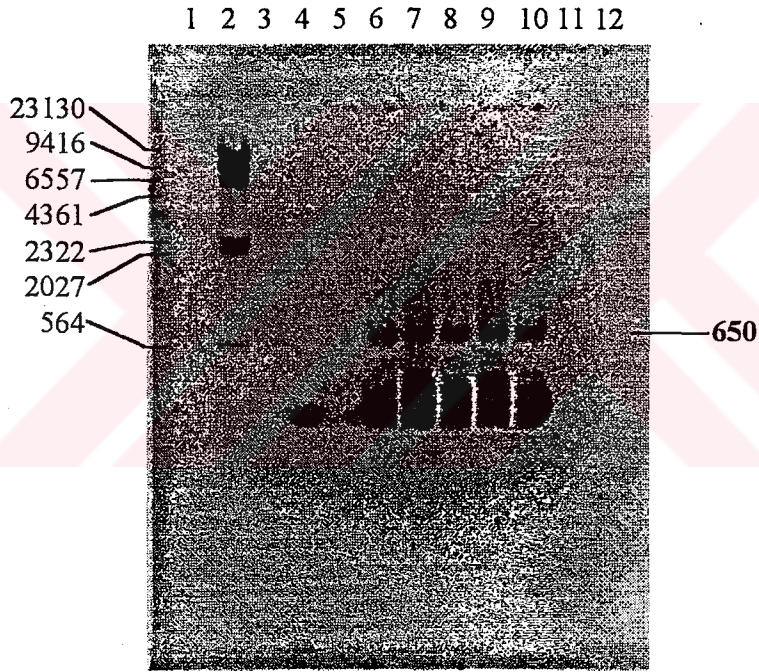
MgCl₂ konsantrasyonuna TE'nin etkisinin araştırıldığı çalışmada alınan sonuçlar tablo 18'de açıklanmıştır.

TÜPLER	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
ÖRNEK DNA	2µl DNA + 3µl TE								2µl DNA
MgCl ₂ KONS.	1mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	7mM	8mM	2,5mM
BANT GÖRÜNÜMÜ	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Tablo 18:TE ile karıştırılan örneklerde 4-8mM MgCl₂ konsantrasyonlarda pozitif sonuç alınabilirken, TE kullanılmayan örnek için 2,5mMMgCl₂ yeterli olmuştur.

4.2 CHELEX YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN ÖRNEKDE $MgCl_2$ KONSANTRASYONLARININ DENENMESİ

Chelex yöntemi ile saflaştırılan örneklerde $MgCl_2$ konsantrasyonlarının incelendiği çalışmaya ait jel fotoğraf 4'de gösterilmiştir. 2. sırada markır, 6-10. sıralarda 4-8mM $MgCl_2$ konsantrasyonu ile amplifiye edilen tüplere ait 650bp'e uyan bantlar görülmekte, 3-5. sıralarda, 1-3mM $MgCl_2$ kullanılan amplifikasyon ürünlerinin bant oluşturmadığı izlenmektedir.



Fotograf 4 : $MgCl_2$ konsantrasyonlarının denemesi. (1, 11, 12:Boş, 2:Marker II, 3-11:Sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8mM $MgCl_2$)

5. *Plasmodium yoelii* İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

5.1 CHELEX YÖNTEMİ KULLANILARAK DUYARLILIK VE MgCl₂ KONSANTRASYONLARININ İNCELENMESİ

5.1.1 % 10 PARAZİTEMİLİ ÖRNEKLERLE YAPILAN ÇALIŞMA

Chelex yöntemi ile duyarlılık ve MgCl₂ konsantrasyonlarının incelendiği %10 parazitemili filtre kağıtlarının kullanıldığı çalışmanın sonucunda, 5mM MgCl₂ konsantrasyonu ve 3 filtre kağıdı bulunan örnek ile 2,5mM MgCl₂ konsantrasyonu ve 1 filtre kağıdı bulunan örneğe ait 300bp'lik bantlar gözlenmiştir.

5.1.2 %0,04 PARAZİTEMİLİ ÖRNEKLERLE YAPILAN ÇALIŞMA

Parazitemisi %0,04 olan örneğin Chelex metodu ile saflaştırılarak 2-6mM MgCl₂ konsantrasyonlarının denendiği çalışmada bant elde edilememiştir.

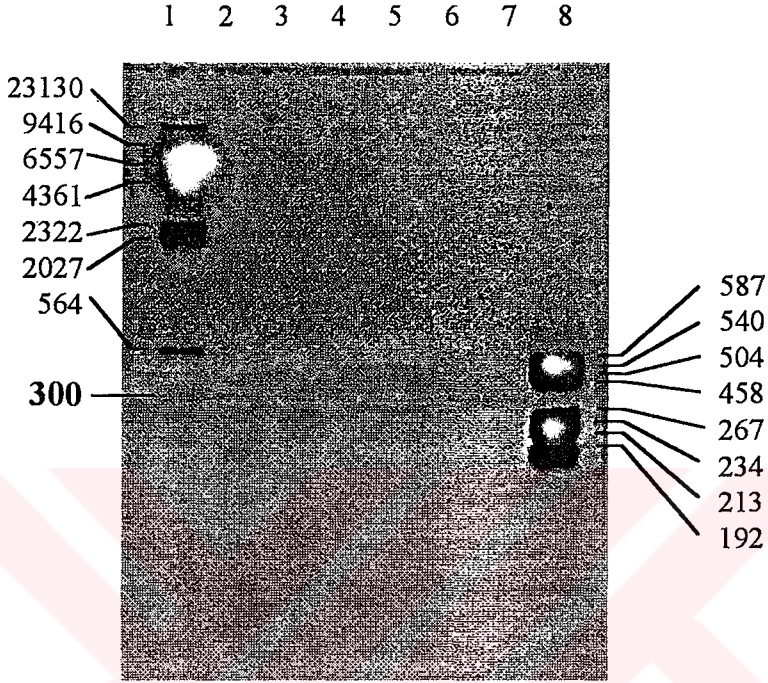
5.2 FENOL / ETANOL YÖNTEMİ İLE TE'NİN ETKİSİNİN VE DUYARLILIĞIN ARAŞTIRILMASI

TE'nin etkisinin ve duyarlılığın incelendiği çalışmada %15 parazitemili örneğin TE ile resüspanse edileni (3. tüp) 300bp seviyesinde bant görünümü oluşturmuş, distile su kullanılan ve %0,04 parazitemili örneklere ait amplifikasyon ürünleri negatif sonuç vermiştir.

5.3 FENOL / ETANOL YÖNTEMİ İLE DUYARLILIĞIN ARAŞTIRILMASI

Duyarlılığın fenol etanol yöntemi ile saflaştırılan örneklerde incelendiği çalışmanın jelinin görüntüsü fotoğraf 5'dedir. 1. ve 8. sıralarda markırlar belirgin 7. sıradan (1000 parazit

DNA'sı); 2. sıraya (100 parazit DNA'sı) doğru gittikçe zayıflayan bant görünümüleri gözlenmektedir.



Fotograf 5: Fenol / Etanol yöntemi ile duyarlılık çalışmasında *Plasmodium yoelii*'e ait bantlar. (1:Marker II, 2:1000 parazit, 3:800 parazit, 4:600 parazit, 5:400 parazit, 6:200 parazit, 7:100 parazit)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Karşılaştırmalı çalışmalar incelendiğinde çeşitli tanı yöntemlerinin halen altın standart kabul edilen direkt mikroskopik inceleme ile karşılaştırıldığı görülmekte, ancak mikroskopik incelemenin basitliği, direkt yöntem olması, morfolojinin değerlendirilmesi gibi avantajlarının yanında zahmetli oluşu, sensitivitenin parazitemi ile orantılı oluşu, morfolojileri benzeyen yapıların karıştırılması, deneyimli personel gereksinimi gibi dezavantajlarından bahsedilmektedir(53).

Malaria tanısı için direkt yöntemlerde kullanılmak üzere alınacak örneğin lam üzerine yayılması ve tespit edilmesi gerektiği bildirilirken, nükleik aside dayalı yöntemlerde kullanılacak örneklerin filtre kağıdına damlatılarak naylon poşet içinde laboratuvara ulaştırıldığı görülmektedir (4, 6, 24, 25, 32). Leishmaniosis tanısı için de aynı sorunlar geçerli olmakla birlikte özellikle tedavi ile kanda bulunan parazit sayısı azalacağından mikroskopik inceleme için kemik iliği veya dalak aspirasyonu gibi invazif yöntemlerin uygulamasının zorunluluğundan bahsedilmiştir(53). Parazit sayısının azlığından kaynaklanan hatalar çoklaştırma yöntemleri ile de önlenmeye çalışılmakta olup, malaria tanısı için bu amaçla QBC yöntemi geliştirilmiştir(27).

Mikroskopik inceleme için Giemsa boyama yöntemi ile boyanmış preparatların uygun kalitede bir mikroskopta, yetişmiş bir personel tarafından incelenmesi gerektiği belirtilirken leishmaniasis tanısında amastigotlara benzer yapılardan kaynaklanan hatalara rastlanabileceği, sıtma tanısında tür ayrımının yapılamayabileceği, ayrıca *Plasmodium* türlerine ait çeşitli varyasyonların ve *Leishmania* türlerinin mikroskopik bakı ile belirlenmesinin mümkün olmadığı bildirilmektedir(32, 53). PCR'da ise saflaştırma, amplifikasyon ve görüntüleme işlemlerini uygulayacak personelin, titiz ve dikkatli olması gerektiği üzerinde durulmuştur(47).

Kültür yöntemlerinin canlı, üreyebilen parazitleri saptama özelliğine karşılık pahalı, yavaş oluşu, örnek materyalinde yeterli parazit gerektirmesi, in vivo yöntemlerin deney hayvanları gerektirmesi ve zahmetli olduğu vurgulanmıştır(53).

Serolojik yöntemlerin basit, hızlı ve çok sayıda örnek inceleme avantajına karşılık, spesifite düşüklüğü, saptanan antikorların aktif hastalığı göstermemesi veya akut devrede antikor saptanamaması gibi olumsuzluklarından söz edilmiştir(53). Ayrıca immün yetmezlik olgularında serolojik tanı yöntemlerinin yetersiz kalacağı da bildirilmiştir(35).

Nükleik aside dayalı yöntemlerin hızlı, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip direkt yöntemler olması, farklı tür ve varyantları tanıyabilmesi, bağışık yanıt ve klinik tablodan bağımsız olması gibi avantajlarına karşılık, pahalı olması, ölü organizmaları da tanınması, kontaminasyon riskinin yüksek olması gibi dezavantajlarından söz edilmiştir. Bu yöntemlerin duyarlılıkları probe hibridizasyon yöntemlerinde örnek başına 10^4 - 10^6 kopya, probe amplifikasyon ve sinyal amplifikasyon yöntemlerinde 10^4 kopya olarak belirtilirken PCR'da 10 kopyanın altına kadar inebildiği gösterilmiştir, (Tablo 3) (32). Kullanılan amplifikasyon veya hibridizasyon yönteminin dışında duyarlılığı etkileyen önemli bir faktörün de görüntüleme yöntemi olduğu *Pl. malaria* ile yapılan bir duyarlılık çalışmasında gösterilmiş, PCR ürünlerinin doğrudan agaroz jel elektroforezi ile yürütülüp ethidium bromide ile boyanmasıyla %0,001 paraziteminin, enzim işaretli prob hibridizasyonu ile %0,0001 paraziteminin saptanabildiği bildirilmiştir(34).

Çeşitli deneysel PCR çalışmalarında duyarlılığın amplifikasyon için hedeflenen sekansa göre değiştiği belirtilmiş, *Leishmania* türleri için 16-18S rRNA geni hedeflendiğinde 10 parazitin altına inildiği, *L. donovani* ve *L. major* için tekrar eden sekans hedeflenerek yine 10 parazitin altına inildiği, *L. major* ve *L. infantum* ile kDNA hedeflenerek probe hibridizasyonu yöntemiyle 10^4 parazit duyarlılığa ulaşılabildiği bildirilmiştir(53).

Kala-azarlı hastaların kanlarıyla kDNA hedeflenerek yapılan çalışmada PCR'ın 8ml kanda bir enfekte makrofajı dahi tanıyabildiği, testin duyarlılığının ise %90 olduğu saptanmış olup, saptanamayan %10, biyolojik yanlış negatif (organlarda amastigot olmasına rağmen periferik kanda yeterli enfekte makrofaj bulunmaması) olarak değerlendirilmiştir(33).

İmmün yetmezlikli 73 hasta ile yapılan bir çalışmada, Kala-azar tanısı için, kemik iliği aspirasyon materyalinin direkt bakışı ve kültürü, dört farklı serolojik metot (IFA, CE, ELISA, WB) ile tekrarlayan sekansı hedefleyen PCR karşılaştırılmış, PCR'ın duyarlılığı

%82 iken, duyarlılık direkt bakıda ve kültürde %55, serolojik yöntemlerde %80 olarak belirtilmiş, PCR'in özgünlüğü %97 iken, direk bakının ve kültürün %100, serolojik yöntemlerin %94 olarak saptandığı bildirilmiştir(37).

L. aethiopica promastigotlarının kDNA'sını hedefleyen primerlerle yapılan duyarlılık çalışmasında PCR ürünü agaroz jel elektroforezi ile incelendiğinde, 1 promastigotun, radyoaktif işaretli hibridizasyonu ile incelendiğinde ise 0,01 promastigotun saptanabildiği gösterilmiş, parafinli biopsi materyallerinin CL tanısı için PCR ile incelenmesinde 17 ve 22 örneklik iki seride çalışılmış yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuç görülmediği belirtilmiştir. Bu çalışmada kronik CL olgularında direkt bakı ve kültür yöntemleri ile saptanamayacak kadar az parazit bulduran lezyonlardan alınan örneklerin PCR ile incelenmesiyle daha sağlıklı sonuçlar elde edileceği sonucuna varılmıştır(28).

Pl. falciparum tanısında her bir preparat için üç saate varan süre gerektiği halde Nested PCR tekniği ile günde 20 örneğin incelenabildiği, DHFR-TS genini hedefleyen primerlerle tedavinin dördüncü gününde dahi pozitif sonuç alınabildiği, bu duyarlılığın, %0,002 paraziteminin (100 parazit/ μ l) altında duyarlılığı azalan mikroskopik bakı karşısında önemli olduğu iddia edilmiştir(51).

Plasmodium türlerinin ssrRNA kodlayan gendeki değişken kısımları hedeflenerek PCR ile dört farklı *Plasmodium* türünün varlığı araştırılmış, iki farklı sağlık merkezinde incelenen ince yayma preparatlarda özellikle miks enfeksiyonların saptanamadığı, PCR ile gerek miks gerekse tek türden kaynaklanan enfeksiyonların mikroskopik bakıya oranla daha iyi tespit edilebildiği gösterilmiştir(44).

Nested PCR tekniği ile *Plasmodium*'larda tür tayini amaçlanmış, mikroskopik olarak *Pl. vivax* saptanan 37 örneğin 33'ünün PCR ile pozitif bulunduğu ve hatalı negatifler ile parazit yoğunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi olmaması üzerine sonucun, primerlerin tanıyamadığı genetik değişikliklerden, parazit yoğunluğunun örnek toplama yönteminin neden olduğu limitin altında olmasından veya her hangi bir aşamada yapılan teknik hatadan kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir(36).

Benzer bir çalışmada *Pl. falciparum* ve *Pl. vivax*'a özgün, ssrRNA'yı kodlayan geni hedefleyen enzim işaretli primerlerle elde edilen PCR ürünlerinin *Pl. vivax*'ı ve *Pl. falciparum*'u tanıyan iki prob yardımı ile hibridizasyonu gerçekleştirilmiş, sonuçlar mikroskopik bakı ile karşılaştırılarak, *Pl. falciparum* için duyarlılık %93,3 (14/15), özgünlük %100, *Pl. vivax* için duyarlılık (6/6) ve özgünlük %100 olarak duyurulmuştur(29).

Nükleik aside dayalı yöntemlerin son on yıldaki gelişimi değerlendirilerek gelecekte yaygın olarak kullanılacağı savunulmaktadır(53).

Pl. vivax ile yapılan çalışmalarda beş farklı saflaştırma yöntemi denenmiş olup, bunlardan, Wataya metodunun yetersiz kalarak inhibitör faktörleri uzaklaştıramadığı, Chelex yöntemlerinde ısıtılmış %5'lik Chelex 100'ün örnekler üzerine aktarılması sırasında konsantrasyonun veya ısının düşmesinden kaynaklanan hatalar, Snounou ve fenol / etanol yönteminde kullanılacak kristalize fenolün ancak 160°C'de doyurularak quinonlar gibi fosfodiester bağlarını koparan oksidasyon ürünlerinin uzaklaştırılmasının mümkün olduğu, bu nedenle sıvı fenolün önerildiği ve hydroxyquinoline ile β -mercaptoethanol yardımı ile oksidasyonun önlenmesine çalışıldığı belirtilmesine rağmen sıvı fenol temininde karşılaşılan sorunlar üzerine kristalize fenol kullanılmış olması, çalışmamızda beklenen sonuçlara ulaşamamasının muhtemel nedenleri olabileceğini düşündürmüştür(42). Amplifikasyonda kullanılan pozitif kontrollerin bant oluşturması üzerine *Pl. vivax*'a ait primerler dışında tüm amplifikasyon komponentlerinin çalıştığı anlaşılmış, böylece, primerlerde bir sorun olabileceği ihtimali doğmuştur.

Promastigotlarla klasik yöntemin beş farklı modifikasyonunun da başarılı olması üzerine 2. tüpten kloroform, 4. tüpten F/C/İ, 5. tüpten hem F/C/İ hem de kloroform kullanımının şart olmadığı anlaşılmış, 1. tüpten fenolün yeterli ekstraksiyon yapabildiği, 5. tüpten ise inhibisyona neden olmadığı sonucu çıkartılmıştır. Kontrol çalışması ile bant görülmemesi amplifikasyonun gerçekleştiğini göstermiştir.

Duyarlılık çalışmasında 4×10^5 promastigotla dahi sonuç alınamaması, ancak pozitif kontrolün amplifikasyonun olduğunu göstermesi üzerine saflaştırma yönteminin

optimizasyonu düşünülerek, bir önceki çalışmada kullanılan detejan yerine SDS denenmiştir. SDS kullanımı ile de başarılı sonuç alınamaması üzerine bir kaynaktan belirtilen öneri dikkate alınarak kullanılan solüsyonların asiditeleri incelenmiş ve bir çoğunun niteliklerinin değiştiği görülmüştür(3). Bu sorunun özellikle kullanılan distile sudan kaynaklandığının anlaşılması üzerine distilasyon cihazından elde edilen suyun iki kez daha damıtılması ile uygun niteliğe ulaşılabilmiş, stok solüsyonlarda ve bu solüsyonların sulandırımında, PCR’da tridistile su kullanılmıştır.

Chelex ve fenollü ekstraksiyon metodlarının karşılaştırılmasında Chelex yöntemi ile 10^4 , fenollü yöntem ile 10^3 promastigot duyarlılığına ulaşıldığı görülmüştür. Bir çalışmada *L. infantum*’un tekrarlanan kısmı hedeflendiğinden PCR’ın bir *Leishmania*’yı saptayabildiği bildirilmiş olmasına rağmen direkt kemik iliği aspirasyon materyali, kültür ve seroloji ile karşılaştırılan sonuçlarda Chelex metodu ile uygulanan PCR’ın duyarlılığı %82 olarak bildirilmiştir(37). Minicircle kDNA’yı hedefleyen primerlerle yapılan PCR’ın $8\mu\text{l}$ ’de bir enfekte makrofaji saptayabildiği belirtilirken saponin ve proteinaz K kullanılan saflaştırma metodu ile bir PCR tüpüne $1,5 \times 10^6$ mononükleer kan hücresi konularak amplifikasyon yapılmış, görüntüleme yöntemi olarak da direkt boyamadan daha duyarlı olan enzim işaretli prob metodu kullanılmış ve duyarlılık %90 olarak saptanmıştır(33). Saf genetik materyal dilüe edilerek yapılan duyarlılık çalışmaları oldukça etkileyici olmakla beraber, duyarlılık çalışmalarına saflaştırma yöntemi de dahil edildiğinde oran beklenenden düşük görülmektedir. Çalışmamız fenollü yöntemin daha duyarlı olması ile birlikte her iki yöntemin de yeterli duyarlılığa sahip olduğunu ortaya koyarken, Chelex yönteminin, sağladığı zaman ve malzeme tasarrufu açısından avantajlı olduğu değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan PCR Core Kit Plus içinde bulunan dNTP miks solüsyonunda dUTP konsantrasyonu diğer nükleotidlerin üç katı fazla olduğundan yeni hazırlanan karışımda bu oran korunmuştur. İlk yapılan çalışmada hazırlanan solüsyondan 1(dUTP $600\mu\text{M}$, diğer nükleotidlerin her biri $200\mu\text{M}$ son konsantrasyonda), 2,5, 5 ve $10\mu\text{l}$ kullanılmış, $1\mu\text{l}$ ile beklenen sonuç alınamadığından konsantrasyonların bir kez daha denenmesine karar verilmiştir. İkinci çalışmada kullanılan örneklerin ve primerlerin güvenilir olmasına rağmen çeşitli dNTP konsantrasyonları ile sonuç alınamaması sonucu

dTTP içeren farklı bir nükleotid solüsyonu ile elimizdeki solüsyon yine iki değişik örnekle çalışılmış ve sonuçlar kullandığımız nükleotidlerle reaksiyonun oluşmadığını ortaya koymuştur. Bu şartlar altında PCR'in optimizasyonunun yapılması zorunluluğu doğmuş olup daha önceki çalışmalarda siklus ısılarının çeşitli primerlerle denenmiş olması göz önünde tutularak MgCl₂ konsantrasyonunun ayarlanmasına karar verilmiştir.

MgCl₂ konsantrasyonları önce amplifiye *Leishmania* DNA'sının örnek olarak kullanıldığı çalışmada denenirken, örnek, TE ile dilüe edilerek fenollü ekstraksiyon ürününe uygun olması sağlanmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar lityum tuzlu nükleotidlerle yapılan PCR'in daha yüksek MgCl₂ konsantrasyonu gerektirdiğini göstermektedir. Ayrıca TE ile karıştırılmayan örneğin (9. tüp) 2,5mM MgCl₂ ile amplifiye olması, TE'nin varlığında MgCl₂ konsantrasyonunun artırılmasının gerektiği ve optimizasyonun kullanılan saflaştırma yöntemine göre yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Chelex yöntemi ile saflaştırılan materyal kullanılarak yapılan MgCl₂ konsantrasyonları çalışması ile alınan sonuç, amplifiye ürün kullanılan çalışma sonucu ile uyumlu olup, 3mM ve daha düşük MgCl₂ son konsantrasyonu ile PCR'in gerçekleşmediği görülmüştür.

Kullanılan nükleotid solüsyonunda dTTP bulunması halinde MgCl₂ son konsantrasyonun optimizasyonun 1,5mM'de sağlanabileceği, ancak bu değer 1-5mM arasında da değişebileceği belirtilirken, dUTP'nin kullanılmasıyla MgCl₂ ihtiyacının arttığı, dUTP konsantrasyonunda artışın da MgCl₂ konsantrasyonunun artırılmasını gerektirdiği, 1-10mM arasında olabilen MgCl₂ konsantrasyonun genellikle 2,5mM'de optimizasyonu sağladığı bildirilmiştir(1, 3). Çalışmamızda 5mM MgCl₂ ile reaksiyonun optimize olduğu ele alındığında (fotograf 4), neden olarak, hazırlanan dNTP solüsyonunda dUTP konsantrasyonunun olması gerekenden daha yüksek olabileceği, bu aksaklığın 100µl kadar düşük miktarda dNTP hazırlamak yerine pipetlemede olabilecek hatanın oranını düşürecek kadar fazla miktarda solüsyon hazırlayarak giderilebileceği değerlendirilmiştir.

Paraziteminin %0,04 olduğu örnek Chelex metodu ile saflaştırılarak MgCl₂ konsantrasyonlarının incelendiği çalışmanın sonucunda hiçbir konsantrasyonda bant

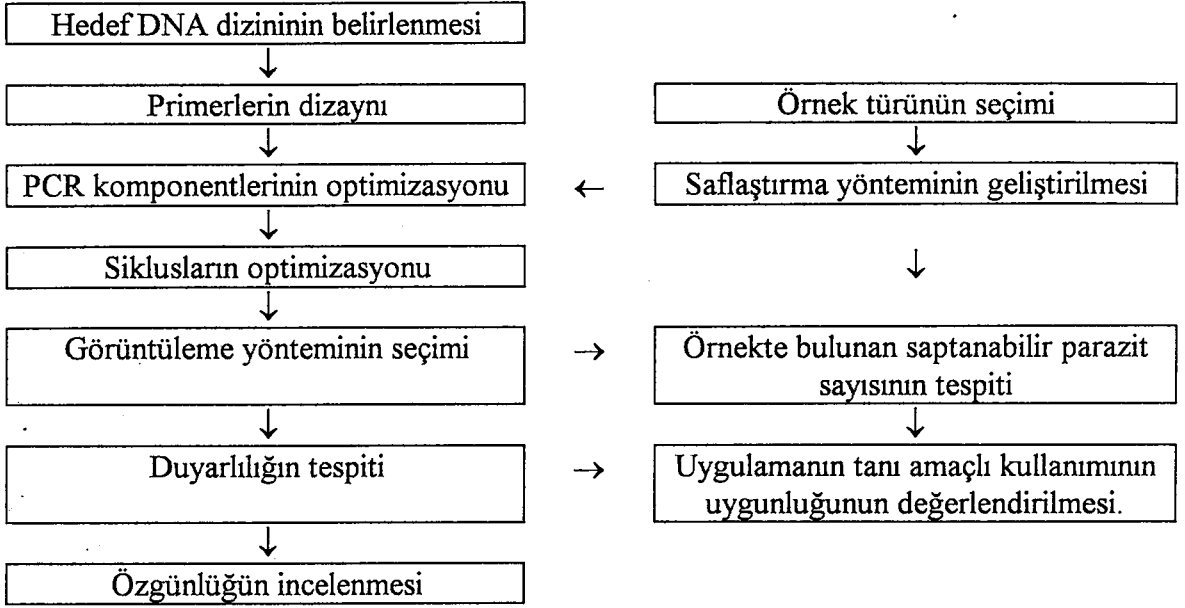
görülememesi, Chelex metodu kullanıldığında duyarlılığın %0,04'e ulaşamadığını göstermektedir.

Fenollü ekstraksiyon sonunda pelletin resüspansiyonu için TE ve distile su kullanılarak sonuca etkileri incelendiğinde, %0,04 parazitemili örneğin Chelex'e göre daha etkili olan fenollü yöntemle saflaştırılarak kullanılmasına rağmen bant oluşmaması duyarlılığın yetersiz kaldığını düşündürmüştü, %15 parazitemili örneğin sadece TE kullanıldığında bant görünmesi ise amplifikasyon için sağlanan optimizasyonun uygulanan saflaştırma metodundan bağımsız olmadığını göstermiştir.

Son yapılan duyarlılık çalışmasında 1cm çapında filtre kağıdı kullanıldığından pelletin resüspansiyonu 100µl TE ile yapılarak filtre kağıdının MgCl₂ konsantrasyonuna etkisi kompanse edilmiştir. Bu bölümde farklı bir uygulama yapılarak ethidium bromide jelin içine eklenmiş ve amplifikasyon ürünlerinin elektroforez anında boyanması sağlanmıştır. Minijel tablasının ultraviyole ışınlarına geçirgen olması nedeniyle elektroforezin yarıda kesilerek jelin tablası ile birlikte transluminatöre alınarak gerek markırların gerekse amplifikasyon ürünlerinin konumlarının incelenmesine, gerekirse elektroforeze devam edilmesine fırsat tanıyan bu boyama yöntemi, ayrıca boyama aşaması gerektirmemesi nedeni ile zaman tasarrufu sağlarken, ileri derecede kanserojen olduğu bildirilen ethidium bromide'in elektroforez tertibatını da kontamine etmesi gibi bir sakıncası bulunmaktadır.

Duyarlılık çalışmasının 100 parazitin fenollü ekstraksiyon yöntemi ile saptayabileceğini gösteren fotoğraf 6'da jelin bir bölümünde görülen beyazlık ethidium bromide olup, elektroforez anında boyanın hareketinden bahseden yayınlarla uyumludur(42).

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda sadece *L. infantum* promastigotlar ve *Pl. yoelii* ile PCR gerçekleştirilebilmiş, *Pl. vivax* ile başarılı olunamamıştır. Amplifikasyonu yapılabilen türlerle ulaşılan duyarlılık çeşitli yayınlarda bildirilen göz kamaştırıcı sonuçlara göre oldukça düşük olmakla birlikte, çalışmamızda ulaşılan değerler sadece PCR'a ait olmayıp, PCR'dan bağımsız kabul edilmemesi gereken saflaştırma ve görüntüleme yöntemlerini de kapsamaktadır. Bu değerlendirmeye uygun olarak, yeni bir PCR çalışması geliştirilirken takip edilmesi gereken aşamaları gösteren şema şekil 7'de sunulmuştur(53).



Şekil 7: Bir nükleik asidi hedefleyen PCR geliştirilmeye karar verildiğinde izlenmesi önerilen prosedür şeması.

PCR'in çalışmasına etki eden faktörlerin incelenerek iki farklı parazit ile sınırlı bir duyarlılığa ulaşılabilen çalışmalarımızda, şekil 7'de hedeflenen tanı amaçlı kullanımın uygunluğu ve özgünlük çalışması kapsam dışı bırakılarak duyarlılığın geliştirilmesi hedeflendiyse de, ulaşılan sonuçlar, saflaştırma yönteminin her bir parazit türü ve inceleme materyaline göre geliştirilerek, PCR'in da bu örnekler için optimizasyonu ile, duyarlılığın tanı amaçlı çalışmalar için yeterli seviyeye ulaşabileceği değerlendirilmektedir.

ÖZET

Genetik moleküler yöntemlerin yüksek duyarlılıklarından kaynaklanan güçleri, bu yöntemlerin yaygın olarak kullanılmasına ve sürekli geliştirilmesine neden olmuştur.

Nükleik aside dayalı tanı metodlarından yaygın olarak kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında uygulanması amaçlanmıştır.

Pl. vivax, *Pl. yoelii* ve *L. infantum* parazitleri kullanılarak PCR için uygun saflaştırma yöntemlerinin, optimum amplifikasyon şartlarının ve görüntüleme yöntemlerinin laboratuvarımız koşullarına uyarlanmasına çalışılmış, farklı yöntemlerin birbirlerine olan üstünlükleri değerlendirilmiştir.

Pl. yoelii ve *L. infantum* kullanılarak yapılan çalışmalarda örnek başına 100 paraziti saptayabilecek duyarlılığa erişilmiş, her bir parazit için, örneğin alınış şekline uygun saflaştırma yönteminin, amplifikasyon için en uygun koşulların ayrı ayrı belirlenmesiyle daha duyarlı sonuçlara ulaşabileceği değerlendirilmiştir.

SUMMARY

Genetic molecular technologies has been widely accepted and developed, because of their high sensitivity.

This study aimed to establish the necessary conditions for Polymerase Chain Reaction (PCR), the widely used. Nucleic acid-based diagnostic procedure, in Ege University Medical Faculty Parasitology Department laboratories.

Pl. vivax, *Pl. yoelii* and *L. infantum* parasites were used to determine the DNA extraction, optimal amplification conditions and visualization procedures.

The sensitivity of 100 parasites per specimen was obtained for *Pl. yoelii* and *L. infantum*. It's concluded that, DNA purification and amplification procedures must be considered individually for each parasite to determine the most sensitive method.

KAYNAKLAR

1. -, (-) PCR Core Kit Plus broşürü. Boehringer Mannheim GmbH Germany.
2. -, (1991) Perkin Elmer Cetus, Gene Amp PCR Reagent Kit with *AmpliTaq* DNA Polymerase broşürü. Norwalk, USA.
3. -, (1995) PCR Applications Manual. Boehringer Mannheim GmbH Germany.
4. Alkan M Z, Hedstrom R, Özcel M A, Hoffman S L. (1994) Kurutulmuş Kan Örneklerinde *Plasmodium yoelii*'nin Polymerase Chain Reactin (PCR) ile Araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi 18:386-390.
5. Alkan M Z, Jones T R, Özbilgin A, Özbel Y, Ak M, Turgay N, Özcel M A, Hoffman S L. (1995) Detection of Polymorphism in the Circumsporozoite (CS) protein of *Plasmodium vivax* in Turkey. Türkiye Parazitoloji Dergisi 19 (2):386-390.
6. Ash L D, Orihel T C. (1987) Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. American Society of Clinical Pathologists, Chicago.
7. Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K. (1992) Short Protocols In Molecular Biology. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons. New York.
8. Barany F. (1991). Genetic Disease Detection and DNA Amplification Using Cloned Thermostable Ligase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 : 189-193.
9. Barker R H, Banchongaksorn T, Courval J M, Suwonkerd W, Rimwungtragoon K, Wirth D F. (1992). A Simple method to Detect *Plasmodium falciparum* Directly from Blood Samples Using the Polymerase Chain Reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46 (4) : 416-426.

10. Brinn N T. (1983) Rapid Metallic Histological Staining Using the Microwave Oven. *J. Histo-technol.* 6 : 125-129.
11. Compton J. (1991). Nucleic Acid Sequence-based Amplification. *Nature* 350 : 90-91.
12. Çetin E T, Anđ Ö, Töreci K. (1973) *Tıbbi Parazitoloji*. Hilal Matbaacılık Koll. Şti. Istanbul.
13. D'Aquila R T, Bechtel L J, Videler J A, Eron J J, Gorczyca P, Kaplan J C. (1991) Maximizing Sensitivity and Specificity of PCR by Preamplification Heating. *Nucleic Acids Research.* 19:3749.
14. Dennis D T, Kean B H. (1971) Isolation of Microfilariae: Report of a New Method. *J. Parasitol.* 57 : 1146-1147.
15. Erlich H A, Grifand D, Sninsky J J. (1991) Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* 252: 1643-1651.
16. Fahrlander P D, Klausner A. (1988). Amplifying DNA Probe Signals: A "Christmas Tree" Approach. *Bio/Technology* 6 : 1165-1168.
17. Garcia L S, Bruckner D A. (1993) *Diagnostic Medical Parasitology*. Second Ed. American Society for Microbiology Washington.
18. Gomori G. (1950) A Rapid One-step Trichrome Stain. *Am. J. Clin. Pathol.* 20 : 661-663.
19. Graham J F. (1941). A Device for the Diagnosis of Entebius infection. *Am. J. Trop. Med.* 21 : 159-161.

20. Greenwood B M, Armstrong J R M. (1991) Comparison of Two Simple Methods for Determining Malaria Parasite Density. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 85: 186-188.
21. Henriksen S A, Pohlenz J F L. (1981) Staining of Cryptosporidia by a Modified Ziehl-Neelsen Technique. Acta Vet. Scand. 22 : 594-596.
22. Hung T, Mak K, Fong K. (1990) A Specificity Enhancer for Polymerase Chain Reaction. Nucleic Acids Research. 18:4953.
23. Hunsaker W R, Badri H, Lombardo M, Collins M R. (1989) Nucleic Acid Hybridization Assays Employing dA-Tailed Capture Probes. Analytical Biochemistry. 181 : 360-370.
24. Kain K C, Brown A E, Lanar D E, Ballou W R, Webster H K. (1993). Response of *Plasmodium vivax* Variants to Chloroquine As Determined by Microscopy and Quantitative Polymerase Chain Reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49 (4) : 478-484.
25. Kain K C, Wirtz R A, Fernandez I, Franke E D, Rodriguez M H, Lanar D E. (1992). Serologic and Genetic Characterization of *Plasmodium vivax* from Whole Blood-Impregnated Filter Paper Discs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46 (4) : 473-479.
26. Kwok S, Higuichi R. (1989) Avoiding False Positives with PCR. Nature 339:237-238.
27. La Fuente C, Saucedo E, Urjel R. (1984) The Use of Microhaematocrit tubes for the Rapid Diagnosis of Chagas' Disease and Malaria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 78 : 278-279.
28. Laskay T, Miko T L, Negesse Y, Solbach W, Röllinghoff M, Frommel D. (1995). Detection of cutaneous Leishmania infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 89 : 273-275.

Aspiration, Myeloculture, and Serology for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Immunocompromised Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 3 : 746-749.

38. Piatak M Jr., Luk K, Williams B, Lifson J, D. (1993) Quantitative Competitive Polymerase Chain Reaction for Accurate Quantitation of HIV DNA and RNA Species. *BioTechniques* 14: 70-81.
39. Rogers W O, Rogers M D, Hedstrom R C, Hoffman S L. (1992). Characterization of the gene encoding sporozoite surface protein 2, a protective *Plasmodium yoelii* sporozoite antigen. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 53 : 45-52.
40. Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I. (1992) PCR: Clinical Diagnostics and Research. Springer-Verlag Berlin.
41. Rychlik W, Spencer W J, Rhoads R E. (1990) Optimization of the Annealing Temperature for DNA Amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Research*. 18:6409-6412.
42. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning*. Second Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
43. Sandalcı A. (-) *Tamda Yenilikler I. Diagno Tibbi Cihaz ve Mlz. San. ve Tic. Aş. Istanbul*.
44. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown K N. (1993). Identification of the human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 58 : 283-292.
45. Southern E M. (1975). Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Elektrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 : 503-517.

46. Tompkins V N, Miller J K. (1947) Staining Intestinal Protozoa With Iron-hematoxylin-phosphotungstic Acid. *Am. J. Clin. Pathol.* 17 : 755-758.
47. Türkoğlu S, Badur S. (1995). İnfeksiyon Hastalıkları Tanısında PCR. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:22 Tayf Ofset Istanbul.
48. Unat E K, Yücel A, Altaş K, Samastı M. (1991) Unat'ın Tıp Parazitolojisi İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları. Istanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları.
49. Voller A, Barlett A, Bidwell D E. (1978) Enzyme Immunoassays with Special Reference to ELISA Techniques. *J. Clin. Pathol.* 31 : 507-520.
50. Walker J, Conner G, Ho J, Hunt C, Peckering L. (1989) Giemsa Staining for Cysts and Trophozoites of *Pneumocystis carinii*. *J. Clin. Pathol.* 42 : 432-434.
51. Wataya Y, Arai M, Kubochi F, Mizukoshi C, Kakutani T, Ohta N, Ishii A. (1993). DNA diagnosis of falciparum malaria using a double PCR technique: a field trial in the Solomon Islands. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 58 : 165 - 168.
52. Watson J D, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. (1992) Recombinant DNA (Second Ed.) W. H. Freeman and Company. New York.
53. Weiss J B. (1995). DNA Probes and PCR for Diagnosis of Parasitic Infections. *Clinical Microbiology Reviews.* Jan. : 113-130.
54. Wetmur J G. (1991) DNA Probes: Applications of the Principles of Nucleic Acid Hybridization. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 26: 227-259.
55. Wheatley W. (1951) A Rapid Staining Procedure for Intestinal Amoebae and Flagellates. *Am. J. Clin. Pathol.* 21 : 990-991.

ÖZGEÇMİŞ

1961 yılında Ankara'da doğdum. İlk ve orta öğrenimi Ankara'da liseyi İstanbul Kuleli Askeri Lisesi'nde tamamladım. 1978 yılında İstanbul Tıp Fakültesi'nde başladığım yüksek öğrenimi 1985 yılında GATA Askeri Tıp Fakültesinde bitirdim.

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde, İstanbul ve Kars'da görev yaptım. Halen son atandığım Ankara'da muvazzaf doktor olarak görevimi sürdürmekteyim.

Evliyim ve bir çocuğum var.

