

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



PCR İLE GSBL POZİTİF *Klebsiella pneumonia*
MİKROORGANİZMASININ TANISI

Güliden NASUHBEYOĞLU

Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Prof. Dr. İsa GÖKÇE
2010
Her hakkı saklıdır

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PCR İLE GSBL POZİTİF *Klebsiella pneumonia*
MİKROORGANİZMASININ TANISI

Gülden NASUHBEOĞLU

TOKAT
2010

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. İsa GÖKÇE danışmanlığında, Gülden NASUHBEYOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 01/07/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

İmza:

Üye :

İmza:

Üye :

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Metin YILDIRIM
Enstitü Müdürü

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Gülden NASUHBEOĞLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PCR İLE GSBL POZİTİF *Klebsiella pneumonia* MİKROORGANİZMASININ TANISI

Gülden NASUHBEOĞLU

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

PCR bir çeşit *in vitro* replikasyondur ve bu yüzden geniş uygulama alanı olan bu teknik Moleküler biyoloji alanında önemli yer tutar. PCR özellikle diğer moleküler metotlardan farklı olarak taşıdığı yüksek potansiyel nedeniyle kullanımı daha yaygındır. PCR gibi Moleküler yöntemler genellikle mikroskopi ile görülmesi, kültürde üretilmesi uzun zaman alan zor veya olanaksız mikroorganizmaların saptanmasında kullanıldığından yapılan bu çalışmada geleneksel yöntemlerle laboratuvar tanısı zaman alıcı ve zahmetli olan Geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) pozitif *Klebsiella pneumonia* mikroorganizmalarının çeşitli biyolojik sıvılardan tanısını yaparken PCR tekniği kullanıldı. Çalışmanın amacı, insanlarda hastalığa sebep olan GSBL pozitif mikroorganizmaları tanımlamak için, PCR metodunun etkinliğinden, güvenilirliğinden ve veriminden yararlanılarak uygulanacak tedavinin belirlenebilmesine ışık tutmaktır.

2010, 51 sayfa

Anahtar kelimeler: Polimeraz zincir reaksiyonu, GSBL, *Klebsiella*, Biyolojik sıvılar.

ABSTRACT

Master Thesis

IDENTIFICATION OF ESBL POZİTİVE *Klebsiella pneumonia* MICROORGANISMS USING PCR

Gülden NASUHBEOĞLU

Gaziosmanpaşa University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

PCR is a kind of in vitro replication and therefore it has a very wide application and also it is a very important method in molecular biology. PCR is a more common method than the other molecular methods because it carries especially a very high potential. Molecular methods such as PCR generally used to detect the micro organisms that can not be seen easily with microscope and that also require long time to grow in culture. Therefore, in this study Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) positive *Klebsiella pneumonia* micro organisms were taken from a variety of biological liquids and cultured in the medium. ESBL positive *Klebsiella pneumonia* micro organism was diagnosed by PCR directly without DNA purification. As a result, PCR was used for detection of these definite ESBL positive micro organisms that cause a lot of human diseases at a very short time.

2010, 51 page

Anahtar Kelimeler: Polimerase chain reaction, ESBL, *Klebsiella*, Biological materials.

TEŞEKKÜR

Çalıőmam süresince bilgi ve tecrübesiyle bana rehberlik eden saygıdeğer hocam Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye ve Doc. Dr. Mahfuz ELMASTAŐ'a, deneysel çalıőmalarım süresince laboratuvarlarını bana açan sayın Doç. Dr. Őaban TEKİN ve grubuna, Sayın İskender PARMAKSIZ'a, Arő. Gör. Sema BİLGİN'e, Ergül MUTLU ALTUNDAĞ'a vede Osman Gazi Üniversitesi Mikrobiyoloji Bölümü Arő. Gör. Dr. Emrah AYDIN'a, her zaman her konuda yanımda olan benden maddi manevi desteğini esirgemeyen sevgili aileme vede kuzenim Yard. Doc. Dr. Sezer ŐAHİN'e desteklerinden dolayı sonsuz teőekkürler.

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

G	Gram
L	Litre
M	Molar
°	Derece
°C	Santigrat Derece
S	Saniye

Açıklamalar

Kısaltmalar

µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
Ark.	Arkadaşları
AT	Adenin Timin
Bç	Baz Çifti
C	Sitozin
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
Cdna	Komplementer DNA
Datp	Deoksiadenozin trifosfat
ddH ₂ O	Deiyonize destile su (ultra saf su)
Dgtp	Deoksiguanozin trifosfat
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleosid Trifosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Açıklama

ESBL	Extended spectrum beta lactamase
G	Guanin
GC	Guanin Sitozin
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
HCl	Hidroklorik Asit
KCl	Potasyum Klorür
LB Agar	Luria Bertani agar
mA	Miliamper
Mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
Min	Minumum
mL	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
Nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
<i>K.pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribonükleik asit
Rpm	Rotation Per Minute
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TAE	Tris-Asetat EDTA
TE	Tris-EDTA
Tm	Erime sıcaklığı (melting temperature)
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>K. pneumonia</i> mikroorganizmasının elektron mikroskopisinden alınan fotoğrafı.....	8
Şekil 2.2. <i>Klebsiella pneumonia</i> 'nın yetiştirildiği besi ortamı.....	8
Şekil 2.3. <i>Klebsiella pneumonia</i> Bakterisi.....	9
Şekil 2.4. DNA'nın Replikasyonu	12
Şekil 2.5. Primerlerin Kalıp DNA'ya bağlanması.....	13
Şekil 2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	21
Şekil 4.1. GSBL Pozitif <i>Klebsiella pneumoniae</i> genomik DNA'sı kullanılarak yapılan Touch Down PCR ürünlerinin %1'lik agoroz jel elektrofotezi sonrası UV Transilüminatörde eldedilen görüntüsü.	39
Şekil 4.2. GSBL Pozitif <i>Klebsiella pneumoniae</i> DNA'sı kullanılarak yapılan Touch Down PCR ürünlerinin %1'lik agoroz jel elektrofotezi sonrası UV Transilüminatörden eldedilen görüntüsü	41
Şekil 4.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> nin serumdan direk tanısı için yapılan Touch Down PCR ürünlerinin agoroz jel elektroforezi sonrası UV Trans-illüminatörden elde edilen görüntüsü.....	42
Şekil 4.4. GSBL Pozitif <i>Klebsiella pneumoniae</i> DNA'sı kullanılarak yapılan Multiplex PCR ürünlerinin %1'lik agoroz jel elektrofotezi sonrası UV Transilüminatörden eldedilen görüntüsü.	45

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Termostabil DNA polimerazlar ve kaynakları.....	16
Tablo 2.2. PCR’da sıklıkla kullanılan DNA polimerazların özellikleri.....	16
Tablo 3.1. <i>Klebsiella pneumonia</i> için spesifik olan primer dizileri.....	33

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLERDİZİNİ.....	vi
TABLOLARDİZİNİ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ivi
1.GİRİŞ	1
2.KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL).....	4
2.1.1. <i>SHV</i> Grubu GSBL' ler.....	4
2.1.2. <i>TEM</i> Grubu GSBL' ler.....	5
2.1.3. <i>VEB</i> Grubu GSBL' ler.....	5
2.1.4. <i>CTX</i> Grubu GSBL' ler.....	5
2.2. <i>GSBL</i> Tanı Yöntemleri.....	6
2.3. <i>Klebsiella pneumonia</i> Mikroorganizması.....	6
2.3. 1. <i>Klebsiella pneumonia</i> Mikroorganizmasının Özellikleri.....	7
2.3. 2. <i>Klebsiella pneumonia</i> Mikroorganizmasının Laboratuvar Tanısı.....	8
2.3.3. <i>Klebsiella pneumonia</i> 'nın Sebep Olduğu Hastalıklar.....	9
2. 4. Tanısal Uygulamalar.....	9
2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	10
2.5.1. PCR'da DNA replikasyonu.....	12
2.6. PCR'ın Temel Bileşenleri.....	13
2.6.1. Kalıp DNA.....	13
2.6.2. Polimerazlar.....	14
2.6.3. Primerler.....	16
2.6.4. dNTP.....	17
2.6.5. Tamponlar ve MgCl ₂	17
2.7. PCR Engelleyicileri (İnhibitörleri) ve Artırıcıları.....	18
2.8. PCR'ın İşleyişi.....	19
2.9. PCR Ürünlerinin Belirlenmesi ve Analizi.....	21
2.10. PCR Optimizasyonu ve PCR ile Doğru Ürünün Çoğaltılması.....	23
2.10.1. Magnezyum İyonları.....	23
2.10.2. Taq DNA polimeraz konsantrasyonu.....	24
2.10.3. Sıcaklıklar.....	24
2.10.4. Touchdown PCR.....	25
2.10.5. Multiplex PCR.....	26
2.10.6. PCR katkı maddeleri.....	26
3.METARYAL ve YÖNTEM	28
3.1. Materyal.....	28
3.1.1 Kullanılan Malzemeler ve Kimyasal Maddeler.....	28
3.1.2. Cihazlar.....	28
3.1.3. Çözeltilerin Hazırlanışı.....	29
3.1.3.1. 6X Bromophenol Blue.....	29
3.1.3.2. 0,5 M EDTA Çözeltisi.....	29
3.1.3.3.EMB/ Kanlı agar.....	29

3.1.3.4. Etidium Bromür.....	30
3.1.3.5. 25 mM'lık dNTP Mixin Hazırlanışı.....	30
3.1.3.6. FSB (Frozen Storage Buffer).....	30
3.1.3.7. LB ve LB Agar.....	30
3.1.3.8. TE (10 Mm Tris, 1Mm EDTA)Tamponu.....	31
3.1.3.9. 50x Tris Asetat EDTA (TAE) Tamponu.....	31
3.1.3.10.1X Tris Asetat EDTA (TAE) Tamponu.....	31
3.1.3.11. Xylene Cyanol.....	31
3.1.3.12. Primerlerin Hazırlanışı.....	32
3.1.3.13. Kalıp DNA'nın Hazırlanışı	33
3.2. Yöntem.....	33
3.2.1. Bakteri kültürü	33
3.2.2. Kalıp DNA'nın Üretimi ve İzolasyonu.....	34
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonları.....	34
3.2.3.1. Thermal Cycler' ın Program Ayarı.....	34
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	35
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	38
4.1. BULGULAR.....	38
4.2. TARTIŞMA.....	44
5.SONUÇ.....	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	51

1. GİRİŞ

Klinik araştırmalarda başı çeken konular, daha önce bilinmeyen enfeksiyon hastalıklarının ortaya çıkması veya daha önceden tanımlanan enfeksiyon hastalıklarının insanlarda tekrardan tanımlanmasıyla beraber toplumun sağlığını olumsuz yönde etkilenebileceğinin düşünülmesi ile başlar. Bakterilerin tanımlanmaları genellikle kültür ortamlarında retilmeleriyle yapılmaktadır. Kültür ortamlarında çoğalan bakterilerin koloni morfolojileri ve biyokimyasal özellikleri gibi fenotipik karakterleri bakterilerin belirli bir tür veya cins düzeyinde tanısını yapabilmektedir yalnız patojen bakteri kültür ortamında üretilmemesi ya da üretilmesinde zorlanma, patojen mikroorganizmaların kültüre dayatılmasının uzun zaman alması tedavi sürecini olumsuz yönde etkilemesi, bir organizmaya ait bazı fenotipik karakterlerin laboratuvar koşullarına bağlı olarak değişebilmesi ya da belirli bir fenotipik karakterin birçok değişken gen tarafından oluşturulması vede genetik olarak farklı organizmalar tek bir mikroorganizma olarak tanımlanabilmesi çalışmaları olumsuz yönde etkilemektedir (Relman ve Persing, 1996). Fenotipik tanıda ortaya çıkan bu sorunlar insanları daha güvenilir bir yöntem olan PCR'ı ve daha birçok moleküler yöntemi mikrobiyolojide kullanmaya sevk etmiştir.

PCR teknolojisinin bakteriyolojide yaygın olarak kullanıldığı alanlar şunlardır:

- Antimikrobiyal direncin saptanması
- Antibiyotik almış olan hastalarda veya stoklanmış örneklerde tanı koyma
- Bakterilerin toksinojik suşlarının ayırt edilmesinde
- Bulaşıcı özelliği fazla olan patojenlerin araştırılması
- İnvaziv olmayan metotlar kullanılarak erken tanı koymada
- PCR'ın tiplendirmede kullanılması
- Tanıda süreyi kısaltmak ve kültürü yapılamayan bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonları tanımlamak.

Hastalık yapan mikroorganizmaları çabucak belirlenmek oldukça zordur (Morshed ve ark., 2007). Ayrıca mikroorganizmaların tanımlanması için hızlı ve güvenilir yöntemlere gereksinim duyulmuştur (Palomares ve ark., 2003). Hızlı ve güvenilir yöntemlerin başında moleküler metotlar gelmektedir. Moleküler metotlar, bulaşıcı mikroorganizmaların tanımlanması ve belirlenmesi için kullanılır. Klinik laboratuvarlarda kullanılan en güvenilir moleküler tanı yöntemlerinden biri PCR' dır (Morshed ve ark., 2007). Geleneksel teşhis metotları başlama materyalinin miktarından dolayı yanlış sonuçlar verebilir. İlk moleküler metotlar klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan polimeraz zincir reaksiyonlarıdır (Buckingham ve Flaws, 2007). Mikroorganizmaların hızlı ve spesifik belirlenmesi için tanı laboratuvarlarında PCR'ın kullanımı çok önemlidir ve geniş kullanım alanı bulmaktadır (Cremonesi ve ark., 2005). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro (tüp içinde) bir yöntemdir. Geniş uygulama alanı olan PCR'da metot basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır. Moleküler biyoloji alanında önemli yer tutan PCR 1980'li yılların ortalarında geliştirilmesinin ardından temel moleküler biyolojik araştırmalarında (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalanması gibi) ve birçok hastalığın (ortak hücre analizi, kistik fibröz, 'fragile X sendromu, AIDS, lösemi vs.) DNA temeline dayalı tanısı ile insan genomik DNA'sı gibi kompleks DNA kalıplarından spesifik DNA parçalarının sentezi birkaç saat içinde gerçekleştirilebilir yani PCR ile istenilen genlerin yada DNA dizilerinin jenerasyonlara bağlı replikasyonu hızlandırılmış bir şekilde gerçekleştirilebildiğinden bu teknolojinin oldukça yaygınlaşmıştır. PCR, DNA'nın istenilen bir dizisini çoğaltmada duyarlı, seçici ve son derece hızlı bir yol sağlar.

PCR'ın Kullanım Alanları

- Adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde;
- Allelik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde;
- Arkeolojik örnekler kullanılarak evrimin incelenmesi alanlarında;

- DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında; Doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde;
- Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısında;
- Klinik örneklerde patojen organizmaların saptanmasında;
- Orak hücre anemisi, AIDS, lösemi vb. birçok hastalığın DNA ve RNA temeline dayalı tanısı için klinik tıpta;
- Probe'ların oluşturulmasında / klonlamada / gen ekspresyon araştırmalarında;
- Tarımda tohum saflığının belirlenmesinde kullanılabilir.

PCR metodunun duyarlılığı bulaşıcı bakteri hücrelerinin sayısının çok düşük olabildiği yerlerde, özellikle de klinik örneklerde, materyallerin çoğu türünde bakteriyel ürünleri veya bakterinin düşük konsantrasyonlarının doğrudan bulunmasını sağlar. Bu yüzden patojenlerin moleküler izlenmesi, klinik ve epidemiyolojik önemi, organizmaların bulunması ve belirlenmesi için hızlı ve güvenilir bir metot olan PCR'a gereksinim duyulmaktadır. Klasik yöntemlerle mikroorganizmaların tanıları tam standardize edilememiş olmaları, bazılarının duyarlılığının düşük olması, bazılarının da pahalı ya da uygulanması zor yöntemler olması nedeniyle, kişileri mikroorganizmaları tanımlamak için daha kolay, ucuz, güvenilir ve standart bir yöntem arayışına itmiştir (Livermore 1995). Son zamanlarda PCR'la daha hızlı ve güvenilir sonuçların elde edilmesiyle ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Biz de çalışmamızda Geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) pozitif mikroorganizmaları tanımlamak için moleküler biyolojide ve genetikte oldukça fazla kullanılan çok hassas PCR tekniğinden yararlanılarak GSBL pozitif mikroorganizmaların daha hızlı, güvenilir ve düşük bir maliyetle teşhis edilerek tedavi sürecini olumlu yönde etkileyebilmektedir. Bu nedenle biz de bu çalışmamızda in vitro koşullarda güvenilir ve hızlı sonuçlar veren PCR tekniğini kullanarak insanlarda hastalıklara sebep olan, klasik yöntemlerle tanısı zaman alıcı ve zahmetli olan GSBL pozitif *klebsiella* mikroorganizmalarının biyolojik materyallerden hızlı, güvenilir ve daha düşük bir maliyetle belirlenmesi sağlayarak tedavi sürecine olumlu ivme kazandırmayı amaçlıyoruz.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL)

Betalaktamaz enzimi üreten Gram-negatif bakterilerin, penisilinleri ve birinci kuşak sefalosporinleri aktif bir biçimde parçaladıkları halde sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi geniş spektrumlu beta-laktam ajanlara etkisi yetersizdir. Fakat 1980'li yıllardan başlayarak geniş spektrumlu beta-laktam ajanların kliniklerde yaygın kullanımları sonucunda, bu ana enzimleri kodlayan genlerdeki nokta mutasyonlarına bağlı yeni enzimler türemiştir. Bu enzimler "genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) olarak adlandırılmaktadır (Delialioğlu ve ark., 2005).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar geniş spektrumlu penisilinazların türevleridir ve çoğu TEM ya da SHV enzimlerinden köken almaktadır. Fakat son zamanlarda amino asit dizileme çalışmaları sonucunda GSBL dokuz farklı yapısal ya da gelişimsel grup içinde araştırılmaktadır. Bunlar *TEM*, *SHV*, *CTX-M*, *OXA*, *PER*, *VEB*, *GES*, *TLA* ve *BES* aileleridir. Bunlarda kendi içinde alt tiplere ayrılmaktadır. Örneğin; yaklaşık 90'ın üzerinde *TEM*-tipi ve 25'in üzerinde *SHV*-tipi beta-laktamaz enzimi bulunmaktadır (Dolapçı, 2005).

Özellikle *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli* başta olmak üzere, GSBL üretimi ve patojen bakteriler arasında hızla yayılması son yıllarda ciddi sorunlar oluşturmaktadır. GSBL üreten kökenlerde enfeksiyon riski; uzun süre hastanede yatış, yoğun bakım ünitesinde bulunma, idrar, venöz kateter vb. uygulamalar gibi çeşitli girişimler ve geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotik kullanımı gibi bazı faktörlerle artmaktadır. Hastane infeksiyonu etkeni olarak görülme sıklığı giderek artmakta ve genellikle çoklu ilaç direncine sahip olduklarından tedavide güçlüklerle yol açmaktadır (Procop ve ark., 2003).

2.1.1. *SHV* Grubu GSBL' ler

SHV grubu GSBL'ler bu grup enzimlerin öncüsü olan *SHV*-1 enzimi en sık *K. pneumoniae*'da bulunmaktadır. Genellikle de kromozomal bir enzimdir. Ampisilin, tikarsilin ve piperasiline direnç oluşturmaktadır. *SHV* türü enzimlerin ilk türevi 1983 yılında bulunmuş ve *SHV*-2 olarak tanımlanmıştır. *TEM* grubu GSBL'lere kıyasla *SHV*-

1'den köken alan enzim sayısı ve aminoasit değişikliği olan pozisyonlar daha azdır. Bunlarda karakteristik değişiklik 238. pozisyonda glisin yerine serin girmesidir. *SHV* grubu enzimler *K. pneumoniae*'dan başka *Citrobacter diversus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da bildirilmiştir (Delialioğlu ve ark., 2005).

2.1.2. TEM Grubu GSBL'ler

TEM grubu GSBL'ler GSBL fenotipi gösteren ilk *TEM* türevi *TEM-3*'tür ve 1987 yılında bildirilmiştir. *TEM* grubu beta laktamazlar *E. coli* ve *K. pneumoniae* başta olmak üzere *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* ve *Salmonella spp.* gibi Enterobacteriaceae üyelerinde sık bulunmaktadır. Nadir de olsa *P. aeruginosa*'da da bildirilmiştir. Buna karşın *TEM-4*, *TEM-21*, *TEM-24* ve *TEM-42* *P. aeruginosa*'da, *TEM-17* *Capnocytophaga ochracea*'da bildirilmiştir (Delialioğlu ve ark., 2005).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar en sık *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli*'de görülür (Kaçmaz ve ark. 2005). *Klebsiella* cinsi adını 19. yüzyılın sonlarında yaşamış mikrobiyolog Edwin Klebs'ten almıştır. *Enterobacteriaceae* ailesinin *Klebsiellae* kabilesinde sınıflandırılan *Enterobacter*, *Hafnia* ve *Serratia* ile birlikte yer alır (Erdem, 1999).

2.1.3. VEB Grubu GSBL'ler

İlk olarak Vietnam'da bir *E. coli* suşunda gösterilmiş daha sonrada Tayland' da *P. aeruginosa*'da bulunmuştur. Bunlar içinde *PER-1*, *PER-2*, *VEB-1*, *CME-1* ve *TLA-1* birbirleriyle ilişkili olup, yaklaşık %40-50 civarında homoloji gösterirler. Hepsi oksiminino sefalosporinlere, özellikle de seftazidime ve aztreonama karşı direnç gelişimini sağlarlar.

2.1.4. CTX Grubu GSBL'ler

Bu enzimler özellikle sefotaksimi substrat olarak tercih eden özelliğe sahiptirler. Başlıca *Salmonella typhimurium* ve *E. coli*'de tanımlanmış olmakla birlikte diğer bazı enterik gram negatif bakterilerde de gösterilmişlerdir. Otuzdan fazla değişik tipi bulunan bu enzimler, *TEM* ve *SHV* kökenli enzimlerle en fazla %40 civarında benzerlik

göstermektedirler ve farklı olarak toplum kökenli enfeksiyonlardaki izolatlarda sık izole edilirler. *CTX-M* türü enzimler yakın zamanda ülkemizde de gösterilmiştir. Bu enzimlerin önemli bir özelliği de; bunlara karşı tazobaktamın inhibitör etkisinin klavulanik aside ve sulbaktama göre daha fazla olmasıdır. Günümüzde *CTX-M* ailesinde 40 enzim bulunmaktadır ve *CTX-M-1*, *CTX-M-2*, *CTX-M-8*, *CTX-M-9* ve *CTX-M-25* olarak tanımlanan 5 gruba ayrılmıştır.

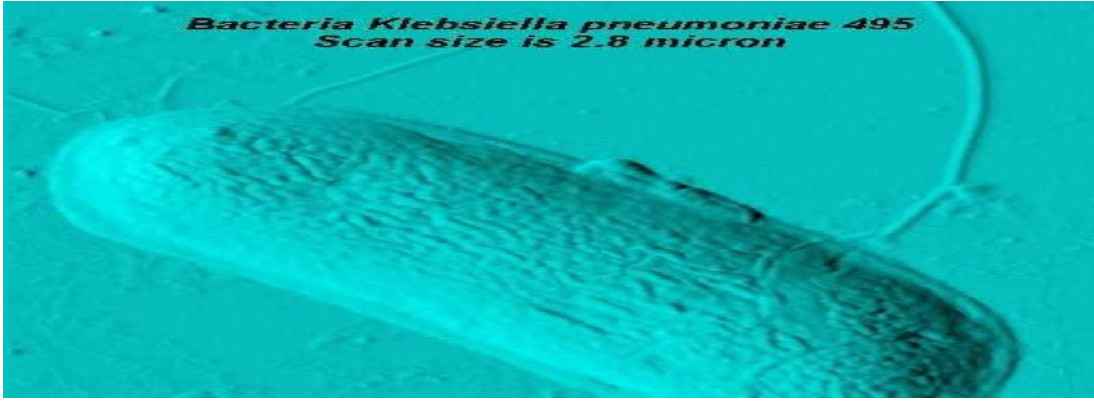
2.2. GSBL Tanı Yöntemleri

GSBL'ler, genellikle seftazidim ve /veya sefotaksim MIK değerlerinde orta derecede bir artışa yol açarlar ve tanımlanma güçlükleri ortaya çıkarırlar. GSBL üretimi normal duyarlılık testleriyle saptanamayabilir. Etkilenen antibiyotiklere azalmış duyarlılık bir gösterge olabilir. Antibiyogramlarda indikatör antibiyotiklerin tamamı bulunmalıdır. Bir izolatın GSBL ürettiği saptandığında beta laktamaz inhibitör kombinasyonları ve sefamisinler hariç tüm sefalosporinler, penisilinler ve monobaktamlara dirençli kabul edilirler.

GSBL üreten suşlar bakteri sayısının yüksek olduğu durumlarda direnç düzeylerinde artmasıyla açıklanan inokulum etkisi gösterirler. Bu durum in vitro testlerde duyarlı görülseler bile beta-laktam grubu kullanılmaması gerekliliğini ortaya koyar. Laboratuarda etkilenen antibiyotiklerde azalmış duyarlılık GSBL göstergesi kabul edilir. Çoklu direnç özelliği (gentamisin ve *SXT*) GSBL için ipucu olabilir (Gülay, 2004).

2.3. *Klebsiella pneumonia*

Klebsiella cinsi adını 19. yüzyılın sonlarında yaşamış mikrobiyolog Edwin Klebs'ten almıştır. *Enterobacteriaceae* ailesinin *Klebsielleae* sınıfında *Enterobacter*, *Hafniave Serratia* ile birlikte yer alır.



Şekil 2.1. *Klebsiella pneumonia* mikroorganizmasının elektron mikroskopisinden alınan fotoğrafı

2.3. 1. *Klebsiella pneumonia* Mikroorganizmasının Özellikleri

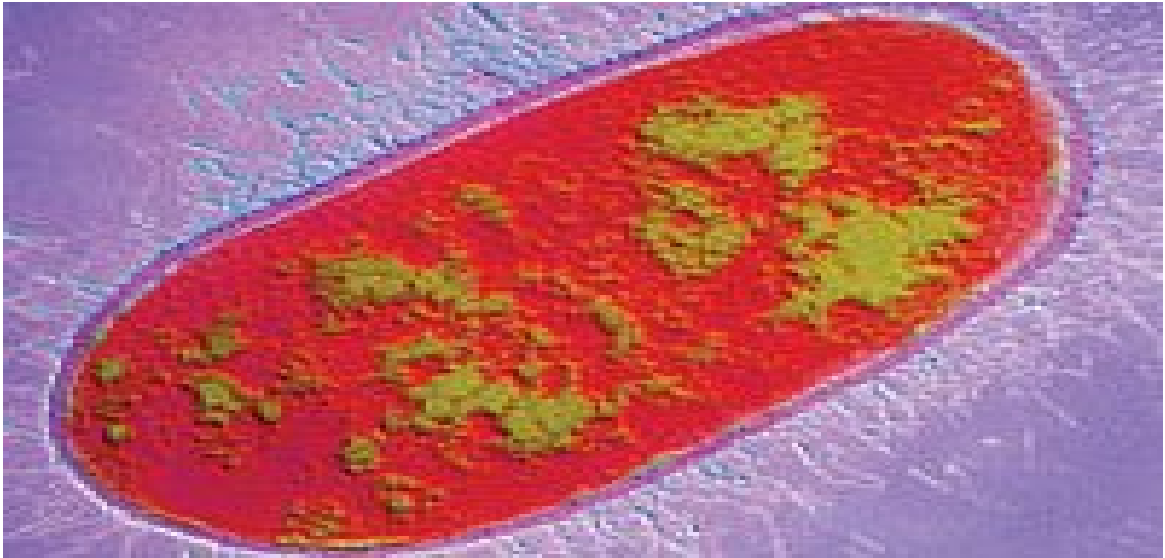
Klebsiella cinsi bakteriler kuruluğa dirençli olup ısıya duyarlıdırlar. Nemli ısıda 55C' de yarım saatte ölürlür. Kemoterapötiklere oldukça direnç gösterirler. *K. pneumonia majör* antibiyotiklere dirence yol açan plamid kaynaklı genler için rezarvuar görevi yaparlar. *Klebsiella* cinsi bakterileri arasında beta-laktam direnci sıklıkla beta-laktamazlara bağlıdır. *TEM 1*, *TEM 2* gibi plazmid kaynaklı beta-laktamazlar olabileceği gibi, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlara (GSBL) bağlı direnç de sık rastlanır. Hastane ortamında izole edilenler dirençlilik yüksek oranda iken, solunum yollarından izole edilenlerde direnç daha düşüktür (Erdem, 1999).



Şekil 2.2. *Klebsiella pneumoni* 'nın yetiştirildiği besi ortamı

2.3. 2. *Klebsiella pneumonia* Mikroorganizmasının Laboratuvar Tanısı

Klebsiella türleri enzim üretimi rutin antibiyogramlarda gözden kaçmaktadır (Yavuzdemir ve ark., 2001). Bu nedenle *Klebsiella* türleri 1982'den beri GSBL yapan suşların giderek aran oranda soyutlanması ile sorun oluşturan bakteri olma özelliğini sürdürmektedir (Jacoby ve ark., 1996). Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz üreten kökenlerin klinik olarak penisilinler, sefalosporinler ve aztreonama da dirençli olabilmeleri, rutin antibiyogramda duyarlı bulunabilen bu antibiyotiklerin tedavide kullanılmaları sonucu tedavi sorunlarıyla karşılaşılmasına neden olduğundan dolayı da GSBL üreten mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlar son zamanlarda oldukça büyük bir problem oluşturmaktadır (Zaoutis ve ark., 2005). Bu nedenle de GSBL üreten kökenlerin saptanmasının bir gereklilik olduğu bildirilmektedir. Ancak, bu amaç için geliştirilen bazı yöntemlerin tam olarak standardize edilememiş olması, bazılarının duyarlılığının düşük olması, bazılarının da pahalı ya da uygulanması zor yöntemler olması nedeniyle, kişileri güvenilir ve standart bir yöntem arayışına itmiştir (Livermore, 1995).



Şekil 2.3. *Klebsiella pneumonia* Bakterisi

2.3.3. *Klebsiella pneumoniae*'nin Sebep Olduğu Hastalıklar

Klebsiella pneumoniae kan akımı enfeksiyonuna neden olan etken olup hastanede yatan hastalarda solunum yolundan izole edilen bir patojendir. Sıklıkla pek çok antimikrobiyal ajana direnç gösterirler. Özellikle beta laktam inhibitörü içeren tüm penisilinlere ve sefalosporinlere dirençlidirler ve ayrıca GSBL üreten mikroorganizmalara bağlı ciddi enfeksiyonların tedavisinin güç olduğu bildirilmektedir. Doğada, insan barsaklarında oldukça yaygındır. Genellikle dışkı ve nazofarekste floranın geçici üyeleri olarak kabul edilirler.

2. 4. Tanısal Uygulamalar

Moleküler Tekniklerin çok farklı alanlarda geniş çalışma ve araştırma alanları buldurmaktadır. Bu çalışma alanlarının başında enfeksiyon hastalıkları geldiğinden moleküler teknikler enfeksiyon hastalıklarının tanısında, hastalık yapan etkenin belirlenmesinde yaygın kullanılır yani genellikle mikroskopi ile görülmesi, kültürde üretilmesi uzun zaman alan zor veya olanaksız mikroorganizmaların saptanması için kullanılmaktadır.

Moleküler teknikler enfeksiyon hastalıklarında;

- Antiviral tedavinin takibinde
- Bakteri akrabalığının araştırılmasında
- Bulaşıcı kaynaklardaki bakteriyel patojenlerin belirlenmesinde
- Enfeksiyon ajanlarının hızlı tanısında
- Etkeni belirlenmemiş hastalıklarla, enfeksiyon ajanları arasında ilişki kurulmasında
- Mikroorganizmaların direnç genlerinin belirlenmesinde
- Mikroorganizmaların dokuda yerleşimlerinin belirlenmesinde
- Yeni enfeksiyon ajanlarının bulunmasında kullanılmaktadır (Akar, 1999).

Klinik laboratuvar yöntemleri geleneksel olarak hastalık tanısı için gereken doğru ve özgün bilgiyi sağlarlar. Nükleik asit analizlerinde laboratuvarın rolü tedaviyi

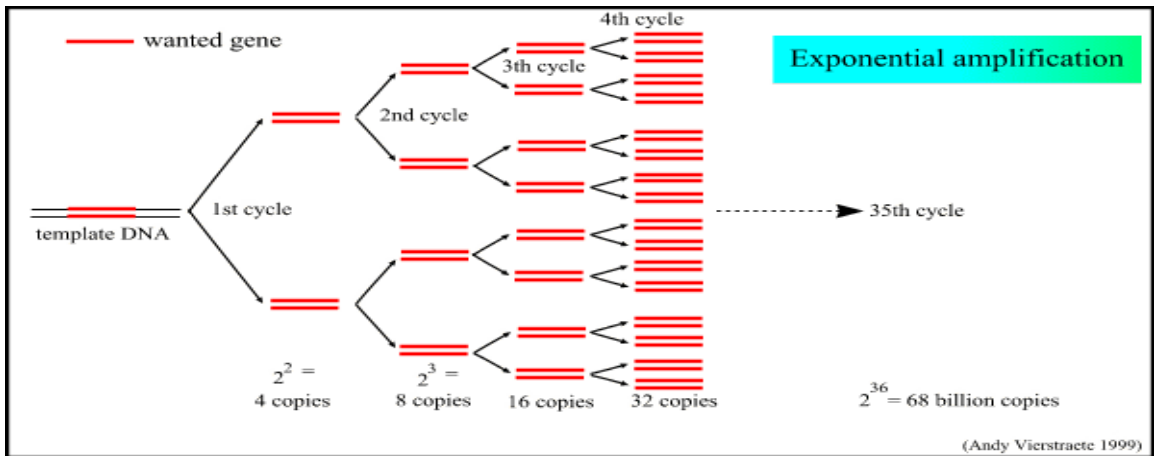
yönlendirecek şekilde geliştirecek potansiyelde olmasıdır. Moleküler tekniklerin uygulanması belirli bir hastalık veya duruma ilişkin iyi kurgulanmış klinik şüphe gerektirir. Enfeksiyon ajanların saptanması ve tanısında geleneksel yaklaşım; uygun boyaların kullanılması ve direkt inceleme, kültür ve izolasyon veya konaktaki antikörlerin saptanmasıdır. Ancak organizmaların çoğu boyama ile kolayca tanınmaz, kültür zahmetlidir ve uzun inkübasyon zamanları gerektirir. Bazı organizmalar pahalı kültür ortamları gerektirirler veya hiç kültür edilemezler. Oysa Nükleik asit problemlerini numunedeki patojenin genetik bilgisini saptama potansiyelindedir. Reaktif, cihaz ve eğitilmiş eleman maliyetleri nedeni ile, enfeksiyon ajanların moleküler çalışmaları yalnız klinik olarak, uygun zaman aralığında tanımlanması zor olan organizmalarla çalışmaktadırlar. Amplifikasyon yöntemlerinin klinik laboratuara ilk girişi enfeksiyon hastalık uygulamalarında olmuştur (Burtis ve Ark, 2005).

Nükleik asit çoğaltma yöntemleri klinik örneklerde bulunabilecek etkenin kısa sürede gösterilmesi, çabuk belirlenmesi, moleküler tiplendirilmesi ve ilaç direncinin saptanmasında kullanılmaktadır. PCR yöntemine dayalı erken tanıda, klinik örneklerde direkt olarak bakteriler araştırılmaktadır. Enfeksiyon hastalıklarının çoğunda hasta antibiyotik almaya başladıktan sonra etkenin üretilerek tanı konulması zorlaşmaktadır. Bu durumda PCR yöntemiyle etkene ait genetik materyal araştırılarak klinik tanıya yardımcı olunabilir. Biyokimyasal yöntemlerle çoğunlukla tür düzeyinde tanımlanan suşların birbirleriyle ilişkileri tam olarak anlaşılammaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar için gerekli olan alt tür düzeyinde tiplendirmede biyotipleme faj tipleme, serotipleme ve antibiyotipleme gibi fenotipik yöntemler ön bilgiler vermektedir yalnız çoğunlukla kesin ayırım için moleküler yöntemlere gereksinim duyulmaktadır (Köksal, 1999; De La Puente-Redondo ve ark., 2000).

2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İlk kez 1985’de ABD’de Cetus Corporation’da çalışan Erlich, Kary Mullis Henry A.s, ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilerek bilim dünyasına sunulan PCR, izole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA) (spesifik kısa zincirli oligonükleotid) primerler yardımı ile enzimatik olarak in vitro koşullarda sayıca çoğaltılmasıdır. Kısaca hücre içinde gerçekleşen doğal DNA

replikasyonunun laboratuvar ortamında *in vitro* koşullarında (tüp içerisinde) taklit edilmesi esasına dayanır yani laboratuvar da nükleik asitlerin *in vitro* koşullarda analiz edilmelerini sağlamaktadır (Mc Kane ve Kandel, 1996; Prescott ve ark., 1999). Hücrelerde DNA doğal olarak, replikasyon ile çoğalır. DNA çift sarmalında birbirinden ayrılan ipliklerin tamamlayıcıları sentezlenerek bir DNA molekülünden onunla aynı olan iki yavru molekül meydana gelir. Böylece hücre bölünmesiyle yeni oluşan hücrelere tüm genler aynen geçerler. Her yeni hücre jenerasyonunda genlerin kopya sayılarının iki katına çıkması nedeniyle jenerasyonlar boyunca DNA miktarı başlangıca göre üssel olarak artar. Örneğin 35 jenerasyon sonra hücre ve gen sayısında milyarlarca kez artış olur. *In vitro* koşullarda istenilen bir genin ya da özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilmesi için rekombinant DNA yöntemleri ile DNA klonlamasına ek olarak, 1980’li yıllardan itibaren Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) da kullanılmaya başlanmıştır, PCR’da da hücre jenerasyonu üssel olarak (2^n) artmaktadır. Örneğin 4 jenerasyon sonunda gen sayısı 16’a çıkmaktadır. 1980’li yılların ortalarında geliştirilmesinin ardından temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi, ve DNA Haritalaması gibi) bir çok hastalığın (ortak hücre analizi, kistik fibröz, ‘fragile X’ sendromu, Aids, lösemi vb.) DNA temeline dayalı tanısı için de klinik tıpta hızla kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknolojinin bu kadar yayılmasının başlıca sebebi insan genomik DNA’sı gibi kompleks DNA kalıplarından spesifik DNA parçalarının sentezini birkaç saat içinde gerçekleştirebilmesidir (Dikmen ve Özgünen, 2004).



Şekil 2.4. DNA'nın Replikasyonu

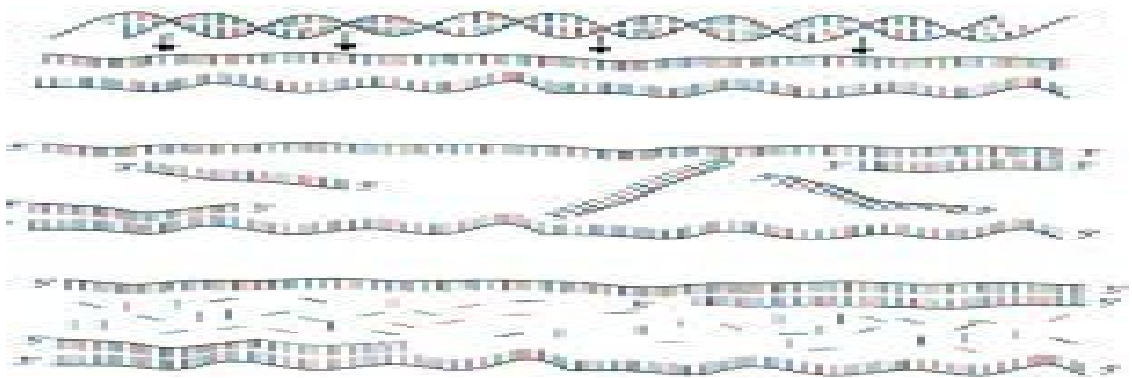
2.5.1. PCR'da DNA replikasyonu

PCR'da DNA replikasyonu 3 aşamada gerçekleşir.

1- Denatürasyon: DNA replikasyonunun başlayabilmesi için çift iplikli DNA zinciri arasındaki hidrojen bağlarının kırılarak zincirlerin birbirinden ayrılması gerekir. Hidrojen bağlarını birbirinden ayılması için de yüksek sıcaklık gerekir. Yüksek sıcaklık ortamı sağlanarak (94°C-98°C) çift iplikli bir DNA molekülünün birbirinden ayrılması olayına da denatürasyon denir. Yaşamını 37°C'de sürdüren hücrede denatürasyon adı verilen zincir ayrılması, bir kısmı enzim yapısında olan yardımcı proteinlerle gerçekleşir. PCR'da ise zincir ayrılması DNA moleküllerinin yüksek sıcaklığa dayanıklı olması nedeniyle ortamın 94°C-98°C'ye kadar ısıtılmasıyla mümkün olmaktadır (Dutton, 1998).

2-Annealing: (Hibridizasyon: Primer Bağlanması): Kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıkta denatüre edildikten sonra tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere Sentetik oligonükleotidlerin bağlanmasıdır. PCR işleminde replikasyonu yapılacak bölgenin iki ucuna özgü olan baz dizilerini bu bölgedeki tanımlayıcı sentetik oligonükleotid primerler tepkime karışımının içerisine önceden konulur. Reaksiyon 37°C–65°C'de gerçekleşir (Dutton, 1998).

3-Polimerizasyon: Extension (Çift İplikli DNA Sentezi): Spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler DNA'ya eklenerek zincirin uzaması sağlanır. Bu reaksiyon 72°C'de gerçekleşir (Dutton, 1998).



Şekil 2.5. Primerlerin Kalıp DNA'ya bağlanması

PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile molekül ağırlıklarına göre ayrılarak, DNA'nın varlığı gösterilebilir. Oluşan bantların özgülüğü UV altında değerlendirilir. Bununla beraber PCR'ın özgülüğü ve duyarlılığını etkileyen faktörler bulunmaktadır. Bunlar kalıp DNA, primerlerin uzunluğu, kullanılan ısı ve reaktiflerin konsantrasyonu gibi parametrelerdir. Yine enzim ve primer konsantrasyonları da PCR'ın başarıyla yapılmasını etkilemektedir. Analiz esnasında ise reaksiyon sonrası istenmeyen amplifikasyonlar analizin yanlış değerlendirilmesine yol açabilir. Elde edilen sonucun değerlendirilmesi için mutlaka PCR içinde kullanılan maddelerin çok uygun konsantrasyonda ve döngülerin uygun sayıda olması gerekmektedir. Fazla miktarda hedef DNA konması istenmeyen amplifikasyona sebep olabilir. Kontaminasyonu engellemek için de kullanılan tüp ya da pipet uçlarının tek kullanımlık olması öneriler arasındadır (Lynch ve Brown, 1990; Taylor, 1993).

2.6. PCR'ın Temel Bileşenleri

- Kalıp olarak kullanılan DNA molekülü
- DNA polimeraz enzimi,
- Primerler,
- dNTP karışımı,
- Tampon ve $MgCl_2$ 'dür.

2.6.1. Kalıp DNA

PCR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA, genom kitaplıkları halinde olabilir. PCR'da kalıp olarak tek yada çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA'da kullanılabilir. Kalıp DNA'lar ya araştırma laboratuvarları ve kliniklerden ya da ticari olarak elde edilir (Temizkan ve Arda, 2004).

En iyi kalıplar, DNA sentezini durdurabilen ya da nükleotid bazlarının yanlış birleşmesine neden olabilen çentikler, kırıklar ve kontamine edici proteinler içermeyen kalıplardır. Yüksek GC muhtevasına ve sekonder yapıya sahip kalıpların amplifikasyonunu optimize etmek oldukça zordur (Buckingham ve Flaws, 2007). Kalıp olarak kullanılacak DNA temiz olmak zorunda değildir. Kurumuş kan veya semen gibi

adli tıp örnekleri, tek bir saç teli, uzun süre saklanmış tıbbi örnekler, mumya kalıntıları ve fosil gibi değişik kaynaklardan, genomik DNA elde edilebilir (İşcan, 2003). PCR’da Kalıp olarak yüksek molekül ağırlıklı genomik DNA kalıp olarak kullanılacaksa, DNA kısmi kesim yapan *NotI* ya da *SfiI* gibi restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra kullanılmalıdır. Genellikle kalıp DNA’da hedef dizinin konsantrasyonu bilinmediğinden, PCR’ın pozitif kontrol DNA ile optimizasyonu faydalıdır. Optimizasyon çalışmalarında normalde klonlanmış bir DNA parçası için nanogram, genomik DNA için ise mikrogram düzeyindeki miktarlar kullanılır. Eğer RNA kullanılacaksa total RNA ya da poli (A)⁺ RNA’dan önce klasik yolla cDNA elde edilir ya da *Thermus thermophilus* kaynaklı rekombinant *Tth* DNA polimeraz enzimi kullanımıyla aynı tüpte RNA’dan DNA ürününün elde edilmesi tek kademeli olarak yapılabilir (Temizkan ve Arda, 2004).

Eğer çoğaltılacak kalıp DNA dizisi hakkında bilgi mevcut değilse, bu durumda gelişigüzel başlatılmış (Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)) veya gelişigüzel çoğaltılmış polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)) yöntemleri kullanılarak genomik parmak izleri çıkartılabilir (İşcan, 2003).

2.6.2. Polimerazlar

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfattan uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Sentezin yönü 5’ uçtan 3’ uca doğru olup, primerin serbest 3’OH (hidroksil) ucuna ortamdaki dNTP’lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. Termostabil (sıcaklığa dayanıklı) DNA polimeraz enziminin PCR’da kullanılmaya başlanması araştırma ve klinik laboratuvarlarında rutin olarak yapılan deneylere teknolojik olarak büyük bir avantaj sağlamıştır. Termostabil DNA polimerazlardan PCR’da en yaygın olarak kullanılan *Thermus aquaticus*’dan elde edilen Taq DNA polimerazdır (Temizkan ve Arda, 2004).

Günümüzde PCR’de yaygın bir şekilde kullanılan bazı termostabil DNA polimeraz enzimlerin adları ve kaynakları Tablo 2,1’de, Tablo 2.2’ de de PCR’da sıklıkla kullanılan DNA polimerazların özellikleri verilmiştir.

Tablo 2,1. Termostabil DNA polimerazlar ve kaynakları

DNA polimeraz	Doğal/Rekombinant	Kaynak
<i>Taq</i>	Doğal	<i>Thermus aquaticus</i>
Amplitaq [®]	Rekombinant	<i>T. aquaticus</i>
Hot Tub [™]	Doğal	<i>Thermus flavis</i>
Vent [™]	Rekombinant	<i>Thermococcus litoralis</i>
Deep Vent [™]	Rekombinant	<i>Pyrococcus GB-D</i>
<i>Tth</i>	Rekombinant	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>Pfu</i>	Doğal	<i>Pyrococcus furiosus</i>

Tablo 2.2. PCR’da sıklıkla kullanılan DNA polimerazların özellikleri

	<i>Taq/</i> Amplitaq [®]	Stoffel Fragment	Vent [™]	<i>Pfu</i>	<i>Tth</i>	UITma [™]
Termostabilite- 95°C’deki yarılanma ömrü (dakika)	40	80	400	>120	20	>50*
5’→3’ ekzonükleaz aktivitesi	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Yok
3’→5’ ekzonükleaz aktivitesi	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Var
Processivity **	50-60	5-10	7	***	30-40	***
Kalıbı uzatma oranı (Nükleotid/saniye)	75	>50	>80	60	>33	***
*97,5 °C’de ölçülmüştür. ** Enzimin DNA kalıbından ayrılmaksızın kalıba eklediği ortalama nükleotid sayısı. ***Bilgi bulunmamaktadır.						

2.6.3. Primerler

Gen çoğaltılması dahil PCR'in birçok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere gereksinim vardır. Genel olarak kullanılan kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotid uzunluğundadır. Oligonükleotid primerler, primer sentezi yapan laboratuarlardan ya da ticari olarak elde edilebilirler. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır. Primer tasarımı yapmak için bilgisayar programları da geliştirilmiş olmakla beraber, çoğu zaman araştırmacılar ilgilendikleri genleri ya da DNA parçalarını çoğaltmak için kendileri primer tasarımı yapmak durumundadırlar. Tasarım yapılırken mümkün olduğunca dört bazın eşit sayıda kullanımına dikkat edilir. Primerin Tm (erime sıcaklığı) değeri, amplifikasyon reaksiyonunun spesifitesi için kritik bir aşama olan en uygun annealing sıcaklığının belirlenmesi için başlangıç noktası olarak kullanılabilir. Dolayısıyla forward ve revers primerler benzer Tm değerine sahip olacak şekilde tasarlanmalıdır ki her ikisi de aynı annealing sıcaklığında optimal olarak hibridize olabilsin. Tm primerlerin uzunlukları arttırılarak ya da kalıp üzerinde daha çok ya da daha az G ve C'lere sahip bölgelere yerleştirilerek ayarlanabilir (Buckingham ve Flaws, 2007).

Sonucu olumsuz yönde etkilemesi istenmeyen oluşumları minimize etmek için önem verilmesi gereken bazı noktalar:

- Primerlerin polipürün, poliprimidin ya da tekrarlı bölgeler içermemesi,
- Primer çiftlerinin 3' uçlarının birbirine ya da primer içindeki bir bölgeye tamamlayıcı olmaması (Temizkan ve Arda, 2004),
- Primerin dimer oluşturmasını engellemek için 3' ucunda G ve C'ler bulunmamasıdır (İşcan, 2003).

2.6.4. dNTP

Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtdü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Optimal dNTP konsantrasyonu $MgCl_2$ ve primer konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, çoğaltılmış ürün boyuna ve PCR döngü sayısına bağlıdır. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10–100 μ M) kalıba uygun, doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 100 μ M dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Yapılacak PCR için en uygun dNTP konsantrasyonu deneysel olarak belirlenmelidir (Temizkan ve Arda, 2004).

2.6.5. Tamponlar ve $MgCl_2$

PCR tamponları enzim aktivitesi için optimal şartlar sağlar. Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini uyarırlar ve çift iplikli DNA'nın T_m değerini artırır, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar. Bu nedenle $MgCl_2$ 'ün PCR'ın özgünlüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum $MgCl_2$ konsantrasyonu olarak 1,0-1,5 mM'lık değerler tercih edilir. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonu, enzim etkinliğini düşürerek ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu ise yanlış birleşmeleri destekleyerek spesifik olmayan ürün birikimine yol açar. KCl (20-100mM), amonyum sülfat (15-30 mM) ya da tek değerli katyonların diğer tuzları önemli tampon bileşenleridir. Bu tuzlar DNA'nın denatürasyon ve annealing sıcaklıklarını ve enzim aktivitesini etkiler. Tampon/tuz şartlarının etkisi farklı primerler ve kalıplar için değişiklik gösterir. PCR'da kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tampondur. Diğer enzimler için de benzeri tamponlar bulunmakta ve bunlar çoğunlukla satın alınan enzimle birlikte 10 \times konsantrasyonda sağlanabilmektedir. $MgCl_2$ içeren tamponlar kullanılıyorsa, ayrıca $MgCl_2$ kullanımına gerek yoktur (Temizkan ve Arda, 2004).

2.7. PCR Engelleyicileri (İnhibitörleri) ve Artırıcıları

PCR çeşitli maddeler ile aktive olabileceği gibi aynı zamanda bazı maddelerin kullanımıyla inaktivedebilir. Bir örnek verecek olursak klinik örnekler kullanıldığında örneklerin toplanması ve saklanması için uygun yöntem ve meteryal seçimi önemlidir. DNA kaynağı, herhangi bir kişinin ortama dağılmış olan deri yada saç hücreleri, laboratuardaki çeşitli yüzeyler yada ortam havası tarafından kontamine olabilir. Bunların dışında PCR’da kullanılan bileşenlerin hemen tamamı hatta DNA polimeraz bile, kontaminasyon kaynağı olabilir. Yani birçok faktör PCR reaksiyonunun inhibe olmasına yol açar. Burada sadece optimizasyon çalışmaları için genellikle kullanılan inhibe edicilerden söz edilecektir. Çeşitli maddelerin PCR reaksiyonunu olumsuz etkilemesi PCR’de kullanılan biyolojik örneklerin çeşitliliğinden ve DNA izolasyonunda kullanılan yöntem ve maddelerden kaynaklanmaktadır. Çok sayıda değişik biyolojik meteryal (hayvan dokuları ve vücut sıvıları, bakteri örnekleri, adli ve arkeolojik materyaller) PCR’de DNA kaynağı olarak kullanılır.

PCR’ da insan DNA’sı,

- amniyon sıvısından,
- biyopsi materyallerinden,
- hücre döküntülerinden,
- idrardan,
- korionik villusdan
- periferel kan hücrelerinden,
- plasenta saç kökünden,
- semenden,
- serebrospinal sıvı gibi

değişik biyolojik kaynaklardan izole edilir. Bu doğal kaynaklar çok çeşitli reaksiyonları olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle inhibisyonun olmadığına ilişkin olarak PCR kontrolleri yapılmalıdır. DNA izolasyonu için en sık kullanılan materyallerden biri kan olduğu için kanın pıhtılaşmasını engellemek için EDTA’lı ya da heparinli tüpler kullanılır. Heparin de PCR için potansiyel bir inhibitördür. Heparinin dışında kanda bulunan porfirin gibi diğer maddeler de DNA izolasyonu sırasında lizis ve santrifüjleme

aşamalarında uzaklaştırılırlar çünkü PCR için kuvvetli inhibitör etki gösterirler (Temizkan ve Arda, 2004).

PCR’da Kontaminasyondan Korumak için Alınabilecek Önlemler

- Araştırmacıların eldiven, önlük, koruyucu gözlük vb. kullanmaları.
- Kaliteli pipetler ve koruyucu pipet uçları tercih edilmelidir.
- Kullanılacak malzeme ve metaryallerin, çözeltilerin steril edilmeleri.
- Kullanılacak malzemeler ve bileşenlerin genel laboratuvar donanımından ve özellikle PCR ürünlerinin analizinde kullanılacak olan bileşenlerden ayrılması.
- PCR çalışmasının steril bir kabin yada özel bir laboratuvarda yapılması.
- dNTP’ler ve tamponlar PCR bileşenlerinin stok çözeltilerden kaynaklanabilecek kontaminasyonu engelleyebilmek için uygun miktarda saklanabilecek şekilde hazırlanmalı (Temizkan ve Arda, 2004).

1%-10%’luk konsantrasyonlarda ilave edilen dimetil sülfoksit, gliserol ve triton X-100 gibi katotropik ajanlar (chaotropic agents) sekonder yapıları azaltabilir böylece zor bölgeler boyunca polimerazın zinciri uzatmasına imkan verir. Bu ajanlar bir de enzim stabilitesine katkıda bulunurlar (Buckingham ve Flaws, 2007). Bu arttırıcı maddelerin kullanımındaki en önemli güçlük, başarılı bir sonuç almak için hangi maddenin hangi tip PCR’de kullanılacağına belirli olmamasıdır. Arttırıcılar belirli bir konsantrasyonda kullanıldıklarında PCR’ı olumlu olarak etkilerler, ama aynı koşullar bir başka PCR’da aynı etkiyi göstermeyebilirler. PCR arttırıcılarının (enhancerların) yüksek konsantrasyonlarının Taq DNA polimerazı inhibe ettiği düşünüldüğünden optimum konsantrasyonları deneysel olarak belirlenmelidir (Temizkan ve Arda, 2004).

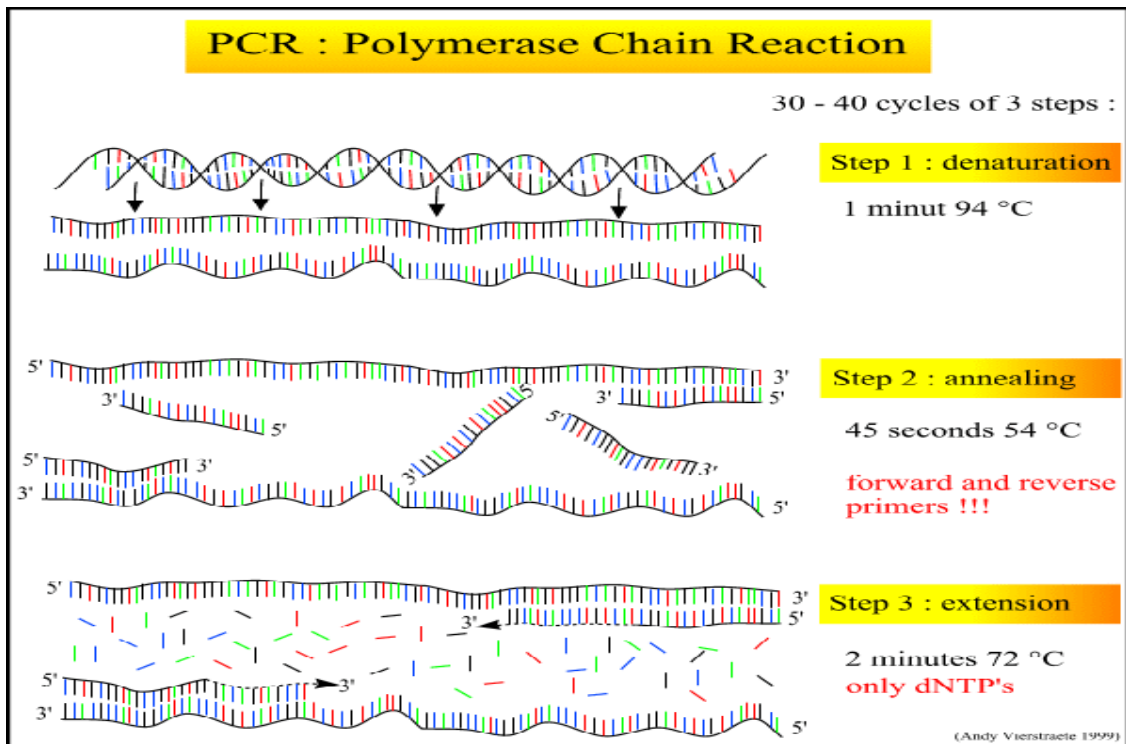
2.8. PCR’ın İşleyişi

Termostabil DNA polimerazların farklı sıcaklık derecelerini istenilen süreler için otomatik olarak ayarlanabilen PCR aletlerinin (thermal cyclers) kullanıma sunulması, PCR’nin verimi ve kullanımında önemli gelişmelere yol açmıştır. Verimli bir PCR için;

- Denatürasyon,
- Primerlerin bağlanması,

- Primerlerin uzaması,
- Döngü sayısı,
- PCR makinesinin sıcaklık iniş ve çıkış süreleri önemlidir (Temizkan ve Arda, 2004).

Polimeraz zincir reaksiyonu mikrotüplerde gerçekleştirilir. Amaca göre farklı PCR tüpleri ve değişik sıcaklık dereceleri kullanılabilir. PCR'de bir döngüyü oluşturan aşamaların sıcaklık değerleri ile süreleri Şekil 2.6.'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR çift zincirli DNA ile başlar. İlk önce denatürasyon aşamasında çift iplikli DNA replike edilebilmesi için iki tek zincire denatüre edilir. Bu kalıba bağlı olarak birkaç saniyeden birkaç dakikaya kadar 94-96°C'de örnek ısıtılarak gerçekleştirilir. Başlangıç denatürasyon aşaması genomik ya da diğer büyük DNA kalıp fragmentleri için uzatılabilir. Sonraki denatürasyonlar daha kısa olabilir. Bir sonraki aşama PCR'ın spesifitesi açısından çok büyük önem taşıyan annealing (hibridizasyon) aşamasıdır. Annealing sıcaklığının primerler ve reaksiyon şartları ile optimize edilmesi önemlidir. Annealing sıcaklıkları 50-70°C arasında olup genellikle deneysel olarak belirlenir.

Başlangıç noktası primer dizilerinin T_m 'si kullanılarak belirlenebilir. Reaksiyon şartları, tuz konsantrasyonu, yanlış eşleşmeler, kalıp durumu ve sekonder yapı reaksiyondaki primerlerin gerçek T_m 'sini etkileyecektir. Primerlerin T_m değerinin hesaplanması için çeşitli formüller ve bilgisayar programları kullanılmaktadır. Çoğu zaman hesaplanan T_m değerinin $3-5^\circ\text{C}$ altındaki sıcaklıklar bağlanma sıcaklığı olarak seçilir ve daha sonra optimum sıcaklık değeri denenerek saptanır (Temizkan ve Arda, 2004).

Primerlerin uzaması aşamasında genellikle *Taq/Amplitaq* DNA polimerazların polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan 72°C kullanılır. Uzama aşaması için çoğu zaman iki dakika yeterli olmakla birlikte, eğer uzun ampliconlar (PCR ile çoğaltılan DNA parçası) çoğaltılıyorsa süre artırılır. PCR ürünü olan tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanmasını garanti altına almak için son döngünün uzama süresi çoğunlukla uzun (10-15 dakika) tutulur. Toplam döngü sayısı genellikle 25-35 arasındadır. Döngü sayısının artırılması halinde istenmeyen ürünler fazlalaşırken, istenen ürünlerde herhangi bir artış meydana gelmez. Bu yüzden 40'dan fazla sayıda döngüden oluşan PCR reaksiyonları genellikle başarılı sonuçlar vermez (Temizkan ve Arda, 2004).

2.9. PCR Ürünlerinin Belirlenmesi ve Analizi

PCR ürünleri (ampliconlar) boyları primerlerle sınırlandırılmış DNA parçası ya da parçaları'dır. PCR ürünlerinin analizi ile genellikle üç çeşit bilgi edinilebilir:

- (1) Başlangıç materyali olarak kullanılan DNA ya da RNA'nın kabaca ya da kesin miktarının belirlenmesi için çoğaltılmış PCR ürününün miktarının ölçülmesi
- (2) Dizi analizi
- (3) Hedef DNA dizisinin varlığının ve taşıdığı varyasyonun belirlenmesi

PCR tamamlandıktan sonra ürünler başka bir aşamada kullanılmadan önce, ürün kalitesi kontrol edilmelidir. Çünkü PCR bazen çeşitli nedenlerden dolayı başarılı olmayabilir. Bu durumun nedeni aşağıda saydıklarımızdan kaynaklanmış olabilir.

- Kullanılan DNA kaliteli olmayabilir.
- Seçilen primerler uygun olmayabilir veya birden fazla tanıma dizisi olmayabilir.
- Ürün doğru boyutlarda olmayabilir.
- Bazen ürün oluşmuştur ancak çoğaltılacak gen uzunluğunda değildir. Bu durumda primerlerden birisi diğer primere yakın bir bölgeye yerleşmiştir ya da primerler yanlışlıkla tamamen farklı bir geni tanımış da olabilir bundan ötürü Jelde birden fazla bant gözlemlenebilir.
- Primerlerin bazıları doğru yerlere yerleşmiştir, ancak bazıları yanlış yerleşerek, farklı dizilerin çoğaltılmasına neden olmuştur olabilir (İşcan, 2003).

Fragmente edilmiş DNA moleküllerinin ayrıştırılmasında, tanımlanmasında ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan yöntemler agaroz jel elektroforezi ve poliakrilamid (PAGE) elektroforezleridir. Bu metodların ilkesi; yapısındaki fosfat grubu nedeniyle negatif yüklere sahip olan DNA moleküllerinin elektriksel alanda pozitif elektroda doğru hareket etmesidir. Bu işlemde jel porları nedeniyle küçük DNA molekülleri daha hızlı hareket ederler. Yöntem basit olması, kısa zamanda yapılabilmesi ve yoğunluk gradienti gibi diğer yöntemlerle ayrıştırılamayan fragmanların analizine olanak sağlaması bakımından moleküler biyolojide sıklıkla kullanılmaktadır. Standart agaroz jeller genellikle PCR ürünlerinin (200 bp-50 kb büyüklüğündeki DNA moleküllerinin) analizi için yeterli ayırma gücüne sahiptir. Poliakrilamid jeller ise daha çok 5-500 bp büyüklüğündeki DNA moleküllerinin analizlerinde kullanılmaktadır (Topçu, 2007). Agaroz ya da poliakrilamid jellerde, bir floresan boya olan ve DNA zincirlerinin arasına giren, etidyum bromür (EtBr) boyaması ile ürünler görülür. Boyamadan sonra DNA, jelde bir UV transilüminatörden yararlanılarak görülebilir hale gelir. Jelin kalıcı görünümü fotoğflanarak elde edilir. Boyutu bilinen işaret DNA'lar ve kontrol PCR ürünleri de aynı elektroforez jeline uygulanır, böylece çoğaltılmış ürünün boyutu hakkında fikir edinilir (Temizkan ve Arda, 2004).

2.10. PCR Optimizasyonu ve PCR ile Doğru Ürünün Çoğaltılması

PCR'nin etkinliği ve özgünlüğünde etkili olan çeşitli faktörler vardır. Bunlardan kalıp DNA'nın kalitesi, primer tasarımı, MgCl₂ konsantrasyonu, DNA polimeraz ve tampon koşulları özellikle önemli olanlardır (Grunewald, 2003).

2.10.1. Magnezyum İyonları

Magnezyum iyon konsantrasyonu PCR spesifitesi açısından önemlidir. dNTP-Mg²⁺ kompleksleri nükleik asitlerin şeker-fosfat omurgası ile etkileşir ve *Taq* DNA polimeraz aktivitesini etkiler. Bu yüzden MgCl₂ konsantrasyonunun değişimi aynı şartlar altında bir diğerinden önemli ölçüde farklı davranan bir primer/template çiftine yol açabilir. Mg²⁺ iyon konsantrasyonunun etkisini analiz etmek için genel strateji, standart tamponu ayarlamaktır ki MgCl₂ konsantrasyonu genellikle 0.5 ya da 1mM'lık aşamalarla 0.5 ve 5mM arasında değişir. Genelde konsantrasyonlardan biri, önemli ölçüde artmış PCR ürün örneği gösterecektir. Reaksiyonda dNTP'lerin konsantrasyonu değiştirildiğinde Mg²⁺ konsantrasyonunun değiştirilmesi gerektiği hatırlanmalıdır (McPherson ve Moller, 2007). Ayrıca enzimatik DNA sentezi için optimal Mg⁺² konsantrasyonu kullanılan DNA polimerazın özellikleri tarafından belirlenir. Örneğin *Taq* ve *Klentaq* DNA polimerazlar için optimal Mg⁺² konsantrasyonu sırasıyla 1,5-2 ve 3-4 mM'dır. Bu nedenle kullanılan DNA polimeraza bağlı olarak PCR karışımında doğru Mg⁺² konsantrasyonunun kullanıldığından emin olmak gerekir. Çok yüksek Mg²⁺ konsantrasyonu, DNA polimerazın aktivitesini artırarak DNA sentezinin verimini artırırken non-spesifik ürünlerin amplifikasyonuna yol açabilir. Çok düşük Mg²⁺ konsantrasyonu ise PCR spesifitesini artırırken amplifikasyon veriminin düşmesine neden olacaktır (Ignatov ve ark., 2002).

2.10.2. Taq DNA polimeraz konsantrasyonu

Eğer hiç ürün bandı elde edilemediyse ya da zayıf bandlar elde edildiyse çok az Taq DNA polimeraz kullanılmış olabilir. Taq DNA polimerazın farklı versiyonları çeşitli spesifik aktivite ve konsantrasyonlarda sağlanabilir. Termostabil proofreading DNA polimerazlar Taq DNA polimerazdan daha düşük processiviteye sahip olabilir ve bu nedenle başarılı amplifikasyon için daha fazla enzime ihtiyaç duyulabilir. Termostabil polimerazların yüksek sıcaklıklarda inaktive olacağını hatırlamak da önemlidir çünkü polimerazların inaktivasyonu ürün miktarının azalmasına yol açabilir. Mümkün olduğunca düşük denatürasyon sıcaklığı kullanarak 90°C'nin üzerinde enzimin geçireceği zamanı sınırlandırmaya çalışmak önemlidir. Örneğin birçok protokolde tavsiye edilen 94°C'den ziyade 90°C ya da 92°C'lik bir sıcaklıkta çalışmak ve/ya da denatürasyon aşaması için süreyi azaltmak önemlidir (McPherson ve Moller, 2007).

2.10.3. Sıcaklıklar

Denatürasyon

PCR için tek zincirli kalıpları sağlamak için kalıbın etkin olarak denatüre edilmesi önemlidir. Eğer bu aşama verimsiz olursa kısmen denatüre olmuş dupleks moleküller, etkin primer bağlanmasını ve DNA'nın uzatılmasını önleyecek biçimde hızla yeniden birleşecektir. Her bir siklüsün başlangıcında kısa bir denatürasyon aşaması vardır. Birçok protokol bu aşamada 94°C'lik bir sıcaklık kullanırken GC'ce zengin olanlar daha yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyabilmelerine rağmen birçok kalıp için 90-92°C'lik bir sıcaklık kullanmak yeterli olabilir. Reaksiyonda en yüksek DNA polimeraz aktivitesini kaybetmemek için etkin en kısa süre için en düşük etkin sıcaklık kullanmaya çalışmak yararlıdır (McPherson ve Moller, 2007).

Annealing

PCR'in başarısı şiddetle spesifiteye bağlıdır ki bu, primerin yalnızca hedef dizisine bağlanması anlamına gelir bu nedenle bu moleküler etkileşimi optimize etmek önemlidir. Primerin yalnızca kalıbın mükemmel komplementlerine bağlanıp bağlanmadığı önemli ölçüde annealing sıcaklığına bağlıdır. Genellikle daha yüksek

annealing sıcaklığı primerin kalıp üzerindeki komplementer dizisine daha spesifik bağlanmasını sağlar ve böylece yalnızca hedef dizi amplifikasyonu daha büyük bir olasılıkla gerçekleşir. Daha düşük sıcaklık, kalıp ve primer arasında daha fazla yanlış eşleşmelere neden olabilir ki bu, hedef olmayan dizilerin amplifikasyonunun artmasına neden olur. Pratikte annealing aşamasına 55°C gibi bir sıcaklıkta başlamak genellikle uygundur. Eğer ürünün zayıf kazanımı ve nonspesifik ürünlerin amplifiyesi söz konusu olursa optimal annealing sıcaklığının deneysel olarak belirlenmesi gerekli olabilir ayrıca bu durum MgCl₂ konsantrasyonunun optimizasyonu ile ilişkilendirilebilir. Annealing için genellikle yaklaşık 30-60s'lik bir süre önerilir ve daha kısası daha iyidir. Polimeraz, annealing sıcaklığında kısmi aktiviteye sahip olacağından bu sıcaklıkta reaksiyonun daha uzun tutulması nonspesifik ürünlerin amplifikasyon riskini artıracaktır (McPherson ve Moller, 2007).

2.10.4. Touchdown PCR

Touchdown PCR, başlangıçta primerlerin T_m'sinden daha yüksek annealing sıcaklığı ile başlar ve ondan sonra PCR'ın ilk siklüsleri süresince annealing sıcaklığı T_m'nin altına kademeli olarak düşürülür. Bu, herhangi bir nonspesifik annealing olayı gerçekleşmeksizin primerlerin yalnızca doğru hedef dizilerine spesifik olarak bağlanmalarını sağlar. Böylece elde edilen ilk ürünler spesifik olduğundan PCR'ın ilk siklüslerinde doğru hedef dizilerin konsantrasyonu artar. Don ve ark. tarafından tanımlanan "thumb" kuralına göre yaklaşık 20 nükleotit uzunluğunda primerler kullanıldığında ilk 20 siklüs annealing sıcaklığı her iki siküsde bir 1°C düşürülür. Ondan sonra reaksiyon 55°C'lik bir annealing sıcaklığında bir 10 siklüs daha gerçekleştirilerek tamamlanır (McPherson ve Moller, 2007). Ya da başlangıç siklüsünde annealing sıcaklığı, primerlerin T_m değerine eşit ya da 2-5°C altında bir sıcaklığa ulaşıncaya kadar 1-2°C/siklüslük aşamalarla düşürülür. Touchdown PCR, başlangıç primer-kalıp çift zincir oluşumunun spesifitesini ve böylece final PCR ürününün spesifitesi artırır (Anonim, 2006).

2.10.5. Multiplex PCR

Bir PCR ile birden fazla hedef dizinin birlikte çoğaltılması çoklu (multipleks) PCR olarak adlandırılır. Multipleks PCR işlemi kalıp DNA yada DNA'larda birden fazla bölgeye bağlanan çok sayıdaki primer çiftlerinin kullanımı ile gerçekleştirilir. Bu PCR gen delesyonlarının haritalanması, küçük delesyonların, çerçeve kayması ve nokta mutasyonlarının analizinde kullanılan bir yöntem olduğundan "Duchenne Muscular Dystrophy" (DMD) ve kistik fibrozis gibi genetik hastalıkların tanısında kullanılmaktadır (Temizkan ve Arda 2004).

2.10.6. PCR katkı maddeleri

Çeşitli 'enhancer' bileşiklerin PCR'ın spesifitesini ve etkinliğini artırdığı bilinmektedir. Bunlar reaksiyonun etkin annealing sıcaklığını artıran kimyasalları, DNA bağlayıcı proteinleri ve ticari olarak elde edilebilir reagentları içerir. Böyle katkı maddeleri, primer annealing spesifitesini artırmak, primerlerin bağlanma olasılığını artırmak, özellikle GC'ce zengin diziler gibi zor kalıplar söz konusu olduğunda PCR verimini artırmak, ürün uzunluğunu artırmak, ürün spesifitesini artırmak, enzim stabilitesine katkıda bulunmak için PCR'lara ilave edilebilir. Ayrıca enhancerlar sıklıkla PCR'ın ticari optimizasyon ve enhancer kitlerinin bileşenleri olarak kullanılırlar. Baz eşleşmesinin destabilizasyonuna yol açan katkı maddeleri özellikle GC'ce zengin diziler gibi zor kalıplar söz konusu olduğunda PCR'ı artırabilir ve yanlış eşleşen primer-kalıp komplekslerinin göreceli olarak daha fazla stabilize olmasını sağlayarak spesifiteyi de artırabilir. Bu bileşikler optimal olmayan PCR şartlarını iyileştirmek için bazı durumlarda yararlı olabilmesine rağmen bazıları, kalıpların ve primer kombinasyonlarının geniş bir aralığına uygulanamaz. Her PCR'da başarıyı kesinleştirecek olan 'büyülü' bir katkı maddesi yoktur ve annealing sıcaklığı gibi farklı şartlar altında farklı katkı maddelerini test etmek gerekli olabilir. Farklı annealing sıcaklıklarının otomatik testine izin veren bir gradient termal döngü cihazı kullanımı ile böyle bir test kolaylaştırılır (McPherson ve Moller, 2007).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Kimyasal Maddeler

Agaroz (amResco), Agar (Bacto™ Agar, BD), Betaine monohidrat (Fluka), Bromophenol blue (Panreac), Buffer Q (Qiagen), BSA (Promega), CaCl₂.2H₂O (Merck), dNTP (BIORON), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merc), Dimetil formamit (DMF) (Fluka), Etidium bromür (amResco), Gliserol (EUROMEDEX), GoTaq® DNA polimeraz (Promega), GoTaq® Flexi Buffer (Promega), Xylene cyanol (Sigma), Primer (Iontek), Primer (Metabion international), Precipitation solution (Fermantas), NaCl solution (Fermantas), Na₂EDTA.2H₂O (amResco); NaOH (Aldrich), Kloroform, KCl (Sigma), KCH₃COO (Merck), Lysis solution (Fermantas), Lystophin, (Sigma), MgCl₂ çözeltisi (Promega), SDS (Merck), Sulfolane (Fluka), Template DNA, Triton X-100 (Sigma Aldrich), Tween 20 (Merc), Trisma base (Sigma), λ/Ecor I Hind III markör (Iontek), 1kb DNA Ladder (Promega), 2-Pyrolidon (Fluka), Invitrogen™ LB Broth Base (Lennoxl Broth Base), Falcon Tüpü Erlen, Beher, Cam Şişeler (100 ml, 250ml, 500 ml, 1000 ml' lik), Mezür, Petri kapları (Isolab), Pipet uçları (Isolab, Gilson), Mikrosantrifüj (CLP) ve PCR tüpleri (BBI) ile diğer laboratuvar malzemeleri kullanıldı.

3.1.2. Cihazlar

-20 ve -80 °C'deki buzdolapları (Arçelik, Arçelik, Hettich), Etüv (TERMAL® Laboratuvar ALETLERİ), Güç kaynağı (BIORAD Power PAC 300), Hassas terazi (VİBRA), Otomatik pipetler (Gilson, ependorf), Otoklav (Hiclave), Manyetik karıştırıcı (IKA® RH basic 2), Mikrodalga fırın (Arçelik), PH metre (Sartorius Professional meter pp 15), Thermal cycler (BioRad), Saf su cihazları (YOUNGLIN INSTRUMENT), Santrifüj (MIKRO22R Hettich), Shaker-İnkübatör (BIOSAN) , UV transillüminatör (Syngene and Kodak), Vorteks (FALC), Buz makinesi (Scotsman, Vision), Yatay elektroforez (BIORAD) kullanıldı. Mikrosantrifüj (CLP) ve PCR tüpleri (BBI) ile diğer laboratuvar malzemeleri kullanıldı.

3.1.3. Çözeltilerin Hazırlanışı

3.1.3.1. 6X Bromofenol Mavisi

15 ml gliserol, 0,25 g bromophenol blue ile 0,25 g Xylene cyanol, 100 ml deiyonize su içerisinde tamamen çözününceye kadar karıştırılarak hazırlandı.

3.1.3.2. 0,5 M EDTA Çözeltisi

18,61 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'nun 70 ml deiyonize suda manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılarak ve pH metre ile pH kontrolü yapılarak 10 M NaOH ilavesiyle tamamen çözünmesi sağlandı. Ardından 10 M NaOH ile pH:8.0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim deiyonize suyla 100 ml.'ye tamamlandı.

3.1.3.3.EMB/ Kanlı agar

Pepton	10 g	
Laktoz.....	5g	
Sakkaroz.....	5 g	
Di potasyum hidrojen fosfat.....	2 g	pH= 7.2±0.2
Eosin Y.....	0.4	
Metilen mavisi.....	0.065 g	
Agar.....	13.5 g	
Saf su.....	1lt	

Hazır karışımdan 36 gr tartıldı ve 1 lt saf su eklenip, agar eriyene kadar kaynar su banyosunda tutuldu. pH'ı ayarlandı. Otoklavda 121° C' de 15 dakika sterilize edildi. Besiyeri 60° C' lere düşürüldü. Sterilizasyon sırasında ısı etkisiyle metilen mavisi indirgendiğinden besi yeri turuncu renge dönüştü. Metilen mavisi okside olup kendi mavi-mor renge dönmesi için besi yeri çalkalanıp, steril petri kutularına 15-20 ml kadar boşaltıldı.

3.1.3.4. Etidium Bromür

10 mg Etidium bromür, 10 ml deiyonize su içinde çözöldü ve +4°C’de muhafaza edildi.

3.1.3.5. 25 mM’lık dNTP Karışımının Hazırlanışı

dGTP 25 µl (100 mM)

dATP 25 µl (100 mM)

dCTP 25 µl (100 mM)

dTTP 25 µl (100 mM)

100 µl (25 mM)

900 µl ddH₂O

1000 µl (10 mM) dNTP mix

Yukarıda verildiği gibi dGTP, dATP, dCTP, dTTP’nin her birinden 25’er µl alınıp steril ependorf tüpünde karıştırıldı. Hazırlanan 100 µl 25 mM’lık bu dNTP mixine üzerine 900 µl ddH₂O ilave edilerek karıştırıldı. Elde edilen 10 mM’lık dNTP mix 250 µl’lik hacimler halinde steril ependorf tüplerine konuldu ve -80°C’de muhafaza edildi.

3.1.3.6. FSB (Frozen Storage Buffer)

100 mM KCl (3,7250 g/0,5 L), 50 mM CaCl₂ (2,7750 g/0,5 L), 10% (w/v) gliserol (50 g), 10 mM KCH₃COO (pH’sı 7,5 olan 1 M’lık çözeltisinin 5 ml’si) bir miktar suda çözöldü, pH , 1M HCl ile 6,2’ye ayarlandı ve toplam hacim deiyonize su ile 500 ml’ye tamamlanarak otoklavlandı.

3.1.3.7. LB ve LB Agar

20 g Invitrogen™ LB Broth Base (Lennox I Broth Base, %1 (w/v) Trypton, %0,5 (w/v) Yeast ekstrakt ve %0,5 (w/v) NaCl) alındı ve 1 litre deiyonize suda çözöldü. Hazırlanan bu LB besiyeri 50 ml’si her birine 5’er ml olmak üzere 10 adet deney

tüpüne dağıtıldı, deney tüplerinin ağzı alüminyum folyoyla kapatılarak otoklavlandı. Katı besi yeri için ise litrede %1,5 (w/v) agar içerecek şekilde 1 litrelik LB besi yeri ihtivasına ekstraktan 15 gram katı agar ilave edildi.

3.1.3.8. TE (10mM Tris, 1mM EDTA) Tamponu

Trisma-base	1,21g
Na ₂ EDTA	0,372g
Distile su	900ml
Son hacim	1000ml

Maddeler iyice çözüldükten sonra pH : 8.0' e ayarlandı ve distile su ile 1lt' ye tamamlandı.

3.1.3.9. 50XTris Asetat EDTA (TAE) Tamponu

242 g Trisma-base, 57,1 ml Glasiyal asetik asit ve 100 ml 0,5 M EDTA (pH:8) ilave edilerek manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Hazırlanan çözeltinin pH'ı glasiyal asetik asitle 8,5'e ayarlandı ve toplam hacim deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı.

3.1.3.10. 1X Tris Asetat EDTA (TAE) Tamponu

10 ml 50X TAE Tamponu alındı toplam hacim deiyonize suyla 500 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.11. Xylene Cyanol

250 mg Xylene cyanol, 4 ml gliserol toplam hacimde 5x TAE tamponu ile 10 ml' ye tamamlandı.

3.1.3.12. Primerlerin Hazırlanışı

PCR işlemi GSBL Pozitif *Klebsiella pneumonia* bakterisi için 100 µM olarak hazırladığımız primer çözeltilerini 5µM seyreltip hedef gen bölgeleri çoğaltılmaya çalışılmıştır.

Tablo 3.1. *Klebsiella pneumonia* için spesifik olan primer dizileri

Primerin adı	Oligonükleotid dizisi	Hedef Büyükük	T _m (°C)
PAesbl_TEMA	ATAAAATTCTTGAAGAC	626	40.7
PAesbl_TEMB	TTACCAATGCTTAATCA	697	43.1
PAesbl_SHVFO R	TGGTTATGCGTTATATTC GCC	708	55.9
PAesbl_SHVRE V	GCTTAGCGTTGCCAGTGC T	625	58.8
PAesbl_CTXM9 F	ATGGTGACAAAGAGAGT GCA	589	55.3
PAesbl_CTXM9 R	CCCTTCGGCGTAGATTCT C	685	58.8
PAesbl_VEBFO R	CGACTTCCATTTCCTGAT GC	616	59.4
PAesbl_VEBRE V	GGACTCTGCAACAAATA CGC	603	57.3

PCR işlemi esnasında her bir numune için primerlerin son kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgeleri tanıyarak bağlanmışlardır.

3.1.3.13. Kalıp DNA'nın Hazırlanışı

Klebsiella kanlı agar plağı üzerinde 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Yani ekimi yapıp çoğalması için beklemeye bırakılan bakteriler çoğaldıktan sonra DNA izolasyonu yapılmaksızın doğrudan kalıp olarak kullanıldı.

3.2. Yöntem

Öncelikle yapılan optimizasyon çalışmaları ile Touch Down ve Multiplex PCR'da kullanılacak enhancer konsantrasyonlarına ve annealing sıcaklıklarına karar verildi. Gerçekleştirilen PCR'larda kullanılan primerlerin hesaplanan annealing sıcaklıkları (T_m'leri); *TEMA* ve *TEMB* için 58°C olarak belirlendi. *SHVFOR* ve *SHVREV* için ise 62°C olarak belirlendi. *CTXM9F* ve *CTXM9R* için ise de 62°C olarak belirlendi. *VEBFOR* ve *VEBREV* için ise 60°C olarak belirlendi. Polimeraz zincir reaksiyonları, Touch Down PCR ve Multiplex PCR prosedürü kullanılarak 62°C'den başlanarak annealing sıcaklığı her bir siklüsde 0,5°C düşecek şekilde 14 siklüs ve bu 14 siklüsün ardından 55°C'lik sabit bir annealing sıcaklığında 20 siklüs olmak üzere gerçekleştirildi.

Kontrol deneylerinden sonra gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonlarında kalıp olarak, DNA saflaştırılmaksızın doğrudan GSBL pozitif *Klebsiella pneumonia* mikroorganizması kullanıldı.

3.2.1. Bakteri kültürü

Bakteri kültür eldesi;

1. GSBL pozitif *Klebsiella pneumonia* kanlı agar plağı üzerinde, sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış inkübatöre konularak bir gece boyunca (yaklaşık 24 saat) inkübe edildi.
2. Ekimi yapıp çoğaltılan bakterilerden birer koloni özenle alınarak PCR tüplerine konuldu.

3.2.2. Kalıp DNA'nın Üretimi ve İzolasyonu

Gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonlarında kalıp olarak doğrudan GSBL pozitif *Klebsiella pneumonia* kullanıldı.

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonları

1. PCR toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla bir PCR tüpüne konuldu.
2. PCR tüpüne konan bileşenlerin iyice karışması sağlandı.
3. 200 µl'lik thin walled tüpler PCR aletine (thermal cycler) yerleştirildi.
4. Belirlenen program seçilerek reaksiyon başlatıldı.
5. PCR sonrası Agoroz Jel elektoroforezi yapıldı.
6. Elektroforez fotoğrafları UV ışığı altında incelendi.

3.2.3.1. Thermal Cycler' in Program Ayarı

Touch Down PCR ve Multiplex PCR için thermal cycler'in programı; ilk zincirin ayrılmasının tamamlandığından emin olmak için 94°C'de 5 dk'lık bir siklüs, denatürasyon için 94°C'de 1 dk, anealing için 65°C–50°C'de (65°C'lik bir sıcaklıktan başlatılarak 58°C'lik bir sıcaklığa ulaşılana kadar sıcaklık her bir siklüsde 0,5°C düşürüldü) 1 dk, extension için 72°C'de 1 dk olmak üzere 14 siklüs, denatürasyon için 94°C'de 1 dk, annealing için 50-65°C'de 1 dk, extension için 72°C'de 1 dk olmak üzere 20 siklüs ve final extension için 72°C'de 5 dk, 4°C'de for ever olacak şekilde ayarlandı.

4°C'de 1 dakika

94°C'de 5 dakika

94°C'de 1 dakika

65°C'de 1 dakika



14 döngü

-0,5°C her bir döngü için

72°C'de 1 dakika

94 °C'de 1 dakika

58°C'de 1 dakika



20 döngü

72°C'de 1 dakika

72°C'de 5 dakika

4°C'de for ever

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR işlemi yapıldıktan sonra oluşan PCR ürünleri aşağıda açıklandığı şekilde %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir. 1 gr agaroz 100 ml 1 X TAE tamponu içine alındı ve mikrodalga fırında hafif hafif kaynatılıp karıştırılarak agarozun tamamen çözünmesi sağlandı. Agoroz tompon içinde çözüldükten sonra elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde 20 µl etidyum bromür ilave edildi, elde edilen bu homojen karışım jel tabakasına döküldü ve kuyucukların oluşması için jel sistemine tarak yerleştirilerek donması beklendi. Donma gerçekleştikten sonra tarak oluşan kuyucuklara zarar vermiyecek şekilde ortmdan dikkatlice uzaklaştırıldı ve jel elektroferez tankına yerleştirildi. Tanka 1 X TAE tamponu jelin üzerini tamamen örtünceye kadar aktarıldı. Touch Down PCR sonrası 15'er µl'lik numuneler, Multiplex PCR sonrası ise 10'ar µl'lik numuneler mikropipet yardımıyla dikkatlice jele yüklendi. Orta boydaki jellerde (10 X 20 cm) 90 mA'lik bir akımda 1 saat, küçük jellerde ise (8 X 10 cm) 90 mA'de 30

dakika süreyle DNA'lar yürütüldü ve son olarak jel bir UV transillüminatör kullanılarak görüntülendi ve fotoğraflandı. Marker olarak 1kb (0.5mg DNA/ml 0.05 mg, λ / Ecor I Hind III) DNA ladder kullanıldı. Marker DNA parçalarının uzunluğu bilindiğinden parçacıkların jelde göçü ölçüt alınarak örneklerdeki DNA parçacıklarının uzunluğu saptanabilmektedir. Örneğimizden elde edilen DNA bandı kendi hizasındaki markörün DNA bandı ile karşılaştırılarak bant hedef DNA ile aynı uzunlukta bulunduğu da bunu o mikroorganizmaya ait olduğu düşünülür.

GSBL Pozitif *Klebsiella* bakterisinden Genomik DNA izolasyonu

DNA izolasyon işlemi için Fermentas firmasının Genomik DNA saflaştırma kiti kullanıldı ve kitin prosedürü aşağıdaki basamaklar şeklinde takip edildi.

- 5 ml'lik LB besiyerine GSBL pozitif *Klebsiella pneumoniae* inoküle edildi ve 37°C'de gece boyunca bekletildi.
- 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılan bakteri (3 ml) 15.000 rpm'de 2dk santrifüj edilerek toplandı.
- Bakteri 200 μ l'lik TE tamponunda (pH: 8, 10 mM Tris, 1 mM EDTA) süspansiyon edildi.
- Lizis çözeltilisinin 400 μ l'si ile örneğin 200 μ l'si karıştırılıp 5 dk 65° C'de inkübe edildi.
- Kloroformdan 600 μ l eklenir, yavaşça (3-5 kez) emülsiyon haline getirildi ve 2 dk 15.000 rpm' de örnek santrifüj edildi.
- Sağlamış olduğumuz konsantre çözeltilinin 80 μ l' si ile sterilize de iyonize suyun 720 μ l' sini karıştırılarak çöken bir çözelti hazırlandı.
- Yeni bir tüpe DNA içeren üst sulu faz transfer edilir ve hazırlanmış çöken çözeltilinin 800 μ l' si eklendi. 1-2 dk oda sıcaklığında farklı değişimler gözlenerek karıştırıldı. 2 dk 15.000 rpm' de santrifüj edildi.
- Süpernatant kısım tamamıyla çıkarıldı ve yavaşça vortekslenerek 1,2 M NaCl çözeltilisinin 100 μ l'sinde DNA pelleti çözüldü. Pelletin tamamıyla çözüldüğünden emin olundu.
- Soğuk %100 etanolden 300 μ l eklenir, DNA çökeltisinin oluşması sağlandı (20° C'de min. 30 dk). 10 dk 15.000 rpm'de döndürüldü. Pellet % 70'lik 650 μ l

soğuk etanol ile yıkandı ve yavaşça vortekslenerek sterilize de iyonize suyun 100 µl'sinde DNA çözüldü.

- Elde Edilen Genomik DNA PCR işlemlerinde kullanılmak üzere -20 C de saklandı.

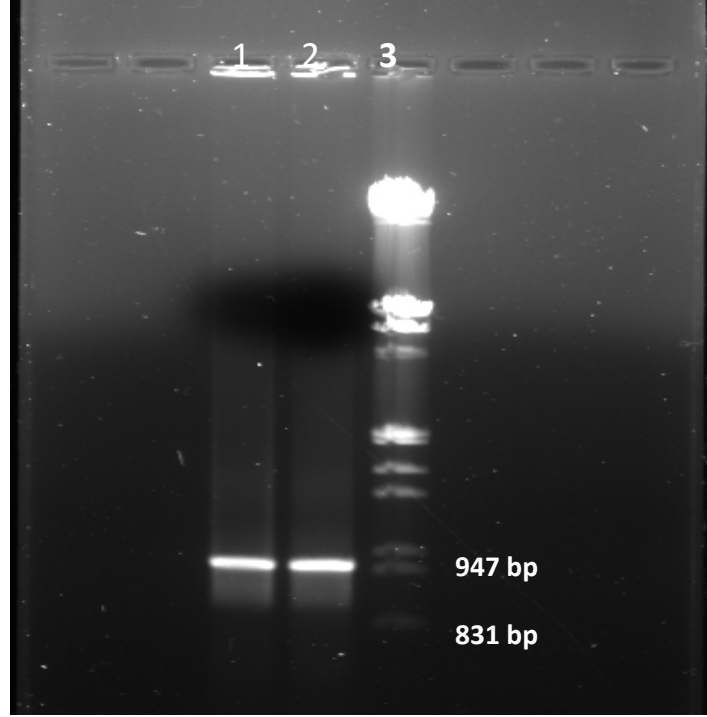
1. Touch Down PCR için

- | | |
|------------------------------|--------------------------------------|
| • Buffer | 10,0µl (5x GoTaq® Flexi Buffer) |
| • MgCl ₂ | 4µl (25 mM MgCl ₂) |
| • dNTPmix | 3µl (her biri 2,5 mM) |
| • Primer rev | 2.5µl (10 µM) |
| • Primer for | 2.50µl (10 µM) |
| • Template DNA | 2 µl (200ng) |
| • DNA polimeraz | 0,2µl (5 U/µl Go Taq® DNA polimeraz) |
| • PCR enhancer (Q çözültisi) | 20 µl |
| • Deiyonize H ₂ O | 5.8 µl |

-
- | | |
|------------------------|----------------|
| • Toplam Hacim; | 50,0 µl |
|------------------------|----------------|

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bulgular



Şekil 4.1. GSBL pozitif *Klebsiella pneumoniae* genomik DNA sı kullanılarak yapılan Touch Down PCR ürünlerinin % 1 lik agaroz jel elektroforezi sonrası UV Transilüminatörden elde edilen görüntüsü. 1. kuyucuk *CTX* primerleriyle yapılan PCR 870 bpürün vermektedir, 2. kuyucuk *SHV* primerleriyle yapılan PCR 867 bpürün vermektedir, 3. kuyucuk λ / HindIII-EcoRI DNA Markör

PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonrası UV transilüminatörden elde edilen görüntüsüdür. Bu görüntü ‘‘Thermal Cycler’ in Program Ayarı’’ 3.2.3.1. bölümde tanımlanan bir Touch Down PCR prosedürü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu görüntüde ki PCR ürünleri genomik DNA saflaştırılarak kalıp olarak kullanılmıştır. Yukarıda, jele ait bu fotoğraf incelenerek PCR’ da kullanılan enhancer kombinasyonlarının amplifikasyon üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

2. Touch Down PCR

• Q solution	20µl (5x GoTaq [®] Flexi Buffer)
• MgCl ₂	3µl (25 mM MgCl ₂)
• dNTPmix	3µl (her biri 2,5 mM)
• Primer 1	3µl (10 µM)
• Primer 2	3µl (10 µM)
• Template DNA (kalıp DNA)	3 µl
• DNA polimeraz	0,5µl (5 U/µl Go Taq [®] DNA polimeraz)
• Tampon (10X)	.5 µl
• Deiyonize H ₂ O	19.5 µl

Toplam Hacim	50,0 µl
---------------------	----------------

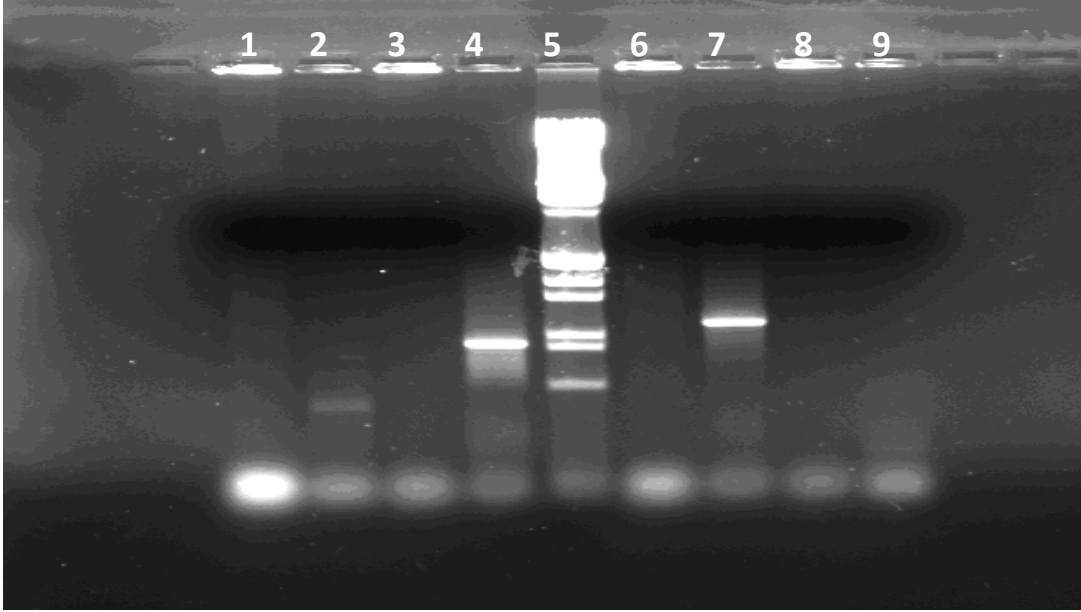


Şekil 4.2. GSBL Pozitif *Klebsiella pneumoniae* DNA'sı kullanılarak yapılan Touch Down PCR ürünlerinin %1'lık agaroz jel elektrofotezi sonrası UV Transilüminatörden eldedilen görüntüsü. 1.kuyucuk *CTX* primerleriyle yapılan PCR 870 bp ürün vermektedir, 2. kuyucuk *SHV* primerleriyle yapılan PCR 867 bp ürün vermektedir, 3. kuyucuk λ / HindIII-EcoRI DNA Markör, 4. kuyucuk *TEM* kuyucuk primerleriyle yapılan PCR 1075 bp ürün vermektedir, 5. Kuyucuk *VEB* primerleriyle yapılan PCR 642 bp ürün vermektedir.

3. Serumdan direk olarak Touch Down PCR ile ESBL pozitif *Klebsiella*'nın tanısı (PCR)

- | | |
|------------------------------|--|
| • Buffer(Q solution) | 10,0 μ l (5x GoTaq [®] Flexi Buffer) |
| • MgCl ₂ | 3 μ l (25 mM MgCl ₂) |
| • dNTPmix | 3 μ l (her biri 2,5 mM) |
| • Primer 1 sense | 3 μ l (10 μ M) |
| • Primer 2 reverse | 3 μ l (10 μ M) |
| • Template DNA (kalıp DNA) | |
| Seumdan alınan | 3 μ l |
| • DNA polimeraz | 0,5 μ l (5 U/ μ l Go Taq [®] DNA polimeraz) |
| • Tampon (10X) | 5 μ l |
| • Deiyonize H ₂ O | 19.5 |

- **Toplam Hacim** **50,0 µl**



Şekil 4.3. *Klebsiella pneumoniae*'nin serumdan direk tanısı için yapılan Touch Down PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonrası UV Trans-illüminatörden elde edilen görüntüsü. 1. kuyucuk petrideki koloniden, 2. kuyucuk sıvı serumdan *CTX* primerleriyle yapılan PCR 870 bp ürün vermektedir, 3. kuyucu petrideki koloniden, 4. kuyucuk sıvı serumdan *SHV* primerleriyle yapılan PCR 867 bp ürün vermektedir, 5. kuyucuk; λ /HindIII-EcoRI DNA Markör, 6.kuyucuk petrideki koloniden, 7. kuyucuk sıvı serumdan *TEM* primerleriyle yapılan PCR 1075 bp ürün vermektedir, 8. kuyucuk petrideki koloniden 9. kuyucuk sıvı serumdan *VEB* primerleriyle yapılan PCR 642 bp ürün vermektedir.

Multiplex PCR için;

Multiplex PCR işlemini yapmak için aşağıdaki PCR karışımları hazırlandı ve touch down PCR programı kullanılarak işlem tamamlandı.

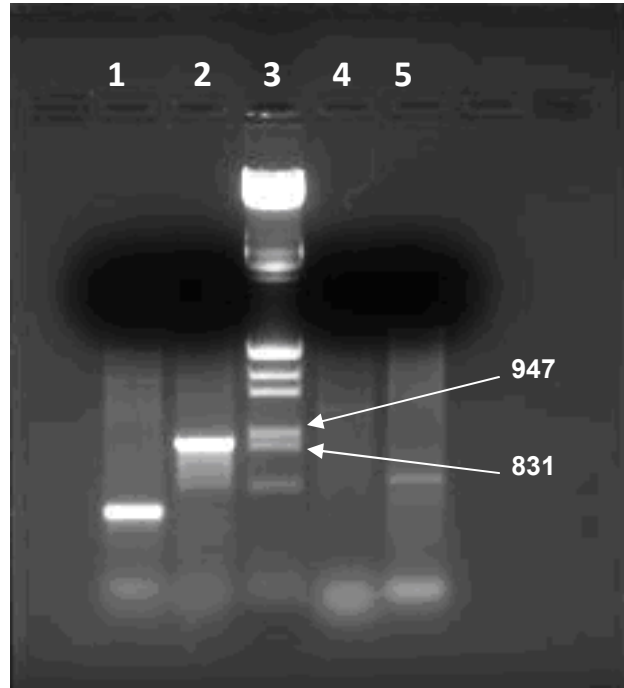
- **PCR Mix 1**

• Enhancer/Enhancer mix+ ddH ₂ O	20 µl
• Buffer	10 µl (5x GoTaq [®] Flexi Buffer)
• MgCl ₂	4 µl (25 mM MgCl ₂)
• Template DNA	2 µl (biyolojik sıvı)
• dNTPmix	3 µl (her biri 2,5 mM)
• Deiyonize H ₂ O	0.8 µl
• Primer CTXF	2.5 µl
• Primer CTXR	2.5 µl
• Primer TEMA	2.5 µl
• Primer TEMA	2.5 µl
• Primer TEMA	2.5 µl
• DNA polimeraz	0.2 (5 U/µl Go Taq [®] DNA polimeraz)
<hr/>	
• Toplam Hacim	50,0 µl

PCR Mix 2

• Enhancer/Enhancer mix+ ddH ₂ O	20 µl
• Buffer	10 µl (5x GoTaq [®] Flexi Buffer)
• MgCl ₂	4 µl (25 mM MgCl ₂)
• Template DNA	2 µl (biyolojik sıvı)
• dNTPmix	3 µl (her biri 2,5 mM)
• Deiyonize H ₂ O	0.8 µl
• Primer VEBFOR	2.5 µl
• Primer VEBREV	2.5 µl
• Primer SHVFOR	2.5 µl
• Primer SHVREV	2.5 µl
• DNA polimeraz	0.2 (5 U/µl Go Taq [®] DNA polimeraz)
<hr/>	
• Toplam Hacim	50,0 µl

Thermal Cycler' in Program Ayarı'' 3.2.3.1. bölümde tanımlanan bir Touch Down PCR prosedürü takip edilerek gerçekleştirilen Multiplex PCR ürünleri %1' lik agaroz jel elektroforezi sonrası UV transilüminatörle bakılarak sonuçlar analiz edildi.



Şekil 4. 4. GSBL Pozitif *Klebsiella pneumoniae* DNA'sı kullanılarak yapılan Multiplex PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektrofotezi sonrası UV Transilüminatörden eldedilen görüntüsü. 1.kuyucuk CTX primeriyle, 2. kuyucuk SHV primeriyle, 3.kuyucuk markör 4. kuyucuk TEM primeriyle, 5. kuyucuk ise VEB primeriyle yapılan PCR ürünlerini göstermektedir. CTX ve TEM primerleriyle yapılan PCR 500 bp den daha düşük spesifik olmayan bir ürün vermektedir, SHV primerleriyle yapılan PCR 867 bp ürün vermektedir, SHV ve VEB kuyucuk primerleriyle yapılan PCR 1075 bp ürün vermektedir, VEB primerleriyle yapılan PCR 642 bp ürün vermektedir.

4. 2 Tartışma

Moleküler tekniklerde günümüzde hızla ilerlemeler meydana gelmektedir. Mikroorganizmaların DNA analizlerinin yapılabilmesi için de klinik mikrobiyoloji çalışmalarında klasik kültür yöntemlerine karşı alternatif olarak bazı moleküler tekniklerin kullanımını yaygınlaşmaya başlamıştır. *Klebsiella pneumonia* kompleks DNA analiz çalışmalarında da genel olarak son zamanlarda yaygın olarak kullanılan ve çok hassas moleküler bir yöntem olduğu belirlenen PCR kullanılmaktadır (Van Pelt ve ark., 1999; Vandamme ve ark., 1994).

PCR tekniği kullanılarak yapılan laboratuvar tanımlarında büyük bir hız ve kesinlik kazandırılmıştır. PCR tekniğinde kullanılan genetik materyal çok az miktarda bile olsa çoğaltılabilir ve kolaylıkla tanımlanabilir. Oysa klasik yöntemlerle çalıştığımız zaman

kullanılan metaryalin miktarı önemlidir az miktardaki numuneyle yapılan çalışmalarla istenilen sonuca sağlıklı bir şekilde ulaşılamayabilir. Bu nedenle PCR teknikği, mikrobiyolojik çalışmaların vazgeçilmezi olmuştur (Mahenthiralingam ve ark., 1996).

PCR gibi moleküler tekniklerde birden çok numunenin bir arada test edilmesi bu tekniğin avantajlarının başında gelir. Klasik yöntemlerde ise her bir numune için tek tek analiz yapılması gerekir. PCR'la yaptığımız çalışmada ise bir defada birden fazla numunenin analizine fırsat vererek oldukça fazla zaman ve maliyetten kazanç sağlanır. Yani PCR'ın bir kez çalışmasıyla araştırmaya kazandırdığı maliyet ve hız oldukça fazladır. Ayrıca PCR ile testlerin istenildiği anda tekrarlanabilir olması PCR çalışmalarının güvenilirliğini göstermektedir. Klasik yöntemlerle yapılan çalışmalarda herhangi bir basamakta meydana gelen hatada analiz tekrar en başa dönülerek yapılmalıdır. PCR'da ise örneğin Elektroforez başamağında meydana gelen bir hata elektroforezin tekrarıyla çözümlenebilir. Bu durumda da çok fazla zaman kaybı olmaz. (Van Pelt ve ark., 1999; Vandamme ve ark., 1994).

İlk önce PCR optimizasyonu çalışmaları yapılarak elimizde olan bakterilerin tanı amaçlı yaptığımız PCR'larda DNA izolasyonu yapmadan herhangi bir biyolojik sıvıyı doğrudan kullanabilmemizi sağlayan karışım kombinasyonları oluşturmamızı sağlamıştır. Çalışmamızda *Klebsiella pneumoniae* bakterileri pipet ucuyla koloniden alınarak PCR reaksiyon karışımına direk katıldığından reaksiyonların gerçekleştirildiği her bir PCR tüpündeki kalıp miktarı birbirinden farklı olabilir ancak burada çalışmamızda önemli olan nokta mikrobiyolojik tanı amaçlı olup olmadığıdır yani Kalitatif tanı yapılmaya çalışıldı. Touch Down PCR sonrası elde edilen ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapıldıktan sonra jeller UV transilüminatörden görüntülenerek fotoğraflandı ve amplifikasyon sonuçları değerlendirildi. Çalışmamızda kontrol yapmak için ilk önce genomik DNA kalıp olarak kullanılarak elimizdeki mikroorganizmanın GSBL Pozitif olup olmadığını anlamak için genomik DNA izolasyonu yapıldı sonra PCR işlemi yapıldı. Şekil 4.1'de GSBL pozitif *Klebsiella pneumoniae* genomik DNA'sı kullanılarak yapılan Touch Down PCR ürünlerinin % 1 lik agaroz jel elektroforezi sonrası UV Transilüminatörden elde edilen görüntüsü 1. Kuyucukta CTX primerleriyle yapılan PCR 870 bp'ün vermektedir, 2. kuyucukta SHV primerleriyle yapılan PCR 867 bp'ün vermektedir, 3. kuyucuk λ / HindIII-EcoRI DNA Markör vardır. Aradığımız

genlere bu şekile bakarak ulaşabildik ve mikroorganizmalarımızın GSBL Pozitif olduğuna karar verdik.

Genomik DNA izolasyonu yaparak bu genlere ulaşabildik fakat bizim amacımız genomik DNA izolasyonu yapmaksızın koloniden direk tanı koymaya çalışmaktı. Genomik DNA saflaştırması yapılarak bu teşhis konulmaya çalışılsa klasik yöntemlerle yapılan teşhislere göre bir üstünlük sağlanamayacaktı. Klasik tanı yöntemlerini kullanarak yapılan teşhisler hem zaman hem de maliyet açısından direk koloniden PCR ile yapılan teşhise göre üstünlüğü bulunmamaktadır. Genomik DNA izolasyonu için Klasik teşhis yöntemlerini yapmak için zaman gerekir. Aynı şekilde genomik DNA izolasyonu için inkübasyon süresi gerektiğinden bu şekildeki teşhiste zaman kayıplarına yol açmaktadır. Oysaki genomik DNA izolasyonu yapmaksızın koloniden direk yapılan teşhisler süre ve maliyet açısından oldukça avantaj sağlamaktadırlar. Teknolojinin gelişmesiyle de klasik yöntemle yapılan teşhisler zamanla rafa kalkarak yerini PCR gibi gelişmiş teknolojilere bırakacağı düşünülmektedir.

Şekil 4.2. de GSBL Pozitif *Klebsiella pneumoniae* DNA'sı kullanılarak yapılan Touch Down PCR ürünlerinin %1'lık agaroz jel elektrofotezi sonrası UV Transilüminatörden elde edilen görüntüsüdür. Ulaşılmak istenen genler 1. Kuyucukta *CTX* primerleriyle yapılan PCR 870 bp ürün vermiştir, 2. kuyucukta *SHV* primerleriyle yapılan PCR 867 bp ürün vermektedir, 3. kuyucuk λ / HindIII-EcoRI DNA Markör bulunmaktadır, 4. kuyucukta *TEM* primerleriyle yapılan PCR 1075 bp ürün vermektedir, 5. kuyucukta *VEB* primerleriyle yapılan PCR 642 bp ürün vermektedir.

Şekil 4.3.' de de *Klebsiella pneumoniae*'nin serumdan direk tanısı için yapılan Touch Down PCR ürünlerinin agaroz jel elektrofotezi sonrası UV Transilüminatörden elde edilen görüntüsüdür. 1. kuyucuk petrideki koloniden, 2. kuyucuk sıvı serumdan *CTX* primerleriyle yapılan PCR 870 bp ürün vermiştir, 3. Kuyucu petrideki koloniden, 4. sıvı serumdan *SHV* primerleriyle yapılan PCR 867 bp ürün vermiştir, 5. kuyucuk; λ / HindIII-EcoRI DNA Markör, 6. kuyucuk petrideki koloniden, 7. kuyucuk sıvı serumdan *TEM* primerleriyle yapılan PCR 1075 bp ürün vermiştir, 8. kuyucuk petrideki koloniden 9. kuyucuk sıvı serumdan *VEB* primerleriyle yapılan PCR 642 bp ürün vermiştir. Böylece genomik DNA saflaştırması yapmaksızın istenilen genlere ulaşılabilmiştir.

Şekil 4.4.' de ise GSBL Pozitif *Klebsiella pneumoniae* DNA'sı kullanılarak yapılan Multiplex PCR ürünlerinin %1'lık agaroz jel elektrofotezi sonrası UV Transilüminatörden eldedilen görüntüsü. 1.kuyucuk CTX primeriyle, 2. kuyucuk SHV primeriyle, 3.kuyucuk markör 4. Kuyucuk TEM primeriyle, 5. Kuyucuk ise VEB primeriyle yapılan PCR ürünlerini göstermektedir. *CTX* ve *TEM* primerleriyle yapılan PCR 500 bp den daha düşük spesifik olmayan bir ürün vermektedir, *SHV* primerleriyle yapılan PCR 867 bp ürün vermektedir, *SHV* ve *VEB* kuyucuk primerleriyle yapılan PCR 1075 bp ürün vermektedir, *VEB* primerleriyle yapılan PCR 642 bp ürün vermektedir. Multiplex PCR işlemlerinde elimizdeki primerlerle yapılan PCR mixler ve sonuçlarında tanımlanmak istenilen birden fazla ürün meydana gelmemiştir, sonuç olarak genelde ürünlerden sadece birisi meydana gelirken bazı denemelerde de bu tek ürün oldukça az miktarda elde edilmiştir.

5. SONUÇ

Enfeksiyon hastalıklarının belirlenebilmesi, tedaviye nasıl yön verileceği açısından oldukça önemlidir. Örneğin kişilerde var olan bir enfeksiyon hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlandığında ve özellikle organizmanın herhangi bir direncinin varlığı da tespit edildiği takdirde tedaviye hangi ilaç ile başlanacağına karar verilmesi açısından çok önemlidir. Hastanın tedavisine sürecinin nasıl işleyeceğine ne kadar hızlı karar verilirse hastalığı meydana getiren etmenler çabucak ortadan kaldırılarak iyileşme sürecine çabucak ulaşılabilir. Araştırmacılar moleküler düzeylerde yapılan analizlerin bakterilerin belirlenmesi için daha güvenilir sonuçlar vereceğini belirtmişlerdir (Laguerre ve ark., 1994, Lavenir ve ark., 2007).

PCR yöntemi enfeksiyonel hastalıklara sebep olan mikroorganizmaları ve varsa dirençlerinin belirlenebilmesini hızlı ve güvenilir bir şekilde yapabildiği için PCR yöntemini yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. PCR yöntemi etkenin bulunmasında diğer yöntemlere göre göreceli olarak daha pahalı ve de kontaminasyona açık bir yöntem olmasına rağmen yaşamsal önemi olan vakalarda etkenin gösterilmesinde klasik tanı yöntemlerine göre daha çabuk, daha düşük maliyetli, daha hassas ve daha özgün

bir şekilde yapılabilir bu nedenle klasik bakteriyolojik yöntemlerden daha fazla tercih edilmektedir. Ayrıca PCR reaksiyonunda kullanılan primerler GSBL Pozitif *Klebsiella pneumoniae*'nin genine özgün olduğu için PCR tekniği ile mikroorganizmanın GSBL Pozitif *Klebsiella pneumoniae* olup olmadığı da kesin olarak ayrılabilmemizi sağlamaktadır. Kesin olarak yapabileceğimiz bu ayrımlarla da hastaların tedavi süreçlerini olumlu yönde etkileyerek yaşam kalitelerine tekrardan kavuşabilmelerini daha kısa bir şekilde sağlanabilecektir.

Yaptığımız literatür çalışmalarında genel olarak mikroorganizmaların tanısında ya klasik yöntemlerden faydalanılmış ya da DNA saflaştırma işlemine gidilerek tanı konulmaya çalışılmıştır. Bizim çalışmamız da ise diğer çalışmalardan farklı olarak GSBL Pozitif *Klebsiella pneumoniae* mikroorganizması için DNA saflaştırma işlemine gidilmeksizin doğrudan koloni PCR ile mikroorganizmanın GSBL pozitif olup olmadığının tanısının konulmasıydı. Bu gibi çalışmalarda tanı genomik DNA saflaştırarak yapılırsa tanı koymadaki süreç klasik bakteriyolojik tanı yöntemleri için gereken süre ve de maliyet açısından pek fazla bir farkı olmayacaktır. Ayrıca GSBL Pozitif genleri *Klebsiella pneumoniae* mikroorganizmalarında yaygın görüldüğünden insan sağlığı açısından bu mikroorganizmalar daha fazla tehdit oluştururlar. Bu nedenle teşhis edilmeleri önem arz etmektedir. Bizim çalışmamızda da genomik DNA saflaştırması yapmaksızın direk koloni analiz yapılarak klinik tanıda sürenin kısaltılması sağlanmıştır.

Maliyetlerin azaltılması ve de daha hızlı bir şekilde güvenilir sonuçlar elde edilmesi gibi amaçlara çalışmamızda bir vücut sıvısı olan kan serumunda GSBL Pozitif *Klebsiella pneumoniae* mikroorganizmalarını direk genomik DNA saflaştırması yapılmadan teşhis edilmek istenilen Beta laktamaz genlerine özgün primerler kullanılıp bu gen parçaları amplifiye edilerek GSBL pozitif mikroorganizmaların tanımlanması sağlanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Akar, N., 1999. Klinik Moleküler Patolojiye Giriş. Ankara Antıp A.Ş. 381.
- Anonim, 2006. Orlab On-line Mikrobiyoloji Dergisi. www.microbiology.org/pdf. (07.08.08).
- Buckingham, L and Flaws M.L., 2007. Molecular Diagnostics, F. A. Dawis Company, 264-289.
- Burtis, C. A., Aswood, E. R., 2005. Klinik Kimyada Temel İlkeler (Tietz), Palme Yayınları.
- Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini, D., Caramenti, G., Moroni, P., Castiglioni, B., 2005. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Molecular and Cellular Probes, 19, 299-305.
- De La Puente-Redondo, V.A., Del Blanco N. G., Gutierrez-Martin C. B., Garcia-Pera F. Delialioğlu N, Öcal ND, Emekdaş 2005, G. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinde genişlemiş spektrumlu betalaktamaz oranları. *Ankem Derg*; 19: 84-7.
- Dolapçı İ., 2005. Genişlemiş spektrumlu bata laktamazlar: Klinik mikrobiyoloji laboratuvarı, tedavi ve enfeksiyon kontrolündeki rolleri. *Mikrobiyol Bül*t 39: 229-40.
- Dikmen, N., Özgünen, T. (2004) "Harper Biyokimya" Dutton, G., 1998. Advances in Polymerase Chain Reaction. Genetic Engineering News, 16-18.
- Dutton, G., 1998. Advances in Polymerase Chain Reaction. Genetic Engineering News, 16-18.
- Erdem B 1999. "Enterobacteriaceae" Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi, Temel ve Klinik mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, 1. baskı: sayfa 471-515
- Grunewald, H., 2003. Optimization of Polymerase Chain Reactions. Methods in Molecular Biology, Bartlett, J., Stirling, D., 89-99, Humana Pres, Totowa NJ.
- Gülây Z. 2004 ESBL'lerin tanı yöntemleri. Yeni ve yeniden gündeme gelen enfeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara,:13-25.
- Ignatov, K. B., Miroshnikov, A.I., Kramarov, V. M., 2003. A New Approach to Enhanced PCR Specificity. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 29, 368-371.
- Iscan, M., 2003. Moleküler Genetikte Modern Teknikler. Biyoinfarmatik-1, Telefoncu,

- Kaçmaz B, Çakır FÖ, Aksoy A. 2005. Hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* türlerinde genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz saptanması. *Ankem Dergisi*: 19: 125-9.
- Jacoby GA, Han P. ,1996. Detection of extended spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 34: 908-11.
- Köksal, F., 1999. Moleküler Biyolojik Tiplendirme Yöntemlerinin Hastane İnfeksiyonlarında Kullanımı. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 3, 95-189.
- Laguerre, G., Rigotter-Gois, L., and Lemanceau, P., 1994. Fluorescent *Pseudomonas* species categorized by using PCR/restriction fragment analysis of 16s rDNA. *Mol. Ecol.*, 3, 479-487.
- Lavenir, R., Jacktane, D., Laurent, F., Nazaret, S., Cournayer, B., 2007. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific ecfX gene target. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 20-29.
- Livermore DM. 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*; 8: 557-84.
- Mahenthalingam, E., Campbell, M. E., Faster, J., Lam, J. S., Speert, D. P., 1996. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol*, 34, 1129-1135.
- Lynch, J., Brown, J., 1990. The Polymerase chain reaction. Current and Future clinical applications, 27, 2-9.
- Mc Kane, L., Kandel, Y., 1996. *Microbiology Essentials and Applications*. Boston, 33-45.
- McPherson, M., Moller, S., 2007. PCR, 288, Taylor & Francis.
- Morshed, M.G., Lee, M., Jorgensen, D., Isacc-Renton J.L., 2007. Molecular methods used in clinical laboratory: prospects and pitfalls, 49, 184-191.
- Palomares, C., Torres, M.J., Torres A., Aznar J., Palomares, J.C., 2003. Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 45, 183-189.
- Prescott, M. L., Harley, J., Klein, D., 1999. *Microbiology*. Boston, 78-99.
- Procop GW, Tuohy MJ, Wilson DA, Williams D, Hadziyannis E, Hall GS, 2003. Cross-class resistance to on beta-laktam antimicrobials in extended spektrum beta-laktamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Am J Clin Pathol*;120(2):265-7.

- Relman, D. A., Persing, D. H., 1996. Genotypic methods for microbial identification. PCR Protocols for Emerging Infectious Disease, 3-31.
- Taylor G., 1993. Polymerase chain reaction , basic principles automation, Oxford University pres, Oxford, 1-15.
- Temizkan, G., Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 101-119.
- Van Pelt, C., Verduin, C. M., Goessens, W. H. F., Vos, M. C., Tümmler, B., Segand, C., Reubsæet, F., Verbrugh, H., and Van Belkum, A., 1999. Identification of *Burkholderis* spp. In the clinical microbiology: comprasion of conventional and molecular methods. J. Clin. Microbiol, 2158-2164.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., and Swings, J., 1996. Polyhasic taxonomy, a consencus approach to a bacterial systmatics. Microbio Rev. 60, 407-438.
- Yavuzdemir Ş, Aysev AD, Güriz H. 2001. Hastane kökenli GSBL yapan 50 *Klebsiella pneumoniae* suşunun bazı antibiyotiklere direnç oranları ve GSBL belirlenmesinde disklerarası mesafenin önemi. *Flora* , 16: 196-200.
- Zaoutis TE, Goyal M, Chu JH, Coffin SE, Bell LM, Nachamkin I, et al. 2005. Risk factors for and outcomes of bloodstream infection caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in children. *Pediatrics* 115: 942-946.

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler**

Adı Soyadı : Gülden NASUHBEOĞLU
Doğum Tarihi ve Yer : 07.11.1984 ORDU
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0505-562-76-83
e-mail : gulden_nasuhbeyoglu@hotmail.com.

Eğitim

<i>Derece</i>	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lise	Ordu Anadolu Lisesi/ ORDU	2002
Lisans	Atatürk Üniversitesi / ERZURUM	2007