

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

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE
KARS ÇAYI'NDA BAKTERİ TAYİNİ

Ferhat BALKAY
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Doç. Dr. Babir TAGİYEV

TEMMUZ-2008

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ferhat BALKAY'ın yüksek lisans tezi olarak hazırladığı **“Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Kars Çayı’nda Bakteri Tayini”** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

...../...../2008

Adı Soyadı	İmza
Başkan :.....
Üye :.....
Üye :.....
Üye :.....

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../2008 tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Vahit ALIŞOĞLU
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmada Kars Çayı suyunda *E.Coli*, *Salmonella* ve *Shigella* bakterilerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile tayini yapıldı.

Tez çalışmam boyunca bana her türlü desteği sağlayan, danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Babir TAGİYEV'e, standart bakterilerin çoğaltılmasını sağlayan Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç.Dr. Zeynep ULUKANLI'ya, Moleküler Biyoloji laboratuvarındaki olanakları kullandıran Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Y.DoçDr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e ve çalışmamın her aşamasında yakın ilgisini esirgemeyen, bilgi ve önerileri ile beni her konuda yönlendiren Sayın Doç. Dr. Müslüm AKGÖZ'e ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın, örnek toplama, deneylerin gerçekleştirilmesi ve tez yazımı sırasında benden yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Hüseyin TÜREL, Orhan DOĞAN ve Dinçer ERDAĞ'a da teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Her zaman desteğini ve yardımlarını aldığım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
RESİMLER DİZİNİ	V
TABLolar DİZİNİ	VI
KISALTMALAR DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bakteriler	3
2.1.1. <i>Salmonella</i> Tipleri	3
2.1.2. <i>Shigella</i> Tipleri	4
2.1.3. <i>Escherichia</i> Tipleri	5
2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)	6
2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarının Kullanım Alanları	6
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarının Prensibi	7
2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Bileşenleri	9
2.2.4. PZR'nin İşleyişi	14
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	16
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	16
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	16
3.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	17
3.3.1. 0.5 M EDTA Hazırlanışı	17
3.3.2. 5X TBE Çözeltisinin Hazırlanışı	17

3.3.3. DNA Yükleme Tamponu Hazırlanışı	17
3.3.4. Standart Bakterilerin Çoğaltılması ve DNA Ekstraksiyonu	18
3.3.5. Örnek Toplanması ve DNA Ekstraksiyonu	18
3.3.6 PZR Protokolü	19
3.3.7. DNA Analizleri	19
4. SONUÇ ve TARTIŞMA	21
5. KAYNAKLAR	26
6. ÖZGEÇMİŞ	30

ÖZET

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE KARS ÇAYI'NDA BAKTERİ TAYİNİ

Bu yüksek lisans tezinde, son yıllarda geliştirilmiş olan PZR tekniği ile Kars ilinin sınırları içerisinde bulunan Kars Çayı'nda *Salmonella*, *Shigella* ve *E. Coli* taraması yapılmıştır. Çalışmadan elde edilen deneysel sonuçlara göre Kars Çayı'ndan alınan sularda insansal ve hayvansal kirliliğin belirteçleri olan *Shigella* ve *E.coli* bakterilerinin varlığına rastlanmıştır. Bu yüzden, Kars Çayı havzasında bulunan diğer yerleşim yerlerine ve Kars iline kanalizasyon arıtma tesislerinin kurulması insan sağlığı ve temiz bir doğa için gereklilik arz etmektedir.

Anahtar kelimeler; **PZR**, *Salmonella*, *Shigella*, *E. Coli*, Kars Çayı

ABSTRACT

POLYMERASE CHAIN REACTION AND DETERMINATION OF THE BACTERIA IN THE KARS CREEK

In this MSc thesis, *Salmonella*, *Shigella* and *E. Coli* were scanned through the newly developed PCR technique in the Kars Creek, which runs through Kars province. According to the experimental results, *Shigella* ve *E.coli* bacteria, which are considered as the indicators of human and animal pollution, were found in the sample water taken from the Kars Creek. Therefore, the establishment of waste treatment facilities is a must in many allocation units located along the basin of the Kars Creek and in Kars province for human health and clean nature.

Key Words; PCR, *Salmonella*, *Shigella*, *E. Coli*, River Kars

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

- Resim 4.1.** Standart Bakterilerinin PZR sonuçlarının DNA agaroz gel elektroforezi. 24
- Resim 4.2.** Kars Nehri suyu örnekleri PZR sonuçlarının DNA agaroz gel elektroforezi. 26-27

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 4.1. Primerlerin Dizisi ve Büyüklüğü

23

KISALTMALAR DİZİNİ

<i>E. Coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA:	Enzim-bağlı İmmün Test
PZR :	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>S. typhi:</i>	<i>Salmonella typhi</i>
DNA :	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA:	Ribo Nükleik Asit
dNTP:	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
ddH₂O:	Çift distile su
A:	Adenin
T:	Timin
G:	Guanin
C:	Sitozin
EDTA:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr:	Etidyum Bromid

1. GİRİŞ

Son yıllarda hızla artan dünya nüfusu, plansız kentleşme, nükleer denemeler, tarım ilaçları, yapay gübreler, evsel atıklar, deterjanlar ve sanayi kuruluşlarının arıtmadan deşarj ettikleri çeşitli kimyasal maddeler ve özellikle şehir kanalizasyon atıklarının su kaynaklarına karışması, dünyayı önemli ölçüde kirleterek bugün olduğu gibi gelecekte de en büyük problemlerden birisini oluşturacaktır. Hijyen kurallarının yeterince uygulanmadığı, atık su sistemlerinin istenilen düzeyde olmadığı ülkelerde çevre kirliliğinin bir parçası olarak; insan ve hayvan dışkılarıyla atılan bağırsak patojeni mikroorganizmalar deniz, göl ve akarsulara karışmakta ve içinde yaşayan canlıları da kontamine edebilmektedir. Özellikle besin hijyenine ilişkin control mekanizmalarının az olduğu ülkemizde kirli sulardan çıkarılan midye ve balık gibi su ürünlerinin birçok hastalık oluşturacak mikroorganizmaları insanlara bulaştırmada önemli rolleri olabileceği açıktır.

Diğer gıda maddelerinde olduğu gibi su ürünlerinde de hastalık yapıcı çeşitli mikroorganizmalar gelişebilmektedir. Bunlar genellikle; *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Vibrio*, ve *Escherichia coli* (*E. Coli*) gibi bakterilerdir. *Salmonella* insan ve balıklarda septisemi ve gastroenteritis oluşturması nedeniyle zoonoz karaktere sahiptir. Kanalizasyonların boşaltıldığı su ortamlarını kontamine eden bu bakterinin aynı zamanda akuatik canlıları da enfekte etme ihtimali yüksektir. Kirli sulardaki patojen etkenler gerek taze ve gerekse dondurularak muhafaza edilen midyelerde uzun süre canlı kalabilmektedir. *Salmonella*'nın da; iyi pişirilmemiş midyeler ve balıkların tüketilmesiyle veya bunların işlenmesi sırasında açık yaralardan insanlara bulaşmaları söz konusudur.

Gerek beşeri ve gerekse veteriner hekimlikte bakteriyel hastalıkların teşhisinde kültür metodu ve biyokimyasal analizlerin yanı sıra, aglutinasyon, immunodifüzyon, immunofloresans, hemaglutinasyon, radioimmun assay, enzim-bağlı immunosorbent assay (ELISA), komplement fikzasyon gibi serolojik testler, histopatolojik yöntemler ve

moleküler biyolojide büyük önem kazanan Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) tekniği de kullanılmaktadır [1-5].

Su ürünleri içerisinde yer alan özellikle tatlısu canlılarının mikrobiyolojisi hakkında kapsamlı araştırmaların sayısı azdır. Bu çalışmada da, son yıllarda geliştirilmiş olan PZR tekniği ile Kars ilinin sınırları içerisinde akmakta olan Kars Çayı'nda *Salmonella*, *Shigella* ve *E. Coli* taraması yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bakteriler

Az gelişmiş ülkelerde suya karışan patojen bakteriler hastalık ve ölümlerin en önemli nedenidir. Tifo, paratifo, çocuk ishalleri, basilli dizanteri ve diğer bağırsak enfeksiyonları suyla bulaşan başlıca bakteriyel hastalıklardır. Sudaki *E. coli* bakterisi bilindiği gibi normal bağırsak florasında bulunur ve normal şartlarda hastalık etkeni değildir ama lağım sularıyla bulaşmanın güzel bir göstergesi olduğundan dolayı diğer dışkı ile bulaşabilecek hastalıklar hakkında bilgi verir. Aynı zamanda koliformlar yüksek miktara ulaştıklarında kendileri de ishale seyreden bağırsak hastalıklarına neden olabilirler.

2.1.1. *Salmonella* Tipleri

Salmonella typhi (*S. typhi*) ve nadiren de *S. Paratyphi A* ve *S. Schottmülleri* primer olarak insanlarda enfeksiyonlara neden olurlar. Genellikle kontamine yiyecek ve içeceklerle alınırlar. 10^5 - 10^8 adet *salmonella* insanda enfeksiyon oluşturmak için yeterlidir. Doğada çok yaygın olarak bulunan *Salmonella* etkenleri, adlarını, Amerikalı bakteriyolog Salmon'dan almaktadır. *Enterobacteriaceae* familyasının genel özelliklerini gösteren *Salmonella*'lar 0.7-1.5x2.0-5.0 mikrometre boyutlarında, Gram negatif çomak şeklinde, aerob, fakültatif anaerob, fekal veya oral yollarla yayılan bakterilerdir. *Salmonella* aranmasında ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme, selektif katı besiyerinde tipik kolonilerin gösterilmesi, şüpheli suşların biyokimyasal tanısı ve aglutinasyon testleri ile serolojik tiplendirilmesi yapılmaktadır [6-10].

Salmonella etkenlerinin kesin identifikasyonları, biyokimyasal özelliklerinin ve antijenik yapılarının incelenmesiyle yapılmaktadır. Biyokimyasal özelliklerine göre *Salmonella* olduğu anlaşılan suşlar önce polivalan O antiserumu ile lam üzerinde aglutinasyona tabi tutulur [11-13].

Gıda maddelerinde, *Salmonella* belirlenmesinde kültürel ve biyokimyasal analizlerin yapılması yaklaşık yedi günlük bir süreyi gerektirdiğinden, hızlı yöntemlerin geliştirilmesine olan gereksinim geçmişte olduğu gibi günümüzde de devam etmektedir. Bugün kültürel yöntem dışında; kültürel-enzimatik testler, lateks aglütinasyon testleri, ELISA ve PZR yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yeni teknolojik metodlar; etkenlerin genetik materyallerinin hibridizasyonu ve immunojenik substansların (protein, glikoprotein vs.) saptanması şeklinde başlıca iki grup altında toplanır. Hibridizasyon teknikleri, genellikle materyallerde bulunabilen patojenlerin veya bu dokulara ait hücre DNA'larındaki spesifik genlerin işaretli problemlerle ortaya konması ve sayısal olarak çoğaltılması amacıyla kullanılmaktadır. Şimdiye kadar *Salmonella*'ların identifikasyonu amacıyla çok az çalışmada PZR tekniği kullanılmakla birlikte, bu teknik spesifitesi ve duyarlılığı nedeniyle diğer sistemlerden daha avantajlıdır [14-19].

Su ürünlerinde *Salmonella* ilk olarak 1934 yılında Doğu Kanada kıyılarında yakalanan bir balıktan izole edilmiş, daha sonraları ise tatlı ve tuzlu sularda yakalanan birçok balıkta farklı *Salmonella* türleri izole edilmiştir [20-22].

İnsan ve hayvanların *Salmonella* enfeksiyonuna yakalanmalarında suyun enfeksiyon kaynağı olarak rolü büyüktür. Prensip olarak temiz sularda *Salmonella* türleri çoğalamazlar. Fakat kirli ve bu bağlamda bakteriler için besin kaynağı içeren, uygun pH ve sıcaklığa sahip sularda *Salmonella* cinsi bakteriler rahatlıkla çoğalabilirler [23].

2.1.2. *Shigella* Tipleri

Gram negatif olan *Shigella* fakültatif anaerob olmakla birlikte en iyi aerobik olarak ürerler. Çoğu olgu 10 yaşın altındaki çocuklarda görülmektedir. Orta ve Güney Amerika'da yaygın olarak bulunurlar. *Shigella* enfeksiyonları hemen daima intestinal traktta sınırlıdır, kan yoluyla yayılım son derece nadirdir. Temel patolojik proses; mukozal epitelyumun invazyonu, kalın bağırsak ve terminal ileumda muköz membranın nekrozuna yol açan mikroabseler, yüzeysel ülserasyon, kanama ve ülserli bölgede psödomembran oluşumudur.

Shigella türlerinin ürettiği ısıya-duyarlı ekzotoksin bağırsak ve santral sinir sistemini etkiler. Bu toksin bir enterotoksin gibi etki göstererek diyareye neden olur. Ayrıca bu toksin insanda bağırsaktan şeker ve amino asit emilimini engeller.

Bir iki gün süren inkübasyon periyodunu takiben karın ağrısı, ateş ve sulu diyare başlar. Bir gün kadar sonra enfeksiyon ileum ve kolona yayılırken defekasyon sayısı artar, sıvı içeriği azalır ama gaitada sıklıkla mukus ve kan bulunur. Har bağırsak hareketine karında gerginlik ve tenezm eşlik eder. Alt kadranda karın ağrısı vardır. Yetişkinlerin yarısında ateş ve diyare 2-5 günde kendiliğinden geriler, fakat yaşlı ve çocuklarda su ve elektrolit kaybı dehidratasyon, asidozis ve hatta ölüme neden olabilir. Düzelme esnasında çoğu hasta basili kısa bir süre etrafa yayar, fakat çok azı kronik intestinal taşıyıcı olarak kalır [24].

2.1.3. *Escherichia* Tipleri

E.coli 1950'lerden beri üzerinde en çok bilimsel araştırma yapılan bir bakteridir. Etkenin kısa sürede ve konvansiyonel besiyerlerinde üreyebilmesi çalışmaları kolaylaştırmış ve bu nedenle moleküler biyolojide bir model olarak kullanılmıştır. Başlangıçta *E.coli* bir patojen olarak düşünülmemiş ise de, daha sonraki yıllarda, insanlarda ishal, dizanteri, üriner sistem enfeksiyonları, septisemi, hemolitik üremik sendrom ve menenjit gibi hastalıklara neden olduğu belirlenmiştir [25,26].

Barsak kökenli bakterilerden *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* memelilerin gastrointestinal sisteminde bulunan ve en iyi bilinen fakültatif mikroorganizmalardır. *E.coli* O 157:H7 üzerinde yapılan ilk araştırmaların başlangıcı, 1898 yılında Kioshi Shiga tarafından *Shigella dysenteriae*'nin epidemik bakteriyel dizanterinin etkeni olarak bulunmasıyla başlamıştır [27]. *E.coli* O157:H7'nin tam anlamıyla insanlar için patojen olduğu ilk kez 1982 yılında ortaya konmuştur [28]. *E.coli* O,H ve K antijenlerine sahiptir ve O antijeni ve DNA yönünden Shigellaya benzemektedir. Günümüzde yaklaşık 160 tip *E.coli* serotipi belirlenmiştir. Bunlar arasında patojen ve apatojen *E.coli* suşları bulunmaktadır [29]. Patojenite ve virülensin belirlenmesinde serotiplerden çok, bu serotiplerde bulunan adhezin

ve toksin genlerinin varlığının ortaya konması önem taşımaktadır. Hücreye tutunma, infekte etme ve toksin üretimi ile ilgili olan bu genler, bir *E.coli* suşundan diğerine transfer edilebilen karakterde olup, büyük kromozomlar, plazmidler ve fajlarda bulunmaktadır [30].

2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)

PZR yöntemi, bir organizma veya bir mutant gene ilişkin sağlam veya parçalanmış DNA veya RNA parçasının *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem saç teli ve sperm gibi değişik dokulardan elde edilen 1-2 hücreden bile sonuca ulaşılmasını sağlar.

PZR yöntemi, bir gen veya DNA bölgesinin bu bölgeye bağlanan oligonükleotid primerler aracılığı ile bir dizi replikasyon döngüsü geçirerek çoğaltılması işlemidir. PZR yönteminde sözü edilen her replikasyon döngüsü; i) DNA'nın denatürasyonu, ii) Primerlerin bağlanması ve iii) Primerlerin uzaması, olmak üzere 3 aşamadan oluşur. Bu döngüler tekrarlanarak istenen sayıda hedef DNA bölgesi elde edilir. Her döngüde oluşan ürün bir öncekinin 2 katıdır. Böylece yaklaşık 20 döngülük bir reaksiyon sonucunda yaklaşık 1 milyon DNA kopyası elde edilir [31].

2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarının Kullanım Alanları

- 1-) Hedef DNA'nın çoğaltılması
- 2-) DNA'daki mutasyonların belirlenmesi
- 3-) Dizi analizi için DNA'ların çoğaltılması
- 4-) Laboratuvar şartlarında kontrollü mutasyon oluşturulması

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarının Prensibi

PZR, nükleik asitlerin *in vitro* şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş, bir test tüp sistemidir. Hedef DNA/RNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna imkan verir [32,33]. *in*

vivo şartlarda bölünen bir hücrede DNA'nın replikasyonu çeşitli enzimler tarafından düzenlenen ve genomun kopyalanması ile sonuçlanan bir işlemdir.

Bir test tüpü içerisinde gerçekleştirilen PZR'da *in vivo* çoğalma örnek olarak alınmıştır. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, özel bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir. Kullanılan polimeraz enzimine bağlı olarak kopyalanarak çoğaltılacak olan bölgenin uzunluğu Taq DNA polimeraz için 2 kb'dan küçük, daha komplike enzim veya enzim karışımları ile 5 kb'dan daha büyük hatta 40-50 kb kadar olabilmektedir [31].

In vivo şartlarda DNA replikasyonu esnasında enzimler ilk olarak DNA'nın çift zincirli yapısını bozarak tek zincirli hale geçişini sağlar. Daha sonra RNA polimeraz sentezlenir ve replikasyon başlangıç bölgesinde tek zincirli hale dönüştürülmüş DNA zincirlerinden birisine tamamlayıcı RNA'nın oluşumu sağlanır. Bu DNA/RNA heterodupleksi DNA polimerazın saldırısı için bir başlatıcı bölge rolü oynar. Böylece DNA'nın tamamlayıcısı sentezlenir. PZR çalışmalarında reaksiyonun gerçekleşmesi için küçük miktarda hedef DNA (1-100 ng kadar) içeren örnek çalışma solüsyonu içerisine ilave edilir. Daha sonra örnekteki çift sarmal DNA'nın tek sarmal DNA'ya dönüştürülmesi sağlanır. Tek sarmal DNA iplikçiklerinin karşısı 20-30 baz çifti uzunluğundaki sentetik oligonükleotid diziler, RNA/DNA heterodubleksini oluşturmak üzere primer gibi kullanılır. Spesifik bir bölgenin amplifikasyonu için hedefi sınırlamak amacıyla ikinci primer kullanılır. Primerlerden birisi tek iplikçikli DNA zincirinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, ikincisi de diğer zincir üzerinde sonlandırıcı bölgeye bağlanır. Taq DNA polimeraz enziminin yardımıyla primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren her tek zincirli DNA zincirinin tamamlayıcısı oluşturulur. Böylece iki adet çift sarmal DNA oluşur. Oluşan çift sarmal DNA'lar yeni amplifikasyon için kalıp görevini üstlenirler. Bu işlem 30 siklus tekrarlandığında birkaç saat içerisinde, hedefin milyarlarca kopyası elde edilebilir. PZR temel olarak tekrarlayan üç basamaklı bir yöntemdir . Bu basamaklar sırasıyla denaturasyon, bağlanma ve uzamadır.

Denaturasyon

Çift iplikçikli DNA'nın birkaç saniye 94-96 °C ısı ile tek iplikli DNA'ya ayrılmasıdır. Bazı çalışmalarda, amplifikasyon siklusları başlamadan önce 3-5 dakikalık bir ön denatürasyon işleminin, özellikle denatürasyonu zor olan kalıp DNA'lar için yararlı olduğu bildirilmiştir [34].

Bağlanma

Örnek, birkaç dakika 30-60 °C de tutularak, primerin (spesifik sentetik oligonükleotidler) tek iplikçikli DNA'daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlanır. Bu hidrojen bağlarının yardımı ile olur. Bağlanma ısısı sadece DNA/DNA eşleşmesine imkan sağlayacak kadar yüksek olmalıdır. Primerlerin yapısı erime derecelerine göre hesaplanarak optimize edilebilirse de, yaklaşık olarak 20 baz çifti uzunluğa sahip primerlerin kullanılması halinde 54 °C olarak belirlenmesi optimal sonuçları vermektedir [31].

Uzama

Polimeraz enzimi yardımı ile tek iplikçikli DNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5' → 3' yönde uzamasıdır. DNA zincirinin tamamlayıcısını sentezlemesi için 65-72 °C birkaç dakika beklenir. Taq DNA polimerazı optimal uzama ısısında yani 72-78 °C arasında 2000 nükleotid/dakika hızında çalışır. Ancak tüm sikluslarda enzimin aynı performansı göstermesi beklenemez. Başlangıç sikluslarında, dakikada bir kb uzunluğunda uzama beklenirken, siklus sonlarına doğru uzama hızı bir miktar azalır.

Ayrıca özellikle multipleks PZR yapılıyorsa yani aynı anda birden fazla hedef bölgenin uzatılması söz konusu ise, o zaman enzimin tutunması ile nükleotidleri bularak bağlanması için daha uzun süreye ihtiyaç duyulacaktır. Bu süre iki dakika kadar olabilir. Ancak ısının 72 °C olması küçük uzunluktaki ürünlerde denatürasyon problemi yaratacağı için kalıp

noksanlığına bağı olarak azalmaya ve özgül olmayan ürünlerin açığa çıkmasına neden olacaktır. Bu nedenle ısı 65 °C altında tutulmalıdır.

Bağlanma sikluslarını takiben, orijinal DNA segmenti yeni tamamlayıcı DNA'lar ve yeni kalıp DNA'lar oluşturur. Böylece her PZR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkmaktadır.

Amlifikasyondan sonra PZR ürünleri genellikle agoroz jel üzerindeki kuyucuklara yüklenir ve daha sonra elektroforeze tabi tutulur. PZR çalışmalarında klasik agorozun yanı sıra Nu-Sieve agar da kullanılmaktadır. Bu son agar kısa sürede özellikle küçük amlifikasyonların gösterilmesinde, klasik agorozdan daha başarılı bulunmuştur. Bu agarın daha saydam olması, jelde boyanmış bantların daha net görülmesini sağlamaktadır [31].

2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Bileşenleri

PZR'nın temel bileşenleri kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tamponlar ve MgCl₂'dür [35].

Kalıp DNA

PZR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA genom kitaplıkları halinde, ya araştırma laboratuvarları ve kliniklerden ya da ticari olarak elde edilebilir.

PZR'de kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA'da kullanılabilir. Kalıp olarak RNA kullanılacaksa total RNA ya da poli(A) RNA'dan önce klasik yolla cDNA elde edilir, ya da *Thermus thermophilus* kaynaklı rekombinant TthDNA polimeraz enzimi kullanımı ile aynı tüpte RNA'dan DNA ürününün elde edilmesi tek kademeli olarak yapılabilir. Eğer yüksek molekül ağırlıklı genomik DNA kalıp olarak kullanılacaksa, DNA

kısmi kesim yapan NotI ya da SfiI gibi restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra kullanılmalıdır. Genellikle kalıp DNA'da hedef dizinin konsantrasyonu bilinmediğinden, PZR'nin pozitif kontrol DNA ile optimizasyonu faydalıdır. Optimizasyon çalışmalarında normalde kullanılmış bir DNA parçası için nanogram, genomik DNA için ise mikrogram düzeyindeki miktarlar kullanılır

Polimerazlar

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozit trifosfattan uzun polinükleotit 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' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmaları ile, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır.

Termostabil (sıcaklığa dayanıklı) DNA polimeraz enziminin PZR'de kullanılmaya başlanması araştırma ve klinik laboratuvarlarında rutin olarak yapılan deneylere teknolojik olarak büyük bir avantaj sağlamıştır. Önceleri kullanılan *Escherichia coli*'nin DNA polimeraz I enziminin klenow fragmenti sıcaklığa dayanıklı olmadığı için her PZR döngüsünde denatürasyon aşamasından sonra yeniden enzim ekleme zorunluluğu duyulmaktaydı. Ancak günümüzde kullanılan termostabil DNA polimerazlarla bu sorun ortadan kalktığından enzimin amplifikasyonun başlangıcında tüplere konulması yeterli olmaktadır.

Termostabil DNA polimerazlardan PZR'de en yaygın olarak kullanılan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimerazdır. Taq DNA polimerazın polimerizasyon oranı (nükleotit / saniye) enzim için en uygun sıcaklık olan 70-80 °C de 35-100 dür. Bu enzime kalıptan ayrılmaksızın kalıba ilave ettiği ortalama nükleotid sayısı da yüksektir. Taq DNA polimeraz Amplitaq zincirinin uzayan ucundan nükleotidleri uzaklaştıran 5' → 3'

ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Amplitaq, Taq DNA polimerazın *E.coli*'de klonlanmış ve modifiye edilmiş rekombinant formudur. Amplitaq'ın özellikleri Taq DNA polimerazınki ile aynıdır, ama Amplitaq rekombinant olduğundan saflığı Taq DNA polimerazdan daha fazladır ve PZR'de tercih edilir. Ancak bakteriyal DNA'ların çoğaltılmasında Amplitaq yerine Taq DNA polimeraz kullanımı daha güvenlidir. Çünkü Amplitaq *E.Coli*'de klonlandığından bakteriye ait kontaminant DNA taşıyabilir. Bununla birlikte özellikle bakteri DNA'larının çoğaltılması amacı ile Perkin-Elmer Cetus firması düşük DNA içerikli özel bir Amplitaq, LD üretmiştir. Yine aynı firmanın ürettiği rekombinant Amplitaq'ın değiştirilmiş bir tipi olan Stoffel fragmenti 5'→3' ne ekzonükleaz aktivitesi taşımaktadır; Taq ve Amplitaq'dan iki kat daha termostabil olup aynı zamanda magnezyum konsantrasyonunun daha geniş sınırlarında optimum aktivite gösterir; buna bağlı olarak PZR koşullarının optimizasyonu için zaman kaybını ortadan kaldırır. Stoffel fragmenti yüksek termostabilitesi nedeni ile yüksek denatürasyon sıcaklıklarının kullanılmasını gerektiren, özellikle G-C çiftleri bakımından zengin olan yada kompleks sekonder yapıya sahip olan kalıp DNA'ların çoğaltılması için tercih edilir. 5'→3' ekzonükleaz aktivitesinin bulunmayışı plazmid DNA'sı gibi halkasal kalıpların çoğaltılmasının daha etkin bir şekilde gerçekleşmesi için önemlidir. Taq, Amplitaq ve Amplitaq Stoffel fragmenti DNA polimerazları PZR sonunda oluşan DNA ürününün 3' ucuna bir adenin nükleotidi eklerler. Eğer PCR ürünü klonlanacaksa bu tek baz fazlalığı dikkate alınmalıdır.

VentTM DNA polimerazı termofilik bir arke olan *Thermococcus litoralis*'den izole edilmiştir. VentTM DNA polimeraz geni *E.coli*'de klonlanmıştır. Ekzonükleaz aktivitesi taşımayan Vent (exo⁻)TM ve yüksek termostabilite gösteren diğer bir tipi de (Deep VentTM) geliştirilmiştir. VentTM DNA polimerazın termostabilitesi Taq DNA polimerazdan daha fazladır ve 8-13 kilo baz çiftlik ürün oluşturma yeteneğindedir. VentTM DNA polimeraz hata düzeltme özelliği olan 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi göstermesi nedeniyle yanlış baz eşleşmelerinin oluşumunu engellediğinden Taq DNA polimerazdan 5-15 kat daha fazla doğrulukta oluşturur. VentTM DNA polimeraz küt uçlu fragmentleri %95'den fazla oluşturduğundan, PZR ürünlerinin doğrudan klonlanmalarını kolaylaştırır. Ancak bu enzimin 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi nedeniyle primerlerin yok edilmesi sorun oluşturur.

Bu sorunun ortadan kaldırılması için enzim reaksiyona en son eklenmeli ve 3'- fosforotioat içeren primerler kullanılmalıdır.

Pfu DNA polimeraz hipertermofilik bir arke olan *Pyrococcus furiosus*'dan izole edilmiştir. Enzim hem 5' → 3' hem de 3'→ 5' eksonükleaz aktivitesine sahiptir. Pfu DNA polimerazın doğruluğu Taq DNA polimerazdan 12 kat daha fazladır. dNTP'lerin yokluğunda enzimin 3'→ 5' eksonükleaz aktivitesi kalıp ve primerlerin yıkımı ile sonuçlanacağından enzim, reaksiyona VentTM polimeraz gibi en son eklenmelidir. Pfu DNA polimerazın genetik mühendisliği ile geliştirilmiş tipi olan Pfu DNA polimeraz (exo⁻)'nun spesifik aktivitesi Pfu DNA polimeraz'dan 10 kat daha fazla olmasına karşın, hata giderme yeteneği olan 3' → 5' ekzonükleaz aktivitesi yoktur.

Thermus thermophilus'dan izole edilen beş DNA polimerazdan ikisi PZR'de kullanılır. Termostabil bir enzim olan ve genetik mühendisliği ile geliştirilmiş Tth DNA polimeraz 70 °C dolayında etkin bir şekilde ters transkriptaz aktivitesi gösterir.

UITmaTM DNA polimerazı *Termostopa maritima* DNA polimerazının değiştirilmiş rekombinant tipidir. *T.maritima* (Tma) hipertermofilik bir bakteri olup, 90°C üstündeki sıcaklıklarda ürer. UITmaTM DNA polimeraz Amplitaq DNA polimerazdan çok daha yüksek bir termostabilite gösterir. Bu enzim 5'→ 3' ekzonükleaz aktivitesi göstermezken, 3'→ 5'ekzonükleaz hata düzeltme aktivitesine sahiptir. Bu aktivite, enzim, primer ve MgCl₂'ün bir arada bulunduğu PZR koşullarında primerin 3' ucunu istenmeyen şekilde değiştirebilir. Bu durum reaksiyon karışımına enzim eklenmesinden önce denatürasyon için ısıtma yapılarak ("Hot-start" tekniği) azaltılabilir. UITmaTM DNA polimerazı çoğaltılan DNA'da yüksek düzeyde doğruluk gerektiğinde kullanılmalıdır [35].

Primerler

Gen çoğaltılması dahil PZR'nin bir çok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere ihtiyaç vardır. Genel olarak kullanılan kalıp ve yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotid uzunluğundadır. Oligonükleotid

primerler, primer sentezi yapan laboratuarlardan ya da ticari olarak da elde edilebilirler. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır.

dNTP Karışımı

Optimal dNTP konsantrasyonu; (1) MgCl₂ konsantrasyonuna, (2) reaksiyon koşullarına, (3) primer konsantrasyonuna, (4) çoğaltılmış ürünün boyuna , (5) PCR döngüsü sayısına bağlıdır. Yapılacak PZR için en uygun dNTP konsantrasyonu deneysel olarak belirlenmelidir.

Tamponlar ve MgCl₂

PZR’da kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tampondur. Diğer enzimler içinde benzeri tamponlar bulunmakta ve bunlar çoğunlukla satın alınan enzimle birlikte 10x konsantrasyonda sağlanabilmektedir. MgCl₂’ün reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonu değiştirmekle beraber genellikle 0,5-5,0 mM’lık değerler arasında çalışılır. Mg⁺² iyonları dNTP’ler ile çözülebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve çift iplikli DNA’nın Tm değerini (Tm Değeri: Çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalmasına yol açan sıcaklık derecesi) arttırırlar ve ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar. Bu nedenle MgCl₂’ün PCR’nin özgüllüğü ve ürün verimi üzerinde çok etkisi vardır. Genellikle optimum MgCl₂ konsantrasyonu olarak 1,0-1,5 mM ‘lik değerler tercih edilir. Düşük Mg⁺² konsantrasyonu, ürün oluşumunda azalmaya , yüksek Mg⁺² konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün birikimine yol açar. MgCl₂ içeren tamponlar kullanılıyorsa, ayrıca MgCl₂ kullanımına gerek yoktur. Eğer tampon MgCl₂ içermiyorsa, hazır olarak elde edilen 25mM konsantrasyondaki MgCl₂ solüsyonu ayrıca sulandırım yapmadan final konsantrasyonu 2,5 mM olacak şekilde uygun miktarda reaksiyon karışımına eklenir.

2.2.4. PZR'nin İşleyişi

Termostabil DNA polimerazları ve farklı sıcaklık derecelerini istenilen süreler için otomatik olarak ayarlayabilen PZR aletlerinin (“thermal cycler”) kullanıma sunulması, PZR'in verimi ve kullanımında önemli gelişmelere yol açmıştır. Verimli bir PCR için; (i) denatürasyon, (ii) primerlerin bağlanması, (iii) primerlerin uzaması, (iv) döngü sayısı, (v) PZR makinesinin sıcaklık iniş ve çıkış süreleri önemlidir. Polimeraz zincir reaksiyonu mikrotüplerde gerçekleşir. Amaca göre farklı PZR tüpleri ve değişik sıcaklık dereceleri kullanılabilir.

Başlangıç denatürasyonu için genomik DNA gibi kompleks kalıpların denatüre olmasını sağlamak üzere yüksek sıcaklıklar (95-100 °C) kullanılır. Ancak PZR sırasında genellikle en etkin denatürasyon sıcaklığının 92-95 °C olduğu saptanmıştır. Denatürasyonu ardışık primerin bağlanması aşamasındaki Tm/bağlanma sıcaklığı oranının saptanması, PZR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle başarılı bir PZR için kullanılan çeşitli formüller arasında en sık kullanılanı şu şekildedir.

$$[(A+T\text{'lerin sayısı}) \times 2^{\circ}\text{C} + (G+C\text{'lerin sayısı}) \times 4^{\circ}\text{C}]$$

Çoğu zaman bu formülle hesaplanan Tm değerinin 3-5 °C altındaki sıcaklıklar bağlanma sıcaklığı olarak seçilir ve daha sonra optimum sıcaklık değeri denenerek saptanır. Yukarıda verilen formül, boyu en fazla 20 nükleotid olan primerler için geçerlidir. 20 nükleotitten daha uzun olanlar için geliştirilmiş başka formüller kullanılır.

Primerlerin uzaması aşamasında genellikle Taq/Amplitaq DNA polimerazların polimerizasyon aktivitesi için çoğu zaman iki dakika yeterli olmakla birlikte, eğer uzun DNA parçası çoğaltılıyorsa süre arttırılır. PZR ürünü olan tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanmasını garanti altına almak için son döngünün uzama süresi çoğunlukla uzun (10-15 dakika) tutulur.

Toplam döngü sayısı 25-35 arasındadır. Döngü sayısının arttırılması halinde istenmeyen ürünler fazlalaşırken, istenilen ürünlerde herhangi bir artış meydana gelmez. Bu yüzden 40'dan fazla döngüden oluşan PZR reaksiyonları genellikle başarılı sonuçlar vermez [35].

3. MATERİYAL VE METODLAR

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- 1- Biorad-MyCycler marka PZR cihazı
- 2- Denver Instrument marka terazi
- 3- Fine Pix S 5600 model dijital fotoğraf makinesi ve kırmızı filtre
- 4- Biorad marka elektroforez güç kaynağı
- 5- Hettich-Zentrifugen marka Micro200 model masaüstü santrifüj cihazı
- 6- Dahian Scientific marka Wise Clave model otoklav cihazı
- 7- Biohit marka hassas otomatik pipetler ve uçları
- 8- 200 ul , 500 ul, 1500 ul'lik ependorf tüpleri, 15 ml ve 50 ml Falcon tüpleri
- 9- Labart marka vorteks
- 10- Yellow line marka manyetik karıştırıcı

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1- EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$; FW: 372.24; Sigma no: E5134)
- 2- Tris Baz ($C_4H_{11}NO_3$; FW: 121.14 ; Sigma no: T6066-)
- 3- Borik asit (H_3BO_3 ; FW:61.83 ; Sigma no: B6768)
- 4- EtBr ($C_{21}H_{20}N_3.Br$; FW: 394.32; Sigma no: E8751)
- 5- Gliserol ($C_3H_8O_3$; FW: 92.09; Sigma no: G5516)
- 6- Bromofenol Blue ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$; FW: 669.96 Sigma no: B0126)
- 7- Agaroz (Sigma No: 5093)
- 8- dNTP (Invitrogen)
- 9- Primer (Operon veya Midland, Teksas, USA)
- 10- Taq DNA Polimeraz (Sigma)

3.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

3.3.1. 0.5 M EDTA Hazırlanışı

18.6 gr EDTA 80 ml ddH₂O içerisinde çözülür ve çözülmenin hızlanması için NaOH ile pH, 8.0'e ayarlanır ve çözeltinin son hacmi 100 ml'ye tamamlanır.

3.3.2. 5X TBE Çözeltisinin Hazırlanışı

- 0.4 M Tris Baz

- 0.4 M Borik Acid

- 20 mM EDTA

1000 ml 5X TBE çözeltisi hazırlamak için

54 gr Tris Baz

27.5 gr Borik Asit

20 ml 0.5 M EDTA çözeltisi

900 mL ddH₂O içerisinde karıştırılır. Çözeltinin pH'ı 8.0 oluncaya kadar konsantre HCl eklenir. Son hacim 1000 ml'ye tamamlanır.

3.3.3. DNA Yükleme Tamponu Hazırlanışı

- 400 µl gliserol,

- 300 µl 5XTBE,

- 300 µl ddH₂O,

Çok az miktarda Bromofenol Blue boyası eklenir ve yükleme tamponunun rengi mavi oluncaya kadar 1 M NaOH eklenir.

3.3.4. Standart Bakterilerin oğaltılması ve DNA Ekstraksiyonu

E.Coli, Salmonella ve Shigella bakterilerinin tespiti için pozitif kontrol olarak kullanılan bakteriler Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'nden temin edilmiştir. Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Zeynep Ulukanlı bu bakterileri uygun koşullarda çoğaltarak ve karakterizasyonunu yaparak bizlere vermiştir. Bakterilerden DNA ekstraksiyonu 6 kere dondurulup çözülerek gerçekleştirilmiştir. İlk önce standart bakteriler ayrı ayrı tüplerde PZR işlemine tabi tutularak standart PZR koşulları belirlenmiştir. Daha sonra bu üç bakteriyi tek tüpte belirleyebilmek için Multipleks PZR uygulanmıştır. Spesifik olmayan bakteri – primer etkileşimleri incelemiş fakat herhangi bir etkileşim gözlenmemiştir (Data konulmadı).

3.3.5. Örnek Toplanması ve DNA Ekstraksiyonu

Örnekler aylık olarak Mayıs-Eylül 2007 tarihleri arasında Kars ayı'nın Kars şehri girişinden 3 istasyon, şehir içinden 1 istasyon ve şehir çıkışından 3 istasyon olmak üzere toplam 7 istasyondan alınmıştır. Bu istasyonların isimleri ve Resim 4.2'de verilen numaralar şu şekildedir;

- 1: Erzurum – Kars yolu köprü altı
- 2: Kafkas Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi - Fen Edebiyat Fakültesi yolu arasındaki köprü altı
- 3: Kars Paşaçayırı Mahallesi, Tugay eşmesi karşısı
- 4: Kars şehir içi, tarihi hamamların yanı
- 5: Kars ayı şehir çıkışları, Eski tarihi köprü altı
- 6: Eski mezbaha öncesi
- 7: Eski mezbaha sonrası

Örnekler 500 ml'lik steril tek kullanımlık plastik kavanozlara su akımının olduğu yerlerden alındı. Örnekler aynı gün laboratuvara getirilerek 10 ml'si 0.22 mikronluk filtrelerden vakum filtrasyonu yöntemiyle süzüldü (24). Filtreler iki steril cımbız yardımıyla bükülerek steril 15 ml Falkon tüplerine konuldu ve üzerlerine 1 ml steril ve filtrelenmiş ddH₂O eklendi. Tüpler 1 dakika vortekslenerek filtre üzerindeki bakterilerin suya geçişleri sağlandı. 1000 rpm de 5 dakikalık bir sentrifigasyondan sonra filtreden ayrılan sulu kısım eppendorf tüplerine konarak analiz zamanına kadar -20 °C'de saklandı (24). Bütün örnekler toplandıktan sonra 6 kez dondur çöz yöntemiyle bakteri DNA'larının suya geçişleri sağlandı ve bu örnekler PZR'de kullanıldı (24).

3.3.6. PZR Protokolü

- 40 µl su örneği
- 5 µl 10 x PZR Tamponu
- 0,5 µl dNTP (10 mM)
- 1 µl ileri primer (10 pmol/ul)
- 1 µl geri primer (10 pmol/ul)
- 0,5 µl Taq Polimeraz enzimi (5u/ul)
- x µl ddH₂O; toplam hacim 50 µl oluncaya kadar

PZR koşulları: İlk denaturasyon: 94 °C 4dk, denaturasyon: 94 °C 30 sn, bağlanma: 55 °C 30 sn, Uzama: 72 °C 30 sn, toplam döngü sayısı: 35. PZR ürünleri analize kadar -20 °C de saklandı.

3.3.7. DNA Analizleri

1,5 gr agaroz 100 ml 1xTBE çözeltisi içerisinde mikrodalga fırında 1 dakika kadar ısıtılarak çözünmesi sağlandı. Biraz soğutulduktan sonra çözelti içerisine 1 µl EtBr eklendi ve tarakları yerleştirilmiş elektroforez tankına döküldü. Yarım saat beklendikten sonra donan jelden taraklar çekilerek uzaklaştırıldı ve jelin üzerini örtecek kadar tank içerisine 1xTBE

özeltisi eklendi. Tarak dişlerinin jel üzerinde oluşturdukları kuyucuklara DNA'lar DNA yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi ve 100 voltta yarım saat koşturuldu. Jel tanktan alınarak ultraviyole ışığının üzerinde incelendi ve DNA bantlarının fotoğrafları çekildi.

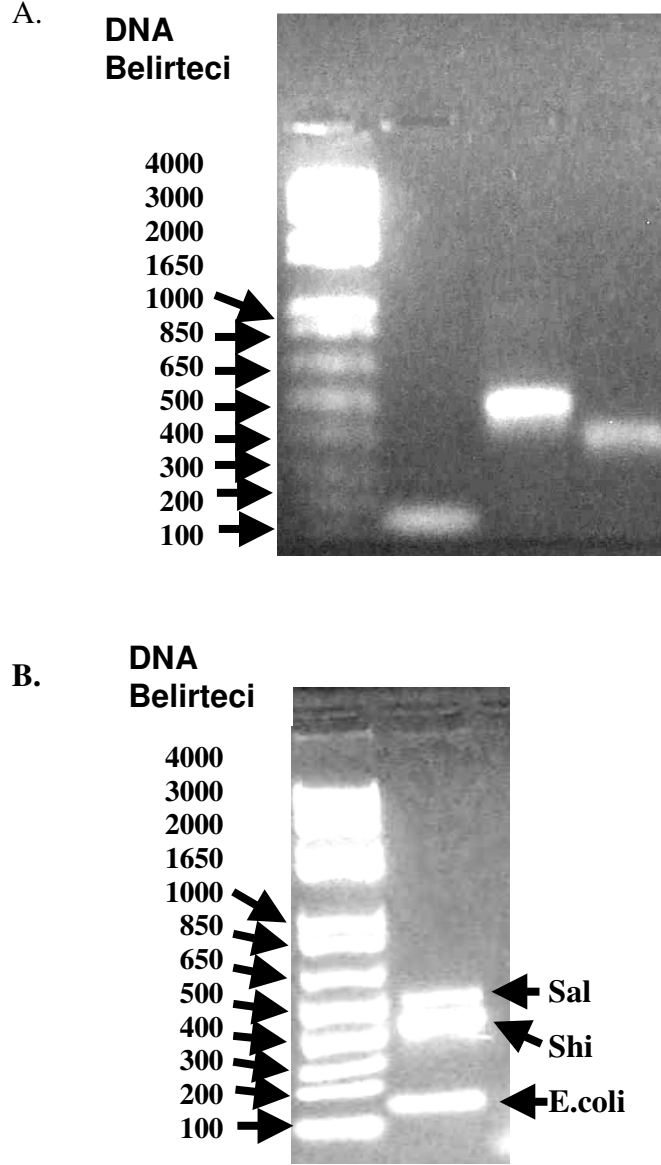
4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu tezin amacı polimeraz zincir reaksiyonlarını (PZR) kullanarak Kars Çayı'nda *E.Coli*, *Salmonella* ve *Shigella* bakterilerinin belirlenmesidir. Bunun için Mayıs-Eylül tarihleri arasında aylık olarak Kars Çayı'nın 7 farklı bölgesinden su örnekleri alındı.

PZR'de kullanılacak olan bakteriler Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi'nden elde edildi. Lifolize bakterilerin canlandırılması ve çoğaltılması Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç.Dr. Zeynep ULUKANLI tarafından gerçekleştirildi. Bakterilere uygun primerler Dr. Recai Oğur'un uzmanlık teziden alındı (Tablo 4.1, 24) ve bizim laboratuvarımızdaki koşullarda PZR gerçekleştirildi ve istenilen büyüklükte DNA bantları elde edildi; *E.Coli*: 147 bç, *Salmonella*: 526 bç ve *Shigella*: 408 bç (Resim 4.1.A). Daha sonra her üç bakteriyi de aynı anda tek tüp içerisinde bir polimeraz zincir reaksiyonu ile belirleyebilmek için multipleks PZR uygulandı (24). Bu teknikte üç bakteri ve bu bakterilere özgün üç primer çifti kullanılarak PZR gerçekleştirildi ve üç bakteriye ait özgün DNA bantları doğru büyüklüklerde gözlemlendi (Resim 4.1.B).

Tablo 4.1. Primerlerin Dizisi ve Büyüklüğü (24)

Primer Adı	Primer Dizisi	Tespit Edilecek Bakteri	PCR ürünü büyüklüğü, (baz çifti)
E.coli	AAAACGGCAAGAAAAAGCAG ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG	E.coli	147
Sal	ACGGTTGTTTAGCCTGATAC CTGGATGAGATGGAAGAATG	Salmonella	526
Shi	TTGACCGCCTTTCCGATAC ACTCCCGACACGCCATAGA	Shigella	408

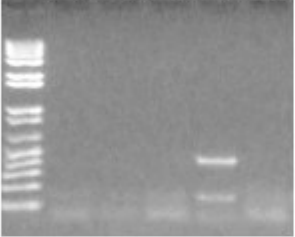


Resim 4.1. Standart Bakterilerinin PZR sonuçlarının DNA agaroz gel elektroforezi. *Salmonella*, *Shigella* ve *E.Coli* bakterilerine ayrı ayrı tüplerde (A) veya aynı tüpte (multiplex PZR) (B) PZR uygulandı. PZR koşulları: 94 °C 4dk, 94 °C 30 sn, 55 °C 30 sn, 72 °C 30 sn., 35 devir. DNA'lar %1.5 luk agaroz jellerinde koşturuldu. Beklenen büyüklükte bantlar gözlemlendi.


Daha sonra Kars ayı'nın Kars Őehrine giriş, Şehir içi ve Şehir ıkıŐı olmak üzere farklı noktalarından su örnekleri toplandı ve bunlar her üç bakterinin de aynı anda saptanabilmesi için *E.Coli*, *Salmonella* ve *Shigella* bakterilerinin primerleri ile PZR'ye tabi tutuldu. Bu deneylerin sonuçları Resim 4.2'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre Salmonella bakterisine örneklerin hiç birisinde rastlanmamıŐtır. *Shigella* bakterisi ise Mayıs 2007 tarihinde alınan 2 örnekte görülmüŐtür ve bu örneklerden bir tanesi Őehrin girişinden diğeri ise Őehrin çıkışından alınan su örneklerindedir. Mayıs ayında Doğu Anadolu Bölgesi'nde kar suları hızlı bir Şekilde eridiği için *Shigella* bakterisinin Kars ayı'nın havzasında bulunan bazı büyük ve kk ölçekli yerleşim yerlerindeki evsel veya hayvansal atıklardan geldiği düŐünülebilir.

E.coli bakterisinin görülme sıklığı ise daha fazla olup özellikle Mayıs ve Haziran aylarında bu bakteriye daha fazla rastlanmıştır (Resim 4.2). Temmuz ve Ağustos aylarında ise sadece Őehrin çıkıŐlarından alınan örneklerde görülmüŐtür. Eylül ayında alınan örnekler de ise bu bakterinin tesbiti yapılamamıŐtır (Resim 4.2). *E.coli* bakterisinin varlığı insan veya hayvan kaynaklı kirliliğinin bir belirtecidir. Kars ayı'nın havzasını oluŐturan Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki yerleşim yerlerinde kanalizasyon arıtma tesisi olmadığından evsel ve hayvansal atıklar doğrudan Kars ayı'na verilmektedir, bu yüzden Őehrin giriŐinde bile bakteri tesbiti yapılabilmesi kirliliğin Őehrin öncesinde baŐladıėını göstermektedir. Temmuz ve Ağustos aylarındaki sonuçlarda kirliliğin Őehrin çıkıŐlarında tesbit edilmesi ise Kars ili kaynaklı kirliliğin bir belirteci olarak yorumlanabilir. Eylül ayında bakteri tesbitinin yapılamamasının sebebi ise bölgenin 2007 yılında az yaėıŐ alması sonucu suyun içinde znmeyen maddelerin artması ve bu maddelerin PZR'deki DNA Polimeraz'ın aktivitesini ortadan kaldırması olabilir.

Örnek No:	M	5-5	5-4	5-3	5-2	5-1
Salmonella						
Shigella					+	
E. Coli		+	+	+	+	+

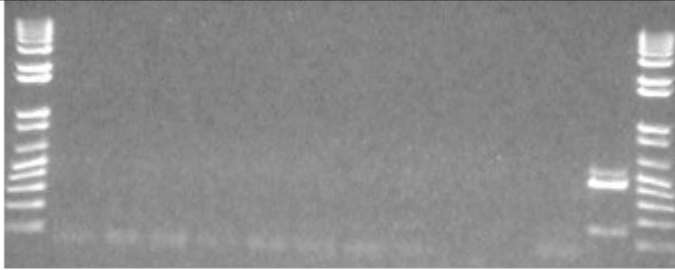


Örnek No:	M	7-4	7-3	7-2	7-1	6-7	6-6	6-5	6-4	6-3	6-2	6-1	5-7	M
Salmonella														
Shigella													+	
E. Coli								+	+	+			+	

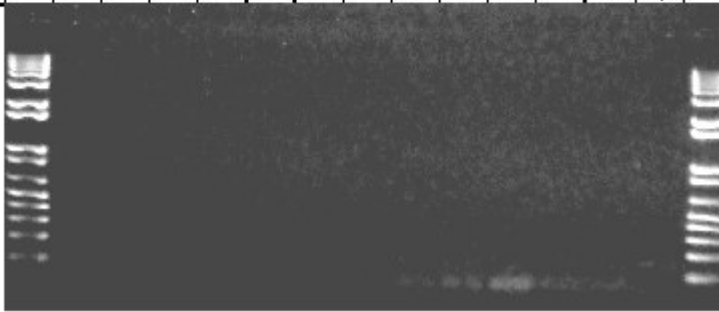


Resim 4.2. Kars Çayı su örnekleri PZR sonuçlarının DNA agaroz gel elektroforezi. *Salmonella*, *Shigella* ve *E.coli* bakterilerinin tespiti Multipleks PZR ile yapıldı. Örnek numaralarının başındaki ilk rakam o ayın numarasıdır, ikinci rakam ise istasyon yerini göstermekte olup bunlar Materyal ve Metod bölümünde verilmiştir. (+) işareti bakteri pozitif örnekleri simgelemektedir. “M” harfi DNA Belirteci anlamına gelmekte olup belirtecin DNA bantlarının büyüklüğü Resim 4.1’deki gibidir. “P” harfi Pozitif kontrol anlamına gelmektedir ve bu örneklerde *Salmonella*, *Shigella* ve *E.coli* standart bakterileri ve bunlara spesifik primerler kullanılmıştır (Tablo 4.1).

Örnek No:	M	9-1	8-7	8-6	8-5	8-4	8-3	8-2	8-1	7-7	7-6	7-5	P	M
Salmonella														
Shigella														
E.Coli								+	+					



Örnek No:	M	10-7	10-6	10-5	10-4	10-3	10-2	10-1	9-7	9-6	9-5	9-4	9-3	9-2	M
Salmonella															
Shigella															
E.Coli														+	



Resim 4.2. devamı. Kars Çayı su örnekleri PZR sonuçlarının DNA agaroz gel elektroforezi.

PZR yöntemi son yıllarda bakteri tesbitinin de başarıyla ve hızla yapıldığı bir metod olarak sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Klasik bakteri belirlenmesi yöntemlerine göre PZR çok daha hızlı sonuç vermektedir ve de bu metodun hassasiyeti de daha fazladır. PZR yöntemini kullanarak Kars Çayı'ndan aldığımız sularda yaptığımız bu deneylerde insansal ve hayvansal kirliliğin belirteçleri olan *Shigella* ve *E.coli* bakterisine rastlanmıştır. Bu yüzden, Kars Çayı havzasında bulunan diğer yerleşim yerlerine ve Kars iline kanalizasyon arıtma tesislerinin kurulması insan sağlığı ve temiz bir doğa için gereklilik arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Anderson, D. P., “Fish Immunology”, *T. F. H. Publications Inc. Ltd.*, USA, 239p., (1974).
2. Bollock, A. M., “Laboratory Methods. In: Fish Pathology”, Second Edition, *Bailliere Tindall*, London, 374-407, (1989).
3. Kubilay, A. ve Timur, G., “Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Yersinia ruckeri* Bakterisine Karşı Antikor Üretiminin Aglutinasyon Yöntemleriyle Tespiti Üzerine Bir Araştırma”, *IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu*, Cilt II, Isparta, 642-650, (1997).
4. Plumb, A. J., and Bowser, R. P., “Microbial Fish Disease Laboratory Manual”, *Brown Printing Company*, Montgomery, Alabama, 95 p., (1983).
5. Tanrıkul, T., Çağırğan, H, ve Tokşen, E., “Bakteriyal Balık Hastalıkları”, *Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitü Müdürlüğü Dergisi*, Cilt: 20, Sayı: 34, Bornova, 105-127, (1996).
6. Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M., Diker, S., “İmmunoloji”, *Medisan Yayınları*, Yayın No:13, 386-388, Ankara, (1994).
7. Bekar, M., “Salmonella’ların Genel Karakterleri ve Tanı Yöntemleri”, *Etilik Vet. Kont. Ve Araşt. Enst.*, Ankara, (1997).
8. Bilgehan, H., “Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları”, *Fakülteler Kitabevi*, Şafak Matbaacılık, II. Baskı, Ankara, 364-451, (1995).
9. Merchant, I.A., Packer, R.A., “The Genus Salmonella”, *Veterinary Bacteriology and Virology*, The Iowa State university Pres, U.S.A., 286-307, (1967).
10. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K.and Carter, G.R., “Enterobacteriaceae”, *Clinical Veterinary Microbiology*, Wolfe Pupl., Spain, 209-218, (1994).

11. Anonim, "Manuel of Recommended Diagnostic Technigues and REquirements for Biological Products. Vol. III." *Office International Des Epizooties*, Rue de Prony, Paris, (1991).
12. Arda, M., "Temel Mikrobiyoloji", *Medisan Yayinlari*, Yayın No: 45, 2. Baskı Ankara, 361 s, (2000).
13. Carter, G.R., "Enterobactericeae", *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology*, U.S.A., 93-103, (1984).
14. Bailey, J.S., "Detection of Salmonella Cells within 24 to 26 Hours in Poultry Samples with the Polymerase Chain Reaction BAX system." *Journal of food Protection*, 61 (7) : 792-795, (1998).
15. Fluit, A. C., Widjoatmodjo, M.N., Box, A.T., Torensma, R. And Verhoef, j., "Rapid Delection of Salmonella in Poutry with the Megnetic Immunopolymerase Chain Reaction Assay Appl. Environ". *Microbiol.*, 29 : 1342-1346, (1993).
16. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higucci, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A., "Primer-Derected Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase". *Science*; 239, 487-491, (1988).
17. Steffan, R.J. and Atlas, R.M., "Polymerase Chain Reaction: Applications in Environmental Microbiology". *Annu. Rev. Microbiol.*, 45, 137-161, (1991).
18. Erlich, H.A., Gelfand, D. and Sninsky, J.J., "Recent Advences in the Polymerase Chain Reaction". *Science*, 252, 1643-1651, (1991).
19. Barrow, P.A., "Salmonella Control, Past, Present and Future". *Avian Pathol.*, 22: 651-699, (1993).
20. Morse, E.V., Greenwood, D.E., Meyers, E.P., Anderson, V.L. and Duncan, M.A., "Experimantal Salmonella Infections in Carassius auratus (Goldfish)". *J. Environ. Sci. Health*, 13: 325-335, (1978b).

21. Souther, B.W., Sonstegaurd, R.A. and mcDermott, L.A., “Enteric Bacteria in Carp (Cyprinus carpio) and white Suckers (Catostoma commersoni)”. *J. Fish: Res. Board Can.*;33: 1401-1403, (1972).
22. Twiddy, D.R., “Antibiotic-Resistant Human Pathogens in Integrated Fish Farms”. *Asean Food Journal.*, 10,1: 22-29, (1995).
23. Şeker, E., “Tatlı Su Midyesinde (*Unio elongatulus eucirrus* Bourguignat, 1860) *Salmonella* Bakterisinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Tespiti” *Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı*, (2001).
24. Oğur, R., “Ankara İl Merkezindeki İçme ve Kullanma Sularının Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi ile Mikrobiyolojik Analizlerinin Yapılması”, *Uzmanlık Tezi, T.C. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı Başkanlığı*, Ankara, (2000).
25. Law, D., “Virulence factors of Escherichia coli O157 and other Shiga toxin-producing E.coli”, *J Appl Microbiol*; 88: 729-745, (2000).
26. Riemann, H.P., Cliver, D.O., “Escherichia coli O157:H7”, *Microbial Food Borne Path*; 14 (1): 41-48, (1998).
27. Park, S., Worobo, R.W., Durst, R.A., “Escherichia coli O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: A Literature Review”. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 39 (6): 481-502, (1999).
28. Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, L.G., Davis, B.R., Herbert, R.J., Olcott, G.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L., “Haemorrhagic colitis associated with an Escherichia coli serotype”. *New Eng J Med.*, 308: 681-685, (1983).

29. Clarke, S., “Diarrhoeagenic Escherichia coli-an emerging problem?” *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 41 (3): 93-98, (2001).
30. DebRoy, C., Maddox, C.W., “Identification of virulence attributes of gastrointestinal Escherichia coli isolates of veterinary significance”. *Anim Health Res.*, 2(2): 129-140, (2001).
31. Durmaz, R., “Uygulamalı Moleküler Biyoloji”, *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*, Malatya, (2004).
32. Tomkins, L.S., “The use of molecular methods in infectious diseases”. *N Engl. J.Med.*,;327 (10):1290-7, (1992).
33. Buimer, M., “Van Doornum G.J.J.; et al. Detection of chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae by ligase chain reaction- based assays with clinical specimens from various sites: implications for diagnostic testing and screening”. *J. Clin. Microbiol.*, 34:2395-400], (1996).
34. Tomkins, L.S., “The use of molecular methods in infectious diseases”. *N Engl. J.Med.*, 327 (10):1290-7, (1992).
35. Temizkan, G., Yilmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Etan, H., Sarıkaya, A.T., ve Arda, N., “Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler”, *İstanbul Üniversitesi BİYOGEM yayınlar*, İstanbul, (2004).

7. ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Kars'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kars'ta tamamladı. 2002 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2006 yılında Kimyager olarak mezun oldu. Aynı yıl içerisinde Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.