



Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler

Esin Çetinkaya, Kamuran Ayhan*

Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Dışkapı, Ankara 06110

Özet

Moleküler tekniklerin mikrobiyoloji alanında kullanımı, her geçen gün daha da yaygınlaşmaktadır. Bu derlemede günümüzde kullanılmakta olan moleküler tekniklerden PFGE (Darbeli Alan Jel Elektroforezi), PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), MLST (Çoklu Lokus Dizilim Analizi), MALDI-TOF (Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu/İyonizasyonu - Uçuş Süresi) ve 16S rDNA dizilim analizi hakkında genel bilgilere yer verilmiş olup yöntemlerin çalışma prensipleri açıklanmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Moleküler tanımlama, PFGE, PZR, MLST, MALDI-TOF, 16S rDNA dizilim analizi

Molecular Technics Used in Microbiology

Abstract

The usage of molecular technics in molecular microbiology is getting widespread day by day. In this review general information and principles of current methods which are PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), PCR (Polymerase Chain Reaction), MLST (Multi Locus Sequence Typing), MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight) and 16S rDNA sequence typing were mentioned.

Keywords: Molecular identification, PFGE, PCR, MLST, MALDI-TOF, 16S rDNA sequence analysis

1. Giriş

1.1 Moleküler Tanımlama Yöntemleri

Moleküler tanımlama yöntemleri, gelişmekte olan teknolojinin mikrobiyoloji alanında sunduğu en önemli yeniliklerden biridir. Moleküler tanımlama tekniklerine her geçen gün bir yenisinin eklenmesi, farklı amaçlarla yürütülen bilimsel çalışmalara büyük yarar sağlamaktadır. Bu yöntemlerin yaygın olarak kullanımını etkileyen en önemli faktörler maliyet ve deneyimli personel ihtiyacı olsa da, kendisine özgü avantajlara ve dezavantajlara sahip olan bu yöntemlerden tüm dünyada yaygın olarak yararlanılmaktadır. Bu bağlamda, son yıllarda ülkemizde de bu tür yöntemlerin kullanıldığı bilimsel araştırmalar hız kazanmıştır.

Türkiye’de yapılan araştırmalarda en çok kullanılan moleküler tanımlama yöntemlerinin başında PFGE (Darbeli Alan Jel Elektroforezi) (Durmaz 2007, Ünal ve İstanbulluoğlu 2009, Çakır ve Güven 2007, Akçalı vd. 2008, Durmaz vd. 2007, Us vd. 2011), PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) (Yılmaz ve Temiz 2003, Kıran ve Osmanağaoğlu 2011, Törnük vd. 2008, Karahan 2006, Oktay ve Hepekran 2010, Koluman 2010) ve 16S rDNA dizilim analizi (Çakır ve Çakmakçı 2003, Başbülbul vd. 2007, Aydın Osmanağaoğlu vd. 2010, Adıgüzel vd. 2011) gelmekte olup bunlara her gün yeni bir moleküler teknik içeren çalışma eklenmektedir.

Cronobacter universalis yeni tanımlanan bir türdür ve dünyada tanımlanan çok az sayıda suşu bulunmaktadır. Türkiye’de rezene, arpa unu, yulaf unu ve pirinç unu örneklerinden izole edilen

*Sorumlu yazarın e-mail adresi: kayhan@eng.ankara.edu.tr

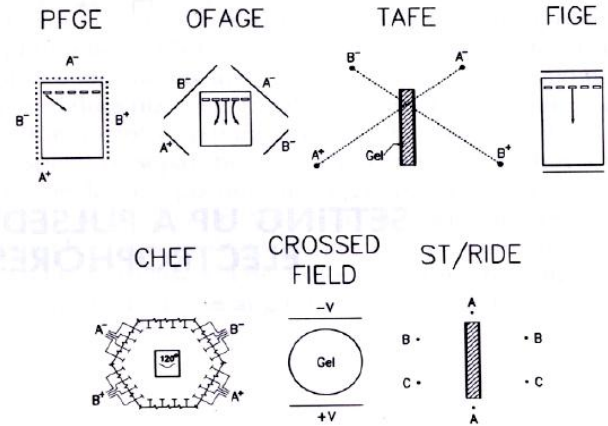
Cronobacter spp. suşlarından (Çetinkaya 2011) biri, 16S rDNA dizilim analizi ve çoklu lokus dizilim analizi (MLST) ile *Cr. universalis* olarak tanımlanmış ve www.pubmlst.org adresli *Cronobacter* spp. veri tabanında yerini almıştır. İzole edilen bu suşa, *Cr. universalis* hakkında bugüne kadar yazılan ilk makalede (Joseph vd. 2011) yer verilmiştir.

Birçok kurum ve kuruluşta moleküler mikrobiyoloji teknikleri üzerine eğitimler düzenlenmekte ve böylece moleküler tanımlama yöntemlerinin kullanıldığı çalışmaların önü açılmaktadır.

1.2 PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis – Darbeli Alan Jel Elektroforezi)

Geleneksel jel elektroforez yöntemleri, DNA örneklerinin katı matrikse (agaroz ya da poliakrilamid) yerleştirilmesi ve jel içindeki moleküllerin statik elektrik alanında göç ettirilmesidir. DNA molekülleri bu elektrik alanında uzayıp bir hizaya girer ve anota doğru göç eder. Bu olaya ‘sürünme’ denir. DNA’nın jelde göçüne etki eden bir dizi parametre vardır: jelin yoğunluğu ve içeriği, tampon çözelti, sıcaklık ve elektrik alanının voltaj farkı. Standart yöntemli DNA elektroforezinde, 20kb’dan büyük DNA molekülleri elektrik alanında aynı hareketliliği gösterdiğinden DNA molekülleri arasındaki farkı görmek imkansızdır. Bu büyük kesitleri çözmeye yönelik ilk girişimler, düşük yoğunlukta agaroz jel ve düşük voltaj farkının kullanımudur. Bu uç koşullar altında bile büyük DNA moleküllerinin birbirinden ayrılması zordur. 1984 yılında David Schwartz yeni bir teknik önermiştir. Önerisine göre elektrik alanının yönünü düzenli olarak değiştirmek, ilk elektrik alanının ortadan kalkmasından dolayı jel içindeki DNA moleküllerini gevşemesine ve yeni alanda uzayarak hizaya girmesine neden olacaktır (Birren ve Eric 1993).

Darbeli alan jel elektroforezi ilk kez 1982’de işlevsel hale getirilmiş ve bu tarihten itibaren büyük DNA moleküllerini ayırmak için çoklu elektrik alanlarını kullanan çeşitli aygıtlar geliştirilmiştir. Tüm sistemler DNA moleküllerini aynı boyutta ayırır, ancak ayırma hızı ve netliğinde farklılıklar vardır. Bu yöntemler Şekil 1’de gösterilmektedir.



Şekil 1. Darbeli alan jel sistemlerinin gösterimi (<http://www.bio.davidson.edu> 2003).

Sistemin doğru şekilde anlaşılması için bazı terimlerin bilinmesinde yarar vardır ki bunlar şu şekilde sıralanabilir;

Darbeli Alan (Pulsed Field): Alternatif olarak birden fazla elektrik alanı kullanan herhangi elektroforez işlemi

Değişim Aralığı (Switch Interval): Alternatif alanların etkin olduğu zaman

Yeniden Yönlendirme Açısı (Reorientation Angle): İki alternatif elektrik alanı arasındaki dar açı

Alan Dönüşümü (Field Inversion): İki alternatif alanın birbirinin karşısında yönlendirildiği PFGE sistemleri

Voltaj Farkı (Voltage Gradient): Jele uygulanan elektrik potansiyeli

Homojen Alan (Homogenous Field): Tüm alan boyunca tekdüze potansiyel farkı olan elektrik alanı (<http://www.bio.davidson.edu> 2003)

Büyük DNA çok kırılmandır ve yüksek viskozitesinden dolayı genellikle pipetlenmesi zordur. Bu nedenle DNA’nın PFGE için hazırlanması, standart DNA hazırlama yöntemlerine göre biraz daha farklıdır. Kromozomal DNA önce agaroz dolguların içine gömülür ve bu dolgular proteinlerin sindirilip geriye yalnız DNA’nın kalması için enzimler ile muamele edilir. Bu dolgular daha sonra belli boyutlarda kesilip restriksiyon enzimleri ile muamele edildikten sonra jeldeki küçük kuyulara aktarılır ve agaroz ile oldukları konuma sabitlenir (<http://www.bio.davidson.edu> 2003).

Koşturulan jelde PFGE sistemi kullanılırken uygun kurulumun sağlanabilmesi için göz önünde bulundurulması gereken birkaç parametre bulunmaktadır. Örneğin, voltaj farkı elektroforezlenen örneğin boyutuna göre düzenlenmiş olmalıdır. Daha büyük DNA örnekleri jel üzerinde düzgün ilerleyebilmek için daha düşük voltaj farkına ihtiyaç duyar. Agaroz seçerken de örnek boyutunun unutulmaması gerekir. EEO (elektroendoozmoz) agaroz, moleküler biyolojide 2,5 Mbc'den büyük moleküllerin ayrılabilmesi için sertifikalandırılmıştır. Diğer yandan, darbeleri alan agarozlarının koşturma süresi daha az olduğundan büyük moleküller için daha uygundur. Jelde DNA'nın hareketliliğini etkileyen bir parametre de sıcaklıktır. Sıcaklığı arttırmak daha fazla harekete yol açar. Bu nedenle 12-15°C en çok kullanılan sıcaklık aralığıdır. Buna ilaveten DNA'nın, iyonik gücü düşük tampon çözeltiler içinde daha hızlı yol aldığı da göz önünde bulundurulmalıdır (Birren ve Eric 1993).

1.3 PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz zincir reaksiyonu; bakteri, virüs, fungus, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin, primerler (özgül tamamlayıcı oligonükleotitler) ile ısıya dayanıklı enzimleri kullanarak laboratuvar ortamında çoğaltılmasını sağlayan özgün ve güvenilir bir yöntemdir. Üzerinde çalışma yapılan genetik materyal, çok az sayıda ve hatta birçok ilgisiz DNA moleküllerinin arasında olsa bile çoğaltılabilir, homojen bir DNA materyali haline getirilebilir ve böylelikle kolayca tanımlanabilir (Arda 1995; Schochetman ve Jones 1988).

Reaksiyon polimeraz enzimi ve gerekli maddelerin bulunması halinde DNA'nın karşıt sıraları sentezleyebilme yeteneği ile gerçekleşir. Seçilen DNA dizisi çoğaltılırken istenmeyen diziler baskılanabilir. Böylece DNA dizisinin tanımlanması kolaylaşır. (Saiki vd. 1988, Walker ve Dounan 1989).

PZR'nin temel bileşenlerini ise şu şekilde sıralayabiliriz;

Kalıp DNA: Başlangıçta çoğaltılacak olan, baz dizisine sahip genetik materyaldir. Bu amaç için DNA yerine RNA kullanılacaksa reaksiyondan önce ters transkriptaz kullanılarak RNA, komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilir. Bu cDNA daha sonra PZR için kalıp olarak kullanılır (Arda 1995; Miwa vd. 1997; Rodriguez 1997).

Primer: 4-10 işaretlenmiş nükleotitten meydana gelen, sentezde basamak oluşturan DNA'yı çoğaltmak için kullanılan kısa ve tek sarmallı DNA molekülleridir. Bunlar hedef DNA'ya özgü olduklarından ortamdaki başka DNA'lar ile çapraz reaksiyon vermezler (Arda 1995; Persing 1991; Wolcott 1992).

Polimeraz Enzimleri: *Thermus aquaticus*'tan elde edilen, sıcaklığa dirençli DNA polimeraz enzimleri, en yaygın kullanılan polimeraz enzimidir. Bu enzimin diğer enzimlerden daha kullanışlı olmasının nedeni, her denatürasyon döngüsünde ortama yeni enzim ilavesini gerektirmemesidir. Bununla beraber primerlerin bağlanması, yüksek sıcaklıkta daha özgül olmaktadır (Arda 1995; Persing 1991; Wolcott 1992).

Deoksinükleotit-Trifosfat (dNTP) Karışımı: Yeni DNA sarmalının tamamlanmasında kullanılan; dATP, dTTP, dGTP ve dCTP olarak bilinen 4 tip dNTP'nin nötralize edilmiş, molaritesi belirlenmiş dördü setleridir.

DNA'nın PZR ile çoğaltılması; zaman, sıcaklık ve döngü sayısı düzenlenerek aşağıda belirtilen aşamalarla gerçekleştirilir;

Denatürasyon: Çift iplikli kalıp DNA denatüre edilir.

Bağlanma: Tek iplikli hale gelen DNA dizilimlerinden her birinin, 3' uçlarındaki nükleotitlere uygun sıcaklıkta primer bağlanır.

Uzama: Yüksek sıcaklığa dayanabilen polimeraz enzimi, primerler ve kalıp DNA'yı kullanarak yapay ortamda çift iplikli DNA sentezler (Türkyılmaz ve Esenal 2002).

PZR'ın avantajlarını ve dezavantajlarını Çizelge 1'deki gibi özetleyebiliriz:

1.4 MLST (Multi-Locus Sequence Typing - Çoklu Lokus Dizilim Tiplendirmesi)

Bakterilerin mutasyona uğramayan genlerinde görülen farklı yapıların listelenmesi yaklaşımı MLEE (Multi-Locus Enzyme Electrophoresis, Çoklu-Lokus Enzim Elektroforezi) yöntemiyle saptanmıştır (Selander vd. 1986). Her ne kadar MLEE küresel bakteriyel epidemiyolojide önemli bir rol üstlenmiş olsa da teknik olarak elverişsizdir ve rutin araştırmalar için adapte edilememiştir. Ek olarak, farklı laboratuvarlarda elde edilmiş sonuçların karşılaştırılması da zordur (Enright ve Spratt 1999).

Çizelge 1. Polimeraz zincir reaksiyonunun avantaj ve dezavantajları*.

Avantajlar	Dezavantajlar
<ul style="list-style-type: none"> • Hızlı ve özgüldür. • Eskimiş, kurumuş, az miktarda DNA içeren örnekler bile uygulanabilir. • Toksin oluşturan etkenlerin, saptanması güç toksinlerin, bakteri alt tiplerinin, laboratuvar koşullarında üretilmesi güç virüslerin teşhisine uygundur. • Antibakteriyel direnci olan bakterilerin saptanmasına uygundur. • Babalık testinden, popülasyon genetiği ve epidemiyolojik çalışmalara varıncaya geniş kullanım alanı bulunmaktadır. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ortamdaki istenmeyen DNA'nın primer ile ortak dizilime sahip olma riski vardır. • Deneyimli personel gerektirir. • Cihaz ve malzemeleri pahalıdır.

*(Schochetman vd. 1988, Walker vd. 1989, Erlich vd. 1991, Persing 1991, Arda 1992, Wolcott 1992, Çevik 1994, Tunchilli vd. 1996, Diallo vd. 1998)

MLST yaklaşımı, korunan çoklu gen lokuslarındaki farklılıkları hedeflemede MLEE'nin gösterdiği başarıya dayanmaktadır. Bununla beraber bu farkın MLST ile kesin olarak tanımlanması, gen kesitlerindeki nükleotit dizilimlerinin saptanmasıyla mümkün kılınmıştır.

Nükleotit diziliminin avantajı, sonuçlarının kolayca onaylanabilmesi, saklanabilmesi ve elektronik olarak paylaşılabilmesidir. MLST analizine verilmiş olan lokus için tüm benzersiz dizilimler keşif sıralarına göre bir allele atanır. Bu MLEE'deki elektromorfların tasarımına karşılık gelmektedir. Eldeki izolataın her bir MLST lokusunda var olan alleller, allelik profili oluşturur ve dizilim tiplendirilmesi tasarlanır ki, bu da MLEE'deki elektroforetik tiplendirme tasarımına karşılık gelir (Selander vd. 1986; Maiden vd. 1998). MLST'de, MLEE'ye göre daha az lokus incelenerek benzer düzeyde ayırım yapılabilmektedir. Bu durum, MLST'nin nükleotit dizilimlerini ayırma gücünün daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir (Maiden vd. 1998; Enright ve Spratt 1999). İzolatlar arasındaki ilişkiler allelik profillerin karşılaştırılması ile belirginleşir. Yakın ilişkili izolatlar özdeş dizilim tiplendirmelerine veya birkaç lokusta farklılık gösteren dizilim tiplendirmelerine sahiptirler.

MLST için gerek duyulan örnekler, uygun ambalaj içinde olması koşuluyla taşınmasında herhangi bir problem ortaya çıkarmayan DNA dizileri veya ölü hücre süspansiyonudur. Ayrıca hazırlanan örnekler, posta yoluyla bir laboratuvardan diğerine kolaylıkla gönderilebilir. Bu durum, MLST'nin diğer bir avantajıdır. Protokoller ve primer dizilimleri elektronik olarak dağıtılabılır ve tercih edilen MLST parametreleri kolaylıkla otomatize edilebilir (Jefferies vd. 1993). Bu yöntemle ait şemalar birkaç

prokaryot ve bir kısım ökaryot patojen için yayınlanmıştır. Ayrıca ilave şemalar da literatürde yer almaktadır.

MLST; korunan 7 temel gen (housekeeping gene) içindeki belirli kısımlar kullanılarak, bakteri izolatlarının tanımlandığı güvenilir bir yöntemdir. Her bir genin iç kısmında yaklaşık 450-500 baz çifti (bç) büyüklüğündeki parçalar, otomatik DNA dizilimleyicisi aracılığıyla iki iplikçik yönünden de doğru bir şekilde dizilimlenerek kullanılır. Bakteri türündeki farklı dizilimler, her bir korunan temel gen için farklı alleller olarak atanır ve her bir izolat için 7 lokustaki alleller, allelik profili ya da dizilim analizini tanımlar (www.mlst.net 2010). Türlerle ait her bir izolat korunan 7 temel gen lokusundaki allellere karşılık gelen 7 tamsayı serisi sayesinde doğru bir şekilde tanımlanır (www.mlst.net 2010).

MLST'de alleller arasındaki nükleotit farklılıklarının sayısı gözardı edilerek, bu farklılıkların tek bir nükleotit alanında mı yoksa birkaç alanda mı meydana geldiği göz önünde bulundurulur ve farklı allel numaraları verilir. Buradaki mantık, yeni bir allel oluşumuna neden olan tek bir genetik olayın nokta mutasyonu ya da sonradan meydana gelecek olan allelden çok orjinal allelle ilişkili olan yeniden birleşim anındaki yer değişimi ile meydana gelmesidir (www.mlst.net 2010).

İzolatların bu yöntemle incelenmesi için önce polimeraz zincir reaksiyonundan faydalanılır. Sonuç, elde edilen PZR ürünlerinin çoklu lokus dizilim analiziyle elde edilir (Baldwin vd. 2009).

Tüm potansiyel lokuslar için çeşitli kriterler kullanılmaktadır. Bunları içeren genler, DNA onarımı, replikasyonu ve amino asit sentezi için

önemli olan temel ürünleri kapsamaktadır. Muhtemel virulans faktörü ve mobil elementler olarak bulunan ya da yakına yerleşmiş olan genlerden seçici evrimsel baskıya diğerlerinden daha duyarlı olmaları nedeniyle kaçınılmaktadır. Seçilmiş lokuslar, her lokusun genetik farkının saptanması için mümkün olduğunca kromozomun karşısına dağıtılır. Her gen kesitinin, tercihen değişken olan merkezi bir noktanın yan kısımlarında bulunan her bir lokusa uygun ve tüm dünyada aynen kabul edilen primerlerin dizaynının kolaylaştırılması amacıyla yaklaşık 500 baz çifti uzunluğunda olması gerekmektedir (Baldwin vd. 2009).

Yeni bir MLST sisteminin düzenlenmesinin üç yolu vardır: başlangıç değerlendirmesinde kullanılacak izolatların seçimi, karakterize edilecek genetik lokusların seçimi, gen yükseltilmesi ve nükleotit dizilim tespiti için primerlerin dizaynıdır (Urwin ve Maiden 2003).

Mevcut tiplendirme bilgilerinin veya epidemiyolojik verilerin temelinde çeşitli izolatları içeren koleksiyonun toplanması tavsiye edilmektedir. Geliştirilmiş primerlerin mümkün olduğunca fazla izolat için uygulanabilir olması ve sorgulanan lokusların her birindeki çeşitlilik düzeyinin tespit edilmesi için koleksiyonda 100 kadar izolat olmalıdır. Bununla beraber koleksiyon, bakteriyel popülasyonu ideal ölçülerde temsil etmelidir (Urwin ve Maiden 2003).

Benzer işlevdeki genlerin çevrelerinden kuşattığı temel genler, MLST için doğru hedeflerdir. Genom diziliminin elde edilebilmesi ve aday lokusun tanımlanması son derece kolaylaştırılmıştır. Bir MLST allelini tanımlayan nükleotitlerin sayısı, teknik yetersizlik ve yüksek maliyet, prensip olarak bir dizilimin tek yöndeki uzama reaksiyonu ile kolayca saptanabilen nükleotit dizilimin uzunluğuna bağlıdır. MLST projesi üzerine ilk çalışmanın başladığı 1996 yılında, bu uzunluk otomatikleştirilmiş çoğu nükleotit dizilim enstrumanı için 450 bç civarındaydı. Daha uzun dizilimlerin artık alışlagelen şekilde elde edilmesinin yanında, bazı bakteriyel türlerden sağlanan bulgular, temel genlerden bu uzunlukta alınan kesitlerin boyutunun uygun olduğunu göstermektedir (Maiden vd. 1998, Enright ve Spratt 1998, Salcedo vd. 2003). Gelişme aşamasında, son MLST sistemi için düşünülen daha uygun lokuslar sorgulanmaktadır. Aday olan temel genin genom

eklemelerinde işlevi olduğu varsayılarak seçilen genler, beklenmedik düzeyde rekombinasyon ve seleksiyonla denenebilir ve böylece uygunsuz olduğu kanıtlanır. Çok az lokus sorgulayan bir sistem, allellerin ilişkileri ile karmaşık hale gelebilir. Lokusların sayısı, çözünürlüğün geliştirilmesi için yükseltilebilir (Urwin ve Maiden 2003).

Oligonükleotit primerlerinin ve primerlerin yükseltme ve dizilimleme için dizaynı, gerekli işin çoğunluğunu oluşturur. Son dizilim için gerekenden daha büyük olan DNA kesitlerinin başlangıçta yükseltildiği yuvalanmış stratejinin uygulanması özellikle tavsiye edilir. Bu kesitlerin nükleotit dizilimleri yükseltilecek kesitler içindeki belli dizilim primerleri kullanılarak saptanır. Bu gibi primerler, genellikle daha kaliteli nükleotit dizilimi verisi oluşturur ve sahte yükseltme ürününün dizilimlenme olasılığı düşürülür. Sonuç olarak, yükseltme aşamasında daha gevşek PZR koşulları kullanılabilir. Bu durum, primerler tarafından hedeflenen gen dizilimlerinde polimorfizmin meydana gelebildiği yüksek çeşitlilikteki bakteriler için bir avantajdır. Buna ilaveten 'nesting', bakterinin geliştirilemediği klinik örneklerde dizilim tiplenmesinin saptanmasına olanak sunan yüksek duyarlılığı sağlar (Enright vd. 2000; Kriz vd. 2002). Yükseltme ve dizilimleme için reaksiyon koşullarının optimizasyonu önemli bir konudur. Geçici bir MLST sisteminin kurulması, diğerlerine göre daha basittir çünkü klinik laboratuvarında rutin bir şekilde işleyen bir sistem kurmak daha zordur (Urwin ve Maiden 2003).

1.5 16S rDNA Dizilim Analizi

Woese ve arkadaşları, bakterilerin ve diğer yaşam formlarının filogenetik ilişkisinin, genetik şifrenin değişmeyen bir bölgesinin kıyaslanması ile saptanabilir olduğunu ortaya koymuştur (Woese vd. 1985, 1987).

Bakterilerdeki bu genetik alan için uygunluğu incelenmekte olan kısımlar 5S, 16S (küçük alt ünite de denir) ve 23S rDNA'yı şifreleyen genlerden meydana gelmektedir. Bakterilerde taksonomik amaçlar için en çok kullanılan DNA parçası 16S rDNA genidir (Bottger 1989, Palys vd. 1997, Kolbert ve Persing 1999, Garrity ve Holt 2001, Tortoli 2003, Harmsen ve Karch 2004). 16S rDNA geni sadece bakteriler arasında değil, aynı zamanda arkebakterilerin 16S rDNA geni ve ökaryotların 18S rDNA geni ile de karşılaştırılabilir.

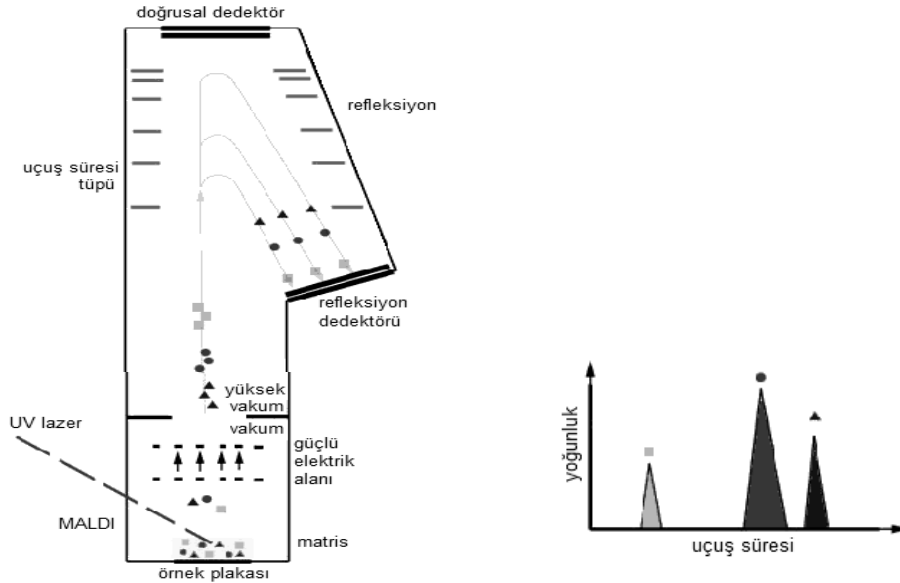
Çizelge 2. Bakteriyel tanımlama için 16S rDNA gen dizilimi analizinin prosedürleri ve zamanları^a.

Adım	Prosedür	Zaman (el)	Zaman (cihazda) ^b
1	Hücrelerin elde edilmesi: Organizma saf olduğu sürece kaç saat/gün önce aktive edildiğine önem verilmeden herhangi bir agar yüzeyinden ya da brotdan elde edilebilir. 1-2 öze kültür yeterlidir.	3-5 dakika	
2	DNA ekstraksiyonu.	30 dakika	10 dakika ve 3 dakika
3	PCR uygulaması.	30 dakika	2 saat
4	PCR ürününün analizi. Yükleme, koşturma, jelin incelenmesi.	20 dakika	1 saat
5	PCR ürünlerinin saflaştırılması.	1 saat	
6	Döngü dizilimi.	30 dakika	3 saat
7	PCR ürünlerinin saflaştırılması.	1 saat	
8	16S rDNA geninin dizilimlenmesi, kapiler tepsinin yüklenmesi ve koşturma.	1 saat	2,5 saat
9	Analiz zamanı.	5-15 dakika/örnek	
10	İsmlendirme: Eğer incelenen organizma, veritabanına daha önce kaydedilmişse 1 dakika sürer. Yeni bir organizma üzerinde çalışılıyorsa çeşitli veritabanları araştırılmalı ve dizilimler detaylı incelenmelidir (15- 30 dakika). Bu noktada fenotipik karakterizasyon ve klinik gösterim yapılır.	30 dakika	
11	Sonuçların raporlandırılması		

^a Clarridge vd. (2001).^b ABI 3100 cihazına dayanarak.

Spektrumlar mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılmaktadır. İncelenmek istenen mikroorganizmaya ait koloni doğrudan hedef noktasının üzerine yayılır ve matriksle kaplanır. Meydana gelen kütle spektrumları, ilgili yazılımla

incelendikten sonra kayıtlı profillerle karşılaştırılır. Türlerin bu teknik ile tanımlanması, günümüz standart immünolojik ve biyokimyasal yöntemlerden daha güvenilir ve ucuz olmasından kaynaklanmaktadır (Seng vd. 2009).

**Şekil 3.** Matris destekli lazer iyonizasyonunun şekilsel anlatımı (<http://www.proteomicsnijmegen.nl> 2007).

PZR ve MALDI-TOF tavsiye edilen teknikler olsa da Çetinkaya (2011) tarafından yapılan araştırmada *Cronobacter* spp. suşlarının PZR, PFGE, MLST, MALDI-TOF, 16S rDNA dizilim analizi yöntemleri kullanılarak yapılan tanımlama sonuçlarının karşılaştırılmasıyla elde edilen bulgulara göre nükleik asit dizilimlendirmesine dayanan 16 rDNA dizilim analizi ve MLST yöntemlerinin, tür düzeyinde doğru sonuçların alınması açısından adı geçen diğer yöntemlerden daha güvenilirdir.

Sonuç olarak; klasik yöntemler ile tanımlamalarda yaşanan problemler, günümüzde geliştirilmekte olan çeşitli moleküler yöntemler ile çözülmeye çalışılmaktadır. Bu yöntemler sayesinde gerek bilimsel, gerek endüstriyel, gerek toplum sağlığı açısından önemli olacak gelişmeler söz konusu olabileceği gibi analizlerde doğru ve hızlı sonuç alınması sağlanacağından, bu yöntemlerin iyi ve kötü yönlerinin araştırılarak optimizasyonun sağlanması büyük önem taşımaktadır.

2. Kaynaklar

- Adıgüzel, A., İnan, K., Şahin, F., Arasoğlu, T., Güllüce M., Beldüz, AO., Barış, Ö. 2011.** Pasinler kaplıcasından izole edilen termofilik bakterilerin moleküler farklılıkları. *Turk. J. Biol.*, 35: 267-274.
- Akçalı, A., Levent, B., Akbaş, E., Esen, B. 2008.** Türkiye'nin bazı illerinde izole edilen *Shigella sonnei* suşlarının antimikrobiyal direnç ve "Pulsed Field" jel elektroforezi yöntemleri ile tiplendirilmesi. *Mikrobiyol. Bül.*, 42: 563-572.
- Arda, M. 1995.** Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara.
- Aydın Osmanağaoğlu, Ö., Kıran, F., Oral, B. 2010.** Laktik asit bakterilerinin 16S rDNA sekans analizi ile tanımlanması, Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, Ankara Üniversitesi, Ankara, 28 s.
- Baldwin, A., Loughlin, M., Caubilla Barron, J., Kucerova, E., Manning, G., Dowson, C., Forsythe, S. 2009.** Multilocus sequence typing of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. *BioMed Central Microbiol.*, 9: 223.
- Başbülbül, G., Ateşlier Bakır, Z. B., Bozdoğan, B., Metin, K., Oryaşın, E., Bıyık, HH.** Antimikrobiyal aktiviteye sahip termofilik bakterilerin 16S rRNA analizi ile saptanması, Biyoloji Eğitiminde Evrim Sempozyumu, Malatya, 198- 203 s.
- Birren, B., Eric, L. 1993.** Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide, Academic Press Inc. San Diego, California.
- Bottger, EC. 1989.** Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol. Let.*, 65: 171-176.
- Clarridge, J. E., Osting, C., Jalali, M., Osborne, J., Waddington, M. 1999.** Genotypic and phenotypic characterization of "*Streptococcus milleri*" group isolates from a Veterans Administration hospital population. *J. Clinic. Microbiol.*, 37: 3681-3687.
- Çakır, İ., Çakmakçı, L. 2003.** Laktobacillus ve Bifidobakterlerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 84 s.
- Çakır, P., Güven, K. 2007.** Gıda ve insan kaynaklı *Staphylococcus aureus* strainlerinin karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, 97 s.
- Çetinkaya, E. 2011.** Gıdalardan izole edilen *Enterobacter* sp. ve *Cronobacter sakazakii* suşlarının biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 88s.(Basılmamış).
- Çevik, AM. 1994.** PCR ve infeksiyöz hastalıklarda kullanımı, Seminer, Ankara Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Bölümü.
- Diallo, IO., Mackenzie, AM., Spradbrow, PB., Robinson, W. F. 1998.** Field isolates of fowl pox virus contaminated with reticuloendotheliosis virus. *Avian Dis.*, 27: 60-66.
- Durmaz, R., Otlu, B., Çalışkan, A., Gürsoy, N. 2007.** *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinin moleküler tiplendirilmesinde kullanılacak kısa süreli "Pulsed Field Gel" elektroforez (PFGE) protokolü. *ANKEM Derg.*, 21(2): 113-117.
- Erlich, AH., Gelfand, D., Sninsky, JJ. 1991.** Recent advantages in PCR. *Science*, 252: 1643-1652.
- Enright, MC., Spratt, BG. 1998.** A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated

with serious invasive disease. *Microbiology*, 144: 3049–3060.

Enright, MC., Spratt, BG. 1999. Multilocus sequence typing. *Trend. Microbiol.*, 7: 482–487.

Enright, M.C., Knox, K., Griffiths, D., Crook, DW. M., Spratt, BG. 2000. Molecular typing of bacteria directly from cerebrospinal fluid. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 19: 627–630.

Garrity, G. M., Holt, JG. 2001. The road map to the manual, p. 119–166. In G. M. Garrity (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, New York, N.Y.

Harmsen, D., Karch, H. 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *Am. Soc. Microbiol. New.*, 70: 19–24.

Jefferies, J., Clarke, SC., Diggle, MA., Smith, A., Dowson, C., Mitchell, T. 2003. Automated pneumococcal MLST using liquidhandling robotics and a capillary DNA sequencer. *Mol. Biotechnol.*, 24: 303–308.

Joseph, S., Cetinkaya, E., Drahovska, H., Levican, A., Figueras, M. J., Forsythe, SJ. 2011. *Cronobacter condimentii* sp. nov., isolated from spiced meat and *Cronobacter universalis* sp. nov., a novel species designation for *Cronobacter* sp. genomospecies 1, recovered from water, and food ingredients. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* (Basımda).

Karahan, ZC. 2007. *Staphylococcus aureus* suşlarında Panton Valentine Lökosidin (PVL) genlerinin araştırılması. Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, Ankara Üniversitesi, Ankara, 37 s.

Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö. 2011. Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda/ tiplendirilmesinde kullanılan moleküler yöntemler. *Erciyes Ün. Fen Bil. Enst. Derg.*, 27(1): 62-74.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Mol. Evol.*, 16: 111–120.

Kolbert, CP., Persing, DH. 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2: 299–305.

Koluman, A. 2010. Piliç Kümesleri ve kesimhanelerinde *Campylobacter jejuni* kontaminasyonu belirlenmesi. *Türk Hijyen Den. Biyo. Derg.*, 67(2): 57-64.

Maiden, MCJ., Bygraves, JA., Feil, E., Morelli, G., Russel, JE., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, DA., Feavers, IM., Achtman. M., Spratt, BG. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 3140–3145.

Maldi Tof Ms. 2010
<http://www.proteomicsnijmegen.nl>

Miwa, N., Nishina, T., Kubo, S., Honda, H. 1997. Most probable number method combined with nested PCR for detection and enumeration of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* intestinal contents of cattle, pig and chicken. *J. Vet. Med. Sci.*, 59: 557-560.

Multi locus sequence typing. 2010.
<http://en.wikipedia.org>

Multi locus sequence typing. 2010. www.mlst.net

Oktay, Hİ., Heperkan, D. 2010. *Aspergillus* izolatlarının PZR ile tanısı, bazı mikotoksinlerin in vitro tayini, sıcaklık ve sürenin incirde aflatoksin ve siklopiazonik asit oluşumuna etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.

Pace, N. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276: 734–740.

Palys, T., Nakamura, LK., Cohan, FM. 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 47: 1145–1156.

Persing, HD. 1991. Polymerase chain reaction: Trenches to benches. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 1281-1285.

Pfister, P., Risch, M., Brodersen, DE., Bottger, EC. 2003a. Role of 16S rRNA helix 44 in ribosomal resistance to hygromycin B. *Antimicrob. Agents Ch.*, 47: 1496–1502.

Pfister, P., Hobbie, S., Vicens, Q., Bottger, EC., Westhof, E. 2003b. The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance :relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures. *Biochem.*, 4: 1078–1088.

Pulsed Field Gele Electrophoresis. 2003.
<http://www.bio.davidson.edu>

- Rodriguez, JM.** 1997. Detection of pathogens by using the polymerase chain reaction. *Vet. J.*, 153: 287-302.
- Saiki, KR., Gelfand, HD., Stoffi, S., Scharf, JS., Higuchi, R., Horn, T. G.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Salcedo, C., Arreaza, L., Alcalá, B., De la Fuente, L., Vazquez, JA.** 2003. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 757-762
- Schochetman, G., Jones, KW.** 1988. Polymerase Chain Reaction. *J. Infect. Dis.*, 158: 1154-1157.
- Selander, RK., Caugant, DA., Ochman, H., Musser, JM., Gilmour, MN., Whittam, TS.** 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 873-884.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, PE., Rolain, JM., Raoult, D.** 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by MALDI-TOF MS. *Clin. Infect. Dis.*, 49(4): 552-3.
- Thorne, JL., Kishino, H., Painter, IS.** 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 15: 1647-1657.
- Tortoli, E.** 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16: 319-354.
- Törnük, F., Kesmen, Z., Yetim, H.** 2008. Et ve et ürünlerinde patojen bakterilerin tespitinde RT-PCR tekniğinin kullanılması. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, s 519-522, Erzurum.
- Tunchili, LM., Kodama, H., Sharma, RN., Takatori, I., Pandey, GS.** 1996. Detection of *Salmonella* DNA in chicken embriyos and environmental samples by Polimerase Chain Reaction. *J. Vet. Med. Sci.*, 58: 881-884.
- Türkyılmaz, S., Esendal, Ö.** 2002. Polimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanım alanları. *Kafkas Ün. Vet. Fak. Derg.*, 8(1): 71-76.
- Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T., Kataoka, M.** 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J. Bacteriol.*, 181: 78-82.
- Urwin, R., Maiden, MCJ.** 2003. MultiLocus Sequence Typing: a tool of global epidemiology. *Trend Microbiol.*, 10(11): 479-487.
- Us, E., Erdem, B., Tekelli, A., Gerçeker, D., Saran, B., Bayramova, M., Şahin, F.** *Salmonella* serotip Enteridis izolatlarının plazmid profil analizi ve "Pulsed Field" jel elektroforezi ile incelenmesi. *Mikrobiyol. Bül.*, 45(2): 210-227.
- Ünal, N., İstanbulluoğlu, E.** 2009. İnsan ve sığır kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması. *Ankara Ün. Vet. Fak. Derg.*, 56: 119-126.
- Walker, J., Dounan, G.** 1989. DNA Probes: A new role in diagnostic microbiology. *J. Appl. Microbiol.*, 67: 229-230.
- Woese, CR., Stackebrandt, E., Macke, TJ., Fox, GE.** 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Sys. Appl. Microbiol.*, 6: 143-151.
- Woese, CR.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51: 221-271.
- Wolcott, JM.** 1992. Advances in nucleic acid-based detection methods. *Clin. Microbiol. Rev.*, 5: 370-386.
- Yılmaz, R., Temiz, A.** 2003. *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu. *Orlab Mikrobiyol. Derg.*, 1(3): 19-42.