

PCR ve RFLP YÖNTEMLERİ İLE MYCOBACTERIUM TÜRLERİNİN İDENTİFİKASYONU

Prof.Dr. Ahmet SANİÇ¹, Doç.Dr. Cafer EROĞLU², Y.Doç.Dr. Ahmet KİZİRGİL³

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji,

²Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun

³Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

GEREKEN MADDELER

Trizma, Borik asit, EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit)	Sigma
Chelex-100	”
Standard agaroz	”
NuSieve GTG agaroz	FMC BioProduct
Ethidium bromid	Sigma
Taq polimeraz (5 ü/ul)	Promega, Roche, Fermentas
dNTP	” ” ”
Primer TB11: 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3'	50 nmol MOLBIOL
Primer TB12: 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3'	” ”
Primer T4: 5'-CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG -3'	” ”
Primer T5: 5'-CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG -3'	” ”
Enjeksiyonluk distile su	Eczacıbaşı ilaç
Filtreli pipet uçları: 1-10, 10-100, 50-200 ve 100-1000 µl hacimlerinde	
Eppendorf tüpleri: 0.2 (ince cidarlı), 0.5 ml ve 1.5 ml (yan yüzleri pürüzlü) hacimlerinde	

GEREKEN ALETLER

Su banyosu veya kuru ısıtıcı blok,	Nüve, Clifton veya diğer markalar
Vorteks,	Techne veya diğer markalar
Derin dondurucu (-20 °C)	Nuarie veya diğer markalar
Buzdolabı 2 adet (temiz ve kirli odada)	-20 °C'lik bölmeli ve Nofrost değil
Laminar hava akımlı kabin	dan LAF veya yerli üretim
Mikrosantrifüj (en az 14.000 devir)	Jouan veya diğer markalar
Thermal cycler	Birçok üretici var
Agaroz Jel Elektroforez Sistemi (Komple set)	Birçok üretici var
pH metre	Birçok üretici var
UV transilliminatör	”
Mikrodalga fırın veya küçük elektrik ısıtıcısı	”
Mikropipetler (1-10, 10-100, 50-200, 100-1000 µl)	Rainin, Biohit, Costar

ÇALIŞMA

Çalışma Üç Aşamada Yapıldı:

1. Mycobacterium DNA'sının izole edilmesi.
2. Mycobacterium DNA'sının saptanması.
 - a-) Mycobacterium tuberculosis Complex'e Spesifik IS6110 PCR : Sadece tüberküloz basilleri kompleksini tanımlar.
 - b-) Tüm Mycobacterium'lara Spesifik 65 Kilo Daltonluk Isı Şok Proteini Bölgesine Ait PCR : Tüberküloz basilleri kompleksi dışındaki mikobakteriler de tiplendirilebilir.
 - c-) Agaroze jel elektroforezi
3. Tüm mycobacterium'lara spesifik 65 kilo daltonluk ısı şok proteini bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesilerek mycobacterium türlerinin belirlenmesi.

I. Mycobacterium DNA'sının İzole Edilmesi:

Nükleik asitlerin hücrelerden ayrılarak, fiziksel ve/veya kimyasal işlemlerden geçirilip saflaştırılma işlemi ekstraksiyon olarak tanımlanmaktadır. Bu işlem esnasında nükleik asitlerin parçalanmaya karşı korunması, amplifikasyon inhibitörlerinin ortamdan uzaklaştırılması ve hedef nükleik asidin saflaştırılarak konsantre edilmesi amaçlanmaktadır. Değişik ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir: Fenol-kloroform yöntemi, distile suda kaynatma, deterjanlar + proteinaz K, değişik kimyasalların kullanımı (Chelex-100, Guanidium vb.) ve sonikasyon gibi yöntemler DNA ekstraksiyonu için kullanılmıştır (11,12).

Chelex-100 Kullanılarak Mycobacterium DNA'sının İzole Edilmesi

Chelex-100 Solüsyonu (%10) (13):

- 2.5 ml TE Buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA)
- 7.5 ml distile su
- 1 gram Chelex-100 (Sigma)
- Toplam 10 ml solüsyon kullanılıncaya kadar + 4 °C'de saklandı. Kullanılmadan önce vortekslenerek karıştırıldı.

BACTEC 12 B Şişesinden DNA Ekstraksiyonu: (13)

- 1- Bactec şişesi iyice vortekslendi,
- 2- Şişenin lastik tıpası izopropil alkol ile iyice silindi,
- 3- Üremiş kültürden 1 ml'lik enjektörle 0.5 ml alınıp 1.5 ml'lik ependorf tüpüne konuldu,
- 4- 5 dakika 14000 rpm'de santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü, Üstteki sıvı atıldı,
- 5- 250 µl kullanılmadan hemen önce vortekslenmiş Chelex-100 (% 10'luk solüsyon) ilave edildi,
- 6- 10-15 sn. vortekslendi,
- 7- 10 dakika 60 °C'lik kuru ısı bloğunda veya su banyosunda inkübe edildi,
- 8- 10-15 sn. tekrar vortekslendi,
- 9- 15 dakika 100 °C'lik kuru ısı bloğunda veya su banyosunda inkübe edildi,
- 10- Oda ısısında soğumaya bırakıldı,
- 11- 3 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edildi,
- 12- Mycobacterium DNA'sını içeren süpernatant PCR için hemen kullanılabilir veya daha sonra kullanmak üzere -20 veya -70°C'de saklanır.

Not: Löwenstein-Jensen'den DNA izole edilecekse bir öze dolusu taze üremiş koloni alınıp 100 ul distile suda süspansiyon yapıldıktan sonra üzerine 100 ul % 10'luk Chelex-100 eklendi, iyice vortekslendikten sonra Bactec için kullanılan prosedür 7 nolu aşamadan sonra aynen takip edildi (14)

II. **Mycobacterium DNA'sının Saptanması.**

a-) **Mycobacterium tuberculosis Complex'e Spesifik IS6110 PCR (1,5)**

Öncelikle Mycobacterium tuberculosis Complex'e spesifik IS6110 bölgesine ait primerler T4: 5'-CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG -3' ve T5: 5'-CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG -3' kullanılarak klasik PCR yapıldı. Böylece Mycobacterium tuberculosis Complex atipik mikobakterilerden kolayca ayrılabilir. IS6110 PCR yapılırken aşağıdaki PCR siklusu uygulandı.

Mycobacterium tuberculosis Complex (IS6110)'e ait PCR Programı:

94	°C'de	5 dk.	1 siklus
94	„	1,,	35 siklus
60	„	1,,	
72	„	2,,	
72	„	8,,	1 siklus

Diğer aşamalar tüm Mycobacterium'lara spesifik PCR yapılırken izlenen prosedürle aynı olarak uygulandı.

b-) **Tüm Mycobacterium'lara Spesifik 65 Kilo Daltonluk Isı Şok Proteini Bölgesine Ait PCR (1,10)**

DNA'nın çoğaltılabilmesi için PCR tepkime karışımında gerekli olan elemanlar şunlardır:

DNA Ekstraktı: Ekstraksiyonu yapılmış, amplifikasyona hazır hale getirilmiş DNA örneğidir.

Primer'ler: Çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan sınırlayan, çoğaltılması istenen bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan bir çift sentetik DNA parçaları. Primerler 15-30 nükleotid uzunluğunda olup, mikroorganizma genomunun spesifik bölgesine yapışmaya uygun olarak hazırlanır. Ürün spesifikliği büyük ölçüde uygun seçilen primerlere bağlıdır (1,15). Primerler liyofilize halde geldi ise DNAz ve RNAz free distile suda 10 veya 50 pmol/ul olacak şekilde sulandırılır. Daha sonra küçük hacimlere (10-20 örneklik) bölünerek -20 °C'de saklanır. Tüm mycobacterium'ların PCR ile saptanması için primer TB11: 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3' ve TB12: 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3' kullanıldı (10).

dNTP Karışımı: Amplifikasyon esnasında denatüre edilen zincirlerin tamamlanmasında kullanılacak olan deoksi nükleotit trifosfatlar (dNTP'ler: eşit oranda dATP, dGTP, dCTP, dTTP)'lerden oluşur (1,2). 100 mM konsantrasyonda olan stok dNTP'ler 10 defa DNAz ve RNAz free distile suda sulandırılarak küçük hacimlere (25-50 örneklik) bölünerek -20 °C'de saklanır. Sulandırılan bu solüsyondan 50 ul PCR karışımı için 1 ul dNTP eklenir.

DNA Polimeraz: Genellikle PCR çalışmalarının büyük çoğunluğunda *Thermus aquaticus* (Taq) bakterilerinden elde edilen termostabil Taq DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Taq DNA polimeraz optimal sıcaklıkta (70-80 °C) saniyede 35-100 nükleotidin polimerizasyonu ve 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini gerçekleştirme yeteneğine sahiptir (1,16). Taq polimeraz genellikle 5 ünite/ul konsantrasyonda gelir ve -20 °C'de saklanır.

Tamponlar ve MgCl₂: 10x PCR tamponunda 100 mM Tris ve 500 mM KCl bulunur. Taq DNA polimeraz MgCl₂

varlığında etkindir. MgCl₂'ün PCR'ın özgüllüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum MgCl₂ konsantrasyonu olarak 1.5 mM tercih edilir. Düşük Mg⁺² iyon konsantrasyonu zayıf ürün oluşumuna, yüksek Mg⁺² iyon konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün oluşumuna sebep olmaktadır (1,3,17). 10x PCR bufer ve MgCl₂ (25 mM) genellikle Taq enzimi ile birlikte gelir ve aşağıda belirtilen konsantrasyonda kullanılır.

PCR Karışımının Hazırlanması:

Kırık buz üzerinde 1.5 ml'lik reaksiyon tüpünde aşağıdaki karışım hazırlandı:

Distile su	30.75	ul
PCR Bufer (10x konsantrasyonda)	5	„
MgCl ₂ (25 mM)	3	„
dNTP (10 mM)	1	„
Primer 1 (TB11, 10 pmol/ul)	2.5	„
Primer 2 (TB12, 10 pmol/ul)	2.5	„
Taq polimeraz (Promega, Roche veya Fementas 5 Ü/ul)	0.25	„
Örnek DNA	5	„
Toplam	50	„

Yukardaki karışım vorteksenerek karıştırıldıktan sonra santrifüje edilir. Çalışılacak örnek sayısının çarpımı kadar hazırlanan karışım 45'er ul olarak örnek numaraları yazılmış 0.2 veya 0.5 ml'lik (Thermal cycler'ın bloğuna bağlı olarak) eppendorf tüplerine dağıtıldı. Üzerine 5 ul Mycobacterium DNA'sı eklenerek thermal cycler aletine yerleştirildi. Thermal cycler

aletinde aşağıdaki siklus programı uygulandı.

Tüm Mycobacterium'lara Spesifik PCR

Programı:

94	°C'de	5	dk.	1 siklus
94	„	1	„	} 35 siklus
55	„	1	„	
72	„	2	„	
72	„	8	„	1 siklus

c) Agaroze Jel Elektroforezi: (4)

Amplifiye edilen PCR ürünleri değişik yöntemlerle belirlenebilir. En yaygın olarak kullanılanı agaroz jel elektroforezidir. PCR ile elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektrik alanında büyüklüğüne göre ayrılır. Agaroz jelde DNA bantlarının görülebilmesi için PCR ürünlerinin flouresan bir boyayla (ör. Ethidium bromid) muamele edilmesi gerekir. Ethidium bromid'le boyanan DNA bantları ultraviyole (UV) transilluminatör veya epiilluminatör ışığı altında görünür hale gelir. Beklenen PCR ürünlerinin varlığı DNA molekül ağırlık standartları (DNA marker) veya pozitif kontroldeki bant büyüklüğü ile karşılaştırılarak belirlenir (4,15).

Beklenen PCR ürünü büyüklüğüne göre agaroz konsantrasyonu aşağıdaki tablodan belirlenir (4).

Tablo: Agaroz Konsantrasyonu ile DNA Ayırma Gücü Arasındaki İlişki.

Agaroz Konsantrasyonu (%)	DNA Ayırma Aralığı (baz çifti)
0.3	5000-60000
0.6	1000-20000
0.7	800-10000
0.8	500-7000
1.2	400-6000
1.5	200-3000
2.0	100-2000

PCR Ürününün Agaroz Jelde Yürütülmesi (4):

1. İlk olarak PCR ürününü büyüklüğü hesaplanarak kullanılacak jelin agaroz yüzdesine karar verilir (Tablo). 200 ile 3000 baz çifti arasındaki bir ürün için % 1.5'lik agaroz yeterlidir.
2. İlk önce agaroz ve terazinin bulunduğu odaya girilir. Elektroforez tankının büyüklüğüne göre dökülecek jel miktarı belirlenir. Örnek: 40 ml'lik tank için; 0.6 gram agaroz tartılıp 40 ml 0.5 x TBE tamponuna ilave edilir.
3. Stok 5x TBE bufer (50 gr Tris base, 27.5 gr Boric acid, 20 ml 0.5 M EDTA pH:8.0, 1 litre distile suda eritilir) on defa distile suda sulandırılarak 0.5x TBE bufer kullanma solüsyonu hazırlandı.
4. 40 ml 0.5x TBE bufer behere konuldu. Üzerine tartılan agaroz eklenerek karıştırıldı.
5. Mikro dalga fırında 1 dk 400 Watta tutuldu. Mikro dalga yoksa ocak üzerinde arada bir karıştırılarak agaroz eritilebilir.
6. Karıştırıldıktan sonra soğuması için beklenirken agaroz jelin döküleceği plate hazırlandı. Örnek sayısına göre 8'li veya 12'li tarak yerleştirildi.
7. 50 °C civarına kadar soğuyan 40 ml'lik agaroz 4 ul ethidium bromide (5 mg/ml) eklendi karıştırıldıktan sonra jel döküldü.
8. Jel donduktan sonra (yaklaşık 30 dakika oda ısısında) plate'nin iki tarafındaki lastikler ve tarak çıkarıldı.
9. Her örnek için prafilm üzerine 2 ul yükleme solüsyonu (**5x Loding bufer:** 250 mg Bromophenol blue, 3 ml gliserol, 7 ml distile su) kondu. 10'ar ul PCR ürünü 2 ul yükleme solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra sırayla agaroz jele yüklendi.

10. 125 voltta 20 dakika veya 90 voltta 60 dakika elektroforez uygulandı.
11. Elektroforez durdurulduktan sonra jel UV transilluminatörde incelendi. Beklenen bant görülen örnekler pozitif kabul edildi. Gerekirse poloroid fotoğraf makinası veya jel dökümantasyon sistemi ile jeller fotoğraflandı.

III. **Tüm Mycobacterium'lara Spesifik 65 Kilo Daltonluk Isı Şok Proteini Bölgesine Ait PCR Ürününün Restriksiyon Enzimleri ile Kesilerek Mycobacterium Türlerinin Belirlenmesi (10)**

Uygun (beklenen yerde ve yeterli yoğunlukta) bant görülen örneklerin 11'er ul'si *HaeIII* (*BsuRI*) ve *BstEII* (*Eco91I*) enzimleri ile kesilerek Mycobacterium türleri identifiye edildi (Şekil 1,2).

HaeIII ile PCR ürününün kesilmesi:

Distile su	2.0	ul
Bufer R ⁺	1.5	„
<i>HaeIII</i>	0.5	„
(10 ünite/ul, Fermentas)		
PCR ürünü	11.0	„
Toplam	15.0	„

BstEII ile PCR ürününün kesilmesi:

Distile su	2.0	ul
Bufer O ⁺	1.5	„
<i>BstEII</i>	0.5	„
(10 ünite/ul, Fermentas)		
PCR ürünü	11.0	„
Toplam	15.0	„

Enzim ve bufer karışımları örnek sayısınca temiz odada hazırlandıktan sonra 0.2 veya 0.5 ml'lik eppendorf tüplerine 4'er ul olarak bölündü. Daha sonra kirli odada üzerlerine 11'er ul PCR ürünü eklendi ve 37 °C'de 4 saat su banyosu veya thermal cycler'da tutuldu. Daha sonra Mycobacterium türlerinin identifikasyonu için restriksiyon enzimleri ile kesilen ve kesilmeyen ürünler birlikte % 3'lük NuSieve GTG agaroz (FMC BioProduct)'da yürütüldü (Şekil 1,2). PCR ürününün kesilmesi ile ortaya çıkan bantlar değerlendirilerek Mycobacterium türleri identifiye edildi (10).

KAYNAKLAR

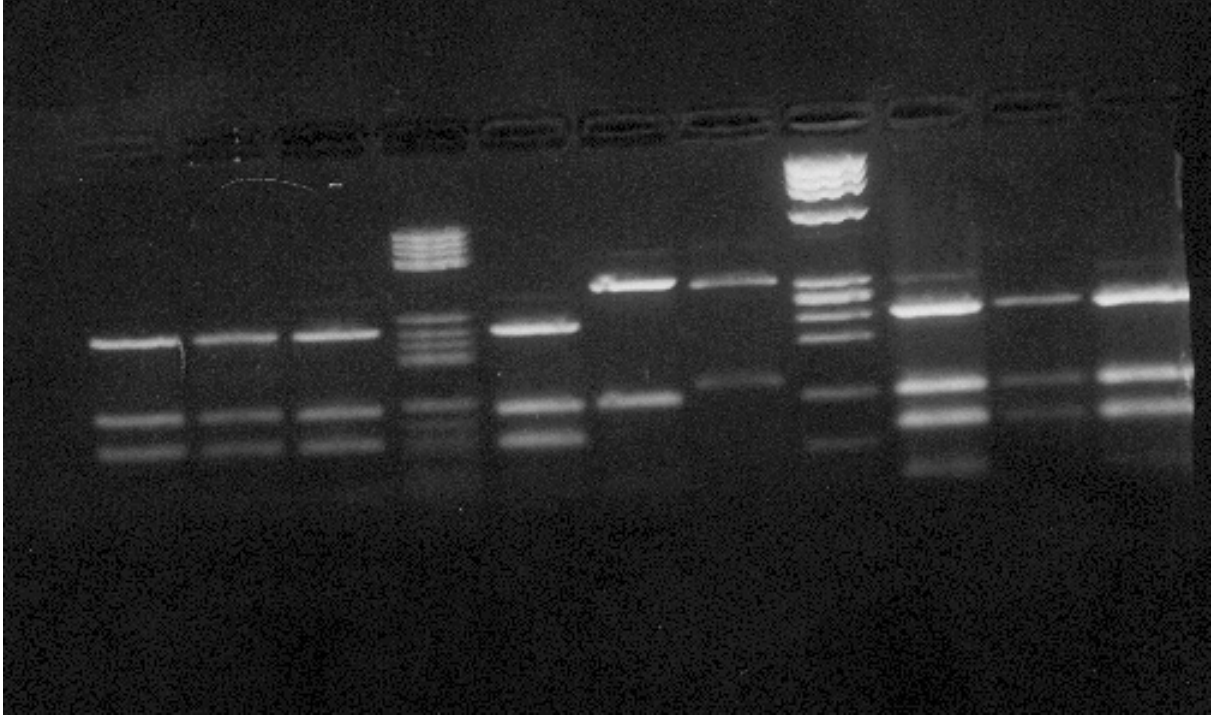
1. Sambrook J, Russell DW. (2001). Molecular Cloning A laboratory Manual. Third edition. CSHL Press, New York, 8.1-8.24.
2. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 161, 1376–1395.
3. Durmaz R. Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemlerinde Sorunlar ve Standardizasyon. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Durmaz R (Eds.) 2. Baskı. Kozan Ofset, Ankara, 45-56.
4. Sambrook J, Russell DW. (2001). Molecular Cloning A laboratory Manual. Third edition. CSHL Press, New York, 5.1-5.17.
5. Hellyer TJ, DesJardin LE, Assaf MK, Bates JH, Cave MD, Eisenach KD. (1996). Specificity of IS6110-based amplification assays for Mycobacterium tuberculosis complex. *J Clin Microbiol*. 34:2843–2846.

6. Gillespie, S. H., & McHugh, T. D. (1997). Monitoring the therapy of pulmonary tuberculosis by nested polymerase chain reaction. *Journal of Infection*, 35, 324–325.
7. Davies, A. P., Newport, L. E., Billington, O. J., & Gillespie, S. H. (1999). Length of time to laboratory diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection: comparison of in-house methods with reference laboratory results. *Journal of Infection*, 39, 205–208.
8. Carrino, J. J., & Lee, H. H. (1995). Nucleic acid amplification methods. *Journal of Microbiological Methods*, 23, 3–20.
9. Wittwer C. Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. Meuer S, Wittwer C, Nakagawara KI (Eds.) Page:1-8.
10. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. (1997). Routine Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of *Mycobacteria* Growing in Liquid Media. *J Clin Microbiol*. 35:79-85.
11. Pao CC, Yen B, You JB, et. al. (1990). Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *Journal Clinical Microbiology*, 28: 1877-1880.
12. Almeda J, Garcia A, Gonzales J, et. al. (2000). Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 859-867.
13. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. (1991). Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10: 505-513.
14. Torres M, Criado A, Polomares J, et. al. (2000). Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *M. tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9): 3194-3199.
15. Henegariu O, Heereme NA, Dlougy SR et. al. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step by step protocol. *Bio Techniques*, 23: 504-511.
16. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et. al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491.
17. Pershing DH. (1991). Polymerase chain reaction: trenches to benches. *Journal Clinical Microbiology*, 29: 1281-1285.

Ek:

1. Bazı mycobacterium türlerinin DNA amplifikasyon ürünlerinin *BstEII* ve *HaeIII* enzimleri ile kesim sonucu oluşan DNA bant paternleri
2. Ek 1'deki konu ile ilgili DNA paternleri ve ayrıntılı bilgi için <http://www.hospvd.ch:8005> internet adresine bakabilirsiniz.

Şekil 1: Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün *Bst*II enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri



Şekil 2: Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün *Hae*III enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri

