

**Hayvan Hastalıklarının Hızlı Tespiti İçin
PCR Tabanlı Moleküler Tanı Kiti
Geliştirilmesi: Model Çalışma**

Esin İŞCAN VARAN

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
I. Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT
II. Danışman: Dr. Esin AKÇAEL
2019**

T.C.

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HAYVAN HASTALIKLARININ HIZLI TESPİTİ İÇİN PCR TABANLI
MOLEKÜLER TANI KİTİ GELİŞTİRİLMESİ: MODEL ÇALIŞMA**

Esin İŞCAN VARAN

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

I. DANIŞMAN: PROF. DR. SEZEN ARAT

II. DANIŞMAN: DR. ESİN AKÇAEL

TEKİRDAĞ-2019

Her hakkı saklıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HAYVAN HASTALIKLARININ HIZLI TESPİTİ İÇİN PCR TABANLI MOLEKÜLER TANI KİTİ GELİŞTİRİLMESİ: MODEL ÇALIŞMA

Esin İŞCAN VARAN

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT

II. Danışman: Dr. Esin AKÇAEL

Bacillus anthracis özellikle otçul hayvanları etkileyen ancak tüm memelilerde etkili olan şarbon hastalığı etmenidir. *B. anthracis*'in patojenik özelliği pXO1 ve pXO2 olmak üzere iki plazmid üzerinde taşınan virülans genlerine dayanmaktadır. pXO1 antraks toksin genlerini üzerinde taşıırken pXO2 plazmidini ise bakterinin dış yüzeyinde bulunan ve konak canlıının immün sisteminden kaçmasını sağlayan bir kapsül sentezinden sorumlu gen operonunu taşımaktadır. *B. anthracis*, *B. cereus* grubu içerisinde yer alan ve çok yüksek monomorfik özellik gösteren bir türdür. Bugüne kadar geliştirilmiş birçok *B. anthracis* polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli tanı kiti, virülans plazmidleri üzerindeki markör genlerinin tespitine dayanmakta, *B. anthracis*'in *B. cereus* grubu içerisindeki diğer türlere kromozomal DNA düzeyinde yüksek benzerlik göstermesi sebebiyle çok azı kit içerisinde kromozomal DNA markörlerini dâhil etmektedir. Ancak son yıllarda *B. anthracis* pXO1 plazmidini taşıyan *B. cereus* suşları keşfedilmiş ve hem pXO1 hem de pXO2 plazmidlerini taşıyan *B. cereus* suşları Afrika'da büyük insansı maymunlardan izole edilmiştir. Ayrıca pXO2 kapsül genlerini taşıyan *B. thuringiensis* suşları da mevcuttur. Bu yüzden pXO1 ve pXO2'nin varlığı *B. anthracis*'i diğer basil türlerinden ayırmakta yetersiz kalmaktadır. Bu çalışmada, pXO1 ve pXO2 plazmidleri üzerinde yer alan virülans genlerinin yanı sıra, *B. anthracis*'e özgü kromozomal lambdoid profaj bölgesi de hedeflenerek iki farklı multipleks gerçek zamanlı PCR kiti geliştirilmiştir. Bu kitlerden biri tamamen bu çalışmaya özgün olup, saf DNA örneklerinin yanı sıra sahadan elde edilen örneklerde de başarılı bir şekilde kullanılabilir, yüksek hassasiyete sahip çift aşamalı bağlanma özelliğinde bir prob ile kromozomal bölgenin tespiti sağlanmaktadır. İkinci kit ise literatürde var olan primer ve prob setlerinin bu çalışmaya adapte edilmesiyle oluşturulmuş, alternatif olarak kullanılabilir bir tanı kitidir. Ayrıca her iki kit için de yanlış negatif sonuçların değerlendirmesinin yapılabilmesi için internal kontrol fragmentleri tasarlanmıştır. Bu çalışma ile iki kitin de optimizasyonu yapılmış ve başarılı bir şekilde dörtlü multipleks düzende çalışabilirliği gösterilmiştir. Aynı zamanda *B. anthracis*'e genetik olarak çok yakın basil türlerinden oluşan bir panel kullanılarak kitlerin özgüllüğü test edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Şarbon, *Bacillus anthracis*, gerçek zamanlı PCR, multipleks, tanı kiti

2019, 117 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

DEVELOPMENT OF PCR BASED MOLECULAR DIAGNOSIS KIT FOR RAPID DETECTION OF ANIMAL DISEASES: A MODEL STUDY

Esin İŞCAN VARAN

Tekirdağ Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Sezen ARAT

II. Supervisor: Dr. Esin AKÇAEL

B. anthracis is the causative agent of anthrax, which is primarily affecting herbivores but can be seen in all mammals. Pathogenicity of *B. anthracis* is based on the virulence genes carried on two plasmids, namely pXO1 and pXO2. While pXO1 contains anthrax toxin genes, pXO2 plasmid carries the gene operon responsible for the synthesis of a capsule which enables the bacteria to evade the immune system of the host organism. *B. anthracis* is a member of the *B. cereus* group and shows a highly monomorphic lineage. Many *B. anthracis* polymerase chain reaction (PCR) based diagnosis kits developed up to now rely on the detection of marker genes carried on the virulence plasmids, relatively few assays incorporate chromosomal DNA markers due to high similarity of the *B. anthracis* to other *B. cereus* group members at the chromosomal DNA level. However, in recent years, *B. cereus* strains that carry pXO1 plasmid were discovered and strains with both pXO1 and pXO2 have been isolated from African great apes. Besides there are *B. thuringiensis* strains harboring pXO2 capsule genes. Therefore, presence of pXO1 and pXO2 is insufficient in discriminating *B. anthracis* from other *Bacilli*. In this study, two different multiplex PCR kits targeting *B. anthracis*-specific chromosomal lambdaoid prophage region besides the virulence genes on the pXO1 and pXO2 plasmids were developed. One of these kits is completely specific to this study and provides the detection of the chromosomal region with a dual-stage binding probe, which can be used for the environmental samples as successfully as pure DNA samples. As for the second kit, it is a diagnosis kit that can be used alternatively and formed by adapting primer and probe sets existing in the literature. Furthermore, internal control fragments were designed in order to evaluate false-negative results. With this study, optimization of the two kits presented here was performed and their ability to work successfully in a quadruple multiplex setting was shown. At the same time, exclusivity of the kits were tested by using a panel of *Bacillus* species genetically very close to *B. anthracis*.

Keywords: Anthrax, *Bacillus anthracis*, real-time PCR, multiplex, diagnosis kit

2019, 117 pages

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
TEŞEKKÜR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Etiyoloji	3
2.2. Patojenez	4
2.3. Mikrobiyoloji	6
2.4. <i>B. anthracis</i> Virülans Faktörleri	9
2.5. <i>Bacilli</i> ve <i>Bacillus cereus</i> Grubu Arasındaki Filogenetik İlişki	10
2.6. <i>B. anthracis</i> Kromozomu ile Diğer <i>Bacillus</i> Türlerinin Çoklu Sekans Sıralaması ...	14
2.7. pXO ve pXO Benzeri Plazmidlerin Çoklu Sekans Sıralaması	15
2.8. Mevcut <i>B. anthracis</i> PCR Kitleri ve Güncel Çalışmanın Özgünlüğü	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM	19
3.1. <i>Bacillus anthracis</i> 'e Özgü Sekansların Belirlenmesi	19
3.2. Primer Seçimi, Tasarımı ve Bilgisayar Ortamında Analizler	19
3.3. Prob Tasarımı ve Uygun Floroforların Seçimi	21
3.4. Internal Kontrol Tasarımı ve Transformasyon ile Çoğaltılması	26
3.4.1. Internal kontrol DNA fragmentlerinin tasarlanması.....	26
3.4.2. Internal kontrol DNA fragmentlerinin <i>E.coli</i> BL21 hattına transformasyonu ...	27
3.5. <i>B. anthracis</i> ve Kontrol Suşlarının Kültürü ve DNA İzolasyonu	28
3.5.1. Kullanılan cihazlar.....	28
3.5.2. Kullanılan malzemeler.....	29
3.5.3. Hazırlanan solüsyonlar	29
3.5.4. Protokol	30
3.6. Konvansiyonel PCR ve Optimizasyonu	31
3.6.1. Kullanılan cihazlar.....	31
3.6.2. Kullanılan malzemeler.....	32
3.6.3. Hazırlanan solüsyonlar	32

3.6.4.	Protokol	33
3.7.	Agaroz Jel Elektroforezi	35
3.7.1.	Kullanılan cihazlar.....	35
3.7.2.	Kullanılan malzemeler.....	36
3.7.3.	Hazırlanan solüsyonlar	36
3.7.4.	Protokol	37
3.8.	Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR	38
3.8.1.	Kullanılan cihazlar.....	38
3.8.2.	Kullanılan malzemeler.....	38
3.8.3.	Protokol	39
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	41
4.1.	Primer Çiftleri Çalışma Koşullarının Konvansiyonel PCR ile Optimizasyonu.....	41
4.1.1.	Genomik bölge primerleri	41
4.1.2.	pXO1 primerleri	46
4.1.3.	pXO2 primerleri	49
4.2.	Konvansiyonel PCR ile Oluşturulan Multipleks PCR Kitlerinin Test Edilmesi	53
4.3.	Primerlerin Özgünlüğünün Konvansiyonel PCR ile Test Edilmesi.....	54
4.4.	Internal Kontrol Fragmentlerinin <i>E.coli</i> BL21 Suşuna Aktarılarak Çoğaltılması	56
4.5.	Primer ve Probların Gerçek Zamanlı PCR Kullanılarak Test Edilmesi	59
4.5.1.	TaqMan problemlerinin ve ilgili primerlerin test edilmesi	59
4.5.2.	Tentacle prob ve Rapid problemlerin test edilmesi	62
4.5.3.	Dizayn ve literatür kitlerinin gerçek zamanlı PCR ile multipleks olarak çalışabilirliğinin kontrol edilmesi	67
4.5.4.	Oluşturulan 2 farklı gerçek zamanlı multipleks PCR kitinin <i>Bacillus anthracis</i> 'e filogenetik olarak yakın diğer <i>Bacilli</i> suşları ile test edilmesi.....	71
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	76
6.	KAYNAKLAR	77
EKLER		84
EK 1 – Dizayn ve Literatür Setleri İçerisinde Yer Alan Primerlerin <i>in-silico</i> Analizleri		84
EK 2 – ICD ve ICL Fragmentlerinin Sekansları		101
ÖZGEÇMİŞ		102

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 3.1. Dizayn seti içerisinde yer alan primerler.....	20
Çizelge 3.2. Literatür seti içerisinde yer alan primerler	21
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan problemler	25
Çizelge 3.4. Genomik bölge primerleri ile Mg^{+2} konsantrasyonu ve sıcaklık optimizasyonu deney şeması. Üst satır Mg^{+2} konsantrasyonunu, sağ sütun ise sıcaklık değerlerini gösterir. (NT (Non-template): DNA içermeyen negatif kontrol örnekleri).....	33
Çizelge 3.5. pXO1 primerleri ile Mg^{+2} konsantrasyonu ve sıcaklık optimizasyonu deney şeması. Üst satır Mg^{+2} konsantrasyonunu, sağ sütun ise sıcaklık değerlerini gösterir.	34
Çizelge 3.6. pXO2 primerleri ile Mg^{+2} konsantrasyonu ve sıcaklık optimizasyonu deney şeması. Üst satır Mg^{+2} konsantrasyonunu, sağ sütun ise sıcaklık değerlerini gösterir.	34
Çizelge 3.7. Gerçek zamanlı PCR testlerinde birim reaksiyon için kullanılan malzemeler ve miktarları	39
Çizelge 4.1. Rapid problemlerin 30 ng hedef DNA ile reaksiyonunda alınan Ct değerleri	64
Çizelge 4.2. <i>B.anthraxis</i> tanı kitlerinin 20 farklı basil suşu ile çapraz reaksiyon kontrolü.....	72

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>B.anthraxis</i> yaşam döngüsü (Mock ve Fouet 2001).....	3
Şekil 2.2. Şarbon patofizyolojisi (Dixon ve ark. 1999).....	5
Şekil 2.3. <i>B. anthracis</i> kolonilerinin kanlı agar üzerindeki tipik görünümü (Doğanay ve Demiraslan 2015)	6
Şekil 2.4. <i>B. anthracis</i> koloni marjınlarının medusa başı denilen tipik görüntüsü (Anonim 2019a).....	6
Şekil 2.5. McFadyean Reaksiyonu. Polikrom metilen blue boyaması ile boyanmış lezyondan alınmış antraks sürüntüsünün mikroskop görüntüsü (Anonim 2019b)	7
Şekil 2.6. Kapsüllü <i>B. anthracis</i> , fare akciğer dokusu örneği, McFadyean reaksiyonu (Doganay ve Demiraslan 2015).....	8
Şekil 2.7. Laboratuvar kültüründe büyütülmüş <i>B. anthracis</i> . Uzun zincirler halinde box-car veya bambu çubuğu denilen, uçları kare şekilli tipik görünüm. Hücre içlerinde merkezi konumlu endosporlar görülmekte ve sporlar boyamaya karşı yüksek dirençli ve ışığı kıran yapıda (Anonim 2019c).....	8
Şekil 2.8. <i>Bacilli</i> ve <i>Bacillus cereus</i> grubu bakterileri arasındaki filogenetik ilişki. 57 <i>Bacillus</i> türünün 16S ribozomal DNA (rDNA) sekanslarına dayanılarak filogenetik ağaç çıkarılmıştır (Kolstø ve ark. 2009)	12
Şekil 2.9. 4 lambdoid profaj bölgesinin genomik pozisyonları (Ames ancestor suşu, Genbank erişim numarası: AE017334) (Sozhamannan ve ark. 2006).....	13
Şekil 2.10. <i>Bacillus anthracis</i> ve diğer basil türlerinin tüm-genom karşılaştırması. (Kolstø ve ark. 2009).....	14
Şekil 2.11. <i>B. anthracis</i> virülans plazmidleri çoklu sekans karşılaştırması (Kolstø ve ark, 2009).....	16
Şekil 3.1. Tentacle probun 2 boyutlu saç tokası yapısı. Yakalama bölgesi Tm değeri 54,8°C, deteksiyon bölgesi Tm değeri 56,1°C, prob gövdesi Tm değeri 66,0°C	22
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan Rapid problemlerin ikincil yapısını gösteren diagram. a) Rapid prob 1, Tm 67,6°C, prob gövdesi 64,1°C b) Rapid prob 2, Tm 68,2°C, prob gövdesi 65,5°C c) Rapid prob 3, Tm 66,1°C, prob gövdesi 64,2°C	23
Şekil 3.3. Seçilen floroforların emisyon spektralleri. Şeklin üstünde 1'den 6'ya numaralandırılan aralıklar kullanılan real-time PCR cihazındaki optik filtrelerin tespit ettiği dalga boyu aralıklarıdır.....	24
Şekil 3.4. pUC57 vektörü haritası	26
Şekil 4.1. 2 mM MgCl ₂ varlığında genomik bölge primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: NEB, 100 bç DNA markörü)	41
Şekil 4.2. 3 mM MgCl ₂ varlığında genomik bölge primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: NEB, 100 bç DNA markörü)	42
Şekil 4.3. 3,5 mM MgCl ₂ varlığında genomik bölge primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: NEB, 100 bç DNA markörü)	43
Şekil 4.4. 4 mM MgCl ₂ varlığında genomik bölge primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: NEB, 100 bç DNA markörü)	44
Şekil 4.5. <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 genomik DNA'sı ve <i>B. anthracis</i> genomik bölge primerleri kullanılarak yürütülen gradyan PCR çalışması. (Markör: NEB, 100 bç DNA markörü).....	45

Şekil 4.6. Negatif kontrol amaçlı, DNA örneği içermeyen PCR çalışması. (Markör: NEB, 100 bç DNA markörü) (NT: “Non-template”, DNA örneği içermeyen).....	46
Şekil 4.7. 1,5 mM MgCl ₂ varlığında pXO1 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)	47
Şekil 4.8. 2 mM MgCl ₂ varlığında pXO1 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)	47
Şekil 4.9. 3 mM MgCl ₂ varlığında pXO1 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)	48
Şekil 4.10. 3,5 mM MgCl ₂ varlığında pXO1 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)	48
Şekil 4.11. 4 mM MgCl ₂ varlığında pXO1 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)	49
Şekil 4.12. 1,5 mM MgCl ₂ varlığında pXO2 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)	49
Şekil 4.13. 2 mM MgCl ₂ varlığında pXO2 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)	50
Şekil 4.14. 3 mM MgCl ₂ varlığında pXO2 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)	50
Şekil 4.15. 3,5 mM MgCl ₂ varlığında pXO2 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)	51
Şekil 4.16. 4 mM MgCl ₂ varlığında pXO2 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)	51
Şekil 4.17. Multipleks PCR kitlerinin konvansiyonel PCR ile testi (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü).....	53
Şekil 4.18. LambdaBa03 ve Pag primerlerinin <i>Bacillus</i> grubu türleriyle çapraz bağlanma kontrolü.....	54
Şekil 4.19. DCapB ve E4 primerlerinin <i>Bacillus</i> grubu türleriyle çapraz bağlanma kontrolü.....	55
Şekil 4.20. Cya ve LCapB primerlerinin <i>Bacillus</i> grubu türleriyle çapraz bağlanma kontrolü.....	55
Şekil 4.21. Transformasyon sonrası izole edilen plazmid örnekleri, ticari olarak alınan ICD ve ICL içeren pUC57 plazmidleriyle karşılaştırılması. (Markör: NEB 1 kb DNA markörü)	56
Şekil 4.22. ICD ve ICL fragmentlerini içeren pUC57 vektörlerinin KspAI ve Eco147I enzimleriyle kesimi sonrası elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	58
Şekil 4.23. TaqMan problemlerinin gerçek zamanlı PCR ile test edilmesi. a) Dizayn seti içerisinde yer alan problemlerin amplifikasyon eğrileri b) Literatür seti içerisinde yer alan problemlerin amplifikasyon eğrileri	60
Şekil 4.24. Pag ve cya problemlerinin çok bileşenli grafikleri.....	61
Şekil 4.25. Pag ve cya problemlerinin 210 ng başlangıç hedef DNA miktarı ve 45 döngülük gerçek zamanlı PCR ile testi.....	62
Şekil 4.26. R1, R2 ve R3 Rapid problemlerinin ABI Viia7 ile alınan amplifikasyon grafiği.....	63
Şekil 4.27. R1, R2 ve R3 Rapid problemlerinin Bio-Rad CFX96 ile alınan amplifikasyon eğrileri.....	63
Şekil 4.28. Tentacle prob amplifikasyon eğrisi, bağlanma sıcaklığı 60 °C.	64
Şekil 4.29. Tentacle prob ile 58°C-68°C arasında değişen bağlanma sıcaklıklarında yürütülen gradyan gerçek zamanlı PCR sonucu elde edilen amplifikasyon grafikleri.....	65
Şekil 4.30. Dizayn setinden oluşan <i>B. anthracis</i> tanı kitinin 4'lü multipleks olarak farklı ICD konsantrasyonlarıyla gerçek zamanlı PCR ile test edilmesi.....	68

Şekil 4.31. Literatür setinden oluşan <i>B. anthracis</i> tanı kitinin değişen ICL konsantrasyonları ile 4'lü multipleks düzende gerçek zamanlı PCR ile test edilmesi.....	71
---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
ATCC	: American Type Culture Collection
bç	: Baz çifti
BHQ1	: Black Hole Quencher 1
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
CO ₂	: Karbon dioksit
Ct	: Threshold cycle, probdan alınan floresans sinyalinin eşik değerin üzerine çıktığı döngü numarası
cya	: Ödem faktörü geni
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
dUTP	: Deoksiurasil trifosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EEO	: Elektroendoosmoz
EF	: Ödem faktörü
γ	: Gama
gr	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
ICD	: Internal Control Design
ICL	: Internal Control Literature
kb	: Kilobaz
L	: Litre
LB	: Luria Bertani sıvı besi yeri
lef	: Lethal faktör geni
LF	: Lethal Faktör
M	: Molar

MA	: Moleküler ağırlık
Mbp	: Megabaz çifti
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MP	: Mustang Purple
NaCl	: Sodyum klorür
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NT	: Non template
PA	: Protektif antijen
pag	: Protektif antijen geni
PEG9	: Polietilen glikol 9
PCR	: Polimerase Chain Reaction
rDNA	: Ribozomal DNA
RFU	:Relative Fluorescence Units
rpm	: Revolution per minute
TAE	: Tris asetat EDTA
TBE	: Tris borat EDTA
TE	: Tris EDTA
T _m	: Erime sıcaklığı
UNG	: Urasil N-glikozilaz
UV	: Ultraviole
V	: Volt
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana her zaman destek olan ve rehberlik eden, başarılı bir bilim kadını olma yolunda örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Sezen ARAT'a, ne zaman kendisine başvursam kıymetli zamanını bana ayırarak yorum ve önerileriyle çalışmamı yönlendiren, motive edici sözleriyle azmimi perçinleyen sevgili hocam Dr. Esin AKÇAEL'e, hem laboratuvar çalışmaları sırasında hem de tez metninin düzenlenmesinde benden yardımlarını ve en önemlisi arkadaşlığını hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Neslihan TAŞKALE KARATUĞ'a çok teşekkür ederim.

Projenin tamamlanmasında emeği geçen, çalışmalarına kaynak sağlayan değerli hocalarım Kafkas Üniversitesi'nden Prof. Dr. Mitat ŞAHİN'e, Namık Kemal Üniversitesi'nden Doç. Dr. Hasan Murat VELİOĞLU'na, Gebze Teknik Üniversitesi'nden Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya, İstanbul Üniversitesi'nden Prof. Dr. Ayten KİMİRAN, Prof. Dr. Şule ARI ve Prof. Dr. Harun AKSU'ya, Yeditepe Üniversitesi'nden Prof. Dr. Fikretin ŞAHİN ve Sadık KALAYCI'ya, Uludağ Üniversitesi'nden Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY'a, Ankara Üniversitesi'nden Prof. Dr. Kadir HALKMAN'a saygı ile teşekkürlerimi sunarım. Çalışma içerisinde kullanılan Rapid problemlerin sekanslarını karşılıksız sağlayan Co-Diagnostics Inc.'a çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, beni bugünlere getiren ve beni ben yapan annem Makbule İŞCAN ve babam Kenan İŞCAN'a, gözümü kırpmadan güvенеbileceğim destekçim, arkadaşım, kardeşim Necip Atakan İŞCAN'a ve tüm zorluklara benimle beraber göğüs geren, benimle sevinip benimle üzülen, her daim yardımcım, canım eşim Sabri VARAN'a sonsuz minnet ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Esin İŞCAN VARAN

Haziran, 2019

1. GİRİŞ

Şarbon, otçul hayvanlarda akut enfeksiyona sebep olan ve insanlara da bulaşabilen, antik literatürde bile tanımına rastlanan, insanlık tarihi boyunca önemli olmuş bir hastalıktır. Bilinen en eski şarbon tanımına Yaratılış Kitabı'nda (Book of Genesis), milattan önce 15. yüzyılda Antik Mısır'da büyükbaş hayvanları öldüren 5. salgın olarak rastlanır (Hart ve Beeching 2002). Antik Roma İmparatorluğu döneminde Homer'in İlyada'sında ve Hipokrat'ın yazılarında şarbon salgınlarından bahsedilmektedir. Daha sonraki dönemlerde Hindu, Yunan ve Çin edebiyatında hem hayvanlarda hem de insanlarda şarbon vakalarının olduğu bahsi geçmektedir (Klemm ve Klemm 1959, Dirckx 1981). 17. yüzyıl başlarında güney Avrupa'da başlayan büyük bir şarbon salgını 60.000 insanın ölümüne sebep olmuş, hastalığa kara lanet (black bane) adı verilmiştir (Klemm ve Klemm 1959). Hastalığın deride sebep olduğu siyah renkli püstül sebebiyle bu hastalığa Fransızlar şarbon (charbon: kömür), İngilizler antraks (anthrax, Yunanca'da kömür) adını vermişlerdir. Sığırlarda görülen hastalığa "kıran" (murrain) adı verilmektedir (Eski Fransızca'daki moraine ve Latince'de ölmek anlamındaki morire sözcüğünden türetilmiştir) (Hart ve Beeching 2002).

Louis Pasteur ve Robert Koch 1877'de, şarbon hastalığının sebebinin basil formundaki bakteriler olduğunu göstermiş ve bakterinin yaşam döngüsünü karakterize etmişlerdir. Louis Pasteur canlı attenüe şarbon aşısı geliştirerek hayvanların şarbona karşı aşılmasını sağlamıştır. Şarbonun sebebi olan *Bacillus anthracis*, 1896'da Robert Koch tarafından *in vitro* kültüre alınmış ve sağlıklı hayvanlara kültür bakterisinin transferiyle hastalığın bulaştığını göstererek Koch postulatlarının kanıtlanmasına temel oluşturmuştur (Hart ve Beeching 2002).

Max Sterne tarafından 1937'de etkili bir hayvan aşısı geliştirilmesi (Sterne 1937), penisilin tedavisinin başarılı şekilde uygulanması (Knudson 1986) ve karantina regülasyonlarının hayata geçirilmesi ile birlikte dünyadaki birçok ülkede besi hayvanlarında şarbonun görülme sıklığında ciddi bir düşüş yaşanmıştır. Fakat yine de günümüzde şarbon dünyanın birçok bölgesinde endemik olarak görülmeye devam etmektedir. Temelde hayvan hastalığı olarak kabul edilmekle birlikte, endemik olarak görüldüğü yerlerde insanlarda da şarbon vakalarına sıklıkla rastlanmaktadır. Ayrıca hayvanlardan elde edilen deri, yün gibi ürünlerin işlendiği meslekler de şarbona yakalanma tehlikesi açısından riskli meslek gruplarıdır (Beyer ve Turnbull 2009). Daha çok gelişmekte olan ülkelerde şarbon problem olmaya devam ettiğinden, bu ülkelerden ihraç edilen hayvan ürünleri de risk teşkil etmektedir.

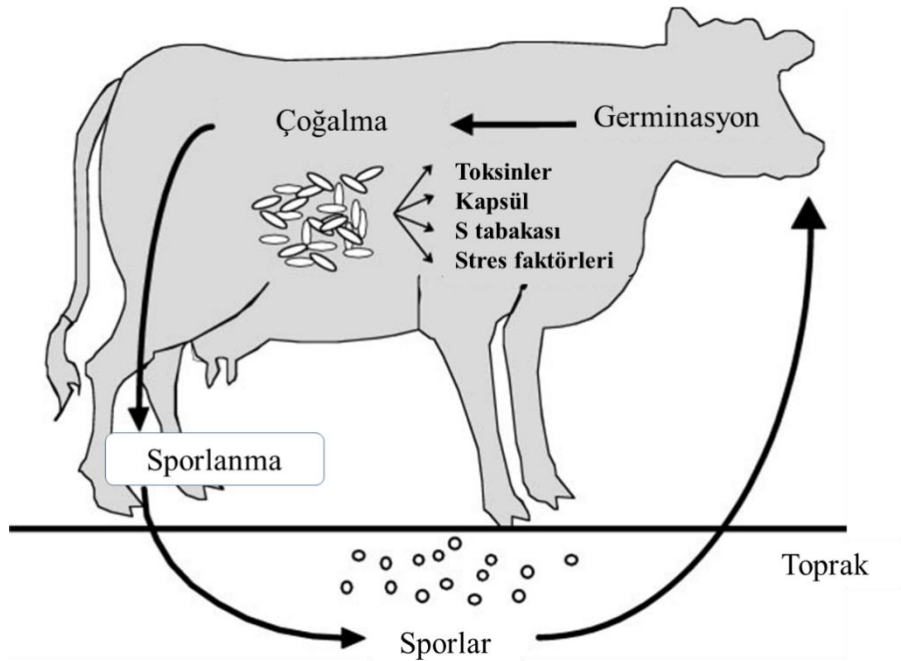
Hayvanlarda şarbon hastalığının kontrol edildiği ve herhangi bir hastalık durumunda mümkün olduğunca hızlı müdahale edilebildiği ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde ise insanlarda şarbona rastlanması pek olası görülen bir durum değildir. Ancak son yıllarda şarbonun biyoterör ajanı olarak da kullanılma potansiyeli üzerinde durulmaktadır. Amerika’da 11 Eylül 2001’de Dünya Ticaret Merkezi’ne yapılan saldırının kısa bir süre ardından çeşitli medya kuruluşlarına ve politikacılara şarbon sporları içeren mektuplar gönderilmiş ve bunun sonucu olarak pulmoner şarbona yakalanan 11 kişiden 5’i kurtarılamamıştır (Jernigan ve ark. 2002). Bu durum, modern dünyada tekrar şarbon hastalığına dikkatleri çekmiştir.

Bu çalışmada *Bacillus anthracis*’in tüm suşlarının diğer benzer *Bacillus* türlerinden ayırt edilmesine olanak sağlayacak ve saha örneklerinden elde edilecek izolatlarda da başarılı bir şekilde kullanılabilecek bir multipleks gerçek zamanlı PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) tanı kiti oluşturulması amaçlanmaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Etiyoloji

Bacillus anthracis şarbon hastalığının etmeni olan ve *Bacillus cereus* grubuna ait, gram pozitif, aerobik ve çubuk şekilli bir bakteridir. Aynı zamanda hareketsiz, γ fajına duyarlı, fosfolipaz C negatif ve kanlı agarda hemoliz oluşturmeyen bir türdür. *B. anthracis* açlıkla veya başka çevresel stres faktörleriyle karşılaştığında spor oluşturur ve bu sporlar kuraklık, sıcaklık, çeşitli kimyasallar ve ultraviyole ışığa karşı dirençlidir (Watson ve Keir 1994). Bu sebeple çok uzun süreler toprakta dormansi halinde kalabilirler. Özellikle yaz dönemi sıcaklıkların zirveye ulaştığı dönemlerde sığır, koyun, keçi gibi toynaklı hayvanlar otlama sırasında antraks sporları ile kontamine olmuş topraktan soluma veya sporları yutma yoluyla hastalığa yakalanırlar. Konak organizma içine giren sporlar kısa sürede vejetatif forma geçerek çoğalırlar ve hastalığa sebep olan toksinleri üretmeye başlarlar. (Şekil 2.1)



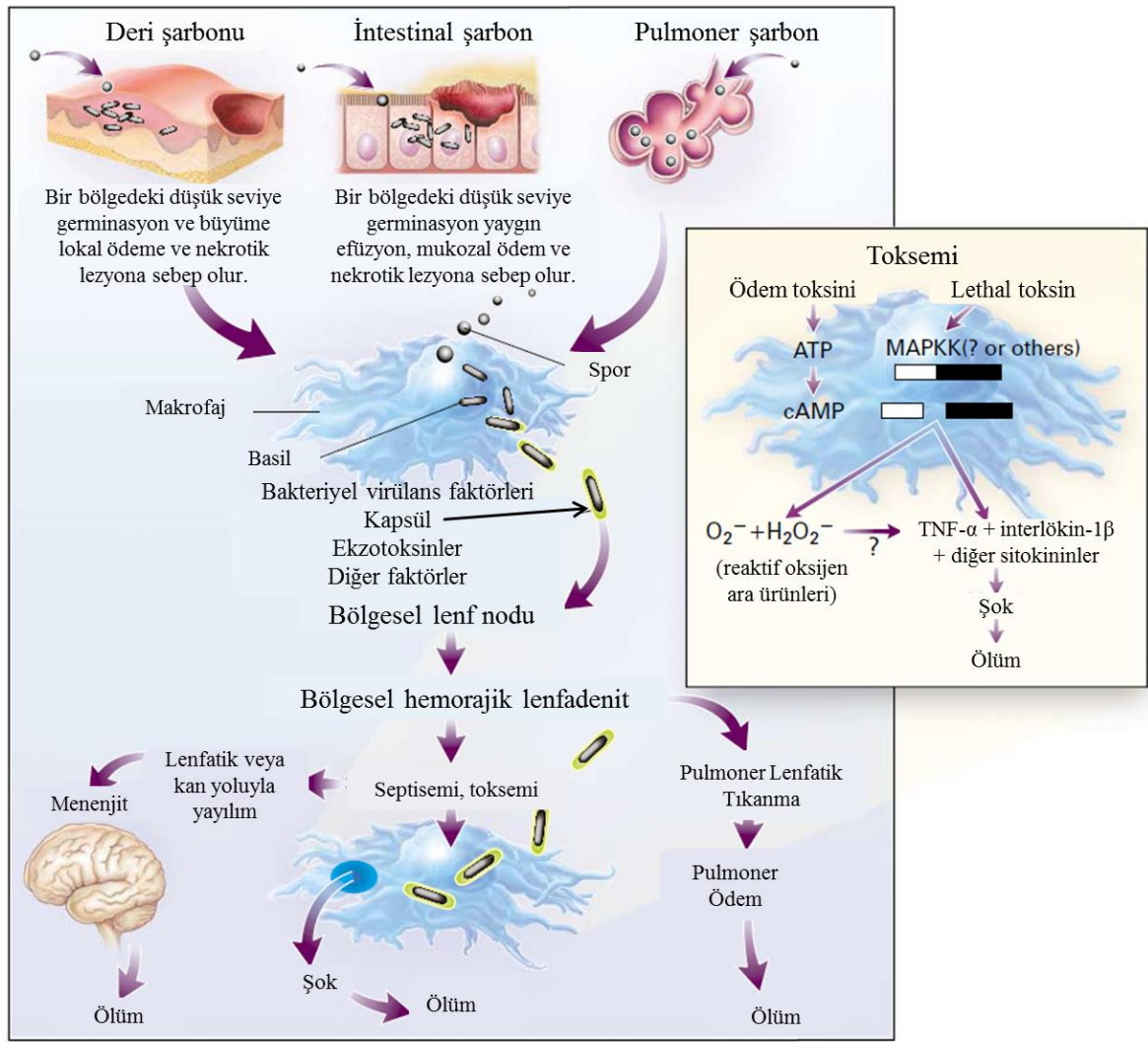
Şekil 2.1. *B.anthraxis* yaşam döngüsü (Mock ve Fouet 2001)

Antraks sporları konak canlıının vücuduna girdikten sonra 3-7 gün içerisinde hastalık belirtileri görülür ve genellikle belirtiler görülmeye başladıktan sonra en geç 2 gün içerisinde ani hayvan ölümleri meydana gelir (Schlingman ve ark. 1956). Çoğu zaman 2-3 saat öncesinde görünüşte normal gözükten hayvanlar aniden kötüleşir ve ölür. Bazı hayvanlarda ölmeden önce titreme, yüksek ateş, nefes almada güçlük, kasılmalar ve koma hali görülebilir.

Ölümünden sonra hayvanın kanı pıhtılaşmayabilir ve genellikle burundan, ağızdan ve vücudun diğer doğal açıklıklarından küçük miktarlarda kan sızıntısı görülür (Sterne 1959, 1966). Bu durum hastalığın yayılmasını ve ölen hayvandan yayılan şarbon sporlarının toprağı kontamine etmesini de beraberinde getirir. Toprağı bulaşan şarbon sporları çok dirençli oldukları için, bu hastalıktan ölen hayvanın gömüldüğü yerde veya kanının damladığı yerde yıllar sonra bile canlı kalıp hastalığa sebep olabilir. Kontamine olan bölge yıllar içerisinde yağışlarla veya toprağın tarım amaçlı sürülmesiyle daha da genişleyebilir. Toprağın dekontaminasyonu formalin, formaldehit veya klorin gibi aynı zamanda çevreye de zararlı kimyasalların kullanılmasını gerektirmektedir ve oldukça zahmetlidir (Manchee ve ark. 1983, Turnbull 2008). Bu durum, bir şarbon salgını durumunda oluşacak hayvan kayıplarının yarattığı ekonomik zararın yanında, uzun süreli karantina uygulama zorunluluğı ve kontamine toprağın kullanılamaz hale gelmesiyle oluşan zararı katlamaktadır.

2.2. Patojenez

İnsanlarda şarbonun cilt enfeksiyonu, gastrointestinal enfeksiyon ve solunum yoluyla enfeksiyon olmak üzere üç ana klinik formu bulunmaktadır. Antibiyotik ile tedavisi zorunludur ve tedavi edilmezse veya tedavide geç kalınırsa şarbonun tüm klinik formları sepsisemi ve ölüme yol açabilir (Lakshmi ve Kumar 1992, Henry 2001, Bartlett ve ark. 2002, Brook 2002).



Şekil 2.2. Şarbon patofizyolojisi (Dixon ve ark. 1999)

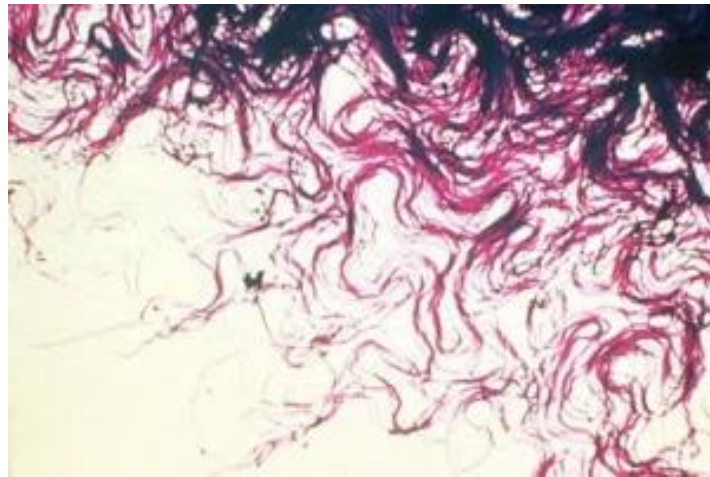
Şarbon patofizyolojisinde vücuda deri üzerindeki çatlaklardan, yutma yoluyla veya solunum yoluyla giren endosporlar makrofajlar tarafından fagosite edilerek bölgesel lenf düğümlerine taşınırlar. Endosporlar makrofajların içinde gelişerek vejetatif bakteri formuna geçerler. Daha sonra vejetatif bakteriler makrofajlardan salınıp lenfatik sistemde çoğalarak dolaşım sistemine girer. Kanda yoğunlukları 10^7 - 10^8 hücre/mL seviyesine kadar ulaşabilir ve ağır septisemiye yol açarlar. Makrofajlardan salınmalarından sonra vejetatif bakterilere karşı herhangi bir immün yanıt oluştuğuna dair kanıt bulunmamaktadır. Sonucunda gelişen sistemik toksemi konak canlının ölümüne sebep olur (Şekil 2.2) (Ross 1957, Dixon ve ark. 1999, Guidi-Rontani ve ark. 1999)

2.3. Mikrobiyoloji

B. anthracis bakterisinin tanımlanması mikrobiyolojik, moleküler ve serolojik teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilir (Broussard 2001). *B. anthracis* vejetatif hücreleri yaklaşık olarak 4 µm x 1 µm, spor formu da 2 µm x 1 µm boyutlara sahiptir. 37°C’de kan veya agar besi yerlerinde, aerobik koşullarda hızla büyüyerek geniş, düz, beyazdan griye değişen renklerde, yapışkan ve medusa başı olarak bilinen tipik bir morfolojide koloniler oluştururlar (Şekil 2.3, Şekil 2.4). Bu bakteriler aynı zamanda katalaz pozitifdir ve endospor oluştururlar fakat CO₂ yokluğunda katı medyum üzerinde kapsül oluşturmazlar.



Şekil 2.3. *B. anthracis* kolonilerinin kanlı agar üzerindeki tipik görünümü (Doğanay ve Demiraslan 2015)



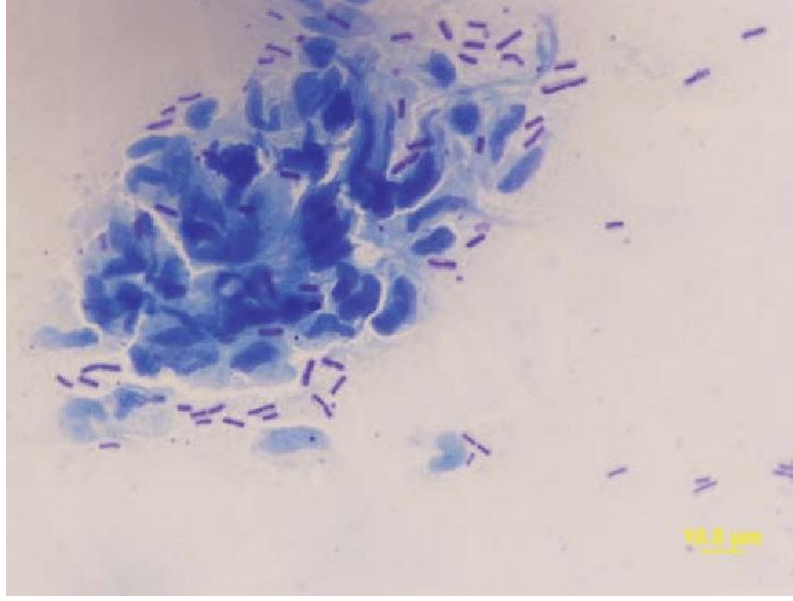
Şekil 2.4. *B. anthracis* koloni marjınlarının medusa başı denilen tipik görüntüsü (Anonim 2019a)

Antraks ile enfekte olmuş lezyon veya dokulardan alınan örneklerin mikroskopik incelemesinde bakteriler tek başına veya kısa zincirler halinde ve kapsüllü olarak görünürler. Kapsüllerin görüntülenmesinde McFadyean Reaksiyonu olarak bilinen, polikromatik metilen blue boyaması kullanılır (Şekil 2.5). Bu boyamada bakteriler mavi renk gözükürken bakterilerin çevresinde pembe veya mor renkte bir tabaka görülür. Bu tabaka kapsüldür (Şekil 2.6).

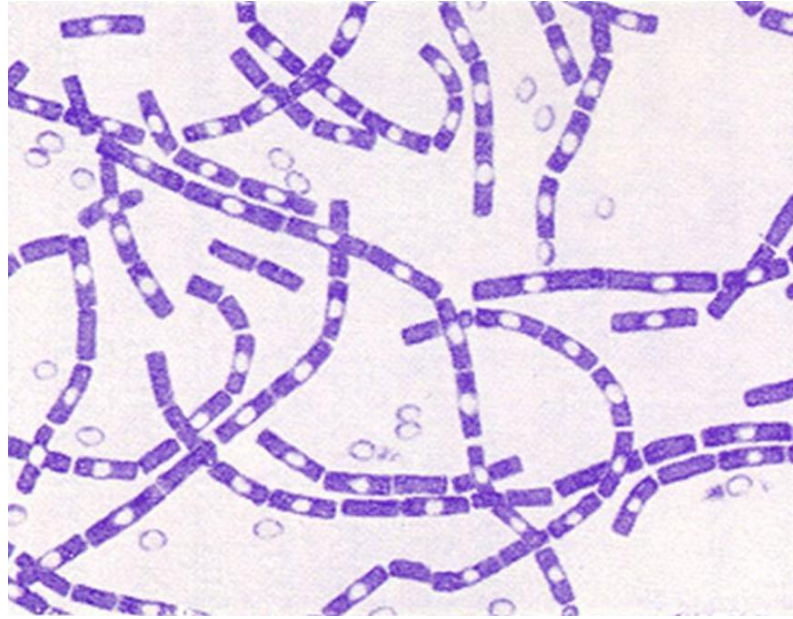
Laboratuvarda büyütülen antraks kültürlerinde bakteriler uzun zincirler halinde ve uçları kare şeklinde (box-car shaped) görülürler (Şekil 2.7). Eğer vejetatif bakteriler kültür ortamında 24-48 saat boyunca büyütülürse mevcut besinleri tüketirler ve sonuç olarak her bir hücrenin içinde elipsoid şekilli spor oluştururlar. Bu sporlar vejetatif hücrede genellikle hücre ortasında veya ucuna yakın (subterminal) bulunurlar. Spor oluşturdktan sonra sıcaklığa, basınca, ultraviyole ve iyonlaştırıcı radyasyona, kimyasal ajanlara ve dezenfektanlara karşı yüksek dirençli hale gelirler.



Şekil 2.5. McFadyean Reaksiyonu. Polikrom metilen blue boyaması ile boyanmış lezyondan alınmış antraks sürüntüsünün mikroskop görüntüsü (Anonim 2019b)



Şekil 2.6. Kapsüllü *B. anthracis*, fare akciğer dokusu örneği, McFadyean reaksiyonu (Doganay ve Demiraslan 2015)



Şekil 2.7. Laboratuvar kültüründe büyütülmüş *B. anthracis*. Uzun zincirler halinde box-car veya bambu çubuğu denilen, uçları kare şekilli tipik görünüm. Hücre içlerinde merkezi konumlu endosporlar görülmekte ve sporlar boyamaya karşı yüksek dirençli ve ışığı kıran yapıda (Anonim 2019c)

B. anthracis, kanlı agarda hemoliz oluşturmayan, penisiline ve gamma fajına duyarlı, hareketsiz bir bakteridir ve mikrobiyolojik tanısında bu özelliklerinden faydalanılır (Turnbull ve ark. 1992). Ancak mikrobiyolojik yöntemlerden sonuç alınabilmesi için 2 günlük analiz süresi vardır ve çoklu analiz yapılması daha da uzun zaman almaktadır. Bakterinin daha erken tespiti için hızlı ve doğru sonuç alınabilecek moleküler biyoloji yöntemleri

kullanılabilmektedir. Bunların başında, polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı yöntemler gelmektedir. Bu yöntemler kapsamında klasik PCR'ın yanı sıra gerçek zamanlı PCR ve multipleks PCR da kullanılabilmektedir. Bu yöntemle yapılan testler çok yüksek doğruluk oranında, güvenilir ve mikrobiyolojik testlerden daha hızlı sonuçlar vermektedir (Edwards ve ark. 2006). Özellikle multipleks PCR yönteminde aynı reaksiyon içerisinde birden fazla hedef gen bölgesinin tespiti yapılabildiği için en hızlı sonuçlar bu yöntemle alınmakta ve bu da hastalığın zamanında teşhisi ve tedavisine olanak sağlamaktadır.

2.4. *B. anthracis* Virülans Faktörleri

B. anthracis'in patojenik özelliği pXO1 (Dixon ve ark. 1999, Okinaka ve ark. 1999a) ve pXO2 (Okinaka ve ark. 1999b) olmak üzere iki plazmid üzerinde taşınan virülans genlerine dayanmaktadır. pXO1 antraks toksin elemanları olan *pag* (koruyucu antijen geni, PA), *lef* (lethal faktör, LF) ve *cya* (ödem faktörü, EF) genlerini 44.8 kb boyutundaki bir patojenisite adacığında taşımaktadır. Her bir toksin elemanı tek başına toksik değildir ancak sinerjistik olarak etkileşimde bulunurlar. Koruyucu antijen hücre yüzey reseptörlerine bağlanabilme kapasitesine sahiptir ve EF ile LF'nin hücre sitoplazmasına aktarılmasında rol oynamaktadır (Bradley ve Young 2003). PA ve EF kombinasyonu ödem toksinini oluşturarak ödeme neden olur ve polimorfonükleer nötrofil fonksiyonunda azalmaya yol açarak konak canlının *B. anthracis* enfeksiyonuna daha duyarlı hale gelmesine sebep olduğu düşünülmektedir (Brossier ve ark. 2000, Mourez ve ark. 2002). Öte yandan PA ve LF kombinasyonu lethal toksini oluşturur ve konak organizma üzerinde ölümcül etkiye sahiptir (Brossier ve ark. 1998).

pXO2 plazmidini ise bakterinin dış yüzeyinde bulunan poly- γ -D glutamil (poliglutamat) kapsülü sentezinden sorumlu 5-gen operonunu (*capBCADE*) taşımaktadır. Bu kapsül yapısı sayesinde *B. anthracis* hücreleri konak canlının makrofajları tarafından fagosite edilememekte ve immün sistemden kaçabilmektedir (Makino ve ark. 2002, Candela ve ark. 2005, Drysdale ve ark. 2005).

Bazı *B. anthracis* suşları pXO1 ve/veya pXO2 plazmidini kaybetmiştir. Bu suşlar aşılama amacıyla üretilmiş olup ölümcül hastalığa sebep olmayan suşlardır. Dolayısıyla *B. anthracis* 4 farklı virülans potansiyeline sahip grubu içerisinde barındırmaktadır: Tam virulent suşlar (pXO1+ / pXO2+), tek virülans plazmidini taşıyan suşlar (pXO1+ / pXO2- veya pXO1- / pXO2+) ve avirulent suşlar (pXO1- / pXO2-).

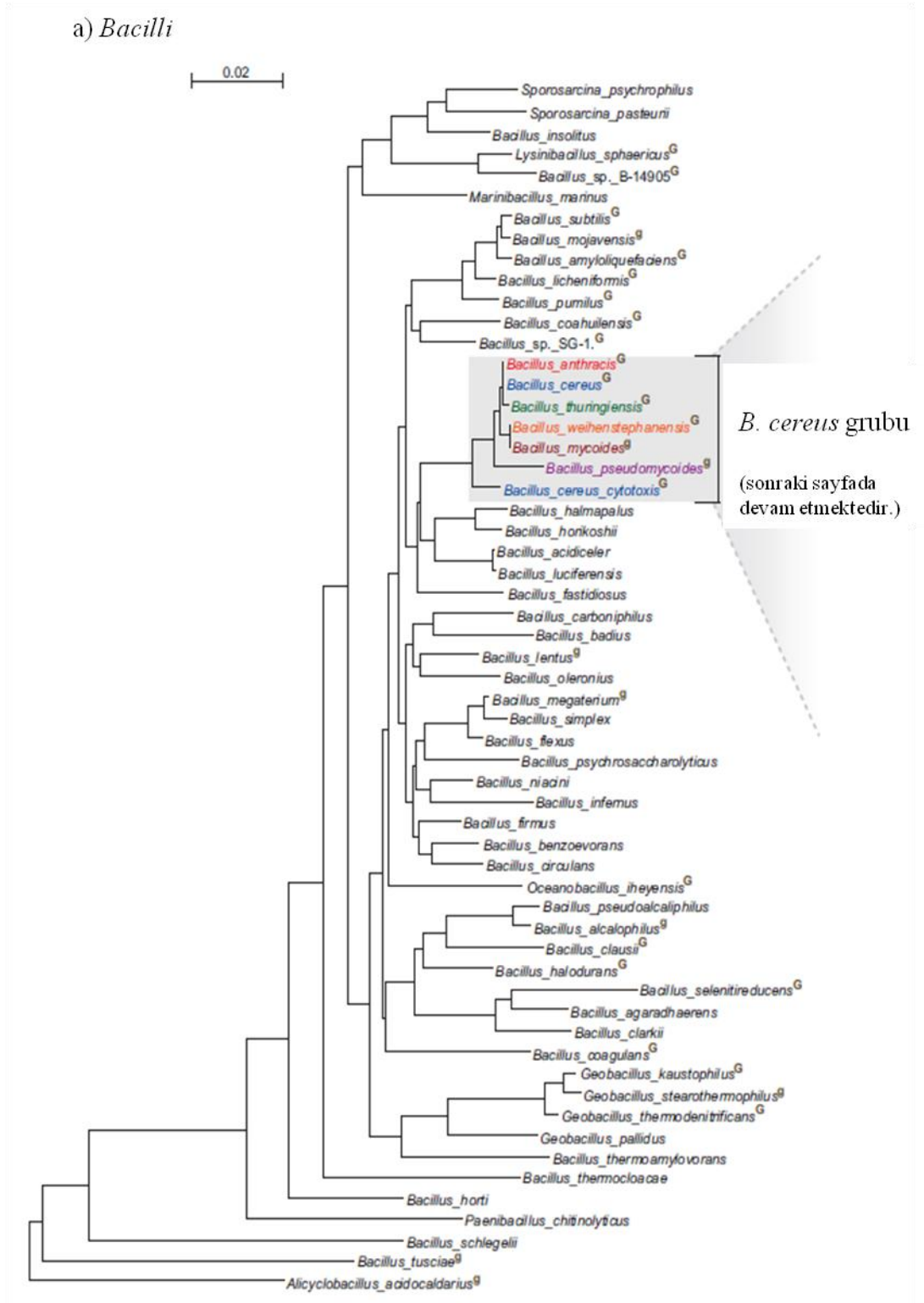
B. anthracis tanısı için virölans faktör genleri *B. anthracis*'in *B. cereus* grubu içerisindeki diğer türlerden ayırımında markör olarak kullanılmaktadır. *B. cereus* grubu birbirine genetik olarak yakın 6 türü içermektedir: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis* ve *B. pseudomycoides*. Ancak *B. anthracis*, *B. cereus* (potansiyel olarak gıda zehirlenmesine sebep olan patojen) ve *B. thuringiensis* (böcek patojeni) arasında o kadar yüksek derece genetik homoloji bulunmaktadır ki bazı araştırmacılar bunların tek bir tür olarak kabul edilmesini öngörmektedir (Helgason ve ark. 2000). Dahası, antraks pXO plazmidlerine benzer plazmidlerin bazı *B. cereus* suşlarında bulunduğu ve hatta pulmoner şarbona benzer bir hastalığa sebep olduğu anlaşılmıştır (Turnbull ve ark. 1992, Pannucci ve ark. 2002a, Hoffmaster ve ark. 2004, Klee ve ark. 2006a, Klee ve ark. 2010). Aynı zamanda bazı *B. thuringiensis* suşlarının pXO2 üzerinde taşınan 5 kapsül virölans genlerinden (*capBCADE*) bir kısmını veya tamamını taşıdığı görülmüştür (Hoffmaster ve ark. 2004, Cachat ve ark. 2008). Tüm bu bulgular *B. anthracis*'in doğru tanısı için yalnızca pXO plazmidleri üzerinde taşınan virölans genlerinin determinant olarak kullanılmasının yetersiz kaldığını, bu nedenle *B. anthracis*'e özgü kromozomal bir bölgenin de tanıda kullanılmasının gerekli olduğunu göstermektedir.

2.5. *Bacilli* ve *Bacillus cereus* Grubu Arasındaki Filogenetik İlişki

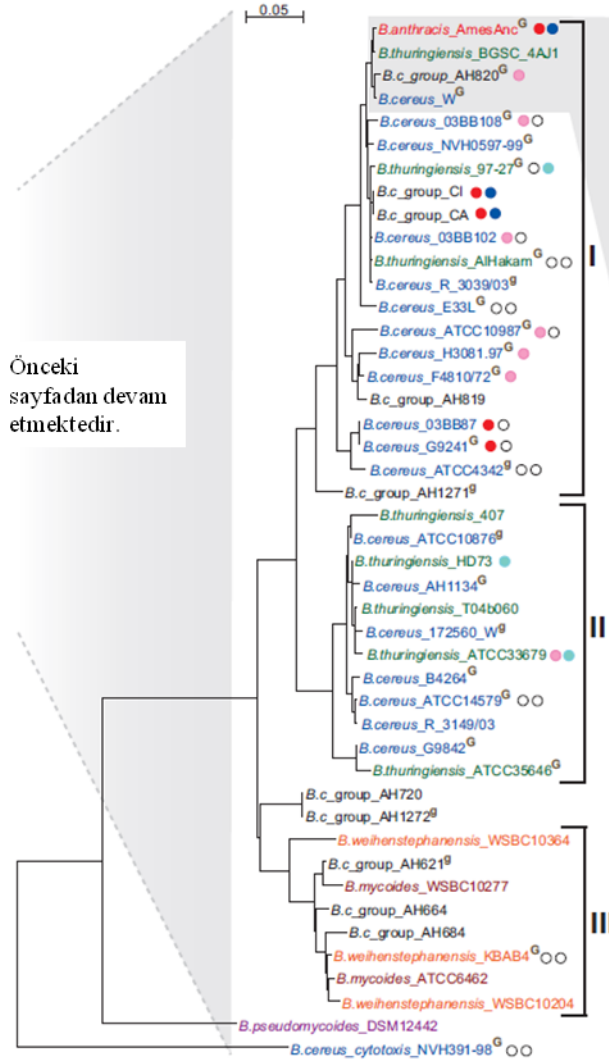
Basil türleri (*Bacilli*), 16S rRNA filojenisi ve GC içeriği açısından yüksek derecede değişken (%33 – %78), heterojen türlerdir. Bu durum, Kolstø ve ark. (2009) tarafından oluşturulan, 57 tür basil arasındaki ilişkiyi gösteren filogenetik ağaç şeması ile de gösterilmektedir (Şekil 2.8a).

Bacillus cereus grubu birbiriyle yakın *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis* ve *B. pseudomycoides* olmak üzere 6 türden oluşan *Bacilli* alt grubudur. İlk 3 tür böcekler veya memeliler için fırsatçı veya patojenik bakteri türleridir. Son 3 tür ise genel olarak hastalık yapmayan türler olarak kabul edilirler. Tüm bu basil türleri çeşitli toprak tipleri, toprakta yaşayan omurgasızların sindirim sistemi, bitki rizosferi ve insan eliyle oluşturulmuş gıda üretim fabrikaları gibi ortamlar olmak üzere çok geniş bir habitatta bulunabilirler (Jensen ve ark. 2003). *Bacillus cereus* grubu fenotipik ve genotipik olarak heterojen olmasına rağmen aynı türün suşları ve daha da dikkat çekici olarak farklı türlerin suşları yakın akraba olabilir ve filogenetik olarak kromozomal seviyede birbirine karışmış olabilir (Şekil 2.8b). *B. cereus* grubu üyeleri genel olarak kompleks genomlara sahip olup çoğu suş çeşitli sayı (1- >12) ve boyutta (2-600 kb; sıklıkla >80 kb) plazmid taşımaktadır.

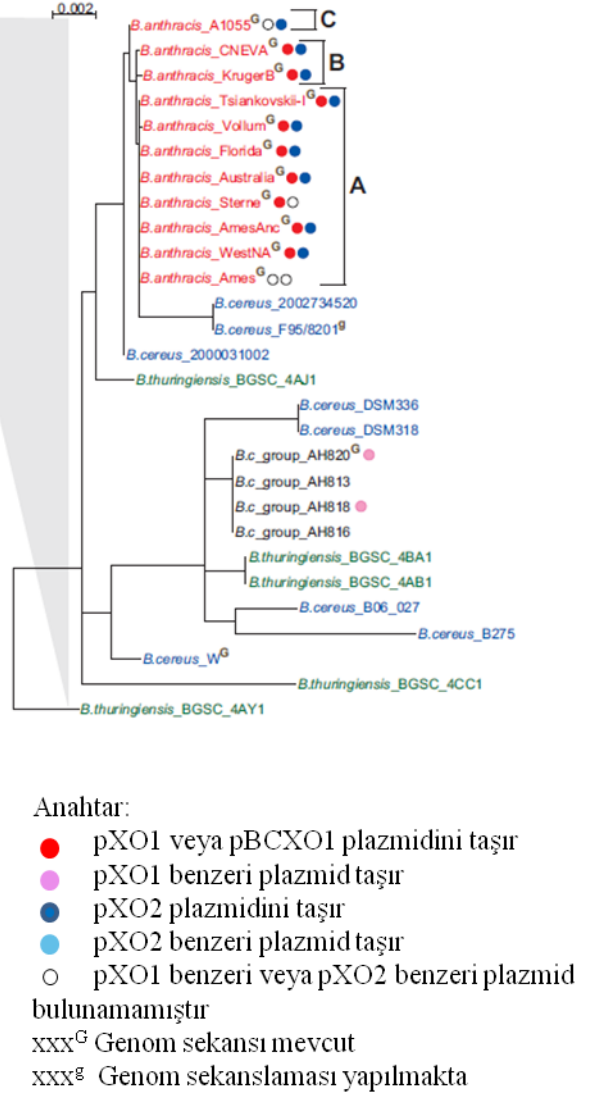
Ayrıca kromozoma dağılmış benzersiz sekans tekrarları veya kromozoma profaj olarak entegre olmuş bakteriyofajlar içermektedirler (Rasko ve ark. 2005, Tourasse ve ark. 2006, Kolstø ve ark. 2009). Türlerin filogenetik olarak birbirinin içine karışmış olması ve ana fenotipik özelliklerinin taşıdıkları plazmidlerce kodlanıyor olması, *B. cereus* grubu içerisindeki tür isimlendirmeleri konusunda bilim dünyasında tartışmalara yol açmaktadır. (Helgason ve ark. 2000, Rasko ve ark. 2005).



b) *B. cereus* grubu



c) *B. anthracis* komşuları

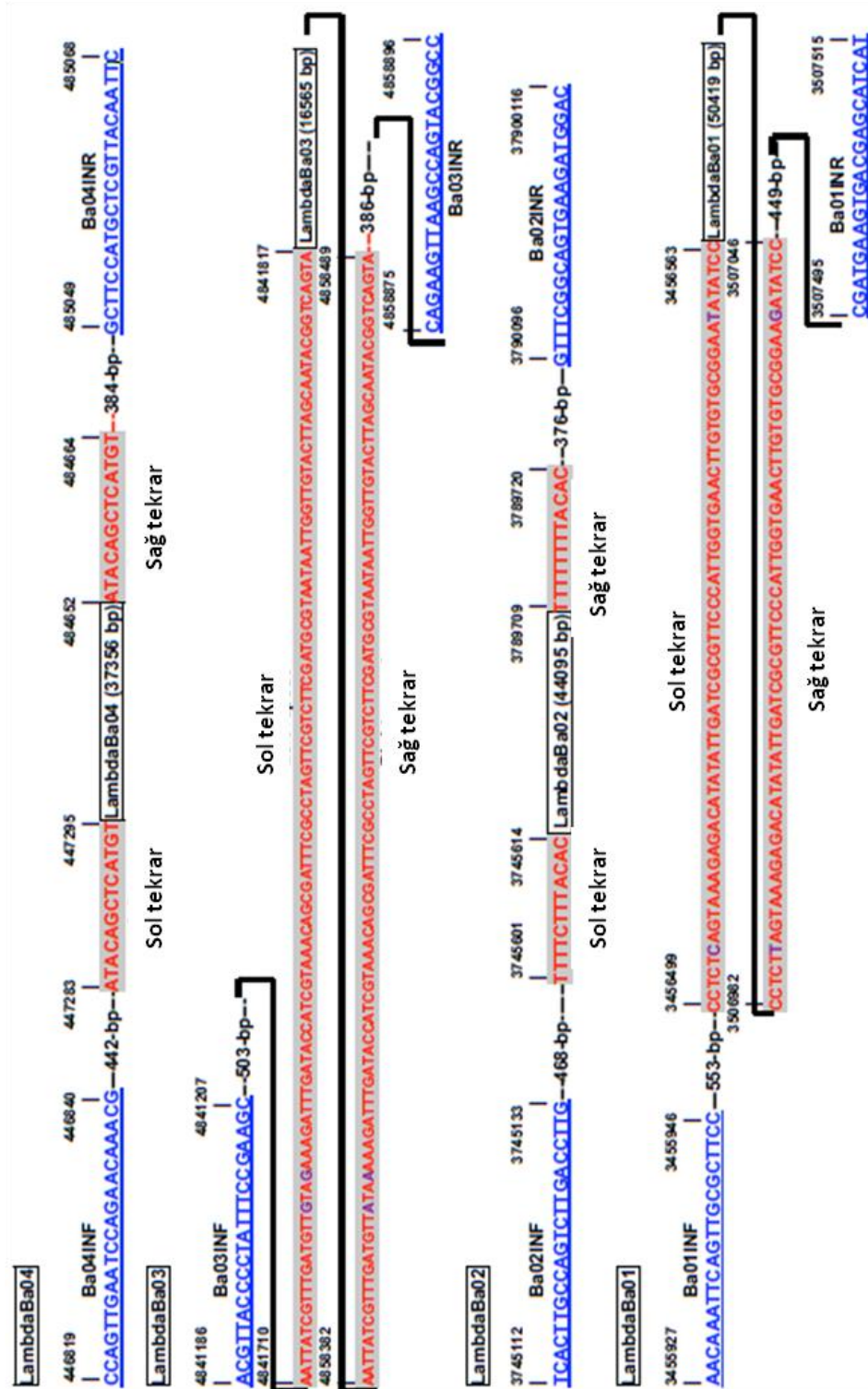


Şekil 2.8. *Bacilli* ve *Bacillus cereus* grubu bakterileri arasındaki filogenetik ilişki. 57 *Bacillus* türünün 16S ribozomal DNA (rDNA) sekanslarına dayanılarak filogenetik ağaç çıkarılmıştır (Kolstø ve ark. 2009)

Yukarıdaki filogenetik ağaçta görüldüğü üzere (Şekil 2.8c), bazı *B. cereus* ve *B. thuringiensis* türleri *B. anthracis* kümesi ile yakından ilişkilidir. Ayrıca kimi *B. cereus* ve *B. thuringiensis* türlerinin pXO1 ve pXO2'ye benzer plazmidler taşıdığı görülmektedir. Bunlardan *B. c._group_CI* ve *B.c._group CA*, *B. anthracis*'in virülans genlerini taşıyan pBCXO1 ve pXO2 plazmidini bulundurmakta ve şarbon hastalığına sebep olmaktadır (Klee ve ark. 2006b).

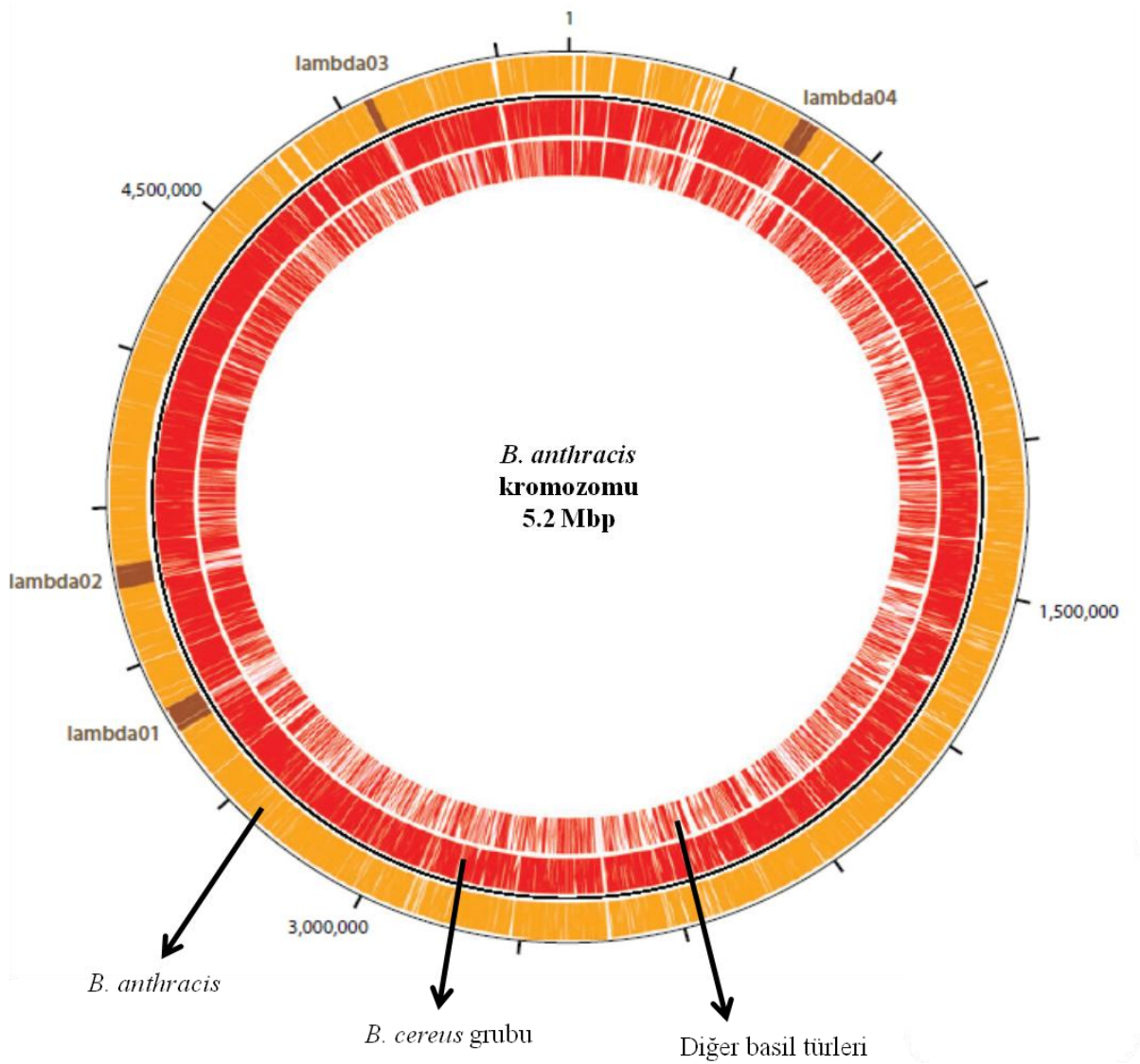
Kromozomal DNA açısından incelendiğinde *B. anthracis* yüksek derecede monomorfik bir popülasyon yapısına sahiptir ve suşları arasında çok az genetik varyasyon

göstermektedir. Ancak *B. anthracis*'e özgü sekanslar yalnızca 4 kromozomal lambdoid profaj bölgesi üzerinde bulunmaktadır (Şekil 2.9). (Sozhamannan ve ark. 2006).



Şekil 2.9. 4 lambdoid profaj bölgesinin genomik pozisyonları (Ames ancestor suşu, Genbank erişim numarası: AE017334) (Sozhamannan ve ark. 2006)

2.6. *B. anthracis* Kromozomu ile Diğer *Bacillus* Türlerinin Çoklu Sekans Sıralaması

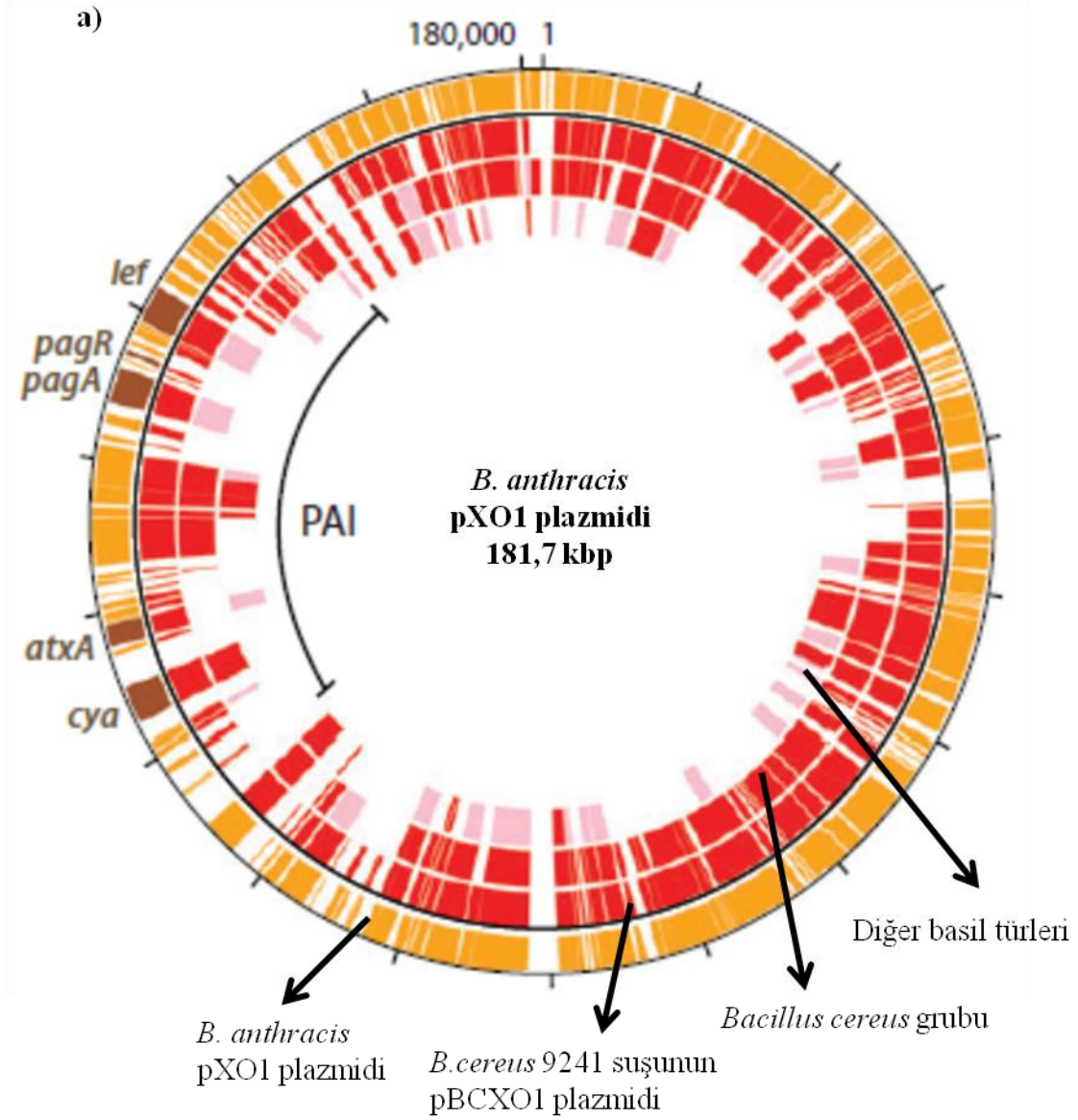


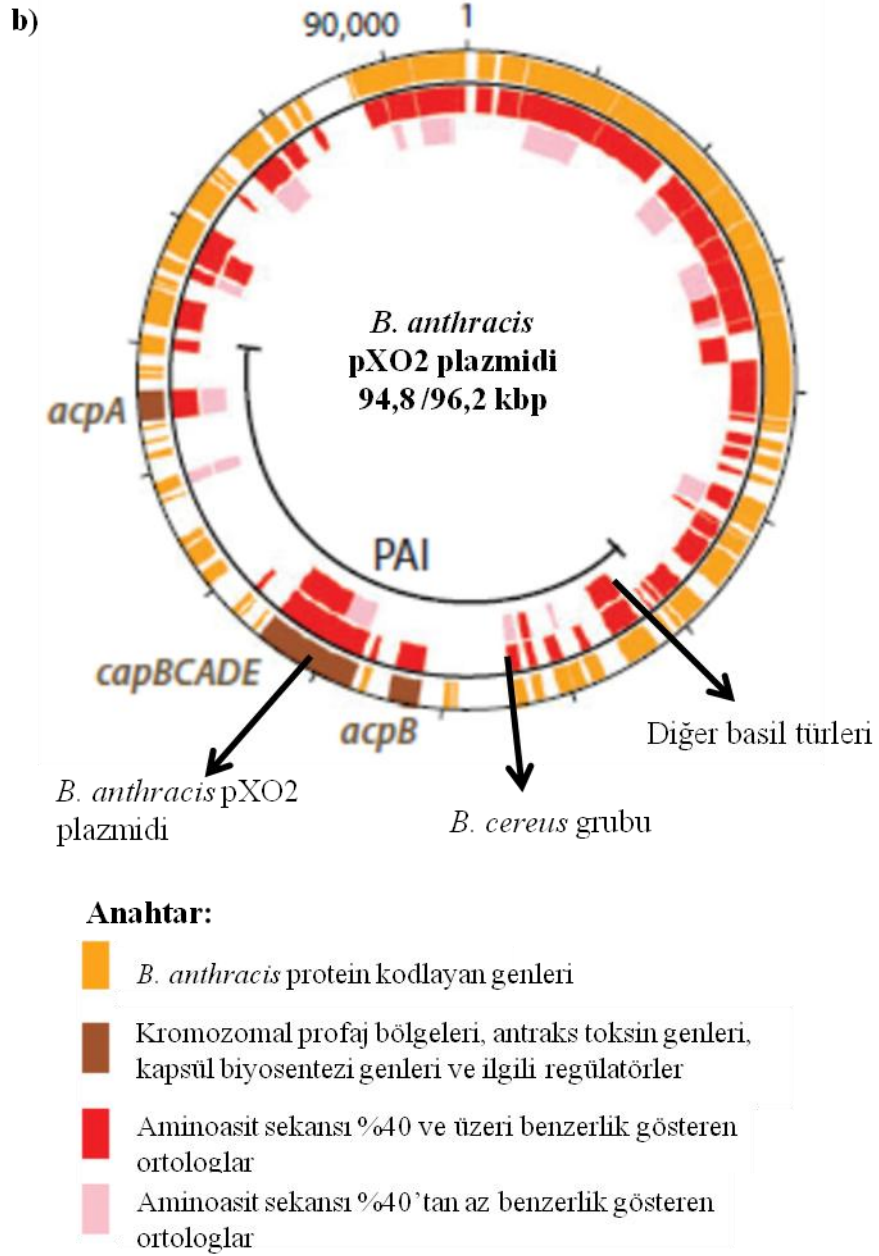
Şekil 2.10. *Bacillus anthracis* ve diğer basil türlerinin tüm-genom karşılaştırması. (Kolstø ve ark. 2009).

Şekil 2.10’da da görüldüğü üzere, *B. anthracis* kromozomu ile *B. cereus* grubu türlerin kromozomu çok yüksek oranda benzerlik gösterirken, yalnızca 4 lambda profaj bölgesinin ortolog sekansı bulunmamakta ve *B. anthracis*’e özgü özellik göstermektedir. Bir çalışmada bazı lambdoid profaj bölgelerinin *B. anthracis* dışında başka *Bacillus* türlerinde de mevcut olduğu gösterilmiştir. LambdaBa01 profaj bölgesi *B. cereus* E33L ve *B. weihenstephanensis* KBAB4 suşunda, LambdaBa02 profaja özgü sekanslar da birçok *B. anthracis* harici *B. cereus* grubu üyelerinde gözlemlenmiştir. Ancak incelenen 108 ayrı *B. anthracis* harici izolatın

hiçbirinde 4 profaj bölgesinin tümüne birden rastlanmamaktadır (Sozhamannan ve ark. 2006). Öte yandan *B. anthracis* ve 19 *B. cereus* ve *B. thuringiensis* türlerinin karşılaştırmalı genom hibridizasyonu göstermiştir ki %66-%92 oranında *B. anthracis* kromozomal geni herhangi bir *B. cereus* veya *B. thuringiensis* suşunda bulunmaktadır (Read ve ark. 2003).

2.7. pXO ve pXO Benzeri Plazmidlerin Çoklu Sekans Sıralaması





Şekil 2.11. *B. anthracis* virülans plazmidleri çoklu sekans karşılaştırması a) pXO1 plazmidi b) pXO2 plazmidi (Kolstø ve ark. 2009).

Son yıllarda antraks toksin genleri ve onların regülatörleri de dahil olmak üzere tüm pXO1 plazmidini taşıyan 3 adet *B. cereus* suşu tespit edilmiştir (Hoffmaster ve ark. 2004, 2006). Bu suşlar (G9241, 03BB87 ve 03BB102), Teksas ve Luisiana'daki metal işçilerinde görülen ciddi ve ölümcül pnömoniden sorumlu ve klinik olarak inhalasyonel antraksa çok benzer seyreden hastalığın etmeni olarak bulunmuşlardır. Karşılaştırmalı pXO1 sekans

analizi, *B. anthracis* pXO1 plazmidi ile *B. cereus* G9241'de bulunan pBCXO1 plazmidinin yüksek oranda homoloji ile tüm virölans genleri ve onların regülatörleri olan genlerin ortologlarını bulundurduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 2.11a).

pXO2 kapsül gen operonu (*capBCADE*) ve onun regülatör bölgeleri *acpA* ve *acpB*, diğer *B. cereus* grup üyeleri ile de paylaşılmaktadır ve *B. anthracis*'e özgü değildir (Şekil 2.11b). Farklı kaynaklardan izole edilen 5 adet *B. cereus* ve *B. thuringiensis* suşunun, pXO2 kapsül biyosentezinden sorumlu *capBCADE* operonundaki 5 genden en az 3'ünü kodladığı anlaşılmıştır (Cachat ve ark. 2008, Hoffmaster ve ark. 2008). Tüm 5 kapsül geni, *B. anthracis*'e filogenetik olarak yakın *B. thuringiensis* var. *monterrey* 4AJ1 suşunda bulunmaktadır. Buna ek olarak, tüm kapsül operonu ve replikasyon genleri dahil olmak üzere 10 gen sekansının tamamen aynı olduğu plazmidler *B. circulans* ve *B. acidiceles* türlerinde tespit edilmiştir (Luna ve ark. 2006).

2.8. Mevcut *B. anthracis* PCR Kitleri ve Güncel Çalışmanın Özgünlüğü

Bugüne kadar *B. anthracis* tanısı için birçok PCR temelli test geliştirilmiştir. Bunların çoğu pXO1 ve pXO2 virölans genlerine dayanan çalışmalar olmakla beraber, çok azı kromozomal DNA markörlerini de teste dahil etmiştir. Kromozomal DNA markörleri arasında farklı genler kullanılmış ve bunların birçoğu antraksla yakından alakalı *B. cereus* ve *B. thuringiensis* suşları ile çapraz reaksiyonlar vermiştir. Bir araştırmada, 35 PCR temelli *B. anthracis* tanı kiti incelenmiş ve bunların yalnızca 4'ünün *B. anthracis* kromozomu için %100 spesifik olduğu görülmüştür. Bu testler daha sonra 90 *Bacillus* suşu kullanılarak değerlendirildiğinde kitlerden 3'ünün yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar vermediği rapor edilmiştir (Ågren ve ark. 2013).

Bakteriyel ajan tanısında kullanılan gerçek zamanlı PCR kitlerinin en büyük handikaplarından biri, özellikle *B. anthracis* için geçerli olan, birbirine çok yakın genetik özellikte türlerle çapraz reaksiyon verme ihtimalidir. Bu durum hedef DNA konsantrasyonunun ve kaynağının kesin olarak bilindiği laboratuvarlarda yapılan test analizlerinde ortaya çıkmayabilir ancak içerdiği DNA çeşitliliği ve saflığı bilinmeyen örneklerde (saha örnekleri) PCR reaksiyonunun inhibe olması veya test dizaynında kullanılan problemlerin özgünlüğünün kaybedilmesi durumları ile karşılaşılmaktadır (Satterfield ve ark. 2007a). Bu problemin üstesinden gelebilmek amacıyla, standart kök-döngü (stem-loop) yapısına sahip problemlere kıyasla arttırılmış bağlanma kinetiğine sahip ve çift aşamalı bağlanma

şemasıyla tasarlanan, hassasiyetten kayıp vermeden özgün olarak bağlanabilen yeni nesil probler (Tentacle prob) geliştirilmiştir (Satterfield ve ark. 2007b).

Bu çalışmada, pXO1 ve pXO2 plazmidleri üzerinde yer alan virölans genlerinin yanı sıra, *B. anthracis*'e özgü kromozomal lambdoid profaj bölgesi de hedeflenerek gerçek zamanlı bir PCR kiti geliştirilmesi amaçlanmakta ve ayrıca, saf DNA örneklerinde olduğu kadar sahadan elde edilen örneklerde de ek bir saflaştırmaya ihtiyaç kalmadan direk ve hızlı kullanım için kromozomal bölgenin Tentacle prob ile tespit edilmesi planlanmaktadır. Gerçek zamanlı PCR kitinin yanlış-negatif sonuç verip vermediğinin kontrolü için kit içerisinde mevcut primer setlerinden biriyle çoğaltılabilen, ancak farklı bir boya ile işaretli probun yardımıyla varlığı tespit edilebilen bir internal kontrol DNA parçası da tasarlanmıştır. Internal kontrol DNA parçasının kit içerisine dahil edilmesiyle, PCR inhibitörlerinin varlığı veya PCR reaksiyonunun tamamen başarısız olması durumlarında alınan negatif sonuçların doğru değerlendirilmesi yapılabilecektir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. *Bacillus anthracis*'e Özgü Sekansların Belirlenmesi

Daha önceki çalışmalarda *B. anthracis*'in kromozomal DNA düzeyinde *B. cereus* grubu türlerine yüksek oranda benzerlik gösterdiği, *B. anthracis*'e özgü sekansların 4 ayrı lambdoid profaj bölgesi (LambdaBa01-04) üzerinde olduğu gösterilmiştir (Read ve ark. 2003, Sozhamannan ve ark. 2006, Kolstø ve ark. 2009). Genomik DNA üzerinde *B. anthracis*'e özgü sekansların belirlenmesi ve seçimi için *B. anthracis* Ames Ancestor suşunun genomu (GenBank erişim numarası: AE017334) baz alınmıştır. Buna göre lambdoid profaj bölgelerinin bulundukları nükleotit pozisyonları LambdaBa01 için 3456563-3506982, LambdaBa02 için 3745614-3789709, LambdaBa03 için 4841817-4858382 ve LambdaBa04 için 447295-484652 baz aralığındadır. Bu bölgelerin *B. anthracis*'e özgünlüğü, NCBI Nucleotide BLAST bilgisayar veri tabanı yardımıyla *Bacillus cereus* grup türleri ile çoklu sekans sıralaması yapılarak kontrol edilmiştir. Buna göre, hedef kromozomal bölge olarak LambdaBa03 bölgesi seçilmiştir. pXO1 ve pXO2 plazmidleri üzerindeki hedef bölge seçiminde ise şarbon virülans genleri göz önüne alınarak hedef bölge tayini yapılmıştır. Bu sayede geliştirilecek kit ile yalnızca *B. anthracis*'in tespiti yapılmakla kalmayıp aynı zamanda teste tabi tutulan suşun virulent veya avirulent olduğunun da ayrımı yapılabilecektir. Dolayısıyla, pXO1 hedef bölgesi olarak *pag* geni (*B. anthracis* Sterne suşu, GenBank erişim numarası: AY700758.1) ve pXO2 hedef bölgesi olarak ise *capB* geni (GenBank erişim numarası M24150.1) üzerinde bölgeler seçilmiştir.

3.2. Primer Seçimi, Tasarımı ve Bilgisayar Ortamında Analizler

Hedef bölgeler üzerinde olası primer çiftleri NCBI Primer BLAST ve Primer3 çevrimiçi araçları kullanılarak belirlenmiştir. Alternatif primer çiftleri arasından multipleks çalışma için en uygun olanları DINAMelt ve OligoAnalyzer kullanılarak, Tm değerleri, homo- ve hetero-dimer oluşumları, ikincil yapıları, 3' üzerine katlanma durumları vb. parametreler göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Aynı zamanda, seçilen primer çiftinin kromozom üzerinde başka bir bölgeye veya *B. anthracis* harici başka bir organizma genomu üzerinde bir bölgeye bağlanıp bağlanmayacağı NCBI Nucleotide BLAST ile kontrol edilmiştir.

Dizayn edilen primer setleriyle geliştirilecek multipleks PCR kitinin yanı sıra, alternatif bir kit oluşturmak amacıyla literatürde yer alan, yüksek özgünlük gösterdiği daha

önceki çalışmalarda verilen primer çiftleri tespit edilerek ayrı bir multipleks set oluşturulmuştur. Kromozomal bölge için LambdaBa01 profaj bölgesinde bulunan ve kromozomal bir belirteç olan E4 bölgesini hedef alan primerler (Bassy ve ark. 2017), pXO1 ve pXO2 plazmid bölgelerinde sırasıyla ödem faktörünü kodlayan *cya* geni (AY997301) ve kapsül oluşumundan sorumlu *capB* genini (M24150) hedefleyen primerler seçilmiştir (Wielinga ve ark. 2011). Bu primerlerin multipleks olarak çalışıp çalışmadıklarının kontrolü bilgisayar ortamında analizlerle yapılmıştır.

Hem literatürden adapte edilen primer setinde hem de yeni tasarlanan primer setinde pXO2 tespiti için *capB* geni hedeflenmiştir. Bu primerler *capB* üzerinde farklı bölgeleri hedeflemektedir. Karışıklığı önlemek adına yeni dizayn edilen set içerisindeki *capB* primerleri DCapB, literatürden adapte edilen set içerisindeki *capB* primerleri ise LCapB olarak adlandırılmıştır.

Her iki set için oluşturulan internal kontrol fragmentleri, bulunduğu set içerisindeki kromozomal bölge primerleriyle çoğaltılabilir şekilde tasarlanmıştır. Bu sayede multipleks reaksiyon içerisinde bulunacak primer sayısı azaltılarak çoklu reaksiyon yapısını daha da karmaşık hale getirmekten kaçınılmıştır.

Primerler Sentromer firması tarafından sentezlenmiştir.

Dizayn seti (Çizelge 3.1) ve literatür seti (Çizelge 3.2) içinde yer alan primerler aşağıda verilmiştir. Primerlerin bilgisayar üzerinde analizleri EK 1’de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. Dizayn seti içerisinde yer alan primerler

Primer-Prob Setinin Adı	Gen Bölgesinin Adı	Oligo İsmi	Primer ve Prob Sekansları
Dizayn Seti	LambdaBa03	LambdaBa03-F	TCGCTGGACAACCTCTCAAC
		LambdaBa03-R	ATGTGGCGTTTCACTGTTGC
	Pag	Pag-F	CCTTGTGGCAGCTTATCCGA
		Pag-R	TAGATTGGAGCCGTCCTCAG
	DCapB	DCapB-F	TGCTTTAGCGGTAGCAGAGG
		DCapB-R	AGTACGATCAACGCGGTCAG
	İnternal Kontrol	LambdaBa03-F	TCGCTGGACAACCTCTCAAC
		LambdaBa03-R	ATGTGGCGTTTCACTGTTGC

Çizelge 3.2. Literatür seti içerisinde yer alan primerler

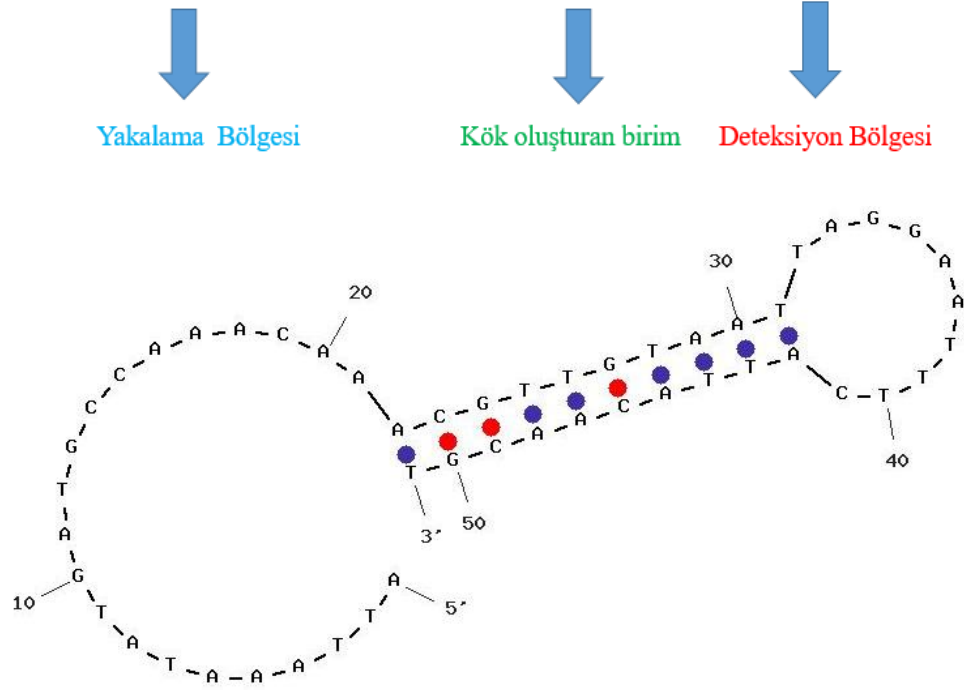
Primer-Prob Setinin Adı	Gen Bölgesinin Adı	Oligo İsmi	Primer Sekansları	Literatür
Literatür Seti	E4	E4-F	AGCAAAAGCTAACTGCTCGGG	(Bassy ve ark. 2017)
		E4-R	TCTACCCCTTCAGGATTAGCG	(Bassy ve ark. 2017)
	Cya	Cya-F	AGGTAGATTATAGAAAAAACATTACGGG	(Wielinga ve ark. 2011)
		Cya-R	GCTGACGTAGGGATGGTATT	(Wielinga ve ark. 2011)
	LCapB	LCapB-F	AGCAAAATGTTGGAGTGATTGTAAATG	(Wielinga ve ark. 2011)
		LCapB-R	AAAGTAATCCAAGTATTCACCTTCAATAG	(Wielinga ve ark. 2011)
	İnternal Kontrol	E4-F	AGCAAAAGCTAACTGCTCGGG	(Bassy ve ark. 2017)
		E4-R	TCTACCCCTTCAGGATTAGCG	(Bassy ve ark. 2017)

3.3. Prob Tasarımı ve Uygun Floroforların Seçimi

Dizayn seti içerisinde yer alan pXO1 ve pXO2 hedef bölgelerine özgü TaqMan problemler manuel olarak tasarlanmıştır. Problemlerin ikincil yapıları ve T_m değerleri OligoAnalyzer ve DINAMelt çevrimiçi araçları kullanılarak kontrol edilmiştir. LambdaBa03 kromozomal hedef bölgesi içinse yeni nesil bir prob çeşidi olan ve özellikle saha kullanımında diğer problemlere göre üstün hassasiyet ve özgünlük sağlayan “Tentacle Prob” geliştirilmiştir. Tentacle problemler yakalama ve deteksiyon bölgesi olmak üzere iki ayrı bölgeden oluşan ve önce yakalama, sonra deteksiyon bölgesinin hedefe bağlanması amaçlanan iki aşamalı problemlerdir. Bu yüzden yakalama bölgesi linear DNA zinciri yapısında, deteksiyon bölgesi florofor ve susturucu içeren bir “kök-döngü” (stem-loop) yapısındadır. Tentacle problemin tasarımı Satterfield ve ark.(2007)’nin yayınladığı çalışmada bahsedilen prensipler göz önüne alınmıştır. Yakalama ve deteksiyon bölgesi arasında bağlayıcı molekül olarak polietilen glikol 9 (PEG9), işaretleyici olarak da FAM floroforu kullanılmış ve probda kök-döngü yapısının oluşması için 9 nükleotit uzunluğunda, deteksiyon bölgesi ile palindromik bir sekans eklenmiştir (Şekil 3.1). Prob gövdesi, yakalama bölgesi-hedef bölge dupleks form ve

deteksiyon bölgesi-hedef bölge dupleks formun erime sıcaklıkları DINAMelt çevrimiçi aracı kullanılarak hesaplanmıştır.

Tentacle Prob : ATTAATATGATGCCAAACAA-PEG9_FAM- acgttgtaa-TTAGGAATTCATTACAACGT-BHQ1



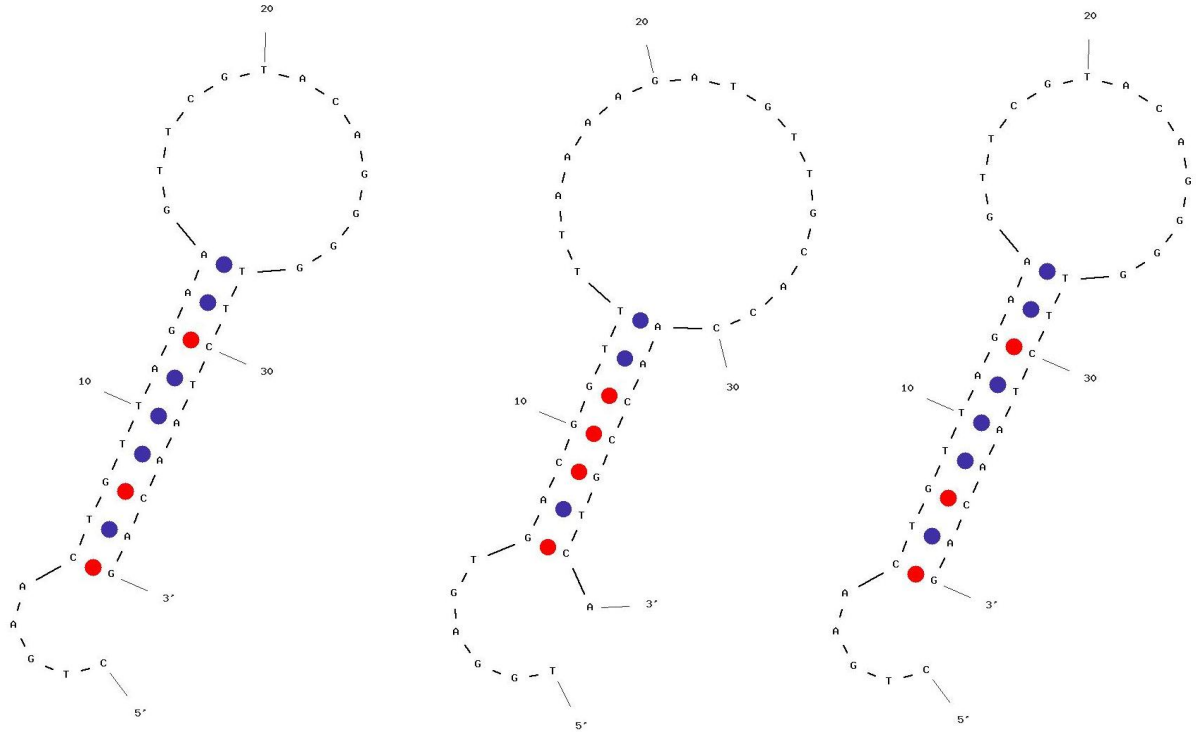
Şekil 3.1. Tentacle probun 2 boyutlu saç tokası yapısı. Yakalama bölgesi Tm değeri 54,8°C, deteksiyon bölgesi Tm değeri 56,1°C, prob gövdesi Tm değeri 66,0°C

Tasarlanan Tentacle probun yanı sıra alternatif olarak kullanılmak üzere yine LambdaBa03 bölgesini hedefleyen, 3 ayrı Rapid prob (yeni nesil Tentacle prob) sekansı Co-Diagnostics Inc. firmasından alınarak sentezletirilmiştir (LGC Biosearch Tech.). Bu problemlerin Tentacle probdan farkları yakalama bölgelerinin daha kısa oluşu sebebiyle daha hızlı bağlanma kinetiğine sahip olmalarıdır (Şekil 3.2).

Rapid prob 1: FAM-ACAAGCTTTCTGGAGCATTAATCGCAGAAAGC-BHQ1

Rapid prob 2: FAM-TGGAGTGACGGTTTTAAAAGATGTTGCACCAACCGTCA-BHQ1

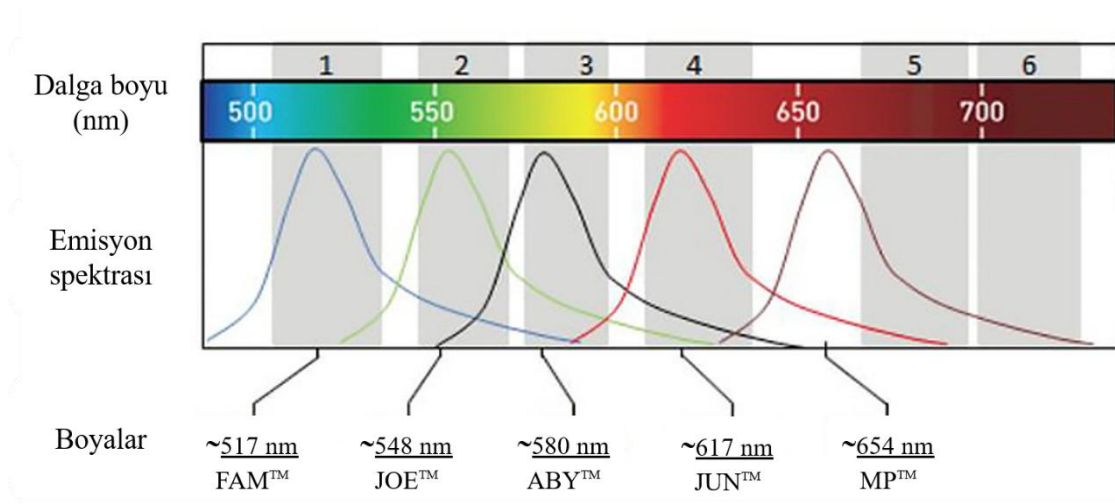
Rapid prob 3: FAM-CTGAACTGTTAGAAGTTCGTACAGGGGTTCTAACAG-BHQ1



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan Rapid problemlerin ikincil yapısını gösteren diagram. a) Rapid prob 1, Tm 67,6°C, prob gövdesi 64,1°C b) Rapid prob 2, Tm 68,2°C, prob gövdesi 65,5°C c) Rapid prob 3, Tm 66,1°C, prob gövdesi 64,2°C

Literatür multipleks seti içindeki problemler, ilgili primerlerin alındığı çalışmalarda kullanılan TaqMan prob sekanslarıdır (Wielinga ve ark. 2011, Bassy ve ark. 2017). Kullanılan problemlerin multipleks düzende çalışmaya uygunlukları OligoAnalyzer ve DINAMelt çevrimiçi araçları yardımıyla analiz edilmiştir. Problemlere bağlı olan floroforlar bu çalışmaya uygun olacak şekilde değiştirilmiştir.

Problarda kullanılacak floroforların seçiminde, belirli bir hedef bölgenin deteksiyonunun doğru yapılabilmesi için reaksiyon içerisindeki diğer hedeflerden alınacak florofor sinyallerinin birbirinden bağımsız olarak ayırt edilebilir olması prensibi göz önünde bulundurulmuştur. Bunun için multipleks düzende kullanılacak floroforların emisyon spektralarının mümkün olduğunca birbirinden ayrı olması gerekmektedir. Aynı zamanda kullanılacak olan gerçek zamanlı PCR cihazının her florofor için o floroforun emisyon yaptığı dalga boyunu tespit edebilen ayrı optik filtresinin olması gerekmektedir. Tüm bu sebeplerden dolayı, multipleks çalışma için FAM, JOE, ABY ve JUN boyalarının kullanılması uygun görülmüştür. Referans boya olarak kullanılmak üzere ise Mustang Purple (MP) boyası seçilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Seçilen floroforların emisyon spektralleri. Kullanılan gerçek zamanlı PCR cihazındaki optik filtrelerin tespit ettiği dalga boyu aralıkları 1'den 6'ya numaralandırılmış olarak şekil üzerinde gösterilmektedir.

Floroforların problarda kullanımında dikkat edilmesi gereken bir nokta da hedef olarak seçilen bölgenin sayıca azlığı veya çokluğudur. Her floroforun verdiği floresans yoğunluğu farklıdır. Bu sebeple sayıca az olan hedeflerin tespitinde en parlak ışık yayan boyalar, en çok bulunan hedeflerin tespitinde ise floresans şiddeti az olan boyalar seçilmelidir. Seçilen floroforlardan FAM en parlak floresans sinyal verirken, ışık parlaklığı JOE, ABY ve JUN boyalarında verilen sırada gitgide azalmaktadır (ThermoFisher Scientific, TaqMan Multiplex PCR Optimization User Guide). Dolayısıyla genomik hedef bölgeleri için FAM, pXO1 hedef bölgeleri için ABY, pXO2 hedef bölgeleri için JOE ve internal kontrol içinse JUN boyası tercih edilmiştir.

FAM ve JOE boylarının eklendiği problemler için susturucu molekül olarak BHQ1 (Black Hole Quencher 1) kullanılmıştır. ABY ve JUN flüoroforları Thermo-Fisher markasına ait boylardır ve bu problemler QSY™ susturucular ile sentezlenmektedir. Bu sebeple, pXO1 ve internal kontrol problemleri Thermo-Fisher Scientific firmasından ticari olarak temin edilmiştir. Tentacle Prob ve Rapid problemler LGC BioSearch firmasından, geriye kalan E4 ve pXO2 problemleri ise Sentromer firmasından satın alınmıştır.

Çalışmada kullanılan problemler ve sekansları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan problemler (*Internal kontrol için bkz. Bölüm 3.4.)

	Dizayn Seti	Literatür Seti
Genomik Bölge	LambdaBa03 <u>Tentacle Prob:</u> ATTAAATATGATGCCAAACAA- PEG9_FAM- ACGTTGTAATTAGGAATTCATTACAAC GT-BHQ1 <u>Alternatif Rapid problemler:</u> 1) FAM- ACAAGCTTTCTGGAGCATTAAATCGC AGAAAGC-BHQ1 2) FAM- TGGAGTGACGGTTTTAAAAGATGTT GCACCAACCGTCA-BHQ1 3) FAM- CTGAAGTGTAGAAAGTTCGTACAGG GGTTCTAACAG-BHQ1	E4 FAM- AGGAAGAGAATGAGTAAAGTAAT TGAAGGAC-BHQ1
pXO1	Pag ABY- ACGACGCATGCACTTCTGCATTTCCA- QSY	cya ABY- CCACTCAATATAAGCTTTATTACC AGGAGC-QSY
pXO2	DCapB JOE- CTCATTGCTCCTGGATCCGGATGAGCA- BHQ1	LCapB JOE- AGGTCCCATAACATCCATATGATC TTCTAA-BHQ1
Internal Kontrol*	JUN- AAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC- QSY	JUN- AAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT AAC-QSY

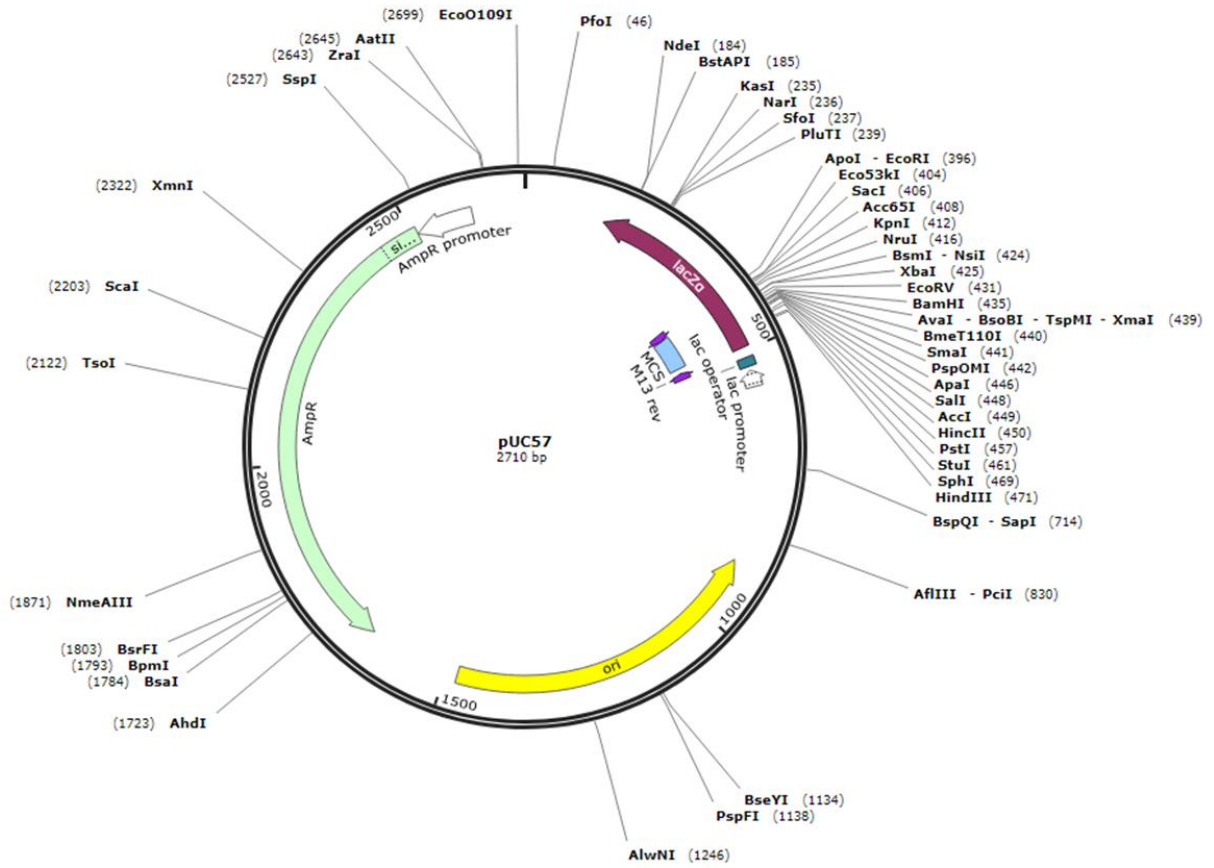
3.4. İnternal Kontrol Tasarımı ve Transformasyon ile Çoğaltılması

3.4.1. İnternal kontrol DNA fragmentlerinin tasarlanması

Her iki primer-prob seti için farklı internal kontrol fragmenti dizayn edildi. Dizayn seti için oluşturulan kontrol ICD, literatür seti için oluşturulan kontrol ICL olarak adlandırılmıştır.

İnternal kontrol fragmentleri, bulundukları set içindeki genomik DNA hedef bölgesi alınıp içinden bir kısım sekans silinerek yerine *B. anthracis* Ames 16S rDNA sekansı (KU500026) eklenerek oluşturulmuştur. Bu sayede internal kontrol fragmentleri için ayrı bir primer çifti dizayn edilmesine gerek kalmamakla birlikte bu fragmentlerin varlığı da genomik hedef bölgesi için tasarlanan primer çiftiyle tespit edilebilmektedir.

İnternal kontrol fragmentleri pUC57 vektörü içerisine klonlanmış şekilde ticari olarak temin edilmiştir (GenScript). pUC57 vektörü ampisilin direnç geni taşımaktadır ve bu vektörü kesen restriksiyon enzimleri vektör haritasında gösterilmektedir (Şekil 3.4) ICD fragmentinin klonlanması için vektör *EcoRI* ve *SphI* enzimleriyle, ICL içinse *EcoRI* ve *HindIII* enzimleriyle kesilmiştir.



Şekil 3.4. pUC57 vektörü haritası

ICD ve ICL fragmentlerini vektörden kesebilmek için her ikisinde de DNA dizisinin başına *HpaI* (*KspAI*), sonuna da *StuI* (*Eco147I*) enzimleri kesim bölgesi eklendi. Bu enzimler küt uçlu kesim yapan restriksiyon enzimleridir.

Kontrol fragmentlerinin, klonlamada ve vektörden kesip çıkarmada kullanılan restriksiyon enzimleri ile kesilmediği Webcutter çevrimiçi aracı (<http://heimanlab.com/cut2.html>) ile kontrol edilmiştir.

ICD ve ICL fragmentlerinin sekansları EK-2’de yer almaktadır.

3.4.2. İnternal kontrol DNA fragmentlerinin *E.coli* BL21 hattına transformasyonu

3.4.2.1 Kullanılan cihazlar

Elektroporasyon cihazı (Eporator-Eppendorf)
Çalkalamalı inkübatör (N-BioTek NB-205L)
Spektrofotometre (Biochrom Libra S22)
Santrifüj (Eppendorf 5415 R)
Buz makinesi (Scotsman AF100)
Sınıf II biyogüvenlik kabini (Heraeus LaminAir)

3.4.2.2 Kullanılan malzemeler

Petri kapları (Isolab Laborgeräte GmbH)
Steril öze (Ansa)
Steril santrifüj tüpleri (15 mL, 50 mL) (TPP)
Mikropipetler (10 µL, 100 µL, 1000 µL) (Eppendorf Research Plus)
Steril mikropipet Uçları (10 µL, 100 µL, 1000 µL) (Eppendorf)
Steril mikrosantrifüj tüpleri (0,2 mL, 0,6 mL, 1,5 mL, 2 mL) (Axygen)
Elektroporasyon küvetleri (1 mm) (Cellprojects)
Kriyotüpler (2 mL) (Corning)
LB Lennox besi yeri (Sigma)
Agar (Sigma)
Ampisilin (Roche)
Parafilm M (Sigma)

3.4.2.3 Protokol

İnternal kontrol fragmentlerinin bulunduğu pUC57 plazmidlerinin çoğaltılması için *E.coli* BL21 hücre hattı seçilmiştir. Bunun için öncelikle *E.coli* BL21 hücrelerinin kompetant haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, *E.coli* BL21 hücreleri LB agar besiyeri içeren petrilere çizgi ekimi yapılarak gece boyu 37°C’de inkübe edilmiştir. Ertesi gün petriden tek koloni seçimi yapılarak sıvı LB besiyerine inoküle edilmiş ve kültürler 18 saat boyunca 37°C’de 220 rpm çalkalama hızında geliştirilmiştir. Ertesi gün 5 mL bakteri kültürü 50 mL LB besiyerine eklenerek yaklaşık 2 saat boyunca OD₆₀₀ değeri 0,5-0,8 aralığına ulaşana dek 37°C’de 220 rpm’de çalkalanarak inkübe edilmiştir. OD₆₀₀ değeri istenen aralığa ulaşan kültür santrifüj tüplerine aktararak 4100 rpm’de 7 dakika (dk) +4°C’de santrifüjlenmiştir. Supernatant uzaklaştırılarak elde edilen pellet 15 mL 0,1 M steril CaCl₂’de çözülmüş ve buz üstünde 15 dakika bekletilmiştir. Ardından, 4100 rpm’de 7 dk +4°C’de santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Supernatant uzaklaştırılarak pellet 0,1 M steril CaCl₂ + %15 gliserol çözeltisinde çözülmüş ve steril kriyotüplere 100’er µl dağıtılarak -80°C’de saklanmıştır.

Transformasyon için, -80°C’den alınan kriyotüpler buz üzerinde bekletilerek bakteriler çözündürülmüştür. Daha sonra 50 µL bakteri kültürü 1 milimetre (mm) elektroporasyon kuvvetlerine transfer edilmiş ve her bir küvete 1-2 µL ICD veya ICL içeren pUC57 örnekleri eklenerek elektroporasyon yapılmıştır. Elektroporasyon sonrası her örneğe hızlı bir şekilde 1 mL LB besiyeri eklenmiş ve hücreler 37°C’de 220 rpm’de 2 saat inkübe edilmiştir. Önceden oda sıcaklığına getirilen 100 µg/mL ampicilin içeren nutrient agar petrilere transforme edilen 100 µL *E.coli* BL21 hücreleri yayılarak 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Antibiyotikli agar içeren petrilere üreyebilen bakteriler, plazmidin transformasyonu sonucunda ampicilin direncini kazanan bakterilerdir. Başarılı bir şekilde transforme olmuş kolonilerden sıvı LB besiyerine aktarılan bakteriler, 37°C’de 220 rpm’de çalkalanarak 18 saat boyunca inkübe edilmiş ve ardından plazmid izolasyonu yapılmıştır.

3.5. *B. anthracis* ve Kontrol Suşlarının Kültürü ve DNA İzolasyonu

3.5.1. Kullanılan cihazlar

Sınıf II biyogüvenlik kabini (Esco Class II BSC, Heraeus LaminAir)

Santrifüj (Eppendorf 5415 R)

Çalkalamalı inkübatör (N-BioTek NB-205L)

Isıtma bloğu (Benchmark Digital Heat Block)

Tezgah üstü santrifüj (LMS Harmony MCF-2360)

Vorteks (IsoLab Laborgeräte GmbH)
Nanodrop (ThermoScientific Nanodrop 8000)
pH metre (Mettler-Toledo)
Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
Manyetik karıştırıcı (VELP Scientifica)
Otoklav (Sistek)

3.5.2. Kullanılan malzemeler

Petri kapları (Isolab Laborgeräte GmbH)
Steril öze (Ansa)
Steril santrifüj tüpleri (15 mL, 50 mL) (TPP)
Mikropipetler (10 µL, 100 µL, 1000 µL) (Eppendorf Research Plus)
Steril mikropipet Uçları (10 µL, 100 µL, 1000 µL) (Eppendorf)
Steril mikrosantrifüj tüpleri (0,2 mL, 0,6 mL, 1,5 mL, 2 mL) (Axygen)
Şişe (500 mL, 1000 mL) (Schott)
Dereceli silindir (Isolab Laborgeräte GmbH)
QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen)
Genejet Plasmid Mini Prep Kit (ThermoFisher)
LB Lennox besi yeri (Sigma)
Pepton (from meat) (VWR Chemicals)
Maya özütü (Sigma)
Sodyum klorür (NaCl) (Sigma)
Agar (Sigma)
Ampisilin (Roche)
Parafilm M (Sigma)

3.5.3. Hazırlanan solüsyonlar

Luria-Bertani (LB) sıvı besiyeri:

1 litre distile su içerisine 20 gram LB Lennox tartılarak manyetik karıştırıcı yardımıyla eritilmiş, solüsyon kullanımdan önce 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Nutrient agar:

Distile su içerisine %0,5 pepton, %0,3 maya özütü, %0,5 NaCl ve %1,5 agar eklenerek karıştırılmış, solüsyonun pH’ı 7,4’e ayarlandıktan sonra otoklavlanıp soğumaya bırakılmıştır.

Nutrient agar solüsyonuna ampisilin ekleneceği zaman, solüsyon sıcaklığı agarın katılaşma sıcaklığı olan 36-37°C'nin biraz üstünde iken eklenmiştir. Agar solüsyonu katılaşmaya başlamadan önce petrilere dağıtılarak agarın petrilere donması için petri kapakları yarım kapatılarak beklenmiştir. Agar tamamen katılaştıktan sonra petri kapakları kapatılarak kenarları parafilm ile sarılmış ve +4°C'de saklanmıştır.

3.5.4. Protokol

Genomik bölge primerlerinin test edilmesinde ve optimizasyonunda *B. anthracis* Sterne aşısı suşundan elde edilen DNA kullanılmıştır.

B. anthracis tam virulent suşların DNA'sı Kafkas Üniversitesi'nden temin edilmiştir.

Primerlerin özgünlüğünü test etmek amacıyla çapraz reaksiyon testlerinde kullanılmak üzere aşağıda belirtilen *Bacillus* suşları çeşitli kaynaklardan elde edilmiştir:

- *B. cereus* ATCC 14579 (TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü)
- *B. cereus* ATCC 10876 (Ankara Etlik Veteriner Kontrol Merkezi Araştırma Enstitüsü)
- *B. cereus* ATCC 33019 (Yeditepe Üniversitesi)
- *B. cereus* ATCC 11778 (Uludağ Üniversitesi)
- *B. cereus* DSM 4312 (Gebze Teknik Üniversitesi)
- *B. cereus* (Ankara Üniversitesi, yabanıl tip)
- *B. cereus* (İstanbul Üniversitesi, yabanıl tip)
- *B. thuringiensis* (Namık Kemal Üniversitesi, yabanıl tip)
- *B. thuringiensis ssp. kurstaki* (Yeditepe Üniversitesi)
- *B. thuringiensis ssp. israelensis* ATCC 35646 (Gebze Teknik Üniversitesi)
- *B. subtilis* 41 (IMD 75165) (TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü)
- *B. subtilis* ATCC 6633 (Ankara Etlik Veteriner Kontrol Merkezi Araştırma Enstitüsü)
- BGSC-4AJ1 *B. thuringiensis* serovar *monterrey* (Bacillus Genetic Stock Center (BGSC))
- BGSC-4BA1 *B. thuringiensis* serovar *pondicheriensis* (BGSC)
- BGSC-4CC1 *B. thuringiensis* serovar *pulsiensis* (BGSC)
- BGSC-4AY1 *B. thuringiensis* serovar *brasilensis* (BGSC)
- BGSC-4Y1 *B. thuringiensis* serovar *tochigiensis* (BGSC)

- BGSC-4AW1 *B.thuringiensis* serovar *andalousiensis* (BGSC)
- BGSC-4BD1 *B. thuringiensis* serovar *huazhongensis* (BGSC)
- BGSC-4AB1 *B. thuringiensis* serovar *morrisori* (BGSC)
- BGSC-4A3 *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis* (BGSC)
- BGSC-6E1 *B. cereus* (BGSC)
- BGSC-6A5 *B. cereus* (BGSC)
- BGSC-6A10 *B. cereus* (BGSC)
- BGSC-6A15 *B. cereus* (BGSC)
- BGSC-6A18 *B. cereus* (yabanıl tip izolatu) (BGSC)
- BGSC-7A16 *B. megaterium* (BGSC)
- BGSC-10A5 *B. subtilis* ssp. *subtilis* (BGSC)
- BGSC-6A19 *B. mycoides* (BGSC)
- BGSC-6A20 *B. mycoides* (BGSC)
- BGSC-6A49 *B. pseudomycoides* (BGSC)
- BGSC-6A46 *B. weihenstephanensis* (BGSC)

Çapraz reaksiyonlar için elde edilen tüm suşlar steril LB Lennox sıvı besiyerine ekilip çalkalamalı inkübatörde 30°C’de 220 rpm’de 18 saat boyunca geliştirilmiştir. Daha sonra nutrient agar petrilere çizgi kültürü yapılarak tek koloni izolasyonu yapılmıştır. Seçilen saf koloniler tekrar LB sıvı besiyeri içerisine inoküle edilerek 18 saat boyunca büyümeye bırakılmıştır. Aktif kültürlerden kit aracılığıyla üretici firmanın direktifleri doğrultusunda DNA izolasyonu yapılmıştır (QiaAmp DNA Mini Kit, katalog no:51306). DNA izolasyonunda üreticinin sağladığı talimatlar izlenmiştir. İzole edilen DNA konsantrasyonları Nanodrop spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.

Ayrıca, ICD ve ICL fragmentlerini içeren pUC57 plazmidleri ile transforme edilmiş *E.coli* BL21 hücrelerinden plazmid izolasyonu yapılarak kontrol DNA fragmentleri çoğaltılmıştır. Plazmid DNA izolasyonu için GeneJet Plazmid Mini Prep Kit (Thermo-Fisher) kullanılmış ve üreticinin plazmid DNA izolasyon talimatları izlenmiştir.

3.6. Konvansiyonel PCR ve Optimizasyonu

3.6.1. Kullanılan cihazlar

Sınıf II Biyogüvenlik Kabini (Esco)

PCR cihazı (BioRad C1000 Touch Thermal Cycler)

Santrifüj (ThermoScientific SL8R)
Mini masaüstü santrifüj (LMS Harmony)
Vorteks (IsoLab Laborgeräte GmbH)
Buz makinesi (Scotsman AF100)

3.6.2. Kullanılan malzemeler

Primerler (Bölüm 2.2.'ye bkz.)
10X PCR Buffer II (Applied Biosystems)
dNTP karışımı (10 mM) (ThermoScientific)
MgCl₂ (ThermoScientific)
AmpliTaq Gold 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems)
Moleküler biyoloji derecesi saf su (Invitrogen™ UltraPure™- ThermoFisher)
Mikropipetler (2 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL) (Eppendorf Research Plus II)
Pipet uçları (20 µL, 200 µL, 1000 µL) (Eppendorf Dualfilter)
Strip tüpler ve kapakları (Axygen)
Mikrosantrifüj tüpleri (0,2 mL, 0,6 mL, 1,5 mL, 2 mL) (Axygen)
Parafilm M (Sigma)
Trizma bazı (Sigma)
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) disodyum tuzu (Sigma)

3.6.3. Hazırlanan solüsyonlar

Tris-EDTA (TE) Tamponu:

TE tamponu 10 mM Tris ve 1 mM EDTA karışımından oluşmaktadır. TE tamponu hazırlamak için önce 1 M Tris ve 0,5 M EDTA solüsyonları hazırlanmıştır.

1 M Tris için 60,57 gram Trizma bazı (Moleküler ağırlık (MA): 121,4 gr) 400 mL distile su içerisinde çözülmüş ve hidroklorik asit (HCl) kullanılarak pH 8,0'a ayarlanmıştır. Ardından solüsyon hacmi distile su ile 500 mL'e tamamlanmıştır.

0,5 M EDTA solüsyonu için 18,6 gram EDTA disodyum tuzu (MA: 372,2 gr) tartılarak 80 mL distile su içerisine eklenmiştir. Sodyum hidroksit pelleti kullanılarak solüsyon pH'ı 8,0'e ayarlanmış ve solüsyon hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

500 mL steril TE tamponu için 5 mL 1 M Tris (pH 8,0), 1 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) ve 494 mL distile su ile karıştırılarak otoklavlanmıştır.

Liyofilize primer ve problemlerin çözülmesinde TE tamponu kullanılmıştır.

3.6.4. Protokol

Tüm primer çiftlerinin optimal bağlanma koşulları konvansiyonel PCR ile ayrı ayrı belirlenmiştir. Bunun için her bir primer çifti için magnezyum ve sıcaklık gradyanları oluşturularak PCR reaksiyonları yürütülmüştür. Hedef DNA olarak genomik bölge primerleri için *B. anthracis* Sterne genomik DNA'sı, plazmid primerleri için yabancı tip *B. anthracis* plazmid DNA'sı ve kontrol grubu için *B. cereus* ATCC 14579 DNA'sı kullanılmıştır. Optimizasyon deney şemaları kromozomal bölge primerleri, pXO1 primerleri ve pXO2 primerleri için sırasıyla Çizelge 3.4, Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 3.4. Genomik bölge primerleri ile Mg^{+2} konsantrasyonu ve sıcaklık optimizasyonu deney şeması. Üst satır Mg^{+2} konsantrasyonunu, sağ sütun ise sıcaklık değerlerini gösterir. (NT (Non-template): DNA içermeyen negatif kontrol örnekleri)

		2 mM		3 mM						3.5 mM		4 mM	
		L. Ba03	E4	L. Ba03	E4	<i>B. cereus</i> L.Ba03	<i>B. cereus</i> E4	NT(-) kontrol L.Ba03	NT(-) kontrol E4	L. Ba03	E4	L. Ba03	E4
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
65°C	A												
64,6 °C	B												
63,7 °C	C												
62,1 °C	D												
60,2 °C	E												
58,6 °C	F												
57,5 °C	G												
57°C	H												

Çizelge 3.5. pXO1 primerleri ile Mg⁺² konsantrasyonu ve sıcaklık optimizasyonu deney şeması. Üst satır Mg⁺² konsantrasyonunu, sağ sütun ise sıcaklık değerlerini gösterir.

		1,5 mM		2 mM		3 mM				3.5 mM		4 mM	
		<i>pag</i>	<i>cya</i>	<i>pag</i>	<i>cya</i>	<i>B. cereus pag</i>	<i>B. cereus cya</i>	<i>pag</i>	<i>cya</i>	<i>pag</i>	<i>cya</i>	<i>pag</i>	<i>cya</i>
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
65°C	A												
64,6 °C	B												
63,7 °C	C												
62,1 °C	D												
60,2 °C	E												
58,6 °C	F												
57,5 °C	G												
57°C	H												

Çizelge 3.6. pXO2 primerleri ile Mg⁺² konsantrasyonu ve sıcaklık optimizasyonu deney şeması. Üst satır Mg⁺² konsantrasyonunu, sağ sütun ise sıcaklık değerlerini gösterir.

		1,5 mM		2 mM		3 mM				3.5 mM		4 mM	
		<i>D CapB</i>	<i>L CapB</i>	<i>D CapB</i>	<i>L CapB</i>	<i>B. cereus DCapB</i>	<i>B. cereus LCapB</i>	<i>D CapB</i>	<i>L CapB</i>	<i>D CapB</i>	<i>L CapB</i>	<i>D CapB</i>	<i>L CapB</i>
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
65°C	A												
64,6 °C	B												
63,7 °C	C												
62,1 °C	D												
60,2 °C	E												
58,6 °C	F												
57,5 °C	G												
57°C	H												

Her bir PCR reaksiyonu için kullanılan malzeme miktarları aşağıda verilmiştir.

1 reaksiyon için:
0,3 µM ileri primer
0,3 µM geri primer
200 µM dNTP
30 ng DNA
1,25 birim Taq Polimeraz
1X PCR Tamponu
Toplam reaksiyon hacmi: 10 µL

Her Mg^{2+} konsantrasyonu için reaksiyon karışımı hazırlanıp reaksiyon tüplerine eşit olarak paylaştırılmıştır. Ardından her reaksiyon için 30 ng olacak şekilde hedef DNA eklenip reaksiyon içeriği vorteks kullanılarak kısaca karıştırılmıştır. Reaksiyon tüpleri 1200 rpm’de 2 dakika santrifüj edildikten sonra PCR cihazına yerleştirilerek aşağıda verilen reaksiyon koşulları uygulanmıştır.

95°C	10 dk.		
95°C	1 dk.		
57-65°C	30 sn.		
72°C	1 dk.		
72°C	5 dk.		
4°C	∞		
		X 35	

3.7. Agaroz Jel Elektroforezi

3.7.1. Kullanılan cihazlar

Agaroz jel elektroforez güç kaynağı (BioRad 3000Xi)

Jel görüntüleme cihazı (BioRad Molecular Imager Gel Doc™ XR+)

Çeker ocak

Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)

Manyetik karıştırıcı (VELP Scientifica)

pHmetre (Mettler Toledo)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

Buz makinesi (Scotsman AF100)

3.7.2. Kullanılan malzemeler

Agaroz (Düşük elektroendoosmoz (EEO)) (AppliChem)

Etidyum bromür (EtBr) (Invitrogen)

6X jel yükleme boyası (New England Biolabs (NEB))

50 baz çifti (bç) DNA markörü (GeneRuler) (ThermoFisher)

100 bç DNA markörü (NEB)

1 kilobaz (kb) DNA markörü (NEB)

Saf su (DNaz, RNaz içermeyen) (Invitrogen™ UltraPure™ ThermoFisher)

Trizma bazı (Sigma)

EDTA disodyum tuzu (Sigma)

Borik asit (Sigma)

Asetik asit (Merck)

Sodyum hidroksit pellet (Merck)

Dereceli silindir (100 mL, 500 mL, 1 L) (Isolab Laborgeräte GmbH)

Erlenmayer (Bomex)

Mikrosantrifüj tüpleri (0,2 mL, 0,6 mL, 1,5 mL, 2 mL) (Axygen)

Mikropipetler (10 µL, 100 µL, 1000 µL) (Eppendorf Research Plus)

Mikropipet uçları (10 µL, 100 µL, 1000 µL) (Eppendorf)

Jel tepsisi, tırağı, kaseti ve tankı (BioRad)

3.7.3. Hazırlanan solüsyonlar

Tris-Borat-EDTA (TBE) Tamponu

Öncelikle 0,5 M EDTA solüsyonu hazırlanmalıdır. 500 mL 0,5 M EDTA stoğu için 93,05 gram EDTA disodyum tuzu (Moleküler ağırlık (MA): 372,2 gr) tartılarak 400 mL distile suyun içerisine eklenmiştir. EDTA, pH derecesi 8,0'a yaklaşımdan suda çözünmeyeceğinden, sodyum hidroksit pelletleri kullanılarak pH 8,0'a ayarlanmıştır. Sonrasında solüsyon hacmi distile su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır.

10X TBE stok solüsyonu hazırlamak için 108 gram Trizma bazı (MA:121,14 gr) ve 55 gram borik asit (MA: 61,83 gr) tartılarak 900 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Ardından

40 mL 0,5 M EDTA solüsyonu eklenmiş ve solüsyon hacmi distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Kullanımdan önce istenen miktar 10X TBE tamponunun konsantrasyonu distile su ile 1:9 oranında seyreltilerek 1X konsantrasyona ayarlanmıştır.

Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu

10X TAE stok solüsyonu hazırlamak için 48,4 gram Trizma bazı (MA:121,14 gr) tartılarak 900 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Ardından 11,42 mL asetik asit ve 20 mL 0,5 M EDTA (pH:8,0) eklenmiş ve solüsyonun hacmi distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

1X konsantrasyonunda TAE tamponu elde etmek için 1:9 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

3.7.4. Protokol

PCR ürünlerinin elektroforezi için %1,5 agaroz jel kullanılmıştır. 1,5 gram düşük EEO agaroz 100 mL 1X TBE içeren bir erlenmayere konularak mikrodalga fırında ısıtılarak çözdürülmüş ve soğumaya bırakılmıştır. Erimiş haldeki jelin sıcaklığı agarozun donma sıcaklığı olan 36-37°C'ye yaklaştığında içerisine DNA fragmentlerini görüntüleyebilmek için 10 mg/mL EtBr solüsyonundan 5 µL ilave edilmiştir. Hızlıca karıştırılıp EtBr'nin homojen dağılımı sağlandıktan sonra önceden hazırlanmış jel kaseti içerisine dökülerek agaroz jelin polimerleşmesi beklenmiştir. Jel polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice çıkarılarak, agaroz jel tepsisi ile beraber jel tankı içerisine yerleştirilmiş ve tankın içi jelin üstünü tamamen örtecek şekilde 1X TBE tamponu ile doldurulmuştur.

PCR ürünleri kuyulara yüklenmeden önce 6X yükleme boyası ve saf su ile karıştırılmıştır. Bunun için 4 µL PCR ürünü, 2 µL 6X yükleme boyası ve 6 µL saf su karıştırılarak son hacimde yükleme boyasının konsantrasyonu 1X'e getirilmiştir. DNA markörü olarak 100 bp (NEB) veya 50 bp (GeneRuler, ThermoFisher) markörler kullanılmıştır. Benzer şekilde, jele yüklenmeden önce 1 µL DNA markörü 1 µL 6X yükleme boyası ve 4 µL saf su ile karıştırılmıştır. Hazırlanan PCR örnekleri ve DNA markörü sırayla kuyucuklara yüklendikten sonra anot ve katot uçları güç kaynağına bağlanmıştır. PCR ürünleri agaroz jelde 120 Volt (V)'ta 45 dakika yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazında UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafı alınmıştır.

Genomik ve plazmid DNA'larının izolasyondan sonra konfirmasyon amaçlı görüntülenmesi için ve internal kontrol fragmentlerinin transformasyon sonrası izolasyon kontrolü için de agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. PCR ürünlerinin

elektroforezinden farklı olarak %0,8 agaroz jel kullanılmış, jel hazırlanmasında ve koşu tamponu olarak da 1X TAE tamponu kullanılmıştır. Ayrıca, görüntülenen DNA örneklerinin boyutlarının büyük olması sebebi ile 1 kb DNA markörü (NEB) kullanılmıştır. Yukarıda bahsedilen amaçlarla hazırlanan agaroz jeller, 80 V'ta yaklaşık 1,5 saat yürütülerek UV ışık altında görüntülenmiştir.

3.8. Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR

3.8.1. Kullanılan cihazlar

Real-Time PCR cihazı (Applied Biosystems ViiA7 qRT-PCR, BioRad CFX96)
Sınıf II Biyogüvenlik Kabini (Esco)
Santrifüj (ThermoScientific SL8R)
Mini masaüstü santrifüj (LMS Harmony)
Vorteks (IsoLab Laborgeräte GmbH)
Buz makinesi (Scotsman AF100)

3.8.2. Kullanılan malzemeler

Primerler (Bölüm 3.2.'ye bknz.)
Problar (Bölüm 3.3.'e bknz.)
TaqPath ProAmp Multiplex Master Mix (Thermo-Fisher)
MicroAmp Optical Fast-96 kuyucuklu reaksiyon plakları (Thermo-Fisher)
MicroAmp Optical yapışkan filmler (Thermo-Fisher)
Background ve Region of Interest (ROI) spektral kalibrasyon plağı (Thermo-Fisher)
JUN boyası multipleks PCR için spektral kalibrasyon plağı (Thermo-Fisher)
ABY boyası multipleks PCR için spektral kalibrasyon plağı (Thermo-Fisher)
Mustang Purple boyası multipleks PCR için spektral kalibrasyon plağı (Thermo-Fisher)
FAM boyası multipleks PCR için spektral kalibrasyon plağı (Thermo-Fisher)
JOE-TTTTTTTTTT fragmenti (Sentromer)
10X PCR Buffer II (Applied Biosystems)
dNTP karışımı (10 mM) (ThermoScientific)
MgCl₂ (ThermoScientific)
AmpliAq Gold 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems)
Moleküler biyoloji derecesi saf su (Invitrogen™ UltraPure™- ThermoFisher)
Mikropipetler (2 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL) (Eppendorf Research Plus II)

Pipet uçları (20 µL, 200 µL, 1000 µL) (Eppendorf Dualfilter)
Mikrosantrifüj tüpleri (0,2 mL, 0,6 mL, 1,5 mL, 2 mL) (Axygen)
Parafilm M (Sigma)

3.8.3. Protokol

Primer ve problemlerin test edilmesinde ABI Viia7 ve BioRad CFX96 olmak üzere 2 farklı gerçek zamanlı PCR cihazı kullanılmıştır.

ABI Viia7 gerçek zamanlı PCR cihazının arka fon, ilgi alanı (region of interest), uniformite, normalizasyon kalibrasyonları ve kullanılan tüm floroforlar için kalibrasyonu üreticinin talimatları doğrultusunda yapılmıştır (Applied Biosystems). JOE boyasının kalibrasyonu için JOE-TTTTTTTTTT fragmenti kullanılarak manuel bir kalibrasyon plağı hazırlanmıştır.

ABI Viia7 ile gerçek zamanlı PCR deneylerinde referans boya olarak Mustang Purple kullanılacağından, bu boyayı içeren TaqPath ProAmp Multiplex Master Mix (ThermoFisher) kullanımı tercih edilmiştir. Bu karışımın içerisinde sıcaklık ile aktive edilen (hot-start) Dual-Lock™ Taq Polimeraz enzimi bulunmaktadır. Ayrıca, taşıma (carry-over) kontaminasyonunu engellemek amacıyla sıcaklığa duyarlı urasil-N-glikozilaz (UNG) enzimi ve deoksi-urasil trifosfat (dUTP) da içermektedir.

Her iki cihazda da yürütülen çalışmalarda birim reaksiyon için kullanılan malzemelerin miktarı Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Gerçek zamanlı PCR testlerinde birim reaksiyon için kullanılan malzemeler ve miktarları

Bileşen	ABI Viia 7	BioRad CFX96
TaqPath ProAmp Multiplex Master Mix	5 µL	10 µL
Hedef DNA	30 ng	30 ng – 210 ng
Primer	0,3 µM	0,3 µM
Prob	0,15 µM	0,15 µM
Nükleaz içermeyen su	Hacmi 10 µL’ye tamamlayacak kadar	Hacmi 20 µL’ye tamamlayacak kadar
Total hacim	10 µL	20 µL

Çizelge 3.7'ye göre DNA harici tüm bileşenler gerekli reaksiyon sayısının %10 fazlasına yetecek miktarda karıştırıldıktan sonra 96 kuyucuklu reaksiyon plaklarına uygun hacimde dağıtılmıştır. Her bir kuyucuğa gerekli hedef DNA eklendikten sonra yapışkan film ile plağın üstü kapatılmıştır. Kuyucukların içeriğinin duvarlarda kalmaması ve hava kabarcıklarının elimine edilmesi için plak kısaca santrifüjlenerek gerçek zamanlı PCR cihazına yerleştirilmiştir. Daha önce konvansiyonel PCR ile optimizasyon çalışmalarında da uygulanan reaksiyon koşulları, TaqMan problemlerinin test edilmesinde de uygulanmış ancak daha sonraki denemelerde döngü sayısının 35'ten 45'e çıkarılması uygun görülmüştür. Buna göre, uygulanan reaksiyon koşulları aşağıdaki gibidir:

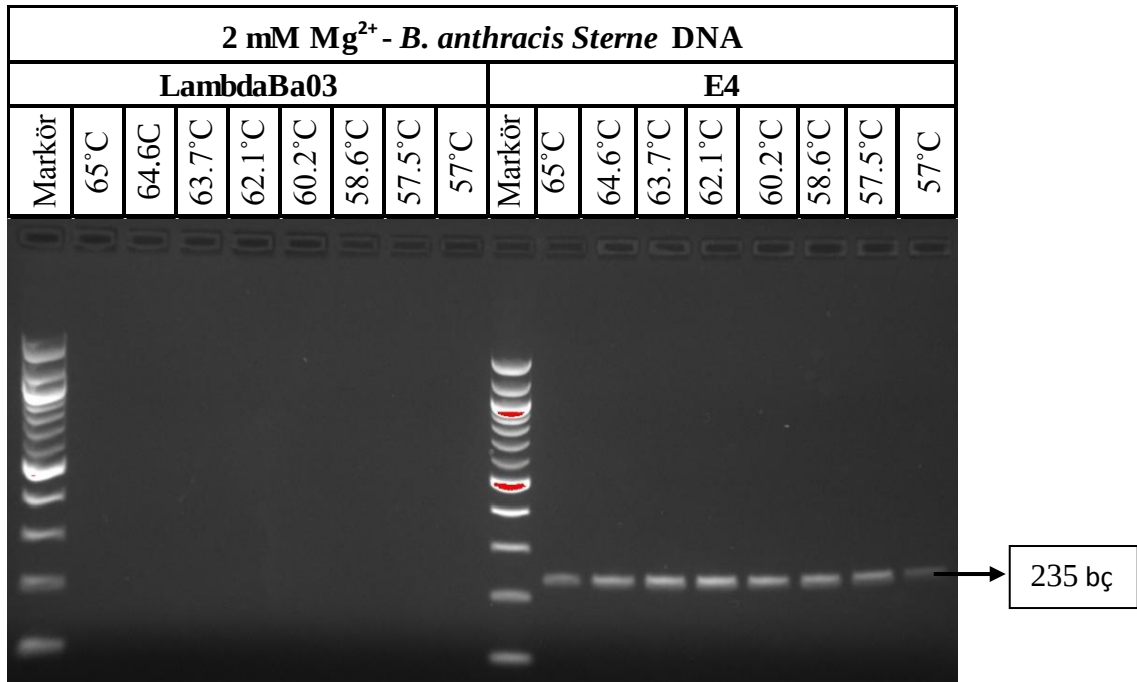
95°C	10 dk.	} X 45
95°C	1 dk.	
60°C	30 sn.	
72°C	1 dk.	
72°C	5 dk.	
4°C	∞	

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Primer Çiftleri Çalışma Koşullarının Konvansiyonel PCR ile Optimizasyonu

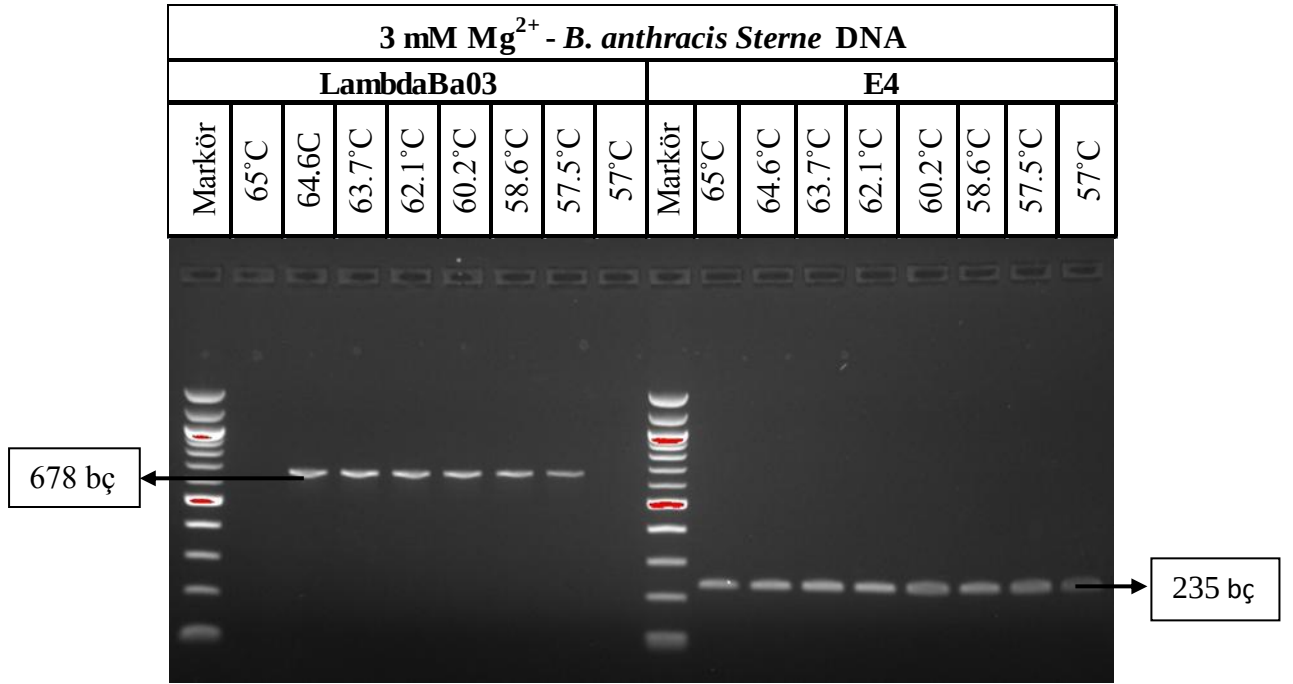
4.1.1. Genomik bölge primerleri

Her iki set içerisinde yer alan primerler için (her primer çifti için ayrı ayrı olmak üzere) uygun bağlanma sıcaklığı ve magnezyum konsantrasyonu değerleri, bu parametreler için gradyan oluşturularak (Bknz. Çizelge 3.4) tespit edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %1,5 agaroz jelde yürütüldükten sonra alınan sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.



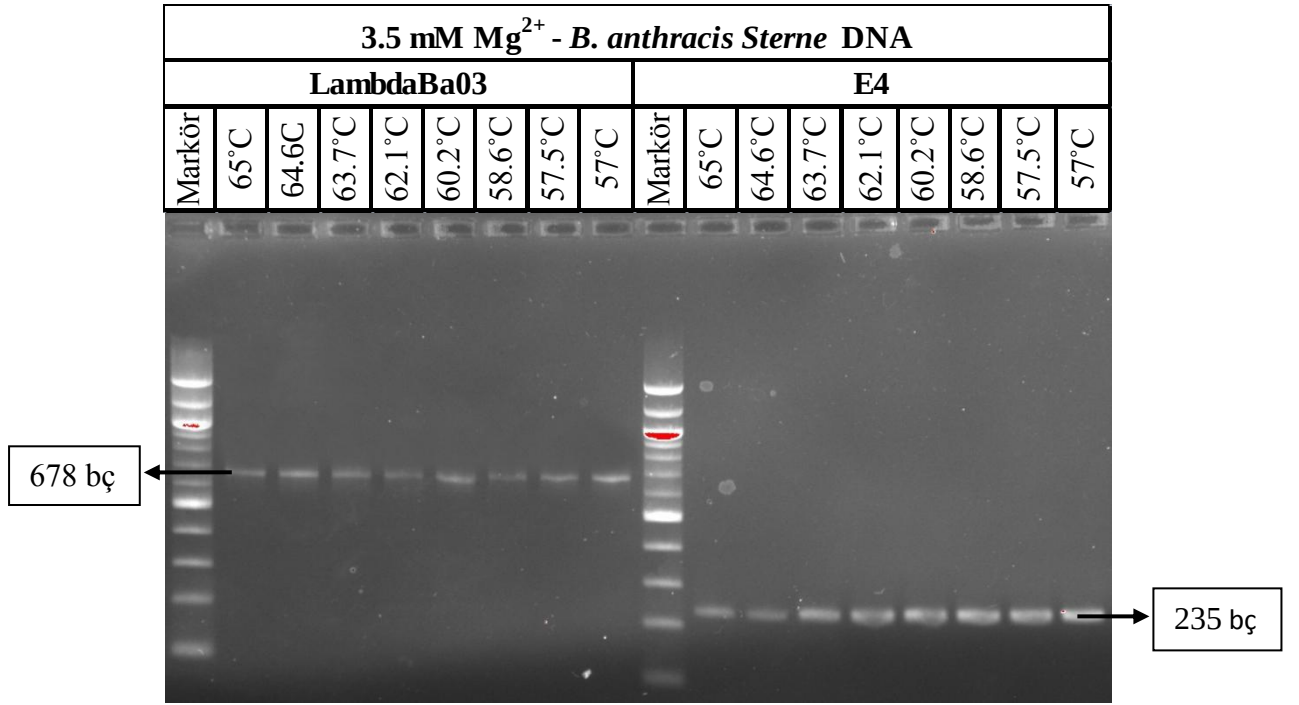
Şekil 4.1. 2 mM MgCl₂ varlığında genomik bölge primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: NEB, 100 bç DNA markörü)

2 mM MgCl₂ konsantrasyonunda LambdaBa03 primerlerinin çalışmadığı, E4 primerlerinin ise çalıştığı gözlemlendi (Şekil 4.1). 235 bç büyüklüğünde, E4 hedef bölgesi elde edildi. Multipleks PCR koşulları, tek hedef bölgeye yönelik reaksiyonlara kıyasla çok daha yüksek magnezyum konsantrasyonları gerektirmektedir. Bu nedenle LambdaBa03 primerleri 5 mM magnezyum konsantrasyonunda 60°C’de hedef bölgeye optimal olarak bağlanacak şekilde tasarlanmıştır. Reaksiyon içerisindeki magnezyum miktarı azaldıkça primerlerin T_m değeri de düşüş göstermektedir. Dolayısıyla, 2 mM magnezyum varlığında bu primerlerin ürün oluşturmaması, belirlenen sıcaklık değerleri aralığının bu primerler için uygun bağlanma koşullarını sağlamadığını düşündürmektedir.



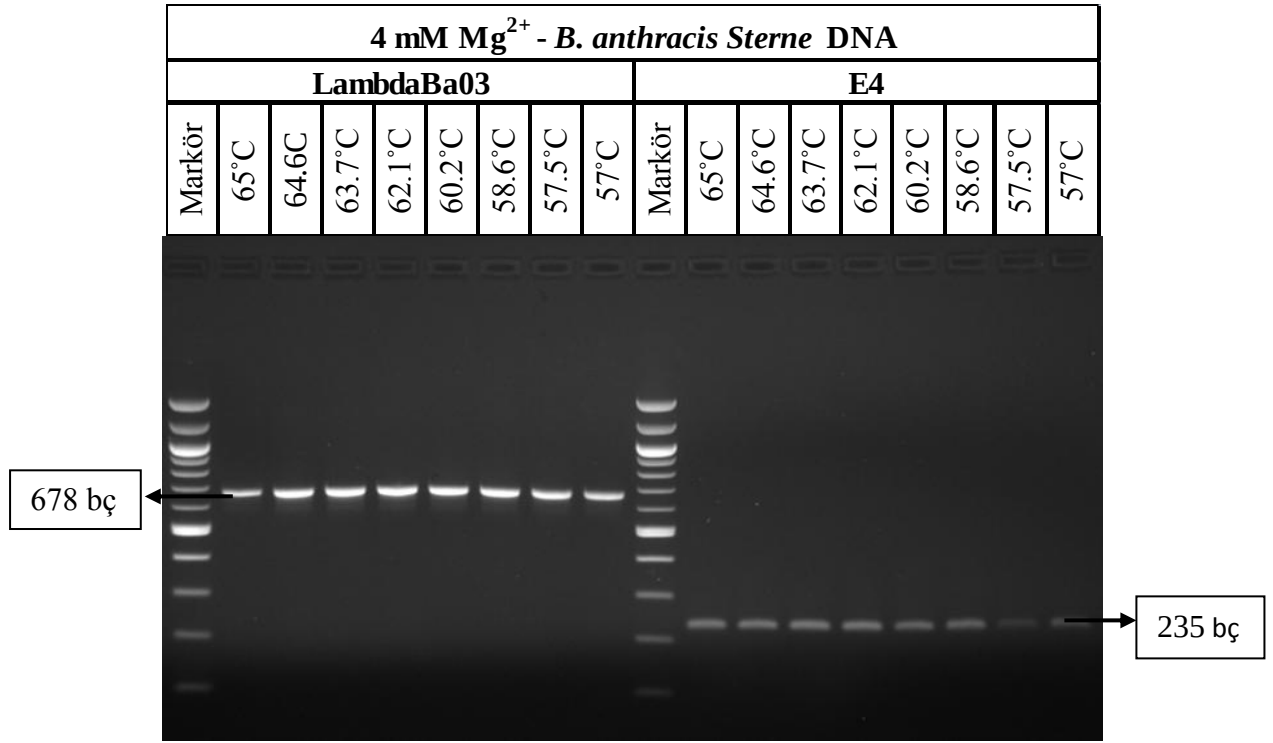
Şekil 4.2. 3 mM MgCl₂ varlığında genomik bölge primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: NEB, 100 bç DNA markörü)

3 mM MgCl₂ konsantrasyonunda 678 bç büyüklüğünde LambdaBa03 ve 235 bç büyüklüğünde E4 hedef bölgeleri elde edildi (Şekil 4.2). LambdaBa03 primerlerinin 65°C ve 57°C’de ürün oluşturmadığı gözlemlenmektedir. 2 mM magnezyum varlığında yapılan PCR sonuçlarından da görüldüğü üzere, LambdaBa03 primerleri magnezyum konsantrasyonuna daha duyarlı olarak bağlanma gerçekleştirmektedir. 3 mM magnezyum varlığında 57°C primerlerin bağlanması için yetersiz kalırken, 57,5°C’de bağlanma meydana gelmektedir. Öte yandan, yüksek sıcaklıklarda primerler termodinamik açıdan kararsız hale gelip erir (Rychlik ve ark. 1990). Bu yüzden yüksek sıcaklıklar primerlerin hedef bölgeye bağlanmasını engellemektedir. Reaksiyon ortamındaki magnezyum miktarı ise primerlerin erime sıcaklığını yükselterek onları daha kararlı hale getirmektedir (Owczarzy ve ark. 2008). Bu iki parametrenin etkileşimi sonrasında 3 mM magnezyum konsantrasyonunda 65°C’de LambdaBa03 primerlerinin hedef bölgeye bağlanamadığı görülmektedir.



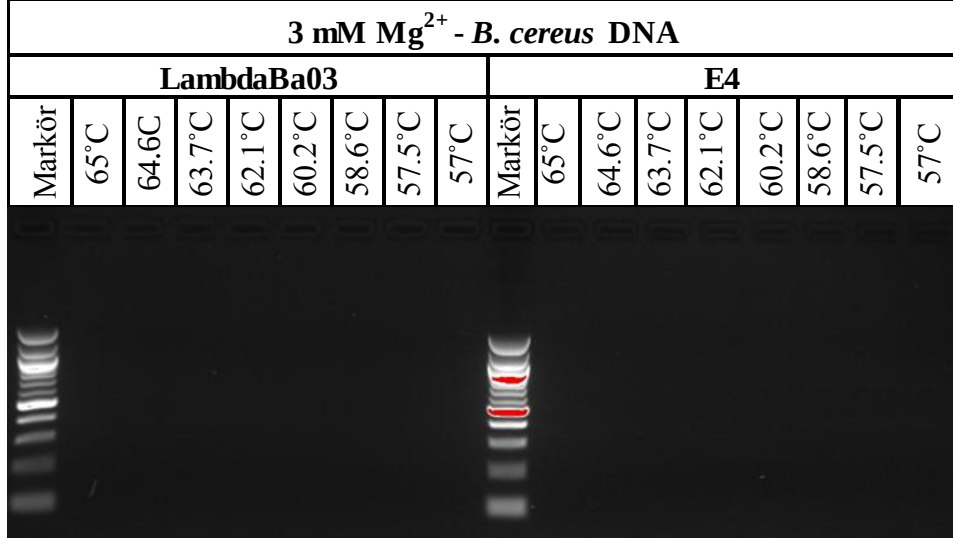
Şekil 4.3. 3,5 mM MgCl₂ varlığında genomik bölge primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: NEB, 100 bç DNA markörü)

3,5 mM magnezyum konsantrasyonunda hem LambdaBa03 hem de E4 primerleri test edilen tüm sıcaklık derecelerinde başarılı bir şekilde ürün oluşturmuştur. Şekil 4.3'te görüldüğü üzere 678 bç uzunluğunda LambdaBa03 hedef bölgesi ve 235 bç uzunluğunda E4 hedef bölgesi agaroz jelde görüntülenmektedir.



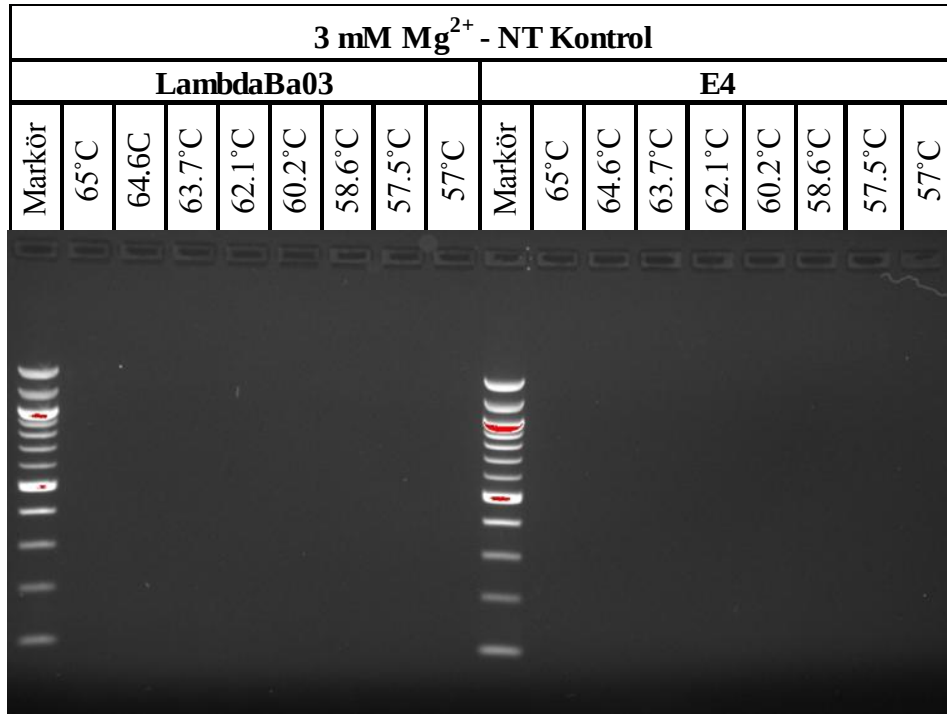
Şekil 4.4. 4 mM MgCl₂ varlığında genomik bölge primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: NEB, 100 bç DNA markörü)

4 mM magnezyum içeren reaksiyonlarda da hem LambdaBa03 hem de E4 primerlerinin hedef bölgelere bağlandığı gözlemlenmektedir (Şekil 4.4) Ancak, bant kalınlıklarına bakıldığında E4 primerlerinin daha ince ve az ışık yoğunluğunda bantlar oluşturduğu görülmektedir. Agaroz jelde görüntülenen bant kalınlıkları örneğin içerdiği DNA miktarı ile doğru orantılıdır. PCR sonucu oluşan DNA miktarı ise primerlerin belirtilen koşullarda hedef bölgeye bağlanma etkinliğinin ölçütü olarak kullanılır (Booth ve ark. 2010). Dolayısıyla denenen tüm magnezyum konsantrasyonlarıyla karşılaştırma yapıldığında E4 primerlerinin en etkili şekilde hedef bölgeye bağlandığı durum 3 mM magnezyum konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. LambdaBa03 primerleri içinse en kalın ve ışık yoğunluğu fazla bantlar 4 mM magnezyum konsantrasyonunda elde edilmiştir.



Şekil 4.5. *Bacillus cereus* ATCC 14579 genomik DNA'sı ve *B. anthracis* genomik bölge primerleri kullanılarak yürütülen gradyan PCR çalışması. (Markör: NEB, 100 bp DNA markörü)

LambdaBa03 ve E4 primerlerinin *B. anthracis*'e özgünlüğünü göstermek amacıyla ilk etapta *Bacillus cereus* standart suşu olan ATCC 14579 suşu genomik DNA'sı kullanılarak PCR çalışması yürütülmüştür. Bunun sonucunda her iki primerin de *B. cereus* DNA kaynağı olarak kullanıldığında hiç bir bölgeye bağlanmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.5)



Şekil 4.6. Negatif kontrol amaçlı, DNA örneği içermeyen PCR çalışması. (Markör: NEB, 100 bp DNA markörü) (NT: “Non-template”, DNA örneği içermeyen)

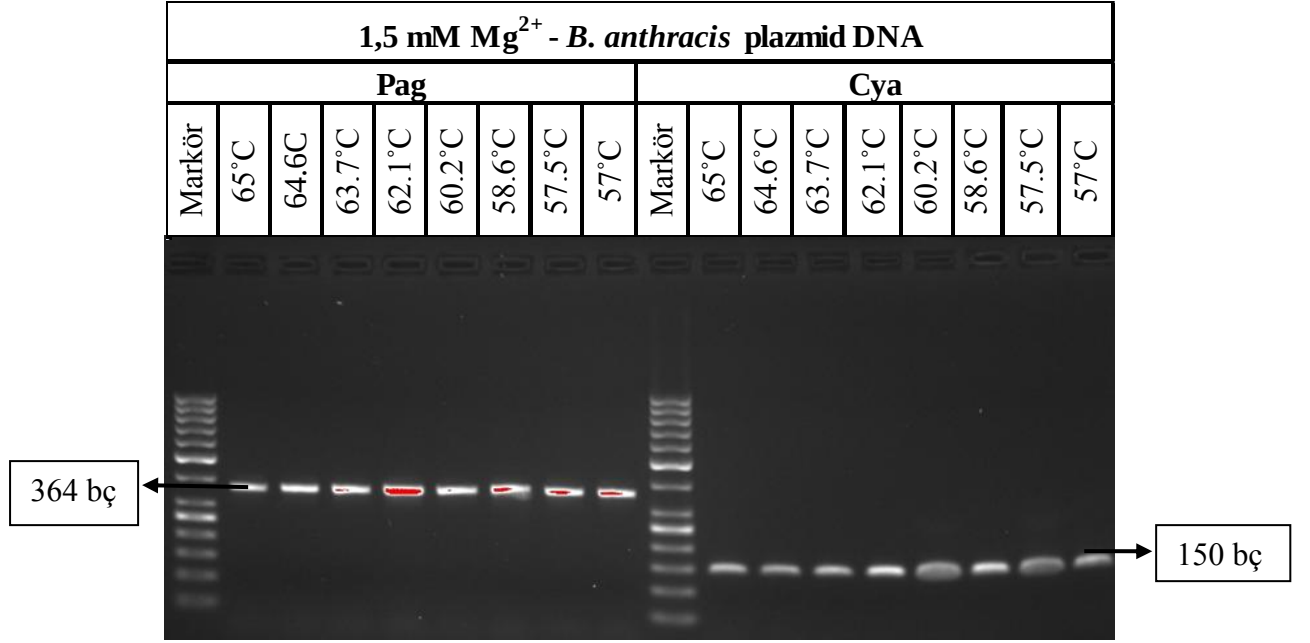
PCR deneylerinde, DNA haricinde kullanılan tüm reaksiyon bileşenlerinin bir önceki PCR reaksiyon ürünleri ile veya yabancı DNA ile kontamine olmamış olması, elde edilen DNA bantlarının doğrudan yapılmış PCR çalışması sonucu oluştuğunu göstermesi açısından önemlidir. Bu sebeple, DNA örneği eklenmemiş reaksiyonlar DNA kontaminasyonu varlığını test etmek amacıyla her çalışmada yürütülmektedir. Şekil 4.6’da gösterilen sonuç, kullanılan PCR bileşenlerinde DNA kontaminasyonu olmadığını kanıtlamaktadır.

4.1.2. pXO1 primerleri

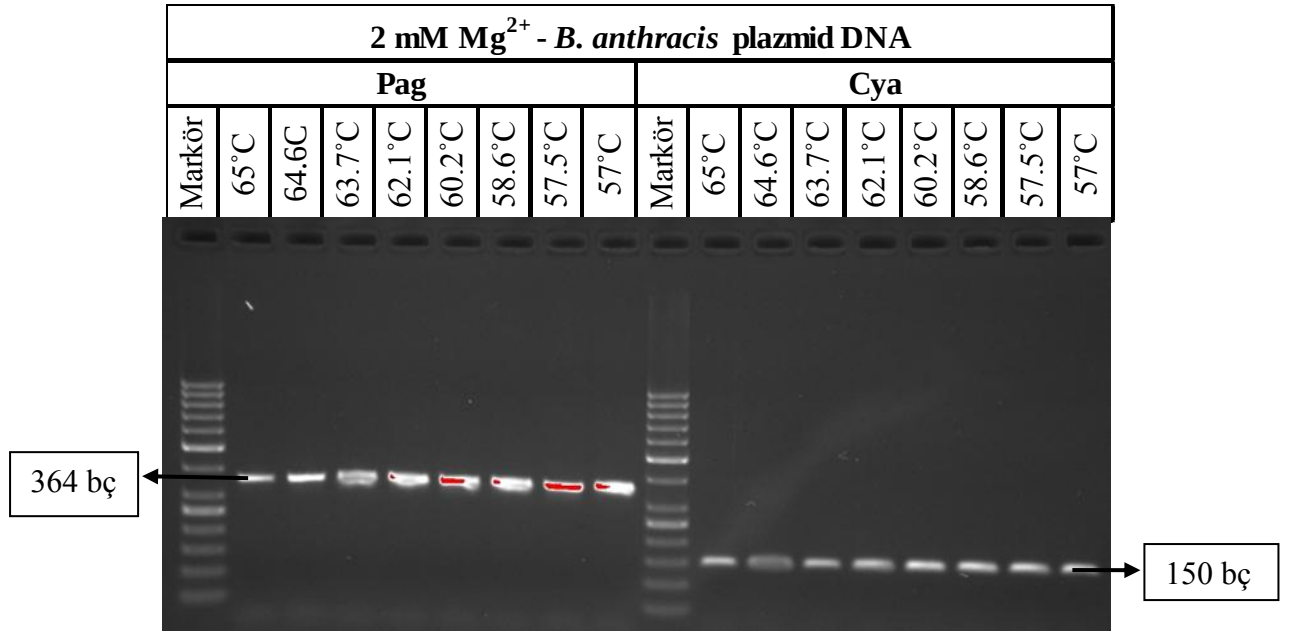
Hem literatür hem de dizayn seti içerisindeki pXO1 plazmidi üzerindeki bölgeleri hedefleyen primerler sıcaklık ve magnezyum gradyanı oluşturularak PCR ile test edildi (Bknz. Çizelge 3.5). PCR sonucunda elde edilen ürünler %1,5 agaroz jelde yürütülerek aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Sırasıyla Şekil 4.7 – Şekil 4.11’e kadar sonuçlar incelendiğinde artan magnezyum konsantrasyonlarında tüm reaksiyon sıcaklıklarında Pag ve Cya primerlerinin hedef bölgelerine bağlanarak beklenen uzunluklarda (Pag primerleri hedef bölge uzunluğu: 364 bp, Cya primerleri hedef bölge uzunluğu: 150 bp) ürün oluşturduğu görülmektedir. Magnezyum konsantrasyonları arttıkça optimal reaksiyon sıcaklığının genel olarak yükselme eğiliminde

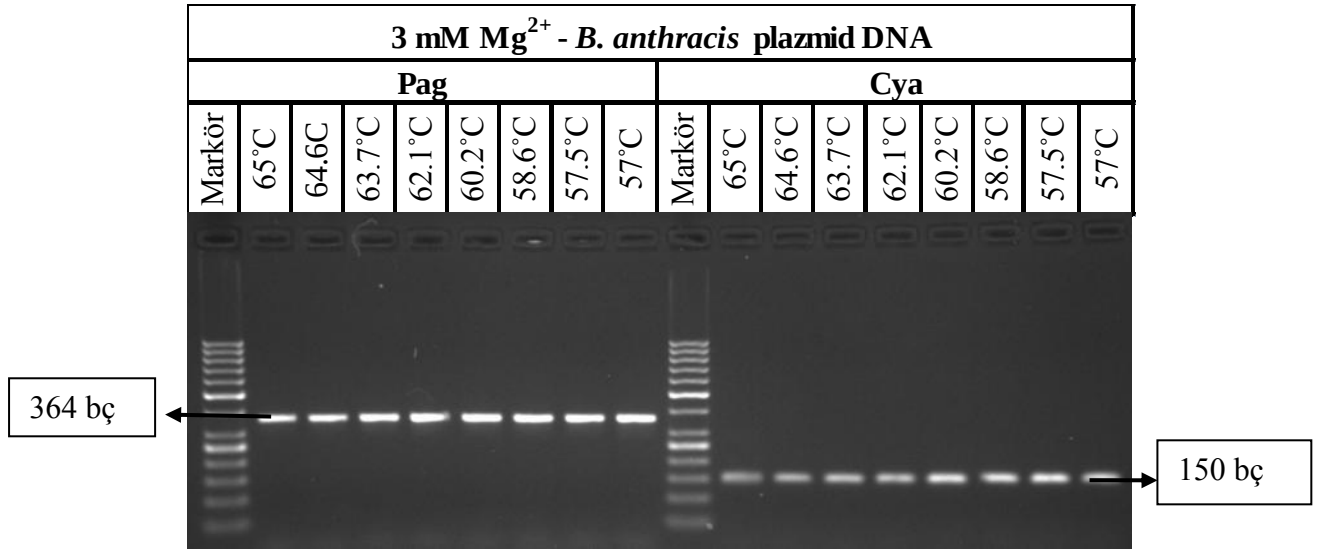
olduğu, elde edilen bant kalınlıklarından çıkarılabilir olsa da bu durum anlamlı bir fark oluşturmamaktadır.



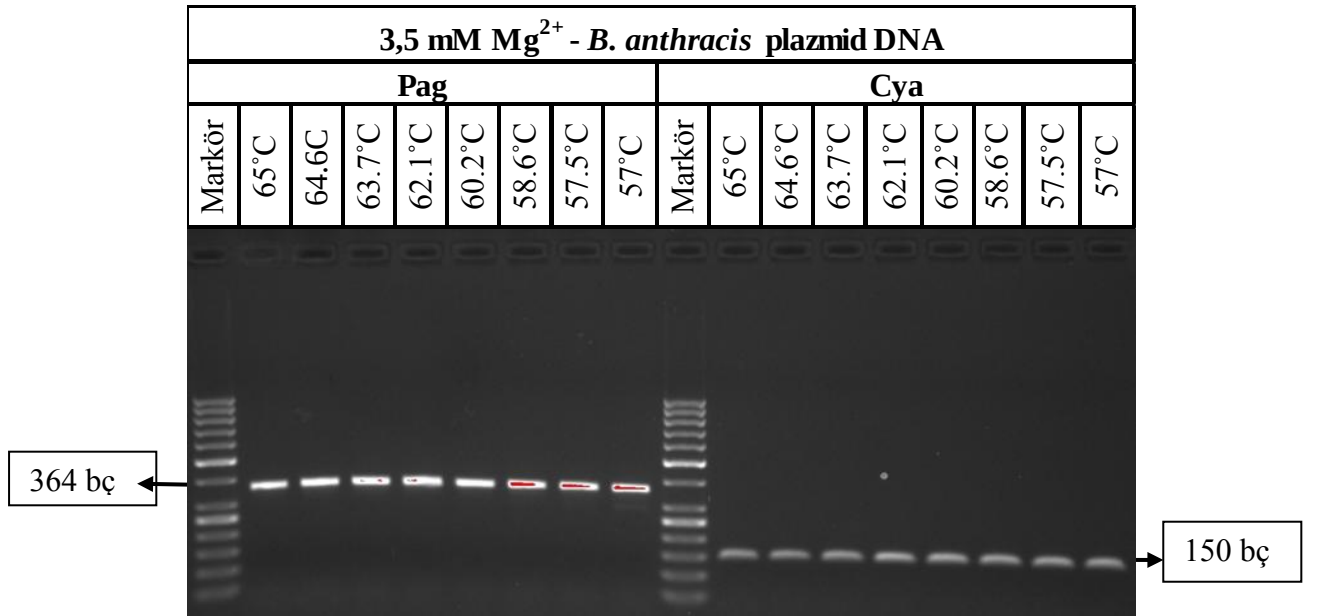
Şekil 4.7. 1,5 mM MgCl₂ varlığında pXO1 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)



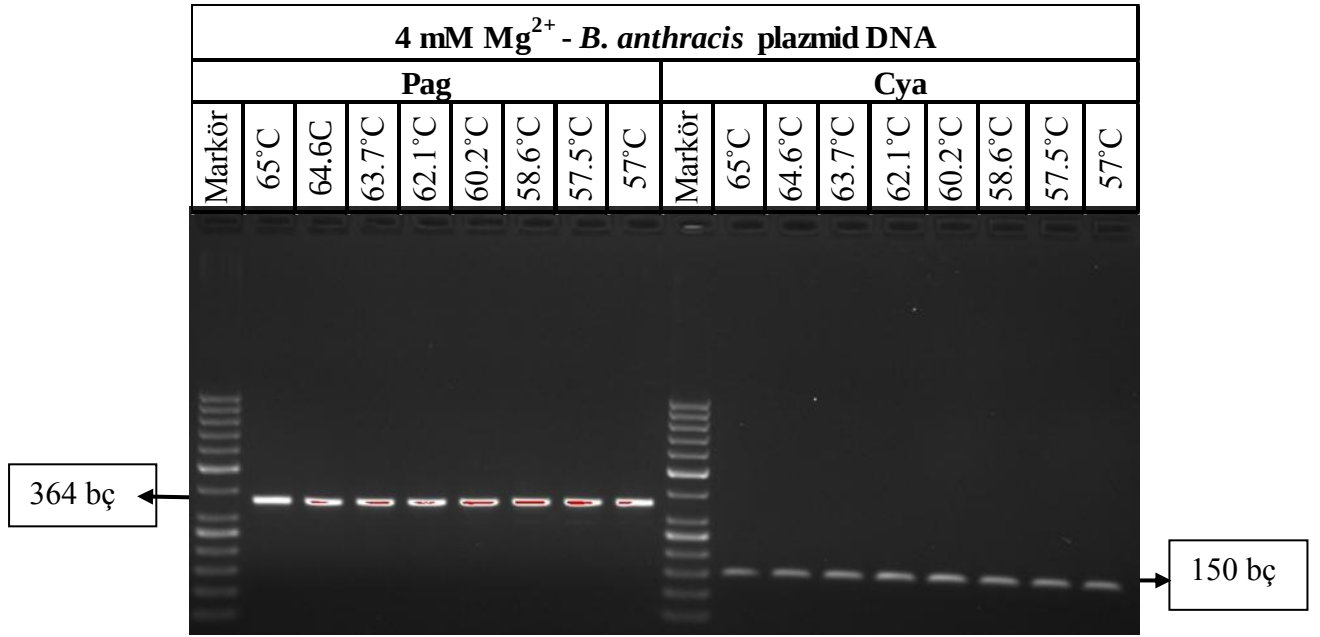
Şekil 4.8. 2 mM MgCl₂ varlığında pXO1 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)



Şekil 4.9. 3 mM MgCl₂ varlığında pXO1 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)



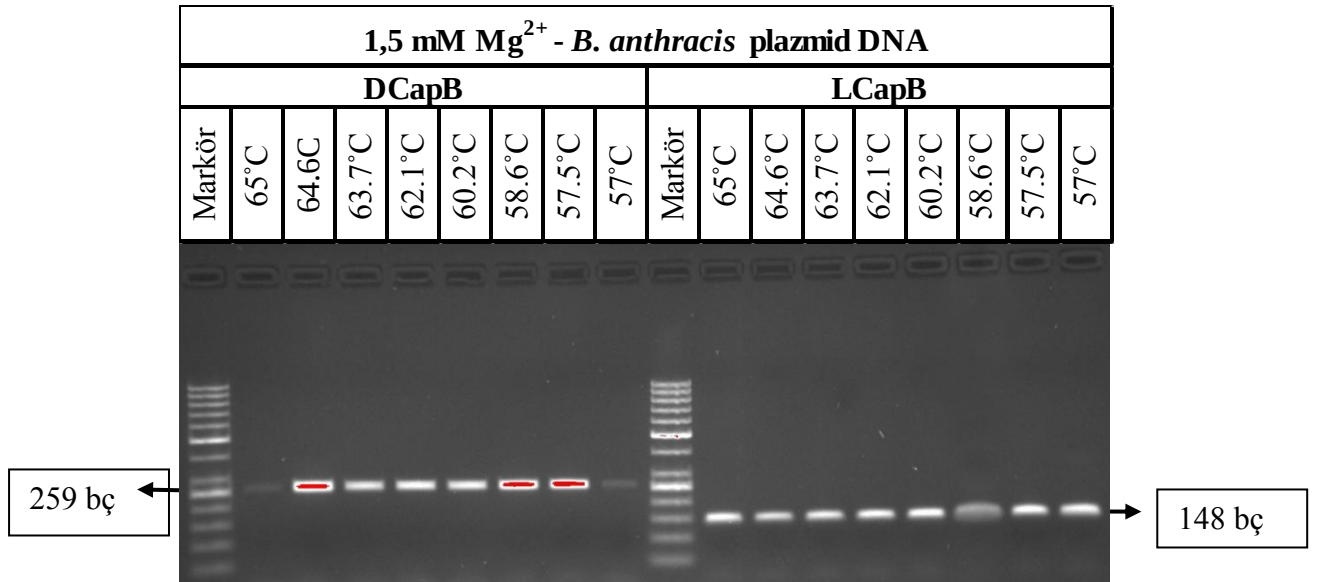
Şekil 4.10. 3,5 mM MgCl₂ varlığında pXO1 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)



Şekil 4.11. 4 mM MgCl₂ varlığında pXO1 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)

4.1.3. pXO2 primerleri

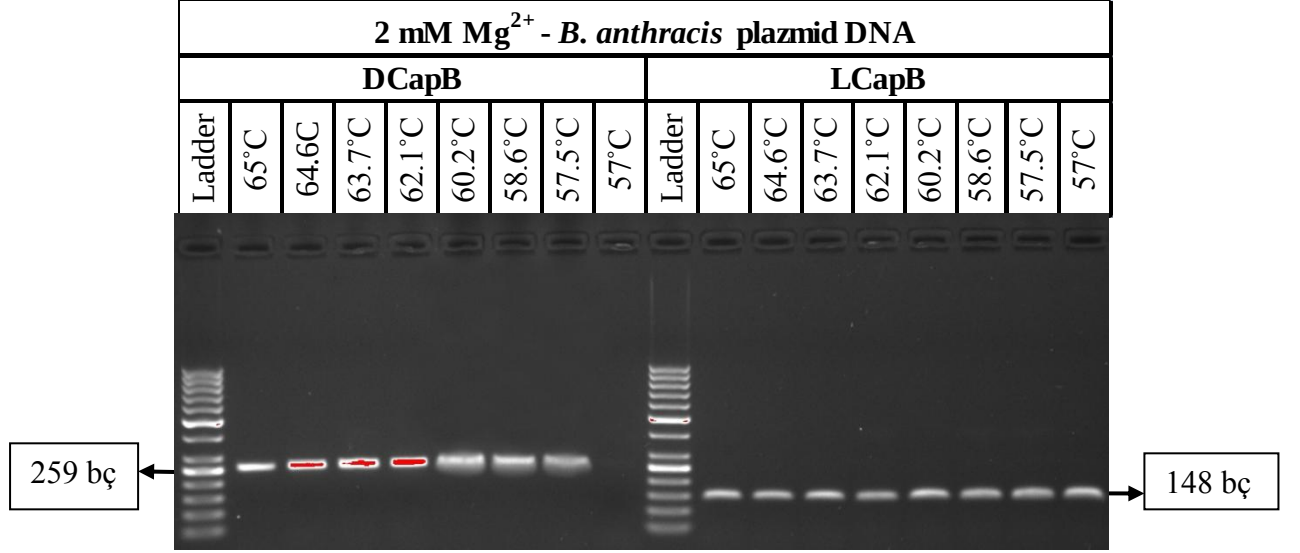
Genomik bölge ve pXO1 primerlerinin optimizasyonunda kullanılan metodoloji pXO2 primerleri için de izlenmiştir. Sıcaklık ve magnezyum gradyanı şeması Çizelge 3.6'da gösterilmektedir. Yürütülen PCR çalışması sonuçları %1,5 agaroz jelde görüntülenmiştir.



Şekil 4.12. 1,5 mM MgCl₂ varlığında pXO2 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)

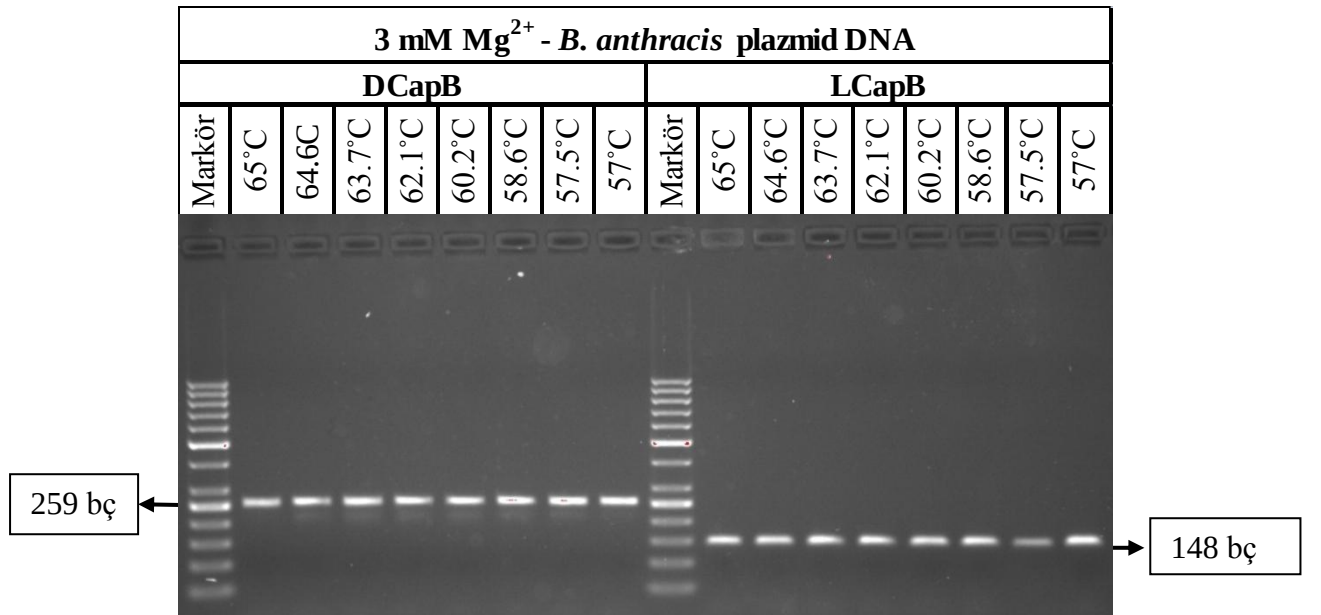
1,5 mM magnezyum içeren reaksiyonlara bakıldığında LCapB primerlerinin test edilen tüm sıcaklık değerlerinde hedef DNA'ya bağlanarak 148 bç uzunluğunda DNA

fragmentleri ürettiği görülürken, DCapB primerlerinin 57°C ve 65°C’de verimli bir şekilde bağlanma gerçekleştiremediği bu sıcaklık değerlerinde yürütülen reaksiyonlardan silik görünümlü DNA bantları elde edilmesinden anlaşılmaktadır (Şekil 4.12).



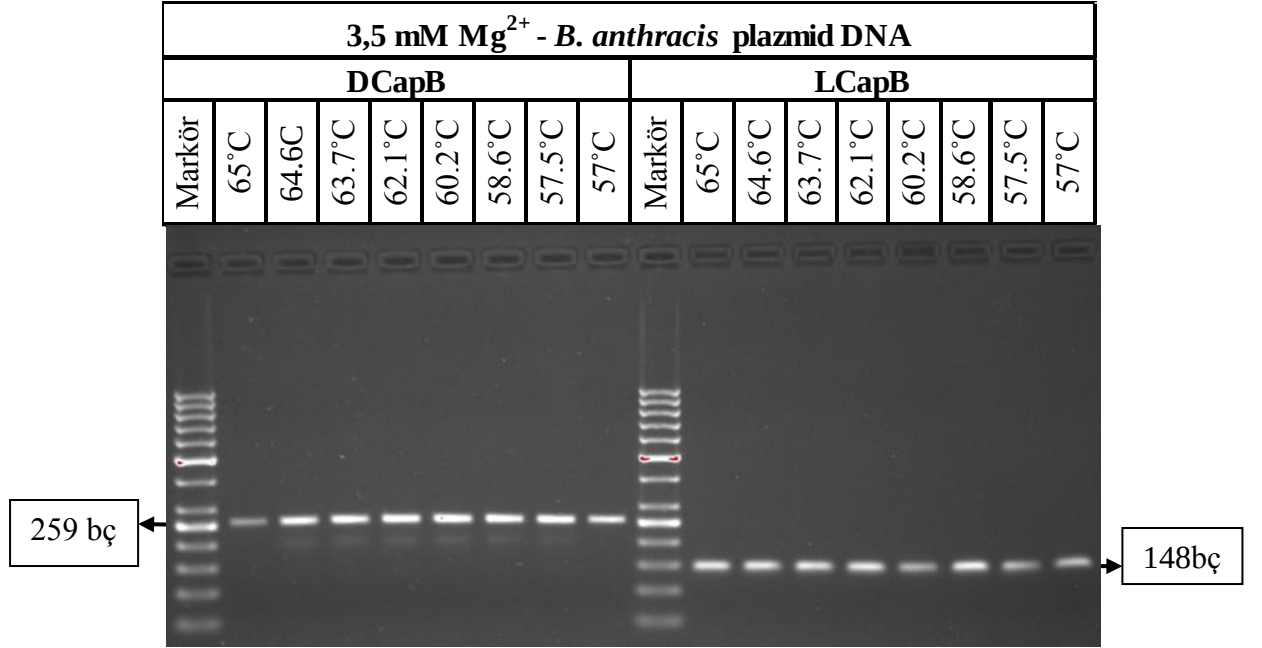
Şekil 4.13. 2 mM MgCl₂ varlığında pXO₂ primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)

2mM magnezyum konsantrasyonunda DCapB ve LCapB primerleri beklenen DNA ürünlerini oluşturmakta, ancak 57°C’de DCapB primerlerinin hedef DNA’ya bağlanma veriminin çok düşük olduğu görülmektedir (Şekil 4.13).

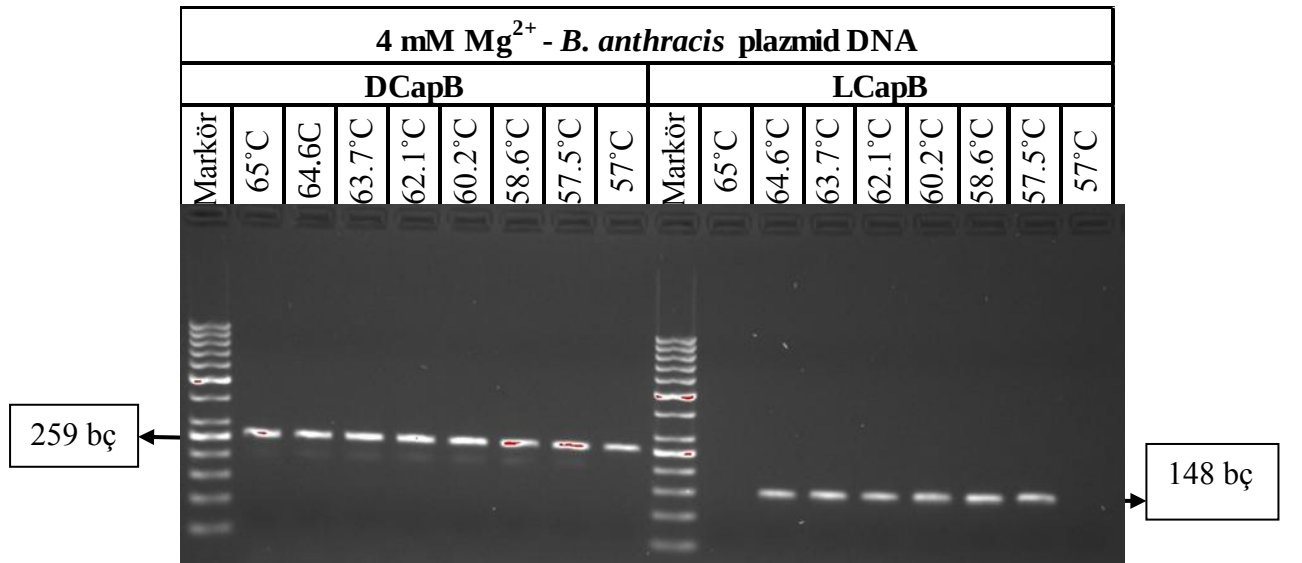


Şekil 4.14. 3 mM MgCl₂ varlığında pXO₂ primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)

Magnezyum konsantrasyonu 3 mM'a çıkarıldığında hem DCapB, hem de LCapB primerlerinin tüm reaksiyon sıcaklıklarında hedef bölgelerine etkili bir şekilde bağlandığı görülmektedir. Ancak artan magnezyum konsantrasyonu sonucu DCapB primerlerinin kısmi oranda özgün olmayan bağlanma da gerçekleştirdiği asıl PCR ürünü olan 259 bp uzunluğundaki DNA bantlarının altında görülen silik bant görünümünden anlaşılmaktadır (Şekil 4.14)



Şekil 4.15. 3,5 mM MgCl₂ varlığında pXO2 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bp DNA markörü)



Şekil 4.16. 4 mM MgCl₂ varlığında pXO2 primerleri için gradyan PCR çalışması. (Markör: Thermofisher Generuler 50 bp DNA markörü)

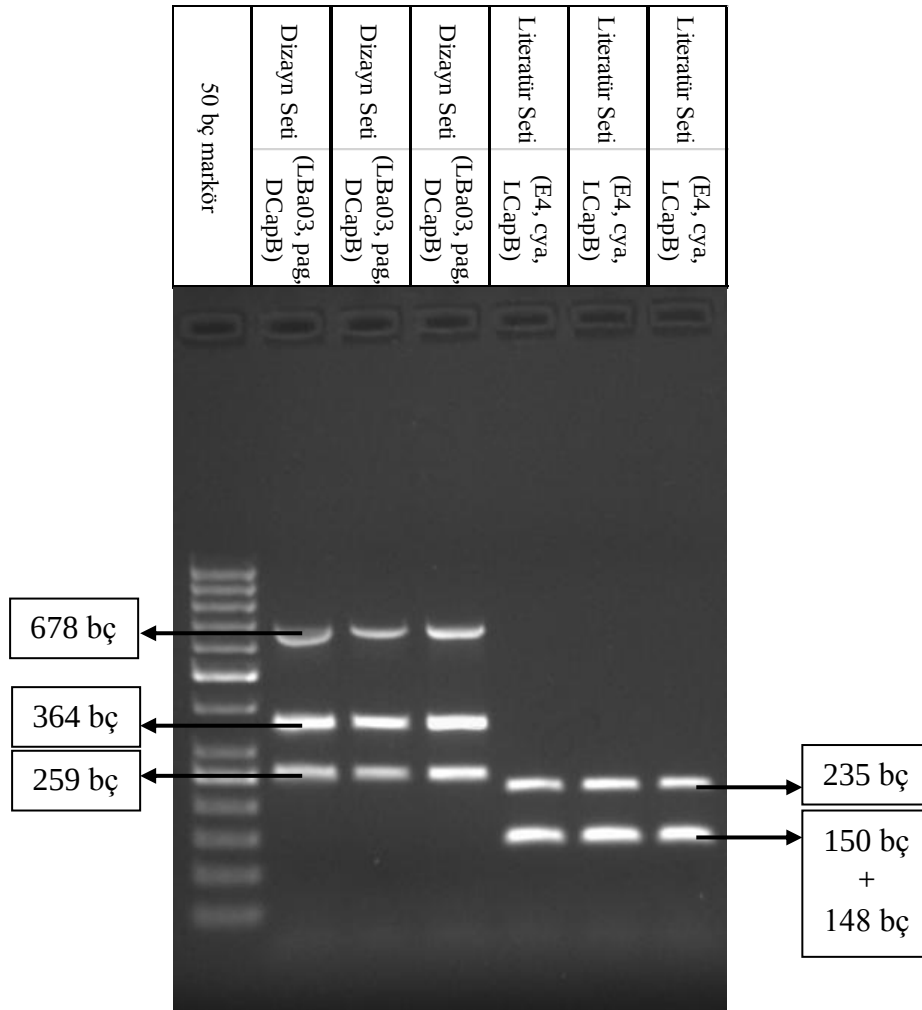
3,5 mM (Şekil 4.15) ve 4 mM (Şekil 4.16) magnezyum içeren reaksiyon sonuçlarına bakıldığında DCapB primerlerinde hedef bölgeye bağlanmanın yanında özgün olmayan bağlanma sonucu oluşan DNA bantları görülmeye devam etmektedir. Bu durum yüksek magnezyum miktarının spesifik olmayan bağlanmalara sebep olması ile açıklanabilir (Lorenz 2012). Ancak, hedef bölgeye bağlanmanın yüksek verimle gerçekleşiyor olması ve multipleks düzende PCR yürütüldüğü zaman diğer primer çiftlerinin de ortamdaki magnezyumu kullanacak olması sebebiyle özgün olmayan bağlanmanın önüne geçilebileceği düşünülmektedir.

LCapB primerlerinin 3,5 mM magnezyum konsantrasyonunda tüm sıcaklık değerlerinde beklenen 148 bp boyutundaki DNA ürünlerini oluşturduğu, ancak 4 mM magnezyum konsantrasyonuna çıkıldığında 57°C ve 65°C reaksiyon sıcaklıklarında hedef bölgeye bağlanmada başarısız olduğu görülmektedir (Şekil 4.16). Yine yüksek magnezyum miktarının primerlerin stabilitesini yükseltmesi sebebiyle (Owczarzy ve ark. 2008) 57°C’de bağlanmayı engellemesi ve 65°C sıcaklığın primer ve hedef DNA bölgesindeki bazların arasında hidrojen bağları kurulmasını engellemesi sebebiyle ürün oluşmadığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, dizayn grubu primerlerinden oluşan multipleks PCR kiti için, kromozomal primerlerin en iyi sonuç verdiği 4 mM magnezyum değerinde pXO1 ve pXO2 primerlerinin de verimli bağlanma gerçekleştirmesi sebebiyle, multipleks PCR reaksiyonu denemesi için bu değer seçilmiştir. Aynı şekilde literatür grubu primerlerinin olduğu kit için ise bu gruptaki kromozomal (E4) primerlerinin en verimli bağlanma gerçekleştirdiği 3 mM magnezyum konsantrasyonu değeri seçilmiştir. Her iki multipleks kit için de reaksiyon sıcaklığı olarak tüm primer çiftlerinin ürün oluşturduğu ortalama bir sıcaklık değeri olan 60°C değeri seçilmiştir.

4.2. Konvansiyonel PCR ile Oluşturulan Multipleks PCR Kitlerinin Test Edilmesi

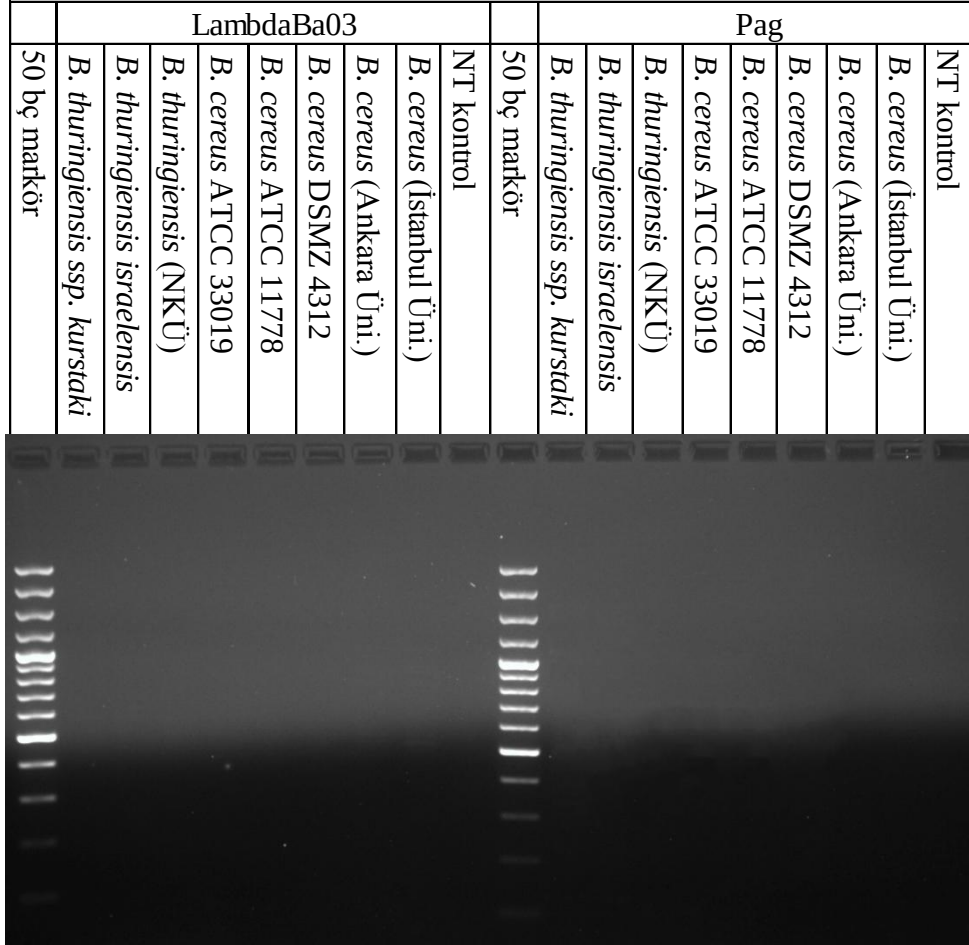
LambdaBa03, Pag ve DCapB primerlerinden oluşan dizayn seti ve E4, Cya ve LCapB primerlerinden oluşan literatür seti ile 3'lü multipleks düzende PCR yürütülmüş, hedef DNA örneği olarak Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'nden elde edilen, tam virulent *B. anthracis* kültüründen izole edilmiş genomik DNA ve plazmid DNA'sı kullanılmıştır. Dizayn seti için magnezyum konsantrasyonu 4 mM, literatür seti içinse 3 mM olacak şekilde ayarlanmıştır. Reaksiyon bağlanma sıcaklığı 60°C'dir. PCR sonuçları %1,5 agaroz jelde yürütülmüştür. Şekil 4.17'de görülen jel sonuçlarına göre her iki multipleks PCR kiti de beklenen DNA bantlarını üreterek başarıyla tüm hedef bölgelerini tanımaktadır. Literatür setinde yer alan Cya ve LCapB primerlerinin oluşturdukları ürünler (sırasıyla 150 bç ve 148 bç) arasında çok küçük uzunluk farkı olması sebebiyle agaroz jelde ayrımları sağlanamamaktadır.



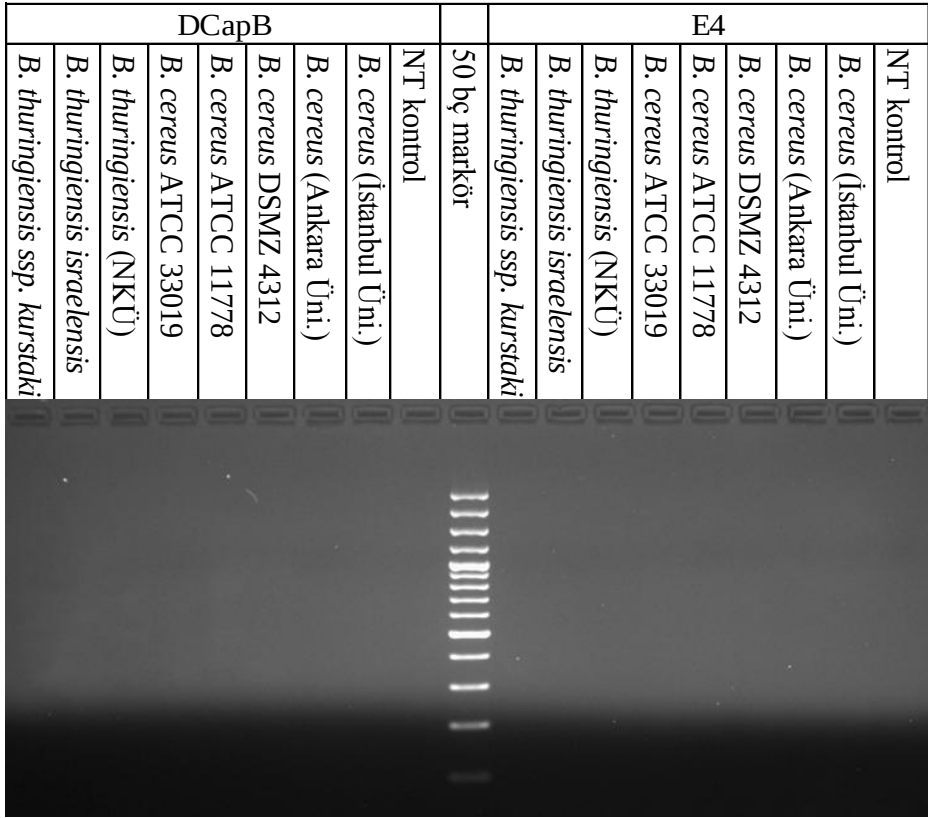
Şekil 4.17. Multipleks PCR kitlerinin konvansiyonel PCR ile testi (Markör: Thermofisher Generuler 50 bç DNA markörü)

4.3. Primerlerin Özgünlüğünün Konvansiyonel PCR ile Test Edilmesi

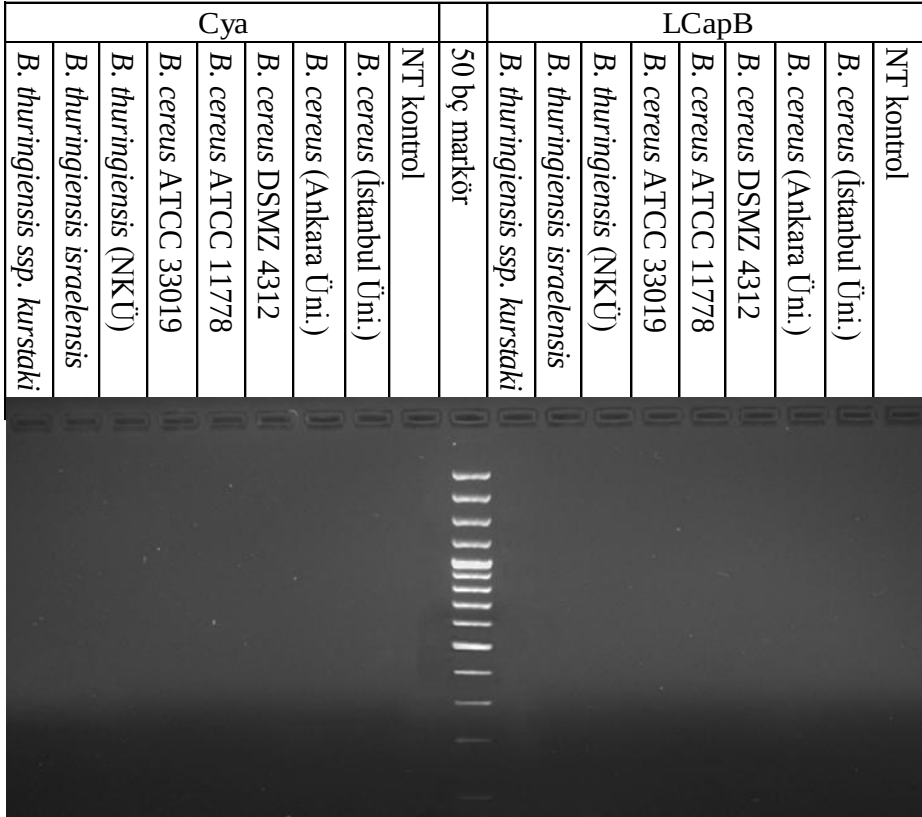
Tüm primer çiftlerinin yalnızca *B. anthracis*'e özgü olduğunun gösterilmesi amacıyla her bir primer çifti ayrı ayrı olarak 8 farklı *B. cereus* grubu suşu üzerinde denenmiş, alınan sonuçlar Şekil 4.18, 4.19 ve 4.20'de gösterilmektedir. Beklendiği üzere hiç bir primer çifti farklı basil türlerinden elde edilen DNA örneklerine bağlanarak çapraz reaksiyon göstermemiştir.



Şekil 4.18. LambdaBa03 ve Pag primerlerinin *Bacillus* grubu türleriyle çapraz bağlanma kontrolü



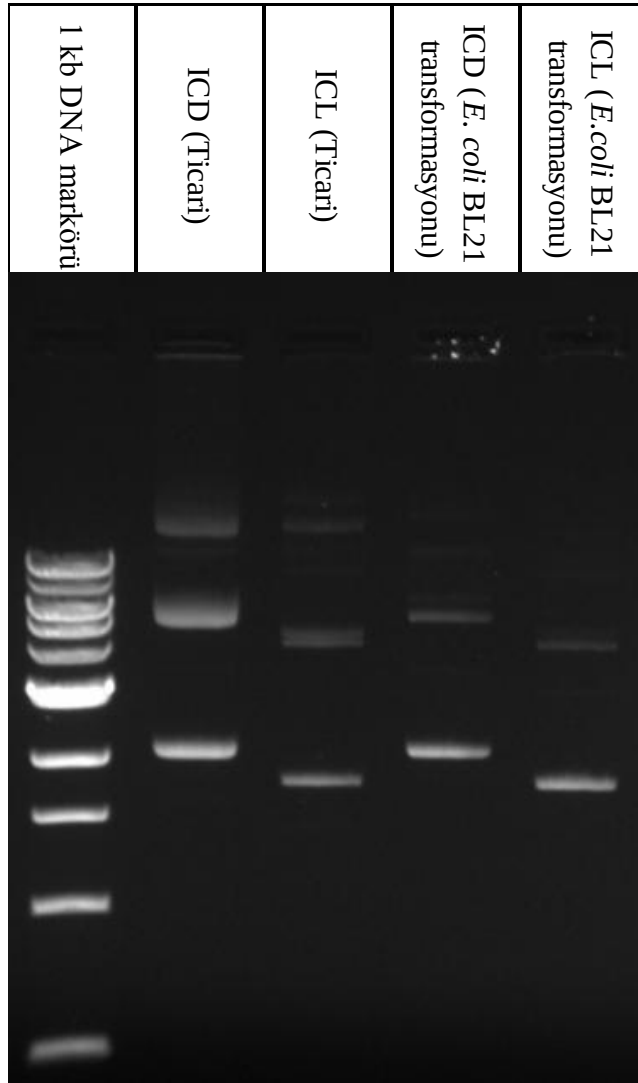
Şekil 4.19. DCapB ve E4 primerlerinin *Bacillus* grubu türleriyle çapraz bağlanma kontrolü



Şekil 4.20. Cya ve LCapB primerlerinin *Bacillus* grubu türleriyle çapraz bağlanma kontrolü

4.4. Internal Kontrol Fragmentlerinin *E.coli* BL21 Suşuna Aktarılarak Çoğaltılması

ICD ve ICL fragmentlerini içeren pUC57 vektörlerini çoğaltmak için *E. coli* BL21 hattına elektroporasyon yoluyla transformasyon yapılmıştır. pUC57 vektörü ampisilin direnç geni içerdiğinden yalnızca başarılı bir şekilde transforme olmuş *E. coli* hücreleri ampisilinli LB agarda büyüebilmektedir. Bu sayede pUC57 ile başarılı şekilde transforme olmuş bakteriler ampisilin içeren LB agar üzerinde seçilebilmektedir. Daha sonra elde edilen kolonilerden plazmid izolasyonu yapılarak agaroz jel elektroforezi ile ticari örneklerle karşılaştırılmıştır (Şekil 4.21). Buna göre *E.coli* BL21 hattından transformasyon sonrası izole edilen plazmid örnekleri, ticari ICD ve ICL fragmentlerini içeren pUC57 vektörleri ile uyumluluk göstermektedir.



Şekil 4.21. Transformasyon sonrası izole edilen plazmid örnekleri, ticari olarak alınan ICD ve ICL içeren pUC57 plazmidleriyle karşılaştırılması. (Markör: NEB 1 kb DNA markörü)

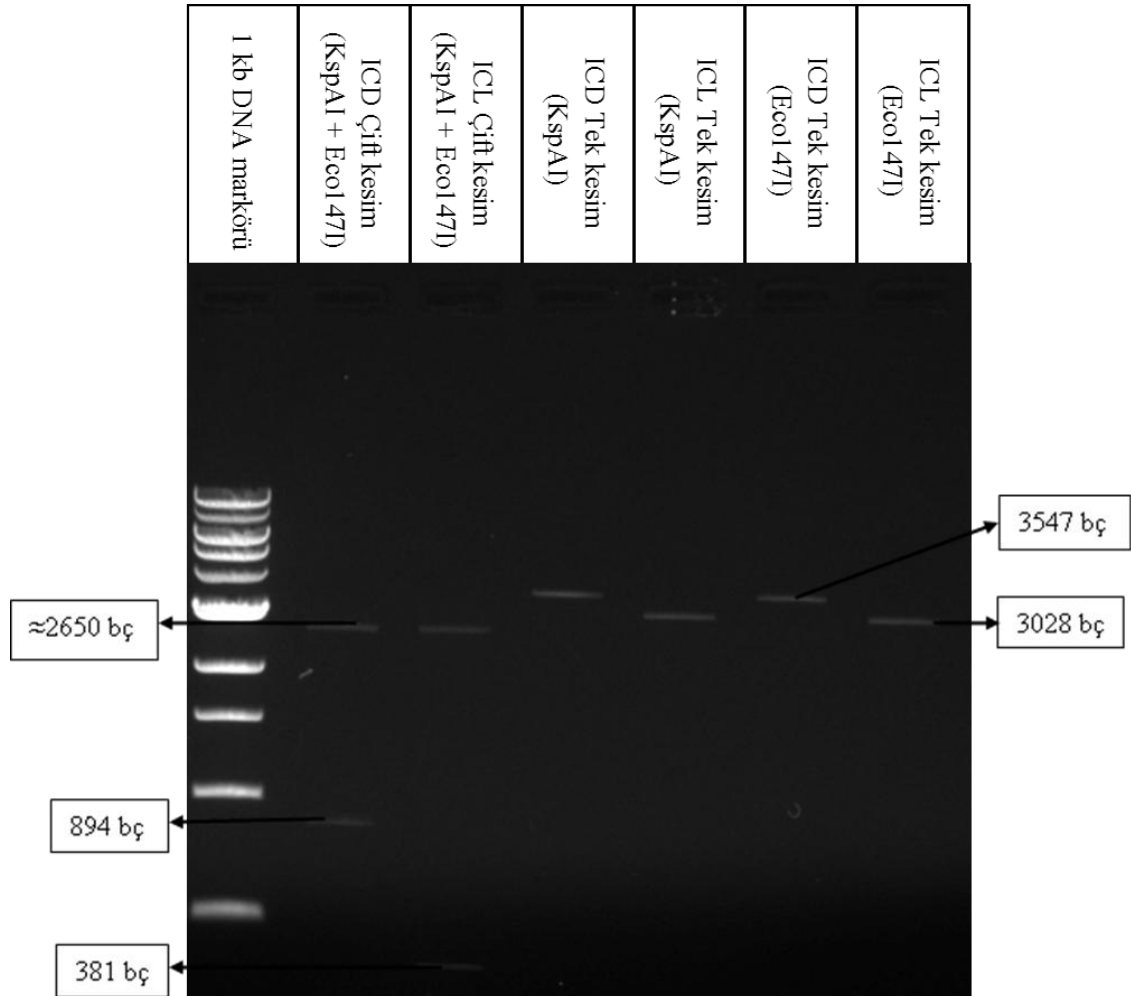
Gerçek zamanlı PCR kitlerinde kontrol olarak belirli bir hedef bölgesi içeren plazmidleri kullanmak, kitin yanlış negatif sonuç verdiği durumların tespiti için gereklidir. Reaksiyondan alınan negatif sonuç, teste tabi tutulan örnek içerisinde hedef organizmanın bulunmaması durumunun yanında, reaksiyonun inhibe olduğu veya başka sebeplerle gerçekleşmediği durumlarda da alınmaktadır. Bu yüzden kit içi kontrol fragmenti kullanılmadığında alınan negatif sonuçların doğruluğundan emin olunamaz. Özellikle patojenik özelliği yüksek organizmaların tespiti için kullanılan gerçek zamanlı PCR kitlerinde gözden kaçırılan yanlış negatif sonuçlar, hem sağlık için büyük risk oluşturacak, hem de ekonomik boyutta ciddi sonuçlara sebep olacaktır. Saha örneklerinde bulunabilecek PCR inhibitörlerinin varlığında veya herhangi bir sebeple reaksiyonun başarısız olması durumunda kontrol olarak kite dahil edilen DNA fragmentinden de çoğaltım olmayacağı için yanlış negatif sonuçların ayrımı yapılabilmektedir.

Kit içi kontrolü olarak plazmid DNA kullanmak, DNA manipülasyonunun ve çoğaltımının kolay olması sebebiyle yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ancak plazmid DNA'nın süperkıvrımlı şekilde bulunması polimeraz reaksiyonunda primerlerin ve polimeraz enziminin bağlanmasını engelleyebilmektedir (Chen ve ark. 2007, Hou ve ark. 2010, Lin ve ark. 2011). Plazmidler linearize edildiklerinde ise konformasyon değiştirerek süperkıvrımlı formdan çıkarlar. Bu yüzden PCR'de kullanılacak kontrol plazmidlerinin linearize edilmesi önerilmektedir. Bu sebeple, dizayn edilen ICD ve ICL fragmentlerinin bir ucuna KspAI, diğer ucuna da Eco147I enzimlerinin tanıma bölgeleri eklenmiştir. Bu sayede ICD ve ICL içeren pUC57 vektörleri linearize edilebilecek veya gerekirse çift kesim ile kontrol fragmentleri izole edilebilecektir. Bu amaç için seçilen restriksiyon enzimlerinin küt uçlu kesim yapan enzimler olması, DNA fragmentlerinin multipleks gerçek zamanlı PCR içinde çok sayıda bulunan primer ve problarla yapışkan uçlar yoluyla bağlanması ihtimalinin önüne geçmek için tercih edilmiştir. Aynı zamanda seçilen restriksiyon enzimlerinin aynı tampon (Tampon B, ThermoFisher) içerisinde %100 verimle çalışıyor olması, çift kesim işlemini kolaylaştıran bir faktör olduğu için bu şekilde çalışmaya uygun enzimler seçilmiştir.

KspAI enziminin tanıma bölgesi, bakteriyel metilaz enzimleri Dam ve Dcm aktivitesinden etkilenmemektedir. Eco147I enzimi tanıma bölgesi ise, Dam proteininden etkilenmemekte ancak Dcm tarafından metile edilmektedir. Tanıma bölgeleri metilasyona uğradığında ilgili restriksiyon enzimi bu bölgeye bağlanamamakta ve kesim gerçekleşmemektedir (Arber 1965, McClelland 1981). Bu sebeple ICD ve ICL

fragmentlerinin çoğaltımı için *dam(+)/dcm(-)* genotipine sahip *E. coli* BL21 suşu konak organizma olarak seçilmiştir.

pUC57 vektörü 2710 baz çifti uzunluğunda, *E.coli*'de klonlama için yaygın olarak kullanılan bir vektördür (Anonim 2019d). ICD fragmentinin klonlanması sırasında vektör EcoRI ve SphI enzimleri ile kesilerek çoklu klonlama bölgesinden 63 bç uzunluğunda bir parça çıkarılmıştır. ICL fragmenti içinse EcoRI ve HindIII enzimleri kullanıldığı için kesilen parça 69 bç uzunluğundadır. Kontrol fragmentleri vektör içine klonlandığında ICD dizisini taşıyan vektör 3547 bç, ICL dizisini taşıyan vektör ise 3028 bç uzunluğuna ulaşmaktadır. KspAI (HpaI) ve Eco147I (StuI) enzimleriyle çift kesim yapıldığında enzimlerin tanıma bölgelerinden gelen toplamda 6 bç uzunluk vektör üzerinde kalmakta, ICD fragmenti 894 bç, ICL fragmenti ise 381 bç uzunluğunda olmaktadır. Çift kesim sonrası geriye kalan boş ICD ve ICL vektörlerinin uzunluğu yaklaşık olarak aynıdır (ICD vektörü 2653 bç, ICL vektörü 2647 bç). (Şekil 4.22)



Şekil 4.22. ICD ve ICL fragmentlerini içeren pUC57 vektörlerinin KspAI ve Eco147I enzimleriyle kesimi sonrası elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü

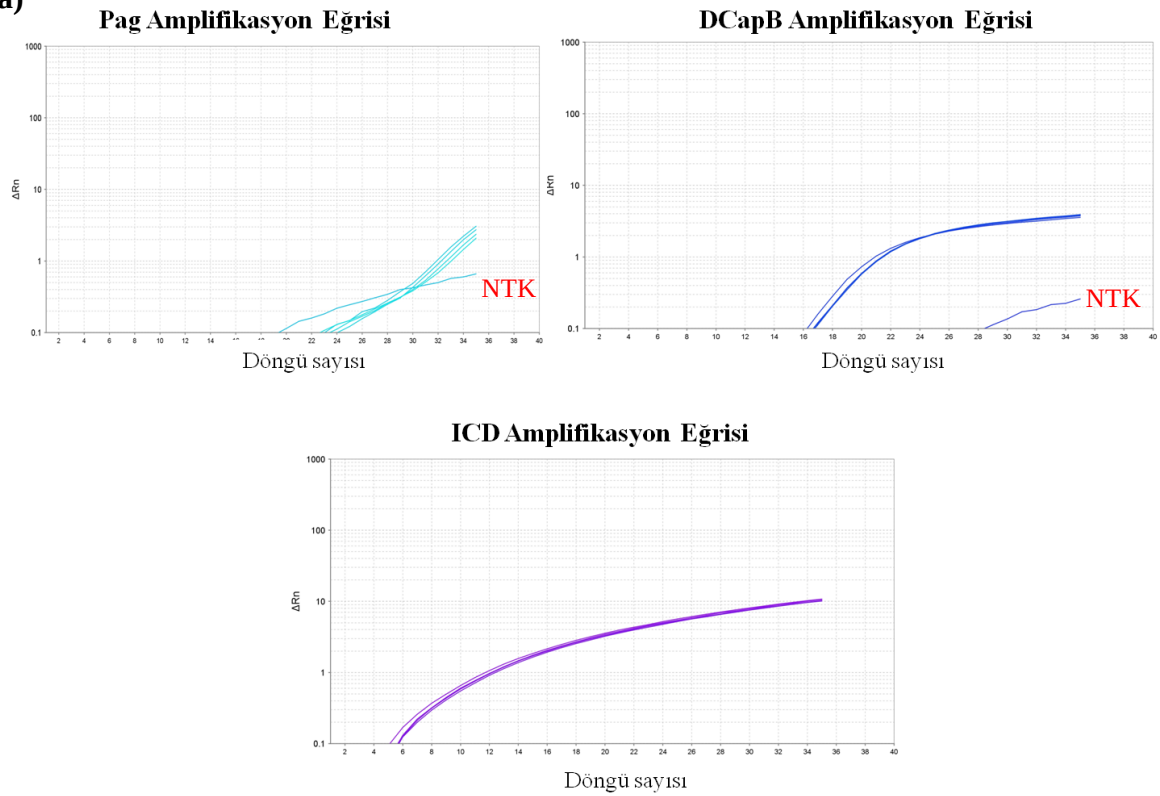
4.5. Primer ve Probların Gerçek Zamanlı PCR Kullanılarak Test Edilmesi

4.5.1. TaqMan problemlerinin ve ilgili primerlerin test edilmesi

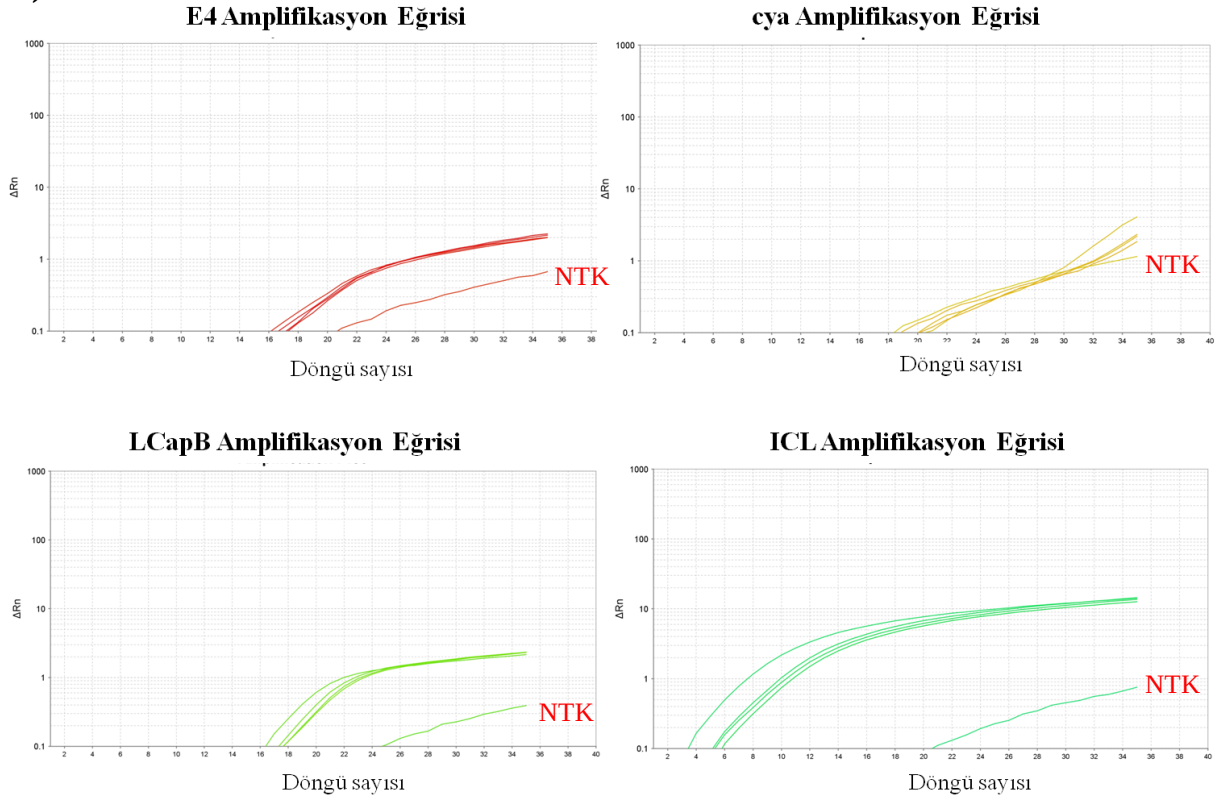
Dizayn seti içerisinde yer alan Pag, DCapB ve ICD problemleri ile literatür seti içerisindeki E4, cya, LCapB ve ICL problemlerinin çalışabilirliği, her bir hedef bölge için farklı reaksiyonlar oluşturularak test edilmiştir. Hedef bölgesi kromozomal DNA olan primer ve problemler için yabancı tip *B. anthracis* genomik DNA'sı, plazmid bölgelerini hedefleyen primer ve problemler içinse yabancı tip *B. anthracis* plazmid DNA izolasyonu örneği kullanılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen amplifikasyon grafikleri Şekil 4.23'te gösterilmektedir.

DCapB, E4, LCapB, ICD ve ICL problemlerinin amplifikasyon eğrilerine bakıldığında 4'lü tekrar olarak yürütülen reaksiyonların birbiri ile üst üste kümelenmiş olarak sonuç verdiği ve negatif kontrolden tamamen ayrıldığı görülmektedir (Şekil 4.23). Bu durum problemlerin başarı ile ilgili sekansa bağlandıklarını ve tekrarlı örnekler arasında hedef DNA'nın ve reaksiyon elemanlarının homojen dağıldığını göstermektedir.

a)

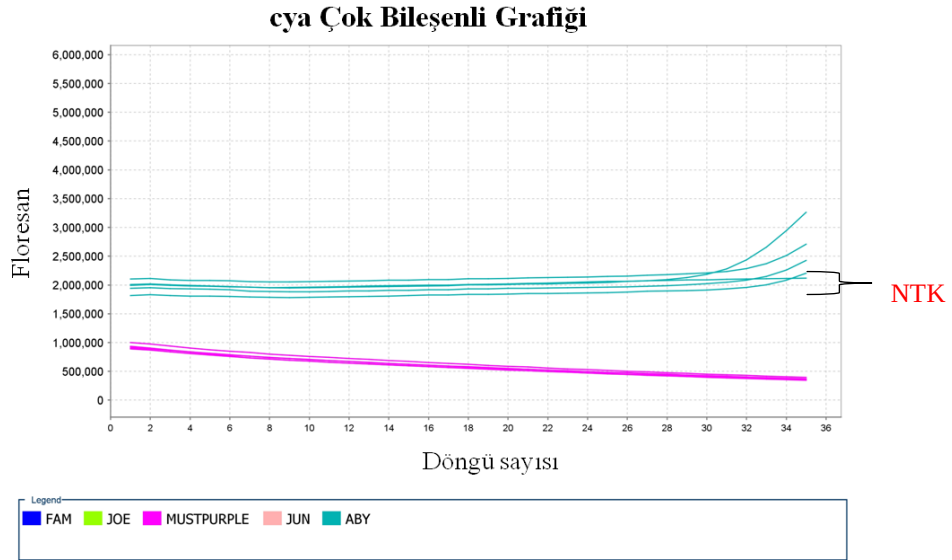
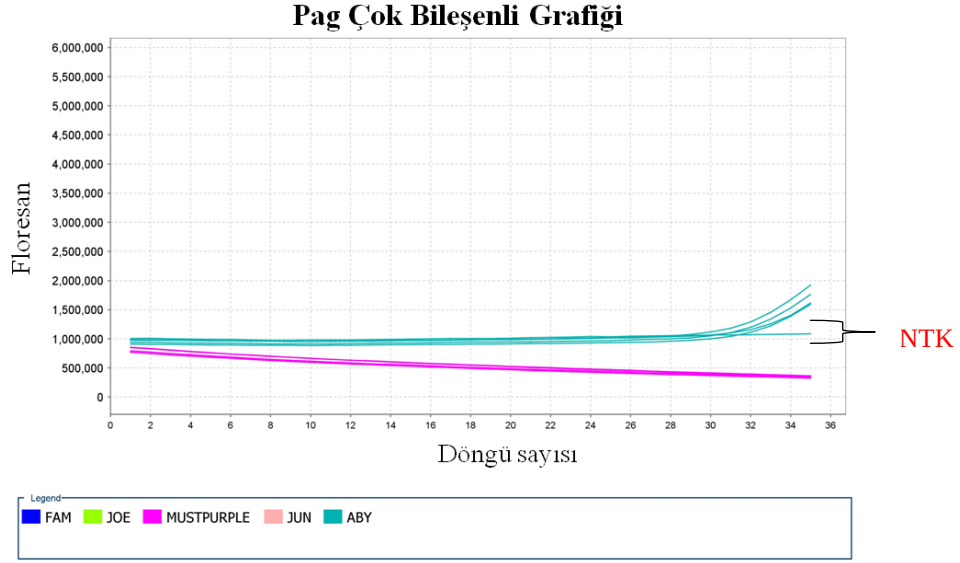


b)



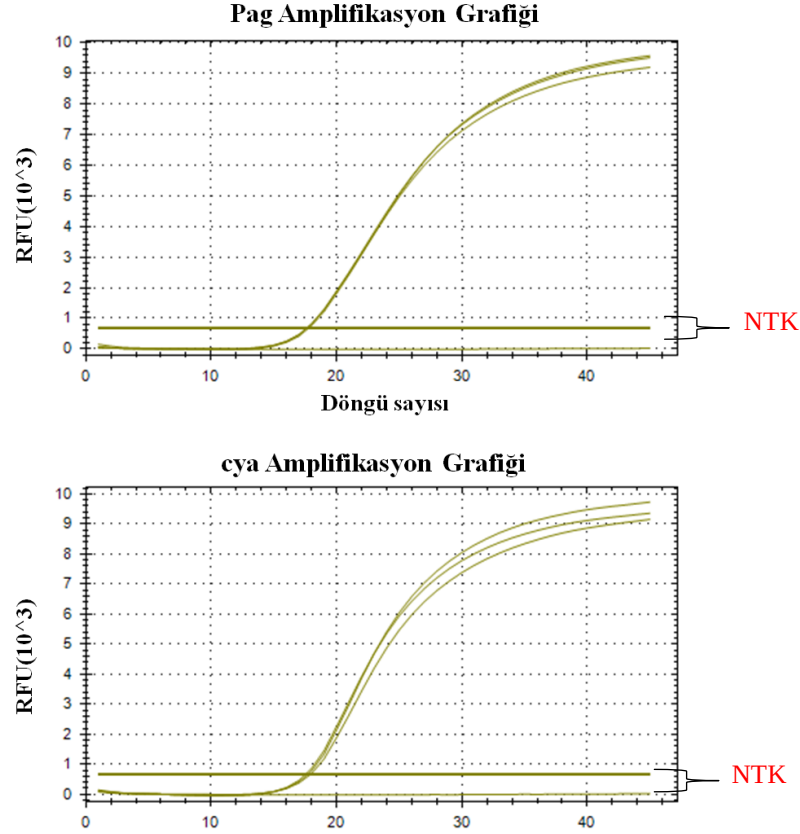
Şekil 4.23. TaqMan problemlerinin gerçek zamanlı PCR ile test edilmesi. a) Dizayn seti içerisinde yer alan problemlerin amplifikasyon eğrileri b) Literatür seti içerisinde yer alan problemlerin amplifikasyon eğrileri

Pag ve cya problemlerinin amplifikasyon eğrilerine bakıldığında ise test grubunun negatif kontrol örneğinden ancak 33.-34. döngüde ayırmaya başladığı fakat reaksiyonun tamamının 35 döngüden oluşması sebebi ile bu ayırışmanın net olarak görüntülenemediği görülmektedir (Şekil 4.23). Bu iki prob için çok bileşenli floresans artış grafiğine bakıldığında, deney gruplarının negatif kontrol örneğinden reaksiyonun son döngülerinde farklılaşmaya başladığı daha açık bir şekilde görülebilir (Şekil 4.24). Çok bileşenli grafiklerde Mustang Purple referans boyasından alınan floresans değeri de ayrı olarak gösterilmektedir.



Şekil 4.24. Pag ve cya problemlerinin çok bileşenli grafikleri

Bu durum, reaksiyonda kullanılan plazmid DNA örneğinde Pag ve cya problemlerinin hedeflediği pXO1 plazmidinin pXO2 plazmidine kıyasla çok daha az miktarda bulunduğunu düşündürmektedir. Bu sebeple başlangıçtaki DNA miktarı artırılarak (30 ng → 210 ng) ve reaksiyonda döngü sayısı 45'e çıkarılarak deney tekrarlanmıştır. Bunun sonucunda Pag ve cya problemlerinin hedef bölgelerine başarı ile bağlandıkları ve 18. döngüde eşik değeri aşıldıkları görülmüştür (Şekil 4.25).

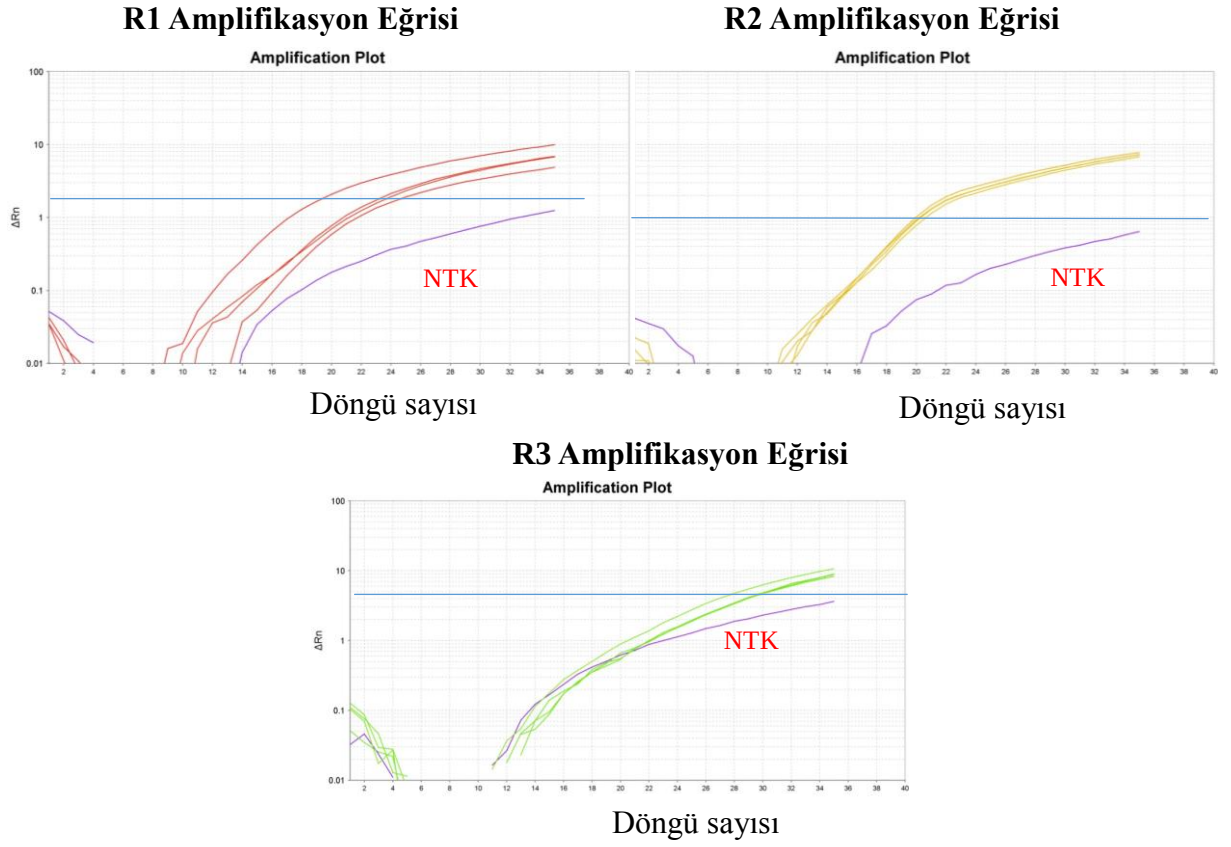


Şekil 4.25. Pag ve cya problemlerinin 210 ng başlangıç hedef DNA miktarı ve 45 döngülük gerçek zamanlı PCR ile testi

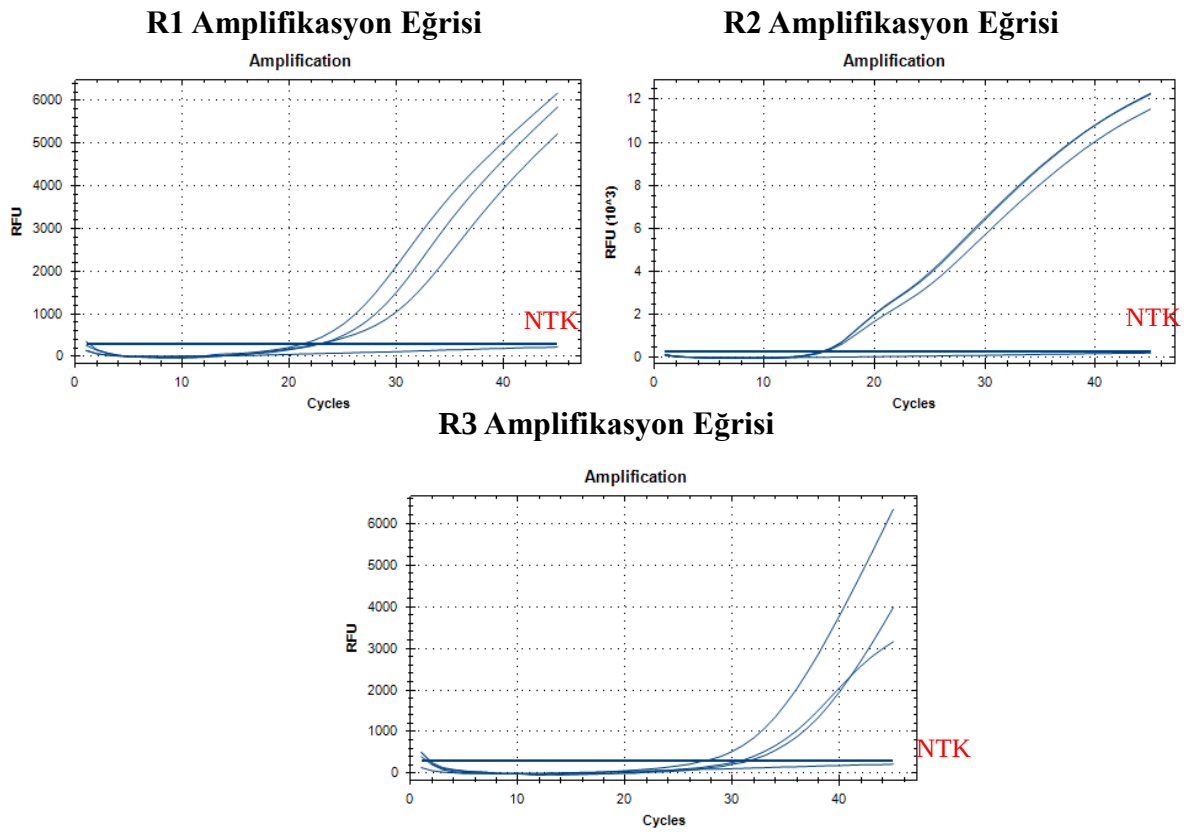
4.5.2. Tentacle prob ve Rapid problemlerin test edilmesi

Birbirlerine alternatif olarak tasarlanan tentacle prob ve rapid problemlerin test edilmesinde hem ABI Viia7 hem de BioRad CFX96 gerçek zamanlı PCR cihazı kullanılmıştır. Bu problemlerin hepsi LambdaBa03 hedef bölgesi üzerinde farklı lokasyonları hedeflemektedir. Dolayısıyla içlerinden en verimli bağlanmayı gerçekleştiren prob LambdaBa03 bölgesi için kit içerisinde kullanılacaktır. Tüm denemelerde 30 ng *B. anthracis* genomik DNA'sı hedef DNA olarak kullanılmıştır.

Şekil 4.26 ve Şekil 4.27'de görüldüğü üzere her 3 rapid prob da hedef bölgeye bağlanmakta ancak bağlanma verimliliği açısından birbirlerinden ayrılmaktadırlar. BioRad CFX 96 cihazı ile yapılan denemede tüm problemlerin Ct (Threshold cycle; probdan alınan floresans sinyalinin eşik değerin üzerine çıktığı döngü numarası) değerleri daha düşük olmakla beraber sonuçlar problemlerin bağlanma verimliliği açısından paralellik göstermektedir.



Şekil 4.26. R1, R2 ve R3 Rapid problemlerinin ABI Viia7 ile alınan amplifikasyon grafiği



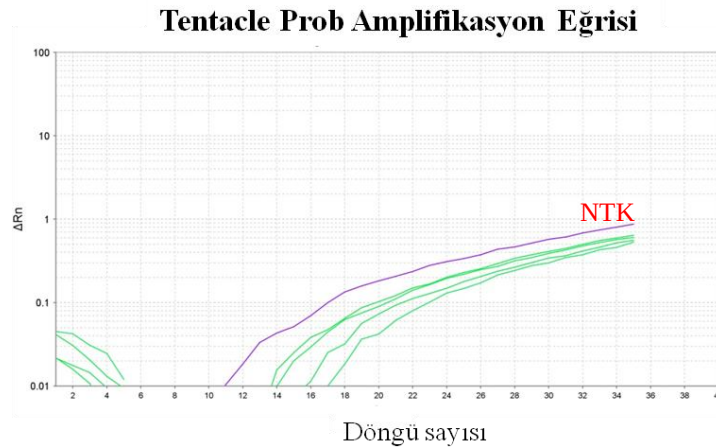
Şekil 4.27. R1, R2 ve R3 Rapid problemlerinin Bio-Rad CFX96 ile alınan amplifikasyon eğrileri

Çizelge 4.1'e bakıldığında en düşük Ct değerinin R2 probu ile elde edildiği görülmektedir. Tüm örneklerde aynı primer çifti ve eş miktar başlangıç DNA'sı kullanıldığı için, alınan floresans değerinin eşik değerini erken döngü sayısında geçmesi, o reaksiyonlarda kullanılan probun hedefe bağlanma verimliliğinin yüksek olduğunun göstergesidir.

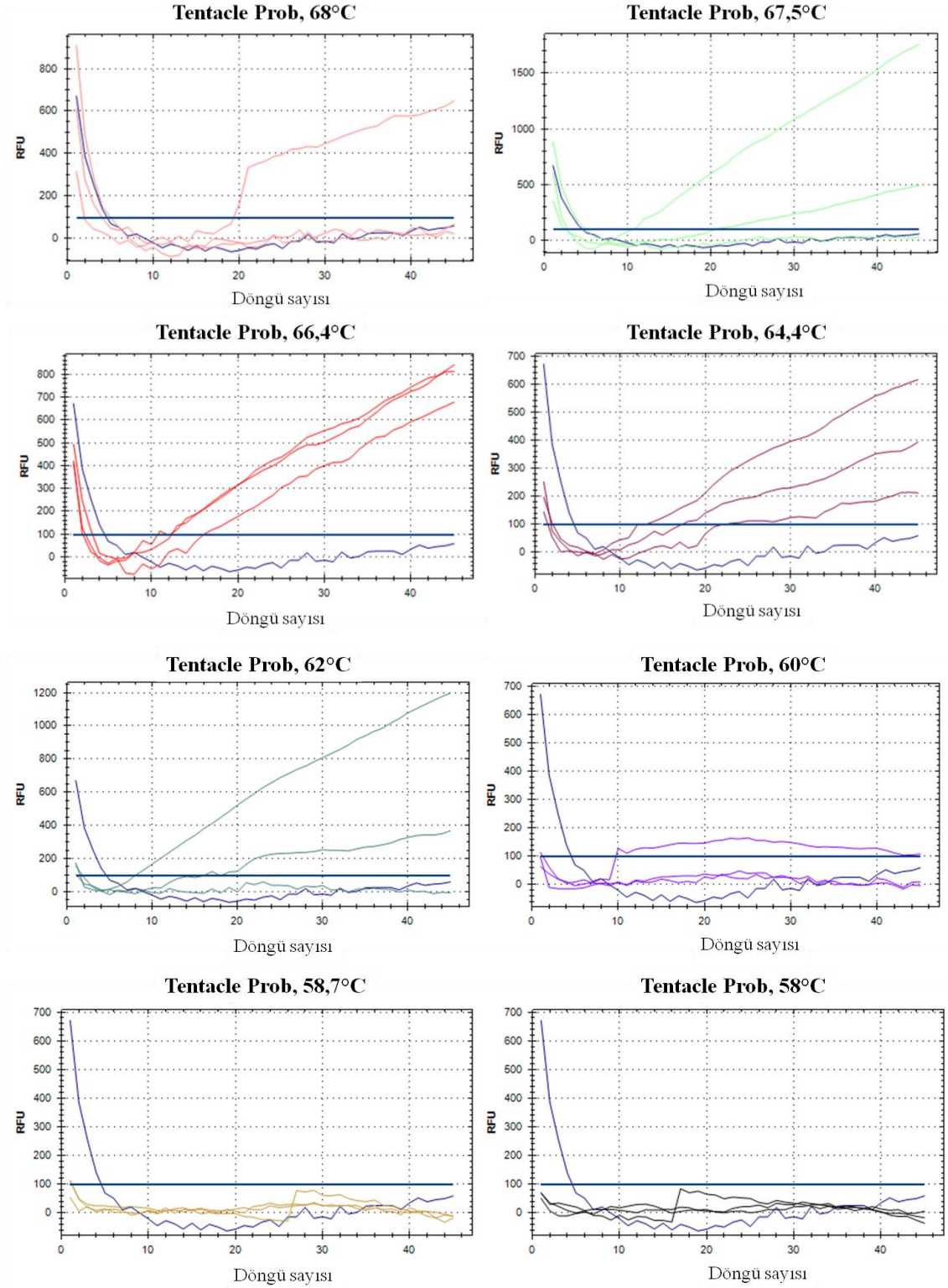
Çizelge 4.1. Rapid problemlerin 30 ng hedef DNA ile reaksiyonunda alınan Ct değerleri

	Ortalama Ct Değerleri	
	ABI Vii7	BioRad CFX96
R1	23	22
R2	20	15
R3	29	30

Tentacle probun test edilmesinde diğer problemlerde olduğu gibi, bağlanma sıcaklığı olarak önceden de optimal olduğu belirlenmiş 60°C seçilerek polimeraz zincir reaksiyonu yürütülmüş ancak bu sıcaklık değerinde probun hedef bölgeye bağlanmadığı görülmüştür (Şekil 4.28). Bunun üzerine, tentacle probun hedef sekansa bağlanabildiği sıcaklığı belirlemek amacıyla sıcaklık gradyanı oluşturularak yeni bir reaksiyon yürütülmüştür. Denenen bağlanma sıcaklıkları sırasıyla 68°C, 67,5°C, 66,4°C, 64,4°C, 62°C, 60°C, 58,7°C ve 58°C'dir. Şekil 4.29'da görüldüğü üzere, bu sıcaklıkların hiç birinde bağlanmanın gerçekleşmediği ve floresans değerinin yükselişe geçtiği birkaç örnekte kaydedilen artışın probun bağlanmasından değil, yapısal bir kırılmadan ötürü FAM floroforunun BHQ1 susturucusundan uzaklaşması sebebiyle olduğu değerlendirilmiştir. Bunun gibi probun yapısında kırılma durumlarında amplifikasyon eğrisinde taban çizgisinden üssel artışa geçişte ani eğim değişiklikleri ve zikzak şeklinde değişimler görülebileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.28. Tentacle prob amplifikasyon eğrisi, bağlanma sıcaklığı 60 °C.



Şekil 4.29. Tentacle prob ile 58°C-68°C arasında değişen bağlanma sıcaklıklarında yürütülen gradyan gerçek zamanlı PCR sonucu elde edilen amplifikasyon grafikleri

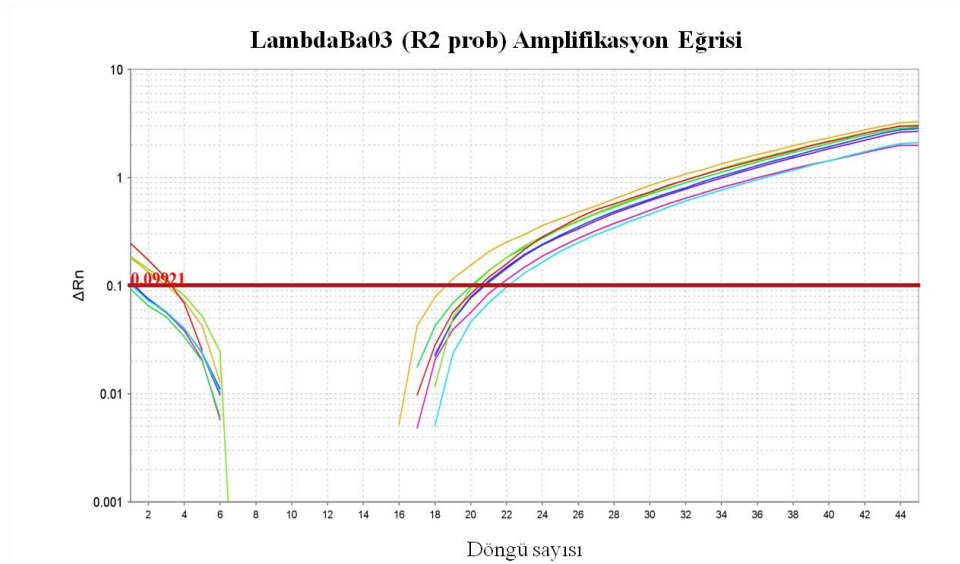
Daha önce yapılan bir çalışmada Tentacle problemlerin TaqMan problemlara kıyasla yakın akraba türlerin ayrımında ve sahadan alınan örneklerde yanlış pozitif sonuçlar vermemesi açısından daha üstün olduğu bildirilmiştir (Satterfield ve ark. 2007a). Tentacle problemler yapısal açıdan “moleküler fener” (Molecular beacon) problemlara benzeyen bir saç tokası yapısı içermekte ve bu özelliği sayesinde arttırılmış özgünlük kazanmaktadır. Bunun yanında yakalama probunun eklenmesiyle daha yüksek afinite ve yüksek bağlanma kinetiğine sahiptir. Benzer gövdeye sahip moleküler fener problemlarla karşılaştırıldığında kinetik oran sabitlerinin 200 kata kadar daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Satterfield ve ark. 2007b). Bu sebeple Tentacle problemlerin hassasiyetten ödün vermeden özgün bir şekilde hedef bölgeye bağlandığı ve sahadan alınan örneklerde olduğu gibi analit miktarının belli olmadığı, analitin saf olmadığı durumlarda bile yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar vermediği rapor edilmiştir (Satterfield ve ark. 2007a). Bu sebeplerle bu çalışmada *B. anthracis*’in tanısında kromozomal hedef bölgenin tespiti için Tentacle probun ve onların üst nesli olan Rapid problemlerin dizayn kiti içerisine dahil edilmesi uygun görülmüştür. Tentacle/Rapid problemlerin multipleks gerçek zamanlı PCR tanı kiti içerisine dahil edilmesi, bugüne kadar yayımlanmış *B. anthracis* için PCR tabanlı tanı kiti geliştirilmesine yönelik çalışmalar içerisinde bir ilk teşkil etmektedir.

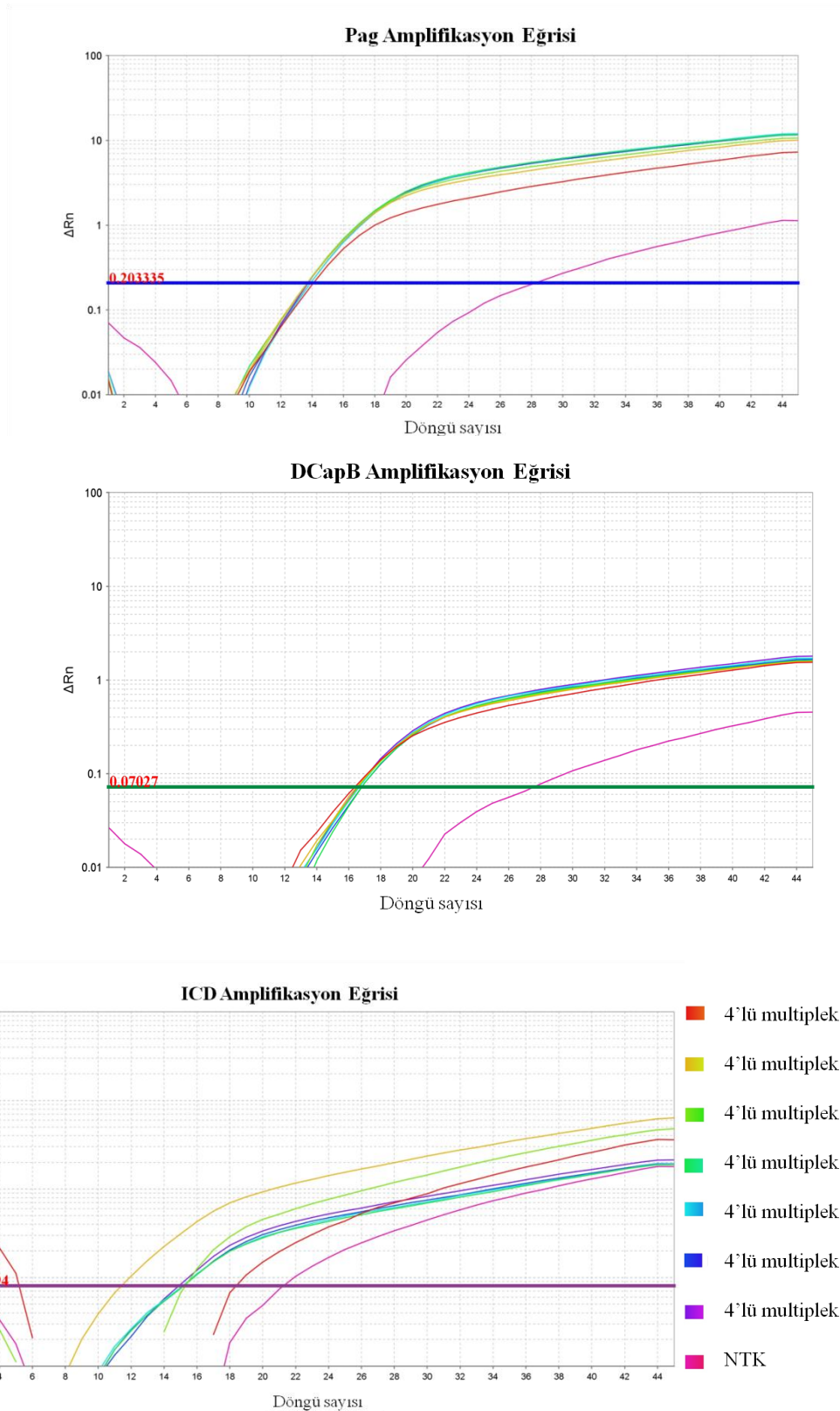
Bu çalışmada kullanılan Tentacle probun 58°C-68°C arasında değişen bağlanma sıcaklıklarının hiç birinde hedef sekansa bağlanmayıp özellikle yüksek sıcaklıklarda yürütülen reaksiyonlarda kırılmaya uğramasına sebep olarak bu probun kompleks yapısı gösterilebilir. Tentacle prob, yakalama bölgesi ve deteksiyon bölgesi arasında PEG9 bağlayıcı molekülünü ve FAM floroforunu taşımaktadır. Dolayısı ile probun yapısındaki bu farklı elemanların arasında oluşabilecek herhangi bir kırılma probun doğru çalışmasını engellemiş olacaktır. Ayrıca tentacle probun kompleks yapısı sentezini de zorlaştıran bir etmendir. Prob sentezi sırasında oluşabilecek hatalar probun hedef sekansa bağlanma kinetiğini etkilemiş olabilir. Bunların haricinde, probun saç tokası yapısının erime sıcaklığı her ne kadar kullanılan online araçlar ile 66°C olarak belirlenmişse de, gerçek reaksiyon koşullarında bu yapının erime sıcaklığı daha yüksek olup probun açılmasını engelliyor olabilir. Tüm bu ihtimaller göz önüne alınarak tentacle probun PEG9 molekülüne ihtiyaç kalmadan ve floroforun probun orta kısmında değil de uç kısmında yer alacağı şekilde yapısı modifiye edilip sadeleştirilebilir.

Dizayn seti içerisinde genomik hedef bölgesi için birbirine alternatif 4 farklı prob bulunduğundan, test sonuçlarına göre bunların arasından bağlanma verimliliği en yüksek olan R2 probu kit içerisine dahil edilmek üzere seçilmiştir.

4.5.3. Dizayn ve literatür kitlerinin gerçek zamanlı PCR ile multipleks olarak çalışabilirliğinin kontrol edilmesi

Oluşturulan *B. anthracis* tanı kitlerinin dörtlü multipleks düzende çalışabilirliği gerçek zamanlı PCR ile kontrol edilmiştir. Bunun için, hedef DNA olarak *B. anthracis* genomik DNA'sı ve plazmid DNA'sı eşit oranda karıştırılarak kullanılmıştır. Ayrıca reaksiyon içerisine dizayn kiti için ICD fragmenti, literatür seti için ise ICL fragmenti eklenmiştir. Bu kontrol fragmentleri reaksiyonda genomik hedef bölgesi ile aynı primer çiftlerini kullandığından, primerler iki farklı hedef DNA'ya bağlanma konusunda yarışmalı olarak çalışacaktır. Bu sebeple, reaksiyona dahil edilecek kontrol fragmenti konsantrasyonu önem taşımaktadır. Eklenen kontrol fragmentinin fazla olması durumunda reaksiyon içerisindeki ilgili primerler genomik hedef bölgesine kıyasla yüksek oranda kontrol fragmentine bağlanarak bu DNA parçasının çoğaltımını sağlarlar. Bunun gerçekleşmesi durumunda genomik hedef bölgesi için elde edilen Ct değeri yükselerek yanıltıcı sonuç verebilir. Ayrıca kontrol fragmentinin çok fazla olduğu durumlarda ortamdaki dNTP ve serbest polimeraz enzimi miktarı da azalarak diğer hedef bölgelerin çoğaltımında kısıtlayıcı faktör olabilirler. Bu sebeplerle reaksiyona eklenecek kontrol fragmentinin miktarı optimize edilmelidir. Bunun için ICD ve ICL fragmentleri ile seri dilüsyonlar yapılarak 40 ng, 0,04 ng, 4×10^{-5} ng ve 4×10^{-8} ng olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda multipleks reaksiyona eklenmiştir.



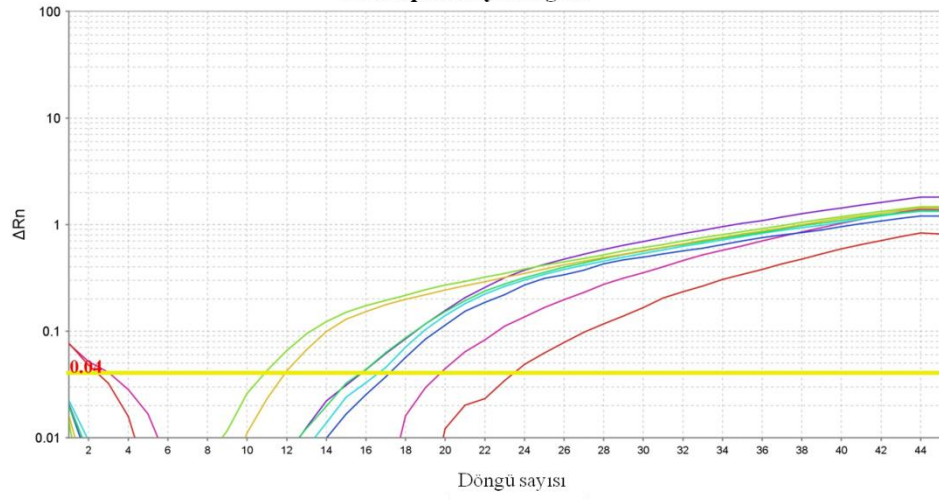


Şekil 4.30. Dizayn setinden oluşan *B. anthracis* tanı kitinin 4'lü multipleks olarak farklı ICD konsantrasyonlarıyla gerçek zamanlı PCR ile test edilmesi

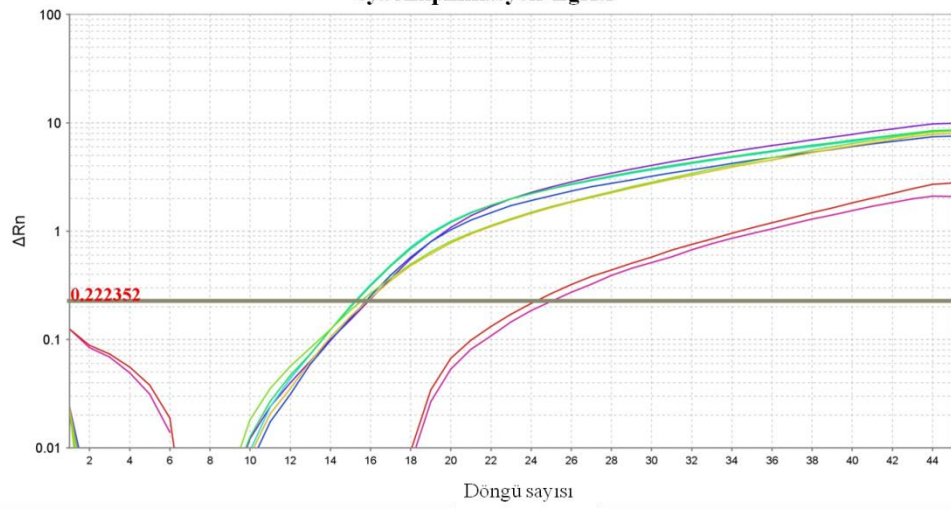
Şekil 4.30'da görüldüğü üzere, ICD miktarındaki farklılık, LambdaBa03 hedef bölgesinin çoğaltımını önemli ölçüde etkilememekte ve bu bölgeden elde edilen amplifikasyon eğrileri birbirine yakın kümelenmektedir. Ancak, ICD fragmentinin amplifikasyon eğrisine bakıldığında en yüksek ICD konsantrasyonu içeren reaksiyonun en büyük Ct değerini vermiş olması, yarışımlı primerlerin daha çok LambdaBa03 bölgesine bağlanarak ICD çoğaltımını olumsuz etkilediğinin göstergesidir. ICD amplikonunun 888 bp uzunluk ile en uzun hedef bölge olması, yarışımlı primerler ile çoğaltımında bu bölgenin daha dezavantajlı olabileceğini düşündürmektedir. 0,04 ng ICD içeren reaksiyonlarda Ct değerleri arasındaki fark reaksiyon içeriğinin kuyucuklara yüklenmesi esnasında homojen olarak karışmamış olması veya pipetleme hataları sebebiyledir. Pag ve DCapB bölgelerinin amplifikasyon eğrilerinde ise beklendiği üzere tüm reaksiyonlar birbiri ile çakışan eğriler oluşturmaktadır. Primer ve problemlerin 4'lü multipleks düzende başarı ile çalıştığı, internal kontrol fragmenti ICD'nin miktarının genomik hedef bölgesinin ve diğer hedef bölgelerin çoğaltımını önemli ölçüde etkilemediği ancak yüksek ICD miktarının kendi çoğaltımını negatif yönde etkilediği bu test ile görülmüştür.

Literatür setinden oluşan *B. anthracis* tanı kitinin 4'lü multipleks düzende gerçek zamanlı PCR ile testinde ise yüksek ICL miktarının hem genomik hedef bölgesi E4'ün hem de pXO1 hedef bölgesi cya'nın çoğaltımını inhibe ettiği görülmektedir (Şekil 4.31). Öte yandan 4×10^{-8} ng ICL fragmenti içeren reaksiyonlar negatif kontrol örneğinden daha yüksek Ct değerinde sonuç verdiği için negatif sayılmaktadır. 0,04 ng ICL miktarı E4 hedef bölgesi en küçük Ct değerlerini vermektedir. Dolayısıyla ICL fragmenti ile ortak primer kullanımından test edilen diğer ICL konsantrasyonlarında olduğu kadar çoğaltımı baskılanmamaktadır.

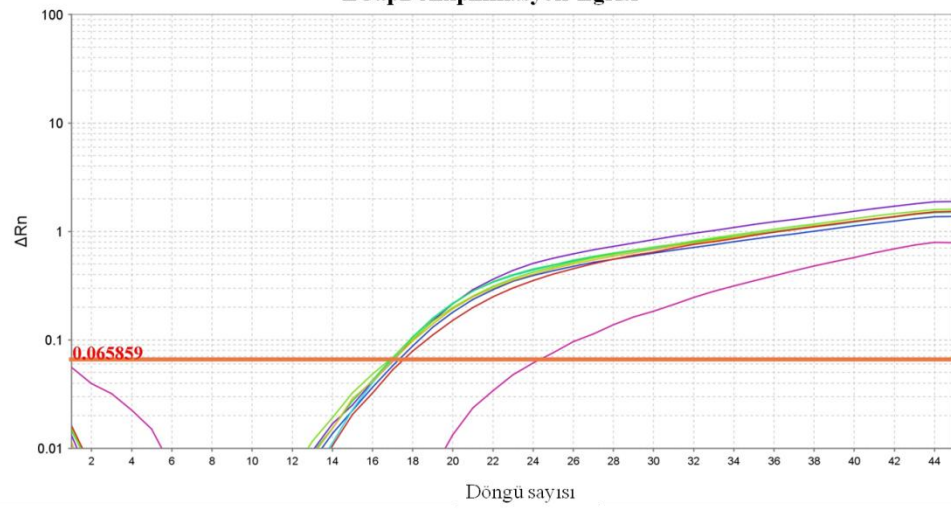
E4 Amplifikasyon Eğrisi

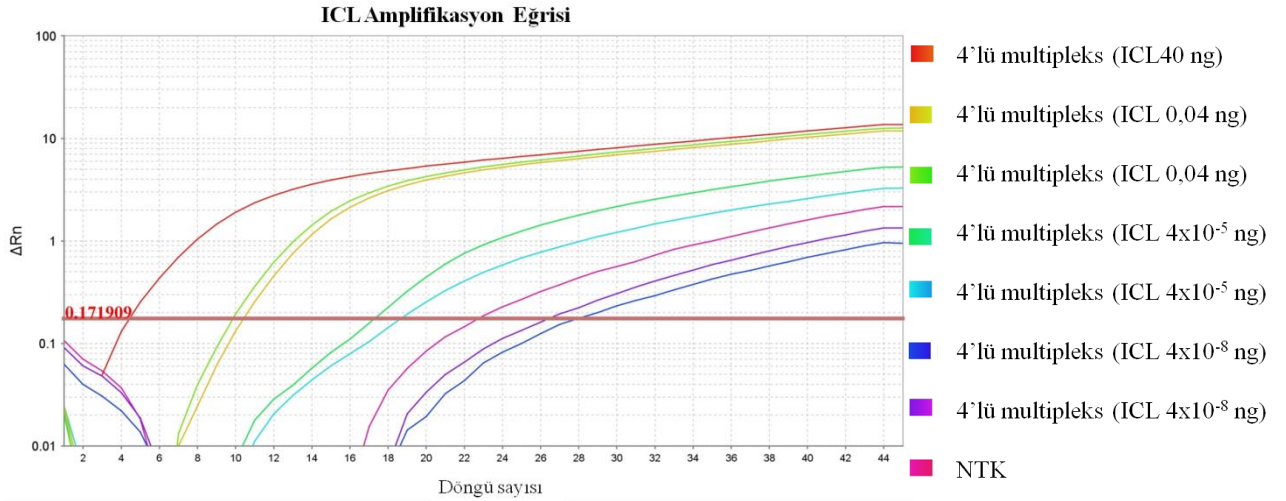


eya Amplifikasyon Eğrisi



LCapB Amplifikasyon Eğrisi





Şekil 4.31. Literatür setinden oluşan *B. anthracis* tanı kitinin değişen ICL konsantrasyonları ile 4'lü multipleks düzende gerçek zamanlı PCR ile test edilmesi

Sonuç olarak, literatür setinin de 4'lü multipleks düzende gerçek zamanlı PCR ile başarı ile çalıştığı ve kit içerisine eklenecek ICL fragmenti için en uygun miktarın 0,04 ng olduğu görülmektedir.

4.5.4. Oluşturulan 2 farklı gerçek zamanlı multipleks PCR kitinin *Bacillus anthracis*'e filogenetik olarak yakın diğer *Bacilli* suşları ile test edilmesi

B. anthracis multipleks gerçek zamanlı tanı kitlerinin çoğu *B. cereus* grubu türlerinden oluşan 20 farklı suş ile çapraz reaksiyon testleri gerçek zamanlı PCR ile yürütülmüştür. Pozitif kontrol için *B. anthracis* genomik DNA'sı ile plazmid DNA'sı karıştırılarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. *B.anthraxis* tanı kitlerinin 20 farklı basil suşu ile çapraz reaksiyon kontrolü

Suş kodu	Gerçek zamanlı PCR sonucu					
	Dizayn kiti			Literatür kiti		
	LambdaBa03 (Genomik bölge)	Pag (pXO1)	DCapB (pXO2)	E4 (Genomik bölge)	cya (pXO1)	LCapB (pXO2)
4A3	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
4AB1	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
4AJ1	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
4AW1	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif
4AY1	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
4BA1	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
4BD1	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
4CC1	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
4Y1	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
6A5	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
6A10	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
6A15	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
6A18	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif
6A19	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
6A20	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
6A46	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
6A49	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
6E1	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif
7A16	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
10A5	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Pozitif kontrol	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
Negatif kontrol	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif

Çapraz reaksiyon testinde kullanılan suşların listesi aşağıda verilmiştir.

- BGSC-4A3 *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis*
- BGSC-4AB1 *B. thuringiensis* serovar *morrisori*
- BGSC-4AJ1 *B. thuringiensis* serovar *monterrey*
- BGSC-4AW1 *B. thuringiensis* serovar *andalousiensis*
- BGSC-4AY1 *B. thuringiensis* serovar *brasilensis*
- BGSC-4BA1 *B. thuringiensis* serovar *pondicheriensis*
- BGSC-4BD1 *B. thuringiensis* serovar *huazhongensis*
- BGSC-4CC1 *B. thuringiensis* serovar *pulsiensis*
- BGSC-4Y1 *B. thuringiensis* serovar *tochigiensis*
- BGSC-6A5 *B. cereus*
- BGSC-6A10 *B. cereus*
- BGSC-6A15 *B. cereus*
- BGSC-6A18 *B. cereus* (yabanıl tip izolatu)
- BGSC-6A19 *B. mycoides*
- BGSC-6A20 *B. mycoides*
- BGSC-6A46 *B. weihenstephanensis*
- BGSC-6A49 *B. pseudomycoides*
- BGSC-6E1 *B. cereus*
- BGSC-7A16 *B. megaterium*
- BGSC-10A5 *B. subtilis* ssp. *subtilis*

Dizayn kitinin verdiği sonuçlar incelendiğinde 4AJ1-*B. thuringiensis* serovar *monterrey* ve 4AW1-*B. thuringiensis* serovar *andalousiensis* suşları için CapB bölgesi pozitif sonuç vermektedir. *B. thuringiensis* 4AJ1 suşunun *B. anthracis* kapsül genlerinin tamamını taşıdığı ve benzer bir poliglutamat kapsül oluşturduğu bilinmektedir (Cachat ve ark. 2008). Bu suşun *B. anthracis*'e filogenetik olarak en yakın suşlardan olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Valjevac ve ark. 2005, Marston ve ark. 2006, Cachat ve ark. 2008). *B. thuringiensis* 4AW1 suşu da *B. thuringiensis* 4AJ1 suşu ile çok yakın akraba bir suştur (Zwick ve ark. 2012, Wang ve Ash 2015). Dizayn kiti *capB* geninin her iki suşta da var olduğunu göstermekten literatür kiti aynı geni hedeflemesine rağmen farklı primer çiftini içerdiğinden negatif sonuç vermektedir.

Literatür setinden oluşan kit ile alınan sonuçlarda, E4 genomik bölgesi için *B. thuringiensis* 4AJ1 suşunda, ve LCapB bölgesi için *B. cereus* 6A18 ve 6E1 suşlarında pozitif yanıt alınmıştır. E4 sekansı LambdaBa01 profaj bölgesinde yer almaktadır ve *B. anthracis*'e özgü bir sekans olduğu bildirilmektedir (Dwyer ve ark. 2004, Bassy ve ark. 2017). Ancak E4 bölgesi için bildirilen primer çiftinin daha önce yukarıda verilen suşlar ile çapraz reaksiyon verip vermediği kontrol edilmemiştir (Bassy ve ark. 2017). Aynı durum LCapB bölgesi için kullanılan primer çifti için de geçerlidir (Wielinga ve ark. 2011).

Bugüne kadar *B. anthracis*'in tanısı için PCR temelli birçok kit geliştirilmiştir. Bu kitlerin bazıları *B. anthracis*'in tespiti için pXO1 ve pXO2 virülans plazmidlerinin varlığını test etmeye dayanmaktadır. Ancak son 10 yılda elde edilen bulgular *B. cereus* grubu türlerinin pXO-benzeri virülans plazmidleri içerdiğini, çevresel *Bacillus* izolatlarının pXO2 gen homologlarını taşıdığını hatta pXO1 ve pXO2 plazmidlerinin her ikisini de bulunduran *B. cereus* suşlarının varlığını göstermektedir (Turnbull ve ark. 1992, Pannucci ve ark. 2002a, 2002b, Hoffmaster ve ark. 2004, Klee ve ark. 2006, 2010). Bu sebeple *B. anthracis*'in doğru tespiti için bu türe özgü kromozomal bölgelerin kit içerisine dahil edilmesi gerekmektedir (Ågren ve ark. 2013).

Öncül çalışmalarda kullanılan *B. anthracis* DNA imza sekansları arasında *vrrA* markörü (Andersen ve ark. 1996, Jackson ve ark. 1998, Keim ve ark. 2000), AC390 geni (Cherif ve ark. 2002) ve SG-850/749 fragmenti (Daffonchio ve ark. 1999) bulunmaktaydı. Fakat bu genetik markörler kısıtlı özgünlük sağlamaktaydı. Tanıda kullanılabilecek potansiyel DNA hedef bölgeleri arasında BA813 (Ramisse ve ark. 1996,1999, Cheun ve ark. 2001, Luna ve ark. 2003) ve BA5510 (Olsen ve ark. 2007) bölgeleri, *bclB* (Leski ve ark. 2009), *sap* (Ryu ve ark. 2003), *saspB* (Hoffmaster ve ark. 2002), *sspE* (Kim ve ark. 2005, Janse ve ark. 2010) genleri ve profaj bölgeleri üzerinde bulunan BA5345 (Antwerpen ve ark. 2008), BA5357 (Létant ve ark. 2011) ve PL3 (Wielinga ve ark. 2011) lokusları araştırılmıştır. Bu bölgelerin çoğunun antraksa özgü olduğu iddia edilse de, bazı *B. cereus* suşları ile yanlış-pozitif sonuçlar verdikleri görülmüştür (Edwards ve ark. 2006, Rao ve ark. 2010, Ireng ve Gala 2012).

Bu çalışmada ise daha önce denenmemiş ve *B. anthracis*'e özgü olduğu bilinen lambda profaj 3 bölgesine ait bir bölge kromozomal hedef bölgesi olarak dizayn kiti içerisinde yer almıştır. Bunun yanında yine bu çalışmaya özgü olan Pag ve CapB bölgelerini hedefleyen primer ve prob kullanılmıştır. Alternatif olarak, yalnızca kromozomal E4 bölgesini hedefleyen bir çalışmadan (Bassy ve ark. 2017) alınan primerler ve ilgili prob ile *B.*

anthracis'in tanısı için geliştirilen başka bir multipleks PCR çalışmasında yer alan Cya ve CapB primerleri ve probları (Wielinga ve ark. 2011) birleştirilerek yeni bir kit oluşturulmuştur. Literatürden alınan bu primer ve prob sekansları, her ne kadar daha önce etkinlikleri gösterilmiş olsa da, daha önce bir araya getirilip multipleks düzende çalışabilirlikleri gösterilmemiştir. Bu sebeple, bu çalışma ile oluşturulan literatür seti de bu açıdan özgünlük taşımaktadır.

Sonuç itibarıyla, dizayn setinden oluşan kit ve literatür setinden oluşan kit ile yapılan çapraz reaksiyon testlerinde, dizayn kiti CapB bölgesini içerdiği bilinen *B. thuringiensis* 4AJ1 suşu için pozitif sonuç verirken, literatür kiti bu bölgenin varlığını yakalayamamaktadır. Ayrıca literatür kiti *B. anthracis*'e filogenetik olarak çok yakın *B. thuringiensis* 4AJ1 suşunda genomik bölge için, *B. cereus* 6A18 ve 6E1 suşlarında LCapB bölgesi için çapraz reaksiyon göstermekte ve yanlış pozitif sonuçlara sebebiyet vermektedir. Bu sebeple, dizayn kitinin literatür kitine kıyasla daha güvenilir sonuçlar verdiği görülmüştür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada *B. anthracis*'in hızlı tespiti için gerçek zamanlı multipleks PCR tabanlı 2 farklı tanı kiti oluşturulmuştur. Kitlerden biri tamamen özgün olarak dizayn edilmiş, ikinci kitin oluşturulmasında literatürde var olan *B. anthracis* tanısında kullanılan primer ve probalar bir araya getirilmiştir. Bu iki kitin multipleks düzende çalışabilirliği hem konvansiyonel PCR hem de gerçek zamanlı PCR kullanılarak gösterilmiş, *B.anthraxis*'e filogenetik olarak çok yakın suşlar ile çapraz reaksiyon testleri yapılarak performansları karşılaştırılmış ve literatür kitinin bazı *B. cereus* grubu suşarında yanlış pozitif sonuçlar verdiği, dizayn kitinin ise daha güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır. Bu aşamadan sonra daha fazla suş ile çapraz reaksiyon testleri yapılarak kitlerin güvenilirliğinin ortaya konması faydalı olacaktır. Ayrıca kitlerin hassasiyetini belirlemek için her hedef bölgesi için standartlar oluşturulmalı ve kitlerin deteksiyon limiti standartlarla karşılaştırmalı olarak belirlenmelidir. Bu sayede kitlerin tespit edebileceği en düşük bakteri sayısı tespit edilebilir. Son olarak, farklı çevresel örneklerde kitlerin denenmesi, kitlerin başarı ile kullanılabileceği ortamları belirlemede ve geliştirilmesinde önemli rol oynayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Ågren J, Hamidjaja RA, Hansen T, Ruuls R, Thierry S, Vigre H, Janse I, Sundström A, Segerman B, Koene M, Löfström C, Rotterdam B Van, Derzelle S (2013). In silico and in vitro evaluation of PCR-based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences. *Virulence* 4(8):671–685.
- Andersen GL, Simchock JM, Wilson KH (1996). Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J Bacteriol.* ; 178:377-84
- Anonim 2019a. (MSD Veterinary Manual). <https://www.msdsvetmanual.com/generalized-conditions/anthrax/overview-of-anthrax>, (erişim tarihi, 09.05.2019).
- Anonim 2019b. (MSD Veterinary Manual). <https://www.msdsvetmanual.com/generalized-conditions/anthrax/overview-of-anthrax>, (erişim tarihi 09.05.2019).
- Anonim 2019c. (Anthrax: Disease of the Past Becomes Terror of the Present). http://www.educationupdate.com/archives/2001/nov01/articles/cover_anthrax.html, (erişim tarihi 09.05.2019).
- Anonim 2019d. (pUC57 Plasmid DNA). https://www.genscript.com/vector/SD1176-pUC57_plasmid_DNA.html, (erişim tarihi 21.05.2019).
- Antwerpen MH, Zimmermann P, Bewley K, Frangoulidis D, Meyer H (2008). Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *Bacillus anthracis*. *Mol Cell Probes*; 22:313- 5.
- Arber W. (1965) Host-controlled modification of bacteriophage. *Annu. Rev. Microbiol* 19: 365-78.
- Bartlett JG, Inglesby, Jr. T V., Borio L (2002). Management of Anthrax. *Clinical Infectious Diseases*, 35: 851–858.
- Bassy O, Jiménez-Mateo O, Ortega M. Victoria, Granja C, Cabria JC (2017). Rapid identification of *Bacillus anthracis* by real-time PCR with dual hybridization probes in environmental swabs. *Elsevier. Molecular and Cellular Probes*, 37:22-27.
- Beyer W, Turnbull PCB (2009). Anthrax in animals. *Molecular Aspects of Medicine*, 30:481-489.
- Booth CS, Pienaar E, Termaat JR, Whitney SE, Louw TM, Viljoen HJ (2010). Efficiency of the Polymerase Chain Reaction. *Chem Eng Sci.*, 65(17): 4996–5006.
- Bradley KA, Young JAT (2003). Anthrax toxin receptor proteins. *Biochemical Pharmacology*, 65: 309–314.
- Brook I (2002). The prophylaxis and treatment of anthrax. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20: 320–325.
- Brossier F., Guidi-Rontani C., Mock M., 1998, Anthrax toxins, *C R Seances Soc Biol Fil.*, 192(3):437-44.
- Brossier F, Weber-Levy M, Mock M, Sirard JC (2000). Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infection and Immunity*, 68: 1781–1786.

- Broussard LA (2001). Biological agents: Weapons of warfare and bioterrorism. *Molecular Diagnosis*, 6(4):323-33.
- Cachat E, Barker M, Read TD, Priest FG (2008). A *Bacillus thuringiensis* strain producing a polyglutamate capsule resembling that of *Bacillus anthracis*. *FEMS Microbiology Letters*, 285: 220–226.
- Candela T, Mock M, Fouet A (2005). CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. *Journal of Bacteriology*, 187: 7765–7772.
- Chen J, Kadlubar FF, Chen JZ (2007). DNA supercoiling suppresses real-time PCR: A new approach to the quantification of mitochondrial DNA damage and repair. *Nucleic Acids Research*, 35: 1377-1388.
- Cherif A, Borin S, Rizzi A, Ouzari H, Boudabous A, Daffonchio D (2002). Characterization of a repetitive element polymorphism-polymerase chain reaction chromosomal marker that discriminates *Bacillus anthracis* from related species. *J Appl Microbiol.*, 93:456-62.
- Cheun HI, Makino SI, Watarai M, Shirahata T, Uchida I, Takeshi K (2001). A simple and sensitive detection system for *Bacillus anthracis* in meat and tissue. *J Appl Microbiol.* ; 91:421-6.
- Daffonchio D, Borin S, Frova G, Gallo R, Mori E, Fani R, Sorlini C (1999). A randomly amplified polymorphic DNA marker specific for the *Bacillus cereus* group is diagnostic for *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol.* ; 65:1298-303.
- Dirckx JH (2006). Virgil on anthrax. *The American Journal of Dermatopathology*, 3: 191–196.
- Dixon TC, Meselson M, Guillemin J, Hanna PC (1999). Anthrax. *New England Journal of Medicine*, 341: 815–826.
- Doganay M, Demiraslan H (2015). Human Anthrax as a Re-Emerging Disease. *Recent Patents of Anti-infective Drug Discovery*. 10(1):10-29.
- Drysdale M, Heninger S, Hutt J, Chen Y, Lyons CR, Koehler TM (2005). Capsule synthesis by *Bacillus anthracis* is required for dissemination in murine inhalation anthrax. *EMBO Journal*, 24: 221–227.
- Dwyer KG, Lamonica JM, Schumacher JA, Williams LE, Bishara J, Lewandowski A, Redkar R, Patra G, Delvecchio VG (2004). Identification of *Bacillus anthracis* specific chromosomal sequences by suppressive subtractive hybridization. 11: 1–11.
- Edwards KA, Clancy HA, Baeumner AJ (2006). *Bacillus anthracis*: toxicology , epidemiology and current rapid-detection methods. *Anal Bioanal Chem.* 384(1):73-84.
- Guidi-Rontani C, Pereira Y, Ruffie S, Sirard JC, Weber-Levy M, Mock M (1999). Identification and characterization of a germination operon on the virulence plasmid pXOI of *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology*, 33: 407–414.
- Hart CA, Beeching NJ (2002). A spotlight on anthrax. *Clinics in Dermatology*, 20: 365–375.
- Helgason E, Økstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolstø AB (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - One species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2627–2630.

- Henry L (2001). Inhalational anthrax: threat, clinical presentation, and treatment. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 13: 164–170.
- Hoffmaster AR, Hill KK, Gee JE, Marston CK, De BK, Popovic T, Sue D, Wilkins PP, Avashia SB, Drumgoole R, Helma CH, Ticknor LO, Okinaka RT, Jackson PJ (2006). Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: Strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 3352-3360.
- Hoffmaster AR, Novak RT, Marston CK, Gee JE, Helsel L, Pruckler JM, Wilkins PP (2008). Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using multilocus sequence typing. *BMC Microbiology*, 8: 191
- Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, De BK, Sacchi CT, Fitzgerald C, Mayer LW, Maiden MCJ, Priest FG, Barker M, Jiang L, Cer RZ, Rilstone J, Peterson SN, Weyant RS, Galloway DR, Read TD, Popovic T, Fraser CM (2004). Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 8449–8454.
- Hoffmaster AR, Meyer RF, Bowen MD, Marston CK, Weyant RS, Thurman K, Messenger SL, Minor EE, Winchell JM, Rassmussen MV, et al (2002). Evaluation and validation of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg Infect Dis.* ; 8:1178-82
- Hou Y, Zhang H, Miranda L, Lin S (2010). Serious overestimation in quantitative pcr by circular (supercoiled) plasmid standard: Microalgal pcnaas the model gene. *PLoS ONE*, 5: e9545.
- Irengue LM, Gala JL (2012). Rapid detection methods for *Bacillus anthracis* in environmental samples: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* ; 93:1411-22.
- Jackson PJ, Hugh-Jones ME, Adair DM, Green G, Hill KK, Kuske CR, Grinberg LM, Abramova FA, Keim P (1998). PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims: the presence of multiple *Bacillus anthracis* strains in different victims. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95:1224-9
- Janse I, Hamidjaja RA, Bok JM, van Rotterdam BJ (2010). Reliable detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* by using multiplex qPCR including internal controls for nucleic acid extraction and amplification. *BMC Microbiol.* ; 10:314.
- Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives, *Environmental Microbiology*, 5:631-640.
- Jernigan DB, Raghunathan PL, Bell BP, Brechner R, Bresnitz EA, Butler JC, Cetron M, Cohen M, Doyle T, Fischer M, Greene C, Griffith KS, Guarner J, Hadler JL, Hayslett JA, Meyer R, Petersen LR, Phillips M, Pinner R, Popovic T, Quinn CP, Reefhuis J, Reissman D, Rosenstein N, Schuchat A, Shieh WJ, Siegal L, Swardlow DL, Tenover FC, Traeger M, Ward JW, Weisfuse I, Wiersma S, Yeskey K, Zaki S, Ashford DA, Perkins BA, Ostroff S, Hughes J, Fleming D, Koplan JP, Gerberding JL (2002). Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: Epidemiologic findings. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 1019–1028.
- Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, Jackson PJ, Hugh-Jones ME (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic

relationships within *Bacillus anthracis*. J Bacteriol. ; 182:2928-36

- Kim K, Seo J, Wheeler K, Park C, Kim D, Park S, Kim W, Chung SI, Leighton T (2005). Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. FEMS Immunol Med Microbiol.; 43:301-10.
- Klee SR, Brzuszkiewicz EB, Nattermann H, Brüggemann H, Dupke S, Wollherr A, Franz T, Pauli G, Appel B, Liebl W, Couacy-Hymann E, Boesch C, Meyer FD, Leendertz FH, Ellerbrok H, Gottschalk G, Grunow R, Liesegang H (2010). The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. PLoS ONE, 5: e10986.
- Klee SR, Nattermann H, Becker S, Urban-Schriefer M, Franz T, Jacob D, Appel B (2006a). Evaluation of different methods to discriminate *Bacillus anthracis* from other bacteria of the *Bacillus cereus* group. Journal of Applied Microbiology, 100: 673–681.
- Klee SR, Özel M, Appel B, Boesch C, Ellerbrok H, Jacob D, Holland G, Leendertz FH, Pauli G, Grunow R, Nattermann H (2006b). Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Côte d'Ivoire and Cameroon. Journal of Bacteriology, 188: 5333–5344.
- Klemm DM, Klemm WR (1959). A History of Anthrax. Journal of American Veterinary Medical Association, 135: 458-462.
- Knudson GB (1986). Treatment of anthrax in man: history and current concepts. Military Medicine, 151: 71–77.
- Kolstø A, Tourasse NJ, Økstad OA (2009). What Sets *Bacillus anthracis* Apart from Other *Bacillus* Species ? Annual Review of Microbiology, 63: 451–476.
- Lakshmi N, Kumar AG (1992). An epidemic of human anthrax--a study. J Appl Bacteriol, 35: 1–4.
- Létant SE, Murphy GA, Alfaro TM, Avila JR, Kane SR, Raber E, Bunt TM, Shah SR (2011). Rapid-viability PCR method for detection of live, virulent *Bacillus anthracis* in environmental samples. Appl Environ Microbiol. ; 77:6570-8.
- Lin CH, Chen YC, Pan TM (2011). Quantification bias caused by plasmid DNA conformation in quantitative real-time PCR assay. PLoS ONE, 6(12): e29101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029101> (erişim tarihi, 01.05.2018).
- Luna VA, King DS, Peak KK, Reeves F, Heberlein-Larson L, Veguilla W, Heller L, Duncan KE, Cannons AC, Amuso P, Cattani J (2006). *Bacillus anthracis* virulent plasmid pX02 genes found in large plasmids of two other *Bacillus* species. Journal of Clinical Microbiology, 44(7): 2367-2377.
- Luna VA, King DS, Davis C, Rycerz T, Ewert M, Cannons A, Amuso P, Cattani J (2003). Novel sample preparation method for safe and rapid detection of *Bacillus anthracis* spores in environmental powders and nasal swabs. J Clin Microbiol. ; 41:1252-5.
- Makino S, Watarai M, Cheun H, Shirahata T, Uchida I (2002). Effect of the Lower Molecular Capsule Released from the Cell Surface of *Bacillus anthracis* on the Pathogenesis of Anthrax. The Journal of Infectious Diseases, 186: 227–233.
- Manchee RJ, Broster MG, Anderson IS, Henstridge RM, Melling J (1983). Decontamination

- of *Bacillus anthracis* on Gruinard Island? *Nature*, 303: 239-40.
- Marston CK, Gee JE, Popovic T, Hoffmaster AR (2006). Molecular approaches to identify and differentiate *Bacillus anthracis* from phenotypically similar *Bacillus* species isolates. *BMC Microbiology*, 6: 1–7.
- McClelland (1981). The effect of sequence specific DNA methylation on restriction endonuclease cleavage. *Nucleic Acids Research* 9 (22): 5859-5866.
- Mock M, Fouet A (2001). Anthrax. *Annual Review of Microbiology*, 55: 647-671.
- Mourez M, Lacy DB, Cunningham K, Legmann R, Sellman BR, Mogridge J, Collier RJ, Lacy DB, Collier RJ (2002). 2001 : a year of major advances in anthrax toxin research. *Trends in Microbiology*, 10: 287–293.
- Leski TA, Caswell CC, Pawlowski M, Klinke DJ, Bujnicki JM, Hart SJ, Lukomski S (2009). Identification and classification of *bcl* genes and proteins of *Bacillus cereus* group organisms and their application in *Bacillus anthracis* detection and fingerprinting. *Appl Environ Microbiol.* ; 75:7163-72.
- Lorenz TC (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.* (63), e3998
- Okinaka RT, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster AR, Hill KK, Keim P, Koehler TM, Lamke G, Kumano S, Mahillon J, Manter D (1999a). Sequence and Organization of pXO1 , the Large *Bacillus anthracis* Plasmid Harboring the Anthrax Toxin Genes. *Journal of Bacteriology*, 181: 6509–6515.
- Okinaka R, Cloud K, Hampton O, Hoffmaster A, Hill K, Keim P, Koehler T (1999b). Sequence, assembly and analysis of pXO1 and pXO2. *Journal of Applied Microbiology*, 87(2):261–262.
- Olsen JS, Skogan G, Fykse EM, Rawlinson EL, Tomaso H, Granum PE, Blatny JM (2007). Genetic distribution of 295 *Bacillus cereus* group members based on *adk*-screening in combination with MLST (Multilocus Sequence Typing) used for validating a primer targeting a chromosomal locus in *B. anthracis*. *J Microbiol Methods*; 71:265-74.
- Owczarzy R, Moreira BG, You Y, Behlke MA, Walder JA (2008). Predicting Stability of DNA Duplexes in Solutions Containing Magnesium and Monovalent Cations. *Biochemistry* (47):5336–5353
- Pannucci J, Okinaka RT, Sabin R, Kuske CR (2002a). *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *Journal of Bacteriology*, 184: 134–141.
- Pannucci J, Okinaka RT, Williams E, Sabin R, Ticknor LO, Kuske CR (2002b). DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. *BMC Genomics*; 3:34.
- Ramisse V, Patra G, Garrigue H, Guesdon JL, Mock M (1996). Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett.*; 145:9-16.
- Ramisse V, Patra G, Vaissaire J, Mock M (1999). The Ba813 chromosomal DNA sequence effectively traces the whole *Bacillus anthracis* community. *J Appl Microbiol.* ; 87:224-8
- Rao SS, Mohan KV, Atreya CD (2010). Detection technologies for *Bacillus anthracis*:

- prospects and challenges. *J. Microbiol Methods*; 82:1-10.
- Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(2):303-29.
- Read Timothy D., Peterson SN, Tourasse N, Baillie LW, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Holtzapple EK, Økstad OA, Helgason E, Rilstone J, Wu M, Kolonay JF, Beanan MJ, Dodson RJ, Brinkac LM, Gwinn M, DeBoy RT, Madpu R, Daugherty SC, Durkin AS, Haft DH, Nelson WC, Peterson JD, Pop M, Khouri HM, Radune D, Benton JL, Mahamoud Y, Jiang L, Hance IR, Weidman JF, Berry KJ, Plaut RD, Wolf AM, Watkins KL, Nierman WC, Hazen A, Cline R, Redmond C, Thwaite JE, White O, Salzberg SL, Thomason B, Friedlander AM, Koehler TM, Hanna PC, Kolstø AB, Fraser CM (2003). The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*,. 423(6935):81-6.
- Ross JM (1957). The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by the respiratory route. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 73: 485–494.
- Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res.* 18, 6409–6412.
- Ryu C, Lee K, Yoo C, Seong WK, Oh HB (2003). Sensitive and rapid quantitative detection of anthrax spores isolated from soil samples by real-time PCR. *Microbiol Immunol.* ; 47:693-9.
- Satterfield Brent C, Kulesh DA, Norwood DA, Wasieloski LP, Caplan MR, West JAA (2007a). Tentacle Probes TM: Differentiation of Difficult Single-Nucleotide Polymorphisms and Deletions by Presence or Absence of a Signal in Real-Time PCR. *Clinical Chemistry*, 2050: 2042–2050.
- Satterfield Brent C., West JAA, Caplan MR (2007b). Tentacle probes: Eliminating false positives without sacrificing sensitivity. *Nucleic Acids Research*, 35: 1–11.
- Schlingman A, Devlin H, Wright G, Maine R, Manning M (1956). Immunizing activity of alum-precipitated protective antigen of *Bacillus anthracis* in cattle, sheep and swine. *American Journal of Veterinary Research*, 17: 256–261.
- Sozhamannan S, Chute MD, McAfee FD, Fouts DE, Akmal A, Galloway DR, Mateczun A, Baillie LW, Read TD (2006). The *Bacillus anthracis* chromosome contains four conserved, excision-proficient, putative prophages. *BMC Microbiology*, 6.
- Sterne M (1937). Variation in *Bacillus anthracis*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, 8: 271–348.
- Sterne M (1959). Anthrax. *Infectious Diseases of Animals*. Stableforth A, Galloway I, London, Butterworths, Ss. 16–52.
- Sterne M (1966). Anthrax. *International Encyclopaedia of Veterinary Medicine*, In: Dalling T ed. W. Green and Son Ltd., Ss. 221–230, Edinburgh.
- Tourasse NJ, Helgason E, Økstad OA, Hegna IK, Kolstø AB (2006). The *Bacillus cereus* group: Novel aspects of population structure and genome dynamics. *Journal of Applied Microbiology*,. 101(3):579-93.
- Turnbull P (Ed.) (2008). Anthrax in humans and animals. World Health Organization, 219s, Geneva.

- Turnbull PCB, Hutson RA, Ward MJ, Jones MN, Quinn CP, Finnie NJ, Duggleby CJ, Kramer JM, Melling J (1992). *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *Journal of Applied Bacteriology*, 72(1):21-8.
- Valjevac S, Hilaire V, Lisanti O, Ramisse F, Hernandez E, Cavallo JD, Pourcel C, Vergnaud G (2005). Comparison of minisatellite polymorphisms in the *Bacillus cereus* complex: A simple assay for large-scale screening and identification of strains most closely related to *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11):6613-23.
- Wang A, Ash GJ (2015). Whole Genome Phylogeny of *Bacillus* by Feature Frequency Profiles (FFP). *Scientific Reports*, 5: 13644.
- Watson A, Keir D (1994). Information on which to base assessments of risk from environments contaminated with anthrax spores. *Epidemiology and Infection*, 113: 479–490.
- Wielinga PR, Hamidjaja RA, Ågren J, Knutsson R, Segerman B, Fricker M, Ehling-Schulz M, de Groot A, Burton J, Brooks T, Janse I, van Rotterdam B (2011). A multiplex real-time PCR for identifying and differentiating *B. anthracis* virulent types. *Elsevier B.V. International Journal of Food Microbiology*, 145: 137–144.
- Zwick ME, Joseph SJ, Didelot X, Chen PE, Bishop-Lilly KA, Stewart AC, Willner K, Nolan N, Lentz S, Thomason MK, Sozhamannan S, Mateczun AJ, Du L, Read TD (2012). Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: Backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Research*, 22(8): 1512-24.

EKLER

EK 1 – Dizayn ve Literatür Setleri İçerisinde Yer Alan Primerlerin *in-silico* Analizleri

Kromozomal Bölge Primerleri- Dizayn Seti

➤ **LambdaBa03 İleri Primer:** 5' - TCGCTGGACAACCTCTCAAC-3'

Başlangıç nükleotit pozisyonu: 4847460

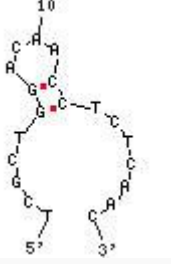
Bitiş: 4847479

T_m sıcaklığı: 59,97°C

GC %: 55

Kendi üzerine eşleniklik: 2, 00

3' üzerine eşleniklik: 0,00

İkincil					
Yapı	Görünüm	$\Delta G(\text{kcal.mol}^{-1})$	T _m (°C)	$\Delta H(\text{kcal.mol}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mol}^{-1})$
1		-0.73	34.3	-24.1	-78.39

➤ **LambdaBa03 Geri Primer:** 5' - ATGTGGCGTTTCACTGTTGC-3'

Başlangıç nükleotit pozisyonu: 4848137

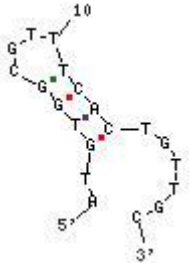
Bitiş: 4848118

T_m: 59,97°C

GC%: 50

Kendi üzerine eşleniklik: 3,00

3' üzerine eşleniklik: 2,00

İkincil Yapı	Görünüm	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	T_m (°C)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mol ⁻¹)
1		-0.22	27.8	-23.7	-78.76

Hetero-Dimer Analizi

LambdaBa03 ileri primer: 5'- TCGCTGGACAACCTCTCAAC -3'

LambdaBa03 geri primer: 5'- ATGTGGCGTTTCACTGTTGC -3'

Maksimum Delta G: -38.58 kcal/mol

Delta G: -6.75 kcal/mol **Baz çifti:** 3

```

      5' TCGCTGGACAACCTCTCAAC
          |||
      3' CGTTGTCACCTTGCGGTGTA

```

Homo-Dimer Analizi

İleri Primer

Dimer Sekansı: 5'- TCGCTGGACAACCTCTCAAC -3'

Maksimum Delta G: -37.76 kcal/mol

Delta G: -3.61 kcal/mol **Baz çifti:** 2

```

      5' TCGCTGGACAACCTCTCAAC
          ||
      3' CAACTCTCCAACAGGTCGCT

```

Geri Primer

Dimer Sekansı: 5'- ATGTGGCGTTTCACTGTTGC -3'

Maksimum Delta G: -38.58 kcal/mol

Delta G: -3.61 kcal/mol **Baz çifti:** 2



pXO1 Primerleri- Dizayn Seti

➤ **Pag İleri Primer:** 5'- CCTTGTGGCAGCTTATCCGA-3'

Başlangıç nükleotit pozisyonu: 781

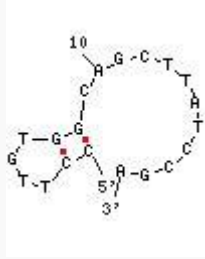
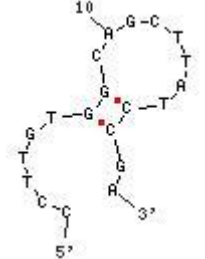
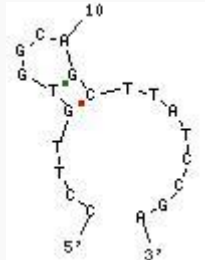
Bitiş: 800

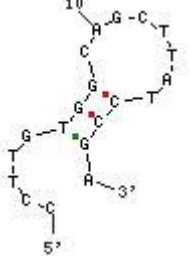
T_m sıcaklığı: 60,11°C

GC %: 55

Kendi üzerine eşleniklik: 4, 00

3' üzerine eşleniklik: 3,00

İkincil Yapı	Görünüm	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	T _m (°C)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mol ⁻¹)
1		0.48	14.8	-13.5	-46.89
2		0.97	8.1	-16.2	-57.59
3		1.33	0	-14.5	-53.08

4		1.4	-3.2	-13.4	-49.63
---	---	-----	------	-------	--------

➤ **Pag Geri Primer:** 5'- GTAGATTGGAGCCGTCCCAG-3'

Başlangıç nükleotit pozisyonu: 1144

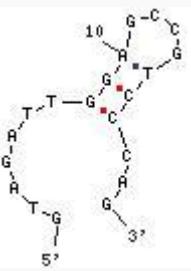
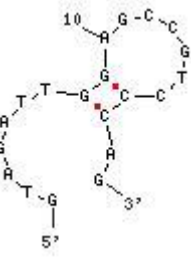
Bitiş: 1125

T_m sıcaklığı: 59,89°C

GC %: 60

Kendi üzerine eşleniklik: 4,00

3' üzerine eşleniklik: 2,00

İkincil Yapı	Görünüm	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	T _m (°C)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mol ⁻¹)
1		-0.91	36.2	-25	-80.81
2		0.09	23.8	-22.8	-76.78

Hetero-Dimer Analizi

Pag ileri primer: 5'- CCTTGTGGCAGCTTATCCGA -3'

Pag geri primer: 5'- GTAGATTGGAGCCGTCCCAG -3'

Maksimum Delta G: -40.57 kcal/mol

Delta G: -6.21 kcal/mol **Baz çifti:** 3

```
5' CCTTGTGGCAGCTTATCCGA
      ||| :
3' GACCCTGCCGAGGTTAGATG
```

Homo-Dimer Analizi

İleri Primer:

Dimer Sekansı: 5'- CCTTGTGGCAGCTTATCCGA -3'

Maksimum Delta G: -40.57 kcal/mol

Delta G: -6.34 kcal/mol **Baz çifti:** 4

```
5' CCTTGTGGCAGCTTATCCGA
      : : ||| : :
3' AGCCTATTCGACGGTGTTC
```

Geri Primer:

Dimer Sekansı: 5'- GTAGATTGGAGCCGTCCCAG -3'

Maksimum Delta G: -39.52 kcal/mol

Delta G: -5.02 kcal/mol **Baz çifti:** 3

```
5' GTAGATTGGAGCCGTCCCAG
      ||| : : ::
3' GACCCTGCCGAGGTTAGATG
```

pXO2 Primerleri- Dizayn Seti

➤ **DCapB İleri Primer:** 5'- TGCTTTAGCGGTAGCAGAGG-3'

Başlangıç nükleotit pozisyonu: 932

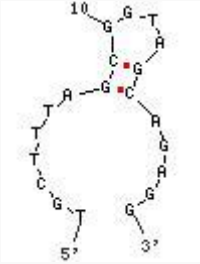
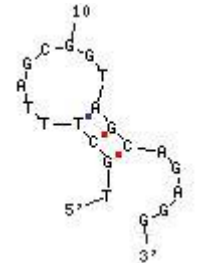
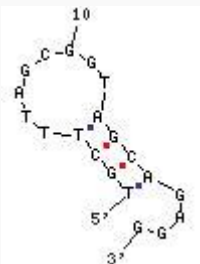
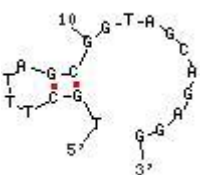
Bitiş: 951

Tm: 59,82°C

GC %: 55

Kendi üzerine eşleniklik: 4,00

3' üzerine eşleniklik: 0,00

İkincil Yapı	Görünüm	$\Delta G(\text{kcal.mol}^{-1})$	$T_m(^{\circ}\text{C})$	$\Delta H(\text{kcal.mol}^{-1})$	ΔS ($\text{cal.K}^{-1}\text{mol}^{-1}$)
1		-1.39	42.9	-24.5	-77.52
2		-1.12	36.2	-30.7	-99.22
3		-0.92	34.3	-30.3	-98.55
4		-0.64	34.6	-20.7	-67.27

➤ **DCapB Geri Primer:** 5'- AGTACGATCAACGCGGTCAG-3'

Nükleotit başlangıç pozisyonu: 1190

Bitiş: 1171

T_m: 60°C

GC%: 55

Kendi üzerine eşleniklik: 4,00

3' üzerine eşleniklik:2,00

İkincil Yapı	Görünüm	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$T_m(^{\circ}C)$	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mol ⁻¹)
1		-1.26	42.1	-23.1	-73.26
2		-0.35	29.3	-24.2	-80

Hetero-Dimer Analizi:

DCapB ileri primer: 5'- AGTACGATCAACGCGGTCAG -3'

DCapB geri primer: 5'- TGCTTTAGCGGTAGCAGAGG -3'

Maksimum Delta G: -39.8 kcal/mol

Delta G: -6.75 kcal/mol **Baz Çifti:**3

5' AGTACGATCAACGCGGTCAG

: : |||

3' GGAGACGATGGCGATTTCGT

Homo-Dimer Analizi

İleri Primer:

Dimer sekansı: 5'- TGCTTTAGCGGTAGCAGAGG -3'

Maksimum Delta G: -39.8 kcal/mol

Delta G: -6.69 kcal/mol **Baz Çifti:** 4

5' TGCTTTAGCGGTAGCAGAGG
 : : : : : : : : : :
 3' GGAGACGATGGCGATTTCGT

Geri Primer:

Dimer Sekansı: 5'- AGTACGATCAACGCGGTCAG -3'

Maksimum Delta G: -38.62 kcal/mol

Delta G: -10.36 kcal/mol **Baz Çifti:** 4

5' AGTACGATCAACGCGGTCAG
 : : : : : : : : : :
 3' GACTGGCGCAACTAGCATGA

Kromozomal Bölge Primerleri – Literatür Seti

➤ **E4 İleri Primer:** 5'- AGCAAAAGCTAACTGCTCGGG-3'

Nükleotit başlangıç pozisyonu: 460713

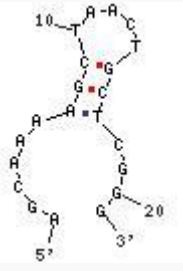
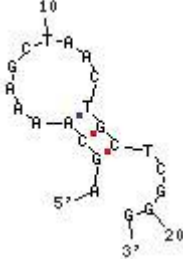
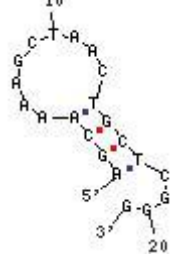
Bitiş: 460733

Tm: 61,22°C

GC%: 52,38

Kendi üzerine eşleniklik: 4,00

3' üzerine eşleniklik: 2,00

İkincil Yapı	Görünüm	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$T_m(^{\circ}C)$	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mol ⁻¹)
1		-1.49	48.4	-20.5	-63.76
2		-0.86	34.4	-28.1	-91.36
3		-0.86	35.7	-24.8	-80.3

➤ **E4 Geri Primer:** 5'-TCTACCCCTTCAGGATTAGCG-3'

Nükleotit başlangıç pozisyonu: 460947

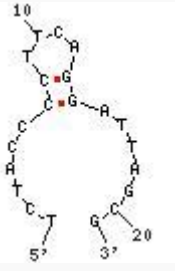
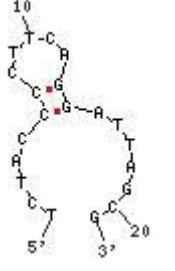
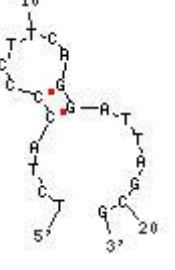
Bitiş: 460927

T_m : 58,68°C

GC%: 52,38

Kendi üzerine eşleniklik: 6,00

3' üzerine eşleniklik: 2,00

İkincil Yapı	Görünüm	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$T_m(^{\circ}C)$	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mol ⁻¹)
1		-0.89	38.5	-20.5	-65.78
2		-0.75	38.8	-16.9	-54.18
3		-0.57	34.3	-18.8	-61.14

Hetero-Dimer Analizi

E4 ileri primer sekansı: 5'- AGCAAAAGCTAACTGCTCGGG -3'

E4 geri primer sekansı: 5'- TCTACCCCTTCAGGATTAGCG -3'

Maksimum Delta G: -42.72 kcal/mol

Delta G: -7.64 kcal/mol **Baz Çifti:** 5

```

5' AGCAAAAGCTAACTGCTCGGG
   |||||
3' GCGATTAGGACTTCCCCATCT

```

Homo-Dimer Analizi

İleri Primer:

Dimer sekansı: 5'- AGCAAAAGCTAACTGCTCGGG -3'

Maksimum Delta G: -42.72 kcal/mol

Delta G: -6.69 kcal/mol **Baz Çifti:** 4

```
      5' AGCAAAAGCTAACTGCTCGGG
          ||||
      3' GGGCTCGTCAATCGAAAACGA
```

Geri Primer:

Dimer sekansı: 5'- TCTACCCCTTCAGGATTAGCG -3'

Maksimum Delta G: -40.73 kcal/mol

Delta G: -4.67 kcal/mol **Baz Çifti:** 3

```
      5' TCTACCCCTTCAGGATTAGCG
          :::: ||| :::: ::::
      3' GCGATTAGGACTTCCCCATCT
```

pXO1 Primerleri- Literatür Seti

➤ **Cya İleri Primer:** 5'- AGGTAGATTTATAGAAAAAACATTACGGG - 3'

Nükleotit başlangıç pozisyonu: 1833

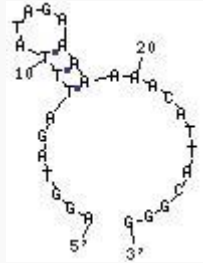
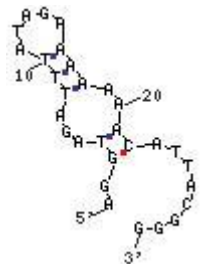
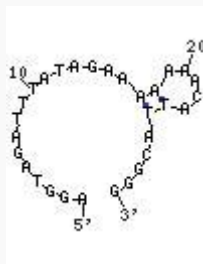
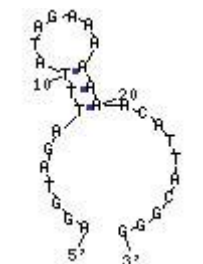
Bitiş: 1862

Tm: 58,74°C

GC%: 30,00

Kendi üzerine eşleniklik: 6,00

3' üzerine eşleniklik: 0,00

İkincil Yapı	Görünüm	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$T_m(^{\circ}C)$	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mol ⁻¹)
1		0.32	20.1	-19.2	-65.46
2		0.51	21.5	-42.6	-144.59
3		0.93	-1.8	-9.4	-34.64
4		1.28	6.4	-19.2	-68.69

➤ **Cya Geri Primer:** 5'- GCTGACGTAGGGATGGTATT-3'

Nükleotit başlangıç pozisyonu: 1982

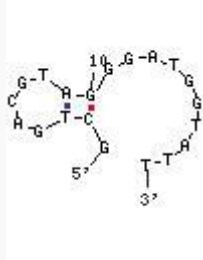
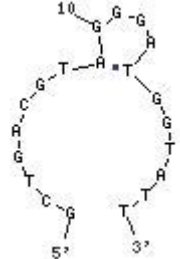
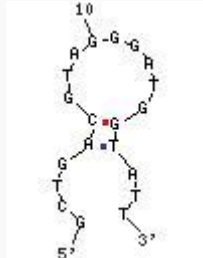
Bitiş: 1963

T_m : 56,80°C

GC%: 50,00

Kendi üzerine eşleniklik: 4,00

3' üzerine eşleniklik: 1,00

İkincil Yapı	Görünüm	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$T_m(^{\circ}C)$	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mol ⁻¹)
1		0.26	20.9	-19.1	-64.95
2		0.55	9.5	-10.1	-35.73
3		1.11	-2.5	-10.9	-40.28

Hetero-Dimer Analizi

Cya ileri primer sekansı: 5'- AGGTAGATTTATAGAAAAAACATTACGGG-3'

Cya geri primer sekansı: 5'- GCTGACGTAGGGATGGTATT -3'

Maksimum Delta G: -52.51 kcal/mol

Delta G: -5.91 kcal/mol **Baz Çifti:** 4

5' AGGTAGATTTATAGAAAAAACATTACGGG
: : : : ||||
3' TTATGGTAGGGATGCAGTCG

Homo-Dimer Analizi

İleri Primer:

Dimer sekansı: 5'- AGGTAGATTTATAGAAAAAACATTACGGG -3'

Maksimum Delta G: -52.51 kcal/mol

Delta G: -3.89 kcal/mol **Baz Çifti:** 3

5' AGGTAGATTTATAGAAAAAACATTACGGG
: : : ||| : : : : : : :
3' GGGCATTACAAAAAAGATATTTAGATGGA

Geri Primer:

Dimer sekansı: 5'- GCTGACGTAGGGATGGTATT -3'

Maksimum Delta G: -37.05 kcal/mol

Delta G: -6.3 kcal/mol **Baz Çifti:** 4

5' GCTGACGTAGGGATGGTATT
: |||| :
3' TTATGGTAGGGATGCAGTCG

pXO2 Primerleri- Literatür Seti

➤ **LCapB İleri Primer:** 5'- AGCAAATGTTGGAGTGATTGTAAATG-3'

Nükleotit başlangıç pozisyonu: 671

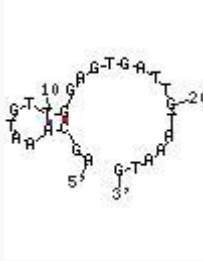
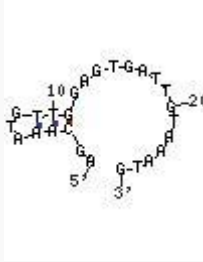
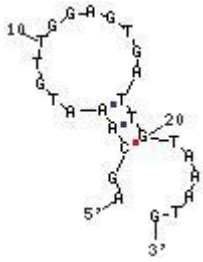
Bitiş: 696

Tm: 59,13°C

GC%: 34,62

Kendi üzerine eşleniklik: 4,00

3' üzerine eşleniklik: 2,00

İkincil Yapı	Görünüm	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$T_m(^{\circ}C)$	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.K ⁻¹ mol ⁻¹)
1		-0.42	30.6	-22.5	-74.07
2		-0.37	28	-36.9	-122.51
3		0.03	24.6	-23.2	-77.91
4		0.13	23.7	-29.1	-98.03

➤ **LCapB Geri Primer:** 5'- AAAGTAATCCAAGTATTCAC TTTCAATAG-3'

Nükleotit başlangıç pozisyonu: 818

Bitiş: 790

T_m : 56,91°C

GC%: 27,59

3' üzerine eşleniklik: 3,00

Hetero-Dimer Analizi

LCapB geri primer sekansı: 5'- AAAGTAATCCAAGTATTCAC TTTCAATAG -3'

Delta G: -8.54 kcal/mol Baz Çifti: 5

Homo-Dimer Analizi

Maksimum Delta G: -45.36 kcal/mol

Delta G: -3.9 kcal/mol **Baz Çifti:** 3

```
          5'AGCAAATGTTGGAGTGATTGTAAATG
              |||   : : :
3' GTAAATGTTAGTGAGGTTGTAAACGA
```

Geri Primer:

Dimer sekansı: 5'- AAAGTAATCCAAGTATTCACTTTCAATAG -3'

Maksimum Delta G: -46.94 kcal/mol

Delta G: -6.83 kcal/mol **Baz Çifti:** 5

```
          5' AAAGTAATCCAAGTATTCACTTTCAATAG
              ||||| :   : : : :
3' GATAACTTTCAC TTATGAACCTAATGAAA
```

EK 2 – ICD ve ICL Fragmentlerinin Sekansları

ICD sekansı:

GTAACTCGCTGGACAACCTCTCAACCTTTTTTCCAGCCATTGCCTTACATTTTGC
AACGGTCACAATAAAATGAGTATGTAAACCTTATAGAAATGGAGACATGCCAAA
TGGGAGATAAAAAACGAATTTTCAAAGTTAAAGTAGTCAATTTTTTTATTAAACA
TGGAGCTGAACTGTTAGAAGTTCGTACAGGGGAAGTGGAACGACCCAAAAGC
TTGCACATTTTTATTGCTAACGATGACAAGCTTTCTGGAGCATTAATCGCATTAA
AAGAATACAAC**AAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCC**
ATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAA
CCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGC
GTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCG
ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAA
GTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACCTTGA
GCCAAAAGAAAATGGAGTGACGGTTTTTAAAAGATGTTGCACCTAAAACAAACGA
ACTCAAAGAAACGATTTAAAAAACATCGAATTGATTCTTAAAGCTGTATTGATT
GATAATGTGTTACCAATGCCAGAAGAAATTTCTAAAAGCATCGGAAAAAGTGAA
GCAACAGTGAAACGCCACATAGGCCT

ICL sekansı:

GTAACTAGCAAAAGCTAACTGCTCGGGTAATGGAATATGGTTTCGAAATGGGTTGT
CTACAGTATTGACGGAATATT**AAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG**
TAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATA
ACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGA
GTTTTATTTCAGGGGAGGAAGAGAATGAGTAAAGTAATTGAAGGACAAGAAGTTT
ATGTAAGCACAAGTGTTGGATGGGTAGGTAAGTCAGAACCTAATTTAAGAAAAT
ACATCGTTGTCAGAGCTAATAAAACAAGTTTTTACGCTAATCCTGAAGGGGTAGA
AGGCCT



HpaI tanıma bölgesi



StuI tanıma bölgesi



B. anthracis Ames 16S rDNA sekansı



ICD için LambdaBa03 hedef bölgesi, ICL için E4 hedef bölgesi kısımları