

**Kromozomal DNA Ayırımında Kullanılan Düşük Maliyetli  
Atımlı Alan Elektroforez Cihazının Tasarımı Ve  
Optimizasyonu**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BURAK KOZAN**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**MERSİN  
TEMMUZ - 2019**

**Kromozomal DNA Ayrımında Kullanılan Düşük Maliyetli  
Atımlı Alan Elektroforez Cihazının Tasarımı Ve  
Optimizasyonu**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BURAK KOZAN**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

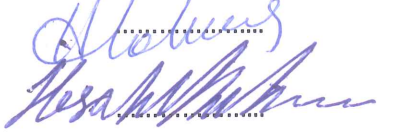
**BİYOTEKNOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi İBRAHİM KÜÇÜKKARA**

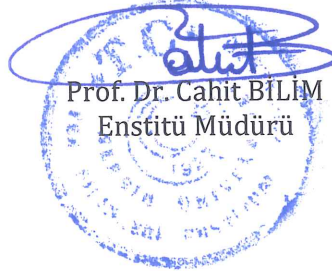
**MERSİN  
TEMMUZ - 2019**

## ONAY

Burak KOZAN tarafından Dr. Öğr. Üyesi İbrahim KÜÇÜKKARA danışmanlığında hazırlanan "Kromozomal DNA Ayırımında Kullanılan Düşük Maliyetli Atımlı Alan Elektroforez Cihazının Tasarımı ve Optimizasyonu" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 30/07/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

| Görevi | Ünvanı, Adı ve Soyadı             | İmza                                                                                |
|--------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Başkan | Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ |  |
| Üye    | Dr. Öğr. Üyesi İbrahim KÜÇÜKKARA  |  |
| Üye    | Dr. Öğr. Üyesi Dilek TEKDAL       |  |

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20/08/19 tarih ve 2018.32./1252 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



*Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.*

## ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

## ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

15 / 08 / 2019

Burak KOZAN

## ÖZET

### Kromozomal DNA Ayrımında Kullanılan Düşük Maliyetli Atımlı Alan Elektroforez Cihazının Tasarımı ve Optimizasyonu

Agaroz jel esaslı DNA elektroforezi, moleküler biyolojide en sık kullanılan tekniklerden birisidir. Pratik çözüm aralığı (yaklaşık 50 kb'a kadar) PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), moleküler klonlama ve plazmid manipülasyonu dahil olmak üzere diğer birçok yaygın tekniklerle örtüşür. Ancak, yukarıda bahsedilen boyut sınırlaması göz önüne alındığında, geleneksel jel elektroforez teknikleri kullanılarak sağlam kromozomal DNA moleküllerinin, çok büyük DNA parçalarının veya doğrudan genomik analizlerinin yapılması mümkün değildir. Konvansiyonel DNA elektroforezi oldukça kolaydır: sabit bir elektrik alanı agaroz jele uygulanır ve küçük DNA molekülleri boyuta bağlı bir şekilde elenir. Fakat çok büyük DNA moleküllerinin ayrıştırılması gerektiği zaman bu eleme etkisi başarısız olabilir. Bunun nedeni büyük DNA moleküllerinin çözelti içerisinde yumuşak, top gibi halkasal halde bulunmasıdır. Bu moleküller ancak sıkı jel matriksinden geçişine izin verecek kadar ciddi bir çözünmeden sonra küçük parçalarından geçebilir. Bu etki bir eleme jel matrisi vasıtasıyla büyük ve küçük moleküllerin geçişini sağlarken, aynı zamanda, ne yazık ki, boyuta bağlı elektroforetik hareketliliğin ayırım için etkisini ortadan kaldırmaktadır. Bu istenmeyen durumun varlığı, son derece düşük jel konsantrasyonları veya düşük elektrik alan kuvveti kullanılarak zayıflatılır, ancak DNA boyutları yaklaşık 200 kb'yi aştığında bu çözümler de yeterli olmayacaktır. Ayrıca standart jel elektroforezinde kullanılan pipetleme yöntemi büyük boyuttaki DNA parçaları için sorun teşkil etmektedir. Çünkü büyük boyuttaki DNA parçaları oldukça kırılğan yapıdadır. Bunların pipetlenmesi büyük sorundur ve kırılmalarına neden olacaktır. 1983' de Schwartz ve Cantor, bu sınırlamaları atlatmak için milyonlarca baz çifti boyutuna kadar olan çok büyük DNA moleküllerinin ayırımlarına izin veren bir yöntem olarak Atımlı Alan Elektroforezi'ni geliştirdi. Bu teknik 5 Mb'yi aşan DNA moleküllerini çözebilmektedir. Üst sınır hala bilinmiyor. Bu cihaz elektrik alanının yönünü düzenli olarak değiştirerek ilk elektrik alanının ortadan kalkmasından dolayı jel içindeki DNA moleküllerinin gevşemesine son olarak da yeni alanda DNA moleküllerinin uzayarak hizaya girmesini sağlamaktadır. Bizler de bu cihazı 4 yollu 5 voltluk arduino uno kartı ile günümüz teknolojisine uyarlayarak daha düşük maliyette tasarladık. Cihazı dijital kontrollü hale getirdik. Milisaniye cinsinden kontrolünü de sağladık.

**Anahtar Kelimeler:** Atımlı alan, Elektroforez, Agaroz, Arduino, Elektriksel Alan.

**Danışman:** Dr. Öğr. Üyesi İbrahim KÜÇÜKKARA, Mersin Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Mersin.

## ABSTRACT

### Design and Optimization of Low Cost Pulse Field Electrophoresis Device Used in Chromosomal DNA Separation

Agarose-based DNA electrophoresis is one of the most commonly used techniques in molecular biology. The range of practical solutions (up to about 50 kb) coincide with many other standart techniques, including PCR, molecular cloning and plasmid manipulation. However, given the size above limitation, it is not possible to perform robust chromosomal DNA molecules, very huge DNA fragments or direct genomic analyzes using conventional gel electrophoresis techniques. Conventional DNA electrophoresis is quite easy: a constant electric field is applied to the agarose gel and small DNA molecules are sieved in a size-dependent manner. However, this screening effect may fail when very large DNA molecules need to be separated. This is because large DNA molecules are present in solution in a soft, ball-like ring. These molecules can only pass through small pores after severe dissolution to allow passage through the tight gel matrix. This effect allows the passage of large and small molecules through a sieving gel matrix, while at the same time eliminating the effect of size-dependent electrophoretic mobility for separation. The presence of this undesirable condition is attenuated using deficient gel concentrations or low electric field strength, but these solutions will not be sufficient when the DNA size exceeds about 200 kb. In addition, the pipetting method used in standard gel electrophoresis is problematic for large DNA fragments. Because large DNA fragments are very fragile, pipetting them is a big problem and will cause breaks. In 1983, Schwartz and Cantor developed Pulse Field Electrophoresis, a method that allowed the separation of very large DNA molecules up to millions of base pairs to circumvent these limitations. This technique can dissolve DNA molecules exceeding 5 Mb. The upper limit is still unknown. This device changes the direction of the electric field regularly, resulting in the relaxation of the DNA molecules in the gel due to the disappearance of the first electric field, and finally the extension of the DNA molecules in the new field. We designed this device with the 4-way 5-volt Arduino Uno card to today's technology at a lower cost. Moreover we made the device digitally controlled. We now have control in milliseconds.

**Keywords:** Pulsed Field, Electrophoresis, Agarose, Arduino, Electrical Field.

**Advisor:** Asst. Prof. Dr. İbrahim KÜÇÜKKARA, Department of the Biotechnology, Mersin University, Mersin.

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İbrahim KÜÇÜKKARA'ya, yardımcı danışmanım Sayın Prof. Dr. Gökhan CORAL'a, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Dilek TEKDAL'a, Arş. Gör. Gizem YILDIZLI'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Hiçbir yardımı benden esirgemeyen candan da öte babam Mehmet KOZAN'dan, annem Necibe KOZAN'dan, kardeşlerim Burcu ÇİY ve Saadet KOZAN'dan, biricik eşim Semiha KOZAN'dan ve biricik kızım Ebrar KOZAN'dan Allah razı olsun, hepsine çok teşekkür ederim.

Bu çalışmayı 2017-2-TP2-2547 numaralı araştırma projesi ile destekleyen Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)'ne teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                           | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| İÇ KAPAK                                                                                                                  | i     |
| ONAY                                                                                                                      | ii    |
| ETİK BEYAN                                                                                                                | iii   |
| ÖZET                                                                                                                      | iv    |
| ABSTRACT                                                                                                                  | v     |
| TEŞEKKÜR                                                                                                                  | vi    |
| İÇİNDEKİLER                                                                                                               | vii   |
| TABLolar DİZİNİ                                                                                                           | viii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                                                                                           | ix    |
| KISALTMALAR ve SİMGELER                                                                                                   | x     |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                                                                           | 1     |
| <b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI</b>                                                                                            | 3     |
| 2.1. Elektroforez Nedir?                                                                                                  | 3     |
| 2.2. Elektroforez Tarihçesi                                                                                               | 6     |
| 2.3. Elektroforez Fizikokimyası                                                                                           | 7     |
| 2.4. Elektroforez Ekipmanları                                                                                             | 8     |
| 2.5. Elektroforez Çeşitleri                                                                                               | 13    |
| 2.5.1. Kağıt ve Selüloz Asetat Elektroforezi                                                                              | 13    |
| 2.5.2. AgaroZ Jel Elektroforezi                                                                                           | 14    |
| 2.5.3. Poliakrilamid Jel Elektroforezi                                                                                    | 15    |
| 2.5.4. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)                                                                              | 17    |
| 2.5.5. Kapiller Elektroforez                                                                                              | 17    |
| 2.5.6. İmmünoelektroforez                                                                                                 | 20    |
| 2.6. Pulsed Field Jel Elektroforez (PFGE)                                                                                 | 20    |
| 2.6.1. PFGE Tarihçesi                                                                                                     | 25    |
| 2.6.2. Neden PFGE Cihazı Tercih Edilir?                                                                                   | 25    |
| 2.6.3. PFGE Ekipmanları                                                                                                   | 26    |
| 2.6.4. PFGE Jel Elektroforez Çeşitleri                                                                                    | 27    |
| 2.6.4.1. Alan İnverson Jel Elektroforezi (Field İnverson Gel Electrophoresis, FİGE)                                       | 28    |
| 2.6.4.2. Transvers-Dalgalı Alan Jel Elektroforezi (Transverse-Alternating Field Gel Electrophoresis, Tafe)                | 29    |
| 2.6.4.3. Pulsed-Homojen Ortogonal Alan Jel Elektroforezi (Pulsed-Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis, Phoge) | 30    |
| 2.6.4.4. Ortogonal-Field Alternation Jel Elektroforezi (Orthogonal-Field Alternation Gel Electrophoresis, Ofage)          | 31    |
| 2.6.4.5. Programlanabilir Bağımsız Kontrollü Elektrotlar (Programmable Autonomously-Controlled Electrodes, Pace)          | 31    |
| 2.6.4.6. Atımlı Alan Jel Elektroforezi Cihazı (Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields)                               | 32    |
| 2.7. PFGE Kullanım Alanları                                                                                               | 32    |
| 2.8. Atımlı Alan Jel Elektroforezi Cihazı (CHEF Cihazı)                                                                   | 35    |
| 2.8.1. Atımlı Alan Jel Elektroforezi Cihazının Fizikokimyası                                                              | 36    |
| 2.8.2. Ardunio                                                                                                            | 37    |
| 2.8.2.1. Teknik Özellikler                                                                                                | 37    |
| 2.8.3. 4 Yollu 5V'luk Röle Modülü                                                                                         | 38    |
| <b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b>                                                                                              | 40    |
| 3.1. Chef Şekli (Atımlı Alan Jel Elektroforezi)                                                                           | 40    |
| 3.2. Tampon Tankı Ve Elektrotlar                                                                                          | 41    |
| 3.3. Genomik DNA Separasyonu                                                                                              | 41    |
| 3.4. PFGE İçin Gerekli Solüsyonlar                                                                                        | 41    |
| 3.4.1. 0,5x TBE (Tris, Borik Asit, EDTA) Solüsyonu (200 ML)                                                               | 41    |

|                                                                                     | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.5. Agaroz Solüsyonu (%1) (150 ML)                                                 | 41    |
| 3.6. Yükleme Tamponu                                                                | 41    |
| 3.7. Yürütme Tamponu 1x                                                             | 41    |
| 3.8. Ethidium Bromid Solüsyonu 10 Mg/ML                                             | 42    |
| 3.9. Boyayı Geri Alma Solüsyonu 1mm Mgso <sub>4</sub> 200 ML                        | 42    |
| 3.10. PFGE Agaroz Jelinin Hazırlanması, Örneklerin Jele Uygulanması Ve Elektroforez | 42    |
| 3.11. CHEF-PFGE Sisteminde Kullanılan Puls Periyotları                              | 42    |
| 3.12. Agaroz Jelin Boyanması                                                        | 43    |
| <b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA</b>                                                      | 44    |
| 4.1. Deney 1                                                                        | 44    |
| 4.2. Deney 2                                                                        | 44    |
| 4.3. Deney 3                                                                        | 45    |
| 4.4. Deney 4                                                                        | 45    |
| 4.5. Deney 5                                                                        | 46    |
| 4.6. Deney 6                                                                        | 47    |
| 4.7. Deney 7                                                                        | 47    |
| 4.8. Deney 8                                                                        | 48    |
| 4.9. Deney 9                                                                        | 49    |
| 4.10. Deney 10                                                                      | 49    |
| <b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER</b>                                                      | 52    |
| KAYNAKLAR                                                                           | 54    |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                            | 58    |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                     | Sayfa |
|-------------------------------------|-------|
| Tablo 3.11.1. Puls Periyot Süreleri | 42    |
| Tablo 3.11.2. Puls Periyot Süreleri | 43    |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                  | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. Elektroforez Görüntüsü                                                | 3     |
| Şekil 2.2. Elektroforez Cihazı                                                   | 4     |
| Şekil 2.2.1. Tiselius (1937)'un Elektroforez Aygıtı                              | 7     |
| Şekil 2.4.1. Elektroforez Ekipmanları Tank Ve Güç Kaynağı                        | 9     |
| Şekil 2.4.2. Elektroforez Ekipmanları Tarak Ve Boya                              | 9     |
| Şekil 2.4.3. Nişasta Moleküler Yapısı                                            | 10    |
| Şekil 2.4.4. Agaroz Moleküler Yapısı                                             | 11    |
| Şekil 2.4.5. Poliakrilamit Jel Oluşumu                                           | 12    |
| Şekil 2.5.1. Selüloz Asetat Elektroforezi                                        | 14    |
| Şekil 2.5.2. Agaroz Jel Elektroforez Uygulaması                                  | 15    |
| Şekil 2.5.3.1. Poliakrilamit Jel Elektroforezi                                   | 16    |
| Şekil 2.5.4.1. Pulsed Field Jel Elektroforez                                     | 17    |
| Şekil 2.5.5 Kapiller Elektroforez                                                | 18    |
| Şekil 2.6.1. Pfg Yöntemi Ve Aşamaları                                            | 22    |
| Şekil 2.6.3. Pfg Ekipmanları                                                     | 27    |
| Şekil 2.6.4.1. Alan İnversiyon Jel Elektroforezi (FIGE)                          | 29    |
| Şekil 2.6.4.2. Transvers-Dalgalı Alan Jel Elektroforezi (TAFE)                   | 30    |
| Şekil 2.6.4.3. Pulsed-Homojen Ortogonal Alan Jel Elektroforezi (PHOGE)           | 30    |
| Şekil 2.6.4.4. Ortogonal-Field Alternation Jel Elektroforezi (OFAGE)             | 31    |
| Şekil 2.6.4.6. Atımlı Alan Jel Elektroforezi (CHEF Cihazı)                       | 32    |
| Şekil 2.8.1. Atımlı Alan Jel Elektroforezi (CHEF Cihazı)                         | 36    |
| Şekil 2.8.2. Atımlı Alan Jel Elektroforezi Cihazının (CHEF Cihazı) Fizikokimyası | 37    |
| Şekil 2.8.3.1. Arduino Bağlantısı                                                | 39    |
| Şekil 3.1.1. CHEF Şekli (Atımlı Alan Jel Elektroforezi)                          | 40    |
| Şekil 4.1.1. Deney 1                                                             | 44    |
| Şekil 4.2.1. Deney 2                                                             | 45    |
| Şekil 4.3.1. Deney 3                                                             | 45    |
| Şekil 4.4.1. Deney 4                                                             | 46    |
| Şekil 4.5.1. Deney 5                                                             | 46    |
| Şekil 4.6.1. Deney 6                                                             | 47    |
| Şekil 4.7.1. Deney 7                                                             | 48    |
| Şekil 4.8.1. Deney 8                                                             | 48    |
| Şekil 4.9.1. Deney 9                                                             | 49    |
| Şekil 4.10.1. Deney 10                                                           | 50    |
| Şekil 4.10.2. Deney 10                                                           | 50    |

## KISALTMALAR ve SİMGELER

| Kısaltma/Simgesi | Tanım                                           |
|------------------|-------------------------------------------------|
| PZR              | Polimeraz Zincir Reaksiyonu                     |
| PFGE             | Pulse Field Gel Electrophoresis                 |
| FIGE             | Alan İnversiyon Jel Elektroforezi               |
| TAFE             | Transvers-Dalgalı Alan Jel Elektroforezi        |
| PHOGE            | Pulsed-Homojen Ortogonal Alan Jel Elektroforezi |
| OFAGE            | Ortogonal-Field Alternation Jel Elektroforezi   |
| CHEF             | Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields     |
| PAGE             | Programlanabilir Bağımsız Kontrollü Elektrotlar |
| PAGE             | Poliakrilamid Jel Elektroforezi                 |
| DNA              | Deoksiribo Nükleik Asit                         |
| ETBR             | Etidyum Bromür                                  |
| TBE              | Tris Borik Asit EDTA                            |
| EDTA             | Etilendiamin Tetra Asetik Asit                  |
| APS              | Amonyum Persülfat                               |
| TEMED            | N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin                  |
| CZE              | Kapiler Zon Elektroforez                        |
| MEKC             | Miseller Elektrokinetik Kapiler Kromatografi    |
| CGE              | Kapiler Jel Elektroforez                        |
| CITP             | Kapiler İzotakoforez                            |
| CIEF             | Kapiler İzoelektrik Odaklama                    |

## 1. GİRİŞ

Agaroz esaslı DNA elektroforezi, moleküler biyolojide en sık kullanılan tekniklerden birisidir. Pratik çözüm aralığı (yaklaşık 50 kb'a kadar) PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), moleküler klonlama ve plazmid manipülasyonu dahil olmak üzere diğer birçok yaygın tekniklerle örtüşür. Ancak, yukarıda bahsedilen boyut sınırlaması göz önüne alındığında, geleneksel jel elektroforez teknikleri kullanılarak sağlam kromozomal DNA moleküllerinin, çok büyük DNA fragmanlarının veya doğrudan genomik analizlerinin yapılması mümkün değildir. Konvensiyonel DNA elektroforezi oldukça kolaydır. Sabit bir elektrik alanı agaroz jele uygulanır ve küçük DNA molekülleri boyuta bağlı bir şekilde elenir. Fakat çok büyük DNA moleküllerinin ayrıştırılması gerektiği zaman bu eleme etkisi başarısız olabilir. Bunun nedeni büyük DNA moleküllerinin çözelti içerisinde yumuşak, top gibi halkasal halde bulunmasıdır. Bu moleküller ancak sıkı jel matrisinden geçişine izin verecek kadar ciddi bir çözünmeden sonra küçük porlardan geçebilir. Bu etki bir eleme jel matrisi vasıtasıyla büyük ve küçük moleküllerin geçişini sağlarken, aynı zamanda ne yazık ki boyuta bağlı elektroforetik hareketliliğin ayırım için etkisini ortadan kaldırmaktadır. Bu istenmeyen durumun varlığı, son derece düşük jel konsantrasyonları veya düşük elektrik alan kuvveti kullanılarak zayıflatılır, ancak DNA boyutları yaklaşık 200 kb'yi aştığında bu çözümler de yeterli olmayacaktır. 1983' de Schwartz ve Cantor, bu sınırlamaları atlatmak için milyonlarca baz çift boyutuna kadar olan çok büyük DNA moleküllerinin fraksiyonlanmasına izin veren bir yöntem olarak Atımlı Alan Elektroforezi'ni geliştirdi [1].

Elektriksel yüke sahip olan tanecik veya moleküllerin ayrılmasında kullanılan yöntemlerin başında elektroforez cihazı gelmektedir. Elektroforez yöntemi ayırım işlemlerinin temelini oluşturmaktadır. Geçmişte ve günümüzde halen kullanılmakta olan bu yöntem oldukça yaygın ve kullanımı oldukça basittir.

Elektroforez, tampon çözelti içerisinde çözünmüş halde bulunan ve elektriksel yüke sahip olan tanecik veya molekülleri sabit bir elektriksel alana maruz bırakarak, her bir tanecığın veya molekülün kendi karakteristik özelliklerine göre göç etmesini sağlamaktadır.

Tampon çözeltide çözünmüş halde bulunan tanecik veya moleküller sabit bir ortama aktarılır. Bu ortam bir jel destek materyalidir. Jel destek materyali gözenekli yapıdadır ve bu yapılar por adı verilmektedir. Bu gözenekli (por) yapı sayesinde yüklenen moleküllerin hareket etmesi ve ayrımlarının yapılması sağlanmaktadır. Bu jel destek materyali agaroz, poliakrilamid veya selüloz yapıda olmaktadır.

Destek materyaline yüklenen tanecik veya moleküller kendi sahip oldukları yüklere zıt yüklü olan elektroda doğru göç ederler. Her bir tanecik ya da moleküller farklı miktarda büyüklük ve yüklere sahip olacağından göç hızları da farklı olacaktır. Bu farklılık sonucu jel

destek materyalinde edindikleri konum birbirlerinden farklı olacaktır ve tanecik ya da moleküllerin ayrımı gerçekleşmiş olacaktır. Ancak bu yaygın teknik ile belirli büyüklükteki tanecik ya da moleküllerin ayrımı yapılabilmektedir. Daha büyük moleküller jel destek materyalindeki porlardan geçemez ve boyutuna bağlı olmaksızın ilerlerler. Bu durum ayrımı olanaksız kılar.

Schwartz ve arkadaşları temeli standart jel elektroforezine dayanan, 50 kb'ın daha büyük DNA moleküllerinin iki değişken elektriksel alan kullanarak ayırttıkları Atımlı Alan Jel Elektroforez cihazını İlk kez 1983'de bizlere sunmuşlardır.

Atımlı Alan Jel Elektroforez cihazı, tanecik ya da moleküllere uygulanan elektriksel alanın yönünü değiştirerek daha büyük boyuttaki maddelerin zigzag yapmasını sağlayarak jel matriksinde göç etmelerini sağlar.

Atımlı Alan Jel Elektroforez cihazı elektriksel alanının yönünü ve uygulama süresini elektromekanik röleler sistemleri ile gerçekleştirmektedir. Yani cihazın kontrolü sınırlıdır. Bu cihaz oldukça pahalı bir cihazdır.

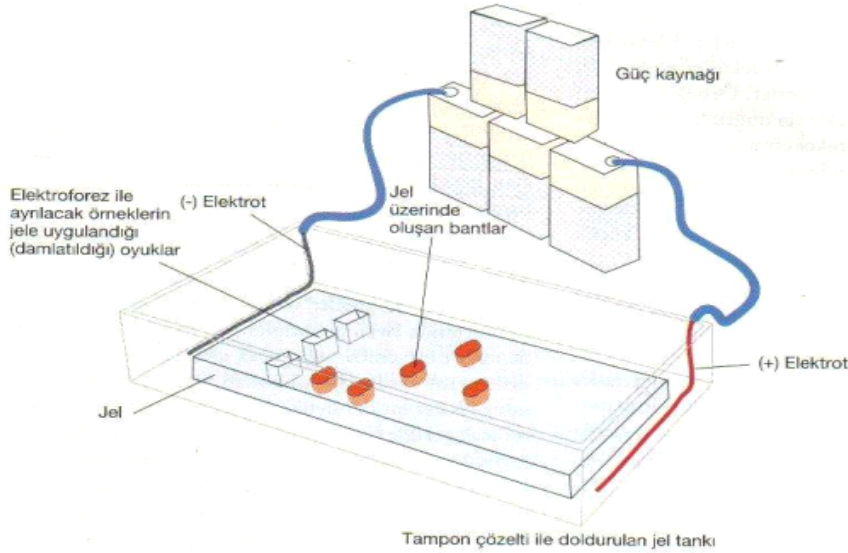
Bu tez kapsamında, Atımlı Alan Jel Elektroforez cihazını diğerlerinden farklı olarak Arduino ve 4 Yollu 5V'luk Röle Modülü kullanarak düşük voltajda çalıştırıldı ve cihaza, çalışmak istenilen programın uygulanması özelliği sağlandı. Yapılan sistem tamamen bilgisayar ve dijital kontrollü oldu. Diğer sistemlerden farklı olarak elektromekanik röleler yerine zaman aralığı çok hassas bir aralıkta (mili saniye) ayarlanabilen dijital kumanda röleleri kullanıldı. Diğer önceki yapılan cihaz ile ana fikir aynı olmasına rağmen sistemin tüm bileşenleri mikro işlemcili hale getirilmiş oldu. Böylece sistemde oluşturulan elektrik alan süresi bin kat daha hassas hale getirilmiş oldu.

Bu sayede cihazı daha düşük maliyette, daha basit, daha ulaşılabilir bir biçimde tasarladığımızda cihaz laboratuvar koşulları için gayet kullanışlı hale gelecektir. Cihazın düşük maliyette üretilebilen bir formda olmasının, ülkemizin bu alandaki dışa bağımlılığının önüne geçmek için iyi bir örnek olacağı kanaatindeyiz.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

### 2.1. Elektroforez

Yüklü olan birden fazla molekülün elektriksel alan uygulandığı durumda, sıvı bulunan bir ortamda hareket hızlarının ölçüldüğü tekniktir. Elektroforetik ortamlarda analizi yapılacak örnek bir destek alanına uygulanmaktadır. Üst düzey elektroforetik yöntemlerde destek alanı olarak daha çok jeller kullanılmaktadır. Jeller içine tampon konularak uygulama yapılmaktadır. Elektroforezler, nükleik asit ve proteinler gibi makro molekülleri birbirinden ayırmak için ya da bazen saflaştırmak için kullanılmaktadır. Aynı zamanda molekülleri büyüklüklerine, yüklerine ve konformasyonlarına göre sınıflandırmak için kullanılır [2].



**Şekil 2.1. Elektroforez görüntüsü [14]**

Analiz yapılacak olan örnek jele bir leke veya ince bir bant halinde uygulanır. Katı jelin dayanağı ile ayrımı yapılacak moleküllerin hareketi, moleküllerin yüküne, büyüklüğüne, şekline, kimyasal yapısına ve uygulanan elektriksel ortama göre değişim gösterir. Son derece hızlı olan ve kullanışlı bir yöntem olan elektroforezin bir homojenattaki molekülleri ayırma sınırlılığı çok yüksek değildir. Bu sebeple, bu yöntemden preparatif olarak çok az miktarda yararlanılmaktadır. Aynı zamanda protein veya nükleik asit karışımlarını saflaştırmada ve analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır [3].

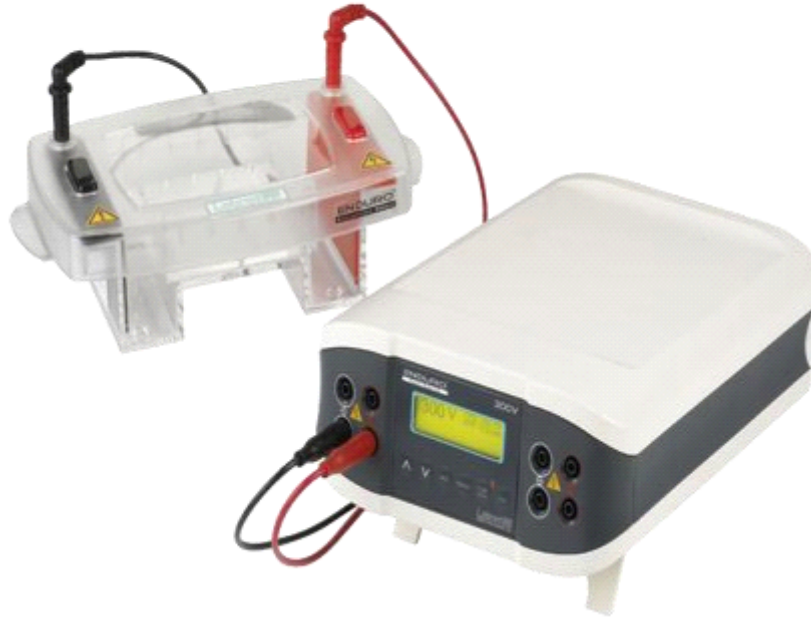
Elektroforez için dört etmen gereklidir. Bunlar;

- İyonların hareketinin rahat olması için uygun alanın meydana gelmesi yani destek

ortamının oluşması gerekir.

- Elektriksel alanı oluşturmak için bir güç kaynağına ihtiyaç vardır.
- Uygun pH aralığını yakalamak için tampon çözelti (buffer) gerekir [4].

Ohm yasalarında, elektrik alanı, akım ile direncin çarpımına eşit olarak verilmektedir. Elektroforez cihazında meydana gelen direncin neredeyse hepsi jel tarafından sağlanır. Direncin, akımın geçtiği kısmın alanının ve elektroforezde kullanılan tamponun iyonik kuvveti ile ters orantılı olduğu bilinmektedir. Belirlenmiş bir akım için, jelin kalınlığının ya da tamponun oranının ve iyonik kuvvetinin düşmesi direnci yükseltir; böylelikle jel boyunca meydana gelen voltaj değerlendirilmesi ve jele uygulanan molekülün elektroforetik akış hızı yükselmektedir. Sistemin ortaya çıkardığı gücün direnç ile akımın karesinin çarpımına eşit olduğu bilinmektedir. Üretilen güç ısı şeklinde meydana gelir ve elektroforez cihazı, jelin sıcaklığını yükseltmeksizin sadece belli oranda gücü yayabilir. Bu sebeple voltajın üst sınırı çoğu zaman elektroforez cihazının ısıyı yayma kapasitesine bağlıdır [5].



**Şekil 2.2. Elektroforez cihazı [93]**

Elektroforez genel olarak elektrik yükü olan moleküllerin elektriksel bir ortamın etkisi altında sıvı ya da yarı katı bir alanda farklı özelliklere göre seçimini ve analizini gerçekleştiren

bir tekniktir. Elektroforez, nükleik asitlerin uzunluk durumu, proteinlerin yük durumu veya moleküllerin ağırlık durumlarına göre sınıflandırılmasını sağlamak için kullanılmaktadır. DNA dizi analizi gibi bir takım denemeler dışında nükleik asitlerin elektroforetik sınıflandırılması için ayırıcı alan olarak agaroz jel, proteinlerin ayrımı için poliakrilamit jel laboratuvarlarda genel olarak tercih edilmektedir. Hızlı ve aktif bir şekilde yatay olarak hazırlanan agaroz jelin tam tersi olarak poliakrilamit jeller, yapısında bulunan akrilamidin polimerizasyonunu zorlaştıran oksijen ile temasının engellenebilmesi için iki cam arasında ve sadece dikey olarak hazırlandığı bilinmektedir. Jelin elektroforezi de dikey sistem cihazlarıyla yapılmaktadır. Poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) bu sebeple pahalı sistemlere ihtiyaç duyar ve uygulama yönünden yeterince pratik bulunmamaktadır [6].

Nükleik asitleri elektroforez işlemi sonrası görünür hale getirebilmek için farklı boyalar ve görüntüleme sistemleri vardır. Son zamanlarda elektroforez esnasında nükleik asitlerin aynı anda görüntülenebileceği görüntüleme sistemleri de keşfedilip üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Proteinleri görünür hale getirebilmek için elektroforezde ayırmadan sonra yaygın olarak kullanılan Coomassie mavisi ile boyama ya da gümüş boyama teknikleri veya Sypro Orange gibi floresan jel boyaları tercih edilmektedir. Bu tekniklerin dışında, elektroforezden önce görüntüleme için proteinler maliyeti yüksek floresan işaretlerle ve yorucu prosedürlerden yararlanarak etiketleme işlemi yapılmaktadır. Bu teknik kullanılarak elektroforez sırasında proteinlerin ayrılmasını gözlemlemek ve “Westernblot” analizlerinde membrana taşınma olayını kontrol altında tutabilmek için boyalı protein molekül ağırlık standartları üzerinde çalışılmıştır. Fakat genel analizlerde incelemesi yapılacak protein örneklerini elektroforez sırasında görüntüleyebilecek bir boya ya da hızlı bir teknik bulunmamaktadır [7].

Elektroforez yaşamın birçok alanında kullanılmaktadır. Özellikle bilimsel çalışmalarda ve merkezlerde amacına uygun elektroforezler görülmektedir. Elektroforezin kullanım alanlarını genel olarak özetlemek gerekirse;

- Patolojik olayların incelenmesinde ve takip edilmesinde çok sık kullanılmaktadır. Patoloji alanında serumda, dokuda, hemoglobinde ve idrarda, patolojik olaylar sonucu meydana gelen anormal proteinlerin durumu, normal proteinlerin azlığı ya da yokluk durumu veya tedavi esnasında hastalığın seyrini takip etmek için kullanılmaktadır.
- Son zamanlarda proteomiks (zaman, ortam, doku ya da organizma düzeyinde proteinlerin yapısal, işlevsel ve etkileşimlerini inceler) teknolojisinin, önemli tekniklerinden birisi olmuştur. Bu teknik ile protein miktarlarındaki çok küçük değişikliklerin bile analizleri yapılmaktadır. Böylelikle, patolojik olaylarda meydana gelen yeni proteinlerin çok kısa zamanda ve zahmetsizce tanımlaması yapılabilmektedir.
- Elektroforez sisteminin otomatik hale getirilmiş olması sebebiyle, öncelikle kimya,

biyokimya, farmakoloji, toksikoloji, adli tıp bilimlerini içeren farklı bilimsel denemelerde, özellikle laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan bir cihazdır.

- Yasadışı gerçekleşen ilaç kullanımlarını analiz etmek için kullanılmaktadır. Laboratuvarlar arası denetiminde yasadışı eroin ve kokain testlerinde güvenilir olduğundan bu alandaki merkezlerde mutlaka elektroforez bulunur.
- El yapımı olan patlayıcıların araştırılması, patlamadan sonra meydana gelen anyon ve katyonların incelenmesini daha kolay hale getirmek, kullanılan patlayıcı karışımı türünü ve bileşimini tanımlama konusunda yardımcı olmaktadır
- Saflaştırma işlemleri için yine elektroforez kullanılır [8].

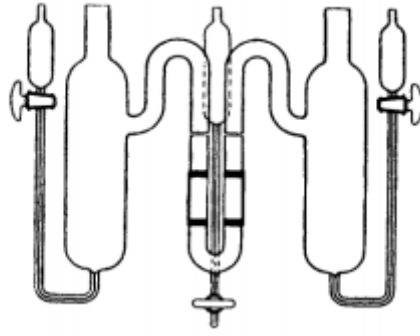
## 2.2. Elektroforez Tarihçesi

Bu ayırma yöntemi ilk kez İsveçli kimyacı Arne Tiselius'un serum proteinleri ile yaptığı denemeler sonucu keşfedilmiştir. Bu buluştan dolayı kendisi 1948'de Nobel Ödülünü almıştır. Elektroforezin kapillerde uygulanmasının yararı 1980'lerin ilk dönemlerinde Jorgenson ve Lukas'ın çalışmaları ile daha da belirgin hale gelmiştir. 1937'de ifade edilen elektroforezler sırasıyla;

- Serbest solüsyon elektroforezi,
- Frontal elektroforez ya da “moving boundary” elektroforezidir.

Tiselius bir elektrolit solüsyonunda çözünmüş halde bulunan proteinleri, protein-elektrolit solüsyonunun bulunduğu “U” şeklindeki kuartz bir borunun içerisinden elektrik akımı geçirerek ayırma işlemi yapmıştır. pH 7.6'da albumin,  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olarak adlandırılan 4 serum protein fraksiyonunu tespit etmiş ve bu bandların sınırlarındaki absorbans değişikliğini optik olarak ölçülmüştür [10].

Bu yöntem günümüzde elektroforetik hareketlilik ve protein-protein etkileşimi ile alakalı denemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır; ancak, klinik laboratuvarlarda genelde yapılan araştırmalar için tercih edilmez. Bunun sebebi bu tekniğin kompleks bir araç gerektirmesidir. Aynı zamanda, teknik zordur ve deneme için 0.5 mL örnek gerekmektedir. En sık kullanılan elektroforez yöntemleri, serum proteinleri, hemoglobinler ve izoenzimleri içermektedir. İzoenzimlerden ise, CK, LDH ve ALP en fazla kullanılanlarıdır [12].



**Şekil 2.2.1. Tiselius (1937)'un elektroforez aygıtı [13]**

Şekil 2.2.1.'de Tiselius' un elektroforez aygıtı şematik olarak gösterilmektedir. Günümüzdeki elektroforez cihazları bu cihazın keşfinden sonra geliştirilmiştir. Şekil 2.1'e bakıldığında aslında günümüzdeki elektroforez sisteminin ilkel hali görülmektedir. Tiselius elektroforez sistemi hassasiyet sahibi Schlieren optikleriyle çevrilmiş, dik açığa sahip, birkaç parçadan meydana gelen, U şeklinde bir tüpten ibarettir [13]. Bu sistem hareket eden proteinleri kısımlar halinde izleyebilmek için, çeşitli protein içeren çözeltilerin kırılma indisindeki değişimleri kullanmayı hedeflemiştir [10]. Bu mekanizmanın keşfi ile insan serumunda en fazla bulunan beş proteini birbirinden ayırmış ve bu proteinlerin bazı hastalık durumlarında ya da normal seyirdeki düzeylerini ölçüp değerlendirmiştir [12].

Elektroforez günümüzde kullanım alanlarında 'planar', 'kapiller' ve 'nano' olarak üç şekilde kullanılmaktadır. En son ulaşılan veriler, Stanford Üniversitesi'nde üretimi yapılan, 1975' tarihli, çip temelli cihazlar ile karakterize edilmiş cihazlar üretilmeye başlanmıştır. Son zamanlarda çoğu akademik çalışmalar ve küçük şirketler "lab-on-a-chip" konseptinin üzerine gelişimi tercih etmişlerdir. Elektrolit yükleme durumunun, voltaj kontrolünün, örnek yükleme, ayırım ve saptamanın tek bir çip üzerinde yapılabilme kapasitesi olan cihazlar artık günümüzde patentlenmiştir [12].

### **2.3. Elektroforez Fizikokimyası**

Elektroforezde yönteminde analizi yapılacak olan numune herhangi bir destek ortamına yüklenir. Güncel olarak kullanılan elektroforetik yöntemlerde jeller tercih edilir. Jeller, içerisine uygun bulunan bir tamponun elektroforez cihazına konması ile uygulama gerçekleştirilir. Katı jel dayanağı ile ayırım olacak moleküllerin yer değiştirmesi, moleküllerin yük durumlarına, büyüklüklerine, şekillerine, kimyasal yapısına ve elektriksel alana bağlıdır [14].

Genellikle basit elektrik devrelerden oluşan bu elektroforez sistemi elektroforez cihazlarındaki iki önemli öğeden oluşur **V(volt)=I(akım) x R(direnç)** formülünden yola çıkarak Voltaj uygulamasından sonra sabit akımın tüm uygulama alanlarından geçişi esnasında bir direnç meydana gelir; bu durum uygulanan toplam voltajda azalmaya neden olur. Elektroforez cihazında meydana gelen direncin hepsi jel tarafından ortaya çıkartılır [15].

Elektroforezde ikinci önemli olgu ise; sistemin oluşturduğu güç (P, Watt) direnç ile akımın karesinin çarpımına eşit olmasıdır ( $P=I^2R$ ). Meydana getirilen güç ısı olarak yayılır ve elektroforez cihazı, jelin sıcaklığını yükseltmeden sadece belli oranda gücü yayabilir. Elektroforezde elektriksel değişkenlerden bir tanesi her zaman sabit tutulmaktadır. Direnç yükselirse, sabit akımda aktarım hızı azalır ve ısı oluşur. Sabit voltaj durumunda ise göç hızı azalır yeni bir ısı meydana gelmez [16].

## 2.4. Elektroforez Ekipmanları

Elektroforez işleminin gerçekleştirilmesi için bazı ekipmanlara ihtiyaç duyulur. Bunlar sırasıyla;

- Elektroforez tankı,
- Güç kaynağı,
- Tampon solüsyonları,
- Destek Matriks ve
- Boyama solüsyonlarıdır (Şekil 2.4.1, Şekil 2.4.2)

Elektroforez tankı: Tampon ve destek matriksin koyulduğu, çevre ısısından korunma ve buharlaşma seviyesini düşürmeyi sağlamaktadır [12].

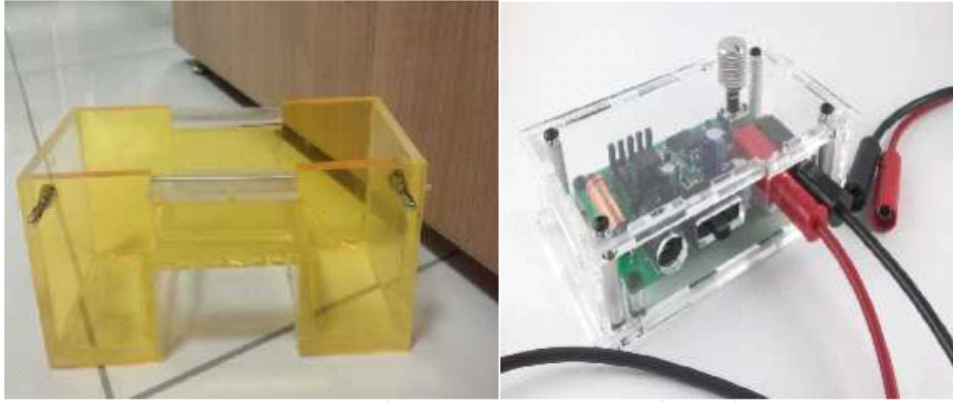
Güç Kaynağı: Güç kaynağı genel olarak dikey ya da yatay jel elektroforez gibi laboratuvarlarda yapılan uygulamalarda kullanılmaktadır [17].

Tampon solüsyonları: Asıl işlevi elektroforez boyunca meydana gelecek pH değişikliklerinin tamponlamasını yapmak ve elektrik akımının iletilmesini sağlamaktır [18].

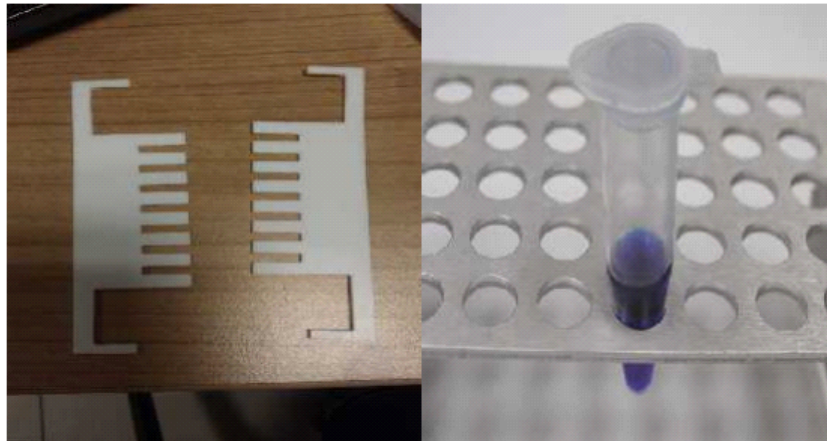
Boyama solüsyonları: Protein gibi moleküller elektroforez sonrası görünür hale getirilmeleri için nitrat veya coomasie mavisi ile boyanmaktadır [19].

Destek matriksi: Genellikle elektroforez işleminin sağlıklı yapılabilmesi için (agaroz) kullanılmaktadır. Agaroz genel olarak, proteinlerin adsorbsiyonuna neden olur. Serum

proteinlerinde, lipoprotein fraksiyonlarında ve DNA, RNA analizlerinde agaroz jel elektroforezinde kullanılır [20].



Şekil 2.4.1. Elektroforez Ekipmanları Tank ve güç kaynağı [16]



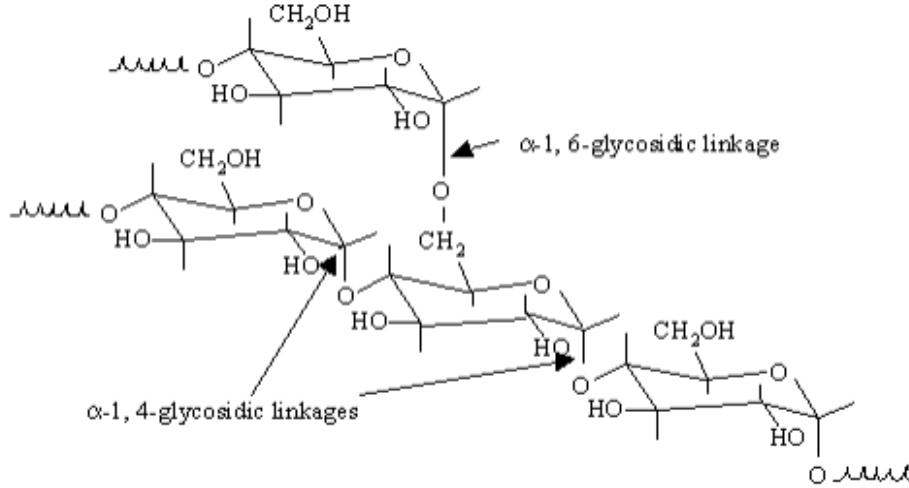
Şekil 2.4.2. Elektroforez Ekipmanları Tarak ve boya [16]

Moleküllerin boyutlarına ya da karakteristik özelliklerine göre ayrımı yapıldığında daha iyi elektroforetik ayırım meydana gelir. Elektroforezde kullanılan ayırıcı ortamlar kısaca;

**Nişasta:** Nişasta, üretildiği bitkiye bağlı olarak, değişik yüzlerce amiloz ve amilopektinden meydana gelmektedir [21]. Ham haliyle jel oluşturma kabiliyeti olmayan, kısmen hidrolize olmuş doğal nişastadan, nişasta jeli elde edilmektedir. Jeller kullanılmadan önce 0-4°C arasında saklanılmaktadır. Nişasta jel elektroforezi (Starch Gel Electrophoresis, SGE) makromolekül yapısındaki iyonları moleküllerin büyüklüklerine ve kütle-yük oranına göre seçim yapmak için kullanılmaktadır [13].

Denatüre edilmeyen proteinler yük ve şekillerine göre nişasta jeline ayrıştırılabilmekte

ve “Naphtal black” ya da “Amido black” boyama yöntemleri ile boyama işlemi yapılabilmektedir. Nişastanın jeldeki derişimi %5 ile %10 arasında bir değerdir [22]. Nişasta jeli hazırlama işlemi çok zahmetli olduğundan ve sadece deneyimli araştırmacılar tarafından yapılması gerektiğinden çok nadir çalışmalarda tercih edilmektedir [23]. Şekil 2.4.3’de Nişastanın moleküler yapısı verilmiştir.



Şekil 2.4.3. Nişasta moleküler yapısı [24]

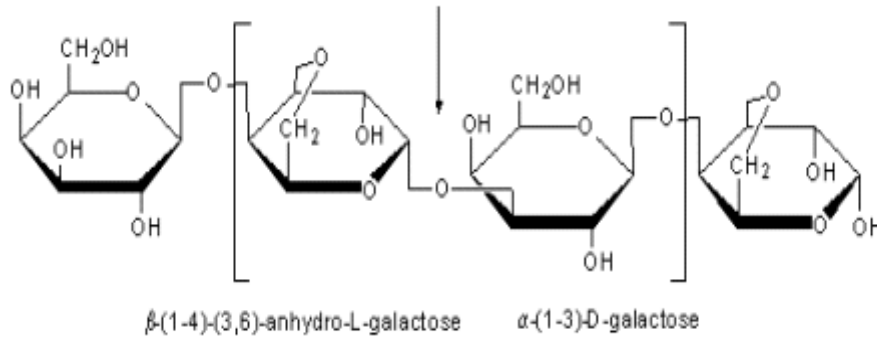
**Selüloz Asetat;** Selüloz Asetat, hidroksil gruplarını asetillemek için selülozun asetik asitle karışım yapılmasıyla oluşan bir termoplastik reçinedir. Birbirine sıkı sıkıya geçmiş selüloz asetat fiberlerinin içerisinde %80 hava boşluğu bulunan selüloz asetat zarları, kolayca bozulabilen, kuru, renksiz, kırılğan şeritler şeklindedir. Tampona daldırıldığı durumda, içinde bulunan hava boşlukları sıvı ile dolan film esnek özellik kazanmaktadır [24].

Elektroforeze tabi tutulan örnekler, tampon absorbe edilmiş selüloz asetat bantlarına ikiz tel uygulayıcı veya bir lamin ucu kullanılarak 0,3 ila 20  $\mu$ l arasında uygulama yapılmış, elektroforez 20 ila 60 dakika arasında yapılmıştır. Selüloz Asetat bantları kullanılmadan önce tamponda bekletilmelidir. Dansitometreden önce yıkama işleminin yapılması zorunlu olduğundan selüloz asetatın yerine çoğu uygulamada agaroz jel kullanılmaktadır [13]. Selüloz asetatın kullanılması doğal polimer esanslı olması, biyobozunur özelliğe sahip olması ve bir çok alanda kullanılabilmesi açısından avantajlıdır.

**Agaroz;** Agaroz, asidik sülfat ve karboksilik yan gruplarını bulundurması nedeniyle fazla oranda yüklü bir fraksiyon olan agaropektinden agarozun ayrılmasıyla oluşturulan, agarın saflaştırılan ve yükü bulunmayan bir fraksiyon halidir [13]. Deniz yosunu cinslerinden olan *Gellidium* ve *Gracillaria*’dan izole edilen agaroz [25], D-galactose, 3,6-anhydro L-galactose

moleküllerinin ardı ardına gelen polimer halidir. Su ortamında kaynatılan polimer eritilmekte ve soğutma işlemi yapıldığında yarı katı halde olan jel meydana gelmektedir [23].

Jelleşme esnasında agaroz polimerleri kovalent olmayan bağlarla bağlanan ağ demetleri oluşturur. Bu yapının gözenek büyüklüğü, jelin moleküler ayırma özelliğini belirlemektedir. Agaroz jel, DNA gibi büyük moleküllerin ayırımında kullanılmaktadır [25].

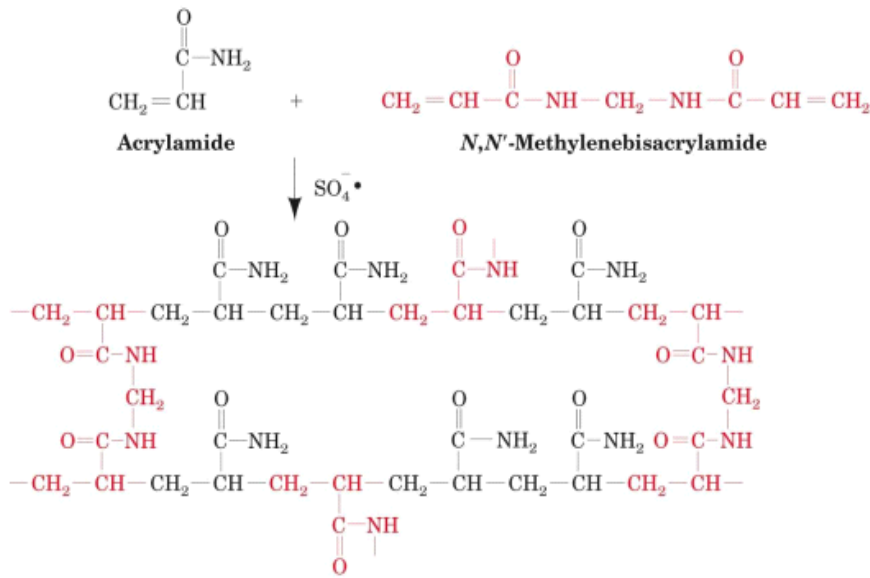


**Şekil 2.4.4. Agaroz moleküler yapısı [6]**

**Poliakrilamit;** Poliakrilamit jeller akrilamit ve bisakrilamit'in beraber polimerleşmesiyle meydana gelmektedir. Tepkime aktif oksijen türlerini oluşturan bir sistemin etkisiyle başlatılan, vinil katılımlı polimerizasyondur [6]. Poliakrilamit jel oluşturulmasında kimyasal sistem genellikle polimerizasyon için gereklilik bulunan aktif oksijen türlerini üreten APS (Amonyum persülfat) ve N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin (TEMED)'i kapsamaktadır.

TEMED, persülfat moleküllerinin sülfat serbest radikallerine ayrılmasını hızlandırmaktadır. Bu hızlandırıcı güç polimerizasyonun olayının başlamasına neden olur. Polimerizasyonun alkalın pH' da etkinliği çok fazladır. Düşük pH'da meydana getirilecek jeller için riboflavin ve TEMED ile fotopolimerizasyon kullanılır. Oksijen poliakrilamidin polimerizasyon oranını azalttığı bilinmektedir. Polimerizasyon oranının durumu monomer ve reaksiyon başlatıcıların derişimlerine, sıcaklık oranına ve kimyasalların saflık durumlarına bağlı olarak gelişmektedir [5].

Poliakrilamidin bileşeni olan akrilamit monomerinin erime noktası 84,5°C [26] olup, bu monomer erime noktasına doğru ısıtıldığında aniden polimerleşebilmektedir [27]. Akrilamit monomeri nörotoksiktir ancak polimerleştğinde toksisitesi çok düşüktür [28].



**Şekil 2.4.5. Poliakrilamit jel oluşumu [22]**

Poliakrilamit jeller çoğu zaman % T ve % C değer çifti ile ifade edilmektedir. Yani; % T, 100 mililitrede var olan monomerin gram cinsinden ağırlık oranını tanımlamaktadır. % C ifadesi ise toplam monomerdeki bisakrilamidin oranını vermektedir. Şekil 1.7’de Poliakrilamit jel oluşumu şematize edilmiştir. Poliakrilamit jelin aktif olan por büyüklüğü toplam monomer derişimi (% T) ile ters aktivasyon, % C ile de bifazik aktivasyon özelliği gösterdiği bilinmektedir. Monomerler çoğu zaman su içinde %30 T veya %40 T kapsayan stok çözeltiler olarak hazırlanırlar. Proteinlerde çapraz bağlayıcı derişimi çoğunlukla %2,7 C’dir. % C oranı sabit tutularak % T düzeyi yükseltirirse zincir sayısı fazlaşmakta ve por genişliği düşmektedir. Aynı zamanda % T değerinin stabil olduğu durumda % C yükseltirirse %5 C dolaylarında minimum por genişliğine sahip olabilmektedir. Yüksek % T seviyesi ile hazırlanmış olan jeller küçük proteinlerin ayrımı için tercih edilirken, düşük %T ile meydana getirilen jeller büyük proteinlerin ayrımında kullanılmaktadır [5]. Çoğu protein %5’ten %15’e kadar akrilamit ve %0,2’den %0,5’e kadar bisakrilamit bulunduran poliakrilamit jellerde ayırışma yapılabilmektedir [3].

Poliakrilamit jeller proteinlerin ayrımı için son derece uygun olmasının yanında nükleik asitlerin elektroforez işleminde de kullanılmaktadır (Stellwagen 1998). Poliakrilamit ayrımı yapılacak olursa kimyasal açıdan inert, elektriksel açıdan nötr, hidrofilik olması sebebiyle protein ayrımları için tamamen uygundur. Aynı zamanda ayrımı yapılacak maddelerle direkt olarak etkileşmemesi büyük bir avantajdır ve çoğu laboratuvarında kullanılan protein boyalarına karşı düşük eğilim özelliğinin olması da pozitif yanlarından birisidir [22].

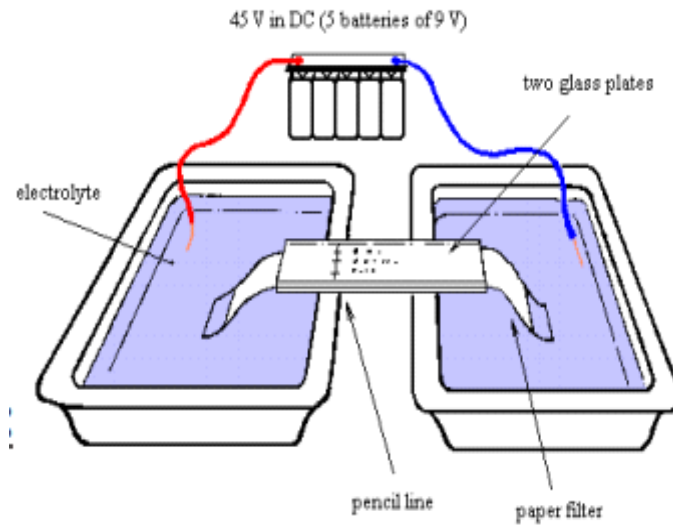
## 2.5. Elektroforez Çeşitleri

1. Kağıt elektroforezi
2. Selüloz asetat elektroforezi
3. Jel elektroforezi
  - a. Agaroze Jel elektroforez
  - b. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)
  - c. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)
4. Kapiller elektroforezi
  - a. Kapiller zon elektroforez (CZE)
  - b. Miseller elektrokin kapiller kromatografi (MEKC)
  - c. Kapiller jel elektroforez (CGE)
  - d. Kapiller izotakofrez (CITP)
5. İmmünoelektroforez

### 2.5.1. Kağıt ve Selüloz Asetat Elektroforezi

Kağıt tampon çözelti ile doyurulma işlemi yapıldıktan sonra, iki ucu tampon çözeltiye batacak şekilde gerilir. Elektroforez olacak örnek kağıt üstünde çoğu zaman bir çizgi şeklinde uygulanır. Örneğin kurummasının önlenmesi için kağıt üstten kapatılır, aynı zamanda bir su deposu üzerinde tutulur. Gerilim uygulaması yapıldıktan sonra kısa bir süre beklenir ve ayrılan süre bittiğinde kağıt çekilir, kurutulur ve analize tabi tutulur. Selüloz asetat elektroforezinde ise; fiberler şeklinde ağsı bir yapı meydana getirilir. Bu ağsı yapının por genişliği, selülozun asetilasyon seviyesiyle belirlenir. Selüloz asetat ile asetillenme işlemi yapılmamış bölümü meydana getiren selüloz nitratin seviyesi, bu porların genişliğini belirler. Selülozlar genel olarak düşük molekül ağırlıkları olan moleküller için uygulanmaktadır [24].

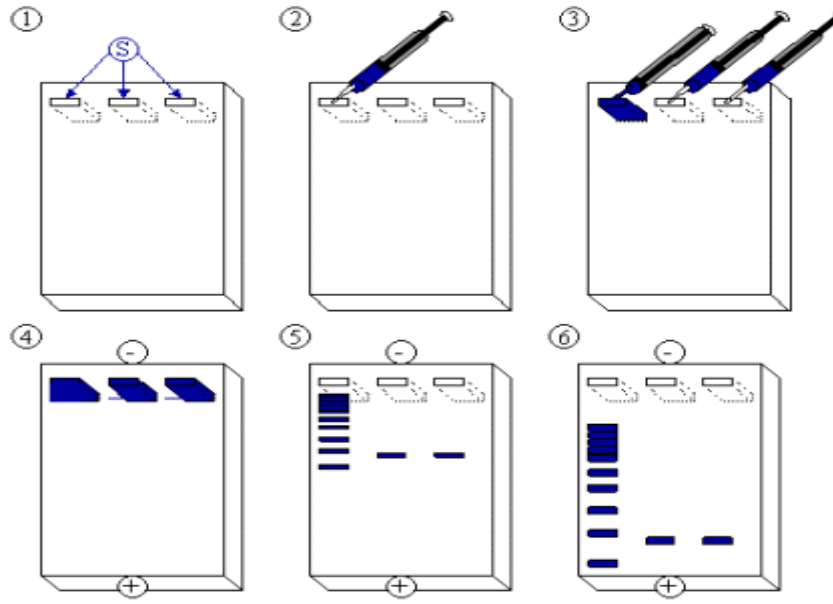
Selüloz asetat elektroforezi kullanmanın avantajları: Ucuzdur, çok çabuk saydamlaşabilir, hızlıdır, uzun süre depolanabilir. Bunların dışında elektroforezin dezavantajları: Rezolüsyon jeldeki kadar iyi değildir ve standardizasyonu ortalama seviyenin altındadır [29].



**Şekil 2.5.1. Selüloz Asetat Elektroforezi [29]**

### 2.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezleri genel olarak; lipoprotein fraksiyonları, serum proteinleri, LDH izoenzimleri, hemoglobin varyantları gibi analizlerde düzenli olarak kullanılmaktadır. Agarozlar sıcak suda çözünme özelliğine sahiptirler, soğutuldukları zaman, karşı karşıya gelen hidrojen bağlarının meydana gelmesi ile jel yapısı oluşmaktadır. Bu jel oluşumu geri dönüşümlü olarak devam eder. 200-50,000 bp boyutlarındaki DNA ve RNA moleküllerini ifade etmekte kullanılan temel teknik agaroz elektroforezi olarak bilinmektedir [30]. Agarozun bir alg türünden elde edildiği bir çok çalışmada gözlenmiştir. Jel elektroforez tamponuna konulmuş agarozun fazla sıcaklık uygulamasında çözündürülme işlemi ile hazırlanmaktadır. Kaynatılan agaroz çözeltisi 50 dereceye kadar soğutma işlemine tabi tutularak jel tepsilerine yayılır. Ayrım işlemi görecekle örnek taraklarla oluşturulan kuyucuklara yerleştirilir ve elektriksel bölgede yürütme yapılarak ayırım uygulaması bitirilir. Jelin uygun olarak hazırlanırken veya örnekler yüklenip elektriksel olarak ayırma işlemi bittikten sonra boyaması yapılır ve örnekler görüntülenir [31]. Şekil 2.5.2' de bu işlemlerin şeması gösterilmektedir.



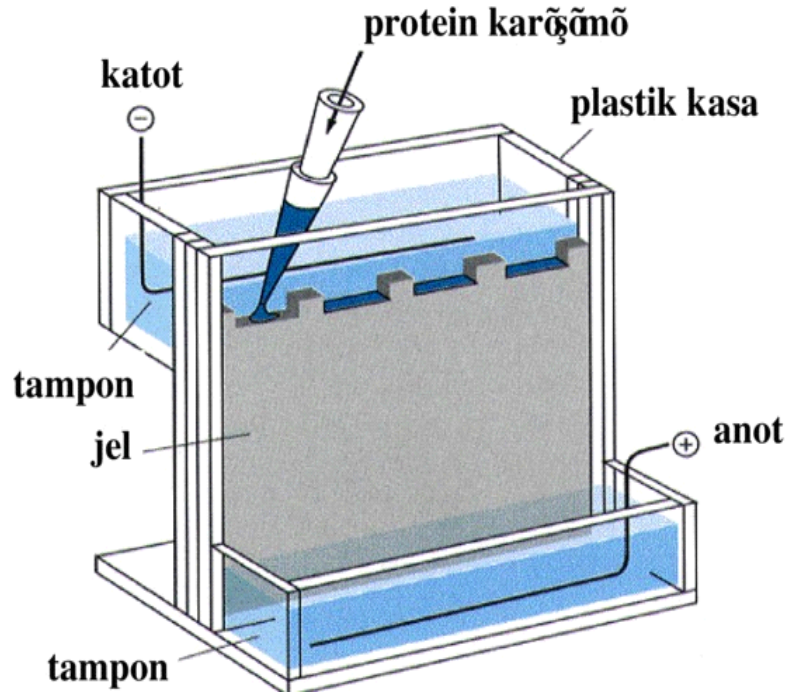
**Şekil 2.5.2. Agaroz Jel Elektrophorez Uygulaması [32]**

Nükleik asitlerin agaroz jeldeki hareketi genel olarak agaroz konsantrasyonu ile nükleik asit moleküllerinin ebatı ve yapısından etkilenmektedir. Nükleik asitlerin ayırım işleminin gerçekleştirilebilmesi için en etkili agaroz konsantrasyonları %0,3-2,0 arasındadır. Agaroz jel elektrophorezi ile farklı kaynaklı DNA'nın izole edildikleri ya da enzimlerin molekül ağırlıkları ve oranları tespit edilebilir. Bunların yanında, proteinlerin yük durumlarına göre ayırım uygulamalarında da tercih edilmektedir [32].

### 2.5.3. Poliakrilamid Jel Elektrophorezi

En fazla tercih edilen elektrophorez çeşididir. Jel sentetik özelliğe sahip olan akrilamid ile akrilamid türevi olan N-N'-metilen bisakrilamidinin polimerleşme işlemi ile meydana getirilmektedir. Elektrophorez uygulanacak örnekler bu jel üzerinde yürütülür. Akrilamid seviyesi ve akrilamid/bisakrilamid oranı jelin ayrıştırma sınırını belirlemektedir. Akrilamid oranı arttıkça jellerde ısınma fazlaşır, kırılabilirlik seviyesi yükselir, yıkanması kolaylaşır. Akrilamidin polimerizasyonu ile oluşturulan poliakrilamid jellerin elektrophoretik ayırım işlemlerinde farklı avantajları mevcuttur. Küçük veya orta seviyedeki nükleik asitler ve proteinler için yüksek ayrıştırma gücü bulunmaktadır. Göç eden moleküllerle destek materyali arasındaki etkileşim durumu en alt düzeydedir. Destek materyalinin özellikleri fiziksel anlamda son derece kararlı ve

dayanıklı olmasından ibarettir. Poliakrilamid jeller akrilamid ve çapraz bağlayıcı N,N'metilen-bis akrilamidin serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanmaktadır. Kimyasal polimerizasyon bir başlatıcı-katalizör sistemi ile takip edilmektedir [33]. Elektroforez işlemleri genelde tampon çözeltirlerinin içinde yapılır. Bunun nedeni, akım geçişini sağlayarak ortamdaki elektrolit miktarını arttırmak ve ortamda meydana gelecek herhangi bir pH değişikliğini önlemektir [2].

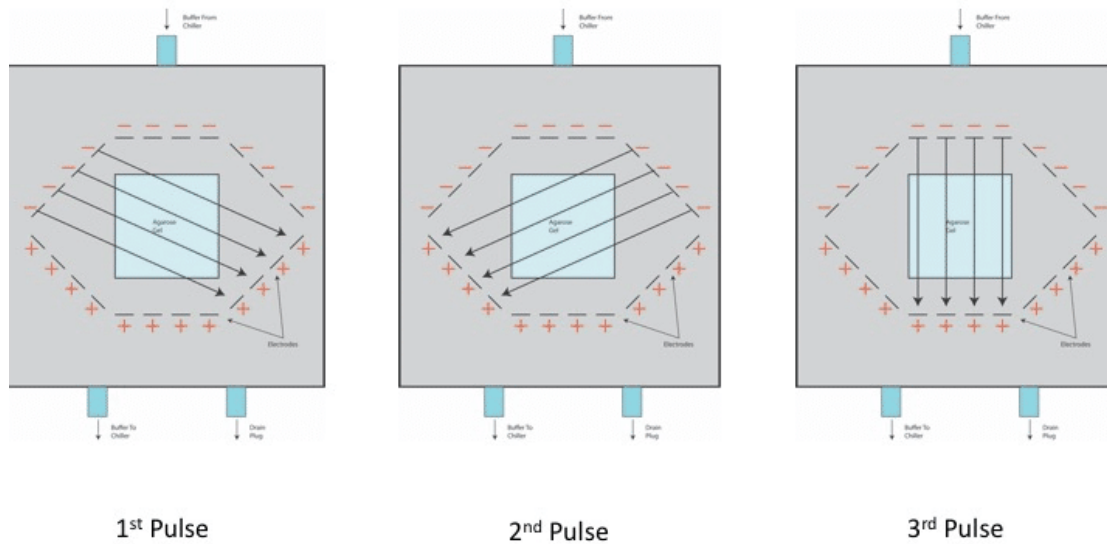


**Şekil 2.5.3.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi [34]**

Fotokimyasal polimerizasyon, UV ışığı altında riboflavin tarafından gerçekleştirilir. Proteinlerin ayrılması için kullanılan jeller genelde %7.5 poliakrilamid içerir. Bu jeller 10.000-1000.000 Da moleküller için kullanılabilir ama en iyi çözünme 30.000-300.000 Da arasında elde edilir. Bir jelin ayrıştırma gücü ve molekül boyutu aralığı akrilamid ve bis-akrilamid konsantrasyonuna bağlıdır. İki maddenin polimerizasyonu ile jelde porlar oluşur. Düşük konsantrasyonda daha büyük porlar oluşur ve yüksek molekül ağırlıklı biyolojik moleküllerin analizi yapılabilir. Yüksek konsantrasyonlarda ise küçük porlar oluşur ve düşük molekül ağırlıklı moleküllerin ayrılması yapılır [34].

#### 2.5.4. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)

PFGE tekniğinde, elektrik akım yönünün düzenli olarak değişmesi ve jeldeki DNA fragmentleri üzerine tespit edilen aralıklarla düz akım aktarılması sonucu, 50kb'dan daha büyük DNA moleküllerin ayrıştırılabilmesi ve genomun bütünü tanımlanabilmektedir. PFGE tekniğinde bakteriyel özelliğe sahip olan enzimlerin spontan degradasyonundan koruma amacı ile agaroz jel içinde bulunan bakteriden, deformasyona uğramadan izole edilmiş olan DNA, yine jel içerisinde 5-6 baz uzunluğunda tanıma bölgesine sahip bir restriksiyon enzimi ile hidrolize edilerek kesim işlemi yapılır. Agaroz jel içerisinde meydana getirilen DNA fragmentleri akım yönü ve şiddeti belirli aralıklarla değişime uğratarak elektroforez uygulaması yapılır. Elektroforezden sonra jelin Ethidium bromid kullanılarak boyanması ile jeldeki DNA fragmentleri UV ışıkta gözlenmekte ve meydana gelen bant polimorfizmi gözle ya da bilgisayar programlarından yararlanarak inceleme altına alınmaktadır [30].



**Şekil 2.5.4.1. Pulsed Field Jel Elektroforez (PFGE) [30]**

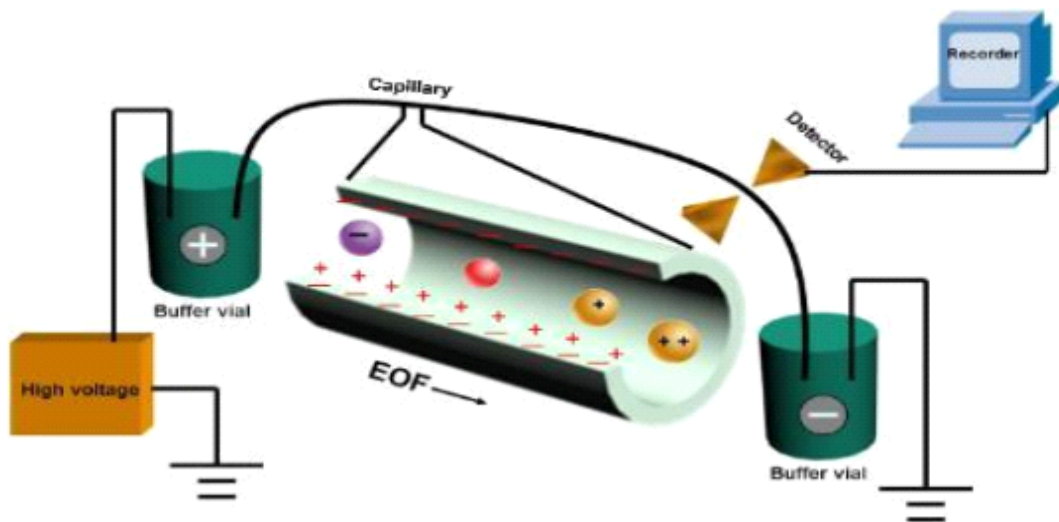
#### 2.5.5 Kapiller Elektroforez

Kapillerin yapısı genel olarak, ince çapa sahip ve ince duvardan meydana gelen damarlıdır. Çeperleri yarı geçirgen özelliğe sahiptir. Arterlerin dokulara ulaşabildiği en ince uç bölgelerine arter kapilleri, venlerin başlangıcı olan en ince uçlarına ven kapilleri adı verilir. Çözelti içerisindeki partiküllerin elektriksel bölgelerinin etkileri içinde göç etme ilkesine dayanan güncel ve güçlü bir analitik ayırma yöntemine ise kapiller elektroforez adı verilir [35].

Fiziksel anlamda sistemi ve çalışma prensibi diğer elektroforezlerle aynı olmasına

rağmen, tekniksel yapısı ve ihtiyaç duyduğu ekipmanları birbirinden farklıdır. Duyarlılık durumunun iyi olması, test maliyetinin çok yüksek olmaması, otomasyon sistemine uyumlu olması, test çeşitliliğine sahip olması gibi bir çok tercih sebebi olan kapiller elektroforez, küçük çapa sahip (25-75  $\mu\text{m}$ ), 100 cm. uzunluğunda olan 'fused' silika kapiller boru kullanılarak uygulaması yapılan bir tekniktir [36].

Genelde kullanılan kapiller elektroforezler, ince silika kapiller boru, iki elektrolit tampon haznesi, bir yüksek voltaj güç kaynağı ve bir veri değerlendirme birimiyle ilişkili detektörden meydana gelmektedir [37]. Şekil 2.5.5' te kapiller elektroforezin çalışma prensibi gösterilmektedir. Kapiller elektroforezde proteinler, peptidler, aminoasitler, nükleik asitler ve organik asitlerin ayrımında kullanılır [38].



**Şekil 2.5.5. Kapiller Elektroforez [38]**

Dar çapa sahip tüplerle çalışmanın avantajlı yanı, diğer elektroforetik tekniklerle meydana gelen ısıнын yok edilmiş olmasıdır. Normal jellerin uygulamasında kullanılan max voltaj 15-40 V/cm civarında olurken, kapiler elektroforezde 800 V/cm gibi oldukça yüksek akımlıdır. Böylelikle DNA'yı jelde yürütme süresi kısılır ve zamandan tasarruf yapılır. Bunların dışında; küçük numune hacmine sahiptir. Az miktarda çözelti harcamaktadır. Maliyeti düşüktür. Tekrarlanabilme özelliği vardır. Kapiler Elektroforez bir çok alanda kullanılabilir. Bunlardan bazıları; uyuşturucu maddelerin incelenmesinde, ilaç etken maddelerinin araştırılmasında, patlayıcı maddelerle ilgili incelemelerde, mürekkepler, inorganik anyon ve katyonlar gibi adli amaçlı araştırmalarda kullanılabilir [39].

Genellikle laboratuvarlarda jel elektroforezi yerine kapiler elektroforez tercih edilir.

Bunun sebebi kapiller elektroforezin daha fazla avantajlı yönlerinin olmasıdır.

Kapiller elektroforez;

- Yüksek voltaja maruz kalması durumunda dahi çalışmaya devam eder.
- Son derece otomatik bir yapıda bulunmaktadır.
- Çok zaman kaybettirmez ve emek harcatmaz bu bakımdan çok fazla tercih edilir
- Elektroforez yapılacağı zaman çok az miktarda numune ile ayırım yapılabilir.
- Çalışma mekanizması olarak çok sayıda lokusla çalışabilir.
- Uygulama biçimi standart bir şekilde devam eder [40].

Jel elektroforez ise;

- Düşük voltajlarda uygulama yapılabilmektedir.
- Çalışma standardı olarak tüm aşamaları manuel seviyededir.
- Çok fazla zaman harcatır. Bu nedenle pratiklikten uzaktır.
- Elektroforez uygulamasının yapılabilmesi için çok fazla örneğe ihtiyaç duyulmaktadır.
- Uygulama için belli bir sınırdaki lokus sayısı vardır.
- Çalışma biçimi ve sonuçlar değişkenlik gösterir [16].

Kapiller Elektroforez yöntemlerinin her birinin farklı bir çalışma standardı vardır.

Bunları sıralamak gerekirse;

- **Kapiller zon elektroforez (CZE);** Ayırımı yapılacak örnek; tampon tarafından sarmalanan dar bir şerit şeklinde uygulanmaktadır. Elektrik alan uygulaması yapıldığında örnek zonunun her bir bileşeni kendi mobilite durumuna göre göç eder. Bütün örnekler saf materyallere ait zonlar oluşturmak üzere ayırım geçirirler. Nötral moleküller ise ayrılmazlar.
- **Miseller elektrokinetik kapiller kromatografi (MEKC);** Nötrat tanecik yapıları kapiller boru içerisinde elektro ozmotik akış halinde hareketlerini gerçekleştirirler. Bu nedenle yüksüz taneciklerin ayrılmasının pek bir imkanı yoktur. Fakat ortama bir miktar surfaktan ilave edildiğinde düşük molekülü nötral yapılar ayrılabilirler.
- **Kapiller jel elektroforez (CGE);** Bu yöntemde kapiller iç bölgesinde jel matris materyali bulunmaktadır. Farklı büyüklükte ve yapıda olan bazı moleküller bu teknikte ayrılabilirler. DNA ve proteinleri ayırmada en fazla kullanılan yöntem olduğu bilinmektedir.
- **Kapiller izotakoforez (CITP);** Hız ve elektroforez kelimelerinden oluşmaktadır. Bu yöntemde ayırma işlemi örnek bölgenin içerisindeki iyonların hız değişikliklerine dayanmaktadır.

- **Kapiller izoelektrik odaklama (CIEF);** Bu yöntemde hız faktöründen çok izoelektrik noktalarındaki farklılıklar önemlidir. Amfolitler kapillerin iç kısmındaki Ph gradiyentini ayarlamak için kullanılırlar. Bu teknik proteinlerin, aminoasitlerin ve peptidlerin ayrılmasında kullanılır [40].

### 2.5.6. İmmünoelektroforez

İlk defa 1953 senesinde Grabar ve Williams adlı iki bilim insanı, jel elektroforez uygulamasından sonra immün diffüzyon uygulaması yapmışlardır [41].

-İmmünoelektroforez yöntemi ile çoğu özel protein takip edilebilir ya da gözlenebilmektedir.

-Prealbumin, albumin,  $\alpha$ 1- asit glukoprotein,  $\alpha$ 1-antitripsin, tiroid bağlayan globulin,  $\alpha$ 1-kimotripsin,  $\alpha$ 2-HS glukoprotein,  $\alpha$ 2-makroglobulin, seruloplazmin, haptogloblin, antitrombin III, C1 esteraz inhibitörü, hemopeksin,  $\beta$  lipoprotein, transferrin, C3, C4, C5, properdin faktör B, plazminojen, IgA, IgM, IgG gibi moleküllerin ayrımı için immünoelektroforez kullanılmaktadır [42]. Bu teknik daha çok laboratuvarlarda, immünglobulinlerin izlenmesinde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. İmmünoelektroforez yönteminde agaroz jele ihtiyaç duyulur. Bu yöntemin esas amacı; serum proteinlerinin elektroforetik ayrımının yapılmasından sonra, gerekli olan protein için antiserum ilave ederek antijen-antikor gösteriminin sağlanmasıdır [43].

İmmünoelektroforez kullanım alanlarını sıralamak gerekirse;

- Laboratuvarlarda kullanılan numunelerin saflaştırma işlemlerinde kullanılır.
- Moleküllerin genel anlamda saflık kontrollerinin yapılmasında kullanılır.
- Elektroforez olacak moleküllerin büyüklüğünün tespit edilmesinde bu yöntemle başvurulur.
- Genetik olan ya da genetik olmayan hastalıkların tanısında bu yöntem kullanılır.
- Enzim izozimlerinin tespit edilmesi ve adli tıp vakalarında bu teknik kullanılır.
- Laboratuvarlarda immünolojik ve moleküler biyoloji alanındaki denemelerde bu yola başvurulur [44].

### 2.6. Pulsed Field Jel Elektroforez (PFGE)

Enfeksiyon hastalıklarıyla ilgili epidemiyoloji biliminde, örneklerden izole edilen mikroorganizmalar arasındaki epidemiyolojik bağlantının tespit edilmesi açısından önemlidir. Genellikle salgınlara neden olan etyolojik faktör genetik anlamda eş ya da akrabalık ilişkisi organizmadan oluşmaktadır. Enfeksiyon faktörlerinin alt çeşitlerine göre değerlendirilmesi; toplumsal ya da nozokomiyal salgınlara ve enfeksiyon kaynağının tespit edilmesi ile

yayılmasının takip edilmesini, virülan suşların tespit edilerek, enfeksiyon sebebiyle tedavi edilmiş olan reenfeksiyon ya da relapsın değerlendirme yapılmasının ve aşılama programlarının izlenebilmesine olanak sağlamaktadır [45].

Türkiye'nin Bazı İllerinde İzole Edilmiş olan *Shigella sonnei* suşlarının Antimikrobiyal Direnç ve "Pulsed Field" Jel Elektroforezi teknikleri ile tiplendirilmesi tekrarlanabilme olasılığının az olması ve değerlendirmesinin değişiklik göstermesi ve sonuçların değerlendirilmesinin zaman alması gibi nedenlerle, 1980 yılından sonra genetik yöntemlere eğilim başlamıştır [46]. İlk defa 1984 yılında Schwartz ve Cantor<sup>13</sup> tarafından ifade edilmiş olan "Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)", genotipik teknikler içinde ayırıştırma gücünün fazla olması ve tekrarlanabilme seviyesinin yüksek olması sebebiyle çoğu etyolojik faktörün moleküler tekniğinde altın standart olarak tanımlanmasında tercih edilmektedir [47].

1983' ten sonra "pulsed field jel elektroforezi" çoğu bakteriyel patojen için tercih edilen moleküler epidemiyolojik analizler içinde "altın standart" metot olarak kullanılmaya başlanmıştır. Kromozomal DNA polimorfizmi esas alan, bütün genomu hedefleyen genotiplendirme tekniğidir. Bu teknikle izolatlar içindeki tekniklerin ilişkilerin gözetilmesinde; bant paternlerinin benzerlik oranlarına veya bant miktarı ve boyutlarındaki farklılıklara göre tespitler yapılmaktadır [48].

Günümüzde hala daha çoğu mikroorganizma «altın standart» genotiplendirme yöntemi olarak kullanılmaktadır. Bu konuda tartışma içeren konular yer almış olsa da esas olarak PFGE teorisi DNA parçalarının agaroz jelde yürütülmesi olarak ifade edilmektedir. Sürekli bölgesel elektroforezi esnasında 30-50 kilobazdan (kb'den) daha büyük DNA'lar hangi büyüklükte olurlarsa olsunlar aynı hızda hareket edebilme özelliğine sahiptirler ve jelde büyük yapıda, tek bir bant olarak gözlenmektedirler [49]. Fakat DNA'nın, elektroforez esnasında farklı yerlere itilerek hareket etmesi söz konusu olduğunda bantlar birbirinden koparlar. Jele uygulanmış olan elektrik alanın yön değiştirmesiyle daha küçük olan DNA parçaları daha hızlı bir biçimde yön değiştirirler ve böylelikle büyük DNA parçaları daha arka sırada kalmak suretiyle bir dizilim oluşturulur [50].

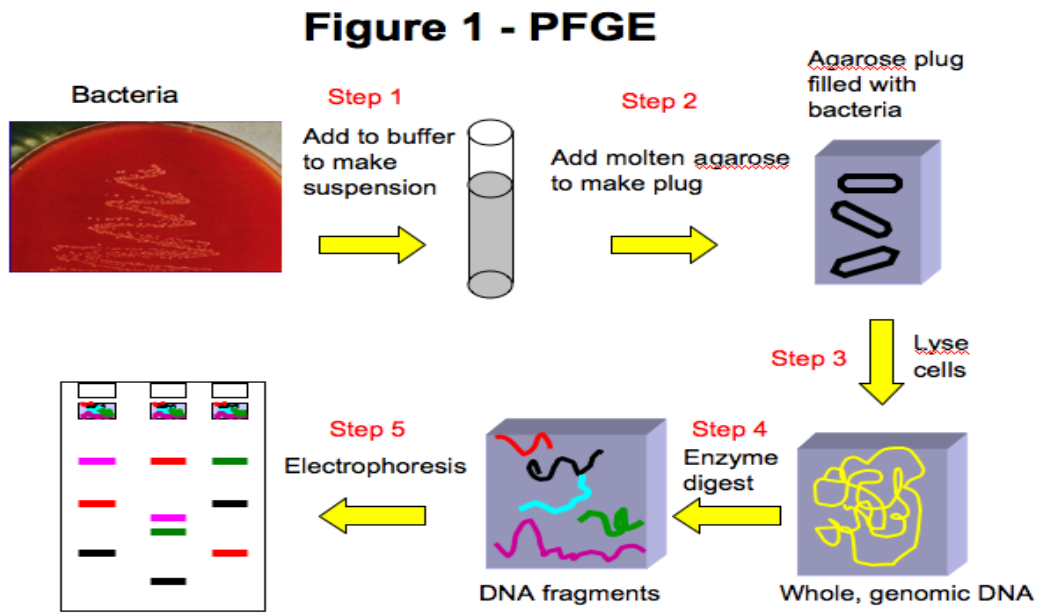
DNA'nın farklı büyüklükteki kısımlarının elektroforez ile yürütülmesi 1970'lerin başında gelişim göstermeye başlamıştır. Bu teknikte DNA'nın güvenli bir şekilde izole işlemi gerçekleştirilir ve restriksiyon enzimleri aracılığıyla kesilerek meydana gelen küçük parçalar agaroz ya da akrilamid içinde elektroforez işlemiyle yürütülür. Bu teknik aslında aynı kalmakla birlikte ayırıştırma kurallarındaki farklılık ile çeşitli uygulamalar ortaya atılmıştır [51].

Jel elektroforez yöntemlerinde, moleküller statik elektrik alan altında hareket etmektedirler. Elektrik alanının etkisinde DNA parçaları, bir hat üzerinde yürüyerek ağırlıklarına göre dizilim gösterirler. DNA parçalarının hareketlerini etkileyen çok fazla sebep bulunmaktadır. Jelin özelliği ve yapısı, konsantrasyonu, elektrik alanı, elektroforez tamponunun

yapısı ve sıcaklık sayılabilecek en önemli nedenler arasındadır [52].

Genellikle standart yöntemlerle DNA elektroforezinde 20 kb'dan boyut olarak daha büyük olan parçaların aynı yöndeki sabit akım içinde yürütülmesiyle ayırıştırma işlemi gerçekleştirilemez. Başta büyük DNA parçalarını yürütmeye düşük yoğunluğa sahip agaroz jelleri ve düşük voltaj gradientine ihtiyaç duyulmuştur. Fakat bu değişik koşullarda bile DNA parçalarının ayrılmasını sağlamamıştır [45].

1984'te David Schwartz yeni bir yöntem olan periyodik aralıklarla yön verilebilen elektrik alanının, DNA moleküllerini jel içinde ilk kısmından ayırma işlemi gerçekleştirilip bir hat üstünde dizeceğini savunmuştur. Genellikle agarozda 30-50 kb'dan 10 megabaz (10 Mb=10,000 kb) kadar olan büyük parçalar halinde yürütme işlemi gerçekleştirilmektedir. Schwartz, bu tekniğin molekül büyüklüğüyle ilgili olabileceğini rapor etmiştir. Sonuç olarak bu teknikte, binlerce kilobaz ağırlığına sahip mantar kromozom parçalarının uzunlamasına ayrılma gösterdiği çalışmalarla kanıtlanmıştır [53]. Cihaz konfigürasyonlarında değişken durumlar olduğu halde bu yöntemler, çeşitli yerlerden belirli zaman aralıklarında verilen elektriksiz akım (pulse) ile megabaz (Mb) büyüklüğündeki DNA parçalarını ayırma ilkesine dayanır. Bütün bu yöntemlerin hespi pulsed field ekipmanları olmasına rağmen, çoğu araştırma laboratuvarı tarafından CHEF (Atımlı Alan Jel Elektroforezi) sistemi tercih edilmektedir [54].



**Şekil 2.6.1. PFGE yöntemi ve aşamaları [50]**

PFGE tekniğinde, sıvı ya da katı besiyerinde meydana gelen bakteriler, düşük erime ısı

agarozla karışım yapıp küçük kalıplar içine dökme işlemi gerçekleştirilmektedir. Agaroz içine eklenen bakteri hücreleri, deterjan ve enzimler ile parçalanır ve sonrasında DNA izolasyon işlemi gerçekleştirilir [55]. Şekil 2.6.1 incelendiğinde; Bakteri süspansiyonuna erimiş agaroz eklemesi yapılmıştır ve agaroz karışımı bir kalıba eklenmiştir (Şekil 1-adım 2). Agarozun katılaşması beklenmiştir, daha sonra DNA'yı salıveren bakterileri açacak bir liziz çözeltisine eklenmiştir. Sonraki yıkama adımları, agaroz tıkaçında (Şekil 1-adım 3), dairesel genomik DNA bozulmadan hücre dışına alınmıştır. Fişin küçük bir parçası kesilmiş ve DNA'yı belirli bir sekansta (Şekil 1-adım 4) ayıran bir restriksiyon endonükleaz karışımına eklenmiştir, bu da değişen boyutlarda 10-20 DNA fragmanı ile sonuçlanmıştır. Büyük DNA parçaları daha sonra pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) ile boyutlandırılır (Şekil 1-adım 5) [56].

PFGE'de deforme olmamış DNA'ya ihtiyaç duyulduğundan, DNA'da kırılmalara sebebiyet verebilen standart DNA izolasyonu bu teknik için tercih edilmez. Lizis işleminden hemen sonra agaroz kalıplarında yıkama işlemi gerçekleştirilerek ya da diyalize yapılarak protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırma işlemi yapılır. Boyutu büyük olan kromozomal DNA agaroz jel içinde tutulmaktadır [57]. Agaroz içerisindeki bakteriyel DNA, az miktarda ve büyük parçalar meydana getiren bir restriksiyon enzimi (RE) ile kesilir. Sonrasında içerisinde kesimi yapılmış DNA parçaları yer alan kalıplar, elektroforez uygulaması yapılacak jel içerisindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve belirli sürelerde yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulmaktadır [58].

Elektroforez işlemi sonunda; jel etidyum bromürle boyanarak, izolatlara ait olan bant profili görünür şekle getirilmektedir. Bu bant görüntüleri bilgisayar programlarıyla incelenerek suşların ilişkileri ortaya çıkarılmaya çalışılmaktadır [33]. Bilgisayarla yapılan analiz işlemlerinde, incelemesi yapılan mikroorganizmalara ait PFGE profillerinin saklanması ile "veri bankası" meydana getirilebilir. Böylelikle incelemesi yapılan suş profillerinin, önceki verilerle karşılaştırılmasının yapılması ve daha derinlemesine inceleme yapılması sağlanmış olmaktadır. PFGE'de kaliteli DNA'nın elde edilmesi çok önemli bir kısıttır. Bu sebeple soğuk tampondaki hücrelerin hızlı bir şekilde işlenmiş olması, erimiş agaroz ilave edilmeden önce bakterilerin buz içinde bekletilmesi ve agaroz kalıpların soğuk işlemi uygulanması gerekmektedir [59]. PFGE uygulamalarında farklı bakterilerin yürütülmesine özgü yöntemler kullanılmaktadır.

PFGE uygulamasında bant kalitesi önemlidir. Uygulama sonuçlarının daha sağlıklı elde edilmesi için bantların kalitesi önemli bir faktördür. Bantların kalitesine etki eden faktörler;

- Agaroz çeşidi
- Tampon konsantrasyonu
- Tampon sıcaklığı

- Pulse açısı
- Pulse süresi
- Elektrik akımının güç durumu
- Elektroforez süresi [60]

Restriksiyon enzimi (RE) seçiminde dikkat edilmesi gereken bir çok öge vardır. Birinci öge, bakteriyel DNA'nın G+C içerik kısmının belirlenmesidir. Düşük G+C içeriğe sahip DNA'lar (örneğin *Staphylococcus aureus*), tanıma bölgesi G+C açısından zengin olan RE (örneğin SmaI) ile uygulama yapıldığında tam anlamıyla kesilme işlemi gerçekleştirilememektedir. İkinci faktör ise, tanıma bölgeleri uzun yapıda olan enzimler, kısa olanlara kıyasla az miktarda kesim parçaları meydana getirirler [61].

Büyük yapıda olan DNA parçalarının agarozda ayrıştırılma işlemine etki eden farklı etkenler bulunmaktadır. Bunları sıralamak gerekirse; agaroz konsantrasyon durumu, tampon konsantrasyonları, sıcaklık, pulse süresi, voltaj ve toplam elektroforez zamanlamasıdır. Tekniğin ayırım gücü son derece fazladır. Fakat zaman alan ve kompleks bir mekanizmadır. Aynı zamanda laboratuvarlar içinde devam eden standardizasyon sorunu vardır [2]. Restriksiyon yapılarının analiz edilmesi ve izolatların yakınlık derecelerine göre ayrıştırılması için önce, ortak veya salgın profilleri tespit edilir. Ortak olan profil bulunmuyorsa eğer muhtemelen izolatlar birbirleriyle alakasızdır [62].

Salgın suşunun profilinin tespiti yapıldıktan sonra, orada bulunan bantların miktarları ve ebatları diğer izolatlarla karşılaştırılır. Bütün izolatların profilleri, salgın suşuyla olan alaka durumlarına göre sınıflandırılır. PFGE ile meydana gelen DNA profillerini değerlendirmek ve bütün bunları epidemiyolojik denemelerde kullanmak amacıyla, PFGE profillerinin karşılaştırılma tekniklerini ve spontan genetik hadiselerin bu profilleri değiştirme yöntemleri bilinmelidir [63]. Çalışmalarda olması gereken, salgın suşlarının PFGE profilleri yapısal olarak aynı olması fakat epidemiyolojik olarak farklı olmasıdır. Suşlarınkinin ise farklı olması gerekmektedir. Böyle olduğu durumlarda salgın suşunun değerlendirilmesinde kolaylık sağlanmaktadır. Fakat genellikle nokta mutasyon, insersiyon ve delesyon gibi spontan genetik durumlar, salgın zamanı içerisinde PFGE profilini değiştirebilmektedir Bundan dolayı, sonuçların değerlendirme evresi sıkıntılı olmaktadır. PFGE tekniğinde genel olarak kromozomal benzerlik karşılaştırılması yapılmaktadır. Bazı bilim insanları, bu durumu açıklamak için bir teknik üzerinde çalışmışlardır. Buna göre, bant profillerine incelenerek, izolatların birbirleriyle ilişkilerinin değerlendirilmesi yapılmaktadır [64].

### 2.6.1. PFGE Tarihçesi

Günümüze kadar moleküler biyolojide, DNA moleküllerinin birbirinden ayrılması, büyüklüklerinin bilinmesi ve izlenmeleri gibi olaylarda en çok kullanılan yöntem standart jel elektroforez yöntemidir. Bu standart yöntem ile, sabit bir elektriksel alan içinde sadece 100-200 baz çifti (bc) ile 50 kilobaz çifti (kbç) arasındaki DNA fragmentlerinin (parçacık) ayırma işlemi gerçekleştirilebilir [65]. 50 kbç'nin üzerinde olan durumlarda ise moleküllerin büyüklüklerinden ötürü jel üzerinde ayırma yaşamazlar [48]. İlk kez 1982'de Schwartz ve arkadaşları 50 kbç'den daha büyük DNA moleküllerinin iki değişken elektriksel alan kullanarak ayrıştırıldığı mekanizmayı bulmuşlardır. Sonraki süreçlerde ise bu yöntemin temelinde bulunan cihazlar üzerinde çalışmalar yapılarak 10 Mbç kadar büyüklükteki moleküllerin ayırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. PFGE, 50 kbç'lik parazit mikro kromozomundan Mbç ile ölçülebilir özelliği boyutundaki maya kromozomlarına kadar bakteri, virüs ve memelilerde olmak üzere çoğu canlı türüne ait olan kromozomal DNA'yı ayırma gücüne sahiptir [66].

### 2.6.2. PFGE Cihazının Tercih Edilmesine Sebep Olan Etmenler

Pulsed field jel elektroforez (PFGE) büyük olan moleküllerin agaroz jelde elektroforetik ayrıştırılmasında kullanılmaktadır. Bu teknikte jele vurulu olan, dalgalı ve dikey elektrik alanları uygulanmıştır. DNA molekülünün büyüklüğüne göre tekrar yönlenmesinin süresi artıp azalmaktadır. PFGE, 20 kb ile 10 Mb uzunluğundaki DNA parçalarını ayırabilmektedir. Günümüze kadar Gene Navigator mekanizması ile ayırma en büyük kromozom bir mantardan olmaktadır ve 12.6 milyon baz çiftine sahiptir [67]. PFGE cihazının genel özellikleri;

- Mekanizma koşu sıralamasına vurgu yapan altıgen elektrot kiti bulundurulur.
- Homojen dalgaların üretimini yapan HEX elektrotlar optimal ayırma olarak kullanılmaktadır.
- Her birisi altı koşu fazından oluşan dokuz koşu prosedürü yüklenebilen kolay bir programlama yöntemi vardır.
- Tekrarlayabilen ve özel koşu koşulların eşit dağılmış sıcaklık ve sabit pH' ın kontrol edilmesini sağlamaktadır.
- Kendisinden contalı jel yükleme aparatı 1 cm kalınlığa kadar olan jellerin yüklenmesinde kullanılabilmektedir [68].

Cihazın asıl kullanım alanı klinik mikrobiyolojide epidemiyolojik denemelerde bakterilerin birbirleriyle olan bağlarını incelemektir. Bu cihazın tercih edilmesinin nedeni

birçok kullanım alanında yararlanılabilmemesinden ileri gelmektedir. Tüm patojeni inceleme altına aldığından universal anlamda bakterilerin parmak izleri ve akrabalık ilişkileri daha spesifik olarak teşhis edilebilmektedir. Bu teknik çok sağlam sonuçlar ortaya çıkardığı için farklı laboratuvarlarda bile aynı hastalıkların teşhisi yapılabilmektedir [69].

PFGE' in sık olarak kullanılan iki tipi mevcuttur. Bunlardan birisi FIGE, diğeri ise CHEF' tir. Bu cihaz hem kullanım kolaylığına sahip olması hem de zamandan çok kayıp sağlamaması açısından tercih edilmektedir. Kontaminasyonların tespit edilmesinde, Kolera gibi salgın hastalıkların tespitinde kullanılması açısından önemlidir [70]. Her bir çalışmaya özgü olarak geliştirilmiş çeşitleri de hastalıkların ve infeksiyon türevi tanılarının konmasında kolaylık sağlamaktadır. Aynı zamanda canlıların DNA hasarı gibi hastane kaynaklı salgın ve ölümcül hastalıkların tanısında kullanıldığı için yani canlı yaşamına ve bilime katkı sağladığı için tercih edilmektedir [71].

### 2.6.3. PFGE Ekipmanları

Bir PFGE mekanizmasındaki ekipmanlar temel ekipmanlar;

- Jel kutusu
- Elektriksel alan kontrolünün yapılması için anahtar ünitesi (switch),
- Bilgisayar programları,
- Soğutma işlemleri için soğutucu,
- UV görüntü cihazı
- Güç kaynağıdır [54].

PFGE cihazı tam olarak bu ekipmanların varlığında çalışmaktadır. PFGE tiplerinin her birisinde bu ekipmanlar bulunmaktadır. Ancak çalışma prensibine ve özelliklerine göre bilgisayar programları ya da güç kaynakları model olarak değişkenlik göstermektedir [72].



**Şekil 2.6.3. PFGE ekipmanları [73]**

Jel kutusu, içine elektrotlar takılı hareketi olmayan bir mekanizmadır. İçerisine DNA blokları konulan sertifikalı PFGE agarozu ile hazırlanan jel, jel kutusuna konulur ve üstünde yer aldığı tampon çözeltisinin elektriksel dönüşümüyle DNA parçacıkları hareket ettirilir. PFGE’de genel olarak kullanılan voltaj değeri 10 volt/cm civarındır. Tampon çözelti sıcaklığının stabil tutulmasını sistem otomatik olarak sağlamaktadır [73].

Elektriksel alanların kontrol edilmesi için kullanılan devre, fragmentlerin ayrımında çok önemlidir. Mekanizmanın çalışma hızı ve aralığı sisteme bağlı bilgisayar ile kontrol edilmektedir. DNA moleküllerinin sınıflandırılması için çalışma hızı belirli bir sınırdan olmak zorundadır [71]. Son yıllarda gerçekleştirilen bir takım aparatlar aracılığı ile elektriksel alanlar içerisindeki oryantasyon kontrolü yapılarak bu ünitenin etkinliği yükseltilmiştir. Uygunluğu tespit edilen RE ile kesilen bir gram pozitif balık patojeni için; plaklar %1 miktarında hazırlanan sertifikalı PFGE agarozuna yüklenip, koşturma zamanı 18 saat, sıcaklık 10°C, voltaj derecesi 130V, açı 120° ve 12 saniye aralıklarla, 0,5x TBE tampon çözeltisi içinde koşturulması DNA fragmentlerinin ayrılması için uygundur [74].

#### **2.6.4. PFGE Jel Elektrophorez Çeşitleri**

PFGE, DNA moleküllerinin küçük veya büyük olmasına göre çözünürlüğünün artırılmasını amaçlayan ekipmanların farklılığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Yani her uygulama için aynı PFGE cihazı kullanılmamaktadır. Her bir farklı deneme için farklı bir cihaz kullanılması gerekmektedir. PFGE tipleri genel olarak asıl cihazın farklı alanlarda farklı özellikleri kazanmış tipleridir [57]. Deneysel çalışmalarda öncelikle hedef; çalışmaya uygun olan PFGE elektrophorez tipinin seçilmesi ve amaca uygun olarak PFGE tipinin seçiminde maliyet ve efor açısından uygunluğunun değerlendirilmesi sürecine dayanır. İki değişik bölgeden sırayla

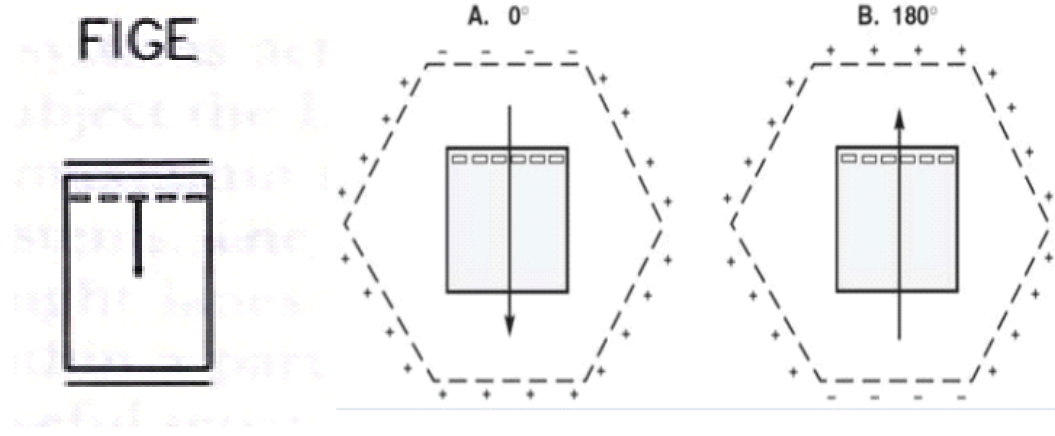
meydana getirilen elektriksel alan uygulamasında birkaç farklı PFGE tipi olduğu ifade edilmiştir [68]. Bunlar sırasıyla;

- Alan İnversiyon Jel Elektroforezi (Field Inversion Gel Electrophoresis, FIGE)
- Transvers-Dalgalı Alan Jel Elektroforezi (Transverse-Alternating Field Gel Electrophoresis, TAFE)
- Pulsed-Homojen Ortogonal Alan Jel Elektroforezi (Pulsed-Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis, PHOGE):
- Ortogonal-Field Alternation Jel Elektroforezi (Orthogonal-Field Alternation Gel Electrophoresis, OFAGE)
- Programlanabilir Bağımsız Kontrollü Elektrotlar (Programmable Autonomously

Controlled Electrodes, PACE)

#### **2.6.4.1. Alan İnversiyon Jel Elektroforezi (Field Inversion Gel Electrophoresis, FIGE):**

Elektrik akımı 180 derece açıyla konulmuş elektrotlardan ileri ve geri olmak üzere iki yönde uygulama yapılmaktadır. İleri yöndeki akımın zamanı geriye göre üç kat daha uzun olmaktadır. Bu moleküllerin ileri göç etmesine neden olmaktadır. FIGE ile DNA moleküllerinin doğrusal göçü sağlanmaktadır. DNA hareketi çoğu kez DNA moleküllerinin boyutuyla uyum göstermemektedir. FIGE’de bantların çözünürlüğünü yükseltme hedefli akım süresi aralık durumu koşturma sırasında kademeli olarak yükseltilir. Günümüz laboratuvarlarında kullanılan bu mekanizma 600-750 kbç kadar küçük fragmentlerin ayrıştırma işlemlerinde tercih edilmektedir.

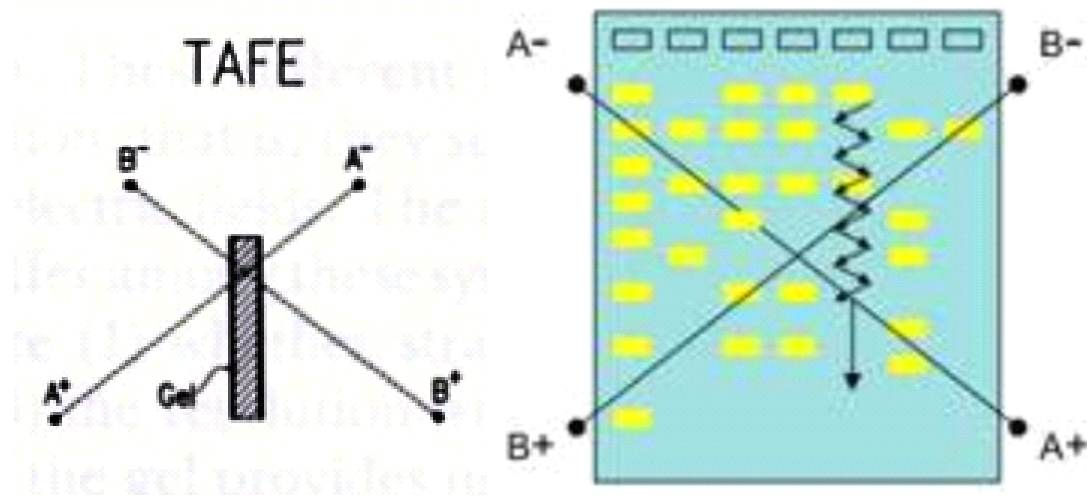


**Şekil 2.6.4.1. Alan inversiyon jel elektroforezi (FIGE) [73]**

FIGE sisteminin genel özellikleri; Tek yönlü olan ve sabit akıma sahip olan bir sistemdir. Toplam elektroforez zaman aralığı fazladır. Genellikle 3 ileri: 1 geri şekilde elektroforez önerilmektedir. Çoğunlukla 50-600 kb aralıkta ayırım gücü bulunmaktadır [73].

#### **2.6.4.2. Transvers-Dalgalı Alan Jel Elektroforezi (Transverse-Alternating Field Gel Electrophoresis, TAFE):**

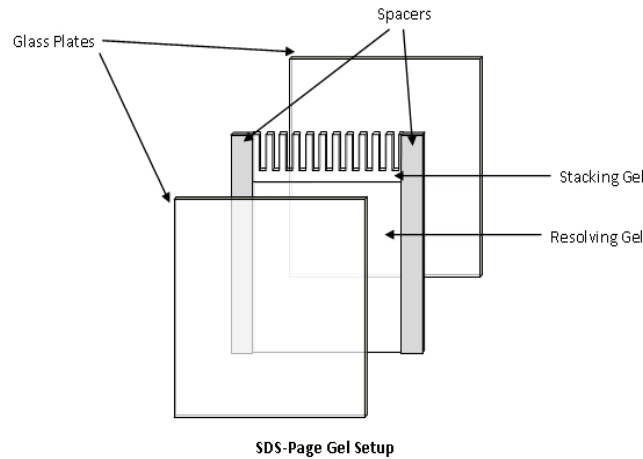
Bu teknikte koşturma işlemi dikey pozisyonda yapılmaktadır ve elektriksel alan jelin yüzey kısmında uygun bir açıyla uygulama yapılmaktadır Böylelikle DNA göçünde meydana gelecek deformasyon en aza indirgenmektedir. PFGE'nin bu çeşidinde geniş DNA fragmentlerinin uygun olarak göçünü mümkün kılmaktadır. TAFE'de dikey hareketi oluşturan jelin ön kısmında ve arka bölgesinde dört tane basit elektrot bulunmaktadır. Bu iki bölgenin elektriksel alanlar içindeki açıları birbirinden farklıdır. Jel boyunca tüm DNA molekülleri aynı etkilerden geçerler ve bantlar düz bir şekilde ilerlerler. TAFE sisteminin tercih edilmesinin nedeni genel olarak; molekül ağırlığının geniş olması ve DNA moleküllerinin düzenli ve belirgin bir şekilde ayrışmasıyla çoğu patojenin genetik denemelerinde birinci sistem olmasıdır. Bu alanda yapılan çalışmalara genel olarak cevap vermektedir [75].



Şekil 2.6.4.2. Transvers-Dalgali Alan Jel Elektroforezi (TAFE) [75]

#### 2.6.4.3. Pulsed-Homojen Ortogonal Alan Jel Elektroforezi (Pulsed-Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis, PHOGE):

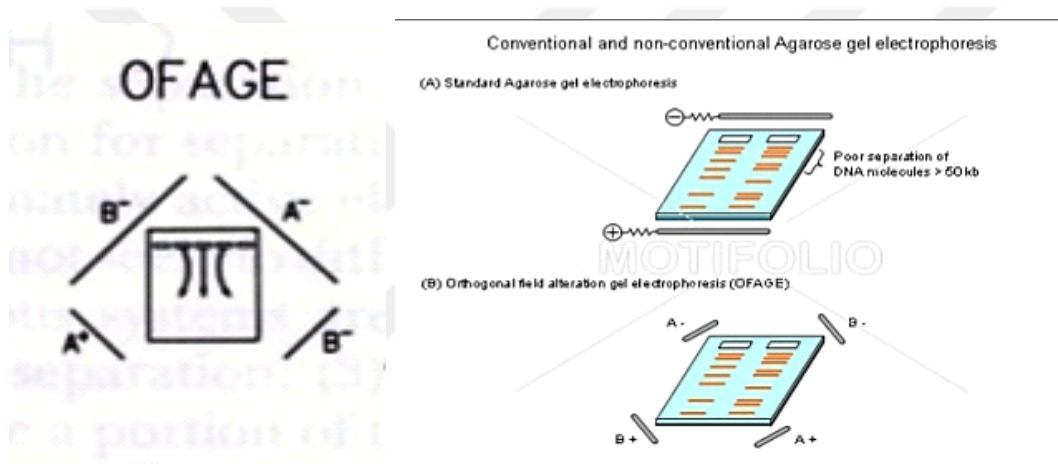
Bu mekanizmanın diğer elektro cihazlarından farkı, homojen elektriksel alanın yönlendirildiği açının  $90^\circ$  olmasından ileri gelmektedir. Ancak DNA moleküllerinin her siklusa 2 yerine 4 kez yönlendirme işlemi uygulaması yapılır. DNA moleküllerinin düz olarak koşturulamadığı mekanizmada 100 Mb'ın daha büyük parçacıkların sınıflandırılmasını mümkün kılmaktadır [76].



Şekil 2.6.4.3. Pulsed-Homojen Ortogonal Alan Jel Elektroforezi (PHOGE) [76]

#### 2.6.4.4. Ortogonal-Field Alternation Jel Elektroforezi (Orthogonal-Field Alternation Gel Electrophoresis, OFAGE):

İlk defa 1984'ta geliştirilip ifade edilen 2 homojen özelliğine sahip olmayan elektriksel alanlar için kullanılmaktadır. Bu mekanizmanın diğer mekanizmalara göre dezavantajlı olduğu durum elektriksel alan örnek olmadan jeldeki elektriksel alan arasında açı farkının bulunmasıdır. Böylelikle DNA molekülleri jel üstündeki yerlerine bağlı olarak değişik miktarlarda göç ederler. Bu durum bazı canlıların genom haritalarının düzenlenmesinde sorun oluşturabilir. Alanlar arasındaki açı farkı ( $90^\circ$ - $180^\circ$ ) arasında olmaktadır. 1000-2000 kb boyutundaki DNA moleküllerinin ayrışmasını mümkün kılmaktadır [77].



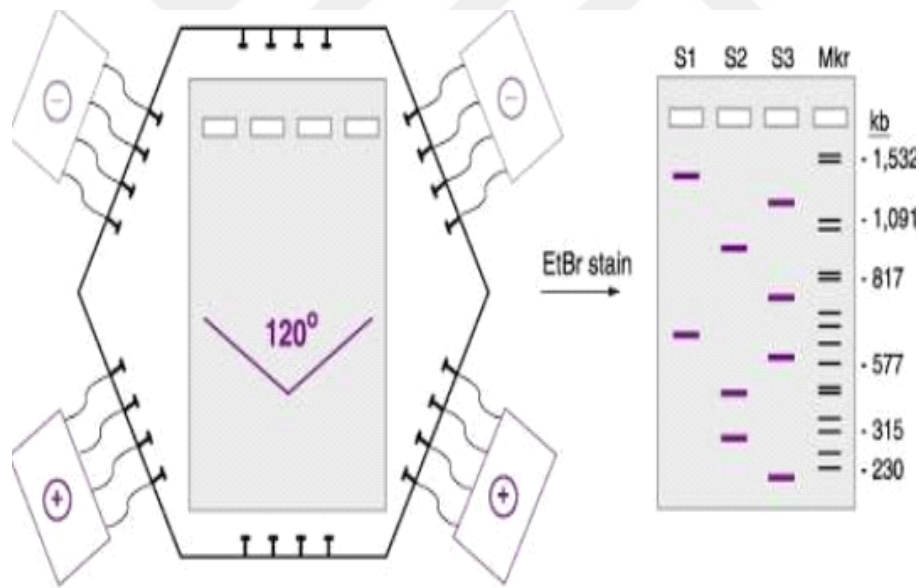
Şekil 2.6.4.4. Ortogonal-Field Alternation Jel Elektroforezi (OFAGE) [77]

#### 2.6.4.5. Programlanabilir Bağımsız Kontrollü Elektrotlar (Programmable Autonomously-Controlled Electrodes, PACE):

Bu mekanizma bütün elektriksel alan parametrelerin bağımsız voltaj regülasyonu ile kontrol seviyesi yüksek olan mekanizmadır. Üstünde 24 düzenli elektrot bulunmaktadır. Diğer PFGE mekanizmalarını yansıtabilir. 100 bç ile 6 Mbç arası DNA parçacıklarının etkin olarak ayrılmasını sağlamaktadır. PFGE'de vuruş süresi, sıcaklık, agaroz konsantrasyonu, voltaj ve açı gibi DNA göçüne etki eden değişkenler yer almaktadır [78].

#### 2.6.4.6. Atımlı Alan Jel Elektroforezi Cihazı (Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields)

Sistem altıgen şeklinde kenarlara yerleştirilmiş yirmi dört nokta elektrodu bulundurmaktadır. Diğer tiplere göre en fazla tercih edilen yöntemdir. Mekanizmada etkili olmayan elektrot bulunmaz, bütün elektrotlar loplar aracılığıyla güç kaynağı bağlantısına sahiptir ve hepsinde aynı direnç vardır. Bu lopların fonksiyonu her pozisyonunda altıgen şeklinde konulan elektrotlardan uygun voltaj üretimini gerçekleştirmektir. Altıgen şeklinde 120 derece olan elektrotlarda sabit bir hızla elektrik akımı gelişi olmaktadır. Mekanizma üzerinde düz jelde etkili ve homojen bir elektriksel alan üretimi yapılır. 120 derecelik açının sağladığı elektrik akımıyla beraber pozitif kutuptan negatif kutuba doğru hareket edilmektedir. Bu yöntem DNA moleküllerinin göçü sırasında oluşabilecek hasarların önüne geçer. Böylelikle birlikte büyük molekül ağırlığı bulunan DNA parçacıklarının göçü gerçekleşir.



Şekil 2.6.4.6. Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields (CHEF Cihazı) [94]

#### 2.7. PFGE Kullanım Alanları

PFGE yöntemi ile büyük DNA parçalarının ayrıştırılabildiği ve bu yöntemin bakteriyel genom analizleri için yeni fikirler sağladığı rapor edilmiştir. Değişik enzimler kullanılarak elde edilen DNA parçalarının PFGE analizlerinin, bakteriyel genomun büyük parçacıklardan küçük

parçalar şeklinde hızlıca ayrılmasını mümkün kılan güçlü bir yöntem olduğunu ispat edilmiştir. Bazı bilim insanları, denemelerinde endonükleaz kullanımını tercih ederek meydana getirdikleri DNA parçalarının PFGE analizlerini, kromozomların parmak izi bulma ve fiziksel haritalamada yararlı olacak değişik örnekleri ortaya çıkardığını ifade etmişler ve PFGE'nin, aynı bakteriyel çeşidin farklı suşları arasında bir bağlantının tespit edilmesinde yararlı olduğunu aktarmışlardır [79].

PFGE'nin, bakteri çeşitlerinin yapısında yararlı olmasının yanında genomların boyutlarının hesaplanması, kromozom haritalarının ortaya çıkarılmasında da sıkça kullanılan bir teknik olduğu bilinmektedir. PFGE'nin genom yapısının belirlenmesinde çok güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmişler ve 180'den fazla bakteriyel kromozomun fiziksel haritalarının meydana gelmesine sebep olduğunu rapor etmişlerdir [72]. PFGE tekniğine maya yapay kromozomu kütüphanelerinin oluşturulmasında ve PFGE deneylerinde transgenik farelerin üretiminde ihtiyaç duyulduğunu ifade etmiştir [49]. PFGE tekniği coğrafik karşılaştırma konularında da tercih edilen bir yöntem olmuştur.

Murray ve ark. üç değişik coğrafik alandan toplanılan Enterokokların genomik DNA'larını incelemek için PFGE tekniğine başvurmuşlardır. Amerika, Taylan ve Şili'de gibi alanlarda bulunan bir hastaneden 1-2 ay zaman aralıkları ile örnekler alınmış ve bir ülkede tespiti yapılan suş tipi başka ülkelerde tespit edilmemiştir. Taksonomik olarak sınıflandırılan olan bakteriler, atasal bağlarına göre ayrılırlar. Genetik bağlara başvuran PFGE gibi yöntemler taksonomi çalışmalarında çok fazla tercih edilmeye başlanmıştır. RFLP analizleri ile genomda çok az kısım taranabilmiş ve bu koşul düşük ayırım sağlamıştır, diğer yandan PFGE; yüksek derecedeki polimorfizmleri tespit edebilmiştir. *Yersinia enterocolitica* genomik DNA'sının, Avrupa'daki tip suşları arasındaki heterojenite durumunu belirlemek hedefiyle PFGE tekniğini kullanmışlardır [59]. Fenotipik markırlar bir serotip içindeki suşları ayırma işlemini gerçekleştirememiştir. Biyotip, serotip ve faj tiplerinin birbirleriyle arasında sağlam bir ilişki durumu gözlenmiştir.

PFGE tekniği açıkça serotip O:5 grubuna eklenen suşların patojenleri ve patojen olmayanları birbirinden ayırmıştır. Bilim insanları, PFGE'nin, izolatların atalarının belirlenmesinde, salgın hastalık durumlarında ve hastane enfeksiyonu gibi şartlarda tercih edilebileceğini belirtmişlerdir [57]. Bu konuyla ilgili olarak Japonya'da PFGE yöntemini epidemiyolojik olan bir araç olarak seçmişlerdir.

Gıda zehirlenmeleri vakalarından, sporadik enfeksiyon durumlarından ve enfekte hastalıklardan ortaya çıkarttıkları Salmonella suşlarının parmak izlerini gözlemlemişlerdir. Enzimlerle kesilme işlemi yapıldıktan sonra bant oluşturan 28 izolat analize tabi tutulmuş ve çeşitli salgın hastalıklardan meydana gelen suşlar farklılık oranlarına göre ayırt etme işlemi yapılmıştır. Sonuçlardan yararlanarak PFGE yönteminin, Salmonella salgınlarının

epidemiolojik analizinde çok rahat bir şekilde kullanıma açık olduğu görülmüştür. Malezya'nın değişik bölgelerinde oluşan ve tespit edilmiş iki kolera salgınına araştırmışlardır [63]. Deneme kapsamında hasta kişilerden alınan ve hasta olmayan kişilerden izole edilen suşlar incelemede kontrollü deney olarak değerlendirilmiştir. Aynı zaman süresince sporadik olgulardan ve yakın coğrafik alanlardan izole edilmiş olan suşlar karşılaştırılmaya tabi tutulmuştur.

Kolera hastalığına çok nadir olarak rastlanan alanlardan izole edilen suşlarda yüksek oranda değişiklik gözlenmiştir. Çoklu klonun Malezya'da nadir olduğu yerde sporadik kısımları meydana getirmiştir. Periyodik salgınların ise pulsed field örnekleri ile yakın ilişkili olan tek bir klon ile birlikte meydana geldiği belirlenmiştir. PFGE bu denemede bireysel izolatları ayırmak için yararlı olmuştur [80].

PFGE yönteminin yararları ve kullanım alanları ile ilgili bir başka çalışma; kaynağı hastane olan *Candida rugosa* salgın türünde, PFGE tekniğini kullanmışlardır [81]. Bu denemede yanık ünitesinden elde edilen dokuz izolat, farklı olan ünitelerden bir izolat ve alakasız olan bir laboratuvarından sekiz izolatın, PFGE tekniği kullanılarak karyotipi elde edilmiştir. Deneme sonucunda, aynı hastanenin değişik ünitelerinden ortaya çıkan bir izolat farklı bir pulsed field tip gösterimi yapmasına rağmen, yanık ünitesinden meydana gelen dokuz izolatın hepsi aynı pulso tipi gösterimi yapmıştır. Karşılaştırmalar için tercih edilen referans laboratuvarına özgü olan izolatlar ise bütünüyle farklı olan tiplerin gösterimini yapmışlardır. Bilim insanları, PFGE'nin *C. rugosa* suşlarını ayırtmada ve sonrasında bu suştan kaynaklanan infeksiyonların tespit edilmesinde bu yöntemin referans olarak tercih edilebileceğine karar vermişlerdir.

190 günlük bir zaman diliminde yanık ünitesindeki hasta kişilerden izole olan dokuz metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşunu kültürünü yapmışlardır [62]. PFGE analizi sonucunda ortaya çıkan profil neredeyse aynıdır ve ayrımı yapılmamıştır. Bazı izolatlarda bir bant fazla olarak tespit edilmiş, suşların birinde büyük bir bant eksiği ortaya çıkmıştır. Denemenin plazmit profillemesi sonucunda ise üç farklı grup ortaya çıkmıştır. Bu dokuz MRSA suşu, aynı suşun klonal türevleri şeklinde kabul görmüştür. Aynı zamanda çalışmada yine PFGE tekniğinin hastaneden meydana gelen infeksiyonlarda faydalı olduğu gözlenmiştir.

PFGE, akuakültürde hastalıklara sebep olabilecek çoğu bakteri çeşidinin yapısını ve genom büyüklüklerinin incelenmesinde kullanılabilir. 180'in üstünde bakteriyel kromozomun fiziksel haritalarının ortaya çıkarılmasında güçlü bir yöntemdir. Bireysel restriksiyon fragmentlerinin tespit edilmesi, restriksiyon haritalama ve gen haritalama işlemlerde son derece faydalıdır. Nokta mutasyon, insersiyon veya delesyon gibi spontan genetik olayların tespit edilmesine olanak sağlar. PFGE markır düzenlerinin belirlenmesinde diğer yöntemlere göre daha sağlam biçimde kullanılabilir. Önceki dönemlerde antimikrobiyal duyarlılık denemeleri, serotiplendirme ve geleneksel biyokimyasal test sonuçlarına göre aynı olduğu gözlenen bir takım bakteri izolatları PFGE şeklinde farklılaşma işlemine tabi tutulabilir. PFGE,

bakteri, mantar, parazitik protozoa ve memeli gibi değişik kaynaklardan meydana gelen büyük molekül ağırlığı olan total genomik DNA'nın analizine imkan veren kullanışlı bir yöntemdir [48].

Yukarıda verilen bilgiler ışığında PFGE kullanım alanlarını madde madde sıralamak gerekirse;

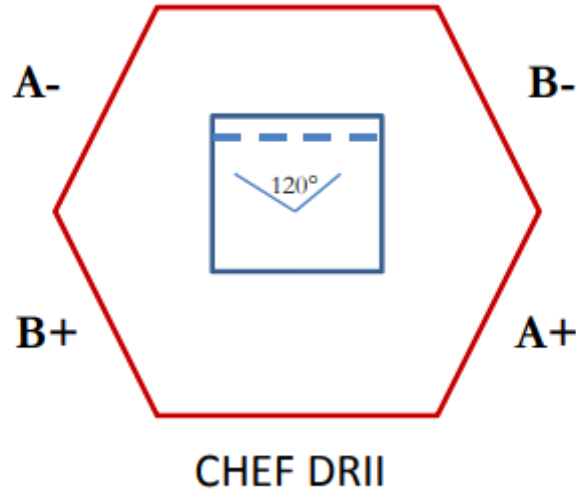
1. PFGE, büyük DNA molekülüne sahip bakteri genomlarının farklı RE'ler ile hızlı ve etkili bir biçimde ayrışmasına olanak sağlar [82].
2. RE aracılığı ile meydana gelen DNA fragmentleriyle farklı kromozomların parmak izi ve fiziksel haritalamaları gözlenir [9].
3. Aynı türden olan farklı suşlar arasındaki bağlantıyı değerlendirmede kullanılır [64].
4. PFGE, akuakültürde hastalıklara sebebiyet verebilecek çoğu bakteri türünün yapısı ve genom büyüklüklerinin incelenmesinde kullanılır [52].
5. 180'in üzerinde bakteriyel kromozomun fiziksel haritalarının ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır [48].
6. Bireysel restriksiyon fragmentlerinin tespit edilmesi, restriksiyon haritalama ve gen haritalama gibi alanlarda kullanılmaktadır [83].
7. Nokta mutasyon, insersiyon veya delesyon gibi spontan genetik hadiselerde tercih edilir [67].
8. PFGE markır düzenlerinin tespit edilmesinde diğer metotlara göre daha güvenilir olduğu belirlenmiştir [58].
9. Önceki zamanlarda antimikrobiyal duyarlılık testleri, serotiplendirme ve geleneksel biyokimyasal testlerinin değerlendirmelerine göre aynı olan bazı bakteri izolatları PFGE ile farklılaştırılabilmektedir [84].
10. PFGE, bakter, mantar, parazitik protozoa ve memeli gibi farklı canlılardan meydana gelen elde edilen büyük molekül ağırlığı olan total genomik DNA'nın analizine imkan sağlamaktadır [48].
11. Bazı canlıların DNA hasarlarının tespitinde kullanılmaktadır [49].

## **2.8. Atımlı Alan Jel Elektforezi Cihazı (Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields) (CHEF Cihazı)**

Hekzagonal yerleşime sahip toplam 24 (6 x 4) elektrota sahiptir. Homojen elektriksel alan sağlar. Elektriksel alanın açısı sabit veya değişken olabilir. DRII sisteminde sabit 120 derecedir. DRIII sisteminde 90-120 derece arasında CHEF Mapper: sisteminde ise 1-360 arasında değişkendir [85].

CHEF teknolojisi, en iyi bilinen PFGE tekniğidir ve düz şeritte geniş bir moleküler ağırlığa sahip olan DNA'yı çözebilmektedir. Elektrotları orta seviyede tutarak homojen elektrik alanlarını oluşturmak için kontur kelepçeli elektroforez çalışma ilkelerini kullanmaktadır ve

böylelikle düz, distorsiyonsuz şerit için ihtiyaç olan homojen elektrik alanlarını meydana getirmektedir [70].

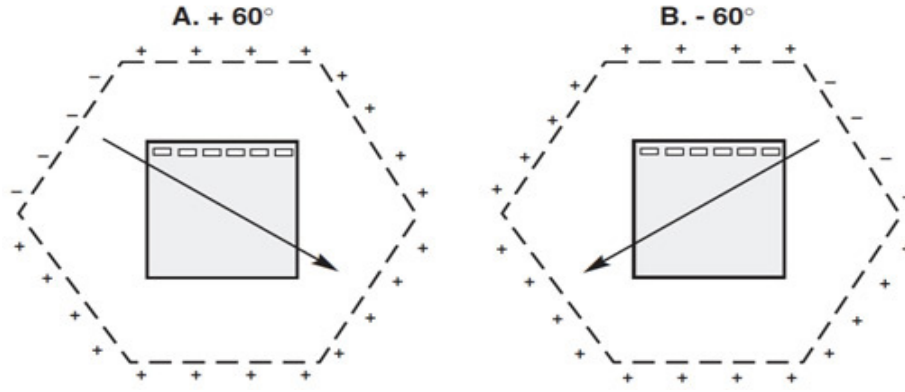


**Şekil 2.8.1. Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields (CHEF Cihazı) [70]**

Ayrıştırma gücü yüksel olan bu tekniğin aşamaları zaman alıcıdır. Bu sebeble standartizasyon problemi yaşanmaktadır. Chef cihazıyla uygulama yapılırken kontaminasyona dikkat edilmelidir. Jel boyama işleminde etidyum bromür güçlü bir teki yarattığı için mutlaka eldiven ve maske giyilmelidir [55].

### **2.8.1. Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields (CHEF Cihazı) Fizikokimyası**

Sistem altıgen şeklinde kenarlara yerleştirilmiş yirmi dört nokta elektrodu bulundurmaktadır. Diğer tiplere göre en fazla tercih edilen yöntemdir. Mekanizmada etkili olmayan elektrot bulunmaz, bütün elektrotlar loplar aracılığıyla güç kaynağı bağlantısına sahiptir ve hepsinde aynı direnç vardır. Bu lopların fonksiyonu her pozisyonda altıgen şeklinde konulan elektrotlardan uygun voltaj üretimini gerçekleştirmektir (Şekil 2.8.2). Altıgen şeklinde 120 derece olan elektrotlarda sabit bir hızla elektrik akımı gelişi olmaktadır.



**Şekil 2.8.2. CHEF Cihazı Fizikokimyası [92]**

Mekanizma üzerinde düz jelde etkili ve homojen bir elektriksel alan üretimi yapılır. 120 derecelik açının sağladığı elektrik akımıyla beraber pozitif kutuptan negatif kutba doğru hareket edilmektedir. Bu yöntem DNA moleküllerinin göçü sırasında oluşabilecek hasarların önüne geçer. Böylelikle büyük molekül ağırlığı bulunan DNA parçacıklarının göçü gerçekleşir [55].

## 2.8.2. Ardunio

İşleme/Kablolama dilini kullanarak çevre elemanları ile temel giriş çıkış uygulamalarını gerçekleştiren açık kaynaklı fiziksel programlama platformudur. Arduino bizlere bağımsız olarak interaktif uygulamalar gerçekleştirmemizi sağlamaktadır. Aynı zamanda Arduinoyu bilgisayar ile Flash, Processing, MaxMSP, C Sharp gibi birçok yazılım üzerinden ya da kendi yazdığımız yazılımlarla kombine ederek de kullanabilmekteyiz. Bu özelliğinden dolayı daha hızlı veri aktarımı ve daha az hafıza kullanılarak bizlere avantaj sağlamaktadır. Arduino UNO R3, Arduino Uno'un en son çıkan modelidir. Bundan önceki modellerde (Uno, Duemilanove) bulunan tüm özellikleri desteklemektedir. Linux ve Mac bilgisayarlarda Arduino'yu bilgisayara bağlamak için herhangi bir sürücüye ihtiyaç yoktur. Windows bilgisayarlarda Arduino IDE yazılımı içinde gelen inf dosyasını bilgisayarınıza tanıtmamız yeterli olacaktır. Bu şekilde Arduino'yu bilgisayarımıza klavye, mouse, joystick ve benzeri aksesuarlar gibi takıp kullanılabilir hale getirebilmekteyiz.

### 2.8.2.1. Teknik Özellikler:

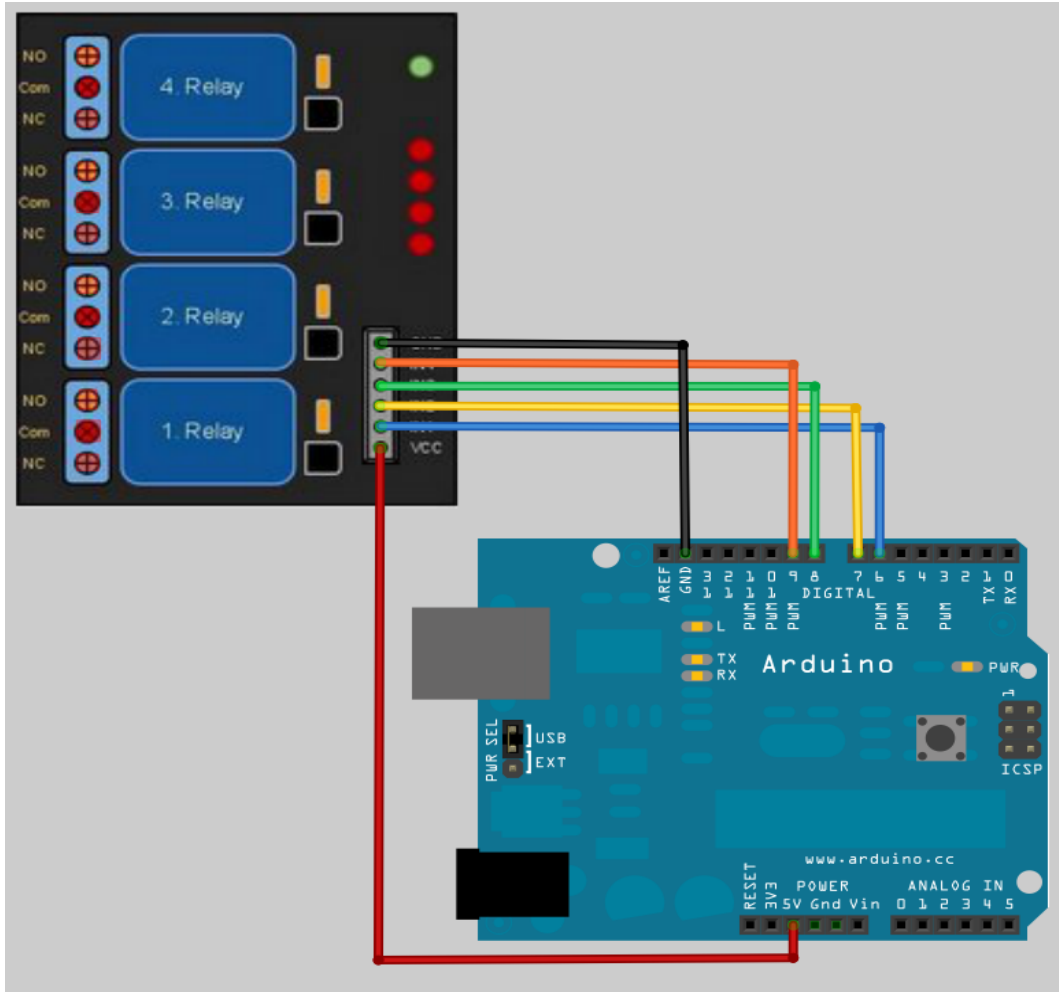
1. ATmega328 Mikrodenetleyici
2. 7-12V Giriş Voltajı
3. 14 Dijital G/Ç Pini

4. 6 PWM Çıkışı
5. 6 ADC Girişi
6. 16MHz Çalışma Frekansı
7. 32KB Flash Hafıza

#### **2.8.3. 4 Yollu 5V'luk Röle Modülü**

Röleler elektromanyetizma üzerinde çalışırlar. Röle bobinine enerji verildiğinde bir mıknatıs gibi hareket eder ve bir düğmenin konumunu değiştirir. Bobine güç sağlayan devre, açık/kapalı anahtarlardan tamamen izole edilmiştir; bu, elektrik izolasyonunu sağlar. Bir röleyi bir arduino'dan 5V kullanarak kontrol edebilmemizin nedeni budur ve yine bu sayede diğer ucunda da 230V'luk bir cihazı çalıştırabilmekteyiz. 230V'luk uç tamamen 5V Arduino devresinden izole edilmiştir. 4 röle kartını bir arduino'ya bağlamak çok kolaydır ve hem AC hem de DC çok çeşitli cihazları açabilmemizi ve kapatabilmemizi sağlar. İlk bağlantılar toprak ve güç pimleridir.

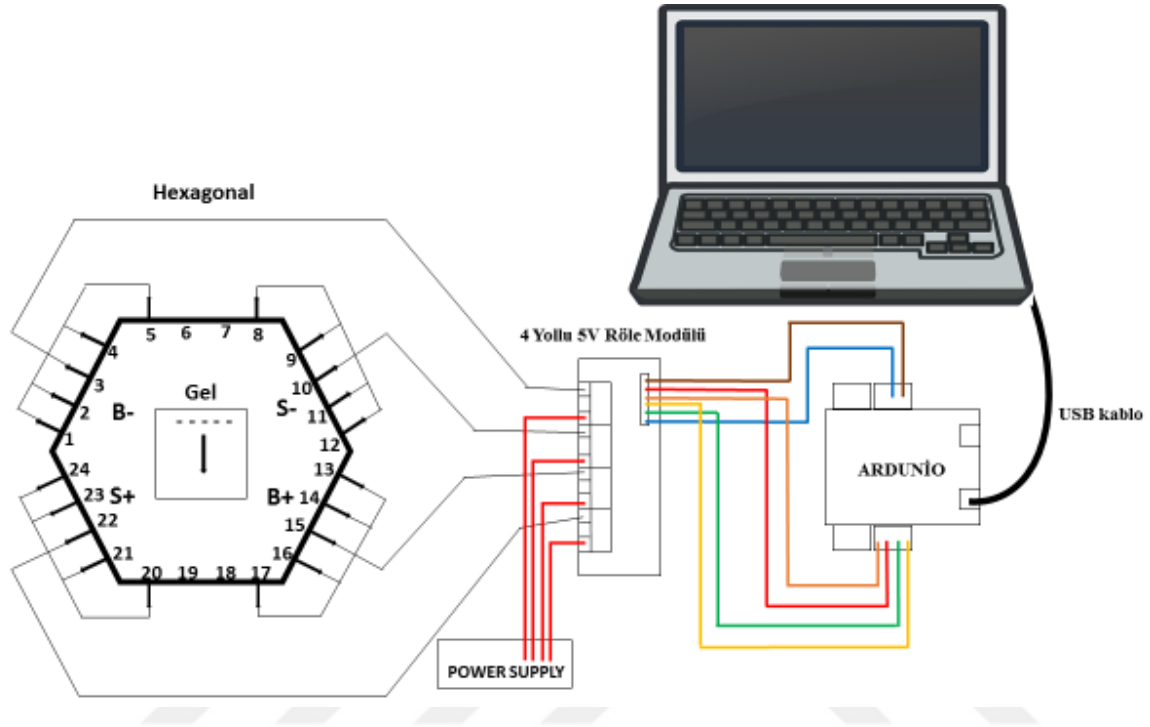
Örnek Bir 4 Yollu 5V'luk Röle Modülünün Arduino'ya Bağlanması;



Şekil 2.8.3.1. Arduino bağlantısı [86]

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. CHEF Şekli (Atımlı Alan Jel Elektroforezi)



**Şekil 3.1.1. CHEF Şekli (Atımlı Alan Jel Elektroforezi) [87]**

CHEF devre diyagramı. Gösterilen elektrot geometrisi, jelin yerleşimi ve elektrot potansiyellerini kontrol eden devredir. Elektrotlar; altıgenin köşelerine 2 cm ve kendi aralarında birbirlerine 4 cm uzaklıkta olacaktır. Elektronik devreye şemada bulunan 24 noktada bağlı olacaklardır. Elektrik alanının B-/B+ ve S-/S+ doğrultuları arasındaki yönelimi 4 yollu 5V'luk röle modülü ile kontrol edilecektir. Yönlendirme ile alan şiddetindeki değişim, değişken direnç tarafından kontrol edilecektir (Şekil 1).

Chef sisteminde pasif olan hiçbir elektrot olmayacaktır. Tüm elektrotlar kablolama sistemleri ile aynı güç kaynağına bağlı olacaktır. Sistemin voltajı bu 24 elektrot ile ayarlanacaktır. Bu sistemin diğer bir önemli özelliği 120° olacak olmasıdır ve bu sistem elektrik alanının büyüklüğünü, konumunu, koordinasyonunu, kararlılığını ve sürekliliğini kontrol edebilecek olmasından dolayı tam kontrol edilebilir bir sistem olacaktır. Bu sayede sistem DNA ayrımları maksimum düzeyde sağlayabilecektir [88].

### 3.2. Tampon Tankı ve Elektrotlar

Üstü açık dikdörtgen şeklinde pleksiglas kabına tampon dökülmüştür. Tampon bir akvaryum pompası vasıtasıyla devirdaim edilmiştir. Bu sistem tampon tankını oluşturmaktadır. Tampon tankının içine altıgen biçiminde kesilmiş pleksiglas yerleştirmiştir. Bu altıgen biçimindeki pleksiglasın üzerinde 24 adet delik açılmıştır. Bu deliklere 24 adet platin elektrodlar, elektrodlar arası 4 cm olacak şekilde altıgen şeklindeki pleksiglas üzerindeki deliklere yerleştirilmiştir. Elektrodların köşelere uzaklığı ise 2 cm olarak ayarlanmıştır. Altıgen pleksiglasın ortasına agaroz jel konularak akıma tabi tutulmuştur.

### 3.3. Genomik DNA Separasyonu

İmal edilecek Atımlı Alan Jel Elektroforez cihazının optimizasyonu için *S. Cerevisiae* kromozomal DNA standartı (Biorad 080018134) kullanılmıştır.

### 3.4. PFGE İçin Gerekli Solüsyonlar

#### 3.4.1. 0,5x TBE (Tris, Borik Asit, EDTA) Solüsyonu (200 ml)

Hazırlanışı: 54 gr Tris, 27,5 gr Borik asit, 20 ml EDTA tartılarak 1000 ml distile suyla çözündürülerek 5x'lik TBE tamponu hazırlanır (ph 8,23'e ayarlanır). Hazırlanan 5x TBE tamponunun 100 ml'sine 900 ml distile su katarak 0,5x'lik TBE elde edilir.

#### 3.5. Agaroz Solüsyonu (%1) (150 ml)

Hazırlanışı: 1,5 gr agaroz tartılıp (SIGMA A.2929) tartılıp, 150 ml 0,5x TBE tamponu içinde çözdükten sonra ısıtılarak eritilir.

### 3.6. Yükleme Tamponu

Hazırlanışı: %25 Brom fenol mavisi, %10 Gliserol, distile su 100 ml.

### 3.7. Yürütme Tamponu 1x

Hazırlanışı: Stok TBE tamponunun 10 kat sulandırılmasıyla hazırlanır.

### 3.8. Etidyum Bromür Solüsyonu 10 mg/ml

Hazırlanışı: 1 gr Etidyum Bromür 100 ml distile suda çözülür. Koyu renkli şişede +4 °C'de saklanır.

### 3.9. Boyayı geri alma solüsyonu 1mM MgSO<sub>4</sub> 200 ml

Hazırlanışı: 0,04 gr MgSO<sub>4</sub> tartılıp, 200 ml distile su içerisinde çözülür [89].

### 3.10. PFGE Agaroze Jelinin Hazırlanması, Örneklerin Jele Uygulanması ve Elektroforez

Hazırlanan agaroz solüsyonu yaklaşık 40°C'ye kadar soğutulduktan sonra 16,5 x 12 x 0,8 cm boyutlarındaki jel kutusuna dökülerek taraklar yerleştirilir.

Jel tamamen katılaştıktan sonra taraklar dikkatlice çıkarılır.

Jel içinde gömülü halde bulunan *S.cerevisiae* marker DNA'sını parçalara ayırarak atımlı alan agaroz jeli kuyucuklarına yerleştirilir.

Atımlı alan agaroz jeli hazırlanırken kenara bir miktar ayrılmış olan jeli tekrar sıvı hale getirip DNA yüklü kuyucuklara dolgu yapılır. (Yüklenen DNA'ların kuyucuklardan çıkmasını engellemek ve jelde yürümesini sağlamak amacıyla dolgu yapılır.)

Jel CHEF aparatına yerleştirilir.

Aparata jelin yüzeyini kaplayacak şekilde yürütme tamponu konur ve tamponun sirkülasyonunu çalıştırmak için peristaltik pompa çalıştırılır.

Güç kaynağı 200 Volta ayarlandıktan sonra sisteme bağlı olan Arduino Uno kartı yardımı ile jele 3 farklı puls periyodu uygulanır ve 48 saat süreyle elektroforez işlemine tabi tutulur.

### 3.11. CHEF-PFGE Sisteminde Kullanılan Puls Periyotları

**Tablo 3.11.1. Puls Periyot Süreleri**

| Seriler | Puls Periyodu (sn) | Döngü süresi (saat) | Volt |
|---------|--------------------|---------------------|------|
| I       | 50                 | 1.5                 | 200  |
| II      | 60                 | 4.5                 | 200  |
| III     | 100                | 12                  | 200  |

[90].

**Tablo 3.11.2. Puls Periyot Süreleri**

| Seriler | Puls Periyodu (sn) | Döngü süresi (saat) | Volt |
|---------|--------------------|---------------------|------|
| I       | 60                 | 24                  | 200  |
| II      | 120                | 24                  | 200  |

[90].

### **3.12. AgaroZ Jelin Boyanması**

Elektroforez işlemi tamamlandığında jel elektroforez aparatından alınarak geniş bir boyama kabına konur. Jelin üzerine Bromid boyama solüsyonu (0,5 µgr/ml Ethidium Bromid) konarak 45 dakika boyanır.

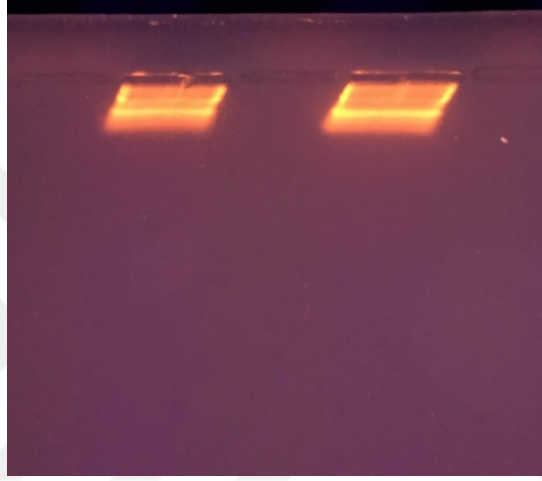
Boyanın fazlası jeli 1mM MgSO<sub>4</sub> solüsyonu ile 15 dakika muamele etmek suretiyle geri alınır.

Jel daha sonra U.V. transilüminatör üzerine konarak fotoğraflanır [89].

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Deney 1:

Atımlı Alan Jel Elektroforez cihazının optimizasyonu için önce kb büyüklüğündeki marker Dna'sı ile ön çalışmalar yapıldı. İlk yapılan deneyde 1 kb boyutundaki DNA agaroz jeline yüklenerek cihaza yerleştirildi. Daha sonra güç kaynağı 60 volta ve darbe periyod süreleri 50-60-100 sn'lik zamanlamaya ayarlandı. Deney 3 saat sürdü. Bu değerler sonucunda elde edilen görüntü şekilde gösterilmektedir (Şekil 4.1.1.).

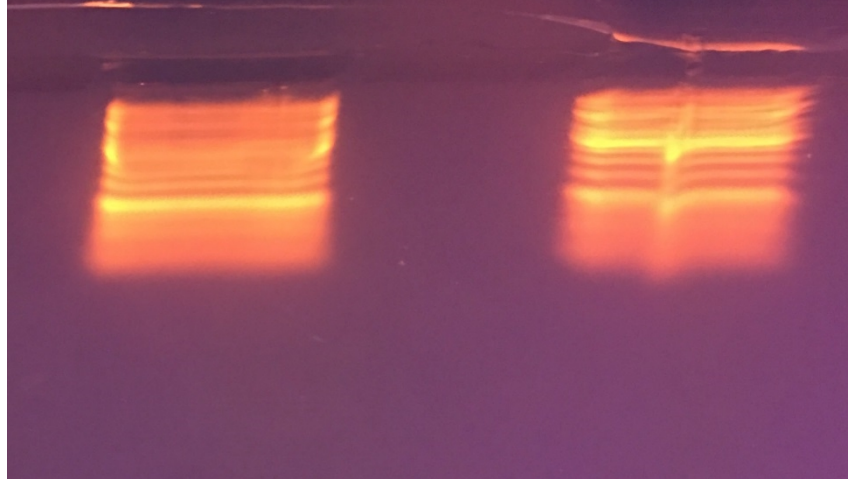


**Şekil 4.1.1. Deney 1**

Tek bant gözlenmiştir. Marker DNA yavaş yürümüştür. Sonraki deneyde volt miktarını arttırmak suretiyle 1 kb boyutundaki marker DNA tekrar yürütülmüştür.

### 4.2. Deney 2:

Yapılan ilk deneyin sonucuna göre 1 kb boyutundaki marker DNA yavaş yürümüştür. Bu nedenle volt değeri 100 volta çıkarıldı. Periyod süreleri 50-60-100 sn'lik zamanlamaya ayarlandı. Deney 3 saat sürdü. Bu değişiklik sonucunda elde edilen görüntü şekilde gösterilmektedir (şekil 4.2.1.).

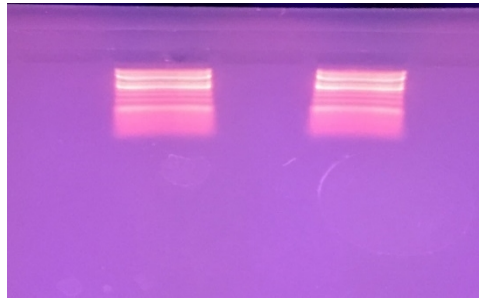


**Şekil 4.2.1. Deney 2**

Marker DNA bantlaşma göstermiştir fakat yürütülen 1 kb boyutundaki marker DNA'sında 14 adet bant bulunmaktadır. Bu yüzden bir sonra ki deneyde tekrar yürütülmüştür.

#### **4.3. Deney 3:**

Önceki deneylerde yürütülen 1 kb'lık marker marker DNA'nın eğri yürüdüğü gözlemlendi. Bu deneyde darbe periyodu değiştirildi. Darbe periyodu 60-120 sn'ye ayarlandı. Volt miktarında değişiklik yapılmadı. Deney tekrarlandı. Bu değişiklik sonucunda elde edilen görüntü şekilde gösterilmektedir (şekil 4.3.1.).



**Şekil 4.3.1. Deney 3**

Deney sonucuna bakıldığında 1 kb boutundaki marker DNA'sı geometrik olarak düzgün bir şekilde yürümüştür. Ancak bant sayısı az olduğundan deney tekrarlandı.

#### **4.4. Deney 4:**

Darbe süresinde yapılan değişiklik ile düzgün bir geometri elde edildi. Bu deneyde volt miktarı tekrar arttırıldı. Volt değeri 150'ye çıkarıldı. Bu değişiklik sonucunda elde edilen görüntü şekilde gösterilmektedir (şekil 4.4.1.).



**Şekil 4.4.1. Deney 4**

Deney sonucuna göre 1 kb'lık marker DNA'sındaki tüm bantlar düzgün bir geometri ile görüntülendi.

Voltaj ve darbe periyodu ayarlaması ile düzgün bir geometri biçiminde tüm bantların gözlemlenmesi ile 2.2 mb boyutundaki *S.cerevisiae* marker DNA'sının yürütülmesi deneylerine geçiş yapıldı.

#### **4.5. Deney 5:**

Jele gömülü halde bulunan 2.2 mb boyutundaki *S.cerevisiae* marker DNA'sı, %0,8' lik atımlı alan agaroz jeli kuyucuklarına parçalara ayrılarak, her kuyucuğa eşit miktarda olacak şekilde yüklendi. Volt değeri 150 volta ayarlanarak deney 18 saat yürütüldü. Bu değişiklik sonucunda elde edilen görüntü şekilde gösterilmektedir (Şekil 4.5.1.).



**Şekil 4.5.1. Deney 5**

*S. cerevisiae* marker DNA'sının kuyucukları terk etmediği gözlemlendi.

#### 4.6. Deney 6:

Deney 5'de marker DNA'larının kuyucukları terk etmemesinden dolayı daha geniş kuyucuklu taraklarla jel dökülerek, aynı voltaj ve darbe periyod süresi ile yürütme 18 saat sürecek şekilde deney tekrar edildi. Bu değişiklik sonucunda elde edilen görüntü şekilde gösterilmektedir (Şekil 4.6.1.).

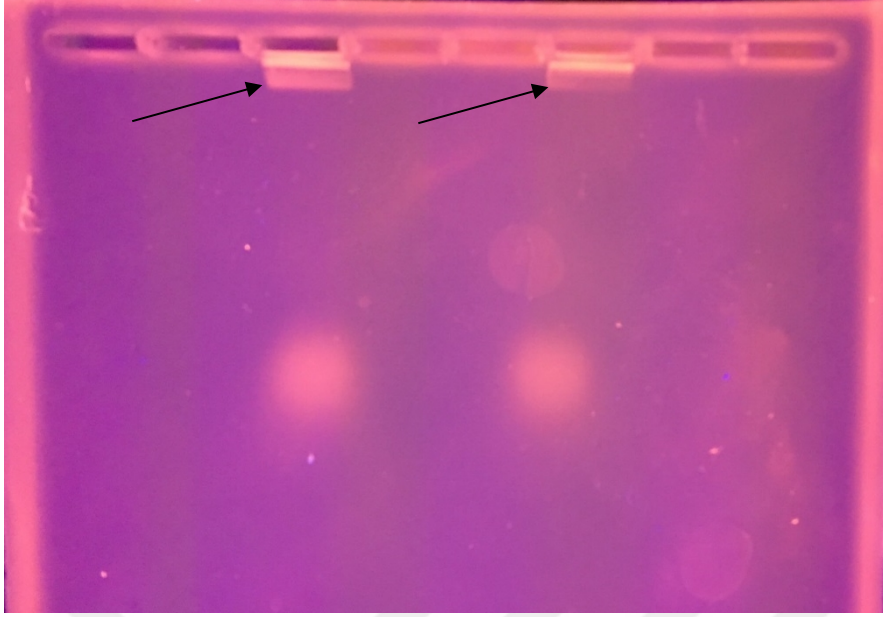


**Şekil 4.6.1. Deney 6**

2.2 mb boyutundaki *S. cerevisiae* marker DNA'sının kuyucuğu terk etmediği gözlemlendi.

#### 4.7. Deney 7:

Deney 6'dan farklı olarak volt miktarı arttırıldı. Volt değeri 200'e çıkarıldı. Darbe periyodunda değişiklik yapılmadı. 18 saat süre ile deney yürütüldü. Bu değişiklik sonucunda elde edilen görüntü şekilde gösterilmektedir (Şekil 4.7.1.).

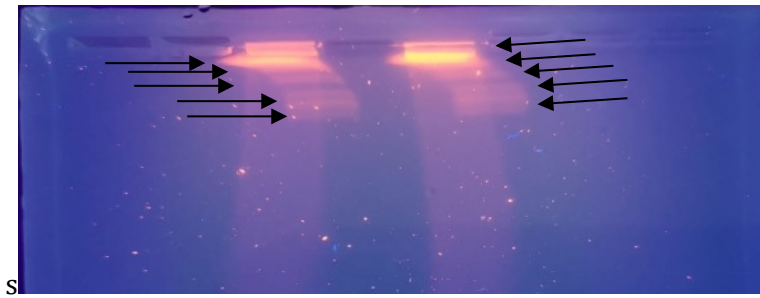


**Şekil 4.7.1. Deney 7**

2.2 mb boyutundaki Marker DNA'sının kuyucukları terk ettiği gözlemlendi. Ancak tek bant gözlemlendi.

#### **4.8. Deney 8:**

Deney 7 de kullanılan atımlı alan agaroz jelinin yoğunluğu 0.8 idi. Bu deneyde atımlı alan agaroz jelinin yoğunluğu 1'e çıkarılarak deney 24 saat yürütülerek tekrar edildi. Bu değişiklikler sonucunda elde edilen görüntü şekilde gösterilmektedir (Şekil 4.8.1.).

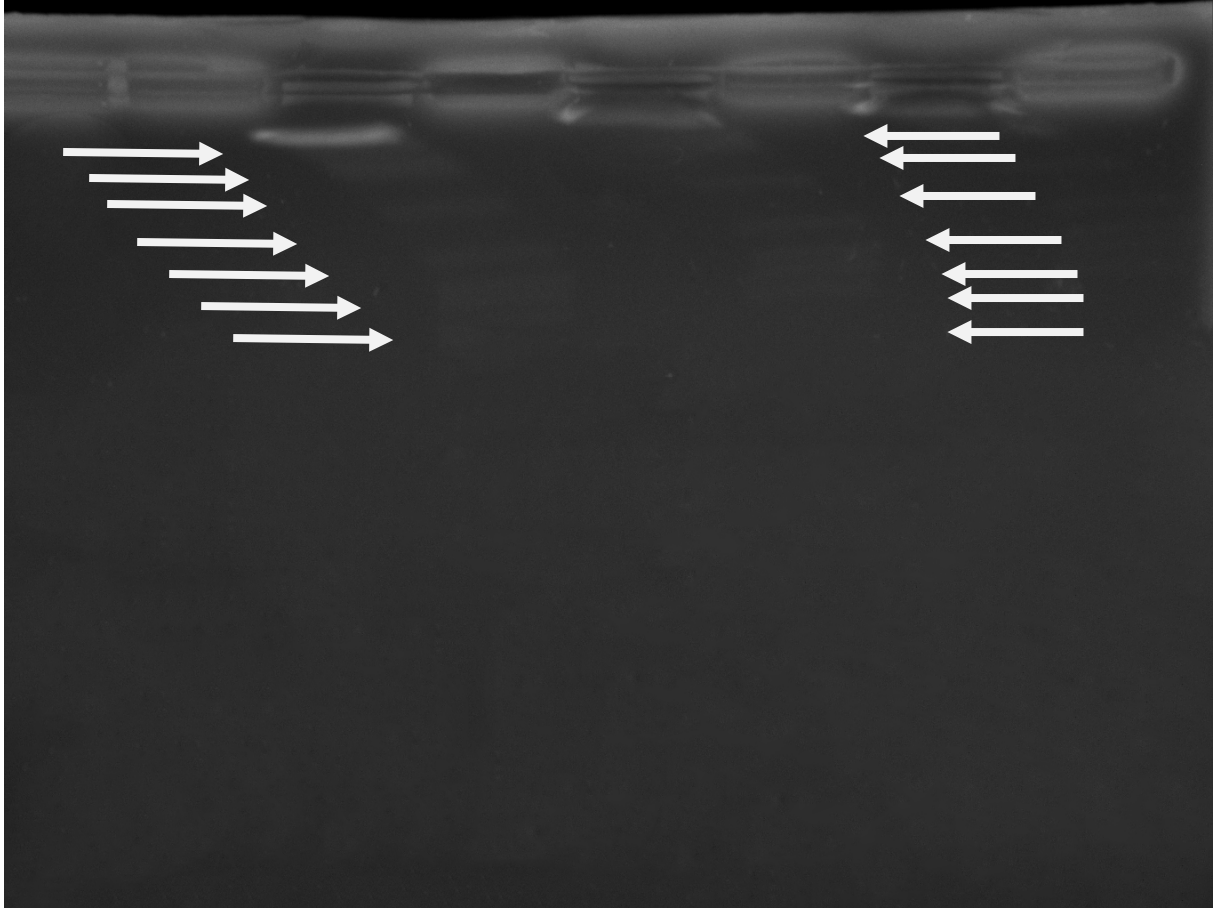


**Şekil 4.8.1. Deney 8**

2.2 mb boyutundaki *S. cerevisiae* marker DNA'sına ait bantlar gözlemlendi. Bantların tamamını gözlemleyebilmek için deney tekrar edildi.

#### 4.9. Deney 9:

Deney 8'deki parametrelerin aynısı olan volt değeri ve darbe periyodunu kullanarak deney 48 saatlik bir süre ile yürülmüştür. Bu değişiklik sonucunda elde edilen görüntüler şekilde gösterilmektedir (Şekil 4.9.1.).



**Şekil 4.9.1. Deney 9**

Elde edilen görüntülerde %1 lik atımlı alan agaroz jeline yüklenen 2.2 mb boyutundaki marker DNA'sının 48 saat süre boyunca 60-120 sn değişen periyodlarla 200 volta tabii tutularak yürütülmesi sonucunda bantlar gözlemlenmiştir. Ancak atımlı alan agaroz jeli hazırlanırken jel içine EtBr eklenmiştir. Ve 48 saatlik bir sürede jelin içindeki boyanın dağıldığı gözlemlenmiştir. Bu sebeple bantlar silik gözlemlendi.

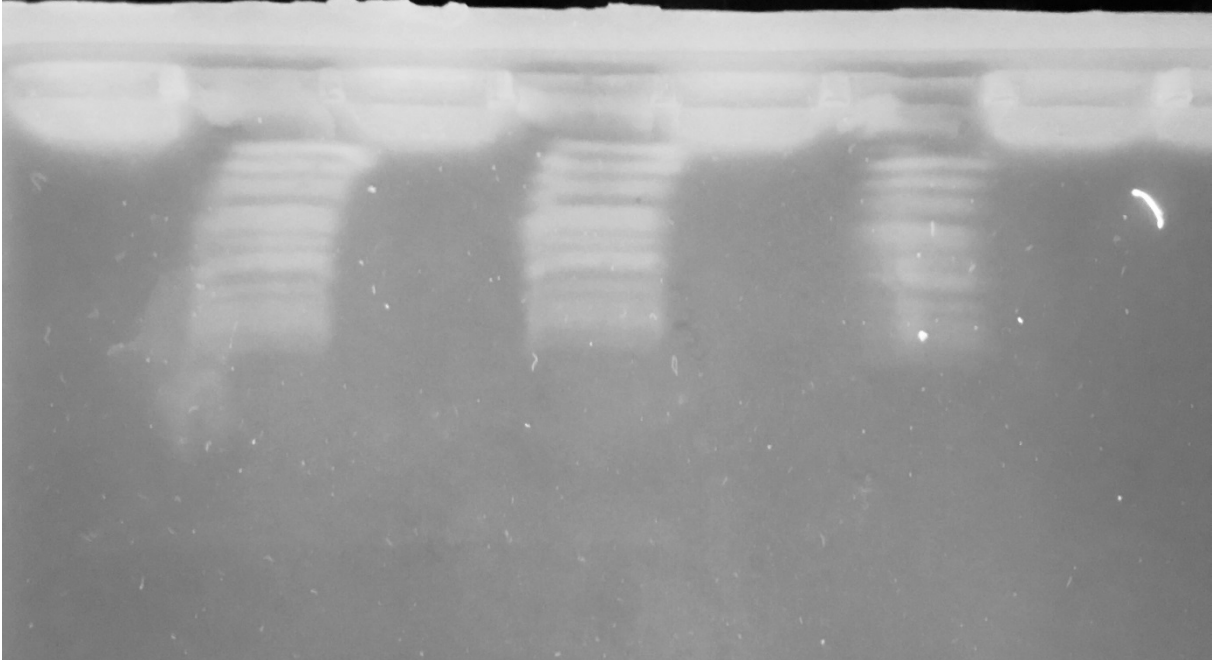
#### 4.10. Deney 10:

Deney 9'deki parametrelerin aynısı olan volt değeri ve darbe periyodunu kullanarak deney 48 saatlik bir süre ile yürütülmüştür. EtBr bu kez jel hazırlanırken eklenmemiştir.

Yürütme işlemi tamamlandığında jel sonradan boyanmıştır. Bu değişiklik sonucunda elde edilen görüntüler şekilde gösterilmektedir (Şekil 4.10.1.).



**Şekil 4.10.1. Deney 10**



**Şekil 4.10.2. Deney 10**

Cihaz elektrik alanının yönünü düzenli olarak değiştirerek ilk elektrik alanının ortadan kalkmasından dolayı jel içindeki DNA moleküllerinin gevşemesine son olarak da yeni alanda DNA moleküllerinin uzayarak hizaya girmesini sağlamaktadır [91]. Gilbert Chu'nun 1984 yılında tasarlamış olduğu bu cihaz mekanik kontrollüdür.

Ardunio uno kartı ile cihaz günümüz teknolojisine tasarlandı. Cihaz mekanik kontrolden dijital kontrollü hale getirildi. Tasarlanan cihaz bilgisayar ile kontrol edilebilir hale getirildi. Ardunio uno ile cihaz mikro işlemcili hale getirildi. Mekanik cihaz saniye cinsinden kontrol edilebilirken Ardunio'lu tasarlanan cihaz milisaniye cinsinden kontrol edildi. Mekanik cihaza kıyasla daha sessiz ve titreşimsiz çalışıldı. Mekanik cihazın yer kaplamasına oranla tasarladığımız cihaz laboratuvar ortamında daha az yer kapladı. Mekanik cihazda çalışma esnasında bir problem oluştuğunda anlaşılması güç olabilirken dijital cihazda (şimdi olmasa da ileride tasarımı geliştirilerek) problem anında sinyal iletimi ve uyarım söz konusu olmaktadır. Sinyal iletimlerinin hızı mekanik cihaza göre daha hızlıdır.

İleride cihaz geliştirilerek cep telefonu, dizüstü, masaüstü bilgisayarı ya da tabletlerden kontrolü mümkün hale getirilebilir ve bu şekilde araştırmacı cihaz çalışırken uzun süre beklemek zorunda kalmadan deneyini her an, her saniye gözlemleyebilecektir.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Agaroz jel elektroforezlerinden biri olan Atımlı Alan Jel Elektroforezi, geleneksel elektroforez yöntemlerine göre farklı bir elektriksel alan oluşturmaktadır. Geleneksel elektroforezlerde tek yönlü (anottan katoda) elektriksel etki uygulanmakta olup Atımlı-Alan Jel Elektroforezi'nde ise bu etki istenilen yönde değiştirilip uygulanmaktadır. Geleneksel yöntemlerde kb boyutunda DNA'lar yürütülürken, Mb boyuttaki DNA'lar bu geleneksel yöntemlerde yürütülememektedir. Mb boyutundaki DNA'lar geleneksel agaroz jel elektroforezinde herhangi bir ayırım oluşturmada düz ilerlerken, Atımlı Alan Jel Elektroforezinde darbeler şeklinde elektriksel alanın uygulanması ile DNA'lar bir zigzag hareketi yaparak jel içinde fragmanlarına ayrılmaktadır. Atımlı Alan jel elektroforez cihazının Mb boyutundaki DNA'ların ayrılmasını sağlaması, karmaşık genomların haritalanmasına, tür analizlerine, hastalık teşhisi gibi büyük boyutta ayırım gereken analizlere olanak sağlamaktadır.

Mb boyutundaki DNA'ların ayrılmasını sağlayan Atımlı Alan Jel Elektroforez cihazının her laboratuvarında çalışılabilmesi, daha düşük maliyette elde edilebilmesi, kontrolünün daha basit ve erişilebilir olması için Atımlı Alan Jel Elektroforez cihazında değişiklikler yapıldı. Bu değişikliklerin başında Arduino uno kartı gelmektedir. Daha önceki çalışmalarda elektrik alanının yönünü değiştirmede yardımcı olarak 120 V'luk röle ve değişken direnç ve elektrik alan bağlantısında 470 ohm 2W'lık direnç kullanılmıştır [70]. Bu çalışmada, 4 yollu 5 V'luk Arduino uno kartı ve 470 ohm 5 W'lık taş dirençleri kullanıldı. Cihaz mekanik kontrolden dijital kontrollü hale getirildi. Cihazın dijital hale gelmesi ile daha iyi hassasiyet ve hesaplama yeteneği, cihazın daha basit algoritmalarla kontrolü, programlamada istediğimiz anda yazılımı değiştirerek farklı çalışma koşullarını yönetmemiz, yapılan deneyin daha güvenilir ve tekrarlanabilir olması, sinyallerin daha kolay iletilmesi ve gürültü ve titreşim yapmadan deney sonuçların doğru bir şekilde alınması sağlandı. Tasarlanan cihaz Gilbert Chu ve arkadaşlarının tasarladığı cihaz ile aynı çalışma mantığında olmasına rağmen sistemin tüm bileşenleri mikro işlemcili hale getirildi. Böylece sistemde oluşturulan elektrik alan süresi bin kat daha hassas hale getirildi. Ayrıca, mekanik kontrollü cihazların yapımından sonra donanımlarının değiştirilmesi ya da yeniden tasarlanması oldukça zordur. Dijital kontrollü cihazda ise donanımsal olarak değişime gerek kalmadan yazılımsal değişiklik yapılarak istenilen parametreler uygulanabilmekte ve değiştirilebilmektedir [92]. Daha önceki çalışmada kullanılan 470 ohm 2 W'lık dirençleri sunulan bu çalışmada tasarlanan cihazda da kullanıldı ve dirençlerin yüksek seviyede ısınma yaptığı gözlemlendi. Bu nedenle, bu dirençlerin yerine 470 ohm 5 W'lık dirençler kullanıldı. Böylece elektriksel alanın ortaya çıkardığı ısıyı minimize ederek akvaryum pompası yardımıyla tampon çözeltinin ısınarak bozulması engellendi. Bu çalışmada da Gilbert Chu ve arkadaşlarının kullanmış olduğu S.

*cerevisiae* marker DNA'sı kullanıldı ve aynı bantlar elde edildi. Yapılan çalışmada deney süresi bir önceki çalışmaya göre uzun sürmesine rağmen ısınma probleminin minimize olmasıyla tampon çözeltinin yenilenmesine ihtiyaç kalmadı.

Birçok donanımların ve hizmetlerin fiyatları düzenli bir şekilde artmış olsa da, dijital devre maliyeti düşmeye devam etmektedir. Çok büyük ölçekli entegrasyon (VLSI) teknolojisindeki gelişmeler, daha iyi, daha hızlı ve daha güvenilir entegre devreler üretmeyi ve bunları tüketiciye daha düşük bir fiyata sunmayı mümkün kılmıştır [91]. Bu sayede, bu çalışmada, Atımlı Alan Jel Elektroforez cihazı daha düşük maliyetle, daha basit ve daha ulaşılabilir bir biçimde laboratuvar koşulları için oldukça kullanışlı olarak tasarlandı. Cihazın düşük maliyetle üretilebilen bir formda olması, ülkemizin bu alandaki dışa bağımlılığının önüne geçmek için iyi bir örnek olacağı kanaatindeyiz.

Sunulan bu tez kapsamında tasarlanan elektroforez cihazının ileride ticarileştirilmesi ile kendi yerel üretim pazarımıza katkı yapılması beklenmektedir. Ayrıca, bu çalışmada önerilen tasarım mantığı farklı teknoloji alanlarında görülen kısıtlamaların giderilmesi konularında çalışan araştırmacılar için temel teşkil edebilir. İlave olarak, önerilen tasarım prosedürü geliştirilerek Atımlı Alan Jel Elektroforez cihazlarının daha ergonomik olması sağlanabilir ve böylece bu cihazların kullanım alanları da genişletilebilir.

## KAYNAKLAR

- [1]. Jill Herschleb, Gene Ananiev & David C Schwartz “Atımlı Alan Jel Elektroforezi”. 10.1038/nprot, (2007).
- [2]. Horvath, J. ve Dolnik, V. (2001), “Polymer Wall coatings for capillary electrophoresis,” Electrophoresis, 22, 644-655.
- [3]. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl, K. (eds) 2003. Current Protocols in Molecular Biology. John Willey & Sons, Inc. 4410 sayfa
- [4]. Cambrex Inc, 2012, The Sourcebook: A Handbook for Gel Electrophoresis, Cambrex Bio Science Rockland, Inc.
- [5]. Garfin, D. E. 2003. Essential Cell Biology. Oxford University Press. Vol1. pp197-268, Oxford UK.
- [6]. Menter, P. 2000. Acrylamide Polymerization- A Practical Approach. Bio- Rad
- [7]. Öktem, S. 2009. Observeable Real Time Electrophoresis. Yüksek Lisans Tezi. Yeditepe
- [8]. Jang, Y.-C., Jha, S.K., Chand, R., Islam, K. ve Kim, Y.-S. (2011), “Capillary electrophoresis microchip for direct amperometric detection of DNA fragments” Electrophoresis, 32, 913-919.
- [9]. Correia, A., Martin, J. F., Castro, J. M. “Aminoasit Üreten *Corynebacteria* Genomunun Pulsed-field Jel Elektroforezi İle Analizi”. Mikrobiyoloji, 140: 2841-2847, (1994).
- [10]. Klug, W. S., Cummings, M. R., 2003. Genetik Kavramlar 6. Baskıdan çeviri Palme Yayıncılık, 816 s., Ankara
- [11]. Smith, C. L., Cantor, C. R. “Moleküler Biyolojide Kullanılan DNA Problarının Genetik Ve Enfeksiyöz Hastalıklar Ve Kanser İçin Uygulamaları”. 87-95, (1986).
- [12]. Perrett, D. 2010. 200 years of Electrophoresis. Chromatography Today, 3(4); 4-7.
- [13]. Burtis, C. A., Ashwood, E. R. Bruns, D. E. 1986. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier Saunders Press, United States of America,
- [14]. Freeman, S. and Herron, J. C. 2001. Evolutionary Analysis. Prentice-Hall. Inc. ISBN: 0- 13- 017291-X.
- [15]. Cooper, G.M., Hausman, R.E., The cell: A Molecular Approach, Third Edition, ASM Press, 2004.
- [16]. Huang, Q., Baum, L. ve Fu, W.L., 2010. Simple and Practical Staining of DNA With GelRed in Agarose Gel Electrophoresis. Clin Lab, 56 (3-4), 149-52.
- [17]. Walker, J. M. 2002. Protein Handbook. Humana Press.Inc. 1139 sayfa. New Jersey Walker, J. M. 2002. Protein Handbook. Humana Press.Inc. 1139 sayfa. New Jersey Elektroforesis , 2000; 21:334-37.
- [18]. Wenk, M. R., Fernandis, A. Z., 2007. A Manual for Biochemistry Protocols. World.
- [19]. Wang X, Sawaguchi T, Sawaguchi A. Application of electrophoresis technology to DNA analysis.
- [20]. Deforce DL, Millegamps RE, Van Hoostat D, Van den Eeckhout EG. Comparison of slab gel electrophoresis a capillary electrophoresis for the detection of the fluorescently labeled polymerase chain reaction products of short tandem repeat fragments. J. Chromatogr A, 1998;806:149-55.
- [21]. Anonim (2012a), Abbott Türkiye, Moleküler Tanı.
- [22]. Anonim (2012b), DNA.
- [23]. Kocagöz, T., Sancak, B., Saraçlı, M. A., Şınık, G., Öktem, S., Aytekin, N. 2009. 24. ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi Elektroforez Kursu Kitapçığı, Elektroforezin Temelleri ve Uygulama Alanları
- [24]. Muhittin A. SERDAR, Fatih ÖZDAĞ, Taner ÖZGÜRTAŞ, Bilge ÖZÇELİK, Ümit Hıdır Ulaş, Serkan
- [25]. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. Journal of Visualized Experiments. (62), e3923, (JoVE).
- [26]. Lide, D.R. 2000. Handbook of Chemistry and Physics. 81st Edition. CRC Press. USA Mathews, C. K., van Holde, K. E., Ahern, K. G. 1989. Biochemistry. Adisson-Wesley press, England

- [27]. Bretherick, L. 1990. Handbook of Reactive Chemical Hazards. 4th ed. p.368 USA
- [28]. Habermann, C. E. 2002. Acrylamide. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.
- [29]. Demirbaş (2008) Balıkesir Üniversitesi, Elektroforez,
- [30]. Zafrin, S., 2013. Olson Lab Protocol: Agarose Gel Electrophoresis Using GelRed. Gel Electrophoresis, p.1-3. [http://www.olsonlab.com/resources/Data-Files/OlsonLabProtocol.Gel\\_Electrophoresis.pdf](http://www.olsonlab.com/resources/Data-Files/OlsonLabProtocol.Gel_Electrophoresis.pdf) (Erişim Tarihi: 06.01.14).
- [31]. Fidancı(2010), Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Elektroforez Uygulamaları ve KlinikLaboratuvar,
- [32]. Uzun (2007) Hacettepe Üniversitesi, Elektroforez, Uzun (2007), [http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/sunu/s\\_elektroforez.pdf](http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/sunu/s_elektroforez.pdf)
- [33]. Cong, W., Chen, M., Zhu, Z., Liu, Z., Nan, J., Ye, W., Ni, M., Zhao, T. ve Jin, L., 2013. A Shortcut Organic Dye-Based Staining Method For the Detection of DNA Both in Agarose And Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Analyst, 138 (4), p. 1187-1194.
- [34]. Jin, L.T. ve Choi, J.K., 2004. Usefulness of Visible Dyes for the Staining of Protein or DNA in Electrophoresis. Electrophoresis, 25, 2429-2438.
- [35]. Buel E, Schwartz MB, La Fountain MJ. Capillary electrophoresis STR analysis: comparison to gel-based systems. J. Forensic Sci, 1998; 43: 164-70.
- [36]. Luckey JA, Drossman H, Kostichka AJ, Mead DA, Di'Cunha JD, Norris TB, Smith LM. High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. Nucleic Acids Res, 1990;18:4417-21.
- [37]. Palladini G, Russo P, Bosoni T, Verga L et al.: Identification of amyloidogenic light chains requires the combination of serum-free light chain assay with immunofixation of serum and urine. Clin Chem. 55(3):499-504, 2009.
- [38]. Tsai JL.Wu WS.Lee HH.Qualitative determination of urinary morphine by capillary zone electrophoresis and ion trap mass spectrometry. Electrophoresis, 2000;21(8): 1580-90.
- [39]. Le Carrer D: Serum protein electrophoresis & immunofixation: illustrated interpretations. Laboratoires SEBIA. 2005.
- [40]. Kocatürk, N. (2002). İnorganik Anyonların Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Tayininde Yüksek Tuz Etkisinin İncelenmesi ve Deniz Suyunda Bromat Tayini, (yüksek lisans tezi) , İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [41]. Nakano T, Nagata A: ELISAs for free light chains of human immunoglobulins using monoclonal antibodies: comparison of their specificity with available polyclonal antibodies. J Immunol Methods. 275: 9-17, 2003.
- [42]. Tietz, Klinik kimyada temel ilkeler, immünglobulinler, Editörler: Burtis CA, Ashwood ER. Çeviri editörü: Aslan D, 5. Baskı, Palme yayıncılık, 336-338, 2005.
- [43]. Palladini G, Russo P, Bosoni T, Verga L et al.: Identification of amyloidogenic light chains requires the combination of serum-free light chain assay with immunofixation of serum and urine. Clin Chem. 55(3):499-504, 2009.
- [44]. Rolcık, J., Lenobel, R., Siglerová, V., Strnad, M. (2002). Isolation of Melatonin by Immunoaffinity Chromatography, Journal of Chromatography B, 775(1), 9-15.
- [45]. Tang, Y. W., Waddington, M. G, Smith, D. H., Manahan, J. M., Kohner, P. C., Highsmith, L. M., Li, H., Cockerill, F. R., Thompson, R. L., Montgomery, S. O., Persing, D. H., 2000, Comparison of protein a gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillinresistant Staphylococcus aureus, Journal of Clinical Microbiology, 38, 1347- 1351.
- [46]. Kuzucu Ç, Baktır E, Acar N. 1998-1999 yılları arasında izole edilen Salmonella ve Shigella suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Türk Hij Den Biyol Derg 2001; 58: 11-4.
- [47]. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics 2001; 17: 1244-5.
- [48]. Basım, E., Basım, H., 2001. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. Turk. J. Biol 25: 405-418
- [49]. Gardiner, K. 1991. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Analytical Chemistry, 63: 658-665.
- [50]. Lai, E., Birren, B.W., Clark, S.M., Simon, M.I., Hood, L., 1989. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Biotechniques, 7: 34-42
- [51]. Carle, G.P., Frank, M., Olsen, M.V., 1986. Electrophoretic separations of large DNA molecules

by periodic inversion of the electric field. Science, 232: 65-68 cast and run in Tris-Acetate-EDTA and Tris-borate-EDTA buffers. Electrophoresis.

[52]. Türe, Z.M., Işıdan, H., Savaş, H., Kutlu, İ., 2012. PFGE Metodu Kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin Genetik Çeşitliliğinin ve Yayılımının Belirlenmesi Projesi. TAGEM/HS/10/09/02/179, s:61.

[53]. Maslow, J. N., Slutsky, A. M., Arbeit, R. D., 1993, Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology, In: Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C., White, T. J., (eds), Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications, ASM Press, Washington DC, 563-572.

[54]. Hoşoğlu, S., 2007, Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) prensip ve uygulamaları, IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 3-7 Eylül 2007, Malatya, 39-46. Hoşoğlu, S., 2007, Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) prensip ve uygulamaları, IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 3-7 Eylül 2007, Malatya, 39-46.

[55]. Goering, R. V., 2004, Pulsed-field gel electrophoresis, In: Persing, D. H., Tenover, F. C., Versalovic, J., Tang, Y. W., Unger, E. R., Relman, D. A., White, T. J., (eds), Molecular Microbiology; Diagnostic Principles and Practice, ASM Press, Washington, D.C., 185-196.

[56]. Durmaz, R., 2001, Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Şti., Adana, 139-147.

[57]. Murase, T., Okitsu, T., Suzuki, R., Morozumi, H., Matsushima, A., Nakamura, A., Yamai, S., 1995, Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infections, Microbiology and Immunology, 39 (9), 673-6.

[58]. Ziegler, A., Vols, A., 1992. Methods in Molecular Biology, Pulsed-field gel electrophoresis. Eds. M. Burmeister, L. Ulanovsky, Totowa.

[59]. Najdenski, H., Iteanu, I., Carniel, E., 1994, Efficient subtyping of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by pulsed-field gel electrophoresis, Journal of Clinical Microbiology, 32, 2913-2920.

[60]. Kudaka, J., Itokazu, K., Taira, K., Iwai, K., Kondo, M., Susa, T., Iwanaga, M., 2006. Characterization of *Salmonella* Isolated in Okinawa, Japan. Journal of Infection Disease, 59, 15-19

[61]. Birren, B.W., Lai, E., Clark, S.M., Houd, L., Simon, M.I., 1988. Optimized conditions for pulsed-field gel electrophoretic separations of DNA. Nucl. Acids Res., 16: 7563-7581.

[62]. Winters, M. A., Goering, R. V., Boon, S. E., Morin, R., Sorensen, M., Snyder, L., 1993, Epidemiological analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* comparing plasmid typing with chromosomal analysis by field inversion gel electrophoresis, Medical Microbiology Letters, 2, 33-41.

[63]. Mahalingam, S., Cheong, Y. M., Kan, S., Yassin, R. M., Vadivelu, J., Pang, T., 1994, Molecular epidemiologic analysis of *Vibrio cholerae* O1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis, Journal of Clinical Microbiology, 32 (12), 2975-2979.

[64]. Vela, A.I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Liebana, P., 2000. Phenotypic and Genetic Characterization of *Lactococcus garvieae* Isolated in Spain from Lactococcosis Outbreaks in Comparison with Isolates of Other Countries and Sources. J. Clin. Microbiol., 38: 3791-3795.

[65]. Correia, A., Martin, J.F., Castro, J.M., 1999. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of aminoacid producing *Corynebacteria*: Chromosome sizes and diversity of restriction patterns. Microbiology, 140: 2841- 2847.

[66]. Levene, S.D., 1992. Methods in Molecular Biology, Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Eds. M. Burmeister and L. Ulanovsky, Totowa, NJ, The Humana Press, 345-365.

[67]. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering R.E., 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Pattern Produced by Pulse-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J. Clin. Microbiol., 33: 2233-2239

[68]. Swaminathan, B., Matar, G. M., 1993, Molecular typing methods, In: Persing, D. H., Smith, T. F.,

[69]. Boxall, N., 1999, Pulsed-field gel electrophoresis: A tool for molecular, epidemiology, Master thesis, Massey University Veterinary Studies, New Zealand, 1-108.

[70]. Chu, G., Vollrath, D., Davis, R.W., 1986. Separation of large DNA molecules by contour-

clamped homogeneous electric fields. *Science*, 234:1582-1585.

[71]. Dempsey, J. A. F., Livaker, W., Madhure, A., Snodgrass, T. L., Cannon, J. G., 1991, Physical map of the chromosome of *Neisseria gonorrhoea* FA1090 with locations of genetic markers, including opa and pil genes, *Journal of Bacteriology*, 173, 5476-5486

[72]. Bourgeois, P. L., Lautier, M., Berghe, L. V. D., Gasson, M. J., Ritzenthaler, P., 1995, Physical and genetic map of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 chromosome: Comparison with that of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403 reveals a large genome inversion, *Journal of Bacteriology*, 177, 2840-2850.

[73]. Türe M., Altınok İ. Pulsed-Field Jel Elektroforez (PFGE) Metodu ve Akutik Organizmalarda Kullanımı Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 9(1): 44-54 (2013)

[74]. Grothues, D., Tümmler, B., 1991, New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species, *Molecular Microbiology*, 5, 2763-2776.

[75]. Suwanto, A., Kaplan, S. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2-4.1. Genome: Presence of two unique circular chromosomes. *J. Bacteriology*, 171: 5850-5859, 1989

[76]. Larsen, F., Gunderson, G., Prtdz, H. Choice of enzymes for mapping based on CpG islands in the human genome. *GATA*, 9(3): 80-85, 1992.

[77]. VanderPloeg, L. H. T., Schwartz, D. C., Cantor, C. R., Borst, P. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* analyzed by electrophoretic separation of chromosome-sized DNA molecules. *Cell*, 37: 77-78, 1984.

[78]. Pyle, L. E., Taylor, T., Finch, L. R. Genomic maps of some strains within the *Mycoplasma mycoides* cluster. *J. Bacteriology*, 172: 7265-7268, 1990.

[79]. Roussel, Y., Pebay, M., Guedon, G., Simonet, J. M., Decaris, B. Physical and genetic map of *Streptococcus thermophilus* A054. *J. Bacteriology*, 176: 7413-7422, 1994.

[80]. Hacıoğlu, E., Basım, H., Stall, R. E. Rarely-cutting restriction endonucleases useful for determining genome size and physical map of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 86: 77-78, 1996.

[81]. Dib, J. C., Dube, M., Kelly, C., Rinaldi, M. G., Patterson, J. E., 1996, Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a typing system for *Candida rugosa*: comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphisms, *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (6), 1494-1496.

[82]. Schwartz, D.C., Cantor, C.R., 1984. Separation of yeast chromosomesized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37:67-75.

[83]. Steward, G., Furst, A., Avdalovic, N., 1988. Transferse Alternating Field Electrophoresis (TAFE). *Biotechniques*, 6: 68-73.

[84]. McClelland, M., Jones, R., Patel, J., Nelson, M. Restriction endonucleases for pulsed-field mapping of bacterial genomes. *Nucl. Acids Res.*, 15: 5985-6005, 1987.

[85]. Bautsch, W. Pulsed-field gel electrophoresis, protocols, methods and theories. Eds. M. Burmeister, L. Ulanovsky, Humana Press, 185-201, 1992

[86]. Arduino ve 4 Yollu 5V'luk Röle Modülü (<http://www.robotistan.com/>) (17.05.2019).

[87]. Gilbert Chu "Boyut Veya Topoloji İle DNA'nın Çözünürlüğü İçin Kontur-Kelepçeli Homojen Elektrik Alanlarında Atımlı Alan Elektroforezi". 10, 290-295, (1989).

[88]. Tiselius, A. 1937. *Trans. Faraday Soc.*, 33:524-531.

[89]. Gökhan Coral ve ark. "Darbeli Alan Jel Elektroforezi Kullanılarak Megabased Boyutlu *Aspergillus Niger* DNA Moleküllerinin Ayrılması". *Biyolojik gösterim vol.*, 50 no 1-2, (2002).

[90]. Birren, B., Eric L. "Atımlı Alan Jel Elektroforezi". *Pratik Rehber*, (1993).

[91]. Digital Control Engineering Analysis and Design, M.Sami Fadali, Antonio Visioli (2013)

[92]. CHEF Solutions, <http://www.bio-rad.com> (19.06.2019).

[93]. Elektroforez cihazı <http://merlab.metu.edu.tr> (15.06.2019).

[94]. CHEF Cihazı [https://uvmgg.fandom.com/wiki/Pulsed\\_Field\\_Gel\\_Electrophoresis](https://uvmgg.fandom.com/wiki/Pulsed_Field_Gel_Electrophoresis) (25.05.2019).

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** : Burak KOZAN

**Doğum Tarihi** : 27.03.1991

**E-mail** : burakkozan331@gmail.com

**Öğrenim Durumu** :

| Derece | Bölüm/Program                 | Üniversite           | Yıl  |
|--------|-------------------------------|----------------------|------|
| Lisans | Moleküler Biyoloji ve Genetik | Atatürk Üniversitesi | 2014 |

**Görevler** :

| Görev Ünvanı | Görev Yeri                         | Yıl  |
|--------------|------------------------------------|------|
| GDO Analisti | SGS Supervize Gözetim Etüd Merkezi | 2019 |