

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Zeynep KOLÖREN

***CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*'DA TRANSİENT TRANSFORMASYON**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*'DA TRANSİENT TRANSFORMASYON**

Zeynep KOLÖREN

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 18.07.2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği İle Kabul Edilmiştir.

İmza
Prof.Dr. Sadık DİNÇER

DANIŞMAN

İmza.....
Doç. Dr. Soner KOLTAŞ

ÜYE

İmza.....
Doç Dr. Hatice KORKMAZ
GÜVENMEZ
ÜYE

İmza
Doç. Dr. Gökhan CORAL
ÜYE

İmza.....
Doç. Dr. M. Nisa ÜNALDI CORAL
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü

**Bu çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: FEF2005D6**

Not : Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA

***CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*'DA TRANSİENT TRANSFORMASYON**

Zeynep KOLÖREN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Sadık DİNÇER

Yıl :2007, Sayfa : 158

Jüri : Doç. Dr. Soner KOLTAŞ

Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

Doç. Dr. Gökhan CORAL

Doç. Dr. M. Nisa ÜNALDI CORAL

Bu çalışmanın amacı *Cryptosporidium parvum* için genetik transformasyon sistemini (transient transformasyon) kurmaktır. Genetik transformasyon gen fonksiyonlarını analiz etmek için gerekli olup, *C. parvum* genleri ile henüz böyle bir analiz gerçekleştirilmemiştir. Bu amaç doğrultusunda *C. parvum*'un ribosomal protein genlerini (BX538351 segment 2/4 L11 protein genleri üzerinde 84361-85501 baz dizisi) taşıyan Crypto-construct GFP plazmidinin, *C. parvum* sporozoitlerine transformasyonu elektroporasyon ve lipofektamin yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Hücre kültürlerinde elde edilen transformantlar invert floresan mikroskop ve revers- transkriptaz PCR ile doğrulanmıştır. Transformasyon ve elektroporasyon koşullarını optimize etmek için Crypto construct GFP vektörün yanı sıra pCMV-DsRed, pEYFP-Mem ekspresyon vektörleri de kullanılmıştır. *C. parvum* sporozoitlerini açığa çıkarmak için kullanılan eksistasyon koşulları içinde ookistlerin % 80 oranında Taurocholic acid /cytomix:RPMI-1640 (1:1) besi ortamında existe olduğu gözlenmiştir. Bu ortam içerisinde bir elektrik akımı verilerek elektropore edilen sporozoitlerin HCT-8 hücre kültürlerini daha iyi infekte ettiği belirlenmiştir. Hem elektroporasyon hem de lipofektamin yöntemiyle pCMV-DsRed ve pEYFP-Mem vektörlerinin HCT-8 hücre kültürlerine transfeksiyonu sağlanmıştır. Elektroporatorün 180 V, kapasitans 250 µF, resistans yok şeklinde ayarlandığı koşullar altında pCMV-DsRed ve pEYFP-Mem vektörlerinin HCT-8 hücre kültürlerindeki ekspresyonları floresan mikroskop altında gözlenirken, elektroporatorün 1000 V, 50 µF, 50 Ω şeklinde ayarlandığı koşullarda bu vektörlerin HCT-8 hücre kültürlerindeki ekspresyonları floresan mikroskop altında gözlenememiştir. Her iki elektroporasyon koşulları altında Crypto construct GFP Vektörün transfeksiyonu sonucunda floresan mikroskop altında gözle görülebilir ekspresyon elde edilememiştir. Yapılan RT-PCR ve Nested PCR ile az olan GFP mRNA ekspresyonu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Cryptosporidium*, Hücre Kültürü, Elektroporasyon, Lipofektamin, Real time PCR

ABSTRACT
PhD THESIS

TRANSIENT TRANSFORMATION OF *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

Zeynep KOLÖREN

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATUREL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor: Prof. Dr. Sadık DİNÇER

Year: 2007, Pages : 158

Jury : Assoc. Prof. Dr. Soner KOLTAŞ

Assoc. Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

Assoc. Prof. Dr. Gökhan CORAL

Assoc. Prof. Dr. M. Nisa ÜNALDI CORAL

The goal of the present research is to develop a genetic transformation system for *Cryptosporidium parvum*. Genetic transformation is an essential tool for analyzing gene function and regulation, but it is not available for *C. parvum*. Establish a transient transformation system for *C. parvum*, electroporetic transformation of sporozoites with plasmids carrying *C. parvum* intergenic regions flanking a reporter (Prot L11 on BX538351 segment 2/4, between 84361- 85501 bp); detection of transformants in cell culture by fluorescent microscopy or reverse transcription PCR. In this study, transformation efficiency was optimized by testing different plasmid constructs (pCMV-DsRed and pEYFP-Mem expression vectors) and electroporation conditions. It was shown that all of the using excystation condition, TA/cytomix:RPMI-1640media (1:1) was the best condition and determined 80% of excystation rate. Electroporated sporozoites giving 1 pulse infected HCT-8 cell culture much more efficiently than the other pulse. pCMV-DsRed and pEYFP-Mem Vectors were transfected into HCT-8 cell line by using both electroporation and lipofectamine methods. Transfected pCMV-DsRed and pEYFP-Mem Vectors expressions at 80 voltage, 50 capacitance, none resistance of electroporation condition observed by fluorescent microscopy. However when giving 1000 voltage, 50 capacitance, 50 resistance in electroporator, transfected pCMV-DsRed Vector and pEYFP-Mem Vector and Crypto-construct GFP Vector expressions could not be observed visually by fluorescent microscopy. There was no visually *C. parvum* (Crypto-construct GFP Vector) expression in both of electroporation condition by fluorescent microscopy. In order to show increase of available a little GFP mRNA expression of *C. parvum* vector in transfected HCT-8 cells by two electroporation conditions was used RT-PCR, Nested PCR.

Key words: *Cryptosporidium*, Cell culture, Electroporation, Lipofectamine, Real time PCR

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminde, yürütülmesinde ve sonuçların değerlendirilmesinde gerekli tüm yardımlarını ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sadık Dinçer'e ve ikinci tez danışman hocam Tufts Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Bölümünden Sayın Doç. Dr. Giovanni Widmer'e, tez izleme komisyon üyelerim Doç. Dr. Soner KOLTAŞ ve Sayın Doç Dr. Hatice Korkmaz'a şükran ve saygılarımı sunarım.

Çalışmaların sırasında her konuda desteklerini esirgemeyen Tufts Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Bölümünden çalışma arkadaşlarım Sayın Dr. Sultan Tanrıverdi'ye, doktora öğrencisi Sayın Yi-Lin YANG'a ve laboratuvar teknisyeni Sayın Ruben Bonilla'ya ve bölüm çalışanlarına, değerli arkadaşım Araştırma Görevlisi Sayın Ayşenur Kaya'ya teşekkür ederim.

Yine bu özverili yolda manevi desteğini esirgemeyip oldukça sabırlı davranan eşim ve aileme, projeye destek sağlayan Ç.Ü. Araştırma Fonu ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Cryptosporidium parvum</i> 'un Morfoloji, Biyoloji ve Yaşam Döngüsü.....	1
1.2. Plazmidler.....	6
1.3 Doğrulama Testleri.....	10
1.3.1. LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Real time PCR)	10
1.3.2. Nested PCR.....	11
1.3.3. RT PCR.....	12
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	14
3. MATERYAL ve METOD.....	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Kullanılan Parazit.....	29
3.1.1.1. <i>Cryptosporidium parvum</i>	29
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	29
3.1.2.1. Ultrasantrifüj.....	29
3.1.2.2. Benmari.....	29
3.1.2.3. İnkübatör.....	29
3.1.2.4. İnvert floresan Mikroskop.....	29
3.1.2.5. Elektroporasyon Cihazı.....	29
3.1.2.6. PTC-100 TM Thermal Kontrol Cihazı.....	29
3.1.2.7. Real Time PCR Cihazı.....	29

3.1.3. Kullanılan Besi yerleri, hücre kültürleri ve kültür ortamları.....	30
3.1.3.1. LB-agar ve LB-broth ortamı.....	30
3.1.3.2. HCT-8 (Human adenocarcinoma, ileocecal) hücreleri.....	30
3.1.3.3. RPMI-1640 kültür ortamı.....	30
3.1.3.4. MDBK (Mardin-Darby bovine kidney) hücre kültürü.....	30
3.1.3.5. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium/High Modified) kültür ortamı.....	30
3.1.3.6. DH5 α Tm <i>Escherichia coli</i> kompetent hücreleri.....	30
3.1.4. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri.....	30
3.1.4.1. 25 cm ² ve 75 cm ² lik steril plastik şişeler.....	30
3.1.4.2. 24 ve 96 kuyucuklu plaklar.....	30
3.1.4.3. Falkon tüpü.....	31
3.1.4.4. Kryovial tüpler.....	31
3.1.4.5. Nalgene Tm Cryo 1°C freezing Konteyner.....	31
3.1.4.6. Otomatik pipet.....	31
3.1.4.7. Lab-Tek ^R Chamber Permanox Slide TM	31
3.1.4.8. BTX boş küvet.....	31
3.1.5. Kullanılan çözeltiler ve kimyasallar.....	31
3.1.5.1. Sitomiks Tampon Çözeltisi.....	31
3.1.5.2. L-glutamin.....	32
3.1.5.3. FBS (Fetal Bovine Serum)	32
3.1.5.4. At serumu.....	32
3.1.5.5. Sodyum pruvat.....	32
3.1.5.6. DMSO (Dimethyl sulfoksid Sigma D-8418)	32
3.1.5.7. PBS (% 1)	32
3.1.5.8. RNA later ^R (RNA'yı stabilize eden solüsyon).....	32
3.1.5.9. Fenol:kloroform:İzoamil alkol.....	32
3.1.5.10. Etanol.....	32
3.1.5.11. Glikojen veya pellet paint.....	32
3.1.5.12. TE Tamponu (1X)	32
3.1.5.13. MMLV Tamponu (5X)	32

3.1.5.14. RNasin.....	32
3.1.5.15. MMLV-RT (200U/μl) (Promega M170A).....	32
3.1.5.16. Taurocholic acid.....	32
3.1.5.17. Glutathionin ve ATP.....	33
3.1.6. Kullanılan Plazmidler.....	33
3.1.6.1. Crypto construct GFP Vektör.....	33
3.1.6.2. pCMV-DsRed Ekspres Vektör (clontech PT3682-5).....	33
3.1.6.3. pEYFP-Mem Vektör (PT3378-5 Clontech).....	34
3.1.7. Kullanılan Antibiyotikler.....	35
3.1.7.1. Ampisilin (Kat no: L0168 Sigma) ve Kanamisin: (L0543 Sigma).....	35
3.1.7.2. Penisilin/streptomisin.....	35
3.1.8. Kullanılan Kitler.....	35
3.1.8.1. Puregene Genomic DNA Purification Kiti ve PureYield Plazmid Midiprep Kiti.....	35
3.1.8.2. Lipofektamin 2000 Kiti.....	35
3.1.8.3. RNeasy Mini Kit.....	35
3.1.8.4. Superscript [™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kiti	35
3.1.8.5. LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kiti.....	35
3.1.9. Kullanılan Enzimler.....	35
3.1.9.1. Restriksiyon Enzimleri.....	35
3.1.9.2. Akkutaz Enzimi.....	35
3.1.10. Kullanılan Primerler.....	36
3.1.10.1. pCMV-DsRed Ekspres Vektör Primerleri.....	36
3.1.10.2. pEYFP-Mem Vektör primerleri.....	37
3.1.10.3. Crypto construct-GFP primerleri.....	38
3.1.10.3.(1). C-GFP F 1-R1 primerleri.....	38
3.1.10.3.(2). C-GFP F 2-R2.....	39
3.1.10.3.(3). C-GFP Nested Primer.....	40
3.1.10.4. <i>C. parvum</i> Primerleri.....	40
3.1.10.4.(1). <i>C. parvum</i>	40

3.1.10.4.(2). L11 primerleri.....	41
3.1.10.4.(3). β tübulin primerleri (<i>C. parvum</i> baz dizisi).....	41
3.1.10.5.GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase housekeeping gen) Primerleri.....	42
3.2. Metod.....	43
3.2.1. Lipofektamin Yöntemiyle Transient Transformasyon.....	43
3.2.1.1. <i>Cryptosporidium parvum</i> 'un Lipofektamin Yöntemi İçin Hazırlanması.....	43
3.2.1.1.(1). <i>Cryptosporidium parvum</i> Ookistlerinin Çoğaltılması	43
3.2.1.1.(1).(a). <i>Cryptosporidium</i> Ookistleri İçin Asit-Fast Boyama Yöntemi.....	44
3.2.1.1.(1).(b). Asit-Fast Yöntemi ile Boyanmış Preparatta Ookist Skorunun Belirlemesi.....	45
3.2.1.1.(1).(c). Karbol Fuksin Hazırlanışı.....	45
3.2.1.1.(1).(d).Ookistlerin Fare Dışkılarından İzole Edilmesi	46
3.2.1.1.(1).(e). Nycodenz (Histodenz) Gradient Saflaştırma Yöntemi (Ultrasantrifüj Yöntemi).....	46
3.2.1.1.(1).(f). NaCl ₂ Yüzdürme Metodu.....	48
3.2.1.1.(1).(g). İmmüno Manyetik Ayırma (IMS) İşlemi.....	49
3.2.1.1.(2). Ookistlerin Yüzeysel Sterilizasyonu ve Eksistasyonu	51
3.2.1.1.(3). Ookistlerin DNA İzolasyonu İçin Hazırlanması.....	53
3.2.1.1.(3).(a). Ookistlerden DNA İzolasyonu.....	53
3.2.1.1.(4). DNA'nın Restriksiyon Enzimleriyle (NcoI, SpeI) Kesilmesi.....	54
3.2.1.2. Plazmidlerin Lipofektamin Yöntemi İçin Hazırlanması....	55
3.2.1.2.(1). Plazmidlerin DH5 α Tm <i>Escherichia coli</i> Kompetent Bakterilerine Transformasyonu.....	55
3.2.1.2.(1).(a). Subcloning Efficiency TM DH5 α TM Kompetent Hücre Kiti.....	55
3.2.1.2.(1).(b). One shot Topo Cloning Kompetent Hücre Kiti.....	57

3.2.1.2.(2). Transformantların Çoğaltılması.....	59
3.2.1.2.(2).(a). LB agar+Ampisilin Besiyerinin Hazırlanması	59
3.2.1.2.(2).(b). Plazmid İzolasyonu.....	60
3.2.1.2.(2).(b).(a). Eppendorf [®] Perfectprep [®] Plazmid İzolasyon Kiti (Kat No: 955150007)..	60
3.2.1.2.(2).(b).(b). Modifiye Edilmiş Qiagen Maxipreps....	61
3.2.1.2.(2).(c). Plazmid DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi.....	62
3.2.1.2.(2).(d). Transformantların Saklanması.....	63
3.2.1.2.(2).(d).(a). Sıvı Besi Yerinde Büyüyen Bakteri Kültürünün Stoklanması.....	63
3.2.1.2.(2).(d).(b). Katı Besi Yerinde Büyüyen Bakteri Kültürünün Saklanması.....	64
3.2.1.2.(2).(e). İzole Edilen Plazmidlerin Doğrulanması.....	64
3.2.1.2.(2).(e).(a). DNA'nın Kesilmesi Protokolü.....	64
3.2.2. Hücre Kültürünün Lipofektamin Yöntemi İçin Hazırlanması.....	65
3.2.2.1. % 60-90 Konfluent MDBK Hücre Kültürünün Hazırlanması (Gibco Kat no: CCC-244).....	65
3.2.2.2. % 60-90 Konfluent HCT-8 Hücre Kültürünün Hazırlanması (CCL-244, ATCC).....	66
3.2.2.3. Hücre Kültürlerinin Pasajı.....	66
3.2.2.4. Hücre Kültürü Plaklarının Hazırlanması.....	67
3.2.3. Hedef DNA'nın Hücre Kültürlerine Transfeksiyonu.....	69
3.2.3.1. Lipofektamine [™] 2000 Kiti.....	69
3.2.3.2. Lab-Tek [®] Chamber Permanox Slide [™]	71
3.2.4. IF (İmmunofloresan Method).....	73
3.2.5. Transformantların Doğrulanması.....	74
3.2.5.1. RT PCR (Lipofektamin 2000 için).....	74
3.2.5.1.(1). RNeasy Mini Kit (Qiagen Kat no: 74104).....	75
3.2.5.1.(2). RNA'dan DNA Kontaminasyonunu Önlemek.....	75
3.2.5.1.(2).(a). DNA'se ile Muamele Kiti.....	76

3.2.5.1.(2).(b). RNA'nın DNaz Enzimiyle Muamele Edilmesi....	76
3.2.5.1.(3). RT PCR.....	77
3.2.5.1.(3).(a). Red Vektör İçin RT-PCR Yapılacak Örnekler.....	78
3.2.5.1.(3).(a).(a). RFP Vektör ile Real-time PCR Koşullarının Optimizasyonu.....	80
3.2.5.1.(3).(a).(b). RFP Vektör Transformantlarının Real-time PCR'da Doğrulanması.....	81
3.2.5.1.(3).(b). Crypto Construct GFP Vektör Transformantlarının RT-PCR ile Doğrulanması	83
3.2.5.1.(3).(b).(a). C-GFP Plazmidi ile Real-time PCR Koşullarının Optimizasyonu.....	84
3.2.5.1.(3).(b).(b). C-GFP Vektör Transformantlarının Real-time PCR'da Doğrulanması.....	85
3.2.5.1.(3).(b).(b).(a). Crypto Construct GFP Vektör RNA Örnekleri.....	85
3.2.5.1.(3).(b).(b).(b). Crypto construct GFP Vektör c-DNA Örnekleri.....	86
3.2.2. Elektroporasyon Yöntemiyle Transient Transformasyon.....	88
3.2.2.1. <i>Cryptosporidium parvum</i> 'un Elektroporasyon Yöntemi İçin Hazırlanması	88
3.2.2.1.(1). <i>Cryptosporidium parvum</i> Ookistlerinin Çoğaltılması.....	88
3.2.2.1.(2). Ookistlerin Fare Dışkılarından İzole Edilmesi.....	88
3.2.2.1.(3). Ookistlerin Yüzeysel Sterilizasyonu ve Eksistasyonu.....	88
3.2.3. Plazmidlerin Elektroporasyon Yöntemi İçin Hazırlanması.....	89
3.2.4. Hücre Kültürünün Elektroporasyon Yöntemi İçin Hazırlanması.....	89
3.2.5. Elektroporasyon Deneyi I	90
3.2.6. Transfeksiyon Neticesinde Elde Edilen Transformantların Doğrulanması.....	93
3.2.7. Elektroporasyon Deneyi II.....	93
3.2.8. Elektroporasyon Yöntemiyle Elde Edilen Transkriptlerden RNA Sentezi.....	95

3.2.9. Crypto-construct GFP Vektör Transformantları İçin RT-PCR.....	95
3.2.9.1. RT-PCR Yapılan GFP Vektör Transformant Örnekleri.....	95
3.2.9.2. HCT-8 Hücrelerinin Enfeksiyonunun Doğrulanması.....	96
3.2.9.2.(1). L11 Primerleri.....	97
3.2.9.2.(2). β tübulin Primerleri.....	97
3.2.10. GAPDH Primerleri.....	97
3.2.10.1. GAPDH Primerleri Kullanılarak PCR Yapılacak Örnekler...	98
3.2.11. Crypto-construct GFP Vektör ile Real-time PCR Koşullarının Optimizasyonu.....	99
3.2.11.1. Crypto-construct GFP Vektör Transformantları İçin Conventional PCR.....	100
3.2.11.2. Crypto-construct GFP Vektör Transformantları (c-DNA) İçin C-GFP2-R2 Primerleri ile Real –time PCR.....	101
3.2.11.3. Nested Primerleri İle Real–time PCR.....	101
3.2.12. pEYFP-Mem Vektör Transformantları İçin RT-PCR.....	103
3.2.12.1. pEYFP-Mem Vektör ile Real-time PCR Koşullarının Optimizasyonu.....	104
3.2.12.2. RT-PCR Yapılan YFP Vektör Transformant Örnekleri.....	105
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	108
4.1. Bulgular Lipofektamin.....	108
4.1.1. NcoI ve SpeI Restriksiyon Enzimleriyle Transformantların Kesilerek Doğrulanmasına Ait Bulgular.....	109
4.1.2. pCMV- DsRed-Ekspress Plazmidinin Real time PCR ile Doğrulanmasına Ait Bulgular.....	110
4.1.3. Transfeksiyon İşleminde Sonra Plazmid Ekspresyonunun Floresans Mikroskop Altında İncelenmesi.....	110
4.1.4. HCT-8 Hücrelerinin Sporozoitlerle Enfeksiyonunun Kontrolüne Ait Real time Optimizasyon Sonuçları.....	112

4.1.5. pCMV-DsRed Ekspres Vektörün HCT-8 Hücrelerine Transfeksiyonundan Sonra Elde Edilen m-RNA Transkriptlerine Ait Real time PCR Sonuçları.....	116
4.1.6. Crypto construct GFP Vektörün HCT-8 Hücrelerine Transfeksiyonundan Sonra Elde Edilen m-RNA Transkriptlerine Ait Real time PCR Sonuçları.....	117
4.2. Bulgular Elektroporasyon.....	120
4.2.1. DH ₅ α Tm <i>Escherichia coli</i> Kompenent bakterilerine Transformasyonu Yapılan Crypto construct GFP Plazmidlerin Agaroz jel Analizi ile Doğrulanması.....	121
4.2.2. Ookistlerin Eksistasyonu.....	123
4.2.3. Elektroporasyon Deneyi I.....	125
4.2.3.1. Elektroporasyon ile Transfeksiyon İşleminde Sonra Plazmid Ekspresyonunun Floresan Mikroskop Altında İncelenmesi.....	127
4.2.4. Elektroporasyon Deneyi II.....	139
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	147
KAYNAKLAR.....	149
ÖZGEÇMİŞ.....	158

ÇİZELGELER DİZİNİ SAYFA

Çizelge 1.1.	<i>Cryptosporidium</i> 'un taksonomik sınıflandırılması ve farklı konakçıları.....	1
Çizelge 1.2.	Kriptosporidiyoz sıklığı.....	4
Çizelge 1.3.	Kriptosporidiyozlu immün sistemi normal kişiler ve AIDS hastalarında görülen semptomlar.....	5
Çizelge 1.4.	Real-time PCR ile konvensiyonel PCR arasındaki farklar.....	11
Çizelge 3.1.	Yüksek devirli santrifüj kullanma rehberi.....	47
Çizelge 3.2.	Farklı eksistasyon koşulları.....	52
Çizelge 3.3.	NcoI, SpeI restriksiyon enzimleriyle DNA'nın kesilmesi protokolü.....	55
Çizelge 3.4.	One shot Topo Cloning kompetent hücre kiti için ligasyon protokolü.....	57
Çizelge 3.5.	Restriksiyon enzim kullanılarak DNA'nın kesilmesi protokolü.....	64
Çizelge 3.6.	Hücre kültürü plaklarının büyüme ortamları ve maksimum hücre sayısı.....	68
Çizelge 3.7.	RFP vektör ile Real-time PCR koşullarının optimizasyonunda kullanılan program.....	81
Çizelge 3.8.	RFP vektör transformantlarının doğrulanması için kullanılan Real-time PCR programı.....	82
Çizelge 3.9.	Crypto Construct GFP vektör ile Real-time PCR koşullarının optimizasyonu için kullanılan program.....	85
Çizelge 3.10.	C-GFP vektör transformant RNA'larının Real-time PCR'da doğrulanmasına ait program.....	86
Çizelge 3.11.	C-GFP vektör transformant c-DNA'larının Real-time PCR'da doğrulanmasına ait program.....	87
Çizelge 3.12.	Farklı eksistasyon koşullarında ookist eksistasyonu.....	88

Çizelge 3.13.	GAPDH Primerleri ile GFP vektör mRNA miktarlarının ölçüldüğü Real time PCR programı.....	98
Çizelge 3.14.	GFP vektör transformantlarının Real time PCR’da doğrulanmasına ait program.....	100
Çizelge 3.15.	Crypto-construct GFP vektör m-RNA’larının Nested primerleri ile doğrulanmasına ait Real time PCR programı.....	103
Çizelge 3.16.	pEYFP-Mem vektör ile Real-time PCR koşullarının optimizasyonuna ait program.....	105
Çizelge 3.17.	YFP vektör transformantlarının doğrulanmasına ait Real time PCR programı.....	106
Çizelge 4.1.	Farklı koşullarda enfekte edilen HCT-8 hücrelerinin floresan mikroskop altında tespit edilen ortalama sayıları.....	124
Çizelge 4.2.	Farklı koşullarda enfekte edilen HCT-8 hücrelerinin standart sapma değerleri.....	124
Çizelge 4.3.	Elektroporasyon işleminde elektroporatör cihazında okunan YFP vektöre ait elektrik alan kuvveti ve akımına ait bulgular.....	126
Çizelge 4.4.	Elektroporasyon işleminde elektroporatör cihazında okunan GFP vektörüne ait elektrik alan kuvveti ve akımına ait bulgular.....	127
Çizelge 4.5.	Elektroporasyon işleminde elektroporatör cihazında okunan RFP vektörüne ait elektrik alan kuvveti ve akımına ait bulgular.....	127
Çizelge 4.6.	Elektroporasyon işleminde elektroporatör cihazında okunan YFP vektörüne ait elektrik alan kuvveti ve akımına ait bulgular.....	130
Çizelge 4.7.	Elektroporasyon işleminde elektroporatör cihazında okunan YFP vektöre ait elektrik alan kuvveti ve akımına ait bulgular.....	138

ŞEKİLLER DİZİNİ**SAYFA**

Şekil 1.1.	<i>Cryptosporidium</i> 'un yayılmasındaki kaynaklar.....	2
Şekil 3.1.	Crypto construct GFP vektör şeması.....	33
Şekil 3.2.	pCMV-DsRed ekspres vektör şeması.....	34
Şekil 3.3.	pEYFP-Mem Vektör Şeması.....	34
Şekil 3.4.	DH5 α TM kompetent hücre kiti ile transformasyon deney düzeneği.....	55
Şekil 3.5.	One shot Topo Cloning kompetent hücre kiti ile transformasyon deney düzeneği.....	57
Şekil 3.6.	Lipofektamin TM 2000 kitinin esası.....	69
Şekil 3.7.	Lipofektamin TM 2000 kiti ile transfeksiyon deney düzeneği.....	70
Şekil 3.8.	Chamber permanoks slayt ile transfeksiyon deney düzeneği.....	72
Şekil 3.9.	Elektroporasyon yönteminin esası.....	90
Şekil 3.10.	Elektroporasyon I deney düzeneği.....	90
Şekil 3.11.	Elektroporasyon II deney düzeneği.....	93
Şekil 3.12.	YFP vektörünün stabil transformasyon deney düzeneği..	107
Şekil 4.1.	Crypto construct GFP vektörün NcoI ve SpeI Restriction enzimleriyle kesilmesi	109
Şekil 4.2.	pCMV- DsRed-Ekspres vektör kolonilerinin melting curve analizi.....	110
Şekil 4.3.	pCMV- DsRed-Ekspres vektör ve pEYFP-Mem Vektör ekspresyonlarının inverted mikroskop altındaki görüntüleri	111
Şekil 4.4.	L11 primerlerinin Real-time PCR ile optimizasyonu	113
Şekil 4.5.	Real time PCR'da L11 primerleri kullanılarak testlenen RT PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri.....	114

Şekil 4.6.	Real time PCR’da β - tübin primerleri kullanılarak testlenen RT PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri.....	115
Şekil 4.7.	pCMV-DsRed Ekspres Vektörün m-RNA ekspresyonunun Real Time PCR ile gösterilmesi.....	116
Şekil 4.8.	Crypto construct GFP Vektör primerlerinin Real-time PCR ile optimizasyonu sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri.....	117
Şekil 4.9.	GFP Vektör transformantlarından elde edilen RNA örneklerinin c-GFP F1-R1 primerleri kullanılarak Real Time PCR ile doğrulanması.....	118
Şekil 4.10.	GFP Vektör transformantlarından elde edilen cDNA örneklerinin c-GFP F1-R1 primerleri kullanılarak Real Time PCR ile doğrulanması.....	119
Şekil 4.11.	Crypto construct GFP Vektör DNA’sının restriksiyon enzimleriyle (NcoI, SpeI) kesilmesi.....	122
Şekil 4.12.	Farklı koşullarda enfekte edilen HCT-8 hücrelerinin standart sapma değerlerinin grafiği.....	125
Şekil 4.13.	YFP vektör transformantlarının floresan mikroskop altındaki görüntüleri	128
Şekil 4.14.	RFP vektör transformantlarının floresan mikroskop altındaki görüntüleri	129
Şekil 4.15.	YFP primerleriyle yapılan Real-time PCR’da melting curve analizi	132
Şekil 4.16.	YFP vektör transkriptlerinin Real-time PCR’da melting curve analizi.....	133
Şekil 4.17.	YFP vektör transkriptlerinin Real-time PCR’da quantification analizi.....	134
Şekil 4.18.	YFP vektör transkriptlerinin GAPDH mRNA ekspresyonlarının Real-time PCR’da melting curve analizi.....	136

Şekil 4.19.	YFP vektör transkriptlerinin GAPDH mRNA ekspresyonlarının Real-time PCR’da quantification analizi	136
Şekil 4.20.	YFP vektör transkriptlerinin GAPDH mRNA ekspresyonlarının agaroz jel analizi.....	137
Şekil 4.21.	Enfekteli HCT-8 hücrelerinin β - tübin primerleri kullanılarak Real time PCR ile doğrulanması	140
Şekil 4.22.	β - tübin primerleri kullanılarak elde edilen Real time PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	140
Şekil 4.23.	Enfekteli HCT-8 hücrelerinin β - tübin primerleri kullanılarak Real time PCR ile doğrulanması	141
Şekil 4.24.	L11 primerleri kullanılarak elde edilen Real time PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	141
Şekil 4.25.	GFP vektör ile GFP F ₂ -R ₂ primerlerinin Real time PCR cihazında optimizasyonu.....	142
Şekil 4.26.	GFP mRNA transkriptlerinin Konvensiyonel PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü	143
Şekil 4.27.	GFP mRNA transkriptlerinin Real-time PCR’da melting curve analizi.....	144
Şekil 4.28.	GFP mRNA transkriptlerinin Real-time PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	144
Şekil 4.29.	GFP mRNA transkriptlerinin nested primerleri kullanılarak yapılan Real-time PCR’da melting curve analizi.....	145
Şekil 4.30.	GFP mRNA transkriptlerinin nested primerleri kullanılarak yapılan Real-time PCR melting curve analizinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	146

1. GİRİŞ

1.1. *Cryptosporidium parvum*'un Morfoloji, Biyoloji ve Yaşam Döngüsü

Cryptosporidium spp. Apicompleksa şubesi, Alveolata grubu, *Cryptosporidiidae* familyasında bulunan hücre içi bir parazittir. Konakçı spesifikliğı ve ookist morfolojisine dayanılarak şu ana kadar 10 cinsi tanımlanmıştır (Chen ve ark, 2002).

Adal ve ark (1995), *Cryptosporidium*'un taksonomik sınıflandırılması ve farklı konakçıları Çizelge 1.1'deki gibi belirtmişlerdir.

Çizelge 1.1. *Cryptosporidium*'un taksonomik sınıflandırılması ve farklı konakçıları

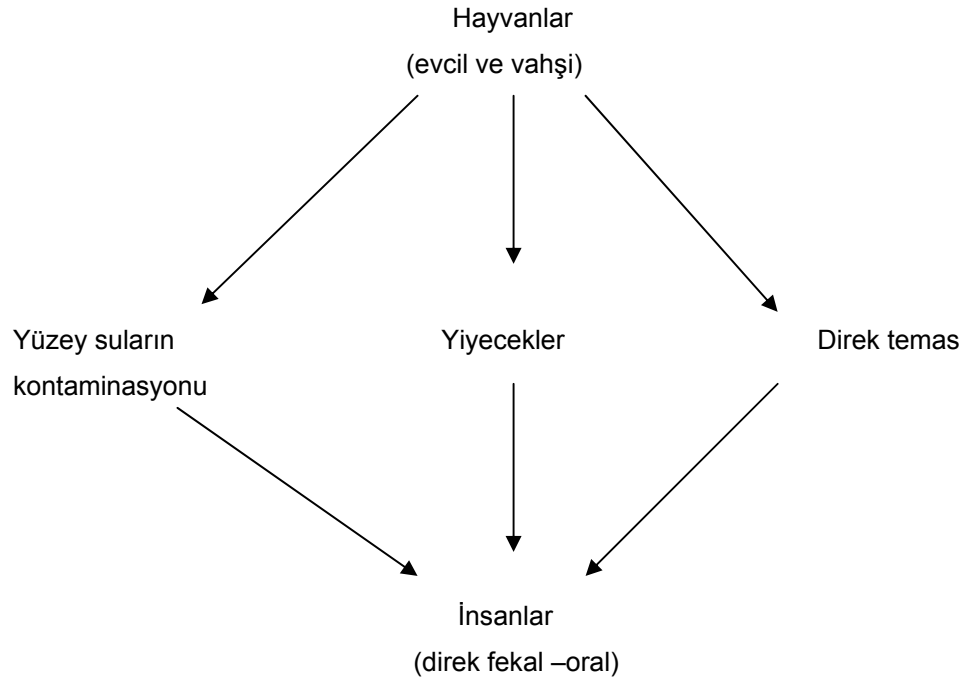
Sınıflandırma	Konakçı
Phylum: Apicomplexa	
Class : Sporozoida	
Subclass: Coccidiasina	
Order: Eucoccidiorida	
Suborder: Eimeriorina	
Family: Cryptosporidiidae	
Genus: <i>Cryptosporidium</i>	
Species: <i>C. parvum</i> <i>C. muris</i> <i>C. baileyi</i> <i>C. melaegridis</i> <i>C. serpentis</i> <i>C. nasorum</i>	Memelilerde Memelilerde Kuşlarda Kuşlarda Sürüngenlerde Balıklarda

Cryptosporidium parvum mide ve bağırsak mukozası epitel hücrelerinin mikrovillus bölgelerinde yaşar. Yerleşim yeri nedeniyle diğer hücre içi parazitlerinden ayrılır. Çünkü, onlar hücrenin sitoplazması içinde yerleşirken, *C. parvum* hücrenin ekzositoplazmik alanında yerleşir ve birbirini izleyen eşeyli ve eşeysiz üremeye çoğalır. Ağızdan alınan infeksiyeli, olgun ookist ince bağırsakta bilinmeyen bir mekanizmayla açılır ve içindeki sporozoitler serbest kalır ve her biri bir epitel hücresi içine girerek parazitoforoza vaküole yerleşir. Hücre içindeki trofozoitler 2-2.5 µm çapında, yuvarlak veya oval yapılardır. Hücre içinde beslenen, büyüyen trofozoit eşeysiz olarak şizogoni ile çoğalır ve sonuçta 6-8 merozoit oluşur. Merozoitleri taşıyan bu hücreye meront I (şizont) denir. Bunların parçalanmasıyla

açığa çıkan merozoitler diğer hücrelere girer ve yeni bir şizogoniye başlatıp meront I veya meront II ye dönüşürler. Şizogoni sonucunda meront II içinde 4 merozoit oluşur. Hücre parçalanınca serbest kalan bu merozoitler yeni epitelyum hücreleri içine girerek mikro veya makro gametositlere dönüşürler. Bu gametositlerin gametlere dönüşmesinden sonra mikrogamet makrogameti döller, oluşan zigot ookistlere dönüşür. Ookistler konak hücre içinde olgunlaşır ve içinde sporozoit oluşmuş dönemde konak bağırsağına, ordanda dışkıyla dışarı atılır (Saygı, 2002).

C. parvum'un eşeyli üremesi sonucunda iki farklı tip ookist oluşur. Bunlardan ince çeperli olup içinde 4 sporozoit bulunanlar konak vücudu dışına çıkmadan bağırsak içinde açılır ve içlerinde bulunan sporozoitler serbest kalarak yeni epitelyum hücrelerine girerler. Bu durum iç oto enfeksiyon olarak tanımlanmıştır. Konak dışkısı ile dışarı atılan kalın çeperli ikinci tip ookist ise hem dış otoenfeksiyon yoluyla, hem kişiden kişiye direkt temasla, hem de bulaşık yiyecek içeceklerle ağızdan alınır. Bu şekilde parazitoz insana bulaşır. *C. parvum*'un yaşam döngüsünde ara konakçı yoktur (Saygı, 2002).

Adal ve ark, (1995), *Cryptosporidium*'un yayılmasındaki kaynakları Şekil 1.1 de olduğu gibi tanımlamışlardır.



Şekil 1.1. *Cryptosporidium*'un yayılmasındaki kaynaklar

İntestinal bölge Kriptosporidiyozun primer alanıdır. Klinik semptom büyük ölçüde enfekteli kişinin immün sistemine bağlıdır. Enfeksiyon asemptomatik seyretmesine rağmen pek çok hastada mukus içeren sulu ishal, nadiren kanlı ve lökositli dışkı görülmektedir. İmmün sisteminde problem olmayanlarda hastalık genellikle ya asemptomatik veya sınırlı ölçüde semptomlarla kendini gösterir. Enfekteli hastaların % 90'ından fazlası 7-10 günlük inkubasyon periyodundan sonra yaklaşık iki hafta akut sulu ishal, mide bulantısı, kusma ve kramp benzeri abdominal sızıyla; % 36'sı aynı zamanda ateş gibi semptomlarla ortaya çıkar (Farthing, 2000).

Dışkılama alışkanlığında herhangi bir değişme olmayıp bir günde üç defadan daha az sayıda dışkıya çıkma (Hastaların % 4); Geçici enfeksiyon 2 aydan daha az bir süre ishal görülmesi; kronik enfeksiyon son iki ay ve daha fazla sürede ishalin devamlılığı ve bu süreler boyunca dışkıda parazit görülmesi (% 60). Günde en azından iki kez sulu dışkı çıkaran hastalar (fulminant enfeksiyon % 8). AIDS'li hastalarda ishal genellikle sulu ve bir günde 10 kez veya daha fazla dışkıya çıkma şeklinde kendini gösterir. Bu hastaların % 10'unda kilo kaybı ve şiddetli malabsorbsiyon görülür (Farthing, 2000).

C. parvum apikompleksan bir protozoan olup immün yetersizliği olan kişilerde ve AIDS'li hastalarda şiddetli semptomlara neden olmaktadır. Kriptosporidiyoz gelişmekte olan ülkelerde özellikle çocuklarda kesintisiz ishallerle seyreden yaygın bir parazitozdur (Saygı, 2002).

C. parvum Tip-1 ve Tip-2 olmak üzere 2 alt gruba ayrılır (Peng ve ark, 1997). Bu alt gruplar arasındaki farklılıklar genetik markerlar kullanılarak (Carraway ve ark, 1996; Widmer, 1995; Morgan ve ark, 2000) ve farklı konakçı dizilerinin olduğu belirlenerek tespit edilmiştir. *C. parvum* Tip-2'nin insanlarda ve çeşitli hayvan türlerinde bulunmasına rağmen Tip-1'in tipik bir şekilde sadece insanlarda görüldüğü belirlenmiştir.

Kriptosporidiyozun kozmopolit bir dağılımı vardır. Prevalansı % 0.6-33 arasında değişir. Yurdumuzda da görülmüştür. Bu parazitoza çocukların erişkinlerden, anne sütü ile beslenenlerin, anne sütüyle beslenmeyenlere oranla daha sık yakalandıkları saptanmıştır (Saygı, 2002).

Asya, Afrika, ve Latin Amerika’da yıllık 250-500 milyon insan *C. parvum*’la enfekteli hale gelmektedir (Adal ve ark, 1995).

Diyareli bağışıklık sistemi normal kişilerde yapılan, gelişmiş ülkelerdeki 43, gelişmekte olan ülkelerdeki 35 çalışma sonucunda, Kriptosporidiyoz sıklığı Çizelge 1.2.’deki gibi belirlenmiştir (Adal ve ark, 1995).

Çizelge 1.2. Kriptosporidiyoz sıklığı (Adal ve ark, 1995)

Alan	Kriptosporidiyoz / % total diyareli hasta	Pozitif kontrol/ % total kontrol
Gelişmiş Ülkelerde	1.486 / 24.269 (% 6.1)	61 / 4.146 (% 1.5)
Gelişmekte Olan Ülkelerde	2.232 / 107.329 (% 2.1)	3 / 1.941 (% 0.15)

C. parvum Kriptosporidiyoz salgınlarına yol açan tehlikeli protozoon bir parazittir. Bu parazit çeşitli çevresel stres koşullarına ve gıda işleme prosedürlerine dirençli olan ookist formunda, kontamine su ve çiğ gıdalar ile nakledilebilmektedir. Gıda maddelerinin işlenmesi sırasında *C. parvum* ile bulaşık suların kullanılması etkenin gıda işletmelerine girişinde potansiyel bir kaynak olarak görülmektedir (Çetinkaya, 2004).

Gelişmekte olan ülkelerde enfeksiyonun prevalansının endüstrileşmiş ülkelere oranla çok daha yüksek olduğu ve bu durumun endüstrileşmiş ülkelerde içme suyuna uygulanan etkili temizlik ve dezenfeksiyon prosedürlerine bağlı olduğu öne sürülmektedir. Yapılan seroprevalans çalışmaları sonucunda, endüstrileşmiş ülkelerdeki populasyonun % 25-35’inin, gelişmekte olan ülkelerdeki populasyonun ise % 64’ünün Kriptosporidiyoz ile enfekteli olduğunu ortaya koymuştur.

Çocuklar, kötü beslenen kişiler ile AIDS hastaları, kanser için kemoterapi gören hastalar, organ nakli gerçekleştirilen kişiler, immunsupresif hastalar gibi immünitesi zayıflamış kişiler enfeksiyon için çok daha büyük bir risk taşımaktadır. Gerek immünitesi zayıflamış gerekse immün sistemi normal olan kişilerde görülen gastrointestinal sisteme ilişkin semptomlar şiddetli diyare, dehidrasyon, abdominal kramplar, kusma, ağırlık kaybı ve elektrolit dengesizliğidir. Etken ya enfekte hayvanlarla direk temas, kontamine su ve çiğ gıdalar ile insanlara ya da insanlardan

insanlara bulaşabilmektedir. Başlıca bulaşma yolu ise kontamine gıdalar ve suyun tüketimi sonucu fekal-oral yoldur. Son yıllarda Kriptosporidiosisün etkeni *C. parvum*; su ve gıdalar ile insanlara bulaşması yanında sağlıklı kişilerde yüksek morbidite ve duyarlı kişilerde yüksek mortalite oranının görülmesi ve semptomların gözlemlendiği hastalarda etkeni yok etmede etkili bir tedavinin bulunmaması nedeniyle gıda endüstrisinde büyük bir kaygı yaratmaktadır (Çetinkaya, 2004).

Kriptosporidiosisli AIDS hastalarında enfeksiyonun bulunduğu bölgeye bağlı olarak asemptomatikten kolera benzeri semptomlara (Çizelge 1.3.) varıncaya kadar geniş bir spektrum görülür (Chen, 2002).

Çizelge 1.3. Kriptosporidiosisli immun sistemi normal kişiler ve AIDS hastalarında görülen semptomlar

İmmun sistemi normal kişiler	AIDS'li hastalar
Özellikle bir yaşın altındaki çocuklar ve herhangi bir yastaki yetişkinler	
Genellikle intestinal sistemde	İntestinal veya extra intestinal
Asemptomatik, akut ve persistent	Asemptomatik, geçici ve kronik
İshal, ateş, abdominal kramplar, kusma, bulantı ve kilo kaybı	İshal, ateş, kusma, kilo kaybı
2 hafta kadar	2 günden tüm yaşam boyunca

Kriptosporidiosisün tanısında inceleme materyali dışkıdır. Laboratuvar enfeksiyonundan korunmak için şüpheli örnekler formalin içine alınmalıdır. Dışkının incelenmesinde modifiye edilmiş asit fast yöntemi veya Giemza boyası kullanılabilir. Ookistlerin yoğunlaştırılması için de modifiye çinko sülfat veya Sheather'in şeker solüsyonu ile yüzdürme yöntemi uygulanır. Parazitin hemen bütün evrim dönemleri bağırsak biyopsisinde bulunabilir. Bu örnekler hematoksilen-eozin veya Masson'un boyası ile boyanmaktadır. İndirekt immunfloresan yöntemiyle de ookistler saptanabilir (Saygı, 2002).

Kriptosporidiosisün tanısında dokulardan veya vücut sıvılarından alınan örneklerin mikroskopik incelemelerinin yanı sıra klinik, endoskopik, immunolojik, ve moleküler teknikler kullanılabilir (Farthing, 2000).

C. parvum için selektif ilaç kullanımı sınırlı olmakla beraber, *invivo*'daki enfeksiyonuna karşı sadece birkaç ilacın etkili olduğu ortaya konulmuştur (Tzipori ve ark, 1982; Woods ve ark, 1996; Tzipori, 1995).

C. parvum ile enfekteli insan ve hayvanlarda test edilen 150 antimikrobiyal ilacın hiçbirisi bu parazite karşı etkili bir çözüm oluşturamamıştır (Griffiths, 1998). Ayrıca *C. parvum* ile sınırlı olarak enfekte edilen doku kültürü sistemlerine uygulanan antispöridial terapilerin de hiçbir yarar sağlamadığı görülmüştür (Theodos ve ark, 1998).

Bu çalışmaları Meinhardt ve ark (1996)'nın da yaptığı çalışmalar destekleyip *C. parvum*'a karşı henüz spesifik ve tamamen efektif bir tedavi yönteminin olmadığı tespit edilmiştir.

150 antimikrobiyal ilaçtan fazlası *Cryptosporidium* ile enfekteli insan ve hayvanlar üzerinde test edildi. Ancak bunların hiçbirisi bu parazite karşı devamlı bir etki gösterilmemiştir. Yine anti Kriptosporidial terapi için invitroda hücre kültürü çalışmalarıyla da dikkate alınır sonuçlar kaydedilmemiştir. Bu patojenin genom yapısı, gen ekspresyonu ve regülasyonu, konakçı spesifitesi ve virülans mekanizması tam anlamıyla anlaşılmadığından yeni tedavi yöntemleri de (aşı ve yeni kemoterapiler) etkili olmamıştır. İnsanlarda hastalığa neden olan *C. parvum* tip 2 nin genom dizisi tamamlanırken tip 1 in henüz bir kısmı tamamlanmıştır. Bu iki genomun kıyaslanması mümkün oldukça konakçı spesifitesinin ve virülans mekanizmasının da anlaşılmasının kolay olacağı düşünülmektedir (Widmer ve ark. 2002).

1.2. Plazmidler

Hücre içerisinde kromozomların dışında bulunabilen ve içinde bulundukları hücreye çeşitli özellikler kazandıran DNA yapısındaki ekstrakromozomal DNA moleküllerine plazmid adı verilir (Solak ve ark, 2000).

Bu yapılar içinde bulundukları bakterilerde antibiyotikleri inaktive eden maddeleri sentezleyen genetik bilgiler taşırlar. Bir plazmid bakteri hücresinde kendiliğinden oluşmaz, plazmid taşıyan bakterilerden aktarılır. Plazmidler çift

sarmallı çembersel yapıda, bakteri kromozomundan küçük moleküllerdir. Bir plazmidin bir bakteriden diğerine aktarılabilmesi için *tra* genleri (transfer genleri)'ne sahip olması gerekir. Bu tür plazmidlere konjugatif plazmidler denir (Nayler, 1987).

Gen mühendisliği teknolojisi ile laboratuvarlarda çeşitli amaçlarla kullanılabilecek yeni yapay plazmidler yapılabilmektedir. Bu tür yapay plazmidler içine çok çeşitli genler yerleştirilebilmekte ve uygun konaklarda çoğaltılabilmektedir.

Bakteriler arasında plazmidlerin transferi; transdüksiyon, konjugasyon ve transformasyon ile mümkündür (Mach ve Grimes, 1982; Mazodier ve Davies, 1991).

Bakteri transformasyonu, alıcı hücrelerin bulundukları ortamdaki DNA moleküllerini hücre içine alabilme yetenekleri olarak tanımlanmıştır. Bu mekanizma *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Salmonella* spp., *Rhizobium* spp., *Pneumococcus* spp. gibi bakteri gruplarında doğada kendiliğinden oluşmaktadır. Fakat oluşum frekansı oldukça düşüktür (Temizkan ve Arda, 1999).

Bir çok bakteri türü farklı oranlarda transformasyon için doğal olarak kompetent (yetenekli veya hazır) olabilir ancak *Escherichia coli* (*E. coli*) gibi kompetentliğe inatçı türler, fiziksel ve kimyasal metodlarla kompetent hale getirilebilirler (Wang ve Taylor, 1990).

Bu çalışmada genleri ökaryotik hücrelere aktarmak için Lipofektamin 2000 ve Elektroporasyon yöntemi kullanılmıştır.

Elektrik akımıyla hücrelerin geçirgenliğinin geri dönüşümlü olarak bozulması işlemi elektroporasyon olarak adlandırılır. Elektroporasyon nükleik asitlerin adherent ve süspansiyon şeklinde hazırlanmış ökaryotik hücrelerine (elektro-transfeksiyon) ve prokaryotik hücrelere (elektro-transformasyon) transfer edilmesinde kullanılan en önemli yöntemlerden biridir (Shigekawa ve Dower, 1988).

Elektroporasyon, başlangıçta memeli hücrelerine DNA sokmak için kullanılmış, ancak son zamanlarda çeşitli bitki, bakteri ve maya türlerine DNA transferinde de uygulanmaya başlamıştır. Elektroporasyonda elektrik alan kuvveti, akım süresi ve DNA konsantrasyonu dikkat edilmesi gereken noktalar. Uzun süre yüksek voltaj uygulandığında transformasyon etkinliğinde artış saptanmıştır. Fakat bu durumda hücre canlılığında düşüş görülmüştür. Koşullar optimize edildiğinde yüksek transformasyon etkinliği % 50-75 hücre ölümüyle gerçekleşmektedir. Ayrıca

halkasal DNA parçaları doğrusal DNA'ya göre daha etkin bir biçimde aktarılabilmektedir. Elektroporasyon yüksek transformasyon etkinliğine (10^9 - 10^{10} transformant/ μ g DNA) yol açmakla birlikte oldukça pahalı aletler gerektiren bir yöntemdir (Temizkan ve Arda, 1999).

Elektroporasyon ile transformasyon etkinliği elektrik alan kuvveti, verilen elektrik akım süresi, sıcaklık, DNA yoğunluğu ve kullanılan ortamın iyonik kompozisyonu gibi pek çok faktöre bağlıdır.

Elektrik alan kuvveti: düşük voltajda kültürü yapılmış hücrelerin plazma membranları hedef DNA moleküllerinin yeterli bir şekilde geçişine izin vermez. Çok yüksek voltajda hücreler geri dönüşümsüz olarak zarar görebilir. Pek çok memeli hücrelerinde voltaj 250 V/cm -750 V/cm aralığında kullanıldığında maksimum transformasyon etkinliği elde edilmiştir. Bu uygulamayla hücrelerin canlılığı % 20-50 arasında belirlenmiştir (Sambrook ve ark., 1989).

Verilen elektrik akım süresi: Genellikle tek elektrik akımı hücrelerin içinden geçirilir. Elektrik akımının uzunluğu ve elektrik alan kuvveti kullanılan güç kaynağının kapasitesine ve kullanılan boş küvetin kalınlığına bağlı olarak belirlenmelidir. Optimal elektrik akım süresi elektroporasyon için 20-100 ms'dir (Sambrook ve ark., 1989).

Sıcaklık: Bazı araştırmacılar transient ekspresyon için hücrelerin oda sıcaklığında tutularak elektropore edilmesinin maksimum sonuç verdiği; bazılarının ise 0 °C'nin maksimum sonuca götürdüğü hakkında iddaları vardır. Ancak elektroporasyon sırasında elektrik akımı verildikten sonra örneklerin 1-2 dakika elektroporatörde bekletilmesinin transient ekspresyonun etkinliğini arttırdığı belirtilmiştir (Sambrook ve ark., 1989).

DNA konsantrasyonu ve konformasyonu: Hem lineer hem de dairesel DNA'ların elektroporasyon yöntemiyle transfekte edilmesine rağmen lineer DNA'nın daha fazla transient ekspresyona sahip olduğu belirtilmiştir. Etkili DNA konsantrasyonunun 1 μ g/ml - 80 μ g/ml arasında olduğu tespit edilmiştir (Sambrook ve ark., 1989).

Ortamın iyon kompozisyonu: Hücreler tuz solüsyonu içeren tampon çözeltilerde süktroz ve mannitol gibi iyonik olmayan tampon çözeltilerinden pek çok defa daha fazla transfeksiyon etkinliğine sahiptir (Sambrook ve ark., 1989).

Hücrelerin büyüme aşaması: En iyi sonucun hücrelerin aktif bir şekilde bölündüğü mid-log hücre kültürü büyüme fazı olduğu ortaya konulmuştur (Sambrook ve ark., 1989).

Memeli hücrelerinin elektroporasyonu genellikle ~ 0.5 ms sabit zamanlı ve $25.0 \mu\text{F}$ kapasitans kullanılarak kültür ortamı veya tuz solüsyonu tamponu içerisinde yapılır (Sambrook ve ark., 1989).

Elektrik alan kuvveti (E) = $F(V,d)$ şeklinde bir orantıya sahiptir. Verilen akımların elektrik alan kuvveti uygulanan voltajla doğru orantılı, kullanılan küvetin büyüklüğü olarak tanımlanan iki elektrod arasındaki mesafe ile ters orantılıdır. Pek çok firmanın ürettiği 0.1 cm, 0.2 cm ve 0.4 cm'lik küvetler vardır. Bu küvetlerin her birine 1000V elektrik akımı uygulandığında, 0.1 cm'lik küvette elektrik alan kuvveti 10.000V/cm , 0.2 cm'lik küvette 5000 V/cm , 0.4 cm'lik küvette 2500V/cm 'dir. (Sambrook ve ark, 1989).

Elektroporasyon tekniği DNA'nın çok çeşitli hücrelere (bakteri, mantarlar, bitki hücreleri ve çok sayıda kültüre edilmiş memeli hücre kültürleri) transformasyonunda hızlı, kolay ve etkili bir tekniktir. Dolayısı ile bu tekniğin en büyük avantajı hem prokaryot hemde ökaryot organizmalara uygulanabilmesidir (Sambrook ve ark., 1989).

Elektroporasyon tekniğiyle hücre membranlarında minimum 2 nm 'den maksimum birkaç nm çapında geçici hidrofobik porlar oluşturulur. Bazen büyük hidrofobik porlar hidrofilik porlara dönüşebilir. Elektroporasyon işleminden sonra açılan porların tekrar kapanmaması için elektropore edilmiş hücrelerin 0°C 'de tutulması gerekir. Bu porlar açıkken 0.5 pg DNA'dan daha fazla DNA hücrelere girebilir (Bertling ve ark, 1987).

DNA'yı ökaryotik hücrelere aktarmak için transient ve stabil transfeksiyon olmak üzere iki farklı yaklaşım vardır. Transient transfeksiyonla, rekombinant DNA alıcı hücreye geçici olarak transfer edilir. Ancak bu yöntemle yüksek seviyede ekspresyon elde edilmektedir. Transfekte edilmiş DNA'nın alıcı hücrenin

kromozomlarına entegre olması sözkonusu değildir. Bu yöntemle çok sayıda örneğin çok kısa sürede transfeksiyonu mümkündür.

1.3 Doğrulama testleri

1.3.1. LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Real time PCR)

Bu sistem daha kısa sürede PCR ürünlerinin çoğalması ve bir monitör yardımı ile bu çoğalmanın on-line olarak gözlenmesi esasına dayanır. PCR data analiz koşulları ve her bir örnek verileri bu monitöre kaydolduğundan daha sonra kontrol etmek kolaylaşıp hatayı tespit etmede yarar sağlamaktadır.

PCR ürününü boyamada kullanılan birkaç floresan işaretleyici vardır. Bunlardan ethidium bromid agaroz jel analizinde PCR ürünlerini tespit etmek için kullanılan en yaygın floresandır. LightCycler System de ethidium bromid düşük hassasiyeti ve spesifitesinden dolayı kullanılmamaktadır. Bu sistemde kullanılan sadece dsDNA (çift zincirli DNA)'ya bağlanan floresan boya SYBR Green I oldukça spesifik bir boyadır. Denatürasyon sonrasında oluşan tek zincirli DNA'ya SYBR Green I bağlanmaz dolayısıyla floresan yoğunluğu düşüktür. Primerlerin hedef DNA'ya bağlanması ve uzama aşamasında DNA çift zincirli hale geçeceğinden SYBR Green I'in sayısı artacak dolayısıyla floresan yoğunluğu da artacaktır. Bu şekilde her bir örneğe ait floresan yoğunluğu monitörden takip edilmektedir.

Amplifikasyondan sonra elde edilen dsDNA örneklerinin her biri spesifik erime ısısına (melting temprature T_m) sahiptir. SYBR Green I ile PCR ürününün T_m 'ni belirlemek, bilinmeyen örneklerin teşhisinde kullanılmaktadır. Bunun için pozitif kontrol olarak kullanılan örneğin T_m 'i ile bilinmeyen örneğin T_m 'i kıyaslanmaktadır. Yine aynı şekilde primer-dimer gibi spesifik olmayan PCR ürünü ile pozitif kontrolün T_m 'i ile kıyaslanarak tespit edilir. Spesifik olmayan PCR ürünü daima daha düşük T_m vermektedir.

Bu kit içerisinde Taq polimeraz enzimi ve tamponu, dNTP karışımı (dTTP, dATP, dCTP, dGTP), SYBR Green I floresan boyası, $MgCl_2$ (1 mM son konsantrasyonda)'ü bulunduran bir karışım vardır. PCR işlemi sırasında dışardan

sadece kalıp DNA, primerler ve eğer gerekliyse ek $MgCl_2$ eklenir. Dolayısıyla karışım zaten hazır ve steril olduğu için dışardan bulaşabilecek bir kontaminasyon riski çok azdır.

Bu metotta kullanılan karosel kapasitesi 32 örneği alacak kadardır. Karosele yerleştirilecek her bir kapiller tüpün maksimum alacağı hacim 20 μl 'dir. Örnekler on-line takip edildiğinden çoğalmayı durdurmak veya daha fazla döngü eklemek mümkündür.

Real-time PCR ile konvensiyonel PCR arasındaki farklar Çizelge 1.4'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 1.4. Real-time PCR ile konvensiyonel PCR arasındaki farklar

	Konvensiyonel PCR	Light Cycler
Kalıp DNA	0.1-1 $\mu g/100 \mu l$	50 ng ve üstü/20 μl
Son hacim	50-100 μl	Maksimum: 20 μl
Son konsantrasyon	1-3 mM	1-5mM
Amplikon uzunluğu	3 kb genom	10-1000bp

LightCycler protokolü on-line olarak aşağıdaki gibi yazılır.

Pre-inkübasyon: Taq DNA polimerazın aktivasyonu ve hedef DNA'nın denaturasyonu için gerekli zamanı içeren başlangıçtaki inkübasyon zamanı.

Amplifikasyon: Hedef DNA'nın çoğaltıldığı aşama

Melting curve: PCR ürünlerinin teşhis edildiği aşama

Cooling: Cihazın soğuması için verilen zamanı içeren aşamadır.

1.3.2. Nested PCR

PCR metoduyla tüm bir genomdan istenilen tek bir lokus bir milyondan daha fazla çoğaltılabilir. Ancak bazı zamanlarda hedef DNA yanında spesifik olmayan dizilerinde aynı şekilde çoğaldığı düşünüldüğünde spesifik olmayan dizinin de bir milyondan daha fazla çoğalma ihtimali vardır. Bu noktada PCR metodunun spesifitesi yine diğer bir PCR primerleri ile sağlanabilir. Nested PCR olarak tanımlanan ve ilk PCR'ın spesifitesini sağlayan bu metod için primerler şu şekilde

dizayn edilir. Yapılan ilk PCR'ın her iki primerleri arasında ikinci primerler dizayn edilir ve ilk PCR primerleri ile amplifiye edilmiş ürünler ikinci PCR primerleri (nested primerler) için kalıp DNA'yı oluşturur.

Nested primerleri ile elde edilen PCR ürünü birinci üründe daha kısa olacaktır. İlk PCR ile eğer yanlış lokus çoğaltılmışsa ikinci PCR primerleri ile bu yanlış lokusun çoğaltılması ihtimali çok düşük olacaktır.

Nested PCR aynı zamanda PCR ile elde edilen kopyaların sayısının çok az olduğu durumlarda yine spesifiteyi göstermek için kullanılır. Belirgin olmayan PCR ürünü spesifik değilse nested primerleri ile fazlaca kopyası elde edilip ürünün arttırılması sağlanır. Bu durumda ürün miktarını arttırmak ve spesifiteyi sağlamak amaçlı Nested PCR yapılmaktadır (www.bio.davidson.edu/Courses/genomics).

1.3.3. RT PCR

cDNA sentezi için 3 yöntem vardır.

1) Gen spesifik primer kullanarak: 3' (antisense) gene –spesifik primer mRNA'ya yapışır ve reverse transkriptaz ile sentezlenir. Bu yöntemle primer konsantrasyonunu ve annealing sıcaklığını optimize etmek gerekmektedir.

2) Oligo(dT) kullanılarak: Bununla hedef mRNA dışında ortamda bulunan tüm mRNA'lar kullanılarak cDNA sentezlenir. Oligo dT mRNA'nın poly A kuyruğuna yapışır ve ortamdaki tüm mRNA'lar cDNA'ya dönüştürülür.

3) Random hexamer: Kısa oligonükleotidler (tipik olarak hexamerler) rastgele mRNA moleküllerine tutunur ve cDNA sentezlerler.

Bu çalışmada hem gen spesifik primerler, hemde oligo dT kullanılmıştır.

Bu çalışmanın amaçları;

1) Gelecekte yapılacak gen manüplasyon çalışmalarına temel oluşturması ve henüz kesin bir tedavi yöntemi olmayan Kriptosporidiosis hastalığına neden olan *C. parvum* genlerinin fonksiyonlarını ve bilinmeyen yönlerini ortaya çıkarmak için bu parazitin genetik transformasyon sisteminin kurulması

2) *C. parvum* ookistlerinin en iyi eksiste olduğu koşulların optimize edilmesi

3) Eksiste olmuş ookistlerin hücre kültürlerini enfekte edip etmediklerinin IMF yöntemi kullanılarak invert mikroskop altında incelenmesi

4) Transfeksiyon sırasında kullanılacak ve optimum sonuçların alınacağı hücre kültürlerinin belirlenmesi

5) Transfeksiyon işlemi için elektroporasyon ve lipofektamin yöntemlerinin kullanılması ve optimize edilmesi

6) Crypto-construct GFP vektör ve bazı ekspresyon vektörlerinin hücre kültürlerine transfeksiyonundan sonra invert mikroskop altında bu vektör ekspresyonlarının fotoğraflanması ve doğrulama testleri (Real time PCR, Nested PCR ve RT-PCR) ile doğrulanmasıdır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Tyzzar (1907), tarafından farelerde sıklıkla bulunan protozoon parazit *Cryptosporidium*'u tespit edilip bu adla isimlendirilmiştir.

Tyzzar (1912), farelerin ince bağırsaklarında daha küçük organizmalar olduğunu belirtip buna *C. parvum* adını verdikten yaklaşık 70 yıl sonra bu parazit üzerinde tekrar çalışmalar hızlandırılmıştır.

1955 yılında genç hindilerin gastrointestinal bölgelerinde (Salvin, 1955), 1971 yılında sığırlarda (Panciera ve ark, 1971) ve 1976 yılında da iki bağımsız grup ilk iki kryptosporidiyozlu insanı tespit etmiştir (Meisel ve ark, 1976; Nime ve ark, 1976).

Tzipori ve ark (1982), 16 antimikrobiyal ilacın (Ethopabate, Nicorbazin, Sulfaquinoksailin, Furaltadon, Enterolyte-N, Sulfamethazin, Trinamid, Amprol, fenamidin, Zoaquin, Halofuginon, Salinomisin, Monensin, Emtryl, Apprinosid, Amprolium) *C. parvum*'a karşı terapatik etkisini araştırmışlardır. Bu ilaçlardan hiçbirisinin *C. parvum* enfeksiyonunu engellemediği gibi herhangi bir değişiklik yapmadığını, aynı zamanda Amprolium'un fareler için oldukça toksik olduğunu tespit etmişlerdir.

White ve ark (1994), kryptosporidiyoz için eğer antiretroviral terapi etkili değilse Paromomisin, azithromisin, nitazoksanid gibi ilaçların kullanımının yararlı olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca *Cryptosporidium* ookistlerinin çevresel faktörlere, pek çok dezenfektanlara ve antiseptiklere karşı oldukça dirençli olduğunu, pek çok aldehit, amonyak, alkol, klor ve alkalın gibi önemli ticari dezenfektanların bu parazit üzerinde etkisiz olduğunu tespit etmişlerdir. İmmün yetersizliği olan kişilerin herhangi bir işlem görmemiş göl ve ırmak sularından kesinlikle su içmemeleri gerektiğini; genç hayvanlar ve enfekteli insanlarla temastan kaçınmalarını önemle vurgulamışlardır.

1986'da 19 AIDS hastasının % 3.6'sının kryptosporidiyozlu olduğu kaydedilmiştir (Navin ve Hardy, 1987).

Jurkat hücre tüpleri için DEAE dekstran yöntemi daha önce kullanılan en iyi yöntem olmasına rağmen, elektroporasyon yöntemiyle bu tip hücrelerinin daha fazla ekspresyon oluşturduğu gözlenmiştir (Siebenlist ve ark, 1986).

Maurice ve ark (1992), tarafından elektroporasyon yöntemi DNA'nın memeli hücrelerine transfeksiyonunda kullanılan en kullanışlı yöntem olduğu görülmüştür. Elektrik akımının hücre membranlarında geri dönüşümlü por açtığı düşünülmektedir. Kullanılan ortamın iyonik bileşiminin bu yöntemde büyük öneme sahip olduğu savunulup tampon olarak sitomiks tamponu (120 mM KCL; 0.15 mM CaCl₂; 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄; 25mM Hepes; 2 mM EGTA; 5 mM MgCl₂ pH; KOH ile 7.6'ya ayarlanır) kullanılmıştır.

Moore ve ark (1993), birkaç yüzme havuzu ve suların *Cryptosporidium*'lu olduğunu belirlemişlerdir.

Upton ve ark (1994), standardize edilmiş kültür ortamı kullanılarak *C. parvum*'un Mardin-Darby Bovine Kidney (MDBK) hücreleri ve Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) alınan 10 farklı hücre kültüründe büyüme oranlarını kıyaslamışlardır. 68 saatlik enfeksiyon süresinden sonra Nomarski interference-contrast mikroskobu kullanılarak rastgele seçilmiş 25 sahadaki enfekteli monolayerler sayılmıştır. Sonuç olarak *C. parvum*'un insan ince bağırsak kanser hücrelerinin (HCT-8), MDBK hücrelerinden 2 kat daha fazla gelişimlerini sürdürdükleri sayılan enfekteli monolayerler ile tespit edilmiştir. *C. parvum*'un BALB/3T3, HT-1080, HT-29 ve RL95-2'deki gelişimi MDBK hücrelerindeki gelişiminden % 20 daha az olarak tespit edilmiştir. Yine BT-549, Hs700T veya Ls-174T'de elde edilen parazit sayısı MDBK hücrelerinin yarısı kadar olduğu ; HCT-8 hücrelerindeki parazit sayısının ise diğer tüm hücre tiplerinin yaklaşık 2 katı kadar olduğu belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda ookistler kullanılarak MDBK ile HCT-8 hücreleri arasındaki parazit gelişimi incelendiğinde HCT-8 hücrelerinin daha fazla sayıda enfekte edildikleri saptanmıştır.

Carraway ve ark (1996), insanlardan direk elde edilen bir grup *C. parvum* izolatu ile diğer bir grup çeşitli konakçı tiplerinden elde edilen *C. parvum* izolatları arasındaki genetik polimorfizmi tanımlamak için RAPD (Rapid amplified polymorphic DNA), 18 S rRNA ve İnternal transcribed spacer 1(ITS 1) bölgesindeki polimorfizmden yararlanmıştır. RAPD analizleri ile belirlenen genetik farklılıkları rRNA lokuslarının dizi analizleri desteklemiştir. En büyük dizi değişimleri 18S rRNA bölgesinde gözlenip, bu bölgede 645-647 pozisyonundaki 3 bp TGA'nın

delesyonu belirleyici olmuştur. Bu delesyon MD izolatu ve 5 UCP DNA klonlarının 2 tanesinde gözlenmiştir. ITS1'in analizi sonucunda MD ve UCP nin diğer izolatlardan daha yakın bir homoloji gösterdiği belirlenip, 18 S primerleri ve PCR testleriyle GCH1-UCP-MD ve GCH2-GCH3 arasında polimorfizm tespit edilmiştir.

Du Pont ve ark (1995), ookistlerin küçük olduğu için uygun filtrasyon prosedürleri kullanılarak bu etmenin elimine edilebileceğini vurgulamışlardır. *Cryptosporidium*'un enfeksiyon dozunun düşük olduğunu, 30 ookist başlangıç enfeksiyonu için % 20, 132 ookist için % 50 oranında sağlıklı kişilerde enfeksiyona neden olduğunu ve immün yetersizliği olan hastalarda daha düşük dozlarda ookistin infektif olduğunu tespit etmişlerdir.

O'Donoghue (1995), vakuol içerisindeki ookistin olgunlaşıp merozoitleri oluşturan asexual aşamaya (şizogoni) geçildiğini, intestinal lumende yayılan merozoitlerin ya diğer epitel hücrelerini enfekte ettiğini veya olgun gametositi (seksüel form) oluşturduğunu tespit etmiştir. Bu şekilde intestinal lumende yaşam döngülerini tekrarladıklarını (otoenfeksiyon) ve ağır persistent enfeksiyona neden olduklarını, gaitada ookistlerin görülmesiyle hastanın enfekteli olduğunu anlaşıldığını belirtmiştir.

Woods ve ark (1996), mikrotitre ELISA yönteminin invitroda *C. parvum*'a karşı farmassötikal etkisini belirlemede kullanılan en kullanışlı yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Bu yöntemle 101 antimikrobiyal ilaın her bir 3 ve 4 konsantrasyonunu invitro'da *C. parvum*'un gelişmesini inhibe edip etmeme kabiliyetlerini belirlemek için test etmişlerdir. 40 ilaıktan fazlasının farklı derecelerde antikryptosporidial aktivitede rol oynadığını belirleyip, bu ilaılardan ionoforların *C. parvum*'a karşı en çok potansiyele sahip olan ilaı olduğu tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra paramomisin'in mikrogram seviyesinde ve özellikle Paramomisin sülfat IC50 nin 45-50 µg/ml lik dozunun etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Eritromisinin yüksek dozunun bazı hastalarda etkili olmasına rağmen makrolid antibiyotiklerin hiçbirisinin kryptosporidiosisi elimine etmede kullanılamadığını ortaya koymuşlardır. Tetrasiklin grubunun *C. parvum*'a karşı invitroda bazı etkilerinin olduğu belirlenmesine rağmen invivoda herhangi bir etkisinin olmadığını ortaya koymuşlardır.

Guerrant (1997) tarafından genel olarak kriptosporidial enfeksiyonun gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı % 1-3 oranındayken gelişmekte olan ülkelerde % 10 olarak tespit edilmiştir. Kriptosporidial enfeksiyonun neden olduğu ishallerin gelişmiş ülkelerdeki normal insanlarda % 2.2, gelişmekte olan ülkelerde % 6.1 gelişmiş ülkelerdeki toplam ishalleri çocukların % 7 gelişmekte olan ülkelerdeki çocukların ise % 10 oranında olduğu tespit edilmiştir.

Slifko ve ark (1997), tarafından HCT-8 hücre kültürü kullanılarak enfektif ookistin seviyesi ve parazitin gelişme aşamaları belirlenmiştir. *C. parvum*'un intraselüler gelişme aşamaları parazite spesifik primer antibadiler ve sekonder floresin izothiosyanate-konjugat antikor kullanılarak indirekt antikor testleriyle tespit edilmiştir. Bu metod FDM (focus detection method) olarak adlandırıldı. Enfeksiyon (en azından 1 ookistin dört sporozoiti) epifluorescence mikroskop ve Nomarski differential interference kontrast mikroskopunda mikroskobik olarak gösterilmiştir. Bu çalışmalar 12 saatlik inkübasyondan sonra HCT-8 hücrelerinde bu parazitin gelişim aşamaları ELİSA (enzyme linked immunosorbent assay) ve *C. parvum*'a karşı geliştirilen polklonal antibadi tekniğiyle belirlenmiştir.

Smith ve Rose (1998) tarafından *Cryptosporidium*'un içme sularında kontrol gerektiren en önemli yeni kontaminant olduğunu tespit edilmiştir. *Cryptosporidium* ookistlerinin suda geniş bir yayılım gösterdiğini, yüzey suları ve atık sularda, % 100 içme suyu örneklerinde dahi % 37 oranında bulunduğunu ortaya konulmuştur.

Kriptosporidial enfeksiyon immün sistemi yetersiz kişilerde özellikle AIDS'li hastalarda daha yaygındır. Gelişmiş ülkelerdeki AIDS'li ve ishal hastaların oranı % 14 iken, gelişmekte olan ülkelerde bu oran % 24 olarak tespit edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde de AIDS'li hastalardaki bu oran % 3-4 olup yoğun antiretroviral terapiden sonra düşmüştür (Miller, 1998; Clark, 1998).

C. parvum'da intraspesifik varyasyonları tespit etmek için kullanılan moleküler karakterizasyon teknikleri RAPD (random amplified polymorphic DNA analizleri), 18 sRNA ve PCR-RFLP (Polimerase chain reaction restriction fragment length polymorphism) ile insanlarda *C. parvum*'un iki farklı genotipi tespit edilmiştir. Bunun için insanlardan, buzağılardan, köpeklerden, maymunlardan, ve geyiklerden alınan 92 *C. parvum* izolatında TRAP-C2 genini temel alan PCR-RFLP metodu

kullanılarak *C. parvum*'un iki genotipi arasındaki farklılıklar gösterilmiştir. Pek çok insan ve sığır izolatu arasında 5 pozisyonda nükleotid farklılığı olduğu gösterilmiştir (Irshad ve ark, 1998).

Son yıllarda AP-PCR yönteminden parazitlerin populasyon genetiği çalışmalarında yararlanılmıştır. *C. parvum* ile aynı grup içindeki koksidian parazitlerin türleri arasındaki farklılıkları göstermek için kullanılmıştır. Bu yöntem oldukça kolay, primer dizaynı için baz dizilimine ihtiyaç göstermeyen, az sayıda ookist ile profili belirleyen bir yöntemdir. Modifiye PCR tekniği ile aynı zamanda kryptosporidial türler (*C. parvum*, *C. muris*, *C. baileyi*) arasındaki farklılıkları da belirlemek mümkündür. AP-PCR insan ve hayvan izolatlarının subspesifik farklılıkları gibi daha küçük genotipik farklılıkları göstermek için de kullanılabilir (Fatih ve ark, 1998).

Enfekteli insanlardan, buzağılardan ve koyunlardan elde edilen *C. parvum* izolatları AP-PCR (arbitrary primed polymerase chain reaction) ve izoenzim elektroforez yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir AP-PCR ve izoenzim elektroforezinde test edilen bütün hayvan *C. parvum* izolatları (n=17) benzer profil göstermiştir. AP-PCR'da 15 insan izolatu'nun 9 tanesi ayırt edici insan profili gösterirken 6 izolat hayvan profili gösterdi. İzoenzim elektroforezinde AP-PCR'da insan profili gösteren 5 insan izolatu, aynı izoenzim bandı oluştururken, AP-PCR'da hayvan profili gösteren 2 izolat hayvan izoenzim bandı oluşturmuştur. İki farklı yöntem arasındaki doğru korelasyon *C. parvum*'un hayvan ve insan populasyonunun genetik olarak farklılık taşıdığını desteklemiştir (Fatih ve ark, 1998).

Griffiths ve ark (1998), Paramomisin'in bir aminoglikosid antibiyotik olup *cryptosporidiyaz*'a karşı en fazla aktiviteye sahip tek antibiyotik olduğunu belirtmişlerdir. Bu antibiyotiğe karşı ökaryotik organizmalar prokaryotik organizmalardan 10-15 kez daha az hassas olmasına rağmen, paramomisin hem bakteriyel, hem de ökaryotik ribosomal protein sentezini inhibe ettiğini ve intestinal bölgede az bir şekilde absorbe edildiğini tespit etmişlerdir. Ağızdan alınan paramomisin'in ekstrasellüler bölgede bulunan *C. parvum*'u inhibe ettiği veya öldürdüğü konusunda desteklenmiş bir yayın yoktur. Ökaryotlar hem intracellüler hemde ekstrasitoplazmik olmasına rağmen, *C. parvum*'un intracellüler yerleşimi

yoktur. Enfekteli sporozoit veya merozoitler konakçı hücre ile kontağa geçtikten sonra, konakçının apikal membranı tarafından sporozoitler sarılır. Parazit ile konakçı membran arasındaki boşluk parasitoforus vakuol olarak adlandırılır. Parazitin besin alış veriş bu bölgedeki besin organeli tarafından sağlanır. Hücre sitoplazmasına yerleşen hücre içi parazitlerinin (*Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Eimeria*, *Cyclospora*) aksine *C. parvum* hücrenin ekzositoplazmik alanında konak hücre orijinli parasitoforus bölgesine yerleşir. Bu çalışmada hem paramomisin hemde aminoglikosid antibiotik genetsin CaCO_2 hücre kültürü içinde intraselüler büyüyen *C. parvum*'u inhibe etme kabiliyetleri araştırılmıştır. Paramomisinin paraziti etkilerken konakçı hücreye zarar vermemesi şu şekilde açıklanmıştır. Prokaryotların paramomisine bağlanıp ribosomal inhibisyonun olması için esas olan A^{1408} - A^{1493} 16S rRNA bölgesine sahiptir. Ökaryotlarda G^{1408} baz çiftinin varlığı paramomisine zayıf bağlanmayı sağlayıp bu ilaca karşı dirençliliğini artırır. Bu ilacın konakçı hücre sitoplazmasına etkili bir şekilde giremediğini (yaklaşık % 1) fakat intrasellüler *C. parvum*'u öldürdüğünü; ancak bu ilacın diğer hücre içi parazitlerine (*Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Eimeria*, *Cyclospora*) karşı *C. parvum*'dan daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Yapısal olarak bu hücre içi parazitlerinin kolay bir şekilde besinleri ve düşük moleküler ağırlıklı bileşikleri geçirebilen tamamı ile geçirgen bir vakuolle çevrili oldukları için bu ilacın etkisinin fazla olması muhtemeldir. Tüm bunların aksine *C. parvum*'un konakçı ile kontağı parasitoforus bölgesindeki besin organeli tarafından gerçekleşir. Yani diğer hücre içi parazitleri gibi tamamı ile direkt bir şekilde değildir. Dolayısıyla bu besin organeli konakçı hücreden parazite ilaç alınımını önemli bir şekilde azaltmaktadır. Bu invitro çalışmada kullanılan paramomisin 2,00 $\mu\text{g/ml}$ (2 g/L) olup yetişkin domuzlarda tipik dozun 2g/L olduğu belirlenmiştir. Ancak kriptosporidiyozlu bir domuzun ishal nedeniyle kaybettiği sıvı 24 saat içinde 10-24 litreye kadar çıkabilmektedir (Griffiths ve ark, 1998).

Invitroda HCT-8 (human ileocecal adenocarcinoma) hücre kültüründe *C. parvum*'un gelişimi üzerine 13 antiviral ilacın etkisini araştırmak için in situ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi kullanılmıştır. Bu bileşiklerden 6 tanesinin bazı etkileri olduğu ortaya konulmuştur. Bunların hepsi nükleosid analogudur ve 5 tanesinin yapısal olarak birbirine benzer olduğu

belirlenmiştir. In situ ELİSA yöntemi kullanılarak 100 antimikrobiyal ilaçtan daha fazlası *C. parvum*'a karşı etkilerini belirlemek için denenmiştir. Furazolidan, nitrofurazon, aprinocid-1-N oksid gibi birkaç nükleosidinin anticryptosporidial aktiviteye sahip olduğu, ancak diğer birçok ilacın hiçbir etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir (Woods ve Upton, 1998).

Fare monoklonal antitadileri, tavşan antikorları kullanılarak yapılan Western blot çalışmaları ile farklı memeli izolatları arasındaki antijenik farklılıklar belirlenebilir. Son zamanlarda *C. parvum* içindeki multiple tiplerin tanımlanması için western blot analizi yöntemi kullanılmaktadır. İzoenzim elektroforez yararlı bir teknik olmakla birlikte uygulanabilmesi için çok sayıda (10^7) ookist gerekmektedir. RFLP (restriction fragment length polymorfism) tekniği de insan ve hayvan *C. parvum* izolatların arasındaki farklılıkları göstermek için kullanılabilir. Ancak bu metod için çok sayıda ookist (10^9) dolayısıyla oldukça ağır bir enfeksiyonun geçirilmiş olması gereklidir. Bu anlamda PCR temelli moleküler teknikler, çok küçük miktarda materyal gerektirdiğinden *C. parvum*'un genetik karakterizasyonu için en avantajlı yöntemlerden birisidir. Son yıllarda kullanılan karakterizasyon yöntemleri Random Amplified Polymorphic DNA analizi (RAPD) veya arbitrarily primed PCR (AP-PCR) yöntemi 1990 yılında Williams ve arkadaşları tarafından *C. parvum*'un genetik varyasyonunu belirlemede kullanılan ilk PCR temelli tekniklerdir. RAPD tekiğinin dezavantajı DNA kontaminasyonu neticesinde spesifik olmayan ürünlerin de çoğaltılmasıdır. *C. parvum*'un bazı izolatlarından bakteri ve mantarları tamamen uzaklaştırmak zor olduğundan, RAPD tekniğinin kullanımı bu parazit için her ne kadar sodyum klorit ile muamele edilsede sınırlıdır. Pek çok araştırmacı PCR-RFLP metodunun *C. parvum* izolatları arasındaki farklılıkları göstermede kullanılan daha spesifik bir yöntem olduğunu kabul etmektedir (Morgan ve ark, 2000).

rDNA ünitesinde *C. parvum*'da farklılıkları göstermek için kullanılır. rDNA ünitesi aşağıdaki gibi bir standart düzenlemeye sahiptir. IGS (intergenomik spacer), ETS (external transcribed spacer), 18 s (küçük subünit ribosomal gen), ITS (İnternal transcribed region), 5s (5.8 s ribosomal gen), 28 S (büyük subünit ribosomal gen). 18s rDNA geninin dizi analizi sonucunda belirlenen polimorfik bölge (yaklaşık 520-

660bp) genotipik çalışmalarda kullanılabilir. Son zamanlarda yapılan 18s rDNA analizleri ile *Cryptosporidium* izolatlarının genetik olarak bir hayvandan diğerine ve insanlarda büyük farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Baz dizi analizi ve ITS1, 5.8s, ITS2 rDNA bölgelerinin PCR-RFLP analizleri farklı coğrafik alanlardaki sığırlar ve insanlar arasında büyük varyasyonların olduğunu gösterdi. Dra 1 enzimi kullanılarak yapılan ITS1 in RFLP analizleri ile insan, sığır, domuz, kedi, fare deki *C. parvum*'un 6 ayırtedici genotipi belirlendi (Morgan ve ark, 2000).

Asetil-CoA sentez geninin 390 bp'lik baz dizisi insan, sığır, ve farelerde 18s rDNA baz dizisi kullanılarak tespit edilen *Cryptosporidium* izolatlarının genetik farklılıklarını göstermek için kullanılmıştır. Yine başka bir çalışmada 3 farklı coğrafik alandan alınan fare *Cryptosporidium* izolatları arasındaki genotipik farklılıkları belirlemek için Asetil-CoA sentez geninden yararlanılmıştır (Morgan ve ark, 2000).

PCR-RFLP tekniği kullanılarak *C. parvum* ookist duvar proteinlerini (COWP) kodlayan gen *C. parvum* 2 izolatı (insan ve hayvan) ile *C. wrairi*'nin baz dizilimleri arasındaki farklılığı göstermek için kullanılmış ve bu yöntemle % 98 başarı elde edilmiştir. Daha sonra *C. muris*, *C. serpentis*, *C. meleagridis* ve birkaç *C. parvum* genotipleri (insan, sığır, fare)'nin ayırt edilmesinde COWP geni kullanılmıştır. *C. serpentis*'in COWP gen lokusunun diğer *Cryptosporidium* tür ve izolatlarından farklı olduğu belirlenmiştir (Morgan ve ark 2000).

Dihydrofolate Redüktaz –Thimidilayt Sentez (dhfr-ts) geninin 575 bp'lik segmenti, üç farklı kıtadan toplanan *C. parvum*'un 14 izolatı (insan ve hayvan) arasındaki farklılıkları göstermek için PCR-RFLP analizlerinde kullanılmıştır. 18s rDNA dizisi ve RAPD analizleri sonucunda *C. parvum*'un insan genotipi olarak belirlenen örneklerde dhfr lokus bölgeleri kullanılarak yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Dhfr genindeki farklılıklar hem *C. parvum* genotiplerinde hemde *Cryptosporidium* türlerinde ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda *C. muris* ve *C. serpentis*'in *C. parvum*'dan çok farklı olduğu ortaya konulmuştur (Morgan ve ark 2000).

4 farklı hücre kültürü *C. parvum*'un invitroda enfeksiyonu işleminde en uygun koşulları belirlemek için suplement ilave edilerek denenmiştir. AGS (human stomach

adenocarcinoma-insan mide kanser hücreleri), MDCK (Mardin-Darby canine kidney cell, köpek böbrek hücreleri), HCT-8 (human ileocecal adenocarcinoma–insan bağırsak kanser hücreleri), ve CaCo-2 (Amerikan tip culture collection-amerika tip kültür koleksiyonundan) hücre kültürleri bu amaç için kullanılmıştır. Supplement olarak fetal bovine serum (FBS, yeni doğan sığır serumu), sodyum choleat, askorbik asid, folik asid, kalsiyum pantothenat, para-aminobenzoik asid ve pruvat kullanılıp bunların etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak AGS hücre kültürünün *C. parvum*’a karşı en hassas olduğu belirlenirken, CaCo-2 nin en dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. % 10 FBS nin *C. parvum*’la enfekteli AGS ve HCT-8 hücrelerinin büyümesi için en uygun, % 1 FBS’in ise MDCK hücreleri için en uygun olduğu belirlenmiştir. Vitaminlerin AGS hücreleri için pozitif etkiye sahip olduğu, Prüvatın da CaCo2 hariç bütün hücreler için pozitif etkisi olduğu rapor edilmiştir. Uyarlanmış ortamlarda en yüksek parazit sayısı AGS hücrelerinde tespit edilip, uyarlanmış ortamın kontrol ortamından 2-3 kat daha fazla sayıda parazitin canlılığını devam ettirmesine neden olduğu ortaya konulmuştur. Böylece bu çalışma neticesinde AGS hücrelerinin *C. parvum*’un büyümesi için en uygun hücre kültürü olduğu belirlenmiştir. CaCo2 hariç diğer tüm hücre kültürleri için RPMI-1640 ortamı (L- glutamin, 15 mM Hepes, N-2-hidroksiethylpiperazin, N- 2-ethanesulfonik asid, 14mM sodyum bicarbonate, 100U penisilin/ml, 100µg streptomisin/ml ve 0.25 µg amphoteresin B/ml) besi yeri olarak kullanılırken, CaCo2 hücreleri için Eagle’s minumum essential ortamının daha uygun olduğu tespit edilmiştir (Jae-Ran YU ve ark, 2000).

Hayvan gübrelerinin yaygın bir biçimde toprağa bırakılması sonucu, aerosol yayılmayla direk olarak veya su kaynaklarının kontaminasyonu ile indirekt olarak enfeksiyon oluşabilmektedir. *C. parvum*’un doğada yaygın olarak bulunması ve su yoluyla bulaşma potansiyeli; ookistlerin her zaman infektif olması, oldukça küçük olmaları (3.5-6.0 µm) ve düşük sedimentasyon oranına (0.5(m/s) sahip olmaları ile de ayrıca kolaylaşmaktadır. İşlenmemiş atık sular, filtre edilerek işlenen atık sular, kanalizasyonda, yer altı sularında, yeryüzü sularında ve işlenmiş içme suyunda ookistlerin belirlenmesi; dışkıyla kontaminasyonu göstermektedir (Fayer, 2000).

Henüz tam anlamıyla antimikrobiyal kemoterapötik ilaç tedavisi yoktur. Bununla beraber enfeksiyonu baskılayacak bazı ilaçların olduğu kaydedilmiştir. Asemptomatik ve immün sistemi normal olan kişilerde spesifik bir terapiye ihtiyaç yoktur. Akut diyarede oral veya intravenöz sıvı yardımıyla elektrolit dengesini sağlamak mümkündür. AIDS hastaları için kullanılan oldukça aktif antiretroviral terapi aynı zamanda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun tedavisi içinde yardımcı olur ancak tamamıyla bu etkeni intestinal bölgeden uzaklaştırmaz (Farthing, 2000).

C. parvum insanlarda en yaygın tespit edilen parazit olmasına rağmen *C. felis*, *C. muris*, *C. meleagridis* cinsleri de immün sistemi yetersiz kişilerde görülmektedir (Xiano ve ark, 2000).

Pokorny ve ark. (2002) tarafından nehir sularından alınan örneklerdeki *C. parvum* ookistleri üzerine sıcaklığın etkisi, hücre kültürleri kullanılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Su örnekleri 11 µm nitrosellulöz filtreler kullanılarak büyük partiküllü maddeleri uzaklaştırmak için steril edilmiştir. Suyun pH 7.5 ayarlanıp 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtılmış ve her bir tüpe 10^7 ookist (2 kez % 1'lik PBS ile yıkanan) konulmuştur. *C. parvum* ookistlerini içeren bu tüpler karanlık koşullarda -20, 4, 10, 21-23 °C sıcaklıklarda tutulmuştur. HCT-8 hücre kültürü % 60-80 konfluent olana kadar 24 saat 37 °C'de tutulmuştur. Bu sıcaklıklarda tutulan ookistler ile HCT-8 hücreleri enfekte edilmiştir. Sıcaklığın ookist infektivitesine etkisi enfekteli monolayerların immunofloresan mikroskop altında sayılmasıyla ortaya çıkarılmıştır. 14 hafta sonra 4 °C tutulan örneklerdeki ookistlerin infektivitesinin 5 kat; 10 °C'de tutulmaların ise 2.5 kat kadar azaldığı ortaya konulmuştur. Pozitif kontrol (4 °C % 2.5 potasyum dikromat içinde bekletilen ookistler) de 2 kat infektivitesinde azalma görülmüştür. 14 hafta sonra 21-23 °C'de tutulan ookistlerin hiçbirinde infektivite görülmemiştir. -20 °C'de tutulanlarda ise bir hafta sonra herhangi bir ookist infektivitesi ortaya konulamamıştır.

Chen ve ark. (2002) bildirdiğine göre, Meinhardt ve ark (1996), *Cryptosporidium*'un 1976 yılında hem immün yetersizliği olanlarda hem de normal olan kişilerde dünyadaki en yaygın enterik patojen olduğunu belirlemişlerdir.

Cryptosporidium'un ara konakçısı yoktur. Bütün büyüme aşamalarını tek bir konakçı içerisinde geçirir. İnsanlar *Cryptosporidium* ookistlerini sindirim yoluyla

aldıkları zaman enfekte edilirler. Ookistler gastrointestinal bölgede existe edilip sporozoitleri açığa çıkarırlar. Bunun için konakçı hücredeki reseptörler ile sporozoit yüzeylerinin spesifik olarak birbirine bağlanması gerekir. Sporozoitler özellikle konakçı epitel hücrelerinin apikal membranlarına tutunur. Konakçı hücre tarafından sporozoit vakuol şeklinde sarılır. Böylece sporozoit intrasellular olarak kalır fakat ekstrasitoplazmiktir. Parazit kendisi için gerekli elementleri konakçı hücreden alır (Chen ve ark, 2002).

Enfekteli kişilerle direk ilişkide olan insanlarda, umumi yüzme havuzlarını kullanan kişilerde, bu hastalığın yoğun olarak bulunduğu yerlere seyahat edenlerde Kriptosporidiyoz riski büyüktür. Kriptosporidial ookist her tip suda bulunmaktadır. Dokunulmamış yüzey sularında, filtre edilmiş yüzme havuzu suyunda hatta klorlanmış veya filtre edilmiş içme sularında da bulunabilir (Chen ve ark, 2002).

Su, Kriptosporidiyozin nakledilmesinde önemli bir araç olarak görülmektedir (Millar, 2002).

C. parvum su kökenli enfeksiyonlara neden olup, geniş konakçı dizisine sahiptir. Ookistler dezenfektanlara dayanıklıdır. Direkt olarak fekal-oral yolla (insandan-insana, hayvandan-insana) bulaşabilirler. Enfeksiyon dozu 10-100 ookistdir. Spesifik ve tamamen etkili tedavisi yoktur (Chen ve ark, 2002).

En basit tanı metodu modifiye edilmiş asid-fast yöntemiyle gaitada etkenin aranması şeklindedir. Laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan tanı testleri immunofloresan testleri ve ELISA (antigen capture enzym linked immunosorbent assays) yöntemi olup, PCR (polimerase-chain-reaction-based) tekniği araştırma testleri olarak kullanılabilir. Bu hastalıktan şüphelenildiğinde Ultrasonografi en iyi ön tanı yöntemidir (Chen ve ark, 2002).

Diğer enterik koksidiyalarda gibi *Cryptosporidium*'da tek konakçı içerisinde yaşam döngüsünü tamamlar. Diğer koksidiyalardan ayıran özellikleri organ ve konakçı spesifitesinin olmaması, antimikrobiyal ajanlara dayanıklılığının bulunması, otoenfeksiyon kabiliyetinin varlığı şeklinde ki özellikleridir. *C. parvum* ookistleri enfekteli insan ve buzağılardan büyük bir şekilde yayılır. Bulaşma fekal-oral, direkt veya indirek kontamine olmuş su ve yiyeceklerden olur. İzolatına bağlı olarak 10 taneden az sayıda ookist enfeksiyon etkeni olabilir. Ookistler bilinen dezenfektanlara

karşı oldukça fazla bir rezistansa sahiptir. Son zamanlara kadar *C. parvum*'un tek başına insanlarda hastalığa sebep olduğu ve hepsinde olmasa da pek çok memelide de hastalık oluşturduğu bilinmektedir. Bununla beraber son yıllarda *C. meleagridis*'inde insanlarda hastalığa neden olduğu tespit edilmiştir. *C. meleagridis* Kriptosporidiyozli hastalarda ve kalıcı ishallere sahip kötü beslenen çocuklarda bulunmuştur (Tzipori ve Ward, 2002).

Kriptosporidiyoz 6 kıtanın 40'dan fazla ülkesinde immün yetersizliği olan ve olmayan insanlarda rapor edildi. Gelişmekte olan ülkelerde (Asya, Afrika, Latin Amerika) yapılan 43 çalışma ile gelişmiş ülkelerde (Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya) yapılan 35 çalışma neticesinde *Cryptosporidium* enfeksiyonundan dolayı diyareli insanların oranı sırasıyla % 6.1 ile % 2.1 olarak tespit edilmiştir. 1500'ü aşkın HIV pozitif olan ishallerli hastalarda *Cryptosporidium* enfeksiyonunun oranı yapılan 9 çalışma ile gelişmekte olan ülkelerde sırasıyla % 24 ve % 14 olarak tespit edilmiştir (Dillingham ve ark, 2002).

C. parvum genotip 1 (insan kökenli) ve genotip 2 (hayvan ve insan kökenli) izolatları arasındaki farklılıklar iki ayırt edici türün oluşmasına nedendir. Genotip 1 % 30-40 oranında genotip 2 ise % 60-70 oranında insan kriptosporidiyozuna neden olmuştur. Genotip 1 ve 2'nin yüzey glikoproteinleri arasında (gp 40/15) çok az genetik dizi benzerliği mevcuttur. Genotip 1 ve 2 inokule edilmiş genotobiotik domuzların serum örnekleri incelendiğinde *C. parvum* gp15 hem genotip 1 hemde 2 de immunodominanttır. Bu iki tip için gp15 yüzey glikoproteinleri seviyesinin büyük bir fenotipik varyasyon gösterdiği belirlenmiştir. Gp 15 yüzey glikoproteininin immün cevap indükleyicisi ve virülans faktörü olması bakımından öneme sahip olduğu bilinmektedir (Sestak ve ark, 2002).

Cryptosporidium için kullanılan iki ticari immunomagnetik seperasyon (IMS) kiti ookistlerin saf olarak elde edilmesinde kullanılır. Dynal ve Crypto-scan kits bu amaç için kullanılan testlerdir. Yapılan çalışmalar neticesinde IMS'in örnekte bulunan ookistlerin saf ve iyi bir şekilde elde edilmesinde kullanılan en iyi yöntem olduğu ve bu işlem sonrasında ookist infektivitesinin kaybolmadığı ortaya konulmuştur (Rochelle ve ark, 2002).

RFLP (restriction fragment length polymorphism) nin *C. parvum* ve diğer *Cryptosporidium* türleri arasındaki farklılıkları belirlemede kullanılan en popüler yöntem olduğu belirlenmiştir. RFLP markırları kullanılarak *C. parvum*'un tip1 ve tip 2 genotipleri tespit edilmiştir. Son zamanlarda mikrosatellite length polymorphismde oldukça başarılı bir teknik olarak uygulanmaktadır. Bunun yanı sıra küçük subünit ribosomal RNA, komşu internal transcribed spacer 1, dihydrofolate reduktaz, ısı şoku proteini (hsp) 70, β tübülün gibi birkaç genetik loki taksonomik sınıflandırma için kullanıldı. Belirli *Cryptosporidium* türleri için basit ookist morfolojisi, konakçı spesifitesi, enfeksiyon yeri gibi özellikler moleküler taksonomiye desteklemede kullanılmıştır. Örneğin *C. muris*, *C. parvum* ve *C. meleagridis* β tübülün gen dizisinde 287 bp lik intron ve 200bp komşu ekson 2 gen dizisi incelendiğinde *C. parvum* ve *C. meleagridis* arasında 200 bp ekson 2 gen dizisinde hiçbir polimorfizm yokken *C. muris* ile 39 mutasyonun neden olduğu 6 bölgede sinonim olmadığı gözlenmiştir. Birçok araştırmacının yaptığı PCR neticesinde *C. parvum* ve *C. meleagridis* gen dizilimleri arasında büyük benzerliklerin olduğu tespit edilmiştir. *C. meleagridis* ve *C. parvum* konakçı dizisi benzerliğinin yanı sıra *C. meleagridis*'in ara sırada insanlarda tespit edilmesi de *C. parvum* ile benzerliğini ortaya koymaktadır (Widmer ve ark, 2002).

Homer ve ark (2003), inhibitörlerin çeşitli konsantrasyonları ve uygun solvent kontroller sadece serin proteaz inhibitörleri (PIs) ve PIs+paramomycin kullanılarak, *C. parvum*'un eksistasyonu, konakçı hücreye girişi ve gelişmesi üzerine etkileri invitro HCT-8 hücre kültürü kullanılarak araştırmışlardır. Serin proteaz inhibitörleri olarak Amprenavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, indinavir ve paromomisin kullanmışlardır. Bu inhibitörlerin konakçı hücre kültürü HCT-8 hücrelerinin artışı ve canlılığı üzerine etkileri yani sitotoksitesi MTS (tetrazolium bileşikler)/PMS (phenazine methosulfat) deneyleriyle tespit edilmiştir. MTS/PMS testleri neticesinde inhibitörlerin HCT-8 hücreleri üzerindeki sitotoksitesinin birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir. Amprenavir ve indinavir hariç diğer bütün PI s'lerin 25 μ g/ml konsantrasyonunun üzerinde sitotoksik etkisinin olduğu belirlenmiştir. Dolayısı ile *C. parvum* gelişmesi üzerine bu inhibitörlerin kullanımının sınırlı konsantrasyonlarda olacağı tespit edilmiştir. Yine bu inhibitörlerin her birisi ile ayrı olarak hazırlanmış

paramomisin kombinasyonunun HCT-8 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Sonuç olarak parazit gelişmesini önemli ölçüde azaltan kombinasyonun paramomisin ve ayrı ayrı indinavir, ritonavir ve saquinavir olduğu gösterilmiştir. Paramomisin (200 µg/ml) + indinavir (200 µg/ml) % 82 oranında; Paramomisin (1000 µg/ml) + indinavir (200 µg/ml) % 94 oranında inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. Yine paramomisin (200 µg/ml) + ritonavir (10 µg/ml) % 78; Paramomisin (1000 µg/ml) + ritonavir (10µg/ml) % 88 oranında inhibisyona sebep olduğu ; Paramomisin (200 µg/ml) + saquinavir (10µg/ml) % 56 oranında *C. parvum*'un gelişmesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar dikkate alınarak indinavir + paramomisin, ritonavir + paramomisin, saquinavir + paramomisin komplekslerinin kullanıldığı hastalarda mikrobiyolojik ve klinik olarak *C. parvum*'un inhibisyonu üzerine tam anlamıyla olmasada etkili olduğu ayrıca indinavir, nelfinavir ve ritonavirin ise direk olarak *C. parvum*'un gelişmesini inhibe ettikleri tespit edilmiştir.

Düşük ve orta derecede etkisi olan UV lambaları kullanılarak düşük dozdaki ($1-3\text{mj}/\text{cm}^2$) ultraviyole ışınların *C. parvum*'un potansiyel tamirinde ve inaktivasyonundaki etkisi araştırılmıştır. Bunun için *C. parvum* ookistleri PBS içinde süspanse edilip UV'ye maruz bırakılmıştır. Ookist süspansiyonu 5 °C veya 25 °C'de aydınlık ve karanlık koşullar altında 120 saat, 5 gün) fazla UV altında fotoreaktivasyonu ve karanlık tamir potansiyelini incelemek üzere tutuldu. İnkübasyon süresi boyunca *C. parvum* infektivitesi, HCT-8 hücreleri kullanılarak ve antibodi boyama tekniğiyle tespit edilmiştir. İnkübasyon neticesinde ne karanlık ne de aydınlık koşullar altında *C. parvum* için dikkate değer bir inaktivasyon ya da kendi kendine tekrar potansiyel tamiri gözlenememiştir (Zimmer ve ark, 2003).

C. parvum'un tip 1 ve tip 2 olmak üzere 2 genotipi belirlenmiştir. Tip 1 *C. hominis* anthroponotik, tip 2 *C. parvum* zoonotik olarak adlandırılmıştır. Bu her iki tipin konakçı dizisinin birbirinden farklı olduğu; tip 1 in sadece insanlarda, tip 2 nin pek çok memeli türlerinde (kemirgen hayvan, geviş getiren hayvan) enfeksiyona neden olduğu ortaya konulmuştur. İnsanlar her iki tipe karşı hassas olmalarına rağmen yapılan çalışmalar neticesinde bu iki tipin birlikte nadiren enfeksiyon oluşturduğu tespit edilmiştir. RFLP (restriction fragment length polymorfizm)

yöntemi kullanılarak İngiltere’de yapılan bir çalışmada 49 Kriptosporidiyozlu insandan sadece bir tanesinin hem tip 1 hemde tip 2 nin birlikte oluşturduğu karma enfeksiyona sahip olduğu belirlenmiştir. Son zamanlarda mikro ve mini satellite length polymorfizm yöntemi kullanılarak İsveç’te yapılan bir çalışmada 135 kriptosporidiyozlu insandan % 12 oranında tip1/tip 2’nin birlikte enfeksiyon oluşturdukları rapor edilmiştir (Tanriverdi ve ark, 2003).

Pastörize edilmemiş elma sularında gıda kökenli Kriptosporidiyoz tespit edilmiştir. Bu çalışmada *C. parvum*’u inhibe etmek için meyve sularına organik asit ve hidrojen peroksit ilave edilmiştir. Ookistlerin canlılığı human ileocecal hücre kültüründe (HCT-8) infektivite oranları belirlenerek gösterilmiştir. Hücre monolayerleri 10^6 ookist ve 10 kat sulandırılmış serileriyle enfekte edilmiştir. İn vitro da eksistasyon deneyleri bu ilaç uygulamalarını değerlendirmek için kullanılmıştır. Organik asit ve H_2O_2 elma suyu, portakal suyu ve üzüm suyuna ağırlık/hacim temel alınarak eklenmiştir. Malik, sitrik ve tartarik asidin % 1-5 konsantrasyonlarında *C. parvum* ile enfekteli HCT-8 hücrelerini % 88’in üzerinde inhibe ettiği görülmüştür. Hidrojen peroksitin düşük oranlarda pasterizasyona alternatif olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır. Organik asitlerin canlı hücrelerin yaşadığı ortamdaki pH değerini düşürerek dolayısıyla membran ve enzim aktivitelerini bozarak etkili oldukları düşünülmektedir. Bakterilerin aksine ookistler pH’daki bu değişimlere dirençlidir. Ookistin hücre duvarına sahip olması bu dirençlilik mekanizmasını oluşturmaktadır. Ancak asidik ortamların indirekt olarak eksistasyonu arttırdığı dolayısıyla ookist duvarındaki geçirgenliğin de arttığı gözlenilmiştir (Kniel ve ark, 2003).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Lipofektamin ve Elektroporasyon yöntemiyle yapılan Transient Transformasyonda kullanılan materyaller aşağıdaki gibidir.

3.1.1. Kullanılan parazit

3.1.1.1. *Cryptosporidium parvum*: Iowa suşuna ait ookistler Bunch Grass çiftliğinden, Indiana; Amerika Birleşik Devletleri, Tufts Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Biyomedikal Bölümü Enfeksiyon Hastalıkları Laboratuvarlarından temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

3.1.2.1. Ultrasantrifüj: Beckman L-70 Ultrasantrifüj, dışkıdan oosistleri saflaştırıp elde etmek için kullanılmıştır.

3.1.2.2. Benmari: Eksistasyon sırasında ookistlerin 37 °C’de bekletilmeleri için kullanılmıştır.

3.1.2.3. İnkübatör: % 5 CO₂’i sağlayan 37 °C’lik inkübatör hücre kültürlerinin pasajı için kullanılmıştır.

3.1.2.4. İnvirt floresan Mikroskop: Olympus CK2 ULWCD 0.30 invert mikroskop kullanılarak infekteli HCT-8 (Human Ileocecal adenocarcinoma cell) hücreleri incelenmiştir.

3.1.2.5. Elektroporasyon Cihazı: ABTX^R ECM 630 elektroporasyon cihazı, *C. parvum* sporozoitlerine reporter gen taşıyan plasmidi aktarmak için kullanılmıştır.

3.1.2.6. PTC-100TM Thermal Kontrol Cihazı: Transformantları kontrol etmek için PCR tekniği kullanılmıştır.

3.1.2.7. Real Time PCR Cihazı: (Light Cycler Software version 3.5 Roche) Transformantları kontrol etmek için kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Besi yerleri, hücre kültürleri ve kültür ortamları

3.1.3.1. LB-agar ve LB-broth ortamı: (LB agar Invitrogen; Katalog no: 22700-025), (LB Broth (Invitrogen; Kat no: 12795-027) (<http://www.invitrogen.com>). Transformantların çoğaltılmasında kullanılan besiyerleridir.

3.1.3.2. HCT-8 (Human adenocarcinoma, ileocecal) hücreleri: (CCL-244 ATCC Kat no: 2056312). Bu hücreler ATCC firmasından satın alınmıştır. Elde edilen transformantların çoğaltılması amacıyla kullanılan hücre kültürleridir.

3.1.3.3. RPMI-1640 kültür ortamı: RPMI-1640 [(25 mM HEPES içeren, sodyum bikarbonat ve L-glutamin bulunduran) (Sigma; R5886)] (Gibco, Kat no: 11875-093). HCT-8 hücrelerinin çoğaltılması için kullanılan besin ortamıdır.

3.1.3.4. MDBK (Mardin-Darby bovine kidney) hücre kültürü: (Gibco, Kat no: CCC-244). Elde edilen transformantların çoğaltılması amacıyla kullanılan hücre kültürleridir.

3.1.3.5. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium/ High Modified) kültür ortamı: DMEM ortamı [(Gibco, Corp. Kat no: 11960044) (4500 mg/L Glukoz, 110 mg/L Sodyum prövat, L-Glutaminin olmadığı ortam)]. MDBK hücrelerinin çoğaltılması için kullanılan besin ortamıdır.

3.1.3.6. DH5a[™] Escherichia coli kompetent hücreleri: (Kat No:18265-017; Invitrogen firmasından satın alınan bu bakteriler plazmidlerin transformasyonu işleminde kullanılmıştır (<http://www.invitrogen.com>))

3.1.4. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri

3.1.4.1. 25 cm² ve 75 cm²'lik steril plastik şişeler: HCT-8 hücrelerinin devamını sağlamak ve bu kültürleri pasajı yapılabildiği kadar saklamak amacıyla kullanılan plastik ve steril kaplardır.

3.1.4.2. 24 ve 96 kuyucuklu plaklar: Transformantların çoğaltılması için aktarıldıkları, içinde hücre kültürü bulunan değişik sayılarda ve çaplarda kuyucuklara sahip steril kaplardır.

3.1.4.3. Falkon tüpü: (konikal tüpler) 15 ml veya 50 ml sıvı alabilen altı konik şekilde olup santrifüj tüpü veya gerekli çözeltileri küçük kısımlar şeklinde saklamak amacıyla kullanılmıştır.

3.1.4.4. Kryovial tüpler: -80 °C’de saklamak ve stok oluşturmak amacıyla hücre kültürlerinin konulduğu ağız vida şeklinde kıvrılarak kapatılan tüplerdir.

3.1.4.5. Nalgene™ Cryo 1°C freezing Konteyner: (Kat no: 5100-0001). Kryovial tüplerin yerleştirildiği konteynerlardır.

3.1.4.6. Otomatik pipet: 0.2 µl’den 500 µl’ye kadar değişik aralıkta otomatik pipetler kullanılmıştır.

3.1.4.7. Lab-Tek^R Chamber Permanox SlideTM: (Kat no:177445) Floresan mikroskop altına ebatları küçük olduğu için yerleştirilebilen dolayısıyla transformantların fotoğraflarını çekmek için kullanılan, içine transforme edilmiş hücre kültürlerinin aktarıldığı steril plaklar kullanılmıştır.

3.1.4.8. BTX boş küvet: 1 mm gri küvet ve 2 mm mavi küvet elektroporatörde kullanılmıştır.

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

3.1.5.1. Sitomiks Tampon Çözeltisi: Elektroporasyon işleminde ve eksistasyon sırasında kullanılmıştır (Maurice J. B. van den Hoff ve ark. 1992).

120 mM KCL

0.15 mM CaCl₂

10 mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄

25 mM HEPES

2 mM EGTA

5 mM MgCl₂

ATP 2mM

Glutathionin 5 mM

pH 7.6’ya 10 M KOH kullanılarak ayarlanmıştır.

3.1.5.2. L-glutamin: L-glutamin hem DMEM ortamı, hemde RPMI-1640 besi ortamına son konsantrasyon % 1 olacak şekilde ilave edilmiştir.

3.1.5.3. FBS (Fetal Bovine Serum): FBS (yeni doğan sığır serumu) DMEM ortamını zenginleştirmek amacıyla son konsantrasyonda % 10 olacak şekilde kullanılmıştır.

3.1.5.4. At serumu: At serumu RPMI-1640 besi ortamına son konsantrasyon % 10 olacak şekilde ilave edilmiştir.

3.1.5.5. Sodyum prüvat: RPMI-1640 besi ortamı içine ortamı zenginleştirmek için son konsantrasyonda 1 mM olacak şekilde sodyum prüvat ilave edilmiştir..

3.1.5.6. DMSO (Dimethyl sulfoksid Sigma D-8418): Nalgene™ Cryo 1 °C freezing konteynırında hücre kültürlerini saklamak için kullanılan solüsyondur.

3.1.5.7. PBS (% 1): Hücrelerin ve ookistlerin deneye hazırlanması aşamasında yıkama solüsyonu olarak kullanılmıştır.

3.1.5.8. RNA later^R (RNA'yı stabilize eden solüsyon): (Kat no= 7020, Ambion.) Hücrelerin plaktan toplanıp RNA izolasyonu yapılmadan önce stabilizasyonunu sağlamak amacı ile ilave edilen solüsyondur. Bu solüsyon ilave edildikten sonra hücreler -20 °C'de çok uzun olmamak kaydıyla saklanabilir.

3.1.5.9. Fenol:kloroform:İzoamil alkol: DNA'nın bulaşık olduğu tüm artıkları çöktürüp uzaklaştırmak amacıyla kullanılmıştır.

3.1.5.10. Etanol: % 70'lik etanol DNA ekstraksiyonu işleminde DNA'yı yıkamak amacıyla kullanılmıştır.

3.1.5.11. Glikojen veya pellet paint: Pellet paint (Kat no: 69049-3 Novagen) ve glikojen DNA'yı dibe çöktürmek amaçlı kullanılmıştır.

3.1.5.12. TE Tamponu (1X): 10 mM Tris-Cl, (pH 8.0), 1 mM EDTA. (pH 8.0) Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyondur.

3.1.5.13. MMLV Tamponu (5x): (Promega M531A) RT-PCR için kullanılır.

3.1.5.14. RNasin: (40 U/μl) Promega N251A) RT-PCR için kullanılır.

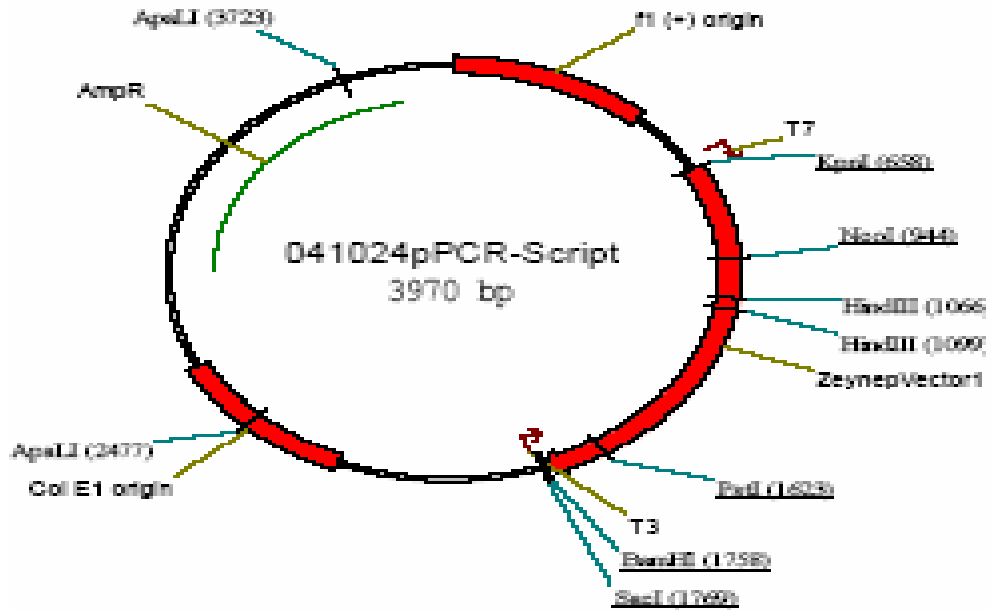
3.1.5.15. MMLV-RT (200U/μl) (Promega M170A): RT-PCR için kullanılan enzimdir.

3.1.5.16. Taurocholic acid: (TA- Sigma T9034). Ookistleri eksiste etmek için 0.075 g/L oranında kullanılmıştır.

3.1.5.17. Glutathionin ve ATP: Stok ATP (sigma A-9187) 100 mM ve stok Glutathione (sigma G-4501) 100 mM konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Elektroporasyon kuvvetinin üzerindeki sızmayı önlemek amacıyla kullanılmıştır.

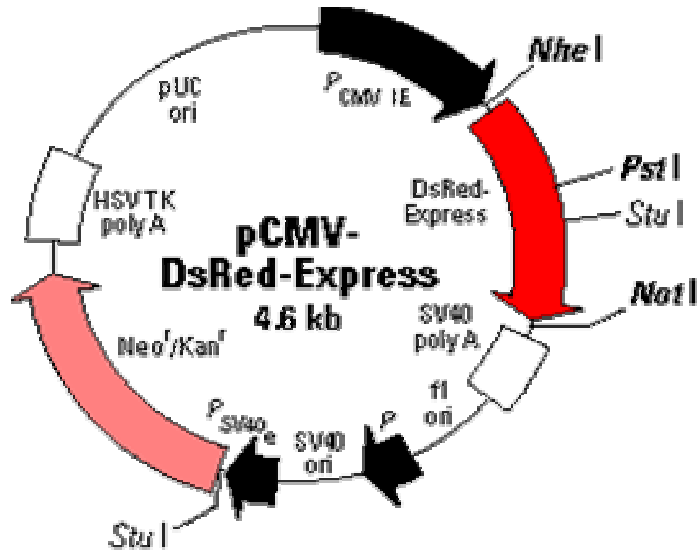
3.1.6. Kullanılan Plazmidler

3.1.6.1. Crypto construct GFP Vektör: Bu çalışmada kullanılan plazmid, Geneart firması tarafından (www.geneart.com), sentetik oligonukleotidler kullanılarak hazırlanmıştır. Bu fragment KpnI ve SacI restriksiyon bölgeleri kullanılarak pPCR-Script vektörüne klonlanmıştır. Bu plazmidin dizaynında *E.coli* K12 XL 10-GOLD (dam⁺ dcm⁺)’dan yararlanılmıştır (Şekil 3.1).



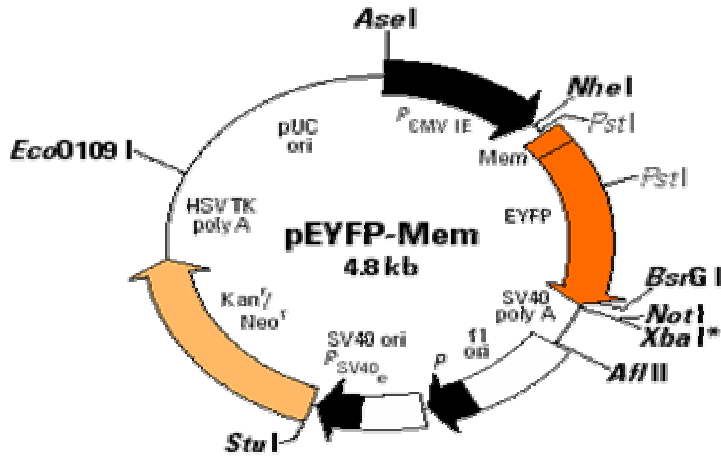
Şekil 3.1 Crypto construct GFP Vektör Şeması

3.1.6.2. pCMV-DsRed Ekspres Vektör (clontech PT3682-5): Bu plazmid BD Biosciences Clontech firmasından (Kat no: PT3682-5) satın alınmıştır (<http://orders.clontech.com/clontech/techinfo/vectors/catlc.shtml#egfp>) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. pCMV-DsRed Ekspres Vektör Şeması

3.1.6.3. pEYFP-Mem Vektör (PT3378-5 Clontech): Bu plasmid BD Biosciences Clontech firmasından (Kat no: PT3682-5) satın alınmıştır. (<http://orders.clontech.com/clontech/techinfo/vectors/catlc.shtml#egfp>) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. pEYFP-Mem Vektör Şeması

3.1.7. Kullanılan Antibiyotikler

3.1.7.1. Ampisilin (Kat no: L0168 Sigma) ve Kanamisin: (L0543 Sigma)

Ampisilin (100 mg/ml) ve Kanamisin (50 mg/ml) konsantrasyonunda plazmidlerin seçiciliğinde kullanılmıştır.

3.1.7.2. Penisilin/streptomisin (Kat no: P0781; Sigma): (RPMI-1640 besi ortamına kontaminasyonu engellemek amacıyla eklenen antibiyotiklerdir.

3.1.8. Kullanılan Kitler

3.1.8.1. Puregene Genomic DNA Purification Kiti ve PureYield Plasmid Midiprep Kiti: (Promega; Kat; A2492) Plazmid izolasyonu için kullanılmıştır (<http://www.gentra.com>).

3.1.8.2. Lipofektamin 2000 Kiti: (Kat no: 11668-027, Invitrogen) *C. parvum* sporozoitlerine ve HCT-8 hücrelerine reporter gen taşıyan plazmidi aktarmak için elektroporasyon yöntemine alternatif olarak kullanılmıştır.

3.1.8.3. RNeasy Mini kit: (Qiagen; Kat no: 74104). RNA ekstrakte etmek için kullanılmıştır.

3.1.8.4. Superscript[™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR kiti: (Invitrogen, Kat no: 11904-018). cDNA elde etmek için kullanılmıştır.

3.1.8.5. LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kiti: (Kat no: 2 239 264-Roche). Real time PCR yapmak için kullanılan kittir.

3.1.9. Kullanılan Enzimler

3.1.9.1. Restriksiyon Enzimleri: SpeI (R0156S; NewEngland BioLabs), NcoI (#R0193L; NEB BioLabs), enzimleri Crypto construct GFP Vektörün izolasyonundan sonraki doğrulama aşamasında kullanılmıştır (<http://www.neb.com>).

3.1.9.2. Akkutaz enzimi: (Kat no: AT04 innovative Cell Technologies, Inc.). Hücre kültürlerini petriden toplamak için kullanılmıştır.

3.1.10. Kullanılan Primerler

3.1.10.1. pCMV-DsRed Ekspres Vektör Primerleri

pCMV-DsRed Ekspres Vektörün aşağıda verilen baz dizisi kullanılarak bu primerler sentezlenmiştir.

CCGGA CTCAG ATCCACCGGT CGCCACCATG GCCTCCTCCG
AGGACGTCAT CAAGGAGTTCATGCGCTTCA AGGTGCGCAT
GGAGGGCTCC GTGAACGGCC ACGAGTTCGA GATCGAGGGC
GAGGGCGAGG GCCGCCCTA CGAGGGCACC CAGACCGCCA
AGCTGAAGGT GACCAAGGGCGGCCCCCTGC CCTTCGCCTG
GGACATCCTG TCCCCCAGT TCCAGTACGG CTCCAAGGTG
TACGTGAAGC ACCCCGCCGA CATCCCCGAC TACAAGAAGC
TGTCTTCCC CGAGGGCTTCAAGTGGGAGC GCGTGATGAA
CTTCGAGGAC GGCGGCGTGG TGACCGTGAC CCAGGACTCC
TCCCTGCAGG ACGGCTCCTT CATCTACAAG GTGAAGTTCA
TCGGCGTGAA CTTCCCCTCCGACGGCCCCG TAATGCAGAA
GAAGACTATG GGCTGGGAGG CCTCCACCGA GCGCCTGTAC
CCCCGCGACG GCGTGCTGAA GGGCGAGATC CACAAGGCCC
TGAAGCTGAA GGACGGCGGCCACTACCTGG TGGAGTTCAA
GTCCATCTAC ATGGCCAAGA AGCCCGTGCA GCTGCCCGGC
TACTACTACG TGGACTCCAA GCTGGACATC ACCTCCCACA
ACGAGGACTA CACCATCGTG GAGCAGTACG AGCGCGCCGA
GGGCCGCCAC CACCTGTTCC TGTAGCG

F- CCCAGT TCCAGTACGG

R- CCCAGCCCATAGTCTT

RT- CAGCACGCCGTCGCGGGG

3.1.10.2. pEYFP-Mem Vektör primerleri

pEYFP-Mem Ekspres Vektörün aşağıda verilen baz dizisi kullanılarak bu primerler sentezlenmiştir.

ATTCTGCAGT CGACGGTACC GCGGGCCCGG GATCCACCGG
TCGCCACCAT GCTGTGCTGT ATGAGAAGAA CCAAACAGGT
TGAAAAGAAT GATGAGGACC AAAAGATCAT GGTGAGCAAG
GGCGAGGAGC TGTTACCGG GGTGGTGCCC ATCCTGGTCG
AGCTGGACGG CGACGTAAAC GGCCACAAGT TCAGCGTGTC
CGGCGAGGGC GAGGGCGATG CCACCTACGG CAAGCTGACC
CTGAAGTTCA TCTGCACCAC CGGCAAGCTG CCCGTGCCCT
GGCCCACCCT CGTGACCACC TTCGGCTACG GCCTGCAGTG
CTTCGCCCCG TACCCCGACC ACATGAAGCA GCACGACTTC
TTCAAGTCCG CCATGCCCCG AGGCTACGTC CAGGAGCGCA
CCATCTTCTT CAAGGACGAC GGCAACTACA AGACCCGCGC
CGAGGTGAAG TTCGAGGGCG ACACCCTGGT GAACCGCATC
GAGCTGAAGG GCATCGACTT CAAGGAGGAC GGCAACATCC
TGGGGCACAA GCTGGAGTAC AACTACAACA GCCACAACGT
CTATATCATG GCCGACAAGC AGAAGAACGG CATCAAGGTG
AACTTCAAGA TCCGCCACAA CATCGAGGAC GGCAGCGTGC
AGCTCGCCGA CCACTACCAG CAGAACACCC CCATCGGCGA
CGGCCCCGTG CTGCTGCCCCG ACAACCACTA CCTGAGCTAC
CAGTCCGCCC TGAGCAAAGA CCCCAACGAG AAGCGCGATC
ACATGGTCCT GCTGGAGTTC GTGACCGCCG CCGGGATCAC
TCTCGGCATG GACGAGCTGT ACAAGTAAAG CGGCCGCGAC

F:AACA GCCACAACGT CT

R: CCT GCT GGA GTT CGT

3.1.10.3. Crypto construct-GFP primerleri**3.1.10.3.(1). C-GFP F 1-R1 primerleri**

GFP (green fluoresans protein)'nin baz dizisi kullanılarak bu primerler sentezlenmiştir.

ATCCAATACT TCCTTAAGTT ATTATTGTTT AGGATTTAAA
TAATTATAAT TCACCATGCT AAGGGAGAAG AACTTTTTAC
AGGAGTTGTT CCAATTCTTG TTGAACTTGA TGGAGATTTA
ATGGACATAA GTTTTCAGTT TCAGGAGAAGGTGAAGGAGA
TGCAACTTAT GGAAAGTTAC TCTTAAGTTT ATTTGCACTA
CTGGAAAGCT TCCAGTTCCT TGGCCAACTT TGGTTCTACT
TTTTTCATATG GAGTTCAATG CTTTTCAAGA TATCCAGATC
ATATGAAGCA ACATATTTTT TTAAGTCAGC AATGCCAGAA
GGATATGTTT AAGAAAGAAC TATTTTTTTTT AAGATGATGG
AAATTATAAG ACTAGAGCAG AAGTTAAGTT TGAAGGAGAT
ACTCTTGTTA ATGAATAGAA CTTAAGGGAA TAGATTTTAA
GGAAGATGGA AATATTCTTG GACATAAGTT GAATATAATT
ATAATTCACA TAATGTTTAT ATTATGGCAG ATAAGCAAAA
AAATGGAATT AAGTTAATTT TAAGATTAGA CATAATATAG
AAGATGGATC AGTTCAACTT GCAGATCATA TCAACAAAAT
ACTCCAATTG GAGATGGACC AGTTCTTCTT CCAGATAATC
ATTATCTTCA ACTCAATCAG CACTTTCAA AGATCCAAAT
GAAAAAAGAG ATCATATGGT TCTTTTGAAT TTGTTACTGC
AGCAGGAATT ACTCATGGAA TGGATGAATT GTATAACTAG
TAGTATA

C-GFP F 1= GGAGAAGGTGAAGGAGAT

C-GFP R 1= TCTGGCATTGCTGACTTA

C-GFP RT 1= TCTTGAACATATCCTTC

3.1.10.3.(2). C-GFP F 2-R2

GFP (green fluoresans protein) baz dizisi kullanılarak bu primerler sentezlenmiştir.

ATCCAATACT TCCTTAAGTT ATTATTGTTC AGGATTTAAA
TAATTATAAT TCACCATGCT AAGGGAGAAG AACTTTTTTAC
AGGAGTTGTT CCAATTCTTGT TGAAGTTGAT GGAGATTTAA
TGGACATAAG TTTTCAGTTT CAGGAGAAGG TGAAGGAGAT
GCAACTTATG GAAAGTTACT CTTAAGTTTA TTTGCACTAC
TGGAAGCTT CCAGTTCCTT GGCCAACTTT GGTTCTACTT
TTTCATATGG AGTTCAATGC TTTTCAAGAT ATCCAGATCA
TATGAAGCAA CATATTTTTT TAAGTCAGCA ATGCCAGAAG
GATATGTTCA AGAAAGAACT ATTTTTTTTA AGATGATGGA
AATTATAAGA CTAGAGCAGA AGTTAAGTTT GAAGGAGATA
CTCTTGTTAA TGAATAGAAC TTAAGGGAAT AGATTTTAAG
GAAGATGGAA ATATTCTTGG ACATAAGTTGA ATATAATTAT
AATTCACATA ATGTTTATAT TATGGCAGAT AAGCAAAAAA
TGGAATTAAG TTAATTTTAA GATTAGACAT AATATAGAAG
ATGGATCAGTT CAACTTGCAG ATCATATCAA CAAAATACTC
CAATTGGAGA TGGACCAGTTC TTCTTCCAGA TAATCATTAT
CTTCAACTCA ATCAGCACTT TCAAAAGATCC AAATGAAAAA
AGAGATCATA TGGTTCTTTT GAATTTGTTA CTGCAGCAGG
AATTACTCAT GGAATGGATG AATTGTATAA CTAGTAGTATA

C-GFP F 2= GTCAGCAATGCCAGAAG

C-GFP R 2= ACTGGTCCATCTCCAAT

C-GFP RT 2= CTGGAAGAAGAAGACTGG

3.1.10.3.(3). C-GFP Nested Primer

C-GFP F2-R2 Primerleri arasındaki baz dizisi kullanılarak bu primerler sentezlenmiştir.

GTCAGCAATG CCAGAAGGAT ATGTTCAAGA AAGAAGCTATT
TTTTTTAAGA TGATGGAAAT TATAAGACTA GAGCAGAAGT
TAAGTTTGAA GGAGATACTC TTGTTAATGA ATAGAAGCTTA
AGGGAATAGA TTTTAAGGAA GATGGAAATA TTCTTGGACA
TAAGTTGAAT ATAATTATAA TTCACATAAT GTTTATATTA
TGGCAGATAA GCAAAAAAAT GGAATTAAGT TAATTTTAAG
ATTAGACATA ATATAGAAGA TGGATCAGTT CAACTTGCAG
ATCATATCAA CAAAATACTC CAATTGGAGA TGGACCAGT

C-GFP NF1: TTTGAAGGAGATACTCTTG

C-GFP NR1: GCAAGTTGAACTGATCCAT

3.1.10.4. C. parvum Primerleri**3.1.10.4.(1). C. parvum**

C. parvum'un baz dizisi kullanılarak bu primerler sentezlenmiştir.

CAAATAACCG TCTACAGACG TTAAATAAG GTTCACGGAA
CTGGTTTTTT TAATTTTCAG TTTGTACAGG CATCCAATAC
TTCCTTAAGT TATTATTGTT CAGGATTAA ATAATTATAA
TTCAATAGTA TTAATCTTTA AGGTATAAGTT ATTACTATGA
ACCACTAGGT AAATCTAGTA CTAATAAAGT TGAAATCGCT
GATTAACGCACAACA

Forward: CAAATAACCGTCTACAG

Reverse: TGTTGTGCGTTAATCA

3.1.10.4.(2). L11 primerleri

Cryptosporidium parvum'un baz dizisi kullanılarak bu primerler sentezlenmiştir.

ATGACAGCAG AGGTGAACCC TATGAAAAAT ATCAAAATTG
 AGAAGTTGGT CATTAATATT AGTGTTGGCC AGTCAGGTGA
 TCGCCTCACC CGTGCAGCGA AGGTATTGGA ACAGTTGACT
 GACCAAAAAC CTGTCTTTGG TCAGGCTCGT TTCACTATCC
 GTTCATTCTC TATCCGTAGG GCTGAAAAGA TATCATGTTA
 TGTTACTGTT CGTGGTGATA AAGCCGAAGA GATTCTTGAG
 AAGGGTTTGA AAGTTAAGGA ATACGAACTT CGTAAAAGGA
 ACTTCTCTGC AACTGGTAAT TTTGGTTTTG GAATAGATGA
 GCACATTGAT TTGGGTATTA AATACGATCC TAGCACCGGT
 ATTTACGGTA TGGACTTCTT CGTACAATTA ACTAGACCAG
 GTAATCGTGT TAGCCTAAGA AGGAAATGTA GATCAAAGGT
 TGGTAAGCAC GGTAGAGTTA CAAAGGATGA AGCTATGCAA
 TGGTTCCAGT CTAAATATGA TGGTATTATC TTGAACTGA

CRYRG ZF (Crypto ribosomal gene Forward) = CTATCCGTAGGGCTGAA

CRYRG ZR (Crypto ribosomal gene Revers) = GGAACCATTCATAGCTT

CRYRG ZRT(Crypto ribosomal gene Revers transcriptaz)=

CAGTTCAAGATAATACCATCA

3.1.10.4.(3). β tübülün primerleri (*C. parvum* baz dizisi)

Tufts Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Biomedikal Bölümünde daha önce dizayn edilmiş mevcut bulunan bu primerler direkt olarak kullanılmıştır.

β - F = AGGACAATGTGGGAAC

β - R = TGCTCTTGGAACGTATC

β - RT = AAAGGACCAGCTCTAACT

3.1.10.5.GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase housekeeping gen) primerleri

Tufts Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları, Biomedikal Bölümünde daha önce dizayn edilmiş mevcut bulunan bu primerler direkt olarak kullanılmıştır.

5' AAT GAC CCC TTC ATT GAC C 3'

5' TGG TGC AGG AGG CAT TGC 3'

3.2. METOD

3.2.1. Lipofektamin Yöntemiyle Transient Transformasyon

3.2.1.1. *Cryptosporidium parvum*'un Lipofektamin Yöntemi İçin Hazırlanması

3.2.1.1.(1). *Cryptosporidium parvum* ookistlerinin çoğaltılması

C. parvum ookistlerini çoğaltmak için C57BL/6 fareleri kullanılmıştır. C57BL/6 fareleri ilk gün sadece içinde yemi ve suyu olan kafeslere alınıp sakinleşmesi beklenilmiştir. Küçük kafeslere maksimum 5, büyük kafeslere ise en fazla 10 tane fare konulmuştur. Kafeslerin üstüne metal etiketleri takılıp farenin numarası ve o günün tarihi yazılmıştır. Bu kafesler haftada iki kez yenileri ile değiştirilip, kafes içindeki su şişelerinin yarıdan fazla dolu olmasına ve yemlerin yeterli olmasına dikkat edilmiştir.

İmmün sistemi baskılanmış fareleri satın almak daha pahalı olduğu için, C57BL/6 farelerinin immün sistemleri laboratuvarında uygulanan işlemlerle baskılanmıştır.

1) Öncelikle C57BL/6 farelerinin immün sistemlerini baskılamak için daima taze 0.01 g/ml deksametason (Sigma- D-176) steril PBS içinde hazırlanmıştır. Farelerinin immün sistemlerini baskılamak işlemi teorik olarak 6 gün olarak belirlenmiştir.

2) Birer gün ara verilerek 3 defa olmak üzere, steril bir enjektör yardımı ile (0.5 mm'lik iğne ucu kullanılır) deksametason kas içine enjekte edilmiştir.

3) İnjesiyona başlanan gün metal kart üzerindeki etikete kaydedilmiştir. İnjesiyon işlemi her defasında diğer bacağa yapılarak tekrarlanmıştır. 4.cü tekrarda hem deksametason enjekte edilmiş, hem de ağızdan ookist verilerek fareler enfekte edilmiştir.

4) Enfeksiyon sırasında kullanılan ookistlerin IMS yöntemiyle tamamen saf olarak elde edildiğine ve % 10'luk sodyum hipoklorit ile yüzeysel sterilizasyona uğratıldığından emin olunmalıdır.

5) Her bir fare için hazırlanan 10 µl ookist süspansiyonu içinde yaklaşık 10^3 ookist olmalıdır. Yine enfeksiyonun tarihi de metal kart üzerindeki etikete yazılmalıdır.

6) Enfeksiyondan sonraki 3. günde farelerin dışkısı toplanarak asit-fast yöntemiyle ookist olup olmadığı belirlenmiştir.

7) Ookistler mikroskop altında gözlemlendikten sonra bu tek bir ookistte olabilir, fareler gündüz normal kafeslerinde tutulup akşam dışkı toplama kafeslerine (içinde pamuk olmayan kafesler) konulmuştur.

8) Her sabah dışkılar kafeslerden toplanıp falkon tüplerine alınmıştır. Bu tüplerin üzerine ookistlerin toplandığı tarih ve kullanılan ookistin suşu yazılarak saflaştırılana kadar buzdolabında saklanmıştır. Dışkıda ookist görülme-yene kadar farelerin dışkıları toplanmıştır.

9) Eğer deney için fazla miktarda ookiste ihtiyaç varsa ve toplanan dışkılardan asit-fast ile yapılan preparatlarda az miktarda ookist gözleniyorsa, farelerin suyuna her 3 günde bir suda çözülebilir deksametason (deksametason 21-fosfat; sigma D1159-1G) 0.004 g/250mls küçük su şişesi için; 0.008 g/500 ml büyük su şişesi için konulabilir.

Deksametason solüsyonu hazırlamak için önce distile su steril edilir. 16 µg deksametason 21-fosfat 1 ml steril distile su içinde olacak şekilde hazırlanır.

3.2.1.1.(1).(a). *Cryptosporidium* spp. Ookistleri İçin Asit-Fast Boyama Yöntemi

Cryptosporidium spp. ookistleri için asit-fast boyama yöntemi kullanılmıştır (Shoaib ve ark, 2003).

- 1) Lam üzerine preparat hazırlanır ve kurutulur. Preparat kalın olmamalıdır.
- 2) Alevden 3 kez geçirilerek veya % 100'lük methanol ile tespit edilir.
- 3) 5 dakika Kinyon'un karbol fuksin boyası ile boyanır.
- 4) Preparat boyadan alınır ve suyla yıkanır (Suyun rengi berraklaşınca-yaya kadar ~3 dakika)

5) Preparat, % 10'luk H_2SO_4 veya TB renk giderici ile ~30-40 saniye renk giderimi edilir (Bu işlem sırasında ookistler dışındaki organizmalar boyayı bırakır.

Dekolorizasyon aşırı yapılırsa ookistler de boyayı bırakabileceğinden dikkatli olunmalıdır).

6) 2-5 dakika zıt boya olarak TB Brilliant Green Counter Stain veya Malaşit yeşili ile boyanır (Ookistler dışındaki organizmalar ve preparat zemini yeşile boyanır).

7) Preparat su ile yıkanır ve kurutulur.

8) Önce x 40 objektif kullanarak yeşil zemin üzerinde parlak pembe-kırmızı renkte ookistler aranır. Ookistler x 100 objektifle incelenir ve en az 20 değişik alan taranarak ookist skoru belirlenir.

3.2.1.1.(1).(b). Asit-Fast Yöntemi ile Boyanmış Preparatta Ookist Skorunun Belirlemesi:

≤ 10 = (+)

≤ 25 = (++)

≤ 50 = (+++)

≤ 100 = (++++)

>100 = (+++++)

3.2.1.1.(1).(c). Karbol Fuksin Hazırlanışı

Karbol Fuksin: 4 gram

Fenol Kristal: 8 gram

% 95 Ethanol: 20 ml

Distile su: 100 ml

Karışım 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 1 saat karıştırmadan bekletildikten sonra kullanılmalıdır.

Karışım koyu renkli bir şişenin içine hazırlanmalı yada şişe aliminyum folio ile sarılmalıdır. Karışım hazırlandıktan sonra manyetik karıştırıcıda en az 30 dakika karıştırılır. 1 saat veya 1 gece bekletildikten sonra kullanılır.

3.2.1.1.(1).(d). Ookistlerin Fare Dışkılarından İzole Edilmesi

Toplanan dışkılarından ookistleri saflaştırmak için Nycodenz (Histodenz) Discontinuos Gradient Saflaştırma yöntemi kullanılmıştır (Widmer ve ark, 1998). Farklı derecede oluşan gradientten yararlanılarak ookistler diğer tüm bakteri, mantar ve artıklardan arındırılmıştır. Ookistleri daha da saf hale getirmek için Immuno Magnetik Separasyon (IMS) kullanılmıştır (Rochelle ve ark, 1999). Bu yöntemlerin yapılışı aşağıdaki gibidir.

3.2.1.1.(1).(e). Nycodenz (Histodenz) Gradient Saflaştırma Yöntemi (Ultrasantrifüj Yöntemi)

1) Falkon tüpündeki tüm dışkı örneklerine 15 ml ye gelinceye kadar distile su konulup dışkı iyice homojenize olana kadar vortekslenir.

2) Steril distile su (dH₂O) veya PBS (Fosfat Tampon Salin) kullanılarak % 15 ve % 25'lik (w/v) iki ayrı Nycodenz çözeltisi hazırlanır.

3) 30 ml'lik tüp için, önce 8 ml % 15 Nycodenz çözeltisi tüplere dağıtılır.

4) 9 ml % 25'lik Nycodenz pipette çekilir ve pipet tüpün dibine daldırılır. Çözeltinin 8 ml'si çok yavaş bir şekilde tüpün dibinden ve pipetin içinde 1ml sıvı kalıncaya kadar doldurulur (Tüpün içine hava kabarcığı yollanacak olursa iki sıvı birbirine karışır ve oluşturulan tabaka (Gradient) yok olur).

5) Tüp sarsılmadan elle tutulup tabakanın oluşup oluşmadığı kontrol edilir.

6) Homojenize edilmiş dışkı pastör pipeti yardımıyla üstten çok yavaş olarak eklenerek tabaka oluşturulur. En son tüpte kalan dışkı kalıntısı biraz steril distile su eklenerek yıkanır ve tüpe eklenir.

7) Tüplerin aynı dengede olup olmadıkları kontrol edilir. Gerekirse dH₂O eklenerek tüpler dengelenir.

8) Tüplerin dış kısmı alkolle silinir ve 1'den 6'ya kadar numaralandırılmış metal adaptörlerin içine, çalkalanmadan ve sırasıyla yerleştirilir.

9) Metal adaptörlerin vidalı kapakları yerleştirilip sıkıca kapatılır.

10) SW28 rotor'una yerleştirilir.

11) 1 saat, 10.000 rpm'de, 10°C'de santrifüj edilir.

12) Metal adaptörler çalkalanmadan vidalı kapakları açılır. İçerisine yerleştirilen tüpler çıkarılarak uygun bir spora yerleştirilir.

13) Gradientin oluşturulduğu yerde nispeten beyaz renkte görülen tabaka ince uçlu plastik pastör pipeti yardımıyla toplanarak 15 ml'lik plastik tüplere aktarılır.

14) Toplanan örnek hacminin en az iki katı hacimde steril distile su ilave edilir (5 ml örnek için 10-15 ml). Tüpün kapağı kapatılıp birkaç kez alt/üst edilerek karıştırılır.

15) 4000 rpm'de 15 dakika, 10°C'de santrifüj edilir.

16) Üstteki sıvı dipte en az 300-500 µl sıvı kalacak şekilde, dipteki çöküntüye dokunulmaksızın aspire edilerek atılır.

17) Tüpe hafifçe vurularak dipteki çöküntü karıştırılıp homojenize edilir. Gerekirse distile su veya ookist saklama solüsyonu ilave edilir.

18) Buz üzerine yerleştirilir ve Toma lamı (Hemasitometer) ile ookistler sayılır.

19) Tüplerin üzerine izolatın adı, ookist konsantrasyonu ve izolasyon tarihi yazılır.

Nycodenz ile saflaştırılmış ookistler +4 °C'de 3-4 ay saklanabilir. DNA hazırlamak için kullanılabilir. İstenirse IMS yöntemi ile ileri saflaştırma yapılır. Nycodenz yönteminde Çizelge 3.1'de verilen yüksek devirli santrifüj kullanma rehberinden yararlanılmıştır.

Çizelge 3.1. Yüksek devirli santrifüj kullanma rehberi

Santrifüj Tüpü	Rotor tipi	% 15 Nycodenz (ml)	% 25 Nycodenz (ml)	Örnek hacmi (ml)	Santrifüj hızı (Rpm)
SW60	SW60	1.5	1.5	1.0	35.000
SW50	SW50	2	2	1-1.5	35.000
SW41	SW41	5	5	2-3	28.000
SW28Ti	SW28	3	3	6	10.000-20.000
SW28i	SW28	9	8	2-6	10.000

Nycodenz (Histodenz) Gradient Saflaştırma Yönteminde Gerekli Solüsyonlar: Nycodenz (Histodenz-Sigma D2158) toz halinde -20 °C'de saklanır. Nycodenz (% 15) 15 gram Nycodenz tartılır ve üzerine 100 ml distile su eklenir ve karıştırılır.

Nycodenz (% 25) 25 gram Nycodenz tartılır ve üzerine 100 ml distile su eklenip karıştırılır. Her iki solüsyonda +4 °C’de saklanır.

Bu yöntemde kullanılacak ultrasantifüj yoksa, örnekler falkon tüpleri içinde hazırlanarak, 2000 G yada daha yüksek devirlere çıkabilen normal, açılır rotorlu santrifüjde kullanılabilir. Fakat elde edilen ookist bandı çok temiz olmayabilir.

3.2.1.1.(1).(f). NaCl₂ Yüzdürme Metodu

1) Dışkı eşit hacimde distile su ile homojenize edilir ve iki katlı gazlı bezden geçirilerek temiz bir tüpe süzülür.

2) 2000 G’de 10-15 dakika +4 °C’de santrifüj edilir.

3) Üstteki sıvı atılır. Çökelti tekrar distile su ile sulandırılır..

4) Dışkının miktarına göre 2-10 ml eter eklenir ve 1 dakika iyice karıştırılır.

5) 2000 G’de 10-15 dakika +4 °C’de santrifüj edilir.

6) Üstteki eter kısmı dikkatlice atılır. 1-2 ml sıvı kalıncaya kadar sıvı kısmı da atılır. Çökelti tekrar distile su ile süspanse edilir. 30 ml dışkı için, 60 ml (iki kat) doymuş NaCl₂ eklenip, tüp alt üst edilerek ve 15-20 saniye vorteks kullanılarak karıştırılır.

7) Örnek, 2000 G’de, 15 dakika +4 °C’de açılır rotoru olan santrifüj kullanılarak santrifüj edilir.

8) Üstteki sıvı dikkatli bir şekilde toplanır ve ağzına iki katlı gazlı bez yerleştirilmiş temiz bir tüpe aktarılır. Gazlı bez atılır.

9) Örneğe 3 hacim (1 ml örnek için 3 ml distile su) distile su eklenir. Karıştırılır ve 2000 G’de 15 dakika +4 °C’de santrifüj edilir.

10) Üstteki sıvı dikkatli bir şekilde atılır. Çökelti az miktarda distile su ile sulandırılır. Bu aşamada, preparat hazırlanarak asit-fast boyama yapılır ve örnekte ookist olup olmadığı kontrol edilir.

11) Eger örnek başka bir merkeze yollanacaksa, örnekteki muhtemel bazı patojenleri etkisiz hale getirmek için, çökeltiye az bir miktar distile su daha eklenir ve homojenize edilmiş dışkının üzerine eşit hacimde % 20’lik sitrik asid solüsyonu eklenir (son konsantrasyon % 10). Vorteks yardımı ile 15-20 saniye karıştırılır. 20

dakika bekletildikten sonra 4000 G'de 15 dakika +4 °C'de santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Çökelti bir miktar distile su ile homojenize edilir.

12) Örnek buz üzerine alınır ve Toma lamı kullanılarak ookist sayısı hesaplanır. Ookist saklama solüsyonu içinde +4 °C'de bir kaç ay saklanır yada DNA hazırlanması için kullanılır.

Doymuş NaCl₂ Solüsyonu

393 gram NaCl₂

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

30 dakika oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılır. En az 1 saat çözülmemiş NaCl₂'un dibe çökmesi için beklenir. Kullanılacağı zaman karıştırılmadan üstteki sıvı kısım alınır.

Antibiyotik solüsyonu:

% 0.01 Tween 20

100 U Penisilin/ml

100 µg Streptomisin/ml

100 µg Gentamisin/ml

Ookist Saklama Solüsyonun Hazırlanışı:

Pen+Strep sol 1 ml

Tween-20 10 µl

PBS 99 ml

Toplam 100 ml (Widmer ve ark, 2004)

3.2.1.1.(1).(g). İmmüno Manyetik Ayırma (IMS) İşlemi

1) Tampon A kullanıma başlamadan 30-60 dakika önce kristallerin çözülmesi için arada bir çalkalanarak oda sıcaklığına getirilir.

2) 10. adımda yıkama tamponu olarak kullanmak üzere "Tampon A" 1:10 oranında (900µl dH₂O+ 100µl Tampon A) sulandırılır.

3) Saflaştırılacak ookist solüsyonu "Leighton tüpü"ne aktarılır.

4) 1 ml örnek için: 100 µl Tampon A+100 µl Tampon B + 20-30 µl *Cryptosporidium* antikorları ile kaplanmış boncuk (Immunomagnetik beads) solüsyonundan eklenir. Immuno manyetik boncuk solüsyonu kullanılmadan önce köpürtmeden karıştırılmalıdır.

5) Leighton tüpü çalkalayıcı yada rotatora yerleştirilerek, oda sıcaklığında yaklaşık 20 rpm'de 1-3 saat döndürülür.

6) Leighton tüpü rotatordan alınıp düz kısmı manyetik standı denge gelecek şekilde yerleştirilir.

7) Çok yavaş alt-üst edilerek 5 dakika karıştırılır

8) Leighton tüpü manyetik standtan uzaklaştırılmadan tüpün içindeki sıvı temiz bir tüpe boşaltılır.

9) Leighton tüpü manyetik standtan uzaklaştırılır. 1:9 oranında sulandırılmış 500 µl Tampon A Leighton tüpünün içine boşaltılır.

10) Tüp alt/üst edilerek manyetik boncuklar toplanmaya çalışılır. Tüpün içeriğinin tamamı 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılır.

11) 8. adımdaki örnek kullanılarak 6-10. adım bir kez daha tekrarlanır

12) Ependorf tüpünün ağzı kapatılır ve ependorf tüpü için hazırlanmış manyetik standı yerleştirilir. Yaklaşık 5 dakika beklenir.

13) Boncukların hepsi mıknatıs bölgesine yapıştığı zaman, çok yavaşça, boncukları rahatsız etmeden sıvı uzaklaştırılır.

14) Ependorf tüpü manyetik standtan çıkarılır. Önceden 37 °C'de ısıtılmış olan 25 µl 0.1N HCl eklenir ve tüp 5 saniye vortekslenir. (0.1 N HCl yerine 0.05 mM HCl kullandığımızda daha iyi sonuçlar aldık)

15) 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Tekrar 5 saniye vortekslenir. Ependorf için olan manyetik standı yerleştirilir.

16) 5 dakika beklenir. Manyetik boncukları rahatsız etmeyecek şekilde sıvı yavaşça mikropipetle aspire edilip, temiz bir ependorf tüpüne aktarılır.

17) İstenirse, daha çok ookist elde etmek için 14.-16. adımlar 1-2 kez daha tekrarlanır.

18) Ookist süspansiyonu, 5 µl 2N NaOH kullanılarak HCl nötralize edilebilir.

19) Ookistlerin toplandığı tüpe 500 µl steril dH₂O veya PBS eklenir ve karıştırılır

20) 8000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilir.

21) Tüpün dibinde 100 µl sıvı kalıncaya kadar üstteki sıvı atılır ve tüpe tahmin edilen ookist sayısına göre en az 200 µl-1ml dH₂O veya PBS eklenir.

22) Toma lamı kullanılarak oosistlerin sayısı belirlenir.

3.2.1.1.(2). Ookistlerin yüzeysel sterilizasyonu ve eksistasyonu

Ookistler % 10’luk sodyum hipokloritle (Jae-Ran YU ve ark, 2000) muamele edildikten sonra Eksistasyon Metodu (Robertson ve ark, 1993) modifiye edilerek uygulanmıştır. % 10’luk sodyum hipokloritle yüzeysel sterilizasyon için:

1) 10⁷ ookist 1 ml alınır. 8000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilir. Alttaki çökeltiyi dokunulmaksızın supernatant uzaklaştırılır. (Dipte 100 µl ookist çökeltisi kalana kadar)

2) 100 µl ookist çökeltisi + 100 µl taze % 98’lik sodyum hipoklorit + 800 µl distile su karıştırılıp 7 dakika buz üzerinde bekletilir.

3) 8000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilip üstteki sıvı atılır ve 1 ml steril 1x PBS veya distile su ile aynı işlem tekrarlanıp ookist çökeltisi 2 kez yıkanır.

Eksistasyon için kullanılacak solüsyon ookist çökeltisinin üzerine ilave edilir. Eksistasyon solüsyonu 0.015 g taurocholi acid (TA- Sigma T9034) +900 µl 1xPBS ten oluşmaktadır. Bu çalışmada PBS yerine sitomiks tamponu (Maurice J. B. van den Hoff ve ark, 1992) kullanılmıştır. Yüzeysel sterilizasyon sonucunda elde edilen 100 µl lik ookist çökeltisi üzerine TA/cytomix; TA/cytomix:RPMI-1640 ortamı (1:1) ve TA/ RPMI-1640 ortamı şeklinde hazırlanmış eksistasyon solüsyonları 900 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Daha sonra su banyosunda 37 °C’de 45 dakika bekletilip eksistasyon gerçekleştirilmiştir.

Deneye başlarken sitomix tamponu aşağıda verildiği gibi hazırlanmıştır.

Sitomix Tamponu

120 mM KCL

0.15 mM CaCl_2

10 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4

25 mM Hepes

2 mM EGTA

5 mM MgCl_2

ATP 2 mM

Glutathionin 5 mM

pH 7.6'ya 10 M KOH kullanılarak ayarlanmıştır. (Maurice J. B. van den Hoff ve ark, 1992).

Sitomiks tamponunun her bir kimyasalı için $G = V \times F \times W \times M$ (G=gram, V= litre cinsinden hacim, FW= kimyasalın moleküler ağırlığı) formülünden yararlanılarak kendi stok solüsyonu 1 M konsantrasyonunda hazırlanmıştır. pH'leri 7.6'ya ayarlanıp, steril filtasyonları yapıldıktan sonra tüm bu kimyasallar eşit oranda karıştırılmıştır.

Stok ATP (sigma A-9187) 100 mM ve stok Glutathioinin (G-4501) 100 mM konsantrasyonlarında hazırlanıp ependorf tüplerine 1000 μl olacak şekilde dağıtılıp kullanılana kadar -20°C 'de tutuldu.

Önce her bir eksistasyon solüsyonu içinde ookistlerin eksiste olup olmadıkları gözlemek için Çizelge 3.2 gösterilen deney dizayn edilmiştir.

Çizelge 3.2. Farklı eksistasyon koşulları

TA/Sitomiks	TA/sitomiks:RPMI-1640 ortamı (1:1)	TA/RPMI-1640 ortamı
20 μl 10^6 ookist solüsyonu + 40 μl TA/sitomiks solüsyonu	20 μl 10^6 ookist solüsyonu + 40 μl TA/sitomiks:RPMI-1640 besi ortamı (1:1)solüsyonu	20 μl 10^6 ookist solüsyonu + 40 μl TA/sitomiks:RPMI-1640besi ortamı

Çizelgede 3.2’de gösterilen her bir örnek 45 dakika 37 °C’de su banyosunda tutulmuştur. 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilip, supernatant 200 µl kalana kadar uzaklaştırılmıştır. Işık mikroskobu altında toma lamı kullanılarak açığa çıkan sporozoitlerin 1ml’deki sayıları tespit edilerek existasyon oranları belirlenmiştir.

Eksistasyon oranı= Sporozoit /sağlam ookist x100

Eksistasyon oranı= boş ookist/sağlam ookistx100 orantısına göre TA/sitomiksin % 60; TA/sitomiks:RPMI-1640besi ortamının (1:1) % 80; TA/ RPMI-1640 besi ortamı % 70 oranında eksiste olduğu tespit edilmiştir.

Dolayısıyla lipofektamin deneyinde kullanılacak ookistler TA/sitomiks:RPMI-1640 besi ortamı (1:1) içerisinde eksiste edilmiştir.

3.2.1.1.(3). Ookistlerin DNA izolasyonu için hazırlanması

IMS ile tamamen saflaştırılmış *C. parvum* oosistlerinden DNA elde etmek için önce ookistler % 10’lik sodyum hipoklorid ile muamele edilmiştir. Sonra aynı örnek Existasyon Metodu (Robertson ve ark, 1993) kullanılarak eksiste edilip -80 °C’de 10 dakika, 37 °C su banyosunda da 10 dakika tutulmuştur. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. İki kez dondurulup çözmekle existasyon sırasında eksiste olmayan ookistlerin kalın duvarları parçalanarak sporozoitlerin açığa çıkması dolayısıyla DNA izolasyonunun kolaylaştırılması amaçlanmıştır.

3.2.1.1.(3).(a). Ookistlerden DNA izolasyonu

Eksiste edilmiş sporozoitler kullanılarak Puregene (GENTRA) Cell and Tissue (Kat No: D5000A) uyarlanmış genomik DNA izolasyon kiti 10⁷ ookist içeren 200 µl örnek için değiştirilmiştir.

Örnek 3 kez -80 °C’de dondurulup, 37 °C’de yukarıda anlatıldığı şekilde eritilmiştir.

- 1) 1 ml hücre parçalayıcı solüsyonu, eklenir ve vorteksle karıştırılır
- 2) 20 µl proteinaz K eklenir ve karıştırılır.
- 3) 55°C’de 3 saat inkübe edilir (bir gecelik inkübasyon daha iyi sonuç verir)
- 4) 7 µl RNaz A eklenir ve tüp en az 25 kez alt-üst edilerek karıştırılır.
- 5) 37°C’de 20 dakika inkübe edilir

- 6) Tüp 3 dakika buz üstünde bekletilir.
- 7) 400 µl protein çöktürme solüsyonu eklenir ve 20 saniye şiddetli olarak vorteksle karıştırılır.
- 8) 5 dakika buz üzerinde bekletilir.
- 9) 14 000 G'de, 4 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilir.
- 10) Santrifüjden sonra tüpün dibinde görülen beyaz çökeltiye dokunmaksızın üstte kalan sıvı kısım temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne veya iki ayrı ependorf tüpüne konur.
- 11) Bu tüpün üzerine 7500-1000 µl % 100 izopropanol ve 4 µl pink pellet solüsyonu eklenir ve 50 kez alt-üst edilerek karıştırılır.
- 12) 14 000 G'de, 10 dakika santrifüj edilir
- 13) DNA küçük beyaz çökelti halinde görülür.
- 14) Üstteki sıvı yavaşça dökülür ve fazla sıvı beyaz çöküntü rahatsız edilmeden, filtre kağıdı ile alınır.
- 15) 1 ml % 70'lik etanol eklenir
- 16) Tüp bir kaç kez ters çevrilerek karıştırılır.
- 17) 14 000 G'de, 4 dakika santrifüj edilir.
- 18) Etanol çöküntüyü kaybetmemek için dikkatlice dökülür.
- 21) Tüpteki kalan sıvı beyaz çöküntü rahatsız edilmeden filtre kağıdı ile alınır.
- 22) 7 dakika tüpün ağzı açık bırakılarak kurutulur.
- 23) DNA'yı tüp içinde toplamak için 20µl DNA hidrasyon solüsyonu eklenir.
- 24) 65°C'de 1-2 saat veya 1 gece oda sıcaklığında arada bir tüpe vurularak DNA'nın çözülmesi sağlanır.

3.2.1.1.(4). DNA'nın Restriksiyon enzimleriyle (NcoI, SpeI) kesilmesi

İzole edilen bu DNA'lar restriksiyon enzimleri yardımı ile Çizelge 3.3'te gösterildiği şekilde (SpeI, NcoI) kesilmiştir (Sambrook ve ark, 1989; Sulaiman ve ark, 1998; Guyot ve ark, 2002). 85 voltta 1 saat 15 dakika elektroforez tankında yürütülmüştür.

Çizelge 3.3. NcoI, SpeI restriksiyon enzimleriyle DNA'nın kesilmesi protokolü

	Kontrol (kesilmeyen vektör)	Kesilen Vektör
H ₂ O	8 µl	6 µl
BSA(10X)	2 µl	2 µl
DNA	8 µl	8 µl
NE2 Tamponu(10X)	2 µl	2 µl
Enzim (NcoI ve SpeI)	-	1 µl NcoI, 1 µl SpeI
Toplam hacim	20 µl	20 µl

3.2.1.2. Plazmidlerin Lipofektamin Yöntemi İçin Hazırlanması

3.2.1.2.(1). Plazmidlerin DH5αTM *Escherichia coli* Kompetent bakterilerine Transformasyonu

Plazmidlerin bakterilere transformasyonu için Subcloning EfficiencyTM DH5αTM kompetent Hücre (Kat no: 18265-017, invitrogen chemically Competent Cells) ve One shot Topo Cloning Kompetent Hücre (İnvitrogen Kat no: 45-0030) kitleri kullanılmıştır.

3.2.1.2.(1).(a). Subcloning EfficiencyTM DH5αTM Kompetent Hücre Kiti

Şekil 3.4. DH5αTM kompetent hücre kiti ile transformasyon deney düzeneği

1) Öncelikle firmadan liyofilize halde gelen plazmidlere steril distile su ilave edilerek stokları hazırlandı. Örneğin: Cryptoconstruct-GFP vektör 10 µg/µl liyofilize haldeydi. Üzerine 100 µl steril distile su ilave edildi ve böylece 0.1 µg/1 µl stok plazmid DNA'sı elde edildi. Stok -20°C'de saklandı. Bu stoktan kontaminasyonu engellemek amacıyla tekrar 1:100 oranında sulandırma yapıp 1ng/1 µl olacak şekilde plazmid DNA'sı bakteriye transforme edildi.

2) DH5αTM kompetent *E.coli* hücreleri -80 °C'den çıkarılıp, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konur. Tüm işlemlerin buz üzerinde yapılmasına dikkat edilmelidir.

3) 1-5 µl (1-10ng) Plazmid DNA'sı *E.coli*'nin bulunduğu mikrosantrifüj tüpüne konulur ve pipetle alt üst edilmeksizin tüpün dışına parmakla yavaşça vurularak alt üst edilir. Bu çalışmada transformasyon için 2 µl Plazmid DNA'sı kullanılmıştır.

4) Deneyde Subcloning EfficiencyTM DH5αTM kompetent hücre kitinde bulunan pozitif kontrol pUC19 DNA'sından 2.5 µl (250 pg) *E.coli*'nin bulunduğu mikrosantrifüj tüpüne konulur ve pipetle alt üst edilmeksizin tüpün dışına parmakla yavaşça vurularak alt üst edilir.

5) Bu tüpler 30 dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra 20 saniye 37°C'lik su banyosunda bekletilir. Tüpler hiç bekletilmeksizin buz üzerine alınıp 2 dakika buz üzerinde inkübe edilir.

6) Her bir tüpe oda sıcaklığında bulunan 950 µl SOC medium ilave edilir.

7) Tüpler yatay olarak 37°C'de ve 225 rpm'lik çalkalayıcıda 1 saat tutulur.

8) pUC19 pozitif kontrolün olduğu tüp 100 µl olarak içinde ampisilin bulunduran LB agar playtlerine dağıtılır. Diğer örneklerin bulunduğu tüpler ise 50 µl veya 100 µl olacak şekilde içinde uygun seçici antibiyotik içeren agar plaklarına aktarılır.

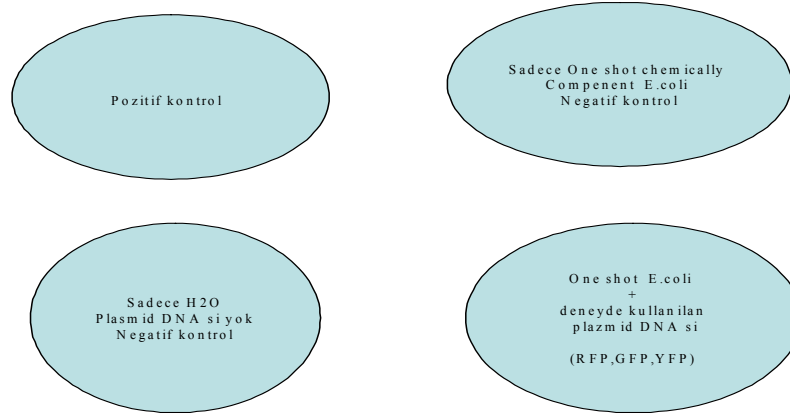
9) Kalan transformasyon karışımı istenirse bir gün sonra kullanılmak üzere + 4°C'de saklanabilir.

10) Ekilmiş agar petrilere 37°C'lik inkübatörde 24 saat bekletilir.

11) Bir gece inkübasyondan sonra agar plaklarındaki kolonilerden seçilerek transformantların hedef plazmid DNA'sını içerip içermedikleri direk PCR ile kontrol

edilebilir veya plazmid izolasyonu yapıp restriksiyon enzimleriyle kesilerek doğrulanır.

3.2.1.2.(1).(b). One Shot Topo Cloning Kompetent Hücre Kiti



Şekil 3.5. One shot Topo Cloning kompetent hücre kiti ile transformasyon deney düzeneği

Bu kit kullanılırken Çizelge 3.4'te verilen ligasyon protokolü dikkate alınmıştır.

Çizelge 3.4 One shot Topo Cloning kompetent hücre kiti için ligasyon protokolü

	Kimyasal kompetent <i>E. coli</i>
Taze PCR ürünü	0.5-4 µl
Tuz Solüsyonu	1 µl
Steril su	Toplam hacime ulaşana kadar tamamla
TOPO vektör	1 µl
Toplam hacim	6 µl

Çizelge 3.4'te belirtilen PCR ürününün yerine 2 µl plazmid DNA'sı kullanılmıştır.

1) Ligasyon

Plazmid DNA'sı	2 µl
Tuz solüsyonu.....	1 µl
TOPO vektör.....	1 µl
DePC li Su.....	2 µl
Toplam hacim	6 µl

2) One shot kimyasal kompetent *E coli*'nin olduğu tüpler örnek sayısına göre - 80°C'den çıkarılıp buz üzerine konulur. Yukarıda hazırlanan ligasyon karışımından 2 µl her bir örnek için alınıp kompetent *E coli*'nin olduğu tüplere ilave edilir. Pipetle alt üst edilmeksizin oldukça nazık bir şekilde parmak ucuyla tüpe vurularak karıştırılır.

3) Bu karışım 5-30 dakika buz üzerinde bekletilir.

4) Karışım çalkalanmaksızın 42°C'de 30 saniye şok olarak ısıtılır ve derhal buz üzerine transfer edilir.

5) 250 µl oda sıcaklığındaki S.O.C besi ortamı bu karışımın üzerine eklenir.

6) Tüpün kapağı sıkıca kapatılıp yatay olarak çalkalayıcıda 200 rpm'de 37 °C'de 1 saat çalkalanır.

7) Buzdolabından çıkarılan LB agar+ ampisilin besiyerleri oda sıcaklığında veya 37°C'lik inkübatörde yarım saat bekletilir. Bu besiyerlerine transformasyon tüplerinden 50-100 µl alınıp ekim yapılır.

8) Ampisilin içeren plaklar en az 8 saat, kanamisin içeren plaklar ise 24 saat 37°C'lik inkübatörde bekletilmelidir.

9) Bu kolonilerin hedef plazmidi içerip içermedikleri direk PCR ile kontrol edilebilir veya plazmid izolasyonu yapıp restriksiyon enzimleriyle kesilerek doğrulanır.

3.2.1.2.(2). Transformantların Çoğaltılması

LB agar petrisinden numara verilerek birbirinden bağımsız üremiş tek koloniler öze yardımıyla alınarak, içerisinde 5 ml LB sıvı ortamı bulunan tüplere konur. 37°C’de 220 dönme hızına sahip çalkalayıcıda 24 saat çalkalanarak karıştırılmıştır.

3.2.1.2.(2).(a). LB agar + Ampisilin Besiyerinin Hazırlanması

1) 7.5 g LB agar besiyeri + 500 ml distile su 1000 ml’lik payreks şişelere konur, iyice karıştırıldıktan sonra kapağı fazla sıkı kapatılmaksızın otoklav bandı yapıştırılarak 121°C’de 2 saat otoklavda steril edilir (Steril edilmiş bu ortam 2 ay kadar oda sıcaklığında bekletilebilir).

2) Otoklavdan çıkarılıp 20 dakika oda sıcaklığında bekletilir.

3) Su banyosu 50°C’ye ayarlanıp LB agar 1-2 saat burada tutulur.

4) 250 µl ampisilin (100 mg/ml) LB agara eklenir ve besiyeri şişesinin ağzı alevden geçirilip hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek petri kaplarına dökülür. Bir gece oda sıcaklığında tutulup amaca göre kullanılır.

5) Bu agar playtleri 4°C’de buzdolabında plastik torbalar içinde 2-3 hafta saklanabilir.

Çoğalttığımız kolonilerin gerçekten transforme olan koloniler mi olduğunu belirlemek için, inkübasyonu tamamlanmış 5 ml’lik bakteri kültürlerini içeren tüpler kullanılarak miniprep kitiyle plazmid izolasyonuna gidilir. 5ml’lik bakteri kültürünün 3ml’si izolasyon için, 1ml’si eğer gerçekten doğru transformantlarsa stok için, geriye kalan 1ml’si ise daha büyük miktarlarda LB-sıvı ortamlarına aktarılıp daha fazla plazmid izolasyonunu gerçekleştirmek için kullanılmıştır.

Plazmid olarak pCMV- DsRed-Ekspres (PT3682-5 Kat no 6995-1) vektör kullanıldığında seçici antibiyotik olarak kanamisin 50 µg/ml kullanılmıştır.

Öncelikle kanamisin stoğu 50 mg/ml olarak hazırlanıp, daha sonra deney sırasında kullanılmak üzere 50 µg/ml olacak şekilde sulandırılmıştır. Örneğin 250 ml lik LB agar besi yerine eklenecek kanamisin miktarı aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$50 \text{ mg} \times X = 50 \text{ µg} \times 250 \text{ ml}$$

X= 250 µl kanamisin gerekmektedir.

3.2.1.2.(2).(b). Plazmid İzolasyonu

Çoğaltılan plazmidler Eppendorf® Perfectprep® Plazmid İzolasyon Kiti (Kat No: 955150007) ve Modifiye edilmiş Qiagen Maxipreps kullanılarak izole edilmiştir.

3.2.1.2.(2).(b).(a). Eppendorf® Perfectprep® Plazmid İzolasyon Kiti (Kat No: 955150007)

Daha az miktarda plazmid konsantrasyonuna ihtiyaç duyulduğu zaman bu metod kullanılır. Kısa süre alması ve daha az kimyasal harcanması gibi nedenlerden dolayı eğer sadece plazmidin varlığı kontrol edilecekse bu yöntemi kullanmak avantajlıdır.

- 1) 3 ml çoğaltılmış plazmid kültüründen alınıp 3500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilir.
- 2) Üst sıvı atılıp çöküntü üzerine 100 µl solüsyon I (Buffer RNaz A) eklenerek vorteksle karıştırılır ve 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
- 3) 100 µl Solüsyon II (Alkalin Lizis) eklenerek yavaşça ters çevrilip karıştırılır.
- 4) 100 µl Solüsyon III eklenerek kuvvetli bir şekilde ters çevrilip karıştırılır.
- 5) 30 saniye 8000 rpm’de santrifüj edilir ve üstteki sıvı toplama tüpündeki spin kolumuna boşaltılır.
- 6) Üzerine 450 µl DNA bağlayıcı matriksi ilave edilip karıştırılır (DNA Bağlayıcı Matriks solüsyonunu kullanılmadan önce kuvvetli bir şekilde alt üst edilerek iyice karıştırılır).
- 7) Bu tüpler 8000 rpm’de 30 saniye santrifüj edilir ve toplama tüpünde birikmiş olan sıvı atılarak spin kolum tekrar toplama tüpüne konulur.
- 8) Spin kolumunun üzerine 400 µl sulandırılmış Saflaştırma Solüsyonu ilave edilip kısaca çalkalanır ve 8000 rpm’de 60 saniye santrifüj edilir.
- 9) Toplama tüpünde birikmiş olan sıvı atılarak spin kolum tekrar toplama tüpüne konulur. Yine 8000 rpm’de 60 saniye santrifüj edilir.
- 10) Spin kolum buradan alınıp temiz ve yeni bir toplama tüpüne konulur. 50 µl elüsyon buffırı (TE) veya steril distile su spin kolumun üzerine ilave edilip 1 dakika oda sıcaklığında tutulur.

11) Kısaca vortekslenip, 8000 rpm’de 60 saniye santrifüj edilir. Spin kolum atılıp, toplama tüpünün kapağı kapatılarak kısa süreli kullanımlar için +4°C’de, uzun süreli saklamak için ise - 20 °C’de saklanır.

3.2.1.2.(2).(b).(b). Modifiye Edilmiş Qiagen Maxipreps

LB agar besiyerlerinden doğruluğu tespit edilmiş koloni direk olarak veya 5ml’lik LB sıvı besiyerinden 1ml alarak, 50 ml LB sıvı + ampisilin (veya uygun antibiyotik) içeren 250 ml’lik plastik şişelere ekim yapılır .

1) 24 saat 37°C’lik etüvde inkübe edildikten sonra steril bir şekilde 600 µl gece boyu çoğaltılmış bu kültürden alınıp 1.5 ml’lik kryovial tüplerine konur. Bu tüpün üzerine 200 µl % 60 steril gliserol ilave edilip vortekslenir ve -80°C’de saklanır (gliserol stok). Tüpün üzerine palzmidin adı ve tarihi muhakkak yazılmalıdır.

2) Gliserol stok yapıldıktan sonra geriye kalan bakteri kültürü 50 ml’lik falkon tüplerine alınır. 4000-4500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek çökelti oluşturulur.

3) Bu çökelti üzerine 20 ml soğuk P1 tamponu konulup vortekslenerek çökeltinin çözülmesi sağlanır.

4) Bu karışımın üzerine 20 ml P2 tamponu konulur vortekslenmeksizin sadece ters düz edilerek karıştırılır ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.

5) Daha sonra 20 ml P3 tamponu da konulup ters düz edilerek karıştırılır ve 4000-4500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilir.

6) Eğer tüpün dibinde kalın, üstünde ise beyaz bir çökelti mevcutsa üsteki bu beyaz kısım toplanıp atılır. Dikkatli bir şekilde sıvı kısım (DNA’nın bulunduğu kısım) maksiprep QIAfilter ünitesine boşaltılır ve supernatant yeni tüpe filtre edilir.

7) 6. aşamada santrifüj işlemi yapılırken Qiagen Maksiprep kolumu hazırlanır. 10 ml QBT buffir equilibrat kolumuna aktarılıp süzülmesi beklenir.

8) 7. aşamada filtre edilerek temizlenmiş supernatant 8. aşamada hazırlanmış columa (QBT tamponunununkolumdan tamamen süzölmüş olması gerekir) ilave edilir ve tamamen süzölməsi beklenir.

9) 30 ml QCtampon eklenir ve süzöldükten sonra diğeri bir 30 ml QC tamponuda ilave edilip tekrar süzölür.

10) 15 ml QF tamponu eklenip DNA 50ml'lik falkon tüpüne süzülmesi beklenir.

11) Bu DNA nın üzerine 15 ml izopropanol konur ters çevirerek alt üst edilip iyice karıştırıldıktan sonra bir gece +4°C'de buzdolabında bekletilir.

12) 4000-4500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilir. Tüpün dibinde gözle görülebilir beyaz çökelti şekillenecektir. Bu çökeltiye dokunulmaksızın üstteki sıvı dikkatli bir şekilde atılır.

13) Mümkün olduğu kadar çok izopropanolün DNA'dan uzaklaştırılması gerekmektedir.

14) 500 µl TE tamponu ilave edilip DNA çözülür ve 5 dakika bekletilir.

15) DNA 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne alınır. Üzerine 55 µl 3M NaOAc (sodyum asetat) ve 600 µl izopropanol eklenip alt-üst edilerek karıştırılır ve bir gece boyunca +4 °C'de buzdolabında bekletilir.

16) 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip DNA çökelti olarak tüpün dibinde toplanır ve supernatant atılır.

17) % 100 etanol konulup alt üst edilir ve bu şekilde 5 dakika oda sıcaklığında tutulur. 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip üst sıvı uzaklaştırılır.

18) Tüpün ağzı açık tutulup tamamen kuruyana kadar (en az 60 dakika) oda sıcaklığında bekletilir.

19) Önce 100 µl TE tamponu konulup DNA çözülür, eğer viskoz ise en fazla 500 µl'ye kadar TE tamponu konulabilir. DNA yı çok fazla sulandırmamak gerekir. Önce konsantrasyonu ölçülüp daha sonra amaca göre tampon eklenmesi daha doğru olur.

3.2.1.2.(2).(c). Plazmid DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Plazmid konsantrasyonlarının DNA dipstik kiti veya spektrofotometre ile ng seviyesinde ölçümü yapılır.

DNA DipstickTM Kit (Kat no: K5632-01,K5632-03)

1) Dipstick membranlarına her bir örneği 1µl olacak şekilde damlatılıp 10 dakika bekletilir.

2) Dipstick küvet 1'e 1 ml temizleme solüsyonu konur. Örnekler bu solüsyonda 10 sn bekletilir.

3) Dipstick küvet 2'ye koupling solüsyonu 1 ml konur ve örnekler bu solüsyonda 3 dakika bekletilir.

4) Steril distile su ile her bir örnek 20 sn yıkanır

5) Örnekler tekrar dipstick küvet 1'e konup 4 dakika bekletilir.

6) Dipstick küvet 3 için 1ml developing solüsyonun içine 1 damla developer damlatılır. Küvet alt üst edilip karıştırıldıktan sonra her bir örnek bu küvette 2 dakika bekletilir.

7) Örnekler dikkatli bir şekilde yıkama solüsyonu içinde 20 dakika bekletildikten sonra normal hava şartlarında kurutulur.

8) Her bir membrandaki renk kitin standartı ile karşılaştırılıp ng seviyesinde ölçüm elde edilir.

3.2.1.2.(2).(d). Transformantların Saklanması

Bakterilere plazmidlerin transformasyonu sonucunda elde edilen rekombinantların saklanması işlemi tıpkı bakteri stoğunda uygulanan işlemler gibidir.

3.2.1.2.(2).(d).(a). Sıvı Besi Yerinde Üreyen Bakteri Kültürünün Stoklanması

1) 1.5 ml bakteri kültürü içerisine 0.5 ml % 60 steril gliserol ilave edilir.

2) Gliserol tamamen karışana kadar vortexlenir. Kapağı burgu şeklinde bükülerek sıkıca kapanan ve havayla teması tamamen kesilmiş tüplere (screw cap) kültür dağıtılır.

3) Gliserollü bakteri kültürü etanol-kuru buz veya sıvı nitrojen yardımıyla dondurulur. -70°C'de uzun süreli olarak saklanır.

4) İhtiyaç duyulduğu zaman bu tüplerin üst yüzeyi öze yardımıyla kazınır ve hiç zaman kaybedilmeksizin LB agar ortamına ekimi yapılır. Kazınan kısım dışında tüp içinde geriye kalan bakteri kültürü derhal -70°C'de saklanır.

3.2.1.2.(2).(d).(b). Katı Besi Yerinde Üreyen Bakteri Kültürünün Saklanması

1) 2 ml steril sıvı LB ortamı bakteri kültürü bulunan agar ortamına ilave edilir. Öze yardımıyla kültür ortamdan kazınarak, içerisinde % 30 gliserol bulunan LB ortamıyla eşit hacimde karıştırılır.

2) Bu karışım tamamen karıştırılınca kadar vortekslenir. Kapağı burgu şeklinde bükülerek sıkıca kapanan ve havayla teması tamamen kesilmiş tüplere dağıtılarak -70°C’de saklanır.

3.2.1.2.(2).(e). İzole Edilen Plazmidlerin Doğrulanması

İzole edilen plazmidlerden Crypto construct GFP vektör DNA’sı Restriksiyon enzimleriyle (NcoI, SpeI) kesilerek, pCMV-DsRed Express Vektör DNA’sı ise diziye özgü primerler kullanılarak PCR tekniğiyle doğrulanmıştır.

3.2.1.2.(2).(e).(a).DNA’nın Kesilmesi Protokolü

DNA’nın kesilme protokolü Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Restriksiyon enzim kullanılarak DNA’nın kesilmesi protokolü

	Kontrol (Kesilmeyen vektör)	Kesilen Vektör
H ₂ O	11 µl	9 µl
BSA (10X)	2 µl	2 µl
Crypto construct GFP vektör DNA’sı (200ng / µl)	5 µl	5 µl
NE2 Buffer (10X)	2 µl	2 µl
Enzyme (NcoI ve SpeI)	-	2 µl (NcoI 1 µl, SpeI 1 µl)
Son hacim	20 µl	20 µl

Restriksiyon enzimle DNA’nın kesilmesi sırasında kullanılan enzim miktarının total hacmin % 10’nunu geçmemesine dikkat edilmelidir.

Kesilen ve kesilmeyen plazmid DNA sıvı içeren eppendorf tüpleri 37°C’de 45 dakika su banyosunda bekletilir. İnkübasyondan sonra her bir tüpten 6 µl alınıp üzerine 3 µl yükleme tamponu (loading dye 6x) ilave edilir. % 1’lik agaroz jele 10 µl olarak yüklenip 85 voltta 1 saat 15 dakika elektroforez tankında yürütülmüştür.

İzole edilen plazmidleri doğrulamak için aynı zamanda Crypto construct GFP vektör dizayn edilirken *C. parvum*'un 5' UTR ile 3'UTR kısmı alınıp araya GFP nin yerleştirildiği (5' UTR +GFP+3'UTR) baz dizisinden sentezlenen primerlerden de yararlanılmıştır.

C. parvum'un 5' UTR ile 3'UTR kısmı esas alınarak CpZF ve CpZR primerleri sentezlenmiştir. *C. parvum* kısmı 215bp, GFP=710 bp , ampikon uzunluğu 925 bp tir.

CpZF: CAAATAACCGTCTACAG 26.38 nmol

CpZR: TGTTGTGCGTTAATCA 35.85 nmol

primerleri aşağıda bahsedildiği şekilde sulandırılmıştır.

Primer stokları 200 pmol olarak hazırlanıp deney sırasında 10 kat sulandırılarak yani 20 pmol olarak kullanılmıştır. Liyofilize haldeki primerleri sulandırırken üzerinde yazılan bilgilerden yararlanılmıştır. 35.85 nmol olarak liyofilize halde gelmiş CpZF primer için gerekli sulandırım şu şekilde hesaplanmıştır.

1 nm 1000 pmol

35.85 nm 35850 pmol

1 μ l 200 pmol stok primer

35850 pmol için $X = 179.3 \mu\text{l}$ 'dir.

179.3 µl steril distile su liyofilize primerin üzerine ilave edilmiştir. Primerlerin bulunduğu tüpün üzerine sulandırım tarihi ve 200 pmol/µl şeklinde yazılmıştır.

200 pmol/ µl stok primerler 10 kat sulandırılarak izole edilen plazmidler, bu primerlerle Real-time PCR’da kontrol edilmiştir.

3.2.2. Hücre kültürünün lipofektamin yöntemi için hazırlanması

3.2.2.1. % 60-90 konfluent MDBK hücre kültürünün hazırlanması (Gibco

Kat no: CCC-244)

MDBK hücre kültürü DMEM ortamı [(Dulbecco's Modifiye edilmiş Eagle Besi ortamı; Gibco Corp. Kat no: 11960044) (4500 mg/L Glukoz, 110mg/L Sodyum prüvat, L-Glutaminin olmadığı besi ortamı)] kullanılarak çoğaltılmıştır. DMEM besi ortamını zenginleştirmek için:

- % 1 L-glutamin
- % 1 Penisilin/streptomisin
- %10 FBS (Yeni doğan sığır serumu)
- 1 mM Sodyum pruvat ilave edilir.

3.2.2.2. % 60-90 konfluent HCT-8 hücre kültürünün hazırlanması (CCL-244, ATCC)

HCT-8 hücre kültürü RPMI-1640 [(25mM Hepes + sodyum bi karbonat içerip L-glutamin bulundurmayan) (Sigma; R5886)] ortamı kullanılarak çoğaltılır. RPMI-1640 besi ortamını zenginleştirmek için

- % 10 At serumu (Gibco; Kat no: 26050-088),
- % 1 Penisilin/Streptomisin (Sigma; Kat No: P0781)
- 1 mM Sodyum pruvat (Sigma; Kat no: S8636)
- % 1 L-glutamin (Sigma; Kat no: G7513) ilave edilmiştir.

Bu kimyasallar karıştırılıp tamamen alt üst edildikten sonra steril filtrasyonda filtre edilip, kontaminasyonu önlemek için 50 ml olarak falkon tüplerine dağıtılır. Tüplerin üzerine ortamın adı, tarihi ve içeriyorsa pen/strep oranı yazılıp +4 °C’de buzdolabında saklanır. Kullanmak istediğimizde gerekli sayıda falkon tüpü deneyden yarım saat önce oda sıcaklığına getirilir.

3.2.2.3. Hücre Kültürlerinin Pasajı

20°C’de saklanan Akkutaz enziminin (Kat no: AT04 innovative Cell Technologies, Inc.) oda sıcaklığına getirilip erimesi beklenir.

- 1) 25 cm²’lik plastik şişede bulunan stok hücre kültürü dikey pozisyona getirilip içindeki eski ortam aspire edilir.
- 2) Hücre kültürü monolayırı 2 kez % 1’lik PBS ile yıkanır.
- 3) 25 cm²’lik plastik şişe için 5 ml, 75 cm²’lik plastik şişe için 10 ml akkutaz veya tripsinaz enzimi konur. 5 dakika % 5 CO₂ ve 37°C’de inkübe edilir.
- 4) İnvert mikroskop altında hücrelerin birbirinden bağımsız ayrı ayrı görülüp görülmediği incelenir. Eğer 5 dakika hücrelerin birbirinden ayrılması için yeterli

değilse bir 5 dakika daha aynı koşullar altında bekletilir ve tekrar İnvert mikroskop altında incelenir.

5) Otomatik pipet yardımıyla birkaç kez akkutazlı ortam çekilip bırakılarak ayrılmamış hücrelerin de tamamen birbirinden ayrılması sağlanarak akkutazlı hücre süspansiyonu elde edilir.

6) 25 cm²'lik plastik şişe için 5 ml besi ortamı (RPMI-1640 =HCT-8 , DMEM=MDBK); 75 cm²'lik plastik şişe için ise 10 ml besi ortamı ilave edilir.

7) Elde edilen bu hücre süspansiyonundan küçük plastik şişe için 1 ml alınıp üzerine 6 ml besi ortamı konur. 24 saat % 5 CO₂ ve 37°C'de inkübe edildikten sonra eski besi ortamının hepsi atılıp yerine aynı oranda taze besi ortamı ilave edilir.

8) Bütün plastik şişe tamamen konfluent olana kadar her iki günde bir eski ortam, taze besi ortamıyla değiştirilir (Kalmia ve ark, 2001).

9) Hücre süspansiyonu tekrar kullanılmak üzere saklanılmak istenirse öncelikle 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

10) 1x PBS ile yıkayıp, PBS uzaklaştırıldıktan sonra çökeltinin üzerine % 10 oranında DMSO/ besi ortamı ilave edilir. Örneğin 8 ml hücre süspansiyonunu saklamak için 800 µl DMSO (Dimetil sülfoksit, Sigma D-8418) + 7.2 ml besi ortamı karıştırılır ve 1 ml olarak ağzı sıkıca kapatılabilen kryovial tüplerine dağıtılır.

11) Bu tüpler Nalgene[™] Cryo 1°C dondurucu kontaynerlara (Kat no: 5100-0001) yerleştirilir. Bu konteynırlar -80°C'de 2 gün bekletilir. Daha sonra -80°C'den gerekli sayıda Kryovial tüpler çıkartılıp amaca uygun olarak kullanılır.

3.2.2.4. Hücre Kültürü Plaklarının Hazırlanması

Hücre kültürü plaklarının büyüme ortamları ve maksimum hücre sayısı Çizelge 3.6'da verildiği gibidir.

Çizelge 3.6. Hücre kültürü plaklarının büyüme ortamları ve maksimum hücre sayısı

Çok kuyucuklu plaklar	Büyüme ortamları (cm ²)	Her kuyucuk için gerekli maksimum. hücre sayısı
96 kuyucuklu	0.32-0.6	4-5x10 ⁴
48 kuyucuklu	1	1.3x10 ⁵
24 kuyucuklu	2	2.5x10 ⁵
12 kuyucuklu	4	5 x10 ⁵
6 kuyucuklu	9.5	1.2x10 ⁶
Flaskler		
40-50 ml	25	3.1 x10 ⁶
250-300 ml	75	9.4 x10 ⁶
650-750 ml	162-175	2 x10 ⁷
900 ml	225	2.8 x10 ⁷

Deney için gerekli kuyucuk sayısı ve hücre sayısı Çizelge 3.6’da verilen tablo değerleri göz önüne alınarak hesaplanır.

1) Bunun için T 25 cm²’lik konfluent küçük plastik şişenin içereceği maksimum hücre sayısı 3.1x10⁶ /10 ml’dir. 96 kuyucuklu plak için 96x4x10⁴ = 3.84x10⁵ total hücre gerekmektedir. Dolayısıyla bir küçük plastik şişe alınır içindeki eski besi ortamı atılır, 2 kez PBS ile yıkanır, 5 ml akkutaz enzimi ilave edilir.

2) Plastik şişe % 5 CO₂ ve 37°C’lik inkübatörde 10 dakika tutulur. İnvert mikroskop altında hücrelerin birbirinden bağımsız olduğu gözlenince, plastik şişe 5ml taze besi ortamı DMEM (MDBK hücreleri için) veya RPMI-1640 (HCT-8 hücreleri için) konulur. Pipetle çekilip bırakılmak suretiyle birbirinden ayrılmayan hücrelerin ayrılması sağlanır.

3) Hücrelerin devamlılığını sağlamak için yeni bir T 25 cm²’lik küçük flask hazırlanır. Bunun için 500 µl hücre süspansiyonu + 7.5 ml DMEM besi ortamı veya 1ml hücre süspansiyonu + 6 ml RPMI-1640 besi ortamı konur ve her iki günde bir yeni ortam eklemek suretiyle inkübatörde tutulur.

4) 96 kuyucuklu plak için gerekli maksimum hücre sayısı 3.84x10⁵ olduğu için T 25 cm²’lik küçük plastik şişenin 10 ml’sinde 3.1x10⁶ hücre gerekmede ise

X 3.84x10⁵ hücre kültürü için

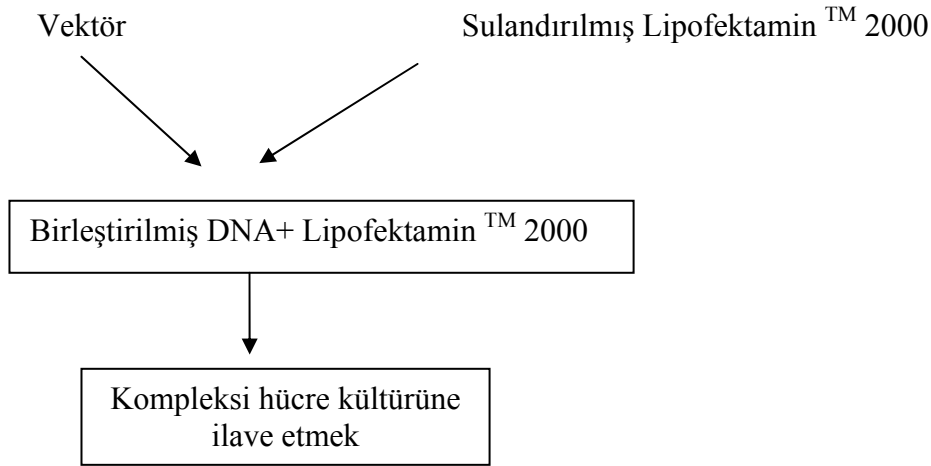
X= yaklaşık 1ml akkutazlı hücre süspansiyonundan alınıp üzerine 20 ml (96x200 µl= 20ml) besi ortamı eklenir ve 96 kuyucuklu plakın her bir kuyucuğuna 200 µl olacak şekilde dağıtılır.

5) Kuyucuklar konfluent olana kadar her iki günde bir taze besi ortamıyla eski ortam değiştirilir ve bu süre boyunca plaklar % 5 CO₂ ve 37°C’de inkübatörde tutulur. Eğer bakteri kontaminasyonu yok ve kültür % 90-95 konfluent ise transfeksiyon prosedürüne geçilir.

6) Öncelikle plaktan antibiyotik içermeyen besi ortamı uzaklaştırılıp, plak 2 kez PBS ile yıkandı. Tekrar serum ve antibiyotik içermeyen besi ortamı ilave edilip plak inkübatöre konuldu ve transfeksiyonun deney malzemeleri hazırlanana kadar inkübatörde bekletildi.

3.2.3. Hedef DNA nın Hücre Kültürlerine Transfeksiyonu

3.2.3.1. Lipofektamine™ 2000 Kiti (Kat no: 11668-027; İnvitrogen) kullanıldı. Bu yöntemin esası genel hatlarıyla şöyledir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. . Lipofektamin™ 2000 kitinin esası

Bu protokol için DMEM ve RPMI-1640 ortamına sadece L-glutamin ve Sodyum pruvat ilave edilirken FBS ve antibiyotik eklenmemiştir.

1) 25 µl FBS (Yeni doğan sığır serumu) içermeyen DMEM veya RPMI-1640 ortamı içinde 0.2 µg plazmid DNA’sı (plazmid DNA sının miktarı DNA Dipstick™ Kiti kullanılarak ng cinsinden ölçüldü) hazırlanır.

2) + 4 °C’de saklanan lipofektamin 2000 kullanılmadan önce vortekslenerek iyice karıştırılır. Daha sonra 0.5 µl lipofektamin 2000, 25 µl FBS ve antibiyotik içermeyen DMEM veya RPMI-1640 ortamı içinde olacak şekilde hazırlanıp 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir.

3) 30 dakika içinde muhakkak sulandırılmış plazmid DNA’sı ile lipofektamin 2000 karıştırılması gerekmektedir.

4) 25 µl sulandırılmış plazmid DNA sı + 25 µl lipofektamin 2000 karışımı 20 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Bu kompleks 6 saat kadar oda sıcaklığında stabildir.

5) 50 µl’lik bu kompleksi % 90-95 konfluent olan 96 kuyucuklu playtlere aktarılıp, 4-6 saat sonra playtlerdeki ortam taze besi ortamıyla değiştirilir.

6) 37°C’de % 5 CO₂ içeren inkübatörde 18-48 saat bekletilir.

İnkübasyondan sonra transfekte olmuş hücreler invert floresan mikroskop altında incelenmiştir. Gözle görülebilir bir ekspresyon olmadığı zaman , hücreler plaktan toplanıp, az da olsa bir gen ekspresyonunun olup olmadığını belirlemek için RT-PCR yapılmıştır.

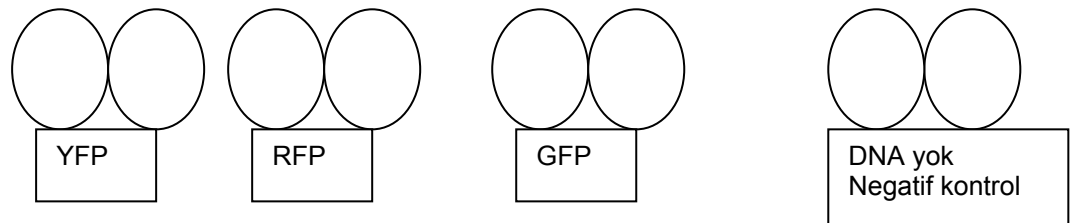
Deney Lipofektamin TM 2000 kit protokolü takip edilerek aşağıdaki gibi dizayn edilmiştir.

YFP [(pEYFP-Mem Vektör (PT3378-5 Clontech)]= 1 µg/ µl

RFP [pCMV- DsRed-Ekspres (PT3682-5 Kat no 6995-1)]=300 ng/ µl

GFP (Crypto construct GFP Vektör)=150 ng/ µl

Her bir plazmid için 96 kuyucuklu plaktan 2 kuyucuk kullanılmıştır.



Şekil 3.7. Lipofektamin TM 2000 kiti ile transfeksiyon deney düzeneği

Plazmidler RPMI-1640 besi ortamında aşağıdaki gibi sulandırılmışlardır.

0.4 µl stok YFP/ 49.6 µl RPMI-1640 ortamı (serum ve antibiyotik içermeyen)

1.4 µl stok RFP/48.6 µl RPMI-1640 ortamı (serum ve antibiyotik içermeyen)

2.7 µl stok GFP/47.3 µl RPMI-1640 ortamı (serum ve antibiyotik içermeyen)

Lipofektamin 2000 solüsyonu 96 kuyucuklu plakın her bir kuyucuğu için 0.5 µl lipofektamin 2000/25 µl at serumu ve antibiyotik içermeyen RPMI-1640 ortamı olacak şekilde hazırlanmıştır. Deneydeki 8 kuyucuk için $0.5 \mu\text{l} \times 8 = 4 \mu\text{l}$ lipofektamin 2000/ $25 \times 8 = 200 \mu\text{l}$ FBS ve antibiyotik içermeyen RPMI-1640 ortamı kullanılmıştır.

25 µl sulandırılmış plazmid DNA'sı + 25 µl lipofektamin 2000 karışımı 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 50 µl'lik bu kompleks % 90-95 konfluent olan 96 kuyucuklu playtlere aktarılmıştır. 4-6 saat sonra playtlerdeki ortam, taze besi ortamıyla (at serumu ve antibiyotik içeren besi ortamı) değiştirildi. 37°C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde 18-48 saat bekletildi.

24 saatlik inkübasyondan sonra plak invert floresan mikroskop altında incelendi. RFP, YFP vektörlerinin ekspresyonu gözle görülebilirken GFP vektör ekspresyonu gözlenemedi. Bu sonuçların fotoğraflarını alabilmek için floresans mikroskoba uygun olan Chamber Permanoks Slayt kullanılarak yukardaki deney koşulları biraz modifiye edilerek tekrarlanmıştır.

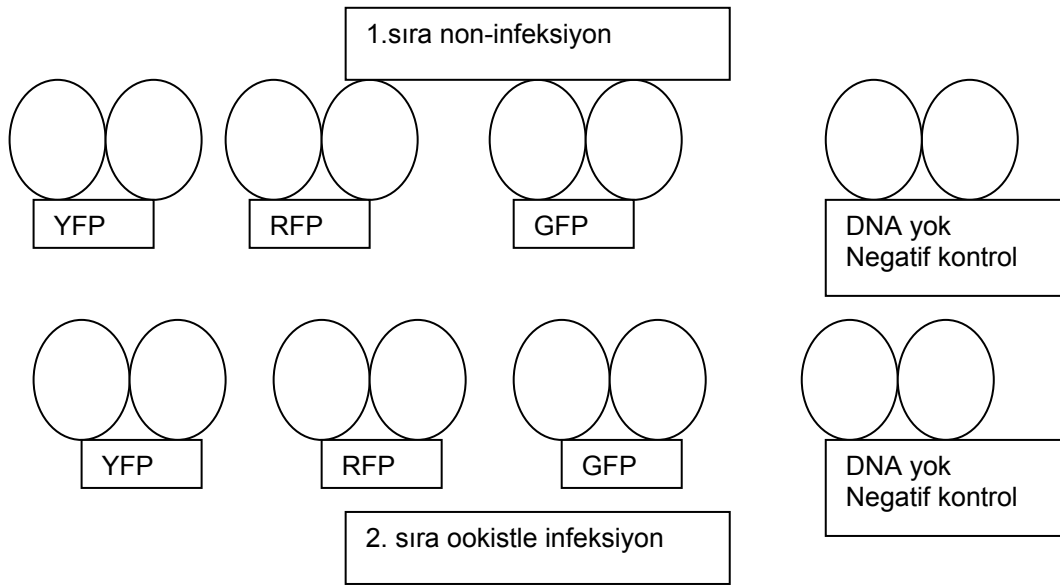
3.2.3.2. Lab-Tek^R Chamber Permanox SlideTM

(Kat no:177445); 8 kuyucuklu olup her bir kuyucuğun çapı 0.8 cm²'dir. 96 kuyucuklu playtin her bir kuyucuğunun çapı ise 0.6 cm² olduğu için, chamber slayt kullanırken hesaplamalarda bazı değişiklikler yapılmıştır.

8 kuyucuklu chamber permanoks slaytın her bir kuyucuğu 300 µl besi ortamı alır. Dolayısıyla bu slayt için toplam $300 \times 8 = 2400 \mu\text{l}$ yaklaşık 2.5ml besi ortamı gereklidir. Bir tane T25 cm²'lik küçük plastik şişedeki hücreler akkutaz enzimi yardımıyla toplandı ve daha önce bahsedildiği gibi PBS ile yıkandıktan sonra, 2.5 ml RPMI-1640 ortamı ilave edilip chamber permanox slayta 300 µl olarak dağıtıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra yeni besi ortamıyla eski ortam değiştirildi ve bundan

sonraki her iki günde bir taze ortamla eski ortam plak konfluent olana kadar değiştirildi. Bu işlem yaklaşık bir hafta bu şekilde takip edildi. Hücrelerin hazır olduğu gözlemlendikten sonra lipofektamin ile transfeksiyon işlemine geçildi.

Chamber permanoks slayt ile transfeksiyon deneyi Şekil 3.8’de gösterildiği gibi dizayn edilmiştir.



Şekil 3.8. Chamber permanoks slayt ile transfeksiyon deney düzeni

Lipofektamin 2000 protokolüne göre 300 µl’lik chamber permanoks slaytın (0.8 cm²), 96 kuyucuklu plak (0.6 cm²) ile 24 kuyucuklu plak (2 cm²) arasında değerlendirilmesi uygun görülmüştür. Buna göre plazmidlerin 0.5 µg /37.5 µl FBS ve antibiyotik içermeyen RPMI-1640 ortamı; lipofektamin 2000’in 1.25 µl/37.5 µl FBS ve antibiyotik içermeyen RPMI-1640 ortamı içinde olacak şekilde sulandırılmaları yapılmıştır.

Transfeksiyondan bir gün önce chamber permanoks slaytın ikinci sıra hücre kültürü *C. parvum* ookistleri ile 2:1 oranında enfekte edilirken, ilk sıra enfekte edilmemiştir. Enfeksiyon işleminden önce bütün plakın ortamı antibiyotik içermeyen RPMI-1640 ortamı ile değiştirilmiştir. Ookistler % 10 çamaşır suyu ile yüzeysel sterilizasyona uğratılıp, sitomiks tamponu içinde eksiste edildikten sonra hücreleri

enfekte etmek için kullanılmıştır. Enfeksiyondan sonra slaytlar 24 saat 37°C de % 5 CO₂ içeren inkübatörde tutulmuştur.

Deney kurulurken plak içinde hücre bulunmayan boş iki 2 kuyucuğa sadece besi ortamı ilave edilir. Eğer enfeksiyondan sonra bir kontaminasyon varsa bunun ookist kaynaklı olup olmadığını daha doğrusu ookistlerin bakterilerle kontamine olup olmadığını belirlemek mümkündür. Bunun yanı sıra *C. parvum* ookistlerinin HCT-8 hücrelerini enfekte edip etmediklerini kontrol etmek için İmmunofloresan metod (IMF) kullanılmıştır.

3.2.4. IF (İmmunofloresan Method)

1) 96 kuyucuklu plaktaki hücreleri tespit etmek için 200 µl % 100'lük MeOH (methanol) ilave edilip 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir.

2) Plak ters çevrilip metanol döküldükten sonra 1xPBS ile yıkanır.

3) Her bir kuyucuğa ayrı ayrı 200 µl 1:100 NGS / PBS konularak hücreler tekrar süspanse edilir. Bu şekilde 30 dakika oda sıcaklığında tutulur. (300 µl Normal keçi serumu + 30 ml 1xPBS)

4) Plak ters çevrilip NGS / PBS döküldükten sonra 1xPBS ile yıkanır.

5) Her bir kuyucuğa ayrı ayrı 200 µl 1:1000 1. antibadi solüsyonu / NGS:PBS konulup 30 dakika oda sıcaklığında tutulur. [(10 µl 1. antibadi (tavşan anti-crypto) + 10 ml NGS:PBS)]

6) Plak ters çevrilip 1^o antibadi solüsyonu/NGS:PBS döküldükten sonra 1xPBS ile yıkanır.

7) Her bir kuyucuğa ayrı ayrı 200 µl 1:1000 2. antibadi solüsyonu / NGS:PBS konulup 30 dakika oda sıcaklığında karanlık bir ortam içinde tutulur. (10 µl 2. antibadi (Alexa Fluor 488 anti-rabbit GFP veya FITC) + 10 ml NGS:PBS)]. Bu antibadi ışığa karşı hassas olduğu için hem antibadi solüsyonu hem de plak aliminyum foliye sarılarak ışıktan korunmalıdır.

8) Plak ters çevrilip 2. antibadi solüsyonu / NGS:PBS döküldükten sonra 1xPBS ile yıkanır. (Not: 1. ve 2. antibadi solüsyonları hazırlandıktan sonra 5000 rpm de 15-20 dakika santrifüj edilip sadece üstte kalan sıvı çalışma sırasında kullanılır.)

9) Plak biyogüvenlik kabininin tabandaki filtreli kısmına kuyucuklar aşağı gelecek şekilde yerleştirilip 10 dakika beklenir. Bu işlem sırasında plakın üzerinin aliminyum foli ile kaplanmasına dikkat edilir.

10) Plak değerlendirilmek üzere flouresans mikroskop altında incelenir veya daha sonra incelenmek üzere aliminyum foliye sarılıp + 4°C’de saklanır.

3.2.5. Transformantların Doğrulanması

Transformasyon sonucunda seçilen kolonilerin doğrulugunu tespit etmek için, önce RNA sentezlenip, Bu RNA lardan RT-PCR ile c-DNA’lar elde edilmiştir. Diziye özgü spesifik primerlerden yararlanılarak, Real Time PCR Cihazında (Roche–Ligt Cycler), LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kiti (Kat no: 2 239 264-Roche) kullanılıp, transformantlar doğrulanmıştır. Bunun yanı sıra koloniler sıvı LB ortamında çoğaltılıp, izole edilerek ve restriksiyon enzimleriyle kesilerek de kontrol edilmiştir.

3.2.5.1. RT PCR (Lipofektamin 2000 için)

Plaklardaki besi ortamı uzaklaştırılıp 2 kez % 1’lik PBS ile yıkanır. 96 kuyucuklu playt için her bir kuyucuğa 100 µl akkutaz enzimi konulup % 5 CO₂ ve 37°C’de 5 dakika inkübatörde tutulur. İnvert mikroskopta incelenip hücreler birbirinden ayrılmışsa üzerine 150 µl besi ortamı konulur. Otomatik pipet yardımıyla alt üst edilip bütün hücre süspansiyonu (hücreler+besi ortamı) ependorf tüplerine alınır. 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilip hücrelerin dibe çökmesi beklenir. Bu şekilde bir kez % 1’lik PBS ile yıkanıp RNA izolasyonuna geçmeden önce RNA later^R (RNA stabilization solüsyonu, Kat no= 7020 , Ambion) kiti, çok kırılgan nitelikteki RNA’yı korumak ve stabilize etmek için kullanılır. Hücre çökeltisinin 5 katı (Örn: pellet 10 µl ise 50 µl RNA later^R) oranda bu kimyasal kullanılır ve hücreleri -20°C’ye koymadan önce RNA later^R in ilave edilmesine dikkat edilmelidir. RNA izolasyonu, içinde RNA later^R bulunan hücre çökeltisinden, RNeasy Mini kit (Qiagen, Kat no = 74104) kullanılarak izole edilmiştir.

3.2.5.1.(1). RNeasy Mini Kit (Qiagen Kat no: 74104)

1) İçinde RNA later^R bulunan hücre çöktisine 350 µl RLT buffer ilave edilip herhangi bir hücre kümelenmesi görülmeyene kadar vortexlenir veya pipetle alt üst edilir.

2) Bu karışım 2ml lik toplama tüplerine yerleştirilmiş QIAshredder kolumnları içine aktarılır ve 2 dakika maksimum hızda (mikrosantrifüjde 10000 rpm 23°C) homojenize edilir.

3) 1 hacim (genellikle 350 µl veya 600 µl) % 70'lik etanol konulur ve pipet yardımıyla iyice karıştırılır. Bu aşamada santrifüj kullanılmaz.

4) 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilmiş RNeasy Mini spin kolumlarına 700 µl 3. aşamadaki karışımdan konulur. Mikrosantrifüjde 10000 rpm 23°C'de 15 saniye santrifüj edilir.

5) Aynı RNeasy Mini spin kolumlarına 700 µl RW1 tamponu eklenip mikrosantrifüjde 10000 rpm 23°C'de 15 saniye santrifüj edilir.

6) RNeasy Mini spin kolumları yeni 2 ml'lik toplama tüplerine transfer edilir ve 500 µl RPE konulup mikrosantrifüjde 10000 rpm 23°C'de 15 saniye santrifüj edilir.

7) Tekrar 500 µl RPE konulup mikrosantrifüjde 10000 rpm 23°C'de 2 dakika herhangi bir solüsyon artığı kalmayana kadar santrifüj edilir.

8) RNeasy Mini spin kolumları 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine yerleştirilir. Üzerine 50 µl RNA'se-free su ilave edilip mikrosantrifüjde 10000 rpm 23°C'de 1 dakika santrifüj edilir.

3.2.5.1.(2). RNA'dan DNA Kontaminasyonunu Önlemek

RT-PCR'a geçmeden önce elde edilen RNA'dan DNA kontaminasyonunu önlemek için, DNA'se Treatment kiti (Ambion cat no: 1906 DNase Treatment and Removal Reagents; DNA-freeTm kiti) veya DNaz enzimi kullanılır.

3.2.5.1.(2).(a). DNA'se ile Muamele kiti

1)

Son konsantrasyon

Total RNA örneği µl

10x DNase I Buffer..... 0.1 V

RNase-free DNase I (2U/ µl)..... 1µl

Total hacim µl

RNA örneği, tampon ve enzim yukarda verilen oranlarda konulduktan sonra nazik bir şekilde karıştırılır.

2) 37°C'de 30 dakika inkübe edilir.

3) DNaz inaktivasyon solüsyonu 0.1 hacim ilave edilip karıştırılır.

4) Bu tüpler 2 dakika oda sıcaklığında arada sırada karıştırılarak inkübe edilir.

5) Tüpler 10.400 rpm'de 1.5 dakika +4°C'de sanrifüj edilir.

6) Dikkatli bir şekilde alttaki çökeltiliye dokunmaksızın üstteki sıvı yeni bir tüpe aktarılır.

7) Eğer hemen kullanılmayacaksa, küçük volumlerde tüplere bölünerek -20°C'de saklanır.

3.2.5.1.(2).(b). RNA'nın DNaz Enzimiyle Muamele Edilmesi

RNA 40 µl

RQ1tamponu 5 µl

RQ1DNaz 5 µl

Bu karışım 37°C'de 30 dakika su banyosunda tutulur.

Fenol-kloroform presipitasyon yöntemiyle ortamdaki tamponlar ve artıklar uzaklaştırılır.

Fenol-kloroform presipitasyonu :

1) DNaz enzimiyle muamele edilmiş 50 µl örneğin üzerine 50 µl DePC ile muamele edilmiş (DePC) su ilave edilir.

2) Bunun üzerine 200 µl fenol:kloroform:İzoamil alkol (25:24:1) ilave edilir. Vortekslenip 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir.

3) Santrifüjden sonra elde edilen üstteki tabaka yeni bir tüpe aktarılır. Üzerine 200 µl kloroform:izoamilalkol (24:1) ilave edilip vortekslenir. 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir.

4) Tekrar üstteki tabaka toplanıp, üzerine 500 µl % 100’lük soğuk etanol (2.5V), 20 µl 3M CH₃COONa (sodyum asetat) (0.1 V) ve 1.5 µl glikojen veya pellet paint (Kat no: 69049-3 Novagen RNA için daha verimli sonuç alındı) ilave edilir. İyice karıştırıldıktan sonra bir gece boyunca -20°C’de inkübe edilir.

5) 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra alttaki çökeltiye dokunmaksızın bütün supernatant dışarı atılır.

6) 1 ml % 70’lik etanol ilave edilip vortekslenir ve tekrar 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir.

7) Çökeltiye dokunmaksızın bütün üst sıvı atılır. Oda sıcaklığında tüpün ağzı açık bırakılarak örneğin üzerinde etanol atıkları kalmayana kadar kurutulur.

8) 30-40 µl TE tamponur ile örnek sulandırılır. Ependorf tüplerine 6 µl dağıtılarak -20°C kullanılabilecek kadar saklanır.

3.2.5.1.(3). RT PCR

RT reaksiyon (cDNA sentezi)

Premiks I

H ₂ O	x µl
EDTA (1mM)	1 µl
Spesifik primer (20 pmol)	1 µl
RNA	x µl
Toplam	9 µl

PCR Cihazında ilk aşama

80°C’de 2 dakika tutulur

37°C’de yavaşça soğuması beklenir

Premiks II

H ₂ O	x µl
MMLV tamponu(5x) (Promega M531A)	4 µl
dNTP mix (25mM)	1 µl
RNasin (40U/ µl) (Promega N251A)	0.5 µl
MMLV-RT (200U/ µl) (Promega M170A)	0.5 µl
Toplam	11 µl

PCR Cihazında ikinci aşama

Reaksiyon 37°C'ye ulaştıktan sonra PCR Cihazının kapağı açılır ve çok hızlı bir şekilde 11 µl'lik premiks II örnekleri, her bir premiks I tüplerine aktarılır ve pipet yardımıyla alt üst edilip tekrar aynı cihaza yerleştirilerek kapağı kapatılır.

37°C'de 1 saat

95°C'de 2 dakika ve 10°C'de 10 dakika tutulur.

Elde edilen cDNA örneklerinden 2-5 µl örnek, PCR kalıbı olarak konvensiyonel veya Real-time PCR'da kullanılır.

3.2.5.1.(3).(a). Red Vektör için RT-PCR Yapılacak Örnekler

- 1) H₂O (negatif kontrol)
- 2) HCT-8 (sadece hücre kültürünün bulunduğu RNA örneği)
- 3) RED plazmid DNA
- 4) RFP enfekteli transkript (*C. parvum*'la enfekteli ve RFP'nin transfekte edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen RNA)
- 5) RFP enfekteli olmayan transkript (*C. parvum*'la enfekteli olmayan ve RFP'nin transfekte edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen RNA)
- 6) Plazmid yok (*C. parvum* + sitomiks tamponu + HCT-8 hücrelerinin bulunup, plazmidin olmadığı örnek- negatif kontrol)

Premiks I

H ₂ O	2 µl x 6.1=12.2 µl
EDTA (1mM)	1 µl x 6.1= 6.1 µl
Ds-Red RT4 (20 pmol)	1 µl x 6.1= 6.1 µl
RNA	5 µl x 6.1= 30.5 µl
Toplam	9 µl x 6.1= 54.9 µl

PCR Cihazında ilk aşama

80°C’de 2 dakika

37°C’de yavaşca soğumasını bekle

Premiks II

H ₂ O	5 µl x 6.1= 30.5 µl
MMLV tamponu (5x) (Promega M531A)	4 µl x 6.1= 24.4 µl
dNTP mix (25mM)	1 µl x 6.1= 6.2 µl
RNasin (40U/ µl) (Promega N251A)	0.5 µl x 6.1= 3.05 µl
MMLV-RT (200U/ µl) (Promega M170A)	0.5 µl x 6.1= 3.05 µl
Toplam	11 µl x 6.1= 67.1 µl

PCR Cihazında ikinci aşama

Reaksiyon 37°C’ye ulaştıktan sonra, her bir 11 µl’lik premiks II örnekleri; her bir premiks I tüplerine aktarılır ve bu tüpler bu cihazda 37°C’de 1 saat, 95°C’de 2 dakika ve 10°C’de 10 dakika tutulur.

Elde edilen her bir RT-PCR örnekleri (cDNA’lar) için aşağıdaki verilen Real-time PCR koşulları ve PCR malzemeleri kullanılarak Real-time PCR yapıldı.

Ancak tüm bunlardan önce sadece RFP plazmidi kullanılarak bu vektör için Real-time PCR koşulları optimize edildi.

3.2.5.1.(3).(a).(a). RFP Vektör ile Real-time PCR Koşullarının Optimizasyonu

RFP primerleri

RFP F- CCCAGT TCCAGTACGG

RFP R- CCCAGCCCATAGTCTT

Forward primer 31.4 nmol olarak liyofilize şekilde satın alındı. 157 µl distile su konarak 200 pmol'lük stok çözeltisi hazırlandı. Deney sırasında 10 kat sulandırılarak 20 pmol (20 µM)'lük solüsyonu hazırlandı.

Revers primer (44.7 nmol) için 223.5 µl distile su konarak 200 pmol'lük stok çözeltisi hazırlandı. Bu primerler RED vektör kullanılarak optimize edildi. MgCl: 0.6 ve 0.8 µl oranlarında ve annealing Tm:68 °C olarak kullanıldı.

PCR koşulları

H₂O 6.7 x3.1= 20.8 µl

MgCl₂ 0.8x 3.1= 2.5 µl

Ds-Red F 0.25x3.1= 0.8 µl

Ds-Red R 0.25x3.1= 0.8 µl

Master miks 1x3.1= 3.1 µl

Toplam hacim = 28 µl

H₂O 6.9 x3.1= 21.4 µl

MgCl₂ 0.6x 3.1= 1.86 µl

Ds-Red F 0.25x3.1= 0.8 µl

Ds-Red R 0.25x3.1= 0.8 µl

Master miks 1x3.1= 3.1 µl

Toplam hacim = 28 µl

Bu havuz hazırlandıktan sonra negatif kontrol, red plazmid DNA (pozitif), MDBK DNA (negatif) olmak üzere 3 örnek, 9 µl olacak şekilde buz üzerindeki PCR tüplerine dağıtılır. Her bir örneğin DNA'sı ayrı ayrı 1'er ml olarak bu tüplerin üzerine ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra Real-time PCR cihazına yerleştirilir. Bu cihazda Çizelge 3.7'de gösterilen Real-time PCR programı yazılarak program başlatılır.

Çizelge 3.7. RFP vektör ile Real-time PCR koşullarının Optimizasyonunda kullanılan program

Analysis Mode	Cycles Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode
Pre-Incubation				
None	1	95 °C	10 min	none
Amplification				
Quantification	45			
.....Denaturation		95 °C	2 s	none
.....Annealing		68 °C (Primere bağlı)	2 s	none
.....Extension		72 °C =amplicon/[bp]/25s	9 s	single
Melting Curve				
Melting Curves	1			
.....Denaturation		95 °C	1s	none
.....Annealing		65 °C	15 s	none
.....Melting		95 °C Slope= 0.1°C/sec	0 s	continuous
Cooling				
None	1	40 °C	30s	none

3.2.5.1.(3).(a).(b). RFP Vektör Transformantlarının Real-time PCR’da doğrulanması

PCR yapılacak örnekler

- 1) H₂O (negatif kontrol)
- 2) HCT-8 DNA(negatif kontrol)
- 3) RFP pDNA (Plazmid DNA pozitif kontrol)
- 4) RFP enfekteli transkript - RNA (*C. parvum*’la enfekteli ve RFP’nin transfekte edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen RNA)
- 5) RFP enfekteli olmayan transkript - RNA (*C. parvum*’la enfekteli olmayan ve RFP’ nin transfekte edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen RNA)
- 6) HCT-8-RNA (sadece hücre kültürünün bulunduğu RNA örneği)
- 7) Plazmid yok-RNA (*C. parvum* + citomixbuffer + HCT-8 hücrelerinin bulunup, plazmidin olmadığı örnek- negatif kontrol)
- 8) H₂O (cDNA için negatif kontrol)

9) RFP enfekteli transkript – cDNA (*C. parvum*'la enfekteli ve RFP'nin transfeke edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen cDNA)

10) RFP non-enfekteli transkript-CDNA (*C. parvum*'la enfekteli olmayan ve RFP'nin transfeke edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen cDNA)

11) HCT-8-RNA(sadece hücre kültürünün bulunduğu cDNA örneği)

12) Plazmid yok-cDNA (*C. parvum* + sitomix tamponu + HCT-8 hücrelerinin bulunup, plazmidin olmadığı örnek- negatif kontrol)

PCR malzemeleri

H₂O 6.9 x12.1= 83.49 µl

MgCl₂ 0.6x 12.1= 7.26 µl

Ds-Red F 0.25x12.1= 3.03 µl

Ds-Red R 0.25x12.1= 3.03 µl

Master miks 1x12.1= 12.1 µl

Toplam hacim = 108.91 µl

Tüm bu maddeler biyogüvenlik kabini içerisinde karıştırılıp, üstüne örneğin adı yazılmış PCR tüplerine dağıtılır. Real-time PCR'da çoğaltıldıktan sonra agaroz jele yüklenir. Real-time PCR'da Çizelge 3.8'de verilen program kullanılmıştır.

Çizelge 3.8. RFP Vektör Transformantlarının doğrulanması için kullanılan Real-time PCR programı

Analysis Mode	Cycles Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode	
Pre-Incubation					
None	1	95 °C	10 min	none	
Amplification					
Quantification	45	Denaturation	95 °C	2 s	none
		Annealing	69 °C (Primere bağlı)	2 s	none
		Extension	72 °C =amplicon/[bp]/25s	10 s	single
Melting Curve					
Melting Curves	1	Denaturation	95 °C	1s	none
		Annealing	65 °C	15 s	none
		Melting	95 °C Slope= 0.1°C/sec	0 s	continuous
Cooling					
None	1	40 °C	30s	none	

RFP vektör transkriptleri pozitif kontrol olarak kullanılıp RT-PCR protokolumuzun çalışıp çalışmadığı kontrol edilmiştir. Bu protokolun çalıştığı görüldükten sonra aynı koşullar kullanılarak Crypto construct GFP vektör transformantlarından da cDNA'lar elde edilmiştir.

3.2.5.1.(3).(b). Crypto Construct GFP Vektör Transformantlarının RT-PCR ile Doğrulanması

RT-PCR yapılacak örneklerin

- 1) H₂O (negatif kontrol)
- 2) HCT-8 (sadece hücre kültürünün bulunduğu RNA örneği)
- 3) C-GFP plazmid DNA
- 4) C-GFP enfekteli transkript (*C. parvum*'la enfekteli ve C-GFP'nin transfekte edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen RNA)
- 5) C-GFP enfekteli olmayan transkript (*C. parvum*'la enfekteli olmayan ve C-GFP nin transfekte edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen RNA)
- 6) Plazmid yok (*C. parvum* + citomixbuffer + HCT-8 hücrelerinin bulunup, plazmidin olmadığı örnek- negatif kontrol)

Premiks I

H ₂ O	2 µl x 6.1=12.2 µl
EDTA (1mM)	1 µl x 6.1= 6.1 µl
Ds-Red RT4 (20 pmol)	1 µl x 6.1= 6.1 µl
RNA	5 µl x 6.1= 30.5 µl
Toplam	9 µl x 6.1= 54.9 µl

PCR Cihazında ilk aşama

80°C'de 2 dakika

37°C'de yavaşça soğumasını bekle

Premiks II

H ₂ O	5 µl x 6.1= 30.5 µl
MMLV tamponu (5x) (Promega M531A)	4 µl x 6.1= 24.4 µl
dNTP miks (25mM)	1 µl x 6.1= 6.2 µl
RNasin (40U/ µl) (Promega N251A)	0.5 µl x 6.1= 3.05 µl
MMLV-RT (200U/ µl) (Promega M170A)	0.5 µl x 6.1= 3.05 µl
Toplam	11 µl x 6.1= 67.1 µl

PCR Cihazında ikinci aşama

Reaksiyon 37°C'ye ulaştıktan sonra, her bir 11 µ'lik premiks II örnekleri; her bir premiks I tüplerine aktarılır ve bu tüpler bu cihazda 37°C'de 1 saat, 95°C'de 2 dakika ve 10°C'de 10 dakika tutulur.

Elde edilen her bir RT-PCR örnekleri (cDNA'lar) için aşağıdaki verilen Real-time PCR koşulları ve PCR malzemeleri kullanılarak Real-time PCR yapılmıştır. Ancak tüm bunlardan önce sadece C-GFP plazmidi kullanılarak bu vektör için Real-time PCR koşulları optimize edilmiştir.

3.2.5.1.(3).(b).(a). C-GFP Plazmidi ile Real-time PCR Koşullarının Optimizasyonu

C-GFP plazmidi primerleri

C- GFP F 1= GGAGAAGGTGAAGGAGAT

C-GFP R 1= TCTGGCATTGCTGACTTA

C-GFP RT 1= TCTTGAACATATCCTTC

MgCl: 0.4 ve annealing Tm:65 °C olarak kullanıldı.

H₂O.....6.9X 3.1= 22.01 µlMgCl₂.....0.6 X3.1= 1.24 µl

c-GFP F1.....0.25X3.1= 0.775 µl

c-GFP R1.....0.25X3.1= 0.775 µl

Master Mix.....1X3.1= 3.1 µl

Çizelge 3.9’da verilen Real-time PCR programı kullanılarak C-GFP plazmidi primerleri ile Real-time PCR koşulları optimize edilmiştir.

Çizelge 3.9. Crypto Construct GFP Vektör ile Real-time PCR koşullarının optimizasyonu için kullanılan program

Analysis Mode	Cycles Segment		Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode
Pre-Incubation					
None	1		95 °C	10 min	none
Amplification					
Quantification	45	Denaturation	95 °C	1 s	none
		Annealing	65 °C (Primere bağlı)	2 s	none
		Extension	72 °C =amplicon/[bp]/25s	9 s	single
Melting Curve					
Melting Curves	1	Denaturation	95 °C	1s	none
		Annealing	65 °C	15 s	none
		Melting	95 °C Slope= 0.1°C/sec	0 s	continuous
Cooling					
None	1		40 °C	30s	none

3.2.5.1.(3).(b).(b). C-GFP Vektör Transformantlarının Real-time PCR’da Doğrulanması

3.2.5.1.(3).(b).(b).(a). Crypto construct GFP vektör RNA örnekleri

Öncelikle aşağıdaki koşullar kullanılarak sadece RNA örnekleri herhangi bir DNA kontaminasyonunun olup olmadığını tespit etmek için Real-time PCR cihazında çoğaltılmıştır.

PCR yapılacak örnekler

- 1) H₂O (negatif kontrol)
- 2) HCT-8 RNA(negatif kontrol)
- 3) C-GFP pDNA (Plazmid DNA pozitif kontrol)
- 4) C-GFP enfekteli transkript - RNA (*C. parvum*’la enfekteli ve C-GFP’nin transfekte edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen RNA)
- 5) C-GFP non-enfekteli transkript - RNA (*C. parvum*’la enfekteli olmayan ve C-GFP vektörünün transfekte edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen RNA)
- 6) C-GFP enfekteli supernatant transkript - RNA (*C. parvum*’la enfekteli ve C-GFP vektörünün transfekte edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen RNA)

PCR malzemeleri

H₂O 6.9 x 6.1 = 42.09 µl

MgCl₂ 0.6x 5.1 = 3.06 µl

Ds-Red F 0.25x5.1 = 1.27 µl

Ds-Red R 0.25x5.1 = 1.27 µl

Master miks 1x5.1 = 5.1 µl

Toplam hacim = 52.79 µl

Çizelge 3.10. C-GFP Vektör Transformant RNA'larının Real-time PCR'da doğrulanmasına ait program

Analysis Mode	Cycles Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode
Pre-Incubation				
None	1	95 °C	10 min	none
Amplification				
Quantification	45	Denaturation	95 °C	2 s
		Annealing	65 °C (Primere bağlı)	2 s
		Extension	72 °C =amplicon/[bp]/25s	13 s
Melting Curve				
Melting Curves	1	Denaturation	95 °C	1s
		Annealing	65 °C	15 s
		Melting	95 °C Slope= 0.1°C/sec	0 s
Cooling				
None	1	40 °C	30s	none

3.2.5.1.(3).(b).(b).(b). Crypto construct GFP Vektör c-DNA Örnekleri

DNA kontaminasyonunun olmadığı görüldükten sonra yukardaki koşulların aynısı kullanılarak c-DNA örnekleri Real-time PCR cihazında çoğaltılmıştır..

PCR yapılacak örnekler

1) H₂O (negatif kontrol)

2) HCT-8 c-DNA(negatif kontrol)

3) C-GFP pDNA (plazmid DNAsı- pozitif kontrol)

4) C-GFP enfekteli transkript – c-DNA (*C. parvum*'la enfekteli ve C-GFP'nin transfekte edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen c-DNA)

5) C-GFP non-enfekteli transkript – c-DNA (*C. parvum*'la enfekteli olmayan ve C-GFP'nin transfekte edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen c-DNA)

6) C-GFP enfekteli supernatant transkript – c-DNA (*C. parvum*'la enfekteli ve C-GFP' nin transfekte edildiği HCT-8 hücrelerinden elde edilen c-DNA)

PCR malzemeleri

H₂O 6.9 x6.1= 42.09 µl

MgCl₂ 0.6x 5.1 = 3.06 µl

Ds-Red F 0.25x5.1 =1.27 µl

Ds-Red R 0.25x5.1= 1.27 µl

Master mix 1x5.1= 5.1 µl

Toplam Hacim 9 = 52.79

Tüm bu maddeler biyogüvenlik kabini içerisinde karıştırılıp, üstüne örneğin adı yazılmış PCR tüplerine dağıtılır. Real-time PCR'da çoğaltıldıktan sonra agaroz jele yüklenir. Çizelge 3.11'de verilen Real-time PCR programı kullanılarak C-GFP vektör transformantları doğrulanmıştır.

Çizelge 3.11. C-GFP Vektör Transformant c-DNA'larının Real-time PCR'da doğrulanmasına ait program

Analysis Mode	Cycles Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode
Pre-Incubation				
None	1	95 °C	10 min	none
Amplification				
Quantification Denaturation	45 Annealing Extension	95 °C	2 s	none
		65 °C (Primere bağlı)	2 s	none
		72 °C =amplicon/[bp]/25s	13 s	single
Melting Curve				
Melting Curves Denaturation	1 Annealing Melting	95 °C	1s	none
		65 °C	15 s	none
		95 °C Slope= 0.1°C/sec	0 s	continuous
Cooling				
None	1	40 °C	30s	none

Lipofektamin metodu 3 tekerrürlü yapılmıştır.

3.2.2. Elektroporasyon Yöntemiyle Transient Transformasyon

3.2.2.1. *Cryptosporidium parvum*'un Elektroporasyon Yöntemi İçin Hazırlanması

3.2.2.1.(1). *Cryptosporidium parvum* Ookistlerinin Çoğaltılması

C. parvum ookistlerinin çoğaltılması için kullanılan yöntemler lipofekamin yönteminde anlatıldığı şekildedir.

3.2.2.1.(2). Ookistlerin fare dışkılarından izole edilmesi

Ookistlerin fare dışkılarından izole edilmesi için kullanılan yöntemler lipofektamin yönteminde anlatıldığı şekildedir.

3.2.2.1.(3). Ookistlerin yüzeysel sterilizasyonu ve eksistasyonu

Ookistlerin yüzeysel sterilizasyonu ve eksistasyonu lipofektamin yönteminde belirtilenlerin dışında Çizelge 3.12'de verildiği şekildedir.

Önce her bir eksistasyon solüsyonu içinde ookistlerin eksiste olup olmadıklarını gözlemek için Çizelge 3.12'de verilen deney koşulları lipofektamin yönteminde yapıldığı gibi tekrarlanmıştır.

Çizelge 3.12. Farklı eksistasyon koşullarında ookist eksistasyonu

TA/sitomix	TA/sitomix:RPMI-1640 ortamı (1:1)	TA/ RPMI-1640 ortamı
20 µl 10 ⁶ ookist solüsyonu + 40 µl TA/sitomix solüsyonu	20 µl 10 ⁶ ookist solüsyonu + 40 µl TA/sitomix:RPMI-1640 ortamı (1:1)solüsyonu	20 µl 10 ⁶ ookist solüsyonu + 40 µl TA/sitomix:RPMI-1640 ortamı

Çizelgede 3.12 gösterilen her bir örnek 45 dakika 37°C'de su banyosunda tutulmuştur. 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, supernatant 200 µl kalana kadar uzaklaştırılmıştır. Işık mikroskobu altında hemasitometer lamı kullanılarak açığa çıkan sporozoitlerin 1ml'deki sayıları tespit edilerek eksistasyon oranları belirlenmiştir.

Üç farklı eksistasyon koşulları altında açığa çıkan sporozoitler ile HCT-8 hücreleri enfekte edilmiştir. 24 saat % 5 CO₂ ve 37°C’de inkübe edildikten sonra enfekteli hücreleri floresan mikroskop altında sayabilmek için IMF (Widmer ve ark, 2006) yöntemi uygulanmıştır.

3.2.3. Plazmidlerin Elektroporasyon Yöntemi İçin Hazırlanması

pCMV- DsRed-Ekspres, pEYFP-Mem Vektör, Crypto construct GFP Vektör, plazmidlerin bu yöntem için hazırlanması tıpkı lipofektamin yönteminde kullanılan aşamalar gibidir.

3.2.4. Hücre Kültürünün Elektroporasyon Yöntemi İçin Hazırlanması

Elektroporasyon yönteminde kullanılacak 96 kuyucuklu plaklar lipofektamin yönteminde anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Ancak lipofektamin yönteminden farklı olarak RPMI-1640 besi yeri hem at serumu hemde pen/strep antibiyotiği içermektedir.

1) Bunun için T 25 cm²’lik konfluent küçük plastik şişenin içereceği maksimum hücre sayısı 3.1x10⁶ /10 ml dir. 96 kuyucuklu plak için 96x4x10⁴ = 3.84x10⁵ total hücre gerekmektedir. Dolayısıyla bir küçük plastik şişe alınır içindeki eski besi ortamı atılır, 2 kez PBS ile yıkanır, 5 ml akkutaz enzimi ilave edilir.

2) Plastik şişe % 5 CO₂ ve 37°C’lik inkübatörde 10 dakika tutulur. İnvert mikroskop altında hücrelerin birbirinden bağımsız olduğu gözlenince, plastik şişeye 5 ml taze besi ortamı DMEM (MDBK) veya RPMI-1640 (HCT-8) konulur. Pipetle çekilip bırakılmak suretiyle birbirinden ayrılmayan hücrelerin de ayrılması sağlanır.

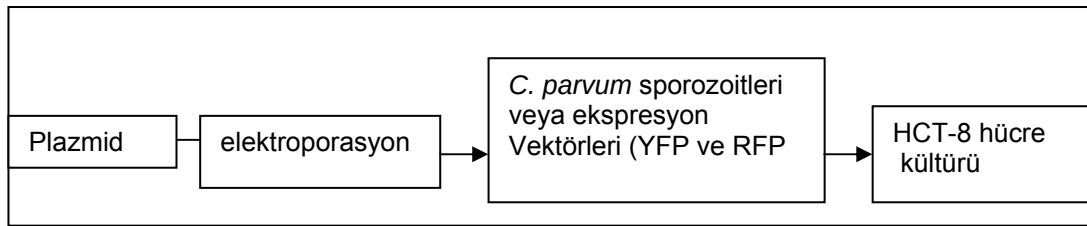
3) Hücrelerin devamlılığını sağlamak için yeni bir T 25 cm²’lik küçük plastik şişe hazırlanır. Bunun için 500 µl hücre süspansiyonu + 7.5 ml DMEM besi ortamı veya 1ml hücre süspansiyonu + 6 ml RPMI-1640 besi ortamı konur ve her iki günde bir yeni ortam eklemek suretiyle inkübatörde tutulur.

7) 96 kuyucuklu plak için gerekli maksimum hücre sayısı 3.84x10⁵ olduğu için
T 25 cm²’lik küçük plastik şişenin 10 ml sinde 3.1x10⁶ hücre varsa
X 3.84x10⁵ hücre için

X= yaklaşık 1ml akkutazlı hücre süspansiyonundan alınıp üzerine 20 ml (96x200 µl= 20ml) besi ortamı eklenir ve 96 kuyucuklu plakın her bir kuyucuğuna 200 µl olacak şekilde dağıtılır.

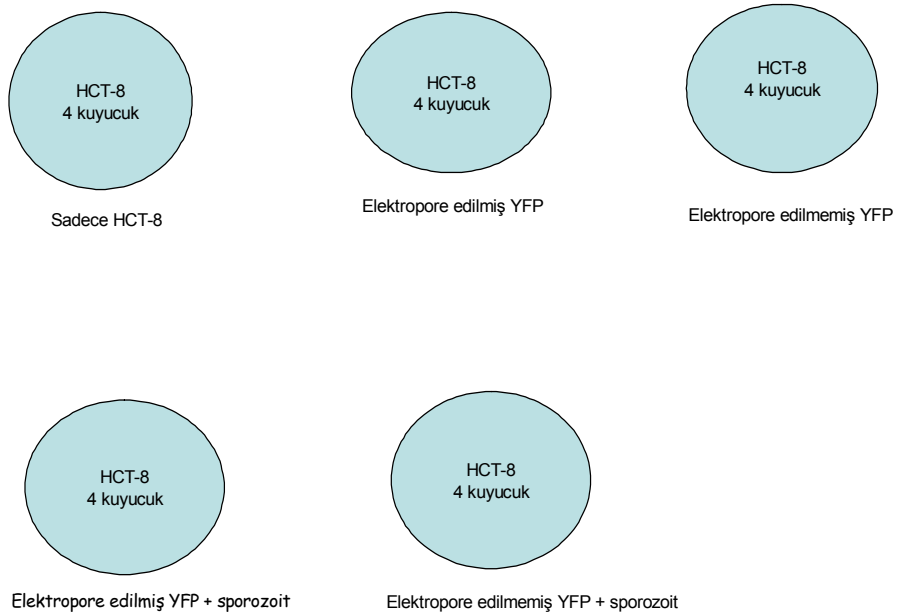
8) Kuyucuklar konfluent olana kadar her iki günde bir taze besi ortamıyla eski ortam değiştirilir ve bu süre boyunca plaklar % 5 CO₂ ve 37°C’de inkübatörde tutulur. Eğer bakteri kontaminasyonu yok ve kültür % 90-95 konfluent ise transfeksiyon prosedürüne geçilir.

Bu yöntemin esası genel hatlarıyla Şekil 3.9’da verildiği gibidir.



Şekil 3.9. Elektroporasyon yönteminin esası

3.2.5. Elektroporasyon I Deneyi



Şekil 3.10. Elektroporasyon I deney düzeneği

Bu deney YFP dışında RFP ve C-GFP vektörlerine de aynı koşullarda uygulanmıştır.

1) Her bir kuyucuk için gerekli olan ookist miktarı şu şekilde hesaplandı: Sporozoit ile beraber 4 kuyucuk elektroporasyonun yapıldığı, 4 kuyucuk ise elektroporasyonun olmadığı kuyucuklar olarak kullanıldı.. Her bir kuyucuk 8×10^5 ookistle enfekte edildiğine göre; 8 kuyucuk $\times 8 \times 10^5 = 7 \times 10^6$ ookist ile deneye başlanmasına karar verildi. 7×10^6 ookist önce yüzeysel sterilizasyola steril edildi.. Bu ookistler TA/sitomix:RPMI-1640 ortamı (1:1) kullanılarak eksiste edildi. Existasyon oranının % 45-50 oranında olması yeterli kabul edildi. Bu koşullar YFP ve RFP vektörleri için dizayn edilen deneyde kullanıldı.

2) Deneyde kullanılan plazmidler 200 ng/ μ l olan plazmid stoklarından 15 μ l alınmıştır. Üzerine 10 μ l RPMI-1640 besi ortamı eklenip total 25 μ l plazmid solüsyonu hazırlanmıştır. Kullanılan plazmidlerin miktarı aşağıdaki gibidir.

YFP [(pEYFP-Mem Vektör (PT3378-5 Clontech))]= 1 μ g/ μ l

RFP [pCMV- DsRed-Ekspres (PT3682-5 cat no 6995-1)]= 300 ng/ μ l

GFP (Crypto construct GFP Vektör)= 200 ng/ μ l

YFP ve RFP plazmidlerinin önce 200ng/ μ l lık stok solüsyonları hazırlanmıştır.

3) Bu deney için hücre kültürü sedimenti T25 cm²'lik küçük plastik şişeden akkutaz enzimi yardımıyla hücrelerin toplanıp santrifüj edilmesiyle elde edilir. 96 kuyucuklu plakin her bir kuyucuğu için 10^5 HCT-8 hücresi yeterlidir. Dolayısıyla 10 ml'lik hücre süspansiyonu 3×10^6 hücre içerdiğinden, bu süspansiyondan 350 μ l alıp bir eppendorf tüpüne konulmuştur. 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Tekrar santrifüj edilip PBS uzaklaştırıldıktan sonra her bir elektroporasyon küveti için, bu hücre çökeltisinin üzerine 75 μ l RPMI-1640 besi ortamı ilave edilmiştir.

Her bir vektör için 0.1 cm'lik küvette aşağıdaki koşullar sağlanmıştır.

1 mm lik BTX küveti

25 µl plazmid + 75 µl RPMI-1640 + 350 µl hücre süspansiyonundan elde edilmiş hücre kültürü sedimenti Toplam Hacim 100 µl
--

4) Crypto construct GFP Vektör için bu deney dizayn edilirken her bir elektroporasyon küvetine yukarda verilen koşullardan farklı olarak 75 µl parazit/ RPMI-1640 besi ortamı konulmuştur.

5) $G = V \times FW \times M$ (G =gram, V = litre cinsinden hacim, FW = kimyasalın moleküler ağırlığı) formülünden yararlanılarak ATP (sigma A-9187) ve Glutathionin (G-4501) kendi stok solüsyonu 100 mM konsantrasyonunda hazırlandı. pH'leri 7.6'ya ayarlanıp, steril filtrasyonları yapıldıktan sonra ependorf tüplerine 1000 ml olacak şekilde dağıtılıp kullanılabilecek kadar -20°C'de tutulmuştur.

6) Bir küvet için gerekli malzemeler yukardaki gibi hazırlandıktan sonra, elektroporasyona uğratılmış 2 küvet birleştirilip; yani toplam 200 µl'lik örnekler daha önce pasajı yapılmış 96 kuyucuklu plakın her bir kuyucuğuna aktarıldı. Ancak öncelikle maksimum 300 µl alan 96 kuyucuklu konfluent plakın her bir kuyucuğundaki ortam 100 µl kalana kadar boşaltıldı ve üzerine 200 µl'lik elektropore edilmiş örnekler ilave edilir. Pasajı yapılmış 96 kuyucuklu plaktaki HCT-8 hücrelerinin deney sırasında % 80-90 oranında konfluent olmasına dikkat edildi.

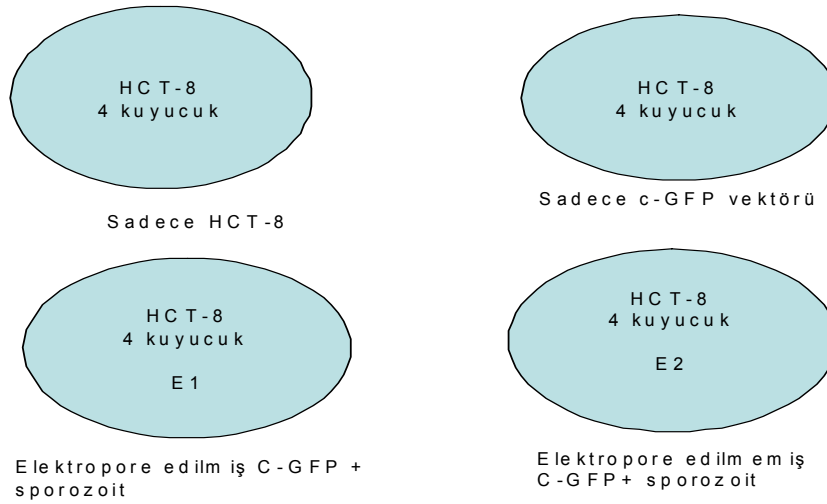
7) Elektroporator voltaj 180, kapasitans 250, Resistance None şeklinde ayarlanıp örnekler elektroporasyona uğratılmıştır.

8) Elektroporasyon işleminden sonra örnekler buz üzerinde tutulup hiç bekletilmeksizin 96 kuyucuklu plaka dağıtılmıştır. 24 saat % 5 CO₂ ve 37°C'de inkübatörde bekletildikten sonra floresan mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.6. Transfeksiyon neticesinde elde edilen Transformantların Doğrulanması

Elektroporasyon ile transfeksiyon neticesinde floresan mikroskop altında YFP, RFP vektörlerinin transfeksiyonu sonucunda gözle görülür ekspresyon olmasına rağmen; GFP vektör transfeksiyonunda herhangi bir ekspresyon gözlenmedi. Dolayısıyla GFP vektör transfeksiyonunda az da olsa bir ekspresyonun olup olmadığını belirlemek için RT-PCR yapıldı.

3.2.7. Elektroporasyon II deneyi



Şekil 3.11. Elektroporasyon II deney düzeneği

Bu deney aynı koşullarda YFP ve RFP vektörleri içinde dizayn edilmiştir. Sadece HCT-8 hücrelerinin ve sadece C-GFP plazmidinin olduğu kuyucuklar negatif kontrolü temsil etmektedir. Elektropore edilmiş c-GFP vektörü + sporozoitleri içeren kuyucuklar pozitif; Elektropore edilmemiş c-GFP vektörü + sporozoitleri içeren kuyucuklar negatif kontrolü temsil etmektedir.

1) Her bir kuyucuğa gerekli olan ookist miktarı şu şekilde hesaplandı. Sporozoit ile beraber 4 kuyucuk elektroporasyon, 4 kuyucuk elektroporasyona uğratılmamış olup toplam 8 kuyucuk kullanılmıştır. Her bir kuyucuk 8×10^5 ookist ile enfekte edildi. $8 \text{ kuyucuk} \times 8 \times 10^5 = 7 \times 10^6$ ookist ile yüzeysel sterilizasyona

başlandı. TA/sitomix:RPMI-1640 besi ortamı (1:1) oranında kullanılarak bu ookistler eksiste edildi. Existasyon oranının % 45-50 oranında olması yeterli kabul edildi.

Her bir 0.2 cm'lik küvet için şu koşullar sağlandı.

2 mm BTX küveti

300 µl parazit
100 µl plazmid
9 µl ATP
22.5 µl glutathionin
18.5 µl besi ortamı

2) 2 mm'lik elektroporasyon küveti maksimum 400 µl hacime sahiptir. Hazırladığımız malzemelerde pipet payı ve pipetleme sırasında kayıp olabileceği düşüncesiyle 50 µl daha fazla hazırlanmıştır. Bu çalışmada toplam 8 küvet yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Oluşturulan havuzdan 400 µl karışım jel yükleme pipeti yardımı ile alınıp her bir elektroporasyon küvetine hava kabarcığı oluşturulmaksızın pipetlenmiştir. Gerek hazırlık gerekse deney sırasında tüm küvetlerin buz üzerinde olmasına dikkat edilmiştir.

3) Elektroporatör 1000 V voltaj, 50 µF kapasitans, 50 Ω resistans şeklinde ayarlanıp küvetler tek tek elektroporasyona uğratılmıştır. Her bir örnek için 2 kez elektrik akımı verilmiş ve örnekler bekletilmeksizin HCT-8 hücre kültürlerine aktarılmıştır. Elektroporasyon işleminden sonra oluşturulan porların kapanmaması için küvetlerin buz üzerinde tutulmasına ve hiç beklemeksizin hücre kültürüne aktarılmasına dikkat edilmiştir.

5) Her bir 400 µl karışım (Parazit + plazmid + ATP) içeren elektroporasyon küveti, 96 kuyucuklu plakın iki kuyucuğuna 200 µl olarak aktarılmıştır. Elektropore edilmemiş örneklerde yine 200 µl olacak şekilde kuyucuklara ilave edildikten sonra % 5 CO₂ içeren 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her bir plak floresans mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.8. Elektroporasyon Yöntemiyle Elde Edilen Transkriptlerden RNA Sentezi

Plaklardaki besi ortamı uzaklaştırılıp 2 kez % 1'lik PBS ile yıkanır. 96 kuyucuklu plak için her bir kuyucuğa 100 µl akkutaz enzimi konulup % 5 CO₂ ve 37°C'de 5 dakika inkübatörde tutulmuştur. İnvert mikroskopta incelenip hücrelerin birbirinden ayrıldığı gözlemlendikten sonra üzerine 150 µl besi ortamı konulmuştur. Otomatik pipet yardımıyla alt üst edilip bütün hücre süspansiyonu (hücreler+besi ortamı) ependorf tüplerine alınmıştır. 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip hücrelerin dibe çökmesi beklenmiştir. Bu şekilde bir kez % 1'lik PBS ile yıkayıp RNA izolasyonuna geçmeden önce RNA later^R (RNA yı stabilize eden solüsyon, Kat no= 7020 , Ambion) kiti, çok kırılğan nitelikteki RNA'yı korumak ve stabilize etmek için kullanılmıştır. Hücre çökeltisinin 5 katı (Örn: çökelti 10 µl ise 50 µl RNA later^R) oranda bu kimyasal kullanılıp ve hücreleri – 20 °C'ye koymadan önce RNA later^R in ilave edilmesine dikkat edilmiştir. RNA izolasyonu, içinde RNA later^R bulunan hücre çökeltisinden, RNeasy Mini kit (Qiagen, Kat no = 74104) kullanılarak elde edilmiştir.

3.2.9. Crypto-construct GFP Vektör Transformantları İçin RT-PCR

Gözle görülebilir ekspresyon olmasada azda olsa bir ekspresyonun olup olmadığını kontrol etmek için GFP vektör transformantları bilinmeyen örnekler olarak RT- PCR yapıp kontrol edilmiştir..

3.2.9.1. RT-PCR Yapılan GFP Vektör Transformant Örnekleri

- 1) H₂O
- 2) Sadece HCT-8
- 3) Sadece crypto-construct GFP vektör (pozitif kontrol)
- 4) Elektropore edilmiş crypto-construct GFP vektör (bilinmeyen ve pozitif sonuç beklenen örnek)
- 5) Elektropore edilmemiş crypto-construct GFP vektör (bilinmeyen ve negatif sonuç beklenen örnek)

Premiks I

10mM dNTPs 1 µlx5.1= 5.1 µl

Oligo dt.....1 µlx5.1= 5.1 µl

Toplam.....= 10 µl

Premiks her bir örnek sayısı kadar tüplere 2 µl olarak dağıtılır ve üzerine her bir RNA örneğinden 8 µl ilave edilip tüpler iyice alt üst edildikten sonra 65°C’de 5 dakika bekletilir. Daha sonra en azından 1 dakika buz üzerinde tutulur.

Premiks II

10x RT tamponu 2x5.1= 10.2 µl

25 mM MgCl₂....4x5.1= 20.4 µl

0.1 m DTT.....2x5.1= 10.2 µl

RNase out (RNA yı uzaklaştıran solüsyon).....1x5.1= 5.1 µl

Toplam Hacim.....= 45.9 µl

Premiks II’den 9 µl alınıp Premiks I’e ilave edilir.

PCR cihazında

42°C’de 2 dakika bekletilip, her bir tüpe cihazdan uzaklaştırılmaksızın 1µl superscript revers transcriptaz enzimi eklenir.

42°C’de 50 dakika

70°C’de 15 dakika tutulur.

Daha sonra örnekler buz üzerinde 10 dakika tutulup vorteksenerek tüm karışım dibte toplanır. 1µl RNaseH solüsyonu konulup 37°C’de 20 dakika bekletilir. Tekrar vorteksenir ve örneklerin miktarı ng olarak ölçülür.

3.2.9.2. HCT-8 Hücrelerinin Enfeksiyonunun Doğrulanması

Elde edilen transformantların (c-DNA’ların) *C. parvum* sporozoitleriyle enfekte olup olmadıkları IMF yöntemiyle kontrol edildiği gibi, *C. parvum*’un baz dizisinden dizayn edilen L11 ve β- tübülün primerleri kullanılarak yapılan Real time PCR yöntemiyle de kontrol edilmiştir.

3.2.9.2.(1). L11 primerleri

CRYRG ZF (Crypto ribosomal gene Forward) = CTATCCGTAGGGCTGAA
28.40 nmol

CRYRG ZR (Crypto ribosomal gene Revers) = GGAACCATTGCATAGCTT
31.12 nmol

CRYRG ZRT(Crypto ribosomal gene Revers transkriptaz) =

CAGTTCAAGATAATACCATCA 28.28 nmol

CRYRG ZF için 142 µl distile su; CRYRG ZR için 150.6 µl distile su liyofilize primerlerin üzerine ilave edilmiştir. Primerin bulunduğu tüpün üzerine sulandırım tarihi ve 200 pmol/µl şeklinde yazılıp, 200 pmol/µl stok primerler 10 kat sulandırılarak Real-time PCR’da kullanılmıştır.

3.2.9.2.(2). β tübulin primerleri

β- F = AGGACAATGTGGGAAC

β- R = TGCTCTTGGAACGTATC

β- RT = AAAGGACCAGCTCTAACT

Bu primerler laboratuvarında mevcut olduğundan, primerlerin sulandırımları yapılmadan hazır bulunan 200 pmol/µl olan primerler 10 kat sulandırılarak kullanılmıştır.

3.2.10. GAPDH primerleri

Transfeksiyon neticesinde elde edilen transformantların doğrulanması amacıyla Elektroporasyon deneyi’nin mRNA örneklerinin miktarlarını kıyaslamak amacıyla GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase housekeeping gen) primerleri kullanılmıştır.

GAPDH F 1 5’ AAT GAC CCC TTC ATT GAC C 3’

GAPDH R 1 5’ TGG TGC AGG AGG CAT TGC 3’

Bu primerler laboratuvarında mevcut olduğundan, primerlerin sulandırımları yapılmaksızın hazır bulunan 200 pmol/µl’lük stok primerler 10 kat sulandırılarak kullanılmıştır.

3.2.10.1. GAPDH Primerleri Kullanılarak PCR Yapılacak Örnekler

- 1- H₂O (neg)
- 2- YFP p-DNA (pozitif kontrol)
- 3- Electropore edilmiş YFP transkript (c-DNA)
- 4- Electropore edilmemiş YFP transkript (c-DNA)
- 5- Electropore edilmiş YFP+sporozoit transkript (c-DNA)
- 6- Elektropore edilmemiş YFP+sporozoit transkript (c-DNA)
- 7- HCT-8 transkript

GAPDH F1-R1 primerleri ile Real-time PCR

H₂O 6.9 x 7.1= 48.99 µl

MgCl₂ 0.6 x 7.1= 4.26 µl

Ds-Red F 0.25 x 7.1= 1.775 µl

Ds-Red R 0.25 x 7.1= 1.775 µl

Master miks 1x7.1= 7.1 µl

Toplam Hacim 63.9 µl

Çizelge 3.13. GAPDH Primerleri ile GFP vektör mRNA miktarlarının ölçüldüğü Real time PCR programı

Analysis Mode	Cycles Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode
Pre-Incubation				
None	1	95 °C	10 min	none
Amplification				
Quantification	40	95 °C	1 s	none
Denaturation		64 °C (Primere bağlı)	2 s	none
Annealing		72 °C =amplicon/[bp]/25s	15 s	single
Extension				
Melting Curve				
Melting Curves	1	95 °C	0 s	none
Denaturation		65 °C	15 s	none
Annealing		95 °C	0 s	continuous
Melting		Slope= 0.1°C/sec		
Cooling				
None	1	40 °C	30s	none

3.2.11. Crypto-construct GFP Vektör ile Real-time PCR Koşullarının Optimizasyonu

C-GFP F 2= GTCAGCAATGCCAGAAG 24.35 nmol

C-GFP R 2= ACTGGTCCATCTCCAAT.....24.84 nmol

C-GFP RT 2= CTGGAAGAAGAACTGG.....21.70 nmol

C-GFP F 2 için 122 µl distile su; C-GFP R 2 için 124.4 µl ve C-GFP RT 2 için 108.5 µl liyofilize primerlerin üzerine ilave edilmiştir. Primerin bulunduğu tüpün üzerine sulandırım tarihi ve 200 pmol/µl şeklinde yazılmıştır. 200 pmol/µl stok primerler 10 kat sulandırılarak izole edilen plazmidler Real-time PCR’da kontrol edilmiştir.

Crypto-construct GFP vektör primerleri aşağıdaki koşullar kullanılarak optimize edilmiştir.

- 1) H₂O (negatif kontrol)
- 2) HCT-8 DNA
- 3) Crypto-GFP pDNA

H₂O.....6.9X 3.1= 22.01 µl

MgCl₂.....0.6 X3.1= 1.24 µl

c-GFP F1.....0.25X3.1= 0.775 µl

c-GFP R1.....0.25X3.1= 0.775 µl

Master miks.....1X3.1= 3.1 µl

Real time PCR’da optimize edilen bu primerler kullanılarak Crypto-construct GFP vektör transformantları önce konvensiyonel daha sonra, Real time PCR’da doğrulanmıştır. Çizelge 3.14’ te GFP vektör transformantları için kullanılan Real time PCR programı verilmiştir.

Çizelge 3.14. GFP vektör transformantlarının Real time PCR’da doğrulanmasına ait program

Analysis Mode	Cycles Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode
Pre-Incubation				
None	1	95 °C	10 min	none
Amplification				
Quantification 40	Denaturation	95 °C	1 s	none
		60 °C (Primere bağlı)	2 s	none
		72 °C =amplicon/[bp]/25s	9 s	single
Annealing				
Extension				
Melting Curve				
Melting Curves	1	95 °C	0 s	none
		65 °C	15 s	none
Annealing		95 °C Slope= 0.1°C/sec	0 s	continuous
	Melting			
Cooling				
None	1	40 °C	30s	none

3.2.11.1. Crypto-construct GFP Vektör Transformantları İçin Conventional PCR

- 1) H₂O
- 2) c-GFP pDNA
- 3) Elektropore edilmiş c-GFP transkripti c-DNA
- 4) Elektropore edilmemiş c-GFP transkripti c-DNA
- 5) HCT-8 c-DNA
- 6) H₂O c-DNA
- 7) Elektropore edilmiş c-GFP RNA
- 8) Elektropore edilmemiş c-GFP RNA
- 9) HCT-8 RNA

PCR miks

H₂O.....17.8x 9.1=
 10xPCR buffer...2.5x 9.1=
 25 mM MgCl₂ 1.5x 9.1=
 10 mM dNTP.....0.5x 9.1=
 c-GFP F2.....0.25x9.1=

c-GFP R2.....0.25x9.1=
 Taq pol(5U/ µl)...=0.2x9.1=
 Toplam Hacim.....23 µl

Bu karışımın üzerine her bir c-DNA örneğinden 2 µl ilave edilir.

Konvensiyonel PCR cihazında aşağıdaki program yazılarak işlem yapılmıştır.

94°C 2 dak.

94°C 15 sn.

57°C 30 sn.

68°C 22 sn.

72°C 6 dak.

10°C 1saat veya daha fazla tutulabilir veya hemen çıkarılıp kullanılabilir.

3.2.11.2. Crypto-construct GFP Vektör Transformantları (c-DNA) İçin C-GFPF2-R2 Primerleri ile Real-time PCR

Yukarıda verilen optimizasyon koşulları kullanılarak aynı c-DNA örneklerinin Real time PCR ile analizi gerçekleştirilmiştir.

H₂O.....6.9x8.1= 55.89 µl
 MgCl₂.....0.6x8.1= 48.6 µl
 C-GFP F2....0.25x8.1= 2.025 µl
 C-GFP R2...0.25x8.1= 2.025 µl
 Master miks....1x8.1= 8.1 µl

3.2.11.3. Nested Primerleri İle Real-time PCR

Crypto-construct GFP vektör m-RNA'larının spesifik olmayan ürünler olup olmadığını belirlemek için Nested PCR yapılmıştır. Bunun için C-GFP F2-R2 primerleri arasında yeni forward ve revers primerleri (C-GFP NF1ve C-GFP NR1) dizayn edilmiştir. C-GFPF2-R2 primerleri kullanılarak elde edilen ampikonlar C-GFP NF1 ve C-GFP NR1 nested primerleri ile kontrol edilmiştir.

C-GFP NF1: TTTGAAGGAGATACTCTTG.....28.34nmol

C-GFP NR1: GCAAGTTGAACTGATCCAT.....24.66 nmol

C-GFP NF 1 için 142 µl distile su; C-GFP NR 1 için 123.3 µl distile su liyofilize primerlerin üzerine ilave edilmiştir. Primerin bulunduğu tüpün üzerine sulandırım tarihi ve 200 pmol/ µl şeklinde yazılıp, 200 pmol/ µl stok primerler 10 kat sulandırılarak Real-time PCR’da kullanılmıştır.

C-GFP NF1 ve C-GFP NR1 Primerleri İle Real–time PCR Yapılacak Örnekler

- 1) H₂O amplikon
- 2) c-GFP pDNA amplikon
- 3) Elektropore edilmiş c-GFP transkripti c-DNA amplikon
- 4) Elektropore edilmemiş c-GFP transkripti c-DNA amplikon
- 5) HCT-8 c-DNA amplikon
- 6) Elektropore edilmiş c-GFP RNA amplikon
- 7) Elektropore edilmemiş c-GFP RNA amplikon
- 8) HCT-8 RNA amplikon

C-GFP NF 1- NR 1 primerleri ile PCR karışımı

H₂O.....7.1x8.1= 57.51 µl

MgCl₂.....0.4x8.1= 3.24 µl

C-GFP NF 1....0.25x8.1= 2.025 µl

C-GFP NR 1 ...0.25x8.1= 2.025 µl

Master miks....1x8.1= 8.1 µl

Crypto-construct GFP vektör m-RNA’larının Nested primerleri ile doğrulanması için kullanılan program Çizelge 3.15’te verildiği gibidir.

Çizelge 3.15. Crypto-construct GFP vektör m-RNA'larının Nested primerleri ile doğrulanmasına ait Real time PCR programı

Analysis Mode	Cycles Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode	
Pre-Incubation					
None	1	95 °C	10 min	none	
Amplification					
Quantification	45	Denaturation	95 °C	1 s	none
		Annealing	66 °C (Primere bağlı)	2 s	none
		Extension	72 °C =amplicon/[bp]/25s	10 s	single
Melting Curve					
Melting Curves	1	Denaturation	95 °C	0 s	none
		Annealing	65 °C	15 s	none
		Melting	95 °C Slope= 0.1°C/sec	0 s	continuous
Cooling					
None	1	40 °C	30s	none	

3.2.12. pEYFP-Mem Vektör Transformantları İçin RT-PCR

Elektroporasyon I deneyinin YFP örneklerinden öncelikle RNA izole edilip daha sonra c-DNA'lar elde edilmiştir.

RT-PCR yapılan YFP Vektör Örnekleri

1-H₂O (neg)

2-YFP p-DNA (poz)

3-Electropore edilmiş YFP transkripti

4-Electropore edilmemiş YFP transkripti

5- Electropore edilmiş YFP+ sporozoit transkripti

6-Electropore edilmemişYFP+sporozoit transkripti

7-HCT-8

Premiks I

10 mM dNTPs 1x7.1= 7.1 µl

Oligo dT(0.5 µg/ µl) 1 x7.1= 7.1 µl

RNA.....8 x7.1= 56.8 µl

Toplam Hacim.....71 µl

İyice karıştırılıp 65°C'de 5 dakika tutulur. En az 1 dakika tüpler soğutulana kadar buz üzerinde bekletilir. Vortekslenip premix I'in tüpün altında toplanması sağlanır.

Premiks II

10X buffer.....	2 x 7.1= 14.2 µl
0.1 M DTT.....	2 x 7.1= 14.2 µl
25 mM MgCL ₂	4 x 7.1= 28.4 µl
RNAse out- Rnase inhibitör.....	1x7.1= 7.1 µl
Toplam Hacim.....	63.9 µl

Premix II'yi premix I ilave edip 42°C'de 2 dakika bekletilir.

1 µl superscript revers transcriptaz eklenip, 42°C'de 50 dakika, 70°C'de 15 dakika bekletilir. Örnekler buz üzerinde 10 dakika tutulup vortekslenerek tüm karışım dibte toplanır.

1µl RNAseH solüsyonu konulup 37°C'de 20 dakika bekletilir. Tekrar vortekslenir ve örneklerin miktarı ng olarak ölçülür.

3.2.12.1. pEYFP-Mem Vektör ile Real-time PCR Koşullarının Optimizasyonu

Öncelikle YFP F1-R1 primerleri kullanılarak Real-time PCR koşulları optimize edilmiştir.

F: AACA GCCACAACGT CT 37.6 nmol

R: CCT GCT GGA GTT CGT 31.9 nmol

YFP F 1 için 188 µl distile su; YFP R 1 için 159.5 µl distile su liyofilize primerlerin üzerine ilave edilmiştir. Primerin bulunduğu tüpün üzerine sulandırım tarihi ve 200 pmol/µl şeklinde yazılmıştır. 200 pmol/µl stok primerler 10 kat sulandırılarak PCR için kullanılmıştır.

YFP F1-R1 primerleri kullanılarak aşağıdaki koşullarda optimize edilmiştir.

- 1) H₂O (negatif kontrol) Mg=0.4 µl
- 2) HCT-8 DNA
- 3).Crypto-GFPpDNA

H₂O 6.9 x 4.1= 28.29 µl

MgCl₂ 0.6 x 4.1= 2.46 µl

Ds-Red F 0.25 x 4.1= 1.025µl

Ds-Red R 0.25 x 4.1= 1.025 µl

Master mix 1x4.1= 4.1 µl

Toplam Hacim 36.9 µl

Çizelge 3.16. pEYFP-Mem Vektör ile Real-time PCR Koşullarının Optimizasyonuna ait program

Analysis Mode	Cycles Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode	
Pre-Incubation					
None	1	95 °C	10 min	none	
Amplification					
Quantification	35	Denaturation	95 °C	1 s	none
		Annealing	66 °C (Primere bağlı)	2 s	none
		Extension	72 °C =amplicon/[bp]/25s	10 s	single
Melting Curve					
Melting Curves	1	Denaturation	95 °C	0 s	none
		Annealing	65 °C	15 s	none
		Melting	95 °C Slope= 0.1°C/sec	0 s	continuous
Cooling					
None	1	40 °C	30s	none	

3.2.12.2. RT-PCR Yapılan YFP Vektör Transformant Örnekleri

Elde edilen cDNA örneklerinde YFP ekspresyonunu göstermek için YFP primerleri kullanılarak Real time PCR yapıldı

- 1) H₂O (negatif kontrol) Mg=0.6 µl
- 2) YFP p-DNA (poz)
- 3) Elektropore edilmiş YFP transkript (c-DNA)
- 4) Elektropore edilmemiş YFP (c-DNA)
- 5) Elektropore edilmiş YFP transkript + sporozoit(c-DNA)
- 6) Elektropore edilmemiş YFP transkript + sporozoit(c-DNA)
- 7) HCT-8 (c-DNA)
- 8) Elektropore edilmiş YFP RNA
- 9) Elektropore edilmemiş YFP RNA

- 10) Elektropore edilmiş YFP + sporozoit RNA
 11) Elektropore edilmemiş YFP + sporozoit RNA
 12) HCT-8 RNA

YFP F1-R1 primerleri ile hazırlanan PCR karışımı

H₂O 6.9 x 12.1= 83.49 µl

MgCl₂ 0.6 x 12.1= 7.26 µl

Ds-Red F 0.25 x 12.1= 3.025 µl

Ds-Red R 0.25 x 12.1= 3.025 µl

Master miks 1x12.1= 12.1 µl

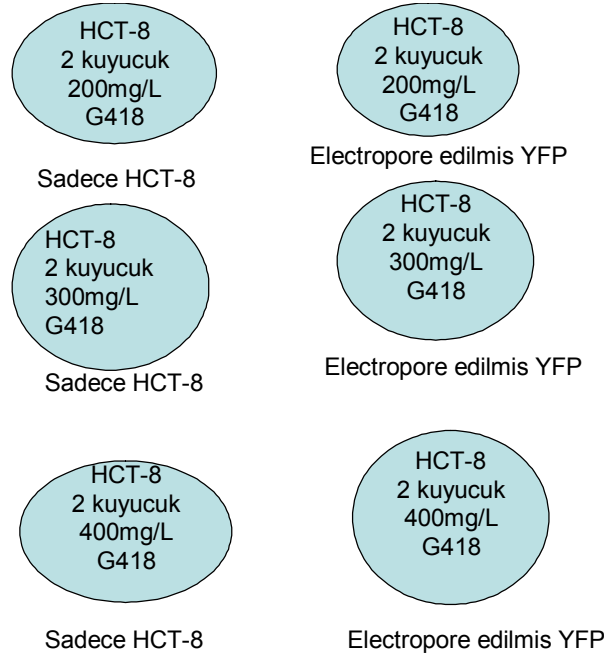
Toplam Hacim= 108.9 µl

Çizelge 3.17. YFP Vektör transformantlarının doğrulanmasına ait Real time PCR programı

Analysis Mode	Cycles Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode
Pre-Incubation				
None	1	95 °C	10 min	none
Amplification				
Quantification	49	95 °C	1 s	none
Denaturation		66 °C (Primere bağlı)		2 s
Annealing		72 °C =amplicon/[bp]/25s		10 s
Extension		single		
Melting Curve				
Melting Curves	1	95 °C	0s	none
Denaturation		65 °C	15 s	none
Annealing		95 °C	0.1 s	continuous
Melting		Slope= 0.1 °C/sec		
Cooling				
None	1	40 °C	30s	none

Aynı zamanda YFP vektörün stabil transformasyonu Geneticin selektif antibiyotiği (G4 18 Life Technologies, Kat no: 11811-023) kullanılarak yapıldı. Bu antibiyotik stable transforme edilmiş HCT-8 hücreleri dışındaki bütün hücreleri öldürerek transformantların seçilmesini sağladı. Ortama ilave edilen taze besi yeri ile

tek olarak elde edilen YFP transformantı yeniden çoğaltılarak bütün plakı kapladı. Deney Şekil 3.12’de verildiği gibi dizayn edildi.



Şekil 3.12. YFP vektörünün stabil transformasyon deney düzeneği

Her iki günde bir Geneticin selektif antibiyotiği eklenip taze RPMI-1640 besi ortamı ile eski ortam değiştirildi. 4. günden itibaren 300 mg/L ve 400 mg/L konsantrasyonlarda antibiyotiğin uygulandığı kuyucuklarda hiçbir canlı hücre kalmadı. Ancak 200 mg/L konsantrasyonunun uygulandığı kuyucukta sadece 1 tane canlı hücre görüldü. Bu hücrenin transformant olup olmadığını belirlemek için yine her iki günde bir, önce tüm eski ortam uzaklaştırılıp Geneticin antibiyotiği ve taze besi ortamı ilave edildi. Yaklaşık 3 hafta bu uygulamaya devam edildi ve tüm playti kaplayan transformantlar elde edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular Lipofektamin

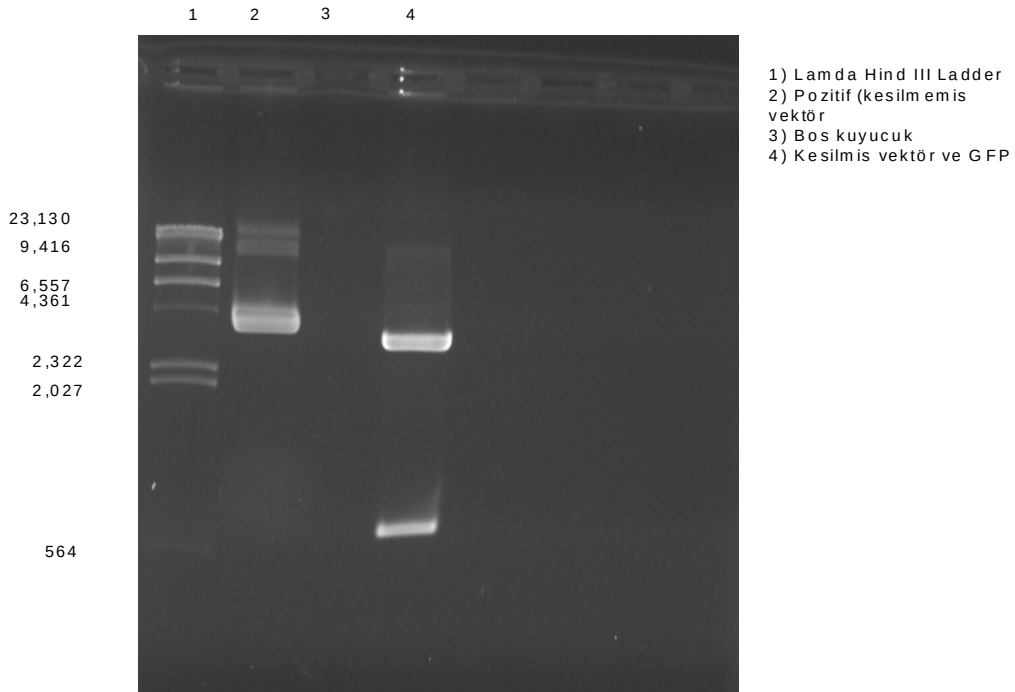
Weechrangsın ve arkadaşları insan kanser hücre kültürlerinde katyonik vektörlerin (polyetilamin, PEI25K, lipofektamin), elektroporasyon yöntemi ve bu yöntemlerin her ikisinin birlikte uygulanmasının transfeksiyon üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Katyonik vektörler ve elektroporasyon yöntemleri ayrı ayrı uygulandığında transfeksiyon etkinliğine sahipken, birlikte uygulandıklarında transfeksiyon üzerinde etkinliklerinin olmadığı bulunmuştur (Weechrangsın ve ark, 2007)

Nickcevic ve arkadaşları lipofektamin (life technologies) ve effekten (Qiagen) transfeksiyon yöntemiyle lacZ reporter genlerini taşıyan pCH110 ökaryotik deney vektörlerini NT2/D1 ve Hela hücre kültürlerine transfekte etmişlerdir. Effekten yöntemiyle transfeksiyon etkinliği için protokolün önerdiği plazmid DNA sıندان 1.5-3 kez daha yüksek oranda DNA kullanılmış ve herhangi bir sitotoksosite sorunu ile karşılaşılmamıştır. Lipofektamin yöntemiyle ise her iki hücre kültüründe protokolün belirttiği optimal transfeksiyon etkinliği elde edilmiştir (Nikcevic ve ark, 2003).

Decastro ve ark (2006), katyonik lipid temelli transfeksiyon yöntemlerini büyümekte olan vertebra embriolarında gen ekspresyonlarını göstermek için kullanmışlardır. Bu amaçla lipofektamin, lipofektamin 2000, lipofektamin (mPEG-SS-DOPE) gibi katyonik lipid transfeksiyon yöntemleri optimize edilmiş hücre kültürlerinde denenmiştir. İn vitro gen ekspresyonlarında lipofektamin 2000 (1:4 DNA/ lipofektamin 2000) ile % 7.5 oranında lipofektamin (mPEG-SS-DOPE) yöntemlerinin daha yüksek oranda ekspresyona neden oldukları belirlenmiştir. Her iki yöntemde etkili olmasına rağmen lipofektamin (mPEG-SS-DOPE) yönteminin lipofektamin 2000 yöntemine göre daha sınırlı hücre kültürlerinde etkili olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmayla katyonik lipid temelli transfeksiyon yöntemlerinin elektroporasyon yöntemine alternatif kullanılabileceği tespit edilmiştir.

4.1.1. NcoI ve SpeI Restriksiyon Enzimleriyle Transformantların Kesilerek Doğrulanmasına Ait Bulgular

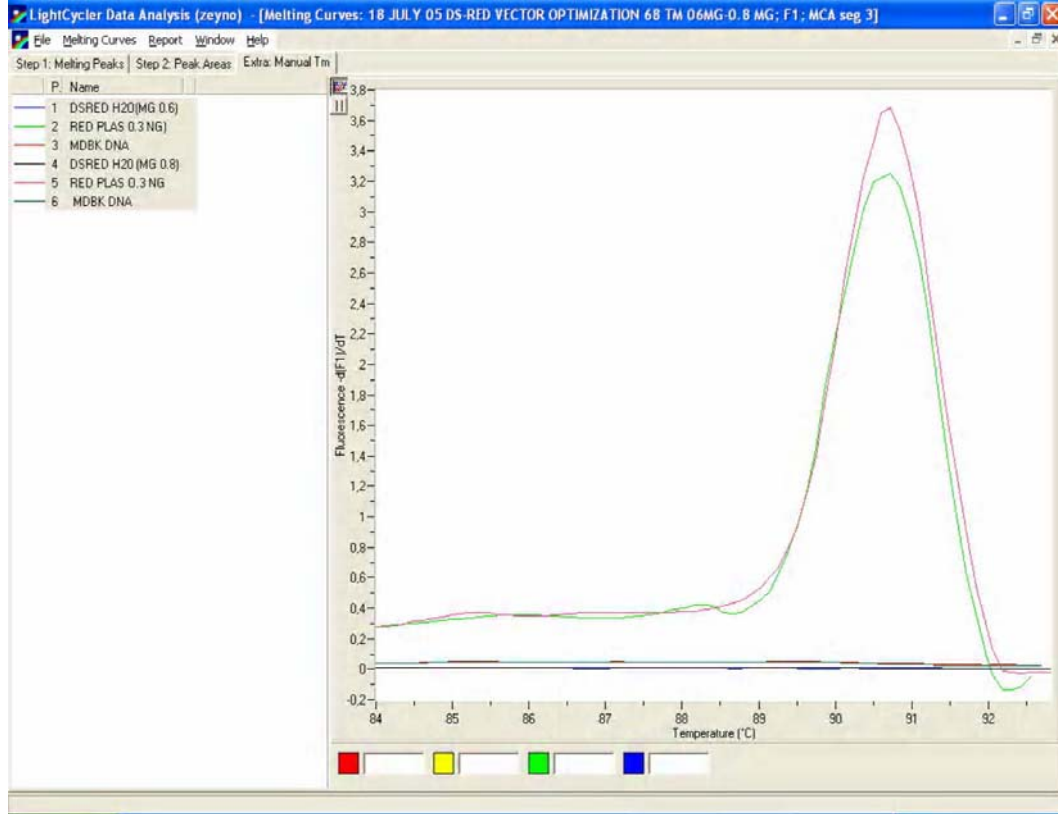
DH α Tm *Escherichia coli* komponent bakterilerine transformasyonu yapılan plazmidler (ligasyon ve transformasyon), LB agar besiyerinde çoğaltılmıştır. Elde edilen kolonilerden plazmid izolasyonu yapıp, izolasyonu yapılmış plazmidlerin Crypto construct GFP vektörü bulundurup bulundurmadıkları NcoI ve SpeI Restriksiyon enzimleriyle kesilerek kontrol edilmiştir. Restriksiyon enzim ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi sonucunda elde edilen bulgular Şekil 4.1.'de görülmektedir.



Şekil 4.1. Crypto construct GFP vektörün NcoI ve SpeI Restriction Enzimleriyle kesilmesi (Örnek sırası: 1: Lamda Hind III Ladder; 2: Pozitif kontrol (Kesilmemiş Crypto construct GFP vektör, sirküler vektör); 3: Boş kuyucuk; 4: Bilinmeyen örnek (Kesildikten sonra linear Crypto construct GFP vektör 3260bp ve sadece GFP 710bp))

4.1.2. pCMV- DsRed-Ekspress Plazmidinin Real time PCR ile Doğrulanmasına Ait Bulgular

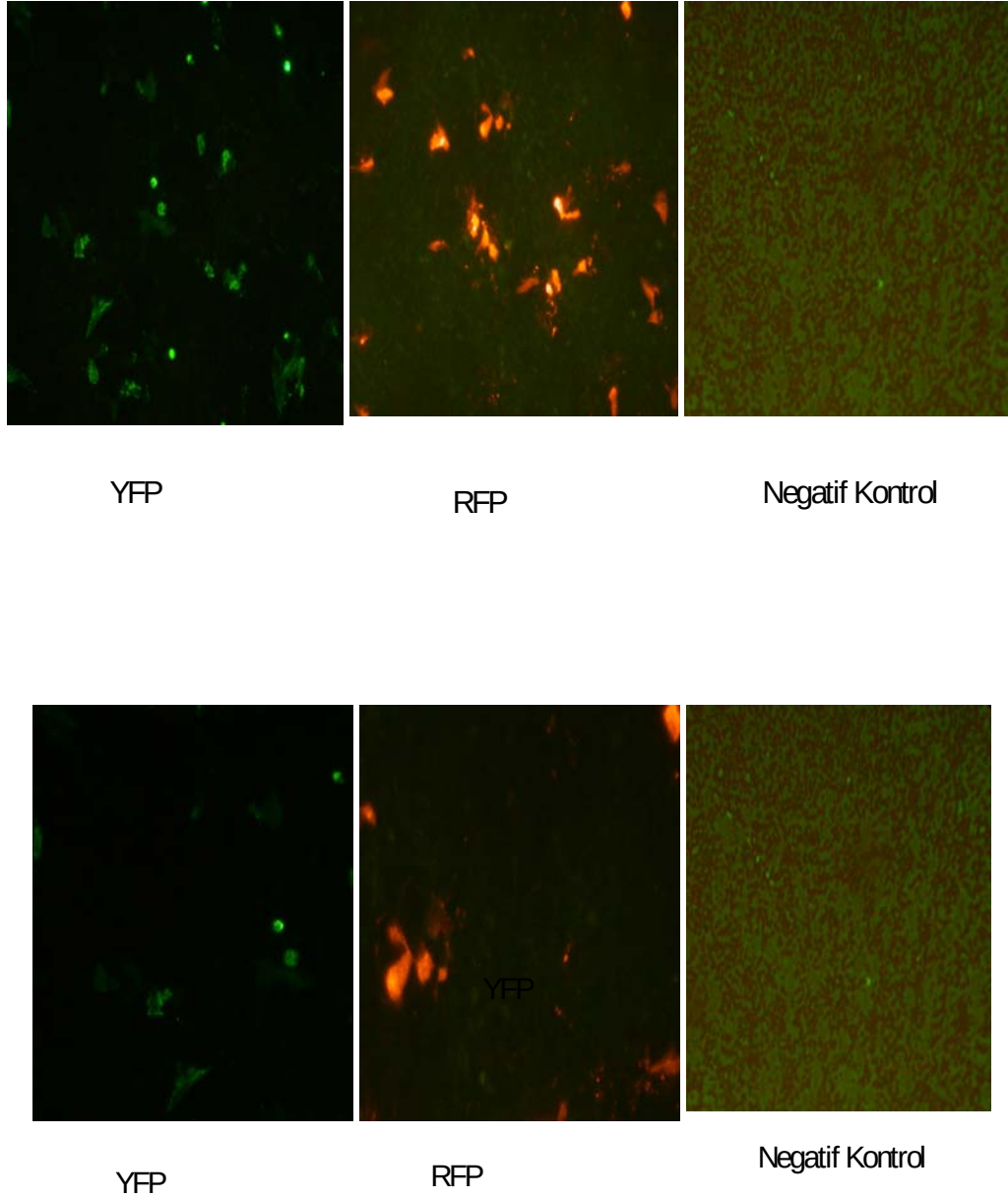
İzole edilen plazmidlerin RED vektör olup olmadığı RFP primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda doğrulanmıştır. Elde edilen Real time PCR sonucu Şekil 4.2’de görülmektedir.



Şekil 4.2. pCMV- DsRed-Express vektör kolonilerinin melting curve analizi (Örnek sırası: 1: Negatif kontrol (sadece su); 2: Red plazmid vektör (pozitif kontrol); 3; MDBK DNA (kullanılan hücre kültürü DNAsı-negatif kontrol); 4: Negatif kontrol (sadece su- MgCl 0.8 için); 5: Red plazmid vektör (pozitif kontrol MgCl 0.8 için); 6: MDBK DNA (kullanılan hücre kültürü DNAsı-negatif kontrol MgCl 0.8 için))

4.1.3. Transfeksiyon İşleminde Sonra Plazmid Ekspresyonunun Floresans Mikroskop Altında İncelenmesi

Transfeksiyondan bir gün sonra chamber permanox slayt floresan mikroskop altında incelenip her bir plazmid ekspresyonunun fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. pCMV- DsRed-Ekspres vektör ve pEYFP-Mem Vektör ekspresyonlarının İnverted Mikroskop altındaki görüntüleri (Birinci örnek sırası: YFP: enfektesiz HCT-8 hücrelerindeki YFP ekspresyonu; RFP: enfektesiz HCT-8 hücrelerindeki RFP ekspresyonu; Negatif Kontrol: sadece HCT-8 hücreleri; İkinci örnek sırası: YFP: enfekteli HCT-8 hücrelerindeki YFP ekspresyonu; RFP: enfekteli HCT-8 hücrelerindeki RFP ekspresyonu; Negatif Kontrol: sadece HCT-8 hücreleri)

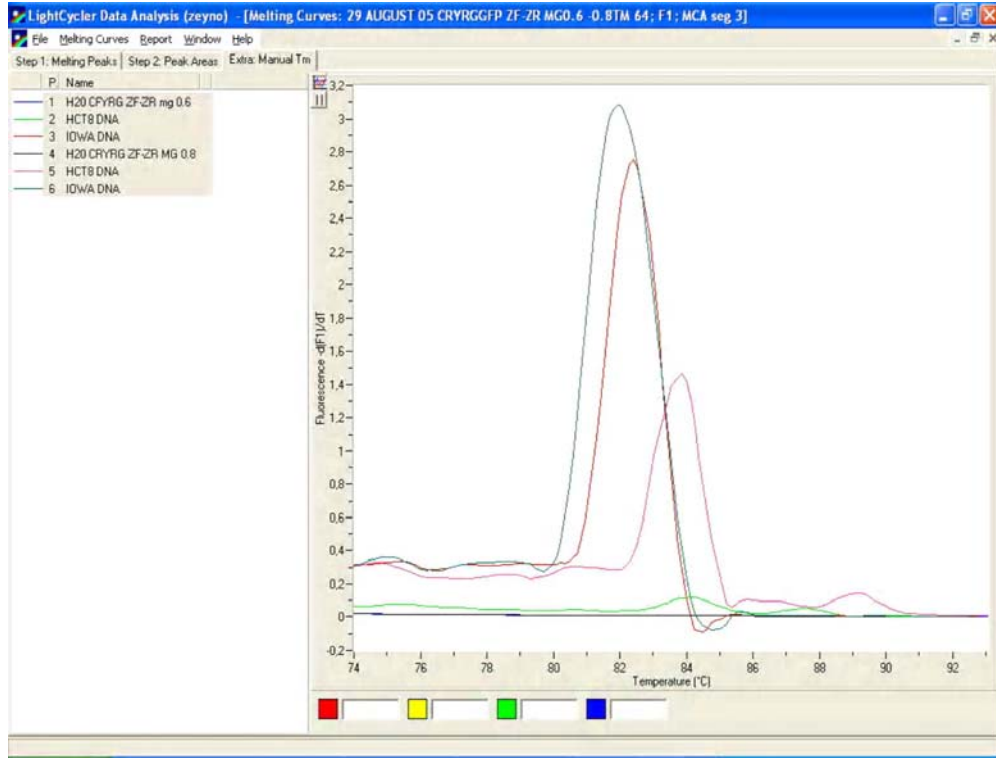
Şekil 4.3'te görüldüğü gibi *C. parvum* sporozoitleriyle enfekte edilmeyen HCT-8 hücrelerine transfekte edilen YFP ve RFP vektör ekspresyonlarının, enfekteli HCT-8 hücrelerindeki ekspresyondan daha belirgin ve fazla olduğu tespit edilmiştir.

Bu durum HCT-8 hücrelerinin bir kısmının *C. parvum* sporozoitleriyle enfeksiyon sonucunda canlılıklarını yitirdiği, dolayısıyla aktif olmayan bu hücrelerde ekspresyonun gözlenmediği şeklinde açıklanmıştır.

Lipofektamin ile transfeksiyon neticesinde floresan mikroskop altında YFP ve RFP vektörlerinin gözle görülür ekspresyona sahip olmasına rağmen GFP vektörüyle herhangi bir ekspresyon gözlenmemiştir. Gözle görülebilir ekspresyon olmasa da azda olsa bir ekspresyonun olup olmadığını kontrol etmek için GFP vektör transformantları bilinmeyen örnekler olarak kullanılıp RT-PCR yapılarak incelenmiştir. RFP vektör ekspresyonunun daha belirgin olmasından dolayı bu vektör RT-PCR sırasında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

4.1.4. HCT-8 Hücrelerinin Sporozoitlerle Enfeksiyonunun Kontrolüne Ait Real time Optimizasyon Sonuçları

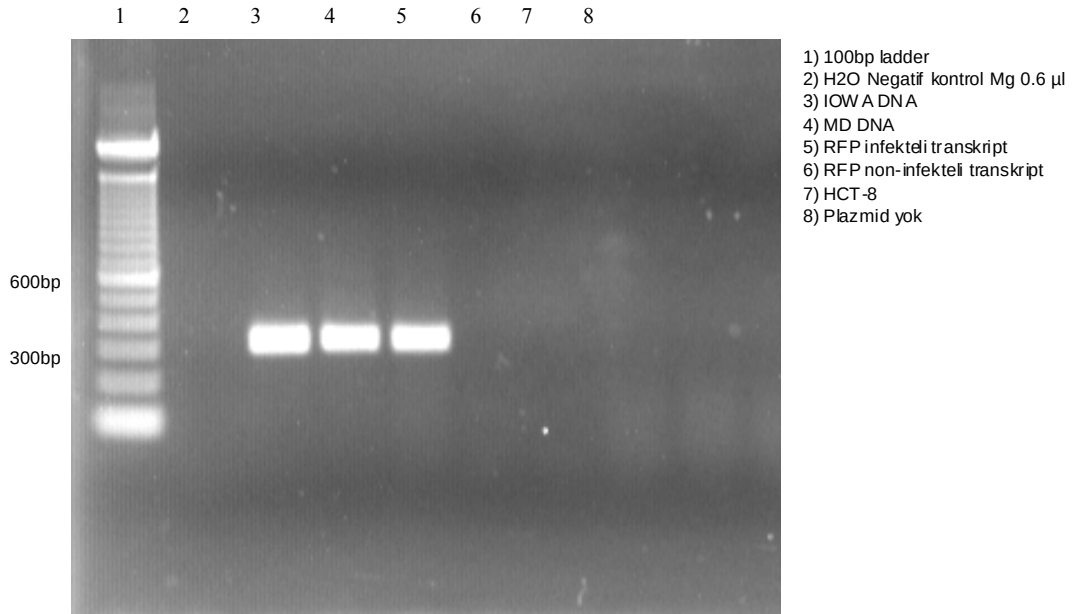
Lipofektamin yöntemiyle transfeksiyonda deney enfekteli ve enfekteli olmayan HCT-8 hücreleri kullanılarak iki kısımda dizayn edilmiştir. HCT-8 hücrelerinin ookistler ile enfekte edilip edilmediği IMF yönteminin yanı sıra L11 ve β -tübin primerleri kullanılarak da tespit edilmiştir. Öncelikle bu primerlerin optimizasyonu, GFP vektör pozitif kontrol olarak kullanılıp Real-time PCR cihazında sağlanmıştır. Optimizasyon işlemi annealing sıcaklığı ve $MgCl_2$ üzerindeki değişimlerle sağlanmıştır.



Şekil 4.4. L11 primerlerinin Real-time PCR ile Optimizasyonu (Örnek sırası: 1: Negatif kontrol (H₂O MgCl₂ 0.6 için); 2: Sadece HCT-8 DNA(negatif kontrol, MgCl₂ 0.6 için); 3: IOWA cinsi ookist (pozitif kontrol, MgCl₂ 0.6 için) 4: Negatif kontrol (H₂O, MgCl₂ 0.8 için); 2: Sadece HCT-8 DNA (negatif kontrol, MgCl₂ 0.8 için); 3: IOWA cinsi ookist (pozitif kontrol, MgCl₂ 0.8 için)

L 11 primerlerini optimize ederken MgCl₂ 2.5 mM (0.6 µl) ve MgCl₂ 3 mM (0.8 µl) konsantrasyonlarında kullanılmıştır. LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kitinin master miksi 1mM konsantrasyonunda MgCl₂ içermektedir. Stok 25Mm'lık MgCl₂ den 0.6 ve 0.8 µl alınarak yukarıda verilen konsantrasyonlarda MgCl₂ elde edilmiştir. Her iki konsantrasyonda da örnekler çoğalıp primer-dimer oluşumu gözlenmemesine rağmen ürün tasarrufu açısından düşünülerek MgCl₂'ün 2.5 mM (0.6 µl) konsantrasyonunda kullanılmasına karar verilmiştir. Normalde MgCl₂'ün yüksek konsantrasyonda kullanılması çoğu zaman istenmeyen spesifik olmayan çoğalmalara neden olur. Ancak L 11 primerleri için böyle bir durum söz konusu olmamıştır.

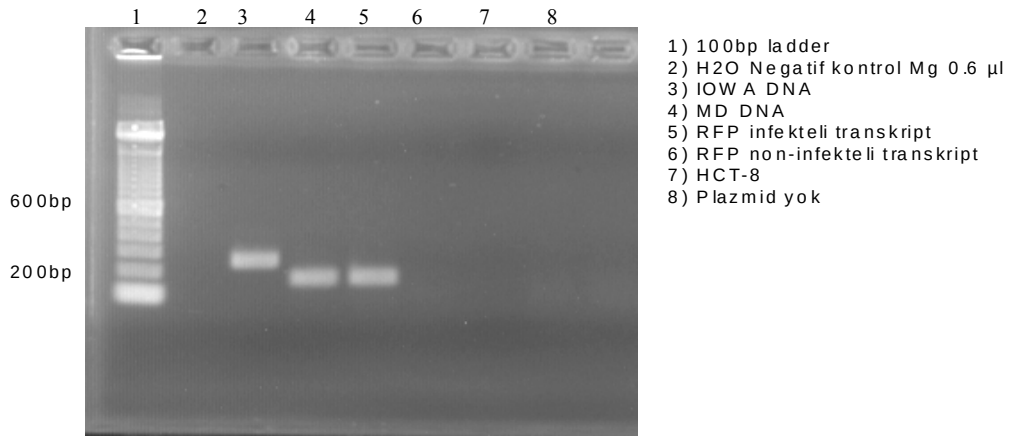
Deney dizayn edilip transfeksiyon gerçekleştirildikten sonra yapılan RT-PCR ile elde edilen C-DNA'lar L11 primerleri kullanılarak HCT-8 hücrelerinin enfekteli olup olmadığı yukarda verilen optimizasyon koşulları ile belirlenmiştir. PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 4.5'te gösterildiği gibidir.



Şekil 4.5. Real time PCR'da L11 primerleri kullanılarak testlenen RT PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri
(Örnek sırası:1: 100bp ladder; 2: Negatif kontrol (H₂O, MgCl₂ 0.6); 3: IOWA DNA (pozitif kontrol); 4: MD DNA (pozitif kontrol); 5: Enfekteli HCT-8 hücrelerine transfekte edilmiş RFP vektör transkriptleri (c-DNA); 6: Enfekte edilmemiş HCT-8 hücrelerine transfekte edilmiş RFP vektör transkriptleri (c-DNA); 7) Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol); 8) Lipofektamin solüsyonları + HCT-8 hücreleri (plazmid yok, negatif kontrol)

HCT-8 hücrelerinin *C. parvum* sporozoitleri tarafından enfekte edildiğini, pozitif kontrol olarak kullanılan IOWA DNA'sı ile Enfekteli HCT-8 hücrelerine transfekte edilmiş RFP vektör transkriptleri örneğinin agaroz jelde 318 bp'lik aynı bandı göstermesi doğrulamıştır.

Transfeksiyondan sonra yapılan RT-PCR ile elde edilen C-DNA'lar β - tübülün primerleri kullanılarak da HCT-8 hücrelerinin enfekteli olup olmadığı Real time PCR'da test edilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 4.6'da görülmektedir.



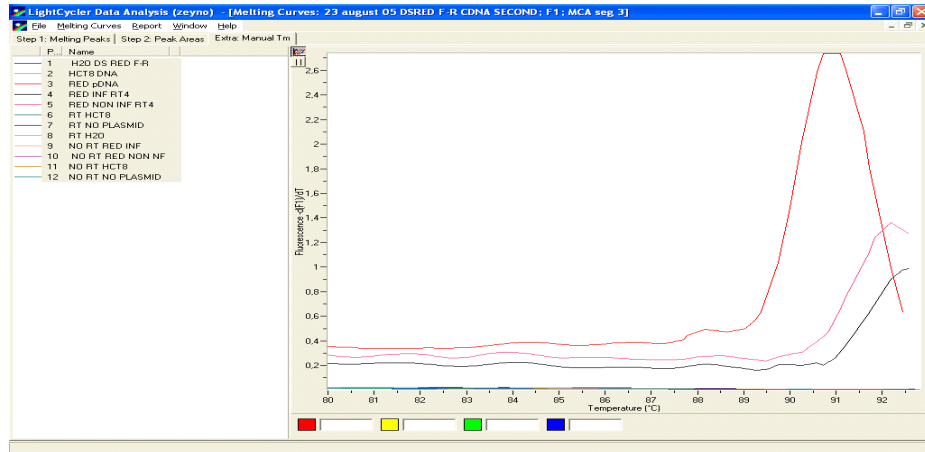
Şekil 4.6. Real time PCR'da β - tübülün primerleri kullanılarak testlenen RT PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri
Örnek sırası:1: 100bp ladder; 2: Negatif kontrol (H₂O, MgCl₂ 0.6); 3: IOWA DNA (pozitif kontrol); 4: MD DNA (pozitif kontrol); 5: İnfekteli HCT-8 hücrelerine transfekte edilmiş RFP vektör transkriptleri (c-DNA); 6: Enfekte edilmemiş HCT-8 hücrelerine transfekte edilmiş RFP vektör transkriptleri (c-DNA); 7) Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol); 8) Lipofektamin solüsyonları + HCT-8 hücreleri (plazmid yok, negatif kontrol)

HCT-8 hücrelerinin *C. parvum* sporozoitleri tarafından enfekte edildiğini, L11 primerlerinin yanı sıra β tübülün primerleri de pozitif kontrol olarak kullanılan IOWA DNAsı ile Enfekteli HCT-8 hücrelerine transfekte edilmiş RFP vektör transkriptleri örneğinin agaroz jelde aynı bandı göstermesi doğrulamıştır. Bu primerlerin amplifiye ettiği baz dizisinde intronlar bulunduğu için DNA=264bp (3. ve 4. örnek) iken mRNA=166 bp (5. örnek)'dir.

Lipofektamin yöntemiyle transfeksiyon neticesinde floresans mikroskop altında RFP ve YFP vektör ekspresyonu yukarıda gösterildiği gibi oldukça net

olmasına rağmen GFP vektör ekspresyonu gözle görülemedi. Yapılan RT-PCR ile olası bir GFP mRNA ekspresyonunu belirlemek amaçlanmıştır. RFP vektör transformantları gözle görülür bir ekspresyona sahip olduğu için, RT-PCR da pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ekspresyondan emin olduğu için RNA'ların mRNA'ya dönüşmesi muhtemel olup dolayısıyla RT-PCR işlemlerini ve koşullarını optimize etmede bu vektör transformantlarından yararlanılmıştır. RFP vektör transformantlarından elde edilen cDNA'lar Ds RED F-R primerler kullanılarak Real-time PCR'da doğrulanmıştır. GFP vektör mRNA transkriptleri ise c- GFP F1-R1 primerleri kullanılarak real time PCR'da test edilmiştir.

4.1.5. pCMV-DsRed Ekspres Vektörün HCT-8 Hücrelerine Transfeksiyonundan Sonra Elde Edilen m-RNA Transkriptlerine Ait Real time PCR Sonuçları



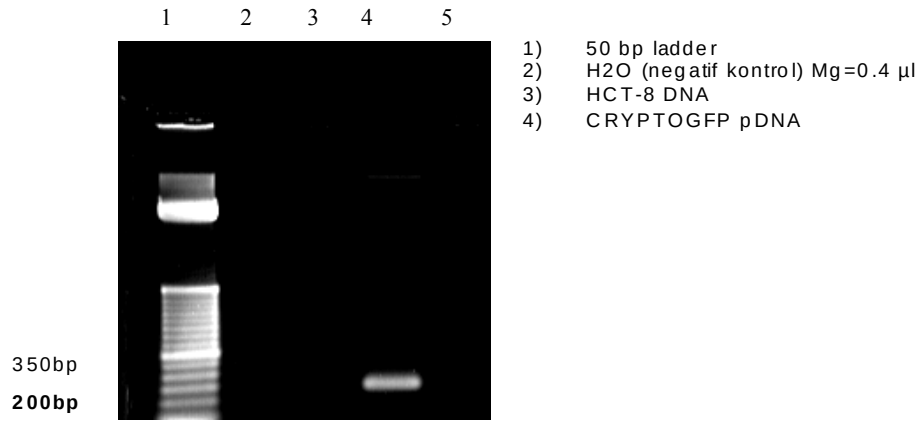
Şekil 4.7. pCMV-DsRed Express Vektörün m-RNA ekspresyonunun Real Time PCR ile gösterilmesi

(Örnek sırası: 1: H₂O (Negatif kontrol) PCR için ; 2: HCT-8 DNA (negatif kontrol); 3: pCMV-DsRed plazmid DNA'sı (pozitif kontrol); 4: Enfekteli HCT-8 hücrelerine transfekte edilmiş RFP vektör transkriptleri; 5: Enfekte edilmemiş HCT-8 hücrelerine transfekte edilmiş RFP vektör transkriptleri; 6: Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol); 7: Lipofektamin solüsyonları + HCT-8 hücreleri (plazmid yok, negatif kontrol); 8: Negatif kontrol (H₂O) c-DNA için; 9: Enfekteli HCT-8 hücrelerine transfekte edilmiş RFP vektör RNA'sı; 10: Enfekte edilmemiş HCT-8 hücrelerine transfekte edilmiş RFP vektör RNA'sı; 11: Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol) RNA; 12: Lipofektamin solüsyonları + HCT-8 hücreleri (plazmid yok, negatif kontrol) RNA'sı)

Tüm RNA örnekleri her bir cDNA örneklerinin negatif kontrolü olup Şekil 4.7 de görüldüğü gibi bu örneklerde PCR sonucunda herhangi bir çoğalma görülmemiştir. Dolayısıyla elde edilen c-DNA'ların RNA ile kontamine olmadığı, esasen elde edilen RNA larında DNA kontaminasyonuna maruz kalmadığı bu şekilde ispatlanmıştır.

4.1.6. Crypto construct GFP Vektörün HCT-8 Hücrelerine Transfeksiyonundan Sonra Elde Edilen m-RNA Transkriptlerine Ait Real time PCR Sonuçları

c- GFP F1-R1 primerleri kullanılarak GFP vektör ile Real time PCR'da bu primerlerin optimizasyonu yapıp, daha sonra mRNA transkriptleri kontrol edilmiştir. Optimizasyon deneyinin Real time PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 4.8'deki gibidir.

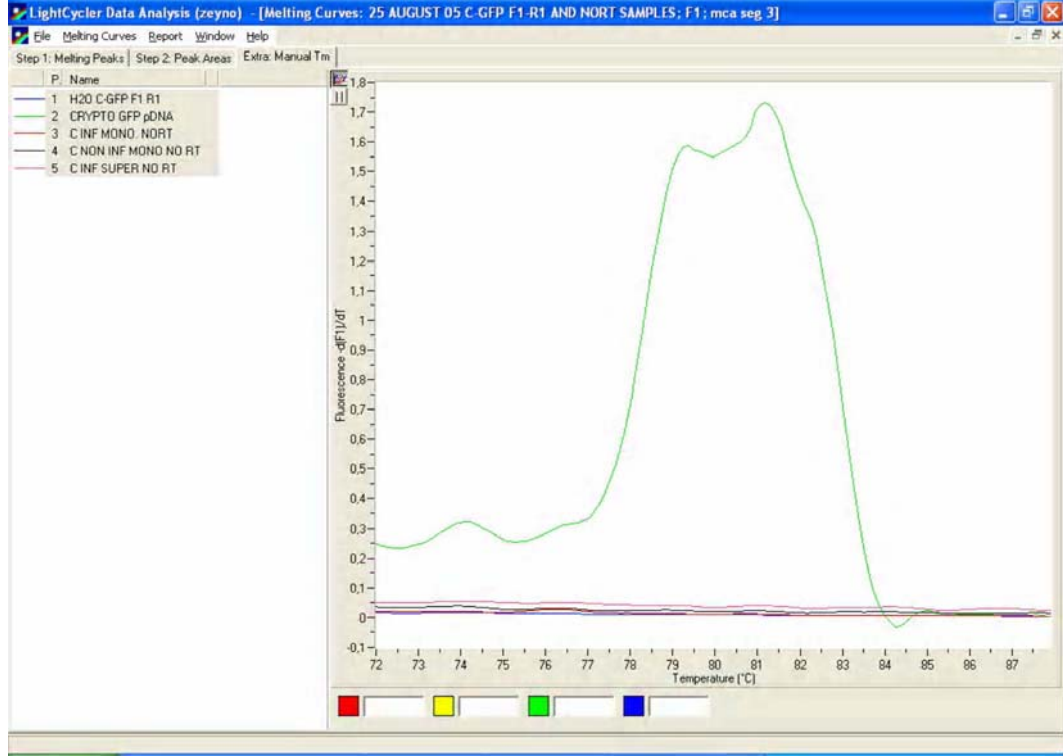


Şekil 4.8. Crypto construct GFP Vektör primerlerinin Real-time PCR ile Optimizasyonu sonucunda elde edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jeldeki Görüntüleri

(Örnek sırası: 1: 50 bp ladder; 2: Negatif kontrol (H₂O, MgCl₂ 0.4 µl) ; 3: Sadece HCT-8 DNA(negatif kontrol, MgCl₂ 0.4 µl için); 4: GFP vektör (pozitif kontrol, MgCl₂ 0.4 µl için)

GFP vektör transformantlarından RT PCR ile cDNA'lar elde edilmiştir. Bu cDNA'lar kullanılarak yapılan Real time PCR'da öncelikle RNA örnekleri herhangi bir DNA kontaminasyonunun olup olmadığını belirlemek için şekil 4.9'daki gibi

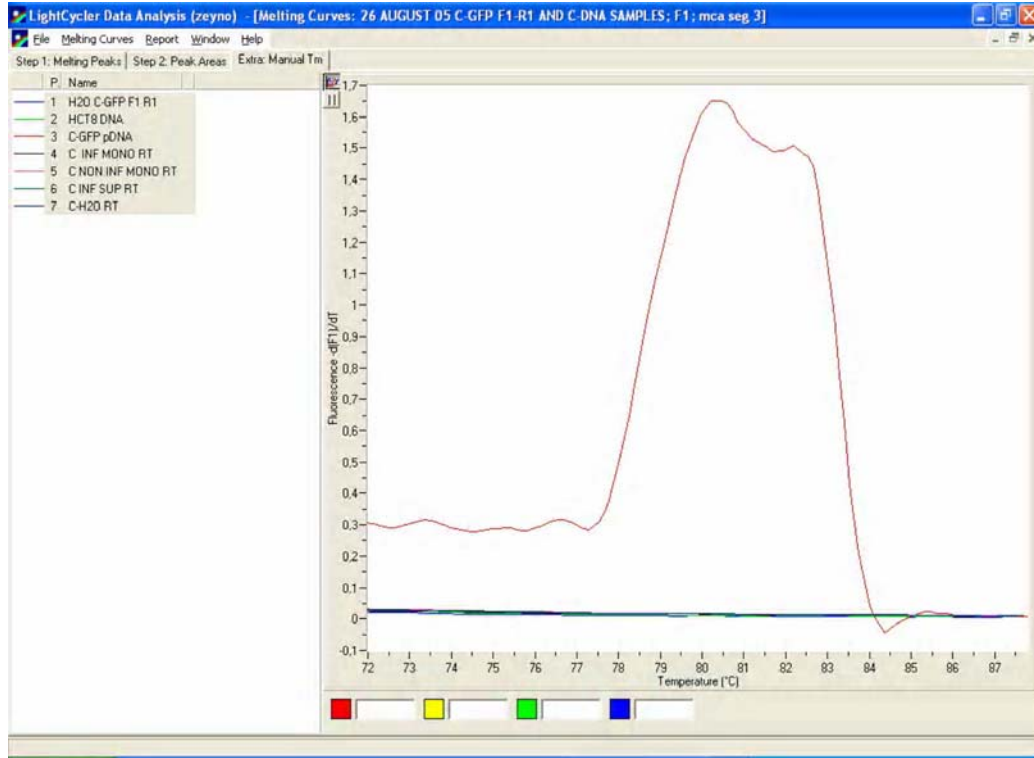
test edilmiştir. RNA’larda kontaminasyon olmadığı gözlemlendikten sonra cDNA’lar Şekil 4.10’da olduğu gibi test edilmiştir.



Şekil 4.9 GFP Vektör transformantlarından elde edilen RNA örneklerinin c-GFP F1-R1 primerleri kullanılarak Real Time PCR ile doğrulanması (Örnek sırası 1: Negatif kontrol (H₂O, MgCl₂ 0.4 µl); 2: Crypto construct GFP Vektör DNA sı (pozitif kontrol); 3: Enfekte edilmiş HCT-8 hücre monolayırına transfeke edilmiş GFP vektör RNA sı; 4: Enfekte edilmemiş HCT-8 hücre monolayırına transfeke edilmiş GFP vektör RNA sı; 5: İnfeke edilmiş HCT-8 hücrelerini bulunduran süpernatantlara transfeke edilmiş GFP vektör RNA’sı;)

Lipofektamin ile transfeksiyon işleminden sonra plaklara inverted mikroskop altında bakıldığında HCT-8 monolayırının bir kısmının plaka tutunmaksızın yüzeye çıktığı gözlenmiştir. Transformantların bir kısmının bu yüzeye çıkan monolayırda olabileceği düşüncesiyle hem süpernatanttan hemde toplanan monolayırlardan RNA izole edilmiştir. Bu RNA’larda herhangi bir DNA kontaminasyonunun olmadığı şekil 4.9’da sadece GFP vektör DNA’sının çoğalıp diğer RNA örneklerinde herhangi bir çoğalmanın olmamasıyla ortaya konulmuştur. Bu RNA örnekleri c DNA örnekleri için negatif kontrolü oluşturmaktadır. Eğer bu

RNA örneklerinde herhangi bir çoğalma görülseydi cDNA'larda elde edilen çoğalmanın DNA kontaminasyonu kaynaklı olduğu düşünülecekti.



Şekil 4.10. GFP Vektör transformantlarından elde edilen cDNA örneklerinin c-GFP F1-R1 primerleri kullanılarak Real Time PCR ile doğrulanması (Örnek sırası 1: Negatif kontrol (H₂O) PCR için; 2: HCT-8 DNA (negatif kontrol); 3: GFP plazmid DNA'sı (pozitif kontrol); 4: Enfekte edilmiş HCT-8 hücre monolayırılarına transfekte edilmiş GFP vektör transkriptleri; 5: Enfekte edilmemiş HCT-8 hücre monolayırılarına transfekte edilmiş GFP vektör transkriptleri; 6: Enfekte edilmiş HCT-8 hücrelerini bulunduran süpernatantlara transfekte edilmiş GFP vektör transkriptleri; 7: Negatif kontrol (H₂O) cDNA için)

Lipofektamin yöntemiyle yapılan GFP vektör transfeksiyonunda RT-PCR ile herhangi bir GFP vektör mRNA transkripti elde edilemedi.

Lipofektamin yöntemi son 10 yıldır değişik tipte hücre kültürlerine genleri aktarmak için kullanılan biyokimyasal metodlardan biridir. Özellikle süspansiyon hücre kültürlerinde tutunan hücre kültürlerinden (adherent) daha verimli sonuçlar elde edilmiştir (Sambrook ve ark, 1989).

Bu metod ile katyonik lipid, hücre kültürleri üzerinde suni membran vezikülleri oluşturup DNA'nın bu veziküllere tutunmasını sağlamaktadır (Felgner ve ark, 1989).

Lipofektamin yönteminin gerek pahalı olması gerek kullanılan besi ortamının antibiyotiksiz olması, gerekse kullanılan hücre kültürünün adherent olması bu yöntemin dez avantajları olduğunu ortaya koymuştur. Bu deney sırasında HCT-8 hücrelerinin büyük bir kısmı plaka tutunmaksızın playtın üstünde besi ortamında yüzüyor şeklindeydi. Bu problemin Lipoektamin yönteminde antibiyotiksiz ortam kullanılması dolayısıyla bir bakteri veya mikoplazma sorununun kontaminasyona neden olabileceği ihtimali üzerinde durulmuştur. Ancak hiçbir muamele görmemiş kuyucuklarda (negatif kontrollerde) herhangi bir bulanıklık veya hücrelerin üste çıkması şeklinde bir problemle karşılaşılmadı. Her ne kadar bu çalışmada bakteri kontaminasyonu görülme de bu yöntemle çalışırken diğer yöntemlere nazaran daha itinalı olmanın gerekliliği görülmüştür. Tüm bu nedenler göz önüne alındığında bu yöntem alternatif olarak transfeksiyon için elektroporasyon yöntemi kullanılmıştır.

4.2. Bulgular Elektroporasyon

Genleri ökaryotik hücrelere aktarmak için 3 kategori mevcuttur (Sambrook ve ark, 1989)

- 1)Biyokimyasal
Kalsiyum-fosfat
DEAE-dextran
Katyonik lipid (Lipofektamin 2000)
- 2) Fiziksel
Biolistik
Elektroporasyon
- 3) Virüs yoluyla transdüksiyon

Elektrik akımıyla hücre membran geçirgenliğinin geri dönüşümlü olarak bozulması işlemi elektroporasyon olarak adlandırılır. Elektroporasyon nükleik asitlerin adherent (tutunan) ve süspansiyon haldeki ökaryotik hücrelere (elektro-

transfeksiyon) ve prokaryotik hücelere (elektro-transformasyon) transfer edilmesinde kullanılan en önemli yöntemlerden biridir (Shigekawa ve Dower, 1988).

Elektroporasyon ile transformasyon etkinliği elektrik alan kuvveti, verilen elektrik akım süresi, sıcaklık, DNA yoğunluğu ve kullanılan ortamın iyonik kompozisyonu gibi pek çok faktöre bağlıdır (Sambrook ve ark., 1989).

Maxwell ve ark (1986), tarafından kalsiyum fosfat ve elektroporasyon yöntemi kullanılarak birkaç değişik hücre tipinde transient transfeksiyon işleminden sonra lusiferaz aktivitesi ölçülmüştür. Buna göre 293 ve SW480 hücre tipi kalsiyum fosfat yöntemi kullanılarak aynı plazmid ile transfekte edilmiştir. 293 hücre tipi bu metodla oldukça iyi transfekte edilmesine rağmen, elektroporasyon yöntemiyle transfekte edilen 293 hücrelerinin kalsiyum fosfat ile transfekte edilenlerden 4 veya 6 kat daha fazla oranda lusiferaz ekspresyonu oluşturduğu tespit edilmiştir.

Maxwell (1988), tarafından elektropore edilen Hela ve Jurkat hücrelerinin oluşturduğu lusiferaz ekspresyonunun, kalsiyum fosfat kullanılarak transfekte edilen 293 hücrelerinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Siebenlist ve ark, 1986).

Elektroporasyon yönteminin tüm bu avantajları dikkate alınarak öncelikle plazmidler, ookistler ve hücre kültürleri bu yöntem için hazırlanıp doğrulama testleri yapılmıştır. Elde edilen bulgular aşağıda verildiği gibidir.

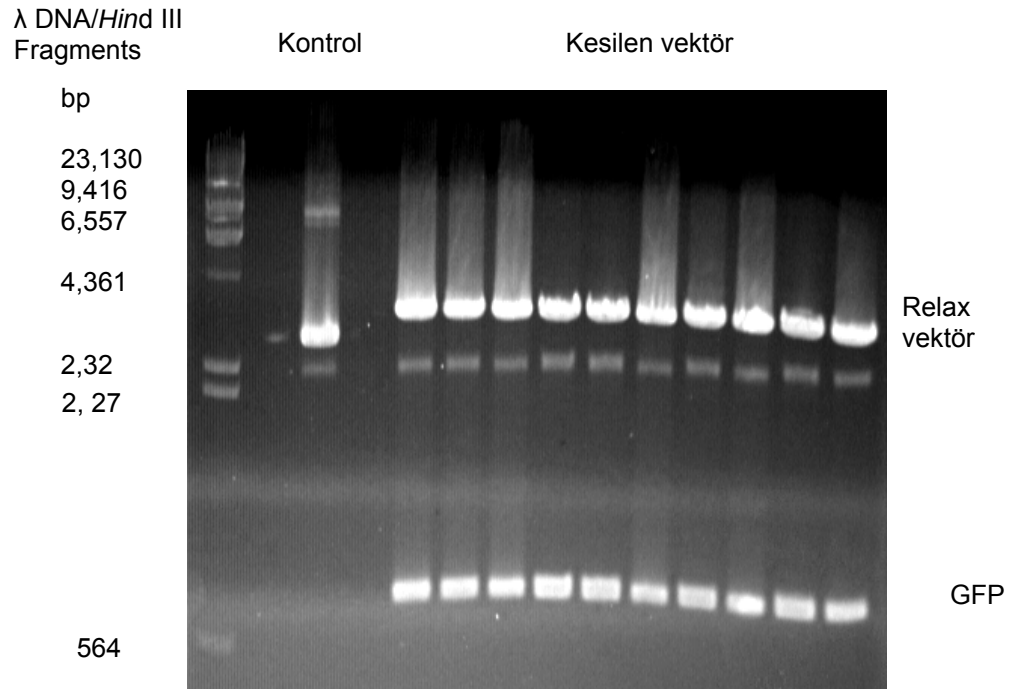
4.2.1. DH α Tm *Escherichia coli* Komponent bakterilerine Transformasyonu Yapılan Crypto construct GFP Plazmidlerin Agaroz jel Analizi ile Doğrulanması

Aequoria victoria (pasifik jellfish) dan elde edilen green floresan protein (GFP) doğal bir floresan protein olup gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu proteinin avantajı herhangi bir substrata ve ko-faktöre ihtiyaç duymaksızın floresans göstermesi dolayısıyla inverted mikroskop veya flow sitometrede kolayca tespit edilebilmesidir. (Striepen ve ark, 1998).

GFP'nin çeşitli mutant versiyonlarının *Toxoplasma gondii* de ekspresyonları floresan mikroskop, flow sitometre (FACS), immunoblot testleriyle gösterilmiştir. Floresan yoğunluğunun gen kopya sayısı ve protein ekspresyon seviyesiyle direk korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Striepen ve ark, 1998).

Yine belirli GFP mutantlarının *Plasmodium falciparum*'da ekspresyonları tespit edilmiştir. (VanWye and Haldar, 1997)

Bu çalışmada *Toxoplasma gondii* ve *Plasmodium falciparum* da ekspresyonu gözlenen GFP dikkate alınarak, yine apikompleksan grubuna dahil *Cryptosporidium*un genleri ve GFP reporter genini taşıyan Crypto construct GFP vektöründeki GFP ekspresyonu gözlenmeye çalışılmıştır. Ancak öncelikle GFP reporter genlerini taşıyan plazmid LB agar besisi yerinde çoğaltılmıştır. Plazmid izolasyonu sırasında LB agarda elde edilen kolonilerin Crypto construct GFP vektörü bulundurup bulundurmadaıkları yani ligasyon ve transformasyon işleminin doğrulanması amacıyla plazmidlerin NcoI ve SpeI restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve agaroz jelle yüklenmesine ait bulgular Şekil 4.11'de görülmektedir.



Şekil 4.11. Crypto construct GFP Vektör DNA'sının Restriksiyon Enzimleriyle (NcoI, SpeI) Kesilmesi

Kesilmemiş vektör uzunluğu 3970 bp'dir. Reporter gen olarak kullanılmış GFP uzunluğu ise 710 bp'dir. Agaroz jel üzerinde elde edilen band uzunlukları bilinen kesilmemiş vektör ve GFP band uzunlukları ile paralellik göstermiştir.

Çoğaltılan plazmidlerin istenen plazmidler olduğundan emin olduktan sonra test edilmiş bu örnekler kullanılarak daha fazla miktarda plazmid izolasyonu yapılmıştır. Elektroporasyon metodunda etkili DNA konsantrasyonunun 1 µg/ml - 80 µg/ml (Sambrook ve ark, 1989) arasında olduğu tespit edilmiştir. Bunun anlamı izole edilecek plazmid kopya sayısının yüksek olması gerekliliğidir. Dolayısıyla yüksek plazmid konsantrasyonu için daha çok plazmid izole edilmiştir.

4.2.2. Ookistlerin Eksistasyonu

Mele ve arkadaşları tarafından, enfekteli buzağılardan elde edilen *C. parvum* ookistlerini eksiste etmek için 10mM HCl kullanılmıştır. Ookistler 3 °C de 10 dakika HCL içerisinde bekletilmiştir. 3000g de 5 dakika çöküntü oluşturulup, PBS içinde hazırlanmış 2mM sodyum taurocholate solüsyonu eklenip 15 °C de 10 dakika ve bunu takiben 37°C de 5-8 dakika bekletilmiştir. 2-3 haftalık ookist örneklerinde % 90 oranında existasyon gözlenmiştir (Mele ve ark, 2003)

Johnson ve arkadaşları ise *C. parvum* ookistlerini HBSS (Hank's balanced salt solution) tamponu ile 2 kez yıkadıktan sonra eşit hacimde % 40 lık sodyum hipoklorit ile muamele etmişlerdir. 10 dakikalık inkübasyondan sonra tekrar 4 kez HBSS tamponu ile yıkayıp ortmdaki sodyum hipokloritin uzaklaştırılması sağlanmıştır. elde edilen çöküntüye taze HBSS tamponu eklenip 37oC de 60 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra bu karışıma eşit hacimde sodyum taurocholate ve % 0.5 tripsin ilave edilip 37oC de 45-60 dakika su banyosunda tutulmuştur (Johnson ve ark, 2004).

Bu çalışmada ookistlerden sporozoitleri açığa çıkarmak için in vitro eksistasyon yöntemi (Robertson ve ark, 1993) esas alınıp, modifiye edilerek farklı koşullarda (TA/sitomiks; TA/sitomiks:RPMI-1640 besi ortamı (1:1); TA/ RPMI-1640 besi ortamı) eksistasyon işlemi denenmiştir.

Hücreler tuz solüsyonu içeren tampon çözeltilerde sükröz ve mannitol gibi iyonik olmayan tampon çözeltilerinden pek çok kez daha fazla transfeksiyon etkinliğine sahiptir (Sambrook ve ark., 1989).

Elektroporasyon işleminde iyon konsantrasyonunun önemi dikkate alınarak bu işlem sırasında sitomiks tamponu kullanılmıştır (Maurice J. B. van den Hoff ve ark. 1992).

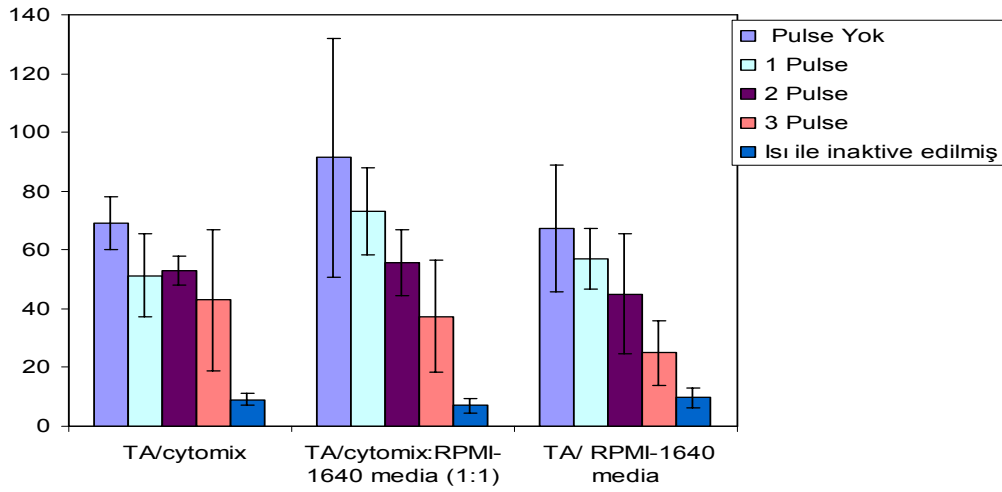
En iyi eksistasyon koşulunu belirlemek için sporozoitlerin ne oranda HCT-8 hücrelerini enfekte ettikleri tespit edilmiştir. Bunun için farklı koşullarda (TA/sitomiks; TA/sitomiks:RPMI-1640 besi ortamı (1:1); TA/ RPMI-1640 besi ortamı) eksiste edilen ookistler ile enfekte edilen HCT-8 hücrelerinin IMF yöntemi kullanılarak floresans mikroskop altında tespit edilen ortalama sayı değerleri, standart sapma değerleri ve grafiği sırasıyla Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 ve Şekil 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı koşullarda enfekte edilen HCT-8 hücrelerinin floresan mikroskop altında tespit edilen ortalama sayıları

Elektrik akımı Sayısı	Enfekteli HCT-8 hücrelerinin ortalama sayıları (TA/sitomiks)	Enfekteli HCT-8 hücrelerinin ortalama sayıları (TA/sitomiks:RPMI-1640 ortamı(1:1))	Enfekteli HCT-8 hücrelerinin ortalama sayıları (TA/ RPMI-1640 ortamı)
Akım Verilmeyen	69	91.3	67.3
1 kez akım verilen	51	73	57
2 kez akım verilen	57	55.6	45
3 kez akım verilen	43	37	25
Isı ile inaktive edilmiş ookistler (akımın verilmediği)	9	7	9.6

Çizelge 4.2. Farklı koşullarda enfekte edilen HCT-8 hücrelerinin standart sapma değerleri

Elektrik akımı Sayısı	Enfekteli HCT-8 hücrelerinin SD değerleri (TA/sitomiks)	Enfekteli HCT-8 hücrelerinin SD değerleri TA/sitomiks:RPMI-1640 ortamı (1:1)	İnfekteli HCT-8 hücrelerinin SD değerleri (TA/ RPMI-1640 ortamı)
Akım Verilmeyen	9.00	40.50103	21.5484
1 kez akım verilen	14.05	14.80	10.44
2 kez akım verilen	5.00	11.06	20.42
3 kez akım verilen	24.02	19.09	11.00
Isı ile inaktive edilmiş ookistler (akımın verilmediği)	2.00	2.65	3.21



Şekil 4.12. Farklı koşullarda enfekte edilen HCT-8 hücrelerinin standart sapma değerlerinin grafiği

Enfekteli HCT-8 hücrelerini saymak için IMF yöntemiyle anti-cyptosporidium antikorları kullanılarak sporozoitler boyanmış ve floresan mikroskop altında incelenmiştir. Enfekteli olan HCT-8 hücre sayısının fazlalığı canlı sporozit sayısını gösterir. Dolayısıyla kullanılan farklı eksistasyon koşulları içinde en fazla enfekteli HCT-8 hücre sayısı en iyi elektroporasyon koşulunu vermiştir. Elektroporasyon yönteminin en büyük dezavantajı elektrik akımı altında canlı hücrelerin büyük oranda ölümüdür. Bu çalışmada en iyi optimizasyon koşulunu sağlayarak sporozoit ölümlerinin % 50 oranına düşürülmesi çalışılmıştır. Bu durum dikkate alınarak başlangıçta eksiste edilecek ookist miktarını fazla tutup elektroporasyonu etkileyen tüm koşullar (ortamın iyon kompozisyonu, hücrelerin büyüme aşaması, sıcaklık, DNA konsantrasyonu ve konformasyonu) optimize edilmiştir.

Şekil 4.12’de verilen grafikte görüldüğü gibi ookistler en iyi 1kez elektrik akımının verildiği TA/sitomix:RPMI-1640 besi ortamı (1:1) içerisinde eksiste olmuş ve bu koşullarda HCT-8 hücrelerinin en iyi enfekte olduğu koşulları oluşturmuştur.

4.2.3. Elektroporasyon Deneyi I

Elektroporasyon yöntemiyle *C. parvum* sporozoitlerine hedef plazmid (reporter gen taşıyan) genlerinin aktarılması amaçlanmıştır.

Plazmidler istenen konsantrasyonda hazırlanıp, *C. parvum*'un sporozoitleri elde edildikten sonra, uygun hücre kültürü ve iyon konsantrasyonu Şekil 4.12'de gösterildiği gibi belirlendikten sonra elektroporasyon işlemine geçilmiştir.

Daha önce apicompleksan parazitler için $1-5 \times 10^6$ sporozoit 200 µl sitomiks tamponunda çözülüp (van den Hoff ve ark, 1992), etanol ile çöktürülmüş plazmid DNA'sı (10-100 µg) kullanılarak 2 mm'lik elektroporasyon kuvvetinde (BTX) elektroporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. (Goonewardene ve ark, 1993; Sultan ve ark, 1997; van Dijk ve ark., 1995).

Yine GFP reporter genini taşıyan plazmidin *Toxoplasma gondii* tachyzoitlerine transfeksiyonu işleminde elektroporasyon yöntemi kullanılmıştır. Bunun için 10^7 taze tachyzoit ve 50 µg plazmid DNA sı 2mm lik elektroporasyon kuvvetinde (BTX) 24Ω resistansta, 1.5 keV voltajda eletropore edilmiştir. Parazitler 15 dakika bekletildikten sonra HFF hücre kültürüne aktarılmıştır (Striepen ve ark, 1998).

Plasmodium falciparum'a yabancı DNA'yı transfekte etmekte kullanılan tek metod elektroporasyon yöntemi olup 0.31kV, 960 µF koşullarında 0.2 cm'lik kuvvetler kullanılarak DNA parazite aktarılmıştır.(Waterkeyn ve ark, 1999)

Bu çalışmada elektroporator voltaj 180 V, kapasitans 250 µF, Resistance yok şeklinde ayarlanıp YFP, RFP ve GFP vektörleri HCT-8 hücrelerine transfekte edilmiştir. Verilen elektrik akımı sonucunda elektroporatorde okunan değerler Çizelge 4.3'de görülmektedir.

Çizelge 4.3. Elektroporasyon işleminde elektroporator cihazında okunan YFP vektöre ait elektrik alan kuvveti ve akımına ait bulgular

YFP vektör için	1 kez uygulanan elektrik akımı (sporozoitsiz)	1 kez uygulanan elektrik akımı (sporozoitli)
Kör	0.170 V 004.5 msn	0.169 V 004.2 msn
E1	0.170 V 006.6 msn	0.171 V 005.1 msn
E2	0.171 V 006.5 msn	0.171 V 006.6 msn
E3	0.171 V 006.1 msn	0.169 V 006.4 msn

Çizelge 4.4. Elektroporasyon işleminde elektroporator cihazında okunan GFP vektörüne ait elektrik alan kuvveti ve akımına ait bulgular

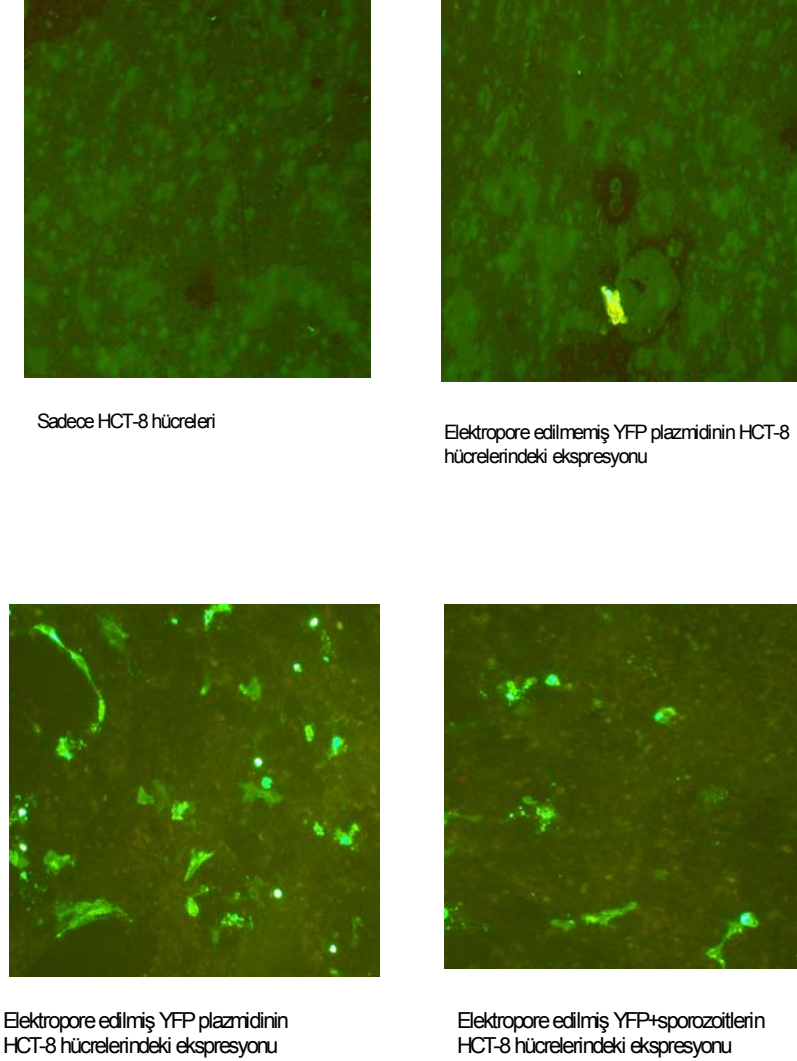
GFP vektör için	1 kez uygulanan elektrik akımı (sporozoitsiz)	1 kez uygulanan elektrik akımı (sporozoitli)
Kör	0.169 V 005.9 msn	0.167 V 005.5 msn
E1	0.172 V 005.6 msn	0.169 V 005.4 msn
E2	0.171 V 005.1 msn	0.171 V 005.0 msn
E3	0.168 V 005.1 msn	0.169 V 005.5 msn

Çizelge 4.5. Elektroporasyon işleminde elektroporator cihazında okunan RFP vektörüne ait elektrik alan kuvveti ve akımına ait bulgular

RFP vektör için	1 kez uygulanan elektrik akımı (sporozoitsiz)	1 kez uygulanan elektrik akımı (sporozoitli)
Kör	0.170 V 005.0 msn	0.169 V 004.9 msn
E1	0.170V 006.4 msn	0.171 V 005.7 msn
E2	0.171 V 006.6 msn	0.170 V 006.9 msn
E3	0.171 V 006.1 msn	0.169 V 006.0 msn

4.2.3.1. Elektroporasyon ile Transfeksiyon İşleminde Sonra Plazmid Ekspresyonunun Floresan Mikroskop Altında İncelenmesi

Elektroporasyon ile transfeksiyondan sonra bu vektörlerin inverted floresan mikroskop altında gözlenen ekspresyonları Şekil 4.13 ve 4.14'te olduğu gibidir.

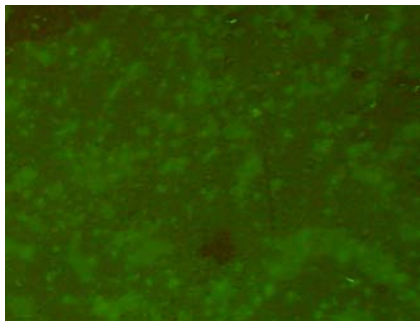


Şekil 4.13 YFP vektör transformantlarının Floresan Mikroskop Altındaki Görüntüleri

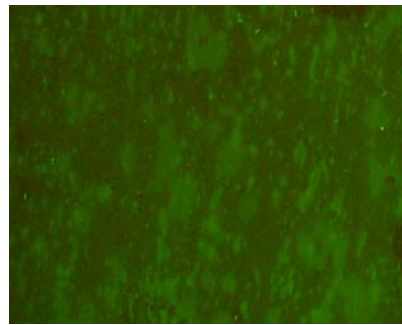
(Örnek sırası: 1: Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol) ; 2: Elektropore edilmemiş YFP plazmidinin HCT-8 hücrelerindeki ekspresyonu (negatif kontrol); 3: Elektropore edilmiş YFP plazmidinin HCT-8 hücrelerindeki ekspresyonu (pozitif kontrol); 4: Elektropore edilmiş YFP+sporozoitlerin HCT-8 hücrelerindeki ekspresyonu (pozitif kontrol))

Lipofektamin yönteminde olduğu gibi elektroporasyon yönteminde de *C. parvum* sporozoitleriyle enfekteli HCT-8 hücrelerine aktarılmış YFP (örnek sırası 4) vektör transformantlarının ekspresyonu, enfektesiz HCT-8 hücrelerindeki (örnek sırası 3) ekspresyondan daha az orandadır.

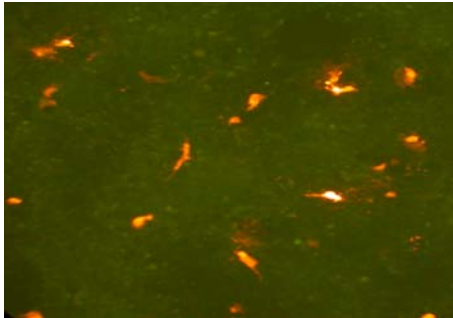
Bu durum *C. parvum* enfeksiyonunun HCT-8 hücrelerini olumsuz yönde etkileyip bir kısım hücrenin canlılıklarını yitirmesine paralel olarak ekspresyonunda azalması şeklinde yorumlanmıştır.



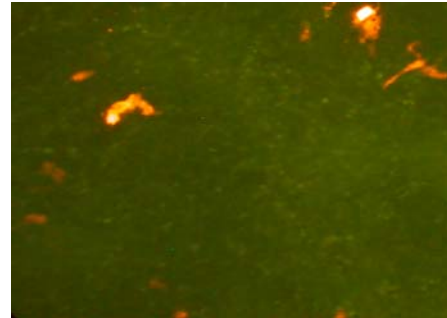
Sadece HCT-8 hücreleri



Elektropore edilmemiş RFP plazmidinin HCT-8 hücrelerindeki ekspresyonu



Elektropore edilmiş RFP plazmidinin HCT-8 hücrelerindeki ekspresyonu



Elektropore edilmiş RFP+sporozoitlerin HCT-8 hücrelerindeki ekspresyonu

Şekil 4.14. RFP vektör transformantlarının Fluoresans Mikroskop Altındaki Görüntüleri

(Örnek sırası: 1: Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol) ; 2: Elektropore edilmemiş RFP plazmidinin HCT-8 hücrelerindeki ekspresyonu (negatif kontrol); 3: Elektropore edilmiş RFP plazmidinin HCT-8 hücrelerindeki ekspresyonu (pozitif kontrol); 4: Elektropore edilmiş RFP+sporozoitlerin HCT-8 hücrelerindeki ekspresyonu (pozitif kontrol))

C. parvum sporozoitleriyle enfekteli HCT-8 hücrelerine (örnek sırası 4) aktarılmış RFP vektör transformantlarının ekspresyonu, enfektesiz HCT-8 hücrelerindeki (örnek sırası 3) ekspresyondan daha az orandadır. Plazmid DNA ları transfekte edildikten sonra ekspresyonları için canlı hücreye ihtiyaç duyarlar. Sporozoitlerle enfekte edilmiş HCT-8 hücrelerinin bir kısmının canlılığını yitirmiş ve bir kısım hücre kültürünün stres altında olduğu göz önüne alınırsa enfekteli hücre kültürlerinde ekspresyonların daha az oranda olması muhtemeldir.

GFP vektörü için floresan mikroskop altında gözle görülebilir bir ekspresyon elde edilmediği halde YFP ve RFP vektör transformantlarının ekspresyonu mevcuttu. Ancak YFP vektör ekspresyonunun RFP vektör ekspresyonundan daha iyi olduğu gözlemlendi. Bu nedenle YFP vektör transkript örnekleri yapılan RT PCR’da pozitif kontrol olarak kullanıldı. YFP vektör ile kurulan yeni bir denemede aynı elektroporasyon koşulları kullanıldı ve bu denemenin örneklerinden önce RNA sentez edilip daha sonra cDNA’lar elde edildi. Bu deneme için verilen elektrik akımı sonucunda elektroporatörde okunan değerler Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Elektroporasyon işleminde elektroporatör cihazında okunan YFP vektörüne ait elektrik alan kuvveti ve akımına ait bulgular

YFP vektör	1 kez uygulanan elektrik akımı (sporozoitsiz)	1 kez uygulanan elektrik akımı (sporozoit)
Kör	0.170 V 004.7 msn	0.169 V 004.4 msn
E1	0.171 V 006.9 msn	0.171 V 005.9 msn
E2	0.171 V 006.6 msn	0.170 V 006.7 msn
E3	0.171 V 006.0 msn	0.169 V 006.4 msn
E4	0.170 V 006.7 msn	0.172 V 006.6 msn
E5	0.171 V 006.2 msn	0.171 V 006.2 msn
E6	0.169 V 006.5 msn	0.171 V 006.5 msn
E7	0.170 V 006.7 msn	0.171 V 006.2msn
E8	0.171 V 006.2 msn	0.169 V 006.4 msn

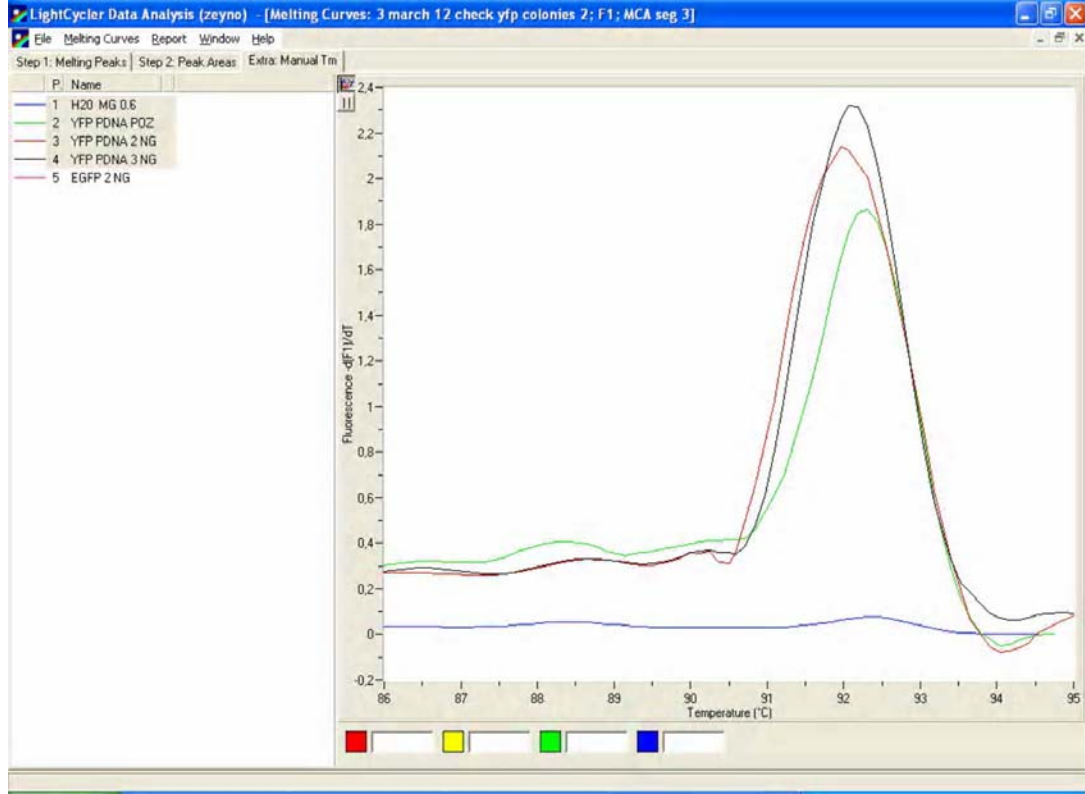
YFP vektörünün ekspresyonu invert mikroskop altında gözlemlendikten sonra YFP primerlerinin optimizasyonu pEYFP-Mem Vektör kullanılarak yapılmıştır. Bu primerlerin real time PCR sonucu Şekil 4.15’de gösterildiği gibidir.

Real time PCR yöntemi daha kısa sürede PCR ürünlerinin çoğaltılması ve bir monitör yardımıyla bu çoğaltmanın on-line olarak gözlenmesi esasına dayanır. PCR data analiz koşulları ve her bir örnek verileri bu monitöre kaydolduğundan daha sonra kontrol etmek kolaylaşıp hatayı tespit etmede yarar sağlamaktadır (www.roche.com).

Tanrıverdi ve arkadaşları, *C. parvum*’un genotipini belirlemede birkaç real-time PCR prosedürünün olduğunu belirtmiştir. Mikromanüplasyon ile karıştırılmış ookist solüsyonu içerisinde 157 bp lik β tübulin geninin 40 döngülük amplifikasyonu ile ookistlerin genotipik ayrılıklarıyla belirlenmesi mümkündür. SYBR green I melting curve analizi ile *C. parvum*’un iki farklı genotipi tip 1 ve tip 2’nin ayrımı yapılmıştır (Tanrıverdi ve ark, 2002)

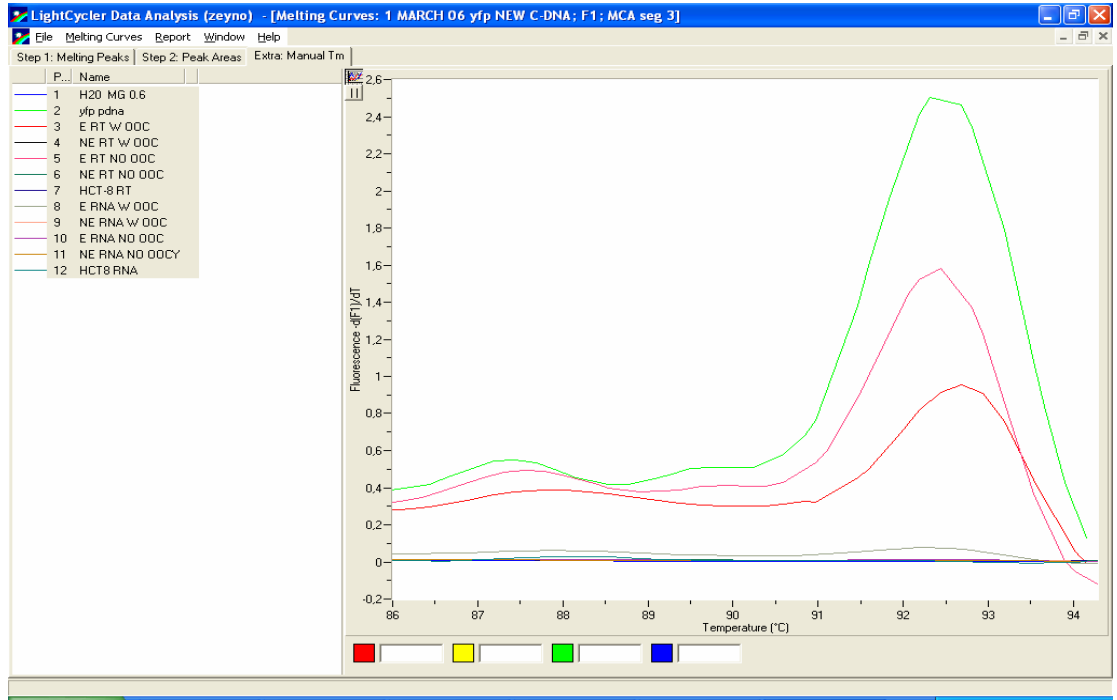
Giovanni ve arkadaşları kantitatif TaqMan PCR metodunu *C. parvum* ile infekteli HCT-8 hücre kültürlerini değerlendirmek için kullanmıştır. Bu yöntemle hücre kültürlerinde parazit enfeksiyonunu araştırmak mümkündür. Bu kültürler 24, 48, 72 saatlik inkübasyonlarla *C. parvum* ile infekte edilmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra % 20 ve % 60 oranında enfeksiyonun arttığı gözlemlendi. (Di Giovanni ve ark., 2004).

Bu çalışmada Real time PCR cihazıyla elde edilen plazmidin kontrolü, bu plazmide ait spesifik bir gen bölgesinden elde edilen primerler yardımıyla sağlanmıştır. Öncelikle sadece pozitif olan plazmid DNAsı kullanılıp hem primerlerin çalışıp çalışmadığı kontrol edilmek istenmiş (Şekil 4.15) hem de optimize edilmiş bu koşullar kullanılarak transfeksiyon işleminden sonra elde edilen mRNA transkriptlerinin kontrolü (Şekil 4.16 ve 4.17) sağlanmıştır.



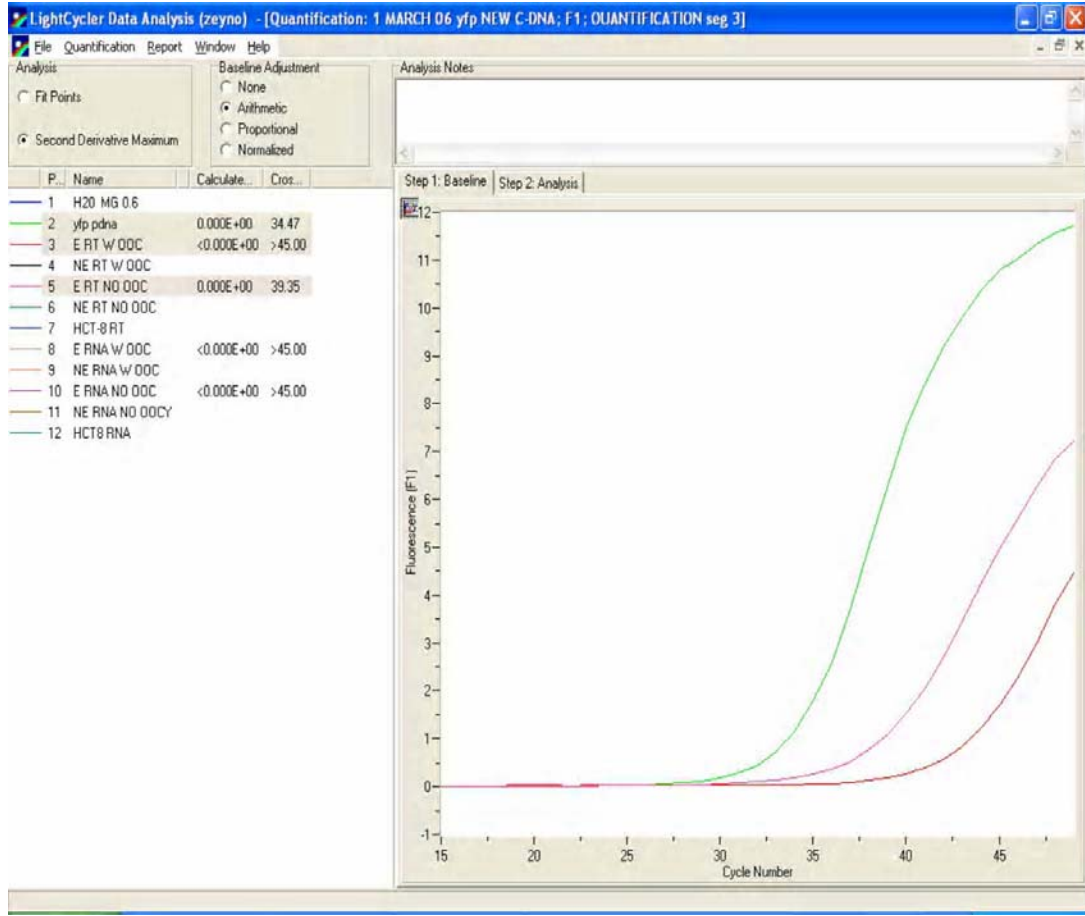
Şekil 4.15. YFP primerleriyle yapılan Real-time PCR’da Melting curve Analizi
(Örnek sırası: 1: H₂O (negatif kontrol); 2: YFP plazmid DNA 0.5 ng (pozitif kontrol); 3: YFP plazmid DNA 2 ng (pozitif kontrol); 4: YFP plazmid DNA 3 ng (pozitif kontrol))

Farklı konsantrasyonlarda YFP plazmid örnekleri kullanılarak Real time PCR melting curve analizi yapıldı. Elde edilen farklı üç konsantrasyondaki plazmidin de YFP olduğu tespit edildi. Daha sonra optimize edilen bu koşullar kullanılarak YFP vektör transkript (cDNA’lar) örnekleri Real time PCR’da Şekil 4.16 ve 4.17’de gösterildiği gibi test edilmiştir.



Şekil 4.16. YFP vektör transkriptlerinin Real-time PCR’da Melting curve Analizi

(Örnek sırası: 1: H₂O (negatif kontrol); 2: YFP plazmid DNA (pozitif kontrol); 3: Elektropore edilmiş YFP plazmid+sporozoit cDNAsı (pozitif kontrol); 4: Elektropore edilmemiş YFP+sporozoit plazmid cDNAsı (negatif kontrol); 5: Elektropore edilmiş YFP plazmid cDNA’sı (pozitif kontrol); 6: Elektropore edilmemiş YFP+ plazmid cDNA’sı (negatif kontrol); 7: Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol); 8: Elektropore edilmiş YFP plazmid+sporozoit RNA’sı (negatif kontrol); 9: Elektropore edilmemiş YFP+sporozoit plazmid RNA’sı (negatif kontrol) 10: Elektropore edilmiş YFP plazmid RNA’sı (negatif kontrol) 11: Elektropore edilmemiş YFP plazmid RNA’sı 12: Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol))



Şekil 4.17. YFP vektör transkriptlerinin Real-time PCR'da Quantification Analizi

(Örnek sırası: 1: H₂O (negatif kontrol); 2: YFP plazmid DNA (pozitif kontrol); 3: Elektropore edilmiş YFP plazmid+sporozoit cDNAsı (pozitif kontrol); 4: Elektropore edilmemiş YFP+sporozoit plazmid cDNA'sı (negatif kontrol); 5: Elektropore edilmiş YFP plazmid cDNA'sı (pozitif kontrol); 6: Elektropore edilmemiş YFP+ plazmid cDNA'sı (negatif kontrol); 7: Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol); 8: Elektropore edilmiş YFP plazmid+sporozoit RNA'sı (negatif kontrol); 9: Elektropore edilmemiş YFP+sporozoit plazmid RNA'sı (negatif kontrol) 10: Elektropore edilmiş YFP plazmid RNA'sı (negatif kontrol) 11: Elektropore edilmemiş YFP plazmid RNA'sı 12: Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol))

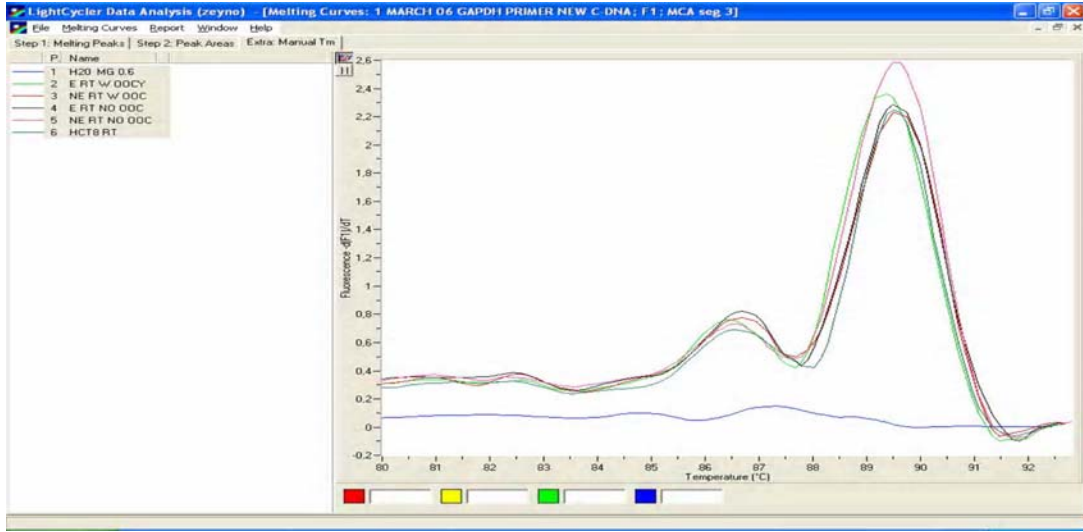
Real time PCR'ın Quantification Analizinde elektropore edilmiş YFP plazmid cDNA'sının (Sporozoitsiz olan yani infekteli olmayan 5 numaralı örnek), elektropore edilmiş YFP plazmid+sporozoit cDNA'sından (3 numaralı örnek) daha önce çoğaldığı görülmüştür. Aynı örneklerin invert floresan mikroskop altındaki

ekspresyonları da benzer sonuçlar göstermiştir. Sporozoitsiz olan (5 numaralı örnek) ile elektropore edilmiş YFP plazmid+sporozoit cDNA (3 numaralı örnek) m-RNA miktarlarının eşit olup olmadıklarını belirlemek için GAPDH housekeeping primerleri kullanılarak Real time PCR yapılmıştır.

Housekeeping genlerinin kodladığı proteinler bütün hücrelerin canlılıklarını devam ettirmesi için gerekli olan proteinlerdir. Bu genlerin bütün hücre ve dokularda aynı seviyede üretildiği ancak sadece hücre büyümesi ve organizmanın gelişmesi sırasında bir takım varyasyonların olduğu bilinmektedir. En yaygın bilinen housekeeping geni GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) glikolitik yoldaki enzimi kodlar. Bunun dışında albumin, beta-actin ve tubulin, 18S rRNA ve 28S rRNA gibi housekeeping genleri mevcuttur (www.biocompare.com).

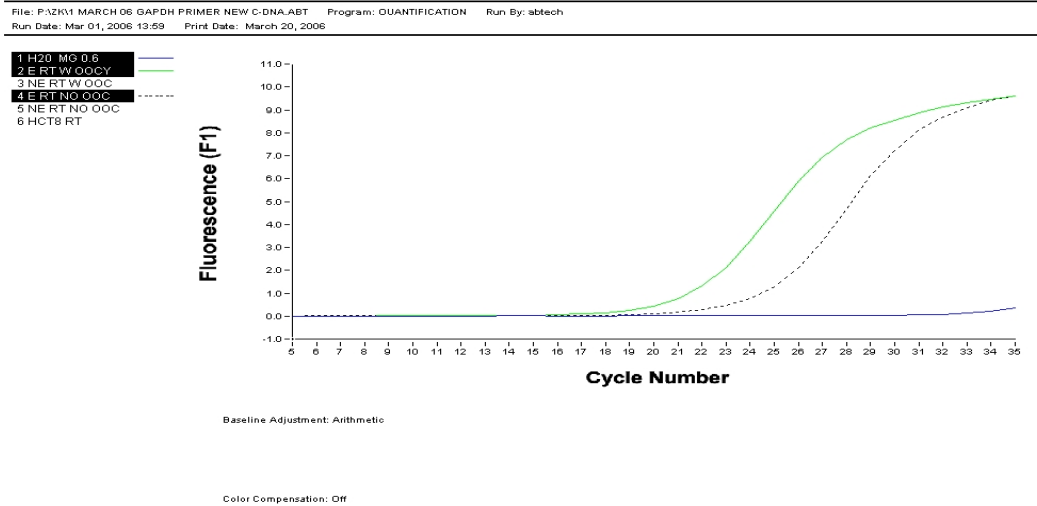
Housekeeping genlerinin bütün hücrelerdeki üretiminin sabit olmasından yararlanılarak gene ekspresyonlarının kıyaslanmasında kullanılmaktadır (Barber ve ark, 2005).

Bu çalışmada GAPDH housekeeping genlerinden sentezlenen primerler kullanılarak her bir YFP vektör transkriptlerinden elde edilen cDNA'ların Real time PCR'da ortaya çıkan GAPDH mRNA ekspresyonları Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da gösterildiği gibidir.



Şekil 4.18. YFP vektör transkriptlerinin GAPDH mRNA ekspresyonlarının Real-time PCR'da Melting Curve Analizi

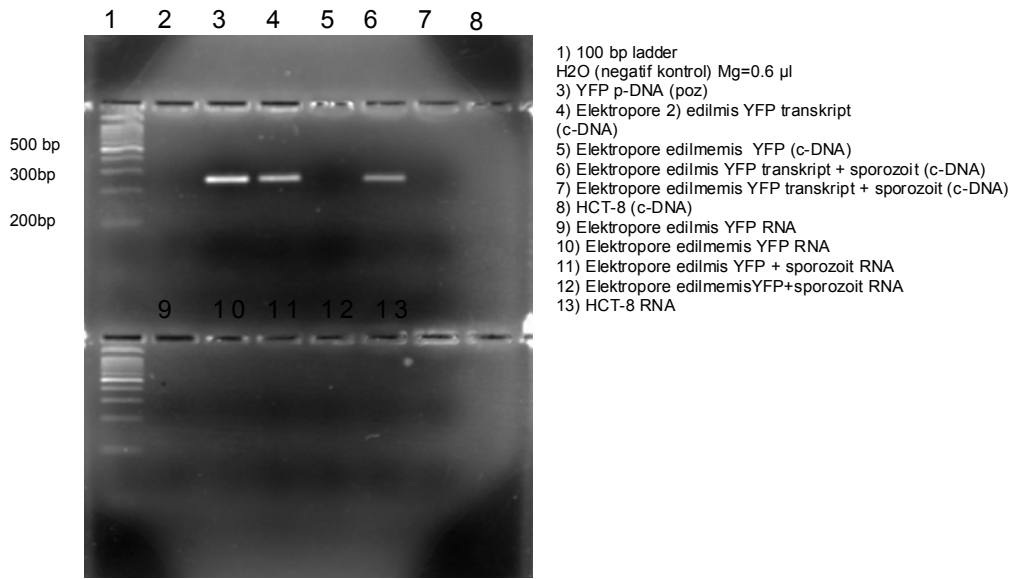
(Örnek sırası: 1: H₂O (negatif kontrol); 2: Elektropore edilmiş YFP plazmid+sporozoit cDNA'sı (pozitif kontrol); 3: Elektropore edilmemiş YFP+sporozoit plazmid cDNA'sı (negatif kontrol); 4: Elektropore edilmiş YFP plazmid cDNA'sı (pozitif kontrol); 5: Elektropore edilmemiş YFP plazmid cDNA'sı (negatif kontrol); 6: Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol))



Şekil 4.19. YFP vektör transkriptlerinin GAPDH mRNA ekspresyonlarının Real-time PCR'da Quantification Analizi

(Örnek sırası: 1: H₂O (negatif kontrol); 2: Elektropore edilmiş YFP plazmid+sporozoit cDNA'sı (pozitif kontrol); 3: Elektropore edilmemiş YFP+sporozoit plazmid cDNA'sı (negatif kontrol); 4: Elektropore edilmiş YFP plazmid cDNA'sı (pozitif kontrol); 5: Elektropore edilmemiş YFP plazmid cDNA'sı (negatif kontrol); 6: Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol))

Real-time PCR’da Quantification Analizi ile tüm YFP vektör transkriptlerinin GAPDH mRNA ekspresyonlarının aynı seviyede olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.19’da görüldüğü gibi örneklerin çoğalmaya başladığı nokta arasında fark yoktur. Her ne kadar bu şekil bize yeterli bilgi versede, bu PCR ürünleri agaroz jele yüklenerek ikinci kez doğrulanmıştır. PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.20’de görülmektedir.



Şekil 4.20. YFP vektör transkriptlerinin GAPDH mRNA ekspresyonlarının agaroz jel analizi

GAPDH primerleri 236 bp uzunluğundadır. YFP plazmid DNA örneğinin GAPDH mRNA’sı (3 numaralı örnek; pozitif kontrol) ile, Elektropore edilmiş YFP plazmid+sporozoit GAPDH mRNA’sı (6 numaralı bilinmeyen örnek) ve Elektropore edilmiş YFP plazmid GAPDH mRNA’sının (4 numaralı sporozoitsiz bilinmeyen örnek) ampikon uzunluğunun jelde şekil 4.19’da gösterildiği gibi 236 bp olması . GAPDH mRNA miktarlarının eşit düzeyde olduğunu ortaya koymuştur.

Aynı elektroporasyon koşulları kullanılarak Crypto-construct GFP vektör de HCT-8 hücrelerine transfekte edilmiştir. Ancak invert floresan mikroskop altında

gözle görülebilir ekspresyon tespit edilmemiştir. Verilen elektrik akımı sonucunda elektroporatorde okunan değerler Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Elektroporasyon işleminde elektroporator cihazında okunan YFP vektöre ait elektrik alan kuvveti ve akımına ait bulgular

c-GFP vektör	1kez elektrik akımının uygulandığı
Kör	0.169 V 005.9 msn
E1	0.172 V 005.2 msn
E2	0.169 V 005.6msn
E3	0.170V 005.1 msn
E4	0.171 V 005.0 msn
E5	0.171 V 005.7 msn
E6	0.170 V 0053 msn
E7	0.169 V 005.5 msn
E8	0.170 V 005.5 msn

Olası bir GFP mRNA transkriptini göstermek için yapılan RT-PCR sonucunda da herhangi bir çoğalma elde edilmemiştir. Elektroporasyon I deneyi (elektroporator voltaj 180V, kapasitans 250Ω, Resistance None) ile amplifiye edilen YFP vektör mRNA transkriptleri, elde edilen cDNA’ların kontrolünde yani takip edilen işlemlerin doğruluğunu belirlemede pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

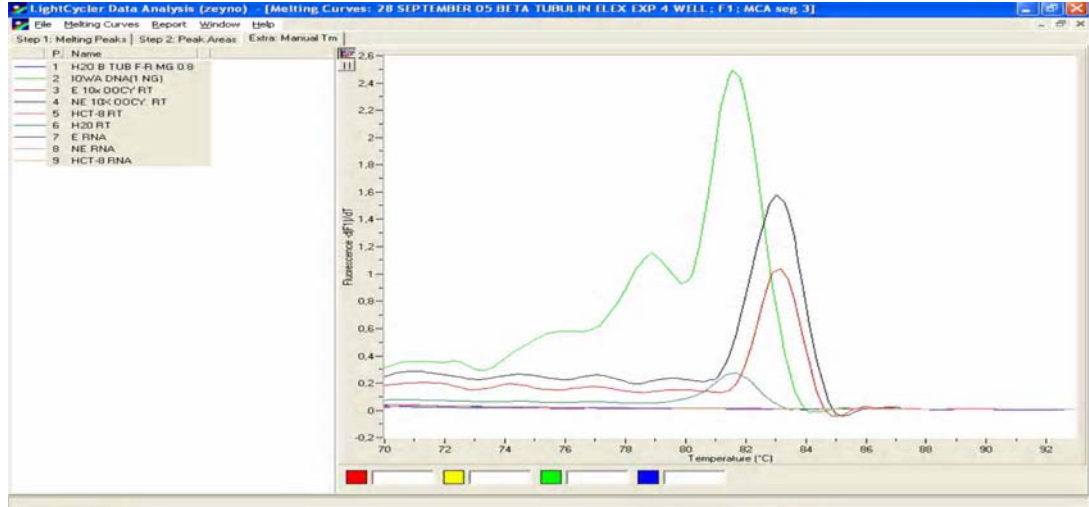
4.2.4. Elektroporasyon Deneyi II

Toxoplasma gondii'nin elektroporasyon yöntemiyle transfeksiyonunda 3500 Volts/cm, 48 Ω resistans, none kapasitans μ F (Soldati ve ark, 1993), 7500 Volts/cm, 24 Ω resistans, none kapasitans (Donald ve ark, 1993); *Plasmodium falciparum*'un elektroporasyon yöntemiyle transfeksiyonunda 1550 Volts/cm, none resistans, 960 μ F kapasitans (Deitsch ve ark, 2001), 2000 Volts/cm, none resistans, 25 μ F kapasitans (van Dijk ve ark, 1995), 2500 Volts/cm, none resistans, 25 μ F kapasitans (Goonewardene ve ark, 1993) kullanılmıştır.

Bu çalışmada elektroporasyon koşulları 1000 V voltaj, 50 μ F kapasitans ve 50 Ω resistance olarak ayarlanıp GFP, RFP, YFP vektörleri HCT-8 hücrelerine transfekte edildi. Ancak her üç vektörde de gözle görülebilir bir ekspresyon elde edilmedi. Yine GFP vektör için çok düşük dozda bir ekspresyon varlığı olabilir düşüncesiyle RT PCR yapıp ekspresyon gözlenilmeye çalışıldı.

GFP vektörünün transfeksiyonu sırasında HCT-8 hücrelerinin eksiste edilmiş ookistlerle enfekte edilip edilmedikleri IMF yönteminin yanı sıra L11 ve β - tübin primerleri kullanılarak tespit edilmiştir. GFP vektör mRNA transkriptleri bu primerler kullanılarak real time PCR'da test edilmiştir.

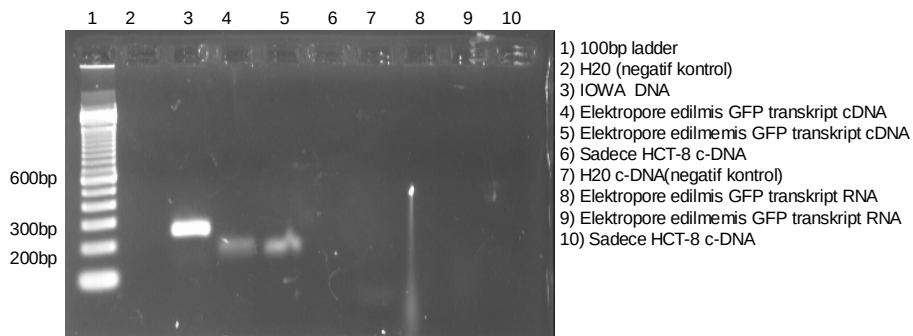
HCT-8 hücrelerinin enfekteli olup olmadıklarının *Cryptosporidium parvum* β -tübin primerleri kullanılarak Real time PCR ile doğrulanması Şekil 4.21'deki gibidir.



Şekil 4.21. Enfekteli HCT-8 hücrelerinin β - tübilin primerleri kullanılarak Real time PCR ile doğrulanması

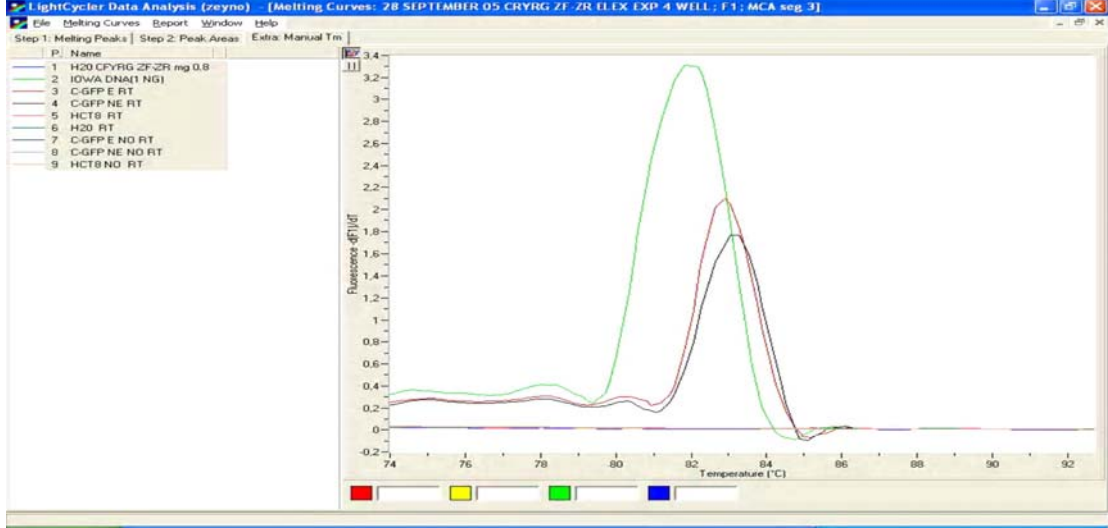
(Örnek sırası 1: H₂O (negatif kontrol); 2: IOWA DNA (pozitif kontrol); 3: Elektropore edilmiş YFP+sporozoit plazmid cDNA'sı (negatif kontrol); 4: Elektropore edilmemiş YFP+sporozoit plazmid cDNA'sı (negatif kontrol); 5: Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol); 6: RT için H₂O (negatif kontrol); 7: Elektropore edilmiş YFP+sporozoit plazmid RNA'sı (negatif kontrol); 8: Elektropore edilmemiş YFP+sporozoit plazmid RNA'sı (negatif kontrol); 9: Sadece HCT-8 hücreleri RNA (negatif kontrol))

Aynı PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü ise Şekil 4.22'deki gibidir.



Şekil 4.22. β - tübilin primerleri kullanılarak elde edilen Real time PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

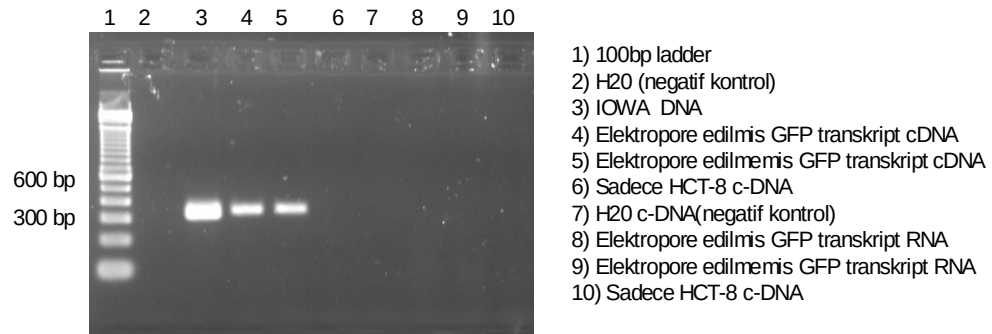
HCT-8 hücrelerinin enfekteli olup olmadıklarının *Cryptosporidium parvum* L11 primerleri kullanılarak Real time PCR ile doğrulanması Şekil 4.23'deki gibidir.



Şekil 4.23. Enfekteli HCT-8 hücrelerinin β - tübin primerleri kullanılarak Real time PCR ile doğrulanması

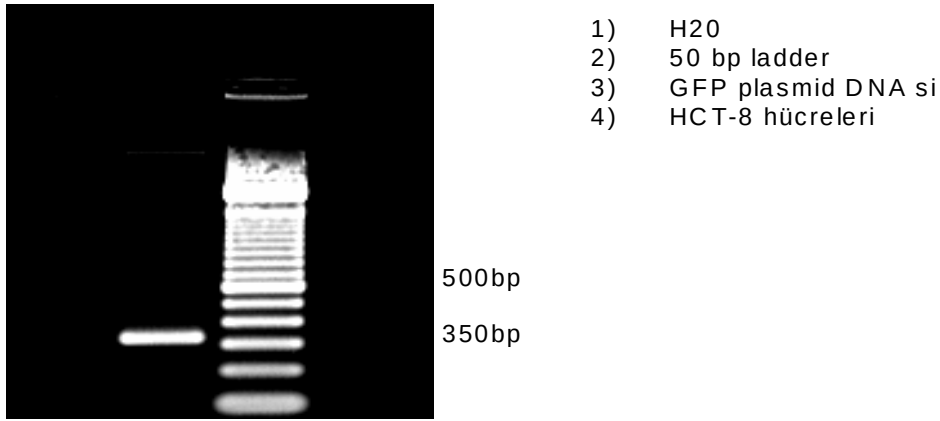
(Örnek sırası 1: H₂O (negatif kontrol); 2: IOWA DNA (pozitif kontrol); 3: Elektropore edilmiş YFP+sporozoit plazmid cDNA'sı (negatif kontrol); 4: Elektropore edilmemiş YFP+sporozoit plazmid cDNA'sı (negatif kontrol); 5: Sadece HCT-8 hücreleri (negatif kontrol); 6: RT için H₂O (negatif kontrol); 7: Elektropore edilmiş YFP+sporozoit plazmid RNA'sı (negatif kontrol); 8: Elektropore edilmemiş YFP+sporozoit plazmid RNA'sı (negatif kontrol); 9: Sadece HCT-8 hücreleri RNA (negatif kontrol))

Aynı PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü ise Şekil 4.24'deki gibidir.



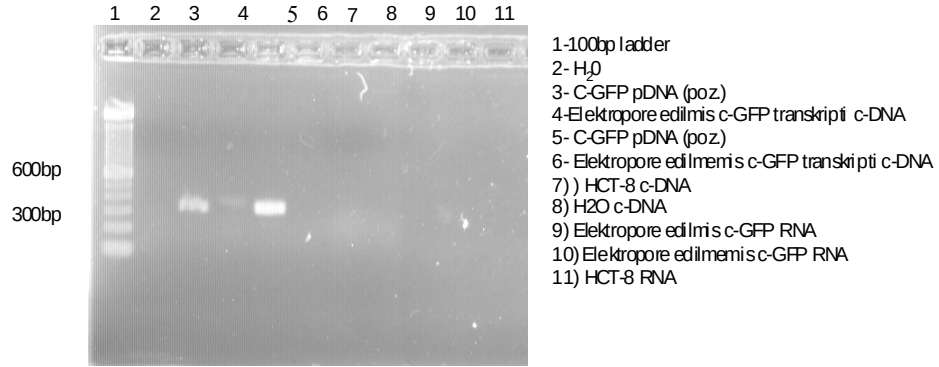
Şekil 4.24. L11 primerleri kullanılarak elde edilen Real time PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

Gerek L11 gerekse β - tübin primerleri kullanılarak yapılan Real time PCR sonucunda HCT-8 hücrelerinin sporozoitler ile enfekteli olduğu pozitif kontrol ile bilinmeyen örneklerin (örnek sırası 4 ve 6) aynı bandı göstermesiyle tespit edilmiştir. GFP vektör transkriptlerinden elde edilen cDNA'lar ampikon uzunluğu 324 bp olan c-GFP F2-R2 primerleri kullanılarak doğrulanmıştır. Ancak önce bu primerlerin optimizasyonu gerçekleştirilip daha sonra bu optimize koşullar kullanılarak cDNA'lar test edilmiştir. Bu primerlerin real time PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 4.25'deki gibidir.



Şekil 4.25. GFP vektör ile GFP F₂-R₂ primerlerinin Real time PCR cihazında optimizasyonu

Optimize edilen GFP F₂-R₂ primerleri ile GFP mRNA transkriptleri konvensiyonel (Şekil 4.26) ve Real-time PCR yöntemiyle test edilmiştir (Şekil 4.27).

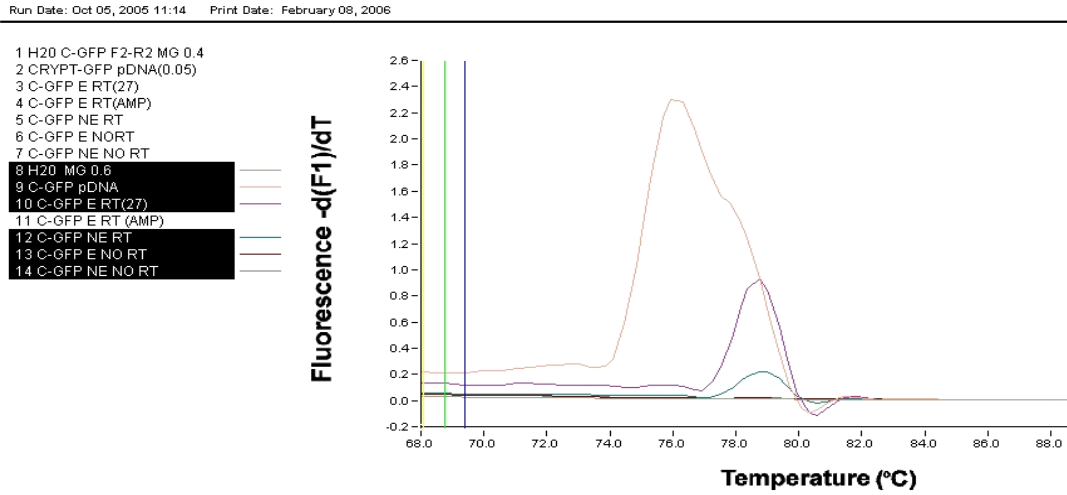


Şekil 4.26. GFP mRNA transkriptlerinin Konvensiyonel PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü
(Örnek sırası: 1: 100bp ladder; 2: H₂O (negatif kontrol); 3: C-GFP pDNA (pozitif kontrol); 4: Elektropore edilmiş c-GFP transkripti c-DNA; 5: C-GFP pDNA (pozitif kontrol); 6: Elektropore edilmemiş c-GFP transkripti c-DNA (negatif kontrol); 7: HCT-8 c-DNA (negatif kontrol); 8:H₂O c-DNA (negatif kontrol); 9) Elektropore edilmiş c-GFP RNA (negatif kontrol); 10: Elektropore edilmemiş c-GFP RNA (negatif kontrol); 11: HCT-8 RNA (negatif kontrol))

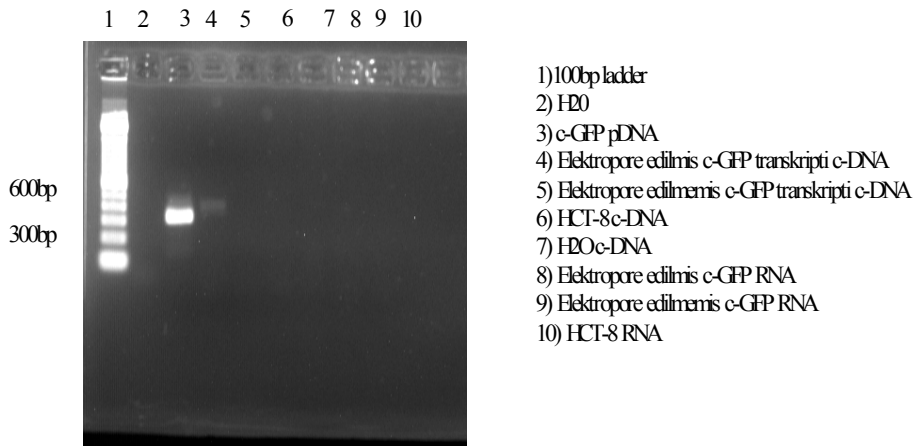
Normalde GFP mRNA transkriptlerini tespit amaçlı 4 numaralı örnekte (elektropore edilmiş c-GFP transkripti c-DNA) PCR sonucu çoğalma beklenmekteydi. Şekil 4.26'de görüldüğü gibi 4 numaralı kuyucukta çok az bir çoğalma görülmüştür. Ancak bunun spesifik olup olmadığını belirlemek için konvensiyonel PCR'dan daha hassas sonuçlar elde edilebilen Real time PCR ve Nested PCR ile doğrulanması düşünülmüştür.

PCR metoduyla tüm bir genomdan istenilen tek bir lokus bir milyondan daha fazla çoğaltılabilir. Ancak bazı zamanlarda hedef DNA yanında spesifik olmayan dizilerinde aynı şekilde çoğaldığı düşünüldüğünde, spesifik olmayan dizinin de bir milyondan daha fazla çoğalma ihtimali vardır. Bu noktada PCR metodunun spesifitesi yine diğer bir PCR primerleri ile sağlanabilir. Nested PCR olarak tanımlanan ve ilk PCR'ın spesifitesini sağlayan bu metod için primerler şu şekilde dizayn edilir. Yapılan ilk PCR'ın her iki primerleri arasında ikinci primerler dizayn

edilir ve ilk PCR primerleri ile çoğaltılmış örnekler ikinci PCR primerleri (nested primerler) için hedef DNA'yı oluşturur (www.bio.davidson.edu/Courses/genomics). GFP mRNA transkriptlerini doğrulamak için yapılan Real time PCR sonucu Şekil 4.27'deki gibidir.



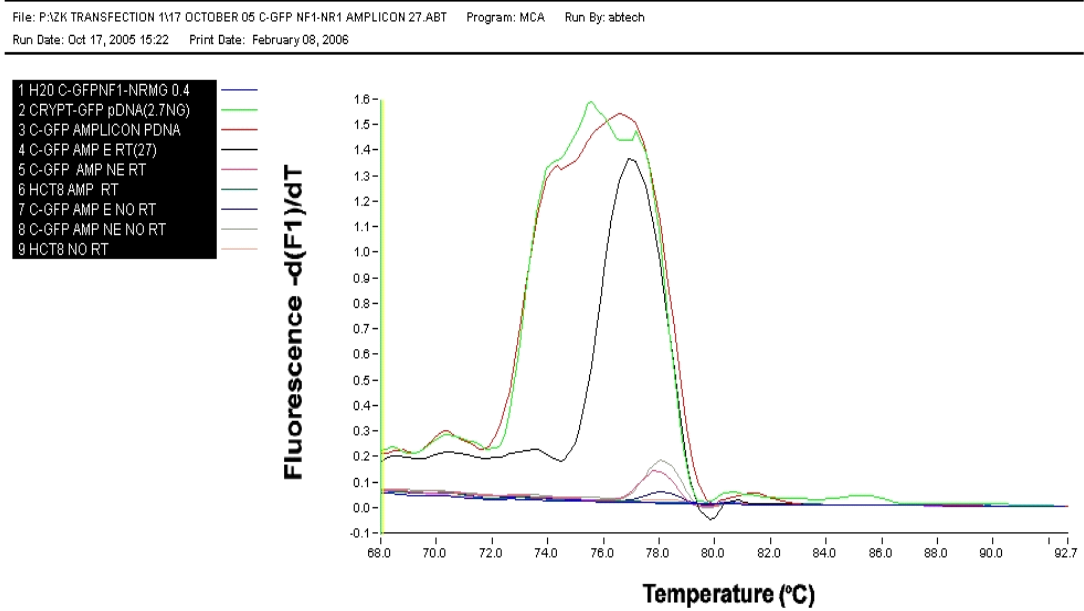
Şekil 4.27. GFP mRNA transkriptlerinin Real-time PCR'da Melting Curve Analizi



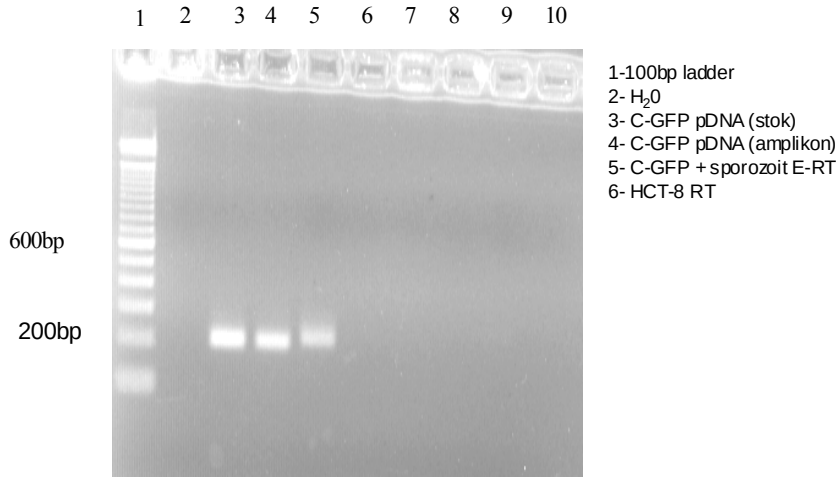
Şekil 4.28. GFP mRNA transkriptlerinin Real-time PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

Pozitif kontrol (3 numaralı örnek) ile Elektropore edilmiş c-GFP transkripti c-DNA (4 numaralı örnek) 324 bp'lik aynı bandı göstermiştir.

Şekil 4.27’de gösterilen melting curve analizinde koyu şekilde belirtilmiş 10 numaralı örnek (elektropore edilmiş c-GFP transkripti c-DNA; bilinmeyen örnek), pozitif kontrol (9 nolu örnek) kadar olmasa da çoğalmıştır. Ancak bu çoğalmanın spesifik olup olmadığı c-GFP F2-R2 primerleri arasındaki baz dizisinden sentezlenen nested PCR primerleri (C-GFP NF1-NR1) kullanılarak tespit edilmiştir. Şekil 4.28’deki ampliconların nested PCR primerleri kullanılarak yapılan Real time PCR bulguları Şekil 4.29’daki gibidir.



Şekil 4.29. GFP mRNA transkriptlerinin nested primerleri kullanılarak yapılan Real-time PCR’da Melting Curve Analizi



Şekil 4.30. GFP mRNA transkriptlerinin nested primerleri kullanılarak yapılan Real-time PCR Melting Curve Analizinin agaroz jeldeki görüntüsü

Nested PCR sonucu GFP vektör pozitif kontrolü ile amplikonlar (4 ve 5 numaralı örnek) 194 bp'lik aynı bandı göstermiştir. Dolayısıyla çoğalmanın spesifik olmayan bir çoğalma olmadığı görülmüştür. Spesifik olan ancak belirgin olmayan PCR ürünlerinin nested primerleri ile fazlaca kopyası elde edilmiş ve PCR ürün miktarlarının artırılması sağlanmıştır.

T. gondii ile transformasyon deneylerinde floresan mikroskop altında bazen GFP ekspresyonunun düşük olmasından dolayı ekspresyon tespit edilemeyebilir (Kim ve ark, 2001)

Bu durumda aynı deneylerin mutant GFP allelleriyle (GFP mutM1, GFPmutM2, GFPmutM3) yapılması, RT PCR ile mRNA ekspresyonunun gösterilmesi veya anti-GFP antitadileri ve immunofloresans yöntemlerinin kullanılması alternatif yöntemler olarak düşünülebilir.

Bu çalışmada çok az olan GFP ekspresyonu RT-PCR ve Nested PCR ile belirlenmiştir. Ancak çalışmanın asıl hedefi GFP ekspresyonunu arttırmak olduğu için daha sonraki çalışmalarda alternatif yöntemler denenebilir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda;

1) *Cryptosporidium parvum* ookistlerinin en iyi şekilde eksiste olduğu koşullar tespit edilmiştir. Buna göre PBS yerine TA/sitomiks:RPMI-1640 besi ortamında (1:1) ve 37°C'lik su banyosunda 45 dakika bekletmek *C. parvum* ookistlerinin en iyi şekilde (% 80 oranında) eksiste olduğu koşulları oluşturmuştur. Kullanılan diğer eksistasyon koşullarında eksistasyon oranı sırasıyla TA/cytomix ortamında % 60, TA/ RPMI-1640 ortamında % 70 olarak tespit edilmiştir.

2) Eksiste olmuş ookistlerin hücre kültürlerini enfekte ettikleri IF yöntemi ile invert floresan mikroskop altında gözlenmiştir. Her üç eksistasyon koşulu için IMF yöntemi kullanılmış ve farklı koşullarda enfekte edilen HCT-8 hücrelerinin Standart Sapma Değerleri göz önüne alındığında en iyi sonuçların elektroporatörde 1 kez uygulanan elektrik akımı ile elde edildiği tespit edilmiştir.

3) Transfeksiyon işlemi için elektroporasyon ve lipofektamin yöntemleri kullanılıp, elektroporasyon yöntemi için iki farklı koşul denenmiştir.

Elektroporasyon I koşullarında (elektroporatörde voltaj 180V, kapasitans 250 μ F, Resistance None şeklinde ayarlandığında) YFP ve RFP vektörlerinin HCT-8 hücrelerine transfeke edildiği invert floresan mikroskop altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Yine, YFP vektör ekspresyonunun RFP vektör ekspresyonundan daha belirgin olduğu invert floresan mikroskop altında gözlenmiştir. Ancak GFP vektörünün bu koşullar altında invert floresan mikroskopta gözle görülür ekspresyonu belirlenememiştir. Olası az bir GFP ekspresyonunu göstermek için yapılan RT-PCR yöntemiyle de herhangi bir GFP mRNA transkripti elde edilememiştir.

YFP ve RFP vektörlerinin gözle görülür ekspresyonu dikkate alınarak RT-PCR yöntemini optimize etmek için (sentezlenen C-DNA'ların çalışıp çalışmadığını belirlemek, eğer varsa bir hatanın hangi aşamada olduğunu tespit etmek) bu vektörler kullanılmıştır.

Elektroporasyon II koşullarında (elektroporatörde 1000V voltaj, 50 μ F kapasitans ve 50 Ω resistans şeklinde ayarlandığında) ise YFP, RFP ve GFP

vektörlerinin invert mikroskop altında ekspresyonu gözlenmemiştir. GFP vektör örnekleri için yapılan RT-PCR sonucunda belirgin olmayan GFP mRNA transkriptleri elde edilmiştir. Bu transkriptlerin spesifik olmayan ürünler olmadığı yapılan Nested PCR ile doğrulanmıştır.

Lipofektamin yöntemiyle YFP, RFP vektörler HCT-8 hücrelerine başarılı bir şekilde transfekte edilmiştir. Ancak GFP vektörünün bu yöntemle de transfeksiyonu sağlanamamıştır. YFP ve RFP vektörlerinin ekspresyonları invert mikroskop altında incelenip fotoğrafları çekilmiştir. Bu yöntemle RFP vektörlerinin ekspresyonunun YFP vektör ekspresyonundan daha iyi olduğu invert floresan mikroskop altında çekilen fotoğraflarıyla ortaya konulmuştur.

4) YFP vektör için Geneticin antibiyotiği kullanılarak stable transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada gelecekte yapılacak gen manipulasyonlarına temel oluşturması ve henüz kesin bir tedavi yöntemi olmayan Kriptosporidiyoz hastalığına neden olan *C. parvum* genlerinin fonksiyonlarını ve bilinmeyen yönlerini ortaya çıkarmak için, genetik transformasyon sisteminin kurulması adına ön çalışma koşulları oluşturulmuştur.

KAYNAKLAR

ADAL, K.A, STERLING, C.R., and GUERRANT, R.L., 1995. *Cryptosporidium* and Related Species. In: Infections of the Gastrointestinal Tract. Eds, M.J Blaser, P.D Smith, J.I Ravdin, H.B Greenberg, R.L Guerrant. New York: Raven Press, 1107-1128.

BARBER, R.D., HARMER, W.D., ROBERT, A. C., and BRIAN, J. C., 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 21:389-95.

BERTLING, W., HUNGER-BERTLING, K., and CLINE M.J., 1987. Intracellular Uptake and Persistence of Biologically Active DNA after Electroporation of Mammalian Cells. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 14: 223-232.

CARRAWAY, M., TZIPORI, S., and WIDMER, W., 1996. Identification of Genetic Heterogeneity in the *Cryptosporidium parvum* Ribosomal Repeat. *Appl Environ Microbiol*, 62: 712-716.

CHEN, X., KEITHLY, J. S.; PAYA C.V., LA RUSSO, N. F., 2002. Cryptosporidiosis, *The New England Journal of Medicine*. Volume 346 (22), 1723-1731.

CLARK, D.P., 1998. New Insights Into Human Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:554-63.) (Miller JR. Decreasing cryptosporidiosis among HIV-infected persons in New York City, 1995-1997. *J Urban Health* ; 75:601-2.

ÇETİNKAYA F., 2004. *Cryptosporidium parvum*'un Bulaşmasında Su ve Gıdaların Rolü. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.* 23, 1-2-3: 103-109

DECASTRO, M., SAIJOH, Y., and SCHOENWOLF, G.C., 2006. Optimized cationic lipid-based gene delivery reagents for use in developing vertebrate embryos. *Dev Dyn*, 235(8):2210-2219.

DEITSCH, K., DRISKILL, C., and WELLEMS, T., 2001. Transformation of malaria parasites by the spontaneous uptake and expression of DNA from human erythrocytes. *Nucleic Acids Res*, 29: 850-853.

DI GIOVANNI, G., and LECHEVALLIER, M. W., 2004. Quantative-PCR Assesment of *Cryptosporidium parvum* Cell Culture Infection. Applied and Environmental Microbiology, Vol:71: 1495-1500.

DILINGHAM, A.R., LIMA, A.A., and GUERRANT, L.R., 2002. Cryptosporidiosis: Epidemiology and Impact. Microbes and Infection, 4: 1059-1066.

DONALD, R.G., and ROOS D.S., 1993. Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. Proc Natl Acad Sci USA, 90:11703-11707.

DUPONT, H.L., CHAPPEL, C.L., STERLING, C.R., OKHUYSEN, P.C., ROSE, J.B., and JAKUBOWSKI, W., 1995. The Infektivty of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers. N. Eng. J. Med., 332: 855-859.

FARTHING, M.J., 2000. Clinical Aspects of Human Cryptosporidiosis. Contrib Microbiol, 6: 50-74.

FATIH, M., AWAD –EL-KARIEM., HEIDI A.R., FRANZ P., VINCET M., DAVIS, E., and DAVID, C., 1998. Differentiation between human and animal isolates of *C. parvum* using molecular and biological markers. Parasitol Res., 84:297-301.

FAYER, R., 2000. Waterborne and foodborne protozoa. In: HUI YH, GORHAM JR, MURRELL KD, AND CLIVER DO (eds.) Foodborne Diseases Handbook, Volume 2, Chapter 13, p. 289-322. Marcel Dekker, Inc., New York.

FELGNER, P.L., and HOLM, M., 1989. Cationic Liposome-mediated Transfection. Focus. Life Technologies, 11: 21-25.

GOONEWARDENE, R., DAILY, J., KASLOW, D., SULLIVAN, T.J., DUFFY, P., CARTER, R., MENDIS, K., and WIRTH, D., 1993. Tranfection of The Malaria Parasite and Expression of Firefly Luciferase. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 5234-5236.

GRIFFITHS, K.J., BALAKRISHNAN, R., WIDMER, G., and TZIPORI, S., 1998. Paromomycin and Geneticin Inhibit Intracellular *Cryptosporidium parvum* without Trafficking through the Host Cell Cytoplasm: Implications for Drug Delivery. Infection and Immunity. 3874-3883.

GUERRANT, R. L., 1997. Cryptosporidiosis: an Emerging, Highly Infectious Threat. *Emerg Infect Dis*; 3:51-58.

GUYOT, K., FOLLET-DUMOULIN, A., RECOURT, C., LELIÈVRE, E., CAILLIEZ, J. C., and DEI-CAS, E., 2002. PCR-restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of a Diagnostic 452-base-pair DNA Fragment Discriminates Between *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis* and Between *C. parvum* Isolates of Human and Animal Origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (4): 2071-2076.

IRSHAD M.S., LIHUA XIAO., CHUNFU Y., LILIAN E., MOORE A., CHARLES B. BEARD, MICHAEL J. A., and ALTAF A. LAL., 1998. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, (October-December 1998). V:4.

JOHNSON, J., SCHMIDT J., GELBERG, H., and KUHLENSCHMIDT, M., 2004. Microbial adhesion of *Cryptosporidium parvum* sporozoites: Purification of an inhibitory lipid from bovine mucosa. *The journal of parasitology*, 90(5) 980-90.

KALMIA, K., PHELPS, DAVID S. LINDSAY., SUSAN S. SUMNER and RON FAYER., 2001. Immunohistochemistry Based Assay to Determine the Effects of Treatment on *C. parvum* Viability. *J. eukaryot. Mikrobiol.* 48 :40–41

KIM, K., EATON, M.S., SCHUBERT, W., WU, S., and TANG, J., 2001. Optimized expression of green fluorescent protein *Toxoplasma gondii* using thermostable green fluorescent protein mutants. *Mol Biochem Parasitol*, 113: 309-313

KNIEL, K., SUMNER, S., LINDSAY, D., HACKNEY, C., PIERSON, M., and ZAJAC, A., 2003. Effect of Organic Acids and Hydrogen Peroxide on *Cryptosporidium parvum* Viability in Fruit Juices. *Journal of Food Protection*, 66 (9): 1650-1657.

KNUTSON, J.C. and YEE, D., 1987. Elektroporation: Parameters affecting transfer of DNA into mammalian cells. *Anal. Biochem.* 164: 44-52.

MACH, P.A., and GRIMES, D.J., 1982. R-plasmid Transfer in A Wastewater Treatment Plant. *Appl. Env. Microbiol*, 1395-1403.

MAURICE, J.B., VAN DEN HOFF, A., MOORMAN, F.M. and WOUTER H.L., 1992. Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. *Nucleic Acids Research*, Vol: 20:11.

MAXWELL, I.H., and MAXWELL, F., 1998. Electroporation of Mammalian Cells with a Firefly . DNA (Mary Ann Liebert, Inc.), 7 :557-562.

MAZODIER, P., and DAVIES, J., 1991. Gene Transfer Between Distantly Related Bacteria, Annu. Rev. Genet., 25: 147-171.

MEINHARDT, P.L, CASEMORE, D.P., and MILLER, K.B., 1996. Epidemiologic Aspects of Human Cryptosporidiosis and The Role of Waterborne Transmission. Epidemiol Rev.18: 118-136.

MEISEL, J.L., PERERA, D.R., MELIGO, C., and RUBIN, C.E., 1976. Overwhelming Watery Diarrhea Associated with a *Cryptosporidium* in a Immunosuppressed Patient. Gastroenterology, 70: 1156-1160.

MELE, R., GOMEZ, M., TONSINI, F., and POZIO, E., 2003. Detection and counting of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells by flowcytometry. Parasite, 10(4):297-302.

MILLAR, B.C., FINN, M., XIAO, L., LOWERY, C.J., DOOLEY, J.S.G., and MOORE, J.E., 2002. *Cryptosporidium* in Foodstuffs-An Emerging Aetiological Route of Human Foodborne Illness. Trends Food Sci.Technol., 13: 168-187.

MILLER, J.R., 1998. Decreasing Cryptosporidiosis Among HIV-Infected Persons in New York City, 1995-1997. J Urban Health, 75: 601-602.

MOORE, A.C., HERWALDT, B.L., CRAUN, G.F., CALDERON, R.L., HIGHSMITH, A.K., and JURANEK, D.D., 1993. Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks-United States, 1991-1992. Morb Mortal Wkly Rep, 42:1-22.

MORGAN, U. M., XIANO, L., FAYER, R., ALTAF, A. L., and THOMPSON ANDREW R.C., 2000. Epidemiology and Strain Variation of *Cryptosporidium parvum*. Cryptosporidiosis and Microsporidiosis, 6: 116-139.

MUSTAFA S., BAĞCI H., ŞENGİL A.Z., ve ÖZTAŞ S., 2000, Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi, 81-99.

NAVIN T.R, and HARDY, A.M., 1987. Cryptosporidiosis in Patients with AIDS. J. Infect Dis, 155:150.

NAYLER, J.H.C., 1987, Resistance to β -lactams in Gram-negative Bacteria: Relative Contributions of β -lactamase and Permeability Limitations. J. Antimicrob Chemother, 19: 713-732.

- NIKCEVIC, G., KOVACEVIC-GRUJICIC, N., and STEVANOVIC, M., 2003. Improved transfection efficiency of cultured human cells. *Cell Biol Int.* 27 (9): 735-737.
- NIME, F.A, BUREK, J.D., PAGE, D.L., HOLSCHER, M.A., and YARDLY, J.H., 1976. Acute Enterocolitis in a Human Being Infected with the Protozoen *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*, 70: 592-598.
- O'DONOGHUE, P.J., 1995. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis* in Man and Animals. *Int J. Parasitol*, 25: 139-195.
- PANCIERA R.J, THOMASSEN R.W, and GARNER, F.M., 1971. *Cryptosporidial* infection in a calf. *Vet Pathol*, 8:479-484.
- PENG, M.M., XIAO, L., FREEMAN, A.R., ARROWOOD, M.J., ESCALANTE, A. A., WELTMAN, A.C., ONG, C. S., MAC KENZIE, W. R., LAL, A.A., and BEARD, C. B, 1997. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerg Infect Dis* 3: 567-573.
- POKORNY, N., WEIR, S., CARRENO, R., TREVORS, J., and LEE, H., 2002. Influence of Temperature on *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of Parasitology*, 88 (3): 641-643.
- ROCHELLE, A.P., MARSHALL, M.M., MEAD, R.J., JOHNSON, M.A., KORICH, G.D., ROSEN, S.J., and RICARDO, De LEON., 2002. Comparison of In Vitro Cell Culture and Mouse Assay for measuring Infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Applied and Enviromental Microbiology*, 3809-3817.
- ROSSIGNOL, J.F., AYOUB, A., and AYERS, M.S., 2001. Treatment of Diarrhea Caused by *Cryptosporidium parvum*: A Prospective Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Nitazoxanide. *J. Infect Dis*, 184: 103-106.
- SALVIN, D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp Pathol*, 65: 262-266.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T., 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Second Edition. 162-189.
- SAYGI, G., 2002. Temel Tibbi Parazitoloji. 2: 95.

SESTAK, K., WARD, A.L., SHEORAN, A., FENG, X., AKIYOSHI, E.D., WARD, D.H., and TZIPORI, S., 2002. Variability among *Cryptosporidium parvum* Genotype 1 ve Genotype 2 Immunodominant Surface Glycoproteins. *Parasite immunology*, 24: 213-219.

SHIGEKAUWA, K., and DOWER, W.J., 1988. Electroporation of Eukaryotes and Prokaryotes; a g. *Bio Techniques*, 6:8: 742-751.

SHOAIB, S., TAUHEED, S., and HAFIZ, A., 2003. Frequency of *Cryptosporidium* in Chilhood Diarrhoea-Importance of Modified Acid-Fast Technique. *J. Ayub Med coll, Abottabad*, 15(3): 3-5.

SLIFKO, R.T., FRIEDMAN, D., ROSE, B.J., and JAKUBOWSKI, W., 1997. An In Vitro Method for Detecting Infectious *Cryptosporidium* Ookist with Cell Culture. *Applied and Environmental Mikrobiyology*, 3669-3675.

SMITH, H. V, and ROSE, J. B., 1998. Waterborne Cryptosporidiosis: Currents Satus. *Parasitol Today*, 14: 14-22.

SOLAK, M., BAĞCI, H., ŞENGİL, A. Z., ve ÖZTAŞ, S., 2000. Mokeküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi (Temel Bilgiler). T.C. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Eğitim sağlık ve Bilimsel Araştırmalar Vakfı, Yayın No: 5, 187 s.

SOLDATI, D., and BOOTHROYD, J. C., 1993. Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplazma gondii*. *Science* 260: 349-352.

STRIEPEN, B., HE, C.Y., MATRAJT, M., SOLDATI, D., and ROOS, D.S, 1998. Expression, selection, and organellar targetting of the green fluorescent protein in *Toxoplazma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.*, 92:325-338.

SULAIMAN, I.M., XIANO, L., YANG, C., ESCALANTE, L., MOORE, A., BEARD, C.B., ARROWOOD, M.J., and LAL, A.A., 1998. Differantiating Human from Animal Isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerg. Infect. Dis.*, 4: 681-685.

SULTAN, A.A., THATHY, V., FREVERT, U., ROBSON, K. J., CRISANTİ, A., NUSSENZWEIG, V., NUSSENZWEIG, R.S., and MENARD, R., 1997. TRAP is Necessary for Gliding Motility and Infectivity of *Plasmodium* Sporozoites. *Cell.*, 90: 511-522.

TANRIVERDI, S., ARSLAN, M. O., DONA, E.A., TZIPORI, S., and WIDMER, G., 2003. Identification of Genotypically Mixed *Cryptosporidium parvum* Populations in Humans and Calves. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 130: 13-22.

TANRIVERDI, S., TANYELI, A., BASLAMISLI, F., KOKSAL., F., KILINÇ Y., FENG, X., BATZER, G., TZIPORI, S., and WIDMER, G., 2002. Detection and genotyping of oocyst of *Cryptosporidium parvum* by Real-Time PCR end Melting Curve Analysis. *Journal of Clinical Mikrobiology*, Vol: 40: 3237-3244.

TEMİZKAN, G ve ARDA, N., 1999. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği, Araştırma ve Uygulama Merkezi, Yayın No:1, 236 s.

THEODOS C.M., GRIFFITHS J.K., D'ONFRO J., FAIRFIELD A., TZIPORI, S., 1998. Efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in animal models. *PG-1959-65. Antimicrob Agents Chemother* 1998-42.

TYZZER, E. E., 1907. A Sporozoen Found in the Pepticglands of the Common Mouse, *Proc Soc Exp Biol Med*, 5: 12-13.

TYZZER, E.E., 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp.nov.), a Coccidium Found in the Small Intestine of the Common Mouse. *Arch Protistenkd*, 26: 394-412.

TZIPORI, S., and WARD, H., 2002. Cryptosporidiosis: Biology, Pathogenesis and Disease. *Microbes and Infection*, 4 : 1047-1058.

TZIPORI, S.R., CAMPBELL, I., and ANGUS, K.W., 1982. The Therapeutic Effect of 16 Antimicrobial Agents. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 60: 187-90.

TZIPORI, S., 1998. Cryptosporidiosis: laboratory investigations and chemotherapy. *Adv Parasitol* 40: 187-221.

UPTON, S.J., TILLEY, M., and BRILLIHART, D.B., 1994. Comparative Development of *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiology letters*, 118: 233-236.

VAN DIJK, M.R., WATERS, A.P., and JANSE, C. J., 1995. Stable Transfection of Malaria Parasite Blood Stages. *Science*, 268: 1358-1362.

VANWYE, J.D., and HALDAR, K., 1997. Expression of green fluorescent protein in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol, 87:225-229.

VERA, H., EICHHOLZ, J., and PETRY, F., 2003. Effect of Antiretroviral Protease Inhibitors Alone, and in Combination with Paromomycin, on the Excystation, Invasion and in Vitro Development of *Cryptosporidium parvum*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52: 359-364.

WANG, Y., and TAYLOR, D.E., 1990, Natural Transformation in Campylobacter Species, J. Bacteriol, 172: 949-955.

WATERKEYN, J.G., CRABB B.S., and COWMAN, A.F., 1999. Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. International Journal for Parasitology, 29: 945-955.

WEECHARANGSAN, W., OPANASOPIT, P., and LEE, R. J., 2007. In vitro gene transfer using cationic vectors, electroporation and their combination. Anticancer res, 27 (1A): 309-313.

WHITE, A.C. JR., CHAPPELL, C.L., HAYAT, C.S., KIMBALL, K.T., FLANIGAN, T.P., and GOODGAME, R.W., 1994. Paramomycin for Cryptosporidiosis in AIDS: A Prospective, Double-blind Trial. J. Infect Dis, 170: 419-424.

WIDMER, G., 1995. Suppression of Leishmania RNA Virus Replication by Capsid Protein Overexpression. J. Virol., 69: 4122-4126.

WIDMER, G., TZIPORI, S., FICHTENBAUM, C.J., and GRIFFITHS, J.K., 1998. Genotypic and phenotypic characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates from people with AIDS. J Infect Dis 178:834-840.

WIDMER, G., FENG, X., and TANRIVERDI, S., 2004. Genotyping of *Cryptosporidium parvum* with Microsatellite Markers. In Methods in Molecular Biology. Eds: Spencer JFT and Ragout de Spencer AL. Humana Press Inc., NJ., 268: 177-187.

WIDMER, G., LIN, L., KAPUR, V., FENG, X., and ABRAHAMSEN, S.M., 2002. Genomics and Genetics of *Cryptosporidium parvum* :the Key to Understanding Cryptosporidiosis. Microbes and infection, 4: 1081-1090.

WOODS, K.M., NESTERENKO, M.V., and UPTON, S.J., 1996. Efficacy of 101 antimicrobials and other Agents on. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 90: 603-615.

WOODS, M.K., and UPTON, J.S., 1998. Efficacy of Select Antivirals Against *Cryptosporidium parvum* in Vitro. *FEMS Microbiology Letters*, 168: 59-63.

XIANO, L., MORGAN, U.M., FAYER, R., THOMPSON, R.C., and LAL, A.A., 2000. *Cryptosporidium* Systematics and Implications for Public Health. *Parasitol Today*, 16: 287-92.

YU, J.R., SUNG-DON, C., and YOUNG-WOOK, K., 2000. In vitro infection of *Cryptosporidium parvum* to four different cell lines. *The Korean Journal of Parasitology*. Vol:38 No:2, 59-64,

ZIMMER, J.L., SLAWSON, R.M., and HUCK, P.M., 2003. Inactivation and Potential Repair of *Cryptosporidium parvum* Following Low-and Medium-Pressure Ultraviolet Irradiation. *Water Research*, 37: 3517-3523.

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Adıyaman'ın Gölbaşı ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi sırasıyla Kahramanmaraş, Gaziantep ve Adana'da tamamladım. 1998 yılında 19 Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 2001 yılında Gaziantep Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Yüksek Lisans eğitimimi tamamladım. 1999-2002 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalıştım. 2003 yılında Adana Bölge Hıfzısıhha Enstitüsü Müdürlüğünde Uzman Biyolog olarak çalışmaya başladım ve halen aynı göreve devam etmekteyim. 2003 yılında Ç.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde doktora eğitimime başladım.

Evli ve bir çocuk annesiyim.