

Pulsed-Field Jel Elektroforez (PFGE) Metodu ve Akuatik Organizmalarda Kullanımı

Mustafa TÜRE^{1*} İlhan ALTINOK²

¹ Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yomra, Trabzon

² Karadeniz Teknik Üniversitesi KTU, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği, Çamburnu, Trabzon

*Sorumlu yazar: mtüre@sumae.gov.tr

Özet

PFGE (Pulsed-Field Jel Electroforez), akuakültürde salgın hastalıklara yol açan izolatların ilişkilendirilmelerinde anahtar rol oynayan bir metottur. Teknik, 10 megabaz çifti (Mbç) kadar geniş molekül ağırlığına sahip DNA parçalarının etkin bir biçimde ayrışmasına olanak sağlamıştır. PFGE, çeşitli patojenlerin epidemiyolojisi, genom büyüklüklerinin belirlenmesi, bakteri kromozomlarının fiziksel ve genetik haritalandırılmalarının gerçekleştirilmesi gibi konularda son yıllarda sıkça kullanılan ve altın standart olarak kabul gören bir metottur. Agaroz içerisindeki bakteri hücresinden elde edilen genomik DNA'nın, uygun enzim ile kesimi sonucu oluşan bant desenlerinin yorumlanması şeklinde gerçekleştirilir. Bu derlemede, PFGE'nin genel özellikleri, çalışma prensibi, tipleri, genel ve akuakültürdeki kullanımından söz edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Akuakültür, Epidemiyoloji, PFGE, Kesici enzimler

Method of Pulsed-Field Gel Electroforesis (PFGE) and Its Usage in Aquatic organisms

Abstract

PFGE (Pulsed-Field Gel Electroforesis) played a key role in determining the outbreak-associated isolates in aquaculture. The technique has enable to separate large DNA fragments of up to 10 megabase pairs (Mb) effectively. In recent years PFGE, is a method that comonly used and accepted as the gold standard for epidemiology of various pathogen, determining to genome size and constructing the physical and genetic map of the chromosome of bacteria. PFGE is performed: Genomic DNA is derived from bacterial cell in agarose, cut with the appropriate enzyme and band patens are described. In this review, the general characteristics of PFGE, principles of experiment, types of PFGE, the use of PFGE in general and aquaculture are introduced.

Key words: Aquaculture, Epidemiology, PFGE, Restriction enzymes

GİRİŞ

Akuakültürde, bakteriyel hastalıkların geleneksel olarak tespiti; bakterinin izolasyonu fenotipik özelliklerini içeren geleneksel bakteriyolojik testler ve serolojik özelliklerinin belirlenmesi şeklinde gerçekleştirilir (Bernardet ve ark., 1990). Fakat yapılan çalışmalar aynı genus içerisinde olan bazı patojenlerin bu klasik testler sonucu farklılık göstermediklerini ortaya koymuştur (Eldar ve ark., 1996). Son yıllarda balık patojenlerinin tespiti üzerine moleküler biyolojinin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Sürekli gelişim halinde olan akuakültürde balık patojenlerinin rutin tespiti ve kontrolü, bakteriyel ve viral etkenlerin epidemiyolojilerinin araştırılması rutin çalışmalar haline gelmiştir. Bu sayede birçok etkenin sadece tespiti değil aynı zamanda yayılımı, bunun mekanizması ve korunma önlemleri konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Vela ve ark., 2000; Çağırğan, 2004; Türe ve ark., 2012).

Klasik biyokimyasal testler, antimikrobiyal duyarlılık testleri ve serotiplendirme gibi test sonuçlarına göre aynı görünen izolatlar moleküler epidemiyoloji teknikleri sayesinde

farklı adlandırılabilmişlerdir. Yeni teknikler geliştirilirken bir yandan da eski teknikler modifiye edilerek daha az zaman ve işgücü ile kaliteli sonuçlar elde edilebilmiştir (Mc Ellistrem ve ark., 2000).

Gelişim halinde olan akuakültürdeki değişik problemleri çözmek üzere Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE), Enterobacterial Repatitive Intragenic Consensus Element (ERIC-PZR), Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP), Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Multipleks (Çoklu) PZR ve In Sütü Hibridizasyon gibi teknikler geliştirilmiştir.

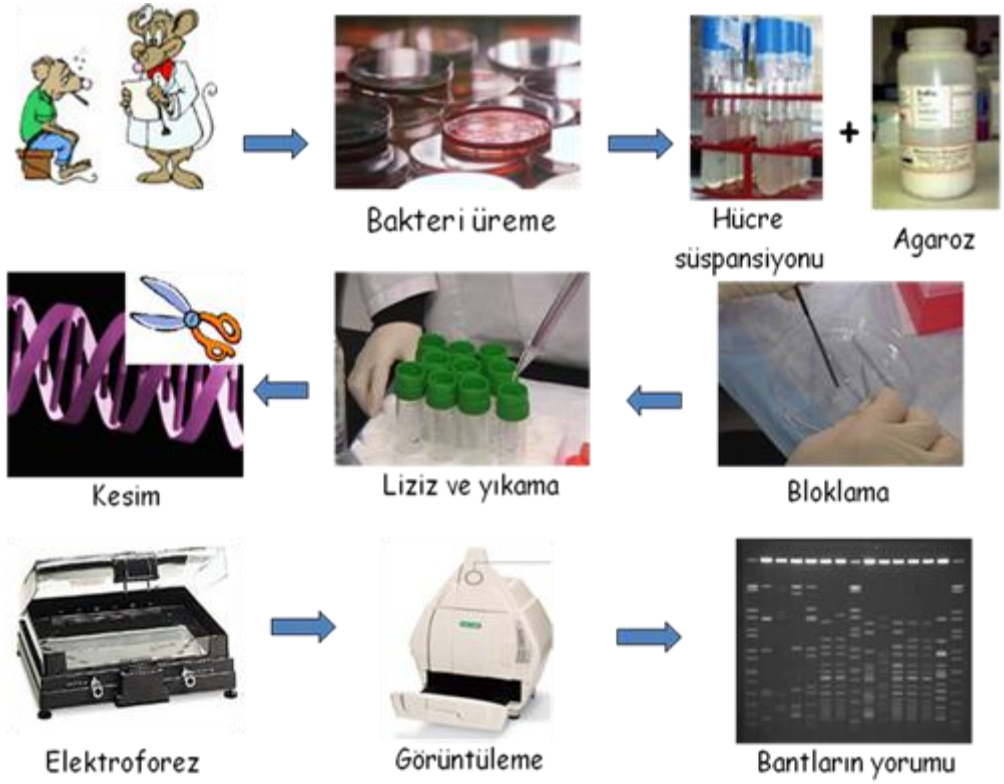
Bu derlemenin amacı; yüksek ayırt etme gücüne sahip olması ve çok iyi epidemiyolojik uygulamalarından dolayı son 20 yıldır bakteriyel patojenlerin alt tiplmelerinde altın standart olarak kullanılan PFGE tekniğinin (Olive ve Bean, 1999) akuakültürdeki kullanımı ile ilgili bir değerlendirmesini yapmak ve bu tekniğin nasıl kullanıldığı, avantaj ve dezavantajları hakkında güncel bilgi sunmaktır.

Pulsed-Field Jel Elektroforesiz Tarihçesi

Yakın zamana kadar moleküler biyoloji alanında, DNA moleküllerinin ayrılmaları, boyutlarının bilinmesi ve görüntülenmeleri gibi konularda kullanılan en yaygın teknik standart jel elektroforezidir. Bu geleneksel teknik ile, sabit bir elektriksel alan altında ancak 100-200 baz çifti (bç) ile 50 kilobaz çifti (kbç) arasındaki DNA fragmentlerinin (parçacık) ayrışması sağlanabilir. 50 kbç'nin üzerindeki ise moleküllerin büyüklüğünden dolayı jel üzerinde ayrılmazlar (Basım ve Basım, 2001). İlk kez 1982'de Schwartz ve arkadaşları 50 kbç'den daha büyük DNA moleküllerinin iki değişken elektriksel alan kullanarak ayrıştırıldığı sistemi tanıtmışlardır. Daha sonraki zamanlarda da bu prensip temelinde ki cihazlar geliştirilerek 10 Mbç kadar büyüklükteki moleküllerin ayrışmaları sağlanmıştır. PFGE, 50 kbç'lik parazit mikro kromozomundan Mbç ile ölçülebilen büyüklükteki maya kromozomlarına kadar bakteri, virüs ve memelilerde dahil birçok canlı türüne ait kromozomal DNA'yı mükemmel bir şekilde ayrıştırma kabiliyetine sahiptir (Schwartz ve Cantor, 1984; Gardiner, 1991).

Pulsed-Field Jel Elektroforesizin Çalışma Prensibi

Düşük erime ısı (low melting) agaroz içine gömülü haldeki bakteri hücresinden, yapısal bütünlüğü bozulmadan izole edilen genomik DNA'nın uygun restriksiyon endonükleaz enzimi (RE) ile kesimi sonucu oluşan profillerin belirlenmesi ve yorumlanması esasına dayanır (Şekil 1). Standart jel elektroforezine göre çok daha büyük DNA moleküllerinin hareket ettirilmesi, değişken elektriksel alan kaynaklı akım oryantasyonunun periyodik bir şekilde hareketiyle mümkün olmaktadır. PFGE'de uygun RE ile tam olarak kesilmiş 10 ile 800 kbç arasında uzunluğa sahip parçalar etkin bir şekilde göç ettirilmekte ve bunun sonucunda yaklaşık 5 ila 25 arasında farklı yapıda DNA fragmentleri ortaya çıkmaktadır (Murray ve ark., 1998; Türe ve ark., 2012).



Şekil 1. PFGE'nin pratik adımları (URL 1)

PFGE Ekipmanları

Bir PFGE sistemindeki temel ekipmanlar (Şekil 2); jel kutusu, elektriksel alan kontrolü için anahtar ünitesi (switch), bilgisayar programı, soğutucu, UV görüntüleme cihazı ve güç kaynağıdır (Lai ve ark. 1989). Jel kutusu, içerisine elektrotlar takılı hareketsiz bir sistemdir. İçine DNA blokları yerleştirilmiş sertifikalı PFGE agarozu ile hazırlanmış jel, jel kutusuna yerleştirilir ve üzerinde bulunduğu tampon çözeltisinin elektriksel sirkülasyonu ile DNA parçacıkları hareket ettirilir. PFGE'de yaygın olarak kullanılan voltaj değeri 10 volt/cm kadardır. Tampon çözeltisi sıcaklığı sistem tarafından sabit tutulur (Lai ve ark., 1989; Basım ve Basım, 2001).

Elektriksel alan kontrolü için kullanılan devre, fragmentlerin ayrımı için önemlidir. Çalışma hızı ve aralığı sisteme bağlı bilgisayar tarafından kontrol edilir. DNA moleküllerinin ayrışması için çalışma hızı belirli limitlerde olmalıdır. Son zamanlarda geliştirilen bazı aparatlar vasıtası ile elektriksel alanların arasındaki oryantasyon açısı kontrol edilerek bu ünitenin etkinliği artırılmıştır (Basım ve Basım, 2001). Uygun RE ile kesilen bir gram(+) balık patojeni için; plaklar %1 oranında hazırlanan sertifikalı PFGE agarozuna yüklenmiş, koşturma zamanı 18 saat, sıcaklık 10°C, voltaj derecesi 130V, açısı 120° ve 12 saniye aralıklarla, 0,5x TBE tampon çözeltisi içerisinde koşturulması DNA fragmentlerinin yeterince ayrışması için uygun bulunmuştur (Türe ve ark., 2012).

PFGE sisteminde, DNA moleküllerinin ayrışmalarının kontrolünde switch aralığı (interval) önemlidir. Çok yönlü ünitenin aynı karakteristikte bilgisayar yazılım sistemi olmalıdır. Sistem yeterince hızlı olmalı ve vuruş aralığının zamanla artması gerekir. Koşurma zamanı, çok geniş DNA moleküllerinin ayrışmasını olanak sağlayacak uzunlukta olmalıdır. Tüm bu işlemler sisteme dahil bilgisayar programı sayesinde kurulup kontrol edilir (Lai ve ark., 1989).

PFGE’de ayrışmanın istenilen düzeyde olabilmesi için sistemin bağlı olduğu elektriksel akımın sürekli ve kontrol altında olması gerekir. Jelde gerekli akım ve voltaj için güç kaynağı yeterince yüksek randımına sahip olmalıdır. PFGE’de yaygın olarak kullanılan voltaj derecesi aralığı (1,5-15 volt/cm) için 750 volt gücünde güç kaynağına ihtiyaç duyulmaktadır (Lai ve ark., 1989).

Tampon çözeltisinin sirkülasyonu, jel içindeki sıcaklık değişimini elemine etmesi ve elektrolizden kaynaklanan tampon çözeltisindeki bazı aksaklıkları hafifletmesinden dolayı önemlidir. DNA molekülünün göçü sıcaklığa duyarlıdır ve göç tamamlanmaya kadar sabit kalması gerekir. Tampon çözeltisi sistemdeki pompa aracılığı ile yaklaşık 450ml/dk. oranında dolaştırılır. Tampon rezervuar tankındaki soğuk su vasıtası ile soğutulur böylece Tampon çözeltisi sıcaklığı koşurma süresi boyunca sabit (10-15°C) kalır (Birren ve ark., 1988).

Koşurma işlemi tamamlandıktan sonra jel %0,01’lik etidyum bromür (EtBr) ile boyanarak UV altında görüntülenir. Jelde oluşan DNA fragmentlerinin yorumlanması için standart jel elektroforezinde de kullanılan çeşitli UV görüntüleme cihazları kullanılabilir (Türe ve ark., 2012).



Şekil.2. PFGE ekipmanları (orijinal)

Pulsed-Field Jel Elektroforesiz Tipleri

PFGE büyük ya da küçük DNA moleküllerinin çözünürlüğünü arttırmak amacı ile kullanılan ekipmanların çeşitliliğine bağlı olarak farklılıklar gösterir. Varılacak hedefe uygun PFGE sistemin seçimi maliyet ve efor değerlendirmesi açısından önemlidir (Basım ve Basım, 2001). İki farklı alandan sırayla oluşturulan elektriksel alan uygulaması temelinde birkaç farklı PFGE tipi bildirilmiştir.

a) Alan inversiyon jel elektroforezi (Field inversion gel electrophoresis, FIGE): Elektrik akımı 180 derecelik açılarla yerleştirilmiş elektrotlardan ileri ve geri olmak üzere iki yönde uygulanır. İleri yöndeki akımın süresi (pulse zamanı) geri yöne göre üç kat daha uzundur. Bu durum moleküllerin ileriye göçüne sebep olur. FIGE ile DNA moleküllerinin doğrusal göçü sağlanır. DNA hareketi her zaman DNA moleküllerinin boyutu ile uyumlu değildir (Carle ve ark., 1986). FIGE’de bantların çözünürlüğünü arttırmak amacı ile akım süresi aralığı (durasyon) koşturma esnasında kademeli olarak artırılır. Günümüzde bu sistem 600-750 kbç kadar küçük fragmentlerin ayrışmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Basım ve Basım, 2001).

b) Contour-Clamped Homojen Elektrik Alanları (Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields, CHEF): En geniş kullanım alanına sahip tiptir. Sistem altıgen biçiminde kenarlara yerleştirilmiş yirmi dört nokta elektroda sahiptir. Sistemde etkisiz elektrot olmayıp tüm elektrotlar loplara vasıtasıyla güç kaynağı ile bağlantılıdır ve hepsi aynı dirence sahiptir. Bu loplara görevi her pozisyonda altıgen olarak yerleştirilmiş elektrotlardan uygun voltaj üretmektir. Altıgen biçiminde 120 derecelik elektrotlarda sabit hızla elektrik akımı gelmektedir. Sistemde düz jel üzerinde etkili ve homojen bir elektriksel alan üretilir. 120 derecelik açılarla yerleştirilmiş elektrotlardan sabit hızla gelen elektrik akımı sayesinde pozitif kutuptan negatif kutba doğru hareket sağlanır. Bu düzenek DNA moleküllerinin göçü esnasındaki hasarları önler. Böylece sistem sayesinde büyük molekül ağırlığına sahip DNA parçacıklarının göçü sağlanmış olur (Chu ve ark., 1986; Levene, 1992).

c) Transvers-Dalgalı Alan Jel Elektroforezi (Transverse-Alternating Field Gel Electrophoresis, TAFE): Bu yöntemde koşturma işlemi dikey pozisyonda gerçekleşir ve elektriksel alan jelin yüzeyinde uygun bir açı ile sağlanır. Bu sayede DNA göçünde oluşacak hasar azaltılır (Gardiner ve Patterson, 1988). PFGE’nin bu tipi geniş DNA fragmentlerinin uygun bir biçimde göçüne olanak sağlar. TAFE’de dikey hareketi sağlayan jelin önünde ve arkasında dört basit elektrot mevcuttur. Bu iki alan arasında elektriksel alanlar arasındaki açı farklıdır (115°- 165°). Jel boyunca tüm DNA molekülleri aynı etkiye maruz kalır ve bantlar düz bir biçimde ilerler. TAFE sistemi geniş molekül ağırlığına sahip DNA moleküllerinin düzenli ve belirgin biçimde ayrışması sayesinde pek çok patojenin genetik çalışmasında ilerde öncü sistem olması beklenmektedir (Steward ve ark., 1988).

d) Pulsed-Homojen Ortogonal Alan Jel Elektroforezi (Pulsed-Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis, PHOGE): Bu sistemin diğerlerinden en önemli farkı, homojen elektriksel alanın yönlendirildiği açı 90°’dir. Fakat DNA molekülleri her siklusta 2 yerine 4 kez yönlendirme işlemine tabi tutulur. DNA moleküllerinin düz bir şekilde koşturulmadığı bu sistemde 100Mbç’den büyük parçacıkların ayrışmasına olanak sağlanır (Ziegler ve ark., 1992).

e) Ortogonal-Field Alternation Jel Elektroforezi (Orthogonal-Field Alternation Gel Electrophoresis, OFAGE): İlk kez 1984 yılında bildirilen bu sistemde 2 homojen olmayan elektriksel alan kullanılır. Sistemin en önemli dezavantajı elektriksel alan bir örnek olmayıp, jeldeki elektriksel alan arasında açı farkı olmasıdır. Böylece DNA molekülleri jel üzerindeki konumlarına bağlı olarak farklı oranlarda göç ederler. Bu durum bazı canlıların genom haritalarının düzenlenmesinde problem yaratabilir. Elektriksel

alanlar arasındaki açı farkı (90°-180°) kadardır. 1000-2000kb boyutundaki DNA moleküllerinin ayrışmasına olanak sağlar (Carle ve ark., 1984).

f) Programlanabilir Bağımsız Kontrollü Elektrotlar (Programmable Autonomously-Controlled Electrodes, PACE): Bu sistem tüm elektriksel alan parametrelerin bağımsız voltaj regülasyonu aracılığı ile tam kontrollü olduğu bir sistemdir. Üzerinde 24 düzenli elektrot mevcuttur. Önceki PFGE sistemlerini temsil edebilir. 100 bç ile 6 Mbç arası DNA parçacıklarının etkin ayrışmasına olanak sağlar. PFGE’de vuruş zamanı, sıcaklık, agaroz konsantrasyonu, voltaj ve açı gibi DNA göçünü etkileyen değişkenlerin yer aldığı çalışmalar için çok kullanışlı bir sistemdir (Birren ve ark., 1988).

PFGE için Kullanılan Materyal Ve Metot

1. PFGE için bakteriyel DNA’nın elde edilmesi

Bakteri katı ya da sıvı besi ortamında geceden inkübe edilir (nutrient, triptik soy agar veya broth). 14-18 saat inkübasyon yeterli olup, eskimiş kültürler kolay DNA hasarına neden olurlar. Plaktan alınan bakterinin yoğunluğu hücre süspansiyon tamponu (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8.0) içerisinde ayarlanır. Bakteri yoğunluğu ortalama 610nm’de 0,6-1,0 optik dansite olmalıdır. Bakteri hücresi ortalama 5ml lizis tamponu (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% Sarcosyl; 0,5 mg/ml Proteinase K, her örnek için) içerisinde parçalanır (Turabelidze ve ark., 2000). Lizis zamanı organizmalar arasında değişmekle beraber ortalama 37°C 0,5-3 saat yeterlidir. Bu aşamada bakteri türüne göre değişmekle beraber lizozim, lizostapin ve mutonalizn gibi güçlü litik enzimler kullanılabilir. Lizis aşaması DNA ekstraksiyonu için çok önemli olup, yetersiz lizis enzimle kesim işleminin yetersiz olmasına dolayısı ile jel üzerinde bantların kötü gözükmesine sebep olur (URL 1, ; Türe ve ark., 2012). Sonrasında süspansiyon, %0,5 sodyum dodesil sülfat içeren %1,2-2’lik düşük erime ısılı agaroz ile eşit hacimde karıştırılarak agaroz kalıpları içerisine dökülür ve soğutulmak üzere 4°C de 10 dakika bekletilir. Kolay parçalanabilen bazı organizmalarda lizis işlemi agaroz blokları içerisinde yapılabilir. Agaroz kalıplarından nazikçe alınan bloklar temiz bir tüp içerisine alınarak proteolizis (0,5 M EDTA, %1 sarkozil ve 400µg/ml proteinaz K, 3 saat-1 gece / 55°C) işlemi gerçekleştirilir. DNA bloklarını kullanılan enzim ve deterjan atıklarından arındırmak amacıyla 50°C’de her bir aşaması 10 dakika olacak şekilde en az 3 kez distile su ile 3 kez de TE ile yıkanır. Yetersiz yıkama, yetersiz kesime neden olabilir (Turabelidze ve ark., 2000).

2. DNA’nın restriksiyon enzimi (RE) ile kesimi

Agaroz içerisindeki kromozomal DNA’nın kesimi için uygun RE’nin seçimi önemlidir. Az sayıda fakat büyük molekül ağırlığına sahip parçalar oluşturabilen enzimler seçilmelidir. Bakteriyel DNA’nın G+C içeriği ve enzimin tanıma bölgesinin uzunluğu RE seçiminde önemli kriterlerdir (Swaminathan ve ark., 1993). DNA blokları temiz bir tüp içerisine alınarak uygun RE ile üretici firma talimatlarına uygun bir şekilde kesim işlemine uğratılır. Gökkuşluğu alabalıklarından izole edilen *Lactococcus garvieae* izolatları ile gerçekleştirilen bir epidemiyolojik çalışmada tüm suşlar 50 U *ApaI* enzimi (173µl dH₂O, 3µl BSA, 5µl Tampon ve 5µl enzim) ile bir gece / 37°C de kesim işlemleri gerçekleştirilmiş ve başarılı görüntüler ele edilmiştir (Türe ve ark., 2012).

3. Pulsed-Field Elektroforezi

Enzim ile kesim işleminden sonra uygun büyüklükteki bloklar ortalama %1 oranında hazırlanan sertifikalı PFGE agarozuna yüklenerek uygun şartlarda koşturulur. Büyük DNA parçalarının agarozda ayrışmasını etkileyen çeşitli faktörler vardır. Agaroz ve tampon konsantrasyonu, sıcaklık, voltaj, pulse süresi ve toplam elektroferez süresi başlıcalarıdır (Maslow ve ark., 1993). Tüm bu şartlar çalışılan organizmaya bağlı olarak değişmekle beraber deneysel çalışmalardan önce ön denemeler yapılarak uygun şartlar oluşturulmalıdır. Voltaj miktarı önemlidir. Voltaj değerinin yüksek ya da düşük olması tampon konsantrasyonu ile ilgilidir. Ortalama değerler (130 mA –165 mA) arasında olmalıdır. Koşurma zamanı, son bandın jelin son kısmının 1-1,5cm kadar üzerinde olması kriteriyle hesaplanabilir. Bu süre tamponun pH'sına, sıcaklığına, tampon ve jelin konsantrasyonuna bağlı olarak değişmekle beraber laboratuvar, ekipman ve çalışılan organizmaya göre de farklılık gösterir. Koşurma zamanı yetersiz ise bant desenleri iyi açılmaz ve yakın göç eden bantların çözünürlüğü azalabilir. Sürenin uzun olması durumunda ise bantlar jel dışına taşabilir. Daha sonra jel 1 litre distile suda 25-30 dakika 100µl EtBr (10mg/ml) ile boyanarak UV altında görüntülenir. İlk görüntü alındıktan sonra jel 500ml distile su içerisine alınarak geri boyama yapılır (URL 1).

4. Bant desenlerinin yorumlanması ve izolatların yakınlık derecelerine göre gruplandırılmaları

Test edilen suşların yanı sıra jelde farklı türden bir suş ile restriksiyon profili iyi bilinen bir bakteride kontrol amacı ile bulunmalıdır. Böylelikle DNA ekstraksiyonu, restriksiyon işlemi, blokların yıkanması, elektroferez koşulları ve sonuçların tekrarlanabilirliği gibi işlemlerin uygunluğu ve oluşan bazı aksaklıklar kontrol edilmiş olur (URL 2).

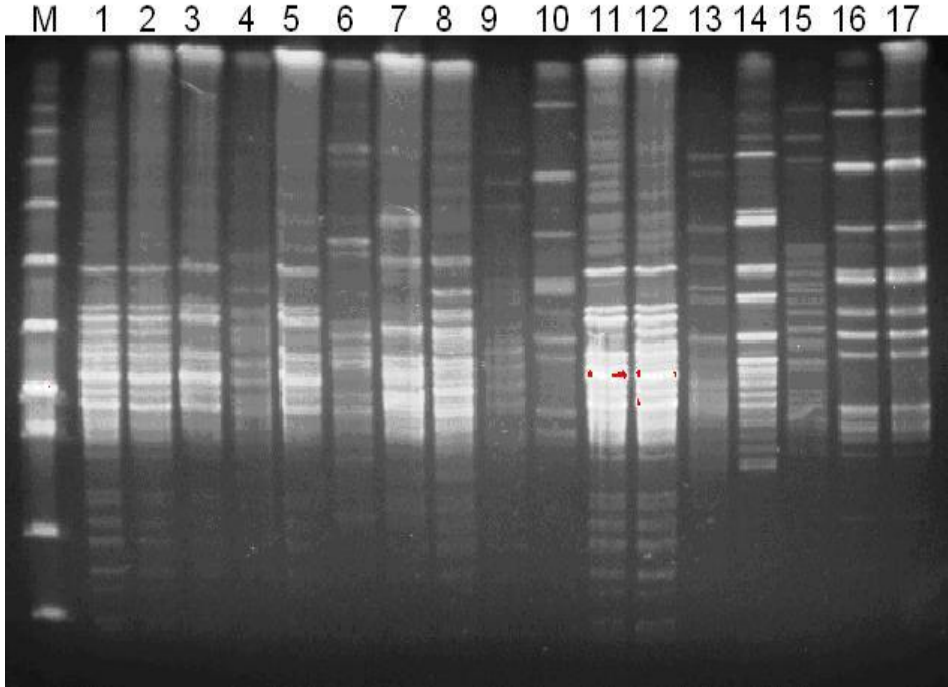
Genetik olaylardan kaynaklanabilecek küçük değişikliklerin tespiti için jeldeki bir veya iki kuyucukta moleküler ağırlık standardı bulunmalıdır. En yaygın kullanılanı *Lambda ladder*'dir. Temel olarak, jelde oluşan bantların sayısı ve büyüklükleri kıyaslanarak suşlar arası genetik ilişkilendirme yapılmaktadır. Genelde salgın suşların profilleri birbirileri ile aynı, epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşlar ise farklı gözükmektedir. Yalnız, mutasyon, insersiyon ve delesyon gibi bazı genetik olaylar PFGE profillerinde değişikliğe yol açabilirler. Şekil 3'de balıklardan izole edilen *L. garvieae* suşları ile yapılan bir epidemiyolojik çalışmada elde edilen bant profili görülmektedir (Türe ve ark., 2012)

Tenover ve ark. (1995)'nin kullandıkları sistem, PFGE sonuçlarının değerlendirilmesinde ideal ve nispeten kolay bir sistem olup sıklıkla kullanılmaktadır. Bant profillerinin yeri ve sayıları kıyaslanarak suşlar arası ilişkilendirme yapılmaktadır. Şöyle ki: Öncelikle salgın suşu belirlenir. Bu suş ile aynı sayı ve büyüklüğe sahip bantlar veren izolatlar için aynı izolat tabiri kullanılır. Bunlar salgının bir parçası olup epidemiyolojik olarak yakın ilişkili izolatlardır. Tek bant farklılığı dikkate alınmaz. Salgın suşu ile aralarında 2-3 bant farkı olan izolatlar ise yakın ilişkili izolat olarak isimlendirilir. Bu küçük bant farklılıkları nokta mutasyon, insersiyon ya da delesyon gibi tek bir genetik olayla ilişkili olup suşlar salgının bir parçası olarak değerlendirilir. Salgın suşları ile aralarında 4-6 bant farkı olan izolatlar için ise muhtemel ilişkili izolat tabiri kullanılır. Bu farklılık iki bağımsız genetik olay sonucu daha uzun sürede ortaya çıkmış olup, suşlar aynı soydan olsalar bile epidemiyolojik olarak ilişkili olma ihtimalleri azdır. Salgın suşu ile

aralarında yedi ve daha fazla bant farkı olan izolatlar ise ilişkisiz izolatlar olarak kabul edilir. İzolatların DNA'sında üç yada daha fazla genetik olay meydana gelmiştir (Tenover ve ark., 1995).

Tüm bu kriterler kullanılırken; PFGE'de en az on ayrı bant oluşması, epidemiyolojik çalışmanın kısa bir zaman sürecinde ve lokal bir alanda olması, sınırlı kaynağa sahip ve tek bir RE ile çalışılması gibi durumlar için geçerlidir. Geniş zaman sürecinde, geniş popülasyonlardan toplanmış izolatlar ve birden fazla RE ile yapılan epidemiyolojik çalışmalar için bu yöntem çok uygun değildir (Tenover ve ark., 1995).

Son yıllarda, geniş alanlardan izole edilen suşlar ile gerçekleştirilen uzun soluklu epidemiyolojik çalışmalarda değişik karakterlerde yazılımlar ve istatistik programları kullanılarak tam ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. PFGE paternleri görsel olarak yorumlandıktan sonra jelde oluşan değişik sayı ve boyutlardaki DNA bantları yazılım analiz sistemlerine aktarılmakta ve bu sistem sayesinde izolatlar arası ilişkilendirme sayısal olarak yapılabilmektedir. Küçük tolerans oranları ve optimizasyon ile gerçekleştirilen işlemler sonrasında küme analizi [Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (UPGMA)] kullanılarak dendrogram oluşturulmakta ve herhangi bir patojenin yayılımı ve bu olayın mekanizması hakkında daha derin bilgi edinilmektedir (Vela ve ark., 2000; Kawanishi ve ark., 2005; Tejedor ve ark., 2011; Türe ve ark., 2012).



Şekil 3. M: Molekül ağırlık standardı, 1-12 ve 14-17: *L. garvieae*, 13: *L. lactis* spp. (Türe ve ark., 2012)

PFGE'nin kullanım alanları

1. PFGE, büyük DNA molekülüne sahip bakteri genomlarının farklı RE'ler ile hızlı ve etkili bir biçimde ayrışmasına olanak sağlar (Schwartz ve Cantor, 1984).
2. RE vasıtası ile elde edilen DNA fragmentleri sayesinde çeşitli kromozomların parmak izi ve fiziksel haritalamaları tespit edilebilir (Correia ve ark., 1994).
3. Aynı türe ait farklı suşlar arasındaki ilişkiyi derecelendirmede eşsiz bir metottur (Vela ve ark., 2000).
4. PFGE, akuakültürde hastalıklara yol açabilen birçok bakteri türünün karakterizasyonu ve genom büyüklüklerinin araştırılmasında kullanılabilir (Vela ve ark., 2000; Kawanishi ve ark., 2005; Tejedor ve ark., 2011; Türe ve ark., 2012).
5. 180'in üzerinde bakteriyel kromozomun fiziksel haritalarının oluşturulmasında güçlü ve etkili bir metottur (Basım ve Basım, 2001).
6. Bireysel restriksiyon fragmentlerinin tespiti, restriksiyon haritalama ve gen haritalama gibi konular için kullanışlıdır (Smith ve ark., 1988).
7. Nokta mutasyon, insersiyon yada delesyon gibi rastlantısal genetik olayların tespitine imkan tanır (Tenover ve ark., 1995).
8. PFGE markır düzenlerinin tespitinde diğer metotlara oranla daha güvenilir biçimde kullanılabilir (Burmeister, 1992).
9. Önceki yıllarda antimikrobiyal duyarlılık testleri, serotiplendirme ve geleneksel biyokimyasal test sonucuna göre aynı görünen bazı bakteri izolatları PFGE sayesinde farklılaştırılabilir (Mc Ellistrem ve ark., 2000).
10. PFGE, bakteri başta olmak üzere, mantar, parazitik protozoa ve memeli gibi farklı kaynaklardan elde edilen büyük molekül ağırlığa sahip total genomik DNA'nın analizine olanak sağlayan güçlü ve eşsiz bir metottur (Basım ve Basım, 2001).
11. Bazı canlıların DNA hasarlarının tespitinde kullanılabilir (Gardiner, 1991).

SONUÇ

İnfeksiyöz hastalıklarının tespiti ve epidemiyolojisi konularında son yıllarda devrim niteliğinde gelişmeler gerçekleşmiştir. Önceki yıllarda geleneksel test metotları ile yapılan epidemiyolojik çalışmalar yeni teknikler sayesinde çok farklı boyutlar kazanmış, epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşlar eşsiz fragment desenleri ile ilişkilendirilebilmişlerdir. Yeni tekniklerin geliştirilmesi bir yandan da eski tekniklerin modifiye edilmeleri ile desteklenmiş, daha az zaman ve efor ile yüksek kalitede üretken jel görüntüleri ortaya çıkmıştır.

Son 20 yılda PFGE metodu epidemiyoloji alanına altın standart olarak katılmış ve geleneksel elektroforezden farklı olarak büyük DNA moleküllerinin eşsiz bir biçimde ayrışmasına olanak tanımıştır. Günümüzde bu ve benzeri metotların daha iyi anlaşılabilmesi için merkezler kurulmuş ve daha geniş fragmentlerin ayrışmaları için yeni sistemler hedeflenmiştir. PFGE metodu aynı türün farklı bireyleri arasındaki ilişkinin

derecelendirilmesinde, birçok türe ait fiziksel haritalamanın gerçekleştirilmesinde kullanılabilen eşsiz bir metottur.

Gelecekte proteinlerin jel üzerinde ayrışmalarını ve DNA topoloji çalışmalarını hedefleyen bu teknik ile günümüzde, akuakültürde yüksek kayıplara yol açan birçok patojenin epidemiyolojisi rutin bir şekilde çalışılabilir.

KAYNAKLAR

- Basım, E., Basım, H., 2001. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. Turk. J. Biol 25: 405-418.
- Birren, B.W., Lai, E., Clark, S.M., Houd, L., Simon, M.I., 1988. Optimized conditions for pulsed-field gel electrophoretic separations of DNA. Nucl. Acids Res., 16: 7563-7581.
- Burmeister, M., 1992. Methods in Molecular Biology. Eds. M. Burmeister, L. Ulanovsky, New Jersey, Humana Press, 259-284.
- Carle, G.F., Olson, M.V., 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. Nucl. Acids Res., 14: 5647-5663.
- Carle, G.P., Frank, M., Olsen, M.V., 1986. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. Science, 232: 65-68.
- Chu, G., Vollrath, D., Davis, R.W., 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science, 234:1582-1585.
- Correia, A., Martin, J.F., Castro, J.M., 1994. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of aminoacid producing Corynebacteria: Chromosome sizes and diversity of restriction patterns. Microbiology, 140: 2841- 2847.
- Gardiner, K. 1991. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Analytical Chemistry, 63: 658-665.
- Gardiner, K., Patterson, D., 1988. Transverse alternating electrophoresis. Nature, 331:371-372.
- Kawanishi, A., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Kijima, M., Takahashi, T., 2005. Drug Resistance and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns of *Lactococcus garvieae* Isolates from Cultured Seriola (Yellowtail, Amberjack and Kingfish) in Japan. Lett. Appl. Microbiol., 40: 322-328.
- Lai, E., Birren, B.W., Clark, S.M., Simon, M.I., Hood, L., 1989. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Biotechniques, 7: 34-42.
- Levene, S.D., 1992. Methods in Molecular Biology, Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Eds. M. Burmeister and L. Ulanovsky, Totowa, NJ, The Humana Press, 345-365.
- Mc Ellistrem, M.E. Stout, J., H. Harison, L., 2000. Simplifield Protocol for Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Clinical Microbiology. 351-353.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S., Pfaller, M.A., 1998. Medical Microbiology. Mosby Inc., St. Louis, 140-144.
- Olive, B.M., Bean, P., 1999. Principles and Application of Methods DNA Based Typing of Microorganism. J. Clin. Microbiol., 37; 1661-1669.
- Schwartz, D.C., Saffran, W., Welsh, J., Haas, R., Goldenberg, M., Cantor, C.R., 1982. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, XLVII: 189-195.
- Schwartz, D.C., Cantor, C.R., 1984. Separation of yeast chromosomesized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell, 37:67-75.
- Smith, C.L., Klco, S.R., Cantor, C.R., 1988. Genome analysis a practical approach. Edited by K. E. Davis, Washington D.C., IRL Press, Oxford, 41-72.
- Steward, G., Furst, A., Avdalovic, N., 1988. Transverse Alternating Field Electrophoresis (TAFE). Biotechniques, 6: 68-73.

- Swaminathan, B., Mathar, G.M., 1993. Molecular Typing Methods. In Persing, D.H., Smith T.F., Tenover F.C., White, T.C. (eds.). Diagnostic Molecular Microbiology: Principle and Application. ASM Press, 26-50.
- Tejedor, J.L., Vela, A.I., Gibello, A., Casamayor, A., Dominguez, L., Fernandez, J.F., 2011. A Genetic Comparison of Pig, Cow and Trout Isolates of *Lactococcus garvieae* by PFGE Analysis. Letters in Applied Microbiology, 53: 614–619.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Geering R.E., 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Pattern Produced by Pulse-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J. Clin. Microbiol., 33: 2233-2239.
- Turabelidze, D., Kotetishvili, M., Kreger, A., J. Morris, J.G., Sulakvelidze, A., 2000. Improved Pulse-Field Gel Elektrophoresis for Typing Vancomycin-Resistant Enterococci. Journal of Clin. Microbiol., 4242-4245.
- Türe, M., Işdan, H., Savaş, H., Kutlu, İ., 2012. PFGE Metodu Kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin Genetik Çeşitliliğinin ve Yayılımının Belirlenmesi Projesi. TAGEM/HS/10/09/02/179, s:61.
- URL1.http://www.pulsenetinternational.org/SiteCollectionDocuments/pfge/PFGE_troubleshooting.pdf, Kara Cooper. PFGE: General Overview and Troubleshooting Tips. Erişim tarihi: 25.03.2011.
- URL2. <http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/161.pdf>. Durmaz, B. ve Durmaz, R. Erişim tarihi: 18.06.2012.
- Vela, A.I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Liebana, P., 2000. Phenotypic and Genetic Characterization of *Lactococcus garvieae* Isolated in Spain from Lactococcosis Outbreaks in Comparison with Isolates of Other Countries and Sources. J. Clin. Microbiol., 38: 3791-3795.
- Ziegler, A., Vols, A., 1992. Methods in Molecular Biology, Pulsed-field gel electrophoresis. Eds. M. Burmeister, L. Ulanovsky, Totawa, NJ, Humana Press, 63-72.