

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

FİKİR KATEGORİSİ

**PROJE ADI: Streptococcus pyogenes (Et Yiyen Bakteri)
DNA'sının Tayini için Yeni Bir Moleküler
Yaklaşım**

TAKIM ADI: Gözde Büyüyen Tehlike

TAKIM ID: T3-23806-156

DANIŞMAN ADI: Dr. Güllü POLAT

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----|
| 1. PROJE ÖZETİ (PROJE TANIMI)..... | 3 |
| 2. PROBLEM/SORUN | 3 |
| 3. ÇÖZÜM..... | 4 |
| 4. YÖNTEM..... | 5 |
| 4.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar | 5 |
| 4.2 Glisin, Lizin ve BSA Konjuge Tosil Boncukların Hazırlanması..... | 6 |
| 4.3 PCR koşulları..... | 7 |
| 4.4 Agaroz jel elektroforezi..... | 7 |
| 4.5 Sonuçlar | 8 |
| 4.5.1 Glisin-konjuge tosil boncuğun PCR'a etkisi..... | 8 |
| 4.5.2 Glisin-konjuge tosil boncuğun daha fazla konsantasyonlarda PCR'a etkisi..... | 9 |
| 4.5.3 Lizin- Konjuge Tosil Boncuğun PCR'a Etkisi..... | 9 |
| 4.5.4 BSA- konjuge Tosil Boncuğun PCR'a Etkisi..... | 10 |
| 4.5.5 Yapay Serum ve Süt Örneklerinde Glisin- konjuge Tosil Boncuğun PCR'a Etkisi..... | 10 |
| 5. YENİLİKÇİ (İNOVATİF) YÖNÜ..... | 10 |
| 6. UYGULANABİLİRLİK..... | 11 |
| 7. PROJE FİKRİNİN HEDEF KİTLESİ(KULLANICILAR)..... | 11 |
| 8. PROJE EKİBİ | 12 |
| 9. KAYNAKLAR..... | 12 |

1. PROJE ÖZETİ (PROJE TANIMI)

Grup A Streptococcus (GAS) olarak da bilinen *Streptococcus pyogenes*, insanlarda çok çeşitli enfeksiyonlara neden olan Gram pozitif bir patojendir. *S. pyogenes*, halk arasında bilinen adı ile et yiyen bakteri hastalığı ile beraber sepsis, kanda, deride ve yumuşak dokularda ciddi enfeksiyona neden olan son derece tehlikeli bir bakteridir. Bu nedenle *S. pyogenes*'in gıda örneklerinde ve serumda tanısında hızlı ve hassas tayin yöntemlerine acil ihtiyaç vardır.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), patojenlerin spesifik DNA dizilerinin belirlenmesi amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır fakat standart uygulamasında düşük amplikasyon verimi ve GC-zengin bölgelerin varlığı gibi sorunlar nedeni ile spesifiklik ve hassasiyetin artırılması gerekmektedir. Bu çalışmada projenin gerçek örneklerde uygulanabilirliği açısından yapay serum ve süt örneklerinde çalışılmıştır ve *Streptococcus pyogenes* patojeninin spesifik gen bölgesinin magnetik nano-PCR kullanılarak daha hızlı ve hassas tayini hedeflenmiştir. Çalışmada, tosil manyetik boncuk yüzeyi Glisin (Gly), L-Lizin (Lys) ve Bovine serum albumin (BSA) ile kaplanmış ve bu şekilde mevcut PCR yönteminden daha kısa sürede sonuç veren ve daha hassas bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak, geleneksel PCR yöntemine üstünlük sağlanmış ve dedeksiyon limiti 1 ng DNA'ya düşürülmüş ve PCR süresi 16 dakika kısaltılmıştır.

Anahtar sözcükler: polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) , tosil manyetik boncuk, gıda patojenleri, Glisin , L- Lizin

2. PROBLEM/SORUN

Halk arasında et yiyen bakteri olarak bilinen *Streptococcus pyogenes*, ölüme neden olan ilk 10 patojen arasındadır (Barnett vd., 2018). *S. pyogenes*'in virulansı ile ilgili olan enzim, hücre dışına salgılanır ve konağa özgü antimikrobiyal peptid, antikor, plazminojen ve fibrinojen gibi bağışıklık sistemi elemanlarını parçalar (Walker vd.,2014). *S. pyogenes* tarafından üretilen başlıca virulans proteini olan SpeB (ekzotoksin B), geniş substrat spesifikliğine sahip bir sistein proteazdır. SpeB'nin patogenezdaki rolünü gösteren bir çalışmada, hastalardan alınan örneklerden *S. pyogenes* suşları izole edilmiş ve suşların %84.3'ünün SpeB proteaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Olsen vd., 2015). Grup A Streptococcus, halk arasında et yiyen bakteri hastalığı olarak bilenen nekrotizan fasiit (NF), sepsis ve streptococcal toksik şok sendromuna yol açar (Wong vd., 2003).

S. pyogenes'in tanılarının %80'ni kültivasyona dayanmaktadır (Nelson vd. 2016). Kültivasyon sonuçlarının alınması için de en az 24 saat beklenmelidir. Bu da ciddi zaman kaybına neden olmaktadır.

PCR, en yaygın kullanılan moleküler biyolojik tekniklerden biridir. Gen klonlanması, DNA dizi analizi, genotipleme, adli tıp, patojen dedeksiyonu gibi farklı uygulamalarda bu teknolojiye dayanılarak yararlanılmaktadır. Bununla birlikte, standart uygulamasında düşük amplikasyon verimi ve GC-zengin bölgelerin varlığı gibi sorunlar nedeni ile spesifiklik ve hassasiyetin artırılması gerekmektedir.

3. ÇÖZÜM

Manyetik nanoparçacıklar teknolojik , biyoteknoloji, sağlık, ilaç sektörü ve manyetik kayıt cihazları başta olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Bu uygulamaların çoğu kimyasal olarak kararlı, düzgün bir şekle ve boyuta sahip nanoparçacıkları gerektirmektedir. Nanopartiküllerin yığılmalarını engelleyen koruyucu kabukla çevrelenmesi gerekir. Parçacık yığılmasının önlenmesi için etkili yaklaşımlardan birisi onların biyoyumluluklarını dikkate alarak, polimer veya diğer hedef ajanlarla nanoparçacıkları kaplamaktır. Bu amaç için kaplama kimyasalları arasında normal şartlarda vücutta birçoğunun bulunabilir olması ve çok da önemli rollere sahip olmaları nedeniyle aminoasitler tercih edilirler.

Nanoteknoloji alanındaki hızlı gelişmeler ile birlikte, 24 saatlik kültivasyon yerine nanomateryal-destekli PCR (nano-PCR) dikkat çekmiştir (Pan vd., 2012). Nano boyutlu materyallerin özel fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeni ile PCR'ın spesiflik, hassasiyet ve verim gibi özelliklerinin iyileştirilmesine yardımcı oldukları gösterilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) , DNA zincirinin bilinen iki parçası arasında uzanan özel bir DNA bölümünün enzimatik olarak çoğaltılmasına dayanır. PCR , patojenlerin spesifik DNA dizilerinin belirlenmesi amacı ile kullanılmaktadır.

PCR spesifik DNA bölgelerini çoğaltmaya yarayan moleküler biyoloji ve genetikte çok sık kullanılan bir tekniktir. PCR'ın çalışabilmesi için kalıp DNA'ya, primerlere, serbest nükleotidler (dNTPs), taq polimeraza, $MgCl_2$ 'e ve tampona ihtiyaç vardır.

Kalıp DNA: PCR'da çoğaltılması hedeflenen DNA'dır.

Primerler: çoğaltılması hedeflenen gen bölgesine komplementer olan yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda olan oligonükleotidlerdir. Primerler polimerazın zinciri uzatması için gerekli olan serbest 3'-OH grubunu sağlar.

Serbest nükleotidler (dNTPs): Polimerazın zinciri uzatması için gerekli olan serbest adenin, guanin, sitozin ve timin nükleotidleridir.

Taq polimeraz: *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen bir polimerazdır. Bu enzim PCR'ın çalıştığı yüksek sıcaklıklarda stabilitesinin koruyan bir enzimdir. Primer ucundaki 3'-hidroksil grubu ile serbest nükleotidin 5'-fosfat grubu arasında fosfodiester bağını oluşturarak zincirin uzamasını sağlar.

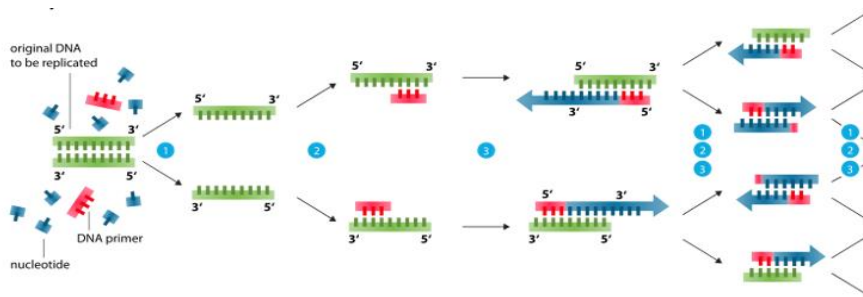
$MgCl_2$: Taq polimerazın aktivitesi için Mg^{+2} iyonuna ihtiyaç vardır. PCR'da ürün oluşumu üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptir.

PCR'ın çalışma mekanizması üç döngüden oluşur:

1.Denatürasyon:94-98°C' de çift zincirli DNA fragmentlerinin arasındaki hidrojen bağlarının kırılması,

2.Tavlama:37-65°C' de primerlerin ve polimeraz enziminin fragmentlere bağlanması,

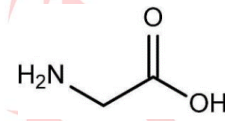
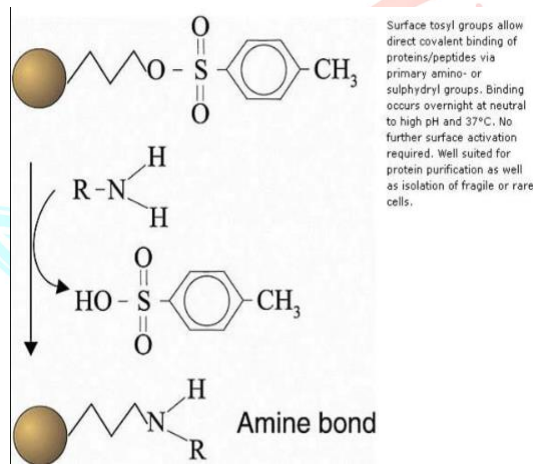
3.Uzama:72°C' de polimeraz enziminin ilgili gen bölgesinin uzatılması esasına dayanır. (Bartlett vd., 2003)



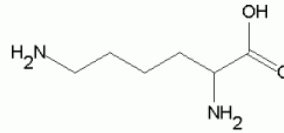
Şekil 1: PCR'ın çalışma mekanizması

BSA'nın PCR'in etkinliği arttırdığını kanıtlayan çalışmalar vardır. Bu bilgiler ışığında, tosil manyetik boncuk yüzeyi Glisin(Gly), L-Lizin (Lys) ve BSA ile kaplanmış nanopartiküller hazırlanmış konjuge edilen manyetik nano boncuklar PCR ortamına ilave edilip etkileri karşılaştırılarak *S. pyogenes*'in yapay serum ve gıda örneklerinde daha hızlı ve daha hassas tayini amaçlanmıştır.

Glisin yan zincirinde hidrojen grubu taşıyan yüksüz bir amino asit iken lizin yan grubunda amino grubu taşıyan pozitif yüklü bir aminoasittir. Şekil 2'te glisin aminoasidinin yapısı , Şekil 3 'de ise lizin aminoasidinin yapısı görülmektedir. Şekil 4' te görüldüğü gibi tosil aktive boncuk, amino asitleri serbest amino uçları üzerinden bağlar. Bu nedenle tosil aktive boncuğa konjuge glisin PCR karışımına karboksil grubundan dolayı negatif yük verirken, tosil aktive boncuğa konjuge lizin PCR karışımına amino grubundan dolayı hem bir pozitif yük hem de karboksil grubundan dolayı bir negatif yük verir.



Şekil 2 : Glisin aminoasidi



Şekil 3 : Lizin aminoasidi

Şekil 4 :Herhangi bir aminoasidin tosil boncuğa bağlanması (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/figures/3596.jpg-650.jpg>) .Tosil boncuk; aminoasit, protein ve peptitleri pimer amino grupları üzerinden kovalent bağlar.

Manyetik nano-PCR'la glisin konjuge tosil boncuk kullanarak, GAS patojeninin PCR' da tayininde geleneksel PCR yöntemine üstünlük sağlanmış ve dedeksiyon limiti 1 ng DNA'ya düşürülmüş ve PCR süresi 16 dakika kısaltılmıştır. Bu şekilde en az 24 saatlik kültivasyon yöntemine göre tayin süresini yaklaşık 1.5 saate düşürülerek zaman kaybından oluşan problemi gidermiş olduk.

4. YÖNTEM

4.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Çalışmada *S. pyogenes*'in genomik DNA'sı kullanıldı (Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya bölümünden temin edildi) , My Taq DNA polimeraz, geneid 10X PCR tamponu, Geneid MgCl₂, agaroz (Sigma), agaroz jelde DNA fragmentlerinin görülmesi için Safe view jel görüntüleme boyası (ABM), dNTPs (Thermo Scientefic), Agaroz jel yürütülmesi için TAE (Tris-Asetik asit-EDTA tamponu) 40 mM Tris, 20 mM asetik asit ve 1 mM EDTA içerecek şekilde hazırlandı. Dynabeads® M-280 Tosil aktive (Catalog nos. 14203, 14204) boncuk kullanıldı. PCR çalışması Applied Biosystems firmasına ait termal döngü cihazında,

jel yürütme çalışması Hoefer marka elektroforez sisteminde yapıldı. Elektroforez sonrası DNA fragmentlerinin görüntülenmesi için Biometra UVStar transilluminator cihazı kullanıldı.

Çalışmada kullanılan süt örneğinin hazırlanması; ticari süt alındı, 100 µL örnek alınıp 14000 rpm’de on dakika santrifüjlendi. Orta tabaka alınıp *S. pyogenes* genomik DNA’sı eklendi ve Macherey Nagel ile genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı.

Yapay serum örneğinin hazırlanması; 8 mmol/L NaH₂PO₄, 1.5 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L CaCl₂, 0.8 mmol/L MgCl₂, 4.5 mmol/L KCl, 0.05 mmol/L NH₄Cl, 4.7 mmol/L glukoz, 2.5 mmol/L üre, 10 mg/ml HSA bileşenlerini içeren yapay serum ortamı hazırlandı (Merzouk, 2014). Yapay serumda *S. pyogenes* genomik DNA’sı eklendi ve Macherey Nagel DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı.

4.2 Glisin, Lizin ve BSA Konjuge Tosil Boncukların Hazırlanması

Lizin , glisin ve BSA’nın Dynabeads® M-280 Tosil aktive (Catalog nos. 14203, 14204) boncuğa immobilizasyonu ThermoFischer Scientific’in protokolünde belirttiği gibi yapıldı. 165 µL boncuk (yaklaşık 5 µg boncuk) aynı hacimde 0.1M sodyum-fosfat (pH=7.4) tamponu ile resüspanse edildi ve boncuklar tampondan manyetik alan yardımı ile ayrıldı. Bu işlem iki kez gerçekleştirildi. Tosil boncuğa aminoasit bağlanması için gerekli konsantrasyon protokolde 1 mg/mL protein olarak verilmiştir. 0.1 M sodyum-fosfat (pH=7.4) tamponunda konsantrasyonları 1 mg/mL olacak şekilde glisin, lizin ve BSA çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiden 150 µL boncuklara eklendi ve 100 µL 0.1 M sodyum-fosfat (pH=7.4) tamponunda 3 M amonyum sülfat bulunan tampondan da 100 µL eklendi ve 12-18 saat 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Bu işlemden sonra manyetik rak yardımı ile süpernatant boncuktan ayrıldı (Şekil 5) ve ortama 1 mL %0.5 BSA içeren PBS tamponu eklendi ve bir saat 37°C’de inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon bittikten sonra %0.1 BSA içeren PBS ile 7-8 kez boncuklar yıkandı. 240 µL %0.1 BSA içeren PBS ile boncuklar saklanır. Bu işlemler glisin, lizin ve BSA için ayrı ayrı yapıldı. Bu arada yüzeyine hiçbir şey immobilize edilmemiş boncuğun PCR’ a etkisini incelemek içinde ilk aşamada alınan 165 µL boncuk alınıp iki kez yukarıdaki belirtildiği gibi yıkanıp kaplanmadan saklama tamponuna alındı.



Şekil 5 : Manyetik tosil aktive boncukların manyetik rak yardımı ile miktarıs etrafında toplanıp süpernatanttan manyetik boncukların ayrılmasına olanak verdiği gösterilmektedir.

4.3 PCR koşulları

Çalışmada *S. pyogenes*'in genomik DNA'sı kullanıldı. PCR'da çoğaltılması hedeflenen gen bölgesi streptopain B (Spe B)'dir. Streptopain B'yi kodlayan DNA fragmentinin uzunluğu 1113 bp uzunluğundadır. Şekil 6'da PCR cihazının görüntüsü ve koşulları mevcuttur.



Şekil 6: PCR cihazı

Başlangıç denatürasyonu 94°C'de üç dakika, daha sonraki denatürasyon basamakları 45 sn, 65°C'de 45 sn tavlama, 72°C de 70 sn'de uzama, son uzama 72°C'de 10 dakika 30 ve 25 döngü yapıldı.

İleri primer:5'GGATCCGGATCCCATCATCATCATCATGATCAAACCTTTGCTCG
TAACGAA-3'

Geri Primer:5'-GCACCTCGAGCTAAGGTTTGATGCCTACAACAG-3'

4.4 Agaroz jel elektroforezi

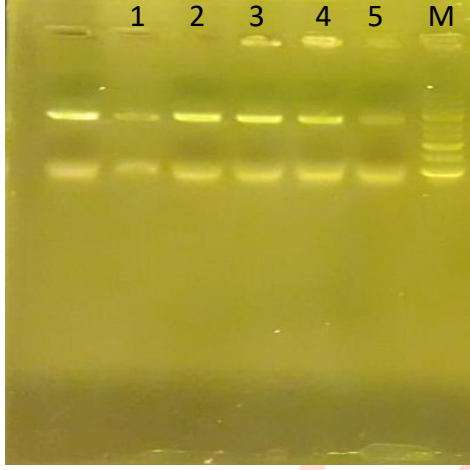
Agaroz jel elektroforezi PCR ile elde edilen DNA fragmentlerinin doğruluğunun kontrol edilmesi amacı ile kullanıldı. %1'lik 20 mL agaroz jelin hazırlanması için 0.2 g agaroz tartıldı ve üzerine 20 mL 1xTAE tamponu eklendi. Mikrodalgada hazırlanan jelin güzel çözünmesi için mikrodalga sık sık durduruldu ve karıştırıldı. Çözünen agarozu 20 mL jelle için 1 µL SafeView™ Classic nükleik asit boyası eklendi. Hazırlanan jel örneklerin yükleneceği kuyucukları oluşturacak olan tarakların yerleştirildiği kalıba döküldü. Agaroz jel, oda sıcaklığında katılaşması için bırakıldı. Hazırlanan agaroz jel elektroforez sistemine yerleştirildi, örnekler X6 yükleme boyası eklenerek kuyucuklara yüklendi ve 100V'ta 20 dakika yürütüldü. Biometra UVStar transilluminator cihazı yardımı ile DNA fragmentleri görüntülendi.



Şekil 7 : PCR örneklerinin agaroz jelle yüklenmesi

4.5 Sonuçlar

Çalışmalara 25 µl PCR hacminde 20-25-30 döngüde 0,5 ile 2 ng aralığında değişen kalıp DNA miktarları ile 1 µl boncuk kullanılarak başlandı. 20 döngüde PCR'in sonuç vermediği görüldü.

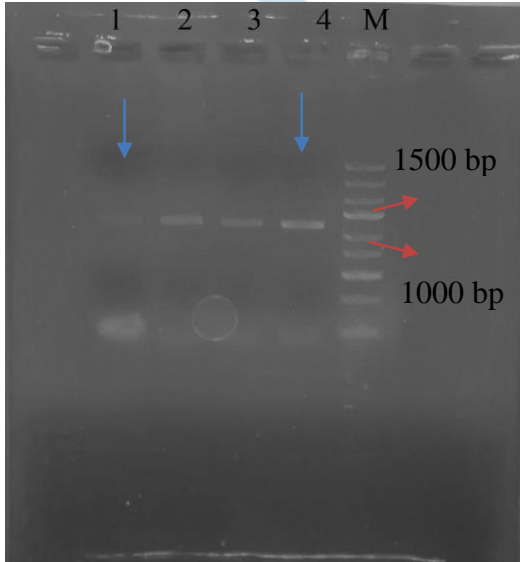


2 ng kalıp DNA 1 µl boncuk kullanılarak 25 µl PCR hacminde 30 PCR döngüsünde yapılan çalışma sonucu şekil 8'de görüldüğü gibi yüzeyi kaplanmamış boncuğun diğerlerine göre çok silik bant verdiği gözlenmiştir. Glisin kaplı boncuğun PCR etkisini en çok arttırdığı görülmektedir. Bu deney sonuçlarından yararlanılarak yüzeyi glisin lizin ve BSA kaplı her bir boncuk için konsantrasyon deneyleri 25 PCR döngüsünde 25 µl PCR hacminde 1 ng kalıp DNA ile gerçekleştirilmiştir.

Şekil 8 : 1; pozitif kontrol (boncuk yok), 2 glisin kaplı boncuk, 3 lizin kaplı boncuk, 4 BSA kaplı boncuk, 5 yüzeyi kaplanmamış boncuk, M marker

4.5.1 Glisin- Konjuge Tosil boncuğun PCR'a Etkisi

Denemede 1 ng kalıp DNA ile 25 PCR döngüsünde yapıldı. 0,5, 1, 2 µL glisin- konjuge tosil boncuk PCR karışımına eklendi.

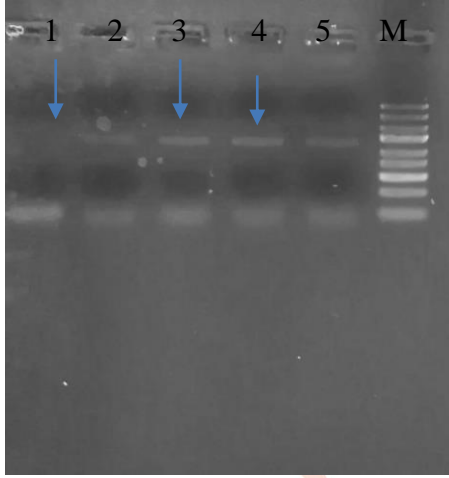


Glisin- konjuge tosil boncuğun PCR karışımına eklendiğinde kontrol grubu olan boncuk içermeyen PCR örneğine göre gözle görülür şekilde PCR'ın etkinliğini arttırdığı gözlemlendi.

Şekil 3 üzerinde oklarla gösterildiği gibi 2 µL boncuğun PCR'ın etkinliği en fazla arttırdığı gözlemlendi. Pozitif kontrolde bant gözlenmez iken boncukla kurulan PCR 'da bant görüldü. Bu denemeye göre patojen tayini açısından glisin konjuge tosil boncuğun dedeksiyon limitini düşürdüğü ve tayin süresini kısalttığı sonucuna varıldı.

Şekil 9 : 1; pozitif kontrol (boncuk yok), 2; 1 µL boncuk, 3; 0.5 µL boncuk 4; 2 µL boncuk, M; marker

4.5.2 Glisin -konjuge tosil boncuğun daha fazla konsantarsyonlarda PCR'a etkisi



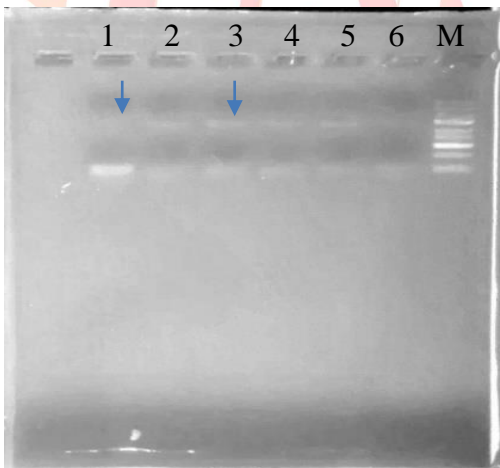
Denemede 1 ng kalıp DNA içerecek şekildi kuruldu ve 25 PCR döngüsü yapıldı. Denemede fazla konsantrasyon etkisini incelemek PCR karışımına 1, 2, 3, 4 µl glisin- konjuge tosil boncuk eklendi.

Şekil 9'te görüldüğü gibi 2 ve 3 µL glisin-konjuge boncuğun PCR'ın etkinliğini arttırdığı gözlemlendi ve aynı zamanda deneme 4.5.1 'in tekrarlanılabilirliği kanıtlandı. Boncuğun aşırısının PCR'ın etkinliğine olumsuz etki yaptığı görüldü.

Şekil 9 : 1; pozitif kontrol (boncuk yok), 2; 1µl, 3; 2 µl, 4; 3 µl, 5; 4 µl glisin- konjuge tosil aktive boncuk , M; marker

4.5.3 Lizin- Konjuge Tosil Boncuğun PCR'a Etkisi

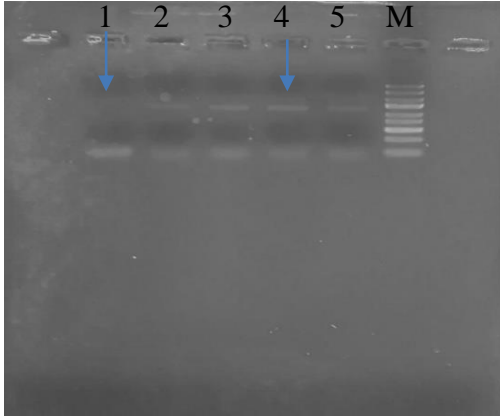
Deneme 1 ng kalıp DNA içerecek şekildi kuruldu ve 25 PCR döngüsü yapıldı. Denemede lizin kaplı tosil boncukların konsantrasyon etkisini incelemek ve glisin kaplı boncuklarla karşılaştırmak amacıyla PCR karışımına 0,5 , 1, 2, 3, 4 µl lizin- konjuge tosil boncuk eklendi.



Şekil10'da görüldüğü gibi denemede lizin- tosil boncuk ile 1 ng kalıp DNA ve 25 PCR döngüsünde glisin kaplı boncuklara göre daha silik bantlar elde edildi. Ancak Lizin-konjuge boncuğunun PCR'ın etkinliğini arttırdığı agaroz jel elektroforezinde görülmektedir. Fakat bu artış glisinle kıyaslandığında daha düşüktür. Bu denemede de boncuğun aşırısının PCR'ın etkinliğine olumsuz etki yaptığı görüldü.

Şekil 10 : 1; pozitif kontrol (Boncuk yok), 2: 0.5µL, 3; 1 µL; 4; 2 µL; 5; 3 µL, 6; 4µL lizin-konjuge tosil boncuk , M; marker

4.5.3 BSA- konjuge Tosil Boncuğun PCR'a Etkisi



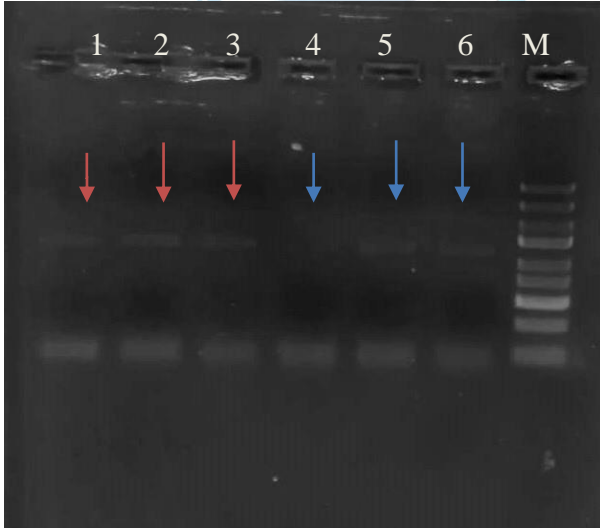
1ng kalıp DNA kullanıldı, 25 PCR döngüsü yapıldı. PCR etkinliğini artırılması için BSA-konjuge tosil boncuk kullanıldı.

BSA, PCR'da enhansır molekül olarak kullanılmaktadır. Bu denemedeki amaç bağlı BSA'nın PCR'ın etkinliğini arttırdığını kanıtlamaktır. Şekil 11'de görüldüğü gibi BSA-konjuge tosil boncuk PCR'ın etkinliğini arttırmış olup en fazla artış 2µL boncukta gözlemlendi.

Şekil 11:1; pozitif kontrol, 2; 0.5 µl, 3; 1µl, 4;2 µl, 5;3 µl BSA bağlı tosil boncuk, M ; marker

4.5.5 Yapay Serum ve Süt Örneklerinde Glisin- konjuge Tosil Boncuğun PCR'a Etkisi

Nano-PCR yönteminin gerçek örneklerde kullanılabilirliğinin araştırılması amacı ile, yapay serum ve süt örneğinde en iyi sonuç glisin konjuge tosil boncukta alındığı için glisin-konjuge tosil boncuk PCR'da kullanıldı.1 ng kalıp DNA ile 25 PCR döngüsünde çalışma yapıldı. Şekil 12'de görüldüğü gibi yapay serum örneğinde kontrol grubunda silik bant gözlenirken glisin-konjuge tosil boncuğu ile kurulan PCR karışımlarında PCR'ın etkinliğini arttırdığı gözlemlendi. Süt örneğinde ise kontrol grubunda bant gözlenmedi ve glisin-konjuge tosil boncuğun ilave edildiği örneklerde bant gözlemlendi. Bu son derece heyecan verici bir sonuçtur.



Şekil 12 :1, 2 ve 3 numaralı kuyucukta yapay serum örneği ile kurulan PCR örnekleri vardır: 1 numaralı kuyucukta; glisin-konjuge tosil boncuk yoktur. 2 numaralı kuyucukta 1 µL glisin-konjuge tosil boncuk , 3 numaralı kuyucukta 2 µL glisin-konjuge tosil boncuk vardır.

4, 5 ve 6 numaralı kuyucuklarda süt örneği ile kurulan PCR örnekleri vardır: 4 numaralı kuyucukta; glisin-konjuge tosil boncuk yoktur. 2 numaralı kuyucukta 1 µL glisin-konjuge tosil boncuk, 3 numaralı kuyucukta 2 µL glisin-konjuge tosil boncuk vardır.

5. YENİLİKÇİ (İNOVATİF) YÖNÜ

S. pyogenes dünya üzerinde bulunan en tehlikeli patojenlerden biridir ve bazı vakalarda ölüme neden olabilmektedir. Bu derece tehlikeli patojenin tanısının kültivasyona dayanması ciddi zaman kaybına yol açmaktadır. Bu projede, nano-PCR yöntemi ile *S.pyogenes* tayinine yönelik kültivasyona göre çok daha hızlı (kültivasyon en az 24 saat/ PCR yaklaşık bir buçuk saat) ve hassas bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, literatürdeki nano-PCR yöntemlerinden farklı olarak ilk kez glisin, lizin ve BSA konjuge tosil boncuklar hazırlanmıştır. Glisin ve BSA-konjuge tosil boncukların PCR'ın etkinliğini arttırdığı

belirlenmiştir. Glisinin lizine göre etkinliği daha çok arttırması, manyetik partikülün yük durumundaki farklanma ile açıklanabilir. (Glisin bağlı tosil boncuk ortama karboksil grubundan dolayı negatif yük verirken lizin ortama amino grubundan dolayı pozitif yük, karboksil grubundan dolayı bir de negatif yük verir.) Nano-PCR yönteminin gerçek örneklerde kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla da, yapay serum ve süt örneğinde glisin-konjuge tosil boncuk kullanılmıştır.

Altın nanopartiküller, biyomateryaller ile uyumludurlar ve ticari olarak temin edilebilmektedirler. Literatürde, altın nanopartiküllerin PCR'ın etkinliğini ve spesifikliğini arttırdığı yönünde çalışmalar mevcuttur (Li vd., 2005; Chen vd., 2009;). Li vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada, altın nanopartiküllerin PCR'a etkisi agaroz jel elektroforezi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Altın nanopartiküllerin PCR'ın etkinliğini tam olarak nasıl arttırdığı henüz aydınlatılamamakla birlikte altın nanopartiküllerin primer, kalıp DNA, dNTPs, polimeraz ile yüzey etkileşimine girerek PCR ortamını daha yalınlaştırdığı bu şekilde de PCR'ın etkinliğini arttırdığı düşünülmektedir (Xinhuli Lou vd.,2013). Lou ve arkadaşlarının 2013 yılında yayınladığı makalede altın nanopartikülün PCR'ın etkinliğini arttırdığına dair üç olası mekanizma önerilmiştir: 1- Polimerazı adsorblayarak PCR'daki aktif polimeraz miktarının düzenlenmesi, 2- Primerleri adsorblayarak primerlerin T_m sıcaklıklarının düşürülmesi, 3- Ürünleri adsorblayarak ürünlerin daha kolay ayrılmasının sağlanmasıdır. Bu mekanizmalara göre PCR karışımındaki yük farklılıklarından dolayı glisin ve lizin modifikasyonlarının PCR'ı farklı şekilde etkilediği gözlenmiştir.

Glisin, lizin, BSA konjuge tosil boncuk ile PCR'ın etkinliğinin arttırılması ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu proje kapsamında PCR'ın etkinliğini arttırdığı kanıtlanan nanopartiküllere bir yenisinin daha eklenmesi hedeflendi.

Bu çalışma kapsamında, nano-PCR yönteminin kullanılmasının sayesinde dedeksiyon limiti 1 ng DNA'ya ve gerekli PCR döngü sayısı 25 döngüye kadar düşürülmüştür. Bu nedenle, amino asit kaplı tosil boncuk ile geliştirilen nano-PCR yöntemi *S.pyogenes*'in dedeksiyon limitinin düşürülmesi için literatüre katkı yapmıştır. Bunun yanında, PCR döngü sayısının düşürülmesi, tayin için gerekli zamanda 16 dakika kısalmaya sağlamıştır.

6. UYGULANABİLİRLİK

Nano-PCR yönteminin gerçek örneklerde kullanılabilirliğinin araştırılması amacı ile, yapay serum ve süt örneğinde glisin konjuge tosil boncuk PCR'da kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarının yapay serum ve süt örneğinde doğrulanması, geliştirilen nano-PCR yönteminin gelecekte gıda veya klinik analiz laboratuvarlarında uygulanabilmesi açısından umut vericidir. Gerekli validasyon çalışmalarının tamamlanmasının ardından, ülkemizin yurtdışından temin ettiği analiz kitlerinin yerli üretimine katkıda bulunma potansiyeli bulunmaktadır. Patojen bakteri hücreleri ile kontamine gerçek örneklerde bu yöntemin doğrulanması durumunda manyetik nanopartikül temelli bir kit üretimi sağlanabilecektir.

7. PROJE FİKRİNİN HEDEF KİTLESİ (KULLANICILAR)

PCR, en yaygın kullanılan moleküler biyolojik tekniklerden biridir. Gen klonlanması, DNA dizi analizi, genotipleme, adli tıp, patojen dedeksiyonu gibi farklı uygulamalarda bu teknolojiye yararlanılmaktadır. Nanoteknoloji alanındaki hızlı gelişmeler ile birlikte nanomateryal-destekli PCR (nano-PCR) üzerindeki çalışmalar başlamıştır.

Manyetik nanoparçacıklar , biyoteknoloji, sağlık, ilaç sektörü ve manyetik kayıt cihazları başta olmak üzere elektronik, fizik , kimya , çeşitli mühendislikler, malzeme üretimi, çevre,

enerji, tarım, bilgisayar ve bilişim teknolojileri ile ulusal güvenlik gibi birçok uygulama alanında kullanılmaktadır. Klinik alanlarda, manyetik parçacıklar tıbbi teşhis, patolojen mikroorganizmaların hızlı tespiti için manyetik bağışıklık yöntemi, kemoterapi ve radyoterapiye ek bir tedavi yöntemi olarak düşünülen hipertermi tedavisi, manyetik rezonans görüntüleme için kontrast ajanlar, manyetik nanopartiküller tarafından radyoizotopların manyetik olarak yönetilerek hedef dokuya taşınması gibi birçok uygulama alanında hücre ayırma ve ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadırlar.

Bu doğrultuda projenin başlıca hedef kitlesi : Sağlık Sektörü ,Sağlık Teknolojileri, Gıda Sektörü, Analitik Kimya, Adli tıp, İlaç sektörü , Biyokimya

8. PROJE EKİBİ

Takım Lideri: Sıla ÇALMAN

| Adı Soyadı | Projedeki Görevi | Okul | Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi |
|-----------------|--|------------------------------|---|
| Ümmügülüm ÖKTEM | Kaynak tarama , araştırma deney yapama | İzmir Bornova Anadolu Lisesi | Tübitak İzmir Bölge Sergisine davet edildi. |
| Sıla ÇALMAN | Kaynak tarama , araştırma deney yapama | İzmir Bornova Anadolu Lisesi | Tübitak İzmir Bölge Sergisine davet edildi |
| Dr Güllü POLAT | Danışman öğretmen | İzmir Bornova Anadolu Lisesi | Tübitak İzmir Bölge Sergisine davet edildi |

9. KAYNAKLAR

1. Barnett TC, Bowen AC, Carapetis JR.(2018). The fall and rise of Group A Streptococcus diseases. *Epidemiology and Infection* 147, e4, 1–6
2. Bartlett, J. M. S.; Stirling, D. (2003). *A Short History of the Polymerase Chain Reaction. PCR Protocols. Methods in Molecular Biology*. 226 (2nd ed.), 3–6.
3. Chen, L., Wei, H., Guo, Y., Cui, Z., Zhang, Z., Zhang, X. E. (2009). Gold nanoparticle enhanced immuno-PCR for ultrasensitive detection of Hantaan virus nucleocapsid protein. *Journal of immunological methods*, 346(1), 64-70
4. Li, H., Huang, J., Lv, J., An, H., Zhang, X., Zhang, Z., Hu, J. (2005). Nanoparticle PCR: Nanogold-Assisted PCR with Enhanced Specificity. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(32), 5100-5103
5. Lou, X. ve Zhang, Y. (2013). Mechanism studies on nanoPCR and applications of gold nanoparticles in genetic analysis. *ACS applied materials & interfaces*, 5(13), 6276-6284.
6. Nelson, G.E., Pondo, T., Toews, K.A., Farley, M.M., Lindegren, M.L., Lynfield, R., Aragon, D., Zansky, S.M., Watt, J.P., Cieslak, P.R., Angeles, K., Harrison, L.H., Petit, S., Beall, B., Van Beneden, C.A. (2016). Epidemiology of Invasive Group A Streptococcal Infections in the United States 2005-2012. *Clin Infect. Dis.*, 63, 478-486.
7. Olsen, R. J., Raghuram, A., Cantu, C., Harrell-Hartman, M., Jimenez, F., Lee, S., Ngo, A., Rice, Saddington, D., Spillman, H., Valson, C., Flores, A.R., Beres, S.B., Long, S.W., Valson, C., Nasser, W., Musser, J.M. (2015). The majority of 9,729 group A streptococcus strains causing disease secrete SpeB cysteine protease: pathogenesis implications. *Infection and Immunity*, 83(12), IAI-00989-15.
8. Pan, D., Mi, L., Huang, Q., Hu, J., & Fan, C. (2012). Genetic analysis with nanoPCR. *Integrative Biology*, 4(10), 1155-1163.
9. Walker, M.J., Barnett, T.C, McArthur, J.D., Cole, J.N., Gillen, C.M., Henningham, A., Sriprakash, K.S., Sanderson-Smith, M.L., Nizet, V. (2014). Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A Streptococcus. *Clin. Microbiol, Rev.*, 27 (2), 264-301
10. Wong, C. H., Chang, H. C., Pasupathy, S., Khin, L. W., Tan, J. L., Low, C. O. (2003). Necrotizing fasciitis: clinical presentation, microbiology, and determinants of mortality, *JBJS*, 85(8):1454-1460