

Maya ve maya benzeri mantarların sekans analizi ile identifikasyonu

Dr. Ayşe KALKANCI
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

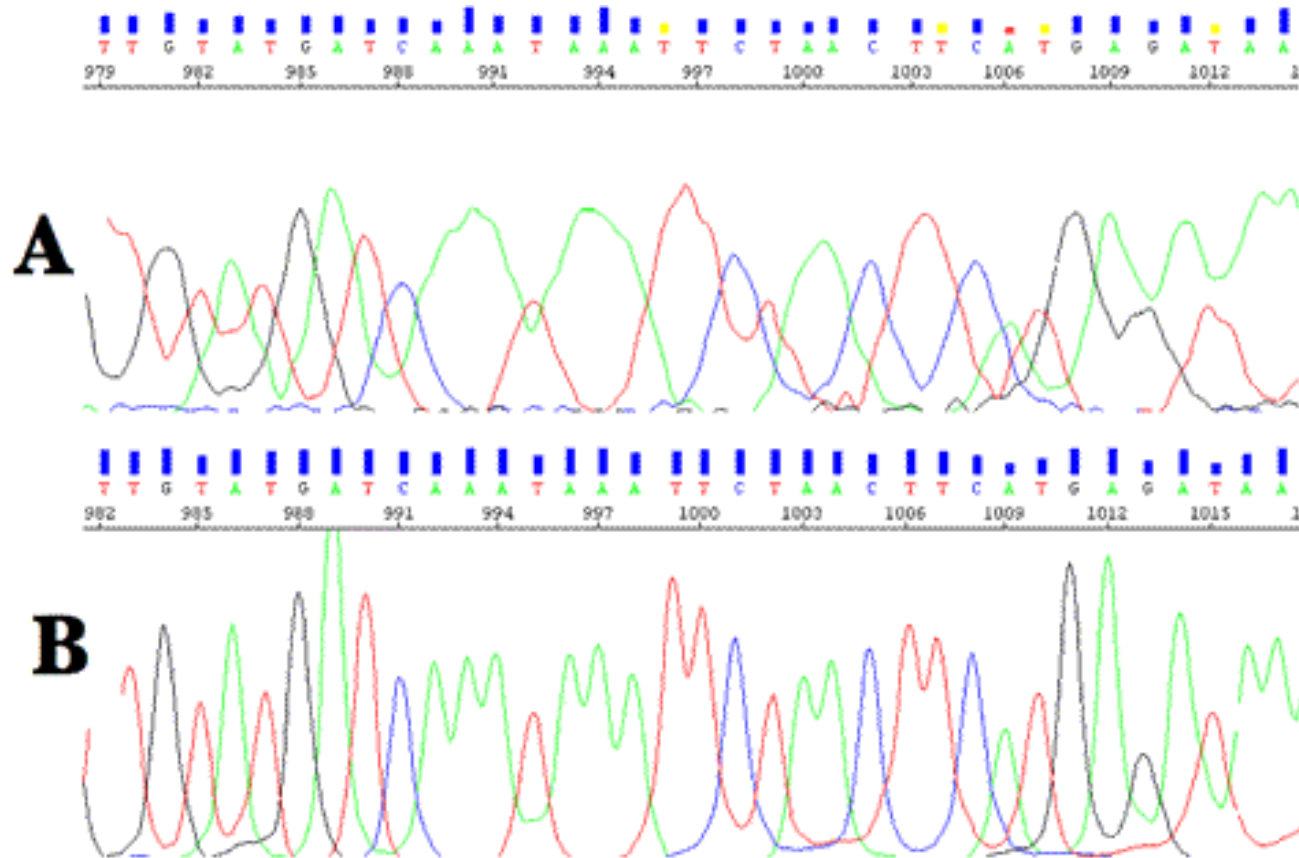
24-25 Şubat 2011, İzmir

Sunum Planı

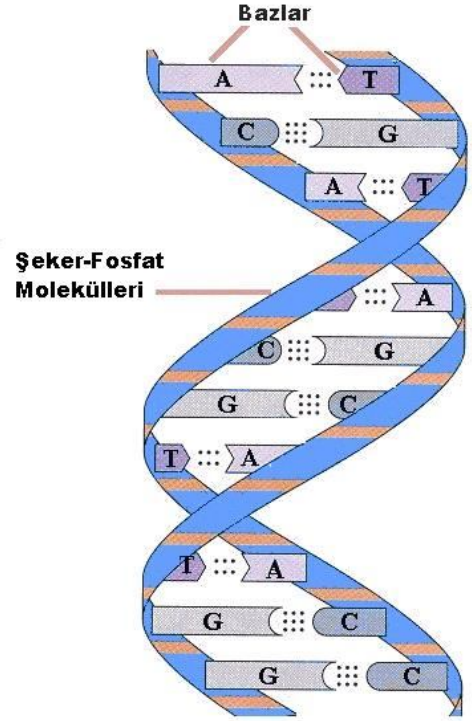
- Teorik bilgi (20 dk)
- Örnekler (15 dk)
- Tartışma (10 dk)

Sekans analizi nedir ?

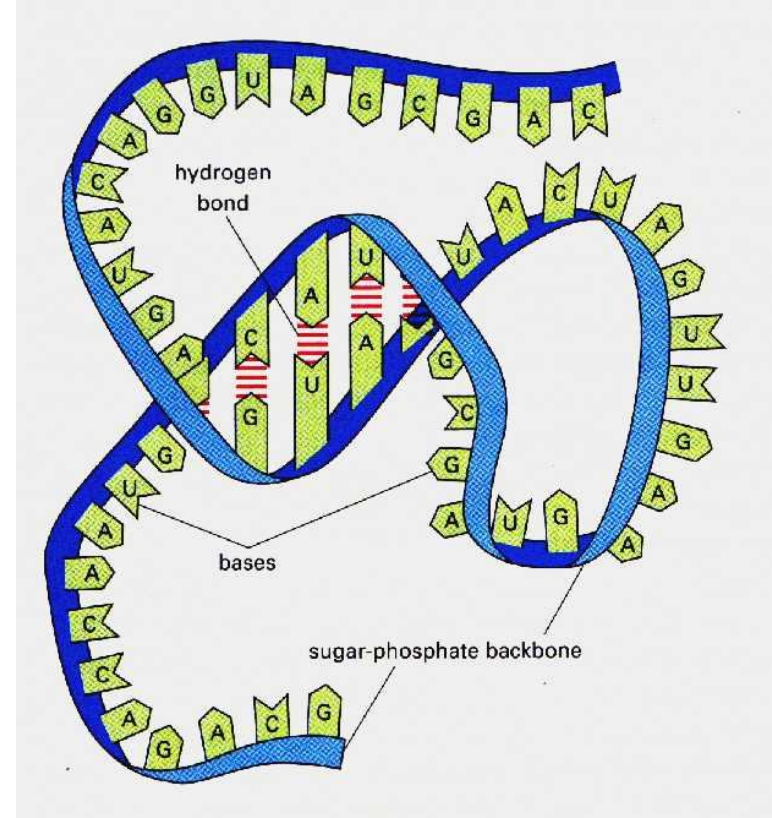
DNA baz dizilimlerinin belirlenmesi



	DNA	RNA
Şeker	D-deoksiriboz	D-riboz
Asit	Fosforik asit	Fosforik asit
Baz	A, T, G, C	A, U, G, C



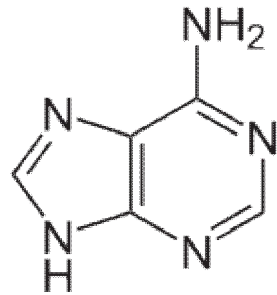
DNA Çift Sarmalı



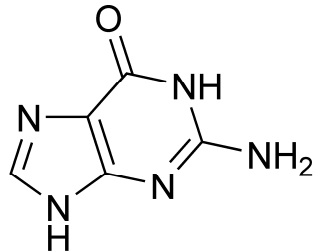
Bazlar

Pürin

- Adenin

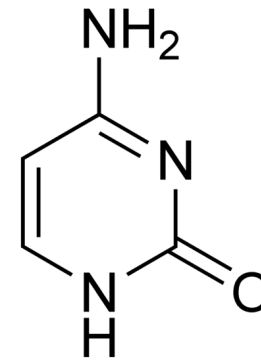


- Guanin

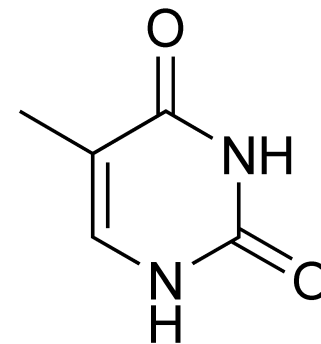


Pirimidin

- Sitozin



- Timin



- Nükleozid = Baz + Şeker

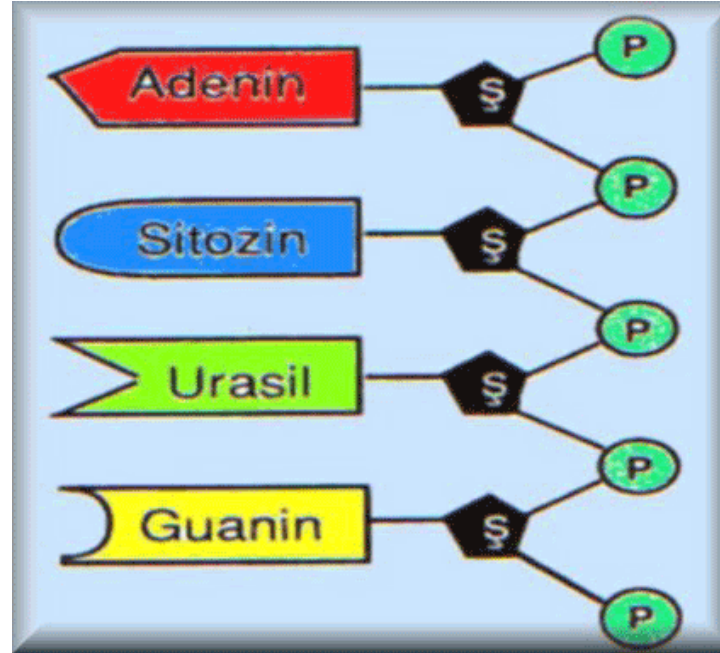


Glikozid bağı ile birleşir, aradan su çıkar

- Nükleotid = Fosfat + Şeker + Baz

Nükleotidler

- DNA ve RNA yapı taşıdır



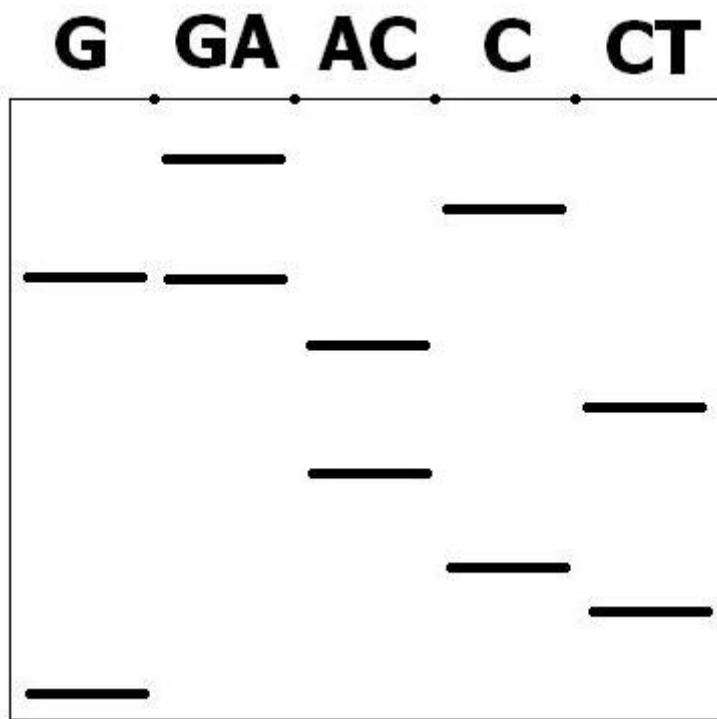
Sekans (DNA dizi) analizi yöntemleri

1. Kimyasal (Maxam-Gilbert)
2. Enzimatik (Sanger)
3. Pirosekanslama

Kimyasal yöntem

- DNA molekülü kinaz enzimi ile 5' fosfat ucundan ^{32}P ile işaretlenir.
- Seçici olarak 4 bazı parçalayan kimyasal maddeler kullanılarak farklı uzunluklarda **DNA parçaları** elde edilir.
- Elektroforezle ayrılan bantlar otoradyografi ile incelenir.

Maxam A & Gilbert W. 1977

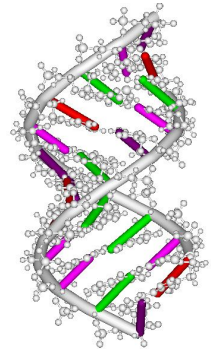


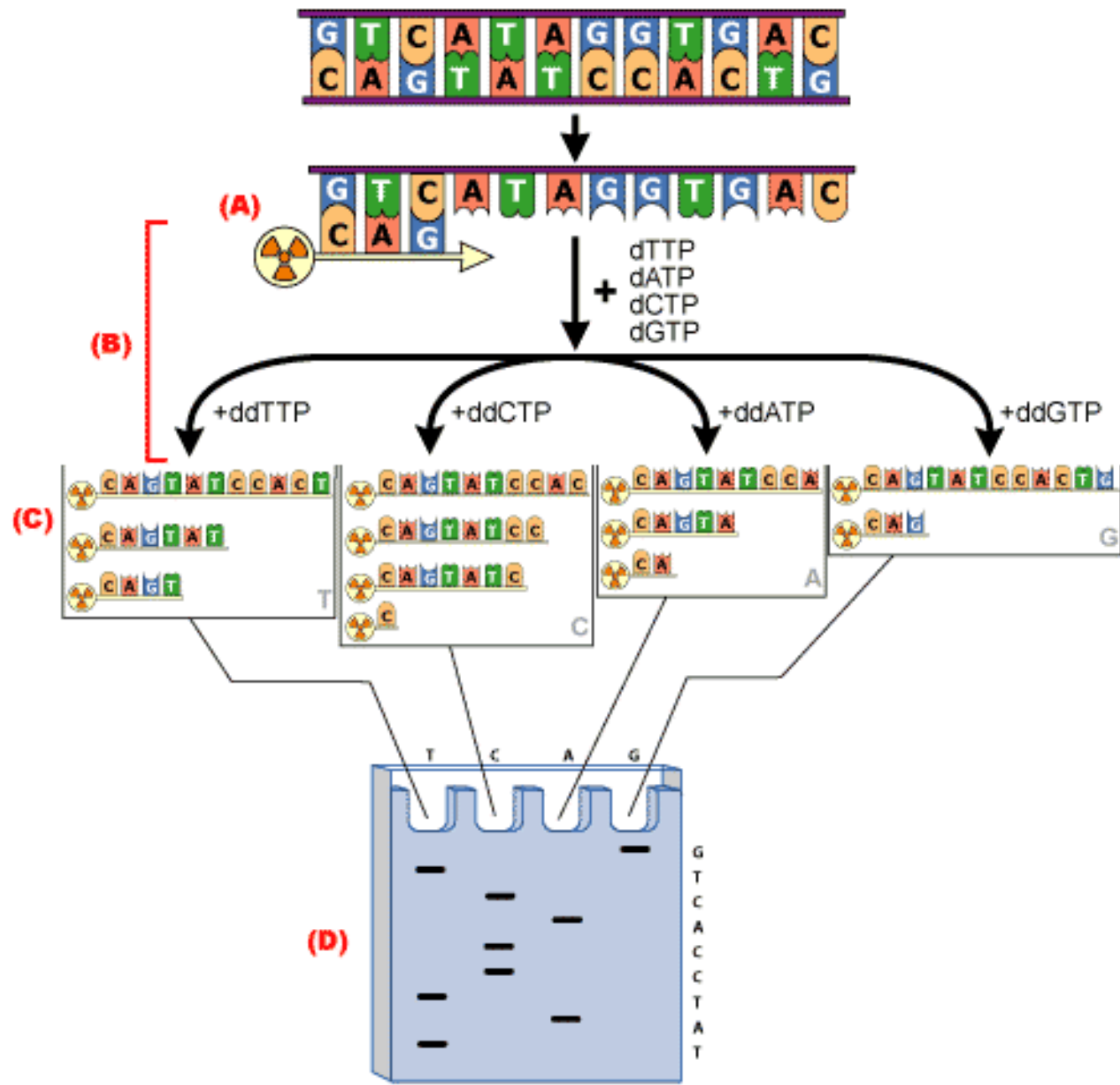
G	A+G	C+T	C	SEQUENCE (END)
—	—	—	—	C (3')
—	—	—	—	G
—	—	—	—	A
—	—	—	—	T
—	—	—	—	T
—	—	—	—	T
—	—	—	—	C
—	—	—	—	G
—	—	—	—	G
—	—	—	—	A
—	—	—	—	T
—	—	—	—	C
—	—	—	—	A
—	—	—	—	A (5')

Enzimatik yöntem

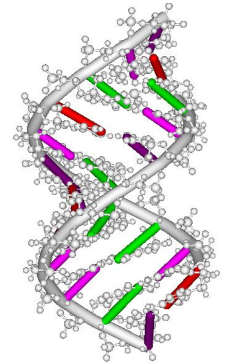
- DNA parçası asimetrik PCR ile tek zincir halinde çoğaltılır ve kalıp olarak kullanılır.
- DNA polimerazlar deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan **dideoksiribonükleotidleri** dizilere ekler.
- Sentezleri **ddNTP** kullanılarak durdurulmuş farklı uzunlukta yeni zincirler
- Her modifiye baz için ayrı tüplerde sentez yapılır ve ürünler denatüre akrilamid jel elektroforezinde 4 sıra halinde yürütülür.

Sanger ve ark., 1980

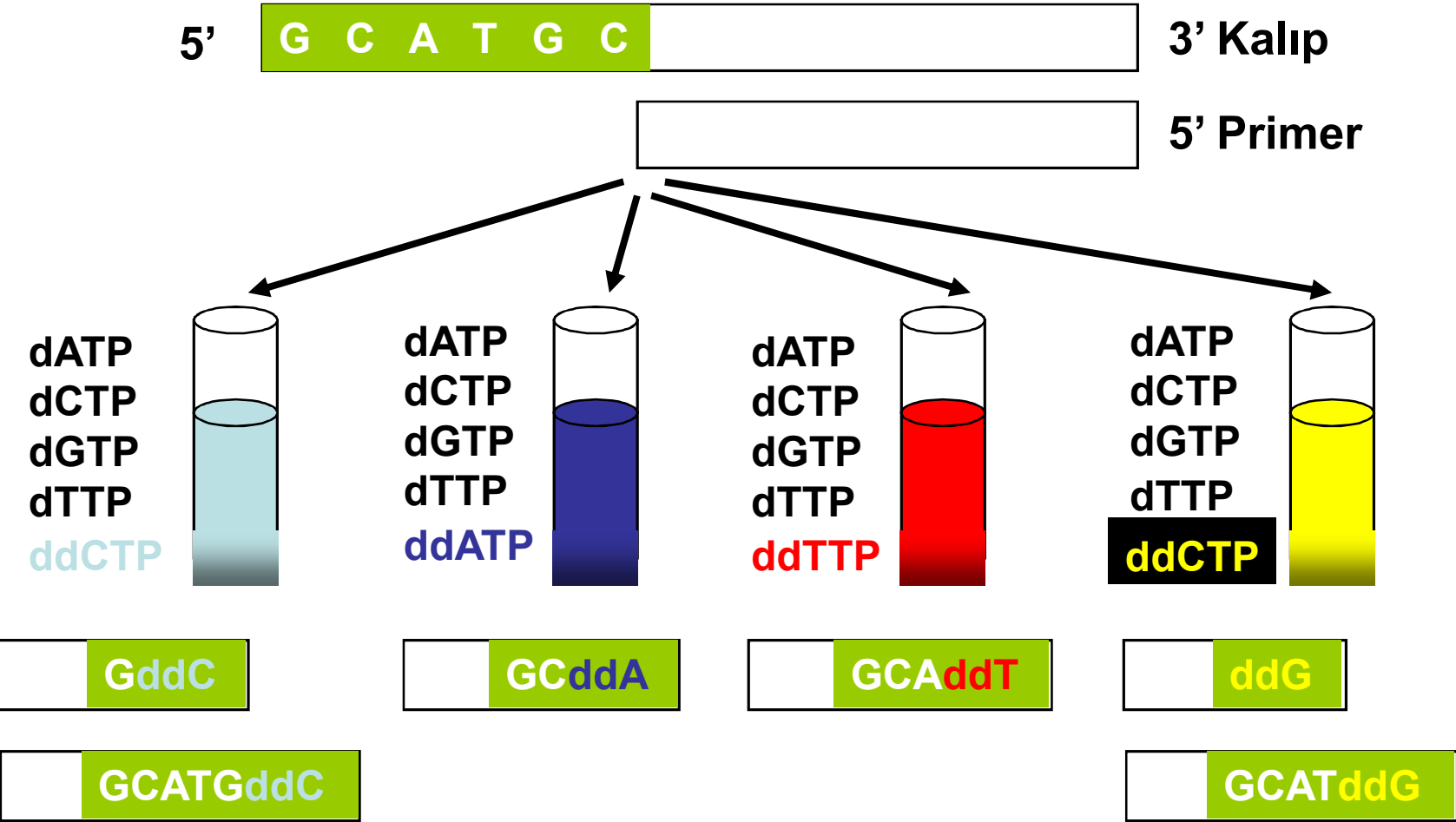


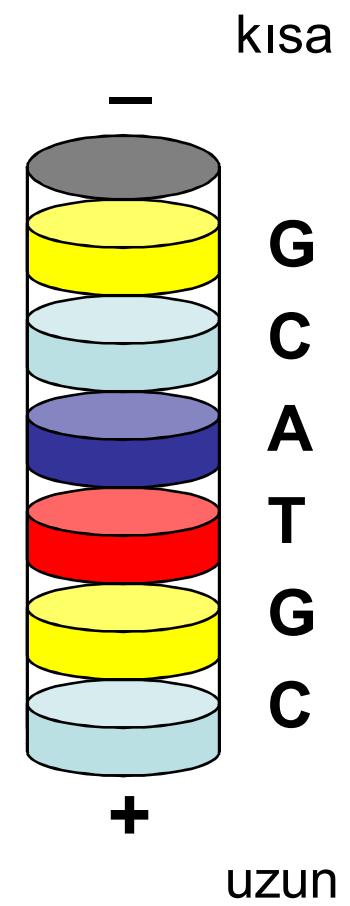
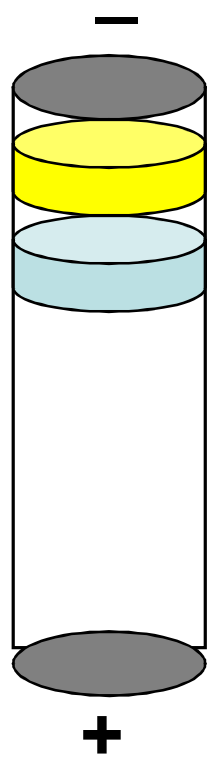
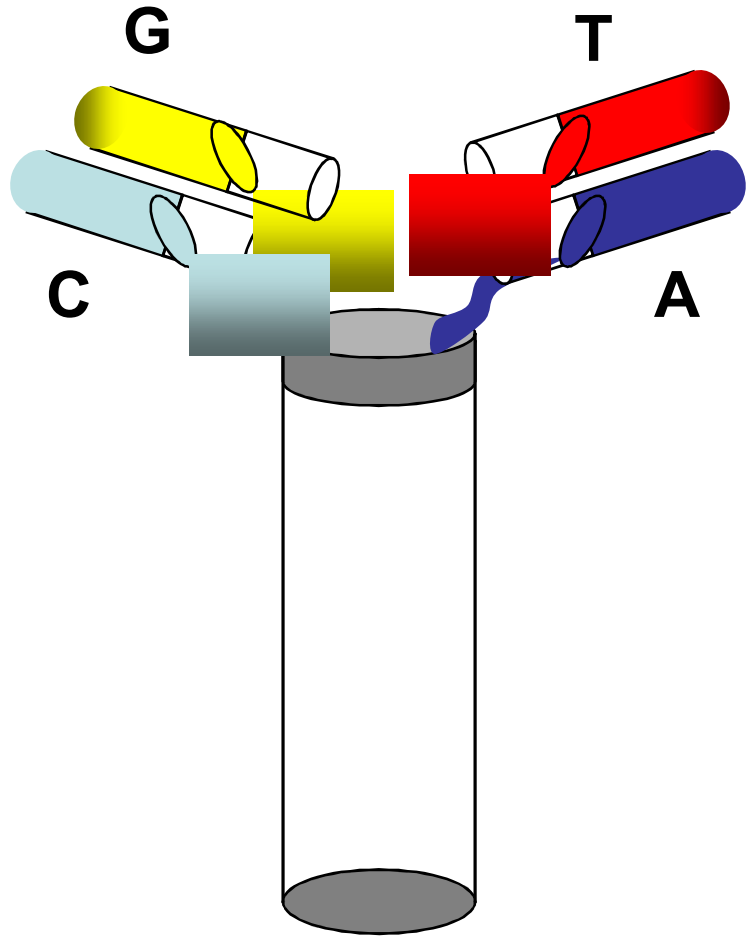


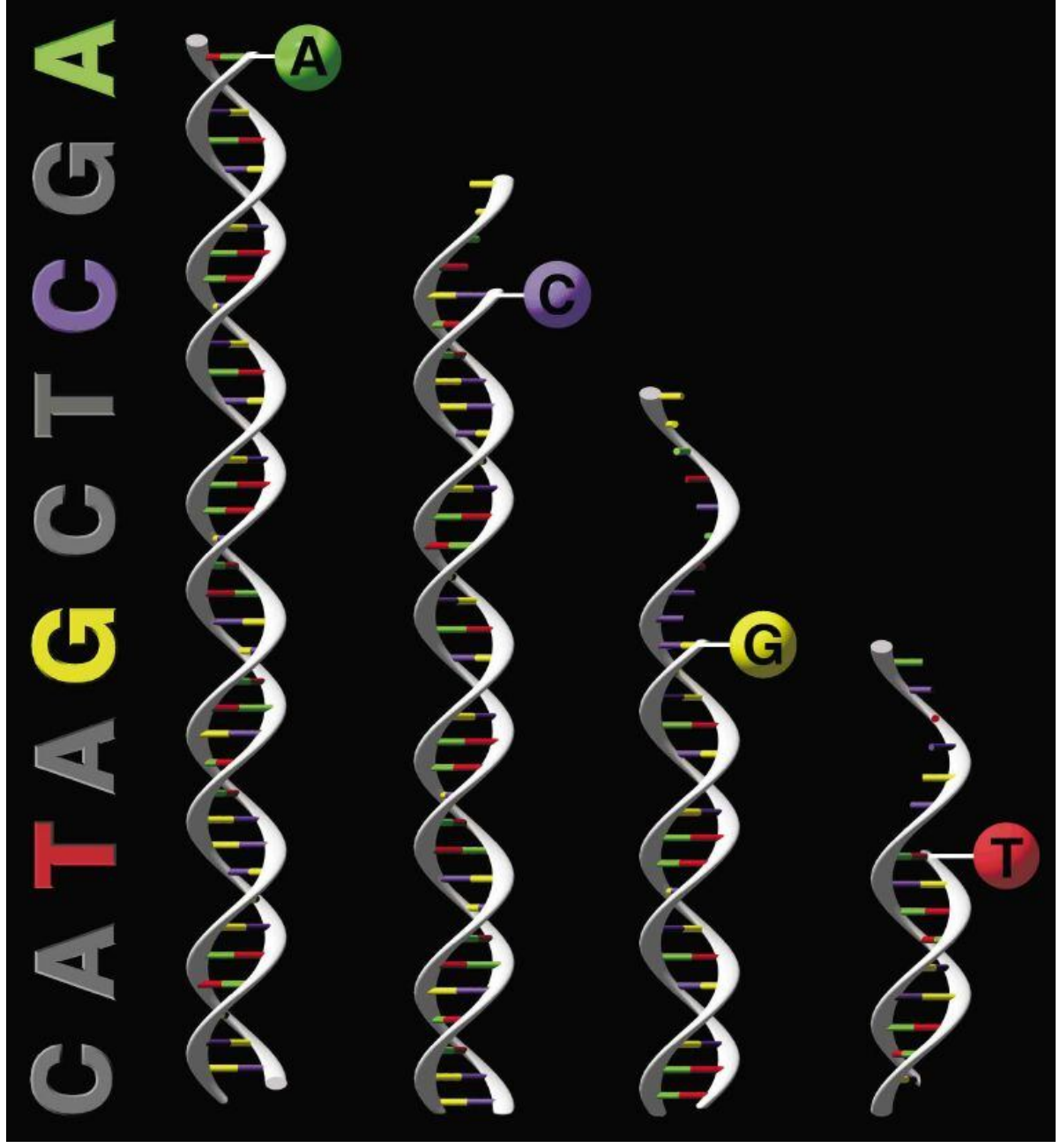
- Kalıp DNA'lar
- Primer
- dNTP karışımı
- Enzim
- Dört reaksiyon tüpünün her birine bir ddNTP eklenmesinden sonra bağlanma ve uzama işlemleri uygulanmaktadır.
- Farklı uzunlukta DNA parçaları
- Jel elektroforezi

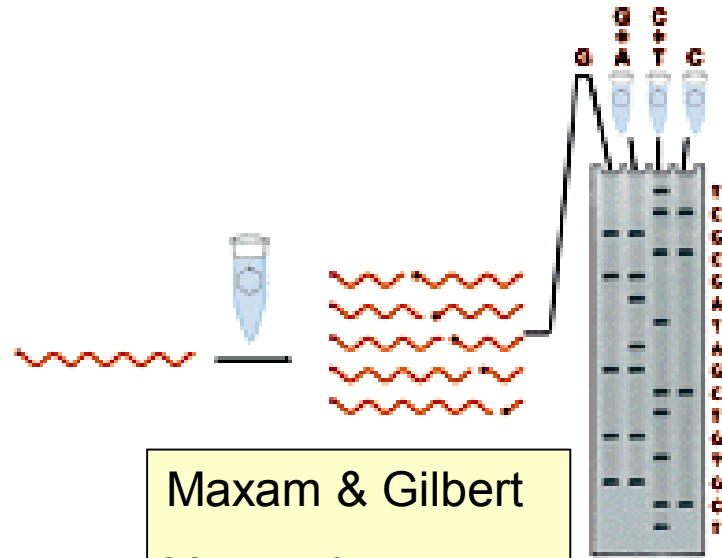


DNA dizi analizi

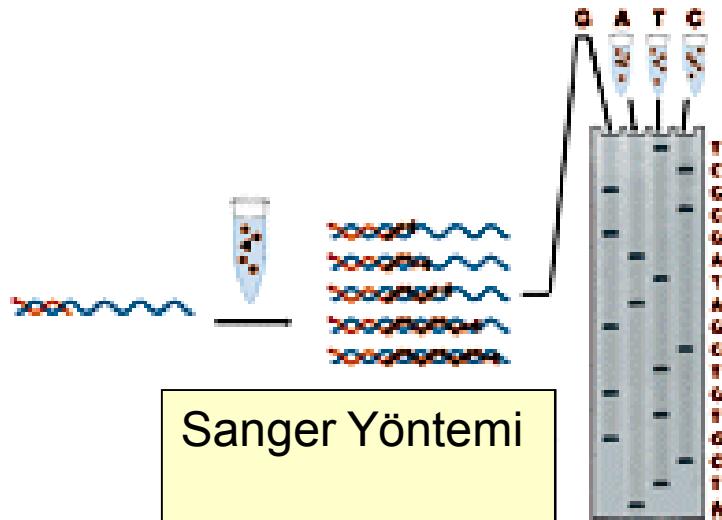








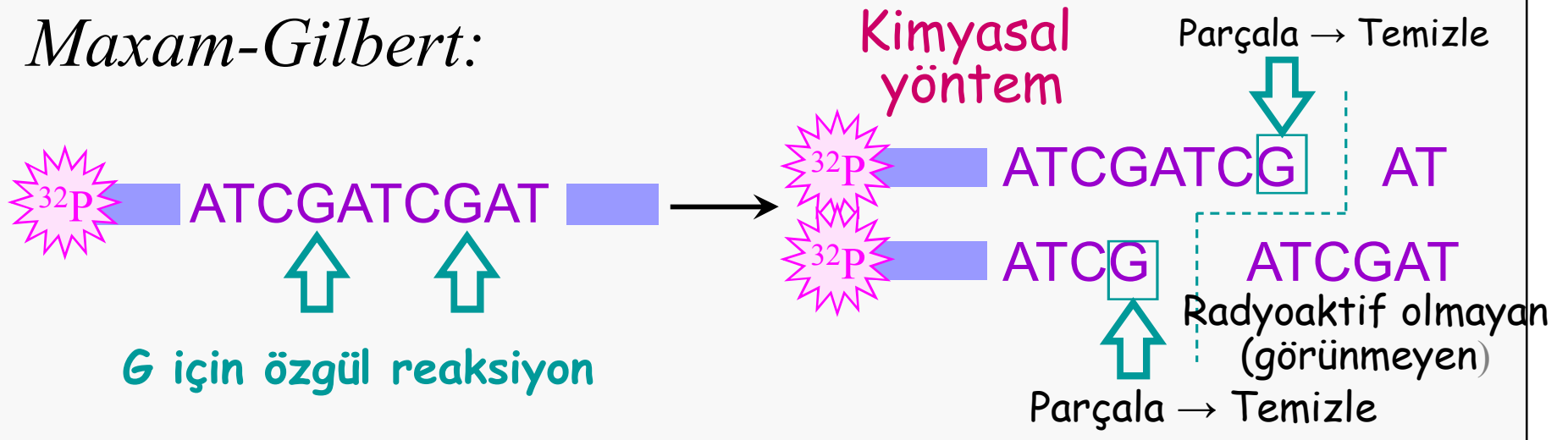
Maxam & Gilbert
Yöntemi



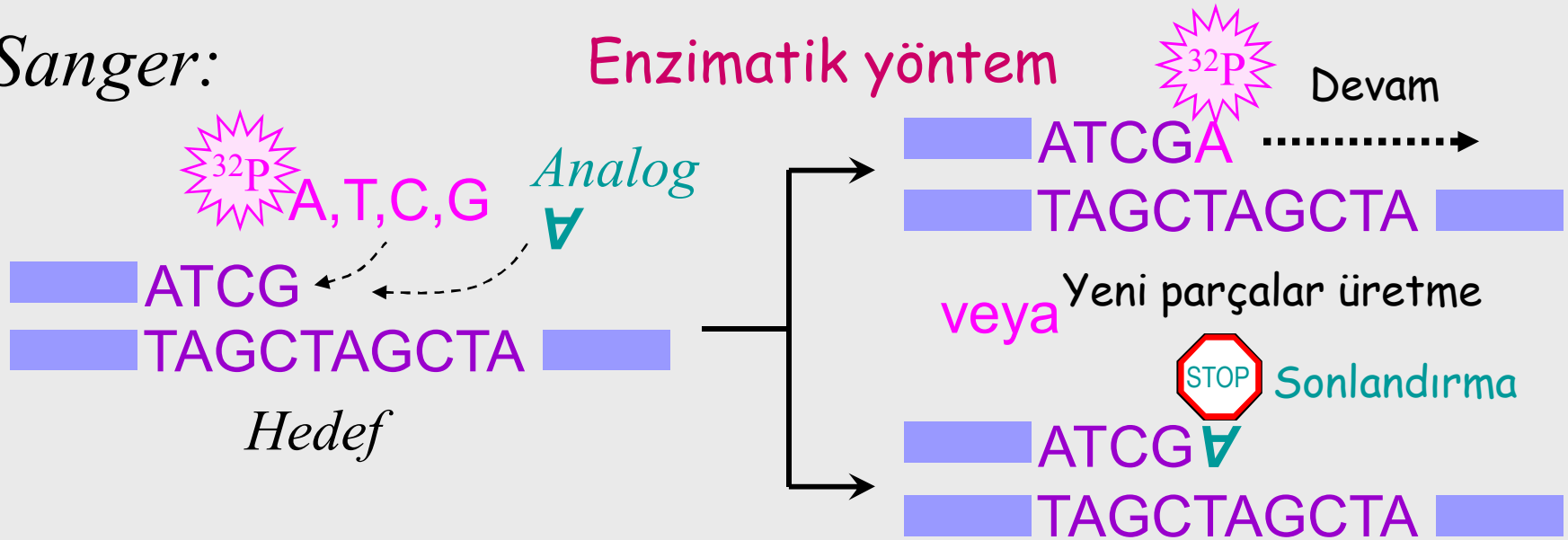
Sanger Yöntemi

DNA parçaları nasıl elde edilir ?

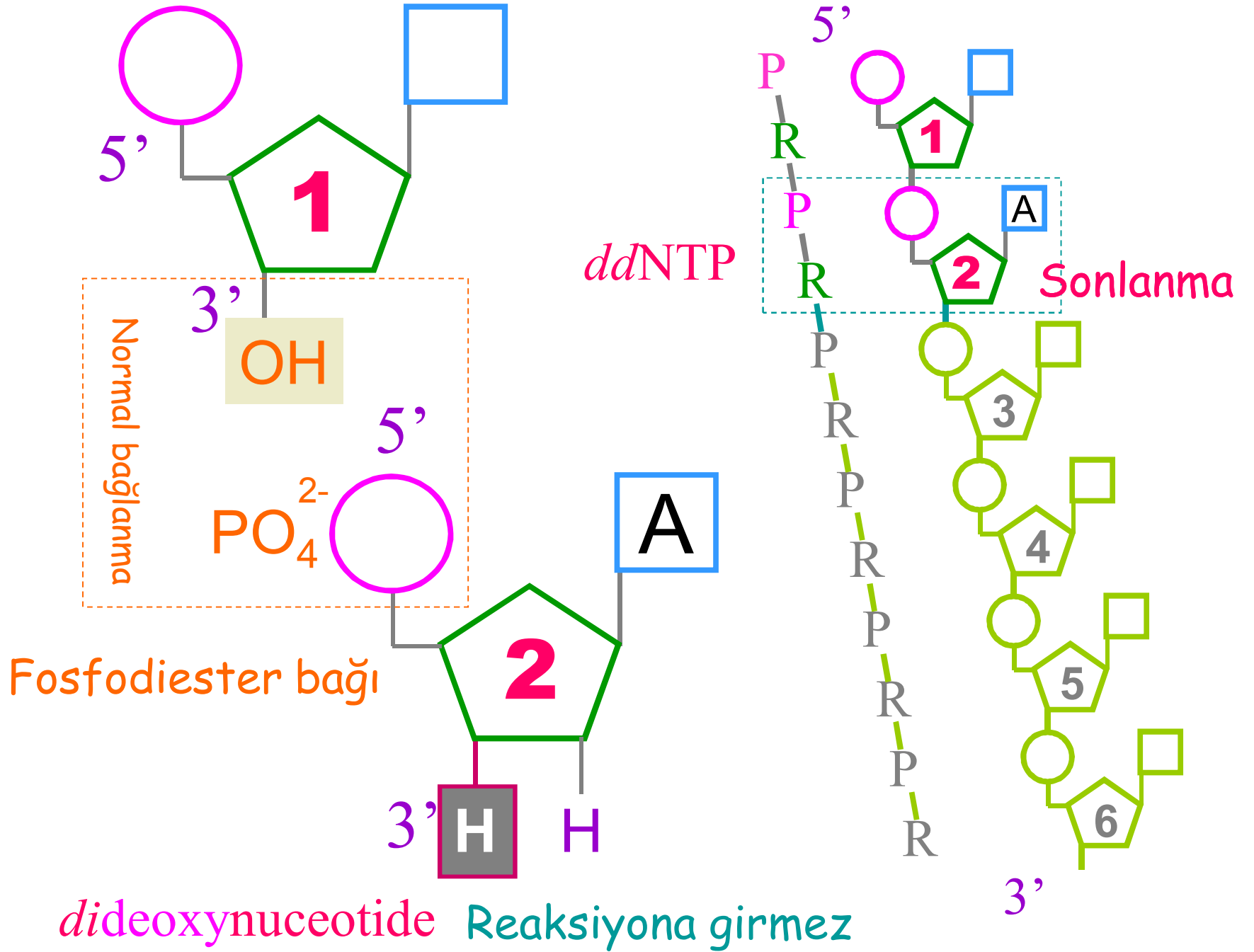
Maxam-Gilbert:



Sanger:

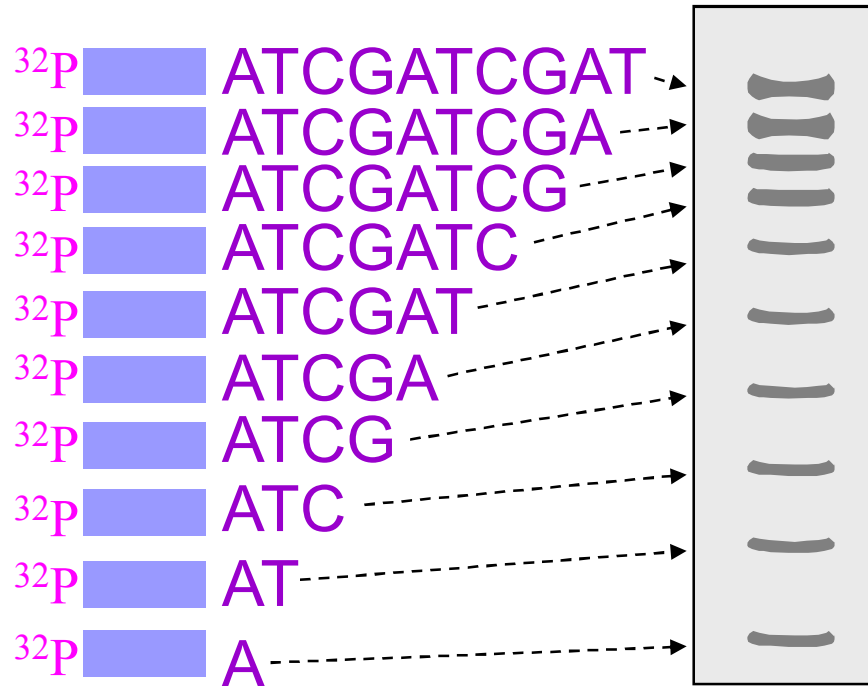


Sanger Yöntemi



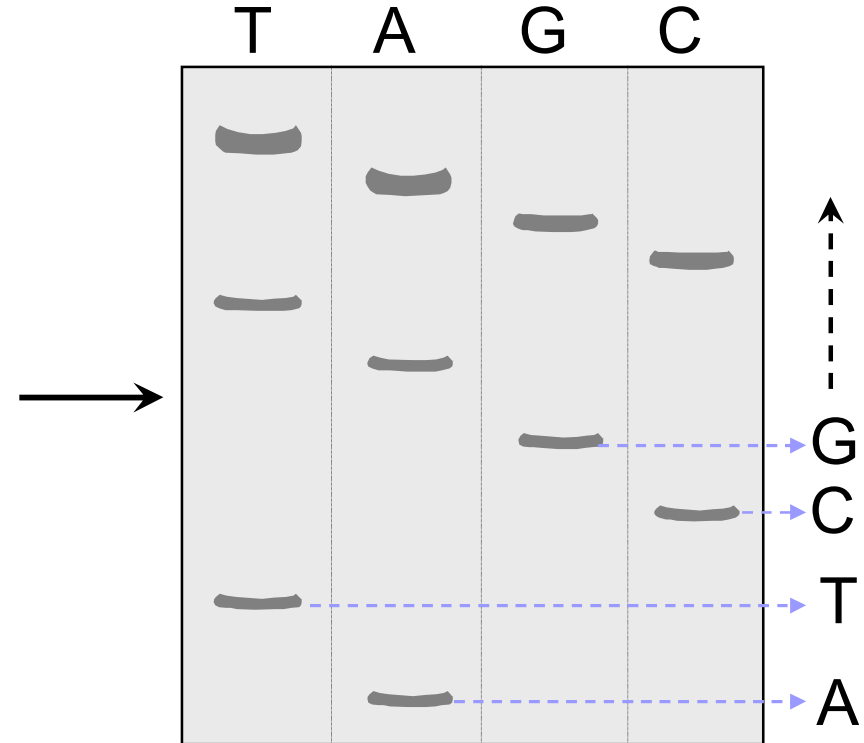
DNA dizisi nasıl sonlandırılır ?

Bir nükleotid farkı olan
DNA parçaları jelde ayrılır



Fakat bu bantlar bize
son nükleotid bilgisini vermez

PAGE



Aynı nükleotid ile biten
dizileri gruplar isek,
tüm genomu tanımlayabiliriz.

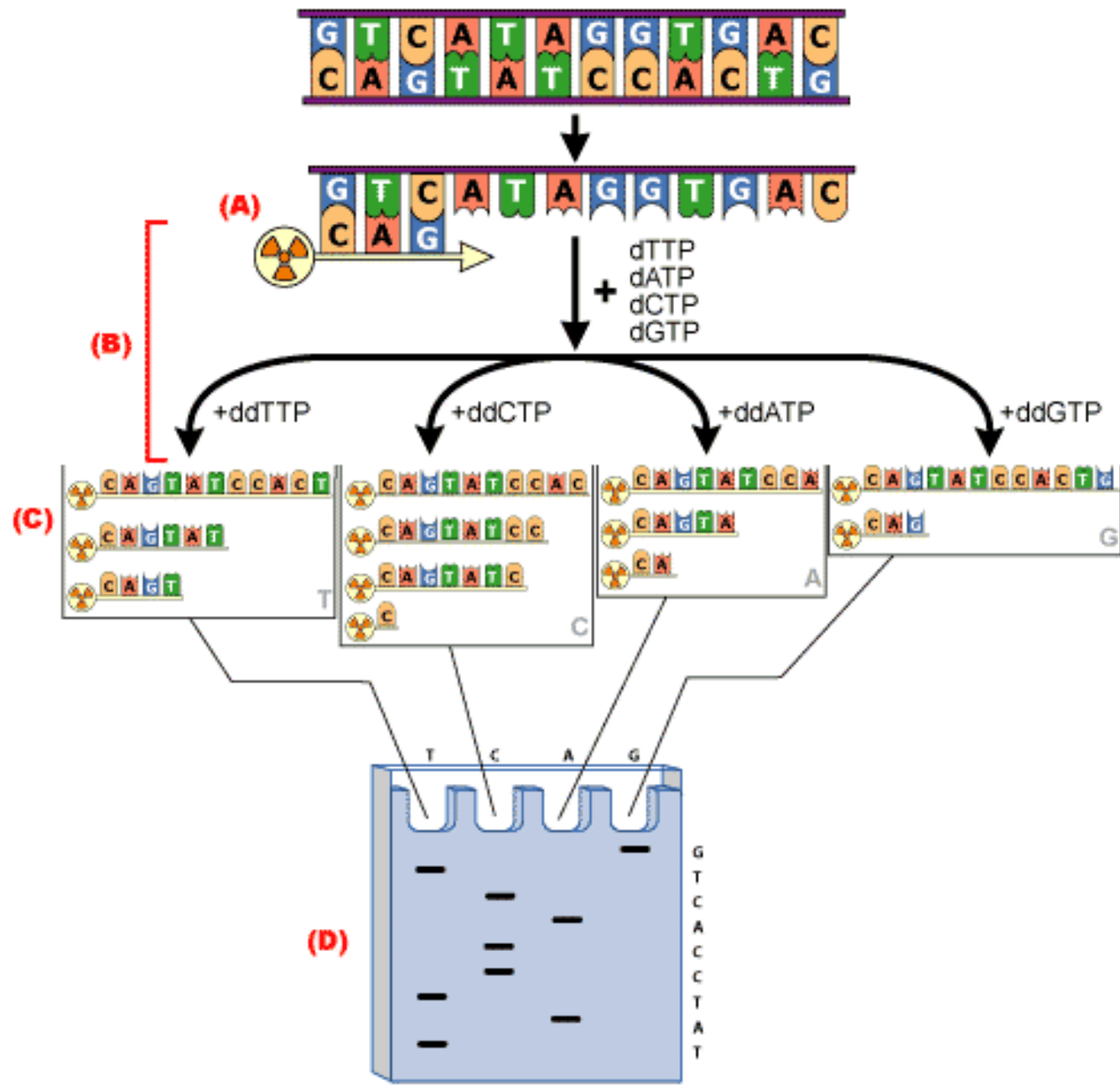
OTOMATIZE DNA DİZİ ANALİZİ

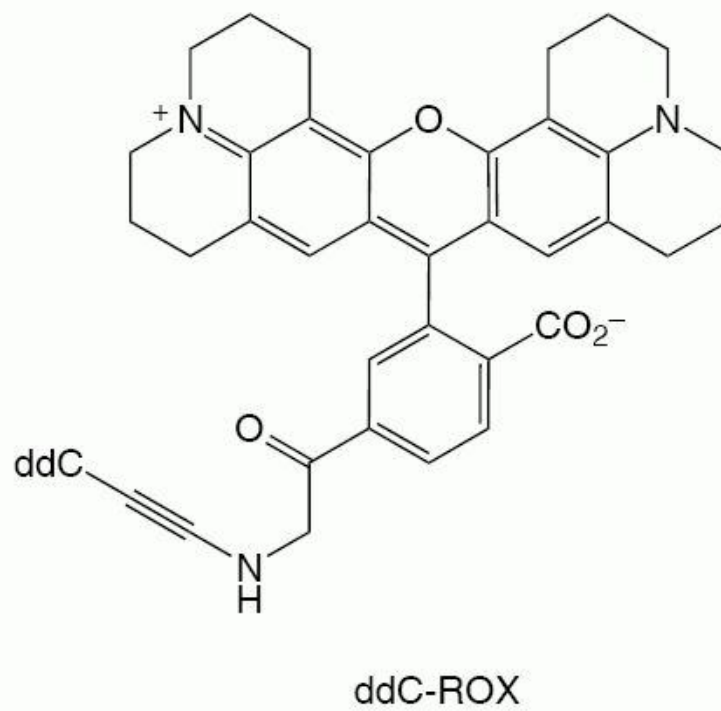
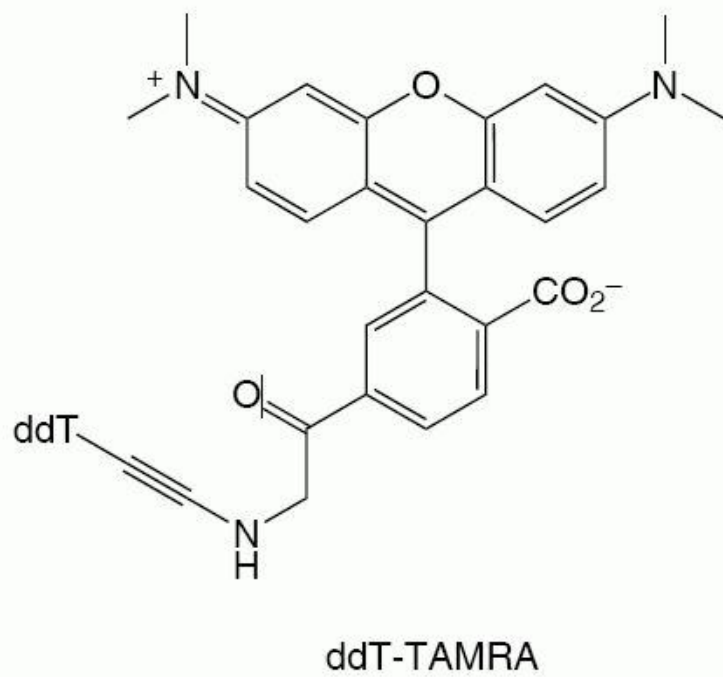
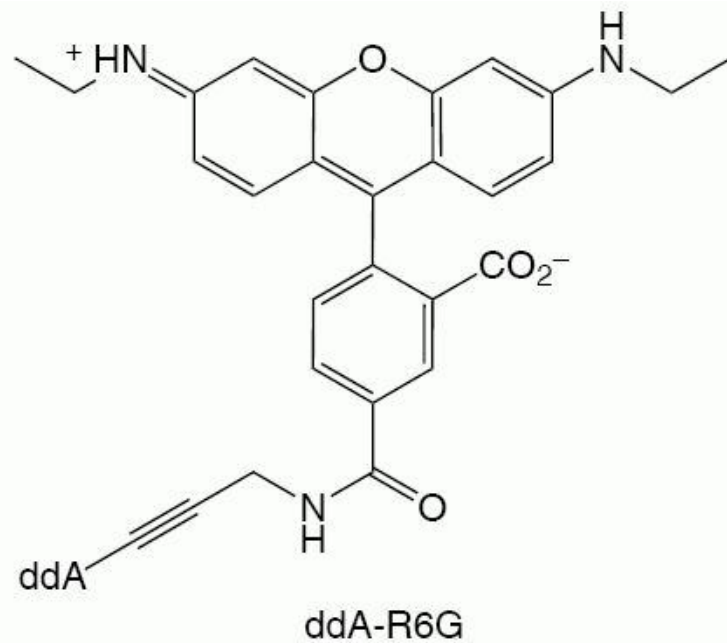
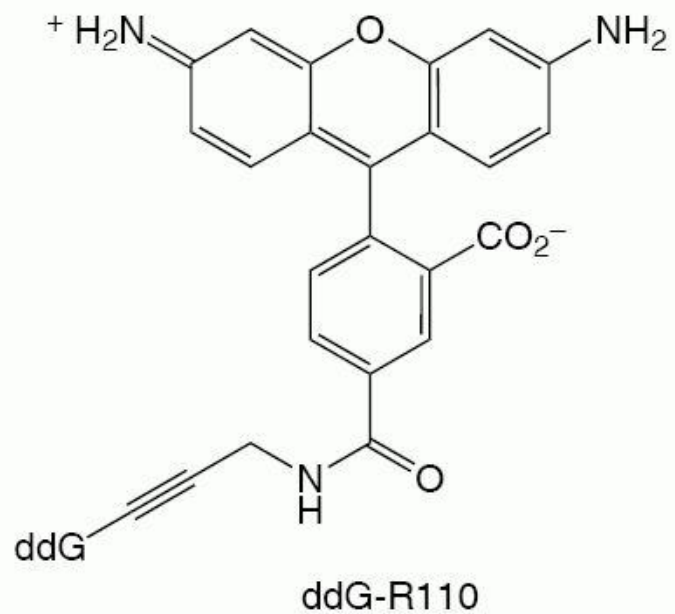


Floresans boya

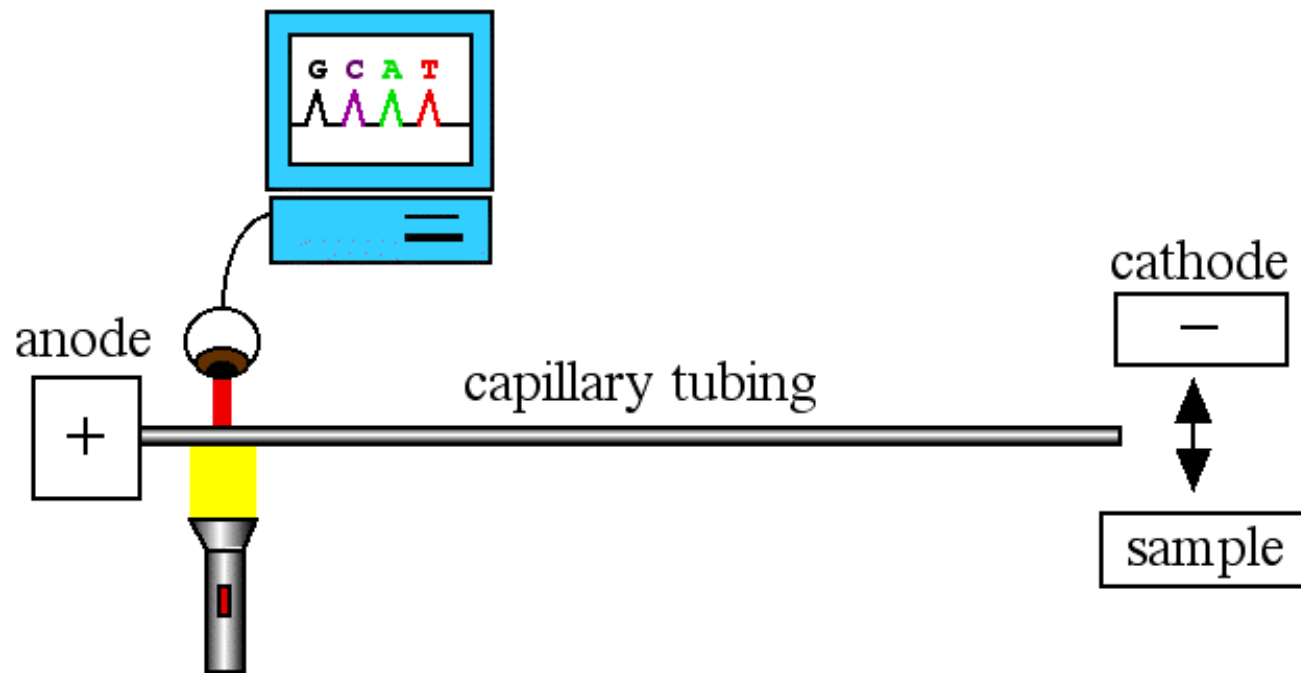
Two arrows originate from the text "Floresans boya". One arrow points to the left and ends at the "primer" oval. The other arrow points to the right and ends at the "dNTP" oval.

Leroy Hood ve ark. 1986

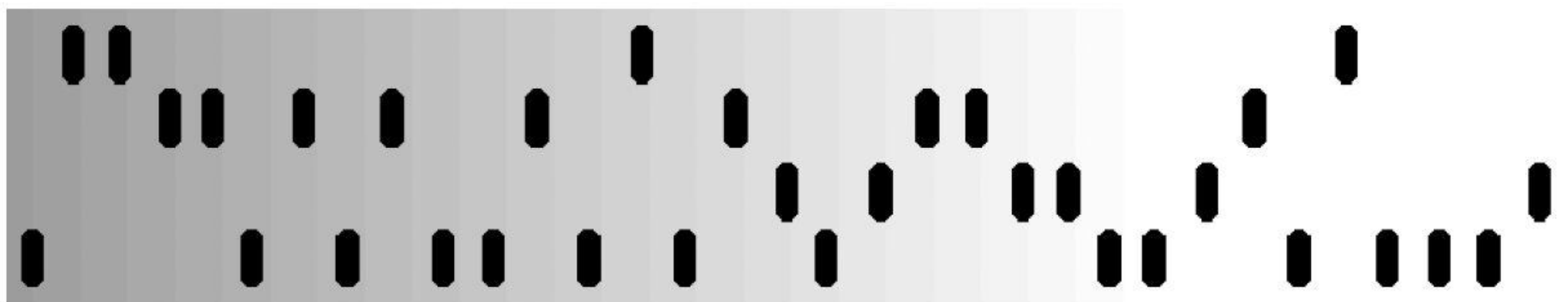
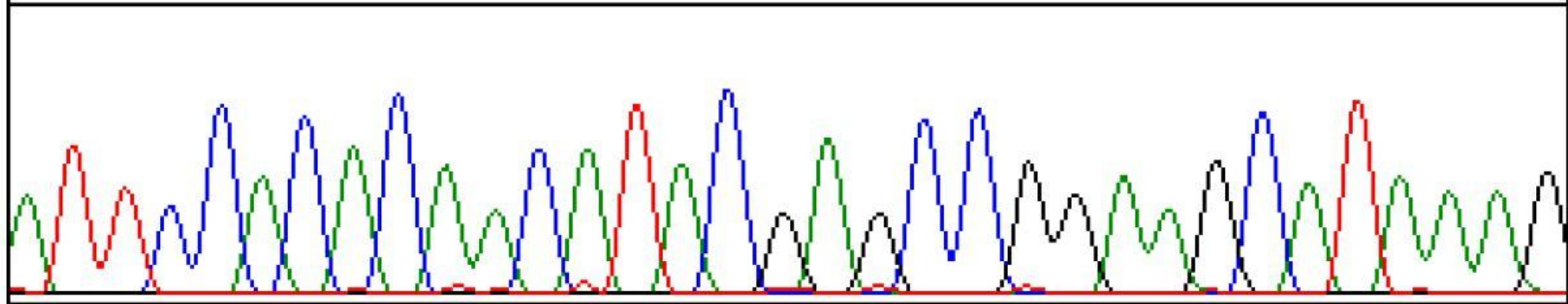




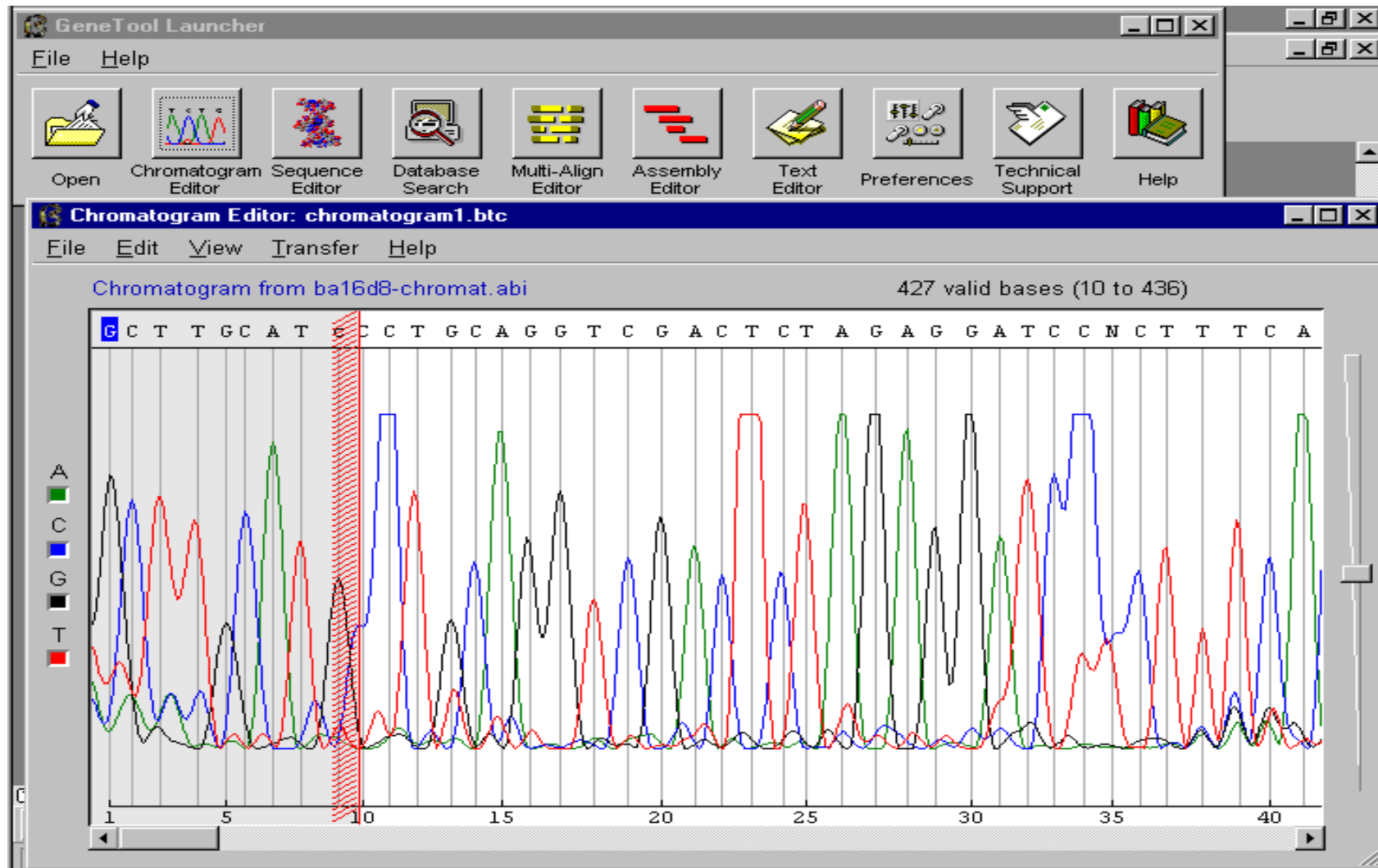
Kapillar Elektrophorez










A T T C A C A C A A C A T A C G A G C C G G A A G C A T A A A G
180 190 200



Kromatogram analizi



DNA sekans cihazları

	Cihaz						
	 3730xL	 3730	 3500xL	 3500	 3130xL	 3130	 310
Kapiller sayıları	96	48	24	8	16	4	1

PCR



Saflaştırma



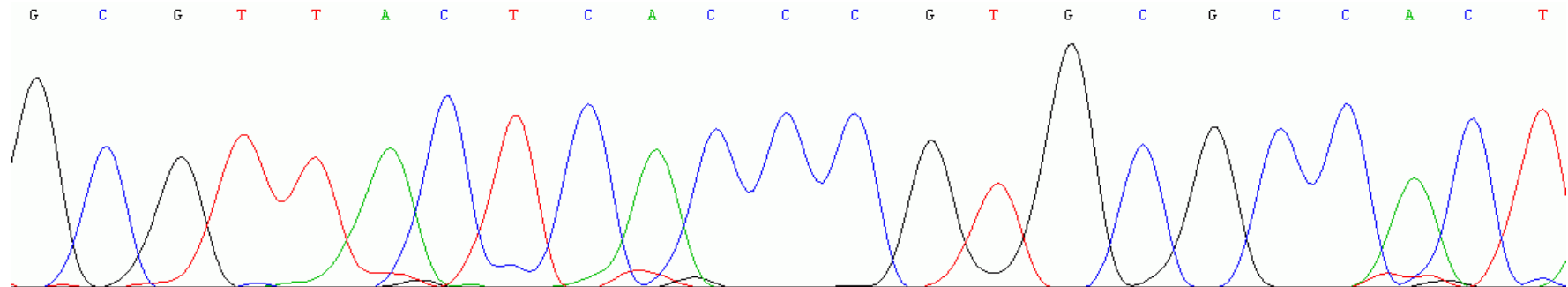
"Cycle Sequencing" (ddNTP)



Presipitasyon



Kapiller jel elektroforezi ve okuma



HEDEF

- ✓ ssDNA vektörleri
 - M13
 - pUC
 - ✓ PCR
- ✓ dsDNA (+/- PCR)

Primerler

✓ Genel primerler

- ucuz, hızlı, kolay

✓ Özel primerler

- pahalı, yavaş, özgül

UZAMA

✓ Polimeraz

- Sekans
- (Cycle Sequencing)

✓ Sonlandırma

- Boyama=İşaretleme ("Big Dye")
 - ddA,C,G,T

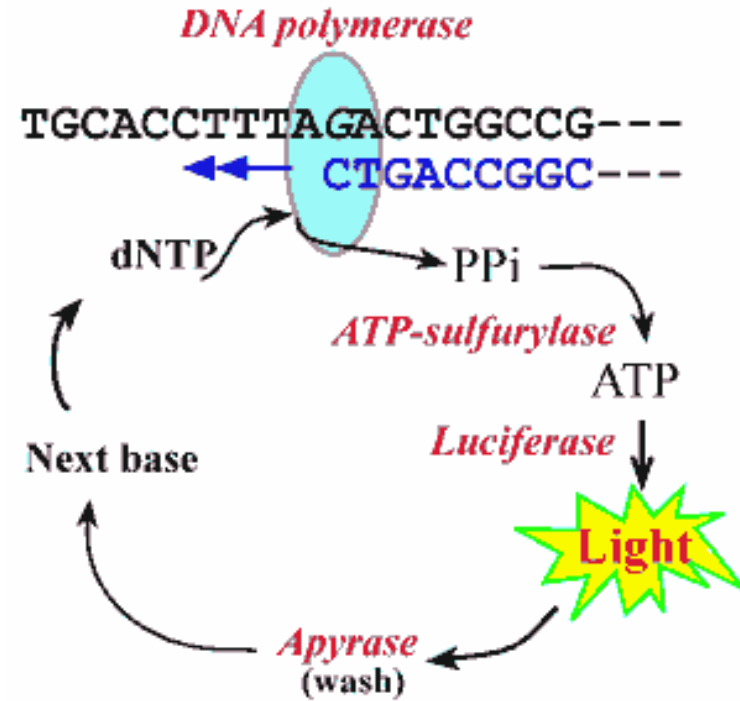
AYIRMA

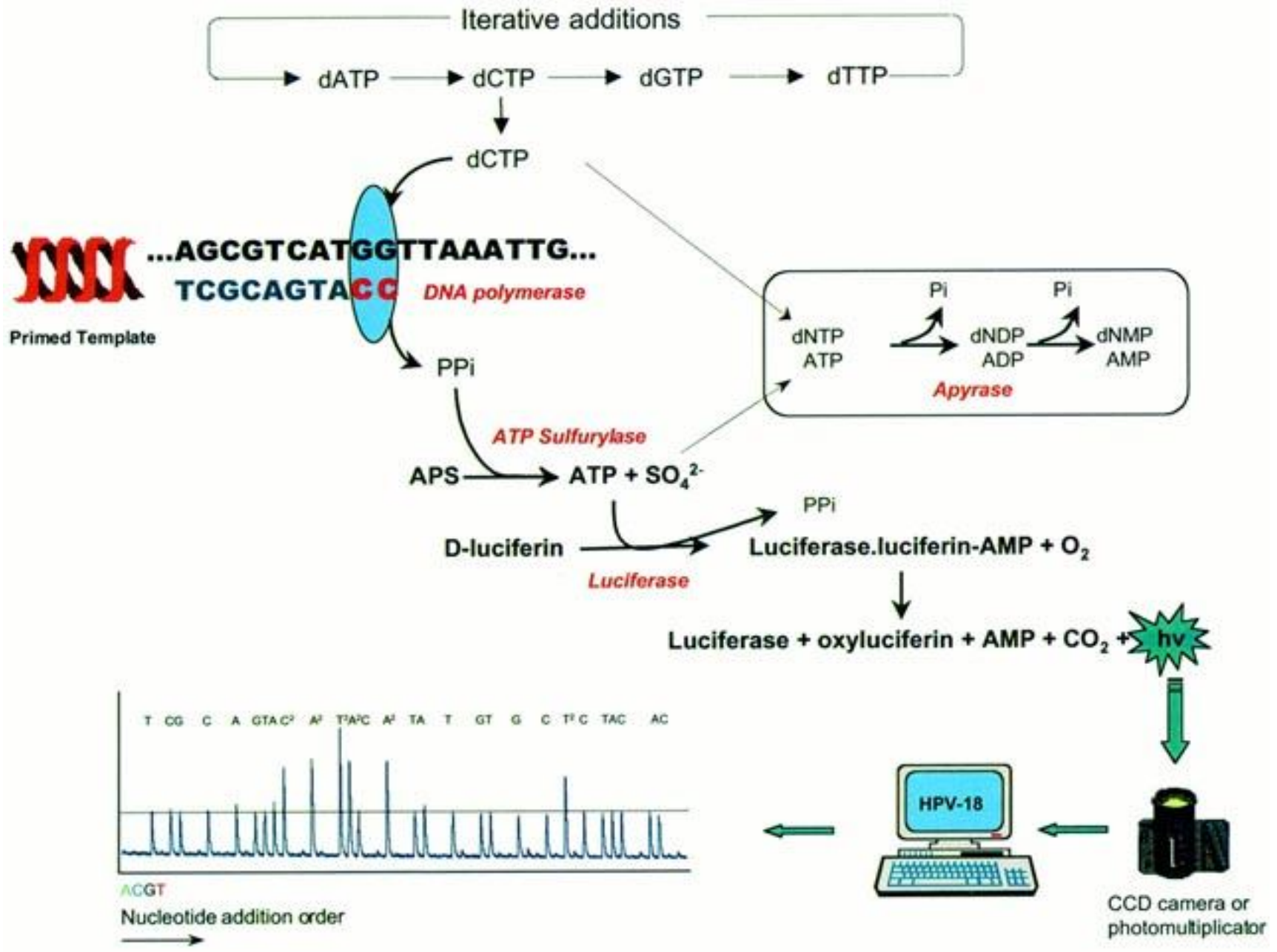
- ✓ Jel Elektforezi

- ✓ Kapiller Elektforez
 - Otomatize edilebilir
 - Hızlı (2 saat)
 - Basit ısı kontrolü
 - 96 kuyucuk

PIROSEKANSLAMA

- Sekans primeri tek zincirli DNA kalıbına hibridize olur.
- 4 deoksinükleotid trifosfattan (dNTP) ilki reaksiyona eklenir.
- Her nükleotid yerleşimine, yerleşen nükleotid miktarı kadar pirofosfat (PPi) salınımı eşlik eder.



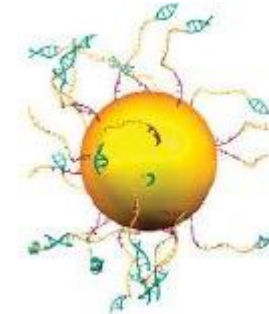
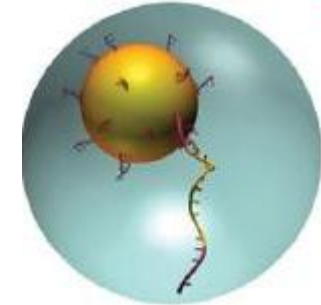
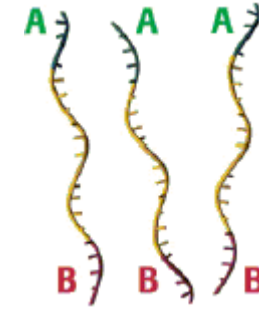
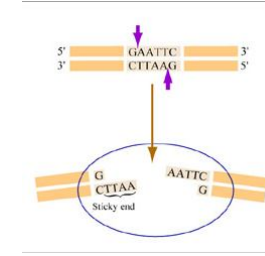


PİROSEKANSLAMA

- Elektroforez gerektirmez
- Hızlıdır
- Her dNTP sıra ile eklenir
- Komplimenter değilse hızla ortadan kaldırılır

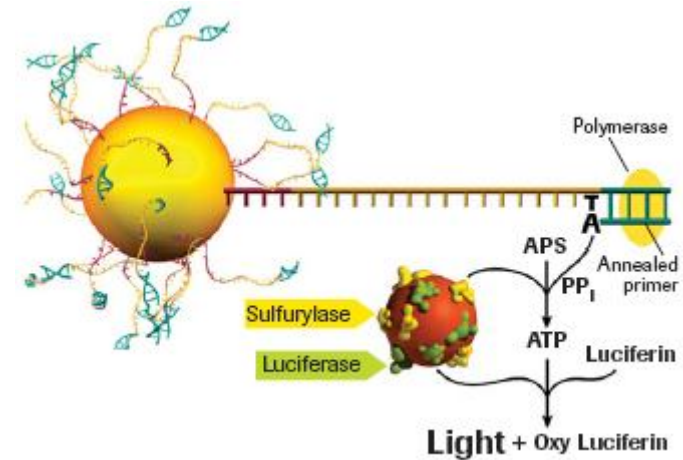
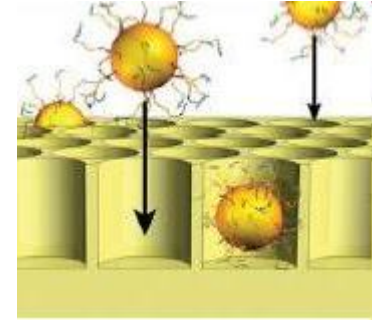
454 Teknolojisi

- Başlangıçta DNA 300-800 bp parçalara ayrılır
- Her sona bir adaptör bağlanır
- Bir adaptör biotin içerir ve streptavidin-kaplı boncuklara bağlanır. Boncuk / DNA oranı kontrol edilir. Her boncuğa bir DNA bağlanması sağlanır.
- Boncuklara yağ eklenir ve bir sütsü sıvı yaratılır. PCR yapılır. DNA kopyalanır.



454 Teknolojisi

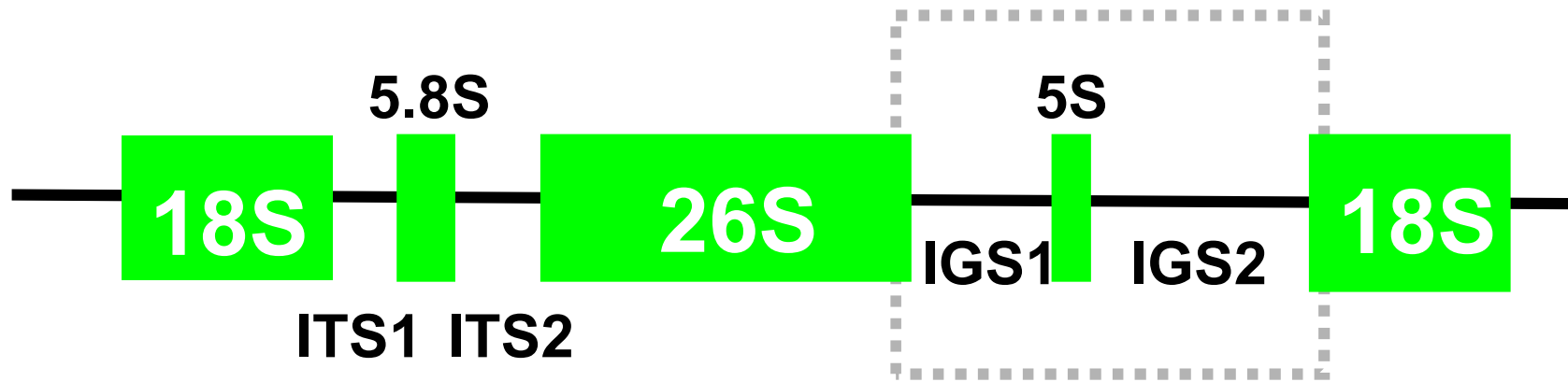
- Yağ uzaklaştırılır. Boncuklar "picotiter" plaklarına eklenir. Her bir kuyucuğa bir boncuk yerleşir.
- Her kuyucuğa pirosekans enzimi eklenir.
- Her plak tekrar tekrar dNTP ile yıkanır. Gerekli kimyasallar eklenir.
- Plak "fiber optik" çip ile kaplanır. Her kuyucuktan ayrılan ışığa CCD kamera ile okunur.



DNA dizi analizi ile mantarların tanımlanması

Örnekler

rDNA bölgesi



ITS : Internal Transcribed Spacer

IGS : Intergenic Spacer

8,188 bp

Hangi bölgeyi dizileyelim ?

	Sınıf	Aile	Cins	Tür	Köken
18S	—————				
26S	—————				
ITS			—————
IGS				—————	

DNA benzerliği

Aynı tür

> 70%

Farklılık

30-70%

Farklı tür

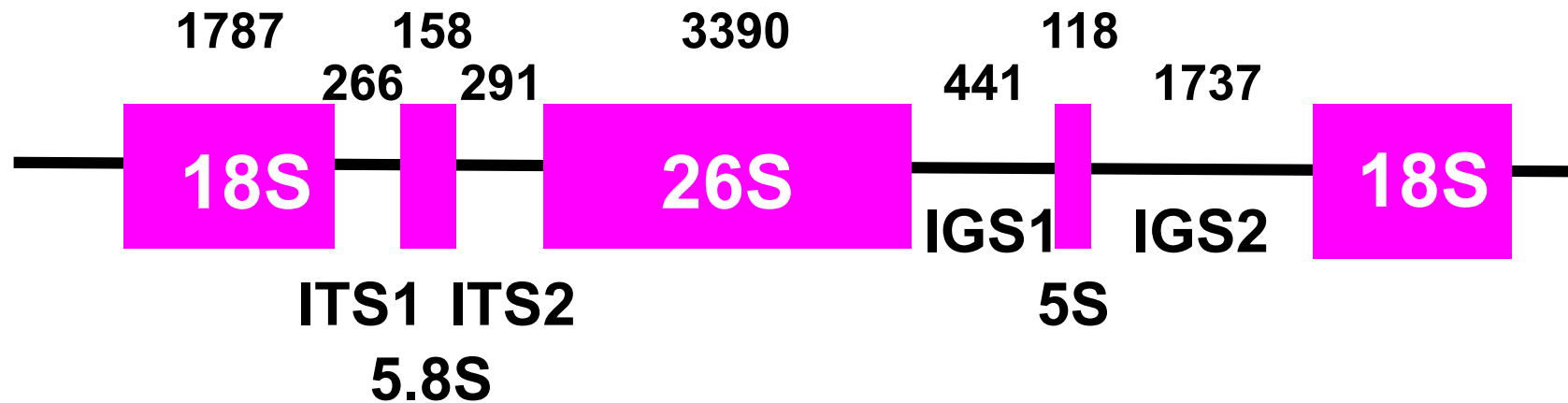
< 30%

rRNA gen bölgesi için kullanılacak primer dizileri

Subunit or spacer region	Name of primer	Sequence
ITS region	ITS1 (forward)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4 (reverse)	TCCTCCGCTTATTGATATG
D1/D2 LSU	NL1 (forward)	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
	NL4 reverse)	GGTCCGTGTTTCAAGACGG

DNA dizi analizi ile mantarların tanımlanması

Malassezia rRNA geni

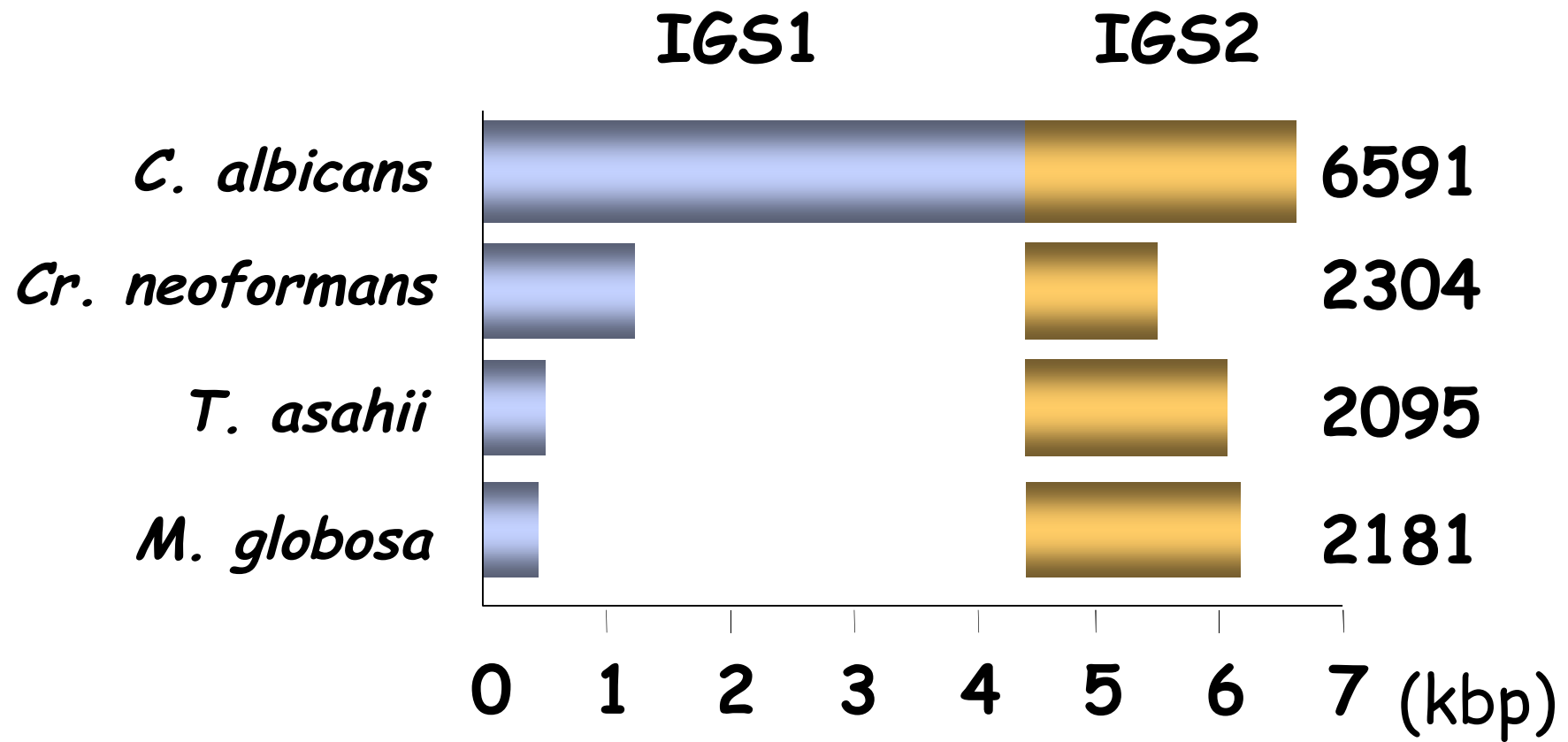


ITS : Internal Transcribed Spacer

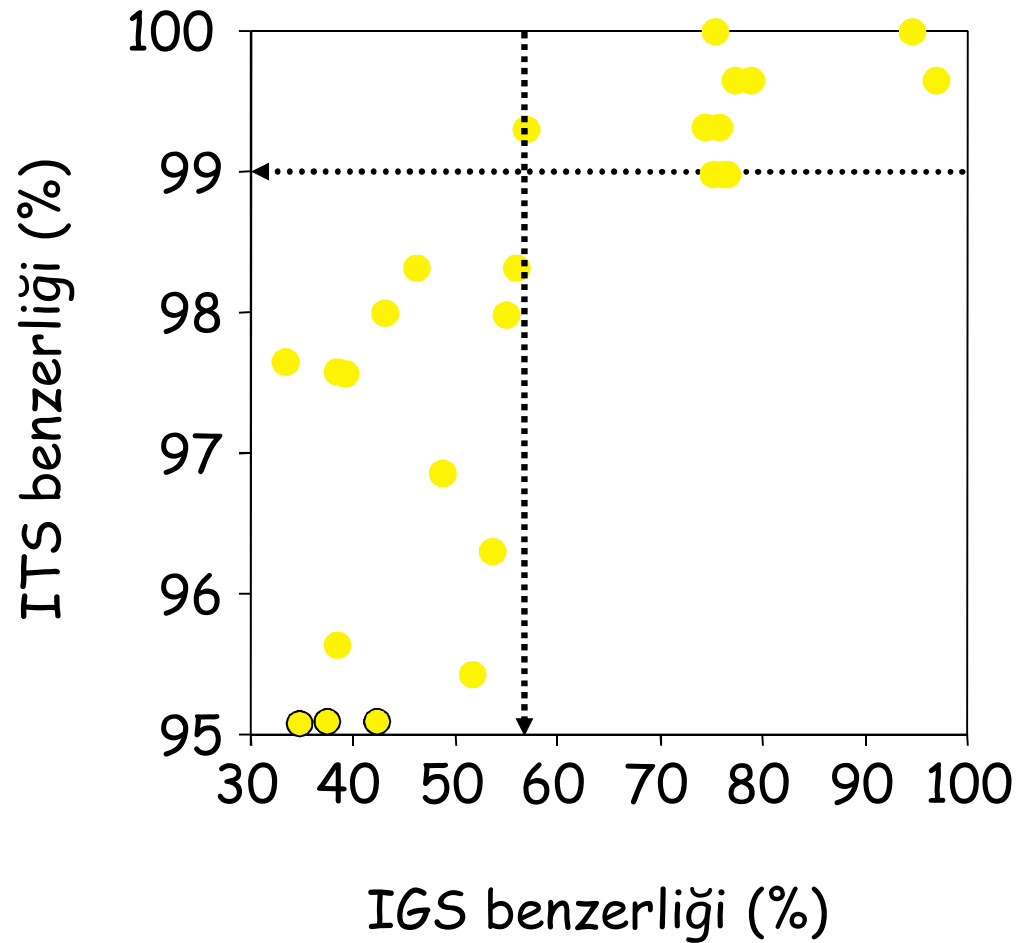
IGS : Intergenic Spacer

8,188 bp

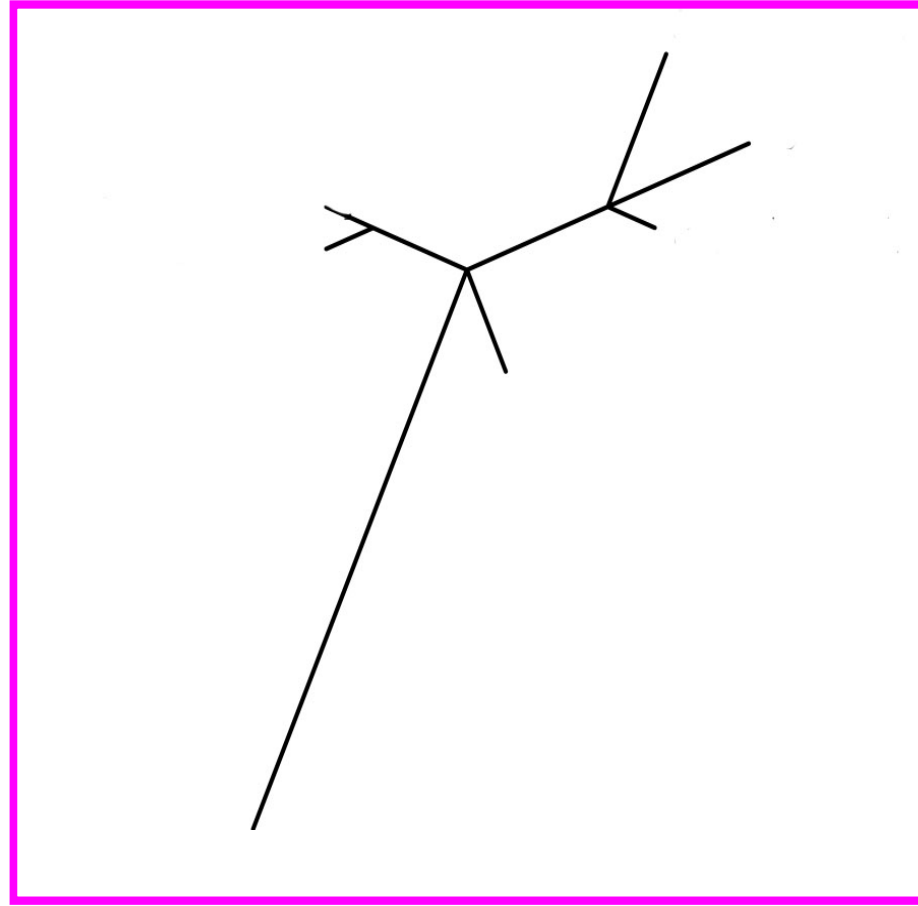
IGS bölgesi



IGS & ITS

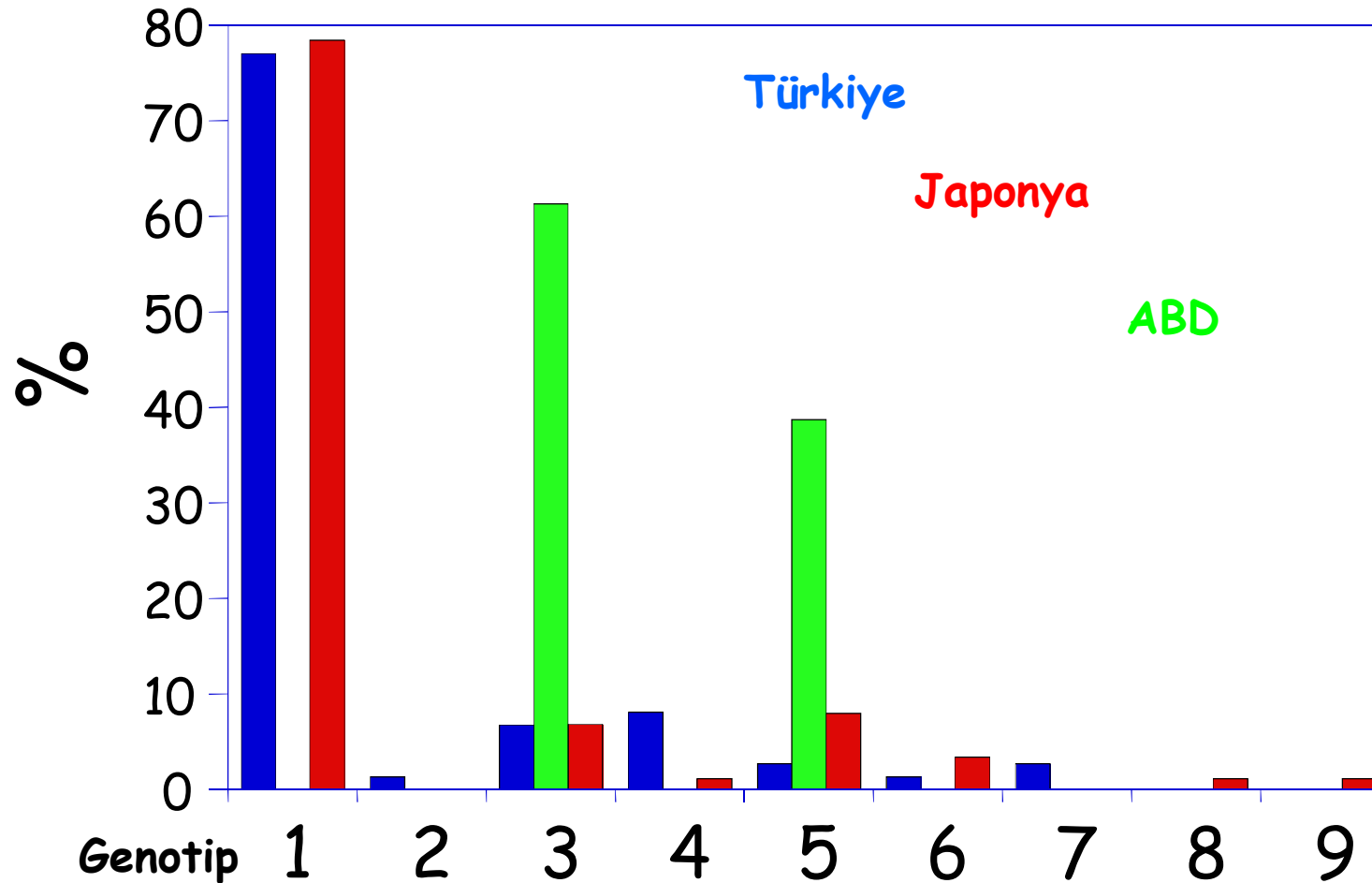


IGS analizi ile epidemiyolojik
karşılaştırma yapılabilir.



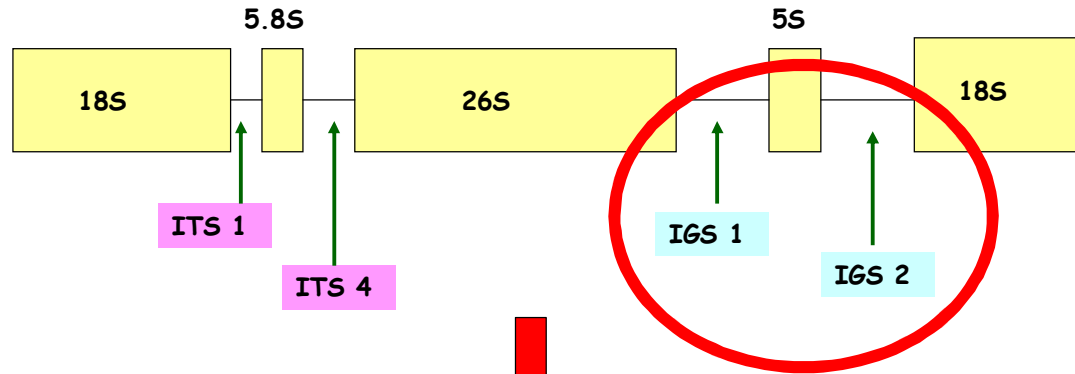


Trichosporon asahii kökenlerinin IGS analizi ile genotiplendirilmesi



Uygulama örneđi

Fenotipik yöntemler ile tür tanımı yapılamayan bir mantar...



DNA DİZİ ANALİZİ

PCR



Saflaştırma



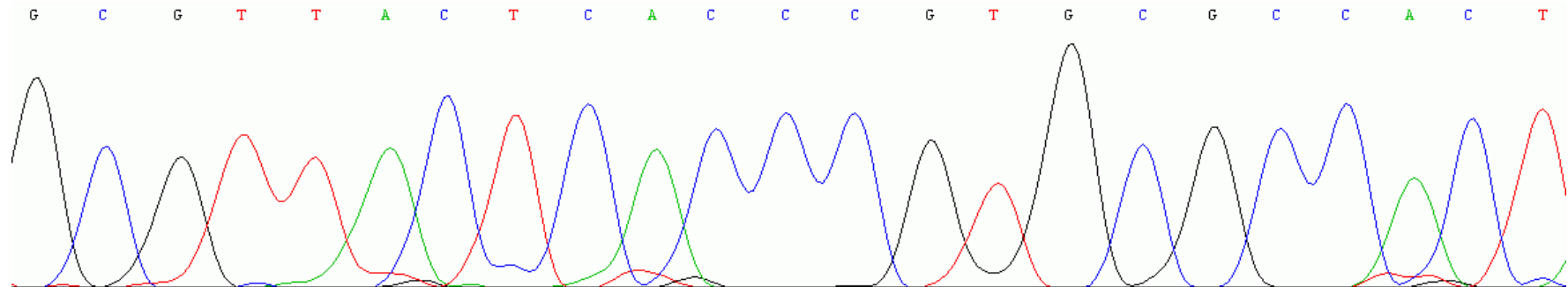
"Cycle Sequencing" (ddNTP)



Presipitasyon

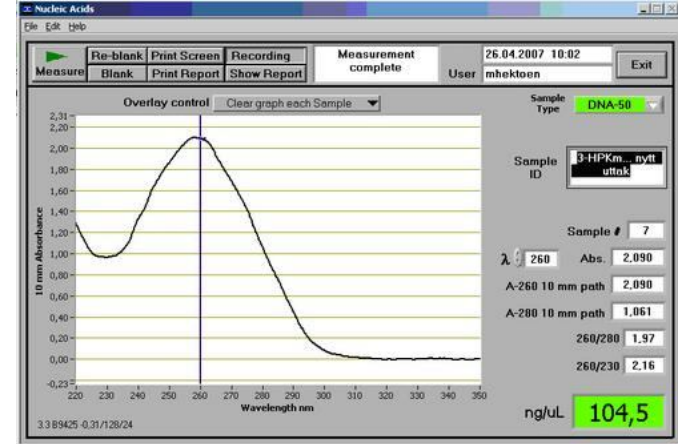
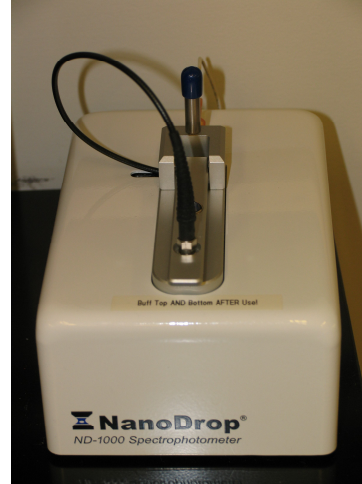


Kapiller jel elektroforezi ve okuma



- Dizilenecek üründen DNA elde edilir. Bu ürün genellikle mantar kolonisidir. Nadiren hasta örneklerinde bulunan fungal DNA da dizilenebilir.
- Elde edilen DNA miktarı ve kalitesi **MUTLAKA** ölçülür. Çok düşük (10-50ng/mikrolitre) DNA olan örneklerde dizi analizi sonucu başarılı olmayabilir. DNA miktarı yüksek ve saf olan örneklerde tür tanımı daha doğru yapılır.

- Nanodrop (USA)



- Bir hedef seçilerek çoğaltma yapılır.

Amplifikasyon karışımı

- 10x buffer 3.5 μ l
- dNTP 2.8 μ l (36.6nmol)
- Forward primer 0.14 μ l (100pmol)
- Reverse primer 0.14 μ l (100 pmol)
- Taq polimeraz 0.175 μ l (250 U)
- SU 27.245 μ l

- HER TÜPE 34 μ l dağıt
- 1 μ l DNA ekle. "Termal cycler" cihazına yükle.

PROGRAM

(IGS 1-IGS 2 primerleri için)

- 94 °C 1 dk
 - 94 °C 30 sn
 - 57 °C 30 sn
 - 72 °C 30 sn
- } x 33 Siklüs
- 72 °C 10 dk

ADI	DİZİSİ
IGS 1	5'-ATC CTT TGC AGA CGA CTT
IGS 2	AGC TTG ACT TCG CAG ATC

- Amplifikasyon sonrasında PCR ürünü MUTLAK elektroforez yürütülür. Kontrol edilir. **Sekans öncesi mutlak gereklidir.**
- Yürütme sırasında 1 birim yükleme tamponu, 3 birim örnek yüklenir.
- PCR sonrasında mutlak pürifikasyon yapılır. Pürifikasyon için spin kolon protokolü kullanılır.
- Pürifiye edilen ürünlerde ürün tekrar ölçülür veya tekrar elektroforez yapılır. Kontrol için.

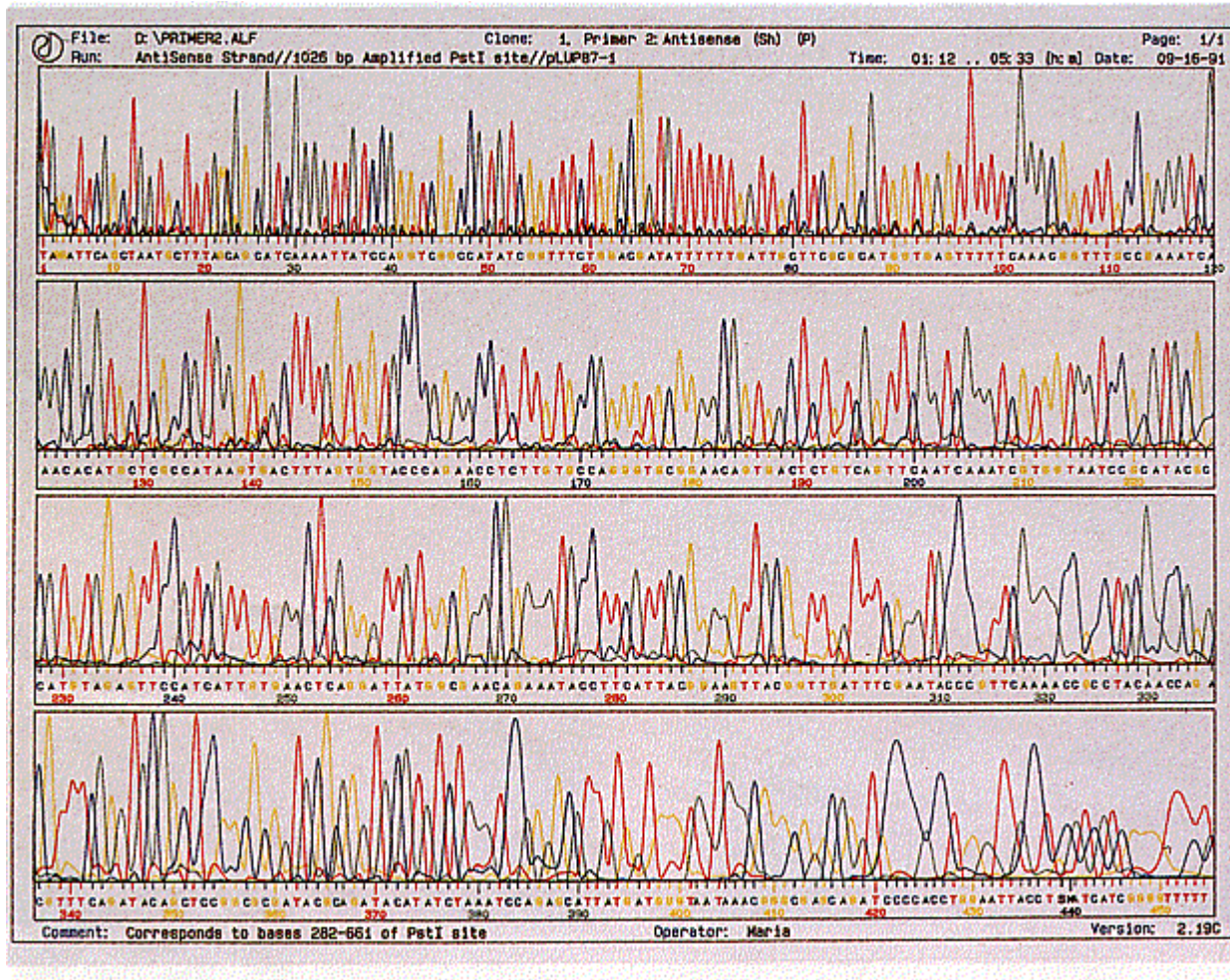
"Cycle Sequencing" (ddNTP)

- BigDye daha önceden 6 μ l halinde 0.2 lik ependorflara hazırlanarak -20 de bekletilebilir.
 - 20 μ l karışım için her tüpe tek tek şunlar eklenir;
 - BigDye 6 μ l (HAZIR)
 - Hedef PCR ürünü (pürifikasyon sonrası ürün) 1 μ l
 - Primer (reverse primer) 0.65 μ l
 - SU 12.35 μ l
-
- Program:
 - 96 °C 10 sn
 - 50 °C 5 sn
 - 60 °C 4 dk
- } X 25 siklüs

BigDye Cycle sequencing sonrası pürifikasyon

- Pürifikasyon için, etil alkol kullanılır.
 - 20 µl BigDye ürünü içeren ependorf termal cyclor dan çıkarılıp üzerine 3.3 µl **NaOAc (sodyum asetat)** eklenir. Pipetaj yapılır.
 - Karışımın üzerine 2.5 kat ($20+3.3=23.3 \times 2.5 = 58.25$ µl) **Etil alkol** (%100) eklenir.
 - 14 000 rpm 15 dk santrifüj yapılır.
 - Süpernatant atılır. Çökelek üzerine 100 µl %70'lik **Etil alkol** konur.
 - 14 000 rpm 5 dk santrifüj yapılır.
 - Süpernatant atılır.
 - 14 000 rpm 3 dk santrifüj
 - 10µl lik pipet ile kalan etil alkol çekilir.
 - Ependorflar vakumlu santrifüj ile kurutulur.
 - -20 °C de saklanır.

- Etanol pürifikasyonu sonrası **YİNE DNA ölçülür.**
Kalite kontrolü için.
- Otomatik sekans cihazına yüklenir. Burada yapılan kapiler jel elektroforedir. Tek yönde uzatılmış (BigDye) DNA burada tek tek okunur.
- Elde edilen nükleotid dizisi veri kütüphaneleri ile karşılaştırılarak tür tanımlaması yapılır.



- Hizalama
- Göz ile kontrol !!!!!

İşlem basamakları

- DNA eldesi
- DNA ölçümü
- PCR
- Elektroforez
- Pürifikasyon
- DNA ölçümü
- Elektroforez
- "Cycle sequencing"
- Pürifikasyon
- DNA ölçümü
- Kapiller elektroforez
- Veri analizi

Fungal DNA dizi analizi bize neler sağlar ??

- Kesin tür tanımı
- Alt tür
- Filogenetik analiz

- Mutasyon analizi
 - Direnç bölgelerinde mutasyon
 - Virülans genlerinde mutasyon



Sorular ?