***CANDIDATUS* PHYTOPLASMA SOLANI**

Gerekli Kimyasallar:

- DNA izolasyon kiti (Qiagen Plant Minikit)
- TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

Gerekli Sarf Malzemeleri

- 0-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl ve 200-1000 µl pipetler
- 0-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl ve 200-1000 µl'lik steril filtreli pipet uçları
- Kimyasalları depolamak için 1.5 ml'lik tek kullanımlık tüpler
- Kullanılan cihaza uyumlu real-time PCR tüpleri veya tabakalar
- Masa üstü santrifüj
- Derin dondurucu
- Buz makinesi
- Lateks veya nitril eldivenler
- Real time thermal cycler

ÖNEMLİ: *Laboratuvarda bulunan real-time PCR cihazına uygun Master Mix kullanılabilir.*

<u>Dikkat edilmesi gereken hususlar:</u>

DNA izolasyonu ve PCR 'ın tüm aşamalarında örneklerin ve kitlerin bulaşmasını önleyecek aşağıdaki tedbirler alınmalıdır.

1. DNA izolasyonu ve PCR karışımının hazırlanmasında kullanılan pipetler ayrı olmalıdır.
2. Pipetleme işlemi kurallara uygun yapılmalıdır.
3. Filtreli pipet uçları kullanılmalı ve her kullanımdan sonra pipet ucu değiştirilmelidir.
4. Tüplerden gerekli miktarlar alındıktan sonra kapakları hemen kapatılmalıdır.
5. Eldiven kullanılmalı ve bulaşmaları durumunda eldivenler değiştirilmelidir.
6. Temiz ve steril plastik malzeme kullanılmalıdır.
7. Analizlerin aşağıdaki aşamaları ayrı bölmelerde ayrı malzeme ve ekipman (pipet, tüp taşıyıcı, tüp, önlük, eldiven vb.):
    - PCR karışımı hazırlama (bu bölmede DNA izolasyonu yapılmamalı)
    - PCR karışımına DNA ilavesi (UV kabini)

Gerekli Olan Primer ve Problar

Fitoplazma spesifik Primer ve prob dizileri (Christensen *et al.*, 2004)

Primer / Prob Adı	**Dizisi**
Forward primer	5′-CGT ACG CAA GTA TGA AAC TTA AAG GA-3′
Reverse primer	5′-TCT TCG AAT TAA ACA ACA TGA TCC A-3′
Probe	5′- FAM-TGA CGG GAC TCC GCA CAA GCG-BHQ -3′

Primer / Prob Adı	**Dizisi**
Bitki forward primer	5′-GAC TAC GTC CCT GCC CTT TG-3′
Bitki reverse primer	5′-AAC ACT TCA CCG GAC CAT TCA-3′
Bitki probe	5′-FAM-ACA CAC CGC CCG TCG CTC C-TAMRA-3′

ÖNEMLİ: *Primer ve problar aşağıdaki belirtildiği şekilde sulandırılarak kullanılmalı ve derin dondurucu (-20 ^{o}C) da saklanmalıdır. Problar ışıktan uzak tutulmalıdır.*

DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonu

Bitki örneklerinin hazırlanması

Belirtili bitki örneklerinden örnekleme: Belirtilerin olduğu 3-5 yaprak ve/veya sap toplanır.

Belirtisiz bitkilerden örnekleme: Bitkinin farklı kısımlarından olmak üzere 5-10 yaprak ve/veya sap toplanır.

Alınan örneklerden mümkün olduğu kadar fazla iletim dokusu (yaprak sapı, yaprak ana damarı) içerecek şekilde doku parçaları alınır.

Patates yumrularından örnekleme: *Ca*. Phytoplasma solani'nin yumru içerisindeki dağılımı homojen değildir. Bu nedenle yumruların farklı bir kaç noktasından, özellikle iletim demeti halkasından örnekleme yapılmalıdır. DNA izolasyonunda kullanılmak üzere, yumrunun iletim demetlerinden steril bisturi yardımı ile küçük doku parçaları çıkarılır.

Not: Örnekler hazırlanırken çapraz bulaşma olmamasına dikkat edilmelidir.

Örneklerden ekstraksiyon:

DNA izolasyonu için hazırlanan örneklerden bitkisel materyalin özelliğine göre farklı metotlarla ekstraksiyon yapılacaktır. Yumuşak bitki dokularından ekstraksiyon için; Bioreba veya benzeri tek kullanımlık örnek ezme poşeti içerisine yerleştirilen bitki parçaları Bioreba veya benzeri el tipi homojenizatör kullanılarak parçalanacaktır.

Daha sert bitki dokularından ekstraksiyon yapılacaksa havan ve havan eli yardımıyla dokular iyice parçalanacak şekilde ezilecektir. Eğer doku öğütülemeyecek kadar sert ise işlem sıvı azot ilave edilerek yapılacaktır.

Not: Örnek ektraksiyonu için otomatik doku parçalayıcılar da kullanılabilir.

Not: Hangi metotla ektraksiyon yapılırsa yapılsın önemli olan nokta bitkinin iletim demetlerinin tamamen parçalanacak şekilde dokunun ezilmesidir.

DNA izolasyonu Qiagen DNeasy Plant Mini Kit kullanılarak yapılacaktır. Elde edilen DNA'lar klasik real-time PCR testlerine tabi tutulana kadar -80 ^{0}C'de saklanacaktır.

QİAGEN Plant Mini Kit Quick Start Protokol'un uygulanması

DNA izolasyonu Qiagen DNeasy Plant Mini Kit kullanılarak yapılacaktır. Elde edilen DNA'lar klasik real-time PCR testlerine tabi tutulana kadar -80 ^{0}C'de saklanacaktır.

QİAGEN Plant Mini Kit Quick Start Protokol'un uygulanması

Dikkat edilmesi gereken hususlar:

- Tüm santrifüj işlemleri oda sıcaklığı (15-25 ^{o}C)'nda yapılmalıdır.
- AP1 ve AW 1 çözeltilerinde oluşan her hangi bir çökelti çözdürülmelidir.
- AW 1 ve AW 2 çözeltilerine etanol (etil alkol) eklenmelidir.
- Sıcak su banyosu veya ısı blok önceden 65 ^{o}C'ye getirilmelidir.

DNA İzolasyon Aşamaları

1. Bitki parçaları (≤100 mg yaş ağırlık veya ≤20 mg liyofilize doku) doku parçalayıcı (TissueRuptor veya TissueLyser II), Bioreba tek kullanımlık örnek ezme poşeti kullanılarak Homex el homojenizatörü veya havan ve havaneli kullanılarak parçalanır.
2. 400 µl Buffer AP1 ve 4 µl RNase A eklenir. Vorteks yapılır ve 10 dakika için 65 ^{o}C' de inkubasyona bırakılır. Tüpler inkubasyon sırasında 2-3 defa alt-üst çevrilir.
   Not: Buffer AP1 ve RNase A çözeltileri kullanımdan önce karıştırılmamalıdır.
3. 130 µl Buffer AP3 eklenir. Karıştırılır ve buz üzerinde 5 dakika inkube edilir.
4. Öneri: Lysate 5 dakika için 20,000 x g (14,000 rpm)'de santrifüj edilir.
5. Pipet yardımıyla Lysate, 2 ml toplama (collection) tupüne konulmuş olan QIA shredder spin column'a aktarılır. 20,000 x g'de 2 dakika süreyle santrifüj yapılır.
6. Süzülen kısım (flow-through) çökelti (peleti) (varsa) bozulmadan yeni tüpe aktarılır. 1,5 hacim Buffer AW1 eklenir ve pipetleme ile karıştırılır.
7. 650 µl karışım 2 ml toplama (collection) tüpüne konulmuş olan DNeasy Mini spin column' a transfer edilir. ≥6000 x g (≥8000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edilir. Süzülen kısım (flow-through) atılır. Bu işlem örneğin geri kalan kısmı ile tekrar edilir.
8. Spin kolon yeni 2 ml toplama (collection) tüpüne konulur. 500 µl Buffer AW2 eklenir ve 1 dakika ≥6000 x g'de santrifüj edilir. Süzülen kısım (flowthrough) atılır.

9. Yeniden 500 µl Buffer AW2 eklenir ve 2 dakika 20,000 x g'de santrifüjleme yapılır.
10. Note: Spin kolon toplama (collection) tüpünden kolon süzülen kısma (flow-through) dokunmayacak şekilde dikkatlice çıkarılır.
11. Spin kolon yeni 1.5 ml veya 2 ml 'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
12. DNA'yı aşağı akıtabilmek için (elution) 100 µl Buffer AE eklenir. Oda koşullarında (15–25°C) 5 dakika inkube edilir. 1dakika ≥6000 x g'de santrifüj edilir.
13. 11.ci madde tekrar edilir.

DNA numunelerinin kalite ve miktar tayini

Bu işlem Nanodrop spektrofotometre (veya alternatif cihazda) cihazında yapılacaktır.

DNA numunelerinin 260 nm, 280 nm'de absorbans değerleri ile 260 nm/280 nm ve 260 nm/230 nm oranları ölçülecektir. DNA konsantrasyonları ng/µl olarak belirlenecektir.

Spektrofotometrik okumalar 3 tekerrürlü olarak yapılacaktır.

PCR karışımının hazırlanması

1. Derin dondurucudan tüm malzemeler çıkarılır ve erimeye bırakılır. Erime tamamlandıktan sonra tüplerdeki malzeme (reaktif) iyice karıştırılır ve gerekirse kısa süreyle (~5 s) santrifuj edilir.
2. Örnekler tercihen 2 tekerrürlü çalışılır, her defasında negatif kontrol olarak su ve pozitif kontrol kullanılır.
3. Bir tüpte, örnek sayısı dikkate alınarak gerekli malzemelerden ne kadar alınacağı hesaplanarak (pipetleme hatalarını önlemek amacıyla 1 fazla hacim hesaba katılmalıdır) PCR karışımı hazırlanmalıdır.
4. PCR karışımı hazırlanırken malzemeler aşağıda belirtilen sırada eklenir. DNA ilave edildikten sonra PCR tüpleri kapatılır ve kuru buzda bırakılır.
5. Kullanılan cihazın özelliğine göre çok odacıklı PCR tabağı veya real-time PCR cihazına uygun tüpler alınır. Her bir kuyuya veya tüpe 23 µl PCR karışımı ilave edilir.
6. Her DNA ekstraktı'ndan 2 µl her kuyucuğa eklenir. Daima negatif kontrol olarak su eklenerek başlanır, sonra örneklerden elde edilen DNA lar ile devam edilir ve en sonra pozitif kontroller ilave edilir. Bu şekilde çalışıldığında bulaşma olasılığı azalır.
7. DNA'lar eklendikten sonra tabağın üzeri özel uygulayıcı (aplikatör) kullanarak, özel optik yapıştırıcı bant ile kaplanır veya tüpler kullanılıyorsa kapakları kapatılır.
8. Tabak, tabak santrifüjü ile 1 dakika 1000 rpm'de santrifuj edilir ve karışımın odacıkların dibinde biriktiğine dikkat edilir. Tüplerin kullanıldığı durumlarda karışımın dibe çökmesine yetecek kadar mini santrifüjde kısa süreli santrifüjlenir.
9. Hazırlanan karışımı içeren tabaklar veya tüpler hemen cihaza konulmalıdır.
10. Cihaz gerekli koşulları sağlayacak şekilde ayarlanır.

Kontroller:

1. **Pozitif kontrol** (Enfekteli bitki örneği)
2. **Negatif kontrol** (Nuclease-free su)

Kimyasal	**Hacim**
Total genomik DNA	5.0 µl
TaqMan Universal Master Mix (2x)	12.5 µl
10 µM forward primer	0,75 µl
10 µM reverse primer	2.25 µl
10 µM TaqMan prob	0.75
Su	8.75 µl
Toplam	**25,0 µl**

Bu karışım tüplere veya tabaklara yüklenerek aşağıdaki koşullara ayarlanan real-time cihazına yerleştirilecektir.

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
50^0 C	2 dak.	UNG aktivasyonu için
95^0 C	10 dak.	1 döngü
95^0 C 60^0 C	15 san 1 dak.	45 döngü

Ct (threshold cycle) değeri 40'tan az olan örnekler pozitif olarak değerlendirilecektir.

Sonuçların raporlanması

Örnek No	**Ct değeri**	**Pozitif/Negatif**
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		

9		
10		
Negatif kontrol*		
Pozitif Kontrol		
Non-template kontrol		

Negatif- Ct =0.00 veya >40.00

Pozitif - Ct = <40.00