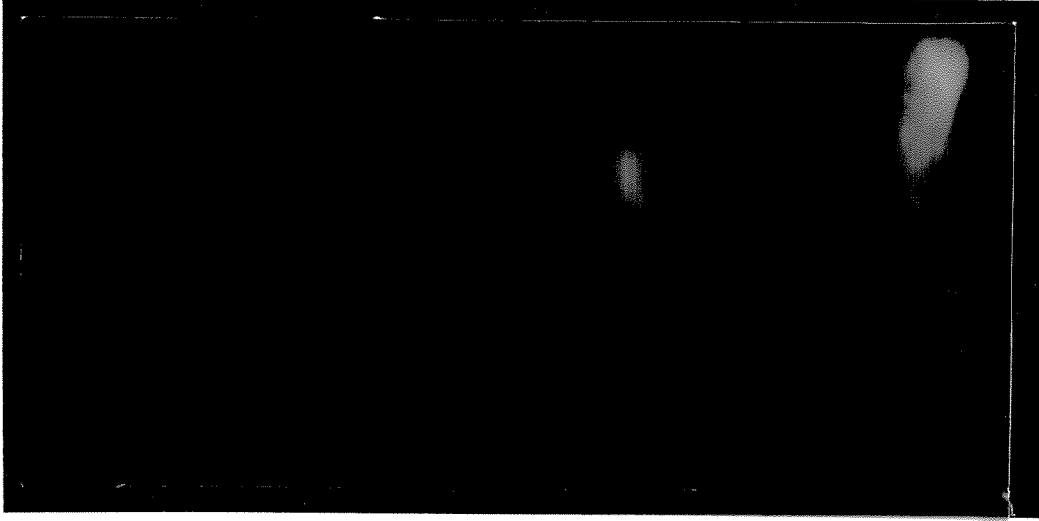




TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU *MD.*

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

1997-1440



Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri Araştırma Grubu

Agriculture Forestry and Food Technologies Research Grant
Committee

83588

SALMONELLA'NİN TEŞHİS VE TANIMLANMASINDA
RAPD-PCR TEKNİĞİNİN KULLANILMASI

PROJE NO: TOGTAG 1301



Y.Doç.Dr.Zümrüt Begüm Ögel

Araş.Gör. N. Gülce Ören

Prof.Dr.Faruk Bozoğlu

Y.Doç.Dr.Candan Gürakan

Elif Doğan

NİSAN 1997

ANKARA

ÖNSÖZ

Gerçekleştirilen proje'de *Salmonella*'nın teşhis ve tanımlanmasında RAPD-PCR tekniğinin kullanımının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda 14 *Salmonella* ve 16 *Salmonella* dışındaki bakterinin toplam hücre ekstraktları 10 adet 8-10 baz uzunluğunda rastgele dizayn edilmiş oligonükleotit primere karşı PCR'da kullanılmıştır. Denenen primerlerden biri teşhis, diğer ikisi de tanımlama primeri olarak kullanılmak üzere olumlu sonuçlar vermiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *Salmonella*-spesifik bir DNA marker'ı elde edilememekle birlikte RAPD-PCR tekniği standardize edilmiş ve araştırmaların sürdürülmesi halinde bu yöntemin rutin gıda ve izolat analizlerinde kullanılabileceğini gösteren bazı önemli sonuçlar elde edilmiştir. Bunlardan bazıları özetle şöyledir; seçilen teşhis primeri, en sık rastlanan *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. typhi* ve *S. paratyphi* olmak üzere, test edilen *Salmonella* serotiplerinin %80'inde spesifik ve tek bir amplifikasyon bandı vermiştir. Aynı primer *Salmonella* ve *Citrobacter*'i etkin bir şekilde ayırd edebilmiş ve aynı zamanda *C. perfringens*'da diğer tüm suşlardan farklı bir amplifikasyon bandı vermiştir. Seçilen tanımlama primerlerinden birisi *S. typhimurium*, *S. typhi*, *Salmonella D group* ve *Salmonella paratyphi B* için diğer *Salmonella* suşlarından ayırd edilebilecek amplifikasyon profilleri vermiştir. Denenen diğer bir primer ile ise olası *Salmonella typhimurium*-spesifik bir DNA marker'ı elde edilmiştir.

İlgili proje'nin TÜBİTAK-Tarım Orman ve Gıda Araştırma gurubu tarafından TOGTAG 1301 proje numarası ile Kasım 1995-Kasım 1997 tarihleri arasında maddi olarak desteklenmesi nedeni ile TÜBİTAK'a araştırma gurubu adına teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla,



Y.Doç.Dr. Zümrüt Ögel

İçindekiler

ÖNSÖZ.....	2
İçindekiler.....	3
Şekiller.....	4
Tablolar.....	5
ÖZ.....	6
ABSTRACT.....	8
PROJE ANA METNİ.....	10
Giriş.....	10
Gelişme.....	13
1. DNA İzolasyonu.....	13
2. Saf Kromozomal DNA ile RAPD-PCR.....	13
3. Hücre Ekstraktı Eldesi ve PCR'da Kullanılması.....	17
3.1 Kaynatma ile hücre parçalanması:.....	17
3.2 Sonikasyon ile hücre parçalanması:.....	17
4. Toplam Hücre Ekstraktı ile RAPD-PCR.....	17
4.1. RAPD-PCR optimizasyon ve standardizasyonu.....	19
4.2 Primerlerin RAPD-PCR'daki verimliliklerinin araştırılması.....	20
4.3. <i>Salmonella</i> serotiplerinin primer 7'ye karşı taranması.....	20
4.4 <i>Salmonella</i> dışındaki suşlarla ve primer 7 ile RAPD-PCR amplifikasyonları.....	22
4.5 <i>Salmonella</i> serotipleri ve primer 3 & primer 6 ile RAPD-PCR amplifikasyonları.....	23
5. DNA Hibridizasyon Çalışmaları.....	27
Sonuç.....	30
REFERANSLAR.....	32
EKLER.....	35
EK1- <i>S. typhimurium</i> Büyüme Eğrisi.....	35
EK2-Moleküler Boyut Standartları.....	36
EK3-Çözeltiler.....	38
1. DNA İzolasyonunda kullanılan Çözeltiler.....	38
2. Jel Elektroforez Çözeltileri.....	38
3. Southern Hibridizasyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	38
Bibliyografik Bilgi Formu.....	40

Şekiller

Şekil 1.....	14
Şekil 2.....	15
Şekil 3.....	18
Şekil 4.....	19
Şekil 5.....	21
Şekil 6.....	22
Şekil 7.....	24
Şekil 8.....	25
Şekil 9.....	26
Şekil 10.....	28
Şekil 11.....	28

Tablolar

Tablo 1.....	14
Tablo 2.....	16
Tablo 3.....	21
Tablo 4.....	23

ÖZ

Bu çalışmada, RAPD-PCR tekniğinin *Salmonella* serotiplerinin teşhis ve tanımlanmasında uygulanması araştırılmıştır. 8-10 bp büyüklüğünde 10 farklı rastgele seçilmiş oligonükleotit primer 14 *Salmonella* serotipi ve *Salmonella* dışındaki 16 suş ile birlikte araştırmanın çeşitli aşamalarında kullanılmıştır. Primerlerin teşhis ve tanımlama yönünden etkinliklerinin analiz edilmesi amacı ile başlangıçta 10 primer *S.typhimurium* ile birlikte PCR'da kullanılmıştır. Bu primerlerin üç tanesi (primer 7, primer 3 ve primer 6) istikrarlı ve ayırt edilebilir PCR ürünleri vermeleri nedeni ile seçilmiş ve çalışmaların ileri aşamalarında *Salmonella* ve diğer mikroorganizmalarla RAPD-PCR' da kullanılmıştır.

Buna göre, *S.typhimurium* ve primer 7 ile 550 bp büyüklüğünde güçlü bir amplifikasyon ürünü elde edilmiş ve bu primerin teşhis amacı ile kullanımının denenmesine karar verilmiştir. Denenen 14 serotipinden 11' i aynı güçlü amplifikasyon bandını vermiş ancak 2 serotip farklı büyüklükte bandlar vermiştir. Buna karşılık *Salmonella* dışındaki bazı suşlarda da aynı primerle 550 bp'lik bir amplifikasyon bandı elde edilmiştir.

Diğer yandan, *Salmonella* dışındaki kontrol suşları arasından bazıları, örneğin *Citrobacter* 550 bplik amplifikasyon fragmanını vermemiştir. *Citrobacter* ve *Salmonella* türlerini immunolojik metotlarla ayırt etmek oldukça zor olduğundan primer 7 nin bu iki türün ayırt edilmesinde kullanılma olasılığı ortaya çıkmıştır. Primer 7 ile yapılan amplifikasyonlarda *Clostridium perfringens*'in diğer tüm suşlardan farklı, tek ve spesifik bir band verdiği de gözlenmiştir.

Primer 3 ve 6'nın PCR'da kullanımı sonucunda her iki primerin de diğer *Salmonella* serotipleri ile farklı amplifikasyon şekilleri verdikleri ortaya çıkmıştır. Ancak primerler sadece bazı *Salmonella* serotipleri ile ikna edici bandlar vermişlerdir. Diğer yandan, genotip düzeyinde bile farklı serotiplerden farklı amplifikasyon şekilleri elde edilebildiği için RAPD-PCR *Salmonella*'nın teşhis ve tanımlanmasında kullanılabilir yararlı bir teknik olarak değerlendirilmiştir.

Primer 3 *S.typhimurium* ile diğer serotiplerden kolaylıkla ayırt edilebilir amplifikasyon bandları vermiştir. Bu bakımdan bu primer daha sonra 11 farklı *S.typhimurium* izolatına karşı test edilmiştir. Bütün izolatlar ,bu primerin *S.typhimurium* spesifik marker olarak kullanılması olasılığını işaret edecek biçimde aynı amplifikasyon şeklini vermiştir.

ABSTRACT

In this study, a research has been done on the application of RAPD-PCR for the detection and identification of *Salmonella* serotypes. 10 different random oligonucleotide primers, 8-10bp in size, were used in RAPD-PCR with 14 *Salmonella* serotypes and 16 non-*Salmonella* strains that were used at different stages of the research. At first 10 random primers were used in RAPD-PCR against *S. typhimurium* in order to analyze the effectiveness of these primers in yielding distinct bands or band patterns that could be used in the detection and identification of *Salmonella* serotypes in general. Three of these primers (primer 7, primer 3 and primer 6) were selected based on their ability to produce consistent and distinguishable fragment patterns and were used in RAPD-PCR with other *Salmonella* and non-*Salmonella* serotypes. Accordingly, a 550bp strong amplification product was obtained from *S. typhimurium* and primer 7. It was decided to test this primer as a putative detection primer against the other *Salmonella* serotypes. 11 out of 14 serotypes produced the same 550bp strong amplification product and 2 serotypes gave somewhat smaller products. Although some of the non-*Salmonella* strains have also produced a distinct 550 bp amplification product with the same primer, others including, a *Citrobacter* species, have generated different products of possible use in detection and identification studies. Furthermore, *Clostridium perfringens* has generated a unique and specific amplification product with primer 7, which can be of possible future use for the detection of this organism.

Primers 3 and 6 have been selected as putative identification or classification primers because they have produced several distinct bands of different size with *S. typhimurium* DNA. Both primers yielded different amplification patterns with the other *Salmonella* serotypes. The primers, however, gave convincing band patterns with only some of the *Salmonella* serotypes but not all of them. Nevertheless, since different amplification patterns can be obtained from different serotypes and even at the level of genotypes, it appears that

RAPD-PCR is a useful technique in the identification and classification of *Salmonella* serotypes if not with the 10 primers that have been tested.

S.typhimurium gave a distinguishable amplification pattern with primer 3 and was further tested against 11 different *S.typhimurium* isolates. All of the isolates gave the same amplification pattern, indicating the possibility of the use of this primer as a *S.typhimurium*-specific marker.

PROJE ANA METNİ

Giriş

Gıda maddeleri aracılığı ile insan vücuduna taşınan ve çeşitli zehirlenmelere, hatta ölümlere neden olan bazı mikroorganizmaların yol açtığı sağlık sorunları günümüzde hala önemini korumaktadır. Bu sorun üçüncü dünya ülkelerini olduğu kadar, temizliğe çok daha fazla önem verilen Avrupa ve Amerika'yı da ilgilendirmekte (Hill & Keasler, 1991) ve yalnızca tüketiciyi değil aynı zamanda gıda endüstrisini, sağlık teşkilatlarını ve bazı yönetim birimlerini de etkilemektedir. Son yıllarda gıda maddelerinin tüketimi sonucu artan sağlık sorunlarının nedeni, insanların yiyecek alışkanlıklarının değişmesi, toplu yiyecek üretimi ve artan uluslararası gıda nakliyatına bağlanmaktadır (Datta, 1990).

Zararlı mikroorganizmaların gıda maddeleri içindeki varlığının erken teşhisi şüphesiz hastalık ve ölüm vakalarının azaltılması veya engellenmesi açısından çok büyük önem taşımaktadır. Gıda maddelerindeki mikroorganizmaların çabuk ve kesin teşhisi hem gıda sanayii'nin envanter harcamalarını azaltır, hem de herhangi bir kontaminasyon durumunda alınacak tedbirleri hızlandırır. Bu alanda kullanılacak yöntemler aynı şekilde enfeksiyon sonrası hastalığa neden olan canlının erken teşhisi amacı ile de kullanılabilir ki, tıbbi açıdan, erken teşhis, tedavinin bir an önce başlatılması bakımından büyük öneme sahiptir. Tüm bunlara karşılık, örneğin *Salmonella*'nın teşhisi klasik yöntemlerle en az 3-4 gün, hatta 5-7 gün gibi uzun bir süre gerektirmekte (Flowers, 1987), dolayısı ile yiyeceklerin karantina'da bu süre dahilinde tutulması veya sorunun görmezlikten gelinmesi gibi üreticiye veya tüketiciye zarar verebilecek sonuçlar doğurabilmektedir.

Mikroorganizmaların teşhis ve tanımlanması amacı ile kullanılan pekçok yöntem vardır ve her geçen gün, konunun önemi itibarı ile, bunlara yenileri eklenmektedir. Bunlardan bazıları antikor tekniği, antibiyotik veya virüse karşı direnç ve izoenzim karşılaştırmalarıdır. Genetik yöntemler, yani DNA hibridizasyon teknikleri ve PCR'a dayanan stratejiler ise son

yıllarda önem kazanmaya başlamıştır. Genetik yöntemler genel olarak daha etkin ve kesin sonuç vermeleri bakımından ve, özellikle PCR'a dayanan tekniklerin kullanımında, bir gün gibi kısa bir sürede sonuç verebilmeleri bakımından avantaj sağlamaktadırlar.

İlgili proje kapsamında gerçekleştirilen çalışma PCR tekniğinden yararlanarak mikroorganizmalarda teşhis ve tanımlama amacı ile kullanılabilen, DNA markerlerinin ortaya çıkartılmasını sağlayacak bir yöntemin geliştirilmesini ve *Salmonella* baz alınarak uygulanmasını içermektedir. *Salmonellae* doğada yaygın olarak bulunan ve başlıca konakçıları insanlar ve hayvanlar olan mikroorganizmalardır. *Salmonellae*, *S. enterica*, olarak tek bir cins altında toplanmasına rağmen antijenik özelliklerine göre yaklaşık 2200 serotip içermektedir. Buna karşılık *Salmonella* zehirlenmelerinde en sık rastlanan serotipler Avrupa'da *S. enteritidis*, Türkiye'de ise *S. typhimurium* dur. Bunların dışında *S. typhi* ve *S. paratyphi* de sadece insanları enfekte etmeleri ve tifo ve paratifo gibi ciddi hastalıklara neden olmaları açısından büyük önem taşımaktadırlar (Jay, 1992). *Salmonella* gıda zehirlenmeleri gıda aracılığı ile canlı hücrenin vücuda girmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bir tek *Salmonella* hücrenin bile hastalığa neden olabileceği bilinmektedir. Gastroenteritidis diye anılan bağırsak rahatsızlıklarına neden olan *Salmonella* vakasına Amerika'da her yıl 740,000 ila 5,300,000 (Flowers, 1992) varan bir sayıda rastlanmaktadır. Bu sayının Türkiye'de çok daha önemli boyutlarda olduğu tahmin edilmektedir.

Daha önce belirtilen teknikler yanısıra Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) *Salmonella*'nın teşhisi amacı ile kullanımına dair literatürde bazı araştırmalar daha önce yer almıştır (Widjoatmodjo *et al.* 1991, Aabo *et al.* 1993, Cano *et al.* 1993, Jones *et al.* 1993, Luk *et al.* 1993, Way *et al.* 1993, Bej *et al.* 1994). Ancak bu çalışmalarda kullanılan PCR primerleri daha önce klonlanmış bazı genler baz alınarak tasarlanmıştır. Gen izolasyonu, DNA baz diziliminin belirlenmesi ve yalnızca ilgili mikroorganizmada bulunan bölgelerin tespiti oldukça fazla zaman alan yorucu bir ön çalışma niteliğindedir. Alternatif bir yaklaşım, yine PCR kullanımını içeren ancak DNA bazında herhangi bir ön bilgi gerektirmeyen yöntemlerin kullanımınıdır. Bu yöntemler RAPD (Williams *et al.* 1990), AP-PCR (Welsh & McClelland 1990) ve DAF (Caetano-Anolles *et al.* 1991) kısaltılmış adları ile literatürde yer almışlardır. Diğerlerinde olduğu gibi RAPD-PCR tekniğinde de (Random Amplified Polymorphic DNA) başlıca yaklaşım kısa ve gelişigüzel seçilmiş primerlerin PCR'da kullanımınıdır. Bu primerler hedef mikroorganizma'nın DNA'sında önceden belirlenmemiş

bölgelere bağlanarak amplifikasyona neden olmakta ve böylelikle bazı DNA profilleri ortaya çıkarabilmektedir. Bu DNA profilleri aracılığı ile mikroorganizmaların karşılaştırılması, hatta spesifik bölgelerin bulunması mümkün olabilmektedir. Çalışmalar belli bir hedefe sahip olmadığı için etkin DNA markerlerinin ortaya çıkartılması olabildiğince çok sayıda primerin çok sayıda mikroorganizmaya karşı taranmasını gerektirmektedir. RAPD-PCR tekniği bugüne kadar özellikle tanımlama amacı ile taksonomik çalışmalarda kullanılmıştır. *Listeria monocytogenes* (Lawrence *et al.* 1993), *B. subtilis*, *T. littoralis* (Meunier & Grimont 1993) ve *F. graminearum* (Ouellet & Seifert 1993) bu çalışmalara örnek olarak verilebilir. RAPD-PCR *Haloferax mediterranei* adlı mikroorganizma'da teşhis amacı ile kullanılabilir bir probun hazırlanmasında da kullanılmıştır (Martinez-Murcia & Rodriguez-Valera 1994).

Aşağıda detayları yer alan proje'nin içerdiği çalışmalar özetle *Salmonella* hücre ekstraktlarının ve 10 adet primerin RAPD-PCR'da kullanımını ve ortaya çıkan sonuçların olası DNA markerlerinin elde edilmesi yönünde değerlendirilmesini içermektedir.

Gelişme

1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda J. Marmur tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır (Marmur, 1961). Önceleri küçük miktarlarda, 10 ml kültürden DNA izole edilmiştir. Bunda başarılı sonuç alındığı için tüm serotiplerden PCR'da kullanılmak üzere bu şekilde DNA hazırlanmıştır. Buna karşılık PCR çalışmalarında parametrelerin denenmesi aşamasında bu DNA'ların çoğu harcanmıştır. Bu noktada amaç yöntemi geliştirerek daha fazla miktarda DNA'yı tek seferde elde etmek olmuştur, ancak küçük ölçekten büyük ölçeğe geçerken (scale-up) pek çok sorunla karşılaşmıştır. Örneğin küçük ölçekte SDS ile hücreler başarı ile parçalanmasına rağmen büyük ölçekte jelimsi bir yapı oluşmuş ve bu yapı kloroform ekstraksiyonu sırasında faz ayrışımını engellemiştir. Bu sorunları engellemek amacı incelenen parametreler sırası ile şöyledir; farklı SDS konsantrasyonlarının denemesi, proteinase K kullanılması, fenol kullanılması, hücre konsantrasyonunun optimizasyonu (hücre büyüme eğrilerinin çizilmesi ve jel oluşumunun başladığı hücre konsantrasyonunun belirlenmesi).

2. Saf Kromozomal DNA ile RAPD-PCR

10 adet RAPD-PCR primer'i tasarlanmış ve bu primerler ile (Tablo 1) çalışmalara başlanmıştır.

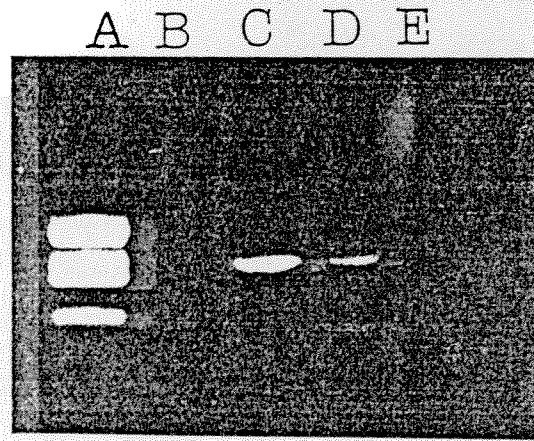
Uygulanan RAPD-PCR koşullarında amplifikasyon elde edilmiştir. Öncelikle farklı DNA konsantrasyonlarında optimizasyon yapılmıştır (Şekil 1). Buna göre kullanılacak DNA miktarı 50 ng/reaksiyon olarak belirlenmiştir. Daha sonra primerler bu DNA miktarı baz alınarak denenmiştir. Daha önceden elde edilen *Fusarium* spp. genomik DNA'sı ile primerler olumlu sonuç vermiştir, ancak *Salmonella* DNA'sı ile aynı derecede tutarlı sonuçlar elde edilememiştir. Buna göre PCR tekniğinin çalışmakta olduğu ancak, daha önce de belirtildiği

gibi, *Salmonella*'dan genomik DNA izolasyonunda yeterli saflığa ulaşılamadığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 1 RAPD-PCR'da kullanılan primerlerin baz sıralaması

<u>Primer sıralaması</u>	<u>Nucleotit sıralaması</u>
Primer 1(8mer)	5'-GCC GAG CG-3'
Primer 2(8mer)	5'-CTG AGC GC-3'
Primer 3(9mer)	5'-CGT GCA CGC-3'
Primer 4(9mer)	5'-GAC GCC GTG-3'
Primer 5(9mer)	5'-CAG TCA GCG-3'
Primer 6(9mer)	5'-GCA NGT CGC-3'
Primer 7(10mer)	5'-TCA CGA TGC A-3'
Primer 8(10mer)	5'-ACT GAT CAG G-3'
Primer 9(10mer)	5'-GCA NTG CGC T-3'
Primer 10(10mer)	5'-CGG TCA GTC C-3'

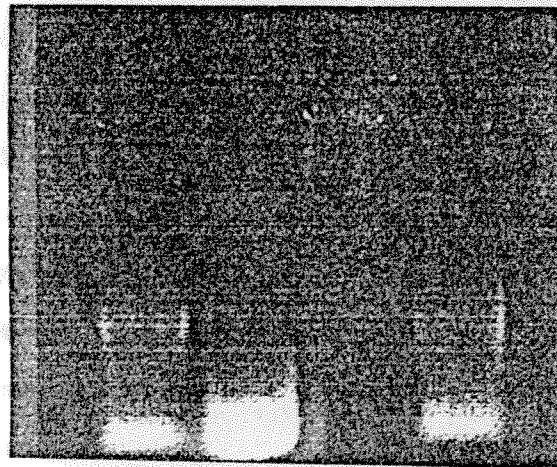
N; A, C, G, ya da T olabilir.



Şekil 1. Marker DNA (A) 25 ng/ reaksiyon *Salmonella* DNA (B) 50 ng/ reaksiyon *Salmonella* DNA (C) 100 ng/ reaksiyon *Salmonella* DNA (D) 150 ng/ reaksiyon *Salmonella* DNA (E). PCR döngüsü: 95°C, 5 dk; 40X(95°C, 1 dk; 35°C, 1 dk; 72°C, 2 dk); 55°C, 3 dk.

Marmur'un DNA izolasyonu yönteminde (Marmur,1961) karşılaşılan sorunlar sonucunda hücre konsantrasyonunun fazla olabileceği düşüncesi ile ekim miktarı ve inkübasyon süresi azaltılmıştır. Hücreler %0.1 inokulumda ve 37°C de 14-15 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra santrifüjle toplanıp DNA izolasyonu yapılmıştır. Bunun yanında hücreleri parçalamak için kullanılan SDS miktarı optimize edilmiştir. Ancak her iki koşulda da istenilen düzeyde DNA izole edilememiştir. Daha sonraki çalışmalarda hücreleri parçalamak için SDS'e ek olarak lizozim kullanımı denenmiştir. Ancak lizoziminde olumlu bir etkisi görülmemiştir. Son olarak kloroform/izoamilalkol ekstraksiyonu yerine fenol/kloroform/izoamilalkol ekstraksiyonu yapılmış, ayrıca bir başka denemede de proteinaz K (100µg/ml) kullanılmıştır. Fenol ekstraksiyonunda Marmur'un yöntemi aynen kullanılmıştır yalnızca kloroform/ izoamilalkol yerine fenol/kloroform/izoamilalkol (25:24:1) oranında eklenmiştir. Proteinaz K ise SDS aşamasından sonra 100µg/ml olacak biçimde eklenmiş ve 37°C de 4 saat bekletildikten sonra DNA izolasyonuna devam edilmiştir. Fenol/kloroform/izoamilalkol ekstraksiyonu ve Proteinaz K ile oldukça fazla miktarda DNA elde edilmiştir (Şekil 2).

A B C D



Şekil 2% SDS + proteinaz K + kloroform izoamil alkol (A), 1% SDS + proteinaz K + fenol/kloroform izoamil alkol (B), 1% SDS + Fenol/ kloroform izoamil alkol (C), 2% SDS + fenol/kloroform izoamil alkol (D).

DNA saflığı spektrofotometre ile 260 ve 280 nm lerde absorban ölçümü yapılarak belirlenmiştir ve bu sonuçlar Tablo 2’de sunulmuştur. OD260/ OD280 oranının 1.8’den yüksek olduğu durumlarda DNA saflığının yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 2 DNA saflık sonuçları

Yöntem	OD260	OD280	OD260/ 280
K//P.K	0,07	0,03	1,94
F+ %1SDS	0,11	0,06	2
F/K//P.K	0,07	0,03	2,03

K:kloroform, Lizoamilalkol, P.K: Proteinaz K, F:fenol

SDS: sodyum dodesil sülfat

Elde edilen DNA yeterli saflığa sahip olduğu halde RAPD-PCR amplifikasyonundan olumlu sonuçlar elde edilememiştir. Bu sorunu ortadan kaldırmak amacı ile çeşitli yaklaşımlar denenmiştir. Bunların başında izolasyon sırasında SDS sonrası eklenen yüksek konsantrasyonda tuzun (sodyum asetat) DNA ile taşınabileceği ve Taq polimeraz aktivitesini olumsuz yönde etkileyebileceği göz önünde bulundurulmuştur. Ayrıca RNA ların fazla oluşunun etkisi ve bunların Rnase kullanılarak yok edilmesi, PCR’da ısınma ve soğuma hızlarının değiştirilmesi gibi yaklaşımlardan olumlu sonuçlar alınmamıştır. Burada belirtilmesi gereken bir husus SDS sonrasında eklenen sodyum asetatın eklenmemesinin aslında değerlendirmesinin tam yapılamamış olmasıdır, çünkü bu durumda DNA izolasyonu olumsuz yönde etkilenmiştir.

TeCrübelere dayanarak PCR’da karşılaşılan sorunun hücre kaynaklı olmasından ziyade izolasyon yönteminde kullanılan bazı kimyasallardan kaynaklandığı düşünülmüş ve bunu test etmek için doğrudan hücre ekstraktlarının PCR’da kullanılmasına karar verilmiştir.

3. Hücre Ekstraktı Eldesi ve PCR'da Kullanılması

Hücre ekstraktı iki ayrı yöntem ile elde edilmiştir. Bunlardan birincisi hücrelerin toplanarak kaynatılması ve ikincisi sonikasyon uygulanmasıdır.

3.1 Kaynatma ile hücre parçalanması:

Salmonella 10 ml nutrient broth'da 37°C de büyütüldükten sonra yaklaşık 4-5 ml'den toplanan hücreler bir eppendorf içinde toplanmış ve 50µl saf steril su içinde çözülmüştür. Hücreler daha sonra kaynayan suda 12 dakika bekletilmiş ve oluşan hücre debrisı 5 dk santrifüjlenerek üstteki sıvı fazdan ayrılmıştır. Oluşan hücre ekstraktı belirli miktarlarda PCR'da kullanılmıştır. Denenen miktarlar şöyledir: 1, 2 ve 5 µl doğrudan hücre ekstraktından ve 1 µl 50 x seyreltilmiş hücre ekstraktından çeşitli zamanlarda reaksiyona eklenmiştir.

3.2 Sonikasyon ile hücre parçalanması:

Salmonella 100 ml nutrient broth içinde 37°C de büyütüldükten sonra hücreler toplanmış, 8 ml saf steril su içinde çözülmüş ve 150 saniye Sanyo soniprep de sonikasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen hücre ekstraktından 500 µl bir eppendorf tüpüne aktarılmış ve santrifüjlenerek hücre debrisinden ayrılmıştır. Üstteki sıvı fazdan bir miktar alınıp PCR da kullanıldı. Kullanılan miktarlar kaynatma yöntemindeki gibidir.

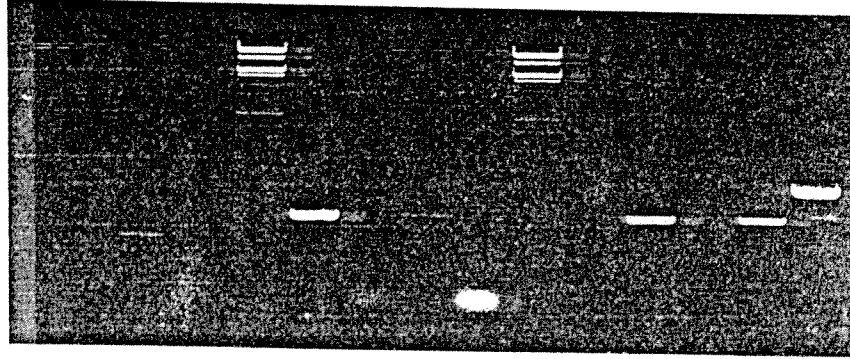
4. Toplam Hücre Ekstraktı ile RAPD-PCR

Kaynatma ve sonikasyon yöntemi ile hücre ekstraktı elde edilmesi ve bunun doğrudan PCR'da kullanılması oldukça başarılı sonuçlar vermiştir. Buna rağmen çalışmalarda sonikasyon yerine kaynatma yöntemine ağırlık verilmiştir. Bunun nedeni sonikasyon uygulamasının sonikatör alımını gerektirmesi buna karşılık kaynatmanın her laboratuvarında uygulanabileceği düşüncesidir. Bu yaklaşımlarla yapılan bir dizi deneyin ilki aşağıda sunulmuştur (Şekil 3). Bu deneyde *S.typhimurium* ve kontrol olarak *E.coli* den kaynatma ve

sonikasyonla hücre ekstraktı elde edilmiş ve yukarıda anlatılan yöntemle uygun olarak RAPD-PCR yapılmıştır.

Kaynatma yöntemi ile sürdürülen RAPD-PCR çalışmaları sırasında doğal olarak yine çeşitli sorunlarla karşılaşmış ancak bunların hepsi çözümlenmiştir. Örneğin ilk deneylerde elde edilen başarılı sonuçlar daha sonraları elde edilememiş bunun nedeninin hücrelerin geçurma fazında toplanması olduğu tespit edilmiştir. Bu aşamada büyüme eğrileri belirlenmiş ve buna göre inokulasyon ve büyüme süreleri optimize edilmiştir (Ek 1). Bunun yanısıra uzun süredir kullanılan Taq polimeraz enziminin inaktive oluşu, çeşitli elektrik kesintileri, PCR makinesinin kalibrasyonunun bozulması ve yeniden bütün sistemin elden geçirilmesi, aletin çalışır hale getirilmesi gibi teknik sorunlar da yaklaşık 1.5 aylık bir süre çalışmaları aksatmıştır.

A B C D E F G H I J K L M N



Şekil 3 (1) *E.coli*(kaynatma) 5µl + RAPD 92, (2) *E.coli*(kaynatma) 1µl + RAPD 93, (3) *E.coli*(kaynatma) 5µl + RAPD 93, (4) *S.typhimurium* (kaynatma) 1µl + Williams, (5) *S.typhimurium* (kaynatma) 5µl + Williams, (6) *S.typhimurium* (kaynatma) 1µl+RAPD 93, (7) *S.typhimurium* (kaynatma) 5µl + RAPD 93, (8) *E.coli* (sonikasyon) 5µl + RAPD 93, (9) *S.typhimurium* (sonikasyon) 5µl + Williams, (10) *E.coli* (sonikasyon) 2µl + RAPD 93, (11) *S.typhimurium* (sonikasyon) 2µl + Williams, (13) pXL + 623/625 (+) kontrol (ayrıca resimde görülmeyen iki ayrı (-) kontrol kullanılmıştır. PCR döngüsü: 95°C, 5 dk; 40X(95°C, 1 dk; 35°C, 1 dk; 72°C, 2 dk); 55°C, 3 dk.

4.1. RAPD-PCR optimizasyon ve standardizasyonu

PCR'da kullanılan hücre ekstraktları logaritmik fazın sonunda ya da durağan fazın başında toplanılan hücrelerden hazırlanmıştır. Bu amaçla büyüme eğrisi hazırlanmıştır ve optik yoğunluk (OD) ölçümleri 420nm de 1.3 ve 2.0 arasındakiler PCR'da kullanılmıştır. Hücre ekstraktlarının kaynatma yöntemi ile elde edilmesinden dolayı, kaynatma zamanı dikkate alınması gereken bir parametre olarak incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda dört farklı kaynatma zamanında elde edilen *S.typhimurium* hücre ekstraktları primer7 (Tablo 1) ile RAPD-PCR'da kullanılmış, bunun yanısıra farklı miktarlarda hücre ekstraktı eklenerek en uygun miktar tespit edilmeye çalışılmıştır. Sonuç itibarı ile en uygun koşullar 15 dakika kaynatma zamanı ve 1 µl hücre ekstraktı kullanımı olarak belirlenmiştir (Şekil 4).

a b c d e f g h i j k l m n p q r s



Şekil 4 (A) 5µl *S.typhimurium* hücre ekstraktı, 12 dak. kaynatma, (B) 3µl *S.typhimurium* , 12 dak. kaynatma, (C) 1µl *S.typhimurium* , 12 dak. kaynatma, (D) 0.5µl *S.typhimurium* , 12 dak. kaynatma, (E) 1:3 seyreltme *S.typhimurium* , 12 dak. kaynatma, (F) 1:5 seyreltme *S.typhimurium* , 12 dak. kaynatma, (G) 1:10 seyreltme *S.typhimurium* , 12 dak. kaynatma, (H) DNA size marker1 (Ek 2), (I) 3µl *S.typhimurium* , 15 dak. kaynatma, (J) 1 µl *S.typhimurium* , 15 dak. kaynatma, (K) 1:3 seyreltme *S.typhimurium* , 15 dak. kaynatma, (L) 3µl *S.typhimurium* , 10 dak. kaynatma, (M) 1 µl *S.typhimurium* ,10 dak. kaynatma, (N) 1:3 seyreltme *S.typhimurium* ,10 dak. kaynatma, (P) 3 µl *S.typhimurium* , 5 dak. kaynatma, (Q) 1 µl *S.typhimurium* ,5 dak. kaynatma, (R) 1:3 seyreltme *S.typhimurium* ,5 dak. kaynatma, (S) negatif kontrol (DNA yok,primer7). Bütün reaksiyonlarda primer7 kullanılmıştır. PCR döngüsü: 95°C, 5 dak; 35X(95°C, 1 dak; 35°C, 1 dak; 72°C, 2 dak); 55°C, 3 dak.

RAPD-PCR sonuçlarına göre *Salmonella* 10^9 cfu/ml düzeyinde teşhis edilebilmektedir. Literatürde 1-10 *Salmonella* hücrelerinin PCR'la teşhis edilebildiği açıklanmıştır ancak burada yapılan çalışmalar hassasiyeti artırmak için ön zenginleştirmenin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu sonuca varılmasında uygulanan yöntemde *Salmonella* hücre sayımı yapılmış ve PCR'da kullanılan hücre ekstraktı 10cfu/ml'ye kadar seyreltilmiştir. Amplifikasyon yalnızca, 9 saatlik bir önzenginleştirme sonunda ulaşılabilen, 10^9 cfu/ml düzeyinde elde edilebilmiştir.

4.2 Primerlerin RAPD-PCR'daki verimliliklerinin araştırılması

Amplifikasyonların standardizasyonunu takiben, *S.typhimurium* hücre ekstraktları RAPD-PCR'da kullanılmak üzere Tablo 1'de listelenen 10 farklı primere karşı denenmiştir. Primerlerin tasarımında dikkat edilen noktalar %G+C nin % 50-70 civarında olması ve palindromik sekansların bulunmamasıdır. Bunun dışında dizilimler tamamen rastgele belirlenmiştir.

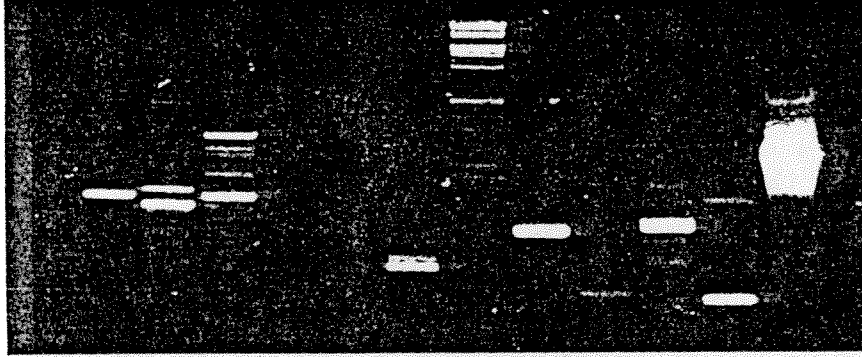
RAPD-PCR amplifikasyonunun sonuçları Şekil 5'te gösterilmiştir. *S.typhimurium* primer7 ile bir spesifik amplifikasyon bandı vermiştir. Primer4 ve primer5 hiçbir amplifikasyon ürünü vermezken, diğer primerler farklı büyüklüklerde amplifikasyon bandları vermişlerdir. Buna göre primer3, 9 ve 6 ayırt edilebilir fragmanlar verdiklerinden dolayı putatif tanımlama ve sınıflandırma primeri olarak seçilmiş ayrıca primer7 tek ve spesifik bir amplifikasyon bandı verdiği için putatif teşhis primeri olarak denenmesine karar verilmiştir.

4.3. *Salmonella* serotiplerinin primer 7'ye karşı taranması

Bu araştırmada kullanılan *Salmonella* izolatları Tablo 3'de sunulmaktadır. Bu izolatlar kullanılarak primer7 ile yapılan RAPD-PCR amplifikasyonunun sonuçları şekil 6'da görülmektedir. Buna göre kullanılan 14 farklı *Salmonella* serotipinden 11 tanesi 550 bp civarında spesifik bir amplifikasyon bandı vermiştir. *S.baildon* hiçbir sonuç vermezken *Salmonella B group* ve *S.bahrenfeld* farklı büyüklükte amplifikasyon bantları vermişlerdir. Sonuç olarak test edilen *Salmonella* serotiplerinin yaklaşık %80'i 550 bp civarında aynı

şekilde tek ve spesifik amplifikasyon ürünü vermişlerdir. Hernekadar tüm Salmonellalar aynı sonucu vermediyse de sonuç oldukça olumlu sayılabilmektedir.

A B C D E F G H I J K L



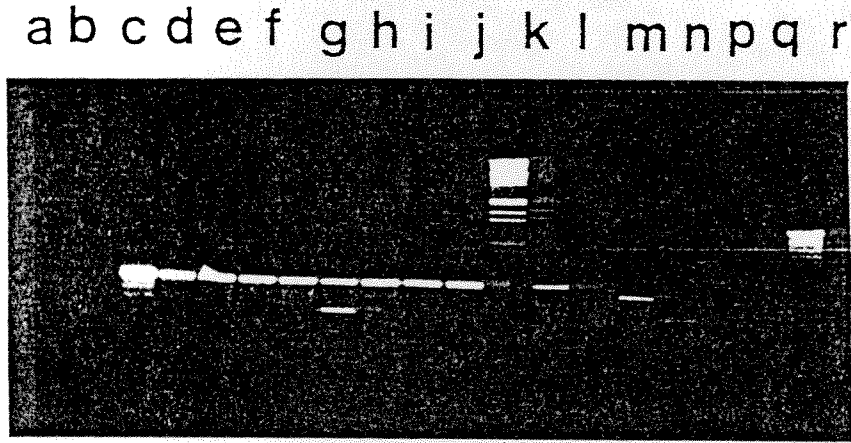
Şekil 5 1µl *S.typhimurium* hücre ekstratı ve (A) primer1, (B) primer2, (C) primer3, (D) primer4, (E) primer5, (F) primer6, (G) DNA size marker1 (Ek 2), (H) primer7, (I) primer8, (J) primer9, (K) primer10, (L) pozitif kontrol pBO.9+315/316. PCR döngüsü: 90°C, 5 dak; 40X(89°C, 1 dak; 32°C, 1 dak; 70°C, 2 dak); 50°C, 3 dak.

Tablo 3 RAPD-PCR'da kullanılan *Salmonella* serotipleri

	<u>Kaynak</u>
<i>Salmonella typhimurium</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Salmonella enteritidis</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Salmonella typhi</i>	Ankara Üniversitesi Ziraat Fak.
<i>Salmonella paratyphi B</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Salmonella rissen</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Salmonella bairdson</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Salmonella anatum (exconj)</i>	ODTÜ Biyoloji Bölümü
<i>Salmonella anatum (rif)</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Salmonella D group</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Salmonella B group</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Salmonella orion</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Salmonella glostrup</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Salmonella strasbourg</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Salmonella bahrenfeld</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara

4.4 *Salmonella* dışındaki suşlarla ve primer 7 ile RAPD-PCR amplifikasyonları

Primer 7'nin *Salmonella* dışındaki suşlarla da benzer 550 bp lik amplifikasyon bandı verip vermediğini test etmek amacıyla *Salmonella* dışındaki suşların hücre ekstraktları primer 7 ile birlikte RAPD-PCR analizinde kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan *Salmonella* dışındaki suşlar Tablo 4'de gösterilmektedir. RAPD-PCR sonuçları şekil 7'de sunulmuştur.



Şekil 6 (A) *S.typhimurium*, (B) *S.typhi*, (C) *S.enteritidis*, (D) *S.anatum (exconj)*, (E) *S.anatum (rif)*, (F) *S.strasbourg*, (G) *S.glostrup*, (H) *S.orion*, (I) *Salmonella D group*, (J) *S.paratyphi B*, (K) *S.rissen*, (L) *S.bahrenfeld*, (M) *Salmonella B group*, (N) *S.baildon*, and primer 7, (P) negatif kontrol (DNA yok, primer 7), (Q) pozitif kontrol pBO.9+315/316. Her reaksiyonda 1 µl hücre ekstraktı kullanıldı. PCR döngüsü: 90°C, 5 dak; 35X(89°C, 1 dak; 32°C, 1 dak; 70°C, 1.5 dak); 50°C, 3 dak.

Elde edilen sonuçlar özetlenecek olursa *P.fluorescence*, *P.vulgaris*, *L.monocytogenes* ve *L.bulgaricus* *S.typhimurium* dan elde edilen 550 bp lik banda benzer amplifikasyon ürünleri ortaya çıkarmışlardır. Buna karşılık *E.coli*, *Y.enterocolitica*, *C.ballerup*, *Cl.perfringens*, *S.boydii* ve *K.pneumoniae* farklı amplifikasyon bandları vermişlerdir. *S.aureus*, *S.thermophilus*, *B.subtilis* ve *S.marcescens* 'te amplifikasyon gözlenmemiştir. Buna göre primer 7 kullanılarak elde edilen amplifikasyon bölgesinin büyük olasılıkla *Salmonella* dışındaki diğer organizmalarda da bulunduğu görülmektedir. En azından bu sonuca göre primer 7'nin tek başına PCR'da *Salmonella* teşhisinde marker olarak kullanılamayacağı ortaya çıkmaktadır. Buna karşılık akla gelen bir diğer uygulama aynı sonucu vermeyen *E. coli* ve,

serolojik ve biyokimyasal yöntemlerle *Salmonella*'dan ayırd edilmesi güç olan, *Citrobacter* gibi suşlardan *Salmonella*'nın ayırd edilmesinde primer7'nin kullanımıdır (Finegold, 1978). Yine görülmektedirki primer7 denenen bütün suşlarda olmamakla beraber pekçok bakteriyel suş'da polimorfik bölgeleri ortaya çıkarabilmektedir. Ayrıca *Cl. perfringens* tüm *Salmonella* serotiplerinden ve *Salmonella*-harici suşlardan farklı bir amplifikasyon ürünü ortaya çıkarmıştır. Buna göre primer 7'nin *Cl. perfringens*- spesifik bir DNA marker'i oluşturup oluşturamayacağı yönünde ileride bir araştırma yapılması olasılığı ortaya çıkmıştır.

Tablo 4 RAPD-PCR'da kullanılan diğer kültürler

	<u>Kaynak</u>
<i>Escherichia coli</i>	ODTÜ Gıda Müh. Bölümü
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ODTÜ Gıda Müh. Bölümü
<i>Shigella boydii</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ODTÜ Gıda Müh. Bölümü
<i>Bacillus subtilis</i>	ODTÜ Gıda Müh. Bölümü
<i>Proteus vulgaris</i>	ODTÜ Gıda Müh. Bölümü
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	ODTÜ Gıda Müh. Bölümü
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ODTÜ Gıda Müh. Bölümü
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	ODTÜ Gıda Müh. Bölümü
<i>Clostridium perfringens</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Citrobacter ballerup</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Listeria monocytogenes</i>	ODTÜ Gıda Müh. Bölümü
<i>Serratia marcescens</i>	Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara
<i>Staphylococcus aureus</i>	ODTÜ Gıda Müh. Bölümü

4.5 *Salmonella* serotipleri ve primer 3 & primer 6 ile RAPD-PCR amplifikasyonları

Dejenere (redundant) primer 6 ve 9 yanısıra primer3 daha önce belirtildiği gibi olası tanımlama primerleri olarak seçilmişlerdir. Belirli pozisyonlara her 4 nükleotitin eklenmesiyle oluşturulan dejenere primerler RAPD-PCR'da oluşturulan band sayısını artırmak olasılığını test etmek için tasarlanmıştır. Başlangıçta primer 6 *S.typhi*, *S.paratyphi B*, *S.enteritidis* ve *Salmonella D group* serotipleri ile kullanılmış ve olumlu sonuçlar vermiştir.

Diğer yandan, primer9 ayırt edilebilir amplifikasyon bantları vermemiştir. Bu nedenle primer6'nın diğer *Salmonella* serotipleri ile de PCR'da kullanılmasına karar verilmiştir.

Primer 6 amplifikasyonlarının sonuçlarına göre *S.glostrup*, *S.baildon* ve *S.anatum(rif)* dışındaki *Salmonella* serotipleri amplifike olmuştur (Şekil 8). *S.typhi*, *Salmonella D group* ve

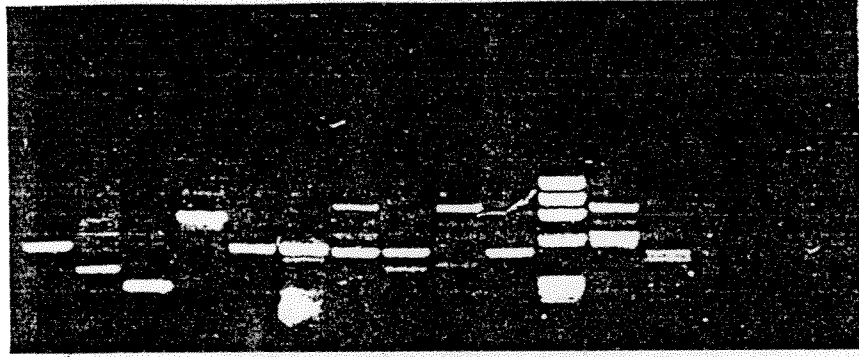
Sonuç

RAPD-PCR *Salmonella* serotiplerinin birbirinden polimorfik DNA'nın amplifike edilmesi ile ayrılmasında olumlu sonuçlar vermiştir. Buna rağmen bu çalışmada *Salmonella* serotipleri ancak 3 farklı primerin profillerinin birlikte kullanılması ile ayırt edilebilmiştir. Daha fazla primeri taramak ve test edilen tüm *Salmonella* serotipleri için farklı ve belirgin profilleri ortaya çıkaracak bir primer bulunması bu çalışmada standardize edilen yöntemin uygulanması ile mümkün olabilir.

Bu çalışmada test edilen farklı bir yaklaşım da organizmanın DNA'sının genus, tür ya da suş spesifik bölgelerinin rastgele amplifikasyonlarla ortaya çıkarılmasıdır. RAPD-PCR ile rastgele amplifike edilen 550 bplik DNA fragmanı test edilen *Salmonella* serotipleri arasından, insan enfeksiyonlarında görülen en önemli serotipleri de içererek, %80'inde primer 7'ye karşı gözlemlenmiştir. *Salmonella*'nın 550 bplik güçlü amplifikasyon ürünü 16 *Salmonella*-harici mikroorganizmaya karşılık genus-spesifik marker olarak test edilmiştir. Buna göre, *Salmonella* dışındaki mikroorganizmalar arasında *Citrobacter ballerup*, *Escherichia coli* ve Enterobacteriaceae familyasından diğer organizmalar, önemli patojenler *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium perfringens* farklı ve ayırt edilebilir amplifikasyon profilleri vermişlerdir. 550 bplik fragman yalnızca *Pseudomonas fluorescence* ve *Lactobacillus bulgaricus*'da gözlenmiştir. Özellikle *Cl. perfringens* ile elde edilen farklı sonuç primer 7'nin bu mikroorganizma'nın PCR ile hızlı bir şekilde teşhis edilmesi yönünde ümit vericidir.

Primer 3 ve dejenere primer 6 olası tanımlama primeri olacak biçimde amplifikasyon ürünleri vermiştir. Primer 6 *S.typhi*, *Salmonella* D grup ve *S.paratyphi* B'ye karşı ayırt edilebilir amplifikasyon şekilleri oluşturmuştur. Bunların dışındaki *Salmonella* serotipleri farklı yoğunluklarda tek bir DNA bandı vermişlerdir. Sonuçlara göre, PCR bandlarının sayısı RAPD-PCR'da dejenere primer kullanılarak istenilen ölçüde artırılmamıştır. RAPD-PCR sonuçları mikroorganizmaların antijenik olarak sınıflandırıldığı Kauffmann ve White şeması

a b c d e f g h i j k l m n p q r

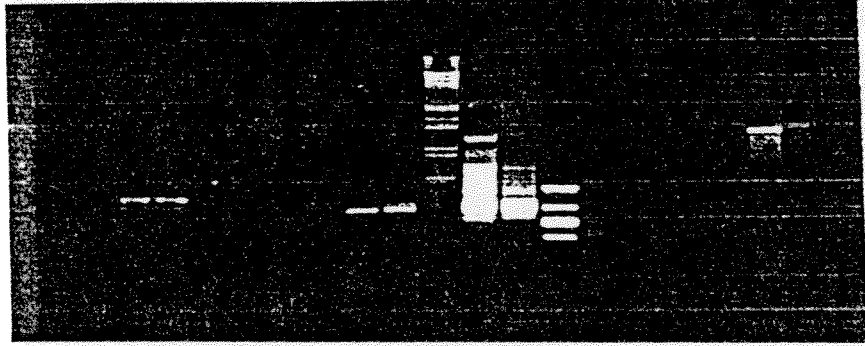


Şekil 7 (A) *S.typhimurium*, (B) *Y.enterocolitica*, (C) *C.ballerup*, (D) *Cl.perfringens*, (E) *P.fluorescence*, (F) *P.vulgaris*, (G) *E.coli*, (H) *L.monocytogenes* (I) *S.boydii*, (J) *L.bulgaricus*, (K) DNA size marker2 (Ek 2), (L) *E.aerogenes*, (M) *K.pneumoniae*, (N) *S.aureus*, (P) *S.thermophilus*, (Q) *B.subtilis*, (R) *S.marcescens*, and primer7. Her reaksiyonda 1µl hücre ekstraktı kullanıldı. PCR döngüsü: 90°C, 5 dak; 35X(89°C, 1 dak; 32°C, 1 dak; 70°C, 1.5 dak); 50°C, 3 dak.

S. paratyphi B ayırt edilebilir amplifikasyon şekilleri vermişlerdir. *S.typhi*'nin amplifikasyon şekli bazı noktalarda *Salmonella* D grub'unkine benzemektedir. Ancak *S.typhi* diğer *Salmonella* serotiplerinden glukozda gaz üreterek ayırt edilebilir (Lennette,1974). Bunlara ek olarak, *S.anatum(exconj)*, *S.bahrenfeld*, *Salmonella* B group, *S.rissen*, *S.orion* ve *S.strasbourg* 415 bp büyüklüğünde tek ve spesifik band vermişlerdir. Buna karşılık, bu serotiplerin Kauffmann ve White (Krieg,1984) şemasında farklı antijenik gruplar altında bulunduğu görülmüştür.

PCR'da tek primer kullanımının verimliliği konusunda oluşan şüpheler karşısında farklı primer kombinasyonları ile elde edilecek iki primer kullanımının denenmesine karar verilmiştir. Bu uygulamanın amplifikasyon bandlarının sayısını artırıp artıramayacağını görmek için, primer kombinasyonları PCR'da *S.typhimurium* hücre ekstraktları ile birlikte kullanılmıştır (Şekil 9).

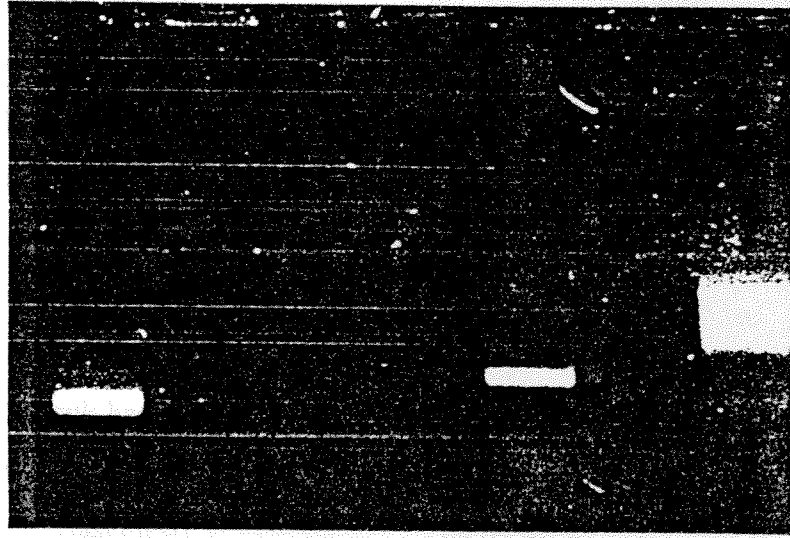
a b c d e f g h i j k l m n p q r



Şekil 8 (A) *S.anatum (exconj)*, (B) *S.bahrenfeld*, (C) *Salmonella B group*, (D) *S.rissen*, (E) *S.orion*, (F) *S.strasbourg*, (G) *S.enteritidis*, (H) *S.typhimurium*, (I) DNA size marker2 (Ek 2), (J) *S.typhi*, (K) *Salmonella D group*, (L) *S.paratyphi B*, (M) *S.glostrup*, (N) *S.baildon*, (P) *S.anatum (rif)*, ve primer6 , (Q) negatif kontrol (DNA yok+primer6), (R)pozitif kontrol, pBO.9+315/316. Her reaksiyonda 1µl hücre ekstraktı kullanıldı. PCR döngüsü: 90°C, 5 dak; 35X(89°C, 1 dak; 32°C, 1 dak; 70°C, 1.5 dak); 50°C, 3 dak.

Beklenen sonucun tersine, 5 primer çifti arasından yalnızca primer3 ve 6 kombinasyonu 500 bp civarında tek bir DNA bandı vermiştir. Dolayısı ile elde edilen sonuçlar primer kombinasyonu kullanımının band sayısını arttırmayıp tersine azalttığını ortaya koymuştur. Buna göre iki primerin varlığında tek primer ile elde edilen amplifikasyonların çoğunun engellendiği görülmekle birlikte bu konuda bir açıklama yapmak oldukça güçtür. Elde edilen amplifikasyon bandı *S.typhimurium* ve primer6 amplifikasyonunda elde edilen küçük bandlardan biri ile aynı büyüklüktedir. Ayrıca iki primerli PCR'da gözlenen küçük amplifikasyon bandı primer6 da ortaya çıkan büyük fragmanın kaybolmasını da beraberinde getirmiştir. Buna göre, daha küçük fragmanların amplifikasyonu daha büyük fragmanların sentezine baskın gelmiş olabilir. Diğer bir deyişle PCR sırasında primerler ve bağlanma bölgeleri arasındaki bir çekişmenin varlığı bu sonucu doğurmuş olabilir (Lankhorst, 1991).

A B C D E F G H

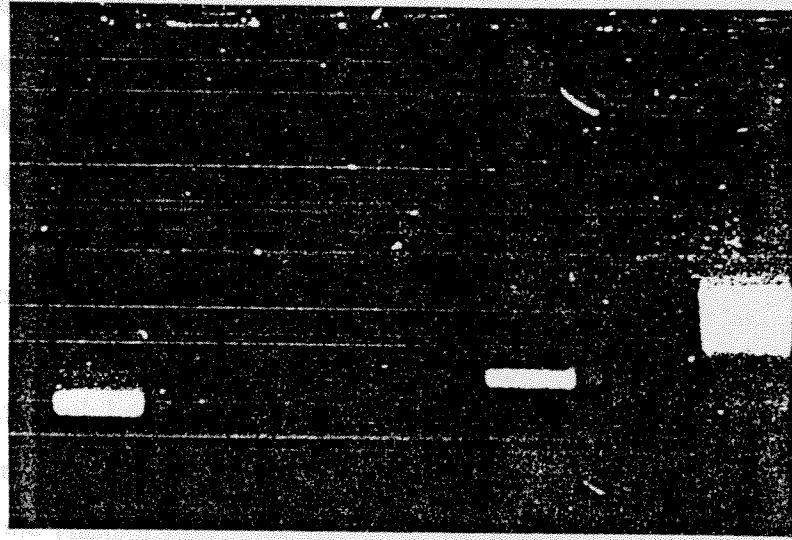


Şekil 9 1µl *S.typhimurium* and (A) primer2/4, (B) primer3/6, (C) primer2/8, (D) primer6/9, (E) primer3/10, (F) primer7, (G) negatif kontrol (primer yok, DNA), (H) pozitif kontrol pBO.9+315/316. PCR döngüsü: 90°C, 5 dak; 35X(89°C, 1 dak; 32°C, 1 dak; 70°C, 1.5 dak); 50°C, 3 dak.

Primer 3 aynı şekilde tüm *Salmonella* serotiplerine karşı RAPD-PCR'da kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 10'da sunulmuştur.

Şekil 10'da görülen amplifikasyon sonuçları iki gruba ayrılabilir. *S.bahrenfeld*, *S.glostrup*, *Salmonella D group* ve *S.orion* 831 bp civarında spesifik amplifikasyon bandı vermişlerdir ve *S.anatum (exconj)*, *S.anatum (rif)*, *Salmonella B group*, *S.bahrenfeld*, *S.strasbourg* ve *S.glostrup* 195 bp civarında spesifik amplifikasyon bandı vermişlerdir. 831 ve 195 bplik amplifikasyon bandlarının her ikisi de *S.anatum (exconj)*, *S.bahrenfeld*, *S.strasbourg* ve *S.glostrup* reaksiyonlarında görülmüştür. *S.typhi*, *S.paratyphi B* ve *S.enteritidis* herhangi bir seçilir amplifikasyon bandı vermemişlerdir. Buna göre 950 ve 300 bp lik amplifikasyon bandlarını veren bölgelerin polimorfik olduğu görülmektedir. Ayrıca bu amplifikasyonlar *Salmonella* dışında test edilen (Şekil 10) suşlarda gözlenmemiştir. Bu fragmanların aynı DNA bölgeleri olup olmadıkları Southern hibridizasyonu ile test edilebilir ve gerekirse bu bölgelerin klonlama ve sekans analizi yapılabilir. Ancak amplifikasyonların plazmid ya da kromosomal DNA kaynaklı olabileceği unutulmamalıdır.

A B C D E F G H



Şekil 9 1µl *S.typhimurium* and (A) primer2/4, (B) primer3/6, (C) primer2/8, (D) primer6/9, (E) primer3/10, (F) primer7, (G) negatif kontrol (primer yok, DNA), (H) pozitif kontrol pBO.9+315/316. PCR döngüsü: 90°C, 5 dak; 35X(89°C, 1 dak; 32°C, 1 dak; 70°C, 1.5 dak); 50°C, 3 dak.

Primer 3 aynı şekilde tüm *Salmonella* serotiplerine karşı RAPD-PCR'da kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 10'da sunulmuştur.

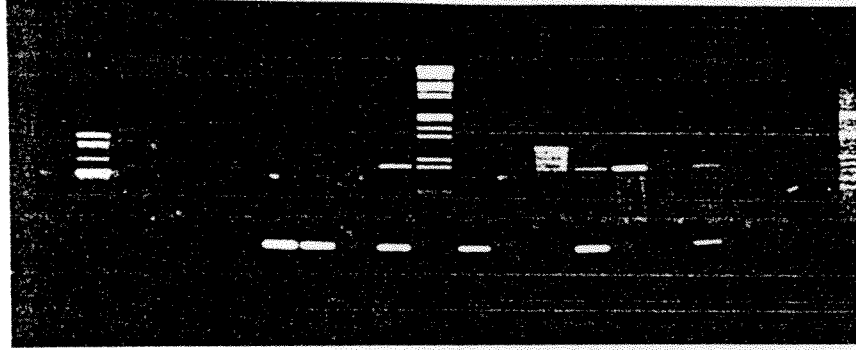
Şekil 10'da görülen amplifikasyon sonuçları iki gruba ayrılabilir. *S.bahrenfeld*, *S.glostrup*, *Salmonella D group* ve *S.orion* 831 bp civarında spesifik amplifikasyon bandı vermişlerdir ve *S.anatum (exconj)*, *S.anatum (rif)*, *Salmonella B group*, *S.bahrenfeld*, *S.strasbourg* ve *S.glostrup* 195 bp civarında spesifik amplifikasyon bandı vermişlerdir. 831 ve 195 bplik amplifikasyon bandlarının her ikisi de *S.anatum (exconj)*, *S.bahrenfeld*, *S.strasbourg* ve *S.glostrup* reaksiyonlarında görülmüştür. *S.typhi*, *S.paratyphi B* ve *S.enteritidis* herhangi bir seçilir amplifikasyon bandı vermemişlerdir. Buna göre 950 ve 300 bp lik amplifikasyon bandlarını veren bölgelerin polimorfik olduğu görülmektedir. Ayrıca bu amplifikasyonlar *Salmonella* dışında test edilen (Şekil 10) suslarda gözlenmemiştir. Bu fragmanların aynı DNA bölgeleri olup olmadıkları Southern hibridizasyonu ile test edilebilir ve gerekirse bu bölgelerin klonlama ve sekans analizi yapılabilir. Ancak amplifikasyonların plazmid ya da kromosomal DNA kaynaklı olabileceği unutulmamalıdır.

Sonuçlara göre *S.typhimurium* primer 3 ile diğer *Salmonella* serotiplerinde görülmeyen değişik bir amplifikasyon profili ortaya çıkarmıştır. Buna göre primer 3'ün *S.typhimurium*-spesifik bir DNA markerı çıkarmak amacı ile kullanılabilme olasılığı ortaya çıkmaktadır. Bu hipotezi test etmek için, primer 3 11 farklı *S.typhimurium* klinik izolatına karşı PCR'da kullanılmıştır (Şekil 11). Bu 11 izolatın her biri isal ve ateş şikayeti ile gelen farklı hastalardan Sn. Dr. Taner Yıldırım tarafından elde edilmiş ve altı tanesi Ankara Numune hastanesinden olmak üzere, iki tanesi Hacettepe Üniversitesi Çocuk hastanesinden, iki tanesi Dr. Sami Ulus Çocuk hastanesinden ve bir tanesi de A.Ü. Tıp Fakültesinden temin edilmiştir. Bu 11 izolatın ayrıca antibiyogramları ve plazmid profilleri de Dr. Taner Yıldırım'ın (Ankara Numune Hastanesi) yürütücülüğünde gerçekleştirilen ayrı bir TÜBİTAK projesinin kapsamında belirlenmiştir.

Şekil 11'de görüldüğü gibi, denenen tüm izolatlar aynı amplifikasyon şeklini vermiştir. Özellikle 831 ve 725 bplik amplifikasyon bandları tüm 11 farklı *S.typhimurium* izolatında gözlenmiştir. 935, 909 ve 195 bplik diğer amplifikasyon bandları ise farklı yoğunluklarda oluşmuşlardır. Burada belirtilmesi gereken bir diğer husus *S.typhimurium* izolatlarının farklı plazmid profillerine sahip olmalarına karşın (sonuçlar burada gösterilmemiştir) tümünün aynı amplifikasyon profillerini vermeleridir. Buna göre elde edilen amplifikasyon bandlarının plazmid kaynaklı olmadığı olasılığı kuvvet kazanmaktadır. *S.typhimurium*'un teşhis ve tanımlanmasında primer 3 ve RAPD-PCR yerine, 725 bp'lik bandın spesifik olarak kullanılma olasılığı göz önünde bulundurulabilir. Hernekadar benzer boyutta çok silik bir band *S. enteritidis*, *S. bahrenfeld* ve *S. strasbourg*' da da görülmüş olsa da (Şekil 10) bu bandların düşük yoğunlukları itibarı ile tek yönlü bir amplifikasyon ürünü olmaları, hatta spesifik olmama olasılıkları oldukça yüksektir. Bu bağlamda 725 bplik band jelden çıkartılabilir ve klonlanıp, DNA sekans analizi yapılarak daha detaylı incelenebilir. Bu bilgilerin ışığında, daha spesifik primerler tasarlanıp PCR'da kullanılabilir.

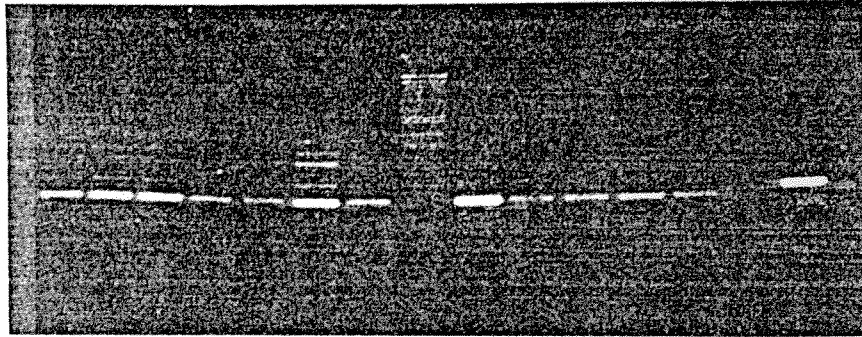
Sonuçlara göre *S.typhimurium* PCR'da primer3 ile diğer *Salmonella* serotiplerinden tamamen farklı amplifikasyon ürünleri vermiştir ve bu kayda değer bir sonuç olarak ileri aşamalarda değerlendirilebilir. Özet olarak primer3 test edilen primerler arasında en olumlu sonuçları vermiştir. Yinede denenen tüm *Salmonellalar* istenilen düzeyde, yani yeterli sayıda ve ayırd edilebilir, DNA bandları vermemiştir. Ancak bu sonuçlar, hernekadar bu çalışmada

a b c d e f g h i j k l m n p q r s t



Şekil 10 (A) *S.typhimurium*, (B) *S.typhi*, (C) *S.paratyphi B*, (D) *S.enteritidis*, (E) *E.coli*, (F) *S.anatum (exconj)*, (G) *S.anatum (rif)*, (H) *Salmonella B group*, (I) *S. bahrenfeld*, (J) DNA size marker2 (Ek 2) , (K) *S.strasbourg*, (L) *K.pneumoniae*, (M) pozitif kontrol pBO.9+315/316, (N) *S.glostrup*, (P) *S.orion*, (Q) *S.baildon*, (R) *Salmonella D group*, (S) *P.fluorescence*, (T) *S.rissen*, ve primer3, (U) negatif kontrol (DNA yok, primer3).Her reaksiyonda 1 µl hücre ekstraktı kullanıldı. PCR döngüsü: 90°C, 5 dak; 35X(89°C, 1 dak; 32°C, 1 dak; 70°C, 1.5 dak); 50°C, 3 dak.

a b c d e f g h i j k l m n p



Şekil 11 1µl *S.typhimurium* izolatlarının hücre ekstraktı; (a) *S.typhimurium*, (b) izolat 4, (c) izolat 5, (d) izolat 6, (e) izolat 10, (f) izolat 13, (g) izolat 18, (h) DNA size marker2 (Ek 2), (i) izolat 28, (j) izolat 29, (k) izolat 31, (l) izolat 45, (m) izolat 50, ve primer 3, (n) negatif kontrol,(primer 3 ve DNA yok), (p) pozitif kontrol (pXL ve primers 682/683). PCR döngüsü: 90°C, 5 dak; 35X(89°C, 1 dak; 32°C, 1 dak; 70°C, 1.5 dak); 50°C, 3 dak.

denen 10 primer ile olmasada, bir dizi daha farklı primerin denenmesi ile olumlu sonuçlara pekala ulaşılabileceği konusunda umut vericidir.

5. DNA Hibridizasyon Çalışmaları

Koloni blotting ve hibridizasyon primer7 ile 11 farklı *Salmonella* serotipinde amplifike olan 550 bp'lik bölgenin *Salmonella* dışındaki suşlarda da korunmuş bir bölge olup olmadığını görmek amacıyla yapılmıştır. Sonuçta probun *S.aureus* dışındaki tüm suşlarla hibridize olduğu görülmüştür (sonuçlar burada gösterilmemiştir). Bu sonuç 550 bp'lik PCR amplifikasyon bölgesinin *Salmonella* dışındaki suşlardan da elde edilmesi ile uyumludur. Buna göre 550 bp'lik bölgenin *Salmonella*'ya spesifik olmadığı bir kez daha ortaya çıkmıştır.

Sonuç

RAPD-PCR *Salmonella* serotiplerinin birbirinden polimorfik DNA'nın amplifike edilmesi ile ayrılmasında olumlu sonuçlar vermiştir. Buna rağmen bu çalışmada *Salmonella* serotipleri ancak 3 farklı primerin profillerinin birlikte kullanılması ile ayırt edilebilmiştir. Daha fazla primeri taramak ve test edilen tüm *Salmonella* serotipleri için farklı ve belirgin profilleri ortaya çıkaracak bir primer bulunması bu çalışmada standardize edilen yöntemin uygulanması ile mümkün olabilir.

Bu çalışmada test edilen farklı bir yaklaşım da organizmanın DNA'sının genus, tür ya da suş spesifik bölgelerinin rastgele amplifikasyonlarla ortaya çıkarılmasıdır. RAPD-PCR ile rastgele amplifike edilen 550 bplik DNA fragmanı test edilen *Salmonella* serotipleri arasından, insan enfeksiyonlarında görülen en önemli serotipleri de içererek, %80'ninde primer 7'ye karşı gözlemlenmiştir. *Salmonella*'nın 550 bplik güçlü amplifikasyon ürünü 16 *Salmonella*-harici mikroorganizmaya karşılık genus-spesifik marker olarak test edilmiştir. Buna göre, *Salmonella* dışındaki mikroorganizmalar arasında *Citrobacter ballerup*, *Escherichia coli* ve Enterobacteriaceae familyasından diğer organizmalar, önemli patojenler *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium perfringens* farklı ve ayırt edilebilir amplifikasyon profilleri vermişlerdir. 550 bplik fragman yalnızca *Pseudomonas fluorescense* ve *Lactobacillus bulgaricus*'da gözlenmiştir. Özellikle *Cl. perfringens* ile elde edilen farklı sonuç primer 7'nin bu mikroorganizma'nın PCR ile hızlı bir şekilde teşhis edilmesi yönünde ümit vericidir.

Primer 3 ve dejenere primer 6 olası tanımlama primeri olacak biçimde amplifikasyon ürünleri vermiştir. Primer 6 *S.typhi*, *Salmonella* D grup ve *S.paratyphi* B'ye karşı ayırt edilebilir amplifikasyon şekilleri oluşturmuştur. Bunların dışındaki *Salmonella* serotipleri farklı yoğunluklarda tek bir DNA bandı vermişlerdir. Sonuçlara göre, PCR bandlarının sayısı RAPD-PCR'da dejenere primer kullanılarak istenilen ölçüde artırılmamıştır. RAPD-PCR sonuçları mikroorganizmaların antijenik olarak sınıflandırıldığı Kauffmann ve White şeması

(Krieg, 1984) ile karşılaştırıldığında, antijenik sınıflandırma ve RAPD-PCR sonuçları arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

Primer3, test edilen primerler arasında, en olumlu sonuçları vermiştir. *S.typhimurium* primer 3'e karşı özellikle 725 bp'de-spesifik ve tümüyle ayırt edilebilir bir band şekli verdiği için de elde edilmiştir. Buna göre primer 3'ün veya elde edilen 725 bp'lik bandın PCR ile *S.typhimurium*-spesifik bir DNA markeri elde edilmesinde kullanılabileceği olasılığı ortaya çıkmaktadır.

Teşhisin hassasiyeti 9 saatlik önzenginleştirmeden sonra ulaşılan 10^9 cfu/ml olarak bulunmuştur. Buna göre *Salmonella*'nın teşhis ve tanımlanması için RAPD-PCR'da hücre ekstraktı kullanılması ile gerekli olan toplam süre 1 gündür. Bu durumda 3-4 gün süren konvensiyonel kültür metotlarına göre *Salmonella*'nın teşhisinde oldukça zaman kazanılmıştır.

RAPD-PCR'da hücre ekstraktı yerine saf kromozomal DNA kullanımı üzerine gidilebilir. Kromozomal DNA'nın saflaştırılması hem PCR'ın etkinliğini artırabilir, hem de stabil olmayan plazmidlerde karşılaşılabilecek sorunları engelleyebilir. Buna karşılık, hücre ekstraktı kullanımı çalışmalarını hızlandırması açısından yine de tercih edilebilir, zira elde edilebilecek, ticari öneme sahip bir DNA markerinin kromozomal veya plazmid kaynaklı olup olmadığı ileriki aşamalarda da incelenebilir. Bu şekilde plazmid kaynaklı amplifikasyonlar elenebilir.

Elde edilen sonuçlara göre, RAPD-PCR tekniğinin, dikkatlice standardize edildiği takdirde, DNA markerlerinin ortaya çıkartılmasında kullanılabilecek etkin ve hızlı (ön zenginleştirme dahil 1 gün) bir yöntem olduğu görülmüştür. Buna karşılık, bu tür bir çalışmada denenen primer sayısının ve mikroorganizma çeşitliliğinin artırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. *Salmonella*'nın ele alındığı bu çalışmada yöntem standardize edilmiş ve ileriye yönelik ilginç araştırma konuları ortaya çıkmıştır.

REFERANSLAR

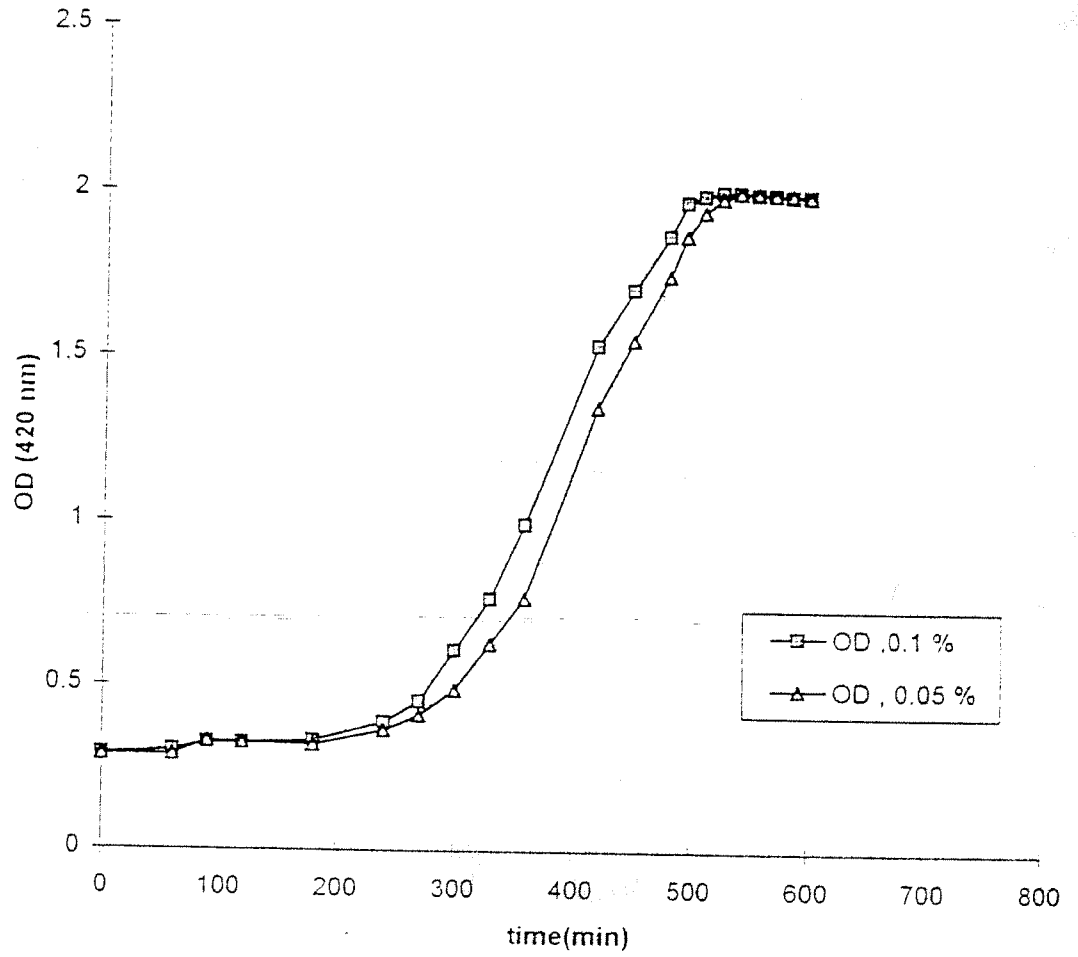
- AABO, S., RASMUSSEN, O.F., ROSSEN, L., SORENSEN, P.D. & OLSEN, J.E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 7, 171-178 (1993).
- BEJ, A.K., MEENA, H., MAHBUBANI, M.H., BOYCE, M.J. & ATLAS, R.M. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 368-373 (1994).
- CAETANO-ANOLLES, G., BASSAM, B.J. & GRESSHOFF, P.M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9, 553-556 (1991).
- CANO, R.J., RASMUSSEN, S.R., FRAGA, G.S. & PALOMARES, J.C. Fluorescent detection polymerase chain reaction (FD-PCR) assay on microwell plates as a screening test for salmonellas in foods. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 247-253 (1993).
- DATTA, A.R., Identification of food-borne pathogens by DNA probe hybridization techniques, *Developments in Industrial Microbiology*, v.31, 165-173 (1990).
- FINEGOLD, S.M., MARTIN, W.J. & SCOTT, E.G. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* pp.148-179. Saint Louis: C.V. Mosby Company (1978).
- FLOWERS, R.S., *et al.*, Comparative study of a DNA hybridization method and the conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in foods, *Journal of Food Science*, 52, 781-785 (1987).
- FLOWERS, R.S., *et al.*, *Salmonella* in *Compendium for the Microbiological Examination of Foods*. ed: Vanderzant, C., ve Splittstoesser, D.F., American Public Health Association (1992), p: 371-415.
- HILL, W.E. & KEASLER, S.P. Identification of food-borne pathogens by nucleic acid hybridization, *International Journal of Food Microbiology*, 12, 67-76 (1991).
- JAY, J.M. *Modern Food Microbiology*, Avi Publishing Co., NY (1992).
- JONES, D.D., LAW, R. & BEJ, A.K. Detection of *Salmonella* spp. in oysters using PCR and gene probes. *Journal of Food Science* 58, 1191-1198 (1993).

- KRIEG, N.L. & HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* pp.427-458. Baltimore, USA: Williams & Wilkins (1984).
- Lankhorst, R.M., Vermunt, A., Weide, R., Liharska, T. and Zabel, P., Isolation of Molecular Markers for Tomato(*L.esculentum*) Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), *Theor.Appl.Genet.*, 83, 108-114 (1991).
- LAWRENCE, L.M., HARVEY, J. & GILMOUR, A. Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3117-3119 (1993).
- LENNETTE, E.H., SPAULDING, E.H. & JOSEPH, P.T. *Manual of Clinical Microbiology* pp.189-221. Washington D.C.: American Society for Microbiology (1974).
- LUK, J.M.C., KONGMUANG, U., REEVES, P.R. & LINDBERG, A.A. Selective amplification of abeucose and paratose synthase genes (*rfb*) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B, C₂, and D). *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2118-2123 (1993).
- MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, *Journal of Molecular Biology*, 3, 208-218 (1961).
- MARTINEZ-MURCIA, A.J. & RODRIGUEZ-VALERA, F. The use of arbitrarily primed PCR (AP-PCR) to develop taxa specific DNA probes of known sequence. *FEMS Microbiology Letters* 124, 265-270 (1994).
- MEUNIER, J.-R. & GRIMONT, P.A.D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research Microbiology* 144, 373-379 (1993)
- OUELLET, T. & SEIFERT, K.A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. *Phytopathology* 83, 1003-1007 (1993).
- WAY, J.D., JOSEPHSON, K.L., PILLAI, S.D., ABBASZADEGAN, M., GERBA, C.P. & PEPPER, I.L. Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1473-1479 (1993).
- WELSH, J. & MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18, 7213-7218 (1990).
- WIDJOJOATMODJO, M.N., FLUIT, A.C., TORENSMA, R., KELLER, B.H.I. & VERHOEF, J. Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*. *European Journal of Clinical Microbiology Infection and Disease* 10, 935-938 (1991).

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V.
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.
Nucleic Acids Research **18**, 6531-6535 (1990).

EKLER

EK1-*S. typhimurium* Büyüme Eğrisi



Growth curve of *S. typhimurium* at 0.1 % and 0.05 % inoculum.

EK2-Moleküler Boyut Standartları

DNA size marker1 (bp)

DNA size marker2 (λ Hind III + Eco RI) (bp)

1,186

21,226

800

5,148

644

4,973

349

4,268

267

3,530

2,027

1,904

1,584

1,375

947

831

564

DNA size marker3 (ϕ X174 DNA HaeIII digest) (bp)

1,353

1,078

872

603

310

281

271

234

194

118

72

EK3-Çözeltiler

1. DNA İzolasyonunda kullanılan Çözeltiler

Saline-EDTA(EthyleneDiamineTetraAcetate)

0.1M NaCl

25mM TrisCl (pH 8.0)

10mM EDTA (pH 8.0)

Tris-EDTA(TE)

10mM TrisCl (pH 8.0)

1mM EDTA (pH 8.0)

2. Jel Elektroforez Çözeltileri

Tris-Acetate (TAE)

0.04M Tris-acetate

0.001M EDTA

Gel-loading Buffer(6X)

0.25% bromophenol blue

40% (w/v) sucrose in water

3. Southern Hibridizasyonunda Kullanılan Çözeltiler

20XSSC

3M NaCl

0.3M Na₃citrate

Denaturing solution

0.5M NaOH

1.5M NaCl

0.1%SDS

Neutralizing solution

1M TrisCl (pH 7.5)

1.5M NaCl

Maleic acid buffer (pH 7.5)

0.1M maleic acid

0.15M NaCl

Blocking stock solution(10Xconcentrate)

10%(w/v) blocking reagent in maleic acid buffer

Standard hybridization buffer

5XSSC

N-lauroylsarcosine 0.1% (w/v)

SDS 0.02% (w/v)

Blocking reagent 1%

Detection buffer(pH 9.5)

0.1M TrisCl

0.1M NaCl

50mM MgCl₂

Neutralizing solution

1M TrisCl (pH 7.5)

1.5M NaCl

Maleic acid buffer (pH 7.5)

0.1M maleic acid

0.15M NaCl

Blocking stock solution(10Xconcentrate)

10%(w/v) blocking reagent in maleic acid buffer

Standard hybridization buffer

5XSSC

N-lauroylsarcosine 0.1% (w/v)

SDS 0.02% (w/v)

Blocking reagent 1%

Detection buffer(pH 9.5)

0.1M TrisCl

0.1M NaCl

50mM MgCl₂

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU	
1- Proje No: TOG TAG 1":1	2- Rapor Tarihi: Nisan 1997
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15.Kasım.1995 - 15.Kasım.1997	
4- Projenin Adı: Salmonella'nın Teşhis ve Tanımlanmasında RAPD-PCR Tekniğinin Kullanılması	
5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Y.Doç.Dr. Zümrüt Ögel, Arş.Gör. N.Gülce Ören , Prof.Dr.Faruk Bozoğlu , Y.Doç.Dr. Candan Gürakan, Elif Doğan	
6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: O.D.T.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü 06531 - Ankara	
7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:	
8- Öz (Abstract): Bu çalışmada, RAPD-PCR tekniğinin <i>Salmonella</i> serotiplerinin teşhis ve tanımlanmasında uygulanması araştırılmıştır. 8-10 bp büyüklüğünde 10 farklı primer 14 salmonella ve 16 <i>Salmonella</i> -harici suş ile birlikte araştırmanın çeşitli aşamalarında kullanılmıştır. <i>S. typhimurium</i> baz alınarak denenen primerlerden üç tanesi (7, 3 ve 6) üzerinde durulmuş ve bunlardan primer 7 olası teşhis primeri ve primer 3 ve 6 olası tanımlama primeri olarak diğer serotipler ve <i>Salmonella</i> olmayan suşlar üzerinde denenmiştir. Sonuçlar primer 7'nin ürettiği 550 bp lik bandın <i>Salmonella</i> serotiplerinin %80'inde ortaya çıktığını buna karşılık bazı diğer mikroorganizmalarda da görüldüğünü ortaya koymuştur. Buna karşılık <i>P. fluorescence</i> ve <i>L. bulgaricus</i> haricindeki tüm mikroorganizmalar ürettikleri farklı DNA profilleri ile <i>Salmonella</i> 'dan ayırd edilebilmişlerdir. Denenen tanımlama primerleri arasından en başarılı sonuçlar primer 3 ile elde edilmiş ve bu primer ayrıca <i>S.typhimurium</i> -spesifik bir marker ortaya çıkarmıştır. RAPD-PCR tekniği'nin genel olarak etkin ve hızlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.	
Anahtar Kelimeler: PCR, RAPD-PCR, Salmonella, Teşhis, Tanımlama	
9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler 6. Uluslararası Gıda Kongresinde bir tebliğ sunulacaktır. World J. of Microbiology and Biotechnology dergisine bir yayın sunulmuştur.	
10- Bilim Dalı: Doçentlik B. Dalı Kodu: ISIC Kodu: Uzmanlık Alanı Kodu:	
11- Dağıtım (*): <input type="checkbox"/> Sınırlı <input type="checkbox"/> Sınırsız	
12- Raporun Gizlilik Durumu : <input checked="" type="checkbox"/> Gizli <input type="checkbox"/> Gizli Değil	

(*) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz