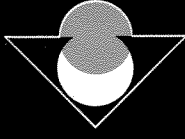


2004 - 295



TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU  
THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

**TARP**

**TÜRKİYE TARIMSAL ARAŞTIRMA PROJESİ**

Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri Araştırma Grubu  
Agriculture Forestry and Food Technologies Research  
Grant Committee



**TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU**

**THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY**

**LAKTİK STARTER SUŞLARINDA  
RİBOTİPLEME (RIBOTYPING)  
VE  
VERİ TABANI OLUŞTURULMASI**

*2004-295*

**Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri  
Araştırma Grubu**

**Agriculture, Forestry and Food Technologies Research  
Grant Committee**

ÖZET

# LAKTİK STARTER SUŞLARINDA RİBOTİPLEME (RIBOTYPING) VE VERİ TABANI OLUŞTURULMASI

PROJE NO: TARP-2547

Prof. Dr. HÜVEYDA BAŞAĞA

Doç. Dr. Zümrüt ÖGEL

Doç. Dr. Candan GÜRAKAN

M.Sc. Filiz DEDE

S-1-30

R-17

Ö-1-T.

ARALIK 2002

ANKARA

## KI ÖNSÖZ

### ÖNSÖZ

### İNDİRİMLER

### LABLO İSTELERİ

Bu proje TÜBİTAK Kurumu tarafından desteklenmiştir ve amacı yeni bir yöntem olan PCR ribotiplemenin *L. plantarum* suşlarının teşhisinde kullanılabilir bir yöntem olup olmadığını test etmek ve daha önce çalışılmış olan RAPD yöntemi ile karşılaştırmaktır. PCR ribotipleme bazı patojen bakterilerle çalışılmış olmasına rağmen şimdiye kadar herhangi bir *Lactobacillus* türüne uygulanmış değildir; bu nedenle uygulanabilirliği test edilmek istenmiştir.

PCR ribotipleme, bakterilerde 16S-23S spacer bölgesi farklılığına dayanılarak tanımlamanın yapıldığı moleküler bir yöntemdir. Prokaryotlarda 16-23-5S genleri birbirlerinden spacer region denilen bölgelerle ayrılmışlardır. Bu bölgeler hem tür hem de cins seviyesinde dizilim ve büyüklük değişiklikleri gösterirler ve tür yada suş seviyesinde tanımlama amaçlı kullanılabilirler.

### ÖZET

Burada amaç 16S-23S rRNA gen bölgeleri arasında bulunan spacer region denilen bölgenin elde edilmeye çalışılmasıdır. Bunun için öncelikle organizma üretilir ve toplam DNA'sı izole edilir, spacer bölgeler PCR işlemi kullanılarak çoğaltılır ve PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi ile devam edilir. Son olarak oluşan restriksiyon bantları agaroz jelde ayrıştırılır.

### DNA PCR ÜRÜNLERİNİN SAFLANDIRILMASI

Proje sonucunda, spacer bölgenin *Lactobacillus* türlerinde ne büyüklük ne de dizilim yönünden herhangi bir varyasyon göstermediği bulunmuştur ve PCR ribotipleme yönteminin *Lactobacillus* türlerini tanımlamasında kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır. Ayrıca, RAPD analizinin *Lactobacillus* organizmasında suş seviyesinde dahi uygulanabilir bulunmuştur. Buna ilaveten çoğu *L. plantarum* suşunda ortak bir bant vermiştir. Bundan dolayı, PCR ribotipleme yöntemi ile karşılaştırıldığında RAPD yönteminin *Lactobacillus* suşlarını tanımlama ve ayırt etmede daha güçlü olduğu açıktır.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	1
İÇİNDEKİLER.....	2
TABLO LİSTELERİ.....	3
FİGÜR LİSTELERİ.....	4
ABSTRACT.....	5
ÖZ.....	6
GİRİŞ	
1. Laktik Asit Bakterileri.....	7
1.1. Cins <i>Lactobacillus</i> .....	8
1.1.1. Tür <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	10
1.2. Bakterilerin Tanımlanması ve Teşhisi.....	11
1.2.1. Ribotipleme.....	11
1.2.2. PCR Ribotipleme.....	12
1.2.3. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA).....	14
1.3. Projenin Amacı.....	14
GELİŞME	
2.1. Kullanılan Bakteriler.....	15
2.2. PCR Ribotipleme Basamakları.....	16
2.2.1. Bakterilerin Üretilmesi ve Korunması.....	16
2.2.2. DNA İzolasyonu.....	16
2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	17
2.2.4. PCR ürünlerinin Saflaştırılması.....	18
2.2.5. Restriksiyon Endonükleaz ile Kesim.....	19
2.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi.....	21
2.3. RAPD.....	21
SONUÇ	
3.1. DNA İzolasyonu.....	22
3.2. PCR.....	22
3.3. PCR ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz ile Kesilmesi.....	25
3.4. RAPD.....	26

## TABLO LİSTELERİ

### TABLO

1.1. <i>Lactobacillus</i> cinsinin sınıflandırılması .....	9
1.2. Günümüzde Probiyotik olarak kullanılan laktobasiller.....	10
2.1. Kullanılan bakteriler.....	14
2.2. <i>L. plantarum</i> 16S-23S rRNA genlerindeki korunmuş bölgelere göre dizayn edilen primerlerin nükleotit dizilimleri .....	17
2.3. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin tanıma bölgeleri .....	19
2.4. RAPD kullanılan primerlerin nükleotit dizilimleri.....	20
3.1. <i>Lactobacillus</i> ve <i>L. plantarum</i> türlerinin DNA'larının dizayn edilen primerlerin nükleotit dizilimleri .....	23
3.2. <i>L. plantarum</i> ve <i>L. acidophilus</i> türlerinin DNA'larının dizayn edilen primerlerin nükleotit dizilimleri .....	26
3.3. <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. acidophilus</i> ve <i>L. reuteri</i> türlerinin dizayn edilen primerlerin nükleotit dizilimleri .....	27
3.4. <i>L. plantarum</i> türlerinin primerlerin nükleotit dizilimleri .....	28

## FİGÜR LİSTELERİ

### Figür

1.1. Tipik bir rRNA operonunun şematik gösterimi .....	12
2.1. Dizayn edilmiş olan P1, P2, ve P3 primerlerinin 16S ve 23S rRNA genlerindeki bağlanma bölgeleri .....	18
3.1. Agaroz jel üzerinde DNA izolasyon sonucu .....	22
3.2. P1 ve P3 primerleri ile PCR analizi .....	23
3.3. P2 ve P3 primerleri ile PCR analizi .....	24
3.4. <i>L. acidophilus</i> ve 4 <i>L. plantarum</i> suşlarına ait P2 ve P3 primer çifti ile yapılan PCR ürünlerinin 4 farklı four-cutter restriksiyon endonükleaz ile kesimi .....	25
3.5. <i>L. brevis</i> ve 2 <i>L. plantarum</i> suşlarına ait P1 ve P3 primer çifti ile yapılan PCR ürünlerinin <i>Tas I</i> ile kesimi .....	26
3.6. <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. salivarius</i> ve <i>B. subtilis</i> suşlarında primer P4 ile RAPD analizi.....	27
3.7. <i>L. plantarum</i> suşlarında primer P5 ile RAPD analizi.....	28

## ABSTRACT

### RIBOTYPING IN LACTOBACILLUS STRAINS AND CONSTRUCTION OF DATABASE

PROJE NO:Tarp-2547

*Lactobacillus plantarum* has a wide range of commercial applications in the food industry, but in several cases their identification has never been easy or reliable. The aim of the present work was to examine whether PCR ribotyping could be of value in the identification of *Lactobacillus plantarum* species. RAPD was also used as an alternative method. PCR ribotyping is a novel method in molecular typing that is based on polymorphism in the 16S-23S rRNA intergenic spacer region, while in RAPD, short oligonucleotides of arbitrarily chosen sequence are used as the primers to generate a fingerprint. For PCR ribotyping, two primer pairs were designed using the conserved regions in 16S and 23S rRNA genes. These primers were used in PCR to amplify the intergenic spacer region between 16S-23S rRNA genes. The obtained PCR products were digested by restriction endonucleases in order to have different banding patterns. Whereas, in RAPD, arbitrary primers were used to obtain banding patterns.

RAPD has been shown to be applicable for distinguishing *Lactobacillus plantarum* at a strain level. Moreover, a common PCR product was found for most *Lactobacillus plantarum* strains by the randomly designed oligonucleotide primer P4 (5'-GCA NGT CGC-3'). On the other hand, PCR ribotyping was found to be an inefficient method for typing *Lactobacillus* even at the species level.

**Keywords :** *L. plantarum*, PCR ribotyping, intergenic spacer region, RAPD.



## ÖZ

### LAKTİK STARTER SUŞLARINDA RİBOTİPLEME (RIBOTYPING) VE VERİ TABANI OLUŞTURULMASI

PROJE NO:Tarp-2547

*Lactobacillus plantarum* gıda endüstrisinde geniş ticari uygulamaları olan bir mikroorganizmadır, fakat bazı durumlarda tanımlanmaları ne kolay ne de güvenilir olmamıştır. Bu çalışmanın amacı, *Lactobacillus plantarum* suşlarının tanımlanmasında PCR ribotipleme yönteminin uygulanabilirliğini araştırmaktır. Alternatif bir yöntem olarak RAPD de kullanılmıştır. PCR ribotipleme 16S-23S rRNA genleri arasındaki bölgede bulunan farklılıkları esas alan yeni bir moleküler tanımlama yöntemidir. Buna karşın RAPD’de bir parmakizi oluşturmak için dizilimi rastgele seçilmiş kısa oligonükleotitler kullanılır. PCR ribotiplemede, 16S ve 23S rRNA genlerindeki korunmuş bölgeler kullanılarak iki primer çifti tasarlanmıştır. Bu primerler 16S-23S rRNA genleri arasındaki bölgeyi PCR’da çoğaltmak için kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri, değişik bant desenleri elde etmek için restriksiyon endonükleazları ile kesilmiştir. Buna karşın, RAPD’de rastgele primerler kullanılmıştır.

Sonuç olarak RAPD’nin *Lactobacillus*’ları suş seviyesinde ayırt edebildiği görülmüştür. Çoğu *Lactobacillus plantarum* suşlarında gelişigüzel dizayn edilmiş oligonükleotit primer P4 (5’-GCA NGT CGC-3’) kullanılarak ortak bir bant bulunmuştur. Diğer yandan, PCR ribotiplemenin *Lactobacillus* türlerini ayırd etmede etkili olmadığı görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** *L. plantarum*, PCR ribotipleme, spacer bölge, RAPD.

## PROJE ANA METNİ

### GİRİŞ

#### 1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri çok geniş ve heterojen bir familyayı kapsayan mikroorganizmalardır. Bu familyada ki tüm bakteriler gram pozitif, katalaz negatif kok ya da çubuk şekilli, spor oluşturmeyen bakterileridir. Ayrıca hepsi asite karşı dirençlilik gösterirler ve karbonhidratların fermentasyonu sonucunda asıl ürün olarak laktik asit üretirler. Genellikle habitat olarak süt, et, sebze ve içecek gibi çeşitli gıda ürünlerinde ve ayrıca normal flora üyesi olarak memelilerde ağız, vajina ve bağırsaklarda bulunurlar.

Laktik asit bakterileri genel olarak; *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, ve *Weissella*' dan oluşur.

Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması büyük ölçüde glikoz fermentasyonu biçimine, morfolojiye, farklı sıcaklıklarda gelişmeye, üretilen laktik asitin biçimine, yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişme yeteneğine ve asit yada baz tolere edebilme gücüne dayanır. Sınıflandırmada kullanılan bu özelliklerden en önemlisi standart koşullar altında glikoz fermentasyon biçimidir ki bu koşullar; sınırlı oksijen ve sınırlandırılmayan glikoz ve amino asit, vitamin gibi büyüme faktörleri bulunabilirliğidir. Bu koşullar altında laktik asit bakterileri homofermentatif; glikozu tamamen laktik asite fermente eden ve heterofermentatif; glikozu laktik asit, etanol/asetik asit ve CO<sub>2</sub> 'e fermente eden olarak iki gruba ayrılabilir.

Laktik asit bakterileri asit, hidrojen peroksit ve bakteriosin gibi maddeler üretirler. Bu üretilen asit laktik asit yada asetik asittir ve ortamın pH'nın ani bir şekilde düşmesine neden olur; aynı zamanda hidrojen peroksit ve bakteriosinin de istenmeyen zararlı bakterileri

öldürme özellikleri vardır. Laktik asit bakterileri zararlı olmayıp ve diğer bakterileri düşük düzeyde tuttıkları gibi yüksek derecede hijyen güvenliği sağlarlar (Eriksson, 1991).

Gelişen dünyamızda, laktik asit bakterileri genel olarak yoğurt, peynir ve tereyağı gibi mayalanmış süt ürünleri ile anılmaya başlanmıştır. Bu yüzden laktik asit bakterilerine hem araştırma hem de eğitim alanında büyük bir önem verilmeye başlanmıştır.

Aynı zamanda bu bakterilerin sağlık açısından yararlı etkileri de bilinmektedir. Günümüzde sayıları gittikçe artan işlevsel gıdalar olarak da adlandırılan sağlıklı gıdalar ve aynı zamanda farmakolojik hazırlıklar ilerlemiş durumdadır ki buna etken laktik asit bakterilerinin bazı suşlarındaki karakterlere dayanan sağlık taleplerinin artmış olmasıdır. Hem çeşitli sanayi hemde insan sağlığı açısından laktik asit bakterileri kullanımının sayısız uygulama alanları vardır; gıdaların korunması ve probiyotik olarak kullanım gibi. Bu kadar çok yoğun çalışılma isteğinin nedeni bu bakterilerin bağırsak florasının istenilen ve vazgeçilene olmayan üyeleri olmalarından dolayıdır (Tannock, 1997).

### 1.1. Cins *Lactobacillus*

*Lactobacillus* cinsi laktik asit bakterileri içinde en geniş olan cins grubudur. Ayrıca fiziksel, biyokimyasal ve fenotipik özellikler bakımından çeşitlilik gösteren türleri içerdiğinden çok fazla heterojenik olma özelliğindedir. Bu heterojenlik bu cinse bağlı türlerin DNA' larındaki %G+C oranıyla kendini gösterir. Bu oran 32-53% arasındadır ve normalde basit bir cins için kabul edilen değerin iki katıdır (Schleifer ve Stackebrandt, 1983). Bu heterojenlik ve içerdiği türlerin fazlalığı bu cinsin tanımından ileri glemektedir; çubuk şekilli laktik asit bakterileri.

*Lactobacillus* cinsi kendi içlerinde üç ana grupta sınıflandırılan 60'ın üzerinde tür içerir: zorunlu homofermentatif, fakültatif heterofermentatif ve zorunlu heterofermentatif. Zorunlu homofermentatifler hekzozları laktik asite; fakültatif heterofermentatifler sadece laktik asite yada glikoz sınırlanması altında laktik asitle beraber asetik asite, etanol ve formic asite; zorunlu heterofermentatifler ise hekzozları laktik asit, asetik asit, etanol ve CO<sub>2</sub>' e, pentozları da laktik asit ve asetik asite fermente ederler (Pot, 1994a). Bu üç ana grubun ayırt edilmesinde kullanılan karakterler ve her grubun en iyi bilinen türleri Tablo 1.1. de gösterilmiştir (Baelé, 2002).

**Tablo 1.1.** *Lactobacillus* cinsinin sınıflandırılması.

Karakterter	Grup I Zorunlu homofermentatif	Grup II fakültatif heterofermentatif	Grup III Zorunlu heterofermentatif
Pentoz fermentasyonu	-	+	+
Glikozdan CO <sub>2</sub>	-	+	+
Glukonatdan CO <sub>2</sub>	+	+	+
Mevcut FDP aldolaz	+	+	-
Mevcut Phosphoketolaz	-	+	+
	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbrückii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. buchneri</i>
	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Lb. reuteri</i>

Laktobasiller doğada çok yaygın olarak bulunurlar ve pek çok türünün özellikle gıda sektöründe geniş uygulama alanları vardır. Bunlar genellikle en asit toleranslı laktik asit bakterileridir ve bu yüzden silaj ve sebze fermentasyonları gibi pek çok ani laktik fermentasyonlarını sona erdirecek özelliktedirler (Daeschel, 1987). Ayrıca insan ve hayvanlarda ağız boşluğu, sindirim sistemi ve vajina ile floranın birer üyeleri olarak ilişkileri vardır. Aynı zamanda süt ürünleri, içecekler, meyvalar, sebzeler ve fermente edilmiş et gibi gıdalarda yaygın olarak bulunurlar.

Pek çok laktobasilli günümüzde ticari olarak kullanılabilir gıda ürünlerinde probiyotik olarak kullanılmaya başlanmıştır (Baele, 2002). Probiyotikler spesifik canlı mikroorganizmalar içeren fermente edilmiş gıdalar olarak tanımlanabilir ve bunların yararlı etkisi hayvan ve insanda bağırsak mikroflora dengesini geliştirmeleri ile açığa çıkar. Bir organizmanın probiyotik olarak kullanılabilmesi için onun mutlaka mide asiditesine ve safra tuzuna dayanıklı olabilmesi, sindirim sistemi yüzeyine yapışabilmesi ve yararlı enzim ve metabolitleri üretebilmesi gereklidir (Eriksson, 1991).

Son zamanlarda laktobasiller probiyotik ürünlerin yapımında büyük oranda rağbet görmeye başlamıştır; bu onların ikna edici yararlı sağlık etkilerinden ve GRAS (Generally Regarded as Safe) statüsü üyeliklerinden dolayıdır. Günümüzde Probiyotik olarak kullanılan laktobasillerin listesi Tablo 1.2. de verilmiştir (Collins, 1998).

**Tablo 1.2.** Günümüzde Probiyotik olarak kullanılan Laktobasiller.

<i>L. acidophilus</i>	<i>L. delbreuckii subspecies bulgaricus</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>L. Fermentum</i>
<i>L. casei subspecies rhamnosus</i>	<i>L. Helveticus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. Johnsonii</i>

### 1.1.1. Tür *Lactobacillus plantarum*

*L. plantarum* spor oluşturmeyen, hareketsiz, gram pozitif, katalaz negatif ve çubuk şekil özelliğinde bir türdür. Fakültatif anaerop olarak sınıflandırılır ve bu yüzden jelatini sıvılaştırmak ve proteinleri hızlıca sindirmek gibi olağan dışı yeteneklere sahiptir. Glikoz fermentasyonu sırasında gazsız asit üretimi vardır.

*L. plantarum* bazı yönlerden ticari önemi olan bir türdür; mesela sebzelerin korunmasında ve fermente edilen etler için starter kültür olarak kullanılır. Ayrıca GRAS statüsüne sahiptir ve bu yüzden genetik gelişimin hedefi olmuş bulunmaktadır (Thompson, 1997). *L. Plantarum* fermente edilmiş gıda ve yem ürünlerinde yaygın olarak bulunur ve ayrıca insan tüketimi için; yeşil zeytin fermentasyonu, peynir yapımı ve kuru fermente sosis yapımı gibi işlenmiş pek çok gıda yapımında ilişkilidir.

*L. plantarum* artık ticari alanda probiyotik olarak *L. Plantarum* 299V (Probi AB, Sweden) (Sanders, 1999), ve Lp 01 (Shah, 2001) adları altında satılmaya başlanmıştır. Ayrıca sağlıklı bir kadının vajinasında bulunur ve burada patojenik mikroorganizmalara karşı kullanılabilir (Redondo-Lopez, 1990).

## 1.2. Bakterilerin Tanımlanması ve Teşhisi

Epidemiyoloji, ekoloji ve biyoloji gibi alanlarda cinsleri veya türleri doğru olarak tanımlamak çok önemlidir. Genel olarak bakteriler ya fenotipik yada genotipik yöntemler kullanılarak teşhis edilirler. Tipik olarak bakterilerin tiplendirilmesi fenotipik özelliklerin karakterize edilmesi ile gerçekleştirilir. Fenotipik yöntemlerden bazıları serotipleme, faj tiplendirmesi, biotipleme, antibiyotik dirençliliği, poliakrilamid jel elektroforezi ve bakteriosin tiplendirmesidir. Ancak bu fenotipik yöntemler pek çok problemi beraberinde getirir. Buna karşın, genotipik yöntemler ki bunlar doğrudan DNA analizini içerirler pek çok avantaja sahiptirler. En önemli avantajlardan biri bakterilerden her zaman DNA izole edilebildiği için her bakteri tiplendirilebilir. Ayrıca bu DNA'ya dayalı yöntemlerin ayırt etme gücü fenotipik yöntemlere göre çok daha fazladır (Farber, 1996). Bu genotipik yöntemlerin bazıları plazmid tiplendirmesi, PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis), Ribotipleme, PCR'ya dayalı yöntemler; PCR ribotipleme, RAPD.

### 1.2.1. Ribotipleme

Ribotipleme kısaca ribosomal genlerini tanıyan nükleik asit problemlerinin kullanımını kapsar. rRNA (ribosomal ribonükleik asit) genleri birkaç kopya halinde her bakteride bulunur ve tipik bir bakteri hücresinde toplam RNA'ların yaklaşık 82% ni oluştururlar ve başlıca üç kısımdan oluşurlar: 16S, 23S, ve 5S rRNA. Bu rRNA'yı kodlayan genler çok yüksek derecede korunmuş genlerdir; yani pek çok farklı bakterideki rRNA genleri çok benzerdirler. Pek çok bakteriyal gen sadece bir kopya halinde bulunurken rRNA operonları her bakteri hücresi başına 2-11 kopya arası bulunabilirler. Kısaca bakterinin ne kadar fazla rRNA operonu varsa ribotiplemenin ayırt edicilik özelliğinin o kadar çok olacağı açıktır.

Şekil 1.1. Çok bir rDNA operonunun şematik gösterimi.

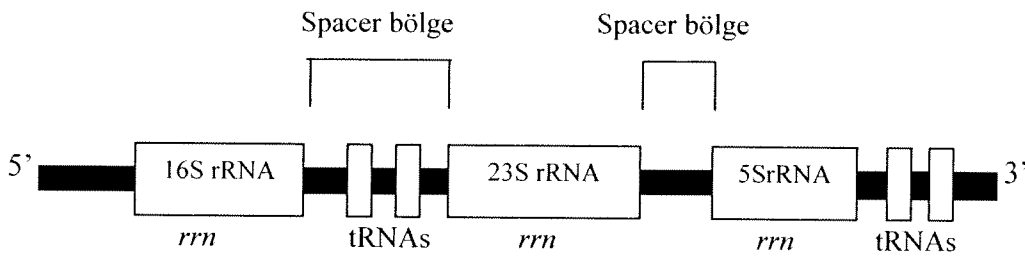
Pratikte ribotiplemede sırasıyla şu basamaklar izlenilir; öncelikle organizma üretimi sağlanır, sonra toplam DNA izole edilir ve elde edilen DNA küçük fragmentlere ayırmak için 6 baz tanıyan bir restriksiyon enzimi ile kesilir. Kesilen bu fragmentler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılır ve sonradan 16S, 23S yada 5S rRNA genlerine ait bir prob ile hibridize edilir; pratikte 16S rRNA'ya ait problemler daha yaygın olarak kullanılır. Hibridizasyon iki şekilde yapılabilir; ya direk jel üzerinde jel hibridizasyon tekniklerini

kullanarak; ya da naylon veya nitroseluloz membran kullanarak. Sonraki aşamada DNA'nın southern transferi sağlanır ardından da problama işleme geçilir; problama işleminde işaretlenmiş rRNA genlerini içeren problar kullanılır. Prob ortaya çıkarma işleminden sonra kopyalar halinde rRNA genlerini içeren restriksiyon bantları görüntülenir ve çıkan bantların büyüklüklerinin deseni karakteristik bir parmakizi oluşturur (Bingen, 1994).

Ribotiplemenin en önemli avantajı ribosomal genlerdeki benzerlikler yüzünden ortak problemlerin kullanılabilmesidir, diğer avantajı üretkenliğidir. Dezavantajları ise (i) PFGE kadar ayırt edici değildir, (ii) yoğun çaba ve güç gerektirir. Ancak otomatik ribotipleme aletlerinin geliştirilmiş olması bu tekniğin uygulama alanını artırmıştır.

### 1.2.2. PCR Ribotipleme

Son zamanlarda PCR' a (Polimeraz Zincir Reaksiyon) dayalı genotipik method olarak tanımlanan oldukça yeni bir yöntemdir. Prokaryotlarda rRNA' yı kodlayan 3 gen sırasıyla 16S, 23S, and 5S rRNA birbirlerinden hem cins hem de tür düzeyinde çok ileri derecede dizilim ve büyüklük farklılığı gösterebilen spacer bölgelerle ayrılırlar (Figür 1.1). Bu method, rRNA' yı kodlayan bu genlerin arasında bulunan spacer bölgelerde bulunan bu heterojenlik özelliği avantajına dayanır.



**Figür 1.1.** Tipik bir rRNA operonunun şematik gösterimi.

Çoğu bakteri her gen için çeşitli kopyalarda rRNA operonun içerirler böylelikle tek bir suşdaki spacer bölgeler bile uzunlukları ve/veya dizilimleri açısından farklı operonlar içinde farklılık gösterebilirler. Böylece belirli bir suşdan çeşitli bantlar ve karakteristik bant deseni elde edilmiş olur. Bu çeşitlilik tamamiyle bazı spacer bölgelerde bulunan tRNA (transferral ribonükleik asit) genlerinin ( $tRNA^{glu}$ ,  $tRNA^{ile}$ ,  $tRNA^{ala}$ ) sayısına ve çeşidine bağlıdır. Sonuçta,

'kısa' yani tRNA genlerini içermeyen ve 'uzun' yani bir yada iki tRNA geni içeren spacer bölgeler ortaya çıkar.

Bu yöntem ribotipleme yöntemine bir alternatif olarak geliştirilmiş bir yöntemdir; ribotipleme çok etkili bir yöntem olmasına rağmen southern blot analiz ve işaretlenmiş prob kullanımı gibi teknik zorluklar; uygulamada çok fazla basamağın oluşu gibi birtakım problemler yüzünden uygulama alanları sınırlanmıştır ve yerine çok daha kısa sürede tamamlanan, hibridizasyon basamağını elimine eden ve de rRNA operon polimorfizmi avantajını kullanabilen PCR ribotipleme geliştirilmiştir.

Bu yöntemde, normal PCR' dan farklı olarak rastgele primerler kullanılmaz; tiplendirilmeye çalışılan organizmanın rRNA' sını kodlayan DNA dizilimi kesin olarak bilinmek zorundadır; çünkü bu dizilime göre primerler kullanılır. Bu amaçla, 16S ve 23S rRNA genleri arasındaki bölgenin PCR ile genişletilebilmesi için 16S ve 23S rRNA genlerindeki korunmuş kısımlar esas alınarak iki primer dizayn edilir.

PCR ribotipleme restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim işlemi ile birleştirilebilir; böylelikle epidemiyolojik analiz için karşılaştırma yapılabilecek kadar fazla bant elde edilmiş olur.

Pratikte bu yöntemde ne yapıldığına kısaca değinecek olursak; öncelikle organizma üretilir ve toplam DNA'sı izole edilir, spacer bölgeler PCR işlemi ile biri 16S diğeri de 23S deki korunmuş bölgelere göre dizayn edilmiş iki primer kullanılarak çoğaltılır. Eğer ayırt etmeyi sağlayacak parmakızı bulunmuş ise yöntem amacına ulaşmıştır ve araştırma burda sona erer ancak eğer bulunmamış ise elde edilen PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi ile devam edilir. Son olarak oluşan restriksiyon bantları agaroz jelde ayrıştırılır.

PCR ribotiplemenin avantajlarından söz edecek olursak; (i) bu yöntem hızlı bir şekilde sabit ve kolay gözlenebilir PCR desenleri oluşturur (ii) moleküler epidemiyoloji açısından oldukça faydalı olabilme potansiyeline sahiptir (iii) genel bakteri primerleri kullanılabilir. En önemli dezavantajı ise PFGE ve RAPD yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha düşük ayırt ediciliğe sahip oluşudur (Farber, 1996).



### 1.2.3. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

RAPD, PCR' a dayanan yeni geliştirilen genotipik methodlardan biridir ve geniş oranda bakterileri tiplendirmede kullanılmıştır. Bu yöntemde, kısa rastgele seçilmiş dizilimler PCR için primer olarak kullanılır ve sonuçta suş spesifik PCR desenleri elde edilir.

RAPD çok basit ve hızlı bir genotipik yöntemdir ve çok fazla avantaja sahiptir. RAPD analizi için kullanılan PCR normal PCR'dan iki yönden biraz farklılık gösterir: kullanılan primerler kısadır (sadece 9-10 nükleotit) ve dizilimleri rastgele seçilir. Bu yüzden, hedef DNA dizilimi hakkında ön bir bilgiye ihtiyaç yoktur. Ayrıca, primerler kısa olduklarından teorik açıdan bir gen boyunca dağılmış çok fazla tamamlayıcı bölgeler bulabileceklerdir ve RAPD analizindeki yapışma sıcaklığı normal PCR'dakine göre çok daha düşük olduğundan bilinen hiçbir homolojisi olmayan bu basit bir primer denk olduğu her tamamlayıcı bölgeye yapışabilecektir. Böylelikle yapışılan her bölge agaroz jel üzerinde bantlar halinde görünümüne neden olacaktır.

### 1.3. Projenin Amacı

Bu projenin amacı, yeni bir yöntem PCR ribotiplemenin *L. plantarum* suşlarının teşhisinde kullanılabilir bir yöntem olup olmadığını test etmek ve daha önce çalışılmış olan RAPD yöntemi ile karşılaştırmaktır.

PCR ribotipleme bazı patojen bakterilerle çalışılmış olmasına rağmen şimdiye kadar herhangi bir *Lactobacillus* türüne uygulanmış değildir; çalışılmış bu patojen bakteriler *Pseudomonas cepacia* (Kostman, 1992), *Clostridium difficile* (O'Neill, 1996 ve Bidet, 1999), *Staphylococcus aureus* (Kostman, 1995), *Enterococcus faecium* (Kostman, 1995), *Neisseria meningitides* (Verdu, 1999).

Bu projede ayrıca RAPD analiz yöntemi de alternatif bir method olarak kullanılmıştır. Bunun nedeni, RAPD'nin pek çok *L. plantarum* neslinde türlerin ayrımında çok uygun bir yöntem oluşundan ileri gelmektedir (Johansson, 1995c).

## GELİŞME

### 2.1. Kullanılan Bakteriler

Çalışmada kullanılan bakteriler Tablo 2.1. de gösterilmiştir.

Table 2.1. Kullanılan Bakteriler

Bakteri	Kaynak yada referans
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	ATCC (Amerikan Type Culture Collections)
<i>L. plantarum</i> DSM 20174	DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
<i>L. plantarum</i> DSM 20246	DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
<i>L. plantarum</i> NCIMB 1193	NCIMB (National Collections of Industrial and Marine Bacteria)
<i>L. plantarum</i> 80	Josson et al., (1989), Scheirlinck et al., (1989)
<i>L. plantarum</i> Z11L	Gazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
<i>L. plantarum</i> Z15L	Gazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
<i>L. plantarum</i> C1	Laboratuvarımız kültür koleksiyonundan
<i>L. plantarum</i> C3	Laboratuvarımız kültür koleksiyonundan
<i>L. plantarum</i> 23	Laboratuvarımız kültür koleksiyonundan
<i>L. plantarum</i> 37	Laboratuvarımız kültür koleksiyonundan
<i>L. plantarum</i> 73	Laboratuvarımız kültür koleksiyonundan
<i>L. pentosus</i>	Laboratuvarımız kültür koleksiyonundan
<i>L. plantarum</i> RSKK 10	RSKK (Refik Saydam Kültür Koleksiyonları)
<i>L. plantarum</i> HU	Hacettepe Üniversitesi, Gıda Müh. izolatı
<i>L. plantarum</i> CG 4	Laboratuvarımız kültür koleksiyonundan
<i>L. salivarius</i>	Laboratuvarımız kültür koleksiyonundan
<i>L. brevis</i>	Laboratuvarımız kültür koleksiyonundan
<i>B. subtilis</i>	Laboratuvarımız kültür koleksiyonundan

## 2.2. PCR Ribotipleme Basamakları:

- 1) Organizma üretilir
- 2) Tüm DNA izole edilir
- 3) PCR işlemi ile 16-23S arasındaki spacer region elde edilir
- 4) Elde edilen PCR ürünleri saflaştırılır.
- 5) Restriksiyon Endonükleaz ile kesilir
- 6) Kesilen parçalar Agarose jel Elektroforezi ile ayrıştırılır ve UV ile analiz edilir.

### 2.2.1. Bakterilerin Üretimi ve Korunması

*Lactobacillus plantarum* bakterisi geliştirmek için MRS broth; sıvı besiyerinde 37°C' de 1 gün boyunca bekletilir. Elde edilen kültürler MRS agar üzerine ekim yapılarak 4 °C'de saklanılır. Uzun periyotlar için ise kültürler gliserol içinde -20 °C'de saklanılabilir.

### 2.2.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu Luchansky 'nin kullanmış olduğu method üzerinde ufak değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (Luchansky, 1991). Bu methoda göre daha önceden 20 ml MRS brotha ekilmiş ve 37°C'de gece boyu büyütülmüş olan 800 µl 40 mM DL threonine içeren kültür 6000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilmiş ve 40 ml taze MRS broth eklenerek çözülmüştür. 2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra tekrar 6000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilmiş ve TES tamponu ile iki defa yıkanmıştır. 25% sükröz, mutanolysin (40 µg/ml) ve lysozyme (20 mg/ml) enzimlerini içeren lysis tamponundan 300 µl eklenerek çözülmesi sağlanmış ve 37°C'de 45 dakikalık inkübasyondan sonra 100 µl 0.5 M EDTA, pH 8.0 eklenilerek ve oda sıcaklığında 5 dak. bekletilmiştir. Daha sonra 300 µl 10% SDS (sodyum dodesil sülfat) eklenilen karışım 65°C'lik su banyosunda berraklaşana kadar bekletilmiş ve 12 µl Proteinase K (20 mg/ml) eklendikten sonra tekrar 65°C'lik su banyosunda 15 dak. kadar bekletilmiştir. Nükleik asitlerin ayrışımı aşamasında ise; sıvı kısım eşit hacimde phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) eklenerek ve 12000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilerek ayrıştırılmıştır. Santrifüj sonrası oluşan 3 tabakadan en üst tabaka nükleik asitleri

içeren tabakadır ve dikkatlice buradan alınması gereklidir. Bu işlem üst tabaka tamamen alınıncaya kadar tekrarlanabilir. Ethanol ile çöktürme aşamasında önce soğuk (-20°C) 95% ethanol karışımının iki katı olarak eklenilmiş ve en az 1 saat -20°C'de bekletilmiştir. 12000 rpm'de 15 dakikalık santrifüj sonrası sıvı kısım atılmış ve pelet kısmı tuzları elimine etmek amacıyla 600 µl soğuk (-20°C) 70% ethanol ile yıkanmış ve tekrar 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve tekrar sıvı kısım atılmıştır. 20 dakikalık bekleme sonrası pelet TE tamponu ile çözülmüştür. RNA'yı uzaklaştırmak için DNA solüsyonuna RNase (10 mg/ml) eklenilmiş ve 37°C'de yarım saat kadar bekletilmiştir. Elde edilen DNA solüsyonları -20°C'de bekletilerek saklanılmıştır.

Elde edilen DNA'nın konsantrasyonu agaroz jele yüklendikten sonra ortaya çıkan bant yoğunluğunun bilinen bantlarla karşılaştırılması ile bulunmuştur.

### 2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)


DNA izolasyonundan sonraki aşama PCR aşamasıdır; burada amaç 16S-23S rRNA gen bölgeleri arasında bulunan spacer region denilen bölgenin elde edilmeye çalışılmasıdır. Bunun için biri 16S diğeri de 23S rRNA gen bölgelerine gelecek şekilde iki ayrı primer gereklidir.


Çalışmamızda 16S rRNA gen bölgesi için iki (Primer1 ve Primer2) ve 23S rRNA gen bölgesi için ise bir tane (Primer 3) olmak üzere üç ayrı primer dizayn edilmiştir. 16S rRNA gen bölgesi için 2 ayrı primer dizayn edilmesinin nedeni spacer region denilen bölgenin en verimli şekilde elde edilmeye çalışılmasıdır.


Primerlerin dizayn edilebilmesi için 16S-23S rRNA gen bölgelerinin nükleotit dizilimlerinin bilinmesi gereklidir bundan dolayı öncelikle gen bankalarından bu gen bölgelerine ait 'DNA sequence' taraması yapılmış ve buradan elde edilen nükleotit bilgilerine göre primerler dizayn edilmiştir. Primer dizaynı için üç ayrı korunmuş bölgenin nükleotit dizilimleri kullanılmıştır. Bu tarama için kullanılan gen bankasının internet adresi : [www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed) dir. Tablo 2.2. de dizayn edilen primerlerin nükleotit dizilimleri ve Figür 2.1 de de bağlanma bölgeleri verilmiştir.

**Table 2.2.** *L. plantarum* 16S-23S rRNA genlerindeki korunmuş bölgelere göre dizayn edilen primerlerin nükleotit dizilimleri.

İlgili rRNA geni	Dizayn edilen Primer (5' den 3')	Primerin		Baz sayısı
		adı	Yönü	
16S	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA	P1	İleri	20
16S	GGC TGG ATC ACC TCC TTT CT	P2	İleri	20
23S	ACC TCC AAC TAG ACT ATG AA	P3	Geri	20

1 cttgtacaca ccgcccgtca caccatgaga gtttgaaca cccaaagtcg gtgggtaac  
  
 Primer 1

61 ttttaggaac cagccgcta aggtgggaca gatgattagg gtgaagtcgt aacaaggtag  
 121 ccgtagagaa cctgcccgtg gatcacctcc tttotaagga atattacgga aacctacaca  
  
 Primer 2

181 cgcgtcgaaa cttgttcag tttgagaga tttactctc aaaacttgtt cttgaaaac  
 241 tagataatat caaatatatt tttcataat gaaaccgaga acaccgctt tttgagttt  
 301 tttattgaag tttattatc gctaaactca ttaatcgcat ttaccgtag gtaaaggg  
 361 ttaagttaac aagggcgcat ggtgaatgcc ttggcactag gagccgatga aggacgggac  
 421 taacaccgat atgcttcggg gagctgtaag taagctatga tccggagatt tccgaatggg  
 481 gcaaccocagc agttttaatc aactgttacc actagatgaa ttcatagtct agttggaggt  
  
 Primer 3

541 aaacgctgtg aactgaaaca tctaagtacc cgga

**Figür 2.1.** Dizayn edilmiş olan P1, P2, ve P3 primerlerinin 16S ve 23S rRNA genlerindeki bağlanma bölgeleri. Organizma: *Lactobacillus plantarum*. Suş: IAM 1216 veya JCM 1149. 1..155: 16S rRNA' yı kodlayan bölge (kısmi). 156..358: spacer region. 359..574: 23S rRNA' yı kodlayan bölge (kısmi).

PCR tekniği DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu, primerlerin yapışması ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimi ile gerçekleştirilen uzama steplerinin tekrarlayan döngülerine dayanan bir tekniktir. PCR'ın her bir döngüsünde seçilen bölge ikiye katlanır ve böylece hedef DNA miktarı sürekli artar. Bu çalışmada yapılan PCR analizlerinde 50 µl'lik reaksiyon karışımları kullanılmıştır.

50 µl'lik bir reaksiyon karışımı şunları içerir:

- 10x reaksiyon tamponu (final konsantrasyonu 1x olacak şekilde)
- 0.25 mM MgCl
- 2 mM dNTP karışımı
- 2 ünite Taq DNA polimeraz
- 100 pmol primerler
- 0.05 µg DNA
- Steril double distile su; final konsantrasyonu 50 µl'ye tamamlayacak kadar.

Son olarak buharlaşmayı engellemek için 30 µl mineral yağ eklenmiştir

PCR işlemi termal cyclus (TECHNE Progene) denilen makinada yapılmıştır ve şu reaksiyon döngüleri izlenmiştir: 95 °C x 3 dak., 38 x (95 °C x 1 dak., T<sub>a</sub> x 1 dak., 72 °C x 1 dak.), 72 °C x 3 dak.; T<sub>a</sub> yapışma sıcaklığını belirtir ve 50°C yada 55°C olarak kullanılmıştır.

Tüm PCR analizlerinde PCR'ın verimli çalışıp çalışmadığını test etmek için pozitif kontrol ve bu amaçla PBluescript (Stratagene) ve 315/316 primerleri kullanılmıştır. Bu primerler 300 bp'lik ürün vermişlerdir. Ayrıca DNA kontaminasyonu ihtimaline karşılık her PCR için bir de negatif kontrol uygulanmıştır.

#### **2.2.4. PCR ürünlerinin Saflaştırılması**

Pek çok restriksiyon endonükleazla kesim deneylerinde genellikle PCR karışımı herhangi bir saflaştırma işlemi olmaksızın doğrudan kullanılır. Fakat çalışmamızda doğrudan PCR karışımını kestiğimizde yeterli aktiviteyi gözlemleyemedik ve bu nedenle elde edilmiş olan PCR ürünlerini Wizard PCR Preps DNA Purification sistemini kullanarak saflaştırdık. Böylelikle PCR karışımları tuz, primer dimerleri gibi kontaminantlardan etkili bir biçimde saflaştırılmış oldu.

### 2.2.5. Restriksion Endonükleaz ile Kesim

Bu çalışmada spacer bölgenin nükleotit dizilimleri göz önüne alınarak seçilmiş olan 4 farklı four-cutter restriksion endonükleaz enzimi kullanılmıştır: *FnuD II*, *Mse I*, *Tas I* ve *Taq I*. Enzim olarak tanıma bölgeleri spacer bölge üzerinde olan four-cutter restriksiyon enzimlerinin seçilmesinin nedeni six-cutter enzim için spacer bölgenin çok kısa olması ve karşılaştırma yapabilmek için oluşacak bant sayısını artırma isteğidir. Bu enzimlerin tanıma bölgeleri Tablo 3.1. de verilmiştir.

**Tablo 2.3.** Restriksion Endonükleaz enzimlerin tanıma bölgeleri.

<i>Bsh</i> 1236I ( <i>FnuD II</i> )	5'...C G↓C G...3' 3'...G C↑G C...5'
<i>Tas I</i> ( <i>Tsp EI</i> )	5'...↓A A T T...3' 3'... T T A A↑...5'
<i>Taq I</i>	5'...T↓C G A...3' 3'...A G C↑T...5'
<i>Tru II</i> ( <i>Mse I</i> )	5'...T↓T A A ...3' 3'...A A T↑T ...5'

Saflaştırma işleminden sonra reaksiyon karışımı hacmine göre DNA konsantrasyonu hesaplanmış ve çıkan sonuca göre de kullanılacak olan enzimin ünitesi hesaplanmıştır. Bu çalışmada 20 µl' lik reaksiyon karışımları kullanılmıştır.

20 µl' lik bir reaksiyon karışımı şunları içerir:

- 2 µl 10x reaksiyon tamponu (final konsantrasyonu 1x olacak şekilde)
- 10 µl DNA
- Steril double distile su; final konsantrasyonu 20 µl' ye tamamlayacak kadar.
- Yeteri miktarda enzim

Son olarak buharlaşmayı engellemek için 20 µl mineral yağ eklenmiştir.

Hazırlanan reaksiyon karışımı kullanılan enzimin çalıştığı spesifik sıcaklıkta 4 saat kadar inkübe edilmiştir. Bu *FnuD* II için 37°C ve diğerleri için 65 °C' dir.

### 2.2.6. Agarose Jel Elektroforezi

Bu çalışmada, DNA analizi için 0.8%' lik agarose jel, PCR ürünleri için ise 1%' lik agarose jel kullanılmıştır.

Agarose jel elektrofrezinde öncelikle jel eritilir ve 50-60 °C' ya kadar soğutulur, sonra 0.5 µg/ml ethidium bromid eklenerek karışım elektrofrez tankına dökülür ve burada katılaşması için beklenilir. Sonra tank içi 1x TAE tamponu ile dolu elektrofrez aletine konular ve 70 voltta 60 dak. çalıştırılır. Son aşamada jelin UV ile analizi gerçekleştirilir.

### 2.3. RAPD

RAPD analizi için PCR' daki aynı reaksiyon karışımı aynı makina ve DNA miktarı kullanılmıştır ve şu reaksiyon döngüleri izlenmiştir: 90°C x 5 dak., 35 x (89°C x 1 dak., 32°C x 1 dak., 72°C x 1.5 dak.), 50°C x 3 dak.

RAPD analizi için rastgele dizayn edilmiş bir grup primer kullanılmış ancak sadece iki tanesi; P4 ve P5 tüm suşlarda sonuç vermiştir. Kullanılan bu primerlerin nükleotit dizilimleri Tablo 2.4. de verilmiştir. Bu primerlerin dizaynında ana husus primerlerde 50-70% G-C birleşme oranıdır ve palindromik bölgelerin olmayışıdır (Ören, 1997).

**Tablo 2.4.** RAPD' de kullanılan primerlerin nükleotit dizilimleri.

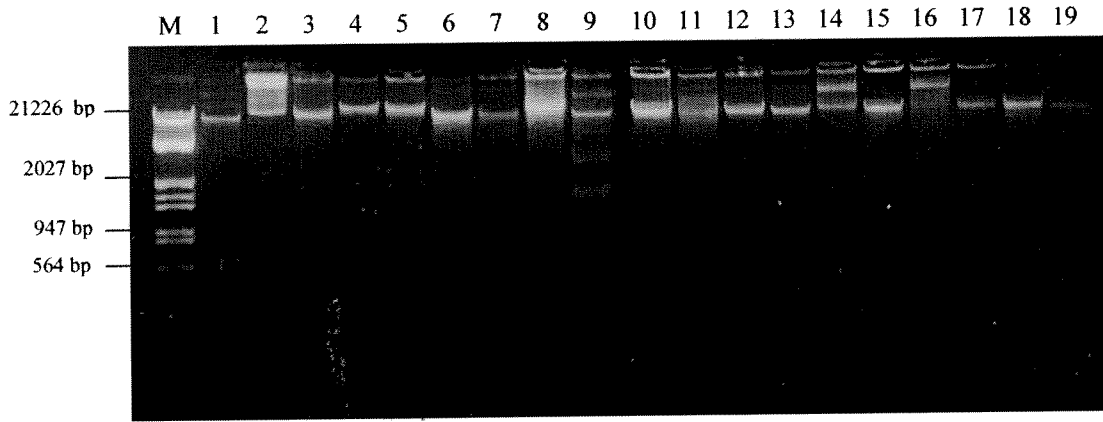
Primer 4 (9 mer)	5' - GCA NGT CGC - 3'
Primer 5 (9 mer)	5' - CAG TCA GCG - 3'



## SONUÇ

### 3.1. DNA İzolasyonu

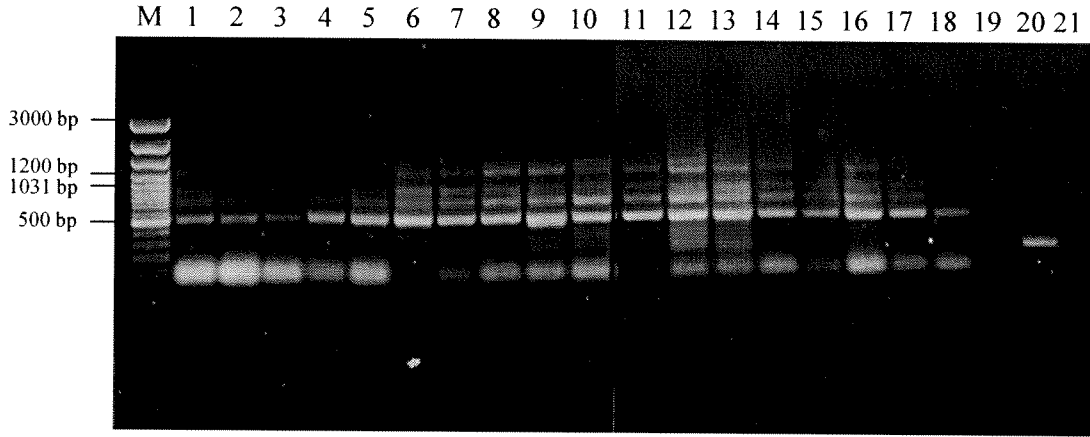
Tablo 2.1. de verilmiş olan tüm bakterilerin DNA' ları izole edilmiştir ve elde edilen sonuç Figür 3.1. de gösterilmiştir. Şekilden de görülebileceği gibi sırasıyla 2, 4, 5, 9, 14 ve 16. kuyucuklarda yer alan *L. plantarum* Ç3, *L. plantarum* Z15L, *L. plantarum* Z11L, *L. plantarum* DSM 20246, *L. plantarum* CG4 ve *L. salivarius* plazmid içermektedirler.



**Figure 3.1.** Agarose jel üzerinde DNA izolasyon sonucu. **M**,  $\lambda$  DNA/EcoRI+ Hind III markırı (0.5  $\mu$ g / $\mu$ l); **1**, *L. plantarum* 80; **2**, *L. plantarum* Ç3; **3**, *L. plantarum* Ç1; **4**, *L. plantarum* Z15L; **5**, *L. plantarum* Z11L; **6**, *L. plantarum* HU; **7**, *L. plantarum* RSKK 10; **8**, *L. plantarum* DSM 20174; **9**, *L. plantarum* DSM 20246; **10**, *L. plantarum* NCIMB 1193; **11**, *L. plantarum* 23; **12**, *L. plantarum* 37; **13**, *L. plantarum* 73; **14**, *L. plantarum* CG4; **15**, *L. acidophilus* ATCC 4356; **16**, *L. salivarius*; **17**, *L. brevis*; **18**, *L. pentosus*; **19**, *B. subtilis*.

### 3.2. PCR

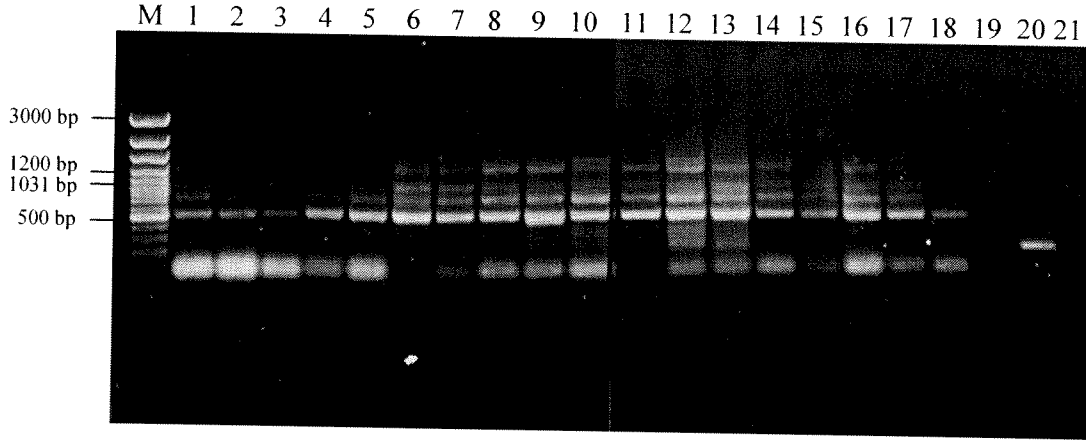
PCR analiz çalışmaları P1/P3 ve P2/P3 primer çiftleri ile *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. salivarius*, *L. pentosus* and *B. subtilis* organizmalarına gelişme kısmında anlatıldığı şekilde uygulanmıştır, P1/P3 primer çiftinden elde edilen sonuç Figür 3.2. de; P2/P3 primer çiftinden elde edilen sonuç ise Figür 3.3. de gösterilmiştir.



**Figür 3.2.** P1 ve P3 primerleri ile PCR analizi. **M**, 100 bp DNA ladder markırı; **1**, *L. plantarum* 80; **2**, *L. plantarum* Ç3; **3**, *L. plantarum* Ç1; **4**, *L. plantarum* Z15L; **5**, *L. plantarum* Z11L; **6**, *L. plantarum* HU; **7**, *L. plantarum* RSKK 10; **8**, *L. plantarum* DSM 20174; **9**, *L. plantarum* DSM 20246; **10**, *L. plantarum* NCIMB 1193; **11**, *L. plantarum* 23; **12**, *L. plantarum* 37; **13**, *L. plantarum* 73; **14**, *L. plantarum* CG4; **15**, *L. acidophilus* ATCC 4356; **16**, *L. salivarius*; **17**, *L. brevis*; **18**, *L. pentosus*; **19**, *B. subtilis*; **20**, positif kontrol; **21**, negatif kontrol.

Primer P1 ve P3 ile analiz edilen *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. salivarius* and *L. pentosus* ait tüm suşlar yaklaşık 500 bp' lik karakteristik bir ana bant ve 500 bp' den daha büyük 3 yada 4 zayıf bant vermiştir. P2 ve P3 primer çifti ile de benzer sonuçlar alınmıştır: 400 bp' lik bir ana bant ve bu ana banttan daha büyük 3 yada 4 zayıf bant. Ancak *B. subtilis* bu her iki primer çiftleri ile de herhangi bir sonuç vermemiştir.

Gen bankasından elde edilen rRNA gen dizilimleri bilgilerine göre P1 ve P3 primer çiftinin yaklaşık 500 bp; P2 ve P3 primer çiftinin ise 400 bp' lik fragmentler vermesi beklenen sonuçlardır. Bu sonuçlar gösteriyor ki, elde edilmiş olan 500 bp ve 400 bp' lik fragmentler beklenen herhangi bir tRNA geni içermeyen 'kısa' spacer bölgeleridir. Elde edilen diğer daha büyük fragmentler ise tRNA genlerini içeren ve içerdikleri bu tRNA genlerinin sayısına göre büyüklükleri değişen 'uzun' spacer bölgeleridir.



**Figür 3.3.** P2 ve P3 primerleri ile PCR analizi. **M**, 100 bp DNA ladder markırı; **1**, *L. plantarum* 80; **2**, *L. plantarum* Ç3; **3**, *L. plantarum* Ç1; **4**, *L. plantarum* Z15L; **5**, *L. plantarum* Z11L; **6**, *L. plantarum* HU; **7**, *L. plantarum* RSKK 10; **8**, *L. plantarum* DSM 20174; **9**, *L. plantarum* DSM 20246; **10**, *L. plantarum* NCIMB 1193; **11**, *L. plantarum* 23; **12**, *L. plantarum* 37; **13**, *L. plantarum* 73; **14**, *L. plantarum* CG4; **15**, *L. acidophilus* ATCC 4356; **16**, *L. salivarius*; **17**, *L. brevis*; **18**, *L. pentosus*; **19**, *B. subtilis*; **20**, positif kontrol; **21**, negatif kontrol.

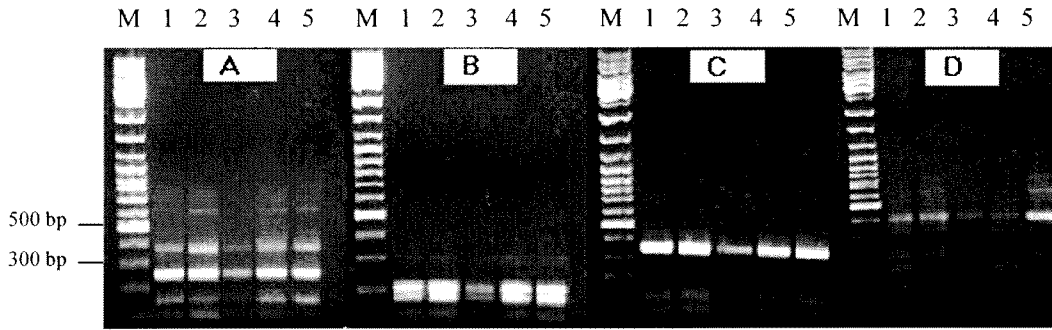
Ancak her iki primer çifti aynı fragmentleri *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. salivarius* ve *L. pentosus* suşlar için de vermiştir; bu beklenilmeyen bir sonuçtur, ve gösteriyorki spacer bölgesinin büyüklük varyasyonu *Lactobacillus* suşları için aynıdır ve bu özellik bu cins için suş yada tür seviyesinde tanımlama amaçlı kullanılamaz.

Aynı zamanda bu çalışmada kontrol organizması olarak kullanılan *B. subtilis* türünün herhangi bir fragment vermemiş olması *Lactobacillus* ve *Bacillus* cinslerinin rRNA operonlarının hiç bir şekilde benzer olmadığını göstermiştir.

PCR ribotipleme yönteminin bazı organizmalarda enzimle kesme gibi birtakım değişiklikler olmaksızın bazen spacer bölgedeki polimorfismin ortaya çıkarılmasında yeterli olmadığı bilinen bir gerçektir (Kostman, 1992). Bu nedenle *L. plantarum* türünün diğer *Lactobacillus* türlerinden ayırma probleminin üstesinden gelebilmek için elde edilmiş olan PCR ürünlerinin farklı bant deseni elde edebilmek için restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesilmesine karar verilmiştir.

### 3.3. PCR ürünlerinin Restriksion Endonükleaz ile Kesilmesi

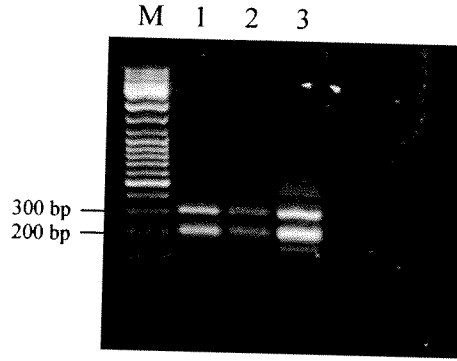
PCR ürünlerinin saflaştırılmasından sonra enzimle kesim işlemi gerçekleştirilir. Bu çalışmada spacer bölgenin nükleotit dizilimleri göz önüne alınarak seçilmiş olan 4 farklı four-cutter restriksion endonükleaz enzimi kullanılmıştır: *FnuD* II, *Mse* I, *Tas* I ve *Taq* I. P2 ve P3 primer çifti ile yapılan PCR ürünleri saflaştırıldıktan sonra bu 4 enzimle kesilmiş ve sonucu Figür 3.4. de gösterilmiştir.



**Figure 3.4.** *L. acidophilus* ve 4 *L. plantarum* suşlarına ait P2 ve P3 primer çifti ile yapılan PCR ürünlerinin 4 farklı four-cutter restriksion endonükleaz ile kesimi. **A**, *FnuD* II; **B**, *Tas* I; **C**, *Taq* I; **D**, *Mse* I. **M**, 100 bp DNA ladder markırır; **1**, *L. plantarum* DSM 20246; **2**, *L. plantarum* HU; **3**, *L. acidophilus* ATCC 4356; **4**, *L. plantarum* RSKK 10; **5**, *L. plantarum* 73.

Elde edilmiş olan bu sonuçlar gösteriyor ki; bu farklı 4 restriksiyon enzimi 400 bp' den küçük bantlar halinde farklı kesim desenleri vermişlerdir. Bu kesim işleminin uygulanmasının nedeni *L. plantarum* ve diğer *Lactobacillus* suşları için tanımlamayı sağlayabilecek farklı kesim desenlerini bulabilmektir. Spacer bölge üzerinde çok farklı tanıma bölgeleri olan 4 farklı restriksiyon enzimi kullanılmış olmasına rağmen herhangi bir farklı bant deseni bulunamamıştır. Bu sonuç gösteriyorki, *Lactobacillus* suşlarında spacer bölgede bulunan dizilim varyasyonu türlerin tanımlanması için yeterli özellikte değildir.

Başka bir kesim işlemi de *L. brevis* ve *L. plantarum* suşlarında denenmiştir; P1 ve P3 primer çifti ile yapılan PCR ürünleri *Tas* I enzimi ile kesilmiştir. Ancak yine herhangi bir tanımlama yapılabilecek sonuç bulunamamıştır. Elde edilen sonuç Figür 3.5. de gösterilmiştir.

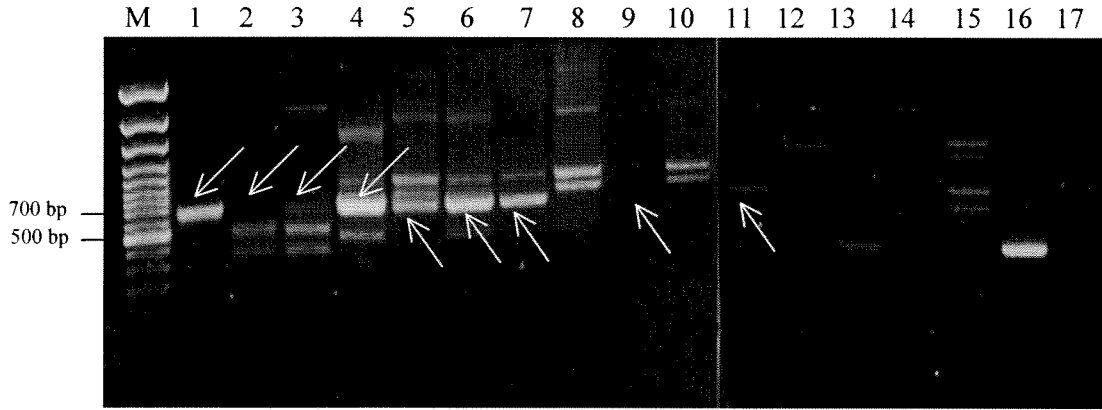


**Figure 3.5.** *L. brevis* ve 2 *L. plantarum* suşlarına ait P1 ve P3 primer çifti ile yapılan PCR ürünlerinin *Tas I* ile kesimi. **M**, DNA ladder mix markırı; **1**, *L. plantarum* CG 4; **2**, *L. brevis*; **3**, *L. plantarum* 1193.

Sonuç olarak, PCR analizlerinde spacer bölgesinin elde edilebilmesi için iki farklı primer çifti kullanılmış ancak her hangibir farklı bant modeli gözlenememiştir; bu durum kısa ve uzun spacer bölgelerin kullanılan *Lactobacillus* suşları arasında farklılığı sağlayabilecek bir faktör olmadığını gösteriyor. PCR ribotipleme yöntemini geliştirmiş olan Kostman' a göre bazı türlerde bu yöntemin başarılı olabilmesi için four-cutter bir enzimle kesim gibi bazı değişikliklerin uygulanması gereklidir (Kostman, 1992). Ancak sözü edilen değişiklik farklı tanıma bölgeleri olan 4 farklı enzim kullanılarak uygulanmasına rağmen tanımlama için her hangibir farklı bant modeli gözlenememiştir; bu sonuç spacer bölgesinin *Lactobacillus* türlerinde ne büyüklük ne de dizilim yönünden herhangi bir varyasyon göstermediğini kanıtlamıştır ve denilebilir ki; PCR ribotipleme yöntemi *Lactobacillus* türlerini tanımlamada kullanılamaz.

### 3.4. RAPD

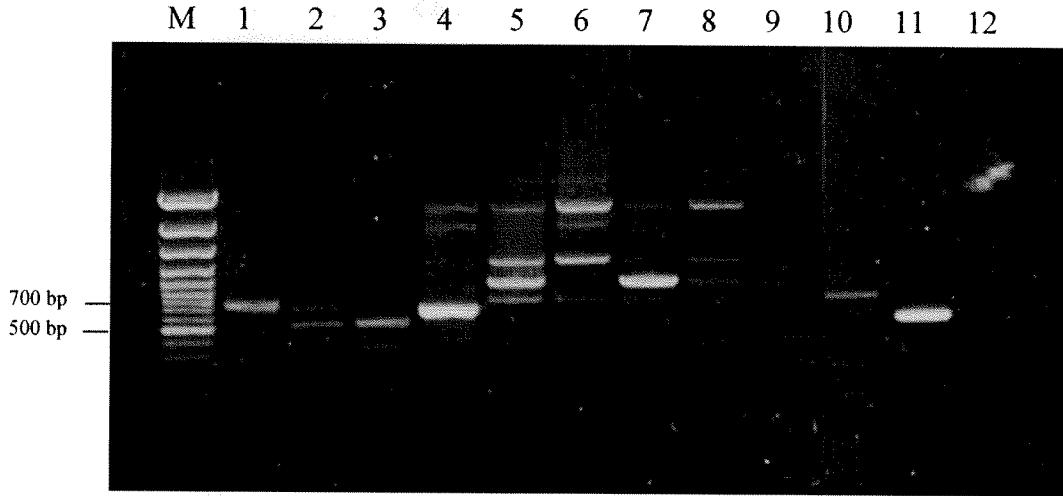
RAPD analizi PCR ribotipleme yöntemine alternatif bir yöntem olarak kullanılmıştır. RAPD analizi için rastgele dizayn edilmiş bir grup primer kullanılmış ancak sadece iki tanesi; P4 ve P5 tüm suşlarda sonuç vermiştir. *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. salivarius*, *L. pentosus* ve *B. subtilis* suşlarında P4 primerinin verdiği sonuç Figür 3.6. da gösterilmiştir.



**Figür 3.6.** *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. salivarius* ve *B. subtilis* suşlarında primer P4 ile RAPD analizi. **M**, 100 bp DNA ladder markırı; **1**, *L. plantarum* 80; **2**, *L. plantarum* Ç3; **3**, *L. plantarum* Ç1; **4**, *L. plantarum* HU; **5**, *L. plantarum* RSKK 10; **6**, *L. plantarum* DSM 20174; **7**, *L. plantarum* DSM 20246; **8**, *L. plantarum* NCIMB 1193; **9**, *L. plantarum* 23; **10**, *L. plantarum* 37; **11**, *L. plantarum* 73; **12**, *L. salivarius*; **13**, *L. brevis*; **14**, *L. pentosus*; **15**, *B. subtilis*. **16**, positif kontrol; **17**, negatif kontrol.

Primer P4 ile RAPD analizi bu çalışmada kullanılan tüm suşlara uygulandı ancak *L. plantarum* Z15L, *L. plantarum* Z11L, *L. plantarum* CG4 ve *L. acidophilus* suşları herhangi bir ürün vermediler. *L. plantarum* 80, *L. plantarum* 23, *L. plantarum* 73 ve *L. brevis* suşları ise sırasıyla 700 bp, 900 bp ve 700 bp, büyüklüğünde sadece bir bant verdiler. Diğer tüm suşlarda farklı bant desenleri gözlenmiştir. Ayrıca, P4 ile test edilen çoğu *L. plantarum* suşunda Figür 3.6. da oklarla gösterilen 700 bp' lik bir DNA fragmentinin olduğu bulunmuştur ve bu fragmente P4 ile test edilen diğer *Lactobacillus* türlerinde rastlanmamıştır.

P5 primerinin *L. plantarum* suşlarında verdiği sonuç Figür 3.7. da gösterilmiştir. Primer P5 ile RAPD analizi bu çalışmada kullanılan tüm suşlara uygulandı ancak sadece *L. plantarum* 80, *L. plantarum* Ç3, *L. plantarum* Ç1, *L. plantarum* HU, *L. plantarum* RSKK 10, *L. plantarum* DSM 20174, *L. plantarum* DSM 20246, *L. plantarum* NCIMB 1193, *L. plantarum* 37 ve *L. plantarum* 73 suşlarında farklı bant desenleri gözlenmiştir. *L. plantarum* 80 ve *L. plantarum* 73 suşları ise büyüklükleri sırasıyla 800 bp ve 750 bp olan tek bant vermişlerdir.



**Figür 3.7.** *L. plantarum* suşlarında primer P5 ile RAPD analizi. **M**, 100 bp DNA ladder markırı; **1**, *L. plantarum* 80; **2**, *L. plantarum* Ç3; **3**, *L. plantarum* Ç1; **4**, *L. plantarum* HU; **5**, *L. plantarum* RSKK 10; **6**, *L. plantarum* DSM 20174; **7**, *L. plantarum* DSM 20246; **8**, *L. plantarum* NCIMB 1193; **9**, *L. plantarum* 37; **10**, *L. plantarum* 73; **11**, positif kontrol; **12**, negatif kontrol.

RAPD analizinde kullanılan bu iki primeri karşılaştıracak olursak; P4 daha iyi sonuç vermiştir, çünkü aşağı yukarı kullanılan tüm suşlarda ayırt edilebilir bant desenleri vermiştir ve çoğu *L. plantarum* suşunda 700bp' lik ortak bir bant oluşturmuştur.

Sonuç olarak, RAPD analizinin *Lactobacillus* organizmasında suş seviyesinde dahi uygulanabilir açıkça görülmektedir. Buna ilaveten çoğu *L. plantarum* suşunda ortak bir bant vermiştir. Bundan dolayı, PCR ribotipleme yöntemi ile karşılaştırıldığında RAPD yönteminin *Lactobacillus* suşlarını tanımlama ve ayırt etmede daha güçlü olduğu açıktır.

Daha sonraki çalışmalarda, *L. plantarum* suşuna spesifik bir primer oluşturmak amacı ile bu 700 bp' lik ortak bant saflaştırılıp sekanslanabilir.

## REFERANSLAR

- Baele M., Vaneechoutte M., Verhelst R., Vancanneyt M., Devriese L.A., Haesebrouck F., Identification of *Lactobacillus* species using tDNA-PCR. J. Microbiol. Methods. 50, 263-271, (2002).
- Bidet P., Barbut F., Lalande V., Burghoffer B., Petit J-C., Development of a new PCR ribotyping method for *Clostridium difficile* based on rRNA gene sequencing. FEMS Microbiol. Lett., 175, 261-266, (1999).
- Bingen E.H., Denamur E., Elion J., Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. Clin. Microbiol. Revs., 7, 311-327, (1994).
- Collins J.K., Thornton G., Sullivan G.O., Selection of probiotic strains for human applications, Int. Dairy Journal, 8, 487-490, (1998).
- Daeschel M.D., Andersson R.E., and Fleming H.P., Microbial ecology of fermenting plant materials. FEMS Microbiol. Rev., 46, 357-367, (1987).
- Eriksson C., Biotechnology Group Meeting Probiotics-Fact or Fiction? J. Chem. Tech. Biotechnol., 51, 539-570, (1991).
- Farber J.M., An introduction to the hows and whys of molecular typing. J. Food Protection, 59, 1091-1101, (1996).
- Kostman J.R., Alden M.B., Mair M., Edlind T.D., Lipuma J.J., and Stull T.L., A universal approach to bacterial molecular epidemiology by PCR chain reaction ribotyping. 171, 204-208, (1995).



- Kostman J.R., Edlind T.D., Lipuma J.J., and Stull T.L., Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 2084-2087, (1992).
- Kostman J.R., Edlind T.D., Lipuma J.J., and Stull T.L., Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 2084-2087, (1992).
- Luchansky John B., Christine Tennant M., and Klaenhammer Todd R., Molecular cloning and deoxyribonucleic acid polymorphisms in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri*. *J. Dairy Science*, 74, 3293-3302, (1991).
- O'Neill G.L., Ogunisola F.T., Brazier J.S., and Duerden B.I., Modification of a PCR ribotyping method for application as a routine typing scheme for *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 2, 205-209, (1996).
- Sanders M. E., Probiotics. *Food Technol.*, 53, 67-75, (1999).
- Schleifer K.H., and Stackebrandt E., Molecular systematics of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 37, 143-187, (1983).
- Tannock G.W. , Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Tibtech* 15, 270-274, (1997).
- Thompson J.K., McConville K.J., McReynolds C. and Collins M.A., Electrotransformation of *Lactobacillus plantarum* using linearized plasmid DNA. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 419-425, (1997).
- Verdu M.E., Coll P., Fontanals D., March F., Pons I., Easo D.V., Prats G., Comparison of conventional ribotyping and PCR-RFLP ribotyping for the analysis of endemic strains of *Neisseria meningitidis* isolated in a local community over 7 years. *FEMS Microbial. Lett.*, 179, 247-253, (1999).

## PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: TARP-2547
Proje Başlığı: LAKTİK STARTER SUŞLARINDA RİBOTİPLEME (RIBOTYPING) VE VERİ TABANI OLUŞTURULMASI
Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar:  Prof. Dr. Hüveyda BAŞAĞA Doç. Dr. Zümrüt ÖGEL Doç. Dr. Candan GÜRAKAN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:  ODTÜ, Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:  ODTÜ, Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:  01.03.2000- 01.03.2002
Öz (en çok 70 kelime): Bu çalışmanın amacı, <i>Lactobacillus plantarum</i> suşlarının tanımlanmasında PCR ribotipleme yönteminin uygulanabilirliğini araştırmaktır. Alternatif bir yöntem olarak RAPD de kullanılmıştır. PCR ribotipleme 16S-23S rRNA genleri arasındaki bölgede bulunan farklılıkları esas alan bir moleküler tanımlama yöntemidir ve primer çifti bu korunmuş bölgeler kullanılarak tasarlanır. Buna karşın RAPD'de dizilimi rastgele seçilmiş kısa oligonükleotitler kullanılır. Sonuç olarak, RAPD'nin <i>Lactobacillus</i> 'ları suş seviyesinde ayırt edebildiği görülmüştür. Ancak, PCR ribotiplemenin <i>Lactobacillus</i> türlerini ayırd etmede etkili olmadığı görülmüştür.
Anahtar Kelimeler: <i>L. plantarum</i> , PCR ribotipleme, spacer bölge, RAPD
Projeden Kaynaklanan Yayınlar: -
Bilim Dalı: Biyoloji Doçentlik Bilim Dalı Kodu: 401