

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
16S rDNA SEKANS ANALİZİ
İLE TANIMLANMASI

Proje Yürütücüs :Doç. Dr. Özlem AYDIN OSMANAĞAOĞLU

Yardımcı Araştırmacılar:Ar. Gör. Fadime KIRAN
Başak ORAL

Proje Numarası: 09H4240002

Başlama Tarihi: 01.02.2009

Bitiş Tarihi: 01.02. 2010

Rapor Tarihi: 08.02.2010

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Ankara - 2010

I. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN 16S rDNA SEKANS ANALİZİ İLE TANIMLANMASI

ÖZET

Laktik asit bakterilerinin (LAB) endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en temel amacı kullanılabilir olan LAB suşlarının seçimidir. Suş bazında güvenilir tiplendirme yöntemleri hem LAB starter kültürlerin performanslarının incelenmesinde hem de fonksiyonel gıda ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılacak olan kültürlerin incelenmesinde önem kazanmaktadır. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayırımı sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir. Günümüzde, LAB tanımlama/tiplendirme çalışmaları ilgi odağı olan fenotipik yöntemlerden daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler yöntemlere (genotipik) doğru kaymıştır. Bizler de çalışmalarımızı fenotipik yöntemlerden genotipik yöntemlere kaydırarak TÜBİTAK (106T742 TBAG/HD ve 108T280 TBAG/HD) ve A.Ü. BAP (20050705006HPD, 09H4240001, 09H4240002 ve 10B4240002) tarafından desteklenen projelerimiz ile Mikrobiyal Genetik Laboratuvarımızın Kültür Koleksiyonunda bulunan 148 adet LAB suşu üzerinde moleküler taksonomik çalışmalarımızı devam ettirmekteyiz. Çalışmalarımızdaki genel amacımız; birbirleri ile oldukça benzerlik gösteren laktik asit bakterilerine ait suşların tür-içi ve türler arası seviyede ayırımı sağlamak için farklı genotipik yöntemlerin kullanımı ile elde edilen taksonomik rezolüsyonun değerlendirmesiyle hem daha önce açıklanamayan ya da beklenmeyen sonuçların giderilmesi hem de tanımlama da kullanılabilir en uygulanabilir yöntemin belirlenmesi yönündedir.

PZR teknolojisi ile çoğaltılan 16S DNA genlerinin direk dizi analizi, bilinmeyen bir suşun tek bir basamak ile tanımlanmasında son yıllarda yaygın olarak kullanılan oldukça etkili ve güvenilir bir yöntemdir. TÜBİTAK (108T280-TBAG) ve BAP (09H4240001) tarafından desteklenen nolu proje çalışmasından elimizde LAB suşlarına ait 16S rDNA bölgeleri bulunmaktaydı. Çalışmamızda; 16S rDNA PZR ürününün saflaştırılmış ve dizi analizine hazır hale getirilmiştir. 16S rDNA PZR ürününün saflaştırılmasından sonra dizi analizi gerçekleştirilecektir. Dizi analizinden elde edilen veriler uygun veri bankaları ile kıyaslanacak ve sonuçlar LAB lere ait bu suşların tek bir basamak ile tanımlanmasında kullanılacaktır.

I. IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA WITH 16S rDNA SEQUENCE ANALYSIS

ABSTRACT

As far as industrial applications of LAB are concerned, the aim of the researches is choosing the LAB strain which can be used. Reliable methods for identification and characterization of bacterial strains belonging to LAB are great interest in food industry in the study of the performance of LAB starter cultures and cultures used as additives in functional food type products as well as in fields of applied microbiology. Therefore, application of reliable methods on spesific and distinct discrimination of any strain is rather important. Nowadays, the main focus for the identification/tying of LAB has moved from phenotypic to genotypic methods as they yield more sensitive and accurate results. We are keeping to work on our molecular taxonomic researches on 148 LAB strains as supported by TUBİTAK (106T742 TBAG/HD, 108T280 TBAG/HD) and A.U.BAP (20050705006HPD, 09H4240001, 09H4240002 and 10B4240002). The general aim of our study is to optimize the experimental conditions with using different genotypic methods for the differentiation of highly related LAB strains at the species and the intra-species level and then evaluate and compare the taxonomic resolution, and to eliminate the previous nonidentified also unforeseeable results.

Sequence analysis of 16S rDNA genes with PCR technology is well effective and reliable method which is commonly used for identification of unknown strain on a single step. So far we have the PCR amplicon of 16S rDNA of LAB strains obtained in a study supported by TUBİTAK 108T280 TBAG/HD and BAP (09H4240001). In this study, 16S rDNA PCR products of 148 LAB were purified and prepared for sequence analysis. Eventually, after purification of 16S rDNA PCR product, sequence analysis will be done. After comparing the data of sequences with the databank , results will be used for identification of LAB on a single step.

II. AMAÇ VE KAPSAM

2.1. AMAÇ

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyal Genetik Laboratuvarımızda 148 adet laktik asit bakterisine ait tiplendirme çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalarda asıl amacımız; birbirleri ile oldukça benzerlik gösteren laktik asit bakterilerine ait suşların tür-içi ve türler arası seviyede ayrımını sağlamak için farklı genotipik yöntemlerin optimize edilmesi ve bu yöntemlerin kullanımı ile elde edilen taksonomik rezolusyonun değerlendirilmesidir. Bu amaç dahilinde Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Müdürlüğü ve TÜBİTAK tarafından çeşitli projelerimiz desteklenmiş bulunmaktadır. Projeler kapsamında hücre duvarı protein profilleri ve plazmit profilleri (AU20050705006HPD), AFLP (106T742-TBAG), RAPD ve ARDRA (108T280-TBAG-TÜBİTAK, BAP 09H4240001 and BAP 09H4240002) bant profilleri taksonomik rezolusyonu değerlendirmek amacıyla çalışılmış ve halen çalışılmaktadır (BAP 10B4240002).

16S rDNA bölgelerinin dizilişleri evrimsel kronometreler olarak kullanılmaktadır. 16S rRNA'ların spesifik yapısı ve belirli bir diziye sahip olması, spesifik DNA problemleri ile identifikasyon için bu bölgeleri ideal bir hedef yapmaktadır. Herhangi bir bakteri cinsine dahil olan türlerin tamamı, 16S rRNA'daki değişken bölgelerin dizi analizinin belirlenmesi ile kesin olarak tanımlanabilmektedir. Çalışmamızın amacı bir önceki projelerimizden (108T280-TBAG ve BAP 09H4240001) elde etmiş olduğumuz 16S rDNA PZR ürünlerini saflaştırarak dizi analizine hazır hale getirmektir. 16S rDNA bölgelerinin dizi analizlerinin belirlenmesi, LAB suşlarına ait ortak bir veri tabanı oluşturmaya yönelik olan amacımızda önemli bir basamak olacaktır. Bu amaçla gerçekleştirdiğimiz ilk aşama ise bu proje desteğiyle birlikte bu bölgenin dizi analizine hazır hale getirilmiş olmasıdır. Devamında ise dizi analizi ile başarılı sonuçlar elde edilmesi hedeflenmektedir.

2.2. KAPSAM

Laktik asit bakterilerinin (LAB) endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en önemli kısmını kullanılabilecek LAB ların doğru bir şekilde tanımlanması oluşturmaktadır. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayırımını sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir. Moleküler yöntemler, güçlü bir ayırım gücüne sahip olmaları, tekrarlanabilir olmaları, uygulamasının kolay olmasının yanında, sonuçların kolay yorumlanabilmesi gibi nedenlerden dolayı son yıllarda sıklıkla kullanılmakta ve geliştirilmektedir (Moschetti *et al.* 1998, Bush and Nitschko 1999). Daha önce desteklenmiş olan (AU-BAP 20050705006HPD, TÜBİTAK HD 106T742, TÜBİTAK HD 108T280, BAP 09H4240001 ve BAP 09H4240002) projelerimiz ile bu amaç doğrultusunda birçok genotipik yöntem denenmiş ve halen denenmekte olup geniş bir veri tabanı oluşturulmaya çalışılmaktadır. TÜBİTAK tarafından desteklenen ve geçtiğimiz aylarda başarıyla tamamlanan 108T280 nolu ve “Laktik asit bakterilerinde tür içi ve türler arası ayırımında RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA - rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA) PZR ve 16S ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis - amplifiye edilmiş ribozomal DNA'nın restriksiyon analizi) tekniklerinin değerlendirilmesi” isimli projeden elde etmiş olduğumuz 16S rRNA PZR ürünleri üzerinden **16S rDNA genlerinin direk dizi analizinin** gerçekleştirmek istemekteyiz. **16S rDNA genlerinin direk dizi analizi bilinmeyen bir suşun tek bir basamak ile tanımlanmasında oldukça etkili bir yöntemdir.** Bu çalışmanın kapsamı dahilinde; daha önce desteklenmiş olan (AU-BAP 20050705006HPD, TÜBİTAK HD 106T742, TÜBİTAK HD 108T280 ve BAP 09H4240001) projelerimizle oluşturulan bilgilerin geliştirilmesine katkıda bulunmak adına; kullandığımız LAB lere ait bazı suşlar arasındaki farklılıkların 16S rDNA genlerinin direk dizi analizi ile ortaya konulması amacıyla yönelik olan çalışmamız için elzem olan bir ön aşama gerçekleştirilmiştir. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Bütçesinden sağlanan destekle 16S rDNA PZR ürünü; kit kullanımı ile jelden saflaştırılmış ve dizi analizi için hazır hale getirilmiştir...

III. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Bakteri kültürleri

Çalışmada Laktik asit bakteri grubuna dahil *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* cinslerine ait toplam 148 bakteri kültürü kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan Laktik Asit Bakterileri

	Bakteri	Kaynak
A	<i>Enterococcus</i>	
1	<i>Enterococcus avium</i> ATCC Pasteur (RSKK 500)	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
2	<i>Enterococcus hirae</i> 115	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab
3	<i>Enterococcus casseliflavus</i> NRLL 3502	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
4	<i>Enterococcus durans</i> RSKK 05034	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
5	<i>Enterococcus durans</i> 51	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
6	<i>Enterococcus durans</i> 56	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
7	<i>Enterococcus durans</i> 69	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
8	<i>Enterococcus durans</i> 75	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
9	<i>Enterococcus durans</i> 89	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
10	<i>Enterococcus durans</i> 116	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
11	<i>Enterococcus durans</i> 124	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
12	<i>Enterococcus faecalis</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
13	<i>Enterococcus faecalis</i> H	İbni Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.
14	<i>Enterococcus faecalis</i> E27	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
15	<i>Enterococcus faecalis</i> EF1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
16	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	GATA, Mikrobiyoloji Lab.
17	<i>Enterococcus faecalis</i> 64	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
18	<i>Enterococcus faecalis</i> 74	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
19	<i>Enterococcus faecalis</i> 78	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
20	<i>Enterococcus faecalis</i> 79	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
21	<i>Enterococcus faecalis</i> 80	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
22	<i>Enterococcus faecalis</i> 81	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
23	<i>Enterococcus faecalis</i> 82	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
24	<i>Enterococcus faecalis</i> 139	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
25	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	GATA, Mikrobiyoloji Lab.
26	<i>Enterococcus faecium</i> F1	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü

27	<i>Enterococcus faecium</i> H	İbni Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.
28	<i>Enterococcus faecium</i> 1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
29	<i>Enterococcus faecium</i> 2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
30	<i>Enterococcus faecium</i> 3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
31	<i>Enterococcus faecium</i> 5	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
32	<i>Enterococcus faecium</i> 6	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
33	<i>Enterococcus faecium</i> 7	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
34	<i>Enterococcus faecium</i> 8	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
35	<i>Enterococcus faecium</i> 71	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
36	<i>Enterococcus faecium</i> 77	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
B.	<i>Lactococcus</i>	
1	<i>Lactococcus lactis</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
2	<i>Lactococcus lactis</i> OZ2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
3	<i>Lactococcus lactis</i> OZ3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
4	<i>Lactococcus lactis</i> OZ4	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
5	<i>Lactococcus lactis</i> PK1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
6	<i>Lactococcus lactis</i> 30	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
7	<i>Lactococcus lactis</i> 32	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
8	<i>Lactococcus lactis</i> 33	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
9	<i>Lactococcus lactis</i> 57	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
10	<i>Lactococcus lactis</i> 86	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
11	<i>Lactococcus lactis</i> 88	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
12	<i>Lactococcus lactis</i> 93	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
13	<i>Lactococcus lactis</i> 94	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
14	<i>Lactococcus lactis</i> 100	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
15	<i>Lactococcus lactis</i> 102	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
16	<i>Lactococcus lactis</i> W1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
17	<i>Lactococcus lactis</i> W2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
18	<i>Lactococcus lactis</i> W3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
19	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 31	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
20	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 34	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
21	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 35	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
22	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 39	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
23	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 62	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
24	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 63	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
25	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 87	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
26	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 99	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
27	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 103	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
28	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 01018	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
29	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NRLL B634	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
30	<i>Lactococcus garvieae</i> 38	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
31	<i>Lactococcus garvieae</i> 43	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
32	<i>Lactococcus garvieae</i> 44	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.

33	<i>Lactococcus garvieae</i> 46	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
34	<i>Lactococcus garvieae</i> 58	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
35	<i>Lactococcus garvieae</i> 59	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
36	<i>Lactococcus garvieae</i> 65	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
37	<i>Lactococcus garvieae</i> 66	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
38	<i>Lactococcus garvieae</i> 67	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
39	<i>Lactococcus garvieae</i> 83	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
40	<i>Lactococcus garvieae</i> 84	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
41	<i>Lactococcus garvieae</i> 85	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
42	<i>Lactococcus garvieae</i> 90	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
43	<i>Lactococcus garvieae</i> 91	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
44	<i>Lactococcus garvieae</i> 92	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
45	<i>Lactococcus garvieae</i> 95	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
46	<i>Lactococcus garvieae</i> 96	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
47	<i>Lactococcus garvieae</i> 97	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
C.	<i>Pediococcus</i>	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
1	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
3	<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
4	<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
5	<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
6	<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
8	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
9	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
10	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
11	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
12	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
13	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
14	<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
15	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
16	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
17	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
18	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
19	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
20	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
21	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
22	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
23	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
24	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
25	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
26	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
27	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü

28	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
29	<i>Pediococcus cereviciae</i> ATCC 666	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
D.	<i>Leuconostoc</i>	
1	<i>Leuconostoc lysis</i> Ly	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL B3469	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
E.	<i>Lactobacillus</i>	
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
2	<i>Lactobacillus buhnerii</i> NRLL B1837	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
3	<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
4	<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	Ankara Üniveritesi Gıda Mühendisliği
5	<i>Lactobacillus maltoramicus</i> NRLL 148532	Ankara Üniveritesi Gıda Mühendisliği
6	<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
7	<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	ODTÜ Gıda Mühendisliği
8	<i>Lactobacillus rhamnasus</i> TK2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
9	<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
10	<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL B21	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
11	<i>Lactobacillus caseii</i> RSKK 708	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
12	<i>Lactobacillus caseii</i> CG1	ODTÜ Gıda Mühendisliği
13	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
14	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
15	<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	Ankara Üniveritesi Gıda Mühendisliği
16	<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	H.Ü. Biyoloji Bölümü
17	<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	ODTÜ Gıda Mühendisliği
18	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
20	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
21	<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	ODTÜ Gıda Mühendisliği
22	<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	ODTÜ Gıda Mühendisliği
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 215L	ODTÜ Gıda Mühendisliği
24	<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	ODTÜ Gıda Mühendisliği
25	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	ODTÜ Gıda Mühendisliği
26	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	ODTÜ Gıda Mühendisliği
27	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	ODTÜ Gıda Mühendisliği
28	<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
29	<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
30	<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.

3.1.2 Kültür ortamları

Çalışmada kullanılan bakteri gruplarından *Enterococcus*, *Pediococcus* cinslerine ait türler TGE besiyerinde 35°C’de, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait olan türler TGE besiyerinde 30°C’de, *Lactobacillus* cinsine ait olan türler ise MRS besiyerinde 35°C’de geliştirilmiştir. LAB’lerin gelişimleri için kullanılan besiyerlerinin içerikleri **EK 1**’de verilmiştir.

3.1.3 Tampon ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanışı **EK 2**’de verilmiştir.

3.1.4 Moleküler Markörler

Çalışma boyunca kullanılan GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus markörü **EK 3**’de verilmiştir.

3.1.5 Kullanılan çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan cam malzemelerin sterilizasyonu için 185°C’de 1 saat pastör fırını kullanılmıştır. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler ise 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir.

3.1.6 Bakteri kültürlerinin saklanması

Çalışmada kullanılmış olan bakteri kültürleri Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı ve Prokaryot Genetiği Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Bu bakteri kültürleri % 50’lik gliserol çözeltisi içinde çözünmüş olarak -86°C’de saklı tutulmakta ve çalışma öncesi aktifleştirilmektedir (Biswas *et al.* 1991).

3.2. YÖNTEM

Daha önce desteklenen projemizle (TUBİTAK 108T280 ve BAP 09H4240001) gerçekleştirilmiş olan aşamalar...

DNA izolasyonu: Çalışmamızda kullanılan laktik asit bakterilerine ait farklı suşlardan kit kullanımı ile toplam genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon aşamalarında kit tarafından sağlanan prospektüs (EK 4) üzerinden birkaç değişikliğe gidilmiştir. Bu değişiklikler sırasıyla (i) elde edilen hücre miktarını arttırmak için toplam hücre hacminin 2 katına çıkarılması (ii) izopropanol ile DNA muamele edildikten sonra DNA'nın ipliksi yapıdaki zincirleri gözlemlenebilir bir kütle oluşturabilsin diye solüsyon buz üzerinde 30 dk süreyle inkübasyona bırakılması ve bu zaman diliminde ependorf tüpün arada bir yavaş hareketlerle sallanması ve (iii) çalışma sonucunda elde edilen ve içerisinde DNA molekülünün bulunduğu pellet üzerine 40 µl kit tarafından temin edilen DNA Rehidrasyon solüsyonunun (Tris-EDTA) eklenmesi ve önce 65°C'de 15 dk ardından 1 gece +4°C'de inkübasyona bırakılması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA daha sonraki çalışmalarda kullanılacak şekilde 1:10 oranında dehidrasyon tamponu içerisinde seyreltilerek (5 µl DNA + 45 µl *dehidrasyon tamponu* veya) bir sonraki aşamada kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Bu arada ana stok DNA sı -80°C de muhafaza edilmiştir.

Saflık ve miktar tayini: Genomik DNA İzolasyon Kit kullanımı ile izole edilen DNA numunelerinin kalite ve miktar tayinleri NANODROP spektrofotometrede yapılmıştır. A_{260}/A_{280} oranı yaklaşık **1.75-1,8'in** üzerinde olan örneklerin, genetik analizlerde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Agaroz Jel elektroforezinde gözlenmesi: Kromozomal DNA izolasyon kit kullanımı ile izole edilen DNA numuneleri saflık ve miktar tayini yapıldıktan sonra elektroforezleri %1 agaroz içeren jellerde yapılmıştır (Maniatis *et al.* 1986).

16S ileri (5'-3') ve 16S geri (3'-5') primerleri kullanılarak izole edilmiş DNA'da

PZR: *E.coli* 16S rDNA'sında sırasıyla 50-70 ve 1492-1508 pozisyonlarına karşılık gelen ve Gram-pozitif ve benzer bakterileri hedef alan **pB 5'd TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG 3'** ve **1492r 5'd TAC CTT GTT ACG ACT T 3'** primer çifti kullanılmıştır. 200 µL'lik PZR tüpüne toplam hacim 50 µL olacak şekilde sırasıyla 14 µL ultra saf steril su, 6 µL 5X KCl tamponu (Promega, USA), 4 µL 2.5 mM deoksiniükleotidtrifosfat (dNTP, Promega, USA) karışımı, 6 µL 10 µmol 16S ileri ve 6 µL 10 µmol 16S geri primer, 6 µL 50 ünite Taq DNA polimeraz enzimi (Promega, USA), 3 µL 25 mM MgCl₂ (Promega, USA) ve 6 µL kalıp DNA ilave edilmiştir. PZR işlemi "Gradient PCR thermocycler/Eppendorf" cihazında her biri kendi içinde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 58°C'de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C'de 1 dakika 45 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 34 döngüde gerçekleştirilmiştir. Son olarak 72°C de 10 dakika ilave bir uzama basamağı yer almıştır. Elde edilen PZR ürünü % 1.5 agaroz (Sigma Chem. Co., USA) içeren jelde yürütülmüş ve 16S rDNA gen bölgesi içeren 1458 bazlık DNA fragmentinin büyüklüğü 100 bp Plus DNA marker (Fermentas, Finland) kullanılarak belirlenmiştir.

Tarafınızca desteklenen projemizle (09H4240002) gerçekleştirilmiş olan aşamalar...

16S ileri (5'-3') ve 16S geri (3'-5') primerleri kullanılarak izole edilmiş DNA'da

PZR: Daha önce desteklenen projemiz dahilinde 16S rDNA PZR ürünü çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Çalışmada gerek optimizasyondan gerekse kullanılan enzimlerin sayısının artmasından dolayı bazı PZR ürünleri azalmış veya tükenmiştir. Bundan dolayı azalan/eksilen PZR ürünleri yukarıda anlatıldığı şekilde kromozomal DNA üzerinden gerçekleştirilen 16 rDNA PZR işlemi ile tekrar elde edilmiş ve saflaştırmaya hazır hale getirilmiştir.

16S rDNA PZR ürünlerinin saflaştırılması:

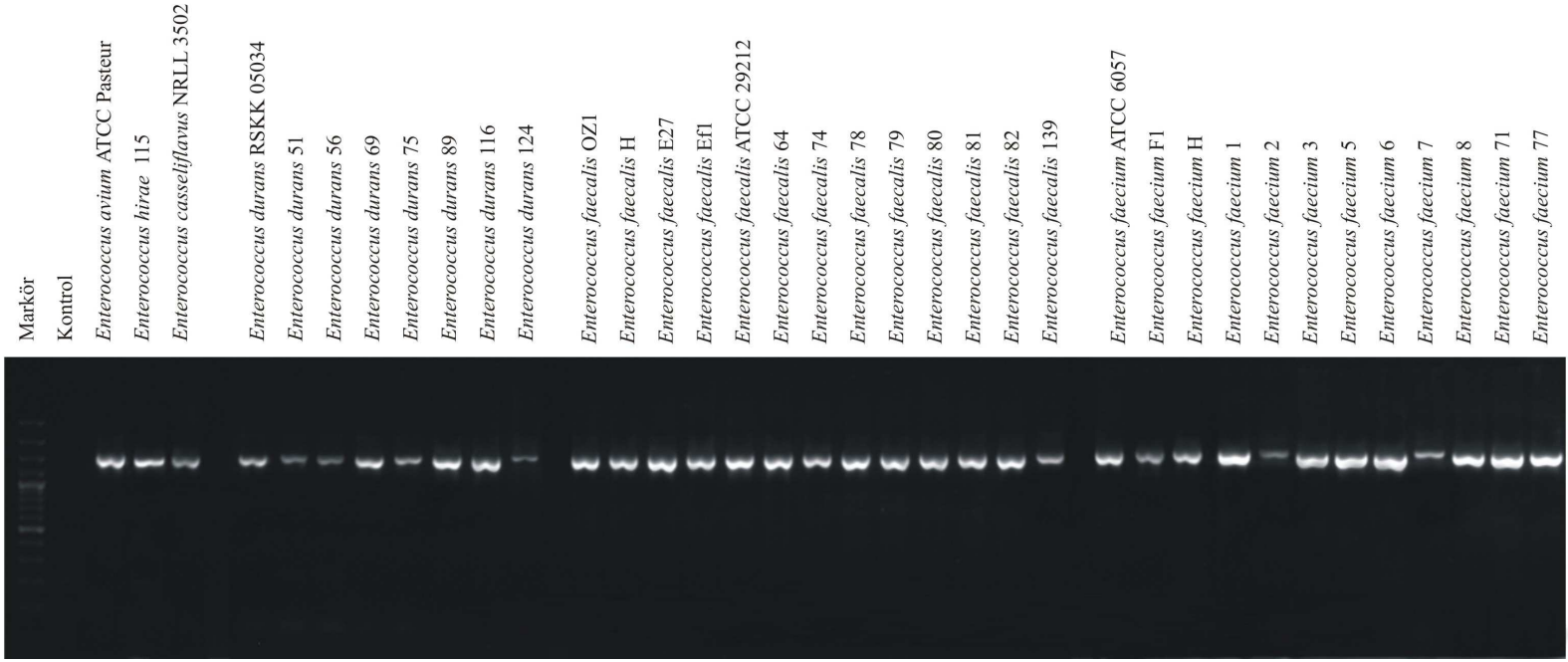
PZR ürünleri DNA dizi analizinden önce ticari olarak temin edilen "ROCHE-Agarose Gel DNA Ekstraksiyon Kit" (Roche, Indianapolis, IN USA) kullanımıyla jelden alınarak saflaştırılmıştır. Jelden alınan 16S rDNA bantı, önceden darası alınmış olan steril mikrosantrifüj tüplerine aktararak hassas terazide tartılmıştır. Bundan sonraki aşamalar Kit kullanım kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir. Her 100 mg'lık agaroz jel miktarına 300 µL olacak şekilde agaroz çözme tamponu eklenmiştir. Ardından silika çözeltilisinden 10 µL eklenerek 56-60°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Karışım her 2-3 dakikada bir vortekslenerek karıştırılmıştır. Süre bitiminde 13.000 devirde 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üst faz atılmış, matriks üzerine 500 µL nükleik asit bağlanma çözeltilisi ilave edilmiş ve vortekslenerek homojenizasyon sağlanmıştır. Karışım tekrar 13.000 devirde 30 saniye santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır. Bu kez çökelti, önceden 80 mL saf etanol eklenmiş olan yıkama solüsyonunun 500 µL'si ile yıkanmış ve 13.000 devirde 30 saniye santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrar edilmiştir. Santrifüj işleminin bitiminde, üst sıvı uzaklaştırılmış ve kuruması için çökelti 15 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Çökelti üzerine, 40 µL TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH: 8.0) tamponu eklenmiş ve 56-60°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İçerik, her 2-3 dakikada bir vortekslenerek karıştırılmıştır. Ardından, 13.000 devirde 30 saniye santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst sıvıdan 30 µL alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Saflaştırılmış PZR ürünleri -20°C'de dizi analiz işlemine kadar saklanmıştır.

Agaroz jel elektroforezi: “ROCHE-Agarose Gel DNA Ekstraksiyon Kit” (Roche, Indianapolis, IN USA) kullanımıyla jelden alınan 16S rDNA PZR ürünlerinin elektroforezleri % 1.5 agaroz içeren jellerde yapılmıştır (Sambrook and Russell 2001). Yatay jel elektroforezi için 4.5 gr agaroz, 300 ml 1XTBE (Tris-Borik asit-EDTA) elektroforez tamponu içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözülmüştür. Sıcaklığı yaklaşık 40°C’ye kadar soğutulan jele % 2 Etidyum bromit (10mg/ml) çözeltisi eklenmiş ve homojen bir karışım sağlandıktan sonra elektroforez plakalarına aktarılıp, taraklar yerleştirilmiş ve bir saat jelin polimerizasyonu için beklenmiştir. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına, jelin yüzeyini kapatacak şekilde “tampon çözelti” (1XTBE) ilave edilmiştir. Ardından jelin hasar görmemesine dikkat edilerek taraklar ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Jelden alınarak saflaştırılan 16S rDNA PZR ürünlerine “yükleme boya çözeltisi” ilave edilerek mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez 100 V’da 2.5-3 saat süreyle yapılmıştır. Markör olarak “100 bp plus DNA ladder” kullanılmıştır (3µl markör + 2µl yükleme boyası). Yüklem boyası jeli terk ettikten sonra akım kesilmiş ve agaroz jel KODAK JEL GÖRÜNTÜLEME (Gel Logic 200 Imaging System) cihazına yerleştirilerek 365 nm dalga boyunda UV ışık altında incelenmiş, fotoğraf çekimleri de yine aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Sekans PZR: DNA dizi analizine tabi tutulmadan önce bir önceki aşamada saflaştırılan PZR ürünü için tekrar PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. pB 5’d TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG 3’ primerinin kullanımı ile yukarıda belirtilen PZR protokolü aynen gerçekleştirilmiş ve sekans PZR ürünü dizi analizine kadar -20°C’de saklanmıştır.

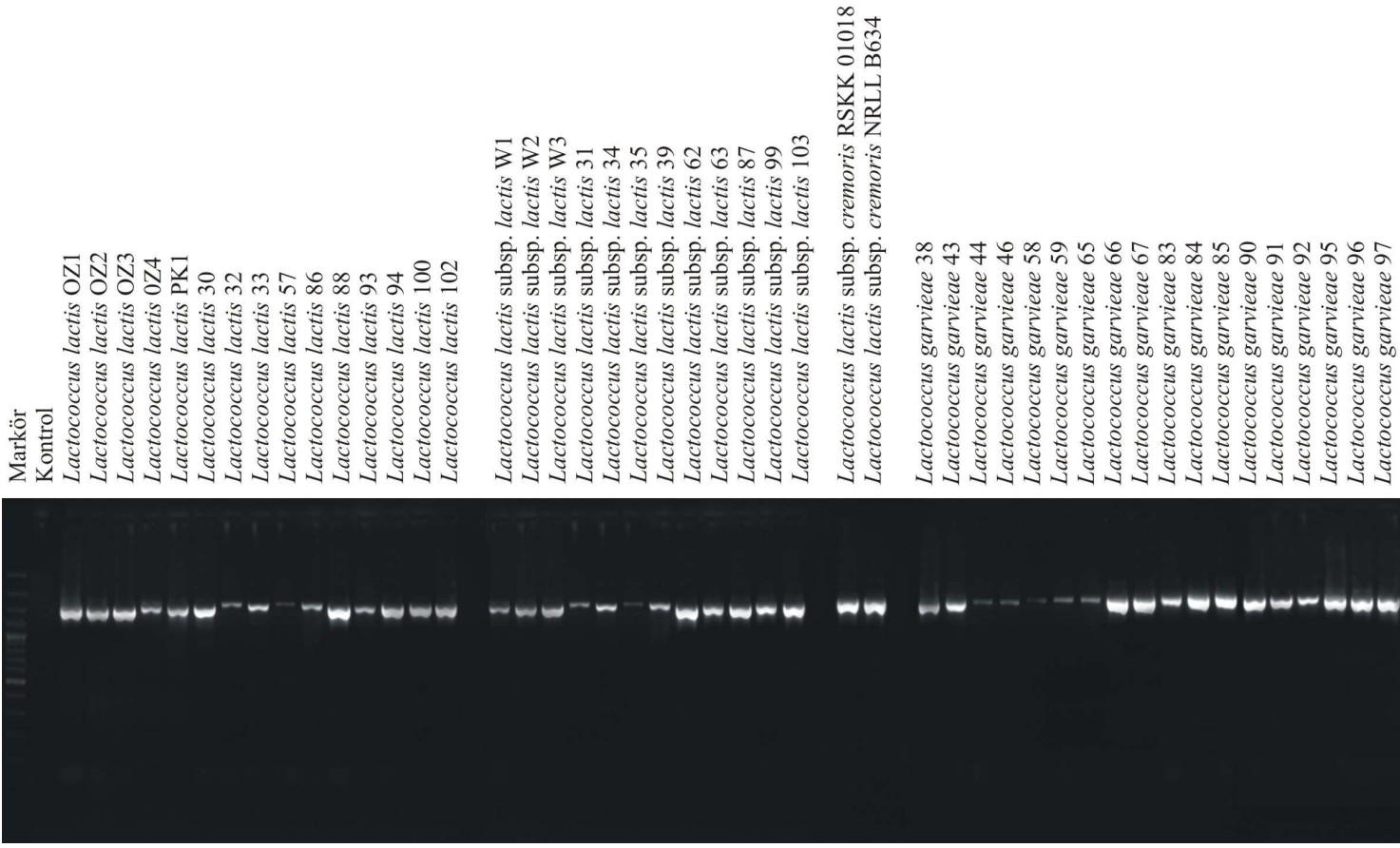
IV. ANALİZ VE BULGULAR

Çalışmamızda 148 adet Laktik asit bakterisine ait 16S rDNA PZR ürünü “ROCHE-Agarose Gel DNA Ekstraksiyon Kit” kullanımı ile saflaştırılmıştır. 1458 bç'lik 16S-PZR DNA ürünleri daha sonra 0.02 µl/ml EtBr içeren % 1.5'lik agaroz jellerde her bir yürütüldükten sonra KODAK jel görüntüleme cihazında jellerin görüntüsü alınmıştır (Şekil 4.1 - 4.5).



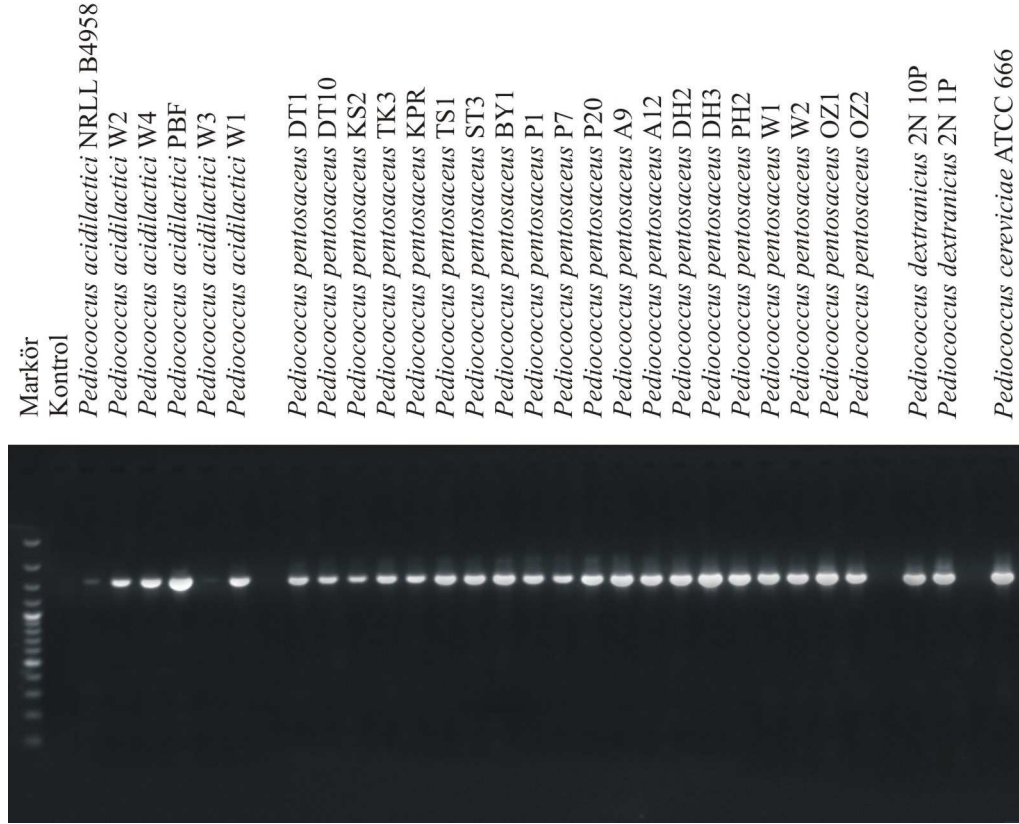
Şekil 4.1

Çalışmada kullanılan *Enterococcus* suşlarına ait 16S rDNA PZR ürününün kit kullanımı neticesinde saf olarak elde edilen jel görüntüsü



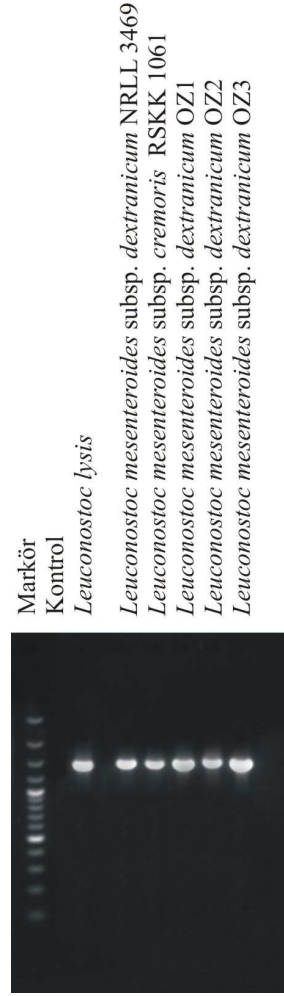
Şekil 4.2

Çalışmada kullanılan *Lactococcus* suşlarına ait 16S rDNA PZR ürününün kit kullanımı neticesinde saf olarak elde edilen jel görüntüsü.

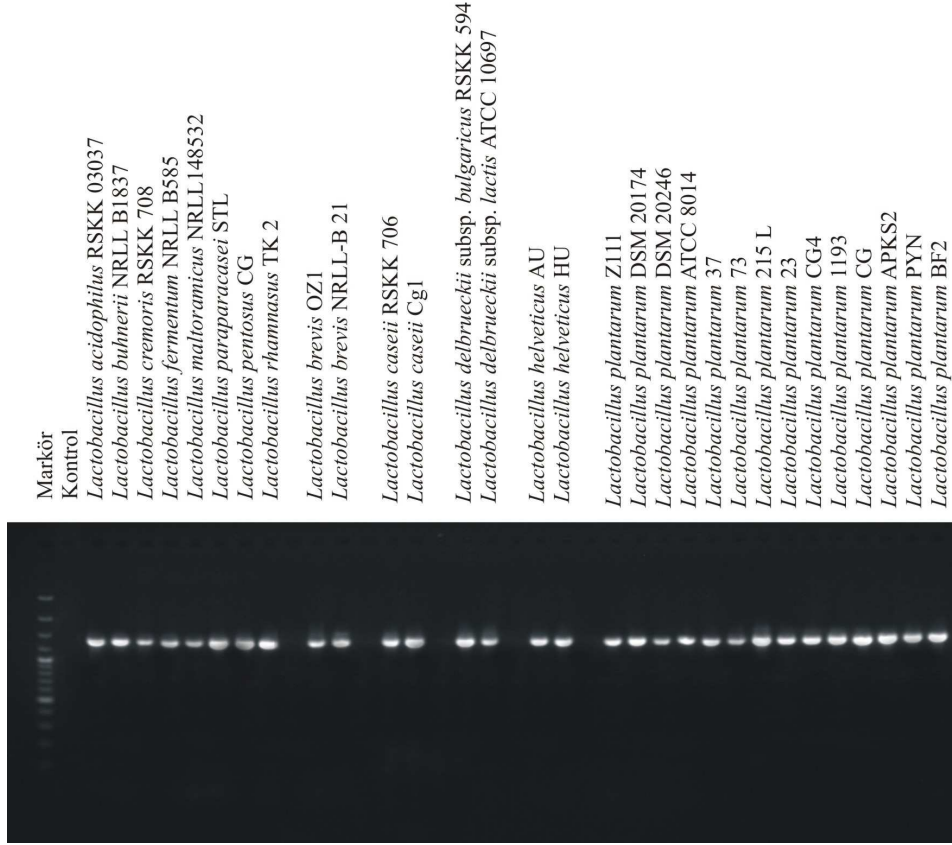


Şekil 4.3

Çalışmada kullanılan *Pediococcus* suşlarına ait 16S rDNA PZR ürününün kit kullanımı neticesinde saf olarak elde edilen jel görüntüsü.



Şekil 4.4 Çalışmada kullanılan *Leuconostocs* suşlarına ait 16S rDNA PZR ürününün kit kullanımı neticesinde saf olarak elde edilen jel görüntüsü.



Şekil 4.5

Çalışmada kullanılan *Lactobacillus* suşlarına ait 16S rDNA PZR ürününün kit kullanımı neticesinde saf olarak elde edilen jel görüntüsü.

V. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda ana materyal olarak daha önceki TUBİTAK (108T280) projemiz dahilinde 148 adet Laktik asit bakterisinden elde etmiş olduğumuz 16S rDNA PZR ürünleri kullanılmıştır. TUBİTAK tarafından desteklenen bu projede 16S rDNA'ları farklı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve bunu takiben oluşan bant profilleri karşılaştırılarak bantlar arasındaki benzerlik ise "Dice product moment correlation coefficient" değeri (r) ile ifade edilip % değerine dönüştürülmüştür. UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile kümeleme (clustering) işlemi yapılarak neticede türler arasındaki genetik benzerlik ayrı ayrı dendogramlar olarak gösterilmiştir.

16S rDNA bölgeleri yüksek derecede korunmuş dizileri içermekte ve evrimsel kronometre olarak kullanılmaktadır. 16S rDNA'ların spesifik yapısı ve belirli bir diziyeye sahip olması, spesifik DNA problemleri ile identifikasyon için bu bölgeleri ideal bir hedef yapmaktadır. Herhangi bir bakteri cinsine dahil olan türlerin tamamı, 16S rDNA'daki değişken bölgelerin dizi analizinin belirlenmesi ile kesin olarak tanımlanabilmektedir. Bu amaca yönelik olarak gerçekleştirdiğimiz ön çalışma neticesinde tarafınızdan desteklenen Hızlı Destek projemizle dizi analizi öncesinde PZR ile çoğaltılan 16S rDNA bölgesi kit kullanımı ile jelden saflaştırılmış ve dizi analizine hazır hale getirilmiştir.

Bu Hızlı Destek Projesi dahilinde saflaştırılan 16S rDNA bölgesi'nin dizi analizi ise; 2010 yılında tarafınızdan desteklenmiş olan ve çalışmalarına henüz başlanacak olan (BAP 10B4240002) nolu proje dahilinde gerçekleştirilecektir. *Bu projeden elde edilecek veriler dahilinde belirlenecek kesin tanı sonuçları neticesinde; hem daha önce açıklanamayan ya da beklenmeyen sonuçların giderilmesi hem de tanımlama da kullanılacak en uygulanabilir yöntemin belirlenebilmesi beklenmektedir.*

VI. KAYNAKLAR

- Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. Applied and Environmental Microbiology, 57(4); 1265–1267.
- Bush, U. and Nitschko, H. 1999. Methods for differentiation of microorganisms. Journal of Chromatography B, 722; 263-278.
- Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. 1986. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory (CSH), New York, 455.
- Moschetii, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Catzeddu, P., Vilani, F., Deianna, P. and Coppola, S. 1998. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: Powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. Journal of Applied Microbiology, 85; 25-36.
- Sambrook, J. and Russell, D.W., Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

VII. EKLER

- a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

- b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar
(BAP Demirbaş numaraları dahil)

- c) Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar
(varsa Kesim III'de yer almayan analiz ayrıntıları)

EK 1

ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE İÇERİKLERİ

MRS (deMan Rogosa Sharpe) besiyerinin kimyasal bileşimi

<u>Bileşen</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Kazein pepton	10 g
Et ekstraktı	8 g
Maya ekstraktı	4 g
Glukoz	20 g
Dipotasyum hidrojenfosfat	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.2 g
Tween 80	1 mL
Triamonyum sitrat	2 g
Sodyum asetat	5 g
pH: 5.7 ± 0.02 (sterilizasyondan önce)	

Sterilizasyon, 118 °C’de 15 dakika süre ile yapılmıştır.

TGE besiyerinin kimyasal bileşimi

<u>Bileşen</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Tripton	10 g
Glukoz	10 g
Maya ekstraktı	10 g
Tween-80	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.05 g
pH: 6.8± 0.02 (sterilizasyondan önce)	

EK 2

ÇALIŞMADA KULLANILAN TAMPON VE ÇÖZELTİLER

Agaroz Jel Elektroforezinde kullanılan tamponlar ve çözeltiler

Tris-Borik asit Tamponu (1X) (pH. 8.3)

Tris	10.8 gr
Borik Asit	5.5 gr
EDTA	0.94 gr
Distile su	1000 ml

Yükleme boyası

Brom fenol blue	0,25 gr
Sakkaroz	40 gr
Distile su	100 ml

İçerik 100ml de çözüldükten sonra 0.22 µm çapındaki Sartorius (Germany) membran filtreden geçirilmiş ve buzdolabı ısısında saklanmıştır.

Etidyum Bromit çözeltisi

Etidyum Bromit	1 gr
Distile su	100 ml

İçerik 100ml de çözüldükten sonra 0.22 µm çapındaki Sartorius (Germany) membran filtreden geçirilmiş ve buzdolabı ısısında karanlık bir şişede saklanmıştır.

% 1.5 lik agaroz jel

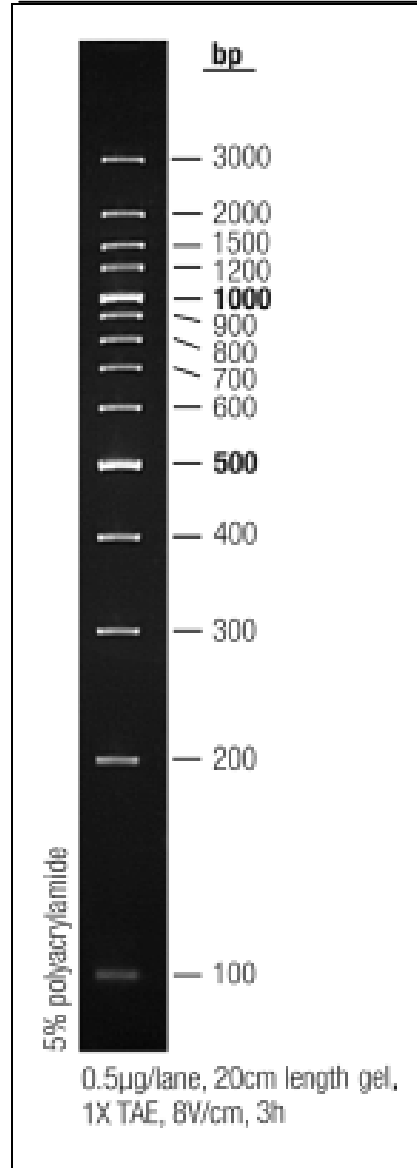
Agaroz	1.5
1X TBE	100 ml
EtBr	4 µl

Agaroz tartılarak 1X TBE Tamponu eklenerek mikrodalga fırında yüksek ısıda yaklaşık 3 dakika eritilir ve homojen hale gelmesi sağlanır. Jel soğuduktan sonra jele etidyum bromit eklenir. Diğer jeller ise belirtilen konsantrasyonlarda agaroz eklenerek gerçekleştirilmiştir.

EK 3

ÇALIŞMADA KULLANILAN MARKÖRLER

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (FERMENTAS)



EK 4

GENOMİK DNA İZOLASYON KİT AŞAMALARI

Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

Quick
PROTOCOL

Isolation of Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Pellet Cells

Centrifuge 1ml of overnight culture for 2 minutes at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$. Discard the supernatant.

A. For Gram Positive Bacteria

1. Suspend cells in 480 μ l 50mM EDTA.
2. Add lytic enzyme(s) (120 μ l) [lysozyme and/or lysostaphin].
3. Incubate at 37°C for 30–60 minutes.
4. Centrifuge for 2 minutes at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$ and remove supernatant.
5. Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

B. For Gram Negative Bacteria

Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

Lyse Cells

1. Add 600 μ l Nuclei Lysis Solution. Pipet gently to mix.
2. Incubate for 5 minutes at 80°C, then cool to room temperature.
3. Add 3 μ l of RNase Solution. Mix, incubate at 37°C for 15–60 minutes, then cool to room temperature.

Protein Precipitation

4. Add 200 μ l of Protein Precipitation Solution. Vortex.
5. Incubate on ice for 5 minutes.
6. Centrifuge at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$ for 3 minutes.

DNA Precipitation and Rehydration

7. Transfer the supernatant to a clean tube containing 600 μ l of room temperature isopropanol. Mix.
8. Centrifuge as in "Pellet Cells" above, and decant the supernatant.
9. Add 600 μ l of room temperature 70% ethanol. Mix.
10. Centrifuge for 2 minutes at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$.
11. Aspirate the ethanol and air-dry the pellet for 10–15 minutes.
12. Rehydrate the DNA pellet in 100 μ l of Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.

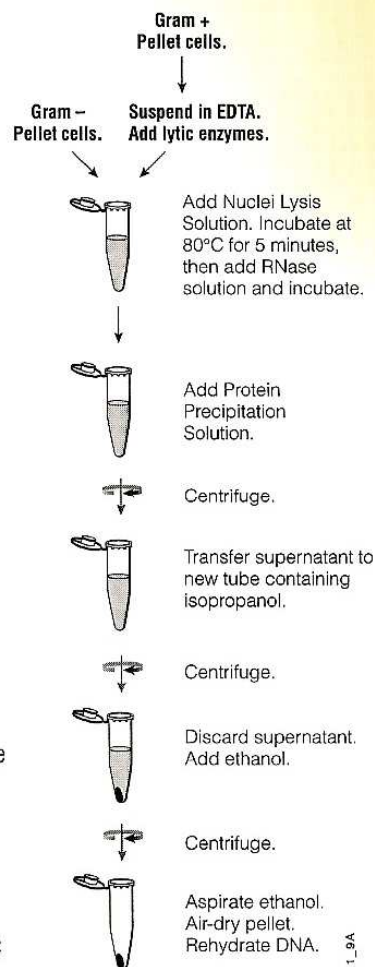
* Maximum speed on a microcentrifuge.

See additional protocol information in Technical Manual #TM050, available upon request from Promega or online at www.promega.com

ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:

www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601

©1999–2005 Promega Corporation. All Rights Reserved.



2825MA11_0A



Promega

Printed in USA. Revised 4/05
Part #9FB022