

## **Bazı Gıdalardan İzole Edilen *L. monocytogenes* İzolatlarının Virulanslık Özelliğinin Moleküler Yöntemle Belirlenmesi**

Canan Cengiz, S. Aykut Aytaç\*

Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara  
\*aytac@hacettepe.edu.tr

### **Özet**

Bu çalışmada, Ankara çevresinde yetiştirilen çiğ tüketilen yeşil yapraklı sebzelerden immunomanyetik ayırma (İMA) yöntemi ile izole edilen önemli bir gıda patojeni olan *L. monocytogenes* izolatlarının moleküler yöntemler kullanılarak virulanslık özelliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için İMA sonrası, ISO'nun önerdiği Palcam ve Oxford Agar (Merck) besiyerlerinden izole edilen şüpheli *Listeria* kolonileri Kromojenik Listeria Agar (OCLA-Oxoid) besiyerine aktararak zon oluşturma yeteneğine göre olası *Listeria monocytogenes* olarak belirlenmiş ve bu izolatlara PZR yöntemi uygulanarak patojenik *Listeria monocytogenes*' de bulunduğu bilinen bir yüzey proteini olan *Listeria* internalin geni (virülanslık geni) çoğaltılmıştır. Bu amaçla internalin geni için spesifik olan primer çiftleri *inlA*-ileri ve *inlA*-geri kullanılarak 250 bç uzunluğundaki hedef DNA çoğaltılmıştır. Sonuç olarak; şüpheli izolatların internalin genindeki çoğaltılması hedeflenen bölgeyi içerip içermedikleri, dolayısıyla da virulans olup olmadıkları jel görüntülerinde bantlarla belirlenerek yeşil yapraklı sebzelerden izole edilen *L. monocytogenes* izolatlarının virulanslık özellikleri moleküler olarak gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Listeria monocytogenes*, PZR, virulanslık

### **Giriş**

*L. monocytogenes*, ölümlü sonuçlanabilen gıda kaynaklı hastalıklar yapabilmektedir. Son yıllarda *Listeria* hücrelerinin daha hızlı saptanabilmesi için PZR yöntemi gibi nükleik asit çoğaltılması sık kullanılan yöntemlerden birisi olmuştur (1). PZR yöntemi DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir gen bölgesini enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan bir yöntemdir (2).

*L. monocytogenes*'e özgü patojeniteden sorumlu gen olarak seçilen "internalin A", bir yüzey proteini olan ve memeli hücrelerinin yüzeyindeki bir reseptörle etkileşime giren ve bu şekilde hücreye girişimi sağlayan internalinin sentezinden sorumludur (3).

Bu çalışmada sebze örneklerinden İMA yöntemi ile izole edilmiş olası *L. monocytogenes* izolatlarının internalin genindeki çoğaltılması hedeflenen bölgeyi içerip içermediklerinin, dolayısıyla da virulanslıklarının PZR yöntemleri ile belirlenmesi amaçlanmaktadır.

## **Materyal ve Yöntem**

### **Materyal**

#### **Saf Kültür, Boya Çözeltileri, Tampon Çözeltiler ve Besiyerleri:**

Çalışmada Viyana'dan temin edilen *L. monocytogenes* (1462) saf kültürü, 1 mg/mL etidyum bromür çözeltisi, 6X yükleme boya çözeltisi (Roche), 100 bç' lik moleküler ağırlık belirteci (Gene ruler, 100bp plus), Lambda tamponu, 10 mM tris-HCl çözeltisi (pH: 8.0), 10 mg/mL lizozim çözeltisi, 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA (disodyum etilendiamin tetraasetik asit) çözeltisi (pH: 8.0) ve tris-borik asit-EDTA (TBE) tamponu (10x) kullanılmıştır. Besiyeri olarak TS broth, TS agar ve Palcam, Oxford Agar (Merck) ve Kromojenik Listeria Agar (OCLA-Oxoid) kullanılmıştır.

#### **DNA İzolasyon Kiti, PZR Yöntemi Deney Düzeneği, Oligonükleotidler ve Jel Görüntüleme Deney Düzeneği:**

DNA izolasyon kiti olarak Roche (Almanya) marka High Pure PCR Template Preparation Kit, PZR cihazı olarak THE-MWG (Almanya) marka Primus 96 termocycler, oligonükleotid olarak *inlA* geninin 250 bç'lik bölümünü (Genbankası çıkış numarası M67471) çoğaltan *inlA*-ileri: 5'-ACT ATC TAG TAA CAC GAT TAG TGA-3' ve *inlA*-geri: 5'-CAA ATT TGT TAA AAT CCC AAG TGG-3' primer çifti ve Syngene (İngiltere) InGenius jel görüntüleme sistemi kullanılmıştır.

### **Yöntem**

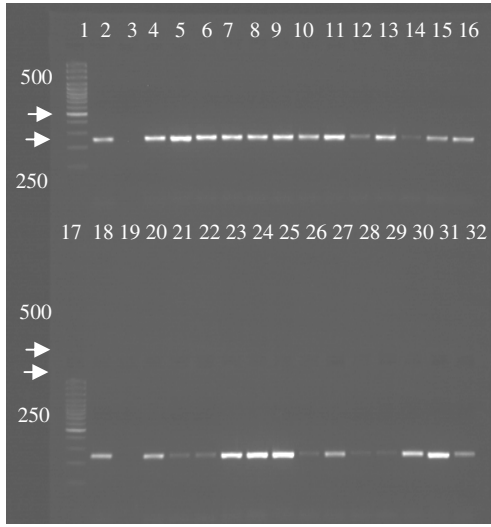
PZR tüpü ve döngüsündeki parametrelerin optimum değerlerinin belirlendiği saf kültür çalışmasında; primer (0.5 µM), dNTPs (200 ve 260 µM), Taq polimeraz (1.25 U), MgCl<sub>2</sub> (2.2-3.0 mM) ve DNA (1.5µL) miktarları ile denatürasyon (94 °C, 45 sn.), bağlanma (50-64.5 °C, 45 sn.), uzatma (72 °C, 1 dak.) sıcaklıkları ve döngü sayısı (30x) belirtilen aralıklarda denenmiş ve optimum PZR koşulları belirlenmiştir. İMA yöntemi sonrası elde edilen şüpheli izolatların DNA izolasyonlarının ardından izolatların hedef gen bölgeleri PZR yöntemi ile çoğaltılarak jel elektroforez yönteminde gen bölgesine ait bantlar belirlenmiştir.

### **Bulgular, Tartışma ve Sonuç**

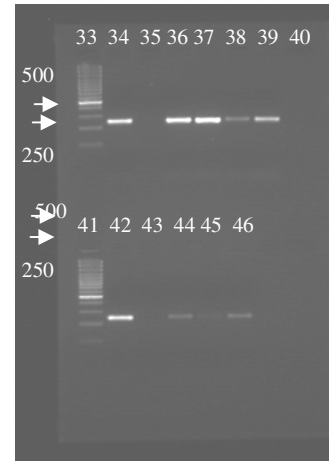
Çalışmada *L. monocytogenes* için bulunan optimum PZR koşulları kullanılarak şüpheli izolatların hedef gen bölgelerinin çoğaltılması sağlanmış ve elde edilen jel görüntüleri Şekil-1 ve Şekil-2'de gösterilmiştir.

Şekil-1 ve 2' de farklı sebze örneklerine ait 33 farklı *L. monocytogenes* izolatının virulanslıktan sorumlu *inlA* genine sahip olduğu, gene özgü 250 bç' lik bant görüntüleri ile belirtilmiştir. Çalışma esnasında hatalı-pozitif ya da beklenilmeyen ürün (primer-dimer) bandına rastlanmamıştır.

Sonuç olarak; Ankara ve çevresinden tesadüfi olarak toplanan sebze örneklerine uygulanan İMA işlemi sonrası, ISO'nun önerdiği Palcam ve Oxford Agar (Merck) besiyerlerinden izole edilen şüpheli 300 adet *Listeria* spp. kolonisi Kromojenik *Listeria* Agar (OCLA-Oxoid) besiyerine aktarılmış, bunların zon oluşturma yeteneklerine göre 72 adeti olası *L. monocytogenes* olarak belirlenmiş ve bu 72 izolat DNA izolasyon işlemine tabi tutulmuştur. DNA izolasyonunu takiben yapılan PZR ile hedef gen bölgesinin çoğaltılması ve agaroz jelde PZR ürünlerinin yürütülmesi sonucu bu 72 izolatın 33'ünün *L. monocytogenes*'in virulanslığından sorumlu *inlA* geninin seçilen bölgesini içerdiği gözlenmiştir.



Şekil-1



Şekil-2

Şekil 1 ve 2: Farklı gıda örneklerinden izole edilen *inlA* geninin 250 bç'lik bölgesini içeren *L. monocytogenes* jel görüntüleri; 1,17,33,41: Moleküler ağırlık belirteci (100bç), 2,18,34,42: Pozitif kontrol, 3,19,35,43: Negatif kontrol, 4-16, 20-32, 36-39, 44-46: Gıda örneklerinden izole edilen *L. monocytogenes*, 40: Yükleme yapılmadı.

Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum

### **Teşekkür**

Bu çalışma TÜBİAK (TOVAG 106 O 108) tarafından desteklenmiştir.

### **Kaynaklar**

1. Bessesen MT, Rotbart QLHA, Blaser MJ, Elisson RT. 1990. Detection of *L. monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. Applied Environmental Microbiology, 56, 2930-2932.
2. Polimeraz Zincir Tepkimesi. <http://tr.wikipedia.org> (07.11.2007)
3. Mengaud J, Ohayon H. Gounon P, Mege RM, Cossart P. 1996. E-Cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. Cell. 84:923-932.