

*Listeria monocytogenes*'in  
ELEKTROKİMYASAL  
SENSÖR SİSTEMLERİ İLE  
BELİRLENMESİ

Emine DİNÇER  
Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü  
Genel Biyoloji Anabilim Dalı  
Ocak-2013

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1102F030**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Emine Dinçer'in "*Listeria monocytogenes*'in Elektrokimyasal Sensör Sistemleri İle Belirlenmesi" başlıklı Genel Biyoloji Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 15.01.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. MERİH KIVANÇ	.....
Üye (İkinci Danışman)	Prof. Dr. YÜCEL ŞAHİN	.....
Üye :	Doç. Dr. M. BURÇİN MUTLU	.....
Üye	Doç. Dr. TURGAY TAY	.....
Üye	Doç. Dr. MUSTAFA YAMAÇ	.....

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
..... Tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

**ÖZET**  
**Doktora Tezi**

***Listeria monocytogenes*'in ELEKTROKİMYASAL  
SENSÖR SİSTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ**

**EMİNE DİNÇER**

**Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ  
II. Danışman: Prof. Dr. Yücel ŞAHİN  
2013, 174 Sayfa**

*Listeria monocytogenes*, gram pozitif, kısa basil şeklinde, fakültatif anaerob, hücre içi bir gıda patojenidir. İlk kez 1926 yılında tanımlanmıştır. 1980 yıllarında meydana gelen bir dizi salgından beri, aşırı derecede önemli, yayılımcı ve insan hayatını tehdit eden gıda kaynaklı hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. Nadiren salgın hastalığa yol açmaktadır, ancak listeriosis olarak adlandırılan hastalık diğer gıda kökenli mikrobiyal patojenler ile kıyaslandığında ölüm oranı yüksektir (%20-30). *L. monocytogenes* tayini için kullanılan klasik kültür yöntemleri, temel olarak zaman alan zenginleştirme basamağını takiben biyokimyasal identifikasyona dayanmaktadır ve bir haftanın üzerinde zaman gerektirmektedir. Bu nedenle immüno analiz ya da moleküler tekniklere dayalı hızlı test teknikleri geliştirilmiştir. Geçtiğimiz son 20 yıl boyunca, mikroorganizmaların hızlı ve gerçek zamanlı belirlenmesi için biyolojik sensör geliştirme çalışmaları büyük ilgi görmüştür. Bu çalışmada *L. monocytogenes* tayini için elektrokimyasal biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, immüno analiz tabanlı ve DNA tabanlı elektrokimyasal biyosensör sistemleri geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, DNA tabanlı sensör sistemi immüno analiz tabanlı sensör sisteminden daha başarılı bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Listeria monocytogenes*, Listeriosis, Elektrokimyasal Biyosensörler, DNA Sensörleri, Hızlı Tayin Metotları

**ABSTRACT****PhD Thesis****DETERMINATION OF *Listeria monocytogenes*  
BY ELECTROCHEMICAL SENSOR SYSTEMS****EMİNE DİNÇER****Anadolu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Program****Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ****Co-supervisor: Prof. Dr. Yücel ŞAHİN****20013, 174 Pages**

*Listeria monocytogenes* is a gram positive, small rod shape, facultative anaerobe, intracellular food borne pathogen. It first described in 1926. Since the series of outbreaks in 1980's, it is apparent that *L. monocytogenes* cause an extremely serious, invasive and life threatening food borne disease. It can cause a rare but serious disease called listeriosis with high fatality rates (20–30%) compared with other food borne microbial pathogens. Conventional culture methods for the detection and identification of *L. monocytogenes* have primarily relied on time-consuming enrichment steps, followed by biochemical identification and require up to one week. As a result more rapid tests were developed based on immuno assays or molecular techniques. Over the last two decade, a great deal of research has focused on the development of biological sensors for the detection of microorganisms, allowing rapid and real-time identification. In this study aimed to develop an electrochemical biosensor for the detection of *L. monocytogenes*. For this purpose, immuno analyses based and DNA based electrochemical biosensors systems were developed. As a result of the studies, DNA based sensor system were more successful than immuno analyses based sensor system.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, Listeriosis, Electrochemical Biosensors  
DNA Sensors, Rapid Detection Methods

## TEŞEKKÜR

Yurt İçi Doktora Burs Programı çerçevesinde 5 yıl süre ile maddi destek sağlayarak doktora öğrenimimi gerçekleştirmeme olanak sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında bilgi, deneyim ve güler yüzlerini benden esirgemeyen; çalışmamı yakından takip edip, tecrübeleri ile bana yol gösteren tez hocalarım Prof. Dr. Merih KIVANÇ ve Prof. Dr. Yücel ŞAHİN'e,

Tez izleme komitesine katılmayı kabul edip, değerli katkılarını ve anlayışlarını benden esirgemeyerek, çalışmalarına destek olan sayın hocalarım Doç Dr. M. Burçin MUTLU ve Doç. Dr. Turgay TAY'a,

Bu çalışmada kullanılan klonlama vektörü ve konak hücrelerini temin eden Sayın Yard. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU'na,

Çalışmalarım sırasında hiçbir karşılık beklemeden gerek dostluğu gerekse bilgi paylaşımları ile her daim yanımda olan, birlikte çalışmaktan keyif aldırın, anlam katan, Nurçin KÜÇÜKOĞLU başta olmak üzere, ortak bir süreci paylaştığım, yardımlaştığım, değerli arkadaşlarım Hülya Karaca GENCER, Erhan ASLAN ve Gürkan YILMAZ'a,

Huzurlu bir çalışma ortamı yaratan tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına ve beni aralarına kabul etme inceliği gösteren, yardımlarını esirgemeyen elektrokimya laboratuvarı çalışanlarına,

Bu günlere gelmemi sağlayan, tüm eğitim hayatım boyunca manevi desteklerini hissettiren sevgili anne ve babama,

Gösterdikleri sabır, anlayış ve dostluk için aynı evi paylaştığım kız kardeşlerim Elif DİNÇER ve Nevin ÜNAL'a

en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	.....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b>	.....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	.....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	.....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	.....	<b>xi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	.....	<b>xiv</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b>	.....	<b>xv</b>
<b>1. GİRİŞ</b>		<b>1</b>
1.1. <i>Listeria</i> Cinsi ve Genel Özellikleri .....		3
1.2. Listeriosis .....		5
1.3. <i>L. monocytogenes</i> İle Çeşitli Gıdaların İlişkisi .....		6
1.4. Gıda Kökenli Listeriosis Salgınları.....		8
1.5. <i>Listeria</i> İzolasyon ve İdentifikasyonu.....		9
1.5.1. <i>Listeria</i> izolasyonu için kullanılan kültüre bağlı yöntemler .....		10
1.5.1.1. FDA BAM ve ISO 11290 metotları.....		10
1.5.1.2. USDA AOAC 993.12 metodu .....		12
1.5.1.3. İzole edilen kültürlerin identifikasyonu .....		13
1.5.1.4. Kültürel ve biyokimyasal doğrulama.....		14
1.5.1.5. Kromojenik ortamlar.....		16
1.5.2. İmmüno analiz metotları ile <i>L. monocytogenes</i> tayini.....		17
1.5.2.1. ELİZA yöntemi ile <i>L. monocytogenes</i> tayini .....		17
1.5.2.2. İmmüno-yakalama yöntemi ile <i>L. monocytogenes</i> tayini .....		19
1.5.2.3. ELFA yöntemi ile <i>L. monocytogenes</i> tayini .....		20

1.5.3.	Nükleik asit tabanlı analiz metotları ile <i>L. monocytogenes</i> tayini .....	20
1.5.3.1.	PZR yöntemi ile <i>L. monocytogenes</i> tayini .....	21
1.5.3.2.	RT-PZR yöntemi ile <i>L. monocytogenes</i> tayini.....	23
1.5.3.3.	Diğer nükleik asit tabanlı analizler ile <i>L. monocytogenes</i> tayini.....	23
1.5.4.	Alt tiplendirme metotları .....	25
1.5.5.	Biyosensör sistemleri ile <i>L. monocytogenes</i> tayini.....	26
1.6.	Biyosensörler .....	27
1.7.	İdeal Biyosensör Karakteristikleri .....	30
1.8.	İletken Polimerler.....	32
1.8.1.	Polipirol (PPy) .....	33
1.9.	Biyolojik Bileşenin Polimer Sentezine Katılması.....	35
1.10.	Voltametik Yöntemler .....	37
1.10.1.	Dönüşümlü voltametri (DV).....	37
1.10.2.	Diferansiyel puls voltametri (DPV).....	39
1.11.	Elektrokimyasal Spektroskopisi.....	40
1.12.	Kullanılan Elektrotlar.....	41
1.12.1.	Referans elektrotlar.....	41
1.12.2.	Çalışma elektrotları.....	42
<b>2.</b>	<b>MATERYAL VE METOT</b>	<b>44</b>
2.1.	Materyal .....	44
2.1.1.	Çalışmalarda kullanılan test mikroorganizmaları .....	44
2.1.2.	Çalışmalarda kullanılan besi ortamları .....	44
2.1.2.1.	Beyin Kalp Infusion Broth (53286, Sigma).....	44
2.1.2.2.	Listeria Zenginleştirici Broth (CM0862, Oxoid)...	45

2.1.2.3.	Listeria Seçici Agar (62355, Fluka).....	45
2.1.2.4.	PALCAM Listeria Seçici Agar (75977, Fluka) .....	45
2.1.2.5.	Listeria Kromojenik Agar (1345, Conda).....	46
2.1.2.6.	Luria-Bertani Broth (L3022, Sigma) .....	47
2.1.3.	Çalışmada kullanılan solüsyonlar .....	47
2.1.3.1.	Fosfat Tamponu (PBS) 1X .....	47
2.1.3.2.	TAE 50X.....	47
2.1.3.3.	TBE 5X.....	48
2.1.3.4.	0,5 M Asetat Tamponu pH 4.8 .....	48
2.1.3.5.	SSC 2X .....	48
2.1.3.6.	Destek Elektrolit Çözeltisi .....	48
2.1.4.	Çalışmada kullanılan oligonükleotit dizileri.....	49
2.1.5.	Çalışmada kullanılan klonlama plazmiti ve konak hücre .....	49
2.1.6.	Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, enzimler ve elektrotlar .....	50
2.1.7.	Çalışmada kullanılan kitler .....	51
2.1.8.	Çalışmada kullanılan cihazlar .....	51
2.2.	Metot .....	52
2.2.1.	Test mikroorganizmalarının seçici ortamlarda geliştirilmesi ...	52
2.2.2.	API <i>Listeria</i> test kitleri ile tanımlama .....	53
2.2.3.	<i>L. monocytogenes</i> tayini için antikor tabanlı sensör çalışmaları .....	54
2.2.3.1.	Çalışma elektrotu olarak kalem ucu elektrotun kullanılması.....	55
2.2.3.2.	Çalışma elektrotu olarak GCE elektrotunun kullanılması.....	56
2.2.3.3.	Çalışma elektrotu olarak platin disk elektrotun kullanılması.....	57



2.2.3.4.	Çalışma elektrotu olarak kimyasal işlem görmüş kalem ucu elektrotunun kullanılması .....	57
2.2.3.5.	Destek elektrolit kullanmadan yapılan polimerizasyon çalışmaları .....	58
2.2.3.6.	Elektrot-mikroorganizma etkileşimi için bekletme süresinin etkisinin belirlenmesi .....	59
2.2.4.	PPy ve PPy-aLis elektrotların SEM ile görüntülenmesi .....	60
2.2.5.	ELİZA yöntemi ile <i>L. monocytogenes</i> tayini.....	60
2.2.6.	VIDAS yöntemi ile <i>L. monocytogenes</i> tayini .....	62
2.2.7.	Genomik DNA izolasyonu .....	62
2.2.8.	Elektrokimyasal DNA biyosensörü için primer ve prob tasarımı.....	64
2.2.8.1.	702bç uzunluğundaki <i>hlyA</i> gen fragmenti .....	65
2.2.8.2.	209 bç uzunluğundaki 16S RNA fragmenti.....	66
2.2.9.	PZR İle <i>hlyA</i> gen fragmentinin çoğaltılması .....	66
2.2.10.	PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi ve jelden izole edilmesi .....	67
2.2.11.	Re-PZR .....	68
2.2.12.	PZR ürününün klonlanması .....	68
2.2.12.1.	PZR ürününün klonlama plazmitine aktarılması (Ligasyon).....	68
2.2.12.2.	Plazmitin kompetent hücrelere aktarımı (Transformasyon).....	69
2.2.12.3.	Koloni PZR .....	70
2.2.12.4.	Plazmit izolasyonu .....	70
2.2.12.5.	Restriksiyon enzim analizi.....	72
2.2.12.6.	Stok alımı .....	72
2.2.13.	<i>hlyA</i> gen fragmentinin plazmitten PZR ile çoğaltılması.....	72
2.2.14.	16S RNA gen fragmentinin PZR ile çoğaltılması .....	73
2.2.15.	Dizi analizi .....	74
2.2.15.1.	Dizi analizi için PZR.....	74

2.2.15.2.	Dizi analizi PZR ürünlerinin manyetik boncukla saflaştırılması .....	74
2.2.16.	Elektrokimyasal DNA sensörü ile mikroorganizma tayini.....	75
2.2.16.1.	Elektrot hazırlığı (KUE) .....	76
2.2.16.2.	Elektrot modifikasyonu.....	76
2.2.16.3.	Prob immobilizasyonu .....	77
2.2.16.4.	Hibridizasyon.....	77
2.2.16.5.	Voltametrik ölçümler .....	77
2.2.17.	Gıda örneklerinden <i>L. monocytogenes</i> genomik DNA izolasyonu .....	78
2.2.18.	RT-PZR ile <i>L. monocytogenes</i> tayini.....	79
<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>80</b>
3.1.	Test Mikroorganizmalarının Seçici Ortamlarda Geliştirilmesi.....	80
3.2.	API <i>Listeria</i> Test Kitleri İle Tanımlama .....	81
3.3.	<i>L. monocytogenes</i> Tayini İçin Antikor Tabanlı Sensör Çalışmaları.....	82
3.3.1.	Çalışma elektrotu olarak kalem ucu elektrotun kullanılması ...	82
3.3.2.	Çalışma elektrotu olarak camı karbon disk elektrot kullanılması.....	84
3.3.3.	Çalışma elektrotu olarak platin disk elektrotun kullanılması ...	85
3.3.4.	Çalışma elektrotu olarak kimyasal işlem görmüş kalem ucu elektrotunun kullanılması.....	85
3.3.5.	Destek elektrolit kullanmadan yapılan polimerizasyon çalışmaları .....	86
3.3.5.1.	Empedans Analizi .....	89
3.3.6.	Bekletme süresinin etkisinin belirlenmesi .....	90
3.4.	PPy ve PPy-aLis Elektrotların SEM ile Görüntülenmesi .....	91
3.5.	ELİZA Yöntemi İle <i>L. monocytogenes</i> Tayini.....	93
3.6.	VIDAS Yöntemi ile <i>L. monocytogenes</i> Tayini .....	94

3.7. Genomik DNA İzolasyonu .....	95
3.8. PZR İle <i>hlyA</i> Gen Fragmentinin Çoğaltılması ve Klonlanması.....	96
3.9. 16S RNA Gen Fragmentinin PZR ile Çoğaltılması .....	98
3.10. Ürünlerin DNA Dizi Analizi İle Doğrulanması.....	99
3.10.1. 702 bç için geri primer LM2 ile yapılan analiz sonucu .....	99
3.10.2. 209 bç için geri primer NE2 ile yapılan analiz sonucu.....	101
3.11. Elektrokimyasal DNA Sensörü İle Mikroorganizma Tayini.....	102
3.11.1. 702bç uzunluğundaki DNA fragmenti ile yapılan çalışmalar	102
3.11.1.1. İki döngüde kaplama yapılarak sentezlenen PPy elektrotlar ile elde edilen sinyaller .....	102
3.11.1.2. Dört döngüde kaplama yapılarak sentezlenen PPy elektrotlar ile elde edilen sinyaller .....	105
3.11.1.3. Aktive edilmiş PGE elektrotlar ile elde edilen sinyaller.....	107
3.11.2. 209 bç uzunluğundaki DNA fragmenti ile yapılan çalışmalar	110
3.11.2.1. İki döngüde kaplama yapılarak sentezlenen PPy elektrotlar ile elde edilen sinyaller .....	110
3.11.2.2 Dört döngüde Ppy kaplama yapılarak sentezlenen elektrotlar ile elde edilen sinyaller.....	112
3.11.2.3. Aktive edilmiş PGE elektrotlar ile elde edilen sinyaller.....	113
3.12. Gıda Örneklerinden <i>L. monocytogenes</i> Genomik DNA İzolasyonu.....	117
3.13. RT-PZR ile <i>L. monocytogenes</i> Tayini .....	119
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>120</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>147</b>

<b>Ek-1 Ticari olarak satın alınan antikorun bütün hücre ile ilişkisinin kontrolü</b>	<b>161</b>
<b>Ek-2 <i>hlyA</i> gen fragmenti için dikey hizalamada kullanılan gen bölgeleri</b>	<b>162</b>
<b>Ek-3 16S RNA gen fragmenti için dikey hizalamada kullanılan gen bölgeleri</b>	<b>171</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1.	<i>Listeria</i> cinsine ait bazı karakteristik özellikler .....	15
1.2.	<i>Listeria</i> türlerinin fenotipik identifikasyonu .....	15
1.3.	Biyosensör bileşenleri .....	28
1.4.	Pirol monomeri ve polipirol yapısı .....	34
1.5.	DV için zamana karşı gerilim grafiği ve elde edilen voltomogram .....	38
1.6.	Diferansiyel puls yöntemi uyarma sinyalleri şematik gösterimi .....	39
2.1.	pGEM-T Easy plazmit DNA yapısı .....	50
2.2.	API test stribinin değerlendirilmesi .....	53
2.3.	Genomik DNA dan <i>hlyA</i> gen fragmentinin PZR ile çoğaltılması .....	67
2.4.	16S RNA gen fragmentinin çoğaltılmasında kullanılan PZR şartları .....	73
3.1.	Kromojenik agar ortamında <i>L. monocytogenes</i> 4b 19115 kolonileri .....	80
3.2.	PALCAM agar ortamında <i>L. innocua</i> 6a 33090 kolonileri .....	81
3.3.	PPy-aLis ve AYPPy-aLis elektrotlar ile alınan voltamogramlar .....	83
3.4.	PPy-aLis elektrot ile alınan diferansiyel puls voltamogramı .....	84
3.5.	Modifiye GCE elektrot ile alınan voltamogramlar .....	84
3.6.	Modifiye platin disk elektrotu ile alınan voltamogramlar .....	85
3.7.	ETPG elektrot ile alınan voltamogramlar .....	86
3.8.	Antikorun polimer sentezine ilavesi .....	87
3.9.	20 Dön. PPy-aLis ile alınan dönüşümlü voltamogramlar .....	87
3.10.	Döngü sayılarının karşılaştırılması .....	88
3.11.	Tarama hızlarının karşılaştırılması .....	88
3.12.	Empedans analizleri ile elde edilen Niquist grafikleri .....	90

3.13.	PPy elektrotun. 5,00 K X büyütmede ve 20,00 K X büyütmede SEM görüntüleri .....	91
3.14	PPy-aLis elektrotun 5,00 K X büyütmede ve 20,00 K X büyütmede SEM görüntüleri .....	91
3.15.	PPy-aLis elektrotun 1 saat mikroorganizmalı ortamda bekletildikten sonra 5,00 K X büyütmede ve 20,00 K X büyütmede SEM görüntüleri .....	92
3.16.	ELİZA test sonuçları.....	93
3.17.	Genomik DNA izolasyonu.....	95
3.18.	Genomik DNA'dan gradient yöntemi ile PZR ve Re-PZR (702 bç için) .....	96
3.19.	Olası pozitif kolonilerden kurulan koloni PZR sonuçları .....	97
3.20.	Restriksiyon enzim analizi ve plazmitden PZR ile fragmentin çoğaltılması .....	97
3.21.	Genomik DNA'dan gradient yöntemi ile PZR ve Re-PZR .....	98
3.22.	BLAST analizi ile elde edilen sonuçlar (702 bç).....	100
3.23.	Dizi analizi sonucunda elde edilen pikler (702 bç).....	100
3.24.	BLAST analizi ile elde edilen sonuçlar (209 bç).....	101
3.25.	Dizi analizi sonucunda elde edilen pikler (209 bç).....	101
3.26.	2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile pozitif hibridizasyon voltamogramı. ....	103
3.27.	2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile <i>hlyA</i> gen fragmentinin hibridizasyonu .....	103
3.28.	2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile <i>hlyA</i> gen fragmenti tayini için elde edilen voltamogramlar .....	104
3.29.	4 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile pozitif hibridizasyon voltamogramı .....	105

3.30.	4 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile <i>hlyA</i> gen fragmentinin hibridizasyonu .....	106
3.31.	4 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile <i>hlyA</i> gen fragmenti tayini için elde edilen voltamogramlar .....	107
3.32.	Aktif PGE elektrotlar ile <i>hlyA</i> gen fragmenti tayini için elde edilen voltamogramlar.....	108
3.33.	2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile pozitif hibridizasyon .....	110
3.34.	2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile 16S RNA gen fragmentinin hibridizasyonu .....	111
3.35.	2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile 16S RNA gen fragmenti tayini için elde edilen voltamogramlar .....	111
3.36.	4 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile 16S RNA gen fragmentinin hibridizasyonu. ....	112
3.37.	2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile 16S RNA gen fragmenti tayini için elde edilen voltamogramlar. ....	113
3.38.	Aktif PGE elektrotlar ile 16S RNA gen fragmenti tayini için elde edilen voltamogramlar.....	114
3.39.	<i>hlyA</i> gen bölgesi için elde edilen sonuçların histogram üzerinde değerlendirilmesi .....	116
3.40.	16S RNA gen bölgesi için elde edilen sonuçların histogram üzerinde değerlendirilmesi .....	116
3.41.	DNA ekstraksiyon kiti ile süt ürününden saflaştırılmış olan DNA'dan PZR .....	118
3.42.	RT-PZR sonuçları .....	119

## ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1.	<i>L. monocytogenes</i> enfeksiyonların klinik sendromları .....	6
3.1.	Karbonhidrat fermantasyon test sonuçlarına göre sayısal profiller .....	81
3.2.	Mevcut kültür bilgisi ile API sonuçlarının karşılaştırılması .....	82
3.3.	VIDAS test sonuçları .....	94
3.4.	Kullanılan farklı elektrotlar ile elde edilen guanine ait yükseltgenme pik akım değerleri (702 bç uzunluğundaki fragment için).....	109
3.5.	Kullanılan farklı elektrotlar ile elde edilen guanine ait yükseltgenme pik akım değerleri (209 bç uzunluğundaki fragment için).....	115



## KISALTMALAR DİZİNİ

*aLis*: anti *Listeria monocytogenes* antikor

AYPy elektrot: KUE yüzeyine pirolün elektropolimerizasyonu ile hazırlandıktan sonra aşırı yükseltgenmiş modifiye elektrot

AYPy-*aLis* elektrot: KUE yüzeyine pirol ve antikorun elektropolimerizasyonu ile hazırlandıktan sonra aşırı yükseltgenmiş modifiye elektrot

BAM: Bakteriyolojik ve Analitik Metotlar

BHI: Beyin kalp infusion sıvı besi ortamı

DV: Dönüşümlü voltametri

DPV: Diferansiyel puls voltametri

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

ELİZA: Enzim bağlı immün analiz

ELFA: Enzim bağlı floresans test

ETPG: Kimyasal işlem görmüş kalem ucu

GCE: Camsı karbon disk elektrotu GCE

HACCP: Tehlike analizi ve kritik kontrol noktaları

ISO: Uluslararası Organizasyon Standartları

KUE: Kalem ucu elektrot

MAB: Monoklonal antibadi

NASBA: Nükleik asit dizi tabanlı amplifikasyon

PFGE: Değişken alanlı jel elektroforezi

PPy: Polipirol

PPy-*aLis*: KUE yüzeyine pirol ve antikorun elektropolimerizasyonu ile hazırlanan modifiye elektrot

PPy elektrot: KUE yüzeyine pirolün elektropolimerizasyonu ile hazırlanan modifiye elektrot

Pt: Platin

PZR Polimeraz zincir reaksiyonu

RT-PZR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

SCE: Doymuş kalomel elektrot

SEM: Taramalı elektron mikroskobu

US FDA: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç idaresi

USDA AOAC ABD: Tarım Bölümü ve Analitik Kimyacılar Derneği

VİDAS: Vitek immüno tanı analiz sistemi

## 1. GİRİŞ

Bakteri ve virüs gibi mikroorganizmalar çok çeşitli çevrelerde örneğin; gıdalarda, denizlerde, nehir sularında toprakta ve insan ya da hayvanların intestinal sistemlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu organizmaların çoğu, doğada temel görevlere sahiptir, bununla birlikte kesin olarak zararlı olan mikroorganizmalar insan ve hayvanlarda oldukça negatif etkilere sahip olup, gıda endüstrisinde her yıl milyonlarca doların kaybına sebep olmaktadır. Bulaşıcı hastalıkların dünya çapında yıllık toplam ölümlerin %40'ına yaklaşık olarak 50 milyon ölüme yol açtığı hesaplanmıştır (Leonard ve ark. 2003). Yakın zaman önce *Listeria monocytogenes* gibi gıda zehirlenmelerine yol açan bakteriler nedeni ile toplamda milyon dolarlık gıdanın kullanılamaz hale geldiği bildirilmiştir (Schlech III, 2000). Gıda kalitesinin ve tazeliğinin kontrolü gerek tüketiciler gerekse gıda endüstrisinin gelişmesi açısından son derece önem taşımaktadır. Gıda endüstrisinde bir ürünün kalitesi, periyodik olarak yapılan kimyasal ve mikrobiyolojik analizler ile değerlendirilebilmektedir.

*L. monocytogenes*, gıda kökenli oldukça önemli bir patojen olarak 20 yy. ikinci yarısında ortaya çıkmıştır. Organizma gıda, çevresel ve klinik örneklerde oldukça yaygın olarak bulunmaktadır, *Listeria* kökenli görülen hastalıklar listeriosis olarak adlandırılmaktadır. Bu mikroorganizmanın sebep olduğu klinik sendromlar arasında bağışıklık sistemi bozuk olan hastalarda zehirlenme (sepsis), bebek ya da yetişkinlerde beyin ve zarlarda iltihaplanma (meningoensefalit), ateşli bağırsak iltihaplanması (gastroenteritis) bulunmaktadır. Vücudun diğer merkezlerinde enfeksiyon oluşumuna ise daha az sıklıkta rastlanmaktadır. *Listeria* türleri yaygın olarak ham ve işlenmemiş gıda ürünlerinde bulunmaktadır. Yüksek hastalık ve ölüm oranı ile birlikte görülen ana listeriosis salgınlarına çeşitli gıdalar (yumuşak peynir, şarküteri ürünleri ve sebze ürünleri) yol açmaktadır. Geliştirilen tayin metotları, beslenme ile ilgili öneriler ve çeşitli durumlarda koruyucu antibiyotik tedavisi ya da hastalıklardan korunmak için yapılan diğer girişimler listeriosis enfeksiyonlarının görülme sıklığını azaltmıştır. Ancak gıda kökenli hastalıklara yol açan çevresel *L. monocytogenes* strainlerinin ayırt edici özellikleri olan mikrobiyal virulans faktörleri ve enfeksiyonun oluşumunu etkileyen konak

canlı faktörleri enfeksiyonların tam olarak anlaşılmasından kalmasına yol açmaktadır (Schlech III, 2000).

1970 yılından itibaren, Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları (HACCP) sistemi gıda endüstrisi tarafından kullanılan gıda güvenlik stratejilerini belirlemektedir. HACCP potansiyel kontaminasyonun ortaya çıktığı zaman, yer ve sıcaklık problemleri (kritik kontrol noktaları) ile ilgilenen bir sistemdir. Her hangi bir HACCP programına göre başarılı bir şekilde, tam zamanında mikrobiyal belirleme, izleme ve kaynağın identifikasyonu için anahtar teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır (Leonard ve ark., 2003). Gıdaların güvenlik açısından kalitelerini belirlemek için yapılan klasik uygulamalar yalnızca patojen mikroorganizmaların aranmasına değil aynı zamanda, insan veya hayvan kaynaklı fekal gıda kontaminasyonlarını ve olası patojen varlığını gösteren, fekal koliformlar gibi indikatör mikroorganizmaların aranmasına da dayanmaktadır. Mikroorganizmalar için kullanılan rutin belirleme metotları seçici kültür ortamı gerektiren koloni sayımlarına ve biyokimyasal, serolojik karakterizasyona dayanmaktadır. Bu metotlar ile bakterilerin belirlenmesi oldukça seçici ve duyarlı olmakla birlikte sonuç alımı günler hatta haftalar sürebilmektedir. Ayrıca bu metotların maliyetleri de oldukça yüksektir (Ercole ve ark. 2003, Mathew ve Alocilja 2005).

Patojen mikroorganizmaların belirlenmesi özellikle, bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların doğru tedavisinde gereken ilaç alanıyla, sularda kalite kontrolüyle, halk sağlığı için gıda zincirinde temel olan gıda kontrolleri ve gıda güvenliği ile yakından ilgilidir, ancak biyolojik savaş güvenliği ve olayın kompleksliğinden dolayı sonuçlarla ilgili garanti vermek oldukça zordur. Patojen mikroorganizmaların belirlenmesi ve identifikasyonu oldukça karmaşık bir alandır, inanılmaz çeşitliliğe sahip olan ve her zaman her yerde bulunan bakterilerin yalnızca belirli bir bölümü patojendir. Geleneksel metotlar ile bu mikroorganizmaların belirlenmesi, özellikle uzun inkübasyon sürecinin (organizmaya bağlı olarak günden haftaya kadar) temel kısıtlama olarak karşımıza çıktığı bir sistemdir. Kısa zamanda iyileştirmenin kritik olduğu durumlarda yetersiz kalan, spesifik mikrobiyal ve biyokimyasal identifikasyona dayalı olarak yapılmaktadır (Serra ve ark. 2008).

Tüm bu sebeplerden ötürü bu mikrobiyal kontaminantların belirlenmesinde kullanılacak daha hızlı, daha güvenilir ve spesifik metotlara duyulan ihtiyaç artmaktadır. Bu bağlamda biyosensörler, tam zamanlı, ucuz, hızlı ve çoklu analizlerin yapımına olanak sağlayarak, umut vaat eden bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle bakteriyel patojenler için farklı tipte biyosensörler geliştirilmiştir. Patojen belirleme için biyosensör uygulamalarının çoğu patojen-antibadi bağlanması ya da patojenik DNA-prob DNA hibridizasyon olayının gözlemlenmesine dayanmaktadır. Bu metotlar oldukça yüksek oranda seçicilik ve duyarlılık sağlamaktadır ancak oldukça kompleks bir sistem olduğundan dolayı gerçek örneklere uygulanmaları oldukça zordur. Dahası bu metotlarda hedef belirli bir patojendir. Bu nedenle kontaminasyon kaynağının bilinmediği durumlarda kullanışlı değildir. Patojen bakteri biyosensörleri alanındaki yakın zaman gelişmeleri içerisinde elektrokimyasal biyosensörlerin kullanımı da yer almaktadır. Bakterilerin belirlenmesinde metabolik ürünlerin ölçümü; işlem basitliği, düşük maliyet, farklı canlı ve canlı olmayan hücrelerin belirlenebilmesi ve etiketlemeye ihtiyaç duymadan tayin edebilme gibi çeşitli avantajlar sağlayan oldukça ilginç bir yaklaşımdır (Serra ve ark. 2008; Signoretto ve Canepari, 2008).

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında tüketime hazır olarak piyasaya sunulan gıda örneklerinde bulunma olasılığı olan ve insan sağlığı açısından tehlike oluşturan mikroorganizmalardan *L. monocytogenes*'in hızlı ve güvenilir tayini için antibadi ve DNA tabanlı sensör geliştirilmesi ve mevcut tayin sistemlerden yaygın olarak kullanılan sistemler ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

### **1.1. *Listeria* Cinsi ve Genel Özellikleri**

İlk ismi *Bacterium monocytogenes* olan gram pozitif bakteri türü *Listeria monocytogenes* ilk olarak 1926 yılında Cambridge Üniversitesinde, laboratuvar hayvanlarında (kemirgen türü) görülen monositoz enfeksiyonunun etmeni olarak keşfedilmiştir. Daha sonraki yıllarda Pirie, Güney Afrika da bulunan bir yabancı kemirgen türünden gram pozitif bir bakteri izole etmiş ve Doktor Lord Lister anısına cinsin isminin *Listerella* olmasını önermiştir. Ardından Murray ve Piere

izole edilen iki bakterinin de aynı tür olduğunu fark etmiş ve isimleri kombine ederek türe *Listerella monocytogenes* ismini vermişlerdir. Takip eden yıllarda taksonomik nedenlerden dolayı türün ismi *Listeria monocytogenes* olarak değiştirilmiştir (Wagner ve McLauchlin 2008).

*Listeria* cinsi genomundaki düşük G+C oranında dayanılarak gram pozitif bakterilerde *Clostridium* cinsinin yan dalı olarak kabul edilmektedir. Mikroskopik olarak incelendiğinde kısa basil formunda (0,5 X 2,0 µm) görülen organizmalar sporsuz ve 20-25 °C'de hareketlidirler. Sahip oldukları polar kamçı sayesinde takla hareketi ile ilerlemektedirler. Aerobik ve fakültatif anaerobik olarak gelişim göstermektedirler. Optimum gelişim sıcaklıkları 30-37°C olmakla birlikte birçok bakteri türünün aksine buzdolabı sıcaklığı olan 4-10 °C'de gelişim göstermektedirler (Bell ve Kyriakides 2005; Gasanov ve ark. 2005).

Taksonomik açıdan incelendiği zaman Bergey's Sistemik Bakterioloji kitabının 9. baskısında (1986) *Listeria* cinsi içersine *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* olmak üzere 5 tür kesin olarak, *Listeria grayi*, *L. denitrificans* ve *L. murrayi* olası türler olarak dahil edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar *L. denitrificans* türünün bu cinse ait olmadığını ortaya çıkarmış ve tür *Jonesia denitrificans* olarak başka bir cinse dahil edilmiştir. *Listeria grayi* ve *L. murrayi* aynı cins içerisinde kalmış olup *L. murrayi* türünün yapılan DNA-DNA hibridizasyon, çok lokuslu enzim elektroforezi çalışmaları sonucunda *L. grayi* türünün bir alt türü olduğu açığa çıkartılmıştır. Günümüzde bu cins içerisinde 6 tür yer almaktadır; *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* ve *Listeria grayi* (Bell ve Kyriakides 2005; Wagner ve McLauchlin 2008). Bu cins içerisinde bulunan türlerden yalnızca iki tanesi patojen olarak kabul edilmektedir ki bunlardan *L. monocytogenes* insanlarda, *L. ivanovii* ise diğer memelilerde hastalık etmenidir. Bununla birlikte çeşitli raporlarda *L. seeligeri* ve *L. ivanovii* türlerinin insanlarda hastalığa yol açtığı ileri sürülmüştür (Gasanov ve ark. 2005). *L. monocytogenes* aracılığıyla görülen patojenik enfeksiyon listeriosis ile sonuçlanmaktadır ve genellikle kanser ya da AIDS gibi immün sistemi baskılanmış bireylerde, ayrıca yaşlı ve hamile insanlar ile yeni doğan bebekler veya fetüs gibi hassas bireylerde görülmektedir. Hastalığın

semptomları gribe benzerdir, ancak menenjit, septisemi, düşük ya da yeni doğanda listeriosis gibi çeşitli komplikasyonlarla sonuçlanmaktadır. Her ne kadar diğer gıda kökenli hastalıklarla kıyaslandığında listeriosis oluşum sıklığı düşük gibi görünse de ölüm oranı oldukça yüksek olup %30 civarındadır (Özçelik 1994; Bell ve Kyriakides 2005; Gasanov ve ark. 2005; Lorber 2007; Wagner ve McLauchlin 2008).

## 1.2. Listeriosis

1929 yılından itibaren insanlarda patojen olduğu bilinen *L. monocytogenes*'in insanlara nasıl bulaştığı, bir dizi gıda kaynaklı salgında organizmanın bulunduğu 1980'li yıllara kadar anlaşılamamıştır. Günümüzde insanlarda görülen listeriosis enfeksiyonlarının neredeyse tamamının gıda kökenli olduğu bilinmektedir. Listeriosis gıda kökenli patojenlerden kaynaklanan bütün hastalıklar arasında çok küçük bir parça olmakla birlikte ciddi hastalıklara neden olduğundan büyük önem taşımaktadır; listeriosis gıda kökenli hastalıklardan hastaneye yatırılma vakalarının yalnızca %3,8'ini oluştururken gıda kaynaklı ölümlerin %27,6'sını oluşturmaktadır. Hastalığın görüldüğü bireyler sıklıkla hamile bayanlar, yaşlılar ve bebeklerdir. Kesin olarak belirlenmiş listeriosis riski taşıyan ve grupta hamileler, yeni doğanlar ve immün sistemi baskılanmış bireyler bulunmaktadır ancak enfeksiyon sağlıklı bir bireyde de görülebilmektedir. Organizma toprak, su, çürüyen bitki örtüsü gibi farklı ekolojik çevrelerde bulunmaktadır, bununla birlikte insanlarda görülen enfeksiyonların kontrolü için gıdalardaki *Listeria* kontaminasyonunun nasıl kontrol edileceğinin anlaşılmasına ve kontrollerin geliştirilmesine bel bağlanmaktadır (Painter ve Slutsker 2007).

Organizma konak canlıda birden fazla dokuya yerleşme kapasitesine sahiptir ve yerleştiği dokuya göre görülen klinik sendromlar değişmektedir. Bunlar arasında düşük ve meningoensefalit en sık rastlanılan vakalardır ki bu durum organizmanın spesifik olarak beyin ya da plasentaya yerleşme eğiliminde olduğunu göstermektedir. Ayrıca *L. monocytogenes* kuş ve memelileri içeren çeşitli hayvan türlerinde de enfeksiyona yol açtığından çok konaklı patojen olarak kabul edilmektedir. Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar oral yolla

mikroorganizmanın vücuda girişinden 24 saat sonra enfeksiyonun ortaya çıktığı yönündedir. Yapılan çalışmalarda organizmanın ilk 6 saat içerisinde mezentik lenf düğümlerine yerleştiği buradan da birincil hedef organlar olan karaciğer ve dalağa geçtiği gösterilmiştir. Ardından sıklıkla beyin ya da plasenta da yerleşim gerçekleşmektedir. Enfeksiyonun ortaya çıkışı için kontamine gıda ile birlikte alınan *L. monocytogenes* miktarının  $10^6$  cfu/ml (g) üzerinde olması gerektiği tespit edilmiştir. Minimum enfektif doz (MID) dışında *L. monocytogenes* straininin virülans derecesi de hastalık seyri için önem arz etmektedir. Her ne kadar *L. monocytogenes* türüne ait tüm strainler patojen organizma olarak kabul edilse de epidemiyolojik kanıtlar hastalık oluşturma eğiliminin strainden straine fark ettiği yönündedir. Dünya çapında insanlarda ve hayvanlarda görülen listeriosis vakaları incelendiğinde 13 serotipi bulunan türün yalnızca 4 serotipinin (1/2a, 1/2b, 1/2c ve 4b) vakalara yol açtığı belirlenmiştir. Organizmanın bireylerde yol açtığı enfeksiyonlar Çizelge 1.1'de özetlenmiştir (Painter ve Slutsker 2007; Kuhn ve ark. 2008)

**Çizelge 1.1.** *L. monocytogenes* enfeksiyonların klinik sendromları (Painter ve Slutsker 2007)

	Ateş + kas ağrısı + ishal
Hamile bayanlar	Preterm doğum Düşük Ölü doğum
Yeni doğanlar	
< 7 gün	Kan zehirlenmesi, zatüre
≥ 7 gün	Menenjit, kan zehirlenmesi
Hamile olmayan yetişkinler	Kan zehirlenmesi, menenjit, fokal enfeksiyonlar
Sağlıklı bireyler	İshal ve ateş

### 1.3. *L. monocytogenes* ile Çeşitli Gıdaların İlişkisi

Baharatlı Alman sosis çeşitleri, bazı yumuşak peynirler, etli soğuk meze çeşitleri gibi pişirilmeden kullanılan yemeğe hazır gıdalar, duyarlı popülasyonlar için yüksek oranda listeriosis riski oluşturmaktadır. Bu gıdaların saklanma



koşullarında genellikle donma olayı meydana gelmediği için *L. monocytogenes* gelişiminin engellenmesi garantili değildir (Swaminathan ve ark.2007).

Çiğ süt *L. monocytogenes* için ana kaynaklardan birini oluşturmaktadır. Pastörize edilmemiş süttten yapılan Meksika tipi peynirler Kaliforniya da, ilk listeriosis salgınlarından birine neden olmuştur. Pastörizasyon işleminin yeterli seviyede koruma sağladığı kabul edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), pastörizasyon işleminin çiğ sütteki *L. monocytogenes* sayısını tehdit oluşturmayacak seviyelere kadar düşürdüğünü açıklamıştır. Bununla birlikte pastörize sütlerde proses sonrasında kontaminasyon olabilmekte, özellikle 7 °C’de *L. monocytogenes* süt içerisinde rahatlıkla gelişebilmektedir. Pastörize edilmiş olsa bile buzdolabında saklanan bir süt örneğinde 1 hafta içerisinde *L. monocytogenes* sayısı  $10^9$  cfu/ml konsantrasyona ulaşabilmektedir (Montville ve Matthews 2008).

*L. monocytogenes* peynir üretimi ve olgunlaşma sürecinde, soğukta gelişim ve tuz toleransı olduğundan canlılığını koruyabilmektedir. Peynir üretimi sırasında *L. monocytogenes* sayısı pıhtı oluşumu esnasında artmaktadır. Üretilen peynir tipi de mikroorganizma sayısını etkilemektedir; örneğin peynirin olgunlaşma sürecinde kamember peynirlerinde *L. monocytogenes* gelişirken, çedar peynirlerinde ölmektedir (Montville ve Matthews 2008).

Et ve kümes hayvanları ile ilişkili ürünlerde, ürünün tipi, pH değeri ve diğer bakterilerin bulunma oranlarına göre *L. monocytogenes* görülme sıklığı değişmektedir. Bununla birlikte tavuk ürünlerinde diğer et tiplerine göre daha fazla oranda bulunduğu bilinmektedir. Biftek ve kurutulmuş sosisler gelişimi en az destekleyen et çeşitleridir. Kesimden önce ya da sonra hayvanın kas dokularındaki kontaminasyon *L. monocytogenes* varlığına neden olabilmektedir. Organizma canlıda böbrek, lenf düğümleri, karaciğer, dalak gibi organlara yerleştiğinden bu organların tüketilmesi kas dokularının tüketilmesinden daha büyük risk oluşturmaktadır. *L. monocytogenes* çiğ etlerin yüzeyine tutunmakta ve buradan uzaklaştırılması ya da öldürülmesi daha zor olmaktadır. Ayrıca vakumla paketlenen etler de dahil olmak üzere işlenmiş etlerde pH 6,0’da gelişebilmektedir. pH değerinin 5,0 olduğu ürünlerde ise gelişim tamamen durmakta ya da çok aza indirgenmektedir. Organizmanın tuza toleransı yüksek

olduğu için tuzlu et ürünlerinde rekabetçi bakterilerin gelişimi azaldığından gelişimi artmaktadır (Swaminathan ve ark.2007).

*L. monocytogenes* taze, dondurulmuş ya da işlem görmüş kabuklu deniz ürünleri ve balık gibi deniz ürünlerinde de bulunmaktadır. Deniz ürünleri arasında mollusk, midye, istiridye gibi çiğ ürünler listeriosis açısından tuzlanan, fermente edilen, marine edilen ya da düşük ısıda işlem gören balık türlerinden daha yüksek risk taşımaktadır (Montville ve Matthews 2008).

#### 1.4. Gıda Kökenli Listeriosis Salgınları

1980-2000’li yıllar arasında gıda ürünlerinin tüketilmesi ile ilişkili çok sayıda listeriosis salgını meydana gelmiştir. Bu salgınlarının birçoğunun en önemli ortak özelliği ölüm oranlarının yüksek oluşudur. Salgın kaynağı olan gıdaların ana gruplarını ise süt, et, sebze ve balık olarak ayırmak mümkündür. Salgınların sayısı ve sonuçların ciddiyeti gıda üretim prosesi sırasında ve sonrasında *L. monocytogenes* kontrolünün önemini açıkça vurgulamaktadır (Bell ve Kyriakides 2005).

Doğruluğu kanıtlanmış olan gıda kökenli ilk listeriosis salgını 1981 yılında Kanada da gerçekleşmiştir. Altı aylık bir süre içinde yapılan çalışmalarda 34 hamile kişi ve 7 yetişkin birey olmak üzere toplamda 41 vaka kaydedilmiş olup, 18 tanesi ölümle sonuçlanmıştır. Salgının kaynağının *L. monocytogenes* 4b serotipi ile kontamine olmuş lahana salatasının tüketimi olduğu yapılan araştırmalar ile belirlenmiştir (Bell ve Kyriakides 2005; Swaminathan ve ark.2007). 1983-1987 yılları arasında toplamda 122 listeriosis vakasının kaydedildiği ve 34 tanesinin ölümle sonuçlandığı İsviçre’de bildirilmiştir. Salgının kaynağının  $10^4$ - $10^6$  cfu/g *L. monocytogenes* 4b serotipi ile kontamine olmuş yumuşak peynir olduğu kaydedilmiştir (Bell ve Kyriakides 2005; Montville ve Matthews 2008). 1987-1989 yılları arasında İngiltere de oldukça büyük bir salgın ortaya çıkmış ve 350 den fazla vakanın kaydedildiği salgında 90 vakadan fazlasının ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir. Salgının gramında  $10^2$ - $10^6$  *L. monocytogenes* 4b serotipi ile kontamine olmuş pişirilmiş olarak satılan ambalajlı köftelerin tüketiminden kaynaklandığı belirlenmiştir (Bell ve Kyriakides 2005).

Çok sayıda ölüm ile sonuçlanan bir başka önemli salgında Fransa da jöle içerisinde pişirilerek satılan etlerin tüketilmesi sonucunda ortaya çıkmıştır. Mart-Aralık 1992 tarihleri arasında gerçekleşen salgında 279 vaka kaydedilmiş olup bunlardan 63 tanesinin ölüm ile sonuçlandığı ve 22 düşük vakasının yaşandığı bildirilmiştir. Salgına sebep olan serotip ise yine *L. monocytogenes* 4b olarak kaydedilmiştir (Bell ve Kyriakides 2005; Swaminathan ve ark.2007). Yine 1992 yılında Yeni Zelanda da listeriosis salgını olduğu ve  $10^3$  cfu/g 1/2a ve 4b serotiplerini içeren tütülenmiş midye tüketimi ile görülen salgında 2 düşük ile sonuçlanan 4 vaka görüldüğü bildirilmiştir (Bell ve Kyriakides 2005). 1994 yılında Amerika da  $10^7$ - $10^9$  cfu/ml 1/2b serotipi içeren pastörize çikolatalı süt ürününün tüketilmesi ile çıkan salgında kaydedilen 45 vakada can kaybı yaşanmadığı bildirilmiştir (Norton ve Braden 2007). 1997 yılında İtalya da iki okul ve bir üniversitede, 4b serotipi ile kontamine olmuş mısır salatasının tüketilmesi sonucunda ortaya çıkan oldukça büyük bir salgında 1566 vaka kaydedilmiş fakat can kaybı görülmemiştir (Norton ve Braden 2007). 1998-1999 yılları arasında Finlandiya da  $10^4$  cfu/g 3a serotipi içeren tereyağı tüketimi nedeniyle 25 vakanın gözlemlendiği ve bunlardan 6 tanesinin ölümle sonuçlandığı bir listeriosis salgını kaydedilmiştir (Bell ve Kyriakides 2005).

### 1.5. *Listeria* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterlerine göre gıdaların 25 gramında veya 25 mililitresinde *L. monocytogenes* bulunmaması istenmektedir. *L. monocytogenes* aranmasında ve tanımlanmasında kullanılan klasik identifikasyon yöntemleri seçici zenginleştirme ve plakta geliştirmeye dayanan kültür metotlarını takiben *Listeria* türünün koloni morfolojisi, şeker fermantasyonu, hemolitik özelliklerine dayanan karakterizasyonunu kapsamaktadır. Bu metotlar altın standartlar olarak tanımlanmakta birlikte çok uzun zaman almaktadırlar. Bu nedenle kısa raf ömrüne sahip gıdaların kontrolü için bu yöntemler uygun olmamaktadır. Bunun sonucunda antikorlara ya da moleküler tekniklere dayanan daha hızlı testler geliştirilmiştir. Bu testler eşit derecede hassasiyete sahip olup daha kısa sürede, örneğin 48 saat içerisinde testin tamamlanmasına olanak

sağlamaktadır (Gasnov ve ark. 2005). Özellikle son yıllarda gıda endüstrisindeki yeni trend moleküler metotların kullanımına doğrudur. Günümüzde *Listeria* identifikasyon ve karakterizasyonu için çok sayıda moleküler metot ulaşılabilir durumdadır. Yapılmış olan çok sayıdaki yayına dayanarak son 20–25 yılda tanımlanan moleküler testlerin gıda analizlerindeki klasik polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) metotlarına adapte edildiği görülmektedir; oldukça yüksek bir olasılıkla yakın gelecekte bu tekniklerin çoğu rutin analizler için uygulanacaktır. Son yıllarda tanı sistemleri için kullanılan yöntemlerden biri de biyosensör teknolojileridir. Oldukça dikkat çekici çalışmaların yapıldığı sensör sistemleri, patojen mikroorganizmaların tanısı için de kullanılmaktadır (Leonard ve ark 2003).

### **1.5.1. *Listeria* izolasyonu için kullanılan kültüre bağlı yöntemler**

Bütün gıda ürünlerinde *Listeria* tayini için en çok kullanılan iki referans kültür metodu Uluslararası Organizasyon Standartları (ISO) 11290 metodu ve Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (US FDA) Bakteriyolojik ve Analitik Metotlar (BAM) tarafından önerilen standartlardır. Metotların her ikisi de seçici besiyerine ekim ve tipik kolonilerin biyokimyasal identifikasyonundan önce, rekabetçi organizmaların gelişimini yavaşlatacak şekilde tasarlanmış seçici bir broth ortamında, 25 gram örnek için ön zenginleştirmeye ihtiyaç duymaktadır. Bu iki klasik metot dışında sıklıkla kullanılan kültüre bağlı tayin metotlarının üçüncüsü ABD Tarım Bölümü ve Analitik Kimyacılar Derneği (USDA AOAC) 993.12 metodudur (Janzten ve ark. 2006; Jeyaletchumi ve ark. 2010).

#### **1.5.1.1. FDA BAM ve ISO 11290 metotları**

Birçok düzenleyici kuruma göre, izolasyon metodu bir gıda örneğinin 25 gramında bulunan bir adet *Listeria*'yı belirleyebilecek kapasitede olması gerekmektedir. Bu nedenle önerilen referans metotların tamamı ön zenginleştirme işlemine ihtiyaç duymaktadır. Seçici agar ortamlarında gelişimden önce kullanılan ön zenginleştirme ortamları kullanılan yöntemle birlikte, hepsinin

ortak özelliği rekabetçi floranın gelişimini engellemek için antimikrobiyal ajanlar içermesidir. Sıklıkla kullanılan zenginleştirme broth ortamı ajanlarından akriflavin diğer gram pozitif bakterilerin gelişimini engellemekte, nalidiksik asit gram negatif bakterileri inhibe etmekte ve sikloheksimit küf gelişimini engellemektedir (Beumer ve Hazeleger 2003; Janzten ve ark. 2006).

FDA BAM ile *Listeria* izolasyonu için örnek 30 °C'de 48 saat süreyle ön zenginleştirmeye tabi tutulmaktadır. Zenginleştirme brothu (LEB, FDA BAM formülasyonu) seçici ajan olarak akriflavin, nalidiksik asit ve antifungal ajan olarak sikloheksimit içermektedir. Daha sonra zenginleştirme ortamından seçici agar plaklarına (Oxford, PALCAM, MOX ya da LPM) ekim yapılmaktadır (Hitchins ve Jinneman 1998).

ISO 11290 metodu iki basamaklı zenginleştirme prosedürü içermektedir; örnek ilk olarak yarı FRASER broth ortamında 24 saat süreyle zenginleştirmeye tabi tutulur, ardından daha sonraki zenginleştirme aşaması için buradan alınan sıvı FRASER broth ortamına inkübe edilir. FRASER broth ortamı akriflavin ve nalidiksik asitin yanı sıra, ortamın siyahlaşmasına yol açan ve *Listeria* tarafından gerçekleştirilen  $\beta$ -D-glikosidaz aktivitesini gösteren eskulin bileşiğini de içermektedir. Daha sonra birincil ve ikincil zenginleştirme ortamlarından Oxford ve PALCAM agar ortamına ekim yapılmaktadır (Hitchins ve Jinneman 1998; Gasanov ve ark. 2005).

1997 yılında ISO 11290 Part 1 başlığı altında yayınlanan *L. monocytogenes* tayini yöntemin onaylanması için 14 Avrupa ülkesinden 19 laboratuvarın katıldığı ortak bir projede yöntemin mikrobiyolojik nitelikleri ve ilave edilmesi gereken değişiklikler değerlendirilmiştir. Ortaklaşa yapılan çalışma sonucunda metodun %85,6 hassasiyette ve %97,4 seçicilikte olduğu belirlenmiştir. Ayrıca test materyalinde *L. innocua* türünün *L. monocytogenes* türüne oranla baskın olması durumunda daha fazla yalancı negatif sonuç alındığı ortaya çıkarılmış ve elde edilen bulgular ışığında yeni düzenlemeler yapılmıştır. Benzer şekilde 1998 yılında ISO 11290 Part-2 başlığı altında *L. monocytogenes* sayımı için standart metodunun onaylanması için 16 Avrupa ülkesinden 21 laboratuvarın katıldığı ortak bir projede yöntemin değerlendirilmesi yapılmıştır. Günümüzde ISO 11290

Part 1 ve Part 2 metotları altın metotlar olarak da tanımlanan klasikler arasında yer almaktadır (Scotter ve ark. 2001a; Scotter ve ark. 2001b).

Her ne kadar zenginleştirme sürecinde rekabetçi organizmaları inhibe etmek için seçici ajanlar gerekli olsa da, bu ajanların *Listeria* hücreleri üzerinde de stres ya da hücreyi zedeleme gibi zararlı etkilerinin olduğu çeşitli raporlarda bildirilmektedir. FDA BAM ve ISO 11290 metotlarında bu problemin çözümü için farklı yöntemlere başvurulmaktadır. FDA BAM metodunda seçici ajanlar bazal ortama, hassas hücrelerin uygun ortam koşulları içerisinde iyileşmesine olanak sağlamak için, 4 saatlik inkübasyondan sonra eklenmektedir. ISO 11290 metodunda ise yarı FRASER Broth ortamında gerçekleştirilen birincil zenginleştirmede ortama yarı konsantrasyonda seçici ajan eklenmektedir. Yüksek tamponlama kapasitesine sahip olan her iki zenginleştirme ortamı da hücrelerin gelişimini ve iyileşmesini artıracak şekilde tasarlanmıştır (Hitchins ve Jinneman 1998; Gasanov ve ark. 2005; Scotter ve ark. 2001a; Scotter ve ark. 2001b).

#### **1.5.1.2. USDA AOAC 993.12 metodu**

Belirli gıda grupları için belirli referans metotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin FDA BAM protokolü genellikle; süt ürünleri, deniz ürünleri ve sebzeler için daha uygun bulunmuştur. ISO 11290 metodunun onay çalışmaları sırasında taze peynir, kıyma ve kurutulmuş yumurta örnekleri için zayıf kaldığı ortaya çıkartılmıştır. USDA AOAC 993.12 metodu et ürünleri, kümes hayvanlarına ait ürünler ve çevresel örnekler için kullanılmaktadır. Yine iki basamaklı zenginleştirme içeren yöntemde, birincil zenginleştirme işlemi için akriflavin ve nalidiksik asit içeren modifiye University of Vermont Medium (UVM) kullanılmaktadır. Birinci zenginleştirmeyi takiben yapılan ikinci zenginleştirmede ise FRASER Broth ortamı kullanılmakta ve buradan seçici ajan olarak moksalaktam ve kolistin sülfat içeren Modifiye Oxford agar (MOX) ortamına ekim yapılmaktadır. Bununla birlikte yapılan birçok çalışma ortamda *L. innocua* ve *L. monocytogenes* türleri bulunduğu zaman gerek UVM Broth ortamında gerek ise FRASER Broth ortamında *L. innocua* türünün *L.*

*monocytogenes* den daha hızlı geliştiğini göstermiştir (Beumer ve Curtis 2003; Janzten ve ark. 2006).

Ayrıca AOAC/IDF 993.12 metodu süt ürünleri için seçilen bir metottur ve spesifik bir süt ürününden örnek hazırlama için spesifik yönerge sunmaktadır. Bu metot aynı zamanda akriflavin ve nalidiksik asit içeren bir broth ortamında 48 saatlik seçici zenginleştirmeyi takiben Oxford agar da ekim işlemlerini içermektedir (Gasnov ve ark. 2005).

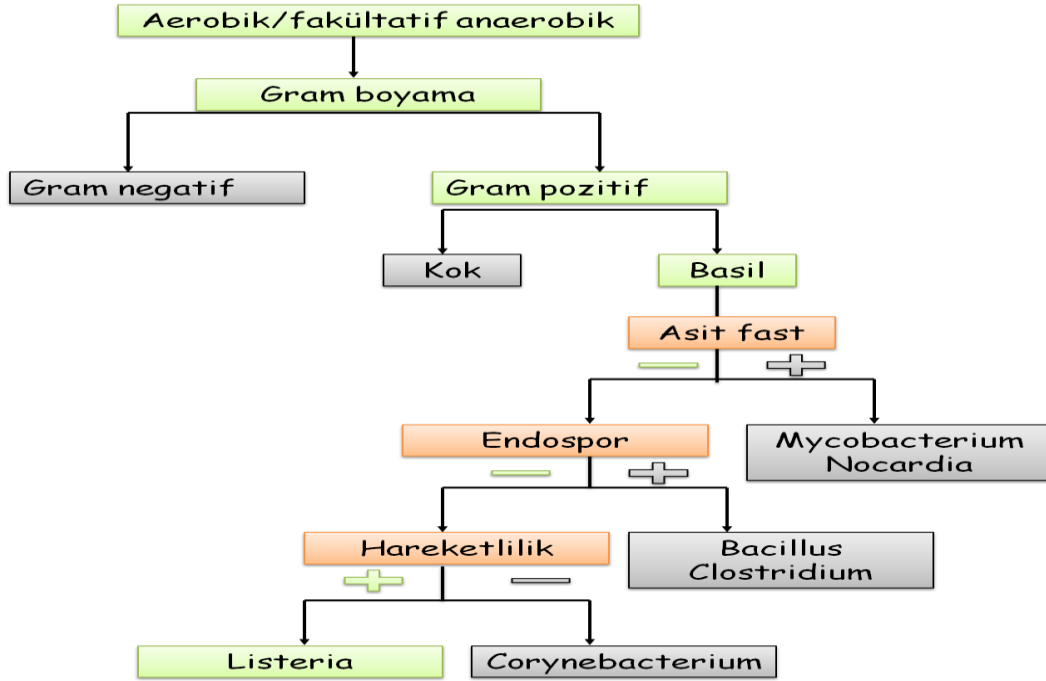
### **1.5.1.3. İzole edilen kültürlerin identifikasyonu**

Genellikle ortalama 24-48 saat süren zenginleştirme metotlarını takiben organizmanın identifikasyonu gerçekleştirilmektedir. Biyokimyasal ve diğer fenotipik karakterlere dayanarak yapılan klasik identifikasyon için kültüre bağlı yöntemler olarak tanımlanan standart metotlarda yapılması gereken testlere yer verilmektedir. Bu bağlamda identifikasyon prosesinin tamamlanması bir haftanın üzerindeki bir zaman dilimini kapsamaktadır. Bu nedenle *Listeria* identifikasyonu için geliştirilmiş ve ticari olarak da bulunabilen çok sayıda kit sistemi mevcuttur. Gıda ya da çevresel örneklerden *Listeria* zenginleştirilmesi ve tayini için bir metot seçildiği zaman metodun onaylanma derecesi ve şekli önem arz etmektedir. Her ülkenin bireysel olarak kendine ait bir doğrulama düzeni olmakla birlikte, Washington'daki AOAC bu bağlamda otorite olarak kabul görebilecek en tanınmış kurumdur. AOAC resmi referans metotları, en az 10 laboratuvar tarafından ortaklaşa doğrulama geçirmiş, enzim immüno analizi ve gen tabanlı testler gibi hızlı metotları içeren çeşitli *Listeria* testi metotlarını sağlamaktadır. AOAC Araştırma Enstitüsü, tek bir laboratuvar ve performans testleri sertifikasyonu ile ticari test kitlerine bağımsız doğrulama sağlamaktadır. AOAC Araştırma Enstitüsü veritabanı ([www.aoac.org](http://www.aoac.org)) ticari olarak satılan test kitleri için uygun referanslar sağlamaktadır. Bununla birlikte bu sistemin kapsamı da sınırlıdır ve veritabanında listelenen kitlerin tamamı AOAC doğrulamasından geçirilmiş değildir (Gasnov ve ark. 2005).

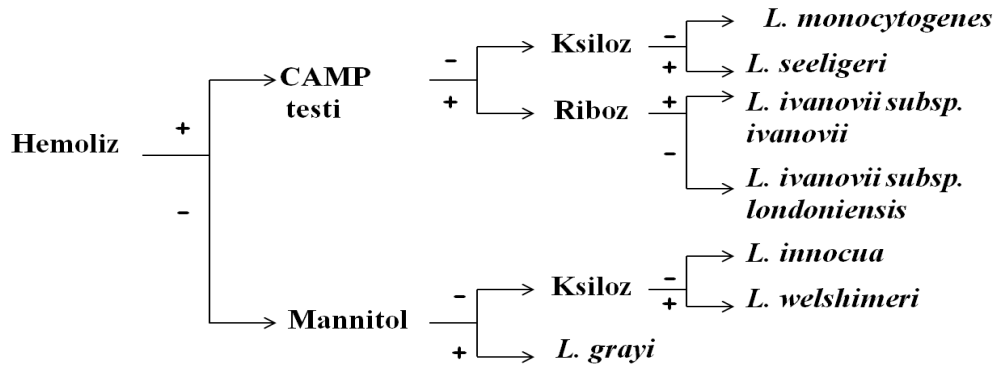
#### 1.5.1.4. Kültürel ve biyokimyasal doğrulama

İdentifikasyon metotları biyokimyasal ve fenotipik karakterler üzerine kurulmuştur ve bu sistem identifikasyon için halen yaygın olarak kullanılmaktadır. *Listeria* izolasyon ve identifikasyonu için kullanılan pek çok seçici agar (Oxford, PALCAM, MOX) *Listeria* ve diğer bakteriler arasındaki farkı ayırt etmek için  $\beta$ -D-glikosidaz aktivitesinden köken alan eskulinaz reaksiyonunu kullanmaktadır. Tipik *Listeria* kolonileri besiyerinde siyah zon oluşumu ile siyah renkte görülmektedir. Aynı zamanda bu besi ortamları diğer organizmaların çoğunun gelişimini inhibe edecek seçici ajanlarda içermektedirler. Bununla birlikte bazı organizmalar bu tip ortam koşulunda büyüme yetisine sahiptir. *Enterococcus*, *Bacillus spp.* gibi bazı türler de eskulini kullanmakta olup kolonileri benzer şekilde görülmektedir (Gasnov ve ark. 2005). Mevcut kolonilerin *Listeria* olduğunu kesin olarak ayırt edebilmek için daha ileri testlerin yapılması gerekmektedir, fakat öncelikle seçici besi ortamındaki şüpheli kolonilerin saflığından emin olunmalıdır. Klasik yöntemlerde şüpheli koloniler (en az 5 adet tipik koloni) Triptik Soy Agar (TSA) ortamında geliştirilmekte ve plaklar *Listeria* kolonilerinin mavi-yeşil renkte ağsı yapıda görünmesini sağlayan bir teknik olan eğimli ışıpta, koloniler değerlendirilmektedir. Daha sonra eğer şüpheli izolatlar; gram pozitif basil, aerobik ve fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyen, katalaz pozitif (bununla birlikte katalaz negatif *Listeria* bulunduğu dair raporlarda mevcuttur), oksidaz negatif, şekerleri fermente edebilen ve gaz olmaksızın asit üretebilen özellikte ise *Listeria* olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.1). *Listeria* strainlerinin çoğu 28 °C’de hareketli iken 37 °C’de hareketsizdir. Ticari identifikasyon kitleri de oldukça uzun zaman alan klasik biyokimyasal testlerine ve en az bir hafta süren türleri ayırmak için yapılan şeker fermentasyon testlerine alternatif olarak yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. API *Listeria* (BioMerieux, France) ve Micro-ID™ (Remel, USA) gibi test stripleri yüksek oranda doğrulanmış ve günümüzde kullanılan standart metotlara dahil edilmiştir (Hitchins ve Jinneman 1998; Beumer ve Hazeleger 2003; Gasnov ve ark. 2005).





Şekil 1.1. *Listeria* cinsine ait bazı karakteristik özellikler (Gasanov ve ark. 2005).



Şekil 1.2. *Listeria* türlerinin fenotipik identifikasyonu (Swaminathan ve ark. 2007).

Elde edilen *Listeria* strainlerinin kendi içerisinde ayrımını yapmak için ilk etapta kültürün hemolitik özellikleri incelenmektedir. Kan içeren agar ortamları hemolitik *Listeria* türlerini (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri* ve *L. ivanovii*), hemolitik olmayan *Listeria* türlerinden (*L. innocua*, *L. grayi* ve *L. welshimeri*) türlerinden ayırt etmede kullanılmaktadır. Gıdalarda bulunan *Listeria spp.* türlerini birbirinden ayırt etmek için hemolitik özellik dışında başka ksiloz olmak üzere çeşitli şekerlerin fermantasyonu ve CAMP (Christie, Atkins, Munch-

Peterson) reaksiyonu kullanılmaktadır. *L. ivonavii* türü *L. monocytogenes* türünden koyun kanı ya da at kanı içeren kanlı agar ortamında oldukça geniş ve berrak bir hemoliz zonu oluşturması ile ayırt edilmektedir. *L. innocua* türü *L. monocytogenes* türünde negatif CAMP reaksiyonu ve negatif hemoliz sonucu ile ayrılmaktadır (Beumer ve Curtis 2003; Beumer ve Hazeleger 2003; Jeyaletchumi ve ark. 2010). Şekil 1.2'de *Listeria* türlerinin birbirinden ayırımında kullanılan fenotipik özellikleri gösterilmiştir.

### 1.5.1.5. Kromojenik ortamlar

Kültüre bağlı klasik *Listeria* izolasyon metotlarında kullanılan PALCAM, Oxford, MOX ya da LPM agar ortamlarından hiçbiri *L. monocytogenes* türü için ayırım sağlamamaktadır. Örneğin PALCAM agarda bütün *Listeria* türleri siyah zonlu koloniler oluşturmaktadır. Sonuç olarak *L. monocytogenes* türünü diğer *Listeria* türlerinden ayırt edebilecek yetide seçici agar ortamı üretimi çalışmaları başlamış ve kromojenik agar ortamları geliştirilmiştir. 24 saat süren inkübasyon sonrasında sonuç vermesi nedeni ile identifikasyon için kısa sürede popüler hale gelen kromojenik ortamlarda ayırım virülans faktörü genler tarafından sentezlenen bileşenlere dayandırılmaktadır. *Listeria* cinsine dahil olan türler arasında yalnızca *L. monocytogenes* ve *L. ivanovii* patojen organizma olarak kabul edilmektedir. Kromojenik agar ortamlarında besiyerine ilave edilen uygun bir substrat virülans faktörleri olan fosfotidilinositol-fosfolipaz C (PI-PLC) ve fosfotidilkolin fosfolipaz C (PC-PLC) tarafından parçalanmaktadır. Kromojenik agar ortamları iki ana gruba ayrılmaktadır, bunlardan birincisinde PI-PCL aracılığı ile L- $\alpha$ -fosfotidil inositol oluşmaktadır ki tüm *Listeria* türlerinin turkuaz renginde görülmesini sağlayan ortamdaki kromojenik substrata ilaveten kolonilerin etrafında beyaz hale oluşumunu sağlamaktadır. İkinci grupta ise yalnızca patojen *Listeria* türleri mavi-turkuaz rengi koloniler oluşturmakta, patojen olmayan *Listeria* kolonileri beyaz renkte görülmektedir. ALOA<sup>TM</sup>, CHROMagar<sup>TM</sup> *Listeria*, BBL CHROMagar<sup>TM</sup> *Listeria*, Rapid<sup>3</sup>L.Mono<sup>®</sup> gibi çeşitli kromojenik agar ortamları piyasan temin edilebilmektedir (Beumer ve Hazeleger 2003; Reissbrodt 2004; Janzten ve ark. 2006).

### 1.5.2. İmmüno analiz metotları ile *L. monocytogenes* tayini

*Listeria* türüne özgü olan antikorlara dayanan immüno analiz metotları uzun yıllardır gıda analizleri için kullanılmaktadır. Bu testler basit, hassas, doğru sonuç veren testler olduklarından ve yorucu örnek hazırlama olmaksızın zenginleştirme ortamından direkt olarak gerçekleştirilebildiklerinden dolayı oldukça popülerdir. Bu tipteki immüno analiz testlerinin çoğu ticari kitler şeklinde satılmaktadır. Bununla birlikte testlerin büyük bir kısmı *Listeria* cinsi için tayin gerçekleştirmektedir, direkt *L. monocytogenes* tayini için var olan kit sayısı daha azdır (Gasnov ve ark. 2005). İmmüno analiz metotlarından sıklıkla kullanılanlar arasında, enzim bağlı immün analiz (ELİZA), Enzim Bağlı Floresans Test (ELFA) ve immüno yakalama ve son dönemlerde immünosensörler ile tayin bulunmaktadır (Gasnov ve ark. 2005)

#### 1.5.2.1. ELİZA yöntemi ile *L. monocytogenes* tayini

1971 yılında Eva Engvall tarafından tanımlanan ELIZA metodu mikrotitre kuyucuğunda, enzim (ya da başka bir etiket) ile bağlı bir spesifik antikor aracılığı ile antijenin bağlanmasını direk veya indirekt yollar ile belirleyebilen ya da sandviç ELİZA olarak tanımlanan ikinci bir antikor kombinasyonunu kullanan bir yöntemdir. Yöntem hızlı sonuç üretimi ve kolay kullanımı nedeni ile oldukça yaygın şekilde uygulanmaktadır. ELİZA metodu zorlu örnek matrisleri ile de kullanılabilir ki, bu durum testi özellikle gıda analizleri için daha da uygun hale getirmektedir. Sonuçlar ELİZA okuyucusu yardımı ile ya da direk renk değişimine bağlı olarak değerlendirilmektedir.

ELİZA analizleri genel olarak 3 gruba ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi olan direk analizde, mikrotitre kuyucuğuna ilk olarak aranan antijenin olduğu düşünülen örnek ilave edilmekte ve olası antijen yüzeye tutturulmaktadır. Daha sonra üzerine enzim etiketli spesifik antikor ilave edilerek, antijen-antikor ilişkisinin kurulması sağlanmaktadır. Son olarak ortama antikorun etiketine uygun substrat ilave edilmekte ve sonuçlar değerlendirilmektedir. İndirekt analiz yönteminde ise ilk olarak yine antijenin olduğu düşünülen örnek ilavesi ile olası

antijen yüzeye tutturulmaktadır. Ardından ortama antijene spesifik birincil antikor ilave edilmekte ve antijen-antikor ilişkisinin kurulması sağlanmaktadır. Daha sonra ortama birincil antikor ile ilişkiye girebilen etiketli ikincil bir antikor ve son olarak da uygun substrat ilavesi yapılmaktadır. Sandviç ELİZA olarak da bilinen üçüncü yöntemde ise mikrotitre kuyucuğu aranan antijene spesifik birincil antikor ile kaplanmaktadır. Üzerine içinde antijen olduğu varsayılan örnek ilave edilerek antijen-antikor ilişkisi sağlanmaktadır. Daha sonra ortama yine antijene spesifik ve etiketli ikincil bir antikor daha ilave edilmekte, son olarak uygun bir substratın da ortama ilavesi ile reaksiyon tamamlanmaktadır (Voller ve ark. 1978; Gasanov ve ark. 2005).

Günümüzde gıdalarda bulunan patojen mikroorganizma türlerinin tayini için spesifik olarak tasarlanmış ELİZA kitleri oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Çeşitli üretici firmalar *Listeria spp.* ya da *L. monocytogenes* tayini için üretim yapmaktadırlar. ELİZA testi yalnızca *Listeria* için değil diğer gıda patojenleri için de ticari olarak mevcuttur. Örneğin *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas spp.* ve *Escherichia coli* O157 için çeşitli firmalar tarafından üretilmiş ticari ELİZA kitleri mevcuttur (Montville ve Matthews 2008).

ELİZA yöntemi ile tayin çalışmalarında ticari kit kullanımı kadar, seçilen, uygun bir antikor üretimi ile yapılan ELİZA tasarım çalışmaları da yaygındır. *Listeria* için spesifik olan pek çok monoklonal antikor (MAbs) tanımlanmış ve ELİZA çalışmalarında kullanılmıştır (Solve ve ark. 2000).

Antikor-antijen arasındaki spesifik ilişkiden yola çıkılarak tasarlanmış olan ELİZA metodu her ne kadar immün analiz sistemi olsa da, yöntem moleküler tabanlı çalışmalarla kombine edilerek de kullanılabilir. Bu bağlamda *Listeria* tayini için PZR-ELİZA yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem kimyasal olarak etiketlenmiş prob dizisini taşıyan PZR ürününün, enzim ile konjuge edilmiş antikor ile tayinine dayanmaktadır ve kısaca şu şekilde gerçekleştirilmektedir, PZR ürünü digoxigenin ile etiketlendikten sonra streptavidin kaplı mikrotitre plaklarına aktarılmaktadır. Ardından ortama biyotin ile etiketlenmiş ve PZR ürününe spesifik olarak tasarlanmış prob dizisi ilave edilmektedir. Daha sonra ortama anti-DİG-POD konjugat solüsyonu (peroksidaz ile kombine edilmiş anti-

digoxigenin antikorunu) ilave edilmektedir. ABTS substratının da ilavesinden sonra ELİZA okuyucusu aracılığı ile ölçümler gerçekleştirilmektedir (Kim ve Jae-Chang 2008). PZR-ELİZA yöntemi çeşitli patojen bakterilerin gıda, klinik ve çevresel örneklerde tayininde kullanılmıştır (Bolton ve ark. 2002; Ge ve ark. 2002; Sails ve ark. 2002).

Kim ve Jae-Chang (2008) yapmış oldukları çalışmada *L. monocytogenes* tayini için PZR-ELİZA metodunu kullanmışlar ve PZR için, listeriolysin sentezini kodlayan *hlyA* geninin 132 bç uzunluğundaki fragmentini seçmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda araştırmacılar PZR-ELİZA yöntemi ile PZR başına 10 hücre alt sınırında tayinin gerçekleşebildiğini ve 5 saatte sonuç alınabildiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise araştırmacılar *L. monocytogenes* tayini için *mpl* gen bölgesini kullanarak primer ve prob tasarımı (biyotin etiketli) gerçekleştirmişler ve yine streptavidin kaplı mikrotitre plaklarında PZR-ELİZA yöntemi ile 5-6 saat sürede tayin gerçekleştirdiklerini, yöntemin *Listeria* tayini için oldukça kullanışlı olduğunu bildirmişlerdir (Scheu ve ark. 1999).

### 1.5.2.2. İmmüno-yakalama yöntemi ile *L. monocytogenes* tayini

İmmüno-yakalama manyetik boncukların (DynaL, Melbourne, Australia) ya da *Listeria* türlerini değer rekabetçi mikrofloradan ve inhibitör gıda bileşenlerinden ayırabilen spesifik antikorlar ile kaplı daldırma çubuklarının (*Listeria* Unique, TECRA International, Frenchs Forest, Australia) kullanıldığı oldukça iyi sonuç veren bir tekniktir. Bu tip spesifik yakalama metotları hedef organizmanın konsantrasyonunun artırılmasına ve testin hassasiyetinin artmasına olanak sağlamaktadır. Yakalama teknikleri alt tür seviyesindeki ayrımı güçlendirmek amacıyla moleküler metotlarla birleştirilebilmektedir.

*L. monocytogenes* türünün ortamdaki diğer *Listeria* türlerinden ayrımı için *L. monocytogenes* de ifade edilen virülans faktörlerine spesifik antikorlara dayanan çalışmaların başarısı değişkendir. Direkt olarak virülans faktörlere karşı pek çok monoklonal ve poliklonal antikor rapor edilmiş olmakla birlikte, çoğu durumda bunların test için etkin olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte ELFA sistemi olan ve *L. monocytogenes* için sabit bir virülans antijenini hedef alan Vitek İmmüno

Tanı Analiz Sistemi (VIDAS) LMO analizi bu bağlamda bir istisna oluşturmaktadır (Gasnov ve ark. 2005).

### 1.5.2.3. ELFA yöntemi ile *L. monocytogenes* tayini

Enzim Bağlı Floresans Test yöntemi ile, *Listeria* antijenlerinin spesifik olarak saptanmasına dayanan VIDAS, son yıllarda *Listeria* analizleri için tercih edilen yöntemler arasında yer almaktadır. VIDAS® LMO2 direkt olarak *L. monocytogenes* türünün tayini için geliştirilmiş bir sistemdir. Tüm işlem basamaklarının cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirildiği sistemde katı faz sağlayıcı olarak kullanılan SPR striplerinin iç kısmı yüzeye absorbe edilmiş anti- *L. monocytogenes* antikorları ile kaplanmıştır. Zenginleştirme sıvı besiyerinden reaktif sribine ilave yapıldığı zaman antijenler sribin iç kısmını kaplayan antikorlara bağlanmaktadır. Yıkama işlemleri ile bağlanmamış bileşenlerin ortamdan uzaklaştırılmasından sonra, ortama alkalen fosfataz ile kaplanmış antikorlar ilave edilmekte ve bu antikorlar SPR duvarındaki antikorlara bağlı herhangi bir *L. monocytogenes* antijenine bağlanmaktadır. Yine bağlanmamış bileşenlerin ortamdan uzaklaştırılması için yapılan yıkama işlemlerinden sonra son saptama basamağında ortama substrat (4-metil-umbelliferil fosfat) ilave edilmektedir. Antikor-antijen-antikor şeklinde oluşturulmuş olan konjugat enzim, substratın floresansı 450 nm’de ölçülen bir floresans ürünün (4-metil-umbelliferon) hidrolizini katalize etmektedir. Testin sonunda sonuçlar her bir numune için test değeri hesaplayan cihaz tarafından otomatik olarak analiz edilmektedir (Vaz-Velho ve ark. 2000; Oktay ve Heperkan 2006).

### 1.5.3. Nükleik asit tabanlı analiz metotları ile *L. monocytogenes* tayini

*Listeria* türlerinin tayin ve identifikasyonu için moleküler metotların kullanımı doksanlı yılların başına kadar uzanmaktadır. *L. monocytogenes* (serotip 1/2a, 4b ve 6a) ve *L. innocua* için komple genom analizlerinin tamamlanması *L. monocytogenes*’ in patojen özelliklerine moleküler anlamda yeni bir boyut

kazandırmıştır. Bu özelliklerin daha iyi anlaşılması da organizmanın belirlenebilmesi için yeni tanı sistemlerinin artmasını sağlamıştır. Özellikle son 20 yıl içerisinde moleküler metotları açıklayan çok sayıda araştırma yapılmıştır. Moleküler metotların kullanımıyla *Listeria spp.* ve *Listeria monocytogenes* identifikasyonu, oldukça doğru sonuç verdiği için, hassas ve spesifik olduklarından dolayı gittikçe artan bir popüleriteye sahiptir. Ayrıca numunelerdeki patojenlerin yapay ortamlarda izolasyonuna gerek duymaksızın direkt tayin edilmesi zaman ve maliyet açısından da avantaj sağlamaktadır. Bununla birlikte moleküler tabanlı testlerin kullanımı için de örnek zenginleştirme işlemi halen gerekmektedir. Moleküler teknikler ile *L. monocytogenes* in diğer *Listeria* türlerinden alt tür seviyesinde ayrımı ve identifikasyonu ELİZA tabanlı analizler ile aynı sürede gerçekleştirilebilmektedir. *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* türlerini tayin etmek için nükleik asit dizi tabanlı amplifikasyon (NASBA), Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR), Değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE) gibi pek çok nükleik asit tabanlı yöntem mevcuttur (Toze 1999; Gasanov ve ark. 2005; Brehm-Stecher ve Johnson 2007; Rantsiou ve ark. 2008).

### 1.5.3.1. PZR yöntemi ile *L. monocytogenes* tayini

PZR, hedef DNA'nın çoklu kopyalarını üreten bir metottur ve keşfedildiği dönemden beri bütün moleküler uygulamalar üzerine çok büyük etkileri olan bir tekniktir. PZR ile ilgili detaylar Sambrook (1989), Giovannoni (1991) ya da Alvarez ve Toranzos (1997) gibi kaynaklardan elde edilebilmektedir. Kısaca PZR metodunda hedef DNA'nın çoklu kopyalarını oluşturmak için, ısı sabit polimeraz enzimi (*Taq* enzimi) kullanılmaktadır. Viral ya da bakteriyel patojen genomunda belli bir hedef DNA'nın belirlenmesi, oligonükleotit primerler olarak bilinen, kısa zincirli, sentetik, tek iplik DNA kullanımı aracılığıyla başarılmaktadır. Bu primerler belli bir grup organizma için ya da tek bir organizma türü için spesifik olarak tasarlanmaktadır. PZR farklı sıcaklıklardaki döngüler ile çalışmaktadır. En yaygın metot 3 farklı sıcaklık ile yapılan çalışmadır. Çift iplik DNA zinciri yüksek sıcaklık kullanılarak (genelde 90°C üzerinde) iki tek iplik şeklinde ayrılır.

Ardından düşük sıcaklık (örneğin 54°C) primerlerin hedef DNA segmentine tutunması için kullanılır. Son olarak daha önce kullanılan iki farklı sıcaklık değerinin arasında orta dereceli bir sıcaklıkta, polimeraz enzimi ile hedef DNA'nın kopyaları üretilmektedir. Bu sıcaklıktaki döngü çok kez tekrar edilmektedir. Teorik olarak hedef DNA'nın 10<sup>9</sup>'dan fazla kopyasını üretmek için, PZR metodunun eksponansiyel doğasından dolayı ortalama 25–30 döngü gerçekleştirilmektedir. Bu kadar çok sayıdaki hedef DNA segmenti, membran hibridizasyonu ya da agaroz jel elektroforezi gibi standart belirleme metotları kullanılarak tespit edilebilmektedir. PZR'nin spesifik bir nükleik asit segmentinin ekstrem yüksek sayıda kopyasını üretebilme yeteneği, bir örnek içerisinde istenilen mikroorganizmaların hızlı, oldukça hassas ve spesifik olarak belirlenmesi için istenilen şartları sağlamaktadır. (Toze 1999; Jeyaletchumi ve ark. 2010).

Günümüzde PZR, *Listeria* identifikasyonu için güvenilir ve tekrarlanabilir bir teknik olarak kullanılmaktadır. Daha da önemlisi *L. monocytogenes* türünün diğer *Listeria* türlerinden ayrımı virülans faktör genlerini ya da RNA alt ünite genlerini hedefleyen primerler kullanılarak yapılabilmektedir. *Listeria* türlerinde 16S ve 23S rRNA genlerinin moleküler düzeyde farklılıklarının açıklanması, *hly*, *inlA*, *inlB*, *iap* ve diğer genler aracılığı ile *L. monocytogenes*' in diğer *Listeria* türlerinden ve gıdalarda bulunan yaygın bakterilerden ayrımını sağlamaktadır. Çoklu primer setlerinin kullanıldığı çoklu PZR, bir örnek içerisinde bulunan *Listeria* ve *Salmonella* ya da *L. monocytogenes* ve diğer *Listeria* türleri gibi, birden fazla patojen türün eş zamanlı olarak tayinine olanak sağlayan bir yöntemdir. Bu yaklaşım test süresi, kullanılan malzeme ve iş gücünün azalmasına yol açtığı için gıda analizlerindeki en çekici yöntemler arasındadır. Çoklu primer setlerinin kullanıldığı bir diğer adapte edilmiş PZR türü de nested PZR yöntemidir; ancak bu primer setleri ardışık reaksiyonlar için kullanılmaktadır ve aynı hedefe karşı dizayn edilmiştir. Bunların kullanımı spesifikliği ve hassasiyeti arttırmaktadır, bu tip PZR klinik örneklerden, çevresel örneklerden ve süt örneklerinden *L. monocytogenes* identifikasyonu için kullanılmaktadır (Niederhauser ve ark. 1992; Gasanov ve ark. 2005; Jeyaletchumi ve ark. 2010).



### 1.5.3.2. RT-PZR yöntemi ile *L. monocytogenes* tayini

RT-PZR yönteminde, araya eklenen bir boyanın ya da hibridizasyon probunun bağlanması sonucunda oluşan ışımaya bağlı olarak çoğaltılan DNA miktarı ölçülebilmektedir. Gerçek zamanlı olarak gözlemlenen ve her döngüde gerçekleşen ışımaya artışı, farklı büyüklüklerdeki hedef DNA ya da RNA dizilerinin miktarlarının doğru olarak ölçülebilmesini sağlamaktadır. Sonuçlar bir saat ya da daha kısa sürede elde edilebilmektedir ki, bu sayede RT-PZR çalışmaları klasik PZR çalışmalarına göre daha kısa sürede sonuç vermektedir. RT-PZR metodunun seçiciliği ve hassasiyeti Southern Bloth analizi ile kombine olarak kullanılan klasik PZR ile eş değerdedir. PZR ürününün çoğaltılmasından sonra manipüle edilmesine olanak tanımadığı için yöntem çapraz kontaminasyondan kaynaklı yalancı pozitif sonuç oluşum riskini azaltmaktadır. Tüm bu karakteristik özelliklerinde dolayı RT-PZR *Listeria* tayini için klasik kültüre bağlı ya da immüno analiz tabanlı metotlara bir alternatif oluşturmaktadır. Bununla birlikte yöntemin özel ekipman ve materyal gereksinimi maliyeti arttırmaktadır.

Gıdalarda *L. monocytogenes* tayini için farklı RT-PZR analizleri geliştirilmiştir. Bu metodu kullanarak, gıdalardan ve klinik örneklerden *L. monocytogenes* identifikasyon ve miktar tayinin yapıldığı çeşitli çalışmalar literatürde yer almaktadır. Ticari olarak bulunan RT-PZR bileşenleri ve kitleri bu metodun laboratuvar ortamlarında kullanımını kolaylaştırmakta ve yaygınlaşmasını sağlamaktadır. Çeşitli RT-PZR kitlerini üreten firmaların yapmış oldukları ortaklaşa çalışmalar sonucunda yaygın olarak kullanılan test protokolleri ve standartları geliştirilmiştir (Rodriguez-Lazaro ve ark. 2004; Gasanov ve ark. 2005; Janzten ve ark. 2006).

### 1.5.3.3. Diğer nükleik asit tabanlı analizler ile *L. monocytogenes* tayini

DNA hibridizasyonu gıdalarda *Listeria* ve *L. monocytogenes* tayini için kullanılan en basit moleküler metottur. Hedef dizinin varlığı, tayin için bir etiket içeren ve hedef DNA dizisinin tamamlayıcı dizisi olan bir oligonükleotit prob kullanımı ile belirlenmektedir. Oligonükleotit dizisine dâhil edilen radyoaktif

izotoplar eskiden belirleme için etiket olarak kullanılmıştır. Son dönemlerde ise radyoaktif probalar ile eşit hassasiyet göstererek hedef sekansın tayinine olanak sağlayan ve radyoaktiviteden kaynaklanan biyolojik hasarı taşımayan biyotin ile işaretlenmiş probalar, digoxigenin ya da floresans belirteç içeren probalar tercih edilmektedir. Yüksek işlem hacimli 96 kuyucuklu mikrotitre plağında PZR ile kombine DNA hibridizasyonu *Listeria* tayini için uygun, oldukça duyarlı ve spesifik bir yaklaşımdır. DNA hibridizasyon testleri öncelikli olarak virülans faktörü olan genlere spesifik probaları hedeflemek aracılığıyla *L. monocytogenes* türünün diğer *Listeria* türlerinden ayrımını gerçekleştirmeyi amaçlamaktadır. Ticari olarak satılan DNA hibridizasyon testleri gıda analizleri için rutin olarak kullanılmaktadır ve bu testlerin hassasiyeti, doğruluğu geniş oranda test edilmiştir (Gasnov ve ark. 2005).

NASBA tekniği RNA analizleri için RT-PZR metoduna bir alternatif olarak kabul edilmektedir. NASBA tek iplik RNA dizisinin çoğaltılması için tek bir tüpte 3 ayrı enzimi içermektedir ki bu enzimler ters transkriptaz, RNaseH ve T7 RNA polimerazdır. NASBA *L. monocytogenes* 16S rRNA ve çeşitli mRNA dzilerinin tayini için kullanılarak canlı hücrelerin tayinine olanak sağlamaktadır. *hly* mRNA kullanılarak NASBA metodu ile et ve deniz ürünlerinde canlı *L. monocytogenes* tayin çalışmaları başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmiştir. Bu yöntem ile 16S rRNA hedef dizi olmak üzere  $10^6$  cfu/ml konsantrasyonda tayin yapılabilmektedir (Liu ve ark. 2008). “Uyttendaele ve ark. (1995)” yapmış oldukları çalışmalarda kullanmış oldukları probun diğer *Listeria* türleri ile hibridizasyona girmediğini, yöntemin ELİZA ile eşit etkinliğe sahip olduğunu ve yalnızca tanı değil spesifik identifikasyon bilgisi de sağladığından dolayı ELİZA metoduna kıyasla daha avantajlı olduğunu bildirmişlerdir.

Verileri daha doğru bir biçimde yorumlamak için temel olarak DNA'yı parçalayan restriksiyon enzimlerinin (endonükleazlar) birlikte kullanıldığı PFGE gibi, DNA fragmentlerinin çözünürlüğünü daha iyi hale getiren, elektroforetik teknikler geliştirilmiştir. Denatüre gradiyent jel elektroforezi ya da kapiler elektroforezi tek nükleotid varyasyonlarını belirlemek için, tek iplik konformasyonel polimorfizim analizleri ile birlikte kullanılan elektroforetik tekniklerdir. PFGE *L. monocytogenes* için yapılan epidemiyolojik araştırmalarda

başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Kesim enzimleri genomik DNA'yı seyrek aralıklarla kestiği için basit bir bant profilinin (10-20 bant) oluşması ile bilgisayar tabanlı analizlerin basitliği, hızlı sonuç alımı ve strainlerin rahatlıkla karşılaştırılabilmesi PFGE yönteminin avantajları arasındadır. Bununla birlikte *L. monocytogenes* ve diğer gram pozitif bakteriler için mevcut olan PFGE protokollerinde DNA plug hazırlığı, hücreleriz lizizi ve DNA kesimi 4-6 gün sürmekte ve buna ilaveten 20-24 saatte jel elektroforezi için gerekmektedir (Lewis ve Swaminathan 2001).

#### 1.5.4. Alt tiplendirme metotları

*L. monocytogenes* strainlerinin tiplendirilmesi, ya serolojik tiplendirmedeki somatik O ve kamçıda bulunan H faktörü, faj reseptörleri veya enzimler (multilokus enzim elektroforezi) gibi fenotipik belirteçlere ya da bakteriyal genom içerisindeki moleküler varyasyonlara (moleküler tiplendirme metotları) dayandırılarak fenotipik tiplendirme metotları ile yapılabilmektedir. Serolojik tiplendirme ise *Listeria* türlerindeki somatik O antijeni ya da kamçıdaki H antijeni ile spesifik reaksiyona girebilen antikörlere dayanmaktadır. *Listeria* türleri sahip oldukları O ya da H antijenine göre serotipler içinde gruplandırılmaktadır. Serotipler *Listeria* türleri arasında paylaşılmaktadır ve antikörlar direkt olarak bu antijenlere karşıdır, burada söz konusu olan antijenler *Listeria* cinsine ait örneklerin identifikasyonunu sağlamaktadır fakat türler arasındaki farklılıkları ortaya koymamaktadır. *L. monocytogenes* identifikasyonu için serolojik doğrulama düzenleyici kurumlar tarafından zorunlu tutulmamakla birlikte, seroloji genellikle çevresel kontaminasyonlarda ve epidemiyolojik çalışmalardaki spesifik serotiplerin yaygınlığını belirlemek için kullanılmaktadır. Faj tiplendirmesi oldukça iyi oturtulmuş ve farklı örnek tipleri üzerinde yoğun olarak değerlendirilmiş bir metottur. Özellikle gıdalarda *Listeria* enfeksiyonu araştırmaları için kullanışlı bir araçtır. Metot belirli bir bakteriyofaj ile *Listeria* konak strainin spesifik etkileşimi sonucunda konak hücrenin lizise uğramasına dayanmaktadır. Çok lokuslu enzim elektroforezi de iyi çalışılmış tiplendirme teknikleri arasında yer almaktadır. Bu yöntem enzimlerin aminoasit

sekanslarındaki varyasyonlar sonucunda proteinlerin farklı elektrostatik yük taşımaları ve bu nedenle de farklı elektroforetik hareket sergilemelerini gözlemlemeye dayanmaktadır. Hareketteki bu varyasyonlar direkt olarak enzimi kodlayan genlerdeki alel çeşitliliği ile ilişkilidir. Elektroforetik hareketleri temel alınarak izolatlar elektroforetik tiplere sınıflandırılabilir. Uygulanan prosedür basittir ve bakteriyel hücrenin lizisi aracılığıyla enzim ekstraktının hazırlanmasını içermektedir, ekstraktın elektroforezi nişasta jelleri ve spesifik enzim boyaları kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Gasnov ve ark. 2005).

### 1.5.5. Biyosensör sistemleri ile *L. monocytogenes* tayini

Güncel çalışmaların çoğu mikrobiyal tayin için daha sağlam, kullanımı kolay, portatif ve pahalı olmayan analitik sistemleri kurmayı hedeflemektedir. Bu bağlamda biyosensörler kompleks örnek matrislerinde, oldukça geniş çeşitlilikteki analitlerin belirlenmesine olanak sağlamaktadırlar ve klinik tanı, gıda analizleri, biyolojik prosesler ve çevresel gözlemler gibi pek çok alanda, tam zamanlı, hızlı ve çoklu analizlerin yapımına olanak sağlayarak, umut vaat eden bir alternatif olmaktadır (Leonard ve ark 2003; Dominguez-Renedo ve ark. 2007). 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından ilk biyosensör olarak bir enzim elektrotu gösterilmiştir. Bu elektrottaki oksijeni gözlemlemek için glikoz oksidaz ile birleştirilmiş bir amperometrik elektrottur. 1987 yılında Vo-Dinh ve arkadaşları fiber optik tabanlı bir immünosensörle kanserojen kimyasalların tayini için antikoların eş zamanlı olarak kullanılabilirliğini göstermişlerdir (Conroy ve ark. 2009). Geçtiğimiz son 10 yıl boyunca, mikroorganizmaların hızlı ve tam zamanlı belirlenmesi için biyolojik sensör geliştirme çalışmaları büyük ilgi görmüş, bakteriyel patojenler için farklı tipte biyosensörler geliştirilmiştir.

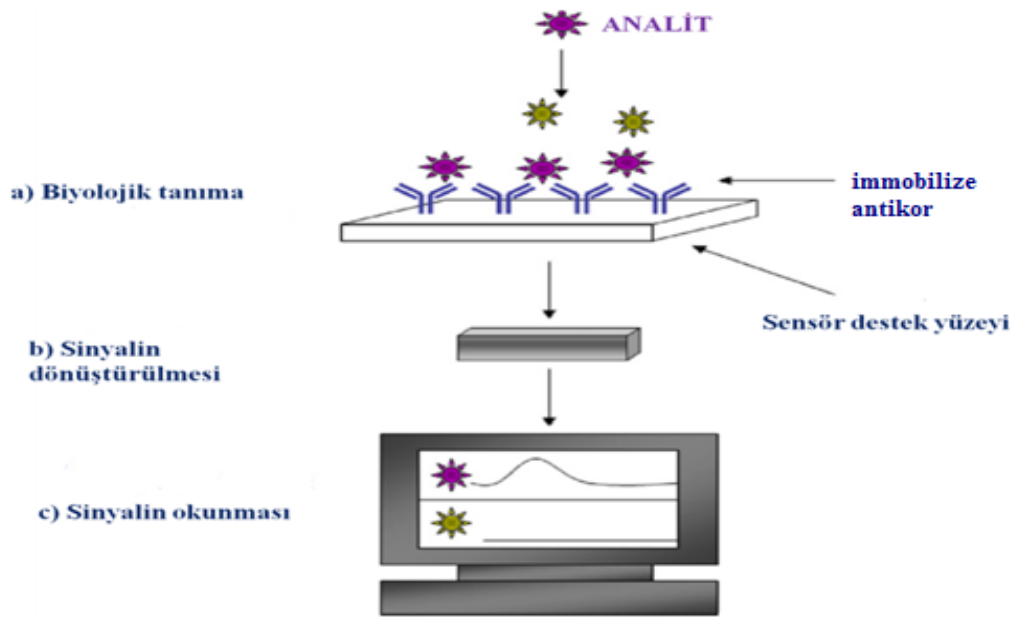
Biyosensör sistemleri ile patojen mikroorganizma tayin çalışmaları yalnızca *L. monocytogenes* için değil diğer patojen mikroorganizmalar içinde gerçekleştirilmiştir. “Serra ve ark. (2008)” tarafından yapılan çalışmada kompleks kültür ortamındaki katalaz pozitif ve katalaz negatif bakterilerin hızlı bir şekilde belirlenmesi, grafit-teflon-peroksidaz-ferrosen bileşimi (kompozit) bir elektrot kullanarak organizmaların hidrojen peroksit tüketim veya üretimleri

gözlemlenerek başarılmıştır. Hidrojen peroksit değişimi amperometrik olarak 0,00 V'da ölçülmüştür. Deneysel çalışmalarda, solüsyonların bileşimi, inkübasyon zamanı ve hidrojen peroksit konsantrasyonu gibi parametreler optimize edilmiştir. Geliştirilen yöntem ile *E. coli* ve *Streptococcus. pneumoniae* yaklaşık olarak  $10^6$  ve  $10^5$  konsantrasyon seviyesinde, sırasıyla 10 ve 15 dakika gibi çok kısa bir analiz sürecinde, ön zenginleştirme veya konsantre etme basamakları olmaksızın belirlenebilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise bitkisel gıdalarda *E. coli* tayini için antikor tabanlı bir biyosensör uygulaması anlatılmaktadır. Bakteriyel kontaminasyon, özellikle de fekal kontaminasyon için biyoindikatör olan *E. coli* varlığı, üreaz-*E. coli* antikor konjugatı tarafından  $\text{NH}_3$  üretimi esnasında oluşan pH değişiklikleri belirlenerek, ışık belirleyebilen potansiyometrik sensör (LAPS) transduser elemanına dayalı potansiyometrik alternatif biyoduyu (PAB) sistemi kullanılarak tanımlanmıştır (Ercile ve ark. 2003). İmmobilizasyon ve sinyal üretim basamaklarının bir arada değerlendirildiği bir çalışmada, “Minnet ve ark. (2003)” antibadi tabanlı biyosensör ile gıdalarda *Listeria* tayini için farklı sinyal üretim tekniklerini araştırmışlardır. Yine aynı araştırmacı grup elektropolimerizasyon sürecinde *Listeria* antikorunun polipirol filmi içerisine yerleştirilmesi ve polimerizasyondan sonra bu antikorun iletken polimer yapısına kovalent olarak bağlanmasını araştırmıştır (Minnet ve ark. 2002). Yine yapılan bir başka çalışmada *L. monocytogenes* analizlerinin hassasiyetinin artırılması için amperometrik tayin ve ELİZA metotları değerlendirilmiştir. Çalışmada ELİZA metodu hem direkt hem de indirekt yolla kullanılmıştır. Amperometrik tayin için antikor tabanlı bir sensör kullanılmıştır (Crowley ve ark. 1999).

## 1.6. Biyosensörler

Biyosensör, fizyolojik ya da biyokimyasal değişimler ile ilgili bilgiyi belirleyen, ileten ve kaydeden bir araçtır. Teknik olarak biyosensör, bir elektronik dönüştürücü (transduser) ile biyolojik aracı birleştiren bir probdur. Böylece biyokimyasal sinyalin ölçülebilir elektriksel cevaba dönüşümünü sağlamaktadır. Biyosensör yapımında çeşitli dönüştürücüler örneğin elektrokimyasal, optik, akustik ve elektronik dönüştürücüler kullanılabilir. Bir biyosensör Şekil

1.3'de gösterilen üç ana bileşenden oluşmaktadır; biyolojik tanıma elementi, dönüştürücü ve sinyal gösterimi ya da okunması. Analit ile biyolojik tanıma elementi arasındaki etkileşim transdüksiyon sistemi tarafından ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmektedir. Ardından sinyal okuma ya da gösterilme şekline dönüştürülmektedir (D'Souza 2001; Dominguez-Renedo ve ark. 2007; Conroy ve ark. 2009).



**Şekil 1.3.** Biyosensör bileşenleri. (a) Analitin biyotanıma elementi ile etkileşimi; bu durum immobilize antibadinin aynı soydan gelen antijene spesifikliği sayesinde kolaylaşmaktadır. Diğer biyotanıma elementleri arasında enzimler, lektinler, reseptörler ve mikrobiyal hücreler bulunmaktadır. (b) Sinyal üretimi; meydana gelen etkileşimin ölçülebilir bir sinyale çevrilmesi. (c) sinyalin sergilenmesi ya da okunması; ilgilenilen analit ile etkileşim sonucunda üretilen spesifik sinyalin gözlemlenmesi. Sarı; spesifik olmayan analit (Conroy ve ark. 2009).

Söz konusu sinyal proton konsantrasyonundaki değişim, amonyak ya da oksijen gibi gazların salınımı veya alımı, ışık yayılımı-absorbsiyonu ya da yansımaları, ısı yayılımı, kütle değişimi vb sonucunda üretilebilmektedir. Üretilen bu sinyal bir dönüştürücü tarafından elektrokimyasal, termal, optik ya da piezoelektrik anlamda akım, potansiyel enerji, sıcaklık değişimi, ışığın

absorbsiyonu ya da kütle artışı gibi ölçülebilir bir cevaba dönüştürülmektedir. Üretilen sinyal daha sonraki analizler için çoğaltılabilir, işlenebilir ya da depolanabilir. Prensipite işlevsel bir biyosensör üretmek için her hangi bir reseptör herhangi bir uygun dönüştürücü ile kombine olarak kullanılabilir (Zhai ve ark. 1997).

Günümüzde biyosensörler klinik, biyokimyasal ve çevresel analizlerde biyomoleküllerin etkileşiminin analizi için oldukça güçlü araçlardır. Biyomedikal alana bakıldığında kaza, acil bölümü ya da doktor ofisi açısından biyosensörler hızlı, gerçek zamanlı ve doğru sonuç sağlama potansiyeli olan cihazlardır. Bunun tipik bir örneği diabet hastalarında kılcal damarlarda glikozun *in vitro* tayinidir (Conroy ve ark. 2009).

Her ne kadar başta moleküler biyoloji olmak üzere pek çok alanda ilerleme sağlanmış olsa da mikrobiyal kontaminantların belirlenmesinde kullanılacak daha hızlı, güvenilir ve spesifik metotlara duyulan ihtiyaç hızla artmaktadır. Bu bağlamda biyosensörler, gerçek zamanlı, hızlı ve çoklu analizlerin yapımına olanak sağlayarak, umut vaat eden bir alternatif olmaktadır. Patojen mikroorganizmaların tayini için farklı tipte biyosensörler geliştirilmiştir. Patojen belirleme için biyosensör uygulamalarının çoğu patojen-antikor bağlanmasının ya da DNA-prob DNA hibridizasyon olayının gözlemlenmesine dayanmaktadır. Patojen bakteri biyosensörleri alanındaki yakın zaman gelişmeleri içerisinde elektrokimyasal biyosensörlerin kullanımı da yer almaktadır. Bakterilerin belirlenmesinde metabolik ürünlerin ölçümü; işlem basitliği, düşük maliyet, farklı canlı ve canlı olmayan hücrelerin belirlenebilmesi ve etiketlemeye ihtiyaç duymadan tayin edebilme gibi çeşitli avantajlar sağlayan oldukça ilginç bir yaklaşımdır (Serra ve ark. 2008; Signoretto ve Canepari 2008). DNA hibridizasyon sensörleri elektrot yüzeyine immobilize edilmiş nükleik asit tanıma tabakasını içermektedir. Bu tabaka seçici olarak spesifik bir DNA sekansının belirlenmesinde rol oynamaktadır. Dönüştürücü sistemi ile hibridizasyon olayı ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmektedir. Sinyal okuma sistemine bağlı olarak DNA sensörleri iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Bunlardan birincisinde redoks aktif türler etiket olarak kullanılmaktadır, ikincisinde ise herhangi bir etiket

kullanılmaksızın DNA ara yüzeyinde meydana gelen değişimler elektrokimyasal olarak gözlemlenmektedir (Gooding, 2002).

Temel olarak bir biyosensörün seçiciliği veya spesifikliğı, mevcut analiti algılama kapasitesine sahip olan biyolojik tanıma elementine bağılı olarak değişmektedir. Biyolojik olarak aktif materyalin seçimi ise; spesifiklik, depolanma, işlevsellik ve çevresel stabilite faktörlerine bağılıdır. Bu seçim aynı zamanda kimyasal bileşik, antijen, mikrop, hormon, nükleik asit gibi belirlenecek olan analite ve de koku, tat gibi sübjektif parametreler de bağılıdır. Enzimler, antibadiler, DNA, reseptörler, organeller ve mikroorganizmalar gibi bitki ve hayvan hücreleri ya da dokuları da biyolojik duyu elementi olarak kullanılmaktadır (D'Souza 2001; Conroy ve ark. 2009).

Bir biyosensörün performansını etkileyen ana faktörler 7 ana başlık altında toplanabilir. Bunlar; seçicilik, hassasiyet aralığı, doğruluk, kullanılan solüsyonun doğası, cevap elde etme süresi, tekrar kullanım zamanı (sensörün bir analizden sonraki analize hazır olması için geçen süre) ve kullanım ömrüdür (Eggins 2002).

### **1.7. İdeal Biyosensör Karakteristikleri**

Hangi tipte tasarlanacak olursa olsun bir biyosensörün işlevsel olabilmesi için, ölçüm sisteminin çeşitli fiziksel özellikleri taşıyor olması gerekmektedir. İdeal bir biyosensörün en önemli özellikleri ve karakteristikleri; hassasiyet, kalibrasyon, doğrusallık, tayin sınırı, arka plan sinyalleri, kesinti (gecikme), uzun süreli stabilite, seçicilik, dinamik cevap oluşturma, düzlemsel membran, küresel membran, akış hassasiyeti, sıcaklığa olan bağımlılık, gürültü sinyali ve kullanım ömrüdür.

Özel bir kimyasalın konsantrasyonundaki değişime ( $\Delta C$ ) bağılı olarak biyosensör cevabında meydana gelen değişim ( $\Delta D$ ) yani  $\Delta C/\Delta D$  hassasiyet olarak tanımlanmaktadır. Biyosensör sistemlerinde analitler genel olarak direkt ölçülmemektedir. Daha çok reaksiyona giren ya da reaksiyon sonucu oluşan bir ürünün konsantrasyonundaki değişime bağılı olarak ölçüm yapılmaktadır.

İdeal bir biyosensör hedef analitin bilinen konsantrasyonlarını içeren standart solüsyonlara ya da gazlara maruz bırakıldığı zaman kolay bir biçimde



kalibre edilebilmelidir. Hassasiyeti belirlemek için kalibrasyon grafiği hazırlanışı sırasında çok fazla veri noktasına ihtiyaç duymamalıdır.

Bir biyosensörün mükemmel düzeyde doğrusallığa sahip olabilmesi için, ölçüm ortamında fiziksel olarak çözünebilen substratın sıfır konsantrasyonundan maksimum konsantrasyonuna kadar uzanan geniş bir aralıkta hassasiyetinin sabit olması gerekmektedir. İdeal olarak, bir substratın en düşük konsantrasyonu bile biyosensör tarafından tayin edilebilmeli, tayin sınırı yalnızca tayinde kullanılan cihazın elektronik çözünürlüğü ile kısıtlanmalıdır.

Genel olarak, bir biyosensör sinyali elde edilen sonuçtan çıkarılması gereken arka plan sinyallerine sahiptir. Arka plan sinyalleri, bir biyosensör ile düşük tayin limitlerinde doğru ölçüm yapılmasını zorlaştırmaktadır. Akım kaçaqları, elektronik cihazdaki veya biyosensörde farklı metallerin temasından kaynaklanan küçük gerilim farklılıkları veya pek çok elektrokimyasal etken bu sinyalleri oluşturabilmektedir.

İdeal bir biyosensör daha önce yapılmış olan ölçümlerden etkilenmemelidir ve düz bir çizgi gibi temsil edilmeli herhangi bir kesintiye uğramamalıdır. Bununla birlikte, sistemde bir sonraki ölçümü etkileyecek şekilde enerji emilebilmekte ya da mevcut kimyasal ortam ölçüm sırasında değişebilmektedir.

İdeal bir biyosensörün tüm kullanım ömrü boyunca ya da en azından ölçüm yapılan kadar hassasiyeti sabit kalabilmelidir. Elektrotun okside olması ve proteinler ya da ortamdaki, diğer kimyasal substratların direk emilmesi yoluyla kirlenme gibi hassasiyeti azaltan birden fazla faktör bulunmaktadır.

İdeal bir biyosensör sadece hedef analit konsantrasyonundaki değişime cevap verir ve diğer kimyasal türlerin varlığından etkilenmez.

Bir biyosensör probunun fiziksel özellikleri ve nispeten büyüklüğü, ölçümü yapılan hedef analitin konsantrasyonundaki değişime nasıl hızlı cevap oluşturabileceğini belirlemektedir. Örnek içerisindeki kimyasal türler genel olarak basit difüzyon yoluyla aktif yüzeye geçmektedirler.

Farklı geometrileri ve basit sınır koşulları ile biyosensörler için, teorik modellerden analitik çözümler üretilebilir. Örneğin büyük elektrotlar genellikle, basit, tek tip ve ölçülebilir kalınlıktaki membranlar ile düzlemsel element olarak kaplanmaktadır. Benzer şekilde analitik çözüm küresel koordinatlardaki tek tip

bir membran içinde bulunabilir. Bu yaklaşım genellikle, ölçüm ortamı ile kıyaslandığı zaman oldukça küçük kalan mikroelektrotlar için kullanılmaktadır.

Bazı durumlarda substratın membrandan sensöre taşınması önemli hale gelebilmektedir. Bazı proseslerde akış sınırlaması olabilmektedir.

Difüzyon katsayısı, kimyasal çözünürlük ve biyosensör yapımında kullanılan katı materyaller gibi bütün fiziksel özellikler sıcaklıkla değişmektedir. Enzimlerin katalizlediği reaksiyon oranı sıcaklığa oldukça bağımlıdır. Çeşitli kimyasal reaksiyonlar sonucunda, biyosensörün ısını değiştirilecek ölçüde ısı üretimi gerçekleşebilmektedir. Pratikte genel olarak su banyoları ya da metal bloklar kullanılarak ölçümler izotermal koşullarla sınırlandırılmaktadır.

Biyolojik elementler genellikle bir biyosensör sistemindeki en az kararlı olan bileşiklerdir. Bir biyosensörün önemli bir özelliği normal işlem koşulları altında hassasiyetini koruyabildiği kadar uzun bir kullanım ömrüne sahip olmasıdır. Kullanım ömrü yapılan toplam ölçüm sayısına veya ölçülen analitin konsantrasyonuna bağlı olabilir (Buerk 1993).

### 1.8. İletken Polimerler

Polimerler (plastikler) güçlü yalıtkan özellikleri ile tanınmaktadırlar ve modern dünyada oldukça yaygın bir biçimde kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte çeşitli polimerlerin elektriksel iletken özelliğe sahip olduğu MacDiarmid, Shirakawa ve Heeger tarafından keşfedilmiştir. Organik doğaya sahip olan bu materyaller, metalik ve yarı iletken karakteristikleri taşıyan polimerlerdir ve diğer bilinen herhangi bir materyalde bu özelliklerin kombinasyonu henüz keşfedilmemiştir.

İletken polimerlerin elektriksel iletkenlik, düşük iyonizasyon potansiyeli ve yüksek elektron affinitesi gibi karakteristiklere sahip olmasını sağlayan anahtar özellikleri, polimer yapısında konjuge çift bağların bulunmasıdır. Konjugasyonda karbon atomları arasındaki bağlar sıralı olarak tek ve çifttir.

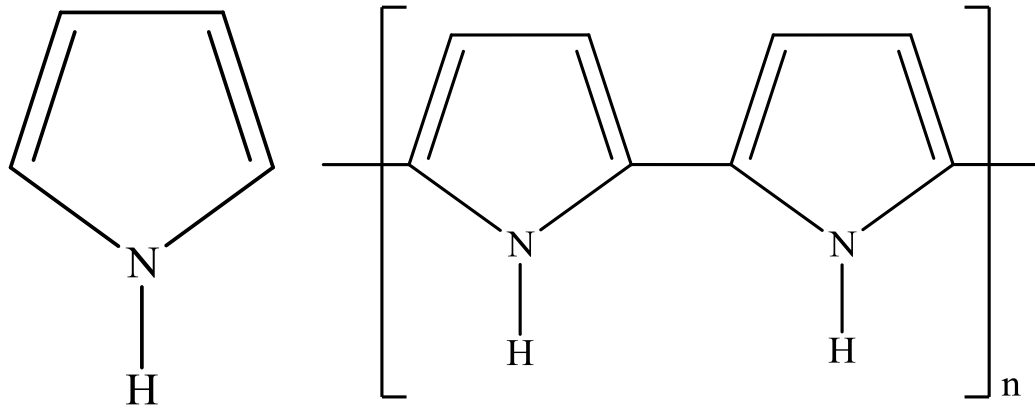
Konjuge sistemde elektronlar yalnızca gevşek bağlı bulunduğundan, elektron akışı olasıdır. Her bağ 'sigma ( $\sigma$ )' olarak adlandırılan güçlü bir kimyasal bağ içermektedir. Buna ilaveten her çift bağ aynı zamanda 'pi ( $\pi$ )' bağ olarak

adlandırılan zayıf bir bağ içermektedir. Bu durum elektronların bütün bir sistem içerisinde yerleşim düzeninin bozulmasına olanak sağlamakta ve pek çok atom tarafından paylaşılmasına yol açmaktadır. Bunun anlamı delokalize olmuş elektronların tüm sistem etrafında hareket edebileceğidir. Bununla birlikte, elektron akışı için polimer materyalinin katkılanması (doping) gerekmektedir. Katılma işlemi ya polimere elektron ilavesi (indirgenme reaksiyonu) ya da polimerden elektronların uzaklaştırılması (yükseltgenme reaksiyonu) ile gerçekleştirilmektedir. Katılama işlemi bir kez meydana geldiğinde,  $\pi$  bağlarındaki elektronlar polimer zinciri üzerinde taşıma yeteneği kazanmaktadırlar. Elektronlar molekül üzerinde hareketli olduğu zaman, elektrik akımı oluşmaktadır. Daha iyi bir iletkenlik için molekülün iyi düzenlenmesi ve hareketli elektronların sınırlı uzaklıkta yakın olarak paketlenmesi gerekmektedir. İletken polimerin iletkenliği, polimer yapısının kimyasal manipülasyonu ile, dopant doğası ile, katılama derecesi ile ya da diğer polimerlerle harmanlama yolu ile ayarlanabilmektedir. İletken polimerlerin iletkenliğini etkileyen ana faktörler arasında, polaron uzunluğu, konjugasyon uzunluğu, toplam zincir uzunluğu ve bitişik molekülden yük transferi yer almaktadır. Organik iletken olmalarının yanı sıra bu çok yönlü materyaller aynı zamanda biyoiletirim için temel olan kritik bir özelliğe daha sahiptirler, iletken polimerler farklı oksidasyon basamakları arasında hızlı ve geri dönüşümlü olmak üzere anahtar görevi görmektedirler. Yani, elektroaktif materyaldirler. Günümüzde pek çok uygulama alanında kullanılan iletken polimerler çeşitli tipte biyosensörlerin üretiminde de yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Sağlık hizmetleri, çevre analizleri, gıda analizleri alanlarında tasarlanan sensörlerde, ayrıca DNA sensörleri ve immüno sensörlerde iletken polimerler kullanılmaktadır (Gerard ve ark. 2002; Wallace ve Kane-Maguire 2002; Arshak ve ark. 2009).

### **1.8.1. Polipirol (PPy)**

Polipirol çeşitli spesifik elektriksel özelliklere sahip olduğundan dolayı en çok dikkati çeken iletken polimerler arasında yer almaktadır. Bu özellikler polipirolün doğal olarak iletken olmasından kaynaklanmaktadır. Diğer pek çok

kullanım amacının yanı sıra biyoanalitik sensör tasarımında en yaygın olarak kullanılan iletken polimer polipiroldür. Redoks aktivitesi, iyon değişim ve iyon ayrımı kapasitesi, gaz, protein ve DNA gibi moleküllere karşı olan güçlü emici özelliği ve buna benzer diğer özellikleri polipirolün yaygın olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bu tip özelliklerinin çoğu kullanılan dopantın doğasına ve sentez prosedürüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Ramanavicius ve ark. 2006; Arshak ve ark. 2009).



Şekil 1.4. Piyrol monomeri ve polipirol yapısı

PPy elektrokimyasal olarak üretilebilmekte ve iletken bir yüzeyde depolanabilmektedir. Bu teknik çeşitli tiplerde elektrokimyasal sensör ve biyosensör tasarımı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Polipirolün elektriksel iletkenliği delokalize orbitallerdeki elektron hareketinin sonucudur. Poliasetilen haricindeki diğer konjuge polimerlerde omurgadaki  $\pi$  bağında elektron ilavesi ya da uzaklaştırılması gerçekleştirilmektedir. Poliasetilende anyon ve katyonlar şarj transferi sırasında üretilmektedir. Polipirolün pek çok tipinin sahip olduğu iletkenlik 1-100S/cm aralığındadır. (Ramanavicius ve ark. 2006; Arshak ve ark. 2009).

İlk kez 1912 yılında sentezi gerçekleştirilen PPy, pirol ya da süstitüe pirol monomerlerinin yükseltgenmesi ile elde edilmektedir. Yükseltgenme genellikle ya kimyasal bir yükseltgen varlığında çözelti içerisinde kimyasal polimerizasyon ile ya da dışarıdan gerilim uygulanarak iletken elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyon yöntemi ile gerçekleştirilmektedir. Elektrokimyasal yöntem

ile sentez sonucunda çalışma elektrotu yüzeyinde film şeklinde polipirol elde edilirken, kimyasal polimerizasyon yöntemi ile genellikle toz halinde polipirol elde edilmektedir (Özcan 2008).

Katalitik biyosensör tasarımında enzimler ile modifiye polipirolün başarılı bir şekilde kullanımı *Aspergillus niger* türünden elde edilen glikoz oksidaz enziminin polipirol içerisine tuzakla yakalama yöntemi ile dahil edilmesiyle başlamıştır. Daha sonraları polialanin de bu enzim ile modifiye edilmiş ve glikoz tayininde kullanılmıştır. Enzimin iletken polimer filmi içerisine gömülmesi enzimin dışarı süzülmesini engellemekle kalmayıp aynı zamanda film tabakası analite karşı geçirgen olduğundan dolayı katalitik bölgeye ulaşımı da sağlamaktadır. Elektrokimyasal yolla elektrot yüzeyinin polimer film hapsedilmesi ile kaplanması için kullanılan puls yöntemleri ince tabaka polipirol üzerine hapsedilen enzim miktarını arttırmakta oldukça başarılı bulunmuştur. Dahası enzim aktivitesi final reaksiyon ürününün karakterizasyonu redoks mediyatörleri kullanılarak amperometrik ya da potansiyometrik metotlar ile belirlenebilmektedir (Ramanavicius ve ark. 2006).

Polipirolün yapısı ve iletkenliği yükseltgenme basamağına bağlıdır. İndirgenmiş polipirol yalıtkan özelliğe sahiptir. PPy zincirinin yükseltgenmesi moleküler yapıyı değiştirir ve polimere iletkenlik kazandırır. Nükleofiller varlığında PPy süstitüe ürünler oluşur. Hidroksil iyonu gibi kuvvetli nükleofil gruplar, konjuge çift bağın yapısını bozan kinon boşluklarının oluşmasına neden olur. Polimerin bu şekilde tersinmez modifikasyonları overoksidasyon yani aşırı yükseltgenme olarak tanımlanır. Polipirol pozitif gerilimlerde ve çok bazik ortamlarda aşırı yükseltgenir. Aşırı yükseltgenme, katılanmanın tersine polipirolün iletkenliğinin azalmasına ve nükleofilik saldırılara elverişli hale gelmesine neden olduğundan istenmeyen bir işlem olarak görülür (Özcan 2008).

### **1.9. Biyolojik Bileşenin Polimer Sentezine Katılması**

Fiziksel tutuklama ve kovalent bağlama metotları daha önceleri de enzim gibi proteinleri ya da antikorları ve hatta bütün bir canlı hücreyi iletken polimerler içersine immobilize etmek için kullanılmıştır. Enzimler için biyoaktif kısmında

mevcut olduğu monomer polimerizasyonu ile indüklenen elektrokimyasal tutuklama metotlarının bazı detayları tartışılmıştır. Bunlar basit yöntemler olup biyoaktif bileşenin lokalizasyonunda kullanılabilir. Bununla birlikte biyolojik bileşen polimer matrisi içerisinde gelişigüzel konumlandığı için hedef analite ulaşamaması sıklıkla oluşan bir durumdur.

Ko-immobilizasyon teknikleri genelde biyolojik bileşenle birlikte ikinci bir ters yüklü iyonun immobilizasyonunu kapsamaktadır. Bu oldukça etkili, genellikle küçük, oldukça yüklü, sonuçta polimerin elektronik ve elektrokimyasal özelliklerinin gelişmesini sağlayan anyonik dopantlar (klorit veya fosfat iyonları) ile sağlanmaktadır. Yeterli miktarda biyoaktif kısmın ortamda bulunması sonuç olarak ortaya çıkan materyalin polimer olarak kullanımına olanak sağlamaktadır. Bu yaklaşım glikoz oksidaz, sülfid oksidaz ve üreaz için kullanılmıştır. Mousty ve arkadaşları 2001 yılında başlangıç materyali olarak dipiralik türevlerini kullanarak yeni hidrofilik çapraz bağlı polimer üretmişler ve bunun glikoz oksidaz immobilizasyonunda etkin olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte bu yaklaşımın kullanımı ile ilgili olarak, biyolojik kısmın sonuçta ortaya çıkan polimer matrisi içerisinde konumlanması ve biyoaktif bileşenin ulaşılabilirliği ile ilişkili olarak polimer filmleri arasında tekrar edilebilirlik açısından halen sorular bulunmaktadır.

İletken polimerin dış tabakasına biyolojik bileşenin immobilizasyonunda kullanılan adsorpsiyon (yüzeye tutunma) teknikleri ile polimer matrisi içerisine gömülme probleminin üstesinden gelinebilmektedir. Ancak bu teknikte de biyolojik bileşenin örnek solüsyonu içerisine difüze olmasından dolayı kayıplar yaşanmaktadır.

Kovalent bağlama teknikleri genel olarak tekrar edilebilirlik problemini ve daha önce bahsedilen metotlarla ilişkili konumlanma sorununu ortadan kaldırmaktadır. Karboksil, amin grupları gibi bağlı grupları içeren monomerlerin türevlendirilerek işlevsel hale getirilmesinin bu bakımdan oldukça faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte kovalent bağlama metotları genel anlamda pahalı ve zaman alan tekniklerdir (Minnet ve ark. 2002).

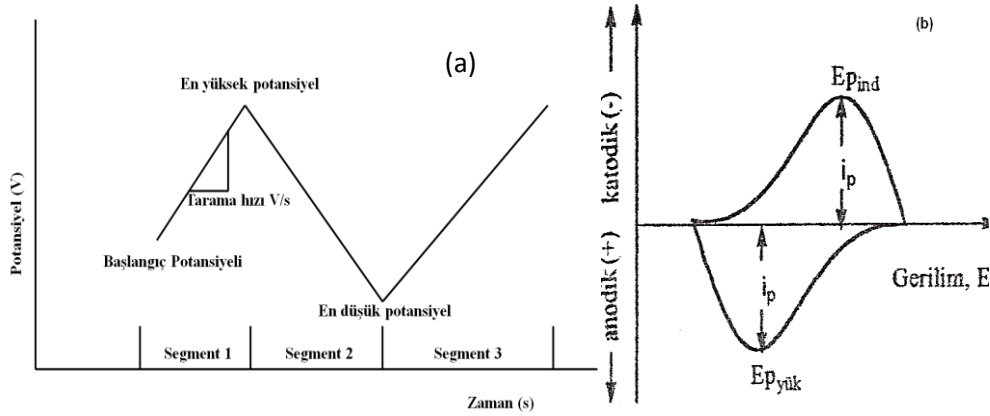
## 1.10. Voltametrik Yöntemler

Voltametri, tıpkı potansiyometri, kulometri ve kondüktometri gibi elektroanalitik kimyanın dört temel metodundan biridir. Dengedeki bir elektrokimyasal hücreye dışarıdan denge geriliminden farklı bir gerilim uygulanırsa, sistem yeniden dengeye ulaşmaya çalışır ve bu sırada bir elektrot tepkimesi olur, yani akım geçer. Üç elektrotlu voltametrik sistemlerde çalışma elektrotu ve referans elektrot arasına uygulanan ve değeri zamanla değiştirilen gerilime karşı, çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasındaki akım ölçülür. Yani voltametrik yöntemlerde uygulanan potansiyele karşılık hücreden geçen akım kaydedilir ve elde edilen grafiğe voltamogram denir. Voltametri de herhangi bir maddenin elektrokimyasal davranışını incelemek için elektrota uygulanabilecek gerilim aralığının sınırları kullanılan çalışma elektrotunun, kullanılan çözücü ve elektrolitin türlerine bağlıdır. Negatif gerilim sınırını ise çözücünün ya da destek elektrolit katyonunun indirgenme akımı belirler (Yıldız ve Genç 1993; Gündüz 2002).

### 1.10.1. Dönüşümlü voltametri (DV)

Voltametri yöntemi genellikle karıştırılmayan çözeltilerde uygulanabilir. Elektroaktif bir madde içeren durgun bir çözeltide bir mikroelettrot ile referans elektrotu arasına doğrusal olarak artan bir gerilim programı uygulanır ve bu sırada akan akım ölçülürse bu yönteme taramalı voltametri denir.

Dönüşümlü voltametri de ise gerilim değeri bir noktadan başlatılır ve tarama başlangıç yönüne göre doğrusal olarak en yüksek değerine ya da en düşük değerine ulaşır. Ardından ters yönde tekrar tarama gerçekleşir. Şekil 1.5'de zamanın fonksiyonu olarak gerilim gösterilmektedir. Bu yöntemde, akım gerilimin bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Sistemde gerilim akım eğrisi pik olarak görülmektedir (Yıldız ve Genç 1993; Anonim 2011).



**Şekil 1.5.** DV için zamana karşı gerilim grafiği (a), elde edilen voltomogram (b).

Dönüşümlü voltametri de ileri ve geri yöndeki gerilim tarama hızları aynı tutulabildiği gibi, istenildiğinde farklı tarama hızları da kullanılabilir. Ayrıca ileri ve geri yönde tarama sayısı istenildiği şekilde ayarlanabilmektedir. İleri yöndeki tarama sırasında oluşan ürün kararlı ise anodik pik akımı, katodik pik akımına eşittir. Ürünün kararlı olmadığı durumlarda anodik pik akımının değeri katodik pik akımının değerine göre daha küçük olur ve ürünün çok hızlı bir biçimde tüketildiği durumlarda ise geri pik tamamen kaybolur (Yıldız ve Genç 1993).

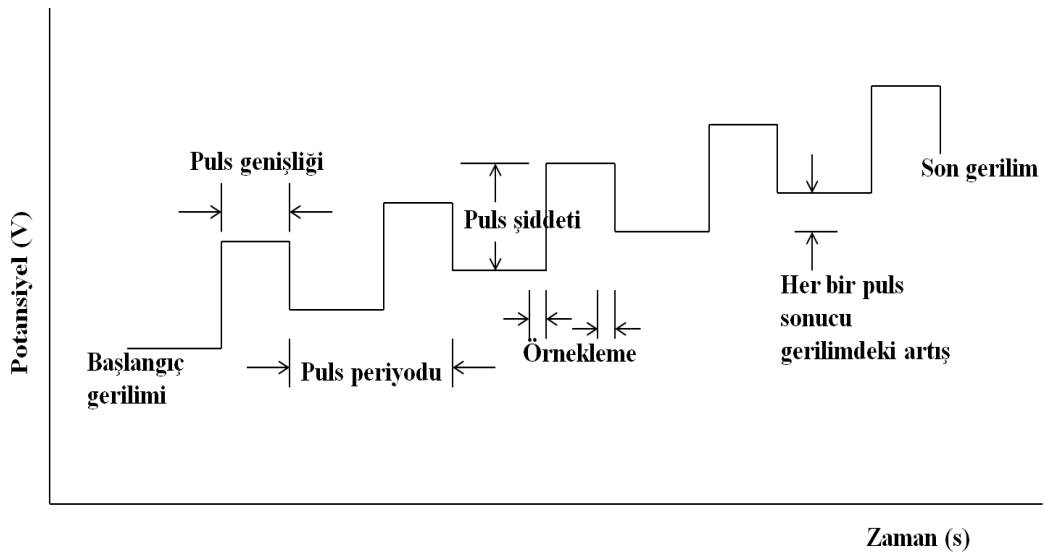
Dönüşümlü voltametri rutin kantitatif amaçlar için pek kullanılmaz. Daha çok reaksiyon mekanizmalarını ve hızlarını incelemek için kullanılır. Organik ve anorganik kimyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Dönüşümlü voltamogramlar ile bir sistemin hangi gerilimlerde ve kaç adımda indirgenip yükseltgendiğini (yükseltgenme indirgenme reaksiyonları esnasında ara maddelerin olup olmadığını), elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığını, indirgenme ya da yükseltgenme ürünlerinin kararlı olup olmadığını, elektrot tepkimesinde rol alan maddelerin yüzeye tutunup tutunmadığını kolayca anlamak mümkündür. Elektrot tepkimesinin tersinirliği azaldıkça katodik ve anodik pikler birbirinden daha ayrıık gerilimlerde ve daha yayvan olarak gözlenir (Yıldız ve Genç 1993; Skoog ve ark. 2000; Gündüz 2002).



### 1.10.2. Diferansiyel puls voltametri (DPV)

Puls teknikleri Baker ve Garden tarafından tekniklerin hassasiyetini arttırmak ve elektroaktif türlerin tayin limitlerini düşürmek amacıyla önerilmiştir. DPV yöntemi tıbbi ürünler ve biyolojik sıvılarda eser miktarda bulunan bileşiklerin tayini için oldukça etkili bir yöntemdir (Gupta ve ark. 2011).

Diferansiyel puls voltametri başlangıç geriliminden, son gerilim noktasına kadar gerilimdeki düzenli artışa dayanmaktadır. Bu yöntemde doğrusal bir tarama sırasında çalışma elektrotuna periyodik olarak potansiyel puls uygulanmaktadır. Şekil 1.6'da gösterildiği gibi birinci pulsun bitimi ile ikinci pulsun bitimi arasında geçen süre puls periyodu olarak tanımlanmaktadır. Akım potansiyel puls uygulamasından önce ve puls sonunda örneklenmektedir. Bu iki akım örnekleme arasındaki fark, potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedilmektedir (Anonim 2011).



Şekil 1.6. Diferansiyel puls yöntemi uyarma sinyalleri şematik gösterimi

Akımlar arasındaki fark gerilime karşı grafiğe geçirildiğinde pik şeklinde bir voltamogram elde edilmektedir. Ölçümün Faradayik akımın en yüksek ve kapasitif akımın en düşük olduğu zamanda yapılması yöntemin duyarlılığının yüksek olmasını sağlamaktadır. Diferansiyel puls ölçümlerinin pik şeklinde olması, yükseltgenme gerilimleri yakın olan türlerin birbirinden ayrılmasını mümkün kılmaktadır. Bu yöntemle yarı dalga potansiyelleri farkı yaklaşık olarak

0.05V olan maddelerin bile verdikleri pikler ayırt edilebilmektedir (Özcan 2008; Çolak 2009).

### 1.11. Elektrokimyasal Spektroskopisi

Tanım olarak empedans, bir elektrik devresinin alternatif akıma karşı gösterdiği reaktif (kapasitif ve endüktif) ve gerçel (rezisif) direnç değerlerinin toplamıdır. Transdüksiyonun bir prensibi olarak, empedans tekniği mikrobiyoloji alanında bakterilerin tayini ya da miktarlarının belirlenmesi anlamında uygulanabilmektedir.

Bakteriyel büyümenin tayini için kullanılan yaygın empedans metodu empedans mikrobiyoloji olarak adlandırılmaktadır. Bu metot kültür ortamının elektriksel empedansının değişiminin ya da bakteriyel büyüme sonucunda oluşan reaksiyon solüsyonunun ölçülmesine dayanmaktadır. Bu bakteriyel gelişim tabanlı empedans tekniği canlı ve ölü hücrelerin birbirinden ayırt edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu sistemde, bir çift elektrotun büyüme ortamına ya da reaktant solüsyonuna batırılması kullanılarak empedanstaki değişim ölçülmektedir. Ölçümler direkt veya indirekt olmak üzere iki yolla gerçekleştirilebilmektedir. Direkt ölçüm tekniğinde, bir çift metal elektrot test edilecek bakteri inoküle edilmiş besiyerine daldırılmaktadır. Bakteri metabolizması sonucunda ortamda meydana gelen empedans değişimi zamanla gözlemlenmektedir. Ortamdaki empedans değişimi esas olarak canlı hücreler tarafından besiyerine salınan iyonik metabolitler sebebi ile meydana gelmektedir. Bakteriler tarafından büyüme ortamına iyon salınımı iki ana kökene dayanmaktadır. Bunlardan birincisi, bakterilerin oksijen ve şekeri tüketerek karbondioksit ve organik asitleri ürettiği enerji metabolizması yani katabolizmadır. Örneğin iyonlarına ayrılmamış glikoz molekülünün, besiyerinin iletkenliğini arttıran iki molekül laktik aside dönüşümü. Diğer köken ise bakteri hücre membranı boyunca görülen iyon değişimidir.  $K^+$  ve  $Na^+$  gibi iyonlar, hücre içi ve dışı arasındaki ozmotik basınç farklılığını ve membran potansiyelini düzenlemede görev alan, hücre membranına gömülü halde bulunan iyon kanalları aracılığıyla aktif olarak transfer edilmektedir. Enerji metabolizması hücrelerden dış çevreye iyon salınımının ana kaynağı iken, iyon

değişim prosesi hücrelerden iyon salınımına küçük bir katkı yapmaktadır. Açık olan durum, bu iyon salınım proseslerinin besiyerinin iyonik bileşiminde değişime yol açtığı ve bunun sonucunda da, ölçümlerin temelini oluşturan empedansı değiştiren besi ortamının iletkenliğinin değiştiğidir.

Bakteri tayininde empedans sistemleri, verilen sıcaklık değerinde bakterinin gelişimi boyunca düzenli zaman aralıklarında iletkenlik, direnç ya da empedanstaki kısmi ya da kesin değişimi ölçmektedir. Ölçülen elektriksel sinyaller, yatay eksenle inkübasyon zamanına karşı dikey olarak grafik şeklinde çizilmekte ve empedans büyüme eğrisi çıkarılmaktadır.

Empedans tekniği ile biyosensör teknolojisinin birleştirilmesi, bakteri tayini için hız kazandıran empedans biyosensörlerin gelişimine önderlik etmiştir. Bakteri tayini için kullanılan empedans biyosensörleri bir elektrota bağlı ya da elektrotla ilişkili bakteri hücrelerinin elektriksel özelliklerinin empedans analizine dayanmaktadır. Empedans biyosensör metotları, bakteri büyümesi temelli empedans metotları ile kıyaslandığında analiz süresini büyük ölçüde 30 dakika ve 2 saat gibi bir süreye düşürmektedir. Özellikle mikrofabrikasyon ve elektromekanik nanoteknolojide yakın zamanda görülen ilerlemeler kullanılarak tayin platformunun geliştirilmesinde önemli ilerlemeler görülmüştür. Hedef bakteri hücresi ile bu biyosensörlerin boyutsal uygunluğu herhangi bir çoğaltma basamağı olmaksızın yüzeye bağlanan bakteri hücrelerinin tayinine olanak tanımaktadır (Yang ve Bashir 2008).

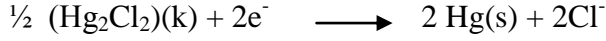
## **1.12. Kullanılan Elektrotlar**

### **1.12.1. Referans elektrotlar**

Analiz edilecek çözümden hiç etkilenmeyen elektrota referans elektrot denir. Gerilim ölçümlerinde kullanılan referans elektrot kolay hazırlanabilmeli, gerilimin sıcaklıkla değişim katsayı düşük olmalı ve belli bir akım aralığında tersinir davranmalı yani içinden küçük akımlar geçtiğinde bile gerilimi sabit kalmalı, Nernst denklemine uymalıdır. Ayrıca bir referans elektrotu zamana bağımlı olmayan sabit bir potansiyel vermelidir. Hg ve Ag gibi bir metal ile o

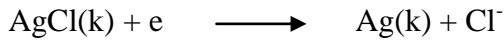
metalin az çözünen bir tuzundan yapılmış elektrotların referans elektrotu olarak kullanılması uygundur (Yıldız ve Genç 1993; Gündüz 2002).

En çok kullanılan referans elektrotlarından bir tanesi kalomel elektrottur. Kalomel elektrotu; kalomel ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ) ve Hg'den oluşturulmuş bir karışım ve KCl çözeltisinden oluşur. Kalomel elektrotun yarı hücre tepkimesi



şeklindedir. Bu reaksiyon için standart potansiyel  $E^0$ : +0.268 voltur. Kalomel elektrot tiplerinden en yaygın olarak kullanılanı doymuş kalomel elektrottur. Kullanılması daha kolay olan bu elektrotun dezavantajı sıcaklığa çok bağımlı olması ve dengeye geç gelmesidir. Oda sıcaklığında  $E^0$  değeri +0.244 V'dur.

En çok kullanılan bir diğer referans elektrot tipi de Gümüş/Gümüş klorür ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) elektrotudur. Bir gümüş telin gümüş klorür ile kaplanarak doygun potasyum klorür çözeltisine daldırılması ile elde edilen bu elektroda ait yarı hücre tepkimesi ,



şeklindedir. Oda sıcaklığında  $E^0$  değeri +0.222 V'dur (Yıldız ve Genç 1993; Harris 1994; Gündüz 2002).

### 1.12.2. Çalışma elektrotları

Voltametik yöntemde çalışma elektrotu olarak civa, platin, altın, paladyum, karbon (grafit, karbon pasta, camsı karbon) gibi elektrotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Elektroanalitik uygulamalarda karbon elektrotların sıklıkla kullanıma sebeplerinin başında kimyasal inertlik, düşük maliyet ve farklı uygulamalar için uygunluk gelmektedir. Karbon elektrot çeşitlerinden biri olan kalem ucu elektrot; yüksek elektrokimyasal reaktivitesi, mekanik dayanıklılığı, düşük maliyet ve teknoloji gerektirmesi, modifikasyon, minyatürleştirme ve yenilenmesinin kolay olması nedeniyle pek çok analitik uygulamada tercih edilmektedir. Kalem ucu elektrotunun geniş aktif yüzeye sahip olması düşük miktarlardaki analitlerin tayini için olanak sağlamaktadır. Özellikle analit miktarının az olduğu tayinlerde bu durum ön plana çıkmaktadır. Dahası tek kullanımlık kalem ucu elektrotlar toplam analiz süresini, camsı karbon

elektrotlarda uygulanan temizleme ve tekrar muamele etme proseslerini gerektirmediğinden dolayı, önemli ölçüde azaltmaktadır (Vestergaard ve ark. 2005; Özcan 2008).

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Çalışmalarda kullanılan test mikroorganizmaları

Gıda maddeleri içerisinde *Listeria* türlerinin tayin edilmesi amacı ile yapılan çalışmalarda kullanılmak üzere ATCC (American Type Culture Collection, USA) referans kültürleri ticari olarak satın alınmıştır. Çalışmalar için kullanılan referans kültürler uzun vadede %15'lik gliserol içerisinde -85°C'de, kısa süreli olarak ise +4 °C'de beyin kalp infusion sıvı besiyerinde saklanmıştır. Kullanılan bütün test mikroorganizmaları, analizlerden önce stoktan çıkartılarak canlandırılmış, saflık kontrolü yapılmış ve daha sonra analizlerde kullanılmıştır. Kullanılan kültürler arasında; *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria monocytogenes* serovar I, *Listeria monocytogenes* 4b 19115, *Listeria ivanovii* 19119, *Listeria innocua* 6a 33090 yer almaktadır. *Listeria monocytogenes* türünün 13 serotipinden yalnızca üç tanesinin insanlarda hastalık etmeni olduğu bilindiğinden, DNA sensör çalışmaları için ilk etapta, patojen olduğu bilinen serotiplerden *Listeria monocytogenes* 4b 19115 kullanılmıştır.

#### 2.1.2. Çalışmalarda kullanılan besi ortamları

##### 2.1.2.1. Beyin Kalp Infusion Broth (53286, Sigma)

Sığır kalbi	5 gr
Dana beyni	12,5 gr
Di sodyum hidrojen fosfat	2,5 gr
Glikoz (D+)	2 gr
Pepton	10 gr
Sodyum klorür	5 gr
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 7,4± 0,2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### 2.1.2.2. *Listeria* Zenginleştirici Broth (CM0862, Oxoid)

Tripton soy broth	15 gr
Maya ekstraktı	3 gr
Distile su	500 ml

Besiyeri içeriği 500 ml distile suda çözüldükten sonra, pH 7,4 ± 0,2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Steril edilen besiyerinin sıcaklığı 55-60 °C'ye düşürüldükten sonra 500 ml besiyeri için 1 vial *Listeria* Selective Enrichment Supplement (SR014E, Oxoid) 1ml steril distile suda çözdürülerek ilave edilmiştir.

#### 2.1.2.3. *Listeria* Seçici Agar (62355, Fluka)

Glikoz (D+)	1 g
Nalidiksik asit	0,04 g
Sodyum klorür	5 g
Tiamin di klorür	0,005 g
Triypalavin	0,01 g
Triptoz	20 g
Agar	13 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 7,4 ± 0,2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### 2.1.2.4. PALCAM *Listeria* Seçici Agar (75977, Fluka)

Pepton	23 g
Nişasta	1 g
Sodyum klorür	5 g

D mannitol	10 g
Amonyum ferik sitrat	0,5 g
Eskulin	0,8 g
Glikoz	0,5 g
Lityum klorür	15 g
Fenol red	0,008 g
Agar	13 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH  $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Steril edilen besiyerinin sıcaklığı  $55\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye düşürüldükten sonra 500 ml besiyeri için 1 vial *Listeria* Selective Supplement (91986, Fluka) 1ml steril distile suda çözdürülerek ilave edilmiştir.

#### 2.1.2.5. *Listeria* Kromojenik Agar (1345, Conda Pronadisa)

Pepton (et)	18 g
Lityum klorür	10 g
Maya ekstraktı	10 g
Tripton	6 g
Sodyum klorür	5 g
Di sodyum hidrojen fosfat	2,5 g
Glikoz	2 g
Sodyum pirüvat	2 g
Magnezyum gliserol fosfat	1 g
Magnezyum sülfat	0,5 g
X-glukozid	0,005 g
Agar	13,5 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH  $7,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Steril edilen besiyerinin sıcaklığı  $55\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye düşürüldükten sonra 500 ml besiyeri için 1 vial *Listeria*



Lipaz C Supplement (6031, Conda pronadisa) ve 2,5 ml steril distile su + 2,5 ml etanol içerisinde çözdürülerek 1 vial *Listeria* Chromogenic Selective Supplement (6040, Conda pronadisa) ilave edilmiştir.

#### 2.1.2.6. Luria-Bertani Broth (L3022, Sigma)

Tripton	10 g
Maya ekstraktı	5 g
Sodyum klorür	5 g

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH  $7,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### 2.1.3. Çalışmada kullanılan solüsyonlar

##### 2.1.3.1. Fosfat Tamponu (PBS) 1X

Sodyum klorür	8,0 g
Potasyum klorid	0,2 g
Di sodyum hidrojen fosfat	1,44 g
Potasyum di hidrojen fosfat	0,24 g

Tampon çözelti içeriği deiyonize suda çözüldükten sonra, pH  $7,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Sambrook ve ark. 1989).

##### 2.1.3.2. TAE 50X

Tris base	242 g
Asetik asit	57,1 ml
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA, 0,5 M pH 8)	100 ml

Son hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmış, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Mutlu, 2006).

### 2.1.3.3. TBE 5X

Tris base	54 g
Borik asit	27,5 g
EDTA (0,5 M pH 8)	20 ml

Son hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmış, pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Mutlu, 2006).

### 2.1.3.4. 0,5 M Asetat Tamponu pH 4.8

Asetik asit	0,1154ml
Sodyum asetat	0,164 g

Son hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlanmış, pH 4.8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Yalçın, 2007).

### 2.1.3.5. SSC 2X

Sodyum klorür	17,53 g
Sodyum sitrat	8,82 g

Son hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlanmış, pH 4.8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır (Heslop-Harrison ve Schwarzacher, 2012).

### 2.1.3.6. Destek Elektrolit Çözeltisi

Sodyum karbonat	1,0599 g
Lityum perklorat	1,0639 g

Son hacim 100 ml'ye deiyonize su ile tamamlanmıştır. Solüsyon her kullanımdan önce taze olarak hazırlanıp, bir gece bekletilmiştir.

#### 2.1.4. Çalışmada kullanılan oligonükleotit dizileri

DNA sensör tasarımında kullanılmak üzere 2 farklı hedef bölgesi belirlenmiştir. Her iki gen fragmenti için de, bölgenin çoğaltılması amacı ile kullanılacak ileri ve geri primer, hedef bölgeyi tanıyacak olan prob dizisi ve prob dizisinin eşleniği olan kontrol grubu (Antiprob) dizisi belirlenip ticari olarak satın alınmıştır. 702 bç uzunluğundaki fragment için:

İleri primer: CCTAAGACGCCAATCGAA

Geri primer: AAGCGCTTGCAACTGCTC

Prob dizisi: NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>- CAITIACAAATITICCCICA

Antiprob dizisi: TGGCGGCACATTTGTCACTG

209 bç uzunluğundaki fragment için:

İleri primer: CACACGTGCTACAATGGAT

Geri primer: TTCGGGTGTTACAAACTCTC

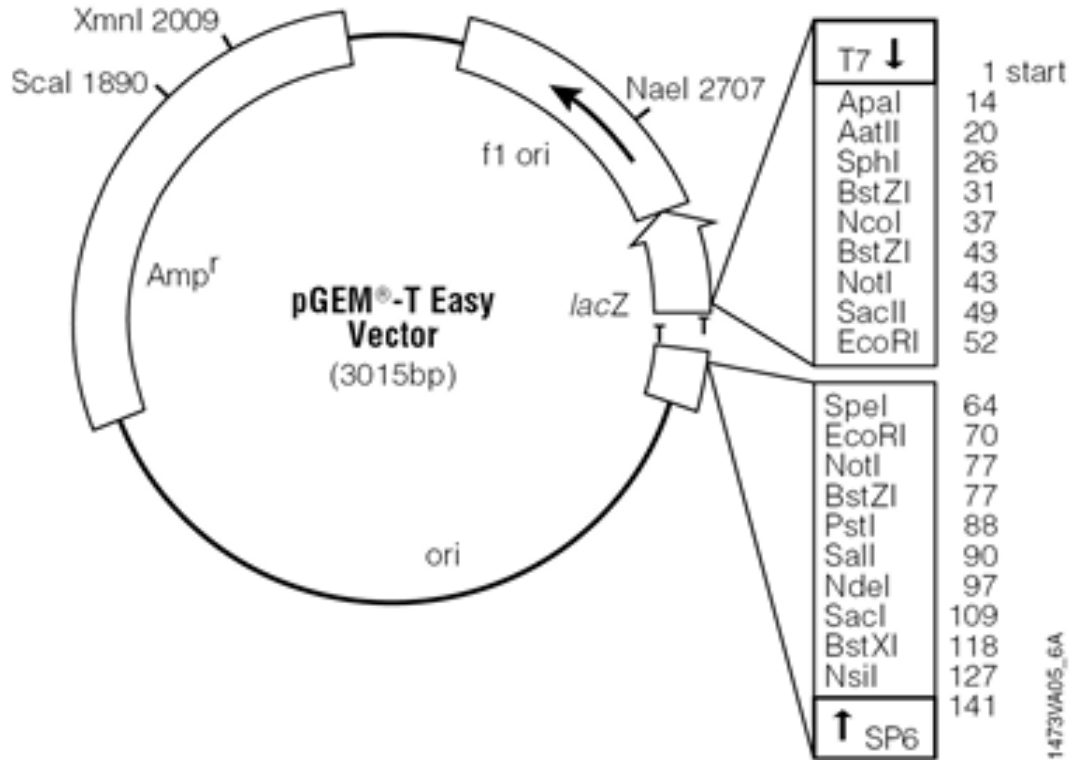
Prob dizisi: NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CTCICCTACATIAAICCIIAA

Antiprob dizisi: TTCCGGCTTCATGTAGGCGAG

#### 2.1.5. Çalışmada kullanılan klonlama plazmiti ve konak hücre

Ticari olarak satın alınan çift zincir, linear pGEM-T Easy vektörünün 5' uçlarında T kuyruğu mevcuttur. Bu nedenle hedef fragmentin plazmit içerisine yerleştirilebilmesi için fragmentin 3' uçlarında A kuyruğunun bulunması zorunludur. Hibridizasyon plazmitde bulunan T kuyruğu ve hedef bölgenin ucundan bulunan A arasında gerçekleşmektedir. Birleşmeyen diğer uçlar ise konağın DNA onarım mekanizmaları tarafından onarılır böylelikle tam bir halkasal DNA molekülü oluşmuş olur.

Şekil 2.1'de gösterilen pGEM®-T Easy Vector System I klonlama vektörü, β galaktosidaz'ın α peptidini kodlayan LacZ genini taşımaktadır. Çoklu klonlama bölgesinin bu bölgede bulunması sonucu genin insersiyonel inaktivasyonu nedeni ile α-komplementasyonun gerçekleşip gerçekleşmemesine bağlı olarak mavi-beyaz seçilimi sağlanmaktadır (Anonim, 2012; Yıldız, 2009).



Şekil 2.1. pGEM-T Easy plazmit DNA yapısı (Anonim, 2012)

Klonlama çalışmalarında konak hücre olarak Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Yard. Doç. Dr. Muhittin Arslanyolu laboratuvarında hazırlanmış olan kompetent *Escherichia coli* XL I – Blue ırkı hücreleri kullanılmıştır.

### 2.1.6. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, enzimler ve elektrotlar

Çalışmalar esnasında kullanılan reaktifler analitik saflıkta olup herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan direkt olarak kullanılmışlardır. Kullanılan kimyasallardan lityum perklorat Lancaster (Morecambe), EDTA, sodyum karbonat, sodyum nitrat, sodyum hidroksit, sodyum asetat ve amonyum asetat potasyum klorür, perklorik asit Fluka firmalarından sağlanmıştır. Agaroz, Amfisilin, Tris HCl, Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (24:23:1) ve pirol Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiş olup, pirol renksiz sıvı elde edilinceye kadar damıtılmıştır. Etanol ve izopropanol Riedel de Haen firmasından satın alınmıştır. Kullanılan antibadi (LZA2 ab1438) ABCAM firmasından temin edilmiş olup, fare

monoklonal ve bütün hücre ile reaksiyona girebilecek özellikte seçilmiştir. Klonlama çalışmalarında kullanılan kullanılan X-Gal, moleküler tabanlı çalışmalarda kullanılan primerler ve sensör çalışmalarında kullanılan pöblar, Rnase A Solüsyonu Bio Basic firmasından temin edilmiştir. Moleküler tabanlı çalışmalarda kullanılan enzimler arasında Taq DNA Polymerase, (Fermantas), Not I (Takara) enzimi bulunmaktadır.

Çalışma elektrotu olarak kullanılan kurşun kalem uçları (0,5 mm çaplı, HB, Tombo) kırtasiyelerden satın alınmıştır. Kalem uçlarını tutturmak için, uç kısmı metal olan mekanik kalemler kullanılmıştır. Çalışmalar sırasında kullanılan referans elektrotlar Ag/AgCl (doymuş KCl), SCE (doymuş kalomel elektrot) çalışma elektrotlarından camsı karbon disk elektrotu (GCE) ve platin disk elektrotu CH Instruments firmasından satın alınmıştır. Karşıt elektrot olarak 1 mm çapında platin (Pt) tel (Aldrich % 99,9) kullanılmıştır.

### **2.1.7. Çalışmada kullanılan kitleler**

Çalışmalar esnasında API *Listeria* (BioMerieux, 10 300) tanımlama kiti, ELİZA çalışmaları için Tecra *Listeria* Visual Immunoassay (Tecra Diagnostic, LISVIA48) kiti, VIDAS *Listeria monocytogenes* II (LMO2) (Biomeriux, 30 704) kullanılmıştır. Moleküler tabanlı çalışmalarda pGEMTeasy plazmit sistemi (Promega, 212440), Dizi Analizi Kiti (Beckman Coulter, GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit, 608120), Illustra™ GFX™ DNA ve Jel Bant Saflaştırma Kiti (GE Health Care 28-9034-70) kullanılmıştır. Gıda örneklerinden genomik DNA izolasyonu için DNA ekstraksiyon kiti (Genoks, GFJ-DNA 022) ve RT-PZR çalışmaları için *Listeria spp.* Real Time Tanı Kiti (GFJ-420) kullanılmıştır.

### **2.1.8. Çalışmada kullanılan cihazlar**

Elektrokimyasal ölçümler için Model 600D Series Electrochemical Analyzer potansiyostat (CH Instruments) sistemi kullanılmıştır. Ayrıca gerekli görüldüğü durumlarda elektrokimyasal çalışmalarda, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi

Kimya Bölümünde PGSTAT 100 model potansiyostat-galvanostat (Autolab) sistemi ile GPES 4.9 yazılımı ve empedans ölçümleri için Model 600D Series Electrochemical Analyzer potansiyostat (CH Instruments) sistemleri kullanılarak yapılmıştır.

Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) görüntüleri için Zeiss-Ultraplus taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılmıştır. PZR çalışmaları ABI Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme işlemleri UV-Photometer jel dokümantasyon cihazı (UviTec) ile gerçekleştirilmiştir. RT-PZR çalışmaları için Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim dalına ait olan RT-PZR Veriti Thermal Cycler (Roche) kullanılmıştır. DNA dizi analizi için okumalar Becman CEQ8000 dizi analizi cihazı ile gerçekleştirilmiştir. VIDAS testi için Anadolu Üniversitesi, Mavi Hastane, Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan mini VIDAS (BioMeriux) cihazı kullanılmıştır.

Elektrokimyasal çalışmalarda, tampon ve stok çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan deiyonize su, Sartorius marka (Arium®611UV model) ultra saf su cihazından elde edilmiştir.

## 2.2. Metot

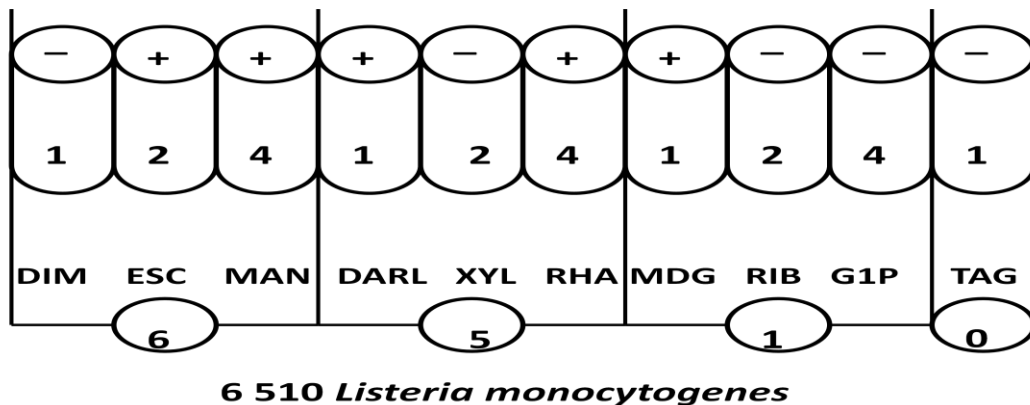
### 2.2.1. Test mikroorganizmalarının seçici ortamlarda geliştirilmesi

Çalışmalarda kullanılacak olan 6 adet liyofilize *Listeria spp.* kültürü steril şartlar altında BHI (Beyin Kalp Infusion) ve LEB (*Listeria* Zenginleştirici Broth) ortamında, 37 °C’de, 18-24 saat süre ile, sıvı kültürde geliştirilmiştir. İnkübasyonu tamamlanan sıvı kültürlerden 3 farklı agar ortamına (Palcam Agar, *Listeria* Kromojenik Agar ve *Listeria* Seçici Agar) çizgi ekim yapılmış ve kültürler yine 37 °C’de, 18-24 saat süre ile inkübasyona bırakılarak geliştirilmiştir. *Listeria* türleri için seçici olan agar ortamlarındaki koloni morfolojisi kaydedilmiştir. Ayrıca gelişen kültürlerden preparat hazırlanarak gram boyama yapılmış ve hücre morfolojileri incelenmiştir.

### 2.2.2. API *Listeria* test kitleri ile tanımlama

API *Listeria* (BioMerieux) test kiti karbonhidrat fermantasyon testleri ve enzimatik testler baz alınarak *Listeria* cinsine dahil olan mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlamasında kullanılan bir sistemdir. Test hazır olarak bulunan kitler aracılığıyla yönetici talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmektedir. İnkübasyon esnasında, metabolizma kendiliğinden veya reaktiflerin ilavesi ile açıklanan renk değişimi meydana getirmektedir. Reaksiyonların okuma tablosuna göre okunması ve sonuçların profil endeksine başvurularak veya tanımlama yazılımı kullanılarak değerlendirilmesi ile tür tayini gerçekleştirilmektedir.

Tanımlaması yapılacak olan *Listeria* kültürleri *Listeria* Kromojenik agar ortamında 24 saat süre ile tek koloni düşecek şekilde aktifleştirilmiştir. Katı besi ortamında geliştirilmiş olan kültürler steril kürdan yardımı ile 2 ml'lik API süspansiyon ortamına aktarılmış ve bioMerieux Mc. Farland 1 yoğunluğuna ayarlanmıştır. Bir inkübasyon kutusunun dibine yaklaşık 3 ml distile su dağıtıldıktan sonra strip inkübasyon kutusuna yerleştirilmiş ve hazırlanan bakteri süspansiyonu her tüpe hava kabarcığı bırakılmadan dağıtılmıştır. İnkübasyon kutusunun kapağı kapatıldıktan sonra test kiti 18-24 saat süre ile 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin bitiminde, DIM testine bir damla ZYM B reaktifi ilave edilmiş ve hemen ardından 3 dakika içerisinde okuma tablosunda verilen sonuçlar doğrultusunda tüm reaksiyonlar okunmuştur.



Şekil 2.2. API test sribinin değerlendirilmesi

Değerlendirme için, 10 farklı testin bir arada yapıldığı sistemde, sonuç kâğıdında testler 3 adet 3'lü gruba ve bir adet tek testli gruba ayrılmıştır. Her grup 1, 2, 4 sayıları ile gösterilmiş ve pozitif reaksiyona ait değerler her grupta toplanarak 4 rakamlı sayısal bir profil elde edilmiştir (Şekil 2.2). Elde edilen sayısal profil firma tarafından optimize edilmiş olan veritabanına (V1.2) girilerek tür tayinleri gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.3. *L. monocytogenes* tayini için antikor tabanlı sensör çalışmaları

Bu çalışmada, *Listeria monocytogenes*'in elektrokimyasal yöntemler ile tayini için literatürde yer alan bilgiler ışığında polipirol iletken polimer temelli çeşitli çalışma elektrotlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla ilk etapta monomer ve analitin elektrokimyasal davranışını belirlemek ve en uygun çalışma elektrotunu tayin etmek için farklı çalışma elektrotları ile denemeler gerçekleştirilmiştir (Minnet ve ark. 2002).

Antikor tabanlı sensör tasarımı amacı ile yapılan bütün çalışmalarda *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 kültürü canlı olarak kullanılmıştır. Mikroorganizma hazırlığı için her çalışmada aynı protokol izlenmiş olup; BHI broth ortamında 24 saatlik süre ile geliştirilen ikinci aktif kültür 11,000 g'de 20 dakika santrifüjlenmiş ve 5 ml steril deiyonize ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildikten sonra, yine steril deiyonize içerisinde yoğunluk ayarı yapılmış ve yoğunluk yaklaşık olarak McFarland 6 =  $18 \times 10^8$  cfu/ml'ye ayarlanmıştır.

Çalışmalar sırasında kullanılan fare monoklonal anti *Listeria monocytogenes* antikoru (aLis, ABCAM ), *L. monocytogenes* dış membran fraksiyonu ve bütün hücre ile reaksiyona girebilecek özellikte seçilmiştir. ELİZA ve Western Blot yöntemleri ile kullanıma uygun olduğu bilinen anitbadinin etkinliğini kontrol etmek ve bütün hücre ile ilişkisini doğrulamak için çalışmaların öncesinde *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 kültürü ile aLis etkileşimi ‘‘Sambrook ve Russell (2001)’’ tarafından önerilen Western Blot prosedüründen yola çıkılarak doğrulanmıştır (Ek 1).



### 2.2.3.1. Çalışma elektrotu olarak kalem ucu elektrotun kullanılması

Kalem ucu elektrot (KUE) kullanılarak yapılan çalışmalarda, destek elektrolit olarak 0,1 M LiClO<sub>4</sub> ve 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi kullanılmıştır. Monomer ve analitin elektrokimyasal davranışını belirlemek amacı ile 4 farklı tipte elektrot tasarlanmıştır;

1. PPy elektrot: Yalnızca 0,1 M pirolün elektropolimerizasyonu ile hazırlanan modifiye elektrotlar. 10 ml destek elektrolit içeren elektrokimyasal hücre içerisine monomer olarak 0,1 M olacak şekilde damıtılmış pirol ilavesi yapılmış ve dönüşümlü voltametri (DV) yöntemi kullanılarak, 0–0,9 V gerilim aralığında, 5 döngüde, 0,1 V/s tarama hızında elektropolimerizasyon gerçekleştirilmiştir.

2. PPy-*aLis* elektrot: 0,1 M pirol + 2,5 ppm *aLis* kullanılarak elde edilen, antikor ihtiva eden, modifiye elektrotlar. 10 ml destek elektrolit içeren elektrokimyasal hücre içerisine monomer olarak 0,1 M olacak şekilde damıtılmış pirol ve 2,5 ppm olacak şekilde antibadi solüsyonu ilavesi yapılmış, DV yöntemi kullanılarak, 0–0,9 V gerilim aralığında, 5 döngüde, 0,1 V/s tarama hızında elektropolimerizasyon gerçekleştirilmiştir.

3. AYPPy elektrot: Kalem ucu 0,1 M pirol çözeltisinde kaplandıktan sonra aşırı yükseltgenme işlemine tabi tutulan elektrotlar. PPy elektrot sentezi ile aynı şartlar altında sentez gerçekleştirilmiş ardından sentezlenen elektrotlar aşırı yükseltgenmiştir. Aşırı yükseltgenme işlemi için elektrotlar bir gece süre ile %10'luk perklorik asit solüsyonu içerisinde bekletilmiş, ardından 10 ml 0,1 M NaOH elektrolit çözeltisi içerisinde, DV yöntemi kullanılarak 0-1,4 V gerilim aralığında, 3 döngüde, 0,1 V/s tarama hızında aşırı yükseltgenmiştir.

4. AYPPy-*aLis* elektrot: 0,1 M pirol + 2,5 ppm *aLis*'in elektropolimerizasyonu ile hazırlanan elektrotların aşırı yükseltgenmiş halleri. PPy-*aLis* elektrot sentezi ile aynı şartlar altında sentez gerçekleştirilmiş ardından sentezlenen elektrotlar aşırı yükseltgenmiştir. Aşırı yükseltgenme işlemi AYPPy elektrotlar ile aynı şartlar altında gerçekleştirilmiştir.

Mevcut denemelerde; referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak Pt ve çalışma elektrotu olarak kalem ucu ve modifiye kalem ucu elektrot çeşitleri kullanılmıştır. Destek elektrolit çözeltisi olarak 0,1 M LiClO<sub>4</sub> + 0,1 M

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> karışımı tercih edilmiştir. Ölçümler üç elektrotlu hücrede, 10 ml 0,15 M NaNO<sub>3</sub> solüsyonu içerisinde, 0-1,4 V gerilim aralığında, tek döngüde, 0,1 V/s tarama hızında dönüşümlü voltametri yöntemi ile belirlenmiştir. Mevcut çalışmada, dönüşümlü voltametri yönteminin yanı sıra, daha önce açıklandığı biçimde aynı şartlar altında sentezlenen elektrotlar için DPV yöntemi de kullanılmıştır. Bu yöntemde, gerilim aralığı genişletilerek farklı gerilim değerleri dikkate alınmaya çalışılmıştır. Bütün ölçümlerde puls şiddeti 0,05 V, puls genişliği ise 0,2 s olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan farklı tipteki çalışma elektrotlarının elektrokimyasal davranışları belirlendikten sonra çözelti içerisine yaklaşık olarak 10<sup>8</sup> cfu/ml olacak şekilde mikroorganizma ilavesi yapılarak mevcut durumda değişiklik olup olmadığı kontrol edilmiştir.

### **2.2.3.2. Çalışma elektrotu olarak GCE elektrotunun kullanılması**

Yaygın olarak kullanılan çalışma elektrotlarından bir tanesi de camsı karbon disk elektrotu'dur. Bu çalışmada, DPV yöntemi, GCE elektrotla 0,15 M NaNO<sub>3</sub> çözeltisinin elektrokimyasal davranışı, bu ortama mikroorganizma ilavesinin etkisi ve son olarak da mikroorganizmalı ortama antibiyotik solüsyonu ilavesinin etkisini belirlemek için kullanılmıştır. Çalışma sırasında her analizden önce GCE elektrot temizleme işlemine tabi tutulmuştur. Elektrotun temizlenmesi işlemi şu şekilde gerçekleştirilmiştir; elektrotun uç kısmı öncelikle deiyonize su ile yıkanmış ardından 0,3 mikron gözenekli filtrenin üzerine alfa alümina dökülerek filtre ıslatıldıktan sonra, elektrot yüzeyi 10 dakika sürtünmeyle yüzeye temas ettirilmiştir. Elektrot deiyonize su içerisinde 10 dakika süre ile ultrasonik su banyosuna alınırken, 0,05 mikron gözenekli filtre üzerine gama alümina dökülerek filtre ıslatılmış ve ultrasonik su banyosundan alınan elektrotlar yine 10 dakika sürtünmeyle yüzeye temas ettirilmiştir. Tekrar 10 dakika süreyle ultrasonik su banyosuna alınan elektrotlar, işlem tamamlanır tamamlanmaz kullanıma alınmıştır. DPV yöntemi için kullanılan parametreler bir önceki çalışma ile aynı şekilde ayarlanmıştır. Çalışma esnasında, referans elektrot; gümüş/gümüş klorür ve karşıt elektrot olarak platin kullanılmıştır. İlk etapta 10 ml 0,15 M NaNO<sub>3</sub> çözeltisinde elektrotun elektrokimyasal davranışı belirlenmiş, ardından çözelti

ortamına yaklaşık olarak  $10^8$  cfu/ml olacak şekilde *L. monocytogenes* kültürü ilave edilerek, elektrot temizlendikten sonra tekrar analiz yapılmıştır. Son olarak ise aynı çözelti içerisine 2,5 ppm olacak şekilde antibadi solüsyonu ilave edilmiş ve elektrot tekrar temizlenerek analiz gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.3.3. Çalışma elektrotu olarak platin disk elektrotun kullanılması

Kullanım oranı yüksek olan bir diğer çalışma elektrotu da platin disk elektrotur. Bu çalışmada, platin disk elektrotun yüzeyi GCE kullanımındaki işlemlere tabi tutularak temizlendikten sonra 10 ml deiyonize su içerisine 0,5 M olacak şekilde damıtılmış pirol ve 5 ppm olacak şekilde antibadi solüsyonu ilavesi yapılarak ve DV yöntemi ile 0–1,0 V gerilim aralığında, 0,1 V/s tarama hızında, 5 döngüde elektrokimyasal polimerleştirilmiştir. Polimer oluşturma işlemi tamamlandıktan sonra yine DV yöntemi kullanılarak çalışma elektrotunun -1,0 / +1,8 V gerilim aralığında 0,15 M  $\text{NaNO}_3$  içerisindeki çözelti davranışı belirlenmiş, ardından bu ortama yaklaşık olarak  $10^8$  cfu/ml olacak şekilde *L. monocytogenes* kültürü ilave edilerek analiz tekrar edilmiştir. Kullanılan çalışma elektrotu temizlendikten sonra tekrar elektrot yüzeyine polimer sentezlenerek aynı çalışma DPV yöntemi ile de gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.3.4. Çalışma elektrotu olarak kimyasal işlem görmüş kalem ucu elektrotunun kullanılması

Kimyasal işlem görmüş kalem ucu (ETPG) elektrot hazırlamak için kalem uçları 0,1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  çözeltisi içerisine 1,2 cm'lik kısmı solüsyon ile temas halinde olacak şekilde yerleştirilmiştir. Uçlar -0,3 V/+2,0 V gerilim aralığında, 50 mV/s tarama hızında, 5 döngüde DV alınarak hazırlanmıştır. Bu çalışmada, referans elektrot olarak SCE, karşıt elektrot olarak da platin tel kullanılmıştır. DV işlemi bittikten sonra deiyonize su ile yıkanan elektrotlar çalışma elektrotu olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, analiz için DPV yöntemi kullanılmış ve 2 farklı çözelti, 0,15 M  $\text{NaNO}_3$  ve PBS, için -1,0 V/+1,0 V gerilim aralığında aynı çalışma yapılmıştır. Analiz için öncelikle daha önce kullanılan DPV parametreleri

aynı tutulmak koşulu ile çözeltilerin elektrokimyasal davranışları incelenmiş, ardından ortama  $10^8$  cfu/ml olacak şekilde *L. monocytogenes* ilave edilerek herhangi bir etkileşimin olup olmadığı kontrol edilmiştir.

### 2.2.3.5. Destek elektrolit kullanmadan yapılan polimerizasyon çalışmaları

Referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak platin ve çalışma elektrotu olarak kalem ucu olmak üzere, antikor direk sentez ortamına ilave edildiğinden dolayı destek elektrolit çözeltisi kullanmadan 10 ml deiyonize su içerisine 0,5 M damıtılmış pirol ve 5 ppm antikor solüsyonu ilavesi yapılarak ve dönüşümlü voltametri yöntemiyle, 0–0,9 V gerilim aralığında, 0,1 V/s tarama hızında, 20 döngüde elektropolimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan elektrotlar ile mikroorganizma etkileşimi, daha önce kullanılan şartlar ile aynı olarak 0,15 M NaNO<sub>3</sub> çözeltisinde ve bu ortama  $10^8$  cfu/ml olacak şekilde *L. monocytogenes* ilavesiyle gincelenmiştir.

Ardından aynı çalışma polimer sentezi ile ilgili parametrelerin belirlenmesi amacı ile kullanılan pirol miktarı ve elektrotlar gibi parametreler sabit tutularak, destek elektrolit kullanılmadığından ve antikorun kaplama sırasında yüzeye tutunmasını arttıracığı düşünüldüğünden dolayı tarama hızı 0,1 V/s'den 0,02 V/s'ye düşürülerek tekrar edilmiştir. Ayrıca diğer tüm parametreler sabit tutulmak kaydı ile tarama hızı 0,05 V/s'ye çıkartılarak elektrot sentezi de gerçekleştirilmiştir. Bu sayede 3 farklı tarama hızı karşılaştırılarak optimum tarama hızı değeri belirlenmiştir. Bu aşamada kullanılan antibadi konsantrasyonu 5 ppm'den 25 ppm'e çıkarılmıştır. Ayrıca çalışma eş zamanlı olarak döngü sayısı 10 ve 20 olmak üzere 2 bölüme ayrılmıştır. Hazırlanan monomer solüsyonu kullanılırken çalışma süresinin uzunluğundan dolayı antikorun aktivitesinde yaşanacak olan kayıpları minimuma indirmek ve aynı monomer solüsyonu ile ilerleyen zamanlarda tekrar elektrot sentezi gerçekleştirebilmek için hazırlanan monomer solüsyonu gerek çalışmalar esnasında gerekse daha sonrasında ağzı kapalı bir biçimde +4°C'de tutulmuştur. Hazırlanan elektrotlar ile mikroorganizma etkileşimini belirlemek için okumalar hem DPV hem de DV yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Ardından belirlenen optimum koşullarda tekrar

elektrot sentezlenerek spesifiklik tayini için *L. monocytogenes* yerine aynı konsantrasyonda ve daha önce anlatılan koşullarda *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* kültürleri hazırlanmış ve çalışma tekrar edilmiştir.

Antikor içeren (PPy-*aLis*) ve antikor içermeyen (PPy) elektrotların empedans yöntemi ile incelenerek yüzey yapılarında farklılık olup olmadığını belirlemek için, elektrot ve mikroorganizma etkileşiminden sonra elektrot yüzeyinde değişimin meydana gelip gelmediğinin belirlenmesi için elektrokimyasal empedans spektroskopisi analizleri gerçekleştirilmiştir. Empedans analizleri sırasında referans elektrot olarak gümüş tel, karşıt elektrot olarak platin kullanılmıştır. Mevcut literatürlerde benzer bir çalışmaya rastlanmadığından dolayı çalışmada frekans aralıkları olabildiğince geniş tutulmuş ve sistemin açık devre potansiyeli başlangıç potansiyel gerilimi olarak belirlenmiştir. Başlangıç olarak 0,15 M NaNO<sub>3</sub> çözeltisi içerisinde PPy elektrotun davranışı incelenmiş, ardından ortama 10<sup>8</sup> cfu/ml mikroorganizma ilavesi yapılarak elektrot yüzeyinde PPy ile mikroorganizma etkileşimi incelenmiştir. Aynı çalışma PPy-*aLis* elektrotları ile de yapılarak antikorun film yüzeyine tutunup tutunmadığı ve sonrasında mikroorganizma ile reaksiyona girip girmediği tespit edilmeye çalışılmıştır. Çift paralel yapılan çalışma eş zamanlı olarak hem 10 hem de 20 döngüde sentezlenen elektrotlar ile yapılmıştır.

#### **2.2.3.6. Elektrot-mikroorganizma etkileşimi için bekletme süresinin etkisinin belirlenmesi**

Daha önce yapılan denemelerde en iyi sonuç veren parametreler olarak belirlenen; 10 ml deiyonize su içerisine 0,5 M olacak şekilde damıtılmış pirol ve 25 ppm olacak şekilde antibiyotik solüsyonu ilavesi yapılarak ve DV yöntemiyle, 0–0,9 V gerilim aralığında, 0,02 V/s tarama hızında, 20 döngüde elektrot sentezi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak elektrotların aynı şartlar altında, yalnızca antikor içermeyen ortamda sentezlenmiş formları kullanılmıştır. Okumalar, hazırlanan elektrotlar 5, 10 ve 60 dakika mikroorganizma içeren ortamda bekletildikten sonra DV yöntemi ile gerçekleştirilerek bekletme süresinin etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

#### 2.2.4. PPy ve PPy-aLis elektrotların SEM ile görüntülenmesi

Tamamen dijital olup, bilgisayar kontrolü ile çalışmakta olan SEM’de görüntü almak üzere 4 adet modifiye KUE hazırlanmıştır. Bunlardan 2 tanesi 0,5 M damıtılmış pirol içeren 10 ml distile su içerisinde 0–0,9 V gerilim aralığında, 0,02 V/s tarama hızında, DV yöntemiyle 20 döngüde sentezlenen PPy elektrotlardır. PPy elektrotlardan bir tanesi görüntü almak için direkt olarak kullanılırken, ikinci elektrot bir saat süre ile  $10^8$  cfu/ml mikroorganizma *L. monocytogenes* içeren 0,15 M NaNO<sub>3</sub> çözeltisinde bekletilmiştir. Diğer iki elektrot ise çalışmalar sırasında optimum sonuç veren şartlarda 0,5 M olacak şekilde damıtılmış polipirol ve 25 ppm antikor solüsyonu içeren 10 ml distile su içerisinde, DV yöntemiyle, 0–0,9 V gerilim aralığında, 0,02 V/s tarama hızında, 20 döngüde polimerizasyona tabi tutularak hazırlanmış PPy-aLis elektrottur. Benzer şekilde elektrotlardan biri direk kullanılırken diğeri  $10^8$  cfu/ml mikroorganizma *L. monocytogenes* içeren 0,15 M NaNO<sub>3</sub> çözeltisinde bekletilmiştir. Hazırlanan elektrotlar cihaz kullanım şartlarında belirtildiği gibi, vakum altında altın ile kaplama yapıldıktan sonra, uygun şekilde cihaza yerleştirilmiş ve görüntü alımı gerçekleştirilmiştir.

#### 2.2.5. ELİZA yöntemi ile *L. monocytogenes* tayini

Antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak temeline dayandırarak belirleyen ELİZA sistemi ile gıda örneklerinde *L. monocytogenes* tayini yapmak için, ticari olarak satılan Tecra *Listeria* Visual Immunoassay (Tecra Diagnostic) test kiti kullanılmıştır.

Mevcut kit sistemi ile gıdalarda *L. monocytogenes* tayini yapılabilmesi için ilk etapta gıdanın uygun bir besi ortamında ön zenginleştirme işlemine tabi tutulması gerekmektedir. Tayin yapılacak gıda örneği olarak ticari olarak satılan ve *Listeria* türlerini içermediği bilinen pastörize süt (Pınar) satın alınmış ve steril koşullar altında süt örneği üçe bölünerek 1, 2 ve 3 numaralı süt örneklerine sırasıyla 1 cfu/ml, 10cfu/ml ve 100 cfu/ml olacak şekilde canlı *Listeria monocytogenes* 4b 19115 kültürü ilave edilmiştir. Süt örneklerinden ön

zenginleştirme işlemi için 25 ml alınarak Stomacher-tipi torbalarda ticari olarak satılan 225 ml yarı FRASER sıvı (BioMeriux) besi ortamına inokülasyon yapılmış ve 30 °C'de 25±1 saat süre ile inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyonu tamamlanan örneklerden 1 ml alınarak 10 ml FRASER sıvı besiyerine transfer edilmiş ve 25±1 saat süre ile inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra örneklerden yönetici talimatları doğrultusunda kit ile analiz gerçekleştirilmiştir. Mevcut testin işlem basamakları kısaca şu şekildedir;

1. Her bir tüpe 50 µl Sample additive ve üzerine 1 ml inkübasyon süresi tamamlanmış FRASER broth ilave edilerek tüpler 15 dakika süre ile kaynayan su banyosunda bekletilmiştir.
2. Kaynama işlemi tamamlandıktan sonra oda sıcaklığında soğutulan her bir tüp için 1 adet hücre tutucuya yerleştirilmiştir, ayrıca 2 adet hücrede pozitif ve negatif kontrol grupları için alınmıştır. Pozitif kontrol hücrelerine 200 µl kontrol solüsyonu, örnek tüplerine ise 200 µl örnekten ilave edilerek hücrelerin ağzı parafilm ile sarılmış ve hücreler 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyonu tamamlanan hücrelerin içeriği hücreler ters düz edilerek boşaltıldıktan sonra, hücreler 3 kez yoğun yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Ardından hücrelere 200 µl konjugat ilave edilerek hücrelerin ağzı parafilm ile sarılmış ve hücreler tekrar 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
4. Hücre içeriği boşaltıldıktan sonra hücreler 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.
5. Yıkama işleminden sonra boş olduğuna emin olunan hücrelerin üzerine 200 µl substrat ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika süre ile bekletilmiştir.
6. Bekleme sürecinden sonra hücrelerde meydana gelen renk değişimi, renk kartını (1 ve 2 negatif, 3, 4 ve 5 pozitif) kullanarak görsel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir. Değerlendirme işlemi ELİZA plak okuyucusu ile 414 nm'de, negatif kontrol hücresi kör olmak üzere de yapılabilmektedir. Plak okuyucusu kullanımı durumunda absorbans değerinin 1 ve üzerinde bulunduğu hücreler pozitif, 0,2'den düşük olan hücreler negatif olarak kabul edilmiştir.

### 2.2.6. VIDAS yöntemi ile *L. monocytogenes* tayini

Enzim Bağlı Floresans Testi tekniği kullanılarak gıda ve çevresel numunelerde *L. monocytogenes*'in spesifik olarak saptanması için kullanılan cihazlardan bir tanesi de VIDAS'dır. Testin gerçekleştirilebilmesi için ticari olarak satılan VIDAS *Listeria monocytogenes* II (LMO2, BioMeriux) kitleri yönetici talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. ELIZA testine benzer şekilde VIDAS testi içinde gıda örneğinin ön zenginleştirme işlemine tabi tutulması gerekmektedir. Test yaklaşık olarak 70 dakika içerisinde tamamlanmakta ve sonuçlar pozitif/negatif şeklinde cihaz tarafından verilmektedir. ELİZA testinde kullanılmak üzere hazırlanan süt örneklerinden yapılan zenginleştirme işlemi tamamlandığında ELIZA ve VIDAS testleri eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Testin gerçekleştirilmesi için, numunelerin yanı sıra S1 ile tanımlanan Standart iki kere, C1 ile tanımlanan pozitif kontrol ve C2 ile tanımlanan negatif kontrol numuneler ile birlikte test edilmelidir. LMO2 striplerinin ilk kuyucuğuna, yapılan tanımlama sırasına göre, 500 µl standart, pozitif kontrol, negatif kontrol ya da numune ilave edildikten sonra stripler cihaza yerleştirilmiş ve uygun test kullanıcı kılavuzunda belirtildiği şekilde başlatılmıştır.

### 2.2.7. Genomik DNA izolasyonu

Test kültürlerinin genomik DNA'sı, hedef bölgenin spesifik primerler ile çoğaltılmasında kalıp DNA olarak kullanılmak üzere izole edilmiştir. Genomik DNA izolasyon protokolü basamakları şu şekildedir;

1. *Listeria* kültürleri 10 ml BHI broth ortamında gece boyu 37 °C'de inkübe edilmiştir.
2. Kültürler 8,000 rpm de +4 °C'de 5 dakika santrifüjlenerak hücreler çöktürülmüş ve süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır.
3. Pelet 1 ml 1X PBS tamponu içerisinde nazıkçe pipetlenerek steril ependorf tüpüne aktarılmış ve -80 °C'de 10-15 dakika bekletilerek dondurulmuştur.



4. -80 °C'den çıkarılan örnekler oda sıcaklığında kendiliğinden çözüldükten sonra 8,000 rpm'de +4 °C'de 5 dakika santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüş ve süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır.
5. Peletin üzerine; 200 µl steril distile su, 50 µl 0,5 M EDTA, 10 µl 10 mg/ml konsantrasyonda Proteinaz K çözeltisi, 10 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,0 ve 5 µl 5 M NaCl çözeltisi ilave edilmiştir.
6. Pipetleme işlemi ile tamamen süspanse hale getirilen örnekler 65°C'ye ayarlanmış su banyosunda 40-60 dakika süre ile inkübasyona bırakılmıştır.
7. Süre sonunda su banyosundan alınan örnekler üzerine eşit hacimde fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve oda sıcaklığında, orbital karıştırıcıda 5 dakika karıştırılmıştır.
8. 13,000 rpm'de 2 dakika santrifüj ile bulanık ve şeffaf olmak üzere iki faz oluşumu sağlanmış ve üstteki berrak faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
9. Bulanık faz üzerine 100 µl distile su ilave edilerek tekrar 2 dakika santrifüj ile faz oluşumu sağlanmış ve yine üstteki berrak faz alınarak bir önceki aşamada alınan sıvı üzerine ilave edilmiştir.
10. İki aşamada toplanan sıvı üzerine eşit miktarda fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve oda sıcaklığında, orbital karıştırıcıda 5 dakika karıştırılmıştır.
11. 13,000 rpm'de 2 dakika santrifüj ile bulanık ve şeffaf olmak üzere iki faz oluşumu sağlanmış ve üstteki berrak faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
12. Toplanan sıvı üzerine yine eşit miktarda fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve oda sıcaklığında, orbital karıştırıcıda 5 dakika karıştırılmıştır. 13,000 rpm'de 2 dakika santrifüj ile bulanık ve şeffaf olmak üzere iki faz oluşumu sağlanmış ve üstteki berrak faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
13. Toplanan sıvı üzerine sıvı hacminin 0,1 katı kadar 3 M sodyum asetat ilave edilmiş ve nazikçe pipetlenerek karıştırılmıştır. Hemen ardından toplam hacmin 2 katı kadar etanol ilave edilerek örnekler -20 °C'ye kaldırılmış ve gece boyu bırakılmıştır.
14. -20 °C'den alınan örnekler 14,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

15. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet 200 µl distile su içerisinde çözdürülmüş ve pelet üzerine 20 µl 3 M sodyum asetat, 440 µl etanol ilave edilerek örnekler en az bir saat süre ile -20 °C'ye kaldırılmıştır.
16. -20 °C'den alınan örnekler 14,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılarak, tüpler ağzı açık bir şekilde kurumaya bırakılmıştır.
17. Elde edilen genomik DNA 30 µl dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülerek daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır (Samboork ve Russel 2001).

### 2.2.8. Elektrokimyasal DNA biyosensörü için primer ve prob tasarımı

“Anzar ve Alarcon (2002)” tarafından yapılmış olan çalışmadan yola çıkarak DNA sensör tasarımı için primer, prob ve hedef bölge belirlenmesi yapılmıştır. Buna göre, DNA sensöründe kullanılmak üzere 2 farklı hedef bölgesi belirlenmiştir. Bunlardan biri yalnızca *Listeria monocytogenes* türüne özgü olan *hlyA* genine ait 702 bç uzunluğundaki fragmentir. İkinci hedef bölge olarak ise *Listeria* cinsine dahil olan tüm türlerde ortak olan 16S RNA genine ait 209bç uzunluğundaki fragment seçilmiştir.

Hedef bölge ve prob tasarımı için ‘Anzar ve Alarcon (2002)’ tarafından çalışmada kullanılan LM1/LM2 primer setinden, ileri primer dizisi üzerinden NCBI ‘National Center for Biotechnology Information’, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gen bankasındaki verilerle BLAST yapılmıştır. Çıkan sonuçlar arasından 11 farklı çalışmadaki listeriyosin, *hlyA* genleri (700bç den uzun) rastgele olarak seçilmiş ve fasta formatında kaydedilmiştir. Daha sonra ‘phylogeny fr’, (<http://www.phylogeny.fr/>) de dikey hizalama yapılarak ileri ve geri primerin oturduğu bölge belirlenmiş ve dizinin orta bölgesinden prob dizisi ve çalışmalar sırasında pozitif kontrol grubu olarak kullanılacak olan prob dizisinin eşleniği karşıt dizi (antiprob) seçilmiştir. Seçimler için dikey hizalamada kullanılan gen bölgeleri Ek 2’de verilmiştir.

Benzer şekilde *Listeria* cinsine dahil olan tüm türlerde ortak olan 16S RNA genine ait hedef bölge belirlemek için aynı araştırmada kullanılan L1/L2 primer setinden ileri primer dizisi üzerinden BLAST yapılmıştır. 4 farklı *Listeria* türü

için toplamda 7 örnek üzerinden dikey hizalama yapılarak, korunmuşluğu yüksek olan 209bç uzunluğundaki fragment seçilmiş ve buna uygun primer, prob tasarımı gerçekleştirilmiştir. Seçimler için dikey hizalamada kullanılan gen bölgeleri Ek 3’de verilmiştir

Elektrot yüzeyine prob immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra guanin oksidasyon sinyalinin görülmemesi ve elde edilen sinyalin yalnızca pozitif hibridizasyon sonucunda oluşması amacı ile seçilen prob dizilerinde, guanin yerine inosin bazı kullanılmıştır. Ticari olarak satın alınan bütün dizilerin 100 µM konsantrasyonda ana stokları hazırlanmış ve kullanıma kadar -20 °C’de saklanmıştır.

### 2.2.8.1. 702bç uzunluğundaki *hlyA* gen fragmenti

**CCTAAGACGCCAATCGAA**AAGAAACACGCGGATGAAATCGATAAGTATATACAAGGATTGGATTAC  
AATAAAAACAATGTATTAGTATACACGAGATG**CAGTGACAAATGTGCCGCCA**AGAAAAGTTAT  
AAAGATGGAAATGAATATATATCGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAATAATGCAGAT  
ATCCAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACATATCCAGGTGCTCTCGTGAAAGCGAATTCGGAA  
TTAGTAGAAAATCAACCCGATGTTCTTCTGTCAAACGTGATTCATTAACACTTAGCATTGATTTG  
CCAGGAATGACTAATCAAGACAATAAAATTGTTGTAAAAAATGCTACTAAATCGAACGTTAACAAC  
GCAGTAAATACATTAGTGGAAAGATGGAATGAAAAATATGCTCAAGCTTATCCAAATGTAAGTGCA  
AAAATTGATTATGATGACGAAATGGCTTACAGTGAATCACAATTAATTGCAAAATTTGGTACGGCA  
TTTAAAGCTGTAAATAATAGCTTGAATGTAAACTTCGGCGCAATCAGTGAAGGGAAAAATGCAAGAA  
GAAGTCATTAGTTTTAAACAAATTTACTATAACGTGAATGTTAATGAACCTACAAGACCTTCCAGA  
TTTTTCGGCAAAGCTGTTACTAAA**GAGCAGTTGCAAGCGCTT**

Koyu ve italik yazılı kısımlar ileri ve geri primer bölgelerini, koyu ve altı çizili bölge ise fragmentin baş kısmında daha yakın pozisyonlardan seçilmiş olan (ileri primerden 82 baz, geri primerden 564 baz uzaklıktaki) 20 baz uzunluğundaki prob dizi bölgesini temsil etmektedir. Buna göre DNA sensör geliştirilmesi amacı ile kullanılacak olan *hlyA* genine ait 702 bç uzunluğundaki fragment için aşağıdaki diziler ticari olarak satın alınmıştır;

İleri primer: CCTAAGACGCCAATCGAA

Geri primer: AAGCGCTTGCAACTGCTC

Prob dizisi: NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>- CAITIACAAATITICICCA

Antiprob dizisi: TGGCGGCACATTTGTCCTG

### 2.2.8.2. 209 bç uzunluğundaki 16S RNA fragmenti

**CACACGTGCTACAATGGAT**AGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAAC  
TATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAA**CTCGCCTACATGAAGCCGGAA**TCGCTAGTAATCGTGGA  
TCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAC**GAGAGTTTG**  
**TAACACCCGAA**

Koyu ve italik yazılı kısımlar ileri ve geri primer bölgelerini, koyu ve altı çizili bölge ise fragmentin orta kısmından seçilmiş olan (ileri primerden 75 baz, geri primerden 74 baz uzaklıktaki) 21 baz uzunluğundaki prob dizi bölgesini temsil etmektedir. Buna göre DNA sensör geliştirilmesi amacı ile kullanılacak olan 16S RNA genine ait 209 bç uzunluğundaki fragment için aşağıdaki diziler ticari olarak satın alınmıştır;

İleri primer: CACACGTGCTACAATGGAT

Geri primer: TTCGGGTGTTACAAACTCTC

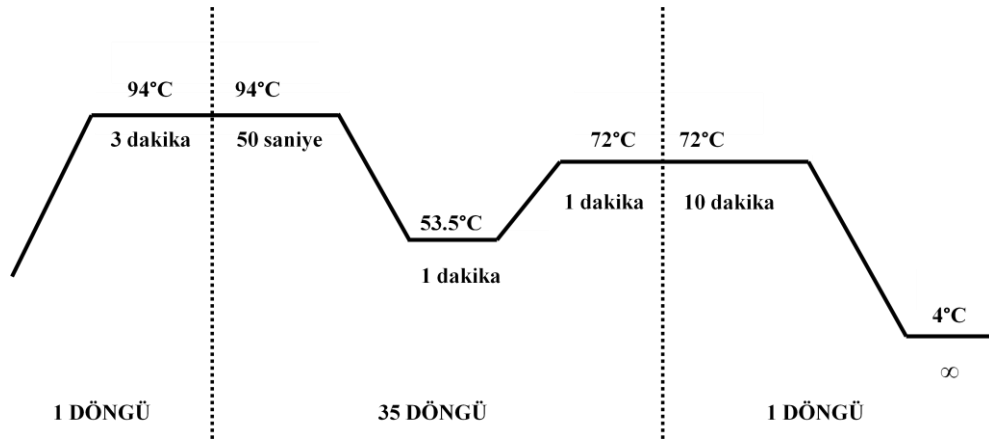
Prob dizisi: NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CTCICCTACATIAAICCIIAA

Antiprob dizisi: TTCCGGCTTCATGTAGGCGAG

### 2.2.9. PZR İle *hlyA* gen fragmentinin çoğaltılması

*L. monocytogenes* 4b 19115 kültürünün genomik DNA'sından spesifik primerler ile *hlyA* gen fragmentinin çoğaltılması için ilk etapta genomik DNA konsantrasyonu ve primerler için Tm değeri belirlenmiştir. Yapılan ön demeler sonucunda son hacim 25 µl olmak üzere reaksiyon içeriği ve reaksiyon şartları aşağıda verilmiştir;

2,5 µl 10X PCR buffer, 3,0 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 10 mM dNTP, 3,0 µl ileri primer, 3,0 µl geri primer, 1 µl kalıp DNA, 0,3 µl Taq Polimeraz (Fermentas) ve 11,7 µl dH<sub>2</sub>O. Reaksiyon şartları Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Genomik DNA dan *hlyA* gen fragmentinin PZR ile çoğaltılması

### 2.2.10. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi ve jelden izole edilmesi

PZR ile elde edilen ürün agaroz jelde yürütülerek UVP transilluminator cihazında kontrol edilmiş ve UV-Photometer jel dokümantasyon cihazı (UviTec) ile veriler kaydedilmiştir. Ardından PZR ürünleri UV transilluminator üzerinde gözlenerek, steril bisturi ucu ile istenilen bantlar agaroz jelden kesilmiş ve saflaştırmaya alınmıştır. Saflaştırma için Illustra™ GFX™ DNA ve Jel Bant Saflaştırma Kiti (GE Health Care) kullanılmıştır. TAE veya TBE agaroz jelden saflaştırma protokolü uyarınca DNA içeren agaroz parçaları tartılarak, bunların üzerine her 10 mg agaroz jel bandı için 10 µl “yakalama tamponu” eklenmiştir. Tüpler elde çevrilerek karıştırıldıktan sonra agarozun tamamı eriyene kadar 60 °C’de su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Erime işlemi tamamlandıktan sonra, 600 µl yakalama tamponu tip 3-örnek karışımı, toplama tüpüne yerleştirilmiş GFX Microspin™ kolonu içerisine aktarılmıştır. 60 saniye oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 30 saniye 16,000 g’de akış sağlanmıştır. Örnek bağlama basamağı olarak da adlandırılan bu işlemler tüm örnek yükleninceye kadar tekrar edilmiştir. Daha sonra toplama tüpü boşaltılmış, kolon tekrar tüp içerisine yerleştirilmiş ve üzerine 500 µl yıkama tamponu tip 1 ilave edilmiştir. Hemen ardından 30 saniye 16,000 g’de akış sağlanmıştır. Ardından toplama tüpü atılmış ve kolon temiz bir toplama tüpüne transfer edilmiştir. Kolona 50 µl tip 6

elüsyon tamponu ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyondan sonra 16,000 g'de 1 dakika santrifüjleme işlemi yapılarak saflaştırılmış ürünler elde edilmiştir.

### 2.2.11. Re-PZR

PZR sonucu elde edilen ürünün konsantrasyonunu arttırmak amacı ile agoroz jelden saflaştırılan ürün kalıp DNA olarak kullanılmış ve tekrar PZR (Re-PZR) reaksiyonu kurulmuştur. Re-PZR reaksiyonu için kalıp DNA haricinde reaksiyon içeriği değiştirilmemiştir. Reaksiyon şartları 94 °C'de 1 dakika süre ile gerçekleştirilen ön denatürasyon basamağı atlanarak sabit tutulmuştur.

### 2.2.12. PZR ürününün klonlanması

#### 2.2.12.1. PZR ürününün klonlama plazmitine aktarılması (Ligasyon)

702 bp uzunluğundaki *hlyA* gen fragmentinin klonlanmasında Promega 'pGEM-T<sup>®</sup> Easy Vektör System I kiti (Promega, katalog no A1360) kullanılmıştır. Mevcut sistemde klonlanacak olan DNA fragmentinin vektör içerisine yerleştirilebilmesi için çift zincir fragmentin 3' uçlarında A kuyruğu bulunması gerekmektedir. Bu nedenle ilk etapta klonlanması hedeflenen fragment spesifik primerler ile Taq Polimeraz (Fermentas) enzimi kullanılarak çoğaltılmış ve saflaştırılıp kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Kullanılacak olan kalıp DNA miktarı (2,1)'de gösterilen formül ile hesaplanmıştır;

$$Kalıp Miktarı = \frac{vektör miktarı (ng) \times insert büyüklüğü (kb)}{vektör büyüklüğü (kb)} \times \frac{insert (mol)}{vektör (mol)} \quad (2,1)$$

Kurulan ligasyon reaksiyonunun içeriği şu şekildedir; uygun miktarda kalıp DNA üzerine, 1 µl pGEM-T Easy vektörü (50 ng/µl), 5 µl ligasyon tampon çözeltisi, 1 µl T4 DNA Ligaz enzimi (5 u/µl) ilave edilmiş ve son hacim deiyonize su ile 10 µl ye tamamlanmıştır. Kurulan ligasyon reaksiyonu 16 °C'de 4 saat, ardından 25 °C'de 2 saat ve 65 °C'de 10 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur.

### 2.2.12.2. Plazmitin kompetent hücelere aktarımı (Transformasyon)

Ligasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra plazmitin uygun bir konak hücre içerisine alınarak çoğaltılması gerekmektedir. Bu amaçla daha önceden Anadolu üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Yard. Doç. Dr. M. Arslanyolu laboratuvarında hazırlanmış olan kompetent *Escherichia coli* XL I – Blue ırkı hüceleri kullanılmıştır. Transformasyon reaksiyonun basamakları aşağıda kısaca özetlenmiştir.

1. Ligasyon süresi tamamlanmak üzere iken -80 °C’de stoklanan kompetent hücre (200 µl hacimde) buz içerisine alınıp 5 dakika bekletilerek çözündürülmüştür.
2. Kompetent hücre üzerine 10 µl hacimdeki ligasyon ürününün tamamı ilave edilmiş ve hüceler öncelikle 30 dakika süre ile buz içerisinde hemen ardından da 2 dakika 42 °C’de bekletilmiştir.
3. 42 °C’den çıkarılan hüceler tekrar buza alınarak 3 dakika süre ile buzda bekletilmiştir.
4. Buzda bekletme işlemi tamamlandıktan hücelerin üzerine 500 µl LB broth besi ortamı ilave edilmiş ve hüceler 30 dakika süre ile 37 °C’de 120 rpm çalkalama ile inkübasyona bırakılmıştır.
5. İnkübasyon süresinin sonlarına doğru daha önceden hazırlanmış 1X konsantrasyonda amfisilin içeren LB agar tabaklarının üzerine 40 µl X-Gal (20 mg/ml) yayılmış ve besiyerinin çözeltiyi çekmesi beklenmiştir.
6. Örneklerin inkübasyonu tamamlandıktan sonra 8,000 rpm’de 3 dakika santrifüj ile hüceler peletlenmiş, yalnızca 50-100 µl kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet kalan süpernatant içerisinde yeniden çözündürülmüştür.
7. Çözürülen peletin tamamı alınarak amfisilin + X-Gal içeren LB agar plağına yayma ekim yapılmış ve plak gece boyu 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır (Samboork ve Russel 2001).

İnkübasyon süresi sonucunda koloni seçimi renk oluşumuna göre gerçekleştirilmiştir. Mavi renkte görülen koloniler negatif koloniler olarak değerlendirilirken, beyaz renkli koloniler pozitif kabul edilmiş ve petri plağında

görülen beyaz koloniler tek tek amfisilin + X-Gal içeren LB agar plağına çizgi ekim yöntemi ile ekilmiştir. Bu şekilde hazırlanan ‘master plaklar’ 16-18 saat süre ile 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

Mavi-beyaz seçilimi  $\alpha$  komplementasyon sisteminin uygulanabilmesi ile gerçekleşmektedir.  $\alpha$  komplementasyonu, inaktif iki  $\beta$  galaktosidaz parçasının birleşerek aktif proteini oluşturması durumudur. Her iki parçada ayrı durumlarda iken inaktif,  $\alpha$  komplementasyon ile birleştikleri anda aktif yani laktoz veya türevi XGal’i parçalayarak renk oluşumu meydana getirebilir duruma geçmektedir.

### 2.2.12.3. Koloni PZR

Koloni PZR için, master plakta beyaz renkte görülen kolonilerin her biri 25  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O içeren ependorf tüpleri içerisinde süspanse edilmiştir. Tüpler 5 dakika süre ile kaynayan su içerisinde bekletilmiş ve hemen ardından 1 dakika süre ile buz içerisine alınmıştır. 1 dakikalık sürenin sonunda 14,000 rpm’de 2 dakika santrifüj ile hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Pipetör yardımı ile süpernatandan 20  $\mu$ l alınarak temiz bir tüpe aktarılmış ve 2  $\mu$ l hacim, PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır. Kalıp DNA dışında reaksiyon içeriği ve şartları daha önceki denemelerde genomik DNA dan PZR reaksiyonu için belirlenmiş olan optimum PZR şartlarında gerçekleştirilmiştir.

Koloni PZR sonuçlarının agoroz jel elektroforezi ile gözlemlenmesi sonucunda istenilen bandı gösteren koloniler, plazmit izolasyonu için master plaktan seçilerek amfisilin ilave edilmiş 10 ml LB broth ortamına ekilmiştir. İnokülasyon yapılan tüpler gece boyu 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

### 2.2.12.4. Plazmit izolasyonu

Klasik metot ile plazmit izolasyonu için izlenen protokolün basamakları aşağıda verilmiştir;

1 İnkübasyonu tamamlanan 10 ml gecelik broth kültürü 8,000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüştür.



- 2 Süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peleti 1ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,8 içerisinde süspanse edilerek, temiz bir endorf tüpüne aktarılmıştır. Ardından 15,000 rpm'de 10 dakika santrifüj ile hücreler tekrar çöktürülmüştür.
- 3 Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet üzerine; 150 µl 10 mg/µl lizozim, 20 µl 0,5 M EDTA pH, 8,0 ve 10 µl Rnase A solüsyonu ilave edilmiştir. Pipetleme yardımı ile hücreler tamamen süspanse hale getirilmiştir.
- 3 Hücreler 30-60 dakika süre ile buz içerisinde inkübasyona bırakılmıştır.
- 4 Inkübasyon süresi tamamlanan hücrelerin üzerine 200 µl 0,2 M NaOH ve 200 µl %1'lik taze hazırlanmış SDS çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler elde dikkatli bir şekilde alt-üst edilerek karıştırıldıktan sonra 5 dakika süre ile buzda inkübasyona bırakılmıştır.
- 5 Süre bitiminde tüplerin üzerine 300 µl 7,5 M amonyum asetat çözeltisi ilave edilmiş ve elde dikkatli bir şekilde alt-üst edilerek karıştırıldıktan sonra 10 dakika süre ile buzda inkübasyona bırakılmıştır.
- 6 15 dakika 13,000 rpm'de santrifüj ile iki faz oluşumu sağlanmış ve üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- 7 Alınan üst faz hacmi kadar Fenol: Kloroform: İzamilalkol (25:24:1) eklenmiş ve tüpler güçlü bir şekilde yaklaşık 5-10 dakika süre ile elde çalkalanmıştır.
- 8 13,000 rpm'de 2 dakika santrifüj ile iki faz oluşumu sağlanmış ve üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- 9 Alınan miktarın 0,6 katı izopropanol ilave edilerek, pipetleme yardımı ile sıvıyla karıştırılmış ve 10 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- 10 Inkübasyon sonrasında tüpler 13,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- 11 Pelet üzerine 200 µl 0.3 M sodyum asetat ve 400 µl etanol ilave edilerek pelet çözdürülmüş ve gece boyu -20 °C'de bekletilmiştir.
- 12 15,000 rpm'de 10 dakika santrifüj ile pelet elde edilmiş, süpernatant uzaklaştırılarak pelet kurumaya bırakılmıştır.
- 13 30 µl dH<sub>2</sub>O içerisinde pelet çözdürülerek, elde edilen plazmit analizlerde kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırılmıştır (Guerry ve ark, 1973).

### 2.2.12.5. Restriksiyon enzim analizi

Elde edilen plazmit DNA içerisinde klonlanması hedeflenen genin varlığını teyit etmek için uygun restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu kurulmuştur. Analiz için izole edilen plazmit, vektörün çoklu klonlama bölgesinde tanıma bölgesine sahip olan fakat inserti içten kesmeyen NotI (Takara) enzimi ile kesilerek agaroz jel analizine alınmıştır. Kesim reaksiyonu için son hacim 10 µl olmak üzere; 0,5 µl enzim, 1 µl 10X enzim tamponu, 3 µl plazmit ve 5,5 µl dH<sub>2</sub>O tüp içerisinde karıştırılarak, 37 °C'de 4-5 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

### 2.2.12.6. Stok alımı

Klonlama aşamaları sırasında pozitif olduğu düşünülen ve son olarak kesim reaksiyonu ile pozitif klonlamanın gerçekleştiği teyit edilen koloniler amfisilin ilave edilmiş LB broth ortamında gece boyu inkübe edilmiştir. Ardından steril şartlar altında, 1ml broth kültürü 150 µl %87'lik steril gliserol ile karıştırılarak steril ependorf tüplerine aktarılmış ve daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'de stoklanmıştır.

### 2.2.13. *hlyA* gen fragmentinin plazmitten PZR ile çoğaltılması

Klonlama ve plazmit izolasyonu gerçekleştirildikten sonra DNA sensör denemelerinde kullanılmak üzere yüksek miktarda hedef bölge üretimi hedef bölgeyi içeren plazmit DNA'sı kalıp olarak kullanılarak PZR reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda kullanılacak kalıp miktarı ve optimum PZR şartları belirlenmiştir. Kalıp DNA kullanılmadan hemen önce 5 dakika kaynatılmış ve hemen ardından buz içerisine alınmıştır. Reaksiyon içeriği ve şartları aşağıda verilmiştir.

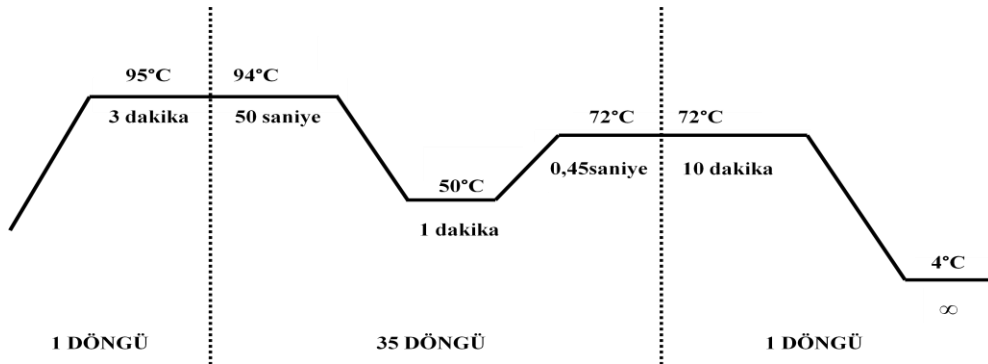
2,5 µl 10X PCR buffer, 2,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,0 µl 2,5 mM dNTP, 2,5 µl ileri primer, 2,5 µl geri primer, 0,5 µl kalıp DNA, 0,3 µl Taq Polimeraz (Fermentas) ve 12,2 µl dH<sub>2</sub>O. Son hacim 25 µl. Reaksiyon şartları ise; 1 döngü 95 °C'de 3 dakika ön denatürasyon, 35 döngü 94 °C'de 1 dakika, 53 °C'de 1 dakika,

72 °C'de 1 dakika, 1 döngü 72 °C'de 10 dakika ve +4 °C'de saklama şeklinde yapılmıştır.

#### 2.2.14. 16S RNA gen fragmentinin PZR ile çoğaltılması

*Listeria monocytogenes* 4b 19115 kültürünün genomik DNA'sından spesifik primerler ile 16S RNA gen fragmentinin çoğaltılması için ilk etapta genomik DNA konsantrasyonu ve primerler için Tm değeri belirlenmiştir. Yapılan ön demeler sonucunda son hacim 25 µl olmak üzere reaksiyon içeriği ve reaksiyon şartları aşağıda verilmiştir;

Reaksiyon içeriği 2,5 µl 10X PCR buffer, 2,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,0 µl 2,5 mM dNTP, 2,5 µl ileri primer, 2,5 µl geri primer, 1,0 µl kalıp DNA, 0,3 µl Taq Polimeraz (Fermentas) ve 11,7 µl dH<sub>2</sub>O dan oluşmaktadır. Reaksiyon şartları Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. 16S RNA gen fragmentinin çoğaltılmasında kullanılan PZR reaksiyon şartları.

Genomik DNA dan PZR reaksiyonunun ardından ürünler daha önce anlatıldığı gibi agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiş ve istenilen bantlar agaroz jelden kesilerek saflaştırılmıştır. DNA sensör denemelerinde kullanılmak üzere yüksek miktarda hedef bölge üretimi saflaştırılmış ürün kalıp olmak koşulu ile Re-PZR ile üretilmiştir.

### 2.2.15. Dizi analizi

DNA dizi analizi için Beckman Coulter GenomeLab DTCS Quick Start Kiti kullanılmış ve okumalar Becman CEQ8000 dizi analizi cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Uygulanan prosedür gereğince, ilk etapta hedef bölgenin analiz öncesinde PZR ile çoğaltılması gerekmektedir. Diz analizine özgü olarak yapılan bu PZR reaksiyonunda kullanılacak olan kalıp miktarı yönetici talimatları doğrultusunda, hedef bölgenin büyüklüğüne bağlı olarak fmol cinsinden hesaplanmıştır. Ardından PZR ürünleri manyetik boncuklar yardımı ile saflaştırılmış ve örnek plate aktarılmıştır. Son olarak tabakların cihaza yerleştirilmesi ve program ayarları yönetici talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar BlastX programı ve GeneTool hizalama programları kullanılarak değerlendirilmiştir.

#### 2.2.15.1. Dizi analizi için PZR

Gerekli miktarda kalıp alındıktan sonra, dH<sub>2</sub>O ile son hacim 10 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra kalıp DNA 65 °C'de 5 dakika denatürasyon için inkübe edilmiş ve tekrar oda sıcaklığına alınmıştır. Oda sıcaklığında 1-2 dakika bekletildikten sonra kalıp üzerine son hacim 10 µl olacak şekilde 8 µl DTCS + 2 µl 1,6 µM primer (ileri ya da geri primerden yalnızca bir tanesi ilave edilmiştir. Bu sistemde ileri ve geri primer için 2 ayrı reaksiyon kurulmaktadır. Toplam hacmi 20 µl olan reaksiyonun şartları; 30 döngü 96 °C'de 20 saniye, 50 °C Tm değerinde 20 saniye, 60 °C'de 4 dakika olarak ayarlanmıştır. PZR sonrası ürünler manyetik boncuklar ile saflaştırılmıştır.

#### 2.2.15.2. Dizi analizi PZR ürünlerinin manyetik boncukla saflaştırılması

Dizi analizi için manyetik boncuklar ile yapılan saflaştırma protokolü adımları şu şekildedir;

1. 50 µl dH<sub>2</sub>O, 20 µl 3 M Na-AC pH 5.2, 20 µl 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8,0 ve 10 µl 20 mg/ml glikojen içermek sureti ile 100 µl stop solüsyonu hazırlanmış ve

her bir reaksiyon tüpüne 1 µl reaksiyon başına 0,55 µl olacak şekilde 11 µl taze hazırlanmış stop solüsyonu ilave edilmiştir.

2. PZR tüpündeki ürünler steril ependorf tüplerine alınmış ve her 1 µl reaksiyon başına 1 µl (stop solüsyonu dahil edilmez) olacak şekilde 20 µl manyetik boncuk (Beckman Coulter Agencourt Clean SEQ) eklenmiştir.

3. Her reaksiyon tüpüne 110 µl taze hazırlanmış %73'lük izopropanol ilave edilmiştir.

4. Tüpler 10-15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

5. İnkübasyon sonrasında tüpler manyetik standı yerleştirilmiş ve 3-5 dakika beklenmiştir. Ardından süpernatant pipet yardımı ile ortamdan uzaklaştırılmıştır.

6. 200 µl % 73 isopropanol magnetteki tüplere eklenmiş ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda izopropanol ortamdan uzaklaştırılmıştır.

7. 200 µl % 73 izopropanol ilavesi ve uzaklaştırılması aşaması tekrar edilmiştir.

8. Tüpler magnetten alınmış ve içinde kalan tüm alkolün uçmasını sağlamak amacı ile kapakları açık bir şekilde 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

9. Tüpler tamamen kuruduktan sonra her tüpe 40 µl SLS (Sample Loading Solution) solüsyonu ilave edilmiş ve pipetleme yaparak iyice karışması sağlanmıştır. Tüpler manyetik standı tekrar yerleştirilerek 3-5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

10. Süre sonunda 35 µl süpernatant, boncuklara değdirilmeden pipet yardımı ile alınmış ve örnek plağına aktarılmıştır. Örneklerin üzerine buharlaşmayı engellemek amacı ile 1 damla mineral yağ ilave edilmiştir.

11. Diğer plağı ise kuyuların  $\frac{3}{4}$ 'ünü kaplayacak şekilde ayırma tamponu (Separation Buffer) ilave edilmiştir.

### **2.2.16. Elektrokimyasal DNA sensörü ile mikroorganizma tayini**

DNA sensörü ile mikroorganizma tayin prosedürü sırasıyla; KUE hazırlığı, elektrot modifikasyonu, prob immobilizasyonu, sentetik hedef dizi ya da denatüre

PCR ürünü ile hibridizasyon, yıkama ve yüzeyde voltametrik transdüksiyon aşamaları gerçekleştirilerek yapılmıştır (Kara ve ark. 2007; Özcan ve ark. 2007).

### 2.2.16.1 Elektrot hazırlığı (KUE)

Çalışma elektrotu olarak kullanılan kurşun kalem uçları (0,5 mm çaplı, HB, Tombo) kırtasiyelerden satın alınmıştır. Kalem uçlarını tutturmak için, uç kısmı metal olan mekanik kalemler kullanılmıştır. Uçlar ortadan ikiye bölünerek 3 cm uzunluğuna getirilmiş ve 1,5 cm kısmı kullanılmıştır.

### 2.2.16.2. Elektrot modifikasyonu

Yapılan çalışmada elektrot modifikasyonu için 2 ayrı yöntem kullanılmıştır. Bunlardan birincisinde kalem uçları polipirol ile kaplanarak elektrot üretilmiş, ikincisinde ise kalem uçları aktive edilerek modifiye edilmiştir.

Polipirol ile kaplama yapılarak elektrot modifikasyonu (aşırı yükseltgenmiş PPy elektrot) için;

10 ml 0,1 M LiClO<sub>4</sub> ve 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> içeren destek elektrolit çözeltisi içerisine 0,1 M (70 µl) damıtılmış pirol ilave edilerek, -0,85 V/+0,85 V gerilim aralığında dönüşümlü voltametri yöntemi kullanılarak 2 ve 4 döngüde polimer kaplı elektrot sentezi gerçekleştirilmiştir. Kaplama yapılmış olan elektrotlar 1 gece %10'luk perklorik asit içerisinde bekletilmiştir.

Perklorik asit çözeltisinden alınan elektrotlar 0,1 M NaOH çözeltisi içerisinde DV yöntemi ile 0-1,4 V gerilim aralığında 2 ve 4 döngülük elektrot için sırasıyla 2 ve 3 döngüde aşırı yükseltgenme işlemine tabi tutulmuştur.

Aktif kalem ucu sentezi için;

KUE elektrotlar, 20 mmol/l NaCl içeren 0,05 mmol/l asetat tampon solüsyonu (pH 4,8) içerisinde, 1 dakika süre ile 1,4 V gerilim uygulanarak aktive edilmiştir (Aktif PGE)

Kullanıma hazır hale gelen elektrotlar aynı gün içerisinde prob immobilizasyonu ve diğer işlem basamaklarına da tabi tutulmuş, işlem basamakları arasında aralık verilmemiştir.

### 2.2.16.3. Prob immobilizasyonu

Bu prosedür elektrostatik immobilizasyon tekniği kullanılarak şu şekilde gerçekleştirilmiştir; farklı elektrotların hazırlığının tamamlanmasının hemen ardından 1,8 µmol/l konsantrasyonda prob dizisi içeren asetat tampon solüsyonu (pH 4,8) içerisinde, 200 rpm karıştırmada, 0,5 V gerilim uygulanarak hazırlanan elektrot yüzeyine, negatif yüklü fosfat grupları aracılığı ile prob immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından elektrotlar 20 mmol/l NaCl içeren 0,05 mmol/l asetat tampon solüsyonu (pH 4,8) içerisinde 10 saniye süre ile yıkanmıştır.

### 2.2.16.4. Hibridizasyon

Elektrostatik yolla prob immobilizasyonunun ardından sentetik hedefler ve denatüre PZR ürünü ile hibridizasyon; elektrotlar hedef diziyi içeren 2X SSC tampon çözeltisi içerisine daldırılarak 8 dakikada gerçekleştirilmiştir. Ardından elektrotlar aşağıda anlatıldığı şekilde yıkama tamponu ile 1 dakika süreyle yıkanmıştır.

Deneyisel çalışmalarda kullanılan her iki gen bölgesinin de çoğaltılması daha önce anlatıldığı gibi 702 bç uzunluğundaki *hlyA* gen bölgesi için plazmitden PZR reaksiyonu ile 209 bç uzunluğundaki 16S RNA gen bölgesi içinse Re-PZR reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda hedef analit konsantrasyonu 38 µg/ml olarak belirlenmiştir. PZR ürününün denatürasyonu 95 °C'de 8 dakika ve 0 °C'de 5 dakikada gerçekleştirilmiştir. Elektrotlar hibridizasyondan sonra 2X SSC+0,1 SDS tamponu içerisinde, spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacı ile 1 dakika boyunca yıkanmıştır.

### 2.2.16.5 Voltametrik ölçümler

Voltametrik ölçümler için elektrotlar asetat tampon solüsyonu (pH 4,8) içerisine transfer edilmiştir. Diferansiyel puls voltamogramları 0,5-1,2 V gerilim aralığında amplitude 0,05 V değerlerinde gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmada hazırlanan her elektrot tipi için 5 farklı okuma yapılmıştır. Yapılan her çalışma 3 paralel olacak düzende kurulmuştur.

- Klasik elektrot (modifiye edildikten sonra başka hiçbir işlem görmemiş elektrotlar)
- Prob bağlı elektrot (yalnızca prob dizisini içeren hibridizasyona alınmamış elektrotlar)
- Template ile hibridize edilmiş elektrot (Deney grubu)
- Antiprob ile hibridize edilmiş elektrot (Prob sekansının birebir eşleniği olan ve ticari olarak satın alınan karşıt dizi ile yapılan pozitif kontrol)
- DNAsız ortamdan hazırlanmış elektrot (deney grubu ile aynı işlemlere DNA içermeyen ortamda tabi tutulmuş negatif kontrol grubu)

#### **2.2.17. Gıda örneklerinden *L. monocytogenes* genomik DNA izolasyonu**

Gıda örneklerinden *L. monocytogenes* genomik DNA'sının izolasyonu amacı ile mikrobiyal gıda DNA ekstraksiyon kiti (Genoks) kullanılmıştır. Ekstraksiyon aşamaları kısaca şu şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Kontamine olduğu düşünülen gıda örneğinden hazırlanmış olan 2 ml ön zenginleştirme sıvı kültür ortamından alınarak ependorf tüpüne aktarılmış ve 12,000 rpm'de 2 dakika süre santrifüj ile pelet elde edilmiştir.
2. Pelet üzerine 200 µl Solüsyon A ilave edilmiş ve pipet yardımı ile pelet çözülmüştür. Daha sonra karışımın üzerine 800 µl Solüsyon I ilave edilmiş ve karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından üzerine tekrar 700 µl Solüsyon I ilave edilmiş ve karıştırılmıştır.
3. 13,000 rpm'de 2 dakika süre santrifüj ile süpernatant temiz bir ependorf tüpüne ayrılmıştır.
4. Elde edilen süpernatantdan 700 µl alınarak, kolon filtreye aktarılmış, 12,000 rpm'de 2 dakika santrifüj ile akış sağlanmış ve süzülen sıvı atılmıştır.
5. Kolon filtre üzerine 700 µl Solüsyon II ilave edilmiş, 10,000 rpm'de 30 saniye santrifüj ile akış sağlanmış ve süzülen sıvı atılmıştır.



6. Kolon filtre üzerine 700 µl Solüsyon III ilave edilmiş, 10,000 rpm'de 30 saniye santrifüj ile akış sağlanmış ve süzülen sıvı atılmıştır. İşlem iki kez tekrarlanmıştır
7. Boş kolon filtre 10,000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
8. Kolon filtre temiz bir ependorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 60 µl dH<sub>2</sub>O ilave edilerek 10,000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
9. Süzülen sıvı tekrar kolon filtreye alınarak 10,000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen DNA -20 °C'de saklanmıştır.

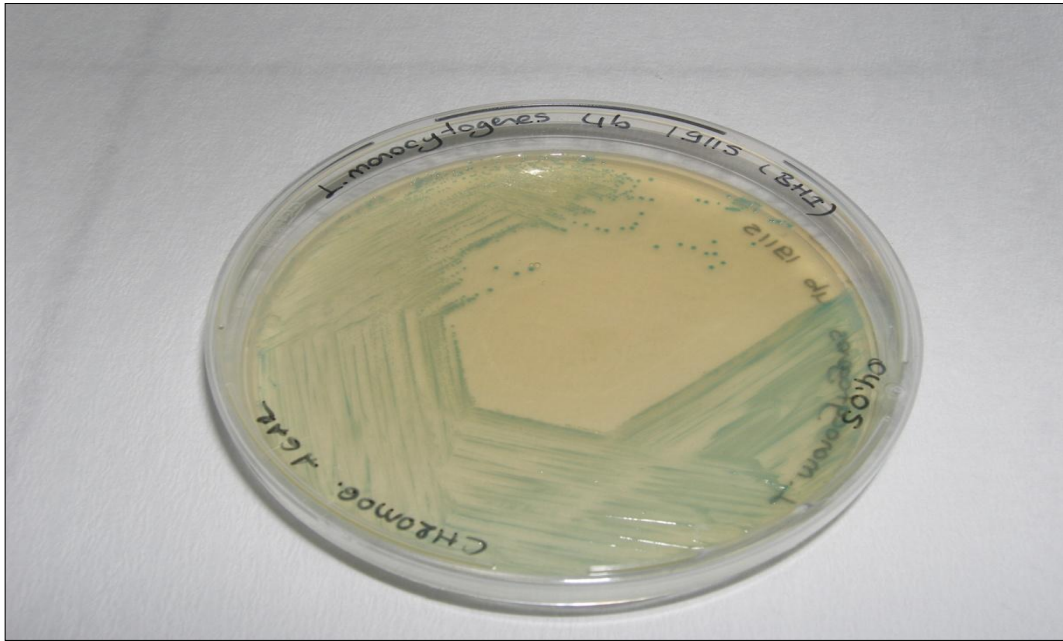
#### **2.2.18. RT-PZR ile *L. monocytogenes* tayini**

RT-PZR çalışmaları için *Listeria spp.* Real Time PZR kiti (Genoks) kullanılmıştır. Reaksiyon içeriği ve koşulları üretici firma tarafından önerilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Buna göre; 35 µl RT-PZR master karışımı, 5 µl *Listeria spp.* özgül prob, 5 µl kalıp DNA ve 5 µl dH<sub>2</sub>O olmak üzere son hacim 50 µl olacak şekilde içerik hazırlanmıştır. PZR döngüleri olarak 1 döngü 94 °C'de 2 dakika ön denatürasyon, 40 döngü 94 °C'de 45 saniye (denatürasyon), 60 °C'de 45 saniye (bağlanma), 72 °C'de 45 saniye (uzama) kullanılmış ve tarama için Texax RED boyası seçilmiştir.

### 3. BULGULAR

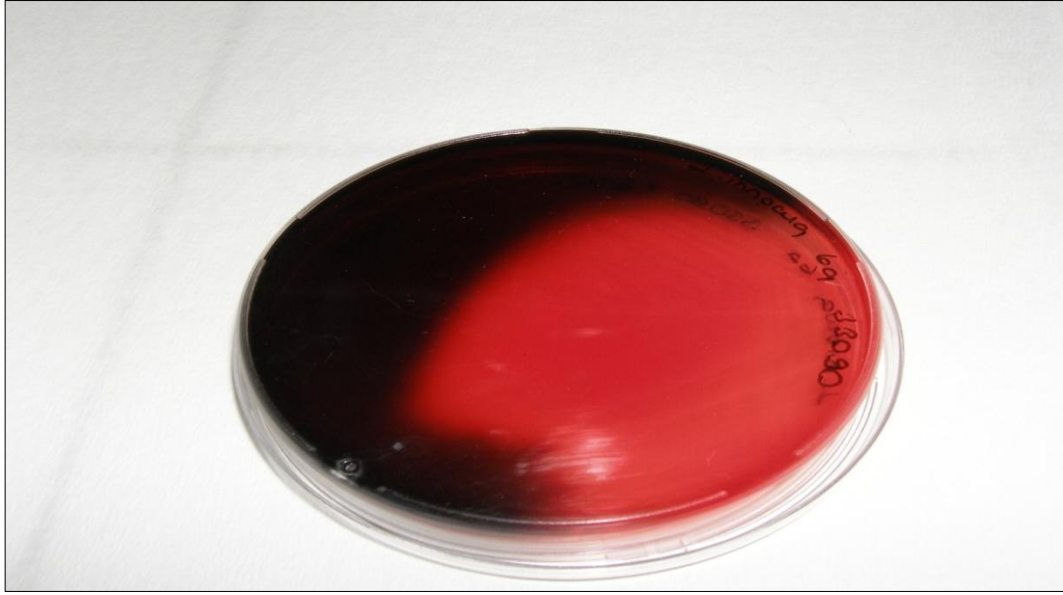
#### 3.1. Test Mikroorganizmalarının Seçici Ortamlarda Geliştirilmesi

Çalışmalarda kullanılması düşünülen 6 adet standart mikroorganizma tür 24 saat süre ile uygun bir broth ortamında geliştirildikten sonra, kültürler PALCAM Agar ve *Listeria* Koromojenik Agar ortamında çizgi ekim yapılarak geliştirilmiştir.



Şekil 3.1. Kromojenik agar ortamında *L. monocytogenes* 4b 19115 kolonileri

*Listeria* Koromojenik Agar ortamında 37 °C'de 24 saat süre ile inkübasyondan sonra *Listeria monocytogenes* ve *Listeria ivanovii* türleri mavi-yeşil renkte ve kolonilerin etrafında beyaz opak bir hale ile gözlemlenmiştir (Şekil 3.1). *Listeria innocua* türü ise yine aynı renkte ancak kolonilerin etrafında hale oluşumu görülmezken gelişmiştir. PALCAM agarda 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrasında koloni oluşumu görülmezken, 48 saat sonrasında siyah renkte *Listeria* türlerine ait koloniler gözlemlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. PALCAM agar ortamında *L. innocua* 6a 33090 kolonileri

### 3.2. API *Listeria* Test Kitleri ile Tanımlama

Çalışmalar için kullanılacak olan ve ticari olarak satın alınan kültürler API *Listeria* (bioMerieux) test kitinin kullanım ve güvenilirlik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile API *Listeria* test kitleri ile tanımlanmış ve türlere ait sayısal profiller çıkartılmıştır.

Çizelge 3.1. Karbonhidrat fermantasyon test sonuçlarına göre sayısal profiller

Kültür	DIM	ESC	A MAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	GIP	TAG	Profil
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	
1	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	6550
2	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	3370
3	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	7530
4	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	2020
5	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	6550
6	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	6510

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen mikroorganizma profilleri Çizelge 3.1’de verilmiştir. Elde edilen sayısal profiller V1.2 veritabanına girilerek profilin hangi mikroorganizma türünü temsil ettiği belirlenmiş, daha sonra bu profillerin mevcut kültür bilgisi ile uyum sağlayıp sağlamadığı karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.2’de özetlenmiştir.

**Çizelge 3.2.** Mevcut kültür bilgisi ile API sonuçlarının karşılaştırılması

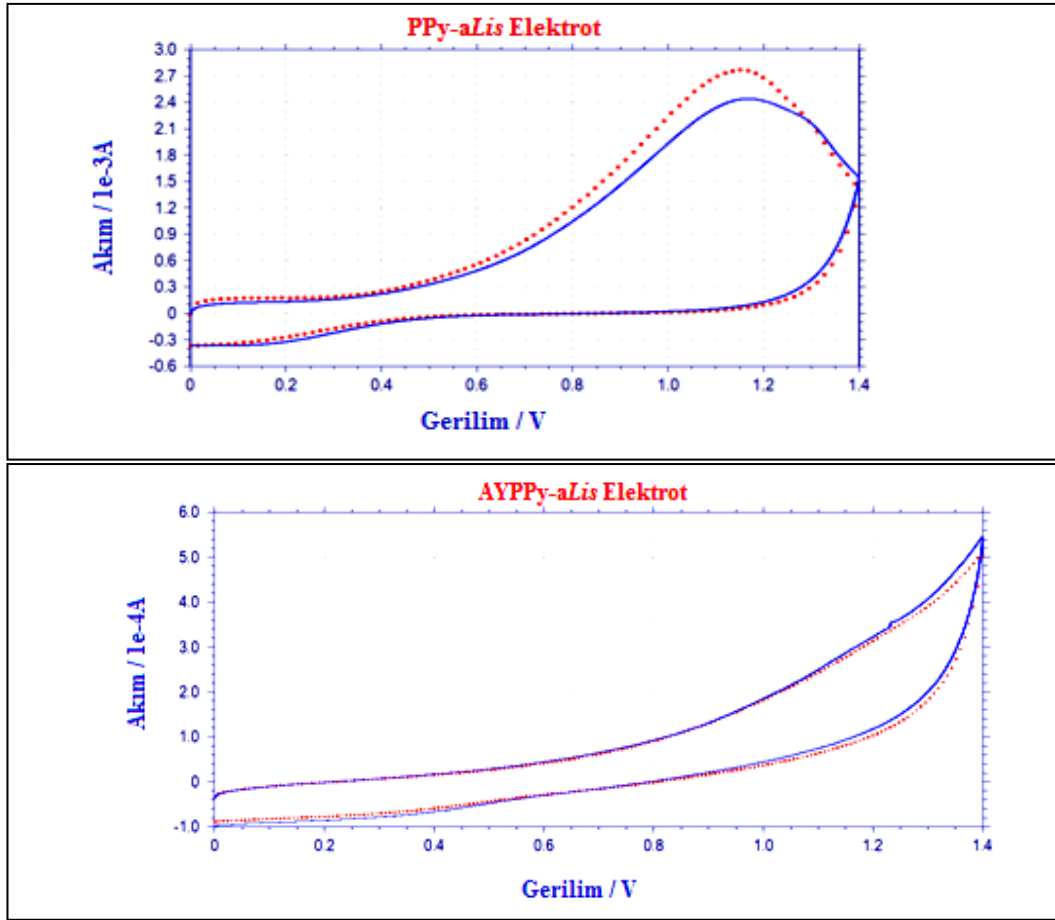
<b>Kültür No</b>	<b>Eldeki mikroorganizma adı</b>	<b>Sayısal profil</b>	<b>Sayısal profile göre tür adı</b>
<b>1</b>	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	<b>6550</b>	<i>L. monocytogenes</i>
<b>2</b>	<i>L. ivanovii</i> 19119	<b>3370</b>	<i>L. ivanovii</i>
<b>3</b>	<i>L. innocua</i> 6a 33090	<b>7530</b>	<i>L. grayi</i>
<b>4</b>	<i>L. monocytogenes</i> serovar I	<b>2020</b>	<i>Profil yok</i>
<b>5</b>	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<b>6550</b>	<i>L. monocytogenes</i>
<b>6</b>	<i>L. monocytogenes</i> 4b 19115	<b>6510</b>	<i>L. monocytogenes</i>

Elde edilen identifikasyon sonuçları değerlendirildiğinde, 6 adet kültürden 4 tanesinin API ile tür düzeyinde doğru değerlendirildiği ancak 2 kültürün farklı sonuç verdiği görülmüştür.

### **3.3. *L. monocytogenes* Tayini İçin Antikor Tabanlı Sensör Çalışmaları**

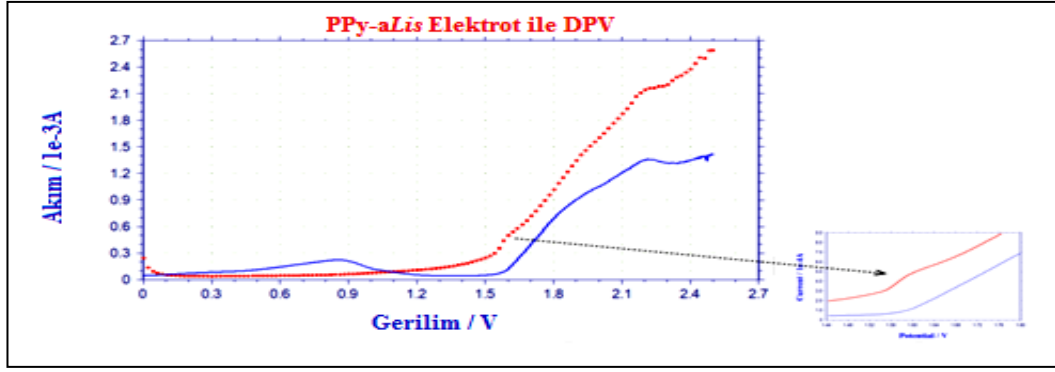
#### **3.3.1. Çalışma elektrotu olarak kalem ucu elektrotun kullanılması**

Çalışma elektrotu olarak 4 farklı tipte elektrotun tasarlandığı çalışmada her bir elektrot tipi için ilk etapta 10 ml 0,15 M NaNO<sub>3</sub> solüsyonu içerisinde çözelti davranışına bakılmış ardından ortama mikroorganizma ilavesi yapılarak sinyal elde edilmeye çalışılmıştır.



**Şekil 3.3.** PPy-aLis ve AYPPy-aLis elektrotlar ile alınan voltamogramlar. Mavi düz çizgi: 0,15 M NaNO<sub>3</sub> içerisinde çözelti davranışı, kırmızı kesikli çizgi 10<sup>8</sup> cfu/ml mikroorganizma içeren 0,15 M NaNO<sub>3</sub> ortamda davranış

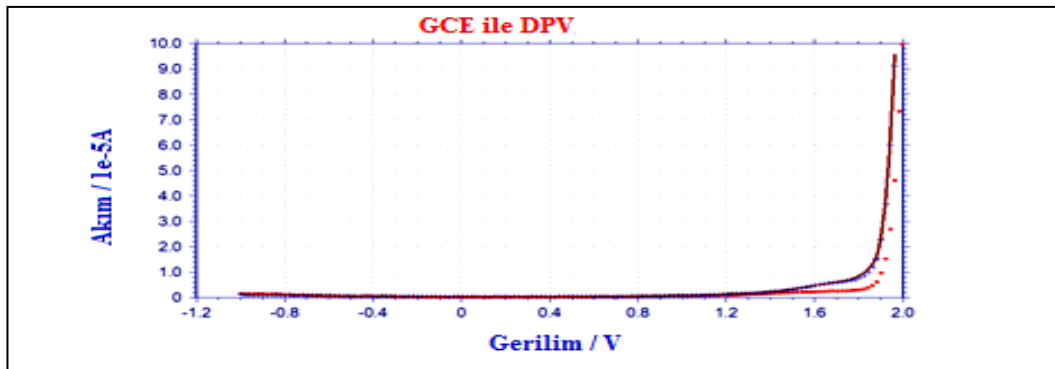
Şekil 3.3’de görüldüğü üzere PPy elektrot ile boş çözeltide DV alındığı zaman 1,0–1,2 V aralığında pik akımında artış gözlemlenmiştir. Aynı ortama 10<sup>8</sup> cfu/ml *L. monocytogenes* ilavesinden sonra elde edilen grafikte aynı gerilim aralığında pik akımında bir miktar daha artış olmakla birlikte ciddi bir değişim gözlemlenmemiştir. PPy-aLis elektrot ile elde edilen sonuçlar incelendiği zaman gerek çözelti davranışının gerekse mikroorganizma ilavesinin etkisinin antibadi içermeyen PPy elektrot ile yaklaşık olarak aynı olduğu görülmüştür. Yapılan işlemler sonucunda aşırı yükseltgenmiş elektrotlarda, PPy elektrotta 1,0-1,2 V gerilim aralığında görülen pikte azalma tespit edilmiştir. Ancak aşırı yükseltgenmiş PPy ve PPy-aLis elektrotta da mikroorganizma ilavesi ile birlikte dikkate değer bir değişim gözlemlenmemiştir.



**Şekil 3.4.** PPy-aLis elektrot ile alınan diferansiyel puls voltamogramları. Mavi düz çizgi: 0,15 M NaNO<sub>3</sub> içerisinde çözelti davranışı, kırmızı kesikli çizgi 10<sup>8</sup> cfu/ml mikroorganizma içeren 0,15 M NaNO<sub>3</sub> ortamında davranış

Şekil 3.4’de DPV yöntemi ile elde edilen voltamogram görülmektedir. DPV ile yapılan değerlendirmeler sonucunda 1,6 V gerilimde çok yüksek pik akımı görülmemekle birlikte PPy ve PPy-aLis elektrotun çözelti davranışı ve mikroorganizma ilaveli ortamdaki davranışı arasında farklılık gözlemlenmiştir. Bununla birlikte aşırı yükseltgenmiş elektrotlarda 1,6 V’da gözlemlenen değişim kaybolmaktadır. Daha sonra yapılan tekrar çalışmaları sırasında görülen değişimin çözelti kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır.

### 3.3.2. Çalışma elektrotu olarak camı karbon disk elektrotunun kullanılması

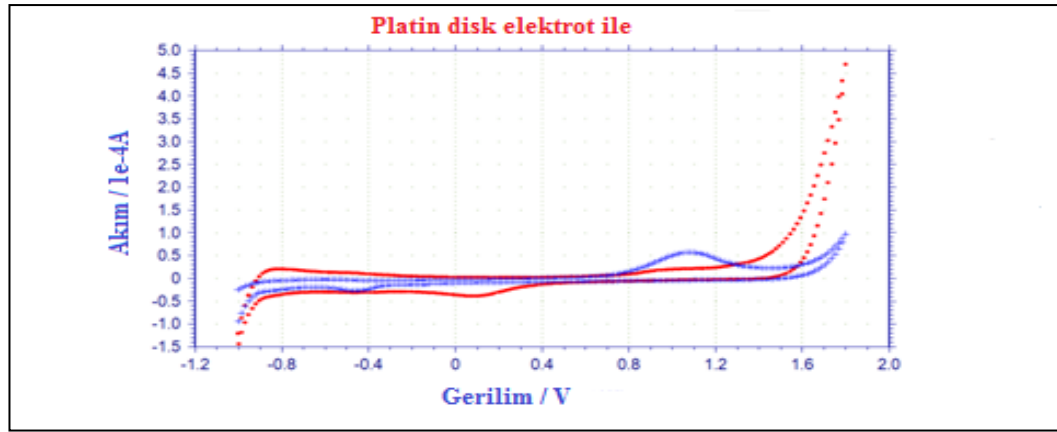


**Şekil 3.5.** Modifiye GCE elektrot ile alınan voltamogramlar. Kırmızı kesikli çizgi; 0,15 M NaNO<sub>3</sub> içerisinde çözelti davranışı, mavi çarpı işaretleri; 10<sup>8</sup> cfu/ml mikroorganizma ilavesinden sonra davranış, kahverengi düz çizgi; 2,5 ppm antibadi solüsyonu ilave edildikten sonraki davranış.

GCE ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar incelendiğinde gerek mikroorganizma ilavesinin gerekse antibadi ilavesinin elektrot davranışında bir fark yaratmadığı görülmüştür (Şekil 3.5).

### 3.3.3. Çalışma elektrotu olarak platin disk elektrotun kullanılması

Yapılan çalışma sonucunda mikroorganizma ile sentezlenen polimer arasında hem DV hem de DPV ile yapılan analizlerde herhangi bir etkileşim gözlenmemiştir (Şekil 3.6).

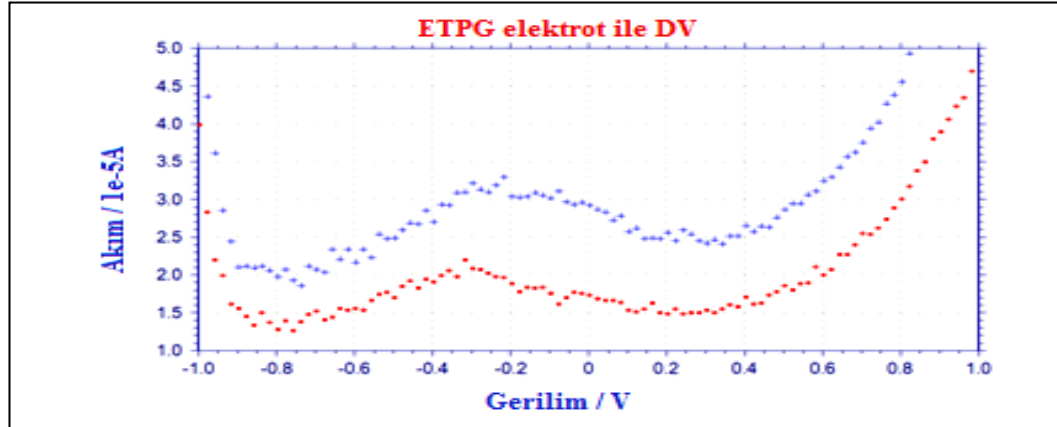


Şekil 3.6. Modifiye platin disk elektrotu ile alınan dönüşümlü voltamogramlar. Mavi düz çizgi; 0,15 M NaNO<sub>3</sub> içerisinde çözelti davranışı, kırmızı kesikli çizgi; 10<sup>8</sup> cfu/ml mikroorganizma ilavesinden sonra davranış

### 3.3.4. Çalışma elektrotu olarak kimyasal işlem görmüş kalem ucu elektrotunun kullanılması

0,15 M NaNO<sub>3</sub> çözelti ortamından ETPG elektrotu kullanımı ile yapılan denemede ortama mikroorganizma ilave edilmesinin her hangi bir değişikliğe yol açmadığı, yani elektrot ve mikroorganizma kültürü arasında bir etkileşim olmadığı görülmüştür. PBS içerisinde alınan DPV sonuçları (Şekil 3.7) incelendiği zaman ortama mikroorganizma ilavesi ile birlikte -0,4/-0,2 V gerilim aralığında akım değerinde çok yüksek olmamakla birlikte artış görülmüştür. Ancak elektrot yüzeyinde *L. monocytogenes* bakterisi ile spesifik bağlantıyı sağlayacak herhangi

bir bileşen bulunmadığından dolayı bu artışın çözelti-mikroorganizma etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir.



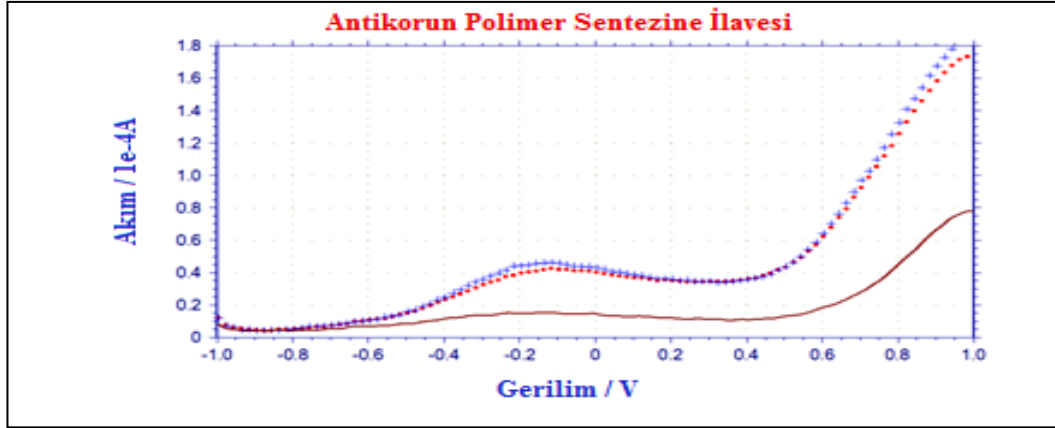
**Şekil 3.7.** ETPG elektrot ile alınan voltamogramlar. Kırmızı kesikli çizgi; 0,15 M NaNO<sub>3</sub> içerisinde çözelti davranışı, mavi çarpı işaretleri; 10<sup>8</sup> cfu/ml mikroorganizma ilavesinden sonra davranış

Bu aşamada, aynı yöntemle ETPG elektrotu sentezlenerek deney tekrar edilmiş ve bu kez mikroorganizma ilavesi ile analiz gerçekleştirildikten sonra, çözelti ortamına 2,5 ppm antibadi solüsyonu ilave edilerek antibadi ilavesinin etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda ortama antibadi ilavesinin ETPG elektrot üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir.

### 3.3.5. Destek elektrolit kullanmadan yapılan polimerizasyon çalışmaları

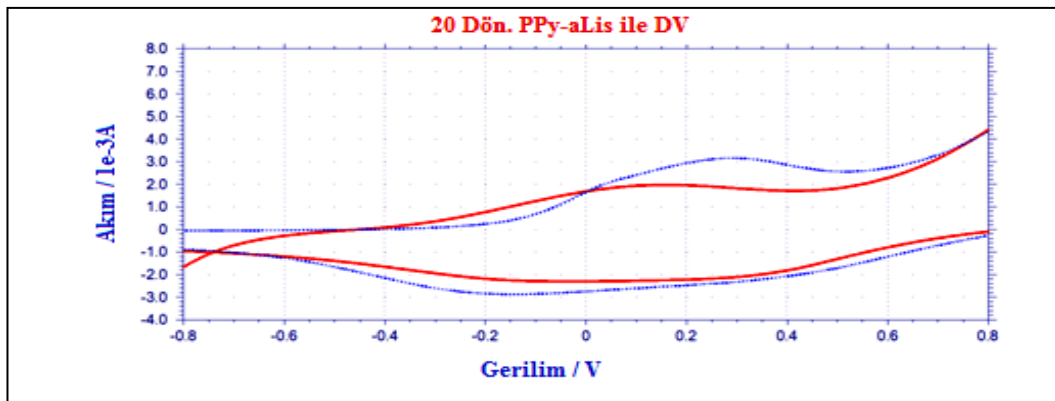
10 ml deiyonize su içerisine 0,5 M pirol ve 5 ppm antibadi solüsyonu ilavesi yapılarak ve DV yöntemiyle, 0,1 V/s tarama hızında, 20 döngüde sentezlenen elektrotlar ile elde edilen voltamogram Şekil 3.8’de gösterilmektedir. Sentez ortamına antibadi ilave edilerek, destek elektrolit kullanılmadan polimerleşme yapıldığında mikroorganizma ilavesinde -0,2–0 V gerilim aralığında, pik akım şiddetindeki ve pik potansiyelindeki değişim umut vaat etmektedir.





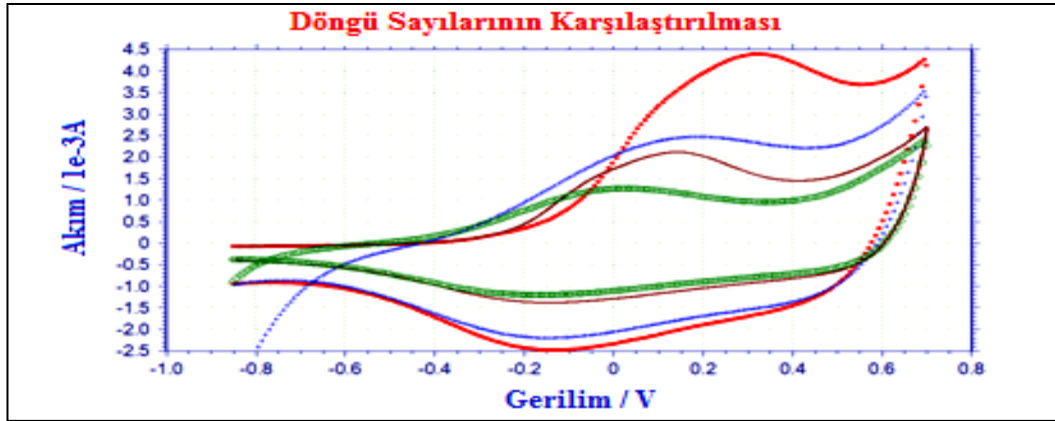
**Şekil 3.8.** Antikorum polimer sentezine ilavesi. Kırmızı kesikli çizgi; 0,15 M NaNO<sub>3</sub> + 10<sup>8</sup> cfu/ml mikroorganizma içeren ortam, mavi çarpı işareti; ikinci bir elektrot ile tekrar, kahverengi düz çizgi; 0,15 M NaNO<sub>3</sub> içerisinde çözelti davranışı.

Yapılan çalışmada elde edilen voltamogramlardaki pik akım değerinin düşük olması, kullanılan antibadi konsantrasyonunun az olmasına bağlanmaktadır. Akım değerlerinin düşük olması ve polimerleşme esnasında destek elektrolit kullanılmamasının elde edilen sonuçların kalitesini etkilediği düşünülmektedir. Bu nedenle sentez koşulları değiştirilerek daha önce anlatıldığı gibi deneyler farklı biçimlerde tekrar edilmiştir. Şekil 3.9'daki voltamogramda 25 ppm antibadi ilaveli ortamda 0,02 V/s tarama hızında sentezlenen elektrotlar ile alınan DV sonuçları görülmektedir.

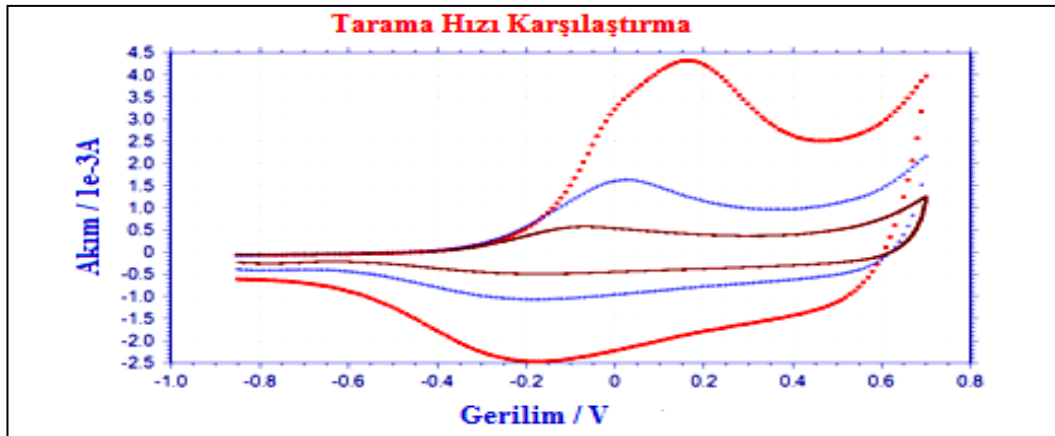


**Şekil 3.9** 20 Dön. PPy-aLis ile alınan dönüşümlü voltamogramlar. Kırmızı düz çizgi; 0,15 M NaNO<sub>3</sub> içerisinde çözelti davranış, mavi kesikli çizgi; 0,15 M NaNO<sub>3</sub> + 10<sup>8</sup> cfu/ml mikroorganizma içeren ortam

Optimum sentez parametrelerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar sonucunda döngü sayıları karşılaştırıldığı zaman 20 döngüde sentezlenen elektrotlarla daha iyi sonuç alındığı, 0,8 V değeri üzerinde elektrot davranışında bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.10).



**Şekil 3.10.** Döngü sayılarının karşılaştırılması. Kırmızı kesikli çizgi; 20 dön. sentezlenen elektrot ile 0,15 M NaNO<sub>3</sub> + 10<sup>8</sup> cfu/ml mikroorganizma içeren ortam, mavi çarpı işareti; 20 dön. sentezlenen elektrotun 0,15 M NaNO<sub>3</sub> içerisindeki çözelti davranışı; kahverengi düz çizgi; 10 dön. sentezlenen elektrot ile 0,15 M NaNO<sub>3</sub> + 10<sup>8</sup> cfu/ml mikroorganizma içeren ortam, yeşil daireler; 10 dön. sentezlenen elektrotun 0,15 M NaNO<sub>3</sub> içerisindeki çözelti davranışı



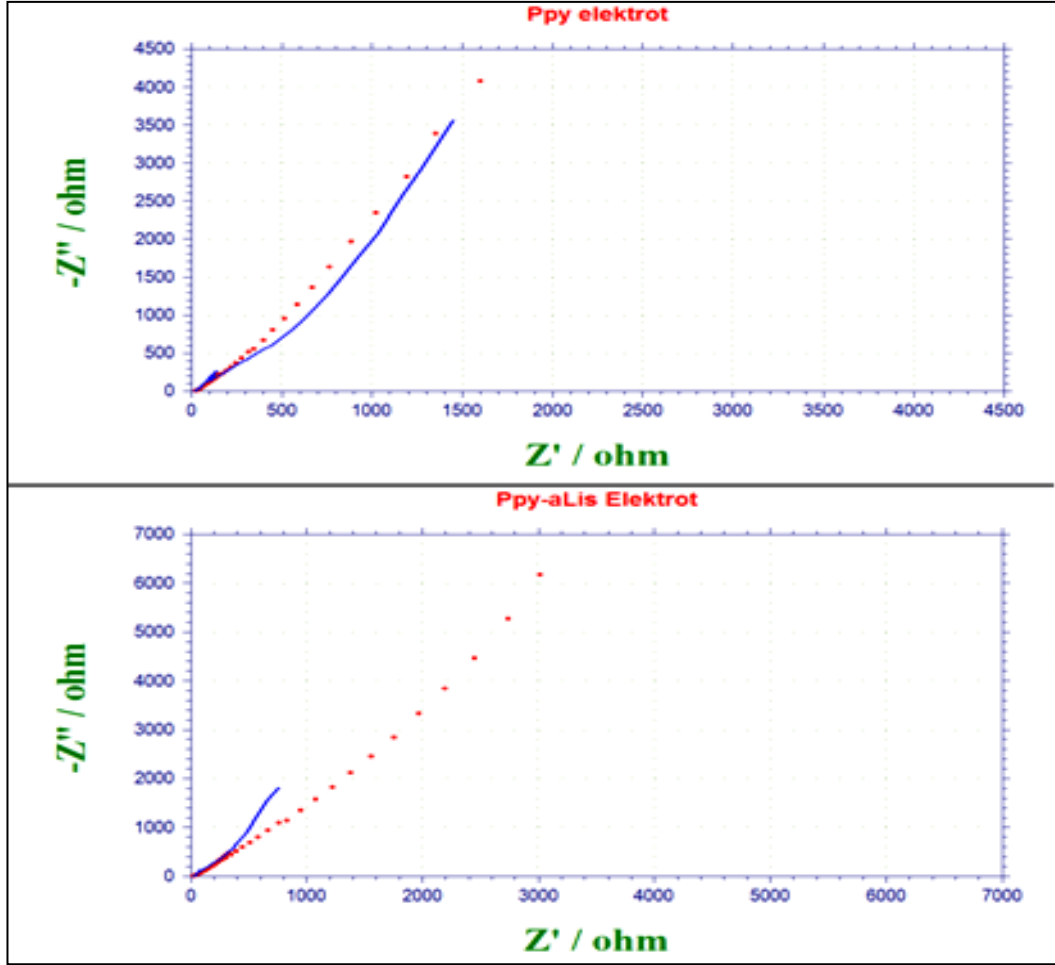
**Şekil 3.11.** Tarama hızlarının karşılaştırılması. Kırmızı kesikli çizgi; 0,02 V/s tarama hızı ile sentezlenen elektrotla mavi çarpı işareti; 0,05 V/s tarama hızı ile sentezlenen elektrotla, kahverengi düz çizgi; 0,1 V/s tarama hızı ile sentezlenen elektrotla 10<sup>8</sup> cfu/ml mikroorganizma içeren ortamda davranış.

Sentez sırasında kullanılan tarama hızları kendi aralarında kıyaslandığı zaman ise düşük tarama hızının, akım şiddetini arttırdığı ve en iyi sonuçların 0,02 V/s tarama hızında alındığı görülmüştür. Şekil 3.11’de gösterilen voltamogramda her üç tarama hızı için sonuçlar verilmektedir. Elde edilen en yüksek pik akımı 0,02 V/s tarama hızında yaklaşık olarak  $4,5 \times 10^{-3}$  amper iken bu değer 0,05 V/s tarama hızında yaklaşık olarak  $1,5 \times 10^{-3}$ ’e ve 0,1 V/s tarama hızında  $0,5 \times 10^{-3}$  değerine düşmektedir. ×

Tasarlanan elektrotun spesifikliğinin belirlenmesi için farklı mikroorganizmaların ilavesiyle yapılan çalışmalarda yine aynı gerilim aralığında *L. monocytogenes* ilavesindeki kadar olmamakla birlikte pik akımında bir miktar artış gözlemlenmiştir.

### 3.3.5.1. Empedans Analizi

Şekil 3.12’de 20 döngüde sentezlenen elektrotlar ile elde edilen Niquist grafikleri verilmiştir. Bu grafiklerde X ekseninde imegenary direnç, Y ekseninde real direnç değerleri görülmektedir. PPy elektrotlarda ortama mikroorganizma ilavesinden sonra elektrotun direnç değerlerinde yaklaşık olarak 500 ohm değerinde bir direnç kaybı görülürken, PPy-*aLis* elektrotlarda bu fark imegenary direnç için yaklaşık olarak 4000 ohm, real direnç içinse 2000 ohm değerindedir. Ayrıca polimerizasyona antibadi ilavesi elektrotun direncinde yükselişe yol açmıştır.



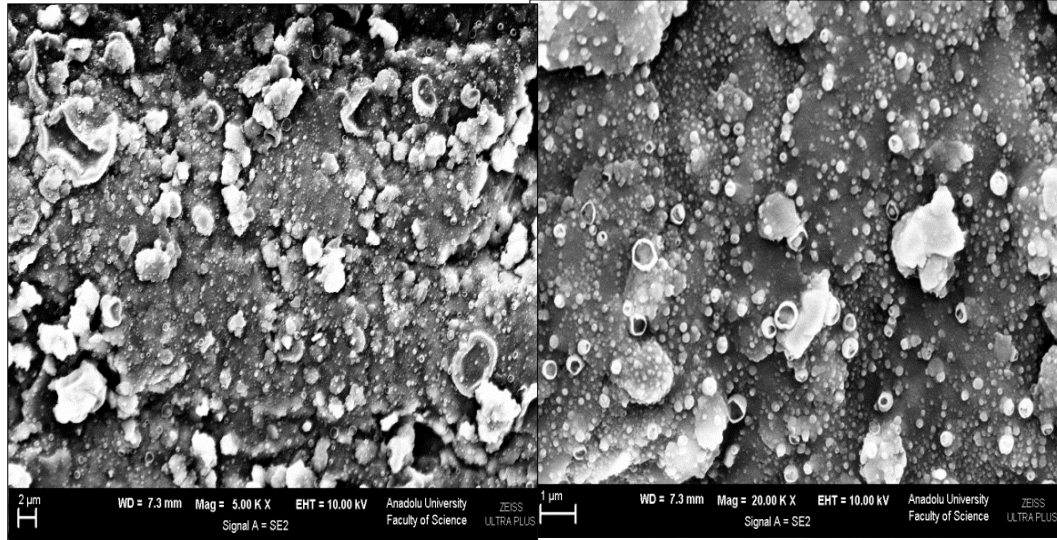
Şekil 3.12. Empedans analizleri ile elde edilen Niquist grafikleri Kırmızı kesikli çizgi; 0,15 M  $\text{NaNO}_3$  içerisindeki çözelti davranışı, mavi düz çizgi;  $10^8$  cfu/ml mikroorganizma içeren ortam.

### 3.3.6. Bekletme süresinin etkisinin belirlenmesi

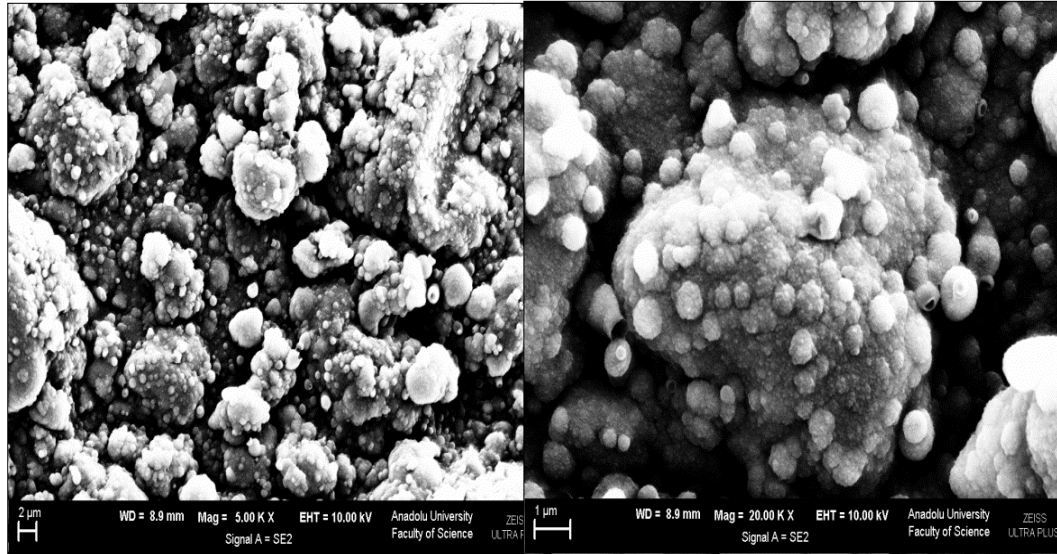
Bekletme süresinin elektrot performansı üzerine etkisini belirlemek amacı ile yapılan çalışmalarda mikroorganizmalı ortamda 5, 10 ve 60 dakika bekletmeler sonrasında okumalar gerçekleştirilmiş ancak bekletme süresinin herhangi bir pozitif etkisine rastlanmamıştır.

### 3.4. PPy ve PPy-aLis Elektrotların SEM ile Görüntülenmesi

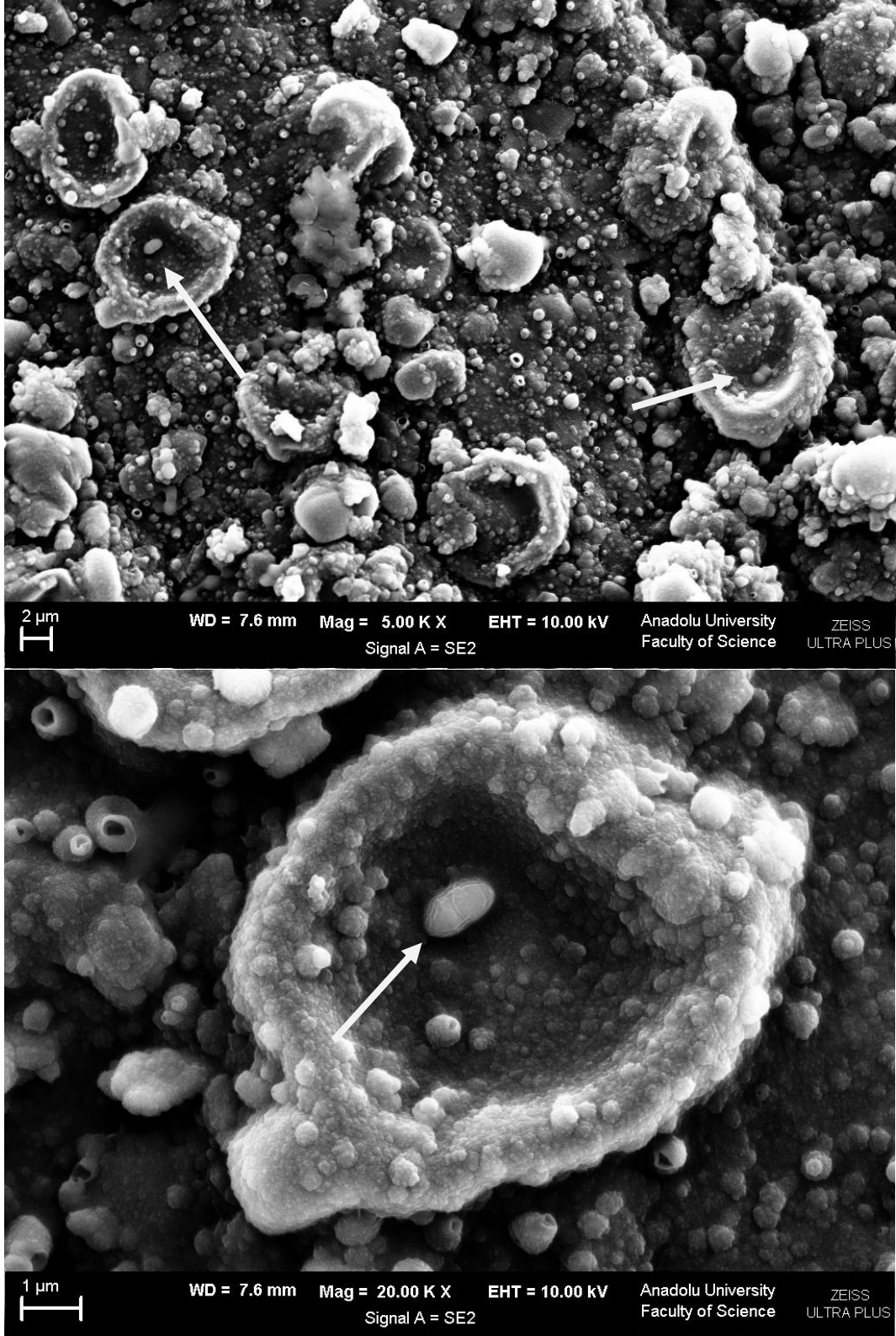
Şekil 3.13, 3.14. ve 3.15’de sırası ile PPy, PPy-aLis ve 1 saat  $10^8$  cfu/ml mikroorganizma *L. monocytogenes* içeren 0,15 M NaNO<sub>3</sub> çözeltisinde bekletilmiş PPy-aLis elektrot ile alınan SEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.13. PPy elektrotun 5,00 K X büyütmede (sağdaki) ve 20,00 K X büyütmede (soldaki) SEM görüntüleri



Şekil 3.14. PPy-aLis elektrotun 5,00 K X büyütmede (sağdaki) ve 20,00 K X büyütmede (soldaki) SEM görüntüleri.



**Şekil 3.15.** PPy-aLis elektrotun 1 saat mikroorganizmalı ortamda bekletildikten sonra 5,00 K X büyütmede (üstteki) ve 20,00 K X büyütmede (alttaki) SEM görüntüleri.

### 3.5. ELİZA Yöntemi İle *L. monocytogenes* Tayini

Gıdalarda *L. monocytogenes* tayini için Tecra Listeria Visual Immunoassay kiti ile ELİZA testinde sırasıyla 1 cfu/ml, 10cfu/ml ve 100 cfu/ml olacak şekilde canlı *Listeria monocytogenes* 4b 19115 kültürü içeren 1, 2 ve 3 numaralı süt örnekleri kullanılmıştır. Ön zenginleştirme işlemine tabi tutulan örneklerden yapılan testin sonuçları hem renk kartı yardımı ile görsel olarak hem de ELİZA plak oyucusu yardımı ile absorbans değerine bakılarak kaydedilmiştir.

Renk kartı ile yapılan değerlendirmede kart üzerinde görülen 1 ve 2 numaralı renklerin oluşumu negatif; 3, 4 ve 5 numaralı renklerin oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirmektedir. Testin geçerli sayılabilmesi için kullanılan pozitif kontrol hücresinin en az 15, en çok 30 dakika içerisinde renk kartındaki 4 ya da 5 numaralı renge dönüşmesi gerekmektedir.



**Şekil 3.16** ELİZA test sonuçları 1; pozitif kontrol, 2; negatif kontrol, 3; 1 numaralı süt örneği (1 cfu/ml), 4; 2 numaralı süt örneği (10 cfu/ml) ve 5; 3 numaralı süt örneği (100 cfu/ml)

Test sonucunda pozitif kontrol hücresi ve süt örnekleri renk skalasında 4 ve 5 numaralı renklere sahip olduğundan dolayı pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.16). Ayrıca yapılan testin sonuçları hücreler ELİZA plak okuyucusunda 414 nm dalga boyunda, negatif kontrol grubu kör olarak kullanılmak kaydı ile değerlendirilmiştir. Çift tekrarlı okumalar sonucunda negatif kontrol hücresinin absorbans değeri 0,01 bulunurken, pozitif kontrol 1,2 ve süt örnekleri 2,0 değerinin üzerinde bulunmuştur.

### 3.6. VIDAS Yöntemi ile *L. monocytogenes* Tayini

Çizelge 3.3. VIDAS Test Sonuçları

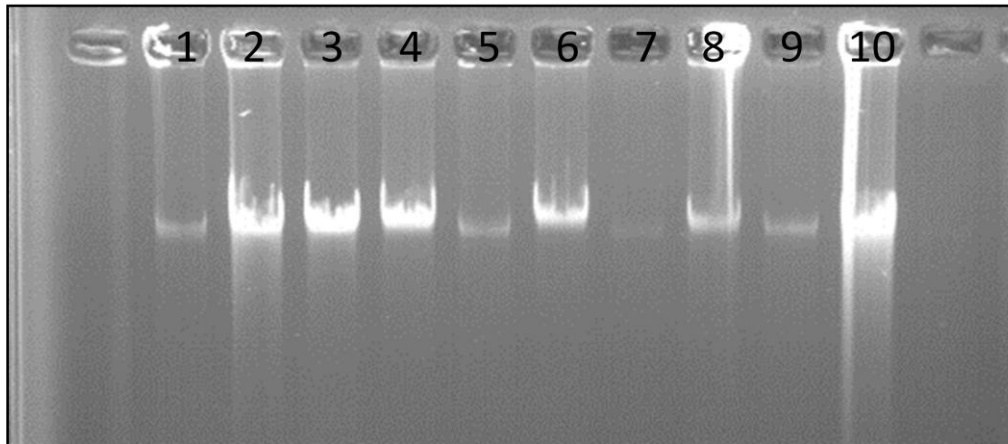
	<b>Mini VIDAS Raporu ANADOLU ÜN. HAST Kompartıman A <i>Listeria monocytogenes</i> II Ver: R5.3.0 Lot# : 130214-0 TV Negatif &lt; 0,05 TV Pozitif &gt;= 0,05</b>	<b>Mini VIDAS Raporu ANADOLU ÜN. HAST Kompartıman B <i>Listeria monocytogenes</i> II Ver: R5.3.0 Lot# : 130214-0 TV Negatif &lt; 0,05 TV Pozitif &gt;= 0,05</b>
<b>LOT GİRİŞİ</b> <b>14:54:50 22</b> Analiz: LMO Strip Lot: 130214-0 Kontrol 1 test değer aralığı: 0,63-0,94 Kontrol 2 test değer aralığı < = 0,04 Max CV X : 13,0	Pozisyon <b>A1</b> Standart 1 Boş Okuma: 128 RFV:3884 Pozisyon <b>A2</b> Standart 1 Boş Okuma: 128 RFV:73# Pozisyon <b>A3</b> Kontrol 1 Boş Okuma: 127 RFV:3032 TV: 0,78 Sonuç: <b>Pozitif</b> Pozisyon <b>A4</b> Kontrol 2 Boş Okuma: 124 RFV:-5 TV: 0,00 Sonuç: <b>Negatif</b>	Pozisyon <b>B1</b> Numune 1 Boş Okuma: 125 RFV:7899 TV: 2,03 Sonuç: <b>Pozitif</b> Pozisyon <b>B2</b> Numune 2 Boş Okuma: 129 RFV:7972 TV: 2,04 Sonuç: <b>Pozitif</b> Pozisyon <b>B3</b> Numune 3 Boş Okuma: 128 RFV:8206 TV: 2,11 Sonuç: <b>Pozitif</b>



VIDAS *Listeria monocytogenes* II (LMO2, BioMeriux) kitleri aracılığı ile gerçekleştirilen testte ELİZA testinde kullanılan ve sırasıyla 1 cfu/ml, 10cfu/ml ve 100 cfu/ml olacak şekilde canlı *Listeria monocytogenes* 4b 19115 kültürü içeren 1, 2 ve 3 numaralı süt örnekleri kullanılmıştır. Her numune ve kontrol grubu (2 adet standart, 1 adet pozitif ve 1 adet negatif kontrol) için bir adet LMO2 test strinin kullanıldığı sistemde sonuçlar Pozitif/Negatif şeklinde cihaz tarafından verilmiştir. Testin uygulaması sırasında A kompartımanına sırasıyla; standart, standar, pozitif kontrol ve negatif kontrol sribleri ve B kompartımanına sırasıyla süt 1, süt 2 ve süt 3 örneklerinden yapılan zenginleştirme ortamından alınan numune sribleri yerleştirilmiştir. Kullanılan her 3 numuneden de pozitifin sonuç alınan test bitiminde elde edilen sonuç raporu Çizelge 3.3’de özetlenmiştir.

### 3.7. Genomik DNA İzolasyonu

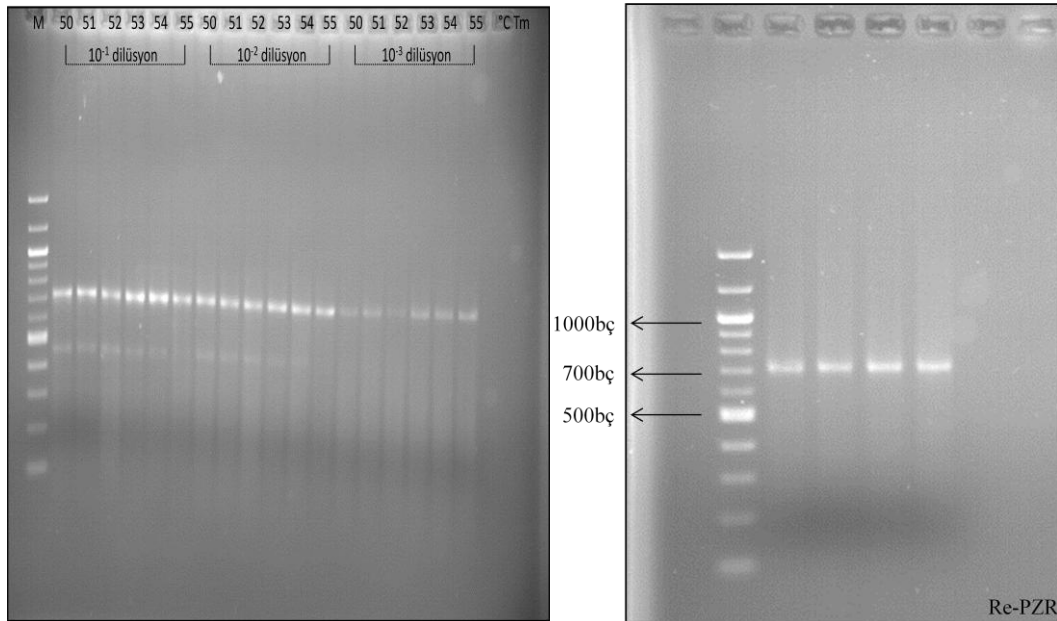
İstenilen bölgelerin çoğaltılmasında kullanılmak üzere, daha önce anlatılan prosedür uygulanarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş (Şekil 3.17) ve saf olarak elde edilen genomik DNA 30 µl dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülerek daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır.



**Şekil 3.17.** Genomik DNA izolasyonu. 1-2; *L. monocytogenes* ATCC 19111, 3-4-5; *L. monocytogenes* 7644, 6-7; *L. innocua* 6a 33090, 8-9; *L. ivanovii* 10119, 10; *L. monocytogenes* 4b 19115.

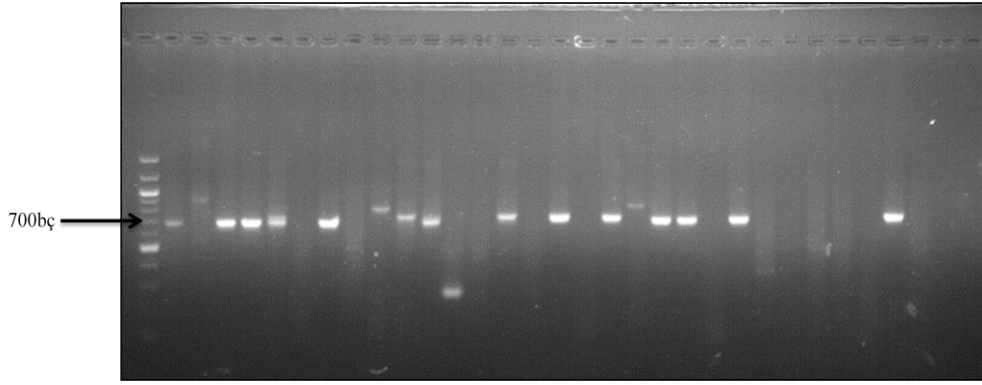
### 3.8. PZR İle *hlyA* Gen Fragmentinin Çoğaltılması ve Klonlanması

*hlyA* gen fragmenti, *Listeria monocytogenes* 4b 19115 kültürünün genomik DNA'sından spesifik primerler yardımı ile optimum şartlar altında çoğaltılmış, agaroz jelde yürütülmüş ve yüksek miktarda üretim için saflaştırılarak Re-PZR reaksiyonu kurulmuştur. Bununla birlikte gerek genomik DNA'dan gerekse saflaştırılmış üründen kurulan Re-PZR reaksiyonlarından istenilen verimlilikte ürün elde edilememiştir (Şekil 3.18). Nanodrop ile yapılan ölçümlerde elde edilen ürünün saflık derecesi elektrokimyasal DNA sensör çalışmalarında kullanılabilecek düzeyde bulunmuş olsa da, DNA miktarı bakımından düşük bulunduğundan dolayı fragmentin klonlanmasına ve fragmentin plazmitden PZR reaksiyonu kurularak üretilmesine karar verilmiştir.



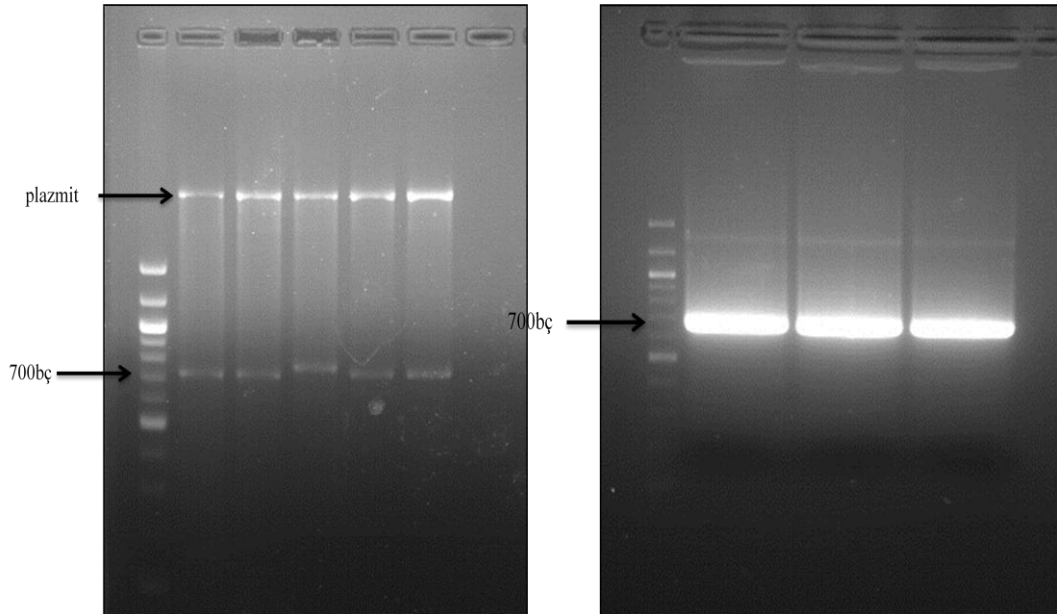
**Şekil 3.18.** Genomik DNA'dan gradient yöntemi ile PZR ve Re-PZR (702 bç için)

702 bç uzunluğundaki fragmentin 'pGEM-T<sup>®</sup> Easy vektörü içerisine yerleştirilmesi ardından vektör kompetent *Escherichia coli* XL I – Blue hücresi içerisine aktarılmıştır. Daha sonra pozitif olduğu düşünülen kolonilerden ilk etapta koloni PZR reaksiyonları kurularak ön değerlendirme yapılmıştır (Şekil 3.19).



**Şekil 3.19.** Olası pozitif kolonilerden kurulan koloni PZR sonuçları (son 3 kuyu negatif kontrol grupları)

Koloni PZR de pozitif sonuç veren kolonilerden 5 tanesi seçilerek amfisilin ilave edilmiş 10 ml LB broth ortamına ekilmiştir. İnokülasyon yapılan tüpler gece boyu 37 °C’de inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin sonucunda 5 tüpten de plazmit izolasyonu yapılmıştır. Ardından elde edilen plazmitlerden kesim reaksiyonu kurularak restriksiyon enzim analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.20) ve pozitif olduğu kesinleşen kolonilerden daha önce anlatıldığı biçimde stok alımı gerçekleştirilmiştir.

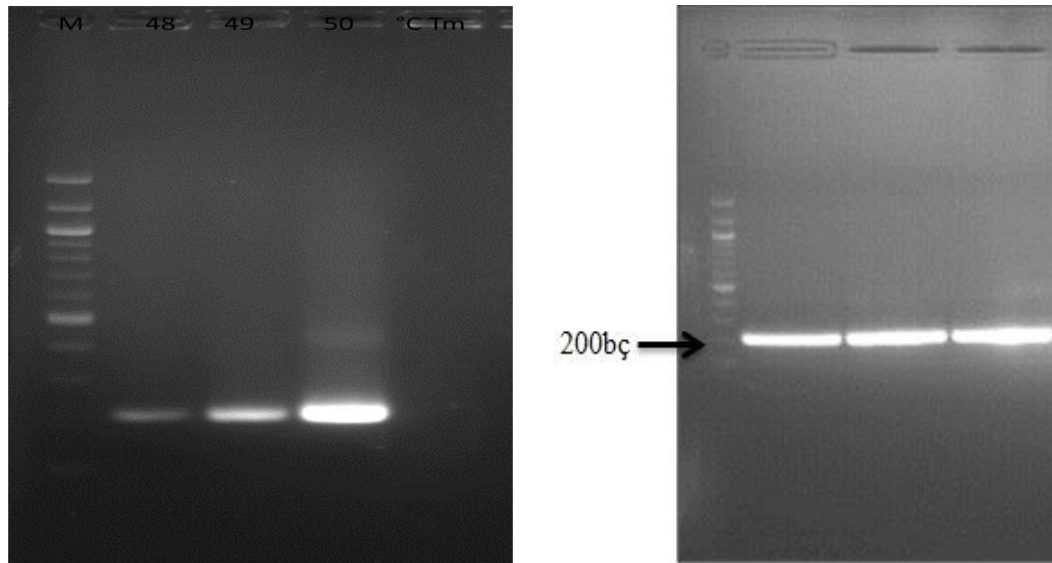


**Şekil 3.20.** Restriksiyon enzim analizi (sağ) ve plazmitden PZR ile fragmentin çoğaltılması (sol).

DNA sensör denemelerinde kullanılmak üzere yüksek miktarda hedef bölge üretimi hedef bölgeyi içeren plazmit DNA sı kalıp olarak kullanılarak PZR reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Agaroz jelde yürütme işleminden sonra (Şekil 3.20) ürün jelden saflaştırılmış ve son ürün DNA/RNA içermeyen steril distile suda çözdürülerek uygun konsantrasyonlarda kullanılmıştır.

### 3.9. 16S RNA Gen Fragmentinin PZR ile Çoğaltılması

16S RNA gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılmak üzere tasarlanmış olan primerler bütün *Listeria* türlerinde kullanılabilir niteliktedir. Bununla birlikte fragmentin çoğaltılmasında kalıp DNA olarak yine patojenitesi kesin olarak kanıtlanmış *Listeria monocytogenes* 4b 19115 kültürünün genomik DNA'sı kullanılmıştır. PZR reaksiyonu optimum şartlar altında gerçekleştirilmiş, ürünler agaroz jelde yürütülmüş ve yüksek miktarda üretim için saflaştırılarak Re-PZR reaksiyonu kurulmuştur (Şekil 3.21). Nanodrop ile yapılan ölçümlerde elde edilen ürünün saflık derecesi ve konsantrasyonu yeterli düzeyde bulunduğu için bu bölge için klonlama işlemi yapılmamıştır. PZR reaksiyon ürünleri jelden saflaştırılmış ve son ürün DNA/RNA içermeyen steril distile suda çözdürülerek uygun konsantrasyonlarda kullanılmıştır.



Şekil 3.21. Genomik DNA'dan gradient yöntemi ile PZR ve Re-PZR

### 3.10. Ürünlerin DNA Dizi Analizi İle Doğrulanması

702 ve 209 bç uzunluğundaki iki ürünün DNA dizi analizi için hem ileri primerler ile hem de geri primerler ile daha önce anlatıldığı şekilde dizi analizi reaksiyonu kurulmuştur. Yapılan çalışma sonucunda 2 ürün için de ileri primerlerden sonuç alınamazken geri primerler ile sonuç elde edilebilmiştir. İleri primerler ile kurulan reaksiyonların çalışmaması evrensel primer kullanılmamış olmasına bağlanmaktadır. Geri primerler ile elde edilmiş olan diziler ve pik grafikleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.23 ve Şekil 3.25).

Dizi analizi sonucunda elde edilen baz bilgisi NCBI ‘National Center for Biotechnology Information’, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gen bankasındaki verilerle BLAST yapılmış ve beklenen dizi olup olmadıkları kontrol edilmiştir. 702 bç uzunluğundaki *hlyA* gen fragmenti protein kodlayan bölge olduğu için BLASTx (Şekil 3.22), 209 bç uzunluğundaki 16S bölgesi protein kodlamadığı için BLASTn (Şekil 3.24) programı kullanılmıştır. BLAST analizleri sonucunda elde edilen verilerin, beklenen gen bölgeleri ile uyduğu gözlemlenmiştir. BLAST analizi sonuçları her iki bölge içinde aşağıda verilmiştir.

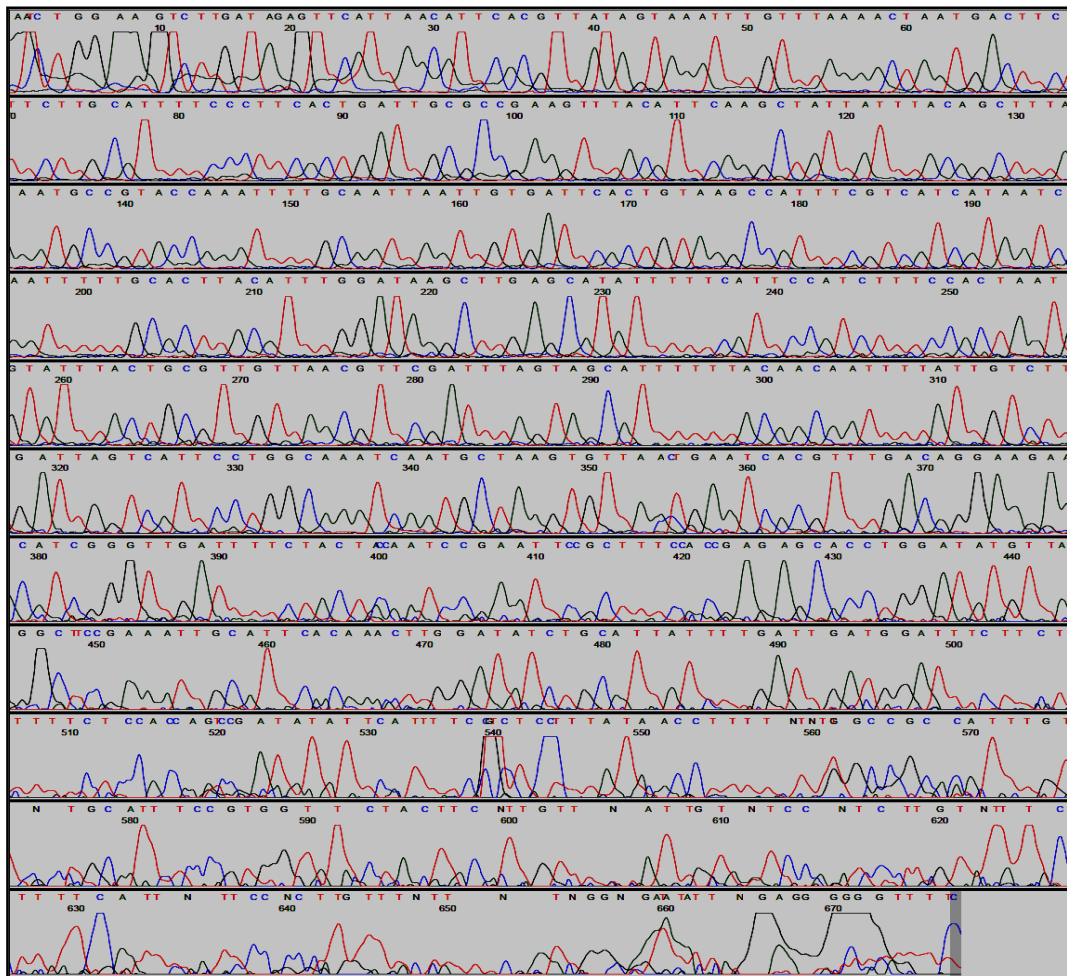
#### 3.10.1. 702 bç için geri primer LM2 ile yapılan analiz sonucu

Dizi analizi ile elde edilen dizi bilgisi

AATCTGGAAGTCTTGATAGAGTTCATTAACATTCACGTTATAGTAAATTTGTTTA  
 AAATAATGACTTCTTCTTGCAATTTTCCCTTCACTGATTGCGCCGAAGTTTACAT  
 TCAAGCTATTATTTACAGCTTTAAATGCCGTACCAAATTTTGCAATTAATTGTGA  
 TTCACTGTAAGCCATTTTCGTCATCATAATCAATTTTGCACCTTACATTTGGATAA  
 GCTTGAGCATATTTTTCATTCCATCTTTCCACTAATGTATTTACTGCGTTGTTAA  
 CGTTCGATTTAGTAGCATTTTTTACAACAATTTTATTGTCTTGATTAGTCATTCC  
 TGGCAAATCAATGCTAAGTGTTAACTGAATCACGTTTGACAGGAAGAACATCGGG  
 TTGATTTTCTACTACCAATCCGAATTCCGCTTTCCACCGAGAGCACCTGGATATG  
 TTAGGCTTCCGAAATTGCATTCACAACTTGGATATCTGCATTATTTTGATTGAT  
 GGATTTCTTCTTTTTCTCCACCAGTCCGATATATTCATTTTCCGTCTCCTTTATA  
 ACCTTTTNTNTTGGCCGCCATTTGTNTGCATTTCCGTGGTTCTACTTCNTTGTTN  
 ATTGTNTCCNTCTTGTNTTTCTTTTCATTNTTCCNCTTGTNTNTNNGNGATA  
TATTNGAGGGGGGTTTTTC

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AEX08651.1	Hly [Listeria monocytogenes]	255	255	99%	1e-87	85%	
ZP_00232026.1	listeriolysin O [Listeria monocytogenes str. 4b H7858] >gb	255	256	99%	9e-86	85%	
ADM96214.1	hemolysin [Listeria monocytogenes] >gb AEN80286.1  Hly [	253	253	99%	1e-83	85%	
AAS85029.1	Hly [Listeria monocytogenes] >gb ADX21054.1  listeriolyisin	253	253	99%	1e-83	85%	
A6F64525.1	listeriolysin O [Listeria monocytogenes]	253	253	99%	1e-83	85%	
YP_002756928.1	listeriolysin O precursor [Listeria monocytogenes serotype 4	253	253	99%	1e-83	85%	G
ZP_05300691.1	listeriolysin O precursor [Listeria monocytogenes LO28]	253	253	99%	1e-83	85%	
ACM42688.1	listeriolysin O precursor [Listeria monocytogenes] >gb ACM	253	253	99%	1e-83	85%	
AAS84845.1	Hly [Listeria monocytogenes] >gb ACN21382.1  listeriolyisin	253	253	99%	1e-83	85%	
ZP_06552256.1	listeriolysin O [Listeria monocytogenes FSL J2-071] >ref YP	253	253	99%	1e-83	85%	
ACN21562.1	listeriolysin O precursor [Listeria monocytogenes]	253	253	99%	1e-83	85%	
ACN21546.1	listeriolysin O precursor [Listeria monocytogenes]	253	253	99%	1e-83	85%	
AFA26320.1	listeriolysin O [Listeria monocytogenes]	253	253	99%	1e-83	85%	
ADX21055.1	listeriolysin O [Listeria monocytogenes] >gb ADX21057.1  li	253	253	99%	1e-83	85%	
ADX21055.1	listeriolysin O [Listeria monocytogenes]	253	253	99%	1e-83	85%	
ACM43569.1	listeriolysin O precursor [Listeria monocytogenes]	253	253	99%	1e-83	85%	
ACM43527.1	listeriolysin O precursor [Listeria monocytogenes]	253	253	99%	1e-83	85%	
AAS84872.1	Hly [Listeria monocytogenes] >gb AAS85364.1  Hly [Listeri.	253	253	99%	1e-83	85%	
AB937173.1	listeriolysin O [Listeria monocytogenes]	253	253	99%	1e-83	85%	
YP_012823.1	hly gene product [Listeria monocytogenes serotype 4b str.	253	253	99%	1e-83	85%	G

Şekil 3.22. BLAST analizi ile elde edilen sonuçlar (702 bç)



Şekil 3.23. Dizi analizi sonucunda elde edilen pikler (702 bç)

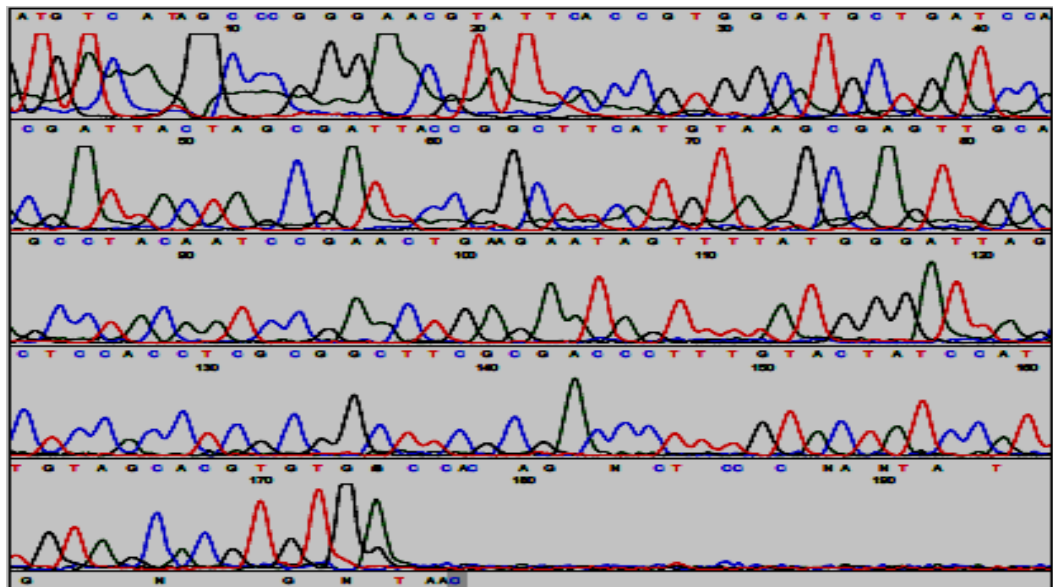
### 3.10.2. 209 bç için geri primer NE2 ile yapılan analiz sonucu

Dizi analizi ile elde edilen dizi bilgisi

ATGTCATAGCCCGGGAACGTATTACCGTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCG  
ATTACCGGCTTCATGTAAGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAAGAATAGTT  
TTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTCGCGACCCTTTGFACTATCCATTGTAG  
CACGTGTGAGCCACAGNCTCCCNANTATGNGNTAAC

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
U084150.1	Listeria monocytogenes 16S ribosomal RNA gene, partial seq	281	281	100%	2e-75	98%
FR220325.1	Listeria monocytogenes serotype 7 str. SLCC2482 complete	229	1679	100%	7e-75	98%
FR233651.1	Listeria monocytogenes strain SLCC2376, serotype 4c	229	1679	100%	7e-75	98%
FR233650.1	Listeria monocytogenes strain SLCC7179, serotype 3a	229	1674	100%	7e-75	98%
FR233649.1	Listeria monocytogenes strain SLCC2479, serotype 3c	229	1679	100%	7e-75	98%
FR233648.1	Listeria monocytogenes strain SLCC2372, serotype 1/2c	229	1679	100%	7e-75	98%
FR233647.1	Listeria monocytogenes strain SLCC5850, serotype 1/2a	229	1679	100%	7e-75	98%
FR233646.1	Listeria monocytogenes strain SLCC2755, serotype 1/2b	229	1679	100%	7e-75	98%
FR233645.1	Listeria monocytogenes strain SLCC2540, serotype 3b	229	1679	100%	7e-75	98%
FR233644.1	Listeria monocytogenes strain SLCC2378, serotype 4e	229	1679	100%	7e-75	98%
FR233643.1	Listeria monocytogenes strain ATCC 19117, serotype 4d	229	1679	100%	7e-75	98%
CP003414.1	Listeria monocytogenes 07PF0776, complete genome	229	1679	100%	7e-75	98%
JF967620.1	Listeria welshimeri strain ATCC 43550 16S ribosomal RNA ge	229	279	100%	7e-75	98%
JF967621.1	Listeria monocytogenes strain ATCC 19118 16S ribosomal R	229	279	100%	7e-75	98%
JF967622.1	Listeria monocytogenes ATCC 19117 16S ribosomal RNA ger	229	279	100%	7e-75	98%
JF967620.1	Listeria monocytogenes strain ATCC 19114 16S ribosomal R	229	279	100%	7e-75	98%
JF967619.1	Listeria monocytogenes strain ATCC 19113 16S ribosomal R	229	279	100%	7e-75	98%
JF967618.1	Listeria monocytogenes strain ATCC 19112 16S ribosomal R	229	279	100%	7e-75	98%
JF967617.1	Listeria monocytogenes strain ATCC 13932 16S ribosomal R	229	279	100%	7e-75	98%
CP002004.1	Listeria monocytogenes Finland 1998, complete genome	229	1679	100%	7e-75	98%

Şekil 3.24. BLAST analizi ile elde edilen sonuçlar (209 bç).



Şekil 3.25. Dizi analizi sonucunda elde edilen pikler (209 bç)

### 3.11. Elektrokimyasal DNA Sensörü İle Mikroorganizma Tayini

Bu çalışmada, gıda maddeleri içerisindeki *Listeria* türlerinin tayin edilmesi amacı ile elektrokimyasal DNA sensörü bir diğer deyişle genosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. DNA sensör çalışmaları sırasında, yalnızca *Listeria monocytogenes* türüne özgü olan *hlyA* genine ait 702 bç uzunluğundaki fragment ve *Listeria* cinsine dahil tüm türlerde ortak olan 16S RNA genine ait 209bç uzunluğundaki fragment kullanılmıştır. Daha önce anlatıldığı gibi uygulanan prosedür; elektrot yüzeyine immobilize edilen 1,8 µmol/l inosin modifiye prob dizisi ile hedef bölgelerin (38 µg/ml) hibridizasyonundan sonra guanin oksidasyonunun diferansiyel puls voltametik transdüksiyonuna dayanmaktadır.

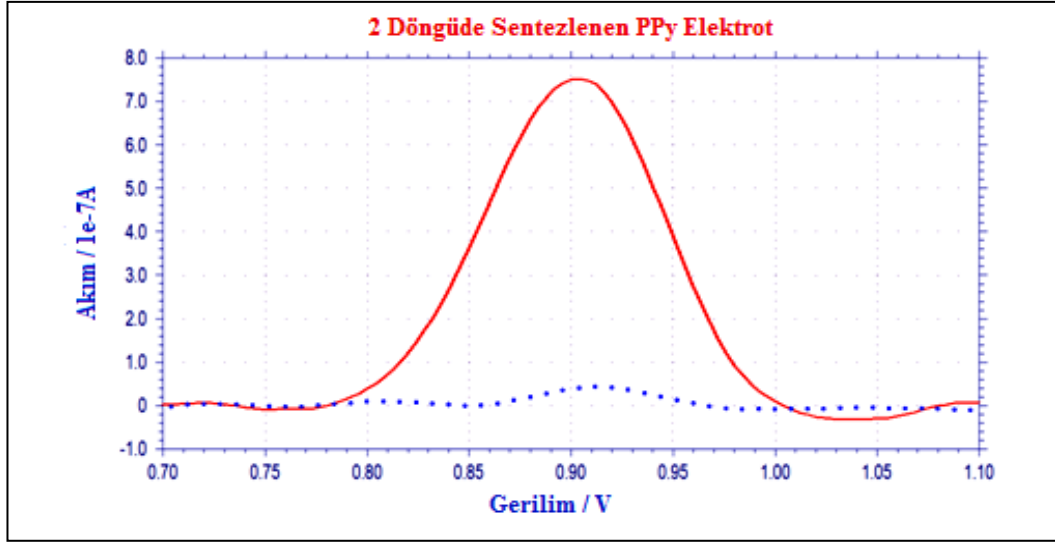
#### 3.11.1. 702bç uzunluğundaki DNA fragmenti ile yapılan çalışmalar

Elektrokimyasal tayin için kullanılacak olan 702 bç uzunluğundaki *hlyA* gen fragmenti daha önce anlatıldığı şeklide çoğaltılmış ve saflaştırılmıştır. Daha sonra son ürün DNA/RNA içermeyen su içerisinde çözdürülmüş ve son ürün konsantrasyonu ile saflığı nanodrop ile belirlenmiştir. 3 paralel olarak tekrarlanan çalışmalar, iki ve dört döngüde kaplama yapılan elektrotlar ve işlem görmüş kalem ucu elektrotlar için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

##### 3.11.1.1. İki döngüde kaplama yapılarak sentezlenen PPy elektrotlar ile elde edilen sinyaller

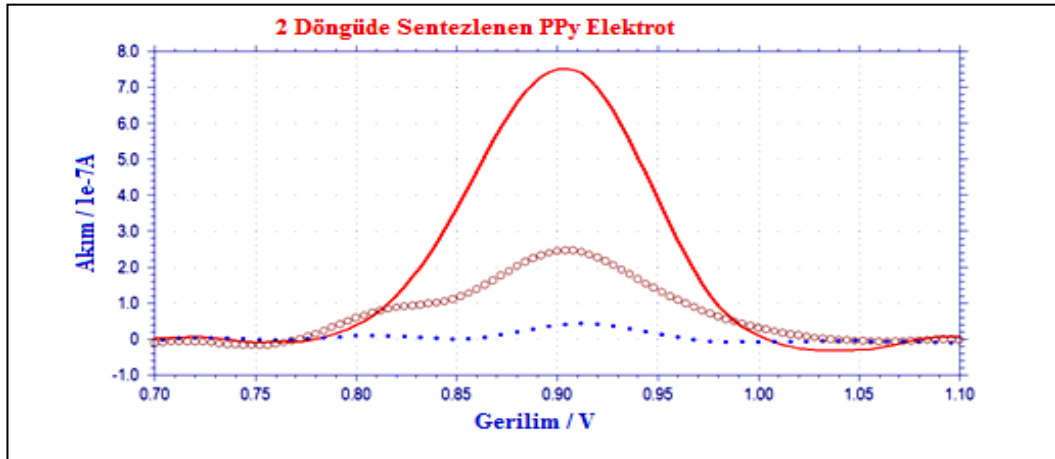
2 döngüde kaplama yapılarak sentezlenmiş PPy elektrotlar ile yapılan çalışmalarda elde edilen voltamogramlar Şekil 3.26.'da görülmektedir. Yalnızca prob immobilizasyonu gerçekleştirilmiş elektrotlarda yaklaşık 0,90 V civarında çok küçük bir yükseltgenme piki (41,3 nA) gözlenmiştir. Bununla birlikte pozitif dizi ile hibridizasyona alınmış modifiye elektrotlarda ise yaklaşık 0,90 V civarında ve prob bağlı elektrot ile elde edilen voltamograma göre yaklaşık 18 kat daha büyük (754,2 nA) bir yükseltgenme piki gözlenmiştir.





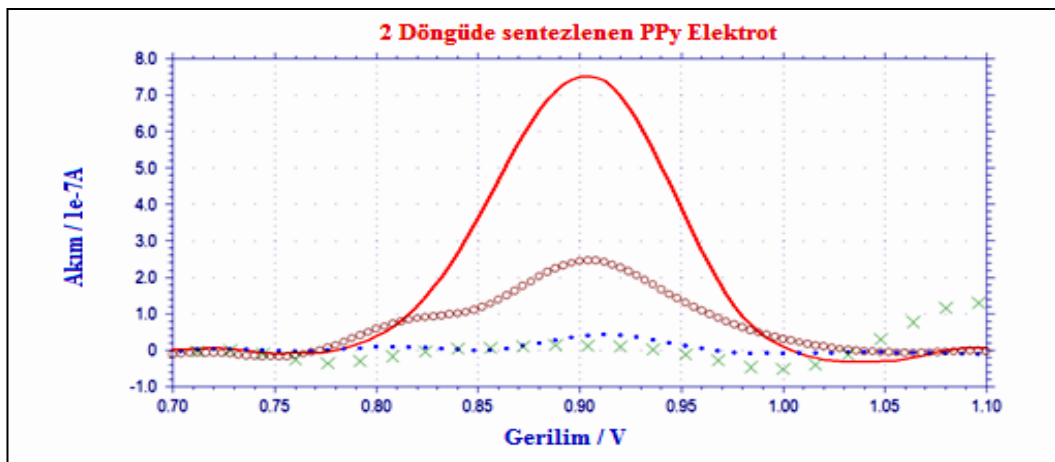
**Şekil 3.26.** 2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile pozitif hibridizasyon voltamogramı. Kırmızı düz çizgi; pozitif kontrol dizisi ile hibridize edilmiş elektrot ve mavi kesikli çizgi; prob bağlı elektrot

Aşağıdaki voltamogramda (Şekil 3.27), prob ve pozitif dizi ile hibridize olmuş elektrotların yanı sıra, saflaştırılmış DNA fragmenti ile hibridize edilmiş elektrotlardan alınan yükseltgenme pikleri de yer almaktadır.



**Şekil 3.27.** 2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile *hlyA* gen fragmentinin hibridizasyonu. Kırmızı düz çizgi; pozitif kontrol dizisi ile hibridize edilmiş elektrot, mavi kesikli çizgi; prob bağlı elektrot, kahverengi daireler; DNA fragmenti ile hibridize edilmiş elektrot.

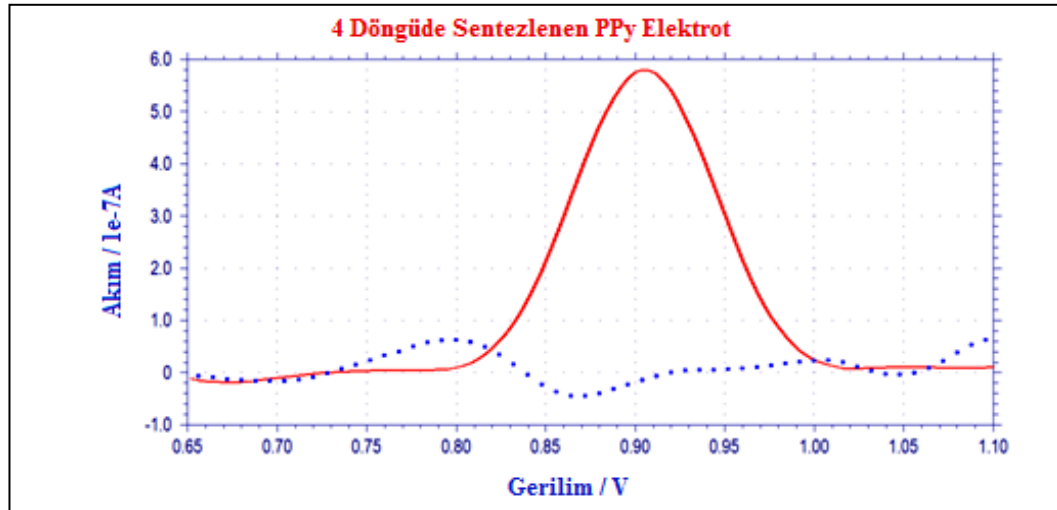
Yapılan değerlendirme sonucunda, saflaştırılmış DNA ile hibridizasyona tabi tutularak modifiye edilmiş elektrotlar prob dizisi ile kıyaslandığında pik potansiyellerinin aynı gerilim aralığında olduğu, bununla beraber akım değerinin yaklaşık altı (6) kat arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, saflaştırılmış DNA fragmenti ve pozitif kontrol dizisi ile modifiye edilen iki elektrot çeşidi birbirleri ile karşılaştırıldığında; daha önceden tahmin edildiği gibi elektrotların pik potansiyellerinin aynı gerilim değerinde olduğu, ancak pozitif kontrol dizisi ile modifiye edilen elektrotlardan elde edilen yükseltgenme pik akım değerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Daha önce anlatıldığı üzere; pozitif kontrol dizisi, prob dizisi ile bire bir eşleşen DNA fragmenti olduğu için prob ve pozitif dizi hibridizasyon sırasında birbir eşleşmektedir. Bununla birlikte laboratuvar ortamında saflaştırılmış olan DNA fragmenti 702 bp uzunluğunda olup hibridizasyon prob dizisinin eşleniği olan 21 baz uzunluğundaki kısmı ile gerçekleşmektedir. Bu durumun daha önce anlatılan protokolde yer alan yıkama basamaklarında saflaştırılmış DNA ile modifiye elektrotlarda hibridize olmuş DNA kaybına yol açtığı düşünülmektedir. Bu nedenle pozitif kontrol dizisine kıyasla, saflaştırılmış ürünler ile hibridize edilmiş elektrotlardan daha düşük pik akımı elde edilmesi beklenen bir durumdur.



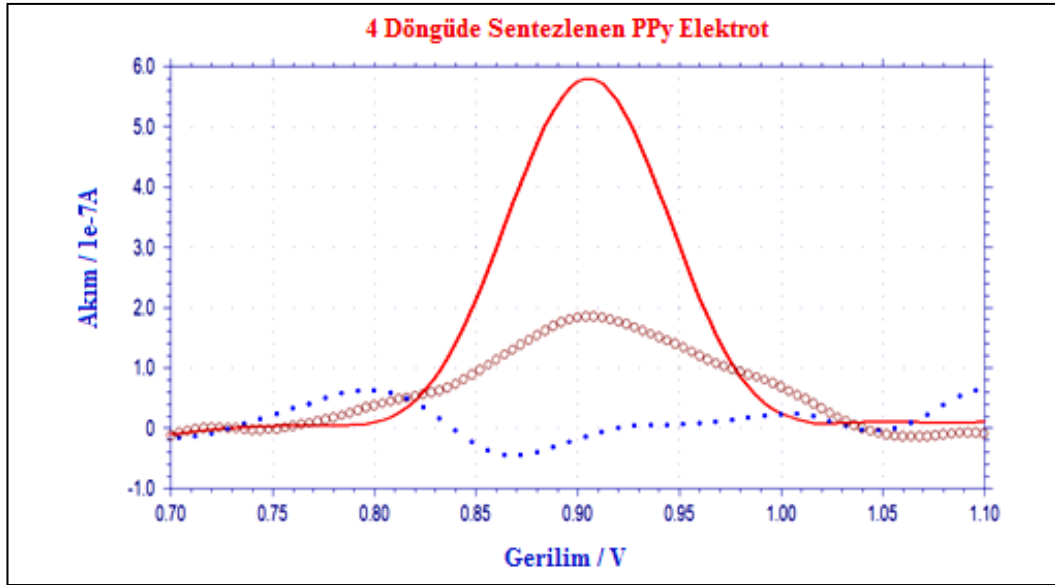
**Şekil 3.28.** 2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile *hlyA* gen fragmenti tayini için elde edilen voltamogramlar. Kırmızı düz çizgi; pozitif kontrol dizisi ile hibridize edilmiş elektrot, mavi kesikli çizgi; prob bağlı elektrot, kahverengi daireler; DNA fragmenti ile hibridize edilmiş elektrot ve yeşil çarpı işaretleri; negatif kontrol elektrotu

Elde edilen sonuçların hibridizasyon sırasında kullanılan tampon çözelti kaynaklı olup olmadığını doğrulamak amacı ile prob dizisi de dahil olmak üzere tamamen DNA içermeyen ortamda aynı şekilde elektrotlar sentezlenmiş, boş tampon çözeltisi ile muamele edilmiş ve elektrotun davranışı incelenmiştir (Şekil 3.28). Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, negatif kontrol grubu olarak adlandırılan bu elektrotların prob bağlı elektrotlar ile benzer davranış sergilediği gözlemlenmiştir. Tamamen DNA içermeyen ortamda sentezlenmiş olan bu elektrotlarda yükseltgenme pikinin gözlemlenmemesi pozitif dizi ve saflaştırılmış DNA ürünü ile modifiye edilen elektrotlarda görülen yükseltgenme pikinin DNA kökenli olduğunu ve herhangi bir çözelti etkisinin bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca negatif kontrol grubu ve prob dizisinin benzer davranış, pozitif kontrol grubu ve saflaştırılmış DNA ürünü içeren elektrotların benzer davranış göstermesi DNA kökenli yükseltgenme pikinin DNA'da bulunan guanin bazından kaynaklandığını ispatlamaktadır.

### 3.11.1.2. Dört döngüde kaplama yapılarak sentezlenen PPy elektrotlar ile elde edilen sinyaller



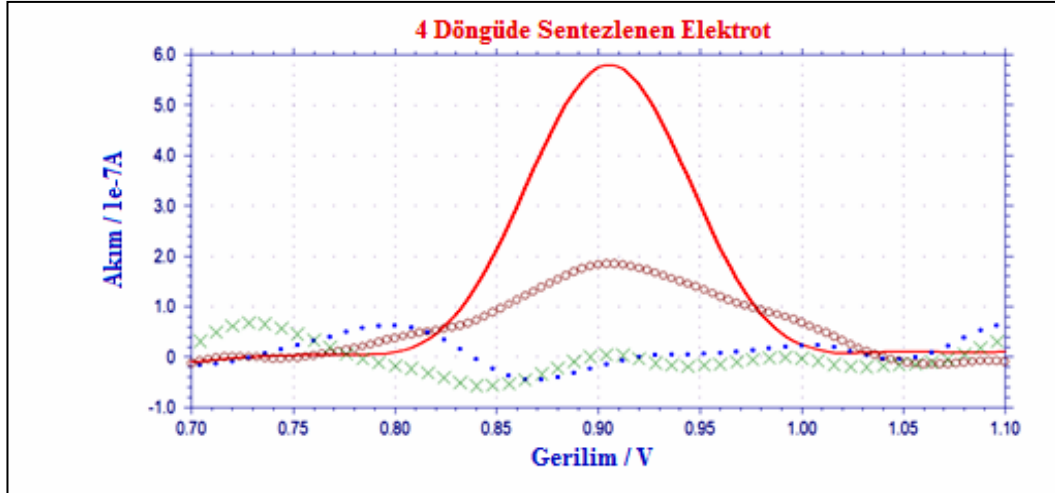
**Şekil 3.29.** 4 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile pozitif hibridizasyon voltamogramı Kırmızı düz çizgi; pozitif kontrol dizisi ile hibridize edilmiş elektrot ve mavi kesikli çizgi; prob bağlı elektrot



**Şekil 3.30.** 4 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile *hlyA* gen fragmentinin hibridizasyonu. Kırmızı düz çizgi; pozitif kontrol dizisi ile hibridize edilmiş elektrot, mavi kesikli çizgi; prob bağlı elektrot, kahverengi daireler; DNA fragmenti ile hibridize edilmiş elektrot

Şekil 3.29 ve Şekil 3.30’da verilen her iki voltamogram sonucuna dayanarak 2 ve 4 döngüde Ppy kaplama yapılarak sentezlenen elektrotların benzer davranışlar sergilediği sonucuna ulaşılmıştır. 4 döngüde Ppy ile kaplanan elektrota prob bağlanması sonucu elde edilen voltamogramda negatif akım (-18,45 nA) akım değeri gözlenirken, pozitif dizi ile hibridizasyona alınmış elektrotlarda 0,90 V civarında, 581,4 nA değerinde bir yükseltgenme piki gözlenmiştir. Benzer şekilde saflaştırılmış DNA fragmenti ile hibridize edilmiş elektrotlardan alınan voltamogramda 188,5 nA değerinde bir yükseltgenme piki elde edilmiştir.

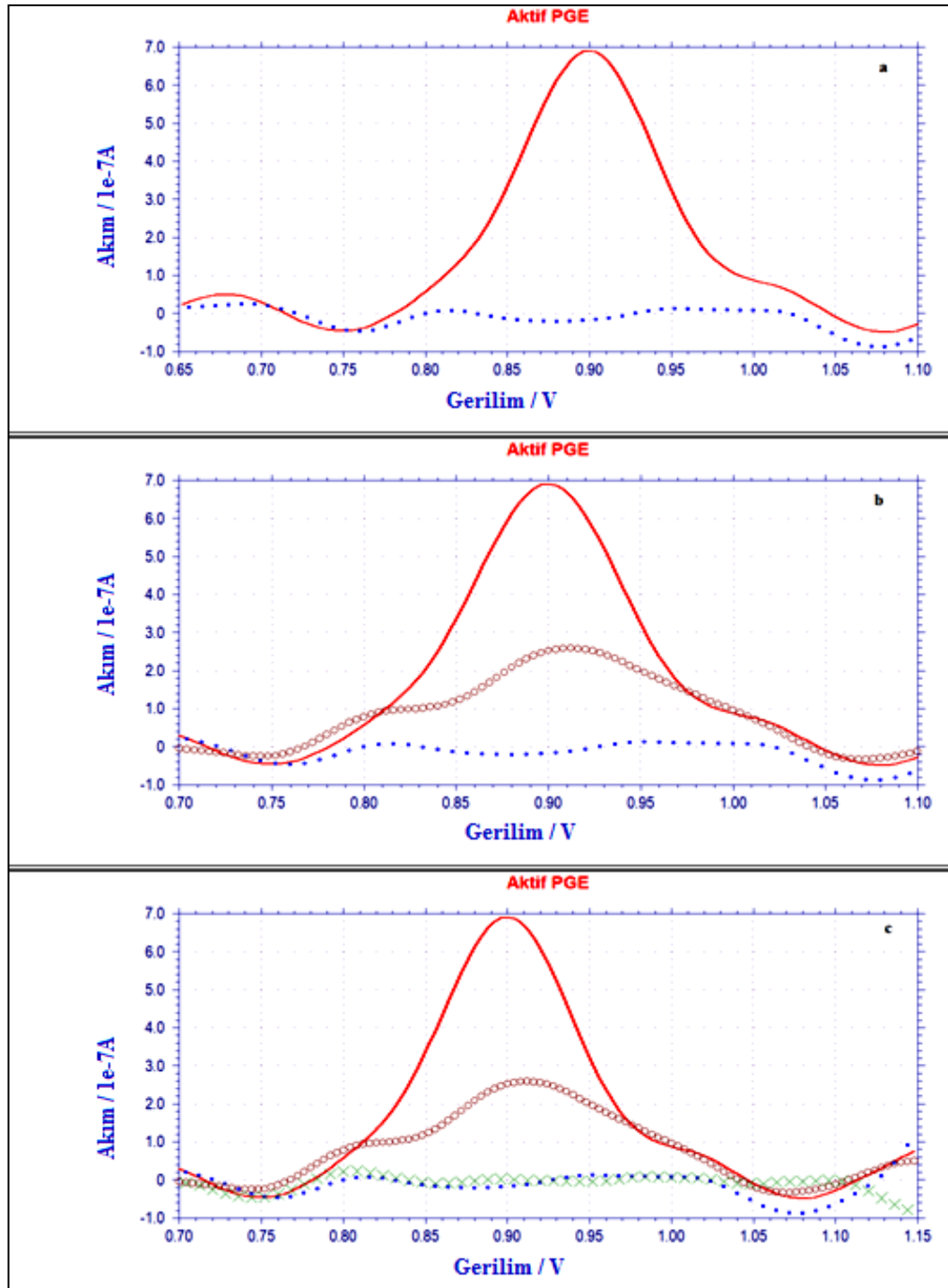
Yine 2 döngüde sentezlenen elektrotlarda olduğu gibi bu elektrot grubunda da DNA içermeyen solüsyonlarda negatif kontrol elektrotları sentezlenmiş ve bu elektrotlar ile alınan voltamogramlarda pik akım artışı gözlemlenmemiştir. Negatif kontrol elektrotu ile elde edilen voltamogram Şekil 3.31’ de gösterilmiştir.



**Şekil 3.31.** 4 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile *hlyA* gen fragmenti tayini için elde edilen voltamogramlar. Kırmızı düz çizgi; pozitif kontrol dizisi ile hibridize edilmiş elektrot, mavi kesikli çizgi; prob bağlı elektrot, kahverengi daireler; DNA fragmenti ile hibridize edilmiş elektrot ve yeşil çarpı işaretleri; negatif kontrol elektrotu

### 3.11.1.3. Aktive edilmiş PGE elektrotlar ile elde edilen sinyaller

PPy kaplama yapılmadan kullanılan PGE elektrotlarda probun yüzeye tutunmasını sağlamak amacı ile elektrokimyasal ön işlem uygulanmıştır. Ardından prob bağlama ve hibridizasyon aşamalarında diğer 2 elektrot grubu ile aynı şekilde işlem gören elektrotların voltametrik davranışları incelenmiştir. Diğer 2 tip elektrot grubu ile aynı şekilde elektrokimyasal ön işlem görmüş PGE elektrotlarda da yalnızca prob bağlı, pozitif dizi ile hibridizasyona alınarak modifiye edilmiş, saflaştırılmış DNA ürünü ile hibridizasyona alınarak modifiye edilmiş ve DNA içermeyen solüsyonlarda negatif kontrol elektrotları sentezlenmiştir. Şekil 3.32’de verilen a, b, c voltamogramlarında sırasıyla, pozitif dizi ile hibridize DNA taşıyan elektrotun, saflaştırılmış DNA ile hibridize elektrotun davranışları ve son olarak da kontrol grubu ile birlikte alınan voltamogram görülmektedir.



**Şekil 3.32.** Aktif PGE elektrotlar ile *hlyA* gen fragmenti tayini için elde edilen voltamogramlar. Kırmızı düz çizgi; pozitif kontrol dizisi ile hibridize edilmiş elektrot, mavi kesikli çizgi; prob bağlı elektrot, kahverengi daireler; DNA fragmenti ile hibridize edilmiş elektrot ve yeşil çarpı işaretleri; negatif kontrol elektrotu

Aktifleştirilmiş PGE elektrotlar ile yapılan çalışma sonucunda, prob bağlanmış elektrotlarda 0,90 V'da negatif akım değeri (-18,01 nA) gözlenirken, pozitif dizi ile hibridizasyona alınmış elektrotlarda pik akımı değeri 689,3 nA olan bir yükseltgenme piki elde edilmiştir. Diğer bir deyişle prob bağlı elektrota kıyasla, pozitif dizi ile hibridize edilmiş olan modifiye elektrotlarda aynı potansiyelinde pik akımı yaklaşık olarak otuz sekiz (38) kat artış göstermiştir. Saflaştırılmış DNA kullanımı durumunda ise yükseltgenme pikinde yaklaşık 10 mV'luk bir kayma gözlenmiş ve prob bağlı elektrota kıyasla akım değeri 14 kat artmıştır.

**Çizelge 3.4.** Kullanılan farklı elektrotlar ile elde edilen guanine ait yükseltgenme pik akım değerleri (702 bç uzunluğundaki fragment için)

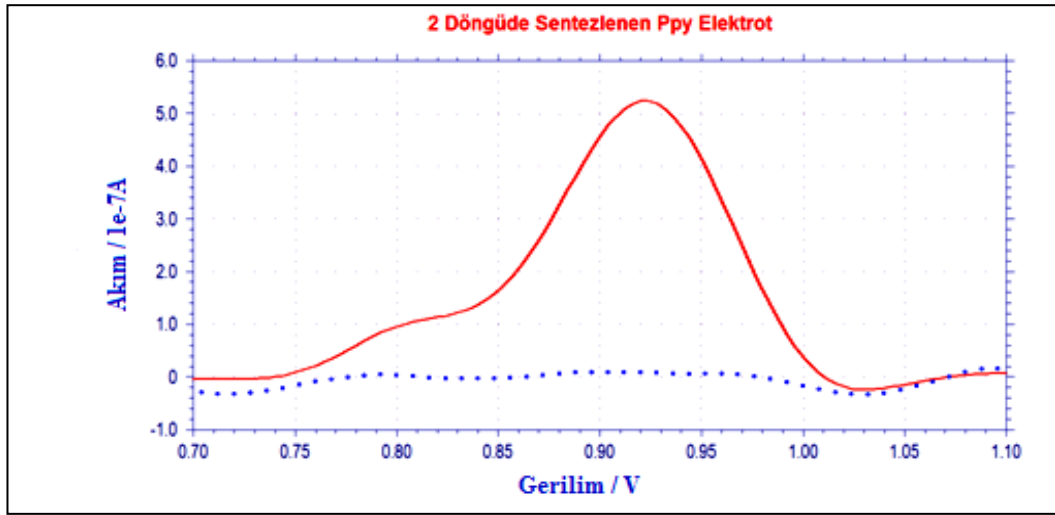
	<b>2Dön. Ppy</b> <b>(nA)</b>	<b>4Dön. Ppy</b> <b>(nA)</b>	<b>Aktif PGE</b> <b>(nA)</b>
<b>Prob bağlı elektrotlar</b>	41,36	-18,45	-18,01
<b>Negatif kontrol grubu</b>	15,32	3,9	0,429
<b>Pozitif kontrol grubu</b>	754	581,4	689,3
<b>Deney grubu</b>	249	188,5	259

Çizelge 3.4.'de yapılan çalışmalar ve tekrar denemeleri sonucunda elde edilen maksimum pik akım değerleri gösterilmektedir. Tablodaki veriler değerlendirildiğinde, prob bağlı elektrotlara kıyasla maksimum akım artışı 38 katlık bir artışla aktif elektrot grubunda görülmektedir. Ayrıca elde edilen akım değerleri incelendiğinde, pozitif kontrol grupları ve saflaştırılmış ürün grupları arasında benzer bir sıralama olduğu gözlenmiştir. Diğer bir deyişle, pozitif kontrol grupları arasında 38 katlık bir artışla gözlenen aktif elektrot grubunun, saflaştırılmış DNA fragmenti ile yapılan çalışmalarda da en iyi sonucu verdiği görülmüştür. Üç ayrı elektrot grubu ile yapılan çalışmaların birlikte değerlendirilmesi ve pozitif kontrol grupları ile deney grupları arasındaki uyum kullanılan sistemin doğruluğuna işaret etmektedir.

### 3.11.2. 209 bç uzunluğundaki DNA fragmenti ile yapılan çalışmalar

702 bç uzunluğundaki DNA fragmenti için uygulanan çalışma protokolü aynı şekilde 209 bç uzunluğunda olan ve tüm *Listeria* türlerinde korunmuş olarak bulunan DNA fragmenti için de uygulanmıştır. Yapılan çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiş olup yalnızca pik akım değerleri arasında farklılıklar gözlemlenmiştir.

#### 3.11.2.1. İki döngüde kaplama yapılarak sentezlenen PPy elektrotlar ile elde edilen sinyaller

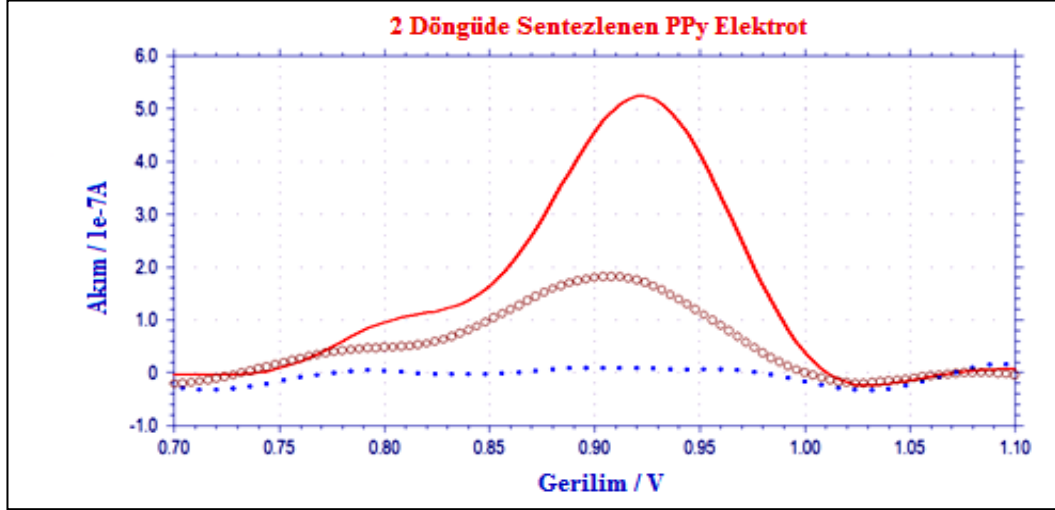


**Şekil 3.33.** 2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile pozitif hibridizasyon. Kırmızı düz çizgi; pozitif kontrol dizisi ile hibridize edilmiş elektrot ve mavi kesikli çizgi; prob bağlı elektrot

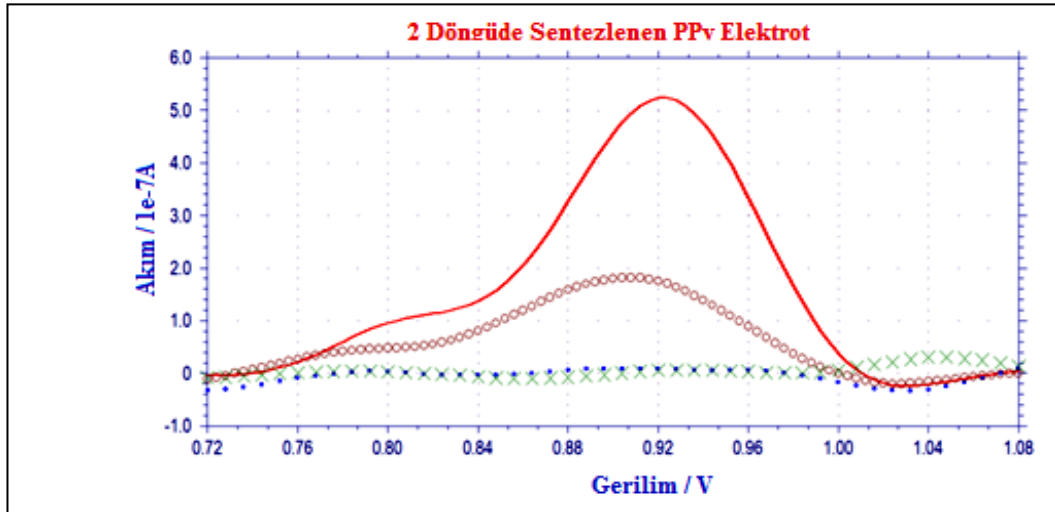
2 döngüde PPy kaplama yapılarak sentezlenen aşırı yükseltgenmiş elektrotlar ile yapılan çalışma sonucunda elde edilen voltamogramlara göre; prob bağlanmış elektrotlarda 0,920 V'da 4,963 nA akım değerinde yükseltgenme piki gözlemlenmiştir. Pozitif dizi ile hibridizasyona alınmış elektrotlarda pik akımı yüz beş (105) kat artarak 524,6 nA değerine yükselmiştir (Şekil 3.33). Saflaştırılmış DNA kullanımı durumunda ise pik potansiyelinde yaklaşık 10 mV civarında bir kayma gözlenmekte ve pik akım değeri 183,3 nA'ya düşmektedir (Şekil 3.34).



Sistemin sağlamlasını yapmak amacı ile kullanılan negatif kontrol elektrotlarda ise aynı gerilim değerinde pik gözlenmemiştir (Şekil 3.35).



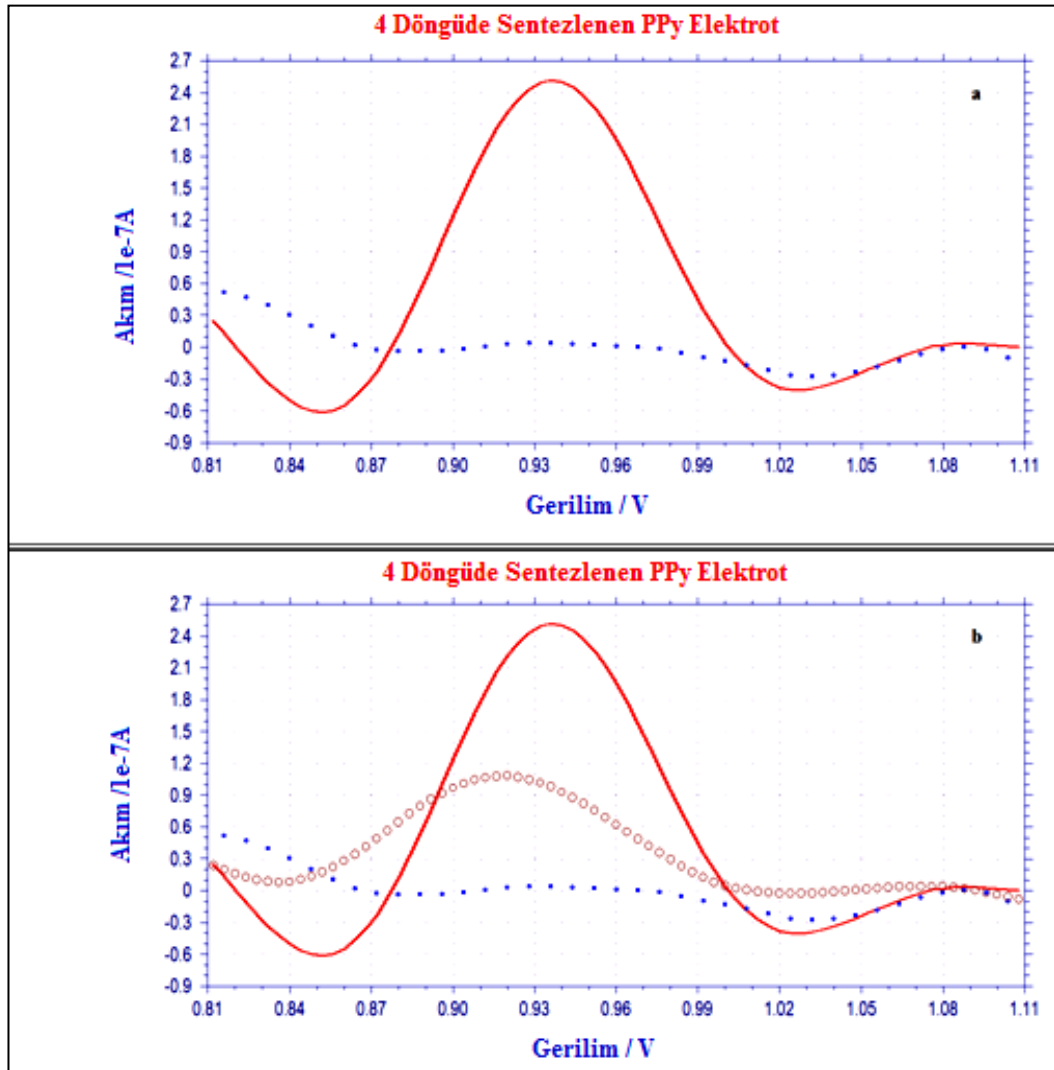
Şekil 3.34. 2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile 16S RNA gen fragmentinin hibridizasyonu. Kırmızı düz çizgi; pozitif kontrol dizisi ile hibridize edilmiş elektrot, mavi kesikli çizgi; prob bağlı elektrot ve kahverengi daireler; DNA fragmenti ile hibridize edilmiş elektrot



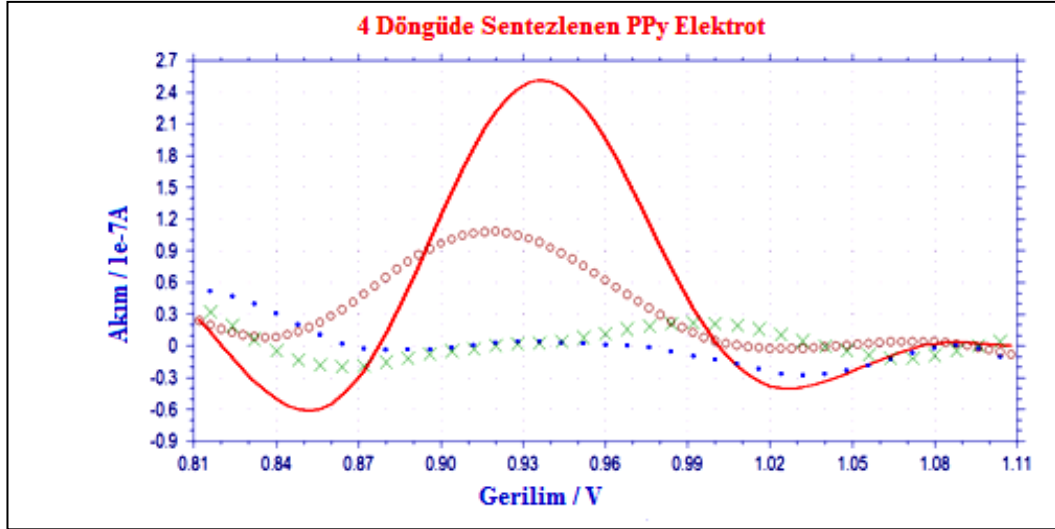
Şekil 3.35. 2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile 16S RNA gen fragmenti tayini için elde edilen voltamogramlar. Kırmızı düz çizgi; pozitif kontrol dizisi ile hibridize edilmiş elektrot, mavi kesikli çizgi; prob bağlı elektrot, kahverengi daireler; DNA fragmenti ile hibridize edilmiş elektrot ve yeşil çarpı işaretleri; negatif kontrol elektrotu

### 3.11.2.2 Dört döngüde Ppy kaplama yapılarak sentezlenen elektrotlar ile elde edilen sinyaller

Şekil 3.36 ve Şekil 3.37’de verilen voltamogramlarda sırasıyla, pozitif dizi ile hibridize DNA taşıyan elektrotun davranışı, saflaştırılmış DNA ile hibridize elektrotun davranışı, son olarak da kontrol grubu ile birlikte alınan ölçümler gösterilmektedir.



**Şekil 3.36.** 4 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile 16S RNA gen fragmentinin hibridizasyonu. Kırmızı düz çizgi; pozitif kontrol dizisi ile hibridize edilmiş elektrot, mavi kesikli çizgi; prob bağlı elektrot ve kahverengi daireler; DNA fragmenti ile hibridize edilmiş elektrot

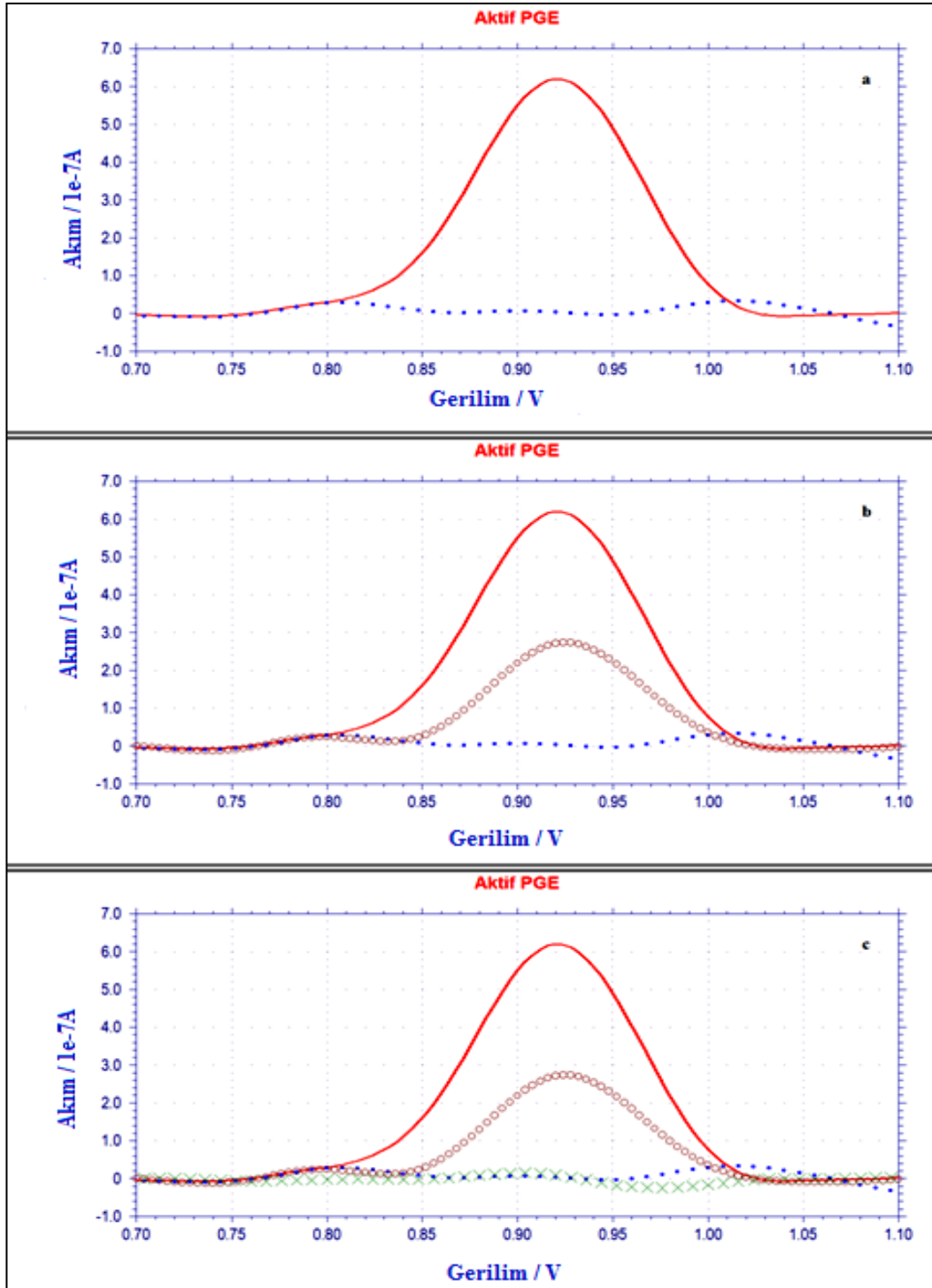


**Şekil 3.37.** 2 döngüde sentezlenen PPy elektrotlar ile 16S RNA gen fragmenti tayini için elde edilen voltamogramlar. Kırmızı düz çizgi; pozitif kontrol dizisi ile hibridize edilmiş elektrot, mavi kesikli çizgi; prob bağlı elektrot, kahverengi daireler; DNA fragmenti ile hibridize edilmiş elektrot ve yeşil çarpı işaretleri; negatif kontrol elektrotu

4 döngüde PPy kaplama yapılarak sentezlenmiş elektrotlar ile yapılan çalışma sonucunda, prob bağlanmış elektrotlarda 2,093 nA olan pik akım değerinin pozitif kontrol dizisi ile hibridizasyona tabi tutulan elektrotlarda yaklaşık yüz yirmi (120) kat artarak 251,7 nA değerine ulaştığı gözlenmiştir. Ayrıca saflaştırılmış DNA kullanımı durumunda pik potansiyel değerinde yaklaşık olarak 10 mV'luk bir kaymanın olduğu ve pik akımının 109,3 nA değerine düştüğü görülmüştür.

### 3.11.2.3. Aktive edilmiş PGE elektrotlar ile elde edilen sinyaller

Şekil 3.38'deki voltamogramlarda da görüldüğü üzere aktifleştirilmiş PGE elektrotlar ile yapılan çalışmada da, prob içeren elektrotlarda 0,8-1,0 V aralığında herhangi bir pik gözlenmezken, hibridize DNA fragmenti içeren elektrotlarda 0,92 V'da 621,9 nA değerinde bir oksidasyon piki yani yaklaşık olarak iki yüz elli sekiz (258) katlık bir akım artışı gözlenmiştir. Saflaştırılmış DNA kullanımı durumunda ise pik akımı 277,6 nA değerinde bulunmuştur.

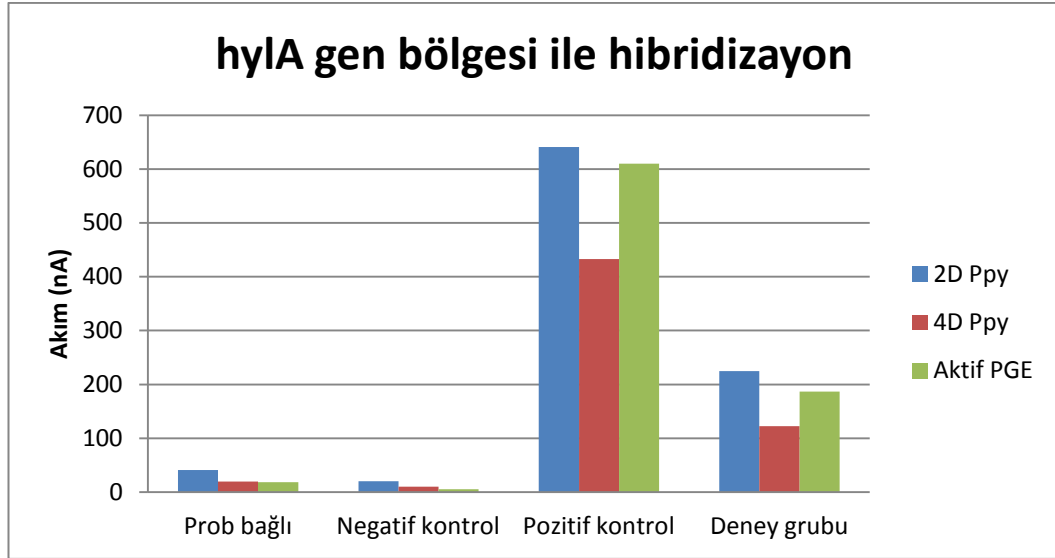


**Şekil 3.38.** Aktif PGE elektrotlar ile 16S RNA gen fragmenti tayini için elde edilen voltamogramlar. Kırmızı düz çizgi; pozitif kontrol dizisi ile hibridize edilmiş elektrot, mavi kesikli çizgi; prob bağlı elektrot, kahverengi daireler; DNA fragmenti ile hibridize edilmiş elektrot ve yeşil çarpı işaretleri; negatif kontrol elektrotu

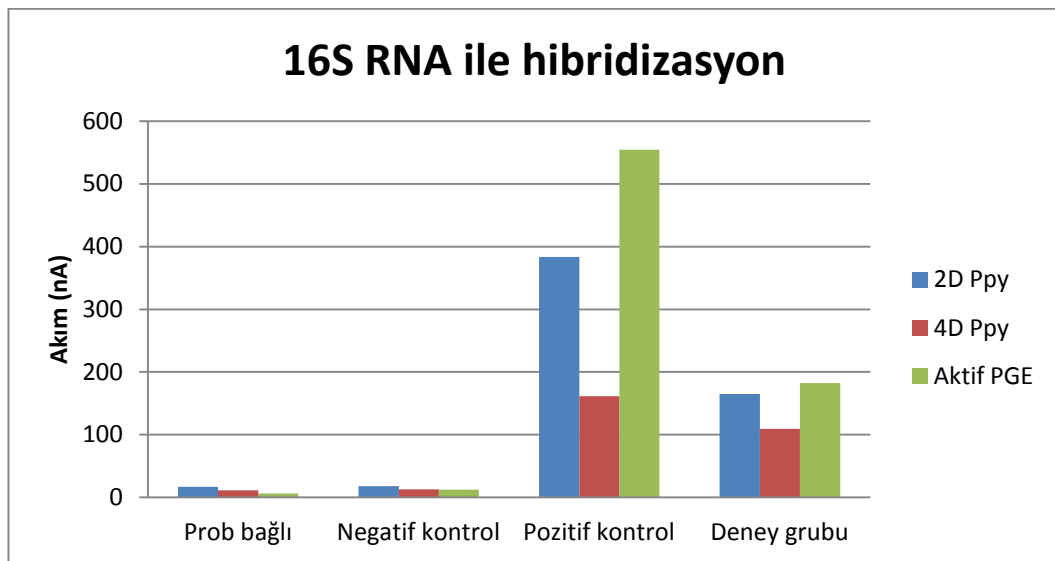
**Çizelge 3.5.** Kullanılan farklı elektrotlar ile elde edilen guanine ait yükseltgenme pik akım değerleri (209 bç uzunluğundaki fragment için)

	<b>2Dön. PPy</b> (nA)	<b>4Dön. PPy</b> (nA)	<b>Aktif PGE</b> (nA)
<b>Prob bağlı elektrotlar</b>	4,963	2,093	2,410
<b>Negatif kontrol grubu</b>	4,960	1,06	5,540
<b>Pozitif kontrol grubu</b>	524,6	251,7	621,9
<b>Deney grubu</b>	183,3	109	277,6

Çizelge 3.5.'de yapılan çalışmalar ve tekrar denemeleri sonucunda elde edilen maksimum pik akım değerleri gösterilmektedir. Çizelgedeki veriler değerlendirildiğinde prob bağlı elektrotlara kıyasla maksimum akım artışı iki yüz elli sekiz (258) katlık bir artışla aktif elektrot grubunda görülmektedir. 702 bç uzunluğundaki fragment ile yapılan çalışmaya benzer olarak, 209 bç uzunluğundaki fragment ile yapılan çalışmada da pozitif kontrol grupları ve saflaştırılmış ürün grupları arasında benzer bir sıralama olduğu gözlenmiştir. Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'de yer alan maksimum pik akım değerleri kıyaslandığında pik akım değerleri kullanılan elektrot ve pozitif kontrole göre değişikli göstermektedir. 702 bç uzunluğundaki fragment ile yapılan çalışmada maksimum pik akım değerleri 2döngü, 4 döngü ve aktif elektrotlar için sırasıyla; 249 nA, 188,5 nA ve 259 nA bulunurken 209 bç uzunluğundaki fragment ile yapılan çalışmada 183,3 nA, 109 nA ve 277 nA olarak bulunmuştur. Bu açıdan değerlendirme yapıldığında 702 bç ile yapılan çalışmalarda daha yüksek akım değerleri elde edilmiştir. Bununla birlikte 209 bç uzunluğundaki fragment ile yapılan çalışmada her ne kadar akım değerleri daha düşük bulunsa da proba göre değerlendirme yapıldığında bu grubun akım artışının, iki yüz elli sekiz kat (258), yüz yirmi (120) gibi daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu durum baz uzunluğu ve fragmentdeki guanine sayısı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 3.39.** *hlyA* gen bölgesi için elde edilen sonuçların histogram üzerinde değerlendirilmesi



**Şekil 3.40.** 16S RNA gen bölgesi için elde edilen sonuçların histogram üzerinde değerlendirilmesi

*Listeria* türlerinin tayin edilmesi amacı ile elektrokimyasal genosensör geliştirilmesi çalışmaları her bir deney grubu üç paralel olmak üzere 3 tekrarlı biçimde gerçekleştirilmiştir. Yukarıda Şekil 3.39 ve Şekil 3.40'da verilen iki histogram sırası ile *hlyA* gen bölgesi ve 16S RNA gen bölgesi ile yapılan çalışmaların ortalama değerleri alınarak hazırlanmıştır.

Buna göre farklı uzunluklardaki 2 gen fragmenti kendi içerisinde değerlendirildiğinde 702 bp uzunluğundaki *hlyA* gen bölgesi ile yapılan çalışmalarda en iyi sonuçlar 2 döngüde PPy ile kaplama yapılarak sentezlenen elektrotlardan elde edilmiştir. 2 döngü PPy elektrotlarda pozitif kontrol grubunda görülen guanine ait yükseltgenme piki prob bağlı elektrottan alınan pikin yaklaşık olarak on beş (15) katıdır ve pik akım değeri ortalaması 641 nA'dır. Aktif PGE de guanin yükseltgenme pik akım ortalaması 610 nA olarak bulunmuştur. En düşük pik akım değeri ise (433 nA) 4 döngüde PPy ile kaplama yapılarak sentezlenen elektrotlarda gözlenmiştir. Hedef bölge ile hibridizasyon sonrasında elde edilen guanine ait yükseltgenme pikinde de aynı sıralama mevcuttur; pik akım değerleri 2Dön. PPy, aktif PGE ve 4Dön PPy için sırasıyla 225 nA, 186,8 nA ve 122,7 nA'dır.

16S RNA gen bölgesi ile yapılan çalışmada ise en iyi sonuçlar aktif PGE ile elde edilmiştir. Pozitif kontrol gruplarında elde edilen pik akım değerleri en yüksekten en düşüğe doğru sırasıyla aktif PGE, 2Dön. PPy ve 4Dön. PPy için 554,366 nA, 383 nA ve 161,868 nA'dır. Prob bağlı elektrota kıyasla pozitif dizi ile hibridize edilmiş aktif PGE elektrotlarda pik akım değerinde 88 katlık bir artış gözlenmiştir. Bu değerler aynı sıralama ile deney gruplarında 182,233 nA, 165 ve 109,266 nA'dır.

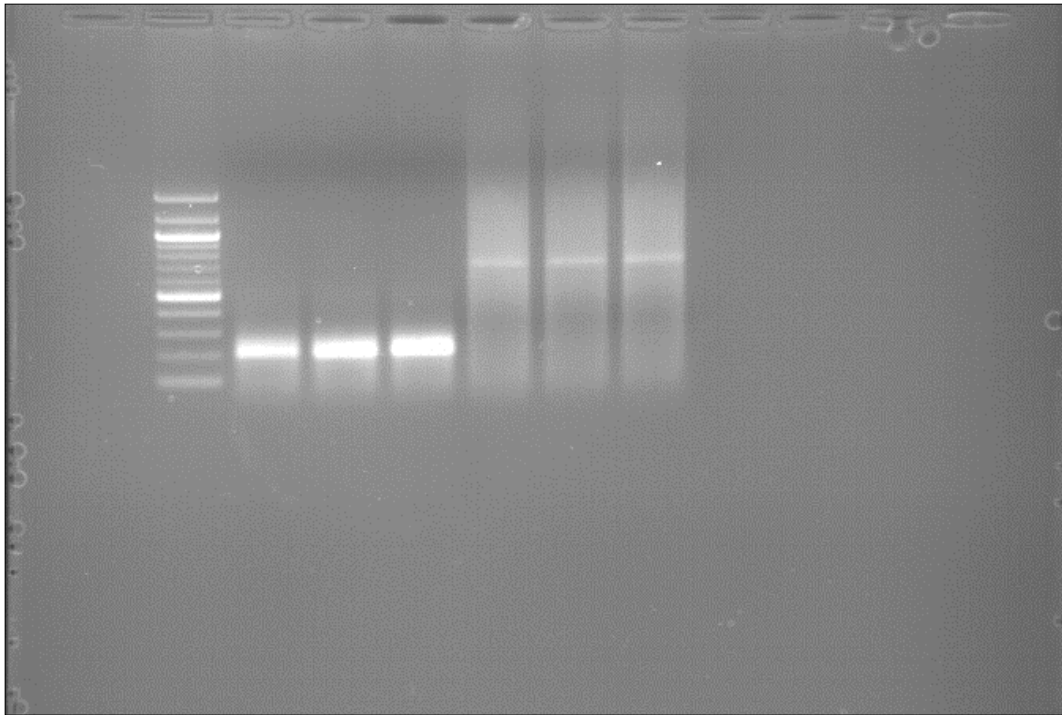
### 3.12. Gıda Örneklerinden *L. monocytogenes* Genomik DNA İzolasyonu

Daha önceki bölümlerde anlatıldığı gibi DNA sensör çalışmaları sırasında *Listeria monocytogenes* 4b 19115 kültürünün genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra, hedef bölgelerin PZR reaksiyonu ile çoğaltılması gerçekleştirilerek, çalışmalar için hedef analit elde edilmiştir. Bununla birlikte DNA sensör çalışmalarının gıda örneklerinde uygulanabilir olması için *L. monocytogenes* genomik DNA'sının gıda örneğinden ekstraksiyonun yapılabilir olması gerekmektedir.

Ekstraksiyon kit protokolünde yer alan bilgiler ışığında kontaminasyon olduğu düşünülen gıdanın 24-48 saat süre ile uygun bir ortamda ön zenginleştirme işlemine tabi tutulması gerekmektedir. Bu nedenle tayin yapılacak gıda örneği

olarak ELİZA ve VİDAS çalışmaları sırasında kullanılan süt örneği tercih edilmiştir. Her iki çalışmada da kullanılmak üzere sırasıyla 1 cfu/ml, 10cfu/ml ve 100 cfu/ml olacak şekilde canlı *Listeria monocytogenes* 4b 19115 kültürü ilave edilmiştir. Süt örneklerinden ön zenginleştirme işlemi tamamlandığı zaman, iki çalışmaya paralel olarak genomik DNA izolasyonu da gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen genomik DNA örneklerinden hem 702 bç uzunluğundaki fragment için hem de 209 bç uzunluğundaki fragment için daha önce belirlenmiş olan optimum PZR koşullarında reaksiyon kurularak hedef analitlerin laboratuvar ortamında üretilebilir oldukları teyit edilmiştir. Şekil 3.41’de verilmiş olan PZR sonuçları, gıdalardan genomik DNA ekstraksiyon kiti ile elde edilen DNA kalıp olarak kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

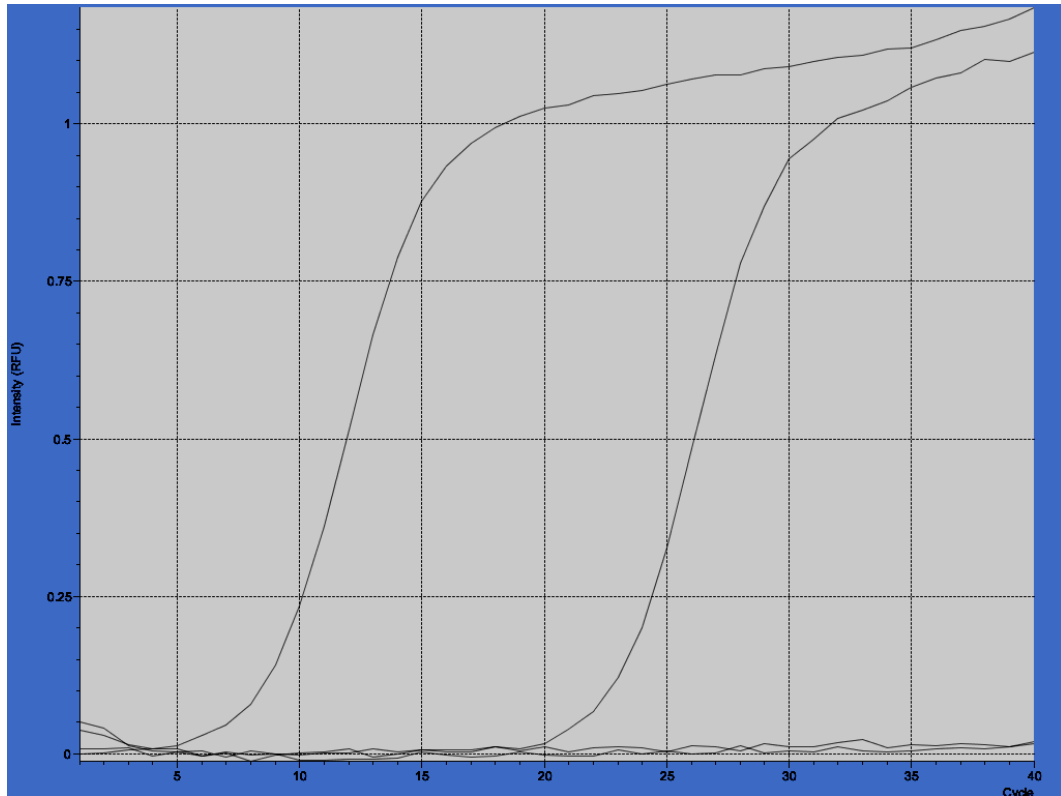


**Şekil 3.41.** DNA ekstraksiyon kiti ile süt ürününden saflaştırılmış olan DNA dan PZR (Marker, süt 1, süt 2, süt 3 için 200 bç fragmentin PZR ile çoğaltılması, süt 1, süt 2, süt 3 için 702 bç fragmentin PZR ile çoğaltılması)



### 3.13. RT-PZR ile *L. monocytogenes* Tayini

*Listeria spp.* Real Time PZR kiti ile yapılan tayin çalışmaları sırasında kalıp DNA olarak süt örneğinden izole edilmiş olan *L. monocytogenes* 4b 19115 kültürüne ait olduğu kabul edilen DNA kullanılmıştır. Sistemin sağlamlasını yapmak amacıyla yalnızca dH<sub>2</sub>O içeren bir tüp ve *Listeria* yerine *E. coli* genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılmak şartıyla diğer tüm bileşenler aynı olmak üzere bir reaksiyon daha çalışmalarda eş zamanlı olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak kalıp DNA yerine kit içeriğinde bulunan rekombinant pozitif kontrol eş hacimde kullanılarak reaksiyon kurulmuştur. Şekil 3.42'de de görüldüğü üzere pozitif kontrol ve *Listeria* DNA'sı kalıp olarak kullanıldığında logaritmik artış gözlemlenirken *E. coli* genomik DNA kalıp olarak kullanıldığı zaman herhangi bir sonuç elde edilememiştir.



**Şekil 3.42.** RT-PZR sonuçları; 5. Döngüden itibaren logaritmik artış gösteren grafik pozitif kontrol, 20 döngüden itibaren logaritmik artış gösteren grafik *L. monocytogenes* gDNA ile artış görülmeyen grafik *E. coli* gDNA ile kurulan reaksiyon

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Altı üyesi bulunan *Listeria* cinsine dahil olan türlerden yalnızca *L. monocytogenes*' in insanlarda ve *L. ivanovii*' nin diğer memelilerde çeşitli hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. Gıda kökenli bir patojen olarak bilinen *L. monocytogenes* nedeni ile oluşan hastalık genel olarak listeriosis olarak adlandırılmaktadır (Gasnov ve ark. 2005; Wagner ve McLauchlin 2008). Görülme sıklığı çok yüksek olmamakla birlikte ölüm oranı yüksek olduğundan dolayı organizma önemli gıda patojenleri arasında yer almakta ve gıdalarda tayini için farklı yöntemlere dayanan bir çok çalışma bulunmaktadır (Painter ve Slutsker 2007). Gıdalarda *L. monocytogenes* tayini için kullanılan yöntemler klasik yöntemlerden, API-*Listeria* test kitleri gibi identifikasyon kitlerine, ELİZA gibi immünoanaliz yöntemlerinden RT-PZR, PFGE gibi moleküler tabanlı yöntemlere kadar geniş çeşitlilik göstermektedir (Gianfranceschi ve ark. 2002; Corcoran ve ark. 2006; O'Connor ve ark. 2010).

Avrupa Gıda Güvenliği tarafından belirlenen kıstaslara göre *L. monocytogenes* için gıdanın 25 gramında var/yok analizi yapılması zorunludur ve yönetmeliğe göre *Listeria monocytogenes* için sıfır tolerans politikası geçerlidir (Yavuz ve Korukluoğlu 2010).

Türk Gıda Kodeksi tarafından 29.12.2011 tarihli, 28157 sayılı resmi gazetede yayınlanan Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğine göre, peynir, kaymak, krema gibi süt ve süt ürünlerinde ürünün 25 ml ya da gramında *L. monocytogenes* bulunmamalıdır. Sucuk gibi fermente et ürünlerinde, sosis, salam gibi ısıtılmış et ürünlerinde ürünün 25 gramında *L. monocytogenes* bulunmamalıdır. Benzer şekilde deniz ürünlerinde ve balık yumurtasından elde edilmiş havyar vb ürünlerde ürünün 25 gramında *L. monocytogenes* bulunmamalıdır. Temel gıda gruplarının yanı sıra pek çok farklı ürünü de ayrıntılı olarak kapsayan mikrobiyolojik kriterler tebliğinde *L. monocytogenes* tayini için referans metot olarak ISO 11290-1 metodu önerilmekte ve analizlerin 5 adet numune üzerinden değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır.

Ülkemizde de gıdalarda *L. monocytogenes* tayinine yönelik gerek klasik gerekse modern teknolojilerin kullanımı ile gerçekleştirilen pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda birçok gıda çeşidinde *Listeria* türlerinin bulunduğu ortaya konmuştur. Van ilinde et örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada, örnekler USDA Gıda güvenliği ve Denetimi Servisi (FSIS) tarafından önerilen protokole göre *Listeria* açısından incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda kıyma, sosis ve parça ette en sık *L. innocua*, sucuk ve pastırmada *L. monocytogenes*, salamda *L. welshimeri* ile kontaminasyon olduğu saptanmış ve et ürünlerinin çiğ olarak ya da yeteri kadar ısı işlemi görmeden tüketilmesi halinde sağlık açısından önemli bir sorun oluşturabilecekleri bildirilmiştir (Berktaş ve ark. 2006). Kayseri ilinde gerçekleştirilen bir çalışmada ise çiğ süttten yapılmış ve ısı işlem görmüş peynir örneklerinde ISO-11290-1 metoduna göre *Listeria* varlığı araştırılmıştır. Sonuç olarak çiğ süttten yapılmış peynirlerin %17,2 ve ısı işlem görmüş peynirlerin %9,5'inde *L. monocytogenes* kontaminasyonu olduğunu bulan araştırmacılar Kayseri ilinde açıkta satılan peynirlerin göz ardı edilmemesi gereken bir tehlike oluşturduğunu bildirmişlerdir (Kum ve ark. 2011). Bir başka çalışmada ise çiğ köfte örnekleri belli konsantrasyonlarda *L. monocytogenes* ile kontamine edilerek yine USDA/FSIS yöntemine göre incelenmiştir. Araştırmacılar yaptıkları değerlendirmeler sonucunda Türkiye'de çiğ köftelerin de yer aldığı hazır gıdalara yönelik yasal düzenlemelerin Avrupa Birliği mevzuatı dikkate alınarak hazırlanmasının halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından yararlar sağlayabileceği görüşüne varmıştır (Şireli ve ark. 2008). Yine çiğ süt örneklerinde *Yersinia enterocolitica* ve *Listeria monocytogenes* taramasının yapıldığı bir çalışmada örneklerin %0,94'ünde *L. monocytogenes* bulunduğu bildirilmiştir (Uraz ve Yücel 1998).

Bu tez çalışmasında önemli bir gıda patojeni olarak kabul edilen *L. monocytogenes*'in tanınması için hızlı teknikler arasında yer alan elektrokimyasal biyosensörün kullanılabilirliğini araştırmak amacı ile immüno-sensör ve DNA sensör tabanlı yöntemler geliştirilmesi hedeflenmiş olup ticari olarak satın alınmış referans kültürler ile klasik izolasyondan antibadi tabanlı yöntemlere, moleküler yaklaşımlara ve sensör sistemlerine kadar geniş bir yelpazede farklı tayin yaklaşımları incelenmiştir. Çalışmalar sırasında antibadi

tabanlı elektrokimyasal immüno sensör ve DNA sensör tasarımı yapılarak optimize edilmiş mevcut *L. monocytogenes* tayin yöntemleri ile karşılaştırma yapılmıştır.

Gıda örneklerinde kültüre bağlı klasik metotlar ile *Listeria* tayini için yaygın olarak kullanılan iki metot, ISO 11290 ve FDA-BAM metotlarıdır. Kültüre bağlı olan bu metotların hepsi *Listeria* izolasyon ve identifikasyon ortamı olarak Oxford (OX), Modifiye Oxford (MO), PALCAM (PAL) agar gibi *Listeria* için seçici gelişim sağlayan agar ortamlarını önermektedir ki bu gelişim ortamlarının cins düzeyinde seçicilik sağladığı kabul edilmektedir (Aragon-Alegro ve ark. 2008; Jeyaletchumi ve ark. 2010).

Çalışmamızda mevcut standart kültürlerin tamamı PALCAM, *Listeria* Kromojenik Agar ve *Listeria* Seçici Agar ortamında geliştirilmiştir. *Listeria* Seçici Agar ortamında zayıf gelişim gösteren kültürler, PALCAM agar ortamında, 48 saatlik inkübasyondan sonra siyah koloniler şeklinde gözlemlenmiştir. *Listeria* kromojenik agar ortamında 24 saatlik inkübasyondan sonra *Listeria monocytogenes* ve *Listeria ivanovii* türleri mavi-yeşil renkte ve kolonilerin etrafında beyaz opak bir hale ile gözlemlenmiştir. Her ne kadar kullanılan besiyeri *L. monocytogenes* için seçici olarak tanımlansa da *L. ivanovii* kolonilerinin de aynı şekilde gözlemlenmesi kullanılan besi ortamında bulunan Lipaz C substratını kullanabildikleri bilindiğinden dolayı beklenen bir sonuç olmuştur. *Listeria innocua* türü ise yine aynı renkte ancak kolonilerin etrafında hale oluşumu görülmeksizin gelişmiştir. Agar ortamında gelişimi takiben yapılan koloni morfoloji incelemesine göre *Listeria* gelişimi için *Listeria* Seçici agar ortamı diğer iki ortama kıyasla zayıf bulunmuştur. PALCAM agarda gelişim Kromojenik agar ortamına nazaran daha uzun sürede gerçekleşmektedir ve PALCAM agar tür düzeyinde ayırma olanak sağlamamaktadır. Kromojenik agar ortamı diğer ortamlara kıyasla *L. monocytogenes* kolonilerinin ayırımına olanak sağlamaktadır.

Renk oluşumu ve seçicilik besiyeri bileşimi ile sağlanmaktadır. PALCAM agar ortamında besiyeri bileşimindeki antibiyotikler ve lityum klorür ile *Listeria* dışındaki pek çok bakteri türünün inhibisyonu sağlanmaktadır. *Listeria* cinsine dahil olan türlerin  $\beta$ -D-glukosidaz aktivitesi eskulin ve amonyum demir (III) sitrat ile belirlenmektedir. Eskulin  $\beta$ -D-glukosidaz enzimi ile eskuletin ve glikoza

parçalanmaktadır. Eskuletin de demir (III) sitrat ile zeytin yeşili-siyah renk veren kompleks yapmaktadır. PALCAM agar ortamında stafilokok ve enterokok gibi mannitol pozitif bakteriler eğer inhibe olmamışlar ise sarı renkli ve sarı zonlu koloniler oluşturmaktadırlar. *Listeria* türleri bu besiyerinde 1,5-2 mm çapında zeytin yeşili-gri renkli, bazen siyah merkezli ancak her zaman siyah zonlu koloniler oluşturmaktadır (Halkman 2005). Bununla birlikte PALCAM agar da dahil olmak üzere kullanılan besiyerleri *L. monocytogenes* için spesifik değildir ve özellikle *L. innocua* başta olmak üzere türün diğer *Listeria* türlerinden ayrımı için seçici besiyeri ihtiyacı doğmuştur. Bu bağlamda *L. monocytogenes* için seçici olan ALOA agar gibi kromojenik agar ortamları geliştirilmiştir (Marrakchi ve ark. 2005).

Kromojenik agar ortamlarında renk ve hale oluşumu besiyerinin bileşiminden kaynaklanmaktadır. Kullanmış olduğumuz besiyerinde bulunan kromojenik bileşen X-glukozid; B-glukosidaz enziminin tayini için substrat oluşturmaktadır. Bu enzim tüm *Listeria* türlerinde bulunmakta ve gerçekleşen reaksiyon sonucunda koloniler mavi-yeşil renkte görünmektedir. Bununla birlikte  $\beta$ -glukosidaz enzimine sahip olan başka mikroorganizma türleri de mevcuttur. Bu mikroorganizma türlerinin gelişimini engellemek için besiyeri bileşiminde nalidiksik asit, sikloheksimit gibi seçici antimikrobiyal bileşikler kullanılmaktadır. Ayrıca *L. monocytogenes* türlerinin diğer *Listeria* türlerden ayrımının yapılabilmesi için besiyeri içerisine Lipaz-C ilave edilmektedir. Lipaz C substratını yalnızca *L. monocytogenes* türleri kullanabilmekte ve lipaz enzimi ile reaksiyon sonucunda kolonilerin etrafında beyaz-opak bir hale oluşmaktadır. Bu iki substratın (Lipaz-C ve X-glukozid) birlikte kullanımı *L. monocytogenes* türlerini diğer *Listeria* türlerinden ayrımını sağlamaktadır. Bununla birlikte hayvanlar için patojen olduğu bilinen ve insanlarda da bazı enfeksiyonlara sebep olabilen *L. ivanovii* türüne ait suşların bir kısmı da bu enzime sahiptir (Greenwood ve ark. 2005; Jeyaletchumi ve ark. 2010).

“Marrakchi ve ark. (2005)” tarafından yapılan benzer bir çalışmada denizsel örnekler üzerinde PALCAM, Oxford ve Kromojenik agar ortamları kullanılarak *L. monocytogenes* tayini yapılmış ve her üç ortam birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Doğrulama testleri için cins düzeyinde klasik identifikasyon

testlerini ve tür düzeyinde API *Listeria* test kitlerini kullanan araştırmacılar yaptıkları çalışma sonucunda CHROMagar ortamının %87,5 doğrulukta sonuç vererek Oxford agar (%12,7) ve PALCAM agar (%3,8) ortamına göre *L. monocytogenes* için daha seçici bir ortam olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada *Listeria* izolasyon ve identifikasyonu için, 2001 yılında ANFOR onayı almış olan, kromojenik agar ortamı CHROMagar değerlendirilmiştir. Yaptıkları alışmada TECRA® *Listeria* VIA, TECRA® *Listeria* UNIQUE test kitleri ile doğrulama çalışmalarını yaptıklarını bildiren araştırmacılar CHROMagar ortamında tipik *L. monocytogenes* karakteri sergileyen 151 koloniden 95 tanesinin *L. monocytogenes* olarak doğrulanabildiği sonucuna ulaşmışlardır. Araştırmacılar kullanılan ortamın kıyma ve jambonda *L. monocytogenes* tayini için yüksek hassasiyete sahip olduğunu ancak pişmiş jambon örnekleri için uygun olmadığını bildirmişlerdir (Aragon-Alegro ve ark. 2008). Bir başka çalışmada ise ISO tarafından nerilen PALCAM ve OXFORD agar *Listeria monocytogenes* Blood Agar (LMBA) agar ortamı ile kıyaslanmıştır. Çeşitli gıda örneklerinin analiz edildiği çalışmada, doğrulama amacı ile mini-VIDAS analiz sistemi, klasik cins düzeyinde biyokimyasal tanımlama testleri ve tür düzeyinde tanımlama için API *Listeria* identifikasyon test kitleri kullanılmıştır. Yapılan alışma sonucunda araştırmacılar LMBA ortamında *L. monocytogenes* diğer *Listeria* türlerinden ayırt edilebildiğini ve LMBA ortamının PALCAM agar ile Oxford agar ortamlarına alternatif olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Pinto ve ark. 2001).

“Greenwood ve ark. (2005)” tarafından yapılan çalışmada gıda rnekleri ISO 11290-1 standartları doğrultusunda hazırlanarak 3 farklı ortamdan izole edilmiş ve bu sayede iki kromojenik agar ortamı, Oxford agar ortamı ile kıyaslanmıştır. Çalışmada doğrulama testlerinin %5 at kanı içeren Colombia Blood Agar ortamında hemoliz testi ve API *Listeria* kitleri ile yapıldığı bildirilmiştir. Çalışmada Oxford agarın kullanımına kıyasla 3-4 gün süren izolasyonun kromojenik agar ortamlarının kullanımı ile 24 saate düşürülebileceği bildirilmiştir.

Günümüzde, API *Listeria* test kitleri şüpheli olduğu düşünülen saf kültürlerin *Listeria* türlerinden herhangi biri olup olmadığını belirlemek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Güvenilirlik oranı yüksek olan bu test, 24 saat içerisinde sonuç vermektedir. API *Listeria* (bioMerieux) test kitleri, FDA-BAM tarafından önerilen gıdalarda *Listeria monocytogenes* tayini ve sayımı protokolünde bahsi geçen besiyerinden saflaştırılmış şüpheli kolonilerin hızlı identifikasyonu için önerilen tanımlama kitleri arasında yer almakla birlikte kesin sonuç alımı için tek başına kullanımının yeterli olmadığı bilinmektedir (Hitchins ve Jinneman 1998).

Standart kültürler ile yapmış olduğumuz çalışmada API *Listeria* test kitleri ile yapılan tanımlamada *L. innocua* 6a 33090 standart kültürü *L. grayi* olarak hatalı tanımlanmıştır. Ayrıca *L. monocytogenes* serovar I olduğu bilinen bir başka standart kültür kit ile tanımlanamamıştır.

API *Listeria* test kiti, arilamidaz varlığı/yokluğu (DIM testi), eskulin hidrolizi,  $\alpha$ -mannosidaz varlığı, D-arabitol, D-ksiloz, L-ramnoz,  $\alpha$ -metil-D-glikozid, D-tagatoz, D-riboz, glikoz-1-fosfattan asit üretimi olmak üzere toplam 10 adet testi içermektedir. *L. monocytogenes* ve *L. innocua* arasındaki ayrımı DIM testine dayanarak gerçekleştiren kitin kullanımı oldukça pratiktir (Bille ve ark. 1992). Bununla birlikte bahsi geçen testlere dayanan yöntemde, sonuçlar ilk aşamada renk değişimine göre, nitel gözleme dayalı olarak değerlendirilmektedir. Bu durum sonuçların değerlendirilmesi sırasında hata payını arttırmakta ve tür düzeyinde hatalı tanımlamalara yol açabilmektedir. Testin uygulanması esnasında, özellikle D-ksiloz şekerinin kullanımı sonucunda ara renk gözlemlenmiştir. Net bir renk değişiminin olmaması, yönetici talimatları doğrultusunda yapılan değerlendirmede yalancı pozitif/negatif sonuç alımına yol açabilmektedir. Tüm bu nedenlerden ötürü API test kitleri her ne kadar tek başına kullanımda *Listeria* tayini için yeterli görülmesi de, diğer testlerle paralel olarak, özellikle klasik identifikasyon çalışmalarında, ya da optimize edilmiş VIDAS, ELİZA gibi sistemlerle yapılan çalışmalarda doğrulama amacı ile kullanılmaktadır.

Bille ve ark. (1992) tarafından yapılmış olan bir çalışmada, API *Listeria* test kitleri ile tanımlama yapılmıştır. Araştırmacılar 258 *L. monocytogenes* izolatından 252 tanesinin (%97,7) 176 *L. innocua* izolatından 175 tanesinin (%99,4) API test kitleri ile doğru olarak tanımlandığını bildirmişlerdir.

Çalışmamıza benzer olarak yapılan bir başka çalışmada ise, 6 *Listeria* türüne ait olan izolatlar klasik identifikasyon testleri ile tanımlanmıştır. Klasik identifikasyonu yapılan kültürler aynı zamanda API *Listeria* test kitleri ile de tanımlanarak her iki yöntem karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda araştırmacı API *Listeria* kitleri ile hatalı identifikasyon görmediklerini ancak 9 adet kültürün sistem ile tanımlanamadığını ve tanımlanamayan kültürlerden 7 tanesi için bu durumun ksiloz fermantasyon testinden kaynaklandığını bildirmiştir (McLauchlin 1997).

“Vaz-Velho ve ark. (2000)” tarafından mini-VIDAS test sisteminin değerlendirilmesinin yapıldığı bir çalışmada araştırmacılar ISO 11290-1 klasik kültür metodu ile doğrulama çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar yapmış oldukları çalışmada tür düzeyinde tanımlama için API *Listeria* test kiti ile tanımlama yaptıklarını bildirmişlerdir. Ülkemizde yapılan benzer bir çalışmada da araştırmacılar alternatif doğrulama sistemi olarak API *Listeria* test kitlerini kullandıklarını bildirmişlerdir (Oktay ve Heperkan 2006).

Tecra *Listeria* VIA test kiti sandviç konfigürasyonuna dayanan ELİZA sistemidir. AOAC tarafından kolorimetrik poliklonal immünoanaliz tarama metodu olarak onaylanan sistem prensip olarak *Listeria*' ya spesifik olan yüksek ilgili yakalama antikorlarının hücre yüzeyine tutturulması ile oluşturulmuştur. Antikor kaplı hücrelerin içerisine numuneye ait zenginleştirme ortamından ilave edildiği zaman antijenler hücreyi kaplamış olan antikorlara bağlanmaktadır. Yıkama işlemleri ile bağlanmamış bileşenlerin ortamdaki uzaklaştırılmasından sonra, ortama *Listeria*' ya spesifik olan enzim bağlı antikorların ilave edilmesi ile sandviç konfigürasyonu oluşturulmaktadır. Bağlanmamış bileşenlerin ortamdaki uzaklaştırılmasından sonra ortama, enzim bağlı antikor ile ilişkiye girerek yeşil renk oluşumunu sağlayan uygun substrat ilavesi yapılmakta ve renk değişiminin olup olmadığı gözlemlenmektedir (Binsfeld 2008).

*L. monocytogenes* 4b 19115 standart kültürü içeren 3 ayrı süt örneği ile yapmış olduğumuz çalışmada ön zenginleştirme işleminden sonra Tecra *Listeria* VIA test kiti ile *L. monocytogenes* tayininin 90 dakika içerisinde gerçekleştirildiği görülmüştür. Sistem 1 cfu/ml konsantrasyondaki bakteri sayısını ön zenginleştirme yaparak çoğaltmak sureti ile tanımlayabilecek hassasiyette



bulunmuştur. Her ne kadar klasik yöntemlere oranla çok daha kısa bir sürede tayin gerçekleştirilebilmekte ise de, başlangıç konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda gıda örneğinin en az 24, en çok 48 saat süre ile ön zenginleştirme işlemine tabi tutulması gerektiğinden toplam analiz süresi uzamaktadır.

“Portanti ve ark. (2011)” *L. monocytogenes* ATCC 7644 referans kültürü ile *Listeria*’ya spesifik MAb üretmişler ve ELİZA metodu ile *L. monocytogenes* tayini için kullanmışlardır. Araştırmacılar sistem geliştirme ve sistemin spesifikliğini belirlemek için yaptıkları çalışmada, çeşitli gıda örneklerinin 25 ml sıvı numunelerini  $10 \pm 3$  cfu/ml *L. monocytogenes* ile kontamine ederek FRASHER broth ortamında zenginleştirme işlemine tabi tutmuşlardır. Ölçümlerin 450 nm de ELİZA okuyucusu ile gerçekleştirildiği çalışmada araştırmacılar uygulamış oldukları metodun  $6,6 \times 10^3$  cfu/ml konsantrasyonda *Listeria spp.* için %100 spesifik olduğunu bildirmişlerdir.

Süt örneklerinde *L. monocytogenes* tayini için yapılan bir başka çalışmada ise indirekt ve Avidin-Biyotin (A-B) ilişkili ELİZA yöntemi kullanılmıştır. Yapılan çalışmada Listeriolysin O (LLO) antijeni kullanılarak indirekt ve A-B ilişkili ELİZA testleri gerçekleştirilmiştir. İndirekt ELİZA yöntemi ile tayin için, hücreler LLO antijeni ile kapladıktan sonra, hücrelere süt örneklerinin immün serumları ilave edilmiştir. İkincil antibadi ilavesinden sonra, ortama substrat da ilave edilmiş ve okumalar 492 nm’de gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerin sonucunda araştırmacılar, her iki sisteminde %100 hassasiyete ve sırasıyla %97,1-%99,9 seçiciliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir (Kalorey ve ark. 2007).

“Kim ve ark. (2005)” yapmış oldukları çalışmada *L. monocytogenes* 4b türünün kamçı antijenlerine spesifik antikolar ile sandviç ELİZA metoduyla *Listeria* tayini gerçekleştirmişlerdir. Uyguladıkları sistem ile çeşitli gıda örneklerinde *Listeria* taraması yapan araştırmacılar geliştirdikleri Sandviç ELİZA sisteminin gıdalarda *Listeria* taraması için uygun olduğunu bildirmişlerdir.

VIDAS<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes* II, otomatik VIDAS<sup>®</sup> sistemi, ELFA yöntemi (Enzim Bağlı Flüoresan Test) kullanılarak, *L. monocytogenes*’in spesifik olarak saptanması için kullanılan bir enzim immün testidir. Bu sistemde katı faz sağlayıcı (SPR), katı faz olarak işlev görmeyen yanı sıra test için pipetleme aygıtı olarak da kullanılmaktadır. SPR’nin iç kısmı, yüzeye adsorbe edilmiş anti-*L.*

*monocytogenes* antikorları ile kaplanmıştır. Testin reaktifleri kullanıma hazır olarak satılmaktadır ve kaplanmış reaktif striplerine ön dağıtım yapılmış durumdadır. Testin tüm basamakları cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirilmektedir (Sewell ve ark. 2003).

1, 10 ve 100 cfu/ml *L. monocytogenes* 4b 19115 standart kültürü içeren süt örnekleri ile yapmış olduğumuz çalışmada ön zenginleştirme işleminden sonra VIDAS® LMO2 kitleri ile *L. monocytogenes* tayininin 70 dakika içerisinde gerçekleştirildiği görülmüştür. Sistem 1 cfu/ml konsantrasyondaki bakteri sayısını ön zenginleştirme yaparak çoğaltmak sureti ile tanımlayabilecek hassasiyette bulunmuştur. Buna ilave olarak mini-VIDAS sisteminin sağladığı en önemli avantajlardan bir tanesi sistem otomatize olduğu için bireysel iş yükünü azaltmakta ve deneysel açıdan uzmanlık gerektirmemektir. ELİZA sistemlerine benzer şekilde yöntemin kullanılabilir olması için ön zenginleştirme işlemine gereksinim duyulmaktadır.

“Ueda ve Kuwabara (2010)” tarafından yapılan benzer bir çalışmada ELFA metodunun hassasiyeti ve spesifikliğı değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada sistemin hassasiyetini belirlemek için farklı gıda örneklerinden 1 gr alınarak 9 ml Yarı Frasher Broth zenginleştirme besiyerine aktarılmış ve  $10^2$  cfu/ml olacak şekilde *L. monocytogenes* 4b kültürü ilave edilmiştir. Araştırmacılar yapmış oldukları bu çalışma sonucunda tayin için mikroorganizma konsantrasyonunun en az  $10^6$  cfu/ml olması gerektiğini ve inkübasyon süresinin 12 saat olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada spesifikliğin belirlenmesi için de değerlendirme yapılmıştır. Araştırma sonuçlarında tüm *L. monocytogenes* strainlerinin pozitif sonuç verdiği, 2 adet *Salmonella* straini haricinde tüm diğer örneklerin negatif sonuç verdiği ve rutin kullanım için 12 saatlik ön zenginleştirme süreci ile birlikte sistemin *L. monocytogenes* tayini için uygun olduğu bildirilmiştir.

Mini VIDAS LMO2 testinin değerlendirildiği bir başka çalışmada araştırmacılar Portekiz’de bulunan üretim merkezlerinden numune temin etmişler ve örnekleri hem VIDAS LMO2 kitleri ile hem de doğrulama çalışmaları için ISO 11290-1 klasik protokolü ile analiz etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda kit spesifikliğini 0,96 olarak belirleyen ekip çalışmada 11 yalancı pozitif sonuç aldıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca kit hassasiyetinin 0,73 olarak tespit edildiği

çalışmada 2 adet yalancı negatif sonuç alındığı bildirilmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar yapmış oldukları genel değerlendirme sonucunda, tütülenmiş balık örneklerinde *L. monocytogenes* tayini için VIDAS LMO2 kitlerinin uygun bir metot olarak göz önüne alınabileceğini bildirmişlerdir (Vaz-Velho ve ark. 2000).

“Meyer ve ark. (2011)” yapmış oldukları çalışmada çiğ et ve domuz/dana eti ile elde edilen ürünlerden VIDAS sistemi ile *Listeria spp.* ve *L. monocytogenes* tayini gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada numuneler ilk etapta VIDAS® LIS kitleri ile *Listeria spp* için taranmış, ardından pozitif sonuç veren numunelerde VIDAS® LMO2 kitleri ile *L. monocytogenes* varlığı araştırılmıştır. *L. monocytogenes* için pozitif sonuç veren numunelerin doğrulamasını kültür testleri ve APİ *Listeria* test kitleri ile gerçekleştiren araştırmacılar gıdalarda rutin olarak *Listeria* tayini yapılması için VIDAS® sistemlerinin uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde yapılmış olan bir çalışmada ise, araştırmacılar İstanbul marketlerinden satın aldıkları çeşitli gıda örneklerini mini-VIDAS sistemi kullanarak, *L. monocytogenes* ve *Salmonella* için analiz ettiklerini bildirmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda mini-VIDAS sistemi ve ISO 11290 klasik kültür çalışmaları arasında farklılık olmadığını bildiren araştırmacılar VIDAS sisteminin *L. monocytogenes* tayini için etkili bir yöntem olarak tanımlamışlardır (Oktay ve Heperkan 2006).

2007 yılında yapılmış olan bir araştırmaya göre, patojen mikroorganizma tayin yöntemleri ile ilgili literatürler incelendiğinde en sık kullanılan yöntemlerin sırası ile PZR, klasik kültüre bağlı yöntemler, ELİZA sistemleri ve biyosensör çalışmaları olduğu bildirilmiştir. Patojen mikroorganizma tayini için son yirmi yıldır kullanılmakta olan ve diğer tayin yöntemleri ile eşit derecede güvenilirliğe sahip olup, kısa sürede tayine olanak sağlayan sensör sistemlerine karşı ilgi her geçen gün biraz daha artmaktadır. Araştırmada elde edilen verilere göre özellikle son yıllarda tayin için PZR ve kültüre bağlı yöntemler ile yapılan çalışmaların sayısında düşüş gözlemlenirken sensör sistemleri ile yapılan çalışmalar artmaktadır. Son 10 yıldır sensör teknolojisi ile yapılan çalışmalara karşı artan ilgi ve alandaki gelişmeler, sistemin kısa zamanda ELİZA sistemleri gibi klasik metotlar arasına gireceğini düşündürmektedir. Ancak sensör sistemlerinin tam bir

alternatif sistem olarak değerlendirilebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Sensör yüzeyi ve örnek matrisi arasında meydana gelen etkileşimden kaynaklı akım ya da potansiyeldeki değişimin gözlemlenmesine dayanan elektrokimyasal biyosensörler özellikle kullanımları daha basit sistemler olduğundan ve maliyet açısından avantaj sağladığından dolayı diğer alanlarda olduğu gibi patojen mikroorganizma tayini çalışmalarında da dikkati çekmektedirler. Akım (amperometrik), potansiyel (potansiyometrik) ya da empedans gibi gözlemlenen parametreye bağlı olarak çeşitli sınıflara ayrılabilen elektrokimyasal sensörlerin dezavantajları ise seçiciliklerinin ve hassasiyetlerinin diğer sistemlere oranla daha düşük olabilmesidir (Lazcka ve ark. 2007). Amperometrik sensörler elektrokimyasal reaksiyon yoluyla üretilen akımı ölçmektedirler. Bir elektrokimyasal reaksiyonda pek çok analit redoks çifti olarak davranmamakta ve bu nedenden dolayı direkt amperometrik sensör uygulamaları kısıtlı olmaktadır. Bundan dolayı amperometrik sensörlerde akım üreten elektroaktif etiketler kullanılmaktadır. Burada akım, analitin spesifik olarak bağlandığı çalışma elektrotu, spesifik bağlanmanın olmadığı referans elektrotu karşı kullanılırken çalışma elektrotunda elektroaktif bir tür yükseltgendiği ya da indirgendiği zaman üretilmektedir. Akım elektroaktif tür konsantrasyonu ile doğrusal ilişkilidir. Referans elektrot tipik olarak Ag/AgCl içermekteyken, çalışma elektrotu yaygın olarak antipadinin immobilize edildiği soy metal, grafit veya karbon ya da iletken polimerlerin modifiye formlarını kapsamaktadır. Bu tipteki sensörlerin ana avantajı kompleks matrislerde kullanılabilmesidir. Bununla birlikte amperometrik sensörler zaman zaman etiketleme ihtiyacı ve etiketli antikorun dağılımı nedeni ile dezavantajlı hale gelebilmektedir (Conroy ve ark. 2009). Kullanılan elektrot tipi ve sensör düzeneği ne olursa olsun antikorun elektrot yüzeyine immobilizasyonu sensör hassasiyeti için son derece önemlidir. Antikorun yüzeye tutunması için direk fiziksel adsorbsiyon ve kovalent bağlama olmak üzere iki farklı yol izlenebilmektedir. Direk fiziksel adsorbsiyon işlem olarak kovalent bağlamadan daha kolay olmakla birlikte, kontrolün olmaması dezavantaj oluşturmaktadır (Ge ve ark. 1993; Skottrup ve ark. 2008).

Son yıllarda *L. monocytogenes* tayini için farklı sensör tipleri ile yapılmış çalışmalar mevcuttur. “Leonard ve ark. (2004)” yapmış oldukları çalışmada

poliklonal antibadi kullanarak, kısa bir inkübasyon periyodundan sonra  $1 \times 10^5$  cfu/ml *L. monocytogenes*' i yüzey plazmon rezonans (SPR) tabanlı immüno sensör sistemi ile tayin edebildiklerini bildirmişlerdir. *Listeria* tayini için yapılan bir başka çalışmada ise antibadi tabanlı fiber optik bir biyosensör geliştirilmiştir. *Listeria* hücrelerini fiber üzerinde yakalamak için tavşan poliklonal antikoların polisitren fibere immobilize edildiği sandviç immüno analiz sisteminde 635 nm'de lazer ışığının gönderilmesi ve 670-710 nm'de bir fotodetektörde toplanması ile başarılı, spesifik bir flüoresan sinyal üretmek için, siyanin 5 etiketli bir mürine monoklonal antibadi kullanılmıştır. Araştırmacılar immüno sensörün *L. monocytogenes* için spesifik olduğunu ve diğer *Listeria* türleri ya da *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica*, gibi diğer mikroorganizmaların saf ya da karışık kültürlerine kıyasla *L. monocytogenes* için daha yüksek sinyal gücü sergilediğini bildirmişlerdir (Geng ve ark. 2004). Sensör yüzeyinin yakınında gerçekleşen kırılma indeksi değişimlerinin ölçümü için optik teknik olarak tanımlanan SPR teknolojisi ile yapılan bir başka çalışmada araştırmacılar *L. monocytogenes* tayini için anti-*L. monocytogenes* antikoru ile kaplanmış altın elektrot kullanımı ile SPR tabanlı biyosensör geliştirdiklerini ve sistemin  $10^4$ - $10^6$  cfu/ml konsantrasyonda *L. monocytogenes* için tayin yapabildiğini bildirmişlerdir (Poltronieri ve ark. 2009). Elektrokimyasal yöntemler kullanılarak yapılmış tayin çalışmaları arasında ise iletken polimer üzerine antikor bağlanması, kültürün gelişimi sırasında yapılan çalışmalar ve empedans çalışmaları yer almaktadır. ‘‘Ruan ve ark. (2003)’’ yapmış oldukları çalışmada LEB ortamında *L. monocytogenes*' in gelişim sürecinde döngüsel voltamogramlarında görülen değişimi incelemiştir. Yapılan çalışma sonucunda araştırmacılar -0,4 V'da gözlemlenen indirgenme pikinin organizmanın gelişimi ile birlikte azaldığını ve bir çift tersinir redoks pikinin görüldüğünü bildirmişlerdir.

Çalışmalarımızda ilk etapta referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak Pt ve çalışma elektrotu olarak kalem ucu elektrot kullanılarak monomer ve analit davranışı, polimerleşme ortamına antikor ilavesi ile birlikte elektrot davranışı incelenmiştir. Bu amaçla daha önce anlatıldığı gibi 4 tip elektrot; PPy elektrot, PPy-*aLis* elektrot, AYPPy elektrot, AYPPy-*aLis* elektrot sentezlenmiş ve

*L. monocytogenes* ile etkileşimleri incelenmiştir. Yalnızca polipirol içeren elektrotlar ile polimerin mikroorganizmalı ortamdaki davranışı belirlenmiştir. Ortama antikorun da ilave edildiği PPy-*aLis* elektrotlar ile antikor ilavesinin sentez sırasında gerçekleştirilmesi sonucunda farklılık oluşturup oluşturmadığı değerlendirilmeye çalışılmıştır. Yapılan aşırı yükseltgenme işlemi ile elektrotun (AYPPy) kendisine ait olan olası piklerin minimuma indirilmesi ve bu sayede girişim etkisinin azaltılması hedeflenmiştir. Gerek PPy gerekse PPy-*aLis* elektrot ile boş çözeltide ve mikroorganizmalı ortamda DV alındığı zaman 1,0 – 1,2 V aralığında pik akımında yaklaşık aynı oranlarda artış görülmüştür. Aşırı yükseltgenme işlemi ile birlikte sentezlenen elektrotlarda ise pik gözlemlenmemiştir. Bu durum pik artışının elektrot kaynaklı olduğunu ve aşırı yükseltgenme ile elektrotun pikinin indirgenebileceğini göstermektedir. Ardından camsı karbon disk elektrotu (GCE), platin disk elektrot, kimyasal işlem görmüş kalem ucu (ETPG) elektrot çalışma elektrotu olarak kullanılmak üzere monomer ve analit davranışını belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar sırasında tayin için kullanılan antikor miktarı, çalışmalar daha çok en uygun çalışma elektrotunun belirlenmesine yönelik olarak yapıldığından dolayı oldukça düşük tutulmuştur. Bu nedenle kullanılan çalışma elektrotlarından her hangi biri ile mikroorganizma ilavesi sonucunda sinyal artışının gözlemlenmemesi beklenen bir durumdur. Farklı çalışma elektrotları ile yapılan denemeler sonucunda en uygun çalışma elektrotunun kalem ucu yüzeyine polipirol sentezi gerçekleştirilerek hazırlanan PPy elektrotlar olduğu sonucuna varılmıştır. GCE ve platin disk elektrot ile yapılan çalışmalarda elektrot yüzeyine antikor katkılı polimer sentezi gerçekleştirildikten sonra ölçümlerin tek sefer yapılması ve daha sonra elektrotun tekrar temizlenerek bir diğer ölçüm için sentez işlemine tabi tutulması dezavantaj olarak değerlendirilmiştir. Kalem ucu yüzeyine polipirol sentezi ile hazırlanan elektrotlar da tek kullanımlık olmakla birlikte tek seferde birden fazla elektrot hazırlama olanağı olduğu için daha uygun bulunmuştur. Yapılan literatür taraması ve elde edilen voltamogramlar değerlendirildiğinde işlem görmüş kalem ucu ile yapılan çalışmaların antikor konsantrasyonu arttırılsa bile sonuç verme olasılığı düşük olarak bulunmuştur. Bu nedenle daha sonraki çalışmalara kalem ucu yüzeyine polipirol sentezi ile elektrot tasarımı yapılarak devam edilmesine karar

verilmiştir. Bununla birlikte aşırı yükseltgenme işleminin antikor yapısı üzerindeki olumsuz etkilerinden kaçınmak için işlemin kullanılmamasına karar verilmiştir. Ancak ön denemelerde PPy ve PPy-*aLis* elektrotlarda belirlenmiş olan elektrotun kendisine ait olduğu öngörülen yükseltgenme piki sonuç alımını etkileyebileceğinden ve aşırı yükseltgenme işlemi kullanılmayacağından dolayı sentez sırasında destek elektrolit çözeltisinin kullanılmaması uygun görülmüştür. Literatürde yer alan bilgiler ışığında polimerleşme ortamında destek elektrolit çözeltisi yerine deiyonize su kullanımına karar verilmiştir. Destek elektrolit çözeltisi olmaksızın yapılacak olan sentez işlemlerinde pirolün yüzeye tutunmasını arttırmak amacı ile DV yöntemiyle yapılan sentez sırasında döngü sayısının 10 ve 20 döngü olarak arttırılması uygun bulunmuştur. “Minnet ve ark. (2002)” yapmış oldukları çalışmada camı karbon disk elektrotu yüzeyine, 0,5 M pirol ve 100 ppm anti-*Listeria* antikorlu içeren deiyonize su solüsyonu ile galvanostatik yolla polimer sentezi gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir.

Yapmış olduğumuz çalışmada 5 ppm antibadi solüsyonu ilavesi yapılarak DV yöntemiyle, 20 döngüde sentezlenen elektrotlar ile elde edilen voltamogram incelendiğinde, mikroorganizma ilavesinden sonra DPV yöntemi ile -0,2-0 V gerilim aralığında, akım değerlerinde üç katlık bir artış tespit edilmiştir. Elde edilen voltamogramlardaki akım değerinin düşüklüğü, kullanılan antikor konsantrasyonunun düşüklüğüne bağlanmaktadır. Akım değerlerinin düşük olması ve polimerleşme esnasında destek elektrolit kullanılmamasının elde edilen sonuçların kalitesini etkilediği düşünülebilir. Ancak mikroorganizmalı ortamda akım değerinin üç katlık artış göstermesi antikorun yüzeye adsorbe edilebildiğini ve ortama *L. monocytogenes* ilave edildiği zaman etkileşimin gerçekleştiğini göstermektedir. Antikor konsantrasyonu 25 ppm'e çıkartıldığı çalışmalarda ortama mikroorganizma ilavesi ile birlikte alınan DV sonuçları incelendiği zaman mikroorganizma ilavesi ile yine akım değerinde ortalama olarak üç, dört katlık bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Antibadi konsantrasyonunu artışı ile birlikte akım değerinde meydana gelen artış oranı yaklaşık olarak aynı olmaktadır, ancak genel olarak voltamogramlarda görülen akım değerlerinde artış gözlemlenmiştir. 5 ppm antikor kullanımı ile  $1,53 \times 10^{-5}$  amperden  $4,18 \times 10^{-5}$  ampere artış görülürken, 25 ppm antikor kullanımı ile  $1 \times 10^{-3}$  amperden  $4,5 \times 10^{-3}$  ampere artış görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar antikor artışının sinyal akımının büyüklüğünden ziyade sonuçların kalitesini etkilediği yönündedir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda antikorun polimerleşme ortamına dahil edilmesi ile elde edilen elektrotların ortamda *L. monocytogenes* kültürü bulunduğu zaman sinyal artışını sağladığı yönündedir. Bununla birlikte tayin için hazırlanan düzeneğin kesin olarak doğru olduğunu kabul edebilmek için optimum parametrelerin belirlenmesi, negatif kontrol grupları ile çalışmalar ve tekrar edilebilirliğin belirlenmesi gerekmektedir.

Elektrokimyasal empedans analizleri ile solüsyon elektrot ara yüzeyindeki çok küçük değişimlerin bile kısa zamanda tayin edilebilir olması, sistemin ucuz, kolay kullanılabilir ve ilave solüsyon gereğinin bulunmaması günümüzde empedans analizlerinin patojen bakteri tayininde kullanımını arttırmıştır (Tolba ve ark. 2012). Bu nedenle yapmış olduğumuz çalışmada bir sonraki aşamada sistemin doğruluğunu teyit etmek amacı ile yapılan empedans analizleri gerçekleştirilmiştir. Empedans analizleri ile elde edilen grafikler incelendiğinde antikor içermeyen PPy elektrotlarda mikroorganizma ilavesinden sonra çok fazla bir direnç kaybı yaşanmadığı ancak antikor içeren PPy-*aLis* elektrotlarda mikroorganizma ilavesi ile direnç değerlerinin ciddi ölçüde değiştiği gözlemlenmiştir. “Bhunja ve ark. (2001)” tarafından yapılan bir çalışmada araştırmacılar yapmış olduğumuz çalışmaya benzer şekilde *Listeria* tayini için tasarlanmış oldukları antikor kaplı biyoçiplerin kullanımını empedans analizleri ile belirlemişlerdir. Araştırmacılar mikroorganizma ilavesinden sonra empedansında düşüş olduğunu ve mikroorganizma ilavesinin iyonik konsantrasyonda değişikliğe yol açtığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak yapmış olduğumuz çalışmada grafikler arası farklar değerlendirildiğinde polimerleşme esnasında solüsyona antikor ilavesi ile antikorun polimer yüzeyine tutunduğu ve mikroorganizma ile temas halinde olduğu zaman antikor-antijen arasında tutunmanın olduğu düşünülmektedir.

Yapılan empedans analizleri ve tekrar çalışmaları ile birlikte polimerleşme sırasında elektrot yüzeyine antikorun adsorbe edildiği PPy-*aLis* elektrotlarda *L. monocytogenes* ilavesinden sonra meydana gelen sinyal artışının antikor-antibadi ilişkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hazırlanan elektrotların yapılarının incelenmesi ve mikroorganizmanın elektrot yüzeyine tutunup/tutunmadığının



resmedilmesi amacı ile taramalı elektron mikroskopta (SEM) elektrotların görüntüleri incelenmiştir. Taramalı elektron mikroskopta, katı numune yüzeyi raster düzeninde yüksek enerjili bir elektron demetiyle taranır. Bu teknikte yüzeyden çeşitli tür sinyaller oluşturulur. Bunlar geri saçılmış elektronlar, ikincil elektronlar, Auger elektronları, X-ışını floresans fotonları ve değişik enerjili diğer fotonlardır. Bütün bu sinyaller yüzey çalışmalarında kullanılmış olmakla beraber, bunların içerisinde en yaygın olarak kullanılanları taramalı elektron mikroskopisinin temelini oluşturan geri saçılmış ve ikincil elektronlar ile elektron mikroskop analizinde kullanılan X-ışını emisyonudur (Skoog ve ark. 1998). SEM ile yapılan çalışmalar sonucunda PPy elektrot yüzeyi ile PPy-aLis elektrot yüzey yapısının birbirinden oldukça farklı görüntülenmesi sentez sırasında ilave edilen antikorun polimer yapısına katıldığını göstermektedir. PPy-aLis elektrotların mikroorganizmalı ortamda bekletildikten sonra alınan SEM görüntülerinde elektrot yüzeyinde *L. monocytogenes* hücrelerinin görülmesi alınan sinyalin antikor-antibadi etkileşiminden kaynaklı olduğunun bir diğer kanıtı olarak değerlendirilmiştir.

Bu aşamadan sonra optimum sinyal alımı için döngü sayısı ve tarama hızı değişken parametreler olmak sureti ile çalışmalar gerçekleştirilmiş ve elde edilen voltamogramlar değerlendirildiğinde en iyi sonuçların yüksek döngüde (20 döngü) ve düşük tarama hızında (0,02 V/s) alındığı görülmüştür. Bunun dışında optimizasyon çalışmaları için bekletme süresinin etkisi belirlenmiş ve elektrotların mikroorganizmalı ortamda bekletilmesi ile sonuçların pozitif yönde değişmediği görülmüştür. Son olarak *E. coli* ve *S. aureus* ilavesiyle yapılan çalışmalarda yine aynı gerilim aralığında *L. monocytogenes* ilavesindeki kadar olmamakla birlikte pik akımında bir miktar artış gözlemlenmiştir, bununla birlikte elde edilen sinyallerin  $E_p$  değerleri arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. Benzer bir sonuç “Minnet ve ark. (2003)” tarafından yapılan bir çalışmada da görülmüştür. Araştırmacılar hem *S. triphymurium* hem de *E. coli* hücreleri için elde edilen sinyalin *Listeria* ilavesi ile elde edilen sinyale benzer olduğunu ancak redoks potansiyellerinin birbirinden farklı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar *E. coli* ve *Listeria* için pik akımlarını identik bulunurken, *Salmonella* ilavesi ile daha büyük bir pik akımı gözlemlendiğini kaydetmişlerdir.

Yapmış olduğumuz çalışmalarda PPy-*aLis* elektrotlarda mikroorganizmalı ortamda sinyal artışının gözlemlenmesi, empedans analizlerinde direnç değerlerinde gözlemlenen düşüş, SEM görüntülerinde PPy ve PPy-*aLis* elektrot yapısı arasındaki farklılıklar antibadi tabanlı elektrokimyasal sensör sistemi ile mikroorganizma tayininin yapılabilir olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte daha öncede anlatıldığı şekilde ELİZA ve VİDAS çalışmaları gibi standart bir immünoensör sisteminin geliştirilebilmesi için çok daha fazla çalışmaya gereksinim vardır. Yapmış olduğumuz çalışmada ELİZA ve VİDAS optimize sistemlerinde standart kültürler kullanıldığı için analizler sırasında herhangi bir yalancı pozitif sonuç alımı ile karşılaşılmamıştır. Ancak daha önce değinildiği gibi optimize edilmiş ve AOAC onayı almış bu immünoanaliz yöntemlerinde bile düşük oranda da olsa çapraz reaksiyon ve yalancı pozitif sonuç oluşumu gözlemlenebilmektedir. Bu nedenle tasarlanan sensör sisteminde farklı mikroorganizma kültürleri ile sinyal alımı beklenen bir durumdur. Tasarlanan sistemin en zayıf noktası farklı kültürler ile sinyal alımından ziyade, polimerizasyon işlemi sırasında solüsyon içerisine daldırılan kalem ucu miktarının her ne kadar ölçülse de her elektrotta birebir aynı olmaması ve antikorun polimerizasyona dahil edilmesi yöntemi nedeni ile elektrot yüzeyine geçen antikor miktarının kontrol edilememesi durumunun sinyal büyüklüğüne yansımadır. Mevcut problem sistemin tekrar edilebilirliğini düşürmektedir. Mevcut literatürler ışığında antikor immobilizasyonu ile ilgili problemin kovalent bağlama yöntemi ile minimuma indirgenebileceği bilinmektedir. Yapılan sensör çalışmaları sırasında mikroorganizma konsantrasyonunun yüksek oluşu bir diğer dezavantaj olarak görülmektedir, bununla birlikte optimize immüno analiz sistemler ile kıyaslandığı zaman bu sistemlerinde tayin için ön zenginleştirme basamağına ihtiyaç duyduğu bir gerçektir. Optimize sistemlere göre değerlendirme yapıldığında tasarlanan sensör sistemindeki ana problem sistemin gerçek örneklere uygulanması durumunda meydana çıkabilecek geri plan sinyalleri ve antikor-antijen reaksiyonu sonucunda elde edilen sinyalin tekrar edilebilirliğinin düşük olmasıdır.

Patojen mikroorganizma tayini için immüno analiz yöntemlerinin yanı sıra moleküler tabanlı yöntemlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Moleküler tabanlı

yöntemler arasında en çok çalışılmış olan sistem PZR'ye dayalı yöntemlerdir. Yapılan birçok çalışma PZR yönteminin gıda kökenli patojenlerin tayini için uygun olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte rutin laboratuvar uygulamaları için standart prosedür eksikliği yöntemin kullanımı için dezavantaj oluşturmaktadır. *L. monocytogenes* tayini için uzun zaman alan klasik tanımlama yöntemlerine alternatif olarak farklı PZR tayin metotları önerilmiştir. PZR ile *Listeria* tayini için genellikle listeriolysin O sentezini kodlayan *hlyA* gen bölgesi kullanılmaktadır. Bunun dışında, *iap* gen bölgesi (konak canlıda yayılma ile ilişkili proteinler), *Dth-18*, 16S rRNA, aminopeptidaz sentezini kodlayan genler ve *inlA* gen bölgeleri ile yapılmış tayin çalışmaları mevcuttur (Anzar ve Alarcon 2003). rRNA gen bölgeleri yaşayan her canlı hücrede bulunduğu ve fonksiyonu yüksek oranda korunduğu için filogenetik bilgi elde etme açısından da oldukça kullanışlı bir bölge olarak kabul edilmektedir. Filogenetik belirteç olarak kabul edilen bu gen bölgelerinin nükleik asit dizi bilgilerine dayanarak yapılan sınıflandırmalar tür tayininde gittikçe önem kazanmaktadır (Sallen ve ark. 1996).

Çalışmamızda PZR ile *Listeria* tayini için daha önce anlatıldığı şekilde klasik yöntem ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve ardından tasarlanan iki farklı primer seti ile, *Listeria monocytogenes* türüne özgü olan *hlyA* genine ait 702 bç uzunluğundaki fragment ve *Listeria* cinsine dahil olan tüm türlerde ortak olan 16S RNA genine ait 209bç uzunluğundaki fragment üzerinden tayin gerçekleştirilmiştir. *Listeria monocytogenes* 4b 19115 kültürünün genomik DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı çalışmalarda PZR optimizasyonu yapıldıktan sonra her iki bölge için de PZR ile sonuç alınmıştır. Yöntemin süt örnekleri üzerinde uygulanabilirliğini test etmek için 1, 10 ve 100 cfu/ml *L. monocytogenes* 4b 19115 standart kültürü içeren süt örnekleri Yarı Frasher ve Frasher ortamında zenginleştirmeye tabi tutulduktan sonra mikrobiyal gıda DNA ekstraksiyon kitiyle DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve optimum şartlarda her iki gen bölgesi içinde PZR reaksiyonu kurulmuştur. Yapmış olduğumuz çalışma sonucunda 1 cfu/ml konsantrasyonda dahi kontaminasyondan sonra ön zenginleştirme işlemi aracılığıyla DNA izolasyonunun ve PZR reaksiyonunun uygulanabilir olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan dizi analizi çalışmaları ile elde edilen gen fragmentlerinin *L. monocytogenes* türüne ait olduğu doğrulanmıştır. Bununla

birlikte PZR ile tayin sisteminin tek başına yeterli olduğunu söylemek için tasarlanmış olduğumuz primerlerin geniş çeşitlilikte gram pozitif ve gram negatif bakteri türleri ile reaksiyon verip vermediklerinin belirlenmesi gerekmektedir.

“Anzar ve Alarcon (2003)” yapmış oldukları benzer bir çalışmada farklı primer setleri kullanarak gıdalarda *L. monocytogenes*'in PZR ile tayinini etkileyen parametreleri belirlemişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışma sonucunda 1 cfu/g<sup>1</sup> konsantrasyonda kültür ile kontamine edilmiş gıdalardan ön zenginleştirme işlemi yaparak, *hlyA* gen bölgesi üzerinden PZR ile *Listeria* tayini yapılabileceğini ve klasik yöntem ile negatif sonuç veren örneklerden bazılarının PZR ile pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Yine benzer bir çalışmada, süt ve kıyma örneklerinde *L. monocytogenes* tayini için, farklı büyüklüklerde *hlyA* gen bölgesi fragmentleri ile PZR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapmış oldukları çalışmada 5 farklı primer kullandıklarını bildiren araştırmacılara 1 cfu/ml konsantrasyonda kontaminasyonun LEB ortamında ön zenginleştirme işleminden sonra PZR yöntemi ile belirlenebildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar 17 farklı cinse ait olan 47 farklı kültür ve diğer *Listeria* türleri ile yaptıkları seçicilik çalışmalarında primerlerin *L. monocytogenes* için spesifik olduğunu da göstermişlerdir (Golsteyn Thomas ve ark. 1991). “Niederhauser ve ark. (1992)” yapmış oldukları çalışmada *hlyA* ve *iap* gen bölgelerini kullanarak genomik DNA izolasyonu basamağı olmaksızın hücre lizatından PZR reaksiyonu ile tayin yaptıklarını bildirmişlerdir.

DNA tabanlı klasik PZR ile tayin sistemlerinin yanı sıra son dönemlerde RNA tabanlı moleküler yaklaşımlar da geliştirilmiştir. Gerçek zamanlı PZR olarak adlandırılan RT-PZR yöntemi ile patojen mikroorganizma tayini çalışmalarında artış mevcuttur. Hedef amplikona tutunan spesifik bir boya aracılığıyla flüoresans ışımının oluşumuna dayanan RT-PZR yöntemi çok fazla manipülasyon olmaksızın hızlı sonuç alımını sağlamaktadır. Elde edilen ışımının yoğunluğu amplikon miktarı ile doğru orantılı olduğu için hem reaksiyon sırasında sonuç alımı sağlanmakta (gerçek zamanlı) hem de reaksiyon sonrasında jel elektroforezi ile sonuçların gözlemlenmesi işlemlerine gerek kalmamaktadır (Poltronieri ve ark. 2009).

Yapmış olduğumuz çalışmada 1, 10 ve 100 cfu/ml *L. monocytogenes* 4b 19115 standart kültürü içeren süt örneklerinden zenginleştirme sonrasında mikrobiyal gıda DNA ekstraksiyon kitiyle DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve RT-PZR için kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Çalışmalar için ticari olarak satın alınan RT-PZR kiti kullanıldığından ve kit içeriğinde pozitif kontrol bulunduğu ve analiz var/yok analizi olarak gerçekleştirildiğinden dolayı kültürün artan konsantrasyonlarına dayalı olarak standart eğri çıkarılmasına gerek görülmemiştir. Reaksiyon sonrasında kullanılan pozitif kontrole dayanarak sistem otomatik olarak eşik çizgisini belirlemektedir. Negatif kontrol grubunda ise kalıp DNA olarak *E. coli* genomik DNA'sı kullanılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda yalnızca *L. monocytogenes* genomik DNA'sı kalıp olarak kullanıldığında kurulan reaksiyonlarda logaritmik artış gözlemlenmiştir. *E. coli* ile yapılan çalışma negatif sonuç vermiştir. Yapmış olduğumuz RT-PZR çalışmaları, daha önce klasik PZR çalışmalarımız ile kıyaslandığında daha kısa sürede sonuç vermektedir. Ayrıca klasik PZR ile reaksiyonunda sonuçları değerlendirmek için jel elektroforezi sistemi kullanılırken RT-PZR ile grafikler şeklinde reaksiyon bitiminde sonuç elde edilmiştir. Bu bağlamda RT-PZR yönteminin klasik PZR yönteminden daha kullanışlı olduğu düşünülmektedir.

“Rodriguez-Lazaro ve ark. (2004)” tarafından yapılan benzer bir çalışmada RT-PZR yönteminin et örneklerinde *L. monocytogenes* tayini için alternatif bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Çalışmada pişmiş jambon dilimleri dereceli olarak *L. monocytogenes* kültürü ile kontamine edilmiş ve uygun görülen kit yardımı ile DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilerek Taq-Man tabanlı *hly* gen bölgesini hedefleyen RT-PZR yöntemi ile tayin gerçekleştirilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada hem *L. monocytogenes* hem de *L. innocua* türlerinde görülen *iap* gen bölgesi hedef alınarak, süt örneklerinde her iki türün tayini için RT-PZR yöntemi kullanılmıştır. Primer ve prob tasarımı gerçekleştirdikten sonra spesiflik çalışmalarını klasik PZR ile yaptıklarını bildiren araştırmacılar, süt örneklerinde *L. monocytogenes* tayini için RT-PZR yönteminin klasik kültür metotları kadar hassas ve daha hızlı bir yöntem olduğu sonucuna ulaşmışlardır (Hein ve ark. 2001). Yapmış olduğumuz çalışmaya benzer “O’ Grady ve ark. (2008)” tarafından yapılan bir başka çalışmada ise 162 bç

uzunluğundaki *ssrA* gen bölgesi hedef alınarak RT-PZR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada araştırmacılar farklı gıda örneklerini *L. monocytogenes* ile kontamine ederek 30 saat süren zenginleştirme işleminden sonra DNA izolasyonu gerçekleştirmişler ve ardından RT-PZR ile tayin çalışması yapmışlardır. Araştırmacılar elde ettikleri bulgular ışığında kullanmış oldukları yöntemin çeşitli gıda gruplarında *L. monocytogenes* tayini için klasik kültür metotlarına alternatif bir yaklaşım olduğunu bildirmişlerdir.

Son dönem teknolojileri arasında dikkati çeken sensör sistemlerinin patojen mikroorganizma tayini için kullanılmaya başlamasıyla birlikte, 1990lı yıllar sürecinde biyokatalitik (enzim) uygulamalar ve immüno sensörler oldukça dikkat çekmiş, nükleik asit problemlerine dayalı gözlem sistemleri ile daha az ilgilenilmiştir. Ancak moleküler biyoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak DNA tabanlı sensör uygulamalarında ciddi bir artış görülmüştür (Wang ve ark. 1997).

Spesifik gen dizilerinin analizi için kullanılan geleneksel metotlar ya direkt olarak sekans analizine ya da DNA hibridizasyonuna dayanmaktadır. Sekans analizi 1970li yıllarda Maxam&Gilbert ve Sanger tarafından keşfedilmiş bir teknolojidir. Aynı dönemde, katı destekli hibridizasyon DNA analizi için yaygın olarak kullanılan bir teknik haline gelmiştir. 90lı yılların başında, çoklu spesifik prob DNA fragmentlerinin ya da oligonükleotitlerin (ODNs) katı yüzey üzerinde sabitlenmesine dayanan gen dizi teknolojileri ve floresan ya da radyoaktif işaretli analit oligonükleotitler ile tayinler gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte bu yöntemlerin etiketleme etkinliğinin sınırlı olması, tehlikeli atıkların uzaklaştırılması ve karmaşık çok basamaklı analizler olmaları gibi eksiklikleri ortaya çıkmıştır. Daha hızlı, hassas ve işaretleme yapılmadan DNA tayini için optik, akustik ve elektrokimyasal tekniklere dayanan çeşitli yaklaşımlar önerilmiştir (Junhui ve ark. 1997; Peng ve ark. 2009).

Hibridizasyonu direk elektriksel sinyale dönüştürebildiklerinden dolayı, elektrokimyasal DNA sensörlerinin direk ve hızlı biyolojik algılama için özellikle uygun olduğu düşünülmektedir. Bunun anlamı bu sistemlerde kompleks sinyal transdüksiyon araçlarına gerek olmadığı ve tayinin ucuz elektrokimyasal analiz araçları ile yapılabileceğidir. Elektrokimyasal DNA algılama yaklaşımları DNA'nın doğasında var olan elektroaktiviteden faydalanmaktadır. Günümüzde

basit, ucuz ve doğru teşhise olanak sağlayan DNA tabanlı elektrokimyasal sensörler ile ilgili birçok çalışma mevcuttur (Drummond ve ark. 2003; Peng ve ark. 2009).

DNA tabanlı sensör sistemleri temel olarak nükleik asit hibridizasyonu olayının gözlemlenmesine dayandığı için tipik olarak sistem kısaca hedef DNA dizinin tamamlayıcısı olan 20-40 baz uzunluğu arasında değişen tek iplik prob dizisinin immobilizasyonu, ardından hedef dizi ile hibridizasyon ve hibridizasyonun sinyal olarak gözlemlenmesi basamaklarından oluşmaktadır (Wang ve ark. 1997; Drummond 2003). DNA prob dizisi ve analit arasındaki bağlanma, probun, tamamlayıcı diziye sahip olan hedef DNA ile birleşme eğilimi aracılığı ile gerçekleşmektedir. İdeal olarak, prob dizisinin oryantasyonu tahmin edilebilir olmalı ve analit DNA ya kolayca ulaşabilecek konumda bulunmalıdır. Ayrıca prob ve hedef DNA fragmentinin uzunluğu, hibridizasyon süresi, sıcaklık gibi hibridizasyonu etkileyen tüm koşullar elde edilen sinyal üzerinde etkili olmaktadır. Prob immobilizasyon metotları arasında elektrokimyasal tutuklama, kovalent bağlama ya da birleşme eğilimi etkileşimleri yer almaktadır (Wang ve ark. 1997; Peng ve ark. 2009).

İletken polimerlerin elektronik yapısı, polimerik zincirin çevresindeki değişimlere ve DNA hibridizasyonu gibi biyolojik tanıma olayları nedeni ile meydana gelen zincir düzeni değişikliklerine karşı oldukça hassastır. Elektronik yapıda ya da diğer iletken polimer özelliklerinde değişim olması optik ve elektriksel özelliklerde de değişikliği olduğunu ve bu sayede ölçüm esnasında hedef analit molekül varlığında sinyal oluşumunun sağlandığını göstermiştir. Bu avantajlar iletken polimerleri DNA tabanlı biyosensör çalışmaları için uygun materyaller haline getirmektedir (Peng ve ark. 2009).

İletken polimer tabanlı bir DNA sensöründe tek iplik DNA prob dizisi iletken polimer tabakasının içine ya da yüzeyine immobilize edilmektedir. Tanıma olayı iletken polimer/elektrolit ara yüzeyinde meydana geldiğinden ve üretilen tanıma sinyali iletken polimer tabakası aracılığıyla sinyal dönüştürücü aparata iletiğinden dolayı, iletken polimerin özellikleri ve immobilize DNA probun iletken polimer üzerindeki oryantasyonu sensör performansı için oldukça önemlidir. Elektrokimyasal tutuklama metodunun kökeni Umana ve Waller

tarafından gerçekleştirilmiş olan enzim sensörü çalışmalarına dayanmaktadır. Bu metot oligonükleotit (ODN) probu içeren bir solüsyondaki iletken polimer ile ilişkili uygun bir monomerin elektrokimyasal olarak yükseltgenmesini kapsamaktadır. Polipirol filminin oluşturulması esnasında oligonükleotitlerin hibridizasyon aktivitelerini kaybetmeden dopant olarak rol oynayabildiği İlk kez Wang tarafından gösterilmiştir. Bu immobilizasyon metodunun en önemli avantajlarından bir tanesi işlemin basitliğidir. Metodun potansiyel zorluğu ise, polimerizasyon çalışması sırasında yüksek potansiyel enerji kullanımının prob DNA ya zarar verme ihtimali ve hedef DNA ya ulaşılabilirliğin, prob DNA'nın film tabakası içinde birleşik halde kalması nedeni ile zayıf olmasıdır (Garnier ve ark. 1999; Peng ve ark. 2009).

Çalışmamızda *L. monocytogenes* tayini için DNA sensörü geliştirilmeye çalışılmıştır. Yapmış olduğumuz DNA sensör çalışmaları *hlyA* genine ait 702 bç uzunluğundaki ve 16S RNA genine ait 209bç uzunluğundaki fragmentin uygun problar ile hibridizasyonunun tayinine dayanmaktadır. Çalışma elektrotu olarak işlem görmüş kalen ucu ve polipirol ile kaplanmış kalem uçları kullanılmıştır.

Yapılan çalışma genel olarak değerlendirildiğinde; yalnızca prob immobilize elektrotlar, pozitif kontrol dizisi (prob dizisinin eşleniği) ile hibridizasyona alınan elektrotların DPV yöntemi ile elde edilen guanine ait oksidasyon pikleri karşılaştırıldığında, hibridize DNA taşıyan elektrotlarda mevcut pik akımında ciddi bir artış olduğu görülmüştür. Daha önce de söylendiği gibi prob dizisinde guanin yerine inosin bazı bulunduğundan dolayı, hibridizasyondan önce beklenildiği gibi guanine ait yükseltgenme piki görülmemiştir. Benzer şekilde laboratuvar ortamında çoğaltılmış ve saflaştırılmış her iki DNA fragmenti ile hibridizasyon sonrasında alınan voltamogramlar, yalnızca prob bağlı elektrotlardan alınan voltamogramlar ile kıyaslandığında yine pik akım değerlerinde artış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte DNA fragmenti ile hibridizasyon sonrası elde edilen yükseltgenme pik akımları pozitif dizi ile elde edilen pik akımlarından daha düşük olduğu görülmüştür. DNA fragmentindeki baz uzunluğu yıkamalar sırasında hibridizasyonda kayıplara yol açabileceği gibi, prob ile eşleşen kısmın dışında kalan bazların kendi içinde katlanma olasılığı ve deneysel olarak bu katlanmaların kontrol edilememesi



pozitif kontrol grubuna kıyasla neden daha düşük pik akım değerleri alındığını açıklamaktadır. Her üç elektrot tipinde de pik akım değerleri haricinde elektrot davranışlarının benzer olması, yapılan tekrar çalışmalarında benzer sonuçların elde edilebilmiş olması, negatif kontrol gruplarında ve prob bağlı elektrotlarda yükseltgenme pikinin görülmemesi hibridizasyonun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Yine aynı sebep ve sonuçlara dayanarak hibridizasyon sonucunda elektrot yüzeyine tutunan DNA fragmentinde bulunan guanin bazı nedeni ile pik potansiyeli yaklaşık olarak 0,90 V civarında olan bir yükseltgenme pikinin oluştuğu görülmektedir. Negatif kontrol grubu elektrotlarında sinyal görülmemesi herhangi bir şekilde kullanılan solüsyonlara dayalı ya da elektrot kaynaklı bir sinyal alımı olmadığını göstermektedir.

Her iki gen grubu için de yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar hibridizasyon protokolünün başarılı bir şekilde uygulandığını ve hibridizasyon sonrasında elektrot yüzeyine tutunmuş olan DNA sebebi ile her üç elektrot tipinde de guanin temelli bir yükseltgenme pikinin oluştuğunu göstermektedir. Tüm veriler değerlendirildiğinde prob içeren elektrotlar ile hibridizasyona alınan DNA fragmentlerinin elektrokimyasal olarak tayin edilebilir olduğu ve sistemin başarılı bir şekilde çalıştığı görülmektedir. Tekrar çalışmaları ve paralel denemeler sistemin tekrar edilebilir özellikte olduğunu ortaya çıkarmıştır. İki farklı gen grubu birbirileri ile kıyaslandığında, en yüksek akım değeri 702 bç uzunluğundaki fragment ile yapılan denemelerde kullanılan pozitif kontrol dizisi ve saflaştırılmış DNA fragmenti ile hibridizasyona alınmış 2 döngüde sentezlen elektrotlarda gözlenmiştir.

Pozitif kontrol grupları ve deney grupları arasındaki guanine ait oksidasyon pik akım değerlerinin farklı olması ve pozitif kontrol dizilerinde oldukça yüksek sonuçlar elde edilmesi bu grupların prob dizisi ile birebir eşlenik olmasına bağlanmaktadır. 2 ayrı gen bölgesinin birbiri ile karşılaştırılması durumunda ise *hlyA* gen fragmenti ile yapılan çalışma sonucunda gerek pozitif kontrollerde gerekse deney grubunda daha yüksek pik akımı elde edilmesi baz dizilimine bağlanmaktadır. Her ne kadar baz uzunluğu arttıkça hibridizasyondan sonra DNA'nın kendi içinde katlanma olasılığı ve bu durumun sinyal düşüşüne sebep

olma ihtimali bulunsa da yapılan çalışmada bu tipte bir problem ile karşılaşmamıştır.

DNA sensör sistemleri üzerine yapılan diğer araştırmalarda da benzer sonuçların elde edildiği literatür bilgilerinde yer almaktadır. Polipirol ile kaplama yapılarak kullanılan elektrotların yanı sıra DNA sensör çalışmalarında elektrokimyasal ön işleme maruz bırakılmış PGE elektrotları sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan benzer bir araştırmada, guanin yerine inosin içeren prob dizisinin karbon pasta elektrot yüzeyine immobilizasyonu ile guanin yükseltgenme sinyaline dayanan elektrokimyasal hibridizasyon biyosensörü geliştirildiği bildirilmiştir (Wang ve ark. 1998).

“Wang ve Kawde (2001)” tarafından yapılan benzer bir çalışmada kalem uçları çalışma elektrotu olarak kullanılmış ve aktive edilen elektrot yüzeyine prob immobilizasyonu yapıldıktan sonra hibridizasyon tayini gerçekleştirilmiştir.

Kalem ucu elektrotlar sensör çalışmalarına, yüksek elektrokimyasal reaktivitesi, mekanik dayanıklılığı, düşük maliyet ve teknoloji gerektirmemesi, modifikasyon, minyatürleştirme ve yenilenmesinin kolay olması nedeniyle tercih edilmektedir (Wang ve ark. 2000). “Korri-Youssoufi ve Yassar (2001)” tarafından yapılan bir çalışmada oligonükleotit ile işlevsel hale getirilmiş polipirol tabanlı elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Araştırmacılar yaptıkları çalışma sonucunda solüsyonda hedef analit yani prob dizisinin tamamlayıcısı olan DNA fragmenti bulunmadığı zaman işlevsel polipirolün modifiye edilemediğini bu sayede seçiciliğin arttığını bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise DNA hibridizasyon olayını gözlemlemek için araştırmacılar platin elektrot yüzeyine işlevsel hale getirilmiş polipirol ile kaplama yaparak etiketsiz elektrokimyasal sensör geliştirdiklerini bildirmişlerdir (Peng ve ark. 2005). “Marrazza ve ark. (1999)” grafit screen printed elektrot yüzeyine sentetik tek iplik DNA probunu immobilize ederek kısa DNA fragmentlerinin hibridizasyonunu gözlemlemek için tek kullanımlık elektrokimyasal sensör geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte *Listeria monocytogenes* tayini için moleküler çalışmalarda sıklıkla kullanılmış olan *hlyA* gen bölgesi ve 16S RNA gen bölgesi ile yapılmış sensör çalışmalarının sayısı çok yüksek değildir. Bu durum yapılan çalışmanın özgünlüğünü açısından önem taşımaktadır.

## SONUÇ

Gıda kökenli patojenlerin halk sağlığını tehdit etmesi ve gıda üretim sektöründe ciddi kayıplara yol açması, bu patojen türlerinin tayin çalışmalarını da beraberinde getirmiştir. Gıda kökenli bir patojen olarak kabul edilen *L. monocytogenes* önemli gıda patojenleri arasında yer almaktadır. Organizmanın tayini ve kontrolü için geliştirilmiş birçok yöntem mevcuttur.

Organizmanın keşfi ile birlikte izolasyon ve identifikasyon için geliştirilen ilk yöntemler kültüre bağlı olarak yapılmıştır. Klasik kültüre bağlı yöntemler günümüzde pek çok araştırmacı tarafından altın yöntemler olarak kabul edilmekle birlikte, yöntemin iş yükü ve uzun sürede sonuç vermesi, daha hızlı ve ucuz yöntemlere olan ihtiyacı doğurmuştur. Mikrobiyoloji, biyoteknoloji ve moleküler biyoloji alanında yaşanan gelişmeler ışığında *L. monocytogenes* tayini için immüno analiz ve nükleik asit tabanlı yöntemler geliştirilmiştir. Günümüzde organizmanın tayini için çok sayıda yöntem bulunmakta ve bunların bir kısmı ticari olarak satın alınabilmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada tayin için son dönemlerde mikroorganizma tayini alanında sıklıkla kullanılmaya başlanmış olan sensör sistemleri üzerinde durulmuş ve *Listeria* için immünosensör, DNA tabanlı sensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Yapılan sensör çalışmaları *L. monocytogenes* tayini için en çok kullanılmış olan yöntemler ışığında değerlendirilmeye çalışılmıştır.

*Listeria* tayini için kullanılan ve geniş çapta araştırılmış olan klasik kültüre bağlı yöntemler, ELİZA, VİDAS, PZR tabanlı tayin yöntemleri gibi birçok analiz sisteminin birbirine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu bağlamda biyosensörler araştırma çevrelerince tayin için umut vaat eden bir alternatif oluşturmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada gerek immünosensör ile yapılan analizlerde gerekse DNA tabanlı sensör denemelerinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte her iki sisteminde rutinde kullanımı için optimizasyon çalışmalarının yapılmasına ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Yapılan immünoanaliz sensör çalışmaları ELİZA, VİDAS gibi optimize immüno analiz sistemleri ile kıyaslandığında daha az başarılı bulunmuştur. Antikor-antijen ilişkisinin tayinine dayanan sistemin tekrar edilebilirliğinin düşük

olması, kullanılan antikor miktarının yüksek olması ve bu nedenle maliyetin artması, seçiciliğin düşük olması gibi etkenler nedeni ile sistemin uygulanabilir kabul edilmesi için erken olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte elektrokimyasal immüno analiz sensör sistemlerinin optimize edilebilmesi ve mevcut problemlerin ortadan kaldırılması durumunda bu sistemlerinde gelecekte ELİZA sistemleri gibi rutin teknikler arasında yer alacağı düşünülmektedir. Temel olarak benzer prensipler ile çalışılan bu sistemlerde, sensör sistemleri daha çabuk sonuç verme, daha az iş yükü ve daha ucuza mal olma gibi belirgin avantajları ile dikkati çekmektedir.

DNA tabanlı sensörler ile tayin tarihsel açıdan bakıldığında immünoanaliz sensör sistemlerinden daha sonra dikkati çekmiş olmakla birlikte günümüzde oldukça popüler hale gelmiştir. Antikor-antijen ilişkisi yerine, DNA hibridizasyonunun gözlemlenmesine dayanan bu sistemlerde DNA yapısından kaynaklı avantajlar göze çarpmaktadır.

Yapmış olduğumuz elektrokimyasal DNA sensör çalışmalarından genel olarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Tekrar edilebilirlik oranı daha yüksek bulunan sistemin en önemli avantajlarından bir tanesi hedef analitin üretimi için PZR sisteminin kullanılmasıdır. Bu sayede her iki analiz tipi eş zamanlı olarak yürütülebilmekte ve birbirleri için kontrol sistem görevi görmektedir. DNA sensör sistemi ile *Listeria* tayini için yapmış olduğumuz çalışmalarda her ne kadar birçok parametre kontrol edilmiş olsa da sistemin tam olarak kabul görmesi için prob oryantasyonu, seçiliğin tanımlanması için daha fazla farklı fragment ile denemelerin yapılması ve kullanılan analit miktarının düşürülmesi için çalışmaların yapılarak sistemin geliştirilmesi gerekmektedir.

**KAYNAKLAR**

- Anonim. (2011), *CH Instruments Model 600D Series User Manual*, CH Instruments Inc., Austin, Texas.
- Anonim. (2012) *Promega Technical Manual - pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems*,  
<https://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>
- Aznar, R. and Alarcon, B. (2002), ‘On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: Comparison of published primers,’ *Systematic and Applied Microbiology*, **25**, 109–119.
- Aznar, R. and Alarcon, B. (2003), ‘PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity,’ *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 958-966.
- Aragon-Alegro, L.C., Aragon, D.C., Martinez, E.Z., Landgraf, M., Gombossy de Melo Franco, B.D. ve Destro, M.T. (2008), ‘Performance of a chromogenic medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* in food,’ *Food Control*, **19**, 483-486.
- Arshak, K., Velusamy, V., Korostynska, O., Oliwa-Stasiak, K. and Adley, C. (2009), ‘Conducting Polymers and Their Applications to Biosensors: Emphasizing on Foodborne Pathogen Detection’ *IEE Sensors Journal*, **9** (12), 1942-1951.
- Bell, C. ve Kyriakides, A. (2005), *LISTERIA, A practical approach to the organism and its control in food*, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Berktaş, M., Bozkurt, E.N., Bozkurt, H., Alişarlı, M. ve Güdücüoğlu, H. (2006), ‘Et ve et ürünlerinden *Listeria monocytogenes*’ in izolasyonu,’ *Van Tıp Dergisi*, **13** (2), 36-41.
- Beumer, R.R. ve Curtis G.D.W. (2003), ‘Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes*,’ *Handbook of Culture Media for Food*

- Microbiology, (Eds: Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W ve Baird R.M.), Elsevier Science B.V., Oxford, UK, 79-90.
- Beumer, R.R. ve Hazeleger, W.C. (2003), “*Listeria monocytogenes*: diagnostic problems,” *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **35**, 191-197.
- Binsfeld, C. (2008), 3M Microbiology, Food Safety Products and Services, [http://solutions.3m.com.au/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?locale=en\\_WW&lmd=1231540417000&assetId=1180608668985&assetType=MMM\\_Image&blobAttribute=ImageFile](http://solutions.3m.com.au/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?locale=en_WW&lmd=1231540417000&assetId=1180608668985&assetType=MMM_Image&blobAttribute=ImageFile)
- Bille, J., Catimel, B., Bannerman, E., Jacquet, C., Yersin, M.N., Caniaux, I., Monget, D. ve Roccourt, J. (1992), “API Listeria, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates,” *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (6), 1857-1860.
- Bolton, F.J., Sails, A.D., Fox, A.J., Wareing, D.R.A ve Greenway D.L.A. (2002), “Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in foods by enrichment culture and PCR Enzyme Linked Immunosorbent Assay,” *Journal of Food Protect*, **65**, 760-767.
- Brehm-Stecher, B. ve Johnson, E.A. (2007), “Rapid methods for detection of *Listeria*,” *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, (Eds: Ryser, E.T. ve Marth, E.H.), CRC Press, New York, USA, 257-281.
- Buerk, D.G. (1993), *Biosensors: Theory and Applications*, CRC Press, USA.
- Bhunja, A.K., Jaradat, Z.W., Naschansky, K., Shroyer, M., Morgan, M., Gomez, R., Bashir, R. ve Ladisch, M. (2001), “Impedance spectroscopy and biochip sensor for detection of *Listeria monocytogenes*,” *Proceedings of SPIE*, **4206**, 32-39.
- Conroy, P.J., Hearty, S., Leonard, P., O’Kennedy, R.J. (2009), “Antibody production, design and use for biosensor-based applications,” *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **20**: 10-26.
- Corcoran, D., Clancy, D., O’Mahony, M., Grant, K., Hyland, E., Shanaghy, N., Whyte, P., McMauchlin, J., Moloney, A. ve Fanning, S. (2006),

“Comparison of *Listeria monocytogenes* strain types in Irish smoked salmon and other foods’, *Int. J. Hyg. Environ-Health*, 527-534.

Crowley, E.L., O’Sullivan, C.K. ve Guilbault, G.G. (1999), “Increasing the sensitivity of *Listeria monocytogenes* assays: evaluation using ELISA and amperometrik detection,” *Analyst*, **124**: 295-299.

Çolak, N. (2009), *Düşük moleküler ağırlıklı maddelerin dna ile etkileşmesinin elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle algılanması*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Dominguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M.A. ve Arcos-Martinez, M.J. (2007), “Disposable electrochemical biosensors in microbiology,” *Talanta*, **73**, 202-219.

Drummond, T.G., Hill, M.G. ve Barton, J.K. (2003), “Electrochemical DNA sensors,” *Nature Biotechnology*, **21** (10), 1192- 1199.

D’Souza, S.F. (2001), “Microbial biosensors” *Biosensors & Bioelectronics*, **16**: 337–353.

Eggin, B.R. (2002), *Chemical sensors and Biosensors*, John Wiley&Sons Ltd, West Sussex, England.

Ercole, C., Del Gallo, M., Mosiello, L., Baccella, S. ve Lepidi, A. (2003), “*Escherichia coli* detection in vegetable food by a potentiometric biosensor,” *Sensors and Actuators B*, **91**: 163-168.

Garnier, F., Korri-Youssoufi, H., Srivastava, P., Mandrand, B. Ve Delair, T. (1999), “toward intelligent polymers: DNA sensors based on oligonucleotide-functionalized polypyrrolles,” *Synthetic Metals*, **100**, 89-94.

Gasanov. U., Hughes, D. and Hansbro, P.M. (2005), “Methods for the isolation and identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*: a review,” *FEMS Microbiology Reviews*, **29**: 851-875.

Ge, B., Zhao, S., Hall, R. ve Meng, J. (2002), “A PCR ELISA for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli*,” *Microbes Infect.*, **4**, 285-290.

- Ge, H., Gilmore, K.J., Ashraf, S.A., Too, C.O. ve Wallace, G.G. (1993), “Chemical polymerization of 3-methylpyrrole-4-carboxylic acid,” *Polymer*, **34** (9), 2007-2010.
- Geng, T., Morgan, M.T. ve Bhunia, A.K. (2004), “Detection of low levels of *Listeria monocytogenes* cells by using a fiber-optic immunosensor,” *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (10), 6138-6146.
- Gerard, M., Chaubey, A., Malhotra, B.D. (2002), “Application of conducting polymers to biosensors” *Biosensors & Bioelectronics*, **17**, 345-359.
- Gianfranceschi, M., Pourshaban, M., Gattuso, A., Wedell-Neergaard, C. ve Aureli P. (2002), “Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and humans in Italy by pulsed-field gel electrophoresis”, *Food Microbiology*, **19**, 47-55.
- Golsteyn Thomas, E.J., King, R.K., Burchak, J. ve Gannon, V.P.J. (1991), “Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction,” *Applied and Environmental Microbiology*, **57** (99), 2576-2580.
- Gooding, J.J. (2002), “Electrochemical DNA hybridization biosensors,” *Electroanalysis*, **14**(17), 1149-1156.
- Greenwood, M., Willis, C., Doswell, P., Allen, G. ve Pathak, K. (2005), “Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food,” *Journal of Applied Microbiology*, **99** (6), 1340-1345.
- Graves, L.M. ve Swaminathan B. (2001), “PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed field gel electrophoresis,” *International Journal of Food Microbiology*, **65**, 55-62.
- Gupta, V.K., Jain, R., Radhapyari, K., Jadon, N. and Shilpi, A. (2011), “Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals - A review” *Analytical Biochemistry*, **408**, 179-196.
- Gündüz, T. (2002), *İnstrumental Analiz*, Gazi Kitapevi, Ankara, Türkiye.



- Halkman, A.K. (2005), *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*, Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti. Ankara.
- Harris, D.C. (1994), *Analitik Kimya*, (Eds:Somer, G., Solak, A.O., Türker A.R., Kılıç, E., Köseoğlu F., Elçi, L., Özcimder, M.D.M., Ateş, S., Kunç, Ş., Güçer, Ş.), Gazi Büro Kitapevi, Ankara, Türkiye.
- Hein, I., Klein, D., Lehner, A., Bubert, A., Brandl, E. ve Wagner, M. (2001), “Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay,” *Research in Microbiology*, **152**, 37-46.
- Heslop-Harrison, P. and Schwarzacher, T. (2012) *Molecular Cytogenetics Research Group - Buffer and Other Solutions*, <http://www.le.ac.uk/bl/phh4/probuffer.htm>
- Hitchins, A.D ve Jinneman K. (1998), ‘Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Food’ Bacteriological Analytical Manual (FDA-BAM) <http://www.fda.gov/food/scienceresearch/laboratorymethods/bacteriologicalanalyticalmanualbam/ucm071400.htm>
- Janzten, M.M., Navas, J., Corujo, A., Moreno, R., Lopez, V. ve Martinez-Suarez J.V. (2006), “Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in food using commercial methods: from chromogenic media to real-timePCR,” *Spanish journal of Agricultural Research*, **4** (3), 235-247.
- Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Margaret, S.P., son, R., Farinazleen, M.G. ve Cheah, Y.K. (2010), “Detection of *Listeria monocytogenes* in foods,” *International Food Research Journal*, **17**, 1-11.
- Junhui, Z., Hong, C. ve Ruifu, Y. (1997), “DNA based biosensors,” *Biotechnology Advances*, **15** (1), 43-58.
- Kalorey, D.R., Kurkure, N.V., Warke, S.R. ve Barbuddhe, S.B. (2007), “Evaluation of Indirect and Avidin-Biotin Enzyme Linked Immunosorbent Assay for detection of anti-Listeriolysin O antibodies in bovine milk samples,” *Zoonoses Public Health*, **54**, 301-306.

- Kara, P., Cavdar, S., Meric, B., Erensoy, S. and Özsöz, M. (2007), 'Electrochemical probe DNA design in PCR amplicon sequence for the optimum detection of microbiological disease' *Bioelectrochemistry*, **71**, 204-210.
- Kim, H.J. ve Jae-Chang, C. (2008), "Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* using PCR-Enzyme Linked Immunosorbent Assay," *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18** (11), 1858-1861.
- Kim, S.E., Park, M.K., Kim, J.Y., Chuong, P.D., Lee, Y.S., Yoon, B.S., Hwang, K. ve Lim, Y.K. (2005), "Development of a sandwich ELISA for the detection of *Listeria spp.* using specific flagella antibodies," *J. Vet. Sci.*, **6** (1), 41-46.
- Korri-Youssoufi, H. ve Yassar, A. (2001), "Electrochemical probing of DNA based on oligonucleotide-functionalized polypyrrolle," *Biomacromolecules*, **2**, 58-64.
- Kuhn, M., Scortti, M. ve Vazquez-Boland, A. (2008), "Pathogenesis," *Handbook of Listeria monocytogenes*, (Ed: Liu, D.), CRC Press, New York, USA, 97-136.
- Kum, E., Yıldırım, Y. ve Ertaş, N. (2011), "Kayseri' de satışı sunulan peynir örneklerinde *Listeria monocytogenes* varlığının klasik kültür yöntemleri ile belirlenmesi," *Erciyes Üniv. Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, **8** (2), 105-109.
- Lazcka, O., Del Campo, F.J. ve Munoz, F.X. (2007), "Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors," *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 1205-1217.
- Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O'Kennedy, R. (2003), "Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water", *Enzyme and Microbial Technology*, **32**: 3-13.
- Leonard, P., Hearty, S., Quinn, J., O'Kennedy, R. (2004), "A generic approach for the detection of whole *Listeria monocytogenes* cells in contaminated samples using surface Plasmon resonance," *Biosensors and Bioelectronics*, **19**, 1331-1335.

- Liu, D., Lawrence, M.L., Ainsworth, A.J. ve Austin, F.W. (2008), “Genotypic Identification,” *Handbook of Listeria monocytogenes*, (Ed: Liu, D.), CRC Press, New York, USA, 169-203.
- Lorber, B. (2007), “Listeriosis,” *Listeria monocytogenes, Pathogenesis and Host Response* (Eds: Goldfine, H. ve Shen, H.), Springer, New York, USA, 13-31.
- Marrakchi, A.E., Boum’handi, N. ve Hamama, A. (2005), “Performance of new chromogenic plating medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from marine environments,” *Letters in Applied Microbiology*, **40**, 87-91.
- Marrazza, G., Chianella, I. ve Mascini, M. (1999), “Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection,” *Biosensors and Bioelectronics*, **14**, 43-51.
- Mathew, F.P. ve Alocilja, E.C. (2005), “Porous silicon-based biosensors for pathogen detection,” *Biosensors & Bioelectronics*, **20**, 1656-1661.
- McLauchlin, J. (1997), “The identification of *Listeria* species,” *International Journal of Food Microbiology*, **38**, 77-81.
- Meyer, C., Fredriksson-Ahomaa, M., Sperner, B. ve Martlbauer, E. (2011), “Detection of *Listeria monocytogenes* in pork and beef using the VIDAS<sup>®</sup> LMO2 automated enzyme linked immunoassay method,” *Meat Science*, **88**, 594-596.
- Minnet, A.I., Barisci, J.N., Wallace, G.G. (2002), “Immobilization of anti-*Listeria* in a polypyrrole film.” *Reactive & Functional Polymers*, **53**: 217-227.
- Minnet, A.I., Barisci, J.N., Wallace, G.G. (2003), “Coupling conducting polymers and mediated electrochemical responses for the detection of *Listeria*,” *Analytica Chimica Acta*, **475**: 37-45.
- Montville, T.J ve Matthews, K.R. (2008), *Food Microbiology*, ASM Press, Washington DC, USA.

- Mutlu, M.B. (2006), *Tuz gölü bakterilerinin karakterizasyonu ve mevsimsel dağılımı*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Niederhauser, C., Candrian, U., Höfelein, C., Jermini, M., Bühler, H.P. ve Lüthy, J. (1992), "Use of Polymerase Chain Reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food," *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (5), 1564-1568.
- Norton, D.M. ve Braden C.R. (2007), "Foodborne Listeriosis," *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, (Eds: Ryser, E.T. ve Marth, E.H.), CRC Press, New York, USA, 305-356.
- O'Connor, L., O'Leary, M., Leonard, N., Godinho, M., O'Reily, C., Coffey, L., Egan, J. ve O'Mahony, R. (2010), "The characterization of *Listeria spp.* isolated from food products and the food-processing environment', *Letters in Applied Microbiology*, **51**: 490-498.
- O'Grady, J., Sedano-Balbas, S., Maher, M., Smith, T. ve Barry, T. (2008), "Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target," *Food Microbiology*, **25**, 75-84.
- Oktay, H.İ. ve Heperkan, D. (2006), "Evaluation of ISO Method and VIDAS automated system for identifying *Listeria* and *Salmonella* in selected foods," *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, **14**, 133-145.
- Özcan, A., Şahin, M., Özsöz, M. and Turan, S. (2007), 'Electrochemical oxidation of ds-DNA on polypyrrole nanofiber modified pencil graphite electrode' *Electroanalysis* **19**, **21**, 2208-2216.
- Özcan, L. ( 2008), *Polipirol iletken polimerinin biyosensör olarak kullanımı*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Özçelik, N. (1994), "‘*Listeria monocytogenes*’ in tanımı, bulunuşu ve neden olduğu hastalıklar," *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **1** (1), 33-36.

- Painter, J. ve Slutsker, L. (2007), “Listeriosis in Human,” *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, (Eds: Ryser, E.T. ve Marth, E.H.), CRC Press, New York, USA, 85-109.
- Peng, H., Soeller, C., Vigar, N., Kilmartin, P.A., Cannell, M.B., Bowmarker, G.A., Cooney, R.P., Travas-Sejdic, T. (2005), “Label-free electrochemical DNA sensor based on functionalised conducting polymer,” *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 1821-1828.
- Peng, H., Zhang, L., Soeller, C. ve Travas-Sejdic, J. (2009), “Conducting polymers for electrochemical DNA sensing,” *Biomaterials*, **30**, 2132-2148.
- Pinto, M., Burri, S., Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P. ve Gibbs, P.A. (2001), “Comparison of Oxford Agari PALCAM and *Listeria monocytogenes* Blood Agar for the recovery of *L. monocytogenes* from foods and environmental samples,” *Food Control*, **12** (8), 511-514.
- Poltronieri, P., de Blasi, M.D. ve D’Urso, O.F. (2009), “Detection of *Listeria monocytogenes* through real time PCR and biosensors methods,” *Plant Soil Environment*, **55** (9), 363-369.
- Portanti, O., Di Febo, T., Luciani, M., Pompilii, C., Lelli, R. ve Semprini, P. (2011), “Development and validation of an antigene capture ELISA based on monoclonal antibodies specific for *Listeria monocytogenes* in food,” *Veterinaria Italiana*, **47** (3), 281-290.
- Ramanavicius, A., Ramanaviciene, A., Malinausks, A. (2006), “Elechthrochemical sensors based on conducting polymer-polypyrrole” *Electrochimica Acta*, **51**, 6025-6037.
- Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P. ve Cocolin, L. (2008), “Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR,” *International Journal of Food Microbiology*, **121**, 99-105.
- Reissbrodt, R. (2004), “New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria spp.*-an overwiee,” *International Journal of Food Microbiology*, **95**, 1-9.

- Rodriguez-Lazaro, D., Hernandez, M. ve Pla, M. (2004), ‘Simultaneous quantitative detection *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR based assay,’ *FEMS Microbiology Letters*, **233**, 257-267.
- Rodriguez-Lazaro, D., Jofre, A., Aymerich, T., Hugas, M. ve Pla, M. (2004), ‘‘Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR,’’ *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (10), 6299-6301.
- Ruan, C., Wang, H., Yang, L. ve Li, Y. (2003), ‘‘Detection of viable *Listeria monocytogenes* in milk using an electrochemical method,’’ *Journal of Rapid Methods an Automation in Microbiology*, **11**, 11-22.
- Sails, A.D., Bolton, F.J., Fox, A.J., Wareing, D.R.A ve Greenway D.L.A. (2002), ‘‘Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental waters by PCR Enzyme Linked Immunosorbent Assay,’’ *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (3), 1319-1324.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F. Ve Mabilat, C. (1996), ‘‘Comparative Analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species,’’ *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46** (3), 669-674.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbour Laboratory. Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York., volume 3, apendix B 12
- Scheu, P., Gasch, A. ve Berghof, K. (1999), ‘‘Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by PCR-ELISA,’’ *Letters in Applied Microbiology*, **29**, 416-420.
- Schlech III, W.F. (2000), ‘‘Foodborne Listeriosis’’, *Clinical Infectious Diseases*, **31**: 770-775.

- Scotter, S.L., Langton, S., Lombard, B., Schulten, S., Nagelkerke, N., In't Veld, P.H., Rollier, P ve Lahellec, C. (2001a), "Validation of ISO method 11290 Part 1- Detection of *Listeria monocytogenes* in foods," *International Journal of food Microbiology*, **64**, 295-306.
- Scotter, S.L., Langton, S., Lombard, B., Lahellec, C., Schulten, S., Nagelkerke, N., In't Veld, P.H. ve Rollier, P. (2001b), "Validation of ISO method 11290 Part 2- Enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods," *International Journal of food Microbiology*, **70**, 121-129.
- Serra, B., Zhang, J., Morales, M.D., Guzman-Vanquez de Prada, A., Reviejo, A.J., Pingarron, J.M. (2008), "A rapid method for detection of catalase-positive and catalase-negative bacteria based on monitoring of hydrogen peroxide evolution at a composite peroxidase biosensor," *Talanta*, **75**: 1134-1139.
- Sewell, A.M., Warburton, D.W., Boville, A., Daley, E.F. ve Mullen, K. (2003), "The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria spp.* from foods," *International Journal of Food Microbiology*, **81**, 123-129.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (1998), "Enstrümantal Analiz İlkeleri," (Eds: Kılıç, E. ve Yılmaz, H.), Bilim Yayıncılık. Ankara, Türkiye.
- Skoottrup, P.D., Nicolaisen, M. ve Justesen, A.F. (2008), "Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors," *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 339-348.
- Signoretto, C. and Canepari, P. (2008), "Towards more accurate detection of pathogenic Gram-positive bacteria in waters," *Current Opinion in Biotechnology*, **19**: 248-253.
- Solve, M., Boel, J ve Norrung, B. (2000), "Evaluation of monoclonal antibody able to detect live *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*," *International Journal of Food Microbiology*, **57**, 219-224.
- Swaminathan, B., Cabanes, D., Zhang, W. ve Cossart, P. (2007), "*Listeria monocytogenes*," *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, (Eds: Doyle, M.P., Beuchat, L.R.), ASM Press, Washington, D.C., USA, 457-491.

- Şireli, U.T., Göncüoğlu, M. ve Pehlivanlar, S. (2008), “Growth of *Listeria monocytogenes* in çiğ köfte (raw meat ball),” *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, **55**, 83-87.
- Tolba, M., Ahmed, M.U., Tlili, C., Eichenseher, F., Loessner, M.J. ve Zourob, M. (2012), “A bacteriophage endolysin-based electrochemical impedance biosensors for the rapid detection of *Listeria* cells,” *Analyst*, **137**, 5749-5756.
- Toze, S. (1999), “PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater,” *Water Research*, **33** (17), 3545-3556.
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, (2011), *Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği*, Resmi Gazete, 28157.
- Ueda, S. ve Kuwabara, Y. (2010), “Evaluation of an Enzyme-Linked Fluorescent Assay for the detection of *Listeria monocytogenes* from food,” *Biocontrol Science*, **15** (3), 91-95.
- Uraz, G. ve Yücel, N. (1998), “*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* ve benzerlerinin (*Yersinia kristensenii*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*) çiğ süt örneklerinden izolasyonu,” *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, **22**, 463–468.
- Uyttendaele, M., Schukkink, R., Gemen, B. ve Debevere, J. (1995), “Development of NASBA, a nucleic acid amplification system, for identification of *Listeria monocytogenes* and comparison to ELISA and modified FDA method,” *International Journal of Food Microbiology*, **27**, 77-89.
- Vaz-velho, M., Duarte, G. ve Gibbs, P. (2000), “Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish,” *Journal of Microbiological Methods*, **40**, 147-151.
- Vestergaard, M., Kerman, K., Tamiya, E. (2005), “An electrochemical approach for detecting copper-chelating properties of flavonoids using disposable pencil graphite electrodes: Possible implications in copper-mediated illnesses” *Analytica ChimicaActa*, **538**, 273-281.



- Voller, A., Bartlett, A ve Bidwell, D.E. (1978), “Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques,” *Journal of Clinical Pathology*, **31**, 507-520.
- Wallace, G.G. and Kane-Maguire, L.A.P. (2002), “Manipulating and Monitoring Biomolecular Interactions with Conducting Electroactive Polymers” *Advanced Materials*, **14**(13-14), 953-960.
- Wagner, M. ve McLauchlin, J. (2008), “Biology,” *Handbook of Listeria monocytogenes*, (Ed: Liu, D.), CRC Press, New York, USA, 3-25.
- Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., Farias, P.A., Valera, F.S., Grant, D.H., Ozsoz, M. ve Flair, M.N. (1997), “DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review,” *Analytica Chimica Acta*, **347**, 1-8.
- Wang, J. ve Kawde, A.N. (2001), “Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization,” *Analytica Chimica Acta*, **431**, 219-224.
- Wang, J., Kawde, A.N. ve Sahlin, E. (2000), “Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA,” *The Analyst Communication*, **125**, 5-7.
- Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Paz, J.L.L., Jiang, M., Waymire, R. (1998), “Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensors,” *Analytica Chimica Acta*, **375**, 197-203.
- Yalçın, G. (2007), *Bazı kimyasal maddelerin DNA ile etkileşmesinin biyosensörlerle algılanması*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Yang, L., Bashir, R. (2008), “Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria” *Biotechnology Advances*, **26**, 135-150.
- Yavuz, M. ve Korukluoğlu, M. (2010), ‘*Listeria monocytogenes*’ in gıdalardaki önemi ve insan sağlığı üzerine etkileri,” *U.Ü. Ziraat fakültesi Dergisi*, **24** (1), 1-10.

- Yıldız, A., Genç, Ö. (1993), *Enstrümental Analiz*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, Türkiye.
- Yıldız, M.T. (2009), *Tetrahymena thermophila Mapk enzim ailesinden birinin cDNA'sının klonlanması ve mRNA ifadesinin karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Zhai, J., Cui, H., Yang, R. (1997), "DNA based biosensors" *Biotechnology Advances*, **15**, 43-58.

### **Ek-1 Ticari olarak satın alınan antikorun bütün hücre ile ilişkisinin kontrolü**

1. *L. monocytogenes* ATCC 19111 kültürü 24 saat süre ile BHI sıvı besiyerinde geliştirildikten sonra 10,000 g'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. 500 mM Tris HCl pH 7,4 ve 150 mM NaCl karıştırılarak 10X TBS stok solüsyonu hazırlanmıştır.
2. Pelet üzerine 10 ml 1X TBS-T solüsyonu ilave edilerek 10,000 g'de 10 dakika santrifüj ile yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından yıkama işlemi ikinci kez tekrar edilmiştir.
3. 10 ml 1X TBS-T solüsyonu içerisine 4 µg/ml olacak şekilde aLis ilave edilerek, birincil antikor solüsyonu hazırlanmıştır.
4. Yıkama işlemi yapılmış olan peletin üzerine hazırlanan birincil antikor solüsyonu ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon ile bağlanma reaksiyonu sağlanmıştır.
5. İnkübasyon süresinin sonunda örnek 10,000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından 10 ml 1X TBS-T solüsyonu ile bir kez yıkama işlemi yapılmıştır.
6. 10 ml 1X TBS-T solüsyonu içerisine 1 µl anti mouse antikor ilave edilerek, ikincil antikor solüsyonu hazırlanmıştır.
7. Yıkama işlemi yapılmış olan peletin üzerine hazırlanan ikincil antikor solüsyonu ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
8. İnkübasyon süresinin sonunda örnek 10,000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından 10 ml 1X TBS solüsyonu ile bir kez yıkama işlemi yapılmıştır.
9. 60 mg 4-klor-1-naftol (4CN) 20 ml soğuk metanol içerisinde çözdürülmüş ve üzerine 80 ml 1X TBS + 60 µl %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilerek 4CN-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karışımı taze olarak hazırlanmıştır.
10. Yıkama işlemi yapılan pelet 200 µl TBS içerisinde çözdürüldükten sonra elde edilen süspansiyondan 100 µl alınarak watman kâğıdı üzerine yayılmıştır. Ardından üzerine hazırlanan 4CN-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karışımı ilave edilmiş ve karanlık ortamda 10 dakika süre ile bekletilmiştir. Süre sonunda siyah renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.



J5043\_3229 AGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTATAAAGATGGAAATGAATATA  
 J4901\_3229 AGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTATAAAGATGGAAATGAATATA  
 NWI\_322952 AGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTATAAAGATGGAAATGAATATA  
 J4403\_3229 AGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTATAAAGATGGAAATGAATATA  
 n07PF0776 AGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTATAAAGATGGAAATGAATATA  
 OIS\_322952 AGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTATAAAGATGGAAATGAATATA  
 OIJ\_322952 AGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGGAAATGAATATA  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 AGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGGAAATGAATATA  
 NRRL\_B\_3\_6 AGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGGAAATGAATATA  
 NRRL\_B\_3\_7 AGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGGAAATGAATATA  
 NRRL\_B\_3\_8 AGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGGAAATGAATATA  
 \*\*\*\*\*

J5043\_3229 TCGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAAATAATGCAGATATC  
 J4901\_3229 TCGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAAATAATGCAGATATC  
 NWI\_322952 TCGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAAATAATGCAGATATC  
 J4403\_3229 TCGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAAATAATGCAGATATC  
 n07PF0776 TCGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAAATAATGCAGATATC  
 OIS\_322952 TCGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAAATAATGCAGATATC  
 OIJ\_322952 TCGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAAATAATGCAGATATC  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 TTGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAAATAATGCAGACATC  
 NRRL\_B\_3\_6 TTGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAAATAATGCAGACATC  
 NRRL\_B\_3\_7 TTGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAAATAATGCAGACATC  
 NRRL\_B\_3\_8 TTGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAAATAATGCAGACATC  
 \* \*\*\*\*\* \*

J5043\_3229 CAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACATATCCAGGTGCTCTCGTGAA  
 J4901\_3229 CAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACATATCCAGGTGCTCTCGTGAA  
 NWI\_322952 CAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACATATCCAGGTGCTCTCGTGAA  
 J4403\_3229 CAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACATATCCAGGTGCTCTCGTGAA  
 n07PF0776 CAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACATATCCAGGTGCTCTCGTGAA  
 OIS\_322952 CAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACATATCCAGGTGCTCTCGTGAA  
 OIJ\_322952 CAAGTTGTAAATGCAATTTTCGAGCCTAACTTATCCAGGTGCTCTCGTAAA  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 CAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACCTATCCAGGTGCTCTCGTAAA  
 NRRL\_B\_3\_6 CAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACCTATCCAGGTGCTCTCGTAAA  
 NRRL\_B\_3\_7 CAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACCTATCCAGGTGCTCTCGTAAA  
 NRRL\_B\_3\_8 CAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCTAACCTATCCAGGTGCTCTCGTAAA  
 \*\*\*\*\* \*

J5043\_3229 AGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCCGATGTTCTTCCCTGTCAAAC  
 J4901\_3229 AGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCCGATGTTCTTCCCTGTCAAAC  
 NWI\_322952 AGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCCGATGTTCTTCCCTGTCAAAC  
 J4403\_3229 AGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCCGATGTTCTTCCCTGTCAAAC  
 n07PF0776 AGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCCGATGTTCTTCCCTGTCAAAC  
 OIS\_322952 AGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCCGATGTTCTTCCCTGTCAAAC  
 OIJ\_322952 AGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCCGATGTTCTTCCCTGTCAAAC  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 AGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCCGATGTTCTTCCCTGTCAAAC  
 NRRL\_B\_3\_6 AGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCCGATGTTCTTCCCTGTCAAAC  
 NRRL\_B\_3\_7 AGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCCGATGTTCTTCCCTGTCAAAC  
 NRRL\_B\_3\_8 AGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCCGATGTTCTTCCCTGTCAAAC  
 \*\*\*\*\* \*

J5043\_3229 GTGATTCATTAACACTTAGCATTGATTTGCCAGGAATGACTAATCAAGAC  
 J4901\_3229 GTGATTCATTAACACTTAGCATTGATTTGCCAGGAATGACTAATCAAGAC  
 NWI\_322952 GTGATTCATTAACACTTAGCATTGATTTGCCAGGAATGACTAATCAAGAC  
 J4403\_3229 GTGATTCATTAACACTTAGCATTGATTTGCCAGGAATGACTAATCAAGAC  
 n07PF0776 GTGATTCATTAACACTTAGCATTGATTTGCCAGGAATGACTAATCAAGAC  
 OIS\_322952 GTGATTCATTAACACTTAGCATTGATTTGCCAGGAATGACTAATCAAGAC  
 OIJ\_322952 GTGATTCATTAACACTTAGCATCGATTTGCCAGGAATGACTAATCAAGAC  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 GTGATTCATTAACACTCAGCATGATTTGCCAGGTATGACTAATCAAGAC  
 NRRL\_B\_3\_6 GTGATTCATTAACACTCAGCATGATTTGCCAGGTATGACTAATCAAGAC  
 NRRL\_B\_3\_7 GTGATTCATTAACACTCAGCATGATTTGCCAGGTATGACTAATCAAGAC  
 NRRL\_B\_3\_8 GTGATTCATTAACACTCAGCATGATTTGCCAGGTATGACTAATCAAGAC  
 \*\*\*\*\* \*

J5043\_3229 AATAAAATGTTGTAAAAAATGCTACTAAATCGAACGTTAACACCGCAGT  
 J4901\_3229 AATAAAATGTTGTAAAAAATGCTACTAAATCGAACGTTAACACCGCAGT  
 NWI\_322952 AATAAAATGTTGTAAAAAATGCTACTAAATCGAACGTTAACACCGCAGT  
 J4403\_3229 AATAAAATGTTGTAAAAAATGCTACTAAATCGAACGTTAACACCGCAGT  
 n07PF0776 AATAAAATGTTGTAAAAAATGCTACTAAATCGAACGTTAACACCGCAGT  
 OIS\_322952 AATAAAATGTTGTAAAAAATGCTACTAAATCGAACGTTAACACCGCAGT  
 OIJ\_322952 AATAAAATCGTTGTAAAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACACCGCAGT  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 AATAAAATCGTTGTAAAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACACCGCAGT  
 NRRL\_B\_3\_6 AATAAAATCGTTGTAAAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACACCGCAGT  
 NRRL\_B\_3\_7 AATAAAATCGTTGTAAAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACACCGCAGT  
 NRRL\_B\_3\_8 AATAAAATCGTTGTAAAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACACCGCAGT









NRRL\_B\_3\_7 AACATAAAAACCTGGAGCGAAAACAATAAAAAGCAAGCTAGCTCATTTTACACA  
 NRRL\_B\_3\_8 AACATAAAAACCTGGAGCGAAAACAATAAAAAGCAAGCTAGCTCATTTTACACA  
 \*\*\*\*\* \*\*

J5043\_3229 TCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACGCAAGAAATATTAATGTTTACGCTAA  
 J4901\_3229 TCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACGCAAGAAATATTAATGTTTACGCTAA  
 NWI\_322952 TCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACGCAAGAAATATTAATGTTTACGCTAA  
 J4403\_3229 TCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACGCAAGAAATATTAATGTTTACGCTAA  
 n07PF0776 TCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACGCAAGAAATATTAATGTTTACGCTAA  
 OIS\_322952 TCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACGCAAGAAATATTAATGTTTACGCTAA  
 OIJ\_322952 TCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACGCAAGAAATATTAATGTTTACGCTAA  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 TCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACGCAAGAAATATTAATGTTTACGCTAA  
 NRRL\_B\_3\_6 TCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACGCGAGAAATATTAATGTTTACGCTAA  
 NRRL\_B\_3\_7 TCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACGCGAGAAATATTAATGTTTACGCTAA  
 NRRL\_B\_3\_8 TCGTCCATCTATTTGCCAGGTAACGCGAGAAATATTAATGTTTACGCTAA  
 \*\*\*\*\* \*\*

J5043\_3229 AGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGATGACC  
 J4901\_3229 AGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGATGACC  
 NWI\_322952 AGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGATGACC  
 J4403\_3229 AGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGATGACC  
 n07PF0776 AGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGATGACC  
 OIS\_322952 AGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGATGACC  
 OIJ\_322952 AGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGATGACC  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 AGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGATGACC  
 NRRL\_B\_3\_6 AGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGATGACC  
 NRRL\_B\_3\_7 AGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGATGACC  
 NRRL\_B\_3\_8 AGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGATGACC  
 \*\*\*\*\* \*\*

J5043\_3229 GGAACCTACCCTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACTACA  
 J4901\_3229 GGAACCTACCCTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACTACA  
 NWI\_322952 GGAACCTACCCTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACTACA  
 J4403\_3229 GGAACCTACCCTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACTACA  
 n07PF0776 GGAACCTACCCTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACTACA  
 OIS\_322952 GGAACCTACCCTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACTACA  
 OIJ\_322952 GGAACCTACCCTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACTACG  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 GGAACCTACCCTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACCACG  
 NRRL\_B\_3\_6 GGAACCTACCCTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACCACG  
 NRRL\_B\_3\_7 GGAACCTACCCTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACCACG  
 NRRL\_B\_3\_8 GGAACCTACCCTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACCACG  
 \*\*\*\*\* \*\*

J5043\_3229 CTTTATCCGAAATATAGTAATAGTGTAGATAATCCAATCGAATAA-----  
 J4901\_3229 CTTTATCCGAAATATAGTAATAGTGTAGATAATCCAATCGAATAA-----  
 NWI\_322952 CTTTATCCGAAATATAGTAATAGTGTAGATAATCCAATCGAATAA-----  
 J4403\_3229 CTTTATCCGAAATATAGTAATAGTGTAGATAATCCAATCGAATAA-----  
 n07PF0776 CTTTATCCGAAATATAGTAATAGTGTAGATAATCCAATCGAATAA-----  
 OIS\_322952 CTTTATCCGAAATATAGTAATAGTGTAGATAATCCAATCGAATAA-----  
 OIJ\_322952 CTTTATCCGAAATATAGTAATAGTGTAGATAATCCAATCGAATAA-----  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 CTTTATCCGAAATATAGTAATAAAGTAGATAATCCAATCGAATAAATTGTA  
 NRRL\_B\_3\_6 CTTTATCCGAAATATAGTAATAAAGTAGATAATCCAATCGAATAAATTGTA  
 NRRL\_B\_3\_7 CTTTATCCGAAATATAGTAATAAAGTAGATAATCCAATCGAATAAATTGTA  
 NRRL\_B\_3\_8 CTTTATCCGAAATATAGTAATAAAGTAGATAATCCAATCGAATAAATTGTA  
 \*\*\*\*\* \*\*

J5043\_3229 -----  
 J4901\_3229 -----  
 NWI\_322952 -----  
 J4403\_3229 -----  
 n07PF0776 -----  
 OIS\_322952 -----  
 OIJ\_322952 -----  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 AAAGTAATAAAAAATTAAGAATAAAAACCGCTTAACACACACGAAAAAATA  
 NRRL\_B\_3\_6 AAAGTAATAAAAAATTAAGAATAAAAACCGCTTAACACACACGAAAAAATA  
 NRRL\_B\_3\_7 AAAGTAATAAAAAATTAAGAATAAAAACCGCTTAACACACACGAAAAAATA  
 NRRL\_B\_3\_8 AAAGTAATAAAAAATTAAGAATAAAAACCGCTTAACACACACGAAAAAATA

J5043\_3229 -----  
 J4901\_3229 -----  
 NWI\_322952 -----  
 J4403\_3229 -----  
 n07PF0776 -----

```

OIS_322952 -----
OIJ_322952 -----
NRRL_B_33460_223702377 AGCTTGTTTTGCACTCTTCGTA AATTATTTTGTGAAGAATGTAGAAACAG
NRRL_B_3_6 AGCTTGTTTTGCACTCTTCGTA AATTATTTTGTGAAGAATGTAGAAACAG
NRRL_B_3_7 AGCTTGTTTTGCACTCTTCGTA AATTATTTTGTGAAGAATGTAGAAACAG
NRRL_B_3_8 AGCTTGTTTTGCACTCTTCGTA AATTATTTTGTGAAGAATGTAGAAACAG

J5043_3229 -----
J4901_3229 -----
NWI_322952 -----
J4403_3229 -----
n07PF0776 -----
OIS_322952 -----
OIJ_322952 -----
NRRL_B_33460_223702377 GCTTATTTTTTAATTTTTTTAG AAGAATTAACAAATGTAAAAGAATATCT
NRRL_B_3_6 GCTTATTTTTTAATTTTTTTAG AAGAATTAACAAATGTAAAAGAATATCT
NRRL_B_3_7 GCTTATTTTTTAATTTTTTTAG AAGAATTAACAAATGTAAAAGAATATCT
NRRL_B_3_8 GCTTATTTTTTAATTTTTTTAG AAGAATTAACAAATGTAAAAGAATATCT

J5043_3229 -----
J4901_3229 -----
NWI_322952 -----
J4403_3229 -----
n07PF0776 -----
OIS_322952 -----
OIJ_322952 -----
NRRL_B_33460_223702377 GACTGTTTATCCATATAATATA AAGCATATCCCAAAGTTAAGCCACCTAT
NRRL_B_3_6 GACTGTTTATCCATATAATATA AAGCATATCCCAAAGTTAAGCCACCTAT
NRRL_B_3_7 GACTGTTTATCCATATAATATA AAGCATATCCCAAAGTTAAGCCACCTAT
NRRL_B_3_8 GACTGTTTATCCATATAATATA AAGCATATCCCAAAGTTAAGCCACCTAT

J5043_3229 -----
J4901_3229 -----
NWI_322952 -----
J4403_3229 -----
n07PF0776 -----
OIS_322952 -----
OIJ_322952 -----
NRRL_B_33460_223702377 AGTTTCTACTGCAAAAACGTATA AATTTAGTTCCACATATACTAAAAAACG
NRRL_B_3_6 AGTTTCTACTGCAAAAACGTATA AATTTAGTTCCACATATACTAAAAAACG
NRRL_B_3_7 AGTTTCTACTGCAAAAACGTATA AATTTAGTTCCACATATACTAAAAAACG
NRRL_B_3_8 AGTTTCTACTGCAAAAACGTATA AATTTAGTTCCACATATACTAAAAAACG

J5043_3229 -----
J4901_3229 -----
NWI_322952 -----
J4403_3229 -----
n07PF0776 -----
OIS_322952 -----
OIJ_322952 -----
NRRL_B_33460_223702377 TGTCCCTAACTCTCTCTGTCAG ATTAGTTGTAGGTGGCTTAAACTTAGTT
NRRL_B_3_6 TGTCCCTAACTCTCTCTGTCAG ATTAGTTGTAGGTGGCTTAAACTTAGTT
NRRL_B_3_7 TGTCCCTAACTCTCTCTGTCAG ATTAGTTGTAGGTGGCTTAAACTTAGTT
NRRL_B_3_8 TGTCCCTAACTCTCTCTGTCAG ATTAGTTGTAGGTGGCTTAAACTTAGTT

J5043_3229 -----
J4901_3229 -----
NWI_322952 -----
J4403_3229 -----
n07PF0776 -----
OIS_322952 -----
OIJ_322952 -----
NRRL_B_33460_223702377 TTACGAATTA AAAAGGAGCGGTGAAATGAAAAGTAAACTTATTTGTATCA
NRRL_B_3_6 TTACGAATTA AAAAGGAGCGGTGAAATGAAAAGTAAACTTATTTGTATCA
NRRL_B_3_7 TTACGAATTA AAAAGGAGCGGTGAAATGAAAAGTAAACTTATTTGTATCA
NRRL_B_3_8 TTACGAATTA AAAAGGAGCGGTGAAATGAAAAGTAAACTTATTTGTATCA

```

J5043\_3229 -----  
 J4901\_3229 -----  
 NWI\_322952 -----  
 J4403\_3229 -----  
 n07PF0776 -----  
 OIS\_322952 -----  
 OIJ\_322952 -----  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 TCATGGTAATAGCTTTTCAGGCTCATTTCACTATGACGGTAAAAGCAGAT  
 NRRL\_B\_3\_6 TCATGGTAATAGCTTTTCAGGCTCATTTCACTATGACGGTAAAAGCAGAT  
 NRRL\_B\_3\_7 TCATGGTAATAGCTTTTCAGGCTCATTTCACTATGACGGTAAAAGCAGAT  
 NRRL\_B\_3\_8 TCATGGTAATAGCTTTTCAGGCTCATTTCACTATGACGGTAAAAGCAGAT

J5043\_3229 -----  
 J4901\_3229 -----  
 NWI\_322952 -----  
 J4403\_3229 -----  
 n07PF0776 -----  
 OIS\_322952 -----  
 OIJ\_322952 -----  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 TCTGTCGGGGAAGAAAACTTCAAAAATAATACACAAGCCAAAAAGACCCC  
 NRRL\_B\_3\_6 TCTGTCGGGGAAGAAAACTTCAAAAATAATACACAAGCCAAAAAGACCCC  
 NRRL\_B\_3\_7 TCTGTCGGGGAAGAAAACTTCAAAAATAATACACAAGCCAAAAAGACCCC  
 NRRL\_B\_3\_8 TCTGTCGGGGAAGAAAACTTCAAAAATAATACACAAGCCAAAAAGACCCC

J5043\_3229 -----  
 J4901\_3229 -----  
 NWI\_322952 -----  
 J4403\_3229 -----  
 n07PF0776 -----  
 OIS\_322952 -----  
 OIJ\_322952 -----  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 TGCTGATTTAAAAGCTTTGCCAGATTCTGCGAAGCAAAAAGATTTTTATA  
 NRRL\_B\_3\_6 TGCTGATTTAAAAGCTTTGCCAGATTCTGCGAAGCAAAAAGATTTTTATA  
 NRRL\_B\_3\_7 TGCTGATTTAAAAGCTTTGCCAGATTCTGCGAAGCAAAAAGATTTTTATA  
 NRRL\_B\_3\_8 TGCTGATTTAAAAGCTTTGCCAGATTCTGCGAAGCAAAAAGATTTTTATA

J5043\_3229 -----  
 J4901\_3229 -----  
 NWI\_322952 -----  
 J4403\_3229 -----  
 n07PF0776 -----  
 OIS\_322952 -----  
 OIJ\_322952 -----  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 AAAATTTTAAAATTCCTTGATATGACAAAAGATAAGCTAGGCCTTACGCAT  
 NRRL\_B\_3\_6 AAAATTTTAAAATTCCTTGATATGACAAAAGATAAGCTAGGCCTTACGCAT  
 NRRL\_B\_3\_7 AAAATTTTAAAATTCCTTGATATGACAAAAGATAAGCTAGGCCTTACGCAT  
 NRRL\_B\_3\_8 AAAATTTTAAAATTCCTTGATATGACAAAAGATAAGCTAGGCCTTACGCAT

J5043\_3229 -----  
 J4901\_3229 -----  
 NWI\_322952 -----  
 J4403\_3229 -----  
 n07PF0776 -----  
 OIS\_322952 -----  
 OIJ\_322952 -----  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 TATACGCTCGCGCTAAGTTCTGGTGGTTACTTGACCGATAATGATGAAAT  
 NRRL\_B\_3\_6 TATACGCTCGCGCTAAGTTCTGGTGGTTACTTGACCGATAATGATGAAAT  
 NRRL\_B\_3\_7 TATACGCTCGCGCTAAGTTCTGGTGGTTACTTGACCGATAATGATGAAAT  
 NRRL\_B\_3\_8 TATACGCTCGCGCTAAGTTCTGGTGGTTACTTGACCGATAATGATGAAAT

J5043\_3229 -----  
 J4901\_3229 -----  
 NWI\_322952 -----  
 J4403\_3229 -----  
 n07PF0776 -----  
 OIS\_322952 -----  
 OIJ\_322952 -----  
 NRRL\_B\_33460\_223702377 CAAGGTCCACGTCACACCGGATAATAAAAATCACTTTCATAAATGGAGATT  
 NRRL\_B\_3\_6 CAAGGTCCACGTCACACCGGATAATAAAAATCACTTTCATAAATGGAGATT

NRRL_B_3_7	CAAGGTCCACGTCACACCGGATAATAAAAATCACTTTTCATAAATGGAGATT
NRRL_B_3_8	CAAGGTCCACGTCACACCGGATAATAAAAATCACTTTTCATAAATGGAGATT
J5043_3229	-----
J4901_3229	-----
NWI_322952	-----
J4403_3229	-----
n07PF0776	-----
OIS_322952	-----
OIJ_322952	-----
NRRL_B_33460_223702377	TGCAGCAAGGACAGCTTAGGATTACTAATCAAATAAAAATTACAGAAAAA
NRRL_B_3_6	TGCAGCAAGGACAGCTTAGGATTACTAATCAAATAAAAATTACAGAAAAA
NRRL_B_3_7	TGCAGCAAGGACAGCTTAGGATTACTAATCAAATAAAAATTACAGAAAAA
NRRL_B_3_8	TGCAGCAAGGACAGCTTAGGATTACTAATCAAATAAAAATTACAGAAAAA
J5043_3229	-----
J4901_3229	-----
NWI_322952	-----
J4403_3229	-----
n07PF0776	-----
OIS_322952	-----
OIJ_322952	-----
NRRL_B_33460_223702377	AATGCTATCGAAAAAGCATTGAAGCCATTGGTCAGAGTGAAGCTCATGT
NRRL_B_3_6	AATGCTATCGAAAAAGCATTGAAGCCATTGGTCAGAGTGAAGCTCATGT
NRRL_B_3_7	AATGCTATCGAAAAAGCATTGAAGCCATTGGTCAGAGTGAAGCTCATGT
NRRL_B_3_8	AATGCTATCGAAAAAGCATTGAAGCCATTGGTCAGAGTGAAGCTCATGT
J5043_3229	-----
J4901_3229	-----
NWI_322952	-----
J4403_3229	-----
n07PF0776	-----
OIS_322952	-----
OIJ_322952	-----
NRRL_B_33460_223702377	GAAAAGTTATGTCGGAAACCCAGTGAAAGAAAAAGAAATCATCCTCAATT
NRRL_B_3_6	GAAAAGTTATGTCGGAAACCCAGTGAAAGAAAAAGAAATCATCCTCAATT
NRRL_B_3_7	GAAAAGTTATGTCGGAAACCCAGTGAAAGAAAAAGAAATCATCCTCAATT
NRRL_B_3_8	GAAAAGTTATGTCGGAAACCCAGTGAAAGAAAAAGAAATCATCCTCAATT
J5043_3229	-----
J4901_3229	-----
NWI_322952	-----
J4403_3229	-----
n07PF0776	-----
OIS_322952	-----
OIJ_322952	-----
NRRL_B_33460_223702377	CCAGAACAAAACGCTTAGTTTATAATATAAAAATTGATTTTTGCTGA
NRRL_B_3_6	CCAGAACAAAACGCTTAGTTTATAATATAAAAATTGATTTTTGCTGA
NRRL_B_3_7	CCAGAACAAAACGCTTAGTTTATAATATAAAAATTGATTTTTGCTGA
NRRL_B_3_8	CCAGAACAAAACGCTTAGTTTATAATATAAAAATTGATTTTTGCTGA

Kırmızı ile işaretli bölge ileri primer dizisi, yeşil ile işaretli bölge prob dizisi, sarı ile işaretli bölge: geri primer dizisi.

### Ek-3 16S RNA gen fragmenti için dikey hizalamada kullanılan gen bölgeleri

Phylogeny.fr dikey hizalama sonuçları  
 CLUSTAL 2.0.3 multiple sequence alignment

```

Lm4_347014      AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC
Lmonocytog      AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC
Lm2_347014      AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC
Lm6_347014      AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC
LinnocuaN2      -----TACATGCAAGTCGAAC
Lwelshimer      AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC
Lgrayi2540      AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC
                                     *****

Lm4_347014      GAACGGAGG-AAGAGCTTGCTCTTCCAAA-GTTAGTGGCGGACGGGTAGTAACACGTGG
Lmonocytog      GAACGGAGG-AAGAGCTTGCTCTTCCAAA-GTTAGTGGCGGACGGGTAGTAACACGTGG
Lm2_347014      GAACGGAGG-AAGAGCTTGCTCTTCCAAA-GTTAGTGGCGGACGGGTAGTAACACGTGG
Lm6_347014      GAACGGAGG-AAGAGCTTGCTCTTCCAAAT-GTTAGTGGCGGACGGGTAGTAACACGTGG
LinnocuaN2      GAACGGAGG-AAGAGCTTGCTCTTCCAAA-GTTAGTGGCGGACGGGTAGTAACACGTGG
Lwelshimer      GAACGGAGG-AAGAGCTTGCTCTTCCAAA-GTTAGTGGCGGACGGGTAGTAACACGTGG
Lgrayi2540      GAATGACCTTAGGAGCTTGCTCTTGGTTCGTTAGTGGCGGACGGGTAGTAACACGTGG
*** *          * ***** *          *****

Lm4_347014      GCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAA
Lmonocytog      GCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAA
Lm2_347014      GCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAGA
Lm6_347014      GCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAG
LinnocuaN2      GCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAGA
Lwelshimer      GCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATAAG
Lgrayi2540      GCAACCTGCCTGTAAGATTGGGATAACTCCGGGAAACTGGAGCTAATACCGAATAATAAT
***** * ***** ** *****

Lm4_347014      GTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGC
Lmonocytog      GTGTGGCGCATGCCATGCTTTTGAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGC
Lm2_347014      ATGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGC
Lm6_347014      ATGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGC
LinnocuaN2      GTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGC
Lwelshimer      TGGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGC
Lgrayi2540      CAGCTCCGCATGGAGCAGGTTTGAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGC
*          *****          ***** ** *****

Lm4_347014      GGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTG
Lmonocytog      GGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTG
Lm2_347014      GGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTG
Lm6_347014      GGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTG
LinnocuaN2      GGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTG
Lwelshimer      GGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTG
Lgrayi2540      GGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTG
*****

Lm4_347014      AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
Lmonocytog      AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
Lm2_347014      AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
Lm6_347014      AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
LinnocuaN2      AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
Lwelshimer      AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
Lgrayi2540      AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
*****

Lm4_347014      TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGG
Lmonocytog      TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGG
Lm2_347014      TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGG
Lm6_347014      TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGG
LinnocuaN2      TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGG
Lwelshimer      TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGG
Lgrayi2540      TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGG
*****

Lm4_347014      TTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAAGAGTAACTGCTTGTCC
Lmonocytog      TTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAAGAGTAACTGCTTGTCC
Lm2_347014      TTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAAGAGTAACTGCTTGTCC
Lm6_347014      TTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAAGAGTAACTGCTTGTCC

```

LinnocuaN2 TTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAAGAGTAACTGCTTGTCC  
Lwelshimer TTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAAGAGTAACTGCTTGTCC  
Lgrayi2540 TTTTCGGATCGTAAAGCACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAAGAGTAACTGCTTGTCC  
\*\*\*\*\*

Lm4\_347014 CTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
Lmonocyto CTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
Lm2\_347014 CTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
Lm6\_347014 CTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
LinnocuaN2 CTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
Lwelshimer CTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
Lgrayi2540 CTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
\*\*\*\*\*

Lm4\_347014 TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTTTAAAG  
Lmonocyto TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTTTAAAG  
Lm2\_347014 TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTTTAAAG  
Lm6\_347014 TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTTTAAAG  
LinnocuaN2 TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTTTAAAG  
Lwelshimer TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTTTAAAG  
Lgrayi2540 TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTTTAAAG  
\*\*\*\*\*

Lm4\_347014 TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGAAGACT-GGAG  
Lmonocyto TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGAAGACT-GGAG  
Lm2\_347014 TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGAAGACT-GGAG  
Lm6\_347014 TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGAAGACT-GGAG  
LinnocuaN2 TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGAAGACT-GGAG  
Lwelshimer TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGAAGACT-GGAG  
Lgrayi2540 TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGAAGACTTAGAG  
\*\*\*\*\*

Lm4\_347014 TGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAA  
Lmonocyto TGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAA  
Lm2\_347014 TGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAA  
Lm6\_347014 TGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAA  
LinnocuaN2 TGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAA  
Lwelshimer TGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAA  
Lgrayi2540 TGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAA  
\*\*\*\*\*

Lm4\_347014 CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG  
Lmonocyto CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG  
Lm2\_347014 CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG  
Lm6\_347014 CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG  
LinnocuaN2 CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG  
Lwelshimer CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG  
Lgrayi2540 CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG  
\*\*\*\*\*

Lm4\_347014 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAG  
Lmonocyto AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAG  
Lm2\_347014 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAG  
Lm6\_347014 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAG  
LinnocuaN2 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAG  
Lwelshimer AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAG  
Lgrayi2540 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAG  
\*\*\*\*\*

Lm4\_347014 GGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGA  
Lmonocyto GGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGA  
Lm2\_347014 GGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGA  
Lm6\_347014 GGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGA  
LinnocuaN2 GGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGA  
Lwelshimer GGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGA  
Lgrayi2540 GGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGA  
\*\*\*\*\*

Lm4\_347014 CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
Lmonocyto CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
Lm2\_347014 CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
Lm6\_347014 CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
LinnocuaN2 CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
Lwelshimer CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT

Lgrayi2540 CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGT  
 \*\*\*\*\*

Lm4\_347014 TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTCTGGAG  
 Lmonocyto TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTCTGGAG  
 Lm2\_347014 TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTCTGGAG  
 Lm6\_347014 TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTCTGGAG  
 LinnocuaN2 TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTCTGGAG  
 Lwelshimer TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTCTGGAG  
 Lgrayi2540 TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTCTGGAG  
 \*\*\*\*\*

Lm4\_347014 ACAGAGCTTTCCTTCGCGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  
 Lmonocyto ACAGAGCTTTCCTTCGCGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  
 Lm2\_347014 ACAGAGCTTTCCTTCGCGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  
 Lm6\_347014 ACAGAGCTTTCCTTCGCGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  
 LinnocuaN2 ACAGAGCTTTCCTTCGCGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  
 Lwelshimer ACAGAGCTTTCCTTCGCGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  
 Lgrayi2540 ACAGAGCTTTCCTTCGCGGACAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  
 \*\*\*\*\*

Lm4\_347014 CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATT  
 Lmonocyto CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATT  
 Lm2\_347014 CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATT  
 Lm6\_347014 CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATT  
 LinnocuaN2 CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATT  
 Lwelshimer CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATT  
 Lgrayi2540 CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATT  
 \*\*\*\*\*

Lm4\_347014 TAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA  
 Lmonocyto TAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA  
 Lm2\_347014 TAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA  
 Lm6\_347014 TAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA  
 LinnocuaN2 TAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA  
 Lwelshimer TAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA  
 Lgrayi2540 TAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA  
 \*\*\*\*\*

Lm4\_347014 ATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAGGGTGC  
 Lmonocyto ATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAGGGTGC  
 Lm2\_347014 ATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAGGGTGC  
 Lm6\_347014 ATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAGGGTGC  
 LinnocuaN2 ATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAGGGTGC  
 Lwelshimer ATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAGGGTGC  
 Lgrayi2540 ATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAGGGTGC  
 \*\*\*\*\*

Lm4\_347014 GCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGC  
 Lmonocyto GCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGC  
 Lm2\_347014 GCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGC  
 Lm6\_347014 GCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGC  
 LinnocuaN2 GCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGC  
 Lwelshimer GCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGC  
 Lgrayi2540 GCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGC  
 \*\*\*\*\*

Lm4\_347014 AACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lmonocyto AACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lm2\_347014 AACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lm6\_347014 AACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 LinnocuaN2 AACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lwelshimer AACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lgrayi2540 AACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 \*\*\*\*\*

Lm4\_347014 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lmonocyto CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lm2\_347014 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lm6\_347014 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 LinnocuaN2 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lwelshimer CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lgrayi2540 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 \*\*\*\*\*

Lm4\_347014 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lmonocyto CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lm2\_347014 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lm6\_347014 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 LinnocuaN2 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lwelshimer CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lgrayi2540 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 \*\*\*\*\*

Lm4\_347014 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lmonocyto CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lm2\_347014 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lm6\_347014 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 LinnocuaN2 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lwelshimer CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 Lgrayi2540 CGTTCGCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATA  
 \*\*\*\*\*

```

Lm4_347014      GGTAGGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATAATTGGGGTGAAGTC
Lmonocytog      GGTAGGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATAATTGGGGTGAAGTC
Lm2_347014      GGTAGGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATAATTGGGGTGAAGTC
Lm6_347014      GGTAGGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATAATTGGGGTGAAGTC
LinnocuaN2      GGTAGGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATAATTGGGGTGAAGTC
Lwelshimer      GGTAGGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATAATTGGGGTGAAGTC
Lgrayi2540      GGTAGGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATAATTGGGGTGAAGTC
*****

Lm4_347014      GTAACAAGGTAACCGTA-----
Lmonocytog      GTAACAAGGTAACCGTA-----
Lm2_347014      GTAACAAGGTAACCGTA-----
Lm6_347014      GTAACAAGGTAACCGTA-----
LinnocuaN2      GTAACAAGGTAGCCGATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT
Lwelshimer      GTAACAAGGTAACCGTA-----
Lgrayi2540      GTAACAAGGTAACCGTA-----
*****

```

Sarı ile işaretli bölge: ileri primer dizisi, yeşil ile işaretli bölge prob dizisi,  
Kırmızı ile işaretli bölge geri primer dizisi.