

# pADU94, Kloramfenikol Direncine Sahip Klonlama ve Ekspresyon Vektörü

## pADU94, a Cloning and Expression Vector with Chloramphenicol Resistance Marker

Hanife Salih<sup>®</sup>, Erman Oryaşın<sup>®</sup>, Bülent Bozdoğan<sup>®</sup>

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Uygulama ve Araştırma Merkezi (REDPROM), Aydın

### Öz

**Amaç:** Günümüzde genellikle ampisilin ve kanamisin direnç geni içeren vektörler klonlama amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmanın temel amacı, farklı bir direnç markırı, kloramfenikol direnç geni taşıyan, beta-laktam direnç genlerinin de klonlanabileceği bir vektör oluşturmaktır.

**Yöntem:** Çalışmada, vektör omurgası için pUC19 ve transformasyon için *Escherichia coli* DH10B kullanılmıştır. pUC19 plazmidini bla geni haricinde invers PCR yoluyla çoğaltılmış ve vektör omurgası olarak kullanılmıştır. Bu omurgaya kloramfenikol direnç geni (cat) eklenmiştir. Oluşan pADU94 plazmidini *E. coli* DH10B bakterisine aktarılmış ve transformantlar 10 µg/ml kloramfenikol içeren besiyerinde seçilmiştir. Konstrüksiyonu yapılan pADU94 vektörüne bla, gfp ve tsst klonlanmıştır. Klonlanan genlerin ekspresyonu gfp için UV altında yeşil parlamanın varlığı ile test edilmiş ve bla için penisilin inaktivasyonu modifiye Hodge testiyle gösterilmiştir.

**Bulgular:** Oluşturulan pADU94 vektörü *E. coli* DH10B bakterisine aktarılmış, plazmid varlığı ekstraksiyonla doğrulanmış transformantlarda kloramfenikol minimum inhibisyon konsantrasyonu (Mik) değerinin 2 µg/ml'den 64 µg/ml'ye çıktığı saptanmıştır. pADU94 içerisine bla, gfp ve tsst genlerinin klonlandığı M13 PCR ve plazmid ekstraksiyonu ile doğrulanmıştır. *E. coli* DH10B'ye bla geni aktarılması ile ampisilin Mik düzeyi 8 µg/ml'den ≥128 µg/ml'ye çıkmıştır. Ayrıca klonlanan beta-laktamaz geninin işlevselliği modifiye Hodge testiyle doğrulanmıştır. pADU94 plazmidinde mavi-beyaz seçim yapılabileceği tsst geninin klonlanmasıyla gösterilmiş ve beyaz kolonilerden plazmid ekstraksiyonu yapılarak tsst geninin insert olarak varlığı doğrulanmıştır. Klonlanan gfp geninin eksprese olduğu ise UV altında yeşil parlama görülmesiyle doğrulanmıştır.

**Sonuç:** Elde edilen sonuçlara göre, konstrükte edilen kloramfenikol direnç geni markırı içeren pADU94 vektörü, mavi-beyaz koloni seçimi ve gen ekspresyonu kapasitesine sahip bir vektördür. pADU94 vektörünün gen ekspresyonunda ve DNA fragman klonlanmasında kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu plazmidin ayrıca bilinmeyen beta-laktam direnç genlerinin klonlanarak karakterize edilmesinde ya da bilinen beta-laktam direnç genlerinin klonlama vasıtasıyla özelliklerinin araştırılmasında kullanılabilecek uygun bir vektör olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile farklı direnç markırlı vektörlerin laboratuvarında nasıl oluşturulabileceği okurların bilgisine sunulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Klonlama vektörü, antibiyotik direnci, kloramfenikol, cat

### ABSTRACT

**Objective:** Nowadays, the vectors with ampicillin and kanamycin resistance genes are widely used to construct a new vector with chloramphenicol -resistance marker that may be used for cloning of the beta- lactam resistance genes.

**Method:** In this study, pUC19 was used for vector backbone amplification and *E. coli* DH10B for plasmid transformation. Vector backbone for pADU94 was amplified from pUC19 by inverse PCR by excluding bla gene. Chloramphenicol-resistance gene (cat) was amplified by PCR and ligated to the vector backbone. The constructed pADU94 plasmid was transferred into *E. coli* DH10B bacteria and the transformants were selected on agar medium containing h 10 µg/ml chloramphenicol. The bla, gfp ve tsst genes were amplified by PCR and cloned into pADU94. The expressions of the cloned genes were tested with the presence of the green fluorescence under the UV for gfp and the penicillin inactivation was demonstrated with modified Hodge test for bla.

**Results:** The constructed pADU94 vector was transferred into *E. coli* DH10B and plasmid extraction was done to show presence of pADU94 in transformants for which the MIC value for chloramphenicol was increased from 2 µg/ml to 64 µg/ml. Also, the functionality of the cloned beta lactamase gene was confirmed using modified Hodge test. By cloning tsst gene it has been demonstrated that selection between blue, and white could be realized using f pADU94 plasmid, vector and presence of tsst gene as an insert was verified by plasmid extraction from white colonies. The expression of the cloned gfp gene was verified with observation of green fluorescence under UV light.

**Conclusion:** According to the obtained results, the constructed pADU94 vector with chloramphenicol resistance marker is a vector that is capable of selecting blue- white colonies and expressing gene. It was shown that pADU94 vector can be used for gene expression and cloning of DNA fragment. The vector has been found to be a suitable vector that can also be used to characterize unknown beta-lactam resistance genes or to investigate the properties of known beta-lactam resistance genes by way of cloning. With this article a method for construction of vectors with different resistance markers in a laboratory were submitted for the use of readers.

**Keywords:** Cloning vector, antibiotic resistance, chloramphenicol, cat

**Alındığı tarih / Received:**

29.07.2019 / 29.July.2019

**Kabul tarihi / Accepted:**

21.10.2019 / 21.October.2019

**Yayın tarihi / Publication date:**

31.03.2020 / 31.March.2020

### ORCID Kayıtları

H. Salih 0000-0003-2141-0669

E. Oryaşın 0000-0003-1242-7434

B. Bozdoğan 0000-0003-2469-9728

✉ hanifesalih94@gmail.com

**Atf:** Salih H, Oryaşın E, Bozdoğan B. pADU94, kloramfenikol direncine sahip klonlama ve ekspresyon vektörü. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(1):27-34.





## GİRİŞ

Günümüzde, pUC türevi vektörler, *Escherichia coli* bakterisine DNA klonlama deneylerinde en yaygın kullanılan vektörlerdendir. Bu vektörün avantajları ise; yüksek kopya sayısı olması, çoklu klonlama bölgesinde çeşitli restriksiyon enzim kesim bölgeleri içermesi ve mavi-beyaz görüntüleme ile insert almış plazmidin belirlenebilmesidir<sup>(1)</sup>. Bu vektörlerin bazı dezavantajları da vardır. Bunlardan biri, pUC19 vektörünün içerdiği beta-laktam direnç geni (*bla*) nedeniyle, başka bir beta-laktam direnç geninin klonlanmasına olanak vermemesidir<sup>(2)</sup>. Bir diğer dezavantaj ise, vektördeki sinyal peptidi içeren beta-laktamaz enziminin konak hücre tarafında hücre dışına salgılamasıyla koloni etrafında ampisilinsiz bölge oluşması ve plazmid içermeyen “satellite” kolonilerin de transformantların yanında çoğalarak yalancı pozitif sonuçlara neden olmasıdır. Aynı nedenle, sıvı besiyerinde ampisilinin etkisiz metabolitlerine dönüştürülmesi, plazmidi içermeyen bakterilerin içerenlerden daha hızlı üremesiyle besiyerinde hâkimiyet kazanmalarına neden olabilmektedir<sup>(3)</sup>.

Kloramfenikol antibiyotiği, bakteri ribozomunun 50S alt ünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe eder<sup>(4)</sup>. Kloramfenikol direnci sağlayan kloramfenikol asetil transferaz enzimi ise kloramfenikolü asetilleyerek ribozomun 50S alt ünitesine bağlanmasını engellemektedir<sup>(5)</sup>. Kazandırdığı direncin yanı sıra *cat* geni farklı promotorların aktivitesini belirlenmesi için reporter gen olarak da kullanılabilir<sup>(6)</sup>. pBC KS/SK(-/+) vektör serisi gibi kloramfenikol direnç genini markır olarak içeren ticari vektörler (Agilent vb.) bulunmaktadır.

Bu çalışmanın temel amacı, markır olarak kloramfe-

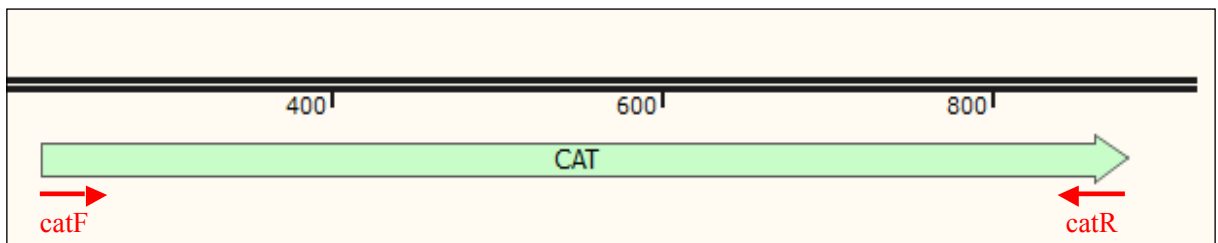
nikol direnç geni içeren, çoklu klonlama bölgesi bütünlüğü bozulmamış ve mavi-beyaz görüntüleme imkanı veren yeni bir vektör inşa etmek ve araştırmacıların hizmetine sunmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Kloramfenikol direnç geninin PCR yoluyla çoğaltılması:** Kloramfenikol dirençli *Staphylococcus aureus* ADU-M38 suşu triptik soy agar (TSA) katı besiyerine ekilerek gece boyu 37°C’de inkübe edilmiştir. Elde edilen petriden tek bir koloni triptik soy broth (TSB) sıvı besiyerine ekilerek gece boyu 37°C’de inkübe edilmiştir. Kültürlenmiş bakteriden fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmış ve etanol presipitasyonu ile elde edilen DNA saflaştırılmıştır. Elde edilen DNA’dan *cat* geni yeni dizayn edilen primer çifti yardımıyla (Tablo 1) Tablo 2’deki koşullarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır (Şekil 1).

**Ampisilin direnç geni içermeyen plazmid omurgasının PCR yoluyla çoğaltılması:** pUC19 plazmidinden markırsız plazmid omurgası çoğaltmak için dizayn edilen spesifik primerlerle (Tablo 1) Tablo 2’de belirtilen koşullarda çoğaltılmıştır.

**Amplikonların kütleştirilmesi ve 5’ uçlarının fosforilasyonu:** Taq polimerazla çoğaltılan plazmid omurgası ve *cat* amplikonunun 3’ ucundaki adenin nükleotidi uzantısı T4 DNA polimeraz enzimi ile kütleştirilmiştir. Bu amaçla her iki amplikon örneğinden 14 µl alınmış ve 1 µl T4 DNA polimeraz (1U), 4 µl 5X reaksiyon tamponu, 1 µl dNTP karışımı (8 mM) eklenerek 20 dakika boyunca 11°C’de inkübe edilmiştir. Kütleştirilen amplikonlar fenol-kloroform-isoamil



Şekil 1. Kloramfenikol direnç geninin PCR yoluyla çoğaltılması ve primerlerinin lokasyonu.

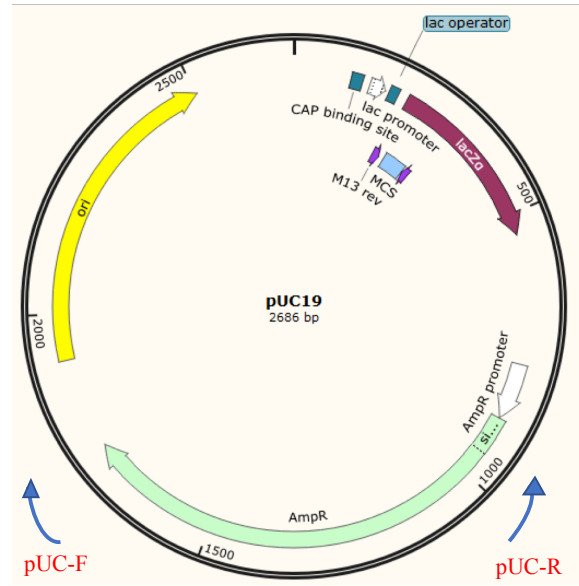


Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerler ve sekansları.

Primer Adı	Sekansı	Referans
cat-F	5' – ATGACTTTTAATATTATTG – 3'	Bu çalışma
cat-R	5' – AATCCGCGGCTAAATCCAATCATCTAC – 3'	Bu çalışma
omg-F	5' – CTGTCAGACCAAGTTTAC – 3'	Bu çalışma
omg-R	5' – ACTCATACTCTTCCTTTTC – 3'	Bu çalışma
bla-F	5' – GCACCTTTTCGGGGAATGTG – 3'	Bu çalışma
bla-R	5' – GACAGTTACCAATGCTTAAT – 3'	Bu çalışma
gfp-F	5' – GAGGATCCAATGAGTAAAGGAGAAG – 3'	Bu çalışma
gfp-R	5' – ATTGGTACCTTATTGTATAGTTCATCC – 3'	Bu çalışma
tsst-F	5' – TCGAATTCATGAATAAAAAATTACTAATG – 3'	Bu çalışma
tsst-R	5' – TCAAGCTTTTAATTAATTTCTGCTTC – 3'	Bu çalışma
m13F	5' – GTAAACGACGCCAGT – 3'	Vieira et al. <sup>(1)</sup>
m13R	5' – GAGCGGATAACAATTCACACAGG – 3'	Vieira et al. <sup>(1)</sup>

alkol (25:24:1) ile saflaştırılıp birleştirildikten sonra T4 polinükleotid kinaz ile fosforilasyona maruz bırakılmıştır. Fosforilasyon reaksiyonu için 1 µl T4 polinükleotid kinaz (10 U), 2 µl 10X reaksiyon tamponu, 2 µl ATP (10 mM) ve 15 µl kütleştirilmiş amplikon DNA'sı kullanılmış ve 20 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Fosforlanmış ürünler fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) ile saflaştırılmıştır.

**Kütleştirilmiş ve fosforlanmış amplikonların ligasyonu ve DH10B suşuna aktarılması:** Saflaştırılmış küt ve fosforlu ürünlerin ligasyonunda 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz (5 Weiss U), 1 µl %50 PEG 4000 solüsyonu ve 16 µl DNA kullanılmıştır. Ligasyon reaksiyon karışımı bir saat 22°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün Sambrook ve ark.nın<sup>(7)</sup> kimyasal transformasyon protokolüne göre kompetan hücre hazırlanmış ve protokole göre ligand



Şekil 2. Ampisilin direnç geni içermeyen plazmid omurgasının çoğaltılması ve primerlerin lokasyonları.

kompetan hücreye aktarılmıştır. Transformasyon sonrası plazmid aktarılmış bakterilerin seçimi için 10 µl/ml kloramfenikol içeren TSA besiyerine ekim yapılmış ve gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

**Transformantlarda plazmid kaynaklı kloramfenikol direncinin belirlenmesi:** Seçici besiyerinde (10 µg/ml kloramfenikol içeren TSA) çoğalan transformantlara, genotipik doğrulama için spesifik primerlerle koloni PCR yapılmıştır. Pozitif sonuç veren kolonilerden plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmidler tek kesim yeri olan EcoRI enzimi ile kesilmiş ve boyutunu belirlemek amacıyla %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Tablo 2. Plazmid omurgası *cat*, *bla*, *gfp* ve *tsst* PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.

PCR Döngüsü	Çoğaltılan fragman	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Döngü
İlk denatürasyon	Plazmid omurgası, <i>cat</i> , <i>bla</i> , <i>gfp</i> , <i>tsst</i>	94	4	1
Denatürasyon	Plazmid omurgası	94	0.5	
	<i>cat</i> ,	94	0.5	
	<i>bla</i> , <i>gfp</i> , <i>tsst</i>	94	0.5	
Bağlanma	Plazmid omurgası	50	0.5	35
	<i>cat</i> ,	44	0.5	
	<i>bla</i> , <i>gfp</i> , <i>tsst</i>	50	0.5	
Uzama	Plazmid omurgası	72	2	
	<i>cat</i> ,	72	0.5	
	<i>bla</i> , <i>gfp</i> , <i>tsst</i>	72	0.5	
Son uzama	Plazmid omurgası, <i>cat</i> , <i>bla</i> , <i>gfp</i> , <i>tsst</i>	72	6	1



Rekombinant plazmid pozitif suşların kloramfenikol direnç düzeyi mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir.

**Ampisilin direnç geninin (*bla*) pADU94'e klonlanması ve transformasyonu:** Ampisilin direnci sağlayan *bla* geni spesifik primerlerle Tablo 2'de belirtilen koşullarda PCR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Taq polimerazla çoğaltılan amplikon 3' ucundaki adenin nükleotidi T4 DNA polimeraz enzimi ile kesilerek kütleştirilmiştir. Bu amaçla 1 µl T4 DNA polimeraz (1U), 4 µl 5X reaksiyon tamponu, 1 µl dNTP karışımı (8 mM) ve 14 µl amplikon kullanılmış ve 20 dakika boyunca 11°C'de inkübe edilmiştir. Kütleştirilen amplikonlar fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) ile saflaştırılmıştır.

pADU94 plazmidinin linearizasyonu için 10 µl plazmid, 2 µl 10X buffer, 1 µl *smal* enzimi ve 7 µl steril su kullanılmıştır. Reaksiyon 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) ile saflaştırılmıştır.

Lineer 7 µl pADU94 plazmidi, kütleştirilmiş 10 µl *bla* amplikonu, 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu ve 1 µl T4 DNA ligaz (5 Weiss U) kullanılarak ligasyon kurulmuştur ve gece boyunca 22°C'de inkübe edilmiştir. Sambrook ve ark.'nın<sup>(7)</sup> kimyasal transformasyon protokolüne göre pADU94Ω*bla* ligandı DH10B *E. coli* suşuna transforme edilmiştir ve 10 µg/ml kloramfenikol ve 100 µg/ml ampisilin içeren TSA seçici besiyerine ekim yapılmıştır. Gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün çoğalan kolonilerden plazmid izolasyonu yapılmış ve HindIII restriksiyon enzimi ile kesilerek 1%'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

pADU94Ω*bla* plazmidi içerdiği doğrulanmış transformantların ampisilin direnç düzeyi mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Sonrasında bu transformantlarda *bla* geninin ekspresyonu sonucunda oluşan enzimin, beta laktam (penisilin) inaktivasyonunu gerçekleştirdiğini göstermek amacıyla modifiye Hodge testi yapılmıştır<sup>(8)</sup>. Bu testte indikatör bakteri olarak *Micrococcus luteus*, pozitif kontrol olarak pUC19 plazmidi içeren *E. coli* DH10B, negatif kontrol olarak *E. coli* DH10B ve 10 µg penisilin içeren antibiyotik

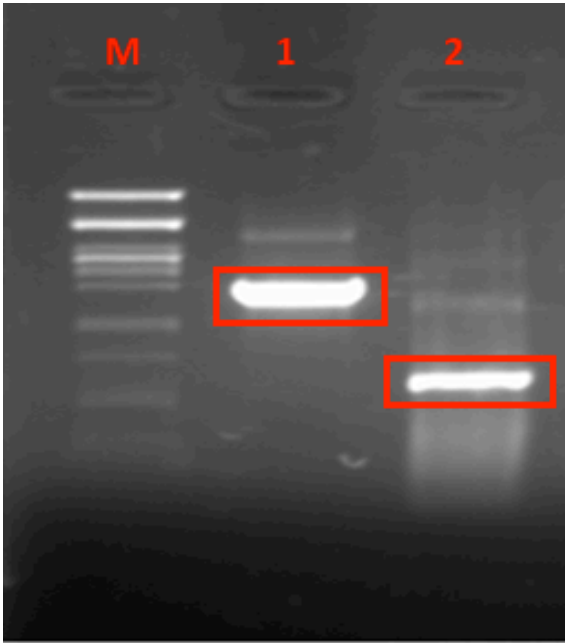
diskisi kullanılmıştır.

***gfp* (Yeşil Floresans Protein) ve *tsst* (Toksik Şok Sendrom Toksini)'nin pADU94'e klonlanması ve transformasyonu:** *gfp* genini çoğaltmak için bu çalışmada dizayn edilen restriksiyon enzim bölgeleriyle modifiye edilmiş spesifik primer çifti (Tablo 1) kullanılmış ve Tablo 2'te belirtilen koşullarda PCR reaksiyonu kurulmuştur. Amplikonların restriksiyonu için, 10 µl *gfp* amplikonu, 2 µl 10X buffer ve 1 µl BamHI, 1 µl KpnI enzimi ve 6 µl steril su kullanılmıştır. Klonlama vektörü pADU94 plazmidi de aynı koşullarda kesilmiş ve bu iki restriksiyon ürünü fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) saflaştırması sırasında birleştirilmiştir. Presipitasyondan sonra kesilmiş vektör ve inserti içeren pellet 17 µl distile suda resüspanse edilmiş ve 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz (5 Weiss U) eklenerek 22°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

Bu çalışmada dizayn edilen ve restriksiyon enzim kesim yeri eklenerek modifiye edilen spesifik primerler (Tablo 1) kullanılarak *tsst* geni *S. aureus* ADUP5 suşundan Tablo 2'de belirtilen koşullarda PCR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan *tsst* amplikonu ve pADU94 vektörü 10 µl DNA, 2 µl 10X buffer, 1 µl HindIII, 1 µl EcoRI ve 6 µl steril su kullanılarak 37°C'da 1 saat inkübe edilerek kesilmiştir. Restriksiyon enzimleriyle kesilen bu iki ürün fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) saflaştırması sırasında birleştirilmiş ve presipitasyon sonrası 17 µl su ile resüspanse edilmiş, 2 µl 10X T4 DNA ligaz tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz (5 Weiss U) eklenerek 22°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

**Transformasyon:** pADU94Ω*gfp* ve pADU94Ω*tsst* ligandları *E. coli* DH10B suşuna transforme edilmiştir ve final konsantrasyonu 10 µg/ml kloramfenikol, 1 mM izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit (IPTG) ve 50 µg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil--D-galaktosidaz (X-gal) olan TSA besiyerine ekim yapılmıştır. Gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kloramfenikollü besiyerinde büyüyen beyaz kolonilere m13F ve m13R primer çifti kullanılarak koloni PCR yapılmıştır.



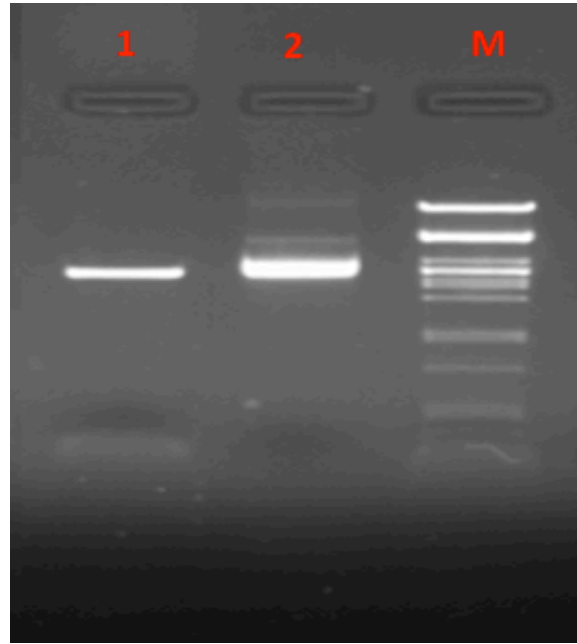


Şekil 3. Plazmid omurgasının ve kloramfenikol direnç geninin PCR görüntüsü. 1 numarada ampisilin direnç geni dışlanmış pUC19 plazmidi amplikonu (1800 bp), 2 numarada kloramfenikol direnç geni amplikonu (626 bp) Kullanılan markır sağda gösterilmektedir. M. Lambda-PstI markır.

Beklenen boyutta bant görülen kolonilerden, plazmid izolasyonu yapılmış (Presto™ Mini Plasmid Kit) ve pADU94Ω*gfp* plazmidi BamHI-KpnI enzimleriyle, pADU94Ω*tsst* plazmidi HindIII-EcoRI enzimleriyle kesilmiştir. Buna ek olarak, pozitif sonuç veren pADU94Ω*gfp* plazmidi içeren hücre UV ışığı altında görüntülenmiştir.

## BULGULAR

**pADU94 plazmidinin eldesi:** Kloramfenikol direnç geni ve vektör omurgasının PCR ürünleri %1'lik jelde yürütülmüş ve jelde görüntülenmiştir. Kloramfenikol direnç geni 626 baz çiftlik (bç) ve vektör omurgasının 1800 baz çiftlik beklenen boyutta görüntülenmiştir (Şekil 3). Kloramfenikol direnç geni ve vektör omurgasının ligasyonundan elde edilen ürünün transformasyonu sonucunda 10 µg/ml kloramfenikollü besiyerinde çoğalan bakterilere *cat* spesifik primerleri ile koloni PCR yapılmış ve PCR ürünleri 1%’lik jelde yürütülmüştür. Yerleştirilen kloramfenikol direnç geninin varlığı doğrulanmıştır. Pozitif sonuç veren kolonilerden biri seçilerek plazmid izolasyonu gerçekleştiril-



Şekil 4. pADU94 plazmidinin lineer ve sirküler formu. 1 numarada linearize edilmiş pADU94 plazmidi (2426 bp) ve 2 numarada plazmidin linearize edilmemiş hali gösterilmektedir. Kullanılan markır sağda gösterilmektedir. M. Lambda-PstI markır.

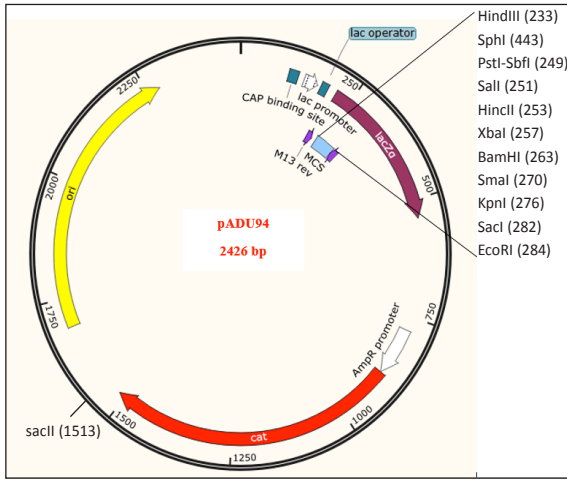
miştir. Bu plazmid çoklu klonlama bölgesinde tek kesim yeri bulunan HindIII enzimi ile kesilmiş ve kesilmemiş hâlde %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Şekil 4'te HindIII enzimi ile kesilmiş pADU94 plazmidi 2426 baz çiftlik beklenen boyutta ve pADU94 plazmidi sirküler ve süpercoiled yapıda farklı konformasyonlarda görülmektedir. Şekil 5'te ise inşa edilen vektörün haritası görülmektedir.

Klonlanan *cat* geni içerisinde çoklu klonlama bölgesindeki restriksiyon enzim bölgeleri olmadığı için bu enzimler klonlama için elverişlidir (Şekil 5). Buna ek olarak, yerleştirilen kloramfenikol direnç geni sekansı sonunda SacII enzim kesim bölgesi bulunmaktadır.

pADU94 vektörünün bulunduğu transformantlarda kloramfenikol MİK değerinin 2 µg/ml'den 64 µg/ml'ye çıktığı saptanmıştır.

*bla* geninin pADU94 vektörüne klonlanması: %1'lik jelde *bla* amplikonu beklenen 816 bç'lik boyutlarda görüntülenmiştir. *bla* amplikonunun pADU94 vektörüne klonlanmasıyla elde edilen plazmidin boyutunu



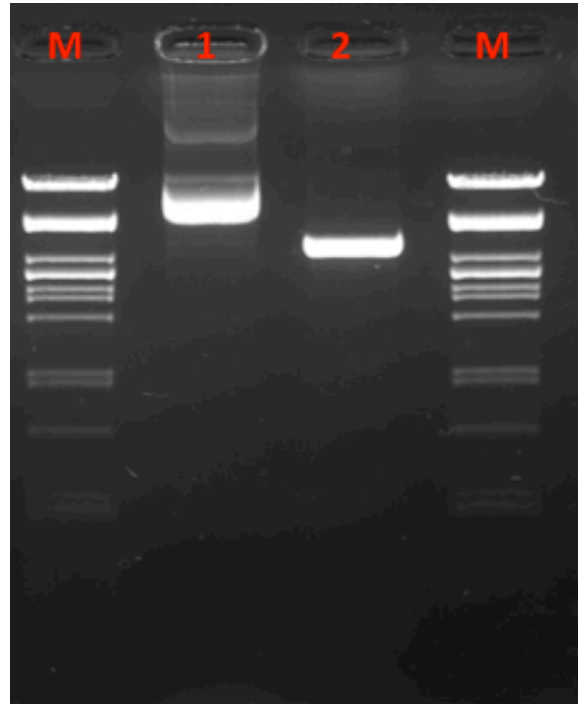


Şekil 5. pADU94 vektörünün haritası.

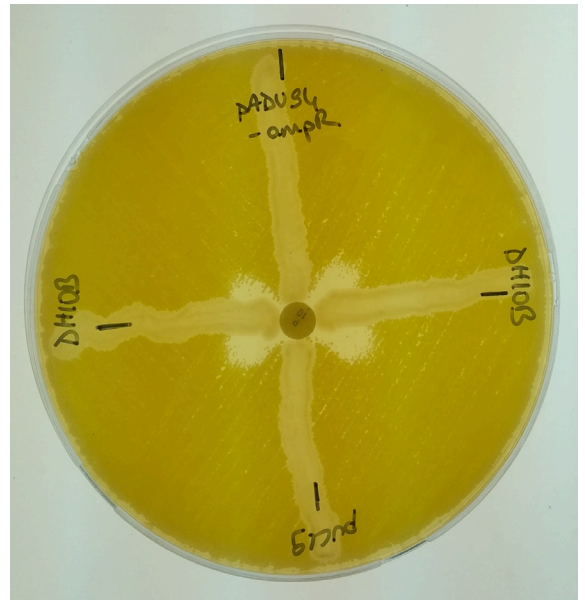
belirlemek amacıyla HindIII restriksiyon enzimi ile kesim gerçekleştirilmiştir ve vektörün lineer ve sirküler hâli 1%’lik jelde görüntülenmiştir (Şekil 6).

pADU94Ωbla vektörünün bulunduğu transformantlarda ampisilin MİK değerinin 8 µg/ml’den 64 µg/ml’ye çıktığı saptanmıştır. Modifiye Hodge testi sonucunda, negatif kontrol olarak kullanılan plazmid içermeyen DH10B çevresinde mikrokok büyümesi gözlenmemiş ve pozitif kontrol olarak kullanılan pUC19 plazmid içeren DH10B çevresinde ise mikrokokların büyüdüğü gözlenmiştir. pADU94Ωbla plazmid içerdği doğrulanan transformantların çevresinde ise mikrokokların büyüdüğü gözlenmiştir (Şekil 7).

**gfp (Yeşil Floresans Protein) ve tsst (Toksik Şok Sendrom Toksini)’nin klonlanması:** Çoğaltılan *gfp* geni pADU94 içerisine klonlanmış ve plazmidin insert aldığı seçici besiyerindeki beyaz kolonilere m13F ve m13R primer çifti ile koloni PCR ile 717 baz çiftlik *gfp* bantı çoğaltılarak gösterilmiştir. PCR’da pozitif sonuç veren kolonilerden birinden elde edilen plazmid BamHI ve KpnI enzimleri ile kesilmiş ve 1%’lik jelde yürütülmüştür. pADU94 2426 bç’lik boyutta ve *gfp* 717 bç’lik beklenen boyutlarda görüntülenmiştir (Şekil 8). pADU94Ω*gfp* plazmidini içeren hücreler, *gfp* ekspresyonunu gözlemek amacıyla UV ışınlarına maruz bırakılmış ve yeşil parlama gözlenmiştir (Şekil 8).

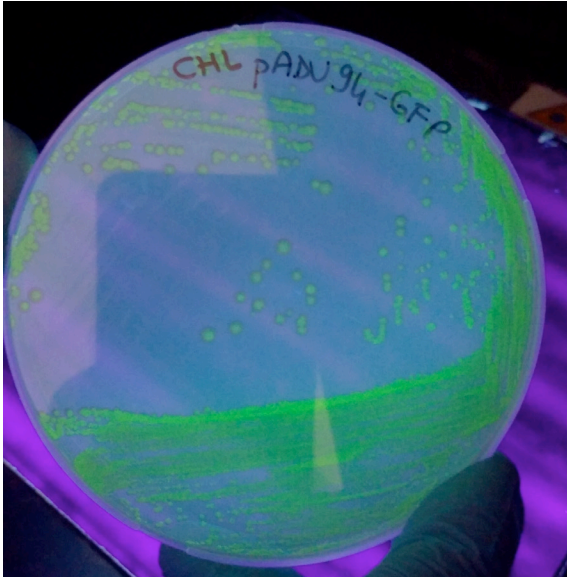


Şekil 6. pADU94Ωbla plazmidinin sirküler ve lineer formu. 1 numarada pADU94Ωbla plazmidinin linearize edilmemiş hâli ve 2 numarada pADU94Ωbla plazmidinin lineer hali beklenen 3242 bç’lik boyuttur. M. Lambda-PstI markırı.



Şekil 7. pADU94Ωbla plazmid içeren transformantlara yapılan Modifiye Hodge testi sonucu görülen zonlar. A (pADU94Ωbla) ve C (pUC19) ile gösterilen suşlar inaktivasyon geni bla içermekte ve B ve D suşları içermemektedir. B-laktamaz geni içeren suşların inhibisyon zonu içinde kalan bölümlerinde *Micrococcus luteus* üremesi gözlenmektedir. pADU94Ωbla plazmid içeren transformantlar: pADU94Ωbla, negatif kontrol: *Escherichia coli* DH10B, pozitif kontrol: pUC19 vektörü içeren *Escherichia coli* DH10B.





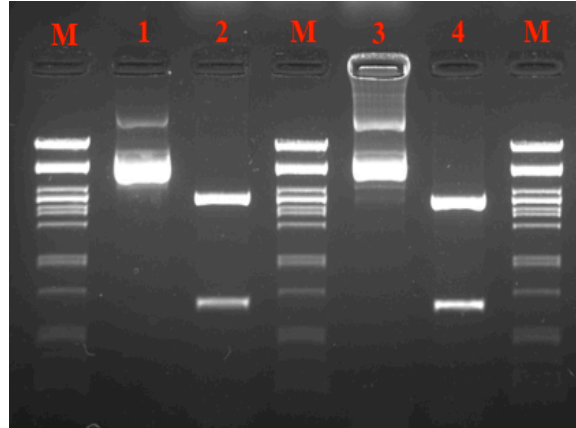
Şekil 8. pADU94Ωgfp plazmidini içeren transformantların UV ışığı altında yeşil parlama görüntüsü.

pADU94Ωtsst klonlamasında oluşan beyaz kolonilere m13F ve m13R primer çifti ile koloni PCR yapılmıştır ve beklenen 708 bp'lık boyutta bant gözlenmiştir. PCR'da pozitif sonuç veren kolonilerden birinden elde edilen plazmid, EcoRI ve HindIII enzimleri ile kesilmiş ve 1%'lik jelde yürütülmüştür. pADU94 2426 bp'lık boyutta ve tsst 708 bp'lık beklenen boyutlarda görüntülenmiştir (Şekil 9).

## TARTIŞMA

Rekombinant DNA çalışmaları 1960'lı yıllarda başlamıştır. Rekombinant DNA'lar, biyoteknoloji ve biyomühendislik gibi alanlarda sıklıkla kullanılmakta ve farklı sektörlerde kullanılabilen ürünler elde edilmektedir. Bu rekombinant DNA'ların yapımı ve transferi için vektörler kullanılmaktadır<sup>(9)</sup>. Gereksinime göre vektörler manipüle edilmekte ve inşa edilmektedir<sup>(10)</sup>. Vektör kullanım alanlarından biri bilinmeyen direnç genlerinin karakterizasyon amaçlı klonlanması veya bilinen direnç genlerinin klonlanarak özelliklerinin araştırılmasıdır<sup>(11)</sup>.

Günümüzde beta laktam direnç genleri, enfeksiyon ve çevre bakterilerinde yaygın olarak bulunmaktadır<sup>(12)</sup>. Bu genlerin klonlanması için markır olarak beta



Şekil 9. pADU94Ωgfp ve pADU94Ωtsst plazmidlerinin kesilmemiş ve klonlamada kullanılan restriksiyon enzimleri ile kesilmiş formları. 1 numarada kesilmemiş pADU94Ωgfp plazmidi, 2 numarada pADU94Ωgfp plazmidinin BamHI ve KpnI enzimleri ile kesilmiş formu, 3 numarada pADU94Ωtsst plazmidi, 4 numarada pADU94Ωtsst plazmidinin EcoRI ve HindIII enzimleri ile kesilmiş formu 1%'lik jelde görüntülenmiştir. M. Lambda-PstI markır.

laktam direnç geni içermeyen vektörlere gereksinim duyulmaktadır. Beta laktam direnç geni içermeyen vektör için diğer bir gereklilik ise, özellikle ampicilin üretiminin son yıllarda azalması ve sağlanmasında zorluk yaşanmasıdır. Bu çalışmada, beta laktam dışı bir markır içeren vektör oluşturmak için dizayn edilen vektörün kloramfenikol direnç geni içermesi hedeflenmiş ve pADU94 vektörü oluşturulmuştur.

Yüksek kopya sayılı olması ve mavi beyaz görüntülemeye olanak vermesi nedeniyle pUC türevli vektörler sıklıkla gen klonlanmasında kullanılmaktadır. Buna ek olarak, küçük boyutlu yapısıyla transformasyon başarısını artırması nedeniyle tercih nedenidir. Bu vektörlerden biri olan pUC19 vektörü ise antibiyotik direnç genlerinin klonlanmasında kullanılmaktadır fakat beta laktam direnç genlerinin klonlanması bu vektör ile gerçekleştirilememektedir. Bu çalışmada dizayn edilen vektöre beta laktam direnç geninin yerine kloramfenikol direnç geni yerleştirilmiştir. pUC19 vektörü sinyal peptidine sahip olan beta laktam direnç geni içermesi nedeniyle hücre dışına salgılanmakta ve koloni çevresinde satellite oluşumuna neden olmaktadır. Bu da kontaminasyon riskini arttırmaktadır<sup>(2)</sup>. Kloramfenikol asetil transferaz ise etkinliğini hücre içinde gösterdiği için satellite koloni-



lerin üremesine olanak vermemektedir<sup>(13)</sup>.

Konstrüksiyon metodu ise, geleneksel restriksiyon yöntemleriyle vektör dizaynından farklıdır. Oluşturulacak vektör omurgası PCR yoluyla elde edilmiştir. Kloramfenikol direnç geninin yerleştirileceği bölgenin ribozomal bağlanma bölgesi ve promotör sekansı içermesi dikkate alınmış ve çalışmada kullanılacak primerler ona göre olarak dizayn edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan ve ayrıntılı olarak anlatılan vektör markırı değiştirme yöntemi laboratuvarların gereksinimlerine göre vektör oluşturabilmelerine olanak veren, moleküler bölümü olan her laboratuvar da rahatlıkla kullanılabilecek bir yöntemdir.

pADU94 vektörünün mavi beyaz seçimde etkin olduğunu ispatlamak amacıyla *tsst* klonlaması yapılmış ve elde edilen beyaz kolonilerin pADU94Δ*tsst* olduğu plazmid izolasyonu ile doğrulanmıştır. Aynı zamanda, ekspresyon varlığını ortaya koymak amacı ile vektöre *gfp* geni klonlanmıştır. Plazmid izolasyonu ile pozitif sonuç veren örneklerin UV ışık altında parlama yapmasıyla pADU94'ün ekspresyon çalışmaları da kullanılabileceği gösterilmiştir.

Bu çalışmanın sonucu, beta laktam direnç genlerinin klonlanması için vektör konstrüksiyonudur. pUC19'da bulunan beta laktam direnç geni pADU94 vektörüne klonlanmış ve transformantlara modifiye Hodge testi ile uygulanmıştır. Bu testte, *bla* geninin ekspresyonu sonucu salgılanan beta laktamaz enzimlerinin penisilini parçaladığı, bu sayede penisiline hassas *M. luteus* bakterilerinin penisilin inhibisyon zonu içerisinde bulunan transformantlar yakınında büyüyebildiği tespit edilmiştir. Böylece, beta laktam direnç geninin pADU94 içine klonlanmasıyla inşa edilen vektörün amacına ulaştığı gösterilmiştir.

Oluşturulan vektöre, beta-laktam direnç geni (*bla*) klonlanmıştır ve pADU94 vektörünün beta-laktam direnç genlerinin klonlanması için uygun bir aday olduğu kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, bir vektörün markırının gereksinime göre, kolay bir yöntemle değiştirilebileceği bu çalışma ile gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Vieira J, and Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*. 1982;19:259-68.  
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(82\)90015-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(82)90015-4)
2. Manna S, Harman A, Accari J, Barth C. Altering the selection capabilities of common cloning vectors via restriction enzyme mediated gene disruption. *BMC Res Notes*. 2013;6:85.  
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-85>
3. Preston A. Choosing a cloning vector. *Methods Mol Biol*. 2003;235:19-26.  
<https://doi.org/10.1385/1-59259-409-3:19>
4. Hann FE, Wisseman CL Jr, Hopps HE. Mode of action of chloramphenicol. III. Action of chloramphenicol on bacterial energy metabolism. *J Bacteriol*. 1955;69(2):215-23.  
<https://doi.org/10.1128/JB.69.2.215-223.1955>
5. Shaw WV, Packman LC, Burleigh BD, Dell A, Morris HR, Hartley BS. Primary structure of a chloramphenicol acetyltransferase specified by R plasmids. *Nature*. 1979;282(5741):870-2  
<https://doi.org/10.1038/282870a0>
6. Podbielski A, Peterson JA, Cleary P. Surface protein-CAT reporter fusions demonstrate differential gene expression in the vir regulon of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol*. 1992;6(16):2253-65.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01401.x>
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vols. 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA; 1989.
8. Amjad A, Mirza IA, Abbasi SA, Farwa U, Malik N, Zia F. Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iran J Microbiol*. 2011;3(4):189-93.
9. Khan S, Ullah MW, Siddique R, et al. Role of recombinant DNA technology to improve life. *Int J Genomics*. 2016;2016:2405954.  
<https://doi.org/10.1155/2016/2405954>
10. Bolivar F, Backman K. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol*. 1979;68:245-67.  
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(79\)68018-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)68018-7)
11. Murakami T, Nojiri C, Toyama H, et al. Cloning of antibiotic-resistance genes in *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1983;36(10):1305-11.  
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.36.1305>
12. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci*. 2015;22(1):90-101.  
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>
13. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev*. 2004;28(5):519-42.  
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>