



Brucella melitensis Rev.1'in Sferoplast Yapısı ile Gen Transferine Açık Hale Getirilmesi

Ali USLU^{1,a,✉}, Osman ERGANİŞ^{1,b}

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0002-8319-831X; ^bORCID: 0000-0002-9340-9360

Geliş Tarihi/Received
13.11.2020

Kabul Tarihi/Accepted
27.12.2020

Yayın Tarihi/Published
31.12.2020

Öz

Bruselozis, ülkemiz ve dünya hayvancılığına zarar veren kronik bakteriyel bir enfeksiyondur. *Brucella* doğada plazmidi bulunmadığından plazmid kaynaklı mutasyonlara çok açık değildir. Ancak *Brucella*'nın uzun pasajlar sonrası bakteriyel adaptasyon ile elde edilmiş mutantları bulunmaktadır. Konjugasyon, lipofektamin ve elektroporasyon yöntemleriyle gen aktarımı yapılmaktadır. Sferoplast yapı, gen aktarımını kolaylaştırmada maya, mantar ve bitki hücrelerinde başarı ile kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan mutant pJQ200KS isimli intihar plazmidi 6,7 kb (*Backbone* 5,4kb + 1,25kb *Insert*) gibi oldukça büyük bir genoma sahiptir. Genom büyüdükçe transformasyon zorlaşmaktadır. Çalışmada *Brucella*'nın kompetent hale getirilerek gen aktarımının elektroporasyon ile kolaylaşması için hücreler, çeşitli yöntemlerle ile sferoplast haline getirildi ve gen aktarımında ki etkisine bakıldı. Stok *Brucella melitensis* Rev.1 kanlı agara pasajlandı. Kültür, *Brucella* broth içerisinde 37 °C'de 24 saat boyunca 160 rpm'da inkübe edildi. Santrifüj ile 8000xg 4 °C'de 5 dakika pellet haline getirildi, PBS ile yıkılarak besi yerinden arındırıldı. Sferoplast uyarımı için 72 saat boyunca penisilin, ampicilin ve glisin ile indüklendi. Elektroporasyon ile gen aktarımda en etkin yöntemin glisin ile uyarım metodu olduğu belirlendi. Aktarımı zor olan ve 7 kb'dan daha büyük olan plazmidlerin aktarımı için uygulanan kompetent hücrenin sferoplast yapıya dönüştürülmesi metodunun gelecekte yapılacak çalışmalarda araştırmacılara avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Brucella*, elektroporasyon, intihar plazmid, sferoplast

Making *Brucella melitensis* Rev.1 Open to Gene Transfer with Spheroplast Structure

Abstract

Brucellosis is a chronic bacterial infection that harms livestock in our country and the world. Because of *Brucella* does not have a natural plasmid, it is not very open to plasmid-derived mutations. However, there are *Brucella* mutants obtained after long passages with bacterial adaptation. Gene transfer studies with conjugation, lipofectamine and electroporation are available. The suicide plasmid called pJQ200KS used in this study cannot be accomplished by conjugation since it does not have the λ pir gene region required for conjugation. It has been reported that as the size of the genome used for transfer increases, transformation becomes more difficult. Spheroplast structure has been successfully used in yeast, fungi and plant cells to facilitate gene transfer. There are two studies conducted for the transformation of *Brucella* into spheroplast structure. In studies to obtain spheroplasts from *Brucella*, after 24 hours of pre-culture, the spheroplast cells were exposed to the stimulation of penicillin, ampicillin and glycine for 48 hours, and penicillin and glycine were taken as the most effective stimulation method. Stock *Brucella melitensis* Rev.1 was passaged on blood agar. The culture was incubated in *Brucella* broth at 37 °C for 24 hours at 160 rpm. 8000xg was pelleted for 5 minutes at 4 °C by centrifugation, and the medium was cleared by washing with PBS. It was induced with penicillin, ampicillin and glycine for 72 hours for spheroplast stimulation. The structure has been made suitable for gene transfer. Since penicillin completely removes the cell wall structure of *Brucella*, unlike spheroplast formation, that it harms bacteria. It was determined that the most effective method in transferring with electroporation was stimulation with glycine. The method of transforming the component cell into a spheroplast structure for the transfer of plasmids that are difficult to transfer and larger than 7 kb will provide an advantage to researchers in studies.

Key Words: *Brucella*, electroporation, suicide plasmid, spheroplast

GİRİŞ

Bruselozis, α -*Proteobacteria* grubunda yer alan memelilerde bulaşıcı ve kronik enfeksiyona sebep olan bir hastalıktır (1). Enfeksiyon, yıllar içerisinde birçok isim değiştirmiştir, son olarak Sir. David Bruce'a ithafen "*Brucella*" olarak isimlendirilmiştir (2). Ülkemizde enfeksiyon, yoğun hayvan hareketleri ve geleneksel tarım uygulamalarındaki değişikliklere bağlı olarak uzun yıllardır gözlenmektedir. Türkiye'de Brusellozisin

kontrol ve eradikasyonu için çalışmalar 1930 yılında başlamıştır. İlk resmi Brusella teşhis laboratuvarı 1951 yılında FAO/WHO Ortadoğu Brusellozis adı ile Merkezi Etlik Veteriner Kontrol Enstitüsü (Etlik VKE) bünyesinde kurulmuş ve daha sonra 1957 yılında Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsüne (Pendik VKE) taşınmıştır. Enstitü bünyesinde devlet destekli olarak 1960 yılında S19 aşısı üretilmeye başlanmıştır. FAO bünyesinde 1965 yılında koyun hastalıkları teşhis

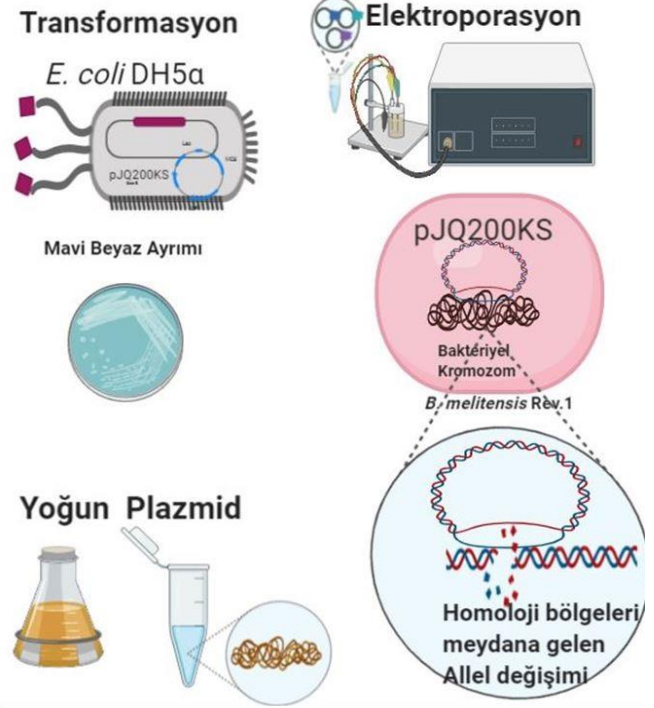
birimi kurulmuş ve 1969 yılında *B. melitensis* Rev.1 aşısı üretimine başlanmıştır (3). Rev.1 aşısı Elberg tarafından etkinliği belirlendikten 12 yıl sonra Türkiye'de kullanılmaya başlanmış ve halen de kullanılmaktadır. Türkiye'de özel sektör bazlı Brusella aşısı üretimi yapan iki adet kuruluş bulunmaktadır; Vetal A.Ş 1991 yılında kurulmuş, 2004 yılında ruhsatlı Brusella aşısı üretimine başlamış ve 2018 yılında iyi üretim uygulamaları (*Good manufacturing practice*) GMP sertifikasyon aşamalarını tamamlamıştır. Dollvet 2003 yılında kurulmuş, 2009 yılında ruhsatlı Brusella aşısı üretimine başlamış ve GMP sertifikalı aşı üretimi sertifikasına sahiptir (4).

Türkiye hastalıkla 1969 yılından beri etkin şekilde mücadele etmektedir. Tarım Orman Bakanlığı hastalığın eradikasyonu için 1984, 2012 ve 2019 yıllarında "Ulusal Brusella Kontrol ve Eradikasyon Projesi" genelgesi yayınlamıştır (5, 6).

Ontolojik olarak *Brucella*'nın toplam 140 proteini bulunmaktadır (7). Outer membran proteinleri ise grup 1 (88-94 kDa), grup 2 (36-38 kDa), grup 3 (31-34 kDa ve 25-27 kDa) ve küçük outer membran proteinleri olarak sınıflandırılır (8). Omp 16, Omp 10, Omp 19 lipoprotein yapısındaki outer membran proteinleridir ve *Rhizobiaceae* ailesinde bulunan bakteriler içinde antijenik determinant göstermektedirler. Bu lipoproteinler ile yapılan serolojik testlerde, *B. melitensis* ile enfekte koyunlarda daha güçlü antikor cevap alınırken, *B. abortus* ile enfekte sığırlarda bu lipoproteinlere karşı daha zayıf bir antikor cevap alınmış olması, koyunlarda *Brucella* enfeksiyonlarında Omp19 bölgesinin antijenik ve serolojik önemini göstermektedir (9).

Brucella'nın çoğu türünün 2 kromozomu bulunmaktadır ancak kromozoma entegre olan plazmidi bulunmamaktadır (10). Bunun sebebinin etkenin yaşamsal döngüsü içerisinde konak ile hızlı etkileşim kurarak hücre içine yerleşmesi ve diğer bakterilerle etkileşim kurmaması olduğu bildirilmiştir. *Brucella* konak ile bağı kesildiğinde doğada aylarca canlı kalabilecek yapıya sahip değildir ve bu durum *Brucella*'nın çevreyle etkileşim kurmasının önüne geçmektedir (11). Doğal plazmid'i bulunmayan *Brucella* içerisinde replike olabilecek plazmid bulmak için tür spesifikliğı geniş olan, RK2 iletim araçlarına sahip ve düşük kopya üretebilen plazmidler tercih edilmiştir. pBBR1mcs, pMR10 ve pGL10 isimli plazmidler *Brucella* içerisinde çoğalarak gen düzenlemesi yapabilmektedir (12-14). Plazmidin *Brucella*'da çoğalmaya başladığı zaman tekrar izole edilebilir olması, Koch postulatının moleküler versiyonunun oluşmasına sebep olmaktadır. pSUP202-1/Tn5 (ColE1), pUT-mini-Tn5 (oriRK6), pSC189 (oriRK6) ve pEX18Ap (oriT) isimli plazmidler *Brucella* içerisinde çoğalamamaktadır (15, 16). Allel değişimi pUC ve pBluescript (ColE1) gen bölgelerinin *Brucella*'da çoğalma yetersizliğine bağlı olarak şekillendiği bildirilmiş ve dezavantaj bu yolla avantaja çevirilmiştir (17). Organizmada antijenik değişim iki yolla meydana gelmektedir; Tesadüfi mutasyonlar; kimyasal yolla veya transposon kullanarak meydana getirilebilir. Bilinçli mutasyonlar; var olan antijenik bölgenin organizma hayatına zarar vermeden genetik olarak silinmesi veya gen eklenmesi sonucu elde edilen mutasyonlardır (18). Allelik değişim ve transposon mutagenizleri bakteriyel gen silmede kullanılan yaygın metotlardır. Allelik değişim genellikle çift kross over ile yapılırken

Pseudomonas gibi Gram-negatif bakterilerde tek kross-over ile allelik değişim mümkündür (19). Allelik değişimde önce silmek istenen ORF bölgesi uygun primerler ile çoğaltılır. Bu gen bölgesi uygun antibiyotik direnç ve sükröz geni (*Sac B*) içeren intihar plazmidde aktarılır. İntihar plazmid önce donör *E. coli* suşuna aktarılır mutasyon doğruluğı antibiyotik dirençliliğı ile takip edilir. Belirlenen mutant çoğaltılıp alıcı bakteri ile konjugasyona tabi tutulur. Mutantlar belirlenir ve sükröz varlığında çoğalan çift kross-over'in şekillendiğı delesyon mutantlar seçilir (20).



Şekil 1. Çalışma hipotezi; intihar plazmid çift kross-over sonucu silinmiş mutantın elde edilmesi

Bu yöntem özellikle Gram-negatif bakteriler için tercih edilmektedir. Gram negatifler sükröz varlığında çoğalamamaktadır. Ancak çift kross-over ile sükröz varlığında konjugasyon sonucu plazmid aktarımı başarılı ise alıcı bakteri sükröz varlığında çoğalmaktadır. Allelik değişim yoluyla *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Vibrio* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Francisella tularensis*, *Brucella* spp., *Rhizobium leguminosarum*, α -2 *Proteobacteria* gibi Gram-negatif aile üyelerinde bu yol kullanılarak birçok gen silme çalışması yapılmıştır (18, 21-23). pJQ200KS plazmid, gentamisin direnç gen bölgesi, birçok kesim enzimine açık çoklu klonlama bölgesi, Sac B gen ve X-gal operonuna sahiptir. Bu plazmid donör olarak *E. coli* DH5 α 'yı kullanmaktadır ve bu plazmidin alıcı α -2 *Proteobacteria* ailesi üyelerine gen aktarımında uygun olduğu belirlenmiştir (18).

Lipopolisakarit (LPS)'de oluşan mutasyona bağlı rough koloni, streptomisine dirençli Rev.1 ve rifampisin dirençli RB51 uzun pasajlar sonrası bakteriyel adaptasyon ile elde edilmiş mutantlardır (24). Konjugasyon, lipofektamin ve elektroporasyon ile yapılmış gen aktarım çalışmaları mevcuttur (14, 25-27). Bu çalışmada kullanılan pJQ200KS isimli

intihar plazmidinde konjugasyon için gerekli λ pir gen bölgesi bulunmadığı için bu yöntem tercih edilmemiştir.

Sferoplast, gram negatif bakterilerin hücre duvarının antibiyotikler ve kimyasallar tarafından kısmen veya tamamen tahrip edilmesi ile oluşur ve bu şartlar ortadan kalktığında bakteri eski formuna geri döner (28). Sferoplast yapı, gen aktarımını kolaylaştırmada maya mantar ve bitki hücrelerinde başarı ile kullanılmaktadır (29, 30). *B. abortus* RB51 hücre duvarında meydana gelen değişim ile gen aktarımını artırdığı bildirilmiştir (31). Ayrıca aktarımda kullanılan genom büyüdükçe transformasyonun zorlaştığı tespit edilmiştir (32).

Çalışmada; protektif ve virulans özellikteki saha/aşı suşunda bulunan *Omp 19* bölgesinin intihar plazmidine aktarımı yapılarak *Brucella* kromozomundan dönüşümsüz olarak silinmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışma ile doğal plazmid bulunmayan *Brucella* kromozomuna, sferoplast yapı sayesinde α -*Proteobacteria* uyumlu pJQ200KS aktarımı hakkında metod bilgisi verilmesi planlanmaktadır.

MATERYAL VE METOT

Suş Seçimi

Bir kamu (Pendik VKE) ve ikisi özel aşı firmalarından (Dollvet A.Ş, Vetal A.Ş) özel izinle alınan *B. melitensis* bv.1. Rev.1. suşları Dye Test ve Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) ile Rev.1 özellikleri taşımaları bakımından test edildi. Etik açıdan suşlar numaralandırıldı ve isimleri saklı tutuldu. En kararlı suş olan 2 numaralı ticari *B. melitensis* Rev.1 suşu çalışmada kullanıldı. Kompetent hücre olarak; *E. coli* DH5 α (New England Biolabs, Inc ABD) ve intihar plazmidini olarak; pJQ200KS (ATCC 77484) kullanıldı.

Besi Yeri

B. melitensis bv.1. Rev.1. bakterisinin koloni morfolojisini gözlemlemek amacı ile *Brucella* agar base (Sigma Aldrich, 18795) kullanıldı. Rekombinant kolonileri geliştirmek için Luria Bertani Agar (LB) (Lab M) ve plazmid izolasyonu öncesinde LB buyyon (Merck 71753) kullanıldı.

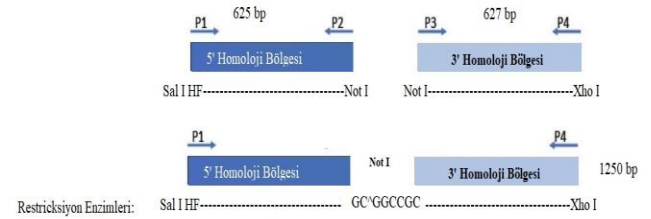
Kullanılan Kitler ve Enzimler

PZR Clean up kiti (Macherey-Nagel GmbH, Germany) ve DNA ekstraksiyonunda ticari DNA purifikasyon kiti (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega) üretici firmanın belirttiği

şekilde kullanıldı. Kompetent hale getirilmiş *Brucella* hücrelerine gen aktarımı öncesi yoğun miktarda plazmid izolasyonu sağlayan ZymoPURE™ II Plazmid Maxiprep Kit (Zymoresearch, ABD) kullanıldı. T4 DNA ligaz enzimi (New England Biolabs, Inc ABD M0202S) kullanıldı. Kesim enzimleri ihtiva eden 5' homoloji bölgesinin, ileri bölgesinden kesim için Sal I HF (New England Biolabs, Inc ABD R3138S) geri bölgesi GC'GGCCGC baz dizisinden kesim için Not I (New England Biolabs, Inc ABD R0189S) kullanıldı. Kesim enzimleri ihtiva eden 3' homoloji bölgesinin, ileri bölgesinden kesim için Not I (New England Biolabs, Inc ABD R0189S) geri bölgesinden kesim için Xho I (New England Biolabs, Inc ABD R0146S) kullanıldı.

5' ve 3'homoloji Bölgelerinin Tek Bir İnsert Haline Getirilmesi

Brucella kromozomunda yer alan *Omp19* gen dizilimi 534 bp'dır. 5'HB-RES F 5'TAACAG/GTCGAC/TGCCGTTGCC'3 ve 3'HB-RES R 5'TGCTTA/CTCGAG/CCGCAATGTCGGTCA'3 primerleri kullanılarak 1250 bp'lık ligasyon ürünü uç kısımlarında Sal I enzim kesim bölgesi orta noktada *Omp19* ORF yerine Not I kesim enzim bölgesi ve son kısımda Xho I kesim bölgesi olacak şekilde 95°C'de 5 dk ön denatürasyon, 35 döngü (95°C'de 30 sn, 63°C de 90 sn ve 72°C'de 90 sn) son uzatma olarak DNA'lar 72°C'de 6 dk amplifiye edildi (Şekil 2).



Şekil 2. Primer 1 ve primer 4 ile homoloji bölgelerinin tek ürün haline getirilmesi

Vektör ve 5'+3' Homoloji Bölgesinin Sal I- Xho I Kesim Enzimleri ile Muamelesi

Saf olarak elde edilen süper yumak halindeki pJQ200KS plazmidini ve tek parça haline getirilmiş 1250 bp'lık homoloji bölgesi Sal I HF ve Xho I kesim enzimleri ile üretici firma (NEB) protokolüne göre hazırlandı (Tablo 1).

Tablo 1. Vektör ve insert için kesim enzimi protokolü

Firma Protokolü	Vektör için	5'+3' HB 1250bp insert'ü için
DNA	1 µg	20µl (20x143.1ng=2862ng)
Cut Smart buffer	5 µl	30µl (30x128ng=3840ng)
Sal I-HF	1 µl	10 µl
Xho I	1 µl	2 µl
Ultra Saf Su	50 µl'ye tamamlanır	2 µl
	100 µl'ye tamamlanır	66 µl'ye tamamlanır

Hazırlanan karışım 37°C'de 15 dk inkübe edildi ve 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren % 1'lik agaroz jelde elektrofoze edildi. Marker olarak 100 bp marker kullanıldı. UV

görüntüleme cihazında görüntülenen band jelden kesilip, jel ekstraksiyon kiti (Macherey-Nagel GmbH, Germany) ile artık ürünlerden ve jelden arındırılıp saflaştırıldı.

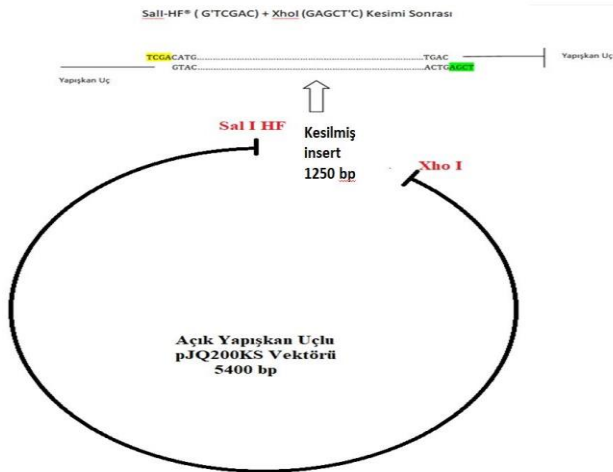
Kesilmiş Vektör ve Kesilmiş İnsert 5'+3' Homoloji Bölgesinin Ligasyonu

Ligasyon protokolü 10 dk 25°C'de protokol takip edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Vektör ve *insert*'ün ligasyonu

	Firma protokolü	Takip edilen protokol
Vektör DNA	50 ng	2 µl (57.2ng/µl)
Cut İnsert 5'+3'HB DNA	50 ng	2 µl (51.7 ng/µl)
T4 DNA ligase buffer	2 µl	4 µl
T4 DNA ligase	1 µl	2 µl
Ultra Saf Su	20 µl total hacim	40 µl total hacim

Karışımın yarısı oda sıcaklığında 10 dk, yarısı 16°C'de bir gece inkübe edildi. Bunun yanı sıra negatif kontrol olarak *insert* ilave etmeksizin ligasyon protokolü uygulandı. Ayrıca işlem görmemiş saf boş vektörde pozitif kontrol olarak kullanıldı (Şekil 3).



Şekil 3. Kesilmiş pJQ200KS ve homoloji bölgesi *insert*'ünün ligasyonu

B. melitensis bv. 1 Rev.1'in Sferoplastlaştırılması

Aktarılacak mutant plazmidin de 6,7 kb (*Backbone* 5,4kb + 1,25kb *İnsert*) büyüklüğünde olması gen aktarımı üzerine etkili bir faktördür.

Deneme grupları için 3 farklı *Brucella* buyyon içeriği hazırlandı, 100 ml *Brucella* buyyon içerisine 2 gr glisin eklendi ve otoklavda steril hale getirildi. Diğer gruplar için *Brucella* buyyon otoklavda steril hale getirildi. Sonrasında 100 ml besiyerine 100 µl ampisilin stok solüsyonundan eklenerek son hacimde 10 µg/ml ampisilin, diğer grupta 100 ml besi yerine 10µl penisilin G stok solüsyonundan eklenerek son hacimde 5 µg/ml penisilin G olması sağlandı.

Ana stoktan kanlı agara ekim yapılarak 10-20 adet *B. melitensis* Rev.1 kolonisi 3 farklı *Brucella* buyyona (20 ml) pasajlandı ve 24 saat boyunca 37°C 160 rpm'de inkübe edildi. OD 600 değerleri 0.220 olarak belirlendi. 8000xg'de 5 dk santrifüj edildi. Peletler yine aynı hacimde, ampisilin (10 µg/ml) *Brucella* buyyon, glisin (%2) *Brucella* buyyon ve penisilin G (5 µg/ml) *Brucella* buyyon içerisine pasajlandı ve çalkalayıcı etüvde 80 rpm 37°C'de 72 saat süre ile inkübe edildi.

Bu 3 sferoplast grubu ile beraber 24 saatlik genç *Brucella* kültürü ve 96 saatlik yaşlı *Brucella* kültüründe deneme için alındı (31, 33, 34).

Sferoplast *Brucella*'nın Elektroporasyon Kompetenti Haline Getirilmesi

Tüm deneme kültürleri ikiye bölünerek 5000xg'de 8 dk santrifüj edildi. Peletler 10'ar ml buzda bekletilmiş %10 gliserol ile çözdürüldü ve 30 dk buzda inkübe edildi. Bu işlem buzda inkübasyon süresi her seferinde 5 dk azalacak şekilde 4 defa daha tekrarlandı. Son inkübasyon periyodu (10 dk) ardından aynı şekilde santrifüj edildi. En son aşamada kompetent *Brucella* pelleti 600 µl %10 gliserol ile çözdürüldü ve elektroporasyon işlemine kadar -80°C de saklandı. Yapılan sayımlarda bu süspansiyonlar içerisinde yaklaşık 5x10¹⁰ CFU/ml bakteri bulunduğu tespit edildi.

Elektroporasyon

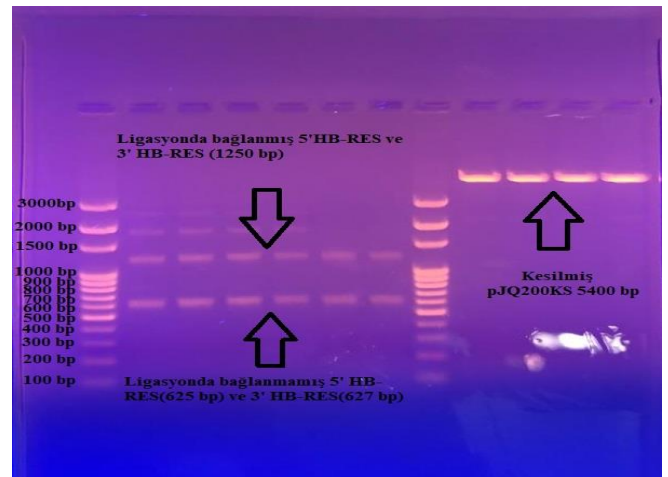
Elektroporasyon için *Time constant* ve *Exponential decay* protokolde (Xcell, Biorad) direnç 100 Ω ile 400 Ω arasında 20 msn boyunca akım devam ettirildi (11, 14, 35).

İstatistik

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanıldı. Değişkenler ortalama±standart sapma ve Medyan (Maksimum-Minimum) yüzde ve frekans değerleri olarak belirlendi.

BULGULAR

Stok kültürlerin doğrulukları onaylandıktan sonra NCBI verilerinden yararlanılarak dizayn edilen primer çifti ile *Omp19* homoloji bölgeleri sentezlendi. Homoloji bölgelerinin ligasyonu ile tek parça haline getirildi (Şekil 4).



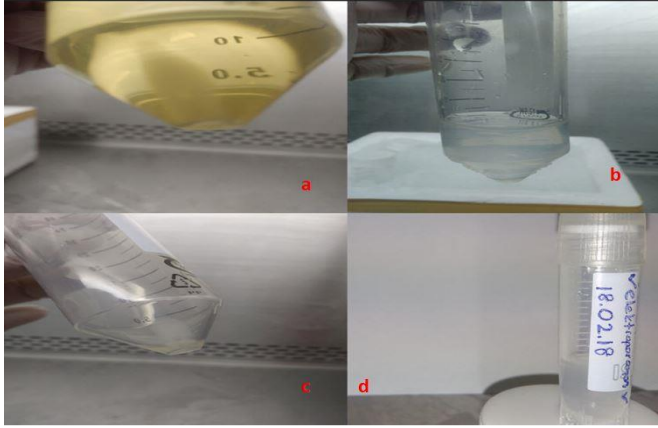
Şekil 4. *Omp19* gen dizilimi çıkarıldıktan sonra 5' ve 3' homoloji bölgelerinin ligasyonu

Büyük miktarlarda plazmid izolasyonu için kullanılan ticari plazmid izolasyon kiti 100 µl elüsyon hacminde en fazla 322,6 ng/ µl elde edildi (Tablo 3). Aktarım için en az 1µg en fazla 10 µg plazmid DNA'sı kullanıldı.

Tablo 3. Maxi prep denemelerinden elde edilen vektör DNA'larının miktarları

Bakteri kültürü	Elüsyon Miktarı	Elüsyon	2. elüsyon	3. elüsyon
kit	100 µl	305,8 ng/ µl	220 ng/ µl	150,6 ng/ µl
kit	100 µl	129,4 ng/ µl	66,8 ng/ µl	41,6 ng/ µl
kit	100 µl	322,6 ng/ µl	210 ng/ µl	138 ng/ µl
kit	100 µl	132,2 ng/ µl	54 ng/ µl	43 ng/ µl

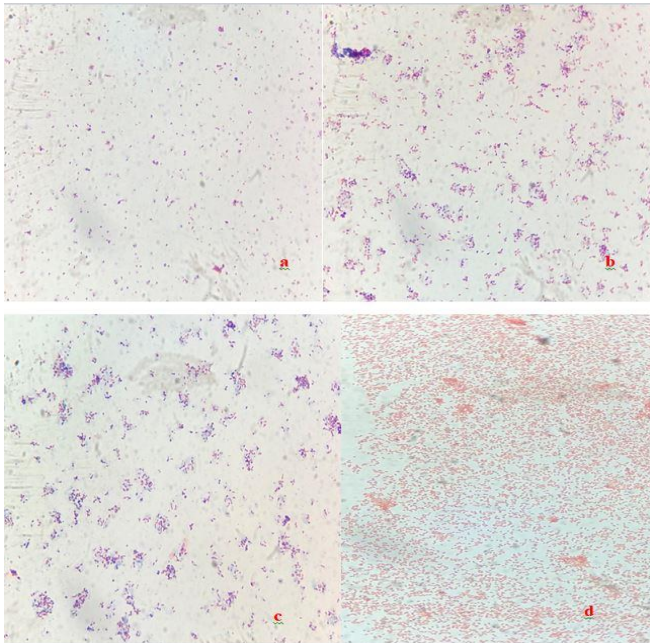
Brucella spp. olarak doğrulanan suş uygun koşullarda sferoplast kompetentler haline getirildi (Şekil 5).



Şekil 5. *B. melitensis* Rev.1'in elektroporasyona uygun kompetent hücre haline getirilmesi, a-Santrifüj sonrası pelet, b- Soğuk %10'luk gliserol ile kültürün yıkanması, c- yıkama sonrası bakteriyel peleti, d- Aktarıma hazır kompetent hücre

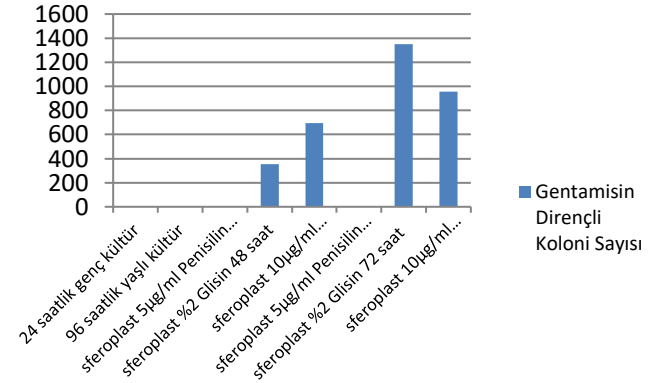
Brucella'nın kompetent hale getirilerek gen aktarımının elektroporasyon ile kolaylaşması için hücreler, çeşitli yöntemlerle ile sferoplast haline geldiği tespit edildi.

Brucella kültürünün sferoplast uyarım sonrası hücre duvarı yapısının değişmesine bağlı olarak gram boyama özelliği değişti. Gram negatif özellik gösteren *B. melitensis* Rev.1 kültürü artık gram pozitif boyandı (Şekil 6).



Şekil 6. Işık mikroskobisi görüntüleri a-72 saatlik %2'lik glisin sferoplast *B. melitensis* bv.1. Rev.1 kültürü b- 72 saatlik 5 µg/ml penisilin G sferoplast *B. melitensis* bv.1. Rev.1 kültürü c-72 saatlik 10 µg/ml ampisilin sferoplast *B. melitensis* bv.1. Rev.1 kültürü d-96 saatlik *B. melitensis* bv.1. Rev.1 kültürü

Elektropotör cihazında "Exponential decay" modunda 20 msn saniye akım hedeflenen, glisin (%2) ve ampisilin (10µg/ml) ile sferoplast haline kompetent *B. melitensis* Rev.1 denemelerinde 17, 19, 43, 44, 45 ve 46 numaralı altı denemede başarılı aktarım sağlandı (Şekil 7).



Şekil 7. Aktarımı başarılı olan sferoplast kompetent *Brucella* uyarımları

Mutant 43, Mutant 44 ve Mutant 45, 24 saat ön kültür sonrası 72 saat %2 glisin içeren ortamda uyarıldı. Kompetent *Brucella*'lardan 1 µg, 5 µg ve 10 µg plazmid DNA'sı içeren tüm gruplarda elde edilen bu başarısı glisin ile sferoplast hale gelen kompetent hücre duvarında meydana gelen bozulma ile 1 µg plazmid DNA'sına kadar etkin sonuç verdiğini gösterdi.

Mutant 19 ve 46, ampisilin (10 µg/ml) ile 96 saatlik kültürlerde hazırlanan sferoplast yapıları yüksek (10 µg) ve düşük (1 µg) plazmid DNA'sı varlığında etkinlik gösteremediği ve her iki grubunda 5 µg plazmid DNA'sı varlığında ideal şekilde etkinlik gösterdiği tespit edildi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kompetent haline gelmiş *Brucella*'ya gen aktarımı için temiz, yoğun ve konsantre olarak minimum 1 µg plazmid elde etmek gerekmektedir. Bunu gerçekleştirmek için ZymoPURE™ II plazmid maxiprep kit protokolünde 1,2 mg kadar plazmid DNA'sı elde edildiğinden bahsedilse de yapılan çalışmada 30-40 µg kadar plazmid DNA'sı elde edilebildi. Bazı denemelerde 150 ml-500 ml arasında başlangıç kültürü kullanılsa da ancak miniprep kiti ile 100 ng/µl DNA elde edildi. Bazı çalışmalarda benzer miktarlarda plazmid DNA'sı elde edilmiş olması ZymoPURE™ II plazmid maxiprep kit belirtilen miktarlarda plazmid DNA'sı elde edemediğini kit ömrü geçtikçe RNase aktivitesini kaybettiği için elüe edilen miktarların düşük olabileceği ya da elüsyon için elüsyon buffer yerine ultra saf suyun kullanımına bağlı olarak kolonda uygun pH değişimini meydana getirememesine bağlı olarak toplam yükün kolondan elüe edilemediği düşünülmektedir (36, 37).

Quandt ve Hynes (18) çalışmasında kullanılan pJQ200KS isimli plazmid, *Rhizobium leguminosarum* için dizayn edilmiş bir intihar plazmididir. *Rhizobium* ve *Brucella*'nın α -proteobacteria türü içerisinde yer alması nedeniyle *B. melitensis* bv.1. Rev.1'den yapılacak gen silinmesi işlemi içinde uyumlu olacağı düşünüldü. Diğer intihar plazmidlerinde bulunan delesyon kasedinde yer alan sükröz direnci ile ilişkili Sac B

genine, Lac operatörünü içeren pBlueIKS plazmid *backbone*'nuna ve pJQ plazmid *backbone*'nuna sahiptir (38). Sahip olduğu kaset ile ilk merodiploid yapının oluşmasında ve kross over basamaklarının şekillenmesinde delesyona yön vereceği düşünüldü. *B. ovis* ile yapılan LPS delesyonu çalışmasında ve *B. abortus* 2308'ten galE geni dizilimi için kütüphane oluşturulmasında pJQ200KS plazmidinin kullanılması, *B. melitensis* Rev.1'den yapılacak gen delesyonunda bu plazmidin etkili olacağı fikrini ortaya çıkarmıştır (27, 39). Çalışmada elde edilen bulgular neticesinde ortaya sürülen bu fikir doğruluğu kanıtlanmıştır.

Ancak *Brucella* ile yapılan gen aktarım çalışmalarında, plazmid'in taşıdığı gen büyüdükçe gen aktarımının zorlaştığı ifade edilmiştir. Gheibi ve ark (31) yaptıkları çalışmada *B. abortus* RB51'e 4 kb'lık plazmid aktarımında normal *Brucella* kompetentlerinin gen aktarımında başarı oranı 1µg DNA için 60 koloni civarında iken, plazmid 7kb'a çıkarıldığında elektroporasyon ile başarı sağlanamadığını tespit etmişlerdir. Mcquiston ve ark (14) *Brucella*'ya intihar plazmidi aktarımı için hazırladıkları protokolde kullanılan plazmid 4,7 kb'dır. Lalsiamthara ve ark (40) *B. abortus* per geni delesyonu için dizayn ettikleri intihar plazmidi 5,6 kb'dır. Çalışmada kullanılan pJQ200KS plazmidi boş iken 5.4 kb büyüklüğünde olup delesyon için kullanılan homoloji bölgesi gen *insertu* (1.3 kb) ile birlikte 6,7 kb büyüklüğünde bir plazmid dönüşmektedir. Gheibi ve ark (31) verileri ile kıyaslandığında, bu çalışmada kullanılan yaklaşık 7 kb büyüklüğünde mutant plazmid pJQ200KS ile yaşanan gen aktarımı problemleri tutarlı gözükmektedir. Bunun yanı sıra *B. abortus* ile yapılan bazı çalışmalarda 8 kb ve 13,7 kb büyüklüğünde plazmidlerin elektroporasyonda 200 Ω 3,7 msn gibi değerlerle başarılı mutant elde edildiği bildirilmiştir (26, 41). Çalışma bulguları ve önerilen protokollerde başarılı *Brucella* mutanti için, 400 Ω dirençte en az 20 msn elektrik akımına maruz kalması tavsiye edilmektedir. Elde edilen veriler ile konu hakkında yapılan çalışma sonuçları kıyaslandığında uyumsuzluğu göze çarpmaktadır.

Brucella'dan sferoplast eldesi için yapılan çalışmada 24 saat ön kültür sonrası 48 saat sferoplast için penisilin, ampisilin ve glisin uyarımına maruz bırakılarak sferoplast haline gelmiş hücreler kontrol edilmiş ve en etkin uyarım yolu olarak penisilin ve glisin alınmıştır (33). Gheibi ve ark (31) yaptığı çalışmada 24 saat ön kültür sonrası 24 saat sferoplast için ampisilin ve glisin uyarımına maruz bırakılarak elektroporasyona alınmış ve başarı oranının ampisilinde yüksek olduğu belirtilmiştir.

Penisilin, *Brucella*'nın hücre duvarı yapısını tamamen ortadan kaldırdığı için sferoplast yapı oluşumunun aksine hücreyi tamamen yok ettiği düşünüldü. Elektroporasyon ile aktarımda en etkin yöntemin glisin ile uyarım metodu olduğu belirlendi. Aktarımı zor olan ve 7 kb'dan daha büyük olan plazmidlerin aktarımı için kompetent hücrenin sferoplast yapıya dönüştürülmesi metodu çalışmalarda araştırmacılara avantaj sağlayacaktır.

ETİK KURUL

Çalışma için Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi 21.03.2017 tarihli 2017-13 karar sayılı karar ile Etik Kurul onayı alınmıştır.

TEŞEKKÜR

Elektroporasyon cihazı temini için Konya Gıda Tarım Üniversitesi KitArgem Birimine ve İstatistiksel analiz için Doç. Dr. M. Agah Tekindal'a teşekkürü borç bilirim. Çalışmanın Özet Kısmı 14. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresinde 13-16 Ekim 2020 tarihinde sunulmuştur.

MADDİ DESTEK VE ÇIKAR İLİŞKİSİ

Çalışma ikinci yazarın danışmanlığında, birinci yazarın tez çalışmasıdır. Finansal olarak Selçuk Üniversitesi tarafından 2015-OYP-116 numaralı proje ile desteklenmiştir ve yazarların herhangi bir çıkara dayalı finansal veya kişisel ilişkisi yoktur.

KAYNAKLAR

1. Siadat SD, Salmani AS, Aghasadeghi MR. (2012). Brucellosis Vaccines an Overview. In: Zoonosis. Morales JL (ed). pp. 143-166. Intech, Rijeka, Croatia.
2. Wyatt H. (2016). Lessons from the history of brucellosis. JMH. 5(1): 75-84.
3. Karagül SM. (2017). Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü ve 115 Yıllık Tarihi. Vet Hek Der Bülteni. (14): 39-48.
4. Erganiş O. (2010). Hayvansal Aşıların Geliştirilmesinde Üniversite Kamu Sanayi İşbirliğinin Rolü. Eurasian J Vet Sci. 26 (1): 1-6.
5. Tarım Orman Bakanlığı. (2019). Brusellanın Konjunktival Aşı İle Kontrol ve Eradikasyonu Genelgesi. Erişim: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/tur196615.pdf> Erişim Tarihi: 16.08.2019.
6. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. (2012). Brusellanın Konjunktival Aşı ile Kontrol ve Eradikasyonu Projesi. Erişim:<http://www.tarim.gov.tr/Documents/Mevzuat/Genelgeler/BRUCELLA.Pdf>. Erişim Tarihi: 26.10.2019.
7. Hur J, Xiang Z, Feldman EL, et al. (2011). Ontology-Based Brucella Vaccine Literature Indexing and Systematic Analysis of Gene Vaccine Association Network. BMC Immunol. 12(1): 49.
8. Gupta V, Verma DK, Singh SV, et al. (2007). Serological Diagnostic Potential of Recombinant Outer Membrane Protein (Omp31) from Brucella melitensis in Goat and Sheep Brucellosis. Small Rumin Res. 70(2-3): 260-266.
9. Tibor A, Decelle B, Letesson J. (1999). Outer Membrane Proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of Brucella spp. are Lipoproteins. Infect Immun. 67(9): 4960-4962.
10. Corbel MJ. (1997). Brucellosis an Overview. Emerg Infect Dis. 3(2): 213.
11. Ficht TA, Pei J, Kahl-McDonagh M. (2010). In Vitro Mutagenesis of Brucella Species. In: In Vitro Mutagenesis Protocols. Braman J (ed). 3rd ed. pp.15-35. Springer, Stratagene, La Jolla, USA.
12. Haine V, Dozot M, Dornand J, et al. (2006). NnrA is Required for Full Virulence and Regulates Several Brucella melitensis Denitrification Genes. J Bacteriol. 188(4): 1615-1619.
13. Elzer PH, Phillips RW, Kovach ME, et al. (1994). Characterization and Genetic Complementation of a Brucella abortus high-temperature-requirement A (htrA) Deletion Mutant. Infect Immun. 62(10): 4135-4139.
14. McQuiston JR, Schurig GG, Sriranganathan N, et al. (1995). Transformation of Brucella Species with Suicide and Broad Host-Range Plasmids. In: Electroporation Protocols for

- Microorganisms. Nickoloff JA (ed). pp. 143-148. Springer, Totowa, New Jersey, USA.
15. Wu Q, Pei J, Turse C, et al. (2006). Mariner Mutagenesis of *Brucella melitensis* Reveals Genes with Previously Uncharacterized Roles in Virulence and Survival. *BMC Microbiol.* 6(1): 102.
 16. Allen CA, Adams LG, Ficht TA. (1998). Transposon-Derived *Brucella abortus* Rough Mutants are Attenuated and Exhibit Reduced Intracellular Survival. *Infect Immun.* 66(3): 1008-1016.
 17. Kahl-McDonagh M, Ficht T. (2006). Evaluation of Protection Afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Unmarked Deletion Mutants Exhibiting Different Rates of Clearance in BALB/c Mice. *Infect Immun.* 74(7): 4048-4057.
 18. Quandt J, Hynes MF. (1993). Versatile Suicide Vectors which Allow Direct Selection for Gene Replacement in Gram-Negative Bacteria. *Gene.* 127(1): 15-21.
 19. Miller VL, Mekalanos JJ. (1988). A Novel Suicide Vector and Its Use in Construction of Insertion Mutations: Osmoregulation of Outer Membrane Proteins and Virulence Determinants in *Vibrio cholerae* Requires *toxR*. *J Bacteriol.* 170(6): 2575-2583.
 20. Gay P, Coq DL, Steinmetz M, et al. (1985). Positive Selection Procedure for Entrapment of Insertion Sequence Elements in Gram-Negative Bacteria. *J Bacteriol.* 164(2): 918-921.
 21. Golovliov I, Sjöstedt A, Mokrievich A, et al. (2003). A Method for Allelic Replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 222(2): 273-280.
 22. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR. (1991). A Wide-Host-Range Suicide Vector for Improving Reverse Genetics in Gram-Negative Bacteria: Inactivation of the *blaA* Gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene.* 109(1): 137-141.
 23. Ortiz-Martín I, Macho AP, Lambersten L, et al. (2006). Suicide Vectors for Antibiotic Marker Exchange and Rapid Generation of Multiple Knockout Mutants by Allelic Exchange in Gram-Negative Bacteria. *J Microbiol Methods.* 67(3): 395-407.
 24. Smith LD, Heffron F. (1987). Transposon Tn5 Mutagenesis of *Brucella abortus*. *Infect Immun.* 55(11): 2774-2776.
 25. Cassataro J, Velikovskiy CA, Barrera Sdl, et al. (2005). A DNA Vaccine Coding for the *Brucella* Outer Membrane Protein 31 Confers Protection Against *B. melitensis* and *B. ovis* Infection by Eliciting a Specific Cytotoxic Response. *Infect Immun.* 73(10): 6537-6546.
 26. Lai F, Schurig GG, Boyle SM. (1990). Electroporation of a Suicide Plasmid Bearing a Transposon into *Brucella abortus*. *Microb Pathog.* 9(5): 363-368.
 27. Soler-Lloréns P, Gil-Ramírez Y, Zabalza-Baranguá A, et al. (2014). Mutants in the Lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are Attenuated and Protect Against *B. ovis* Infection in Mice. *Vet Res.* 45(1): 72.
 28. Martin H. (1983). Protoplasts and Spheroplasts of Gram-Negative Bacteria (with Special Emphasis on *Proteus mirabilis*). In: *Protoplasts 1983*. Potrykus I, Harms CT, Hinnen A, Hütter R, King P, Shillito RD (eds). pp. 213-225. Basel, Switzerland.
 29. Burgers PM, Percival KJ. (1987). Transformation of Yeast Spheroplasts without Cell Fusion. *Anal Biochem.* 163(2): 391-397.
 30. Thierbach G, Schwarzer A, Pühler A. (1988). Transformation of Spheroplasts and Protoplasts of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 29(4): 356-362.
 31. Gheibi A, Khanahmad H, Kardar GA, et al. (2019). Optimization and Comparison of Different Methods and Factors for Efficient Transformation of *Brucella abortus* RB51strain. *Adv Biomed Res.* 8: 37.
 32. Kung SH, Retchless AC, Kwan JY, et al. (2013). Effects of DNA Size on Transformation and Recombination Efficiencies in *Xylella fastidiosa*. *Appl Environ Microbiol.* 79(5): 1712-1717.
 33. Hines WD, Freeman BA, Pearson GR. (1964). Production and Characterization of *Brucella* Spheroplasts. *J Bacteriol.* 87(2): 438-445.
 34. Hines WD, Freeman BA, Pearson GR. (1964). Fine Structure of *Brucella suis* Spheroplasts. *J Bacteriol.* 87(6): 1492-1498.
 35. Potter H, Heller R. (2018). Transfection by Electroporation. *Curr Protoc Mol Biol.* 121(1): 1-13.
 36. Cheng Q, Shi X, Zhang Y. (2020). Reprogramming Exosomes for Immunotherapy. In: *Cell Reprogramming for Immunotherapy*. Katz SG, Rabinovich PM (eds). pp. 197-209. Springer, New Haven, USA.
 37. Nguyen AW, Le K, Maynard JA. (2020). Engineering Antibodies on the Surface of CHO Cells. In: *Genotype Phenotype Coupling*. Zielonka S, Krah S (eds) pp. 397-422. Springer, Darmstadt, Germany.
 38. Hynes MF, Quandt J, O'Connell MP, et al. (1989). Direct Selection for Curing and Deletion of *Rhizobium* Plasmids Using Transposons Carrying the *Bacillus subtilis* *sacB* Gene. *Gene.* 78(1): 111-120.
 39. Scupham AJ, Triplett EW. (1997). Isolation and Characterization of the UDP-glucose 4'-epimerase-Encoding Gene, *galE*, from *Brucella abortus* 2308. *Gene.* 202(1-2): 53-59.
 40. Lalsiamthara J, Gogia N, Tapas KG, et al. (2015). Intermediate rough *Brucella abortus* S19Δ_{per} mutant is DIVA enable, safe to pregnant guinea pigs and confers protection to mice. *JVAC.* 33(22): 2577-2583.
 41. Halling SM, Detilleux PG, Tatum FM, et al. (1991). Deletion of the BCSP31 Gene of *Brucella abortus* by Replacement. *Infect Immun.* 59(11): 3863-3868.

✉ **Sorumlu Yazar:**

Ali USLU

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 42130, Konya, TÜRKİYE

E-mail: aliuslu@selcuk.edu.tr