

Floresans Işımaya Bağlı Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Belirlenmesi

Erman Oryaşın^{1,a,*}

¹Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Araştırma Merkezi (REDPROM), Aydın, Türkiye

^aORCID ID: 0000-0003-1242-7434

Geliş Tarihi: 24.05.2020

Kabul Tarihi: 08.06.2020

Özet: Disk difüzyon yöntemi ve mikrodilüsyon yöntemini kullanan otomatik sistemler son yıllarda mikrobiyoloji laboratuvarlarının vazgeçilmez parçaları olmuşlardır. Ancak, *in vitro* ölçüm yapan bu sistemler bakterilerin doğal ortamında değil laboratuvar koşullarındaki hassasiyetlerini ölçmektedirler. Bu çalışmanın amacı antibiyotiklerin etkisinin floresans absorbansın ölçüm yöntemiyle belirlenmesini sağlayacak yöntem geliştirmektir. Bu çalışmada içlerinde floresan ışımaya yapan protein içeren bakteriler oluşturmak amacıyla rekombinant plazmidler hazırlanmıştır. Floresans kaynağı olarak yeşil floresans protein (GFP) pUC18 ve pAT392 plazmidlerine klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmidleri içeren bakterilerde konvansiyonel minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ölçümü yapılmıştır. Böylece besi yerindeki canlı hücrelerin yaydığı ışığın ölçülmesi esasına dayanarak alternatif bir MİK ölçüm yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Her bir antibiyotik grubu için pUC18-*gfp* ve pAT392-*gfp* plazmidlerini içeren ve içermeyen *E. coli* DH10B bakterisi kullanılmıştır. *gfp* genini içermeyen bakteriler florometrik ölçüm yapabilen cihazda 24 saatlik ölçüm boyunca ışımaya vermemiş grafikleri doğrusal bir ivmeyle izlenmiştir. Ancak sadece canlı hücrelerde ışımaya yapabilecek olan pUC18-*gfp* ve pAT392-*gfp* plazmidini içeren bakteriler antibiyotiğin hiç uygulanmadığı kontrol grubuna göre oldukça yüksek pik yaptıkları gözlenmiştir. İnhibe edici dozlarda grafik doğrusal bir yapı kazanmıştır. Işımanın alındığı konsantrasyonda en az 10 ışık birimi azalmanın okunduğu yere denk gelen antibiyotik dilüsyonu MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Konvansiyonel MİK değerleri ile florometrik MİK değerleri karşılaştırılmış en çok 2 dilüsyon fark saptanmıştır. Işımanın ölçülmesiyle MİK düzeyinin belirlenebileceği bu çalışma ile gösterilmiştir. Geliştirilmeye çalışılan bu yöntem antibiyotiklerin bakterisidal/bakteriostatik etkilerinin saptanmasında, antibiyotiklerin biyofilm içindeki bakterilere etkilerinin gözlenmesinde kullanım potansiyeli vardır. Ayrıca yeni antibiyotik geliştirmede kullanılabilir basit, ucuz ve kolay bir yöntem adayı olarak denenecek moleküllerin daha hızlı ve etkin şekilde değerlendirilmesini sağlayabilme potansiyeli vardır.

Anahtar Kelimeler: Floresans protein, MİK, Antibiyotik direnci, Klonlama.

Determination of Minimal Inhibition Concentration (MIC) by Fluorometry-based Method

Abstract: Automatic systems using the disc diffusion method and microdilution method have become indispensable parts of microbiology laboratories in recent years. However, these systems measure the sensitivity of bacteria in laboratory conditions, not in their natural environment. This study aims to develop a method that will determine the effect of antibiotics using the fluorescence absorbance measurement method. In this study, recombinant plasmids were prepared to create bacteria containing fluorescent protein in them. The fluorescence source was cloned into the green fluorescence protein (GFP) plasmids pUC18 and pAT392. Conventional minimal inhibition concentration (MIC) measurement was performed on bacteria containing recombinant plasmids obtained. Thus, an alternative MIC measurement method was developed based on measuring the light emitted by living cells in the medium. *E. coli* DH10B bacteria with and without pUC18-*gfp* and pAT392-*gfp* plasmids were used for each antibiotic group. Bacteria that do not contain the *gfp* gene were monitored with a linear acceleration in the device capable of fluorimetric measurement that did not emit radiation during the 24-hour measurement. However, bacteria containing pUC18-*gfp* and pAT392-*gfp* plasmids, which can only radiate in living cells, have been observed to have a very high peak compared to the control group in which the antibiotic was not applied at all. The graphic gained a linear structure at inhibitory doses. The antibiotic dilution corresponding to where the at least 10 light units decrease in the concentration at which the irradiation was taken was accepted as the MIC value. Conventional MIC values were compared with fluorimetric MIC values and a maximum of 2 dilution differences were found. It has been shown in this study that the level of MIC can be determined by measuring the radiation. This method, which is tried to be developed, has the potential to be used in determining the bactericidal/bacteriostatic effects of antibiotics and in monitoring the effects of antibiotics on bacteria in the biofilm. It also has the potential to enable faster and more efficient evaluation of the molecules to be tried as a simple, inexpensive, and easy method candidate that can be used in developing new antibiotics.

Keywords: Fluorescence protein, MIC, Antibiotic resistance, Cloning.

Giriş

Yeşil Floresan Protein (GFP) ilk olarak 1960'lı yıllarda *Aequorea victoria* olarak tanımlanmış

denizanasından elde edilmiş ve floresans protein olarak adlandırılmasıyla üzerinde çalışılmaya

başlanmıştır (Shimomura ve ark., 1962). *A. victoria*'nın GFP proteini doğal floresandır yani dışardan herhangi bir substrat ya da kofaktöre gereksinim olmadan floresans ışımaya yapabilmektedir (Collins ve ark., 1998). GFP proteinini kodlayan *gfp* geninin marker bir gen olarak kullanılmaya başlanması model organizma olan *Escherichia coli*'ye 1994 yılında ilk kez klonlanması ile başlamıştır (Chalfie ve ark., 1994). Bu tarihten sonra *gfp* geni çeşitli organizmalarda (bakteri, maya, sinek, çeşitli memeliler...vb.) raportör gen olarak kullanılmaya başlamış ve günümüze kadar tüm dünyada bitki, hayvan ve mikrobiyolojik araştırma laboratuvarlarında çok geniş bir kullanım alanı bulmuştur. 2008 yılında Nobel Komitesi tarafından "GFP geliştirilmesi ve keşfi için" GFP bilim dünyası tarafından tamamen tanınır olmuştur (Anonim, 2020). GFP yirmi birinci yüzyılın moleküler mikroskobu olarak nitelendirilmektedir. Çünkü GFP ile, bir proteinin ne zaman üretildiğini ve nerede üretildiğini izleme ve görme imkânı doğmaktadır. GFP proteini, 238 aminoasit molekülünden meydana gelmektedir. GFP genellikle toksik etkisi az olan bir proteindir ve farklı organizmalarda fizyolojilerini etkilemeden yüksek düzeyde ifade olabilmektedir (Chalfie ve ark., 1994). GFP'nin en yaygın kullanımı, GFP ile birlikte füzyon olan ekspresyon olmuş proteinlerin lokasyon, hareket ve kimyasal reaksiyonlarını da kapsayan bir izlemeye olanak sağlamasıdır. Hücrelerin farklı bölümlerindeki GFP füzyon proteinlerinin lokalizasyonları örneğin hücre döngüsü süresince veya logaritmik artış süresindeki durumları geniş ölçüde çalışılmaktadır (Elf ve ark., 2007). Hücreler içindeki kinetik fenomen çalışmalarını detaylandırmak için diğer bir pencere, GFP floresan temelinde tek molekül mikroskopisi ve tek hücre olarak tedarik edilmesidir (Xie ve ark., 2008). Daha çok organizmalardaki hücre canlılığını göstermek için, herhangi bir maddenin istenilen bölgeye veya hücreye ulaşip ulaşmadığının tespiti için kullanılmaktadır. Mikrobiyolojinin temel görevlerinden birisi doğrudan veya dolaylı olarak mikroorganizmaların varlığını göstermek ve ayırıcı tanımlarını yapmaktır. Sağlık alanındaki diğer bir çalışma alanı ise tedaviye yön verebilmek amacıyla mikroorganizmaların antibiyotiklere olan hassasiyetlerini belirlemektir.

Çalışmamızda floresans ışık yayan sistem içeren bakteri oluşturmak amacıyla iki farklı rekombinant plazmid hazırlanmış ve bunların aktarıldığı bakterilerdeki farklı antibiyotiklerin etkisiyle ışımaya miktarında oluşan değişim ile minimal inhibe edici konsantrasyon (MİK) belirlenmesi ve konvansiyonel yöntem ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bakteri izolatları, plazmidler ve üreme koşulları: Bu çalışmada, bakteri içerisinde GFP içeren rekombinant plazmid hazırlanmıştır. GFP proteinini kodlayan genin çoğaltılıp klonlanması için DNA materyali Dr. Leclercq tarafından laboratuvarımıza (REF-M1) gönderilmiştir (Clarebout ve Leclercq, 2002). Bakteriyel suşlar, 37 °C'de Tryptik Soy Broth (TSB) ve/veya Tryptik Soy Agar (TSA) besiyerlerinde büyütülmüştür. Plazmidlerin saflaştırılmasında plazmid miniprep kiti (Thermo) üretici talimatlarında belirtildiği protokole göre kullanılmıştır. Transformasyon için alıcı suş olarak *E. coli* DH10B kullanılmıştır. pUC18 ve mekik (shuttle) vektör pAT392, klonlama vektörleri olarak kullanılmıştır.

***gfp* geninin pUC18 ve pAT392 plazmidlerine klonlanması ve plazmid konstrüksiyonu:** *gfp* genini çoğaltmak ve doğru yönde klonlayabilmek için Gen Bankasında M62653 erişim numaralı sekans üzerinden KpnI ve BamHI restriksiyon kesim yerleri eklenerek primer dizayn edildi. Dizayn edilen GFP^{KpnI}-Forward:5'-AAGGTACCAGATGAGTAAAGGAGAAGAAC-3' ile GFP^{BamHI}-Reverse:5'-TTGGATCCTTTATTGTATAGTTCATCCAT-3' primer çifti kullanılarak PCR yoluyla çoğaltıldı. pUC18 plazmid ve çoğaltılmış olan *gfp* geni KpnI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesildi. Amplikonların restriksiyonu için, 10 µl *gfp* amplikonu, 2 µl 10X buffer ve 1 µl KpnI, 1 µl BamHI enzimi ve 6 µl steril su kullanılmıştır. pUC18 plazmid de aynı koşullarda kesilmiş ve bu iki restriksiyon ürünü fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) saflaştırması sırasında birleştirilmiştir. Presipitasyondan sonra ligasyon reaksiyonu amacıyla, kesilmiş pUC18 plazmid ve *gfp* genini 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. pUC18::*gfp* ligandı *E. coli* DH10B suşuna transforme edilmiştir ve final konsantrasyonu 100 µg/ml ampisilin, 1 mM izopropil-β-D-tiyogalaktopiranoz (IPTG) ve 50 µg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil-D-galaktosidaz (X-gal) olan TSA besiyerinde seçilmiştir. Elde edilen rekombinant kolonilerin floresansı UV ışığı altında transillüminatör cihazı kullanarak kontrol edilerek, yeşil floresans ışımaya yapan kolonilerden, *gfp* genine spesifik primerlerle PCR yoluyla çoğaltılmıştır (Salih ve ark., 2020). Sekans analizi ile doğrulanmasının ardından pUC18-*gfp* olarak isimlendirilmiştir. pAT392 plazmidine aktarmak için yine aynı primer çifti kullanılmış ve seçici besiyeri kısmına kadar aynı protokoller uygulanmıştır. pAT392 plazmid üzerinde var olan *aac(6)-aph(2)* geni nedeniyle 20 µg/ml gentamisin antibiyotigi içeren TSA agar seçici besiyerinde

seçilmiştir. Transilluminatör cihazında UV ışığı altında yeşil ışımaya yapan kolonilerden alınarak PCR yoluyla genin varlığı doğrulanmıştır. Ayrıca elde edilen ampikon sekansa gönderilerek *gfp* geninin varlığı konfirme edilerek pAT392-*gfp* olarak isimlendirilmiştir.

MİK ölçümü: *E. coli* DH10BΩpUC18-*gfp* rekombinant bakterisi için kloramfenikol ve gentamisin ile, ve *E. coli* DH10BΩpAT392-*gfp* rekombinant bakterisi için ise kloramfenikol ve ampisilin antibiyotikleri kullanılarak CLSI rehberi sıvı mikrodilüsyon method ile duyarlılıkları belirlenmiştir (CLSI Rehberi, 2014). MİK ölçümü için antibiotik konsantrasyonları 0.06 µg/ml - 128 µg/ml aralığında kullanılmıştır. Herhangi bir antimikrobiyal ajanın ve bakterinin eklenmediği Mueller Hinton broth kontaminasyon varlığı testi için negatif kontrol olarak, sadece bakteri süspansiyonunun eklendiği herhangi antimikrobiyal ajanın eklenmediği besiyeri ise üreme kontrolü olarak kullanılmıştır.

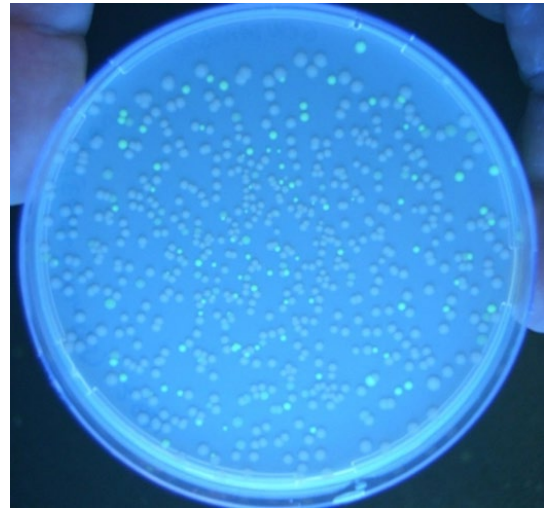
Florometrik MİK tayini: Öncelikle *E. coli* DH10BΩpUC18-*gfp* bakterisi için deneme gerçekleştirilmiştir. Mikroplaka okuyucu cihazda okuma yapılabilecek şeffaf renkli 96 kuyucuklu pleytte 0.06 µg/ml - 128 µg/ml arasında antibiyotik seri seyreltmeleri hazırlanmıştır. Sıvı ortamdaki antibiyotik seyreltileri içerisinde sonraki aşamalarda bakteri kültüründen 5x10⁵ cfu/ml olacak şekilde ilave edilerek hazırlanmıştır. Birinci seride pUC18-*gfp* plazmidini içermeyen *E. coli* DH10B bakterisi negatif kontrol grubu olarak hazırlanmıştır. İkinci seride pUC18-*gfp* plazmidini içeren *E. coli* DH10BΩpUC18-*gfp* bakterisi hazırlanmıştır. Üçüncü seride kloramfenikol, dördüncü seride ise gentamisin antibiyotik dilüsyonu 0.06 µg/ml - 128 µg/ml konsantrasyonları arasında olacak şekilde hazırlanmıştır. Sonrasında, üçüncü ve dördüncü serilerdeki her bir antibiyotik dilüsyonu üzerine *E. coli* DH10BΩpUC18-*gfp* bakterisi eklenmiştir. Ölçümler için, transilluminatör (Multiskan FC Mikroplaka Okuyucu, Thermo) Ex:485/Em:538 nm olarak ayarlanmış ve 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sırasında saatte bir ölçüm almak üzere programlanmıştır.

E. coli DH10BΩpAT392-*gfp* bakterisi kullanılarak gerçekleştirilen deneme için de 96 kuyucuklu pleytte 0.06 µg/ml - 128 µg/ml arasında antibiyotik seri seyreltmeleri hazırlanmış ve sonraki aşamalarda bakteri kültüründen 5x10⁵ cfu/ml olacak şekilde ilave edilerek hazırlanmıştır. Birinci seride pAT392-*gfp* plazmidini içermeyen *E. coli* DH10B bakterisi negatif kontrol grubu olarak hazırlanmıştır. İkinci seride pAT392-*gfp* plazmidini içeren *E. coli* DH10BΩpAT392-*gfp* bakterisi hazırlanmıştır. Üçüncü seride kloramfenikol, dördüncü seride ise

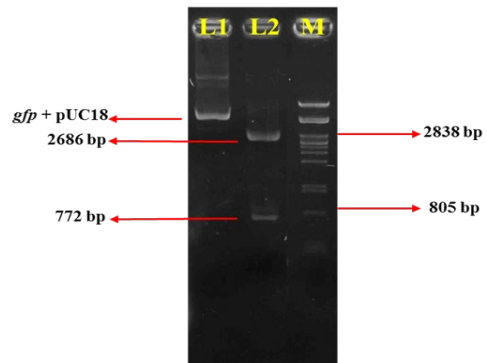
siprofloksasin olacak şekilde 0.06 µg/ml - 128 µg/ml arasında antibiyotik dilüsyonları hazırlanmıştır. Ardından üçüncü ve dördüncü serilerdeki her bir antibiyotik dilüsyonlarının üzerine *E. coli* DH10BΩpAT392-*gfp* bakterisi olacak şekilde eklenmiştir. pAT392 plazmidinde *aacaph* geni varlığından dolayı gentamisine dirençli olduğundan gentamisin antibiyotigi için ölçüm yapılmamıştır. Ölçümler için, transilluminatör (Multiskan FC Mikroplaka Okuyucu, Thermo) 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sırasında saatte bir ölçüm almak üzere programlanmıştır.

BULGULAR

***gfp* geninin klonlanması ve plazmid konstrüksiyonu:** Bu çalışmada, green floresan proteini (GFP) kodlayan *gfp* geni, pUC18 ve pAT392 plazmidlerine klonlanmıştır. Klonlama sonrasında elde edilen petride *gfp* genini alan rekombinant bakteriler Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1: *gfp* genini almış rekombinant bakteriler transilluminatör cihazında UV altında yeşil renkte görünmektedir.



Şekil 2: Plazmid restriksiyonu sonrası insert ve plazmidin incelenmesi. L1: pUC18-*gfp* plazmidinin kesilmeden elektroforez görüntüsü. L2: pUC18-*gfp* plazmidinin KpnI ve BamHI enzimleriyle kesimi sonrası oluşan elektroforez görüntüsü. M: Lambda-PstI marker görüntüsü.

Elde edilen rekombinant bakterilerden plazmid üzerindeki insertin gösterilmesi amacıyla KpnI ve BamHI enzimleriyle kesim sonrasında oluşan elektroforez görüntüsünde, Şekil 2'de görüldüğü gibi 772 bp olarak *gfp* geni, 2686 bp olarak gösterilen ise pUC18 plazmididir. pAT392 plazmidine *gfp* geninin klonlanması için de restriksiyon, ligasyon, transformasyon ve seçici besiyerinde rekombinant kolonilerin seçimi işlemleri tekrarlanmıştır. Ardından elde edilen ve transilluminator cihazında UV ışığı altında yeşil ışımaya yapan kolonilerden PCR yoluyla genin varlığı ve restriksiyon analiziyle insertin varlığı doğrulanmıştır.

Konvensiyonel Mik ve floresans absorbansa dayalı Mik ölçümleri: *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* ve *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* bakterileri için CLSI rehberindeki protokole göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile konvensiyonel Mik ölçümü gerçekleştirilmiştir. Buna göre, *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* bakterisinde kloramfenikol için 2 µg/mL, siprofloksasin için ≤0,06 µg/mL, gentamisin için 1 µg/mL olarak bulunmuştur (Tablo 1). *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* bakterisinde ise kloramfenikol için 2 µg/mL, siprofloksasin için ≤0,06 µg/mL olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Konvensiyonel Mik değerleri

Antibiyotikler	Konvensiyonel Mik	
	<i>E. coli</i> DH10BQpUC18- <i>gfp</i> (µg/ml)	<i>E. coli</i> DH10BQpAT392- <i>gfp</i> (µg/ml)
Kloramfenikol	2	2
Siprofloksasin	≤0,06	≤0,06
Gentamisin	1	(Belirlenmedi)

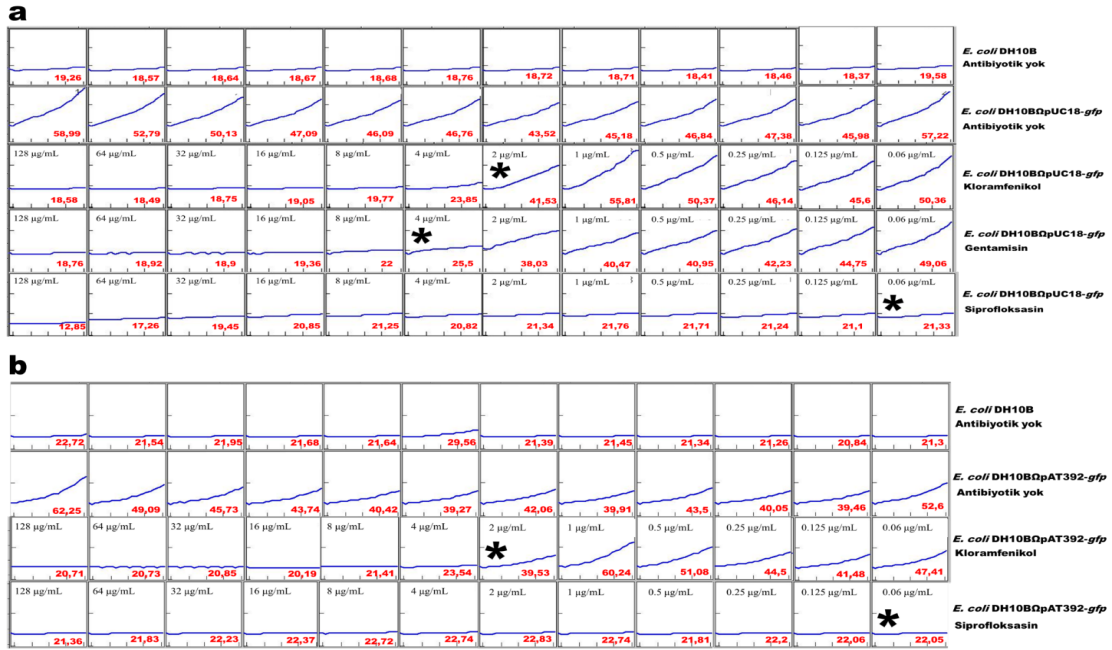
Konvensiyonel Mik ölçümlerinin gerçekleştirilmesinin ardından florometrik absorbans ölçümüne dayalı Mik belirlenmesi için mikropalak okuyucuda Ex:485/Em:538 ölçüm aralığında 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sırasında saatte bir ölçüm alınmıştır. Bu işlemde *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* ve *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* için ayrı ayrı elde edilen sonuçlar Şekil 3a ve Şekil 3b'de gösterilmiştir. Cihaza yüklenen plakda antibiyotik içermeyen on iki kuyucukdaki seride 24. saatte plazmid içermeyen *E. coli* DH10B bakterisinin inoküle edildiği kuyucuklardaki florometrik absorbans değerleri sırasıyla 19,58; 18,37; 18,46; 18,41; 18,71; 18,72; 18,76; 18,68; 18,67; 18,64; 18,57; 19,26 olarak ölçülmüştür (Şekil 3a). Antibiyotik içermeyen kuyucuklara floresans ölçüm süresince pozitif kontrol olarak kullanılan *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* rekombinant bakterisi için elde edilen florometrik absorbans değerleri sırasıyla

57,22; 45,98; 47,38; 46,84; 45,18; 43,52; 46,76; 46,09; 47,09; 50,13; 52,79; 58,99 olarak ölçülmüştür (Şekil 3a). Kuyucuklarda hazırlanmış olan 0.06 µg/ml'den 128 µg/ml konsantrasyona kadar kloramfenikol antibiyotikini ve inoküle edilmiş *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* rekombinant bakterisi için elde edilen floresans absorbans değerleri sırasıyla 18,58; 18,49; 18,75; 19,05; 19,77; 23,85; 41,53; 55,81; 50,37; 46,14; 45,6; 50,36 olarak ölçülmüştür (Şekil 3a). Gentamisin antibiyotik için aynı antibiyotik konsantrasyon aralığında sırasıyla 18,76; 18,92; 18,9; 19,36; 22; 25,5; 40,47; 38,03; 40,95; 42,23; 44,75; 49,06 olarak ölçülmüş, Siprofloksasin için ise florometrik absorbans değerleri 12,85; 17,26; 19,45; 20,85; 21,25; 20,82; 21,34; 21,76; 21,71; 21,24; 21,1; 21,33 olarak ölçülmüştür (Şekil 3a).

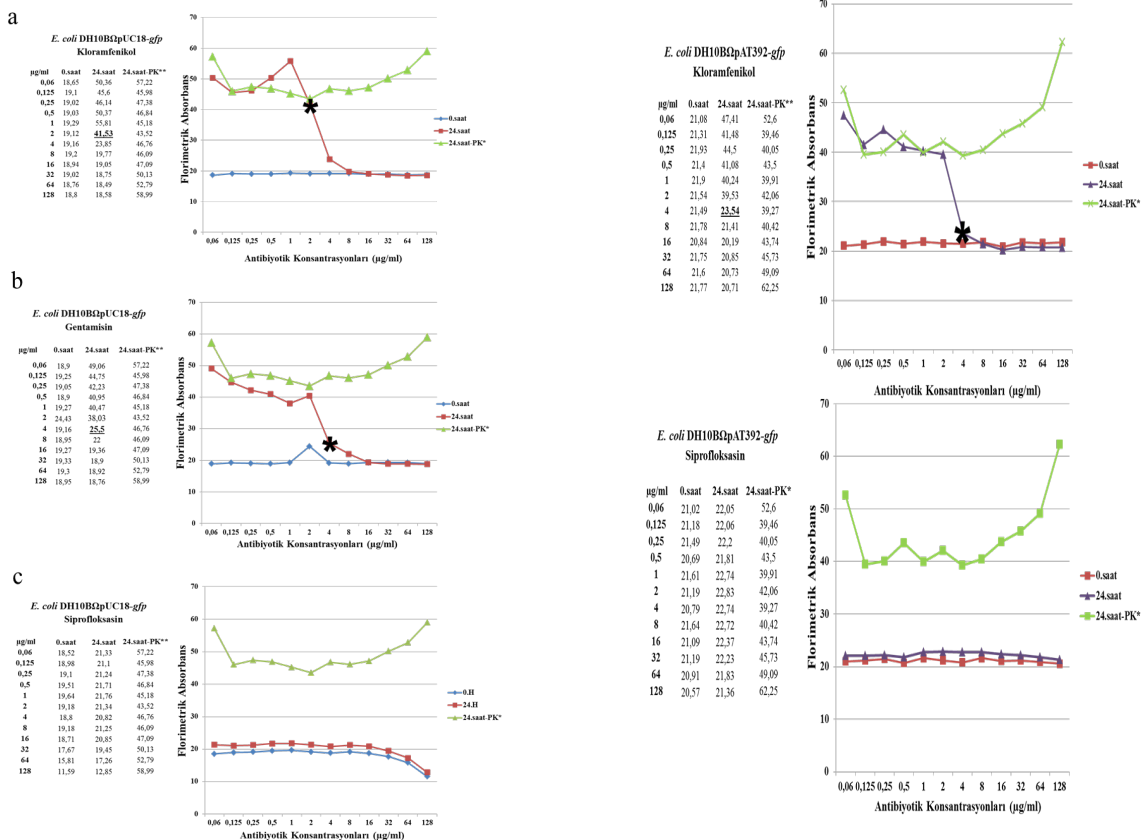
E. coli DH10BQpAT392-*gfp* için gerçekleştirilen ölçümlerde florometrik absorbansın negatif kontrolü olarak plazmid içermeyen *E. coli* DH10B bakterisi kullanılmış ve 24. Saat sonunda elde edilen ölçüm değerleri 22,72; 21,54; 21,95; 21,68; 21,64; 29,56; 21,39; 21,45; 21,34; 21,26; 20,84; 21,3 olarak ölçülmüştür (Şekil 3b). Antibiyotiksiz ortamda pozitif kontrol olan rekombinant *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* için florometrik absorbans ölçümleri 62,25; 49,09; 45,73; 43,74; 40,42; 39,27; 42,06; 39,91; 43,5; 40,05; 39,46; 52,6 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3b). Kloramfenikol antibiyotik için 0.06 µg/ml'den 128 µg/ml aralığında antibiyotik dilüsyonu hazırlanmış kuyucuklara *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* eklenerek gerçekleşen ölçüm sonrası 20,71; 20,73; 20,85; 20,19; 21,41; 23,54; 39,53; 40,24; 41,08; 44,5; 41,48; 47,41 florometrik absorbans değerleri elde edilmiştir (Şekil 3b). Siprofloksasin için ölçülen değerler 21,36; 21,83; 22,23; 22,37; 22,72; 22,74; 22,83; 22,74; 21,81; 22,2; 22,06; 22,05 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3b).

Florometrik absorbans ile Mik belirlenmeye çalışılırken ayrıca 0. saat ile 24. saat absorbans değerlerinin pozitif kontrol ile birlikte, antibiyotik konsantrasyonlarına göre oluşturduğu değişimin grafiksel durumundan da faydalanıldı. Buna göre Şekil 4'de *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* için ve Şekil 5'de ise *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* için florometrik absorbansın keskin bir şekilde en az 10 ışık birimi azaldığı yer Mik değerini vermektedir.

Florometrik absorbans ölçümüne dayalı yöntem ile elde edilen verilere göre *E. coli* DH10BQpUC18-*gfp* bakterisi için floresans Mik (FL-Mik) değerleri kloramfenikol için 2 µg/ml, gentamisin için 4 µg/ml ve siprofloksasin için <0,06 µg/ml olarak bulunmuştur. *E. coli* DH10BQpAT392-*gfp* bakterisi için floresans Mik (FL-Mik) değerleri ise kloramfenikol için 2 µg/ml ve siprofloksasin için <0,06 µg/ml olarak bulunmuştur (Şekil 3a, Şekil 3b, Şekil 4, Şekil 5 ve Tablo 2).



Şekil 3. Mikroplak okuyucu cihazında florimetrik absorbans çıktılarının alınması. Mavi renkle ilerleyen çizgi 24 saat süresince ışığın absorbansına göre şekillenmektedir. Kırmızı renkli rakamlar absorbans değerlerini göstermektedir. Ayrıca her bir kuyucuğu temsil eden kareler içerisinde yer alan antibiyotik konsantrasyonu da belirtilmiştir. a: Kloramfenikol, gentamisin ve siprofloksasin antibiyotikleri için *E. coli* DH10BΔpUC18-gfp bakterisinde mikroplak okuyucu cihazında konsantrasyona bağlı olarak elde edilen değerler b: Kloramfenikol, ve siprofloksasin antibiyotikleri için *E. coli* DH10BΔpAT392-gfp bakterisinde mikroplak okuyucu cihazında konsantrasyona bağlı olarak elde edilen değerler *: Florimetrik absorbansa göre elde edilen MİK değerini göstermektedir.



Şekil 4: *E. coli* DH10BΔpUC18-gfp bakterisi için antibiyotik konsantrasyonlarına göre florimetrik absorbans değerlerinin izlenmesi. 24. saatte meydana gelen en az 10 ışık birimi düşüş MİK değerini vermiştir. a: Kloramfenikol için konsantrasyona bağlı florimetrik absorbans değerleri. b: Gentamisin için konsantrasyona bağlı florimetrik absorbans değerleri. c: Siprofloksasin için konsantrasyona bağlı florimetrik absorbans değerleri *: MİK değeri, PK**: Pozitif kontrol absorbans değerleri (*E. coli* DH10BΔpUC18-gfp).

Şekil 5. *E. coli* DH10BΔpAT392-gfp bakterisi için antibiyotik konsantrasyonlarına göre florimetrik absorbans değerlerinin izlenmesi. 24. saatte meydana gelen en az 10 ışık birimi düşüş MİK değerini vermiştir. a: Kloramfenikol için konsantrasyona bağlı florimetrik absorbans değerleri b: Siprofloksasin için konsantrasyona bağlı florimetrik absorbans değerleri *: MİK değeri, PK**: Pozitif kontrol absorbans değerleri (*E. coli* DH10BΔpAT392-gfp).

Tablo 2. Konvansiyonel ve FL-MİK karşılaştırılması

Antibiyotikler	Konvansiyonel MİK	FL-MİK	Konvansiyonel MİK	FL-MİK
	<i>E. coli</i> DH10BΩpUC18- <i>gfp</i> (µg/ml)	<i>E. coli</i> DH10BΩpUC18- <i>gfp</i> (µg/ml)	<i>E. coli</i> DH10BΩpAT392- <i>gfp</i> (µg/ml)	<i>E. coli</i> DH10BΩpAT392- <i>gfp</i> (µg/ml)
Kloramfenikol	2	2	2	2
Siprofloksasin	≤0,06	≤0,06	≤0,06	≤0,06
Gentamisin	1	4	(Belirlenmedi)	(Belirlenmedi)

Tartışma ve Sonuç

Çalışmamızda, *gfp* geni pUC18 ve pAT392 plazmidlerine klonlanmış ve aktarıldığı *E. coli* DH10B bakterisinde konvansiyonel ve florometrik MİK ölçümleri yapılmıştır. Florometrik absorbans temelindeki MİK yöntemiyle konvansiyonel MİK ölçümü karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Konvansiyonel ve florometrik MİK ölçümlerinin maksimum 2 dilüsyon fark olduğu bulunmuştur.

GFP ve benzeri floresans özellikli proteinlerden yararlanılarak hücrelerin fizyolojisinin farklı koşullardaki cevapları, hücre içi proteinlerin varlığı, ekspresyonu gibi birçok uzun yıllardır konuda çalışılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, kimyasal birtakım maddeler uygulandığında bakterilerin flagellaları gibi büyük moleküler makinelerinin formasyonlarındaki değişimlerin belirlenebilmesi amacıyla GFP 'nin floresans özelliğinden yararlanılmıştır (Kalir ve ark., 2001).

Hücre içindeki farklı protein gruplarının dinamiklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen başka bir çalışmada, bazı protein grupları GFP ile işaretlenerek, normal ve değişken koşullardaki kimyasal inhibitörler, mutasyonlar ve gen inhibisyonlarındaki durumlar incelenmiştir (Ellenberg ve ark., 1998). Makrolid antibiyotikle ile yapılmış bir çalışmada da *gfp* geninin aktarıldığı bakteride farklı grup makrolidlerin indüklemeye kapasiteleri disk difüzyon metodu kullanılarak UV altındaki ışığa ile gözlenmeye çalışılmıştır (Clarebout ve Leclercq, 2002). GFP tabanlı florometrik yöntem kullanılarak T4 ve T7 endolizinlerinin bakteri hücreleri üzerinde etkili olduğu optimal pH, tuz ve metal iyonları konsantrasyonlarını belirlemeye yönelik çalışmada da florometrik absorbans ölçümünden yararlanılmıştır. Hücre lizisini hassas bir şekilde ölçebilecek bir yöntem olarak GFP ışığının florometrik tabanlı ölçümünün kullanılmasının uygulanabilir olduğu belirtilmiştir (Sharma ve ark., 2019). Biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotik hassasiyetlerini belirlemek önemli bir sorundur. Mozioglu yaptığı çalışmada MİK değerini saptamak

için floresans absorbansa dayalı yöntem ve GFP floresans emisyon ölçümlerini kullanmışlardır. Sonuç olarak biyofilm içinde veya dışında, *P. aeruginosa* için antibiyotik MİK ölçümlerinin farklı olmadığı gösterilmiştir (Mozioglu, 2019). Yapılan diğer bir çalışmada araştırmacılar, floresans ışığa yoluyla nükleaz aktivitesini belirlemişlerdir. Taqman tarzı prob oluşturmuşlar ve nükleaz aktivitesiyle floresan madde quencherden ayrılınca artan ışımının nükleaz aktivitesini ifade ettiğini göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar kültür ortamında MİK belirlenmesi için floresans tabanlı bir yöntem kullanılabileceğini de vurgulamıştır (Mozioglu ve ark., 2019).

Konvansiyonel MİK belirlenmesine dayalı metotlarda sıvı besiyerinde oluşan bulanıklık ya da agarda oluşan bakteri kolonileri değerlendirilmektedir. Bizim çalışmamızda ise ışığın absorbansını saptama yoluyla 485/535 nm dalga boyu aralığında florometrik absorbans ölçüm yöntemi kullanılmıştır. İki farklı plazmid kullanılmış ancak MİK sonuçlarında farklılık saptanmamıştır. Kullanılmış olan bu iki plazmidde ekspresyon miktarlarının farklılığına bağlı MİK değişikliği olup olmadığı test edilmiş ancak test edilen antibiyotikler için belirgin bir farka rastlanmamıştır.

Antibiyotik geliştirmede en önemli aşamalardan birisi aday molekülün bakteriler üzerindeki etkilerinin gözlenmesidir. Bu aşamada kullanılabilecek basit, ucuz ve kolay bir yöntemin ortaya konulması aday moleküllerin daha hızlı ve etkin şekilde değerlendirilmesini sağlayacaktır. Yalnızca moleküllerin değil bakteriler üzerinde, hayvanlardan, mikroorganizmalardan ve bitkilerden elde edilecek özütlere etkilerinin çabuk ve kolay bir yöntemle test edilmesi sağlanabilecektir. Bu çalışma ile antimikrobiyal maddelerin MİK değerinin doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde belirlenmesini sağlayan, kullanımı kolay bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem konvansiyonel metotla karşılaştırılmıştır. Yeni geliştirilecek antimikrobiyallerin ya da bakteriler üzerine etkisi test edilecek farklı ürünlerin *gfp* geni gibi floresans genlerin aktarıldığı test organizmalarına karşı etkisi oldukça hassas olarak ölçülebilecektir. Yöntemin sınırlayıcı yönü, floresan

genlerle dönüştürülmüş bakterilerin kullanılacak olmasıdır.

Teşekkür

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiştir. (Proje Numarası: 109T948)

KAYNAKLAR

- Anonim, 2020: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/advanced-information/>. Erişim tarihi; 19/05/2020.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W W, Prasher D C, 1994: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805.
- Clarebout G, Leclercq R, 2002: Fluorescence assay for studying the ability of macrolides to induce production of ribosomal methylase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(7), 2269-2272.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 2014: Twenty-first Informational Supplement. CLSI Document M100-S21. CLSI, Wayne, PA.
- Collins LA, Torrero MN, Franzblau SG, 1998: Green fluorescent protein reporter microplate assay for high-throughput screening of compounds against Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(2):344-347.
- Elf J, Li GW, Xie XS, 2007: Probing transcription factor dynamics at the single-molecule level in a living cell. *Science*, 316(5828), 1191-1194.
- Ellenberg J, Lippincott-Schwartz J, Presley JF, 1998: Two-color green fluorescent protein time-lapse imaging. *Biotechniques*.25(5):838-846.
- Kalir S, McClure J, Pabbaraju K, Southward C, Ronen M, Leibler S, et al, 2001: Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science*. 292: 2080–2083.
- Mozioglu E, 2019: Fluorescence-based real-time monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* and a simple, continuous screening method for detection of antibiofilm activity. *Int. J. Environmen. An. Ch.* DOI: 10.1080/03067319.2019.1685091
- Mozioglu E, Akyürek S, Gündüz S, Akgoz M, Gören AC, Kocagöz T, 2019: Oligomer based real-time detection of microorganisms producing nuclease enzymes. *Analyst*, 144(4), 1379-1385.
- Salih H, Oryaşın E, Bozdoğan B, 2020: pADU94, Kloramfenikol Direncine Sahip Klonlama ve Ekspresyon Vektörü. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 50 (1):027-034.
- Sharma M, Tyagi JL, Poluri KM, 2019: Quantifying bacterial cell lysis using GFP based fluorimetric assay. *Int. J. Biol. Macromol.* 138, 881-889.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y, 1962: Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Physiol.*, 59, 223-239.
- Xie XS, Choi PJ, Li GW, Lee NK, Lia G, 2008: Single-molecule approach to molecular biology in living bacterial cells. *Annu. Rev. Biophys.*, 37, 417-444.

***Yazışma Adresi:** Erman Oryaşın

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Araştırma Merkezi (REDPROM), Aydın,-Türkiye
e-mail: ermanoryasin@gmail.com