



Staphylococcus aureus BAKTERİYOFAJ ENDOLİZİN GENLERİNİN KLONLANMASI VE EKSPRESYONU

Mujib ABDURAHMAN, İlknur TOSUN, Ali O. KILIÇ

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TRABZON



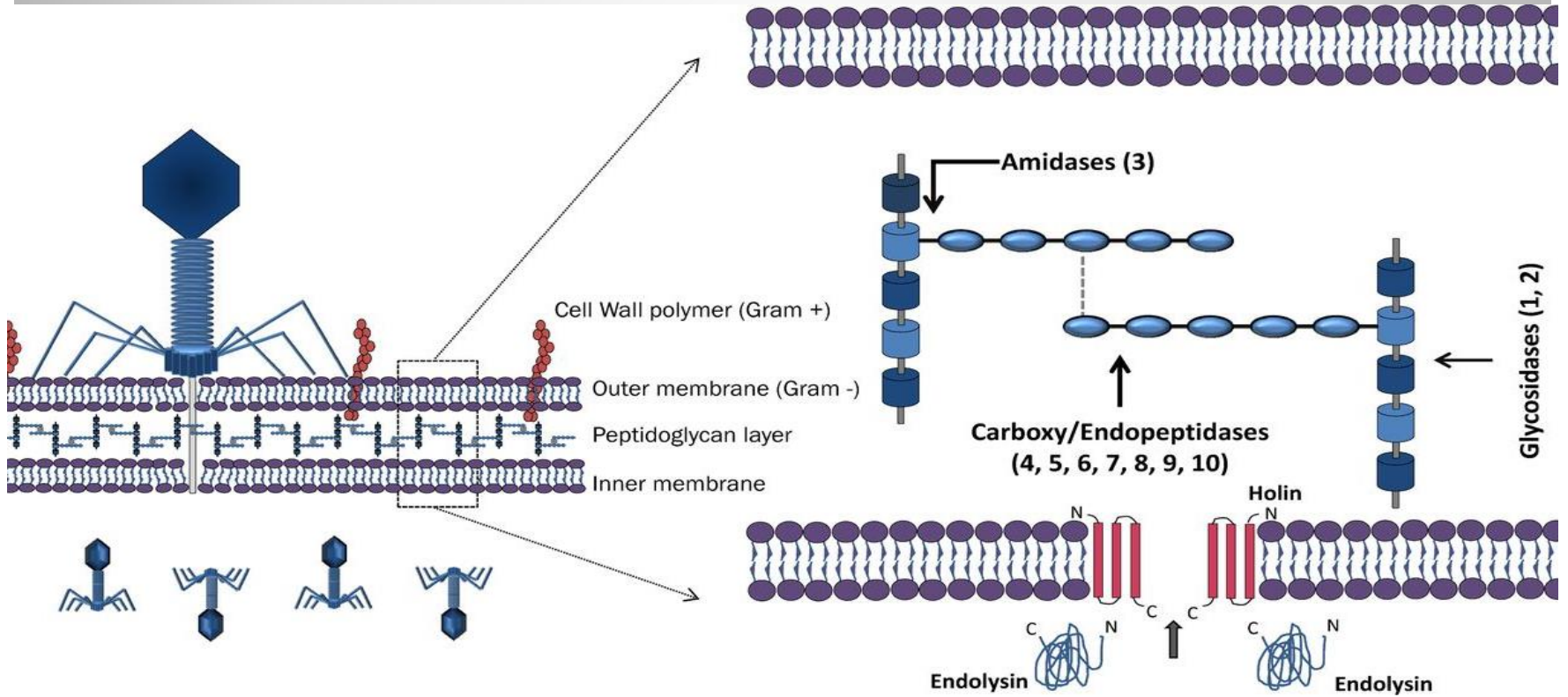
Sunum planı

- **Giriş ve Genel Bilgiler**
- **Çalışmanın Amacı**
- **Gereç ve Yöntem**
- **Bulgular**
- **Tartışma**



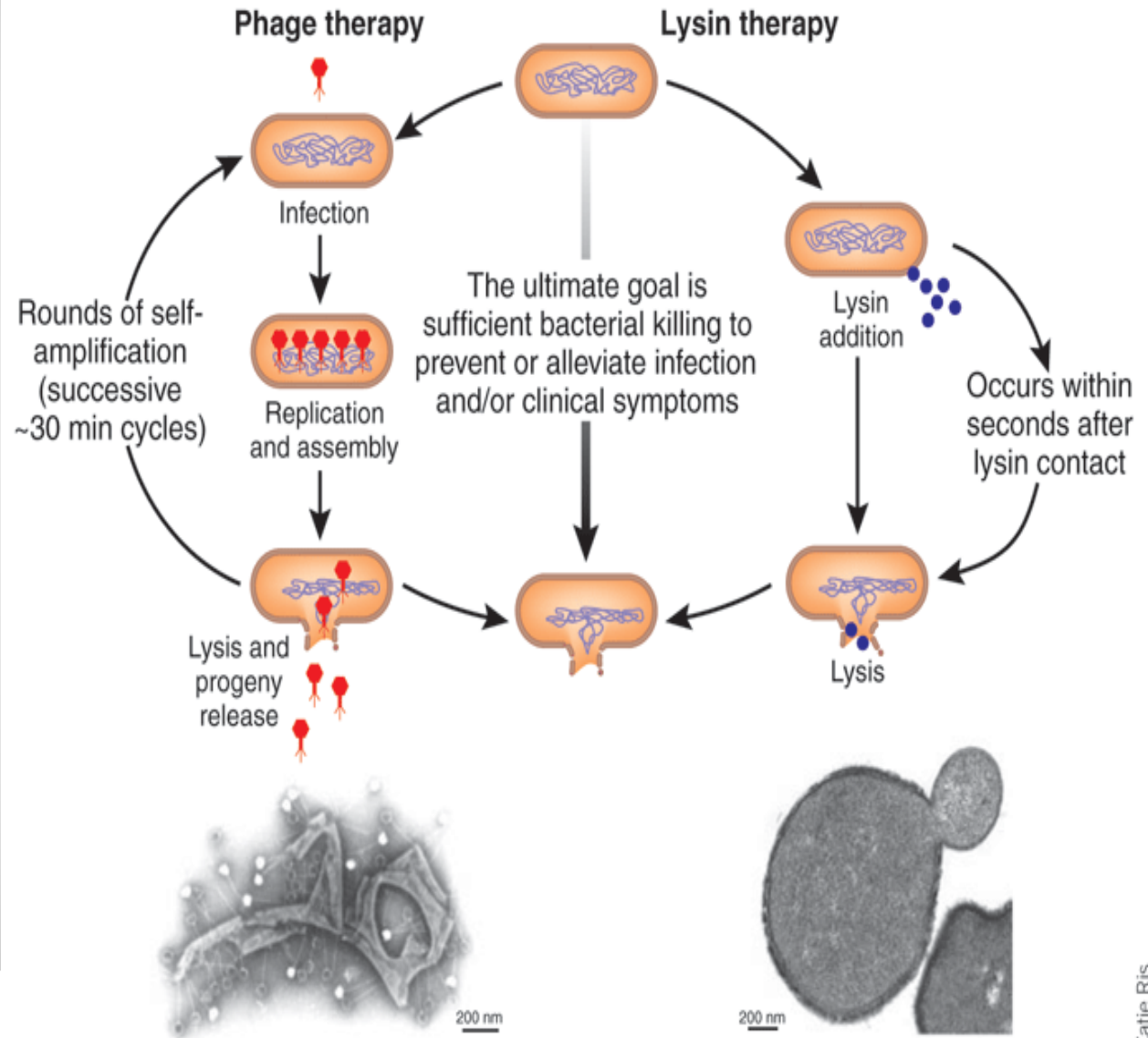
• Endolizin;

- bakteriyofajların replikasyon siklusunun son aşamasında konak tarafından sentezlettilen
- konağın peptidoglikan yapısını hidrolize ederek fajın serbest kalmasını sağlayan enzimdir.



ÖNEMİ

- Tıp
- Veteriner
- Ziraat
- Gıda Sanayii

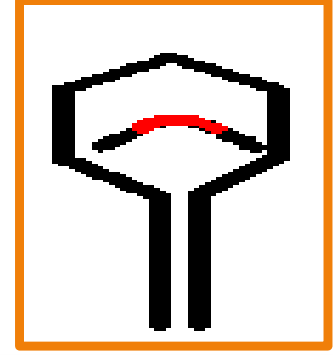


Endolizin uygulamasının klasik antibiyotik tedavisinden farklı olarak;

- Daha hızlı etkili
- Direnç gelişimi düşük
- Normal flora üzerine olumsuz etkisi yok



Amaç



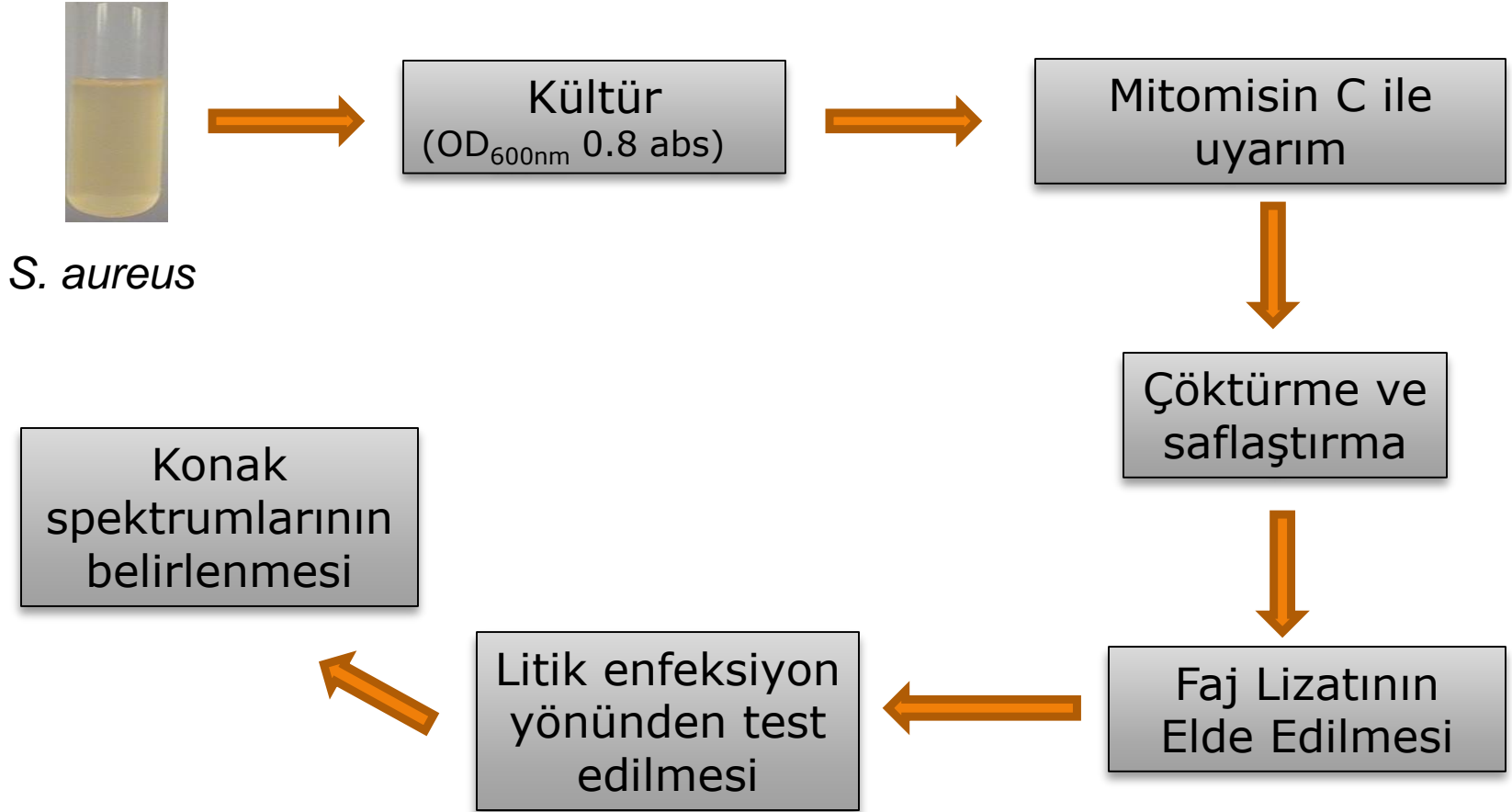
Bu çalışmada stafilokok suşlarına karşı litik etkiye sahip bakteriyofajların endolizin genlerinin klonlanması ve *E. coli*'de rekombinant olarak üretilmesi amaçlandı.

Endolysin

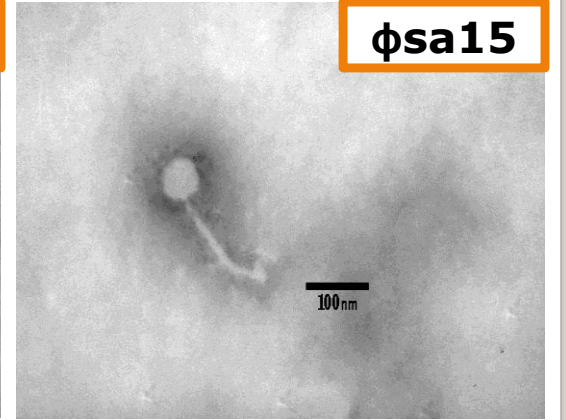
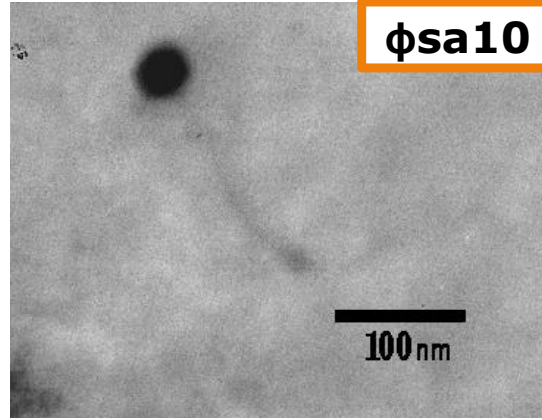
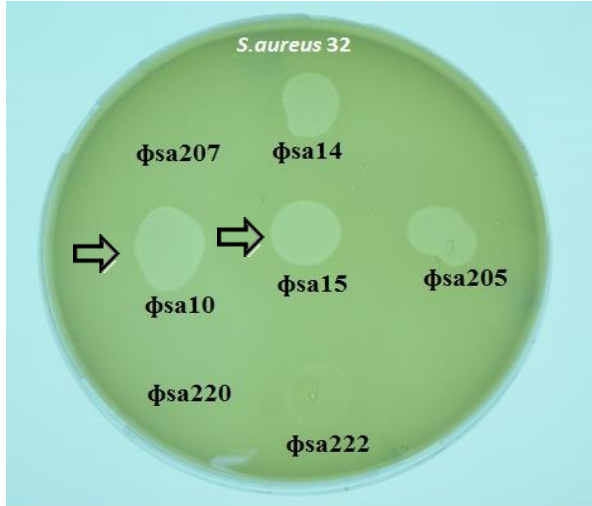


Gereç ve Yöntem

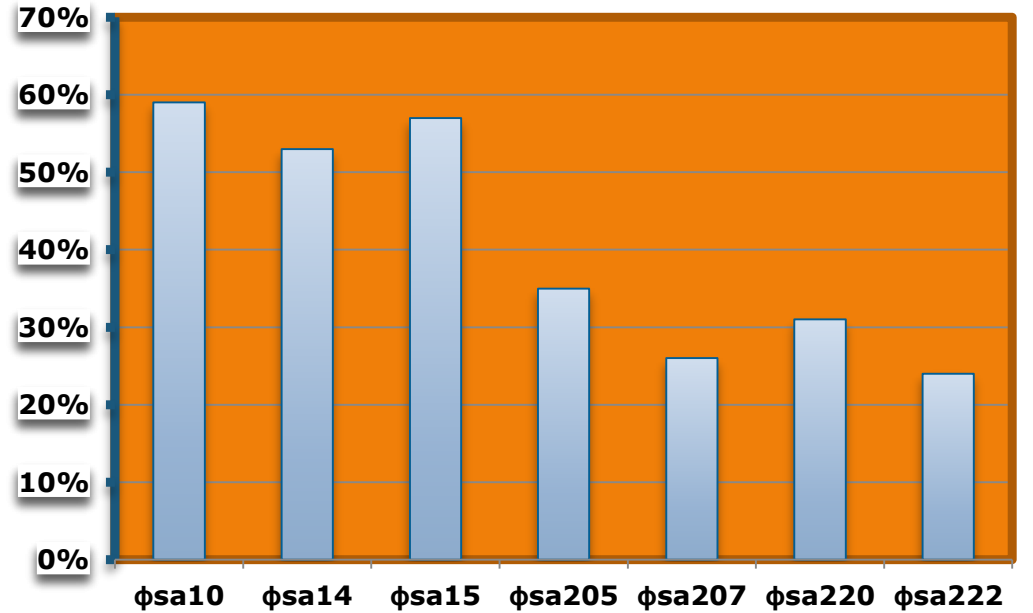
1. Faj izolasyonu



1. Faj izolasyonu



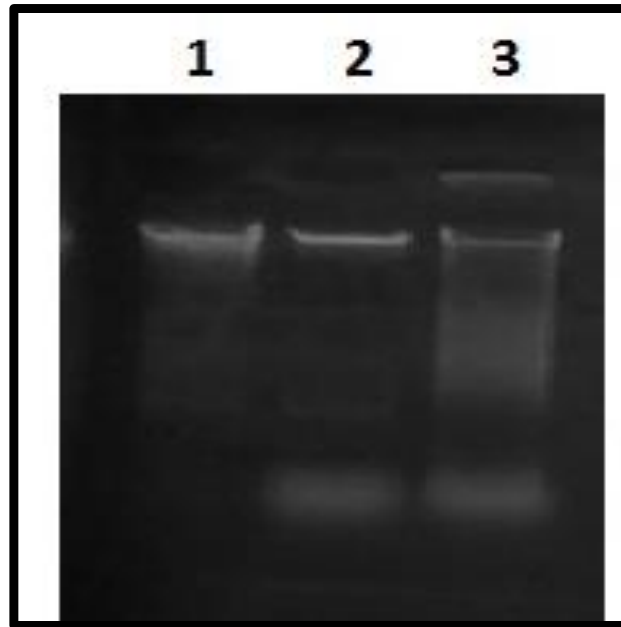
■ Her bir fajın konak spektrumu Yüzdesi



2. Faj DNA'sının izolasyonu

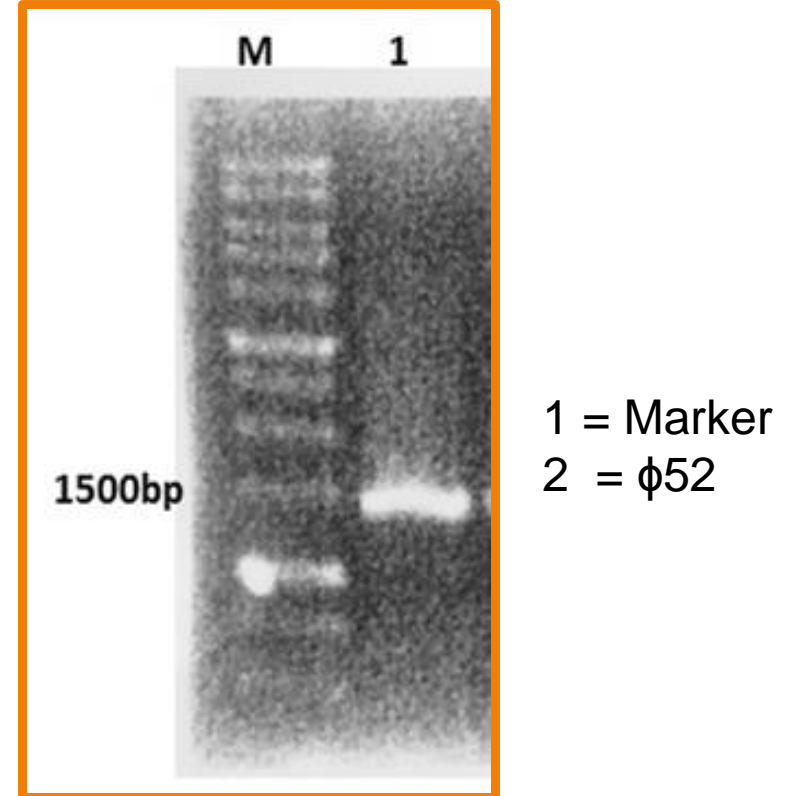
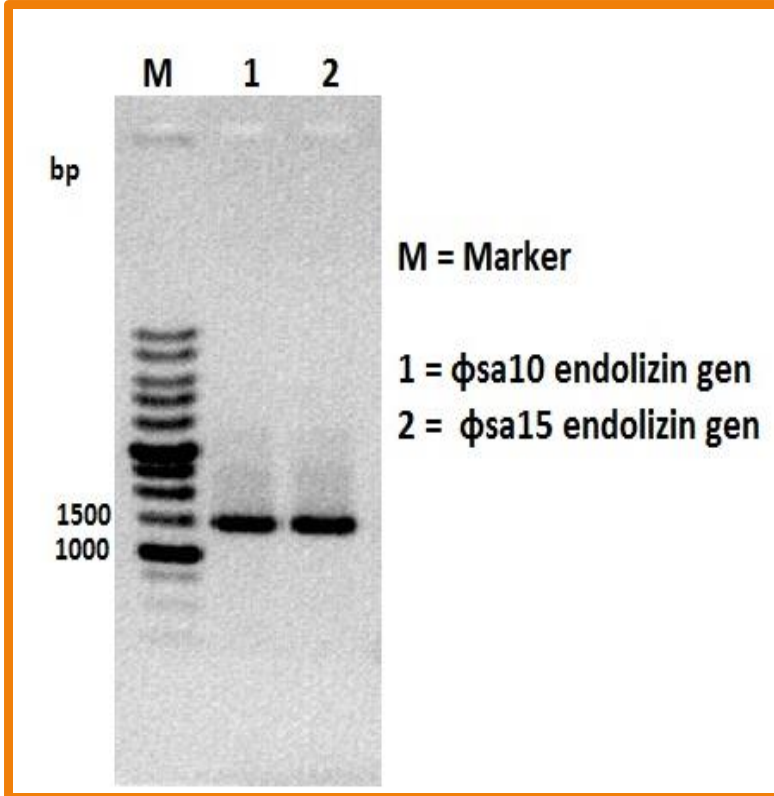
Fenol-kloroform yöntemi kullanıldı

- ❖ ϕ sa10
- ❖ ϕ sa15
- ❖ *S. aureus subsp. aureus* bacteriophage 52 (ATCC® 27692-B1™)



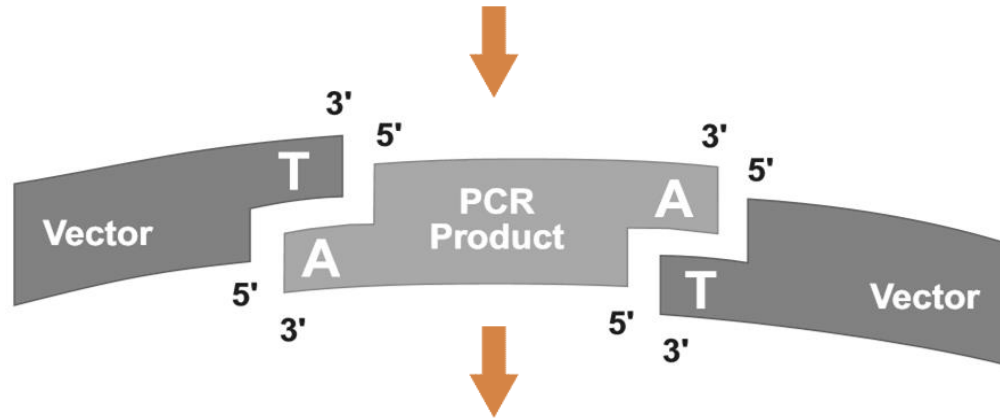
1. ϕ sa10
2. ϕ sa15
3. ϕ 52

3. Endolizin geninin amplifikasyonu

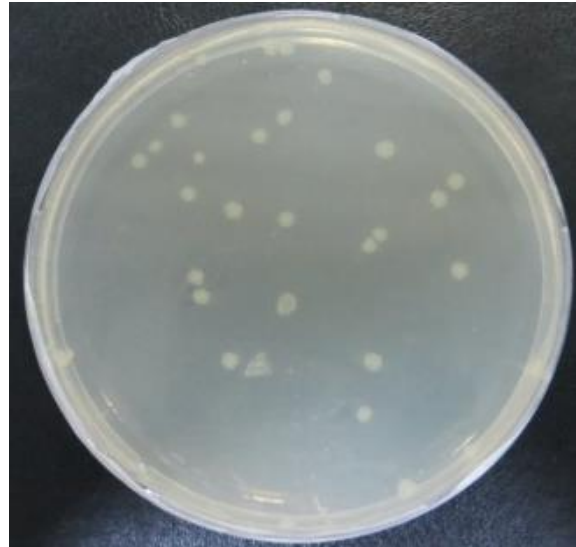


Endolizin geninin PCR amplifikasyonu sonucu yaklaşık endolizin genini içeren 1500 bp'lik DNA fragmenti elde edilmiştir.

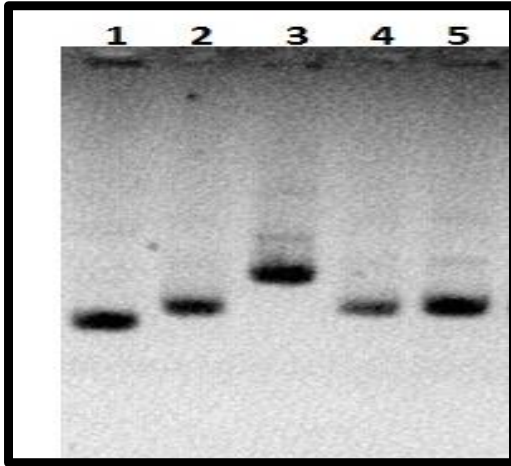
4. Endolizin geninin pET SUMO vektörüne ligasyonu



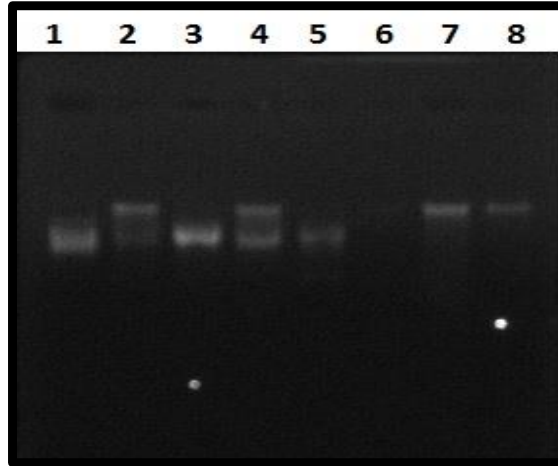
5. *E. coli* One shot kompetan hücrelerine transformasyonu



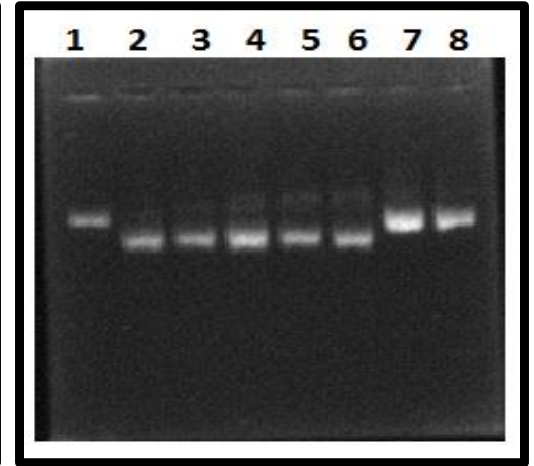
6. Klonlamanın doğrulanması için plazmit izolasyonu ve bundan DNA dizi analizi yapıldı.



ϕ sa10

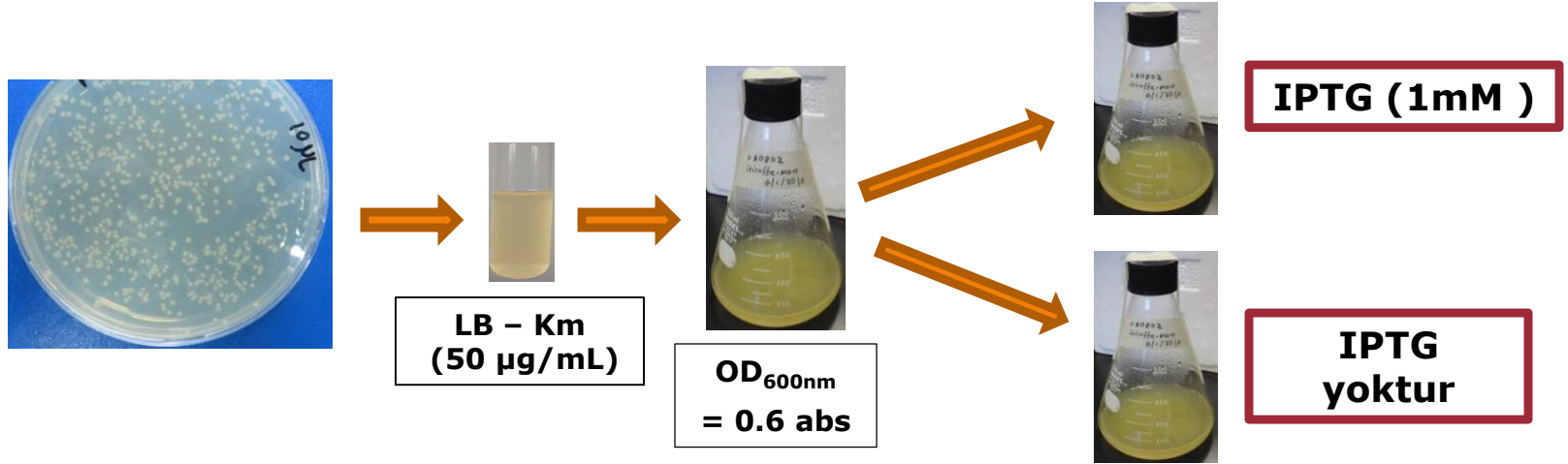


ϕ sa15

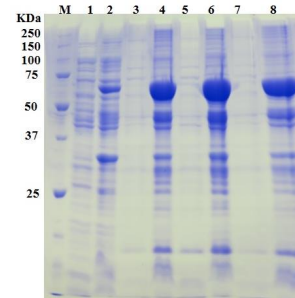
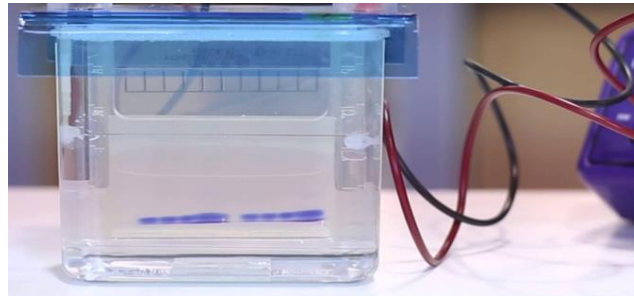
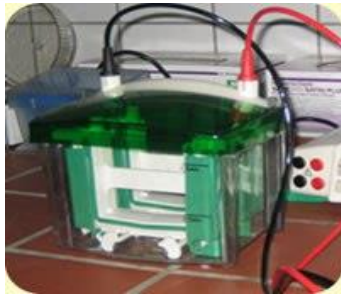


ϕ 52

6. Doğru klonlar ekspresyon işlemi için *E. coli* BL21 (DE3) kompetan hücrelerine transforme edildi.

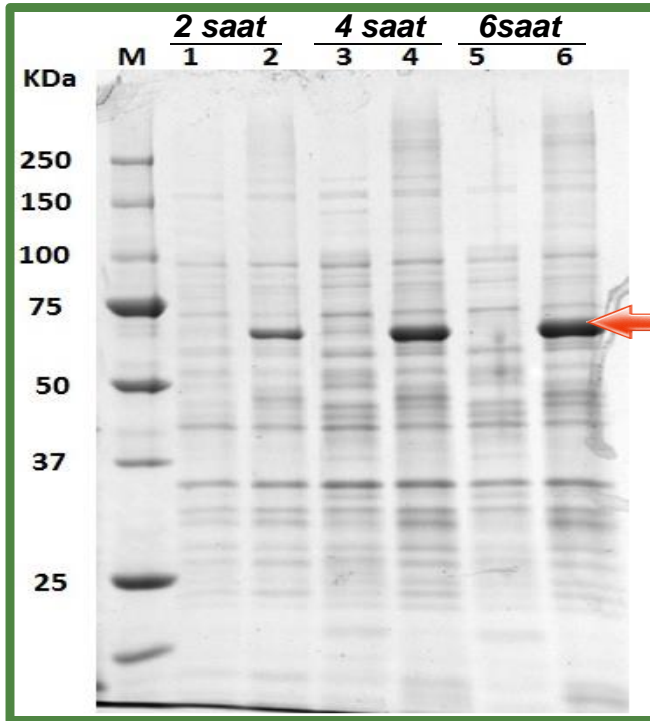


7. Ekspresyon SDS-PAGE elektroforez yöntemi ile gösterildi.



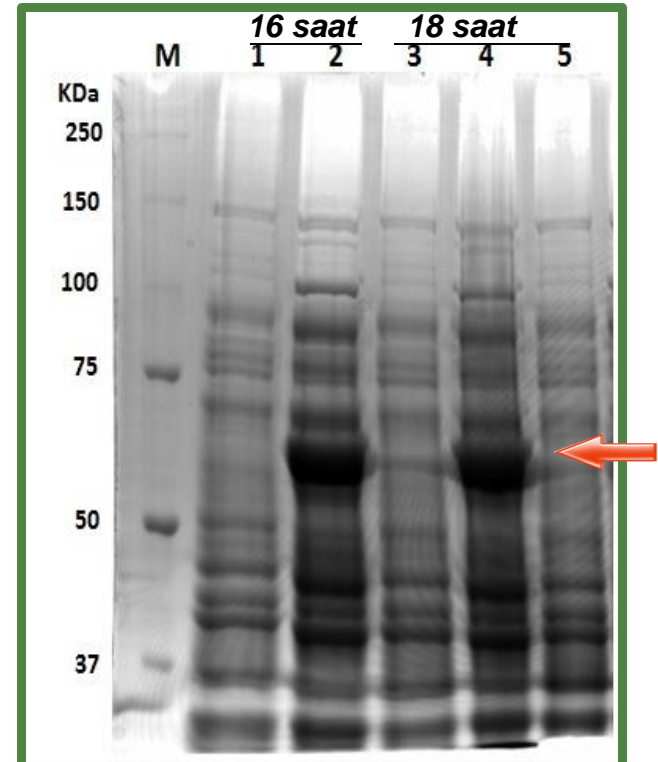
Bulgular

Üç değişik bakteriyofaja ait endolizin genleri füzyon proteini ile birlikte **68 KDa** olarak SDS-PAGE ile gösterilerek molekül ağırlığı yönünden doğrulandı.



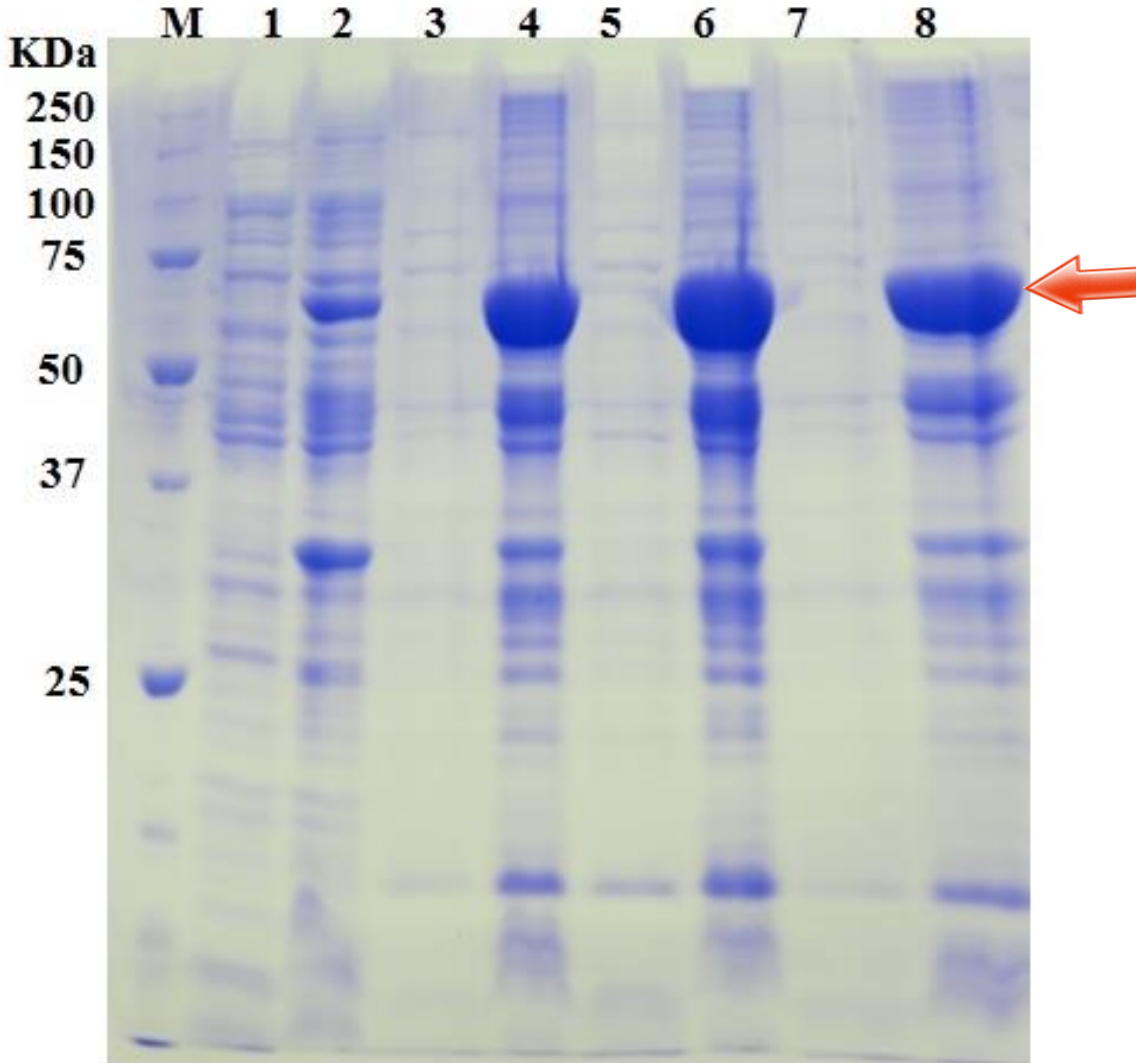
ϕ sa10 endolizin protein

M = Marker
1 = IPTG (-)
2 = IPTG (+)
3 = IPTG (-)
4 = IPTG (+)
5 = IPTG (-)
6 = IPTG (+)



ϕ 52 endolizin protein

ϕ sa15 endolizin protein



M = Marker

Protein üretimi

indklenmesi 100 mM

IPTG ile uygulandı

1 = IPTG (-) (3 sa)

2 = IPTG (+) (3 sa)

3 = IPTG (-) (16 sa)

4 = IPTG (+) (16 sa)

5 = IPTG (-) (20 sa)

6 = IPTG (+) (20 sa)

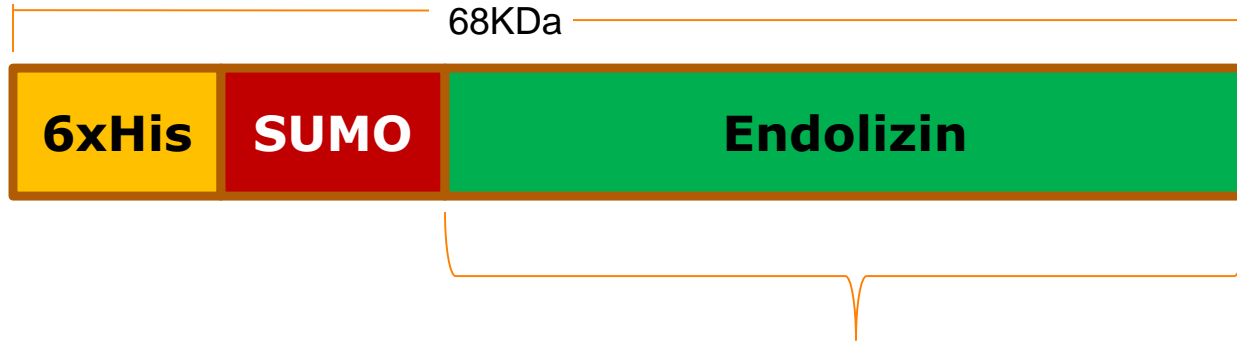
7 = IPTG (-) (24 sa)

8 = IPTG (+) (24 sa)

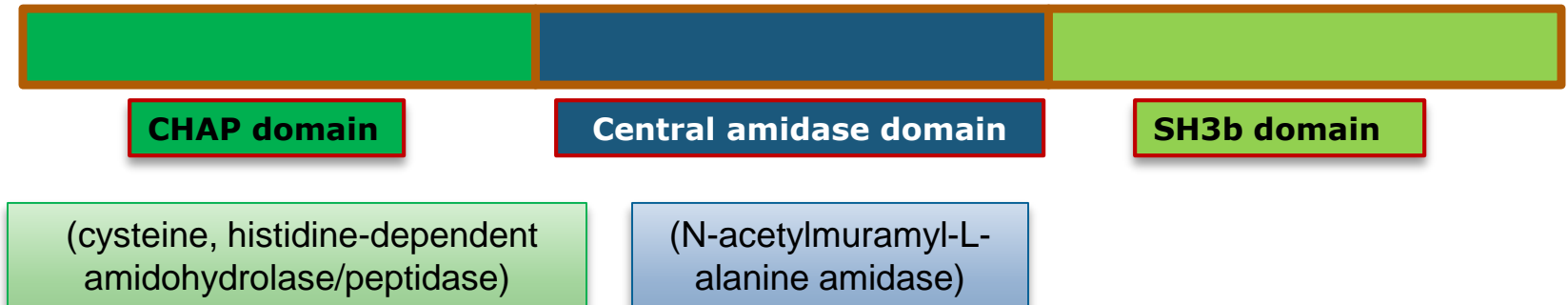
ϕ sa10 ve ϕ sa15 bakteriyofaj 'a ait endolizin gen dizisinin daha önce rapor edilmiş ϕ MR11, ϕ SauS-IPLA88, SA12, SA13 ve DW2 fajlarının endolizinleri ile yüksek seviyede homoloji gösterdikleri saptandı.

	Nucleotide homology (%)					
Faj	DW2	SA12	phiSauS-IPLA88	SA13	phiMR11	Φ 52
Φ SA10	91%	92%	91%	90%	92%	95%
Φ SA15	89%	91%	90%	92%	93%	93%

Elde ettiğimiz Rekombinant Endolizin



- ❖ 53 kDa
- ❖ 481 aminoasit sayısında olduğunu
- ❖ 3 domain yapısına sahip olduğu tespit edildi.



Sonuç

- ❖ Bakteriyofaj endolizin genleri klonlanarak *E. coli*'de rekombinant olarak üretildi.
- ❖ Bu enzimlerinin biyokimyasal karakterizasyonu, litik aktiviteleri ve konak spektrumu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.
- ❖ Bu çalışma sonuçları *S. aureus*'un neden olduğu biyofilm ve yara enfeksiyonlarında bakteriyofaj endolizin enzimlerinin kullanılma potansiyelleri ile ilgili gelecekte yapılacak çalışmalara temel oluşturacaktır.

**TEŞEKKÜR
EDERİM..**