

HAFTA XI

Recombinant protein saflaştırma teknikleri

Saflaştırılan rekombinat proteinin aktivite testi

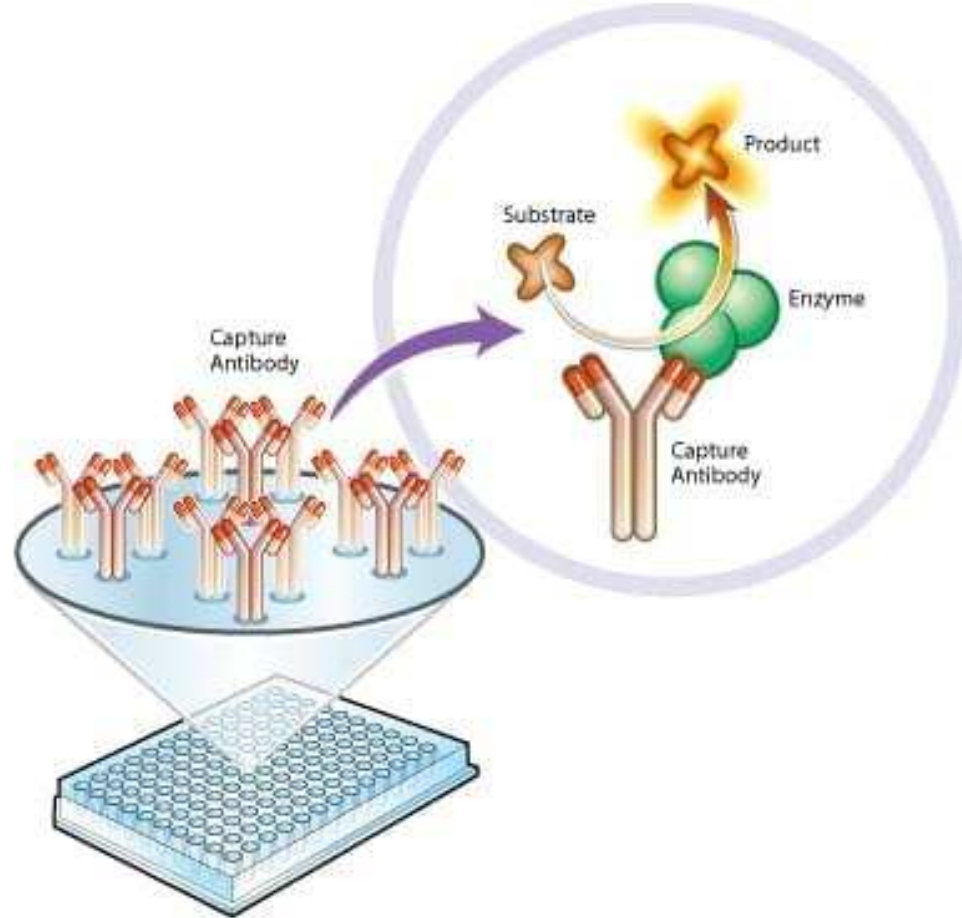
Protein Aktivite Deneyleeri

- Biyolojik proseslerin büyük çoęunluęu yařayan organizmalar içinde çok çeřitli fonksiyonlara sebebiyet veren proteinler tarafından gerçekleřtirilmektedir. Proteinler metabolik prosesler, hücrenel sinyalizasyon ve regülasyon için vazgeçilmezdir ve moleküllerin hareketini ve aktif olarak transportunu saęlayabilir.
- Enzimatik reaksiyonlar substrat molekülleri kimyasal olarak modifiye ürünlere dönüřtürebilirler. Bu modifikasyonlar proteolitik ve glikolitik degradasyon, fosforilasyon, asetilasyon, glikolizasyon ya da oksidatif ve redüktif prosesler içerir. Disregle olmuř protein/enzim aktivitesi hastalık oluřumuna sebep olabilir.
- Bu derece önemli fonksiyonlara sahip proteinlerin/enzimlerin rekombinant olarak üretilmesinin ve saflaştırılmasının ardından aktivitesinin ölçülmesi ve doğrulanması büyük önem taşımaktadır.

Protein Aktivite Deneylemleri

- Protein aktivite assaylerinden biri olan immunocapture yöntemi ile ilgili proteinin saptanması, substrat ve ürün devrinin ölçülmesi ile yapılmaktadır.
- Bu teknik sadece monoklonal antikorlarda kullanılabilir.
- Enzimler aktif formunda ve kompleksler halinde izole edilir ve in sitü ilişkileri açığa çıkarılır.
- Teknikte enzimin diğer proteinlerden saflaştırılarak tek başına çalışılması esastır.

Rekombinant Proteinin İmmün Yakalaması



Protein Aktivite Deneyleeri

- Bakteriyeel transformasyonla elde edilen rekombinant proteinlerin fonksiyonel olup olmadığını test etmek için söz konusu proteinlere aktivite testi yapılmalıdır. Enzim karakterli proteinlerde aktivite testi enzim assayleri ile, non-enzimatik karaktere sahip proteinlerin aktivitesine ise ELISA yöntemi ile bakılabilir
- Enzim assayleri hücresel aktiviteyi ölçmek ve saflaştırılmış enzim proteini monitörize etmek için kullanılan önemli tekniklerden biridir.
- Enzim kinetiğinin llmesi, enzimin katalizleme mekanizması ve enzimin subtratlar, inhibitörler, ilaçlar ve ilaç adayları ile olan ilişkisi hakkında bilgi edinilmesini sağlar.

Protein Aktivite Deneyleeri

- Bir rekombinant proteinin biyolojik aktivitesi kemotaksis ya da hücre proliferasyon assayleri gibi bioassayler ile enzim assayleri ya da fonksiyonel ELISA testi ile ölçülebilir.
- Enzim aktivitesi hazırda bulunan aktif enzim kantitesini ölçer ve bu yüzden ortam koşullarına bağılıdır.
- Bir enzimin spesifik aktivitesi, aktif enzimin total protein miligramına ortalaması gösterir. Deney öncesi enzimin kaliteli bir şekilde saflaştırıldığından emin olunmalıdır.
- Enzim aktivitesi ölçmenin iki yolu vardır: ya substratın ortamdan eksilmesi ya da ürünün oraya çıkma hızı ile ölçülebilir. Ortaya ürün çıkma hızı genellikle aktivite ölçümlerinde daha doğru bir sonuç elde edilmesini sağlayacaktır.
- Enzim aktivite deneyleerinde Michaelis-Menten kinetiğı modeli kullanılır.

Spektrofotometrik Deneyle

- Enzim aktivite saptama deneylelerinden en çok kullanılan deney spektrofotometrik deneylelerdir. Bu teknikle spektrofotometreden elde edilen absorbans değerleri kinetik ölçümle kombine edilir ve Beer kanunu kullanılarak enzim aktivitesi hesaplanır.

