

HAFTA IX

Recombinant Protein Üretimi
Bakteri Kültürünün Rekombinant
Protein İfadesi İçin İndüklenmesi

Rekombinant Protein Üretimi

- Rekombinant proteinlerin mikrobiyal sistemler içinde üretilmesi biyokimyanın devrimi niteliğindedir. Saflaştırılmış proteine ihtiyacı olan her araştırmacının aklına ilk olarak bu proteinin rekombinant formunu nasıl elde edebileceği sorusu gelir. İlgili proteinin fazla miktarda ifade edip saflaştırabilme yeteneği bu proteinin biyokimyasal olarak karakterize edebilme imkanı sunar. Endüstriyel süreçlerde kullanımı ve ticari ürünlerin gelişimine de ek olarak olanak sağlar.
- Teorik olarak protein üretme basamakları oldukça açık anlaşılırdır: ilgili gen alınır, ilgili ekspresyon vektörüne aktarılır, seçilen konakçıya aktarılır, konakçı indüklenir ve protein saflaştırma ve karakterizasyon için hazırdır.
- Ancak pratikte düzinelerce basamak yanlış gidebilir.

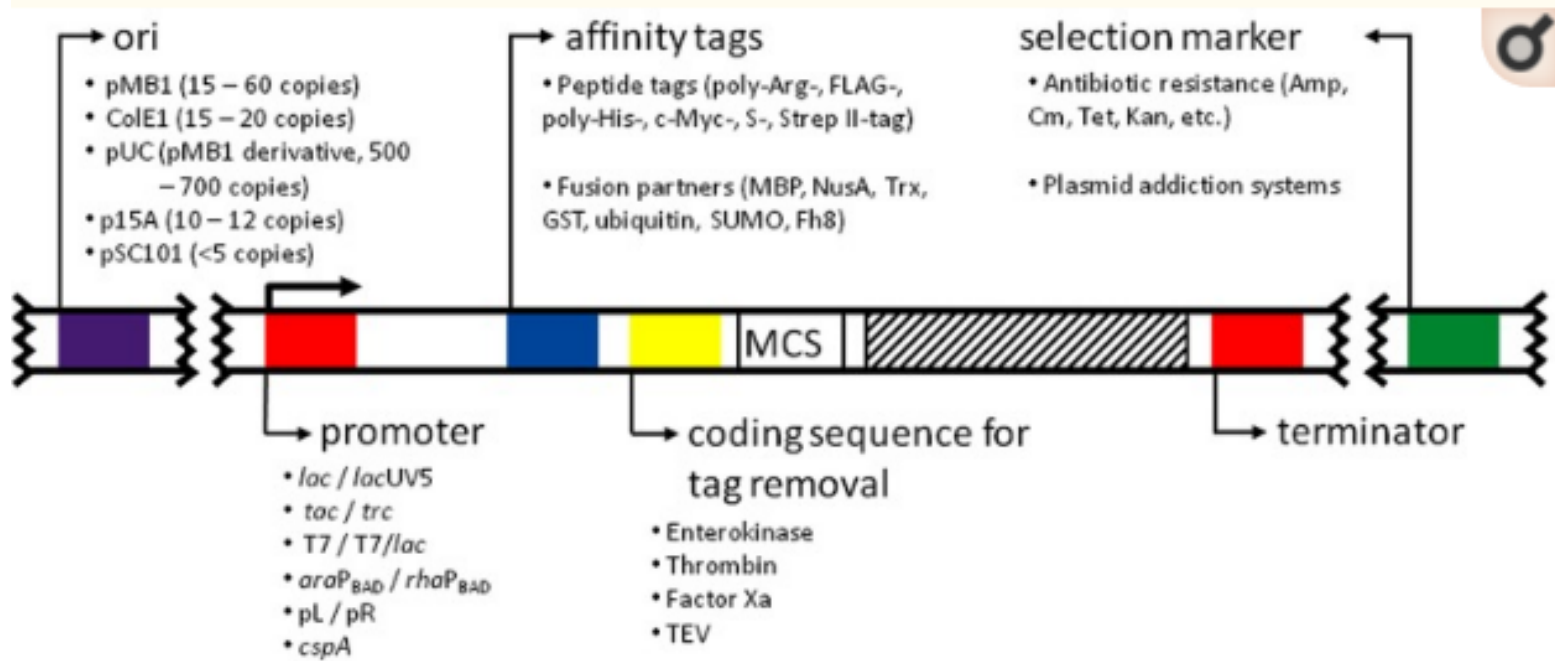
Hangi Organizma Kullanılmalıdır?

- Protein üretimi sürecinde hangi organizmanın seçileceği geri kalan tüm sürecin nasıl başlayıp devam edeceğini belirler. Mikroorganizmalar arasında bakteriler, mayalar, filamentli mantarlar ve tekhücreli algler konak olarak seçilebilir. Hepsinin kendi içerisinde güçlü ve zayıf kaldıkları noktalar vardır ve ilgili proteine bağlı olarak kullanılacak konakçı mikroorganizma seçilmelidir. Örneğin ökaryotik post-translasyonel modifikasyonlara ihtiyaç duyulacaksa, prokaryotik ekspresyon sistemleri seçilmemelidir.
- Konakçı organizma olarak *E.coli* kullanımının çok sayıda avantajı vardır. Optimal çevre koşulları ve glikoz-tuz içeren besiyerinde, *E.coli* doubling time yaklaşık 20 dakikadır ki bu 1/100 oranında satüre starter kültürden inoküle kültürün birkaç saat içinde durağan faza geçeceği anlamını taşır. Ancak rekombinant protein üretiminin mikroorganizma için metabolik bir yük olacağı unutulmamalıdır.

Hangi Plazmid Seçilmelidir?

- Günümüzde kullanılan çoğu ekspresyon plazmidleri, replikonlar, promotörler, seçici markırlar, multiple klonlama bölgelerinin çoklu kombinasyonlarından oluşmaktadır. Bu sebepli çok fazla alternatifi olan ekspresyon vektörü seçme yolunda yeni araştırmacılar kolaylıkla yollarını kaybedebilirler. Bilgiye dayalı bir seçim yapabilmek için tüm özellikler ihtiyaca göre dikkatlice incelenmelidir.
- Plazmid içermeyen boş hücreleri ortamdan elimine edebilmek için plazmid backbonenuna direnç markırı eklenmelidir. *E.coli de* bu amaçla genellikle antibiyotik direnç genleri kullanılmaktadır.

Ekspresyon Vektör Anatomisi



Protein ifadesi için Bakterinin İndüklenmesi

- Bakteriler iki temel metoddan biri ile indüklenebilir. Hızlı indüksiyon tüm proteinlerin üretimi için çalışmaz ve optimum verimin altında bir verimle çalışır. Yavaş indüksiyon bazı proteinlerin çözünmesini tetikleyebilir. Üretilecek protein için en iyi metod üretilecek proteine ve uygulamaya bağlı olarak seçilip optimize edilmelidir.

IPTG İndüksiyon Teorisi

- Isopropyl β -D-1thiogalactopyranoside (IPTG/ İad-y) moleküler bioloji ajanıdır. Bu bileşik allolaktoz'u moleküler olarak taklit eder. Allolaktoz bir laktoz metabolitidir ve lac operonu üzerinden transkripsiyonu tetikler ve bu sebeple *E.coli* protein ekspresyonunu indükler.
- *Allolaktoz gibi IPTG lac repressorlerine bağlanır ve tetramerik repressörü lac operatorü üzerinden allosterik olarak uzaklaştırır. Tetramerik represör uzaklaştığında lac operonu aktifleşir ve gen transkripsiyonu başlar. IPTG kullanımında allolaktozun aksine, sülfür atomları hücreler tarafından hidrolize edilemeyen kimyasal bağlar oluştururlar. Bu sayede hücre indükleyici ajanı yani IPTG yi metabolize edemez ve parçalayamaz. Bu yüzden eklenen IPTG konsantrasyonu indüksiyon boyunca sabit kalır ve lac p/o kontrolündeki genlerin ekspresyonu deney süresince engellenemez.*

Lac Operonu

- Lac operonu *E.coli* de protein sentezlenmesini sağlayan sistemlerden en çok kullanılanıdır.
- *Teknik olarak genellikle ilgili gen ticari bir vektöre iliştilir. Bu vektörler:*
 - *Antibiyotik direnç geni*
 - *Lac represörünü kodlayan lac operonundan lacI geni*
 - *T7 promoter DNA sekansını takiben eklenmiş ilgili gen, lac operatör DNA dizisi ve Ribozom bağlanma bölgesi içermelidir*
- *Lac represör proteini lactoz varlığını sezebilecek şekilde evrimleşmiştir. Konakçı hücre kromozomu ve insörtün ikisi de lac represör gen kopyaları içerir. Bu sayede her zaman DNA operatör bölgelerini titre etmeye yeterli miktarda LacI proteinin varlığı garantilenmiş olur. Laktoz yokluğunda, lac represörü DNA üzerindeki operatör dizisine bağlanır ve DNA'yı 40 derece bükür. Bu bükülme T7 RNA polimerazın promotıra erişimini engeller ve böylece ilgili genin indüksiyon öncesi transkripsiyon sızmasını engeller. Laktoz LacI'ye bağlandığında protein yapısında konformasyonel değişimine sebep olur ki bu sayede DNA operatör dizisine bağlanma yetisini kaybeder.*

IPTG İndüksiyonu

- Laktoza yapısal olarak benzeyen IPTG de lac represörüne bağlanarak, benzer konformasyonel değişiklikleri indükler.
- Laktozun aksine metabolik yolların bir parçası olmadığından dolayı, IPTG parçalanmaz ya da hücreler tarafından kullanılmaz; bu durum IPTG yi laktozdan daha iyi bir indükleyici yapar.

Hızlı IPTG İndüksiyon Protokolü

- Taze pleytten (< 4 hafta) bir koloni seçilir ve 1-2 ml antibiyotik içeren LB içinde 30°C/37°C de gece boyunca çalkalayıcılı inkübatörde büyütülür.
- 1:50/1:100 oranında 2 ml antibiyotikli LB içinde dilüe edilir ve 3-4 saat çalkalayıcılı inkübatörde büyütülür.
- İnkübasyon süresi dolmaya yakın 1 mM IPTG içeren 1 ml antibiyotikli LB hazırlanır.
- İnkübasyon sonrasında 1 ml alınarak oda sıcaklığında maksimum hızda 30 saniye santrifüj edilir. Bu örnek indüklenmeyen kontrol grubunu oluşturur.
- 1 ml İndüksiyon besiyeri hücrelere eklenir ve 37°C de 3-4 saat inkübe edilir. Son hacim 2 ml, son hacimde IPTG konsantrasyonu 0.5 mM olacaktır.
- İnkübasyon sonrasında 1 ml örnek alınır ve santrifüjlenir. Bu örnek indüklenen deney grubunu oluşturur. -20°C de ihtiyaç olana kadar saklanır.

Yavaş IPTG İndüksiyon Protokolü

- Yavaş IPTG indüksiyon protokolü için hızlı indüksiyon protokolünden farklı olarak inkübasyonlar 20°C de 12-16 saat süre ile yapılır.
- İndüksiyon süreleri 2 ile 5 saat arasında değişebilir.
- IPTG konsantrasyonu 0.1 ile 1.0 M arasında değişebilir.
- Söz konusu değişimler ilgi duyulan protein için en uygun konsantrasyon ve indüklenme süresini bulmak için teker teker denenerek bulunmalıdır.
- Genel olarak IPTG 100µM dan 1.0 µM konsantrasyon aralığında protein ekspresyonu için etkili bir indükleyici ajandır. Kullanılan konsantrasyon ihtiyaç duyulan indüksiyon kuvvetine, hücrelerin genotipine ve kullanılan plazmide bağlı olarak değiştirilmelidir. Eğer lacIq gibi lac represörünü fazla miktarda üreten bir mutant söz konusu ise daha yüksek konsantrasyonlarda IPTG ye ihtiyaç duyulacaktır.
- Blue-white screening yapılacaksa, IPTG X-gal ile birlikte kullanılmalıdır.