

ENZİM VE MİKROBİYAL BİYOTEKNOLOJİ



Bakteriyel Transformasyon

2

- Moleküler biyolojide **transformasyon**, serbest DNA'nın alıcı hücre içine girmesi ve genetik değişimi meydana getirmesidir.
- Rekombinant DNA klonlama sürecinde, yabancı DNA'nın hücre içine alınması zorunlu bir adımdır.
- Transformasyon sürecinde rekombinant DNA hücreye plazmidler aracılığıyla yerleştirilir.

Bakteriyel Transformasyon

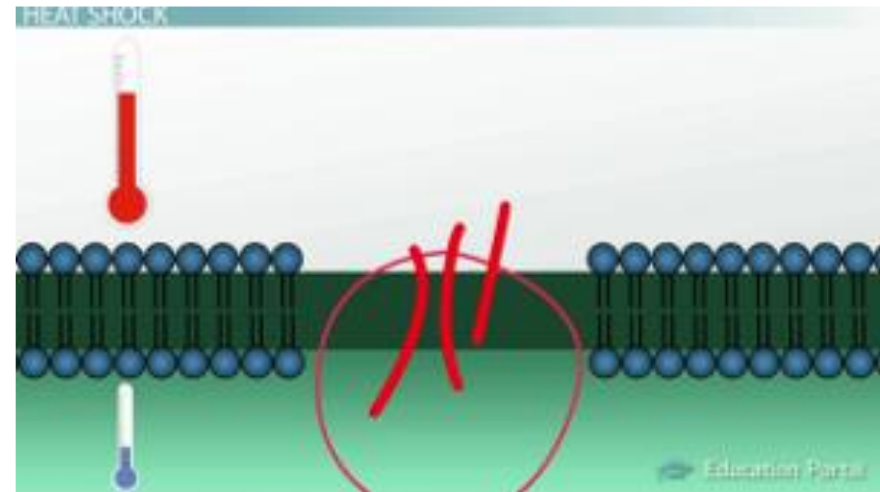
3

- Ancak birçok bakteri hücresi onları daha alıcı hale getiren işlemlerden geçerek plazmidleri bünyesine alabilir. Yani; serbest DNA'nın alıcı hücre tarafından alınması için bu hücrenin “**kompetent**” olması gerekmektedir.
- **Kompetentlik**, hücrenin yüzeyinde spesifik reseptör bölgelere sahip olduğu ya da verici DNA'sının plazma membranından geçişini sağlayabilme yeteneğinde olması gerektiği anlamına gelmektedir.

Bakteriyel Transformasyon

4

- Kompetent hücre hazırlama yöntemlerinden birinde soğuk kalsiyum klorid kullanılmaktadır.
- Bu çözelti hücre duvarı ve zarında plazmidin geçebileceği delikler açar.
- Yeterlilik kazandırılan hücreler -80 ile -60 derece arasında muhafaza edilebilir.



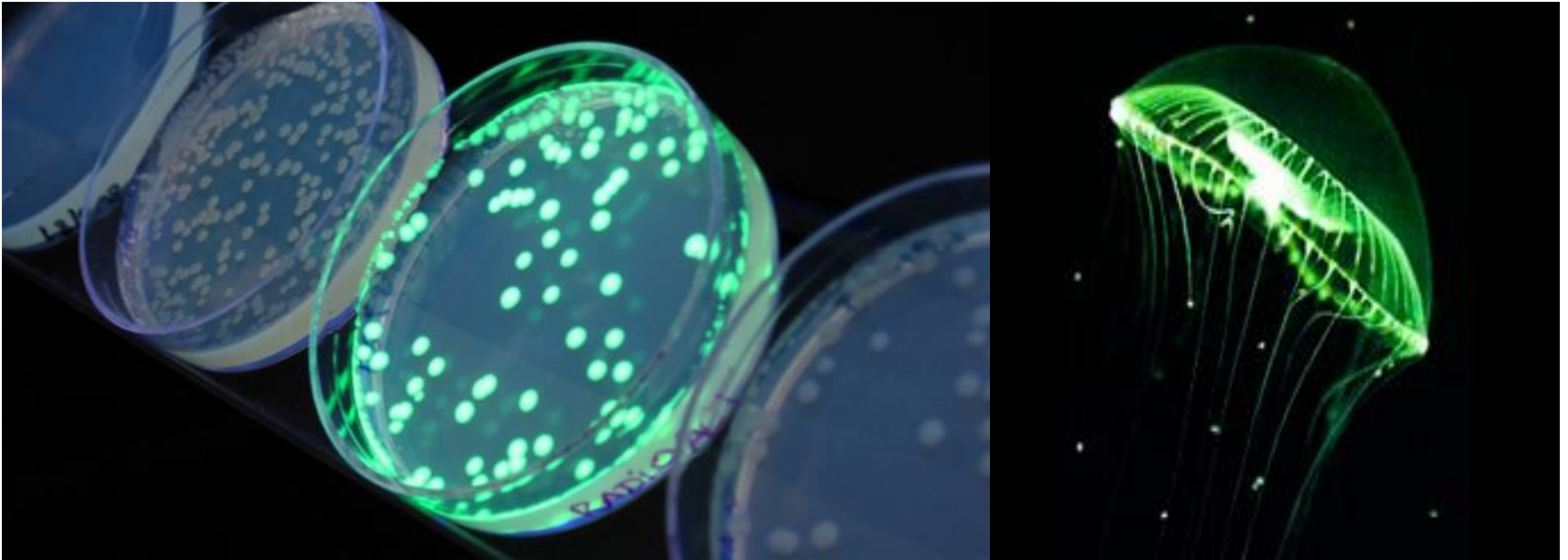
Bakteriyel Transformasyon

5

- Rekombinant DNA transferinde kullanılan plazmidler genellikle bir ya da daha fazla antibiyotik dirençlilik geni içerir.
- Plazmid ve bakteri bir test tüpü içinde karıştırılarak birkaç dakika süre ile soğuk uygulaması yapılır.
- Daha sonra karışım kısa bir süre 37-42 °C arasında ısı şokuna tabi tutulur.
- Transforme hücrelerin seçimi antibiyotik içeren besi ortamında yapılır.
- Antibiyotiğe dirençli hücreler plazmid ile transforme olanlardır.
- Bu hücreler aynı zamanda rekombinant DNA'yı da içermektedirler.

Bakteriyel Transformasyon

6



- Deniz anasına ait yeşil floresan protein (GFP) geni taşıyan bir plazmidle transforme edilmiş bir bakteri örneği.

Elektroporasyon

7

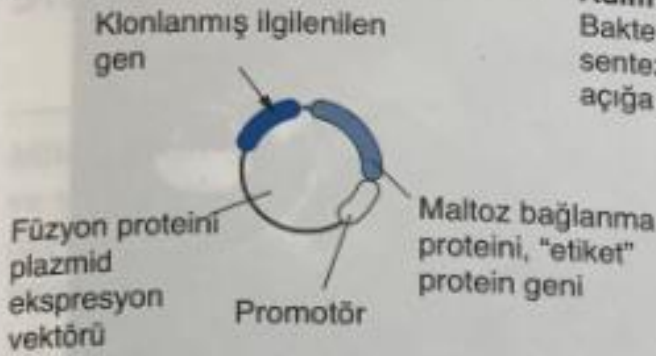
- Bakterileri transforme etmenin bir başka yoludur.
- Elektroporatör adlı bir cihaz ile hücrelere kısa süreli şoklar verilir.
- Bu yöntem kalsiyum kloride göre daha avantajlıdır.
- Daha hızlıdır, daha az sayıda hücre gerektirir.
- Dezavantajı ise daha pahalı bir uygulama olmasıdır.
- Bakteriler dışında maya, fungus, hayvan ve bitki hücrelerini transforme etmekte de kullanılır.
- Bu yöntemde ayrıca daha az miktarda DNA'ya ihtiyaç vardır.

Bakteriyel füzyon proteinlerin üretimi

8

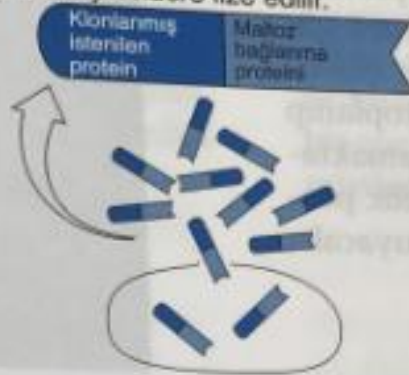
- Bu yöntemde yabancı DNA, “etiket” olarak kullanılabilen iyi bilinen bir gen bölgesi barındıran plazmide yerleştirilmesi için rekombinant DNA yöntemlerini kullanılır.
- Bu şekilde hazırlanan plazmidlerin ürünlerini bakteri hücrelerinden izole etmek daha kolaydır.
- En sık kullanılan genler glutatyon-Stransferaz, lusiferaz, yeşil floresan protein ve β -galaktosidaz genleridir.

Adım 1



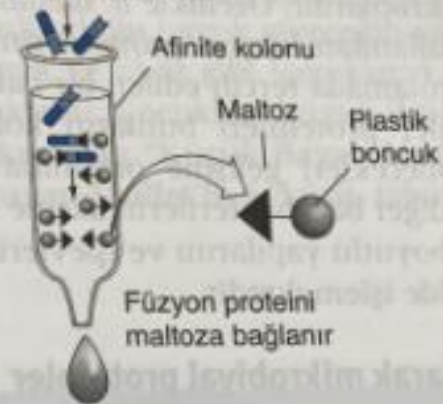
Adım 2

Bakteri transforme edilir ve füzyon proteini sentezlenir. Yoğun sentezlenen proteini açığa çıkarmak için hücre lize edilir.



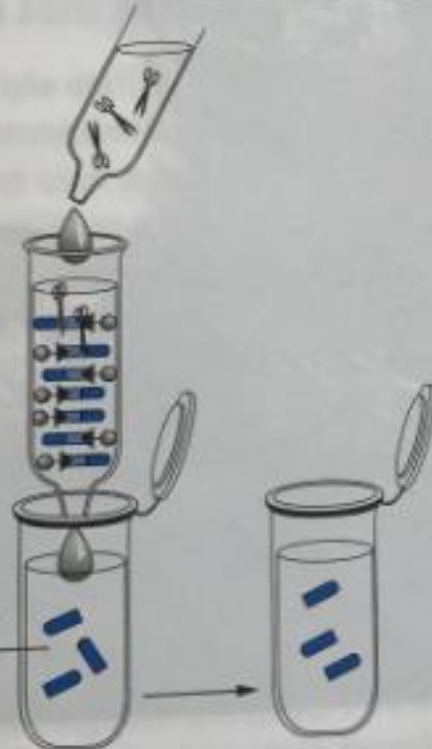
Adım 3

Hücre lizatı maltoz-plastik boncuklara eklenir



Adım 4

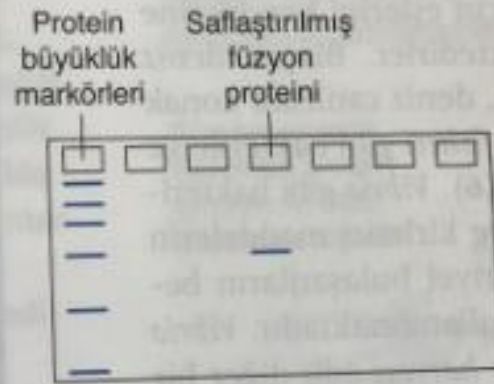
Füzyon proteini bölgeye özgü proteazla kesilir (örneğin Trombin veya Faktör Xa)



İstenilen klonlanmış proteini etiket proteinler olmadan içeren süzuntu

Adım 5

Saflığı kontrol etmek için SDS-PAGE analizi yapılır



Bakteriyel füzyon proteinlerin üretimi

10

- Üretilen füzyon proteinin izole etmek ve ayırmak için hücreler homojenize edilir.
- Oluşan homojenata “afinite kromatografisi” uygulanır.
- Füzyon proteininin etiket kısmı kolona bağlanırken, hedef proteinin uç kısmı serbesttir.
- Daha sonra uygun bir proteaz kullanılarak hedef protein kolondan alınır.

Bakteriyel füzyon proteinlerin üretimi

11

- Araştırmacılar etiket protein olarak “poli-histidin” yapılar geliştirmiştir.
- Bu yapı, hedef proteinin yapısına etki etmez, oldukça küçüktür ve çoğu durumda kesilerek uzaklaştırılmasına da gerek duyulmaz.
- Transformasyon uygulamalarında en sık kullanılan bakteriler *E. coli* ve *B. subtilis*'tir.
- *B. subtilis* hedef proteini çoğu durumda hücre dışı ortama salgıladığı için daha çok tercih edilmektedir.

KAYNAK

12

- Michael A. Palladino , William J. Thieman
Biyoteknolojiye Giriş Kitabı