

**Tallinna Reaalkool**

**GST-GFP liitvalgu ekspressiooni sõltuvus  
IPTG kontsentratsioonist *Escherichia coli*'s**

**Uurimistöo**

**Michael Florea**

**11A**

**Juhendajad: õp Kersti Veskimets,**

**TTÜ GTI teadur Lagle Kasak**

**Tallinn 2011**

# Sisukord

Sissejuhatus.....	4
1. Bakter <i>Escherichia coli</i> .....	5
1.1. <i>Escherichia coli</i> kui mudelorganism.....	5
1.2. Rollid meditsiinis ja looduses.....	6
1.3. Rollid biotehnoloogias.....	6
2. Valkude tootmine <i>E.coli</i> abil.....	7
2.1. DNA rekombinatsioon.....	7
2.2. Ekspressioonisüsteem.....	8
2.2.1. Ekspressioonivektor.....	8
2.2.2. Plasmiid pET42.....	9
Replikatsiooni alguspunkt.....	9
Promooterid ja transkriptsiooni terminatsioon.....	9
Polülinker.....	10
Translatsioon ja mRNA.....	10
Selektsioonimarker ja lisavalikud.....	11
2.2.2. Peremeesorganism.....	11
BL21(DE3).....	11
2.3. Geeniülekanne.....	12
2.3.1. Transformatsioon.....	12
2.4. Valgusüntees.....	13
2.4.1. T7 RNA polümeraasisüsteem.....	13
LacI repressioon.....	14
IPTG indutsioon.....	14
2.4.2. Sünteesijärsed modifikatsioonid.....	15
Shaperonid.....	15
Liitvalgud.....	16
Glutatioon S-transferaas.....	16
2.4.3. Green fluorescent protein.....	16

3. Materjalid ja metoodika.....	18
3.1. Tüvi ja ekspressioonivektor .....	18
3.1.1. LB sööde.....	19
3.1.2. PBS.....	19
3.2. Kultivatsioon.....	18
3.2.1. Optilise tiheduse mõõtmine.....	18
3.2.2. Bakterikultuuri eelkasvatus.....	18
3.2.3. Kultuuri indutseerimine.....	20
3.2.4. Kasvukõvera määramine .....	20
3.2.5. Fluorestsentsi intensiivsuse määramine.....	20
3.3. Valguforees .....	21
3.3.1. Totaalvalgu proov .....	21
3.3.2. Lahustumatu ja inklusioonis oleva valgu proovid .....	21
3.3.3. SDS polüakrüülamiid geelelektroforees .....	21
4. Tulemused ja arutelu .....	23
4.1. Kasvukõverad ja kasvukiirus .....	23
4.2. GFP-GST ekspressioon .....	24
4.3. Valgu elektroforees .....	25
4.4. Tulemused kultuuride kasvatamisel 22 tundi peale induktsiooni .....	26
Kokkuvõte.....	28
Kasutatud kirjandus.....	30
Lisa 1. pET 42 plasmidi mudel ja geneetilised elemendid .....	32
Lisa 2. Kultuuride optilise tiheduse mõõtmiste tulemused, ajad ja lahjendused.....	33

## Sissejuhatus

1977. aastal saavutati biotehnoloogias oluline läbimurre: Herbert Boyeril õnnestus esmakordselt ajaloos panna bakter *Escherichia coli* tootma inimese insuliini. Sellest alates on tohutult suurenenud organismide kasutamine inimestele vajalike valkude ja muude biopolümeeride tootmiseks nii tööstuslikul kui teaduslikul tasandil.

TTÜ Geenitehnoloogia instituudis loodi GST-liiteliste valkude ekspressiooni uurimiseks GST-GFP liitvalgu mudelekspressioonisüsteem. Kuna GST-GFP liitvalk muudab bakterid UV-kiirguses helenduvaks, siis kasutatakse seda ka õpilaste praktikumis transformatsiooni metoodika tutvustamisel. Liitvalgu ekspressiooniks on vajalik bakterite elukeskkonnas teatud indutseerija, milleks on IPTG. Kuna GST-GFP liitvalk on suhteliselt hiljuti kasutusse võetud, siis ei ole uuritud, millise IPTG kontsentratsiooni juures toimub liitvalgu ekspressioon kõige efektiivsemalt häirimata veel bakterirakkude kasvu. Käesoleva uurimustöö eesmärgiks ongi leida GST-GFP liitvalgu edukaks ekspressiooniks vajalik IPTG kontsentratsioon.

Uurimistöös tutvustatakse bakterit *Escherichia coli*, tema rolle looduses ning biotehnoloogias, samuti rekombinantse valgu loomise ja tootmise protsesse.

Uurimistöö allikateks on ingliskeelsed raamatud ja artiklid, samuti ka teised uurimistööd. Uurimismeetoditena kasutati teoreetilise materjali kogumist ja läbitöötamist ning eksperimente.

Uurimistöö koosneb kolmest peatükist. Esimene peatükk annab ülevaate *Escherichia coli* -st kui mudelorganismist ning rollist biotehnoloogias, looduses ja meditsiinis. Teine peatükk kirjeldab kuidas on saadud rekombinantsete valgud. Kolmandas peatükis tuuakse välja uurimistöö eksperimentaalne osa ning kogutud andmetest tehtud järeldused.

Autor soovib tänada juhendajaid Tallinna Reaalkooli bioloogiaõpetaja Kersti Veskimetsa ja TTÜ Geenitehnoloogiainstituudi teadur Lagle Kasakut, kes võimaldasid läbi viia eksperimentaalse osa ning kelle nõu ja abita polnuks uurimistöö ellu viimine võimalik.

# 1. Bakter *Escherichia coli*

## 1.1. *E.coli* kui mudelorganism

*E.coli* on 2µm pikk ning 0,5µm-se diameetriga gram-negatiivne bakter, keda võib leida püsisoojaste loomade soolestikust (Britannica 2011 s.v. *E.coli*). *E.colis* pole membraaniga kaetud organelle: kõik biokeemilised reaktsioonid toimuvad tsütoplasmas. Samuti asub tsütoplasmas ka bakteri kromosoom, mis koosneb ainult ühest rõngas DNA molekulist. Lisaks kromosoomile asub tsütoplasmas veel teisigi lühemaid, enamasti rõngakujulisi DNA molekule, mida kutsutakse plasmiidideks. Peale DNA on prokarüootides üks suurimaid ühendeid veel ribosoomid. Kogu ribosoom on suurusega 70S (S-sadenemiskoeffitsient) ning koosneb kahest alaosast: 30S ja 50S. Kokku koosneb ribosoom 65% rRNA-st ning 35% ribosomaalsetest proteiinidest. Ribosoom talitleb translatsiooni keskkonnana. Raku kuju ja tugevust hoidev tsütoskelett koosneb valgulistest kiududest. (Dale 2004)

Rakumembraanid on ühed prokarüootide keerulisemaid struktuure. Rakukesta tüübi alusel jaotatakse prokarüoote kahte suuremasse rühma: keerulisema rakukesta ehitusega gram-negatiivsed ja lihtsamad gram-positiivsed bakterid.

*Escherichia coli* kuulub gram-negatiivsete hulka. Gram-negatiivsel bakteril on kaks membraani, mille vahel asub periplasma. Raku pinnakiht koosneb fosfolipiididest ja lipopolüsahariididest. Lipopolüsahariidid on negatiivse laenguga, seega omandab rakukest üldise negatiivse laengu. Lipopolüsahariidid on tihti erinevatel bakteritüvedel erineva keemilise koostisega ning vastutavad bakterite mitmete antigeensete omaduste eest.

Periplasmas asub gram-negatiivsetel enamasti üks peptidoglükaani kiht. Sisemine e tsütoplasma membraan on topelt-lipiidkiht, mis koosneb fosfolipiididest, glükolipiididest ja erinevatest proteiinidest. Mõningad proteiinid toetavad membraanstruktuuri, teiste töö seisneb aga suhkrute, aminohapete ja teiste toitainete transportimises rakku. Rakukestal võivad asetseda pilus-ed, flagellad või limakapsel. (Microbial Physiology 1991)

*Escherichia coli* on üks paremini uuritud mikroorganisme. Tema füsioloogiat ja elutegevust kasutatakse tihti mudelina prokarüootide uurimisel. Samuti on palju uuritud *E.coli* erinevate tüvede rolli inimese sümbiontidena või haigusetekiitajana. (Dale 2004)

## ***1.2. Rollid meditsiinis ja looduses***

*E.coli* elutseb püsisoojaste loomade soolestikus. Juba 40 tundi pärast sündi koloniseerib *E.coli* vastsündinu soolestiku, kinnitades selle limaskestale. Ta on peamine fakultatiivne anaeroob inimese seedeelundkonnas. *E.coli* koos teiste kõhus elavate bakteriliikidega moodustavad kõhufloora, mis on inimesega sümbioosis suhtes ja seetõttu mitmeti kasulik. Soolestikus elavad bakterid käärivad kompleksseid süsivesinikahelaid, mida inimene ise lagundada ei suuda. *E. coli* kaitseb inimest patogeensete bakterite eest selle läbi, et ei lase konkurentsi tõttu patogeensetel bakteritel kõhus paljuneda. Lisaks sünteesib ja aitab ta inimesel omistada mitmeid vitamiine ja mineraalaineid. (Britannica 2011 s.v. *E.coli*)

Kuigi enamik *E.coli* tüvesid on inimesele kasulikud või neutraalsed, võivad mõningad patogeensed tüved (näiteks O157:H7) põhjustada haigusi nagu seedeelundkonna põletik, kuseteede põletik, vastsündinute meningiit ja vähemal määral ka teisi haigusi. (Ibid s.v. *E.coli*)

## ***1.3. Rollid biotehnoloogias***

Tänu *E.coli* pikale ajaloole laboratoorse kultuurina ja manipulatsiooni kergusele on *E.coli* enim kasutatud prokarüoot praeguses biotehnoloogias ja tööstuslikus mikrobioloogias. *E.coli*-t kasutati biotehnoloogiale aluse panevas töös, kui S.N.Cohen ja H. Boyer kasutasid teda esimese rekombinantse DNA loomisel. *Escherichia coli*-t kasutades kirjeldasid 1946. aastal J.Lederberg ja E. Tatum esmakordselt konjugatsiooni ning *E.coli* on siiani jäänud peamiseks konjugatsiooni uurimise mudeliks. Esmakordselt bakteriofaagide geenistruktuuri uurimiseks kasutati samuti *E.coli*-t. (Dale 2004)

Tänu lihtsalt manipuleeritavale genoomile ja suurele kasvukiirusele on *E.coli* saanud palju GM-organisme kasulike omadustega valkude masstootmiseks: esimesena hakati sel viisil tootma inimestele insuliini, nüüd kasutatakse *E.coli*-t veel mitmete teiste vaktsiinide ja ensüümide tootmiseks. (Tomson 2007)

Et vältida geneetiliselt muundatud bakterite sattumist loodusesse on sõlmitud lepe, mille kohaselt rekombinantset DNA-d võib luua vaid selliselt muundatud bakterites, mis ei ole võimelised kasvama looduslikes tingimustes (Berg et al., 1975).

## **2. Valkude tootmine *E.coli* abil**

Restriktaaside avastamine lõi võimaluse DNA-ga suure täpsusega manipuleerida. See võimaldas *in vitro* modifitseerida ja kombineerida DNA-d erinevatest allikatest.

Restriktaaside kasutamine võimaldas eraldada ja paljundada geene, mis kodeerivad soovitud valku, võimaldades nii luua tootjarakke, mis valku tähelepanuväärsetes kogustes valmistaksid. Kuigi viimaste kümnendite jooksul on rekombinantsete valkude tootmise tehnoloogias tehtud tohutuid edusamme, pole tegevus veel kaugeltki rutiinne. Terve arendusprotsess on enamasti aeganõudev, koosneb paljudest erinevate võimalustega etappidest ning on tihti sunnitud läbi viima katse-eksitus meetodil. (Tomson 2007)

### **2.1. DNA rekombinatsioon**

Geen, mis kodeerib soovitud valku, tuleb eraldada ja sisestada ekspressioonivektorisse. Mõlema protsessi üheks läbiviimisvõimaluseks on restriktaaside kasutamine. Restriktaasid on ensüümid, mis seostuvad kindlale DNA lõigule ning lõhuvad seejärel mõlemas ahelas kahe nukleotiidi vahelise fosfodietersideme. Kuna kahe ahela DNA järjestused on vastupidised, ei kattu ahelate lõikekohad. Tagajärjeks tekib nn. „kleepuvate otstega“ DNA, sest tekivad üheaahelalised otsad. See, millisele kohale restriktaas kinnitub, sõltub tema aminohappelisest järjestusest ja kujust. „Kleepuvate otstega“ DNA molekul saab omavahel liita tänu komplementaarsusele: lämmastikalused paarduvad vesiniksidemetega, moodustades taas kaksikheeliksi. Et DNA molekul stabiilseks tervikuks muuta, lisatakse DNA ligaasi, mis võimaldab fosfodietersidemetete tekke nukleotiidide vahele. Kuna kindel restriktaas lõikab ahelat alati samast kohast, on erinevate "lõikude" paardumata nukleotiidijärjestused alati samad, ja üksteisele komplementaarsed, mille tulemusel võivad liituda erinevad ahelad. Niimoodi "lõigatakse" ja "kleebitakse" valitud geen ekspressioonivektori koostisesse, moodustub rekombinantne DNA, mille ekspressioonil saadakse soovitud valk. Sellisel meetodikal saadud valku nimetatakse rekombinantse DNA kasutamise järgi rekombinantseks valguks. (Dale 2004)

### **2.2. Ekspressioonisüsteem**

Peremeesorganism ja ekspressioonivektor moodustavad kokku ekspressioonisüsteemi. Ekspressioonivektoriks on enamasti väike rõngakujuline DNA-molekul - plasmiid, mille koostisesse vaadeldav geen kuulub. Looduses kanduvad plasmiidide abil edasi enamasti geenid, mis muudavad organismi immuunseks toksiliste ainete suhtes (antibiootikumid, mürgid, raskemetallid jne), annavad võime seedida uut toitainet (laktoos vms.); ühesõnaga, on peremeesorganismile kasulikud. Seetõttu toodetakse ülekandunud valku rakule kasulikes kogustes, mis ei ole tootmise mõttes kaugeltki piisavalt suured. Lisaks sellele on looduslikud plasmiidid kohastunud kindla geeni ülekandmiseks; selle mõne muu geeniga asendamine on tihti problemaatiline ja võõra geeni ekspressioon on madal või puudub. Nendel ja paljudel muudel kaalutlustel ei kõlba metsikud tüved ja plasmiidid inimese poolt sisestatud geeni tootmiseks. Probleemide lahenduseks on loodud mitmeid süsteeme, mille eesmärgiks on valitud valgu tootmine muuta võimalikult hästi kontrollitavaks ja efektiivseks. (Tomson 2007)

### **2.2.1. Ekspressioonivektor**

Ekspressioonivektoriteks on üldiselt plasmiidid, mida kasutatakse kindla geeni integreerimiseks raku. Plasmide kasutatakse laialdlaselt rekombinantsete geenide paljundamisel, modifikatsioonil ja ekspressioonil prokarüootsetes süsteemides (Ibid: 12). Plasmiidid on väikesed kaheahelalised ringikujulised DNA-molekulid, mis enamasti kromosoomi koostisesse ei kombineeru ning eksisteerivad selle kõrval iseseisvalt tsütoplasmas. Peremeesorganismis on nad võimelised iseseisvalt paljunema ja sõltuvalt keskkonnatingimustest, oma geene ekspresseerima. Selleks, et võimaldada geeni ekspresseerimist ning saavutada kõrge kontrollitavus ja valgusünteesi tase, peab ekspressioonivektor, lisaks geenile, sisaldama mitmeid õige järjestuse ja paigutusega geneetilisi elemente. Kuna plasmiid pET 42-te kasutatakse käesolevas uurimistöös, ning ta sisaldab kõiki ekspressioonivektoris leiduvaid vajalikke geneetilisi elemente, on neid sobiv käsitleda pET 42 mudeli põhjal (Lisa 1).

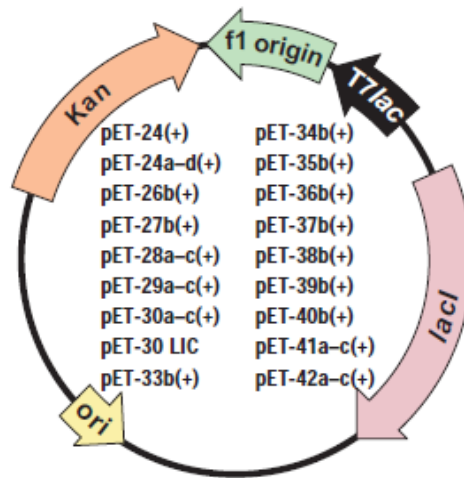
### **2.2.2. Plasmiid pET 42**



### Replikatsiooni alguspunkt

Selleks, et plasmiid kanduks edasi tütarakkudele, peab ka paljunema.

Nukleotiidjärjestust, millega polümeraas, ja kust algab kopeerimine nimetatakse alguspunktiks (*origin of replication*) (Dale 2004:15). Sellest sõltub seostumise kiirus ning koos



raku jagunemisel plasmiid

seostub DNA plasmidi replikatsiooni (*replication*) (Dale 2004:15). Sellest sõltub DNA polümeraasi sellega ka

plasmidi koopiate hulk pET ja pUC seeria (sealhulgas ka pET42-e)

Joonis 1. pET 42 plasmidi mudel  
Allikas: Prokaryotic expression 2003

rakus. pBluescript, plasmiidide replikatsiooni

alguspunkt on tuletatud ColE1 plasmidi omast, mis looduslikult esineb *E. coli*-s. ColE1 replikatsiooni alguspunkti kasutatakse tihti, kuna selle puhul on plasmidi koopiate arv rakus 15 ja 60 vahel. (Tomson 2007) Ekspressioonivektori koopiate suur hulk rakus suurendab sünteesitava valgus hulka. Need mitmekoopialised plasmiidid paljunevad stabiilselt, ning raku jagunemise ajal jaotuvad tütarakkude vahel juhuslikult.

### Promootorid ja transkriptsiooni terminatsioon

Promootorid on nukleotiidjärjestused, millega seostub RNA polümeraas (RNAP). Sarnaselt replikatsiooni alguspunktiga sõltub promootori eripärast RNAP seostumise afiinsus ja seeläbi transkriptsiooni kiirus. Efektiivne promootor peab olema kergesti indutseeritav ja tulemuseks andma ekspressiooni taseme, mis on 10% - 30% kogu valguproduktis. Lisaks sellele peab promootorilt olema minimaalne baasekspressioon (ekspressioon ilma indutseerijata ehk soovimatu ekspressioon). Valgu tootmiseks üks enim kasutatud promootoreid on bakteriofaagi T7 promootor. (Tomson 2007:19) Teiste hulgas kasutavad seda ka pET-plasmiidid (vt Joonis 1). See on laialdaselt kasutusel seetõttu, et T7 promootorile seostub T7 RNA polümeraas, mis on selektiivne ainult T7 promootori suhtes, samuti on T7 RNA polümeraas nii aktiivne, et täielikult indutseeritud olekus suunatakse peaaegu kõik raku

ressursid selle poolt transkripteeritava geeni ekspresseerimiseks (pET Systems....2003:4). Plasmidi sisestatud geenist allavoolu asub transkriptsiooni terminaator. See on nukleotiidjärjestus, milleni jõudes polümeraas eemaldub kaksikheeliksist ja transkriptsioon lakkab. Terminaatorini jõudes tõlgib T7 RNA polümeraas ka selle mRNA-sse, mille tagajärjel tekib viimases *stem-loop* struktuur. Struktuuri tekke tõttu transkriptsioon katkeb. Mõningail juhtudel toimub see ka valgu rho-faktor kaasabil.(Dale 2004)

### *Polülinker*

Ekspressioonivektor peab sisaldama regiooni, mida tunnevad mitmed restriктаasid. Restriктаasid lõikavad polülinkeril(*multiple cloning site*) kaksikheeliksist, mille tagajärjel ringikujuline plasmidi avaneb ning tekib kaks paardumata otsa, millega kloneeritav geen võib rekombineeruda. Selleks, et plasmidi ja geeni paardumata järjestused oleksid samad ja seetõttu üksteisega komplementaarsed, töödeldakse mõlemat sama restriктаasiga. pET-plasmiidide puhul on restriктаasiks BamH1 (Dale 2004:223). Polülinkeri asukoht plasmiidis on väga oluline, kuna geeni ekspresseerimiseks peab viimane asuma teiste geneetiliste elementide suhtes õiges kohas. Selle saavutamiseks on polülinker kavandatud unikaalseks, st. plasmiidis ei ole ühtegi teist nukleotiidjärjestust, mida tunneksid ära polülinkeri restriктаasid (Dale 2004).

### *Translatsioon ja mRNA*

Translatsioon algab ribosoomide sidumisega ribosoomi seostumispunktile(*ribosome binding site*), mis sisaldab Shine-Dalgarno(SD) järjestust. Ribosoom alustab tõlkimist initsiaatorkoodonist. Mitmed mRNA struktuurid mängivad olulist rolli võimalikult sagedase ja kiire translatsiooni saavutamisel, sealhulgas ribosoomi seostumispunkti sekundaarstruktuur, SD-järjestuse nukleotiidjärjestus ja asukoht ning initsiaatorkoodon ja sellele järgnev koodon (AUG ja adeniinile vastav koodon). Lisaks sellele on tähtis veel mRNA üldine koodonkasutus: ühele aminohappele vastab enamasti mitu erinevat koodonit, kuid kui mRNA sisaldab palju haruldasi koodoneid, millele vastavat tRNA-d on raku väheses koguses, võib viimaste puudumise tõttu tekkida translatsiooni seiskumine või katkemine, samuti võib muutuda translatsiooni lugemisraam ning tekkida aminohapete

misinkorporatsioon. Seda probleemi saab lahendada haruldaste koodonite asendamisega või neile vastava tRNA pideva lisamisega rakku. (Tomson 2007)

### *Seleksioonimarker ja lisavalikud*

Keskkonnas, kus plasmiid ei ole rakule hädavajalik, võivad raku jagunemisel tekkida plasmiidita või muteerunud plasmiidiga tütararakud. Kuna sellised rakud rekombinantset valku ei tooda, võivad nad olemasolevaid ressursse kasutada rohkem elutegevuseks kui plasmiidiga rakud, ning kasvavad viimastest kiiremini. Suurema kasvukiiruse tõttu sisaldab populatsioon mõne aja pärast ainult plasmiidivabu rakke, mistõttu kogu valguproduktioon lakkab. Selle vältimiseks on tarvilik luua keskkond, milles selektiivne surve soosib töötava plasmiidiga rakku. Suurima selektiivse surve saavutamiseks lisatakse plasmidi koostisesse geen, milleta rakk hukub. Enim kasutatakse selleks ampitsilliini, kanamütsiini, kloramfenikooli või tetratsükliini suhtes resistentseks muutvaid geene (Tomson 2007:14). pET 42 puhul on selleks kanamütsiini resistentsust kodeeriv geen *kan* (vt Joonis 1) (pET Systems...:2003:18), mille produkt inaktiveerib kanamütsiini periplasmas (Tomson 2007:15). Kasutatakse ka süsteeme, kus peremeesraku kromosoomist on kustutatud või muteeritud eluks vajalik geen, mille töötav koopia on viidud plasmidi. Lisaks seleksioonimarkerile võivad plasmiidid kanda ka valikuliseid lisandeid, nagu plasmidi stabiilsust suurendavaid elemente ja valguliiteid kodeerivaid DNA-ahelaid.

### **2.2.3. Peremeesorganism**

Peremeesorganismi valik sõltub ekspresseeritava valgu omadustest ja lõplikust kasutusest. Kriteeriumeid nagu valgustruktuur (keerukus, S-S sillad, translatsioonijärgsed modifikatsioonid), kultivatsioon, edasine töötlus, kasutusala jm. tuleb peremeesorganismi valikul arvestada.

*E.coli* ekspressioonisüsteeme kasutati esimesena, ning need on siiani enim kasutatud organismid rekombinantsete proteiinide valmistamisel. *E.coli* eelised mitmete teiste ekspressioonisüsteemide ees on võime lihtsal söötmel kiiresti kasvada ning jõuda suure rakutiheduseni, samuti suur valikuvõimalus erinevate omadustega ekspressioonivektorite ja peremeesorganismide vahel. Siiski, *E.coli* võime korrektselt töödelda ja eritada üleekspresseeritud valke on võrdlemisi piiratud. Seetõttu toodetakse keerulise kõrgema järgu struktuuriga või

glükosülatsiooni vajavaid valke enamasti eukarüootsetes ekspresioonisüsteemides. (Tomson 2007) *E.coli* valgu translatsioonijärgse töötlemise efektiivsuse suurendamiseks on loodud mitmeid tüvesid, sealhulgas ka pET süsteemide hulka kuuluvad BL21 tüved. Kuna BL21 tüve kasutati ka käesolevas uurimistöös, tutvustatakse seda järgnevalt lähemalt.

### *Tüvi BL21(DE3)*

Geen ekspresseeritakse plasmiidilt läbi bakteriofaagT7 promootori. Kuna *E.coli* looduses T7 RNA polümeraasi ei tooda, on tüvesse lisatud T7 polümeraasi kodeeriv geen. Need peremeesorganismid on lüsogeenid bakteriofaag DE3-ga, mis on bakteriofaag lambda derivaat. DE3 kannab DNA fragmenti, mille koostisesse kuulub *lacI* geen, *lacUV5* promootor ning T7 polümeraasi kodeeriv geen. Olles kromosoomi rekombineerunud, transkribeeritakse T7 RNA polümeraasi kodeerivat geeni vaid läbi *lacUV5* promootori. Tüves BL21(DE3) on puudulikuks muudetud ka proteaaside *lon* ja *ompT* produktsioon, mis võivad toodetud valku lõhustada. Seetõttu peaksid vähemalt osa ekspresseeritavaid võõrvalke olema stabiilsemad.(pET Systems...:2003)

Vastavalt ekspresseeritava valgu omadustele on lisaks BL21(DE3)-s olevate lisadele võimalik kasutada ka teisi ekspresioonitüvesid, mis on disainitud suurendama võõrvalgu disulfiidsidemete teket ja lahustuvust, tootma suuremas koguses haruldastele koodonitele vastavaid tRNA molekule või mõnel muul viisil suurendama valgusünteesi efektiivsust.

## **2.3. Geeniülekanne**

Kui sobivasse ekspresioonivektoris on kloonitud valitud geen, on selle ekspresseerimiseks vajalik plasmiid rakku sisestada. Selleks on mitmeid võimalusi. Looduses toimib see erinevate prokarüootide vahel konjugatsiooni vahendusel, mille käigus geneetiline info (enamasti plasmidi kujul) kantakse üle doonorrakult retsiptendile. Kuna aga mitmed ülekantavad geenid on võetud teist tüüpi organismidest, või on täielikult inimese poolt loodud, tuleb selleks kasutada muid geeniülekandevõtteid. Selleks kasutatakse enim transduktsiooni, mille käigus kantakse soovitud geen rakku viiruse vahendusel ja transformatsiooni, milles rakk omastab ümbritsevast meediumist "alasti" DNA molekuli. Neist enimkasutatud on transformatsioon. (Dale 2004)

### **2.3.1. Transformatsioon**

Transformatsioon on raku geneetiline muundamine läbi DNA molekuli viimise raku seda ümbritsevast meediumist. See koosneb kahest etapist: DNA molekuli ülesvõtmine raku poolt, ning selle raku integreerimine. Viimane sõltub ülekantava DNA omadustest. Rakku võimet DNA-d ümbristevast meediumist omistada nimetatakse kompetentsuseks. Mitmed bakterid on loomulikult kompetentsed, teised aga (sealhulgas ka töös kasutatav *E.coli*) seda pole; neid tuleb kunstlikult kompetentseks muuta (Dale 2004). Selleks töödeldakse kultuuri kaltsiumkloriidi või mõne muu divalentse metalli soolaga. Positiivsed katioonid ladestuvad negatiivsel rakumembraanil, muutes selle neutraalseks. See muudab rakumembraani negatiivselt laetud DNA-le läbitavaks. Seejärel inkubeeritakse rakke koos ülesvõetava DNA-ga jääl, ning lühiajaliselt kuumutatakse kultuuri, mille tulemusena DNA siseneb raku. (DNA Interactive kodulehekülg) Plasmiidide ülekandel on transformatsiooni efektiivsus suur, lineaarse DNA puhul aga transformatsioon tihti ebaõnnestub, tõenäoliselt tänu raku leiduvatele eksonukleasidele, mis lineaarse DNA kiiresti lagundavad (Dale 2004:225).

### **2.4. Valgusüntees**

Plasmiidiga transformeeritud tüvi on seejärel võimeline plasmiidis sisalduva geeni põhjal valku tootma. Valgu sihilikul tootmisel on soovitatav nii valguekspressiooni suur kontrollitavus kui ka võimalus viia valguekspressioon väga kõrge tasemeni. pET plasmiidides, nagu ka mitmetes teistes, kasutatakse selle saavutamiseks T7 RNA polümeraasi ja T7 promootoril põhinevat süsteemi (pET Systems...:2003). Siinkohal käsitletakse seda töös kasutatud pET42 plasmiidi ja tüve BL21(DE3) põhjal.

#### **2.4.1. T7 RNA polümeraasisüsteem**

Nagu eelnevalt kirjeldatud, toimub plasmiidi kloonitud geeni transkriptsioon T7 RNA polümeraasi (T7 RNAP) seostumisel T7 promootorile. Täielikult indutseerituna seostub T7 RNAP promootoriga kõrge afiinsusega, mis tagab suure valguekspressiooni. Valgu sihilikul tootmisel on aga võime valguekspressiooni suurust kontrollida sama oluline, kui maksimaalne ekspressioon. Kontrollmehhanismi moodustavad repressor *lacI*-st ja induktor

IPTG-st koosnev süsteem(vt Joonis Systems...:2003)

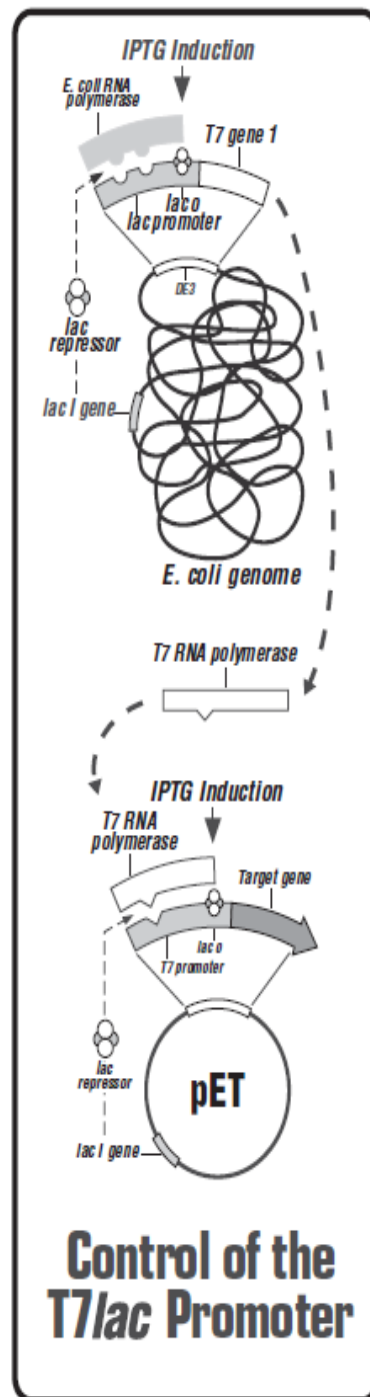
*LacI repressioon*

Rakk toodab nii kromosoomis kui ka asuvalt *lacI* geenilt LacI valku, mis promootoriga (vt Joonis 2). *lacUV5*-ga käitub repressorina: tema kohalolek ei polümeraasil *lac* promootoriga sellele, et T7 RNAP kodeerivat geeni transkribeeritakse läbi *lacUV5*-e, on promootor sisestatud ka allavoolu T7 nii, et LacI seostumisel *lacUV5*-ga T7 RNA polümeraasi seostumist T7 seetõttu, ilma indutseerijata, ei rekombinantset valku ega T7 RNA kodeerivat geeni. LacI-l põhinev kontrollmehhanism on väga efektiivne, baasekspressioon on väga madal.(pET

*IPTG induktsioon*

Rekombinantse valgu ekspressiooni viiakse rakku isopropüül β-D-1-thiogalaktopüranosiidi-ainet, mis allolaktoosi mõju LacI-le. IPTG LacI-ga vabaneb viimane *lacUV5* mille tagajärjel RNA polümeraas RNA polümeraasi ekspressiooni, ning võõrvalgu oma.(vt Joonis 2)

suurus on võrdeline IPTG kontsentratsiooni suurusega, mistõttu valgusünteesi intensiivsus on IPTG abil kergesti kontrollitav. IPTG-d eelistatakse allolaktoosile seetõttu, et rakk on võimeline allolaktoosi lagundama, mille tulemusena allolaktoosi kui indutseerija kontsentratsioon pidevalt langeb ning koos sellega ka rekombinantse valgu süntees. IPTG-d



Joonis 2. T7 RNA polümeraasisüsteemi mudel Allikas:pET Systems Manual 2003

2).(pET

plasmiidil seostub *lac* seostunud LacI võimalda RNA seostuda. Lisaks

*lacUV5* promootorisse takistatakse ka prmootorile. ekspresseerita polümeraasi

mistõttu Systems 2003)

alustamiseks

imiteerib

seostumisel promootorilt, alustab T7 see omakorda Ekspressiooni

ei ole rakk võimeline lagundama, seetõttu jääb IPTG kontsentratsioon rakus pidevalt konstantseks ning sellega koos ka valgusünteesi intensiivsus.(Tomson 2007)

#### 2.4.2. Sünteesijärgsed modifikatsioonid

Valgu funktsioon sõltub suuresti valgu kujust. Seetõttu peavad ekspresseeritavad valgud bioloogiliselt aktiivseks muutumiseks saavutama õige kõrgemat järku struktuuri, bioloogiliselt aktiivsed valgud on omandanud loomuliku konformatsiooni. Primaarstruktuuri ehk polüpeptiidahela muutumist sekundaar, tertsiaar või kvartenaarstruktuuriks nimetatakse valgu voltimiseks(*foldning*). Iga valgu kuju on erinev, seetõttu on erinevad ka voltimisprotsessid ja tingimused selle võimaldamiseks. Valesti volditud või denatureerunud valgud kogunevad inklusioonkehadesse või lagundatakse proteaaside poolt, mis toob kaasa valguproduktiooni languse(Tomson 2007:26). Põhjuseid, miks valgud enda loomulikku konformatsiooni ei jõua või selle kaotavad on mitmeid.

##### *Shaperonid ehk saatjavalgud*

Suured valgud, sealhulgas ka töös kasutatud GFP, vajavad õige struktuuri moodustamiseks voltimise katalüsaatorite ja saatjate(*chaperone*) abi. Saatjad on valgud, mis aitavad suurte valkude mittekovalentsel voltimisel. Saatjavalgud jagunevad kolme klassi: voltimise saatjad(*foldning chaperone*), mis pakivad valke kokku ja lahti, hoidmissaatjad(*holding chaperone*), mis seostuvad osaliselt kokkupakitud valkudega ning eraldavad saatjad(*disaggregating chaperone*), mis suurendavad kuhjunud valkude lahustuvust(Ibid:22). *E.coli* tsütoplasmas on valkude kokkupakkimine assisteeritud kolme saatjasüsteemi poolt: TF (*trigger factor*), DnaK-DnaJ-GrpE ja GroEL-GroES. TF seostub ribosoomiga peptiidi väljumiskoha lähedal ning kaitseb suuri vastsünteesitud valke. Alternatiivselt võivad pikemate polüpeptiidahelatega seostuda DnaK-DnaJ. Mõlemad seostuvad polüpeptiidahela hüdrofoobse osaga, kaitstes neid nii lahusti ja üksteise eest. Peale TF-st või DnaK-st vabanemist võib valk võtta loomuliku konformatsiooni, seostuda uuesti DnaK-DnaJ'ga või kanduda edasi GroEL-GroES kompleksi. Tavalistes tingimustes volditakse 10-15% vastsünteesitud valkudest GroEL-GroES kompleksis. Valgu üleekspressiooni korral võib valkude kontsentratsioon tsütoplasmas ulatuda kuni 400g/l.(Tomson 2007) Sellistes oludes

jääb saatjavalkude hulk tihti ebapiisavaks, mistõttu valgud ei jõua loomuliku konformatsioonini ning sadestuvad inklusioonkehadesse. Inklusioonkehade teket võib põhjustada ka asjaolu, et mitmed valgud vajavad loomulikku konformatsiooni jõudmiseks disulfiidsidemete teket, mille tekkimine tsütoplasma redutseerivas keskkonnas on raskendatud. Disulfiidsidemeid vajavaid valke toodetakse tihti selleks sobivamas periplasmas. (Tomson 2007:24).

Loomulikku konformatsiooniga valgud võivad mitmete tegurite mõjul kaotada õiged kõrgema järgu struktuurid. Protsessi, mille käigus see juhtub, nimetatakse denaturatsiooniks. Denaturatsiooni võib põhjustada temperatuur, kõrge pH, mehhaanilised mõjutused jne. Denatureerunud ja osaliselt volditud valkudega seostuvad hoidmissaatjad, mis ootavad seal voltimissaatjate kättesaadavaks muutumist(Ibid).

#### *Liitvalgud*

Ekspressseeritavate valkude omaduste parandamiseks kasutatakse tihti liitvalke, kus sünteesitav valk seostatakse partnervalguga(*fusion partner*). Partnervalgud on polüpeptiidahelad, mis on ekspressseeritava valguga ühendatud regiooni abil, mida lõikab kindel proteaas. Need võivad kergendada ekspressseeritava valgu puhastamist ja avastamist, põhjustada valgu migratsiooni periplasmasse või suurendab valgu lahustuvust. Käesolevas uurimistöös kasutati GFP ekspressseerimisel partnervalguna GST-liidet, millel on mitmeid funktsioone. (pET Systems...:2003)

#### *Glutatioon-S-transferaas(GST)*

GST koosneb 220-st aminohapest kogumassiga 26 kDa, mis on teiste partnervalkudega võrreldes üsna suur. See liidetakse valgu N-terminusse koos trombiini lõikejärjestusega, kust see puhastamise käigus eraldatakse. GST suurendab GFP(ja teiste valkude) lahustuvust, suurendades nii bioloogiliselt aktiivsete GFP-de hulka ja valgusünteesi efektiivsust. Lisaks sellele on GST-liitelisi valke kerge eraldada ja puhastada, kuna GST seostub enda substraadi glutatiooniga. Kattes agarosikerakesed glutatiooniga, seostub sinna GST-liiteline valk, mida on seejärel võimalik lahusest eraldada. GFP lõplikuks puhastamiseks lisatakse proteaas trombiini, mis lõikab polüpeptiidahelat GFP ja GST vahelt.(pET Systems...:2003)

### **2.4.3. Green fluorescent protein**



2008. aastal said Osamu Shimomura, Marty Chalfie ja Roger Tsien keemia nobelipreemia GFP avastamise ja arendustöö eest. GFP ehk *green fluorescent protein* viitab meduus *Aequorea victoria*-st isoleeritud fluorestseeruvale valgule, kuigi seda leidub ka teistes mereorganismides. GFP-d on teaduslikes uuringutes kasutatud kõikvõimalike organismide peal, kuid see on levinud ka teadusringkonnast väljaspoole: 2003. aastal tuli lemmikloomana turule GlowFish-sebrakala, mida oli geneetiliselt muundatud GFP-d tootma, ning mis seetõttu helendab. Sellest alates on loodud ka muud värvi fluorestseeruvaid valke tootvaid organisme, ning nendega ka uusi müügiartikleid.

Teadusuuringutes kasutatakse GFP-d ja selle derivaate väga erinevatel otstarvetel. Näiteks on võimalik GFP abil täpselt kindlaks määrata teatud valgu produktsiooni ja teekonna, liites sellega fluorestseeruva GFP-liite. GFP abil on võimalik jälgida kindlat organismi ja selle järglaskonda, sarnaselt kasutati GFP-d ja selle derivaate aju ehituse ja talitluse uurimisel. Käesolevas uurimistöös kasutati GFP-d määramaks valguekspressiooniks optimaalset indutseerija kogust.

### 3. Materjalid ja meetodid

Katsete eesmärgiks on määrata kindlaks erinevate IPTG kontsentratsioonidega bakterikultuuride kasvukiirus, ekspresseeritud GFP-GST liitvalgu kogus ning inklusioonis oleva GFP-GST liitvalgu hulk. Kasvukiiruse määramiseks mõõdeti teatud ajavahemike tagant kultuuride optiline tihedus. GFP-GST liitvalgu koguse määramiseks mõõdeti kultuuride fluoressentsi intensiivsuse ning inklusioonis oleva valgu koguse määramiseks viidi läbi elektroforees.

#### 3.1. Tüvi ja ekspressioonivektor

Uurimistöös kasutati *Escherichia coli* tüvi BL21(DE3)-e ning ekspressioonivektorina plasmidi pET 42. GFP geeni oli eelnevalt plasmidi kloneerinud PhD Katrin Tomson TTÜ Geenitehnoloogiainstituudis.

Tüvi BL21(DE3)-e transformeeriti eelnevalt pET42-ga järgneva protkolli kohaselt:

1. Sulata kompetentsed rakud jääl.
2. Lisa 1 ml PBS-le 10µl kompetentseid rakke, külva 100µl antibiootikumita LB söötmele. Saad kontrollkultuuri.
3. Lisa 900µl kompetentsetele rakkudel 1µl plasmidi pET-GFP.
4. Inkubeeri 30 minutit jääl.
5. Kuumuta 1 minut temperatuuril 42<sup>0</sup> C .
6. Inkubeeri 5 minutit jääl.
7. Lisa 0,9ml LB söödet, sega ja inkubeeri 45 min. temperatuuril 37 loksutil.
8. Külva 100µl kanamütsiini ja IPTG-d sisaldavale petri tassile.

9. Ülejäänud kultuur fuugi kiirusel 5000p/min toatemperatuuril 5 minutit.

10. Eemalda 0,8 ml söödet ning suspendeeri bakterid söötmejäägis ning külva kanamütsiini ja IPTG-ga tassile.

11. Aseta tassid 12-14 tunniks termostaadile temperatuuriga 37C .

### **3.1.1. LB sööde**

LB sööde sisaldab 1 liitri kohta:

Bacto-tryptone 10g

Pärmiekstrakt 5g

NaCl 10g

### **3.1.2. PBS**

*Phosphate buffered saline* e PBS sisaldab ühe liitri kohta:

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O 1,44 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24g

## **3.2. Kultivatsioon**

### **3.2.1. Optilise tiheduse mõõtmine**

Optilise tiheduse mõõtmiseks pipeteeriti 1 ml bakterikultuuri küvetti. Mitmete proovide korral oli vajalik teha 10 kordne lahjendus, mille puhul pipeteeriti küvetti 100 µl bakterikultuuri ning 900 µl puhast LB söödet. Küvett asetati LKB Biocrom spektrofotomeetrisse, optiline tihedus mõõdeti Ultrospec II lainepikkusel 600 nm. Täpsema mõõtmise saamiseks loksutati küvetti (sademe vältimiseks) enne spektrofotomeetrisse asetamist.

### **3.2.2. Bakterikultuuri eelkasvatus**

Petri tassilt asetati kolm pET42-GFP-ga transformeeritud BL21(DE3)-e kolooniat kanamütsiiniga LB söötmesse ning seejärel asetati ~16-ks tunniks loksutile temperatuuri 37 C juures.

Kultuuri 10 kordse lahjenduse proovi optiliseks tiheduseks mõõdeti 0,7AU(AU-absorbance

unit), seega bakterikultuuri optiline tihedus oli 7 AU.

500 ml-se kolbi valati 300 ml puhast LB söödet, millele lisati 300 µl kanamütsiini lahust lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml. Kolbi lisati 3ml eelnevalt kasvatatud bakterikultuuri, saadud kultuuri optiliseks tiheduseks mõõdeti 0,045AU.

Kultuuri kasvatati loksutil kuni kultuuri tihedus oli kasvanud 0.17 AU-ni.

### **3.2.3. Kultuuri indutseerimine**

Bakterikultuur jagati seejärel võrdselt kolme kolvi vahel, iga kolb sisaldas ~100ml kultuuri.

Kolvid sildistati. Järgnevalt lisati kolbidesse IPTG:

Kolb 1: kontrollkolb, IPTG-d ei lisatud

Kolb 2: IPTG lõppkontsentratsioon 1mmol/l

Kolb 3: IPTG lõppkontsentratsioon 0,1mmol/l

Peale IPTG-ga indutseerimist asetati kolvid loksutile temperatuuril 37 °C kiirusel 200 pööret/minutis. Kolvid jäid loksutile eksperimendi lõpuni, võeti välja vaid bakterikultuuridest proovide tegemiseks.

### **3.2.4. Kasvukõvera määramine**

Kõikides kolbides kasvanud kultuuride optilised tihedused mõõdeti kokku ~22 tunni jooksul . Esimisel päeval mõõdeti kultuuride optilist tihedust kokku kuue tunni vältel kindlate ajavahemike tagant. Kultuurid jäeti ööseks samadel tingimustel loksutile ning viimast korda mõõdeti kultuuride optilised tihedused järgmisel hommikul. Täpsed kellajad, lahjendused ja mõõtmistulemused on välja toodud Lisas 2.

Kõikide optilise tiheduse mõõtmiseks kasutatud proovid säilitati fluorestsentsi mõõtmiseks: küvettides asunud 1ml proovid tõesteti Eppendorfi tuubidesse, mida tsentrifuugiti 4 minutit kiirusel 5000 pööret/minutis. Tuubides olnud rakud sadenesid põhja. Supernatant eemaldati ning sade suspenderiti 1 ml PBS lahuses. Eppendorfid sildistati ning asetati säilitamiseks jääle.

### **3.2.5. Fluorestsentsi intensiivsuse mõõtmine**

Igat jääl säilitatud proovi lahjendati PBS lahusega uude Eppendorfi tuubi nii, et uue proovi optiliseks tiheduseks oleks 0,1 ja ruumalaks 1ml. Selleks vajalikud PBS-i ja proovi

ruumalad arvatati iga proovi kohta välja eraldi. Seejärel pipeteeriti igast proovist multivellplaadile kolme velli 100 µl lahust. Velliplaat asetati GENios Pro (Tecan) fluorestsents spektrofotomeetrisse. Ergutuslainepikkuseks(excitation wavelength) oli 395nm ja kiirguslainepikkuseks(emission wavelength) 509 nm.

### **3.3. Valguforees**

Viimasest ajapunktist võeti proovid valguforeesiks: 1ml kultuuri tõsteti Eppendorfi tuubidesse, mida tsentrifugeeriti 4 minutit kiirusel 5000 pöört/minutis. Supernatant eemaldati ja rakud suspendeeriti PBS-s proovide ühtlustamiseks tihedusega 1OD/100µl.

#### **3.3.1. Totaalvalgu proovid**

Proovidest pipeteeriti 50µl ning lisati 50µl 2x proovipuhvrit(sisaldab SDS ja merrkaptoetanooli), proovid tähistati totM1, totM2, totM3 vastavalt kolbides kasvatatud kultuuridele.

Proovid külmutati vedela lämmastikus 1 minut ning sulatati toatemperatuuriga(20 C) vees kuni lahuse vedeldumiseni. Protseduuri korrati kolm korda. Vedela lämmastikuga töötlemise tagajärjel hävinesid rakud ning lahusesse tekkis DNA-valk kompleks.

DNA-valgu kompleksi lõhustamiseks sonikeeriti igat proovi 3 korda amplituudil 30% intervalliga 5 sekundit+10 sekundit paus.

#### **3.3.2. Lahustuva valgu ja inklusioonkehade proovid**

250µl proovidele lisati lüsotsüümi (N-atsetüülmuramiid glükaanhüdrolaas) kontsentratsiooniga 100 µg/l ning inkubeeriti jääl.

Proovid külmutati vedelas lämmastikus 1 minut ning sulatati toatemperatuuril(20C) vees kuni lahuse sulamiseni. Protseduuri korrati kolm korda.

Proove sonikeeriti kolm korda amplituudil 30% intervalliga 5 sekundit+10 sekundit paus.

Proovid tsentrifugeeriti 15 minutit temperatuuril 4C kiirusel 14000 pöört/minutis.

Supernatandist saadi lahustuva valgu proov, mis tähistati lah1, lah2 ja lah3.

Sademe moodustasid inklusioonkehad, mis lahustati 250µl 1x proovipuhvris. Proovid tähistati ml1, ml2, ml3.

### 3.3.3. SDS polüakrüülamiid-geelelektroforees

Kõik proovid kuumutati 5 minutit temperatuuril 95°C. Kuumutamise tulemusel lahuses olevad valgud denatureerusid ning nendega seostus proovipuhvris olev SDS, mis andis valkudele negatiivse laengu.

Eraldav geel (*resolving gel*) koosnes 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 10% akrüülamiidi lahusest. Geel segati polümerisatsioonikatalüsaatoritega (APS-ammooniumpersulfaat, TEMED- N-N'-tetrametüületüleendiamiin), valati koheselt vormi ning kaeti õhukese t-amüülalkoholi kihiga.

Geelil lasti polümeriseeruda ~45 minutit, mille tulemusena tekkis polüakrüülamiidi ja bisakrüülamiidist ( vastavalt suhtega 37,5:1) pooride võrk.

Geeli loputati destilleeritud veega ning kuivatati.

Kontsentreeriv geel (*stacking gel*) koosnes 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 4% akrüülamiidi lahusest.

Geeli lisati APS ja TEMED ning valati koheselt eraldava geeli peale. Kontsentreerivasse geeli sisestati 10 hambaga kamm, ning geelil lasti polümeriseeruda ~45 minutit.

Kamm eemaldati ning geel pesti destilleeritud veega.

Geelikasset sisestati elektroodassembleesse (*electrode assembly*), mis seejärel tõsteti veepaaki (*Mini Tank*). Sisemine kamber täideti 125 ml ning paak täideti 200 ml *running buffer*iga (1x sisaldab ühe liitri kohta 3,03g Tris-i, 14,4g glütsiini, 1g SDS-i).

Hammastesse pipeteeriti proovid, suurusmarkerina kasutati PageRuler™ valgumarkerit.

Elektroodid ühendati vooluallikaga algpingel 90V. Kui proovid läbisid kontsentreeriva geeli suurendati pinge 150 voldini. Foreesi kestuseks mõõdeti 82 minutit.

Geel eemaldati geelikassetist, puhastati destilleeritud veega ning kontsentreeriv geel eemaldati eraldavast geelist.

Kontsentreeriv geel asetati Coomassie lahusesse (0,2% Brilliant Blue® värvi, 25% etanool, 7% äädikas), keedeti ~5 sekundit ning loksutati 10 minutit.

Geel eemaldati Coomassie lahusest, loputati destilleeritud veega ning asetati äädika-etanooli lahusesse (10% äädikas, 30% etanool) ning asetati külmkappi temperatuuril 4°C ~16 tunniks.

Äädika-etanoolilahus eemaldati, geel pesti destileeritud veega. Pilt geelist tehti HP Deskjet scanneriga.

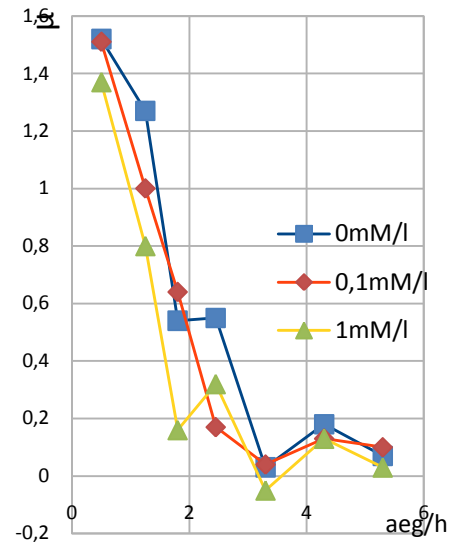
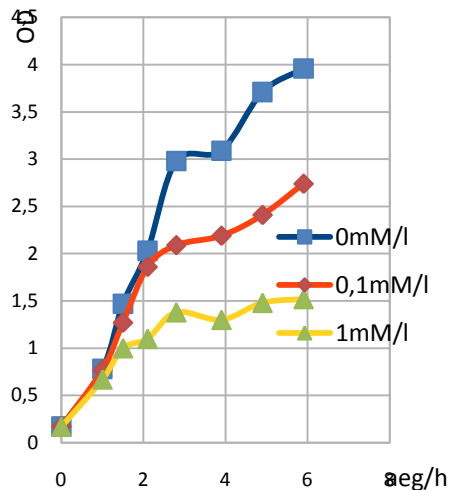
## **4. Tulemused ja arutelu**

Katsete eesmärgiks oli välja selgitada bakterikultuuri kasvukiiruse ja valguekspressiooni seos IPTG kontsentratsiooniga. Kultuurid indutseeriti kahe enimkasutatud IPTG kontsentratsiooniga: 0,1mM/l, mis on enimkasutatud madalaim kontsentratsioon ning 1mM/l, mis on enimkasutatud kõrgeim kontsentratsioon. Võrdluseks mõõdeti kasvukiirust ja valguekspressiooni ka indutseerimata kultuuril.

### ***4.1. Kasvukõverad ja kasvukiirus***

Bakterikultuuride kasvukiirused määrati nende optiliste tiheduste mõõtmiste kaudu. Mõõtmistest kogutud andmete põhjal on järgnevalt esitatud kultuuride kasvukõverad (vt Joonis 3). Kultuuride järsu kasvukiiruse languse 3. ja 4. tunni vahel peale indutseerimist põhjustas aeratsiooni vähenemine: ~20 minuti jooksul oli autori vea tõttu loksuti välja lülitatud. Veast olenemata on selgesti näha kasvukõverate erinevusi: kõrgema IPTG kontsentratsiooniga kultuurid jõudsid madalama rakutiheduseni ning kasvasid aeglasemalt kui madala IPTG kontsentratsiooniga kultuurid.

Väiksem kasvukiirus ilmneb ka kultuuride kasvukiiruste graafikult (vt Joonis 4).



Bakterikultuuride kasvukiiruste arvutamisel kasutati valemit:  $\mu = (\ln OD_1 - \ln OD_2) / (t_2 - t_1)$  ning punktidele vastavaks ajahetkeks valiti kahe vaadeldud ajahetke aritmeetiline keskmine. Kõrge IPTG kontsentratsiooniga kultuuride kasvupidurdusel võib olla mitmeid erinevaid põhjuseid. Peamiseks põhjuseks on metaboolne stress, mida rekombinantse valgu ekspresseerimine rakule avaldab. Suur osa raku ressurssidest kasutatakse rekombinantse valgu tootmiseks, mille tõttu väheneb paljunemiseks kasutatavate vabade ressursside hulk. See on kõige tõenäolisemaks põhjuseks ka käesolevas uurimistöös.

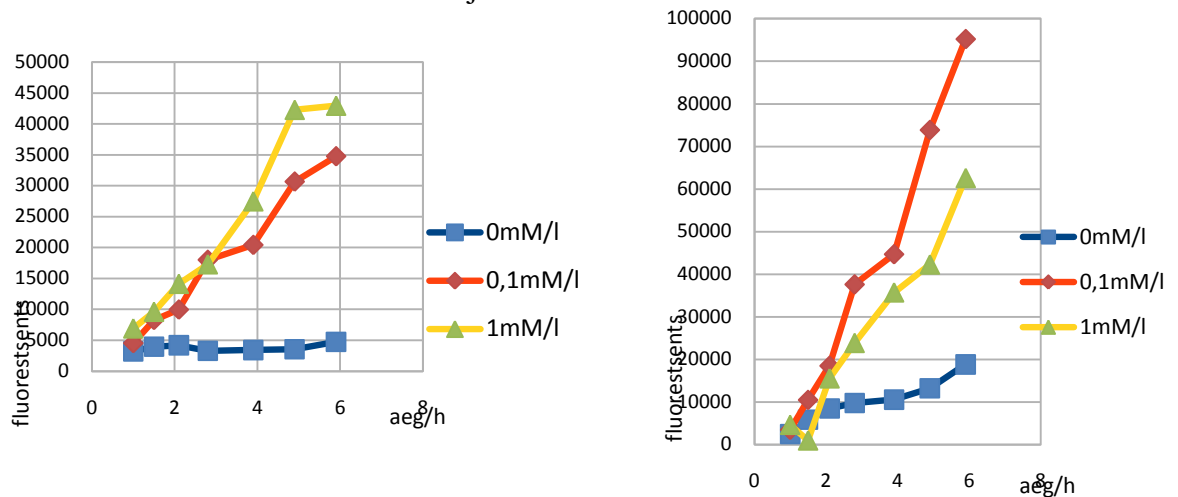
Põhjuseid võib olla teisigi: liiga kõrge ekspressiooni korral vallanduvad raku vabade ressursside puudumise tõttu nälgimisega seotud reaktsioonid, mille tulemusel väheneb kogu raku sünteetitava valgu, sh. ka rekombinantse valgu hulk. Üleekspressiooniga seostatakse ka mürgiste jääkainete kogunemist raku ja bioloogiliselt aktiivsete raku alaliselt vajalike (housekeeping) valkude puudust, mis on põhjustatud shaperonide vähesusest. (Chou 2007:2) Eelnimetatud põhjustele aga käesolevas uurimistöös kogutud andmed ei viita: kultuuride kasvukiirused küll erinevad, kuid vähenevad võrdlemisi samasuguse kiirusega. Kasvukiiruse üldise languse põhjuseks on toitainete vähenemine söötmes või hapniku vähenemisest põhjustatud anaerobioos, mida tahtmatult juba demonstreeriti.

#### 4.2. GFP-GST ekspressioon



Valgu ekspressiooni hindamiseks mõõdeti proovide fluorestsentsi intensiivsus. Enne mõõtmist ühtlustati proovide optiline tihedus ja ruumala:  $OD_{600}=0,1$ ,  $V=100\mu\text{l}$ .

Mõõtmistulemuste täpsuse suurendamiseks tehti igast proovist kolm mõõtmist. Nende aritmeetilised keskmised on esitatud joonisel 5.



Graafik näitab juba oodatud tulemust: kõrgema

IPTG kontsentratsiooniga kultuurid toodavad raku kohta rohkem GST-GFP liitvalku. Samuti kinnitab see firma Novagen väidet pET vektorite madala baasekspressioon kohta.

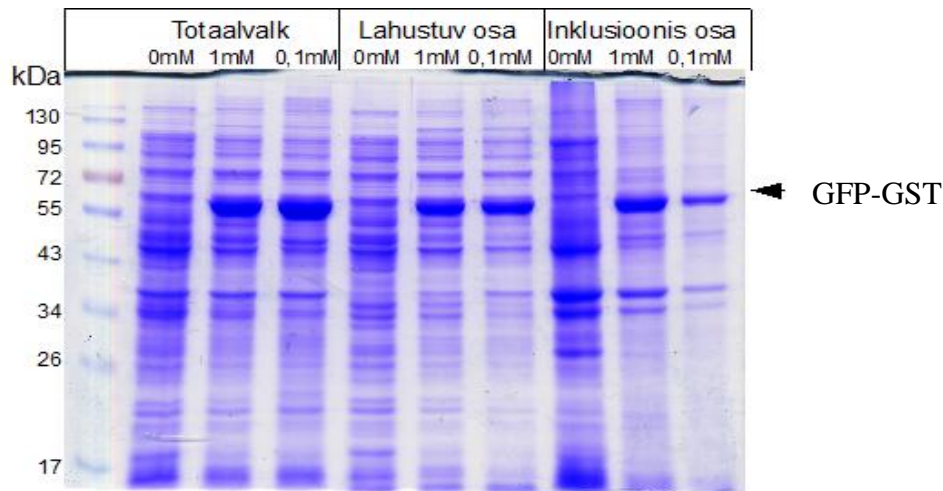
Tööstuslikul ja tihti ka laboris valgu tootmisel on olulisimaks siiski kogu produtseeritud valgu kogus. Selle määramiseks korrutati mõõdetud fluorestsentsi suurused bakterikultuuri optiliste tihedustega (vt Joonis 6).

Tulemustest järeldub, et 0,1mM IPTG kontsentratsiooniga bakterikultuuri koguekspressioon ületab märkimisväärselt 1mM IPTG kontsentratsiooniga kultuuri ekspressiooni. Et kõrgema indutseerija kontsentratsiooni puhul esineb rohkem ka üleekspressiooniga seotud probleeme, on 0,1mM/l või sellele lähedase IPTG kontsentratsiooni kasutamine GFP-GST liitvalgu indutseerimisel optimaalsem ning annab tulemuseks suurema valguproduktiooni. Parimat kontsentratsiooni tuleks siiski edasiste katsetega täpsustada.

### 4.3. Valgu elektroforees

Valkude üleekspressiooni korral moodustub rakku tihti inklusioonkehasid. Inklusioonkehad tekivad valesti pakkunud ja välja sadenenud valkudest. Inklusioonis olevad valgud ei ole enamasti loomulikus konformatsioonis ning pole seetõttu bioloogiliselt aktiivsed (Tomson 2007:23). GFP-GST liitvalgu puhul tähendab see, et inklusioonis olevad valgud ei

fluorestseeru, või fluorestseeruvad märgatavalt väiksema intensiivsusega. Seetõttu ei ole neid fluorestsentsi mõõtmisel võimalik tuvastada ning mõõtmistulemused vihjavad ekslikult väiksemale ekspressiooni suurusele. Inklusioonis olevate valkude osakaalu tuvastamiseks viidi läbi valgu elektroforees, mille tulemused on esitatud joonisel 7.



Joonis 7. Totaalvalgu, inklusioonis oleva valgu ning lahustuva valgu elektroforees IPTG kontsentratsioonidel 0mM/l, 1mM/l ja 0,1mM/l. Allikas: Autori andmed

GST valgu suurus on ~26

kDa ning GFP valgu suurus ~33kDa, seega on liitvalgu suurus ~59kDa, mida on näha ka elektroforeesilt.

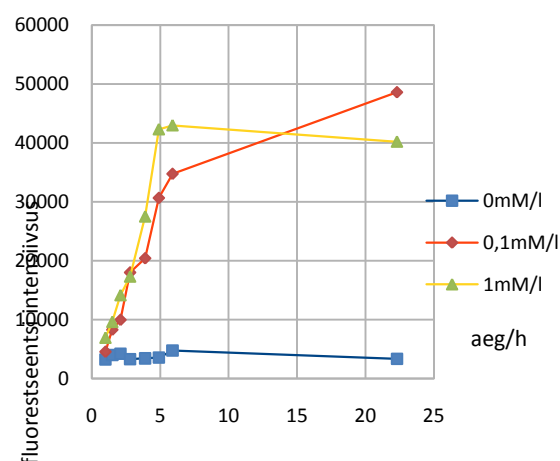
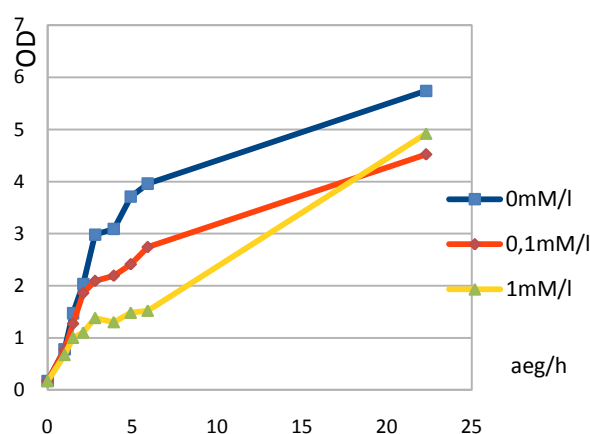
Kuigi tehtud elektroforees ei sobi täpseks kvantitatiivseks analüüsiks, võib andmetest järeldada, et 1mM/l IPTG kontsentratsiooniga kultuuris kogunes suur osa ekspresseeritavast valgust inklusioonkehadesse ning, et 0,1mM/l IPTG kontsentratsiooniga kultuuri inklusioonis oleva GFP-GST liitvalgu hulk oli väiksem 1mM/l kultuuri omast. Sellegipoolest leidis inklusioonkehi märkimisväärses koguses ka 0,1mM/l kultuuris. Arvestades asjaolu, et 0,1mM/l kontsentratsiooni kasutatakse tihti alampiiirina, ning et GFP-ga liidetud GST partnervalgu üheks omaduseks on lahustuvuse suurendamine, võib järeldada, et GFP lahustuvus on võrdlemisi madal.

GFP-GST liitvalku kasutatakse enamasti laborites teatud protsesside analüüsimisel, mille tõttu on soovitatav võimalikult täpsete mõõtmistulemuste saamiseks võimalikult väike inklusioonkehade arv. Ka sellel põhjusel tuleks GFP-GST liitvalgu ekspressiooni indutseerimisel kasutada 0,1mM/l või lähedast IPTG kontsentratsiooni. Siiski tuleks meeles pidada, et tõenäoliselt tekib inklusioonkehi ka madala IPTG kontsentratsiooniga kultuuridesse.

#### 4.4 Tulemused kultuuride kasvatamisel 22 tundi peale induktsiooni

Eelnevalt kirjeldatud mõõtmistulemustest on välja jäetud 22 tundi peale indutseerimist tehtud proovid. Selle põhjuseks on asjaolu, et mõõtmistulemusi hakkavad oluliselt mõjutama tegurid nagu toitainete (või mõne kindla aine) ja kanamütsiini sisaldus lahuses, mida peale indutseerimist juurde ei lisatud, samuti ka jääkainete kuhjumine. Pikaajalisel rekombinantse valgu tootmisel fermenteris varustatakse kultuuri olenevalt söötmissstrateegiast kindlate ajavahemike tagant toitainetega. (Tomson 2007:29).

Kanamütsiin inaktiveeritakse periplasmas aminoglükosiidid transferaaside poolt, mille tagajärjel väheneb kanamütsiini hulk meediumis (Ibid:15). Kanamütsiini puudumisel või liiga väikesel kontsentratsioonil kaob bakterikultuuridelt plasmidi soosiv selektiivne surve, mille tagajärjel hakkavad kiiremini paljunevad plasmiidita rakud võhama. Üldine toitainete või kindla aine puudus söötmes põhjustab valguproduktiooni languse ja proteolüüsi suurenemise toitainete ja energia saamise eesmärgil. Eelnimetatud põhjustel ei ole sellistest tingimustes

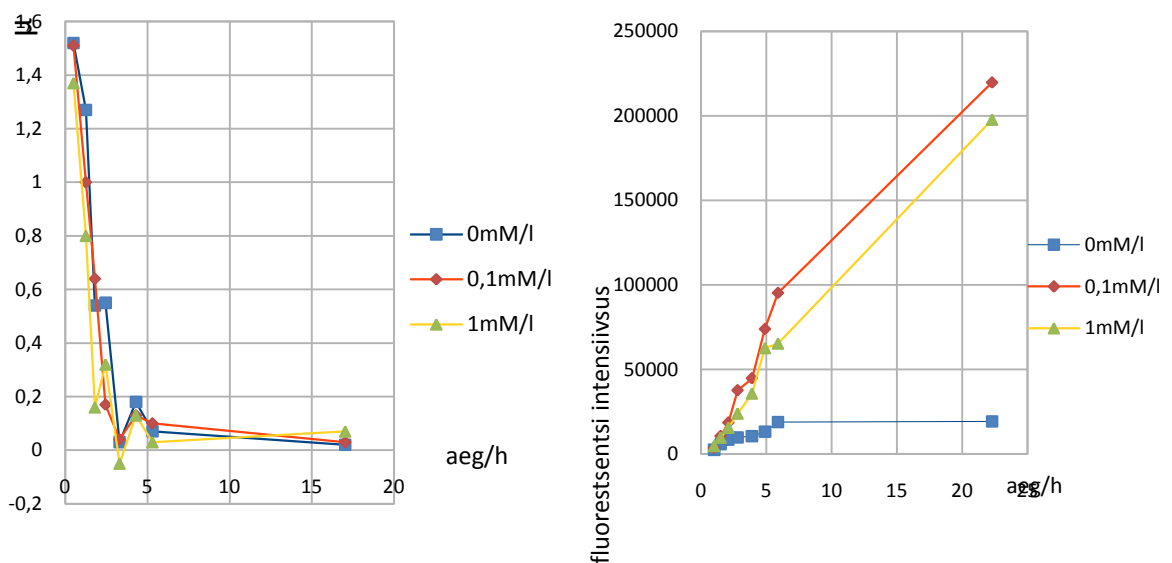


IPTG kontsentratsioon valguekspressioonil

enam määravaim tegur.

Mõõtmistulemused 22 tundi peale indutseerimist tehtud proovidega esitatud joonistel 8..11.

Mõnevõrra üllatav on tõsiasi, et 1mM/l kultuur oli 22 induktsioonitunnil suurema optilise tihedusega, kuid väiksema fluorestseerumise intensiivsusega, kui 0,1mM/l kultuur. Selle põhjuste üle võib lisaandmete puudumise tõttu vaid spekuloida. Nagu näeme jooniselt 8, ammendusid 1mM/l kultuuri ressursid esimesena, mille tulemusel sisenes ta statsionaarsesse faasi varem, siis sai aga lisaenergiat edasiseks kasvuks. Selle põhjus võib olla 1mM/l kultuuris olevates rohketes inklusioonkehades: nälgimise ajal suureneb proteolüüs, ning seda eriti just inklusioonkehadelt (Tomson 2007:26). Kuna 0,1mM/l kultuuris oli suurem osa rekombinantsest valgust bioloogiliselt aktiivne, oli selle lagundamise tase madalam, ja seetõttu ka saadava energia hulk väiksem, kui 1mM/l kultuuril.



## Kokkuvõte

Rekombinantse valgu loomise protsess on tänu paljudele erinevate võimalustega etappidele tihti mahukas ja aeganõudev, efektiivse ekspressiooni saavutamiseks tuleb välja selgitada selleks sobivaimad tingimused.

Esmalt on oluline ekspressioonivektori ja peremeesorganismi valik. Peremeesorganismi

valikul tuleb peamiselt arvestada ekspresseeritava valgu omadustega. Lihtsama struktuuriga valkude, mis vajavad vähe translatsioonijärgseid modifikatsioone, ekspresseerimisel on eelistatavaks peremeesorganismiks *Escherichia coli*. Töös on *E.coli*-t ning valguproduksiooniks disainitud tüve BL21(DE3)-e lähemalt tutvustatud.

Ekspressioonivektori valikul tuleb lähtuda sobivusest peremeesorganismiga, kuna valgu ekspresseerimisel moodustavad nad ühtse, terviku süsteemi. Valguekspressiooni intensiivsus ja kontrollitavus sõltuvad peamiselt ekspresioonivektori omadustest. Plasmiidi pET42 omadused on põhjustatud mitmete geneetiliste elementide, millest ekspresioonivektor koosneb, omadustest. Plasmiidi moodustavate geneetiliste elementide hulka kuulub teiste seas rekombinantse geeni promootor, millest sõltub ekspresseeritava geeni transkriptsiooni intensiivsus, replikatsiooni alguspunkt, mille omadustest sõltuvad ekspresioonivektori stabiilsus ja koopiate number rakus ning mõne antibiootikumi vastu resistentsust kodeeriv geen, mille tagajärjel tekib ekspresioonivektoriga rakke soosiv selektiivne surve. Järgmiseks sammuks on geeni klonimine ekspresioonivektorisse ning seejärel peremeesorganismi transformeerimine ekspresioonivektoriga. Protsesse on kirjeldatud teoreetilise osa teises peatükis.

Transformatsioonile järgnev valgusünteesi protsess pET42-BL21(DE3)-e ekspresioonisüsteemis põhineb mitmete erinevate süsteemide elementidel, mida looduses kasutavad metsikud tüved.

Ekspressioonisüsteemis sünteesitava valgu produktsiooni mõjutavad mitmed tegurid, mille hulka kuuluvad teiste seas toitainete hulk, hapniku kättesaadavus ja indutseerija kontsentratsioon. TTÜ Geenitehnoloogiainstituudis loodud GFP-GST liitvalgu ekspresioonisüsteemis oli vajalik kindlaks teha ekspresiooniks optimaalne indutseerija kogus. Selle määramine on käesoleva uurimistöö peamiseks eesmärgiks.

Eesmärgi täitmiseks viidi töö käigus läbi kaks eksperimenti. Kultuurides kasutatud IPTG kontsentratsioonid olid 0mM/l(ilma IPTG-ta), 0,1mM/l, mis on enimkasutatud madalaim kontsentratsioon, ning 1mM/l, mis on enimkasutatud kõrgeim kontsentratsioon. Esimeses eksperimendis mõõdeti erinevate IPTG kontsentratsioonidega kultuuride kasvukiirused ja fluorestseeruva GFP-GST liitvalgu kogused 22 tunni vältel. Teises eksperimendis mõõdeti erinevate IPTG kontsentratsioonidega kultuuride inklusioonis oleva GFP-GST liitvalgu kogused valgu elektroforeesi abil.

Kogutud andmed näitasid, et 0,1mM/l kontsentratsiooniga kultuuri GFP-GST liitvalgu

koguproduksioon oli suurem, ning inkluusioonis oleva valgus hulk väiksem, kui 1mM/l. Seetõttu on GST-GFP liitvalgus ekspressiooniks sobivaim 0,1mM/l või sellele lähedane IPTG kontsentratsioon, mida tuleks edasiste katsetega täpsustada.

## **Kasutatud materjalid**

1. Dale, J.-W., Park, S.-F. (2004) Molecular Genetics of Bacteria. Guildford: John Wiley & Sons, Inc
2. Foster, J.-W, Moat, A.-G., Spector, M.-P. (1991) Microbial Physiology. Fourth Edition.

New York: Wiley-Liss, Inc

3. Modern Microbial Genetics (2002). New York: Wiley-Liss, Inc

4. pET System Manual. (2003) Novagen kodulehekülg.

Kättesaadav:

<http://lifeserv.bgu.ac.il/wb/zarivach/media/protocols/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf>, 01.03.2011

5. Prokaryotic Expression: pET System Tutorial (2003) Novagen kodulehekülg. Kättesaadav:

<http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/Novagen/C183-001.PDF>, 01.03.2011

6. Tomson, K. (2007) Production of Labelled Recombinant Proteins in Fed-Batch Systems in *Escherichia coli*. Tallinn: TTÜ kirjastus

7. Mini-PROTEAN 3 Cell Instruction Manual. Biorad kodulehekülg. Kättesaadav:

<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006157B.pdf>, 28.02.2011

8. Chou, C.-P. (2007) Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*.

9. Glutathione-S-Transferases. Drug Metabolism kodulehekülg. Loetud:

<http://www.drugmetabolism.co.uk/gst.aspx>, 27.02.2011

10. Kaviraki, L.-E. Protein Folding. Loetud:

<http://cnx.org/content/m11467/latest/>, 27.02.2011

11. GFP-Green Fluorescent Protein. Loetud:

<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>, 27.02.2011

12. Berg, P., Baltimore, D., Brenner, S., Roblin, R.O. and Singeret, M.F. (1975) Summary statement of the Asilomar Conference on recombinant DNA molecules. Proceedings of the National Academy of Sciences kodulehekülg. Loetud:

[www.pnas.org/content/72/6/1981.full.pdf](http://www.pnas.org/content/72/6/1981.full.pdf) 28.02.2011

13. Entsüklopeedia Britannica. Britannica kodulehekülg. Loetud

<http://www.britannica.com/facts/5/463522/E-coli-as-discussed-in-bacteria>, 28.02.2011

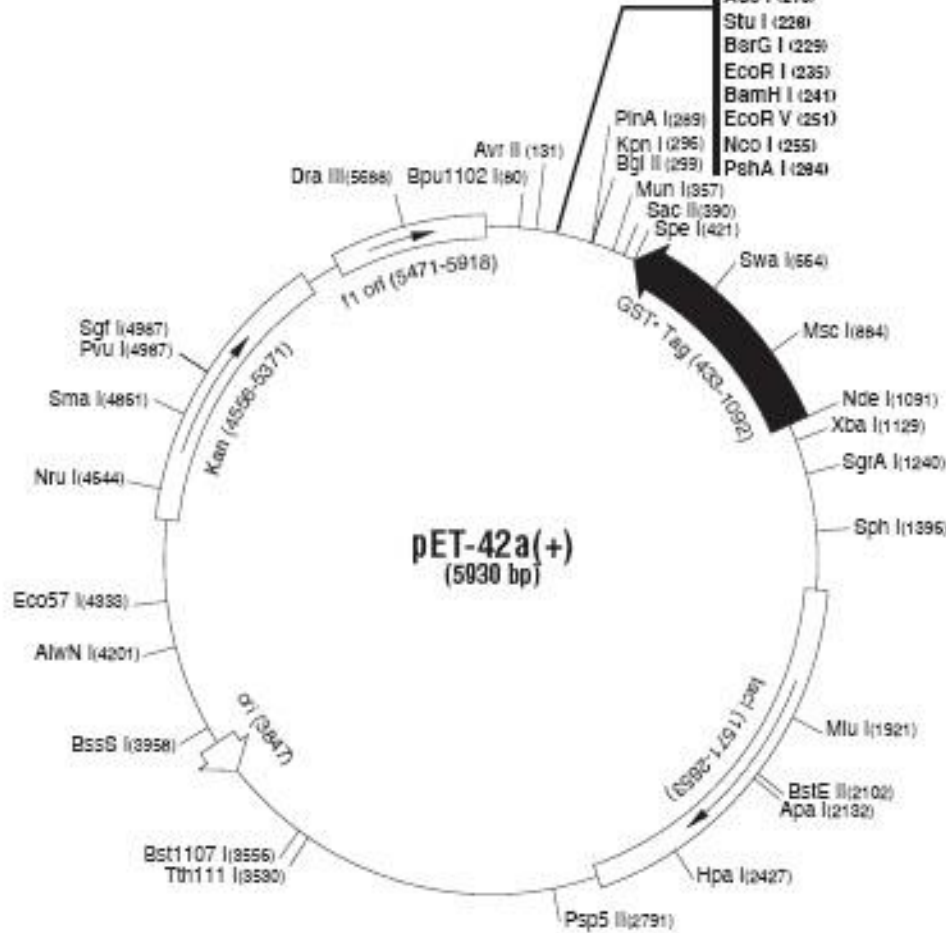
14. DNA Manipulation. DNA Interactive kodulehekülg. Kättesaadav:

<http://www.dnai.org/b/index.html> 01.03.2011

Lisa 1. pET 42 plasmidi mudel ja geneetilised elemendid



- Xho I (174)
- Eag I (182)
- Not I (182)
- Hind III (189)
- Sal I (195)
- Sac I (208)
- Pst I (214)
- SacI367 I (214)
- Aac I (218)
- Stu I (228)
- BsrG I (229)
- EcoR I (235)
- BamH I (241)
- EcoR V (251)
- Nco I (255)
- PstA I (294)
- PinA I (289)
- Kpn I (296)
- Bgl II (299)
- Mun I (357)
- Sac III (390)
- Spe I (421)



LISA 2. Kultuuride optilise tiheduse mõõtmistulemused, ajad ja lahjendused

Tabel 1. Erineva IPTG

Lisa 1. pET 42 plasmidi mudel koos sinna kuuluvate geneetiliste elementidega  
Allikas: pET Systems Manual 2003

kontsentratsiooniga kultuurid

e optiliste tiheduste mõõtmistulemused, ajad ja lahjendused.

Kuupäev Lahjendus	Kellaeg	Kolb1(0mM/l)	Kolb2(1mM/l)	Kolb3(0,1mM/l)		
12.02.2011	14.15	0,78	0,668	0,77	0	
	14.45	0,147		0,1	0,127	10x
	15.20	0,203		0,11	0,186	10x
	16.07	0,298		0,138	0,209	10x
	17.11	0,309		0,130	0,210	10x
	18.10	0,371		0,148	0,241	10x
	19.10	0,396		0,152	0,274	10x
13.02.2011	11.36	0,574	0,492	0,452	10x	

## Resümee

### **GST-GFP liitvalgu ekspressiooni sõltuvus IPTG kontsentratsioonist *Escherichia coli*'s**

GFP on tänu fluorestseerumisele oluline töövahend geenitehnoloogias. TTÜ Geenitehnoloogiainstituudis loodi GST-GFP liitvalgu tootmiseks ekspressioonisüsteem. Valgusünteesi efektiivsuse suurendamiseks oli vajalik leida optimaalne IPTG kontsentratsioon. Selle uurimistöö eesmärgiks oli kindlaks määrata optimaalne IPTG kontsentratsioon GFP-GST liitvalgu ekspressiooniks.

Uurimistöös kasutatud ekspressioonisüsteem koosnes ekspressioonivektorist pET42 ning peremeesorganism *E. coli* BL21(DE3)-st. Rekombinantset valku tootva ekspressioonisüsteemi loomiseks tuleb valitud geen kloneerida ekspressioonivektorisse ning seejärel transformeerida peremeesorganism geeni sisaldava ekspressioonivektoriga. Selleks, et muuta ekspressioon kontrollitavaks ning suurendada selle maksimaalset taset on loodud mitmeid vajalike omadustega ekspressioonivektoreid ja peremeesorganisme. Nende hulka kuuluvad ka pET42 ja BL21(DE3). Soovitud omaduste loomiseks on lisatud või muudetud mitmeid geneetilisi elemente, milleks pET42 puhul on näiteks T7 promootori kasutamine ning BL21(DE3)-e puhul puudulikuks muudetud *lon* ja *ompT* geenid. Ekspressiooni kontrollimiseks on käesoleva ekspressioonisüsteemi puhul kasutatud indutseerija IPTG-l põhinevat süsteemi. Ülevaade ekspressioonivektorite ja peremeesorganismide ehitusest ning nendega toimuvatest protsessidest on pET42 ja *E. coli* BL21(DE3)-e põhjal antud esimeses ja teises peatükis.

IPTG optimaalse kontsentratsiooni välja selgitamiseks mõõdeti erinevate IPTG

kontsentratsioonidega bakterikultuuride kasvukiirust ja valguproduksiooni. Kultuurides kasutati enimkasutatud madalaimat IPTG kontsentratsiooni 0,1mM/l ning enimkasutatud kõrgeimat IPTG kontsentratsiooni 1mM/l. Lisaks kasvukiirusele ja valguproduksioonile mõõdeti valguforeesi abil ka kultuurides tekkinud inklusioonkehade hulka.

Ekspriimentidest kogutud andmete põhjal selgus, et madalama IPTG kontsentratsiooniga kultuuri GFP-GST liitvalgu koguproduksioon ja kasvukiirus olid suuremad ning tekkinud inklusioonkehade hulk väiksem, kui 1mM/l kultuuril. Seetõttu tuleks eelistada 0,1mM/l või sellele lähedast kontsentratsiooni. Parima kontsentratsiooni leidmiseks tuleks siiski teostada edasisi katseid.

**ry**

### **Effect of IPTG concentration on GFP-GST fusion protein expression in *Escherichia coli***

GFP, due to fluorescent properties, is an important tool in genetechnology. In Tallinn University of Technology, expression system for production of GST-GFP fusion protein was created. Determining the optimal IPTG concentration was needed to maximise the efficiency of GST-GFP fusion protein production.

The purpose of this research is to determine the optimal IPTG concentration for GFP-GST fusion protein expression.

Expression system used in this research consisted of expression vector pET42 and host *E.coli* BL21(DE3). To create an expression system, the gene of interest is cloned into an expression vector. The expression vector containing the gene is then used to transform the host. In order to control the expression of the recombinant protein and increase it's maximum level, different expression vectors and hosts have been created. These include pET42 and BL21(DE3). To create the desired properties, many genetic elements have been added or modified. In the case of pET42 and BL21(DE3), these include, for example, T7 promoter in pET42 and defective *lon* and *ompT* genes in BL21(DE3). In the case of pET42 and BL21(DE3), the level of expression is controlled using IPTG based system. Expression vector, host and the processes involved in expressing recombinant protein is discussed in paragraph one and two.

In order to determine the optimal IPTG concentration, growth rate and GFP-GST fusion

protein production of bacterial cultures with different IPTG concentrations were measured. The concentrations used were the commonly used lowest-0,1mM/l and the commonly used highest-1mM/l. Additionally, amount of inclusion bodies in different cultures was also measured via protein electrophoresis.

The data received from experiments revealed that the total GST-GFP production and growth rate of 1mM/l culture were lower and the amount of inclusion bodies higher than that of the 0,1mM/l culture. These results lead to the conclusion that for GST-GFP production, the optimal IPTG concentration is 0,1mM/l close to 0,1mM/l. However, to find the best concentration, further testing is needed.