

Application of an Alternative Recombinant System for Chondroitin Sulfate Synthesis

Şebnem Erenler^a, Aygün Alıyeva^b, Esra Güçlü Ülke^c

^aArt and Science Faculty, ^bScience of Medical Biochemistry, ^cScience of Biotechnology,
Inonu Universty

Abstract

In this study, we aimed to derive Chondroitin Sulphate (CS), which has the opportunity to be used in osteoarthritis which is one of the major health problems of the ever increasing elder population in the world and in other health-related fields, from microbial sources at high purity using the recombinant strains transmitting the VHb/vgb system via safe biotechnological processes. The resources of animal origin such as cattle, pig, poultry and shark are used for the production of CS. However, the tendency for the production of CS based on alternative resources instead of animal resources has increased for many reasons. Nowadays, microbial production methods gain importance as a strong alternative to CS synthesis. Our study aimed to create a novel *E. coli* strain as a recombinant system which carry the common expression of genes by transforming the plasmids of both pUC8: 15, which carries the vgb gene, and pETM6-PACF, which carries the genes of *kfoA*, *kfoC*, *kfoF* which are responsible for chondroitin synthesis. For this purpose, firstly, the plasmids of both pUC8:15 and pETM6-PACF were transferred to the non-pathogenic *E. coli* strain and the presence of both plasmids was confirmed with colony PCR method. This situation was documented with gel photographs.

Key Words: Chondroitin, *vgb*, Biotechnology, Biomedical Applications

GİRİŞ

Çalışmamızda, dünya nüfusunun giderek yaşlanması ile artan osteoartrit tedavisinde ve pek çok medikal alanda kullanılan KS'nin bilinen hayvan kaynaklarından değil VHb/vgb sisteminin entegre edildiği rekombinant suşlar kullanılarak, güvenilir biyoteknolojik işlemler ile mikrobiyal kaynaklardan yüksek saflıkta elde edilmesi amaçlanmaktadır. Günümüzde KS için hayvansal kaynaklar yerine, yapay sentez ve alternatif kaynaklara dayalı üretime yönelim artmıştır. Yapay sentezlenen ürünlerin düşük dereceli özgünlükleri onları tartışmalı

kılmaktadır. Bu durum, KS sentezinde güçlü bir alternatif olan mikrobiyal üretim yöntemlerinin önemini arttırmaktadır [1]. Çalışmamızda, mikrobiyal KS üretiminde kullanım potansiyeli olan yeni bir rekombinant suş oluşturulması amaçlanmıştır.

Materyal Metod

Çalışmamız için ilk önce, pETM6-PACF plazmidi (Bu plazmid Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY'dan Mattheos Koffas 'dan temin edilmiştir) midi prep ile çoğaltılmıştır. Daha sonrada yeni rekombinant organizmada ifadesini amaçladığımız, bir diğer gen olan *vgb* genini taşıyan pUC8:15 plazmidi, *E.aerogenes* [pUC8:15] suşundan izole edilmiş ve çoğaltılmıştır.

Kompetan hücre oluşturulması

Kompetan hücre oluşturulması (hücresinin eksojen kaynaklı bir DNA molekülünü içine alması için yapılan işlem) standart CaCl_2 yöntemi [1] ile aşağıdaki protokol çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

Gece boyunca (15-18 saat) 37 °C 200 rpm'de kültürü yapılan hücrelerden 100 µl örnek (inokulum) alınarak 20 ml LB içeren erlenlere ekim yapılmış ve bu kültürler yine çalkalamalı şartlar (200 rpm) ve 37 °C'de OD₆₀₀ değeri yaklaşık 0.4-0.5 olana kadar inkübe edilmiştir.

1. Belirtilen optik yoğunluğa ulaşan kültürler bir buz kabına gömülerek 10 dk. bekletildikten sonra, soğutmalı (4°C) santrifüjde 14,000 rpm'de 4 dk. santrifüj edilmiştir.

2. Toplanan pelete 10 ml soğuk 0.1 M CaCl_2 eklenmiş ve 30 dk. buz üstünde tutulduktan sonra 4 °C, 14.000 rpm'de 4 dk. santrifüj edilmiştir.

3. Toplanan pelet 2 ml soğuk 0.1 M CaCl_2 içinde süspanse edilmiş ve transformasyon için hemen kullanılmıştır.

Hücrelerin Transformasyonu

E.coli 'ye pETM6-PACF ve pUC8:15 plazmidinin transformasyonu literatürdeki standart "ısı şoku" protokolüne göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır [1].

- İki farklı bakteriye ait kompetan hücreler için ayrı ayrı uygulanan işlemde: Hücre ve CaCl_2 süspansiyonundan 200 µl ependorf tüplerine alınmış ve buz üstünde 5 dk. inkübe edilmiştir.

- Süspansiyonun üzerine 0.1-1 µg DNA içeren 1-10 µl DNA solüsyonu eklenmiş ve buzda 30 dk. bekletilmiştir.
- Tüpler 42 °C'deki bir su banyosuna alınarak 50 sn. tutulmuş ve sonra tekrar buza gömülerek 2 dk. bekletilmiştir.
- Tüpler 800 µl LB eklenerek hafifçe çalkalandıktan sonra 37 °C'de 30-90 dk. inkübe edilmiştir.
- Amfisilin (100 µg/ml) içeren agar petri kaplarında inkübasyonları sağlanmıştır.

Daha sonra Rekombinant klonlar seçilip, sonuçlar koloni PCR yöntemi ile sorgulanmıştır: Bu amaçla, standard PCR şartlarında çalışılmıştır ve agaroz jel elektroforezi ile görüntüleme yapılmıştır.

Agaroz Jel Elektroforezi

Uygun restriksiyon enzimleri ile muamele görmüş kaynaktan (*E.coli*) gelen pETM6-PACF ve pUC8:15 plazmidleri için agaroz jel elektroforezi ayrı jellerde standart metotlar kullanılarak yapılmıştır. Jel hazırlama ve yürütme tamponu 5X stok TBE tamponunun 1X'e dilüe edilmiş halinden oluşmaktadır (1 litre 5X stok TBE tamponu: 54 g Tris baz (pH 8.3), 27.5 g borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)). Jellerin hazırlanması ve yürütülmesi genel olarak aşağıdaki protokole göre uygulanmıştır [2].

a) Jeller için 50 ml 1X TBE tamponuna % 1.5 (w/v) agaroz ilave edilmiş ve mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyip solüsyon berraklaşınca kadar kaynatılmıştır. Solüsyon ısısı 60-70 °C düşünce 10 mg/ml etidyum bromid stok solüsyonundan 30 µl eklenerek hava kabarcığı veya köpürme olmayacak şekilde hafifçe karışması sağlanmıştır.

b) Temiz ve kuru bir jel döküm kalıbına, tarak dişlerini kapatacak kalınlıkta yukarıdaki jel solüsyonundan dökülmüş ve yaklaşık 20 dk. beklenmiştir.

c) Jel, döküm kalıbı ile beraber jel yürütme tankı içine alınarak taraklar çıkarılmış ve jeli yaklaşık 0.5 cm kapatacak miktarda jel yürütme tamponu tanka doldurulmuştur.

d) Restriksiyon enzimi ile muamele görmüş plazmid DNA'sı ve kromozomal (PaJC) DNA ve yine uygun restriksiyon enzimleri ile önceden kesilmiş lambda (λ) DNA'sı uygun kuyucuklara eklenerek sabit voltaj (40-50 Volt) ve akımda (20-25 mA) jeller elektroforeze tabi tutulmuşlardır.

e) Jellerdeki DNA bantlaşma motifi UV ışıktaki floresan ışık yayan Etidyum bromid ile belirlenmiştir. Bu boyanın DNA'ya bağlanarak (interkalasyon) 300 nm UV ışık altında

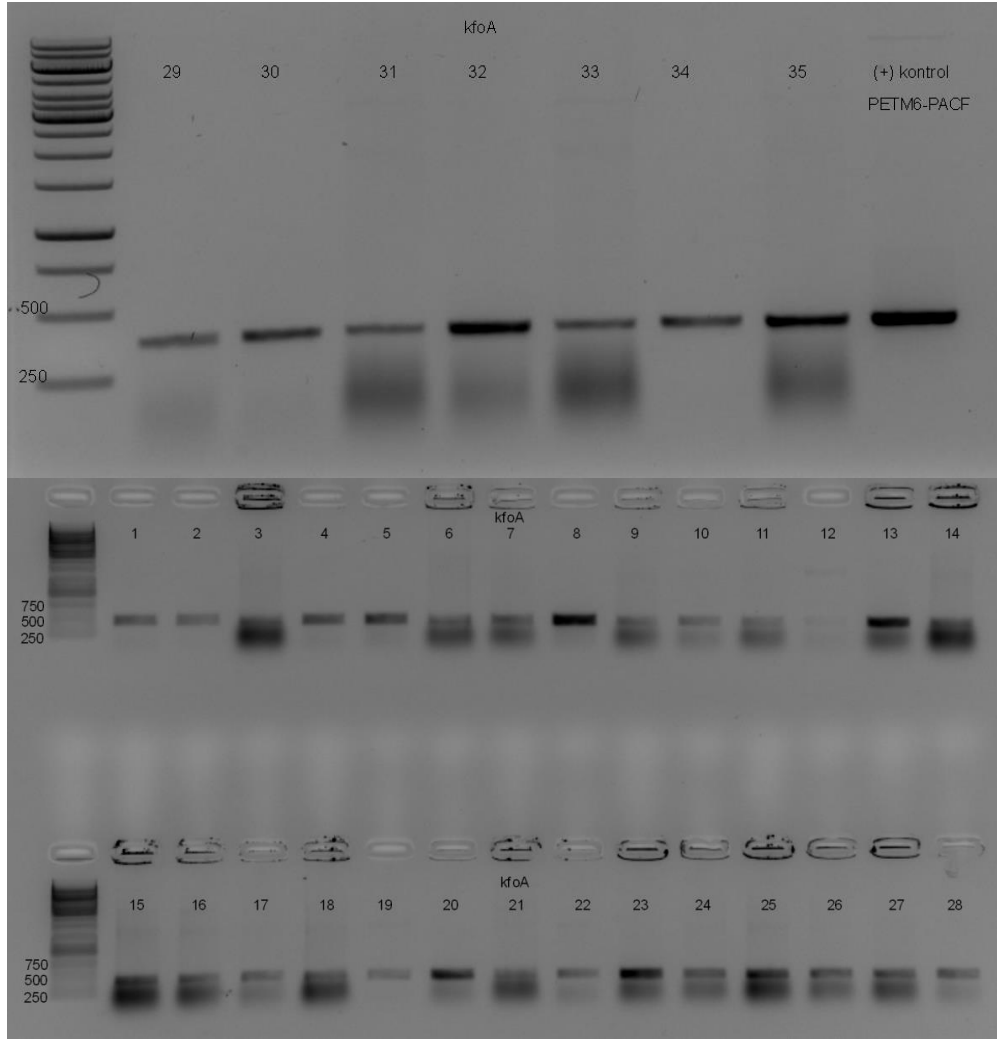
emisiyonu (ışık yayması) DNA bantlarının bulundukları pozisyonlarda görünmelerini ve fotoğraflanmalarını mümkün kılmıştır.

f) Yukarıdaki şekilde hazırlanan jellerin fotoğrafları çekilmiştir [2].

Tartışma

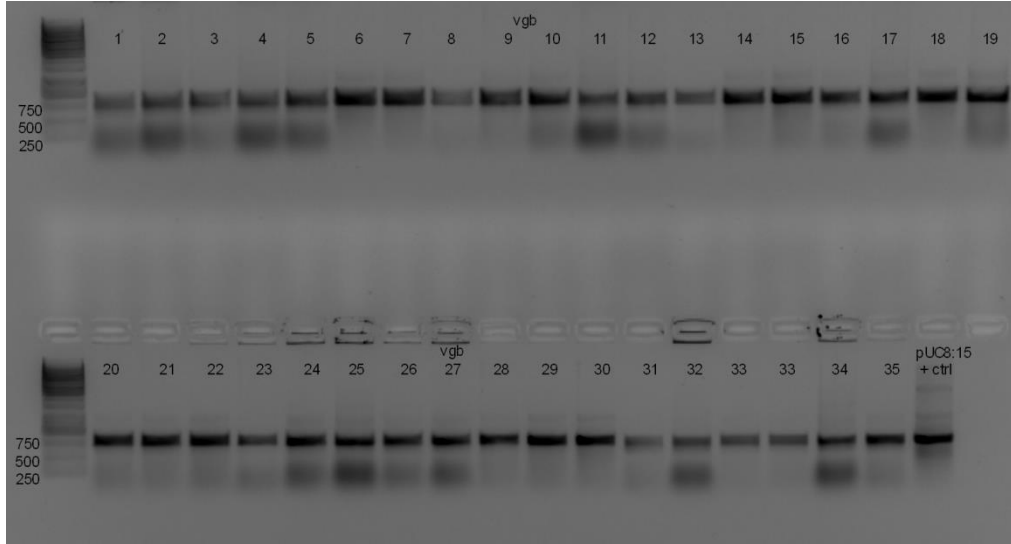
E.coli nin Transformasyon Sonrası Jel Görüntüleri:

pETM6-PACF



(+) ktrl ile aynı boyda band görülen kolonilerde ilgili plazmidin varlığı pozitif olarak belirlenmiştir.

pUC8:15



(+) ktrl ile aynı boyda bant görülen kolonilerde ilgili plazmidin varlığı pozitif olarak belirlenmiştir.

Elde edilen jellerdeki bant yapıları yorumlandığında her iki plazmidinde belirtilen *E. coli* suşuna başarı ile transforme edildiği kanıtlanmış ve kondroitin sentezi için potansiyel kaynak olma özelliğine sahip, kondroitin sentezinden sorumlu *kfoA*, *kfoC*, *kfoF* genlerini taşıyan pETM6-PACF plazmidini ve *vgb* genini taşıyan pUC8:15 plazmidinin ikisinin de yeni suştaki varlığı kanıtlanmıştır.

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 215S861 Proje nolu proje kapsamında desteklenmektedir.

Referanslar

- [1] Wenqin He , Lİ Fu, Guoyun Lİ, Andrew Jones, Robert J. Linhardt, Matteheos Koffas. Production of chondroitin in metabolically engineered *E.coli*. Metab Eng. 2015 Jan;27:92-100.
- [2] Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambork, J. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY.