



Siyan (mavi) Floresan Protein Aquamarine'nin Biyoreaktörde Üretilmesi ve Saflaştırılması

Hülya Kuduğ Ceylan ^{1*}, Rizvan İmamoğlu ², İsa Gökçe ¹

¹ Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Tokat, Türkiye (ORCID ^{1*}: 0000-0003-0365-2760, ORCID¹ 0000-0002-5023-9947)

² Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Bartın, Türkiye (ORCID: 0000-0002-6306-4760)

(İlk Geliş Tarihi 18 Aralık 2019 ve Kabul Tarihi 29 Şubat 2020)

(DOI: 10.31590/ejosat.660492)

ATIF/REFERENCE: Ceylan, H. K., İmamoğlu, R., Gökçe, İ. (2020). Siyan (mavi) Floresan Proteininin Biyoreaktörde Üretilmesi ve Saflaştırılması. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (18), 300-305.

Öz

Aquamarine proteini siyan (mavi) floresan protein ailesinin bir üyesi olup ve *Aequorea victoria*'dan elde edilen GFP (yeşil floresan protein) türevi floresan bir proteindir. Aquamarine benzeri floresan proteinler genetik mühendisliği teknikleri ile geliştirilmiş özellikleri sayesinde canlı hücrelerin biyolojik olarak görüntülenmesi ve hücre içerisinde lokalizasyon çalışmaları için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada *Escherichia coli* BL21(AI) hücreleri pROEX Aqua plasmid DNA'sı ile transforme edilmiş ve %0.04 konsantrasyonda arabinoz ilavesi ile protein ekspresyonu indüklenmiştir. 3L kültür hacimli biyoreaktörde yüksek ekspresyon seviyesinde üretilen Histidin etiketli hedef protein Ni⁺² afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan protein konsantrasyonu bir litre bakteri kültürü için 80 mg olarak belirlenmiştir. Rekombinant Aquamarine'ne ait fotoluminesans özellikler florometre ile analiz edilmiştir. SDS-PAGE analizi rekombinant Aquamarine proteine ait tek bir bandın olduğunu ve saflaştırılan proteinin ileri çalışmalarda kullanılmak üzere yüksek verimde ve saflıkta (>%95) elde edildiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Aquamarine, Siyan (mavi) Floresan Proteini, GFP, *E. coli*, Rekombinant Protein

Production of Cyan (blue) Fluorescent Protein Aquamarine in a Bioreactor and Purification

Abstract

Aquamarine is a member of the cyan fluorescent protein (CFP) protein family and is a GFP (green fluorescent protein) derived fluorescent protein from *Aequorea victoria*. Aquamarine-like fluorescence proteins are often used for biological imaging and localization studies of living cells due to their properties developed by genetic engineering techniques. In this study, *Escherichia coli* BL21 (AI) cells were transformed with pROEX Aqua plasmid DNA and protein expression was induced by the addition of arabinose at a concentration of 0.04%. Histidine-labeled target protein produced at high expression levels in the bioreactor that has 3L culture volume was purified by Ni⁺² affinity chromatography. About 80 mg of the purified protein was yielded per liter of bacterial culture. The photoluminescence properties of the Aquamarine were analyzed by fluorimeter. SDS-PAGE analysis shows a single band corresponding to the recombinant Aquamarine that was obtained high yield and purity (>95%) for further studies.

Keywords: Aquamarine, Cyan Fluorescent Protein, GFP, *E. coli*, Recombinant Protein

* Sorumlu Yazar: Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Tokat, Türkiye, ORCID: 0000-0003-0365-2760, hlykudug@gmail.com

1. Giriş

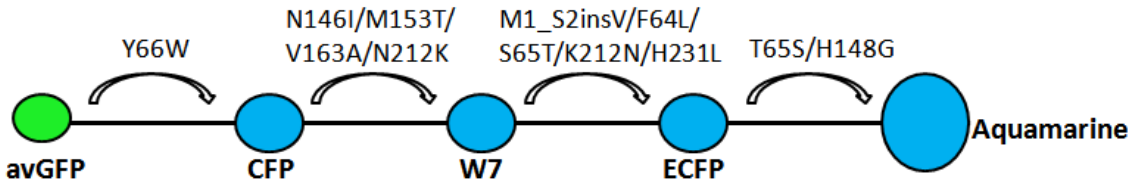
Floresan Proteinler (FP) ilk olarak *Aequorea victoria* denizanası türüne ait Yeşil Floresan Protein (GFP)'in keşfedilmesi ile ortaya çıkmıştır ve günümüzde canlı sistemlerin organizasyon ve işlevlerini incelemek için çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. GFP ultraviyole ışığa maruz kaldığında parlak yeşil floresan özellik gösteren 238 amino asite sahip 27 kDa molekül ağırlığında bir proteindir (Tsien, 1998). GFP'nin amino asit dizisi aydınlatıldıktan sonra bilim insanları GFP'nin fiziksel ve biyokimyasal özelliklerini mutagenез yoluyla geliştirerek yeni FP varyantları elde etmişlerdir. Örneğin Tsien ve arkadaşları (1995) GFP'nin floresan yoğunluğunu ve fotostabilitesini arttıran S65T nokta mutasyonunu gerçekleştirmiştir. Daha sonra GFP'nin çok sayıda mutantları geliştirilerek mavi, turkuaz ve sarı gibi farklı floresan proteinler tanımlanmıştır (Pascual ve ark., 1999, Shaner ve ark, 2005).

A. victoria'ya ait GFP ve Anthozoa mercanlarından elde edilen floresan homologları hücrelerin ve dokuların *in vivo* görüntülenmesi için paha biçilmez araçlar haline gelmiştir. Spektral ve kromofor farklılıklara rağmen GFP benzeri protein ailesinin yaklaşık 100 klonlanmış üyesi ortak yapısal, biyokimyasal ve fotofiziksel özelliklere sahiptir (Verkhusha ve Lukyanov, 2004). GFP benzeri proteinler yüksek stabilite ve yardımcı kofaktörler veya substrat olmadan kromofor oluşturma yeteneklerinden dolayı yaygın olarak floresan markörler olarak kullanılmaktadır (Wilcox ve Hirshkowitz, 2015). Hüresel ve moleküler biyolojide, GFP geni, sıklıkla bir ekspresyon raportörü olarak tercih edilmektedir (Phillips, 2001). Ayrıca biyosensör geliştirmek amacıyla modifiye floresan proteinler kullanılmaktadır. 2008 yılında Nobel Komitesi GFP ile elde edilen başarılarından dolayı Osamu Shimomura, Marty Chalfie ve Roger Tsien'i Kimya Nobel Ödülü'ne layık görmüştür.

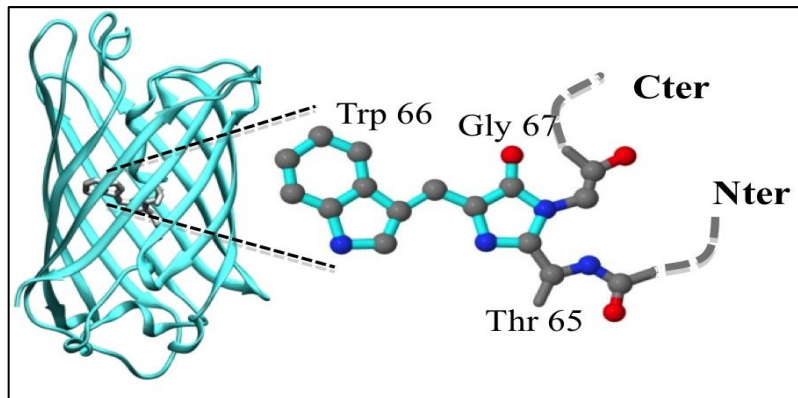
Siyan (mavi) floresan proteinleri (cyan fluorescent protein-CFP) *A. victoria*'dan elde edilen GFP'nin yapısında yapılan çeşitli mutasyonlar sonucunda geliştirilmiş floresan protein grubudur (Park, Kang ve Yoon, 2016) (Şekil 1). CFP türevlerinde kritik mutasyon, kromoforun fenol bileşeninden ziyade bir indol ile oluşmasına neden olan Y66W mutasyonudur (Sawano ve Miyawaki, 2000). Bu mutasyon, kromoforun merkezinde bulunan aminoasitlerden biri olan tirozinin triptofana mutasyonu sonucu, emilim tepe noktasının mavi renge kaymasına neden olur" şeklinde yazılmasının daha doğru olacağı düşünülmektedir. (Goedhart ve ark., 2012).

CFP türleri lokalizasyon ve floresan rezonans enerji transferi bazı etkileşim çalışmalarında kullanılmaktadır (Chudakov, Lukyanov ve Lukyanov, 2005). Förster rezonans enerji transferi (FRET) ile floresan proteinlere dayalı biyokimyasal görüntüleme teknikleri, canlı hücrelerde belirli kimyasal aktiviteleri ve moleküler etkileşimleri izlemek için biyolojik, farmakolojik ve klinik araştırmalarda yer almaktadır. CFP'ler canlı hücre görüntülemesinde FRET donörleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Mérola ve diğerleri, 2014).

Aquamarine proteini 27 kDa ağırlığında *A. victoria* GFP (avGFP) kökenli ve mutant ECFP'nin T65S ve H148G mutasyonu ile elde edilmiş CFP ailesine ait bir floresan proteindir (Şekil 1) (Erard ve ark., 2013). Aquamarine 430 nm uyarılma, 474 nm ışımaya değerlerine sahiptir (Şekil 2). Bu mutasyonlar kromofor boşluğundaki rijitliğin geri kazanılmasına ve ana zincir yapısının bozulmadan korunmasına katkı sağlar. Aquamarine ayrıca pH değeri 4 ila 10 arasında değişmeyen floresan özellikleriyle olağanüstü bir pH stabilitesine sahiptir ve çevresel etkilere düşük duyarlılık gösterir. Farklı memeli hücre sistemlerinde etkin ve parlak ekspresyon sağlamanın yanısıra uzun floresan ömrü ile hücre içi lokasyon ve füzyon çalışmalarına uygun özelliklere sahiptir. Erard ve arkadaşları (2013) canlı hücrelerin görüntülenmesinde Aquamarine'nin Yellow Fluorescent Protein (YFP) ile birlikte güvenilir bir FRET donörü olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.



Şekil 1. *A. victoria* GFP'nin Aquamarine floresan proteinine mutasyonu (<https://www.fpbse.org/protein/aquamarine/>)



Şekil 2: Aquamarine proteininin yapısı ve kromofor bölgesi (<http://www.lcp.u-psud.fr/spip.php?rubrique143&lang=fr>)

Escherichia coli (*E. coli*), rekombinant proteinlerin üretiminde iyi karakterize edilmiş bir sistem olduğu için en çok tercih edilen konakçı organizma olarak bilinmektedir (Choi ve ark., 2006). *E. coli* ekspresyon sistemi düşük maliyetli, yüksek ekspresyon seviyesi, e-ISSN: 2148-2683

kolay büyütme, kısa sürede ürün elde edilmesinden dolayı oldukça avantajlı bir sistemdir (Rosano ve Ceccarelli, 2014). Günümüzde birçok protein rekombinant DNA teknolojisi ile *E. coli* suşları kullanılarak üretilmektedir. Farklı CFP varyantlarının TOP10 *E. coli* hücrelerinde Histidin etiketli olarak üretimi ve saflaştırılması üzerine mevcut çalışmalar bulunmaktadır (Alvarez ve ark., 2010). Bu çalışmada *E. coli* pBAD ekspresyon sistemi kullanılarak Aquamarine floresan proteininin rekombinant olarak üretilmesi, saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Suşlar ve besiyeri

Plazmit DNA'nın çoğaltılması için *E. coli* DH5 α , rekombinant protein üretiminde konukçu organizma olarak ise *E. coli* BL21 (AI) suşu kullanılmıştır. *E. coli* hücrelerinin geliştirilmesi ve plazmit DNA içeren hücrelerin seçilimi için ampisilin (100 μ g/ml) içeren LB (Luria-Bertani) (%1 tripton, %0.5 maya ekstraktı ve %1 NaCl) besiyeri kullanılmıştır.

2.2. Rekombinant ekspresyon vektörü

Aquamarine floresan proteininin ekspresyonu için Fabienne Merola (2013) tarafından oluşturulan pROEX Aqua (Addgene plazmid # 42889) isimli plazmit kullanılmıştır. 717 bp büyüklüğündeki Aquamarine kodlayan gen amino ucunda altı adet histidin ile plazmit içine kodlanmış olarak temin edilmiştir. Rekombinant plazmitin *E. coli* DH5 α hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiş ve plazmit DNA EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kiti (Biobasic) kullanılarak saflaştırılmıştır.

2.3. Aquamarine ekspresyonu ve biyoreaktörde üretimi

Rekombinant pROEX Aqua plazmidini kimyasal olarak kompetent hale getirilmiş *E. coli* BL21 (AI) hücrelerine ısı şoku yöntemi ile transfer edilmiştir. Transforme hücreler ampisilin (100 μ g/ml) içeren LB agar plakalara ekilerek 37°C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Katı besiyerinden tek koloni elde edilmiş ve bu koloniler antibiyotik içeren 5 ml LB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir ve çalkalayıcıda gece boyunca 37°C ve 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Gece kültürünün 1 ml'si 1:1 oranında %30 (w/v) steril gliserol çözeltisi ile karıştırılarak stok kültür hazırlanmıştır ve -80°C'de saklanmıştır. Kalan kültür 5000 rpm'de santrifüj edilerek elde edilen hücre peleti steril LB ile süspansiyon edilmiştir. Kültür 50 ml LB besiyerine 1:100 oranında inoküle edilmiş ve yukarıda belirtilen kültür şartlarında gece boyunca hücreler yetiştirilmiştir. Büyük ölçekli Aquamarine üretimi, 5L çalışma hacmine sahip "Sartorius Biostat®A plus" biyoreaktöründe gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktörde 3L LB (100 μ g/mL ampisilin ve köpük kırıcı olarak %1 zeytinyağı), besiyerine başlangıç OD600 değeri 0.1 olacak şekilde gece boyu gelişen kültürden aşılanmıştır. Biyoreaktörde üretim boyunca pH, sıcaklık, oksijen konsantrasyonu ve karıştırma hızı gibi kültür koşulları biyoreaktör otomasyon sistemi ile sabit tutulmuştur. Kültür ortamının pH dengesi 5M NaOH ilavesiyle (pH 7.0) sağlanmıştır. Değişen karıştırma hızı (500-2000 rpm) ve reaktöre oksijen beslemesi ile çözünmüş oksijen konsantrasyonu (DO) %30 doygunlukta sabit tutulmuştur. Hücre konsantrasyonunun optik yoğunluğu spektrofotometrik olarak 600 nm'de ölçülmüştür. Sıcaklık probu ile 37°C'de hücre yoğunluğu OD600 değeri yaklaşık 2.0 değerine ulaştığında pBAD promotörü indükleyicisi arabinozun %0.04 konsantrasyonda ilavesi ile Aquamarine ekspresyonu indüklenmiştir. 5 saat indüklenme sonrasında hücreler +4°C'de 5000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek hasat edilmiştir.

2.4. Rekombinant Aquamarine'nin saflaştırılması

3L *E. coli* kültürününün santrifüj edilmesi ardından elde edilen hücre pelleti 100 mL lizis tamponu ile (100 mM sodyumfosfat, 100 mM NaCl, pH 7.0) süspansiyon edilmiştir. Hücreler buz banyosunda 2 saat boyunca (15 sn aralıklı 10 döngü, %90 amplitüd) sonikatör ile parçalanmıştır. 8000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile parçalanmamış hücreler pelet şeklinde ayrılmıştır ve tekrar kısa süreli parçalamaya tabi tutulmuştur. +4°C'de 30000 rpm'de bir saat ultrasantrifügasyon sonrasında çözünür protein çözeltisi elde edilmiştir.

Hedef proteinin N-terminal ucundaki 6 adet histidin aminoasiti proteinin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasını sağlamaktadır. Saflaştırma öncesinde 10 mL Ni-NTA kolon dolgu maddesi, 5 kolon hacmindeki yıkama tamponu (100 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.8) ile dengeye getirilmiştir. Ultrasantrifüj sonrası elde edilen süpernatant denge halindeki kolona eklenerek histidin etiketli hedef proteinin kolona tutunması sağlanmıştır. Diğer proteinlerin kolondan uzaklaştırılması amacı ile kolon 10 kolon hacmindeki yıkama tamponu 1 (100 mM sodyum fosfat, 100 mM NaCl, 10 mM imidazol pH 7.8) ve yıkama tamponu 2 (100 mM sodyum fosfat, 100 mM NaCl) yıkanmıştır. Kolona bağlanan Aquamarine, elüsyon tamponu (100 mM sodyum fosfat, 100 mM NaCl, 300 mM imidazol, pH 7.8) ile kolondan elüe edilmiştir. 1'er mL'lik fraksiyonlar halinde elde edilen elüsyon örneklerinin bir kısmı kalitatif analiz için kullanılmıştır. Saflaştırılmış Aquamarine protein çözeltisinden imidazolün uzaklaştırılması amacı ile +4°C'de diyaliz tamponunda (20 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 7.8) gece boyunca diyaliz gerçekleştirilmiştir.

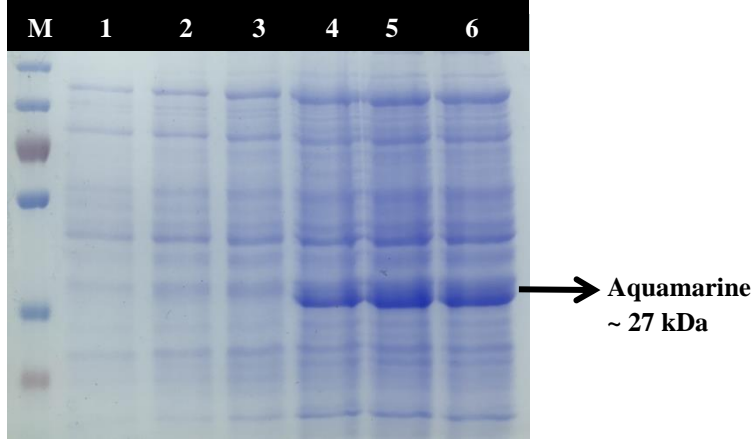
2.5. Protein analizi

Saflaştırılmış Aquamarine protein örneğinin kalitatif analizi Laemmli (1970) yöntemi esas alınarak SDS-PAGE ile gerçekleştirilmiştir. Saf protein 1X numune tamponu ile karıştırılarak 95°C'de 3 dakika denatüre edilmiş ve jelle yüklemeye hazır hale getirilmiştir. %12'lik denatüre SDS-PAGE'ye ile ayrılan proteinler coomassie brilliant blue (Ambresco, ABD) boya çözeltisi ile 1 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde boyanmıştır. 1 saat boya uzaklaştırma çözeltisi ve saf suda çalkalanarak jelden fazla boya uzaklaştırılmıştır. Protein konsantrasyonu belirlemek amacı ile UV-VIS spektrofotometrede (Varian Cary® 50) saf protein örneğinin 280 nm'de absorbans değeri ölçülmüştür. Saflaştırılmış Aquamarine'nin soğurum ve fotolimünesans özelliklerinin belirlenmesinde florimetre (PTI Quanta Master™) kullanılmıştır. Saf protein çözeltisi diyaliz tampon çözeltisi ile seyreltilerek belirli dalga boyu aralığında ölçümler alınarak soğurum, uyarılma ve emisyon grafikleri elde edilmiştir.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

3.1. Transforme hücrelerin seçilimi ve biyoreaktörde protein üretimi

717 bç büyüklüğünde floresan protein Aquamarine kodlayan geni taşıyan pROEX Aqua plazmidi ticari olarak temin edilmiştir. Plazmidin *E. coli* BL21 (AI) hücrelerine transformasyonu yapıldıktan sonra ampisilin içeren LB agar plakalarda inkübasyon sonrası ertesi gün koloni oluşumu gözlenmiştir. Plakalar UV ışığı altında incelendiğinde transforme hücrelerin siyan (mavi) renk ışına vererek transforme olmayan hücrelerden seçilimi sağlanmıştır. Siyan (mavi) renkteki koloniler önce deney tüpü (5 mL) daha sonra erlenlerde (50 mL) LB besiyerinde yetiştirilmiştir ve protein üretimi amacı ile 3L besiyerini içeren biyoreaktöre inoküle edilmiştir. Rekombinant Aquamarine ekspresyonu arabinoz ile indüklenebilen araBAD promotorunun kontrolünde gerçekleştirilmiştir. 2.0 OD600 hücre yoğunluğuna ulaşan biyoreaktör kültürü %0.04 arabinoz ile indüklenmiştir. 5 saat indüklemenin ardından OD600 yaklaşık 12.0 değerine ulaşmıştır. Oksijen konsantrasyonunun ve pH'nın sabit değerlerde tutulduğu biyoreaktörde üretim esnasında belirli aralıklarda reaktörden örnekler alınarak bu örneklerin SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Şekil 3).

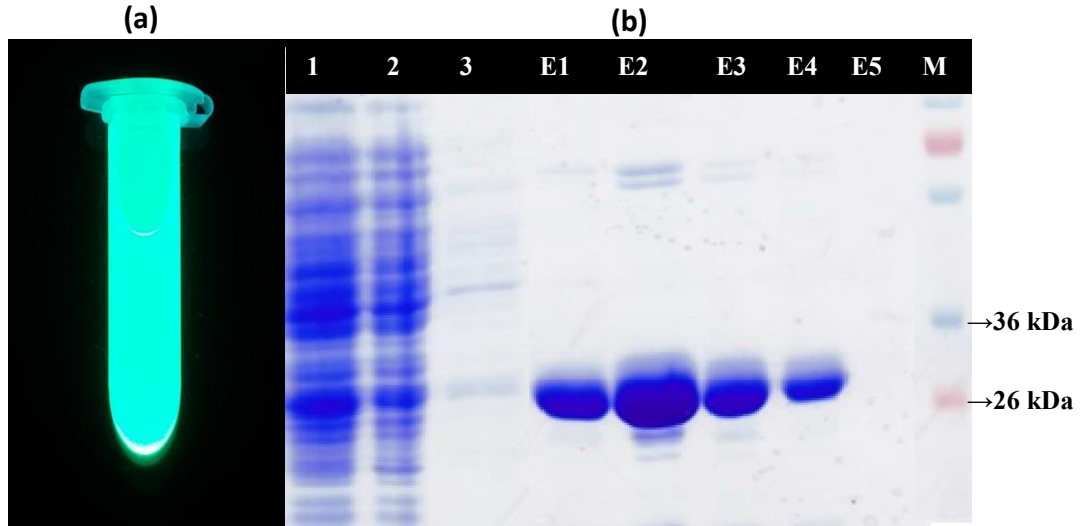


Şekil 3. İndükleme sonrası protein ekspresyonunun SDS-PAGE analizi görüntüsü. M. Protein markörü 1-6: indükleme sonrasında sırasıyla 1. ve 6. saatler arasındaki hücre lizati örnekleri

Şekil 3'te görüldüğü gibi 3. saatten 6. saate doğru 27 kDa boyutunda protein bandının yoğunluğundaki artış protein üretiminin zamanla arttığını göstermektedir. Protein üretimi 3. saatten sonra artarak 5. saatin sonunda en yüksek seviyeye ulaşmıştır. İndüksiyon sonunda elde edilen hücre süspansiyonu ve ardından elde edilen hücre pelletinin Aquamarine proteinine ait rengi aldığı gözlemlenmiştir.

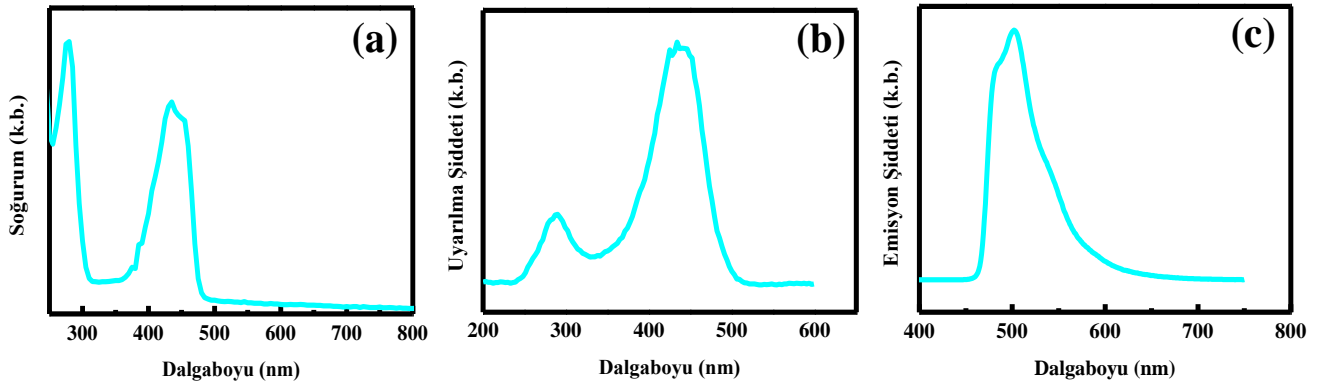
3.2. Aquamarine saflaştırılması ve analizi

Hücre içerisinde eksprese edilen rekombinant protein sonikasyon ile parçalanarak hücre lizati elde edilmiştir. Sonikasyon sırasında gözlemlenen sıcaklık artışına protein denatürasyonuna neden olmaması amacıyla buz banyosunda gerçekleştirilmiştir. Lizatin ultrasantrifüj sonrasında süpernetant kısmı afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Histidin etiketli proteinin Ni-NTA resinine bağlanması kolonun proteine ait siyan (mavi) rengi alması ile anlaşılabilir. 300 mM imidazol içeren elüsyon tamponu ile elüsyon işlemi 1'er mL'lik 5 adet fraksiyonlar şeklinde (E1, 2, 3, 4 ve 5) gerçekleştirilmiştir (Şekil 4). Protein eldesinin ilk fraksiyon ile başladığı ve 4. fraksiyonda sona erdiği %12'lik SDS-PAGE jel görüntüsünde görülmektedir. 1. kuyucuğa yüklenen ultrasantrifüj sonrası örneği beklendiği gibi *E. coli* hücre içi proteinleri ile birlikte hedef Aquamarine proteinini de içermektedir. 2. kuyucukta protein çözültüsü kolona yüklendikten sonra kolonun aşağısından alınan fraksiyonun görüntüsünde ise Aquamarine protein bandının hiç olmaması beklendiği halde az yoğunlukta görülmektedir. Bu durum hedef proteinin konsantrasyonunun yüksek olması ve bu yüzden kolonun aşırı yüklenmesinden kaynaklanmaktadır. Bu fraksiyon çözültüsünün renksiz olması gerekirken siyan (mavi) renkte olması aşırı yüklenmiş kolon fikrini desteklemektedir. Aynı sebepten dolayı 3. kuyucuktaki yıkama fraksiyonunda da çok az yoğunlukta Aquamarine bandı görülmektedir. İlk elüsyon çözültüsünün (E1) en yüksek protein bandına sahip olması gerekirken E2'deki protein bandından daha az yoğunlukta olması ise kolondaki kalmış olan az miktar yıkama çözültüsünün 1. fraksiyondaki protein konsantrasyonunu düşürmesi olarak açıklanabilir. 4. elüsyon fraksiyonunun sonrasında saflaştırmanın tamamlanmış olması E5'te hiçbir Aquamarine protein bandının olmaması ile desteklenmektedir.



Şekil 4. Safleştirilmiş Aquamarine floresan proteini ve SDS-PAGE analizi a) Saf proteinin UV ışığı altındaki görüntüsü. b) SDS-PAGE analizi görüntüsü. 1. Ultrasontrifüj sonrası süpernatant örneği 2. Süpernatant kolona tatbik edildikten sonra kolondan alınan fraksiyon 3. 30 mM imidazol ile yıkama E1, E2, E3, E4, E5 imidazol ile kolondan elüe edilen protein örneği fraksiyonları M. Protein markörü

Elüsyon örnekleri birleştirilerek çalışmadan elde edilen protein miktarı 280 nm’de spektrofotometrik ölçüm ile belirlenmiştir. Sonuç olarak biyoreaktörde üretim sonrası yaklaşık 80 mg/L protein üretilmiştir. Safleştirilmiş floresan proteinin fotoluminesans özellikleri florimetre ile ölçülmüş, soğurum, uyarılma ve emisyon grafikleri elde edilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Aquamarine floresan proteine ait (a) soğurum (b) uyarılma (c) emisyon grafiği

Aquamarine tarafından soğurum 279-440 nm, uyarılma 240-436 nm emisyon ise 502 nm’de gerçekleşmektedir (Erard ve ark., 2013). Bu değerler dikkate alındığında Aquamarine’nin floresan özellikte olup güneş spektrumundaki görünür ışığın (400-700 nm) bu protein tarafından kolaylıkla soğurulabileceği görülmektedir. Bu durum, Aquamarine’nin güneş pillerinde boyar madde olarak kullanılacak bir floresan protein çeşidi olduğunu desteklemektedir. Bunun yanında uyarılma ve emisyon değerleri literatürdeki değerler ile uyumludur (Rizzo ve ark., 2004).

4. Sonuç

Floresan proteinler in vivo görüntüleme gibi biyolojik bilimlerin farklı uygulama alanlarında kullanılan, çalışılması kolay, çevre dostu ve pratik biyolojik araçlar haline gelmişlerdir. GFP ve varyantları, farklı hücre, doku veya organizmaların çok renkli olarak etiketlemesi amacıyla yaygın olarak kullanılır. GFP ile gerçekleştirilen başarılı çalışmalar sonrasında floresan proteinlere olan ilgi artmış ve floresan özelliğe sahip farklı organizmalardan yeni floresan proteinler keşfedilmiştir. Biyomedikal alanda kanser taraması, tümörün izlenmesi ve kanserin fotodinamik tedavisi gibi klinik, klinik öncesi veya terapötik çalışmalarda floresan proteinlerin farklı uygulamaları bulunmaktadır. Farklı çalışma alanlarında uygulanabilirliği yüksek FP’lerin yüksek verimlilikte üretimi rekombinant DNA teknolojisi ile başarılabilir. Bu çalışmada *E. coli* konucusu kullanılarak yüksek saflıkta ve 80 mg/L verimlilikte saf Aquamarine floresan protein eldesi sağlanmıştır. Ticari olarak mikrogram seviyelerinde yüksek fiyatlarda temin edilen Aquamarine gibi pazar değeri yüksek proteinlerin biyoreaktörde üretimi bu proteinler ile yapılacak biyoteknolojik çalışmalar için model oluşturacaktır. Füzyon halde olmayan saf FP’ler karakterizasyon çalışmalarında kullanılabilirliği gibi güneş pillerinde boyarmadde olarak, farklı proteinler ile füzyon çalışmalarında ya da bu protein üzerinde yapılacak olan mutagenез çalışmalarında kontrol grubu olarak kullanılabilir özelliktedir.

Geliştirilmiş hücre içi stabilitesi ve parlaklık gibi özelliklere sahip Aquamarine benzeri floresan proteinler hedef bir protein ile füzyon halinde üretildiği takdirde hücre içi subselüler lokasyonların belirlenmesinde, hücre, doku ve nükleik asitlerin etiketlenmesinde kullanılabilir. Ayrıca belirli karakteristik olgunlaşma sürelerine sahip olması bu proteinlerin hücre içinde gerçekleşen biyolojik süreçlerinin sürelerinin araştırılmasına olarak sağlamaktadır. FP'lerin sahip olduğu fotoağarma (photobleaching) özellikleri hedef proteinin canlı hücre içerisindeki hareketliliğini tahmin etmek ve aynı zamanda dış faktörlerin hareketlilik üzerindeki etkisini araştırmak için kullanılabilir.

Teşekkür

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için verdiği mali destekten dolayı (Proje No: 114Z956) Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederiz.

Kaynakça

- Alvarez, L., Levin, C. H., Merola, F., Bizouarn, T., Pasquier, H., Baciou, L., Rusconi, F., Erard, M. (2010). Are the fluorescent properties of the cyan fluorescent protein sensitive to conditions of oxidative stress? *Photochem Photobiol*, 86(1), 55–61.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., Tsien, R. Y., (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 7877–7882.
- Choi, J. H., Keum, K. C., Lee, S. Y. (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 876–885.
- Chudakov, D. M., Lukyanov, S., Lukyanov, K. A. (2005). Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends in Biotechnology*, 23(12), 605–613.
- Erard, M., Fredj, A., Pasquier, H., Beltolngar, D. B., Bousmah, Y., Derrien, V., Merola, F. (2013). Minimum set of mutations needed to optimize cyan fluorescent proteins for live cell imaging. *Molecular BioSystems*, 9(2), 258–267.
- Goedhart, J., Von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M. A., Royant, A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nature Communications*, 3, 751.
- Heim, R., Cubitt, A., Tsien, R. (1995). Improved green fluorescence. *Nature*, 373(6516), 663-664.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Mérola, F., Fredj, A., Betolngar, D. B., Ziegler, C., Erard, M., Pasquier, H. (2014). Newly engineered cyan fluorescent proteins with enhanced performances for live cell FRET imaging. *Biotechnology Journal*, 9(2), 180–191.
- Park, S. W., Kang, S., Yoon, T. S. (2016). Crystal structure of the cyan fluorescent protein Cerulean-S175G. *Acta Crystallographica Section:F Structural Biology Communications*, 72, 516–522.
- Pascual, A., García, I., Ballesta, S., Perea, E. J. (1999). Uptake and intracellular activity of moxifloxacin in human neutrophils and tissue-cultured epithelial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(1), 12–15.
- Phillips, G. J. (2001). Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiology Letters*, 204(1), 9–18.
- Rizzo, M. A., Granada, B., Piston, D. W. (2004). An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nature Biotechnology*, 20, 445-449.
- Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–17.
- Sawano, A., Miyawaki, A. (2000). Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucleic Acids Research*, 28(16), e78.
- Shaner N. C., Steinbach, P. A., Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2(12), 905-909.
- Shemiakina, I. I., Ermakova, G. V., Cranfill, P. J., Baird, M. A., Evans, R. A., Souslova, E. A., Staroverov, D. B., Gorokhovatsky, A. Y., Putintseva, E. V., Gorodnicheva, T. V., Chepurnykh, T. V., Strukova, L., Lukyanov, S., Zaraisky, A. G., Davidson, M. W., Chudakov, D. M., Shcherbo, D. (2012). A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity. *Nature Communications*, 3(1), 1204.
- Tsien, R. Y. (1998). The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), 509–544
- Verkhusha, V. V., Lukyanov, K. A. (2004). The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nature Biotechnology*, 22(3), 289–296.
- Wilcox, T., Hirshkowitz, A. (2015). The effect of color priming on infant brain and behavior. *NIH Public Access*, 85(1), 302-313.