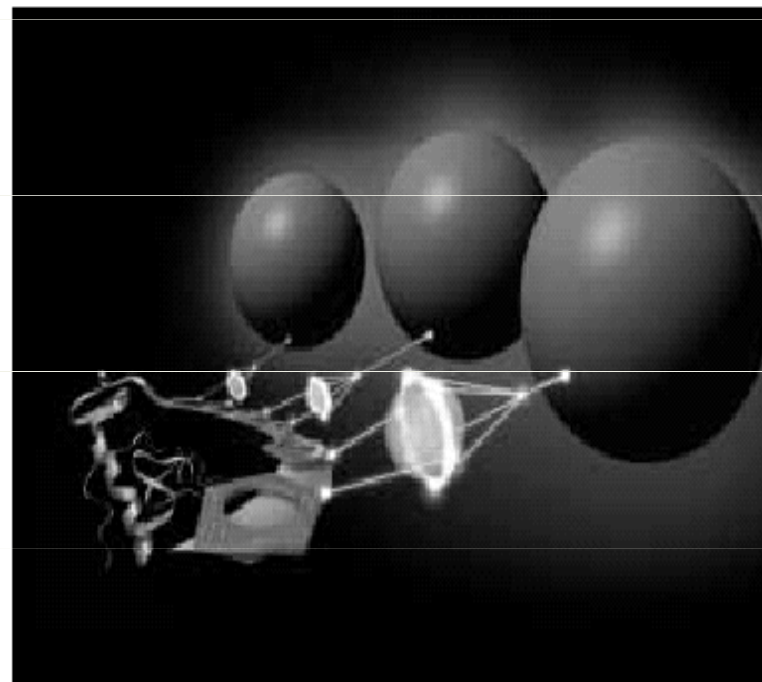
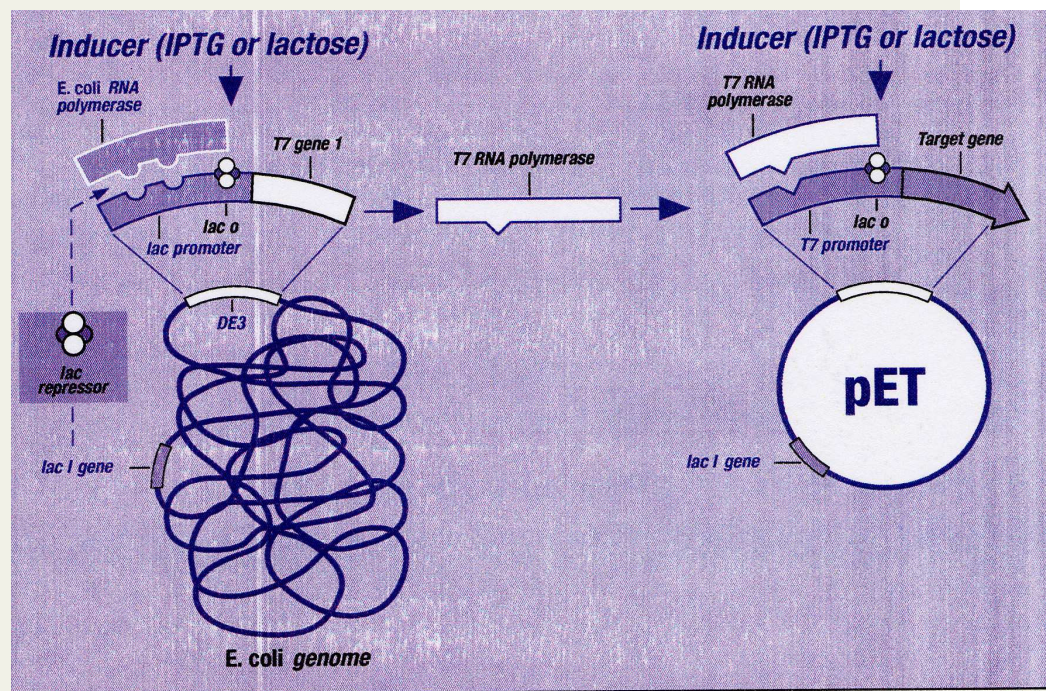
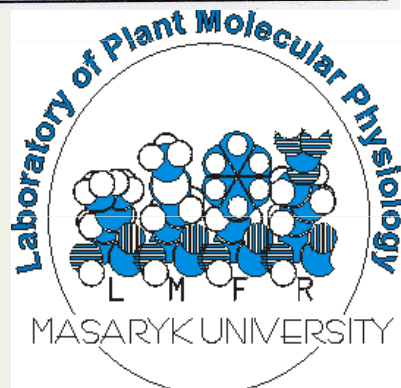


Expresa a purifikace rekombinantních proteinů



Radka Dopitová, 2009



Rekombinantní proteiny

Rekombinantní DNA je arteficiální DNA sekvence, která vznikla novou kombinací různých DNA sekvencí.

Rekombinantní proteiny jsou proteiny získané vnesením rekombinantní DNA do heterologního hostitele (mikroorganismus, kvasinky), ve kterém dojde k produkci genu.

Využití rekombinantních proteinů

Nadprodukce a purifikace rekombinantních proteinů jsou nezbytným předpokladem pro:

- biochemickou funkční charakteristiku proteinu** (určení přesných kinetických parametrů K_m , k_{cat} pro enzymy se substrátem, K_i pro enzymy s inhibítorem, K_d pro protein protein interakce či ligand protein interakce)
- **strukturní analýzu** (NMR, krystalografie)
- v průmyslovém měřítku jsou produkovány léky, vakcíny a potravinové doplňky**

Cíl: vysoký výtěžek homogenního proteinu
zachování biologické aktivity

Proč vyrábět rekombinantní proteiny?

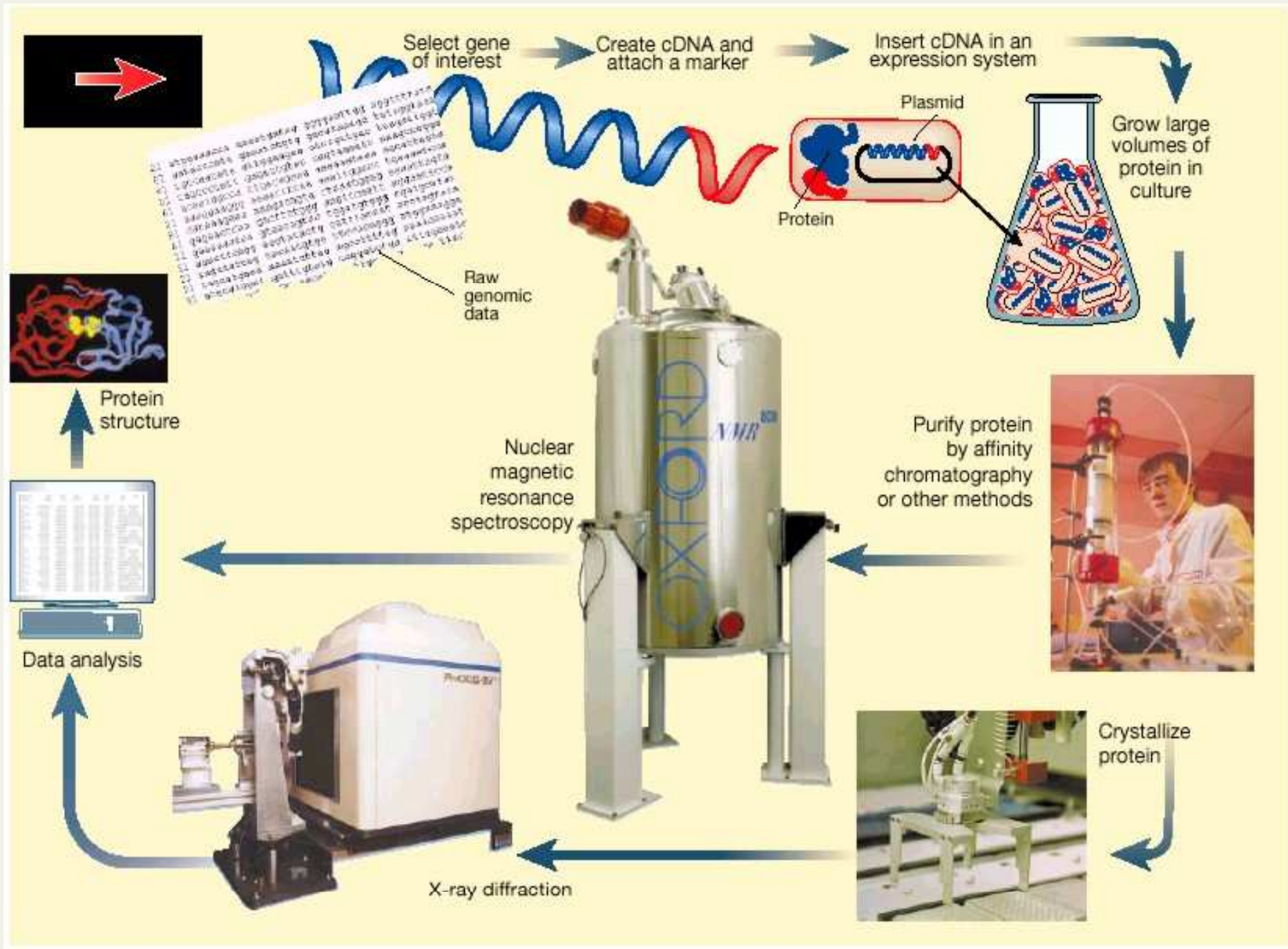
Přirozený zdroj:

- Obtížně získatelný – tkáně, orgány
- Obtížně kultivovatelný – bakterie, viry
- Limitovaná exprese v přirozeném zdroji

Výběr hostitelského organismu pro expresi rekombinantních proteinů

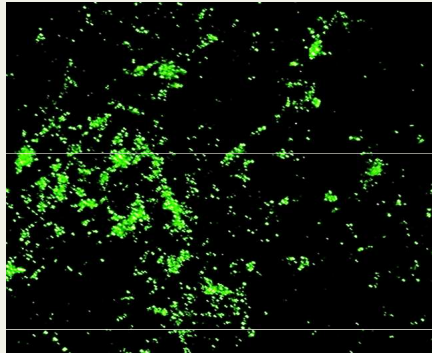
- Bakterie
- Kvasinky
- Rostliny
- Savčí buňky
- Hmyzí buňky s bakuloviry
- Transgenní živočichové

- In vitro translace



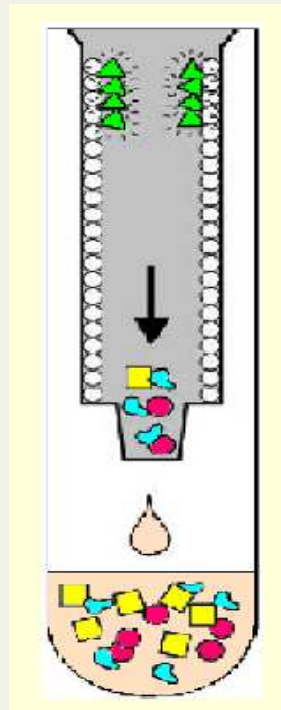
Obsah přednášky

1. část: Expresa rekombinantních proteinů v *E.coli*



Expresa GF fúzovaných proteinů v *E. coli*

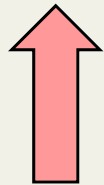
2. část: Purifikace rekombinantních proteinů



Purifikace GFP fúzovaných proteinů pomocí hydrofóbní matrice

Produkce heterologních proteinů v *E. Coli*

VÝHODY :



- vysoká produkce rekombinantních proteinů
- dobře prostudovaný genom a proteom-usnadnění genových manipulací
- design řady vektorů usnadňuje klonování a expresi cizích genů
- rychlý růst v poměrně levném médiu
- přizpůsobivost systému

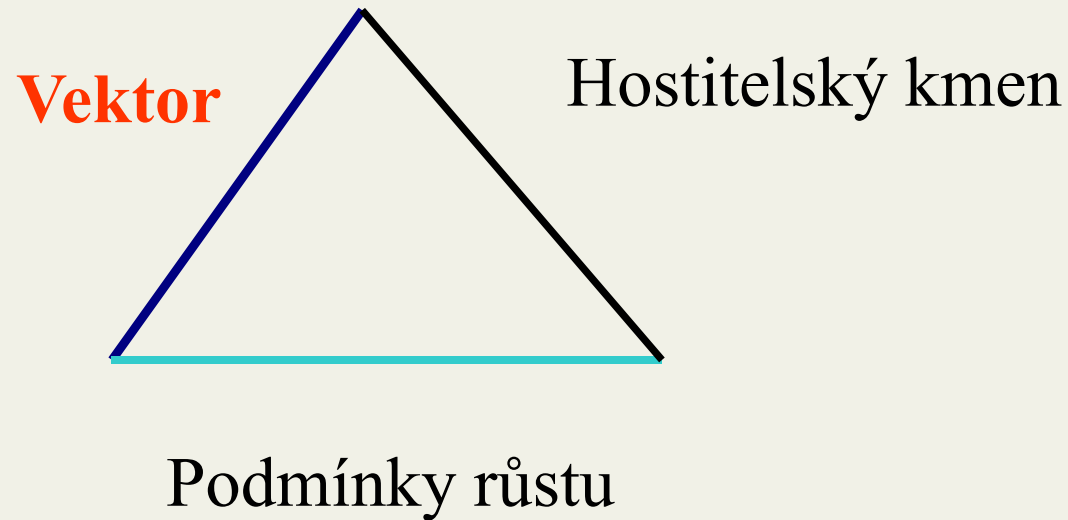
Produkce heterologních proteinů v *E. Coli*

NEVÝHODY:

- potřeba cDNA zkoumaného proteinu
- absence eukaryotických posttranslačních systémů (posttranslační modifikace)
- tvorba nerozpustných inkluzních tělísek
- chybí sekreční mechanismus pro účinné uvolňování proteinu do kultivačního média
- omezená schopnost tvorby disulfidických vazeb

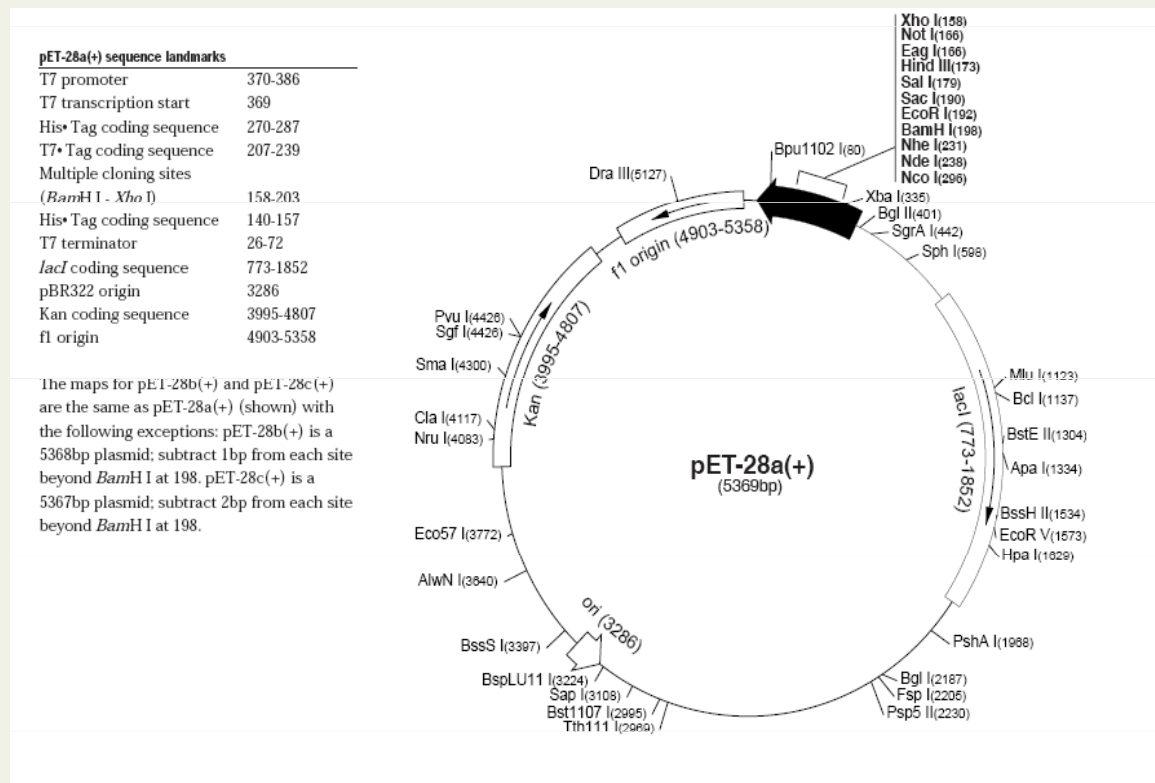


Expresní systém pro produkci rekombinantních proteinů v *E.coli*



Expresní vektor

= klonovací vektor, který obsahuje nezbytné regulační sekvence k tomu, aby podporoval expresi inzertů cizích genů.

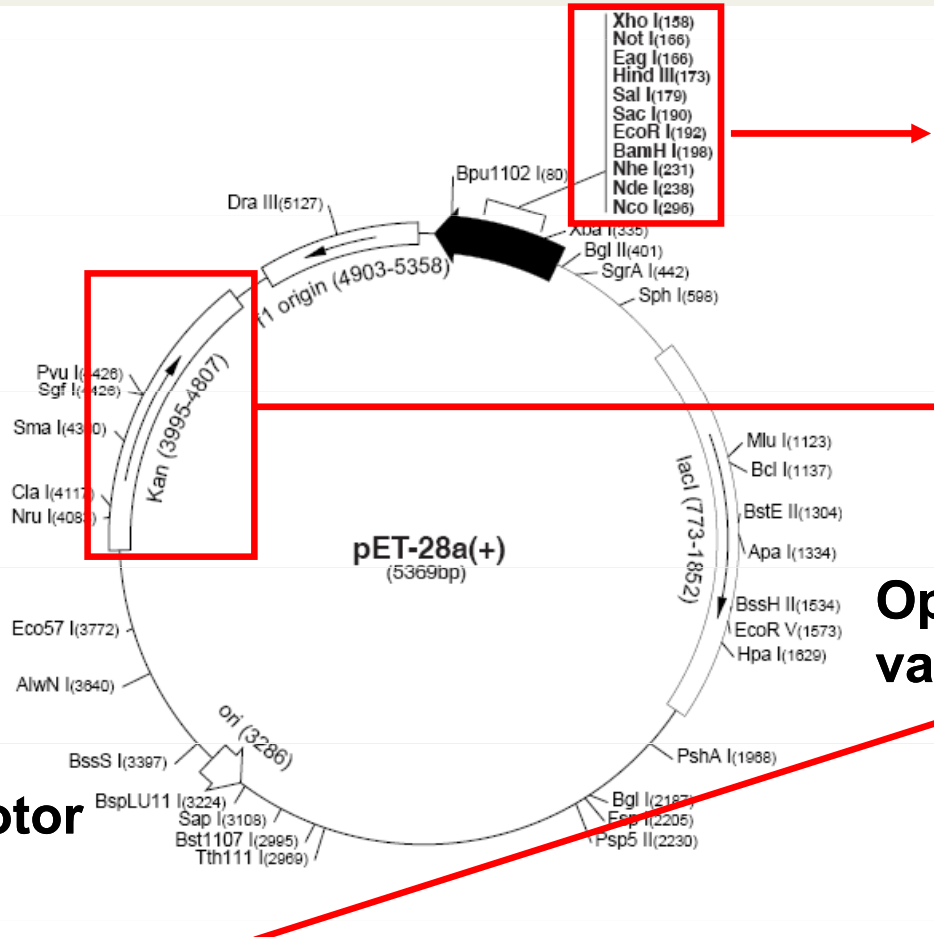


Struktura vektoru pro efektivní expresi rekombinantních proteinů v *E.coli*

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His* Tag coding sequence	270-287
T7* Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His* Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
fl origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



Klonovací místo

Gen pro rezistenci k antibiotiku

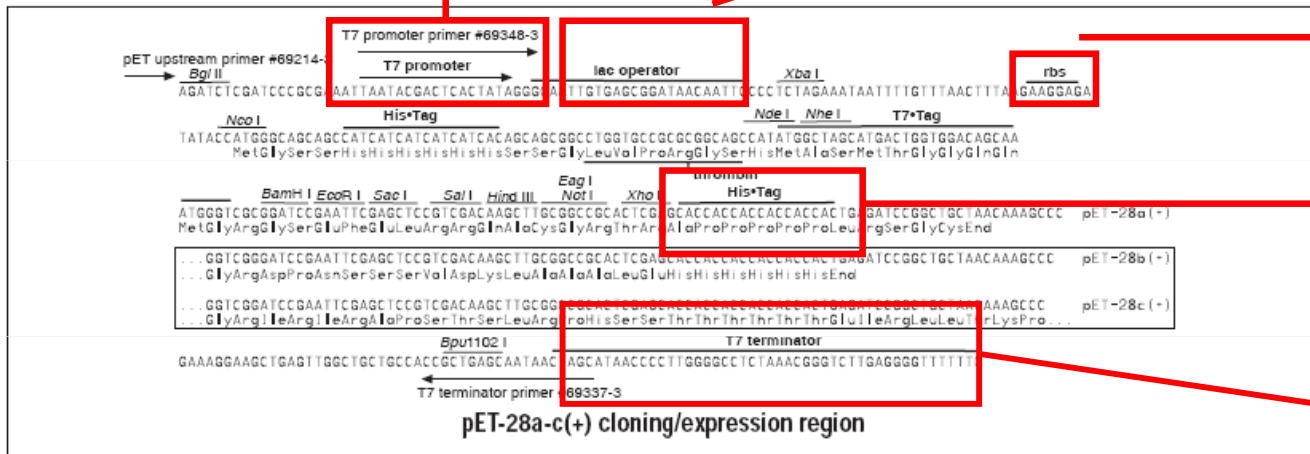
Operátor vazebné místo pro represor

promotor

Ribozom-vazebné místo

Fúzní/purifikační značka/kotva (6xHis tag)

Transkripční terminátor

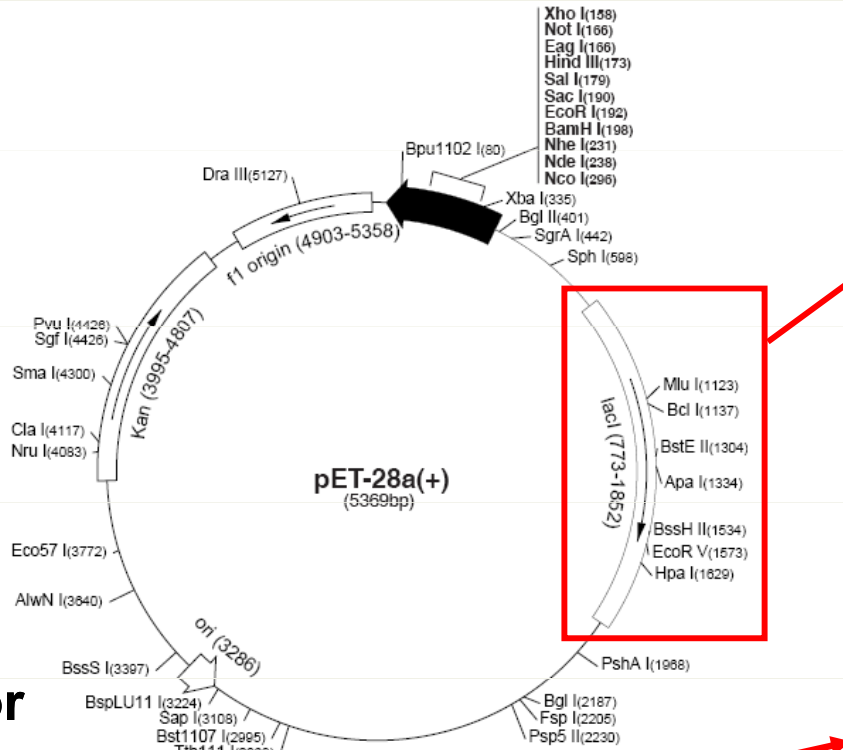


Struktura vektoru pro efektivní expresi rekombinantních proteinů v *E.coli*

pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His* Tag coding sequence	270-287
T7* Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His* Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

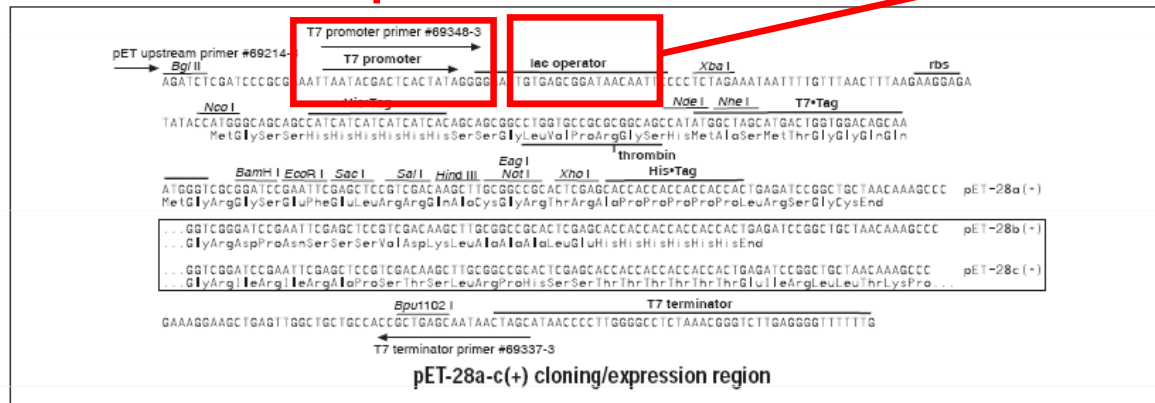
The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



Gen pro lac I repressor

promotor

Operátor vazebné místo pro repressor



Vlastnosti promotoru:

- silný promotor (ptac, ptrp, λ pL, pT₇)

(protein zájmu by měl tvořit 10-30% a více z celkového bakteriálního proteinu)

- přenositelný do různých E.coli kmenů

- vykazuje minimální hladinu bazální exprese

- pokud jsou proteiny netoxické dosahuje se vysokých výtěžků proteinů růstem buněk do vysokých hustot s následnou indukcí aktivity promotoru

- u toxických proteinů pro je nutná stringentní regulace promotoru

- jednoduchá a levná inducibilita

-teplotní (λ pL)

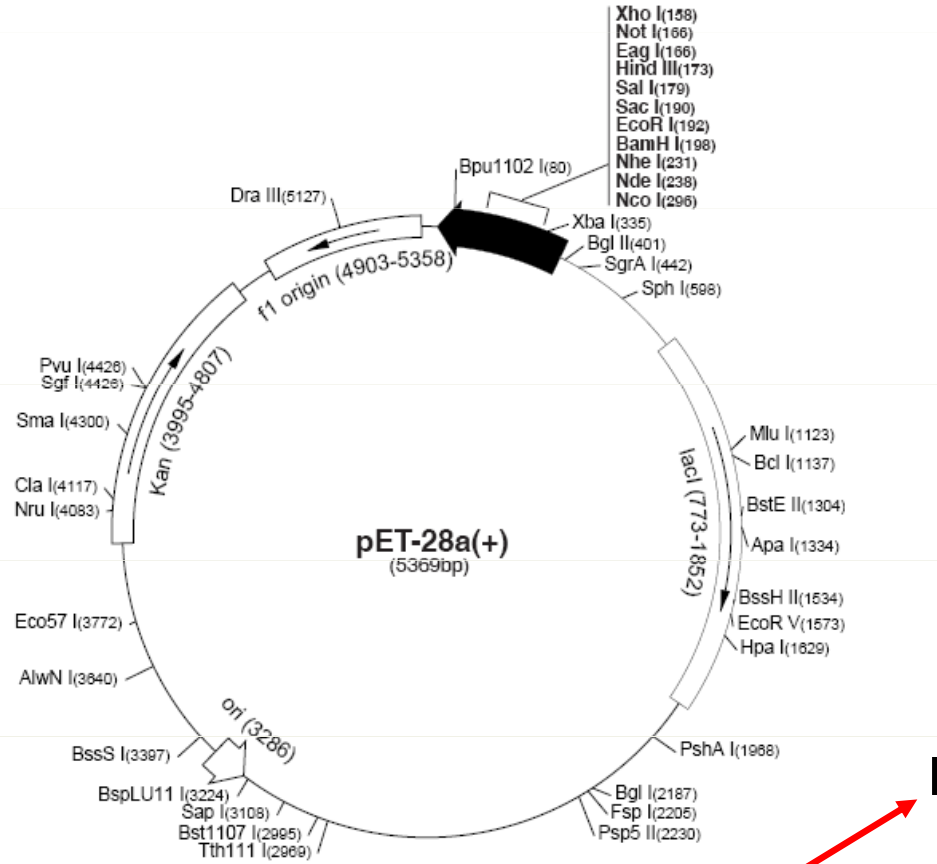
-chemická (ptac, trp): IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranozid)

Struktura vektoru pro efektivní expresi rekombinantních proteinů v *E.coli*

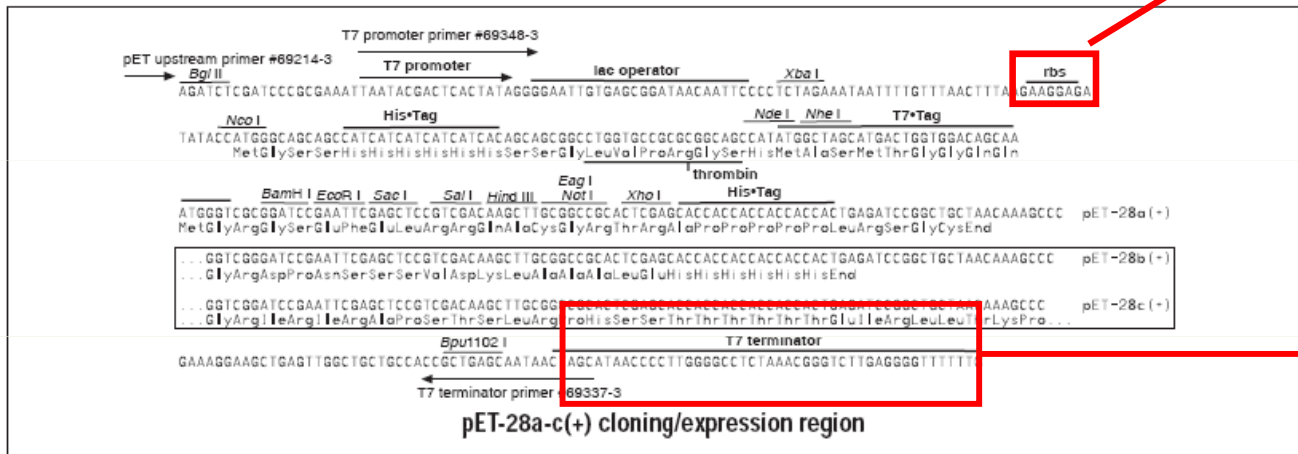
pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His* Tag coding sequence	270-287
T7* Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites	
(<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His* Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.

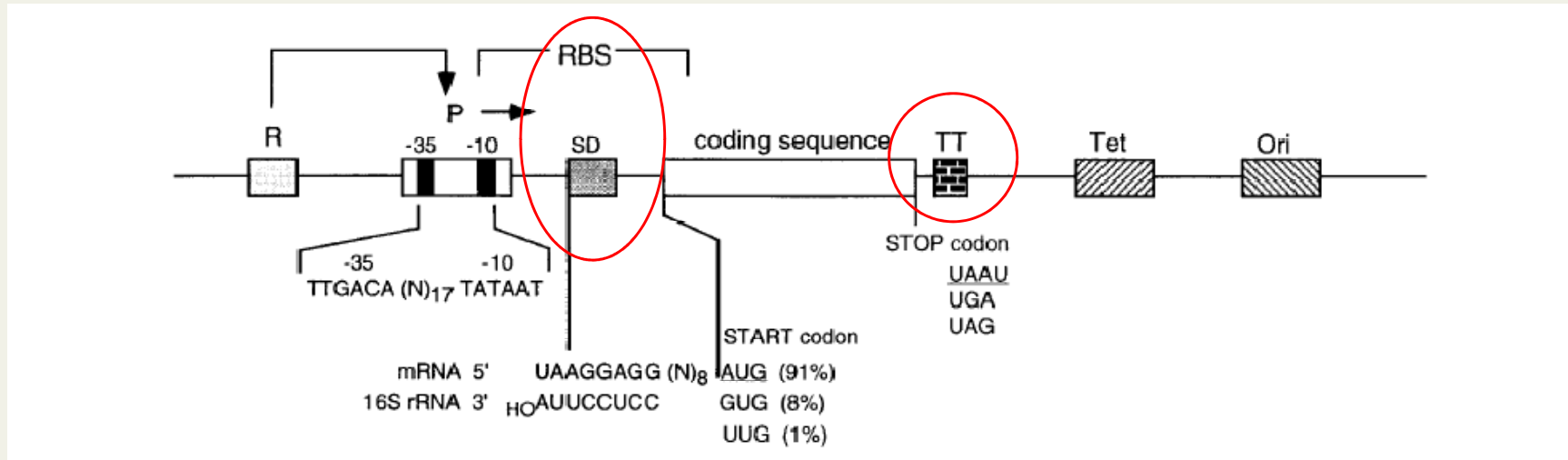


Ribozom-vazebné místo



Transkripční terminátor

Struktura vektoru pro efektivní expresi rekombinantních proteinů v *E.coli*



Ribozomální vazebné místo

SD sekvence

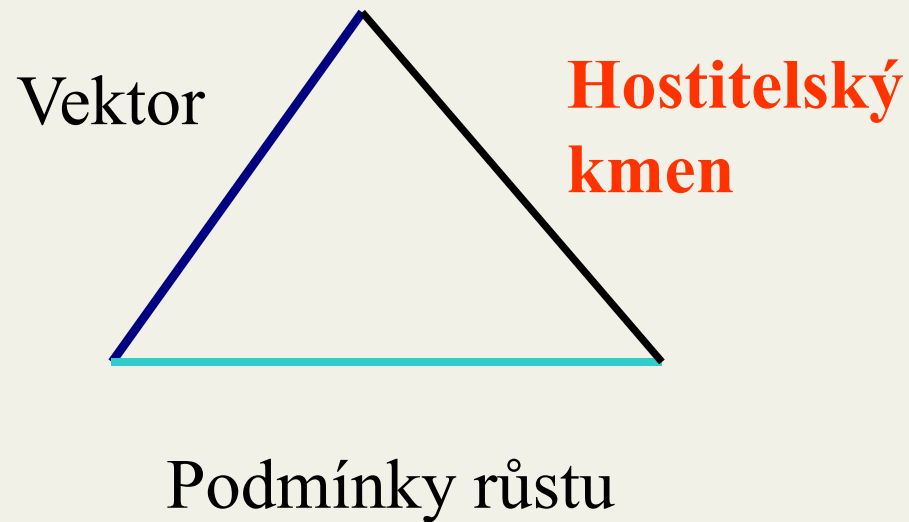
vzdálenost mezi SD sekvencí a iniciačním AUG kodonem: 4-13 nukleotidů
tato vzdálenost ovlivňuje účinnost iniciace translace (**optimální vzdálenost je 4-8 nukleotidů**) - oblast bohatá na AT páry

Transkripční terminátor

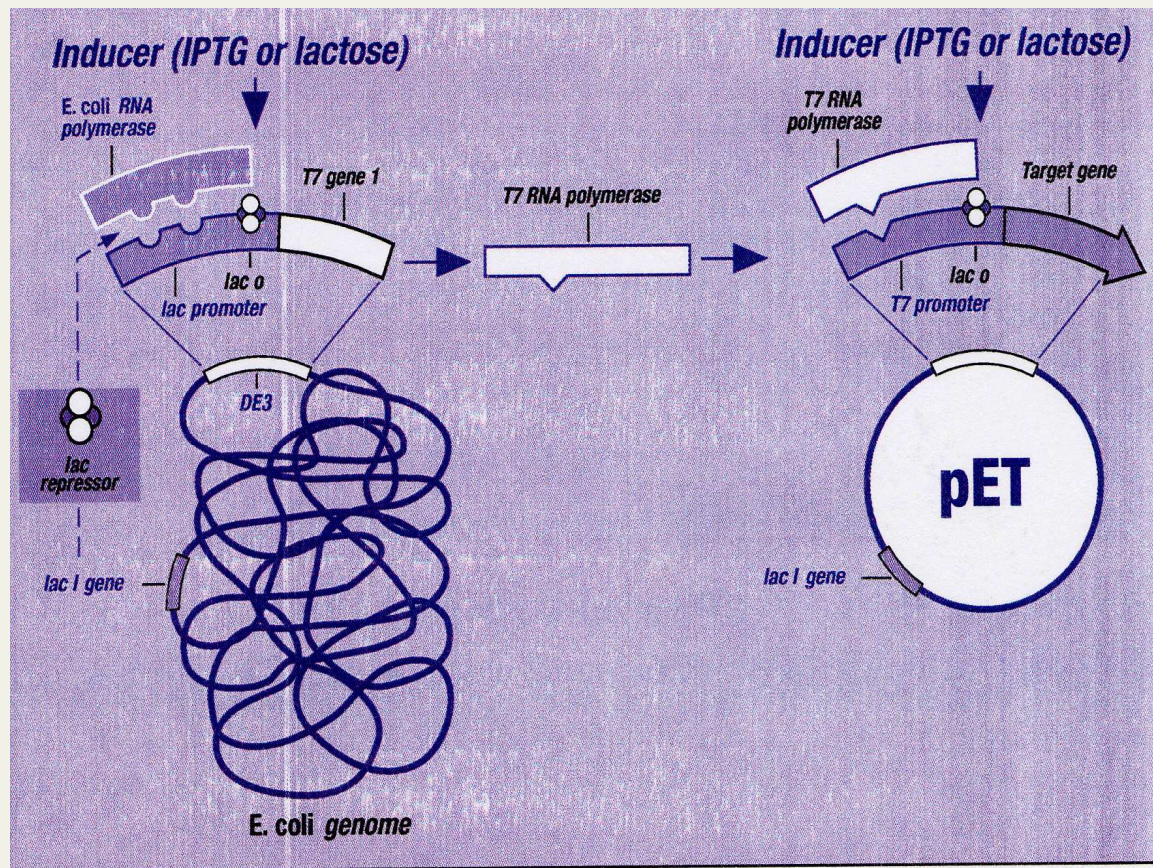
T₇ term, rrnT1, T2

(zabraňuje okluzi promotoru, zvyšuje stabilitu mRNA)

Výběr hostitelského kmene *E.coli* pro expresi rekombinantních proteinů



Expresa rekombinantního proteinu v hostitelském kmeni *E. coli*



Toxicita rekombinantního proteinu pro hostitelský kmen

- není omezena na pouhý fakt, že je protein je pro buňku cizí, ale může být způsobena i tím, že je nadprodukován určitý nativní gen

Pro buňku jsou letální:

- rekombinantní proteiny s hydrofóbními oblastmi mají toxický účinek- asociují s membránou nebo se inkorporují do membránového systému buňky (porušení membránového potenciálu)
- proteiny, které inaktivují ribozomy

Výběr hostitelského kmene E.coli



Pokud je protein je pro buňku toxický

- expresní kmen obsahující pLysS nebo pLysE plazmidy umožňující přísnou regulaci expresního systému využívající T7 promotor. Tyto vektory kódují lysozym, který váže a inaktivuje T7 RNA polymerasu

BL21(DE3)	firma Novagen
BL21(DE3)pLysS	firma Novagen

- pokud je protein membránový, nebo by se mohl vázat na membránu exprese v mutantních kmenech **C41 (DE3)** and **C43 (DE3)** může zlepšit produkci.

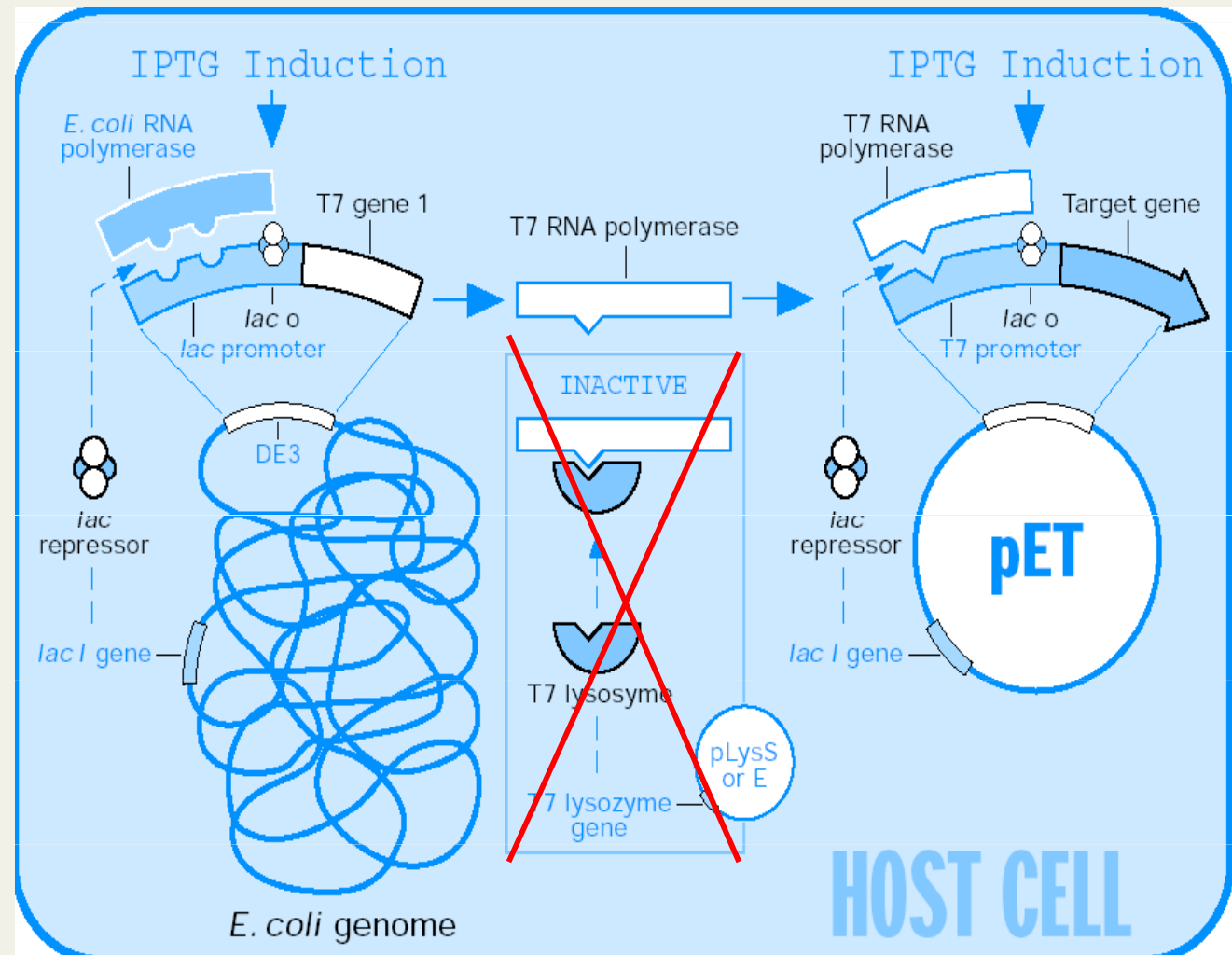
Různé úrovně minimalizace bazální exprese



BL21(DE3)

BL21(DE3)pLysS/E

BL21



- cca 10 % hladina bazální exprese (před indukcí exprese) klonovaného genu

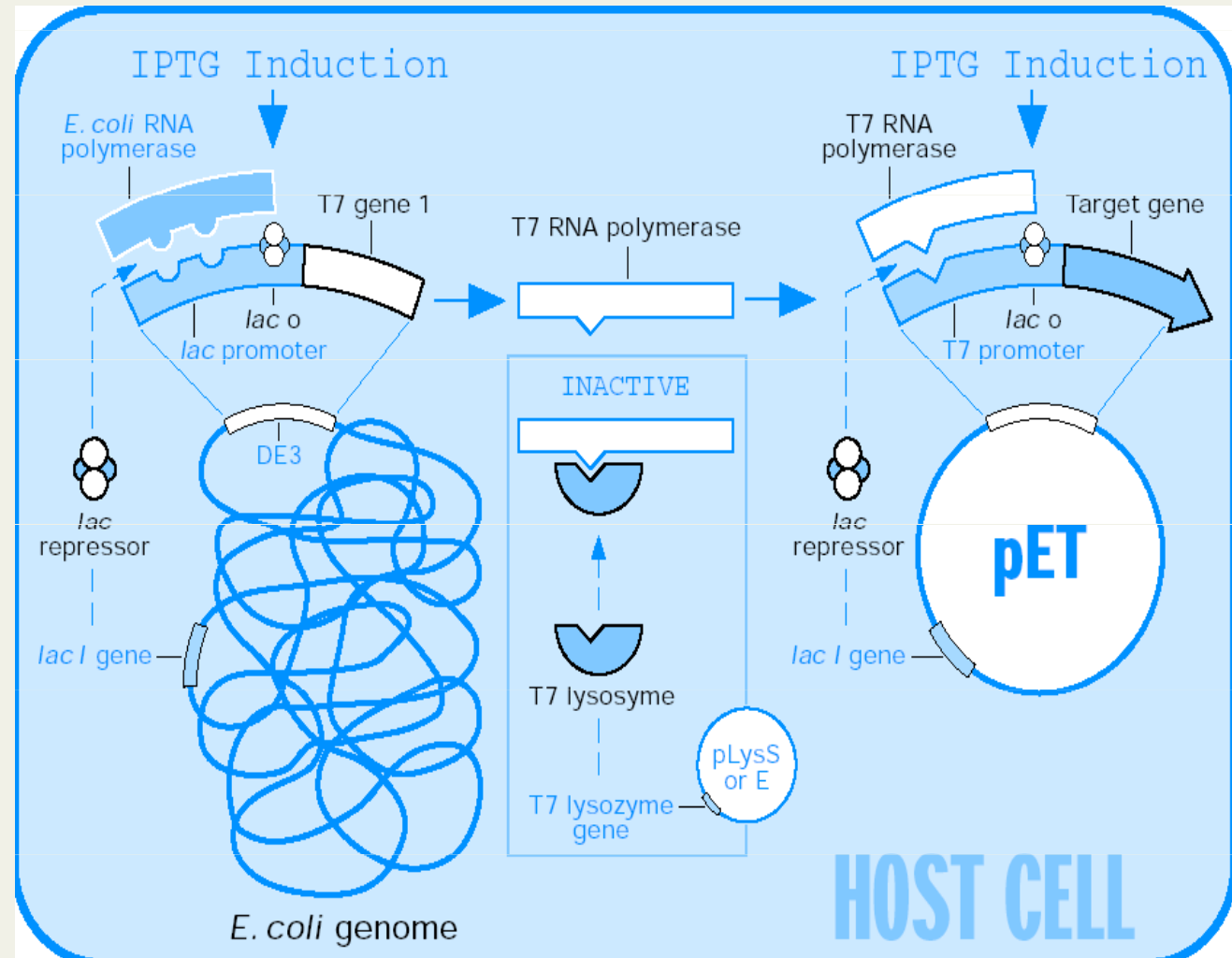
Různé úrovně minimalizace bazální exprese



BL21(DE3)

BL21(DE3)pLysS/E

BL21



- cca 1-3% hladina bazální (před indukcí exprese) exprese klonovaného genu

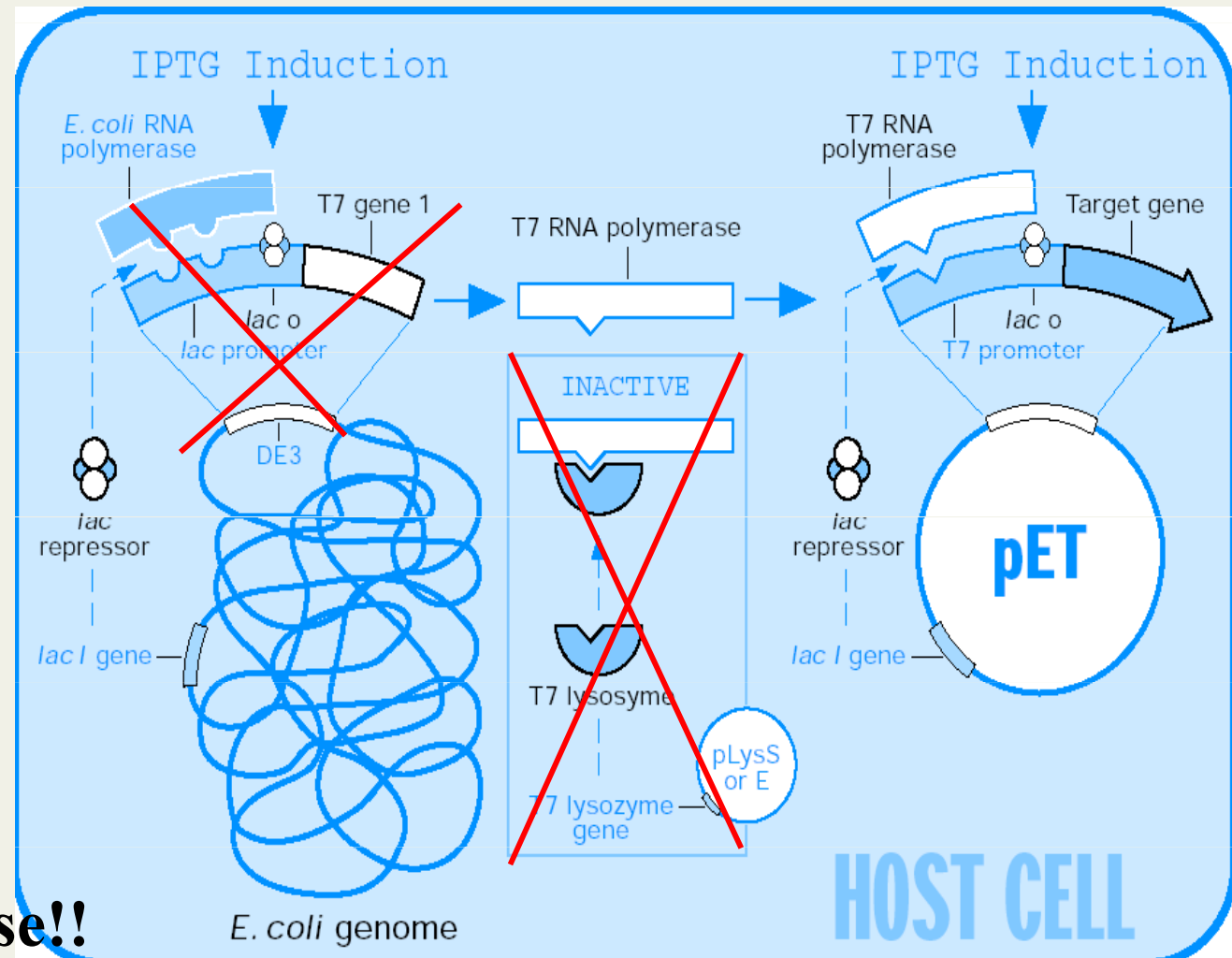
Různé úrovně minimalizace bazální exprese



BL21(DE3)

BL21(DE3)pLysS/E

BL21



Nejvyšší úroveň represe!!

- indukce exprese infekcí bakteriofágem CEG (gen pro T7 RNA polymerasu)

Využívání kodonů *E.coli* (codon usage)

Využívání kodonů *E. coli* se vyznačuje těmito znaky:

- Odchylka v 1-2 degenerovaných kodonech
- Určité kodony jsou nejvíce využívány ve všech genech neohledě na četnost vznikajícího produktu (např. CCG je preferovaný triplet pro prolin)
- Silně exprimované geny vykazují větší množství kodonových odchylek než slabě exprimované geny
- Frekvence využití synonymních kodonů obvykle odráží zastoupení jejich tRNA

Málo preferované kodony *E.coli*

Codon(s)	Amino acid
AGA, AGG, CGA, CGG.....	Arg
UGU, UGC.....	Cys
GGA, GGG.....	Gly
AUA.....	Ile
CUA, CUC.....	Leu
CCC, CCU, CCA.....	Pro
UCA, AGU,UCG, UCC	Ser
ACA	Thr

Heterologní geny obsahující tyto kodony nemusí být v *E.coli* exprimovány účinně!!!

-stop kodon v místě málo preferovaného kodonu- různě dlouhé produkty

-záleží na: umístění málo preferovaného kodonu (5'konec transkriptu)

seskupení více těchto kodonů

sekundární struktura mRNA

Výběr hostitelského kmene *E.coli*



- **pro proteiny obsahující velké množství kodonů, které jsou málo využíváné *E.coli*, je možné použít buňky, které produkují tRNA málo užívaných kodonů *E.coli***

• BL21 (DE3) CodonPlus-RIL	• AGG/AGA (arginine), AUA (isoleucine) and CUA (leucine)	firma Stratagene
• BL21 (DE3) CodonPlus-RP	• AGG/AGA (arginine) and CCC (proline)	firma Stratagene
• Rosetta or Rosetta (DE3)	• AGG/AGA (arginine), CGG (arginine), AUA (isoleucine) CUA (leucine) CCC (proline), and GGA (glycine)	firma Novagen

Degradace proteinu

Bakteriální proteolytický systém:

-*E. coli* obsahuje velké množství proteas, nejvíce v cytoplazmě

- selektivně odstraňuje „abnormální“ proteiny:

- nesprávně sbalené polypeptidy
- proteiny se substituovanými AK
- nadměrně syntetizované podjednotky multimerních proteinů
- proteiny poškozené oxidací nebo volnými radikály
- **cizí rekombinantní proteiny** (problémem jsou proteiny <10kDa)

Výběr hostitelského kmene *E.coli*



Kmeny deficientní na proteasy

- mutace, eliminující produkci proteas a tím proteolytickou degradaci rekombinantních proteinů

BL21 expresní kmeny jsou deficientní na: cytoplazmatickou proteasu *lon*
periplazmatickou proteasu *ompT*

Aminokyseliny redukující stabilitu heterologního proteinu

1. N-koncové pravidlo

Aminokyseliny redukující stabilitu proteinu: **Arg, Lys, Leu, Phe, Tyr a Trp**

Stabilizující aminokyseliny: **His, Gln, Glu, Phe, Met**

2. lysin ve vnitřní sekvenci poblíž N-konce

3. PEST hypotéza

Oblasti bohaté na Pro, Glu, Ser, Thr

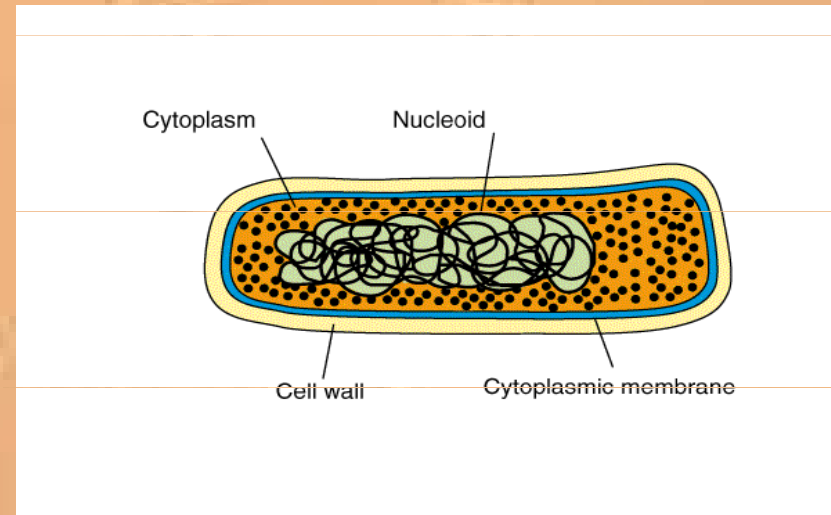
Cílená exprese proteinu

Možnosti:

Cytoplazmatická exprese

Periplazmatická exprese

Extracelulární exprese



Cytoplazmatická exprese

Výhody

- inkluzní tělíka
- vyšší proteinový výtěžek
- jednodušší plazmidové konstrukty

Nevýhody

- inkluzní tělíka
- redukční prostředí
- proteolýza
- více komplexní purifikace

Inkluzní tělíska

Co způsobuje jejich tvorbu?

- intramolekulární asociace hydrofóbních domén během foldingu
- nesprávná tvorba disulfidických vazeb v redukujícím prostředí cytoplazmy
- nejsou známy přesné fyzikálně chemické parametry proteinu, které vedou k tvorbě inkluzí

Výsledky statistické analýzy složení 81 proteinů, které tvořily a netvořily inkluzní tělíska:

- ❖ Průměrný náboj proteinu
 - ❖ AK rezidua vytvářející otočku ve struktuře proteinu
 - ❖ Cysteinové, prolinové frakce, hydrofilicita, celkový počet AK reziduí
- Silně korelují s tvorbou inkluz. tělísek

Inkluzní tělíska

Výhody

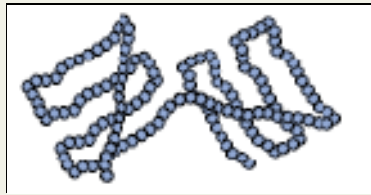
- snadná izolace ve vysoké čistotě
- ochrana před proteasami
- pro produkci proteinů, jejichž aktivita je pro buňku letální

Nevýhody

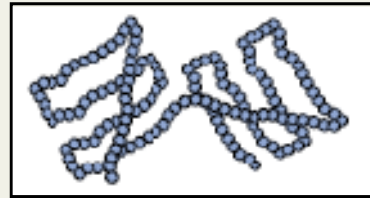
- proteinová nerozpustnost
- refolding pro opětné získání aktivity
- refolding nemusí vést k zaktivování proteinu
- redukce výtěžku proteinu
- zvyšují se náklady

Možnosti minimalizace tvorby inkluzních tělísek

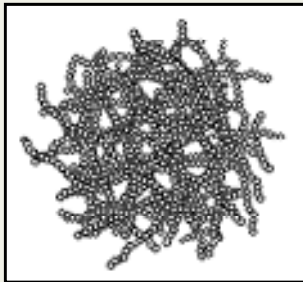
Expese
rekombinantního
proteinu v E. coli



Rozpustný protein



Refolding



Inkluzní tělíska

Modifikace expresních podmínek

- Snížení teploty růstu bakteriální kultury
- Koprodukce chaperonů
- Použití fúzního partnera zlepšujícího solubilizaci
- Růst a indukce buněk za osmotického stresu (sorbitol, glycyyl betain)
- Změna pH kultivačního média
- Selekcce různých kmenů E.coli kmenů- např. bakteriální kmene deficientní na thioredoxin reduktasu

Možnosti minimalizace tvorby inkluzních tělísek

Výběr hostitelského kmene *E.coli*



- pokud protein obsahuje jeden nebo více disulfidických vazeb, správné sbalení proteinu je stimulováno v hostiteli s více oxidujícím prostředím cytoplazmy

•AD494	•mutace v genu pro thioredoxin reductasu (trxB)	• Novagen
•Origami	•double mutant v genu pro thioredoxin reductasu (trxB) and glutathione reductasu (gor)	• Novagen

Periplazmatická exprese

- Periplazma obsahuje jen 4% všech buněčných proteinů (cca 100 proteinů)
- Prokaryotické signální peptidy úspěšně použité v *E.coli*
(OmpA, OmpT z *E.coli*, protein A ze *S. Aureus*, endoglucanase z *B.subtilis*)

Výhody

- Jednodušší purifikace
- Není zde tak rozsáhlá proteolýza
- Zlepšení tvorby disulfidických můstků

Nevýhody

- Signální peptid nezajistí vždy transport do periplazmy
- Redukce foldingu
- Mohou se tvořit také inkluzní tělíka

Extracelulární exprese

- Sekrece proteinů do kultivačního média
- *E.coli* sekretuje velmi málo proteinů
- Manipulace s různými transportními cestami usnadňující sekreci cizího proteinu zatím spíše neúspěšná

Výhody

- minimální kontaminace ostatními proteiny (jednodušší purifikace)
- nejmenší hladina proteolýzy
- zlepšení foldingu

Nevýhody

- často nízká sekrece
- hodně zředěný protein

FÚZNÍ PROTEINY

Translační fúze sekvencí kódujících rekombinantní protein a

a) krátký peptid [př. $(\text{His})_n$, $(\text{Asp})_n$, $(\text{Arg})_n \dots$]

- uniformita purifikace

b) přirozený oligopeptid [př. MBP, GST, thioredoxin ...]

- pozitivní změny kvality a kvantity exprese

(často zvýšení solubility rekombinantního proteinu)

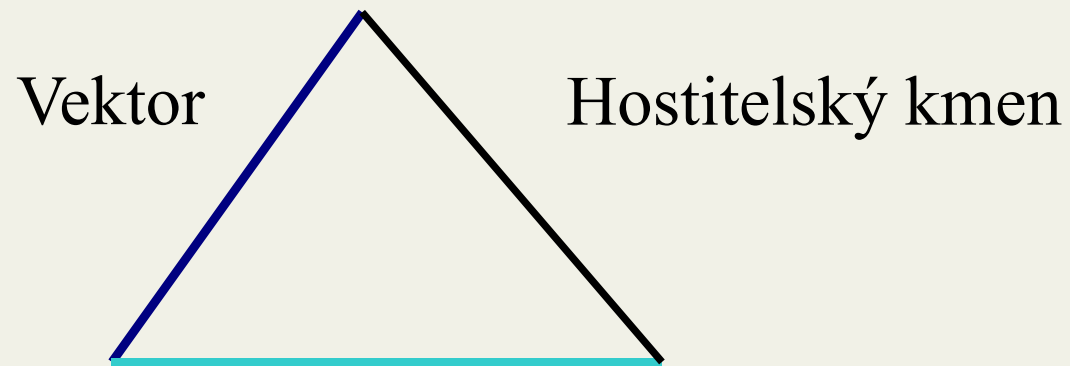
- uniformita purifikace

- detekce, sekrece

- fúzního partnera lze obvykle selektivně odštěpit (protease recognition site)

fúzní partner	velikost	umístění	využití
His-tag	6, 8, or 10 aa	N-, C-, internal	purifikace
thioredoxin	109 aa (11.7 kDa)	N-,C-	purifikace, zvýšení produkce
His-patch thioredoxin	109 aa (11.7 kDa)	N-,C-	purifikace, zvýšení produkce
chloramfenikol acetyltransferasa	24 kDa	N-	sekrece, purifikace, detekce
avidin/streptavidin <i>Strep</i>-tag			purifikace, sekrece
glutathion-S-transferasa-GST	26 kDa	N-	purifikace
maltosu vázající protein (MBP)	40 kDa	N-, C-	purifikace, sekrece
zeleně fluoreskující protein (GFP)	220 aa	N-, C-	detekce
polyasparagová kyselina	5-16 aa	C-	purifikace
ompT /ompA	22 aa /21 aa	N-	sekrece

Modifikace růstových podmínek



Podmínky růstu

Modifikace růstových podmínek

Možností zvýšení produkce proteinu pomocí:

- vysoká hustota buněčné kultury**
- složení média (pH, přídavek substrátů, kofaktorů, složení živin)**
- koncentrace IPTG na indukci, délka indukce exprese**
- změny teploty růstu bakterií a teploty na indukci exprese**

Modifikace růstových podmínek

Vliv různých podmínek exprese na aktivitu mutantní formy kukuřičné β -glukosidasy F461L.

- pH LB média

- Přítomnost substrátu
(celobiosa)

<i>podmínky</i>	<i>Specifická aktivita (nkat/mg)</i>
kontrola	1,9
LB médium pH 6	2,0
LB médium pH 7	4,2
LB médium pH 8	2,8
1% celobiosa (na indukci exprese)	2,7

Specifická aktivita byla po expresi za uvedených podmínek měřena v nativních lyzátech použitím substrátu PNPG.

Expres AHP proteinů v *E. coli* – test rozpustnosti

1. Médium: LB médium, bakteriální kmen BL21(DE3)pLysS

Růst (OD600~0.5-0.6)

Indukce 0,4 mM IPTG/3hodiny

22°C

22°C (3)

37°C

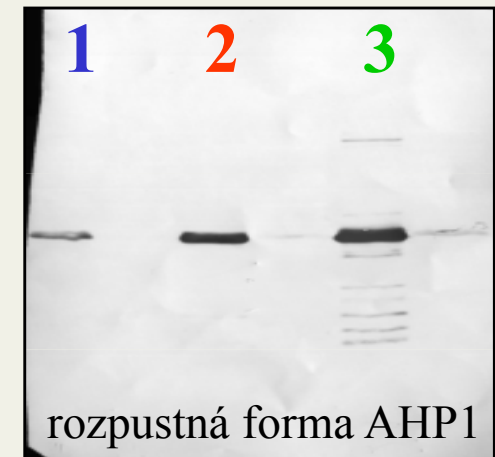
22°C (2)

37°C

28°C (1)

2. Příprava proteinových lyzátů za silně denaturačních podmínek (celková produkce proteinu= rozpustná+nerozpustná forma) a za nativních podmínek (rozpustná forma proteinu)

3. SDS PAGE denaturačních a nativních proteinových lyzátů s následnou analýzou western blottingem



4. Detekce proteinu pomocí protilátek a kvantifikace signálů pomocí programu pro analýzu 1-D gelů (př. Quantity One- BioRad, Quanti Scan-přístupný na internetu)

Expresa AHP proteinů v *E. coli* -optimalizace teploty růstu bakterií a indukce exprese

Procenta produkce AHP proteinů v rozpustné formě						
<i>t</i> (°C) <i>růst/indukce</i>	AHP1	AHP2	AHP3	AHP4	AHP5	AHP6
37°C/28°C	8 %	85 %	100%	0	76 %	0
37°C/22°C	82 %	73 %	100%	0	81 %	51 %
22°C/22°C	71 %	78 %	100%	30 %	81 %	73 %

2. Purifikace rekombinantních proteinů

Než začneme.....

Proč???

Pro jaký účel ?

Co???

Jaké vlastnosti má protein ?

Jak???

Jak protein detekovat?

Proč???

Pro jaký účel ?

Množství a čistota

Krystalizace	μmol	95%
NMR	μmol	95%
Funkční studie	nmol	různá
Produkce protilátek	nmol	90%
Stanovení sekvence	pmol	90%
Hmotnostní spektrometrie	fmol	nízká

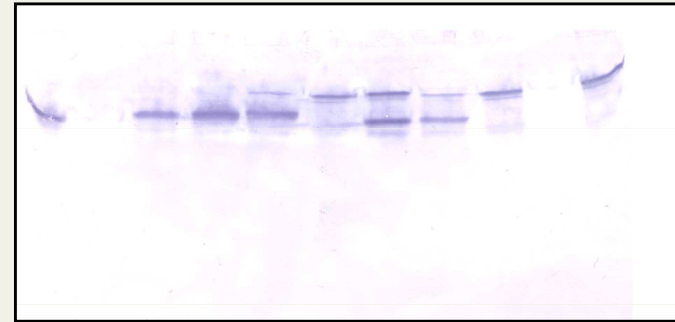
Jak???

Jak budeme protein analyzovat?

Specifická detekce:

Imunodetekce

(pomocí série dvou protilátek)



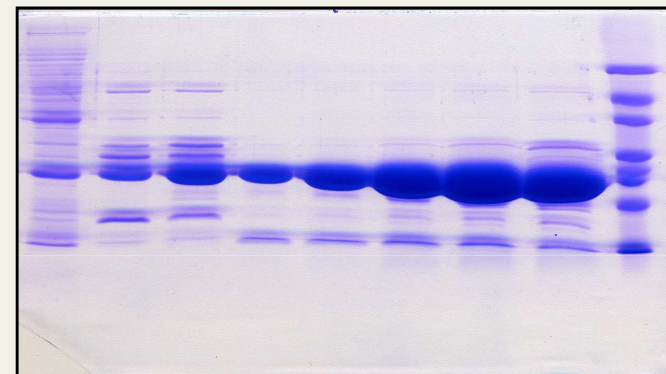
Enzymová aktivita

(barvení v gelu nebo stanovení specifických konstant v komplexních vzorcích pomocí chromogenních substrátů)



Nespecifická detekce:

Barvení pomocí Coommasie blue, stříbra...



Stanovení celkového proteinu

Nejvíce využívané metody: dle Bradfordové, Lowryho metoda

Co???

Jaké vlastnosti má protein ?

Informace o proteinu zájmu a příbuzných proteinů z databází:

- velikost proteinu
- isoelektrický bod
- hydrofobicita
- solubilita

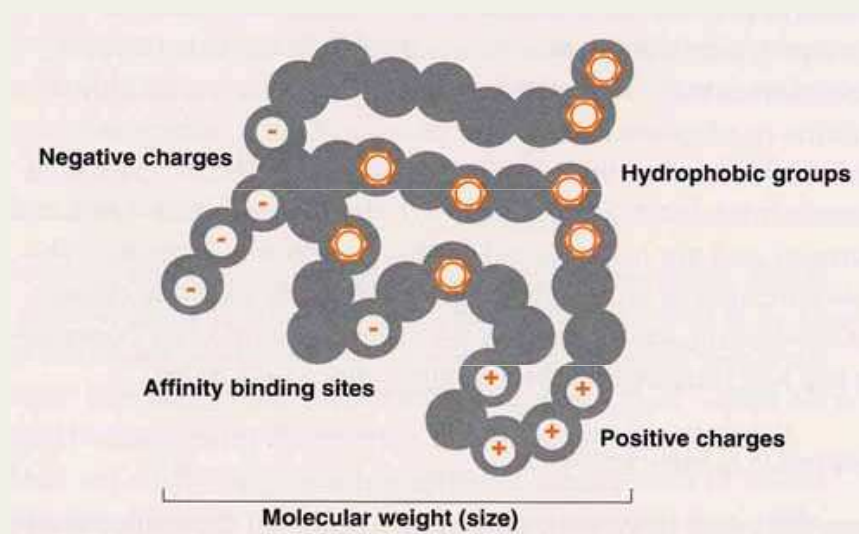
2D a nativní PAGE

- komplexita vzorku, vlastnosti proteinu zájmu a i ostatních kontaminujících proteinů

Informace o proteinu zájmu a příbuzných proteinů z literatury:

- strategie purifikace (metody, pufry, stabilita proteinu,

Vlastnosti/purifikační metody



Rozpustnost

precipitace síranem amonným

Velikost/tvar

gelová filtrace

pI (náboj)

iontově výměnná chromatografie

Hydrofobicita

reverzně fázová chromatografie

Specifická vazba

afinitní chromatografie

Stabilita

teplotní precipitace

Třífázová purifikační strategie

čistota

ZISK PROTEINU

izolace, zakoncentrování a stabilizace cílového proteinu

PURIFIKACE

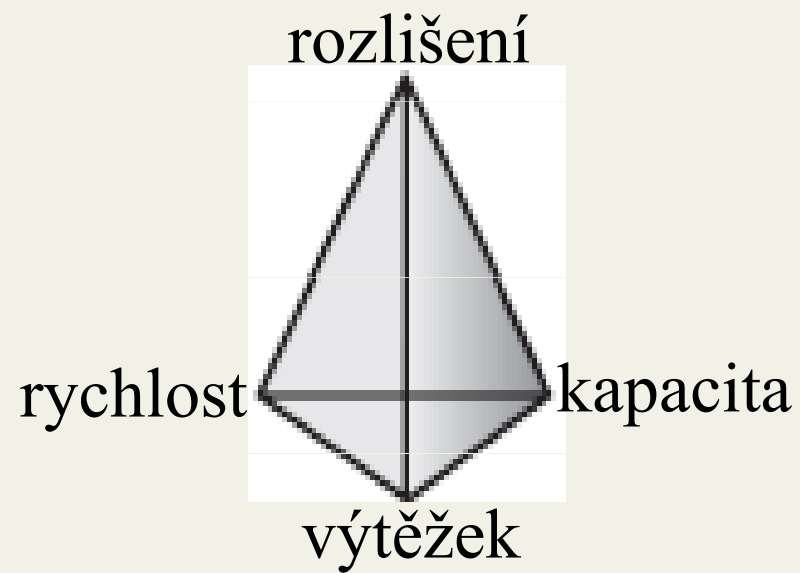
Odstranění většiny nečistot – jiné proteiny, nukleové kyseliny.....

DOČIŠTĚNÍ

Vysoká čistota cílového proteinu- odstranění drobných nečistot, proteinů podobných vlastností

purifikační kroky

Logická kombinace chromatografických kroků



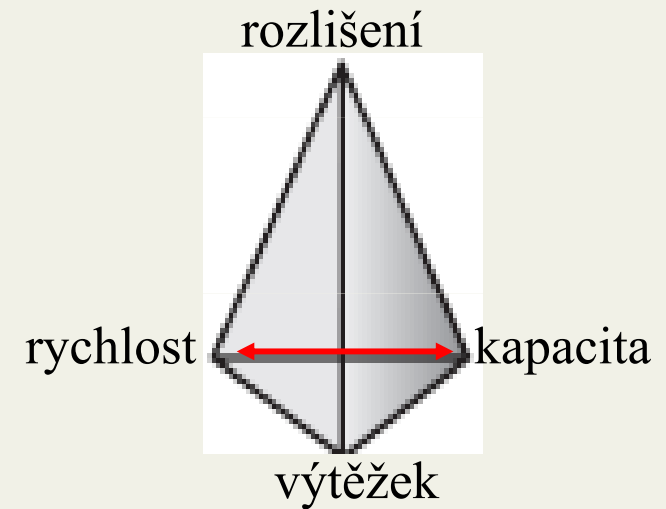
Získ proteinu z extraktu

-afinitní chromatografie

-iontoměničová chromatografie

-hydrofóbní chromatografie

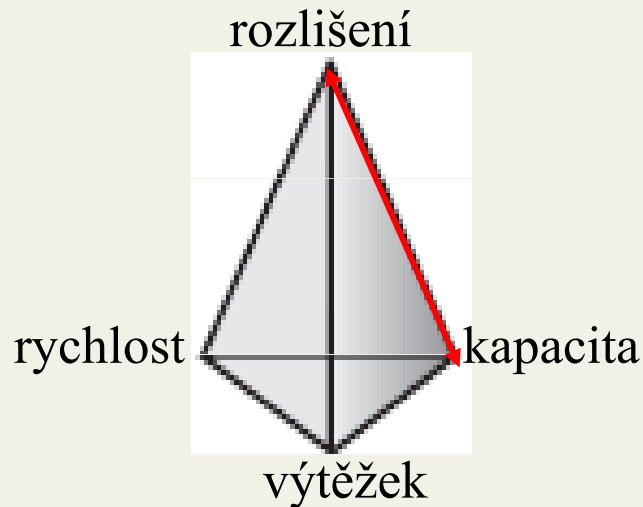
-srážení



Purifikace

iontoměničová chromatografie

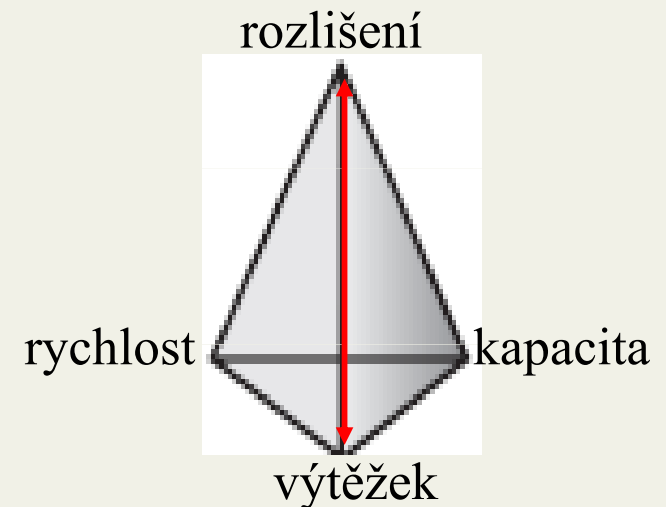
hydrofóbní chromatografie



Dočištění

gelová filtrace

reverzně fázová chromatografie




Základní zásady

- na začátek zařadit metody s vysokou kapacitou a malým výtěžkem a rozlišením → velké množství levného vstupního materiálu
- později metody s vysokým rozlišením a výtěžkem, kapacita méně významná
→ ve vzorku již investovaná práce, množství proteinu je menší
- pokud možno řadit metody za sebou racionálně, bez nutnosti mezikroků (např. dialýza nebo ultrafiltrace → možné snížení výtěžku)
- jednotlivé separační metody pokud možno neopakovat
- čím méně kroků, tím větší výtěžnost proteinu

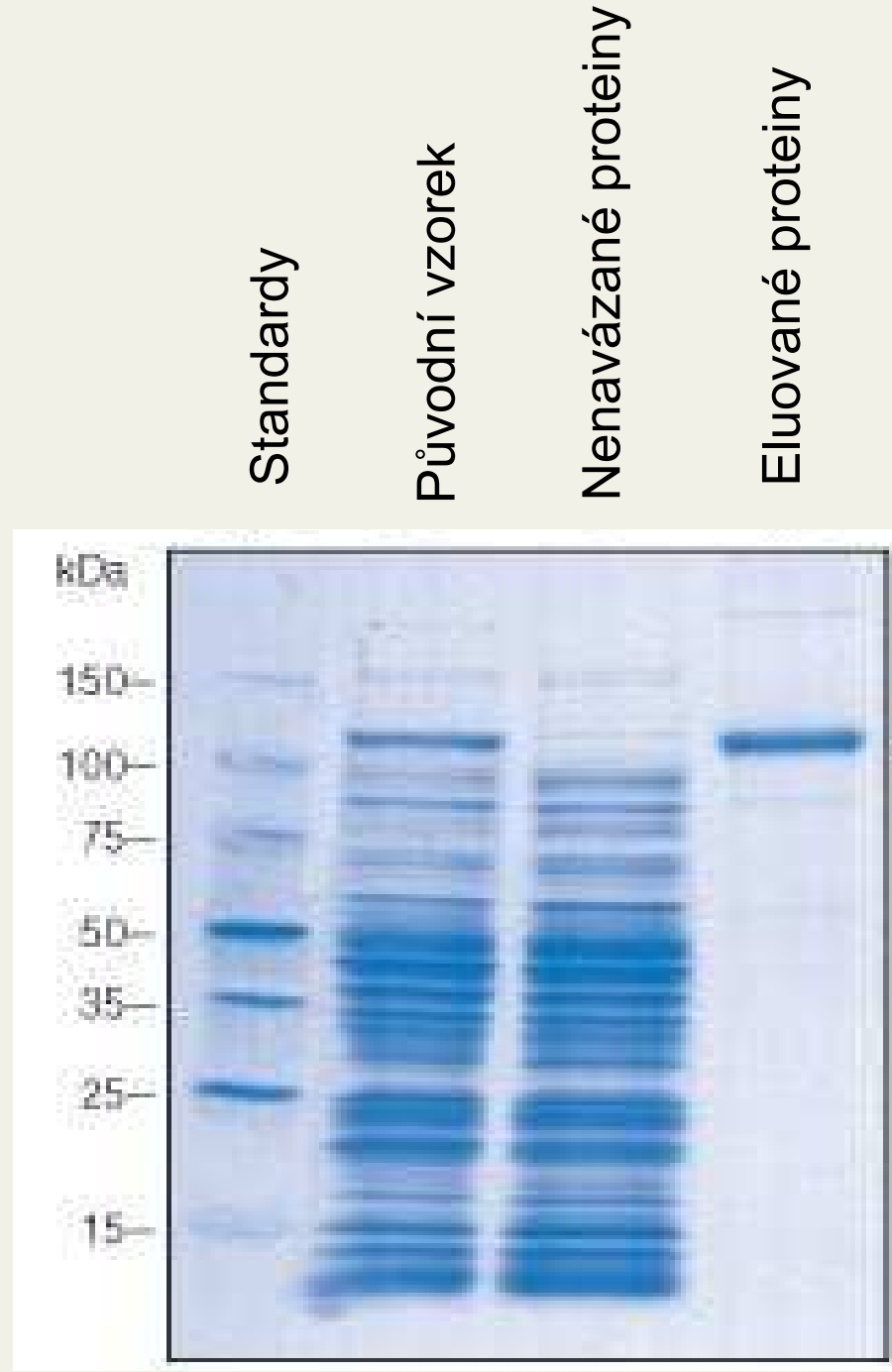
Sledování průběhu purifikace

Metoda	Celková bílkovina	Celková aktivita	Specifická aktivita	Přečištění	Výtěžek
extrakt	100	100	1	-	100 %
HIC	50	99	1.99	1.99	99 %
IEX	25	75	3	3.0	75 %



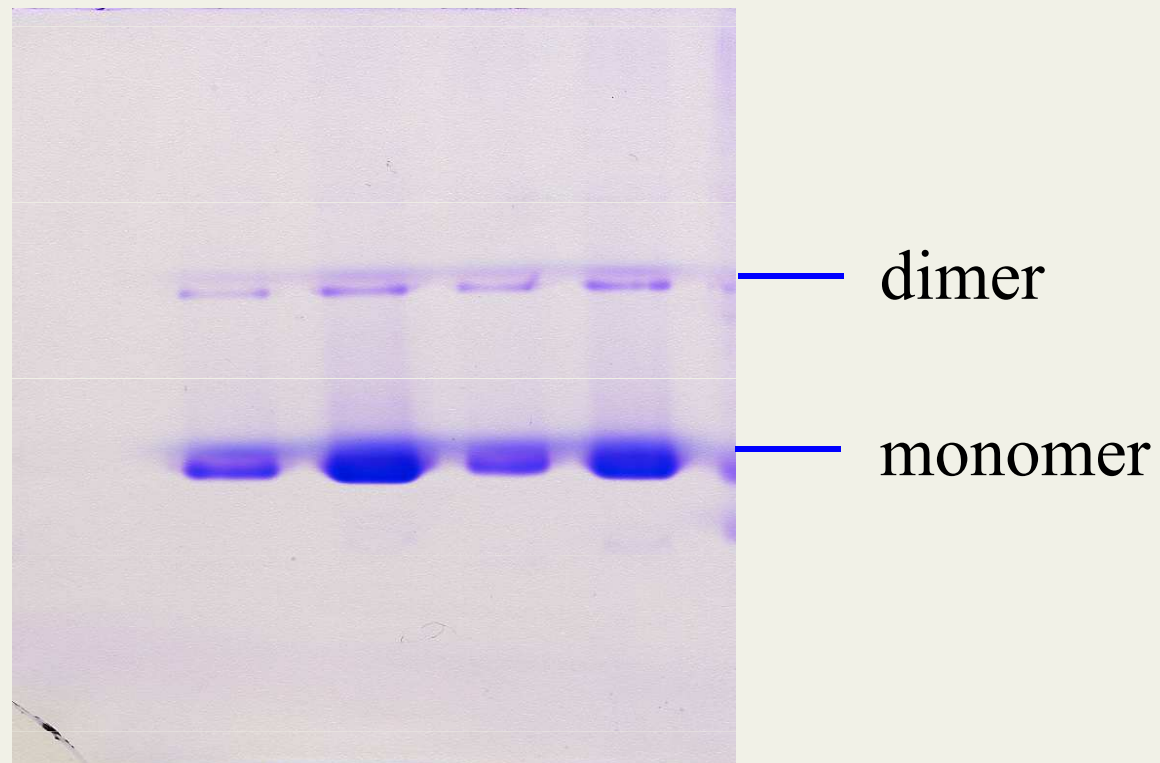
Sledování čistoty proteinů

SDS PAGE



Sledování čistoty proteinů

Nativní PAGE



FÚZNÍ PROTEINY

Tag	Ligand/purifikační matrice	eluční podmínky
His₆	Ni ²⁺ nitriltriocetová kyselina	imidazol
thioredoxin	thio vázající matrice	iontová výměna
His patchT thioredoxin	IMAC	
chloramfenicol/acetyl transferasa	Chloramfenikol sefarosa	chloramfenikol
avidin/streptavidinStr ep-tag	streptavidin	2-iminobiotin diaminobiotin
glutathione-S- transferase-GST	glutathion sefarosa	Snížení pH
maltose binding protein (MBP)	amylosová matrice	maltosa
polyasparagová kyselina	anion vázající matrice	

His-Tag jako N či C-koncové prodloužení proteinu

Vazné místo pro kov

Rozpoznávací sekvence pro proteasu thrombin

MGSSHHHHHSSG**LVPRGS**

FaktorXa **IEGR/X**

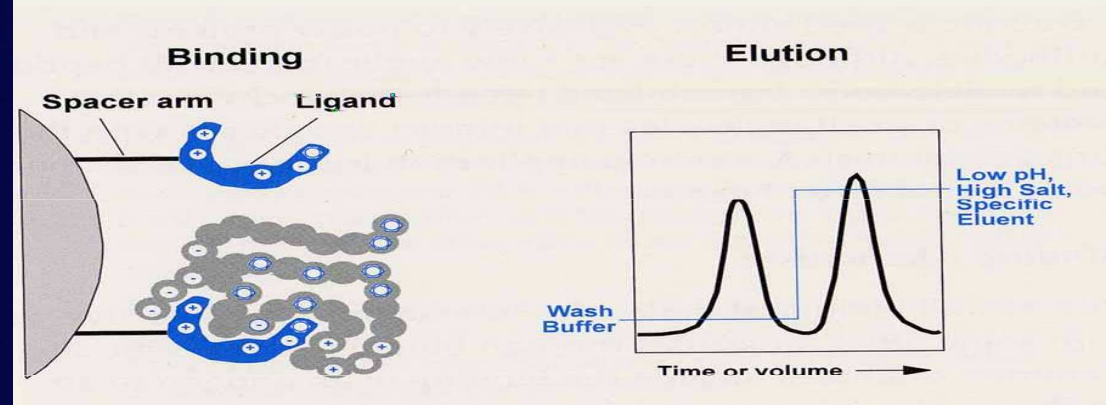
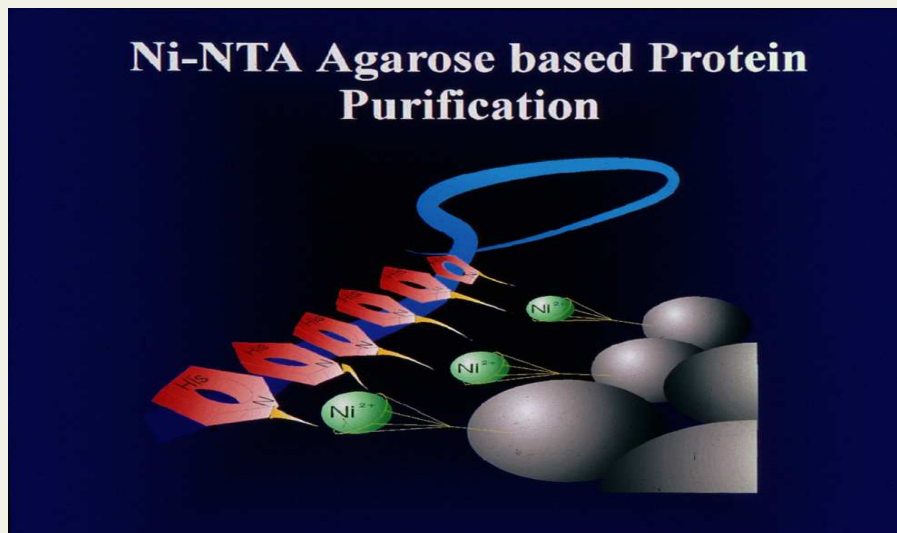
Enterokinasa **DDDDK/X**

3C proteasa **LEVLFQ/GP**

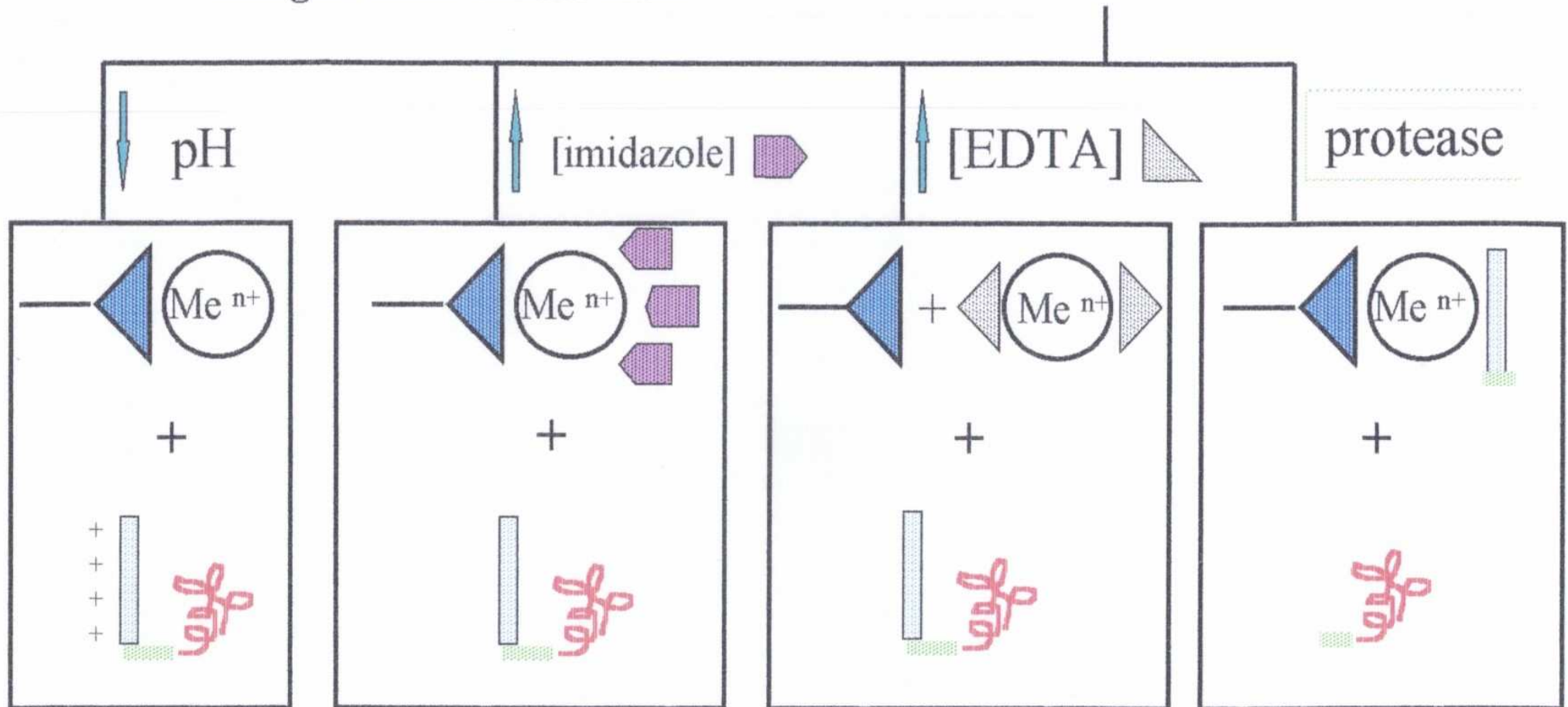
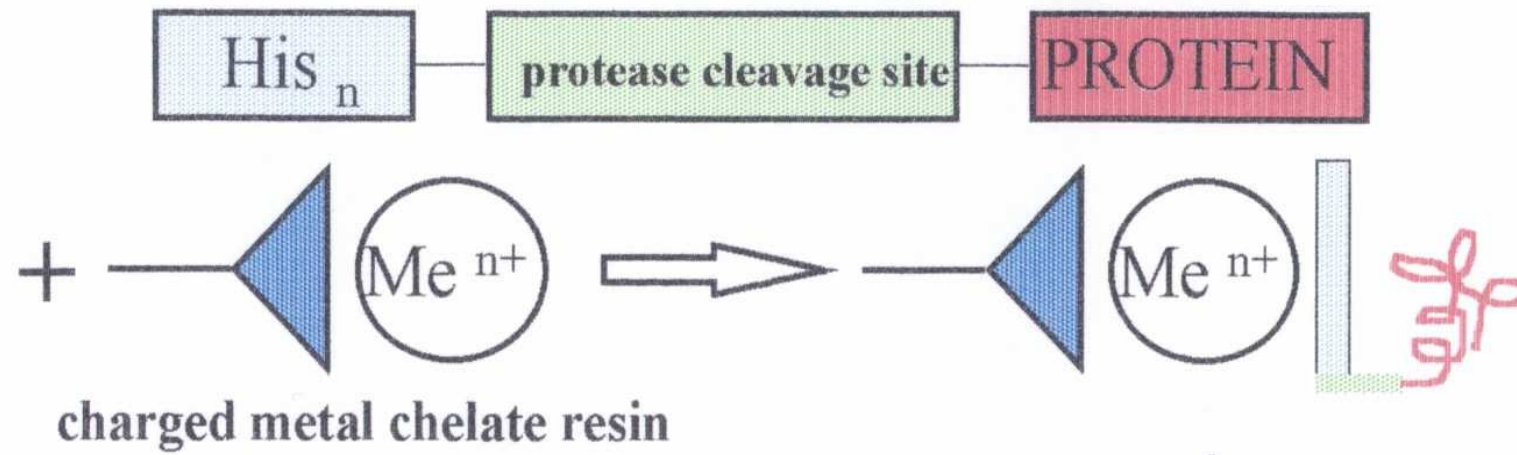
TEV proteasa **ENLYFQ/G**

Metalochelatační afinitní chromatografie

- r.1975- uveřejnil Porath a kol. metodu frakcionace sérových proteinů
- konstrukce umělých oligohistidinových domén fúzovaných k N- nebo C- konci proteinu metodami mol. biologie
- nyní jeden ze základních purifikačních postupů rekombinantních proteinů

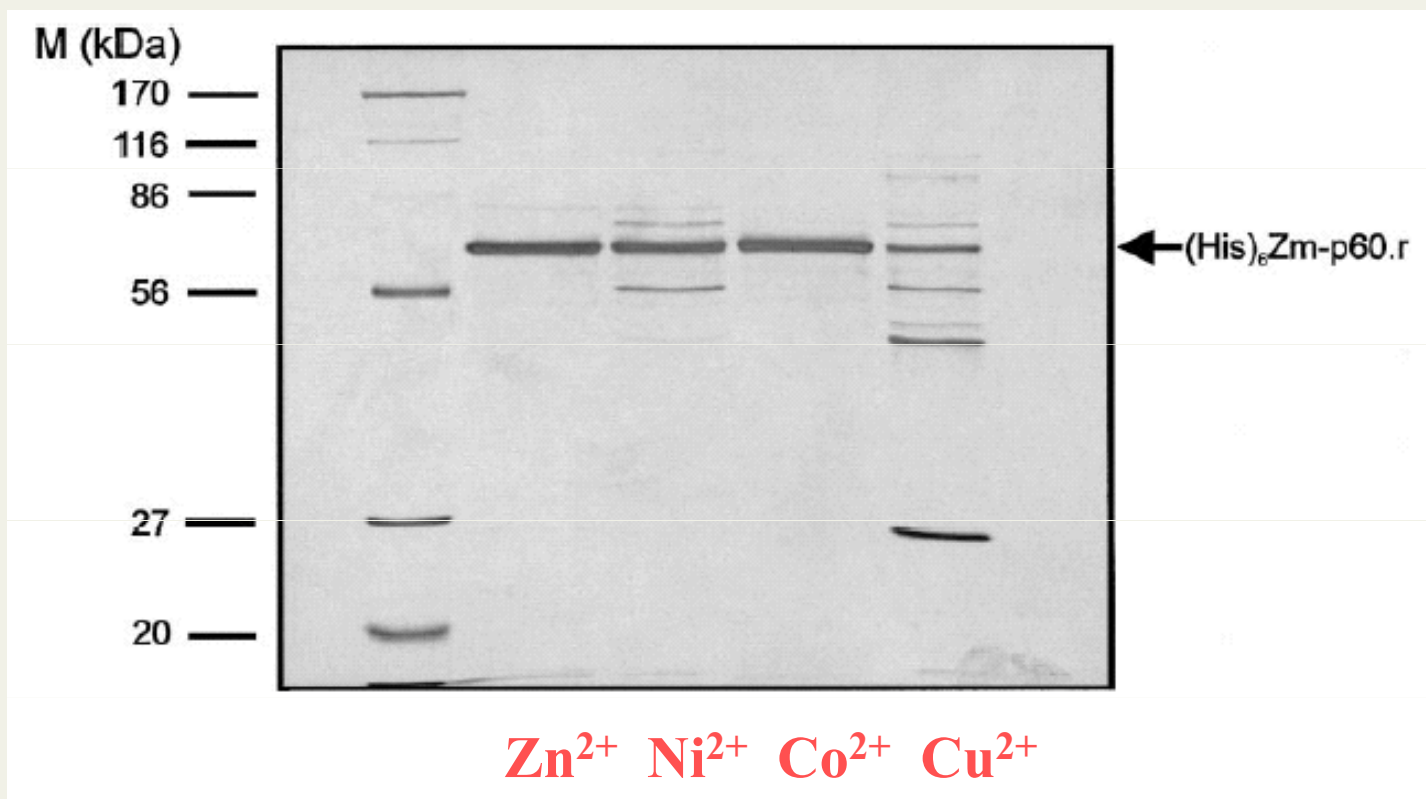


Immobilized metal affinity chromatography



Efekt kovového iontu navázaného na POROS MC/M matrici

Funkční skupina- imidodioctová kyselina



Síla vazby: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \sim \text{Co}^{2+}$

Metalochelelační afinitní chromatografie

Jednokroková purifikace za nativních a denaturačních podmínek

Protokol nativní IMAC konkrétního proteinu je zčásti nepřenositelný na jiné proteiny!

Obecně lze navrhnout:

- ➔ pufrů o pH 7-8 pro vazbu rek. proteinu s kovovým iontem
- ➔ pufrů s vysokou koncentrací solí (např. 0,5-1 mol/l NaCl)
- ➔ nižší koncentrace imidazolu nebo snížení pH pro odstranění balastních proteinů
- ➔ eluce použitím gradientu imidazolu (0-1 mol/l), výrazným snížením pH nebo využitím EDTA

Metalochelelační afinitní chromatografie

Jednokroková purifikace za nativních a denaturačních podmínek

Denaturační IMAC – purifikace proteinů v inkluzních těliscích

- ➔ purifikace za vysokých koncentrací močoviny nebo guanidinium chloridu
 - ➔ čistý protein, ale porušení kvartérní struktury (postačí však např. na imunizace)

Získání nativního konformeru: - nutné pro měření enzymové kinetiky, rtg analýza,...

- eluce enzymu z kolony a jeho renaturace dialýzou nebo výrazným zředěním v renaturačních pufrách
- renaturace enzymu vázaného na matici:
 - ➔ gradient z denaturačních do renaturačních pufrů
 - ➔ pulzní renaturace

Purification of AHP5 – improvement of the protein yield

Comparison of the yield of purified protein expressed in LB and TB medium

Expression in LB medium

Purification: metal chelate affinity chromatography, gel filtration

Purity: 96%

Concentration of the protein: 22 mg/ml

Yield: 3,3 mg/ 4 l of bacterial culture

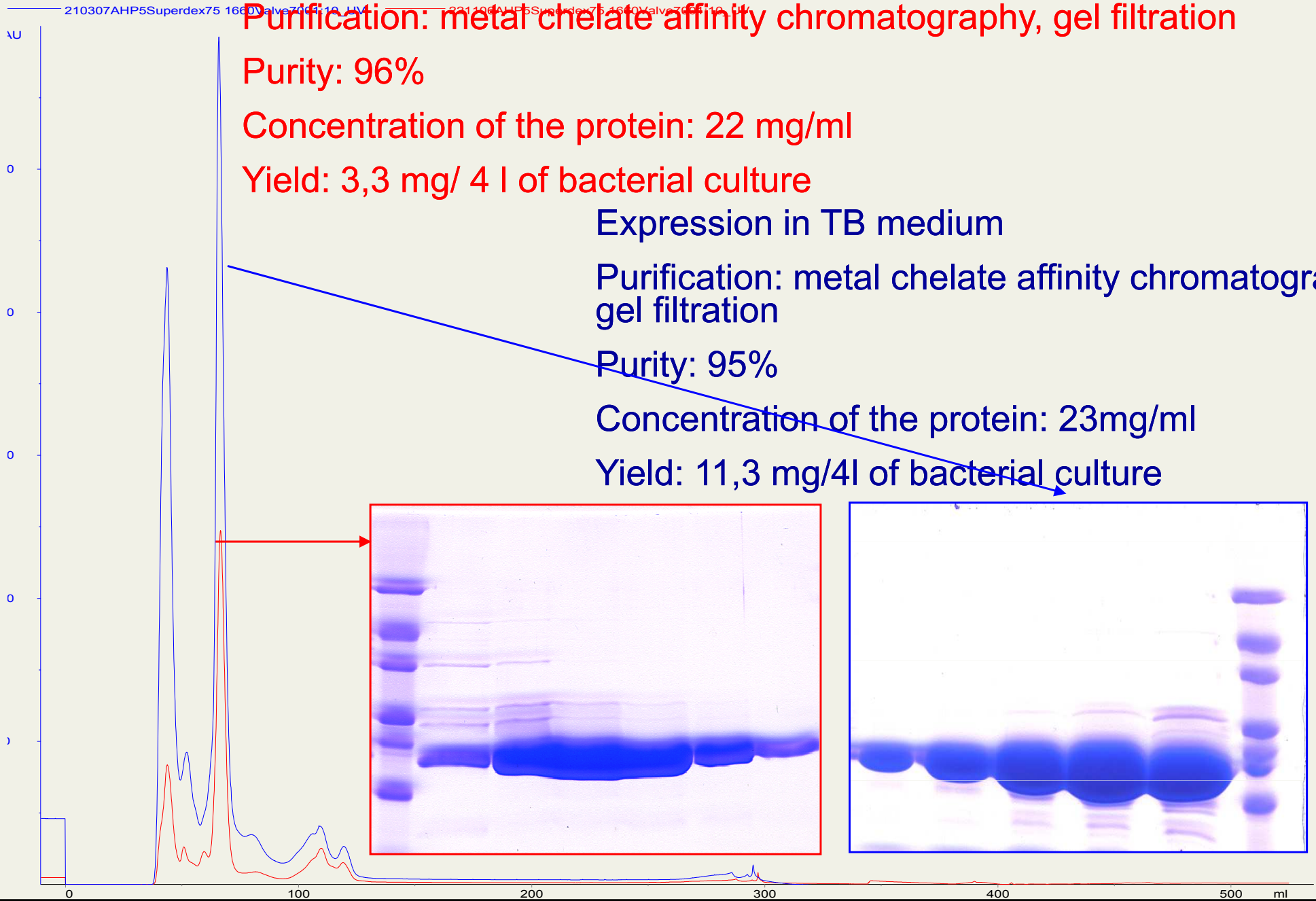
Expression in TB medium

Purification: metal chelate affinity chromatography, gel filtration

Purity: 95%

Concentration of the protein: 23mg/ml

Yield: 11,3 mg/4l of bacterial culture



Doporučená literatura

Makrides SV (1996) **Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli***. Microb.Review 60: (512-538)

[http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/9C7BA3DA6539F07AC1256EB40044A8B2/\\$file/18113229AC.pdf](http://www6.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/9C7BA3DA6539F07AC1256EB40044A8B2/$file/18113229AC.pdf)