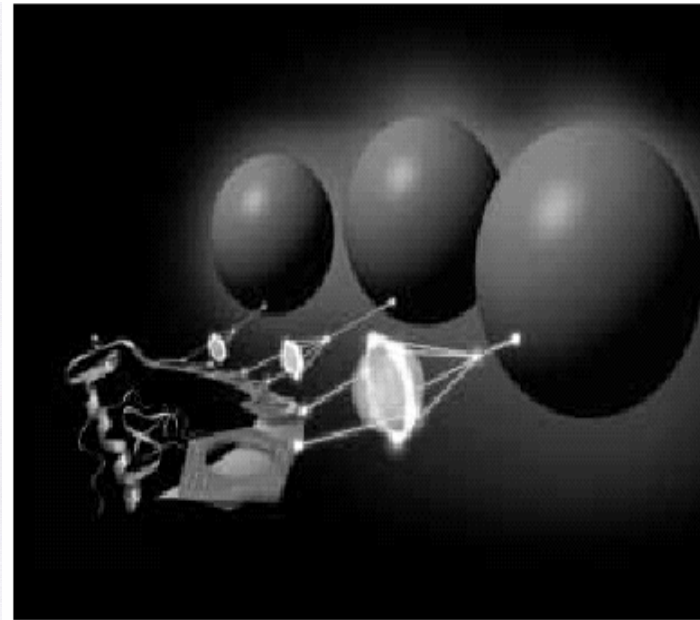
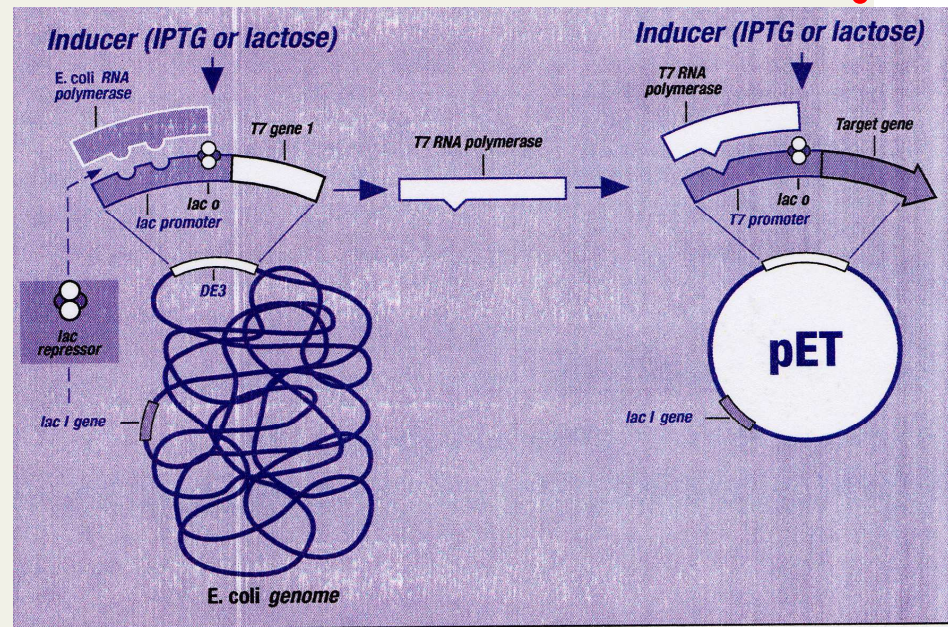
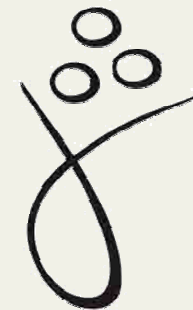


Expresa a purifikace rekombinantních proteinů



Radka Dopitová, 2010



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, tkáňové kultury
- Limitovaná exprese v přirozeném zdroji

TABLE 1.2. Examples of low-abundance proteins and peptides isolated from natural biological sources

Protein	Source	Yield (μg)	Reference
Multipotential colony-stimulating factor	pokeweed mitogen-stimulated mouse spleen-cell-conditioned medium (10 liters)	1	Cutler et al. (1985)
Human A33 antigen	human colon cancer cell lines (10^{10} cells)	2.5	Catimel et al. (1996)
Platelet-derived growth factor (PDGF)	human serum (200 liters)	180	Heldin et al. (1981)
Granulocyte-colony-stimulating growth factor (G-CSF)	mouse lung-conditioned medium (3 liters)	40	Nicola et al. (1983)
Granulocyte-macrophage colony-stimulating growth factor (GM-CSF)	mouse lung-conditioned medium (3 liters)	12	Burgess et al. (1986)
Coelenterate morphogen	sea anemone (200 kg)	20	Schaller and Bodenmuller (1981)
Peptide YY (PYY)	porcine intestine (4000 kg)	600	Tatemoto (1982)
Tumor necrosis factor (TNF)	HL60 tissue culture medium (18 liters)	20	Wang and Creasy (1985)
Murine transferrin receptor	NS-1 myeloma cells (10^{10} cells)	20	van Driel et al. (1984)
Fibroblast growth factor (FGF)	bovine brain (4 kg)	33	Gospodarowicz et al. (1984)
Transforming growth factor- β (TGF- β)	human placenta (8.8 kg)	47	Frolik et al. (1983)
Human interferon	human leukocyte-conditioned medium (10 liters)	21	Rubinstein et al. (1979)
Muscarinic acetylcholine receptor	porcine cerebrum (600 g)	6	Haga and Haga (1985)
β_2 -adrenergic receptor	rat liver (400 g)	2	Graziano et al. (1985)

Adapted, with permission, from Simpson and Nice (1989).

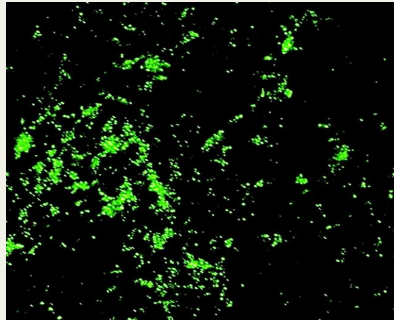
Výběr hostitelského organismu pro expresi rekombinantních proteinů

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

- In vitro translace

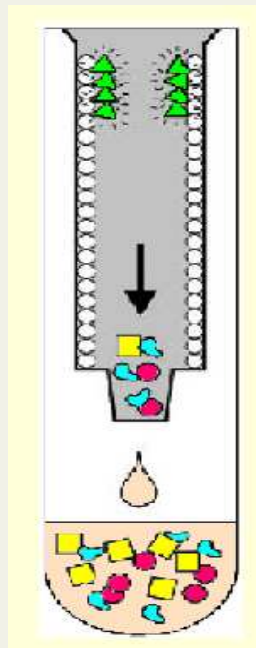
Obsah přednášky

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



Expresa GFP fúzovaných proteinů v *E. coli*

2. část: Purifikace rekombinantních proteinů



Purifikace GFP fúzovaných proteinů pomocí hydrofóbní matrice

Produkce heterologních proteinů v *E. Coli*

VÝHODY :

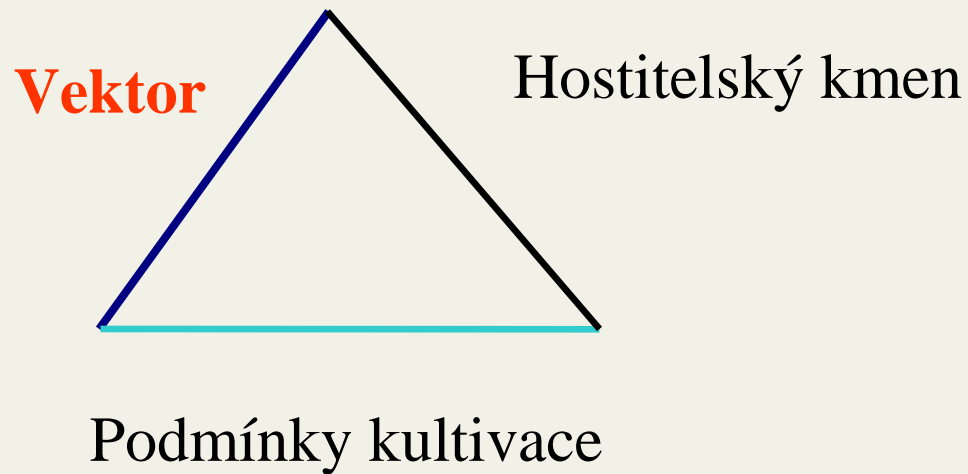
- vysoká produkce rekombinantních proteinů
- dobře prostudovaný genom a proteom-usnadnění genových manipulací
- design řady vektorů usnadňuje klonování a expresi cizích genů
- rychlý růst v poměrně levném médiu
- přizpůsobivost systému

Produkce heterologních proteinů v *E. Coli*

NEVÝHODY:

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

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

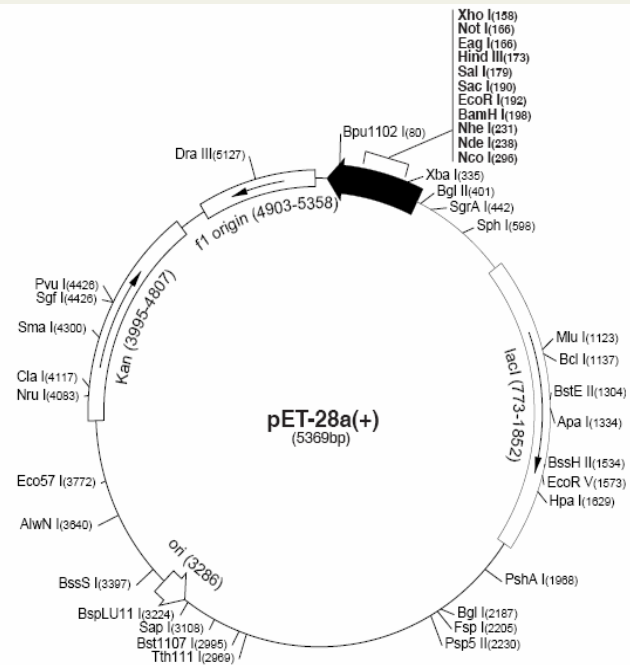


Expresní vektor

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

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.

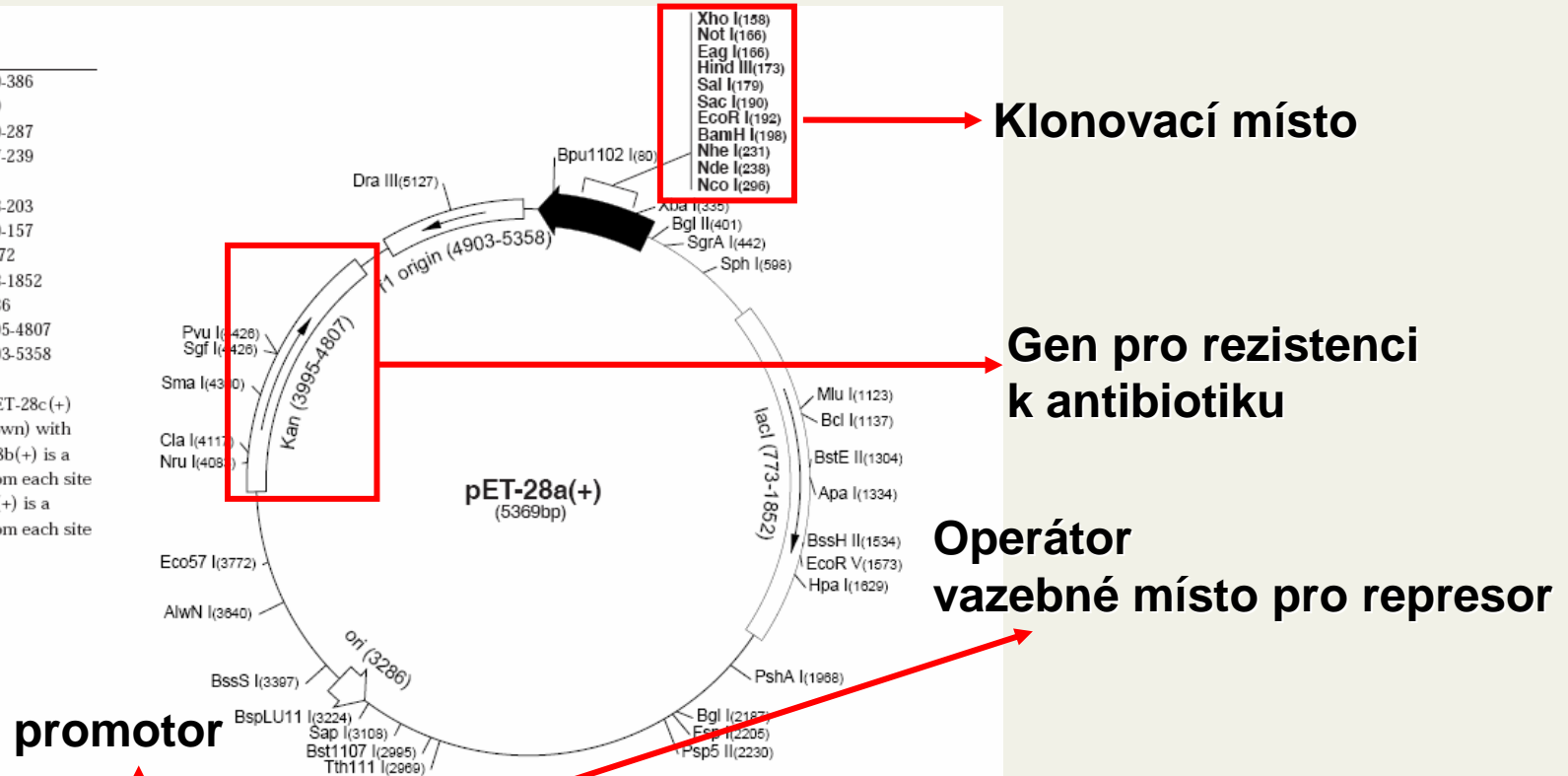


Struktura vektoru pro efektivní expresi rekombinantních proteinů v *E.coli*

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
<i>ori</i> 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)

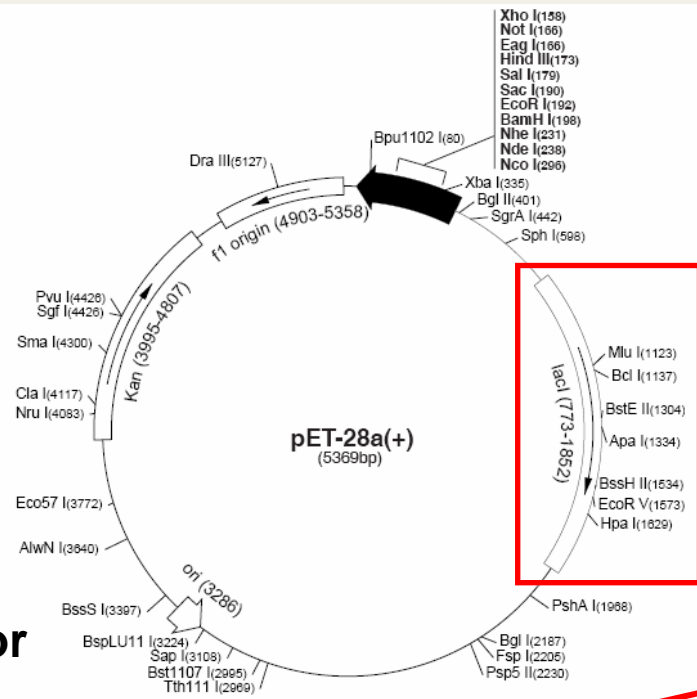
Transkripční terminátor

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>lac</i> I coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

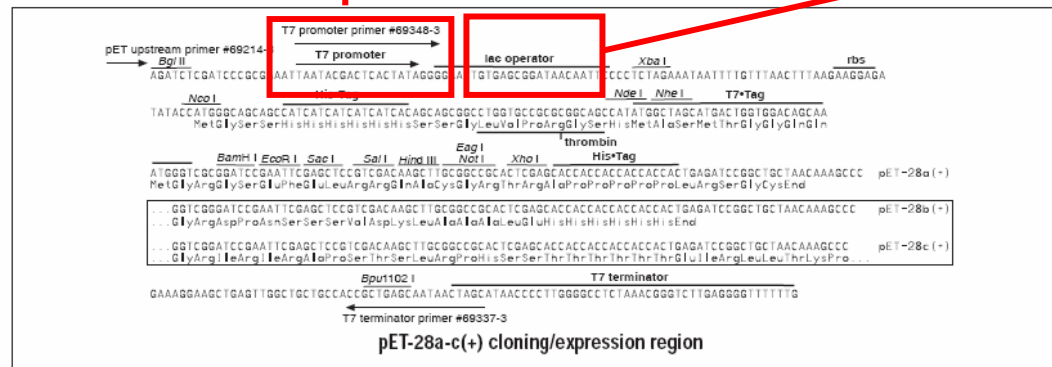
The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



promotor

**Gen pro lac I
represor**

**Operátor
vazebné místo pro represor**



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 kmenů *E.coli***

- **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

- **jednoduše a levně inducibilní**

- teplotní indukce (λ pL)

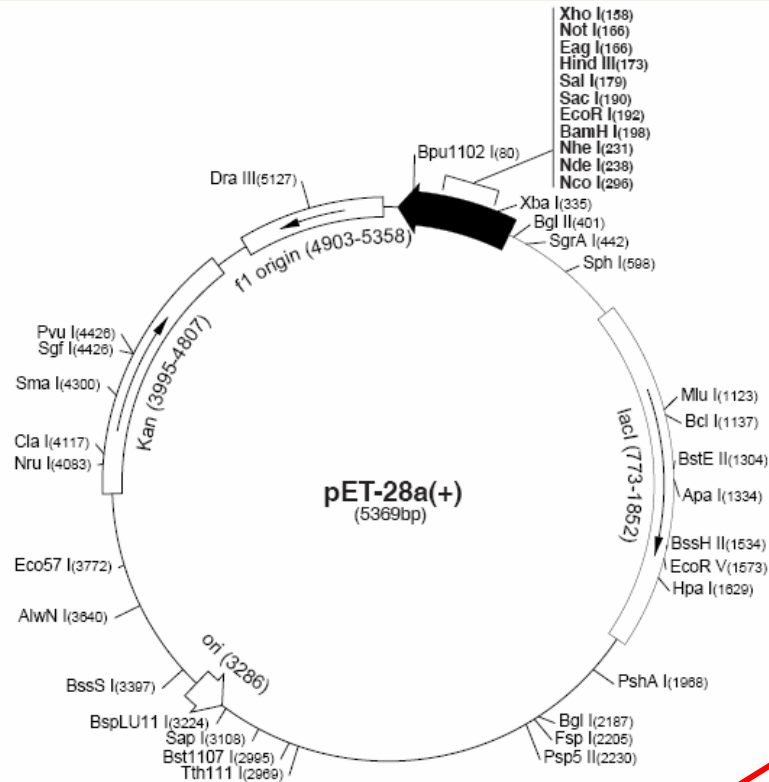
- chemická indukce (ptac, ptrp, pT7): IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranozid)

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

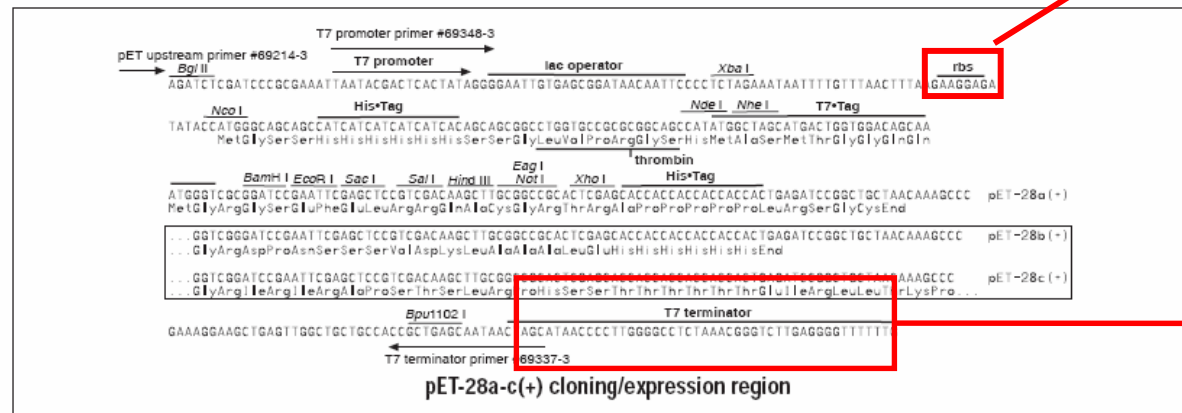
pET-28a(+) sequence landmarks

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.

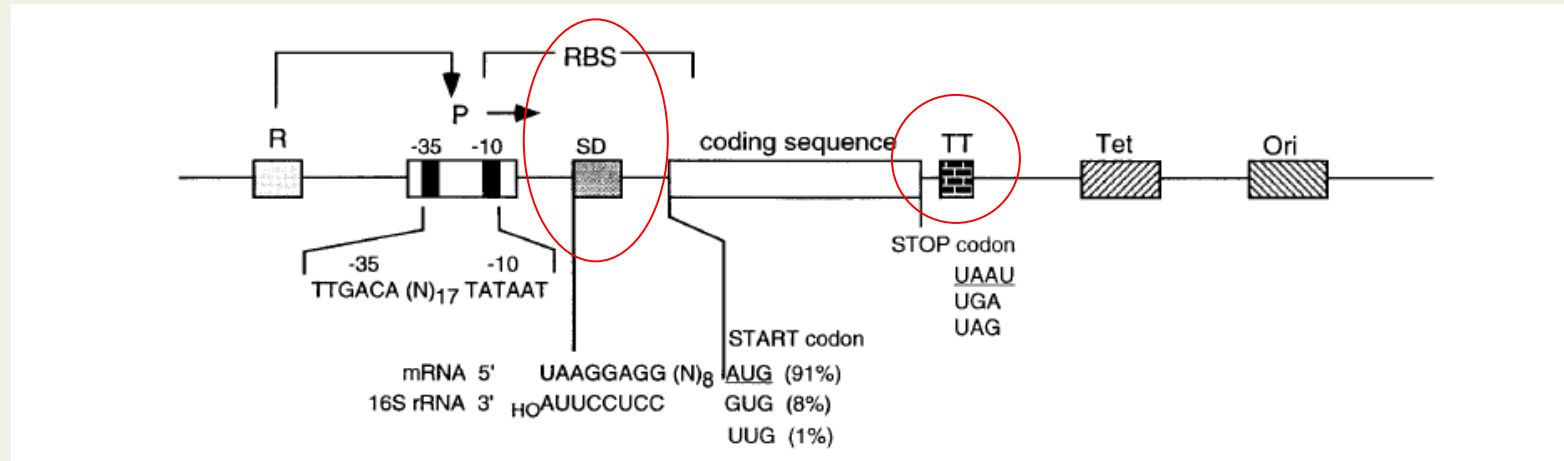


Ribozom-vazebné místo



Transkripční terminátor

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



Ribozomální vazebné místo

SD sekvence

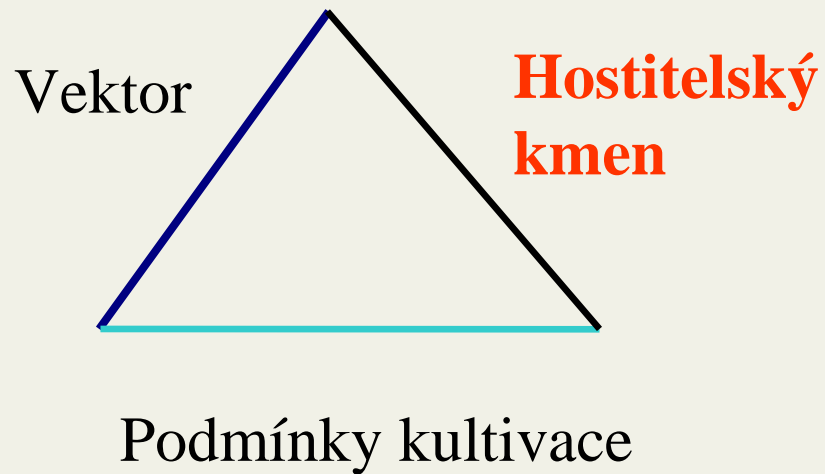
vzdálenost mezi SD sekvencí a iniciačním AUG kodonem: 4-13 nukleotidů
tato vzdálenost ovlivňuje účinnost iniciace translace (**optimální vzdálenost je 4-8 nukleotidů**) - oblast bohatá na AT páry

Transkripční terminátor

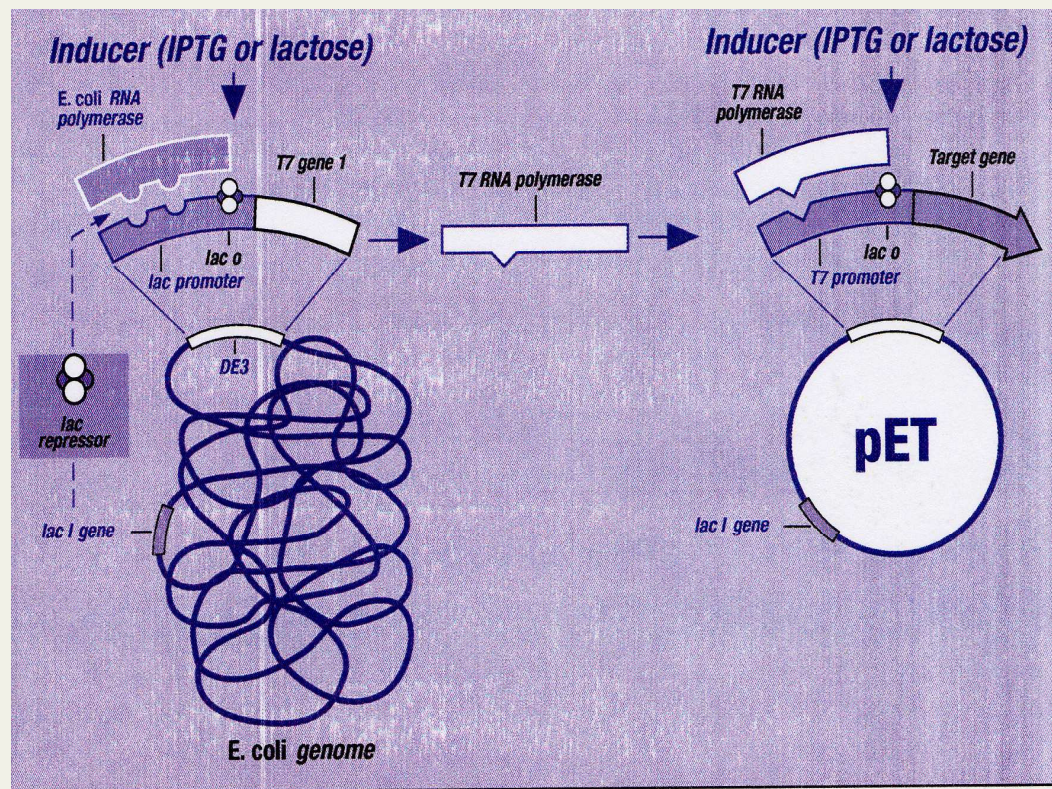
T₇ term, rrnT1, T2

(zabraňuje okluzi promotoru, zvyšuje stabilitu mRNA)

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



Expresie 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 plazmidy pLysS nebo pLysE umožňující přísnou regulaci expresního systému využívající T7 promotor. Tyto plazmidy kódují lysozym, který se váže na T7 RNA polymerasu a inaktivuje ji a minimalizují tak bazální expresi.

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.

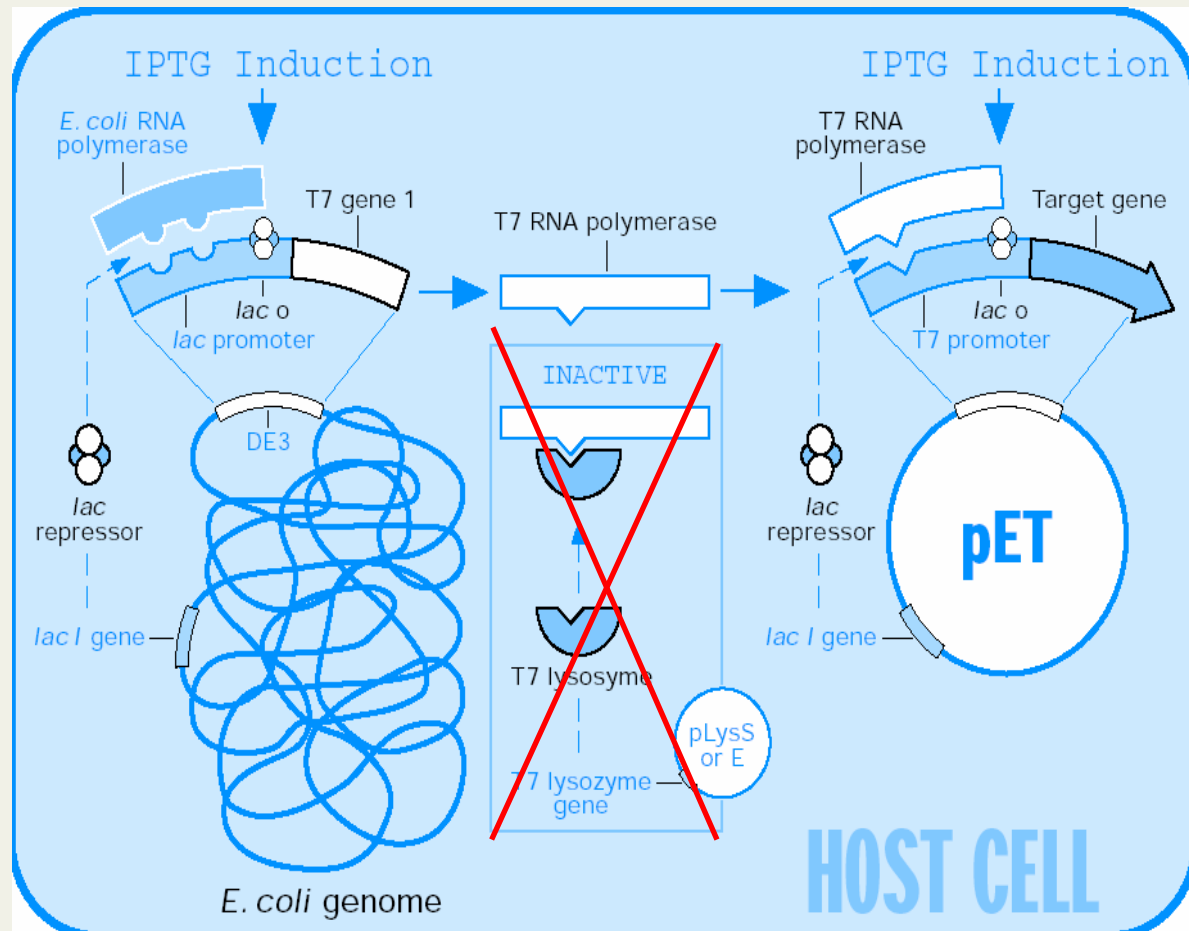
Různé úrovně minimalizace bazální exprese



BL21(DE3)

BL21(DE3)pLysS/E

BL21



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

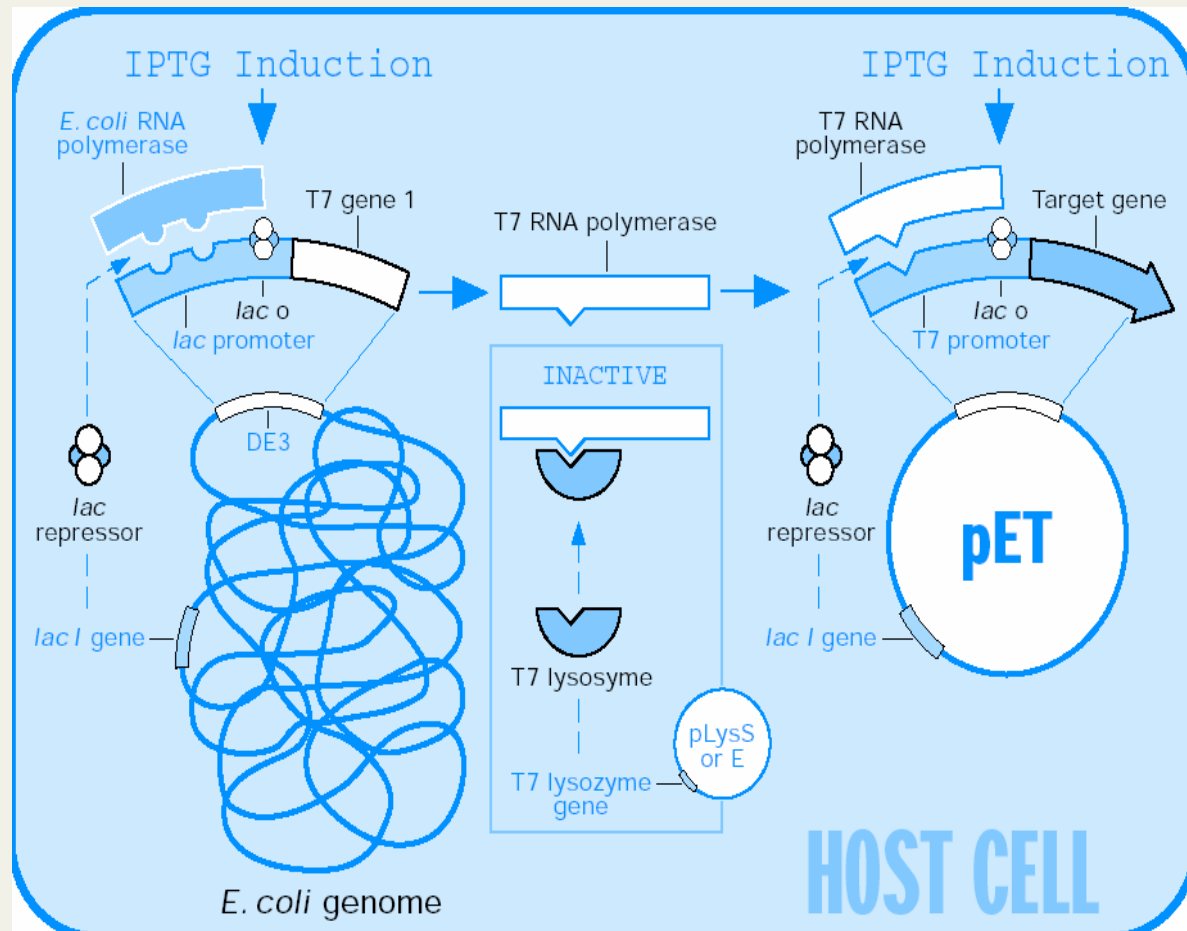
Různé úrovně minimalizace bazální exprese



BL21(DE3)

BL21(DE3)pLysS/E

BL21



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

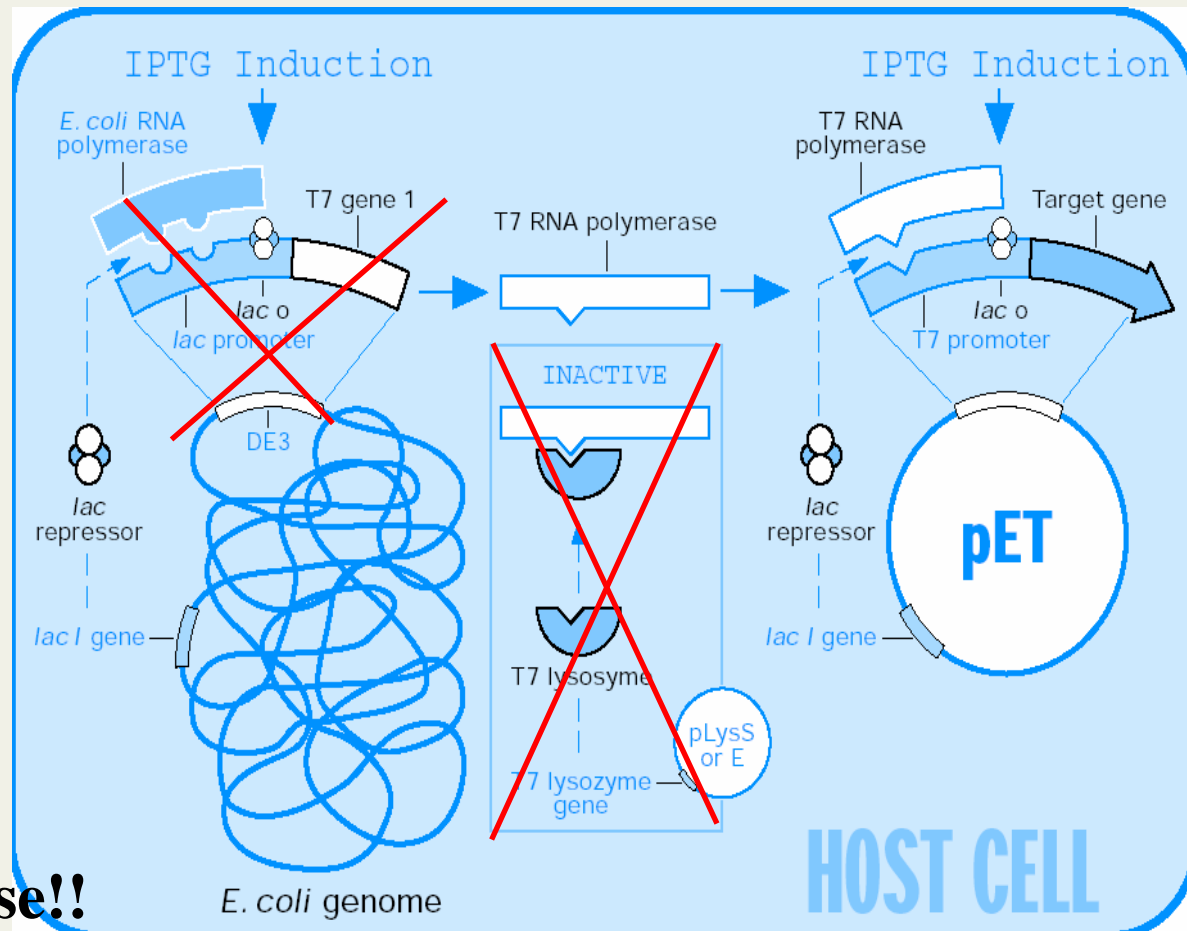
Různé úrovně minimalizace bazální exprese



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:

- sklon k využívání 1-2 kodonů u téměř všech degenerovaných kodonových rodin
- Určité kodony jsou nejvíce využívány ve všech genech nehledě 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 v cytoplazmě

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

Expres heterologní genů obsahujících málo preferované kodony vede k translačním chybám !

- předčasné ukončení translace (zkrácený produkt)
- posunutí čtecího rámce (posun až o 2 AK v místě AGA kodonu)
- záměna aminokyseliny (často bývá zaměněn arginin za lyzin v místě kodonu AGA)

Výběr hostitelského kmene *E.coli*



- **pro proteiny obsahující velké množství kodonů, které jsou málo využívané *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:

- nekompletní polypeptidy
- proteiny se zaměněnými 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

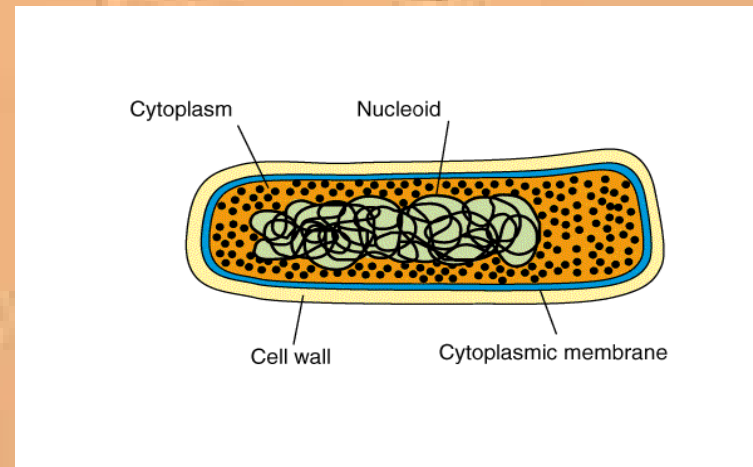
Cílená exprese proteinu

Možnosti:

Cytoplazmatická exprese

Periplazmatická exprese

Extracelulární exprese



Cytoplazmatická exprese

Výhody

- vyšší proteinový výtěžek
- jednodušší plazmidové konstrukty
- inkluzní tělíka

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 inkluzních tělísek

Inkluzní tělíska

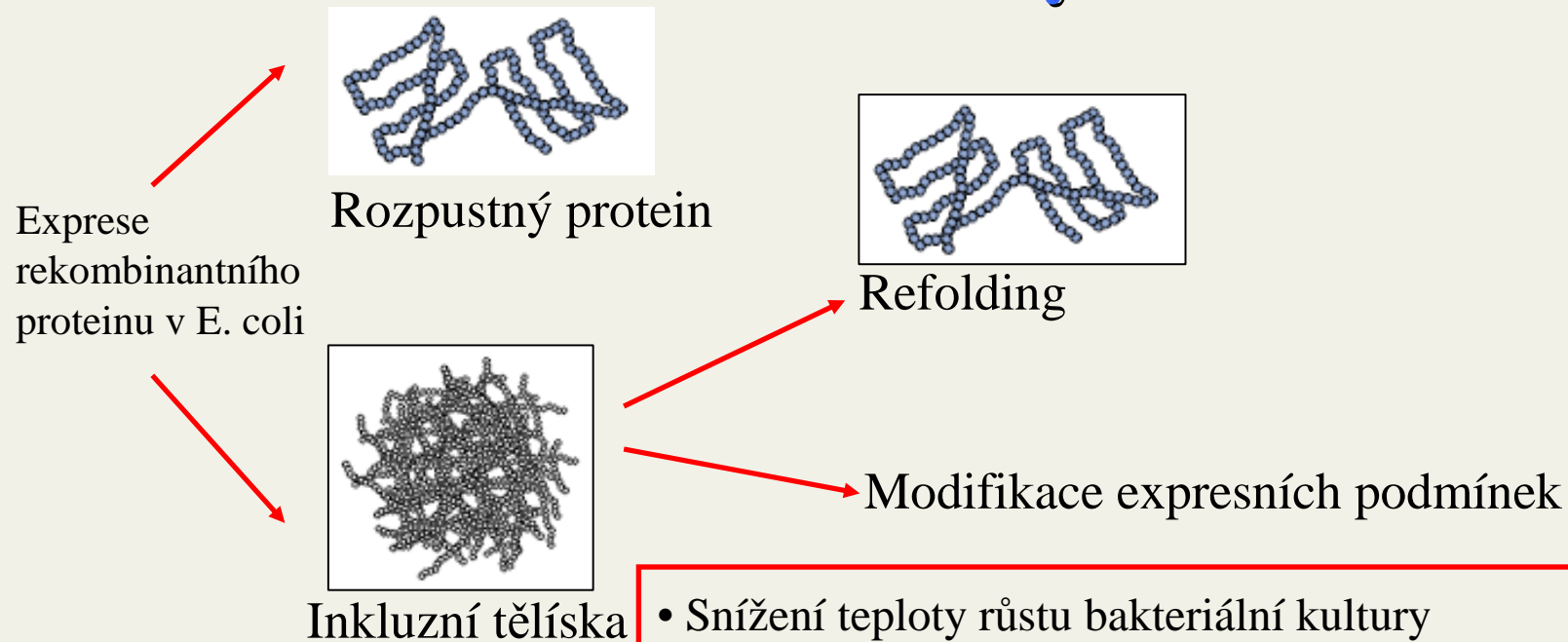
Výhody

- 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



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

Možnosti minimalizace tvorby inkluzních tělísek

Výběr hostitelského kmene *E.coli*



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

•AD494	•mutace v genu pro thioredoxinreduktasu (trxB)	• Novagen
•Origami	•Dvojitá mutace v genu pro thioredoxin reduktasu (trxB) and glutathionreduktasu (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 z *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
- mohou se také tvořit inkluzní tělíka

Extracelulární exprese

- sekrece proteinů do kultivačního média
- *E.coli* sekretuje velmi málo proteinů
- zatím spíše neúspěšná manipulace s různými transportními cestami, které by usnadňovaly sekreci cizího proteinu

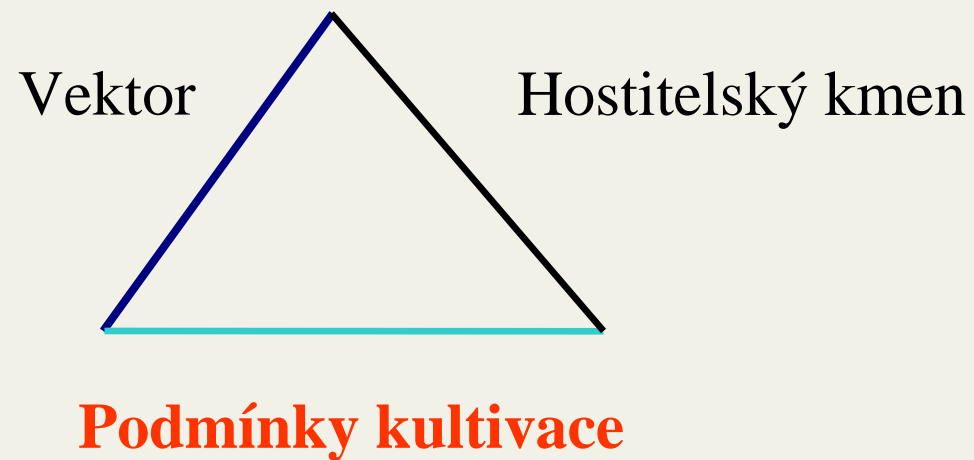
Výhody

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

Nevýhody

- často nízká sekrece
- hodně zředěný protein

Modifikace růstových podmínek



Modifikace růstových podmínek

Možnosti zvýšení produkce rozpustného proteinu pomocí:

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

Expresa 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

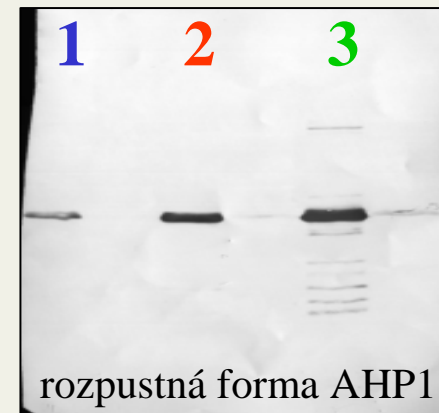
22°C (2)

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



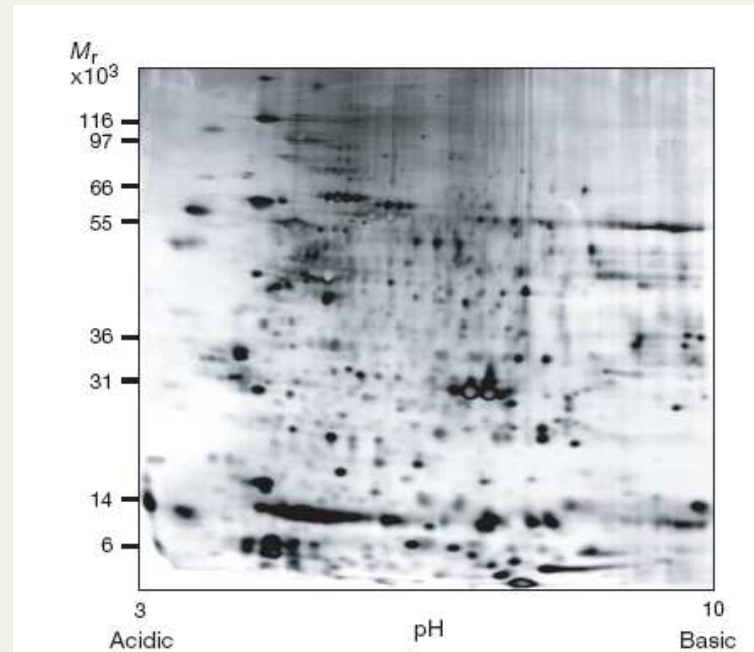
4. Detekce proteinu pomocí protilátek a kvantifikace signálů pomocí programu pro analýzu 1-D gelů (př. Quantity One- BioRad, Quanti Scan-přístupný na internetu)

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

Purifikace proteinu z komplexní směsi makromolekul přítomných v biologickém vzorku (buněčný nebo tkáňový extrakt)



Analýza buněčného extraktu 2D elektroforézou

- několik tisíc proteinů z různými vlastnostmi (~5000-8000) a v různých množstvích (aktin ~ 10%, unikátní transkripční faktor < 0,001% celkového proteinu)
- DNA, RNA, polysacharidy, lipidy

Než začneme.....

Proč???

Pro jaký účel ?

Jak???

Jak protein detekovat?

Co???

Jaké vlastnosti má protein ?

Proč??? Pro jaký účel ?

Aplikace	množství	čistota	poznámka
Identifikace	0,002-0,2 µg	vysoká (>95%)	Edmanovo odbourávání (5-10 pmol), přístupy hmotnostní spektroskopie (0,2-1 pmol)
Produkce protilátek	µg-mg	střední-vysoká	Pro imunizaci: ~ 0,1 µg proteinu Čím větší čistota tím větší a rychlejší šance pro získání vysoce specifické imunitní odpovědi
Enzymologie	1-5 mg	vysoká > 95 %	Množství proteinu závisí na citlivosti analýzy Čistota závisí na specificitě analýzy a ovlivnění výsledků analýzy kontaminacemi
Biofyzikální studie	mg-g	vysoká (>95%)	CD spektroskopie, rezonance povrchových plasmonů, fluorimetrie, analytická ultracentrifugace, UV spektroskopie
3D struktura (krystalizace, NMR)	10-20 mg	vysoká (>95%)	Hledání krystalizačních podmínek ~ 1-2 mg proteinu, získání krystalu o velikosti dostatečné pro rentgenovou difrakci 5-10 mg proteinu Pro první 1-D NMR spektra se vyžaduje ~ 0,5 µmol proteinu, protein (velikost 5-20kDa) značený ¹⁵ N / ¹³ C je nutný pro vyřešení struktury
Farmaceutické účely	mg-kg	vysoká (99,9%)	Pro klinické účely nesmí proteiny obsahovat pyrogeny a bakteriální toxiny a musí být velmi stabilní kvůli dlouhodobému skladování

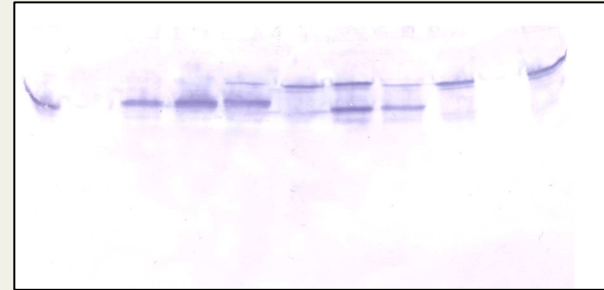
Jak???

Jak budeme protein analyzovat?

Specifická detekce:

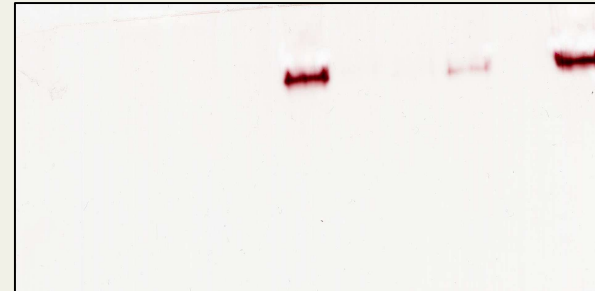
Imunodetekce

(pomocí série dvou protilátek)



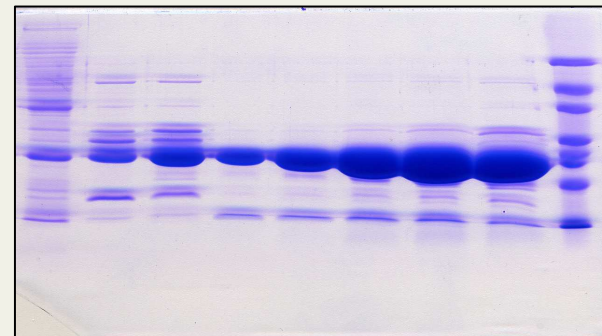
Biologická aktivita

(u enzymů např. 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 nebo z pilotních experimentů:

- velikost proteinu (SDS PAGE, gelová filtrace nebo analytická centrifugace)
- izoelektrický bod (izoelektrická fokusace)
- Stabilita (pH, teplota, přítomnost solí, proteas, additiv zajišťujících solubilitu proteinu)

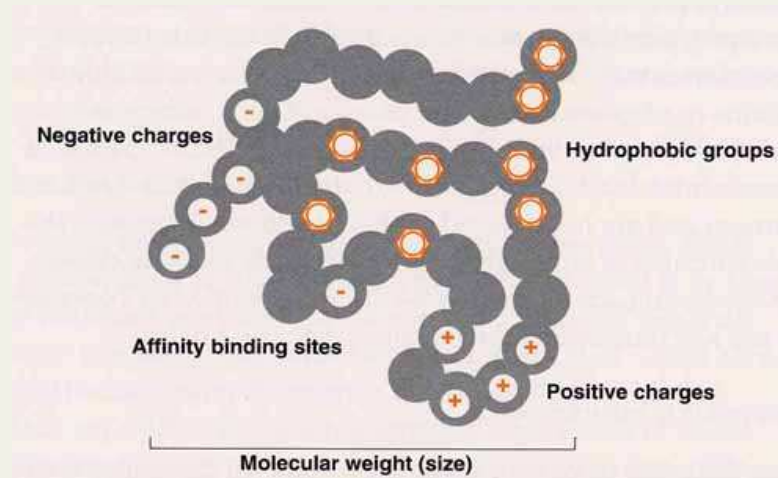
2D a nativní PAGE

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

Informace o proteinu zájmu a o příbuzných proteinech z literatury:

- strategie purifikace (metody, pufrý, stabilita proteinu,

Vlastnosti/purifikační metody



Rozpustnost

precipitace síranem amonným

Velikost/tvar

gelová filtrace

pI (povrchový náboj)

iontově výměnná chromatografie

Hydrofobicita

reverzně fázová chromatografie

Specifická vazba

afinitní chromatografie

Posttranslační modifikace

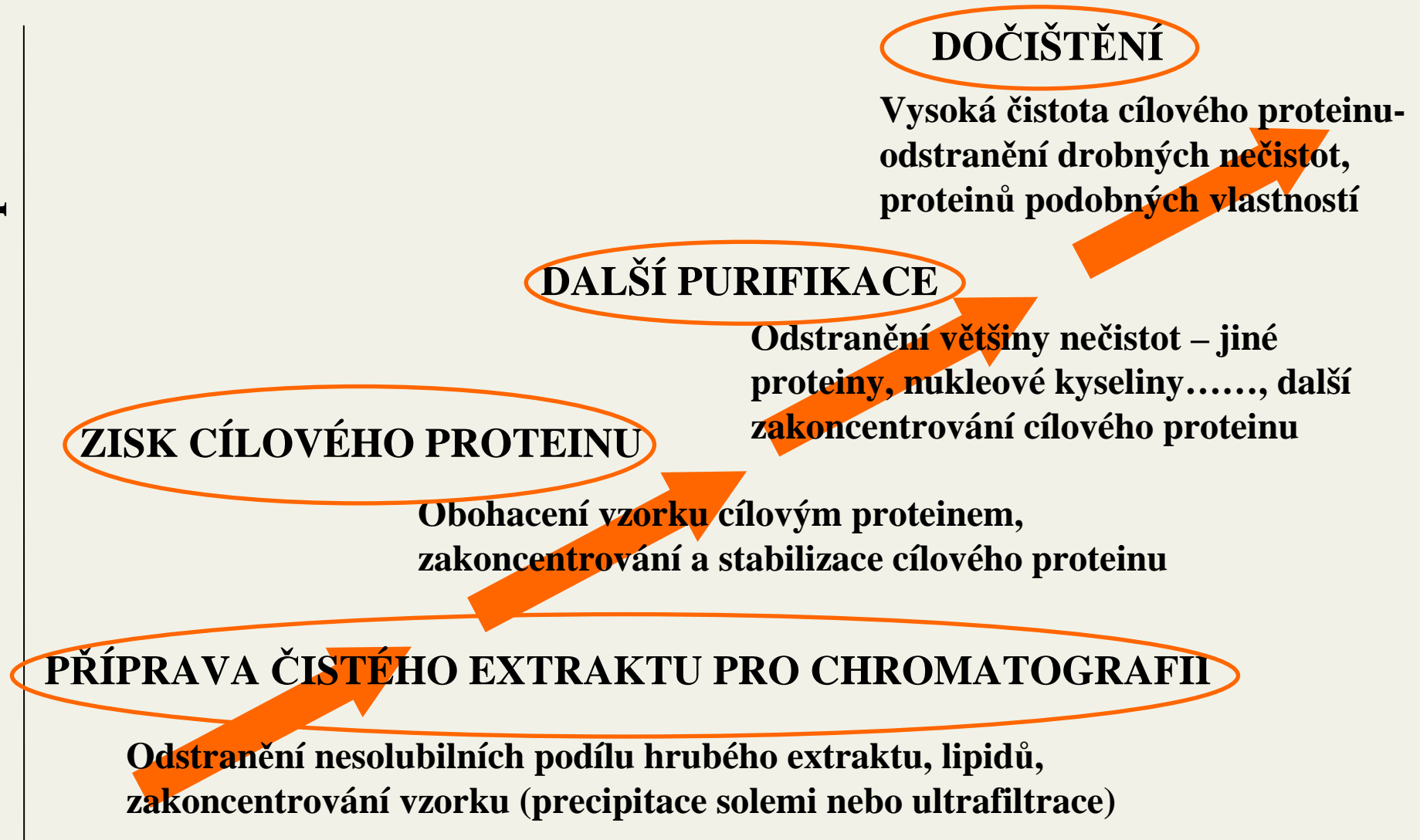
afinitní chromatografie

Stabilita

teplotní precipitace

Čtyřfázová purifikační strategie

Čistota proteinu

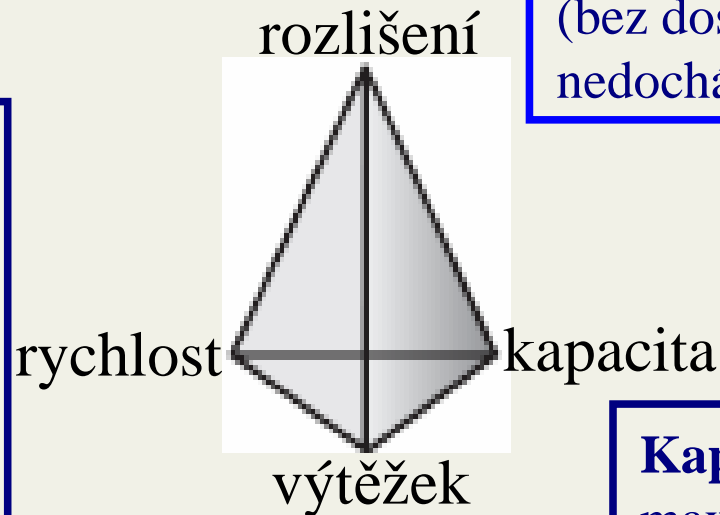


purifikační kroky

Logická kombinace purifikačních kroků

Každá separační technika je vyznačuje rovnováhou mezi **čtyřmi parametry**

Rychlost kroku je důležitá zejména kvůli možné degradaci cílového proteinu působením proteas v komplexním vzorku



Rozlišení je rozsah separace mezi dvěma chromatografickými píky (bez dostatečného rozlišení nedochází k separaci proteinů)

Kapacita (max.) je maximální množství vzorku, které může být navázáno na chromatografickou kolonu.

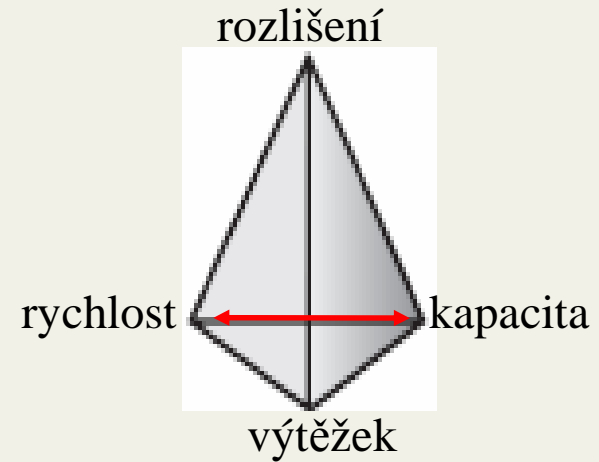
Výtěžek-minimalizace ztráty proteinu během purifikace

Získ cílového proteinu z extraktu

afinitní chromatografie

iontoměničová chromatografie

hydrofóbní chromatografie

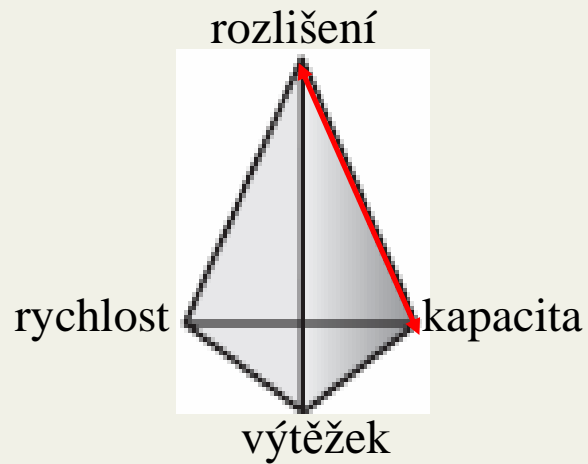


Další purifikace

iontoměničová chromatografie

hydrofóbní chromatografie

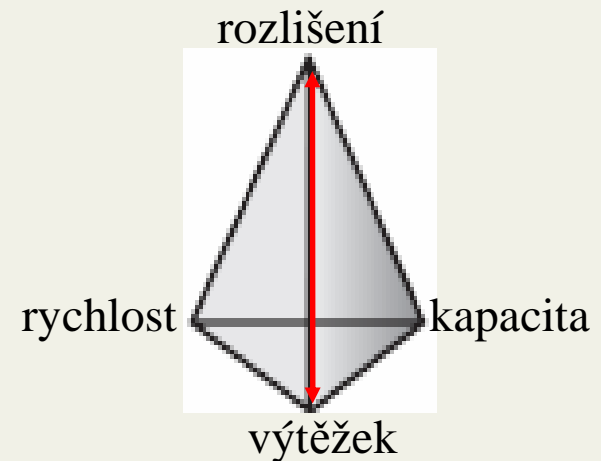
gelová filtrace



Dočištění

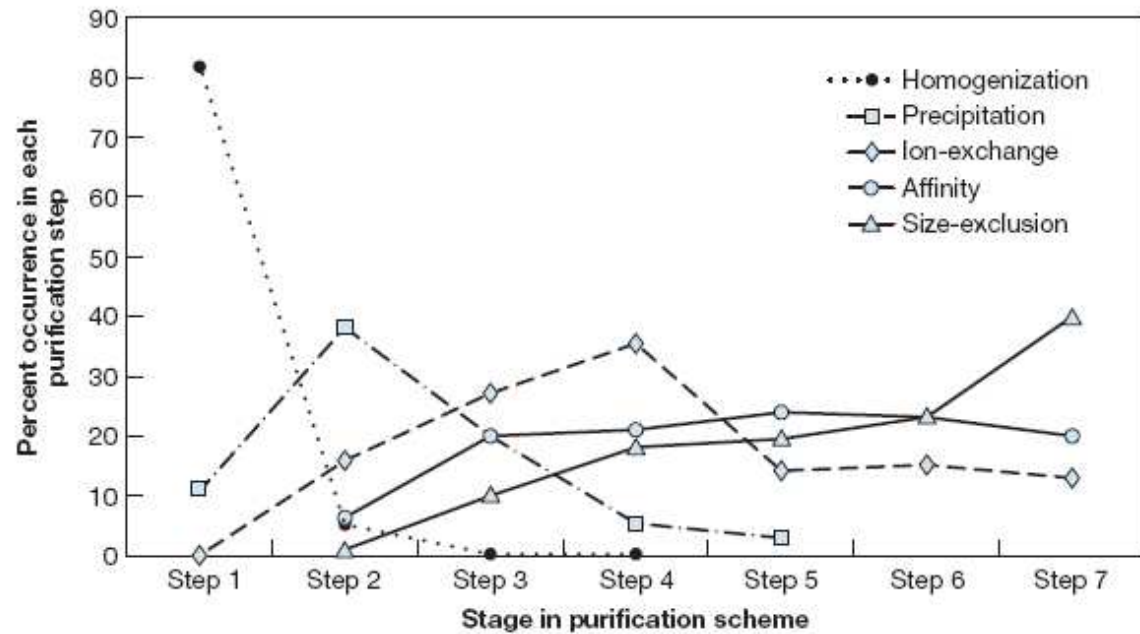
gelová filtrace

reverzně fázová chromatografie



Logické pořadí purifikačních kroků

Analýza 100 úspěšných purifikací



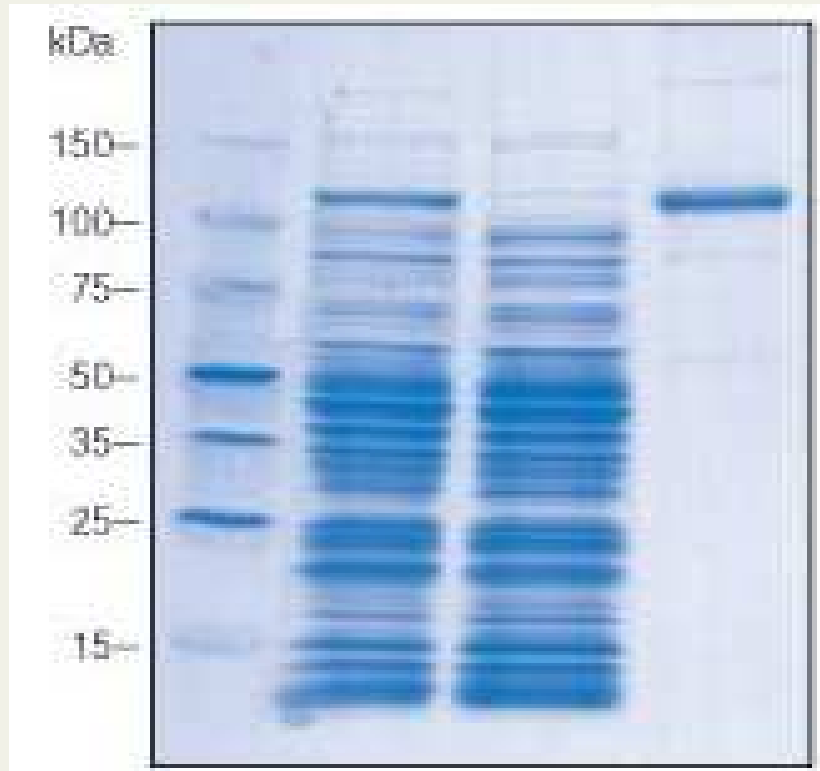
Základní zásady pro pořadí purifikačních kroků

- 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 (výměna pufrů mezi různými separačními technikami např. dialýza nebo ultrafiltrace → snížení výtěžku)
- příklad: po precipitaci síranem amonným nebo iontoměničové chromatografii (protein je eluován z kolony za vysokých koncentracích solí) zařadit hydrofóbní chromatografii (vzorek dávkován na kolonu ve vysoké koncentraci soli)
- jednotlivé separační metody pokud možno neopakovat
 - čím méně kroků, tím větší výtěžnost proteinu

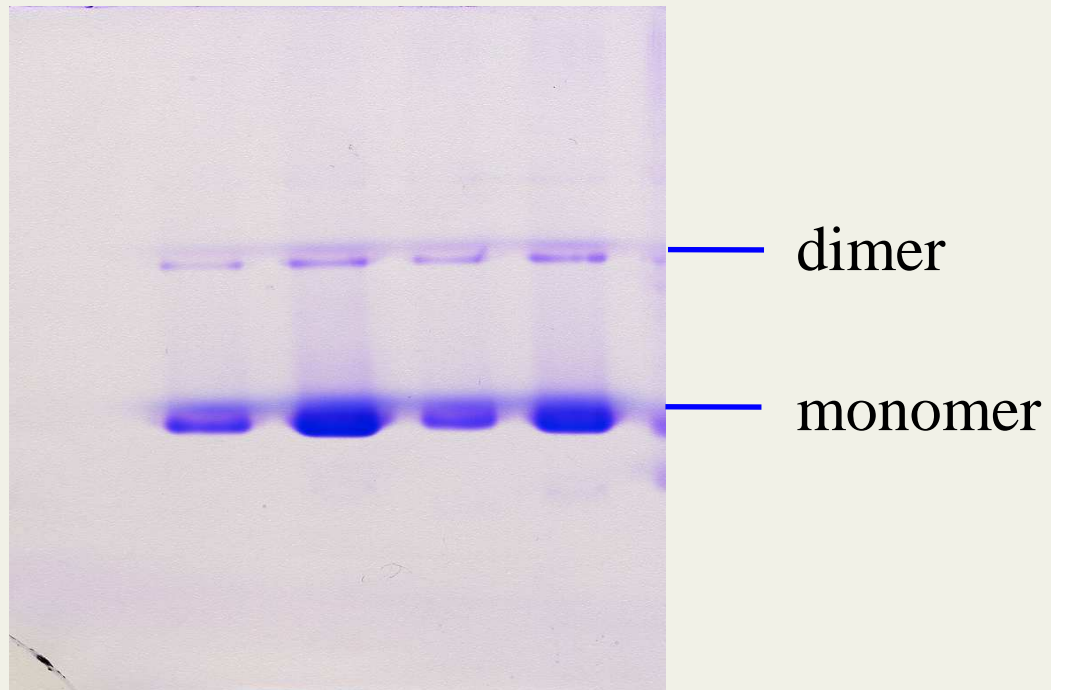
Sledování čistoty proteinů

SDS PAGE

Standardy
Původní vzorek
Nenavázané proteiny
Eluované proteiny



Nativní PAGE



FÚZNÍ PROTEINY

Translační fúze sekvencí kódujících rekombinantní protein a

a) krátký peptid [př. (His)_n, (Asp)_n, (Arg)_n ...]

- uniformita purifikace

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

- pozitivní změny kvality a kvantity exprese

(často zvýšení solubility rekombinantního proteinu)

- uniformita purifikace

- detekce, sekrece

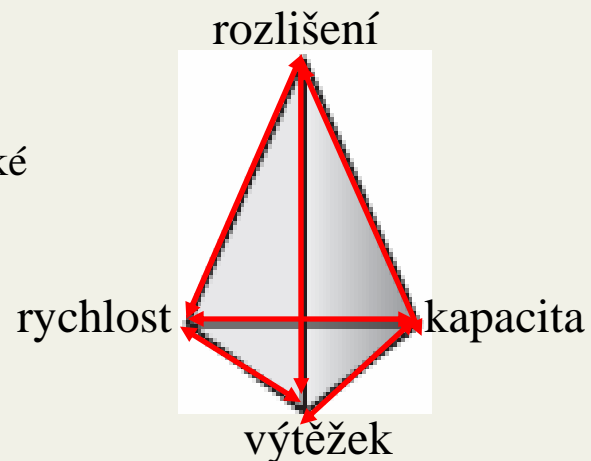
- fúzního partnera lze obvykle selektivně odštěpit

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

REKOMBINANTNÍ PROTEINY S FÚZNÍ KOTVIČKOU

Kotvička (tag)	Typ chromatografie	Princip separační techniky
poly [His]	afinitní	vazba na kov
IgG vazná doména	afinitní	vazba na protilátku
Poly [Asp]	iontoměničová	vazba na anion vazající matrici
Poly [Phe]	hydrofóbní	vazba na hydrofóbní matrici
<i>Strep</i> -tag	afinitní	vazba na streptavidin
Poly [Arg]	iontoměničová	vazba na kation vazající matrici

Separační techniky charakteristické rovnováhou všech parametrů



His-Tag jako N či C-koncové prodloužení proteinu

Vazné místo pro kov

Rozpoznávací sekvence pro proteasu thrombin

MGSSHHHHHSSG**LVPRGS**

FaktorXa **IEGR/X**

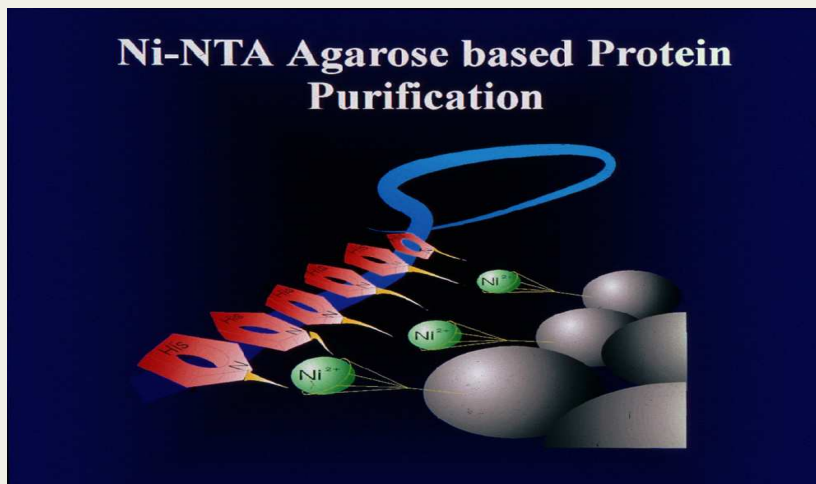
Enterokinasa **DDDDK/X**

3C proteasa **LEVLFQ/GP**

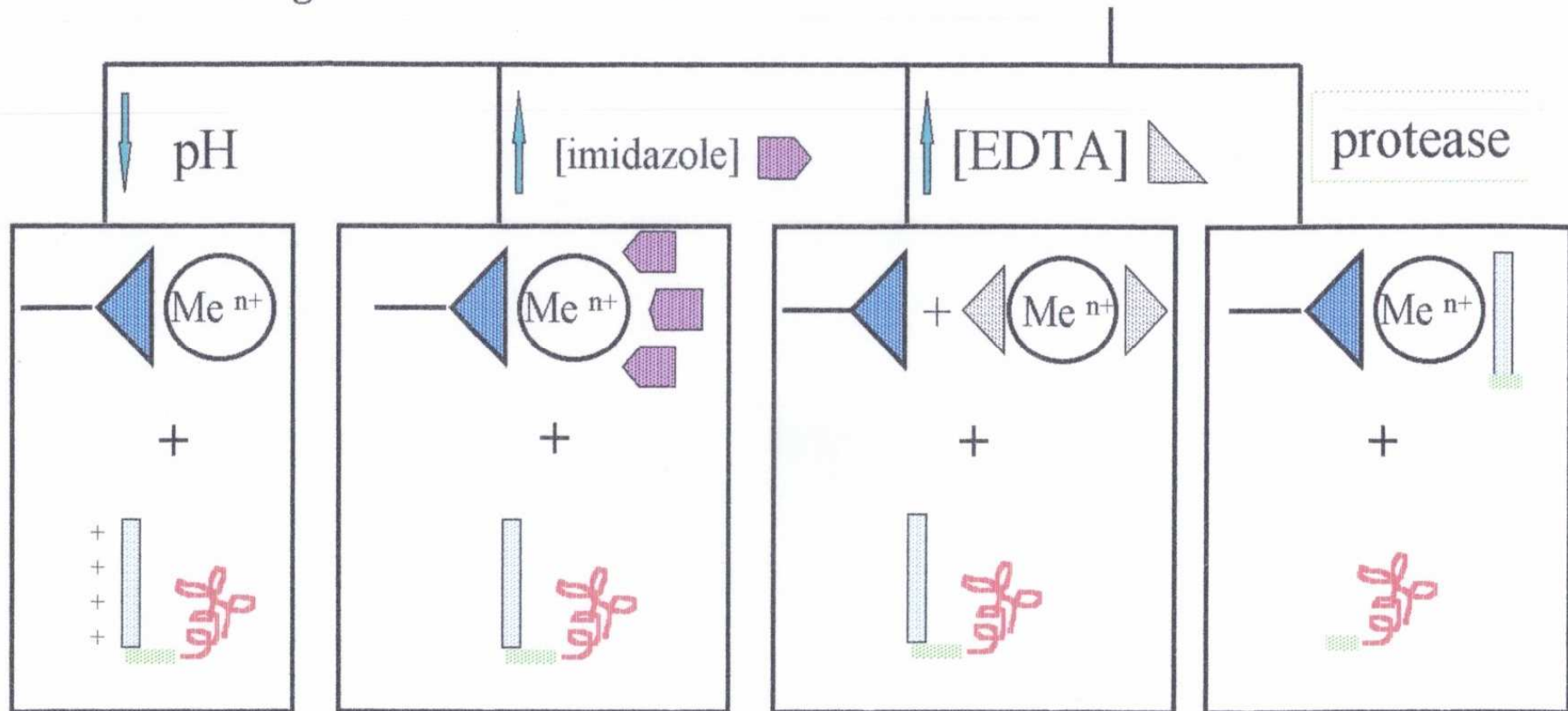
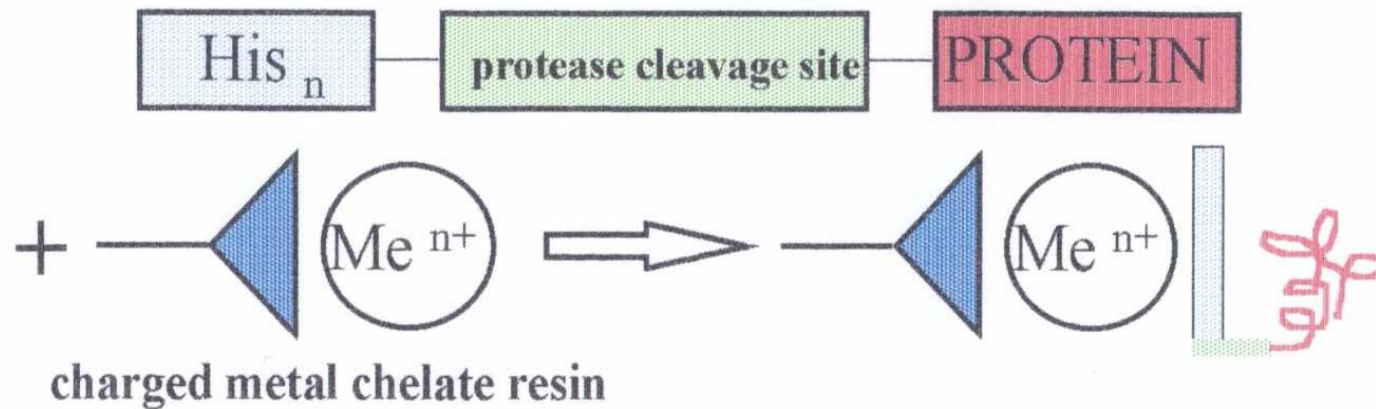
TEV proteasa **ENLYFQ/G**

Metalochelelační 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

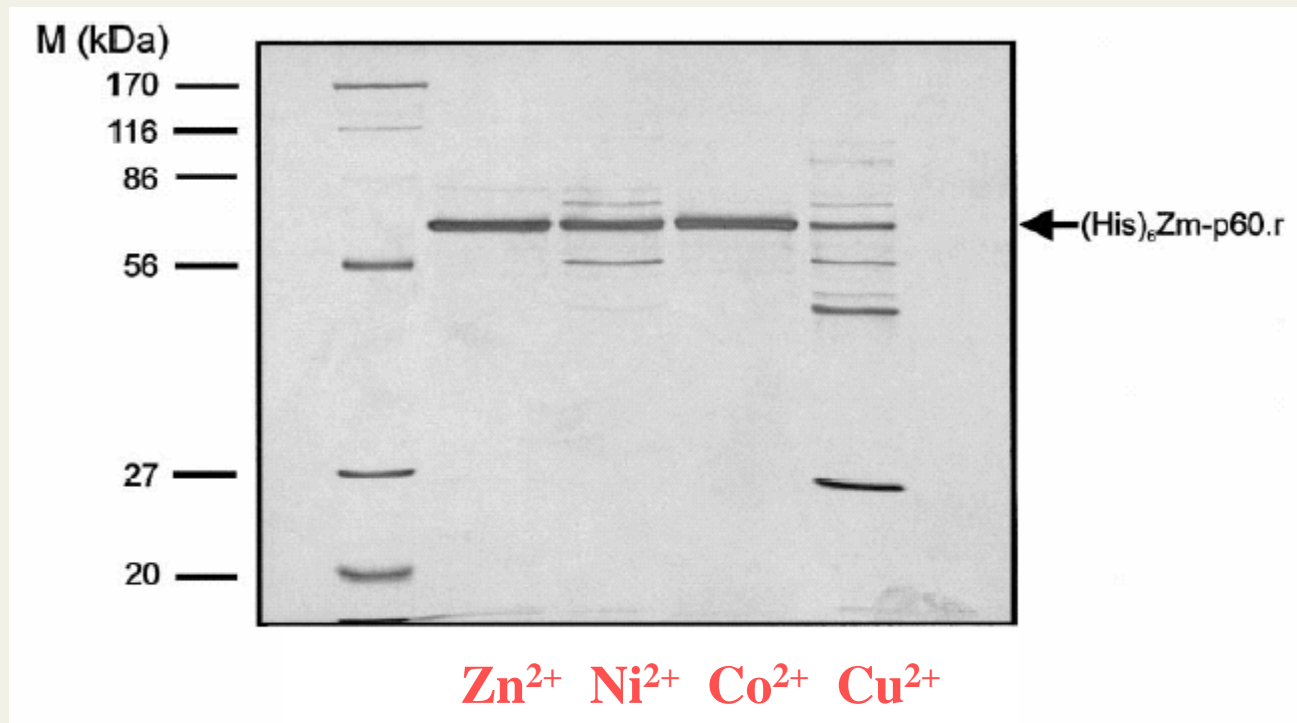


Immobilized metal affinity chromatography



Efekt kovového iontu navázaného na POROS MC/M matrici

Funkční skupina- imidodioctová kyselina



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

Metalochelatační 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 proteinu 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

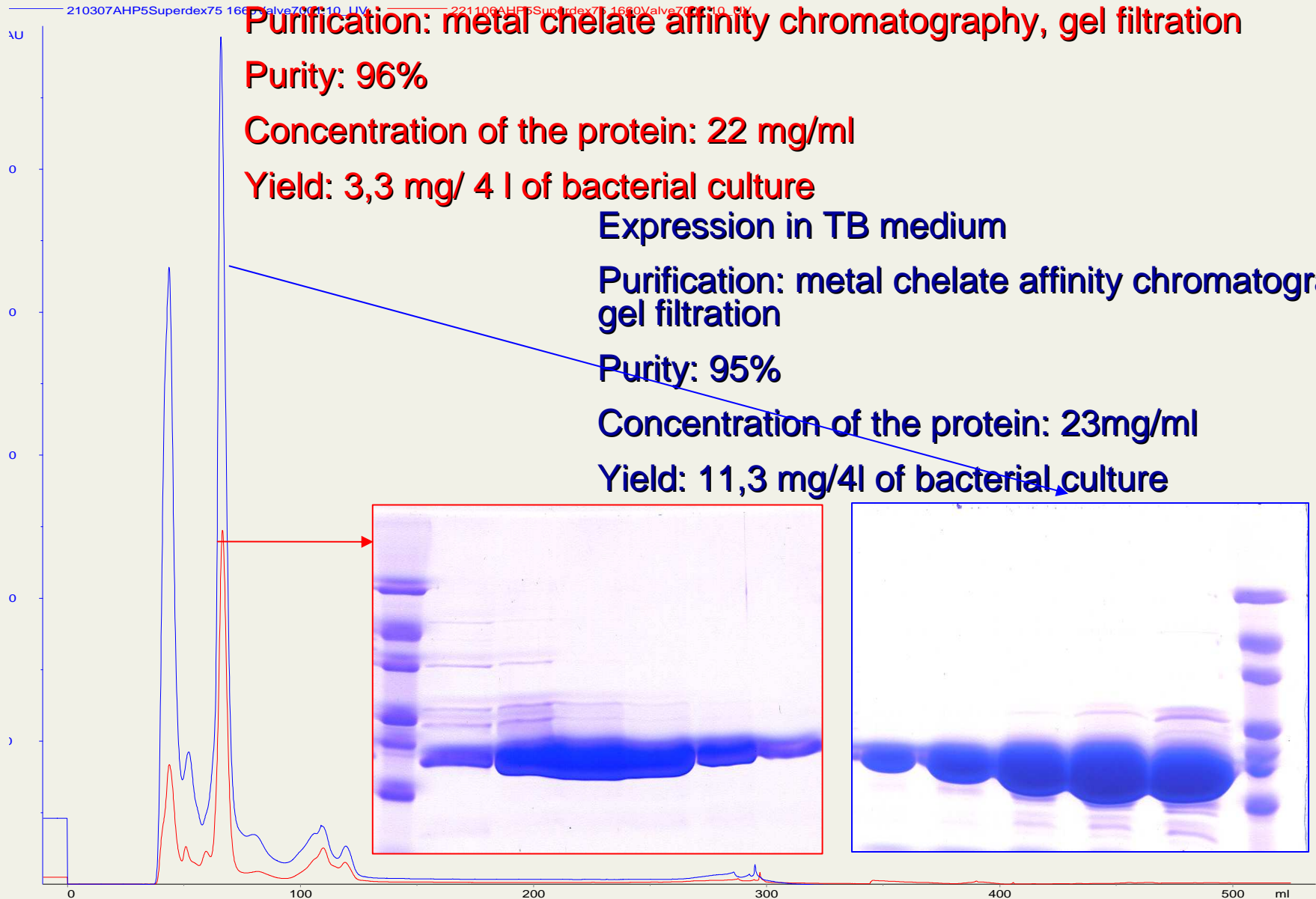
Expression in TB medium

Purification: metal chelate affinity chromatography, gel filtration

Purity: 95%

Concentration of the protein: 23mg/ml

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



Základní doporučení pro uskladnění proteinu po purifikaci

Doba skladování: pár dnů až více než rok – záleží na přirozených vlastnostech proteinu a podmínkách, ve kterých je protein skladován

1. Teplota

Podmínky skladování				
Podmínky	Roztok na 4°C	Roztok na -20°C v 25-50% glycerolu	-80°C, tekutý dusík	Lyofilizovaný vzorek, zamražený
Doba skladování	1 měsíc	1 rok	roky	roky
Požadavek sterilního prostředí nebo přidavek antibakteriálního additiva	ano	Obvykle ano	ne	ne
Kolikrát může být takto skladovaný vzorek použitý?	mnohokrát	mnohokrát	1 x , opakované zamrazování a rozmrazování obecně vede k degradaci proteinu	1 x,

Základní doporučení pro uskladnění proteinu po purifikaci

2. Koncentrace proteinu

- rozředěním proteinu na $< 50 \mu\text{g/ml}$ dochází často k jeho inaktivaci nebo ztrátě proteinu

- disociují podjednotky multimerních proteinů
- ztráta proteinu kvůli signifikantní adsorpci na různé povrchy

Protein by měl být skladován při koncentraci nejméně 1 mg/ml nebo se může protein stabilizovat přidavkem jiného proteinu např. BSA nebo přidavkem additiva

3. Přídavek additiv zajišťujících stabilitu proteinu během skladování

- 25-50% glycerol nebo etylenglykol
- 0,02-0,05 % NaN_3
- inhibitor proteas
- 1-5 mM EDTA
- 1-5mM DTT, merkaptoetanol

Doporučená literatura

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

Simpson RJ; Adams PD; Golemis E

Basic methods in protein purification and analysis: a laboratory manual,
Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009,
436 s., ISBN 978-0-87969-868-3

Navazující předměty

Výukový modul: **Příprava a charakterizace proteinů**

Příprava a charakterizace proteinů I - **Expres a purifikace proteinů** (v češtině)

Příprava a charakterizace proteinů II – **Biokatalýza a enzymová technologie** (v angličtině)

Příprava a charakterizace proteinů III – **Proteinem zprostředkované interakce** (v angličtině)

