

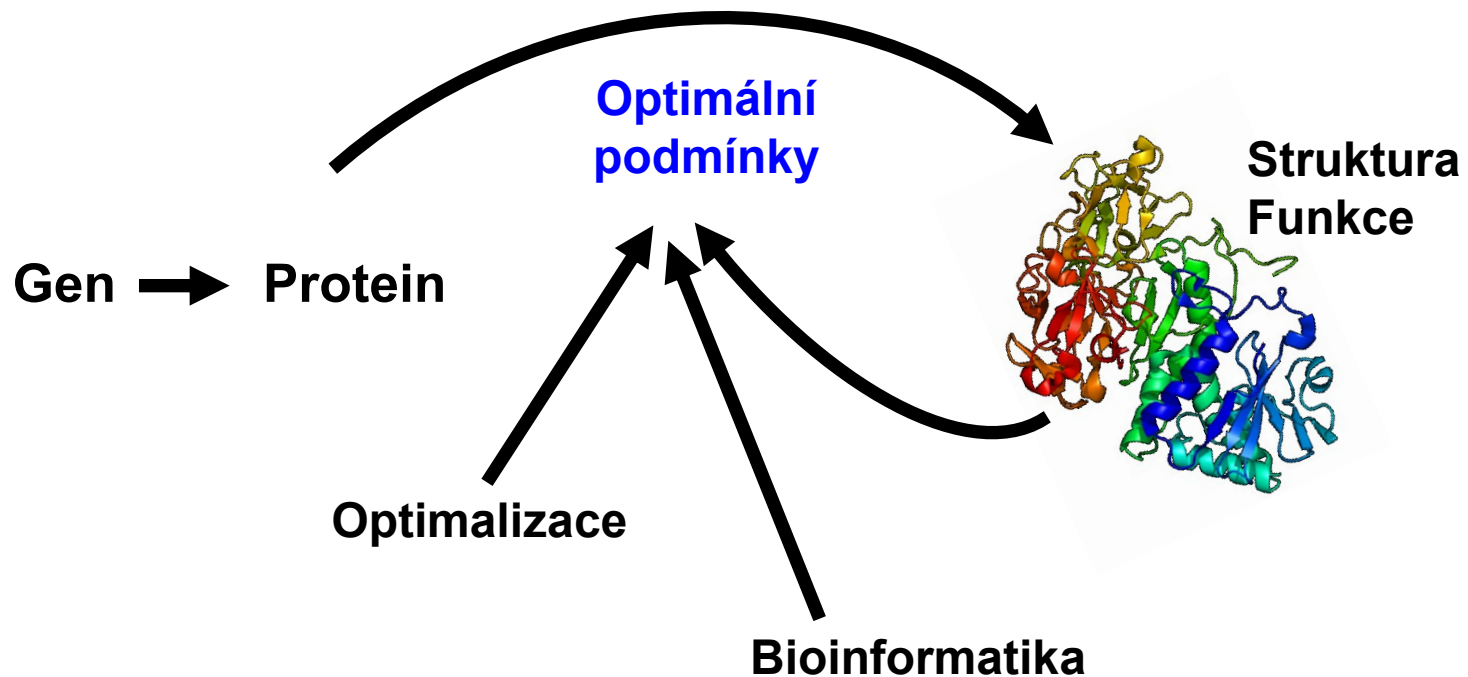
# Produkce rekombinantních proteinů

## Teoretický úvod

Aplikovaná bioinformatika, Jaro 2014

# Práce s proteiny – Zisk proteinů

Protein je správně sbalený, aktivní, v dostatečném množství a koncentraci



# Zisk proteinů

- Izolace *nativních* proteinů z přirozeného zdroje



**Krev a další  
tělní tekutiny**

<http://www.fnbrno.cz/darcovstvi-krve/k1570>



<http://www.laboratorni-mysi.cz>



**Buňky různých  
tkání a orgánů**

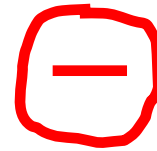


# Získ proteinů

- Izolace *nativních* proteinů z přirozeného zdroje



- Je možné získat velké množství proteinu.
- Může být levná.
- Nemusíme řešit správné sbalování (folding) proteinů a posttranslační modifikace.



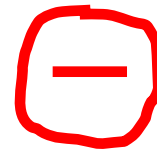
- Organismus může obsahovat velmi málo cílového proteinu, navíc pouze za specifických podmínek a po omezenou dobu.
- Organismus může být nebezpečný (viry) nebo obtížně kultivovatelný/chovatelný.

# Získ proteinů

- Izolace *nativních* proteinů z přirozeného zdroje



- Je možné získat velké množství proteinu.
- Může být levné.
- Nemusíme řešit správné sbalování (folding) proteinů a posttranslační modifikace.



- Získ a zpracování materiálu může být velmi drahé a časově a technologicky náročné. Nebo trestné.



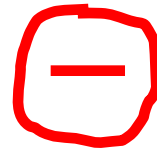
<http://www.zoovienna.at/>

# Získání proteinů

- Izolace *nativních* proteinů z přirozeného zdroje



- Je možné získat velké množství proteinu.
- Může být levné.
- Nemusíme řešit správné sbalování (folding) proteinů a posttranslační modifikace.



- Problémem je rovněž složitost přírodního materiálu. Je nutné využívat množství purifikačních a separačních metod!

C4830 Instrumentální biochemické metody  
C7030 Separační metody  
C6260 Metody separace proteinů  
C6200 Biochemické metody

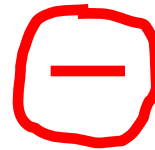
# Zisk proteinů

- **Komercialně dostupné proteiny**



- **Jednoduché a (někdy) rychlé.**
- **Definované složení.**

Výhodné, když používáme proteiny jako **NÁSTROJE** v běžných metodách (enzymy, stabilizátory).



- **Může být dost drahé.**
- **Omezené množství (za hodně peněz málo proteinu).**
- **Dostupná forma nemusí být vhodná pro náš účel.**

# Zisk proteinů

- Komerčně dostupné proteiny

[LOGIN](#) [REGISTER](#) [CHANGE COUNTRY](#)

**SIGMA-ALDRICH®**

albumin



**SAVE TIME,  
EFFORT, AND COST  
WITH PHARMACEUTICAL  
SECONDARY STANDARDS**

Human albumin

Albumin from bovine serum

Albumin human

Albumin solution from bovine serum

Albumin from chicken egg white

[VIEW ALL SEARCH RESULTS](#)

○○●○○○

<http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>





# Zisk proteinů

- Komerčně dostupné proteiny

## Price and Availability

SKU-Pack Size	Availability	Price (EUR/CZK)	Quantity		
A2153-10G	✓ Estimated Delivery 09.04.2013 - FROM	1,708.20	<input type="text" value="0"/>	★	i
A2153-50G	✓ Estimated Delivery 09.04.2013 - FROM	6,383.00	<input type="text" value="0"/>	★	i
A2153-100G	✓ Estimated Delivery 09.04.2013 - FROM	11,024.00	<input type="text" value="0"/>	★	i
A2153-500G	✓ Estimated Delivery 09.04.2013 - FROM	43,940.01	<input type="text" value="0"/>	★	i
A2153-1KG	✓ Estimated Delivery 09.04.2013 - FROM	66,040.00	<input type="text" value="0"/>	★	i

Bulk orders?

 ADD TO CART 

## Práce s proteiny

- Většina savčích proteinů začíná denaturovat již při teplotách nad 40 °C. Při teplotě 95 °C dochází k úplné denaturaci téměř všech proteinů během několika minut. K výrazné destabilizaci a denaturaci může docházet již za laboratorní teploty (25 °C).

S proteiny pracujeme „na ledu“.



## Práce s proteiny

- Při práci s nízkými koncentracemi proteinů (< 1 mg/ml) se může výrazně projevit ztráta způsobená vazbou na stěny použité nádoby (zkumavky).

Pokud je to možné, lze použít inertní proteiny (BSA, cca 2 mg/ml), které vazbě zabrání.



# Zisk proteinů

- Koměrně dostupné proteiny

+33 (0)4 76 40 71 61

Home About ELICITYL About OligoTech® Plant Health News Contact

## OligoTech®

Natural polysaccharides and Oligosaccharides extracted from Biomass

---

Glycan Oligosaccharides

---

Glycobricks®

---

Glycosaminoglycans

---

Aminoglycoside derivatives


---

Human & Bacterial Lectins

---

ELICITYL Research and production of highly purified oligosaccharides for agriculture, pharmacy, nutraceuticals and cosmetics.  
ELICITYL has two commercial offers:

- ▶ [OligoTech®](#): a bank of tailor-made complex sugars
- ▶ [PEL101GV®](#): Complex sugars for Plant health



---


## OligoTech®


A library of tailor-made complex sugars for biomedical, cosmetic, nutraceutical and agriculture applications :

- ▶ [Catalogue](#)
- ▶ [Customized delivery](#)
- ▶ [Analysis services](#)

### Plant Health

 Frost protection for vineyard: [PEL101GV®](#)

 Aide protection gel pour la vigne:  
[PEL101GV®](#)



# Získ proteinů

- **Chemická syntéza**
- **Chemická syntéza peptidů** – karbodiimidová metoda, produkce převážně kratších řetězců (syntéza na nosičích, nutnost aktivace funkčních skupin, blokování, odblokování)
- **Chemická syntéza proteinů** – metodický rozvoj umožnil úplnou chemickou přípravu i proteinů o délce cca 200 aminokyselin.

Chcete vědět víc?

Lukáš Žídek

Skripta předmětu C9530 Strukturní biochemie

# Zisk proteinů

- **Chemická syntéza**

## Through the looking glass – a new world of proteins enabled by chemical synthesis<sup>†</sup>

**Stephen Kent,\* Youhei Sohma, Suhuai Liu, Duhee Bang, Brad Pentelute and Kalyaneswar Mandal**

Nonetheless, despite the powerful methods that had been developed for the chemical synthesis of peptide chains, through the early 1990s reproducible total synthesis was limited to only the smallest proteins containing ~50 amino acids [4–7]. The main problems limiting the size of synthetically accessible peptide chains were the insolubility of protected peptide segments and racemization in solution synthesis, and the statistical accumulation of error peptide byproducts in stepwise solid phase synthesis.

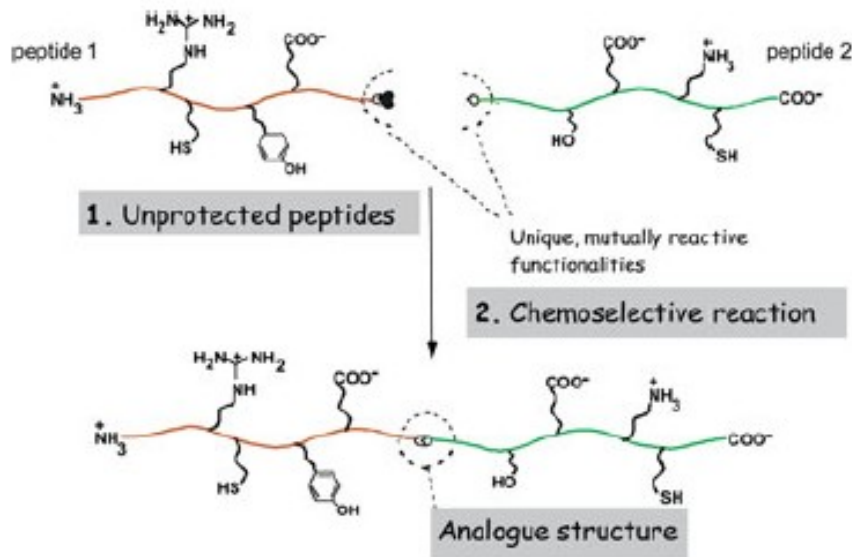
In 2007, Durek reported the total chemical synthesis of human lysozyme (130 amino acid residues; eight Cys residues in four disulfides) and the determination of the high-resolution X-ray structure of the synthetic enzyme, which had full catalytic activity (Figure 1) [8]. Contemporaneously, Torbeev reported the total chemical synthesis of a 203 amino acid residue covalent dimer of the HIV-1 protease protein molecule, also characterized by high-resolution X-ray crystallography and with full enzymatic activity (Figure 2) [9]. Each of these total syntheses was the work of just one talented young scientist using manual synthetic methods. Clearly, a transformation of our ability to make proteins by chemical synthesis had taken place in the preceding ~15 years.

# Zisk proteinů

- Chemická syntéza

## Through the looking glass – a new world of proteins enabled by chemical synthesis<sup>†</sup>

Stephen Kent,\* Youhei Sohma, Suhuai Liu, Duhee Bang, Brad Pentelute and Kalyaneswar Mandal

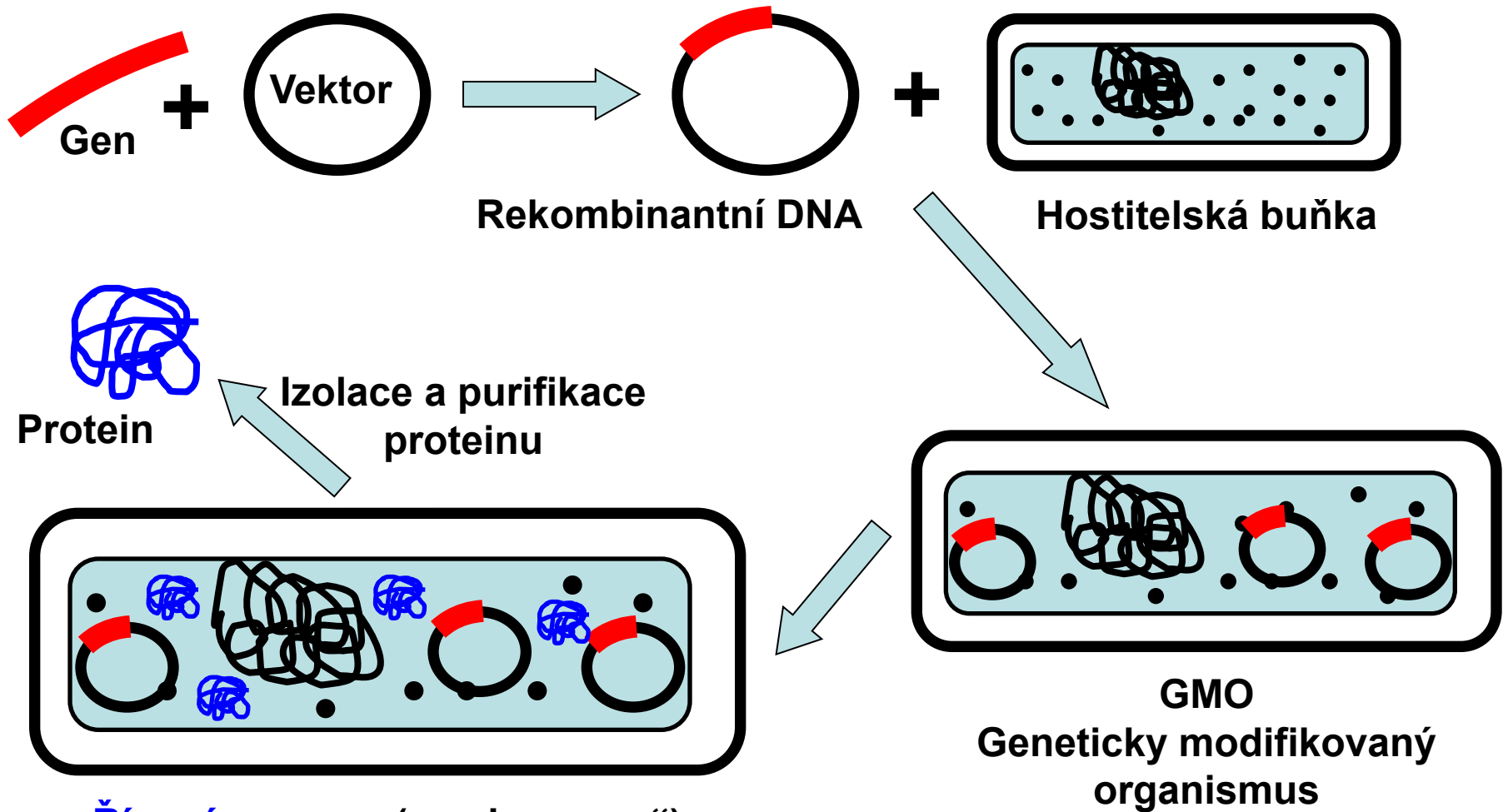


*"The chemical ligation approach... breaks the conceptual shackles imposed by the peptide bond, frees us from the linear paradigm of the genetic code, and opens the world of proteins to the entire repertoire of chemistry."*

S. Kent and associates [31]

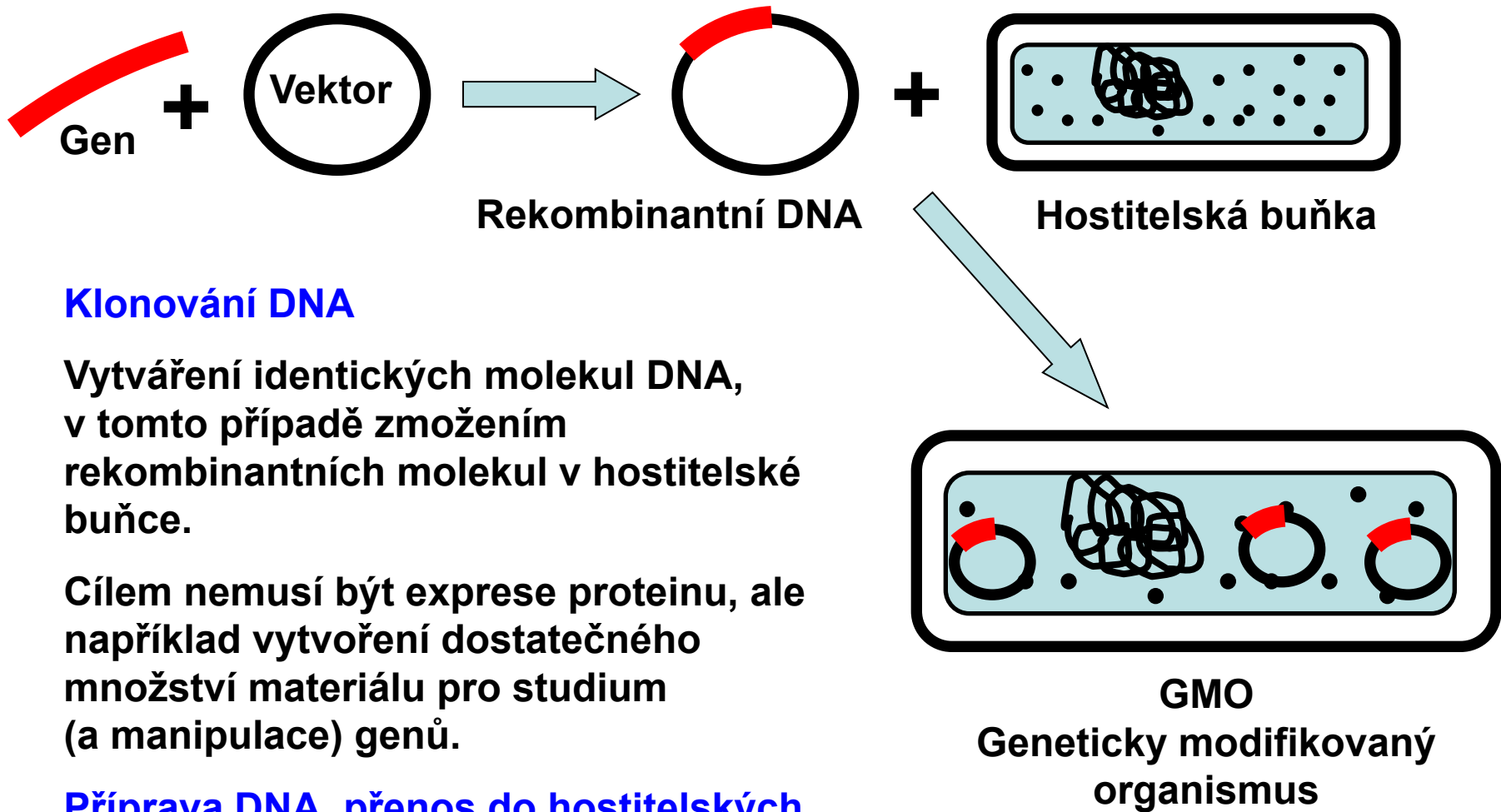
Total protein synthesis based on modern chemical ligation methods enables the reproducible preparation of protein molecules of a size that less than 20 years ago was considered to be inaccessible to chemistry. Key to this ability is the covalent chemical condensation of unprotected peptide segments by means of an *unnatural* link between the two reacting segments. In the native chemical ligation refinement of this approach, the initial thioester-linked intermediate rearranges to give a native amide bond at the ligation site.

# Produkce rekombinantních proteinů



**Řízená** exprese („nadexprese“) našeho genu: „Začni ho dělat teď a hodně a nepřestávej!“

# Produkce rekombinantních proteinů



## Klonování DNA

Vytváření identických molekul DNA, v tomto případě zmožením rekombinantních molekul v hostitelské buňce.

Cílem nemusí být exprese proteinu, ale například vytvoření dostatečného množství materiálu pro studium (a manipulace) genů.

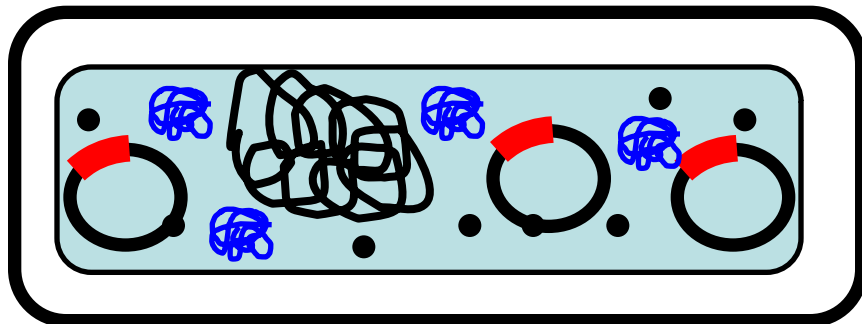
**Příprava DNA, přenos do hostitelských buněk, selekce transformovaných buněk.**

# Produkce rekombinantních proteinů

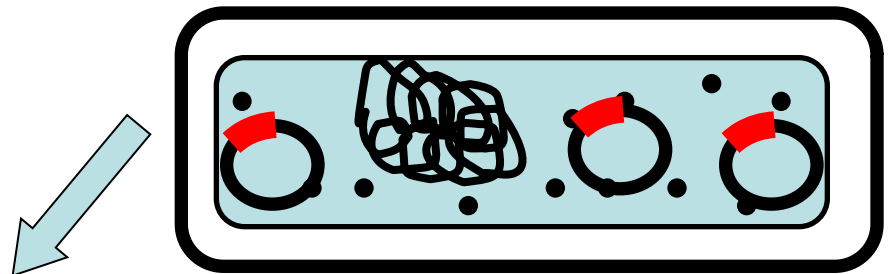
## Exprese genu

Cílem je získání aktivního (správně sbaleného) proteinu v co největším množství. Produkce cizího proteinu buňky zatěžuje, proto je exprese genu indukovatelná – syntéza proteinu je vyvolána až po zmnožení a nárůstu buněčné kultury.

Optimalizace exprese je náročná, je nutné brát v úvahu množství parametrů, např. hustotu buněčné kultury, teplotu, koncentraci induktoru, složení média, pH, dobu indukce...



**Řízená** exprese („nadexprese“) našeho genu: „Začni ho dělat teď a hodně a nepřestávej!“



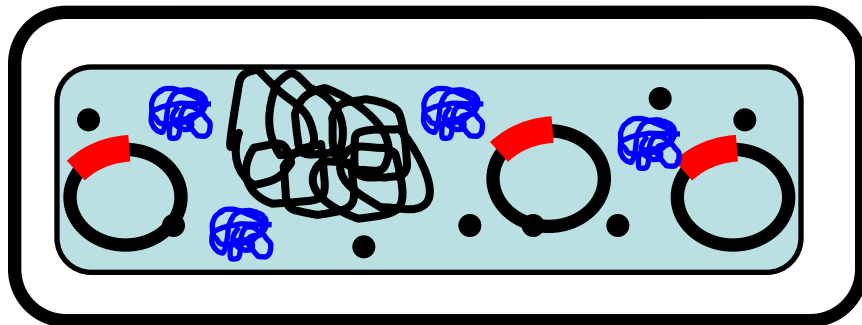
**GMO**  
Geneticky modifikovaný  
organismus



# Produkce rekombinantních proteinů

## Purifikace proteinů

Zahrnuje množství metodik, které je nutné kombinovat a optimalizovat. Výběr závisí na vlastnostech proteinu (stabilita, rozpustnost) a rovněž důvodu proč protein purifikujeme.



**Řízená** exprese („nadexprese“)  
našeho genu: „Začni ho dělat teď  
a hodně a nepřestávej!“

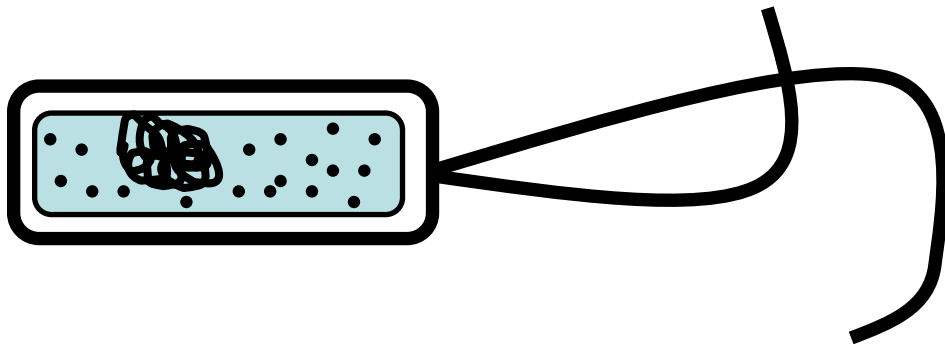
Při charakterizaci nových proteinů není často zisk aktivního proteinu koncem, ale teprve **začátkem** vlastního výzkumu...

C8202 Základy proteomiky

Bi8202c Základy proteomiky - cvičení

# Hostitelský organismus

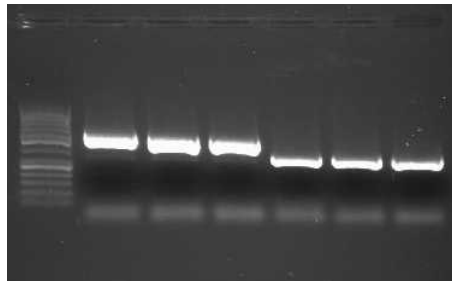
- Známý (tj. dobře prostudovaný) organismus
- Ochoťně akceptující cizorodou DNA
- Bezpečný (tj. neohrožující zdraví, nepatogenní)
- Krátká generační doba
- Snadná kultivace/pěstování/chov
- Nenáročný („levný“), přizpůsobivý
- Vysoká produkce cizorodých proteinů
- Možnost různých modifikací



**Bakterie**

***E. coli***

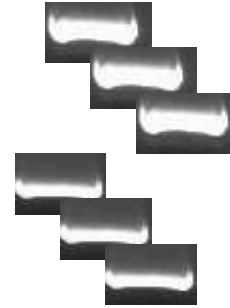
# Klonování DNA



Izolace PCR produktu



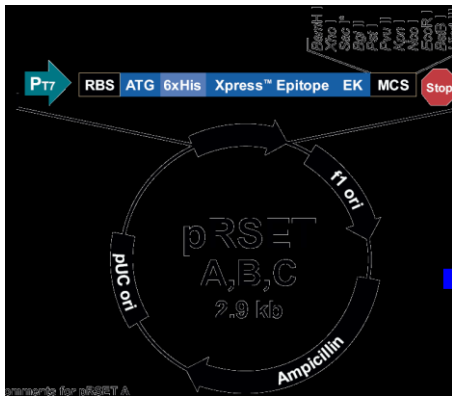
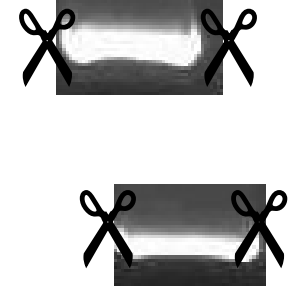
Cca 2 hodiny



Štěpení



3-12 hodin



Štěpení



3-12 hodin



Ligace



Cca 16 hodin

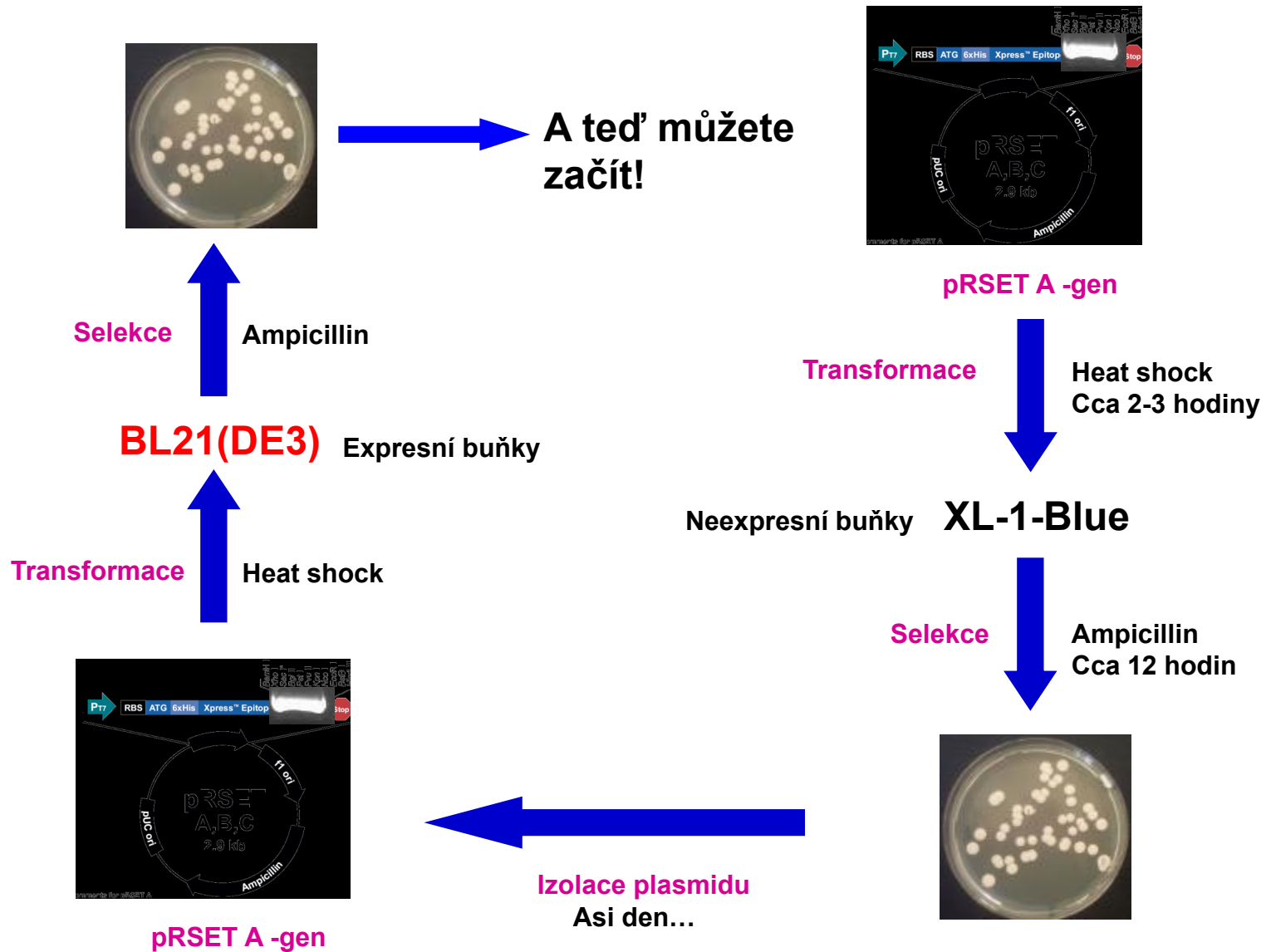


pRSET A

pRSET A

pRSET A-gen

# Klonování DNA



# DNA Cloning

Michael Andrew Quail, *The Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK*

Deoxyribonucleic acid (DNA) cloning is the art of creating recombinant DNA molecules that can be introduced into living cells, replicated and stably inherited, such that multiple 'clonal' copies of that DNA are produced. Techniques for cloning and the various vectors that can be used are described.

## Introduction

Deoxyribonucleic acid (DNA) cloning is a cornerstone of molecular biology. Its power is such that without it a large proportion of modern biological science would simply not be possible.

A clone can be defined as an identical copy. DNA cloning involves joining, or 'ligating', DNA with a 'vector' that enables the resulting construct to be introduced into a cell, replicated and passed on to daughter cells as that cell divides (Figure 1). The result is a population of cells all containing clones of the original DNA. Thereafter that DNA is immortalized, since cells can be grown to order and DNA extracted for study or further manipulation whenever it is required.

DNA cloning has been made possible by the discovery of two types of protein, those that break or modify DNA such that they have suitable termini for ligation and those that are capable of ligating those molecules of DNA.

## How to Clone

DNA exists as a double helix of antiparallel polymer strands with the nucleotide units in each joined by 5'-3' phosphodiester bonds. The ability to selectively break and join these bonds is the basis of DNA cloning. For the detailed experimental protocols described in this article the reader is referred to Sambrook and Russell (2001), an excellent three-volume laboratory manual of molecular biology.

## Ligation

DNA strands can be joined through the action of the enzyme DNA ligase, the normal biological role of which is to join the series of Okazaki fragments that are generated on the lagging strand during replication.

Advanced article

Article contents

- Introduction
- How to Clone
- Vectors
- Introduction of Deoxyribonucleic Acid
- Splicing

doi: 10.1038/npg...

# Restriction Enzymes

Mala Mani, *Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, USA*

Karthikeyan Kandavelou, *Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA*

Srinivasan Chandrasegaran, *Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA*

Type II restriction enzymes are the molecular scissors that catalyse the double-strand cleavage of deoxyribonucleic acid (DNA) at specific base sequences. They are essential tools for manipulating DNA including but not limited to cloning, analysis and

Advanced article

Article Contents

- Introduction
- Restriction Enzymes: Essential Tools for Manipulating DNA
- Cleavage Specificity of Restriction Enzymes
- Biochemical Properties of Restriction Enzymes
- Restriction Enzyme Production by Many Diverse Bacteria
- Restriction-Modification Systems
- Modification Methylases
- Restriction-Modification Systems in eukaryotes
- Changing the Sequence Specificity of Restriction Enzymes
- Summary
- Acknowledgement

doi: 10.1002/9780470015902.ch000973pub3

...ntible (i.e. complementary) ends may be ligated together using DNA ligases to produce recombinant molecules. There are also numerous enzymes that cleave an asymmetric sequence and create a short overhang at that sequence. These are termed as type III enzymes, where 's' stands for shifted cleavage. These enzymes do not recognize any specific sequence at the

...bility to manipulate DNA in defined ways has led to major discoveries in molecular biology since the 1970s. The essential tools of a genetic engineer are the enzymes that use specific reactions on DNA molecules. The enzymes that cleave DNA at discrete nucleotide positions are critical for carrying out the most important step involved in recombinant DNA technology. The discovery of restriction enzymes has made it possible to create heterogeneous DNA fragments of defined length by restriction cloning. The DNA fragments generated by restriction enzymes are used as substrates for a wide variety of enzymatic manipulations. Furthermore, the specific sites provide unique molecular landmarks for creating a physical map of DNA. Thus, restriction enzymes proved to be essential tools for analysing and cloning DNA.

## Cleavage Specificity of Restriction Enzymes

... restriction-modification enzymes have been discovered. These come from widely diverse organisms, primarily from bacteria. These enzymes fall into 'isoschizomers' (identically cleaving) groups with about 200 members. REBASE, the restriction enzyme database, provides information regarding restriction

# Ligation: Theory and Practice

Karthikeyan Kandavelou, *Johns Hopkins University, Maryland, USA*

Mala Mani, *Johns Hopkins University, Maryland, USA*

Sekhar PM Reddy, *Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA*

Srinivasan Chandrasegaran, *Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA*

Ligation is the process by which NAD DNA ligases catalyse the formation of phosphodiester bonds between juxtaposed 3'-hydroxyl group and 5'-phosphate termini in duplex deoxyribonucleic acid (DNA). Ligases use adenosine triphosphate or nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD) as cofactors for this covalent joining of DNA.

## Introduction

One of the key steps in recombinant deoxyribonucleic acid (DNA) technology is the joining of two separate DNA fragments covalently to form a single DNA molecule that is capable of autonomous replication in cells. The construction of recombinant DNA molecules involves the joining of insert sequences into plasmids or bacteriophage cloning vectors. This critical step is performed by DNA ligases. Like type II restriction enzymes, DNA ligases are essential tools in recombinant DNA technology for analysing and manipulating DNA. DNA ligases are essential enzymes in the synthesis of new DNA during cell division and for maintaining the integrity of the genome.

## DNA Ligase Reaction Properties and Intermediates

DNA ligases catalyse the formation of phosphodiester bonds between juxtaposed 5'-phosphate groups and a 3'-hydroxyl termini in duplex DNA. They can repair single-stranded nicks in duplex DNA as well as covalently join compatible cohesive ends or commonly used DNA ligases in DNA cloning. DNA ligase was originally purified from *E. coli*; it is the product of the *lig* gene. In eukaryotes, DNA ligase is the product of the *pol32* gene. These enzymes have been cloned and the enzymes are obtained from overproducing strains. T4 DNA ligase

Introductory article

Article Contents

- Introduction
- DNA Ligase Reaction Properties and Intermediates
- Manipulating and Reconstituting Restriction Fragments with DNA Ligase
- Optimizing the Formation of Recombinant Molecules
- Biochemical Properties of DNA Ligases
- In vivo Function of DNA Ligases
- Ligase Chain Reaction
- Summary
- Acknowledgements

doi: 10.1038/npg...0003838

...joins restriction fragments with compatible cohesive or sticky ends, it does not ligate restriction fragments with blunt ends under normal reaction conditions. See also: Bacteriophage T4; DNA ligases; DNA repair by reversal of damage; Nucleic acids: general properties

DNA ligases catalyse the DNA joining reaction in three distinct steps: (1) the formation of a covalent enzyme-adenosine monophosphate (AMP) complex; (2) the transfer of the AMP moiety to the 5'-phosphate at a nick in the duplex DNA; and (3) the formation of the phosphodiester bond with concomitant release of AMP. See also: DNA-binding enzymes: structural themes

The first step of the reaction is the best characterized. Studies with ATP-dependent T4 DNA ligase and NAD-dependent *E. coli* DNA ligase have shown the formation of a covalent enzyme-nucleoside monophosphate reaction intermediate. It appears that the AMP moiety is linked via a phosphoramidite bond to a lysine residue in an active site motif, KXDXGXR, that is diagnostic for DNA ligases (Figure 2). A further five conserved motifs have been defined by protein sequence alignments of DNA ligases. See also: Protein motifs for DNA binding

The crystal structure of bacteriophage T7 DNA ligase has revealed that this enzyme comprises two distinct domains linked together to form a cleft. The active site motif, KXDXGXR, is at the base of the cleft, and the other conserved motifs are located on the surface of the two domains close to the site of adenylation. It appears that the nicked duplex DNA binds the cleft between the two protein domains.

# Klonování DNA

# Vektory, enzymy, buňky, kity, induktoři...

...jsou komerčně dostupné, a to v široké nabídce.

## ALL CATEGORIES

### Biobanking

DNA and RNA Quantitation, DNA Extraction for Biobanks, Sample ID and Mixed Sample Detection

### Biochemicals and Labware

Biochemical Buffers and Reagents, Nucleic Acids, Nucleic Acids Purification Accessories, Tips and Accessories

### Biologics

Bioanalytical Tools, Bioassays for Biologics, Protein Manipulation Tools

### Cell Health Assays

ADME Assays, Apoptosis Assays, Cell Viability Assays, Cytotoxicity Assays, View All

### Cell Signaling

AMP Detection System, GPCR Assays, Growth Factors, Histone Deacetylase Assays, View All

### Cloning and DNA Markers

Cloning Tools and Competent Cells, Molecular Weight Markers, PCR Cloning, Restriction Enzymes

### DNA and RNA Purification

DNA and RNA Quantitation, DNA Fragment Purification, Genomic DNA Purification Kits, High-Throughput DNA and RNA Purification, View All

### Drug Discovery

ADME Assays, Apoptosis Assays, Cell Viability Assays, Custom Assay Materials, View All



### Molecular Diagnostics

Maxwell® Research Systems, Systems for Molecular Diagnostics Research, Reagents for Molecular Diagnostics Labs, View All

### PCR

Hot-Start PCR, Long PCR, PCR Cloning, qPCR and RT-qPCR, View All

### Protein Expression and Mass Spectrometry

Eukaryotic Cell-Free Protein Expression, Prokaryotic Cell-Free Protein Expression, Cell-Based Protein Expression, Glycosidases, View All

### Protein Purification and Interactions

HaloTag® Protein Purification, GST Protein Purification, Magnetic Systems for Purification of Antibodies and Affinity-Tagged Proteins, Protein Interactions, View All

### Reporter Assays and Transfection

In vivo Imaging, Reporter Assays, Reporter Vectors and Cell Lines, Transfection Reagents

<https://www.neb.com>

APPLICATIONS ▾

PRODUCTS ▾

TOOLS & RESOURCES ▾

SUPPORT ▾

Tools & Resources Overview

FAQs

Protocols

Selection Charts

Troubleshooting Guides

Usage Guidelines/Tips

Interactive Tools

Tutorials

### Popular Tools

Enzyme Finder

Double Digest Finder

NEBcutter

REBASE

DNA Sequences and Maps Tool

TM Calculator

PCR Selection Tool

<http://worldwide.promega.com/products/>



# Vektory, enzymy, buňky, kity, induktoři...

...jsou komerčně dostupné, a to v široké nabídce.

Cloning

<http://www.lifetechnologies.com>



## Get Started With Cloning

Life Technologies offers powerful and versatile Invitrogen™ cloning and expression vectors, GeneArt® gene synthesis and assembly tools, and molecular biology essentials for that critical first step in your experiment. Unsure where to start? [Which cloning method is right for me?](#)

[An Introduction to Cloning](#)

Trust is the most important ingredient

<http://www.qiagen.com/>



New! *mericon* Horse Kit —  
trust is the most important ingredient

[Discover more](#)

## II. Getting Started

### A. Overview of the pET System Process

# Novagen • *pET System Manual* •

#### Choose a pET Vector (page 37)

- Application of the expressed protein
- Specific information known about target protein
- Cloning strategy
  - Solubility and cellular localizations
  - Fusion tags; need for tag removal
  - Regulation of protein expression, (i.e., promoter and expression strain)

#### Prepare pET Vector (page 7)

- Digest with restriction enzyme(s) and dephosphorylate (or use LIC vector)
- Gel-purify (or use LIC vector)

#### Prepare Insert DNA (page 9)

- Plasmid and/or PCR DNA
- Restriction digest or generate LIC overhangs
- Gel-purify

#### Clone Insert into pET Vector (page 10)

- Ligate or anneal insert with pET vector
- Transform into non-expression host (e.g., NovaBlue)
- Identify positive clones; colony PCR, prepare plasmid DNA, verify reading frame by sequencing

#### Transform into Expression Host (page 10)

- Transform host carrying T7 RNA polymerase gene ( $\lambda$ DE3, lysogen page 49) or non-DE3 host compatible with  $\lambda$ CE6 infection (page 19)

#### Induce and Optimize Expression of Target Protein (page 19)

- Determine time course and temperature for expression in total cell and subcellular fractions; analyze solubility and activity (page 19)
- Detect target protein by SDS-PAGE, Western blot, quantitative assay (page 34)

Scale-up culture size

#### Extract Target Protein (page 25)

- Detergent methods
- Mechanical methods

#### Purify Target Protein

- Affinity purification (page 36)
- Cleave tags and remove protease (if desired) (page 44)

I. About the System	3
A. Description	3
B. Licensing and Use Agreement	3
C. System Components	4
II. Getting Started	5
A. Overview of the pET System Process	5
B. Growth Media and Antibiotics	6
Growth media	6
Antibiotics and stock solutions	7
C. Vector Preparation	7
D. Insert Preparation	9
III. Cloning Inserts in pET Vectors	10
A. Ligation	10
B. Transformation	10
Handling tips	
Procedure	
Plating techniques	
ColiRollers™ Plating Beads	
Standard spreader	

READ  
INSTRUCTIONS  
ČTĚTE NÁVOD  
LESEN  
INSTRUKTION



# Stabilita proteinu

## • N-koncové pravidlo - ProtParam

Amino acid	Mammalian	Yeast	E. coli
Ala	4.4 hour	>20 hour	>10 hour
Arg	1 hour	2 min	2 min
Asn	1.4 hour	3 min	>10 hour
Asp	1.1 hour	3 min	>10 hour
Cys	1.2 hour	>20 hour	>10 hour
Gln	0.8 hour	10 min	>10 hour
Glu	1 hour	30 min	>10 hour
Gly	30 hour	>20 hour	>10 hour
His	3.5 hour	10 min	>10 hour
Ile	20 hour	30 min	>10 hour
Leu	5.5 hour	3 min	2 min
Lys	1.3 hour	3 min	2 min
Met	30 hour	>20 hour	>10 hour
Phe	1.1 hour	3 min	2 min

### Jak stabilní je můj protein?

#### • *In vivo* half-life

##### In vivo half-life

The half-life is a prediction of the time it takes for half of the amount of protein in a cell to disappear after its synthesis in the cell. ProtParam relies on the "N-end rule", which relates the half-life of a protein to the identity of its N-terminal residue; the prediction is given for 3 model organisms (human, yeast and E. coli). The N-end rule (for a review see [5],[6]) originated from the observations that the identity of the N-terminal residue of a protein plays an important role in determining its stability in vivo ([2],[3],[4]). The rule was established from experiments that explored the metabolic fate of artificial beta-galactosidase proteins with different N-terminal amino acids engineered by site-directed mutagenesis. The beta-gal proteins thus designed have strikingly different half-lives in vivo, from more than 100 hours to less than 2 minutes, depending on the nature of the amino acid at the amino terminus and on the experimental model (yeast in vivo, mammalian reticulocytes in vitro, Escherichia coli in vivo). In addition, it has been shown that in eukaryotes, the association of a destabilizing N-terminal residue and of an internal lysine targets the protein to ubiquitin-mediated proteolytic degradation [6]. Note that the program gives an estimation of the protein half-life and is not applicable for N-terminally modified proteins.



Pro	>20 hour	>20 hour	?
Ser	1.9 hour	>20 hour	>10 hour
Thr	7.2 hour	>20 hour	>10 hour
Trp	2.8 hour	3 min	2 min
Tyr	2.8 hour	10 min	2 min
Val	100 hour	>20 hour	>10 hour

# Protein = problém pro hostitelskou buňku

- **Produkce toxických proteinů.**
- **Problémem může být i nadprodukce primárně netoxického proteinu – narušení metabolických drah.**
- **Produkce proteinů s hydrofobními oblastmi – mohou se vázat na/do membrány.**

*E. coli* BL21(DE3) strains, like Lucigen's *E. coli*® EXPRESS Competent Cells (see the announcement on p. 8), provide reliable expression of many proteins cloned into T7 expression vectors (e.g., pET or Lucigen's pSMART®-cDNA vectors). However, in some cases expression is minimal or not detectable because the recombinant protein, when expressed, is deleterious or lethal to these standard BL21 strains. Examples of such toxic proteins include many membrane proteins, some cytoplasmic proteins, and nucleases. Unfortunately, successful expression of one or more toxic proteins is often important to the experimental goal.

# Protein = problém pro hostitelskou buňku

- **Produkce toxických proteinů.**
- **Problémem může být i nadprodukce primárně netoxického proteinu – narušení metabolických drah.**
- **Produkce proteinů s hydrofobními oblastmi – mohou se vázat na/do membrány.**



**BLAST, PubMed, ProtParam, Jpred, TMpred**

# Protein = problém pro hostitelskou buňku

- **Produkce toxických proteinů.**
- **Problémem může být i nadprodukce primárně netoxického proteinu – narušení metabolických drah.**
- **Produkce proteinů s hydrofobními oblastmi – mohou se vázat na/do membrány.**
- **Řešením je vysoká kontrola exprese nebo použití speciálních kmenů hostitelských buněk.**

<sup>3</sup> The strain C41(DE3) was derived from BL21(DE3) [*E. coli* F<sup>+</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub> - m<sub>B</sub> -) gal dcm* (DE3)]. This strain has at least one uncharacterized mutation that prevents cell death associated with expression of many toxic recombinant proteins. The strain C43(DE3) was derived from C41(DE3) by selecting for resistance to a different toxic protein. It can express a different set of toxic proteins than C41(DE3).<sup>1</sup>

## eLucidations Archive

---

### [Issue 8](#)

---

- [Expression of Recombinant \*Aspergillus fumigatus\* Antigens Using OverExpress™ C43\(DE3\) Cells](#)
- [BigEasy® Long PCR Cloning Kit](#)
- [Competent Cell Strains & Custom Competent Cells](#)
- [CopyRight® v2.0 BAC Cloning Kits](#)

### [Issue 7](#)

---

- [Genotyping with EconoTaq® PLUS GREEN 2X Master Mix](#)
- [Construction of genomic libraries from \*Neurospora crassa\* with the BigEasy® v2.0 Linear Cloning System](#)
- [Random Shear BAC Library Construction](#)
- [CopyRight® v2.0 Fosmid Cloning Kit](#)

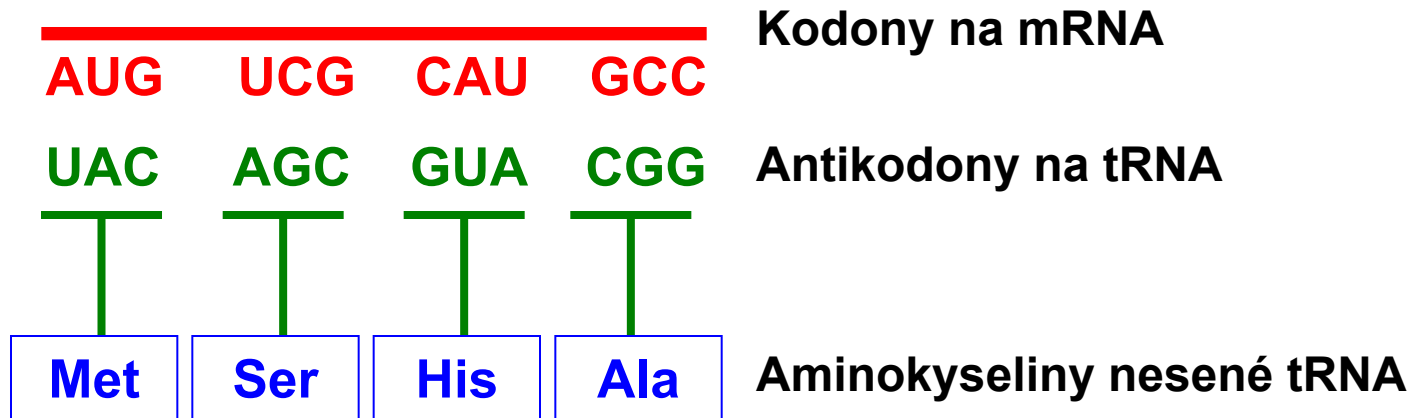
### [Issue 6](#)

---

- [Construction of genomic libraries from \*Flavobacterium clauumare\* using Lucigen's BigEasy Linear Cloning System](#)
- [High Efficiency Expression of Toxic Proteins](#)
- [PCR: Achieving Better Results at a Lower Cost](#)
- [The Importance of RNase I Treatment in DNA Cloning](#)

## *E. coli* – využití kodonů

- Využití kodonů odráží dostupnost jejich tRNA.
- **Vzácné** kodony jsou využívány zřídka a **navíc** jsou rozeznávány tRNA dostupnou v malých množstvích.
- Kodony vzácné v *E. coli* jsou velmi často obvyklé v eukaryotických organismech.
- **PROBLÉMY S TRANSLACÍ!**



# *E. coli* – využití kodonů

- Využití kodonů odráží dostupnost jejich tRNA.
- **Vzácné** kodony jsou využívány zřídka a **navíc** jsou rozeznávány tRNA dostupnou v malých množstvích.
- Kodony vzácné v *E. coli* jsou velmi často obvyklé v eukaryotických organismech.
- **PROBLÉMY S TRANSLACÍ!**

Gene Ther Mol Biol Vol 10, 1-12, 2006

## Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli*

Mini Review

Dequan Chen\* and Donald E. Texada

Department of Ophthalmology, Louisiana State University Health Sciences Center, Shreveport, LA 71130

# *E. coli* – využití kodonů

## The 8 least used codons in *E. coli*, yeast, *Drosophila*, and primates

<i>E. coli</i>	yeast	<i>Drosophila</i>	primates	amino acid
AGG	AGG			arginine
AGA		AGA		arginine
AUA		AUA		isoleucine
CUA				leucine
CGA	CGA	CGA	CGA	arginine
CGG	CGG	CGG	CGG	arginine
CCC				proline
UCG			UCG	serine

Další vzácné kodony:

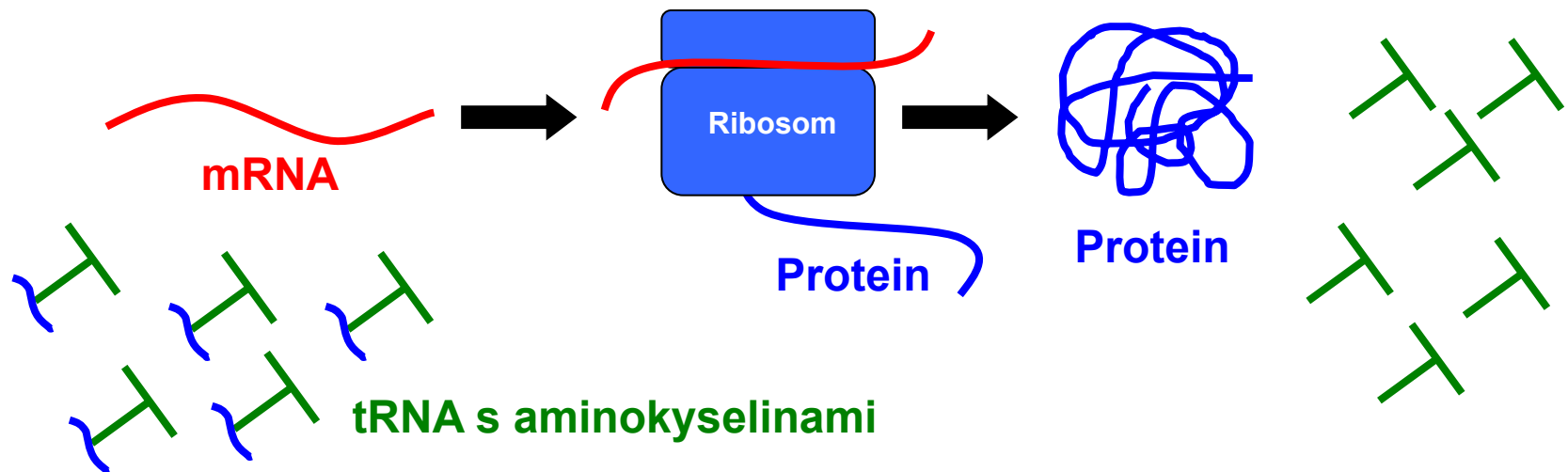
GGA, GGG (glycin), AAG (lysin), ACA (threonin), UGU, UGC (cystein)...

[http://www.embl.de/pepcore/pepcore\\_services/protein\\_expression/ecoli/codons1/index.html](http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/codons1/index.html)



## *E. coli* – využití kodonů

- Využití kodonů odráží dostupnost jejich tRNA.
- **Vzácné** kodony jsou využívány zřídka a **navíc** jsou rozeznávány tRNA dostupnou v malých množstvích.
- Kodony vzácné v *E. coli* jsou velmi často obvyklé v eukaryotických organismech.
- **PROBLÉMY S TRANSLACÍ!**



## *E. coli* – využití kodonů

- Využití kodonů odráží dostupnost jejich tRNA.
- **Vzácné** kodony jsou využívány zřídka a **navíc** jsou rozeznávány tRNA dostupnou v malých množstvích.
- Kodony vzácné v *E. coli* jsou velmi často obvyklé v eukaryotických organismech.
- **PROBLÉMY S TRANSLACÍ!**

**Předčasné ukončení translace, záměna aminokyselin (místo argininu je začleněn lysin u kodonu AGA), změna čtecího rámce, vynechání aminokyselin.**

## *E. coli* – využití kodonů

- **Problém vzácných kodonů lze vyřešit využitím speciálních kmenů hostitelských buněk (upravené, produkují větší množství tRNA pro vzácné kodony).**

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

[http://www.embl.de/pepcore/pepcore\\_services/protein\\_expression/ecoli/optimisation\\_expression\\_levels/index.html](http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/optimisation_expression_levels/index.html)

**BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL – extra kopie genů pro tRNA rozeznávající vzácné kodony argininu, isoleucinu, prolinu a leucinu**

## ***E. coli* – využití kodonů**

- Další možností je změna sekvence genu – cílená mutageneze. Vzácné kodony změníme na běžné. Problém: časová náročnost!
- Alternativa – **SYNTETICKÝ GEN** s optimalizovaným využitím kodonů.

Drahé, ale ve výsledku se dnes vyplatí.

Lze samozřejmě navrhnout i jiné modifikace než „pouhou“ optimalizaci kodonů.

**I SE SYNTETICKÝM GENEM LZE DÁLE PRACOVAT A DODATEČNĚ HO „DOMA“ UPRAVOVAT!**

# Tvorba disulfidických můstků (vazeb)

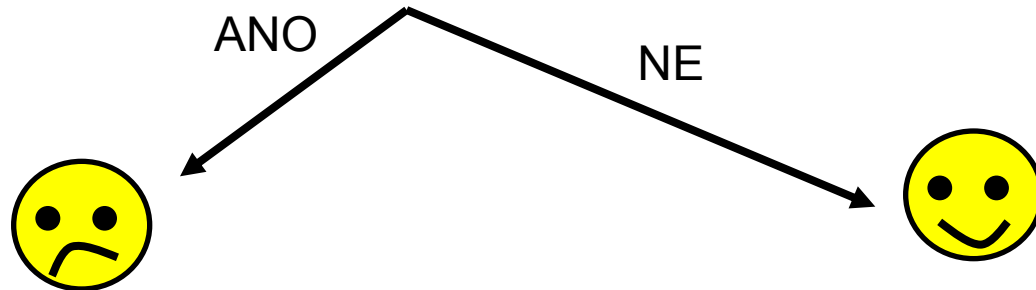
- V cytoplasmě *E. coli* je **redukční** prostředí – „wild-type“ kmeny **netvoří** v cytoplasmě disulfidické můstky!
- Jsou disulfidické můstky pro správné sbalení proteinu důležité?

BLAST

Predikce  
struktury

Obsah  
cysteinů

Původ  
proteinu/genu



Musíte použít speciální kmeny *E. coli*.

Vyzkoušejte cílenou produkci do periplasmy.

Výborně! Můžete řešit jiné problémy.



# Tvorba disulfidických můstků (vazeb)



## Origami(DE3) (Novagen)

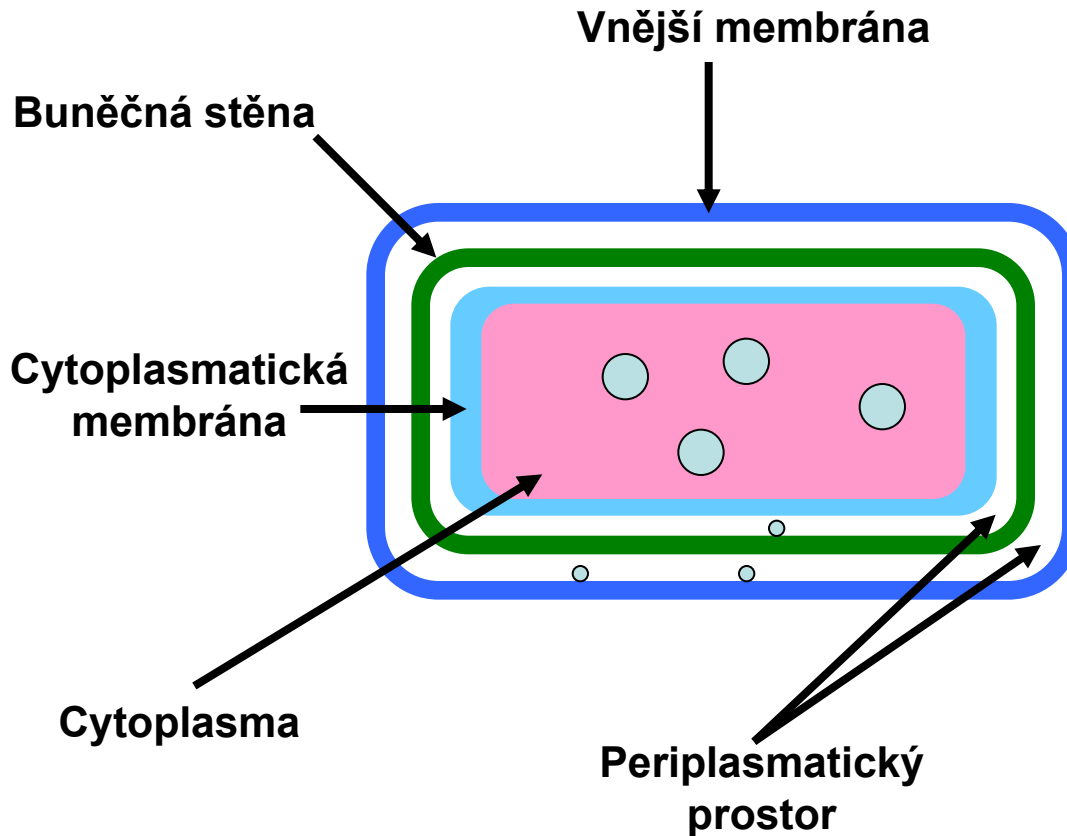
*Origami™ host strains are K-12 derivatives that have mutations in both the thioredoxin reductase (*trxB*) and glutathione reductase (*gor*) genes, which greatly enhance disulfide bond formation in the *E. coli* cytoplasm. Studies have shown that expression in Origami(DE3) yielded 10-fold more active protein than in another host even though overall expression levels were similar. The original Origami strains are compatible with ampicillin-resistant plasmids and are ideal for use with pET-32 vectors, since the thioredoxin fusion tag further enhances the formation of disulfide bonds in the cytoplasm. The *trxB* and *gor* mutations are selectable on kanamycin and tetracycline, respectively; therefore, these strains cannot be used with plasmids that can only be selected with kanamycin or tetracycline. To reduce the possibility of disulfide bond formation between molecules, strains containing mutations in *trxB* and *gor* are recommended only for the expression of proteins that require disulfide bond formation for proper folding.*

## Rosetta-Gami2(DE3)pLySRare (Novagen)



*Rosetta-gami 2 host strains combine the advantages of Rosetta 2 and Origami 2 strains to alleviate codon bias and enhance disulfide bond formation in the cytoplasm when heterologous proteins are expressed in *E. coli*. These *trxB/gor* mutants are compatible with kanamycin-resistant vectors, and carry the chloramphenicol-resistant pRARE2 plasmid, which supplies seven rare tRNAs. pLysS strains express T7 lysozyme, which further suppresses basal expression of T7 RNA polymerase prior to induction, thus stabilizing pET recombinants encoding target proteins that affect cell growth and viability.*

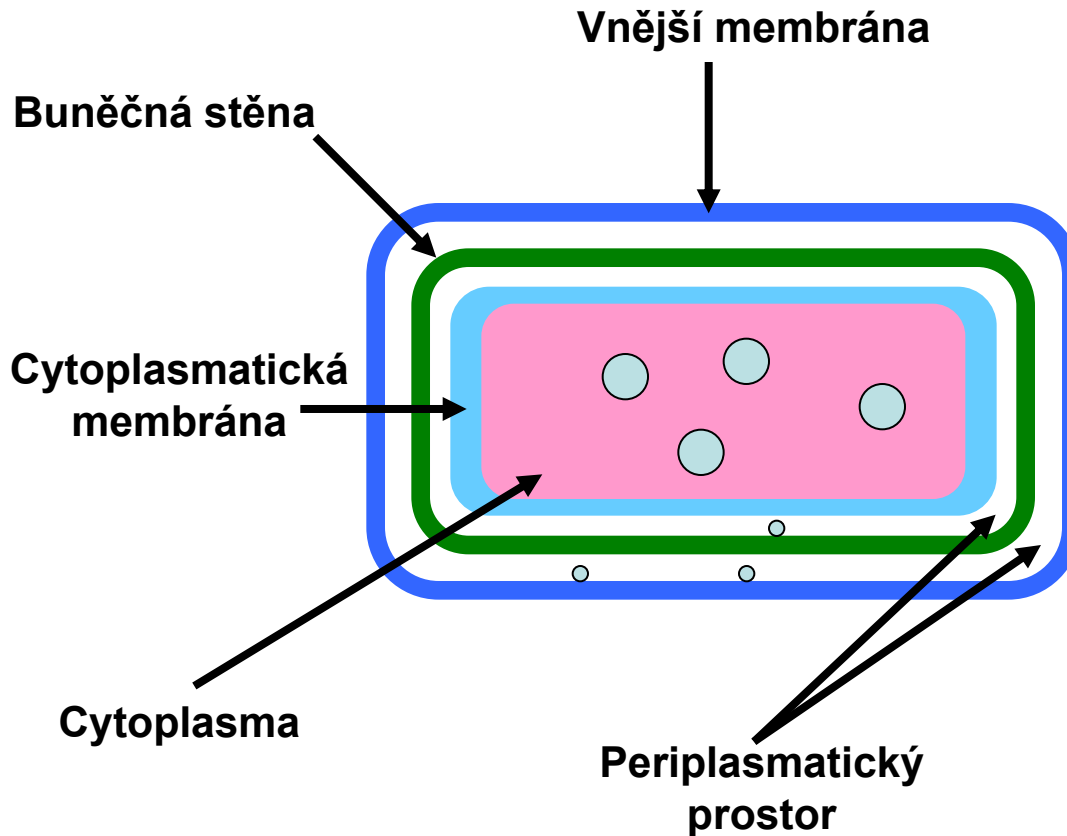
# Tvorba disulfidických můstků (vazeb)



Jak donutíte protein jít do periplasmy?

- Oxidační prostředí v periplasmě umožňuje tvorbu -S-S- vazeb.
- Obsahuje enzymy, které vznik -S-S- katalyzují.

# Tvorba disulfidických můstků (vazeb)



Jak donutíte protein jít do periplasmy?



Signální peptid (sekvence)

- Oxidační prostředí v periplasmě umožňuje tvorbu -S-S- vazeb.
- Obsahuje enzymy, které vznik -S-S- katalyzují.



# Posttranslační modifikace

## Molekulová hmotnost - $M_w$

Note: It is not possible to specify post-translational modification for your protein, nor will ProtParam know whether your mature protein forms dimers or multimers. If you do know that your protein forms a dimer, you may just duplicate your sequence (i.e. append a second copy of the sequence to the first), as all computations performed by ProtParam are based on either compositional data, or on the N-terminal amino acid.

- ProtParam nebere v úvahu možné posttranslační modifikace a oligomerizaci proteinů.
- Pro predikci PTM a oligomerizace existují specializované nástroje.
- Problematika PTM není stále dořešená, především u prokaryot.
- Glykosylace proteinů, dříve považovaná za proces probíhající pouze u eukaryot, byla již prokázána i u prokaryot.  
Databáze prokaryotických glykoproteinů: ProGlycProt  
Predikce glykosylace u prokaryot: GlycoPP

## Izoelektrický bod - pI

- **Izoelektrický bod = pH, při kterém má protein nulový sumární náboj.**

Protein pI is calculated using pK values of amino acids described in Bjellqvist et al., which were defined by examining polypeptide migration between pH 4.5 to 7.3 in an immobilised pH gradient gel environment with 9.2M and 9.8M urea at 15%<sup>v/v</sup> G or 25%<sup>v/v</sup> G. Prediction of protein pI for highly basic proteins is yet to be studied and it is possible that current Compute pI/Mw predictions may not be adequate for this purpose.

- Problémem jsou opět posttranslační modifikace!!!
- Použité hodnoty pK jednotlivých aminokyselin – různí autoři, různé hodnoty...

<http://wwwchem.csustan.edu/chem4400/pppl.htm>  
<http://isoelectric.ovh.org/>

**Stabilita**  
**Struktura**  
**Funkce**  
**Interakce**  
**Lokalizace**

## Reviews

C. T. Walsh et al.

**Protein Chemistry**

DOI: 10.1002/anie.200501023

## Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications

*Christopher T. Walsh,\* Sylvie Garneau-Tsodikova, and Gregory J. Gatto, Jr.*

# Posttranslační modifikace

## Molekulová hmotnost - $M_w$

Note: It is not possible to specify post-translational modification for your protein, nor will ProtParam know whether your mature protein forms dimers or multimers. If you do know that your protein forms a dimer, you may just duplicate your sequence (i.e. append a second copy of the sequence to the first), as all computations performed by ProtParam are based on either compositional data, or on the N-terminal amino acid.

- ProtParam nebere v úvahu možné posttranslační modifikace a oligomerizaci proteinů.
- Pro predikci PTM a oligomerizace existují specializované nástroje.
- Problematika PTM není stále dořešená, především u prokaryot.
- Glykosylace proteinů, dříve považovaná za proces probíhající pouze u eukaryot, byla již prokázána i u prokaryot.  
Databáze prokaryotických glykoproteinů: ProGlycProt  
Predikce glykosylace u prokaryot: GlycoPP

## Izoelektrický bod - pI

- Izoelektrický bod = pH, při kterém má protein nulový sumární náboj.

Protein pI is calculated using pK values of amino acids described in Bjellqvist et al., which were defined by examining polypeptide migration between pH 4.5 to 7.3 in an immobilised pH gradient gel environment with 9.2M and 9.8M urea at 15%<sup>14</sup>C or 25%<sup>14</sup>C. Prediction of protein pI for highly basic proteins is yet to be studied and it is possible that current Compute pI/Mw predictions may not be adequate for this purpose.

- Problémem jsou opět posttranslační modifikace!!!
- Použité hodnoty pK jednotlivých aminokyselin – různí autoři, různé hodnoty...

<http://wwwchem.csustan.edu/chem4400/pppl.htm>  
<http://isoelectric.ovh.org/>

Stabilita  
Struktura  
Funkce  
Interakce  
Lokalizace

*The diversity of distinct covalent forms of proteins (the proteome) greatly exceeds the number of proteins predicted by DNA coding capacities owing to directed posttranslational modifications. Enzymes dedicated to such protein modifications include 500 human protein kinases, 150 protein phosphatases, and 500 proteases. The major types of protein covalent modifications, such as phosphorylation, acetylation, glycosylation, methylation, and ubiquitylation, can be classified according to the type of amino acid side chain modified, the category of the modifying enzyme, and the extent of reversibility.*

- ***E. coli* je prokaryotický organismus = PROKARYOTA PROVÁDĚJÍ POSTTRANSLAČNÍ MODIFIKACE MNOHEM MÉNĚ NEŽ EUKARYOTA...**

# Posttranslační modifikace



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Current Opinion in  
Structural Biology

## Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in Bacteria and Archaea

Mehtap Abu-Qarn<sup>1</sup>, Jerry Eichler<sup>1</sup> and Nathan Sharon<sup>2</sup>



CSIR-IMTECH

### GLYCOPP v 1.0

A webserver for glycosites prediction in prokaryotes

[HOME](#) [SUBMIT](#) [BLAST](#) [HELP](#) [DOWNLOADS](#) [TEAM](#) [CONTACT](#)

<http://www.imtech.res.in/raghava/glycopp/>

### PROGLYCPROT

A Repository of Experimentally Characterized  
Glycoproteins of Prokaryotes

<http://www.proglycprot.org/>



CSIR-IMTECH

Home

ProGlycProtDb

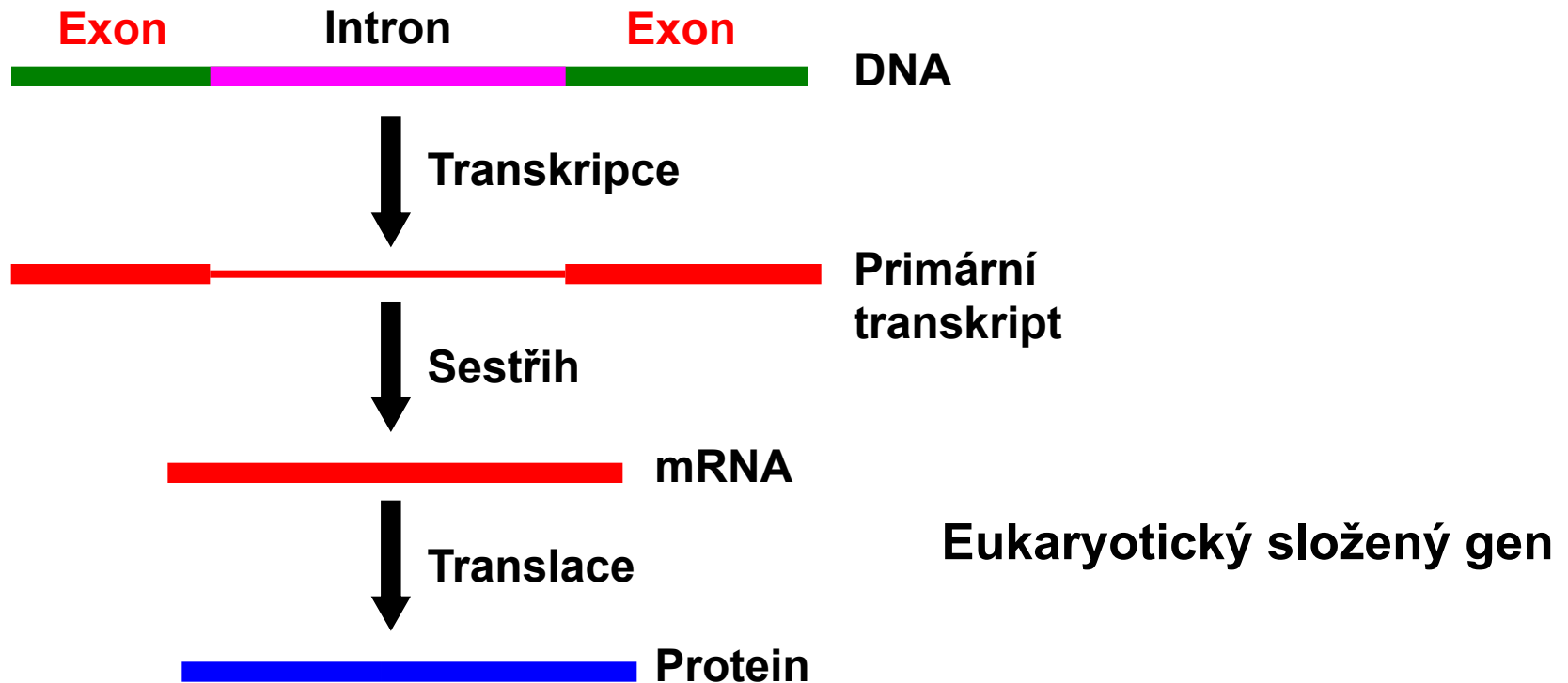
Structure Gallery

Tools

Links

# Problém s introny!

- *E. coli* je prokaryotický organismus = **PROKARYOTA NEPROVÁDĚJÍ SESTŘIH!**



# Problém s introny!

- *E. coli* je prokaryotický organismus = **PROKARYOTA NEPROVÁDĚJÍ SESTRŮH!** Dobře, dělají sestřih, ale mnohem řidčeji než eukaryota a většinou u nekódující RNA (tRNA).

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, July 1995, p. 3897–3903  
0021-9193/95/\$04.00+0  
Copyright 1995, American Society for Microbiology

Vol. 177, No. 14

## MINIREVIEW

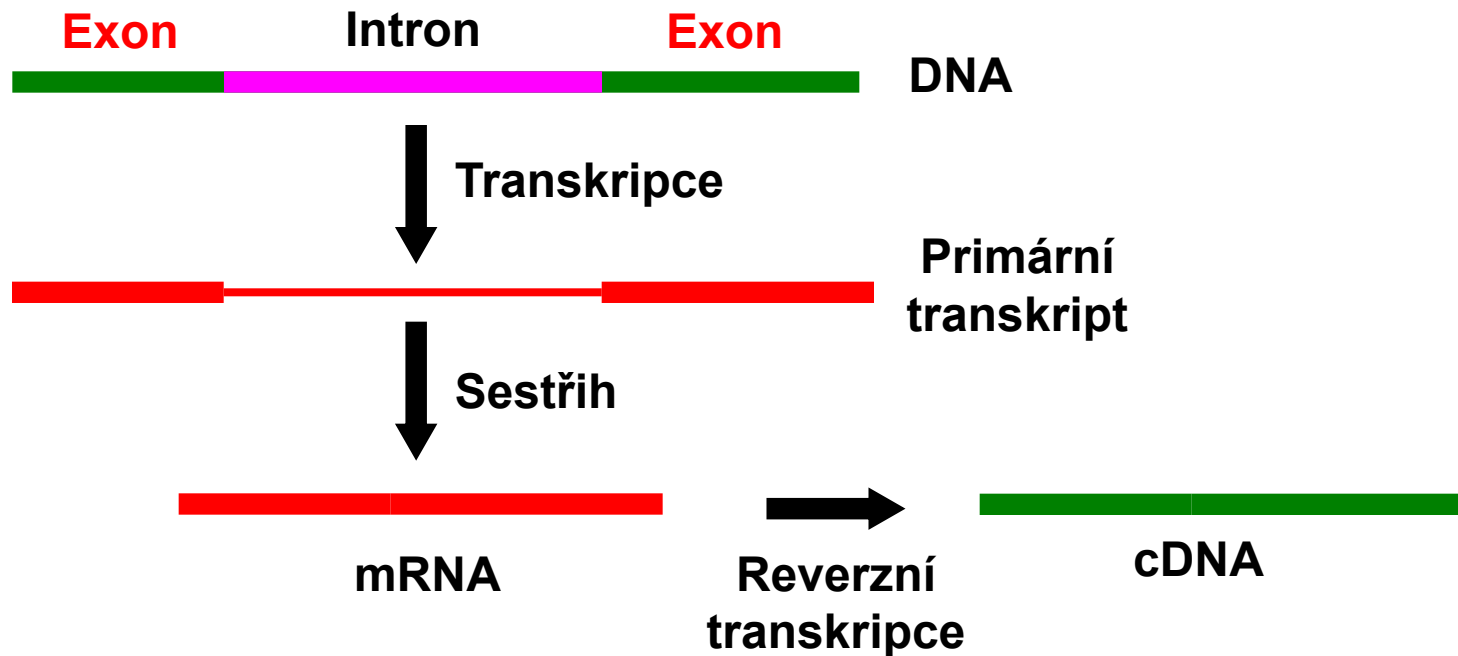
### Prokaryotic Introns and Inteins: a Panoply of Form and Function

MARLENE BELFORT, MARY E. REABAN, TIMOTHY COETZEE,<sup>†</sup> AND JACOB Z. DALGAARD<sup>‡</sup>

*Molecular Genetics Program, Wadsworth Center and School of Public Health, State University of New York at Albany,  
New York State Department of Health, P.O. Box 22002, Albany, New York 12201-2002*

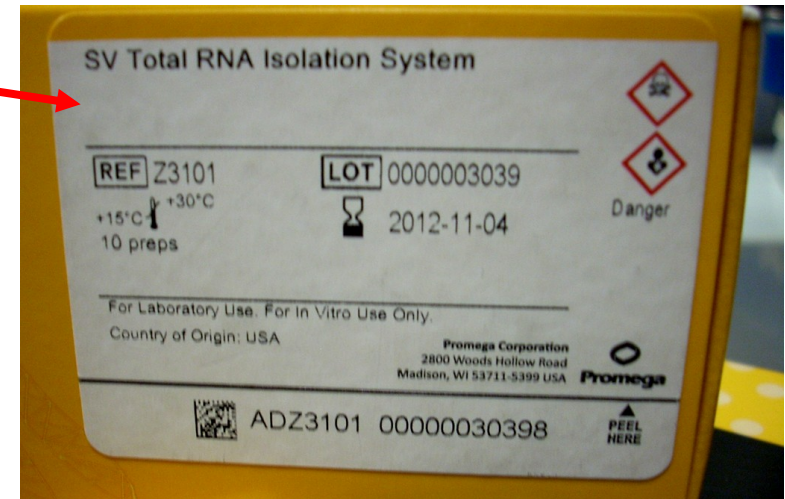
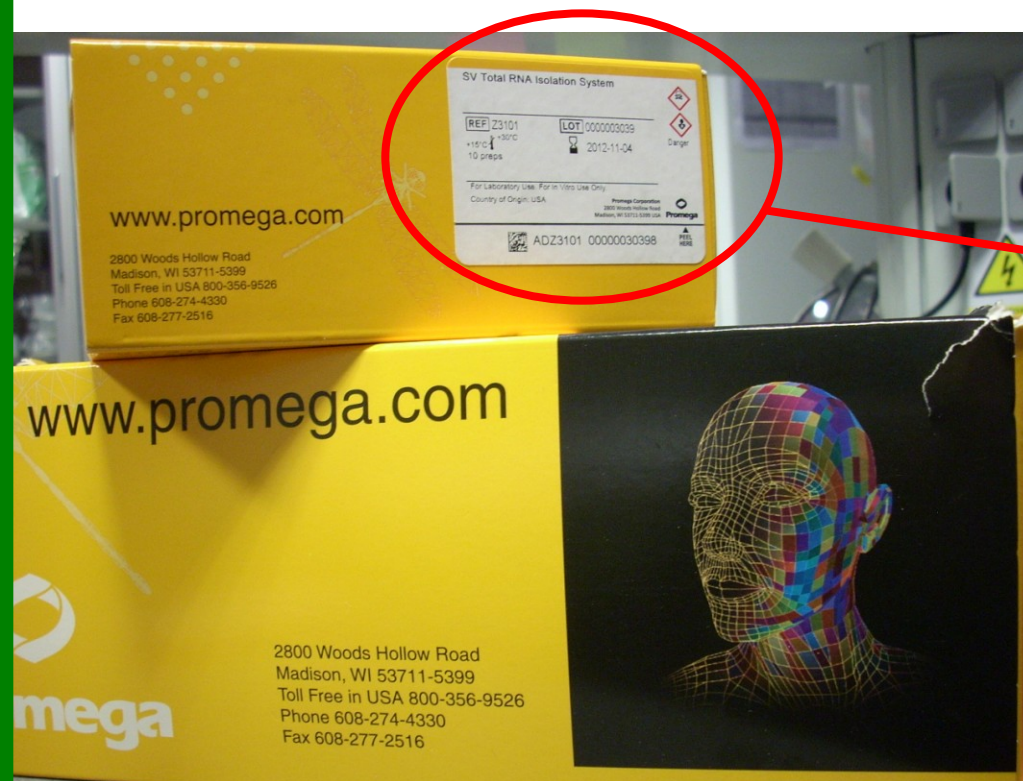
# Problém s introny!

- *E. coli* je prokaryotický organismus = **PROKARYOTA NEPROVÁDĚJÍ SESTŘIH!**
- Pro produkci eukaryotických proteinů v *E. coli* vycházíme z **komplementární DNA – cDNA**. Což je DNA získaná zpětnou transkripcí z mRNA.



# Problém s introny!

- *E. coli* je prokaryotický organismus = **PROKARYOTA NEPROVÁDĚJÍ SESTRŽIH!**
- Pro produkci eukaryotických proteinů v *E. coli* vycházíme z **komplementární DNA – cDNA**. Což je DNA získaná zpětnou transkripcí z mRNA.



Buze na RNA!

Buze na RNA!

Genuine  
**AXYGEN**  
Quality





# Problém s introny!

- *E. coli* je prokaryotický organismus = **PROKARYOTA NEPROVÁDĚJÍ SESTRŽIH!**
- Pro produkci eukaryotických proteinů v *E. coli* vycházíme z **komplementární DNA – cDNA**. Což je DNA získaná zpětnou transkripcí z mRNA.



**\$104.00**

# Problém s introny!

- *E. coli* je prokaryotický organismus = **PROKARYOTA NEPROVÁDĚJÍ SESTRŽIH!**
- Pro produkci eukaryotických proteinů v *E. coli* vycházíme z **komplementární DNA – cDNA**. Což je DNA získaná zpětnou transkripcí z mRNA.
- Nebo si necháme připravit **syntetický gen**. Pozor! Musíme vědět (nebo dostatečně přesně predikovat), kde jsou introny/exony!

## Bioinformatics Reverse Translation Tool (Translate Polypeptide to DNA codons)

Use this tool to convert a Protein Sequence into it's complementary DNA (cDNA - DNA without introns) sequence

Enter a Protein Sequence below (e.g. ABABAEEDBDE)

```
NCWCCVLSDIMMHTSDCKDECWQFYVTSVLRAMCRQPTCCCCATHYCLLSICRIIVKNCG
HCCPCHHVCMCKMCKRVWQTYTNMVMWCHYYEHICWMCGHTIACQENEFYPQCFVIKSCEK
CGPLPRNTGDCPRKYPCDPCLNLTYGDFRCGECCWFDQMGEAKCNFCGQDCVSAQACIF
CARSCYKCCENACFNSLWFS
```

# Inkluzní tělíska

- Proteinová inkluzní tělíska = **nerozpustné** proteinové agregáty
- Špatně sbalené proteiny (problém disulfidických můstků, hydrofobních proteinů, posttranslačních modifikací)
- Toxické proteiny
- Proteiny, které se tvoří až příliš dobře – moc rychle a ve velkém množství
- Proteiny, které tvoří inkluzní tělíska z neznámých důvodů...

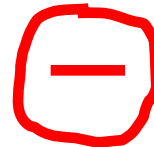


Mohou se tvořit ve velkém množství.

Vysoká čistota.

Někdy lze protein renaturovat.

Možné řešení produkce toxických proteinů.



Nesbalený protein!

# Nevýhody *E. coli* jako expresního systému

- Rozdílné využívání kodonů u *E. coli* a eukaryot
- Problém s tvorbou disulfidických můstků
- Problémy s posttranslačními modifikacemi
- Neprovádí sestřih
- Tvorba inkluzních tělísek

**Analýza genu/proteinu (i základní = rychlá) před vlastní expresí nám může uspořit spoustu času!**

**Stabilita? Aminokyselinové složení?**

**Homologní proteiny? Funkce? Hydrofobní oblasti?**

**Důležité posttranslační modifikace?**

# Použitá a doporučená literatura

Stránky Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com>

Stránky ELICITYL: <http://www.elicityl-oligotech.com>

**Stephen Kent *et al.*** Through the looking glass – a new world of proteins enabled by chemical synthesis, *Journal of Peptide Science* 18: 428-436, 2012.

**Michael Andrew Quail.** DNA Cloning, in Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2005.

**Karthikeyan Kandavelou *et al.*** Ligation: Theory and Practice, in Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2005.

**Mala Mani *et al.*** Restriction Enzymes, in Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2007.

Stránky Promega: <http://worldwide.promega.com>

Stránky New England BioLabs: <https://www.neb.com>

Stránky Life Technologies: <http://www.lifetechnologies.com>

# Použitá a doporučená literatura

Stránky QIAGEN: <http://www.qiagen.com/>

Dokumentace k pET vektoru: pET System Manual (Novagen)

High Efficiency Expression of Toxic Proteins, eLucidations, Issue 6:  
<http://lucigen.com/store/elucidations-archive.html>

**Dequan Chen and Donald E. Texada.** Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli*, *Gene Therapy and Molecular Biology* 10: 1-12, 2006.

EMBL Protein Expression and Purification Core Facility:  
[http://www.embl.de/pepcore/pepcore\\_services/index.html](http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/index.html)

Dokumentace k Origami(DE3) a Rosetta-Gami2(DE3)pLySRare (Novagen)

**Christopher T. Walsh et al.** Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications, *Angewandte Chemie* (International ed. in English) 44: 7342-7372, 2005.

# Použitá a doporučená literatura

**Jagat S. Chauhan et al.** GlycoPP: A Webserver for Prediction of N- and O- Glycosites in Prokaryotic Protein Sequences, *PLoS ONE* 7(7): 1-13, 2012.

Stránky GlycoPP: <http://www.imtech.res.in/raghava/glycopp/>

Stránky ProGlycProt: <http://www.proglycprot.org/>

**Marlene Belfort et al.** Prokaryotic Introns and Inteins: a Panoply of Form and Function, *Journal of Bacteriology* 177(14): 3897-3903, 1995.