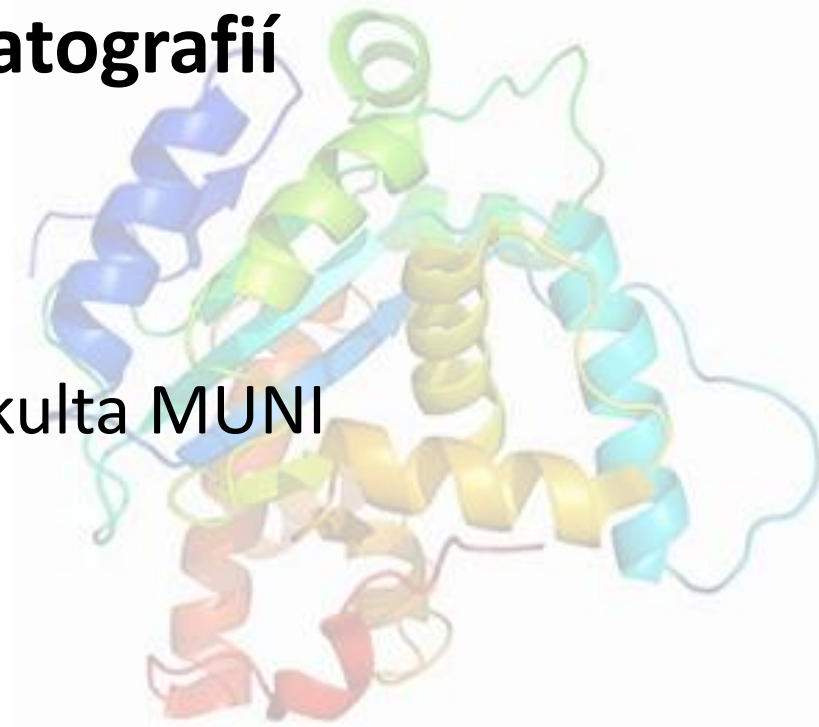


Cvičení č. 6

Purifikace rekombinantního proteinu afinitní chromatografií

Přírodovědecká fakulta MUNI



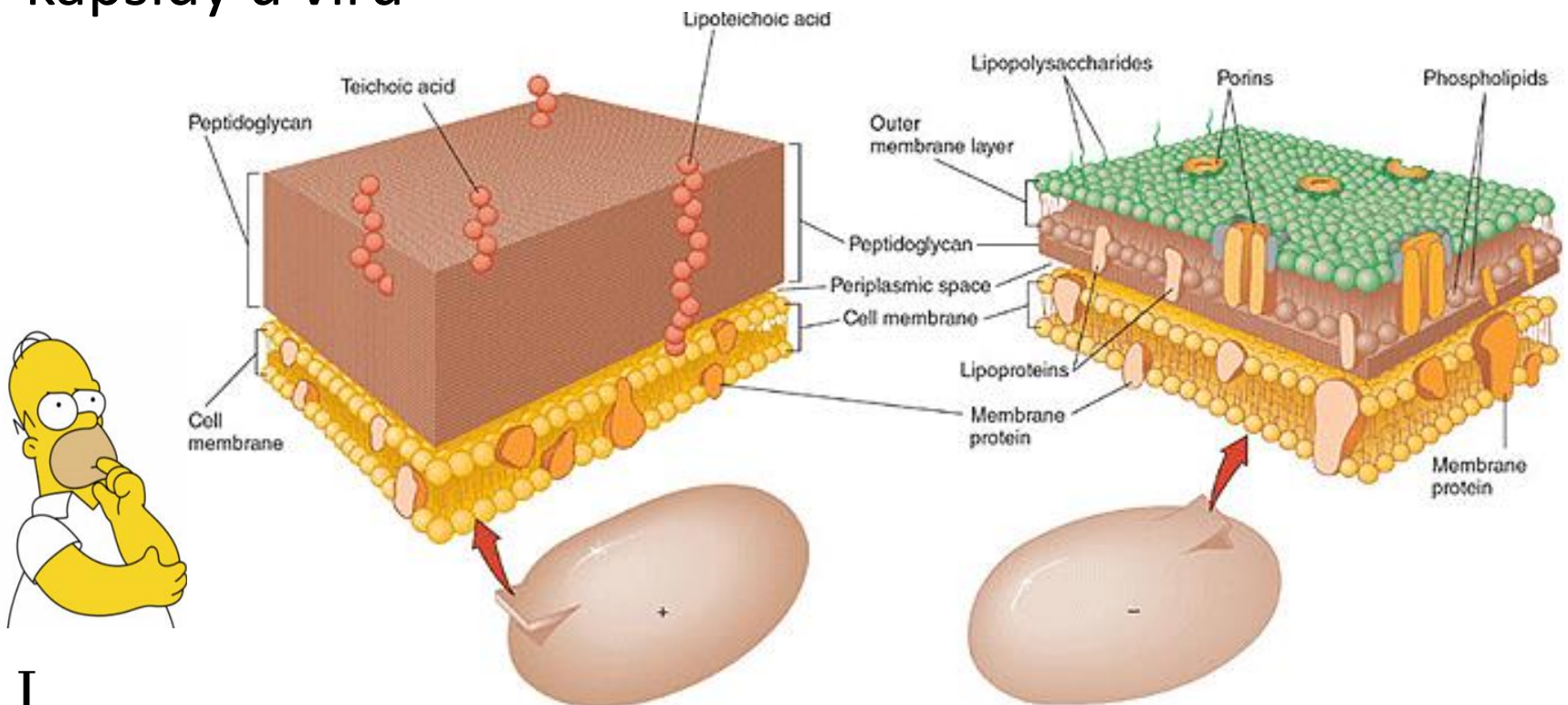
CO NÁS DNES ČEKÁ...

- 1) Teoretický úvod k tématu
- 2) Seznámení se s protokolem ke cvičení
- 3) Separace buněk z média centrifugací
- 4) Lyze buněk a separace CFE centrifugací
- 5) Purifikace GFP-His a BglC-His metaloafinitní purifikací

PŘÍPRAVA BUNĚČNÉHO EXTRAKTU

Podstatou je lyze buňky a odstranění buněčných obalů

- Buněčné stěny u G⁺/G⁻ bakterií či kvasinek, proteinové kapsidy u virů



ODSTRANĚNÍ OBALŮ CHEMICKY

- Chemická činidla narušují integritu buněčných stěn
- Důležité je chemické složení buněčné stěny
- Druhé činidlo pak naruší buněčnou membránu (lipidy)
- Klasický postup u *E. coli* a příbuzných bakterií:

lyzozym + EDTA + SDS

...a jak to funguje?

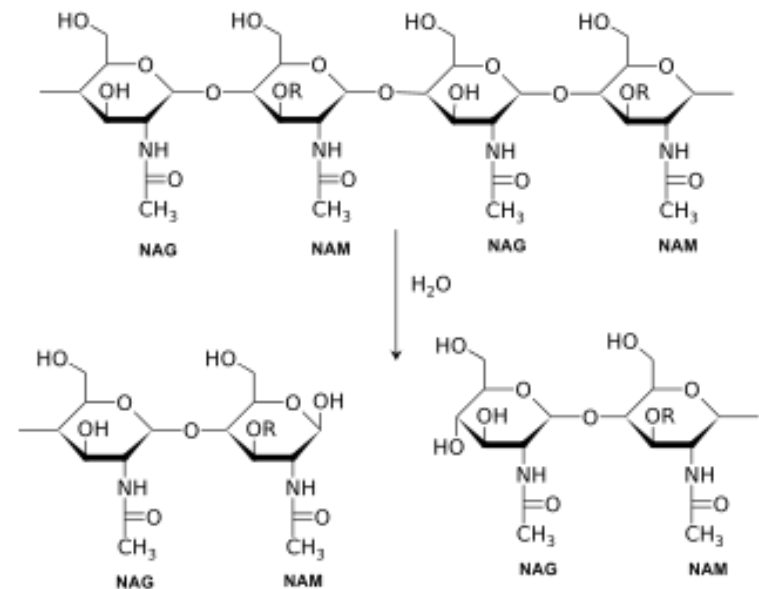


MECHANISMUS ÚČINKU LYSOZYMU

- EC 3.2.1.17, muramidáza, patří mezi glykanhydrolázy
- Hydrolýza vazeb 1,4- β mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminem v peptidoglykanu



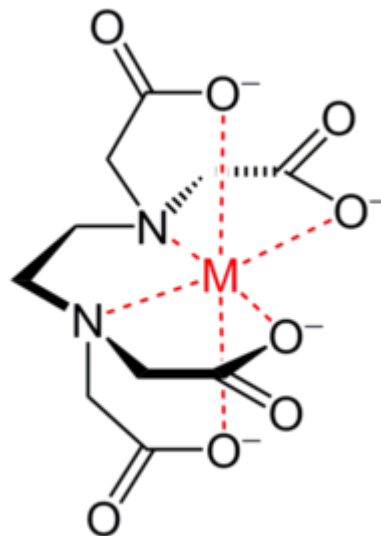
Funguje to i s *Archae*?



MECHANISMUS ÚČINKU EDTA

Etylendiamin tetraacetát (EDTA)

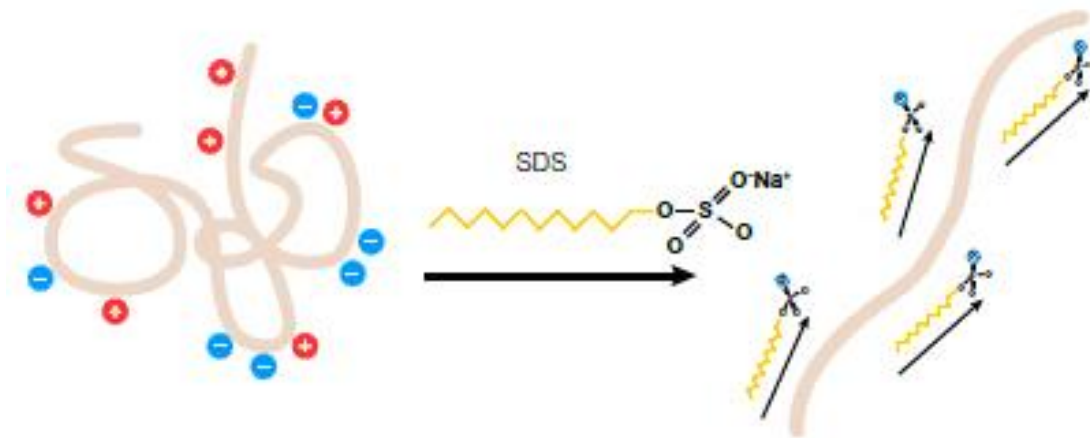
- Chelatační činidlo, vychytává Mg^{2+} , které pomáhají udržovat integritu buněčných obalů
- Inhibuje nukleázy s kofaktorem Mg^{2+} , které by mohly degradovat NK



MECHANISMUS ÚČINKU SDS

Dodecylsulfát sodný (SDS)

- Aniontový detergent
- Rozrušuje vrstvu fosfolipidů ve vnitřní či vnější membráně
- Narušuje nekovalentní vazby proteinů a denaturuje je

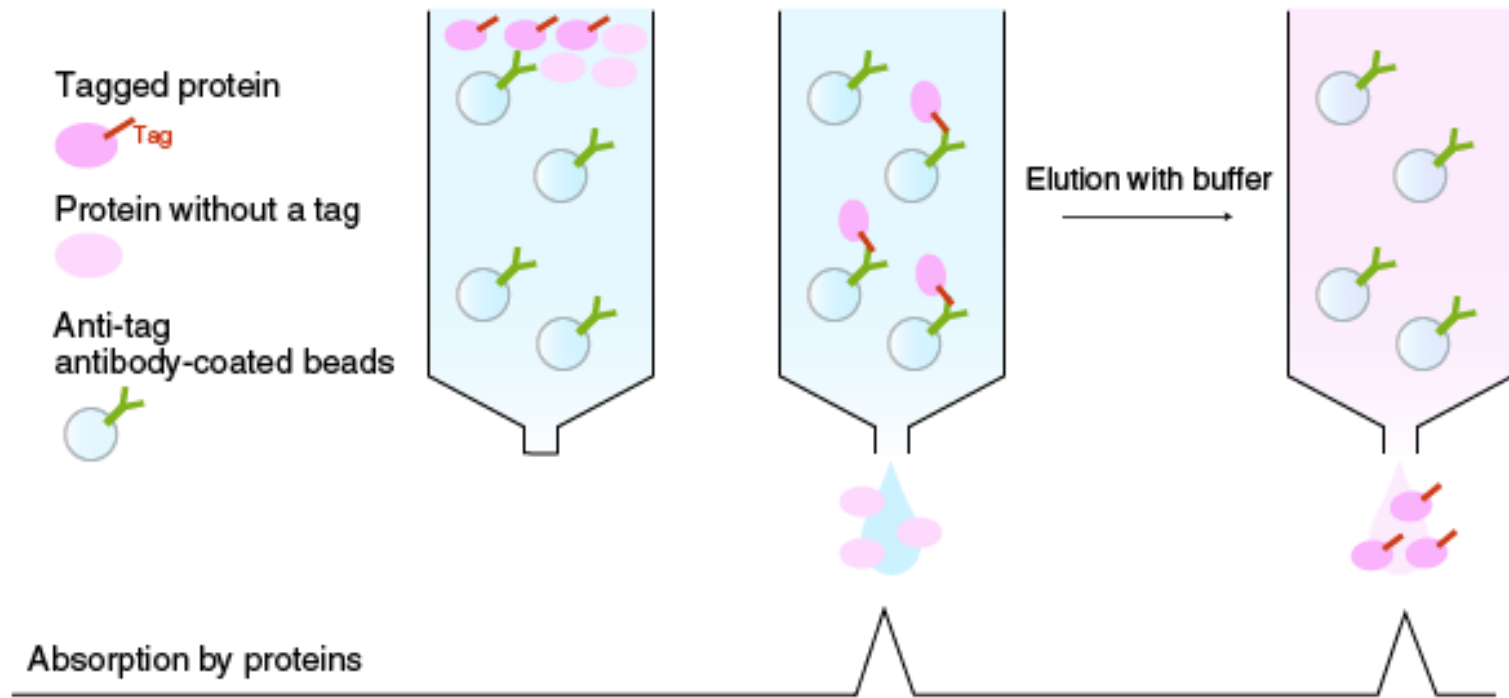


AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

Založena na vysoce specifických interakcích biomolekul

- Enzym-substrát, protilátka-antigen, receptor-ligand, protein-NK, rekombinantní protein-protilátka atd.
- Stacionární fázi tvoří jedna z interagujících molekul vázaná na pevný nosič
- Vazebný partner je vychytáván ze směsi v mobilní fázi
- **Eluce pufry o \uparrow či \downarrow pH či iontové síle (změna konformace či náboje) nebo s \uparrow konc. ligandu (kompetice)**

AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE



<http://ruo.mbl.co.jp>

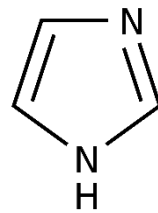
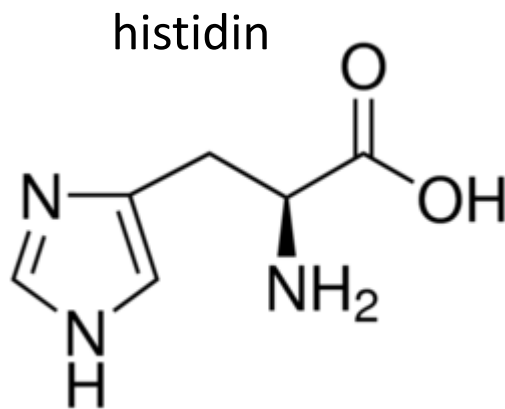
AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

- Komerčně dostupné předplněné kolony s matricí
- Nejčastějšími nosiči jsou polysacharidové gely (agaróza), celulóza, polyakrylamid
- Různé vstupní materiály: bakteriální či kvasinkový lyzát, růstové médiu, krevní sérum...
- Nejčastější využití pro purifikaci NK či proteinů

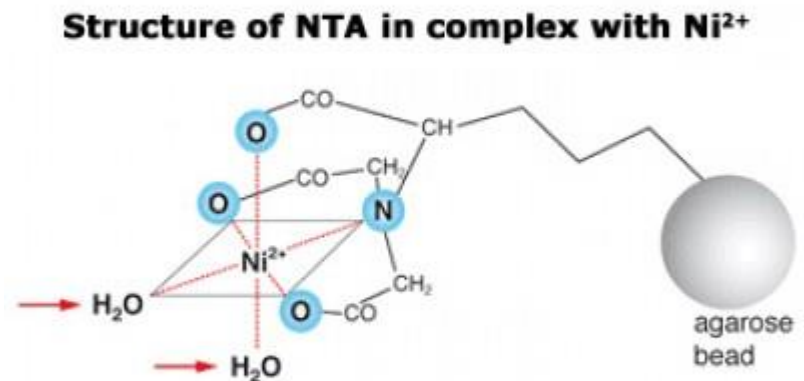


Ni-NTA METALOAFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

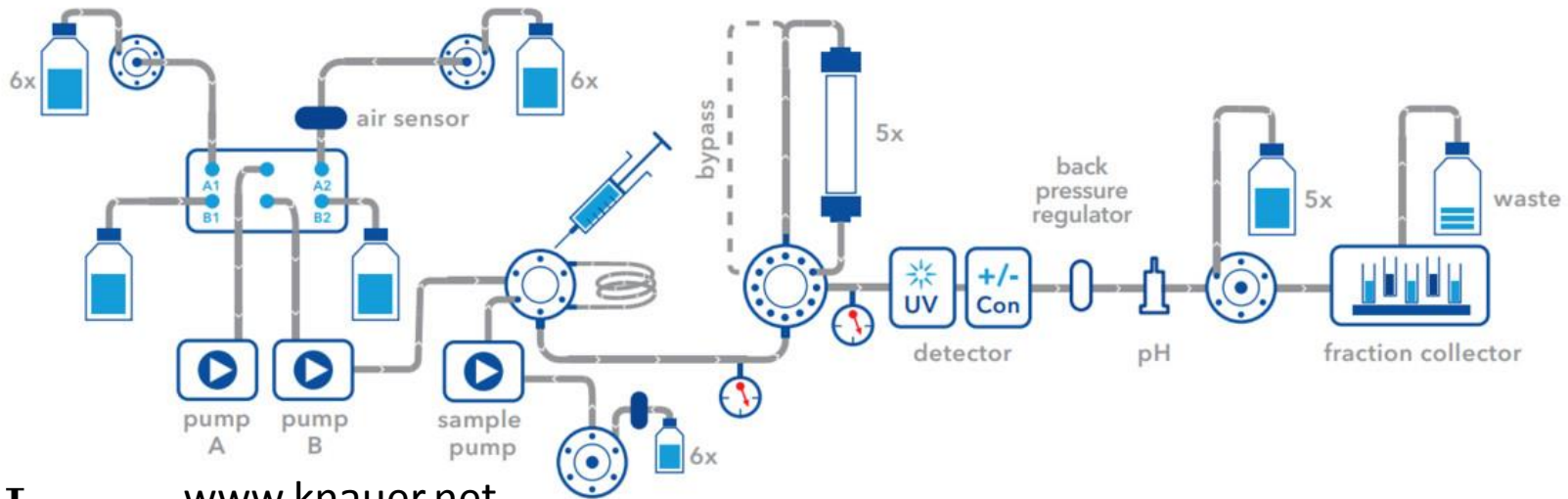
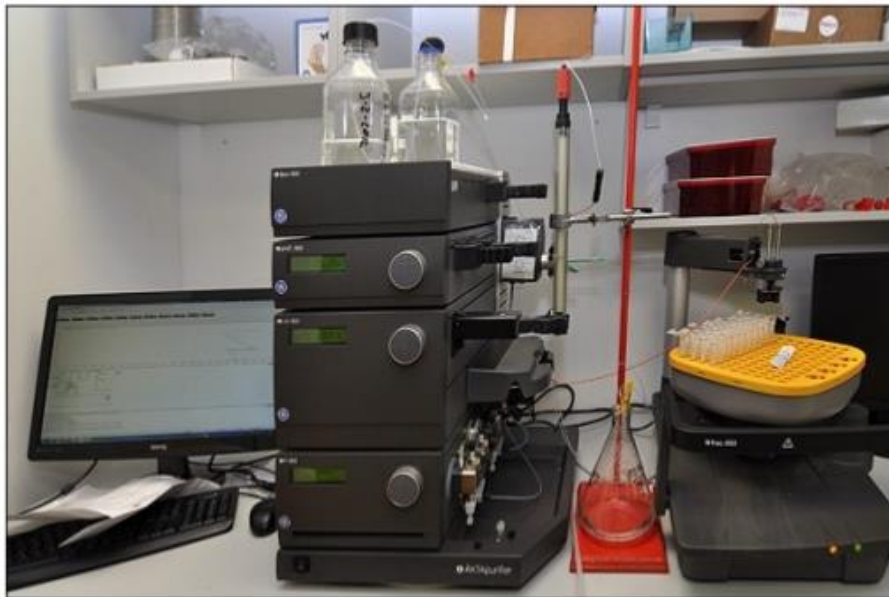
- Založena na silné vazbě mezi histidinem a iontem Ni v zásaditém pH
- 6xHis tag na N nebo C konci rekombinantního proteinu
- Ni-NTA (nitriltrioctová k.) agaróza jako stacionární fáze



imidazol



FPLC (FAST PROTEIN LIQUID CHROMATography)



www.knauer.net

FPLC CHROMATOGRAM

