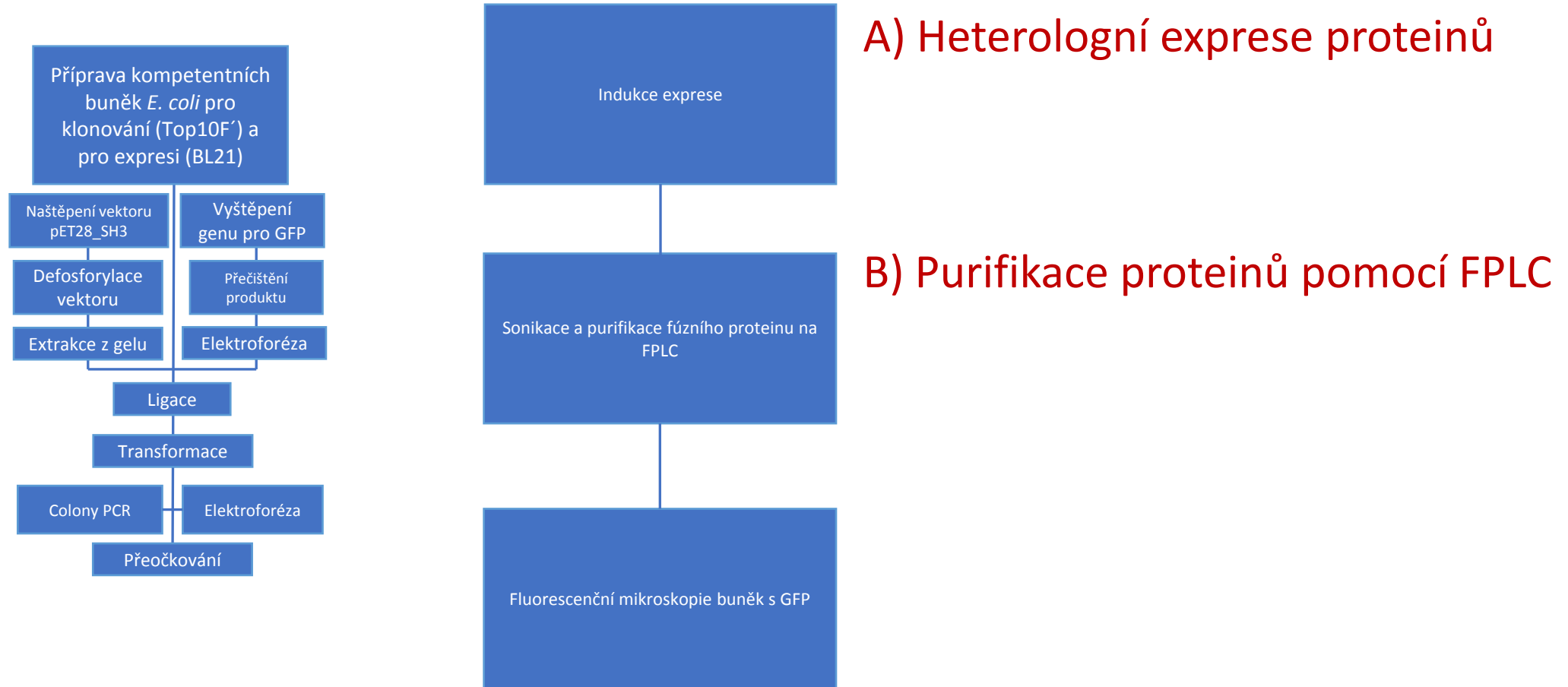


Úloha 4: Příprava fúzního proteinu s GFP

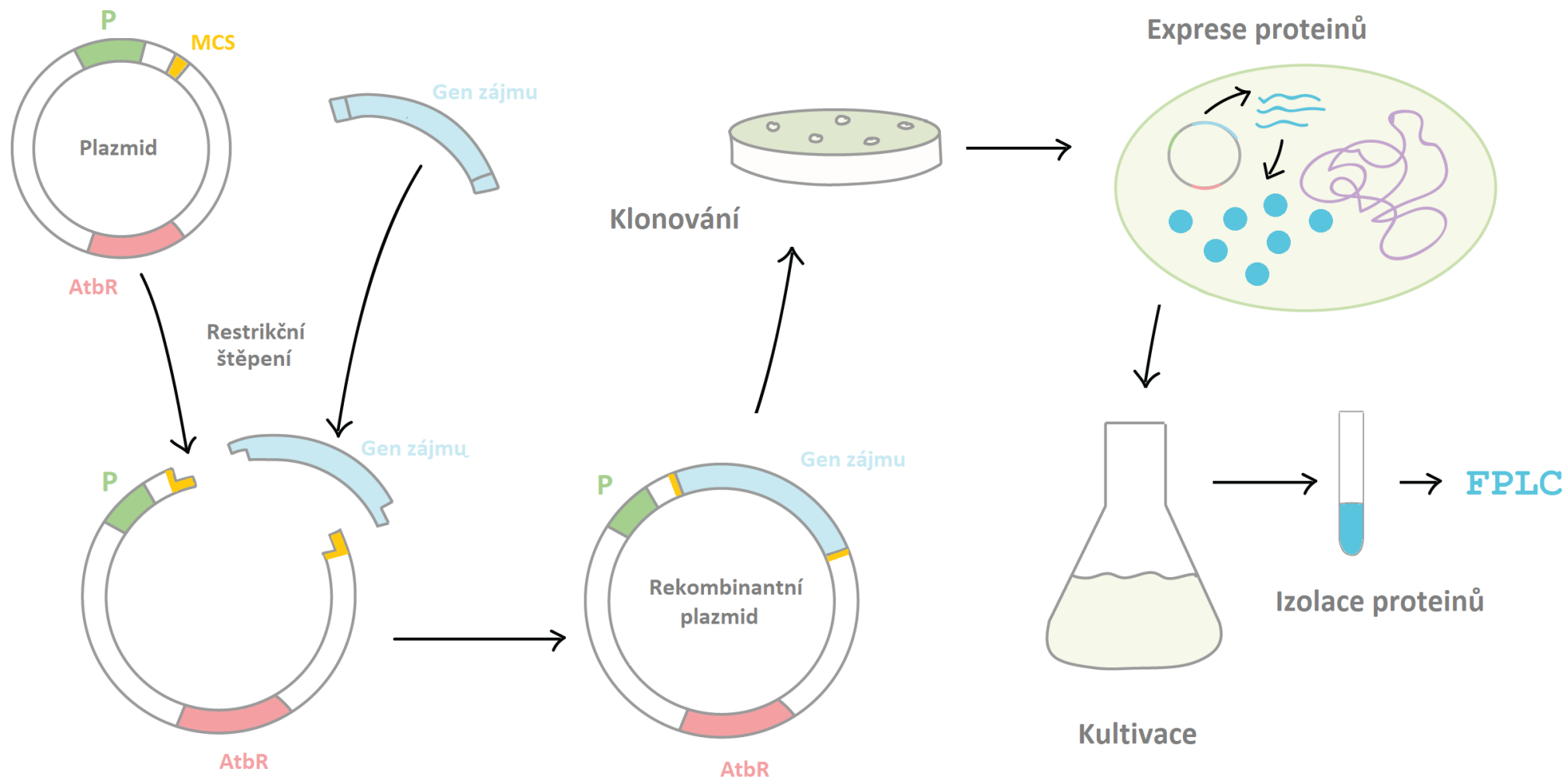
Vyučující: Ivana Mašlaňová, Lucie Kuntová, Roman Pantůček, Jiří Holoubek, Hana Šimečková

Kontakt: maslanova@sci.muni.cz, Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů, Ústav experimentální biologie

Obsah



Schéma



Heterologní exprese v *Escherichia coli*

Výhody exprese v *E. coli*

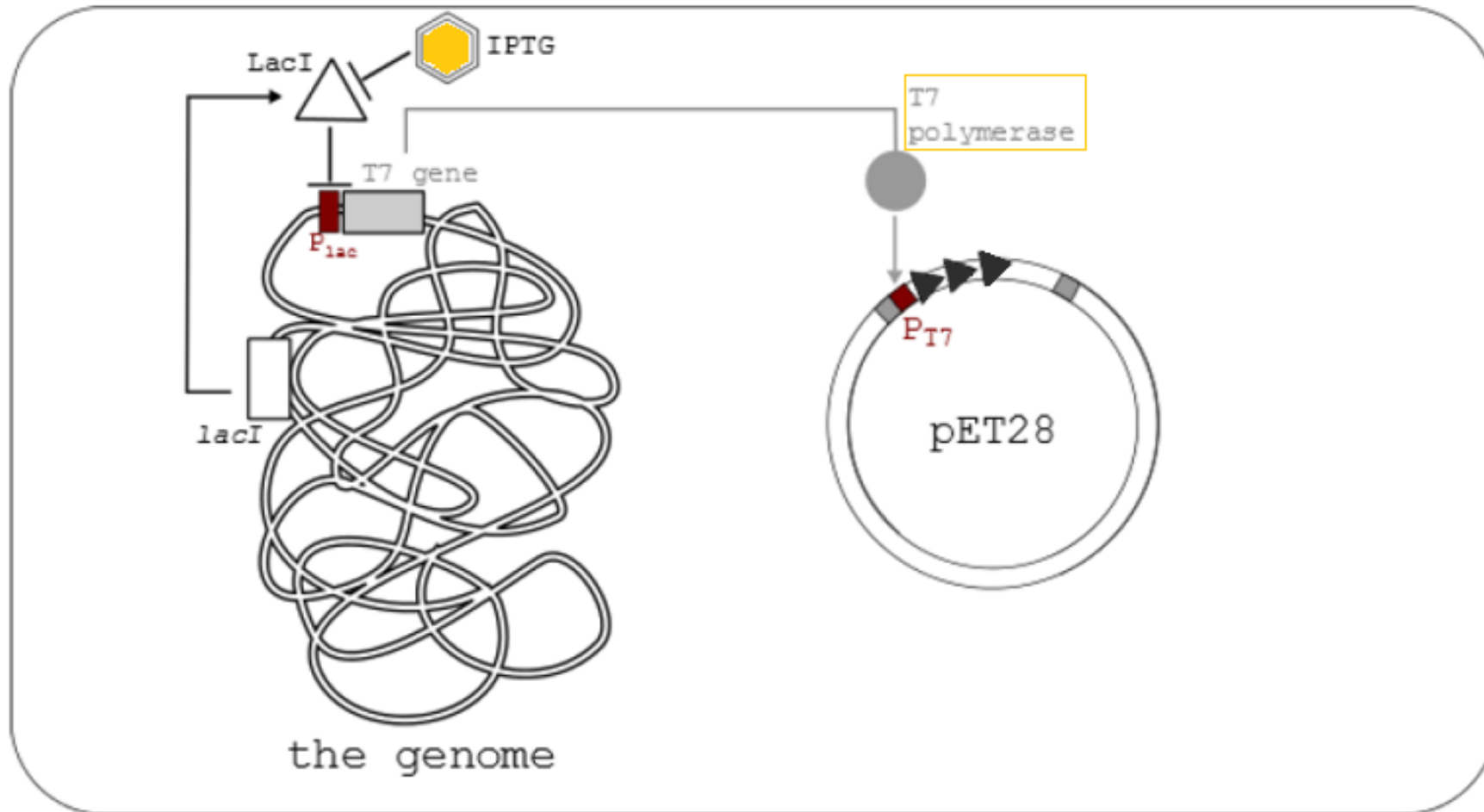
- známý, dobře prostudovaný organismus
- vhodné vektory pro klonování (pET)
- ochota přijmout cizorodou DNA
- snadná a rychlá kultivace
- vysoká produkce proteinů

E. coli BL21 (DE3)

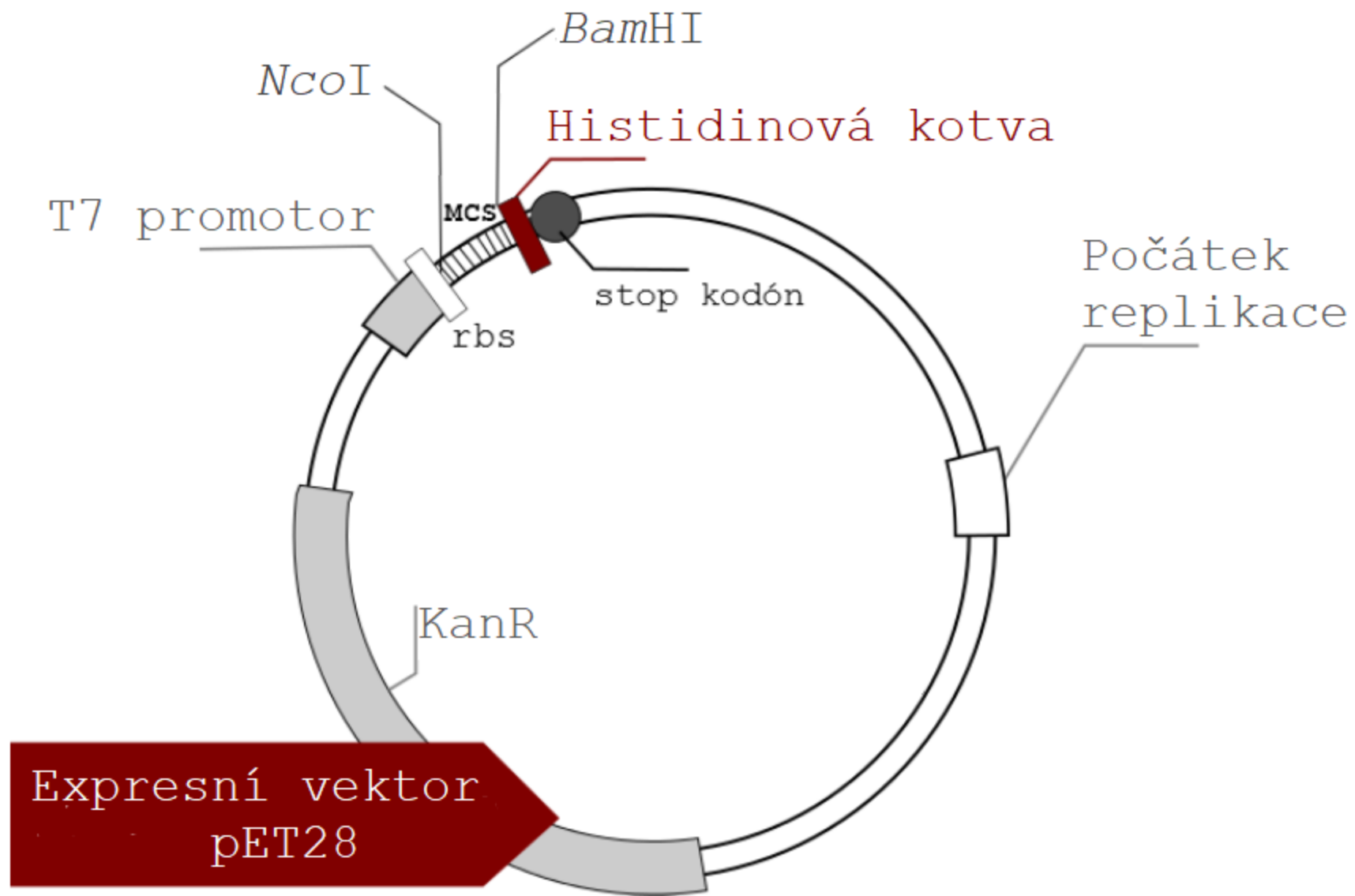
- DE3 - gen pro T7 RNA polymerázu pod kontrolou lac promotoru



pET28 expresní systém



E. coli BL21 (DE3)



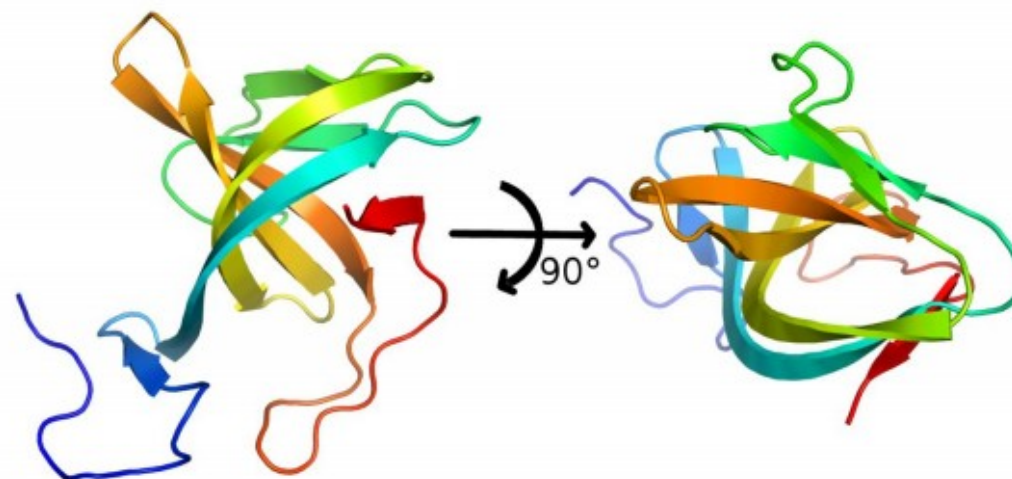
Endolysin fága 812F1

MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDS PYRVKKATSYDPSFGVMEAGAI DADGYHYHAQCQDLITDYVLWLTDNKV
RTWGNAKDQIKQSYGTGFKIHENKPSVTPKKGWIAVFTSGSYEQWGHIGIVYDGGNTSTFTILEQNWNGY
ANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVKAGTTVKKETAKKSASTPATRPVTGSWKKNQYGTWYKPENATFVNGN
QPIVTRIGSPFLNAPVGGNLPAGATIVYDEVCIQAGHIWIGYNAYNGNRVYCPVRTCQGVPPNQIPGVAV
GVFK

284 AA 31.4 kDa pl: 9.32

CHAP doména: lytická aktivita

SH3b doména: vazebná funkce



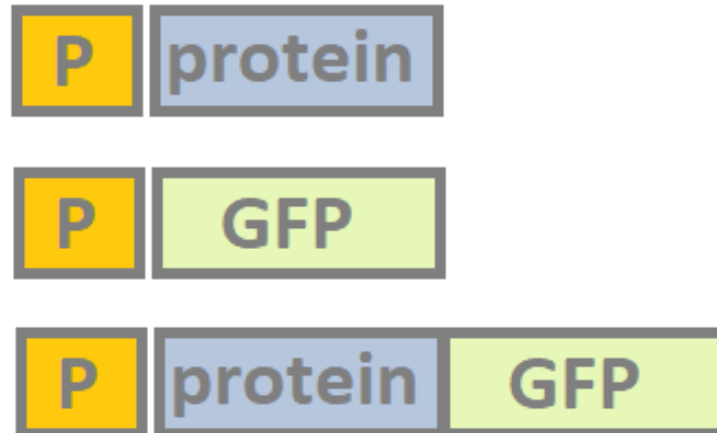
Struktura LysF1 SH3b domény. Proteinové struktury jsou zbarveny na základě jejich pozice od N-konce (modře) k C-konci (červeně).

Reportérové geny/proteiny

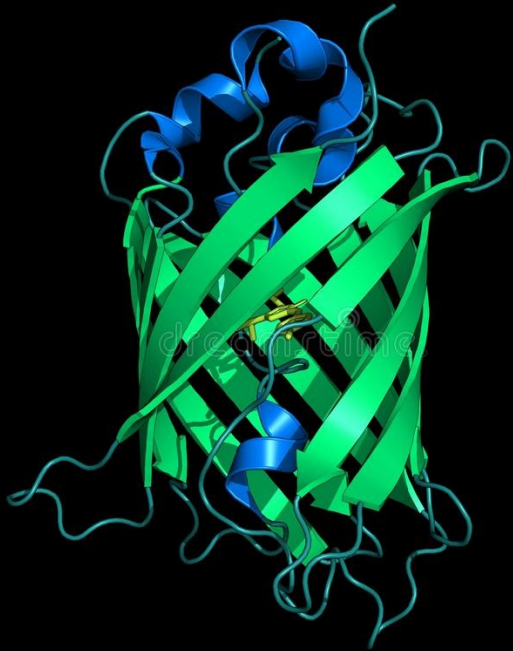
Dva přístupy

- Transkripční fúze: studium regulace (promotor)
- Translační fúze: vizualizace a lokalizace proteinu

Jedním z nejpoužívanějších je GFP



Green Fluorescent Protein GFP



Aequorea victoria

238 AA 26.9 kDa

Zelená fluorescence (509 nm)

„Beta barel“ – 11 beta listů

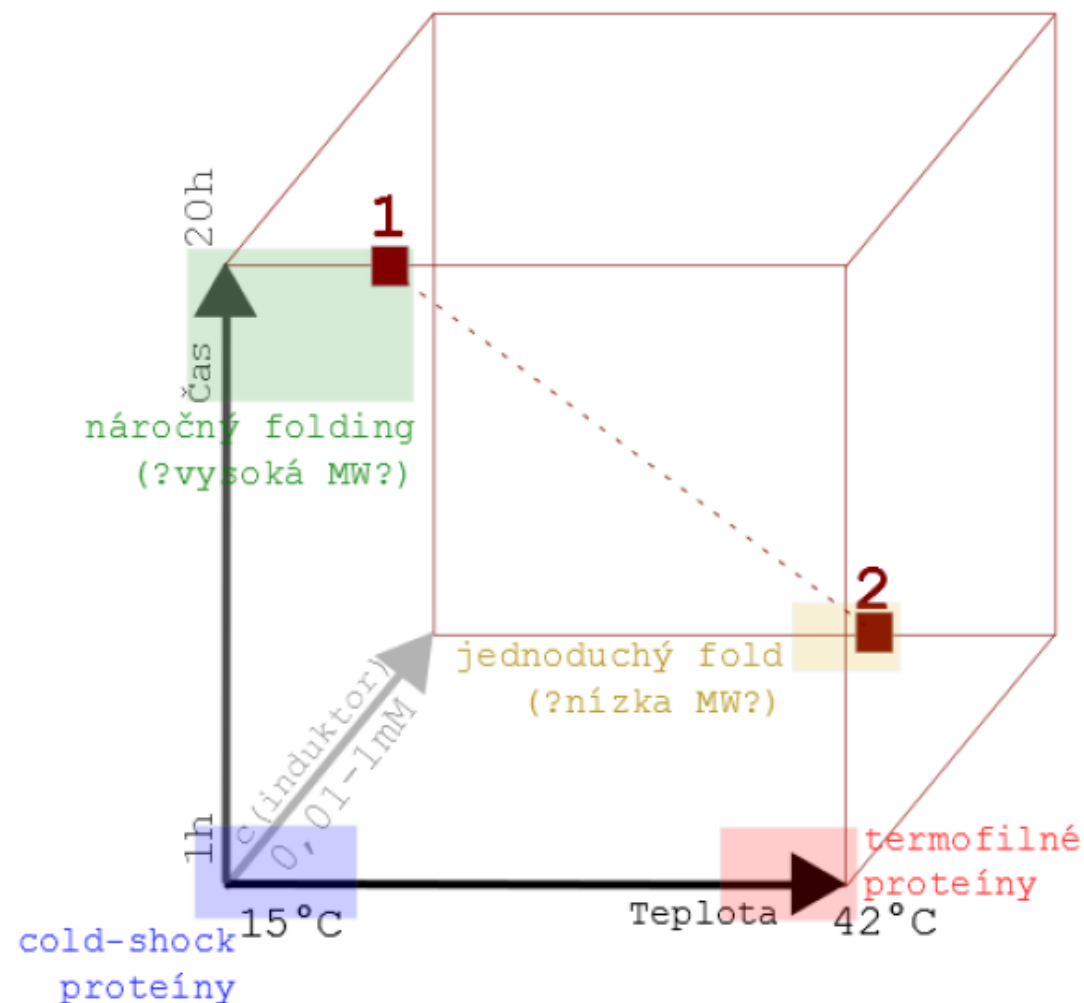
Uvnitř barelu chromofor



Expese proteinů

Testujeme variabilní podmínky:

- **1** pomalá dlouhodobá exprese
 - 22 °C/16h, 0.04 mM IPTG
- **2** rychlá nárazová exprese
 - 37 °C/5h, 0.4 mM IPTG



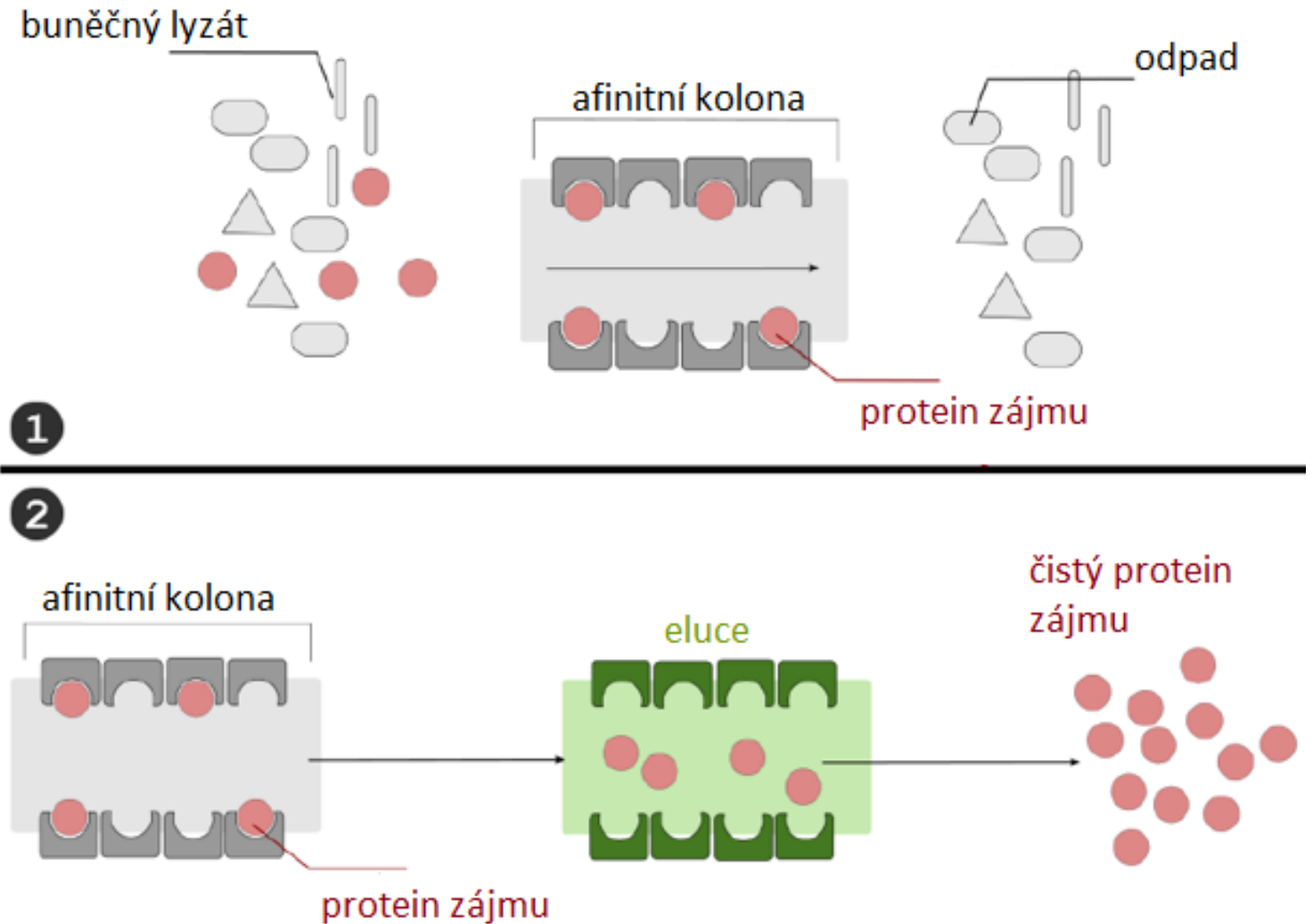
Purifikace proteinů

Vyučující: Ivana Mašlaňová, Lucie Kuntová, Roman Pantůček, Jiří Holoubek, Hana Šimečková

Kontakt: maslanova@sci.muni.cz, Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů, Ústav experimentální biologie

Chromatografie

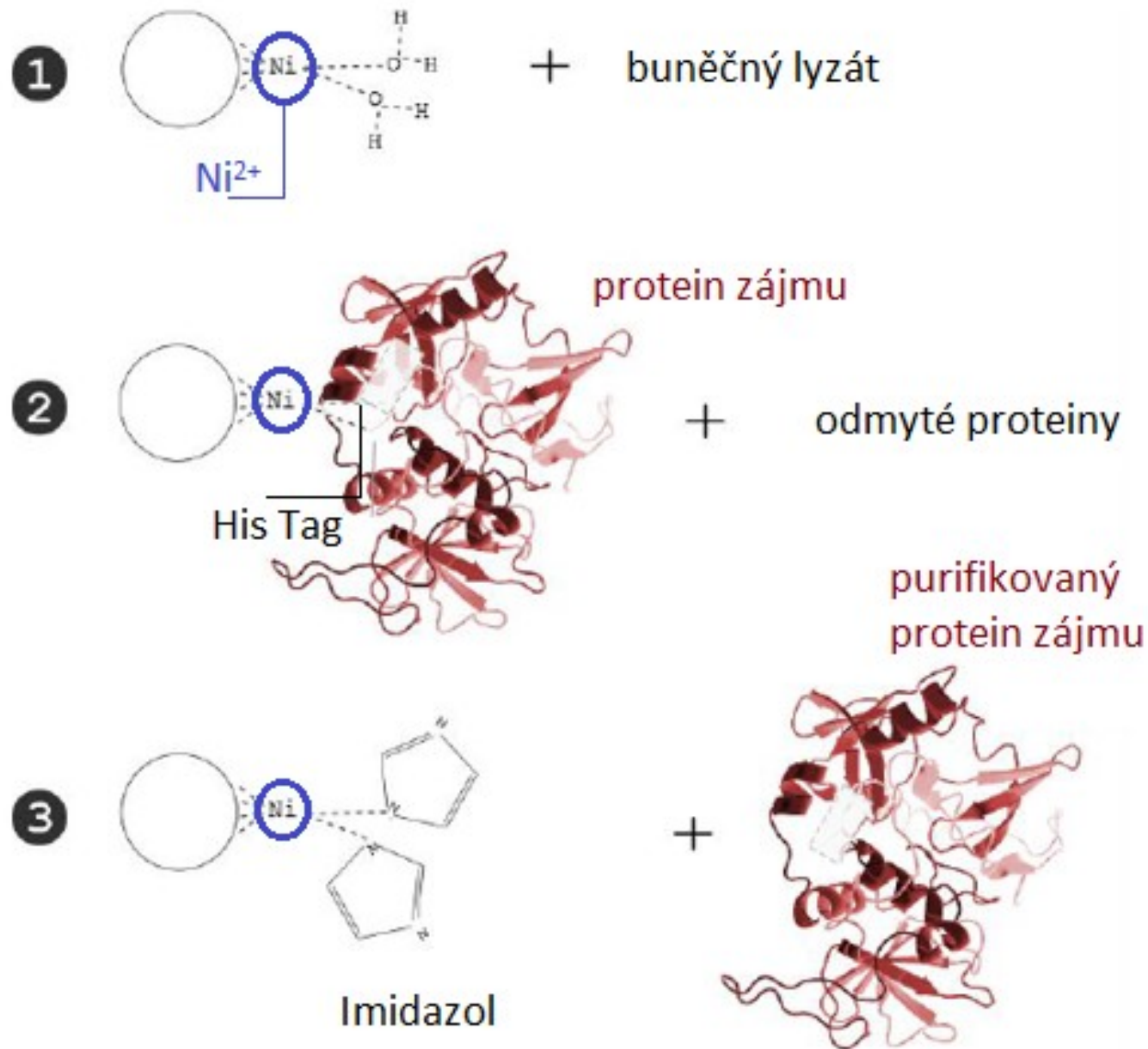
- Fyzikálně-chemická separační metoda
- Rozdělení molekul mezi stacionární a mobilní fázi
- Separace na základě velikosti, náboje, afinity,...



HisTrap

metaloafinitní chromatografie

- 1) Ni-NTA modifikovaný povrch kolony
- 2) Vazba proteinu přes HisTag
- 3) Eluce



Buffer A

HEPES 100mM, pH = 6.8

NaCl 200mM

Imidazole 20 mM

PMSF 0.2mM (optional)

Buffer B

HEPES 100mM, pH = 6.8

NaCl 200mM

Imidazole 500 mM

PMSF 0.2mM (optional)

Purification Buffer

stable pH

optimal ionic strength

elution substance

minimal proteolysis

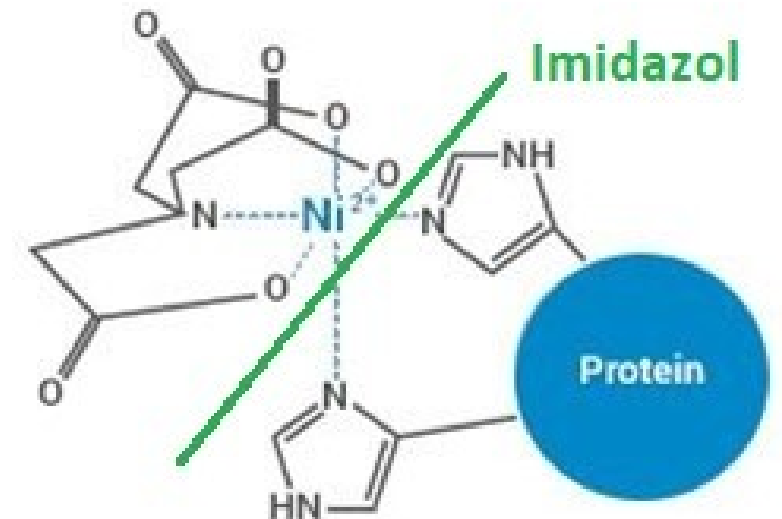
<https://www.youtube.com/watch?v=DfzB6BtSjBY>

Imidazol

eluční činidlo (kompetitivní agens)

PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)

inhibitor serinových proteáz



Kolona

Nabití

NTA (nitrilotrioctová kyselina)

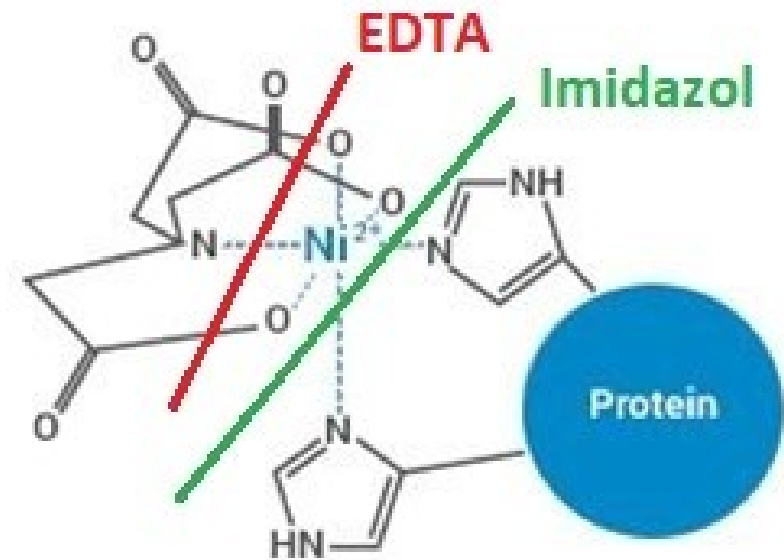
- váže Ni^{2+} (NiSO_4)

Chelatační činidlo

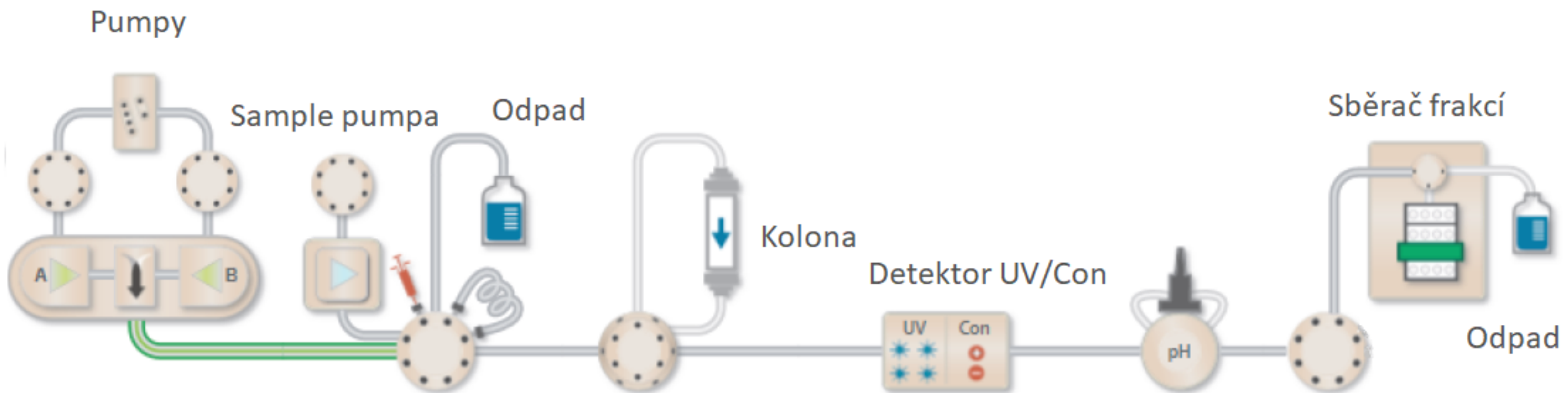
silně se váže na kovové kationty

odvázání Ni^{2+} z NTA

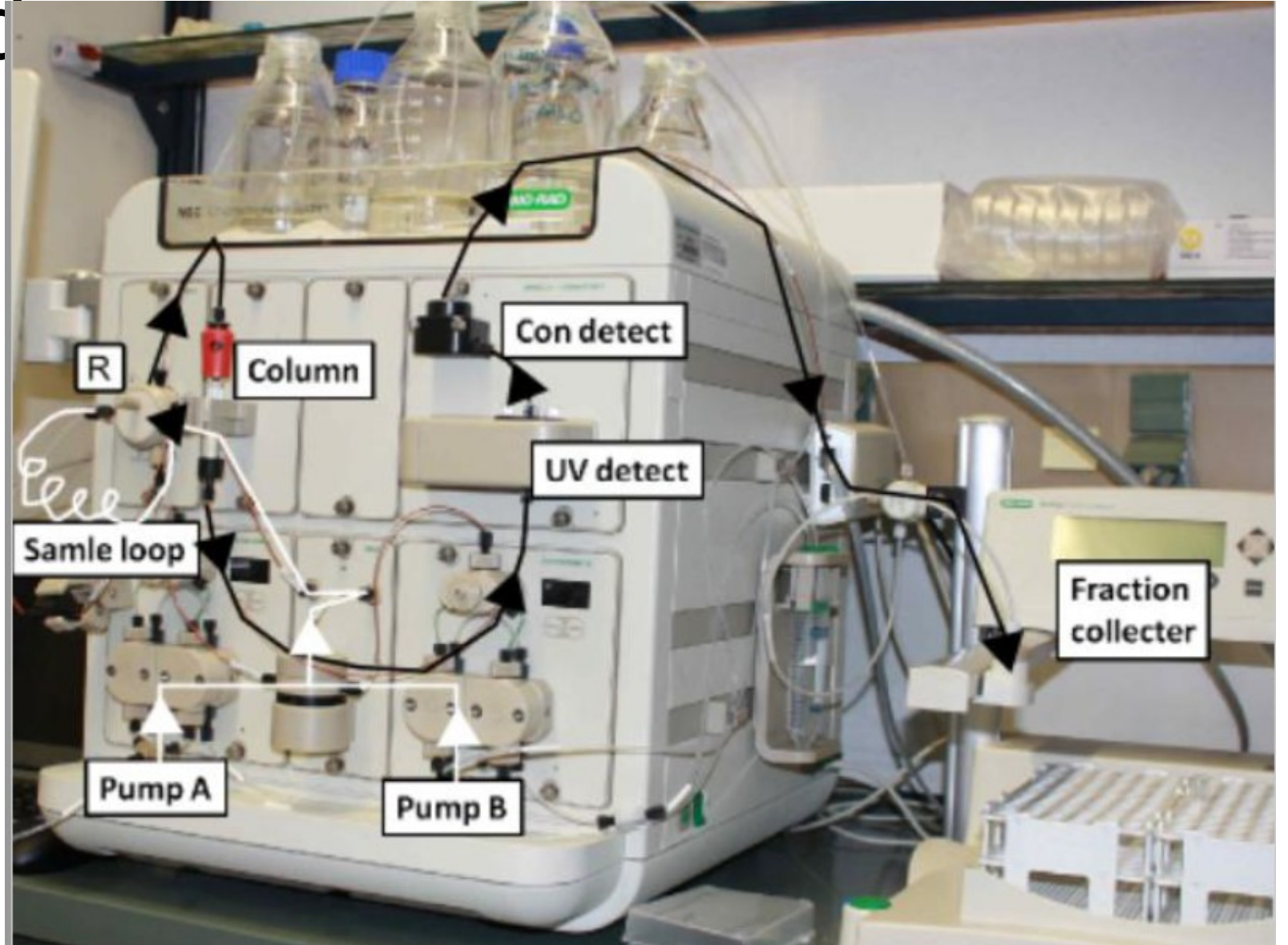
EDTA



FPLC schéma



NGC Biorad



Konfokální mikroskopie

