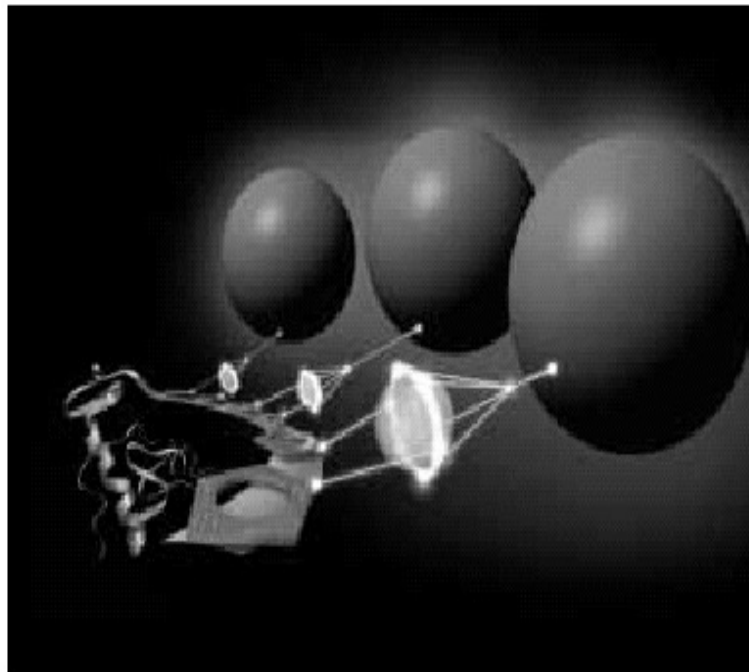
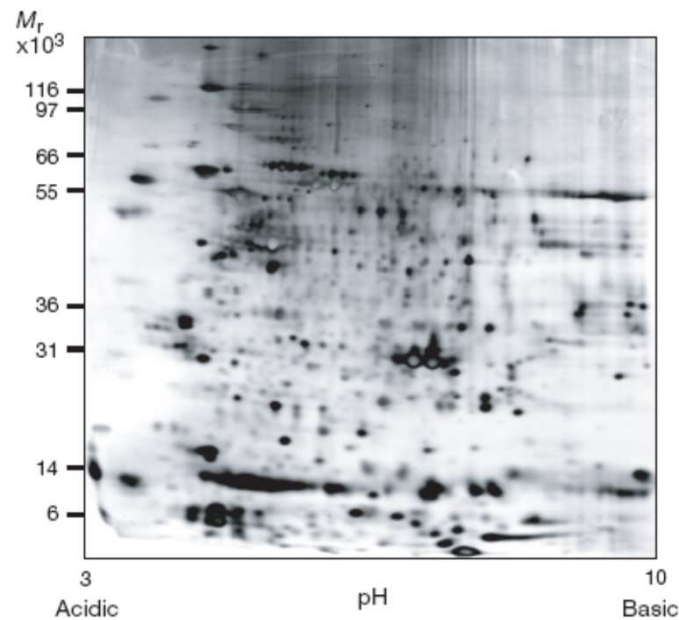


Purifikace rekombinantních proteinů



Purifikace proteinu z komplexní směsi makromolekul přítomných v biologickém vzorku



Analýza buněčného extraktu 2D elektroforézou

- Několik tisíc proteinů z různými vlastnostmi ($\sim 5000-8000$) a v různých množstvích (aktin $\sim 10\%$, unikátní transkripční faktor $< 0,001\%$ z celkového množství proteinů)
- DNA, RNA, polysacharidy, lipidy

Dezintegrace biomasy

Fyzikální metody: sonikace ultrazvukem, tlakem v přístroji French press, osmotický šok, střížné síly v různých typech mlýnků a homogenizátorů
- při sonikaci či mechanických metodách nutno chladit!

Chemické: detergenty, chelátory v lyzačních pufrech, organická rozpouštědla
- látky mohou interferovat s následnou purifikační metodou

Enzymatické: nutno volit podle expresního systému
Lysozym pro bakterie, lytikázu nebo zymolázu (glukanázy) pro kvasinky.

Při všech lyzačních postupech dochází k destrukci buněk a uvolnění jejich obsahu včetně proteolytických enzymů. Proto je vhodné do lyzačního pufru přidávat inhibitory proteáz, které v průběhu dezintegrace i dalších kroků zabrání degradaci produktu.

Než začneme.....

1. Proč???

Pro jaký účel ?

2. Jak???

Jak protein detekovat?

3. Co???

Jaké vlastnosti má protein ?

1. Proč???

Pro jaký účel ?

Aplikace	Množství	Čistota	Poznámka
Identifikace	0,002-0,2 µg	vysoká (>95%)	<ul style="list-style-type: none">• Edmanovo odbourávání (5-10 pmol), přístupy hmotnostní spektroskopie (0,2-1 pmol)
Produkce protilátek	µg-mg	střední-vysoká	<ul style="list-style-type: none">• 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 %	<ul style="list-style-type: none">• Množství proteinu závisí na citlivosti analýzy.• Čistota závisí na specificitě analýzy a ovlivnění výsledků analýzy kontaminacemi.
Biofyzikální studie	mg-g	vysoká (>95%)	<ul style="list-style-type: none">• CD spektroskopie, rezonance povrchových plasmonů, fluorimetrie, analytická ultracentrifugace, UV spektroskopie
3D struktura (krystalizace, NMR)	10-20 mg	vysoká (>95%)	<ul style="list-style-type: none">• 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 ¹⁵N / ¹³C je nutný pro vyřešení struktury.
Farmačeutické účely	mg-kg	vysoká (99,9%)	<ul style="list-style-type: none">• Pro klinické účely nesmí proteiny obsahovat pyrogeny a bakteriální toxiny a musí být velmi stabilní kvůli dlouhodobému skladování.

2. *Jak???*

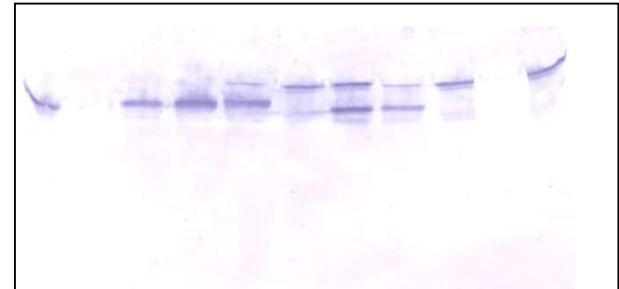
Jak protein analyzovat?

1. Polyakrylamidová gelová elektroforéza za denaturujících (SDS PAGE) nendenaturujících podmínek (NATIVE PAGE) se specifickou detekcí :

Detekce proteinu zájmu během jeho purifikace

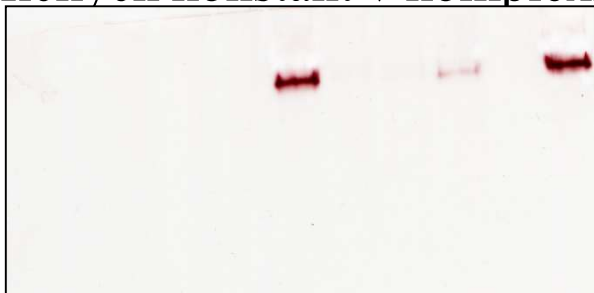
- Pomocí protilátek

SDS PAGE s následných
westernovým přenosem



Sledování biologické aktivity proteinu během purifikace

- U enzymů např. barvení v gelu pomocí chromogenních substrátů (nebo stanovení specifických konstant v komplexních vzorcích)



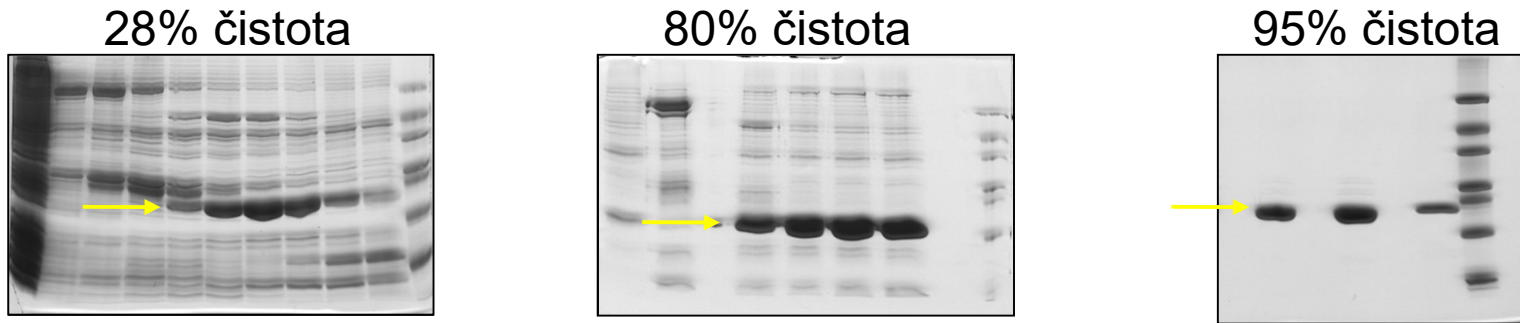
nativní PAGE, zymogram

2. *Jak???*

Jak protein analyzovat?

2. Polyakrylamidová gelová elektroforéza za denaturujících podmínek s nespecifickou detekcí

- Barvení pomocí Coommasie blue, stříbra,...
- **Sledování čistoty purifikovaného proteinu**



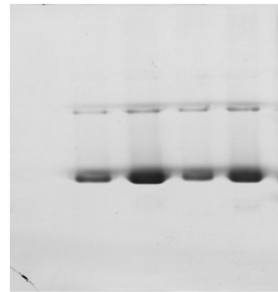
2. *Jak???*

Jak protein analyzovat?

3. Polyakrylamidová gelová elektroforéza za nativních podmínek s nespecifickou detekcí

- Barvení pomocí Coommasie blue, stříbra,...
- **Sledování homogenity purifikovaného proteinu**

Nativní PAGE



— Dimer
— Monomer

4. Stanovení koncentrace proteinu

- Nejvíce využívané metody: dle Bradfordové, Lowryho metoda,....

3. Co???

Jaké vlastnosti má protein ?

Informace o proteinu zájmu a příbuzných proteinech 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 rozpustnost proteinu)

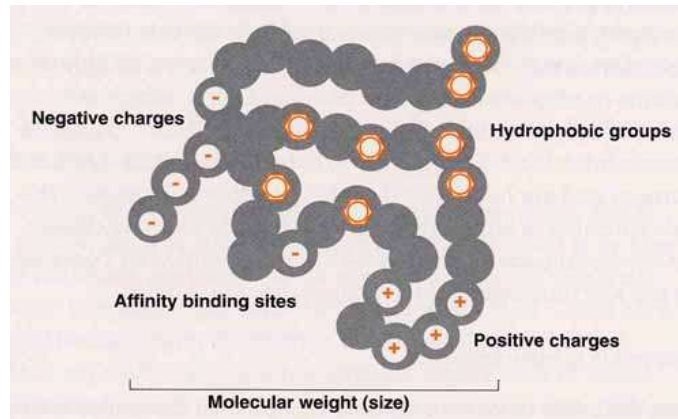
2D a nativní PAGE

- 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 např. síranem amonným, nízké/vysoké pH

Stabilita

teplotní precipitace

Velikost/tvar

gelová filtrace (gelová permeační chromatografie)

pI (povrchový náboj)

iontově výměnná chromatografie

Hydrofobicita

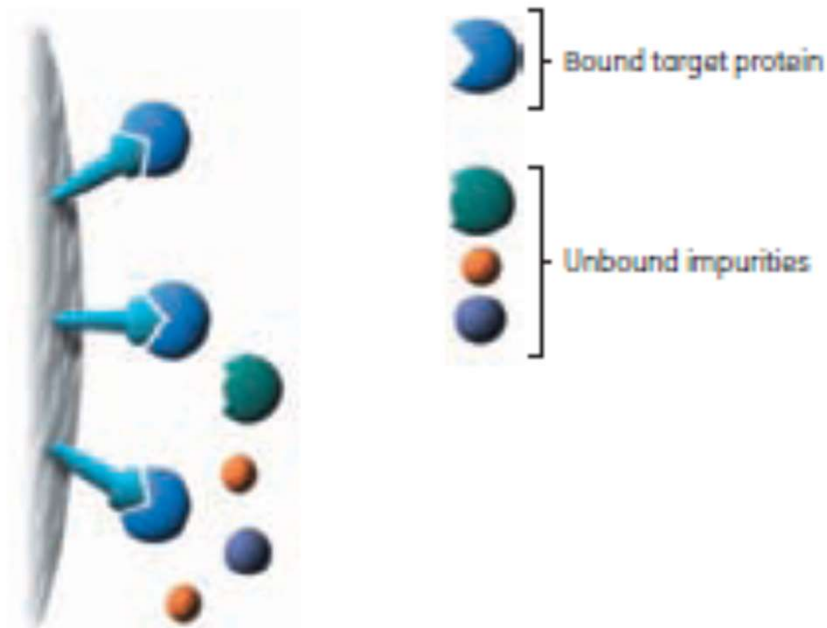
hydrofóbní chromatografie

Specifická vazba

afinitní chromatografie

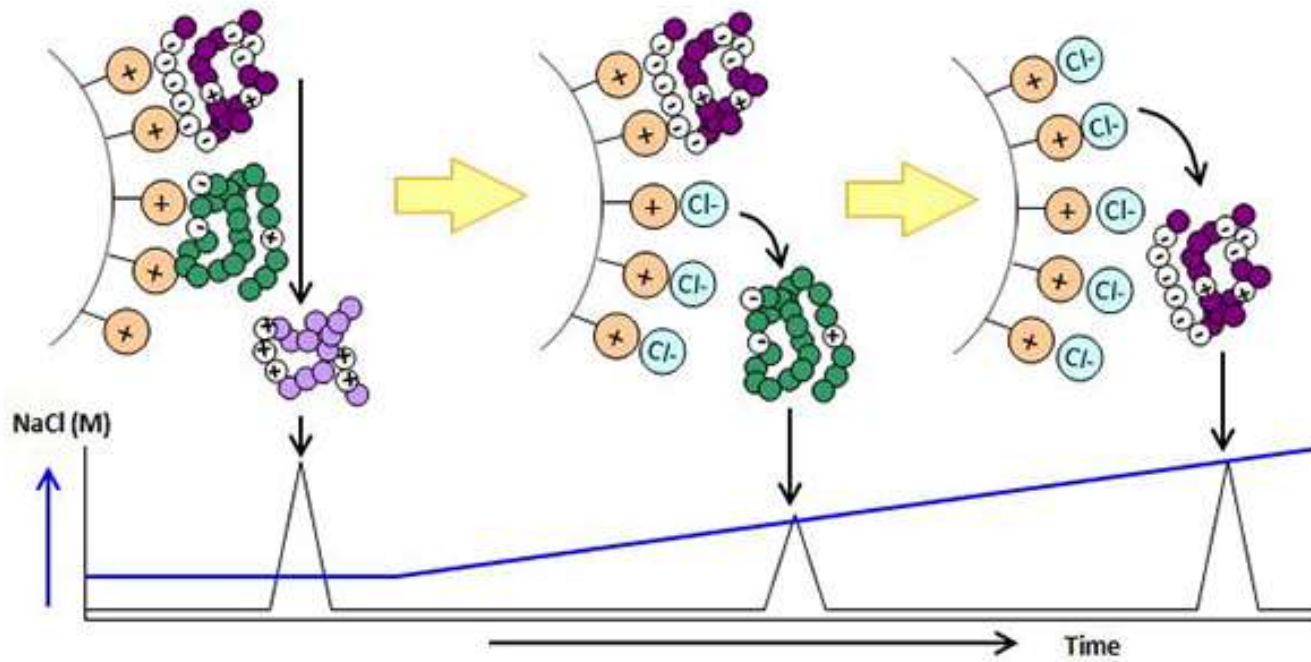
Afinitní chromatografie

- specifická vazby mezi molekulami
- nejčastěji se jedná o specifickou interakci afinitních fúzních tagů (např. polyhistidin, glutathion-S-transferáza, atd.) s ligandy (např. kov, glutathion, atd.) v chromatografických maticích



Iontově výměnná chromatografie

- separace na základě celkového náboje



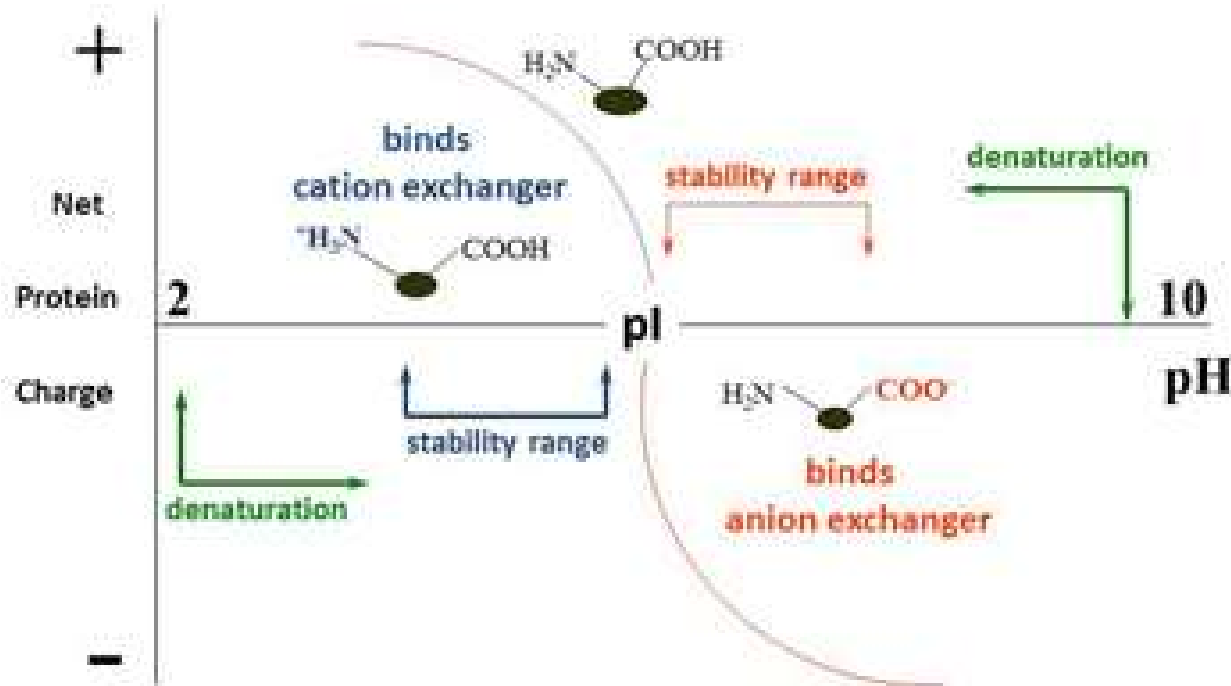
Gradient se zvyšující se koncentrací soli (NaCl)

Cl⁻ kompetuje s proteinem o vazbu na matrici

Stacionární fáze: média s kationtovými a aniontovými skupinami

Mobilní fáze: opačný iont přidáný do pufrů.

Iontově výměnná chromatografie



Resin Type	Cation Exchanger	Anion Exchanger
Net charge of molecule of interest	+	-
Charge of resin	-	+
Running conditions	0.5–1.5 pH units below the pI of the molecule of interest	0.5–1.5 pH units above the pI of the molecule of interest

Funkční skupiny používané na iontoměničových matricích

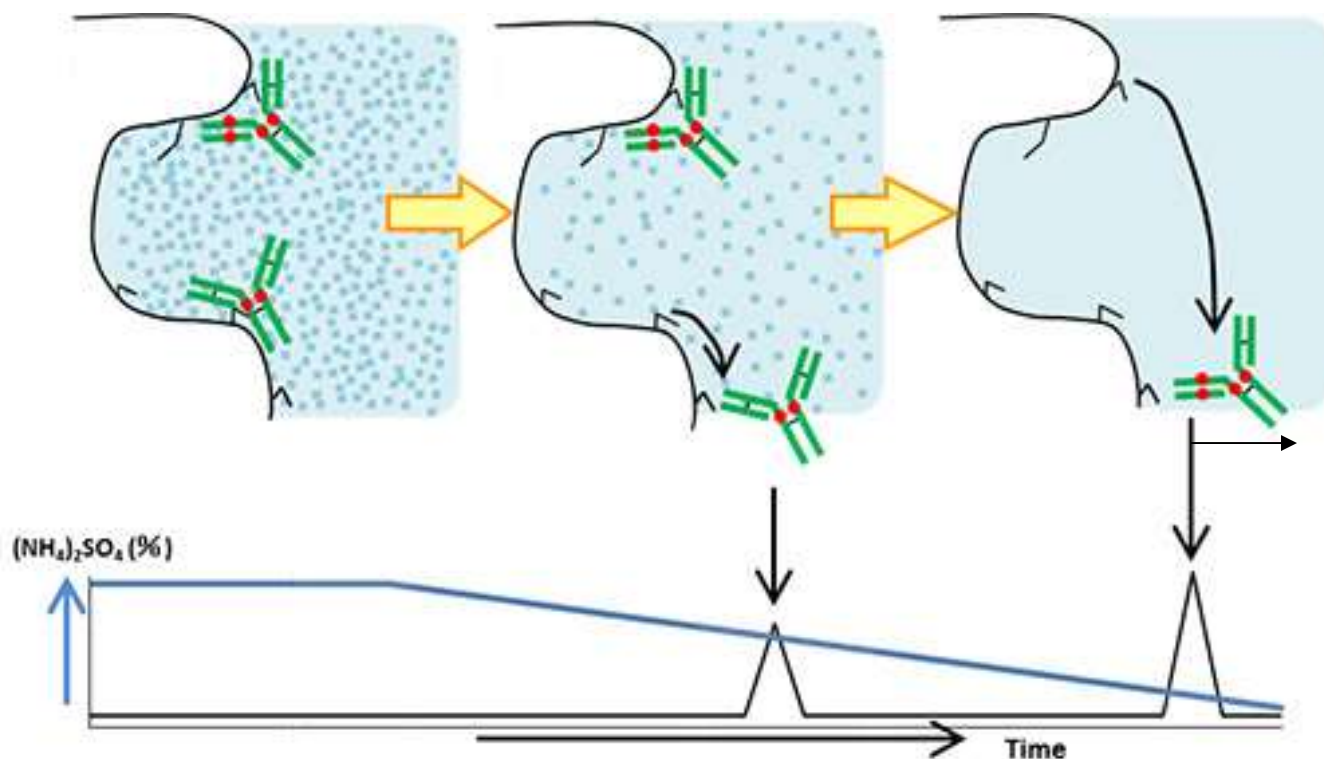
Anex (anion exchanger)

Quaternary ammonium (Q)	strong	$-\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$
Diethylaminoethyl (DEAE)*	weak	$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$
Diethylaminopropyl (ANX)*	weak	$-\text{CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$

Katexy (cation exchanger)

Sulfopropyl (SP)	strong	$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$
Methyl sulfonate (S)	strong	$-\text{CH}_2\text{-SO}_3^-$
Carboxymethyl (CM)	weak	$-\text{CH}_2\text{-COO}^-$

Hydrofóbní chromatografie



- vzorek aplikován ve vysoké koncentraci soli
- sůl snižuje solvatační obal exponují se hydrofobní oblasti

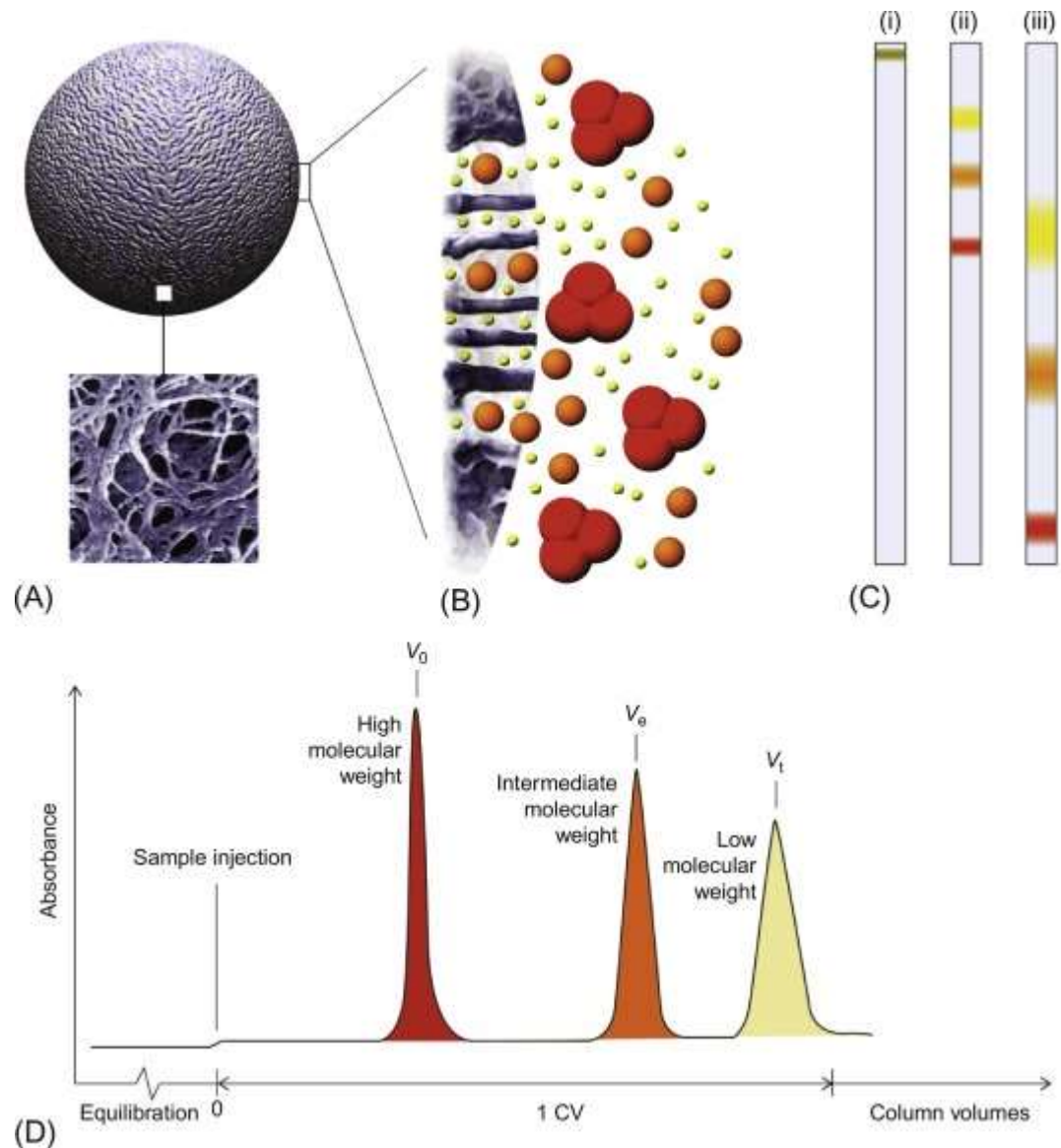
Používané ligandy

Phenyl	$-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$
Butyl-S	$-\text{S}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$
Butyl	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$
Octyl	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$
Ether	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{OH}$
Isopropyl	$-\text{O}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$

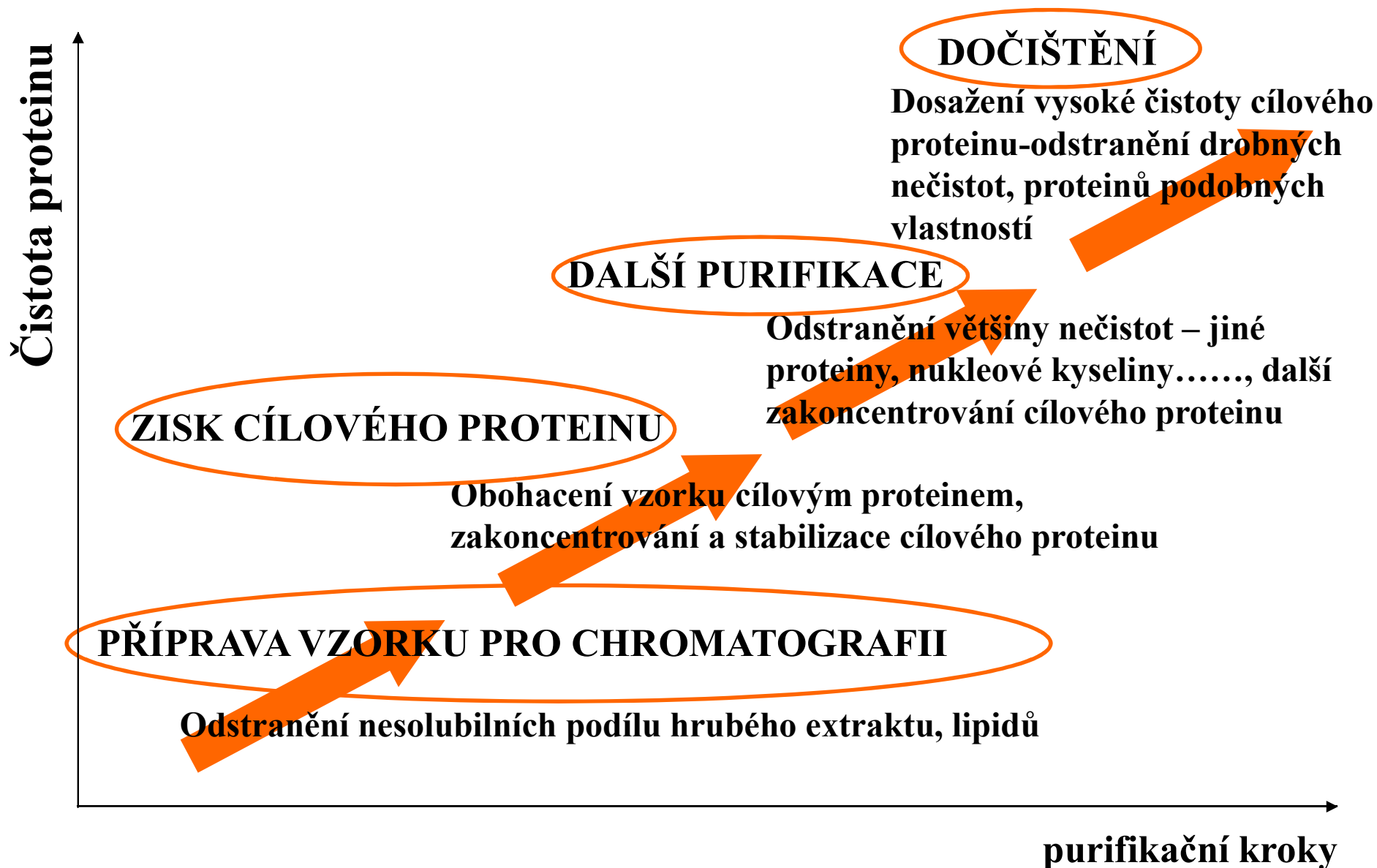
Gelová permeační chromatografie (gelová filtrace)

- matrice složená z kulatých porózních částic, na které se molekuly proteinu neváží.

- Size-exclusion chromatography separates proteins on the basis of size.
- Molecules move through a bed of porous beads. Smaller molecules diffuse further into the pores of the beads and therefore move through the beads more slowly, while larger molecules enter less or not at all and thus move through the beads more quickly.
- Both molecular weight and three-dimensional shape contribute to the degree of retention.



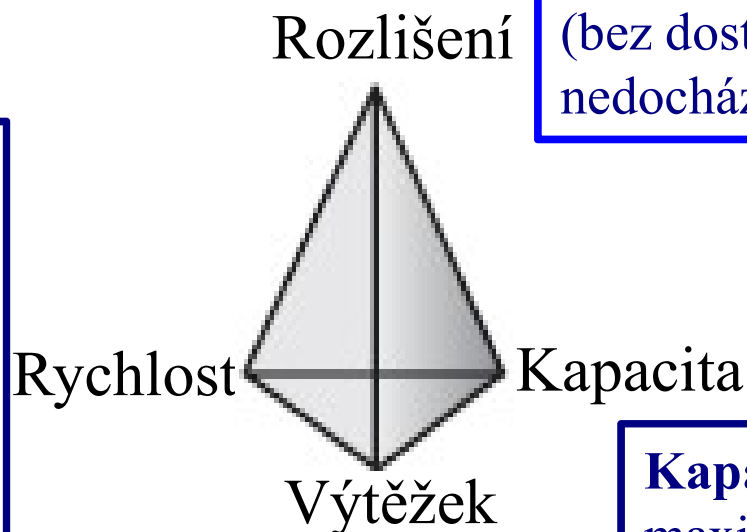
Kolik purifikačních kroků je potřeba?



Logická kombinace purifikačních kroků

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

Rychlost kroku je důležitá zejména v 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).

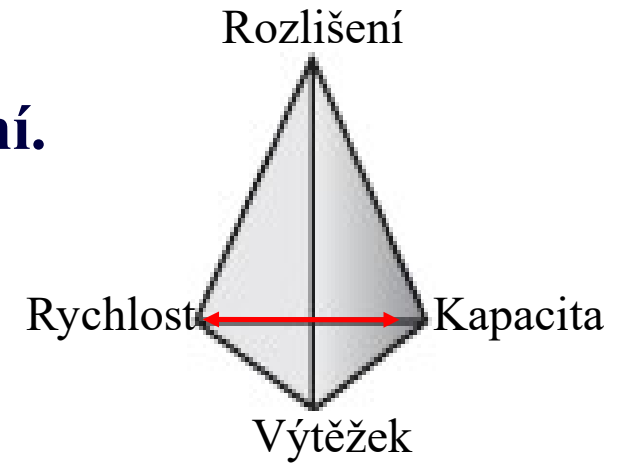
Kapacita (max.) je maximální množství vzorku, které může být navázáno na chromatografickou kolonu.

Výtěžek-minimalizace ztráty proteinu během purifikace.

Získ cílového proteinu z proteinového extraktu

Cíl: rychlá izolace, stabilizace a zakoncentrování.

**Purifikační techniky: afinitní chromatografie
iontoměničová chromatografie
hydrofóbní chromatografie**



Column: rProtein A Sepharose Fast Flow, XK16/20, bed height 4.8 cm (9.6 ml)
Sample: 600 ml clarified cell culture containing 87.6 mg of IgG_{2a}
Starting buffer: 20 mM sodium phosphate, pH 7.0
Elution buffer: 20 mM sodium citrate, pH 4.0
Flow rate: 5 ml/min (150 cm/h)

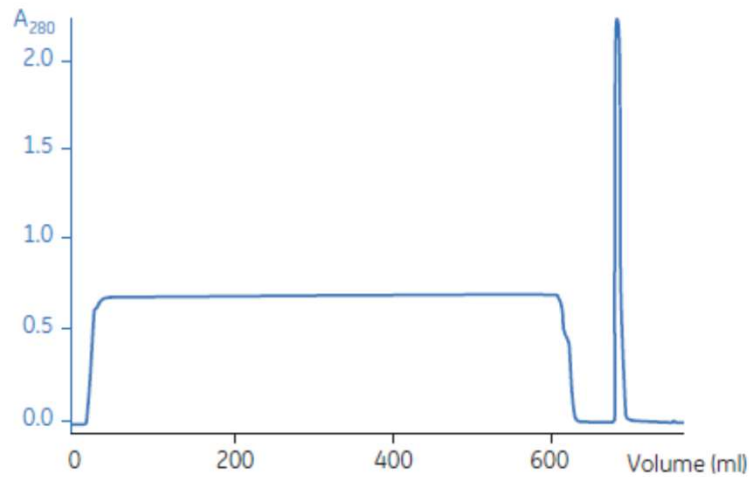
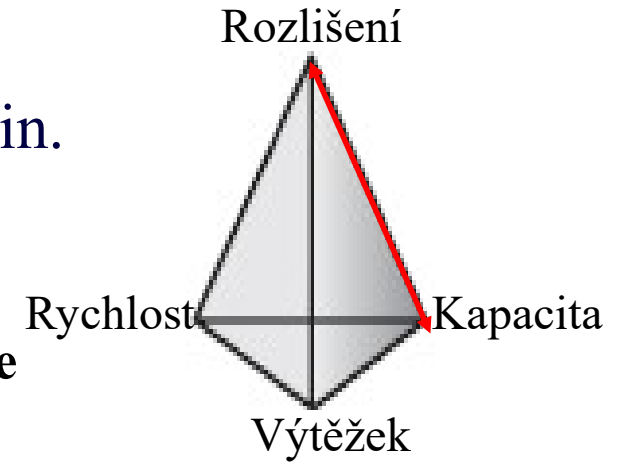


Fig 4.5. Example of capture step: Purification of IgG_{2a} from clarified cell culture.

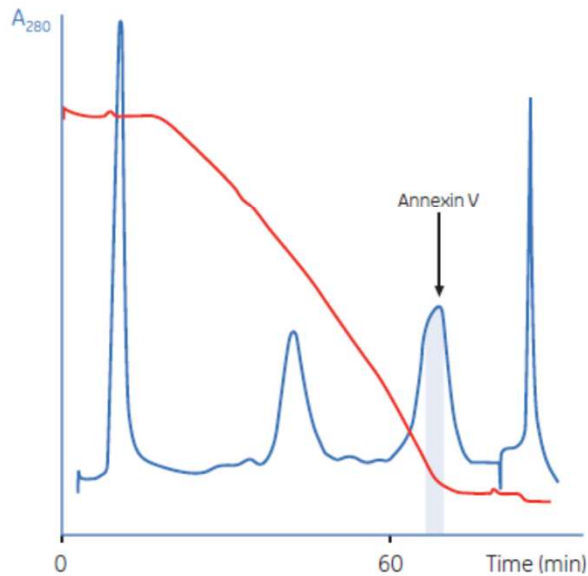
Další purifikace proteinu

Cíl: Dále separovat a zakoncentrovat cílový protein.

Purifikační techniky: iontoměničová chromatografie
hydrofóbní chromatografie



Column: XK 16/20 Butyl Sepharose 4 Fast Flow
Sample: 5 ml of partially purified Annexin V expressed in *E. coli*
Buffer A: 20 mM Sodium phosphate, pH 7.0, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Buffer B: 20 mM Sodium phosphate, pH 7.0
Flow rate: 100 cm/h
Gradient: 0 to 50% B, 20 column volumes

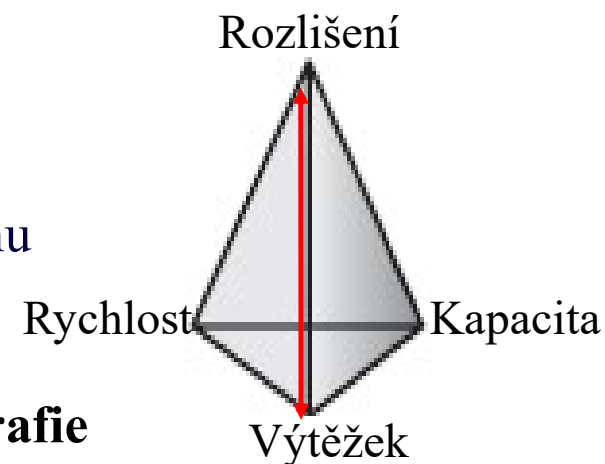


V tomto kroku se využívá eluce kontinuálními gradienty.
Tento krok není vždy potřebný.

Fig 4.7. Example of an intermediate purification step: Purification of recombinant Annexin V by HIC.

Dočištění proteinu a úprava podmínek pro jeho skladování (pH, soli, additiva)

Cíl: Získání produktu o požadované vysoké čistotě. Odstranění stopových kontaminací, odstranění velmi podobných proteinů, fragmentů či agregátů cílového proteinu



Purifikační techniky: gelová permeační chromatografie

Column: XK 16/60 packed with Superdex 75 prep grade
Sample: 1.0 ml of partially purified ZZ-brain IGF
Buffer: 300 mM ammonium acetate, pH 6.0
Flow rate: 0.5 ml/min (15 cm/h)

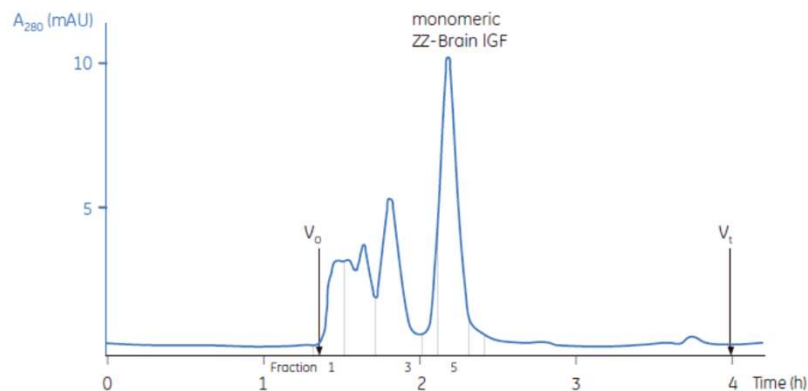


Fig 4.9. Example of polishing step: removal of dimers and multimers by GF.

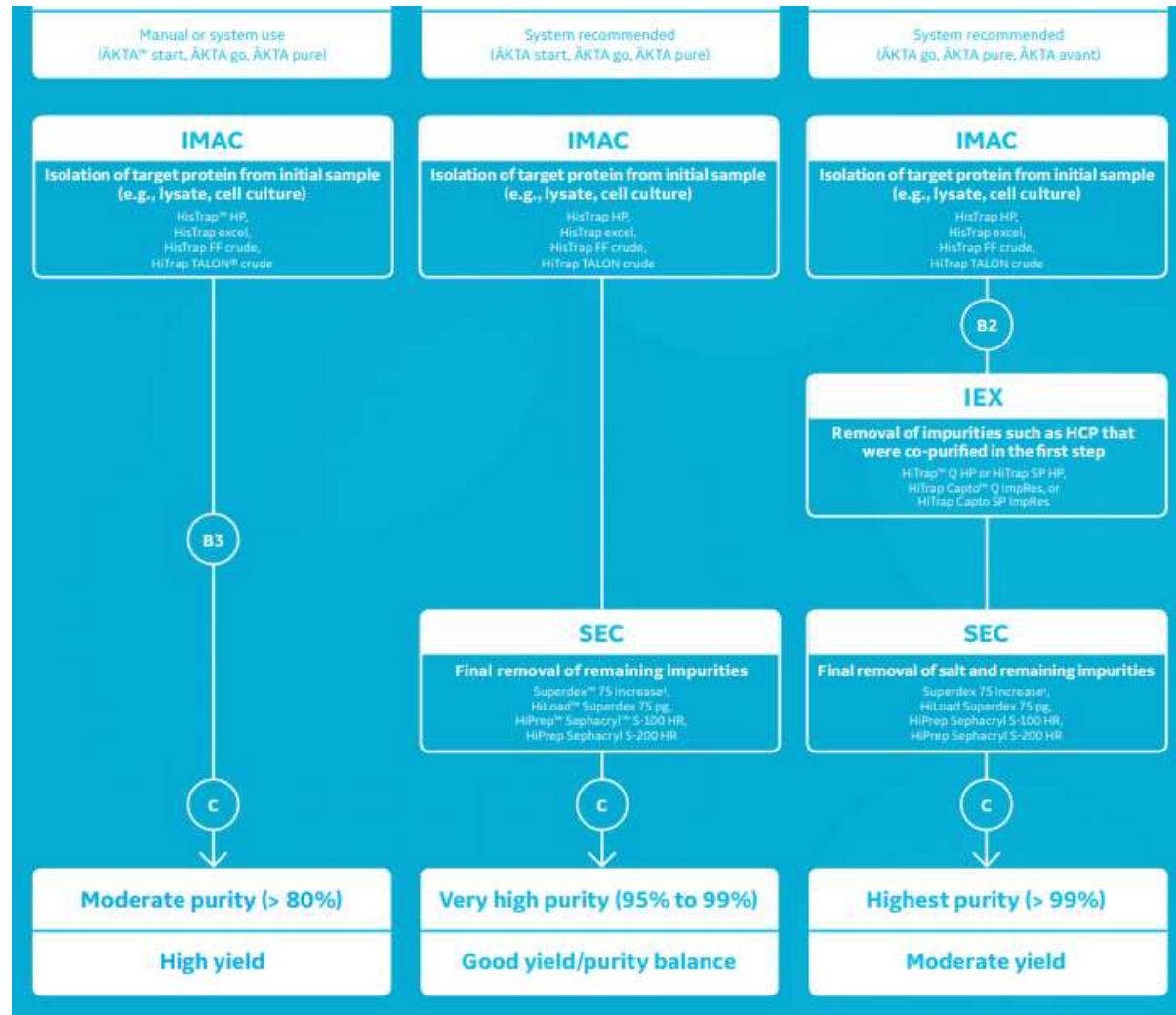
K odstranění molekul stejné velikosti je třeba využít jiných možností purifikace jako iontoměnič nebo hydrofóbní chromatografii.

His-tagged protein purification

1 krok

2 kroky

3 kroky



B2 Buffer exchange to prepare for IEX.
(HisTrap Desalting,
HiPrep 26/10 Desalting columns)

B3 Buffer exchange to remove
imidazole or salts.
(PD-10 Desalting,
HisTrap Desalting columns)

C Concentration for sample volume
reduction. May also be performed
before SEC.
(Vivaspin™ Sample Concentrators)

Steps in circles are optional and are applied if necessary.

Základní zásady pro pořadí purifikačních kroků

Method	Typical characteristics		Purification phase			Sample start conditions	Sample end conditions
	Resolution	Capacity	Capture	Intermediate	Polishing		
AC	+++ or ++	+++ or ++	+++	++	+	Various binding conditions	Specific elution conditions
IMAC	+++	++	+++	++	+	For purifying histidine-tagged proteins using Ni Sepharose columns: 20-40 mM imidazole; pH > 7; 500 mM NaCl; no chelators Other proteins: low concentration of imidazole	High concentration of imidazole, pH > 7, 500 mM NaCl
GF	++	+	+		+++	Most conditions acceptable, limited sample volume	Buffer exchange possible diluted sample
IEX	+++	+++	+++	+++	+++	Low ionic strength. pH depends on protein and IEX type	High ionic strength or pH changed
HIC	+++	++	++	+++	+++	High ionic strength, addition of salt required	Low ionic strength

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, jako je výměna pufru mezi jednotlivými separačními technikami
příklad: po precipitaci síranem amonným nebo iontoměničové chromatografii (protein je eluován z kolony za vysokých koncentracích soli) zařadit hydrofóbní chromatografii (vzorek dávkován na kolonu ve vysoké koncentraci soli)
- Jednotlivé separační metody pokud možno neopakovat.
- Čím méně kroků, tím větší výtěžnost proteinu a rychlost purifikace.

Fúzní proteiny

Translační fúze sekvencí kódujících rekombinantní protein a

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

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

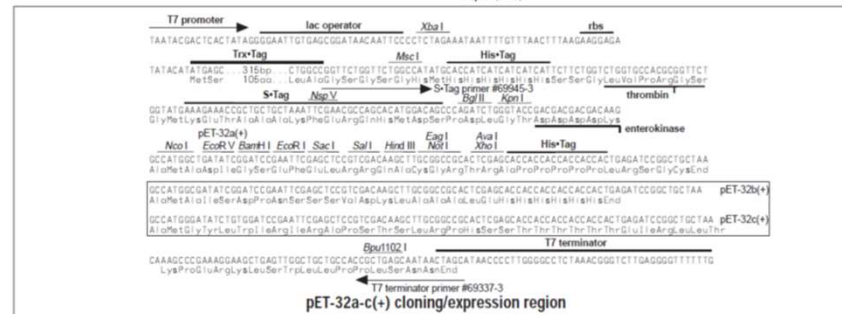
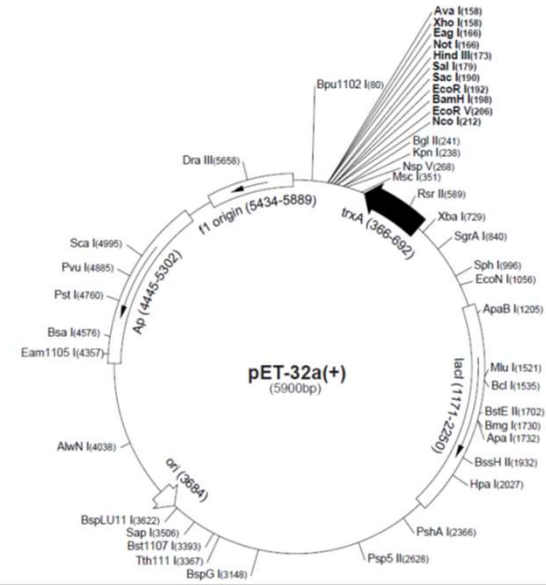
- expresní plazmidy obvykle

obsahují různé tagy/kotvy

- umístění na N- i C- konci proteinu

pET-32a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx•Tag coding sequence	366-692
His•Tag coding sequence	327-344
S•Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites (Nco I - Xho I)	158-217
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	1171-2250
pBR322 origin	3684
bla coding sequence	4445-5302
f1 origin	5434-5889

The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*HI at 198 except for *Eco*R V, which cuts at 209.



Proč využívat tagy?

- **Zvýšení výtěžku rekombinantního proteinu**
- **Možnost detekce proteinu**
- **Lokalizace** – signální sekvence pro transport proteinu
- **Usnadnění purifikace rekombinantního proteinu**

Fúzní partner	Velikost	Umístění	Využití
His-tag	6, 8, or 10 aa	N- or C-terminus	Purification, detection
Thioredoxin	109 aa (11.7 kDa)	N- or C-terminus	Purification, solubility enhancement
Calmodulin-binding domain (CBD)	26 aa	N- or C-terminus	Purification
Avidin/streptavidin <i>Strep</i>-tag	8 aa	N- or C-terminus	Purification, secretion
Glutathione <i>S</i>-transferase (GST)	26 kDa	N-terminus	Purification, solubility enhancement
Maltose binding protein (MBP)	396 aa (40 kDa)	N- or C-terminus	Purification, solubility enhancement
Green fluorescent protein (GFP)	220 aa (27 kDa)	N- or C-terminus	Localization, detection, purification
Poly-Arg	5-16 aa	N- or C-terminus	Purification, solubility enhancement
N-utilization substance A (NusA)	495 aa (54.8 kDa)	N-terminus	Solubility enhancement

Zvýšení výtěžku rekombinantního proteinu

Tagy zvyšující výtěžek jsou proteiny nebo peptidy zapojené do:

➤ **Zvýšení účinnosti iniciace translace** (př. GST, MBP, NusA...)

- Výhoda N-terminálních tagů

- Poskytují spolehlivou sekvenci pro účinnou iniciaci translace

➤ **Ochrany před proteolytickou degradací**

➤ **Pomáhají při skládání (foldingu) proteinu a zvyšují tak rozpustnost cílového proteinu**

Zlepšení rozpustnosti rekombinantních proteinů

Kotvy/tagy zvyšující rozpustnost

- N –terminální tagy
- Spíše proteinové (vysoce solubilní proteiny) než peptidy
- Fúze se solubilním partnerem často pomáhá fúznímu partnerovi se správně poskládat, což vede ke zlepšení rozpustnosti cílového proteinu
- Nemají univerzální efekt
- Mechanismus, jakým působí není plně objasněn

Some commonly used solubility-enhancing fusion partners

Tag	Protein	Source organism
MBP	Maltose-binding protein	<i>Escherichia coli</i>
GST	Glutathione-S-transferase	<i>Schistosoma japonicum</i>
Trx	Thioredoxin	<i>Escherichia coli</i>
NusA	N-Utilization substance	<i>Escherichia coli</i>
SUMO	Small ubiquitin-modifier	<i>Homo sapiens</i>
SET	Solubility-enhancing tag	Synthetic
DsbC	Disulfide bond C	<i>Escherichia coli</i>
Skp	Seventeen kilodalton protein	<i>Escherichia coli</i>
T7PK	Phage T7 protein kinase	Bacteriophage T7
GB1	Protein G B1 domain	<i>Streptococcus</i> sp.
ZZ	Protein A IgG ZZ repeat domain	<i>Staphylococcus aureus</i>

Esposito and Chatterjee, 2006

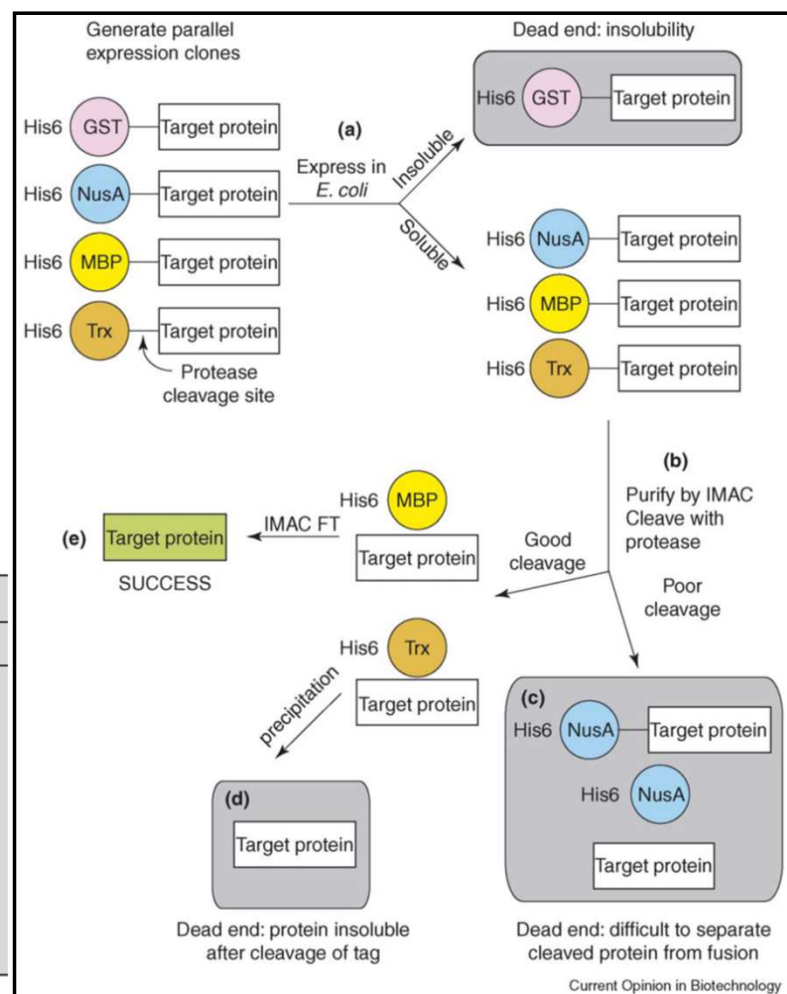


Schéma exprese a purifikace za použití solubilitu zvyšujících kotev. (Esposito and Chatterjee, 2006).

Tagy zvyšující rozpustnost – mechanismus působení

Příklady možných mechanismů

Maltose binding protein (MBP) se pravděpodobně váže reverzibilně na exponované hydrofóbní oblasti nově vznikajících polypeptidů a pomáhá tak polypeptidu získat nativní konformaci mechanismem podobným chaperonům.

NusA zpomaluje translaci tím, že zprostředkovává transkripční pauzy, což může pomoci správnému poskládání cílového proteinu.

Negativně nabitě tagy (peptidy) - dochází k elektrostatickému odpuzování mezi nově vynikajícími polypeptidovými řetězci, čímž se inhibuje jejich agregace (Zhang et. 2004) .

Thioredoxin – oxidoreduktáza

Rychlá redukce intra- i inter- molekulárních disulfidických vazeb.

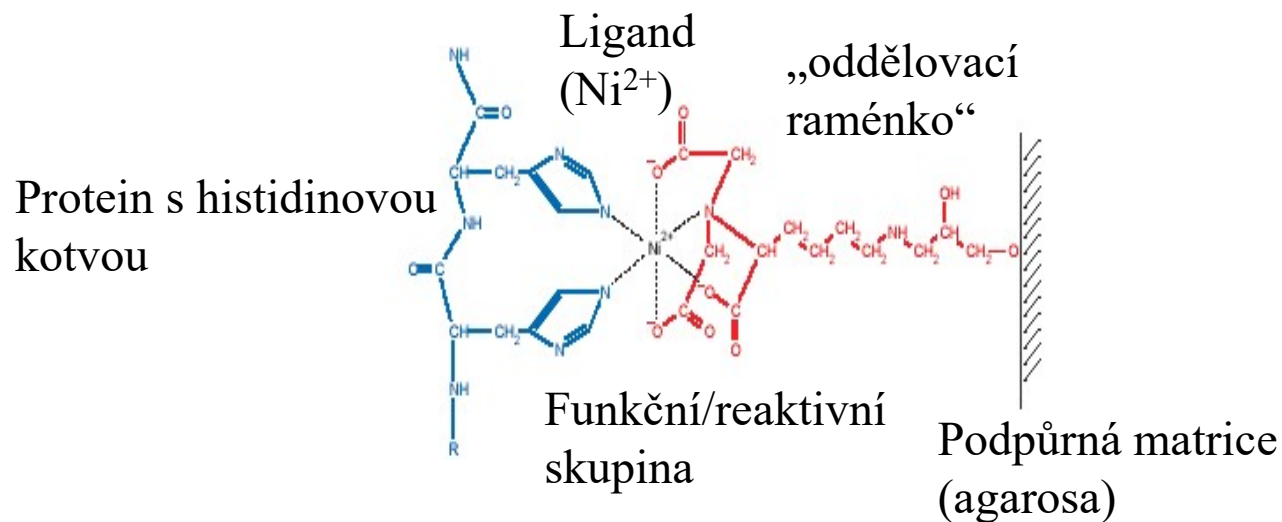
Thioredoxin slouží jako kovalentně navázaný chaperon nezávisle na redoxní aktivitě.

Fúzní kotvy (tagy) využívající se k purifikaci

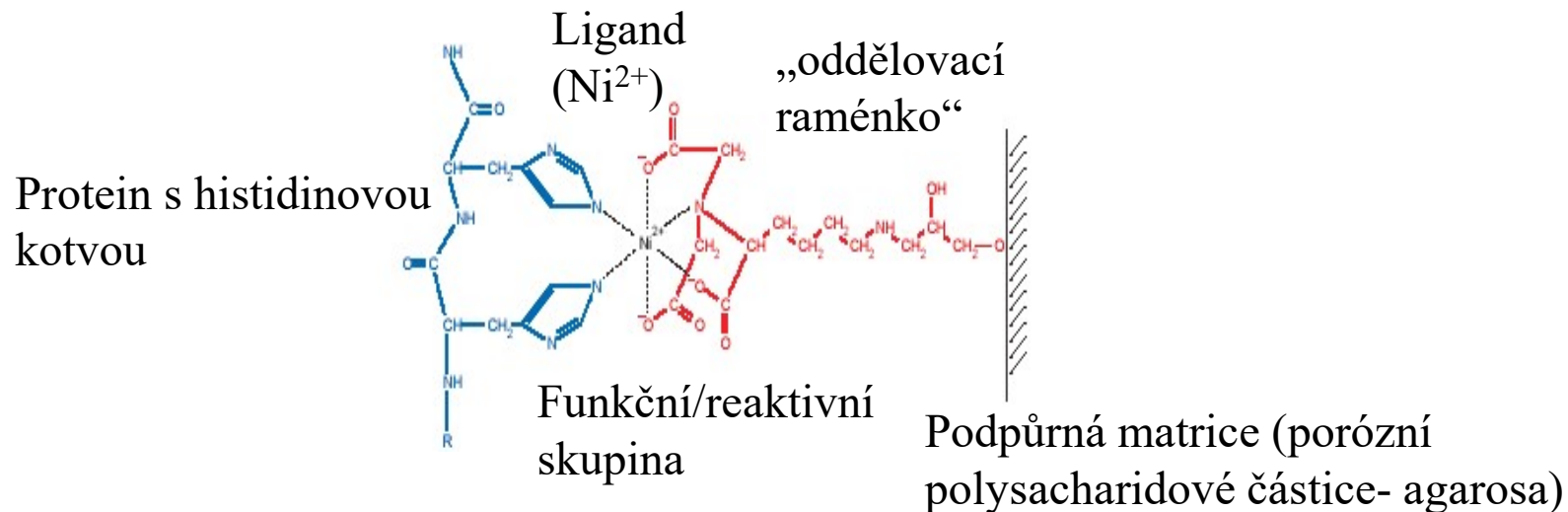
Kotva (tag)	Typ chromatografie	Princip separační techniky
Poly [His]	afinitní	vazba na kov
IgG vazná doména	afinitní	vazba na protilátku
Poly [Asp]	iontoměničová	vazba na anion vázající matrici
Poly [Phe]	hydrofóbní	vazba na hydrofóbní matrici
<i>Strep</i> -tag	afinitní	vazba na streptavidin
Poly [Arg]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

Metalochelatační afinitní chromatografie

- R.1975- uveřejnil Porath a kol. metodu frakcionace sérových proteinů.
- Konstrukce umělých **oligohistidinových domén (poly [His])** fúzovaných k N- nebo C- konci proteinu metodami molekulární biologie.
- Nyní jeden ze základních purifikačních postupů rekombinantních proteinů.
- Interakce proteinu s matricí je zprostředkována neobsazenými d-orbitaly iontů přechodných kovů, které vážou volné elektronové páry převážně z dusíkového atomu imidazolových skupin histidinových zbytků v proteinu.



Matrice pro metalochelatační afinitní chromatografii



„oddělovací raménko“

➤ Snížení stérických zábran a umožnění optimálního navázání rekombinantního proteinu na imobilizovaný ligand

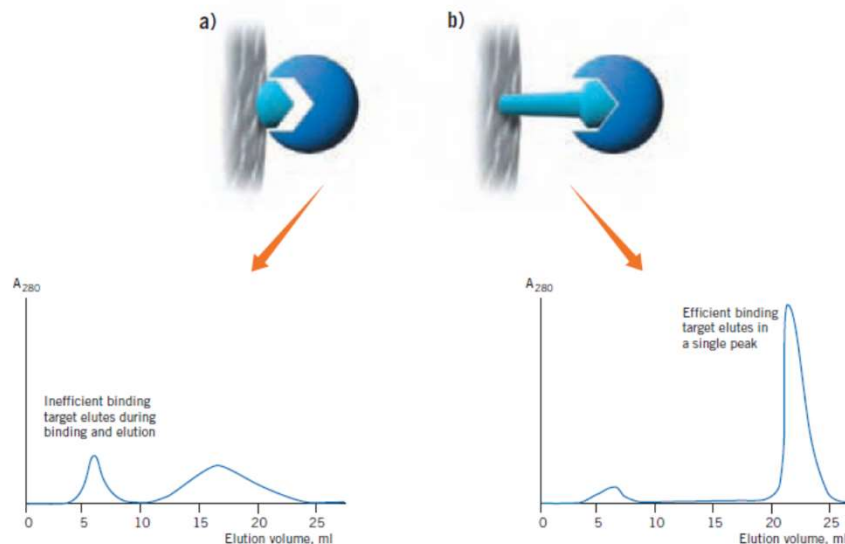
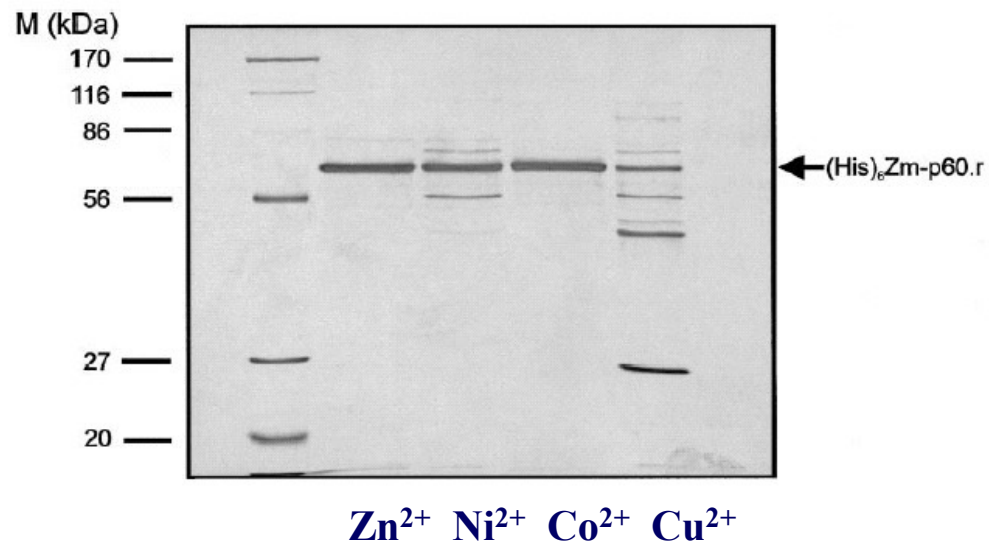


Fig. 56. Using spacer arms. a) Ligand attached directly to the matrix. b) Ligand attached to the matrix via a spacer arm.

Efekt kovového iontu navázaného na matici



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

Metalochelatační afinitní chromatografie

Purifikace za nativních podmínek

➤ Pufry o pH 7-8 pro optimální navázání rek. proteinu na kovovým iontem v matici

➤ Pufry s vysokou koncentrací solí (0.5–1 M NaCl) – redukce nespecifických elektrostatických interakcí.

➤ Neiontové detergenty a glycerol redukuje nespecifické hydrofóbní interakce.

➤ Eluce kontaminujících proteinů se dosahuje snížením pH nebo nízkou koncentrací imidazolu.

➤ Eluce cílového His-tagového proteinu je dosažena při vysoké koncentraci imidazolu (0-0.5 M), větším snížením pH nebo přidavkem EDTA.

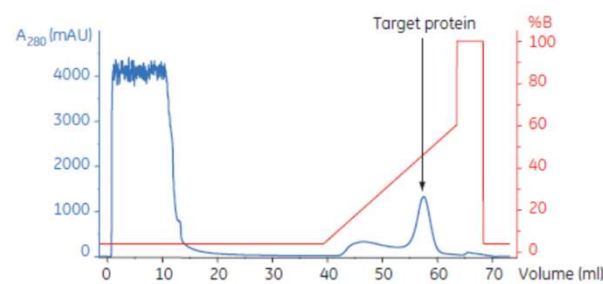
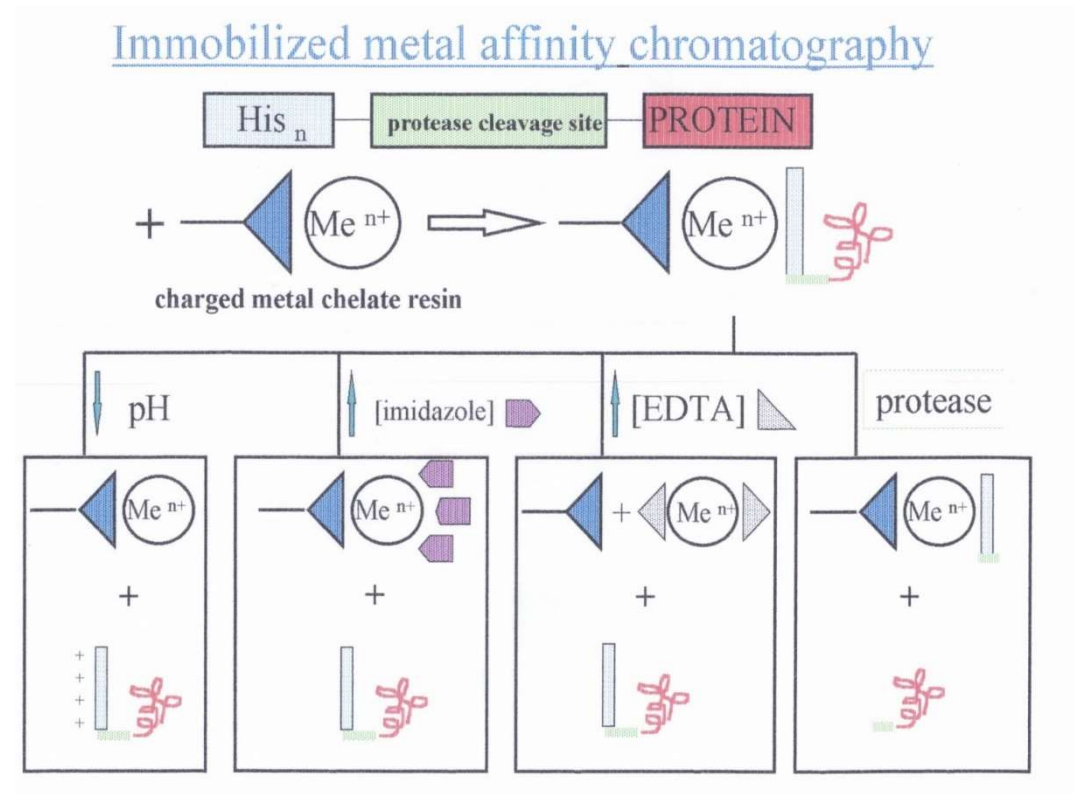


Fig 2.3. Typical IMAC purification with gradient elution.

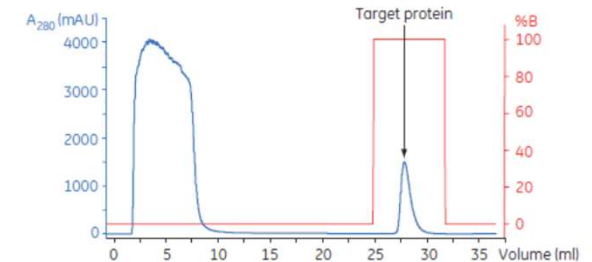



Fig 2.4. Typical IMAC purification with step elution.

Metalochelatační afinitní chromatografie

Purifikace za 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 (pufr podporující správné složení proteinu)

- Renaturace enzymu vázaného na matici:

-  Gradient z denaturačních do renaturačních pufrů
-  Pulzní renaturace

Odstranění fúzních kotev

Jakýkoliv tag může ovlivnit biologickou aktivitu proteinu, může bránit proteinu krystalizovat, zvyšuje proteinovou velikost (protein je pak např. příliš velký pro NMR), proteiny se mohou stát imunogenní díky tagu (problém u terapeutických proteinů).

Možnosti odstranění fúzních kotev

- Chemické štěpení
- Samoštěpení
- Enzymatické štěpení

Odstranění fúzních tagů-chemické štěpení

➤ Používá se nejméně

Bromkyanid Met/X

Hydroxylamin Asn-Gly

1				40
		M12 M15	M28V	
MRGSHHHHHH	G M A S M EKNNQ	GNGQGHNV	PN	DPNRNVDENA
NANSAVKNNN	NEEPSDKHIK	EYLNKIQNSL	STEWSPCSVT	
CGNGIQVRIK	PGSANKPKDE	LDYANDIEKK	ICK V EKCS	

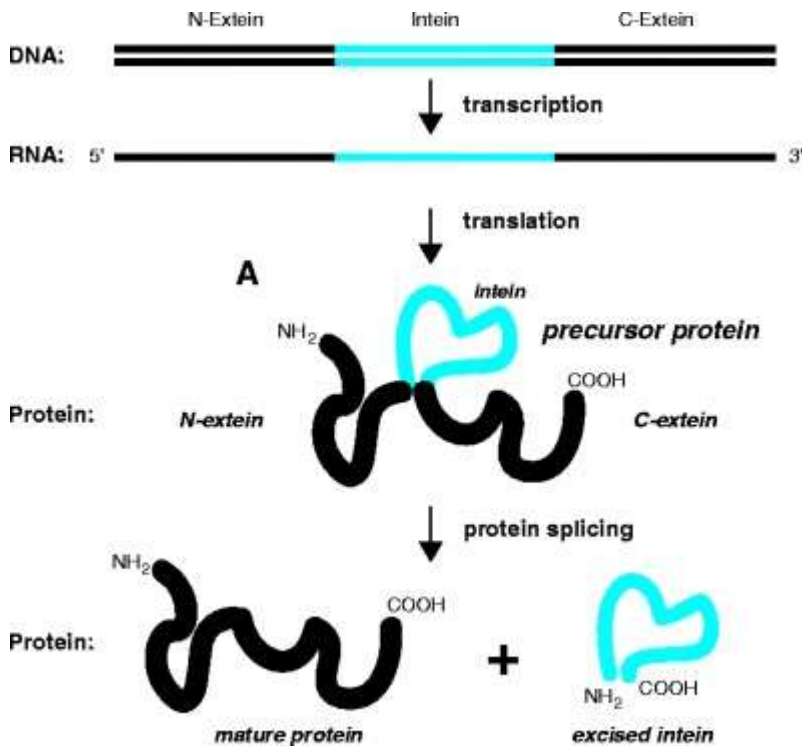
Amino – acid sequence of the *P. falciparum* C-terminal segment of CSP (PfCSP C-ter) fused to a purification tag (*Rais-Beghdadi et al., 1998*).

- Nešetrná metoda
- Velmi účinná
- Spíše nespecifická
- Může vést k denaturaci a modifikaci cílového proteinu

Odstranění fúzních tagů - samoštěpení

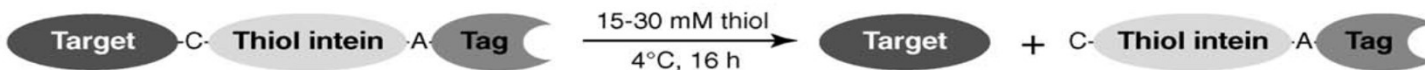
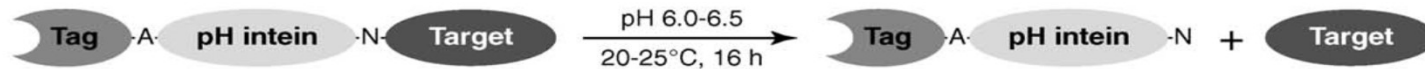
➤ Použití tzv. samo- štěpícího se tagu

Inteiny



Inteiny (inteins, *intervening proteins*) jsou proteinové segmenty, které mají schopnost se samy vyštěpit z proteinových prekurzorů.

➤ Vnesením mutací na N- nebo C- konce inteinu vznikly tzv. samoštěpící tagy odvozené od inteinů (štěpí se pouze na jednom místě).



Perler, (2005)

Odstranění fúzních tagů – proteolytické štěpení

Specifické proteolytické štěpení:

- Exopeptidázy
- Endopeptidázy

Exopeptidázy (aminopeptidázy and karboxypeptidázy):

DAPase (TAGZyme)	Exo(di)peptidase	Cleaves N-terminal. His-tag (C-terminal) for purification and removal
<i>Aeromonas</i> aminopeptidase	Exopeptidase	Cleaves N-terminal, effective on M, L. Requires Zn
Aminopeptidase M	Exopeptidase	Cleaves N-terminal, does not cleave X-P
Carboxypeptidase A	Exopeptidase	Cleaves C-terminal. No cleavage at X-R, P
Carboxypeptidase B	Exopeptidase	Cleaves C-terminal R, K

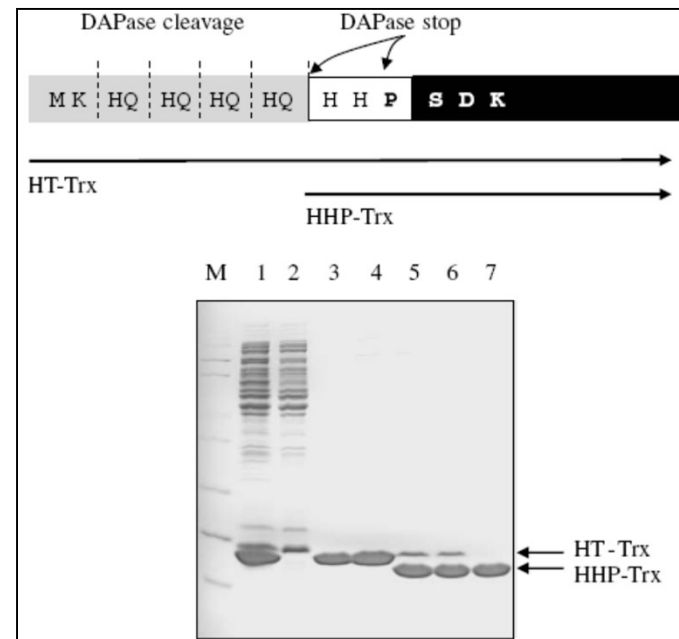
➤ APM, CPA a CPB štěpí postupně po jedné aminokyselině z N- nebo C-konce proteinu až ke specifickému místu, které je signálem pro ukončení štěpení (stop site).

TAGZyme system (Qiagen):

- DAPáza (dipeptidyl aminopeptidáza I)

TAGZyme stop sites

Amino acid	DAPase stop point (↓) sequence*
Lysine (Lys, K)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ lys -Xaa ...
Arginine (Arg, R)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Arg -Xaa ...
Proline (Pro, P)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Xaa-Xaa Pro -Xaa...
Proline (Pro, P)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Xaa-Pro Xaa-Xaa...
Glutamine (Gln, Q)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Gln -Xaa...

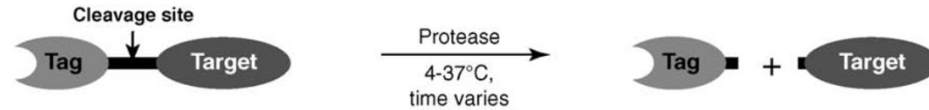


Arnau et al., 2006

Odstranění fúzního partnera - proteolytické štěpení

Endopeptidázy

➤ Štěpící místo pro endopeptidázy mezi fúzním tagem a cílovým proteinem.



Enzyme	Cleavage site	Comments
Enterokinase	DDDDK [*]	Secondary sites at other basic aa
Factor Xa	IDGR [*]	Secondary sites at GR
Thrombin	LVPR [*] GS	Secondary sites. Biotin labeled for removal of the protease
PreScission	LEVLFQ [*] GP	GST tag for removal of the protease
TEV protease	EQLYFQ [*] G	His-tag for removal of the protease
3C protease	ETLFQ [*] GP	GST tag for removal of the protease
Sortase A	LPET [*] G	Ca ²⁺ -induction of cleavage, requires an additional affinity tag (e.g., his-tag) for on column tag removal
Granzyme B	D [*] X, N [*] X, M [*] N, S [*] X	Serine protease. Risk for unspecific cleavage

pRSET B Multiple Cloning Site

```

21  T7 promoter
    AATACGACTC ACTATAGGGA GAACACAACG GTTCCCTCT AGAAATAATT TTGTTAACT TTAAGAAGGA RBS

91  Polyhistidine (6xHis) region
    GATATACAT ATG CCG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
    Met Arg Gly Ser His His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

148 T7 gene 10 leader
    GGT GGA CAG CAA ATG GGT CCG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CCG AGC TCG
    Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Pro Ser Ser
    EK recognition site EK cleavage site

205 Bgl II Pst I Pvu II Kpn I Nco I EcoR I BstB I Hind III
    AGA TCT GCA GCT GGT ACC ATG GAA TTC GAA GCT TGA TCCGGCTGCT AACAAAGCCC
    Arg Ser Ala Ala Gly Thr Met Glu Phe Glu Ala ***

261 T7 reverse priming site
    GAAAGGAAGC TGAGTTGGCT GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA
  
```


Odstranění fúzních tagů – proteolytické štěpení

- **Nespecifické štěpení** - produkt štěpení je doporučeno vždy ověřit pomocí MS analýzy.
- **Optimalizace proteolytického štěpení fúzního proteinu** (poměr enzym substrát, teplota, pH, koncentrace solí, délka štěpení, modifikované proteolytické enzymy)
- **Po odstranění tagu může docházet k precipitaci cílového proteinu.**
- **Účinnost štěpení** (může být snížena kvůli sterickeým efektům nebo agregaci - vložení krátkých linkerů mezi proteázové místo a fúzní tag)
- **Re-purifikační krok** nutný pro oddělení cílového proteinu od fúzního tagu
- **Modifikace cílového proteinu** (po štěpení některými proteázami, např. thrombinem, TEV, Precision zůstává jedna nebo dvě aminokyseliny připojené k cílovému proteinu.

Enterokináza Asp-Asp-Asp-Asp-Lys/X

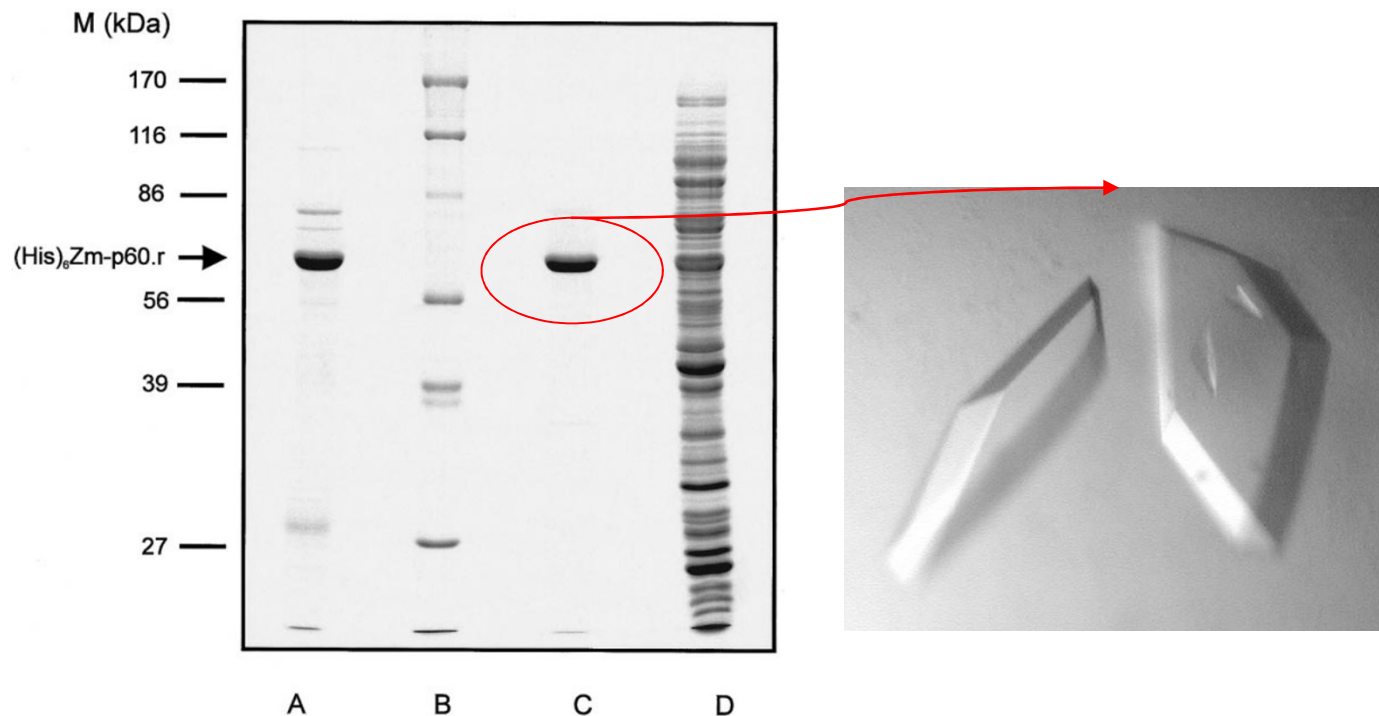
Table 4 Cleavage (%) of enterokinase through densitometry (Hosfield and Lu 1999) based on the amino acid residue X₁. The sequence...-GSDYKDDDDK-X₁-ADQLTEEQIA-... of a GST-calmodulin fusion protein was tested using 5 mg protein digested with 0.2 U of enterokinase for 16 h at 37 °C

Amino acid in position X ₁	Cleavage of enterokinase (%)
Alanine	88
Methionine	86
Lysine	85
Leucine	85
Asparagine	85
Phenylalanine	85
Isoleucine	84
Aspartic acid	84
Glutamic acid	80
Glutamine	79
Valine	79
Arginine	78
Threonine	78
Tyrosine	78
Histidine	76
Serine	76
Cysteine	74
Glycine	74
Tryptophan	67
Proline	61

His-tagged protein and IMAC under native conditions

One-step purification of maize β -glucosidase

- Perfusion matrix: POROS MC/M
- Functional group: iminodiacetate, metal ion Zn^{2+}
- Removing contaminated proteins: linear gradient of imidazole (0–50 mM) and pH (pH 6.1–7)
- Protein elution: 0.1 M EDTA
- 80% recovery, 95 fold purification
- Common production and isolation of wild type protein and soluble mutant form for enzymatic measurements and crystallization.



(Zouhar et al., 1999)

Purifikace proteinu AHP2 (Arabidopsis histidin phosphotransfer protein 2)

Metalochelatační afinitní chromatografie

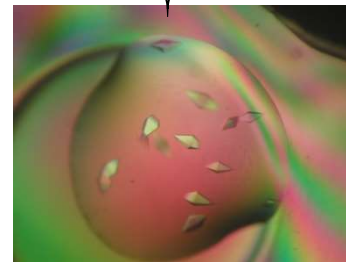
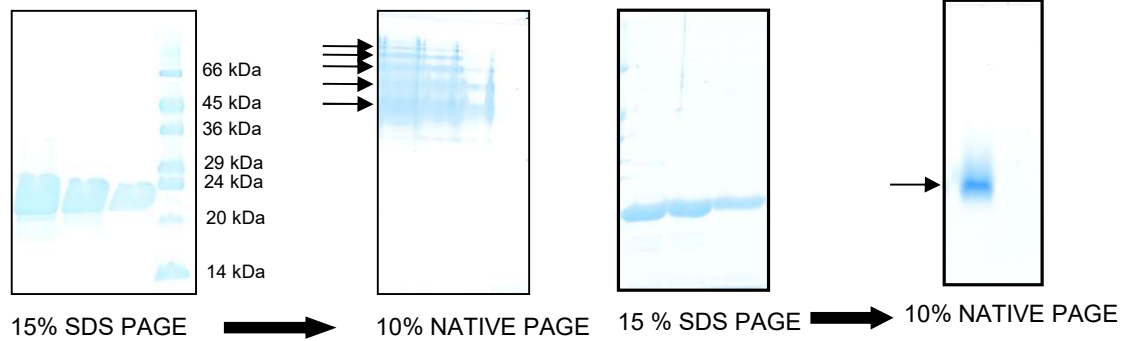
Pufr: 50 mM Tris pH 7.9, 300 mM NaCl, 10 % glycerol, 20 mM imidazol, 3.9 mM merkaptoethanol
Gradientová eluce: 20 -500 mM imidazol

Gelová permeační chromatografie

Pufr: 20 mM Tris pH 7.9, 250 mM NaCl
Isokratická eluce

Anion výměnná chromatografie

Pufr: 20 mM Tris pH 7.9
Gradientová eluce: 0 - 1M NaCl



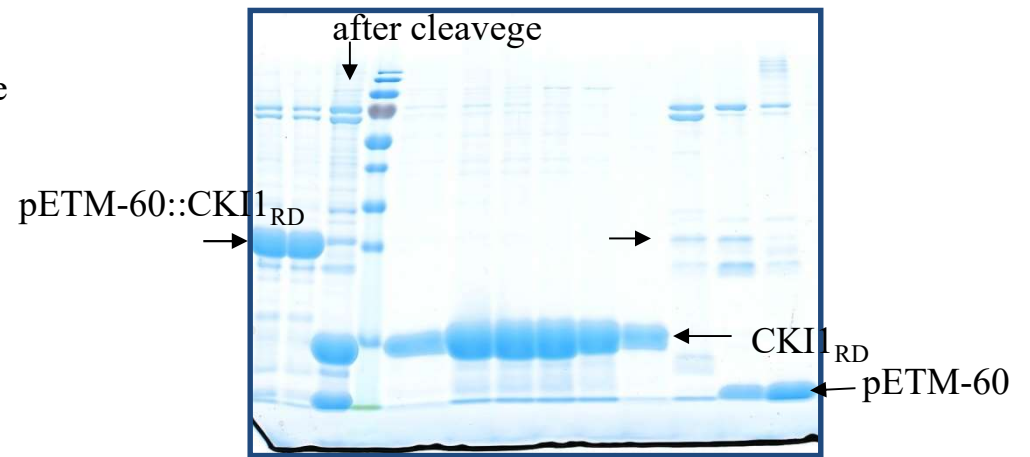
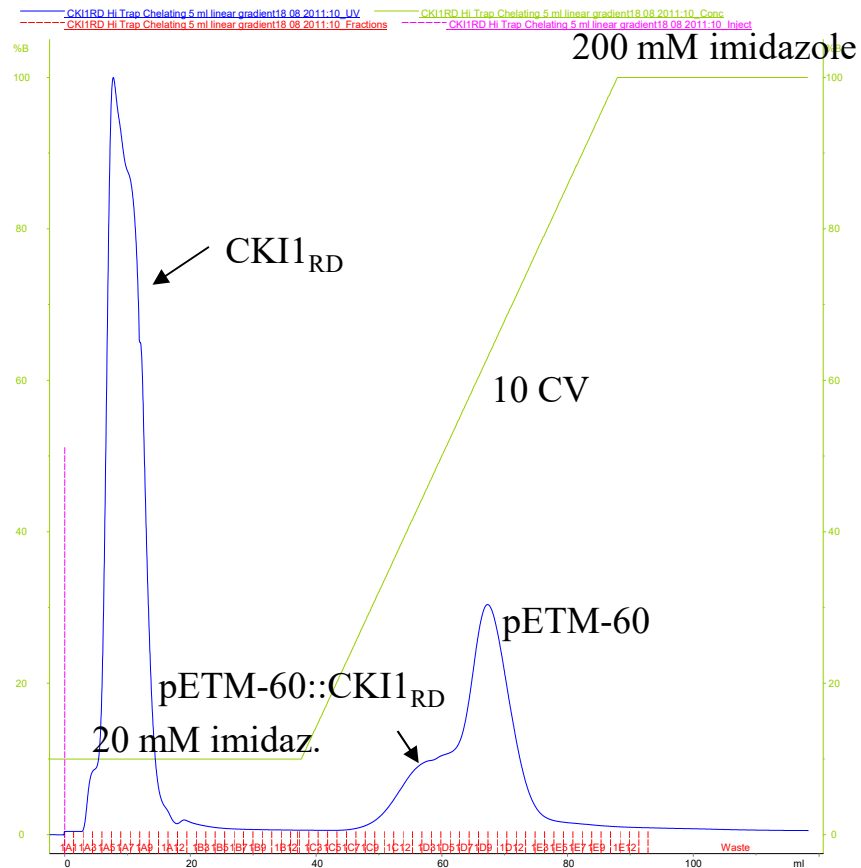
His-tagged protein and IMAC under native conditions

Four-step purification of *Arabidopsis* CKI_{RD}

1. Affinity purification (IMAC)
2. Tag removal (TEV protease)
3. Affinity purification (IMAC)
4. Size exclusion chromatography



3. Affinity purification after TEV cleavage



4. Size-exclusion chromatography

