

Purifikace rekombinantního proteinu

Teoretický úvod

Postupy extrakce vzorků a výběr pufrů, aditiv a detergentů jsou do značné míry určeny zdrojem materiálu, stabilitou cílového proteinu, použitými chromatografickými technikami a zamýšleným použitím produktu.

I. VÝBĚR LYZAČNÍHO PUFRU A ADITIV

Rozpustnost proteinu ovlivňuje jak pH, tak i iontová síla. Proto je volba pufru důležitá, zejména pokud jsou vyžadovány podmínky nativní purifikace. Výběr pufru a pH roztoku pro přípravu vzorku může silně ovlivnit výtěžek rekombinantního proteinu.

Důležité faktory při výběru pufru:

- stabilita rekombinantního proteinu s ohledem na pH a pufrovací sloučeninu
- volba pufru, který je kompatibilní s prvním chromatografickým krokem purifikace

Nejpoužívanější pufrы jsou uvedeny v následující tabulce (obvyklá koncentrace 20–50 mM).

Název pufru	pH
Kyselina citronová – NaOH	2,2 – 6,5
Citronan sodný – kyselina citronová	3,0 – 6,2
Octan sodný – kyselina octová	3,6 – 5,6
Sodná sůl kyseliny kakodylové – HCl	5,0 – 7,4
MES – NaOH	5,6 – 6,8
Dihydrogenfosforečnan sodný – hydrogenfosforečnan sodný	5,8 – 8,0
Imidazol – HCl	6,2 – 7,8
MOPS – KOH	6,6 – 7,8
Chlorid triethanolaminu – NaOH	6,8 – 8,8
Tris – HCl	7,0 – 9,0
HEPES – NaOH	7,2 – 8,2
Tricin – NaOH	7,6 – 8,6
Tetraborát sodný – kyselina boritá	7,6 – 9,2
Bicin – NaOH	7,7 – 8,9
Glycin – NaOH	8,6 – 10,6

- Většina pufrů vykazuje závislost pH na teplotě
- Tris obsahuje reaktivní amin a podílí se na různých enzymatických reakcích. Hodnota jeho pH je ovlivněna koncentrací a teplotou (při desetinasobném zředění se pH sníží o 0,1 jednotky)
- HEPES interferuje s Lowryho metodou stanovení proteinů (ne však s Bradfordovou metodou) a může tvořit radikály za různých podmínek
- Fosfátové pufrы jsou nekompatibilní s použitím dvojmocných kationtů (např. Mg^{2+}).

Funkce aditiv u pufrů:

- zlepšení stability rekombinantního proteinu
- udržení rozpustné formy rekombinantního proteinu v roztoku

Nejpoužívanější aditiva jsou uvedena v následující tabulce.

Třída aditiva	Příklad	Koncentrace	Funkce
Soli	NaCl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄	50–250 mM	Udržování iontové síly
Detergenty	Triton X-100, NP-40	0,1–1%	Solubilizace špatně rozpustných proteinů
Glycerol		5–10%	Stabilizace proteinů
Glukosa / Sacharosa		25 mM	Stabilizace membránových proteinů, snižování uvolňování proteas
Chelátory kovů	EDTA, EGTA	1 mM	Snižování oxidačního poškození, chelatují kovové ionty
Redukční činidla	DTT, DTE	1–10 mM	Snižování oxidačního poškození
Ligandy, kovové ionty	Mg ²⁺ , ATP, GTP	1–10 mM	Stabilizace proteinů

Detergenty narušují hydrofobní interakce mezi proteiny a uvnitř proteinů. Zejména membránové proteiny vyžadují detergenty pro solubilizaci během izolace a pro udržení rozpustnosti. Neiontové detergenty jako NP-40 a Triton X-100 nejsou vždy při solubilizaci hydrofobních proteinů účinné. Zwitteriontové detergenty, jako jsou CHAPS a sulfobetainy (například SB 3–10 nebo ASB 14), poskytují vyšší účinnost solubilizace zejména u integrálních membránových proteinů.

Další důležitou třídou aditiv jsou inhibitory proteas. Rozrušení buněk vede k uvolnění proteolytických enzymů, které snižují celkový výtěžek. K zabránění nežádoucí proteolýzy je nutné přidat koktejl inhibitorů proteas do buněčné suspenze. Tyto sloučeniny nejsou příliš stabilní ve vodných roztocích, proto se přidávají do lyzačního pufru těsně před použitím.

Inhibitor ^a	Pracovní koncentrace	Zásobní koncentrace	Rozpouštědlo	Druh inhibice
Aprotinin	1–2 µg ml ⁻¹	10 mg ml ⁻¹	voda	Ser proteasy
Benzamidin	15 µg ml ⁻¹	10 mg ml ⁻¹	voda	Ser proteasy
EDTA, EGTA	1–10 mM	0,5 M (pH 8)	voda	Metalloproteasy
Leupeptin	1–2 µg ml ⁻¹	10 mg ml ⁻¹	voda	Cys a Ser proteasy
PMSF	0,1–1,0 mM	100 mM	isopropanol	Ser proteasy
Pepstatin A	1 µg ml ⁻¹	1 mg ml ⁻¹	methanol	Asp proteasy

^aPoužití EDTA a EGTA není kompatibilní s přítomností iontů Mg²⁺ (vyžadovaných pro vazbu nukleotidů) v pufru nebo s afinitní chromatografií na Ni²⁺ koloně.

II. ODSTRANĚNÍ DNA

Při lyzi buněk dochází k uvolňování nukleových kyselin (DNA a RNA). Ty musí být odstraněny, jelikož způsobují viskozitu a interferují s následnou chromatografickou purifikací.

Metody odstranění nukleových kyselin:

- Enzymatické štěpení; přidání DNasy I (1–10 µg ml⁻¹) k buněčnému lyzátu a inkubace na ledu po dobu 10–15 min.
- Mechanická degradace pomocí ultrazvuku (sonikace)
- Srážení; přidání 0,1% (w/v) polyethyleniminu nebo 1% (w/v) protamin sulfátu k buněčnému lyzátu a inkubace při 4 °C po dobu 30 min s následnou centrifugací.

III. PŘÍPRAVA LYZÁTŮ BUNĚK

Pro přípravu lyzátů z bakteriálních buněk se používají různé fyzikálně-chemické metody.

- **Enzymatická lyze** pomocí lysozymu je založena na štěpení peptidoglykanové vrstvy bakteriální buněčné stěny. Gram-negativní bakterie však mají vnější membránu, která je vně buněčné stěny a pro vystavení peptidoglykanové vrstvy musí být permeabilizována. Vnější membrány účinně permeabilizuje např. Tris pufr. Tento účinek lze zvýšit přidáním 1 mM EDTA, která chelatuje ionty hořčíku stabilizující membrány. Během buněčné lyze se uvolňuje velké množství DNA a je nutné přidat DNasu, aby se snížila viskozita. Enzymatická lyze může být prováděna v jakémkoli měřítku, ale pro přípravu ve velkém měřítku jsou lysozym a DNasa drahé. Efektivita buněčné lyze může být zvýšena v kombinaci se sonikací.
- **Sonikace** je nejoblíbenější technikou lyze malého množství bakteriálních buněk. Buňky jsou lyzovány kapalinovým stříhem a kavitací. Během sonikace je také degradována DNA, takže není nutné přidávat DNasu do buněčné suspenze. Hlavním problémem je regulace teploty, což je řešeno udržováním suspenze na ledu a použitím několika krátkých pulzů (5–10 s) s přestávkami (10–30 s) pro obnovení nízké teploty. Pro množství buněk větší než 50 g má metoda omezenou hodnotu, protože je obtížné udržovat nízké teploty a dlouhé sonikační časy potřebné k dosažení dostatečné lyze.
- **Homogenizátory** jsou nejčastějšími zařízeními k lyzi bakterií. Lyze buněk probíhá jejich natlakováním a náhlým uvolněním tlaku. Tím se vytvoří tekutý stříh schopný lyzovat buňky. Typický provozní tlak pro starší typ homogenizátorů jako jsou francouzský lis a homogenizátor Manton-Gaulin je v rozmezí 6000–10000 psi. K dosažení přiměřeného stupně lyze je zapotřebí více (alespoň tři) průchodů. Vysoké provozní tlaky však vedou ke zvýšení teploty. Tlakové komory jsou proto před použitím ochlazeny (4 °C). Kromě regulace teploty je třeba se vyvarovat inaktivace proteinů napěněním.
- Další metodou rozrušení buněk je **míchání se skleněnými mikrokuličkami** (balotina o průměry 0,1–1,0 mm). Nejjednodušší způsob pro míchání skleněných kuliček je použití vířivého mixéru (vortex) nebo homogenizačních mlýnků. Míchání (30–60 s) musí být přerušeno po několika cyklech chlazením na ledu k zabránění přehřátí buněčné suspenze. Rozbití buněk je variabilní, ale může být v rozmezí 50–95 %. Metoda je vhodná pro malé objemy (až do 15 ml), ale může být upravena na několik litrů pomocí specializovaného přístroje.
- **Zmrazování a drcení** je alternativní způsob lyze bakterií, při níž se buňky zmrazí v tekutém dusíku a rozemelou na prášek pomocí třecí misky a tloučku, které jsou chlazeny kapalným dusíkem. Prášek může být uložen dlouhodobě při –80 °C. Buněčný lyzát může být kdykoliv připraven přidáním prášku do pěti objemů pufru.

IV. CENTRIFUGACE, FILTRACE A DIALÝZA

Vzorek pro chromatografickou purifikaci by měl být čirý a bez pevných částic. Provedení jednoduchých kroků předčištění vzorku před zahájením purifikace zabrání ucpání kolony, může snížit potřebu přísných promývacích postupů a může prodloužit životnost chromatografického média. Pokud není již vzorek ve vazebném pufru (složení lyzačního pufru odpovídá vazebnému pufru), je nutné jej upravit tak, aby odpovídal složením a pH vazebnému pufru přidáním pufru, NaCl, imidazolu a dalších přísad z koncentrovaných zásobních roztoků. Toho lze docílit naředěním vzorku vazebným pufrům anebo výměnou pufru. Aby se zabránilo vazbě proteinů hostitelské buňky s exponovaným polyhistidinem, je nezbytné zahrnout imidazol v nízké koncentraci do vzorku a vazebného pufru. Přítomnost povrchově exponovaných polyhistidinových zbytků nebo jiných komplexotvorných aminokyselin může vést k nežádoucí vazbě neznačených proteinů hostitelské buňky na purifikační médium. Tyto neznačené proteiny mohou eluovat s cílovým proteinem. Vazebná účinnost těchto

kontaminantů je často nižší než vazebná afinita značených rekombinantních proteinů; proto je možné je odstranit optimalizací podmínek separace.

Centrifugace a filtrace jsou standardní laboratorní techniky pro předčištění vzorku a běžně se používají při manipulaci s malými objemy vzorku. Pokud je však vzorek stále příliš viskózní, lze jej naředit vazebným pufrům, aby nedošlo k ucpání kolony; lze také provést další metody lýze (sonikace, homogenizace); nebo přidat DNasu / RNasu, aby se zmenšili velikosti fragmentů nukleových kyselin.

Centrifugace

Odstředěním se odstraní lipidy a částice, jako jsou zbytky buněk.

- Pro některé následné aplikace stačí použít nízké odstředění při 10–20 000 × g po dobu 15–20 min při 4–15 °C.
- Pokud je nutný čistý vzorek, který je zpravidla přímo aplikován na drahé chromatografické kolony, je nezbytné provést ultracentrifugaci při >100 000 × g po dobu 30–40 min při 4 °C.

Filtrace a ultrafiltrace

Filtrace odstraňuje pevné částice. Pokud vzorek není po odstředění stále čirý, je vhodné použít jako první krok filtrační papír nebo 5 µm filtr a jako druhý krok jeden z následujících 1 µm, 0,45 µm, nebo 0,22 µm filtrů. Membránové filtry, které poskytují nejmenší množství nespecifické vazby proteinů, jsou složeny z acetátu celulózy nebo PVDF. Pro přípravu vzorku před chromatografií se vybírají velikosti pórů filtru ve vztahu k velikosti kuliček chromatografického média.

Ultrafiltrace (UF) je proces separace extrémně malých částic a rozpuštěných molekul z tekutin. Primárním základem pro separaci je velikost molekul, i když propustnost filtru může být ovlivněna chemickými, molekulárními nebo elektrostatickými vlastnostmi vzorku. Aby se mohly oddělit ultrafiltrací, musí se molekuly lišit co do velikosti alespoň o řád a musí mít molekulovou hmotnost mezi 1–1000 kDa. Ultrafiltrační membrány lze použít buď k čištění filtrátu (roztok prošel filtrem), nebo k zachycení retentátu (materiál zadržený filtrem). Ultrafiltrace se obvykle používá k:

- Oddělení proteinů od složek pufru pro výměnu pufru, odsolení nebo koncentraci
- Oddělení volných ligandů vázané na proteiny
- Odstranění materiálů s nízkou molekulovou hmotností
- Rychlá změna iontového anebo pH prostředí

Ultrafiltrační membrány, včetně membrán z regenerované celulózy, jsou membrány, které mají dvě odlišné vrstvy: tenká vrstva (0,1–1,5 µm), hustá vrstva s průměrem pórů 10–400 angstromů a vysoce porézní spodní konstrukce. Na rozdíl od porézní podstruktury umožňuje hustá vrstva na bázi celulózy precizní mezní hodnoty molekulové hmotnosti (MWCO) díky své vysoce kontrolované a přesné velikosti pórů. MWCO označuje molekulovou hmotnost molekuly v daltonech, která je z 90 % zadržena membránou (např. MWCO 3–100 kDa).

Dialýza

Proteiny je možné v roztoku oddělit od anorganických solí a dalších nízkomolekulárních látek pomocí semipermeabilních membrán, které dovolují volný přístup malých molekul, zatímco proteiny skrz tuto membránu neprojdou. Tento proces diferenciální difuze se nazývá dialýza. Malé molekuly přes membránu difundují ve směru koncentračního spádu. Jakmile se koncentrace malých molekul na obou stranách membrány vyrovnají, systém se dostane do ustáleného stavu (tj. rychlost difuze oběma směry je shodná).

Pokud je potřeba proces urychlit, případně z dialyzovaného roztoku nějakou látku úplně odstranit, musí být po celou dobu procesu udržen dostatečný koncentrační spád. Buď se použije velké množství dialyzačního roztoku (relativně – ve vztahu k objemu dialyzovaného roztoku), nebo se dialyzační roztok často vyměňuje (dříve, než dojde k vyrovnání koncentrací malých molekul v dialyzovaném i dialyzačním roztoku). Rychlost dialýzy je také závislá na ploše dialyzační membrány: čím je větší, tím rychleji malé molekuly přejdou.

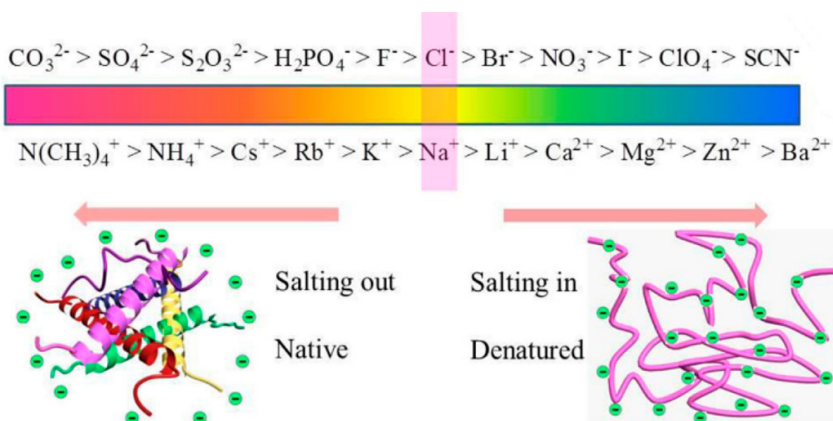
Důležitou vlastností každé dialyzační membrány je její mezní hodnota (MWCO). Informuje o tom, jak velké molekuly membrána považuje za malé (tj. umožní jim volný přístup) a které už jsou velké (tj. skrz membránu neprojdou). Většina molekul s molekulovou hmotností přesahující MWCO dané membrány by měla být touto membránou zadržena. Tento parametr je nutno brát s rezervou, svou roli tu hraje nejen celková velikost molekuly, ale i její tvar.

V. SRÁŽENÍ PROTEINŮ POMOCÍ SÍRANU AMONNÉHO

Rozpustnost globulárních proteinů se zvyšuje po přidání soli (<0,15 M), což se označuje jako vsolování (*salting-in*). Při vyšších koncentracích soli se rozpustnost bílkovin obvykle snižuje, což vede ke srážení, což se označuje jako vysolování (*salting-out*). Soli, které snižují rozpustnost proteinů, mají také tendenci zvyšovat stabilitu nativní konformace. Naproti tomu vsolovací ionty jsou obvykle denaturanty.

Mechanismus vysolování je založen na přednostní solvataci v důsledku vyloučení kosolventu (soli) z vrstvy vody těsně spojené s povrchem proteinu (hydratační vrstva). Hydratační vrstva, obvykle 0,3–0,4 g vody na gram proteinu, hraje rozhodující roli při udržování rozpustnosti a správně složené nativní konformace. Existují tři hlavní interakce mezi proteinem a vodou: iontová hydratace mezi nabitými postranními řetězci (např. Asp, Glu, Lys), vodíková vazba mezi polárními skupinami a vodou (např. Ser, Thr, Tyr a hlavní řetězec všech zbytků) a hydrofobní hydratace (Val, Ile, Leu, Phe). Při hydrofobní hydrataci se v blízkosti nepolárních zbytků snižuje konfigurační volnost molekul vody. Toto uspořádání molekul vody vede ke ztrátě entropie, a je tedy energeticky nevýhodné. Když se do roztoku přidá sůl, zvýší se povrchové napětí vody, což vede ke zvýšení hydrofobní interakce mezi proteinem a vodou. Protein na tuto situaci reaguje zmenšením svého povrchu ve snaze minimalizovat kontakt s rozpouštědlem, což se projevuje skládáním (složená konformace je kompaktnější než rozložená) a následně samoasociací vedoucí ke srážení. Jak skládání, tak srážení uvolňují vázanou vodu, čímž zvyšují entropii systému a činí tyto procesy energeticky výhodnými.

Je třeba zmínit, že zvýšení povrchového napětí vody působením soli se řídí známou Hofmeisterovou řadou (obr. 1). Přibližně tedy platí, že ty soli, které podporují vysolování, zvyšují povrchové napětí vody nejvíce. Protože $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ má mnohem vyšší rozpustnost než kterákoli z fosfátových solí, je pro vysolování nejvhodnějším činidlem.



Obr. 1. Hofmeisterova řada iontů.

VI. STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

Přímé spektrometrické stanovení

Absorbance při 280 nm (semikvantitativní) – pouze pro purifikované proteiny obsahující Trp a Tyr zbytky.

Kolorimetrické metody

- **Lowryho metoda** (Cu^{2+} , Biuretovo činidlo, Folinovo činidlo = kyselina fosfomolybdenová a fosfowolframová); 0–0,1 mg ml⁻¹, přenos elektronů z navázaných měďnatých iontů a z aromatických vedlejších skupin na Folinovo činidlo, interference = kyseliny, chelátory (EDTA), reduktanty (DTT, phenol), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 750 nm
- **BCA metoda** (sodné soli kyseliny bicinchoninové komplexují ionty Cu^+ tvořené reakcí peptidové vazby s Cu^{2+}); 0,02–2,0 mg ml⁻¹; 562 nm
- **RC-DC Protein Assay** (Biorad; modifikovaná Lowryho metoda); 0,1–2,0 mg ml⁻¹; 650–750 nm
- **Metoda dle Bradfordové** (Coomasie Brilliant Blue G250, ethanol, H_3PO_4); 0–0,01 mg ml⁻¹, adsorpce CBB G250 na protein (hlavně Arg, ale také His, Lys, Trp, Tyr a Phe), interference = detergenty (SDS, Triton X100); 595 nm

Fluorescenční metoda

- **Qubit® Protein Assay** (Thermo Fisher Scientific) je navržena speciálně pro použití s fluorometrem Qubit. Při použití 1–20 µl vzorku lze kvantifikovat vzorky v rozmezí od 12,5 µg ml⁻¹ do 5 mg ml⁻¹.

VII. CHROMATOGRAFICKÉ TECHNIKY PURIFIKACE PROTEINU ZNAČENÉHO POLYHISTIDINEM

Rychlá proteinová kapalinová chromatografie (FPLC) je forma středotlaké chromatografie, která pomocí pumpy řídí rychlost, jakou mobilní fáze prochází stacionární fází. Typy chromatografických technik používaných v protokolu purifikace rekombinantního proteinu značeného polyhistidinem závisí na požadavku na čistotu a výtěžek požadovaného proteinu (obr. 2). Požadovaná úroveň čistoty proteinu závisí na aplikaci, jak je uvedeno v tabulce níže.

Typické aplikace	Úroveň čistoty
Hmotnostní spektrometrie, antigen pro imunizaci	Mírná (> 80%)
Funkční a strukturální studie	Velmi vysoká (95–99%)
Strukturální studie, terapeutické proteiny	Nejvyšší (> 99%)

Před začátkem purifikace rekombinantního proteinu je nutné pečlivě definovat cíle a zvážit také to, že každý přidaný krok purifikace zvýší čistotu, ale sníží celkovou obnovu a výtěžek cílového proteinu.

- **Obnova proteinu** odpovídá relativnímu množství cílového proteinu (%), které je získáno po purifikaci ve srovnání s množstvím naneseným na kolonu.
- **Výtěžek proteinu** odpovídá množství cílového proteinu získaného po kroku purifikace nebo po celé purifikaci (více kroků).

Všechny protokoly pro purifikaci rekombinantního proteinu značeného polyhistidinem obvykle začínají krokem afinitní purifikace na imobilizovaných iontech kovů (IMAC). Tato metoda umožňuje izolaci cílového proteinu z počátečního vzorku (např. buněčný lyzát). Po tomto prvním kroku na IMAC koloně je úroveň čistoty obvykle mírná (>80%).

Dvoufázový purifikační protokol: IMAC + SEC

Pro aplikace, jako jsou funkční studie, nestačí mírná úroveň čistoty. To je důvod, proč by měl být přidán krok vylučovací chromatografie (SEC), aby se odstranily zbývající nečistoty. Úroveň čistoty po dvoufázovém purifikačním protokolu je velmi vysoká (95–99%).

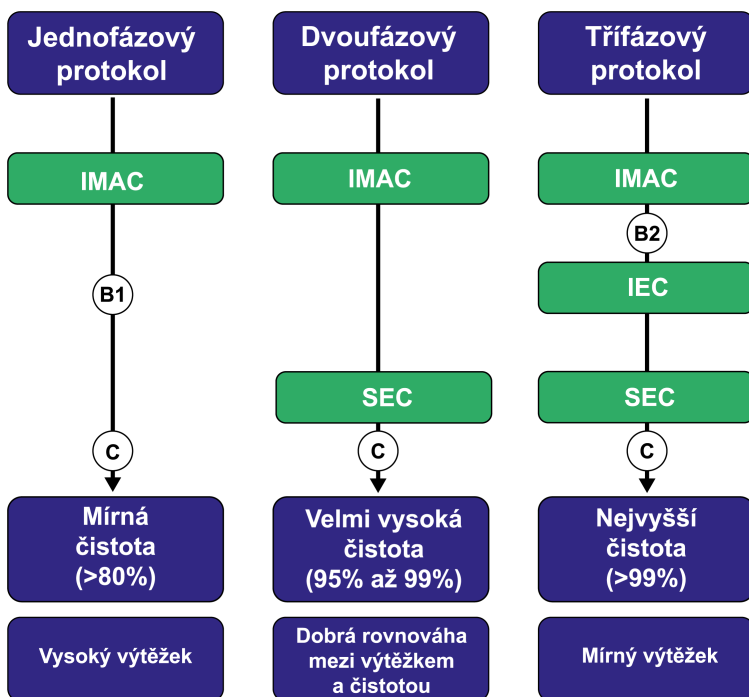
Třífázový purifikační protokol: IMAC + IEC + SEC

V některých případech jsou proteiny hostitelské buňky se stejnou molekulovou hmotností purifikovány společně s požadovaným proteinem značeným polyhistidinem během kroku IMAC. V tomto případě se doporučuje přidat krok iontoměničové chromatografie (IEC) mezi kroky IMAC a SEC. Úroveň čistoty se pak může zvýšit na více než 99 %, což je nezbytné pro strukturní studie proteinů.

Výměna a koncentrace pufru v protokolu purifikace proteinu značeného polyhistidinem:

Aby byl vzorek kompatibilní s následujícími kroky nebo experimenty, používá se k výměně pufru mezi chromatografickými kroky odsolovací kolona (nazývaná také kolona pro výměnu pufru). Kromě toho lze v případě potřeby také použít koncentrační jednotku ke zmenšení objemu vzorku.

- B1: Výměna pufru k odstranění imidazolu nebo solí.
- B2: Výměna pufru pro přípravu na IEC.
- C: Koncentrace pro zmenšení objemu vzorku. Může být také provedeno před SEC.



Obr. 2 Kombinace tří typických chromatografických technik pro purifikaci proteinů značených polyhistidinem.

VIII. PŘÍPRAVA SOUHRNNÉ PURIFIKAČNÍ TABULKY

Předpokládejme, že bychom se rozhodli purifikovat enzym z bakterie *E. coli* a začneme s 10 g vlhké buněčné pelety ze 4 l kultury (10 g vlhké pelety obvykle obsahuje asi 2 g suché hmoty a asi 1200 mg celkových proteinů). Buňky se lyzují sonikací, čímž se získá surový materiál a buněčné zbytky se odstraní odstředěním, čímž se získá surový extrakt, který se vysráží 45–50% nasyceným síranem amonným. Vysrážený pelet z 50% nasyceného síranu amonného se rozpustí v pufru a zředí na nízký obsah soli a nanese na DEAE aniontoměničovou kolonu. Kolona se promyje při nízkém obsahu soli a poté se aplikuje eluce lineárním gradientem solí od 0,1 do 0,6 M NaCl, přičemž vrchol aktivity je

při 0,25 M NaCl. Pík je sloučen a aplikován na gelovou filtrační kolonu Sephacryl S-300 a eluován pufrům s konstantní solí (izokraticky). Frakce píku jsou sloučeny a zobrazeny pomocí SDS-PAGE s Coomassie barvením jako jeden proužek na gelu. Specifická aktivita konečného materiálu je stejná jako u známého čistého referenčního vzorku. Pro všechny hlavní frakce je stanovena enzymová aktivita a koncentrace proteinů. Výsledné údaje jsou uvedeny v tabulce níže.

Krok	Celkový protein (mg) ^b	Celková aktivita (jednotky) ^c	Specifická aktivita (jednotky/mg)	Výtěžek (%)	Čistota (%)
Surový lyzát ^a	1200	120	0,10	100	0,8
Surový extrakt	1000	110	0,11	92	0,9
50% síran amonný ^d	180	75	0,42	62	3,4
DEAE kolona (sloučený pík)	24	60	2,5	50	20
Sephacryl kolona (sloučený pík)	3,6	46	12,5	38	100

^a Z 10 g vlhké pelety buněk *E. coli* (ze 4 l bakteriální kultury).

^b Koncentrace proteinu stanovena Bradfordovým testem za použití BSA jako standardního proteinu.

^c Enzymová aktivita měřena tak, jak je popsáno v části metody.

^d Surový extrakční materiál, který je rozpustný ze 45 %, ale vysráží se z 55 % nasyceného síranu amonného.

Souhrnná purifikační tabulka by měla čtenáři umožnit snadné vyhodnocení a snadno detekovat zvláště účinné a neúčinné purifikační kroky. Mělo by být snadné zjistit, zda v určitém kroku došlo k velkým ztrátám. Vhodná tabulka bude obsahovat následující sloupce:

Hlavní kroky v purifikaci. Ty obvykle zahrnují kroky jako:

- *Surový lyzát* (výsledek narušení buňky). Tento krok je často vynechán, protože testy mohou být obtížné, ale jsou užitečné a dokonce nezbytné, když velká část exprimovaného rekombinantního cílového proteinu je ve formě nerozpustného inkluzního tělíska.
- *Surový extrakt* (lyzát po odstranění jakéhokoli nerozpustného materiálu odstředěním)
- *Srážení síranem amonným*
- *Sloučený pík z iontoměničové kolony*
- *Sloučený pík z gelové filtrační kolony*
- *Sloučený pík z afinitní kolony*
- *Koncentrovaný a dialyzovaný konečný produkt*
- *Solubilizovaná inkluzní tělíska*. Tento krok a dva následující se často používají v případě, kdy je exprimovaný rekombinantní protein produkován jako nerozpustná inkluzní tělíska
- *Promytá inkluzní tělíska*
- *Znovu složený, odstředěný a koncentrovaný materiál*

Množství celkových proteinů (mg). To je obvykle stanoveno standardním proteinovým testem. V části metod je důležité uvést, jaký protein se používá jako proteinový standard (typicky BSA).

Množství cílového proteinu nebo celková aktivita (mg nebo jednotky). Pokud existuje vhodný enzymový test pro cílový protein, měl by být proveden na materiálu z každého hlavního kroku. Pokud protein není enzym nebo neexistuje žádný kvantitativní test a pokud je protein viditelný na SDS-PAGE obarveném Coomassie, pak se často obarvený gel skenuje a stanoví se množství proteinu v proužku odpovídajícím cílovému proteinu. Jinými slovy, čistota je určena a vynásobena celkovým proteinem, aby se získal odhad celkového cílového proteinu.

Specifická aktivita (jednotky/mg). Pokud jsou možné testy enzymové aktivity, pak se celková aktivita (jednotky) vydělí celkovým proteinem (mg), čímž se získá specifická aktivita v jednotkách/mg.

Celkový výtěžek (%). Výtěžek v jednotlivých krocích purifikace je množství cíle (buď celkový cílový protein nebo celková aktivita) v daném kroku děleno množstvím cíle v prvním kroku (definováno jako 100 %).

Čistota cílového proteinu (%). Čistota se často určuje skenováním obarvené SDS-PAGE a měřením množství barviva spojeného s cílovým proužkem jako zlomek barviva spojeného se všemi proužky na gelu. Pokud existuje spolehlivý test, pak pokud je konečný materiál čistý, jeho specifická aktivita může být použita k definování čistoty. Například, pokud má dřívější krok specifickou aktivitu 10 % konečného čistého materiálu, pak by čistota v tomto kroku byla 10 %.

Relativní nebo násobné čištění. To není podstatné, protože to lze vypočítat z ostatních výše uvedených hodnot, ale často je to užitečné. Jedná se pouze o nastavení počáteční čistoty na hodnotu jedna a následné uvedení čistoty v každém kroku vzhledem k čistotě prvního kroku. Například v tabulce I představuje poslední krok celkový násobek čištění 125.

Praktická část

I. PŘÍPRAVA BUNĚČNÉHO LYZÁTU *E. COLI*

1. Alikvotní díl peletu z bioreaktoru rozsuspendujeme v 10 ml lyzačního pufru (20 mM fosforečnan sodný, 500 mM chlorid sodný, 20 mM imidazol, 0,5% NP-40, pH 7, 4). Bezprostředně před použitím přidáme 1 tabletu cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche).
2. Suspenzi homogenizujeme ultrazvukovou sondou MS 72 (HD 2200 Bandelin), tři opakování s pulzy 30 × 0,1 s při 25 W. Mezi každým opakováním chladíme suspenzi na ledu po dobu 30 s.
3. Poté suspenzi inkubujeme dalších 15–30 min na ledu.
4. Nakonec suspenzi centrifugujeme při 12 000 × g po dobu 10 min při 4 °C. Výsledný supernatant poté ultracentrifugujeme při 185 000 × g po dobu 40 min při 4 °C.
5. Změříme koncentraci proteinů v buněčném lyzátu pomocí Qubit® Protein Assay.
6. Čirý buněčný lyzát uchováme na ledu a použijeme pro následnou purifikaci rekombinantního proteinu.

Stanovení koncentrace proteinů

1. Připravíme tři zkumavky pro standardy a jednu pro vzorek.
2. Připravíme si Qubit® pracovní roztok naředěním Qubit® proteinového činidla 1:200 v Qubit® proteinovém pufru. Připravíme 200 µl pracovního roztoku pro každý standard a vzorek.
3. Připravíme testovací zkumavky (použijeme 0,5ml PCR zkumavky) podle následující tabulky.

Objem	Standardy	Vzorky
Pracovní roztok (z kroku 2)	190 µl	180–199 µl
Standard (ze soupravy)	10 µl	–
Vzorek	–	1–20 µl
Celkový objem v každé testovací zkumavce	200 µl	200 µl

4. Standardy a vzorky promícháme na vortexu po dobu 2–3 s a inkubujeme při pokojové teplotě po dobu 15 min.
5. Na fluorometru Qubit® 4 zvolíme „Protein“ ke kalibraci se standardy a odečteme vzorky.

II. DVOUFÁZOVÝ PURIFIKAČNÍ PROTOKOL (IMAC + SEC)

Pro účely laboratorního cvičení bude použit chromatograf ÄKTA PURE 25 M (Cytiva). Pro ovládání přístroje bude použit program UNICORN 7.3 (Cytiva).

IMAC protokol

Afinitní chromatografie (AC) separuje proteiny na základě reverzibilní interakce mezi proteinem a specifickým ligandem spojeným s chromatografickou maticí. Tato technika nabízí vysokou selektivitu, tedy vysoké rozlišení, a obvykle i vysokou kapacitu pro protein, který je předmětem zájmu. Purifikace může být řádově několikatisícinásobná a výtěžnost aktivního materiálu je obecně velmi vysoká. Interakce může být biospecifická, například protilátky vážící protein A nebo receptor vážící hormon; nebo nebiospecifická, například protein vážící barvicí látku nebo protein obsahující histidinovou značku vážící ionty kovů jako v případě imobilizované afinitní chromatografie iontů kovů (IMAC).

Během všech chromatografických běhů vždy používáme odplyněné pufrы a udržujeme konstantní teplotu, aby nedošlo k vniknutí vzduchu do kolony. Nastavíme vhodný limit tlaku na chromatografickém systému, aby nedošlo k poškození ucpávky kolony. Pro roztoky s vysokou viskozitou a nízkou teplotou používáme nižší průtoky.

Příprava IMAC pufrů

Voda a chemikálie používané k přípravě pufru by měly být vysoce čisté (čistý imidazol má při 280 nm velmi nízkou nebo žádnou absorpenci). Optimální koncentrace imidazolu potřebná ve vzorku a pufru k dosažení nejlepší čistoty a výtěžku se liší dle cílové proteiny. Doporučená koncentrace imidazolu ve vazebném pufru je pro většinu proteinů 20–40 mM, zatímco 500 mM imidazol v elučním pufru zajišťuje úplnou eluci cílového proteinu.

1. Pro IMAC purifikaci připravíme:

500 ml deionizované vody

500 ml vazebného pufru (20 mM fosforečnan sodný, 500 mM chlorid sodný, 20 mM imidazol, pH 7,4)

500 ml elučního pufru (20 mM fosforečnan sodný, 500 mM chlorid sodný, 500 mM imidazol, pH 7,4)

500 ml 20% ethanolu

2. Před použitím přefiltrujeme pufrы přes 0,45 µm filtr.

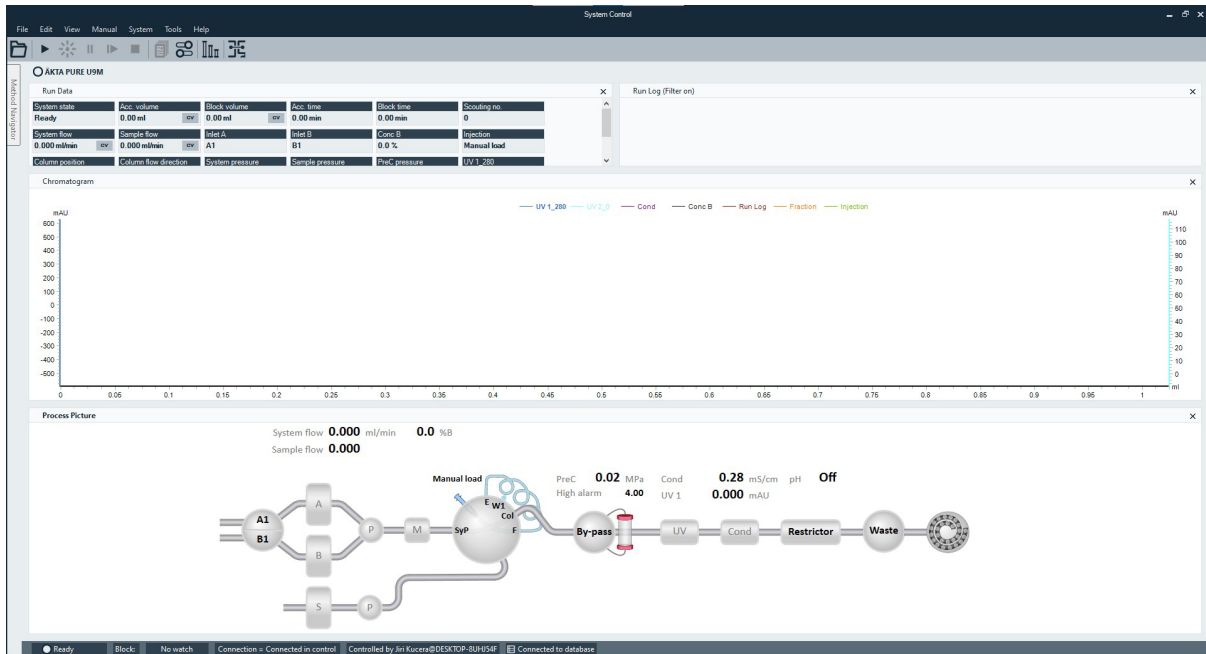
3. Bezprostředně před použitím vložíme pufrы a ostatními roztoky pro chromatografické metody do ultrazvukové lázně na 10–15 min pro odstranění bublinek.

Purifikační běh IMAC

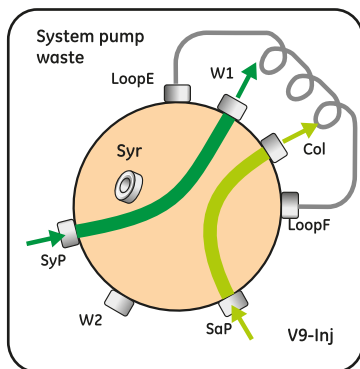
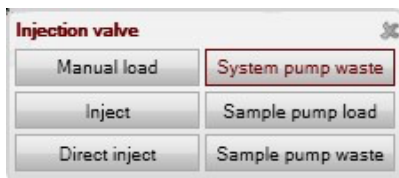
1. Spustíme ÄKTA PURE 25M (Cytiva) systém a PC.



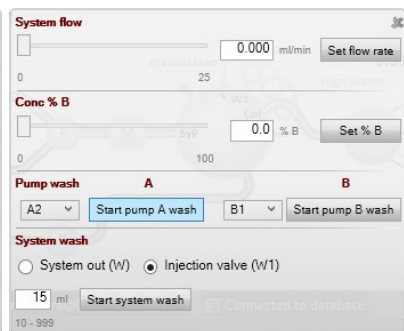
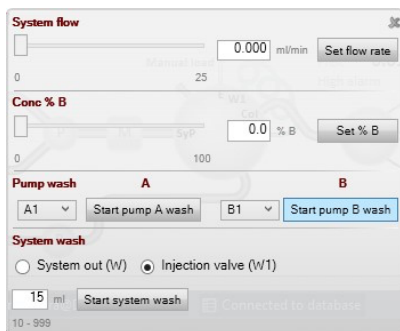
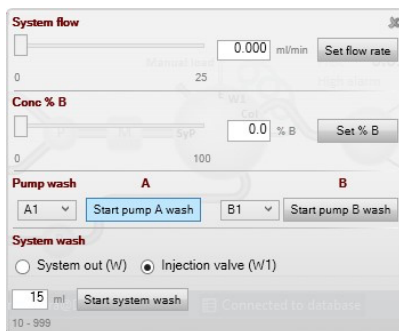
2. Spustíme program UNICORN 7.3 (Cytiva) a přejdeme do okna System Control.



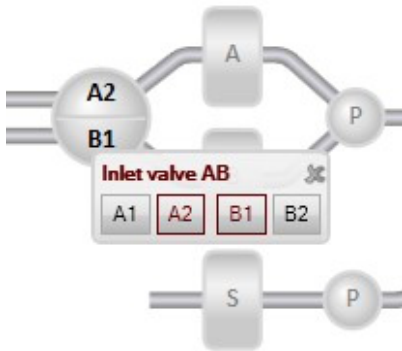
3. Nastavíme [System pump waste] v „Injection valve“, kdy mobilní fáze prochází ze systémových pump (SyP) rovnou do odpadu (W1). Promyjeme pumpu A1 vazebným pufrem v „System pumps“ spustíme [Start pump A1 wash], pumpu B1 elučním pufrem spuštěním [Start pump B1 wash] a pumpu A2 deionizovanou vodou spuštěním [Start pump A2 wash].



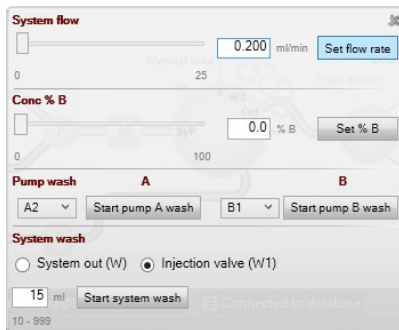
- Primární průtoková cesta
- Alternativní průtoková cesta
- Uzavřená průtoková cesta



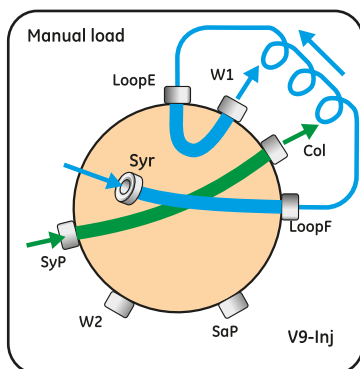
4. V „Inlet valve A/B“ nastavíme pumpu A2 (deionizovaná voda) a pumpu B1 (eluční pufr).



5. Nastavíme průtok mobilní fáze A2 (deionizovaná voda) v „System pumps“ na 0,2 ml min⁻¹ [Set flow rate 0.200; Set % B 0.0].

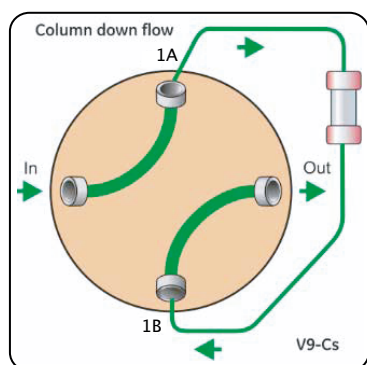
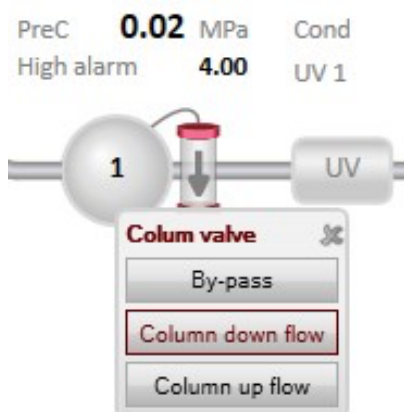


6. Změníme nastavení v „Injection valve“ na [Manual load], kdy mobilní fáze prochází ze systémových pump (SyP) rovnou na kolonu (Col).



- Primární průtoková cesta
- Průtoková cesta pro ruční nanášení

7. Zároveň v „Column valve“ přepneme na [Column down flow], jež nastavuje průtok mobilní fáze kolonou seshora dolů.

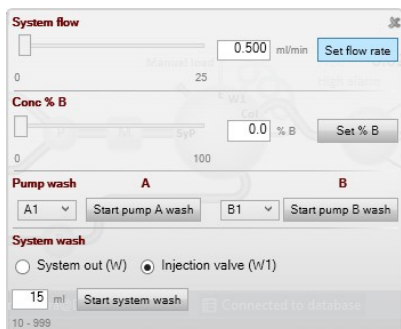


■ Primární průtoková cesta

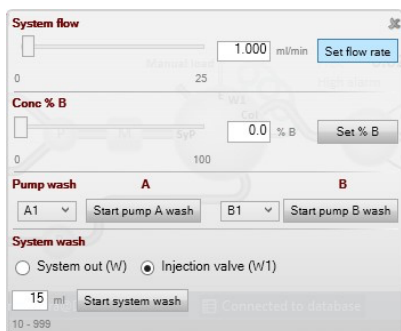
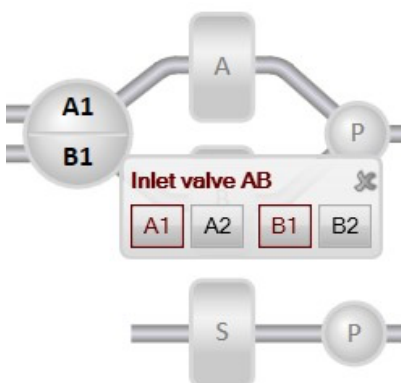
8. Připojíme kolonu plněnou Ni Sepharose 6 Fast Flow (Cytiva) metodou *drop-to-drop* k modulu V9-Cs horní kapilárou kolony do 1A a dolní kapilárou do 1B.



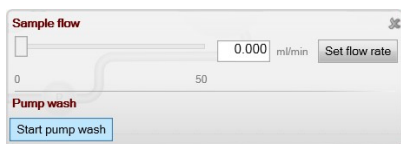
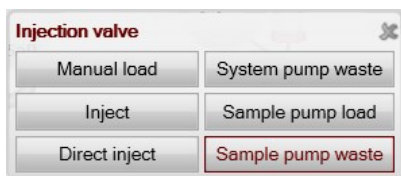
9. Ověříme, zda systém zcela těsní a nedochází k úniku mobilní fáze.
10. Nastavíme průtok mobilní fáze A2 (deionizovaná voda) v „System pumps“ na $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ [Set flow rate 0.500; Set % B 0.0] a promyjeme kolonu 5 objemy kolony (CV) deionizovanou vodou k odstranění 20% ethanolu.

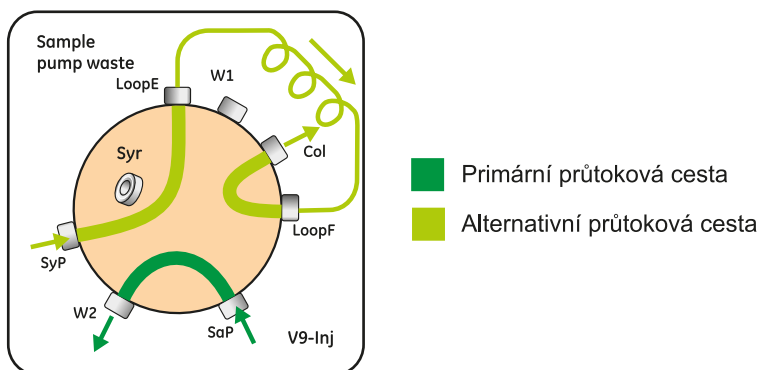


11. Poté kolonu ekvilibrujeme 5–10 CV mobilní fází A1 (vazebný pufr) změnou v „Inlet valve A/B“ na pumpu A1 a nastavením průtoku v „System pumps“ na $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ [Set flow rate 1.000; Set % B 0.0].

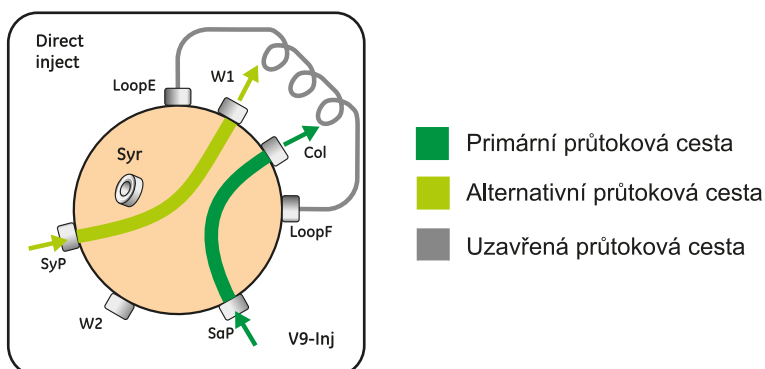
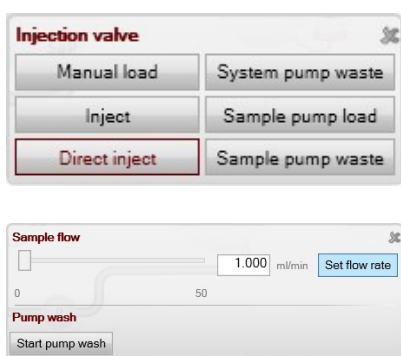


12. Před nanesením vzorku promyjeme vzorkovací pumpu mobilní fází A1 (vazebný pufr) v „Sample pump“ spustíme [Start pump wash]. Ujistíme se, že je v „Injection valve“ nastaveno [Sample pump waste].

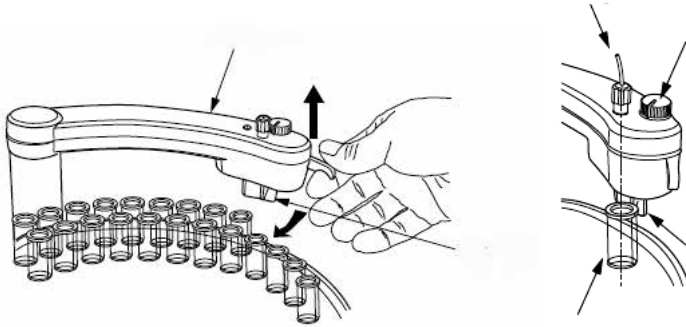




13. Na kolonu nanese předem připravený vzorek na ledu pomocí vzorkovací pumpy při průtoku 1 ml min^{-1} a to tak, že v „Injection valve“ nastavíme [Direct inject], kdy je vzorek aplikován vzorkovací pumpou (SaP) přímo na kolonu (Col), a dále nastavíme průtok vzorku v „Sample pump“ na [Set flow rate 1.000]. Až bude vzorek téměř všechen aplikován ukončíme nanášení vzorku v „Sample pump“ [Set flow rate 0.000], aby se do systému nedostala bublinka.



14. Po nanesení vzorku nastavíme zpět v „Injection valve“ [Manual load] a v „System pumps“ [Set flow rate 1.000; Set % B 0.0].
15. Takto promýváme kolonu mobilní fází A1 (vazebný pufr), dokud absorbance opět nedosáhne základní linie (5–10 CV).
16. Sběrač frakcí naplníme ledovou tříští a vložíme čisté zkumavky. Rameno sběrače nastavíme tak, aby se sensor zkumavek dotýkal sběrných zkumavek na vnější straně. Zkontrolujeme, zda je sensor zkumavek ve správné poloze pro použité zkumavky. Eluentní kapilára by měla být nad středem sběrné zkumavky. Ovládání senzoru lze přepínat mezi dvěma polohami malé zkumavky (s vnitřním průměrem přibližně 18 mm a větším) a velké zkumavky (s vnitřním průměrem menším než 18 mm).



17. Poté otevřeme Manual/Execute Manual Instructions v horní liště. Nastavíme lineární gradient 20–500 mM imidazolu pomocí mobilní fáze B1 (eluční pufr) po dobu 20 min v Pumps/Gradient na [Target 100.0 %B; Length 20.00 min] a pomocí funkce Insert zařadíme do fronty příkazů. V Monitors/Wavelength zkontrolujeme [UV1 280 nm] a případně nastavíme další vlnové délky (celkem lze sledovat až tři vlnové délky) a pomocí funkce Insert zařadíme do fronty příkazů. Sběr frakcí o objemu 2 ml pomocí Fraction Collector F9-R nastavíme ve Fraction Collection/Fractionation na [Volume 2.00 ml] a pomocí funkce Insert zařadíme do fronty příkazů. Nakonec všechny příkazy spustíme najednou pomocí funkce Execute.

System state	Manual Run	0.00 ml	cv	0.00 ml	cv	11.30 min	0.00 min	0	0.000 ml/min	cv	0.000 ml/min	cv
Inlet A	Inlet B	Conc B	Injection	Column position	Column flow direction	System pressure	Sample pressure					
A1	B1	0.0 %	Manual load	By-pass	-	0.02 MPa	0.06 MPa					
PreC pressure	UV 1 280	Cond	Outlet									
0.02 MPa	10.290 mAU	0.53 mS/cm	Waste									

Manual instructions - ÅKTA PURE U9M

Selected column type: Select...

Instructions

- Pumps
 - System flow
 - Sample flow
 - Gradient
 - Pump A wash
 - Pump B wash
 - Sample pump wash
 - System wash
- Flow path
- Monitors
- Fraction collection
- Alarms
- Wash settings

Parameters for Gradient

Target: [0.0 - 100.0] %B

Length: [0.00 - 100000.0] min

Instruction execution list

Gradient 100.0, 20.00

Save result as: Browse...

Auto update of parameters during run

Manual instructions - ÅKTA PURE U9M

Selected column type: Select...

Instructions

- Pumps
- Flow path
- Monitors
 - Auto zero UV
 - Wavelength
 - Noise reduction UV
 - UV lamp
 - Relative scale cond
 - Reset auto zero UV
- Fraction collection
- Alarms
- Wash settings
- Wash parameters

Parameters for Wavelength

UV 1: [190 - 700] nm

UV 2: [190 - 700] nm Off

UV 3: [190 - 700] nm Off

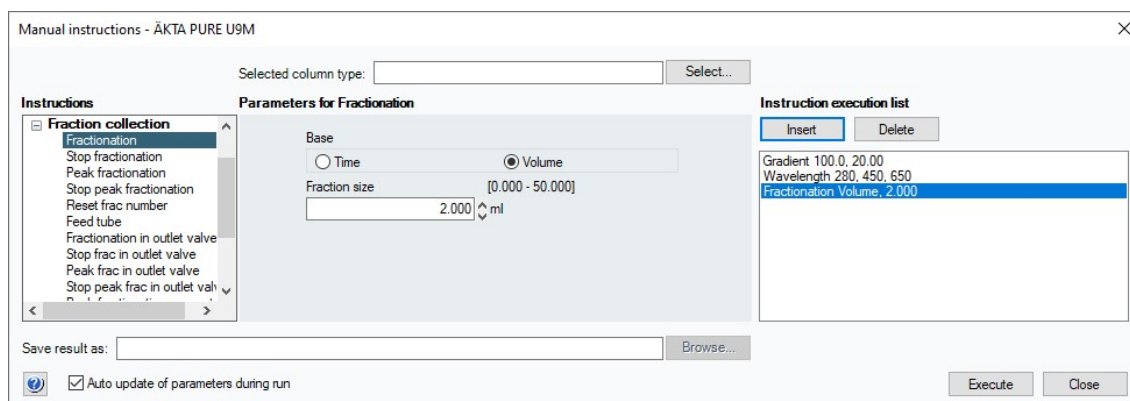
Instruction execution list

Gradient 100.0, 20.00

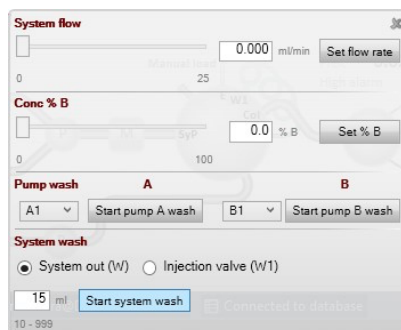
Wavelength 280, 450, 650

Save result as: Browse...

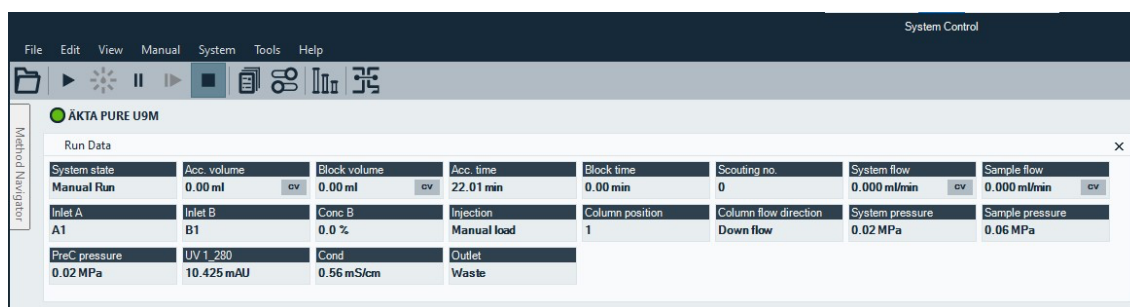
Auto update of parameters during run



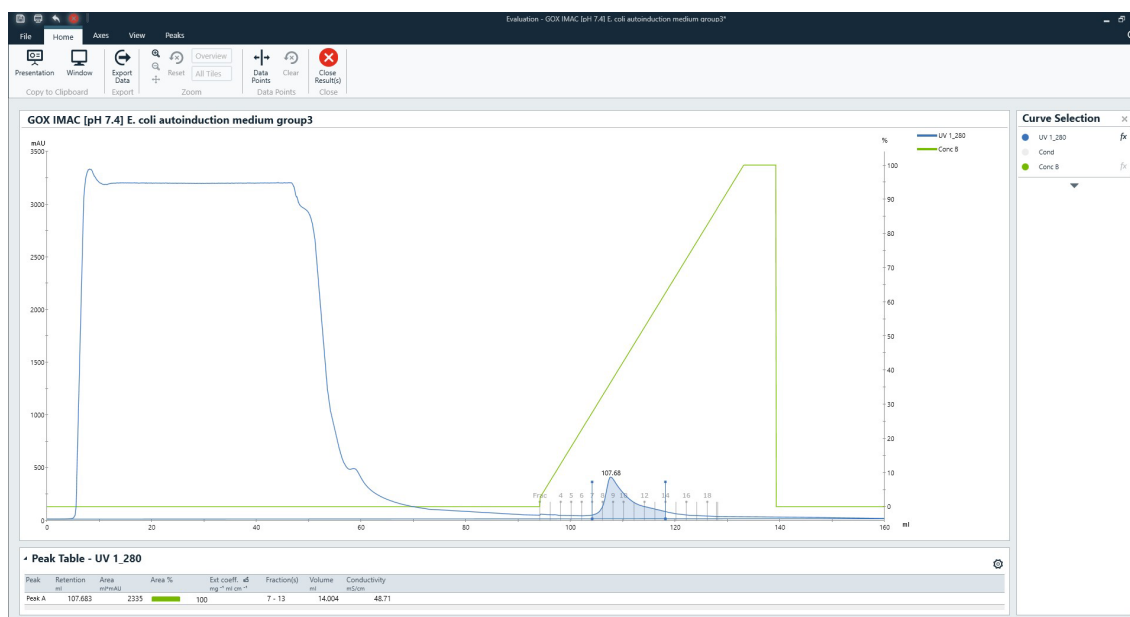
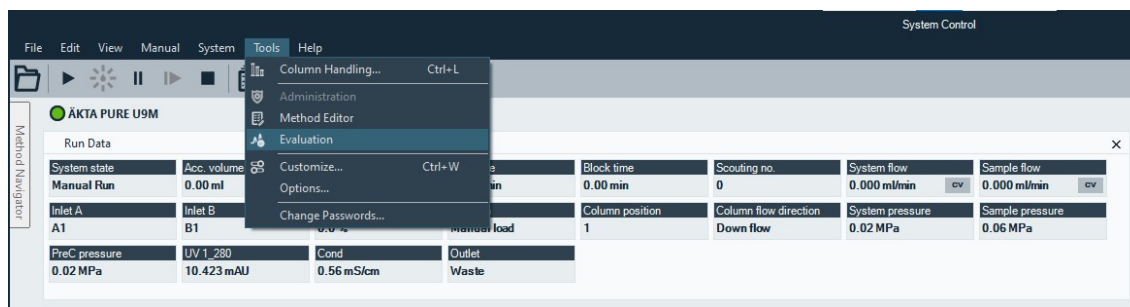
18. Po eluci regenerujeme kolonu promytím 5–10 CV mobilní fázi A1 (vazebný pufr) nastavením [Set flow rate 1.000; Set % B 0.0] v „System pumps“.
19. Poté nastavíme v „System pumps“ [Set flow rate 0.000; Set % B 0.0] a všechny pumpy promyjeme 20% ethanolem; pumpu A1(2) v „System pumps“ spustíme [Start pump A1(2) wash], pumpu B1 pomocí [Start pump B1 wash], a vzorkovací pumpu v „Sample pump“ spustíme [Start pump wash].
20. Nastavíme průtok mobilní fáze A1 (20% ethanol) na $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ v „System pumps“ [Set flow rate 0.500; Set % B 0.0] a promyjeme kolonu 5 CV.
Pro ukončení promývání nastavíme v „System pumps“ [Set flow rate 0.000; Set % B 0.0], odinstalujeme kolonu a uskladníme v lednici.
21. Na závěr promyjeme celý přístroj 20% ethanolem v „System pumps“ spustíme [Start system wash].



22. Ukončíme purifikační běh pomocí „End“ (■), tím se i celý záznam uloží.



23. Vyhodnotíme a exportujeme chromatogram pomocí programu Evaluation.



SEC protokol

Vylučovací chromatografie (SEC), známá také jako gelová filtrace, je nejšetrnější ze všech chromatografických technik. SEC separuje molekuly na základě rozdílů ve velikosti při průchodu kolonou naplněnou matricí. Na rozdíl od technik, jako je iontoměničová chromatografie (IEC) nebo afinitní chromatografie (AC), se molekuly nevážou na chromatografickou matrici, což znamená, že složení pufru nemá přímý vliv na rozlišení (stupeň separace mezi píky). Významnou výhodou SEC je proto to, že podmínky lze měnit podle typu vzorku nebo požadavků na další purifikaci, analýzu nebo skladování, aniž by se změnila separace.

SEC porézní matrice se skládají ze sférických částic (kuliček), které postrádají reaktivní a adsorpční vlastnosti. Po vstupu vzorku do kolony nemohou molekuly větší než póry difundovat do kuliček, takže se eluují jako první. Molekuly, jejichž velikost se pohybuje mezi velmi velkými a velmi malými, mohou do pórů pronikat v různé míře v závislosti na své velikosti. Pokud je molekula menší než nejmenší z pórů v matrici, bude schopna proniknout do celkového objemu pórů. Molekuly, které proniknou do celkového objemu pórů, jsou eluovány jako poslední. Vzorky jsou eluovány izokraticky, takže během separace není třeba používat různé pufrů.

Příprava SEC pufru

Voda a chemikálie používané k přípravě pufru by měly být vysoce čisté.

1. Pro SEC purifikaci připravíme:

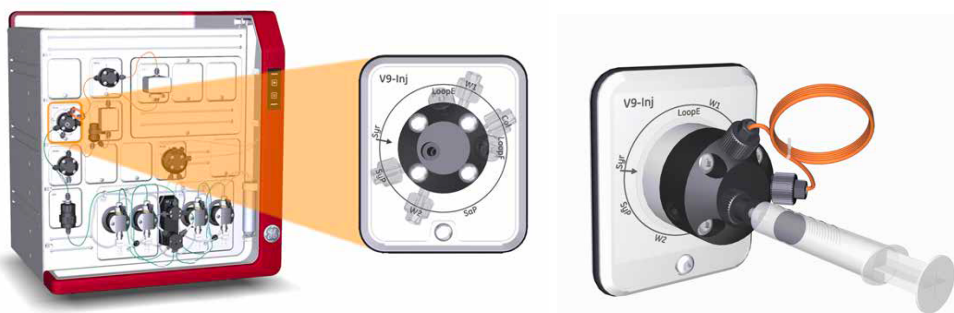
500 ml deionizované vody

500 ml mobilní fáze (20 mM fosforečnan sodný, 150 mM chlorid sodný, pH 7,4)
500 ml 20% ethanolu

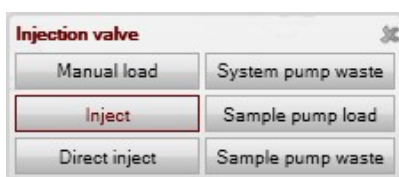
2. Před použitím přefiltrujeme pufrý přes 0,45 µm filtr.
3. Bezprostředně před použitím vložíme pufr a ostatními roztoky pro chromatografické metody do ultrazvukové lázně na 10–15 min pro odstranění bublinek.

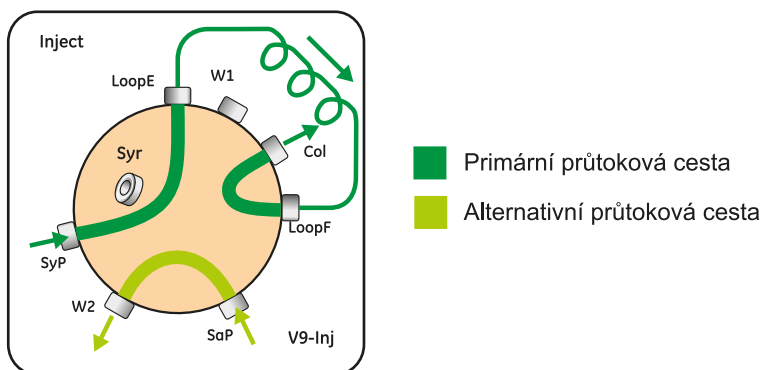
Purifikační běh SEC

1. Spustíme ÄKTA PURE 25M systém a PC.
2. Spustíme program UNICORN 7.3 a přejdeme do okna System Control.
3. V „Injection valve“ nastavíme [System pump waste] a promyjeme pumpu A1 mobilní fází v „System pumps“ [Start pump A1 wash] a pumpu A2 deionizovanou vodou [Start pump A2 wash].
4. V „Inlet valve A/B“ nastavíme pumpu A2 (deionizovaná voda).
5. Nastavíme průtok mobilní fáze A2 (deionizovaná voda) v „System pumps“ na 0,2 ml min⁻¹ [Set flow rate 0.200; Set % B 0.0].
6. Změníme nastavení v „Injection valve“ na [Manual load].
7. Zároveň v „Column valve“ přepneme na [Column down flow].
8. Připojíme kolonu Superose® 12 HR 10/30 (Cytiva) metodou *drop-to-drop* k modulu V9-Cs horní kapilárou kolony do 1A a dolní kapilárou do 1B.
9. Ověříme, zda systém zcela těsní a nedochází k úniku mobilní fáze.
10. Nastavíme průtok mobilní fáze A2 (deionizovaná voda) v „System pumps“ na 0,5 ml min⁻¹ [Set flow rate 0.500; Set % B 0.0] a promyjeme kolonu 5 objemy kolony (CV) deionizovanou vodou k odstranění 20% ethanolu.
11. Poté kolonu ekvilibrujeme 5–10 CV mobilní fází (20 mM fosforečnan sodný, 150 mM chlorid sodný, pH 7,4) změnou v „Inlet valve A/B“ na pumpu A1 a zachováním průtoku 0,5 ml min⁻¹ v „System pumps“ [Set flow rate 0.500; Set % B 0.0].
12. Připojíme vzorkovací smyčku o objemu 0,2 ml k modulu V9-Inj v pozicích LoopE a LoopF a manuálně ji promyjeme deionizovanou vodou a poté mobilní fází pomocí injekční stříkačky s jehlou s tupým hrotem přes port přípojení stříkačky (Syr).



13. Do vzorkovací smyčky nanese předem připravený vzorek pomocí injekční stříkačky s jehlou s tupým hrotem. Aby nedošlo ke ztrátě vzorku v důsledku nasátí, ponechte stříkačku v portu. Vzorek poté aplikujeme ze vzorkovací smyčky (LoopE-F) přímo na kolonu (Col) nastavením [Inject] v „Injection valve“.





14. Jakmile je vzorek všechen aplikován ukončíme nanášení vzorku přepnutím opět do pozici [Manual load] v „Injection valve“ a můžeme vyjmout stříkačku z portu.
15. Eluci provedeme 5–10 CV mobilní fáze.
16. Sběrač frakcí naplníme ledovou tříští a vložíme čisté zkumavky a nastavíme rameno sběrače.
17. Poté otevřeme Manual/Execute Manual Instructions v horní liště. V Monitors/Wavelength zkontrolujeme [UV1 280 nm] a případně nastavíme další vlnové délky a pomocí funkce Insert zařadíme do fronty příkazů. Sběr frakcí o objemu 2 ml pomocí Fraction Collector F9-R nastavíme ve Fraction Collection/Fractionation na [Volume 2.00 ml] a pomocí funkce Insert zařadíme do fronty příkazů. Nakonec všechny příkazy spustíme najednou pomocí funkce Execute.
18. Po eluci regenerujeme kolonu promytím 5 CV mobilní fáze.
19. Poté nastavíme v „System pumps“ [Set flow rate 0.000; Set % B 0.0] a obě pumpy promyjeme 20% ethanolem; pumpu A1(2) v „System pumps“ spustíme [Start pump A1(2) wash].
20. V „Inlet valve A/B“ nastavíme pumpu A1 (20% ethanol).
21. Nastavíme průtok mobilní fáze (20% ethanol) na $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ v „System pumps“ [Set flow rate 0.500; Set % B 0.0] a promyjeme kolonu 5 CV.
22. Pro ukončení promývání nastavíme v „System pumps“ [Set flow rate 0.000; Set % B 0.0], odinstalujeme kolonu a uskladníme v lednici.
23. Na závěr promyjeme celý přístroj 20% ethanolem v „System pumps“ spustíme [Start system wash].
24. Ukončíme purifikační běh pomocí „End“, tím se i celý záznam uloží.
25. Vyhodnotíme a exportujeme chromatogram pomocí programu Evaluation.

III. PŘÍPRAVA EXTRACELULÁRNÍHO MÉDIA *P. PASTORIS*

1. Supernatant po odstředění biomasy z bioreaktoru zakoncentrujeme ultrafiltrací na základě tlaku pomocí míchané cely Amicon® (hnací plyn je dusíku). Sestavte Amicon® celu s ultrafiltrační membránou 3 kDa MWCO z regenerované celulózy. Obecně platí, že mezní molekulová hmotnost (MWCO) nebo nominální mezní molekulová hmotnost (NMWL) membránového filtru by měla odpovídat polovině až třetině velikosti cílového proteinu pro retenci.
2. Koncentrovaný supernatant odsolíme v dialyzační tubulární membráně CelluSep T1 (MWCO 3,5 kDa). Dialyzační membránu ustrihneme o vhodné délce s dostatečnou rezervou (objem vzorku se během dialýzy zvyšuje) a vložíme na 15 min do deionizované vody. Poté ji naplníme koncentrovaným supernatantem a umístíme do nádoby s 1–2 l dialyzačního pufru (5 mM octan sodný, pH 5,0). Za mírného míchání dialyzujeme 2 h při 4 °C. Vyměníme dialyzační pufr a dialyzujeme další 2 h (výměnu pufru lze několikrát zopakovat). Nakonec vyměníme dialyzační pufr a dialyzujeme přes noc.
3. Dialyzovaný koncentrovaný supernatant případně přefiltrujeme přes 0,45 µm filtr.
4. Nakonec vzorek ultracentrifugujeme při $185\,000 \times g$ po dobu 40 min při 4 °C.
5. Změříme koncentraci proteinů ve vzorku pomocí Qubit® Protein Assay.

IV. JEDNOFÁZOVÝ PURIFIKAČNÍ PROTOKOL (IEC)

IEC protokol

Iontoměničová chromatografie (IEC) separuje proteiny na základě rozdílů v jejich povrchovém náboji. IEC využívá skutečnosti, že vztah mezi povrchovým nábojem a pH je pro konkrétní protein jedinečný. Při IEC se reguluje reverzibilní interakce mezi nabitými proteiny a opačně nabitými médii, aby se podpořila vazba nebo eluce specifických proteinů a dosáhlo se separace. Protein, který nemá při pH odpovídajícím jeho izoelektrickému bodu (pI) žádný povrchový náboj, nebude s nabitým médiem interagovat. Při pH vyšším, než pI se však protein váže na kladně nabitě médium nebo aniontový měnič a při pH nižším než jeho pI se protein váže na záporně nabitě médium nebo kationtový měnič. Kromě iontově-výměnné interakce může docházet i k dalším typům vazby, ale tyto účinky jsou velmi malé a jsou způsobeny především van der Waalsovými silami a nepolárními interakcemi.

Příprava IEC pufrů

1. Pro IEC purifikaci připravíme:

500 ml deionizované vody

500 ml vazebného pufru (5 mM octan sodný, pH 5,0)

500 ml elučního pufru (5 mM octan sodný, 1 M chlorid sodný, pH 5,0)

2. Před použitím přefiltrujeme pufrы přes 0,45 μm filtr.

3. Bezprostředně před použitím vložíme pufrы a ostatními roztoky pro chromatografické metody do ultrazvukové lázně na 10–15 min pro odstranění bublinek.

Purifikační běh SEC

1. Spustíme ÄKTA PURE 25M systém a PC.

2. Spustíme program UNICORN 7.3 a přejdeme do okna System Control.

3. Nastavíme [System pump waste] v „Injection valve“. Promyjeme pumpu A1 vazebným pufrem v „System pumps“ spustíme [Start pump A1 wash], pumpu B1 elučním pufrem spuštěním [Start pump B1 wash] a pumpu A2 deionizovanou vodou spuštěním [Start pump A2 wash].

4. V „Inlet valve A/B“ nastavíme pumpu A2 (deionizovaná voda) a pumpu B1 (eluční pufr).

5. Nastavíme průtok mobilní fáze A2 (deionizovaná voda) v „System pumps“ na $0,2 \text{ ml min}^{-1}$ [Set flow rate 0.200; Set % B 0.0].

6. Změníme nastavení v „Injection valve“ na [Manual load].

7. Zároveň v „Column valve“ přepneme na [Column down flow].

8. Připojíme kolonu HiPrep SP FF 16/10 (Cytiva) metodou *drop-to-drop* k modulu V9-Cs horní kapilárou kolony do 1A a dolní kapilárou do 1B.

9. Ověříme, zda systém zcela těsní a nedochází k úniku mobilní fáze.

10. Nastavíme průtok mobilní fáze A2 (deionizovaná voda) v „System pumps“ na 1 ml min^{-1} [Set flow rate 1.000; Set % B 0.0] a promyjeme kolonu 5 objemy kolony (CV) deionizovanou vodou k odstranění 20% ethanolu.

11. Poté kolonu ekvilibrujeme 5–10 CV mobilní fází A1 (vazebný pufr) změnou v „Inlet valve A/B“ na pumpu A1 a nastavením průtoku v „System pumps“ na 3 ml min^{-1} [Set flow rate 3.000; Set % B 0.0].

12. Před nanesením vzorku promyjeme vzorkovací pumpu mobilní fází A1 (vazebný pufr) v „Sample pump“ spustíme [Start pump wash]. Ujistíme se, že je v „Injection valve“ nastaveno [Sample pump waste].

13. Na kolonu nanese předem připravený vzorek na ledu pomocí vzorkovací pumpy při průtoku 3 ml min^{-1} a to tak, že v „Injection valve“ nastavíme [Direct inject], a dále nastavíme průtok vzorku v „Sample pump“ na [Set flow rate 3.000]. Až bude vzorek téměř všechen aplikován

- ukončíme nanášení vzorku v „Sample pump“ [Set flow rate 0.000], aby se do systému nedostala bublinka.
14. Nastavíme zpět v „Injection valve“ [Manual load] a v „System pumps“ [Set flow rate 3.000; Set % B 0.0].
 15. Takto promýváme kolonu mobilní fází A1 (vazebný pufr), dokud absorbance opět nedosáhne základní linie (5–10 CV).
 16. Sběrač frakcí naplníme ledovou tříští a vložíme čisté zkumavky a nastavíme rameno sběrače.
 17. Poté otevřeme Manual/Execute Manual Instructions v horní liště. Nastavíme lineární gradient 0–1 M NaCl po dobu 20 min pomocí mobilní fáze B1 (eluční pufr) po dobu 20 min v Pumps/Gradient na [Target 100.0 %B; Length 20.00 min] a pomocí funkce Insert zařadíme do fronty příkazů. V Monitors/Wavelength zkontrolujeme [UV1 280 nm] a případně nastavíme další vlnové délky a pomocí funkce Insert zařadíme do fronty příkazů. Sběr frakcí o objemu 2 ml pomocí Fraction Collector F9-R nastavíme ve Fraction Collection/Fractionation na [Volume 2.00 ml] a pomocí funkce Insert zařadíme do fronty příkazů. Nakonec všechny příkazy spustíme najednou pomocí funkce Execute.
 18. Po eluci regenerujeme kolonu promytím 5–10 CV mobilní fází A1 (vazebný pufr) nastavením [Set flow rate 3.000; Set % B 0.0] v „System pumps“.
 19. Poté nastavíme v „System pumps“ [Set flow rate 0.000; Set % B 0.0] a všechny pumpy promyjeme 20% ethanolem; pumpu A1(2) v „System pumps“ spustíme [Start pump A1(2) wash], pumpu B1 pomocí [Start pump B1 wash], a vzorkovací pumpu v „Sample pump“ spustíme [Start pump wash].
 20. Nastavíme průtok mobilní fáze A1 (20% ethanol) na 1 ml min⁻¹ v „System pumps“ [Set flow rate 1.000; Set % B 0.0] a promyjeme kolonu 5 CV.
 21. Pro ukončení promývání nastavíme v „System pumps“ [Set flow rate 0.000; Set % B 0.0], odinstalujeme kolonu a uskladníme v lednici.
 22. Na závěr promyjeme celý přístroj 20% ethanolem v „System pumps“ spustíme [Start system wash].
 23. Ukončíme purifikační běh pomocí „End“, tím se i celý záznam uloží.
 24. Vyhodnotíme a exportujeme chromatogram pomocí programu Evaluation.

V. SDS-PAGE A WESTERN BLOT

SDS-PAGE slouží k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Zahřátím vzorku proteinů v denaturujícím a redukujícím pufru dochází k denuraci proteinů včetně odstranění disulfidových můstků a jejich obalení molekulami dodecylsírany sodného (SDS), který udělí proteinům celkový záporný náboj. Je to dáno tím, že SDS se nekovalentně váže na proteiny v poměru 1.4 g SDS na 1 g bílkoviny. Po nanesení vzorku se záporně nabitými proteiny na gel a umístění gelu do elektrického pole migrují proteiny ke kladné elektrodě (anodě). Během této migrace jsou proteiny separovány na principu molekulového síta v polyakrylamidovém gelu. Po následné vizualizaci separovaných proteinů v gelu se dá určit jejich relativní molekulová hmotnost srovnáním vzdálenosti od startu migrace daného proteinu se směsí standardů o známé molekulové hmotnosti. Koncentrace monomeru použitého k přípravě gelu se volí podle velikosti proteinů, které chceme separovat. Nízká koncentrace se používá k separaci proteinů o vysoké molekulové hmotnosti, zatímco vysoká koncentrace se používá k separaci proteinů o malé molekulové hmotnosti.

Koncentrace monomeru (akrylamid + BIS) [%T]	Oblast lineární separace [kDa]
15,0	12–43
10,0	16–68
7,5	36–94
5,0	57–212

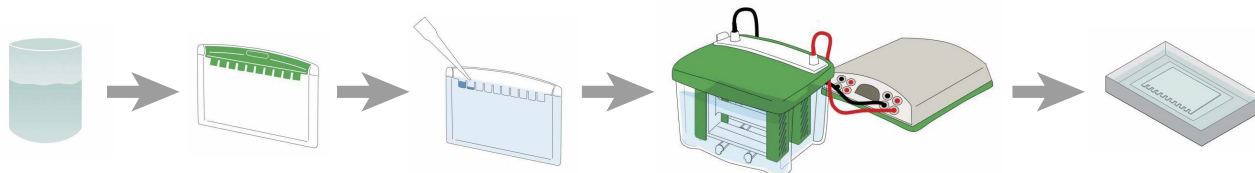
V praxi se pro separace proteinů velmi často používá tzv. diskontinuální elektroforéza skládající se ze dvou gelů, koncentračního a separačního. Tyto gely mají různá pH a také různou koncentraci monomeru. Koncentrační gel má pH 6,8, při kterém mají ionty glycinu ($pI = 6,1$) obsažené v elektroforetickém pufru významně nižší mobilitu než při pH 8,8, které je nastaveno v separačním gelu. Díky tomu v koncentračním a separačním gelu panují odlišné separační podmínky. Kromě iontů glycinu se v systému nacházejí také anionty proteinů, anionty chloridu a kationty TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan). V koncentračním gelu se aniony řadí následovně dle mobility: 1. chloridy 2. proteiny 3. glycin. V této situaci (řidký gel) dochází k zúžení (isotachoforetickému zakoncentrování) zóny proteinů díky tomu, že ionty glycinu tlačí „zezadu“ na zónu proteinů, která je zepředu ohraničena zónou chloridových aniontů. Díky tomu je zóna proteinů velmi dobře zúžena (zakoncentrována) před vstupem do separačního gelu. Po vstupu do separačního gelu je pořadí mobilit anionů díky vyššímu pH a tím pádem zápornějšímu náboji glycinu a jeho vyšší mobilitě odlišné: 1. chloridy 2. glycin 3. proteiny. V této situaci již mobilita proteinů není zezadu ovlivňována jinými ionty a díky hustšímu separačnímu gelu se proteiny s různou molekulovou hmotností postupně separují na principu molekulového síta podle své molekulové hmotnosti.

Western blot je analytická metoda sloužící k přenosu a imunochemické detekci proteinů z SDS-PAGE gelu. Proteiny z SDS-PAGE gelu jsou nejprve přeneseny pomocí elektrického pole na chemicky i mechanicky odolnější membránu – nitrocelulóza nebo polyvinylidendifluorid (PVDF). Existují dva typy uspořádání western blotu a to „wet blotting“ (mokrý přenos) a „semi-dry blotting“ (polosuchý přenos), pomocí obou metod je dosahováno srovnatelných výsledků. Na membráně pak probíhá imunochemická detekce proteinů za pomoci primární a sekundární protilátky. Primární protilátka je specifická vůči cílovému proteinu (antigenu), neboť se váže na specifickou sekvenci aminokyselin v cílovém proteinu zvanou epitop, která se liší protein od proteinu. Sekundární protilátka je pak specifická proti imunoglobulinům zvířete, které vytvořilo primární protilátku, vytváří tedy komplex s primární protilátkou v místě jejího komplexu s antigenem. Sekundární protilátka navíc nese detekční systém (obvykle enzym – alkalická fosfatasa, peroxidasa), který rozkládá substrát, jež po rozložení produkuje chemiluminiscenci (svítí) nebo viditelné zbarvení v místě komplexu antigen-primární protilátka-sekundární protilátka. Díky vysoké specifitě interakce antigen-protilátka a vysoké citlivosti detekce je možné identifikovat jeden konkrétní protein ze směsi obsahující až stovky proteinů.

SDS-PAGE protokol

1. Přidejte 2-merkptoethanol v poměru 1:19 do 2X Laemmli pufru (65,8 mM Tris-HCl, 26,3% (w/v) glycerol, 2,1% SDS, 0,01% bromfenolová modř, pH 6,8; BioRad). Výsledný nanášecí pufr přidejte ke vzorku v poměru 1:1. Připravte o 50 % více než budete nanášet na gel.
2. Zahřívejte při 95 °C po dobu 5 min.
3. Centrifugujte při 10 000 g po dobu 5 min.
4. Opatrně odstraňte hřebínek a zelenou pásku na spodní straně kazety s prefabrikovaný 4–20% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free gelem (BioRad) a vložte jej do elektrodového držáku spolu s pomocnou plastovou kazetou, aby se vytvořil vnitřní katodový prostor.
5. Elektrodový držák vložte do elektrodové vany Mini-PROTEAN (BioRad) a nalijte do jeho vnitřní části čerstvý 1X elektrodový pufr (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS, pH 8,3) až po okraj (cca 125 ml).
6. Poté naplňte elektrodovou vanu 1X elektrodovým pufrem až po plnicí čáru (550 ml pro 1–2 gely).
7. Naneste 5 μ l proteinového žebříčku (Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standards, BioRad).
8. Naneste do jamek gelu 10–20 μ l vzorků.

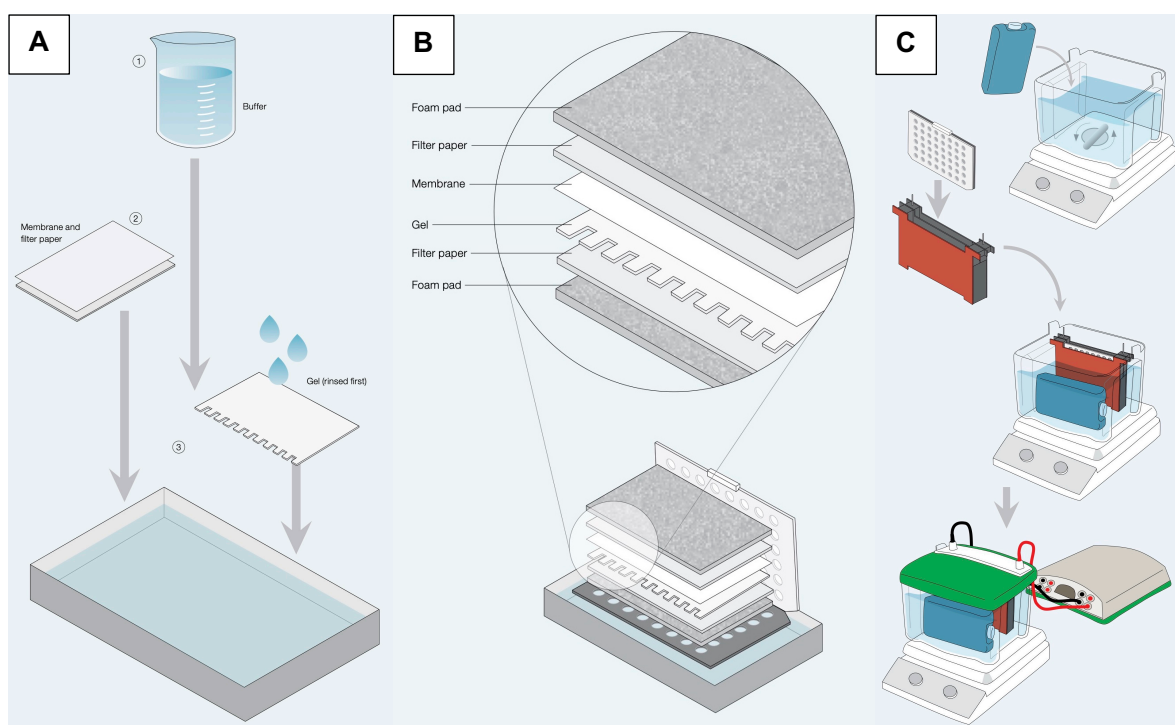
9. Spusťte gel při konstantním proudu 30 mA na gel (nebo konstantním napětí 300 V), dokud barevné čelo nedosáhne spodního konce gelu.
10. Vyjměte gel z kazety a plastového obalu pomocí páky na otevírání kazety a položte na zobrazovací podložku.
11. Aktivujte barvivo pomocí UV po dobu 5 min a poříd'te obrázek gelu.



Western blot protokol

Přenos

1. Stabilizujte pufr Towbin (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol, pH 8,3) pro přenos na vhodnou teplotu při 25 °C.
2. PVDF membránu před ekvilibrací v přenosovém pufru namočte na 1 min do 100% metanolu.
3. Membránu, filtrační papír a polštářky s vlákny nechte 20 min stabilizovat v pufru Towbin pro přenos (A). Gel opláchněte ve vodě a nechte jej 15 minut ekvilibrovat v přenosovém pufru (A). Připravte gelový sendvič (B) a vložte kazetu do modulu (C). Přidejte chladicí jednotku, míchadlo a přenosový pufr.
4. Přenos provádějte při konstantním napětí 100 V po dobu 1 hod.
5. Opláchněte membránu pufrům TBS (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5).



Blokování

1. Membránu ponořte do 10 ml blokovacího pufru EveryBlot (BioRad).
2. Umístěte na orbitální třepačku a blokujte 5 min při pokojové teplotě.

Primární imunodetekce

1. Zřed'te primární protilátku (Mouse anti Histidine Tag) v 10 ml blokovacího pufru EveryBlot. Poměr ředění: 1: 1000.
2. Umístěte na orbitální třepačku a inkubujte 1 hod při pokojové teplotě.
3. Promývejte 10 ml TBS-T (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 7,5) po dobu 5 min za nepřetržitého míchání.
4. Opakujte krok 3 pro celkový počet pěti promytí.

Sekundární imunodetekce

1. Zřed'te sekundární protilátku (Rabbit F(ab')₂ anti Mouse IgG:HRP) v 10 ml blokovacího pufru EveryBlot. Poměr ředění: 1: 2000.
2. Zřed'te sekundární protilátku (StrepTactin-HRP conjugate) v 10 ml blokovacího pufru EveryBlot. Poměr ředění: 1: 4000.
3. Umístěte na orbitální třepačku a inkubujte 1 hod při pokojové teplotě.
4. Promývejte 10 ml TBS-T po dobu 5 min za nepřetržitého míchání.
5. Opakujte krok 3 pro celkový počet šesti promytí.

Detekce

1. Připravte 7 ml substrátu Clarity Max Western ECL (BioRad) smícháním 3,5 ml každé části soupravy.
2. Přidejte připravený substrát k membráně a inkubujte 5 min.
3. Poříd'te sérii snímků, dokud nedojde k nasycení cílových proužků.
4. Poříd'te konečný snímek bez nasycených proužků.

Protokoly pro barvení SDS-PAGE gelů

SILVER STAIN PLUS (BIORAD)

1. Po elektroforéze umístěte mini gel (8 x 10 cm, 0,75–1 mm) do barvicí nádoby s 200 ml fixačního zesilujícího roztoku (50% methanol, 10% kyselina octová, 10% koncentrovaný fixační zesilující roztok). Gel jemným mícháním fixujte po dobu 20 min.
2. Dekantujte fixační zesilující roztok z barvicí nádoby. Gel propláchněte v 200 ml deionizované vody po dobu 10 min za mírného míchání. Poté dekantujte a nahraďte ji čerstvou deionizovanou vodou. Oplachujte dalších 10 min. Dekantujte oplachovou vodu.
3. Do kádinky nalijte 17,5 ml deionizované vody a míchejte míchadlem potaženým PTFE. Přidejte následující látky v tomto pořadí: 2,5 ml roztoku komplexu stříbra; 2,5 ml roztok redukčního moderátoru; 2,5 ml činidla pro vyvolání. Bezprostředně před použitím přidejte 25 ml roztoku urychlovače vyvolávání při pokojové teplotě. Dobře promíchejte. Obsah kádinky přidejte do barvicí nádoby s gelem. Barvení provádějte za mírného míchání po dobu přibližně 20 min nebo dokud nedosáhnete požadované intenzity barvení.
4. Po dosažení požadované intenzity barvení umístěte gel do zastavovacího roztoku (5% kyselina octová) na dobu nejméně 15 min. Po zastavení reakce oplachujte gel 5 min v deionizované vodě.

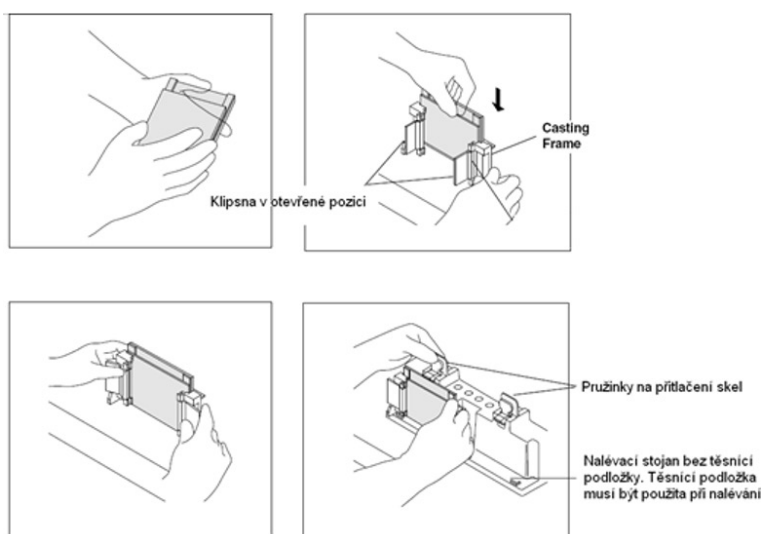
QC COLLOIDAL COOMASSIE G-250 STAIN (BIORAD)

1. Po elektroforéze umístěte mini gel do barvicí nádoby s 50 ml fixačního roztoku (50% methanol, 10% kyselina octová). Gel jemným mícháním fixujte po dobu 15 min.
2. Dekantujte fixační roztok z barvicí nádoby. Gel propláchněte v 50 ml deionizované vody. Dekantujte oplachovou vodu.

3. Do barvicí nádoby s gelem přidejte 50 ml QC koloidní Coomassie G-250. Barvení provádějte za mírného míchání po dobu 1–20 hod.
4. Dekantujte barvicí roztok a odbarvěte gel v deionizované vodě po dobu 1–3 hod s jemným mícháním. Vyměňte vodu alespoň třikrát.

Příprava SDS-PAGE gelu

1. Umístěte rámečky a nalévací stojan na rovnou podložku.
2. Vezměte delší skla se spacersy o tloušťce 1 mm a umístěte na ně kratší skla.
3. Umístěte skla do nalévacího rámečku tak, že popis na delším skle je orientován nahoru.
4. Zaklapněte skla oběma klipsnými zároveň.
5. Umístěte nalévací rámeček se skly na těsnící podložku v nalévacím stojanu a přitlačte je pomocí pružinky.



Nalévání separačního gelu

1. Do eppendorfky si připravte 10% (w/v) persíran amonný (APS) rozpuštěním 50 mg APS v 450 μ l deionizované vody. Podle tabulky níže namíchejte směs pro 10% separační gel do kádinky s míchadlem na magnetické míchačce. Jako poslední přidejte APS a TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethan-1,2-diamin), které slouží jako iniciátor a katalyzátor polymerace, a dobře promíchejte. **Pracujte v digestoři – směs monomerů má neurotoxické a potenciálně karcinogenní účinky, polymer je však již zdraví neškodný.**
2. Pomocí 5 ml pipety nalijte připravený gel mezi připravená skla tak, aby od okraje kratšího skla zůstala mezera cca 1 cm.
3. Opatrně převrstejte nalitý gel tenkou vrstvou 50% isopropanolu.
4. Po 20 min vyndejte nalévací rámeček se skly z nalévacího stojanu a pomocí filtračního papíru odsajte isopropanol na povrchu polymerovaného gelu.
5. Vraťte nalévací rámeček se skly do nalévacího stojanu.

Nalévání koncentračního gelu

1. Podle tabulky níže namíchejte směs pro 5% koncentrační gel do kádinky s míchadlem na magnetické míchačce. Jako poslední opět přidávejte APS a TEMED a dobře promíchejte. **Pracujte v digestoři – směs monomerů má neurotoxické a potenciálně karcinogenní účinky, polymer je však již zdraví neškodný.**
2. Pomocí 5 ml pipety nalijte připravený gel mezi připravená skla na již ztuhlý separační gel tak, aby koncentrační gel byl nalit až po okraj kratšího skla.

3. Poté opatrně zasuňte mezi skla hřebínek o tloušťce 1 mm.
4. Po 20 min vyndejte nalévací rámeček se skly z nalévacího stojanu, vyndejte opatrně hřebínek a vzniklé jamky propláchněte deionizovanou vodou.

TABLE A8-9 Solutions for Preparing Resolving Gels for Tris-glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

↓ COMPONENTS / GEL VOLUME ⇒	VOLUME (ml) OF COMPONENTS REQUIRED TO CAST GELS OF INDICATED VOLUMES AND CONCENTRATIONS								
	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml	
6% gel									
H ₂ O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5	
30% acrylamide mix <!>	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0	
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5	
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	
10% ammonium persulfate <!>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	
TEMED <!>	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04	
8% gel									
H ₂ O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2	
30% acrylamide mix <!>	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3	
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5	
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	
10% ammonium persulfate <!>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	
TEMED <!>	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03	
10% gel									
H ₂ O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8	
30% acrylamide mix <!>	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7	
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5	
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	
10% ammonium persulfate <!>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	
TEMED <!>	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02	
12% gel									
H ₂ O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5	
30% acrylamide mix <!>	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0	
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5	
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	
10% ammonium persulfate <!>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	
TEMED <!>	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02	
15% gel									
H ₂ O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5	
30% acrylamide mix <!>	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0	
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5	
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	
10% ammonium persulfate <!>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	
TEMED <!>	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02	

Modified from Harlow and Lane (1988).

TABLE A8-10 Solutions for Preparing 5% Stacking Gels for Tris-glycine SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis

↓ COMPONENTS / GEL VOLUME ⇒	VOLUME (ml) OF COMPONENTS REQUIRED TO CAST GELS OF INDICATED VOLUMES								
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml	
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8	
30% acrylamide mix <!>	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7	
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25	
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1	
10% ammonium persulfate <!>	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1	
TEMED <!>	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01	

Modified from Harlow and Lane (1988).