# PROTOKOL

# Produkce rekombinantního proteinu v bioreaktoru

***Pichia pastoris***

1. Přiložte graf(y) s průběhem parametrů kultivace a okomentujte jednotlivé fáze fermentace.

***Escherichia coli***

1. Přiložte graf(y) s průběhem parametrů kultivace a okomentujte jednotlivé fáze fermentace.
2. Pomocí excelového souboru „**simulace exponenciálního příkrmu**“ ze zadaných parametrů (*YX/S*= 0,357 g g-1, *cx,DCW,0* = 8,93 g l-1, *cs,0*= 1 g l-1, *cs,f*= 700 g l-1, *µset* = 0,15 h-1, *VR,0* = 1 l) určete následující údaje: a) rovnice exponenciálního příkrmu pro *qS,f*; b) rovnice exponenciálního příkrmu pro *vpum*, c) rovnice exponenciálního růstu *mx,DCW*; d) doba příkrmu potřebná pro dosažení cca 100 g buněk; e) koncentrace buněk na konci exponenciálního příkrmu; f) maximální dosažená rychlost pumpy; g) konečný objem bioreaktoru; h) množství glukosy přidané pumpou. Uvažujte 17 h příkrm a 6 h produkční fázi, ve které je rychlost přídavku substrátu 50 ml h-1.
3. Semilogaritmickým proložením potvrďte exponenciální růstovou křivku a určete maximální specifickou rychlost růstu vsádkové fáze v bioreaktoru. Výsledek diskutujte.

Proč nelze zcela stejné určení specifické rychlosti růstu využít i během příkrmové fáze?

K čemu slouží zastavení přídavku substrátu v souvislosti se sledováním odezvy signálu pH? K jakým dalším změnám dochází po vyčerpání substrátu?

# Purifikace rekombinantního proteinu

1. Pomocí získaných dat během izolace a purifikace rekombinantních proteinů doplňte následující tabulky:

 **Kryptogein**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Metoda** | **Koncentrace proteinu****[mg ml-1]** | **Objem [ml]** | **Množství proteinu [mg]** | **Výtěžek****[%]** |
| Extracelulární medium |  |  |  | 100 % |
| IEC |  |  |  |  |

**Glukosaoxidasa**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Metoda** | **Koncentrace proteinu****[mg ml-1]** | **Objem [ml]** | **Množství proteinu [mg]** | **Výtěžek****[%]** |
| Buněčný extrakt |  |  |  | 100 % |
| IMAC |  |  |  |  |
| SEC |  |  |  |  |

1. Přiložte a popište chromatogramy IMAC, SEC a IEC purifikace rekombinantních proteinů.
2. Přiložte a popište SDS-PAGE gel a Western Blot.
3. Okomentujte výsledky exprese a purifikace rekombinantních proteinů a možnosti dalšího postupu k získání čistého nativního proteinu.