

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 ($Y_{XS} = 0,357 \text{ g g}^{-1}$, $c_{x,DCW,0} = 8,93 \text{ g l}^{-1}$, $c_{s,0} = 1 \text{ g l}^{-1}$, $c_{s,f} = 700 \text{ g l}^{-1}$, $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$, $V_{R,0} = 1 \text{ l}$) určete následující údaje: a) rovnice exponenciálního příkrmu pro $q_{S,f}$; b) rovnice exponenciálního příkrmu pro v_{pum} ; c) rovnice exponenciálního růstu $m_{x,DCW}$; 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				

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