***Cvičení 5 – předpříprava***

Otázky odpovídejte stručně, orientujte se podle velikosti pole pro odpověď, které by mělo být dostatečné. Jako podklady mohou sloužit materiály z přednášek, významnější podíl však bude mít využívání volně dostupných internetových či knižních zdrojů.

**Napište 4–5 příkladů využití purifikovaných proteinů:**

**Vyjmenujte základní využívané metody purifikace proteinů a jejich stručnou charakterizaci – k jaké interakci dochází, podle čeho se proteiny dělí (velikost, náboj, afinita, konformace apod.), typické využití metody (velký objem vzorku, nižší výsledná čistota vs. malý objem vzorku a velmi vysoká výsledná čistota purifikovaného proteinu):**

**Co předchází purifikaci proteinů? Napište 2–3 věty; pro inspiraci můžete použít některé z pojmů níže (nesnažte se využít všechny!).**

Indukční činidlo

Selekční marker

Lyze buněk

Transformace

Heterologní exprese

PCR

Barvení buněk

Plasmid

Typizace bakteriálního kmene

Funkční assay

Kultivace

Elektroforéza

Specifická enzymatická aktivita

Centrifugace

Klonování

Sekvenování

**Návrh metody**

Doplňte text popisující purifikaci proteinu zájmu. Informace čerpejte z přiloženého schématu plasmidu, z přednášek SMAM a z internetu.

Expresní kmen *E. coli* BL21(DE3) obsahující plasmid pET21b(+)\_*gene of interest* kultivujeme v **\_\_\_\_\_\_** médiu s \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ při \_\_\_\_ °C do \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ fáze růstu kultury. Poté zaindukujeme produkci proteinu zájmu přidáním \_\_\_\_\_\_ (typický rozsah koncentrací používaných pro indukci: \_\_\_\_\_\_\_\_ až \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_). Tato látka je strukturní analog cukru \_\_\_\_\_\_\_\_\_ a uvolňuje represor \_\_\_\_\_\_ z jeho cílové sekvence (operátoru), čímž spouští produkci \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_. Tento protein poté umožňuje expresi proteinu zájmu z \_\_\_\_ promotoru.

Buňky po indukci kultivujeme při 20 °C po dobu 20 h. Na konci kultivace buňky sklidíme centrifugací a promytím pufrem odstraníme zbytky růstového média. Buňky poté rozbijeme, abychom z nich uvolnili nitrobuněčně produkovaný protein. Buňky lze rozbít fyzikálně (například metodou \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_), chemicky, nebo pomocí enzymu \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_. Buněčný lyzát opět zcentrifugujeme a získáme tak bezbuněčný extrakt (cell-free extract), který použijeme jako vstupní materiál pro purifikaci proteinu zájmu.

Díky tomu, že \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ (napište vlastnost proteinu zájmu), můžeme pro purifikaci použít metodu \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_. Během této metody se \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ (část proteinu) váže na ionty \_\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_, nebo \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ navázané na matrici v purifikační koloně. Protein zájmu se po nanesení na kolonu s matricí naváže na výše zmíněné ionty, ostatní buněčné proteiny zůstanou nenavázané (nebo budou s matricí interagovat nespecificky, a tedy daleko silněji / slaběji (zakroužkujte správné) než protein zájmu). Pro odmytí nenavázaných proteinů z kolony použijeme nejprve roztok s 5 / 25 / 500 mM koncentrací látky \_\_\_\_\_\_\_\_\_, která je strukturně podobná \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_. Nespecificky navázané proteiny odmyjeme z kolony pomocí 5 / 25 / 500 mM roztoku. Protein zájmu nakonec uvolníme (eluujeme) z kolony 5 / 25 / 500 mM roztokem \_\_\_\_\_\_\_\_\_ (název látky). Čistotu purifikovaného proteinu poté zjistíme pomocí metody \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_.

