

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!).

Typizace bakteriálního kmene	Plasmid	Barvení buněk	PCR	Heterologní exprese	
Sekvenování	Klonování	Centrifugace	Specifická enzymatická aktivita	Transformace	
Elektroforéza	Kultivace	Funkční assay	Indukční činidlo	Lyze buněk	Selekční marker

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 sklídíme centrifugací a promytím puřrem 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 matici v purifikační koloně. Protein zájmu se po nanesení na kolonu s maticí naváže na výše zmíněné ionty, ostatní buněčné proteiny zůstanou nenavázané (nebo budou s maticí 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 _____.

