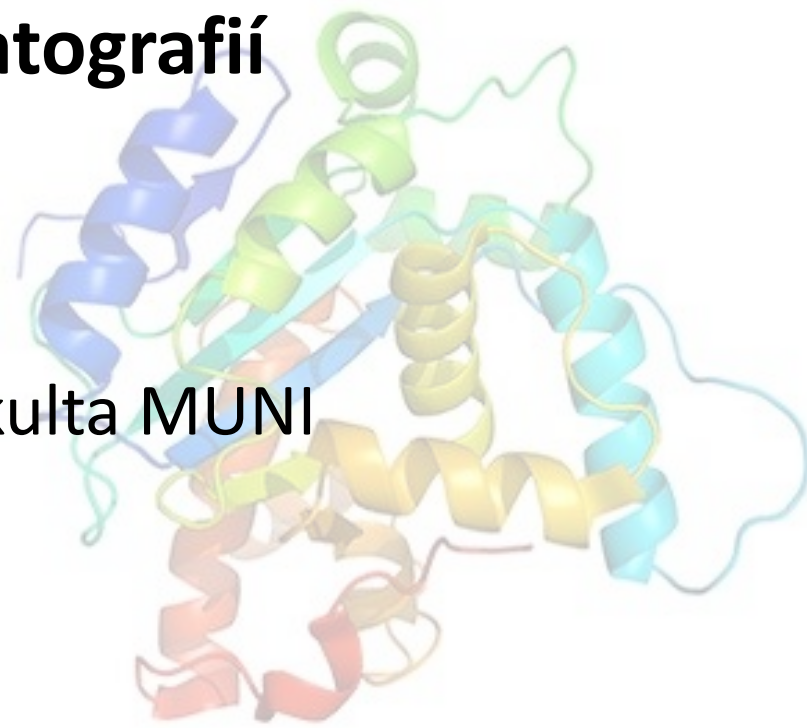


Cvičení č. 6

Purifikace rekombinantního proteinu afinitní chromatografií

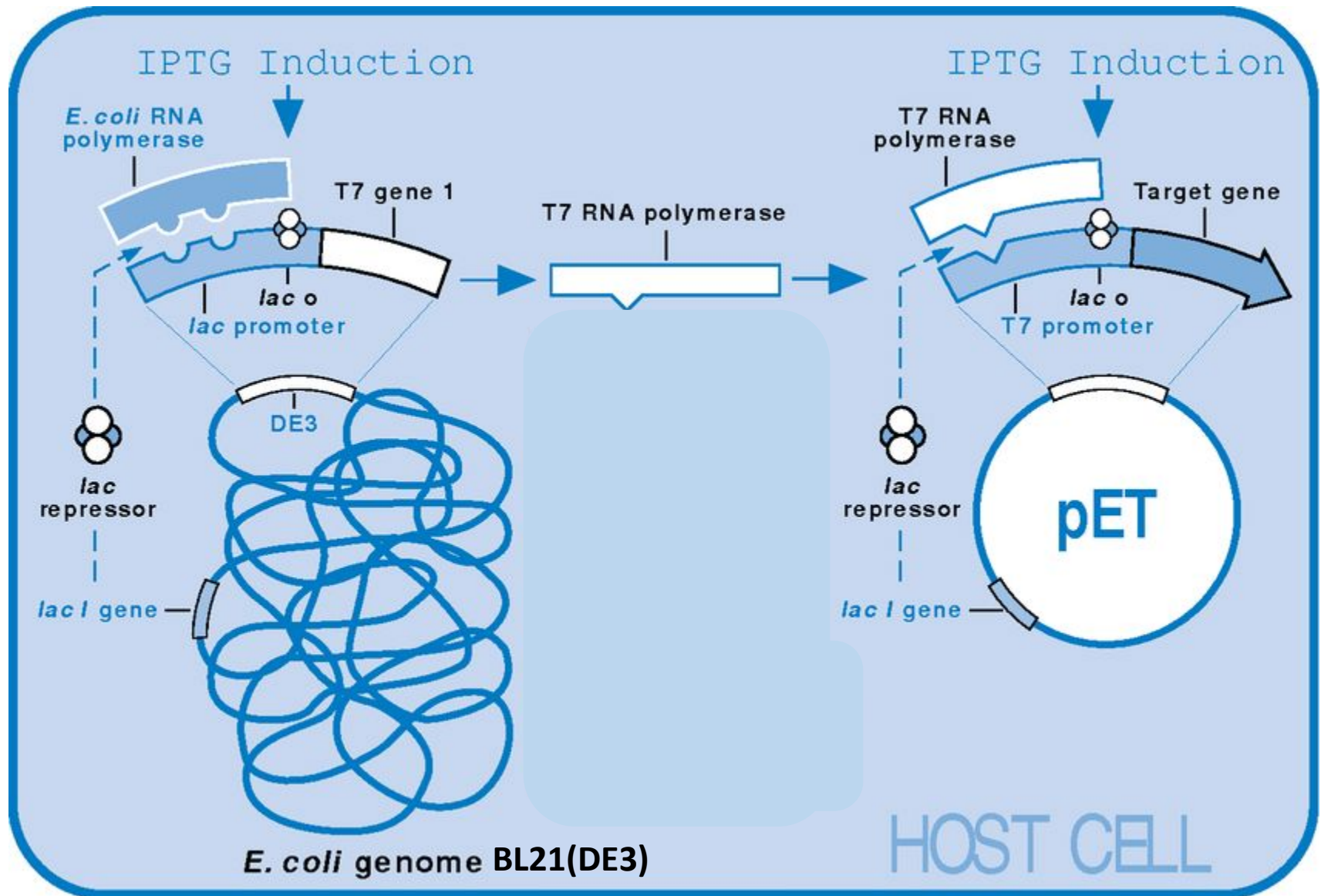
Přírodovědecká fakulta MUNI



CO NÁS DNES ČEKÁ...

- 1) Teoretický úvod k tématu
- 2) Seznámení se s protokolem ke cvičení
- 3) Separace buněk z média centrifugací
- 4) Lyze buněk a separace CFE centrifugací
- 5) Purifikace GFP-His a BglC-His metaloafinitní chromatografií

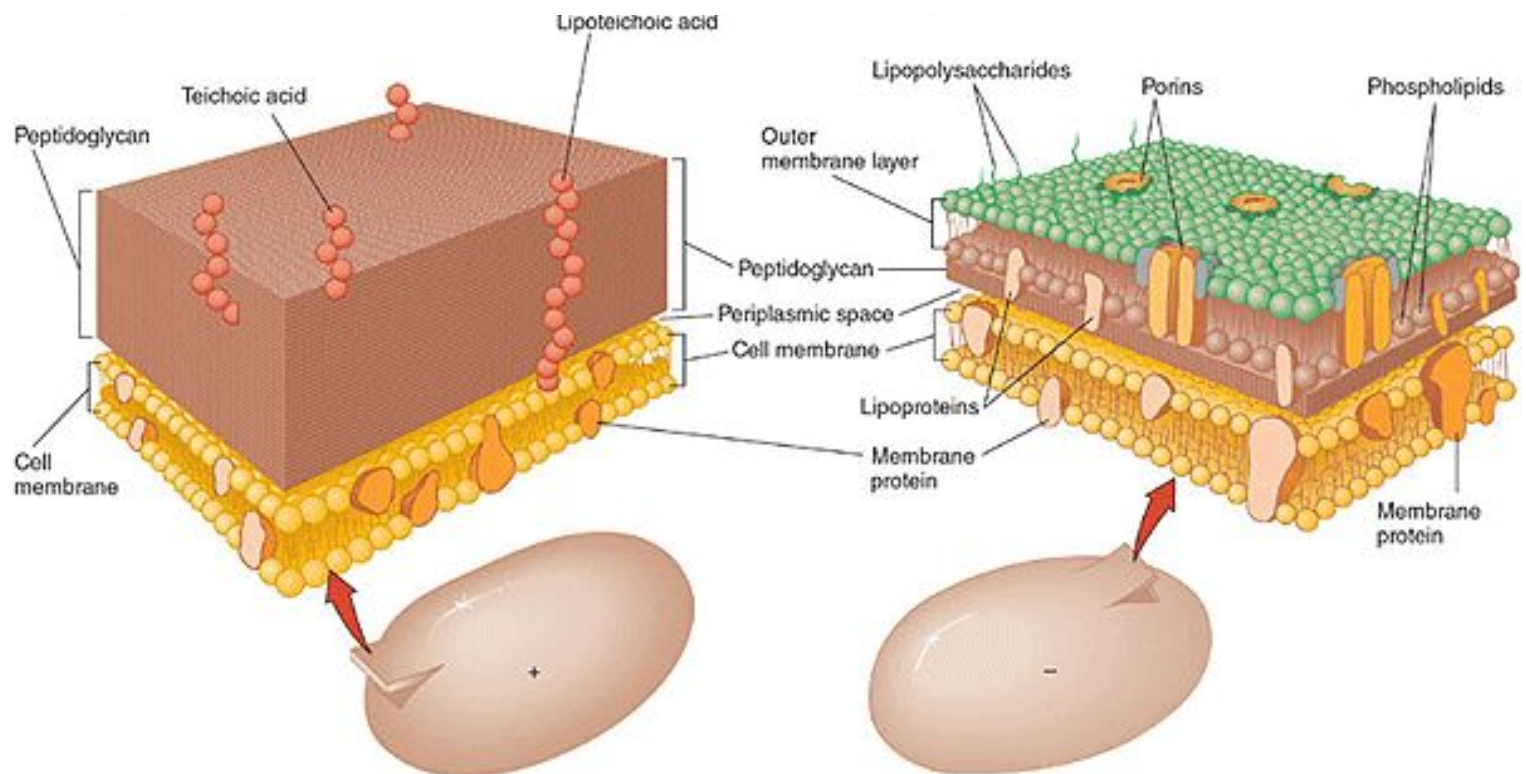
pET EXPRESNÍ SYSTÉM



PŘÍPRAVA BUNĚČNÉHO EXTRAKTU

Podstatou je lyze buňky a odstranění buněčných obalů

- Buněčné stěny u G+/G- bakterií či kvasinek, proteinové kapsidy u virů



ODSTRANĚNÍ OBALŮ CHEMICKY

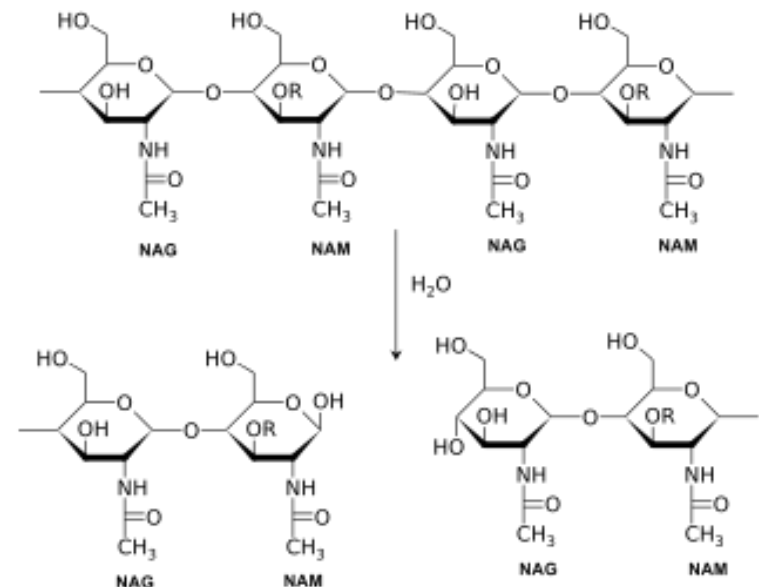
- Chemická činidla narušují integritu buněčných stěn
- Důležité je chemické složení buněčné stěny
- Druhé činidlo pak naruší buněčnou membránu (lipidy)
- Klasický postup u *E. coli* a příbuzných bakterií:

lyzozym + EDTA + SDS

...a jak to funguje?

MECHANISMUS ÚČINKU LYSOZYMU

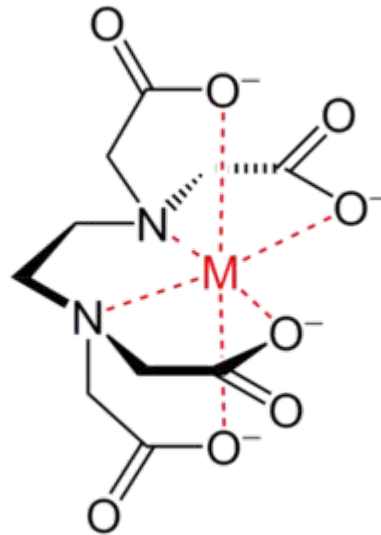
- EC 3.2.1.17, muramidáza, patří mezi glykanhydrolázy
- Hydrolýza vazeb 1,4- β mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminem v peptidoglykanu



MECHANISMUS ÚČINKU EDTA

Etylendiamin tetraacetát (EDTA)

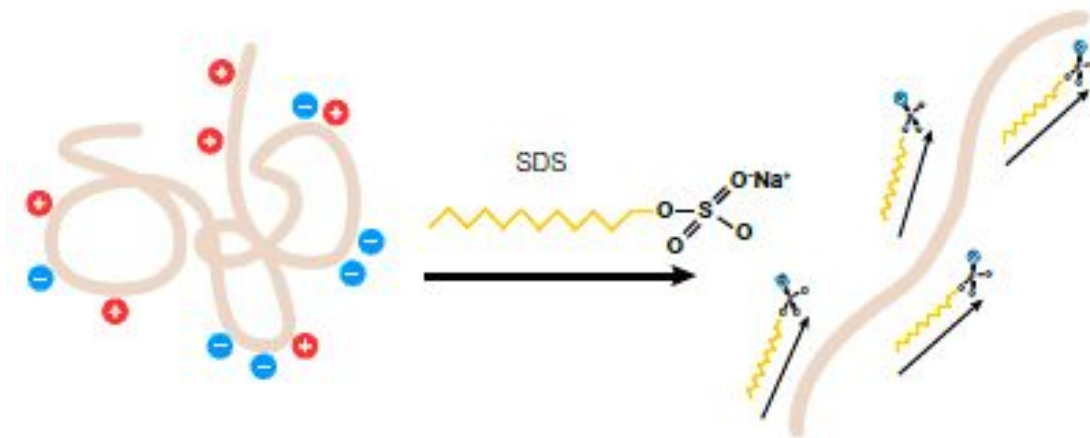
- Chelatační činidlo, vychytává Mg^{2+} , které pomáhají udržovat integritu buněčných obalů
- Inhibuje nukleázy s kofaktorem Mg^{2+} , které by mohly degradovat NK



MECHANISMUS ÚČINKU SDS

Dodecylsulfát sodný (SDS)

- Aniontový detergent
- Rozrušuje vrstvu fosfolipidů ve vnitřní či vnější membráně
- Narušuje nekovalentní vazby proteinů a denaturuje je

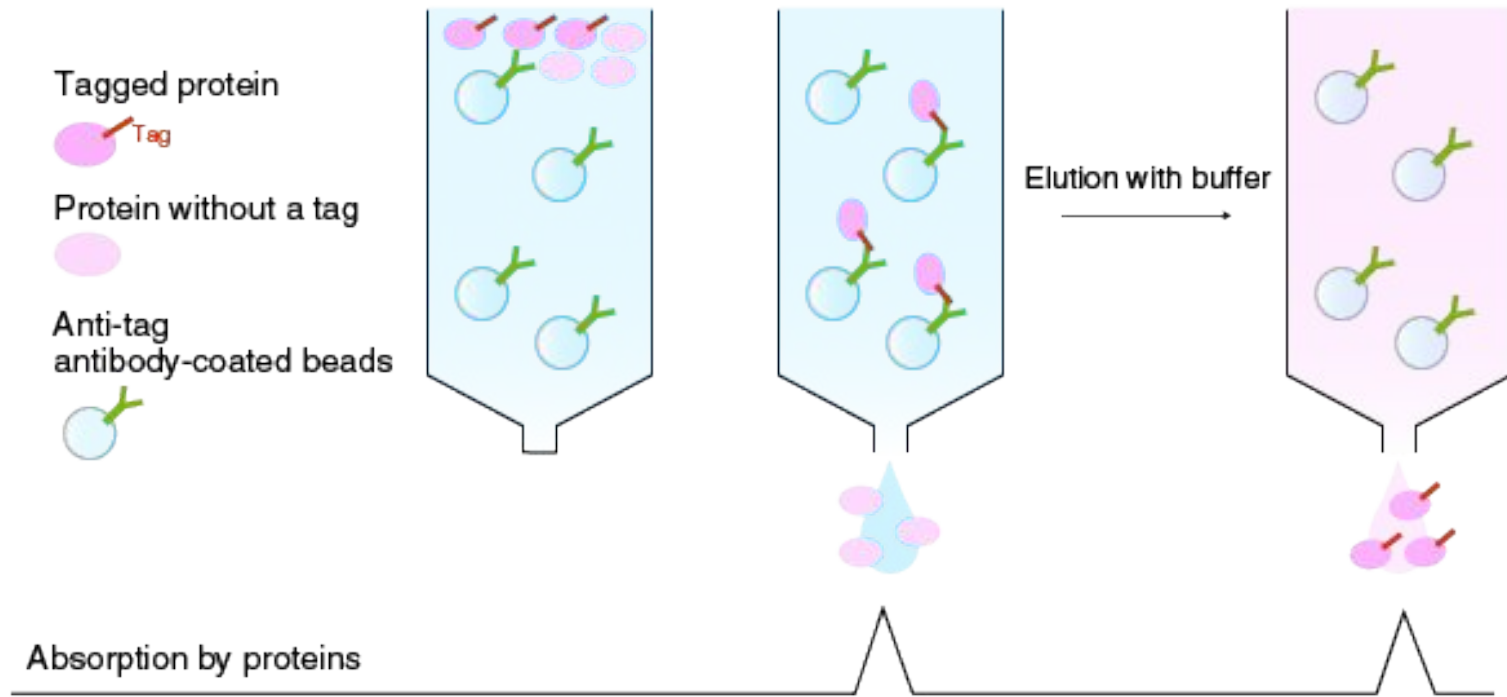


AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

Založena na vysoce specifických interakcích biomolekul

- Enzym-substrát, protilátka-antigen, receptor-ligand, protein-NK, rekombinantní protein-protilátka atd.
- Stacionární fázi tvoří jedna z interagujících molekul vázaná na pevný nosič
- Vazebný partner je vychytáván ze směsi v mobilní fázi
- **Eluce pufry o \uparrow či \downarrow pH či iontové síle** (změna konformace či náboje) nebo s \uparrow **konc. ligandu** (kompetice)

AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE



<http://ruo.mbl.co.jp>

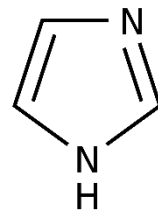
AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE

- Komerčně dostupné předplněné kolony s matricí
- Nejčastějšími nosiči jsou polysacharidové gely (agaróza),
celulóza, polyakrylamid
- Různé vstupní materiály: bakteriální či kvasinkový lyzát, růstové médiu, krevní sérum...
- Nejčastější využití pro purifikaci NK či proteinů

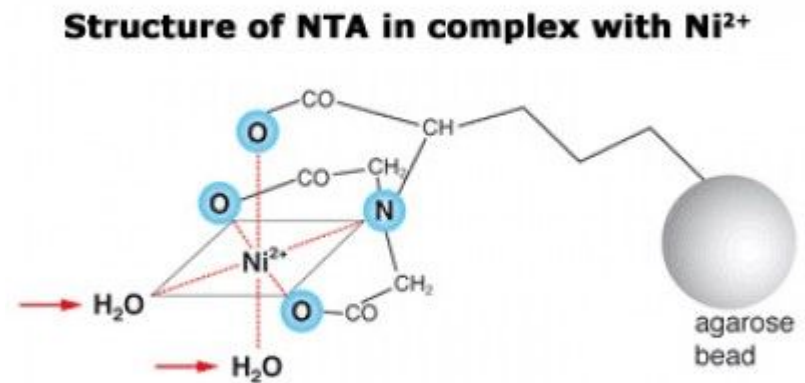


Ni-NTA METALOAFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

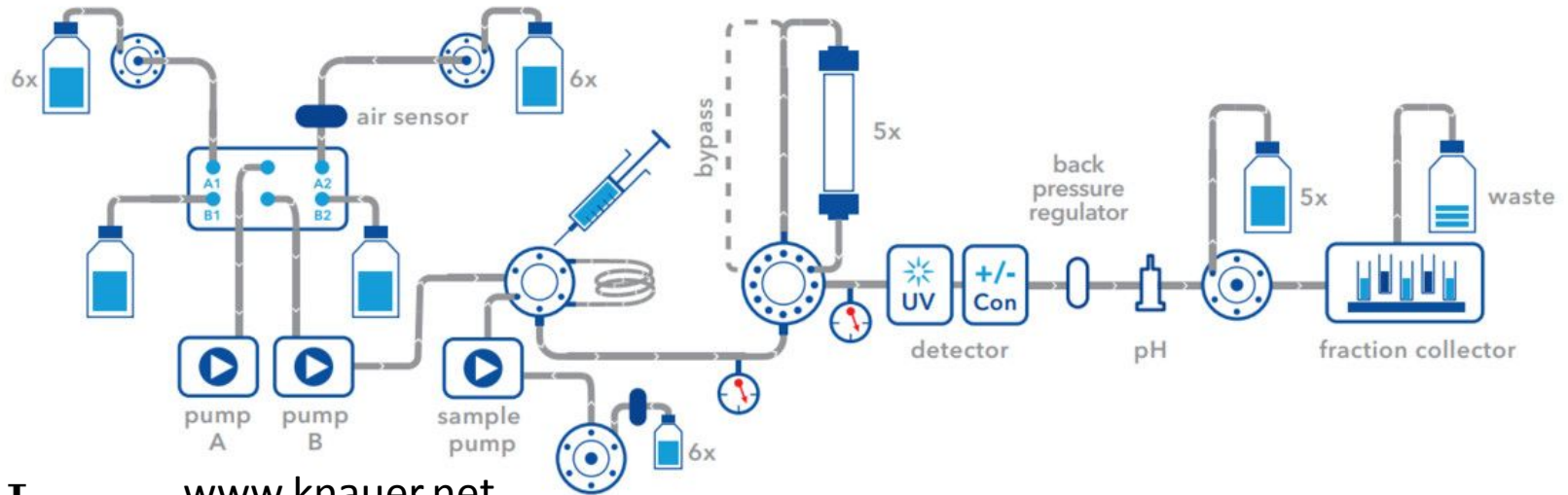
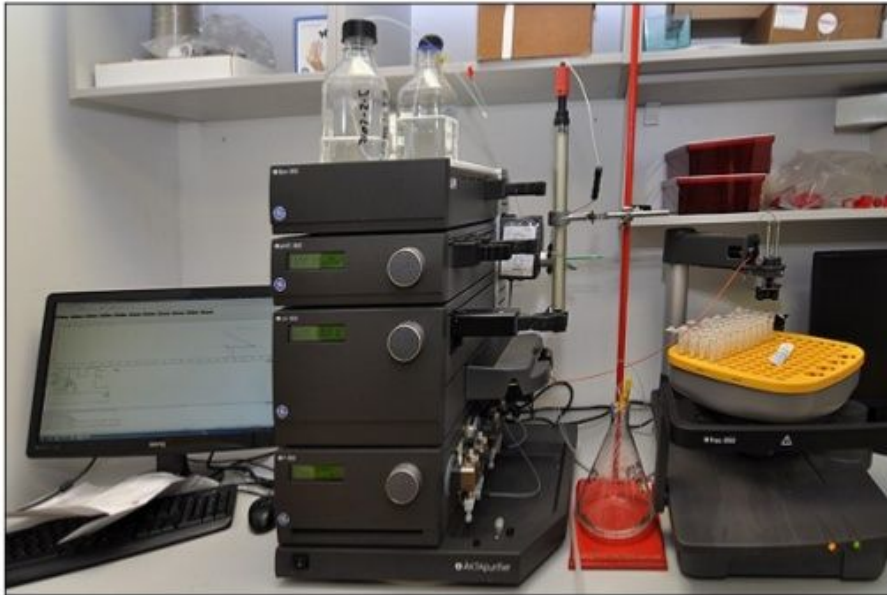
- Založena na silné vazbě mezi histidinem a iontem Ni v zásaditém pH
- 6xHis tag na N nebo C konci rekombinantního proteinu
- Ni-NTA (nitriltrioctová k.) agaróza jako stacionární fáze



imidazol

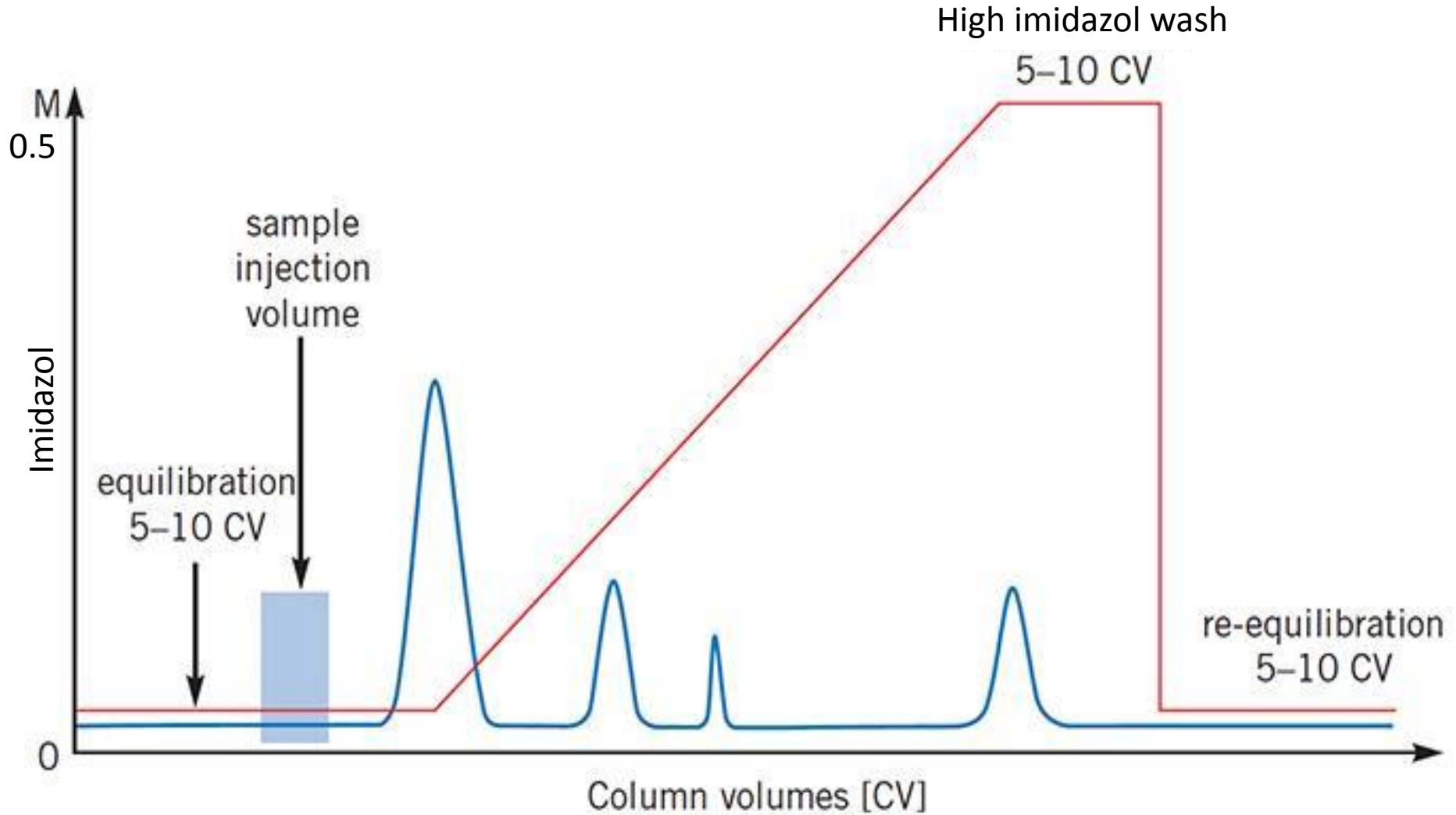


FPLC (FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY)



www.knauer.net

FPLC CHROMATOGRAM



POLYAKRYLAMIDOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (PAGE)

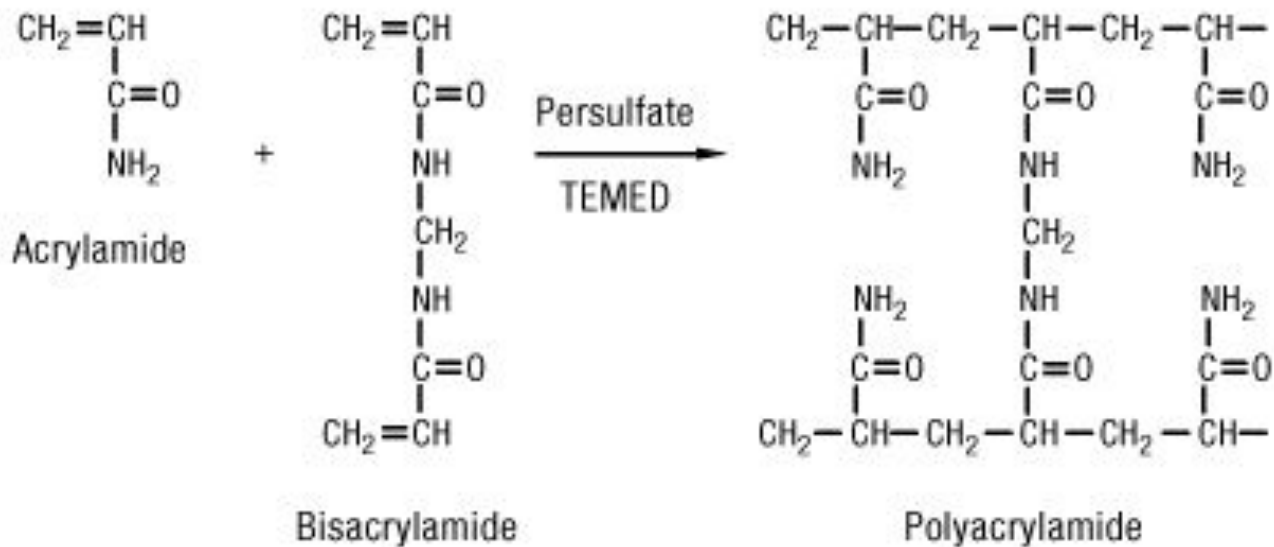
Nativní PAGE a SDS (sodium dodecil sulfát) PAGE

- Proteiny rozděleny na polyakrylamidovém gelu na základě jejich elektroforetické mobility
- Ta je funkcí délky AA řetězce (Mw), konformace (tvaru) a náboje molekuly
- U SDS-PAGE na tvaru molekuly nezáleží, protože je denaturována teplem a detergentem dodecylsulfátem

M U N I
S C I

podným, který zároveň AA řetězci dodá negativní náboj

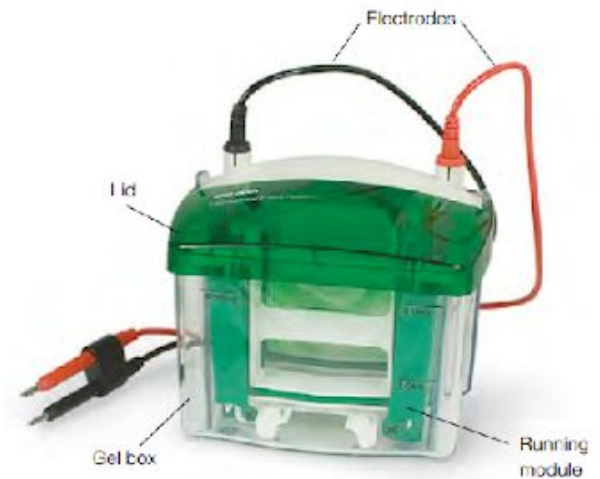
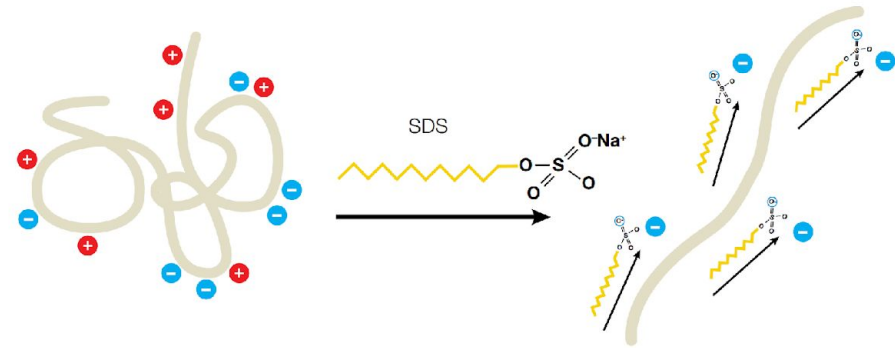
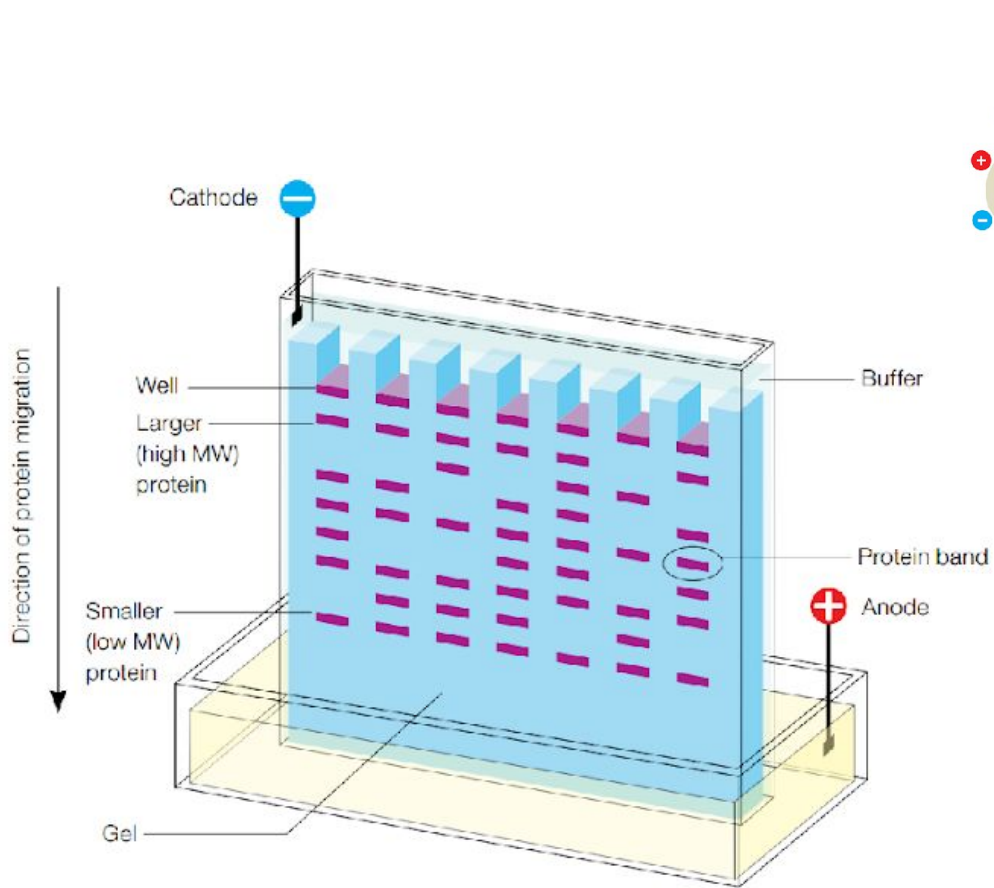
POLYAKRYLAMIDOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (PAGE)



https://www.youtube.com/watch?v=EDi_n_0NiF4

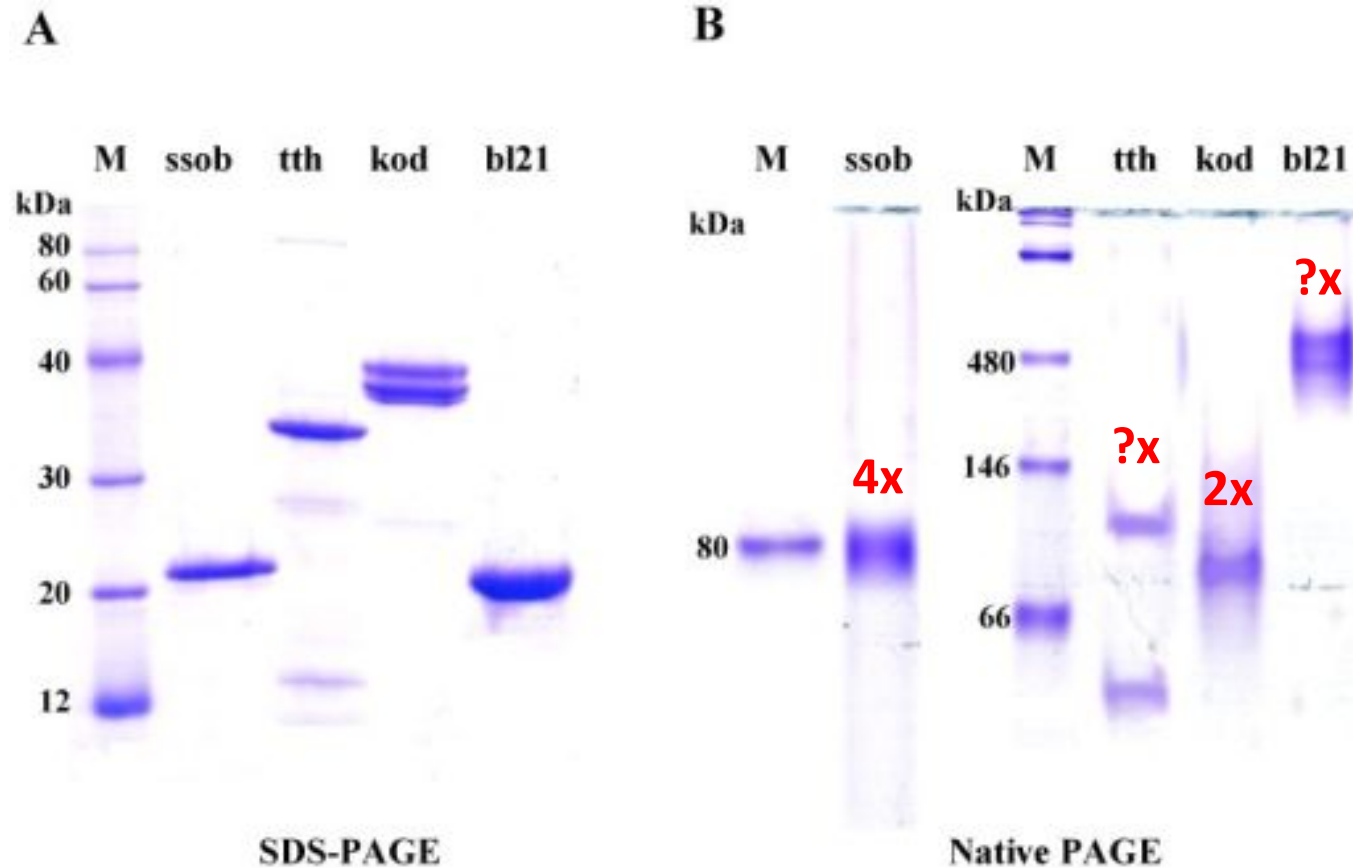


NATIVNÍ VS. DENATURUJÍCÍ PAGE



http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf

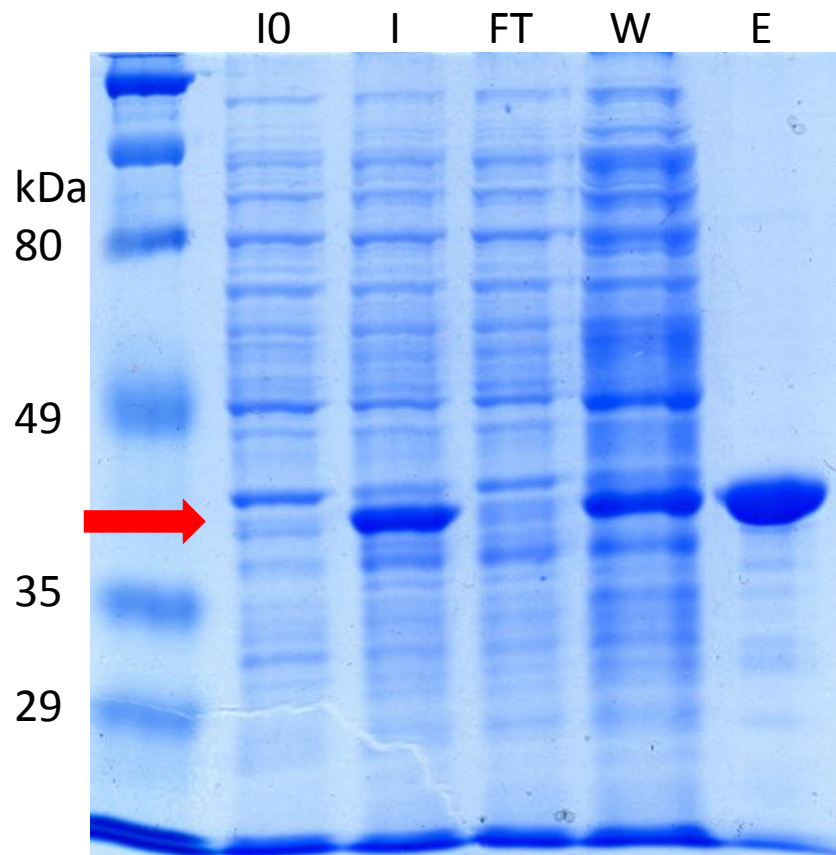
NATIVNÍ VS. DENATURUJÍCÍ PAGE



Shi *et al.* (2013) Systematic functional comparative analysis of four single-stranded DNA-binding proteins and their affection on viral RNA metabolism. PLoS ONE, 8(1):e55076

SDS-PAGE PO PURIFIKACI: VÝSLEDEK

GFP-CtDoc-His
(36,5 kDa)



BglC-CtDoc-His
(63,5 kDa)

