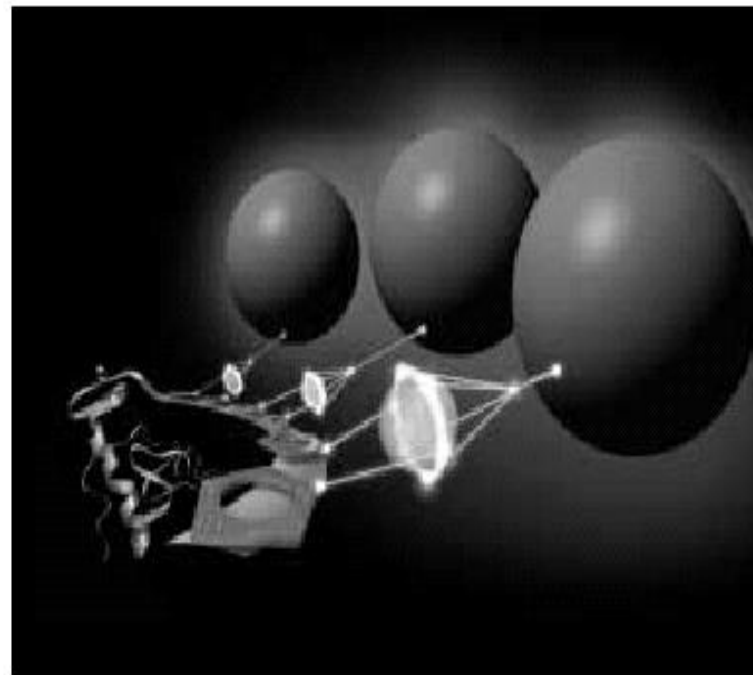
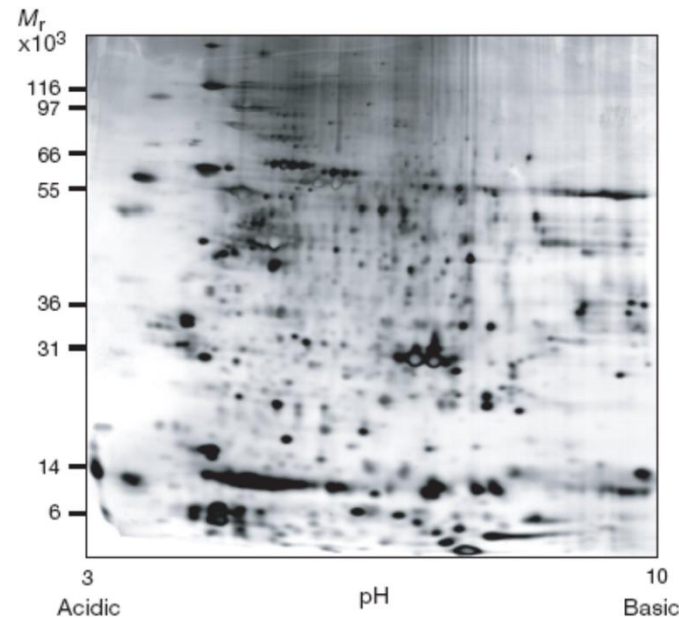


# Purifikace rekombinantních protein



# Purifikace proteinu z komplexní směsi makromolekul přítomných v biologickém vzorku



Analýza buněného extraktu 2D elektroforézou

ÉN kolik tisíc proteinů s různými vlastnostmi (~5000-8000) a v různých množstvích (aktin ~ 10%, unikátní transkripční faktor < 0,001% z celkového množství proteinů)

ÉDNA, RNA, polysacharidy, lipidy

# Dezintegrace biomasy

**Fyzikální metody:** sonikace ultrazvukem, tlakem v pístroji French press, osmotický šok, statické síly v různých typech mlýnků a homogénizátorů  
- při sonikaci i mechanických metodách nutno chladit!

**Chemické:** detergenty, chelátory v lyzáčních pufrách, organická rozpouštědla  
- látky mohou interferovat s následnou purifikační metodou

**Enzymatické:** nutno volit podle expresního systému  
Lysozym pro bakterie, lytikázu nebo zymolázu (glukanázy) pro kvasinky.

Při všech lyzáčních postupech dochází k destrukci buněk a uvolnění jejich obsahu včetně proteolytických enzymů. Proto je vhodné do lyzáčního pufru přidávat inhibitory proteáz, které v průběhu dezintegrace i dalších kroků zabrání degradaci produktu.

*Neflza nemeí í í í í í í í*

***1. Pro ???***

**Pro jaký ú el ?**

***2. Jak ???***

**Jak protein detekovat?**

***3. Co ???***

**Jaké vlastnosti má protein ?**

# 1. Pro ???

# Pro jaký účel ?

<b>Aplikace</b>	<b>Množství</b>	<b>čistota</b>	<b>Poznámka</b>
<b>Identifikace</b>	<b>0,002-0,2 µg</b>	<b>vysoká (&gt;95%)</b>	ÉEdmanovo odbourávání (5-10 pmol), přístupy hmotnostní spektroskopie (0,2-1 pmol)
<b>Produkce protilátek</b>	<b>µg-mg</b>	<b>střední-vysoká</b>	ÉPro imunizaci: ~ 0,1 µg proteinu É čím větší čistota tím větší a rychlejší odpověď. pro získání vysoce specifické imunitní odpovědi.
<b>Enzymologie</b>	<b>1-5 mg</b>	<b>vysoká &gt; 95 %</b>	ÉMnožství proteinu závisí na citlivosti analýzy. É čistota závisí na specifitě analýzy a ovlivní výsledek analýzy kontaminacími.
<b>Biofyzikální studie</b>	<b>mg</b>	<b>vysoká (&gt;95%)</b>	ÉCD spektroskopie, rezonance povrchových plasmonů, fluorimetrie, analytická ultracentrifugace, UV spektroskopie
<b>3D struktura (krystalizace, NMR)</b>	<b>10-20 mg</b>	<b>vysoká (&gt;95%)</b>	ÉHledání krystalizačních podmínek ~ 1-2 mg proteinu, získání krystalu o velikosti dostatečné pro rentgenovou difrakci 5-10 mg proteinu ÉPro první 1-D NMR spektra se vyžaduje ~ 0,5 µmol proteinu, protein (velikost 5-20kDa) značený <sup>15</sup> N / <sup>13</sup> C je nutný pro vyřešení struktury.
<b>Farmaceutické účely</b>	<b>mg-kg</b>	<b>vysoká (99,9%)</b>	ÉPro klinické účely nesmí proteiny obsahovat pyrogeny a bakteriální toxiny a musí být velmi stabilní kvůli dlouhodobému skladování.

## 2. *Jak???*

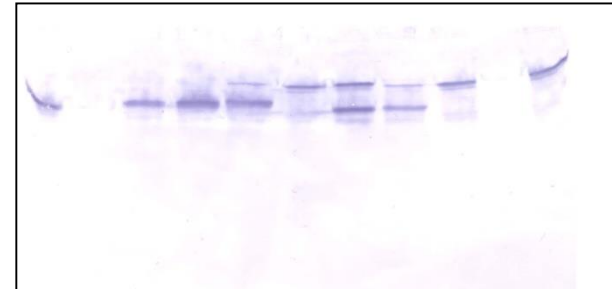
# Jak protein analyzovat?

**1. Polyakrylamidová gelová elektroforéza za denaturujících (SDS PAGE) nendenaturujících podmínek (NATIVE PAGE) se specifickou detekcí :**

**Detekce proteinu zájmu b hem jeho purifikace**

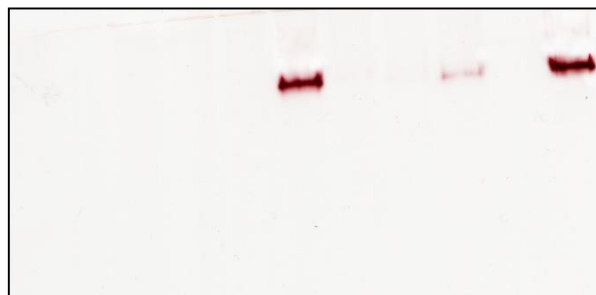
ÉPomocí protilátek

SDS PAGE s následných  
westernovým p enosem



**Sledování biologické aktivity proteinu b hem purifikace**

ÉU enzym nap . barvení v gelu pomocí chromogenních substrát



nativní PAGE, zymogram

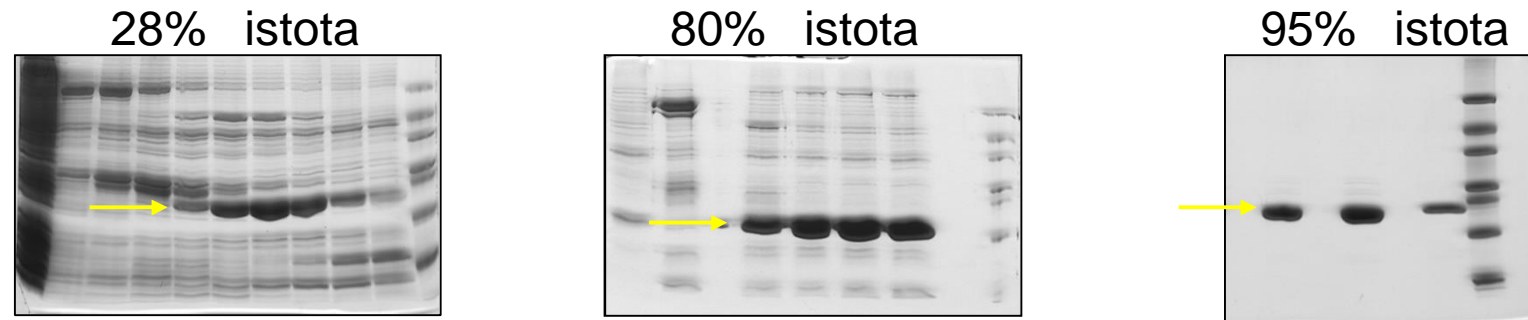
## 2. *Jak???*

## Jak protein analyzovat?

2. Polyakrylamidová gelová elektroforéza za denaturujících podmínek (SDS PAGE) s nespecifickou detekcí

ÉBarvení pomocí Coommasie blue, st íbra,...

ÉSledování istoty purifikovaného proteinu



## 2. *Jak???*

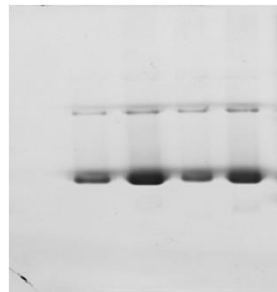
## Jak protein analyzovat?

### 3. Polyakrylamidová gelová elektroforéza za nativních podmínek s nespecifickou detekcí

Barvení pomocí Coommasie blue, stříbra,...

### Sledování homogenity purifikovaného proteinu

Nativní PAGE



— Dimer  
— Monomer

### 4. Stanovení koncentrace proteinu

Nejvíce využívané metody: dle Bradfordové, Lowryho metoda, ...



### 3. Co???

## Jaké vlastnosti má protein ?

Informace o proteinu zájmu a p íbuzných proteinech z databází nebo z pilotních experiment :

ÉVelikost proteinu (SDS PAGE)

ÉIzoelektrický bod (izoelektrická fokusace)

ÉStabilita (pH, teplota, p ítomnost solí, inhibitor proteas, additiv zaji– ujících rozpustnost proteinu)

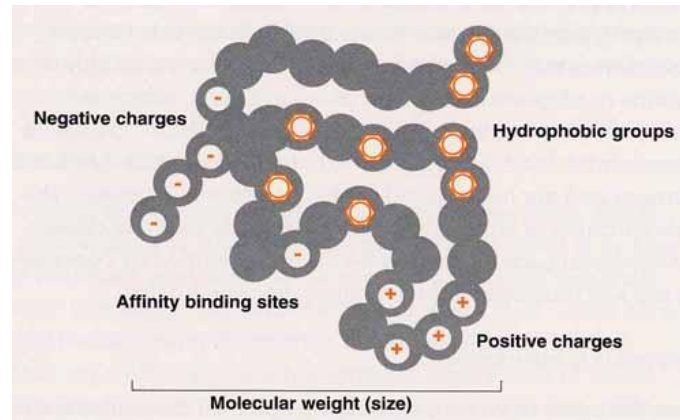
2D a nativní PAGE

ÉKomplexita vzorku, vlastnosti proteinu zájmu a i ostatních kontaminujících protein

Informace o proteinu zájmu a o p íbuzných proteinech z literatury:

ÉStrategie purifikace (metody, pufry, stabilita proteinu, í ..)

# Vlastnosti/purifikační metody



Rozpustnost

precipitace např. síranem amonným, nízké/vysoké pH

Stabilita

teplotní precipitace

Velikost/tvar

gelová filtrace (gelová permeační chromatografie)

pI (povrchový náboj)

iontovým výměnnou chromatografií

Hydrofobicitá

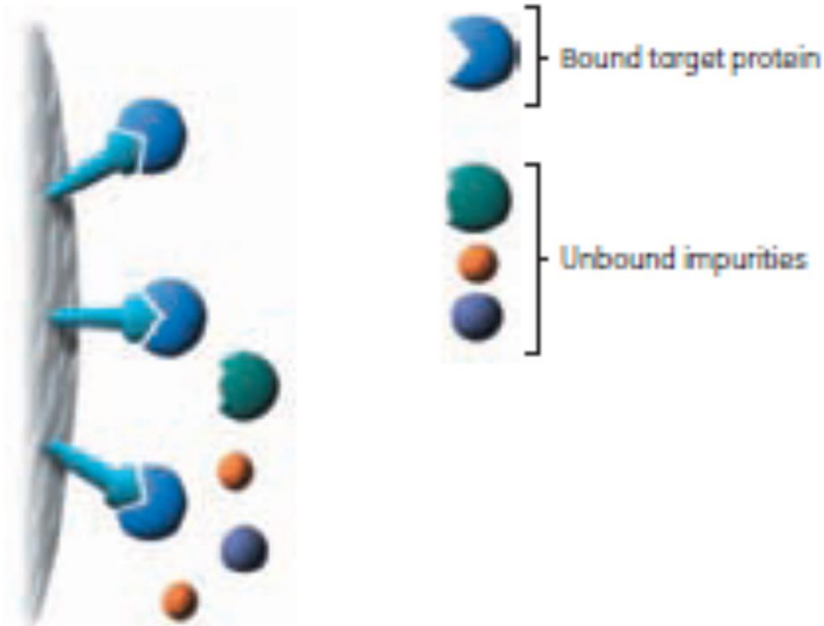
hydrofóbní chromatografie

Specifická vazba

afinitní chromatografie

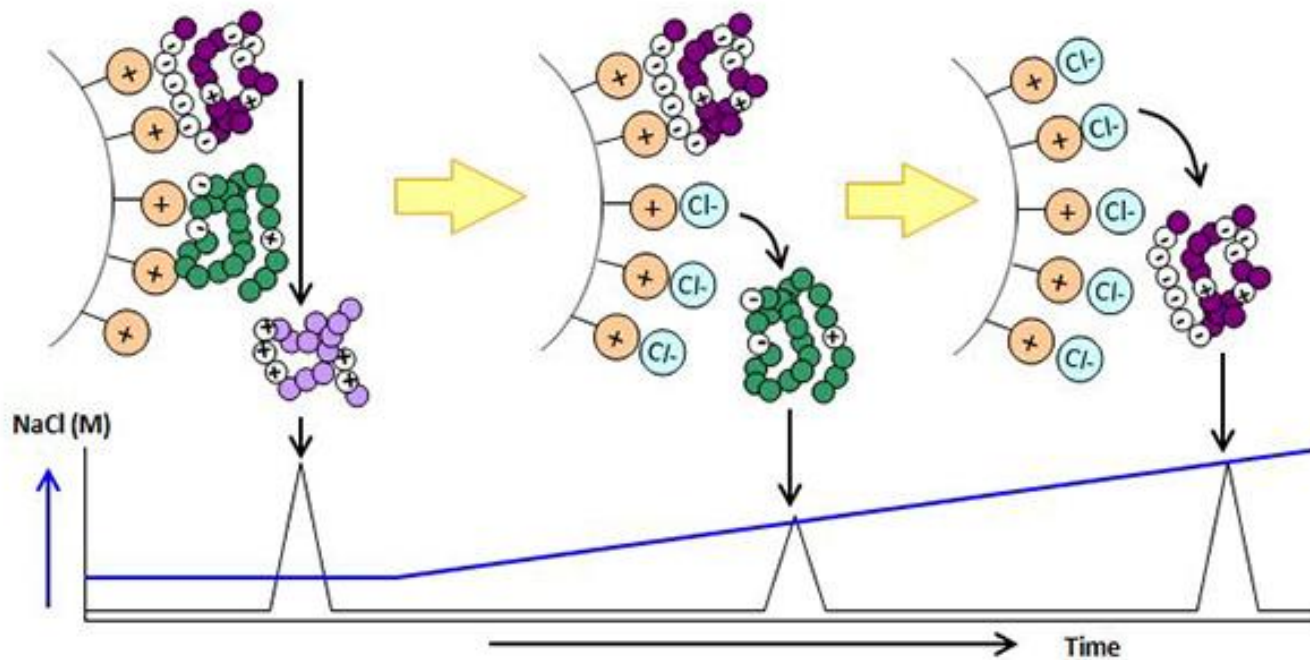
# Afinitní chromatografie

- specifická vazba mezi molekulami
- protein zájmu je translačně fúzovaný s tzv. afinitním tagem/kotvou (např. polyhistidin, glutathion-S-transferáza, atd.).
- nejčastěji se jedná o specifickou interakci afinitních fúzních tagů s ligandy (např. kov, redukovaný glutathion, atd.) v chromatografických maticích



# Iontově výměnná chromatografie

- separace na základě celkového náboje



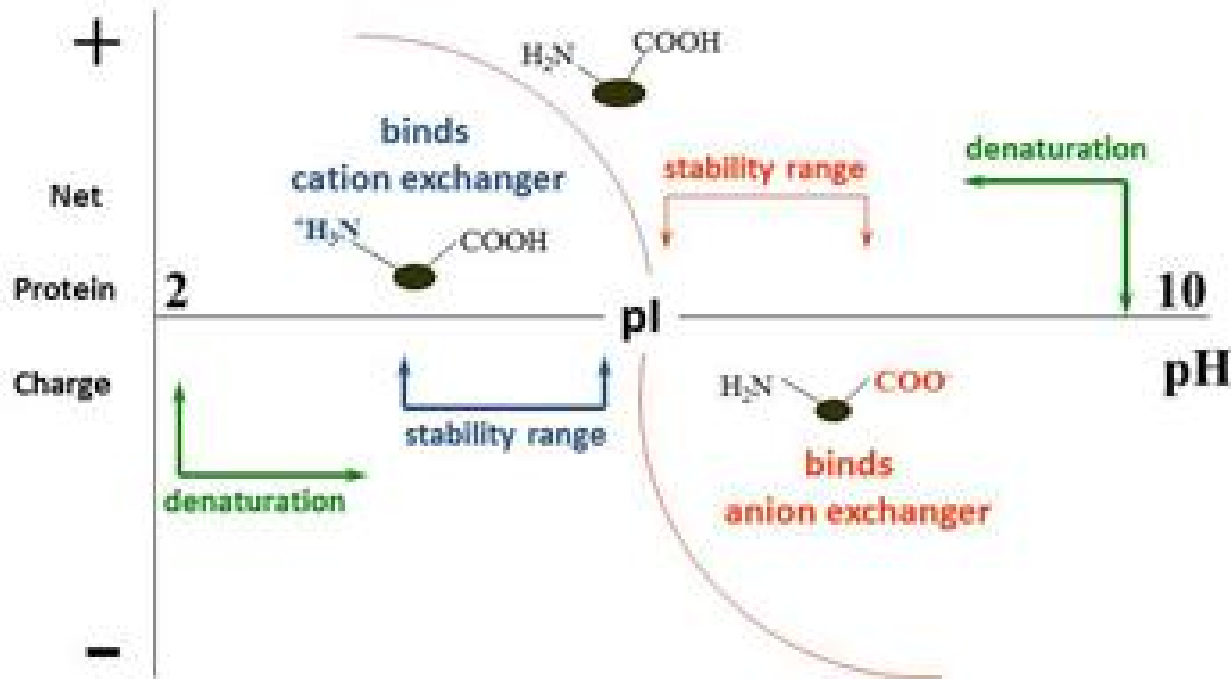
Gradient se zvyšující se koncentrací soli (NaCl)

Cl<sup>-</sup> kompetuje s proteinem o vazbu na matrici

Stacionární fáze: média s kationtovými a aniontovými skupinami

Mobilní fáze: opačný iont přidán do pufru .

# Iontová výměnná chromatografie



Resin Type	Cation Exchanger	Anion Exchanger
Net charge of molecule of interest	+	-
Charge of resin	-	+
Running conditions	0.5–1.5 pH units below the pI of the molecule of interest	0.5–1.5 pH units above the pI of the molecule of interest

Funkční skupiny používané na iontoměnných maticích

## Anex (anion exchanger)

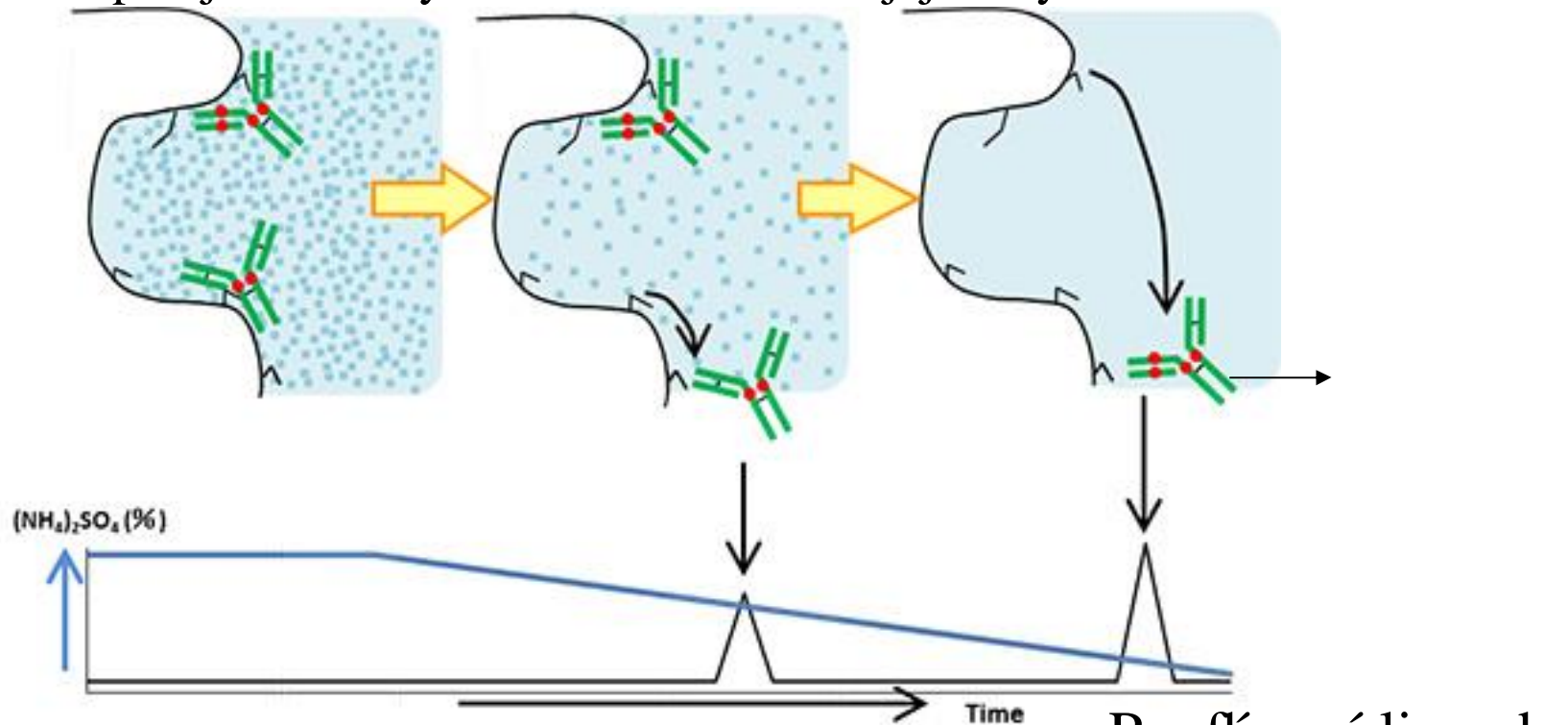
Quaternary ammonium (Q)	strong	$-\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$
Diethylaminoethyl (DEAE)*	weak	$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$
Diethylaminopropyl (ANX)*	weak	$-\text{CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$

## Katexy (cation exchanger)

Sulfopropyl (SP)	strong	$-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$
Methyl sulfonate (S)	strong	$-\text{CH}_2\text{-SO}_3^-$
Carboxymethyl (CM)	weak	$-\text{CH}_2\text{-COO}^-$

# Hydrofóbní chromatografie

- separuje molekuly na základ rozdíl v jejich hydrofobicit



- vzorek aplikován v pufru s vysokou koncentrací solí

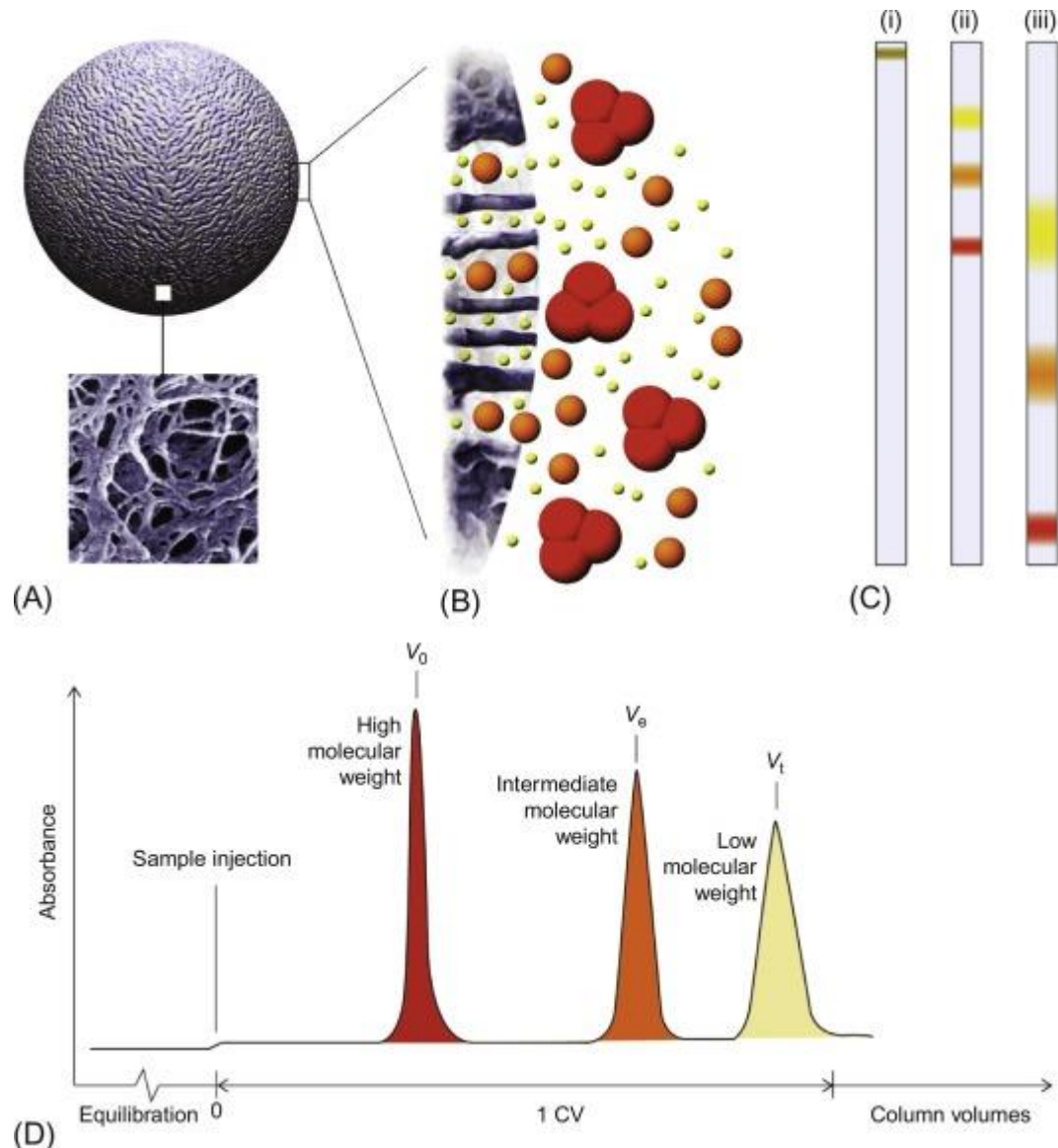
- s 1 snižuje solvataci a exponují se hydrofobní oblasti

## Používané ligandy

Phenyl	<chem>-O-c1ccccc1</chem>
Butyl-S	<chem>-S-(CH2)3-CH3</chem>
Butyl	<chem>-O-(CH2)3-CH3</chem>
Octyl	<chem>-O-(CH2)7-CH3</chem>
Ether	<chem>-O-CH2-CHOH-CH2-OH</chem>
Isopropyl	<chem>-O-CH-(CH3)2</chem>

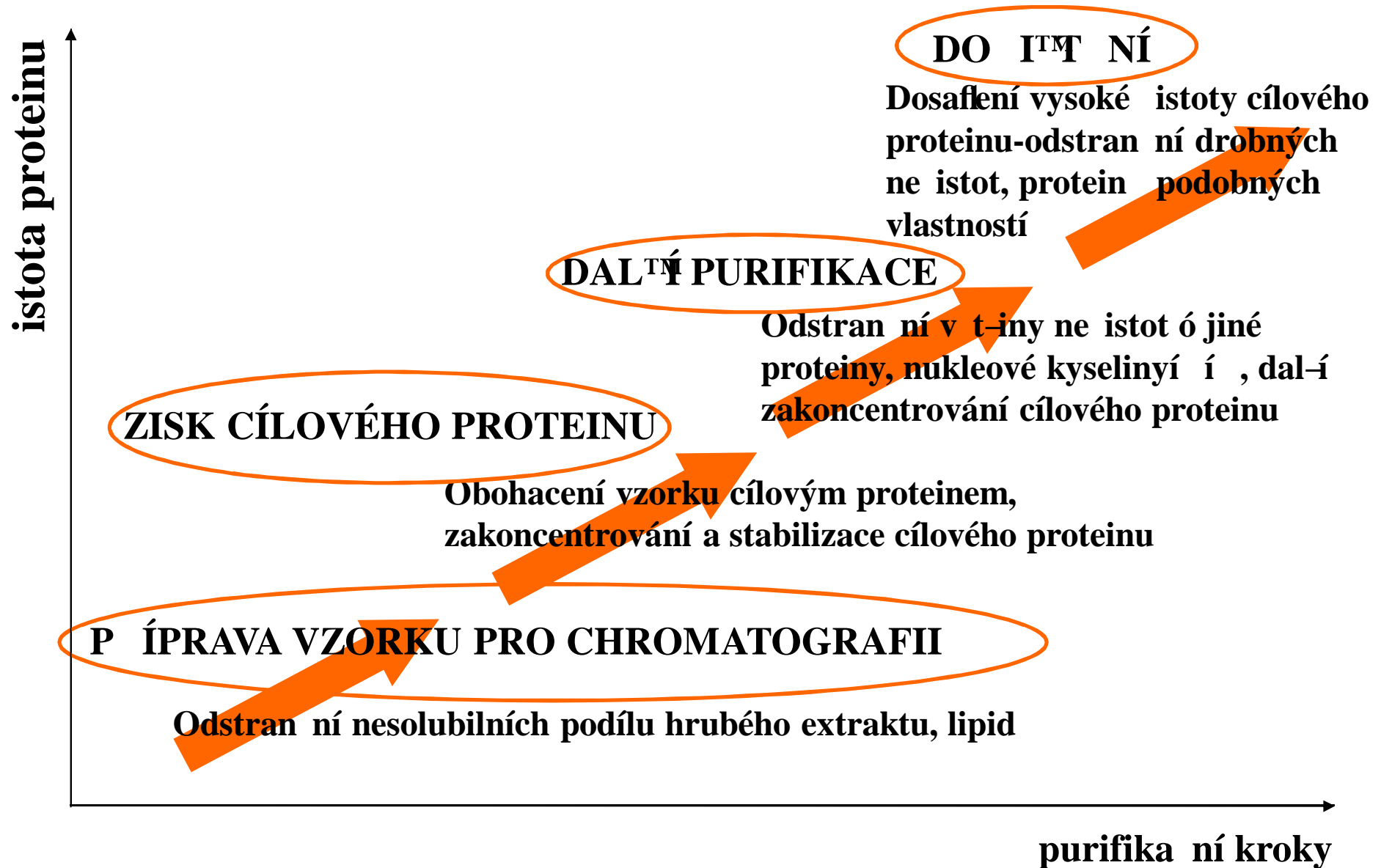
# Gelová permea ní chromatografie (gelová filtrace)

- “ Gelová permea ní chromatografie rozdíl je proteiny na základě velikosti a trojrozměrného tvaru.
- “ Matrice složená z kulatých porózních částic, na které se molekuly proteinu neváží.
- “ Molekuly se pohybují skrz porézní kuličky. Menší molekuly difundují do pórů kuliček a proto se pohybují pomaleji, zatímco větší molekuly vstupují do pórů kuliček méně nebo vůbec proto se pohybují rychleji.





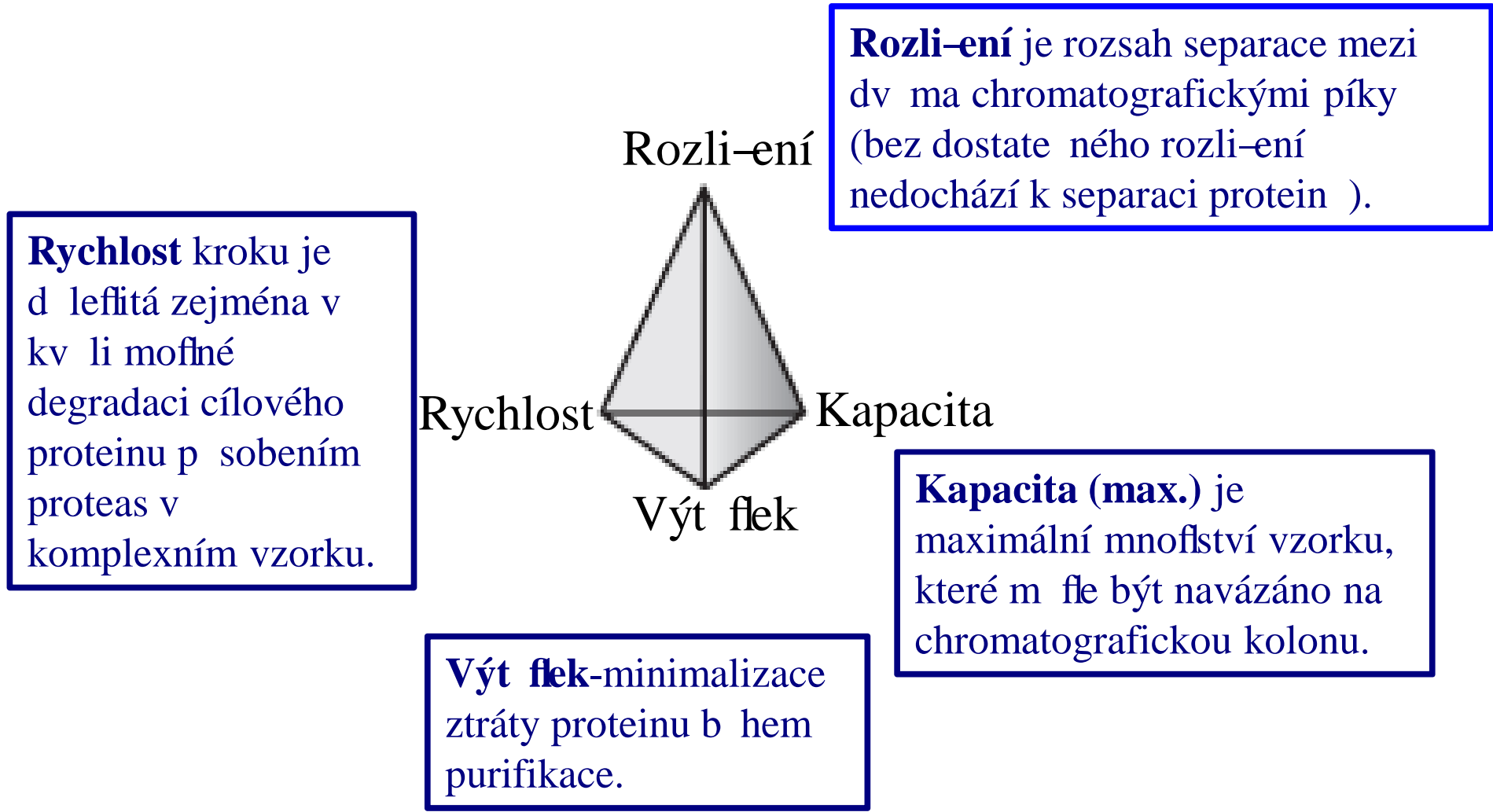
# Kolik purifikačních kroků je potřeba?





# Logická kombinace purifikačních kroků

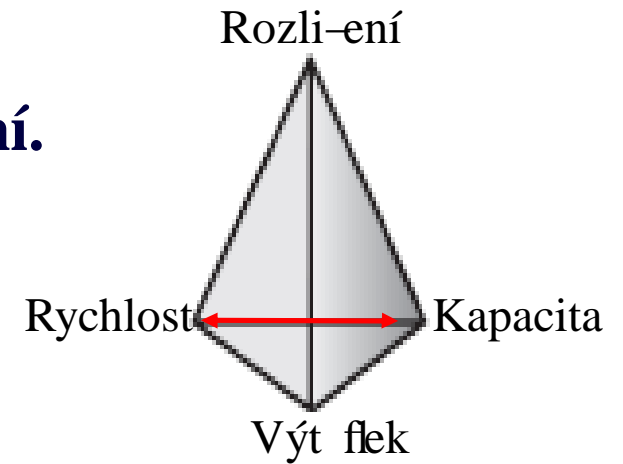
Každá separační technika je vyznačena rovnováhou mezi **tymi parametry**.



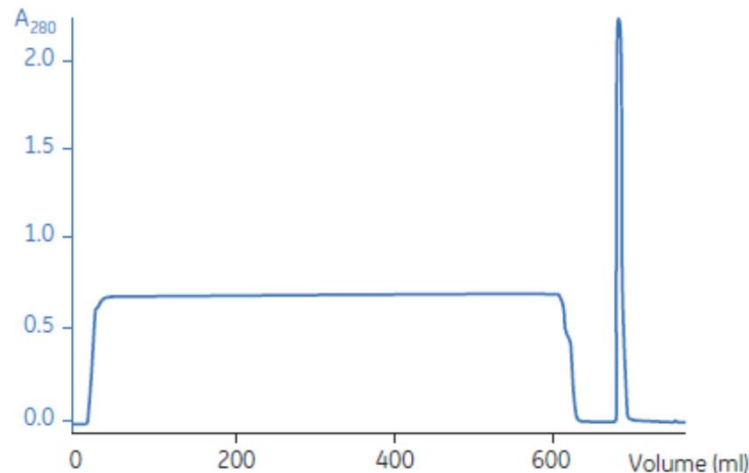
# Získ cílového proteinu z proteinového extraktu

**Cíl: rychlá izolace, stabilizace a zakoncentrování.**

**Purifikační techniky: afinitní chromatografie  
iontomní chromatografie  
hydrofóbní chromatografie**



*Column:* rProtein A Sepharose Fast Flow, XK16/20, bed height 4.8 cm (9.6 ml)  
*Sample:* 600 ml clarified cell culture containing 87.6 mg of IgG<sub>2a</sub>  
*Starting buffer:* 20 mM sodium phosphate, pH 7.0  
*Elution buffer:* 20 mM sodium citrate, pH 4.0  
*Flow rate:* 5 ml/min (150 cm/h)

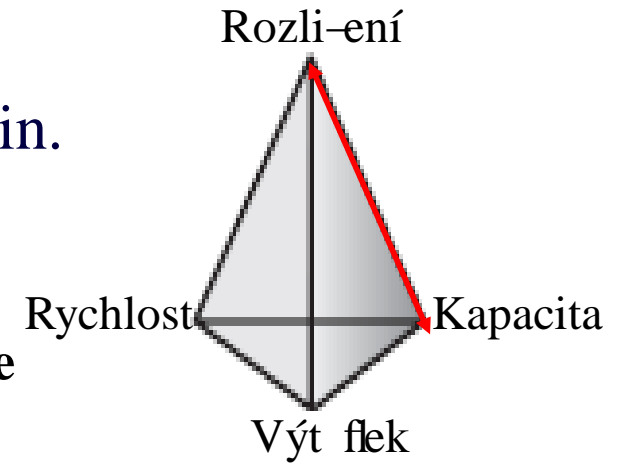


**Fig 4.5.** Example of capture step: Purification of IgG<sub>2a</sub> from clarified cell culture.

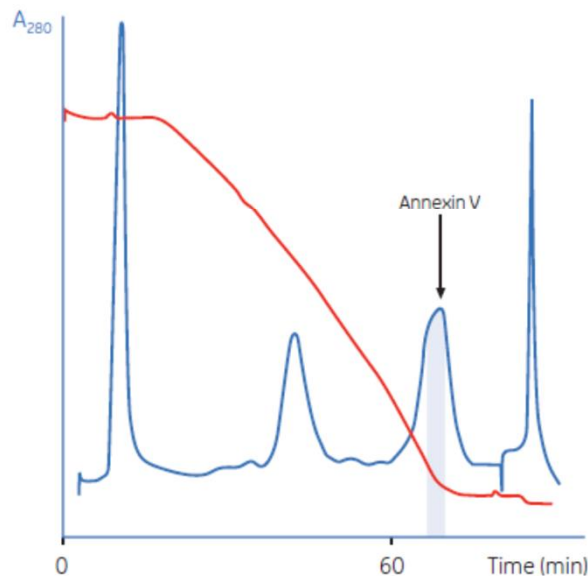
# Další purifikace proteinu

**Cíl:** Dále separovat a zakonzentrovat cílový protein.

**Purifikační techniky:** iontomní a hydrofóbní chromatografie



Column: XK 16/20 Butyl Sepharose 4 Fast Flow  
Sample: 5 ml of partially purified Annexin V expressed in *E. coli*  
Buffer A: 20 mM Sodium phosphate, pH 7.0, 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
Buffer B: 20 mM Sodium phosphate, pH 7.0  
Flow rate: 100 cm/h  
Gradient: 0 to 50% B, 20 column volumes

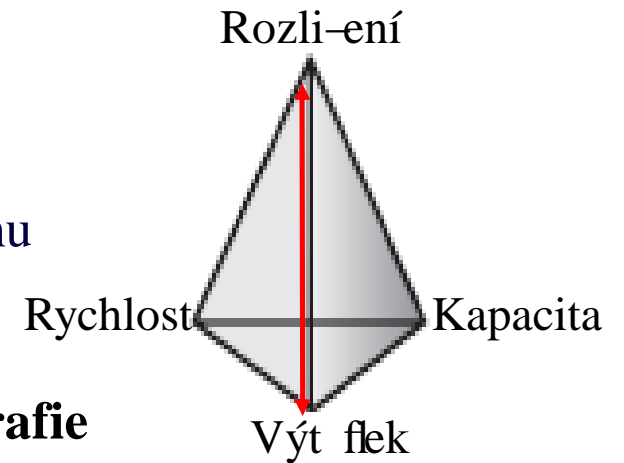


V tomto kroku se využívá eluce kontinuálními gradienty.  
Tento krok není vždy potřebný.

Fig 4.7. Example of an intermediate purification step: Purification of recombinant Annexin V by HIC.

# Do i-t ní proteinu a úprava podmínek pro jeho skladování (pH, soli, additiva)

**Cíl:** Získání produktu o požadované vysoké čistotě. Odstranění stopových kontaminací, odstranění velmi podobných proteinů, fragmentů a agregátů cílového proteinu



## Purifikační techniky: gelová permeační chromatografie

Column: XK 16/60 packed with Superdex 75 prep grade  
Sample: 1.0 ml of partially purified ZZ-brain IGF  
Buffer: 300 mM ammonium acetate, pH 6.0  
Flow rate: 0.5 ml/min (15 cm/h)

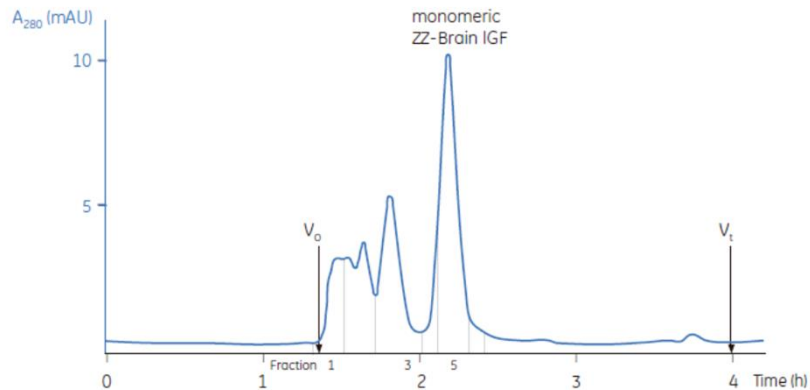


Fig 4.9. Example of polishing step: removal of dimers and multimers by GF.

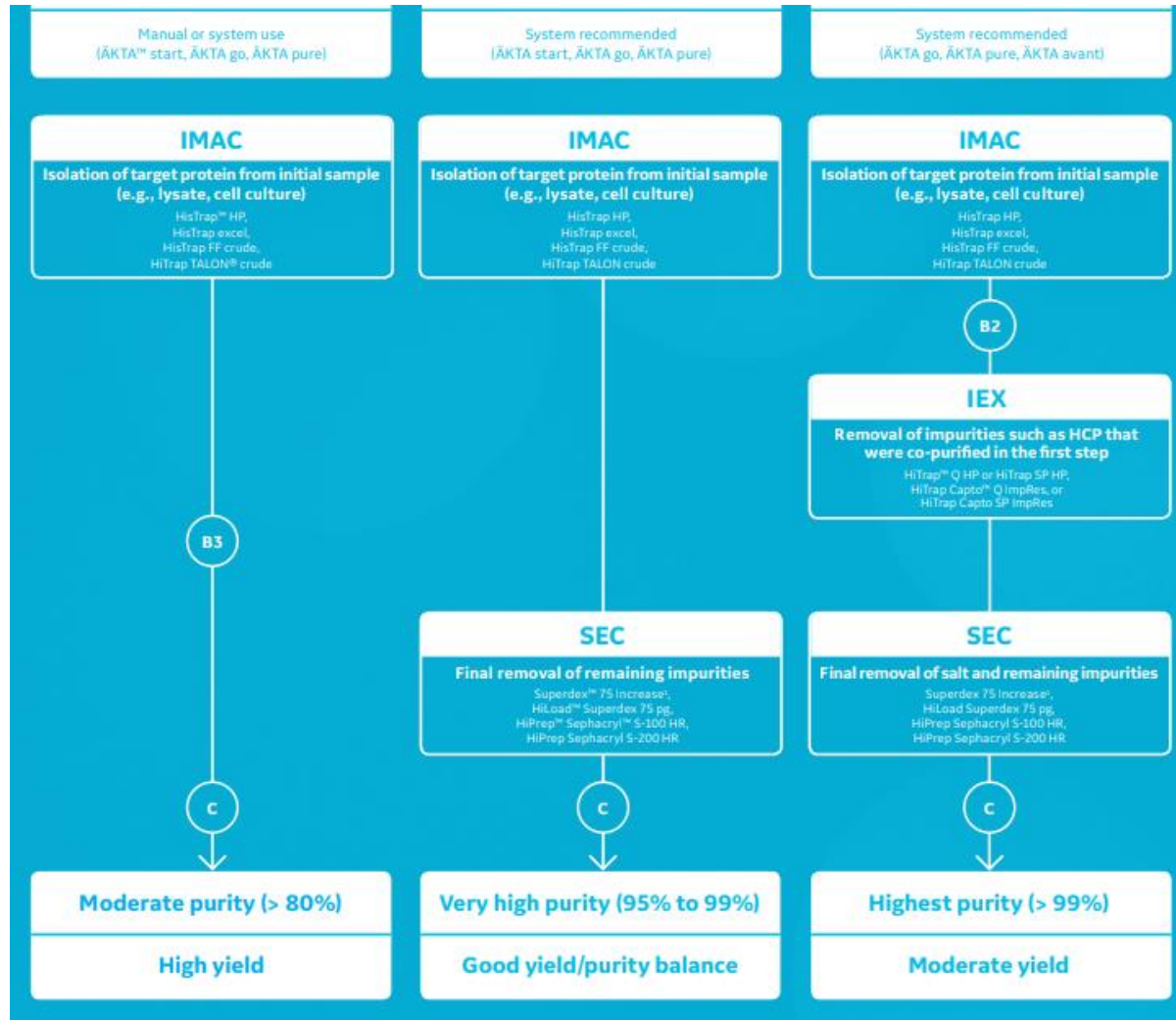
K odstranění molekul stejné velikosti je třeba využít jiných možností purifikace jako iontoměnné nebo hydrofóbní chromatografie.

# His-tagged protein purification

1 krok

2 kroky

3 kroky



**IMAC**  
Immobilized-metal  
affinity chromatography

**IEX**  
Ion exchange  
chromatography

**SEC**  
Size Exclusion  
chromatography

**B2** Buffer exchange to prepare for IEX.  
(HiTrap Desalting, HiPrep 26/10 Desalting columns)

**B3** Buffer exchange to remove imidazole or salts.  
(PD-10 Desalting, HiTrap Desalting columns)

**C** Concentration for sample volume reduction. May also be performed before SEC.  
(Vivaspin™ Sample Concentrators)

Steps in circles are optional and are applied if necessary.

# Základní zásady pro pořadí purifikačních kroků

Method	Typical characteristics		Purification phase			Sample start conditions	Sample end conditions
	Resolution	Capacity	Capture	Intermediate	Polishing		
AC	+++ or ++	+++ or ++	+++	++	+	Various binding conditions	Specific elution conditions
IMAC	+++	++	+++	++	+	For purifying histidine-tagged proteins using Ni Sepharose columns: 20-40 mM imidazole; pH > 7; 500 mM NaCl; no chelators  Other proteins: low concentration of imidazole	High concentration of imidazole, pH > 7, 500 mM NaCl
GF	++	+	+		+++	Most conditions acceptable, limited sample volume	Buffer exchange possible diluted sample
IEX	+++	+++	+++	+++	+++	Low ionic strength. pH depends on protein and IEX type	High ionic strength or pH changed
HIC	+++	++	++	+++	+++	High ionic strength, addition of salt required	Low ionic strength

# Základní zásady pro pořadí purifikačních kroků

- É Na začátku začít metody s vysokou kapacitou a malým výtěkem a rozlišením → velké množství levného vstupního materiálu.
- É Později metody s vysokým rozlišením a výtěkem, kapacita méně významná → ve vzorku již investovaná práce, množství proteinu je menší.
- É Pokud možno začít metody za sebou racionálně, bez nutnosti mezikroků, jako je výměna pufru mezi jednotlivými separačními technikami  
příklad: po precipitaci síranem amonným nebo iontoměnné chromatografii (protein je eluován z kolony za vysokých koncentrací soli) začít hydrofóbní chromatografií (vzorek dávkován na kolonu ve vysoké koncentraci soli)
- É Jednotlivé separační metody pokud možno neopakovat.
- É Čím méně kroků, tím větší výtěžnost proteinu a rychlost purifikace.



# Fúzní proteiny (tagované proteiny)

Translační fúze sekvencí kódujících rekombinantní protein a

a) krátký peptid [p . (His)<sub>n</sub>, (Asp)<sub>n</sub>, (Arg)<sub>n</sub> ... ]

b) pirozený oligopeptid [p . MBP, GST, thioredoxin í ]

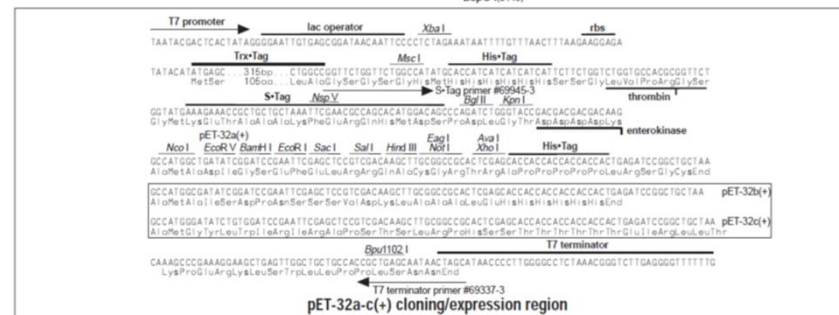
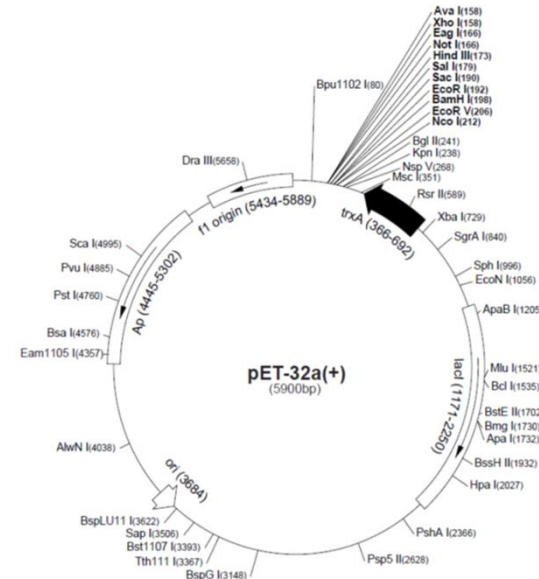
- expresní plazmidy obvykle

obsahují různé tagy/kotvy

- umístí na N- i C- konci proteinu

pET-32a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	764-780
T7 transcription start	763
Trx*Tag coding sequence	366-692
His*Tag coding sequence	327-344
S*Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites	
( <i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	1171-2250
pBR322 origin	3684
<i>bla</i> coding sequence	4445-5302
<i>ori</i> origin	5434-5889

The maps for pET-32b(+) and pET-32c(+) are the same as pET-32a(+) (shown) with the following exceptions: pET-32b(+) is a 5899bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-32c(+) is a 5901bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*HI at 198 except for *Eco*R V, which cuts at 209.





## **Proč využívat tagy?**

- **Zvýšení výtěžku rekombinantního proteinu**
- **Možnost detekce proteinu**
- **Lokalizace** **ó** signální sekvence pro transport proteinu
- **Uspádnutí purifikace rekombinantního proteinu**

<b>Fúzní partner</b>	<b>Velikost</b>	<b>Umíst ní</b>	<b>Vyufití</b>
<b>His-tag</b>	6, 8, or 10 aa	N- or C-terminus	Purification, detection
<b>Thioredoxin</b>	109 aa (11.7 kDa)	N- or C-terminus	Purification, solubility enhancement
<b>Calmodulin-binding domain (CBD)</b>	26 aa	N- or C-terminus	Purification
<b>Avidin/streptavidin <i>Strep</i>-tag</b>	8 aa	N- or C-terminus	Purification, secretion
<b>Glutathione <i>S</i>-transferase (GST)</b>	26 kDa	N-terminus	Purification, solubility enhancement
<b>Maltose binding protein (MBP)</b>	396 aa (40 kDa)	N- or C-terminus	Purification, solubility enhancement
<b>Green fluorescent protein (GFP)</b>	220 aa (27 kDa)	N- or C-terminus	Localization, detection, purification
<b>Poly-Arg</b>	5-16 aa	N- or C-terminus	Purification, solubility enhancement
<b>N-utilization substance A (NusA)</b>	495 aa (54.8 kDa)	N-terminus	Solubility enhancement

# Zvýšení výt flku rekombinantního proteinu

**Tagy zvyšující výt flk jsou proteiny nebo peptidy zapojené do:**

➤ **Zvýšení účinnosti iniciace translace (př. GST, MBP, NusA)**

- Výhoda N-terminálních tag

- Poskytují spolehlivou sekvenci pro účinnou iniciaci translace

➤ **Ochrana před proteolytickou degradací**

➤ **Pomáhají při skládání (foldingu) proteinu a zvyšují tak rozpustnost cílového proteinu**

# Zlepšení rozpustnosti rekombinantních proteinů

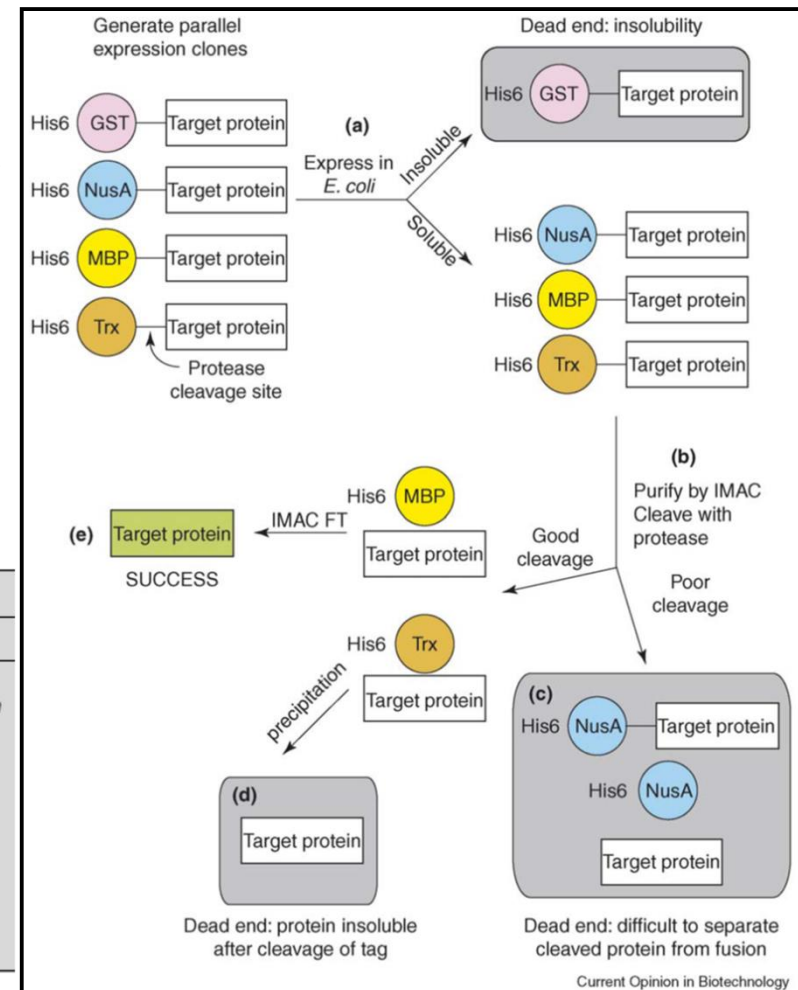
## Kotvy/tagy zvyšující rozpustnost

- N-terminální tagy
- Spíse proteinové (vysoce solubilní proteiny) než peptidy
- Fúze se solubilním partnerem často pomáhá fúznímu partnerovi se správně poskládat, což vede ke zlepšení rozpustnosti cílového proteinu
- Nemají univerzální efekt
- Mechanismus, jakým působí, není plně objasněn

Some commonly used solubility-enhancing fusion partners

Tag	Protein	Source organism
MBP	Maltose-binding protein	<i>Escherichia coli</i>
GST	Glutathione-S-transferase	<i>Schistosoma japonicum</i>
Trx	Thioredoxin	<i>Escherichia coli</i>
NusA	N-Utilization substance	<i>Escherichia coli</i>
SUMO	Small ubiquitin-modifier	<i>Homo sapiens</i>
SET	Solubility-enhancing tag	Synthetic
DsbC	Disulfide bond C	<i>Escherichia coli</i>
Skp	Seventeen kilodalton protein	<i>Escherichia coli</i>
T7PK	Phage T7 protein kinase	Bacteriophage T7
GB1	Protein G B1 domain	<i>Streptococcus</i> sp.
ZZ	Protein A IgG ZZ repeat domain	<i>Staphylococcus aureus</i>

Esposito and Chatterjee, 2006



**Schéma exprese a purifikace za použití solubilitu zvyšujících kotev.** (Esposito and Chatterjee, 2006).

# Tagy zvyšující rozpustnost a mechanismus působení

## Příklady možných mechanismů

**Maltose binding protein (MBP)** se pravděpodobně váže reverzibilně na exponované hydrofóbní oblasti nově vznikajících polypeptidů a pomáhá tak polypeptidu získat nativní konformaci mechanismem podobným chaperonům.

**NusA** zpomaluje translaci tím, že zprostředkovává transkripční pauzy, což může pomoci správnému poskládání cílového proteinu.

**Negativně nabitá tagy (peptidy)** - dochází k elektrostatickému odpuzování mezi nově vznikajícími polypeptidovými řetězci, čímž se zabráňuje jejich agregaci (Zhang et. 2004).

## **Thioredoxin a oxidoreduktáza**

Rychlá redukce intra- i inter- molekulárních disulfidických vazeb.

Thioredoxin slouží jako kovalentně navázaný chaperon nezávisle na redoxní aktivitě.

## Fúzní kotvy (tagy) využívané se k purifikaci

Kotva (tag)	Typ chromatografie	Princip separa ní techniky
Poly [His]	afinitní	vazba na kov
IgG vazná doména	afinitní	vazba na protilátku
Poly [Asp]	iontom ni ová	vazba na anion vázající matrici
Poly [Phe]	hydrofóbní	vazba na hydrofóbní matrici
<i>Strep</i> -tag	afinitní	vazba na streptavidin
Poly [Arg]	iontom ni ová	vazba na kation vázající matrici

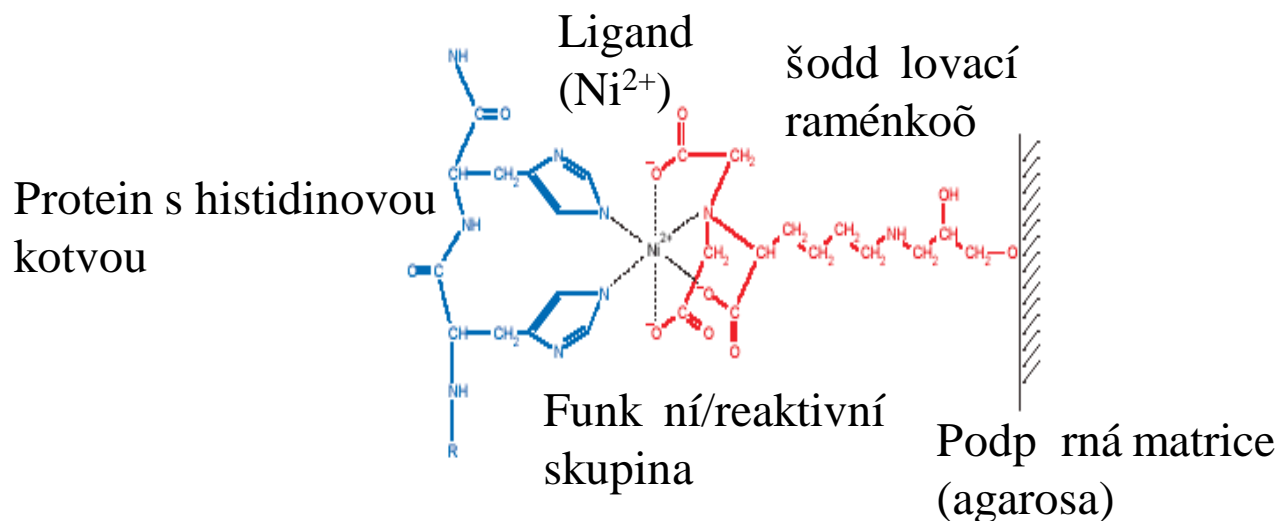
# Metalochelata ní afinitní chromatografie

ÉR.1975- uvedl Porath a kol. metodu frakcionace sérových proteinů .

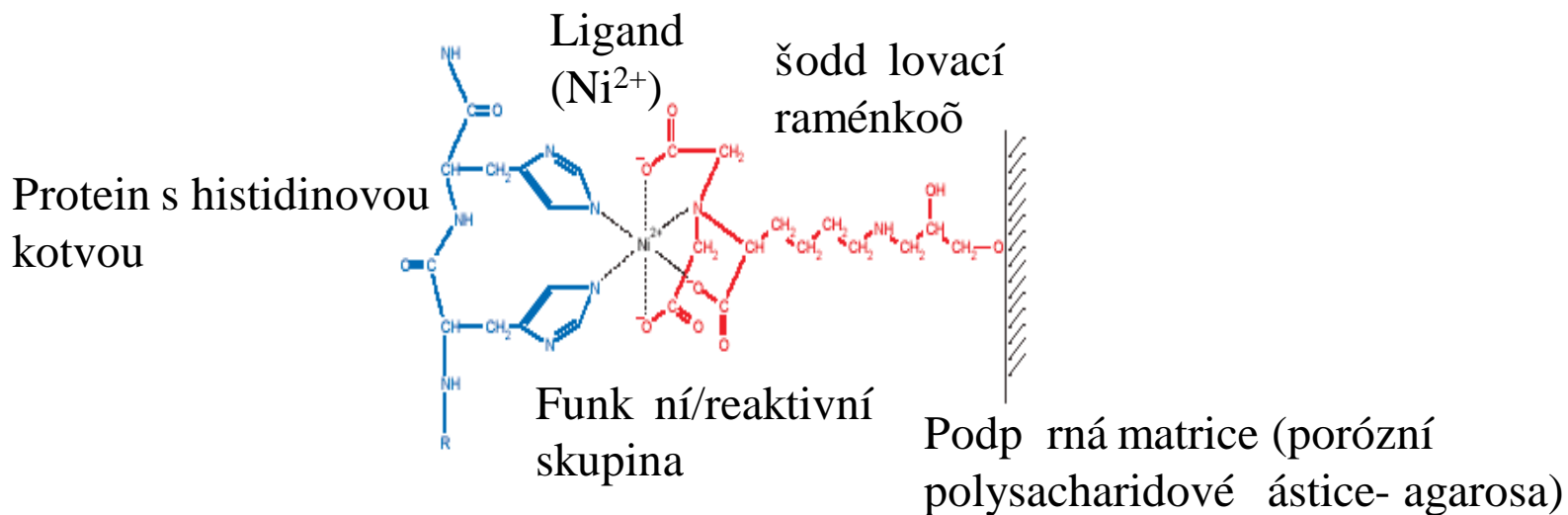
ÉKonstrukce umělých **oligohistidinových domén (poly [His])** fúzovaných k N- nebo C- konci proteinu metodami molekulární biologie.

ÉNyní jeden ze základních purifikačních postupů rekombinantních proteinů .

ÉInterakce proteinu s maticí je zprostředkována neobsazenými d-orbitály iontů přechodných kovů, které váže volné elektronové páry převážně z dusíkového atomu imidazolových skupin histidinových zbytků v proteinu.



# Matrice pro metalochelata ní afinitní chromatografii



šodd lovací raménkoõ

➤ Snížení stérických zábran a umožnění optimálního navázání rekombinantního proteinu na imobilizovaný ligand

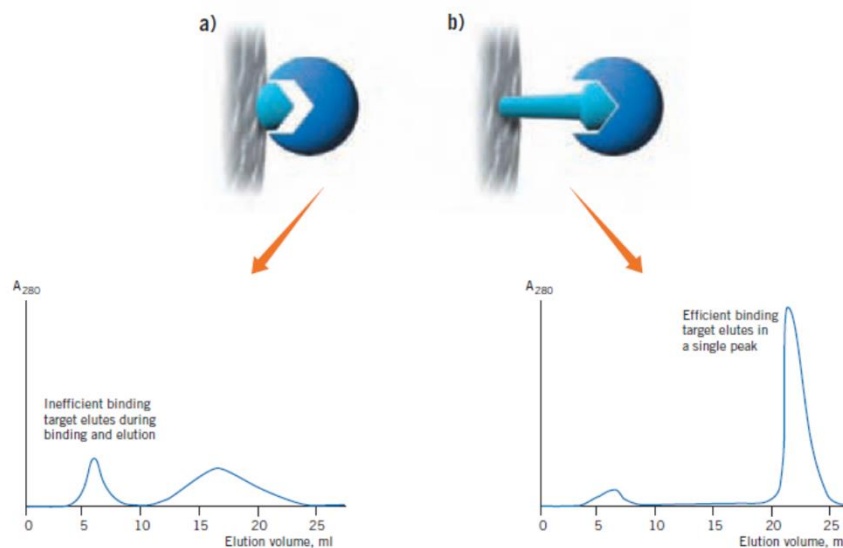
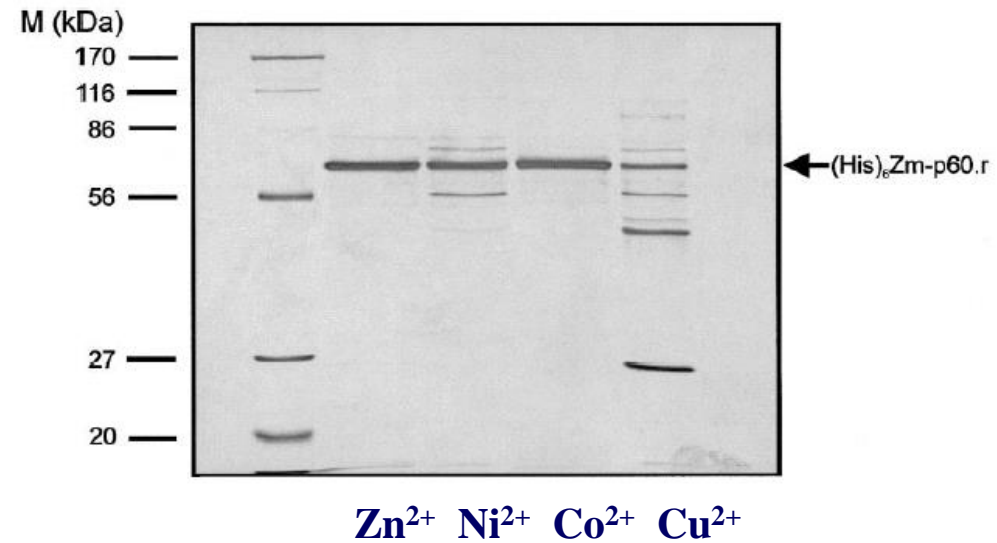


Fig. 56. Using spacer arms. a) Ligand attached directly to the matrix. b) Ligand attached to the matrix via a spacer arm.



## Efekt kovového iontu navázaného na matrici



Síla vazby:  $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \sim \text{Co}^{2+}$

# Metalochelata ní afinitní chromatografie

## *Purifikace za nativních podmínek*

- Pufry o pH 7-8 pro optimální navázání rek. proteinu na kovovým iontem v matici
- Pufry s vysokou koncentrací solí (0.5-1 M NaCl) ó redukce nespecifických elektrostatických interakcí.
- Neiontové detergenty a glycerol redukuje nespecifické hydrofóbní interakce.
- Eluce kontaminujících protein se dosahuje snížením pH nebo nízkou koncentrací imidazolu.
- Eluce cílového His-tagového proteinu je dosažena p i vysoké koncentraci imidazolu (0-0.5 M), v t-ím snížením pH nebo p ídavkem EDTA.

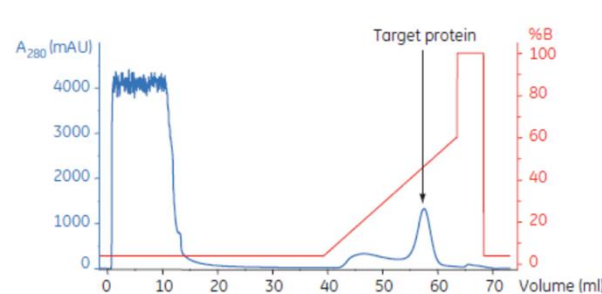
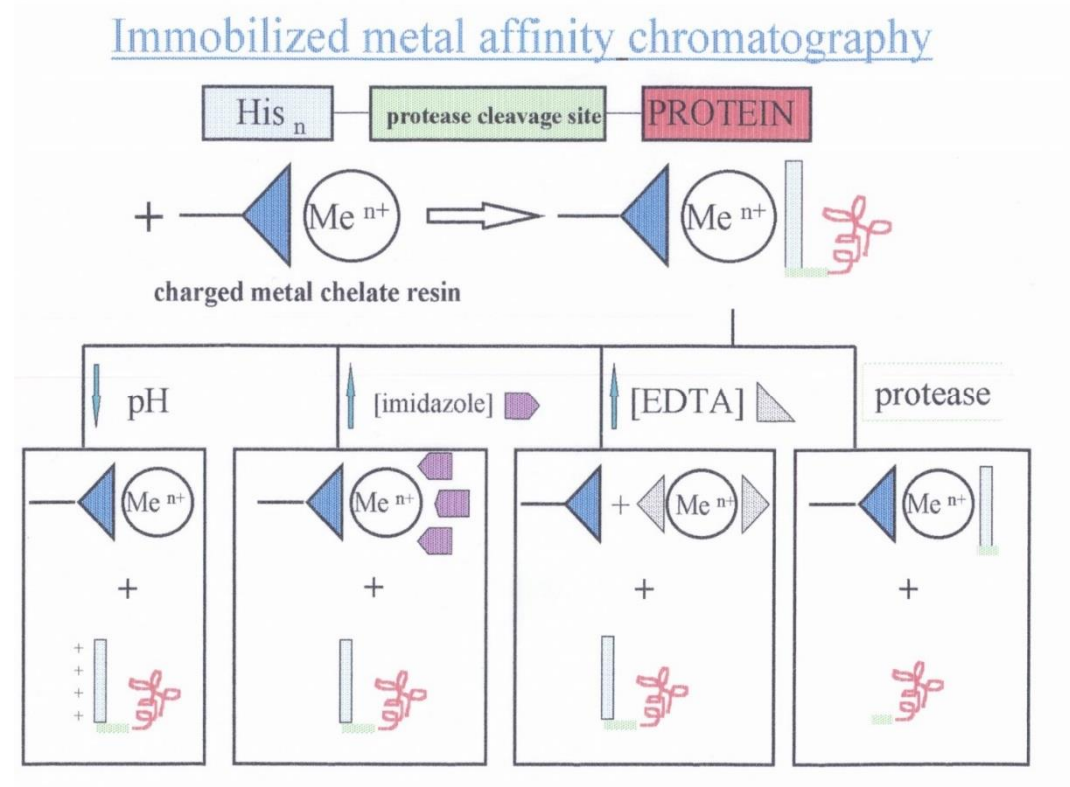


Fig 2.3. Typical IMAC purification with gradient elution.

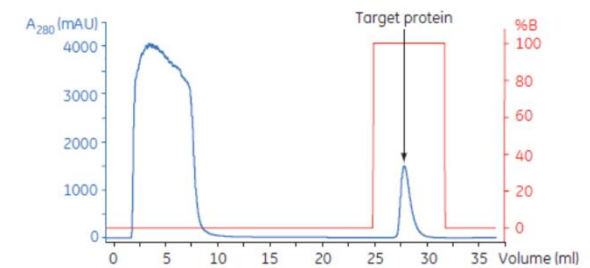



Fig 2.4. Typical IMAC purification with step elution.

# **Metalochelata ní afinitní chromatografie**

## ***Purifikace za denatura níh podmínék***

### **Denatura ní IMAC ó purifikace protein v inkluzních t liscích**



 Purifikace za vysokých koncentrací mo oviny nebo guanidinium chloridu

——→ istý protein, ale poru—ení kvartérní struktury  
(posta í v—ak nap . na imunizace)

Získ nativního konformeru: - Nutné pro mě ení enzymové kinetiky, rtg analýza,í

- Eluce proteinu z kolony a jeho renaturace dialýzou nebo výrazným z ed ním v renatura níh pufrech (pufr podporující správné slofení proteinu)

- Renaturace enzymu vázaného na matrici:

 Gradient z denatura níh do renatura níh pufr  
 Pulzní renaturace

## Odstranění fúzních kotev

Jakýkoliv tag může ovlivnit biologickou aktivitu proteinu, může bránit proteinu krystalizovat, zvyšuje proteinovou velikost (protein je pak například příliš velký pro NMR), proteiny se mohou stát imunogenní díky tagu (problém u terapeutických proteinů).

### **Možnosti odstranění fúzních kotev**

- Chemické odstranění
- Samo-odstranění
- Enzymatické odstranění

## Odstranění fúzních tag -chemické –t pení

➤ málo se využívá

**Bromkyanid** Met/X

**Hydroxylamin** Asn-Gly

1				M28V		40
		M12 M15				
MRGSHHHHHH	GMASMEKNNQ		GNGQGHNV	PN	DPNRNVDENA	
NANSAVKNNN	NEEPSDKHIK		EYLNKIQNSL	STEWSPCSVT		
CGNGIQVRIK	PGSANKPKDE		LDYANDIEKK	ICKVEKCS		

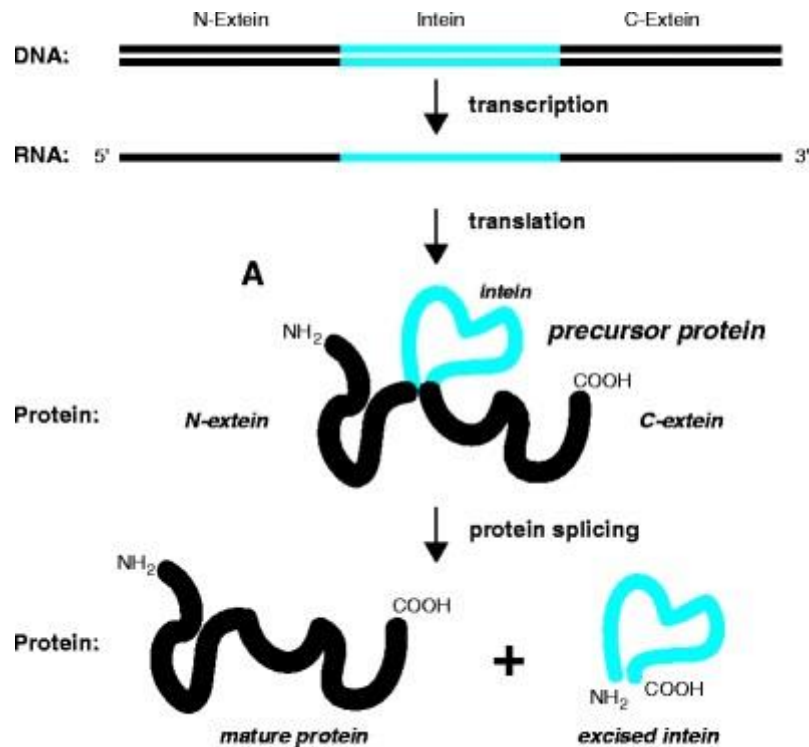
Amino acid sequence of the *P. falciparum* C-terminal segment of CSP (PfCSP C-ter) fused to a purification tag (Rais-Beghdadi et al., 1998).

- Neúčinná, ale velmi úsporná metoda
- Spíše nespecifická
- Může vést k denaturaci a modifikaci cílového proteinu

## Odstranění fúzních tagů - samo-čistění

➤ Použití tzv. samo-čistícího se tagu

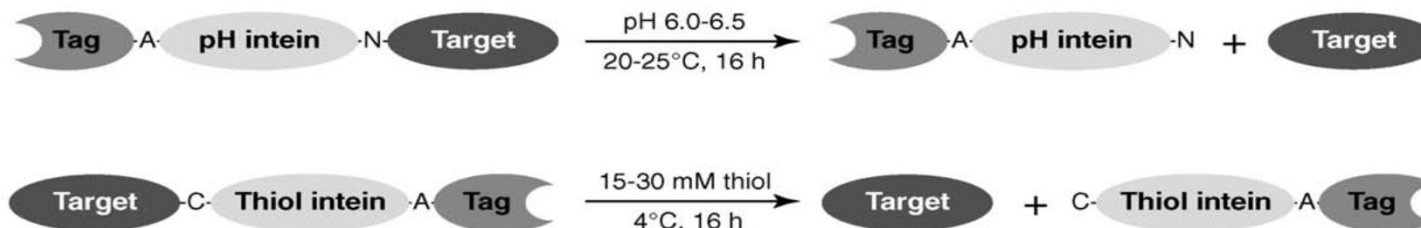
### Inteiny



**Inteiny** (inteíns, *intervening proteins*)

jsou proteinové segmenty, které mají schopnost se samy vyčistit z proteinových prekurzorů.

➤ Vnesením mutací na N- nebo C- konce inteínu vznikly tzv. samo-čistící tagy odvozené od inteínu (čistí se pouze na jednom místě).



Perler, (2005)

# Odstranění fúzních tagů proteolytickým štěpením

## Specifické proteolytické štěpení:

- Exopeptidázy
- Endopeptidázy

## Exopeptidázy (aminopeptidázy a karboxypeptidázy):

DAPase (TAGZyme)	Exo(di)peptidase	Cleaves N-terminal. His-tag (C-terminal) for purification and removal
<i>Aeromonas</i> aminopeptidase	Exopeptidase	Cleaves N-terminal, effective on M, L. Requires Zn
Aminopeptidase M	Exopeptidase	Cleaves N-terminal, does not cleave X-P
Carboxypeptidase A	Exopeptidase	Cleaves C-terminal. No cleavage at X-R, P
Carboxypeptidase B	Exopeptidase	Cleaves C-terminal R, K

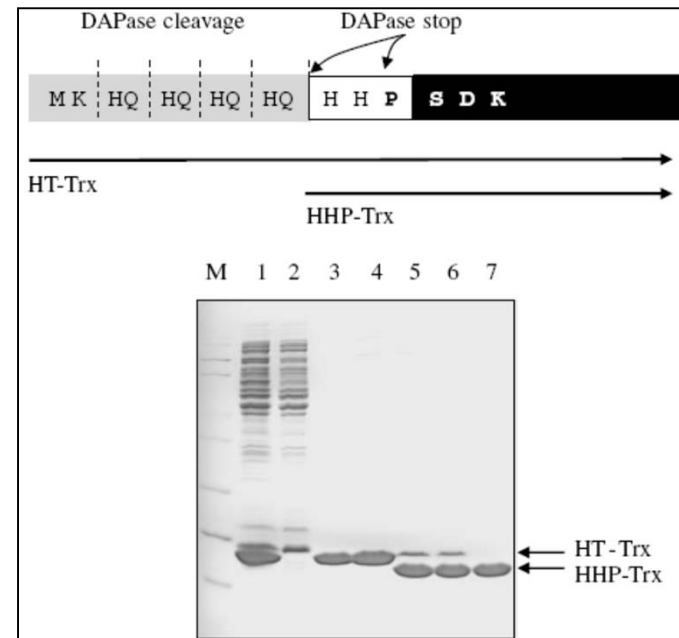
➤ APM, CPA a CPB štěpí postupně po jedné aminokyselině z N- nebo C-konce proteinu až ke specifickému místu, které je signálem pro ukončení štěpení (stop site).

## TAGZyme system (Qiagen):

➤ DAPáza (dipeptidyl aminopeptidáza I)

TAGZyme stop sites

Amino acid	DAPase stop point (↓) sequence*
Lysine (Lys, K)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Lys-Xaa ...
Arginine (Arg, R)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Arg-Xaa ...
Proline (Pro, P)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Xaa-Xaa Pro-Xaa...
Proline (Pro, P)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Xaa-Pro Xaa-Xaa...
Glutamine (Gln, Q)	Xaa-Xaa...Xaa-Xaa ↓ Gln-Xaa...

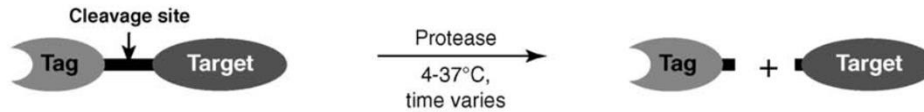


Arnau et al., 2006

# Odstranění fúzního partnera - proteolytické štěpení

## Endopeptidázy

➤ <sup>TM</sup> pící místo pro endopeptidázy mezi fúzním tagem a cílovým proteinem.



Enzyme	Cleavage site	Comments
Enterokinase	DDDDK <sup>*</sup>	Secondary sites at other basic aa
Factor Xa	IDGR <sup>*</sup>	Secondary sites at GR
Thrombin	LVPR <sup>*</sup> GS	Secondary sites. Biotin labeled for removal of the protease
PreScission	LEVLFQ <sup>*</sup> GP	GST tag for removal of the protease
TEV protease	EQLYFQ <sup>*</sup> G	His-tag for removal of the protease
3C protease	ETLFQ <sup>*</sup> GP	GST tag for removal of the protease
Sortase A	LPET <sup>*</sup> G	Ca <sup>2+</sup> -induction of cleavage, requires an additional affinity tag (e.g., his-tag) for on column tag removal
Granzyme B	D <sup>*</sup> X, N <sup>*</sup> X, M <sup>*</sup> N, S <sup>*</sup> X	Serine protease. Risk for unspecific cleavage

### pRSET B Multiple Cloning Site

```

21  T7 promoter AATACGACTC ACTATAGGGA GAACACAACG GTTCCCTCT AGAAATAATT TTGTTAACT RBS TTAAGAAGGA

91  GATATACAT ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
      Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
      Polyhistidine (6xHis) region

148 T7 gene 10 leader GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG Xpress™ Epitope GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT BamH I Xho I Sac I
      Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Pro Ser Ser
      EK recognition site EK cleavage site

205 Bgl II Pst I Pvu II Kpn I Nco I EcoR I BstB I Hind III
      AGA TCT GCA GCT GGT ACC ATG GAA TTC GAA GCT TGA TCCGGCTGCT AACAAAGCCC
      Arg Ser Ala Ala Gly Thr Met Glu Phe Glu Ala ***

261 T7 reverse priming site
      GAAAGGAAGC TGAGTTGGCT GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA
    
```



# Odstranění fúzních tagů proteolytické řezání

- **Nespecifické řezání** - produkt řezání je doporučenou metodou ověřit pomocí MS analýzy.
- **Optimalizace proteolytického řezání fúzního proteinu** (poměr enzym substrát, teplota, pH, koncentrace solí, délka řezání, modifikované proteolytické enzymy)
- **Po odstranění tagu může docházet k precipitaci cílového proteinu.**
- **Účinnost řezání** (může být snížena kvůli sterickým efektům nebo agregaci - vložení krátkých linkerů mezi proteázové místo a fúzní tag)
- **Re-purifikační krok** nutný pro oddělení cílového proteinu od fúzního tagu
- **Modifikace cílového proteinu** (po řezání některými proteázami, například thrombinem, TEV, Precision zůstává jedna nebo dvě aminokyseliny připojené k cílovému proteinu.

## Enterokináza Asp-Asp-Asp-Asp-Lys/X

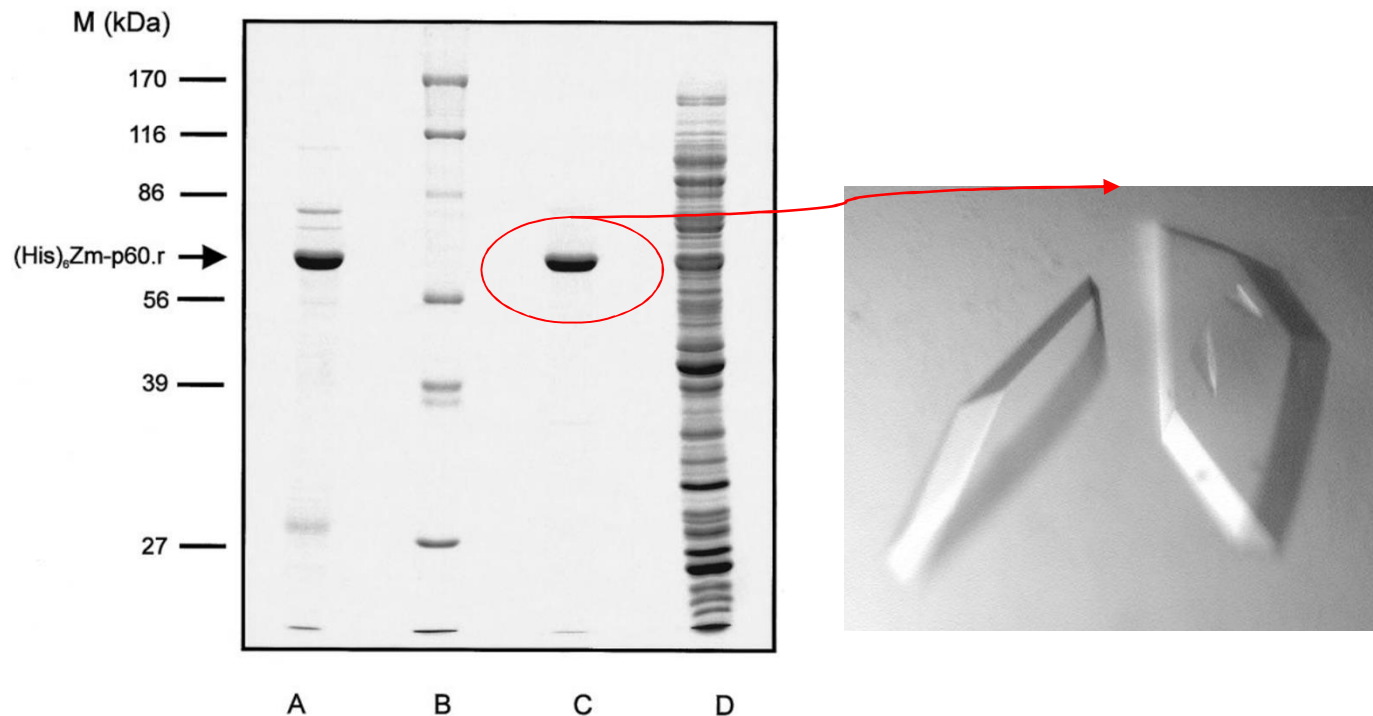
**Table 4** Cleavage (%) of enterokinase through densitometry (Hosfield and Lu 1999) based on the amino acid residue X<sub>1</sub>. The sequence...-GSDYKDDDDK-X<sub>1</sub>-ADQLTEEQIA-... of a GST-calmodulin fusion protein was tested using 5 mg protein digested with 0.2 U of enterokinase for 16 h at 37 °C

Amino acid in position X <sub>1</sub>	Cleavage of enterokinase (%)
Alanine	88
Methionine	86
Lysine	85
Leucine	85
Asparagine	85
Phenylalanine	85
Isoleucine	84
Aspartic acid	84
Glutamic acid	80
Glutamine	79
Valine	79
Arginine	78
Threonine	78
Tyrosine	78
Histidine	76
Serine	76
Cysteine	74
Glycine	74
Tryptophan	67
Proline	61

# His-tagged protein and IMAC under native conditions

## One-step purification of maize $\beta$ -glucosidase

- Perfusion matrix: POROS MC/M
- Functional group: iminodiacetate, metal ion  $Zn^{2+}$
- Removing contaminated proteins: linear gradient of imidazole (0 to 50 mM) and pH (pH 7- 6.1)
- Protein elution: 0.1 M EDTA
- 80% recovery, 95 fold purification
- Common production and isolation of wild type protein and soluble mutant form for enzymatic measurements and crystallization.



(Zouhar et al., 1999)

# Purifikace proteinu AHP2 (Arabidopsis histidin phosphotransfer protein 2)

## Metalochelata ní afinitní chromatografie

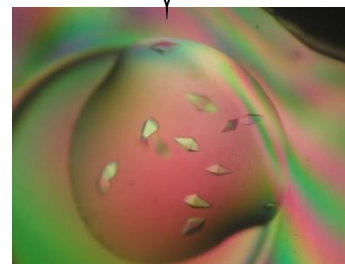
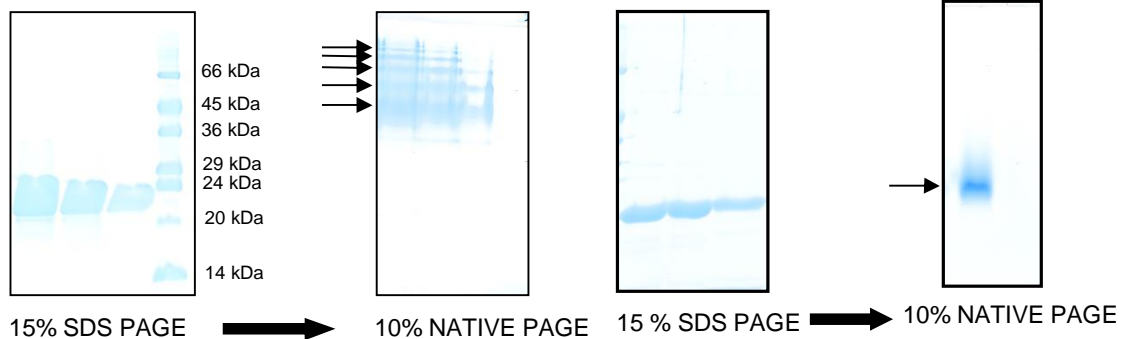
Pufr: 50 mM Tris pH 7.9, 300 mM NaCl, 10 % glycerol, 20 mM imidazol, 3.9 mM merkaptoethanol  
Gradientová eluce: 20 -500 mM imidazol

## Gelová permea ní chromatografie

Pufr: 20 mM Tris pH 7.9, 250 mM NaCl  
Isokratická eluce

## Anion vým nná chromatografie

Pufr: 20 mM Tris pH 7.9  
Gradientová eluce: 0 - 1M NaCl



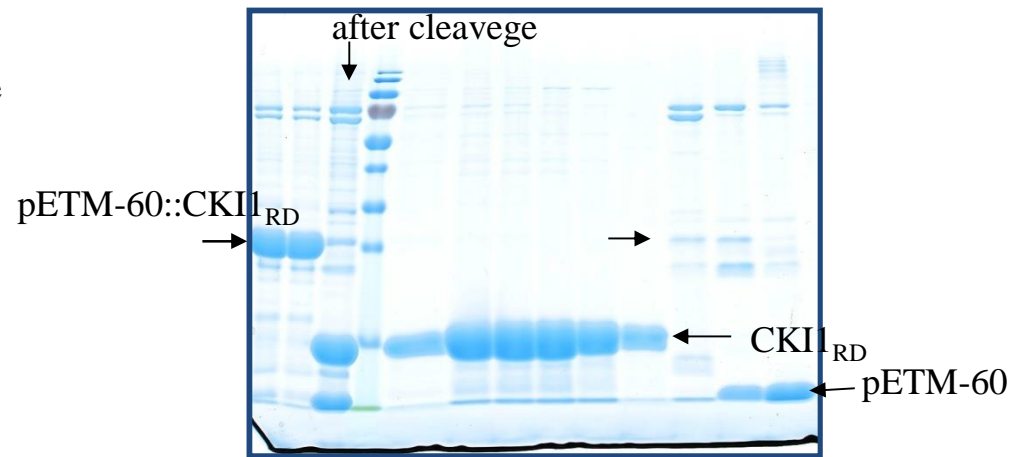
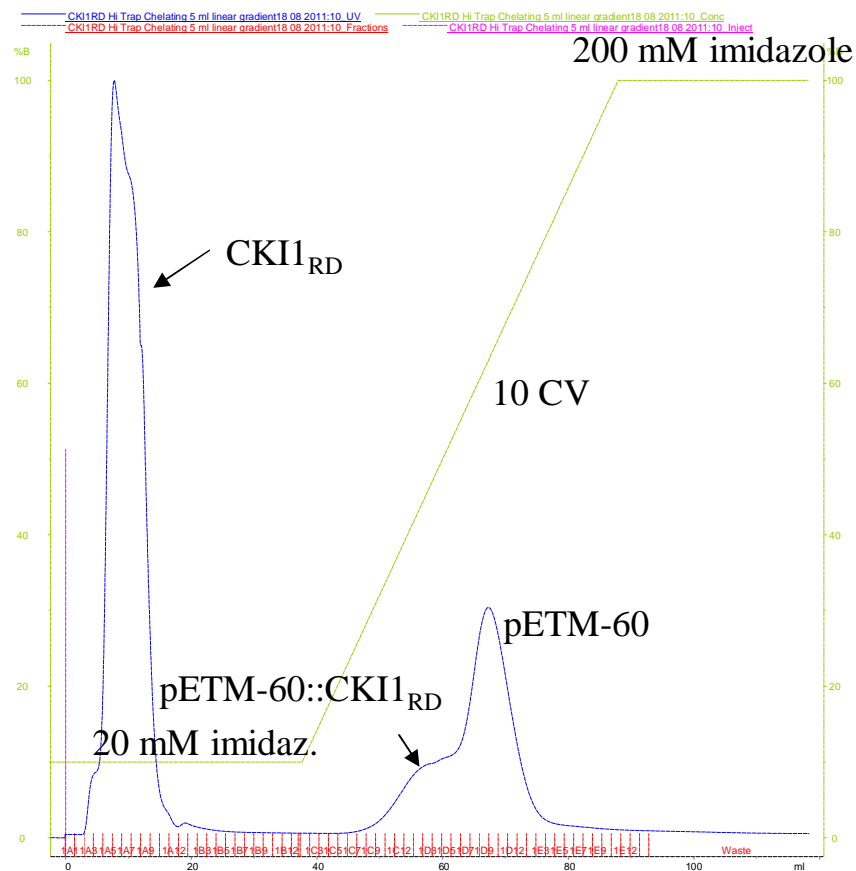
# His-tagged protein and IMAC under native conditions

## Four-step purification of *Arabidopsis* CKI1<sub>RD</sub>

1. Affinity purification (IMAC)
2. Tag removal (TEV protease)
3. Affinity purification (IMAC)
4. Size exclusion chromatography



### 3. Affinity purification after TEV cleavage



### 4. Size-exclusion chromatography

