

Jméno a učo:

Datum:

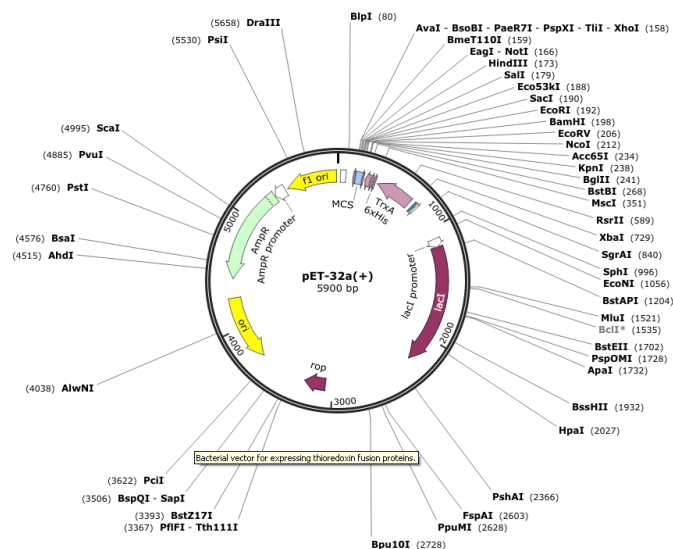
Expresa a purifikace rekombinantních proteinů

Teoretická část

Pomocí různých expresních systémů je možné vytvořit rekombinantní protein odvozený od konkrétního genu, nebo části genu. Expresní systémy lze rozdělit do dvou hlavních tříd, prokaryotní a eukaryotní. Nejznámější a nejpoužívanější systém pro expresi proteinů je bakteriální expresní systém (*E. coli*). Výhodou tohoto systému je především jeho jednoduchost, vysoký výtěžek exprimovaného proteinu a v neposlední řadě jeho nízká časová a finanční náročnost. Na druhou stranu bakteriální systém neumožňuje posttranslační modifikace (možné ovlivnění terciární struktury proteinu) a je schopen exprese proteinů omezené velikosti (maximálně kolem 150 kDa). Typ exprese (cytosol nebo inkluzní tělíska) nelze ovlivnit a závisí zejména na struktuře proteinu.

Lineární molekula DNA obsahující gen pro daný protein (insert) nese na svých koncích restriční místa kompatibilní s vektorem, která jsou potřebná pro tvorbu ligačních přesahů a začlenění inzertu do vektoru. Dále také obsahuje start a stop kodon a signální sekvenci usnadňující purifikaci výsledného proteinu.

Inzert se pomocí ligázy začleňuje do expresního vektoru. Každý expresní vektor obsahuje specifické sekvence potřebné pro integraci inzertu, selekci bakteriálního klonu a expresi proteinu (obr. 1).



Obr. 1: Vektor pET32 (<http://www.snapgene.com>)

- *T7 promotor* – sekvence, na kterou specificky nasedá T7 RNA polymeráza. Tato polymeráza pochází z bakteriofága λ , což zajišťuje vazebnou specifitu pouze na daném úseku expresního vektoru.
- *T7 počátek transkripce* – v tomto místě začíná T7 RNA polymeráza syntetizovat mRNA
- *His Tag sekvence* – sekvence kódující polyhistidinovou kotvu (His Tag). Pokud His Tag nepotřebujeme, je možné jej z vektoru vyštěpit.
- *Klonovací místo* – do tohoto místa lze vložit inzert. Obsahuje několik specifických sekvencí pro různé restriční endonukleázy, plní tak funkci univerzálního klonovacího místa.
- *T7 terminátor* – ukončuje transkripci inzertu

- *lacI* sekvence – kóduje lac represor, který se bez přítomnosti IPTG váže do blízkosti T7 promotoru a blokuje tak činnost T7 RNA polymerázy. V přítomnosti IPTG se lac represor váže na tyto molekuly, T7 RNA polymeráza nasedá na promotor a zahajuje transkripci.
- *pBR322 počátek replikace* – nutné pro replikaci vektoru během kultivace bakteriální kultury
- *Amp^R sekvence* – kóduje rezistenci k ampicilinu (nutné pro selekci klonů se zabudovaným vektorem)

Vektor s inzertem je poté potřeba vložit do tzv. kompetentních buněk. To jsou takové buňky, které jsou schopny přijmout DNA z prostředí. *E. coli* cizorodou DNA za normálních okolností nepřijímá, proto se kompetence buněk navozuje narušením buněčné stěny a membrány chloridem vápenatým. Nejčastěji se používají kompetentní buňky BL21 DE3, což jsou geneticky upravené klony *E. coli* umožňující cíleně ovlivnit a načasovat expresi proteinu (exprese se indukuje přidávkem IPTG). Transformované buňky se kultivují v LB (Luria-Bertani) médiu za standardních podmínek (37°C; 200 - 250 rpm) za přítomnosti antibiotika a IPTG. Nejvyšší hladiny exprese buňky dosahují ve stacionární fázi (4 - 6 h). Po překročení této doby začínají v médiu docházet živiny, hromadí se odpadní látky, buňky se přestávají dělit a postupně odumírají. V této fázi také klesá exprese proteinu, který může být navíc poškozen stresovým stavem umírajících buněk.

Po expresi proteinu následuje purifikace, která zajišťuje odstranění všech nečistot a získání čistého produktu. Při purifikaci se uplatňují afinitní značky (tagy) připojené k proteinu (His Tag, c-myc, aj.), které umožňují jednoduchou jedнокrokovou adsorpční purifikaci. Tyto tagy ovšem nesmí ovlivňovat terciární strukturu proteinu ani jeho biologickou aktivitu. Zároveň se musí dát snadno a specificky odstranit od nativního proteinu. Nejběžněji používaným tagem při purifikaci proteinů je polyhistidinová kotva (His₆). Jde o metalafinitní metodu, při které dochází k poměrně silné interakci mezi imobilizovanými ionty kovů (Ni²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺) a histidinovými zbytky. Po důkladné odmytí nenavázané proteinové frakce a nečistot, následuje uvolnění polyhistidinové kotvy pomocí imidazolu, který má vyšší afinitu vůči částicím kovu než histidinové zbytky.

Purifikovaný produkt je na závěr potřeba charakterizovat, tzn. potvrdit identitu, zjistit čistotu a koncentraci proteinu. Identita proteinu se nejčastěji určuje imunoanalýzou na western-blotu nebo pomocí hmotnostní spektrometrie. Ke stanovení čistoty proteinů ve většině případů postačuje denaturační polyakrylamidová gelová elektroforéza.

Literatura:

1. Chong S., et al., Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*. 1997, roč. 192, s. 271-281.
2. Takacs, Bela J. a GIRARD, Marie-Françoise. Preparation of clinical grade proteins produced by recombinant DNA technologies. *Journal of Immunological Methods*. 1991, roč. 143, s. 231-240
3. SHIH, Yan-Ping, et al. High-throughput screening of soluble recombinant proteins. *Protein Science*. 2002, roč. 11, s. 1714-1719

Postup práce

Příprava, růst kultury a sklizení kultury

1. Do sterilní 250 ml Erlenmeyerovy baňky nalijte 30 ml autoindukčního média (Overnight Express™ Instant LB Medium – Novagen); 30 µl ampicilinu (100 mg/ml) a 750 µl předpěstované noční kultury.
2. Baňky dejte na třepačku a inkubujte 3 h při 37°C.
3. Připravte si dvě sterilní mikrozkušavky a do každé odeberte 700 µl narostlé kultury.
4. Centrifugujte 2 min při pokojové teplotě a při 5 000xg.
5. Odeberte supernatant, pelet použijte v dalších krocích.

Příprava hrubého lyzátu

1. Pelet v první mikrozkušavce roztususpendujte ve 100 µl lyzačního pufru (50 mM fosfátový pufr pH 8; 0,3 M NaCl; 0,2 mg/ml lysozym; 0,1% triton).
2. Inkubujte 10 min na ledu.
3. Přidejte 10 µl DNase pufru a 5 µl DNAsy.
4. Inkubujte 10 min při 37°C.
5. Centrifugujte 10 min při 4°C a při 20 000xg.
6. Odeberte supernatant a uchovejte pro další použití.

Purifikace proteinu

1. Pelet ve druhé mikrozkušavce roztususpendujte v 700 µl HEPES pufru.
2. Přidejte 70 µl FastBreak™ Reagent/DNase I pufru a 75 µl HisLink™ pryskyřice.
3. Inkubujte 30 minut na třepačce při laboratorní teplotě.
4. Přeneste lyzátní roztok s pryskyřicí na kolonku. Jestliže v mikrozkušavce zůstane zbytek pryskyřice, přidejte 100 µl HisLink™ Binding/Wash pufru a přeneste na kolonku.
5. Centrifugujte 5 s při pokojové teplotě a při maximálních otáčkách.
6. Vylijte proteklost kapaliny, umístěte kolonku zpět do mikrozkušavky a přidejte 500 µl HisLink™ Binding/Wash pufru.
7. Centrifugujte 5 s při pokojové teplotě a při maximálních otáčkách.
8. Opakujte promytí 500 µl HisLink™ Binding/Wash pufrům.
9. Centrifugujte 5 s při pokojové teplotě a při maximálních otáčkách.
10. Vyjměte kolonku, opatrně ji otřete, abyste zajistili odstranění zbytků HisLink™ Binding/Wash pufru a vložte do nové, čisté mikrozkušavky.
11. Na kolonku naneste 200 µl HisLink™ Elution pufru, kolonku zavřete, dobře promíchejte a inkubujte 3 min při pokojové teplotě.
12. Centrifugujte 1 min při pokojové teplotě a při 10 000xg.

SDS PAGE

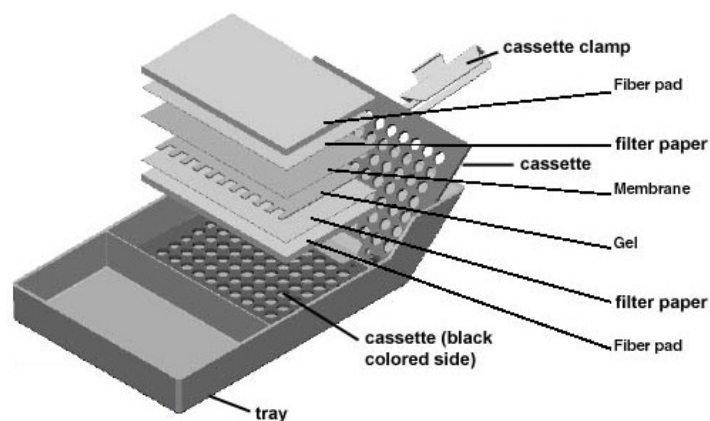
1. Podle uvedené tabulky připravte 12% SDS polyakrylamidový gel.

Koncentrační gel (5%)		Separační gel (12%)	
30% akrylamid	850 μ l	30% akrylamid	4 ml
1M Tris(pH6.8)	625 μ l	1,5M Tris(pH8.8)	2,5 ml
10% amonium persulfát	50 μ l	10% amonium persulfát	100 μ l
10% SDS	50 μ l	10% SDS	100 μ l
TEMED	5 μ l	TEMED	4 μ l
Voda	3,4 ml	Voda	300 μ l
		glycerol	3 ml

2. Mezi připravená skla nalijte nejprve separační gel, pak ihned přilijte koncentrační gel a mezi skla zasuňte hřebínek.
3. Gel nechte tuhnout 20 minut.
4. Tuhý gel umístěte do elektroforetické vany a přilijte elektroforetický pufr (25 mM Tris-Cl; 150 mM glycin; 0.1% SDS).
5. K 15 μ l hrubého lyzátu a k 15 μ l purifikovaného proteinu přidejte 4 μ l nanášecího pufru a naneste vzorky na gel v následujícím pořadí:
délkový marker – hrubý lyzát – purifikovaný protein
6. Spustte elektroforézu, podmínky separace: konstantní proud 30 mA/gel, 40 minut.
7. Po elektroforéze první gel propláchněte 15 minut v MiliQ vodě a následně ponořte do 50 ml barvy koloidní coomasie BioSafe, s druhým gelem proveďte blotting.
8. Gel ponořený do koloidní coomasie po dvou hodinách vyjměte a propláchněte vodou a naskenujte.

Western-blotting

1. Připravte si PVDF membránu a papíry Whatman 3MM o rozměrech 7x5 cm.
2. Ponořte PVDF membránu na 20 s do methanolu (snížení hydrofobicity membrány) a poté inkubujte 5 min v přenosovém pufru (25 mM Tris-Cl; 150 mM glycin; 20 % metanol) společně s papíry Whatman.
3. Sestavte sandwich dle obrázku níže, umístěte ho do aparatury Mini-Protean 3 a zalijte přenosovým pufrům.



4. Provádějte přenos 1 h při konstantním napětí 30V.
5. Po skončení přenosu opatrně vytáhněte membránu, ponořte ji na 5 min do barvy Ponceau S.
6. Membránu opláchněte ve vodě.
7. Vazebná místa na membráně blokujte v 20 ml roztoku 5% sušeného mléka v 1x TBST pufru 30 min na třepačce.
8. Membránu dvakrát promyjte 20 ml 1 x TBST pufru po dobu 5minut.
9. Inkubujte membránu ve 20 ml TBST pufru s primární anti-His protilátkou po dobu 1 h.
10. Membránu dvakrát promyjte 20 ml 1 x TBST pufru po dobu 5minut.
11. Inkubujte membránu ve 20 ml TBST pufru se sekundární anti-(?) protilátkou po dobu 1 h.
12. Membránu dvakrát promyjte 20 ml 1 x TBST pufru po dobu 5minut.

Detekce pomocí alkalické fofatázy (AP)

1. Inkubujte membránu 2 min v 20 ml pufru pro AP (10 mM Tris pH 9,5; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl₂).
2. Pufr pro AP slijte a inkubujte membránu v 20 ml detekčního pufru (0,4 mM BCIP; 0,4 mM NBT v pufru pro AP). Inkubaci provádějte ve tmě.
3. Reakci zastavte promytím v Mili-Q vodě.
4. Membránu nechte volně uschnout na vzduchu.

Vyhodnocení