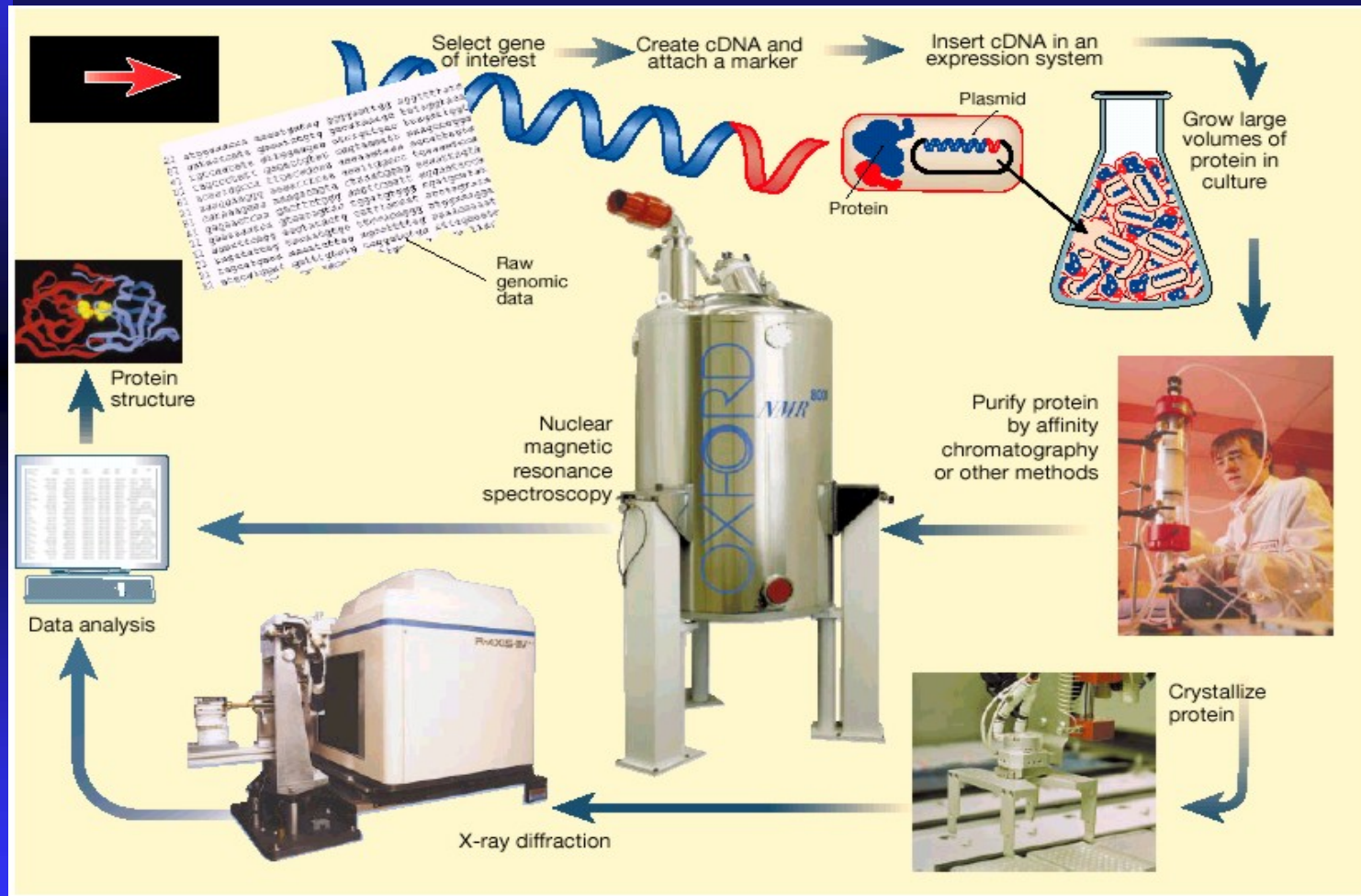


Exprese a purifikace rekombinantních proteinů

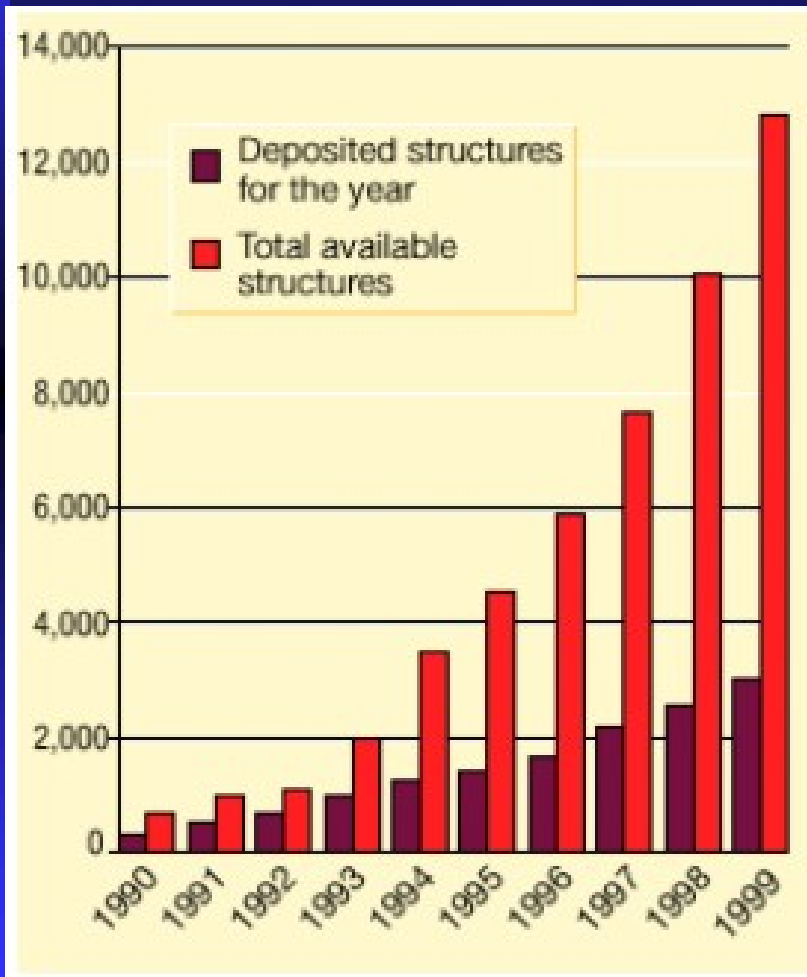
Exprese a purifikace rekombinantních proteinů

- od genů k proteinům
- základní techniky genového inženýrství
 - expresní vektory
 - stanovení sekvence DNA
 - místně řízená mutageneze
- exprese rekombinantních proteinů
 - afinitní značky
 - purifikační postupy

Od genomu k množině trojrozměrných struktur proteomu



Dynamika nárůstu počtu vyřešených trojrozměrných struktur proteinu



Vyřešení první trojrozměrné struktury proteinu (hemoglobinu; Perutz et al., Nature 185, 416-422, 1960) trvalo 22 let.

Předpokládaný výkon v současné době zakládané “Protein Structure Factory” (Německo) je odhadován na 100 - 200 vyřešených struktur ročně. Jednotky se srovnatelnými ambicemi jsou zřizovány v USA a v Japonsku.

Exprese a purifikace rekombinantních proteinů

- od genů k proteinům
- základní techniky genového inženýrství
 - expresní vektory
 - stanovení sekvence DNA
 - místně řízená mutageneze
- exprese rekombinantních proteinů
 - afinitní značky
 - purifikační postupy

Expresní konstrukty

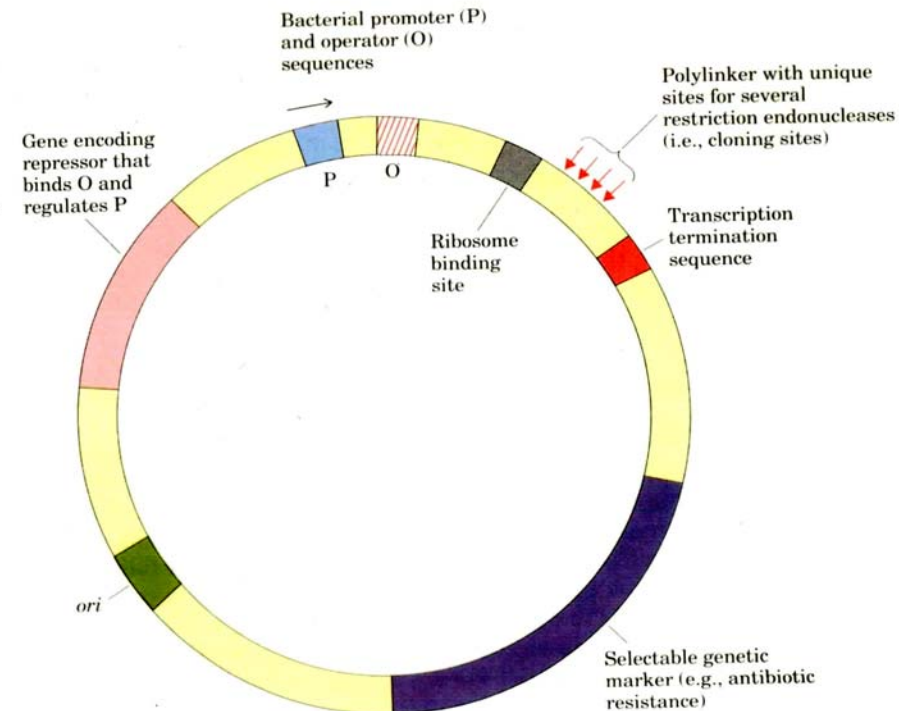
STRUKTURA EUKARYOTNÍHO GENU



cDNA

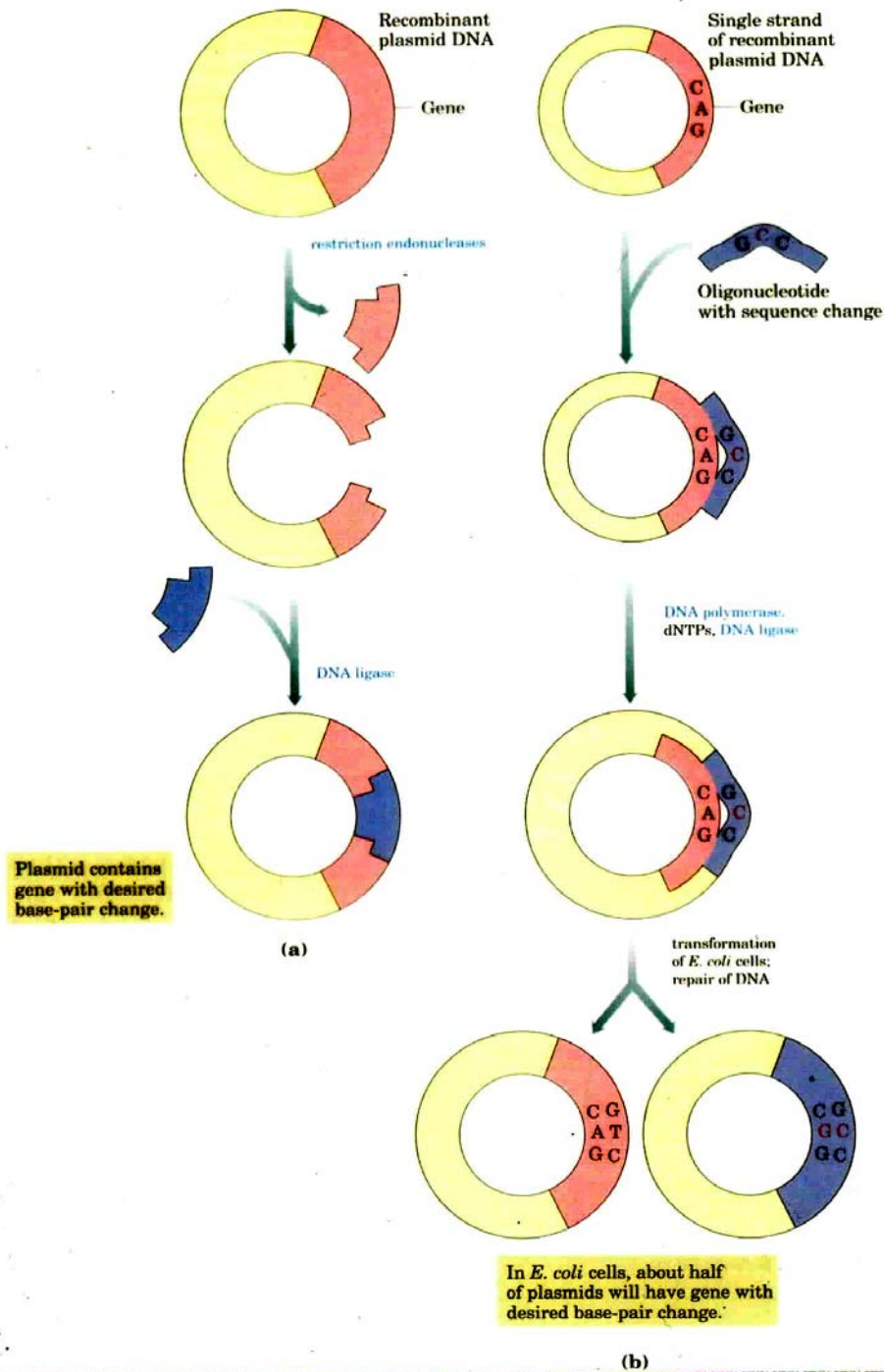


EXPRESNÍ KONSTRUKT

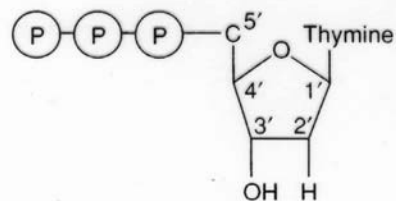


- transformace;
- indukce exprese rekombinantního proteinu;
- extrakce a purifikace rekombinantního proteinu.

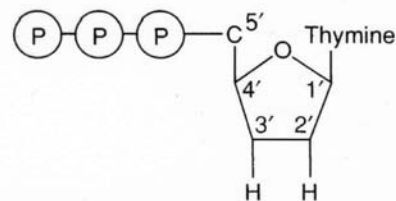
Řízená mutageneze



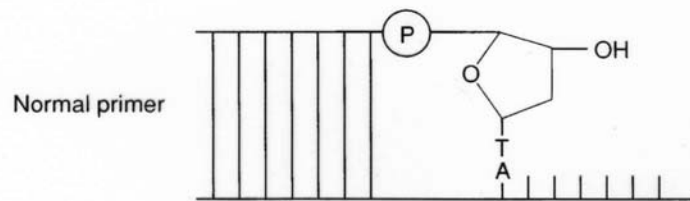
Sekvenování DNA podle Sangera (enzymatická metoda)



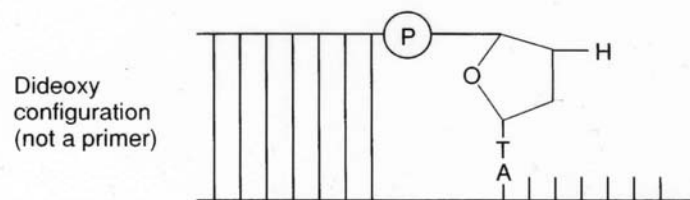
Deoxythymidine triphosphate (dTTP)



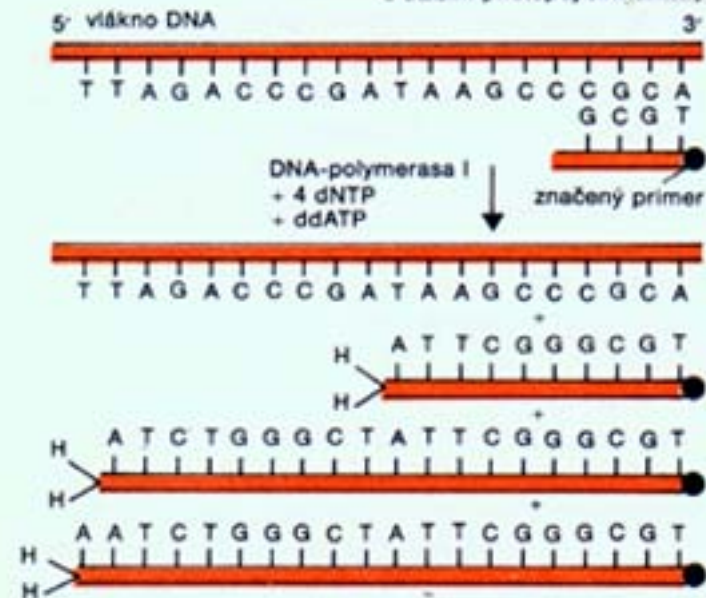
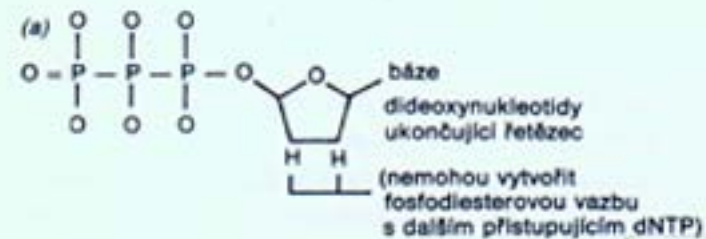
Dideoxythymidine triphosphate (ddTTP)



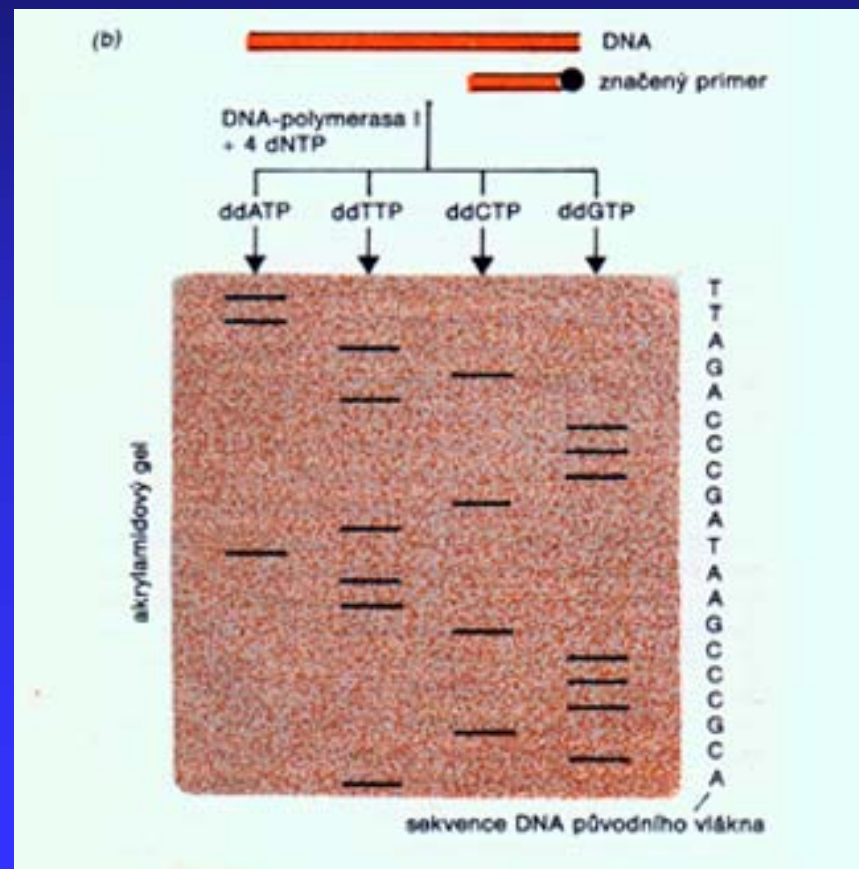
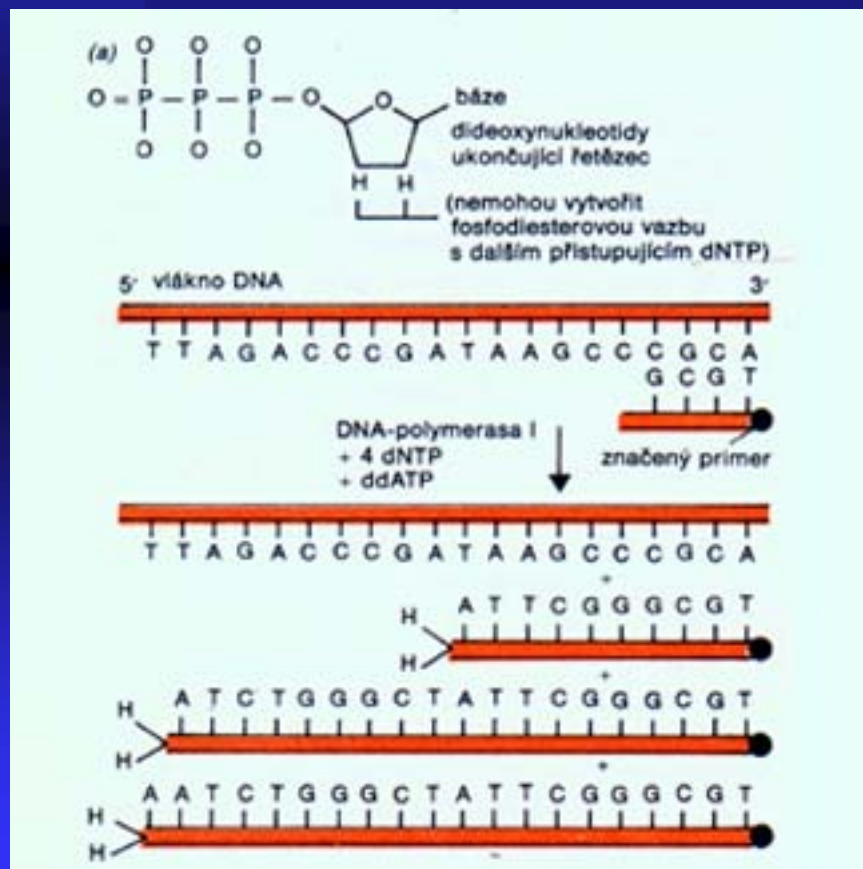
Normal primer

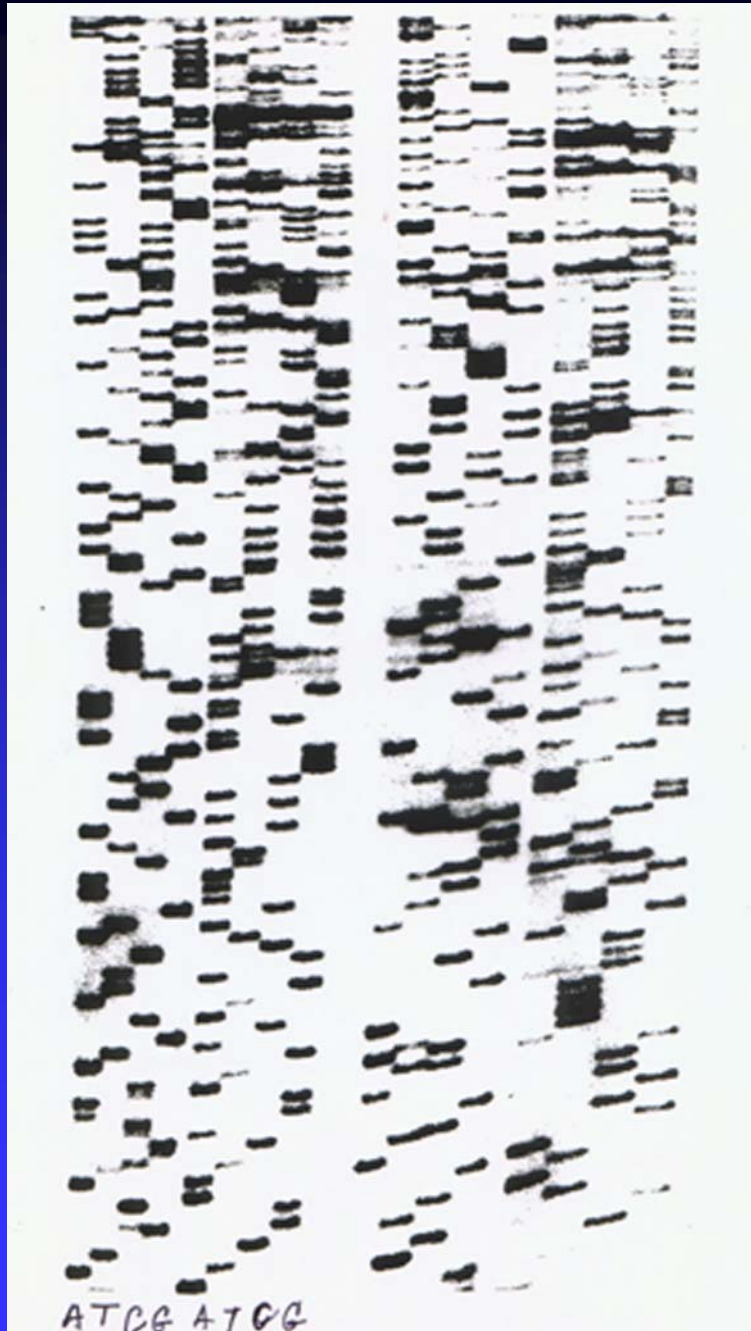


Dideoxy
configuration
(not a primer)



Sekvenování DNA podle Sangera (enzymatická metoda)





**...a takto vypadá
autoradiogram, z
něhož se odečítá
sekvence....**

Od “ruční práce“ k automatizaci....

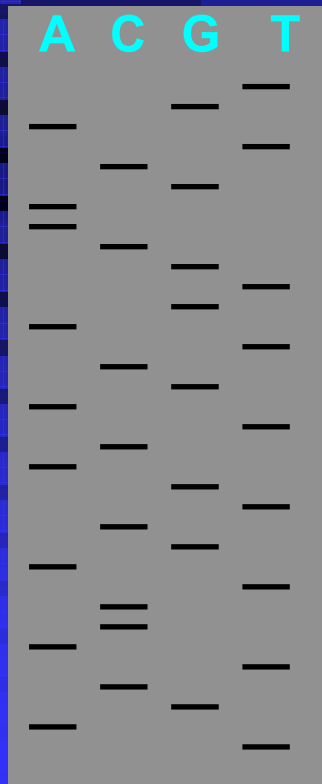
- objev termostabilních DNA polymeráz
- PCR 1986
- zavedení fluorescenčního značení
(fa. Roche Molecular Systems – ABI PRISM - systém
vícebarevné fluorescence)

....od gelu ke kapiláře....

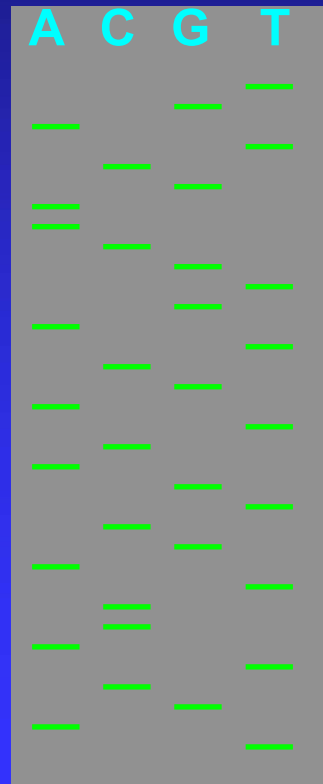
- Výhody:
- odpadá nutnost náročného nalévání gelů a nanášení vzorků na gel (kapilára se plní automaticky)
 - úspora chemikálií
 - reprodukovatelnost

Od radioaktivity k fluorescenci

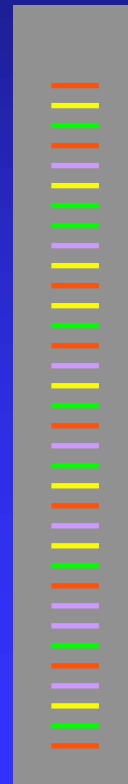
Radioaktivní
značení
gel



“jednobarevná“
fluorescence
gel

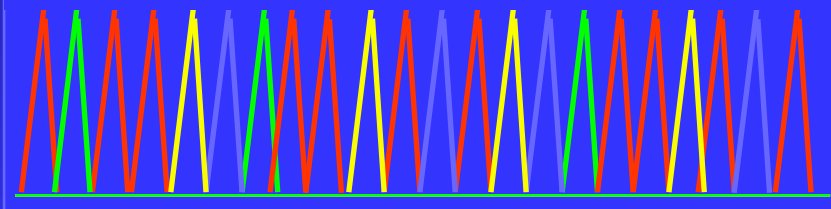


vícebarevná
fluorescence
kapilára



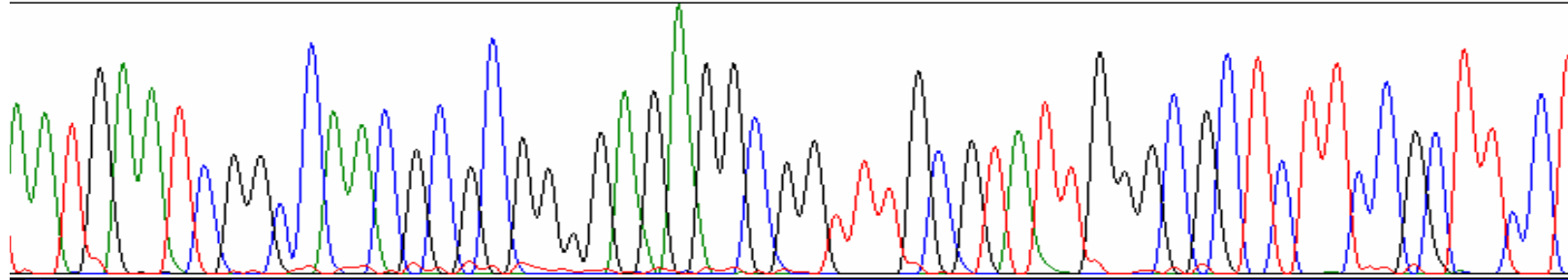
Výsledek sekvenování

TATTGCATTGTCTGCATTGTCT



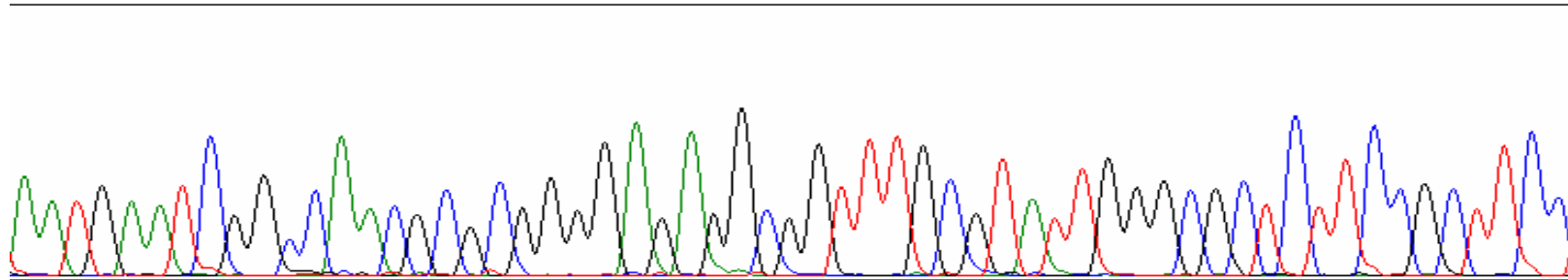
Vývoj sekvenačních kitů

A A T G A A T C G G C C A A C G C G C G G G G A G A G G C G G T T T G C G T A T T G G G C G C T C T T C C G C T T C C T
300 310 320 330 340 350



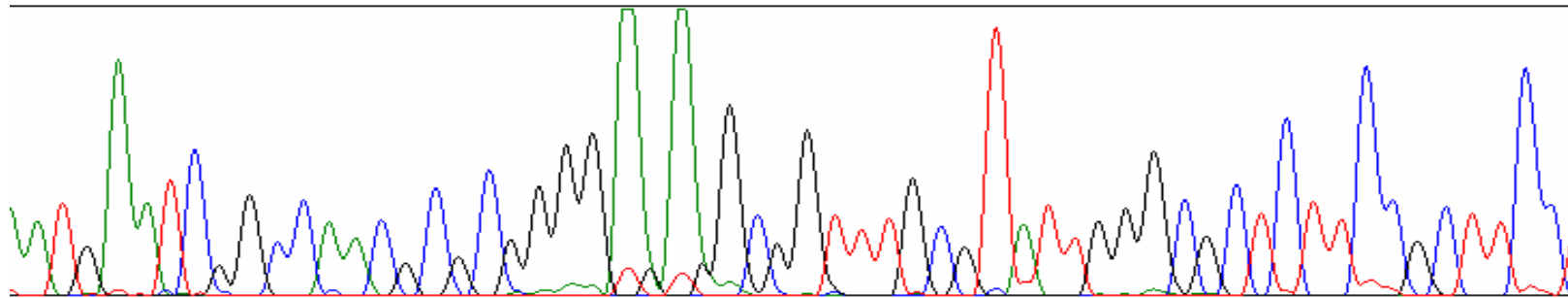
BigDye

A A T G A A T C G G C C A A C G C G C G G G G A G A G G C G G T T T G C G T A T T G G G C G C T C T T C C G C T T C C T
300 310 320 330 340 350



dRhod

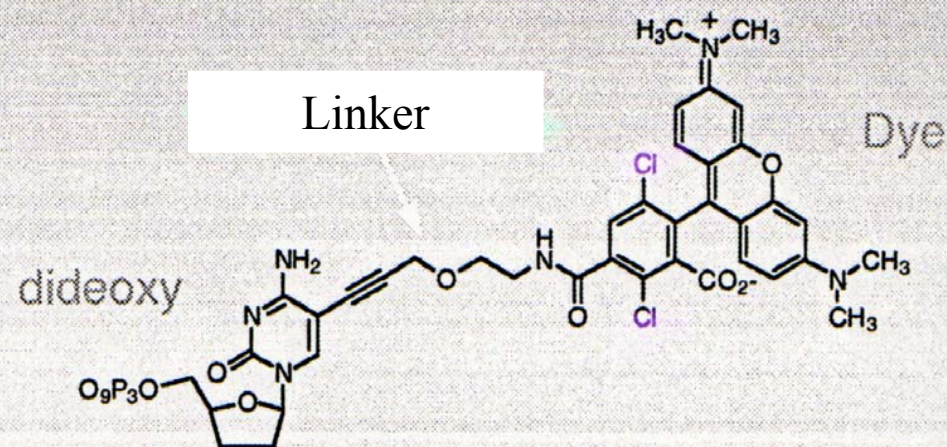
A A T G A A T C G G C C A A C G C G C G G G G A G A G G C G G T T T G C G T A T T G G G C G C T C T T C C G C T T C C T
300 310 320 330 340 350



Rhodamine

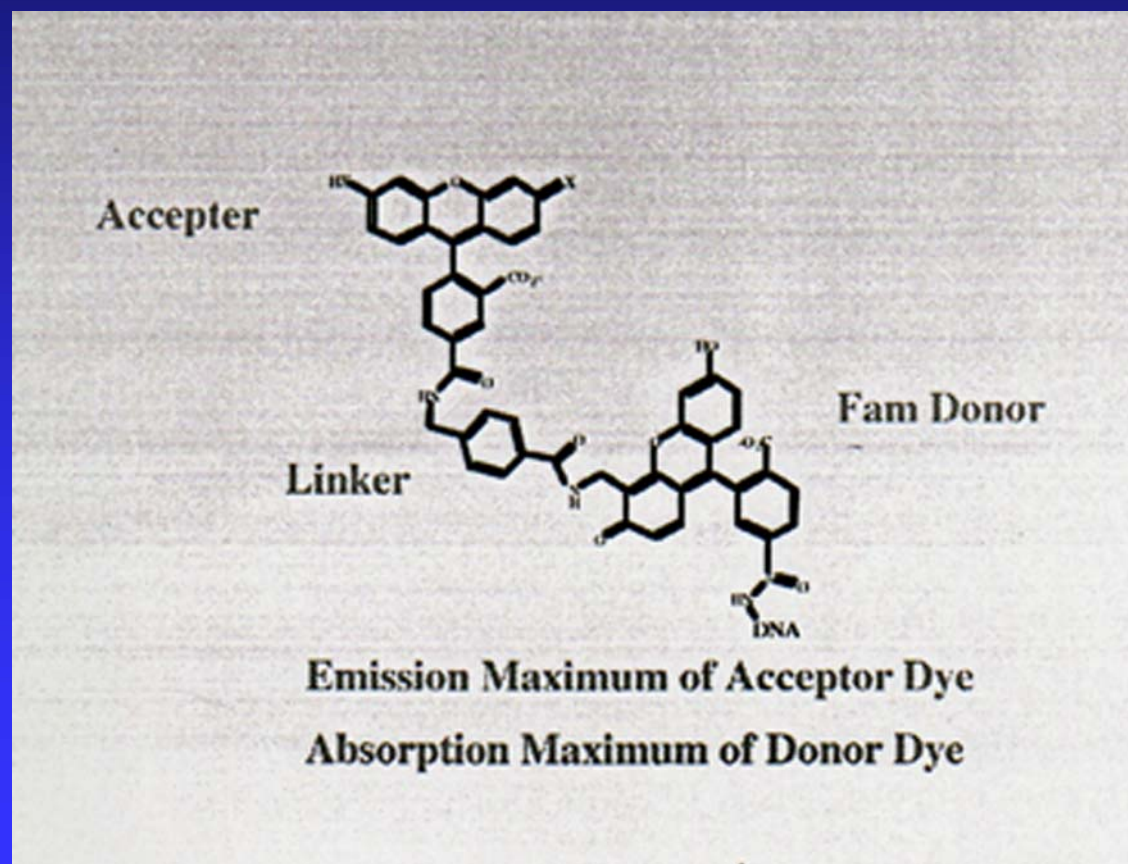
Struktura fluorescenčních značek - dichlororhodaminy

eg. dTamra-EO-ddCTP

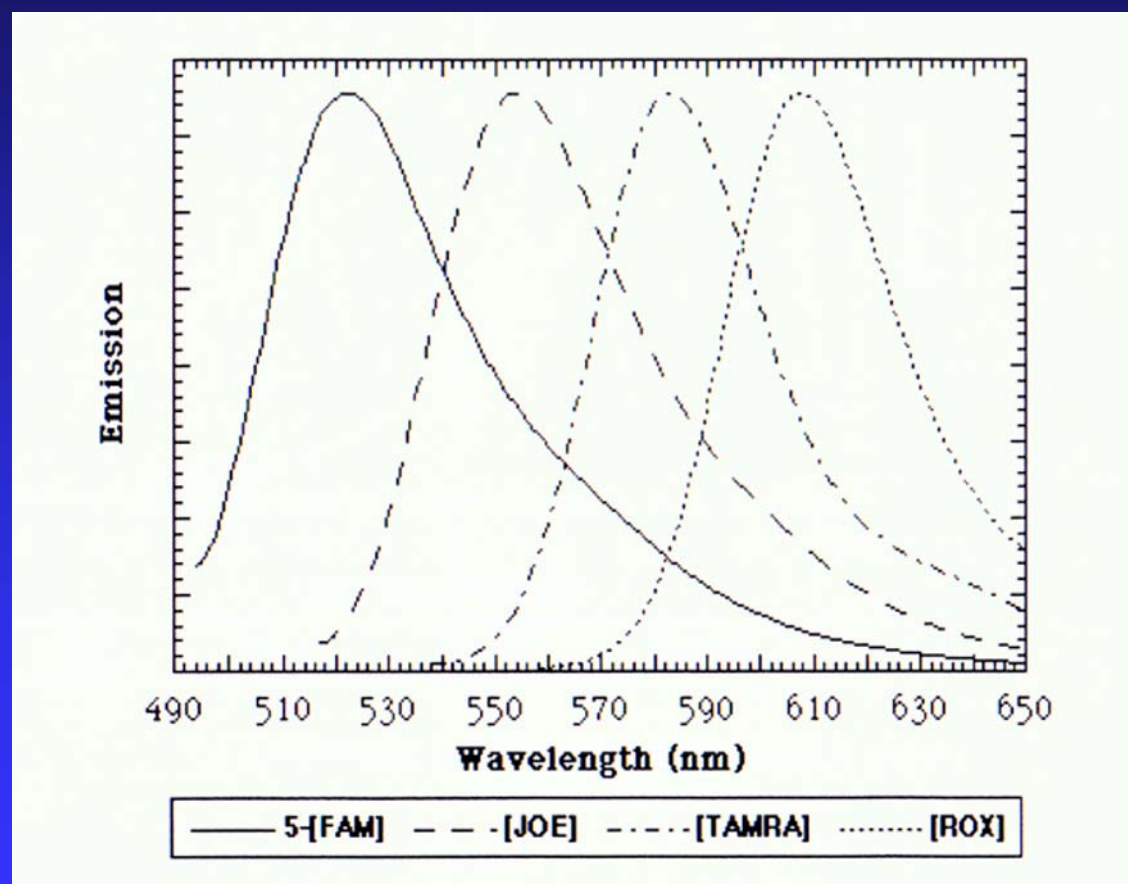


E_{max} 595 nm

Struktura fluorescenčních značek “ Big Dye “

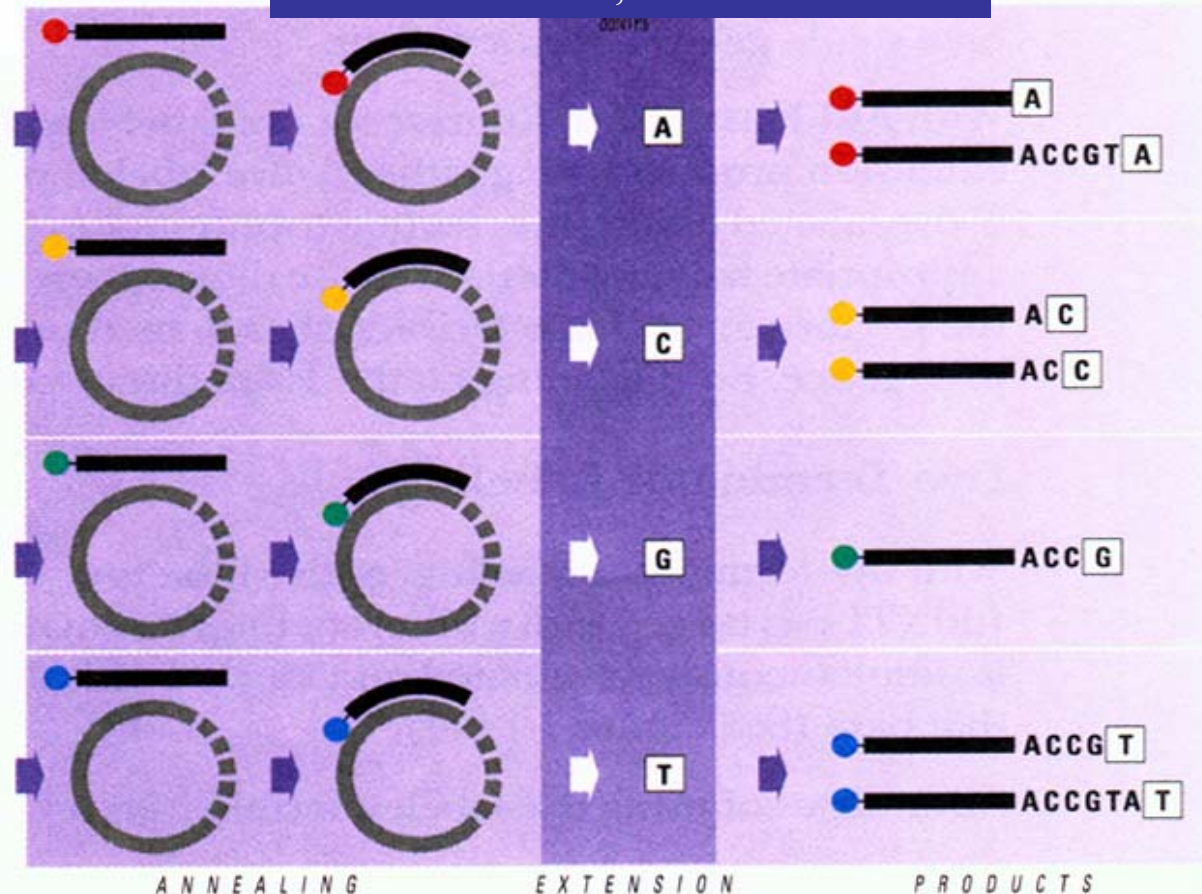


Emisní spektra



Sekvenování se značenými primery

Ampli Taq DNA
Polymerase FS,
dNTPs, ddNTPs



Sekvenování se značenými primery

Ideální metoda pro sekvenování inzertů klonovaných do fágů nebo plazmidů

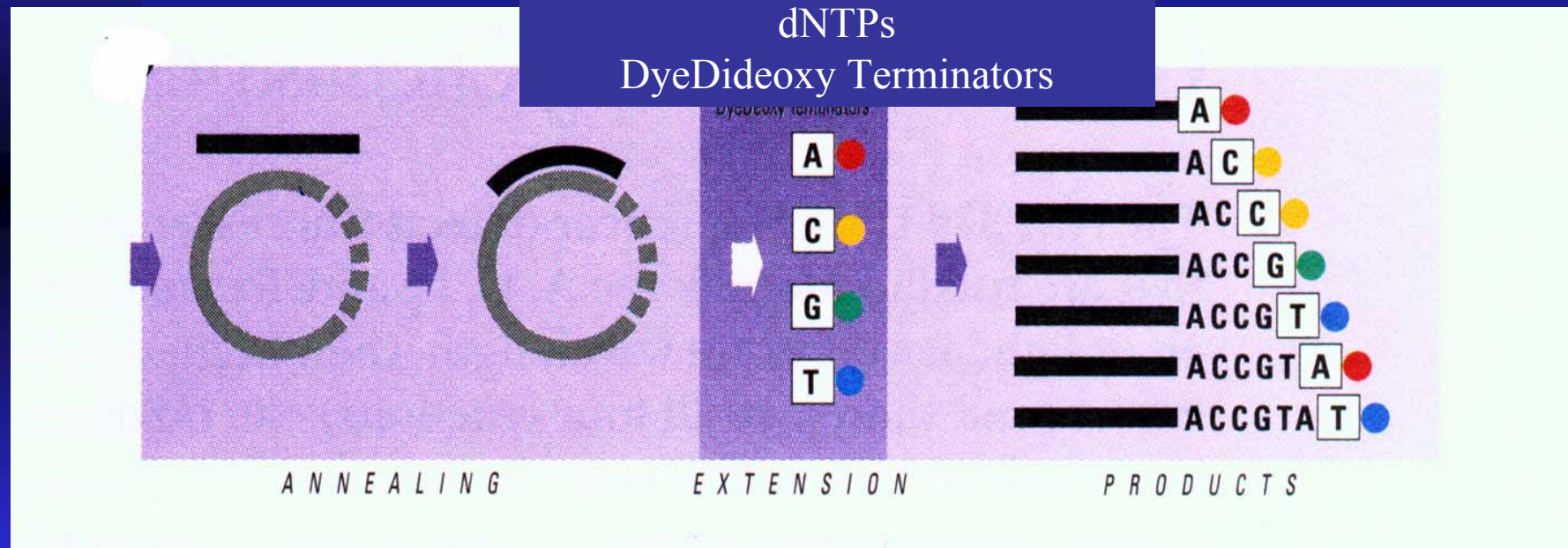
Výhody:

- univerzální fluorescenčně značené primery
neruší při sekvenování
- rovnoměrnější signál
- delší čtení

Nevýhoda: - sekvenace probíhá ve 4 zkumavkách
(větší spotřeba templátu)

Sekvenování se značenými terminátory

Ampli Taq DNA Polymerase FS,
dNTPs
DyeDideoxy Terminators



Sekvenování se značenými terminátory

- Výhody:**
- univerzální metoda
 - používají se neznačené primery
 - reakce probíhá v 1 zkumavce
 - nízká spotřeba templátu

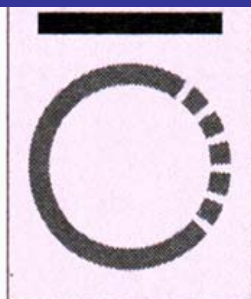
- Nevýhoda:**
- nadbytek nezreagovaných terminátorů může rušit při analýze

Cyklické sekvenování

REACTION
MIXTURE

Ampli Taq DNA
Polymerase FS, dNTPs,
Dye Dideoxyterminators

A C G T



ORIGINAL
TEMPLATE

ANNEALING

EXTENSION

DENATURATION

A	●						
A	C	●					
A	C	C	●				
A	C	C	G	●			
A	C	C	G	T	●		
A	C	C	G	T	A	●	
A	C	C	G	T	A	T	●

PRODUCTS

Genetické analyzátory

ABI PRISM

ABI PRISM™

historie genetické analýzy na kapilárách

1996
310



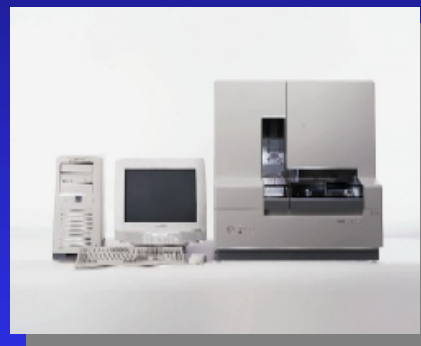
1 capillary
< 10 kb/day
< 700 Gt/day

2002
3100
Avant



4 capillaries
> 45 kb/day
> 3 500 Gt/day

2000
3100



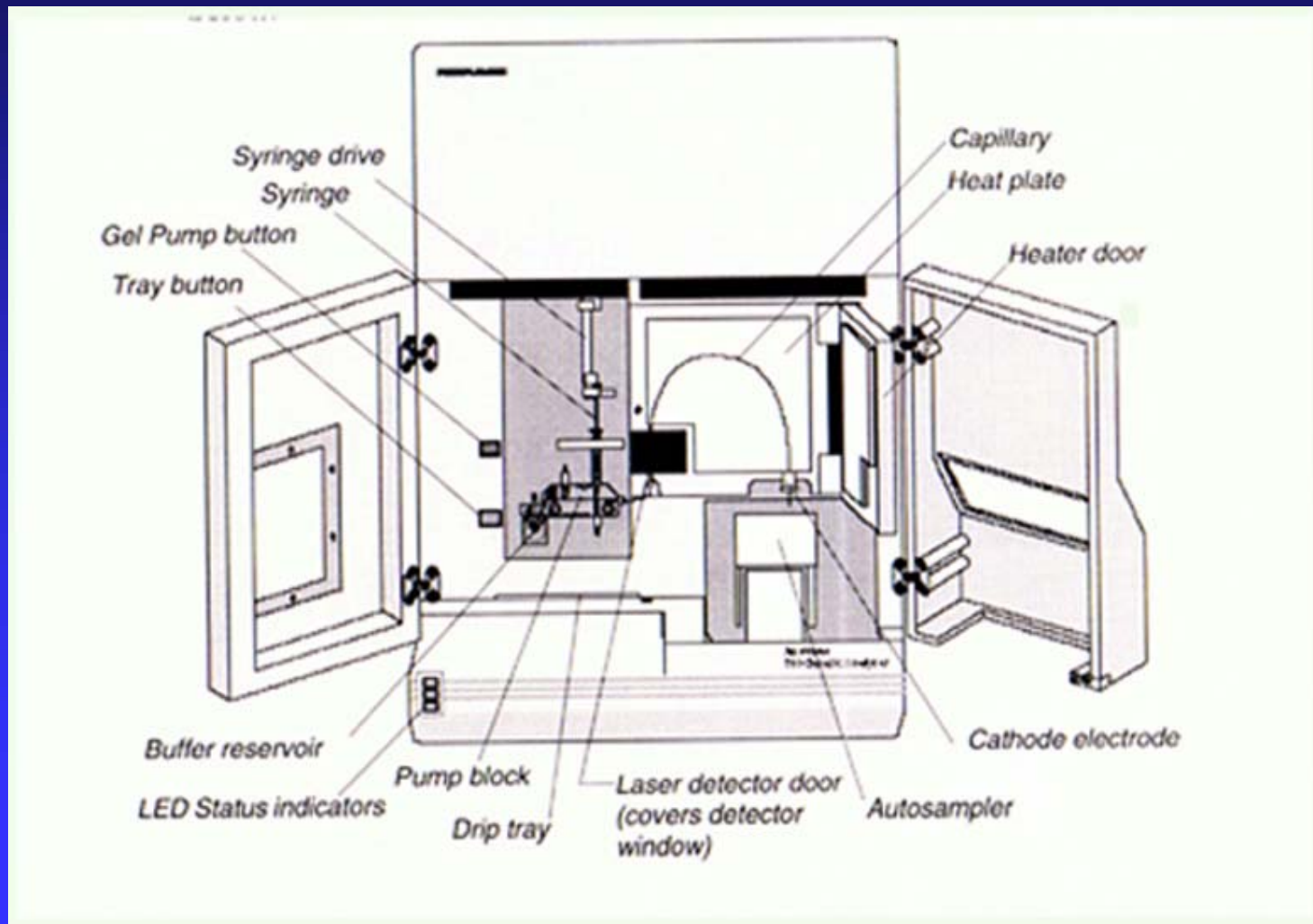
16 capillaries
> 180 kb/day
> 15 000 Gt/day

2002
3730/3730XL
System

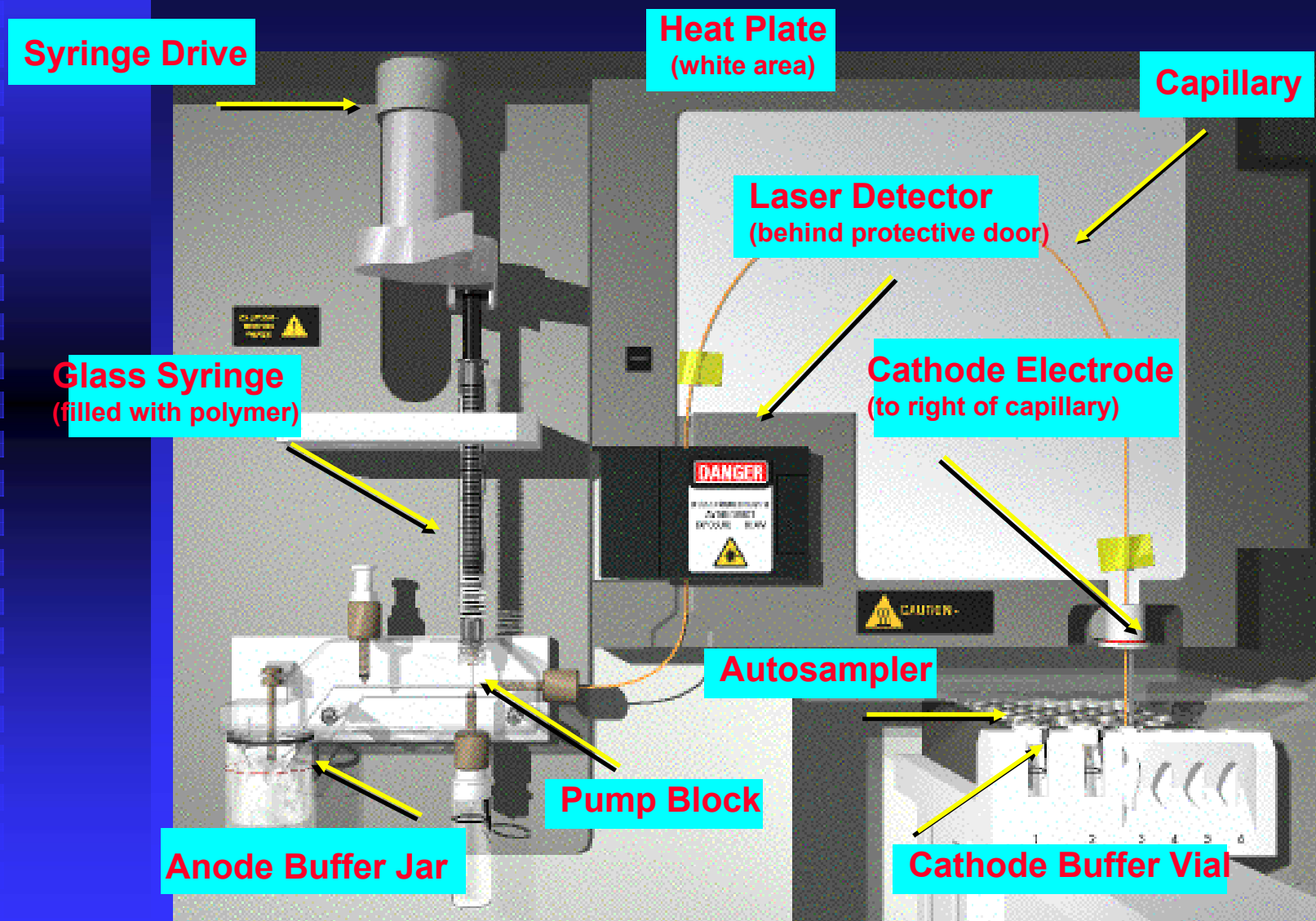


48/96 capillaries
> 1Mb/day
> 75 000 Gt/day

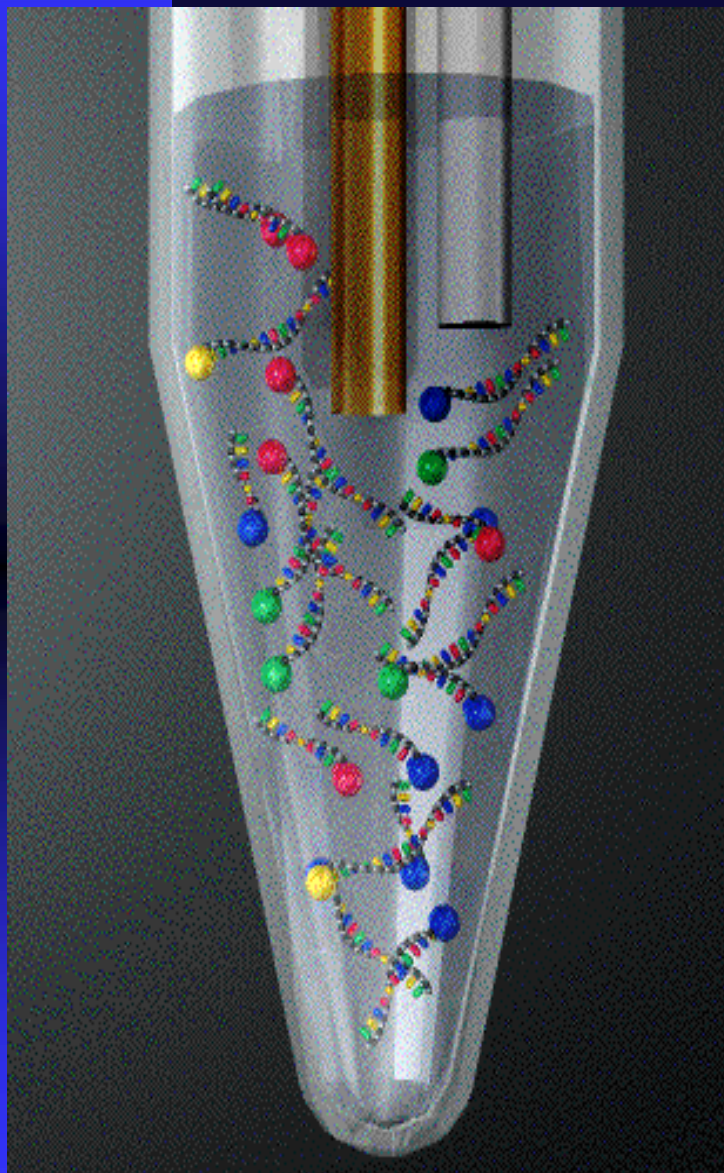
Genetický analyzátor ABI PRISM 310



Genetický analyzátor ABI PRISM 310



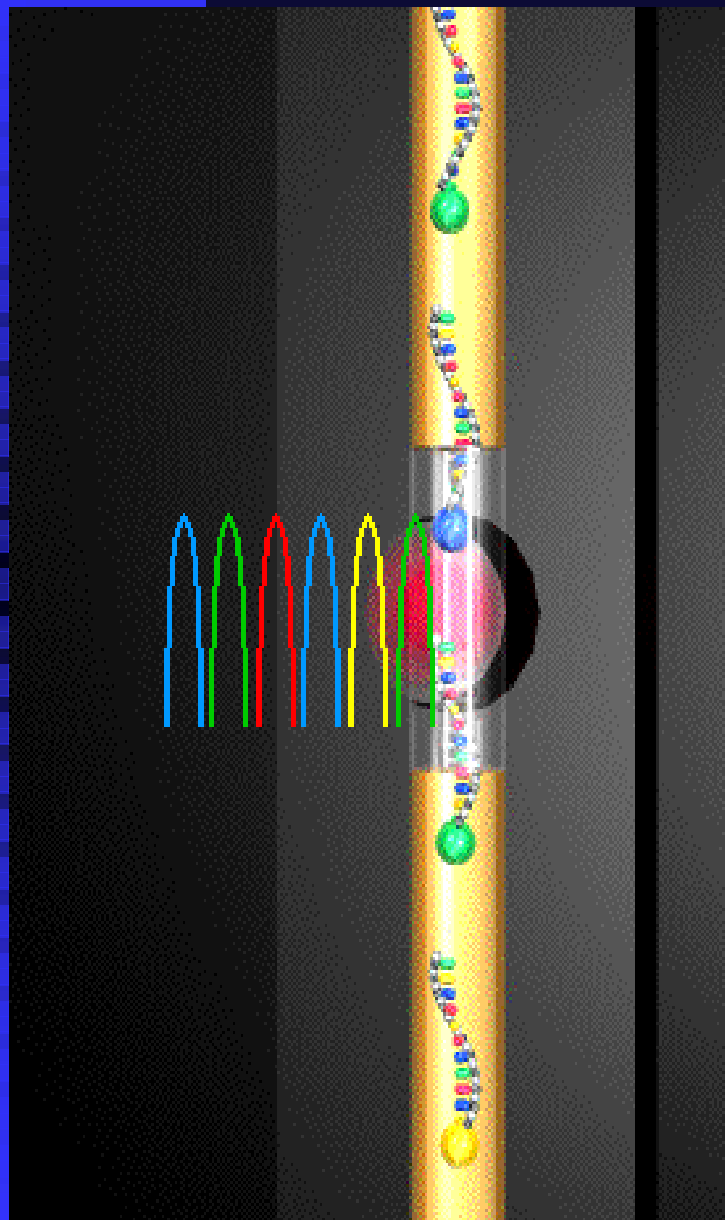
Elektrokinetické dávkování vzorku a elektroforéza



Kapilára a elektroda vstupují do vialky se vzorkem

Vloží se napětí

Záporně nabitě fragmenty DNA vstupují do kapiláry a postupují směrem k anodě, která je na opačném konci kapiláry



Excitace fluorescence a detekce

Fragmenty DNA nesoucí jednu ze čtyř fluorescenčních značek jsou ozářeny laserovým světlem

Dochází k excitaci

Emitované světlo je snímáno CCD kamerou
(4 vlnové délky jsou snímány současně)

Software vyhodnocuje emisní obrazce a převádí je do podoby barevných píků

Dobrá sekvenace vypadá takto.....



Model 310
Version 3.0
SemiAdaptive
Version 3.0

BD HBPDS+M13FSample8/30/01
HANA BUBENICKOVA LMFR
BD HBPDS+M13F
Lane 4

Signal G:1110 A:889 T:516 C:667
DT POP6(BD Set-AnyPrimer)
dRhod.TSR
Points 1385 to 9360 Base 1: 1385

Page 1 of 2
Fri, Aug 31, 2001 6:39 AM
Thu, Aug 30, 2001 8:27 PM
Spacing: 11.90(11.90)



...na kvalitu sekvence má vliv:

Templát	způsob přípravy čistota koncentrace sekvence (GC rich, sekundární struktury)
Primer	sekvence délka T_m
Protokol	počet cyklů
Úprava vzorku po PCR	
Kvalita použitých chemikálií	expirace čistota způsob skladování

Exprese a purifikace rekombinantních proteinů

- od genů k proteinům
- základní techniky genového inženýrství
 - expresní vektory
 - stanovení sekvence DNA
 - místně řízená mutageneze
- **exprese rekombinantních proteinů**
 - afinitní značky
 - purifikační postupy

Než začneme.....

Proč???

Pro jaký účel ?

Co???

Jaké vlastnosti má náš protein ?

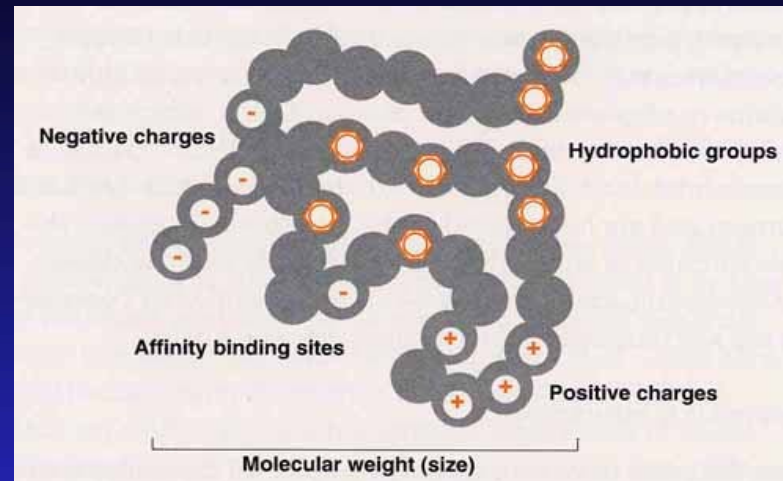
Jak???

Jak protein detekovat?

Množství a čistota

Krystalizace	μmol	95%
NMR	μmol	95%
Funkční studie	nmol	různá
Produkce protilátek	nmol	90%
Stanovení sekvence	pmol	90%
Hmotnostní spektrometrie	fmol	nízká

Vlastnosti/purifikační metody



Rozpustnost

precipitace síranem amonným

Velikost/tvar

gelová filtrace

pI (náboj)

iontově výměnná chromatografie

Hydrofobicita

reverzně fázová chromatografie

Vazba

afinitní chromatografie

Stabilita

teplotní precipitace

Produkce rekombinantních proteinů v *Escherichia coli*

Výhody:

- organizmus s dobře charakterizovaným genomem a proteomem
- design řady vektorů usnadňuje klonování a expresi cizích genů
- nadprodukce rekombinantních proteinů

Nevýhody:

- cDNA je nezbytností
- absence eukaryotních posttranslačních systémů
- tvorba inkluzních tělísek

Fúzní proteiny

- translační fúze sekvencí kódujících rekombinantní protein a
 - a) krátký peptid [př. (His)_n, (Asp)_n, (Arg)_n ...]
 - uniformita purifikace
 - b) přirozený oligopeptid [př. MBP, GST, thioredoxin ...]
 - pozitivní změny kvality a kvantity exprese
(často zvýšení solubility rekombinantního proteinu)
 - uniformita purifikace
- fúzního partnera lze obvykle selektivně odštěpit

Příklady rekombinantních fúzních proteinů

Fúze s...	Afinity k...	Eluce...	Odštěpění...
glutathion-S-transferasa	glutathion	glutathion	thrombin
maltose-binding protein	Amylosa	maltosa	faktor Xa
His-tag	Ni-IMAC	histidin, imidazol, pH	thrombin
Thioredoxin	žádná	osmotický, teplotní šok	enterokinasa
Strep-tag	streptavidin	biotin	nelze

.

.

.

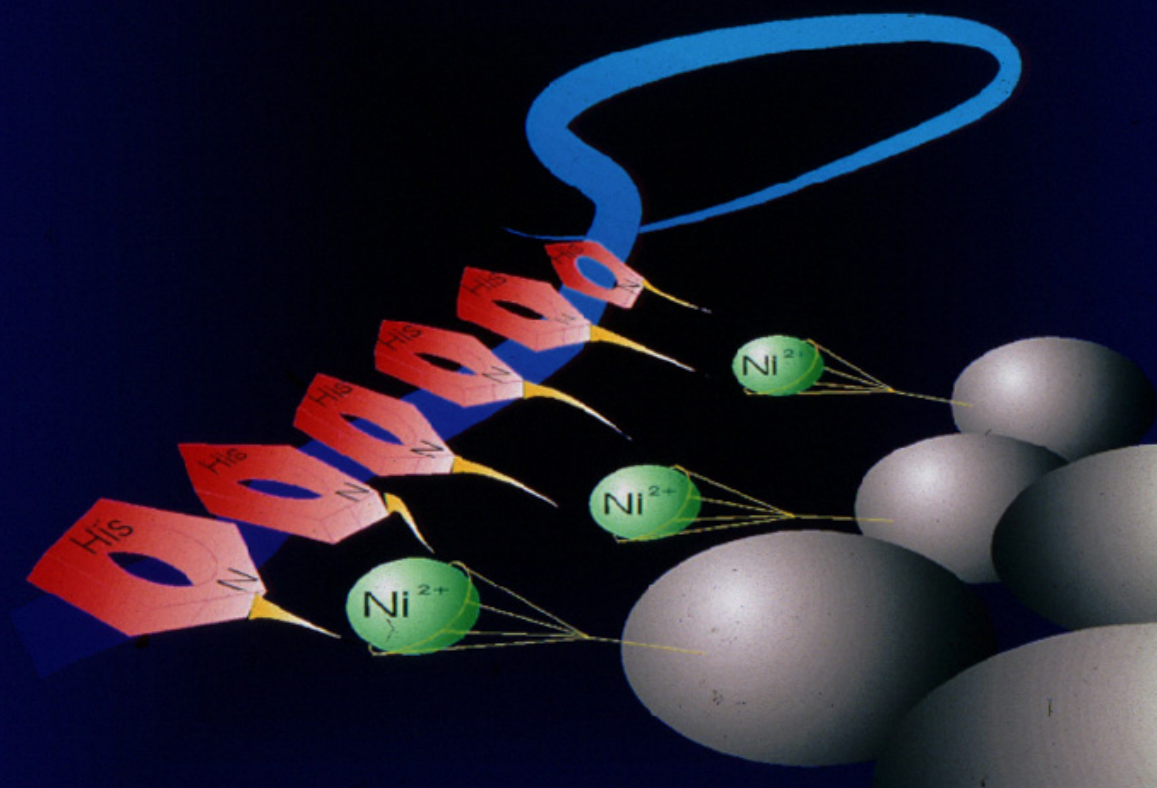
.

.

Metalochelatační afinitní chromatografie (MCAC)

- využívá koordinační interakce převážně histidinových zbytků v molekule proteinu s imobilizovaným iontem přechodného kovu
- poprvé popsána jako metoda frakcionace sérových bílkovin (Porath 1975)
- s rozvojem molekulární biologie se stává jednou z nejuniverzálnějších purifikačních technik pro rekombinantní proteiny s oligohistidinovou doménou
- komplexní interakce není ovlivněna chaotropními činidly (např. močovina), lze ji tak využít pro izolaci proteinu z inkluzních tělísek a asistovanou renaturaci
- eluce proteinu lze dosáhnout snížením pH (protonace imidazolové skupiny histidinu), zvýšením koncentrace kompetitivního činidla (např. imidazol) nebo silného chelatoru (např. EDTA)

Ni-NTA Agarose based Protein Purification



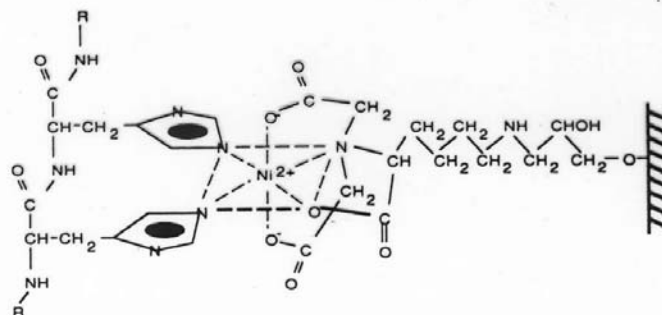


Figure 3: Interaction between 6xHis tag and Ni-NTA resin.

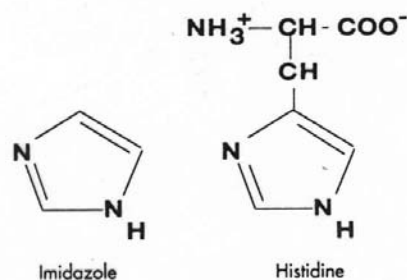


Figure 5: Structures of imidazole and histidine.

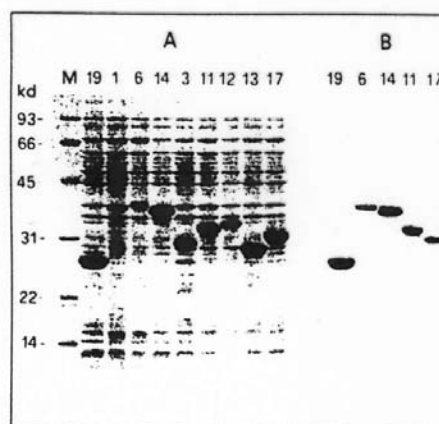


Figure 4: Expression and purification of malaria circumsporozoite antigens with QIAexpress.

A. SDS-Page analysis of recombinant 6xHis-tagged CS proteins, 5 hours after induction with IPTG.

B. SDS-Page analysis of recombinant CS proteins after purification on Ni-NTA resin according to the standard protocol, and elution at pH 5.9. Each protein is more than 80% pure.

D. Stüber, Hoffmann - La Roche, Basel, Switzerland.

Metalochelatační afinitní chromatografie

Jednokroková purifikace za nativních a denaturačních podmínek

Protokol nativní IMAC konkrétního proteinu je zčásti nepřenositelný na jiné proteiny!

Obecně lze navrhnout:

- ➡ pufrů o pH 7-8 pro vazbu rek. proteinu s kovovým iontem
- ➡ pufrů s vysokou koncentrací solí (např. 0,5-1 mol/l NaCl)
- ➡ nižší koncentrace imidazolu nebo snížení pH pro odstranění balastních proteinů
- ➡ eluce použitím gradientu imidazolu (0-1 mol/l), výrazným snížením pH nebo využitím EDTA

Metalochelatační afinitní chromatografie

Jednokroková purifikace za nativních a denaturačních podmínek

Denaturační IMAC – purifikace proteinů v inkluzních těliscích

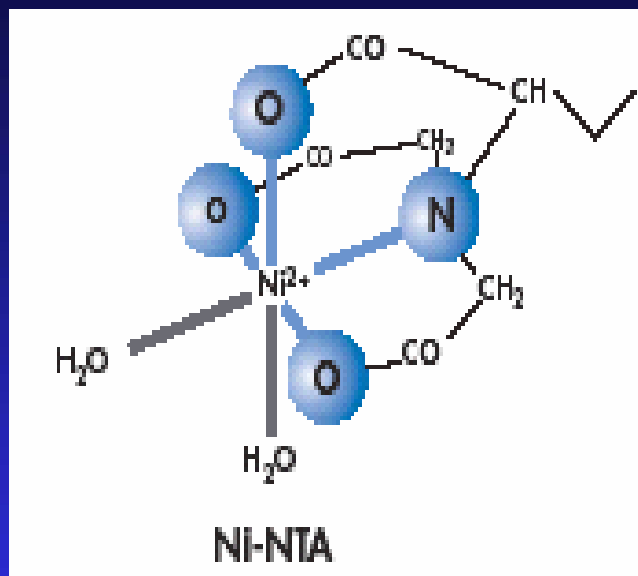
- ➡ purifikace za vysokých koncentrací močoviny nebo guanidinium chloridu
 - čistý protein, ale porušení terciární/kvartérní struktury (postačí však např. na imunizace)

Získání nativního konformeru: - nutné pro měření enzymové kinetiky, rtg analýza,...

- eluce enzymu z kolony a jeho renaturace dialýzou nebo výrazným zředěním v renaturačních pufrch
- renaturace enzymu vázaného na matrici:
 - ➡ gradient z denaturačních do renaturačních pufrů
 - ➡ pulzní renaturace

Metalochelatační matrice

Ni^{2+} NTA (nitrilotrioctová kyselina)



- nejčastěji používaný systém
- NTA poskytuje 4 volné elektronové páry do koordinační vazby → pevná vazba chelator-kov → nedochází k uvolňování Ni^{2+} iontu během purifikace

Ni-NTA matrice

Ni-NTA Agarosa

-vazba Ni-NTA na agarosu

- vysoká vazebná kapacita (5-10 mg/ml)

- vysoká stabilita

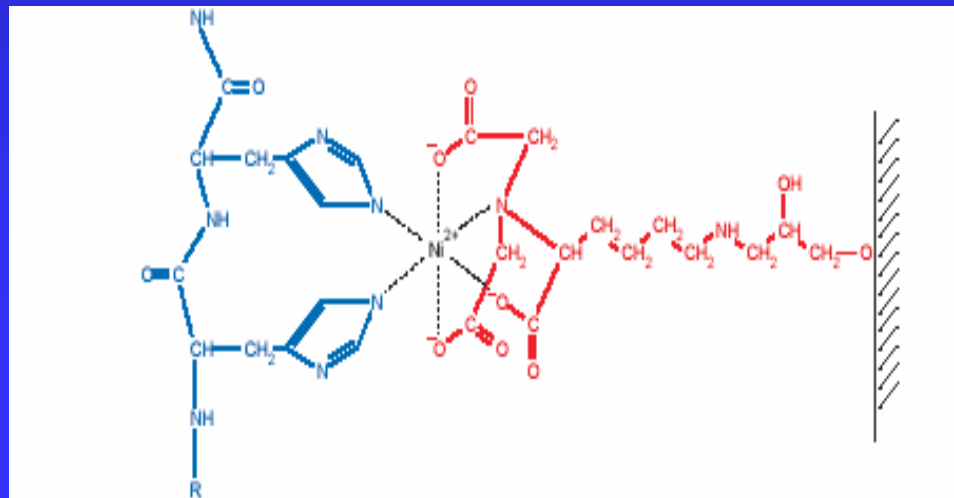
- dobré manipulační vlastnosti
(plnění kolon)

- vhodná pro FPLC

Ni-NTA Superflow

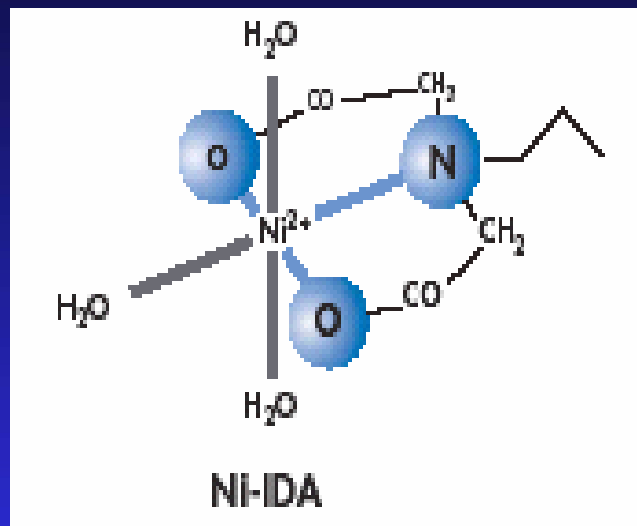
- vazba Ni-NTA na ???

- dá se použít i při vyšších tlacích



Metalochelatační matrice

Ni^{2+} -IDA (imidodioctová kyselina)



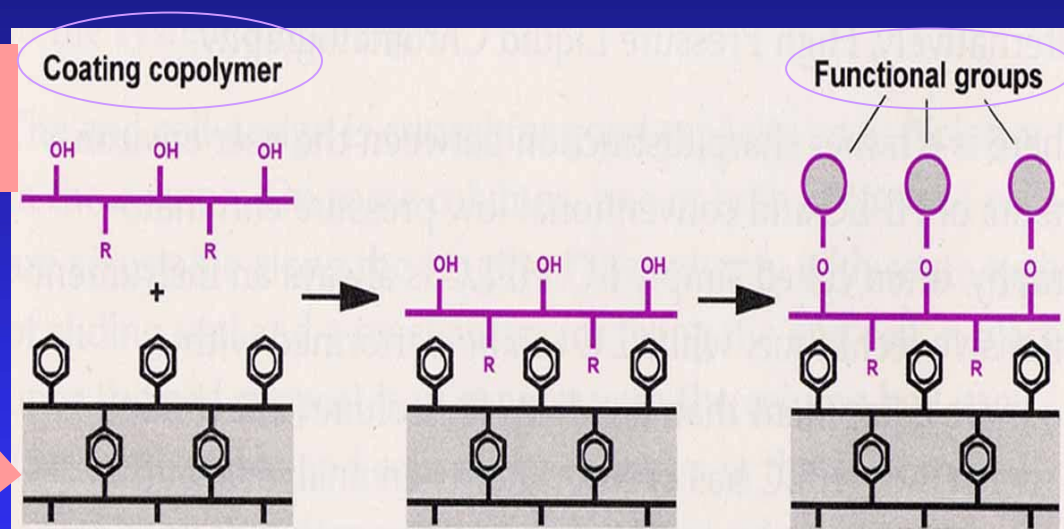
- IDA tvoří výhodné cheláty s Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} ionty
- 3 metalochelatační místa - vazba chelator - kov není tak pevná dochází k uvolňování kovu během purifikace

Matrice POROS MC/M



vazba přechodného kovu

polyhydroxylovaný
polymer



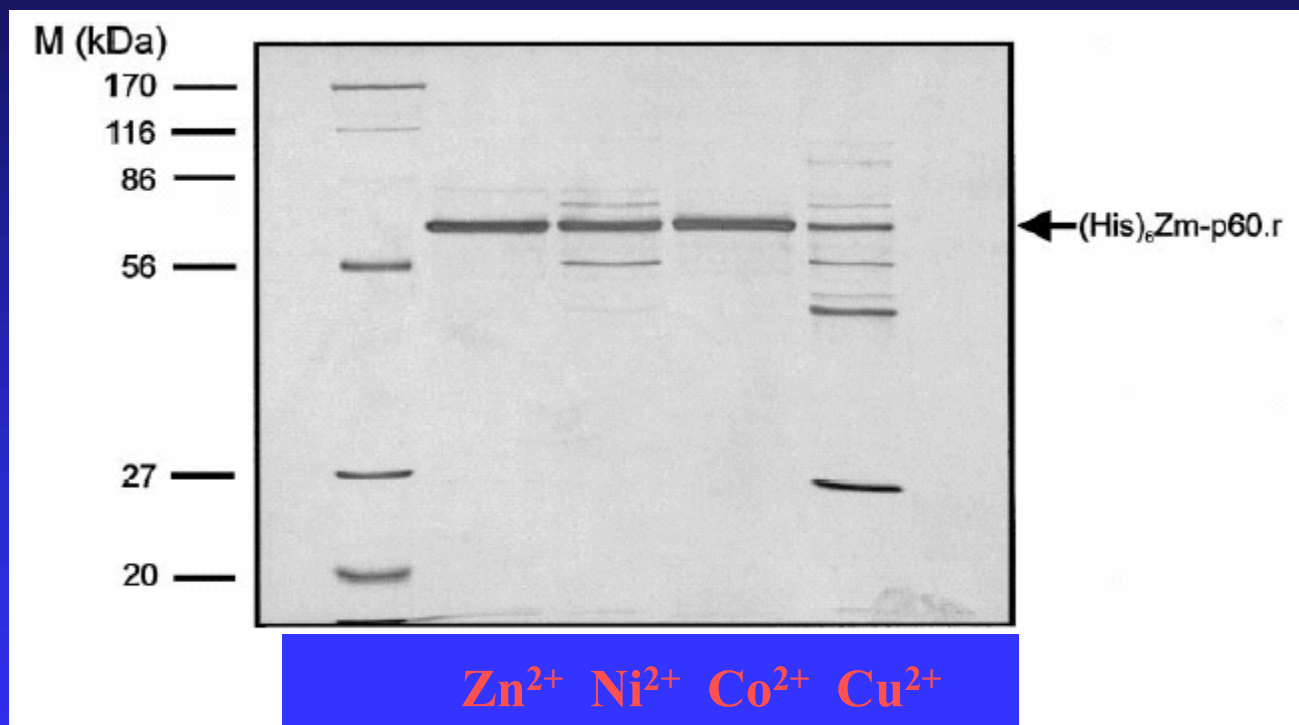
imidodioctová
kyselina

částice zesíťovaného poly(styren-divinylbenzen)
- patentovaná velikost pórů

Vazebná kapacita: 20 mg/ml (myoglobin, Cu^{2+})

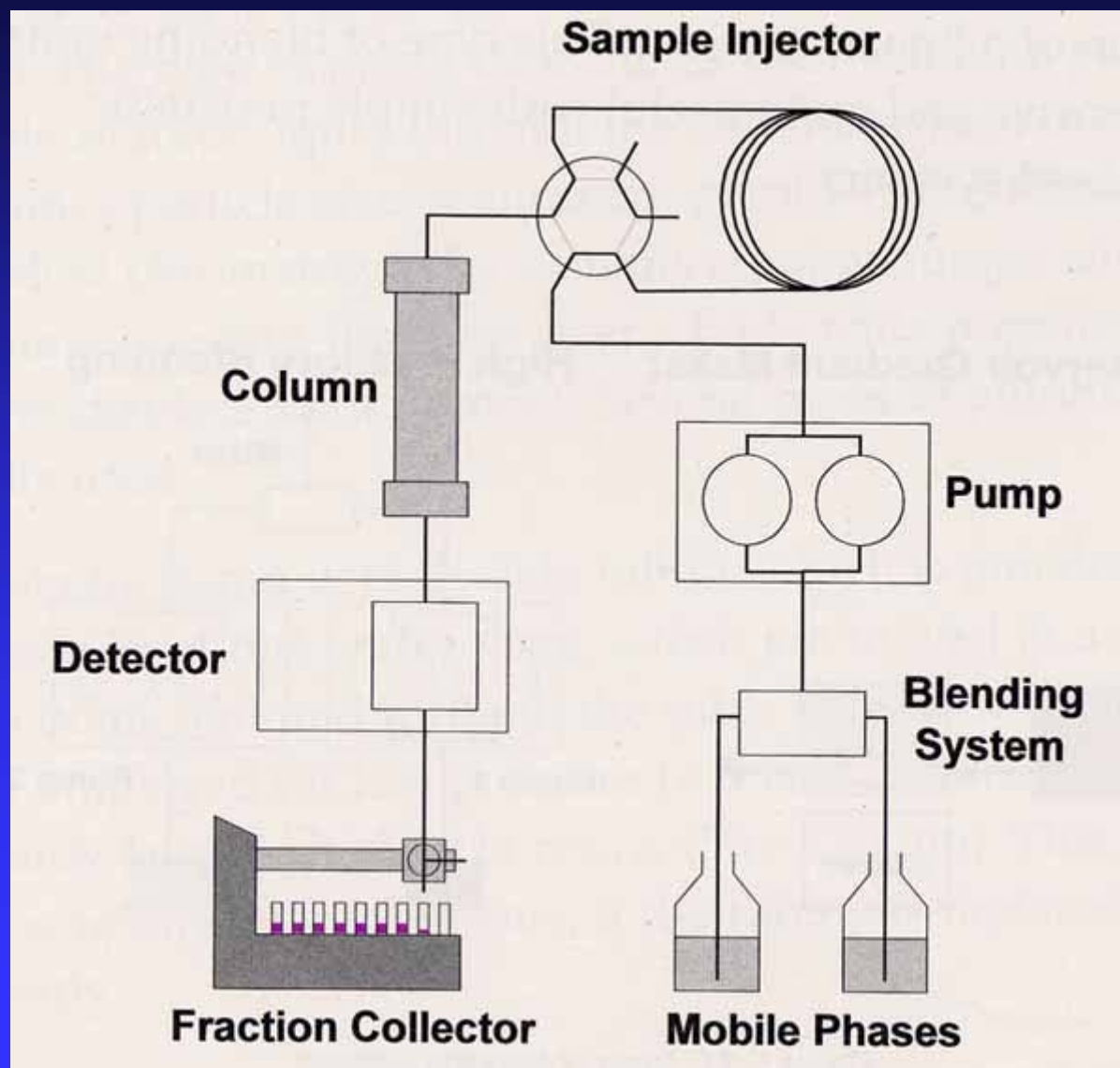
Efekt kovového iontu navázaného na POROS MC/M matrici

Funkční skupina- imidodioctová kyselina



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

Chromatografická instrumentace

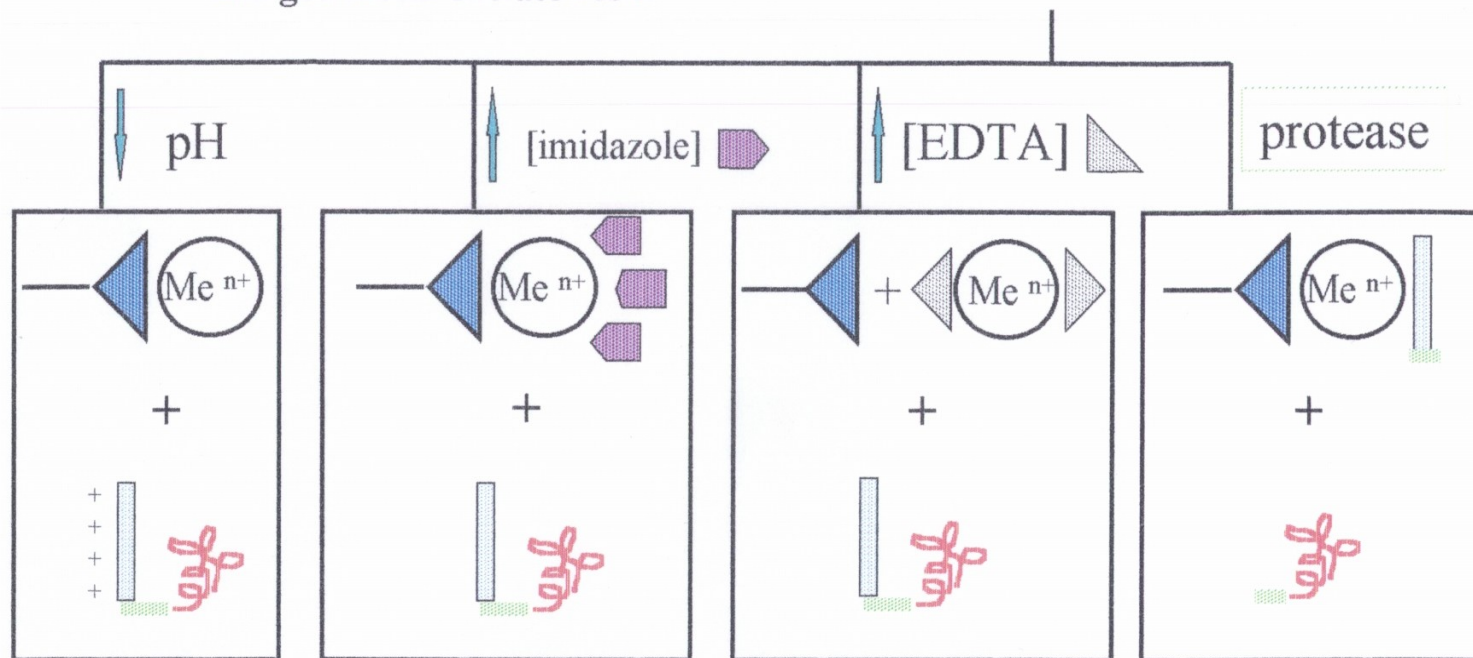
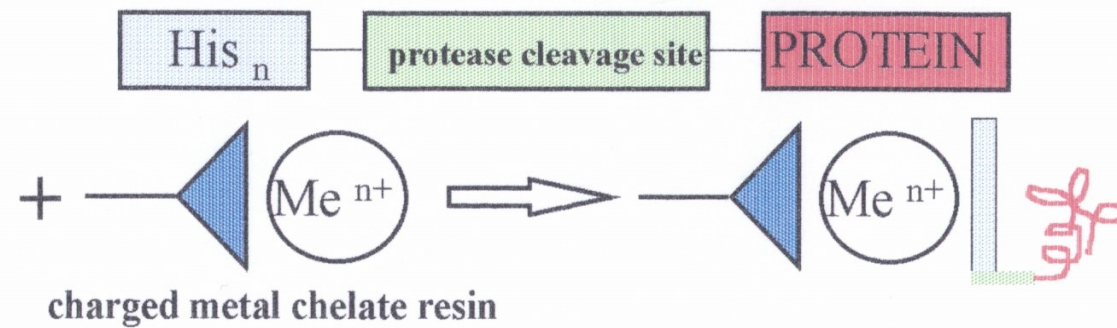


Perfúzní chromatograf BioCAD 700E, PerSeptive Biosystems

- HPLC i FPLC aplikace na jakékoliv koloně
- optimální je využití perfúzních sorbentů Poros
+ zkrácení doby separace na 1/10 až 1/100
času nutného pro použití klasických sorbentů
- dávkování vzorku v rozmezí μl – l
- nasazení až tří kolon
- automatické vytváření gradientu (pH, iontové síly,..)
- automatický sběrač frakcí
- detektory: UV/vis pH elektroda, vodivostní čidlo
- rychlost toku od 0,5 do 60 ml/min
- data, metody, konfigurace automaticky uloženy do paměti



Immobilized metal affinity chromatography

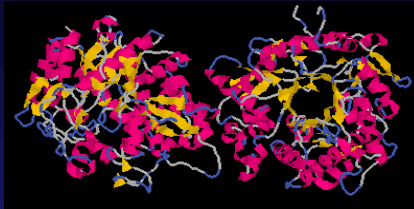


[illegible]

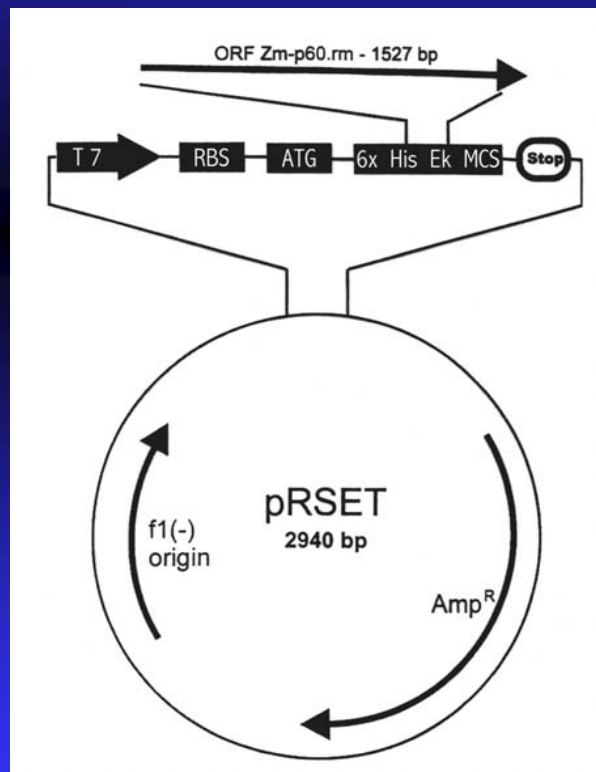
Eluce balastních proteinů: gradient 0-100% B

Eluce Zm-p60.1: 0,1 M EDTA, 1 M NaCl, pH 8

Rekombinatní deriváty kukuřičné β -glukosidasy



Expresní konstrukt pRSETA::*Zm-p60.r*



Exprese:

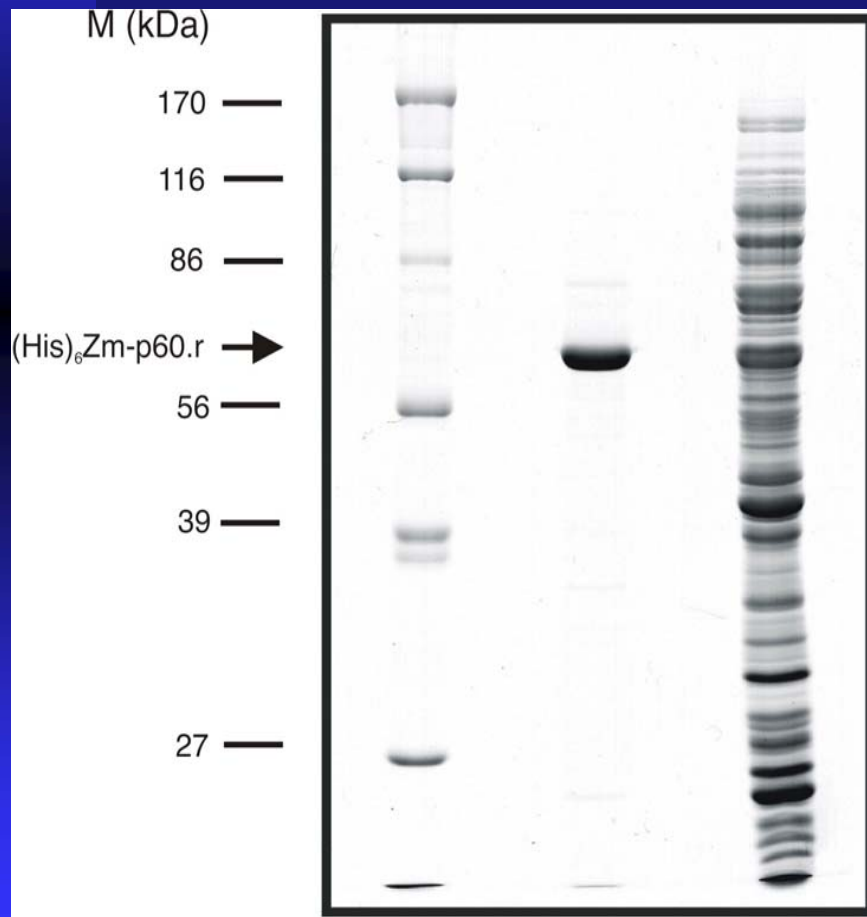
- kmen BL21(DE3)pLysS *E. Coli*
- IPTG-inducibilní T7 RNA polymerasa
- *Zm-p60.r* pod T7 promotorem
- inhibice RNA polymerasy *E. coli* rifampicinem

Purifikace:

- His tag na N-konci proteinu
- metalochelatační afinitní chromatografie
- POROS MC/M Zn-IDA matrice (hlavně WT)
- NiNTA Superflow s následnou gelovou filtrací (mutantní formy)

Rekombinantní derivát (His)₆Zm-p60.r

- konstrukt pRSET::Zm-p60.r, bakteriální kmen BL21(DE3)pLysS
- nativní purifikace na koloně POROS MC/M IDA-Zn²⁺



Expres:

- IPTG-inducibilní T7 RNA polymeráza (kódována na chromozómu)
- T7 lyzozym (pod T7 promotorem, plazmid pLysS, inhibitor T7 RNA polymerázy)
- rifampicin, inhibice RNA polymerázy *E. coli*
- Zm-p60.1 pod T7 promotorem

Purifikace:

- metalochelatační afinitní chromatografie
- perfúzní sorbent POROS MC/M
- komplex iminodiacetát-Zn²⁺
- 80% výtěžek, 95-násobné přečištění

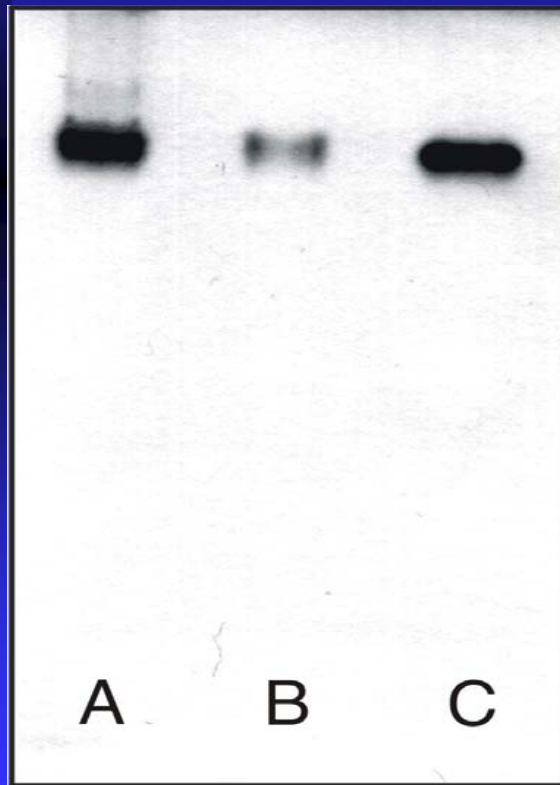
Použití:

- rutinní produkce a izolace standardního kmene a solubilních mutantních forem

In vitro asistovaná renaturace (His)₆Zm-p60.r

podle Etzerodt M. et al.: WPA 94/18227 (1994)

- denaturovaný protein (v 8M močovně) vázán na matrici s imobilizovaným Ni²⁺
- redukce silným redukčním činidlem, přerušení disulfidických můstků
- protein denaturován/renaturován cyklickými pulzy denaturantu/renaturantu se snižující se koncentrací denaturantu v každém cyklu



Metoda:

- 23 denaturačních/renaturačních cyklů
- eluce produktu 0,1 M EDTA

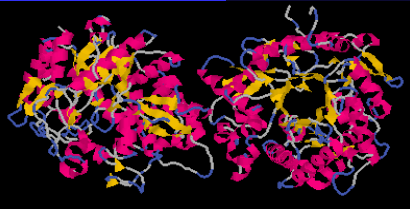
Analýza produktu renaturace (RP):

- nativní PAGE s detekcí enzymové aktivity:
 - A: proteinový extrakt z koleoptilí *Zea mays*
 - B: renaturační produkt
 - C: (His)₆Zm-p60.r purifikovaná za nativních podmínek
- analýza kinetických parametrů
 - $K_M(\text{WT}) = 0,60 \pm 0,08 \text{ mM}$
 - $K_M(\text{RP}) = 0,64 \pm 0,06 \text{ mM}$

Použití:

- renaturace nesolubilních mutant Zm-p60.1

Rekombinativní deriváty kukuřičné β -glukosidasy

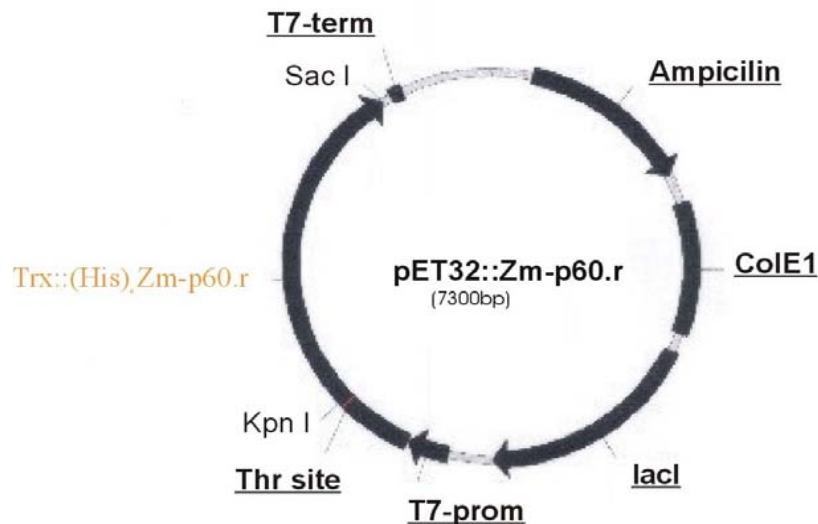


Expresní konstrukt pET32::Zm-p60.r

- pro mutanty Zm-p60.1 se sníženou rozpustností nebo narušenou kvartérní strukturou
➔ zlepšuje folding proteinu

THIOREDOXIN

- ➔ přirozený bakteriální protein- lépe rozeznáván translačním aparátem *E. coli*
- ➔ neovlivňuje funkci enzymu - nemusí být odštěpen



Expres:

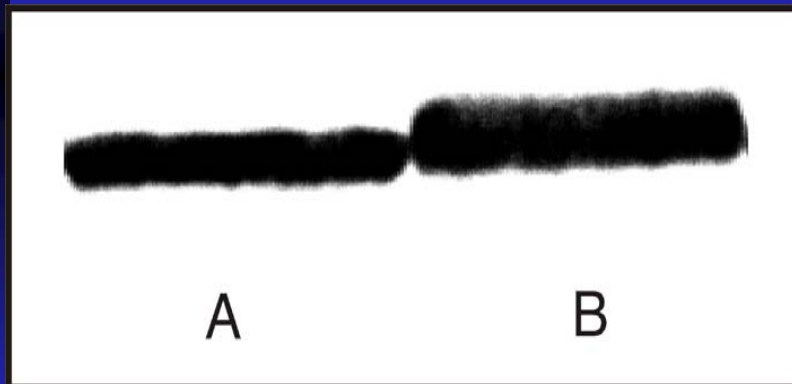
- kmen BL21(DE3)pLysS *E. Coli*
- IPTG-inducibilní T7 RNA polymerasa
- Zm-p60.1 pod T7 promotorem

Purifikace:

- His tag na N-konci
- metalochelatační afinitní chromatografie
- matrice POROS MC/M Zn-IDA (WT i mutantní formy Zm-p60.1)

Rekombinantní derivát hpTrx::Zm-p60.r

- konstrukt pThioHisA::Zm-p60.r, bakteriální kmen JM109
- významný nárůst podílu solubilní frakce rekombinantního proteinu
- fúzním partnerem His-patch thioredoxin (Lu et al. 1996) s afinitou k imobilizovaným iontům přechodných kovů



Exprese:

- bakteriální RNA polymeráza
- Zm-p60.1 pod hybridním *trc* promotorem
- 80% podíl solubilní frakce (A) na celkovém rekombinantním proteinu standardního typu (B)

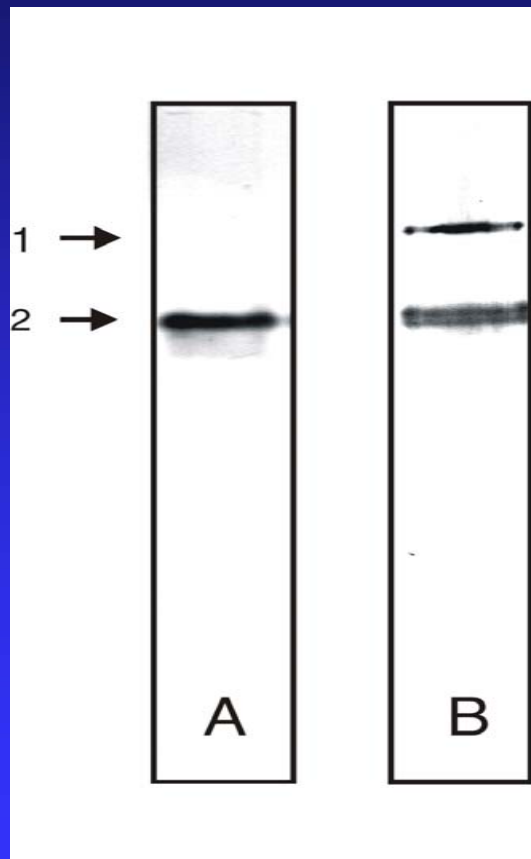
Purifikace:

- metalochelatační afinitní chromatografie

Použití:

- produkce a izolace mutantních forem Zm-60.1 se sníženou solubilitou

Použití fúzní technologie při expresi mutanty Zm-p60.1 s porušenou nativní strukturou



- mutanta I404D produkovaná jako derivát $(\text{His})_6\text{Zm-p60.rm}$ vykazala poruchu při tvorbě nativní dimerní struktury (A), byla nalezena ve formě enzymaticky neaktivního monomeru (2)
- následně byla exprimována jako fúzní protein $\text{hpTrx}::\text{Zm-p60.rm}$ (B), byla identifikována enzymaticky aktivní dimerní forma (1)
- thioredoxin je lépe rozeznávaný translačním aparátem *E. coli*
- může thioredoxin fungovat jako kovalentně vázaný chaperon? (LaVallie 1993)

Otázky