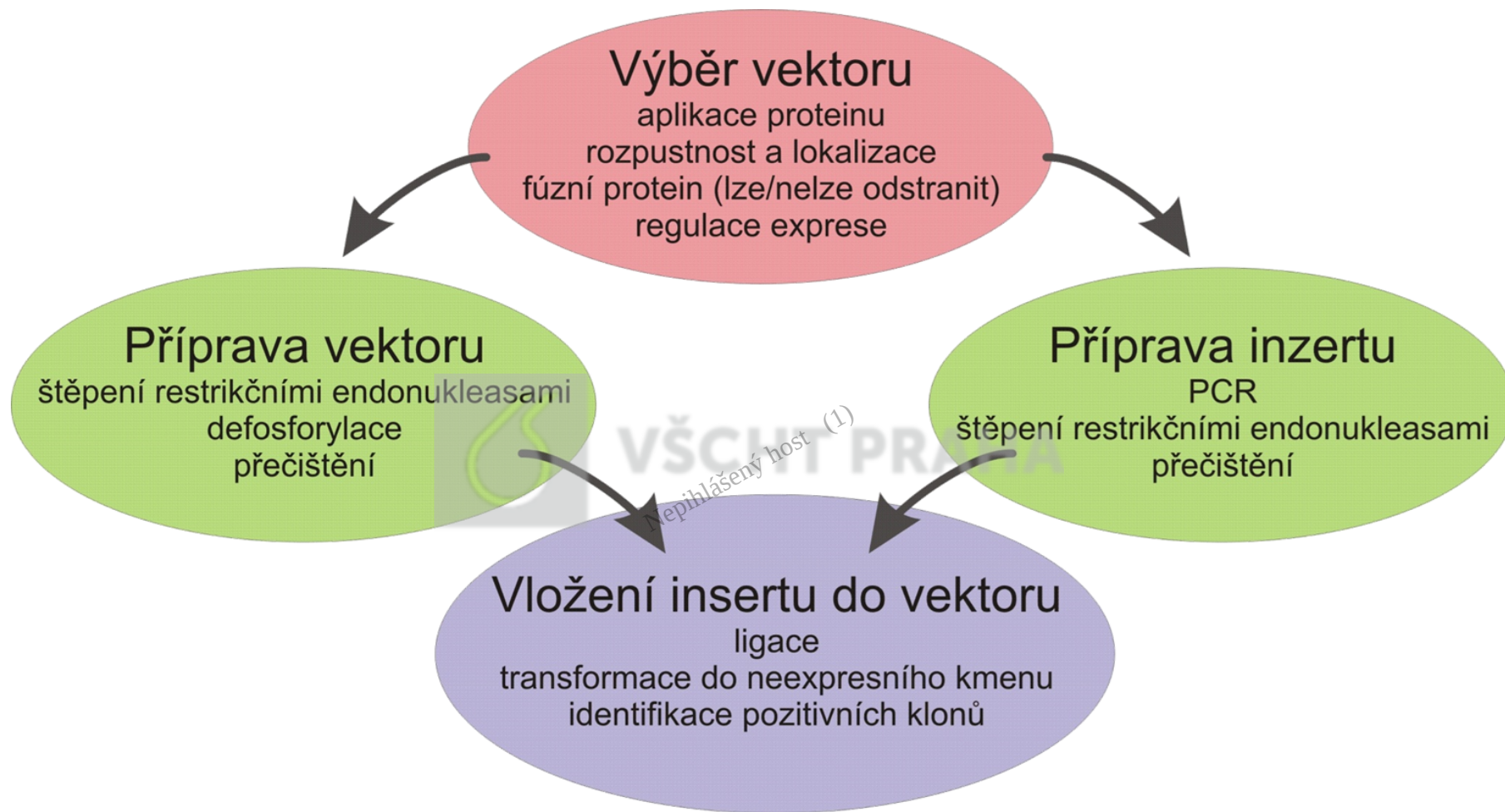


Příprava rekombinantních proteinů



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)



Co lze k rekombinantnímu proteinu připojit???

Epitop – krátká peptidová sekvence, vhodná pro imunologické aplikace jako je WB nebo ko-precipitace

Afinitní „tag“ – obecně delší sekvence, která se používá pro afinitní purifikaci a může zlepšovat rozpustnost a správné sbalení proteinu

Fluorescenční „tag“ – pro sledování lokalizace v buňce

Na N- nebo na C- konec???

- Skládání proteinu
- Ovlivnění funkce



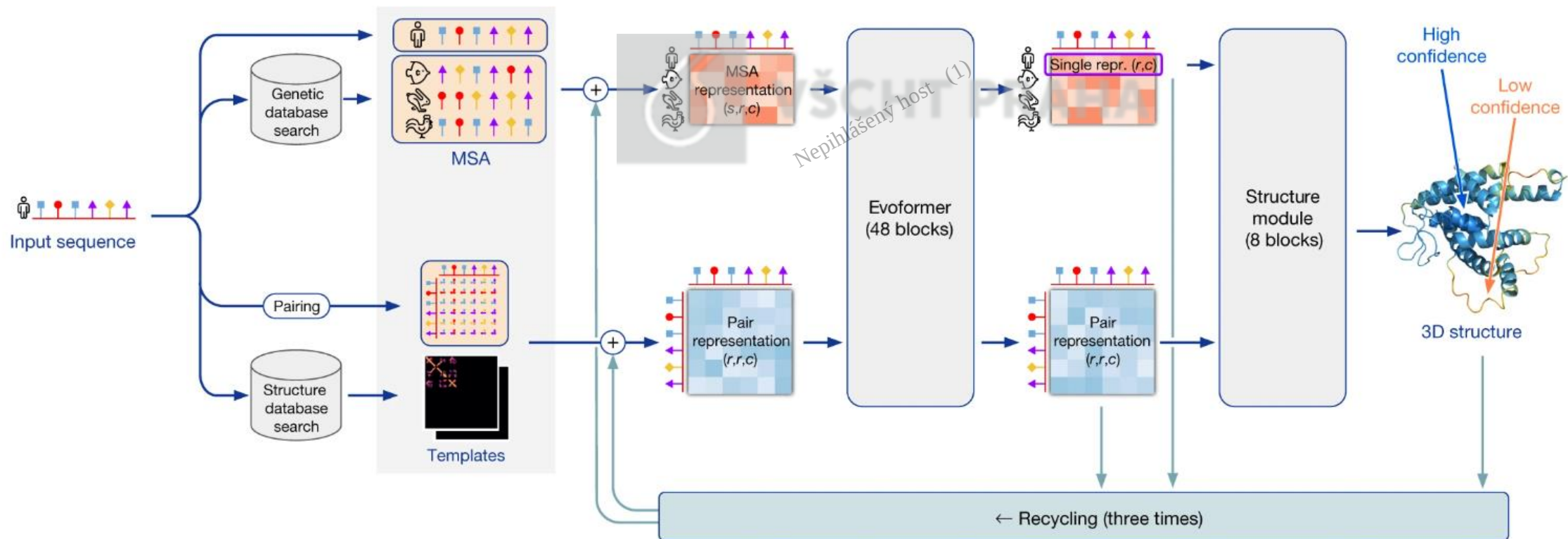
Oba konce

Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold

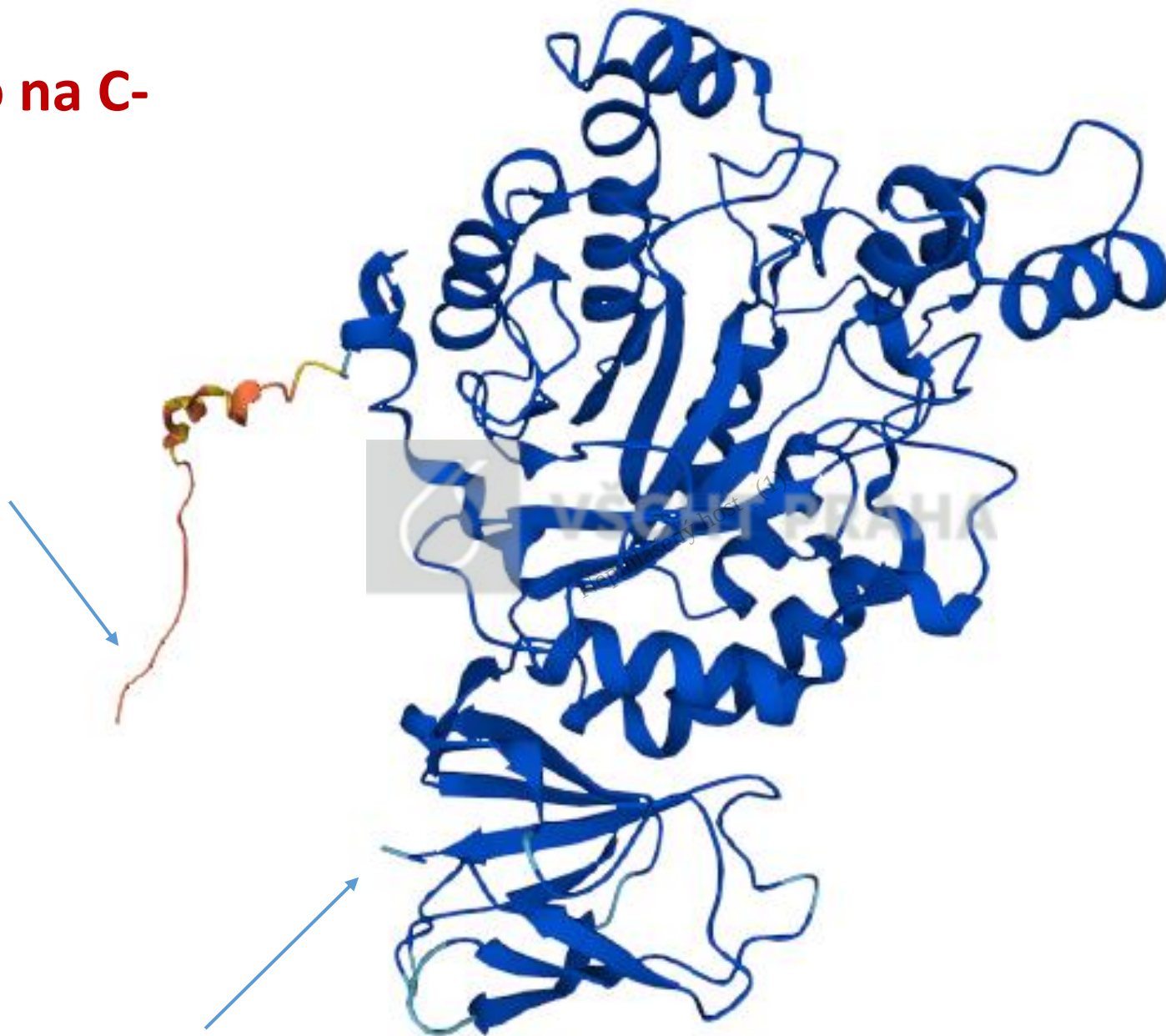
[John Jumper](#) , [Richard Evans](#), [Alexander Pritzel](#), [Tim Green](#), [Michael Figurnov](#), [Olaf Ronneberger](#), [Kathryn Tunyasuvunakool](#), [Russ Bates](#), [Augustin Židek](#), [Anna Potapenko](#), [Alex Bridgland](#), [Clemens Meyer](#), [Simon A. A. Kohl](#), [Andrew J. Ballard](#), [Andrew Cowie](#), [Bernardino Romera-Paredes](#), [Stanislav Nikolov](#), [Rishub Jain](#), [Jonas Adler](#), [Trevor Back](#), [Stig Petersen](#), [David Reiman](#), [Ellen Clancy](#), [Michal Zielinski](#), ... [Demis Hassabis](#) 

[+ Show authors](#)

Nature **596**, 583–589 (2021) | [Cite this article](#)



N- nebo na C-



pozor: kotranslační nebo posttranslační modifikace

Nechat, či odstranit???

Enterokinasa

Místo štěpení:	DDDDK ^X
Výhody:	je obsažena ve FLAG [®] epitopu
Nevýhody:	účinnost je ovlivněna AK za lysinem, nespecifické štěpení

Faktor Xa

Místo štěpení:	I[E/D]GR ^X
Výhody:	často používaný v plasmidech
Nevýhody:	X ≠ Pro, Arg, Faktor Xa vyžaduje aktivaci Ca ²⁺ , nelze ho používat s chelatačními látkami (EDTA), nespecifické štěpení

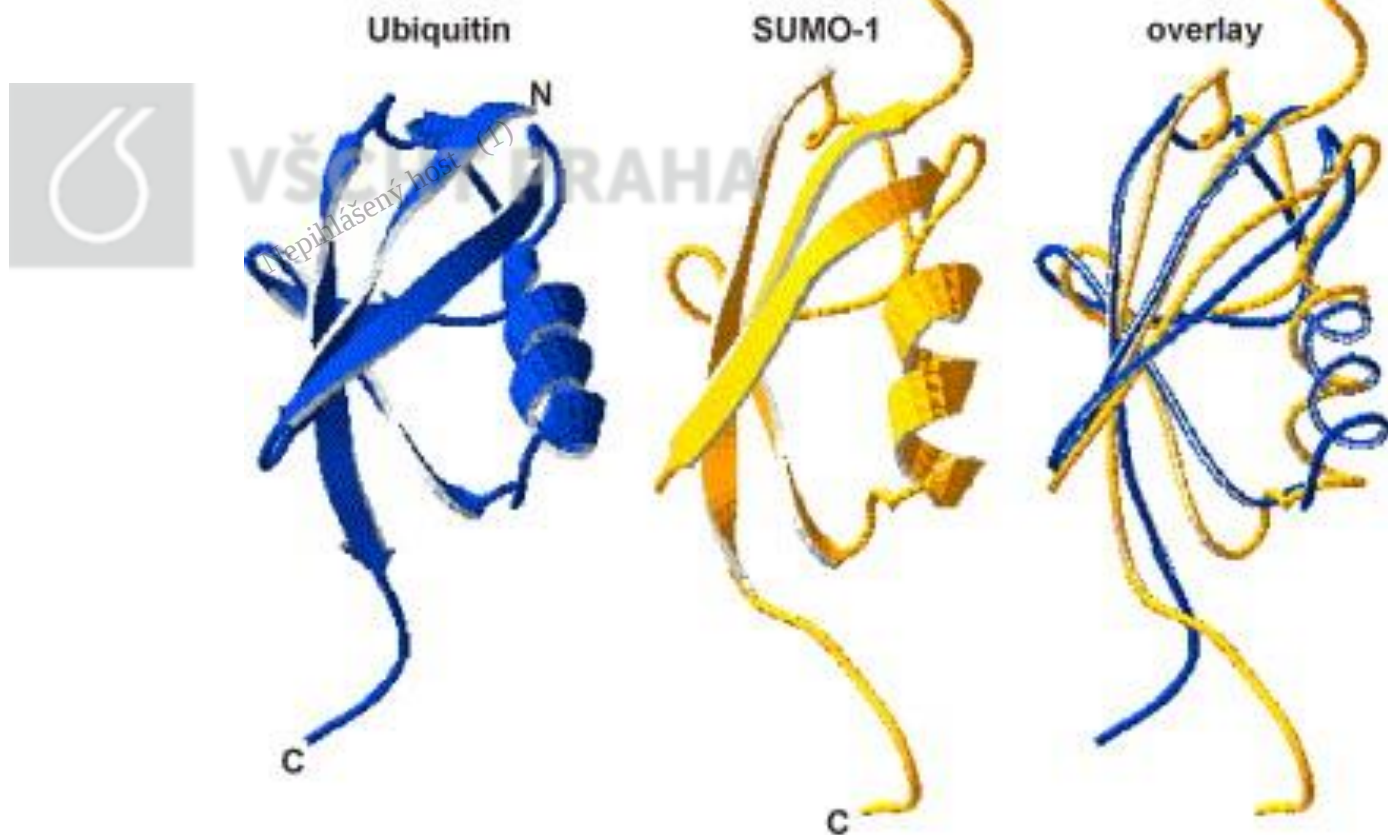
SUMO proteasa

Místo štěpení:	SUMO doména, peptidová vazba XGG ^X na C-konci SUMO
Výhody:	široký pH rozsah (5,5 – 10,5), teplota 4-37°C, 2M močovina
Nevýhody:	X ≠ Pro

Review

SUMO protein modification

R. Jürgen Dohmen [✉](#)



Nechat, či odstranit???

Enterokinasa

Místo štěpení:	DDDDK^X
Výhody:	je obsažena ve FLAG© epitopu
Nevýhody:	účinnost je ovlivněna AK za lysinem, nespecifické štěpení

Faktor Xa

Místo štěpení:	I[E/D]GR^X
Výhody:	často používaný v plasmidech
Nevýhody:	X ≠ Pro, Arg, Faktor Xa vyžaduje aktivaci Ca ²⁺ , nelze ho používat s chelatačními látkami (EDTA), nespecifické štěpení

SUMO proteasa

Místo štěpení:	SUMO doména, peptidová vazba XGG^X na C-konci SUMO
Výhody:	široký pH rozsah (5,5 – 10,5), teplota 4-37°C, 2M močovina
Nevýhody:	X ≠ Pro

TEV proteasa

Místo štěpení:	ENLYFQ^S
Výhody:	často používaný v plazmidech, levná
Nevýhody:	autokatalytické vlastnosti

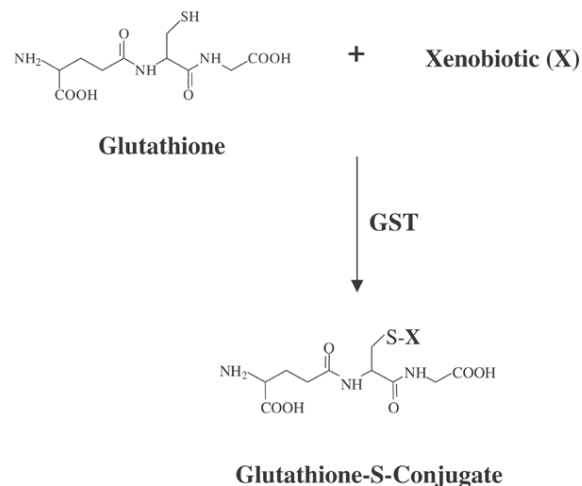
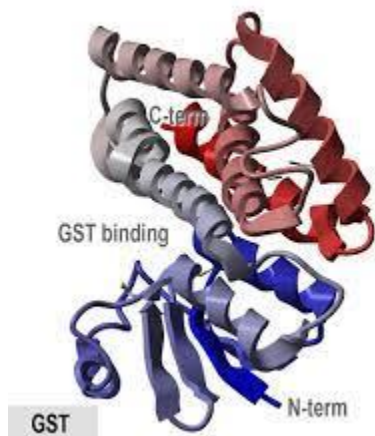
Thrombin

Místo štěpení:	LVPR^GS
Výhody:	relativně specifický, lze ho používat v detergentech, dobře odstranitelný na benzamidinové stacionární fázi často používaný v plazmidech, levná
Nevýhody:	vzácně může štěpit nespecificky

Fúzní kotvy

Glutathion-S-transferasa

Molekulová hmotnost:	26 kDa (211 AK)
Lokalizace:	C- i N-konec
Afinitní ligand:	glutathion
Výhody:	zlepšení rozpustnosti proteinů
Nevýhody:	relativně velká fúzní kotva, může ovlivnit aktivitu, možná kontaminace Heat shock proteiny (70 kDa, 68 kDa), které se eluují z kolony spolu z GST – lze odstranit přidavkem 5 mM MgCl_2 a 5 mM ATP nelze za denaturačních podmínek



Histidinová kotva

Molekulová hmotnost:	0,2 – 1,6 kDa (6 x His = 0,8 kDa)
Lokalizace:	C- i N-konec, nutno testovat
Afinitní ligand:	ionty kovů – Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}
Výhody:	nízká pravděpodobnost ovlivnění aktivity
Nevýhody:	nespecifické interakce především v savčích a hmyzích buňkách nespecifická vazba na stacionární fázi – 10 mM imidazol

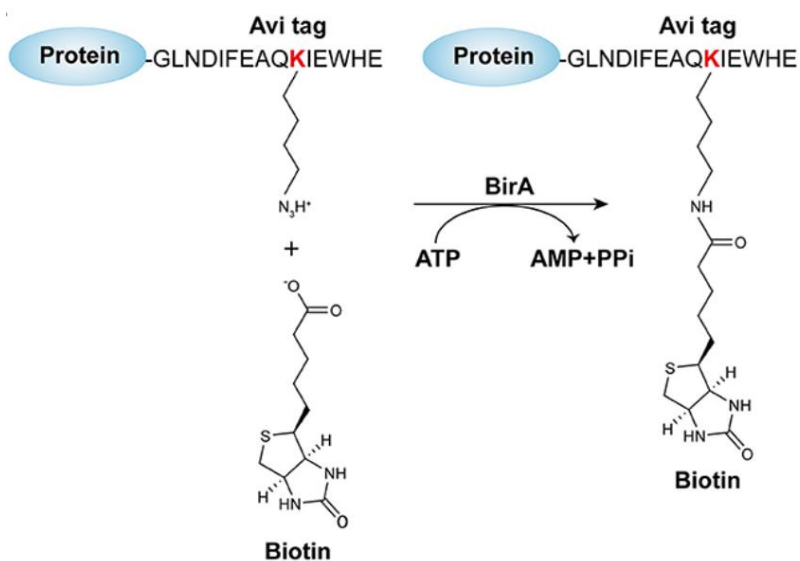
Maltosu vázající protein

Molekulová hmotnost:	42,5 kDa (370 AK)
Lokalizace:	C- i N-konec
Afinitní ligand:	Amylosa
Výhody:	neovlivňuje aktivitu, zlepšuje rozpustnost proteinů



AviTag

Molekulová hmotnost:	cca 15 AK ~1500 Da
Lokalizace:	C- i N-konec, nutno testovat
Afinitní ligand:	Avidin/Streptavidin, tetramerní nebo monomerní
Výhody:	velmi silná afinita k ligandu, neovlivňuje aktivitu
Nevýhody:	v savčích buňkách možná ko-eluce s biotinylovanými látkami tetramerní avidin s biotinylovanými látkami velmi silně interagují – nutnost využít denaturační podmínky k eluci monomerní avidin – jemnější podmínky (10 mM biotin)



[Methods Mol Biol.](#) Author manuscript; available in PMC 2015 Jul 1.

Published in final edited form as:

[Methods Mol Biol. 2015; 1266: 171–184.](#)

doi: [10.1007/978-1-4939-2272-7_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7_12)

Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA

[Michael Fairhead](#) and [Mark Howarth](#)

Používané epitopy

- umožnění identifikace rekombinantních proteinů
- jsou kratší než fúzní kotvy
- lze je použít jako fúzní kotvy, ale finančně náročnější

c-myc

Molekulová hmotnost:	1,2 kDa (EQKLISEEDL)
----------------------	----------------------

Lokalizace:	C- i N-konec
-------------	--------------

Afinitní ligand:	protilátka
------------------	------------

Výhody:	může zlepšit krystalizaci
---------	---------------------------

Nevýhody:	
-----------	--

HA epitop (část lidského chřipkového hemagglutininu)

Molekulová hmotnost:	1,1 kDa (YPYDVPDYA)
Lokalizace:	C- i N-konec
Afinitní ligand:	imobilizovaná anti-HA protilátka
Výhody:	neovlivňuje aktivitu

FLAG®



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Molekulová hmotnost:	1,01 kDa (DYKDDDK)
Lokalizace:	C- i N-konec
Afinitní ligand:	imobilizovaná protilátka
Výhody:	neovlivňuje aktivitu, obsahuje štěpné místo

Fluorescenční značky

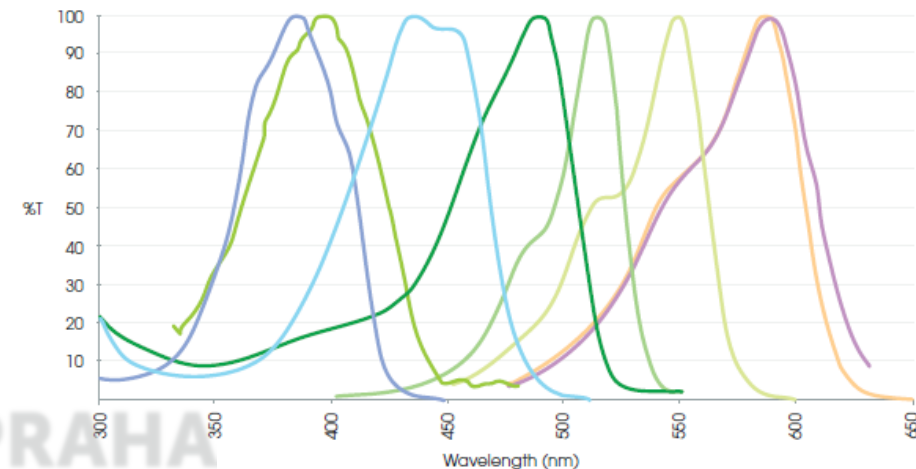
„**Maturace**“ – čas jaký je třeba k formování chromatoforu a počátku fluorescence –
sledování živých buněk
GFP – 10 minut
mOrange – 4 hodiny



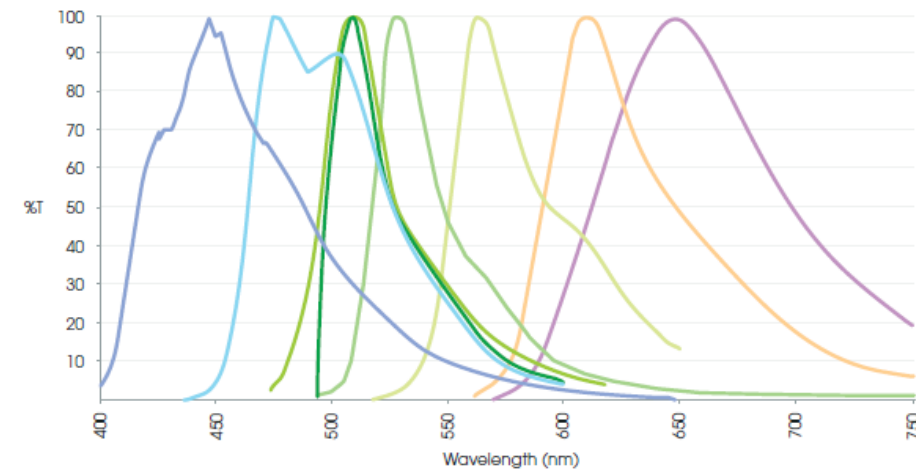
Nepihlášený host (1)
VŠCHT PRAHA

„**Bleaching**“ – stabilita fluorescence v čase
např. $t_{1/2}$ eGFP 174 s

Excitation



Emission



GST fúzní protein

pGEX-4T-3 (27-4583-01)

Thrombin

Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG AAT TCC CGG GTC GAC TCG AGC GGC CGC ATC GTG ACT GAC TGA

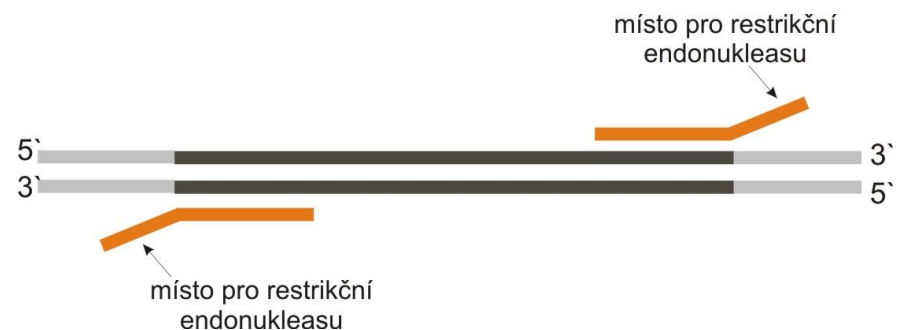
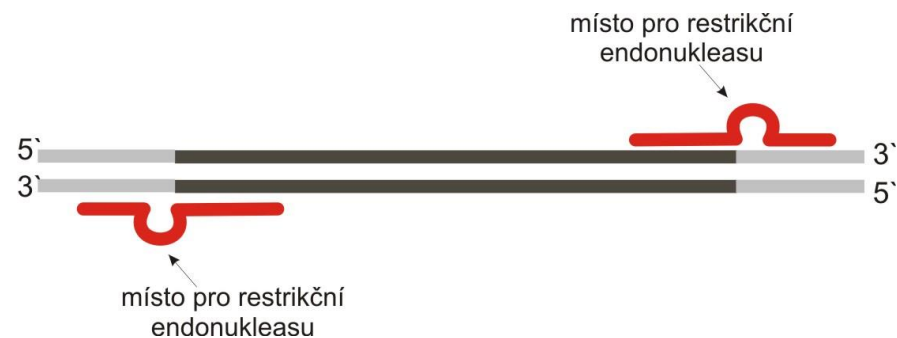
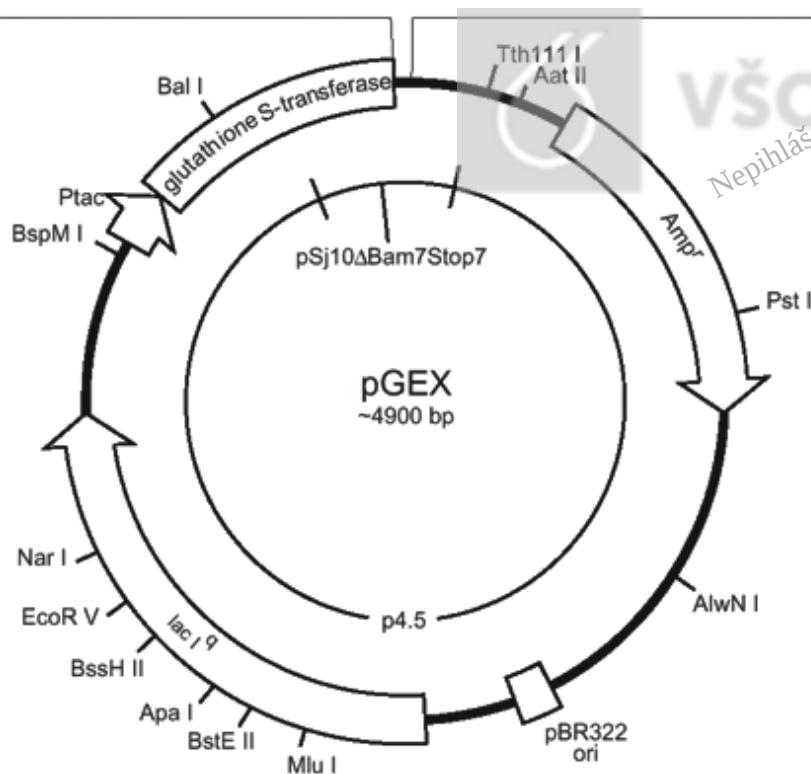
BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I Stop codons

pGEX-3X (27-4803-01)

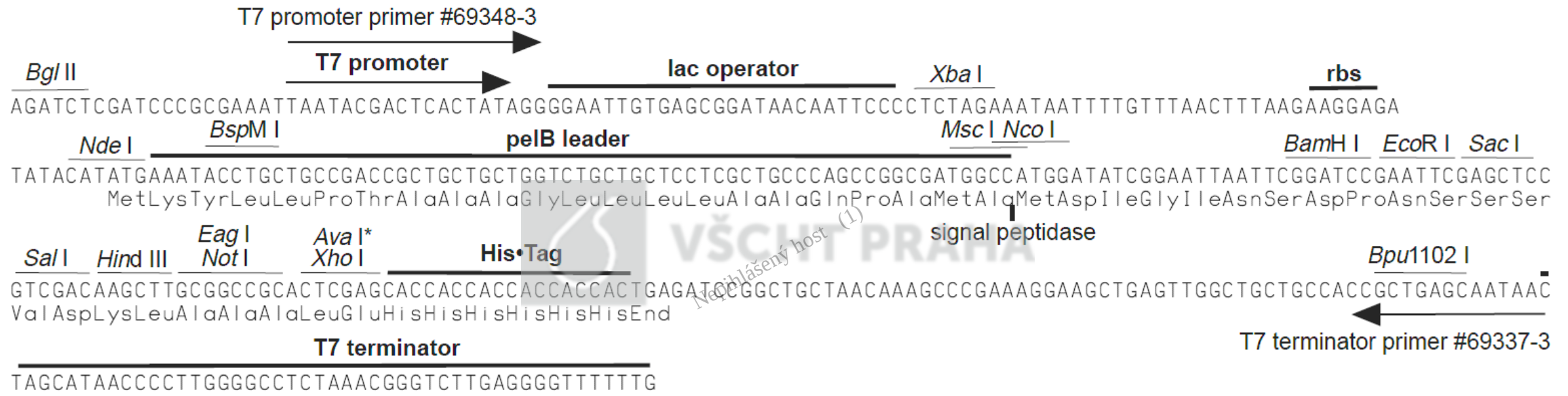
Factor Xa

Ile Glu Gly Arg Gly Ile Pro Gly Asn Ser Ser
ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GGG AAT TCA TCG TGA CTG ACT GAC

BamH I Sma I EcoR I Stop codons

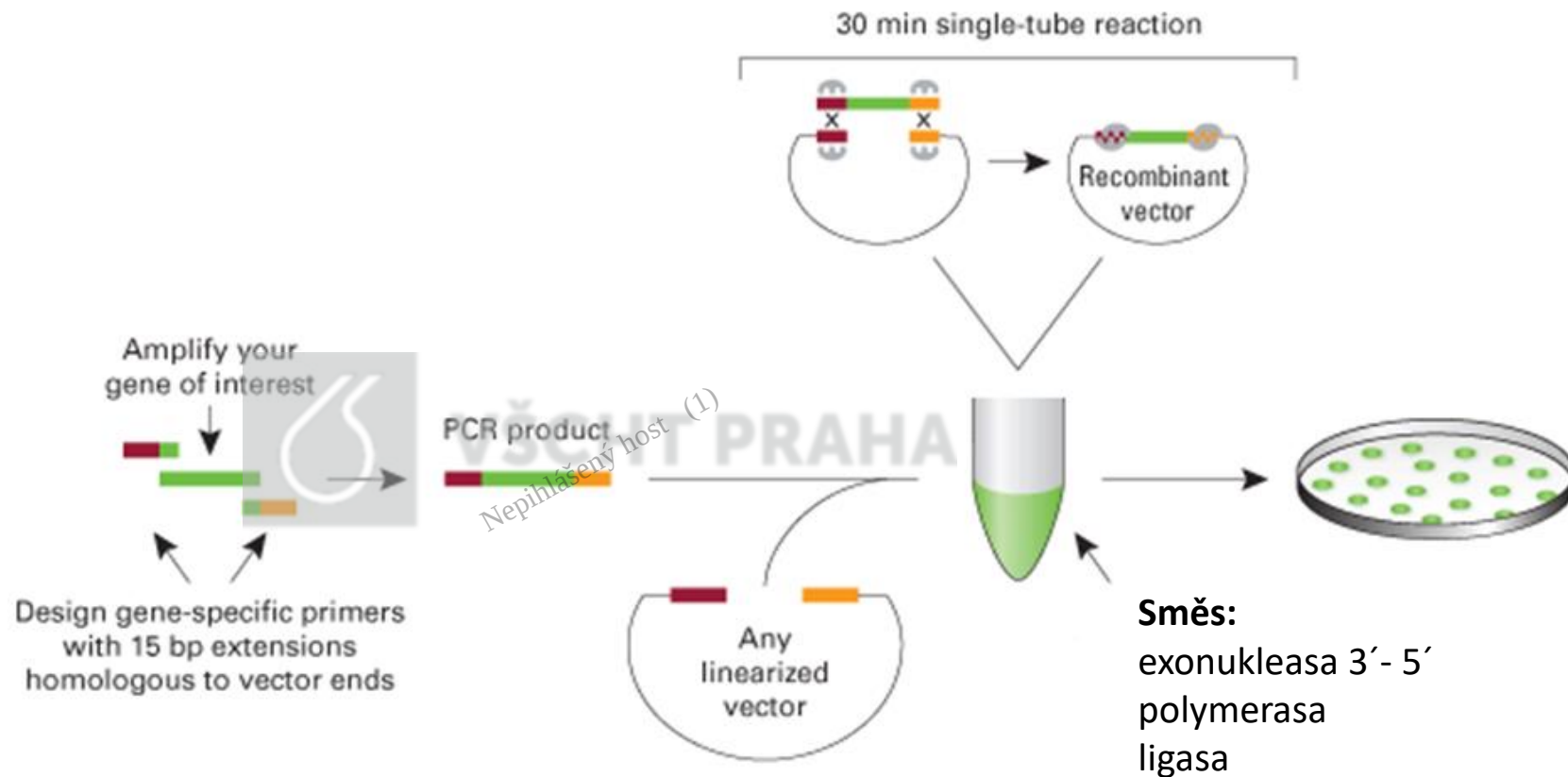


Histidinová kotva



pET-22b(+) cloning/expression region

„In-fusion“ ligace

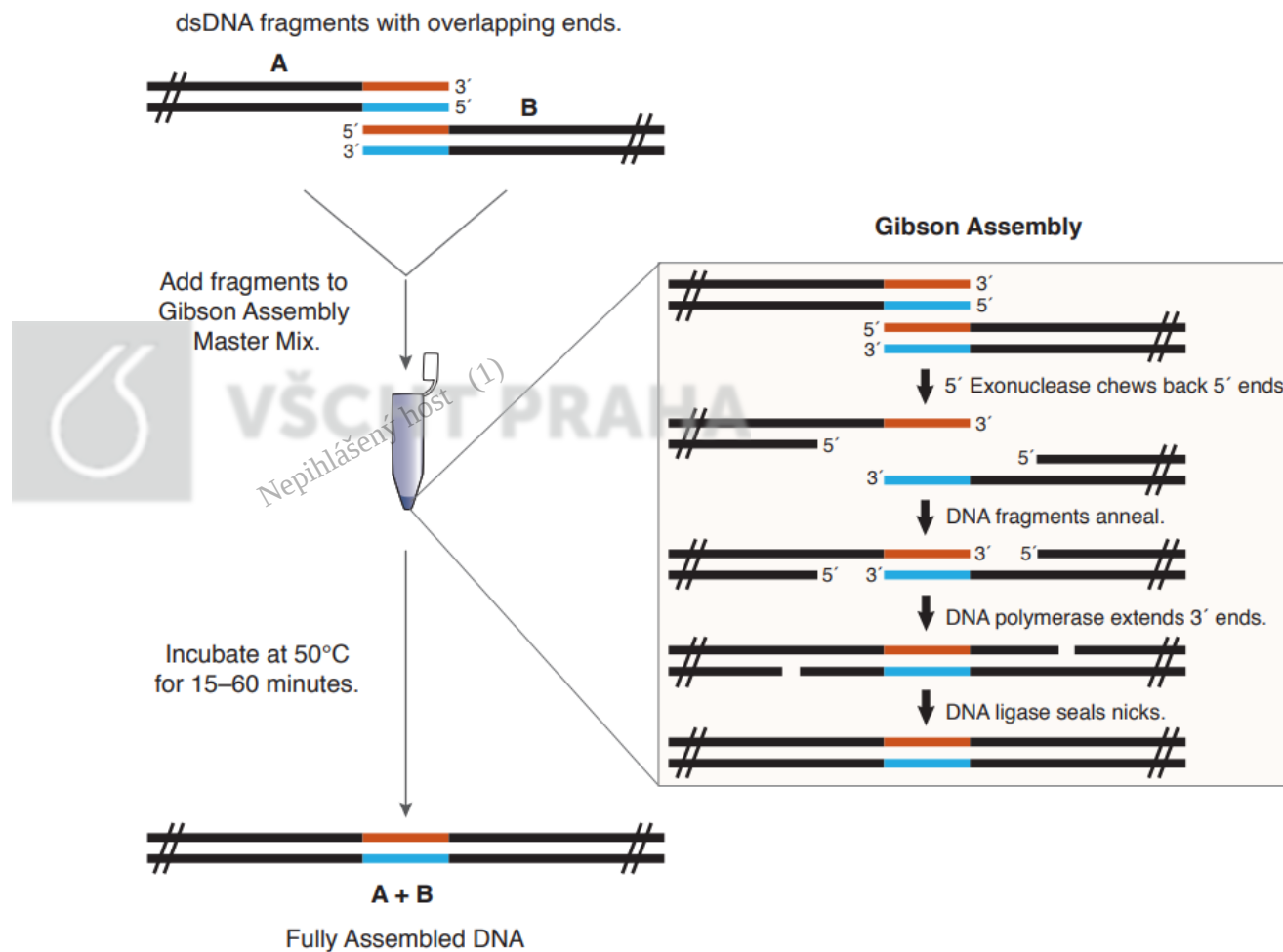


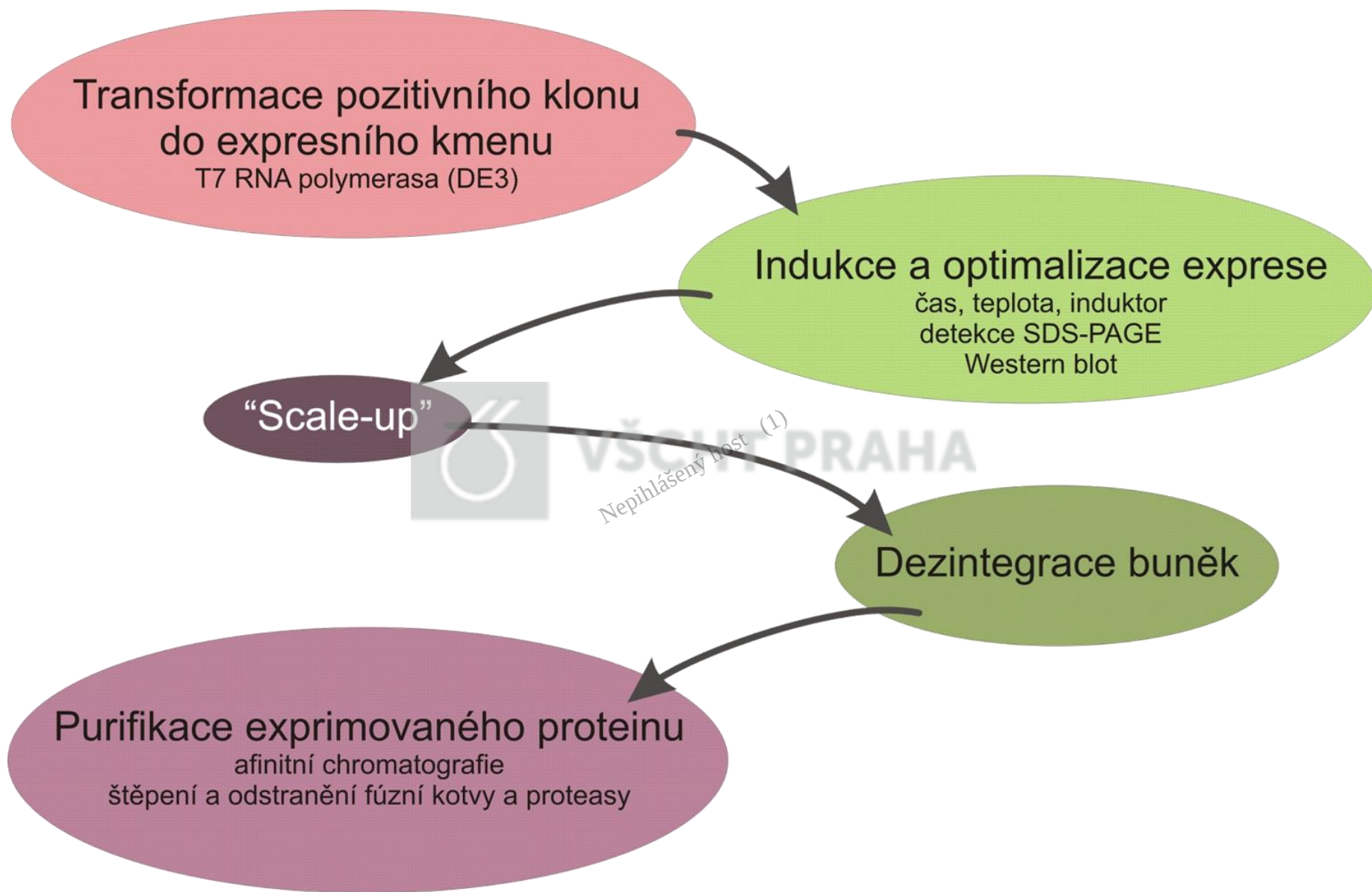
„In-fusion“ ligace nebo T4 DNA polymerasa

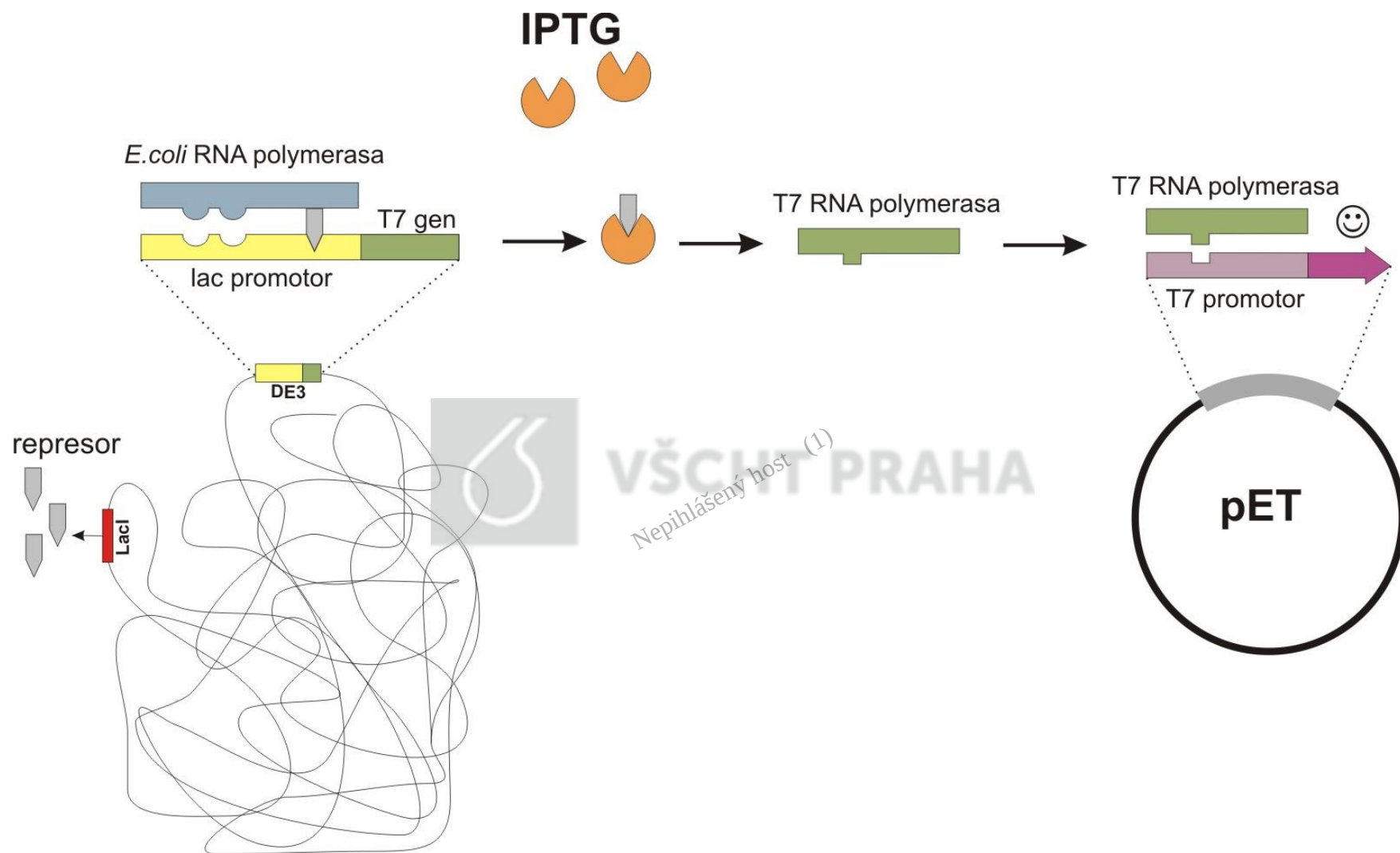
T4 DNA Polymerasa katalyzuje DNA syntézu ve směru $5' \rightarrow 3'$, vyžaduje templát a primer. Má také **$3' \rightarrow 5'$ exonukleasovou aktivitu**

Gibson assembly

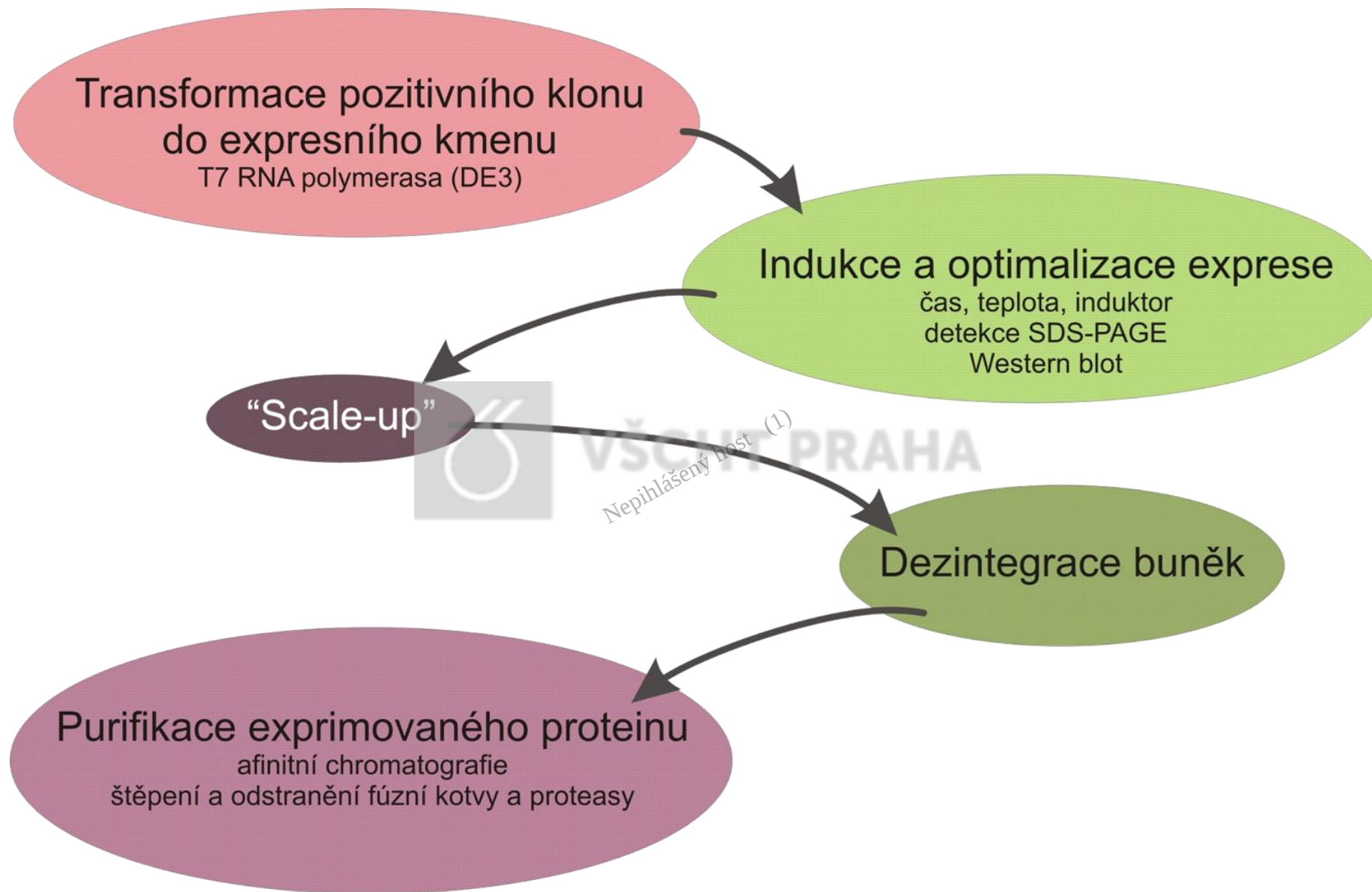
5' → 3' exonukleasová aktivita



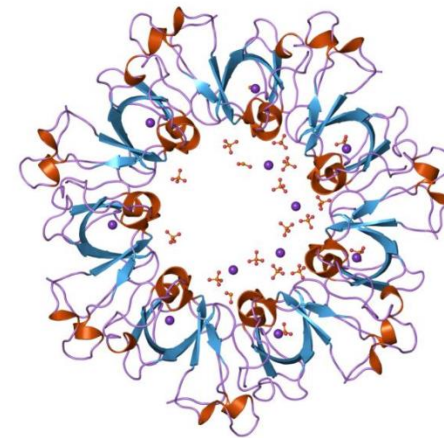




VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)



„overexpresse“ genu

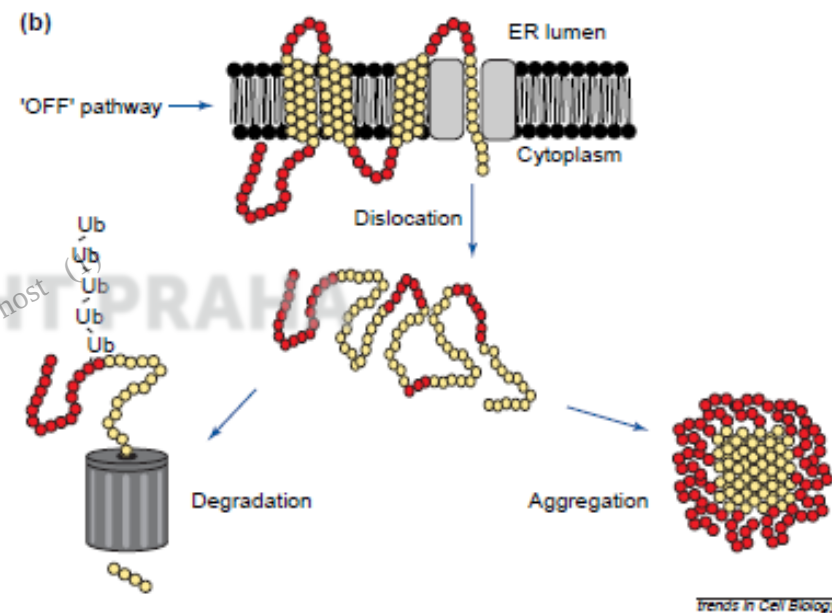
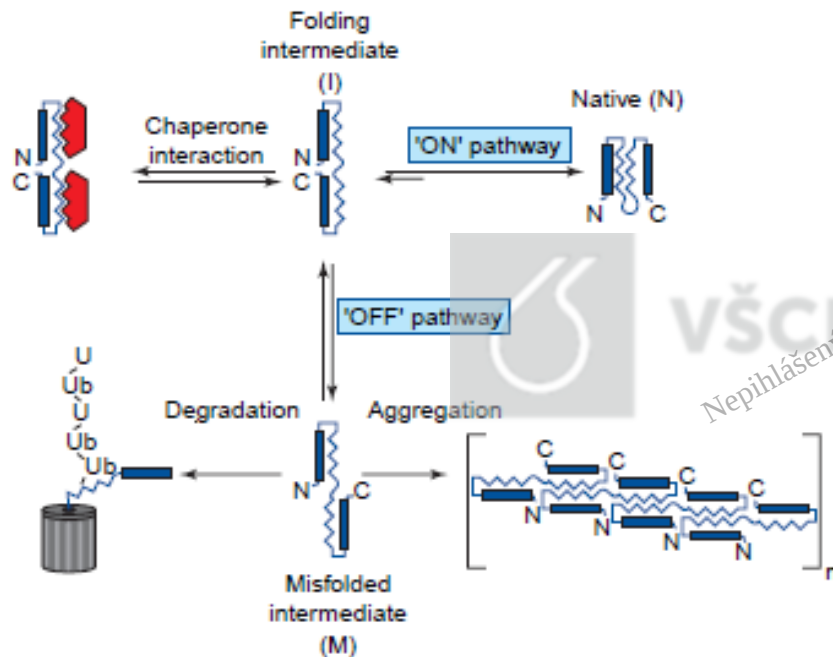


příčiny: poměr protein : chaperon
velké množství částečně
sbaleného proteinu

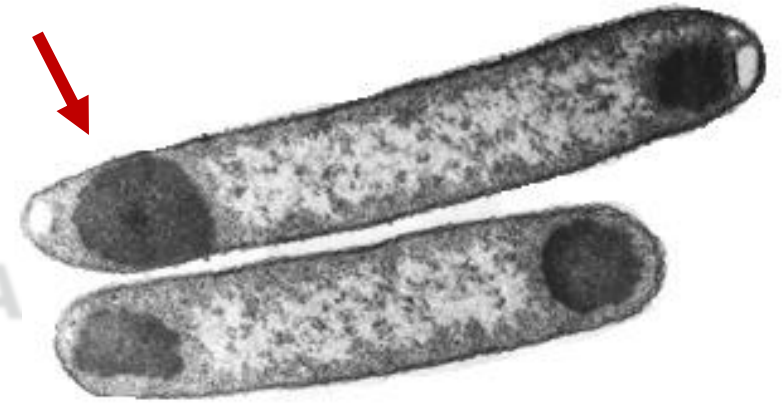
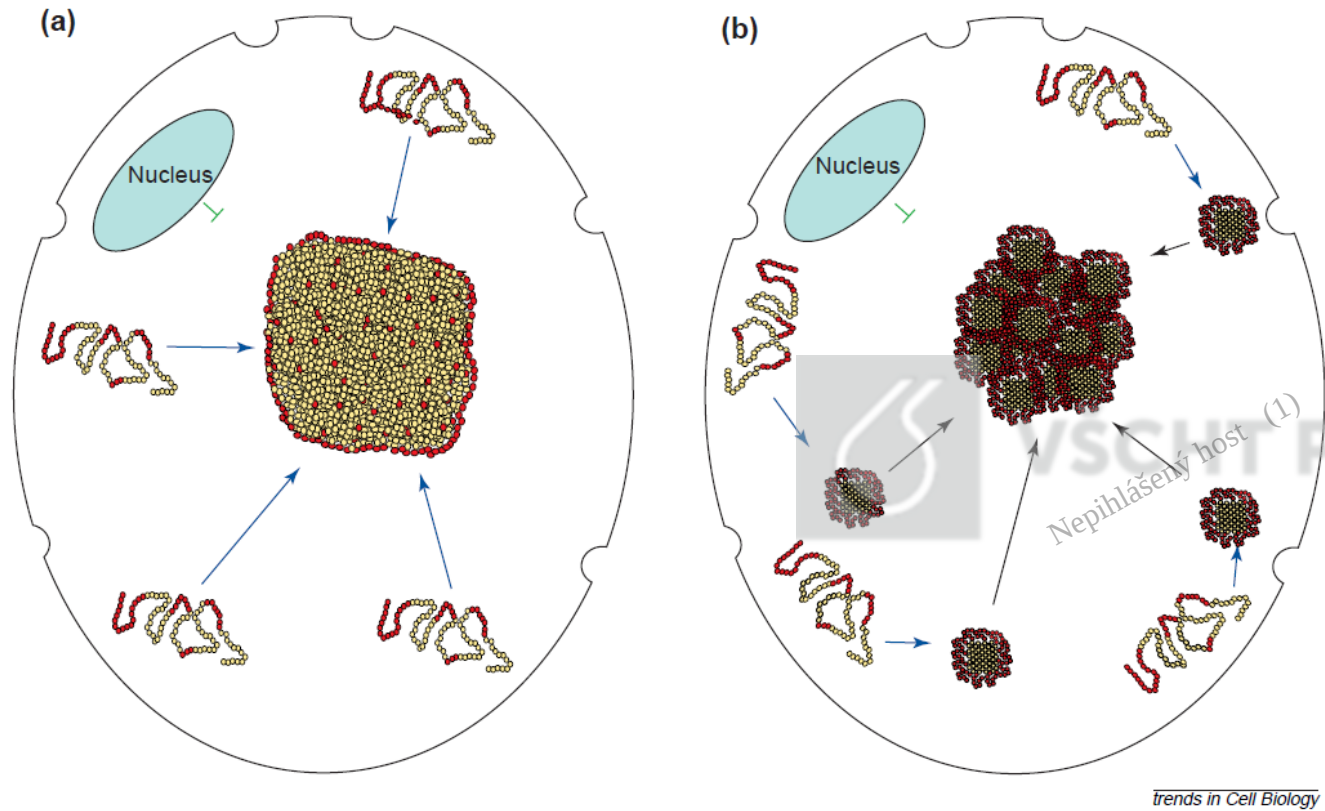
Inkluzní tělíska u eukaryot

strukturované

amorfní



Dva modely tvorby inkluzních tělísek



E. coli – elektronový mikroskop

<http://web.mit.edu/king-lab/www/research/Scott/Scott-Research.html>

Výhody a nevýhody inkluzních tělísek (IB)

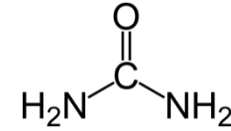
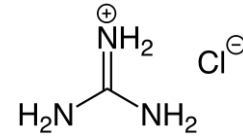
výhody	nevýhody
Vysoká produkce	Obtížná renaturace, optimální postup nelze předpovědět
IB mohou být izolovány ve vysoké čistotě (40 - 90 %)	Produkce nemůže být sledována testováním aktivity
Proteiny v IB jsou chráněny před proteasami	Hlavní kontaminací jsou oligomery a špatně sbalené nebo štěpené formy proteinu, které je problém odstranit
Možnost produkce toxických proteinů	

Izolace inklusních tělísek

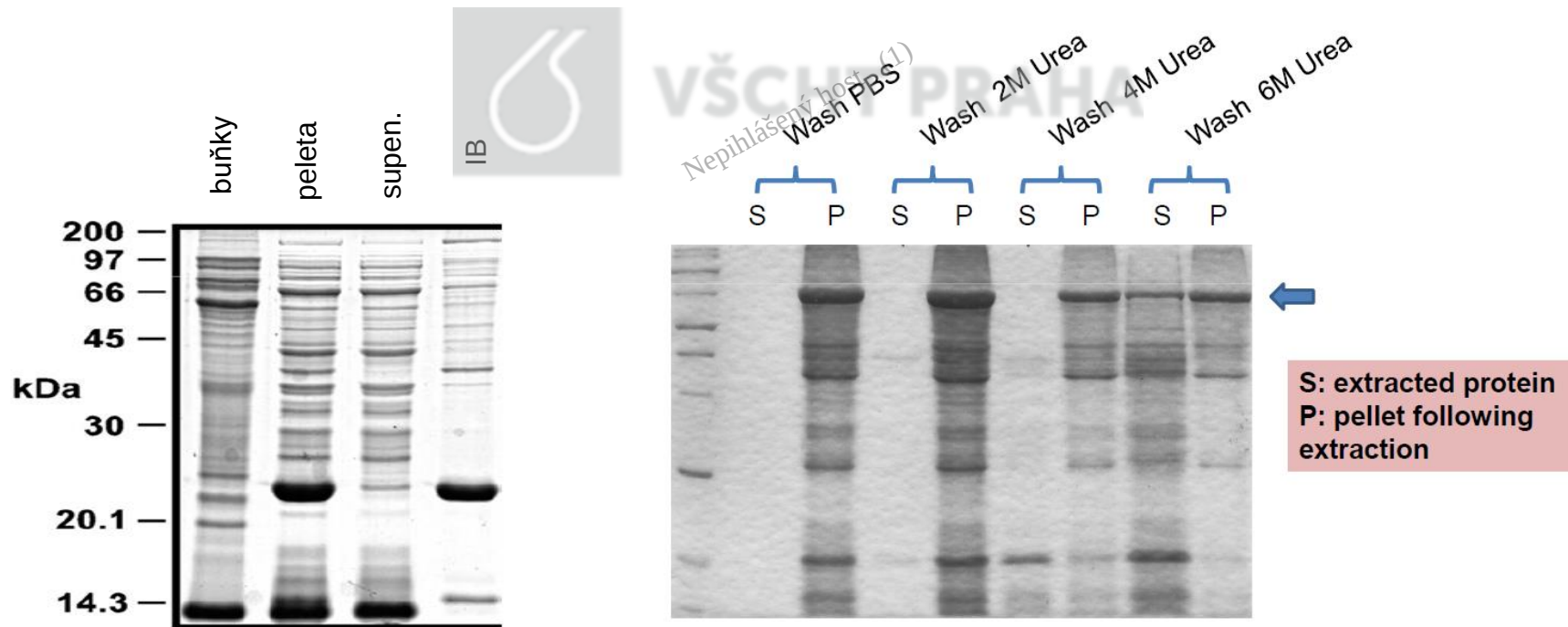
- resuspendace buněčné pelety v pufru s inhibitorem proteas, DTT (5mM) a lysozymem
- přidat detergent (Triton X-100, DOC) + sonikace
- přidat DNasu I
- centrifugace 30 000 x g 30 min 4°C
- opláchnout peletu puftrem s detergentem
- rozpustit peletu (inkluzní tělíska) v pufru s 6M guanidin-HCl a 25 mM DTT
- centrifugace 100 000 x g 10 min – důležitý krok
- změřit koncentraci proteinů v supernatantu

Solubilizace inkluzních tělísek

pufr + denaturační činidlo - 4-6 M guanidin/HCl nebo 8M močovina (! při 4°C krystalizuje)

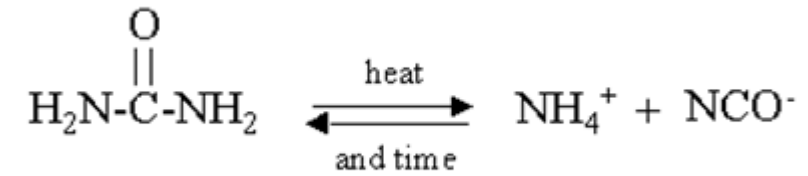


Alternativa: alkalické pH, detergenty např. N-laurylsarkosin, SDS (0,3 - 5%)



6M Gu-HCl >> 6M Urea + 0.5M NaCl > 6M Urea

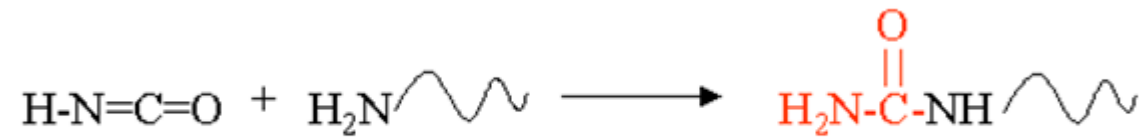
Rozklad močoviny



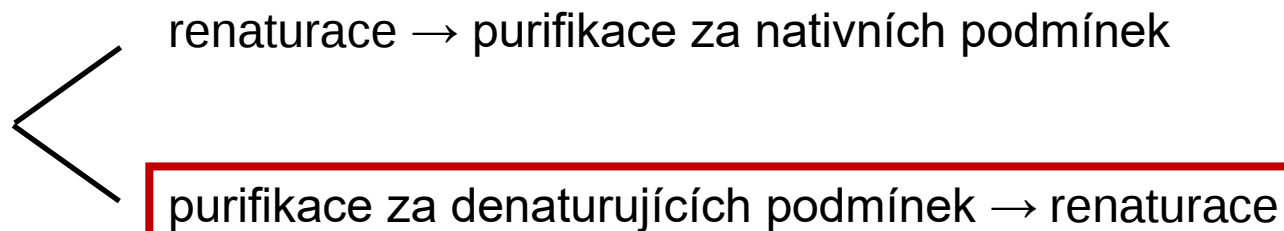
Nepihlášený host (1)

VŠCHT PRAHA

Modifikace proteinů



Purifikace denaturovaných proteinů



→ kompatibilita denaturujících podmínek s chromatografiemi

Chromatographic medium	Urea 6-8M	Urea 6-8M + NaCl	Gu-HCl 6-8M
IEX	OK	OK only after dilution of NaCl	NO
HIC	NO	NO	NO
GF	OK	OK	OK
IMAC (Ni ²⁺)	OK	OK	OK
Other AF	NO	NO	NO

Renaturace

hlavní parametry renaturace proteinů

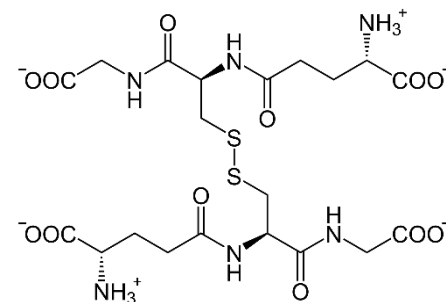
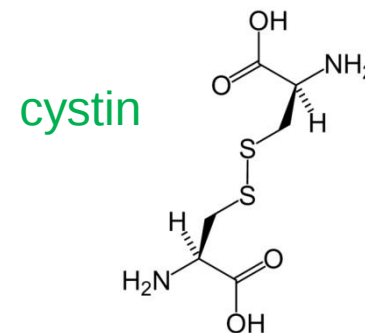
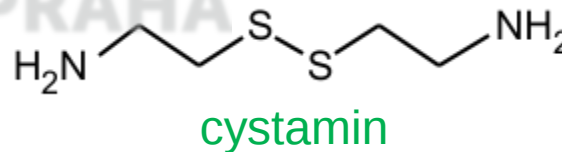
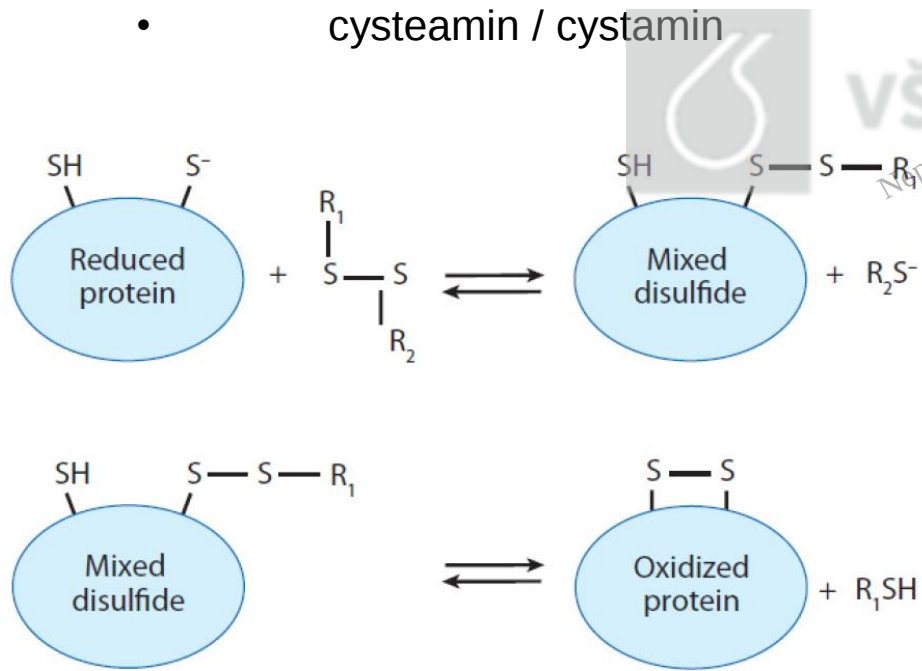
renaturační látky:	typ pufru redoxní systém u proteinů s disulfidovými můstky pH aditiva
renaturační podmínky:	teplota koncentrace proteinu koncentrace aditiva koncentrace redoxního činidla
renaturační techniky:	ředění dialýsa/ultrafiltrace gelová chromatografie na koloně

neexistuje univerzální postup!!!

Redoxní systém

pro proteiny s **disulfidovými můstky** je potřeba optimální koncentrace oxidačního i redukčního činidla, pro umožnění vytvoření správných disulfidových vazeb

- glutathion (GSH/GSSH) - 5-15 mol/l, molární poměr red : ox ~ od 1:1 do 10:1
- cystein / cystin
- cysteamin / cystamin



pH reakce > 9 – rychlá oxidace (pKa Cys v denaturovaném proteinu je 8,3)

Typ a koncentrace aditiva

Additive	NO. REFOLD entries (%)	Concentrations used	Effect
α -cyclodextrin	0.08	4.8 mM	Stabilizer
β -cyclodextrin	0.91	4.8–16.3 mM	Stabilizer
Ammonium sulphate	0.98	0.2 mM to 0.5 M	Salt
1% (v/v) Tween	0.08	–	Detergent
Brij 35	0.23	0.01–20%	Detergent
Calixarene	0.15	–	Calixarene
CHAPS	0.91	20 mM to 0.5 M	Detergent
Ethylene glycol	1.06	5–50%	Stabilizer
Glycerol	12.56	100 mM to 2.5 M	Stabilizer
Glycine	1.21	50 mM to 1 M	Glycine
L-Arginine	15.15	100 mM to 2.5 M	Stabilizer
Lauryl maltoside	0.08	500 mM	Detergent
Mannitol	0.15	0.10%	Stabilizer
<i>N</i> -substituted <i>N</i> -methylimidazolium cations	0.15	–	Stabilizer
Octylglucoside (OG)	0.08	20 mg/ml	Detergent
poly- <i>N</i> -isopropyl acrylamide (PNIPAAm)	0.15	–	Stabilizer
Polyethylene glycol (PEG)	0.60	0.2–0.5 M	Osmolyte
Sodium dioctyl sulfosuccinate (AOT)	0.08	400 mM	Detergent
Triton X-100	2.75	0.05–5%	Detergent
Tween-20	0.76	0.005–10%	Detergent
Tween-60	0.08	0.50%	Detergent
Tween-80	0.08	0.20%	Detergent

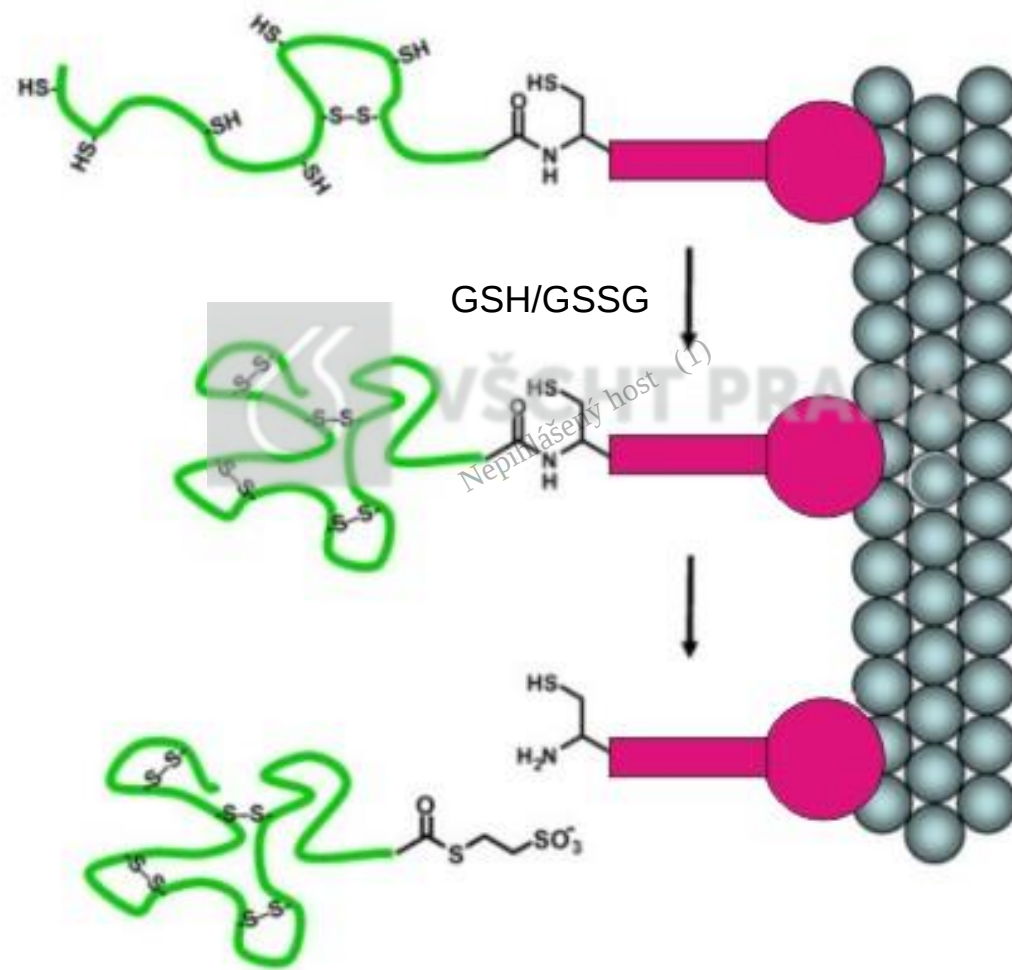
Renaturační kity

pH 7.0																							
A1	TCEP glycerol	A2	TCEP L-Arg	A3	cyclodextrin TCEP	A4	cyclodextrin TCEP GuHCl	A5	100 mM NaCl TCEP PEG6000	A6	100 mM NaCl cyclodextrin TCEP	A7	250 mM NaCl TCEP metals	A8	L-Arg EDTA	A9	100 mM NaCl PEG6000	A10	100 mM NaCl glycerol	A11	100 mM NaCl cyclodextrin metals	A12	250 mM NaCl
B1	GSH/GSSG metals	B2	EDTA GSH/GSSG L-Arg	B3	100 mM NaCl GSH/GSSG EDTA	B4	100 mM NaCl cyclodextrin GSH/GSSG GuHCl	B5	250 mM NaCl GSH/GSSG PEG6000	B6	250 mM NaCl cyclodextrin GSH/GSSG glycerol	B7	250 mM NaCl cyclodextrin GSH/GSSG EDTA	B8	250 mM NaCl cyclodextrin	B9	250 mM NaCl cyclodextrin GuHCl	B10	250 mM NaCl cyclodextrin L-Arg	B11	Buffer only	B12	ddH ₂ O
pH 7.5																							
C1	TCEP metals	C2	cyclodextrin TCEP glycerol	C3	100 mM NaCl TCEP PEG6000	C4	100 mM NaCl TCEP GuHCl	C5	100 mM NaCl cyclodextrin TCEP metals	C6	250 mM NaCl TCEP PEG6000	C7	250 mM NaCl cyclodextrin TCEP L-Arg	C8	cyclodextrin L-Arg	C9	cyclodextrin EDTA	C10	100 mM NaCl GuHCl	C11	100 mM NaCl EDTA	C12	100 mM NaCl cyclodextrin glycerol
D1	GSH/GSSG glycerol	D2	EDTA cyclodextrin GSH/GSSG L-Arg	D3	100 mM NaCl GSH/GSSG	D4	100 mM NaCl cyclodextrin GSH/GSSG	D5	250 mM NaCl GSH/GSSG EDTA	D6	250 mM NaCl cyclodextrin GSH/GSSG GuHCl	D7	250 mM NaCl cyclodextrin GSH/GSSG metals	D8	250 mM NaCl metals	D9	250 mM NaCl glycerol	D10	250 mM NaCl cyclodextrin PEG6000	D11	Buffer only	D12	ddH ₂ O
pH 8.0																							
E1	TCEP glycerol	E2	cyclodextrin TCEP metals	E3	100 mM NaCl TCEP	E4	100 mM NaCl cyclodextrin TCEP	E5	100 mM NaCl cyclodextrin TCEP GuHCl	E6	250 mM NaCl TCEP GuHCl	E7	250 mM NaCl cyclodextrin TCEP	E8	L-Arg	E9	cyclodextrin EDTA	E10	cyclodextrin GuHCl	E11	100 mM NaCl metals	E12	100 mM NaCl cyclodextrin PEG6000
F1	EDTA GSH/GSSG GuHCl	F2	cyclodextrin GSH/GSSG glycerol	F3	100 mM NaCl GSH/GSSG PEG6000	F4	100 mM NaCl cyclodextrin GSH/GSSG glycerol	F5	250 mM NaCl GSH/GSSG EDTA	F6	250 mM NaCl EDTA GSH/GSSG PEG6000	F7	250 mM NaCl cyclodextrin GSH/GSSG EDTA	F8	250 mM NaCl L-Arg	F9	250 mM NaCl PEG6000 metals	F10	250 mM NaCl cyclodextrin glycerol	F11	Buffer only	F12	Empty
pH 8.5																							
G1	TCEP metals	G2	cyclodextrin TCEP GuHCl	G3	100 mM NaCl TCEP glycerol	G4	100 mM NaCl cyclodextrin TCEP L-Arg	G5	100 mM NaCl cyclodextrin TCEP PEG6000	G6	250 mM NaCl TCEP	G7	250 mM NaCl cyclodextrin TCEP	G8	glycerol	G9	L-Arg EDTA	G10	cyclodextrin metals	G11	100 mM NaCl	G12	100 mM NaCl cyclodextrin GuHCl
H1	GSH/GSSG PEG6000	H2	cyclodextrin GSH/GSSG EDTA	H3	100 mM NaCl GSH/GSSG GuHCl	H4	100 mM NaCl cyclodextrin GSH/GSSG metals	H5	100 mM NaCl cyclodextrin GSH/GSSG EDTA	H6	250 mM NaCl GSH/GSSG glycerol	H7	250 mM NaCl cyclodextrin GSH/GSSG PEG6000	H8	250 mM NaCl	H9	250 mM NaCl L-Arg	H10	250 mM NaCl cyclodextrin metals	H11	Buffer only	H12	Empty

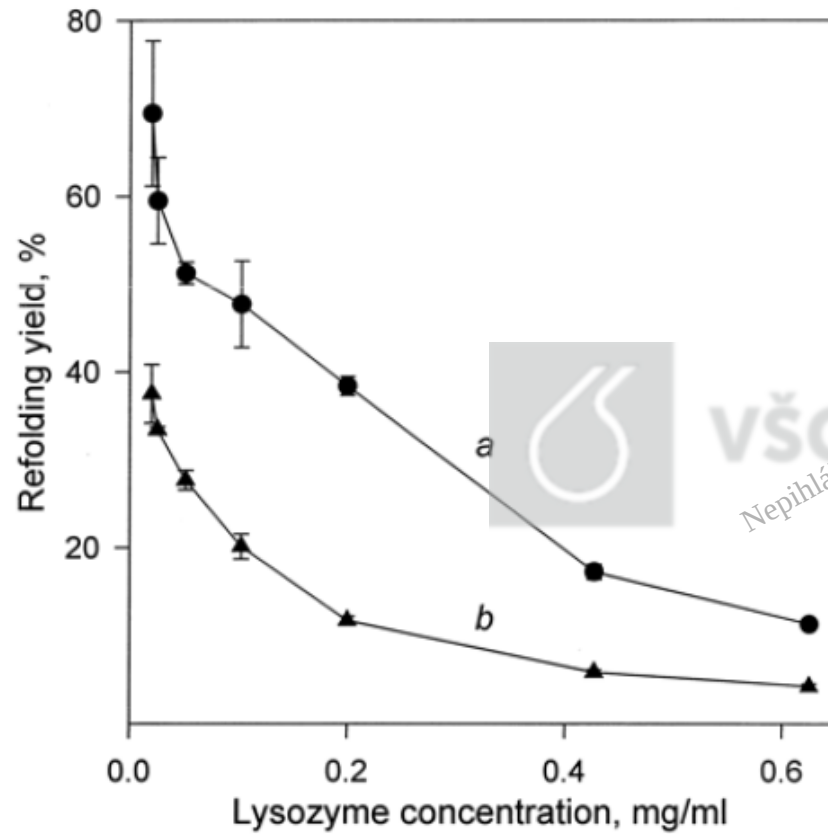
Renaturační techniky

Renaturační technika	Výhody / nevýhody
Dialýza	Časová náročnost Velké objemy pufru
Ředění	Jednoduchá technika Záleží na rychlosti ředění Až stonásobně zředěný protein
Gelová chromatografie	Sepadace agregátů od renaturovaného proteinu Lze použít vysoké koncentrace proteinu Agregáty může být obtížné vymýt z kolony Pouze malý objem nanášeného vzorku
Renaturace na koloně	Jednoduché a rychlé Libovolný objem vzorku

Renaturace na koloně



Koncentrace proteinu



výtěžek renaturace klesá s vyšší počáteční koncentrací proteinu 10 - 50 $\mu\text{g/ml}$

Analýza renaturovaného proteinu

- SDS-PAGE analýza rozpustné a nerozpustné složky
- testování aktivity
- ELISA ne WB
- cirkulární dichroismus nebo infračervená spektroskopie
- DLS



VŠCHT PRAHA
Nepihlášený host (1)

Jak zlepšit rozpustnost rekombinantního proteinu???

- snížit rychlost exprese
 - snížení teploty kultivace
 - použití slabšího promotoru
 - použití low-copy plasmidu
 - snížení koncentrace induktoru
- změna kultivačního média
 - přidavek prostetické skupiny nebo kofaktoru
 - přidavek pufru – kontrola pH
 - přidavek 1 % glukosy – represe indukce lac promotoru laktosou z media (LB,...)
 - přidavek polyolů (sorbitol) nebo sacharosy – zvýšení osmotického tlaku – akumulace osmoprotektantů v buňce
- úprava kodónu
- exprese s chaperony a/nebo enzymy pomáhajícími správně sbalit protein
 - GroES-GroEL, DnaK-DnaJ-GrpE, ClpB
 - peptidyl-prolyl cis/trans isomerasa (PPI's), disulfidoxidoreduktasa (DsbA), disulfidisomerasa (DsbC)
- cílení do periplasmatického prostoru
 - přidavek leader sekvence (pelB , ompT) – v periplasmě disulfidoxidoreduktasa (DsbA), disulfidisomerasa (DsbC)

- použití speciálních kmenů *E.coli*
 - **AD494** - mutace thioredoxinreduktasy (trxB)
 - **Origami** - mutace thioredoxinreduktasy (trxB) + glutathionreduktasy (gor)
 - **Rosseta, Lemo21** - kmeny deficientní v protease – ompT, Lon⁻, degP
 - **Codon Plus RIL** – obsahují geny argU, ileY a leuW pro tRNA
 - **ArcticExpress RIL** – exprese při 13 °C - chaperoniny Cpn10 a Cpn60
 - **NiCo21(DE3), LOBSTR** (low background strain) - modifikace ArnA, SlyD, GlmS, Can
 - **SI** – solí indukovaná tvorba T7 RNA polymerasy
 - **T7 Express lysY** - buňky jsou během exprese méně náchylné k lýzi
- fúzní proteiny – N-konec...

