

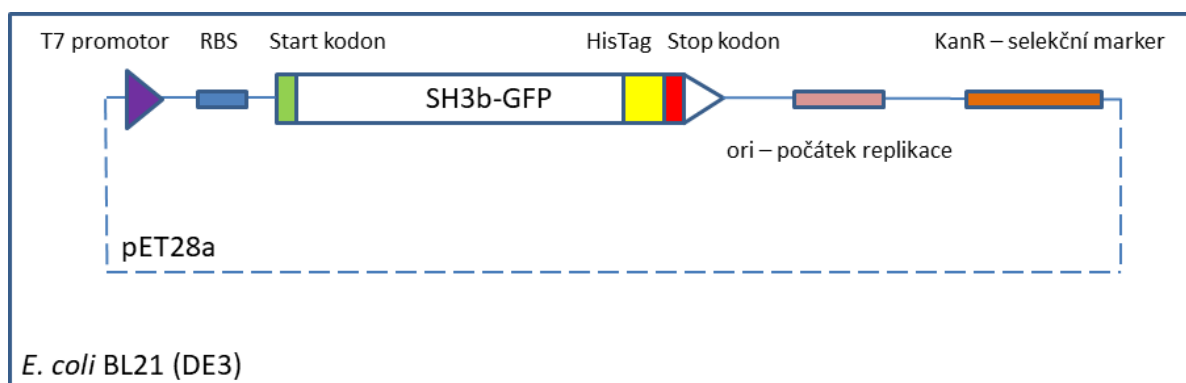
Expres a purifikace rekombinantního proteinu SH3b_GFP

1. Prostudujte publikaci Benešík *et al.*, 2017 (<https://doi.org/10.1007/s11262-017-1507-2>), shlédněte video o purifikaci proteinů (<https://www.youtube.com/watch?v=DfzB6BtSjBY>) a prostudujte prezentace ve studijních materiálech.

Se stafylokokovým endolyzinem jste se seznámili v úloze č. 1. Na základě článku popište funkci SH3 domény.

Jedná se o vazebnou doménu endolyzinu LysF1, zajišťující vazbu bakteriofága na peptidoglykan buněčné stěny stafylokoků.

2. Schématicky znázorněte plazmidový vektor určený k expresi fúzního proteinu SH3b_GFP s histidinovou kotvou na C konci proteinu. Vyznačte start a stop kodon fúzního genu, vazebné místo pro ribozom, vyberte konkrétní promotor pro expresi v *E. coli* BL21 (DE3) a indukci s pomocí IPTG. Zvýrazněte počátek replikace a vyberte vhodný selekční marker pro selekci pozitivních klonů. Vyberte některý z Vámi dříve používaných vektorů vhodných pro expresi tohoto fúzního proteinu.



3. V bodech popište postup navržení fúzního proteinu, jeho klonování do vhodného vektoru, po jeho expresi, purifikaci a funkční test.
 1. Navržení plazmidového konstruktů.
 2. PCR amplifikace genů pro SH3b doménu a GFP s HisTagem, popřípadě vyštěpení těchto sekvencí z již existujících konstruktů.
 3. Ligace naštěpeného vektoru (např. pET28a) s inzertními genovými sekvencemi.
 4. Transformace kompetentních buněk, selekce a ověření klonů s plazmidovým konstruktem.
 5. Izolace plazmidu a transformace expresních *E. coli* BL21 (DE3).
 6. Kultivace a indukce exprese pomocí IPTG.
 7. Izolace proteinů (sonikací).

8. Purifikace proteinu s HisTagem pomocí FPLC.
 9. Funkční test - vizualizace vazby fúzního proteinu na bakteriální buňky pomocí fluorescenční mikroskopie.
4. Rekombinantní protein s GFP a histidinovou kotvou purifikujete metaloafinitní chromatografií, pro vazbu proteinu využíváte kolony s Ni-NTA. Pro eluci máte na výběr ze tří pufrů:
- a. 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0.2 mM PMSF
 - b. 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, 50 mM EDTA, 0.2 mM PMSF
 - c. 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 400 mM imidazol, 0.2 mM PMSF

Který pufr zvolíte? Diskutujte, proč jsou zbývající eluční pufrы nevhodné a jaký byste předpokládali dopad jejich použití. Zjistěte, k čemu slouží PMSF.

Pro eluci je vhodný pufr C. Pufr A obsahuje příliš nízkou koncentraci imidazolu, která by pravděpodobně nebyla dostatečná pro eluci proteinu. Pufr B obsahuje EDTA, chelatační činidlo, které by způsobilo vyvázání Ni^{2+} iontů z kolony.

PMSF (fenylmetansulfonyl fluorid) jako inhibitor nespecifických serinových proteáz zabraňuje nechtěné degradaci proteinů při izolaci a purifikaci.

5. Na základě jakých dalších vlastností proteinů je lze purifikovat pomocí chromatografických metod?
Například na základě jejich náboje (ionexová chromatografie), velikosti (gelová permeační chromatografie) nebo hydrofobních interakcí.
6. Jaké vlastnosti by měl mít hostitelský organismus používaný pro heterologní expresi proteinů?
Měl by být známý a dobře prostudovaný, se snadnou kultivací, nepatogenní. Ochotný snadno přijmout cizorodou DNA a produkovat vysoké množství cílového proteinu.
7. Napište, jaké by mohlo být praktické využití purifikovaného konstruktů GFP-SH3b?
Konstrukt SH3b-GFP může být využit pro testování a vizualizaci interakce SH3b domény s peptidoglykanem buněčných stěn různých druhů stafylokoků a jiných příbuzných druhů. Teoreticky by mohl být také využit k detekci stafylokokové kontaminace.

8. Popište schéma znázorňující přístroj pro HPLC a stručně popište princip metody.

