Exprese a purifikace rekombinantních proteinů

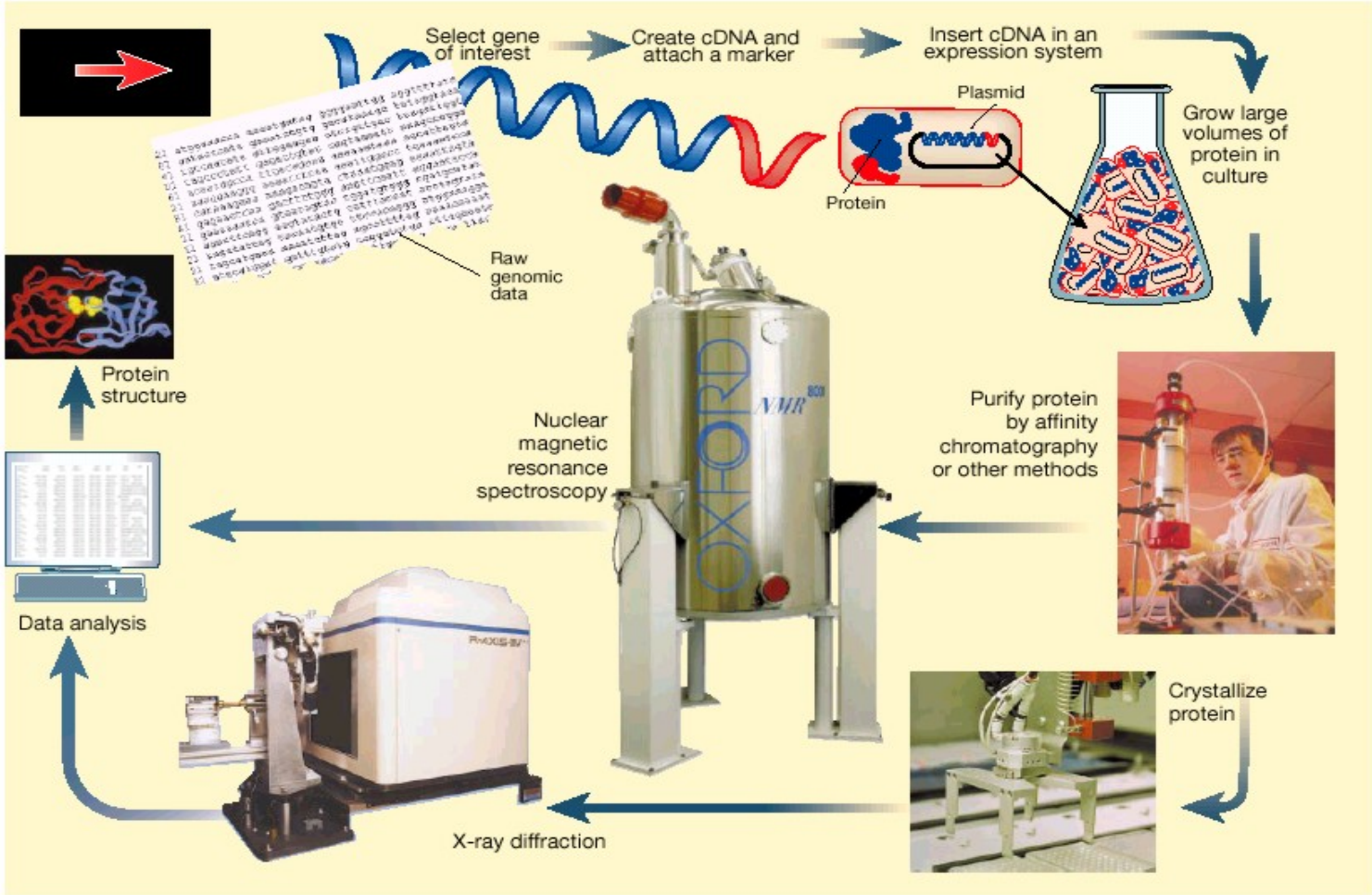
Exprese a purifikace rekombinantních proteinů

- od genů k proteinům

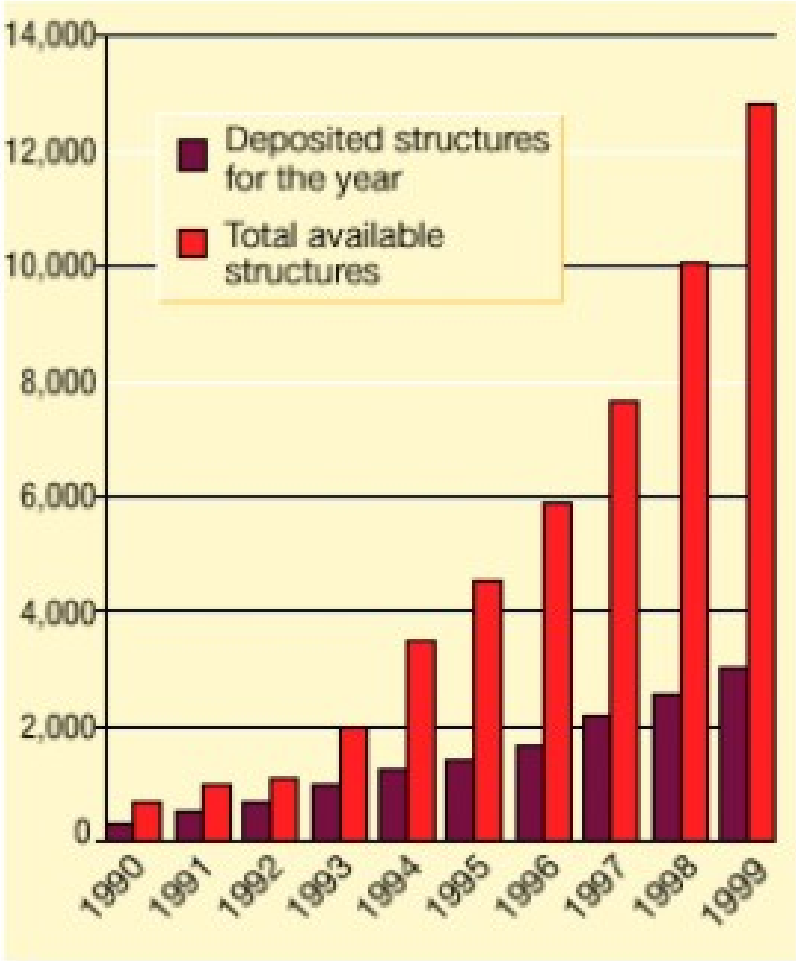
- základní techniky genového inženýrství
  - expresní vektory
  - stanovení sekvence DNA
  - místně řízená mutageneze

- 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.

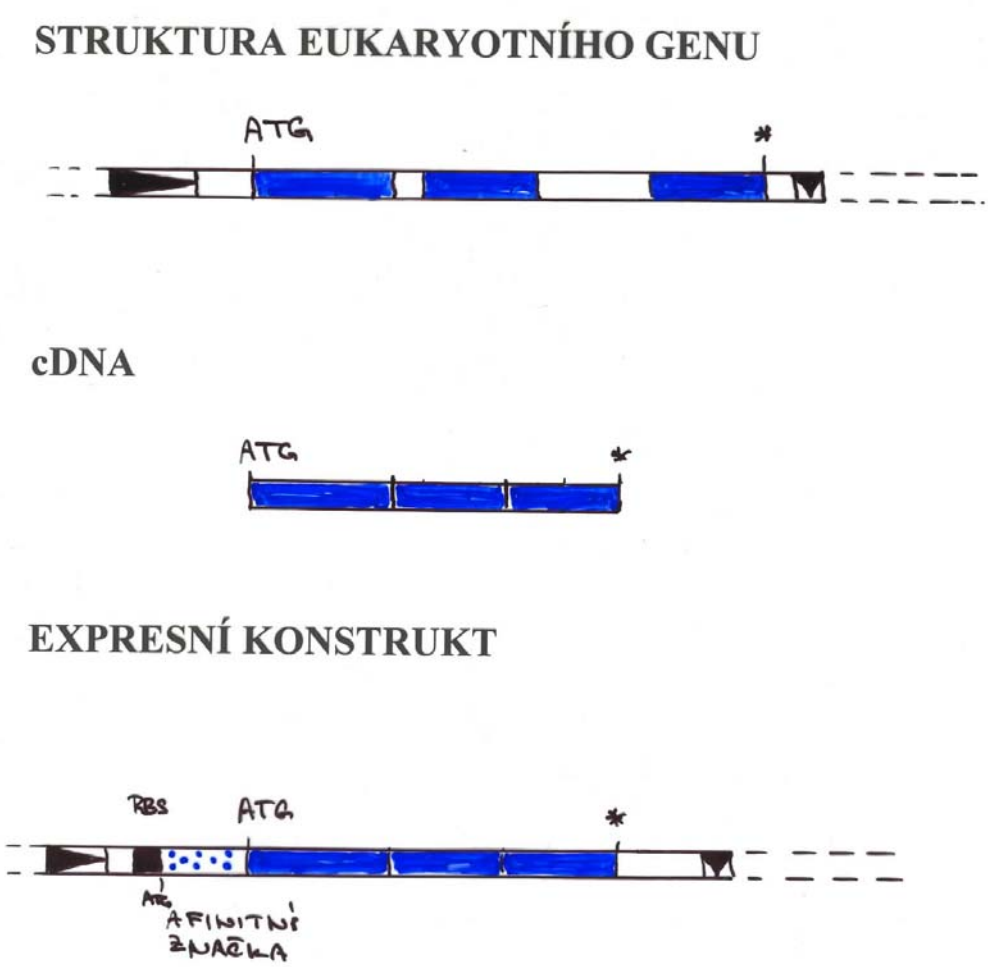
Exprese a purifikace rekombinantních proteinů

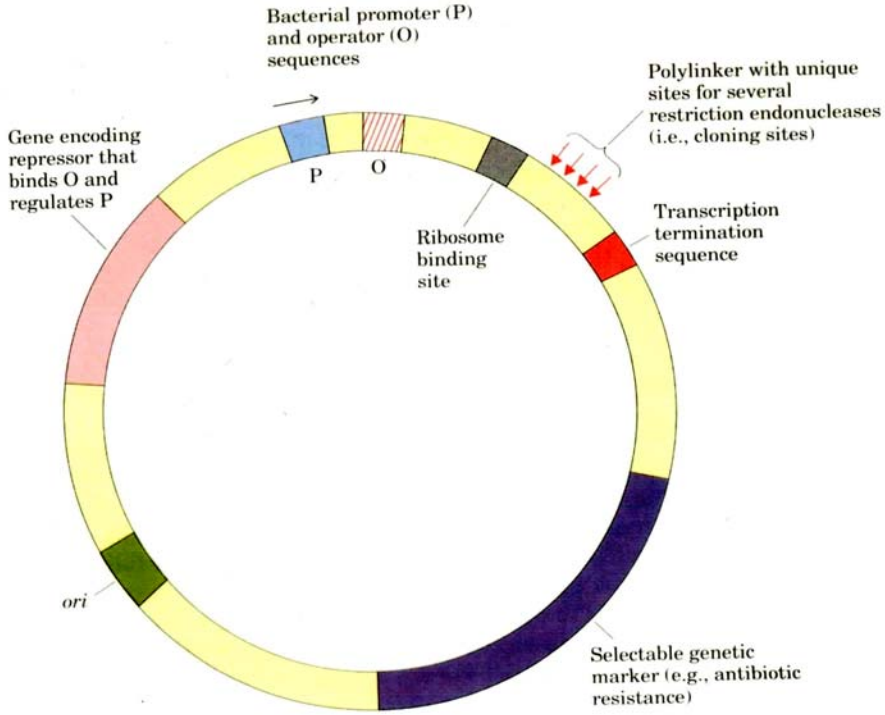
- od genů k proteinům

- základní techniky genového inženýrství
  - expresní vektory
  - stanovení sekvence DNA
  - místně řízená mutageneze

- exprese rekombinantních proteinů
  - afinitní značky
  - purifikační postupy

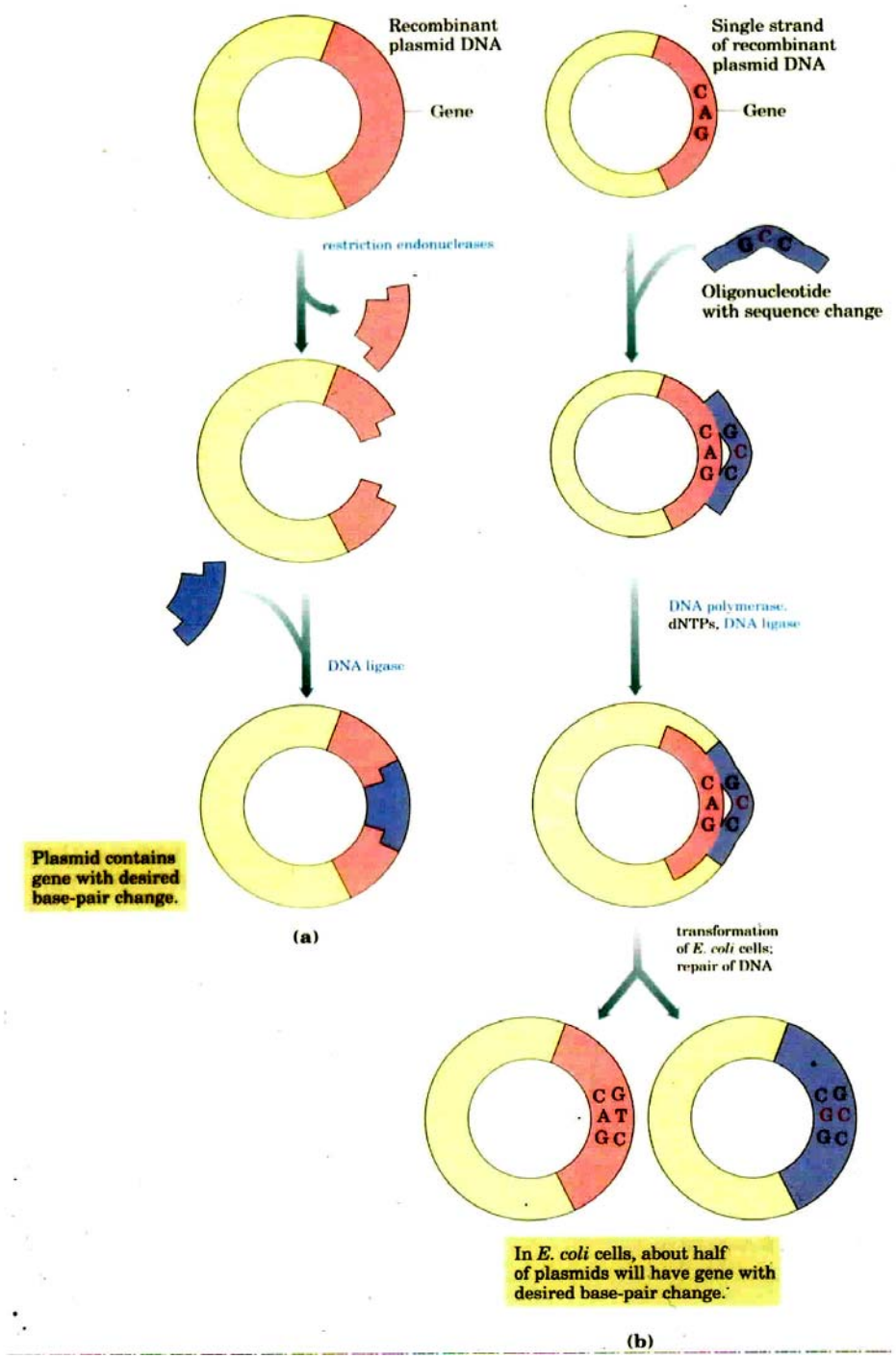
Expresní konstrukty



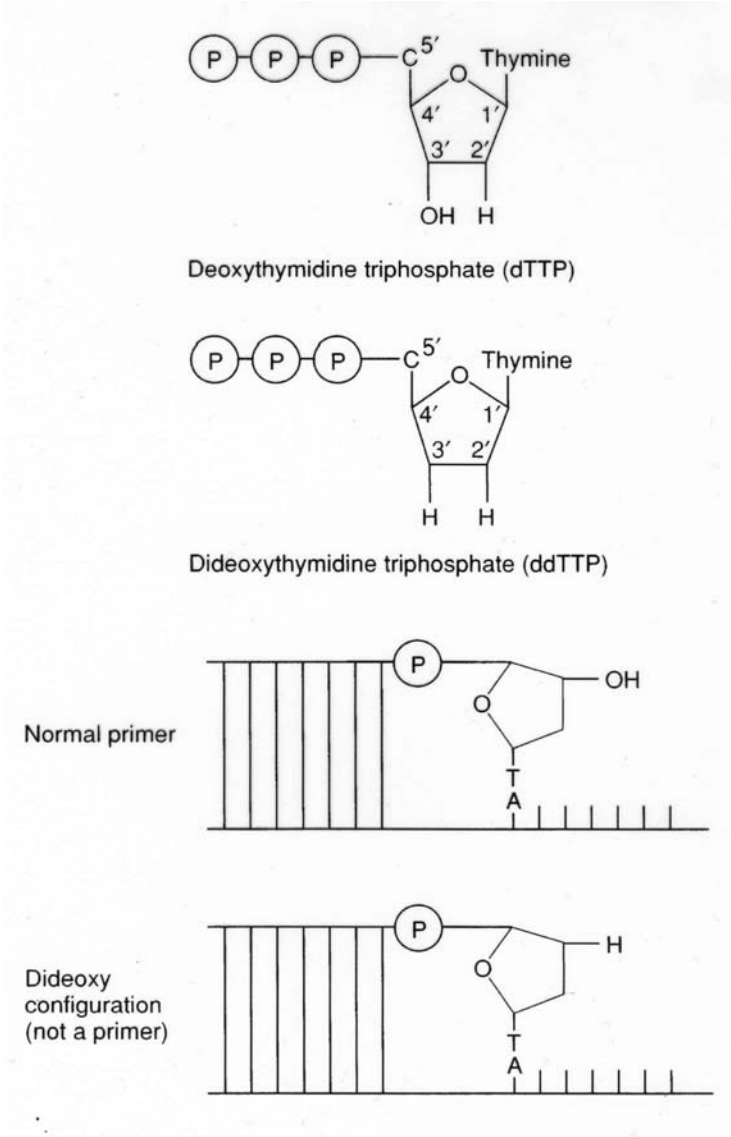


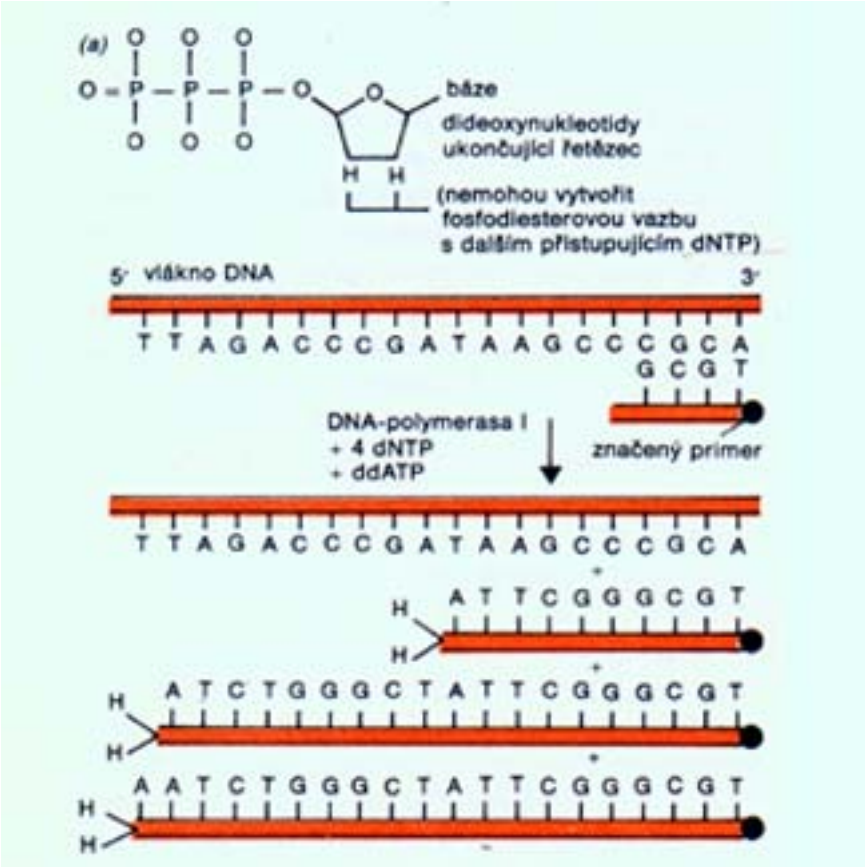
- transformace;
- indukce exprese rekombinantního proteinu;
- extrakce a purifikace rekombinantního proteinu.

Řízená mutageneze

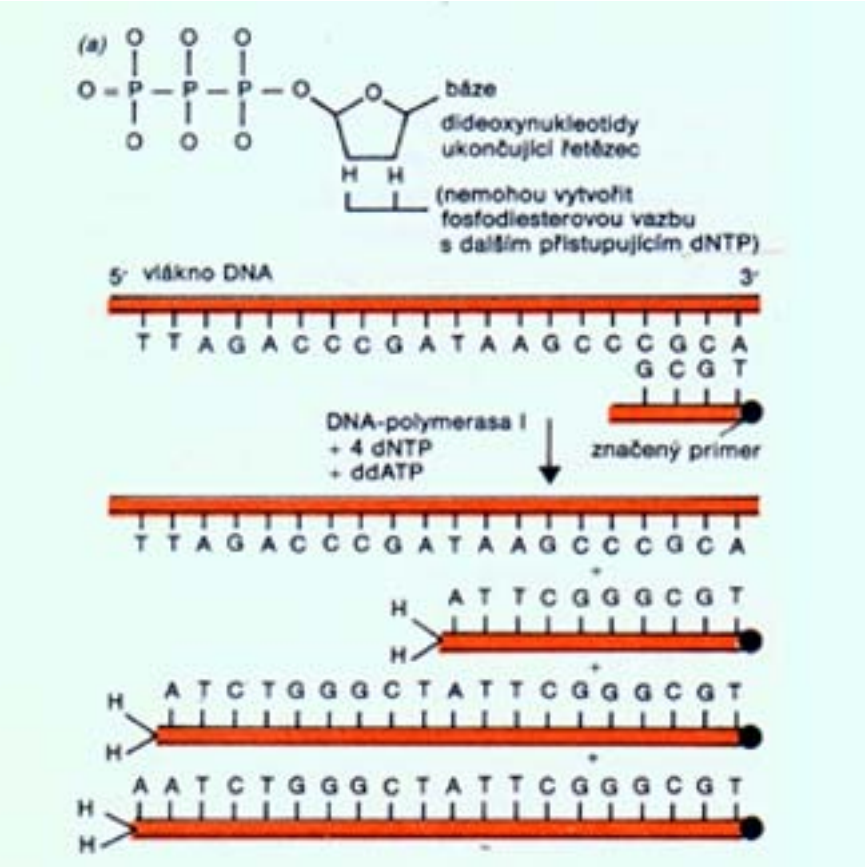


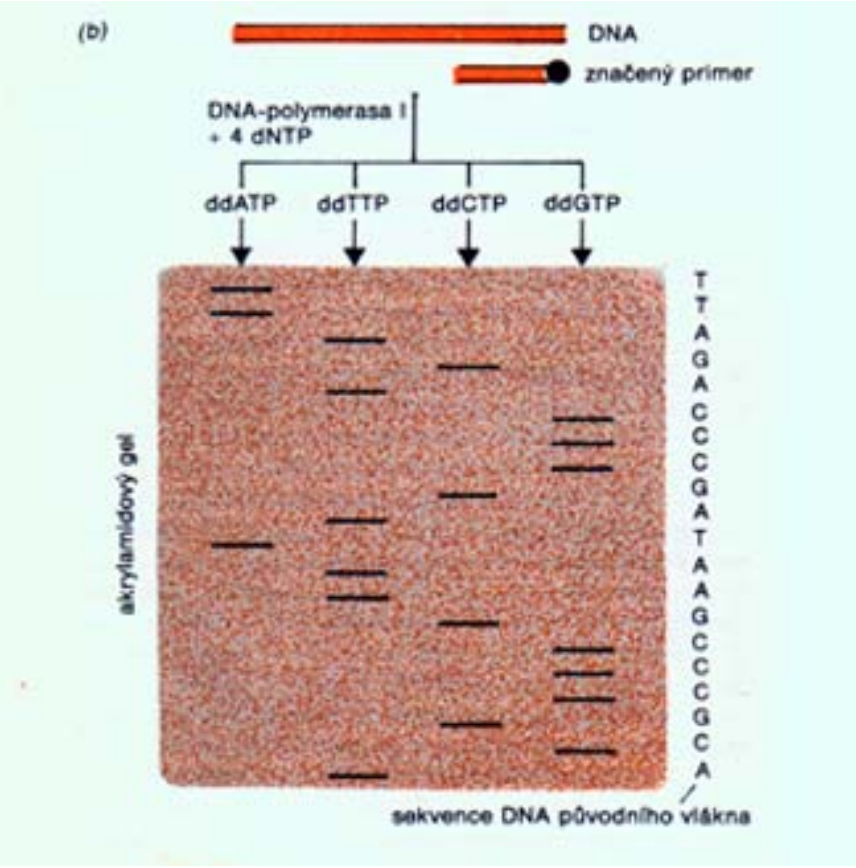
Sekvenování DNA podle Sangera (enzymatická metoda)





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….

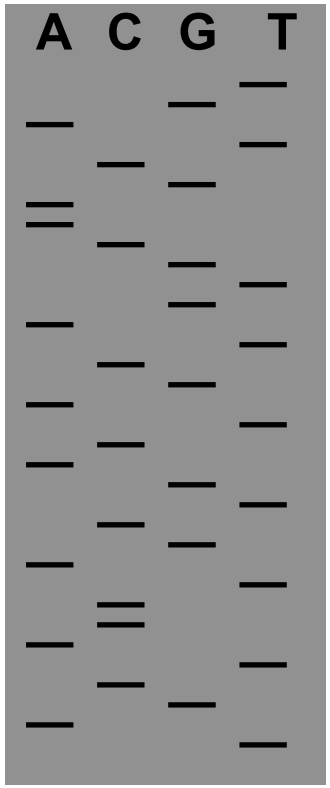
Výhody: - odpadá nutnost náročného nalévání gelů a nanášení vzorků na gel (kapilára se plní automaticky)

- úspora chemikálií

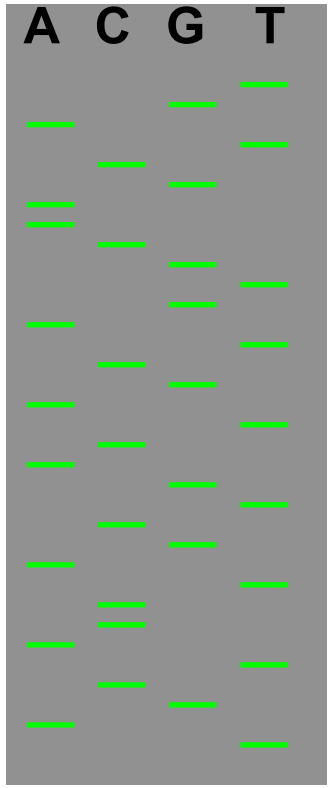
- reprodukovatelnost

Od radioaktivity k fluorescenci

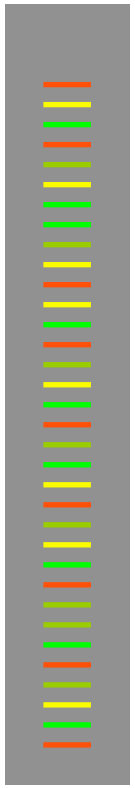
Radioaktivní
značení
gel



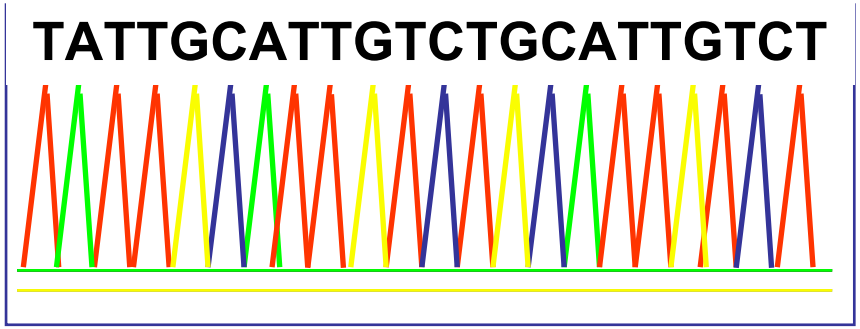
“jednobarevná“
fluorescence
gel



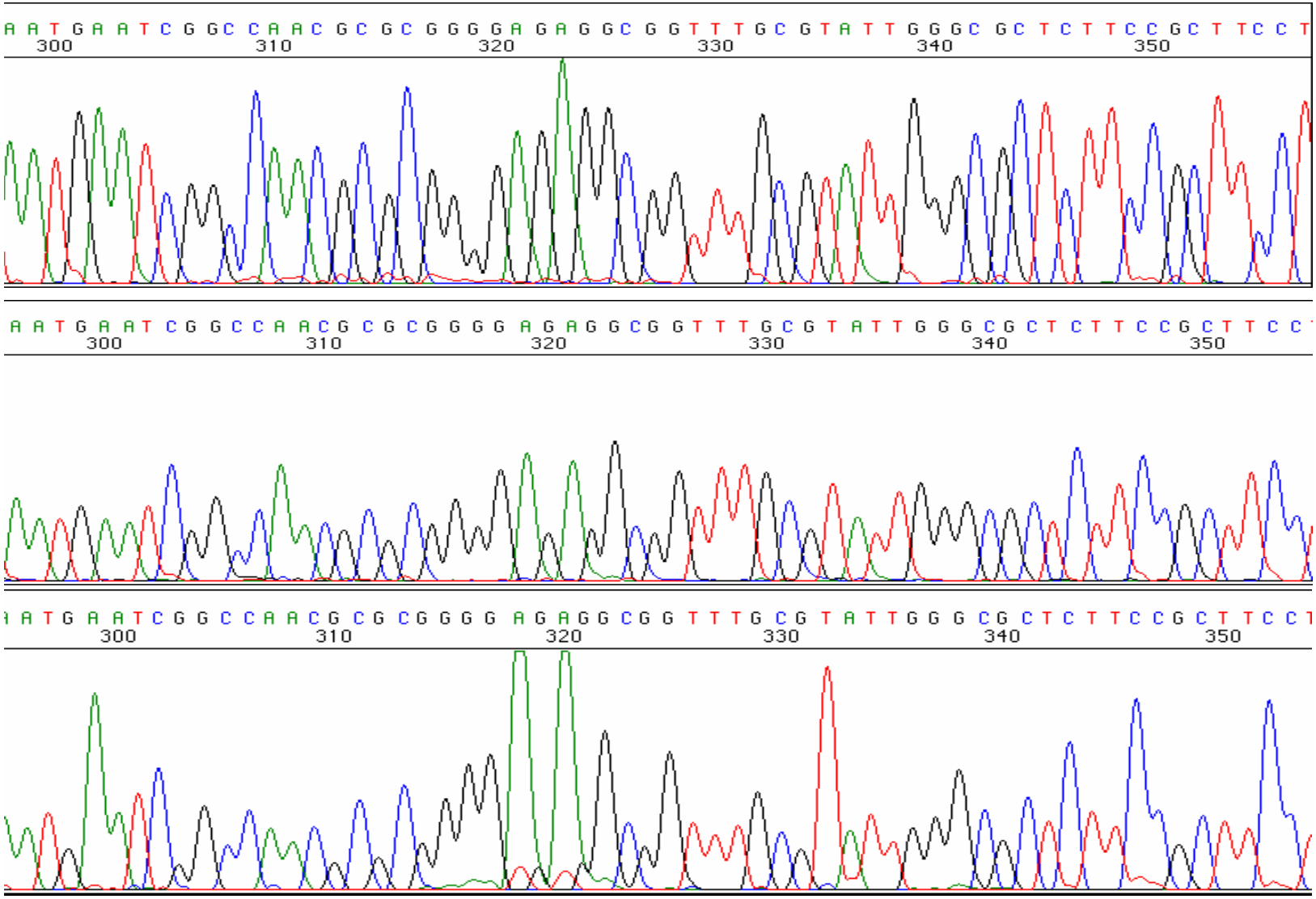
vícebarevná
fluorescence
kapilára



Výsledek sekvenování



Vývoj sekvenačních kitů

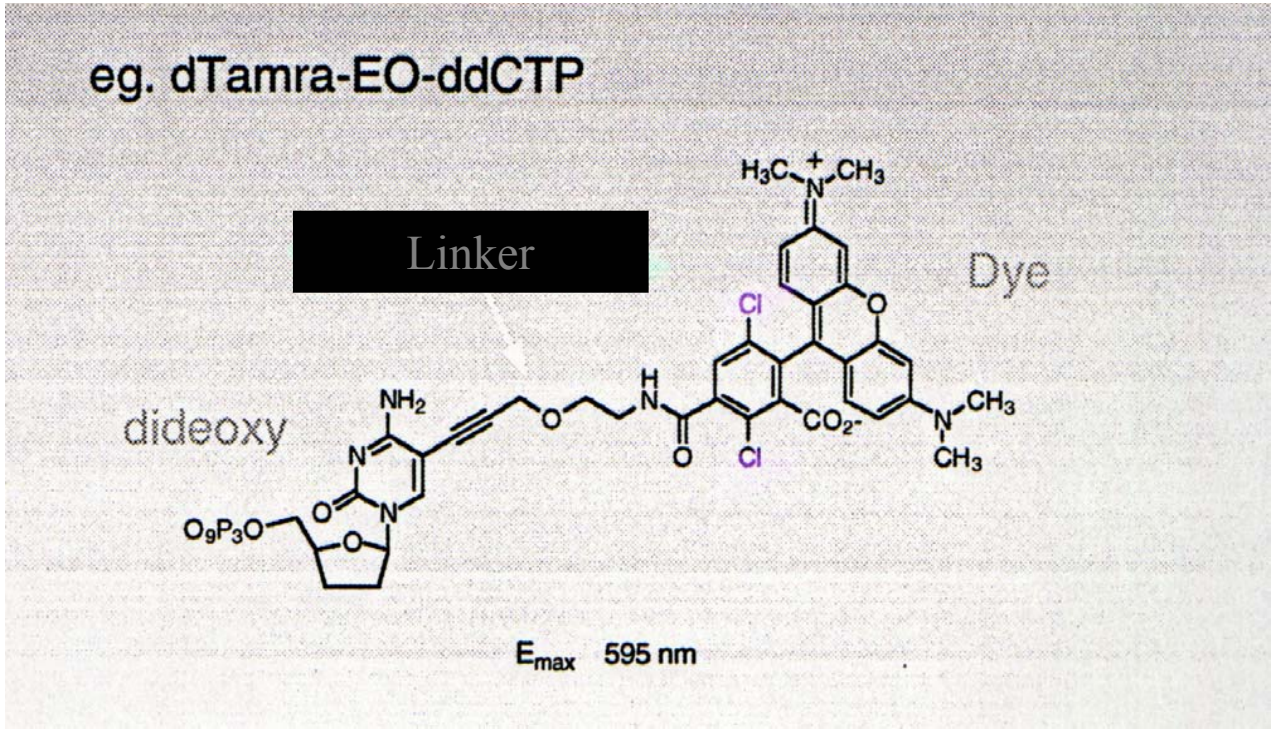


BigDye

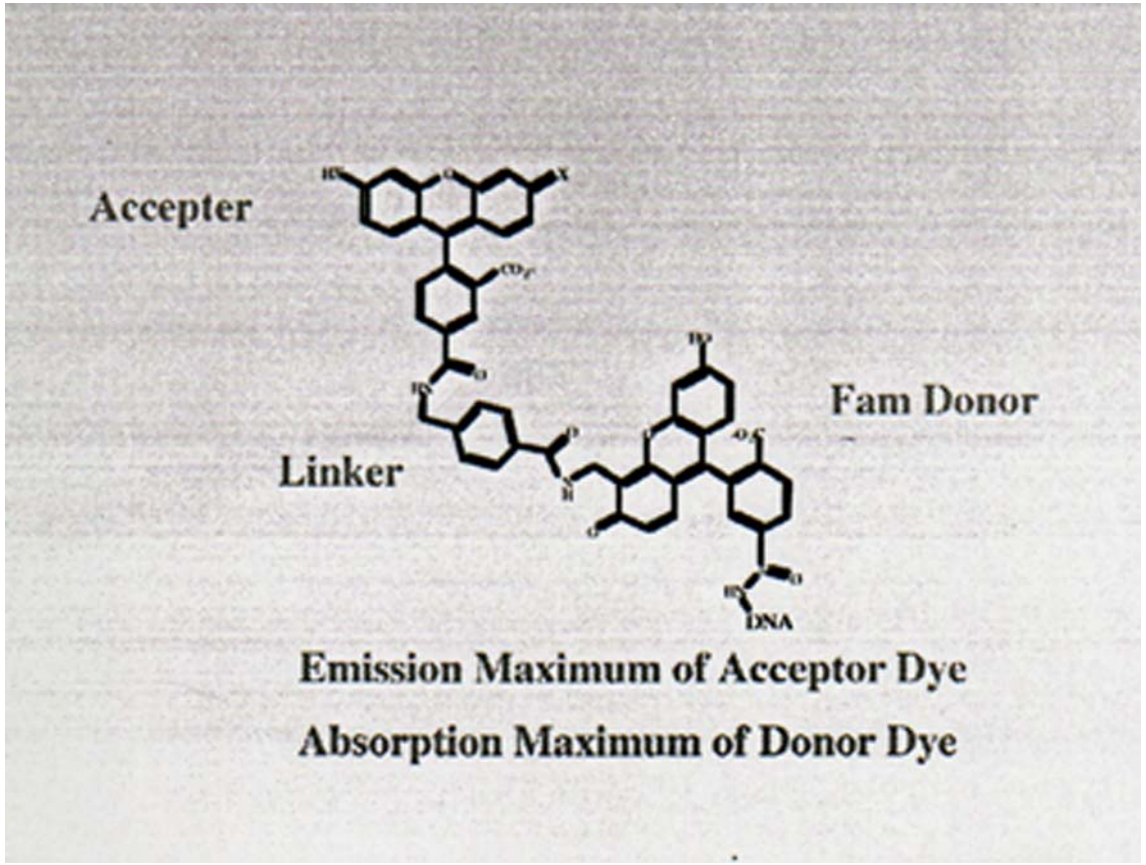
dRhod

Rhodamine

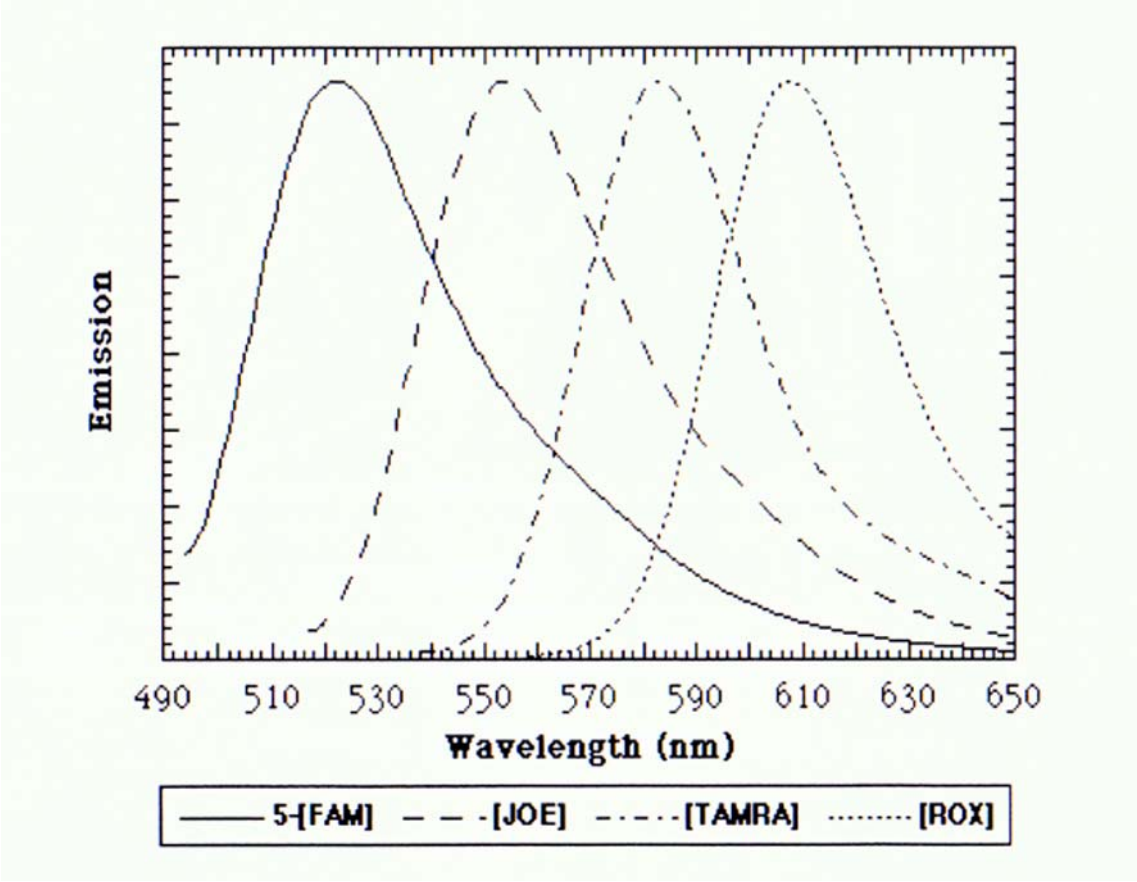
Struktura fluorescenčních značek - dichlororhodaminy



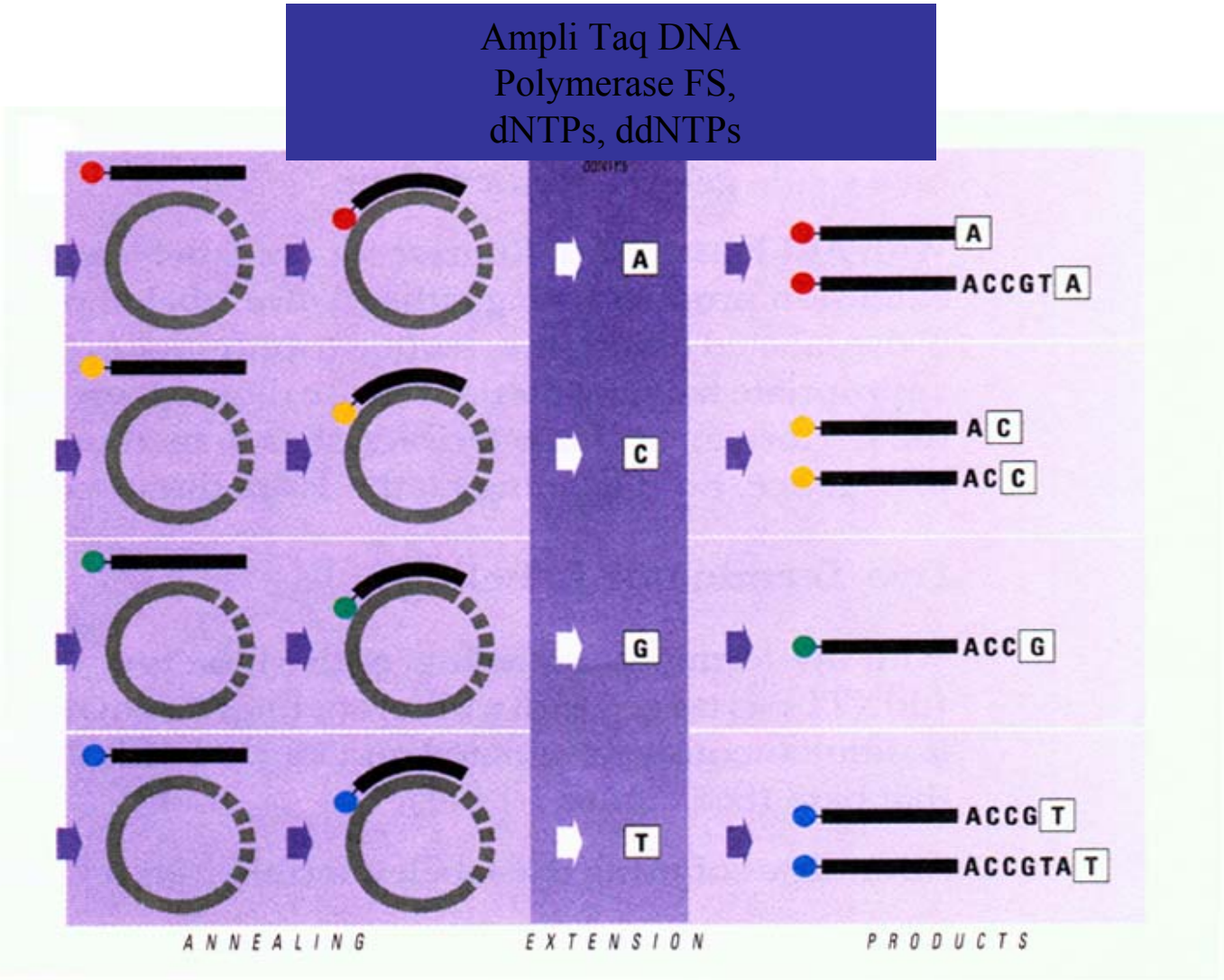
Struktura fluorescenčních značek
“ Big Dye “



Emisní spektra



Sekvenování se značenými primery



Sekvenování se značenými primery

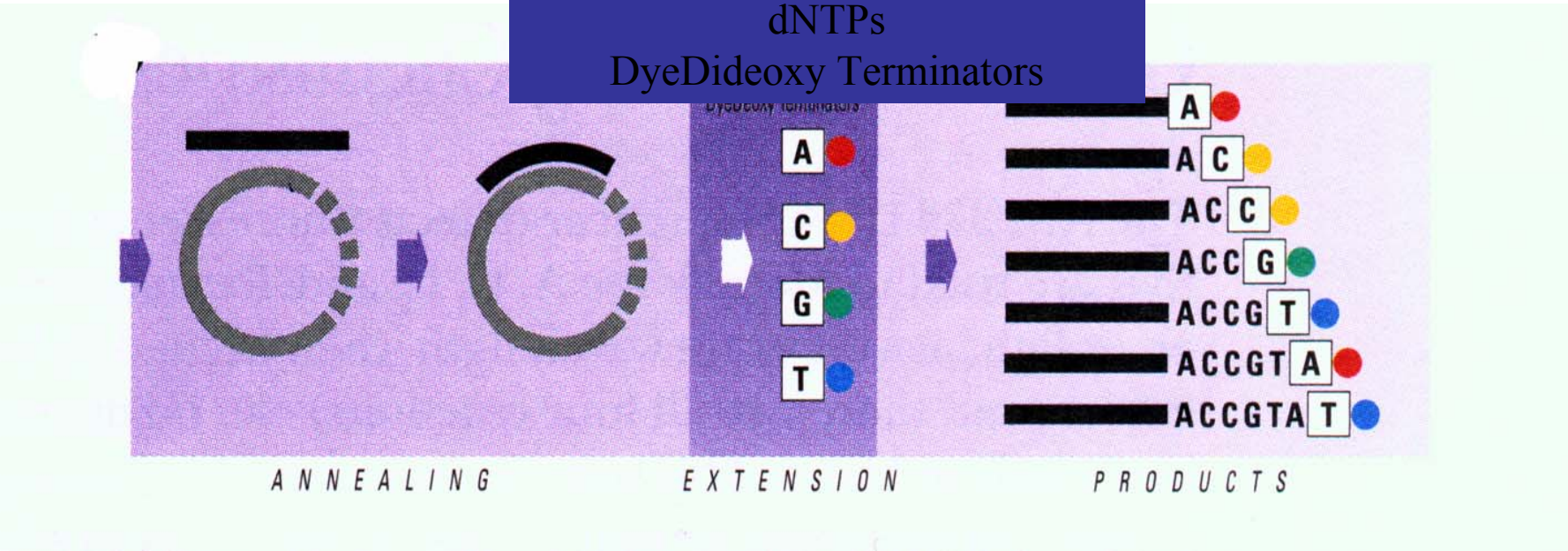
Ideální metoda pro sekvenování inzertů klonovaných do fágů nebo plazmidů

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

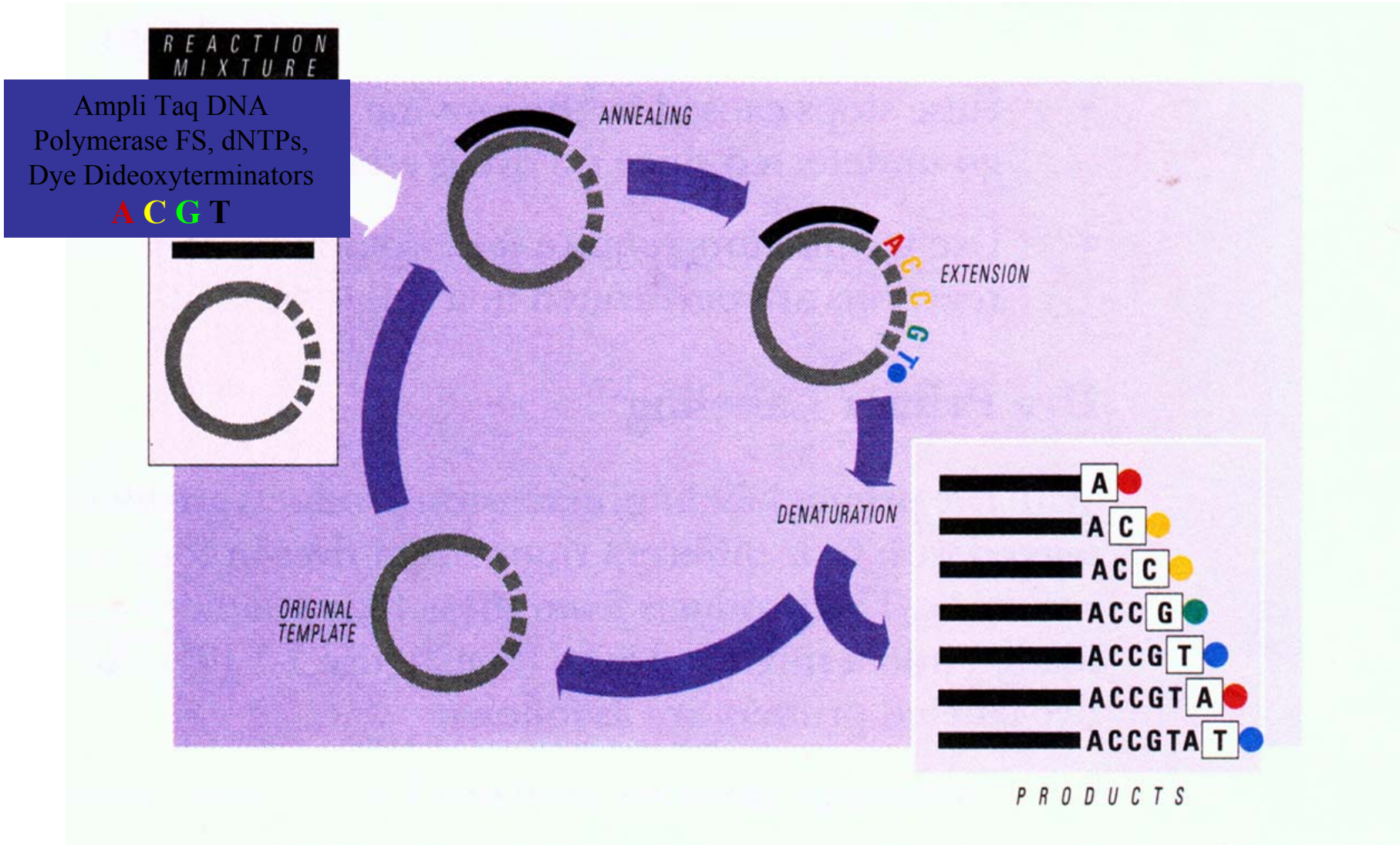


Sekvenování se značenými terminátory

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



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

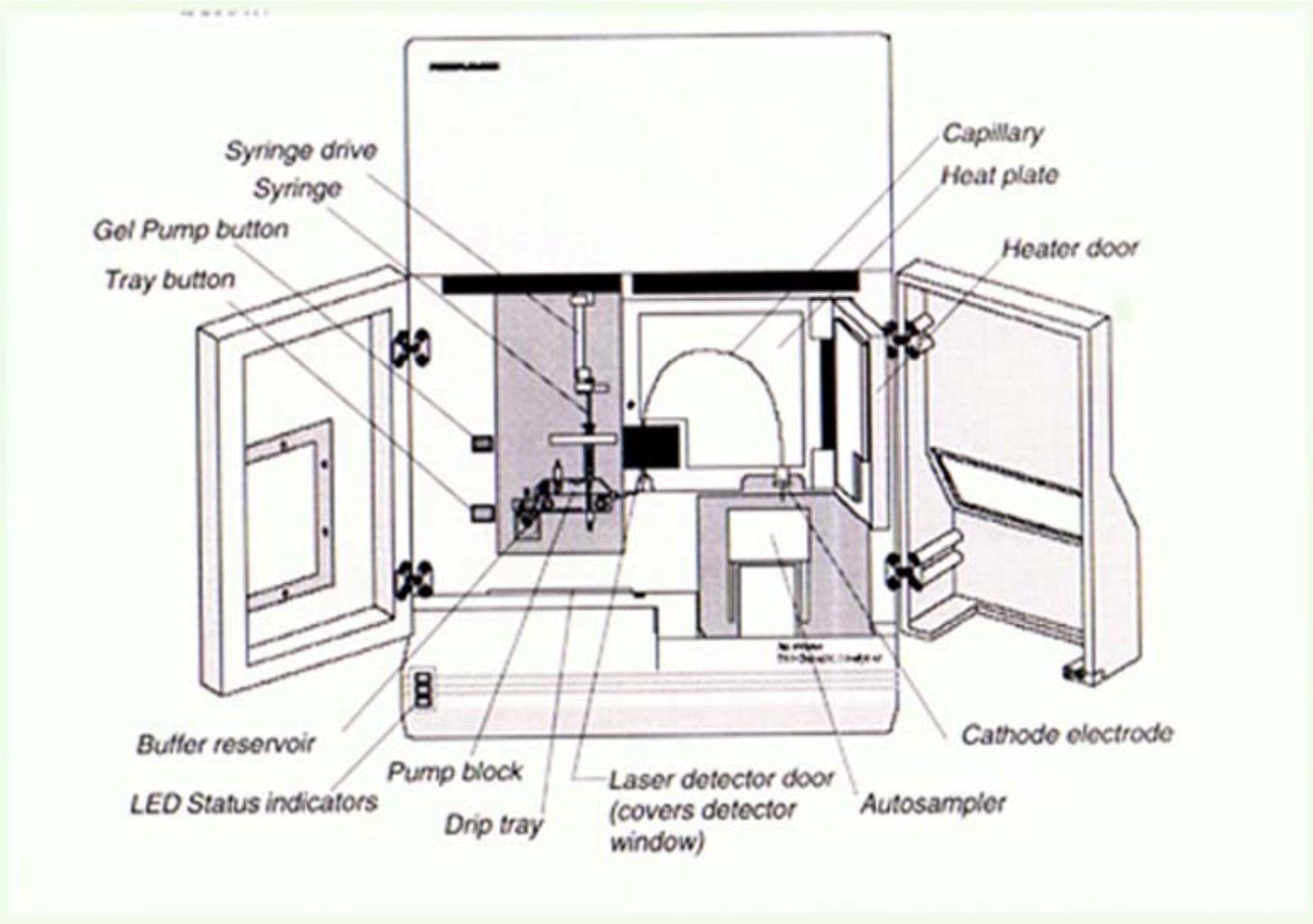
3100

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

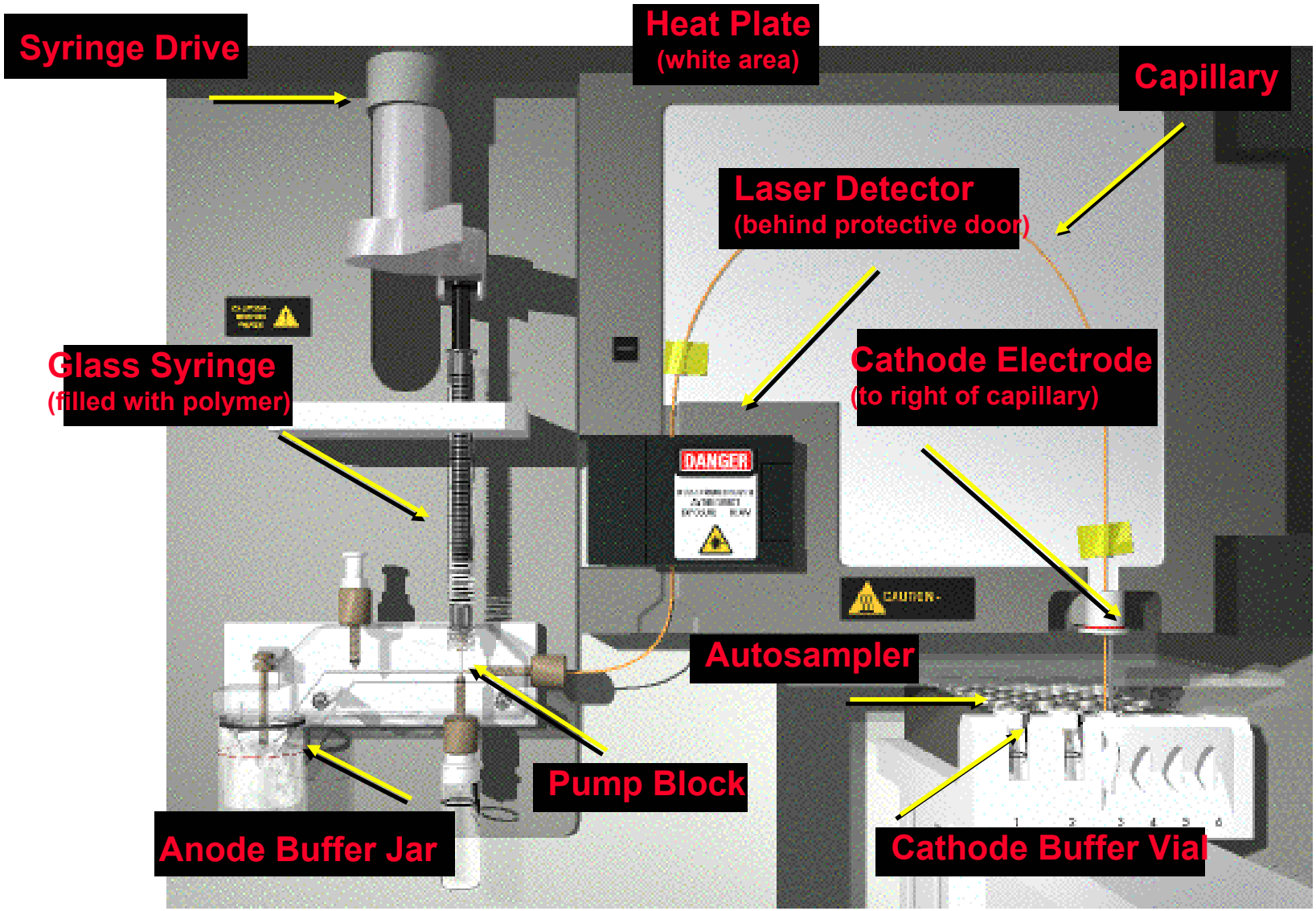
2002
3730/3730XL
System

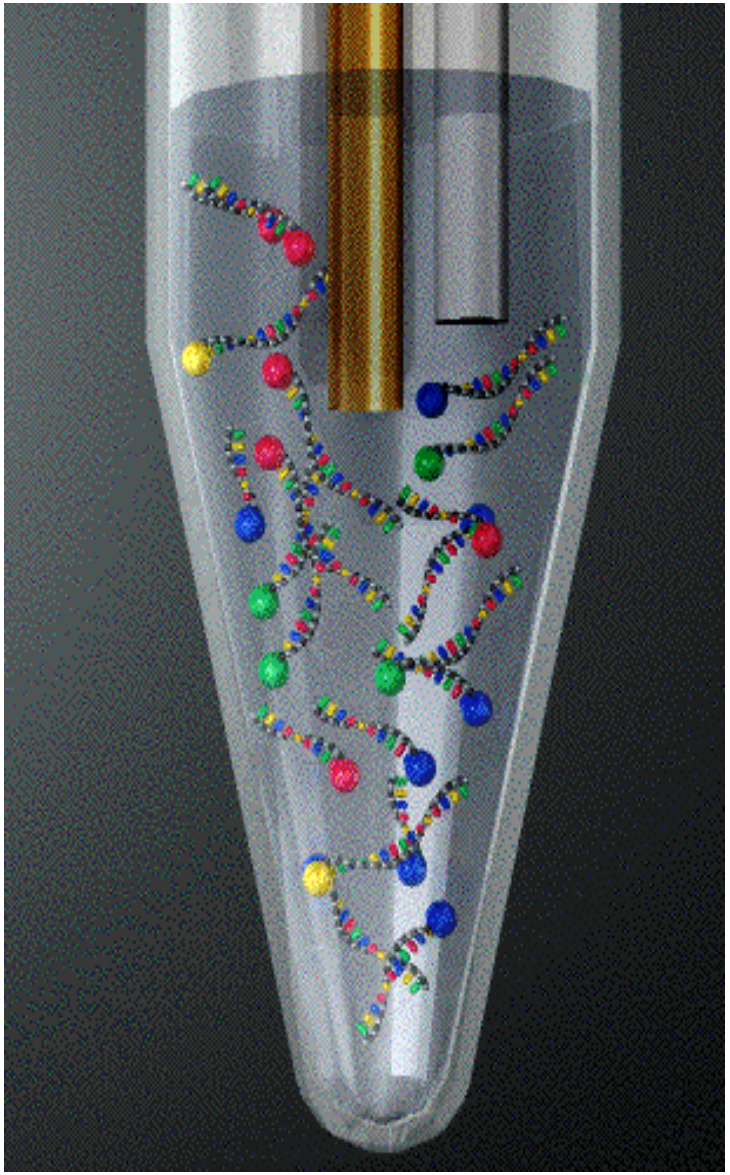
48/96 capillaries
> 1Mb/day
> 75 000 Gt/day

Genetický analyzátor ABI PRISM 310



Genetický analyzátor ABI PRISM 310



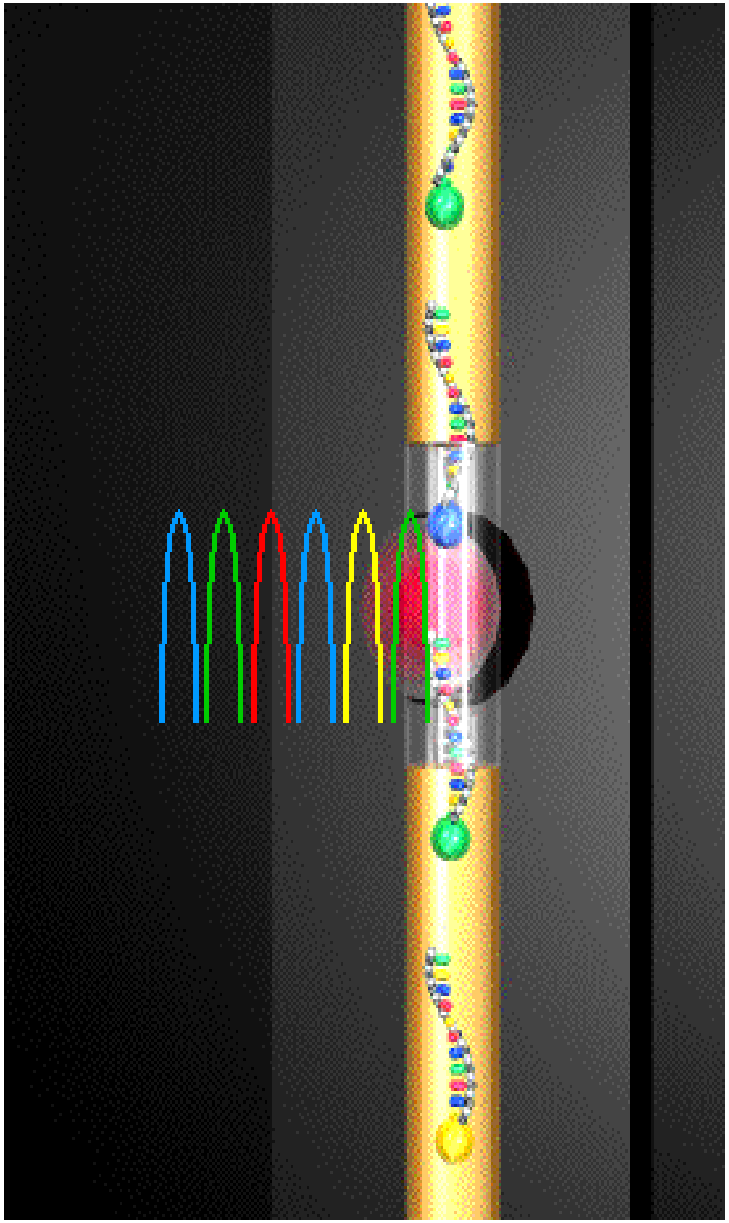


Elektrokinetické dávkování vzorku a elektroforéza

Kapilára a elektroda vstupují do vialky se vzorkem

Vloží se napětí

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



Excitace fluorescence a detekce

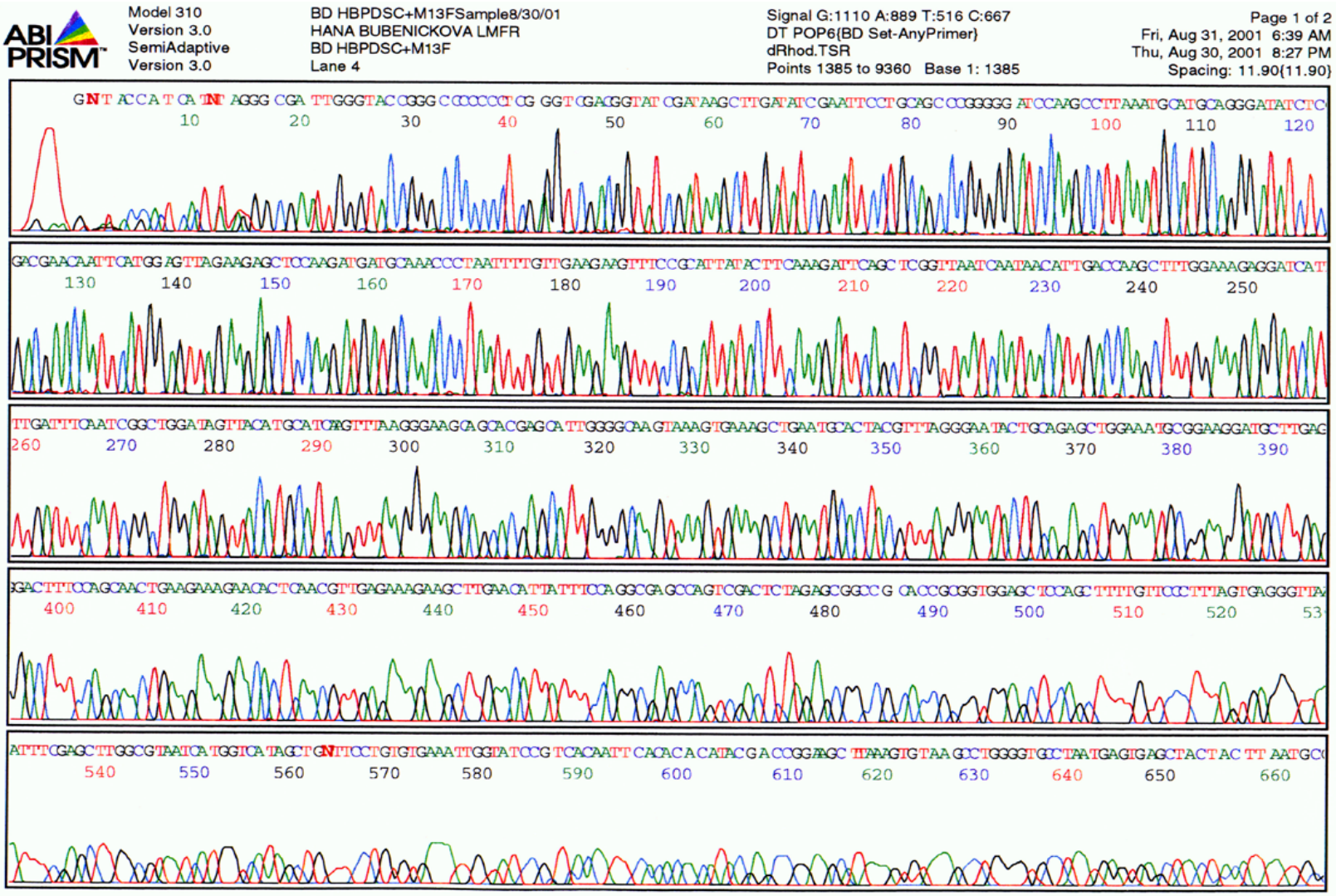
Fragmenty DNA nesoucí jednu ze čtyř fluorescenčních značek jsou ozářeny laserovým světlem

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 sekvence vypadá takto……



…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 ?**

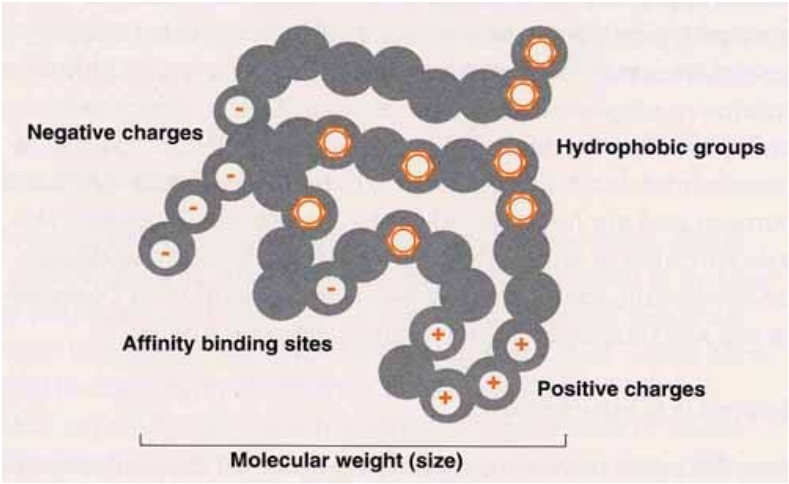
Co??? **Jaké vlastnosti má náš protein ?**

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…	Afinita 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

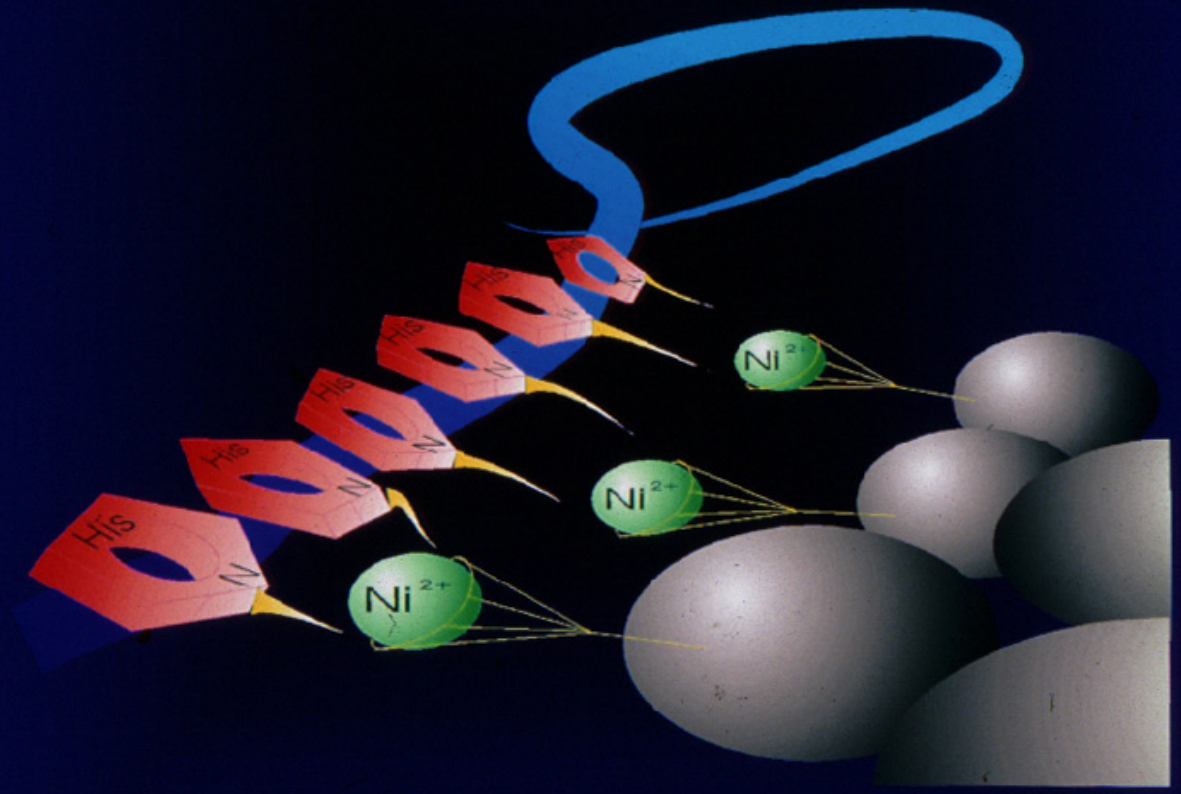
- poprvé popsána jako metoda frakcionace sérových bílkovin (Porath 1975)

- 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



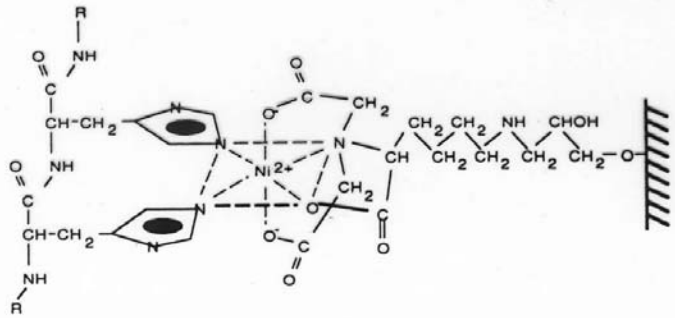


Figure 3: Interaction between 6xHis tag and Ni-NTA resin.

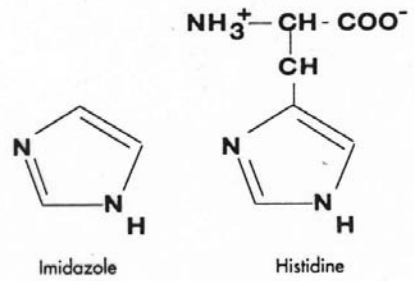


Figure 5: Structures of imidazole and histidine.

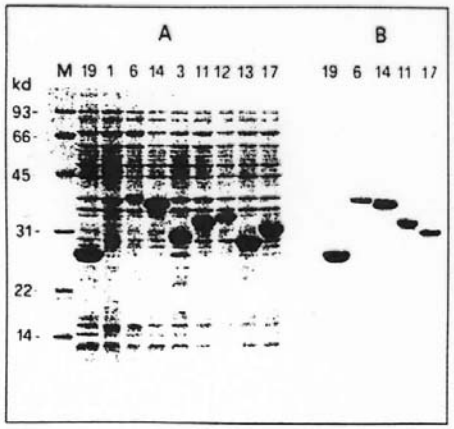


Figure 4: Expression and purification of malaria circumsporozoite antigens with QIAexpress.
A. SDS-Page analysis of recombinant 6xHis-tagged CS proteins, 5 hours after induction with IPTG.
B. SDS-Page analysis of recombinant CS proteins after purification on Ni-NTA resin according to the standard protocol, 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 nepřenosný na jiné proteiny!

Obecně lze navrhnout:

- pufry o pH 7-8 pro vazbu rek. proteinu s kovovým iontem
- pufry 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 tělíscích

→ purifikace za vysokých koncentrací močoviny nebo guanidinium chloridu

→ čistý protein, ale porušení terciární/kvartérní struktury (postačí však např. na imunizace)

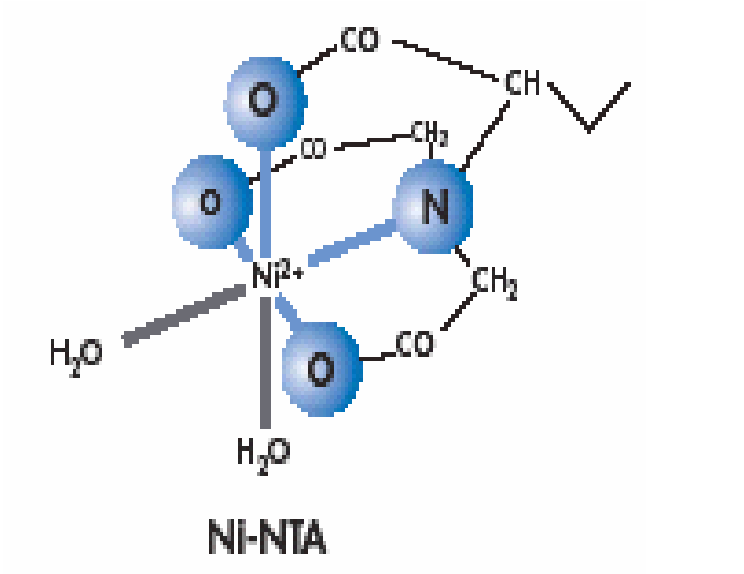
Zisk nativního konformeru: - nutné pro měření enzymové kinetiky, rtg analýza,…

- eluce enzymu z kolony a jeho renaturace dialýzou nebo výrazným zředěním v renaturačních pufrech

- renaturace enzymu vázaného na matrici:
  - → gradient z denaturačních do renaturačních pufrů
  - → pulzní renaturace

Metalochelatační matrice

Ni^{2+} NTA (nitriltrioctová 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

Ni-NTA Superflow

-vazba Ni-NTA na agarosu

- vazba Ni-NTA na ???

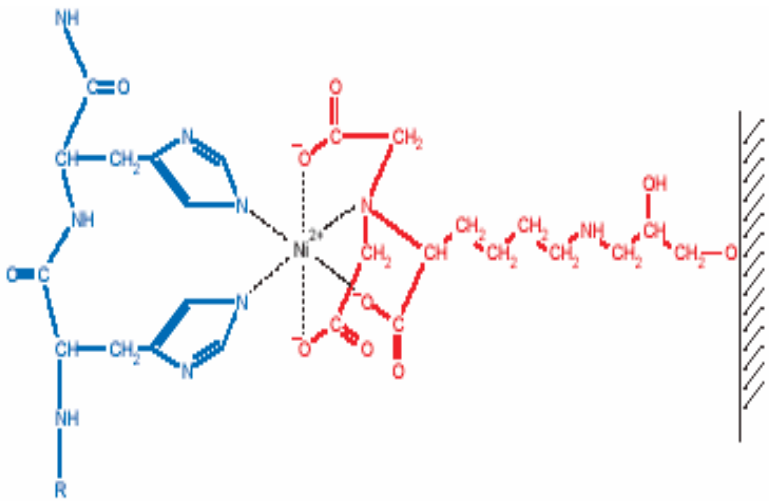
- vysoká vazebná kapacita (5-10 mg/ml)

- vysoká stabilita

- dobré manipulační vlastnosti (plnění kolon)

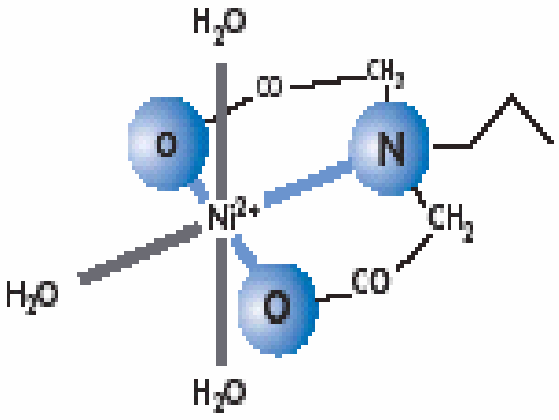
- vhodná pro FPLC

- dá se použít i při vyšších tlacích



Metalochelatační matrice

Ni^{2+}-IDA (imidodioctová kyselina)



Ni-IDA

- IDA tvoří výhodné cheláty s Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}, Cu^{2+} ionty

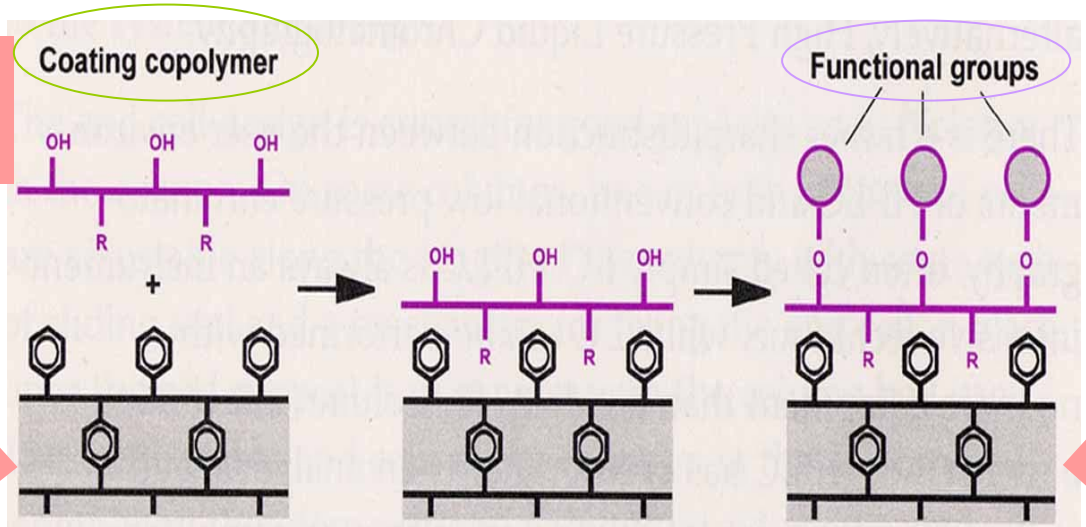
- 3 metalochelatační místa - vazba chelator - kov není tak pevná dochází k uvolňování kovu během purifikace

Matrice POROS MC/M

vazba přechodného kovu

polyhydroxylovaný polymer

imidodioctová kyselina



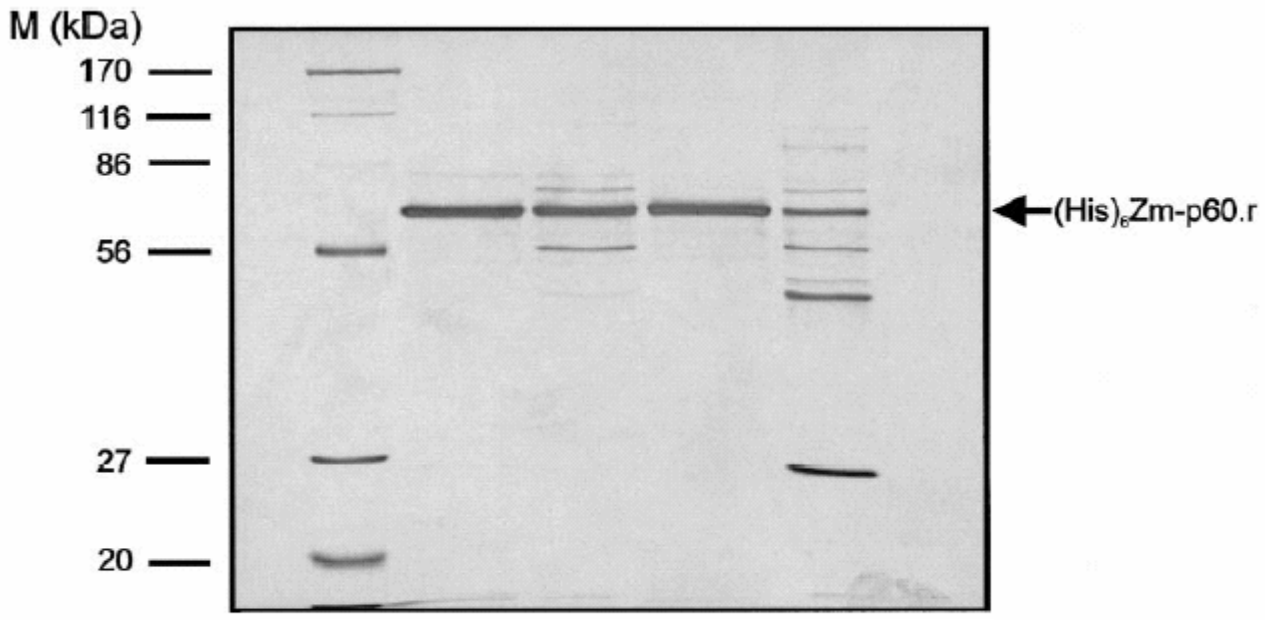
částice zesíťovaného poly(styren-divinylbenzen)

- patentovaná velikost pórů

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

Efekt kovového iontu navázaného na POROS MC/M matrici

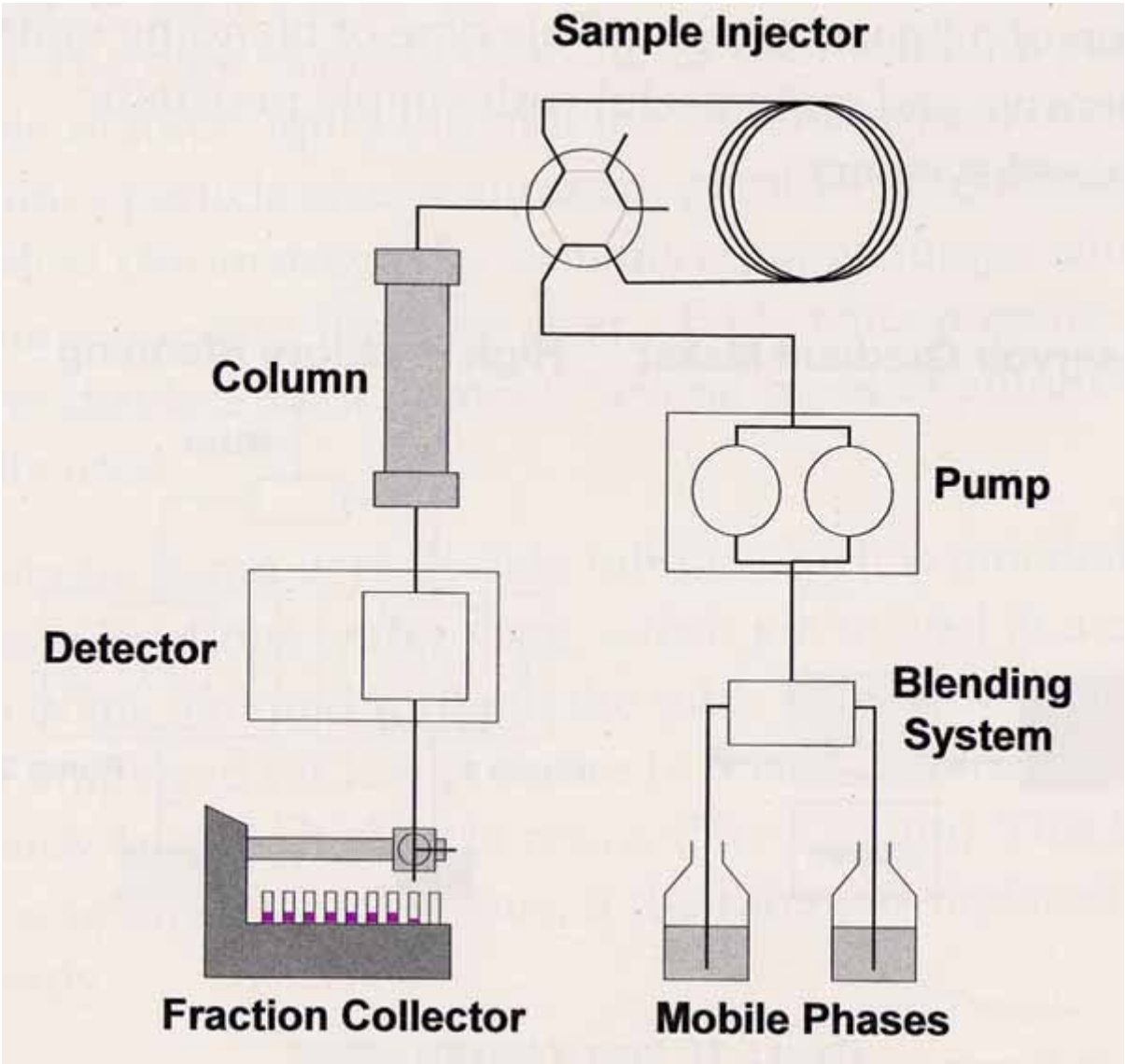
Funkční skupina- **imidodioctová kyselina**



Zn^{2+} Ni^{2+} Co^{2+} Cu^{2+}

Síla vazby: Cu^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} ~ Co^{2+}

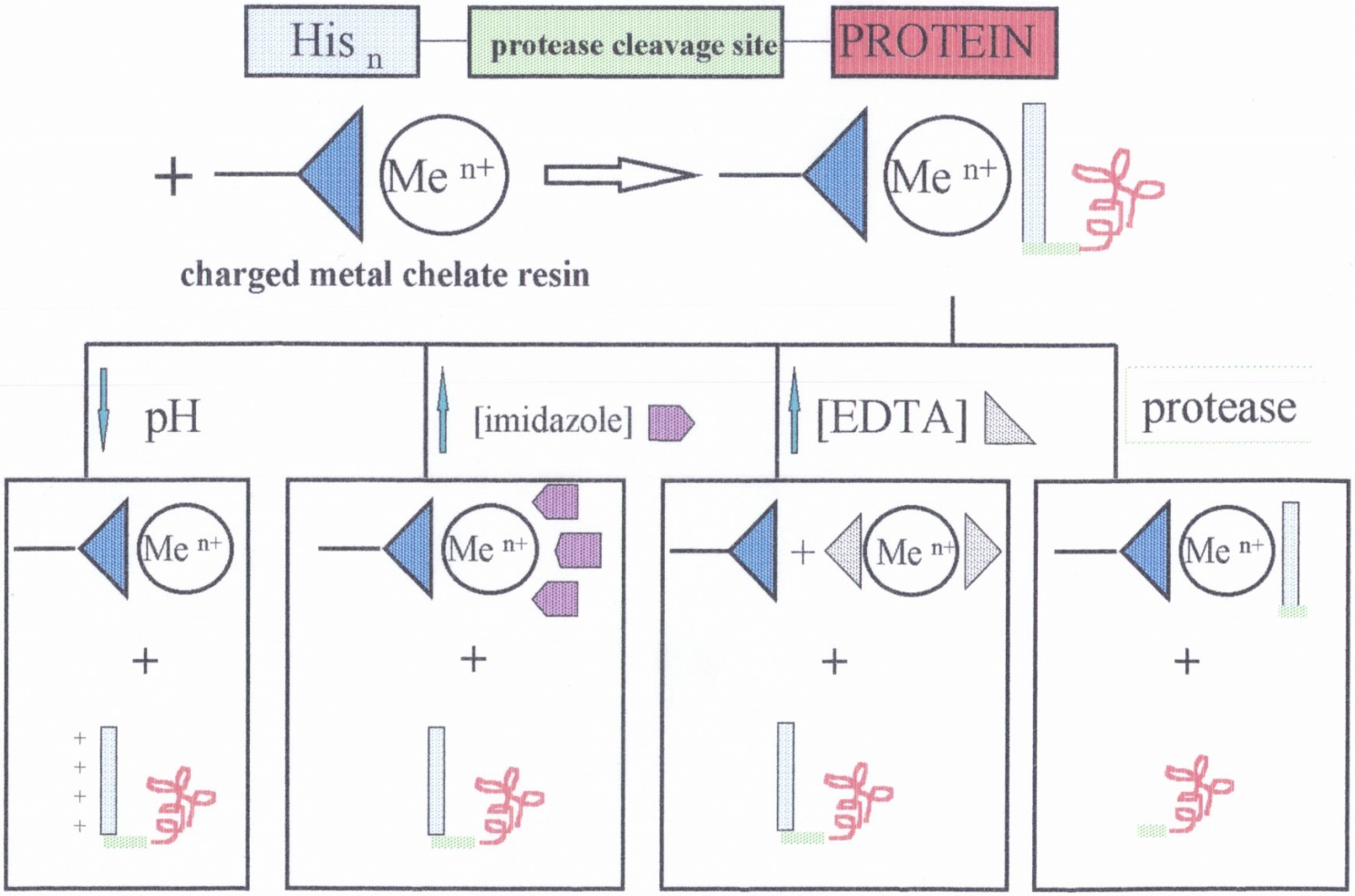
Chromatografická instrumentace



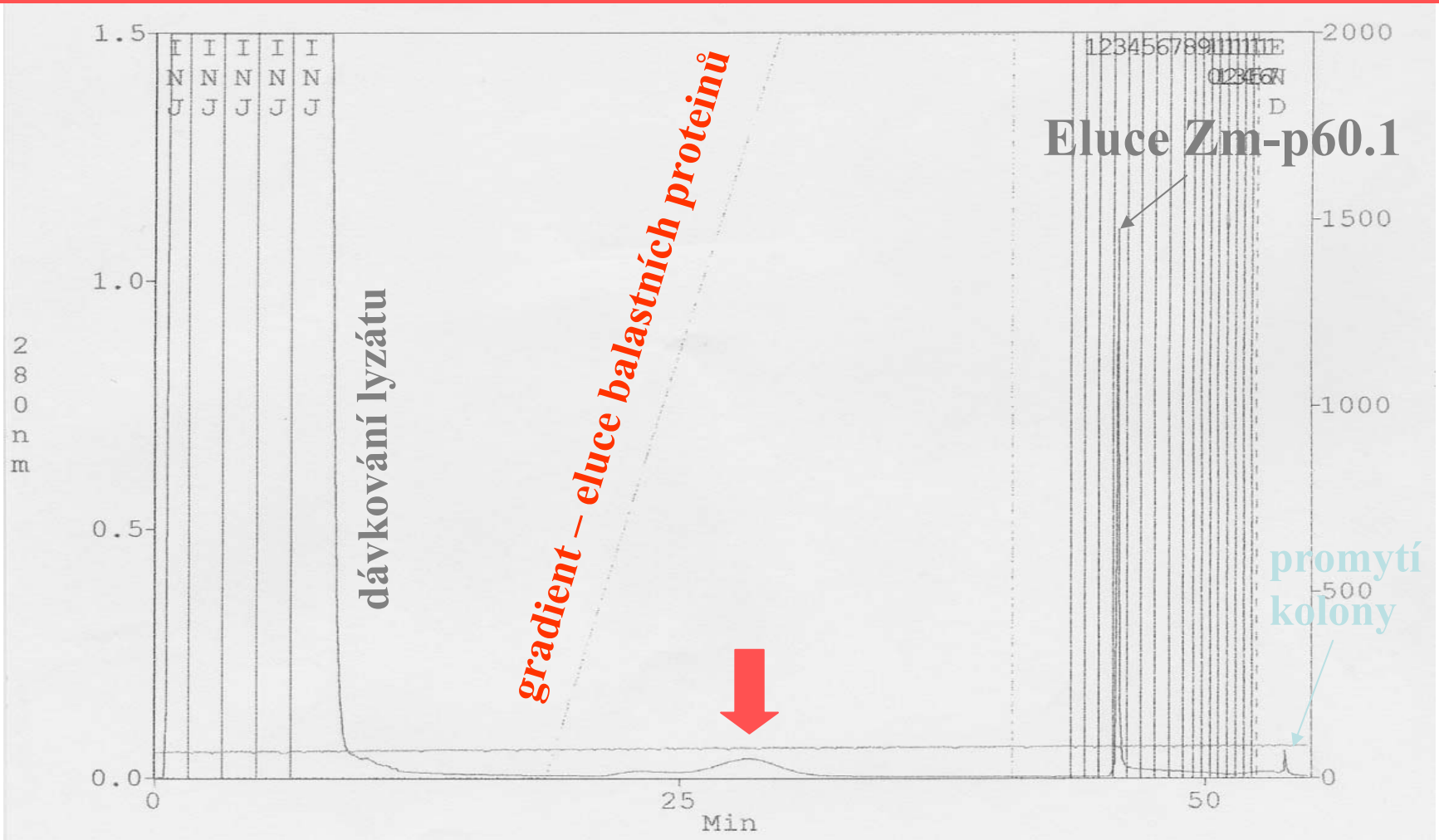
Perfúzní chromatograf BioCAD 700E, PerSeptive Biosystems

- 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



Chromatogram – purifikace na koloně Poros MC/M (Zn-IDA)



Roztok kovu: 50 mM $ZnSO_4$

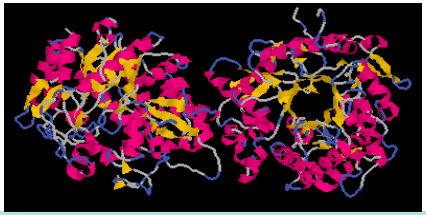
Ekvilibrace kolony: pufr A : 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 1M NaCl pH 7,0

Eluce balastních proteinů: gradient 0-100% B

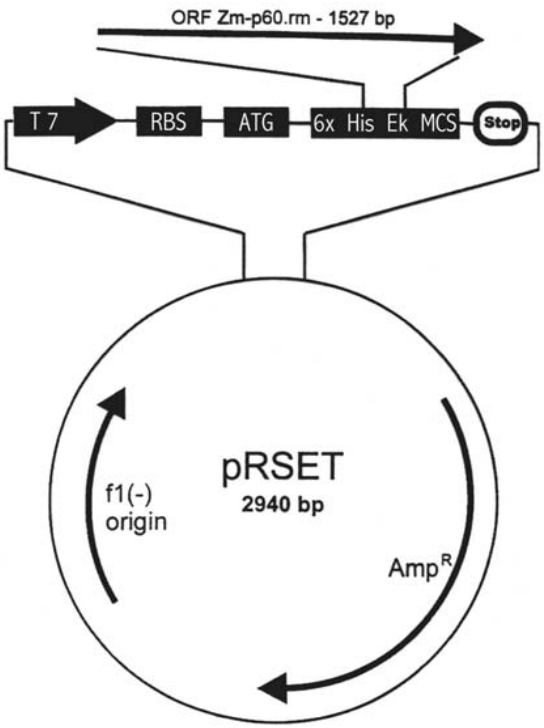
pufr B : 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 50 mM imidazol, 1M NaCl, pH 6,1

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:

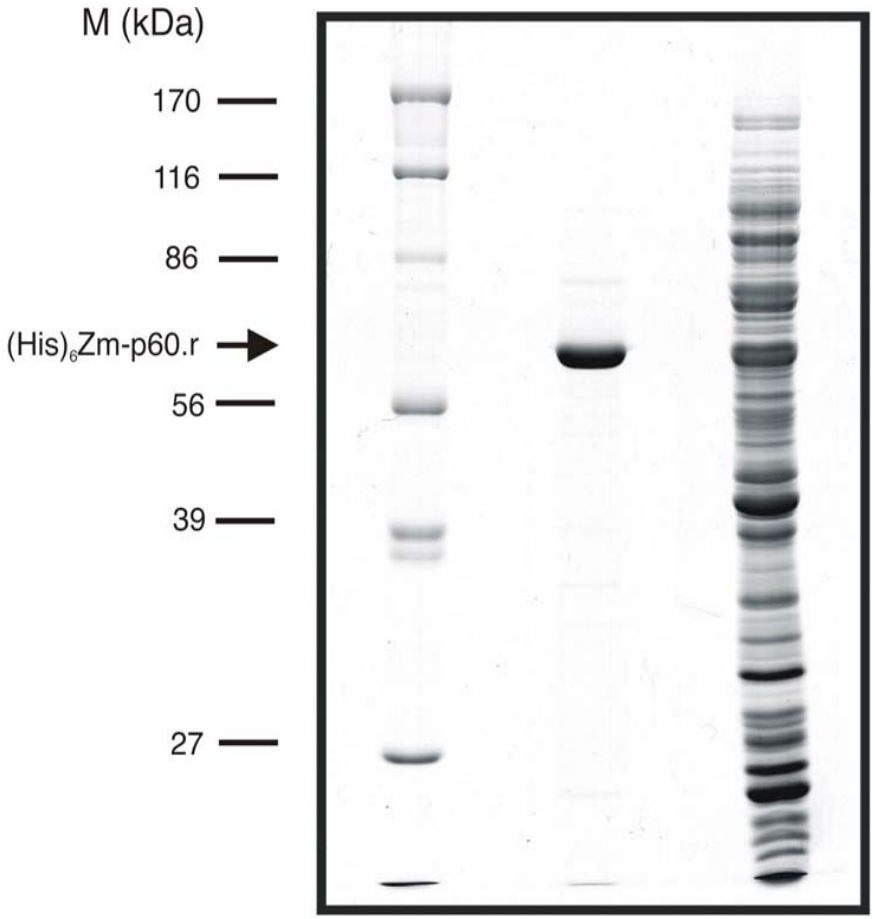
- kmen BL21(DE3)pLysS *E. Coli*
- IPTG-inducibilní T7 RNA polymerasa
- Zm-p60.r pod T7 promotorem
- inhibice RNA polymerasy *E. coli* rifampicinem

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 $(His)_6$Zm-p60.r

- konstrukt pRSET::*Zm-p60.r*, bakteriální kmen BL21(DE3)pLysS
- nativní purifikace na koloně POROS MC/M IDA-Zn^{2+}



Exprese:
- 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

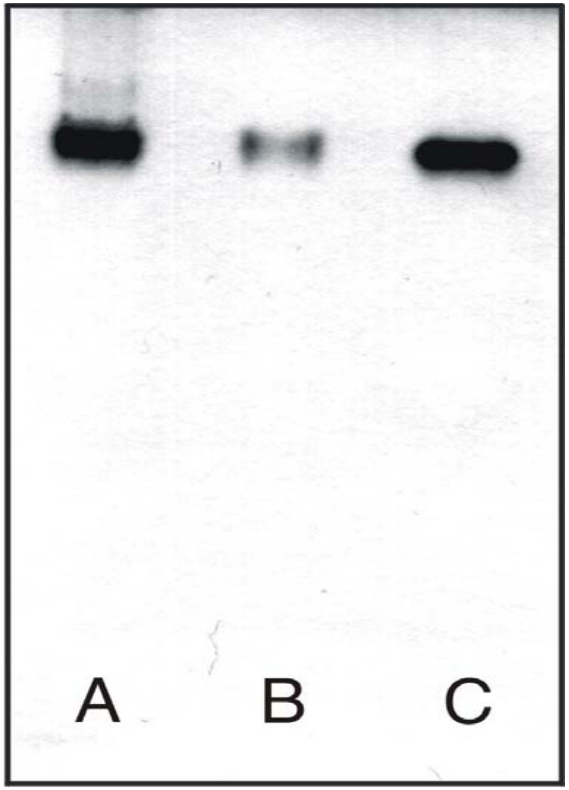
Purifikace:
- metalochelatační afinitní chromatografie
- perfúzní sorbent POROS MC/M
- komplex iminodiacetát-Zn^{2+}
- 80% výtěžek, 95-násobné přečištění

Použití:
- rutinní produkce a izolace standardního kmene a solubilních mutantních forem

In vitro asistovaná renaturace $(His)_6$Zm-p60.r

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

- denaturovaný protein (v 8M močovině) vázán na matrici s imobilizovaným Ni^{2+}
- 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

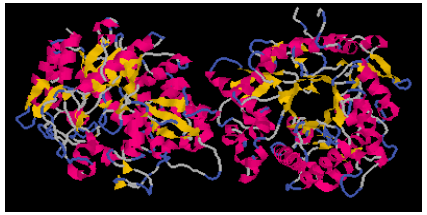
Analýza produktu renaturace (RP):

- nativní PAGE s detekcí enzymové aktivity:
  A: proteinový extrakt z koleoptilí *Zea mays*
  B: renaturační produkt
  C: $(His)_6$Zm-p60.r purifikovaná za nativních podmínek
- analýza kinetických parametrů
  $K_M(WT) = 0{,}60 \pm 0{,}08$ mM
  $K_M(RP) = 0{,}64 \pm 0{,}06$ mM

Použití:

- renaturace nesolubilních mutant Zm-p60.1

Rekombinatní deriváty kukuřičné β- glukosidasy

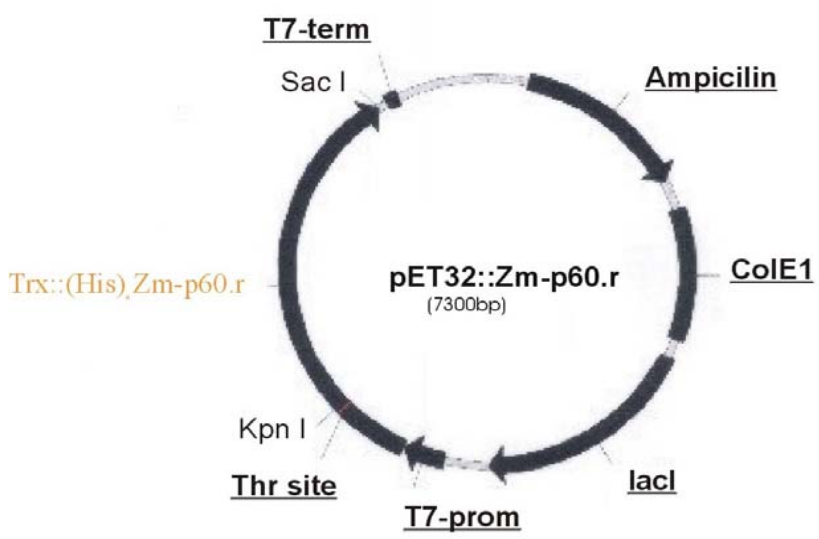


Expresní konstrukt pET32::*Zm-p60.r*

- pro mutanty Zm-p60.1 se sníženou rozpustností nebo narušenou kvartérní strukturou

THIOREDOXIN

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



Exprese:

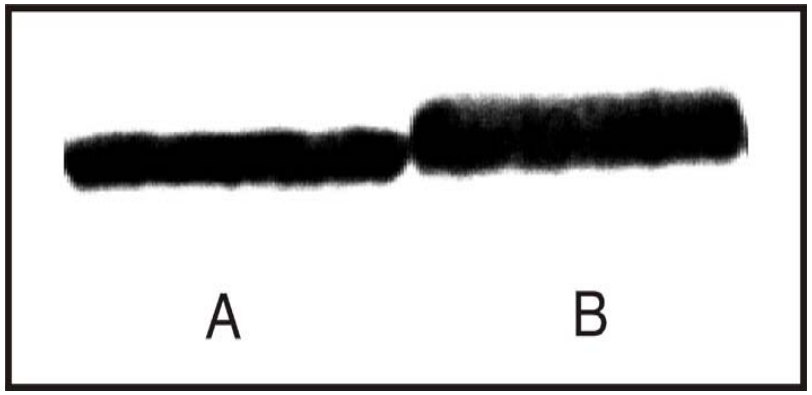
- kmen BL21(DE3)pLysS *E. Coli*
- IPTG-inducibilní T7 RNA polymerasa
- Zm-p60.1 pod T7 promotorem

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 parnerem His-patch thioredoxin (Lu et al. 1996) s afinitou k imobilizovaným iontům přechodných kovů

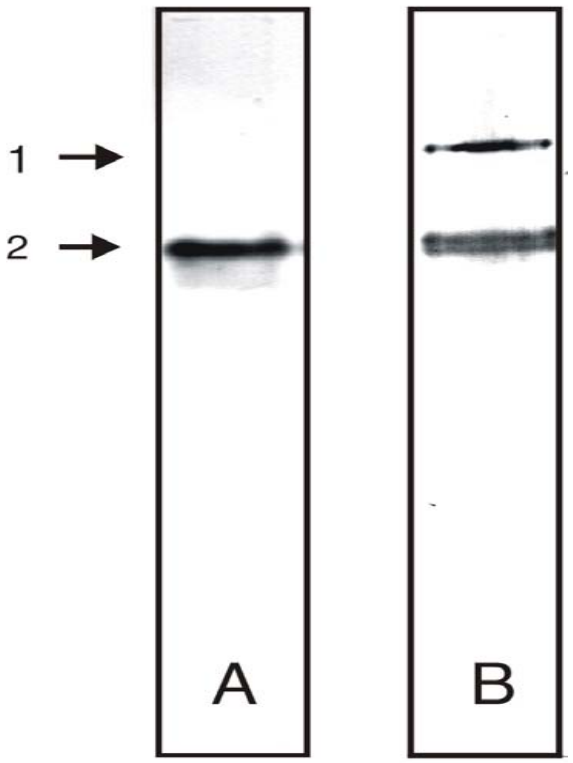


Exprese:
- bakteriální RNA polymeráza
- *Zm-p60.1* pod hybridním *trc* promotorem
- 80% podíl solubilní frakce (A) na celkovém rekombinantním proteinu standardního typu (B)

Purifikace:
- metalochelatační afinitní chromatografie

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

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



- mutanta I404D produkovaná jako derivát $(His)_6$Zm-p60.rm vykázala poruchu při tvorbě nativní dimerní struktury (A), byla nalezena ve formě enzymaticky neaktivního monomeru (2)

- následně byla exprimována jako fúzní protein hpTrx::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