

Úloha C2 – Produkce a purifikace (studijní materiál)

Kultivační média

V současné době je k dispozici velké množství různých kultivačních médií. V mikrobiologii se média dělí v první řadě na tekutá a na pevná (většinou díky obsahu agaru), dále na neselektivní (roste na nich široké rozmezí různých mikroorganismů) a selektivní (obsahují složku, která favorizuje růst úzké skupiny mikroorganismů). Selektivní média často obsahují různé indikátory, které umožňují blíže diagnostikovat či charakterizovat daný mikroorganismus.

Při kultivaci bakterií pro produkci rekombinantních proteinů nás bližší diagnostika příliš nezajímá. Potřebujeme ale zajistit selektivitu kultury, čehož je nejčastěji docíleno přidáním různých antibiotik. Dále se selektivitu snažíme udržovat tím, že používáme sterilizovaná média, pomůcky a pracujeme sterilně (např. v laminárním boxu).

Co se složení médií týká, velmi rozšířené je tzv. LB (Luria-Bertani) médium, které obsahuje trypton (aminokyseliny a krátké peptidy vzniklé štěpením kaseinu trypsinem), kvasničný extrakt a chlorid sodný. Vysoký obsah živin umožňuje rychlý růst buněk, nicméně v některých případech to nemusí stačit. Např. tzv. SOC médium je modifikací LB média lišící se přidáním glukosy, MgSO₄ a KCl. SOC médium se používá pro regeneraci buněk po transformaci teplotním šokem, buňky jsou totiž „vyhladovělé“ a celkově oslabené, použití SOC média tedy vede k vyšší transformační účinnosti. Pro NMR experimenty jsou potřeba izotopově značené proteiny, kultivace tedy probíhá v médiu obsahujícím pouze živiny, kde je jeden z atomů nahrazen svým jiným izotopem (např. ¹²C za ¹³C, ¹⁴N za ¹⁵N).

Antibiotika

Když si odmyslíme šířící se antibiotickou rezistenci mezi patogenními bakteriemi, může být rezistence k antibiotikům v laboratoři užitečná. Antibiotika patří mezi základní selekční faktory pro kultivaci bakterií. Nejen že v médiu zajistí růst právě naší rezistentní kultury, ale přítomnost antibiotik navíc buňku nutí udržovat si plasmid (nesoucí nejen gen zajišťující rezistenci proti použitému antibiotiku, ale také gen pro náš protein) v mnoha kopiích, což přijde vhod např. při izolaci plasmidové DNA.

V molekulárně biologické laboratoři se používá celá řada antibiotik, jejich vlastnosti se liší, je třeba si dávat pozor hlavně na termostabilitu a dobu účinnosti antibiotik (ať už při skladování nebo samotné kultivaci). Příklady používaných antibiotik najdete v tabulce 1.

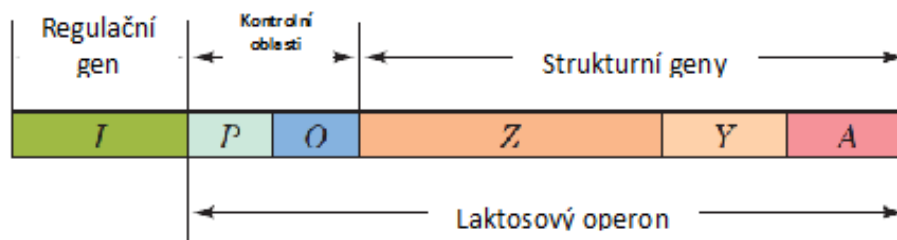
Tabulka 1: Některá antibiotika a jejich vlastnosti. Převzato z [1] a upraveno.

Antibiotikum	Používaná koncentrace	Stabilita v kultuře (37 °C)
Amfotericin B	2,5 μg cm ⁻³	3 dny
Ampicilin	100 μg cm ⁻³	3 dny
Chloramfenikol	5 μg cm ⁻³	5 dnů
Ciprofoxacin	10 μg cm ⁻³	Nezjištěno
Gentamicin	50 μg cm ⁻³	5 dnů
Hygromycin B	500 μg cm ⁻³	Nezjištěno
Kanamycin	100 μg cm ⁻³	5 dnů
Neomycin	50 μg cm ⁻³	5 dnů
Penicilin	100 U cm ⁻³	3 dny
Puromycin	20 μg cm ⁻³	Nezjištěno
Streptomycin	100 μg cm ⁻³	3 dny
Tetracyklin	10 μg cm ⁻³	4 dny

Indukce exprese

V minulé úloze jsme si řekli, že expresní plasmid musí disponovat regulačními elementy, které ovládají genovou expresi inzertu a také to, že při klonování nesmíme tyto regulační oblasti vyjmout a inzert začlenit ve správné orientaci.

Takovým regulačním elementem může být například tzv. *lac* operon *E. coli*, který je popsán na obrázku 1.



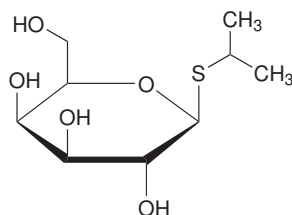
Obr. 1: Schéma *lac* operonu *E. coli*: Nalevo je gen I kódující represorový protein, v kontrolní oblasti se nachází promotor (P) a operátor (O). Laktosový operon dále obsahuje 3 strukturní geny kódující tyto proteiny: β -galaktosidasa (Z), galaktosid-permeasa (Y) a thiogalaktosid-transacetylasa (A). Převzato z [2] a upraveno.

Enzym galaktosid-permeasa přenáší molekuly disacharidu laktosy z vnějšího prostředí do buňky, kde je laktosa štěpena enzymem β -galaktosidasou na molekulu glukosy a galaktosy, které jsou dále metabolicky využívány. Fyziologická funkce thiogalaktosid-transacetylasy zatím není známa. Bakterie *E. coli* je schopná laktosu využívat, ale pokud není v prostředí přítomná, bylo by nevýhodné tyto 3 enzymy syntetizovat a jsou tedy v buňce přítomné jen v minimálním množství. Regulační gen totiž kóduje laktosový represor, který je v nepřítomnosti laktosy navázán na operátor (O). RNA polymerasa, která nasedá na promotor (P), tím pádem nemůže iniciovat transkripci a k přepisování genů Z, Y a A tedy nedochází.

V případě, že se do buňky laktosa dostane, je štěpena jednou z mála přítomných molekul β -galaktosidasou. Minoritním produktem této reakce ale může být i isomer laktosy – 1,6-allolaktosa. 1,6-Allolaktosa se naváže na laktosový represor a vyvolá v tomto proteinu konformační změnu, která způsobí disociaci represoru z operátoru. RNA polymerasa tak může po nasednutí na promotor iniciovat transkripci těchto 3 genů. Po vyčerpání laktosy dojde k disociaci 1,6-allolaktosy z represoru, který se opět stane aktivním a naváže se zpět na operátor, čímž znemožní transkripci *lac* operonu. Na celý proces se můžete podívat i v [této](#) přehledné animaci (v angličtině).

Tento operon často nachází využití v produkci rekombinantních proteinů. Malý rozdíl je v tom, že gen zájmu je na plasmidu pod vlivem T7 promotoru (promotor rozpoznávaný RNA polymerasou z bakteriofága T7) a není tedy přepisován nativní RNA polymerasou kódovanou v genomu expresní buňky. Ta má naopak ve svém genomu zařazený navíc gen pro T7 RNA polymerasu, jejíž exprese je regulována modifikovaným *lac* operonem.

Během kultivace nedochází k žádné nebo jen minimální expresi genu zájmu. Pro maximální výtěžek proteinu se exprese indukuje během logaritmické fáze růstu kultury při OD 0,5–0,8 (OD znamená optická hustota a měří se pomocí spektrofotometru). Místo laktosy se však jako induktor většinou používá její syntetický analog IPTG (obrázek 2). Isopropylová skupina na atomu síry mimikuje molekulu glukosy a IPTG se tedy k *lac* represoru může vázat také. Použití IPTG má taky jednu značnou výhodu (úkol č. 4, odpověď se dá najít i na netu ☺).



Obr. 2: Struktura molekuly IPTG

Desintegrace buněk

V určitých případech může být protein produkován do média či do periplasmy, což má své výhody i nevýhody. Ve většině případů ale produkujeme protein do cytoplazmy, takže pokud s ním chceme pracovat, musíme buňky lyzovat. Přístupů pro desintegraci buněk je několik. Často používaná sonikace funguje tak, že do roztoku s buňkami jsou přes sondu přiváděny ultrazvukové pulzy, které v roztoku vyvolávají vznik kavit – malých „bublinek“, které rychle implodují, čímž vznikají lokální nárazové vlny o vysoké intenzitě. Tím dojde k rozbití buněčné stěny a vylití obsahu cytoplazmy. Nevýhodou je zahřívání vzorku, a tudíž možná denaturace cílového proteinu, musí se tedy chladit a pulzy do něj dodávat s přestávkami.

Dále se buňky mohou rozbít např. pomocí malých skleněných kuliček (průměr 100 až 500 μm), které se přidávají k buňkám a rychlými vibracemi dojde k lyzi buněk. Buňky lze též zmrazit a vysokým tlakem protlačovat přes kovovou mřížku. Pokud je protein produkován do periplasmy, je výhodné využít lysozym, čímž se dá předejít kontaminaci cytoplazmatickými proteiny.

Purifikace proteinů

Pro většinu experimentů je třeba získat protein v dostatečné čistotě, bez kontaminantů. Z předchozí kapitoly jsme zjistili, že čistota proteinu se dá ovlivnit už při desintegraci buněk. Většinou před sebou ale máme komplexní směs o mnoha složkách, ze kterých potřebujeme izolovat jen protein našeho zájmu. Proto se musíme zamyslet, jestli se tento protein od ostatních něčím liší. Zde jsou některá kritéria, která se používají při chromatografických purifikacích:

(a) Izoelektrický bod proteinu

Proteiny jsou složeny s aminokyselin, mnohé z nich mají postranní řetězce nesoucí kladný nebo záporný náboj. Izoelektrický bod je hodnota pH, při které má protein nulový celkový náboj. Pokud se izoelektrický bod proteinu výrazně liší od ostatních, můžeme pro izolaci použít **iontoměničovou** (ionexovou) **chromatografii**. Při ní se používá sorbent, který má kovalentně navázané skupiny se schopností vyměňovat ionty s rozpouštědlem. Vhodnou volbou pH a složení pufru můžeme docílit toho, že studovaný protein bude se sorbentem elektrostaticky interagovat, zatímco ostatní kontaminanty odtečou pryč (nebo naopak).

(b) Velikost proteinu

V případě, že se náš protein od ostatních kontaminantů velikostně značně liší, nebo chceme protein oddělit od nízkomolekulární složky, můžeme použít např. **gelovou permeační chromatografii**. Zde se používají nenabitě sorbenty, které v sobě mají póry definované velikosti. Velké molekuly se do těchto pórů nedostanou a protékají proto s mobilní fází pryč z kolony. Naopak malé molekuly mohou do těchto pórů difundovat, čímž se od ostatních větších částic zdržují, dojde tedy k jejich separaci.

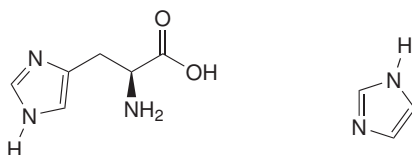
(c) **Vazba proteinu k imobilizovanému ligandu**

Pokud má protein našeho zájmu vazebnou aktivitu k nějakému ligandu, který můžeme imobilizovat (navázat na inertní nosič), můžeme protein purifikovat pomocí **afinitní chromatografie**. Proteiny, které se k sorbentu nevážou, vytečou z kolony pryč. Protein s afinitou k imobilizovanému ligandu se na něj může vázat slabě a kolonu opustit pouze se zpožděním nebo ho při silnější interakci můžeme z kolony získat zavedením pufru s volným ligandem. Ve vazebném místě tedy bude docházet ke kompetici mezi volným a vázaným ligandem, protein se tedy uvolní.

Často využívané „biologické“ interakce jsou např. vazba mezi antigenem a protilátkou. Lektiny (proteiny se schopností vázat sacharidy) zase budou interagovat s imobilizovanými sacharidy. Enzymy můžeme afinitně purifikovat na imobilizovaných substrátech, inhibitech nebo jejich analogích

Pokud náš protein žádnou vazebnou aktivitu nemá, nevadí. Na genové úrovni můžeme k proteinu přidat nějakou afinitní značku (tag), často se může jednat i o celé další proteiny. Lze sem zařadit např. MBP (maltosu vázající protein) nebo dvojici biotin-avidin (nejsilnější známá nekovalentní vazba). Ke svému proteinu můžeme také „přilepit“ enzym glutathion *S*-transferasu, která se bude vázat na imobilizovaný glutathion. Přítomnost těchto proteinových značek může dokonce napomáhat i v procesu sbalování proteinu a zlepšit tak jeho rozpustnost. K tomu se používá např. protein thioredoxin.

Často využívaná je také tzv. histidinová kotva (**His-tag**) – sekvence po sobě jdoucích (nejčastěji 6) histidinů připojených na N- nebo C- konec proteinu. V tomto případě se jedná o **metalochelatační chromatografii**. Jako sorbent zde můžeme použít např. Ni-NTA, což je nikelnatý kation interagující s nitrilotrioctovou kyselinou. Histidinová kotva funguje jako chelátor a ke kationtu se poměrně silně naváže. Po odstranění nezachycených proteinů lze navázaný protein eluovat zavedením pufru s jiným pH nebo s přísadkou imidazolu. Histidin nese v postranním řetězci imidazol, přísadka imidazolu do pufru tedy opět povede ke kompetici a uvolnění proteinu.



Obr. 3: Struktura histidinu a imidazolu

Přidání afinitní značky může mít ovšem i negativní dopad na funkci, sbalení a celkovou strukturu proteinu. V některých případech lze značku z proteinu odštěpit a to po purifikaci nebo častěji během ní.

Literatura

- [1] Antibiotics for cell culture [online]. [vid. 30. prosinec 2015]. Dostupné z: <http://www.thelabrat.com/protocols/antibiotics.shtml>
- [2] VOET, Donald. Biochemistry. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2011. ISBN 9780470570951.