



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**SROVNÁNÍ BIOTECHNOLOGICKÝCH POSTUPŮ
PŘÍPRAVY ČISTÝCH PROTEINŮ**

COMPARISON OF BIOTECHNOLOGICAL PROCEDURES FOR PURE PROTEINS PREPARATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Patrik Bušanski

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1457/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Patrik Bušanski**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Srovnání biotechnologických postupů přípravy čistých proteinů

Zadání bakalářské práce:

Literární rešerše, izolace plasmidové DNA a izolace a purifikace proteinů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Patrik Bušanski
student(ka)

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Produkcia rekombinantných proteínov je biotechnologický proces, počas ktorého vznikajú proteíny v cudzorodom organizme manipuláciou genetickej informácie. Gén, ktorý kóduje žiadanú bielkovinu sa vyizoluje, vloží sa do expresného vektoru za vzniku rekombinantného plazmidu. Pomocou fyzikálnych alebo chemických metód sa následne plazmid transformuje do vhodného hostiteľa, kde sa realizuje genetická informácia za vzniku rekombinantného proteínu.

Teoretická časť práce zahŕňa charakteristiku proteínov a ich vlastnosti, popis prípravy rekombinantného proteínu a porovnáva jednotlivé expresné systémy. Pre spracovanie experimentálnej časti boli vybraté tri izoformy proteínu p53, ktoré boli počas práce syntetizované v mikroorganizme *E.coli*. Transformovaný rekombinantný plazmid obsahoval dve značky na purifikáciu, HIS-tag a GST-tag, vďaka čomu bolo možné porovnať účinnosť izolácie týchto dvoch metód. Bolo zistené, že u všetkých troch izoformiem boli získané vyššie koncentrácie pri purifikácii s HIS-tagom ako u GST-tag. Proteíny p53 majú veľkosť okolo 50 kDa, čo bolo potvrdené gélovou elektroforézou v polyakrylamidovom géle s dodecylsulfátom sodným.

Abstract

The production of recombinant proteins is a biotechnological process during which proteins are produced in foreign organisms by gen manipulation. To form a recombinant plasmid the gene encoding the desired protein is isolated and inserted into an expression vector. The plasmid is then transformed using physical or chemical method into a suitable host, where the recombinant gene is translated into amino acid sequence in the newly synthesized protein.

The theoretical part of this bachelor thesis includes characteristics of proteins, methods of recombinant protein preparation and compares individual expression systems. Three isoforms of the p53 protein, which were synthesized in the *E. coli* microorganism, were selected for processing the experimental part. The transformed recombinant plasmid contained two tags for purification, HIS-tag and GST-tag, making it possible to compare the efficacy of the two purification methods. HIS-tag purification was found to work for all three isoforms better, with concentrations of recombinant proteins were several times higher than those of the GST-tag. The p53 proteins are about 50 kDa long, what was confirmed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

Kľúčové slová

rekombinantné proteíny, expresné systémy, izolácia a purifikácia proteínov

Keywords

recombinant proteins, expression systems, isolation and purification of proteins

BUŠANSKI, P. *Srovnání biotechnologických postupů přípravy čistých proteinů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 41 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa rád poďakoval svojmu vedúcemu práce, doc. Mgr. Václavovi Brázdovi, Ph.D., za odborné vedenie, ochotu, cenné rady a čas, ktorý mi venoval pri vypracovaní tejto práce. Tiež by som sa chcel poďakovať Ing. Otílii Porubiakovej a Bc. Monike Wikarskej za veľkú pomoc a ochotu pri spracovaní bakalárskej práce.

OBSAH

Obsah.....	5
1 Úvod	6
2 Teoretická časť	7
2.1 Proteíny	7
2.1.1 Aminokyseliny.....	7
2.1.2 Štruktúra a vlastnosti bielkovín	7
2.1.3 Rekombinantné proteíny.....	9
2.2 Postup prípravy rekombinantných proteínov	10
2.2.1 Purifikácia rekombinantných proteínov.....	11
2.2.2 HIS-tag kotva.....	11
2.2.3 GST-tag kotva.....	12
2.2.4 Detekcia a analýza rekombinantných proteínov	13
2.3 Expresné systémy	14
2.3.1 Expresia v <i>Escherichia coli</i>	14
2.3.2 Expresia v <i>Bacillus subtilis</i>	15
2.3.3 Expresia v kvasinkách	15
2.3.4 Expresia v rastlinách.....	16
2.3.5 Expresia v živočíchoch.....	17
3 Experimentálna časť	19
3.1 Cieľ práce.....	19
3.2 Materiály a prístroje.....	20
3.2.1 Chemikálie.....	20
3.2.2 Ostatné materiály	20
3.2.3 Laboratórne prístroje	21
3.3 Metódy	22
3.3.1 Transformácia.....	22
3.3.2 Indukcia proteínov	23
3.3.3 Izolácia rekombinantných proteínov	24
3.3.4 Stanovovanie rekombinantných proteínov	25
4 Výsledky a diskusia	28
4.1 Transformácia	28
4.2 Indukcia proteínov	30
4.3 Izolácia rekombinantných proteínov.....	31
4.4 Stanovenie rekombinantných proteínov.....	32
4.4.1 Spektrofotometrické stanovenie	32
4.4.2 Stanovenie pomocou SDS-PAGE.....	33
5 Záver.....	37
6 Zoznam použitej literatúry.....	38
7 Zoznam použitých skratiek a symbolov	41

1 ÚVOD

Proteíny sú makromolekulárne organické látky, ktoré sa skladajú z L- α -aminokyselín spojených peptidovou väzbou. Každý proteín obsahuje špecifické poradie aminokyselín a ich funkcia závisí od štruktúry. Proces syntézy bielkovín sa nazýva proteosyntéza, ktorá sa skladá z dvoch krokov. Transkripcia je prepis genetického kódu z DNA do m-RNA, ktorá je následne prekladaná do poradia aminokyselín v polypeptidovom reťazci.

Rekombinantné proteíny sú umelo vytvorené bielkoviny, ktoré vznikli genetickou manipuláciou genetického kódu jedinca. K príprave rekombinantnej DNA sa používajú transkripčné endonukleázy, ktoré rozštepujú DNA v požadovaných úsekoch, a umožnia tak vloženie sekvencie cudzorodej DNA, ktorá žiaduci proteín kóduje. Takto vytvorená DNA sa po vložení do vhodného organizmu, ktorá disponuje s potrebným proteosyntetickým aparátom, môže realizovať. Syntetizovaná bielkovina je v týchto organizmoch produkovaná vo veľkom množstve (je nadexprimovaná), tým pádom sa ľahšie purifikuje a má veľké uplatnenie v medicíne, farmaceutickom alebo potravinárskom priemysle.

Organizmy používané k expresii rekombinantných proteínov, by mali byť jednoducho kultivovateľné a mali by mať dobrú výťažnosť vzhľadom na produkované proteíny. Neexistuje však univerzálny expresný systém pre všetky proteíny, dokonca aj v rámci jedného expresného systému existuje niekoľko variácií a optimalizácií postupu expresie rekombinantného proteínu pre dosiahnutie požadovaného výťažku.

Kvalita pripraveného rekombinantného proteínu musí byť vysoká, bez ohľadu na konečné využitie produktu. Purifikácia a charakterizácia rekombinantných proteínov môže byť zložitá, drahá a časovo náročná. Pre zvýšenie efektívnosti purifikácie sa používajú rôzne značenia – kotvy, ktoré mnohonásobne zvyšujú výťažnosť prípravy a kvalitu čistých proteínov.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

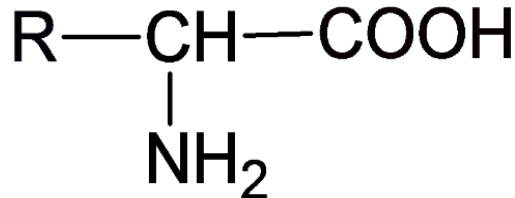
2.1 Proteíny

Proteíny sú makromolekulárne látky, tvorené špecifickou kombináciou 20, u niektorých druhoch až 22 α -aminokyselín zložených do polypeptidového reťazca. Trojrozmerná štruktúra a biologické vlastnosti jednoduchých proteínov sú dané druhom aminokyselín a ich poradím. Proteíny sú najdôležitejšie biomolekuly v živých systémoch, nakoľko majú štruktúrne, hormonálne a katalytické funkcie, ktoré sú pre život nevyhnutné. Sekvencia aminokyselín v proteíne je definovaná sekvenciou génu, ktorý je kódovaný v genetickom kóde. Tieto aminokyseliny sú určujúce aj pre štruktúru a funkciu komplexných proteínov, ktoré okrem nich ešte obsahujú ďalšie nebielkovinové zložky, ako napr. hém, lipidy, sacharidy, nukleové kyseliny a iné. Krátko po syntéze alebo dokonca počas syntézy sú ešte nefunkčné proteíny chemicky modifikované postranslačnou modifikáciou, ktorá mení fyzikálne a chemické vlastnosti, skladanie, stabilitu, aktivitu a taktiež funkciu bielkovín [1].

Z buniek sa dajú purifikovať pomocou rôznych techník, ako je centrifugácia, zrážanie, elektroforéza a chromatografia. Pre študovanie ich štruktúry sa používa nukleárna magnetická rezonancia, hmotnostná spektrometria, alebo röntgenová kryštalografia [2].

2.1.1 Aminokyseliny

V prírode sa nachádza až niekoľko stoviek aminokyselín, avšak len 20 z nich je proteínogénnych. V niektorých organizmoch sa tento počet môže mierne meniť zaradením selenocysteínu alebo pyrolyzínu do polypeptidových reťazcov. Hovoríme im kódované aminokyseliny. Ostatné sa vyskytujú ako medziprodukty metabolizmu a niektoré slúžia ako stavebný materiál pre biosyntézu rôznych dusíkatých zlúčenín (hém, purínové a pyridínové deriváty,...). Obecne sa aminokyseliny skladajú z karboxylovej a aminovej skupiny viazané na rovnaký α -atóm uhlíku (Obrázok 1).



Obrázok 1: Základný skelet aminokyselín [3].

Substituent $-R$ sa označuje ako postranný reťazec aminokyseliny a rozhoduje o jej individuálnom charaktere. Aminokyseliny sa radia medzi amfolyty, čo znamená, že v závislosti na pH sa menia ich acidobázické vlastnosti. Pri určitom pH majú výsledný náboj nulový a nepohybujú sa v elektrickom poli, v takom prípade ide o izoelektrický bod pI. Tieto vlastnosti sú nevyhnutné pri identifikácii a separácii aminokyselín a pri určovaní kovalentnej štruktúry peptidov a bielkovín [4].

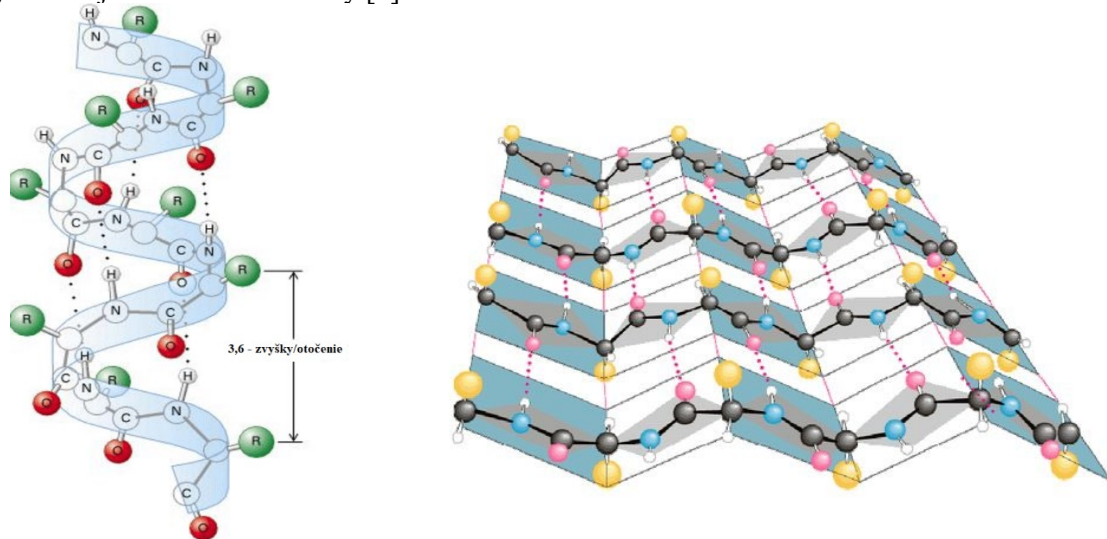
2.1.2 Štruktúra a vlastnosti bielkovín

Sekvencie aminokyselín jednotlivých bielkovín sú v organizmoch kódované génmi, pričom jeden gén môže kódovať viacero proteínov. Reťazec bielkoviny je syntetizovaný procesom tzv. translácie, po ktorej nasleduje zbalenie proteínu (tzv. folding) do fyziologicky funkčnej trojdimenzionálnej štruktúry. Táto štruktúra je udržiavaná v dôsledku interakcií jednotlivých častí proteínu. Najväčší vplyv na vlastnosti proteínu má práve jeho priestorová štruktúra, ktorej všeobecne rozpoznávame štyri úrovne [5].

Primárna štruktúra je charakterizovaná poradím aminokyselín v polypeptidovom reťazci a zahrňuje prípadné disulfidové väzby. Kóduje ju špecifický gén a určuje základné vlastnosti daného proteínu.

Zmena v sekvencií DNA môže viesť k zámene aminokyselín, čo ovplyvní celkovú štruktúru a funkciu proteínu [5].

Sekundárna štruktúra predstavuje lokálne usporiadanie polypeptidového reťazca do pravidelných útvarov, ktoré sa tvoria v dôsledku interakcií medzi atómami bielkovinovej kostry. Všeobecne rozoznávame tri základné typy útvarov: pravidelné (periodicky usporiadané), ohybové a nepravidelné. Jedným z najrozšírenejších typov pravidelných sekundárnych štruktúr je alfa-skrutkovica (α -helix) (Obrázok 2), ktorá obsahuje vodíkové mostíky medzi aminokyselinou a karbonylovou skupinou po každej štvrti aminokyseliny. Ďalším typom je β -forma (β -skladaný list), kde je niekoľko aminokyselinových reťazcov vzájomne rovnobežne spojených s vodíkovou väzbou (Obrázok 2). Sekundárne štruktúry sú vo všeobecnosti stabilizované rôznymi hydrofóbnymi interakciami, z ktorých sú najvýznamnejšie vodíkové mostíky [7].



Obrázok 2: Sekundárne štruktúrne jednotky alfa-helix (vľavo) a beta-skladaný list(vpravo)[8].

Dôležitými a veľmi bežnými štruktúrnymi prvkami sú ohybové štruktúry, ktoré umožňujú priblíženie a interakciu aj vzdialených častí reťazca, čím vytvárajú základ pre terciárnu štruktúru. Terciárna štruktúra zahŕňa omnoho dlhší úsek aminokyselín ako sekundárna štruktúra a udáva celkovú konformáciu polypeptidového reťazca. Terciárnu štruktúru stabilizujú hlavne hydrofóbné a elektrostatické interakcie jednotlivých postranných reťazcov a často i disulfidické väzby. Podľa terciárnej štruktúry sa proteíny rozdeľujú na fibrilárne a globulárne [1, 5].

Mnohé proteíny sú tvorené iba jedným polypeptidovým reťazcom a majú len tri úrovne štruktúry. Niektoré proteíny sú však tvorené viacerými polypeptidovými reťazcami, tiež známymi ako podjednotky. Keď sa tieto podjednotky spoja, dávajú proteínu jeho kvartérnu štruktúru. Sily, ktoré stabilizujú tieto komplexy, sú vodíkové väzby a elektrostatické väzby medzi R-skupinami vyskytujúcich sa na povrchu susedných podjednotiek [5].

V prípade ak sa rozloží sekundárna, terciárna a kvartérna štruktúra proteínov hovoríme o procese denaturácie. Môže byť vyvolaná fyzikálnymi (teplota, pH,...) alebo chemickými vplyvmi (organické zlúčeniny, soli ťažkých kovov,...). Denaturácia môže byť reverzibilná, keď po pôsobení denaturačného faktoru bielkovina obnovuje svoju pôvodnú štruktúru, hovoríme tomu renaturácia. V prípade, keď po pôsobení denaturačného faktoru sa štruktúra už neobnoví, ide o ireverzibilnú denaturáciu. Pri tomto procese bielkovina stráca aj svoju biologickú aktivitu [3].

O proteínoch môžeme povedať, že majú najrôznorodejšie využitie v tele zo všetkých makromolekulárnych látok, nakoľko sa zúčastňujú všetkých procesov, ktoré sa odohrávajú v organizme na intra aj extracelulárnej úrovni. Jednou z ich hlavných funkcií je urýchľovanie reakcií, na čo slúžia enzýmy. Medzi ďalšie funkcie patrí štruktúrna (stavebná) funkcia – tvoria napríklad na bunkovej úrovni

bunkovú stenu, či cytoskelet, na úrovni celého organizmu napríklad chrupavky, vlasy alebo nechty. Iné bielkoviny majú za úlohu transport iných molekúl, či už v rámci bunky (napr. kinezíny a dyneíny) alebo v rámci celého organizmu (hemoglobín, haptoglobín). Bielkoviny môžu menšie molekuly aj skladovať (ferritín, myoglobín). Ďalšie bielkoviny sú tzv. receptory, čo sú často transmembránové bielkoviny, na ktoré sa viažu ligandy (väčšinou iné bielkoviny alebo hormóny), ktoré vnímajú signály z vonkajšieho prostredia a posielajú ďalej do vnútra buniek [3].

2.1.3 Rekombinantné proteíny

V minulosti bolo hlavným spôsobom získania špecifického proteínu jeho izolovanie z prírodného zdroja, ktorý je vo všeobecnosti neúčinný a časovo náročný. V 70. rokoch 20. storočia sa vyvinula nová metóda molekulárnej biológie – molekulárne klonovanie. Pomocou nej sa pripravujú a replikujú tzv. rekombinantné DNA, čo slúži ako templát pre výrobu čistých proteínov. Rekombinantná DNA sa skladá z dvoch alebo viacerých génových úsekov pochádzajúcich z rôznych zdrojov a má schopnosť replikácie v hostiteľskom organizme alebo integrácie do jeho genómu. Pre prípravu rekombinantného proteínu musí byť gén izolovaný a klonovaný do expresného vektoru, ktorý sa vloží do vhodného hostiteľa. Proteosyntetickým aparátom sa gén následne exprimuje a získaná bielkovina sa izoluje a purifikuje.

Produkcia proteínov rekombinantnými technikami je výhodná z viacerých dôvodov. Umožňuje produkciu vybraného alebo prakticky ľubovoľného úseku proteínu vo vysokých koncentráciách a samotná purifikácia je tiež jednoduchá. Na druhej strane mnoho faktorov ovplyvňuje expresiu rekombinantných génov. Ak je produkcia rekombinantného proteínu nadexprimovaná, môže sa agregovať do inklúzných telies [9].

2.1.3.1 Využitie rekombinantných proteínov

V súčasnosti je výroba rekombinantných proteínov jednou z najvýkonnejších techník používaných v prírodných vedách. Rekombinantné proteíny majú široké uplatnenie v medicíne, vo výskume a v biotechnológii. V niektorých prípadoch je potrebná veľká škála proteínov v relatívne malých množstvách na aplikáciu pri testovaní, zatiaľ čo v iných prípadoch je potrebné veľké kvantum pre špecifické terapeutické aplikácie.

Terapeutické proteíny majú veľký potenciál na liečenie rôznych ochorení, ako je diabetes, rakovina, infekčné choroby, hemofília a anémia. Bežné terapeutické proteíny zahŕňajú protilátky, fúzne proteíny, hormóny, interleukíny, enzýmy a antikoagulanty. V dnešnej dobe rapídne rastú požiadavky na rekombinantné proteíny práve pre terapeutické aplikácie. Ľudské proteíny získané prostredníctvom genetického inžinierstva zohrávajú kľúčovú úlohu na trhu liečebných liekov. V súčasnosti sa väčšina rekombinantných terapeutických proteínov produkuje v cicavčích bunkách, pretože cicavčie bunky sú schopné produkovať vysoko kvalitné proteíny podobné tým, ktoré sa vyskytujú prirodzene. Okrem toho sa v bakteriálnych bunkách, napríklad v *Escherichia coli*, generuje veľa schválených rekombinantných terapeutických proteínov vďaka dobre známemu genómu, rýchlemu rastu a produkcii s vysokým výťažkom [10].

Konkrétnym príkladom môže byť proteín p53, ktorá hráva kľúčovú rolu v génovej expresii a ochrane proti rakovine. Proteín p53 má schopnosť sa viazať na špecifické sekvencie DNA a pôsobí tým ako transkripčný faktor. Pomocou regulácie expresie génov tak reguluje bunkový cyklus, opravuje DNA pri mutáciách a navodzuje apoptózu [11]. Keď dôjde k mutácii génu, ktorý tento proteín kóduje, proteín stratí svoju funkciu a môže to viesť k neurodegeneratívnym ochoreniam či rakovine. Obnova funkcie proteínu p53 by mohla byť jedným z kľúčových nástrojov novej protinádorovej liečby [12].

Rekombinantné proteíny majú taktiež obrovské využitie vo výskume, kde pomáhajú objasniť základné princípy života organizmu. Tieto molekuly sa môžu použiť na identifikáciu a lokalizáciu polohy proteínu kódovaného špecifickým genómom a na odhalenie funkcie iných génov v rôznych

bunkových aktivitách, ako je bunková signalizácia, metabolizmus, rast, replikácia a smrť, transkripcia, translácia a modifikácie proteínu. Taktiež sú veľmi užitočným nástrojom pre objasnenia interakcii proteínu s proteínom. Rekombinantné proteíny sa tak často používajú v oblasti molekulárnej biológie, bunkovej biológie, biochémie, štrukturálnych a biofyzikálnych štúdií a mnohých iných oblastiach výskumu [13].

S rekombinantnými proteínmi sa môžeme stretnúť aj v priemysle, potravinárstve, poľnohospodárstve a bioinžinierstve. Napríklad v chovnom priemysle sa do krmiva môžu pridávať umelo vytvorené enzýmy na zvýšenie výživovej hodnoty krmných surovín, podporu zdravia čriev zvierat, zvýšenie výkonnosti zvierat a zlepšenie životného prostredia [14]. Konkrétnym príkladom môžu byť baktérie mliečneho kvasenia (LAB), ktoré sa dlhodobo používajú na výrobu fermentovaných potravín. Nedávno LAB boli geneticky modifikované na expresiu rekombinantných proteínov, ktoré by mali široký rozsah aplikácií, ako napríklad zlepšenie trávenia a výživy človeka či zvierat, na prevenciu infekcií, zlepšenie imunity a liečbu alergií [15].

2.2 Postup prípravy rekombinantných proteínov

S rýchlym vývojom proteomiky sa používanie rekombinantných proteínov značne zvýšilo. Pre ich prípravu je potrebné poznať základné postupy manipulácie. Najpodstatnejším krokom pri príprave rekombinantného proteínu je izolácia jeho kódujúceho génu. U prokaryotických organizmov sa izoluje jadrová DNA, z ktorej musí byť vyštiepený a namnožený cieľový gén pomocou polymerázovej reťazovej reakcie. U eukaryotických organizmov nemôžeme izolovať celkovú DNA, nakoľko štrukturálne gény obsahujú intróny, ktoré sa neprepisujú do mRNA. Práve preto sa u eukaryot izoluje mRNA, ktorá je potom prevedená enzýmom reverzná transkriptáza na DNA. Alternatívnou metódou prípravy DNA je jeho umelá chemická syntéza, čo však je veľmi náročná operácia časovo aj finančne. Vyizolovaná sekvencia sa následne vloží do vhodného klonovacieho vektoru, ktorý je dopredu rozštiepený restriktívnymi endonukleázami. Po rozštiepení vektorovej DNA sa spájajú dopredu vytvorené komplementárne konce ku koncom cudzorodej DNA a renaturujú sa. Pomocou DNA-ligázy sa medzi cudzorodou DNA a vektorovou DNA vytvorí kovalentná väzba a vznikne rekombinantný plazmid. Tento plazmid môže obsahovať doplnkové sekvencie, ktoré môžu kódovať napr. rezistencie voči antibiotikám, s čím sa môže vyselektovať, ďalej môže obsahovať rôzne značky, ktoré napomáhajú purifikácií a iné dôležité sekvencie (Obrázok 5) [9].

Vloženie pripraveného rekombinantného plazmidu do prokaryotického organizmu sa nazýva transformácia a vloženie do eukaryotického organizmu sa nazýva transfekcia. Pre úspešný prestup DNA do cytoplazmy (u prokaryot) a jadra (u eukaryot) sa musí zvýšiť priepustnosť membrány. Na to sa používajú rôzne techniky, ako napríklad elektroporácia, ktorá je založená na dočasnej destabilizácii bunečnej membrány pomocou elektrického pulzu. Táto metóda je síce veľmi rýchla, ale vyžaduje špeciálne a drahé zariadenie. Pomocou elektroporácie je možné preniesť DNA aj do veľkých plazmidov a buniek, kde ostatné techniky zlyhávajú. Častejšie sa však využíva transformácia pomocou tepelného šoku, kde po pridaní CaCl_2 sú bunky vyhľadované a tým za chladu uvedené do stavu kompetencie. Po krátkom tepelnom šoku sú tieto bunky schopné prijať exogénnu DNA. Je pravda, že v porovnaní s predošlou metódou efektívnosť nie je tak vysoká, ale metóda je jednoduchá a kompetentné bunky sa dajú skladovať pri $-70\text{ }^\circ\text{C}$ niekoľko mesiacov. Po integrovaní rekombinantného DNA do hostiteľskej bunky začína jeho expresia, čiže samotná výroba rekombinantného proteínu. V prípade ak vektorová molekula obsahuje aj nejaký kontrolný operón, prídavkom aktivátora promotora môže byť indukovaná syntéza rekombinantného proteínu. Posledným krokom prípravy rekombinantného proteínu je izolácia a purifikácia [16].

2.2.1 Purifikácia rekombinantných proteínov

Pre štúdium funkcie a štruktúry rekombinantných proteínov je základom ich izolácia a purifikácia. Vo všeobecnosti existujú 2 typy základných expresii rekombinantných proteínov a od nich sa odvíja aj izolácia a čistenie. Proteíny, ktoré sú ihneď pri produkcii sekretované do média, sa nazývajú arteficiálne modifikované proteíny. Ich purifikácia je jednoduchá a ekonomicky výhodná. Zložitejší je postup u intracelulárnych proteínoch, kde je potrebné použiť lyzačný krok k rozrušeniu membrány. Medzi najviac využívané purifikačné metódy patria vo všeobecnosti chromatografické techniky, ktoré dokážu separovať proteíny podľa chemickej štruktúry a biologickej funkcie [2].

Podľa požadovaných vlastností produktu je možné vybrať konkrétny typ chromatografie. Kľúčová je vysoká čistota produktu a ekonomickosť produkcie, na čo je najvýhodnejšie využiť metódy afinitnej chromatografie. Je to typ kvapalnej chromatografie, ktorá pre separáciu využíva reverzibilnú interakciu medzi proteínom a ligandom, umiestneným v chromatografickej matrici. Oproti iným chromatografickým technikám používaných pri separácii proteínov, je interakcia medzi proteínom a stacionárnou fázou oveľa pevnejšia a špecifickejšia. Tým pádom máme možnosť získať vysoko koncentrovaný a čistý výťažok i z hrubého lyzátu jedným krokom [17].

Avšak nie všetky proteíny majú schopnosť viazať sa na stacionárne fázy. V tomto prípade sa používajú afinitné „tagy“, ktoré sú súčasťou rekombinantného plazmidu a pri expresii pripojujú na N alebo C koniec polypeptidu rôzne aminokyseliny [18]. Takto získané bielkoviny sa nazývajú fúzne proteíny a uľahčujú čistenie a detekciu rekombinantných proteínov. Výber správnej kotvy záleží hlavne na typu konkrétneho proteínu. Tieto afinitné „tag“-systémy však zdieľajú podobné vlastnosti:

- jednofázová adsorpčná purifikácia,
- minimálny vplyv na terciárnu štruktúru a biologickú aktivitu,
- jednoduché a špecifické odstránenie pre produkciu natívneho proteínu,
- jednoduché a presné stanovenie rekombinantného proteínu,
- použiteľnosť na množstvo rôznych proteínov [19].

2.2.2 HIS-tag kotva

Pre purifikáciu rekombinantných proteínov najčastejšie využívanou afinitnou značkou je poly-histidínová sekvencia aminokyselín. Vo všeobecnosti proteíny majú viac-menej schopnosť koordinovať kovové ióny na svojom povrchu, vďaka čomu ich môžeme oddeliť pomocou afinitnej chromatografie. Štúdie ukázali, že medzi aminokyselinami tvoriacimi proteíny je histidín silne zapojený do koordinačnej väzby s kovovými iónmi, preto ak sa na koniec proteínov pridá niekoľko molekúl histidínu, ich afinita ku kovovým iónom sa značne zvýši a samotné čistenie sa dá ľahšie uskutočniť [20].

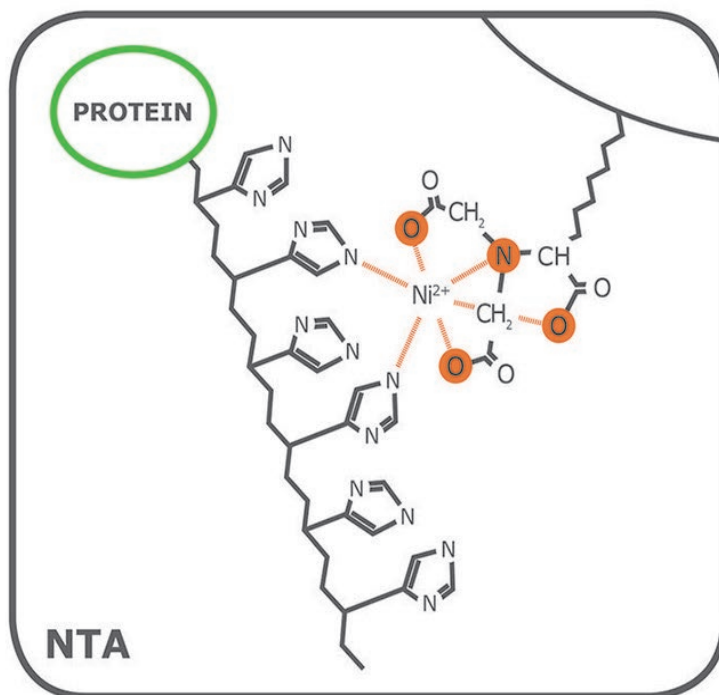
Základom metódy je naviazanie 6 až 10 molekúl histidínu na C alebo N koniec rekombinantného proteínu. Takto získané proteíny môžu byť nasledovne zachytené na géle alebo živici obsahujúcej dvojmocné ióny kobaltu alebo niklu. Táto vlastnosť sa stala základom metódy afinitnej chromatografie na imobilizovaných iónoch kovu (IMAC), ktorá využíva imobilizáciu kovových iónov na agarózovej matrici pomocou chelatačnej väzby s kyselinou imidodioctovou (IDA) alebo kyselinou nitrilotrioctovou (NTA) (Obrázok 3) [21].

Najviac využívanou matricou je Ni-NTA, kde purifikáciu môžeme prevádzať v natívnych aj denaturovaných podmienkach s výťažkom desiatok mg proteínu na 1 ml matrice. Keď sa proteín, ktorý má HIS kotvu, uvedie do kontaktu s nosičom, na ktorom imobilizuje kovový ión, ako je nikel, za podmienok pH 8 alebo vyšších, histidínový zvyšok chelátuje kovový ión a viaže sa na nosič [22].

Pri používaní jednoduchej afinitnej chromatografie pomocou HIS-tagu na Ni-NTA, však musíme zohľadniť aj iné proteíny s afinitou ku kovu a proteíny, ktoré obsahujú prirodzene sa vyskytujúce histidínové repetície. Tieto kontaminanty sú prevažne stresové proteíny produkčných organizmov, práve preto ich množstvo sa dá výrazne ovplyvniť podmienkami kultivácie. Ďalšou možnosťou na zníženie

kontaminácie je pomocou zvýšenia iónovej sily pufru alebo prídanie premývacieho pufru, ktorý vytesní slabšie naviazané kontaminujúce proteíny [23].

Posledným krokom pri purifikácii pomocou HIS-tagu je odštiepenie histidínových zvyškov. Endopeptidázy sa používajú pri označení C-konca tagom a exopeptidázy so stop aminokyselinou u N-konca. Čistý proteín sa napokon oddelí od enzýmov a odštiepených HIS-tagov pomocou kolóny s Ni-NTA. Takto získaný proteín má vysokú čistotu, ktorá sa následne môže stanoviť SDS-PAGE elektroforézou [18].



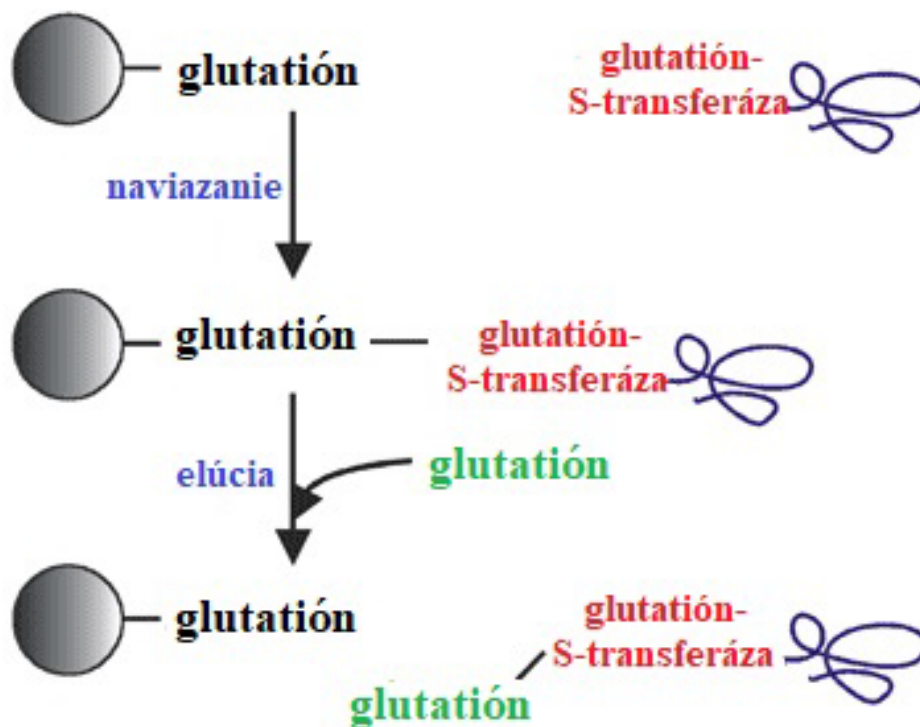
Obrázok 3: Interakcia matrice s HIS-tag proteínom pri purifikácii [21].

2.2.3 GST-tag kotva

Glutatión S-transferázy sú enzýmy, ktoré dokážu viazať glutatión a prenášať ho na substrát. Jeho hlavná úloha je v biotransformáciách xenobiotík, kde naviazaním glutatiónu sa výrazne zvyšuje rozpustnosť lipofilného substrátu a tým pádom sa dané xenobiotikum ľahšie vyplaví z tela. Glutatión sa na GST naviaže prostredníctvom vodíkových mostíkov a vytvára veľmi silnú väzbu s disociačnou konštantou $2 - 6 \times 10^{-7}$, ktorá sa využíva v afinitnej chromatografii [24].

Prvým krokom je pripojenie DNA kódujúcej GST ku kódujúcemu génu proteínu, ktorú chceme izolovať. Vytvorený GST-proteín sa následne oddelí na agarózovom géle s glutatiónom naviazaným prostredníctvom „linkru“ za atóm síry. Po vymytí ostatných látok z gélu sa uvoľňuje žiadaný proteín vytesnením pomocou roztoku glutatiónu (Obrázok 4) alebo odštiepením cieľového proteínu proteázou priamo na kolóne [25].

Nevýhodou GST systému je veľkosť tagu, ktorá s vysokou pravdepodobnosťou ovplyvní funkciu cieľového proteínu a predstavuje metabolickú záťaž pre exprimujúcu bunku. GST-kotva taktiež nie je vhodná na purifikáciu oligomerných proteínov, nakoľko vytvára homodyméry. Ďalšou nevýhodou je náchylnosť agregácie, keďže GST obsahuje cysteínové zvyšky, ktoré sa ľahko oxidujú. GST značené proteíny sa často používajú na štúdium interakcií proteínu s proteínom, kde sa opäť využíva vlastnosť glutatiónovej afinity v postupe zvanom GST „pull-down test“. Táto technika umožňuje určovať, ktoré proteíny navzájom interagujú, čím sa identifikujú relevantné biologické cesty [26].



Obrázok 4: Princíp GST-tag purifikácie [27].

2.2.4 Detekcia a analýza rekombinantných proteínov

Po vyzolovaní a purifikovaní rekombinantného proteínu je potrebné zistiť kvalitu a kvantitu proteínu. Najjednoduchšou metódou pre detekciu proteínov sú kolorimetrické metódy, nakoľko behom niekoľkých minút je možné zistiť, či v roztoku sú alebo nie sú prítomné bielkoviny. Jedným z najpoužívanějších metód je stanovenie koncentrácie proteínov podľa Bradforda, ktoré je založené na interakcii farbiva (Coomassie Brilliant Blue) s bázickými a aromatickými aminokyselinami v proteínoch. Ďalšou možnosťou je spektrofotometrická detekcia založená na absorbancii UV žiarenia aromatickými aminokyselinami pri 280 nm. Táto metóda nám umožňuje zistiť približnú koncentráciu bielkovín v roztoku behom niekoľkých sekúnd, avšak je oveľa náchylnejšia na interferenciu kontaminujúcimi látkami vo vzorku. Ďalšou alternatívou pre určenie koncentrácie proteínov je fluorescenčná metóda založená na meraní aromatických aminokyselín [28].

Pre analýzu kvality vyzolovaných proteínov sa najčastejšie využívajú elektroforetické metódy, pretože proteíny sú druhovo špecifické a elektroforetické separácie sa ľahko vykonávajú. Elektroforéza patrí medzi elektromigračné techniky, ktorá pre separáciu častíc využíva rozdielnu pohyblivosť nabitých častíc v elektrickom poli. Rýchlosť pohybu častíc je závislá na veľkosti náboja, tvare a veľkosti molekúl, na povahe nosiču, elektrolytu, či pH [29, 30].

Typickým príkladom je elektroforéza v polyakrylamidovom géle v prítomnosti dodecylsulfátu sodného, ktorá sa k analytickej separácii proteínov v poslednom období najviac používa. Táto metóda je za istých okolností vhodná aj na purifikáciu. Jej nevýhodou však je nutnosť denaturácie proteínov. Na to slúži dodecylsulfát sodný (SDS), čo je povrchovo aktívna látka, ktorá nesie negatívny náboj na svojom povrchu, čím môže rozpúšťať hydrofóbne molekuly a narušiť terciárnu štruktúru proteínov. Okrem toho SDS sa úmerne viaže na polypeptidový reťazec podľa molekulovej hmotnosti a pridáva mu negatívny náboj, čím umožňuje jeho separáciu. K odstráneniu intramolekulárnych a intermolekulárnych disulfidických mostíkov sa používa β -merkaptoetanol [30].

Pri SDS-PAGE sa ako nosič používa polyakrylamidový gél, ktorý vzniká polymerizáciou akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS), ktorá je zahájená peroxodisíranom amónnym, a ako katalyzátor sa pridáva TEMED (N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin). Pre zvýšenie presnosti analýzy sa používajú gély o rôznom zložení. Horný úsek je tzv. „stacking“ gél o nízkom pH a nízkej koncentrácii akrylamidu, ktorý zjednodušuje vstup veľkých molekúl do gélu a tým pádom zabraňuje upchatiu pórov. Spodná separačná vrstva gélu má vyššiu koncentráciu a pH okolo 8,8, kde prebieha vlastná separácia. Pre vytvorenie elektrického poľa a prúdového napätia od katódy k anóde cez gél sa používa elektródový pufer [29].

2.3 Expresné systémy

Voľba expresného systému je kľúčovým krokom pre úspešnú produkciu rekombinantného proteínu, nakoľko neexistuje univerzálny expresný systém pre všetky proteíny. Dôležitým faktorom pri voľbe expresného systému je výťažnosť a zachovanie biologickej aktivity študovaného rekombinantného proteínu. Na druhú stranu treba brať do úvahy aj ekonomickú a časovú náročnosť. Porovnanie základných vlastností najpoužívanejších expresných systémov je zhrnuté v tabuľke (Tabuľka 1). Veľmi účinná je produkcia rekombinantných proteínov v bakteriálnych bunkách, nakoľko sú schopné priamej extracelulárnej expresií, sekrecii proteínu do periplasmatického priestoru. Pri expresii eukaryotického génu sa však gén musí upraviť na prekladateľnú podobu (gén sa zbavuje intrónov). Existuje tiež rada eukaryotických expresných systémov, v ktorých dochádza k zostrihu RNA a rôznym postranslačným modifikáciám produktu, ktoré bakteriálne bunky nemôžu zaistiť [28].

2.3.1 Expresia v *Escherichia coli*

Kultivácie v bakteriálnych bunkách sú vo všeobecnosti veľmi výhodné, nakoľko ich kultivácia je nenáročná, majú krátky generačný čas a jednoducho sa vytvárajú klony nesúce expresný vektor. Najviac využívanou baktériou je *Escherichia coli*, fakultatívne anaerobná, gramnegatívna, bičíkatá, tyčinkovitá baktéria, ktorá má kompletne preštudovanú genetickú informáciu [31]. Má schopnosť rýchleho rastu aj pri nepriaznivých podmienkach a je nenáročná na živiny. Jej ďalšou výhodou je veľké množstvo použiteľných plazmidov, ktoré obsahujú informácie pre detekciu a purifikáciu proteínu a výber expresných a klonovacích línií [32].

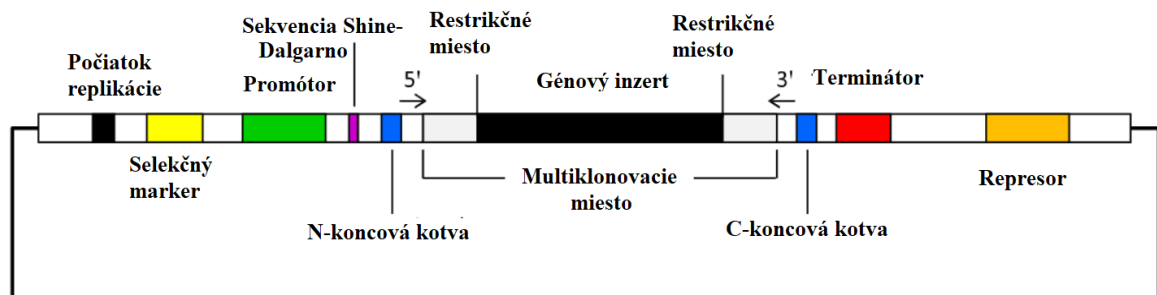
Teoreticky, produkcia rekombinantných proteínov v *E.coli* je relatívne priamočiara, počínajúc identifikáciou cieľového génu a jeho naklonovaním do vhodného vektora. Ďalším krokom je transformácia konštruktu do vhodného kmeňa hostiteľa, kde sa zosilnenou expresiou indukuje rekombinantný proteín, ktorý sa na koniec purifikuje a charakterizuje (sekvenácia, čistota, štruktúrna integrita, stabilita, aktivita). V praxi však máme mnoho prekážok, ktoré sa musia zdolať. Tie môžu zahŕňať slabý rast hostiteľského kmeňa, nestabilitu alebo toxicitu proteínov, tvorbu agregátov a inkluzných telies. Štúdie ukázali, že až tri štvrtiny exprimovaného proteínu v *E.coli* je vo forme inkluzných telies, nakoľko kapacita bakteriálnej bunky pre správne skladanie rekombinantného proteínu je nižšia ako samotný výťažok. Z inkluzných telies sa však proteín musí vyizolovať denaturačnými metódami a následne musí byť renaturovaný. Takto získaný proteín má vysokú čistotu, avšak renaturácia je zložitý dej a nie vždy úplne úspešný [16, 33].

Pre úspešnosť expresie v *Escherichia coli* sa musia zohľadniť niektoré faktory. Prvým z nich je voľba expresného vektora. U *E.coli* sa najčastejšie používajú plazmidové vektory, ktoré obsahujú sekvenčné prvky, ako napríklad: počiatok replikácie, promótor, multiklonovacie miesto, afinitná značka, selekčné markery či terminátor (Obrázok 5). Plazmidy sa replikujú v relaxovanej forme a je ich v bunke okolo 15-60 (napr. pMB1/ColE1). V prípade, že novo vytvorený gén je pre bunku toxický alebo pri kontinuálnych kultiváciách s vysokou hustotou, môže dôjsť k strate plazmidov. Pre zníženie hustoty kolón sa používajú kultivačné média s obsahom antibiotík, ktoré slúžia ako selekčný marker

transformácie a zabíjajú bunky bez plazmidov. Alternatívou na nestabilitu plazmidov je priama inzercia heterologického génu do chromozómu *E.coli* pomocou bakteriofágov [34]. Expresia rekombinantného proteínu môže byť zvýšená takisto optimalizáciou rastu *E.coli*. Medzi hlavné parametre, ktoré môžu byť zmenené patrí:

- Zloženie rastového média – komplexné alebo definované médium, rôzne zdroje uhlíka.
- Teplota kultivácie – to ovplyvňuje rýchlosť rastu buniek a má dôsledky na toxicitu, stabilitu a agregáciu rekombinantných proteínov, najmä po indukcii.
- Hustota buniek pri indukcii – najpriaznivejšia je indukcia pri polovici exponenciálnej fázy rastovej krivky
- Doba indukcie – ovplyvňuje to hladinu expresie rekombinantného proteínu, toxicitu, stabilitu a agregáciu. Zber sa zvyčajne vykonáva pred dosiahnutím stacionárnej fázy. Vysoká expresia hydrofóbných a membránových proteínov môže byť smrteľná pre bunky a môže viesť k agregácii proteínov a tvorbe inklúzných teliesok, čo ich robí nefunkčnými [35].

V súčasnej dobe je k dispozícii mnoho kmeňov odvodených od *E.coli* (*K12*, *B*, *BL21*), ktoré dodávajú komerčný výrobcovia. Existujú aj špeciálne kmene, ktoré sú určené k expresii eukaryotických či toxických proteínov (kmeň Rosetta-gami) [36]. Pre klonovanie sú najvhodnejšie kmene zaisťujúce stabilitu rekombinantnej DNA, to sú kmene, ktoré sú zbavené schopnosti syntézy restričných endonukleáz, schopných degradovať cudzorodé DNA. Je tiež výhodné použiť kmeň s porušenou schopnosťou homológnej rekombinácie (mutant *recA*), čo znižuje riziko porušenia integrity klonovanej DNA. Výber vhodného kmeňa tiež závisí na účele použitia, či sa DNA bude amplifikovať alebo či chceme vytvoriť proteín a tým pádom, gén sa prekladá. Pri takých kmeňoch je vhodné, aby bola znížená úroveň syntézy proteáz pre zachovanie celistvosti a aktivity proteínov [28].



Obrázok 5: Všeobecné znaky plazmidového vektora na amplifikovanú expresiu rekombinantných proteínov s použitím *E. coli* [33]

2.3.2 Expresia v *Bacillus subtilis*

Alternatívou k *E.coli* je baktéria žijúca v pôdach *Bacillus subtilis*, ktorá reaguje na zmeny okolia rôznymi stratégiami na prežitie. *B.subtilis* v porovnaní s *E.coli* má aj mnoho výhod, ako napríklad znížená produkcia lipopolysacharidov (vedľajší produkt u *E.coli*, spôsobujúci degeneratívne poruchy u človeka a zvierat), uľahčená transformácia pomocou bakteriofágov a plazmidov, či priama sekrécia proteínov do média. Okrem toho *B.subtilis* neprodukuje žiadne toxíny, proteíny ním tvorené možno spracovať jednoducho, bez rozrušenia buniek, čo má za následok relatívne veľký a cenovo dostupný výťažok. Hlavnou nevýhodou však je jeho nadprodukcia proteáz, ktoré veľmi rýchlo degradujú rekombinantné proteíny [37].

2.3.3 Expresia v kvasinkách

Pri expresii eukaryotických proteínov, ktoré sa v prokaryotických bunkách dajú produkovať len problematicky, sa najčastejšie využívajú kvasinky. Sú schopné posttranslačne modifikovať a vylučovať produkt, a pri tom ich kultivácia je nenáročná a dajú sa geneticky manipulovať. Ďalšou výhodou

kvasinkových kmeňov je možnosť ich pestovania v haploidnom aj v diploidnom stave, čo umožňuje ich kríženie vedúce k získaniu hybridov s kombináciou genetickej informácie oboch rodičovských buniek. Sporulácia a analýza haploidných buniek naopak poskytuje nástroj pre štúdium rekombinácií a génových konverzií [38].

Najviac využívanou kvasinkou v biotechnologickom priemysle je *Saccharomyces cerevisiae*, ktorá sa bežne vzhľadom na to, že spĺňa predpisy o hospodárskej účinnosti a biologickej bezpečnosti pre humánne aplikácie, používa pre výrobu farmaceutických produktov ako glukagón, somatotropín, inzulín alebo HBsAg (antigen proti Hepatitíde B). Problémami pri produkcii rekombinantného proteínu v *S. cerevisiae* sú zmenené posttranslačné modifikácie (napr. nadmerná glykozilácia produktov), nízka schopnosť sekrécie proteínov a vysoká produkcia sekundárnych metabolitov. Pre expresiu v *S. cerevisiae* existujú dva hlavné typy vektorov – integrujúci (YIp plazmid) a epizomálny (YE_p plazmid). Epizomálny plazmid má schopnosť v hostiteľskej bunke samostatne sa replikovať bez integrácie do chromozómu, oproti tomu integrujúci sa najprv včlení do chromozómu hostiteľa, až potom sa množí [39].

V dnešnej dobe sa už čoraz viac využíva kvasinka *Pichia pastoris*, ktorá má schopnosť využívať metanol ako zdroj uhlíku. Má lepšie sekrečné vlastnosti ako *S. cerevisiae* a zároveň neglykoziluje cudzorodé proteíny. Jediným problémom pri produkcii niektorých heterológnych proteínov je proteolýza, ktorá sa však dá regulovať pomocou zmeny pH [40].

2.3.4 Expresia v rastlinách

Rastliny sú organizmy, ktoré vďaka autotrofnej výžive dokážu vytvárať organické látky z anorganických látok za pomoci slnečného žiarenia. Pre génové inžinierstvo a proteomiku dávajú možnosť vyrobiť proteín bezpečne, lacno a v takmer neobmedzených množstvách len pomocou jednoduchých živín, vody a slnečného svetla. V roku 1990 bol prvý rekombinantný proteín (ľudský sérový albumín) exprimovaný v listoch tabaku. Od tej doby boli vytvorené stovky čistých proteínov pomocou rastlín [38, 39].

V poslednom období rastlinné systémy sa začali skúmať ako sľubné expresné systémy pre produkciu rekombinantných proteínov aj pre terapeutické účely vzhľadom na ich bezpečnosť (nemnožia cicavčie vírusy a patogény), na nízke náklady (lacné kultivačné médium) a na schopnosť posttranslačných modifikácií (schopnosť produkcie glykoproteínov a iných komplexných proteínov). Okrem týchto schopností, rastlinné expresné systémy majú ešte mnoho výhod, ako napr. jednoduchá genetická modifikácia, vysoká schopnosť proteínovej expresie, nízka produkcia sekundárnych metabolitov, či precízne skladanie proteínov [43].

Aj napriek mnohým vyššie uvedeným výhodám, rastlinné expresné systémy sú ešte stále v pozadí oproti bakteriálnym a živočíšnym. Hlavnou príčinou je vysoká cena „downstream“ procesu. Rekombinantné proteíny sa u rastlín musia purifikovať z celulózy, vlákniiny, či oleja, ktoré rastliny produkujú [41].

Pre zvýšenie efektívnosti produkcie rekombinantných proteínov sa v praxi namiesto celých rastlín používajú aseptické suspenzie rastlinných buniek, tkanív či orgánov. Oproti celorastlinným systémom, suspendované rastlinné bunky môžu rásť v bioreaktore pod kontrolovanými podmienkami, čo zabezpečuje reprodukovateľnosť produkcie a tiež znižuje obavy o migrácií geneticky modifikovaných rastlín. Čo však je dôležitejšie, prevozné náklady sú oveľa nižšie, majú zníženú náchylnosť na kontamináciu endotoxínmi a mykotoxínmi, a pri tom získame kvalitnejší produkt. Rekombinantné proteíny vzniknuté v rastlinných bunkových kultúrach môžu byť sekretované do média alebo môžu byť zachytené vo vnútrobunkových orgánoch ako endoplazmatické retikulum, cytoplazma alebo vakuola. Sekretované produkty sa dajú jednoduchšie purifikovať, nakoľko rastlinná bunka nesekretuje mnoho kontaminujúcich proteínov do kultivačného média. Pri takomto type produkcie sa tým pádom dajú

použiť kontinuálne procesy výroby, ktoré mnohonásobne zvyšujú produktivitu. Problémom môžu byť proteolytické enzýmy v médiu, ktoré sú produkované rastlinnými bunkami počas kultivácie, či pochádzajú z odumretých buniek. Pre zníženie tohto rizika sa preto používajú proteázové inhibitory alebo proteínové stabilizátory (napr. želatína) [40, 41].

Pre expresiu rekombinantných proteínov sa tiež s veľkým úspechom používajú rastlinné semená. Vo všeobecnosti je známe, že semená sú orgánom rastliny s vysokým obsahom bielkovín, nízkym obsahom proteáz a vody. Práve tieto vlastnosti sa dajú využiť pre produkciu čistých proteínov. Okrem toho, semená môžu byť priamym nástrojom pre vnesenie terapeutických proteínov, liekov a antigénov, nakoľko sú konzumovateľné. Samotná kultivácia, skladovanie, transport a práca so semenami je jednoduchá. Najviac používanými semenami sú obilniny, strukoviny a olejové semená [42, 43].

2.3.5 Expressia v živočíchoch

Živočíšne expresné systémy dokážu zložiť problémy nižších eukaryotických a prokaryotických systémov. Sú schopné posttranslačne modifikovať proteíny a exprimovať ich v rozpustnej, dokonalo zbalenej forme. Dva najčastejšie používané druhy vyšších eukaryotických hostiteľov sú hmyzie bunky infikované bakulovírusom a niekoľko cicavčích buniek (CHO – vaječné bunky čínskeho škrečka; HEK – bunky ľudskej embryonálnej obličky) [47].

Expresné systémy využívajúce hmyzie bunky sú založené na infekcii hmyzu rekombinantným dvojláknovým DNA vírusom (AcMNPV - *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus). Táto bacmidová DNA sa pripravuje inzerciou cudzorodého génu do plazmidového vektoru, ktorý je potom začlenený do genómu bakulovírusu homológou rekombináciou [48]. Hlavnými výhodami tohto systému sú vysoká výťažnosť, podobnosť konformácie produktu natívnemu proteínu, schopnosť posttranslačnej modifikácie a žiadna kontaminácia endotoxínmi. Bakulovírusom infikované hmyzie bunky však majú aj nedostatky. Keďže infikované hostiteľské bunky nakoniec zomierajú, cudzorodý gén nemôže byť exprimovaný kontinuálne. Po každej úspešnej syntéze je potrebné znovu infikovať nové hmyzie bunky, tým pádom kontinuálny systém fermentácie je skoro nemožný. Okrem toho sa hmyzie bunky a cicavčie bunky líšia glykolizačnými metódami, takže biologická aktivita a imunogenita produktov expresie hmyzu je odlišná od vlastností prírodného produktu [46, 47]. Tento expresný systém sa používa hlavne na prípravu rekombinantných glykoproteínov a proteínov pochádzajúcich z vyšších eukaryot. Pomocou bakulovírusom infikovaného hmyzu sa tak vytvorilo niekoľko tisíc vysoko-hodnotných cudzích proteínov, ktoré sa dajú použiť pri výrobe vakcín a pre génové terapie [51].

Pre produkciu ľudských a cicavčích proteínov sú najvhodnejšie cicavčie expresné systémy. V porovnaní s vyššie diskutovanými systémami majú niekoľko výhod v tom, že sú schopné priamo sekretovať a glykolyzovať proteíny. Tento systém sa môže použiť na prechodnú (transientnú) alebo stabilnú expresiu v závislosti od účelu exprimovaného produktu. Prechodná je časovo a realizačne menej náročná, ale výťažok je obmedzený jednorazovou expresiou. Naopak, pri stabilnej expresii dochádza k včleneniu génu do genómu produkčnej bunky a máme možnosť vybrať najlepšie exprimujúce klony, čo je však časovo náročnejšie. Pre prechodnú expresiu sa najbežnejšie používajú COS bunky (CV-1 in Origin, and carrying the SV40) a pre stabilnú expresiu CHO bunky (Chinese hamster ovary) [49].

Prekážkou pre výrobu rekombinantných proteínov vo veľkej mierke pomocou cicavčích expresných systémov je relatívne vysoká cena, komplikovaná technológia a potenciálne kontaminácie živočíšnymi vírusmi. Tento systém sa však veľmi často používa na výrobu mnohých heterológnych proteínov, ako sú napríklad vírusové štruktúrne proteíny a bioaktívne peptidy pre špecifickú funkčnú analýzu [37].

Tabuľka 1: Zrovnanie základných vlastností najpoužívanejších expresných systémov [34, 39]

Hostiteľský systém	<i>E. coli</i>	Kvasinky	Rastlinné bunky	Hmyzie bunky	Cicavčie bunky
Rast buniek	Rýchla (30 min)	Rýchla (90 min)	Priemerná (6–12 h)	Pomalá (18–24 h)	Pomalá (24 h)
Cena média	Nízka	Nízka	Nízka	Vysoká	Vysoká
Úroveň expresie	Vysoká	Nízka-vysoká	Nízka	Nízka-vysoká	Nízka-mierna
Skladanie bielkovín	Refolding je prevažne potrebný	Refolding je možno potrebný	Správne skladanie	Správne skladanie	Správne skladanie
Posttranslačné modifikácie	Žiadne	Schopný	Schopný	Schopný	Schopný
Homogenita proteínu	Nízka	Priemerná	Vysoká	Priemerná	Vysoká
Stabilita bunkovej línie	Vysoká	Vysoká	Priemerná	Priemerná	Nízka
Riziko kontaminácie	Endotoxíny	Endotoxíny	Veľmi nízke	Nízke	Vírusy, prióny, onkogénne DNA
Cena produkcie proteínu	Nízka (20-100 €/g)	Nízka (20-100 €/g)	Nízka (50-100 €/g)	Priemerná (50-200 €/g)	Vysoká (1000 - 10000 €/g)

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Cieľ práce

Cieľom experimentálnej časti tejto bakalárskej práce bolo:

- Transformácia rekombinantného plazmidu do vhodného hostiteľa.
- Izolácia rekombinantného proteínu exprimovaného v *E.coli*.
- Porovnanie výťažnosti purifikácie HIS-kotvy a GST-kotvy.
- Analýza purifikovaných proteínov pomocou SDS-PAGE elektroforézy.

3.2 Materiály a přístroje

3.2.1 Chemikálie

- Agar (HIMEDIA)
- AgNO₃ (SERVA)
- Akrylamid (SERVA)
- Ampicilín (Biotika)
- APS (VWR Life Science)
- Bromfenolová modrá (Sigma-Aldrich)
- Butan-1-ol (Lach:ner)
- CH₃COOH, konc. (Lach:ner)
- Coomassie Brilliant Blue G – 250 (Sigma-Aldrich)
- Formaldehyd 37% (Lach:ner)
- Glukóza (Lach:ner)
- Glycerol (Lach:ner)
- Glycín (Penta)
- HCl, 35% (LACHEMA)
- IPTG (Sigma-Aldrich)
- KCl (Lach:ner)
- KH₂PO₄ (Lach:ner)
- Kvasinkový Extrakt (HIMEDIA)
- L-glutation, redukovaný >98% (Sigma-Aldrich)
- Lyzozým (Sigma-Aldrich)
- Metanol (Penta)
- MgCl₂ · 6 H₂O (Sigma-Aldrich)
- MgSO₄ · 5 H₂O (Sigma-Aldrich)
- NaCl (Lach:ner)
- Na₂CO₃, bezvodý (Lach:ner)
- Na₂HPO₄ (Lach:ner)
- Na₂S₂O₃ (Sigma-Aldrich)
- SDS (Sigma-Aldrich)
- TEMED (Sigma-Aldrich)
- Tris (Serva)
- Trypton (Serva)
- β-merkaptóetanol (VWR Life Science)

3.2.2 Ostatné materiály

- Inhibitor proteáz (Sigma-Aldrich)
- pH papier (LACHEMA)
- Proteinový rebríček Precision Plus Protein Dual Xtra Protein Standards 2–250 kDa (Bio-Rad)
- Purifikačný kit Capturem His-Tag Purification Miniprep Kit (Takara)
- Purifikačná kolóna GST-tag SpinTrap (GE Healthcare Life Science)
- Purifikačná kolóna HIS-tag Capturem (Takara)
- Rekombinantné plazmidy s HIS a GST značkou (Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky)

3.2.3 Laboratórne prístroje

- Autokláv Microjet Personal Microwave Autoclave (Enbio)
- Centrifúga U-320R (Boeco Germany)
- Centrifúga 5430 R (Eppendorf)
- Centrifúga mini Z 100 M (Hermle LaborTechnik)
- Dokumentačný systém na fotenie gélov Azure c200 (Biosystems)
- Elektroforetická aparátúra Mini Protean Tetra Cell System (Bio-Rad)
- Inkubátor 1000 (Heidolph)
- Laminárny box Aura Mini (Bioair Instruments)
- Sada mikropipet (Pipet4u)
- Spektrofotometer Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)
- Spektrofotometer (Implen)
- Termoblok Termo-Shaker TS-100C (Biosan)
- Trepáčka Mini Shaker (VWR Life Science)
- Váha analytická (A&D INSTRUMENTS LTD)
- Váha stolná Scout Pro SPU 402 (Ohaus)
- Vortex Genie 2 (MoBio Laboratories)
- Zdroj napätia PowerPac 300 (Bio-Rad)

3.3 Metódy

3.3.1 Transformácia

3.3.1.1 Príprava SOC média

Pre prípravu 100 ml SOC média bolo zmiešané 2 g tryptonu, 0,5 g kvasinkového extraktu a 0,05 g NaCl v odmernej banke a zmes bola rozpustená v minimálnom množstve destilovanej vody. Následne bolo pridaných 10 ml 250 mM roztoku KCl, ktorý sa pripravil rozpustením 1,86 g KCl v 100 ml destilovanej vody. Ďalej bolo pridaných 10 ml 10 mM $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ (bol pripravený rozpustením 0,2033 g $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ v 100 ml vody) a 10 ml 10 mM $MgSO_4 \cdot 5 H_2O$ (bol pripravený rozpustením 0,2456 g tejto látky v 100 ml vody). Odmerná banka bola doplnená po rysku s destilovanou vodou a bola vysterilizovaná autokláve. Po vysterilizovaní bolo pridaných 1,8 g glukózy. Roztok bol poriadne premiešaný a bol skladovaný pri 4 °C.

3.3.1.2 Príprava LB média

Pre prípravu 400 ml LB média bolo rozpustených 4 g NaCl, 4 g tryptonu, 2 g kvasinkového extraktu a 6 g agaru v 400 ml destilovanej vody. Následne bola zmes vysterilizovaná v autokláve. Do mierne vychladeného média bolo pridané 400 µg ampicilínu (výsledná koncentrácia 100 µg/ml). Po premiešaní bolo médium rozliate na Petriho misky. Tekuté LB médium bolo pripravené podobným spôsobom, avšak bez prídavku agaru.

3.3.1.3 Transformácia

Pre transformáciu boli použité kompetentné bunky *BL21-CodonPlus*. K 50 µl kompetentných buniek bolo pridaných 50 ng plazmidovej DNA. Skúmavka so zmesou bola najprv inkubovaná na ľade 15 minút a následne bola vložená do vyhriateho termobloku na 42 °C po dobu 25 sekúnd. Následne boli vzorky prenesené na 2 minúty na ľad a potom bol k zmesi pridaný 1 ml predhriateho (na 37 °C) SOC média. Vzorky boli mierne premiešané a ponechané k inkubácii v termobloku 1 hodinu pri 37 °C a 250 rpm. Po inkubácii bola zmes buniek centrifugovaná pri 0,1 x g, prebytok SOC média bol zliaty a bunkový pelet bol rozotrený v očkovacom boxe na pripravených Petriho miskách s LB médium obsahujúcim ampicilín (koncentrácia 100 µg/ml).

3.3.1.4 Kultivácia buniek

Po rozotretí buniek, Petriho misky boli uložené do inkubátoru vyhriateho na 37 °C na 12 – 16 hodín pri otáčkach 300 rpm. Na nasledujúci deň bola jedná kolónia z Petriho misky preočkovaná na novú Petriho miskú s LB médium a ampicilínom, a kolónia bola rozotretá krížovým rozterom. Misky boli opäť ponechané cez noc k inkubácii. Na indukciu a izoláciu proteínov bola následne jedna kolónia z krížového rozteru použitá k zaočkovaniu do 5 ml tekutého LB média s ampicilínom o rovnakej koncentracii a kultivovala sa pri teplote 37 °C pri otáčkach 300 rpm 16 hodín.

3.3.1.5 Príprava konzervy

Po 16 hodinách kultivácie bola z kultúry pripavená konzerva. 0,5 ml kultúry bolo sterilne odpipetovaných nad kahanom do 1,5 ml eppendorfových skúmaviek a následne bolo pridaných 0,5 ml 80 % sterilného glycerolu. Zmes bola rozmiešaná pomocou vortexu a uchovaná pri -80 °C pre prípadné ďalšie použitie.

3.3.2 Indukcia proteínov

3.3.2.1 Sterilizácia erlenmeyerových baniek

Na indukciu proteínov boli pripravené 100 ml erlenmeyerové banky, do ktorých bolo napipetovaných 25 ml tekutého LB média. Erlenmeyerové banky sa zazátkovali a vložili do tlakového hrnca s vodou. Výška vodnej hladiny v hrnci bola tesne nad hladinou média v bankách. Hrnec bol zatvorený a úplne utesnený a následne bol položený na indukčný sporák nastavený na 160 °C po dobu 60 minút. Po vysterilizovaní bol tlak pomaly vypustený a hrniec otvorený. Vysterilizované erlenmeyerové banky po vychladení boli uskladnené pri 4 °C.

3.3.2.2 Rast buniek

Do vysterilizovaných erlenmeyerových baniek bolo v sterilnom laminárnom boxe pridaných 25 µl ampicilínu (výsledná koncentrácia 100 µg/ml). K rastu kultúry pre indukciu a izoláciu proteínov bol použitý 1 ml kultúry, ktorá bola odobratá z krížového rozteru a rástla 16 hodín. Tento objem bol sterilne napipetovaný v laminárnom boxe do pripravených erlenmeyerových baniek. Po zaočkovaní bola banka inkubovaná pri teplote 37 °C a otáčkach 300 rpm po dobu, kým kultúra nedosiahla optickú hustotu 0,6 až 0,8.

Po 45 minútach bola na spektrofotometri pri 600 nm odčítaná optická hustota. Do 2 ml zúženej kyvety bolo napipetovaných 900 µl čistého LB média a nastavil sa blank. Následne bolo pridaných 100 µl kultúry a pomocou pipety bola kultúra dôkladne premiešaná blankom. Takto analyzované vzorky boli 10x zriedené, preto bolo potrebné ich optickú hustotu vynásobiť desiatimi. Analýza OD bola prevedená po 50 minútach do chvíle, kým kultúry nedosiahli optickú hustotu od 0,6 až 0,8. Po dosiahnutí hľadaného OD bolo odobratých 2 ml kultúry, z čoho bola pripravená vzorka K1.

Pre prípravu vzorky K1 bola odobratá kultúra scentrifugovaná pri 11 000 rpm po dobu 10 minút a následne bol odliaty supernatant. Peleta bola zlyzovaná pridaním 75 µl komerčného xTractor pufru a 20 µl lyzozýmu a bolo pridaných 8 µl inhibítora proteáz. Táto zmes bola najprv inkubovaná pri 4 °C po dobu 15 minút a následne bola prevedená centrifugácia pri otáčkach 11 000 rpm po dobu 15 minút. Vzorku K1 predstavoval supernatant po centrifugácii a vzorka bola uchovaná pre následnú analýzu pri -20 °C.

3.3.2.3 Indukcia proteínov

Do erlenmeyerových baniek s kultúrami o optickej hustote 0,6 – 0,8 bolo pridaných 25 µl 1M IPTG (23,8 g Izopropyl β-D-tiogalaktopyranozid v 100 ml vody). Po pridaní tejto látky boli vzorky kultivované pri laboratórnej teplote na trepačke po dobu 4 hodín. Po 4 hodinách bolo odobratých 2 ml kultúry a bola pripravená vzorka K2, rovnakým spôsobom ako K1.

3.3.2.4 Uchovanie kultúr

Bola pripravená sada dvoch 15 ml sterilných skúmaviek pre každú kultúru. Skúmavky boli zvážené na analytických váhach s presnosťou na 4 desatinné čísla. 2krát 10 ml kultúry bolo napipetovaných sterilnou pipetou v laminárnom boxe do pripravených skúmaviek a skúmavky boli vyvážené na váhach s presnosťou na 0,00 g. Takto pripravené skúmavky boli centrifugované pri laboratórnej teplote a otáčkach 2 000 rpm po dobu 5 min. Po centrifugácii bol z nich odliaty supernatant a boli vložené naspäť do centrifúgy na pár sekúnd, aby zvyšná kvapalina klesla na dno. Zvyšný supernatant bol pomocou mikropipety opatrne odstránený tak, aby sa neznížila hmotnosť pelety. Skúmavky boli znovu odvážené na analytických váhach a bola zapísaná a vypočítaná hmotnosť pelety. Následne boli skúmavky uchované pri -20 °C pre následnú izoláciu proteínov.

3.3.3 Izolácia rekombinantných proteínov

3.3.3.1 Lýza buniek

K pripraveným bunkovým peletám bolo pridaných 400 μ l komerčného xTractor pufru na každých 20 mg peletu. Po premiešaní skúmaviek bolo pridané 100 μ l 100x lyzozýmu a 40 μ l inhibítora proteáz. Zmes bola dôkladne premiešaná pomocou vortexu a bola preliata do skúmaviek značky eppendorf o objemu 1,5 ml. Následne boli skúmavky vložené do termobloku, kde boli inkubované po dobu 15 minút pri teplote 4 °C. Po inkubácii bola prevedená centrifugácia pri otáčkach 11000 rpm a pri teplote 4 °C po dobu 15 minút.

3.3.3.2 GST-tag izolácia

Proteíny boli izolované pomocou komerčných GST kolón – „GST SpinTrap“, od firmy GE Healthcare Life Science. Najprv boli pripravené roztoky potrebné na izoláciu. „PBS Binding buffer“ (väzbový pufer) bol pripravený navážením 2 g NaCl, 50 mg KCl, 360 mg Na₂HPO₄ a 60 mg KH₂PO₄. Tieto zlúčeniny boli kvantitatívne prevedené do 250 ml odmernej banky, bolo pridaných 200 ml destilovanej vody a bolo skontrolované pH pomocou pH papierikov. Podľa potreby bolo pH upravené pomocou HCl alebo NaOH, aby bolo v rozmedzí 6,8 až 7,6. Elučný pufer bol pripravený navážením 461 mg redukovaného L-glutathionu a 606 mg Tris-u v 100 ml odmernej banke. Bolo pridaných 80 ml destilovanej vody a pH bol upravený pomocou HCl na 8,0. Následne bola banka doplnená destilovanou vodou po rysku.

Počas práce bola centrifúga vychladená na 4 °C a jednotlivé vzorky sa uchovávali na ľade. Najprv boli kolóny mnohokrát mechanicky trepané za účelom resuspendovania živice. Následne boli kolóny vložené do zbernej nádoby a boli scentrifugované pri teplote 4 °C a otáčkach 100 x g po dobu 30 sekúnd. Kvapalina zo zbernej nádoby bola vyliata a na kolóny bolo pridaných 600 μ l väzbového pufru a kolóny boli znovu centrifugované pri 100 x g po dobu 30 sekúnd. Následne bola na kolóny pridaná jedna polovica pripraveného lyzátu a kolóny boli mierne premiešané pri 4°C po dobu 10 minút pre zabezpečenie optimálneho naviazania proteínov. Po 10 minútach boli kolóny scentrifugované pri 100 x g po dobu 30 sekúnd. Pretečený lyzát bol uchovaný a označený ako vzorka G3. Následne boli kolóny dvakrát premyté 600 μ l binding pufru a pretečený väzbový pufer bol uchovaný ako vzorka G4 a G5. Pridaním 150 μ l elučného pufru a následnou centrifugáciou pri 100 x g 30 sekúnd bola prevedená elúcia proteínov. Elúcia bola zopakovaná až do úplného vymytia cieľového proteínu (vzorky G6-G8). Vzorky G3-G8 boli stanovované pomocou spektrofotometru (nanodrop) a SDS-PAGE elektroforézy a zbytok bol uchovaný v eppendorfových skúmavkách pri teplote -20 °C.

3.3.3.3 HIS-tag izolácia

Pre izoláciu HIS-tag fúznych proteínov bol použitý komerčný kit od firmy Takara. Počas práce bola použitá vychladená centrifúga na 4 °C. Na komerčné kolóny bola naliata druhá polovica lyzátu a následne bola prevedená centrifugácia pri 11000 rpm po dobu 1 minúty. Lyzát, ktorý prešiel cez kolóny bol odobraný a uchovaný ako vzorka H3. Pre premývanie kolóny bol použitý komerčný „wash buffer“ o objeme 300 μ l, ktorý bol centrifugovaný rovnakým spôsobom ako lyzát a pretečený pufer bol uchovaný ako vzorka H4. Následne boli proteíny dvakrát eluované pomocou 150 μ l elučného pufru. Po centrifugácii boli získané vzorky H5 a H6, ktoré boli následne stanovované pomocou spektrofotometru a SDS-page elektroforézy.

3.3.4 Stanovovanie rekombinantných proteínov

3.3.4.1. Stanovenie proteínov spektrofotometricky

Pre rýchlu analýzu koncentrácie celkových proteínov bola použitá spektroskopická metóda pomocou Nanodropu 2000 od firmy Thermo Science. Prístroj bol zapnutý a nastavený na meranie absorbancie proteínov pri 280 nm. Po vyčistení senzoru pomocou etanolu, bol nastavený „blank“ nanosením 1,5 μ l elučného pufru. Postupne boli nanášané vzorky a bola zaznamenaná koncentrácia v mg na ml.

3.3.4.2. Analýza proteínov pomocou SDS-page elektroforézy.

Pre separáciu a detekciu rekombinantných proteínov v jednotlivých frakciách bola použitá elektroforéza v polyakrylamidovom géle s dodecylsulfátom sodným (SDS-PAGE).

Príprava roztokov pre SDS-page elektroforézu

- 5 % akrylamid: bolo zmiešaných 12,5 ml 40% akrylamidu (akrylamid:bisakrylamid 19:1), 12,5 ml 1M Tris-u (pH 6,4), 0,5 ml 20% dodecylsulfátu sodného (SDS) a 74,5 ml vody.
- 10 % akrylamid: 75 ml 40% akrylamidu (akrylamid:bisakrylamid 19:1) bolo kvantitatívne prevedených do 500 ml zásobnej fľaše a bolo pridaných 112 ml 1M Tris-u (pH 8,8), 1,5 ml 20% dodecylsulfátu sodného (SDS) a fľaša bola doplnená 111,5 ml destilovanej vody.
- 1 x Tris-Glycín SDS elektródový pufo: 3,03 g Tris-u, 14,4 g glycínu a 1 g SDS bolo navážených do odmernej banky s objemom 1000 ml a obsah banky bol doplnený po rysku destilovanou vodou.
- 10 % APS: bol navážený 1 g peroxidisíranu amónneho, ktorý bol rozpustený v 10 ml destilovanej vody.
- 2 x Laemmliho nanášací pufo: bol pripravený nanášací pufo zmiešaním 4 ml 10% SDS, 1,2 ml 1M Tris-HCl, 2 ml glycerolu a 0,002 g bromfenolovej modrej v 10 ml skúmavke. Bolo pridaných 1,8 ml vody a v digestory bolo opatrne pridaných 1 ml β -merkaptotanolu. Pufo bol dôkladne premiešaný a uchovávaný pri 4 °C.

Príprava gélu na SDS-PAGE elektroforézu

Pred pripravovaním gélu boli dôkladne umyté sklá a hrebienky saponátom a následne boli opláchnuté destilovanou vodou a etanolom, aby sa nevytvorili bubliny pri nalievaní gélu. Počas práce so sklom bolo manipulované v rukaviciach a sklo bolo chytané na okraji. Sklá boli zostavené k sebe a boli zaistené stojanom, ktorý potom bol vložený do pripravenej aparatury na výrobu gélu.

Spodná časť gélu bola pripravená zmiešaním 10 ml 10% akrylamidu so 100 ml 10 % APS a 30 ml TEMEDu. Po pridaní TEMEDu bol roztok ihneď premiešaný a naliaty medzi pripravené sklá tak, aby horný okraj gélu bol 2,5 cm od konca skla. Po pridaní TEMEDu do akrylamidu začína polymerizácia, čiže je nevyhnutné gél naliať medzi sklá čo najrýchlejšie. Gél bol potom prevrstvený butanolom pre vyrovnanie hladiny naliateho gélu a aby sa zabránilo difúzií kyslíku, ktorý by mohol potlačiť polymerizáciu. Gél bol nechaný na polymerizáciu vo vertikálnej polohe 30 minút. Po stuhnutí gélu bol odliaty butanol a neopolymerizovaný akrylamid bol odstránený prepláchnutím vodou. Nadbytočné kvapky vody na povrchu gélu boli vysušené pomocou filtračného papiera.

Následne bol pripravený zaostrovací gél zmiešaním 3 ml 5% akrylamidu, 30 ml 10% APS a 9 ml TEMEDu. Tento roztok bol po zmiešaní okamžite naliaty medzi sklá k pripravenému separačnému gélu a bol vložený hrebienok. Gél bol nechaný vertikálne polymerizovať, kým úplne nestuhol. Po stuhnutí bol gél vložený do aparatury a bol zaliaty pufrom. Následne bol opatrne odstránený hrebienok, aby sa jamky nepoškodili.

Príprava a nanosenie vzoriek

Testované vzorky boli napipetované o objeme 40 µl do eppendorfových skúmaviek a bolo pridaných 10 µl nanášacieho pufru. Skúmavky boli vložené do centrifugy na short spin a následne boli inkubované pri 95 °C po dobu 5 minút. V stojane umiestnený gél sa vložil do elektroforetickej nádoby, pričom vnútorný priestor nádoby bol úplne zaplnený elektródovým roztokom a vonkajší priestor bol naplnený po značku. Do jamiek boli napipetované vzorky pomocou 20 µl pipety. Vždy boli pripravené 2 identické gély pre následné zrovnanie účinnosti farbiacich metód. Po nanosení všetkých vzoriek bol nanosený rebríček o objeme 2 µl.

Elektroforéza SDS-PAGE

Elektroforetická aparátúra bola zapojená do zdroja a napätie bolo nastavené na 50 V. Po 15 minútach bolo napätie zvýšené na 100 V a po uplynutí ďalších 15 minút bolo nastavené napätie 150 V. Elektroforéza bola ukončená vo chvíli, keď sa bromfenolová modrá dostala k spodnému okraju gélu.

3.3.4.3 Vizualizácia proteínov po elektroforéze SDS-PAGE

Na vizualizáciu boli pripravené 2 misky pre 2 rôzne farbiace metódy. Počas elektroforézy boli pripravené roztoky na farbenie pomocou Coomassie Blue a pomocou striebra.

Pre farbenie pomocou Coomassie Blue boli pripravené nasledovné roztoky:

- Stabilizačný roztok: bolo zmiešané 100 ml metanolu a 400 ml destilovanej vody.
- Farbiaci roztok: bolo navážených 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G – 250, ktoré bolo kvantitatívne prevedené do zásobnej fľaše a bolo pridaných 450 ml metanolu, 100 ml koncentrovanej kyseliny octovej a 450 ml vody.
- Odfarbovací roztok: bolo zmiešané 250 ml metanolu, 100 ml koncentrovanej kyseliny octovej a 650 ml destilovanej vody.

Pre farbenie gélu pomocou striebra boli pripravené nasledovné činidlá:

- Fixačné činidlo: do 1 000 ml odmernej banky bolo naliatych 500 ml metanolu, 120 ml koncentrovanej kyseliny octovej, 0,48 ml 37 % formaldehydu a banka bola doplnená po rysku destilovanou vodou.
- Premývacie činidlo: bolo zmiešané 200 ml metanolu a 800 ml destilovanej vody.
- Senzibilizačné činidlo: bolo rozpustených 0,1274 g tiosíranu sodného v 1 000 ml vody.
- Farbiace činidlo: v 250 ml odmernej banke bolo rozpustených 0,5 g dusičnanu strieborného v 200 ml destilovanej vody a roztok bol uchovaný v 4 °C. Tesne pred farbením k tomuto roztoku bolo pridaných 0,179 ml 37% formaldehydu a banka bola doplnená po rysku destilovanou vodou.
- Vyvíjacie činidlo: do 1 000 ml odmernej banky bolo kvantitatívne prevedených 60 g bezvodého uhličitanu sodného, 0,474 ml 37% formaldehydu a 4 ml senzibilizačného činidla a banka bola doplnená destilovanou vodou po rysku.
- Terminačné činidlo: bolo zmiešaných 120 ml koncentrovanej kyseliny octovej a 880 ml vody.

Farbenie gélu pomocou Coomassie blue

Bezprostredne po dobehnutí elektroforézy bola jedna sada gélov opatrne uvoľnená pomocou stričky s destilovanou vodou z elektroforetických skiel do pripravenej misky. Voda z misky bola odliata a nahradená stabilizačným roztokom a gély boli stabilizované 5 minút na trepačke pri laboratórnej teplote. Následne bol stabilizačný roztok odliaty a gély boli farbené pomocou farbiaceho roztoku na trepačke, kým sa celé nezafarbili (približne 10 minút). Farbiaci roztok bol následne nahradený odfarbovacím roztokom a gély boli nechané odfarbovať 3 hodiny. Po každých 40 minútach bol odfarbovací roztok vymenený za nový. Po odfarbení boli gély vyfotené na dokumentačnom prístroji Azure c200.

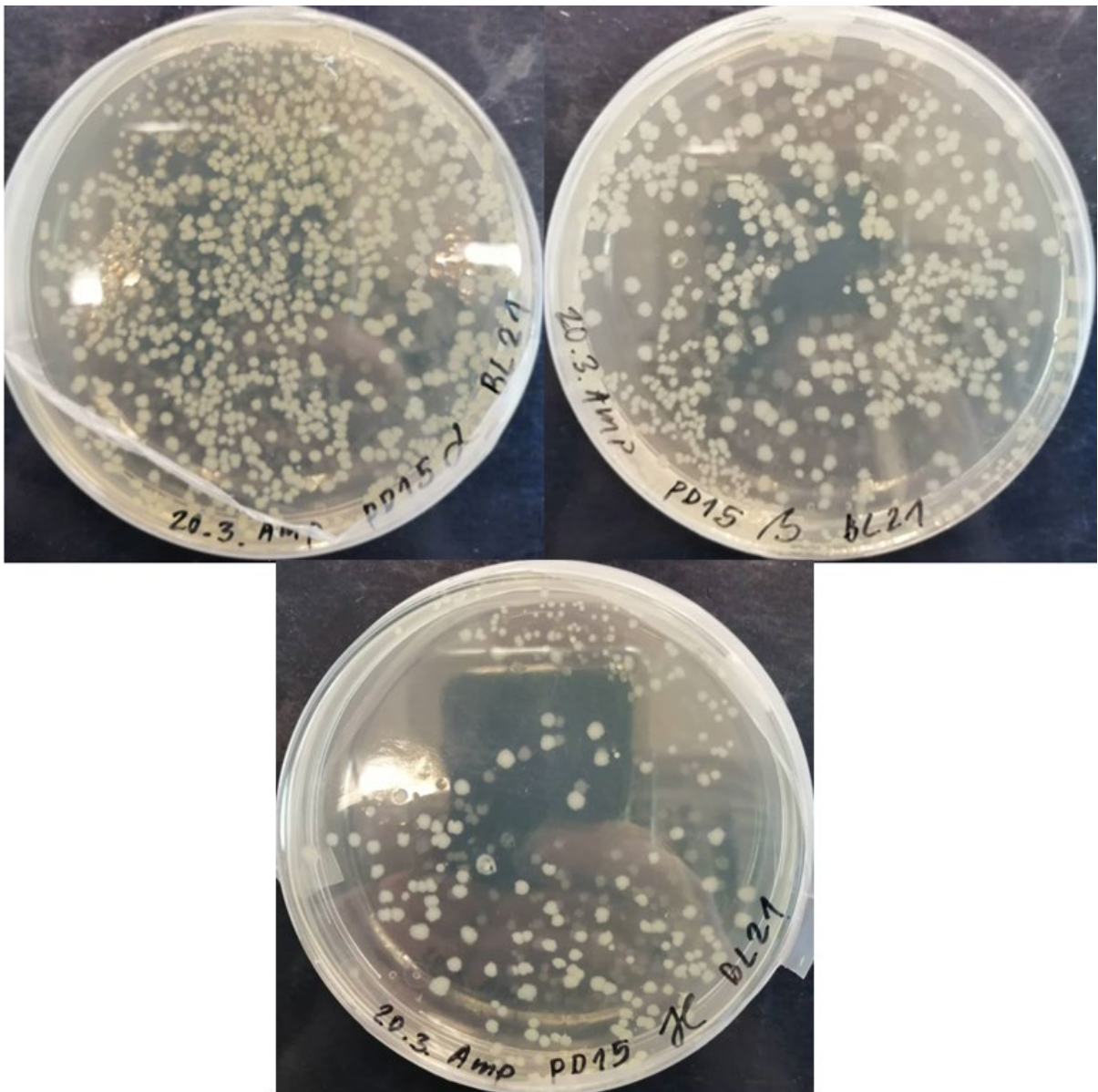
Farbenie gélu striebrom

Druhá sada gélov bola opatrne uvoľnená do pripravenej farbiacej misky a gély boli prevrstvené a ponechané vo fixačnom činidle na dobu 2 hodín. Po fixácií boli gély 3x po desiatich minútach premyté premývacím činidlom a následne premyté destilovanou vodou. Po dôkladnom premytí bolo do misky s gélom naliate senzibilizačné činidlo, ktoré bolo ponechané v miske presne 1 minútu. Po odliatí tohto činidla boli gély znovu premyté vodou a boli ponechané v ochladenom farbiacom roztoku 20 minút. Po uplynutí tejto doby boli gély znovu omyté vodou a vyvíjanie bolo započaté pridaním vyvíjacieho činidla. Vyvíjanie bolo sledované a bolo okamžite ukončené terminačným činidlom, keď už bol výsledok farbenia uspokojujúci. Gély boli následne vyfotené dokumentačným prístrojom na fotenie gélov.

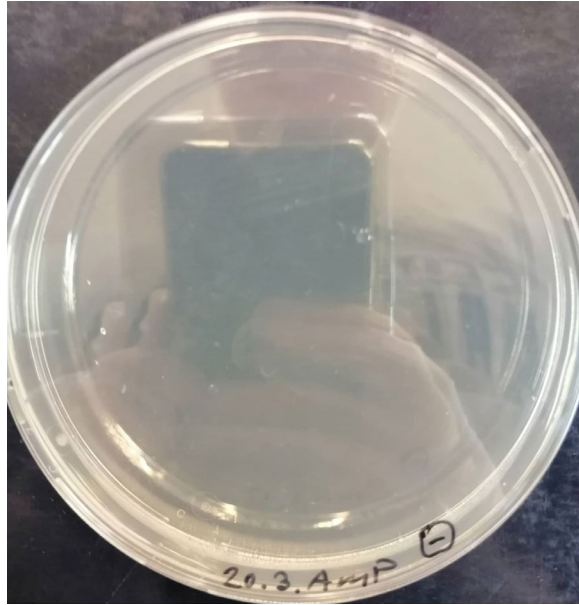
4 VÝSLEDKY A DISKUSIE

4.1 Transformácia

Pre porovnanie účinnosti izolácie GST-tag a HIS-tag boli použité rekombinantné plazmidy, ktoré vo svojej sekvencii obsahovali gén pre GST-tag aj pre HIS-tag. Po transformácii rekombinantných plazmidov do kompetentných buniek *BL21* došlo k selekcii buniek pomocou antibiotika ampicilín. Transformovaný plazmid obsahuje sekvenciu rezistencie voči ampicilínu, ktorý bol súčasťou média. Na agarových miskách vyrástli len tie kolónie, ktoré počas transformácie úspešne prijali cudzorodý plazmid (Obrázok 6). Úspešnosť transformácie a účinnosť ampicilínu bola preverená na negatívnej kontrole (Obrázok 7).

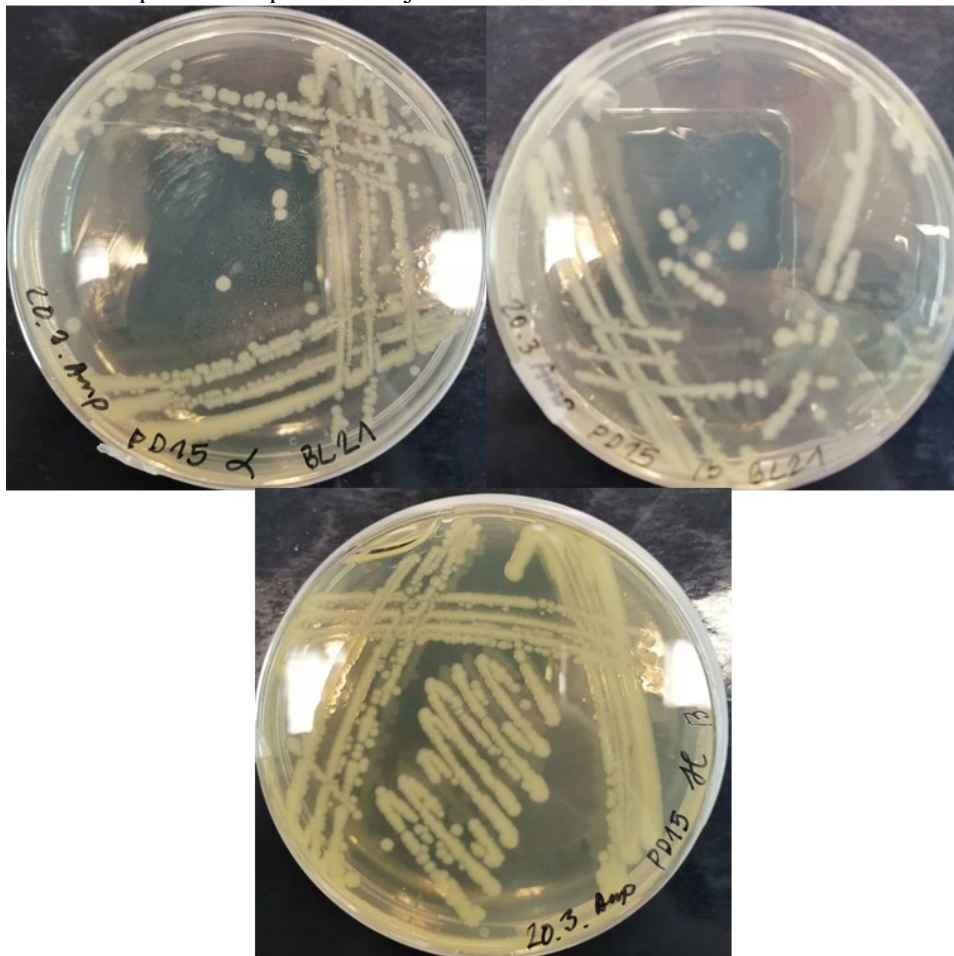


Obrázok 6: Narastené kolónie po transformácii rekombinantných plazmidov (izoformy $p53\alpha$, $p53\beta$ a $p53\gamma$) do kompetentných buniek *BL21*.



Obrázok 7: Negatívna kontrola po transformácii.

Pre izoláciu proteínov je potrebné, aby bola použitá len jedna kolónia. Kolónie s izoformou p53 α a p53 β boli dosť prehustené, práve preto bolo potrebné ich vyriediť pomocou krížového rozteru (Obrázok 8). Pre ďalšiu prácu bola použitá len jedna kolónia z krížového rozteru.



Obrázok 8: Krížový rozter jednej kolónie po transformácii.

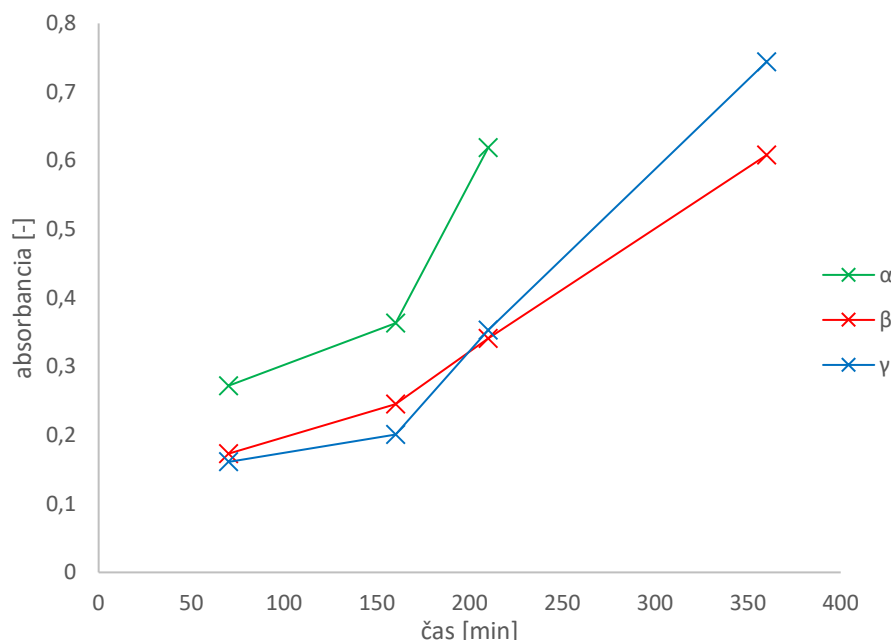
4.2 Indukcia proteínov

Po úspešnej transformácii rekombinantných plazmidov do buniek *BL21* bola zahájená produkcia proteínov. Transformovaný rekombinantný plazmid okrem HIS a GST značiek obsahoval aj *lac* operón. Indukcia produkcie proteínov bola vyvolaná pridaním zlúčeniny veľmi podobnej alolaktóze (metabolitu laktózy), IPTG (izopropyl- β -D-tiogalaktopyranosidu). Podobne ako alolaktóza, IPTG sa viaže na operátor *lac*, čím uvoľňuje tetramérny represor a navodzuje transkripciu génov, ktoré sa nachádzajú v rekombinantnom plazmide.

Indukcia proteínov je najúčinnnejšia pri pridaní do bunečnej kultúry, ktorá sa nachádza v exponenciálnej fáze svojej rastovej krivky. Na kontrolu rastu bola použitá spektrofotometrická metóda merania optickej hustoty kultúry. Pri kultivácii buniek v erlenmeyerových bankách však bola zistená kontaminácia. Problémom mohlo byť degradované antibiotikum, nakoľko ampicilín bol pridaný do nie úplne vychladeného LB média. Na ampicilín má rezistenciu jedine plesň, ktorá bola prítomná v médiu. Tento problém bol vyriešený dodatočným pridaním ampicilínu do vychladnutého média. Čas na dosiahnutie žiadanej optickej hustoty v erlenmeyerových bankách bol mnohonásobne vyšší, ako predpokladaný čas. Dôvodom mohlo byť, že nie celé množstvo antibiotika sa za tepla zdegradovalo a pridaním novej dávky ampicilínu mohlo spomaliť rast buniek. Optické hustoty jednotlivých kultúr sú znázornené v tabuľke (Tabuľka 2). Závislosť optickej hustoty na čase, resp. rastová krivka jednotlivých vzoriek je vynesena v grafe (Graf 1).

Tabuľka 2: Optické hustoty kultúr pri 600 nm pre indukciu proteínov

Čas [min]	70	160	210	360
Vzorka	Absorbancia pri 600 nm [-]			
α	0,272	0,363	0,619	-
β	0,173	0,245	0,341	0,608
γ	0,161	0,201	0,353	0,744



Graf 1: Závislosť absorbancie bunkových kultúr na čase (rastová krivka)

Optimálny čas indukcie sú 4 hodiny. Pri dlhšej indukcii by kultúra prerástla a proteíny by sa degradovali. Po ukončení indukcie bola odobraná vzorka K2. Po stočení a odliatí supernatantu boli vypočítané hmotnosti peliet [Tabuľka 3]. Vzorky $\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$ boli indukované len 2 hodiny.

Tabuľka 3: Hmotnosti jednotlivých skúmaviek a vypočítané hmotnosti pelet po indukcii.

Vzorka	M prázdnej sk. [g]	M plnej skúmavky [g]	M pelety + sk [g]	M pelety [g]
$\alpha 1$	6,8501	16,87	6,8740	0,0239
$\alpha 2$	6,8110	16,87	6,8463	0,0353
$\beta 1$	6,8834	16,55	6,8991	0,0157
$\beta 2$	6,7999	16,55	6,8209	0,0210
$\gamma 1$	6,8420	15,88	6,8209	0,0211
$\gamma 2$	6,8018	15,88	6,8358	0,0340

4.3 Izolácia rekombinantných proteínov

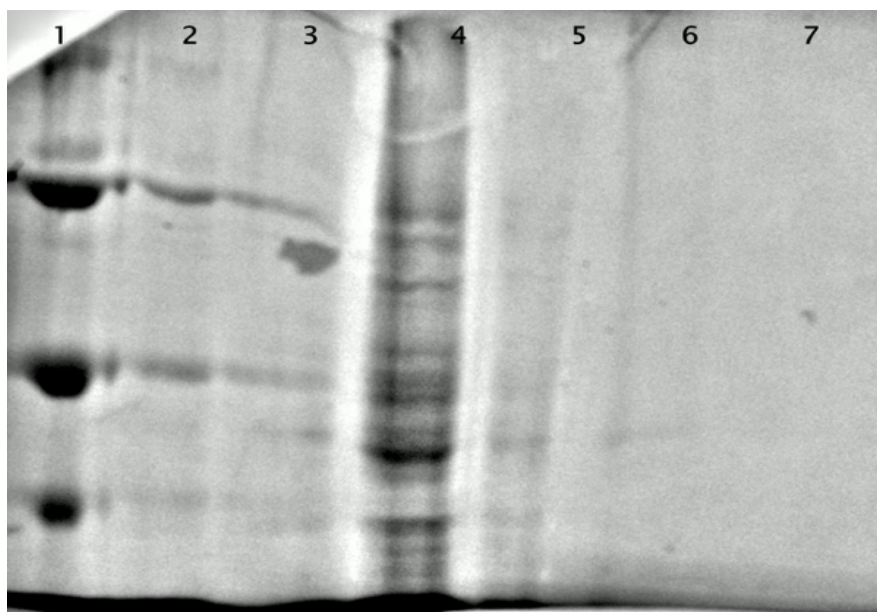
Pre produkciu rekombinantných proteínov bol vybraný kmeň *E.coli BL21*, ktorý sa dá jednoducho transformovať a je vhodný na expresiu proteínov. Tento kmeň má zníženú hladinu proteáz a pridaním inhibítora proteáz do lyzačného roztoku by sme mali zamedziť degradáciu proteínov. Avšak náš rekombinantný proteín je veľmi náchylný k fragmentácií, preto bolo nutné dbať na dodržanie 4 °C počas celej izolácie. Keďže sledovaný rekombinantný plazmid obsahoval HIS-tag aj GST-tag kotvu, bola porovnaná účinnosť izolácie a purifikácie dvoch komerčných kitov na 2 rôzne kotvy. Koncentrácie rekombinantných proteínov po izolácii vzoriek ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$) boli stanovené na prístroji Nanodrop 2000 od firmy Thermo Fisher a sú uvedené v tabuľke (Tabuľka 4). Z tejto tabuľky vyplýva, že namerané koncentrácie u HIS-tag izolácií sú až 10x vyššie.

Tabuľka 4: Koncentrácie jednotlivých eluátov pri 1. izolácii izoformami p53 α , p53 β a p53 γ

izoforma	c [mg/ml]					
	$\alpha 1$		$\beta 1$		$\gamma 1$	
metóda	HIS-tag	GST-tag	HIS-tag	GST-tag	HIS-tag	GST-tag
Eluát 1	1,311	0,138	1,708	0,071	1,388	0,098
Eluát 2	0,101	0,049	0,103	0,034	0,121	0,037

Bol pripravený kontrolný gél (Obrázok 9), pomocou vloženia jednotlivých frakcií do SDS-PAGE elektroforézy, kde štart číslo 1 bol rebríček, číslo 2 bola kultúra pred indukciou a číslo 3 kultúra po indukcií. Po porovnaní bendov pred a po indukcií môžeme usúdiť, že indukcia nebola úspešná. Štart č. 4 je lyzát, č.5 je premývací roztok a eluáty sú umiestnené v štartoch č.6 z HIS-tag purifikácie a č.7 z GST-tag purifikácie. U nich sme dostali veľmi slabé bendy, práve preto bolo potrebné izoláciu optimalizovať.

Pri indukcií vzoriek $\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$ bol čas indukcie zredukovaný na 2 hodiny, čo však zjavne nebolo dostačujúce. Pri vzorkách $\alpha 2$, $\beta 2$, $\gamma 2$ boli kultúry indukované 4 hodiny a pre zvýraznenie jednotlivých bendov, boli vzorky K1 a K2 (pred a po indukcií) pred vložením do elektroforézy zlyzované komerčným lyzačným pufrom.



Obrázok 9: Prvá izolácia izoformy p53 β -polyakrylamidový gél s SDS. Štart č.1 proteínový rebríček 2 – 250 kDa, štart č.2 – 5 kontrolné vzorky odoberané počas produkcie a purifikácie, štart č. 6 a č.7 eluáty.

Pri GST-tag purifikácií bola zoptimalizovaná príprava jednotlivých pufov, a bola dbaná vyššia pozornosť na dodržanie optimálnej pH, čo je 6,5 až 8. Pri vyšších, resp. nižších pH efektívnosť a výťažnosť izolácie výrazne klesá. Lepšie naviazanie rekombinantných proteínov na GST kolónu bola zapríčinená miernym miešaním lyzátu v kolóne pred centrifugáciou po dobu 10 minút. Bola optimalizovaná aj koncentrácia glutatiónu v elučnom pufru zvýšením z 10 mM na 20 mM.

U HIS-tag purifikácií všetky roztoky boli komerčné a jediná možnosť, ako zvýšiť koncentráciu bola znížením elučného objemu z 300 na 150 μ l. Výsledky tejto izolácie sú uvedené v kapitole 4.4.

4.4 Stanovenie rekombinantných proteínov

4.4.1 Spektrofotometrické stanovenie

Pre túto analýzu bola využitá schopnosť absorpcie niektorých aminokyselín pri 280 nm. Táto metóda je veľmi rýchla, nie sú potrebné žiadne činidlá ani inkubácie. Síce takto stanovovať proteíny nie je najpresnejšie, nakoľko akákoľvek neproteínová zložka proteínu, ktorá absorbuje ultrafialové svetlo nám môže interferovať, pre porovnanie výťažnosti GST a HIS izolácií je postačujúca. Prístroj priamo meria koncentrácie, ktoré boli zaznamenané spolu s pomerom absorpcií pri 260 a 280 nm. Koncentrácie v jednotlivých frakciách po druhej izolácii sú uvedené v tabuľke (Tabuľka 5).

Pri porovnaní výsledkov prvej a druhej izolácie (Tabuľka 4 a Tabuľka 5) vidíme, že sa nám podarilo zvýšiť koncentrácie u všetkých eluátoch. Avšak ešte stále platí, že účinnosť HIS-tag purifikácie je 2 až 5x vyššia ako GST-tag purifikácie. Dá sa to odvodniť tým, že GST-tag proteíny majú vyššiu afinitu ku glutatión agaróze a ťažšie sa eluujú ako HIS-tag proteíny. Okrem toho samotná kapacita GST-tag kolón bola nižšia ako HIS-tag kolón.

Hlavný rozdiel však pri HIS-tag a GST-tag značkách je veľkosť „tagu“. HIS-tag je sekvencia dlhá 6 aminokyselín, oproti tomu u GST-tag pripojený tag má okolo 30 kDa, čo je obrovská záťaž pre expresný systém. Nakoľko *E.coli* je veľmi citlivá na tvorbu inklúzných telies pri nadprodukcii proteínu, môžeme uvažovať, že syntéza GST-fúzných proteínov nie je vhodná pri našom expresnom systéme, čo potvrdzujú aj dosiahnuté výsledky. Izolovať proteíny z inklúzných telies sa dá, ale je to časovo a finančne náročný krok, ktorý nie je vždy úspešný.

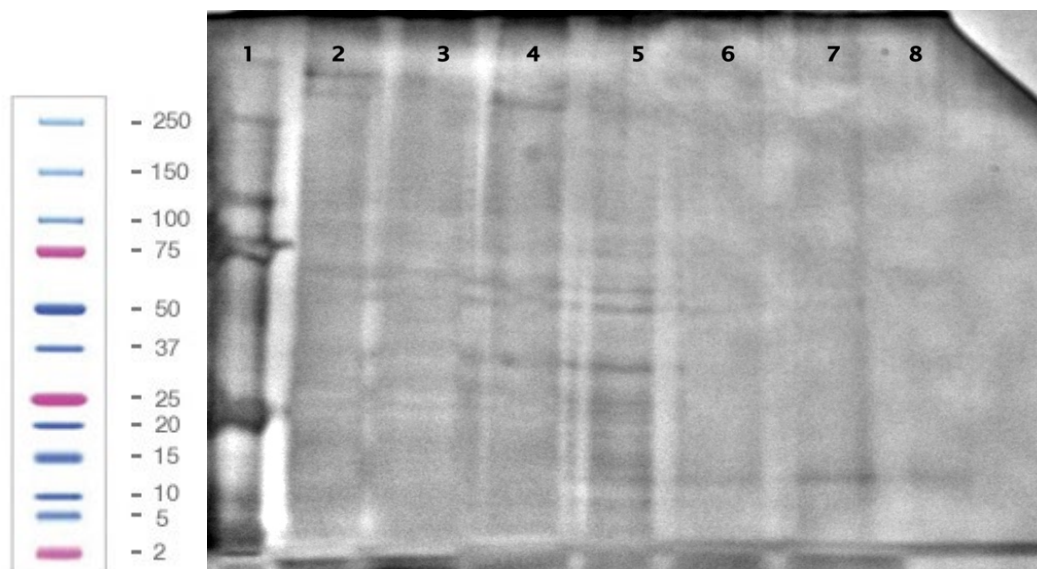
Tabuľka 5: Porovnanie koncentrácií jednotlivých frakcií 2. izolácie izoformiem p53 α , p53 β a p53 γ

izoforma	c [mg/ml]					
	α 2		β 2		γ 2	
metóda	HIS-tag	GST-tag	HIS-tag	GST-tag	HIS-tag	GST-tag
lyzát	9,409	10,433	11,598	12,318	12,641	11,486
wash	0,534	1,214	0,724	3,245	0,927	2,965
		0,023		0,234		0,187
eluát 1	1,983	0,849	3,425	0,345	1,557	0,294
eluát 2	1,042	0,028	0,847	0,033	1,392	0,047

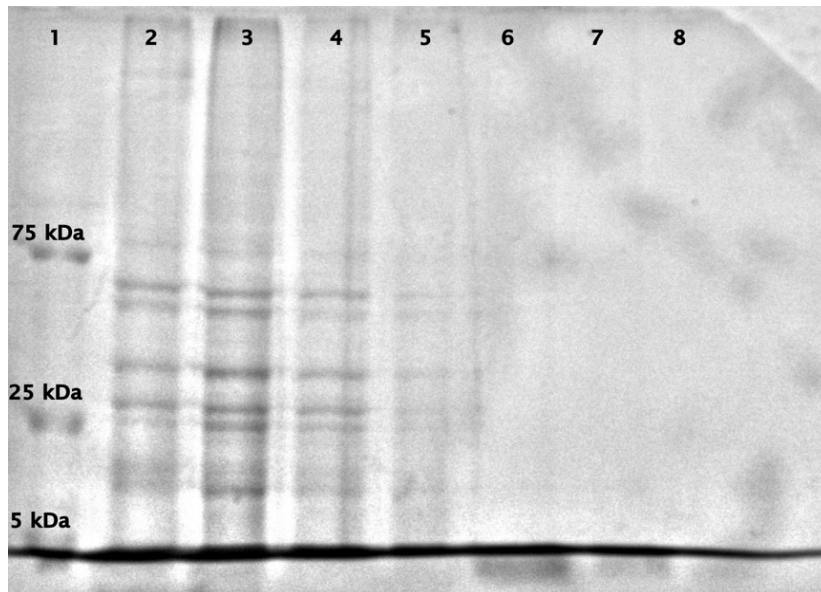
4.4.2 Stanovenie pomocou SDS-PAGE

Po izolácii proteínov a zmeraní koncentrácií jednotlivých frakcií bola použitá elektroforéza na polyakrylamidovom géle s dodecylsulfátom sodným pre kontrolu správnosti izolácie a purifikácie. Pre porovnanie veľkosti molekúl bol použitý vždy v štartoch č.1 rebríček (Precision Plus Protein Dual Xtra Protein Standard) s rozsahom 2 – 250 kDa. Kontrolné vzorky pred indukciou sú v štartoch č.2 a v štartoch č.3 sú umiestnené kontrolné vzorky po indukcii. Po úspešnej indukcii by vzorky č.3 mali mať silnejšie bendy. V štartoch č.4 sa nachádza pretečený lyzát a pre zistenie zbytkového proteínu v premývacom kroku je v štartoch č.5 umiestnený premývací pufor pretečený kolónou. Eluát o vyššej koncentrácii po HIS-tag purifikácii sa nachádza v štarte č.6 a eluát s nižšou koncentráciou v štarte č.7. Eluát po GST-tag izolácii je umiestnený v štarte č.8. Pre každé izoformy boli pripravené vždy dva identické gély, z nich jeden bol farbený pomocou striebra a druhý pomocou Coomassie Blue.

Na detegovanie proteínov na géle bol zvolený objem vzoriek tak, aby celkové množstvo proteínov v jamke bolo v rozmedzí 20 až 40 μ g. Problémom však bolo, že maximálny objem jamiek v géle bol okolo 25 μ l. Keďže koncentrácia GST-fúzných proteínov bola okolo 0,5 mg/ml, pri nadávkovaní 20 μ l vzorku, v podstate bolo nanesené len polovičné množstvo proteínov, ktoré sa dá detegovať. Práve preto sú eluáty z GST izolácie viditeľné veľmi slabou, alebo vôbec.

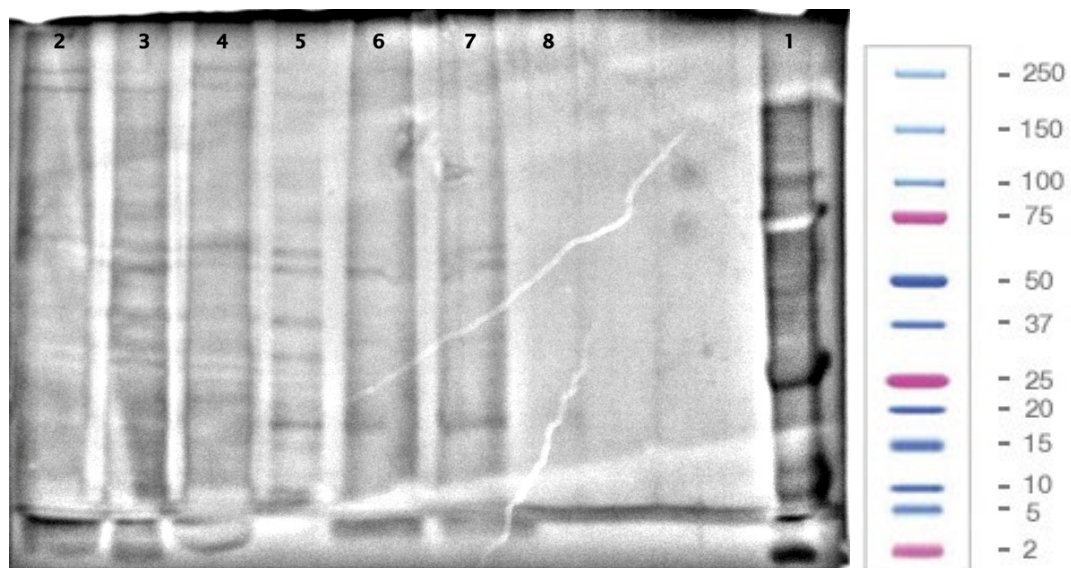


Obrázok 10: Izoforma p53 α -polyakrylamidový gél s SDS farbený so striebrom. Štart č.1 proteínový rebríček 2 – 250 kDa, štart č.2 – 5 kontrolné vzorky odoberané počas produkcie a purifikácie, štart č. 6 a č. 7 izoforma izolovaná pomocou HIS-tag purifikácie, štart.č 8 izoforma izolovaná pomocou GST-tag purifikácie.

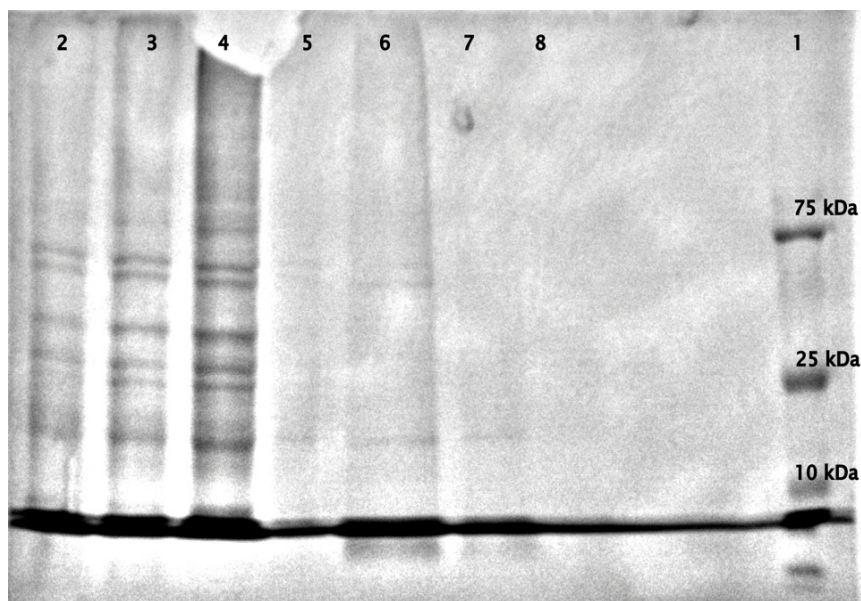


Obrázok 11: Izoforma p53 α -polyakrylamidový gél s SDS farbený s Coomassie Blue. Štarty sú homologické s obrázkom 10.

Na (Obrázok 10 a Obrázok 11) sú analyzované frakcie izoformy p53 α . Najsilnejšie bendy pri elúcii sú pri 12 kDa a 50 kDa. Veľkosť proteínu p53 α by mal byť okolo 50 kDa, z čoho vyplýva, že sa nám podarilo úspešne vyizolovať a purifikovať rekombinantný proteín. Bend pri 12 kDa odpovedá čiastočnej fragmentácii proteínu, nakoľko proteíny p53 sú veľmi citlivé na teplotu a počas práce sa mohli rozštiepiť. Z obrázku (Obrázok 10) tiež vyplýva, že koncentrácie GST-tag proteínov sú veľmi nízke a na géle je možné vidieť bend len pri 12 kDa. Na obrázku (Obrázok 11) vidno úspešnosť indukcie proteínov, keďže v štarte č.3 sú oveľa výraznejšie viditeľné bendy ako v štarte so vzorkou pred indukciou. Pri porovnaní farbiacich metód môžeme tiež usúdiť, že farbenie pomocou striebra (Obrázok 10) je špecifickejšie a je vhodné na analýzu eluátu, naopak pre analýzu viac koncentrovaných vzoriek (napr. bunčných kultúr) je vhodnejšie farbiť s Coomassie Blue (Obrázok 11) .



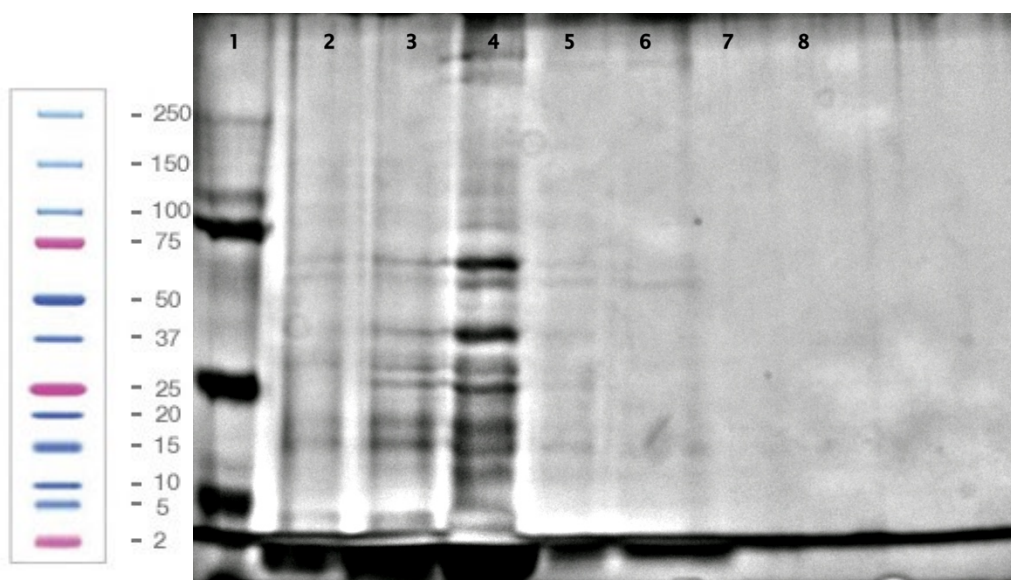
Obrázok 12: Izoforma p53 β -polyakrylamidový gél s SDS farbený so striebrom. Štart č.1 proteínový rebríček 2 – 250 kDa, štart č.2 – 5 kontrolné vzorky odoberané počas produkcie a purifikácie, štart č. 6 a č. 7 izoforma izolovaná pomocou HIS-tag purifikácie, štart.č 8 izoforma izolovaná pomocou GST-tag purifikácie.



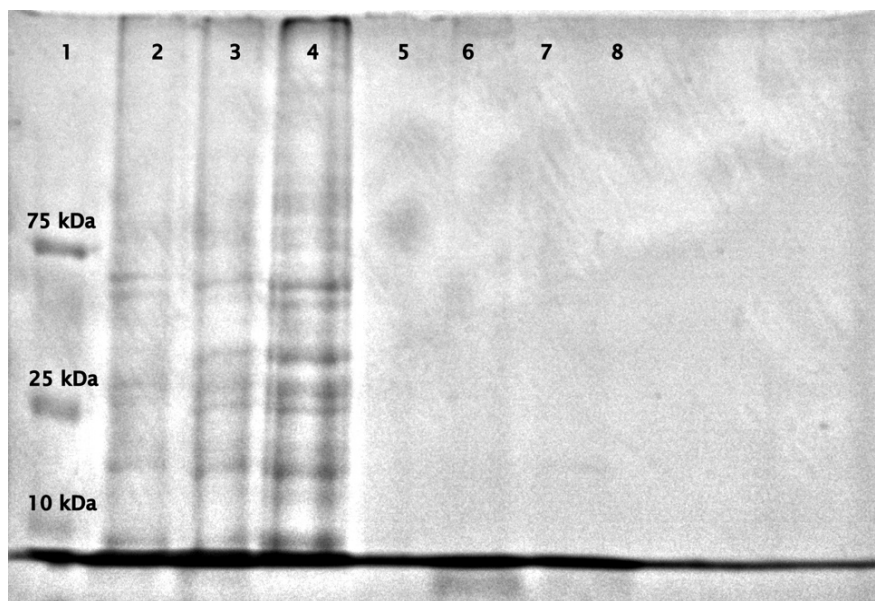
Obrázok 13: Izoforma p53 β -polyakrylamidový gél s SDS farbený s Coomassie Blue. . Štarty sú homologické s obrázkom 12.

U izoformy p53 β (Obrázok 12 a Obrázok 13) sme dosiahli podobné výsledky ako u izoformy p53 α . Avšak pri GST-tag izolácii sme dosiahli nižšie koncentrácie ako u α , a bend u GST eluátu je ešte slabší. Detekčný limit PAGE-SDS elektroforézy je okolo 20 μ g, avšak my sme boli schopní naniesť len okolo 7 μ g, čo zjavne nebolo dostačujúce. Izoforma p53 β má najsilnejšie bendy okolo 48 kDa a frakciovane proteíny majú veľkosť okolo 15 kDa. Pri géle farbenom pomocou Coomassie Blue (Obrázok 13) vidno úspešnú indukciu, avšak eluát po GST izolácii je neviditeľný.

U izoformy p53 γ (Obrázok 14 a Obrázok 15) vidno, ako závisí koncentrácia eluátov a viditeľnosť bendov. Oproti ostatným izoformám sa nám podarilo vyizolovať p53 γ s najnižšou koncentráciou a bendy u eluátoch sú skoro neviditeľné. Indukcia však bola aj v tomto prípade účinná.

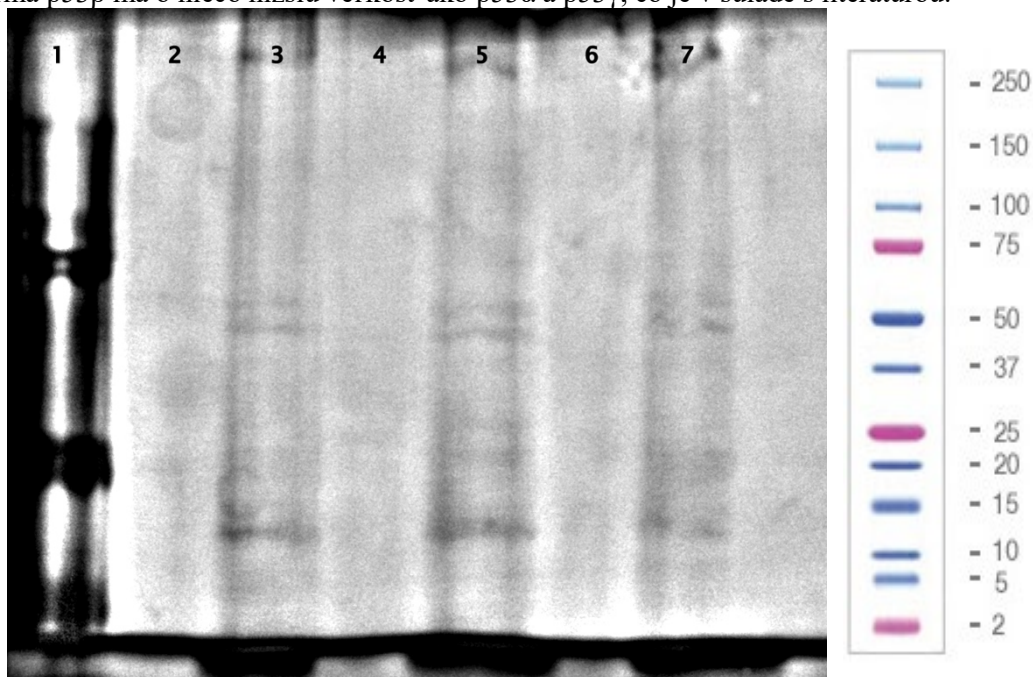


Obrázok 14: Izoforma p53 γ -polyakrylamidový gél s SDS farbený so striebrom Štart č.1 proteínový rebríček 2 – 250 kDa, štart č.2 – 5 kontrolné vzorky odoberané počas produkcie a purifikácie, štart č. 6 a č. 7 izoforma izolovaná pomocou HIS-tag purifikácie, štart.č 8 izoforma izolovaná pomocou GST-tag purifikácie.



Obrázok 15: Izoforma p53 γ -polyakrylamidový gél s SDS farbený s Coomassie Blue. Štarty sú homologické s obrázkom 14.

Na záver bol pripravený gél pre porovnanie všetkých troch izoforiem vyizolovaných s GST-tagom a HIS-tagom (Obrázok 16). Gél bol nechaný dlhšie vo vyvíjacom činidle, pre zosilnenie bendov, čo však spôsobil začernenie rebríčku. Ani pri tomto pokuse sa nám nepodarilo dobre zachytiť bendy po GST izolácii, z čoho vyplýva, že problémom bola nízka koncentrácia proteínov. Z tohto gélu vidíme, že izoforma p53 β má o niečo nižšiu veľkosť ako p53 α a p53 γ , čo je v súlade s literatúrou.



Obrázok 16: Porovnanie izoforiem p53 α , β , γ na PAGE – SDS gélu. Štart č.2 a č.3: izoformy p53 α , štart č.4 a č.5: izoformy p53 β , štart č.6 a č.7: izoformy p53 γ . HIS-tagom vyizolované proteíny sú v štartoch č.3, č.5 a č.7. GST-tagom izolované proteíny sú v štartoch č.2, č.4 a č.6.

5 ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo oboznámiť so základnými biotechnologickými princípmi prípravy rekombinantných proteínov. V teoretickej časti sú zhrnuté základné vlastnosti a štruktúra proteínov, popísané postupy prípravy rekombinantných proteínov a popísané jednotlivé expresné systémy. Cieľom experimentálnej časti bolo úspešne transformovať rekombinantný plazmid do mikroorganizmu *E.coli*, indukovať syntézu rekombinantného proteínu a porovnať izoláciu a purifikáciu s HIS-kotvou a GST-kotvou.

Bola prevedená úspešná transformácia všetkých troch skúmaných izoform rekombinantného proteínu p53 do buniek *BL21* na agarových miskách s antibiotikom. Pomocou negatívnej kontroly bola overená účinnosť antibiotika a samotnej transformácie. Pre indukciu a následnú izoláciu bola vybraná jedna transformovaná kolónia, ktorá bola osamostatnená pomocou krížového rozteru a následne preočkovaná do tekutého LB média.

Počas indukcie bola navodená transkripcia rekombinantných génov pridaním IPTG do kultúry, ktorá sa nachádzala v exponenciálnej fáze rastu. Pre úspešnú indukciu bolo potreba kultúru inkubovať s IPTG minimálne 4 hodiny. Pri vložení vzoriek do PAGE-SDS elektroforézy bolo zistené, že kultúra po indukcii vykazovala viditeľnejšie bendy na géle ako kultúra pred indukciu, z čoho vyplýva, že indukcia bola úspešná.

Po indukovaní boli rekombinantné proteíny vyizolované a purifikované pomocou komerčných kitov na HIS-tag a GST-tag purifikáciu. Pomocou HIS-tag purifikácie boli úspešne vyizolované izoformy rekombinantného proteínu p53 o koncentráciách 1,983 mg/ml u p53 α , 3,425 mg/ml u p53 β a 1,557 mg/ml u p53 γ . Dosiahnuté koncentrácie po GST-tag purifikáciách boli mnohonásobne menšie a to 0,849 mg/ml izoformy p53 α , 0,345 mg/ml p53 β a 0,294 mg/ml p53 γ . Problémom u GST-tag purifikácii mohla byť veľkosť tagu, čo je okolo 30 kDa. Vysoká záťaž veľkého fúzneho proteínu pravdepodobne viedla k vzniku inklúzných teliesok, z ktorých sa dajú proteíny vyizolovať veľmi ťažko.

Jednotlivé kontrolné frakcie boli analyzované aj na PAGE-SDS elektroforéze, ktorá potvrdila úspešnú prípravu rekombinantného proteínu. Veľkosť pripravených rekombinantných proteínov v eluáte činila okolo 50 kDa a 12 kDa. Podľa literatúry je veľkosť proteínu p53 okolo 50 kDa, čo je v súlade s našimi výsledkami [52]. Bend pri 12 kDa naznačuje čiastočnú fragmentáciu proteínu, čo je spôsobené nestabilitou a rýchlou degradáciou proteínu p53. Optimalizácia podmienok kultivácie a izolácie pre dosiahnutie čo najviac neporušeného proteínu bude podkladom pre pokračovanie práce v nadväzujúcej diplomovej práci.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] R. K. Murray, *Harperova biochemie*. Praha: H & H, 2002.
- [2] R. K. Scopes, “Overview of Protein Purification and Characterization”, v *Current Protocols in Protein Science*, J. E. Coligan, B. M. Dunn, D. W. Speicher, a P. T. Wingfield, Ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1995, s. 1.1.1-1.1.6.
- [3] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, a L. Stryer, “Protein Structure and Function”, *Biochemistry*. 5th edition, 2002.
- [4] Z. Vodrážka, *Biochemie*. Praha: Academia, 1996.
- [5] H. S. Stoker, *Organic and Biological Chemistry*. Cengage Learning, 2015.
- [6] W. Kauzmann, “The Three Dimensional Structures of Proteins”, *Biophys J*, roč. 4, č. 1 Pt 2, s. 43–54, jan. 1964.
- [7] A. V. Guzzo, “The Influence of Amino Acid Sequence on Protein Structure”, *Biophys J*, roč. 5, č. 6, s. 809–822, nov. 1965.
- [8] C.-X. Wang, D.-Q. Lin, T. Liu, a S.-J. Yao, “Hydrophobic charge-induction chromatographic resin with 5-aminobenzimidazol ligand: Effects of ligand density on protein adsorption”, *Separation Science and Technology*, roč. 51, č. 10, s. 1700–1707, júl. 2016.
- [9] D. P. Clark a N. J. Pazdernik, “Recombinant Proteins”, v *Biotechnology*, Elsevier, 2016, s. 335–363.
- [10] D. C. Andersen a L. Krummen, “Recombinant protein expression for therapeutic applications”, *Current Opinion in Biotechnology*, roč. 13, č. 2, s. 117–123, apr. 2002.
- [11] V. Brázda *et al.*, “The structure formed by inverted repeats in p53 response elements determines the transactivation activity of p53 protein”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, roč. 483, č. 1, s. 516–521, jan. 2017.
- [12] V. Brazda, P. Muller, K. Brozkova, a B. Vojtesek, “Restoring wild-type conformation and DNA-binding activity of mutant p53 is insufficient for restoration of transcriptional activity”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, roč. 351, č. 2, s. 499–506, dec. 2006.
- [13] B. R. Glick, J. J. Pasternak, a C. L. Patten, *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*, 4. ed. Washington, DC: ASM Press, 2010.
- [14] L. Gifre, A. Arís, À. Bach, a E. Garcia-Fruitós, “Trends in recombinant protein use in animal production”, *Microbial Cell Factories*, roč. 16, č. 1, dec. 2017.
- [15] S. Hanniffy *et al.*, “Potential and Opportunities for Use of Recombinant Lactic Acid Bacteria in Human Health”, v *Advances in Applied Microbiology*, roč. 56, Elsevier, 2004, s. 1–64.
- [16] C. Oliveira a L. Domingues, “Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, roč. 102, č. 1, s. 81–92, jan. 2018.
- [17] H. Gadgil, S. A. Oak, a H. W. Jarrett, “Affinity purification of DNA-binding proteins”, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, roč. 49, č. 1–3, s. 607–624, okt. 2001.
- [18] J. J. Lichy, J. L. Malecki, H. D. Agnew, D. J. Michelson-Horowitz, a S. Tan, “Comparison of affinity tags for protein purification”, *Protein Expression and Purification*, roč. 41, č. 1, s. 98–105, máj. 2005.
- [19] K. Terpe, “Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, roč. 60, č. 5, s. 523–533, jan. 2003.

- [20] G. Chaga, D. E. Bochkariov, G. G. Jokhadze, J. Hopp, a P. Nelson, “Natural poly-histidine affinity tag for purification of recombinant proteins on cobalt(II)-carboxymethylaspartate crosslinked agarose”, *Journal of Chromatography A*, roč. 864, č. 2, s. 247–256, dec. 1999.
- [21] E. Hochuli, H. Döbeli, a A. Schacher, “New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues”, *Journal of Chromatography A*, roč. 411, s. 177–184, jan. 1987.
- [22] A. Spriestersbach, J. Kubicek, F. Schäfer, H. Block, a B. Maertens, “Chapter One - Purification of His-Tagged Proteins”, v *Methods in Enzymology*, roč. 559, J. R. Lorsch, Ed. Academic Press, 2015, s. 1–15.
- [23] V. M. Bolanos-Garcia a O. R. Davies, “Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, roč. 1760, č. 9, s. 1304–1313, sep. 2006.
- [24] R. N. Armstrong, “Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases”, *Chemical Research in Toxicology*, roč. 10, č. 1, s. 2–18, jan. 1997.
- [25] D. B. Smith a K. S. Johnson, “Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase”, *Gene*, roč. 67, č. 1, s. 31–40, júl. 1988.
- [26] F. Schäfer, N. Seip, B. Maertens, H. Block, a J. Kubicek, “Purification of GST-Tagged Proteins”, v *Methods in Enzymology*, roč. 559, Elsevier, 2015, s. 127–139.
- [27] “Protino Glutathione Agarose 4B”, *BIOKÉ*. [Online]. Available at: <https://www.bioke.com/webshop/mn/745500.html>. [Cit: 03-máj-2019].
- [28] T. Ruml, M. Rumlová, a V. Pačes, *Genové inženýrství*, 1st vyd. Praha: VŠCHT.
- [29] J. Káš, M. Kodíček, a O. Valentová, *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005.
- [30] B. D. Hames, Ed., *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*, 3rd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press, 1998.
- [31] S. Y. Lee, Ed., *Systems biology and biotechnology of Escherichia coli*. Dordrecht: Springer, 2009.
- [32] F. Baneyx, “Recombinant protein expression in *Escherichia coli*”, *Current Opinion in Biotechnology*, roč. 10, č. 5, s. 411–421, okt. 1999.
- [33] G. L. Rosano a E. A. Ceccarelli, “Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges”, *Frontiers in Microbiology*, roč. 5, apr. 2014.
- [34] P. Olson *et al.*, “High-Level Expression of Eukaryotic Polypeptides from Bacterial Chromosomes”, *Protein Expression and Purification*, roč. 14, č. 2, s. 160–166, nov. 1998.
- [35] I. Ahmad *et al.*, “Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*”, *Protein Expression and Purification*, roč. 144, s. 12–18, apr. 2018.
- [36] M. Fathi-Roudsari, N. Maghsoudi, A. Maghsoudi, S. Niazi, a M. Soleiman, “Auto-induction for high level production of biologically active retreplase in *Escherichia coli*”, *Protein Expression and Purification*, roč. 151, s. 18–22, nov. 2018.
- [37] J. Yin, G. Li, X. Ren, a G. Herrler, “Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes”, *Journal of Biotechnology*, roč. 127, č. 3, s. 335–347, jan. 2007.

- [38] E. Böer, G. Steinborn, G. Kunze, a G. Gellissen, “Yeast expression platforms”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, roč. 77, č. 3, s. 513–523, nov. 2007.
- [39] D. Porro, M. Sauer, P. Branduardi, a D. Mattanovich, “Recombinant Protein Production in Yeasts”, *Molecular Biotechnology*, roč. 31, č. 3, s. 245–260, 2005.
- [40] J. M. Cregg, J. L. Cereghino, J. Shi, a D. R. Higgins, “Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*”, *Molecular Biotechnology*, roč. 16, č. 1, s. 23–52, 2000.
- [41] E. Łojewska, T. Kowalczyk, S. Olejniczak, a T. Sakowicz, “Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins”, *Protein Expression and Purification*, roč. 120, s. 110–117, apr. 2016.
- [42] J. K.-C. Ma, P. M. W. Drake, a P. Christou, “The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants”, *Nature Reviews Genetics*, roč. 4, č. 10, s. 794–805, okt. 2003.
- [43] T.-K. Huang a K. A. McDonald, “Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures”, *Biochemical Engineering Journal*, roč. 45, č. 3, s. 168–184, aug. 2009.
- [44] P. M. Doran, “Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures”, *Trends in Biotechnology*, roč. 24, č. 9, s. 426–432, sep. 2006.
- [45] H. Daniell, S. J. Streatfield, a K. Wycoff, “Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants”, *Trends in Plant Science*, roč. 6, č. 5, s. 219–226, máj. 2001.
- [46] O. S. Lau a S. S. M. Sun, “Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production”, *Biotechnology Advances*, roč. 27, č. 6, s. 1015–1022, nov. 2009.
- [47] E. A. McKenzie a W. M. Abbott, “Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells”, *Methods*, roč. 147, s. 40–49, sep. 2018.
- [48] J. J. Hodgson, N. Buchon, a G. W. Blissard, “Identification of insect genes involved in baculovirus AcMNPV entry into insect cells”, *Virology*, roč. 527, s. 1–11, jan. 2019.
- [49] T. Kost, “Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells”, *Current Opinion in Biotechnology*, roč. 10, č. 5, s. 428–433, okt. 1999.
- [50] I. M. Kidd a V. C. Emery, “The use of baculoviruses as expression vectors”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, roč. 42, č. 2–3, s. 137–159, aug. 1993.
- [51] S. Ghosh, Md. K. Parvez, K. Banerjee, S. K. Sarin, a S. E. Hasnain, “Baculovirus as Mammalian Cell Expression Vector for Gene Therapy: An Emerging Strategy”, *Molecular Therapy*, roč. 6, č. 1, s. 5–11, júl. 2002.
- [52] M. P. Khoury a J.-C. Bourdon, “The Isoforms of the p53 Protein”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, roč. 2, č. 3, s. a000927–a000927, mar. 2010.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

- α – izoforma α proteínu p53
- β – izoforma β proteínu p53
- γ – izoforma γ proteínu p53
- APS – peroxidisíran amónny
- bis – N,N'-metylenbisakrylamid
- CHO – vaječné bunky čínskeho škrečka
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- *E.coli* – *Escherichia coli*
- GST-tag – glutatión S-tranferázová kotva
- HBsAg – antigen proti Hepatitíde B
- HIS-tag – polyhistidínová kotva
- IPTG – Izopropyl β -D-tiogalaktopyranozid
- kDa – kilodalton
- LAB – bakterie mliečneho kvasenia
- LB – Luria-Bertani médium
- m-RNA – mediátorová ribonukleová kyselina
- Ni-NTA - nitrilotrioctan nikelnatý
- rpm – otáčky za minútu
- pI – izoelektrický bod aminokyselín
- SOC – Super Optimal broth with Catabolite repression
- SDS – dodecylsulfát sodný
- SDS-PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsulfátom sodným
- TEMED – N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
- Tris – tris(hydroxymetyl)aminometán