

Praktické cvičení:

Izolace a purifikace rekombinantního proteinu

Toto blokové praktické cvičení spočívá v teoretickém i praktickém seznámení s rekombinantními proteiny, jejich izolací, purifikací a využitím.

Mezi 3 hlavní praktická využití rekombinantních proteinů v praxi, které samozřejmě zahrnuje jejich izolaci a purifikaci, patří:

1. Získání biologicky aktivního proteinu (polymerázy, restrikční endonukleázy, reverzní transkriptázy a dalších enzymů).
2. Získání velkého množství správně složeného proteinu pro krystalizaci a následnou rentgenovou krystalografii a určení 3D struktury.
3. Získání velkého množství celého proteinu nebo jen jeho části za účelem imunizace a produkce monoklonálních, popř. polyklonálních protilátek (jejich použití pro další studium tohoto proteinu, využití v diagnostice apod.)

Úloha:

Izolace a purifikace rekombinantní *Taq*-DNA-polymerázy

Náplní tohoto praktického cvičení je transformace bakterií *Escherichia coli* plazmidem nesoucím gen pro enzym *Taq*-DNA-polymerázu, indukce bakterií pro jeho produkci, izolace a purifikace tohoto proteinu. Nakonec bude s tímto izolovaným a vyčištěným proteinem provedena PCR amplifikace, aby se studenti přesvědčili, že získali plně funkční protein se zachovanou biologickou aktivitou, srovnali jeho koncentraci s komerčně dostupnou *Taq*-DNA-polymerázou a vyjádřili úsporu při laboratorní produkci tohoto enzymu. Izolace a purifikace rekombinantního proteinu patří k rozšířeným technikám, které spojují genomickou a proteomickou praxi. Studenti si prakticky vyzkoušejí transformaci bakterií plazmidem, indukci exprese proteinu, izolaci proteinu a jednotlivé kroky jeho purifikace jednak vychytáním cílového proteinu s His-tagem pomocí afinitní chromatografie na TALONové kuličky a též alternativním postupem izolace za působení vyšší teploty a lyozymu. Dále budou během jednotlivých kroků purifikace odebírat vzorky polymerázy v různém stupni čistoty. Na konci cvičení s těmito vzorky provedou orientační elektroforézu v polyakrylamidovém gelu, kdy po obarvení tohoto gelu budou moci sledovat ubývání nežádoucích příměsí mezi jednotlivými kroky purifikace.

Plazmid nesoucí gen pro produkci enzymu *Taq*-DNA-polymerázy, který spadá pod patentovou ochranu, byl získán legálním způsobem od společnosti ADDGENE. Tato

nezisková společnost slouží jako depozitář plazmidů. Jakékoli využití většiny plazmidů z této sbírky pro nekomerční vědecké a výukové účely (tedy i plazmidu nesoucího gen pro produkci enzymu *Taq*-DNA-polymerázy) je povoleno na základě UBMTA (Uniform Biological Materials Transfer Agreement), odstavce II., článku 3 a).

Praktické provedení:

První den:

1. Z mrazáku $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ vyjmout mikroskopickou zkumavku označenou "BL-21" s kompetentními bakteriemi *E. coli* a mikroskopickou zkumavku s plazmidem označenou "*Taq* WT pET-24", obojí v ledové tříšti přenést do laboratoře a nechat rozmrazit na ledu (asi 5 minut).
2. Mikroskopické zkumavky velmi krátce zvortexovat, krátce zcentrifugovat na stolní minicentrifuze a obsah zkumavky s kompetentními bakteriemi přepipetovat do sterilní 1,5ml mikroskopické zkumavky (stále na ledu). K tomuto roztoku připipetovat 1 μl roztoku plazmidu (jeho koncentrace je $0,1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$).
3. Zkumavku s napipetovanou směsí nechat 30 minut na ledu, pak ji prstem protřepat a na 45 vteřin vložit do termobloku o teplotě $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po uplynutí této doby zkumavku okamžitě umístit do ledové tříště, připipetovat do ní 1 ml sterilního LB média bez antibiotika a 1 hodinu ji zavřenou nechat třepat v inkubátoru při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
4. Po uplynutí této doby zkumavku vyjmout a zcentrifugovat (2500 G, 2-3 minuty). Supernatant vylít a sediment lehce rozpustit pomocí pipety v 10 ml LB média s kanamycinem a nechat růst v 15ml falkonce s povoleným víčkem v inkubátoru ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za třepání přes noc.

Druhý den:

1. 100 ml sterilního LB média dát ve sterilní Erlenmayerově baňce vytemperovat v inkubátoru na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ cca půl hodiny. Po vytemperování do něj přidat zásobní roztok kanamycinu, aby jeho finální koncentrace v médiu byla $50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ a přepipetuje se do ní 1 ml LB média s bakteriemi, které se od předchozího dne temperovalo v inkubátoru.
2. Tento roztok nechat v inkubátoru ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, třepat) růst 1-5 hodin. Jakmile se roztok začne kalit rostoucími bakteriemi, je třeba změřit na spektrofotometru jeho OD při vlnové délce 600 nm. Jako blank se použije LB médium s antibiotikem, které bylo pro tyto účely též umístěno v inkubátoru, aby výsledek měření nebyl ovlivněn velkým teplotním rozdílem obou kapalin. OD by měla dosahovat hodnoty v rozmezí 0,3-0,4. Pokud ne, nechat

bakterie dále růst a měření po 15-30 minutách opakovat. (*1. frakce pro PAGE – 1 ml, zcentrifugovat, rozpustit v 0,1 ml 2 x vzorkového pufru*)

3. Jakmile dosáhne roztok s bakteriemi žádané hodnoty OD, přidat k němu roztok IPTG tak, že na 1 ml roztoku LB média s rostoucími bakteriemi se přidá 1 μ l zásobního vodného roztoku IPTG o koncentraci 1 mol/l a přisype se L-arabinóza (1 g na 0,5 l média) a roztok vrátit do inkubačního boxu do 37 °C, kde se bakterie nechají růst dalších 5 hodin. (*2. frakce pro PAGE – 1 ml, zcentrifugovat, změřit OD a upravit na stejnou hodnotu s 1. frakcí /1 ml/, rozpustit v 0,1 ml 2 x vzorkového pufru*)
4. Po této době LB médium s bakteriemi vyjmout z inkubátoru, rozlít do 50ml falkonek a centrifugovat při 3000 G, 15 min ve 4 °C.
5. Supernatant vylít a sediment resuspendovat v jedné z falkonek v 15-20 ml lyzačního pufru dohromady ze všech centrifugovaných falkonek. Tu opět zcentrifugovat při 3000 G, 15 min ve 4° C).
6. Supernatant opět vylít a sediment umístit přes noc do dalšího dne v mrazáku v –80 °C (v tomto bodě je možné práci přerušit a sediment nechat dlouhodobě zamražený pro pozdější purifikaci).

Třetí den:

1. Sediment vyjmout z mrazáku, rozmrazit na ledu a resuspendovat v 5 ml lyzačního pufru (obvykle 1/20 objemu média s rostoucími buňkami). Přidat 0,1 ml roztoku 0,1 mol/l PMSF (inhibitor proteáz) tak, aby jeho finální koncentrace v roztoku byla 1 mmol/l PMSF. Rozpuštění sedimentu je problematické, a proto se provádí cca 10 minut s použitím vortexu, kdy se cca 20 vteřin roztok vortexuje, 20 vteřin je umístěn v ledu a toto se stále dokola opakuje. (*3. frakce pro PAGE – 50 μ l, rozpustit v 50 μ l 2 x vzorkového pufru*)
2. Po resuspendování sedimentu v lyzačním pufru s PMSF přidat 1 ml právě rozmrazeného zásobního roztoku lysozymu, aby jeho koncentrace v roztoku byla 4 mg/ml a falkonku s rozpuštěným sedimentem inkubovat 15-20 minut při laboratorní teplotě.
3. Obsah falkonky inkubovat v lázni 1 hodinu při 72 °C; při tom občas opatrně promíchat překlápěním. Pak zchladit na ledu, aby její obsah opět dosáhl laboratorní teploty.
4. Následuje centrifugace 10 minut při 13000 G ve 4 °C. Supernatant teď obsahuje téměř výhradně *Taq*-DNA-polymerázu jen s velmi malým znečištěním jinými proteiny. Supernatant slít do čisté 15ml falkonky a použít pro následnou purifikaci *Taq*-DNA-polymerázy. (*4. frakce pro PAGE – 50 μ l, rozpustit v 50 μ l 2 x vzorkového pufru*)

Purifikace polymerázy:

A – purifikace pomocí TALONových kuliček (stále třetí den):

1. K supernatantu s *Taq*-DNA-polymerázou připipetovat 500-1000 μ l roztoku s TALONovými kuličkami a falkonku s touto směsí umístit do rotátoru a s ním do lednice, kde se nechá překlápět jednu hodinu. Pak ji zcentrifugovat při 300 G 5 minut ve 4 °C. (5. frakce pro PAGE – 50 μ l, rozpustit v 50 μ l 2 x vzorkového pufru)
2. Supernatant vylít a sediment opět resuspendovat ve 20 ml lyzačního pufru a nalít do kolonky. V ní promýt 10 ml lyzačního pufru, aby se vymyly všechny nespecificky navázané proteiny.
3. Kolonku promýt 0,5 ml lyzačního pufru s imidazolem v koncentraci 50 mmol/l a vytékající tekutinu jímat. Dále promýt 3 ml EDTA pufru o koncentraci 50 mmol/l a vytékající kapalinu opět jímat. (6. frakce pro PAGE – 10 μ l, rozpustit v 10 μ l 2 x vzorkového pufru)
4. Získanou kapalinu s enzymem přenést pomocí 10ml pipety do dialyzační membrány Spectra/Por4 a zavázat provázkem, aby kapalina nevytekla (membrána byla asi 10 minut před tím namočená v PBS pufru, aby zvláčněla a na jednom konci zavázána provázkem) a nechat dialyzovat ve 2l kádince na míchačce v lednici proti PBS do večera, večer pufr vylít, vyměnit za nový PBS a opět nechat na míchačce v lednici do rána.

Čtvrtý den (purifikace proteinu pomocí TALONových kuliček):

1. Následuje dialýza dvakrát hodinu proti *Taq* dialyzačnímu pufru. Mezi první a druhou dialýzou proti tomuto pufru enzym v dialyzační membráně sesunout dolů, ustříhnout její zbytečný kus a enzym opět dialyzovat proti *Taq* storage pufru. Pak membránu rozstříhnout a přemístit veškerou tekutinu, která byla uvnitř do falkonky a k ní přidat stejný objem glycerolu vychlazeného v lednici. (7. frakce pro PAGE – 10 μ l, rozpustit v 10 μ l 2 x vzorkového pufru)
2. Otestovat koncentraci enzymu v PCR a podle potřeby naředit
3. Enzym uložit v –20 nebo –80 °C

B – purifikace pomocí dialýzy (stále třetí den):

1. Supernatant s *Taq*-DNA-polymerázou přelít do dialyzační membrány Spectra/Por4 (membrána byla asi 10 minut před tím namočená v PBS pufru, aby zvláčněla a na jednom konci zavázána provázkem) a dialyzovat vůči PBS ve 2l kádince na magnetické míchačce

v lednici do večera, večer pufr vylít, vyměnit za nový PBS a opět nechat na míchačce v lednici do rána.

Čtvrtý den (purifikace proteinu pomocí dialýzy):

1. Následuje dialýza dvakrát hodinu proti *Taq* dialyzačnímu pufru. Mezi první a druhou dialýzou proti tomuto pufru enzym v dialyzační membráně sesunout dolů, ustříhnout její zbytečný kus a enzym opět dialyzovat proti *Taq* storage bufferu. Pak membránu rozstříhnout a přemístit veškerou tekutinu, která byla uvnitř do falkonky (5*. *frakce pro PAGE – 10 µl, rozpustit v 10 µl 2 x vzorkového pufru*) a k ní přidat stejný objem glycerolu vychlazeného v lednici.
2. Otestovat koncentraci enzymu v PCR a podle potřeby naředit.
3. Enzym uložit v –20 nebo –80 °C.

Pozn. 1: Kontrolní PCR s novou polymerázou:

Složení PCR mixu pro 6 vzorků (včetně započítaných ztrát při pipetování):

Deionizovaná voda	45 µl
<i>Taq</i> reakční pufr 10 x	6,7 µl
Roztok MgCl ₂ o koncentraci 25 mmol/l	4,0 µl
Roztok dNTPs o koncentraci 20 µmol/l	0,7 µl
Primer F o koncentraci 10 µmol/l	3,3 µl
Primer R o koncentraci 10 µmol/l	3,3 µl
<i>Taq</i> -DNA-polymeráza	0,4 µl (komerční)

Mikrozkumavku po napipetování všech složek zvortexovat a krátce zcentrifugovat.

Každá reakce sestává z 9 µl PCR mixu a 1 µl roztoku DNA o koncentraci 50 µg/ml.

Pro test se ve cvičení získaný roztok *Taq*-DNA-polymerázy naředí 1:10 a zkusí se ve výše uvedeném PCR mixu v objemu 0,1; 0,5; 1,0 a 2 µl (na základě objemu polymerázy se upraví objem vody v PCR směsi tak, aby celkový objem voda + polymeráza použitý pro PCR byl dohromady 45,4 µl.

Časový a teplotní profil PCR reakce:

94 °C: 5 min

35 x: 94 °C: 30 s

XX °C: 30 s (teplota annealingu podle použitých PCR primerů)

72 °C: 45 s

72 °C: 7 min

Pozn. 2: Elektroforetická separace vzorků *Taq*-DNA-polymerázy a příměsných proteinů 1-7 (resp. 5*) se provede podle návodu ve skriptech „Navrátil *et al.* (2004): Základní praktická cvičení z molekulární biologie. UPOL, Olomouc.“, která jsou k dispozici na webové stránce <http://genetika.upol.cz> . Použije se postup PAGE elektroforézy z úlohy 15 s dělicím gelem o koncentraci 7,5 %.

Pátý den:

Vyhodnocení PAGE elektroforézy proteinů a provedení agarózové elektroforézy se vzorky PCR a vyhodnocení koncentrace získané polymerázy.

Použité roztoky:

EDTA pufr o koncentraci 50 mmol/l:

14,61 g EDTA

rozpustit v 900 ml deionizované vody a upravit pH na hodnotu 8

upravit objem deionizovanou vodou na 1 l

IPTG 1 mol/l:

0,2383 g IPTG (izopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid)

rozpustit v 0,85 ml deionizované vody

rozpipetovat do 0,2ml mikrozkušavek po 0,1 ml a zamrazit v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Kanamycin, zásobní roztok 50 mg/ml:

50 mg kanamycin sulfátu

0,85 ml vyautoklávované deionizované vody

rozpipetovat do 0,2ml mikrozkušavek po 0,1 ml a zamrazit v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

LB médium:

25 g LB-Miller

rozpustit v 1 l deionizované vody, vyautoklávovat a uchovat v lednici

před použitím protřepat

LB médium s kanamycinem:

25 g LB-Miller

rozpustit v 1 l deionizované vody, vyautoklávovat

po vychladnutí přidat 1 ml zásobního roztoku kanamycinu 50 mg/ml

před použitím protřepat

Lysozym, zásobní roztok:

440 mg lysozym

rozpustit v 10 ml deionizované H₂O

rozpipetovat do 1,5 ml mikrokumavek po 1 ml a zamrazit v -20 °C

Lyzační pufr:

2,42 g TRIS

5,84 g NaCl

rozpustit v 900 ml deionizované vody a pomocí HCl upravit pH na hodnotu 8

upravit objem deionizovanou vodou na 1 l, vyautoklávovat a uchovat v lednici

MgCl₂ 25 mol/l pro *Taq*-DNA-polymerázu:

0,508 g MgCl₂·6H₂O

po rozpuštění doplnit deionizovanou vodou na 100 ml

vyautoklávovat, rozpipetovat do 1,5 ml mikrokumavek a zamrazit v -20 °C

PBS pufr:

8 g NaCl

0,2 g KH₂PO₄

2,9 g Na₂HPO₄·12H₂O

0,2 g KCl

rozpustit v 900 ml deionizované vody a pomocí HCl upravit pH na hodnotu 7,4

upravit objem deionizovanou vodou na 1 l a uchovat v lednici

PMSF 0,1 mol/l:

0,174 g PMSF (fenylmethylsulfonylfluorid)

rozpustit v 7 ml v methanolu

upravit objem methanolem na 10 ml a uchovat v -20 °C

Taq dialyzační pufr:

20 ml Tris-HCl pufr, 1 mol/l, pH 7,4

7,46 g KCl

0,154 g Dithiothreitol

0,029 g EDTA

5 ml Triton X-100

rozpustit v 900 ml vyautoklávované deionizované vody

po rozpuštění všech složek doplnit objem deionizovanou vodou na 1000 ml a uložit v lednici

Taq reakční pufr 10 x:

1,211 g Tris (nebo 6,7 ml roztoku Tris 1 mol/l)

rozpustit v 80 ml deionizované vody a pomocí HCl upravit pH na hodnotu 9

3,73 g KCl

1 ml Triton X-100

po rozpuštění doplnit deionizovanou vodou na 100 ml

vyautoklávovat, rozpipetovat do 1,5ml mikrozkuvek a zamrazit v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Taq storage pufr:

20 ml Tris-HCl pufr, 1 mol/l, pH 7,4

7,46 g KCl

0,154 g Dithiothreitol

0,029 g EDTA

5 ml Triton X-100

rozpustit ve 400 ml vyautoklávované deionizované vody

doplnit objem deionizovanou vodou na 500 ml

přidat 500 ml glycerolu

po rozmíchání uložit v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tris-HCl pufr, 0,5 mol/l, pH 6,8

60,57 g Tris

rozpustit v 900 ml deionizované vody a upravit pH pomocí HCl na hodnotu 6,8

upravit deionizovanou vodou objem na 1 l

Tris-HCl pufr, 1 mol/l, pH 7,4

121,14 g Tris

rozpustit v 900 ml deionizované vody a upravit pH pomocí HCl na hodnotu 7,4

upravit deionizovanou vodou objem na 1 l

Vzorkový pufr 2 x:

256 ml Tris-HCl pufr, 0,5 mol/l, pH 6,8

200 ml Glycerol

200 ml 10% SDS

přidat 300 ml deionizované vody a rozmíchat

upravit deionizovanou vodou objem na 1 l