

M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

**Laborleirat - Expresszált Fehérje tisztítás
2018.10.10.**

Laborvezető: Bata Zsófia, Bell Evelin, Molnár Zsófia

A laborleiratot Molnár Bence György Szakdolgozata alapján Bata Zsófia készítette.

**Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék
2018/19 őszi félév**

BEVEZETÉS, A GYAKORLAT CÉLJA

A gyakorlat során heterogén expressziós rendszerben, rekombináns úton termelt fehérjét fogunk elválasztani a nem kívánatos sejtalkotóktól. Az elválasztás során a fehérjéhez fuzionáltatott His10-tag szelektív kikötődését fogjuk kihasználni, kétértékű fémekhez való komplexképzéssel. Az elválasztás hatékonyságát SDS-PAGE-el vizsgáljuk, míg tisztított fehérje minőségét a funkciója segítségével ellenőrizzük.

GYAKORLAT ELMÉLETI HÁTTERE

Wunderlich Lívius: Molekuláris biológiai technikák, ISBN 978 963 279 174 6 Tankönyv, 3. fejezet: Elválasztási technikák. A tankönyv ingyenesen letölthető a InterKönyv honlapjáról. (https://www.interkonyv.hu/konyvek/wunderlich_molekularis_biologiai_tehnikak). A teljes fejezet felrészítése javasolt a gyakorlatra felkészülés során, a 3.3 és 3.4-es alfejezetek ismerete elengedhetetlen a gyakorlat sikeres teljesítéséhez.

A GYAKORLAT LEÍRÁSA

1. PfPAL termelés

A PfPAL¹ (*Pseudomonas fluorescens*) inzertet tartalmazó plazmidot *E.coli* Rosetta törzsbe transzformáltuk. A Rosetta törzs olyan eukarióta fehérjék termelésére lett kialakítva BL21 törzsből, amik az *E. coli*-ban ritkán található kodonokat igényelnek a szintézishez. A Rosetta törzs magas tRNS szinttel rendelkezik a következő kodonokra nézve: AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA. A Rosetta törzs chloramphenikol rezisztenciát hordoz, míg a plazmidon ampicilin rezisztencia található, így a transzformálást követően chloramfenikolt és carbenicilint (ampicilinnel hasonló hatású) tartalmazó 5ml-es LB táptalajon 16 órán (egy éjszaka alatt) 37°C-on, 200 rpm-en rázatva felnövesztettük, így kaptuk az U.N. előkultúrát.

Az előkultúrából 2*1 ml-el beoltottunk 2*500 ml LB táptalajt. A kultúra felszaporítása 600 nm-en mért optikai sűrűség (OD₆₀₀)=0.44-ig 37 °C-on történt, majd 1 mM izopropil β-D-1-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) indukáltuk a fehérje termelését. 0.3–0.6 OD értéknél a sejtek az exponenciális növekedési fázisban vannak, ahol a legtöbb célfehérjét tudjuk velük előállítani. Ekkor egy allolaktóz analógot, ami ellenáll a β-galaktozidáznak, az IPTG-t adtuk a tápoldatba, ami indukálja a lacI operont, és ezen keresztül a célfehérje termelését. Két párhuzamos kultúrával dolgozunk az optimális fehérjetermelési hőmérséklet megtalálására. Indukálás után 28 °C-ra változtattuk a hőmérsékletet. A fehérjetermelés követésére mintákat vettünk közvetlenül az indukálás előtt, és az indukálás végén 6 órával később. Ezeket a mintákat SDS-PAGE –vel fogjuk megvizsgálni a laborgyakorlat során.

(MINTA 1, MINTA 2)

A mintavételezés során 200 µl sejtszuszpenziót centrifugáltunk, a leülepedett sejteket pedig 20 µl lízis pufferbe szuszpendáltuk. A lízis puffer (150 mM NaCl, 50 mM TRIS pH = 8.0) feladata, hogy a sejtben uralkodó ionerősséget fenntartsa ezzel a fehérjék számára kedvező körülményt kialakítva. Ezután mintakotélt (62.5 mM TRIS, 25% glicerin, 2% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 0.01% brómfenolkék, 350 mM ditiotreitól (DTT), pH=6.8 (25

°C)) adtunk hozzá, hogy a poliakrilamid gélen látszódjon a minta haladása, és 98 °C-on 3 percig hőkezeltünk. A DTT a biokémiai munkák során gyakran használt redukálószer, a fehérjék diszulfid-hidjainak kialakulását gátolja.

2. Sejtfeltárás

A termelés után a sejtszuszpenziót Ultracentrifugával 8 000 g, 20 percig 4°C-ra hűtve ülepitettük, majd leöntöttük a felülúszót. **Ettől a lépéstől kezdve végig jégbehűtve, illetve előhűtött pufferekkel dolgozunk!** A *PfPAL* sejt pelletet lízis pufferbe felszuszpendáltuk (egy 500 ml -es kultúrából származó sejt pellethez 50 ml lízis puffert használtunk).

1. táblázat. A *PfPAL* lízis puffer összetétele.

Puffer	Összetétel
PfPAL lízis puffer	150 mM NaCl, 50 mM HEPES, 0,5 mM EDTA <u>Közvetlenül használat előtt hozzáadva:</u> 1 mM BA, 2 mM PMSF, 1 mM TCEP Spatulahegyni DNáz, és lizozim 15 mM Imidazol pH = 8,0

Az EDTA kelátképző vegyület amely komplexálja a metalloproteázokban található fémionokat. Ugyan az EDTA képes komplexálni a gyanta Ni ionjait, a használat során nem tapasztaltunk kapacitás csökkenést és Ni szennyeződést a mintákban mivel minden bizonnyal a lizált sejtekből felszabaduló fém teljesen mértékben komplexálni képes a 0,5 mM EDTA-t. A BA és a PMSF szerin proteáz inhibitorok, a TCEP redukálószer a diszulfid-hidak kialakulásának meggátolására. A lizozimot a sejtfal lebontása, a DNáz pedig a DNS lebontása miatt adjuk az oldathoz, mivel a DNS rátekeredhet a fehérjékre, ami megnehezíti a fehérje tisztítását. Imidazol a Nikkel-nitrilotriecetsav (Ni-NTA) oszlopra aspecifikusan kötődő fehérjék miatt adtunk a lízis pufferhez, hogy kevesebb fehérjeszennyeződés kötődjön aspecifikusan Ni-NTA gyantára a tisztítás során.

Először mechanikus sejtfeltárást végeztünk, potterezéssel. Ilyenkor a nyíróerő hatására roncsolódnak a sejtfalak, illetve a sejtmembránok. Ezután ultrahangos sejtfeltárás következett Bandelin Sonopuls HD 2070 készülékkel. A szonikálást *PfPAL*-nál: 3x2.5 perc 2.5 perces pihentetésekkel végeztük. Ultrahangos kezelés során felmelegedhetnek az oldatok, így minden szonikálási ciklus után pihentetni kellett a szuszpenziót, mert a felmelegedés károsíthatja a fehérjét. A feltárás után ki kellett ülepitni a sejt törmeléket, ehhez 4°C -on 45 percig 20000 g-vel centrifugáltuk a mintákat, majd a felülúszót 50 ml-es falcon csövekbe helyeztük át. **Ez a felülúszó lesz a kiindulási anyag a gyakorlat során.**

3. Fehérje tisztítása

A PfpAL-t His-taggal ellátott formában expresszáltuk. Az ilyen fehérjék elválasztására gyakran alkalmazott módszer a Ni-NTA affinitás kromatográfia. A hisztidin imidazol gyűrűje komplexet képez a nikkell-ionokkal, amik a nitrilotriecetsavval vannak immobilizálva. Az elúciót imidazol oldattal végzik, ami kiszorítja a fehérjét a nikkellel alkotott komplexből.

A gyakorlat során gravitációs oszlopokba töltött a kereskedelmi forgalomban kapható Ni Sepharose² (**Gyanta 1**) gyantán fogjuk elválasztani a sejteltávolításból származó felülúszóból a célfehérjénket a PfpAL-t. A kereskedelmi gyantával párhuzamosan kipróbáljuk a Műegyetemen fejlesztett affinitásanyagot (**Gyanta 2**), amely egy polimetilmetakrilát kereskedelmi forgalomban kapható polimer (Resindion HA403/S) etiléndiamin-tetraecetsavval történő módosításával állítunk elő. A könnyebb összehasonlítás érdekében ez a hordozó is nikkell ionokat tartalmaz a felületen komplexálva.

A kereskedelmi Ni-NTA gyanta a felhasználás előtt előkezelést igényel. 20%-os etanolban tároljuk két felhasználás között, így használat előtt a gyantát vízzel, majd LS pufferrel mostuk (2. táblázat). Ez a fehérje számára kedvező körülmény, így a minta oszlopra vitelekor elkerülhetjük a kicsapódást. A saját fejlesztésű, polimer hordozót az oszlopba töltés után 1 oszloptérfogatnyi LS pufferrel átmoszuk. Mind a két esetben 1 ml gyantát használunk. A felülúszó felvitele után a 2. táblázatban felsorolt oldatokkal mossuk a gyantákat. Az LS és HS oldatokból 2-2 oszlop-térfogatnyit használunk, míg az imidazolos mosások során Bradford-reagenssel mérjük a fehérje mennyiségét az oszlopon átfolyó oldatban. Ebben Coomassie Brilliant Blue G-250 festék található, ami a fehérjékhez savas közegben kötődve kék színű oldatot ad. 2 µl mintához 20 µl 5x higított Bradford reagenst adunk, és addig folytatjuk a mosást az adott imidazolos oldattal, amíg sötétkék színreakciót észlelünk.

2. táblázat. A PfpAL tisztításához használt pufferek összetétele.

Puffer	Összetétel
Low Salt puffer (LS)	30 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH = 8,0
High Salt puffer (HS)	300 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH = 8,0
Imidazol I	25 mM imidazol, 30 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH = 8,0
Imidazol II	500 mM imidazol, 30 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH = 8,0
Imidazol III	1 M imidazol, 30 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH = 8,0

Az affinitás kromatográfias tisztítás során a különböző mosó folyadékokat külön gyűjtjük, melyek összetételét SDS-PAGE-el vizsgáltuk.

MINTA 5-10 Gyanta 1, MINTA 11-16 Gyanta 2

4. Minták összetételének vizsgálata SDS-PAGE-vel.

A fehérjékkel való munka során a minták összetételét SDS-PAGE-vel (nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel) vizsgáltuk. Az SDS-PAGE fehérjeanalitikai módszer, amellyel a fehérjéket tömegük alapján tudjuk elválasztani. Az SDS hidrofób kölcsönhatásokat hoz létre a fehérje belsejében lévő aminosavakkal, kitekerve azt és

a szulfátcsoport miatt az egész fehérje felszínét negatív töltéssel burkolja be, így a fajlagos töltése minden fehérjének azonos lesz. Ezzel a módszerrel elérhető, hogy elektromos erőterbe helyezve a fehérjéket csak a tömegük határozza meg a haladási sebességüket a pozitív elektród felé. A kisebb molekulák gyorsabban, a nagyobbak lassabban fognak haladni.

A gél akrilamidból áll, ami biszakrilamiddal polimerizálva térhálós szerkezetet alakít ki és gél képződik. A polimerizáció elindításához ammónium-perszulfátot (APS) és tetrametiléndiamin (TEMED) katalizátorokat adunk. Kétfázisú gélt használtunk. Az alsó gélen (12%-os akrilamid tartalom, pH=6,8) történik az elválasztás, a felső (4%-os akrilamid tartalom, pH=8,8) pedig a fehérjéket tömöríti, hogy az elválasztó gélbe való belépés egyszerre történjen meg. A tömörítő gél összetételét pedig a **3. táblázat**, az elválasztó gél összetételét a **Error! Reference source not found.** tartalmazza. A futtatást 0,025 M Tris, 0,192 M glicin, 1% SDS pH=8,3 pufferben végeztük.

3. táblázat. SDS-PAGE gél összetétele 1 géltre.

Összetétel	Mennyiség 4% [μ l]	Mennyiség 12 % [μ l]
Desztillált víz	800	1650
10% (W/V) SDS	12,5	37,5
Tömörítő puffer (0.5 M Tris-HCl pH=6.8)	312,5	812,5
40% (W/V) akrilamid	121,5	1125
10% (W/V) APS	12,5	37,5
TEMED (tisza, \geq 99%)	2,5	3,75

Két gélt futtatunk, melyek mindegyik 10-10 zsebet tartalmaz, melyekbe maximum 15 μ l minta fér.

4. táblázat. SDS-PAGE –re felvitt minták

Zseb sorszáma	Minta neve	Mennyiség	Zseb sorszáma	Minta neve	Mennyiség
1	MINTA 1	3 μ l	1	Üres	
2	MINTA 2	3 μ l	2	MINTA 3	3 μ l
3	Létra	2.5 μ l	3	MINTA 4	3 μ l
4	MINTA 5	3 μ l	4	Létra	2.5 μ l
5	MINTA 6	15 μ l	5	MINTA 11	3 μ l
6	MINTA 7	15 μ l	6	MINTA 12	15 μ l
7	MINTA 8	15 μ l	7	MINTA 13	15 μ l
8	MINTA 9	15 μ l	8	MINTA 14	15 μ l
9	MINTA 10	10 μ l	9	MINTA 15	15 μ l
10	Üres		10	MINTA 16	10 μ l

Az SDS-PAGE gélelektroforézis során PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder markert használtunk, mely ismert mól tömegű komponenseket tartalmaz, így megkönnyíti a keresett mintákban levő fehérjék azonosítását. 200 V feszültséget alkalmaztunk a futtatáshoz, ami kb. 45 percig történt. Az elválasztás végén a gélt Coomassie festékkel festettük.

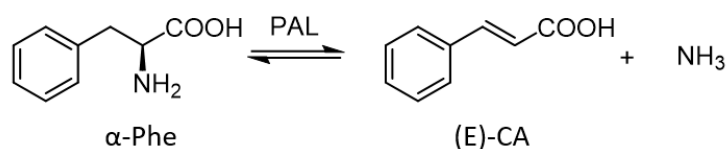
5. PfPAL mennyiségének meghatározása

A fehérje koncentrációját NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific) spektrofotométer segítségével végezzük, mely kis térfogatú minta abszorbanciáját is megfelelő pontossággal méri. NanoDrop segítségével nem küvetében, hanem közvetlenül az optikai mérőfelületre pipettázott kis mennyiségű (2 µl) mintából történik a mérés, melynek alapja a vizsgált fehérje 280 nm-en mutatott saját UV-elnyelésének detektálása. Ezen a hullámhosszon ugyanis a fehérjéket felépítő aromás aminosavak (elsősorban a triptofán és tirozin) erős elnyelést mutatnak. A fotométer által mért abszorbancia értékéből számítógépes szoftver a Lambert-Beer törvény ($A = \varepsilon * l * c$) alapján számítja ki a minta fehérjekoncentrációját. Az optikai úthossz NanoDrop mérés esetében 0,1 cm, a fajlagos extinkciós koefficiens értéke pedig a mérendő fehérje aminosav összetétele alapján számítható. ProtParam internetes szoftver alapján a termelt PfPAL fehérje esetében ez $46410 M^{-1} cm^{-1}$ ($\varepsilon(1\%) 7.86 L mg^{-1} cm^{-1}$). Az enzimet nem tartalmazó „üres” puffer oldatok (háttér) abszorbanciájával korrigáljuk a fehérjekoncentrációkat. Minden mérést 3 ismétléssel végeztem, majd a kapott koncentrációadatokat átlagát vettem.

6. PfPAL enzimaktivitás mérés (Enzim minőség ellenőrzése)

(Ehhez a részhez nézzék át az Enzimkinetika gyakorlat jegyzőkönyvét, illetve ennek elméleti háttérét.)

A PfPAL minőségét aktivitás méréssel is ellenőrizzük, a természetes enzimreakció sebességének mérésével.



Ábra 1: PfPAL természetes reakciója

A PfPAL aktivitását a termék (fahéjsav) abszorbanciájának spektrofotometriás mérése alapján határozzuk meg. Méréseimet, 1 cm optikai úthosszal rendelkező poli(metil-metakrilát) (PMMA) küvetében, 1 ml végtérfogatban, az enzim szubsztrátját (L-fenilalanin) változó koncentrációban tartalmazó 100 mM Tris pufferben végezzük. Alkalmazott koncentrációk: 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25 mM. Háttérnek mindig az adott koncentrációjú L-fenilalanin oldatot vesszük, erre „blankoljuk” a fotométert az enzim hozzáadása előtt. Az alkalmazott enzimkoncentráció mindig 0,01 mg/ml, így a reakciót a 0,01 mg enzim bemérésével indítjuk el reakcióelegy homogenizálásával. A jelváltozást 290 nm hullámhosszon Jasco 750 termosztálható spektrofotométert használva követjük. Kinetikai méréseknél fontos a hőmérsékletet állandó értéken tartani, így 30 °C-ra termosztált méréseket végezzük. A puffer pH-ját azonban szobahőmérsékleten állítottuk be 9.0-ra, így 30 °C-on megkaptuk a megfelelő, pH=8.8 értéket. A méréseket 5 percig végeztük és a spektrofotométer minden másodpercben regisztrálta az abszorbancia értéket.

A regisztrált abszorbancia értékekből a Lambert-Beer törvény ($A = \varepsilon * l * c$, $\varepsilon=10\,000\text{ cm}^{-1}\text{ mM}^{-1}$) alapján számítjuk ki az egyes időpillanatokban mérhető fahéjsav koncentrációját, melyeket az idő függvényében pontdiagramon ábrázoljuk. Az ábrázolt pontokra egyenest illesztünk, melynek meredeksége megadta a kezdeti reakciósebességet (v_0). Minden esetben ellenőrizzük, hogy a szubsztrát fogyasztás nem haladja meg a 10%-ot.

Határozzuk meg az enzim kezdeti sebességét állandó enzimkoncentráció és különböző szubsztrát koncentrációk esetén, és ábrázoljuk ezeket a szubsztrátkoncentráció függvényében. A Michaelis-Menten egyenletnek megfelelő hiperbolát az adatpontokra illesztve határozzuk meg a maximális reakciósebességet (v_{\max}) és a Michaelis-állandót (K_M).

$$v_0 = \frac{v_{\max} * [S]}{K_M + [S]}$$

Határozzuk meg az enzim átviteli számát (k_{cat}) a maximális reakciósebességet az enzimkoncentrációval osztva: $k_{\text{cat}}=v_{\max}/[E]$

$M_{\text{PFPAL}}=59018.28\text{ g/mol}$

Határozzuk meg az enzim katalitikus hatékonyságát is.

JEGYZŐKÖNYV KÖVETELMÉNYEK

A lényeg, hogy a jegyzőkönyv elejétől a végéig reprodukálható legyen! A mértékegységek megfelelő használata minimum követelmény. Hiányzó vagy nem megfelelő mértékegységek esetén a jegyzőkönyvet nem fogadjuk el, és a javítása szükséges!

A jegyzőkönyvben saját szavaival röviden fogalmazza meg a laborban elvégzett feladatokat. Majd a mérési adatok és a labortapasztalatai alapján válaszolja meg az alábbi kérdéseket.

1. Értelmezze az SDS gélképen látottakat! (Melyik mintában mennyi fehérje volt található? Melyik mintában található a célfehérje, kielégítő-e a fehérje tisztasága? Maradt-e az oszlopon kötött fehérje?)
2. Értékelje melyik gyanta volt jobb! Legalább három szempontból hasonlítsa össze a két vizsgált gyantát és indokolja meg, hogy melyik a megfelelőbb rutin laboratóriumi illetve ipari felhasználásra! (Kapacitás, munka könnyűsége, kapott fehérje tisztasága, stb.)
3. Mennyi fehérjét sikerült összesen előállítani? Mit gondol jó kitermelés ez?
4. Számítsa ki a K_M és k_{cat} értékét az enzimnek a kinetikai mérések alapján, az enzimkinetika gyakorlaton tanultak alapján. Hasonlítsa össze az irodalomban1 leírt adatokkal (a hivatkozott cikkben az általunk vizsgált fehérje PFXAL-ként szerepel)! Mint gondol, szignifikánsan különböző adatot mértünk?

(v_0 kezdeti sebesség értékek ábrázolása S_0 függvényében, a 0;0 pont ábrázolásával együtt. Az egyenesre Michealis-Menten görbe illesztése (ld. Korábbi laborleirat és segédlet), az egyenes egyenlete, az illesztés R^2 együtthatója feltüntetésével. A kapott v_{\max} és K_M értékek megadása. (Tengelyfeliratok, mértékegységek, diagramcím ugyancsak szükségesek.) Kiugró pontok esetén a fentebb ismertetett 2 megoldás közül bármelyik választható. Az illesztett görbe értékelése.

k_{cat} és K_M megadása, illetőleg a katalitikus hatékonyság kiszámítása, ezek értékelése. A feltüntetett értékek tizedesjegyeinek száma reális legyen a mérés hibájához képest.)

AZ ÉRTÉKELÉS SZEMPONTJAI

Felkészültség (A sikeres beugró ZH feltétele a gyakorlaton való részvételnek!)

A beugró anyaga ez a jegyzet és az órai előadás. A beugró feladatok között számolási feladatokra is lehet számítani, ezért mindenkinél saját számológép szükséges a gyakorlatra. Az órai aktivitás az elfogadott jegyzőkönyv pontszámát tört pontszám esetén felfelé kerekítheti.

Gyakorlaton vezetett jegyzőkönyv + számolás otthon

A gyakorlat során a munkavédelmi és biztonságtechnikai előírások betartása kötelező!

¹ P. Csuka, V. Juhász, Sz. Kohári, A. Filip, A. Varga, P. Sátorhelyi, L. Cs. Bencze, H. Barton, Cs. Paizs, L. Poppe: *Pseudomonas fluorescens* Strain R124 Encodes Three Different MIO Enzymes, ChemBioChem, Volume19, Issue4 2018, Pages 411-418.

(<https://doi.org/10.1002/cbic.201700530>)

² <https://www.gelifesciences.com/en/hu/shop/chromatography/resins/affinity-tagged-protein/ni-sepharose-high-performance-histidine-tagged-protein-purification-resin-p-06002#related-documents>