

M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

## **Laborleirat - Rekombináns fehérje tisztítás**

Laborvezető: Molnár Zsófia, Sánta-Bell Evelin, Madaras-Koncz Erzsébet

*A laborleíratot Molnár Bence György Szakdolgozata alapján Bata Zsófia készítette.*

**Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem**  
**Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék**  
**2019/20 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\\_miolekularis\\_biologiai\\_tehnikak](https://www.interkonyv.hu/konyvek/wunderlich_miolekularis_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 PfpAL<sup>1</sup> (*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 ampicillin rezisztencia található, így a transzformálást követően chloramfenikolt és carbenicillint (ampicillin-analóg) tartalmazó 5 ml LB táptalajon 16 órán (egy éjszaka alatt) 37°C-on, 200 rpm-en rázatva felnevesztettük, így kaptuk az úgynevezett előkultúrát.

Az előkultúrából 2\*1 ml-el beoltottunk 2\*500 ml autoindukciós táptalajt. Az autoindukciós táptalaj a hagyományos LB táptalajhoz hasonló összetétellel rendelkezik (élesztőkivonat, tripton, és foszfátok a tápoldat pufferálása érdekében). A különbség az indukció módjában van, az autoindukciós táptalajban ugyanis az IPTG-vel történő indukció helyett egy glükóz-glicerín-laktóz keveréket adunk a táptalajhoz, melyből a laktóz az indukcióért felelős komponens.

### 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 jégen, illetve előhűtött pufferekkel dolgozunk**, hogy minimalizáljuk a célfehérje degradációját a folyamat során. A PfpAL sejtpelletet lízis pufferbe felszuszpendáltuk (egy 500 ml-es kultúrából származó sejtpellethez 50 ml lízis puffert használtunk).

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

Puffer	Összetétel
<i>PfPAL</i> 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 Spatulahegyi 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 nikkelnitrilotriecetsav (Ni-NTA) oszlopra aspecifikusan kötődő fehérjék miatt adtuk a lízis pufferhez, hogy kevesebb fehérjeszennyeződés kötődjön aspecifikusan Ni-NTA gyantára a tisztítás során.

Először mechanikus sejteltávolítást végeztünk, potterezéssel. Ilyenkor a nyíróerő hatására roncsolódnak a sejtfalak, illetve a sejtmembránok. Ezután ultrahangos sejteltávolítás 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 feltárást után ki kellett ülepíteni a sejtormelékot, 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, az eddigi lépéseket a gyakorlatvezető a gyakorlat megkezdése előtt elvégzi.**

### 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 oszlopba töltött a kereskedelmi forgalomban kapható Ni Sepharose<sup>2</sup> gyantán fogjuk elválasztani a sejteltávolításból származó felülúszóból a célfehérjénket a *PfPAL*-t. A kereskedelmi gyantával párhuzamosan vizsgáljuk saját fejlesztésű mágneses nanorészecskén és polimetil-metakrilát polimeren 6 különböző fém komplexálási tulajdonságait. Mindkét típusú szilárd hordozón etilén-diamin-tetra-ecetsav a komplexképző és a vizsgált 6 fémion: vas(III), kobalt(II), nikkell(II), réz(II), cink(II), cirkónium(IV).

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 felülúszó felvitele után a 2. táblázatban felsorolt oldatokkal mossuk a gyantákat. Az LS és HS oldatokból 2-2 oszlop-térfogatnyit használunk, mely során a gyanta felületén gyengén megkötött fehérjéket mossuk le. 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 hígított Bradford reagenst adunk, és addig folytatjuk a mosást az adott imidazolos oldattal, amíg már nem észlelünk sötétkék színreakciót. Az imidazol képes a fém-ionok komplexálására, akárcsak a hisztidin aminosavak, így képesek lezorítani a hordozóhoz komplexált fehérjéket. A 25 mM-os imidazol oldattal történő mosással még csak a gyengén komplexált fehérjéket mossuk le (melyek nem rendelkeznek His-taggal, de random aminosavakkal gyengén tudnak kötni az oszlophoz). A töményebb, 500 mM-os imidazol oldatot használjuk a célfehérje eluciójára. A legtöményebb, 1 M-os imidazollal minden maradékot lemosunk az oszlopról, ez már az oszlop tisztítási protokolljának a része.

A kereskedelmi Ni-NTA gyantán felül egy saját fejlesztésű hordozón is vizsgálni fogjuk, hogy különböző fémek használatával hogyan változik a komplexképzésen alapuló tisztítás hatékonysága. A hordozók 5-5 mg-jához Eppendorf csövekbe 0,5-0,5 ml lizátumot adunk, majd 10 percen át rázógépen rázatjuk, olyan fordulaton, hogy a szilárd hordozó ne ülepedjen le. Ezt követően 1 ml LS, majd 1 ml HS és ismét 1 ml LS oldattal mossuk. A sóoldatos mosásokat követően 1 ml 25 mM imidazol oldattal mossuk. A mosások során 10-10 percig rázatjuk a hordozókat és a mosások végén lepipettázzuk a folyadékot a szilárd részecskékről. A 25 mM imidazolos mosást követően a szilárd részecskékhez 40 µl puffert és 20 µl mintakotélt (lásd a 4. Minták összetételének vizsgálata SDS-PAGE-vel részben) adunk és a többi mintával együtt 95°C-on 5 percig hőkezeljük őket, majd a mintákat felvisszük géllapra. A mintaelőkészítés során a megszűnik a fém fehérje kölcsönhatás és az oldatból felvitt mintában vizsgálható lesz a felületre kitapadt fehérjék összetétele. Az előhívást követően vizsgáljuk és értékeljük, hogy az eltérő fémek milyen kapacitással és szelektivitással komplexálták a célfehérjét.

**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 kromatográfiás tisztítás során a különböző mosó folyadékokat külön gyűjtjük, melyek összetételét SDS-PAGE-el vizsgáltuk.

#### 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, kitékerve 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 biszakrilammal 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.

A mintavételezés során 20 µl mintához 10 µl mintakotélt (62.5 mM TRIS, 25% glicerin, 2% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 0.01% brómfenolkék, 350 mM ditiotreitolt (DTT), pH=6.8 (25 °C)), hogy a poliakrilamid gélen követhető legyen a minta haladása, majd 95 °C-on 5 percig hőkezeltünk. A DTT a biokémiai munkák során gyakran használt redukálószer, a fehérjék diszulfid-hidjainak kialakulását gátolja.

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

Összetétel	Mennyiség 4% [µl]	Mennyiség 12 % [µl]
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, ≥99%)	2,5	3,75

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

Az SDS-PAGE gélelektroforézis során PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder markert használtunk, mely ismert molekuláris 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.

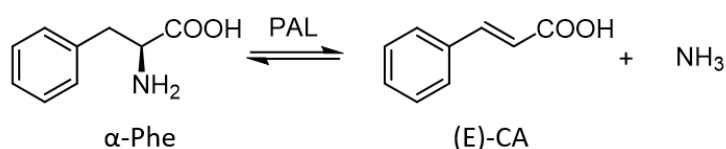
#### 5. PfpAL mennyiségének meghatározása

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 mérőfelszínen

pipettázott kis mennyiségű (2  $\mu$ l) 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 (hátér) abszorbanciájával korrigáljuk a fehérjekoncentrációkat. Minden mérést 3 ismétléssel végzünk, majd a kapott koncentráció adatok átlagát vesszük.

## 6. PfPAL enzimaktivitás mérés (Enzim minőség ellenőrzése)

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. Hátérnek 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 ( $A = \varepsilon * l * c$ ,  $\varepsilon=10\,000\, cm^{-1}\, mM^{-1}$ ) 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 fogyás 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:  $k_{cat}=v_{max}/[E]$

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

## **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 irodalomban 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.

## Sejtszintű szabályozás labor

Rekombináns fehérjetisztítás laborgyakorlat

Gyakorlaton vezetett jegyzőkönyv + számolás otthon

**A gyakorlat során a munkavédelmi és biztonságtechnikai előírások betartása kötelező!**

---

<sup>1</sup> 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>)

<sup>2</sup> <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>