



### Fehérje zárványtestek

A rekombináns fehérjéknél gyakran előfordul, hogy a kifejezett fehérje nem oldatban jelenik meg, hanem szilárd szemcséket, zárványokat alkot a sejteken belül. Csak prokariótáknál fordul elő, eukariótáknál nem. (humán: genetikai betegségek)

*E. coli* →

Legömbölyített, erősen fénytörő, nagy sűrűségű zárványok.



4

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Fehérje zárványtestek

A zárványképződésnek vannak előnyei is:

- > A zárvány tiszta fehérje (>90%), alig kell tisztítani
- > Védett a proteázoktól
- > Nem károsítja a gazdasejtet.

Nem lehet előre megmondani, hogy melyik fehérjéből lesz zárvány. Nem számít:

- > Genetika (host, vektor, génkörnyezet)
- > Méret, oldhatóság, szerkezet

5

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Fehérje zárványtestek

Fehérje bioszintézis

- folding → natív fehérje
- zárvány képződés → IB

Ha a folding sebessége kicsi a termeléshez képest, akkor sok fehérje megy a zárványokba.

A prokariótákban a folding azért lassabb, mert:

- > nincsenek chaperonok
- > a citoplazma redukzív közeg, nem kedvez a diszulfid hidak kialakulásának. Csak a perioplazmikus tér oxidatív.

6

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Fehérje zárványtestek

A zárványtestek feldolgozásának lépései:

- |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|
| 1. Sejtfeltárás          | sejttörmelék             |
| 2. Centrifugálás, mosás  | IB paszta                |
| 3. Oldás, szolubilizálás | oldott, unfolded fehérje |
| 4. Folding/refolding     | oldott, aktív fehérje    |



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

---

---

---

---

---

---

---

---

## 1. Sejtfeltárás

Baktériumsejtek feltárása: lizozim + erős mechanikai behatások (ultrahang, nagynyomású homogenizátor)

## 2. Centrifugálás, tisztítás

A zárványtestek kompakt, nagy sűrűségű részecskék, centrifugálásnál jól ülepednek. A felületen visznek magukkal szennyezőseket → mosással tisztítják (pH=8, 0,2 M NaCl, Triton X100, EDTA, DTT, NaN<sub>3</sub>)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

---

---

---

---

---

---

---

---

## Oldás, szolubilizálás

Tömör szerkezet, vizes közegben oldhatatlan.

Kaotróp, denaturáló oldószerek: 6 M guanidin HCl, 8 M karbamid.

~5 g/l fehérje, 1-4 óra.

Puffer: enyhén lúgos közeg, pH ~8 (tiolát anionok).

Fémionok: EDTA

Erősen redukív közeg (a diszulfid hidakat bontja): ditiotreitrol, dithioeritrol, redukált glutation, merkaptó-etanol, ciszteín, cisz-tamin.

Tisztítás: ha az IB pasztát jól kimosták, alig szükséges. A foldingnál úgyis felhígul.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

---

---

---

---

---

---

---

---

## Folding

A folding („hajtogatás”) a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezetének megfelelő kialakulását jelenti. A szerkezetet rögzítik az intramolekuláris

- > diszulfid hidak
- > másodlagos kölcsönhatások (ionpár, H-hidak, van der Waals)

Az intermolekuláris kapcsolatok hibás szerkezetet eredményeznek.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

---

---

---

---

---

---

---

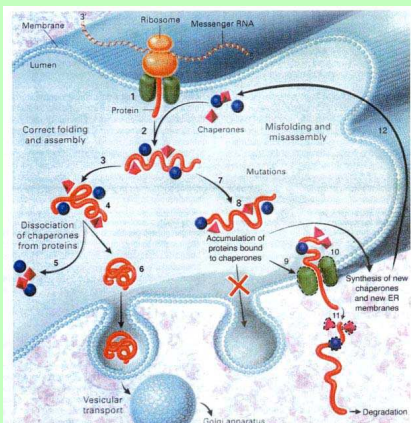
---

---

---

## Folding

Eukariótákban a folding az ER belsőjében történik. A folding normális menetét chaperonok (dajkafehérjék) katalizálják. A hibás fehérjéket a sejt proteaszó-mái lebontják.



BME

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## In vitro folding

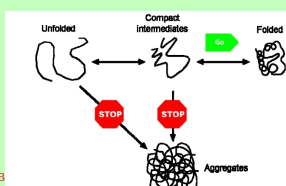
Prokariótáknál a foldingot ER és chaperonok nélkül kell végrehajtani.

Az aggregáció (másodrendű reakció) megakadályozása érdekében a molekulákat távol kell tartani egymástól → hígítás

$$\frac{dc}{dt} = k_f c$$

$$\frac{dc}{dt} = k_A c^2$$

A lehetséges mellékreakciók megakadályozása:



BME Alkalmazott B

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### In vitro folding

A fehérje koncentráció: 10-50 mg/l (100 – 500x hígítás)

Trükkök:

- > lassan engedik be a fehérjeoldatot a folding pufferbe
- > több ponton táplálják be
- > Több adagban adják hozzá a pufferhez, megvárják, amíg az előző adag jórészt átalakul

A hígítás hátránya: nagy térfogat, nagy tartály, nagyon sok folding puffer kell → drága



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

---

---

---

---

---

---

---

---

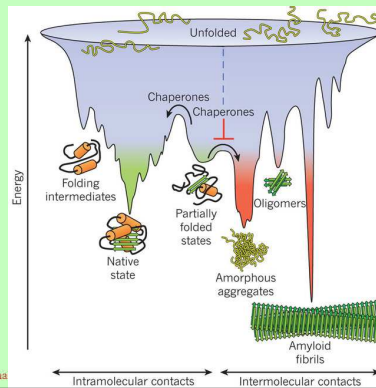
---

---

### In vitro folding

A fehérje nagyon sokféle alakot vehet fel. Ezek közül csak egy a natív → feltételezik, hogy ez az energiaminimum. Ha elég sokáig „rázzuk”, odatalál a natív formához.

Kritikus: a diszulfid hidak helyes kialakítása.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

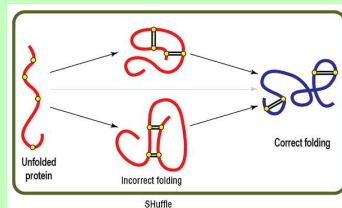
---

### In vitro folding

A lehetséges diszulfid hidak száma:  $n \times (n-1) / 2$

Elsőre nagy valószínűséggel nem a natív keletkezik → felbontás-újrakötés dinamikussúlyát kell megteremteni → „redox-puffer”:

- 1-10 mM –SH és –S–S– vegyület, egymás mellett, oxidáló túlsúly, pl.: Glutation (oxidált > redukált)
- Cisztein < cisztin
- β-merkaptó-etanol < diszulfidja



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## In vitro folding

A pufferben még:

pH puffer (pl. 0,1-0,2 M Tris), enyhén lúgos (pH=7,5-8,5),  
→ az -SH-k részben tiolát anionná alakulnak

Kaotrópok kis koncentrációban

Arginin (0,4 – 1 M)

Detergensek (ionos vagy nemionos, pl. Triton-X)

EDTA (2 – 10 mM) kelátképző

PMSF (~0,1 mM) proteáz-gátló

Esetleg chaperon-hatású molekulák: alkil-karbamid, PEG,  
lauril-maltozid, CHAPS, ciklodextrinek

4–20 °C, 24-48 óra



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

16

---

---

---

---

---

---

---

---

## TRX fehérje/domén

A TRX lehet önálló fehérje, de lehet egy más aktivitású fehérjén belül egy domén.

Két Cys-t tartalmaz, ezek oxidált állapotban diszulfid hidat alkotnak, redukálva két -SH csoportot.

A red forma képes arra, hogy más fehérjék diszulfid hídjait felbontsa. Visszaredukálásához NADPH szükséges.

Feladata a korrekt cisztein párosodás kialakítása és a hibás párosodás korrekciója a fehérje hajtogatás során.

Ezt beadagolva elő lehet segíteni az in vitro foldingot.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

---

---

---

---

---

---

---

---

## Egyéb folding technikák

*Dialízis:* nem hígítanak, hanem dialízissel fokozatosan csökkentik a kaotróp és a redukáló S-vegyületek koncentrációját → néha jó, de néha kicsapódik.

*Micellákban és liposzómákban:* ha a fehérje molekulák elkülönülten állnak, nincs aggregáció.

*Hidrofób kromatográfia:* során a fehérje sokszorosan adszorbeálódik-deszorbeálódik az apoláris felületen, ennek során "gyűrődik" és "megtalálja" a jó foldingot.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

---

---

---

---

---

---

---

---



## II/2/b termékizolálás állati sejt tenyészetből

A jellemző műveleti sorrend (de nincs köbe vésvé):

- A. Sejtek elválasztása → szilárd-folyadék elválasztás  
műveletek: szűrés, centrifugálás
- B. Koncentráció lépés (capturing) → a víztől választjuk el  
műveletek: adszorpció, membránszűrés, kromatográfia,  
(csapadékképzés)
- C. Tisztítás → a termék és a szennyezések elválasztása.  
műveletek: mint az előbb, de főleg kromatográfia
- D. Vég tisztítás (polishing) → a terméket a kereskedelmi forgalomba hozás előírásainak megfelelő tisztaságig tisztítják.  
+ műveletek: vírusmentesítés, sterilizálás



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

---

---

---

---

---

---

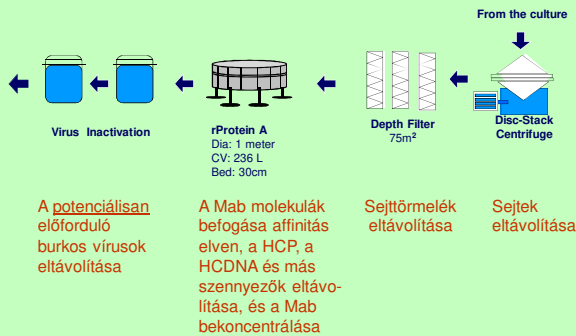
---

---

---

---

## Mab termelés emlős sejttel – Downstream A, B



A potenciálisan előforduló burkos vírusok eltávolítása

A Mab molekulák befogása affinitás elven, a HCP, a HCDNA és más szennyezők eltávolítása, és a Mab bekoncentrációja

Sejttörmelék eltávolítása

Sejtek eltávolítása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## A. A sejtek elválasztása

A sejtenyészeteknél az első lépések jóval egyszerűbbek. Az állati sejtek sokkal nagyobbak, mint a baktériumok, könnyebben elválaszthatók – kisebb g értékű centrifugák

Perfúziós tenyészeteknél a kapott lé egész sejteket nem is, csak sejttörmeléket tartalmaz. Mélységi szűrés, egyszer használható, emiatt drága.

Sejtfeltárássra sincs szükség, a termék a lében található.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

---

---

---

---

---

---

---

---

---

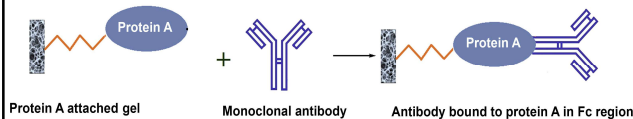
---



## B. Koncentráció (capturing)

A termék elválasztása a víztől és a nagyon eltérő jellegű szennyezésektől. Alkalmos művelet az affin-kromatográfia (valójában adszorpció).

Példa: volt: Faktor IX - heparin  
itt: Mab – Protein A kötés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

---

---

---

---

---

---

---

---

---

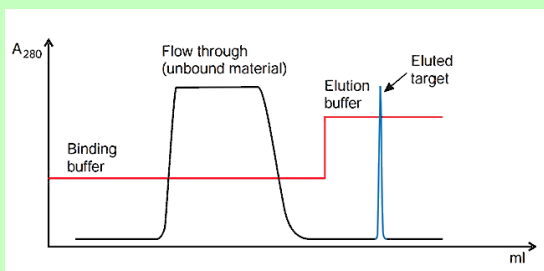
---

---

---

## Protein A kromatográfia

A terméket kötjük, a szennyezéseket kimossuk.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Protein A kromatográfia

A töltet élettartama: (fontos, mert nagyon drága)

Table 4.12 Protein A Resin Lifetime Study

Reuse Cycle Number	Yield (%)	HCP (ng/mg)	Acidic Variants	Aggregate %
6	97	8,100	9	2.2
20	97	7,900	10	2.4
70	97	6,500	11	2.0
130	94	9,500	11	1.9
170	94	8,800	8	2.5
204	91	8,300	9	2.1
250	90	7,900	9	2.2

Kismértékű kitermelés csökkenés, de a minőségi paraméterek nem változtak.

Élettartam: legalább 250 ciklus



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Mab termelés emlős sejttel – Downstream C

Savas töltésű variánsok és HCP eltávolítása

Aggregátumok, vírusok, HCP és HCDNA eltávolítása

További (gyakorlatilag az összes) potenciális vírus eltávolítása

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### C. Tisztítás

A szennyezők elválasztása – lehetőleg a termék maximális megtartásával.  
A szennyezéseket kötjük meg, a terméket átengedjük (flow through).

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### A kromatográfiás oszlopok léptéknövelése

Léptéknövelésnél azonos anyagú és szemcseméretű töltetek esetén hogyan növeljük az oszlop méretét?

Azonos hatékonyságú elválasztáshoz azonos lineáris sebesség kell:

$v = \text{térfogatáram} / \text{keresztmetszet}$   
→ a keresztmetszetet kell arányosan növelni, a hossz változatlan.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### A kromatográfiás oszlopok léptéknövelése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### A kromatográfiás oszlopok léptéknövelése



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

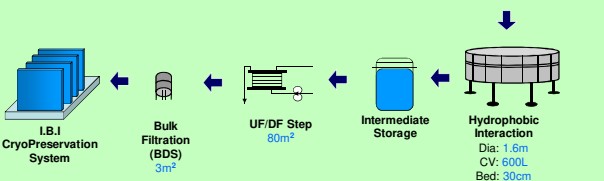
---

---

---

---

### Mab termelés emlős sejttel – Downstream C, D



**Hosszú idejű tárolás**

A potenciálisan előforduló mikrobiális szennyezők eltávolítása, 0,2 µm szűrő

Puffercsere a végleges tároló pufferre és a Mab koncentráció beállítása

További aggregátumok és HCP eltávolítása

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



### Vírusinaktiválás / eltávolítás

#### SD (SOLVENT-DETERGENT) KEZELÉS

S: 1 % TNBP tri-n-butyl-foszfát  
 D: 1 % detergens (Triton X-100, Tween)  
 4 óra 30° C-on (burok leoldása)  
 Extrakció növényi olajjal (pl. steril szójaolaj)  
 Adszorpciós tisztítás (C18 tölteten)  
 Ultraszűrés



37  
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---


---

### Vírusinaktiválás / eltávolítás

A vírusmentesítési műveletek hatékonyságát különböző ismert vírustenyészetek hozzáadásával minősítik.

A vírustiter csökkenését logaritmus skálán adják meg. Egy log-nyi csökkenés 10%-os túlélésnek felel meg. Ennek az az előnye, hogy az egymást követő műveletek log értéke összeadható.

Általában az az elvárás, hogy a technológia során összesen 15-20 log-nyi csökkenés legyen.



38  
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

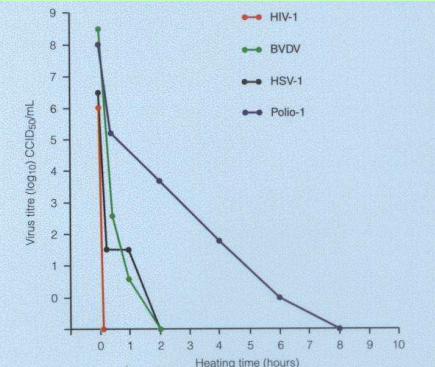
---

---


---

---

### Beriplex P/N® pasztörizációs vírusinaktiválás kinetikája



Heating time (hours)	HIV-1 (log <sub>10</sub> CCID <sub>50</sub> /mL)	BVDV (log <sub>10</sub> CCID <sub>50</sub> /mL)	HSV-1 (log <sub>10</sub> CCID <sub>50</sub> /mL)	Polio-1 (log <sub>10</sub> CCID <sub>50</sub> /mL)
0	8.5	8.5	8.5	8.5
1	0	2.5	1.5	5.5
2	0	0	0	3.5
4	0	0	0	1.5
6	0	0	0	0
8	0	0	0	0



39  
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



### Egyszer használatos tároló

#### Flexel® 3D Bag Modular Palletank® System



Specifications	
Material:	Stainless Steel 304L
Surface Finish:	Bad Blasted
Volumes:	100   200 L, 500 L, 1,000 L
Dimensions	
100   200 L	792 x 592 x 720 mm (31.2" x 23.3" x 28.3")
500 L	1192 x 792 x 856 mm (46.9" x 31.2" x 33.7")
1,000 L	1192 x 992 x 1235.5 mm (46.9" x 39.1" x 48.6")
Stack ability	
100 L   200 L	3x
500 L	2x
1,000 L	not to be stacked

**Description**  
The Modular Palletank® Systems are stainless steel containers designed for the safe and

**Flexibility**  
Each Palletank® includes an integrated pallet base that allows easy carriage by pallet-jack

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---