

# Skripta iz predmeta Biofizička hemija 1

## 1

Proizvodnja i prečišćavanje rekombinantnih proteina  
- primena tehnika centrifugiranja, hromatografije i elektroforeze -

Ana Popović Bijelić

2023.

Citirati kao:

Ana Popović Bijelić, Skripta iz Biofizičke hemije 1, Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 2023.

# Preparativne tehnike u BFH proučavanjima

## 1. Za identifikaciju molekula i kvantitativnu analizu

- Testovi / eseji
- UV/vis spektrofotometrija



## 2. Za vizuelizaciju molekula

- Mikroskopija



## 3. Za razdvajanje i identifikaciju molekula

- Hromatografija
- Centrifugiranje
- Elektroforeza



# Opšti algoritam za proučavanje proteina

## **Proteomika** – proučavanje proteina:

- Izolovanje i prečišćavanje nativnog proteina ili tzv. „masovna produkcija” rekombinantnog proteina dobijenog genetičkim inženjerstvom
- Karakterizacija strukture – osnovni podaci (masena spektrometrija, CD, DSC)
- Kristalizacija proteina
- Određivanje 3D strukture (rendgeno-strukturalna analiza, NMR)
- Matematičko modelovanje – računarska optimizacija strukture na osnovu experimentalnih podataka

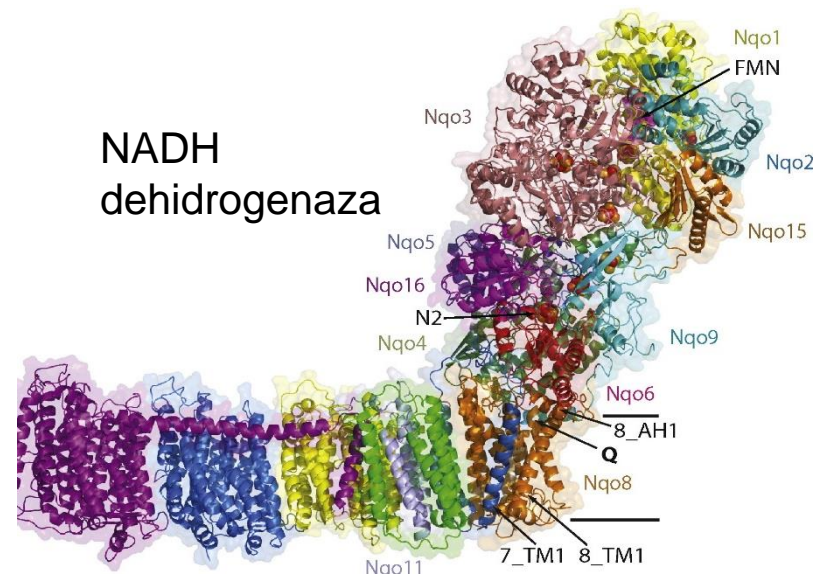
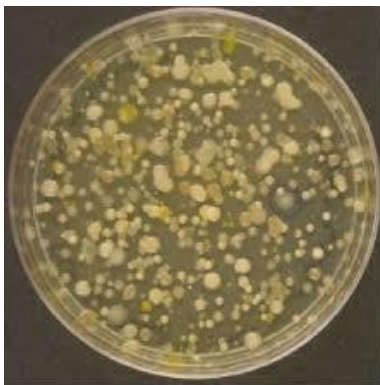
Analogno, oblasti za proučavanje lipida, metala, metabolita:  
Lipidomika, Metalomika, Metabolomika

Primer: Želim da proučavam strukturu i funkciju enzima **NADH dehidrogenaze** koja se nalazi u unutrašnjoj membrani mitohondrija: imam dve opcije, da izolujem nativan protein ili da proizvedem rekombinantni protein.

Odavde mogu da izolujem **nativan protein**

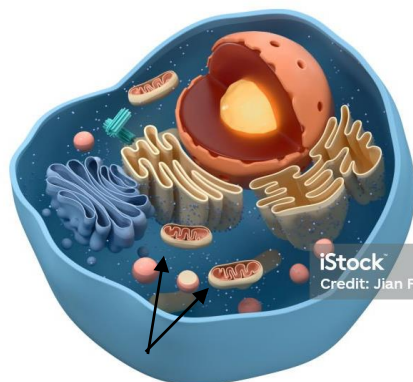


Odavde mogu da izolujem **rekombinantni protein**

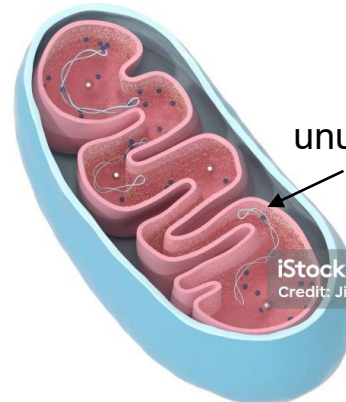


<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.01.012>

Shematski prikaz ćelije (levo) i mitohondrije (desno)



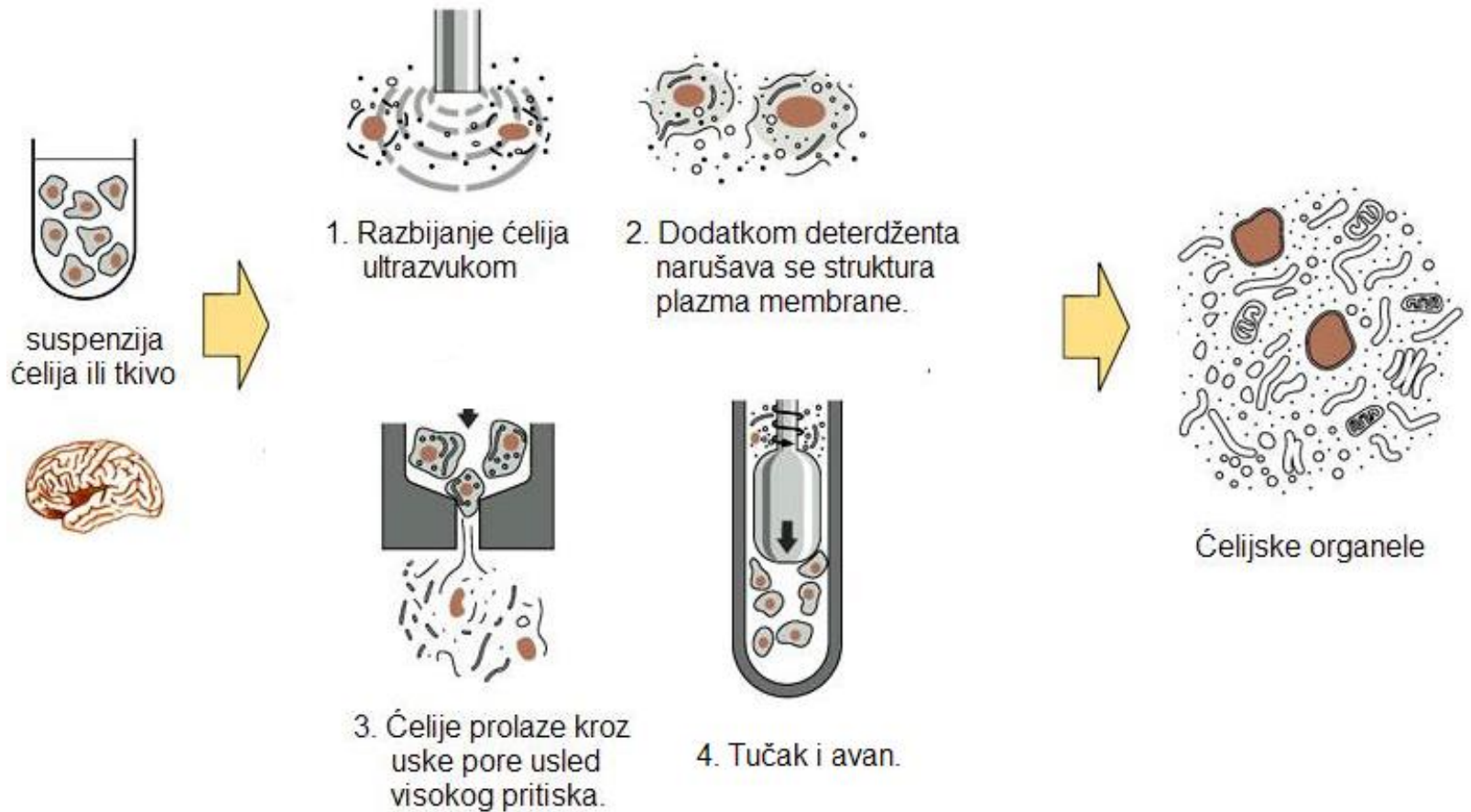
mitohondrije



unutrašnja membrana

<https://www.istockphoto.com/>

# Homogenizacija ćelije



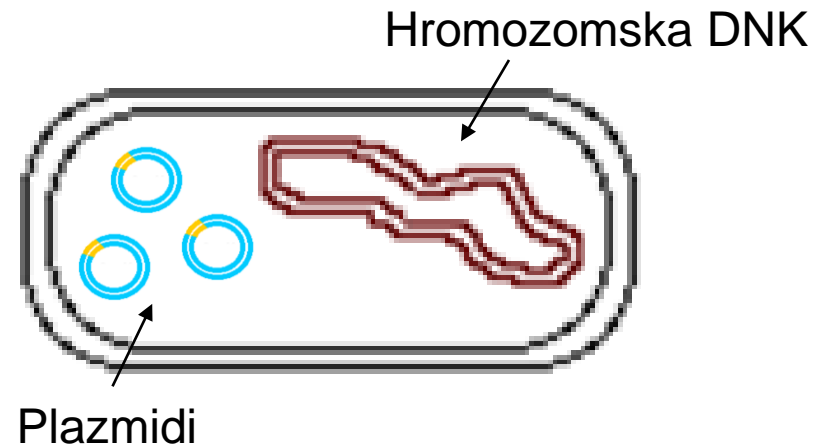
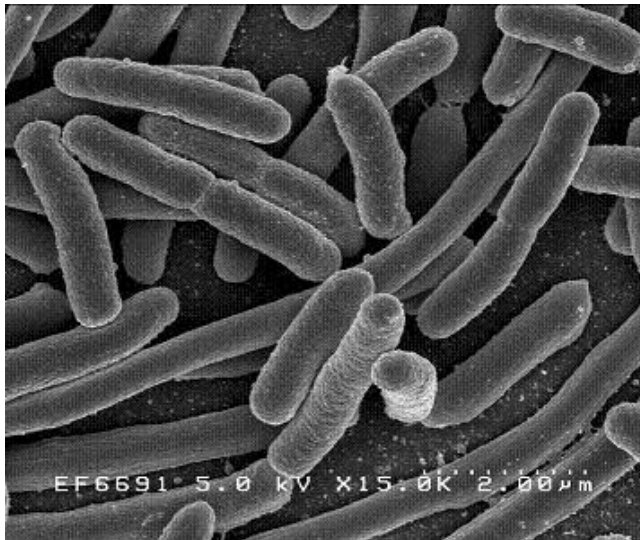
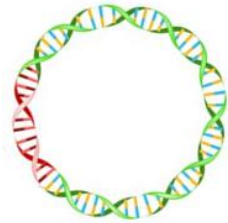
# Rekombinantni proteini

Rekombinantni protein nastaje translacijom iRNK koja je nastala transkripcijom rekombinantne DNK.

(napomena: svaki protein nastaje translacijom iRNK koja je nastala transkripcijom DNK, ovde je ključna reč rekombinantna DNK)

Rekombinantna DNK ne postoji u prirodi, već nastaje kombinacijom različitih sekvenci koje inače ne bi postojale zajedno:

specifična genska sekvenca koja kodira za željeni protein se ubacuje u *Escherichia coli* (*E. coli*) **plazmid**.





## PLAZMIDI

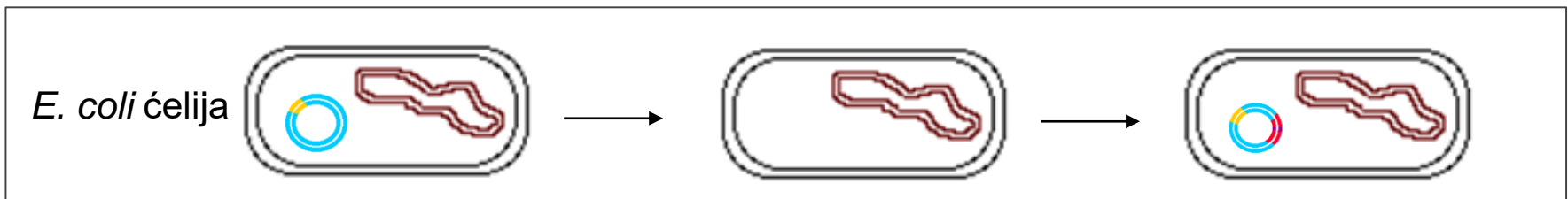
Bakterije imaju dve vrste DNK, hromozomsku i ekstrahromozomsku.

Ekstrahromozomska DNK ima strukturu kružnog lanca i zove se **plazmid**.

Plazmidi se nezavisno razmnožavaju od hromozomske DNK.

Ekstrahromozomska DNK sadrži samo gene koji su vezani za **metaboličke aktivnosti ćelije**: za inaktivaciju antibiotika, proizvodnju toksina itd. Ove aktivnosti omogućavaju bakteriji da preživi u drugim organizmima.

Plazmidi se koriste za proizvodnju rekombinantnih proteina. Potrebno je izvaditi **plazmid**  iz *E. coli* ćelije i od njega konstruisati **vektor**  (ubaciti u njega gen koji kodira za protein koji želimo da proizvedemo). Zatim taj vektor treba vratiti nazad u *E. coli* ćeliju, nakon čega je treba gajiti u određenim uslovima u kojima će se ona brzo razmnožavati. U toku razmnožavanja će doći do replikacije plazmidske (vektorske) DNK i do sinteze željenog rekombinatnog proteina.

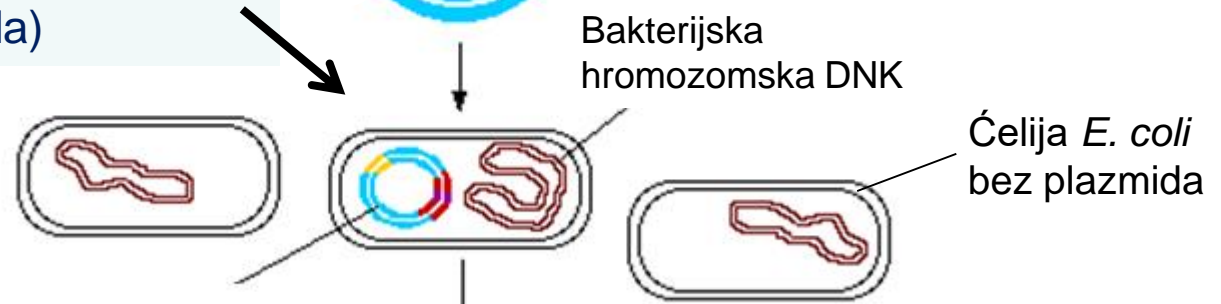




**1. Konstrukcija vektora:**  
 ubacivanje strane DNK u plazmid



**2. Transformacija:**  
 ubacivanje vektora u ćeliju domaćina (*E. coli* bez plazmida)



**3. Replikacija plazmidske DNK i sinteza željenog proteina**



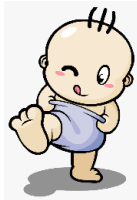
# Napravili smo protein – šta s tim?

Zašto nas interesuju strukture proteina?

Poznavanje **strukture** → poznavanje **funkcije** → razumevanje genetskih bolesti → genska terapija (ubacivanje gena za ekspresiju/inhibiciju željenog proteina ili korekciju mutacija).

## Metode za određivanje strukture proteina:

1. Primarna – Edmanovo sekvenciranje + masena spektrometrija
2. Sekundarna – spektroskopije: FTIR, ramanska, CD, UV/vis, fluorescentna
3. Tercijarna i kvaternarna – rendgeno-strukturna analiza, NMR, elektronska mikroskopija  
(dodatne – CD, fluorescentna spektroskopija, DSC)



Prvi koraci: centrifugiranje, hromatografija, elektroforeza

# Fizičkohemijske tehnike za razdvajanje komponenata iz smeše

**Centrifugiranje** je fh tehnika za razdvajanje komponenata iz smeše prema njihovoj veličini, obliku, gustini i viskoznosti rastvora.

**Hromatografija** je fh tehnika za razdvajanje komponenata iz smeše na osnovu različite interakcije komponenata sa stacionarnom i mobilnom fazom.

**Elektroforeza** je fh tehnika za razdvajanje komponenata iz smeše koje se zasniva na migraciji naelektrisanih čestica kroz rastvor pod dejstvom spoljašnjeg električnog polja.

**razdvajanje komponenata iz smeše = „prečišćavanje“**

Ove tehnike su u nastavku objašnjene kroz njihovu primenu u **proizvodnji i prečišćavanju rekombinantnih proteina.**

# Centrifugiranje – podela, terminologija

## Prema brzini:

Sporo - brzina do  $10.000 \text{ obrt min}^{-1}$

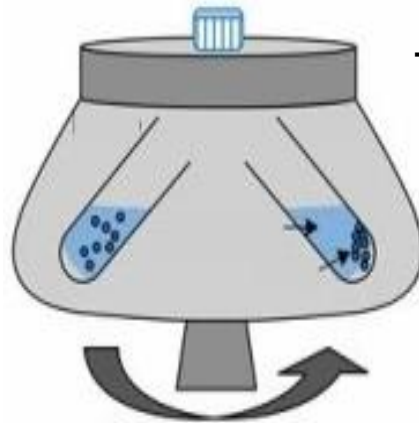
Srednje -  $10.000$  do  $20.000 \text{ obrt min}^{-1}$

Ultracentrifugiranje – veće od  $20.000 \text{ obrt min}^{-1}$

## Prema nameni:

Preparativno – izolovanje čestica

Analitičko - merenje fizičkih osobina sedimentacionih čestica



Terminologija:

supernatant

talog

# Hromatografija – koncept, terminologija

- Hromatografska kolona
- Mobilna faza (t, g)
- Stacionarna faza (t, č)
- Analit
- Elucija, eluent, eluat
- Retenciono vreme
- Hromatogram



Princip razdvajanja:  
različiti afinitet komponenata  
u smeši prema mobilnoj i  
stacionarnoj fazi  
(rastvorljivost + adsorpcija)



POLARNOST

**Analit** – drugi naziv za uzorak, u slučaju hromatografije smeša koju sipamo na vrh kolone i koju želimo da razdvojimo

**Eluent** – supstancija koju dodajemo da bi smo izvršili razdvajanje, u slučaju tečne hromatografije to je neki pufer, on prolazi kroz kolonu, pomera uzorak i razdvaja ga.

**Eluat** – ono što smo dobili elucijom tj. ispiranjem, to je rastvor u kome su eluirana supstancija i eluent.

**Retenciono vreme** je vreme potrebno analitu da prođe kroz kolonu, od momenta ulaska u kolonu do momenta detekcije. Veoma zavisi od kolone i mora se definisati za svaku.

# Proizvodnja rekombinantnih proteina

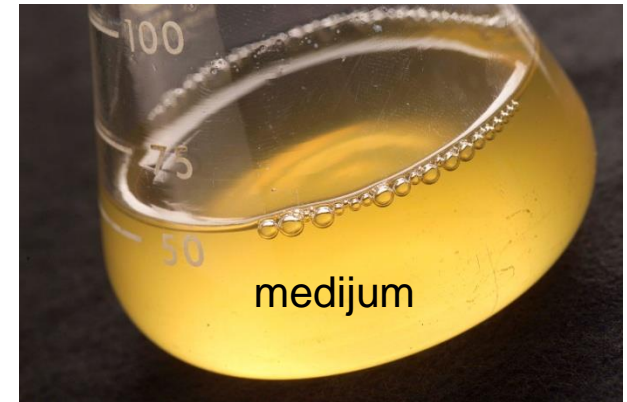
Inkubator za gajenje ćelija



Ćelijska kultura u petrijevoj šolji



Uzima se 1 kolonija i stavlja u 50 ml medijuma sa antibioticima: karbenicilin i hloramfenikol; 12h@37°C



← 6 ml kulture u 1 L medijuma 18h@37°C



Ekspresija proteina: dodatkom izopropil-1-tio-β-D-galaktopiranozida (IPTG), 20h@17°C



Inkubator sa šejkerom

To su bila prva dva koraka u proizvodnji rekombinantnih proteina:

- 1 Gajenje ćelija
- 2 Ekspresija željenog proteina

Sad su bakterije u rastvoru, treba da se istalože.

To se radi CENTRIFUGIRANJEM.

Centrifugiranje je tehnika za razdvajanje ili prečišćavanje čestica iz rastvora prema njihovoj veličini, obliku, gustini i viskoznosti rastvora.

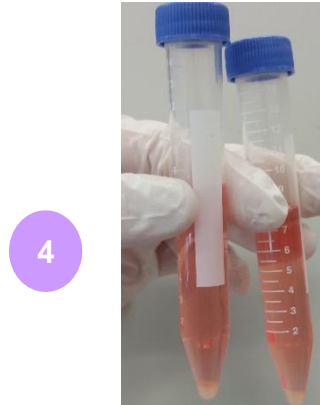


3 **Taloženje bakterija** centrifugiranjem u trajanju od 20 min, brzina 4000 obrt  $\text{min}^{-1}$  na 4 °C.

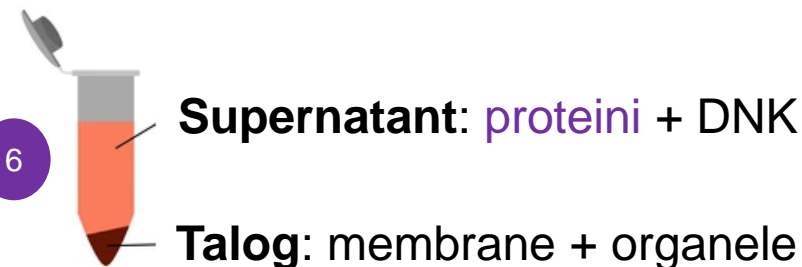
4 Talog sa ćelijama se rastvori u puferu (Tris, Hepes) i naglo zamrzava u tečnom azotu.

Odmrzne se pa se zamrzne još jednom – da bi ćelije pukle.

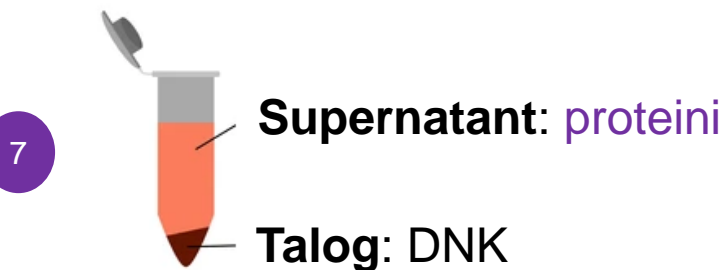
5 **Homogenizacija ćelija** centrifugiranjem 30 min u **ultracentrifugi** brzinom od 45000 obrt  $\text{min}^{-1}$  na 4 °C.



Nakon homogenizacije u tubici imamo izdvojen talog sa membranama i organelama koji odbacujemo, i supernatant koji dalje koristimo:



- Prespemo supernatant u novu tubicu.
- Treba skloniti DNK, taloženjem sa streptomycin sulfatom.
- Centrifug 20 min, 15 *kobrt* min<sup>-1</sup>, 4 °C



- Prespemo supernatant u novu tubicu.
- Treba istaložiti protein, dodaje se 40% rastvor (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, u toku 45 min na 4 °C
- Centrifug 20 min, 15 *kobrt* min<sup>-1</sup>, 4 °C



Talog sa proteinom treba da se rastvori u Tris puferu i da se čuva na -80 °C.



Sad imamo rastvor rekombinantnog proteina ali je on slan.  
Trebalo da se odsoli.

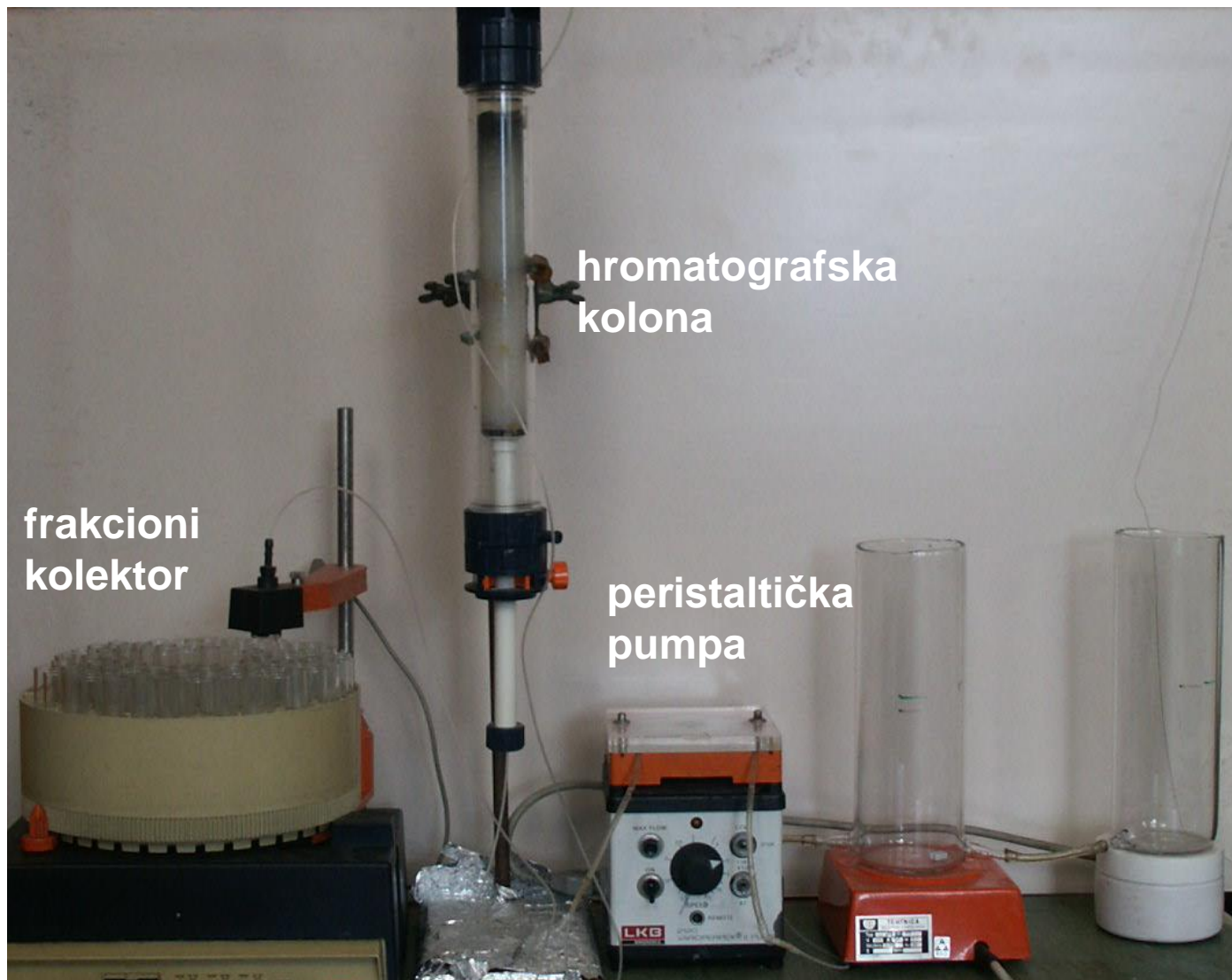
9

Za odsoljavanje se koristi HROMATOGRFIJA, i to **gel hromatografija** (= gel filtracija, ekskluziona hromatografija)

To je tehnika koja se zasniva na razlici u sposobnosti komponenata iz smeše da **prodiru u pore umreženog gela** i koristi se za razdvajanje makromolekula prema njihovoj veličini.

Mali molekuli lako ulaze u gel i tu se zadržavaju neko vreme. Veći molekuli (**proteini**) **ne mogu da uđu u pore**, već se spiraju (eluiraju) niz kolonu odgovarajućim puferom.

Brzina izlaska molekula iz kolone obrnuto je proporcionalna masi molekula.



# Modernija verzija prethodne hromatografske postavke

## **FPLC** - *Fast Protein Liquid Chromatography*

**FPLC** se koristi za razdvajanje komponenti iz smeše.

FPLC je različito od HPLC (*High performance liquid chromatography*).

FPLC je preparativna tehnika.

**HPLC** je analitička tehnika.

HPLC se koristi za kvali i kvanti analizu tečnih uzoraka, npr. za identifikaciju aminokiselina prilikom određivanja primarne strukture proteina u Edmanovom sekvenciranju.

Postoje još:

**UHPLC** - *Ultra high performance liquid chromatography*

**UPLC** - *Ultra performance liquid chromatography*



Komercijalno dostupne kolone – već su napunjene gelom: **Sephadex** (kroslinkovan dekstran) i/ili **MabSelect Prisma** smola (kroslinkovana agarozna koja sadrži specifičan ligand za stabilizaciju)



Ligand (boja) - Cibacron Blue F3G-A



[www.cytivalifesciences.com](http://www.cytivalifesciences.com)



[www.cytivalifesciences.com](http://www.cytivalifesciences.com)

# Proizvodnja rekombinantnih proteina - nastavak

Kad smo hromatografijom odsolili protein ostaje rastvor koji sigurno sadrži smešu proteina koji su nastali prilikom ekspresije

1) gena u plazmidu ali i 2) gena iz hromozomske bakterijske DNK.

Nama treba samo iz 1.

Zato je sledeći korak prečišćavanje proteina, i to se radi **jonoizmenjivačkom hromatografijom.**

Razdvajanje komponenata iz smeše jonoizmenjivačkom hromatografijom vrši se na osnovu razlike u sposobnosti komponenata da razmenjuju jone sa molekulima matriksa.

**Eluacija:** promenom pH ili jonske jačine (pufer + 10-300 mM NaCl) se smanjuju elektrostatičke interakcije između proteina i jonoizmenjivača i jedan po jedan protein se ispiraju iz kolone.

Na kraju treba proveriti da li smo dobili protein koji smo hteli.  
To se radi **elektroforezom**.

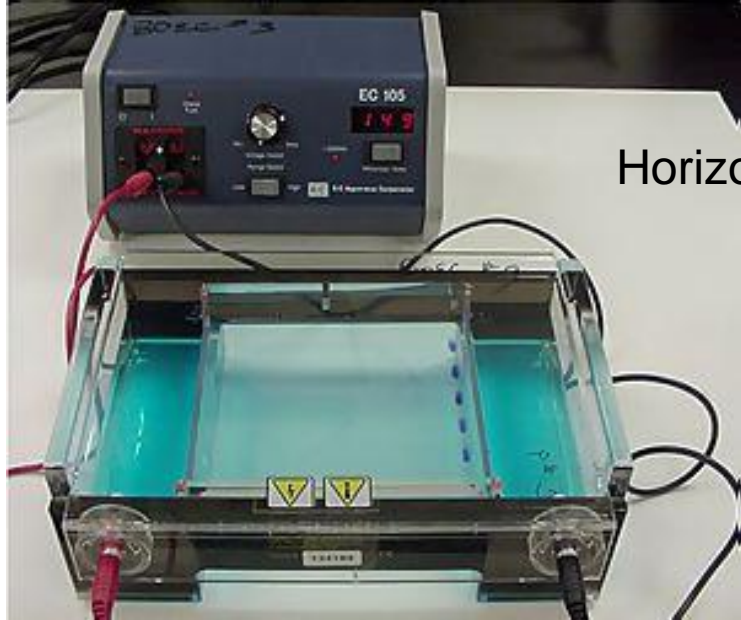
Elektroforeza je tehnika za razdvajanje komponenata iz smeše koje se zasniva na migraciji naelektrisanih čestica kroz rastvor pod dejstvom spoljašnjeg električnog polja.

Mogu da se razdvajaju **nativni** i **denaturisani** proteini.

Za proveru čistoće proteina se obično koristi SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*).

**SDS-PAGE** je elektroforetska tehnika koja se koristi za razdvajanje **denaturisanih** proteina iz smeše prema njihovoj veličini, tj. **molekulskoj masi**.

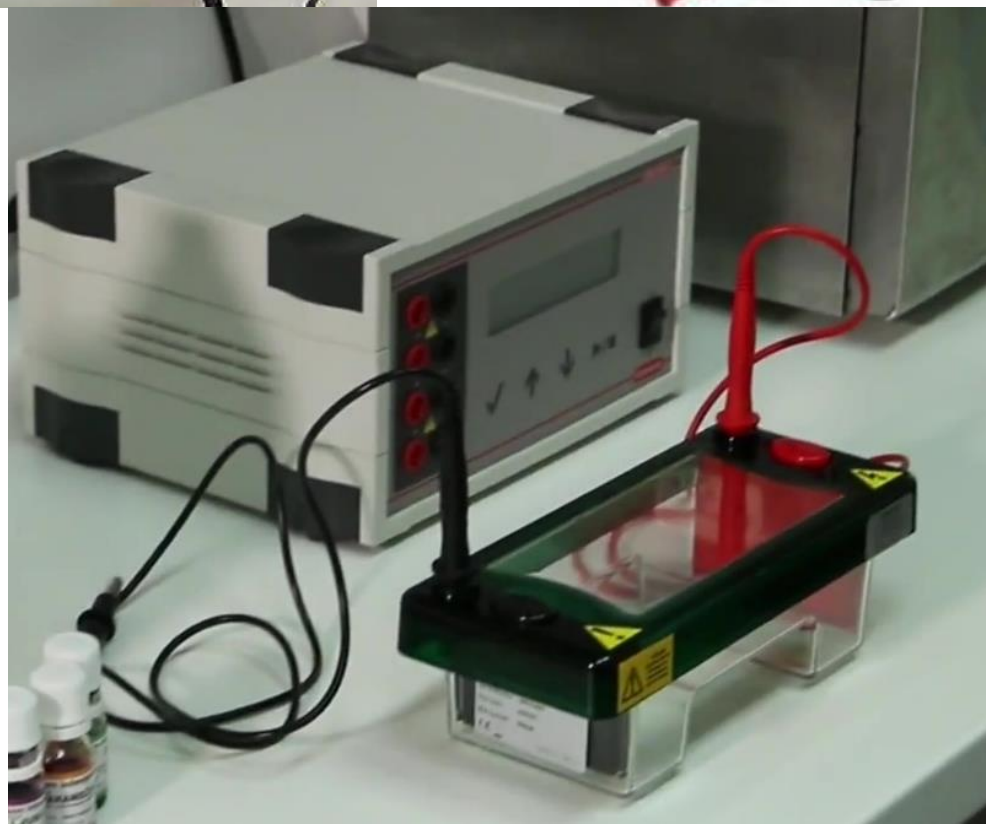
Denaturacija proteina: **2-merkaptetanolom** se redukuju S-S veze, anjonski deterdžent **natrijum dodecil sulfat** (SDS) se vezuje za protein svojim hidrofobnim repom.



Horizontalna



Vertikalna



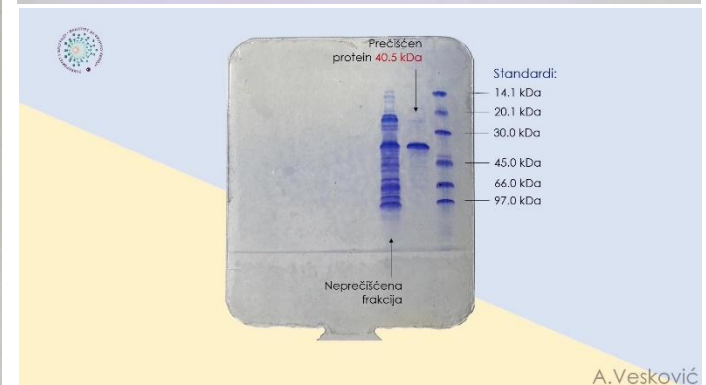
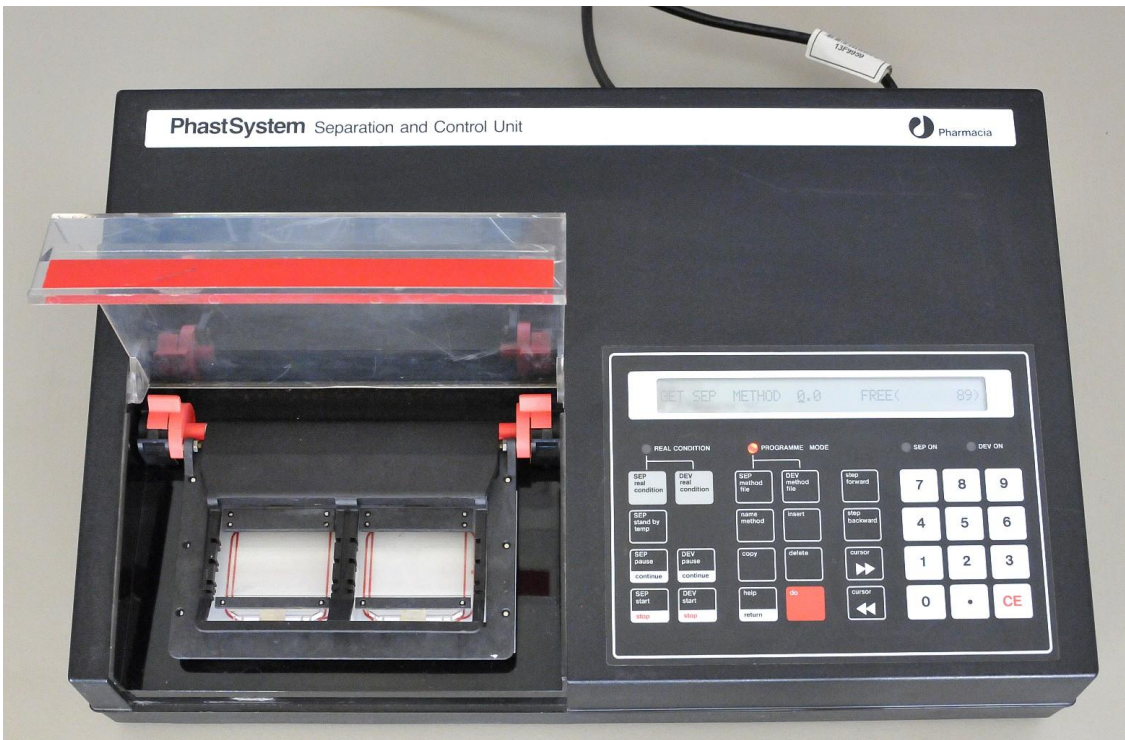


# Pharmacia LKB PhastSystem



razdvajanje

bojenje



# Elektroforeza

Na molekul (u rastvoru) koji se nalazi u električnom polju deluju dve sile:

$$F_e = zE$$
$$F_t = 6\pi\eta r v$$

Kada se uspostavi ravnoteža između  $F_e$  i  $F_t$ , molekul počinje da se kreće konstantnom (stacionarnom) brzinom ( $v$ ):

$$zE = 6\pi\eta r v$$
$$v = zE / 6\pi\eta r$$

Uobičajeno je da se umesto stacionarnih brzina, koje zavise od jačine spoljašnjeg polja, upoređuju pokretljivosti naelektrisanih čestica ( $u$ ):

$$u = v/E = z/6\pi\eta r$$

## Šta utiče na elektroforetsku pokretljivost?

tj. zašto u toku elektroforeze dolazi do razdvajanja

$$u = z/6\pi\eta r$$

### Karakteristike uzorka

1. **Radijus** (tj. molarna masa)
2. **Naelektrisanje** (ovo zavisi i od pH rastvora)
3. Oblik (utiče na trenje; ako su molarne mase iste, **globularni** proteini će se kretati brže nego **fibrilarni**)

Razlike u ovim karakteristikama su odgovorne za činjenicu da dolazi do razdvajanja, a to omogućava identifikaciju poređenjem sa standardima.

### Eksperimentalni parametri

1. Napon (struja)
2. Izbor pufera
3. Izbor gela

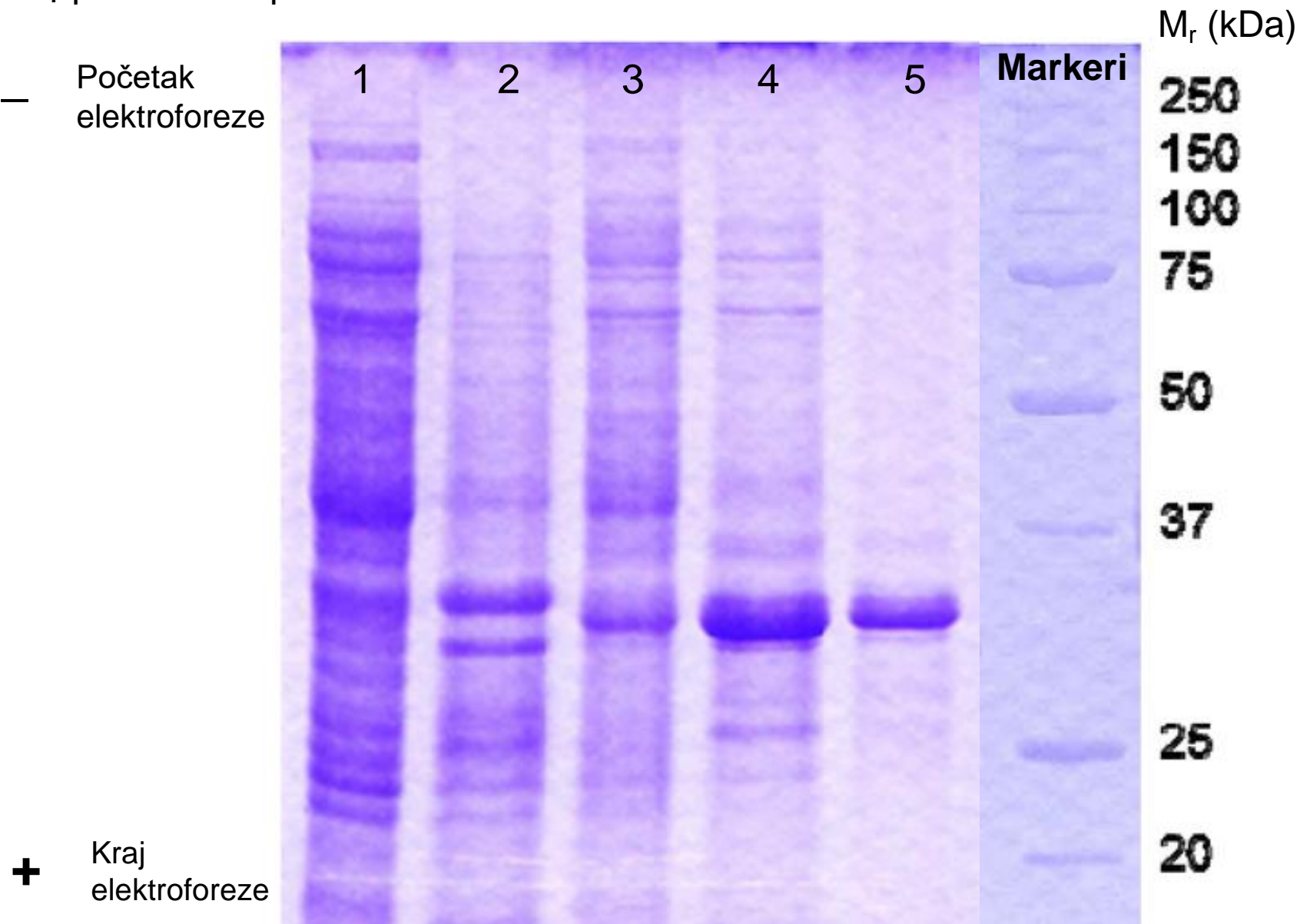
Ali, kod **SDS-PAGE**

- proteini su denaturisani
- svi imaju isti oblik (štapićasti)
- svi su uniformno negativno naelektrisani (vezuju 1,4 g SDS po 1 g proteina).
- tj. imaju **isti odnos  $z/r$**

**Razdvajaju se samo prema  $M_r$**

Veće  $M_r$  znači sporije kretanje kroz gel (efekat molekuskog sita )

SDS-PAGE **elektroforegram** 5 uzoraka proteina i standarda (proteini poznate  $M_r$  koji se u elektroforezi obično nazivaju markeri) na osnovu kojih se određuju  $M_r$  prečišćenih proteina.



## GELOVI

**Skrob** – sposobnost razdvajanja komponenti je veoma dobra, ali je mana što se ne može kontrolisati veličina pora.

**Agaroz** – obično se koristi za razdvajanje molekula velike  $M_r$

**Poliakrilamid** – mogu se sintetisati gelovi sa različitim veličinama pora i različitim odnosom komponenti gela - akrilamida i bisakrilamida, zbog čega je gel veoma pogodan za razdvajanje proteina i nukleinskih kiselina.

**Agaroz-akrilamid** – agaroz pruža fizičku potporu za nisko procentni akrilamidni gel koji pruža efekat molekulskog sita (potrebnog za oštru rezoluciju).

## PUFERI

- Izbor pufera zavisi od **tipa uzorka**.
- Mogu biti formatni, citratni, fosfatni, bikarbonatni, EDTA, acetatni, piridinski, Tris, Hepes. Jonska jačina od **50 – 100 mM**.
- **pH pufera utiče** na elektroforetsku pokretljivost komponenti jer povećava/smanjuje jonizaciju aminokiselina.