

Rening av proteiner: hur och varför?

(och lite biologiska grunder)

Joakim Norbeck
norbeck@chalmers.se

Joakim Norbeck vt-2013

Grunder

Plasmider


Protein-rening

Detektion

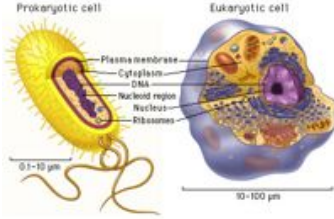
Mest relevanta sidor i "Cell" är 510-518 & 532-552

Joakim Norbeck vt-2013

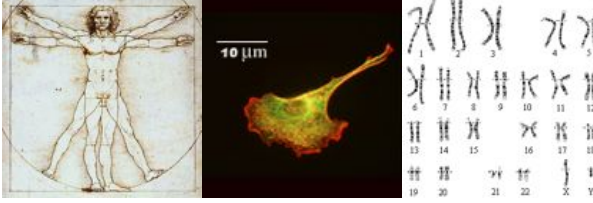
Prokaryoter En cell = en individ 4,6 miljoner bp = ca 3000 gener



Otroligt stor skillnad på organismers komplexitet, men grunderna är ändå dom samma! Alla har DNA, RNA, Protein och till stor del samma metabola vägar...

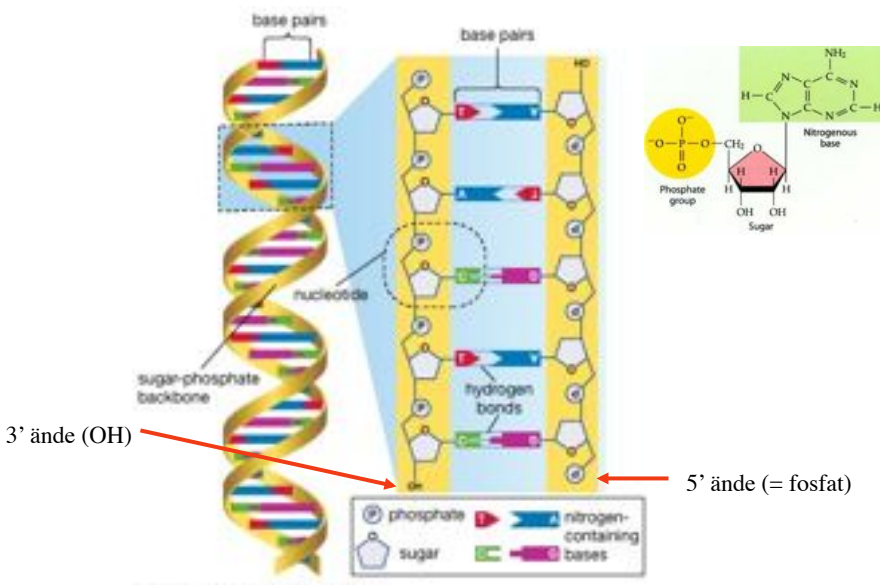


Eukaryoter miljarder celler = individ ca 2 miljarder bp/cell = 30000 gener



Joakim Norbeck vt-2013

DNA molekyler har en riktning. Man läser ALLTID sekvens från 5' till 3' ände!

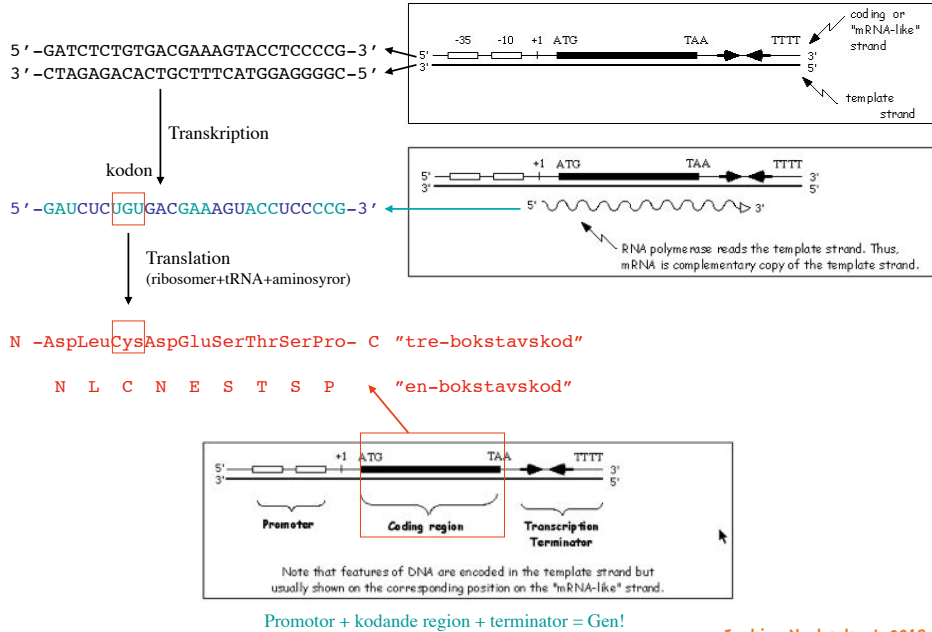


3' ände (OH) 5' ände (= fosfat)

© 2007 Encyclopædia Britannica, Inc.

Joakim Norbeck vt-2013

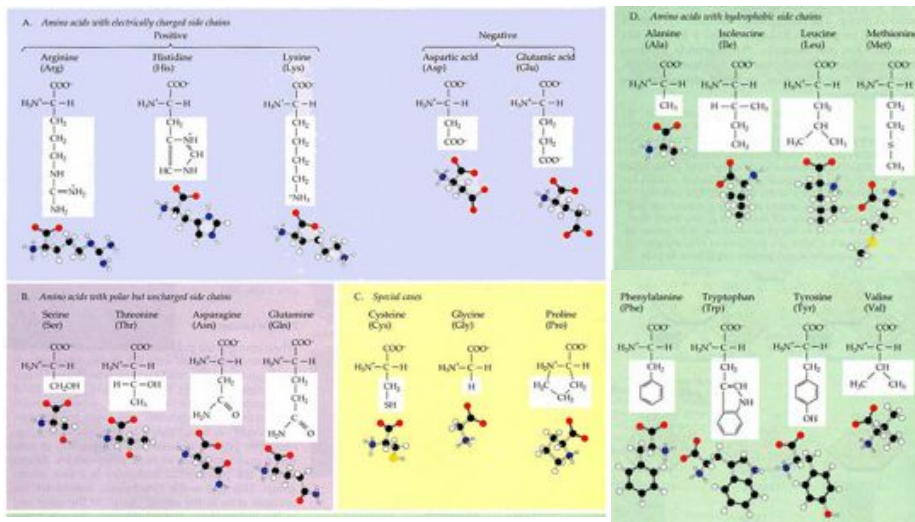
Riktningar och begrepp.....



Studiet av proteiner (20 OLIKA byggstenar) är svårare än studier av nukleinsyror (4 liknande byggstenar).

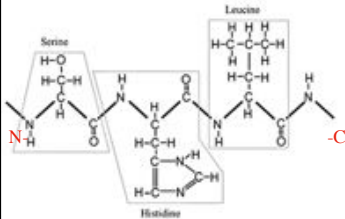
Dessutom kan många av aminosyror bli modifierade ≈ oerhört stort antal möjliga proteiner....

(2 aa > 400 olika, 3 aa > 8000 olika.... 10 aa > 10¹³ olika, 100 aa > 10¹³⁰ ≈ oändligt.... (~10⁸⁰ atomer i universum)



Många möjligheter till variation på protein-strukturnivå!

Amino-terminal = **N**-terminal
 Carboxyterminal = **C**-terminal



Primär-
 (a) Primary structure
 -Ala-Glu-Val-Thr-Asp-Pro-Gly-

Sekundär-
 (b) Secondary structure
 α-helix β-sheet

The diagrams show an alpha-helix, which is a tight coil of the polypeptide backbone, and a beta-sheet, which is a zig-zag structure of the backbone.

Tertiär-
 (c) Tertiary structure
 Domain

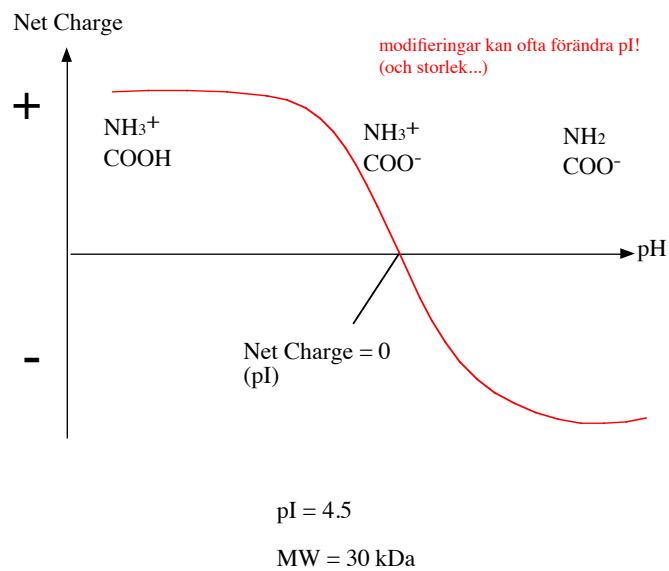
The diagram shows a single protein domain with its tertiary structure, which is a complex, folded 3D shape. A bracket indicates the 'Domain'.

Kvartär-
 (d) Quaternary structure

The diagram shows the quaternary structure of a protein, which is a complex of multiple subunits (domains) interacting with each other.

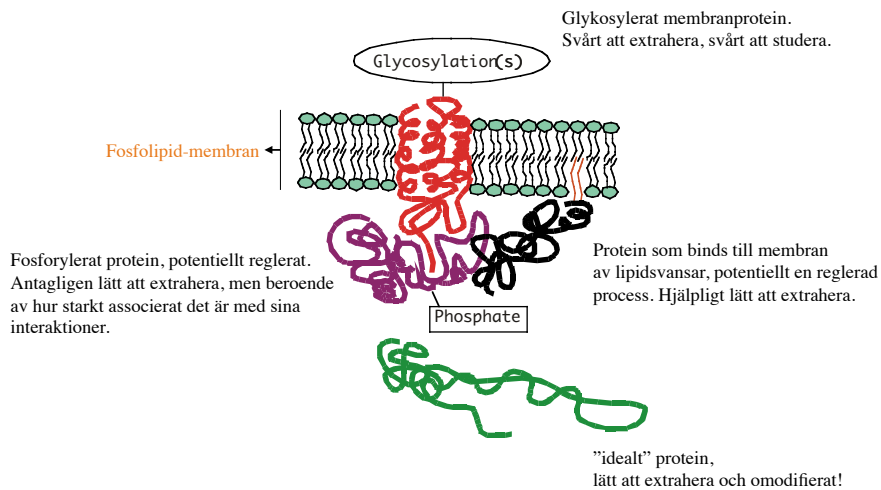
Joakim Norbeck vt-2013

Alla proteiner har en isoelektrisk punkt (pI) där nettoladdning är noll.



Joakim Norbeck vt-2013

Proteiner är mycket variabla i sina egenskaper!
Detta påverkar möjligheten att rena....



Joakim Norbeck vt-2013

Reningar av proteiner involverar ett antal steg:

val av källa till proteinet:

- naturliga celler eller vävnad (ni ska använda köttfärs för rening av cytokrom C)
- genmanipulerade celler/organismer (ni undersöker en plasmid i DNA-labben)

Provberedning

val av renings-metodik:

- olika typer av kromatografi eller fällningar

verifiering av renhet:

- aktivitet
- absorbans/reagens
- gel-elektrofores
- mass-spektrometri

skäl att rena proteiner är att vi vill:

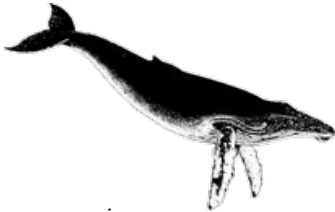
förstå proteinets egenskaper eller använda det för att förstå andra system (forskningssyften),
Eller

rena fram industriella mängder av protein för användning i t ex tvättmedel eller som läkemedel...

Joakim Norbeck vt-2013

Källa till proteinet:

1. Naturliga källor



organism



organ



cell-odling



organell

Joakim Norbeck vt-2013

Källa till proteinet:

2. Genmodifierade organismer

Vi vill ofta uttrycka "syntetiska" gen-konstruktioner

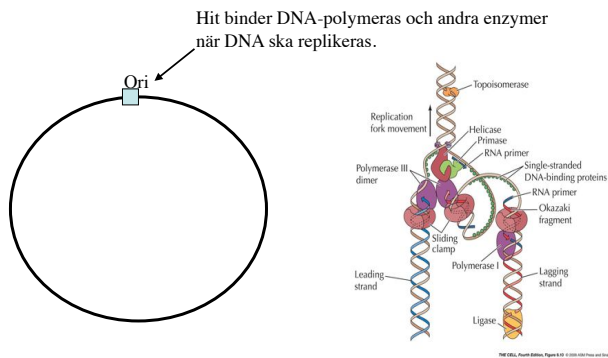
t ex från **plasmider** innehållande **PCR-produkter**.

(viktigt att få med alla delar av en gen för att få uttryck!)

Joakim Norbeck vt-2013

Plasmider är små cirkulära bitar av DNA som kan replikeras i cellen.

Krävs att de har ett **Ori**.

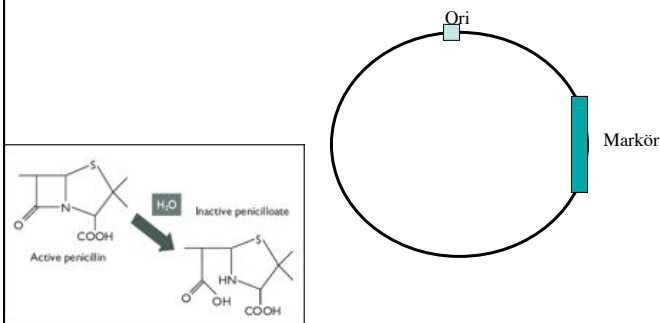


Bakterier har cirkulära kromosomer med ett Ori,

Eukaryoter har linjära kromosomer med många Ori

Joakim Norbeck vt-2013

För att vi ska kunna veta vilka celler som innehåller vår plasmid så sätter vi ofta in en eller flera markörgener (t ex resistens mot antibiotika).



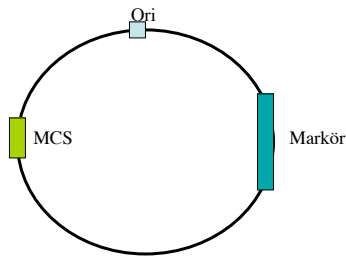
Den vanligaste markörgenen är penicillin (ampicillin)- resistens, AmpR. Detta protein är ett beta-lactamase som kan inaktivera penicillin-strukturen (bakterier med plasmid kan växa i närvaro av Amp).

AmpR endast i prokaryoter (bakterier), andra markörgener finns för användning i eukaryoter.

Joakim Norbeck vt-2013

För att plasmiden ska kunna användas praktiskt på lab så finns oftast ett **multiple cloning site (MCS)**

MCS innehåller ett antal unika restriktionsenzym-igenkännings-sites.



Joakim Norbeck vt-2013

Restriktions-enzym

(egentligen Restriktions-endonukleaser)
kan användas för att klippa specifikt i DNA-sekvenser
Ligas kan sammanfoga DNA-ändar med "passform".

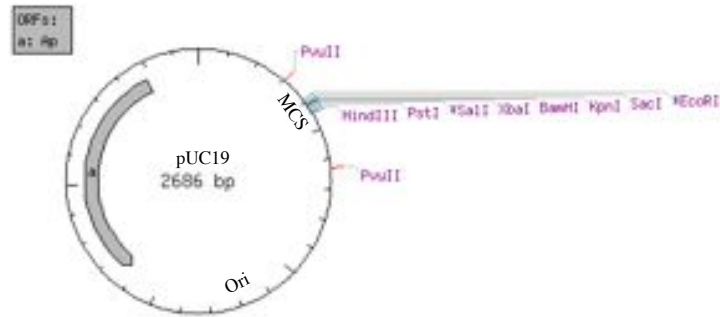
(tillämpa på lab!).



Vid ligering av plasmid används oftast 1 del plasmid
och tre delar "insert"-DNA (mol-ratio!!!)

Joakim Norbeck vt-2013

Så här kan en liten typisk E.coli plasmid se ut.



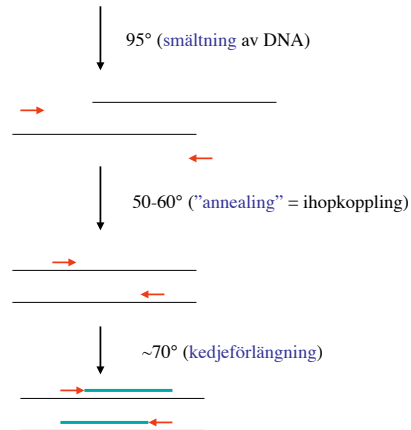
Vi använder plasmiden genom att stoppa in en eller flera bitar DNA i MCS.
Då använder vi ofta(st) **PCR-produkter**

Joakim Norbeck vt-2013

Primers
(20-25 bp homologi)

<http://en.wikipedia.org/wiki/PCR>

Templat (= "mall") dubbelsträngat DNA



PCR

(Polymerase chain reaction)

Används för att förstärka specifika DNA-sekvenser.

Produkten av PCR kan t ex klippas med lämpliga restriktionsenzymer och m h a ligas infogas i plasmid.

Kör 25-30 såna cykler. En fördubbling av mängden DNA i varje cykel.
Primers avgör vilken region av DNA som ska förstärkas!
Replikation utförs av värmestabilt DNA-polymeras.

Joakim Norbeck vt-2013

Det är ofta svårt att manipulera den kromosomala arvsmassan
(men det går hyfsat i t ex jäst-svampar och bakterier)

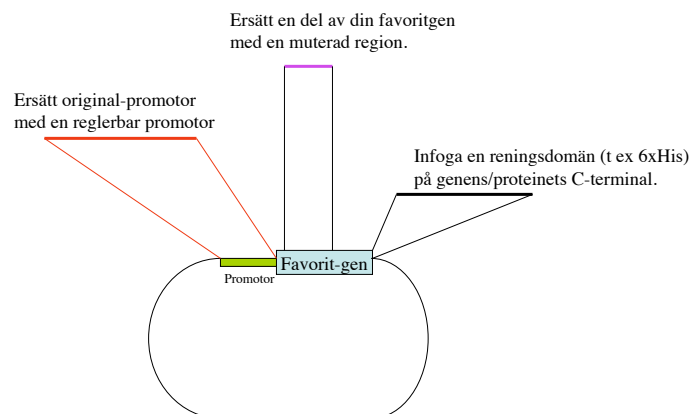
Det är lätt att manipulera DNA som sitter i plasmider

Användningsområden för plasmider:

- överuttryck av proteiner
- reglerat uttryck av proteiner
- uttryck av muterade proteiner
- uttryck av proteiner med renings-/lokaliserings-domän

Joakim Norbeck vt-2013

Exempel på tillämpningar som involverar plasmider:



Joakim Norbeck vt-2013

Joakim Norbeck vt-2013

Metoder för rening av protein:

Provberedning (och Dialys)

Selektiva fällningar/precipitering

Kromatografi

- * jonbyteskromatografi (proteinets laddning)
- * gel-filtrering (proteinets storlek)
- * affinitets-kromatografi (proteinets specifika egenskaper)

Joakim Norbeck vt-2013

Provberedning:

Oftast måste man på nåt sätt få ut proteinet ur sitt material

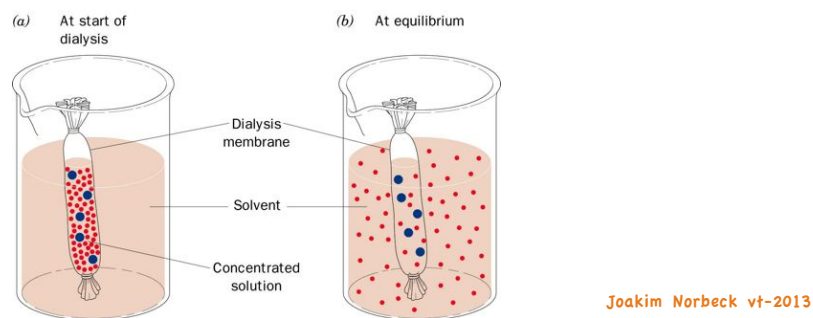
- mekaniskt (t ex kvarnar, mortel, skaka med glaspärlor/metallkuler)
- kemiskt (t ex Detergenter, enzymatisk behandling..)

Proteinet bör finnas i lösning för att kunna renas vidare.

Partiklar blir man ofta av med genom att centrifugera eller filtrera provet.

Ibland kan det finnas störande lösta ämnen. Dessa kan t ex dialyseras bort...

(även små proteiner kan dialyseras bort genom att välja membran med rätt por-storlek)



Fällningar/Precipitering/Salt-fraktionering

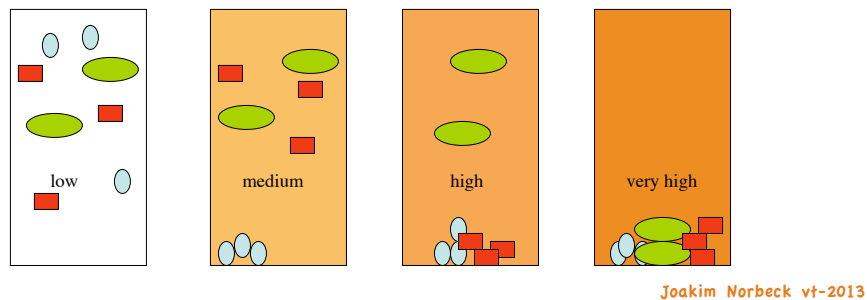
Proteiner har olika hydrofobicitet på ytan, dessa hydrofoba ytor maskeras vanligen av vatten.

Tillsats av salt (ofta ammoniumsulfat) binder först upp fritt vatten i lösning, när detta vatten är slut så binds vattnet som funnits kring proteiner upp.

När proteinerna blir av med sitt omgivande vatten frigörs mer och mer hydrofoba ytor vilka kommer att aggregera och falla ut som protein-komplex.

Olika proteiner har olika mängd hydrofoba aminosyror.

pH påverkar också proteiners löslighet (kom ihåg isoelektrisk punkt, laddning=0)



Jonbyteskromatografi

Proteiner binds in till jonbytarmaterialet beroende av sin laddning.

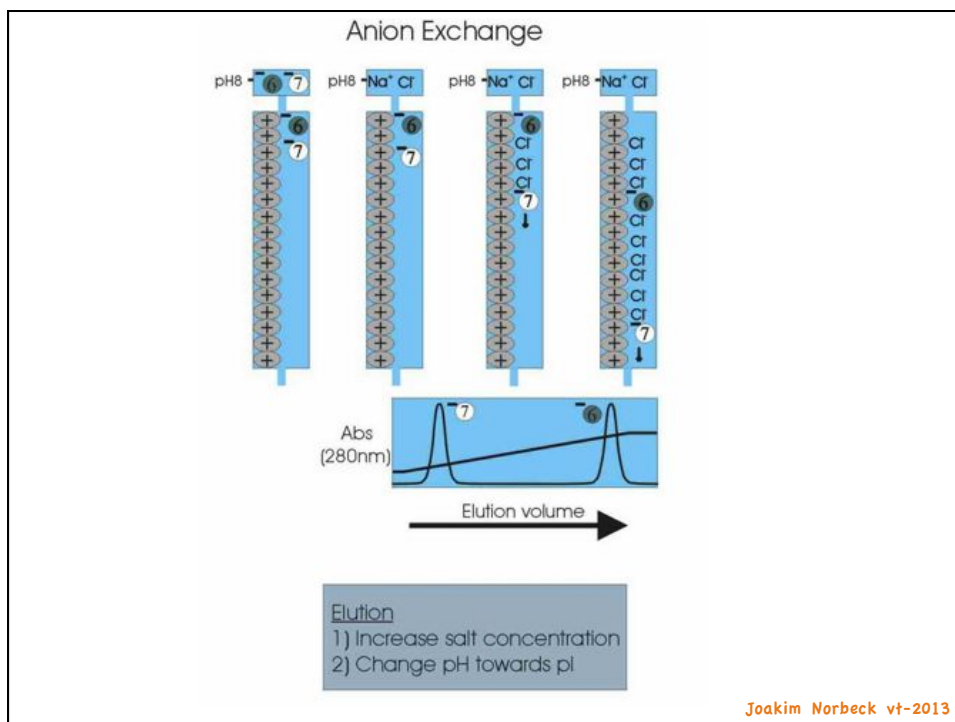
anjon-bytare renar negativt laddade molekyler

katjon-bytare renar positivt laddade molekyler

Principen är att succesivt konkurrera bort bundet material genom att antingen öka salthalten i elueringslösning eller genom att ändra pH och på så sätt ändra laddningen/inbindningen av det inbundna materialet.

Jonbyteskromatografi är en koncentrerande teknik.

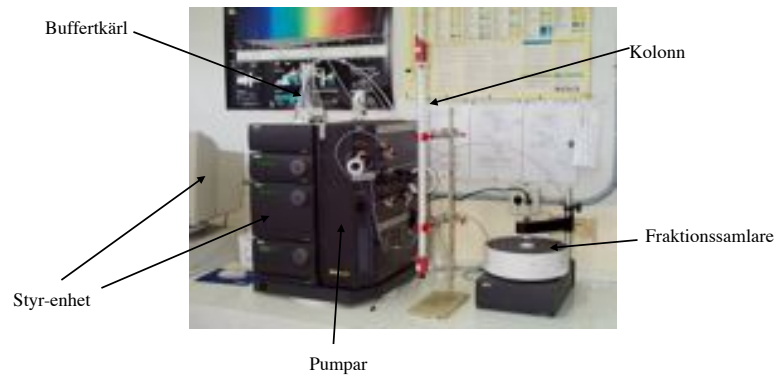
Joakim Norbeck vt-2013



Gelfiltrering

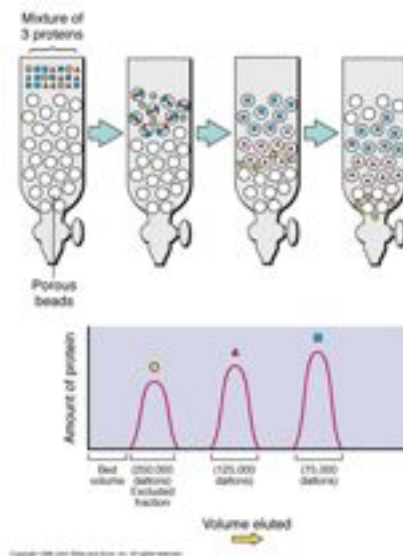
Separation av proteiner på basis av storlek.

Resulterar i relativt utspädda prover.



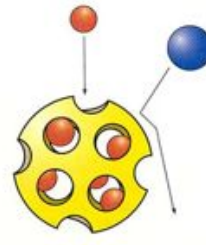
Joakim Norbeck vt-2013

Principen för gel-filtrering



Stora proteiner elueras tidigt därför att de inte fångas in av gel-porerna. ("void-volym"/"bed-volume")

Små proteiner passar in i gel-porerna vilket leder till senare eluering.



Joakim Norbeck vt-2013

Affinitets-kromatografi

exempel:

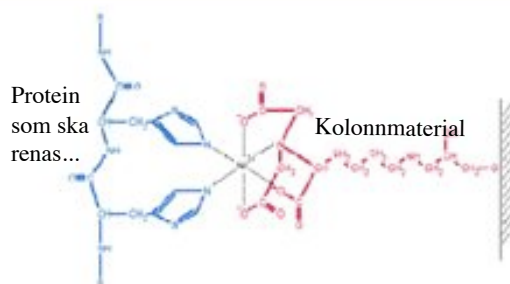
Ni²⁺-kolonn (IMAC): renar upp 6xHis-tag

Antikroppar: kan rena specifika proteiner

(Det finns [många andra typer av affinitetsrening](#))

Joakim Norbeck vt-2013

Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)



Divalenta metall-joner binder kolonn-material

en "svans" av 6-10 histidiner som adderats till favoritproteinet binder till de divalenta metall-jonerna.

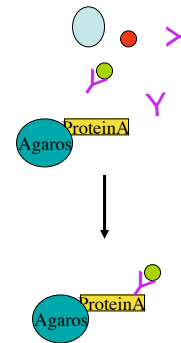
eluera med höga koncentrationer av Imidazole (eller lågt pH eller EDTA).

Joakim Norbeck vt-2013

immunoprecipitering

(rening m h a specifika antikroppar)

- Protein-extraktion
- Tillsätt specifik antikropp (IgG)
- Tillsätt protein A-kopplat till agaroskuler
- Centrifugera ner protein A-agaros-kulorna, släng supernatant.
- Tvätta (flera gånger)
- Extrahera protein m h a SDS-buffert.
- Kör extrakt på gel



Joakim Norbeck vt-2013

Hur ska vi detektera våra proteiner efter rening?

Färg (om man har tur! t ex i er lab renar ni ett gult protein)

Proteinbestämning (reagens eller absorbans vid 280 nm)

Aktivitet

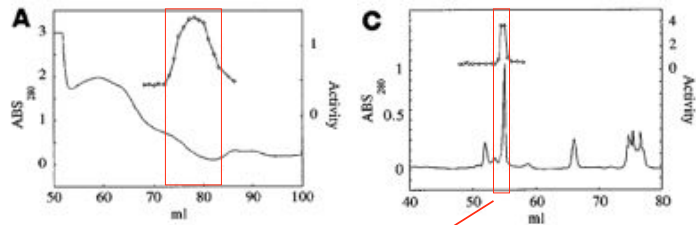
Gel-elektrofores

Joakim Norbeck vt-2013

Kromatografisk rening på aktivitet:

exemplet glycerol 3-fosfatas (följ närvaro av enzym-aktivitet)

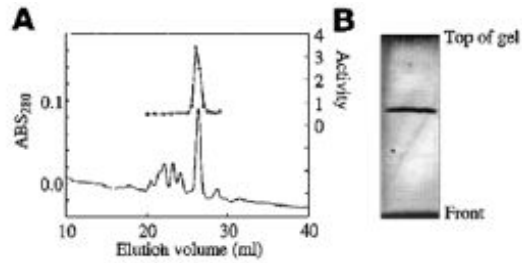
Jästceller krossas m h a glaspärlor
Centrifugera bort partiklar



Gel filtrering
(fraktioner med
aktivitet sparas)

aktiva fraktioner
körda på anjonbyteskromatografi
med ökande NaCl-koncentration

aktiva fraktioner
körda på anjonbyteskromatografi
med stigande pH och KCl gradient



vt-2013

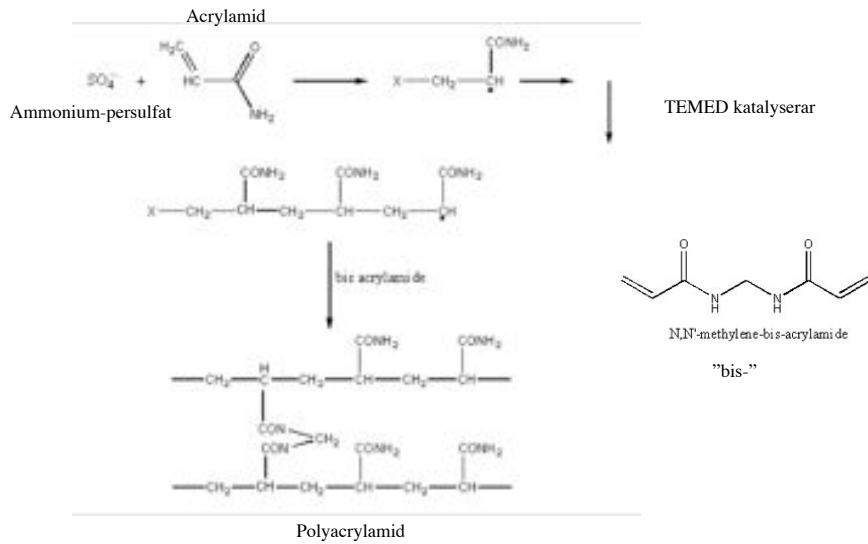
Gel-elektrofores av proteiner

- SDS-PAGE!!!
- Isoelektrisk fokusering (IEF)
- 2D-PAGE (=SDS-PAGE+IEF)

Detektionsmetoder

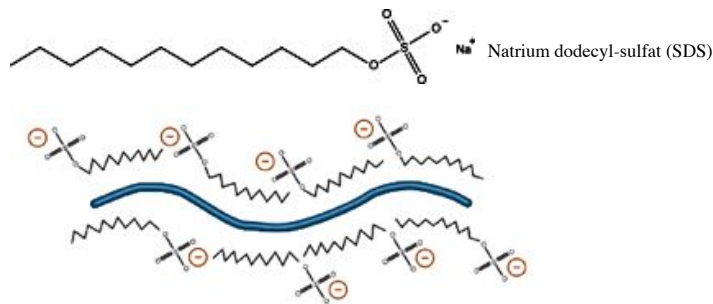
Joakim Norbeck vt-2013

Poly-akrylamid är det mest använda gelmaterialet för protein-separation



Joakim Norbeck vt-2013

SDS-polyakrylamid gel-elektrofores (SDS-PAGE)



SDS binder in till proteiner med ett bestämt antal molekyler/aminosyra.
Effekten blir att laddning/massa blir konstant.
Oavsett hur stort ett protein är så kommer det att **vandra lika fort i en lösning** över vilken en spänning är lagd.

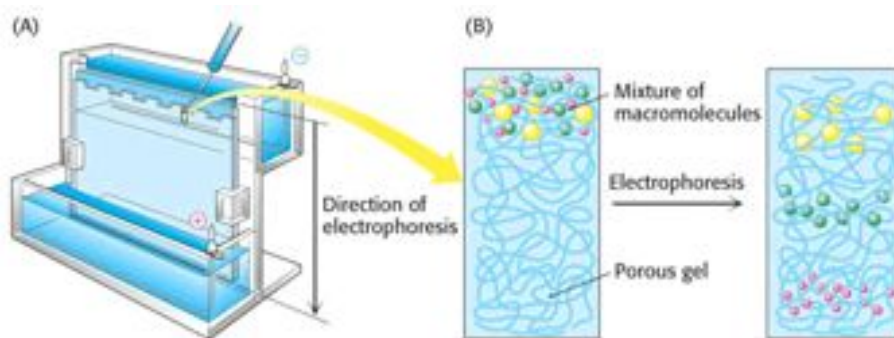
I SDS-PAGE orsakas storleks-separationen av hur tätt nätverket av akrylamid är. Stora proteiner bromsas upp mer än små, och vandrar därför långsammare.

Joakim Norbeck vt-2013

SDS-polyacrylamid gel-elektrofores (SDS-PAGE)

Separationsgel med tris-glycin buffert pH 8.8

variabel procenthalt acrylamid avgör separation:
hög % separerar små proteiner, låg % separerar stora proteiner...

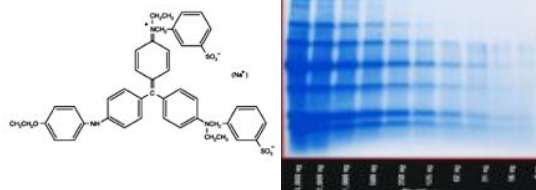


Joakim Norbeck vt-2013

Detektion av proteiner på gel:

- färgningar

- T ex Coomassie Blue



- western blotting

(specifik detektion med god linjär respons)

Joakim Norbeck vt-2013

Western blotting: antikropps-detektion av proteiner på membran
första detektion med **specifik primär-antikropp**. Denna antikropp detekteras sedan
med en **enzym-kopplad sekundär-antikropp** som känner igen primär-antikroppen.

