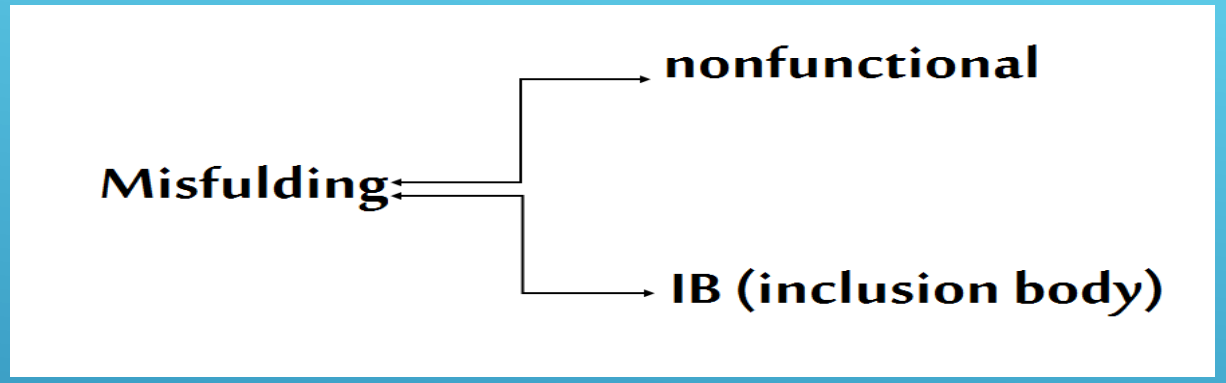
خالص سازی پروتئین های نوترکیب

معضل اصلی در تهیه پروتئین های نوترکیب در میزبان های پروکاریوتی مانند E. coli



مزایا و معایب IB

بیان بالای پروتئین نوترکیب منجر خواهد شد به تشکیل تجمعات غیرمحلول به نام IB که نمی توانند folding صحیح داشته باشند.

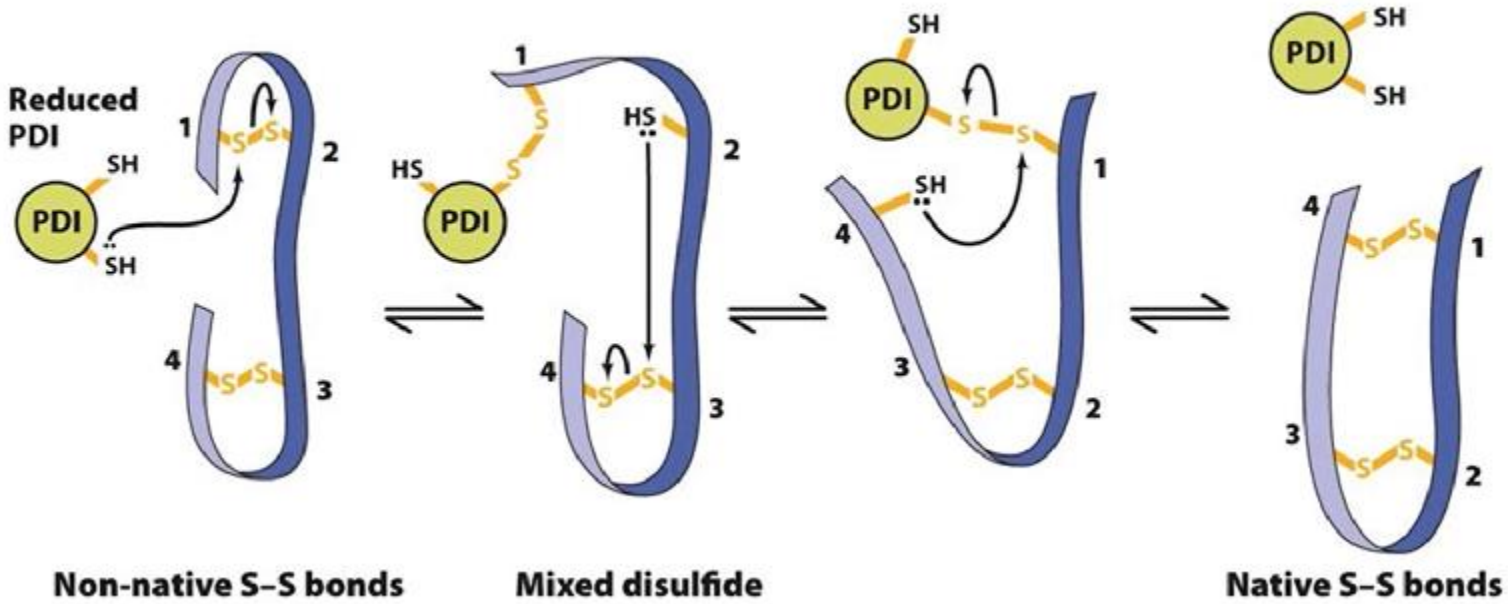
مزایا:

1- کاهش نرخ upstream
2- مانتیورینگ راحت بوسیله تکنیک وسترن بلات
3- حفاظت دربرابرتجزیه پروتئولیتیکی
4- پس ازجداسازی دارای خلوص بالا هستند

معایب:

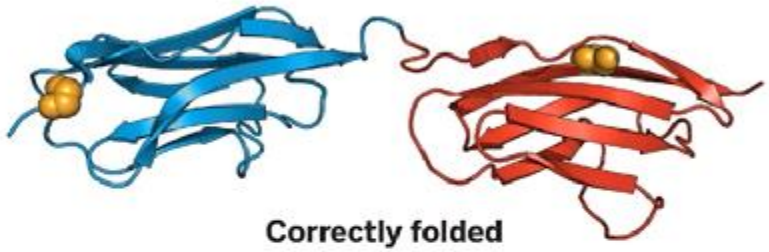
1- افزایش نرخ downstream
2- امکان refold نشدن
3- امکان آلوده شده با پروتئین های غشایی با حلالیت پایین و قطعات دیواره سلولی

◆ Protein Disulfide Isomerase (PDI)

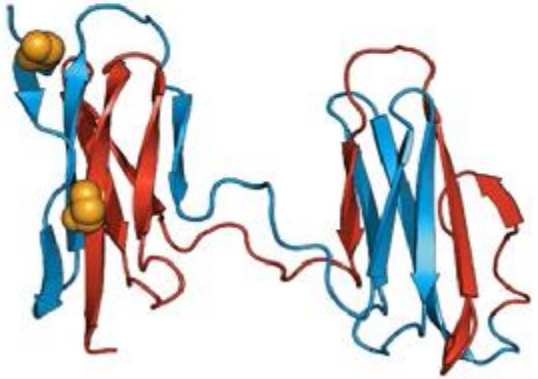


Molecular chaperon: GRP78, Calnexin, Calreticulin

Inclusion Bodies (IBs)



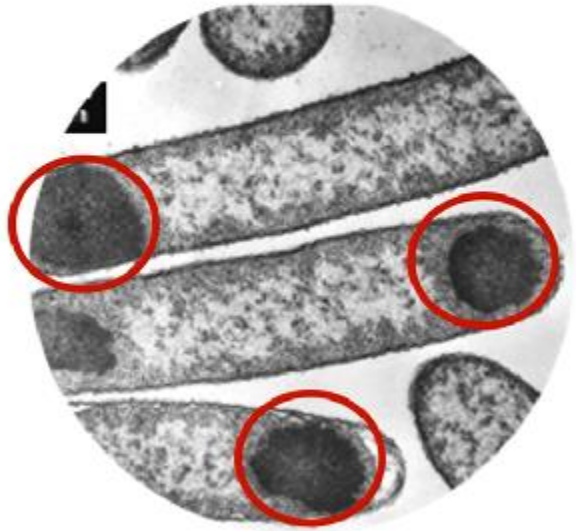
Correctly folded



Incorrectly folded

Aggregation

Inclusion Bodies



IBs Refolding Procedure

- Releasing IBs from E. coli cells
- Separated IBs from the cell homogenate
- IBs solubilization
- Purify IBs
- Refolding

Releasing IBs from E. coli

- ✓ Sonication
- ✓ French press
- ✓ Enzymatic or chemical cleavage of the cells
- ✓ Freeze–thawing
- ✓ High pressure homogenization
- ✓ Bead milling

- Separated IBs from the cell homogenate

Differential centrifugation:

Size-exclusion chromatography (SEC)

- IBs solubilization

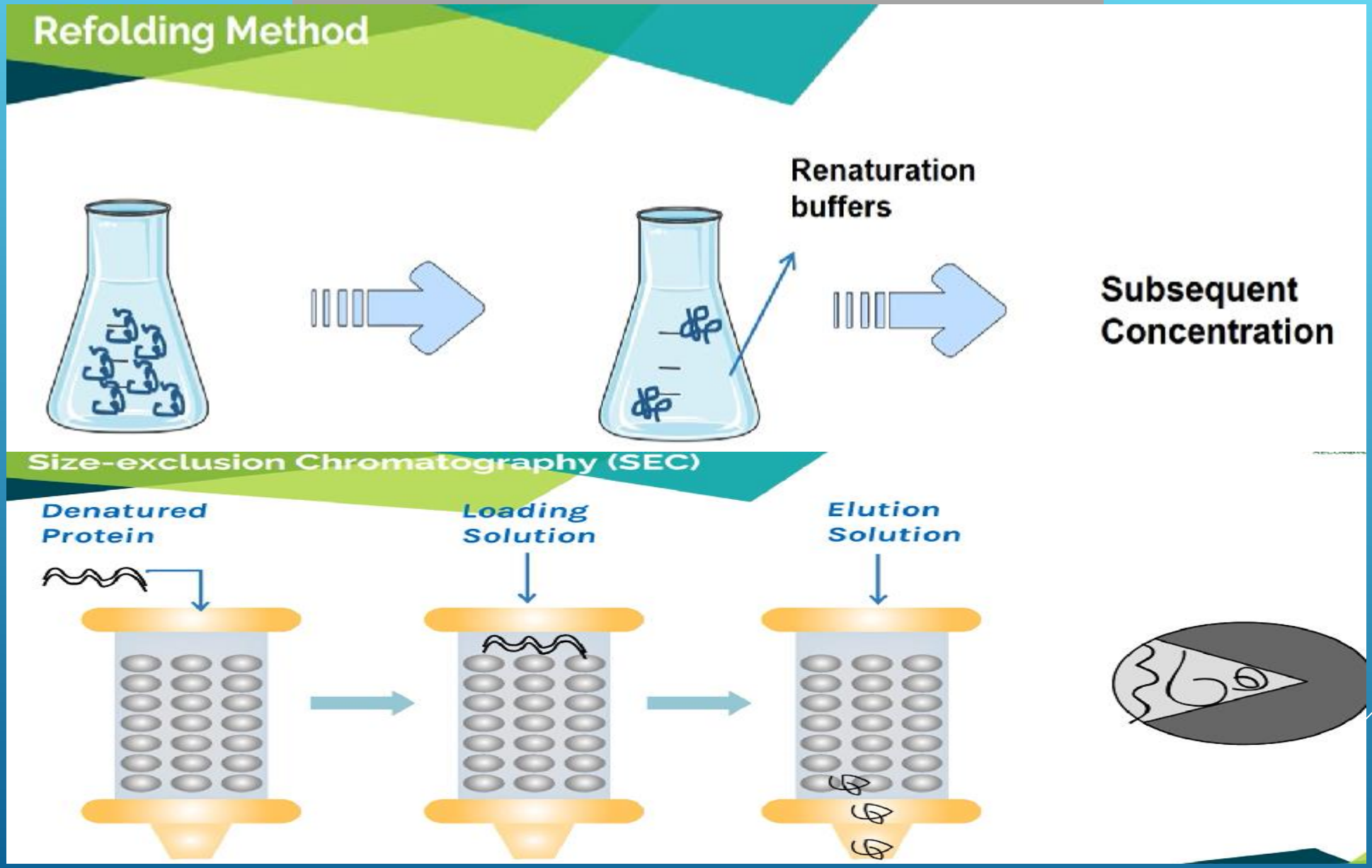
The vast majority of solubilization procedures rely on strong denaturants such as 6 M guanidine hydrochloride or 8 M urea. If the protein contains disulfide bonds, a reducing agent such as DTT should be added.

- Purify IBs
  - Size-exclusion chromatography (SEC)
  - Ion exchange chromatography
  - Columns with solid-phase

◆ Refolding

In chromatographic refolding, the solid medium acts as a kind of chaperone or assistant to help the protein refolding occur in a correct way, which minimizes misfolding and aggregation. The feed solution containing denatured protein and denaturant is loaded into the column packed with porous microspheres. Renaturation buffers are introduced to elute the denatured protein to move through the column. During this process, simultaneous refolding and adsorption take place. The solid phase helps the correct folding of the protein. At the column outlet, the protein may exit in the correct form.

◆ Refolding


Refolding Method
Renaturation buffers
Subsequent Concentration
Size-exclusion Chromatography (SEC)
Denatured Protein
Loading Solution
Elution Solution

How Protein Folding *in vivo*?

راههای کاهش عدم حلالیت (جلوگیری از تشکیل IB)

1- تغییرزمان اضافه نمودن القاء کننده IPTG

2- کاهش غلظت IPTG

3- تغییرسویه میزبان

4- استخراج با سونیکاسیون دربافر حاوی Triton-X100

5- استفاده از His-tag

علت خالص نمودن پروتئین ها

اطمینان از functional بودن

تعیین structure

بررسی اینترکشن

مشکلات استخراج و خالص سازی پروتین های طبیعی ازبافت های گیاهی/حیوانی

1- سخت و پرهزینه است

2- ممکن است درحالت نرمال بیان کم باشد

3- تشخیص بافت مورد نظرکه بالاترین بیان پروتدین مورد نظررا دارد مشکل است

علت استفاده از مهندسی ژنتیک برای تولید پروتئین های نوترکیب

1- بیان سطح بالاتر از پروتئین مورد نظر

2- خالص سازی آسان تر به دلیل بکارگیری Tag ها

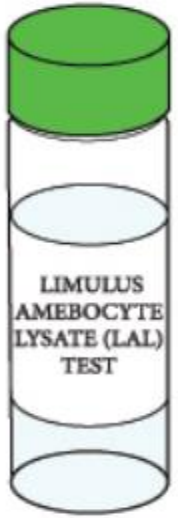
3- امکان دستکاری خصوصیات Antigenicity و Affinity

4- با استفاده از مهندسی ژنتیک می توان قطعه خاصی را که functional است را کلون نمود و از قطعات دیگر صرف نظر کرد (مثل Fab در آنتی بادی)

معضل اصلی در تولید صنعتی پروتئین های نوترکیب:

- Biofunctional=Bioactivity (Folding, Posttranslational modification)
- Toxicity (LAL)
- Purity (HPLC)

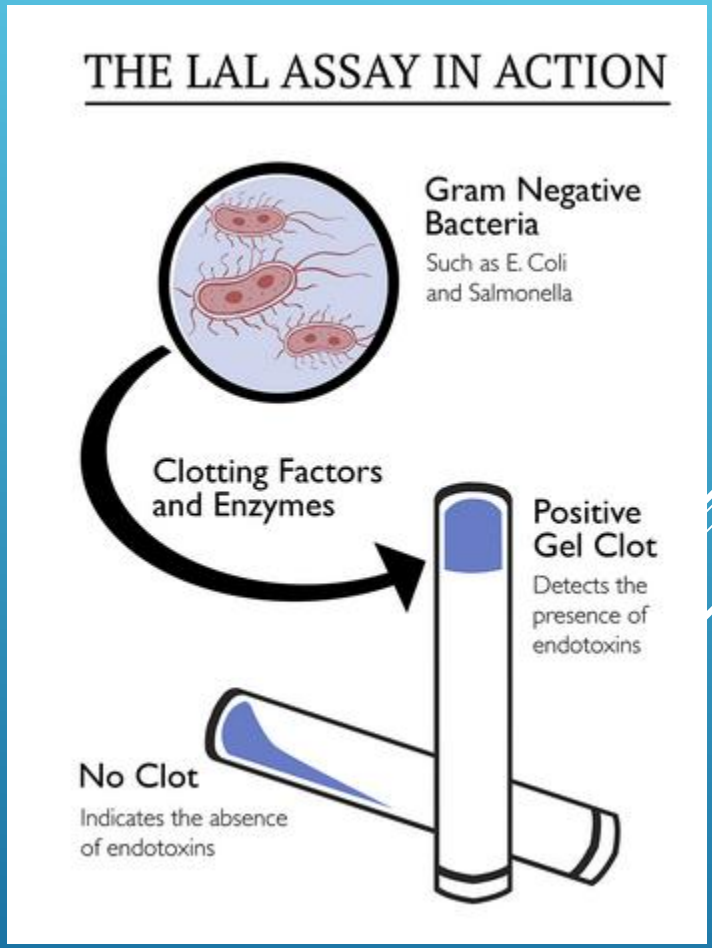




LAL Test

- *Limulus amebocyte lysate* test.
- to measure the concentration of endotoxins of gram-negative bacterial origin
- reagent: amoebocyte lysate from horseshoe crab, *Limulus polyphemus*

LAL is a reagent made from the blood of the horseshoe crab. In the presence of bacterial endotoxins, the lysate reacts to form a clot or cause a color change depending on the technique



متدهای خالص سازی

Gel Filteration Chromatography

Ion Exchange Chromatography

HPLC

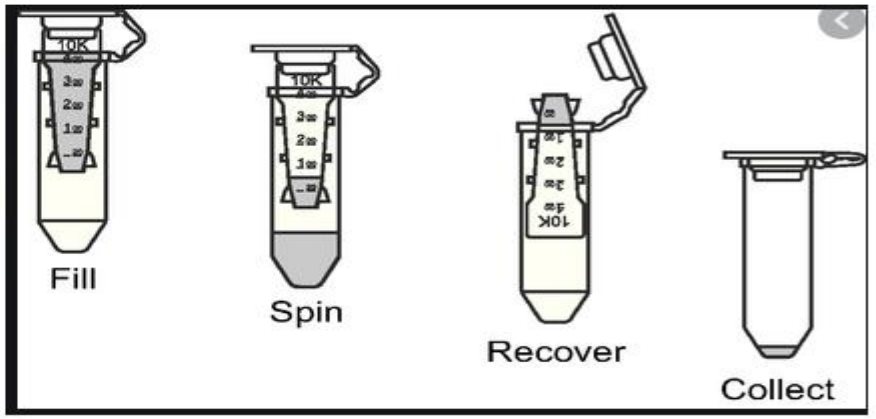
FPLC

Affinity Chromatography

Vivascience tube Cut-Off



vivascience tube cut-off



Vivaspin protein concentrator spin columns |

Affinity chromatography

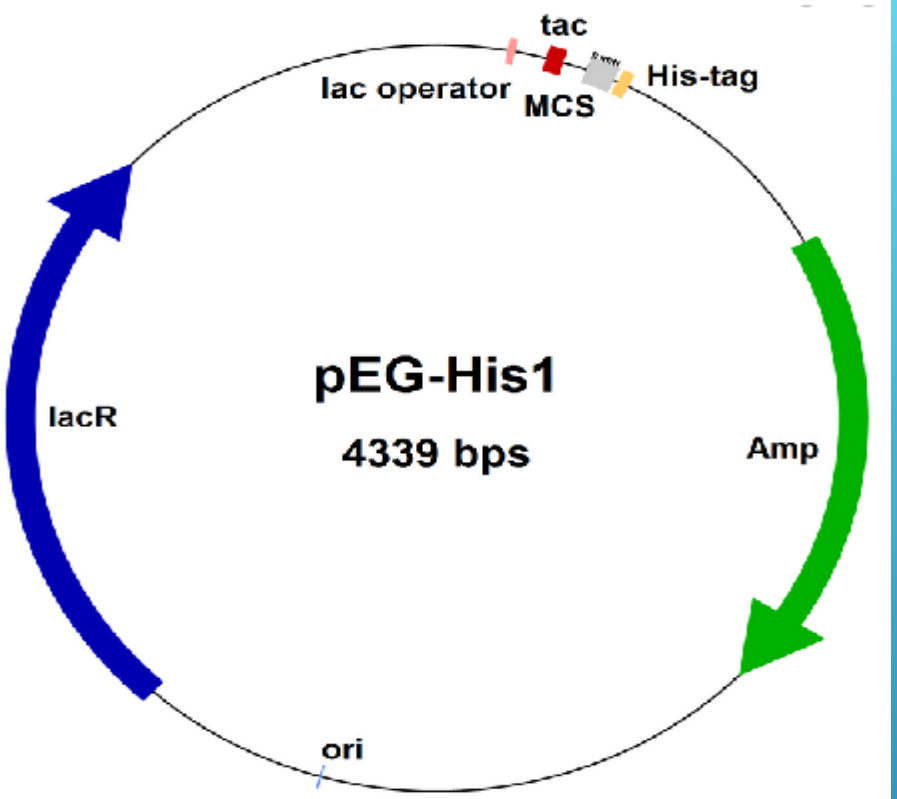
Nickle/Cobalt-Affinity Column (His-tag)

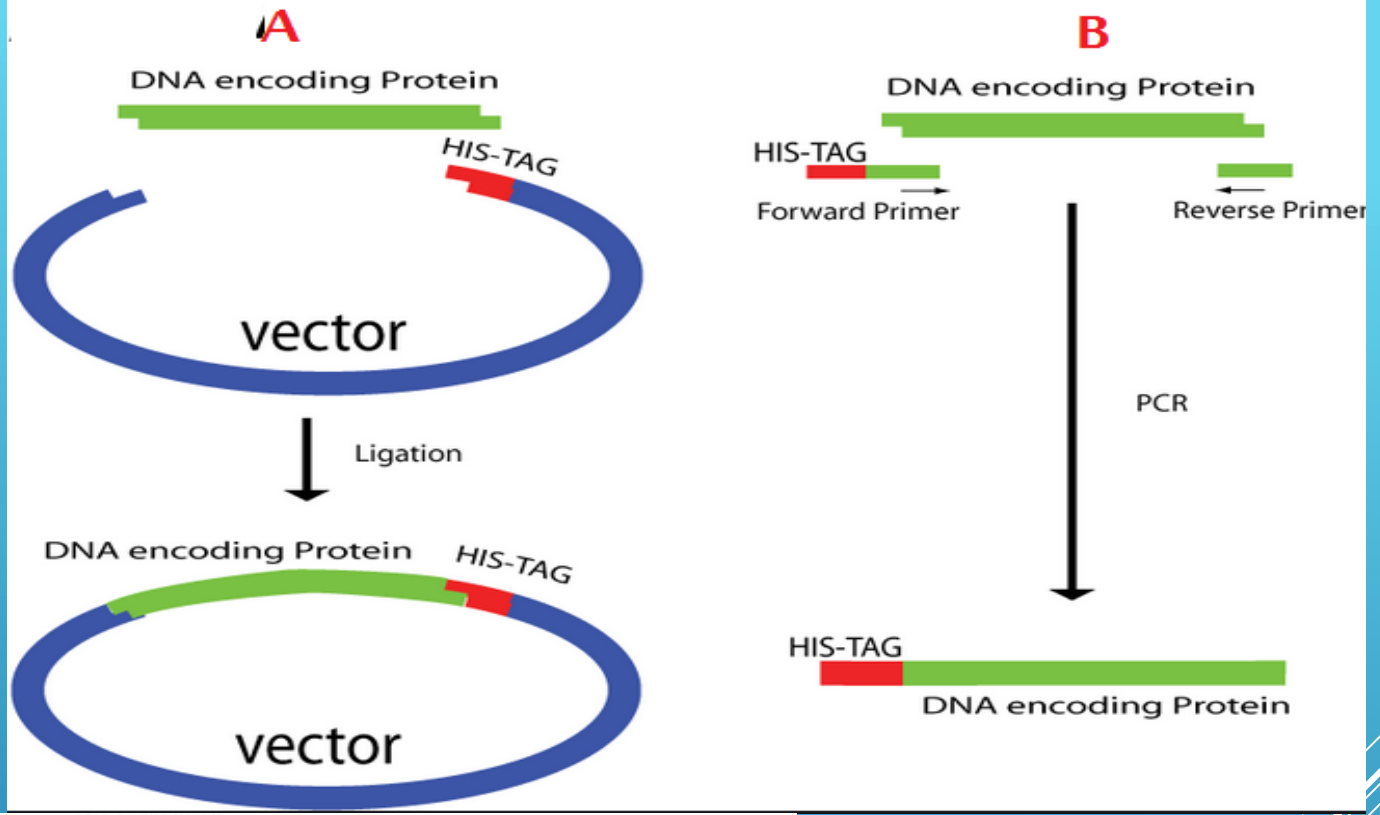
Lectin-Affinity Column (MBL, CRP)

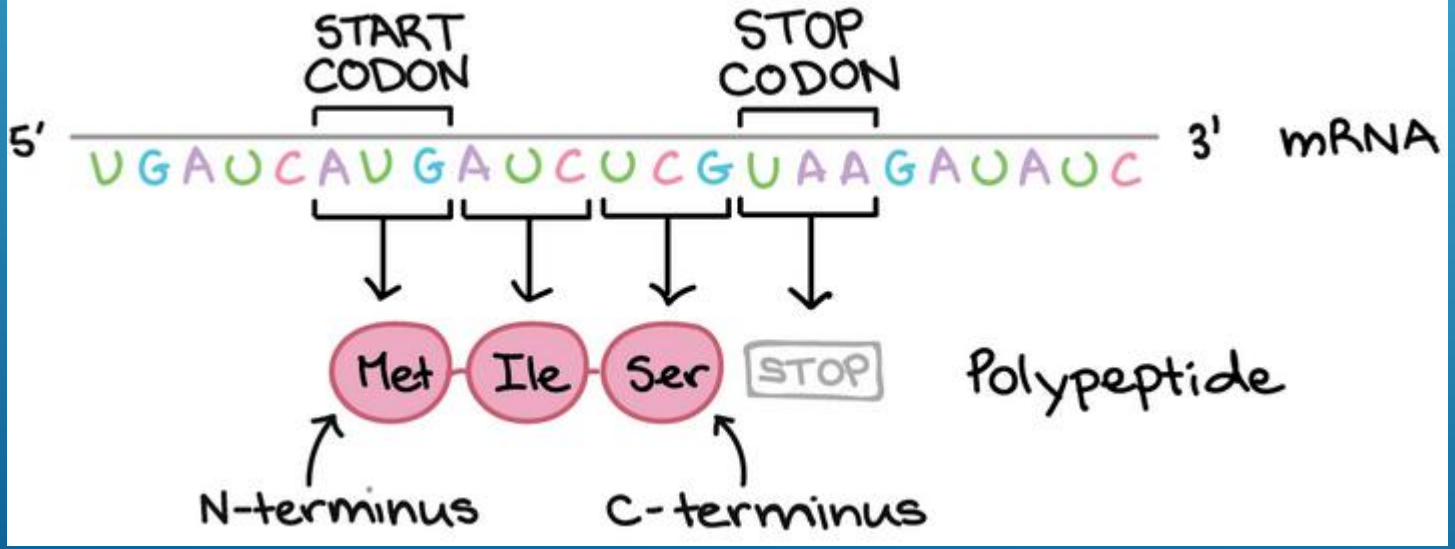
Immune-Affinity column

Glutathione-Sepharose Column (GST-tag)

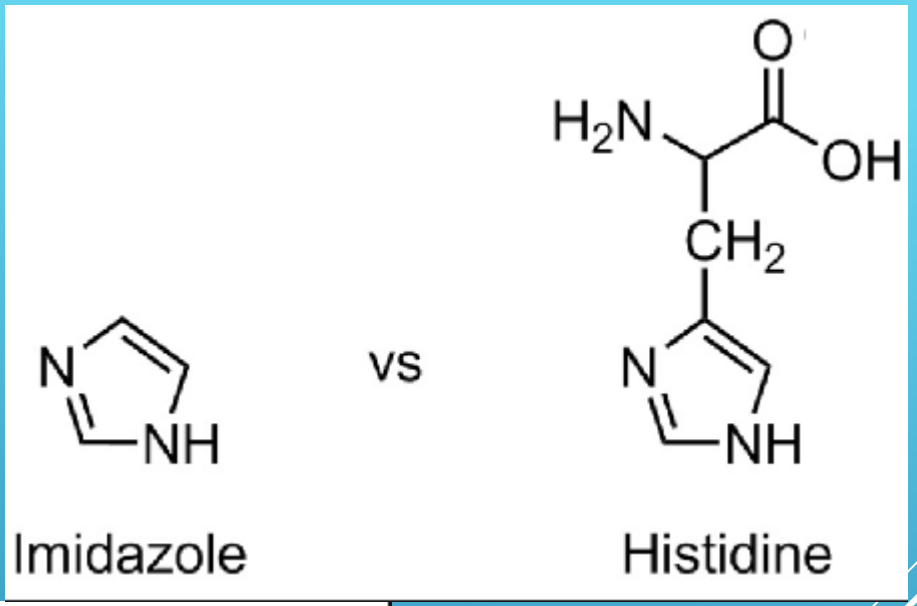
Protein A/G Sepharose Column

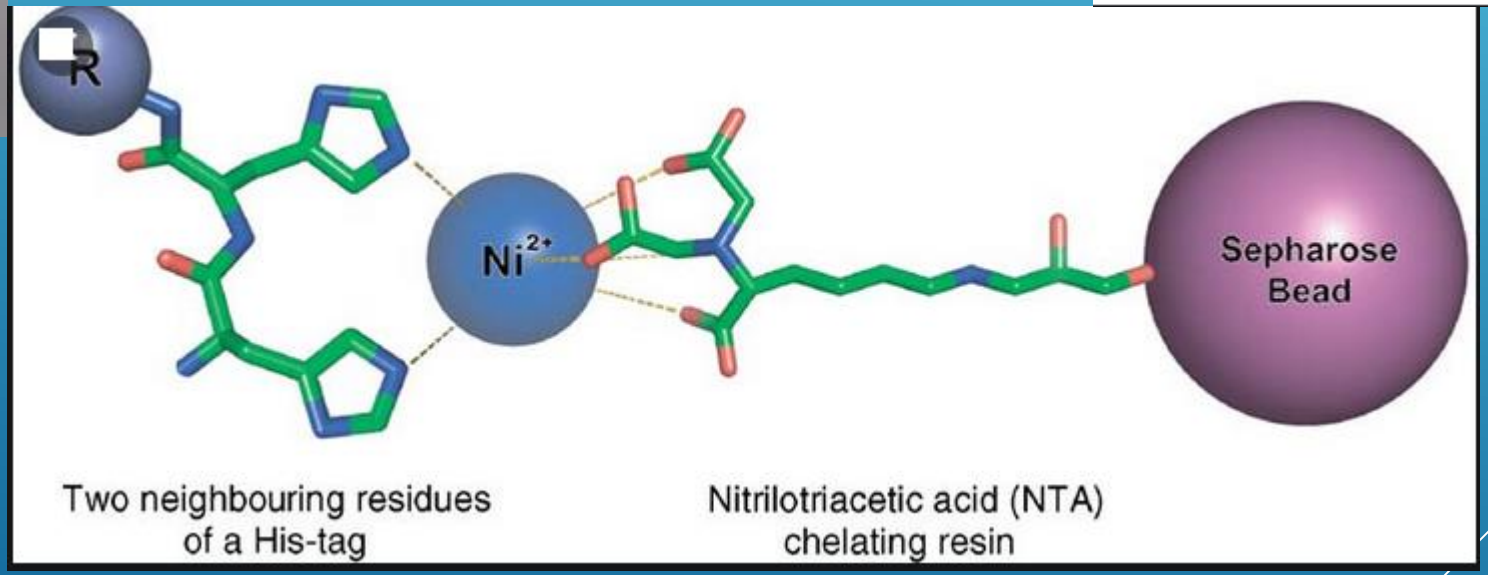

tac
lac operator
MCS
His-tag
pEG-His1
4339 bps
lacR
Amp
ori

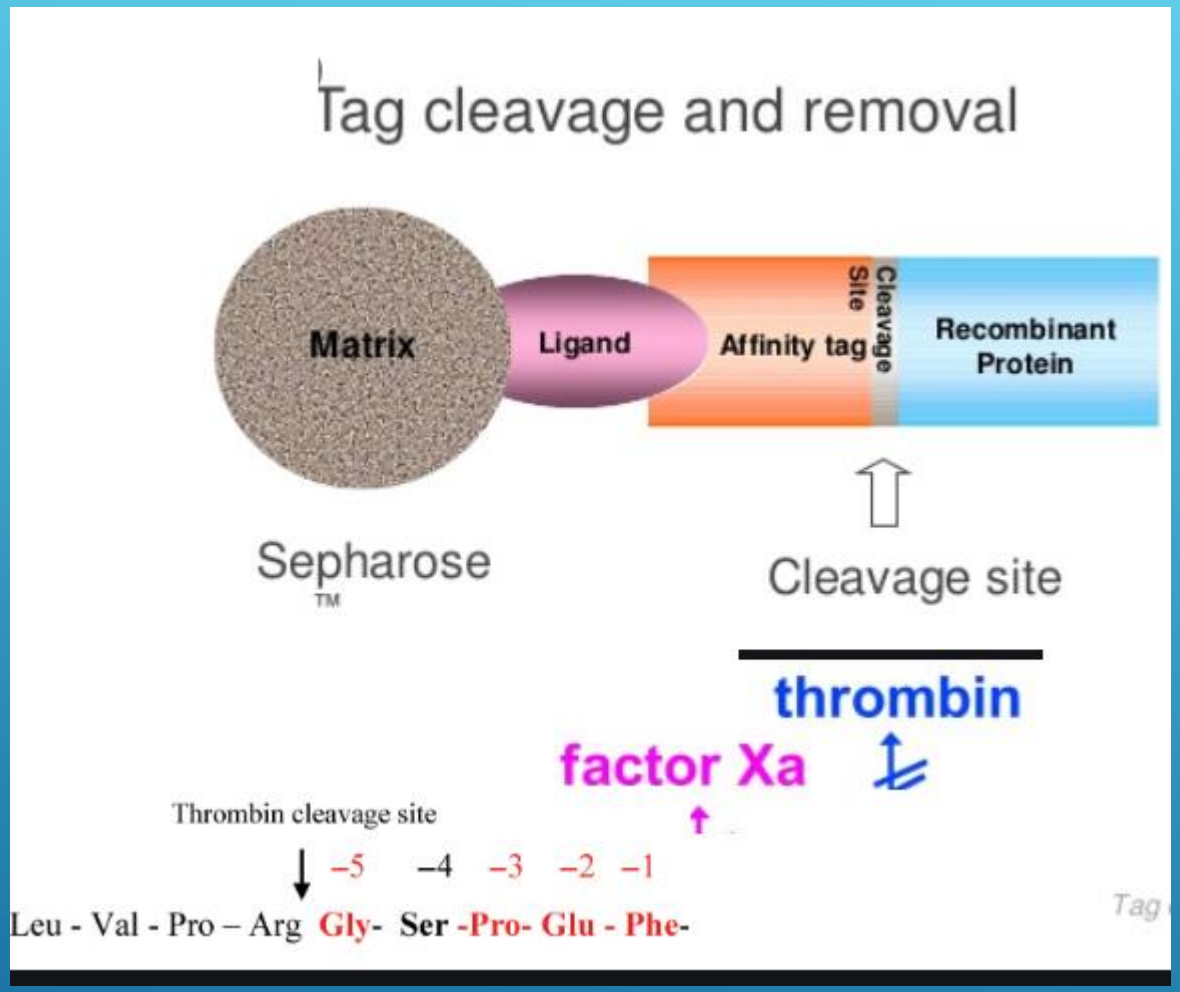

A
DNA encoding Protein
HIS-TAG
vector
Ligation
DNA encoding Protein
HIS-TAG
vector
B
DNA encoding Protein
HIS-TAG
Forward Primer
Reverse Primer
PCR
HIS-TAG
DNA encoding Protein

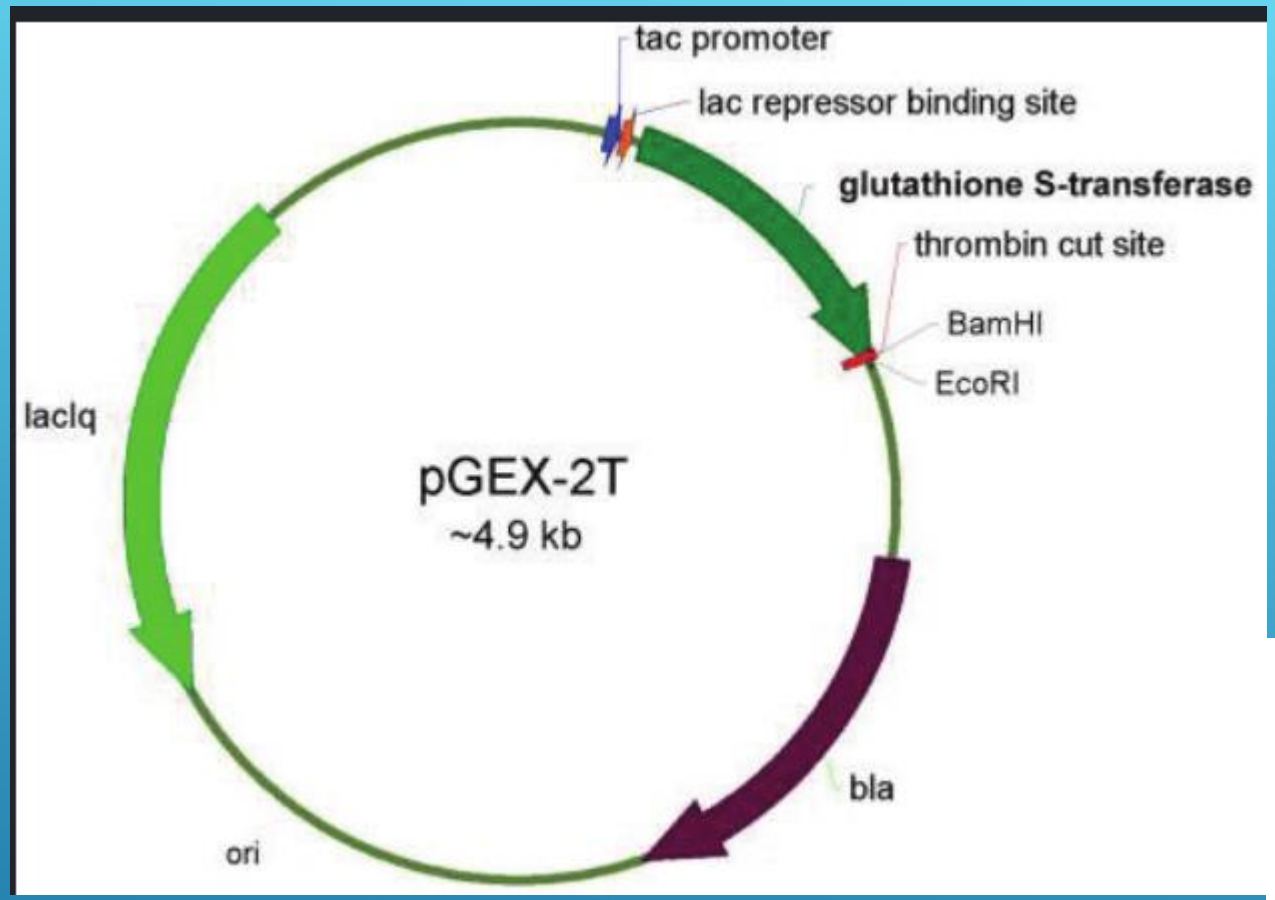

START CODON
STOP CODON
5'
UGAUCAUGAUCUCGUAAGAUAUC
3'
mRNA
Met
Ile
Ser
STOP
Polypeptide
N-terminus
C-terminus

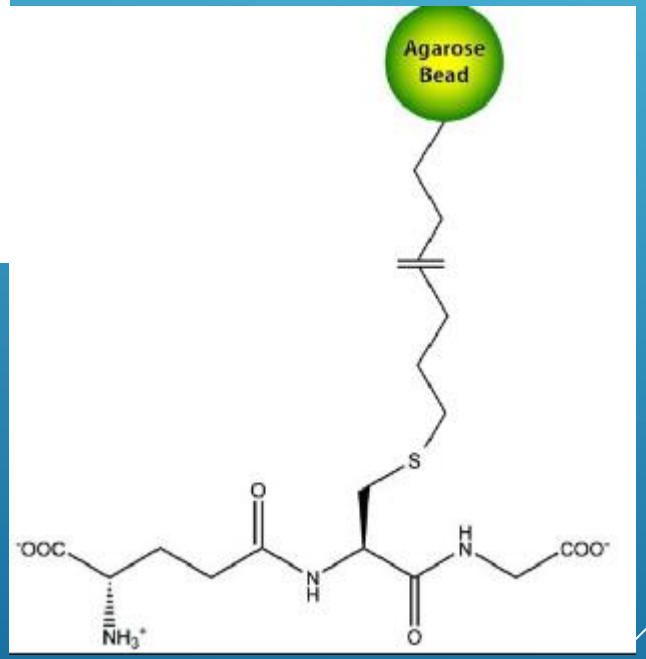



N
NH
vs
O
H_2N
OH
CH_2
N
NH
Imidazole
Histidine


R
Ni^{2+}
Sepharose Bead
Two neighbouring residues of a His-tag
Nitrilotriacetic acid (NTA) chelating resin


Tag cleavage and removal
Matrix
Ligand
Affinity tag
Cleavage Site
Recombinant Protein
Sepharose ™
Cleavage site
thrombin
factor Xa
Thrombin cleavage site
–5 –4 –3 –2 –1
Leu - Val - Pro – Arg Gly- Ser -Pro- Glu - Phe-


tac promoter
lac repressor binding site
glutathione S-transferase
thrombin cut site
BamHI
EcoRI
lacIq
pGEX-2T
~4.9 kb
bla
ori


Agarose Bead
S
O
-OOC
N
H
H
N
COO-
NH3+
O