



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Indrė Čižaitė

REKOMBINANTINIO ŽIURKĖNO PRP23-232 GAMYBA
PRODUCTION OF RECOMBINANT HAMSTER PRP23-232

Baigiamasis bakalauro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vilnius, 2013

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

Indrė Čižaitė

REKOMBINANTINIO ŽIURKĖNO PRP23-232 GAMYBA
PRODUCTION OF RECOMBINANT HAMSTER PRP23-232

Baigiamasis bakalauro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vadovas dr. Vytautas Smirnovas _____

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė) (Parašas) (Data)

Konsultantas Ričardas Mališauskas _____

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė) (Parašas) (Data)

Vilnius, 2013

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Indrė Čižaitė, 20095126

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, BIf-09

(Studijų programa, akademinė grupė)

**BAIGIAMOJO DARBO
SAŽININGUMO DEKLARACIJA**

2013 m. gegužės 27 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Rekombinantinio žiurkėno PrP23-232 gamyba“ patvirtintas 2012 m. spalio 25 d. dekanų potvarkiu Nr. 383fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: Ričardas Mališauskas. Mano darbo vadovas dr. Vytautas Smirnovas.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjusi.

(Parašas)

Indrė Čižaitė

(Vardas ir pavardė)

VILNIUS GEDIMINAS TECHNICAL UNIVERSITY

Indrė Čižaitė, 20095126

(Student's given name, family name, certificate number)

Faculty of Fundamental Sciences

(Faculty)

Bioengineering, Bif-09

(Study programme, academic group no.)

**DECLARATION OF AUTHORSHIP
IN THE FINAL DEGREE PAPER**

May 27, 2013

I declare that my Final Degree Paper entitled „Production of Recombinant Hamster PrP23-232“ is entirely my own work. The title was confirmed on October 25, 2012 by Faculty Dean's order No. 383fm. I have clearly marked the presence of quoted or paraphrased material and referenced all sources.

I have acknowledged appropriately any assistance I have received by the following professionals/advisers: Ričardas Mališauskas. The academic supervisor of my Final Degree Paper is dr Vytautas Smirnovas.

No contribution of any other person was obtained, nor did I buy my Final Degree Paper.

(Signature)

Indrė Čižaitė

(Given name, family name)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Bioinžinerijos studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

BAIGIAMOJO BAKALAURO DARBO

UŽDUOTIS

.....Nr.

Vilnius

Studentei

Indrei Čižaitėi

Baigiamojo darbo tema: **Rekombinantinio žiurkėno PrP23-232 gamyba**

patvirtinta 2012 m. spalio 25d. dekanu potvarkiu Nr. 383fm.

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2013 m. birželio 1 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

Pagaminti rekombinantinį žiurkėno PrP23-232.

Baigiamojo bakalauro darbo (projekto) konsultantas:

Ričardas Mališauskas

Vadovas dr. Vytautas Smirnovas

(Parašas)

Užduotį gavau

..... Indrė Čižaitė

(Parašas)

.....

(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. Sk.
Data-.....-.....

Pirmosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos baigiamasis darbas

Pavadinimas **Rekombinantinio žiurkėno PrP23-232 gamyba**

Autorius **Indrė Čizaitė**

Vadovas **dr. Vytautas Smirnovas**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Infekciniai prionai patekę į organizmą pakeičia jame esančių natyvių priono baltymų struktūrą ir sukelia skirtingas prionines ligas. Tam, kad būtų galima tyrinėti prionų infektyvumą, reikia nemažo natyvaus priono baltymo kiekio. Kadangi tai nėra dažnai naudojamas baltymas, jo pasiūla maža, o kaina didelė. Šio bakalaurnio darbo tikslas – pagaminti rekombinantinį žiurkėno PrP23-232.

Žiurkėno priono baltymą koduojančios plazmidės buvo transformuotos į BL21 (DE3) ir BL21 Star (DE3) kompetentines ląsteles, užauginta biomasė ir indukuota priono baltymų raiška. Biomasė suspenduota 6M guanidino HCl tirpale ir suardyta ultragarsu. Denatūruotų baltymų tirpalas užneštas ant afininės chromatografijos kolonos ir atlikta SHaPrP23-232 renatūracija. Renatūruotas baltymas išeina naudojant aukštą imidazolo koncentraciją. Trombino pagalba nuo baltymo nukirpta histidininė uodegėlė. Trombinas pašalintas naudojant jonų mainų chromatografiją. Baltymo grynumas nustatytas naudojant SDS-PAGE elektroforezę, o masė – masių spektrometrijos pagalba. Nustatyta, kad BL21 Star (DE3) kompetentinės ląstelės geriau tinka priono baltymo gamybai. Pagaminta 29,6 mg SHaPrP23-232.

Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados ir literatūros sąrašas.

Darbo apimtis – 35 p. teksto be priedų, 9 pav., 1 lent., 24 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai:

Afininė chromatografija, jonų mainų chromatografija, priono baltymas, renatūracija, trombinas.

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Egz. Sk.
Data-.....-.....

Bachelor Degree Studies **Bioengineering** study programme Final Thesis

Title **Production of Recombinant Hamster PrP23-232**

Author **Indrė Čižaitė**

Academic supervisor **Dr Vytautas Smirnovas**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Prions are infectious proteins which act by changing the structure of the normal prion protein into an abnormal prion in the host. Due to the high price of commercially available PrP the only way to obtain the amount necessary for biophysical studies is to produce it in our lab. The aim of this research project was to express and purify recombinant hamster PrP23-232.

In this study recombinant plasmids were transformed into BL21 (DE3) and BL21 Star (DE3) competent cells. Expression of hamster prion protein were induced by IPTG and overexpressed as inclusion bodies in the cytoplasm of *E. coli*. Biomass was denatured in 6M guanidine hydrochloride, homogenized and refolded while N-terminally immobilized on a nickel-IDA sepharose. After refolding the protein was eluted at a high imidazole concentration. After elution the histidine tail was removed using thrombin protease. In the final purification step, thrombin was separated from the recombinant SHaPrP23-232 by ion-exchange chromatography. Protein was analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. After using two different *E. coli* strains, it was noticed, that better expression is in BL21 Star (DE3) strain. Total amount of 29,6 mg of the protein was produced.

Structure: introduction, literature part, materials and methods, results and discussion, conclusions and references.

Thesis consists of: 35 p. of text without appendixes, 9 pictures, 1 table, and 24 bibliographical entries.

Keywords

Affinity chromatography, ion-exchange chromatography, prion protein, renaturation, thrombin.

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	9
ĮVADAS.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
1.1. Priono baltymai (PrP)	11
1.2. Rekombinantinių baltymų gamyba.....	13
1.2.1. Genų raiška <i>E.Coli</i>	14
1.2.2. Intarpiniai kūneliai	14
1.2.3. Baltymų renatūracija iš intarpinių kūnelių.....	15
1.2.4. Afininė chromatografija naudojant imobilizuotus metalo jonus (IMAC)	16
1.2.5. Histidino uodegėlės pašalinimas	18
1.2.6. Jonų mainų chromatografija.....	18
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	20
2.1. Darbe naudoti prietaisai, medžiagos, tirpalai ir kitos priemonės.....	20
2.1.1. Naudoti prietaisai	20
2.1.2. Naudotos medžiagos ir rinkiniai pagal gamintoją.....	20
2.1.3. Bakterijų kamienai	21
2.1.4. Genetiniai konstruktai	21
2.1.5. Terpės.....	22
2.1.6. Buferiniai ir kiti tirpalai	22
2.2. Metodai	23
2.2.1. Transformacija į kompetentines ląsteles	23
2.2.2. Bakterijų paruošimas ilgalaikiam saugojimui.....	24
2.2.3. Rekombinantinio SHaPrP23-232 raiškos gavimas <i>E. coli</i> ląstelėse	24
2.2.4. Elektroforezė poliakrilamido gelyje (NDS-PAGE)	25
2.2.5. Baltymo koncentracijos nustatymas spektrofotometriškai	25
2.2.6. Renatūracija ir gryninimas IMAC metodu.....	26
2.2.7. Histidino uodegos nukirpimas ir jonų mainų chromatografija	27
2.2.8. Rekombinantinio SHaPrP23-232 koncentravimas.....	28
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	29
3.1. Rekombinantinio SHaPrP23-232 raiška	29
3.2. Rekombinantinio SHaPrP23-232, auginto <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3), gryninimas...30	
3.3. Rekombinantinio SHaPrP23-232, auginto <i>E. coli</i> BL21 (DE3), gryninimas	33
IŠVADOS.....	36
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	37

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AA – akrilamidas;
APS – amonio persulfatas;
aps./min – apsisukimai per minutę;
Arg – argininas;
Asp – asparto rūgštis;
BAA – bisakrilamidas;
BMR – branduolių magnetinis rezonansas;
CM – karboksimetil;
Gly – glicinas;
Glu – glutamo rūgštis;
GPI – glikozilfosfatidilinozitolis;
GuHCl – guanidino hidrochloridas;
His – histidinas;
IDA – iminodiacetatas;
IK – intarpiniai kūneliai;
IMAC – giminingumo (afininė) chromatografija naudojant imobilizuotus metalo jonus (angl. Immobilized-Metal Affinity Chromatography);
IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas;
lacUV5 – *lac* tipo promotorius;
Lys – lizinas;
mAU – mili-absorbcijos vienetai;
O.V. – optiniai vienetai;
Pro – prolinas;
PrP – priono baltymas (angl. Prion Protein);
NDS – natrio dodecilsulfatas;
NDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė;
Ser – serinas;
SHaPrP23-232 – žiurkėno priono baltymas;
S.O.C. – optimali mitybinė terpė (angl. Super Optimal broth with Catabolite repression);
TCA – trichloracto rūgštis;
TEMED – tetrametiletildiaminas;
TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis.

IVADAS

1982m. Stanley B. Prusiner iškėlė hipotezę, kad užkrečiamus žmogaus ir gyvūnų galvos smegenų ir centrinės nervų sistemos susirgimus sukelia baltyminės kilmės infekcinės dalelės ir pavadino jas prionais. 1997m. jam paskirta Nobelio premija už prionų atradimą (Prusiner, 1998; Soto, 2010). Priono baltymai egzistuoja dviejų skirtingų formų: normali ląstelinė izoforma ir infekcinė izoforma. Normalią priono baltymo formą koduoja pradinis genas, dėl kurio mutacijų atsiranda įvairius sutrikimus sukeliantys infekciniai prionai. Tokie baltymų agregatai, patekę į organizmą pakeičia jame esančių natyvių priono baltymų struktūrą, paversdami juos lygiai tokiais pačiais prionais. Skirtingų struktūrų prionų agregatai, dar vadinami prionų „kamienais“, sukelia įvairias prionines ligas, vadinamas kempinligėmis (angl. transmissible spongiform encephalopathy). Patekę į organizmą ir nukeliavę iki galvos smegenų, prionai gali metų metais kauptis, kol galiausiai, susidarius dideliu jų kiekiui, sukelia mirtį (Aguzzi *et al.*, 2009).

Norint tyrinėti skirtingų prionų „kamienu“ susidarymą *in vitro* biofizikiniais metodais reikia nemažo priono baltymo kiekio, kurį tikimasi pagaminti šio darbo metu. Vienas iš būdų – rekombinantinių baltymų raiška *Escherichia coli* bakterijose, kurios yra labai plačiai naudojamos rekombinantinių baltymų gavimui. Taigi, parinkus tinkamus vektorius, raiškos šeimininkus ir jų auginimo sąlygas, gaunama biomasė, kurią suardžius, renatūravus bei išgryninus galima greitai ir gana pigiai gauti norimą baltymą.

Šio darbo tikslas yra pagaminti rekombinantinį žiurkėno PrP23-232. Tad keliami tokie uždaviniai:

- Transformuoti PrP23-232 koduojančią plazmidę į *E. coli* BL21 (DE3) ir BL21 Star (DE3) kompetentines ląsteles.
- Auginti biomasę ir indukuoti tikslinio baltymo raišką.
- Renatūruoti baltymą iš intarpinių kūnelių ir gryninti afininės chromatografijos metodu.
- Trombino proteazės pagalba nukirpti histidininę uodegą ir galutinai išgryninti baltymą jonų mainų chromatografijos metodu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Priono baltymai (PrP)

Remiantis pagrindine molekulinės biologijos dogma, aminorūgščių seką polipeptidinėje grandinėje lemia informacinės ribonukleorūgšties (mRNR) struktūra, o šios molekulės struktūrą koduoja universali genetinė medžiaga. Eukariotų ląstelėse – tai deoksiribonukleorūgštis (DNR). Baltymų biosintezė vyksta translacijos proceso metu, kai mRNR bazių seka paverčiama į aminorūgščių, sujungtų į polipeptidinę grandinę, seką. Įprastai pats baltymas nepasižymi savybe informaciją perduoti naujai susintetinamiems baltymams. Tačiau atradus prionus buvo nustatyta, kad šios baltyminės dalelės gali išsaugoti informaciją apie savo struktūros konformacinius pokyčius ir perduoti ją naujai sintetiniams baltymams (Lewin, 2002).

Normalus priono baltymas vadinamas PrP^C – ląstelinė forma (angl. cellular) arba PrP^{Sen} – jautrus (angl. sensitive) proteazėms. Priono baltymas, kurio konformacija yra pakitusi vadinamas PrP^{Sc} (angl. scrapie) arba PrP^{Res} – atsparus (angl. resistant) proteazėms. PrP^C ir PrP^{Sc} polipeptidinės grandinės, kurias sudaro identiškas aminorūgščių sąstatas, skiriasi tik erdvine struktūra, t.y. konformacijomis. Manoma, kad PrP^C izoforma turi didelį α -spiralių kiekį ir nežymų β -klosčių kiekį, o PrP^{Sc} priešingai, β -klosčių daugiau nei α -spiralių (Prusiner, 2001), o gal ir visai jų nėra (Smirnovas, 2011). Panaši į grandininę reakciją konversija iš PrP^C į patologinį PrP^{Sc}, gali atsirasti spontaniškai arba įvykus kontaktui su prioniniu infekciniu baltymu taip pat dėl mutacijos koduojančioje priono baltymo sintezę geno dalyje (Aguzzi *et al.*, 2009; Wickner, Edskes, Roberts *et al.*, 2004).

Nustatyta, kad ląstelinė priono baltymo izoforma yra sintetinama, sulankstoma ir glikozilinama endoplazminiame tinkle, o po to transportuojama į ląstelės paviršių – plazminę membraną. Transportavimo metu vyksta baltymo brendimas, kurio metu atjungiamas N galo signalinė polipeptido seka, prie dviejų aminorūgščių likučių prijungiamos oligosacharido grandinės, atjungiamas polipeptido C galo seka ir prie C galinio sutrumpinto peptido prijungiamas glikozilfosfatidilinozitolis (prie 231 serino), kuris ir laiko priono baltymą ląstelės membranos paviršiuje (Aguzzi *et al.*, 2009).

Translacijos produktą – pilną žiurkėno (*Mesocricetus auratus*) priono baltymą koduojanti aminorūgščių seka turi 254 aminorūgštis, tačiau subrendusioje – pilnai susiformavusioje baltymo formoje, turinčioje tik 23-231 translacijos produkto aminorūgštis, nerandama 22 N galo signalinių ir 23 C galo aminorūgščių (1 pav.) (Donne, 1997). Šis priono baltymas turi vieną disulfidinį tiltelį, jungiantį 179 ir 214 cisteiną (2 pav.). Infekciniuose

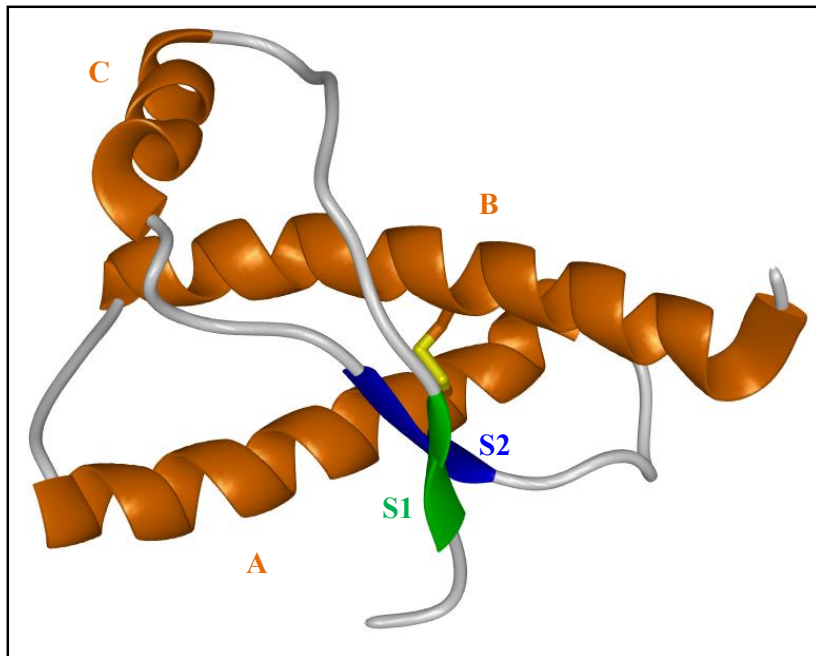
prionuose proteazėms atspari dalis – 90-231 aminorūgštys. Taigi, pagrindinė koduojanti prioninį baltymą yra 23-231 aminorūgščių seka, o jo molekulinė masė – apie 23 kD.

```

1 MANLSYWLLA LFMWTDVG LCKKRPKPGG WNTGGSRYPG QGSPGGNRYP PQGGGTWGP 60
61 HGGGWQPHG GGWQPHGGG WQPHGGGWG QGGGTHNQWN KPSKPKTNMK HMAGAAAAGA 120
121 VVGGLGGYML GSAMSRPMMH FGNDWEDRYR RENMNRYPNQ VYRPPVDQYN NQNNFVHDCV 180
181 NITIKQHTVT TTTKGENFTE TDIKIMERVV EQMCTTQYQK ESQAYYDGRR S SAVLFSSPP 240
241 VILLISFLIF LMVG

```

1 pav. Pilna žiurkėno (*Mesocricetus auratus*) priono baltymą koduojanti aminorūgščių seka (Swiss-Prot Nr. P04273).



2 pav. Rekombinantinio žiurkėno (*Mesocricetus auratus*) PrP90-231 baltymo BMR antrinė struktūra (PrP^C izoforma). Trys α -spiralės pažymėtos oranžine spalva; A ir B α -spirales jungia geltona spalva pažymėtas disulfidinis tiltelis (tarp 179 ir 214 cisteino); β -klostės – mėlyna ir žalia spalva (RCSB Protein Data Bank, Nr. 1B10).

Tyrimai parodė, kad priono baltymų sintezę kontroliuoja ląstelės genai ir jų sintezė vyksta daugelyje žmonių ir gyvūnų audinių bei organų (Aguzzi *et al.*, 2009). Vis dėlto didžiausi

šio baltymo kiekiai aptinkami smegenyse, centrinėje nervų sistemoje (Wickner, Edskes, Ross *et al.*, 2004).

Priono baltymų funkcija dar nėra visiškai žinoma. Manoma, kad jie veikia kaip reguliatoriai ląstelių metabolizme.

Infekciniai prionai sukelia kempinliges, kurios savo morfologinėmis ir patogeninėmis-fiziologinėmis savybėmis panašios į kitus progresuojančius galvos smegenų sutrikimus, pvz. Alzheimerio ir Parkinsono ligas. Kita vertus, prioninės ligos yra unikalios tuo, kad jos yra perduodamos (Aguzzi *et al.*, 2009). Šiems susirgimams būdingas labai ilgas inkubacinis periodas (nuo mėnesių iki metų), ilga ligos trukmė, pilkoji smegenų medžiaga įgauna kempinės struktūrą, vyksta nepastebimi uždegiminiai procesai, nėra imuninio atsako (ląstelinio ar humoralinio) ir galiausiai išstinka neišvengiama mirtis. Tai tokia žmonių liga kaip kuru, gyvulių ligos – kempinligė, avių *scrapie* liga (Wickner, Edskes, Ross *et al.*, 2004). Creutzfeldt-Jakob, Gerstmann-Sträussler-Scheinker ir šeimyninė nemiga (angl. Fatal familial insomnia) yra paveldimos dominantinės žmonių prioninės ligos, kurias sukelia mutacijos priono baltymą koduojančiame gene. 85 % šiuo metu žinomų prioninių ligų yra sukeltos spontinio virsmo, o likę atvejai – infekcinės ir paveldimos formos (Prusiner, 2001).

Infekcinių prionų negalima sunaikinti įprastomis sterilizacijos priemonėmis, pvz. dideliais kiekiais jonizuojančios spinduliuotės ar ultravioletiniais spinduliais, kuriems itin jautrios nukleorūgštis turinčios infekcinės dalelės, virusai (Soto, 2010).

1.2. Rekombinantinių baltymų gamyba

Genų inžinerijos metodais sukurti rekombinantiniai kamienai (bakterijų, mielių) gali gaminti įvairius žmogaus ir kitų organizmų baltymus. Iš biomasės gaunami dideli kiekiai žmogų dominančių baltymų, tame tarpe ir farmacinių, kaip pvz. žmogaus insulinas, žmogaus augimo hormonas, hepatito B vakcina, interferonai ir kt. (Palomares *et al.*, 2004).

Šiuo metu apie rekombinantinių baltymų kūrimą žinoma daug: yra daugybė modelinių organizmų, žinomas jų genomai, molekulinė biologija, fiziologija, biochemija, sukurta daugybė genų raiškos sistemų, tačiau rekombinantinių baltymų kūrimas vis dar kelia nemažai problemų (Sevastyanovich *et al.*, 2010).

Rekombinantiniams baltymams keliami reikalavimai – turi būti gaunamas pakankamas jų kiekis, o baltymas turi atlikti savo funkciją. Svarbūs veiksniai pasirenkant baltymų raiškos sistemas yra baltymo masė, disulfidinių tiltelių skaičius, norimos potransliacinės modifikacijos baltyme, vieta, kurioje kaupsis susintetintas baltymas (Brondyk, 2010). Taip pat būtina atsižvelgti į tai, kad rekombinantiniai baltymai yra linkę kauptis bakterijų citoplazmoje

netirpių intarpinių kūnelių pavidalu (Sevast'syanovich *et al.*, 2010). Rekombinantinių baltymų gamyba yra svarbi vaistų, bioinsekticidų pramonėje, diagnostikoje, fermentinio aktyvumo matavimams, biokatalizatorių sintetinimui ir kt. Tai – pigesnis, greitesnis ir paprastesnis būdas gauti didelius kiekius norimo baltymo, neišskiriant iš gamtinio šeimininko (Palomares *et al.*, 2004).

1.2.1. Genų raiška *E. coli*

Escherichia coli yra vienas iš plačiausiai naudojamų šeimininkų rekombinantinių baltymų gamybai. Tai gramneigiamas, nepatogeninis ir gerai charakterizuotas mikroorganizmas. Tačiau šis producentas neatlieka potransliacinių modifikacijų, t.y. daugeliu atvejų gaunami tiksliniai baltymai neturi savo teisingos struktūros ar reikiamo aktyvumo (Baneyx, 1999). Vis dėlto *E. coli* naudojimas užtikrina paprastą ir sparčią rekombinantinių baltymų raišką dėl trumpo ląstelių dvigubėjimo laiko. Auginimui nereikia brangių terpių, todėl toks baltymų gavimas palyginti pigus ir lengvai pagausinamas (Brondyk, 2010).

Efektyvi genų raiška priklauso nuo transkripcijos efektyvumo, mRNR stabilumo ir jos translacijos dažnio. Geriausi reguliatoriniai mechanizmai vyksta transkripcijos metu. Genų raišką *E. coli* reguliuoja du pagrindiniai elementai – represorius ir operatorius. Bakterijose veikia laktozės (*lac*) operonas, kurį sudaro promotorius, operatorius ir trys struktūriniai genai: *lacZ*, *lacY* ir *lacA*, koduojantys atitinkamai β -galaktozidazę, β -galaktozido permeazę ir β -galaktozido transacetilazę. Represorius, kuris aktyvioje formoje yra tetrameras, nesant induktoriaus, jungiasi prie *lac* operatoriaus sekos ir neleidžia RNR polimerazei katalizuoti šių trijų struktūrinių genų transkripcijos. Tuo metu sintetamos tik kelios *lacZ*, *lacY* ir *lacA* genų baltymų molekulės, palaikančios gana žemą fermentinį efektyvumą, kuris yra būtinas *lac* operono indukcijai, nes tada nedidelis laktozės kiekis, patekęs į ląstelę per membranoje esančias permeazes, β -galaktozidazės yra paverčiamas alolaktoze (Lewin, 2002; Kadziauskas, 2008).

Remiantis *lac* operono reguliacijos principu buvo sukurta rekombinantinių baltymų indukuojama *E. coli* raiškos sistema. Mokslinių eksperimentų metu *lac* operono induktoriumi yra dažnai naudojamas nemetabolizuojamas, į alolaktozę struktūriškai panašus junginys – izopropil- β ,D-tiogalaktopiranozidas (IPTG) (Kadziauskas, 2008).

1.2.2. Intarpiniai kūneliai

Esant didelei rekombinantinių baltymų raiškai, sukuriama nepalanki taisyklingam baltymų susivyniojimui aplinka ir dalinai susivynioję baltymai *E. coli* citoplazmoje ima jungtis į amorfines baltymų granules, vadinamas intarpiniais kūneliais. Didelę įtaką intarpinių kūnelių formavimuisi turi baltymo prigimtis ir raiškos sistema. Kita vertus, esant dideliame baltymo

raiškos greičiui, tarpinių kūnelių susidarymui beveik nebeturi įtakos baltymo savybės ar raiškos sistema, netgi endogeniniai baltymai gali sudaryti tarpinius kūnelius (Hanning *et al.*, 1998). Atsirandančios baltymo molekulės nespėja susivynioti į natyvią struktūrą ir citoplazmoje susidarius didelei daliai susivyniojusio baltymo koncentracijai, jis agreguoja. Rekombinantinių baltymų kiekis tarpinių kūnelių pavidalu kai kuriais atvejais gali sudaryti 50% ir daugiau visų ląstelės baltymų.

Normaliai *E. coli* citoplazmoje dėl redukuoto glutationo pertekliaus disulfidiniai tilteliai bakterijų citoplazmoje nesusidaro, nors kai kuriais atvejais tai yra įmanoma. Tuo tarpu palanki aplinka disulfidinių tiltelių susidarymui yra bakterijų periplazmoje, tačiau ten taip pat gali būti ekspresuojamas baltymas tarpinių kūnelių pavidalu. Taip yra todėl, kad bakterijų periplazmos fermentas disulfidinių tiltelių oksidoreduktazė (DsbA) katalizuoja disulfidinių tiltelių susidarymą, o disulfidinių tiltelių izomerazė (DsbC) – jų persitvarkymą. Kita vertus, bakterijų baltymai turi nedaug disulfidinių tiltelių, o rekombinantiniams eukariotiniams baltymams su dideliu disulfidinių tiltelių skaičiumi *E. coli* periplazmos fermentai yra ne tokie efektyvūs. Be to, esant didelei rekombinantinio baltymo raiškai, fermentų kiekis gali būti nepakankamas (Lilie *et al.*, 1998).

Yra keletas skirtingų strategijų leidžiančių išvengti netaisyklingo baltymų susivyniojimo ir jų agregacijos. Viena iš jų paremta šaperonų – citoplazmoje esančių specialių ląstelės baltymų, aktyviai dalyvaujančių baltymų susivyniojimo procese, panaudojimu. Kita – tinkamų baltymų gamybos sąlygų parinkimu. Paprastai tai – baltymų gamybos lygio sumažinimas auginant žemesnėje temperatūroje arba pridėdant mažiau induktoriaus (Hanning *et al.*, 1998).

Vis dėlto rekombinantinių baltymų gamyba tarpinių kūnelių pavidalu turi keletą privalumų, nes iš tarpinių kūnelių galima atgauti natyvios struktūros, biologiškai aktyvų baltymą, kurį lengva atskirti nuo tirpių ląstelės baltymų, o tai leidžia palengvinti gryninimą (Jonasson *et al.*, 2002). Be to, baltymo molekulės tarpiniuose kūneliuose yra kompaktiškai supakuotos ir tai apsaugo baltymą nuo proteazių poveikio, o taip pat leidžia gauti rekombinantinius baltymus, kurie yra toksiški šeimininko ląstelėms. Norint gauti biologiškai aktyvų baltymą iš tarpinių kūnelių, reikalingi efektyvūs renatūracijos metodai, o tai kartais gali būti per brangu didelės apimties gamyboje (Hanning *et al.*, 1998).

1.2.3. Baltymų renatūracija iš tarpinių kūnelių

Baltymai yra kaupiami tarpinių kūnelių pavidalu ląstelės citoplazmoje, todėl ląsteles reikia suardyti – biomasė išmaišoma buferiniame tirpale, turinčiame denatūrantą ir homogenizuojama. Labai svarbu pilnai suardyti ląsteles, nes nesuardytos ląstelės ar didelės jų

nuolaužos nusėda kartu su tarpiniais kūneliais ir užteršia juos (Lilie *et al.*, 1998). Ardant ląsteles išsiskiria daug šilumos ir proceso metu baltymai gali sulipti (agreguotis), todėl siekiant to išvengti, homogenizavimo procedūros atliekamos kaip galima greičiau ir esant 0-4 °C temperatūrai (Bagdonienė *et al.*, 2001). Tarpinių kūnelių tirpinimui naudojami palyginti didelės koncentracijos denatūrantų tirpalai, 5-8 M GuHCl arba 6-8 M urėja, kurie ardo antrinę baltymo struktūrą (Fischer *et al.*, 1993). Esant nedidelėms denatūrantų koncentracijoms, padidėja dalinai susisukusių baltymo formų ar agregatų tirpumas.

Cisteino aminorūgščių turintys baltymai tarpiniuose kūneliuose dažniausiai sudaro tarpmolekulinius disulfidinius tiltelius, kurie apsunkina tarpinių kūnelių tirpinimą. Siekiant suardyti netaisyklingus tarpmolekulinius ir vidumolekulinius disulfidinius tiltelius dažniausiai naudojami mažos molekulinės masės tioliniai reagentai, tokie kaip glutationo, cisteino ar cistamino redukuotos ir oksiduotos formų mišinys (Lilie *et al.*, 1998). Dažnai tam naudojamo glutationo redukuotos formos optimali koncentracija yra apie 10 mM, o redukuotos bei oksiduotos formų molinis santykis apie 10:1 (Fischer *et al.*, 1993). Renatūracija dažniausiai atliekama silpnai šarminėje terpėje (pH 8-9) tam, kad būtų inicijuojamas tiolato anijono formavimasis (Middelberg, 2002).

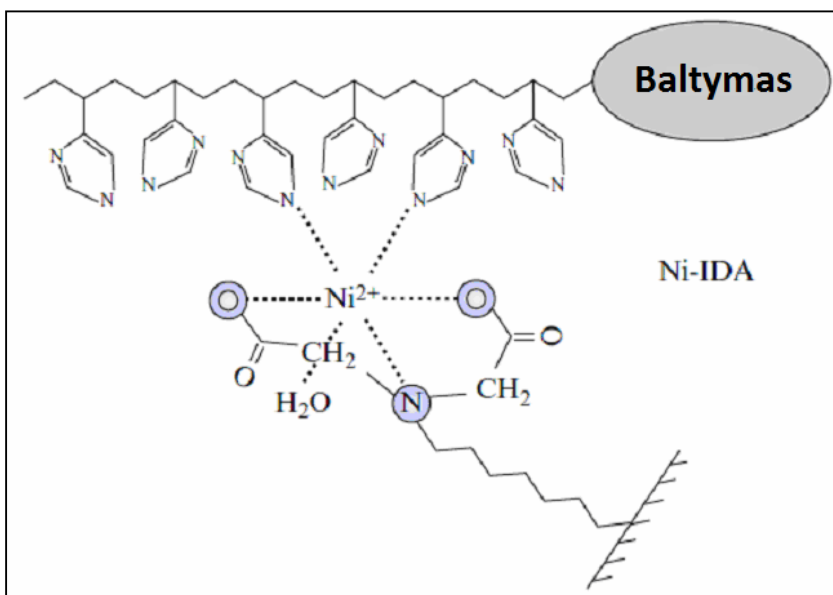
Chromatografinius baltymų renatūracijos metodus galima suskirstyti į tris grupes: a) molekulių išskyrimo chromatografija (gelfiltracija); b) adsorbcinė renatūracija; c) renatūracija panaudojant imobilizuotus taisyklingo baltymų susisukimo katalizatorius (šaperonus, foldazes) (Li *et al.*, 2004).

1.2.4. Afininė chromatografija naudojant imobilizuotus metalo jonus (IMAC)

Giminingumo (afininė) chromatografija – tai skysčių chromatografijos metodas, pagrįstas biospecifine, grįžtamąja sąveika tarp biologiškai aktyvių arba erdviškai unikalių molekulių su kitomis komplementariomis molekulėmis (Sasnauskienė, 2008). Rekombinantiniai baltymai, turintys histidininę uodegą, gali būti renatūruojami ant afininės kolonos. Kadangi su giminingu ligandu sąveikauja nedidelė baltymo molekulės sritis, todėl ši sąveika dažniausiai netrukdo baltymo renatūracijai (Middelberg, 2002). His funkcinės grupės jungiasi koordinaciniu ryšiu su metalų jonais deprotonizuotame būvyje ir taip sudaro patvarų kompleksą su ligandais netgi esant didelei urėjos arba GuHCl koncentracijai.

Didelę įtaką metalo sąveikos su baltymu stiprumui bei specifiškumui turi chelatoriai. Svarbu, jog metalo chelatinis kompleksas turėtų laisvų orbitalių koordinacinio ryšio su baltymų funkcinėmis grupėmis sudarymui ir būtų pakankamai patvarus, kad kiek galima mažiau metalų jonų patektų į eliuentą. Ni(II), o taip pat ir Cu(II), Zn(II), Co(II), kurių koordinacinis skaičius 4-6, labiausiai tinkami yra tridentatiniai ir tetradentatiniai chelatiniai sorbentai, kurie stipriausiai

sąveikauja su histidino ir cisteino aminorūgštimis. Šio darbo metu naudojamas iminodiacetatas (IDA) yra labai dažnai sutinkamas afininėje chromatografijoje tridentatinis chelatorius (3 pav.) (Block *et al.*, 2009).



3 pav. Ni(II) ir chelatinio komplekso su His uodegėle sąveika (Block ir kiti, 2009).

Denatūruotas baltymas, turintis His seką, adsorbuojamas ant metalo chelatinio sorbento, renatūruojamas kolonėlėje mažinant denatūrantų koncentraciją ir po renatūracijos desorbuojamas imidazolo tirpalu (Lilie *et al.*, 1998). Baltymo renatūracijos inicijavimui, iš jo intarpinių kūnelių tirpalo pašalinamas denatūrantas, kad vėl galėtų susidaryti vandeniliniai ryšiai ir baltymas įgytų natyvią struktūrą. Tuo tarpu imidazolas pakeičia baltymo His uodegėlę koordinaciniuose ryšiuose su metalo jonais ir taip išlaisvina baltymą.

Renatūracijos sąlygos turi būti parenkamos atsižvelgiant į sąveikas tarp metalo jonų ir His sekos stabilumą (Block *et al.*, 2009; Middelberg, 2002).

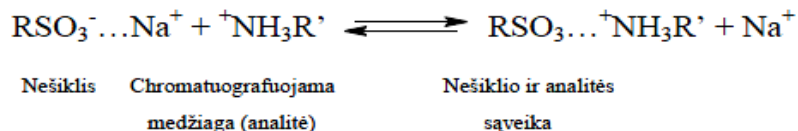
Po baltymų gryninimo IMAC metodu, reikia pašalinti iš tirpalo druskas. Vienas iš būdų tai padaryti – dializuoti tirpalą prieš buferį, kurio druskų koncentracija maža. Dializės žarnelė praleidžia tik atitinkamo dydžio molekules, o greitis priklauso nuo difuzijos, todėl buferinis tirpalas dializės metu nuolat maišomas. Dializuojant tirpalus galima sumažinti druskos koncentraciją tirpale, gauti kitos sudėties baltymo tirpalą, taip pat iš dializuojamo tirpalo pašalinti detergentus, polisacharidus (Bagdonienė *et al.*, 2001).

1.2.5. Histidino uodegėlės pašalinimas

Yra keletas būdų prie N galo prijungtoms sekoms pašalinti. Ji gali būti nukirpta chemiškai, bet šio proceso metu sukuriama sąlyga gali destabilizuoti baltymą, o kai kurios naudojamos buferinio tirpalo sudedamosios dalys – toksiškos. Kitas būdas – naudoti endoproteazes, atpažįstančias specifines aminorūgščių sekas ir skaidančias molekules viduje esančius peptidinius ryšius. Tokios endoproteazės: koaguliacijos faktorius Xa, trombinas, enterokinazė, virusinės endoproteazės (TEV, rinovirusas). Po sekos nukirpimo naudojant kai kurias endoproteazes, pvz. rinoviruso endoproteazę, aminorūgštys, esančios šalia kerpamos sekos baltymo N gale, lemia produkto su nenatūralia N galo seka susidarymą. Be to, šis endoproteolitinis histidino sekos pašalinimas gali būti sąlyginai neefektyvus dėl sunkaus priėjimo prie kerpamos dalies (Schäfer *et al.*, 2002).

1.2.6. Jonų mainų chromatografija

Ši chromatografija pagrįsta sąveika (trauka) tarp priešingus krūvius turinčių molekulių, t.y. tarp molekulių turinčių jonogenines grupes. Biologiškai aktyvūs junginiai – baltymai turi jonogenines funkcinės grupes, kurios vandeniniuose tirpaluose gali jonizuotis. Baltymų molekulėje esančių aminorūgščių: Arg, Lys, Glu, Asp, His radikaluose esančios funkcinės grupės lengvai jonizuojasi neutralioje terpėje: Lys, Arg, His gali turėti teigiamą, o Asp, Glu – neigiamą krūvį. Baltymo sąveika su jonitais priklauso nuo teigiamų ir neigiamų krūvių skaičiaus, o konkretaus baltymo jonogeninių grupių disociacijos konstanta priklauso nuo baltymo erdvinės struktūros ir jonogeninių grupių apsupties. Jonų mainų chromatografijai naudojama stacionarioji fazė – sorbentas taip pat turi jonogeninių grupių – katijonitai geba prisijungti katijonus, o anijonitai prisijungia anijonus. Šio darbo metu naudota CM-sefarozė – silpnas katijonitas, kurio neigiamąjį krūvį turinčios funkcinės grupės sąveikauja su chromatografuojamų medžiagų katijoninėmis grupėmis. Šie nešikliai dar vadinami rūgštiniais jonų mainų nešikliais, nes jų neigiamas krūvis priklauso nuo rūgštinų funkcinių grupių jonizacijos. Katijonų mainai:



Jonų mainai tarp nešiklio ir analitės vyksta keliais etapais:

- Jonų difuzija nešiklio paviršiuje; homogeniniuose tirpaluose procesas vyksta labai greitai.

- Jonų difuzija nuo nešiklio paviršiaus prie pasikeitimo vietos. Tai priklauso nuo nešiklio struktūros ir buferio koncentracijos. Šis etapas kontroliuoja visą jonų pasikeitimo greitį.
- Jonų mainai pasikeitimo vietoje vyksta akimirksnį, tai pusiausvirasis procesas.
- Pasikeitusių jonų difuzija prie nešiklio paviršiaus.
- Prisijungusių jonų elucija nuo nešiklio, kuri pasiekama keičiant joninę jėgą (druskų koncentraciją) (Sasnauskienė, 2008).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Darbe naudoti prietaisai, medžiagos, tirpalai ir kitos priemonės

2.1.1. Naudoti prietaisai

- analitinės svarstyklės „KERN ABJ“;
- autoklavas;
- centrifuga „Beckmann“ su JA 20 rotoriumi;
- centrifuga „Hettich Zentrifugen Rotina 38R“;
- centrifuga „SIGMA 6-16K“;
- gryninimo sistema „AKTA explorer“;
- kaitinanti magnetinė maišyklė „Velp Scientifico ARE“;
- kaitinimo plytelė „ИСКОПКА“;
- laminarinis boksas;
- magnetinė maišyklė „BIOSAN MSH-300“;
- mikrocentrifuga „Eppendorf 5424“;
- pH-metras „OAKLON pH 1100“;
- pH-metras „Thermo Scientific Orion dual star“;
- poliakrilamidinio gelio elektroforezės aparatas „Biometra PS 300T“ ir jo priedai;
- purtyklė „BIOSAN Multi-vortex V-32“;
- rankinis homogenizatorius;
- spektrofotometras „Genesys 10S UV-Vis“;
- spektrofotometras „Agilent 8453“;
- svarstyklės „KERN PCB“;
- ultragarso šaltinis „Bandelin Sonopuls“ (VS 70 T antgalis);
- termostatuojama magnetinė maišyklė „IKA C-MAG HS 7“;
- termostatuojama purtyklė „Heidolph Unimax 1010“.

2.1.2. Naudotos medžiagos ir rinkiniai pagal gamintoją

- Acros Organics: GuHCl, CH₃COOH, HCl, NaOH.
- AppliChem: glicinas, NDS.
- Bio-Rad: APS, bisakrilamidas, Kumasi dažas (Coomassie Brilliant Blue 250R (CBB 250R)), TEMED.
- Carl Roth GmbH+Co.: akrilamidas, ampicilinas, CH₃COONa·H₂O, GuHCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgCl₂, peptonas ir kazeinas, triptonas, Tris-HCl.

- Fisher Scientific: glutationas, imidazolas, IPTG, Tris-bazė, baltymų dydžio standartas BPE3603-1.
- Fluka: mielių ekstraktas, baltymų hidrolizatas, bromfenolio mėlis, GuHCl.
- GE Healthcare: trombinas.
- Merck: NaCl.
- PEAXИM: glicerolis, TCA.
- Scharlau: gliukozė.
- SERVA: β-merkaptoetanolis.
- SIGMA-ALDRICH: NiCl₂·6H₂O, KCl.

2.1.3. Bakterijų kamienai

Darbo metu baltymų raiškai naudotos *E. coli* BL21 (DE3) ir BL21 Star (DE3) kompetentinės ląstelės iš INVITROGEN.

- *E.Coli* BL21 (DE3) kamienas yra išvestas iš laukinio *E. coli* B kamieno, neturi F plazmidės, turi *dcm* mutaciją, nesintetina *ompT* ir *lon* proteazių. Kamienas turi lizogeninį λ profagą DE3 ir *lacUV5* promotoriumi valdomą T7 RNR polimerazės geną.
- *E.Coli* BL21 Star (DE3) kamienas skiriasi nuo BL21 (DE3) kamieno tuo, kad turi mutavusį *rne* geną, koduojantį sutrumpintą RNazės E fermentą.

2.1.4. Genetiniai konstruktai

pRSETB-6xHis-ShaPrP23-232 plazmidės, turinčios įvestą šešių His seką N gale ir atsparumo ampicilinui geną, gautos iš prof. W. Surewicz laboratorijos, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, JAV.

Genetinio konstrukto N gale įterpta uodegėlė susideda iš 18 aminorūgščių sekos (4 pav.). Trombino kirpimo vieta yra tarp 18 arginino ir 19 glicino. Galutinė baltymo seka turi prailginimą Gly-Ser-Asp-Pro aminorūgštimis N gale.

1	MRGSHHHHHH GMASLVPR	GS DPKKRPKPGG WNTGGSRYPG QGSPGGNRYP PQGGGTWGQP	60
61	HGGGWGQPHG GGWGQPHGGG WGQPHGGGWG QGGGTHNQWN KPSKPKTNMK HMAGAAAAGA		120
121	VVGGGLGGYML GSAMSRPMMH FGNDWEDRYR RENMNRYPNQ VYYRPVDQYN NQNNFVHDCV		180
181	NITIKQHTVT TTKGENFTE TDIKIMERVV EQMCTTQYQK ESQAYYDGRR SS		232

4 pav. Rekombinantinį žiurkėno (*Mesocricetus auratus*) PrP23-232 koduojanti aminorūgščių seka su His uodegėle (pažymėta geltonai).

2.1.5. Terpės

- **Skysta mitybinė LB (Luria/Miller) terpė:** 10 g peptono ir kazeino mišinio, 5 g mielių ekstrakto, 10 g NaCl ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens, pH 7. Terpė autoklavuojama 30 min 1 atm slėgyje.
- **S.O.C. mitybinė terpė:** 20 g triptono, 5 g mielių ekstrakto, 10 mmol NaCl, 3,5 mmol KCl ištirpinama 1 l dejonizuoto vandens. Paruošta terpė autoklavuojama 20 min 1 atm slėgyje. Atšaldžius pridedama 10 mmol MgCl₂ ir 20 mmol gliukozės. Terpė steriliai filtruojama, išpilstoma į ependorfinius mėgintuvėlius po 1 ml ir laikoma -20 °C temperatūroje.

2.1.6. Buferiniai ir kiti tirpalai

- **AA (40%):** 12 ml dejonizuoto vandens ištirpinama 8 g akrilamido.
- **Ampicilino tirpalas (100 µg/µl.) :** 1 g ampicilino tirpinama 10 ml dejonizuoto vandens.
- **Amonio persulfato tirpalas (APS) (10%):** 0,9 ml dejonizuoto vandens ištirpinama 100 mg amonio persulfato.
- **BAA (2%):** 12 ml dejonizuoto vandens tirpinama 0,24 g bisakrilamido.
- **Buferinis tirpalas 1 (pH 8):** Dejonizuotame vandenyje tirpinama 401,2 g GuHCl, pilama 70 ml 1 M K₂HPO₄, 7 ml 1 M TRIS. Tūris privedamas iki 650 ml. Tirpalas nufiltruojamas per du filtrinio popieriaus lapelius. Chromatografijos leidimo dieną pridedama 2,15 g glutationo. Tirpalo pH 8. Prireikus pH pakoreguojamas su 0,5 M NaOH. Tūris privedamas iki 700 ml. Tirpalas laikomas lede.
- **Buferinis tirpalas 2 (pH 8):** Į dejonizuotą vandenį pilama 5 ml 1 M TRIS, 50 ml 1 mM K₂HPO₄. Tirpalo pH 8. Prireikus pH pakoreguojamas su 0,5 M NaOH. Tūris privedamas iki 500 ml. Tirpalas nufiltruojamas.
- **Buferinis tirpalas 3 (pH 8):** Dejonizuotame vandenyje tirpinama 1,7 g imidazolo, pilama 5 ml 1 M TRIS, 50 ml 1 M K₂HPO₄. Tirpalo pH 8. Prireikus pH pakoreguojamas su 0,5 M NaOH. Tūris privedamas iki 500 ml. Tirpalas nufiltruojamas.
- **Buferinis tirpalas 4 (pH 5,8):** Dejonizuotame vandenyje tirpinama 23,83 g imidazolo, pilama 5 ml 1 M TRIS, 50 ml 1 M KH₂PO₄. Tirpalo pH 8. Prireikus pH pakoreguojamas su 0,5 M NaOH. Tūris privedamas iki 500 ml. Tirpalas nufiltruojamas.
- **Buferinis tirpalas 5 (pH 5,8):** Į 0,8 l dejonizuoto vandens įpilama 9,2 ml 1 M KH₂PO₄. Į tirpalą lašinama 1 M K₂HPO₄, kol pH pasiekia 5,8. Tūris privedamas iki 1 l.
- **Buferinis tirpalas 6 (pH 5,8):** Į 0,4 l dejonizuoto vandens įpilama 9,2 ml 1 M KH₂PO₄ ir ištirpinama 58,5 g NaCl. Į tirpalą lašinama 1 M K₂HPO₄, kol pH pasiekia 5,8. Tūris privedamas iki 0,5 l. Tirpalas nufiltruojamas.

- **Buferinis tirpalas 7 (pH 4):** Į 3,5 l dejonizuoto vandens įpilama 32 ml 1 M CH₃COOH ir lašinama 1 M CH₃COONa, kol pH pasiekia 4. Tūris privedamas iki 4 l.
- **IPTG tirpalas (1 M):** 5 g IPTG tirpinama 21 ml dejonizuoto vandens.
- **Kumasi R-250 dažo tirpalas:** 0,62 g Kumasi Brilliant Blue R-250 ištirpinama 113 ml 95% etanolio, pridedama 23 ml ledinės acto rūgšties. Tūris privedamas su dejonizuotu vandeniu iki 250 ml.
- **Pavyzdžio buferinis tirpalas (6 kartus koncentruotas):** Dejonizuotame vandenyje tirpinama 1,2 g NDS, 60 mg bromfenolio mėlio, pilama 300 μl 1 M TRIS, 600 μl β-merkptoetanolio, 6 ml glicerolio. Tūris privedamas iki 10 ml. Dažas išpilstomas nedideliu tūriu ir laikomas -20 °C temperatūroje.
- **Natrio dodecilsulfatas (NDS) (10%):** 5 g natrio dodecilsulfato ištirpinama 45 ml vandens.
- **TRIS-glicino-NDS elektroforezės buferinis tirpalas (10 kartų koncentruotas):** Dejonizuotame vandenyje tirpinama 10 g NDS, 30,3 g TRIS bazės, 144 g glicino. Tūris privedamas iki 1 l. Buferis laikomas 4 °C temperatūroje. pH 8,3-8,6 (nekoreguojamas).
- **1,5 M TRIS-HCl:** 18,15 g TRIS ištirpinama 70 ml dejonizuoto vandens. Į tirpalą lašinama HCl, kol pH pasiekia 8,8. Tūris privedamas iki 100 ml. Tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje.
- **1 M TRIS-HCl:** 12,1 g TRIS ištirpinama 50 ml dejonizuoto vandens. Į tirpalą lašinama HCl, kol pH pasiekia 6,8. Tūris privedamas iki 100 ml. Tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje.

2.2. Metodai

2.2.1. Transformacija į kompetentines ląsteles

Į 30 μl atšildytų ant ledo kompetentinių ląstelių pridedama 1 μl iš bakterijų išskirtos plazmidės ir atsargiai sumaišoma nepipetuoiant. Kompetentinių ląstelių ir plazmidės mišinys inkubuojamas 30 min. ledo vonioje. Vykdomas temperatūrinis šokas, kai mėgintuvėlis 90 s laikomas 42 °C temperatūroje, o po to 2 min. inkubuojamas ant ledo. Ląstelių gaivinimui pridedama 400 μl skystos S.O.C. terpės ir 45 min. laikoma 37 °C temperatūroje, jas purtant 220 aps./min greičiu. 100 μl transformuotų ląstelių steriliai užsėjama ant prieš tai 37 °C temperatūroje pašildytų Petri lėkštelių su agarizuota terpe bei ampicilinu ir per naktį auginama 37 °C temperatūros termostate.

2.2.2. Bakterijų paruošimas ilgalaikiam saugojimui

Iš užaugusių pavienių transformantų kolonijų atrenkama viena kolonija ir steriliai perkeliama į kolbą su 200 ml LB terpės ir ampicilinu. Ląstelės auginamos per naktį 37 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu. Ryte po 5 ml per naktį augintos bakterijų kultūros steriliai įpilama į kolbas su 200 ml LB terpės ir ampicilinu. Bakterijos auginamos 37 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu, kol jų optinis tankis ($\lambda=600$ nm) pasiekia 0,8-1 O.V. Ląstelių suspensija perpilama į sterilius centrifugavimo indus ir centrifuguojama 10 min, esant 5000 aps./min., (3326 x g). Supernatantas nupilamas, o nusodintos ląstelės steriliame bokse suspenduojamos 5 ml sterilios LB terpės ir užpilama 5 ml sterilaus 40% glicerolio tirpalo. Taip paruošta ląstelių suspensija laminariname bokse išpilstoma į sterilius ependorfinius mėgintuvėlius ir jie dedami į šaldiklį, kuriame temperatūra palaikoma apie -30 °C.

2.2.3. Rekombinantinio SHaPrP23-232 raiškos gavimas *E. coli* ląstelėse

1 ml rekombinantinių bakterijų, paruoštų ilgalaikiam saugojimui, atšildoma ir steriliai perkeliama į kolbą su 200 ml LB terpės ir ampicilinu. Ląstelės auginamos per naktį 37 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu. Ryte po 20 ml per naktį augintos bakterijų kultūros steriliai įpilama į kolbas su 200 ml LB terpės ir ampicilinu. Bakterijos auginamos 37 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu, kol jų optinis tankis ($\lambda=600$ nm) pasiekia 0,6-0,8 O.V. Tuomet rekombinantinio PrP23-232 geno raiška indukuojama laminariname bokse pridėdant 1 mM IPTG. Bakterijos toliau auginamos 37 °C temperatūroje purtant 220 aps./min greičiu apie 18 valandų. Gauta ląstelių biomasė perpilama į centrifugavimo indus ir 10 min centrifuguojama 9000 aps/min, (13500 x g). Supernatantas nupilamas. Biomasė laikoma -20 °C temperatūroje iki baltymo gryninimo.

Rekombinantinio baltymo raiškai patikrinti ruošiami ląstelių lizatų mėginiai, kurie analizuojami atliekant elektroforezę poliakrilamido gelyje. Ląstelių auginimo metu joms pasiekus optinį tankį ($\lambda=600$ nm) 0,6-0,8 O.V., steriliai paimamas kontrolinis ląstelių mėginys prieš tikslinio baltymo indukciją. Norint įsitikinti, kad į terpę pridėjus tikslinio baltymo raiškos induktoriaus vyko raiška ląstelėse, pasibaigus ląstelių auginimo laikui vėl imama ląstelių suspensija ir matuojamas jos optinis tankis. Mėginyje prieš tikslinio baltymo raiškos indukciją paimtų ląstelių kiekis turi būti toks pats, kaip ir po jos. Apskaičiuotas ląstelių optinių tankių po ir prieš tikslinio baltymo indukciją santykis parodo, kiek kartų daugiau ląstelių yra suspensijoje, pasibaigus jų auginimo laikui po indukcijos, lyginant su ląstelių kiekiu prieš indukciją. Paimtas apskaičiuotas ląstelių suspensijos tūris nucentrifuguojamas 5 min, 10000 aps./min, (9391 x g), supernatantas nupilamas, biomasė tirpinama 10 μ l 6x pavyzdžio buferiniame tirpale ir 50 μ l vandens, bei kaitinama 5 min. 97 °C temperatūroje.

2.2.4. Elektroforezė poliakrilamido gelyje (NDS-PAGE)

Ląstelės baltymai išskirstomi atliekant elektroforezę denatūruojančiomis sąlygomis.

Ruošiamas gelis:

Apatinis frakcionuojantis 12% gelis (5ml):

- 1,46 ml 40% AA
- 0,8 ml 2 % BAA
- 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- 1,42 ml H₂O
- 50 µl 10% NDS
- 2,5 µl TEMED
- 25 µl 10% APS

Viršutinis koncentruojantis 4% gelis (2,5ml):

- 0,24 ml 40% AA
- 0,13 ml 2 % BAA
- 0,63 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8
- 1,46 ml H₂O
- 25 µl 10% NDS
- 2,5 µl TEMED
- 12,5 µl 10% APS

Viršutinio 12 % PAGE paruošimui stiklinėlėje sumaišomi aukščiau nurodyti tirpalų tūriai: AA, BAA, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, NDS ir vanduo. Prieš pat tirpalo pylimą į gelio formą pridedama APS ir TEMED. Gerai išmaišius, tirpalas pilamas tarp švarių, 70% etanolio tirpalu nuvalytų gelio užpylimo stiklų (1 mm tarpelis) iki pažymėtos vietos (4 cm nuo stiklo viršaus). Po to atsargiai iki formos viršaus užpilama vandens. Polimerizacija vyksta apie 40 min. kambario temperatūroje. Sustingusio gelio paviršius praplaunamas vandeniu ir nusausinamas filtriniu popieriumi.

Apatinio 4 % gelio paruošimui stiklinėlėje sumaišomi aukščiau nurodyti tirpalų tūriai: AA, BAA, 1 M Tris-HCl pH 6,8, NDS ir vanduo. Prieš pat tirpalo pylimą į gelio formą, pridedama APS ir TEMED. Gerai išmaišius, tirpalas pilamas ant apatinio gelio iki formos viršaus. Iš karto įstatomos šukutės, kad po dantimis neliktų oro burbulų. Polimerizacija trunka apie 40 min.

Surenkamas elektroforezės aparatas, pripilama elektroforezės buferinio tirpalo ir iš gelio išimamos šukutės. Į šulinėlius po 10 µl įnešami anksčiau aprašytu būdu paruošti ląstelių lizatai. Elektroforezė vykdoma esant 70 mA stiprumo srovei, kol dažo frontas pasiekia frakcionuojančio gelio apačią. Po elektroforezės gelis 15 min. dažomas Kumasi R-250 gelių dažais 25 °C temperatūroje jį purtant 60 aps./min. greičiu. Po to 10 min. blukinamas verdančiame distiliuotame vandenyje.

2.2.5. Baltymo koncentracijos nustatymas spektrofotometriškai

Baltymo tirpalo sugertis matuojama 280 nm bangoje. Jei optinis tankis didesnis nei 1, tirpalas skiedžiamas. Vėliau skaičiuojant baltymo koncentraciją, baltymo sugertis

padauginama iš skiedimo koeficiento. Baltymo absorbcija matuojama 1 cm pločio kvarcinio stiklo kiuvete.

Remiantis šviesos sugertį aprašančiu Beer-Lambert dėsnio bei žinant baltymo molekulinę masę ir ekstinkcijos koeficientą prieš ir po kirpimo trombinu (1 lentelė), koncentracija skaičiuojama pagal formulę:

$$C_{\text{baltymo}} = \frac{OD \cdot M}{\epsilon \cdot l}$$

čia:

OD – šviesos sugertis, O.V.,

M – baltymo molekulinė masė (Da),

ϵ – ekstinkcijos koeficientas ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$),

l – kiuvetės plotis, (cm).

1 lentelė. Rekombinantinio SHaPrP23-232 parametrai.

	Prieš His uodegėlės kirpimą	Po His uodegėlės kirpimo
Molekulinė masė, Da	25483,0	23416,7
$\epsilon, M^{-1} \cdot cm^{-1}$	62005	62005

2.2.6. Renatūracija ir gryninimas IMAC metodu

Užauginta biomasė atšildoma ir suspenduojama ją išmaišant buferiniame tirpale 1, turinčiame 6 M GuHCl bei 10 mM glutationo. Gautas tirpalas supilamas į rankinį homogenizatorių. Homogenizuojama sukant ir spaudžiant prigludusį prie stiklinio indo sienelės stūmoklį tol, kol gaunama vientisa biomasė, kuri vėliau perpilama į stiklinėlę ir ardoma ultragarsu ledo vonelėje 20 min, kas 60 s darant 60 s pertrauką, esant amplitudei 70%. Biomasė išpilstoma į centrifugavimo mėgintuvėlius ir centrifuguojama 40 min. 15000 aps./min, (27143 × g), 4 °C temperatūroje. Supernatantas atskiriamas nuo nuosėdų ir imamas jo mėginys SDS-PAGE elektroforezei.

Supernatantas sumaišomas su sorbentu (IDA-sefaroze, pakrauta Ni(II) jonais), nupusiausvyrintu buferiniu tirpalu 1. Mišinys pusvalandį lėtai maišomas 4 °C temperatūroje, kad prie metalo jonų koordinaciniais ryšiais prisikabintų baltymo His uodegėlės molekulės. Po to,

sorbentas su baltymu pakraunamas į 20 cm aukščio ir 26 mm skersmens kolonėlę XK 26/20, kuri prijungiama prie chromatografinės sistemos. Baltymo tirpalo tekėjimo greitis praplovimo metu – 3 ml/min. Kolonėlėje vykdoma sorbuoto baltymo renatūracija linijiniu GuHCl gradientu, t.y. GuHCl koncentracija mažinama nuo 6 M iki 0 M per 200 ml (tekėjimo greitis 1 ml/min). Tuomet praleidžiama 65 ml buferinio tirpalo 2 (tekėjimo greitis 3 ml/min), kad visiškai atsiplautų GuHCl. Po to – 65 ml buferinio tirpalo 3, (turi 50 mM imidazolo, tekėjimo greitis 3 ml/min), kad išeitų baltymai, silpniau besijungiantys prie nikelio. Galiausiai tikslinis baltymas desorbuojamas 130 ml buferinio tirpalo 4 (turi 700 mM imidazolo, tekėjimo greitis 3 ml/min). Imidazolas veikia kaip konkurentinis ligandas, pakeičiantis baltymą sąveikoje su Ni(II) jonais ir taip baltymas atsikabina nuo sorbento. Iš kolonėlės išplauti baltymai renkami į frakcijas. Jeigu dalis baltymo nerenatūruoja ir lieka ant kolonos, šis ciklas gali būti kartojamas.

Po chromatografijos baltymo tirpalas dializuojamas 4 °C temperatūroje 3 kartus pakeičiant buferinį tirpalą 5, po to steriliai filtruojamas. Baltymo koncentracija matuojama spektrofotometriškai 280 nm bangoje. Baltymas saugomas -20 °C temperatūroje.

Norint nustatyti, ar baltymas buvo sorbuotas ir patikrinti jo kiekį surinktose frakcijose, atliekama NDS-PAGE. Prieš tai, siekiant nusodinti baltymus, į mėginius, paimtus po ląstelių ardymo ir pakrovus chromatografinę kolonėlę (juose yra GuHCl, kuris reaguoja su NDS sudarydamas nuosėdas), pilama po 1 ml 5 % TCA. Palaukiama 10 min, kol baltymai iškris į baltas nuosėdas, tuomet 1 min. centrifuguojama 10000 aps./min, (9391 x g), supernatantas nusiurbiamas, nuosėdos nusausinamos filtriniu popieriumi. Ant nuosėdų užpilama apie 100 µl 0,1 M NaOH tirpalo. Iš kiekvieno pavyzdžio paimama po 30 µl ir užpilama 7,5 µL 6x pavyzdžio buferinio tirpalo. Mėginiai kaitinami 10 min. 98 °C temperatūroje.

2.2.7. Histidino uodegėlės nukirpimas ir jonų mainų chromatografija

Suskaičiuojamas trombino tūris, kurį reikia įpilti į afininės chromatografijos metodu išgrynintą baltymo tirpalą, žinant, kad 1 ml baltymo kirpimui reikia 3 vienetų trombino. Įpylus, trombino tirpalas paliekamas per naktį - 4 °C temperatūroje.

Trombino pašalinimui, baltymas supilamas į buferiniu tirpalu 5 nupusiausvyrintą sorbentą – CM sefarozę ir pusvalandį maišomas ant maišyklės, kad baltymas prisikabintų prie sorbento dalelių. Po to, mišinys pakraunamas į kolonėlę XK 26/20, kuri prijungiama prie chromatografinės sistemos. Nesisorbavę baltymai iš kolonėlės išplaunami 3 ml/min greičiu praleidžiant 5 kolonėlės tūrius buferiniu tirpalu 5. Sorbuotas baltymas tuo pačiu greičiu desorbuojamas linijiniu NaCl gradientu, naudojant buferinį tirpalą 6 (2 M NaCl). Iš kolonėlės išplauti baltymai renkami į frakcijas. Po chromatografijos baltymo tirpalas dializuojamas 3 kartus pakeičiant buferinį tirpalą 7.

2.2.8. Rekombinantinio SHaPrP23-232 koncentravimas

Rekombinantiniai priono baltymai po dializės nufiltruojami ir sukonzentruojami centrifugavimo metu, naudojant koncentravimo mėgintuvėlius, turinčius membraną praleidžiančią ne didesnius kaip 10000 Da junginius. Centrifuguojama 20 min. 6000 aps./min, (2850 x g), 4 °C temp., pastoviai papildant viršutinį mėgintuvėlio rezervuarą baltymo tirpalu. Iki $3 \pm 0,5$ mg/ml sukonzentruotas baltymas išpilstomas į ependorfinius mėgintuvėlius po 0,5 mg ir jie laikomi šaldiklyje, kuriame temperatūra palaikoma apie -20 °C.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

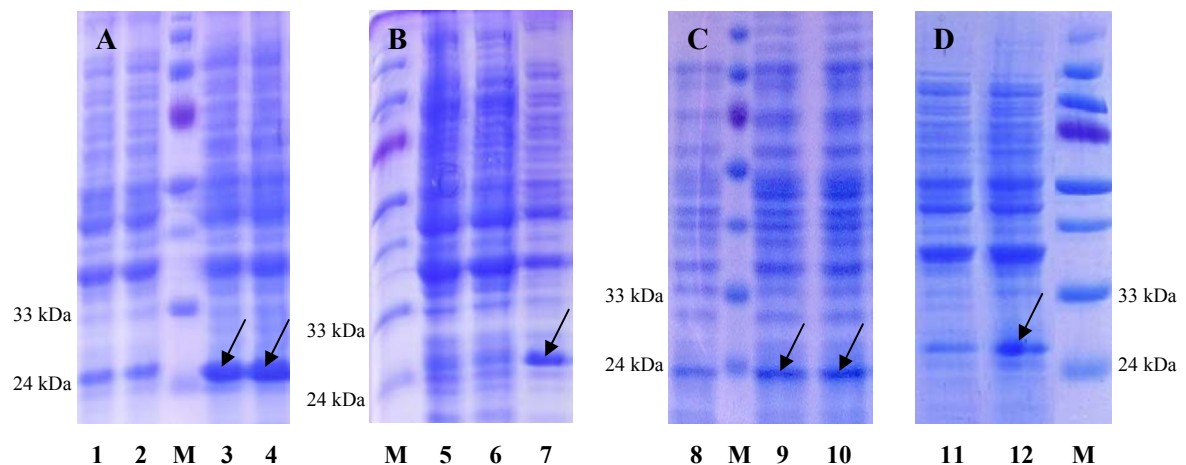
3.1. Rekombinantinio SHaPrP23-232 raiška

Atlikus DNR plazmidės transformaciją į kompetentines *E. coli* BL21 (DE3) ir *E. coli* BL21 Star (DE3) ląsteles, patikrinta rekombinantinio SHaPrP23-232 raiška.

Atlikta po du auginimus kiekviename kamiene, panaudojant vienodą metodiką (2.2.3 metodinė dalis). Baltymai iki indukcijos auginti apie 4 val. 37 °C temperatūroje, o pasiekus optinį tankį 0,6-0,8 O.V ($\lambda=600\text{nm}$), pridėta IPTG induktoriaus ir auginta apie 18 val. toje pačioje temperatūroje.

Auginant ląsteles *E. coli* BL21 Star (DE3) kamiene iš 4 l ląstelių kultūros gauta 14,47 g biomasės, o auginant ląsteles *E. coli* BL21 (DE3) kamiene – iš 4 l gauta 19,79 g biomasės.

Rekombinantinių SHaPrP23-232 baltymų raiškos NDS-PAGE gelių nuotraukos pateiktos 5 paveiksle.



5 pav. Rekombinantinio SHaPrP23-232 raiškos patikrinimas NDS-PAGE (rodyklės rodo apie 25 kDa dydžio rekombinantinį SHaPrP23-232). M – baltymų dydžio standartas; A, B – auginant *E. coli* BL21 Star (DE3) kamiene: 1, 2, 5, 6 – mėginiai prieš indukciją; 3, 4, 7 – mėginiai po indukcijos; C, D – auginant *E. coli* BL21 (DE3) kamiene: 8, 11 – mėginiai prieš indukciją; 9, 10, 12 – mėginiai po indukcijos;

Remiantis 5 paveikslo A ir B elektroforeogramomis galima teigti, kad *E. coli* BL21 Star (DE3) kamiene vyksta gera rekombinantinio SHaPrP23-232 raiška ir galima atlikti tolimesnes baltymo gryninimo stadijas. C elektroforeogramoje manomo tikslinio baltymo juostelė yra žemiau baltymų dydžio standarto 24 kDa masės, o jos intensyvumas prieš ir po

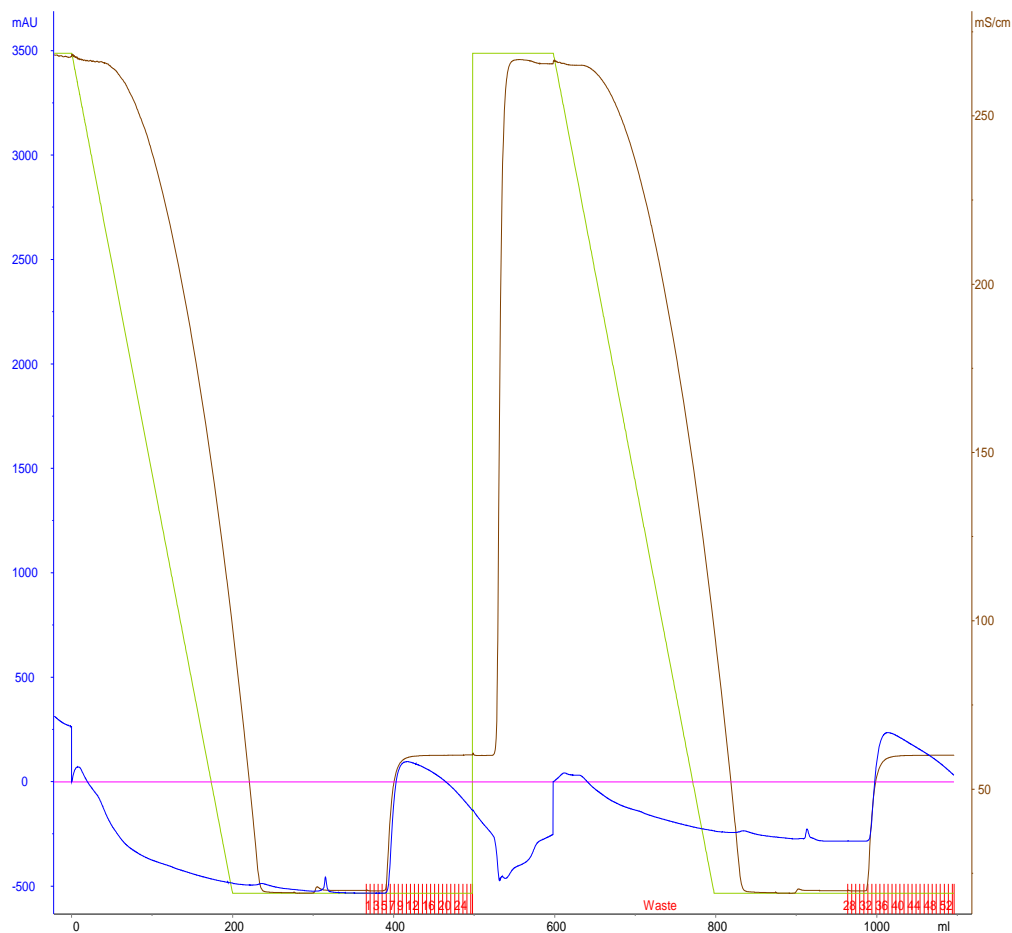
raiškos beveik vienodas. Rekombinantinio SHaPr23-232 molekulinė masė yra virš 25 kDa, todėl gali būti, kad tikslinio baltymo raiška nevyko. D elektroforeogramoje matyti, kad raiška, auginant BL21 (DE3) kamiene, yra mažesnė nei BL21 Star (DE3) kamiene, bet pakankama baltymo gryninimui. Kita vertus, didesnė biomasės išeiga gauta *E. coli* BL21 (DE3) kamiene, nes auginant tą patį lastelių kultūros tūrį, biomasės kiekis gautas *E. coli* BL21 (DE3) kamiene yra 27 % didesnis nei *E. coli* BL21 Star (DE3) kamiene. Remiantis šiais duomenimis buvo nuspręsta gryninti biomasę, augintą abiejuose kamienuose, ir taip patikrinti, ar tikrai vyko rekombinantinio SHaPr23-232 raiška.

3.2. Rekombinantinio SHaPr23-232, auginto *E. coli* BL21 Star (DE3), gryninimas

Rekombinantinio SHaPr23-232, auginto *E. coli* BL21 Star (DE3) kamiene denatūracijai, 14,47 g biomasės suspenduota 50 ml buferinio tirpalo 1 ir homogenizuota. Baltymo surišimui naudota 30 ml IDA-sefarozės sorbento su imobilizuotais Ni (II) jonais. Baltymas desorbuotas 700 mM imidazolo koncentracija. Desorbcijos procesą galima sekti chromatogramoje (6 pav.), stebint absorbciją 280 nm bangoje. Druskų koncentracijos pokyčius parodo laidumo kreivė. Laidumo kreivės poslinkis lyginant su GuHCl gradiento kreive stebimas todėl, kad užtrunka šiek tiek laiko, kol gradientas išeina iš kolonėlės (gradiento poslinkis lygus laisvajam kolonos tūriui). Chromatogramoje matyti, kad gryninimo metu baltymas išeina dviem pikais. Taip daroma todėl, kad pirmo renatūracijos ciklo metu dalis baltymo susivynioja į teisingą struktūrą, o kita dalis – suagreguoja ant kolonėlės. Renatūruotas baltymas yra desorbuojamas imidazolu, o likęs baltymas denatūruojamas, renatūruojamas ir desorbuojamas antro ciklo metu. Remiantis chromatograma, surinktos frakcijos, turinčios didžiausią baltymo koncentraciją pirmame (bendras tūris 115 ml) ir antrame pike (bendras tūris 100ml). Kadangi gautas didelis kiekis baltymo ir, sprendžiant pagal chromatogramą, renatūracijos bei desorbcijos procesai vyko sėkmingai, NDS-PAGE nedaryta.

Norint pašalinti imidazolą, abiejų pikų surinktos frakcijos per naktį dializuotos prieš buferinį tirpalą 5. Po dializės gautas bendras pirmo piko frakcijų tūris – 111 ml, koncentracija – 0,52 mg/ml, baltymo kiekis – 57,48 mg. Bendras antro piko frakcijų tūris – 98 ml, koncentracija – 0,45 mg/l, baltymo kiekis – 44,31 mg. Iš 14,47 g biomasės šioje gryninimo stadijoje gauta 101,79 mg baltymo.

Tolimesniam gryninimui naudotos rekombinantinio SHaPr23-232, auginto *E. coli* BL21 Star (DE3) kamiene, sujungtos pirmo piko frakcijos.



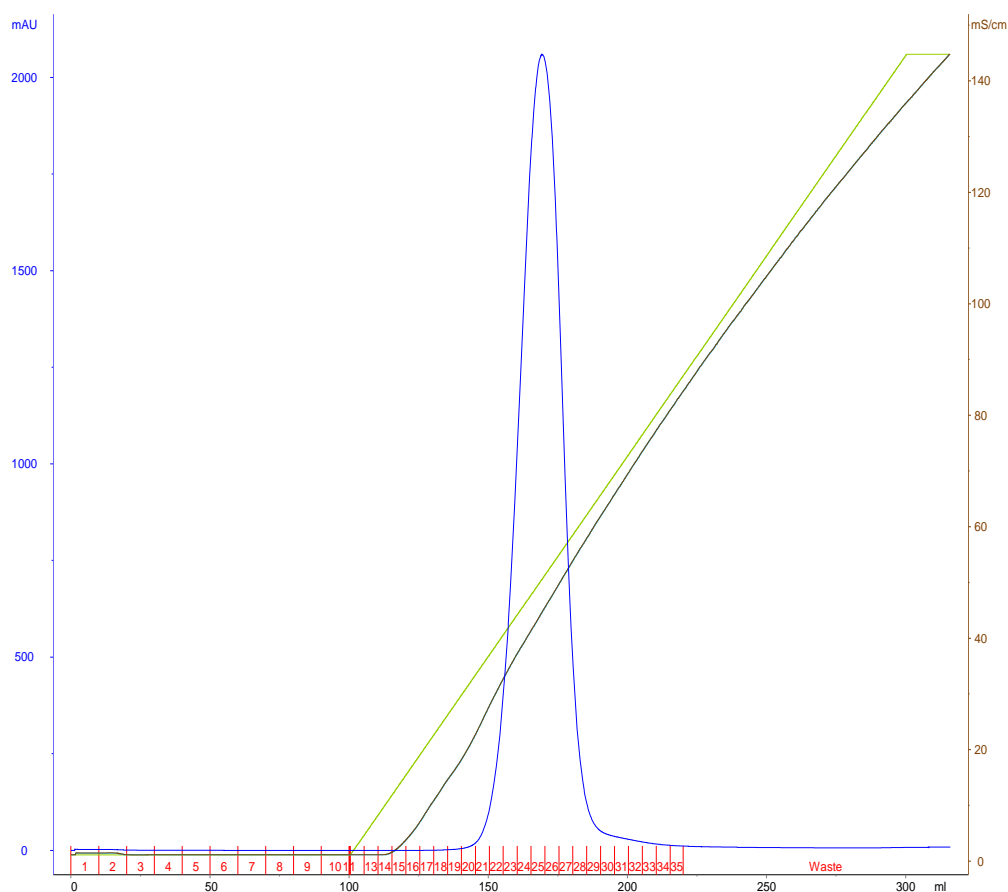
6 pav. Chromatograma gauta gryninant rekombinantinį SHaPrP23-232, augintą *E. coli* BL21 Star (DE3) kamiene afininės chromatografijos metodu. Žalia spalva – GuHCl gradientas, %; mėlyna spalva – baltymo absorbcija 280 nm bangoje, mAU; ruda spalva – laidumas, mS/cm; raudona spalva sunumeruotos frakcijos; rožinė spalva – 0 reikšmė y ašyje.

Baltymo His uodegėlės kirpimui naudotas trombinas. Žinant, kad 1 mg baltymo kirpimui reikia 3 vienetų trombino, apskaičiuotas reikalingas trombino kiekis, karpant 57,48 mg baltymo yra 173 vienetai. Po kirpimo, norint nustatyti ar nusikirpo His uodegėlė, masių spektrometrijos metodu patikrinta baltymo molekulinė masė. Nustatyta baltymo molekulinė masė – $23415,2 \pm 1$ Da. Nuo teorinės rekombinantinio SHaPrP23-232 masės (23416,7 Da) skiriasi per $1,5 \pm 1$ Da. Šis skirtumas patvirtina disulfidinio tiltelio susidarymą.

Siekiant iš tirpalo pašalinti trombiną, dalį His uodegėlių ir kitas priemaišas, gryninta jonų mainų chromatografijos metodu. Tam naudota ~20 ml CM-sefarozės sorbento ir 111 ml rekombinantinio SHaPrP23-232 su trombino proteazės mišiniu. SHaPrP23-232 desorbuotas naudojant NaCl gradientą. Iš chromatogramos (7 pav.) galima apskaičiuoti, kad baltymas eliuojamas prie ~0,69 M NaCl. Laidumo kreivės poslinkis lyginant su teorine NaCl gradiento kreive stebimas todėl, kad užtrunka šiek tiek laiko, kol gradientas išeina iš kolonėlės. Remiantis

chromatograma surinktos frakcijos, turinčios didžiausią baltymo koncentraciją (frakcijos 21-29, frakcijos tūris – 5 ml).

Gautas bendras frakcijų tūris – 45 ml, koncentracija – 0,68 mg/l. Iš 57,48 mg afininės chromatografijos metodu išgryninto baltymo, šioje gryninimo stadijoje gauta 30,6 mg baltymo. Baltymo išeiga šiam gryninimo etapui yra 57,93 %. Šis nemažas baltymo praradimas galimas dėl baltymo agregacijos tirpalo atšildymo metu.



7 pav. Chromatograma gauta gryninant rekombinantinį SHaPrP23-232, augintą *E. coli* BL21 Star (DE3) kamiene jonų mainų chromatografijos metodu. Žalia spalva pažymėta linija – NaCl gradientas, %; ruda spalva – laidumas, mS/cm; mėlyna – baltymo absorbcija 280 nm bangoje, mAU; raudona spalva sunumeruotos frakcijos.

45 ml rekombinantinio SHaPrP23-232 po gryninimo jonų mainų chromatografijos metodu nufiltruojami per 0,22 μm porų dydžio filtrą ir sukonzentruojami centrifuginiame koncentratoriuje. Baltymą sukonzentravus gautas tūris – 10,62 ml, koncentracija – 2,79 mg/ml, baltymo kiekis – 29,62 mg. Sukonzentruotas baltymas išpilstomas į ependorfinius mėgintuvėlius po 180 μl ir jie laikomi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Iš 30,6 mg jonų mainų chromatografijos metodu išgryninto baltymo, šioje gryninimo stadijoje gauta 29,62 mg baltymo. Baltymo išeiga koncentravimo procesui yra 96,79 %, o skaičiuojant afininės chromatografijos gryninimo procesui – 51,53 %.

Iš 1 l ląstelių kultūros gauta 25,44 mg renatūruoto baltymo su His uodegėle arba 13,11 mg, galutinai išgryninto, rekombinantinio SHaPrP23-232 be His uodegėlės.

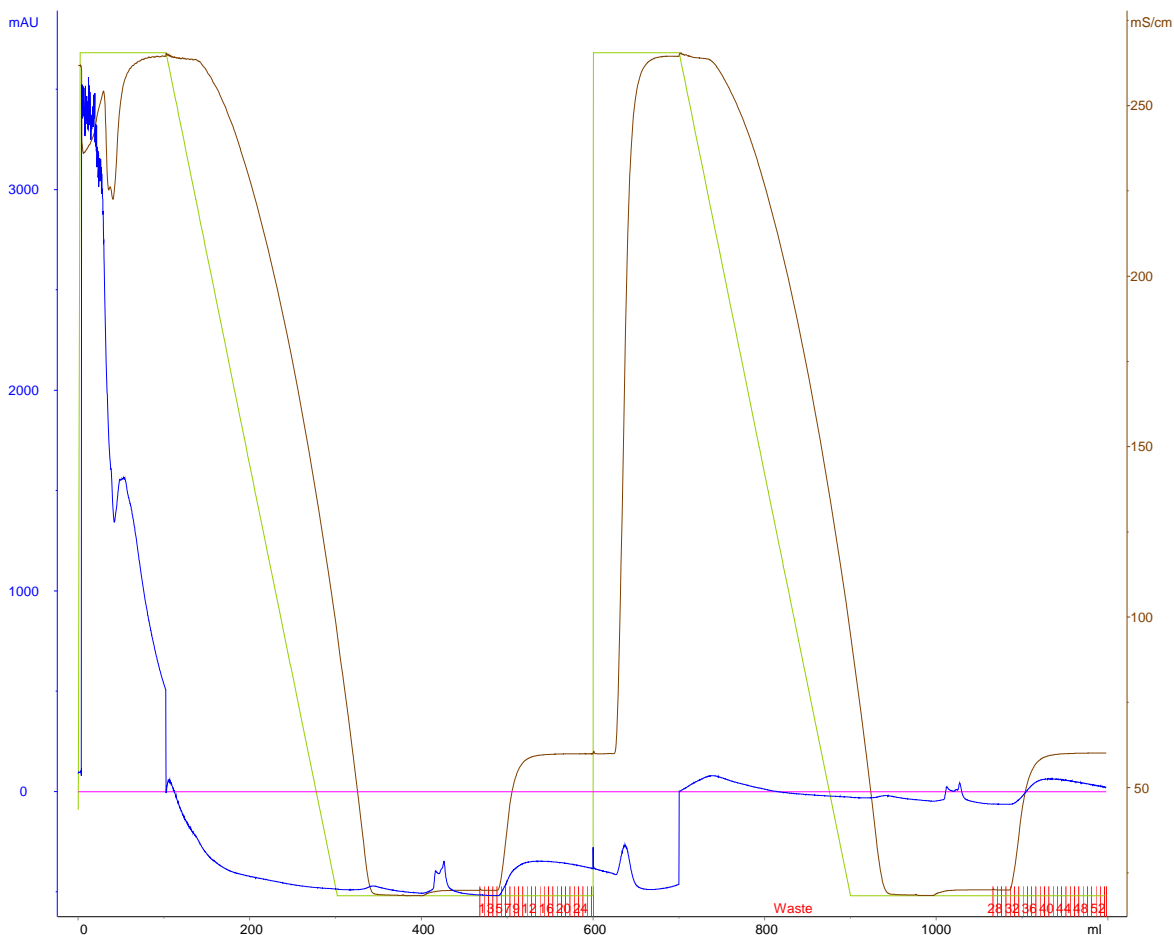
3.3. Rekombinantinio SHaPrP23-232, auginto *E. coli* BL21 (DE3), gryninimas

Rekombinantinio SHaPrP23-232, auginto *E. coli* BL21 (DE3) kamiene denatūracijai, 20 g biomasės suspenduota 70 ml buferinio tirpalo 1 ir homogenizuota.

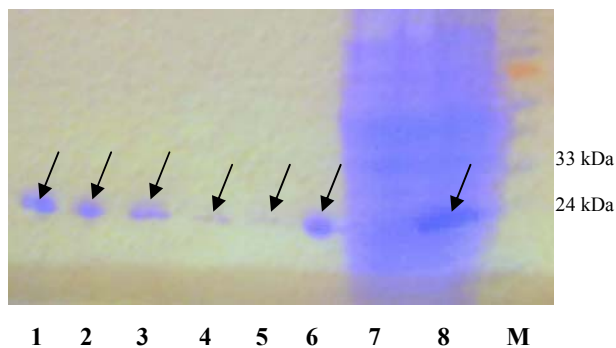
Baltymo surišimui naudota 30 ml IDA-sefarozės sorbento su imobilizuotais Ni(II) jonais. Baltymas desorbuotas 700 mM imidazolo koncentracija. Chromatogramoje (8 pav.) sekant baltymo absorbciją 280 nm bangoje matoma, kad desorbcijos metu buvo desorbuotas labai mažas kiekis baltymo. Remiantis chromatograma surinktos frakcijos, turinčios didžiausią baltymo koncentraciją pirmame pike.

Gautas bendras pirmo piko frakcijų tūris – 115 ml, koncentracija – 0,07 mg/ml, baltymo kiekis – 8,05 mg. Gavus labai mažą baltymo kiekį, antro piko frakcijos nerinktos, o pirmo piko frakcijos toliau negrynintos.

Norint įsitikinti, kad baltymas buvo surištas su sorbentu, atliekama NDS-PAGE. Paimti ir paruošti (2.2.6 metodinė dalis) mėginiai po ląstelių ardymo, taip pat iš skysčio, likusio pakrovus chromatografinę kolonėlę bei pirmo ir antro piko baltymų frakcijos. Rekombinantinio SHaPrP23-232 gryninimo afininės chromatografijos metodu rezultatai NDS-PAGE pateikti 9 pav.



8 pav. Chromatograma gauta gryninant rekombinantinį SHaPrP23-232, augintą *E. coli* BL21 (DE3) kamiene afininės chromatografijos metodu. Žalia spalva – GuHCl gradientas, %; mėlyna spalva – baltymo absorbcija 280 nm bangoje, mAU; ruda spalva – laidumas, mS/cm; raudona spalva sunumeruotos frakcijos; rožinė spalva – 0 reikšmė y ašyje.



9 pav. Rekombinantinio SHaPrP23-232, auginto *E. coli* BL21 (DE3) kamiene, raiškos patikrinimas NDS-PAGE (rodyklės rodo apie 25 kDa dydžio rekombinantinį SHaPrP23-232). 1, 2, 3 – pirmo piko baltymų frakcijos; 4, 5, 6 – antro piko baltymų frakcijos; 7 – skysčio, likusio po kolonėlės pakrovimo mėginiai; 8 – mėginiai po ląstelių suardymo stadijos; M – baltymų dydžio standartas.

Remiantis baltymų elektroforezės rezultatais matyti, kad mėginiuose po ląstelių homogenizavimo, rekombinantinio SHaPrP23-232 baltymo yra, nors ir nedidelis kiekis (8 takelis). Pagal tai, jog skystyje, likusiame po kolonėlės pakrovimo, baltymo nėra, galima spręsti, kad visas baltymas buvo surištas sorbento su imobilizuotais Ni (II) jonais. Pirmo ir antro piko baltymų frakcijose šiek tiek baltymo taip pat matoma. Baltymo gryninimui buvo naudota dviejų baltymo auginimų biomasė, todėl sunku tiksliai pasakyti, ar abiem atvejais vyko tikslinio baltymo raiška, ar tik vienu.

Viena iš priežasčių, kodėl gautas mažas baltymo kiekis galima ta, kad rekombinantinio SHaPrP23-232 raiškos gavimo *E. coli* BL21 (DE3) kamienne stadijos metu, augdamos bakterijos skaido ampiciliną. Greitai jį suskaidžius terpėje gali pradėti augti ir atsparumo antibiotikams neturinčios ląstelės. Taigi pamatavus optinį tankį atrodo, kad biomasės daug, nors baltymą koduojančio geno raiška yra maža arba jos beveik nematyti.

Kita įmanoma mažos baltymo raiškos priežastis – RNR degradacija. Kaip anksčiau buvo minėta šiame darbe, efektyvi genų raiška priklauso nuo mRNR stabilumo. Pagrindinį vaidmenį mRNR degradacijoje vaidina endonukleazė RNazė E ir dvi egzozonukleazės – RNazėII ir poliribonukleotidtransferazė. Šio darbo metu naudotos kompetentinės ląstelės BL21 Star (DE3) turi mutavusį *rne131* geną, kuris koduoja sutrumpintą RNazės E fermentą. Šios RNazės E dėka sumažėja mRNR degradavimo galimybė, todėl mRNR yra stabilesnė. BL21 (DE3) kamienas neturi *rne131* geno, todėl gali būti, kad mRNR nėra pakankamai stabili ir todėl tikslinio baltymo raiška vyksta prasčiau.

IŠVADOS

- Šio darbo metu nustatyta, kad rekombinantinio žiurkėno PrP23-232 raiška priklauso nuo kompetentinių ląstelių, į kurias buvo transformuotas genetinis konstruktas. Baltymo raiška ekspresuojant BL21 Star (DE3) kamiene gauta didesnė nei BL21 (DE3).
- Baltymą renatūravus ir išgryninus afininės ir jonų mainų chromatografijos metodais buvo gauta 29,6 mg gryno rekombinantinio žiurkėno priono baltymo ir 44,31 mg baltymo su nenukirpta His uodegėle.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aguzzi, A.; Calella. A. M. 2009. Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases, *Physiological Review*, 89: 1105–1152.
2. Bagdonienė, L.; Bendikienė, V.; Kadziauskas, J.; Labeikytė, D.; Markuckas, A.; Sabaliauskienė, V.; Sasnauskienė, Z.; Šeputienė, V. 2001. *Biochemijos laboratoriniai darbai*, Vilniaus universiteto leidykla. 34, 48 p.
3. Baneyx. F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia Coli*, *Current opinion in Biotechnology*, 10: 411–421.
4. Block, H.; Maertens, B.; Spriestersbach, A.; Brinker, N.; Kubicek, J.; Fabis, R.; Labahn, J.; Schäfer, F. 2009. Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review, *Methods in Enzymology*, 463: 439–473.
5. Brondyk, W. H. 2010. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein, *Methods in Enzymology*, 463: 131–147.
6. Chiti, F.; Dobson C. M. 2006. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease, *Annual Review of Biochemistry*, 5: 333–66.
7. Donne, D. G.; Viles, J. H.; Groth, D.; Mehlhorn, I.; James, T. L.; Cohen, F. E., Prusiner, S. B.; Wright, P. E.; Dyson, H. J. 1997. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP (29–231): The N terminus is highly flexible, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 13452–13457.
8. Fisher, B.; Sumner, I.; Goodenough, P. 1993. Isolation, Renaturation, and Formation of Disulfide Bonds of Eukaryotic Proteins Expressed in *Escherichia coli* as Inclusion Bodies, *Biotechnology and Bioengineering*, 41: 3–13.
9. Hannig, G.; Makrides, S. C. 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*, *Trends in Biotechnology*, 16: 54–60.
10. Jonasson, P.; Liljeqvist, S.; Nygren, P. A. K.; Stahl, S. 2002. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35: 91–10.
11. Kadziauskas, J. 2008. *Biochemijos pagrindai*, Vilniaus universiteto leidykla. 566 p.
12. Lewin, B. 2002. *Genes VIII*, Oxford: Oxford University press. 279–285, 687–689p.
13. Li, M.; Su, Z. G.; Janson, J. C. 2004. In vitro protein refolding by chromatographic procedures, *Protein Expression and Purification*, 33: 1–10.
14. Lilie, H., Schwarz, E., Rudolph, R. 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*, *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 497–501.

15. Middelberg, A. P. J. 2002. Preparative protein refolding, *Trends in Biotechnology*, 20: 437–443.
16. Palomares, L. A.; Mondaca, S. E.; Ramírez, O. T. 2004. Production of Recombinant Proteins. Challenges and Solutions, *Methods in Molecular Biology*, 267: 15–51.
17. Prusiner, S. B. 1998. Prions, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 13363–13383.
18. Prusiner, S. B. 2001. Shattuck Lecture – Neurodegenerative diseases and prions, *The New England Journal of Medicine*, 344: 1516–26.
19. Sasnauskienė, Z. 2008. *Chromatografiniai metodai*, Kaunas: Technologija. 22–24 p.
20. Sevastyanovich, Y. R.; Alfasi, S. N.; Cole, J. A. 2010. Sense and Nonsense from a Systems Biology Approach to Microbial Recombinant protein Production, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55: 9–28.
21. Smirnovas, V.; Baron, G. S.; Offerdahl, D. K.; Raymond, G. J.; Caughey, B.; Surewicz, W. K. 2001. Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange, *Nature structural & molecular biology*, 18: 504–506.
22. Soto, C. 2011. Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends in Biochemical Sciences*, 36: 151–158.
23. Wickner, R. B.; Edskes, H. K.; Roberts, B. T. *et al.* 2004. Prions: proteins as genes and infectious entities, *Genes & Development*, 18: 470–485.
24. Wickner, R. B.; Edskes, H. K.; Ross, E. D.; Pierce, M. M.; Baxa, U., Brachmann, A., Shewmaker, F. 2004. Prion genetics: New Rules for a New Kind of Gene, *Annual Review Genetics*, 38: 681–707.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui dr. Vytautui Smirnovui už visapusę pagalbą atliekant ir rašant baigiamąjį darbą, naudingus patarimus ir neišsenkančią kantrybę. Esu dėkinga baigiamojo darbo konsultantui Ričardui Mališauskui už pagalbą eksperimentinio darbo metu. Taip pat dėkoju visiems Biotermodynamikos ir vaistų tyrimų laboratorijos bei VGTU Chemijos ir bioinžinerijos katedros darbuotojams ir studentams, padėjusiems šio darbo metu.