



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Tomas Šneideris

REKOMBINANTINIO PELĖS PRP23-230 GAMYBA

PRODUCTION OF RECOMBINANT MOUSE PRP23-230

Baigiamasis bakalauro darbas (projektas)

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)

Tomas Šneideris

REKOMBINANTINIO PELĖS PRP23–230 GAMYBA
PRODUCTION OF RECOMBINANT MOUSE PRP23–230

Baigiamasis bakalauro darbas (projektas)

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vadovas dr. Vytautas Smirnovas _____

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas Ričardas Mališauskas _____

(Pedag. vardas, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2013

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Tomas Šneideris, 20093162

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, Bif-09

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)

SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2013 m. gegužės 27 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Rekombinantinio pelės PrP23-230 gamyba“ patvirtintas 2012 m. spalio 25 d. dekanu 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 mokėjęs (-usi).

(Parašas)

Tomas Šneideris
(Vardas ir pavardė)

(the document of Declaration of Authorship in the Final Degree Paper)

VILNIUS GEDIMINAS TECHNICAL UNIVERSITY

Tomas Šneideris, 20093162

(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 mouse PrP23-230“ is entirely my own work. The title was confirmed on October 25, 2012 by Faculty Dean's order No. 383fm. I have clearly signalled 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)

Tomas Šneideris
(Given name, family name)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

Bioinžinerijos studijų kryptis

(Parašas)

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

BAIGIAMOJO BAKALAURO DARBO (PROJEKTO)

UŽDUOTIS

.....Nr.

Vilnius

Studentui

Tomui Šneideriui

Baigiamojo darbo (projekto) tema: **Rekombinantinio pelės PrP23-230 gamyba**

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

Baigiamojo darbo (projekto) užbaigimo terminas 2013m. birželio 1d.

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) UŽDUOTIS:

Išsiaiškinti, kuris kamienas geriau tinkamas pelės MoPrP23-230 ekspresijai. Tam reikės transformuoti *pRSETB* plazmidę su įklonuotu MoPrP23-230 prioniniu genu į *E. coli* BL21(DE3) ir *E. coli* BL21 Star™(DE3) kamienus, auginti nedidelius tūrius kultūrų, indukuoti baltymo gamybą į kultūrą pridant IPTG ir patikrinti baltymo ekspresiją natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezės metodu. Išsirinkus geriausią kamieną auginti didesnius kiekius biomasės kolbose arba fermentatoriuje, pabandyti optimizuoti auginimo sąlygas. Priauginus pakankamai biomasės, renatūruoti ir išgryninti baltymą giminingumo chromatografijos metodo pagalba. Nukirpti histidininę uodegą panaudojant trombiną, bei atskirti baltymą nuo trombino jonų mainų chromatografijos metodu.

Aiškinamasis raštas: Prionai yra baltymai, kurie gali įgyti dvi formas, natyvią formą ir netinkamai susilanksčiusią patogeninę formą. Tam, kad būtų galima tyrinėti prionus biofizikiniais metodais, visų pirma reikia turėti pakankamą kiekį natyvių prioninių baltymų.

Baigiamojo bakalauro darbo (projekto) konsultantai:

Ričardas Mališauskas

Vadovas

.....

(Parašas)

dr. Vytautas Smirnovas

Užduotį gavau

.....

(Parašas)

.....Tomas Šneideris.....

(Vardas, pavardė)

.....

(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data-....-....

Pirmosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos baigiamasis darbas 3

Pavadinimas **Rekombinantinio pelės PrP23-230 gamyba**
Autorius **Tomas Šneideris**
Vadovas **dr. Vytautas Smirnovas**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Prionai yra baltymai, kurie gali įgyti dvi formas, natyvią formą ir netinkamai susilanksčiusią patogeninę formą. Tam, kad būtų galima tyrinėti prionus biofizikiniais metodais, visų pirma reikia turėti pakankamą kiekį natyvių prioninių baltymų.

Pelės prioninio baltymo (MoPrP23-230) gamyba susideda iš kelių esminių etapų: konstrukto transformacijos į kompetentines ląsteles; transformantų auginimo; tikslinio baltymo renatūravimo ir gryninimo giminingumo chromatografijos metodu; histidininės uodegos atskyrimo nuo baltymo; baltymo gryninimo jonų mainų chromatografijos metodu.

Darbo metu nustatyta, kad iš pradžių ekspresijai naudotas konstruktas turėjo mutaciją, 228 aminorūgštis iš arginino pakeista į treoniną. Vėliau buvo gautas reikiamas konstruktas, kuris buvo naudojamas tolimesniam darbui. Atlikta pelės prioninio baltymo (MoPrP23-230) ekspresija *E. coli* BL21(DE3) ir *E. coli* BL21 Star™ (DE3) kompetentiniuose kamienuose. Nustatyta, kad tinkamiausia mitybinė terpė transformantų auginimui yra LB peptonas. Nors *E. coli* BL21(DE3) ir *E. coli* BL21 Star™ (DE3) transformantai gamino panašius kiekius biomasės, tačiau atlikus baltymų renatūraciją ir gryninimą giminingumo chromatografijos metodu iš *E. coli* BL21 Star™ (DE3) transformantų buvo gauta 105 mg pelės prioninio baltymo, prie kurio buvo prijungta histidininė uodegėlė, tuo tarpu *E. coli* BL21(DE3) transformantai tikslinio baltymo neekspresavo. Panaudojant trombiną nuo tikslinio baltymo atskirta histidininė uodegėlė. Pelės prioninis baltymas galutinai išgrynintas jonų mainų chromatografijos metodu. Gauta 70 mg gryno pelės prioninio baltymo. Apytikslė 1 mg pelės prioninio baltymo gamybos kaina šio darbo metu yra 60,33 Lt.

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

Darbo apimtis 47 p. teksto be priedų, 17 paveikslų, 12 lentelių, 21 bibliografinis šaltinis.

Atskirai pridedami darbo priedai.

Prasminiai žodžiai: MoPrP23-230, pelės prioninis baltymas, rekombinantinių baltymų gamyba, prioninių baltymų gryninimas, baltymų renatūracija.

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Bioinžinerijos studijų kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

Bioinžinerijos specializacija

PAŽYMA
APIE BAIGIAMĄJĮ BAKALAURO DARBĄ (PROJEKTĄ)

.....Nr.
Vilnius

Studentas

Tomas Šneideris
(Vardas, pavardė)

Studento (ės) studijų svartinis įvertinimų vidurkis.....balo.

Baigiamojo darbo (projekto) tema: **Rekombinantinio pelės PrP23-230 gamyba**
Baigiamasis darbas (projektas) peržiūrėtas ir studentui **Tomui Šneideriui**
leidžiama ginti šį baigiamąjį darbą (projektą) bakalauro laipsnio suteikimo komisijoje.

Katedros vedėjas

.....
(Parašas)

Prof. habil. dr. Juozas Kulys
(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

VADOVO ATSILIEPIMAS
APIE BAIGIAMĄJĮ BAKALAURO DARBĄ (PROJEKTĄ)

2013 gegužės 31 d.

Studentas Tomas Šneideris baigiamojo darbo metu gamino rekombinantinį pelės PrP23-230 baltymą. Kadangi dėl mūsų kolegų iš JAV klaidos, pradžioje buvo atsiųstas konstruktas su mutacija, iš pradžių buvo pagaminta 58mg gryno PrP23-230_R228T baltymo, bei apie 70mg šio baltymo su histidinine uodega. Vėliau, gavus teisingą konstrukta, pagaminta 70mg gryno PrP23-230 baltymo. Visi minėti baltymai naudojami mūsų skyriuje vykdomiems tyrimams. Darbo metu Tomas taip pat bandė palyginti baltymo ekspresiją skirtinguose kamienuose bei naudojant skirtingas terpes – šios žinios bus naudingos gaminant panašius batymus ateityje. Pabandžius įvertinti baltymo gamybos kaštus matosi, kad gamybos kaina nėra itin aukšta, tuo tarpu perkant gryną baltymą reikėtų mokėti žymiai daugiau. Manau, šis darbas turi būti vertinamas aukščiausiu balu.

Baigiamojo darbo (projekto) įvertinimas: 10

Vadovas

.....
(Parašas)

dr. Vytautas Smirnovas
(Vardas, pavardė)

Turinys

ĮVADAS	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Natyvaus pelės prioninio baltymo (MoPrP) struktūra.....	13
1.2. Rekombinantinių baltymų ekspresija <i>Escherichia coli</i> ląstelėse.....	14
1.2.1. Kultivavimo temperatūra.....	14
1.2.2. Auginimo terpė.....	14
1.2.3. Kultūros optinis tankis	15
1.2.4. Biomasės atskyrimas nuo kultūrinio skysčio	16
1.2.5. Biomasės auginimas fermentatoriuje ir kolbose	17
1.3. Rekombinantinių baltymų gryninimas	17
1.3.1. Baltymų renatūracija	18
1.3.2. Giminingumo chromatografija.....	18
1.3.3. Jonų mainų chromatografija.....	19
1.3.4. Histidinių uodegų nukirpimas trombinu	20
1.3.5. Baltymų renatūracija ir gryninimas.....	20
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	22
2.1. Naudoti reagentai, laboratoriniai įrenginiai, terpės, buferiniai tirpalai	22
2.1.1. Naudoti reagentai	22
2.1.2. Naudota laboratorinė įranga	22
2.1.3. Naudoti sorbentai	23
2.1.4. Naudoti kamienai	24
2.1.5. Naudoti konstruktai	24
2.1.6. Mitybinės terpės	24
2.1.7. Tirpalai	24
2.1.8. Buferiniai tirpalai naudoti baltymų gryninime.....	26
2.2. Metodai.....	27
2.2.1. Transformacija į kompetentines ląsteles	27
2.2.2. Ekspresija	28
2.2.3. Baltymų elektroforezė	29
2.2.4. Baltymų gryninimas ir renatūracija.....	30
2.2.5. Sorbentų regeneravimas	32
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	33
3.1. MoPrP23-230_R228T konstrukto nustatymas	33
3.2. Transformantų atranka.....	36
3.3. Tinkamiausios mitybinės terpės atranka.....	37
3.4. Pelės prioninio baltymo (MoPrP23-230) ekspresija.....	38
3.5. Pelės prioninio baltymo gryninimas	41
3.6. Ekonominė nauda	44
4. IŠVADOS	45
LITERATŪRA	46

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- AA/BIS – akrilamido ir N,N'-metilen-bisakrilamido mišinys
- APS – amonio persulfatas
- aps. – apsisukimai
- BIS–akrilamidas – N,N'-metilen–bisakrilamidas
- IDA – iminodiacto rūgštis
- IMAC – imobilizuotų metalo jonų afininė chromatografija
- IPTG – izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas
- LB – Luria Bertani mitybinė terpė
- MoPrP23-230 – pelės prioninis baltymas
- MoPrP23-230_R228T – pelės prioninis baltymas su mutacija 228 aminorūgštyje, argininas pakeistas treoninu.
- NDS – natrio dodecilsulfatas
- NDS-PAAG – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė
- NTA – nitrilotriacto rūgštis
- O.T. – optinis tankis
- O.V. – optiniai vienetai
- PrP arba PrP^C – natyvus ląstelinis prioninis baltymas
- PrP^{Sc} – patogeniniai prionai, Sc reiškia *Scrapie* ligą
- TED – trikarboksimetiletilendiaminas
- TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilendiaminas
- TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
- TRIS-HCl – TRIS(hidroksimetil)aminometano hidrochloridas

IVADAS

Prionai yra baltymai, kurie gali įgyti dvi formas: natyvią formą ir netinkamai susilanksčiusią formą. Netinkamai susilansčiusi prioninių baltymų forma yra patogeninė. Patogeniniai prionai (PrP^{Sc}, Sc reiškia *Scrapie* ligą) – infekciniai baltymai, kurie patekę į šeimininko organizmą sukelia neurodegeneraciją, t. y. pažeidžia šeimininko centrinę nervų sistemą. Šiai dienai yra iširta, jog ligos, kurias sukelia tokio tipo baltymai, atsiranda dėl netinkamai susilanksčiusios prioninio baltymo struktūros. Netinkamai susilankstę PrP^{Sc} yra susiję su įvairiomis ligomis tokiomis, kaip kempinligė, Creutzfeldt–Jakob liga (CJD), Gerstmann–Sträussler–Scheinker sindromas (GSS) (Aguzzi *et al.* 2009; Colby ir Prusiner 2011; Collinge 1997). Visos žinomos prioninės ligos veikia smegenų struktūrą arba kitus nervinius audinius ir šiai dienai yra neišgydomos ir mirtinos. PrP^{Sc} patekęs į sveiką organizmą indukuoja tinkamai susilanksčiusių, organizme natūraliai egzistuojančių, ląstelių prioninių baltymų (PrP arba PrP^C) virsmą į patogeninę prioninių baltymų formą PrP^{Sc}, kuri sukelia ligą. PrP^{Sc} veikia kaip šablonas: jo pagrindu natyvūs ląsteliniai prioniniai baltymai (PrP^C) pakeičia konformaciją ir tampa PrP^{Sc} (Colby ir Prusiner 2011; Goodsell 2008). Naujai susidarę PrP^{Sc} gali toliau inicijuoti sveikų PrP^C virsmą į patogeninius prioninius baltymus, t. y. sukelti grandininę reakciją, kurios rezultatas – didžiuliai kiekiai patogeninių prioninių baltymų (Goodsell 2008). Už tyrimus susijusius su prioniniais baltymais ir jų formos kitimu 1997 metais S. Prusiner gavo Nobelio premiją. Nuo to laiko buvo atlikta daugybė tyrimų, atrasti kiti baltymai, kurie veikia panašiai kaip ir prionai *in vitro*. Tačiau išlieka dar daug neaiškumų.

Tam, kad būtų galima tyrinėti prionus biofizikiniais metodais, visų pirma reikia turėti pakankamą kiekį natyvių prioninių baltymų (PrP). Kadangi tai nėra dažnai naudojamas baltymas, jo pasiūla yra labai maža, o kaina ganėtinai didelė. Todėl šiuos baltymus tenka gamintis patiems.

Dėl nesudėtingo auginimo, pigios mitybinės terpės ir geros baltymų ekspresijos, žarnyno bakterijos *Escherichia coli* (*E. coli*) yra tinkamiausias mikroorganizmas rekombinantinių prioninių baltymų (PrP) gamybai. Tačiau, žinduolių prioninių baltymų ekspresija *E. coli* bakterijose yra sudėtinga, nes dėl netinkamai susilanksčiusių rekombinantinių baltymų dažnai susidaro neaktyvūs agregatai. Pavyzdžiui, rekombinantiniai PrP yra dažniausiai ekspresuojami kaip intarpiniai kūneliai (Abskharon *et al.* 2012; Baneyx 1999; Brondyk *et al.* 2009; Makrides 1996). Todėl norint gauti tinkamai susilanksčiusius rekombinantinius prioninius baltymus būtina atlikti baltymų renatūraciją.

Šio darbo tikslas yra rekombinantinio pelės prioninio baltymo (MoPrP23-230) gamyba.

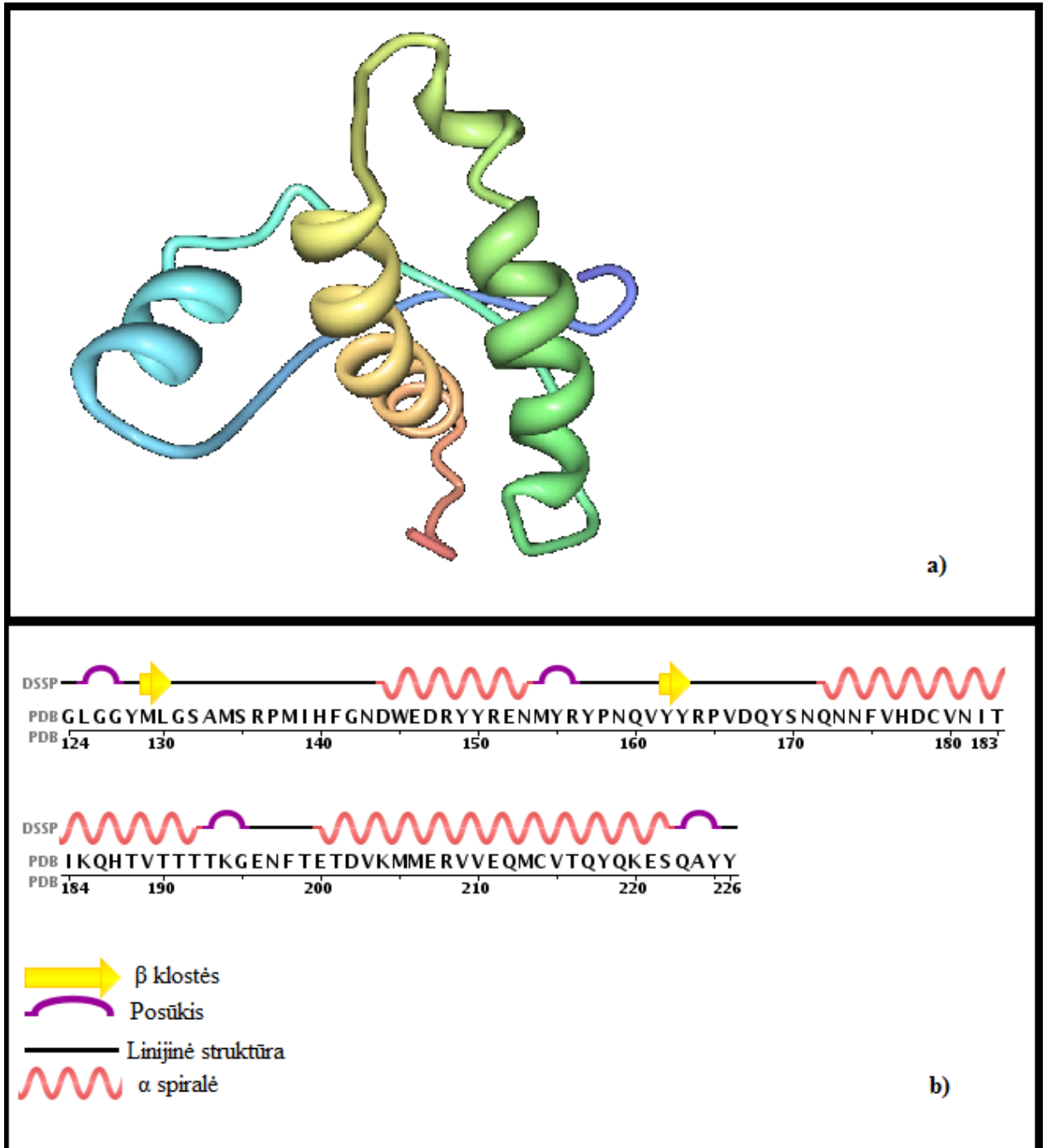
Tad iškeliami tokie uždaviniai:

1. Išsiaiškinti, kuris kamienas geriau tinkamas MoPrP23-230 ekspresijai. Tam reikės transformuoti *pRSETB* plazmidę su įklonuotu MoPrP23-230 prioniniu genu į *E. coli* BL21(DE3) ir *E. coli* BL21 Star™(DE3) kamienus, auginti nedidelius tūrius kultūrų, indukuoti baltymo gamybą į kultūrą pridėdant IPTG ir patikrinti baltymo ekspresiją natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezės metodu.
2. Išsirinkus geriausią kamieną auginti didesnius kiekius biomasės kolbose arba fermentatoriuje, pabandyti optimizuoti auginimo sąlygas.
3. Priauginus pakankamai biomasės, renatūruoti ir išgryninti baltymą giminingumo chromatografijos metodu.
4. Nukirpti histidininę uodegą panaudojant trombiną bei atskirti baltymą nuo trombino jonų mainų chromatografijos metodu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Natyvaus pelės prioninio baltymo (MoPrP) struktūra

Natyvų pelės prioninį baltymą (MoPrP23-230) sudaro 208 aminorūgštys, iš kurių tik 110, nuo 121 iki 230, sudaro erdvinę baltymo struktūrą. Šios aminorūgštys suformuoja tris α spirales bei dvi β klostes (1 pav.) (Riek *et al.* 1996).



1 pav. a) Erdvinė pelės prioninio baltymo (MoPrP121-230) struktūra (PDB ID: 1AG2). b) MoPrP121-230 struktūra (pritaikyta iš PDB ID: 1AG2)

1.2. Rekombinantinių baltymų ekspresija *Escherichia coli* ląstelėse

Augant vis didesniai rekombinantinių baltymų, skirtų moksliniams tyrimams, poreikiui efektyvios rekombinantinių baltymų gamybos strategijos sulaukia vis daugiau dėmesio. Norima turėti didžiulius kiekius rekombinantinių baltymų, jų gamybai išleidžiant kuo mažesnes pinigų sumas. (Palomares *et al.* 2004). Nuo to laiko, kai buvo atrasti prioniniai baltymai ir nustatytas jų vaidmuo neurodegeneraciją sukeliančiose ligose, išaugo poreikis turėti didelius kiekius šių baltymų skirtų moksliniams tyrimams (Abskharon *et al.* 2012). Dėl labai geros rekombinantinių baltymų ekspresijos *Escherichia coli* yra vienas iš labiausiai vertinamų mikroorganizmų, kuris yra tinkamas prioninių baltymų gamybai. Nagrinėtuose literatūros šaltiniuose aprašoma prioninių baltymų ekspresija *Escherichia coli* Rosetta (DE3) (Abskharon *et al.* 2012), *Escherichia coli* XL 1-blue (Corsaro *et al.* 2002), *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Zahn *et al.* 1997; Hornemann *et al.* 2009) kamienuose.

Siekiant gauti didelius biomasės ir rekombinantinio baltymo kiekius reikia parinkti optimalias mikroorganizmų kultivavimo sąlygas.

1.2.1. Kultivavimo temperatūra

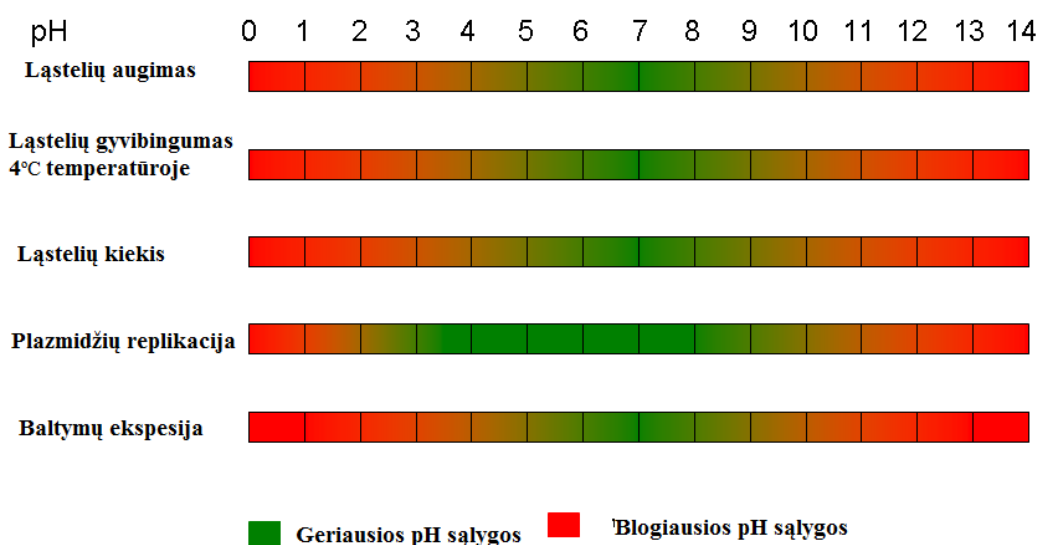
Vienas iš svarbiausių parametru yra tinkama kultivavimo temperatūra. Literatūros šaltiniuose (Abskharon *et al.* 2012; Brondyk *et al.* 2009; Hornemann *et al.* 1997; Zahn *et al.* 1997) nurodoma, jog *Escherichia coli* bakterijos kultivuojamos 37 °C temperatūroje, tuo metu literatūros šaltinyje (Corsaro *et al.* 2002) aprašomas *Escherichia coli* kultivavimas 30 °C temperatūroje. Pastarieji autoriai teigia, jog *E. coli* auginimas 30 °C temperatūroje padidina baltymo ekspresijos ir tirpumo lygį. Norint gauti didelius kiekius tinkamai susilanksčiusio, tirpaus rekombinantinio baltymo *E. coli* kultivavimo temperatūra gali būti sumažinta iki 15–30 °C temperatūros (Brondyk *et al.* 2009). Literatūros šaltinio (Abskharon *et al.* 2012) autoriai nurodo, kad sumažino mikroorganizmų kultivavimo temperatūrą iki 30 °C po indukcijos, o literatūros šaltinių (Hornemann *et al.* 1997; Zahn *et al.* 1997) autoriai temperatūros po indukcijos nesumažino.

1.2.2. Auginimo terpė

Kitas svarbus parametras yra terpė, kurioje yra kultivuojamas mikroorganizmas bei terpės pH. *E. coli* bakterijų kultivavimui dažnai naudojamos šios terpės: LB (Luria Bertani) Miller mišinys: 1 % peptono, 0,5 % mielių ekstrakto ir 1 % NaCl; LB (Luria Bertani) Lennox mišinys: 1 % peptono, 0,5 % mielių ekstrakto ir 0,5 % NaCl; SOB terpė (Super Optimal Broth): 2 % peptono, 0,5 % mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ (Expression Technologies Inc). Literatūros šaltiniuose (Abskharon *et al.* 2012; Corsaro *et al.*

2002; Hornemann *et al.* 1997; Zahn *et al.* 1997) nurodoma, jog bakterijos auginamos Luria Bertani mitybinėje terpėje, tačiau jos sudėtis nėra pateikiama tiksliau.

Taip pat yra labai svarbu parinkti tinkamą mitybinės terpės pH. Literatūros šaltinyje (Expression Technologies Inc) nurodoma, kad optimalios pH reikšmės *E. coli* kultivavimui yra nuo 5,5 iki 8,5 (2 pav.). Kultivuojant mikroorganizmus, ekspresuojančius rekombinantinį baltymą, yra labai svarbu atlikti mikroorganizmų atranką. Šiuo tikslu yra naudojami antibiotikai. *E. coli* bakterijos turinčios įvestą plazmidę, kuri turi atsparumo antibiotikui geną, bus atsparios antibiotiko poveikiui, tuo metu bakterijos, kurios neturės šios plazmidės, bus neatsparios antibiotiko poveikiui ir galiausiai žus. Literatūros šaltinių (Abskharon *et al.* 2012; Corsaro *et al.* 2002; Hornemann *et al.* 1997; Hornemann *et al.* 2009; Zahn *et al.* 1997) autoriai nurodo, jog į mitybinę terpę pridedama antibiotiko. Verta pastebėti, kad literatūros šaltinyje (Expression Technologies Inc) kalbama apie tai, jog esant labai mažai deguonies koncentracijai mitybinėje terpėje arba, kai visiškai jo nėra, *Escherichia coli* ląstelės pradeda gaminti didelius kiekius acto rūgšties. Dėl to sulėtėja arba sustoja ląstelių augimas. Esant mažam pH ampicilinas yra chemiškai skaidomas, todėl ląstelių atranka nebevyksta (Expression Technologies Inc).

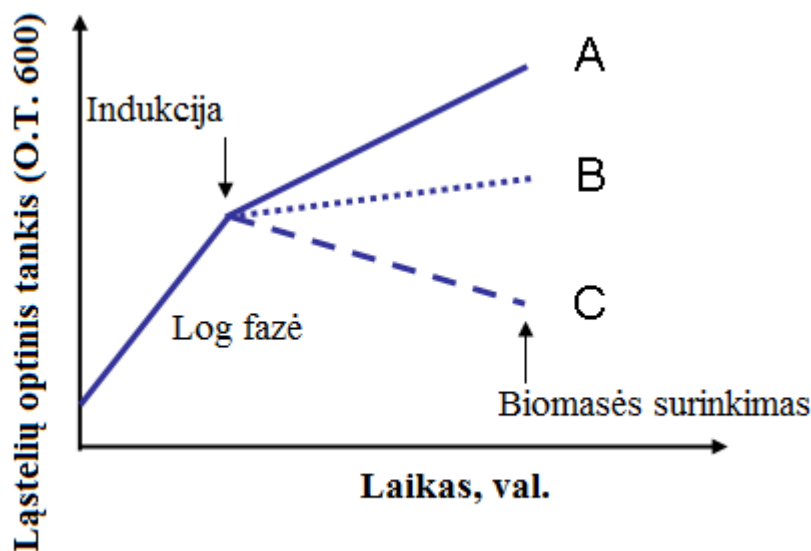


2 pav. *E. coli* pH optimumas (pritaikyta iš Expression Technologies Inc)

1.2.3. Kultūros optinis tankis

Rekombinantiniai genai gali turėti įvairius promotorius. Priklausomai nuo promotoriaus tipo genų ekspresija yra konstitutyvi arba indukuojama (Palomares *et al.* 2004). Konstitutyvi ekspresija gali padidinti plazmidės nestabilumą. Pastoviai gaminant rekombinantinį baltymą medžiagų apykaitos sistema patiria didžiulę apkrovą, dėl to plazmidė tampa nestabili. Todėl dažniausiai yra naudojamos indukuojamos sistemos, kurių indukcija yra atliekama susidarius tam tikram ląstelių optiniam tankiui (O.T.) (3 pav.). Indukcija atliekama pridedant indukcinio agento, pavyzdžiui izopropil-β-D-tiogalaktopiranozido (IPTG). Literatūros šaltiniuose (Abskharon *et*

al. 2012; Corsaro *et al.* 2002; Hornemann *et al.* 1997; Hornemann *et al.* 2009; Zahn *et al.* 1997) prioninių baltymų ekspresijai yra naudojamos indukuojamos sistemos. Pastaruosiuose šaltiniuose nurodoma, kad O.T. yra matuojamas spektrofotometru esant 600 nm bangos ilgiui, išskyrus literatūros šaltinį (Hornemann *et al.* 1997), kuriame nurodoma, kad O.T. yra matuojamas bangos ilgiui esant 550 nm. Literatūros šaltinyje (Abskharon *et al.* 2012) mikroorganizmų kultūros O.T. pasiekus 0,7 optinius vienetus (O.V.) į kultūrą yra pridedama 1 mM IPTG. Tuo metu literatūros šaltinyje (Corsaro *et al.* 2002) mikroorganizmų kultūros O.T. pasiekus 0,6 O.V. į kultūrą yra pridedama 0,4 mM IPTG. Literatūros šaltinyje (Zahn *et al.* 1997) mikroorganizmų kultūros O.T. pasiekus 0,5 O.V. į kultūrą yra pridedama 1 mM IPTG. Literatūros šaltinyje (Hornemann *et al.* 1997) nurodoma, kad mikroorganizmų kultūros O.T. pasiekus 1,0–1,3 optinius vienetus (O.V.) į kultūrą yra pridedama 1 mM IPTG. Remiantis anksčiau minėtų autorių pateikiamais duomenimis galime daryti prielaidą, jog mikroorganizmų kultūrą geriausia indukuoti 0,5–1 O.V. intervale pridedant 1 mM IPTG. Toliau autoriai pateikia skirtingus mikroorganizmų kultivavimo po indukcijos laikus: 16 val. (Abskharon *et al.* 2012; Hornemann *et al.* 1997), 4 val. (Corsaro *et al.* 2002), 8 val. (Hornemann *et al.* 2009).



3 pav. *E. coli*, ekspresuojančių skirtingus baltymus, augimo kreivės. A kreivė – *E. coli*, ekspresuojančios daugumą baltymų. B kreivė – *E. coli*, ekspresuojančios baltymus, kurie trukdo ląstelių proliferacijai ir/ar diferenciacijai. C kreivė – *E. coli*, ekspresuojančios ypač toksiškus baltymus (pritaikyta iš Expression Technologies Inc)

1.2.4. Biomės atskyrimas nuo kultūrinio skysčio

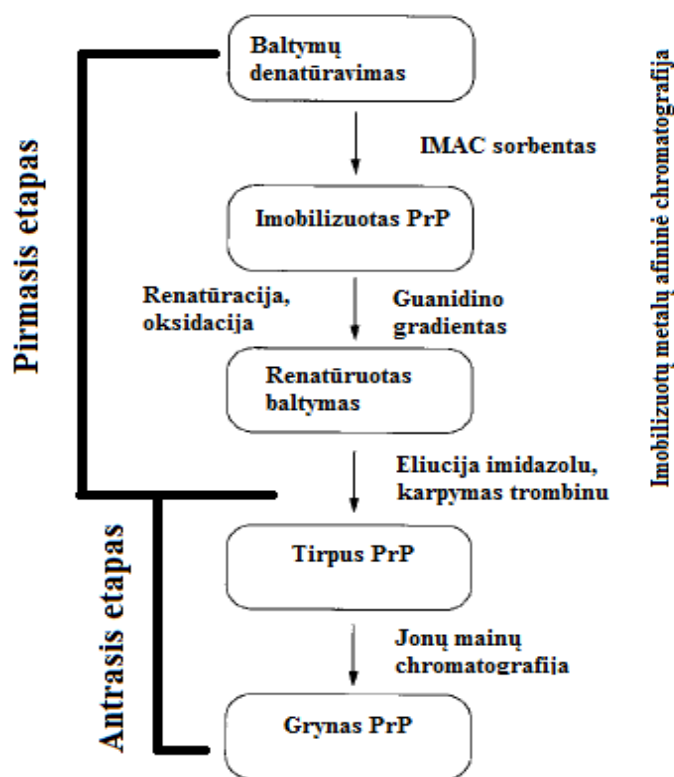
Biomės nuo mitybinės terpės yra atskiriama centrifuguojant. Literatūros šaltinyje (Abskharon *et al.* 2012) biomės atskiriama centrifuguojant 15 min $15000 \times g$. Tuo metu literatūros šaltinyje (Corsaro *et al.* 2002) biomės atskiriama centrifuguojant 15 min $5000 \times g$ 4°C temperatūroje. Nei vienas iš pastarųjų autorių plačiau nekommentuoja, kodėl atskyrimas vykdomas būtent tokiais sąlygomis.

1.2.5. Biomės auginimas fermentatoriuje ir kolbose

Biomės kultivavimas gali būti atliekamas tiek fermentatoriuje tiek kolbose. Fermentatorių (bioreaktorių) privalumas yra tai, jog galima kontroliuoti mikroorganizmų kultivavimo sąlygas. Naujos kartos bioreaktoriuose galima reguliuoti daugumą parametrų: auginimo temperatūrą, pH, ištirpusio deguonies kiekį, aeraciją, ištirpusio anglies dioksido kiekį, ląstelių koncentraciją, substrato koncentraciją, slėgį, tūrį (Makrides 1996; Palomares *et al.* 2004). Tuo metu auginant termostatinėje purtyklėje kolbose galima reguliuoti temperatūrą ir maišymo greitį (Expression Technologies Inc).

1.3. Rekombinantinių baltymų gryninimas

Didelių kiekių rekombinantinių baltymų ekspresija *E. coli* bakterijose dažnai sukelia netinkamą rekombinantinių baltymų susilankstymą, arba netirpių agregatų, dar žinomų kaip intarpiniai kūneliai, susidarymą (Baneyx 1999). Intarpiniai kūneliai susiformuoja ląstelės viduje dėl baltymo polinkio agreguoti arba dėl ląstelinių procesų, kurie yra susiję su tirpios baltymo formos užtikrinimu, nestabilumo (Middelberg 2002). Intarpinių kūnelių susidarymas gali palengvinti rekombinantinių baltymų gryninimą (Baneyx 1999). Taigi norint turėti gryną, tinkamai susilanksčiusį (natyvų) baltymą yra būtina atlikti rekombinantinio baltymo renaturacijos ir gryninimo procesus (4 pav).



4pav. Rekombinantinio baltymo renaturacijos ir gryninimo procesų schema (pritaikyta iš Zahn *et al.* 1997)

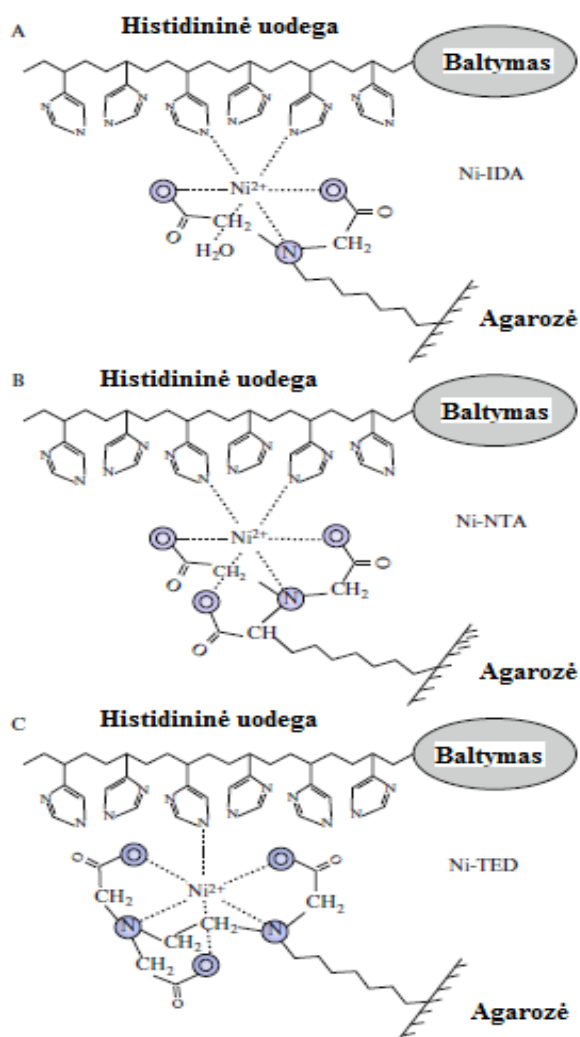
Baltymų gryninimui yra naudojami įvairūs chromatografijos metodai, tačiau plačiausiai naudojami yra giminingumo ir jonų mainų. Toliau nagrinėsime prioninių baltymų gryninimą bei renatūraciją naudojant šiuos chromatografijos metodus.

1.3.1. Baltymų renatūracija

Norint atlikti baltymo renatūraciją visų pirma baltymą reikia denatūruoti, t. y. suardyti jo antrinę struktūrą ir redukuoti disulfidinius tiltelius. Baltymo denatūracijai yra naudojami stiprūs denatūrantai: urėja arba guanidino chloridas. Kartu su denatūrantais yra naudojamas ir glutationas, kuris yra stiprus antioksidantas, neleidžiantis susidaryti disulfidiniams tilteliams. Baltymo renatūracija vykdoma mažinant naudojamo denatūranto ir glutationo koncentraciją (Middelberg 2002).

1.3.2. Giminingumo chromatografija

Giminingumo (afininė) chromatografija – chromatografijos metodas, pagrįstas specifine, grįžtama sąveika tarp biologiškai aktyvių arba erdviškai unikalių molekulių su kitomis komplementariomis molekulėmis. Šis chromatografijos metodas naudojamas selektyviai molekulių ekstrakcijai, išskyrimui, gryninimui, iš grubių, neišgrynintų biologinių mišinių (Cuatrecasas 1970; Sasnauskienė 2008). Imobilizuotų metalo jonų afininė chromatografija (IMAC) yra giminingumo chromatografijos metodas, paremtas pereinamųjų metalų jonų (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}) giminingumu histidinui ir cisteinui vandeniniuose tirpaluose (Block 2009; Porath *et al.* 1975). Stipriai pritvirtinus metalo jonus prie matricos galima išfrakcionuoti baltymus. Kaip chelatuojantis ligandas, tinkantis metalui surišti su agaroze, gali būti naudojama iminodiacto rūgštis (IDA), nitrilotriacto rūgštis (NTA) arba trikarboksimetiltilendiaminas (TED) (Block 2009). Baltymų, turinčių histidines uodegas, sąveika su imobilizuotu metalo jonu pateikta 5 pav. Labiausiai paplitęs IMAC taikymas yra rekombinantinių baltymų, prie kurių yra prijungta histidininė uodega, sudaryta iš šešių ar daugiau histidino liekanų, gryninimas. Dėl didelio histidinių uodegų afiniškumo bei specifiškumo pereinamųjų metalų jonams, gryninant baltymą IMAC metodu dažniausiai yra gaunamas pakankamai grynas baltymas (Block 2009). Maža kaina, paprastumas, galimybė dirbti tiek natūraliomis, tiek denatūruojančiomis sąlygomis, kai yra naudojami 8 M urėja arba 6 M guanidino chlorido tirpalai, bei galimybė atlikti renatūracijos procesą yra vieni iš pagrindinių IMAC privalumų.



5 pav. Baltymo histidininės uodegos sąveika su Ni^{2+} jonu, kuris yra prijungtas prie skirtingų chelatuojančių ligandų. A – Ni^{2+} jonai prijungti prie IDA ligando. B – Ni^{2+} jonai prijungti prie NTA ligando. C – Ni^{2+} jonai prijungti prie TED ligando (pritaikyta iš Block 2009)

1.3.3. Jonų mainų chromatografija

Jonų mainų chromatografijos metodas yra pagrįstas sąveika tarp priešingus krūvius turinčių molekulių. Baltymai turi jonogenines funkcines grupes, kurios vandeniniuose tirpaluose gali jonizuotis, t. y. įgyti teigiamą arba neigiamą krūvį. „Baltymo sąveika su jonitais priklauso nuo teigiamų ir neigiamų krūvių skaičiaus, konkretaus baltymo jonogeninių grupių disociacijos konstanta priklausys nuo baltymo erdvinės struktūros, jonogeninių grupių apsupties.“ (Sasnauskienė 2008). Jonų mainų chromatografijoje yra naudojami sorbentai, kurie taip pat turi jonogeninių grupių: katijonitai pakeičia katjonus, o anijonitai – anjonus. „Katijonų mainų nešiklių 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 rūgštinių funkcinių grupių jonizacijos. Anijonų mainų nešikliai turi teigiamą krūvį, jie vadinami baziniais nešikliais, nes teigiamą krūvį generuoja protoną prisijungusios bazinės funkcinės grupės. Baltymų chromatografijoje labai retai

naudojami sorbentai, turintys tiek katijonines, tiek anijonines grupes – amfoteriniai jonitai.“ (Sasnauskienė 2008).

1.3.4. Histidinių uodegų nukirpimas trombinu

Proteazė trombinas atpažįsta Leu–Va–Pro–Arg–Gly–Ser aminorūgščių sekas ir nutraukia peptidinę jungtį tarp Arg ir Gly. Trombinas dažnai naudojamas vektoriuose, kuriuose yra ši proteazių kirpimo sritis, tai leidžia atskirti histidines uodegas nuo baltymo. Dažniausiai yra naudojama nuo 1 iki 10 vienetų trombino vienam miligramui baltymo. Kirpimo reakciją rekomenduojama atlikti 37 °C temperatūroje. Norint patikrinti ar trombinas atskyrė histidinę uodegą nuo baltymo, reikia imti mėginius kas tam tikrus laiko intervalus bei juos tikrinti natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezės (NDS–PAAG) metodu arba masių spektrometru. Baltymo, nuo kurio buvo nukirpta histidinė uodega, molekulinė masė turi būti apie 2 kDa mažesnė (Structural Biology @ Vanderbilt 2000).

1.3.5. Baltymų renatūracija ir gryninimas

Baltymų renatūraciją galima atlikti kartu su pirminiu baltymų gryninimu (Hornemann *et al.* 1997; Hornemann *et al.* 2009; Middelberg 2002; Zahn *et al.* 1997). Rekombinantinių prioninių baltymų renatūracija bei gryninimas literatūros šaltiniuose (Abskharon *et al.* 2012; Hornemann *et al.* 2009; Zahn *et al.* 1997) atliekamas giminingumo chromatografijos metodu, naudojant imobilizuotai metalų afininei chromatografijai tinkantį sorbentą Ni–NTA (Ni²⁺–nitrilotriacetatinė rūgštis prijungta prie agarozės), kuris jungiasi su prijungta prie baltymo histidine uodega (5 pav.).

Literatūros šaltinių (Block 2009; Hornemann *et al.* 1997; Hornemann *et al.* 2009; Middelberg 2002; Zahn *et al.* 1997) autoriai nurodo, kad prieš pradėdant baltymų renatūraciją ir pirminį gryninimą IMAC metodu reikia nucentrifuguotą biomasę suspenduoti/homogenizuoti su buferiniu tirpalu A1 (8 M urėjos 10 mM TRIS–HCl, 100 mM natrio dihidrofosfato, 10 mM redukuoto gliutinationo, pH 8) (Block 2009; Hornemann *et al.* 1997; Hornemann *et al.* 2009; Middelberg 2002) arba buferiniu tirpalu B1 (6 M guanidinio chlorido, 10 mM TRIS–HCl, 100 mM natrio dihidrofosfato, 10 mM redukuoto gliutinationo, pH 8) (Block 2009; Middelberg 2002; Zahn *et al.* 1997) bei suardyti ultragarsu (UG) (Corsaro *et al.* 2002; Zahn *et al.* 1997) arba naudojant French presą (Abskharon *et al.* 2012; Hornemann *et al.* 1997). Verta pastebėti, kad literatūros šaltinyje (Block 2009) yra minima, jog baltymai, kurie turi prijungtas histidines uodegas ir formuoja intarpinius kūnelius, prastai tirpsta urėjos denatūrate, todėl yra rekomenduojama urėją pakeisti guanidino chloridu. Po ardymo gautas ląstelių lizatas turi būti nucentrifuguojamas. Po centrifugavimo proceso surenkamas supernatantas, kuriame yra denatūruotas baltymas. Sorbentą užpylus supernatantu, mišinys yra lėtai maišomas 10 min, tam,

kad baltymas spėtų gerai prisijungti prie sorbento ligandų (Zahn *et al.* 1997). Vėliau sorbento ir supernatanto mišinys yra pakraunamas į chromatografinę kolonėlę (Abskharon *et al.* 2012; Zahn *et al.* 1997). Tuo metu literatūros šaltinyje (Block 2009) yra nurodoma, kad supernatantas gali būti užpilamas ant sorbento, kuris jau yra chromatografinėje kolonėlėje, tuomet supernatantui yra leidžiama tekėti per kolonėlę. Nė vienas iš pastarųjų autorių nenurodo, kodėl yra naudojamas vienas ar kitas chromatografinės kolonėlės pakrovimo metodas.

Literatūros šaltinyje (Abskharon *et al.* 2012) aprašomas natyvių baltymų gryninimas IMAC metodu. Baltymai, kurie nesąveikavo su sorbentu atplaunami 5 kolonėlės tūriais buferinio tirpalo C1 (50 mM kalio fosfato, 1 M NaCl, 50 mM imidazolo, pH 7,5) bei 10 kolonėlės tūrių buferinio tirpalo D1 (50 mM kalio fosfato, 1 M NaCl, 50 mM imidazolo, pH 6). Tikslinis baltymas yra atskiriamas nuo sorbento naudojant buferinį eliucijos tirpalą (0,05–1 M imidazolo, 50 mM kalio fosfato, pH 7,5).

Literatūros šaltinyje (Zahn *et al.* 1997) aprašytas baltymų gryninimas atliekamas kartu su baltymo renatūracija. Baltymo renatūracija vykdoma sudarant 200 mL buferinio tirpalo B1 ir buferinio tirpalo E1 (10 mM TRIS–HCl, 100 mM natrio fosfato, pH 8) gradientą (buferinį tirpalą B1 pakeičiant buferiniu tirpalu E1). Toliau baltymas yra gryninamas per kolonėlę praleidžiant 75 mL buferinio tirpalo E1, kuriame yra 50 mM imidazolo. Galiausiai tikslinis baltymas yra atskiriamas naudojant buferinį eliucijos tirpalą (10 mM TRIS, 100 mM natrio fosfato, 500 mM imidazolo, pH 5,8).

Literatūros šaltiniuose (Hornemann *et al.* 2009; Zahn *et al.* 1997) aprašomas galutinis tikslinio baltymo gryninimas (antrasis etapas) jonų mainų chromatografijos metodu. Po giminingumo chromatografijos surinktas tikslinis baltymas yra dializuojamas buferiniame tirpale F1 (10 mM natrio fosfato, pH 5,8), vėliau vandenyje. Histidininė uodega atskiriama nuo tikslinio baltymo naudojant trombiną (0,1 U/mL). Ši reakcija atliekama buferiniame tirpale G1 (5 mM TRIS–HCl, pH 8,5). Vėliau trombinas atskiriamas nuo tikslinio baltymo naudojant jonų mainų chromatografijos metodą. Baltymo atskyrimas nuo sorbento vykdomas sukuriant NaCl gradientą (keičiant NaCl koncentraciją). Nukirptos histidininės uodegos atskiriamos dializuojant baltymo tirpalą (Hornemann *et al.* 2009; Zahn *et al.* 1997). Nei vienas iš pastarųjų autorių nenurodo nei kokį sorbentą naudojo, nei aprašo tokio gryninimo būdo privalumus.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Naudoti reagentai, laboratoriniai įrenginiai, terpės, buferiniai tirpalai

2.1.1. Naudoti reagentai

- *AB Vilniaus degtinė* etanolis 96 %.
- *Acros Organics*: acto rūgštis 99,5 %; HCl 37 %; natrio šarmas 50 %; nikelio (II) chlorido heksahidratas .
- *AppliChem*: glicinas 99,5 %; natrio dodecil sulfatas 85 %; TRIS 99,9 %.
- *Bio–Rad*: amonio persulfatas; bis–akrilamidas; kumasi R–250 dažas (Coomassie Brilliant Blue 250R); TEMED.
- *Carl Roth GmbH+Co.*: akrilamidas 98 %; ampicilinas, natrio druskos pavidale, 99 %; guanidino chloridas 99,7 %; kalcio chloridas 98 %; kalio dihidrofosfatas 99 %; kalio hidrofosfatas 99 %; magnio sulfato heptahidratas 99 %; natrioacetatas-trihidratas 99,5 %; peptonas; TRIS–HCl 99 %.
- *Fisher Scientific*: etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA) 99 %; glutationas; imidazolas 99 %; izopropiltio–β–galaktozidas; molekuliniai markeriai: BPE3603–1 ir SM0431; TRIS 99,8%.
- *Fluka*: baltymų hidrolizatas; bromfenolio mēlis; guanidino chloridas 98 %; mielių ekstraktas.
- *GE Healthcare*: trombinas.
- *MERCK*: natrio chloridas.
- *PEAXIIM*: amonio chloridas; glicerolis; natrio hidrofosfatas; trichloracto rūgštis.
- *Scharlau*: gliukozė.
- *SERVA*: 2–merkaptoetanolis.

2.1.2. Naudota laboratorinė įranga

- Bioreaktorius sudarytas iš valdymo bloko „BIOSTAT BPLUS Sartorius Stedim Biotech“ ir 5 L bei 2 L talpos indų.
- Biuchnerio piltuvai.
- Centrifūgos (šaldomos): „Sigma 6–16K“ (12500 rotorius); „Eppendorf 5424“ (F–45–18–11–Kit rotorius); „Eppendorf 5810R“ (Swing–bucket A–4–81 rotorius); „Hettich zentrifugen ROTINA 38R“ (6 Place Angle Rotor rotorius); „Beckman J2–21M“ (Ja–20 rotorius).
- Chromatografinė kolonėlė „GE Healthcare XK 26/20“.
- Chromatografinės sistemos: „Äkta explorer“; „Äkta purifier“.

- Dializės žarnos: 32 ir 50 mm diametro „Zella Trans Roth“, kurių pralaidumas yra 6–8 kDa.
- Elektroforezės aparatai: „Fisher Scientific Verti Gel mini“ su „CONSORT EV 265“ srovės šaltiniu ir „BioRad Mini Protean 3“ su „CONSORT EV 243“ srovės šaltiniu.
- Filtrai: 0,22 µm porų dydžio, 47 mm diametro „Millipore“; stiklo pluošto 0,45 µm porų dydžio, 47 mm diametro „Fisher Scientific“.
- Filtravimo indai: „Millipore Stericup“ 150 ir 250 ml, 73 mm diametro, 0,22 µm porų dydžio.
- Homogenizatorius Potter–Elvehjem „Sigma–Aldrich“.
- Koncentratoriai „Amicon® Ultra–15“, kurių pralaidumas yra 10 kDa.
- Magnetinės maišyklės: „BioSAN Magnetic stirrer MSH 300“; „IKA C–MAG HS7“; „IKA LABORTECHNIK RCT basic“.
- pH metrai: „OAKTON pH 1100 Series“; „InoLAB WTW series“.
- Spektrofotometrai: „GENESYS 10S UV–VIS“; „Agilent 8453“.
- Sūkurinės maišyklės: „VELP SCIENTIFICA VORTEX MIXER“; „IKA MS3 digital“.
- Svarstyklės: „KERN ABJ“; „KERN PCB 400–2“; „KERN PLJ 6000–1GM“; „KERN EW 600–2M“; „KERN GJ“.
- Švirkštiniai filtrai „Carl Roth GmbH+Co.“ 0,22 µm porų dydžio, 33 mm diametro.
- Termostatas „Eppendorf Thermostat plus“.
- Termostatinė vonelė „SELECTA PRECISDIG“.
- Termostatinės purtyklės: „NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Co. 625“; „Heidolph INKUBATOR 1000 UNIMAX 1010“; „GFL 1083“; „Biosan Enviromental Shaker–Incubator ES–20“.
- Ultragarsinis homogenizatorius „Bandelin Sonopuls“.
- Vakuuminė filtravimo sistema „Sigma–Aldrich“.

2.1.3. Naudoti sorbentai

GE Healthcare: „Ni Sepharose™ 6 Fast Flow“; „Chelating Sepharose Fast Flow“; „CM Sepharose Fast Flow“.

2.1.4. Naudoti kamienai

Baltymų ekspresijai naudotas kamienas *E. coli* BL21(DE3), kuris turi tokias genetines charakteristikas: *F⁻ ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)*. Kamienas gautas iš *Biotechnologijos instituto Vilniaus universiteto*.

Baltymų ekspresijai naudotas kamienas *E. coli* BL21 Star™(DE3), kuris turi tokias genetines charakteristikas: *F⁻ ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131(DE3)*. Kamienas pirktas iš *Invitrogen*.

2.1.5. Naudoti konstruktai

pRSETB plazmidė su N- galo histidinine uodega, atsparumo ampicilinui genu ir įklonuotu MoPrP23-230 prioniniu genu.

pRSETB plazmidė su N- galo histidinine uodega, atsparumo ampicilinui genu ir įklonuotu MoPrP23-230_R228T prioniniu genu.

Plazmidės sukonstruotos *Fiziologijos ir Biofizikos skyriuje, Case Western Reserve universitete, Klyvlende, JAV (prof. Witold K. Surewicz grupėje)*.

2.1.6. Mitybinės terpės

Agarizuota LB (Broth) terpė: 10 g NaCl, 10 g peptono, 5 g mielių ekstrakto ir 15 g agaro ištirpinama 1L dejonizuoto vandens, pH 7. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje.

LB peptonas (Luria Broth) mitybinė terpė: 10 g NaCl, 10 g peptono, 5 g mielių ekstrakto ištirpinama 1L dejonizuoto vandens, pH 7. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje.

LB baltymų hidrolizatas (Luria Broth) mitybinė terpė: 10 g NaCl, 10 g baltymų hidrolizato, 5 g mielių ekstrakto ištirpinama 1L dejonizuoto vandens, pH 7. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje.

Minimali mitybinė terpė: 5 g gliukozės, 6 g NaHPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0,5 g NaCl, 0,12 g MgSO₄, 0,01 g CaCl₂. Viskas, išskyrus gliukozę, ištirpinama 900 mL dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje. Gliukozė ištirpinama 100 mL dejonizuoto vandens ir autoklavuojama 15 min 121 °C temperatūroje. Galiausiai gliukozės tirpalas sumaišomas su likusiu turpalu.

S.O.C. mitybinė terpė: 2 g peptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM gliukozės. Peptonas, mielių ekstraktas, NaCl ir KCl tirpinami 97 ml dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 30 min 121 °C temperatūroje. Ataušinus iki kambario temperatūros, pridedama Mg druskų ir gliukozės ir steriliai nufiltruojama.

2.1.7. Tirpalai

0,1 M HCl: 0,83 mL 37 % HCl tirpalo ($\rho = 1,18$) praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

0,1 M NaOH: 0,53 mL 50 % NaOH tirpalo ($\rho = 1,50$) praskiedžiami dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

0,5 M HCl: 4,15 mL 37 % HCl tirpalo ($\rho = 1,18$) praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

0,5 M TRIS, pH 6,8: 7,88 g TRIS–HCl tirpinama 60 mL dejonizuoto vandens. Tirpalo pH koreguojamas 1 M NaOH tirpalu iki 6,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

1 M CH₃COOH: 6,4 mL 99,5 % acto rūgšties ($\rho = 1,048$) praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

1 M CH₃COONa: 13,15 g 99,5 % natrioacetato-trihidrato tirpinama 100 ml dejonizuoto vandens.

1 M K₂HPO₄: 87,09 g K₂HPO₄ ištirpinami 0,5 L dejonizuoto vandens.

1 M KH₂PO₄: 68,05 g KH₂PO₄ ištirpinami 0,5 L dejonizuoto vandens.

1 M NaOH: 5,3 mL 50 % NaOH tirpalo ($\rho = 1,50$) praskiedžiami dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

1 M TRIS, pH 6,8: 15,76 g TRIS–HCl tirpinama 60 mL dejonizuoto vandens. Tirpalo pH koreguojamas 1 M NaOH tirpalu iki 6,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

1,5 M TRIS, pH 8,8: 18,21 g TRIS tirpinama 60 mL dejonizuoto vandens. Tirpalo pH koreguojamas 0,5 M HCl tirpalu iki 8,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 100 mL.

AA/BIS 30 %: 29,2 g akrilamido ir 0,8 g N,N–metilen–bisakrilamido ištirpinama 70 mL dejonizuoto vandens.

Akrilamidas 40 %: 40 g akrilamido ištirpinama 60 mL dejonizuoto vandens.

Ampicilino tirpalas: 1 g ampicilino tirpinamas 10 mL dejonizuoto vandens. Tirpalo koncentracija 100 mg/mL.

APS 10 %: 100 mg amonio persulfato tirpinama 900 μ L dejonizuoto vandens.

Bis–akrilamidas 2 %: 2 g bis–akrilamido ištirpinama 98 mL dejonizuoto vandens.

IPTG tirpalas: 238,3 mg IPTG ištirpinami 1 mL dejonizuoto vandens.

Kumasi R–250 dažo tirpalas: 0,5 g kumasi R–250 dažo ištirpinama 104 mL 96 % etanolio, pridedama 20,3 mL ledinės acto rūgšties. Praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 200 mL.

6X pavyzdžio buferinis tirpalas: 1,2 g NDS ištirpinama 6 mL glicerolio, pridedama 3,75 mL 1 M TRIS pH 6,8 ir 0,93 mL 2–merkaptetanolio bei 6 mg bromfenolio mēlio. Praskiedžiama iki 10 mL dejonizuotu vandeniu (jeigu reikia).

Elektroforezės buferinis tirpalas (10 kartų koncentruotas): 25 mM TRIS, 192 mM glicino, 0,1 % NDS, pH 8.3–8.6 (pH nekoreguojamas). 288 g glicino, 60.4 g TRIS, 20 g NDS tirpinami 2 L dejonizuoto vandens.

2.1.8. Buferiniai tirpalai naudoti baltymų gryninime

A. 10 mM TRIS, 100 mM K_2HPO_4 , pH 8.

10 mL 1M TRIS tirpalo sumaišoma su 100 mL 1 M K_2HPO_4 tirpalo ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 700 mL. Tirpalo pH koreguojamas 0,5 M HCl tirpalu iki 8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 μ m porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

B. 50 mM Imidazolo, 10 mM TRIS, 100 mM K_2HPO_4 , pH 8.

10 mL 1 M TRIS tirpalo sumaišoma su 100 mL 1 M K_2HPO_4 tirpalo, pridedama 3,4 g imidazolo ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 700 mL. Tirpalo pH koreguojamas 0,5 M HCl tirpalu iki 8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 μ m porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

C. 500 mM Imidazolo, 10 mM TRIS, 100 mM KH_2PO_4 , pH 5,8.

10 mL 1M TRIS tirpalo sumaišoma su 100 mL 1 M KH_2PO_4 tirpalo, pridedama 34,4 g imidazolo ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 700 mL. Tirpalo pH koreguojamas 0,5 M HCl tirpalu iki 5,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 μ m porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

D. 600 mM Imidazolo, 10 mM TRIS, 100 mM KH_2PO_4 , pH 5,8.

10 mL 1 M TRIS tirpalo sumaišoma su 100 mL 1 M KH_2PO_4 tirpalo, pridedama 40,85 g imidazolo ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 700 mL. Tirpalo pH koreguojamas 0,5 M HCl tirpalu iki 5,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 μ m porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

E. 700 mM Imidazolo, 10 mM TRIS, 100mM KH_2PO_4 , pH 5,8.

10 mL 1 M TRIS tirpalo sumaišoma su 100 mL 1M KH_2PO_4 tirpalo, pridedama 47,66 g imidazolo ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 700 mL. Tirpalo pH koreguojamas 0,5 M HCl tirpalu iki 5,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 μ m porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

F. 6 M guanidino chlorido, 10 mM TRIS, 100 mM KH_2PO_4 , 10 mM glutationo, pH 8.

402,3 g 99,7 % guanidino chlorido užpilama 7 mL 1 M TRIS tirpalo ir 70 mL 1M KH_2PO_4 tirpalo, užpilamas pakankamas kiekis dejonizuoto vandens (bendras tirpalo tūris apie 650 ml) ir maišant ant magnetinės maišyklės laukiama, kol ištirps guanidino chloridas. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 μ m porų dydžio filtrą. 2,15 g glutationo įdedama prieš pat naudojimą. Tirpalo pH koreguojamas su 1 M NaOH ir 0,5 M HCl iki 8. Matavimo cilindre tirpalas

praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 700 mL. Tirpalas su glutationu turi būti laikomas ant ledo.

G. 10 mM fosfatinis buferinis tirpalas, pH 5,8.

36,8 mL 1M KH_2PO_4 , sumaišoma su 3,2 mL K_2HPO_4 , praskiedžiama vandeniu iki 3800 mL. pH koreaguojamas 1 M NaOH ir 0,5 M HCl (jeigu reikia) iki 5,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 4000 mL.

H. 1 M NaCl, 10 mM PO_4^{3-} , pH 5,8.

9,2 mL 1 M KH_2PO_4 , sumaišoma su 0,8 mL K_2HPO_4 , pridedama 58,44 g NaCl, praskiedžiama vandeniu iki 900 mL. pH koreaguojamas 1 M NaOH ir 0,5 M HCl (jeigu reikia) iki 5,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

I. 1,5 M NaCl, 10 mM PO_4^{3-} , pH 5,8.

9,2 mL 1 M KH_2PO_4 , sumaišoma su 0,8 mL K_2HPO_4 , pridedama 87,66 g NaCl, praskiedžiama vandeniu iki 900 mL. pH koreaguojamas 1 M NaOH ir 0,5 M HCl (jeigu reikia) iki 5,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

J. 2 M NaCl, 10 mM PO_4^{3-} , pH 5,8.

9,2 mL 1 M KH_2PO_4 , sumaišoma su 0,8 mL K_2HPO_4 , pridedama 116,88 g NaCl, praskiedžiama vandeniu iki 900 mL. pH koreaguojamas 1 M NaOH ir 0,5 M HCl (jeigu reikia) iki 5,8. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL. Buferinis tirpalas filtruojamas per 0,22 μm porų dydžio, 47 mm diametro filtrą.

K. 10 mM acetatinis buferis, pH 4.

30 mL 1 M CH_3COOH sumaišoma su 10 mL 1 M CH_3COONa ir praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 3800 mL. pH koreaguojamas 1 M NaOH ir 0,5 M HCl (jeigu reikia) iki 4. Matavimo cilindre tirpalas praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 4000 mL.

L. 0,1 M EDTA, 6 M guanidino chlorido, 10 mM TRIS, 100 mM KH_2PO_4 , pH 8.

586,43 g 98 % guanidino chlorido užpilama 10 mL 1 M TRIS tirpalo ir 100 mL 1M KH_2PO_4 tirpalo, užpilamas pakankamas kiekis dejonizuoto vandens (bendras tirpalo tūris apie 700 ml) ir maišant ant magnetinės maišyklės laukiama, kol ištirps guanidino chloridas. Pridedama 26,06 g EDTA. Tirpalas skiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 1000 mL.

2.2. Metodai

2.2.1. Transformacija į kompetentines ląsteles

1. Paruoštos Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe, kurioje yra ampicilino (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), šildomos 37 °C temperatūroje apie 1 val.

2. Į 30 µL kompetentinių ląstelių įdedama 1 µL plazmidės, sumaišoma lengvai purtant.
3. Transformacijos mišinys laikomas 30 min. ledo vonioje.
4. Vykdomas temperatūrinis šokas, 90 s laikoma 42 °C temperatūroje, tuomet mišinys greitai perkeliamas į ledo vonią ir laikomas joje 2 min.
5. Į transformacijos mišinį pridedama 400 µL S.O.C. mitybinės terpės ir auginama 45 min 37 °C temperatūroje terostatuojamoje purtyklėje (220 aps./min).
6. 50–150 µl transformantų steriliai užsėjama ant pašildytos Petri lėkštelės. Lėkštelė inkubuojama termostate 37 °C temperatūroje 16 val.

2.2.2. Ekspresija

1. Į mitybinę terpę, kurioje yra ampicilino (100 µg/mL), užsėjama viena kolonija nuo Petri lėkštelės su transformantais ir auginama per naktį (16 val.) 37 °C temperatūroje purtant (220 aps./min).
2. Naktinė kultūra persėjama į naują terpę, kurioje yra ampicilino (100 µg/mL), skiedžiant santykiu 1:40.
3. Auginama 37 °C temperatūroje purtant (220 aps./min), kol optinis tankis ($\lambda = 600$) pasiekia 0,6–1 optinius vienetus.
4. Prieš indukciją paimamas mėginys. Paimama 0,5–1 mL ląstelių suspensijos, nucentrifuguojama 5 min $8050 \times g$, supernatantas nupilamas, biomasė tirpinama 10 µL 6X pavyzdžio buferiniame tirpale ir 50 µL dejonizuoto vandens, kaitinama 98 °C temperatūroje 10 min.
5. Indukuojama pridedant 1 mM IPTG. Biomasė auginama 16–20 val. 37 °C temperatūroje purtant (220 aps./min).
6. Paimamas mėginys po 16–20 val. auginimo. Mėginys paruošiamas skiedžiant ląstelių suspensiją taip, kad jos optinis tankis būtų lygus prieš indukciją paimto mėginio optiniam tankiui. Mėginys centrifuguojamas 5 min $8050 \times g$, nuosėdos tirpinamos 10 µL 6X pavyzdžio buferiniame tirpale ir 50 µL dejonizuoto vandens, kaitinama 98 °C temperatūroje 10 min.
7. Bakterijų kultūra centrifuguojama 15 min $15000 \times g$, supernatantas pašalinamas. Biomasė laikoma –20 °C temperatūroje.
8. Mėginiai, paimti prieš ir po indukcijos, analizuojami NDS–PAAG metodu.

2.2.3. Baltymų elektroforezė

Elektroforezei ruošiami geliai:

Apatinis frakcionuojantis 12 % gelis:	Viršutinis koncentruojantis 4 % gelis:
„BioRad Mini Protean 3“ elektroforezės aparatui	
30 % AA/BIS 4 mL	30 % AA/BIS 1,34 mL
1,5 M TRIS–HCl pH 8,8 2,5 mL	1 M TRIS–HCl pH 6,8 2,5 mL
10 % NDS 100 µL	10 % NDS 100 µL
dH ₂ O 3,17 mL	dH ₂ O 6 mL
10 % APS 50 µL	10 % APS 50 µL
TEMED 5 µL	TEMED 10 µL
„Fisher Scientific Verti Gel mini“ elektroforezės aparatui	
40 % akrilamidas 5,84 mL	40 % akrilamidas 0,48 mL
2 % bis–akrilamidas 3,2 mL	2 % bis–akrilamidas 0,26 mL
1,5 M TRIS pH 8,8 5mL	0,5 M TRIS pH 6,8 1,26mL
dH ₂ O 5,66 mL	dH ₂ O 2,92 mL
10 % NDS 200 µL	10 % NDS 50 µL
TEMED 10 µL	TEMED 5 µL
10 % APS 100 µL	10 % APS 100 µL

Frakcionuojantis gelis ruošiamas sumaišant nurodytus reagentus. TEMED ir 10 % APS įpilami pačioje pabaigoje, prieš pat gelio supylimą tarp elektroforezės plokštelių, nes jie inicijuoja polimerizacijos reakciją. Paruoštas mišinys supilamas tarp elektroforezės plokštelių ir užsluoksniuojamas vandeniu. Gelio polimerizacijos reakcija vyksta apie 40 minučių. Geliui sustingus vanduo nupilamas, gelio viršus nusausinamas filtriniu popieriumi. Vėliau frakcionuojantis gelis užpilamas koncentruojančiu geliu ir tarp plokštelių įdedamos „šukos“. Koncentruojantis gelis stingsta apie 30 min. Geliui sustingus, plokštelės įstatomos į elektroforezės aparatą. Elektroforezės aparatas užpildomas vienkartinio elektroforezės buferiniu tirpalu, tuomet išimamos „šukos“. Į gelio takelius įvedami pavyzdžiai. Elektroforezė vykdoma ≤ 70 mA srovėje, neviršijant 200 V įtampos, kol dažo frontas pasiekia frakcionuojančio gelio apačią. Gelis dažomas 20 minučių kumasi R–250 dažu 30 °C temperatūroje purtant (80 aps./min).

2.2.4. Baltymų gryninimas ir renatūracija

Biomasė sumaišoma su buferiniu tirpalu F santykiu 1:5 ir homogenizuojama Potter–Elvehjem homogenizatoriumi. Gautas homogenizatas toliau ardomas ultragarsu, ledo vonelėje, 30 min, kas 60 s darant 60 s pertrauką, esant 70 % amplitudei. Suardyta biomasė centrifuguojama 40 min $27143,1 \times g$, 4 °C temperatūroje.

Ni Sepharose™ 6 arba Ni²⁺ jonais pakrautas Chelating Sepharose sorbentas (20 mL) nulygsvarinamas buferiniu tirpalu F. Nulygsvarintas sorbentas užpilamas supernatantu, gautu po suardytos biomasės centrifugavimo, mišinys maišomas 30 min 80 aps./min greičiu, 4 °C temperatūroje. Chromatografinė kolonėlė pakraunama sorbento ir supernatanto mišiniu.

Kolonėlė praplaunama 100 mL buferinio tirpalo F (3 mL/min greičiu). Baltymas renatūruojamas per 200 min (1 mL/min greičiu) buferinį tirpalą F pakeičiant buferiniu tirpalu A.

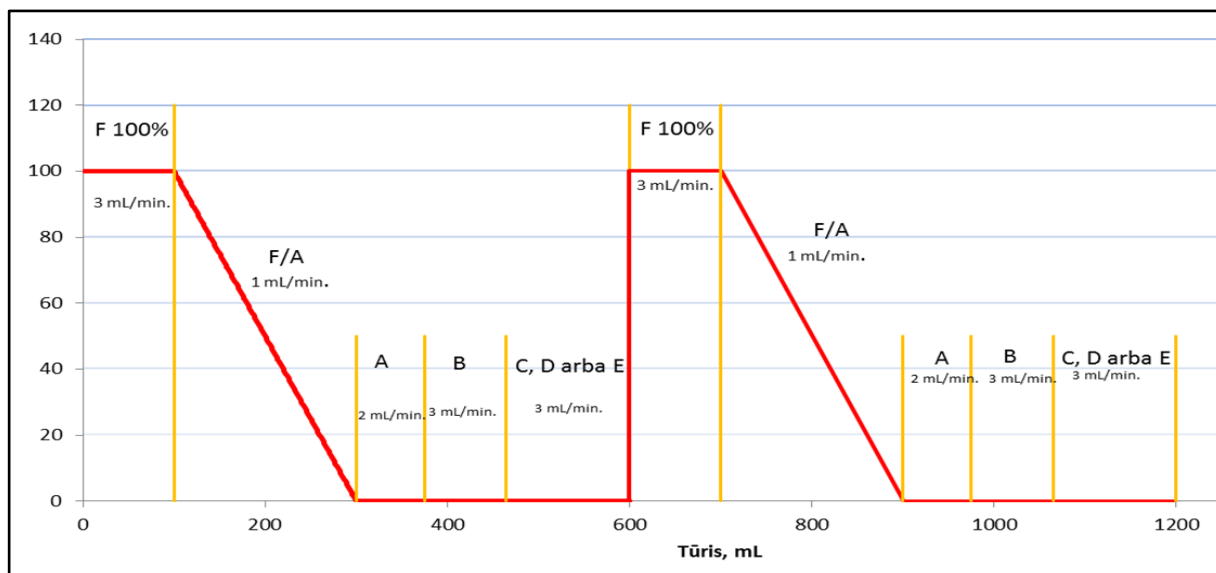
Baltymas toliau yra gryninamas per kolonėlę praleidžiant 75 mL buferinio tirpalo A (2 mL/min greičiu), vėliau 90 mL buferinio tirpalo B (3 mL/min greičiu) ir galiausiai atskiriamas nuo sorbento leidžiant buferinį tirpalą C, D arba E.

Baltymo renatūracijos ir gryninimo giminingumo chromatografijos metodu procesai atliekami du kartus iš eilės, nes po pirmo renatūracijos proceso dalis baltymo vėl suagreguoja ir lieka ant kolonėlės.

C arba D buferiniai tirpalai naudojami su Ni²⁺ jonais pakrautu Chelating Sepharose sorbentu, D tirpalas naudojamas kai norima sukelti staigesnį baltymų atskyrimą nuo sorbento.

E buferinis tirpalas naudojamas su „Ni Sepharose™ 6 Fast Flow“ sorbentu, kadangi remiantis pateikiamais gamintojo duomenimis šis sorbentas stipriau, nei kiti, rišasi su baltymais.

Bendra renatūracijos ir gryninimo, giminingumo chromatografijos metodu, proceso eiga pavaizduota 6 pav.



6 pav. Baltymo renatūracijos ir gryninimo, giminingumo chromatografijos metodu, proceso eiga. F – buferinis tirpalas F. F/A – buferinių tirpalų F ir A gradientas. A – buferinis tirpalas A. B – buferinis tirpalas B. C – buferinis tirpalas C. D – buferinis tirpalas D. E – buferinis tirpalas E

Surinktos baltymo frakcijos yra dializuojamos 4L buferinio tirpalo G, kas 3 valandas pakeičiant buferinį tirpalą. Po dializės baltymo tirpalas filtruojamas panaudojant 150 arba 250 ml, 73mm diametro, 0,22 μ m porų dydžio filtravimo indus „Millipore Stericup“. Filtrato optinis tankis išmatuojamas spektrofotometru ($\lambda = 280$), koncentracija (mg/mL) apskaičiuojama pagal formulę:

$$C = (A \times Mm) / (\epsilon \times l) \quad (1)$$

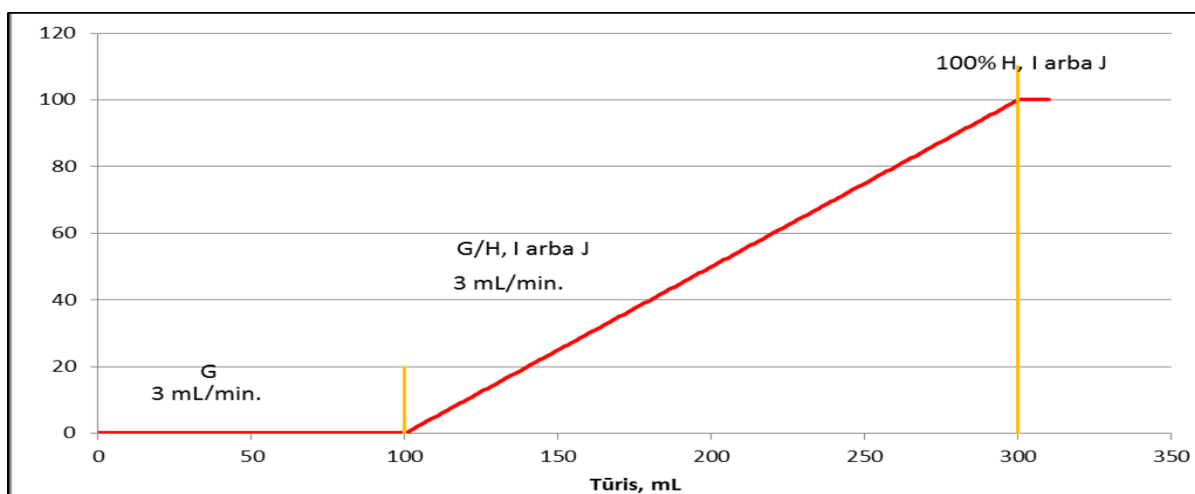
kur A – baltymo tirpalo optinis tankis, Mm – baltymo molekulinė masė (g/mol), ϵ – baltymo ekstinkcijos koeficientas ($63495 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), l – optinio kelio ilgis (1 cm).

Į gautą filtratą pridedama trombino, tam, kad nuo baltymo būtų atskirta histidininė uodega. Kirpimas trombinu atliekamas 4 °C temperatūroje per naktį, kirpimo efektyvumas įvertinamas pagal masių spektrometrinės analizės rezultatus.

CM Sepharose sorbentas (15 mL) nulygsvarinamas buferiniu tirpalu G, lygsvarinama buferiniu tirpalu G tol, kol sorbento tirpalo pH bus ~ 5,8. Nulygsvarintas sorbentas sumaišomas su baltymo tirpalu, kuriame yra trombino, mišinys maišomas 30 min 80 aps./min greičiu, 4 °C temperatūroje. Chromatografinė kolonėlė pakraunama sorbento ir supernatanto mišiniu.

Baltymo gryninimas, t. y. atskyrimas nuo trombino, jonų mainų chromatografijos metodu atliekamas per kolonėlę praleidžiant 100 mL (3 mL/min greičiu) buferinio tirpalo G, vėliau baltymas atskiriamas nuo sorbento sudarant 200 mL buferinių tirpalų G ir H, I arba J gradientą (buferinį tirpalą G pakeičiant buferiniu tirpalu H, I arba J) (7 pav.). H, I, J buferiniai tirpalai naudojami priklausomai nuo to ar norima gauti labiau ar mažiau koncentruotą baltymo tirpalą.

Surinktos baltymo frakcijos yra dializuojamas 4L buferinio tirpalo K, kas 3 valandas pakeičiant buferinį tirpalą. Po dializės baltymo tirpalas filtruojamas panaudojant filtravimo indus „Millipore Stericup“. Filtrato optinis tankis išmatuojamas spektrofotometru ($\lambda = 280$), koncentracija (mg/mL) apskaičiuojama pagal 1 formulę. Nufiltruotas baltymo tirpalas koncentruojamas iki ~3 mg/mL panaudojant koncentratorius „Amicon® Ultra-15“, kurių pralaidumas yra 10 kDa. Galiausiai sukonzentruotas baltymo tirpalas išpilstomas į mėgintuvėlius po 0,5 mg baltymo. Mėgintuvėliai su baltymu saugomi šaldytuve $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.



7 pav. Baltymo gryninimo, jonų mainų chromatografijos metodu, proceso eiga. G – buferinis tirpalas G. G/H, I, J buferinių tirpalų G ir H, I arba J gradientas

2.2.5. Sorbentų regeneravimas

„Ni Sepharose™ 6 Fast Flow“ arba „Chelating Sepharose Fast Flow“ sorbento regeneravimas:

1. Sorbentas laikomas 1 val. buferiniame tirpale L.
2. Sorbentas atplaunamas nuo buferinio tirpalo L dejonizuotu vandeniu.
3. Sorbentas laikomas 1 val. 0,1 M NaOH tirpale.
4. Sorbentas atplaunamas nuo 0,1 M NaOH.
5. Sorbentas laikomas 1 val. 0,1 M HCl.
6. Sorbentas atplaunamas nuo 0,1 M HCl dejonizuotu vandeniu.
7. Sorbentas laikomas 20 % etanolio tirpale $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki tolimesnio naudojimo.
8. Prieš naudojimą sorbentas užpilamas nikelio (II) chlorido heksahidrato tirpalu.

„CM Sepharose Fast Flow“ sorbento regeneravimas:

1. Sorbentas laikomas 1 val. 0,1 M NaOH tirpale.
2. Sorbentas atplaunamas nuo 0,1 M NaOH.
3. Sorbentas laikomas 20 % etanolio tirpale $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki tolimesnio naudojimo.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

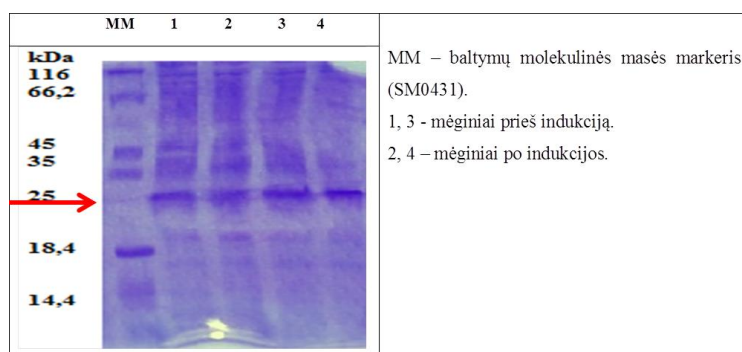
3.1. MoPrP23-230_R228T konstrukto nustatymas

Atlikta gauto konstrukto transformacija į kompetentines ląsteles (*E. coli* BL21(DE3)) bei transformantų auginimas fermentoriuje (1 lentelė.). Transformantai auginti LB peptonas (Luria Broth) mitybinėje terpėje. Iš viso atlikti du transformantų auginimai 5 L fermentoriuje, bei du 2 L fermentoriuje. Gauta apie 45 g biomasės.

1 lentelė. Ląstelių auginimo fermentoriuje duomenys

Mėginių paėmimas	Auginimo laikas, min	O.V.($\lambda = 600$)	pH	temp, °C	pO ₂ , %	Maišymo greitis, aps./min
x	0	0,076	7,05	37	98	200
x	52	0,090	7,05	37	90,9	199
x	80	0,102	7,05	37	92,6	199
x	113	0,177	7,01	37	82,6	199
1	160	0,400	6,95	37	85	255
2	220	0,216×5	7,06	37	31	255
Indukcija, pridedant 1 mM IPTG						
3	295	0,282×10	7,06	37,1	62,8	500
4	325	0,299×10	7,05	37	77,6	500
Gauta 18 g biomasės						

Kaip matome iš 1 lentelėje pateiktų duomenų transformantų kultūra buvo auginama optimaliomis *E. coli* ląstelėms sąlygomis: palaikoma pastovi 37 °C temperatūra; palaikomas pastovus pH ~ 7; ištirpusio deguonies kiekis reguliuojamas didinant arba mažinant maišymo greitį, bei aeraciją. Kultūra indukuota pridedant 1 mM IPTG. Prioninio baltymo ekspresija patikrinta NDS-PAAG metodu (8 pav.).



8 pav. Prioninio pelės baltymo ekspresijos patikrinimas

Remiantis duombazės „UniProt“ bei programos „ProtParam“ pateikiamais duomenimis, MoPrP23-230 (su His uodega), kurio seka yra pateikta 9 pav., molekulinė masė turėtų būti lygi 25354,9 Da. Kaip matome iš 8 pav. transformantai ekspresavo baltymą, kurio molekulinė masė buvo apie 25000 Da iš to sprendžiame, jog tai ir yra mūsų tikslinis baltymas.

```

mrgshhhhhh gmaslvprgs dpkkrpkpgg wntggerypg qgspggnryp pgggtwgqph
      70      80      90      100     110     120
gggwgqphgg swgqphggsw gqphggggwgq gggthnqwnk pskpktnlkh vagaaaagav
      130     140     150     160     170     180
vgglggymlg samsrpmihf gndwedryyr enmyrypnqv yyrpvdqysn qnnfvhdvsn
      190     200     210     220     230
itikghtvtt ttkgenftet dvkmmervve qmcvtqyqke sqayydgrrs

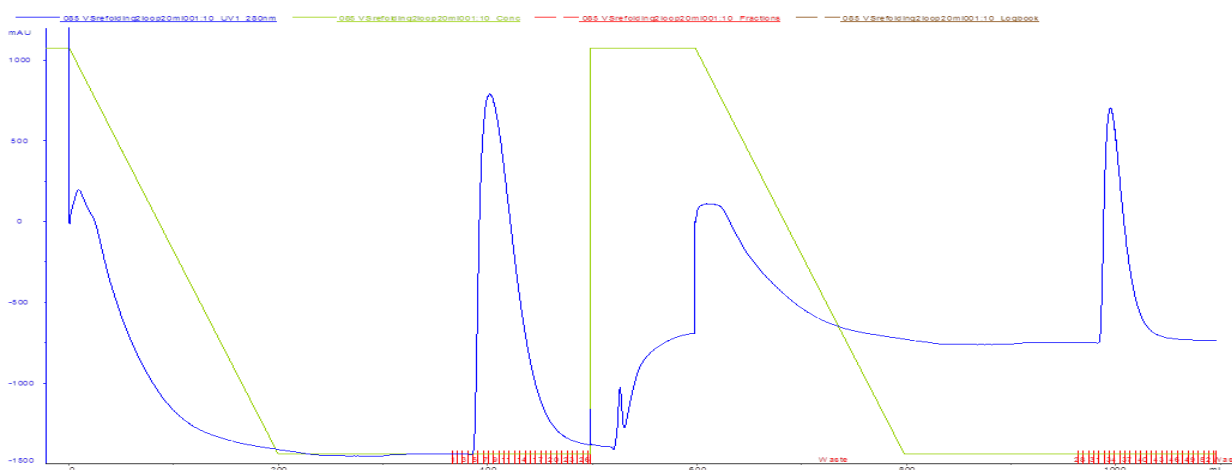
```

9 pav. MoPrP23-230, prie kurio prijungta histidininė uodega, aminorūgščių seka (pritaikyta iš UniProtKB ID: P04925)

18 g biomasės suardyta ultragarsu. Kadangi tikslinis baltymas turi histidininę uodegą, jo renatūracija ir gryninimas atliktas giminingumo chromatografijos metodu, panaudojant Ni²⁺ jonais pakrautą Chelating Sepharose sorbentą. Gauti rezultatai pateikti 2 lentelėje. Remiantis chromatograma (10 pav.) didžiausią tikslinio baltymo koncentraciją turinčios frakcijos apjungiamos kartu. Apjungtos frakcijos buvo dializuojamos buferiname tirpale G. Po dializės baltymo tirpalas filtruojamas panaudojant filtravimo indus „Millipore Stericup“.

2 lentelė. Tikslinio baltymo renatūracijos ir gryninimo giminingumo chromatografijos metodu, duomenys

Biomasė, g	Kompetentinės ląstelės	Renatūracijos sąlygos	Eliucijos sąlygos	Gauta baltymo, mg
18	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	6→0 M Guanidino chlorido 10→0 mM Glutationo.	0,5 M imidazolo, 10 mM TRIS, 100 mM PO ₄ ³⁻ , pH 5,8	130



10 pav. Chromatograma gauta gryninant pelės prioninį baltymą giminingumo chromatografijos metodu. Žalia linija – buferinio tirpalo F gradientas. Mėlyna linija – sugertis ($\lambda = 280$). Raudona – renkamos tirpalo frakcijos

Septyniiasdešimčiai mililitrų baltymo tirpalo (0,93 mg/mL) atliktas histidininės uodegos atskyrimas nuo tikslinio baltymo panaudojant 7 vienetus trombino 1 mg tikslinio baltymo kirpimui. Kirpimas atliekamas per naktį 4 °C temperatūroje. Po kirpimo trombinu paimtas

mėginys buvo perduotas atlikti masių spektrometrinę analizę. Masių spektrometrinės analizės duomenys sukėlė abejonių dėl atsiųsto konstrukto (3 lentelė).

3 lentelė. Masių spektrometrinės analizės duomenys

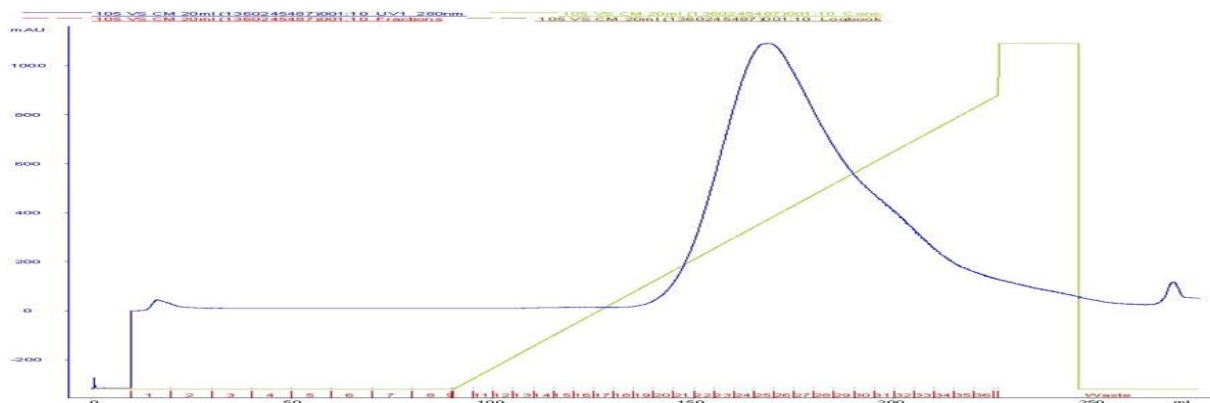
Teorinė MoPrP23-230 molekulinė masė po kirpimo trombinu, Da	Praktiškai išmatuota MoPrP23-230 molekulinė masė po kirpimo trombinu, Da
23288,5	23233,4±1

Remiantis 3 lentelėje pateikiamais duomenimis buvo padaryta išvada, kad atsiųstas konstruktas buvo ne MoPrP23-230, nes atliekant masių spektrometrinę analizę teorinė molekulinė masė, dėl susidariusio disulfidinio tiltelio, nuo gautos praktiškai gali skirtis tik per 2 Da. Todėl norėdami sužinoti, koks konstruktas buvo gautas nusiuntėme užklausa dr. Witold K. Surewicz. Gautas atsakymas patvirtino išvadas, jog atsiųstas konstruktas yra ne MoPrP23-230. Per klaidą buvo išsiųstas konstruktas MoPrP23-230_R228T, kuris turi mutaciją ties 228 aminorūgštimi, argininas pakeistas treoninu.

Nežiūrint to, kad buvo dirbama su netinkamu konstruktu, tikslinis baltymas iš tirpalo, kuriame yra trombino, buvo išgrynintas jonų mainų chromatografijos metodu, panaudojant CM Sepharose sorbentą. Gauti rezultatai pateikti 4 lentelėje. Remiantis chromatograma (11 pav.) didžiausią tikslinio baltymo koncentraciją turinčios frakcijos apjungiamos kartu. Apjungtos frakcijos buvo dializuojamos buferiname tirpale K. Po dializės baltymo tirpalas buvo filtruojamas panaudojant filtravimo indus „Millipore Stericup“. Nufiltruotas baltymo tirpalas saugomas –20 °C temperatūroje.

4 lentelė. Tikslinio baltymo gryninimo, jonų mainų chromatografijos metodu, duomenys

Užnešta baltymo, mg	Eliucijos sąlygos	Gauta baltymo, mg
60	0→1 M NaCl, 10 mM TRIS, 100mM PO ₄ ³⁻ , pH 5,8	58



11 pav. Chromatograma gauta gryninant MoPrPR23–230_228T giminingumo chromatografijos metodu. Žalia linija – buferinio tirpalo H gradientas. Mėlyna linija – sugertis ($\lambda = 280$). Raudona – renkamos tirpalo frakcijos

3.2. Transformantų atranka

Gavus reikiamą konstruklą atlikta MoPrP23-230 transformacija į kompetentines *E. coli* BL21(DE3) ir *E. coli* BL21 Star™ (DE3) ląsteles. Iš abiejų transformantų išsirinkta po 5 kolonijas, kurios buvo persėtos į kolbas su 20 mL LB peptonas (Luria Broth) mitybinės terpės. Transformantų auginimas atliktas 37 °C temperatūroje purtant (220 aps./min). Kultūra indukuota pridodant 1 mM IPTG. Auginimo duomenys pateikti 5 ir 6 lentelėse.

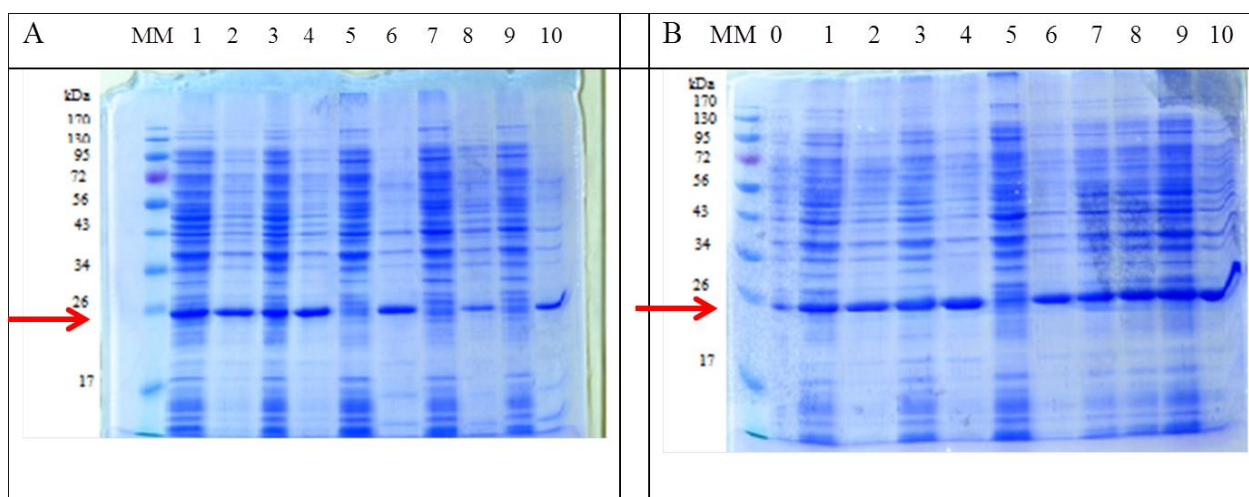
5 lentelė. MoPrP23-230 + *E. coli* BL21(DE3) transformantų auginimo duomenys. Oranžine spalva pažymėti laikai kuomet transformantų kultūra indukuota pridodant 1 mM IPTG

Transformantas	Transformanto kolonijos nr.	Kultivavimo laikas, val	O.V. ($\lambda = 600$)
MoPrP23-230 + <i>E. coli</i> BL21(DE3)	1	4,25	0,351
	2	4,25	0,315
	3	4,25	0,996
	4	4,25	0,558
	5	4,25	0,858
	1	7,5	1,200
	2	7,5	1,256
	3	7,5	Nematuota
	4	7,5	Nematuota
	5	7,5	Nematuota
	1	21,5	0,358×10
	2	21,5	0,627×10
	3	21,5	0,520×10
	4	21,5	0,593×10
	5	21,5	0,537×10

6 lentelė. MoPrP23-230 + *E. coli* BL21 Star™(DE3) transformantų auginimo duomenys. Oranžine spalva pažymėti laikai kuomet transformantų kultūra indukuota pridodant 1 mM IPTG

Transformantas	Transformanto kolonijos nr.	Kultivavimo laikas, val	O.V. ($\lambda = 600$)
MoPrP23-230 + <i>E. coli</i> BL21 Star™(DE3)	1	4,25	0,458
	2	4,25	0,466
	3	4,25	0,103
	4	4,25	0,439
	5	4,25	0,291
	1	7,5	1,141
	2	7,5	1,179
	3	7,5	0,720
	4	7,5	1,130
	5	7,5	1,126
	1	21,5	0,439 ×10
	2	21,5	0,440×10
	3	21,5	0,267×10
	4	21,5	0,686×10
	5	21,5	0,394×10

Prioninio baltymo ekspresija transformantuose patikrinta NDS-PAAG metodu (12 pav.).

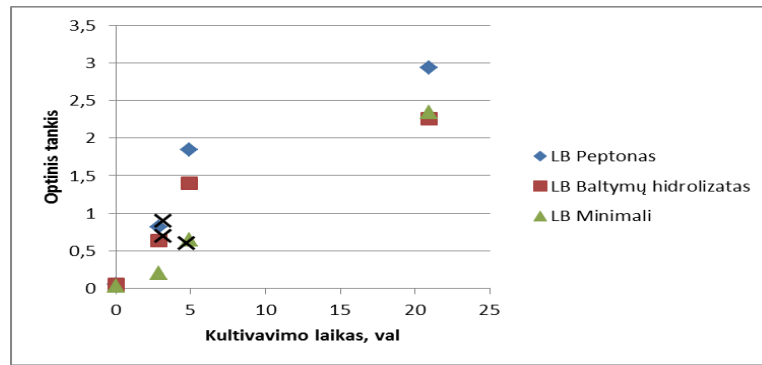


12 pav. A – prioninio baltymo ekspresija *E. coli* BL21(DE3) ląstelėse. B – prioninio baltymo ekspresija *E. coli* BL21 Star™(DE3) ląstelėse. MM – baltymų molekulinės masės markeris (BPE3603–1), 1, 3, 5, 7, 9 – mėginiai prieš ekspresiją, 2, 4, 6, 8, 10 mėginiai po ekspresijos. 1, 2 – pirma transformantų kolonija, 3, 4 – antra transformantų kolonija, 5, 6 – trečia transformantų kolonija, 7, 8 – ketvirta transformantų kolonija; 9, 10 – penkta transformantų kolonija. 0 – tusčias takelis

Kaip matyti 12 pav. visi transformantai ekspresavo baltymą, kurio molekulinė masė buvo 25–26 kDa. Iš to sprendžiame, jog transformantai ekspresavo pelės prioninį baltymą, kurio teorinė molekulinė masė yra 25354,9 Da. Remiantis 12 pav. bei 5 ir 6 lentelių duomenimis tolimesnei MoPrP23-230 gamybai buvo pasirinktos antra MoPrP23-230 + *E. coli* BL21(DE3) ir ketvirta MoPrP23-230 + *E. coli* BL21 Star™(DE3) transformantų kolonijos. Atrinkti tie transformantai, kurie ekspresavo tikslinį baltymą ir kurių užaugusios kultūros optinis tankis buvo didžiausias.

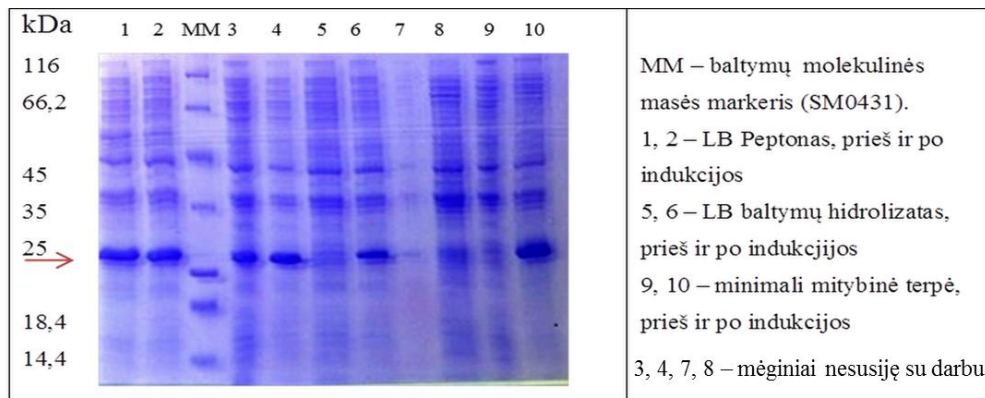
3.3. Tinkamiausios mitybinės terpės atranka

Siekiant nustatyti, kurioje mitybinėje terpėje geriausiai auga transformantai, atliktas LB peptonas (Luria Broth), LB baltymų hidrolizatas (Luria Broth) ir minimalios mitybinių terpių palyginimas (1 grafikas). Transformantų auginimas atliktas 37 °C temperatūroje purtant (220 aps./min). Kultūra indukuota pridodant 1 mM IPTG. Kultūros O.T. matuojamas esant 600 nm bangos ilgiui.



1 grafikas. MoPrP23-230 + *E. coli* BL21 Star™(DE3) transformantų O.T. priklausomybė nuo mitybinės terpės ir kultivavimo laiko. X – indukcija IPTG

Remiantis 1 grafike pateikiamais duomenimis darome išvadą, kad transformantus geriausia yra kultivuoti mitybinėje terpėje LB peptonas (Luria Broth). Prioninio baltymo ekspresija patikrinta NDS-PAAG metodu (13 pav.).



13 pav. MoPrP23-230 ekspresija *E. coli* BL21 Star™(DE3) ląstelėse, auginant skirtingose mitybinėse terpėse

Kaip matome iš 13 pav. mitybinėse terpėse LB peptonas ir LB baltymų hidrolizatas auginti transformantai ekspresavo pelės prioninį baltymą tiek prieš, tiek po indukcijos, tuo metu minimalioje mitybinėje terpėje, kol nebuvo pridėta 1 mM IPTG, tikslinis baltymas nebuvo ekspresuojamas. Darome prielaidą, kad LB peptonas ir LB baltymų hidrolizatas terpėse yra junginių, veikiančių transformantus panašiai kaip naudojamas induktorius.

3.4. Pelės prioninio baltymo (MoPrP23-230) ekspresija

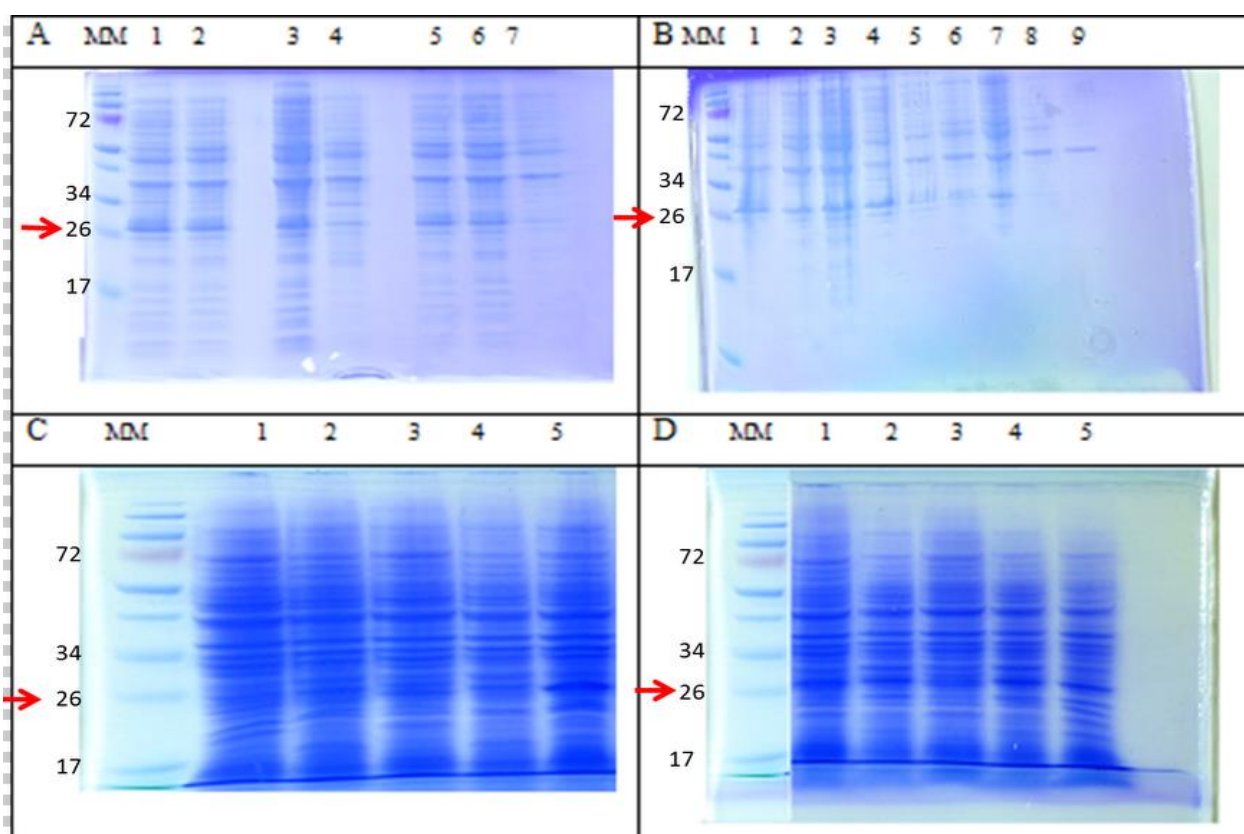
Pelės prioninio baltymo (MoPrP23-230) ekspresija *E. coli* BL21(DE3) ir *E. coli* BL21 Star™(DE3) kamienuose atlikta transformantus auginant 37 °C temperatūroje purtant (220 aps./min) mitybinėje terpėje LB peptonas (Luria Broth). Kultūros indukuotos 0,7–1 O.V. intervale, pridėdant 1 mM IPTG. MoPrP23-230 baltymo ekspresijos rezultatai pateikti 7 lentelėje.

7 lentelė. Pelės prioninio baltymo (MoPrP23-230) ekspresijos *E. coli* BL21 Star™(DE3) ir *E. coli* BL21(DE3) kamienuose duomenys

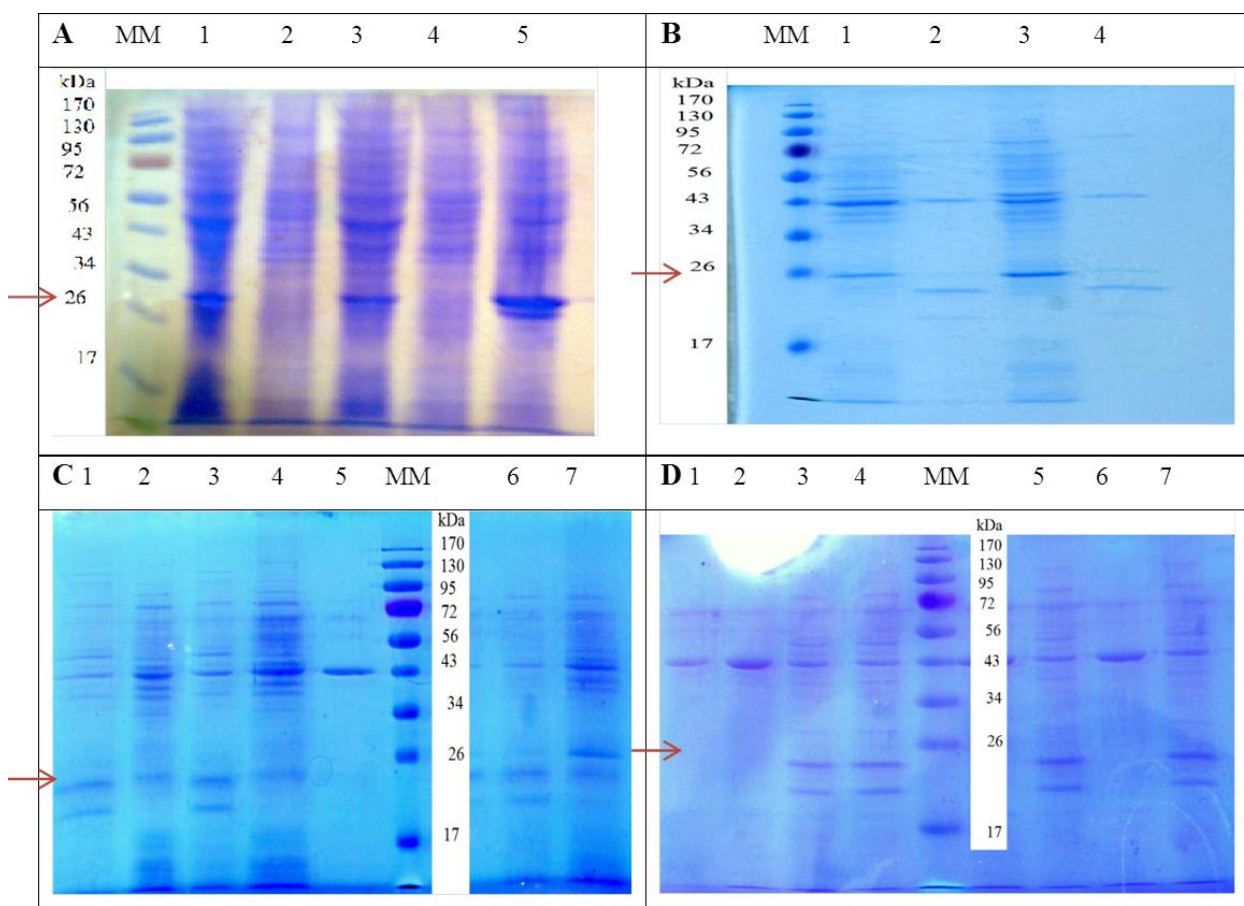
<i>Auginimo nr.</i>	<i>Naudotas kamienas</i>	<i>Kultivavimo laikas po indukcijos IPTG, val</i>	<i>Biomasė, g</i>	<i>Mitybinės terpės tūris, L</i>
1	<i>E. coli</i> BL21 Star™(DE3)	17	9,31	2
2		20	18,46	4
3		19	13,50	2
4		20	11,50	2
5	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	22,5	11,26	2
6		18	10,30	2
7		18,5	9,30	2
8		19,5	10,59	2

Kaip matyti iš 7 lentelėje pateikiamų duomenų abu bakterijų kamienai gamino panašų kiekį biomasės.

Pelės prioninio baltymo ekspresija *E. coli* BL21 Star™(DE3) (14 pav.) ir *E. coli* BL21(DE3) (15 pav.) kamienuose patikrinta NDS-PAAG metodu.



14 pav. Pelės prioninio baltymo ekspresija *E. coli* BL21 Star™(DE3) ląstelėse. MM – baltymų molekulinės masės markeris (BPE3603-1). A – 1 auginimas, 1, 2, 5 – mėginiai prieš indukciją, 3, 4, 6, 7 – mėginiai po indukcijos. B – 2 auginimas, 1, 2, 3, 4, 5 – mėginiai prieš indukciją, 6, 7, 8, 9 – mėginiai po indukcijos. C – 3 auginimas, 1, 3, 5 – mėginiai prieš indukciją, 2, 4 – mėginiai po indukcijos. D – 4 auginimas, 1, 3, 5 – mėginiai prieš indukciją, 2, 4 – mėginiai po indukcijos



15 pav. Pelės prioninio baltymo ekspresija *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse. MM – baltymų molekulinės masės markeris (BPE3603–1). A – 5 auginimas, 1, 3, 5 – mėginiai prieš indukciją, 2, 4 – mėginiai po indukcijos. B – 6 auginimas, 1, 3 – mėginiai prieš indukciją, 2, 4 – mėginiai po indukcijos. C – 7 auginimas, 1, 3, 5, 6 – mėginiai prieš indukciją, 2, 4, 7 – mėginiai po indukcijos. D – 8 auginimas, 1, 3, 5, 7 – mėginiai prieš indukciją, 2, 4, 6 – mėginiai po indukcijos

Atlikus pelės prioninio baltymo ekspresijos patikrinimą NDS–PAAG metodu (14 pav., 15 pav.) įsitikinta, kad *E. coli* BL21 Star™(DE3) ląstelės ekspresuoja pelės prioninį baltymą, kurio molekulinė masė yra 25354,9 kDa (14 pav.), tuo metu *E. coli* BL21 (DE3) ląstelės panašaus dydžio baltymo neekspresavo arba ekspresavo labai mažą jo kiekį (15 pav.). Taip pat yra pastebimas keistas reiškinys: baltymo, kurio molekulinė masė yra 25–26 kDa, *E. coli* BL21 (DE3) ląstelės ekspresuoja daugiau prieš indukciją, nei po jos. Pastarieji rezultatai sukėlė daug abejonių, kadangi atliekant transformantų atranką pelės prioninio baltymo ekspresija buvo stebima (12 pav. A).

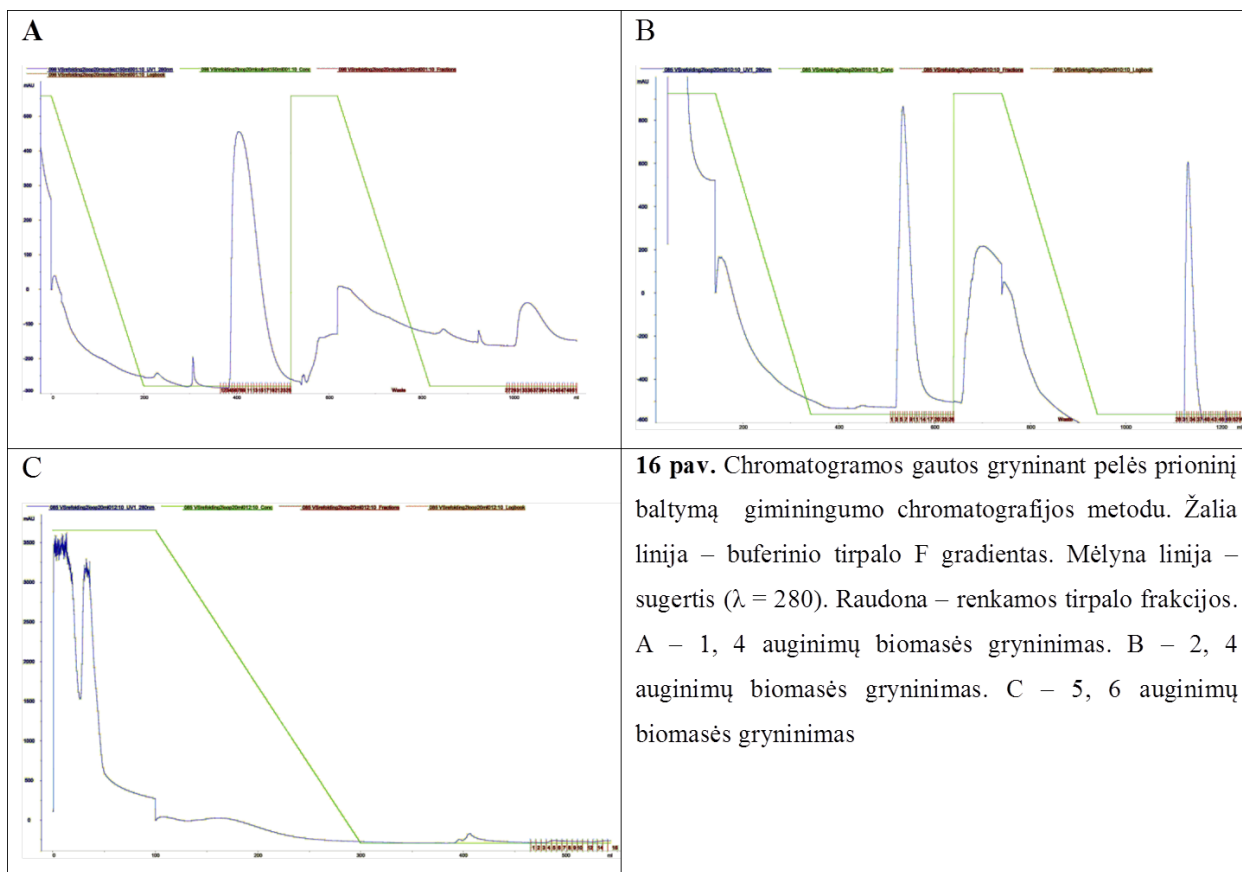
Remiantis pastaraisiais rezultatais buvo nuspręsta išgryninti pelės prioninį baltymą iš 1–4 auginimų biomasių. Taip pat, siekiant įsitikinti ar pelės prioninis baltymas buvo ekspresuojamas *E. coli* BL21 (DE3) ląstelėse, pabandyti išgryninti tikslinį baltymą iš 5–6 auginimų biomasių.

3.5. Pelės prioninio baltymo gryninimas

Ultragarsu suardytos 1–4 bei 5–6 auginimo metu gautos biomasės. Atlikta tikslinio baltymo renatūracija ir gryninimas giminingumo chromatografijos metodu, panaudojant Ni²⁺ jonais pakrautą Chelating Sepharose ir Ni SepharoseTM 6 sorbentus. Renatūracijos ir gryninimo, duomenys pateikti 8 lentelėje. Remiantis chromatogramomis (16 pav.) didžiausią tikslinio baltymo koncentraciją turinčios frakcijos apjungiamos kartu. Apjungtos frakcijos buvo dializuojamos buferiname tirpale G. Po dializės baltymo tirpalas buvo filtruojamas panaudojant filtravimo indus „Millipore Stericup“.

8 lentelė. Tikslinio baltymo renatūracijos ir gryninimo giminingumo chromatografijos metodu duomenys

<i>Auginimai</i>	<i>Gryninimas</i>	<i>Biomasė, g</i>	<i>Kompetentinės ląstelės</i>	<i>Naudoras sorbentas</i>	<i>Renatūracijos sąlygos</i>	<i>Eliucijos sąlygos</i>	<i>Gauta baltymo, mg</i>
1, 4	A	20,81	<i>E. coli</i> BL21 Star TM (DE3)	Ni Sepharose TM 6 Fast Flow	6→0 M Guanidino chlorido 10→0 mM Glutaciono	0,7 M imidazolo, 10 mM TRIS, 100 mM PO ₄ ³⁻ , pH 5,8	40
2, 3	B	31,96		Chelating Sepharose Fast Flow		0,6 M imidazolo, 10 mM TRIS, 100 mM PO ₄ ³⁻ , pH 5,8	65
5, 6	C	21,56	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Ni Sepharose TM 6 Fast Flow		0,7 M imidazolo, 10 mM TRIS, 100 mM PO ₄ ³⁻ , pH 5,8	0



16 pav. Chromatogramos gautos gryninant pelės prioninį baltymą giminingumo chromatografijos metodu. Žalia linija – buferinio tirpalo F gradientas. Mėlyna linija – sugertis ($\lambda = 280$). Raudona – renkamos tirpalo frakcijos. A – 1, 4 auginimų biomasės gryninimas. B – 2, 4 auginimų biomasės gryninimas. C – 5, 6 auginimų biomasės gryninimas

Kaip matyti chromatogramose (16 pav. A ir B), *E. coli* BL21 Star™(DE3) ląstelės ekspresavo tikslinį baltymą, kurį pavyko renatūruoti ir išgryninti giminingumo chromatografijos metodu. Tačiau kaip ir buvo galima numanyti sprendžiant iš 15 pav., *E. coli* BL21 (DE3) neekspresavo tikslinio baltymo arba ekspresavo labai mažą kiekį, ką ir patvirtina chromatograma (16 pav. C), kurioje nėra matoma tikslinio baltymo smailė. Šiai dienai yra nežinomos priežastys, kodėl *E. coli* BL21 (DE3) neekspresavo pelės prioninio baltymo.

Nufiltruotuose baltymų tirpaluose, gautuose po gryninimų A ir B, atliktas histidininės uodegos atskyrimas nuo tikslinio baltymo panaudojant 3 vienetus trombino 1 mg baltymo kirpimui. Kirpimas atliekamas per naktį 4 °C temperatūroje. Po kirpimo trombinu paimti mėginiai perduoti atlikti masių spektrometrinę analizę (9 lentelė).

9 lentelė. Masių spektrometrinės analizės duomenys

Gryninimas	Teorinė MoPrP23-230 molekulinė masė po karpymo trombinu, Da	Praktiškai išmatuota MoPrP23-230 molekulinė masė po karpymo trombinu, Da
A	23288,5	23286,9±1
B		23287,1±1

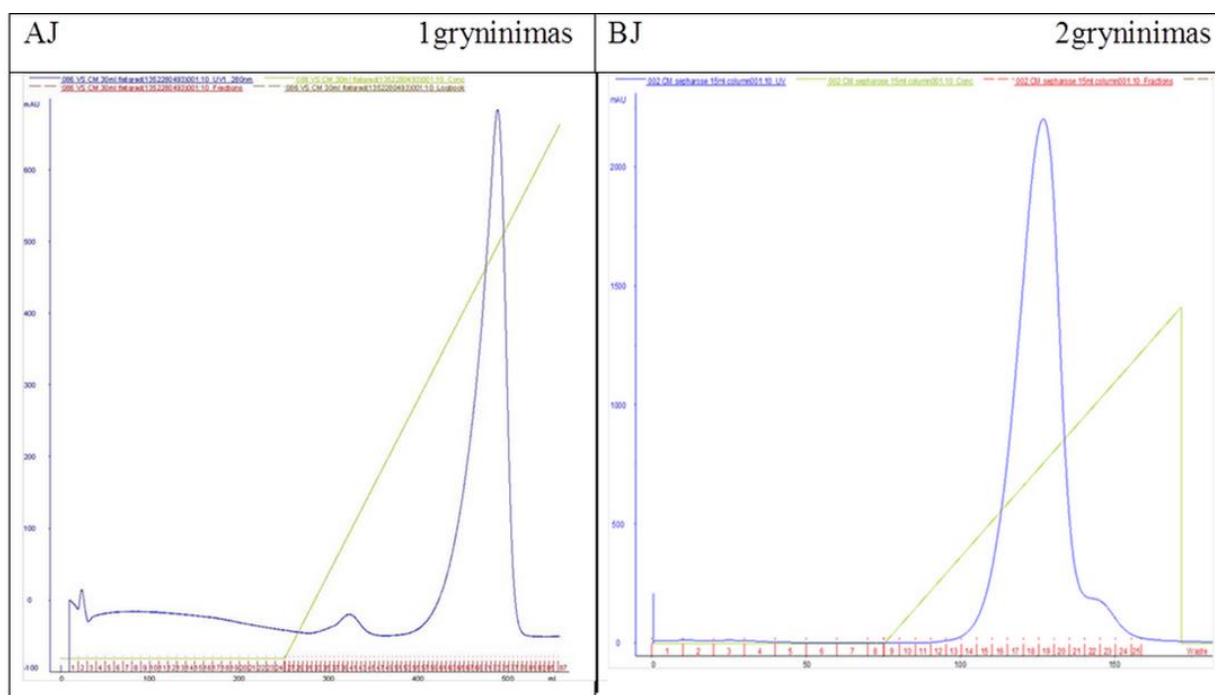
Remiantis 9 lentelėje pateiktais duomenimis darome išvadą, jog buvo gautas reikiamas baltymas, kuris toliau gali būti gryninamas jonų mainų chromatografijos metodu.

Po kirpimo trombinu gauti tikslinio baltymo tirpalai išgryninti jonų mainų chromatografijos metodu, panaudojant CM Sepharose sorbentą. Gauti rezultatai pateikti 10 lentelėje. Remiantis

chromatogramomis (17 pav.) didžiausią tikslinio baltymo koncentraciją turinčios frakcijos apjungiamos kartu. Apjungtos frakcijos buvo dializuojamos buferiname tirpale K. Po dializės tikslinio baltymo tirpalai, gauti po gryninimų AJ ir BJ, buvo filtruojami panaudojant filtravimo indus „Millipore Stericup“. Nufiltruoti baltymo tirpalai sukonzentruoti iki 2,685 mg/mL (AJ) ir 2,930 mg/mL (BJ) koncentracijos panaudojant „Amicon® Ultra–15“ koncentratorius. Sukonzentruoti baltymo tirpalai išpilstyti į mėgintuvėlius po 0,5 mg baltymo ir yra saugomi –20 °C temperatūroje.

10 lentelė. Tikslinio baltymo gryninimo jonų mainų chromatografijos metodu, duomenys

Gryninimas	Užnešta baltymo, mg	Eliucijos sąlygos	Gauta baltymo, mg
AJ	65	0→1,5 M NaCl, 10 mM TRIS, 100mM PO ₄ ³⁻ , pH 5,8	40
BJ	40	0→2 M NaCl, 10 mM TRIS, 100mM PO ₄ ³⁻ , pH 5,8	30



17 pav. Chromatogramos gautos gryninant pelės prioninį baltymą giminingumo chromatografijos metodu. Žalia linija – buferinio tirpalo H gradientas. Mėlyna linija – sugertis ($\lambda = 280$) Raudona – renkamos tirpalo frakcijos

Remiantis 10 lenelėje pateikiamais duomenimis ir chromatogramomis (17 pav.) galime teigti, jo gavome gryną pelės prioninį baltymą (MoPrP23-230), kuris bus naudojamas tolimesniuose tyrimuose.

Literatūros šaltinyje (Abskharon *et al.* 2012) nurodoma, kad iš 1L kultūrinės terpės gauta 1 mg MoPrP23-230. Tuo metu literatūros šaltinyje (Hornemann *et al.* 2009) nurodoma, jog iš 1L kultūrinės terpės gauta 10 – 20 mg MoPrP23-231. Šio darbo metu iš 1L kultūrinės terpės gauta 7 mg pelės prioninio baltymo (MoPrP23-230).

3.6. Ekonominė nauda

Apskaičiuota preliminarai 1 mg pelės prioninio baltymo (MoPrP23-230) gamybos kaina (11 lentelė). Kaina apskaičiuota pagal brangiausius reagentus ir prietaisus. Kiti reagentai ir prietaisai sudaro iki 10 % sumos, kurią sudaro brangiausi reagentai ir prietaisai. Prietaisų kaina apskaičiuota remiantis naudoto prietaiso nusidėvėjimu t. y. jeigu naujas prietaisas kainuoja 100000 Lt, o nusidėvėjimo laikotarpis yra 8 metai, vadinasi per 1 dieną naudojamas prietaisas praranda ~ 34 Lt vertės.

11 lentelė. Brangiausių reagentų ir prietaisų, naudotų pelės prioninio baltymo gamyboje duomenys

Reagentas ir Prietaisas	Viso sunaudota	Kaina	Viso kaina, Lt
0,22 µm porų dydžio filtrai	20	4,75 Lt/vnt.	95
AA/Bis 40 %	60 mL	0,27 Lt/mL	16,2
Akta Explorer	7 dienos	108 Lt/diena	756
Akta Purifier	1 diena	54 Lt/diena	54
Ampicilinas	3,4 g	3,5 Lt/g	11,9
Elektroforezės dažas	240 mL	0,31 Lt/mL	74,4
Giminingumo chromatografijos sorbentai	5 mL	38,88 Lt/mL	194,4
Glutationas	8,6 g	21,5 Lt/g	184,9
Guanidino chloridas 98 %	820 g	0,1Lt/g	82
Guanidino chloridas 99,7 %	804 g	0,98 Lt/g	787,92
Imidazolas	170 g	0,78 Lt/g	132,6
IPTG	8,11 g	30,95 Lt/g	251
Jonų mainų chromatografijos sorbentas	3,75 mL	8 Lt/mL	30
Mitybinė terpė	34 L	6,8 Lt/L	231
Molekulinis markeris	48 µL	0,38 Lt/ µL	18,24
NDS	12 g	0,70 Lt/g	8,4
Stericup 150	1 vnt.	23,67 Lt/vnt.	23,67
Stericup 250	7 vnt.	41,67 Lt/vnt.	291,69
Trombinas	710 vnt.	0,84 Lt/vnt.	596,4
			Iš viso: 3839,72
Kiti reagentai ir prietaisai sudaro 10 % nuo galutinės sumos: 383,97Lt			
70 mg pelės prioninio baltymo (MoPrP23-230) gamyba kainavo: 4223,69 Lt, 1mg baltymo kaina: 60,33 Lt			

Pelės prioninį baltymą galima nusipirkti ir iš įmonių, tačiau jo kaina yra labai didelė (12 lentelė).

12 lentelė. Prioninių baltymų kainos

Įmonė	Produkto kodas	1 mg MoPrP23-230 kaina, Lt
Abcam®	ab74056	19965
Jenabioscience	NM_011170 / P04925	15525

Kaip matome iš 12 lentelės, pirkti pelės prioninį baltymą yra labai brangu, todėl ir tenka jį gamintis patiems.

4. IŠVADOS

1. *E. coli* BL21 StarTM(DE3) kamienas yra labiau nei *E. coli* BL21(DE3) kamienas tinkamas MoPrP23-230 gamybai.
2. Atrinktos transformantų kolonijos, kurios ekspresavo MoPrP23-230 ir kurių kultūros optinis tankis buvo didžiausias. LB peptonas (Luria Broth) mitybinė terpė yra geriausia transformantų auginimui.
3. Pelės prioninis baltymas (MoPrP23-230) renatūruotas ir išgrynintas giminingumo chromatografijos metodu. Gauta 105 mg MoPrP23-230 (su histidinine uodega).
4. Histidininė uodega atskirta nuo MoPrP23-230, baltymas galutinai išgrynintas jonų mainų chromatografijos metodu. Gauta 70 mg MoPrP23-230.

LITERATŪRA

1. Abskharon, Romany; *et al.* 2012. A novel expression system for production of soluble prion proteins in *E. coli*, *Microbial cell factories* vol. 11, p. 6. ISSN 1475–2859.
2. Aguzzi, Adriano; Callela, Anna Maria. 2009. Prions: protein aggregation and infectious diseases, *Physiological reviews* vol. 89, p. 1105–11052. ISSN 0031–9333.
3. Baneyx, Francois. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Current Opinion in Biotechnology* vol. 10, p. 411–421. ISSN 09581669.
4. Block, Helena; *et al.* 2009. Immobilized–metal affinity chromatography (IMAC): a review, *Methods in enzymology* vol. 463, p. 439–473. ISSN 1557–7988.
5. Brondyk, H. William. 2009. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein, *Methods in enzymology* vol. 463, p. 131–147. ISSN 1557–7988.
6. Colby, W. David; Prusiner, B. Stanley. 2011. Prions, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* vol. 3, p. A00683. ISSN 1943–0264.
7. Collinge, J. 1997. Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy, *Human molecular genetics* vol. 6, p. 1699–1705. ISSN 14602083.
8. Corsaro, A.; *et al.* 2002. Expression in *E. coli* and purification of recombinant fragments of wild type and mutant human prion protein, *Neurochemistry international* vol. 41, p. 55–63. ISSN 0197–0186.
9. Cuatrecasas, Pedro. 1970. Protein Purification by Affinity Chromatography, *The Journal of Biological Chemistry* vol. 245, p. 3059–3065.
10. Expression Technologies Inc. Bacterial *E.coli* Growth Media [interaktyvus], [žiūrėta 2013–03–06]. Prieiga per internetą:
<<http://www.exptec.com/Expression%20Technologies/Bacteria%20growth%20media.htm>>.
11. Goodsell, D. 2008. Molecule of The Month: Prions, *RCSB Protein Data Bank*. ISBN 1494014947. ISSN 1234–432X.
12. Hornemann, Simone; *et al.* 1997. Recombinant full–length murine prion protein, mPrP(23–231): purification and spectroscopic characterization, *FEBS letters* vol. 413, p. 277–281. ISSN 0014–5793.
13. Hornemann, Simone; *et al.* 2009. Prion protein library of recombinant constructs for structural biology, *FEBS Journal* vol. 276, p. 2359–2367. ISSN 1742464X.
14. Makrides, S. 1996. Strategies for achieving high–level expression of genes in *Escherichia coli*, *Microbiological reviews* vol. 60, p. 512–538. ISSN 0146–0749.
15. Middelberg, A. 2002. Preparative protein refolding, *Trends in biotechnology* vol. 20, p. 437–443. ISSN 0167–7799.

16. Palomares, A. Laura; Estrada–Mondaca, Sandino; Ramirez, T. Octavio. 2004. Production of recombinant proteins: challenges and solutions, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 267, p. 15–52. ISSN 1064–3745.
17. Porath, J.; *et al.* 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature* vol. 258, p. 598–599. ISSN 0028–0836.
18. Riek, R; *et al.* 1996. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121–231), *Nature* vol. 382, p.180–182. ISSN 0028–0836.
19. Sasnauskienė, Zofija. 2008. *Chromatografiniai metodai: vadovėlis*. Kaunas: Technologija. ISBN 978–9955–25–448–5.
20. Structural Biology @ Vanderbilt. 2000. General Method for Cleavage of His–Tagged Proteins with Thrombin cleavage sites [interaktyvus], [žiūrėta 2013–03–21]. Prieiga per internetą: < <http://structbio.vanderbilt.edu/chazin/wisdom/labpro/thrombin.html> >.
21. Zahn, Ralph; von Schroetter, Christine; Wüthrich, Kurt. 1997. Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high–affinity column refolding, *FEBS Letters* vol. 417, p. 400–404. ISSN 00145793.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju baigiamojo darbo vadovui dr. Vytautui Smirnovui, Ričardui Mališauskui, Vilmai Michailovienei, Ksenijai Michailovai už suteiktas žinias, naudingus patarimus bei pastabas baigiamojo bakalauro darbo metu.