

Sposób oczyszczania rekombinowanego ludzkiego białka PCNA nie posiadającego metki fuzyjnej

Przedmiotem wynalazku jest metoda oczyszczania rekombinowanego ludzkiego białka PCNA nie posiadającego metki fuzyjnej charakteryzującego się wysoką czystością oraz aktywnością biologiczną.

W znanych heterologicznych systemach ekspresyjnych wykorzystywanych do nadekspresji oraz pozyskiwania białek rekombinowanych wykorzystywane są wektory posiadające metki fuzyjne np. His, GST lub MBP wykazujące powinowactwo odpowiednio: do jonu metalu (np. niklu), glutationu lub amylozy. Zastosowanie wymienionych metek umożliwia łatwe oraz szybkie uzyskanie pożądanego preparatu białkowego charakteryzującego się zazwyczaj wysokim stopniem czystości. Podejście takie z powodzeniem jest stosowane dla wielu białek m.in. białka PCNA. Niejednokrotnie specyfika prowadzonych badań wymaga korzystania z białka które nie zawiera metki fuzyjnej. W takim przypadku możliwe są co najmniej dwa rozwiązania: a) odcięcie metki fuzyjnej które nie zawsze jest możliwe lub b) oczyszczanie białka pozbawionego metki fuzyjnej klasycznymi metodami chromatograficznymi.

Opublikowane dotychczas w literaturze naukowej metody oczyszczania białka PCNA bez metki fuzyjnej opisują konieczność zastosowania kilku złożeń chromatograficznych celem pozyskania czystego preparatu.

Celem wynalazku jest dostarczenie alternatywnej metody oczyszczania ludzkiego białka PCNA, która zapewniałaby wysoką wydajność oraz czystość i aktywność uzyskiwanego białka.

Przedmiotem wynalazku jest sposób oczyszczania rekombinowanego ludzkiego białka PCNA nie posiadającego metki fuzyjnej poddanego nadekspresji w komórkach *E. coli*, charakteryzujący się tym, że prowadzi się nadekspresję białka PCNA w komórkach *E. coli* transformowanych plazmidem zawierającym sekwencję kodującą to białko, prowadzi się wysalanie białka siarczanem amonu z roztworu uzyskanych białek wewnątrzkomórkowych a następnie rozdziela się wysoloną frakcję białkową metodą chromatografii jonowymiennej, korzystnie na kolumnie jonowymiennej Q, przy czym izoluje się frakcję zawierającą białko PCNA.

Korzystnie, komórki *E. coli* zawierają kasetę ekspresyjną przedstawioną jako Sekw. Id. Nr 1.

Opracowana metoda oczyszczania ludzkiego PCNA jest łatwa w realizacji ponieważ bazując na dużej rozpuszczalności tego białka wykorzystuje technikę wysalania siarczanem amonu, a następnie chromatografię na kolumnie jonowymiennej Q. Cechuje się ona wysoką wydajnością a uzyskiwany preparat białkowy posiada nieoczekiwanie wysoką czystość i aktywność.

Dla lepszego wyjaśnienia istoty zdefiniowanego powyżej wynalazku niniejszy opis wzbogacono o rysunek oraz opis przykładowej realizacji.

Na figurze 1 przedstawiono oczyszczanie rekombinowanego ludzkiego białka PCNA. 1) standard białkowy; 2) całkowity ekstrakt białkowy z komórek *E. coli* BL21(DE3) pRIL przed indukcją ekspresji PCNA; 3) całkowity ekstrakt białkowy z komórek *E. coli* BL21(DE3) pRIL po 4 godzinach indukcji ekspresji PCNA; 4) frakcja białek rozpuszczonych, wyekstrahowanych z komórek *E. coli* po nadekspresji PCNA; 5) frakcja białek rozpuszczonych przy 60% nasyceniu siarczanu amonu; 6) frakcja białek wysolonych przy 80% nasyceniu siarczanu amonu nałożona na kolumnę Q; 7) 1 µg frakcji oczyszczonego PCNA. Białka rozdzielono w 12% denaturującym żelu poliakrylamidowym, a następnie wybarwiono w barwniku Coomassie.

Przykład.

Do plazmidu bakteryjnego pET29a (Novagen (EMD Millipore)) chronionego patentem o numerze (US Patent 5,693,489) wprowadzono przy użyciu enzymów restrykcyjnych NdeI oraz BamHI otwartą ramkę odczytu kodującą ludzkie białko PCNA zawierającą kodon STOP. Uzyskany plazmid zawierający kasetę ekspresyjną przedstawioną na Sekw. Id. nr 1 i posiadający oporność na kanamycynę wprowadzono do komórek bakterii *E. coli* szczepu BL21 pRIL. Bakterie hodowano w 4L pożywki LB zawierającej kanamycynę o stężeniu 50 mg/L oraz chlofoamfenikol o stężeniu 25 mg/L w temperaturze 37°C intensywnie wytrząsając do momentu gdy wartość gęstości optycznej OD600 wyniosła 0,5. Następnie, do hodowli dodano induktora ekspresji IPTG (izopropyl β-D-1-tiogalaktopiranozyd) w stężeniu 1 mM i prowadzono indukcję ekspresji przez 4h w temperaturze 37°C. Wszystkie poniżej opisane czynności wykonywano w temperaturze 4°C. Po zakończeniu indukcji bakterie odwirowano (5000x g, 10 min). Osad bakteryjny zawieszono w 50 ml buforu ekstrakcyjnego (50 mM Tris, pH 7,5) i poddano sonikacji (10min. 10s puls, 5s przerwy) celem uwolnienia białek wewnątrzkomórkowych. Uzyskany ekstrakt odwirowano (30 000x g, 30 min). Do nadsącza dodano siarczanu amonu do 40% stężenia wysycającego i inkubowano na mieszadle magnetycznym przez okres 20 min. Próbkę odwirowano (30 000x g, 30 min). Następnie do nadsącza dodano siarczanu amonu do 60% stężenia wysycającego i inkubowano na mieszadle magnetycznym przez okres 20 min. Próbkę odwirowano (30 000x g, 30 min). W kolejnym kroku do nadsącza dodano siarczanu amonu do stężenia wysycającego 80% i inkubowano jak wyżej opisano. Po odwirowaniu uzyskany osad rozpuszczono w 1ml buforu ekstrakcyjnego i trzykrotnie przedializowano względem 10ml buforu 50 mM Tris o pH7.5. Uzyskany preparat białkowy nałożono na kolumnę Econo-Pack High Q (5ml, BioRad) zrównoważoną wcześniej buforem ekstrakcyjnym. Po związaniu białka kolumnę przepłukano 50ml buforu ekstrakcyjnego, a następnie dokonano elucji białka 200ml liniowego

gradientu soli (0-0,8M NaCl) rozpuszczonej w 50 mM Tris o pH7,5. W wyniku przeprowadzonego rozdzielania chromatograficznego uzyskano frakcję ludzkiego rekombinowanego białka PCNA nie zawierającego metki fuzyjnej w ilości 6 mg, charakteryzującego się wysoką czystością (Fig.1) oraz aktywnością biologiczną badaną w teście oddziaływania z ludzką endonukleazą Fen1.

Sekwencja Id. nr 1

5' -

AGATCGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCC
CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATatgttcgagggcgcgcctggtccag
ggctccatcctcaagaaggtggttgaggcactcaaggacctcatcaacgaggcctgctgggatattag
ctccagcgggtgtaaacctgcagagcatggactcgtcccacgtctctttggtgcagctcacctgcggt
ctgagggcttcgacacctaccgctgcgaccgcaacctggccatgggctgaacctcaccagtatgtcc
aaaatactaaaatgcgcccggcaatgaagatatcattacactaagggccgaagataacgcgataacctt
ggcgctagtatttgaagcaccacaaccaggagaaagtttcagactatgaaatgaagttgatggatttag
atggtgaacaacttggattccagaacaggagtacagctgtgtagtaaagatgccttctggtgaattt
gcacgtatatgccgagatctcagccatattggagatgctggtgtaatttctgtgcaaaagacggagt
gaaatttctgcaagtggagaacttggaaatggaacattaaattgtcacagacaagtaattgtcgata
aagaggaggaagctgttaccatagagatgaatgaaccagttcaactaacttttgcactgaggtacctg
aacttctttacaaaagccactccactctcttcaacgggtgacactcagtatgtctgcagatgtaccct
tggtgtagagtataaaattgcggatatgggacacttaaaatactacttggctccaagatcgaggatg
aagaaggatcttagGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCA
CCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCCTGA
GCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG