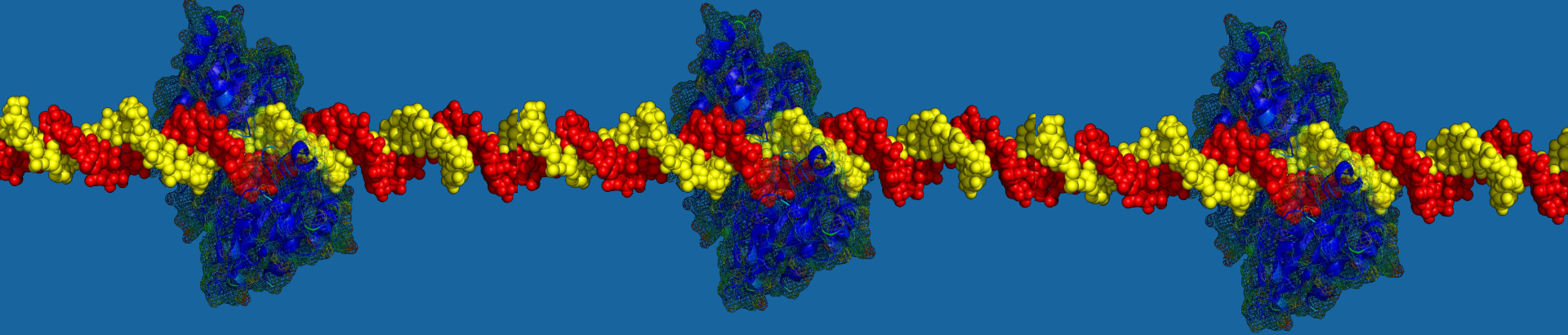
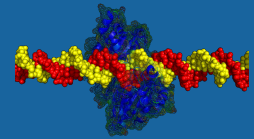




Tehnici de Biologie Moleculară

11.12.2024

Curs 5 – Abordări generale pentru clonarea fragmentelor de ADN în vectori. Producerea proteinelor recombinante.



Termenul de **clonare** desemnează, în sens larg, **o tehnică ce are drept scop producerea mai multor copii identice ale unui fragment ADN de interes.**

Această multiplicare se poate realiza în două moduri:

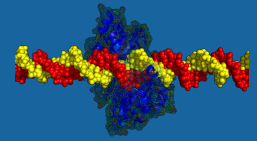
- *in vitro*, folosind polimeraze ADN dependente și reacția de amplificare PCR;
- *in vivo* utilizând sistemele enzimatice ale unor organisme gazdă precum *E. coli*.

Un al doilea sens al termenului de **clonare** este **introducerea unui fragment de ADN dintr-o sursă într-o moleculă acceptoare care provine dintr-o altă sursă și obținerea unei molecule ADN recombinat.**

Acesta este motivul pentru care, în mod uzual, termenul de **clonare** este mai degrabă rezervat pentru desemnarea procesului desfășurat *in vivo* în urma căruia se obține o moleculă de ADN-recombinat, iar cel de **amplificare** este utilizată pentru **procesul enzimatic desfășurat in vitro** (PCR).

Clonarea unui fragment de ADN (ADN genomic, ADN complementar rezultat prin revers-transcrierea ARN-ului mesager sau un fragment sintetizat chimic) **este un proces care constă în parcurgerea a patru etape distincte:**

1. **construirea unui vector recombinat** ce conține fragmentul ADN de interes;
2. **introducerea vectorului recombinat într-o gazdă potrivită;**
3. **propagarea selectivă a vectorului recombinat;**
4. **extracția și purificarea vectorului recombinat.**



Construirea vectorului recombinat

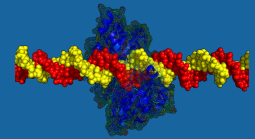
Indiferent de sursa din care provine fragmentul ADN care trebuie clonat, principiul ce guvernează obținerea de molecule recombinante este același și presupune parcurgerea a **2 etape**:

- A) fragmentarea moleculei ADN în vederea separării regiunii/fragmentului de interes;**
- B) introducerea fragmentului în molecula acceptor.**

Fragmentarea moleculei ADN în vederea separării regiunii/fragmentului de interes **se poate realiza** a) **non-enzimatic** sau b) **enzimatic**. Fragmentarea non-enzimatică nu oferă un control strict asupra dimensiunilor fragmentelor obținute, utilizarea enzimelor de restricție fiind preferată datorită specificității foarte mari a acestora.

Metodele ce pot fi folosite pentru fragmentarea non-enzimatică a ADN-ului sunt:

- **Fragmentarea acustică** – sunete cu lungimi de undă reduse și de frecvențe foarte înalte sunt aplicate concentrat în proba de ADN ceea ce duce la ruperea mecanică a catenelor cu obținerea de fragmente cuprinse de sute până la mii de pb;
- **Sonicarea** – aplicarea de sunete cu lungime de mari duce la apariția procesului de cavitație și ruperea catenelor de ADN în fragmente de 700 pb până la câțiva kpb;
- **Fragmentarea prin centrifugare** - forța centrifugală este utilizată pentru a forța soluțiile cu ADN să treacă printr-un orificiu îngust de o dimensiune dată. Viteza de centrifugare este cea ce dictează dimensiunea fragmentelor rezultate, în general aceste fiind de ordinul kpb;
- **Fragmentarea hidrodinamică** - se realizează prin forțarea soluției cu ADN printr-un tub îngust (**point-sink shearing**, rezultă fragmente de câteva kpb) sau printr-un ac de seringă (**needle shearing**, rezultă fragmente de câteva zeci de kpb).



Endonucleazele de restricție

Fragmentarea enzimatică se bazează pe o clasă specifică de nucleaze este reprezentată de **endonuclezele de restricție** (sau **restrictaze**).

Restrictazele clivează specific moleculele de ADN dublu catenar după recunoașterea unei scurte secvențe (4-8 nucleotide) de nucleotide **palindromice**. Secvența specifică se numește **situs de restricție**, iar **enzima clivează 2 legături fosfodiesterice**, una de pe o catenă, alta de pe cealaltă catenă.

Restrictazele se clasifică în:

- 1. restrictaze de de tip I** – clivează în mod aleatoriu molecula de ADN și produc fragmente cu fosfat în 5' și OH în 3';
- 2. restrictaze de de tip II** – clivează molecula de ADN dublucatenar în mod specific, în situsuri foarte clar definite. Clivarea se poate realiza la **nivelul axei de simetrie** a situsul de restricție, fragmentele rezultate având **extremitățile drepte**, sau **decalat față de axa de simetrie**, fragmentele rezultate având capetele **monocatenare și complementare (capete coezive)**;
- 3. restrictaze de de tip III** – recunosc specific situsuri foarte clar definite din molecula de ADN pe care **o clivează la o distanță dată de situs**; capetele formate sunt coezive;
- 3. restrictaze de de tip IV** – acționează asupra ADN-ului modificat chimic;

Inițiala numelui genului urmată de primele 2 litere ale denumirii speciei

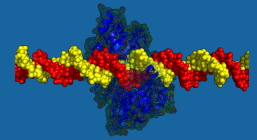
EcoRV

Tulpina specifică din care a fost izolată

Cu numere romane se indică a câta restrictază este identificată în tulpina dată

Endonuclease	Sequence Recognized Cleavage Sites Shown	Bacterial Source
<i>Bam</i> HI	↓ GGATCC CCTAGG ↑	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
<i>Bgl</i> II	↓ AGATCT TCTAGA ↑	<i>Bacillus globigii</i>
<i>Eco</i> RI	↓ GAATTC CTTAAG ↑	<i>Escherichia coli</i> RY13
<i>Eco</i> RII	↓ CCTGG GGACC ↑	<i>Escherichia coli</i> R245
<i>Hind</i> III	↓ AAGCTT TTCGAA ↑	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
<i>Hha</i> I	↓ GCGC CGCG ↑	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>Hpa</i> I	↓ GTTAAC CAATTG ↑	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Mst</i> II	↓ CCTNAGG GGANTCC ↑	Microcoleus strain
<i>Pst</i> I	↓ CTGCAG GACGTC ↑	<i>Providencia stuartii</i> 164
<i>Taq</i> I	↓ TCGA AGCT ↑	<i>Thermus aquaticus</i> YTI

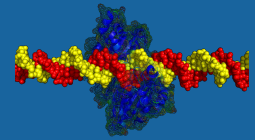
Palidrom (**palin** -inapoi, **dromos** – drum) – cuvinte, fraze sau secvențe ce au aceeași semnificație indiferent de sensul în care sunt citite.



Endonucleazele de restricție

Cel mai frecvent **fragmentarea enzimatică** utilizează **restrictaze de de tip II sau III** deoarece nu situs-ul de clivare, dar și **modul de clivare este foarte specific**, ducând la apariția a două tipuri de capete. În situația în care clivarea se realizează pe ambele catene în aceeași poziție din interiorul situs-ului de restricție, cele două catene se vor sfârși la același nivel, iar capătul rezultat poartă numele de **capăt drept**. Dacă clivarea se realizează în situs-uri diferite pe cele două catene, capetele formate vor avea cele două catene de lungimi diferite. Una dintre catene va fi mai lungă și va expune deci nucleotide neîmperecheate spre exterior. Dacă două fragmente de ADN au la capăt o catenă mai lungă cu aceeași secvență, fragmentele se pot asocia prin formarea unor legături de hidrogen. Din acest motiv capetele poartă numele de **capete coezive**.

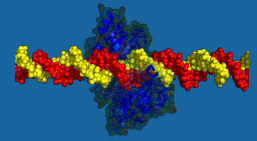
Enzimă de restricție	EcoRV	BamHI	BclI	PvuII
Situs de restricție	<pre>5' .GATATC.3' 3' .CTATAG.5'</pre>	<pre>5' ...GGATCC...3' 3' ...CCTAGG...5'</pre>	<pre>5' .TGATCA...3' 3' .ACTAGT...5'</pre>	<pre>5' ...GGATCC...3' 3' ...CCTAGG...5'</pre>
Capete generate	<pre>5' .GAT ATC.3' 3' .CTA TAG.5'</pre>	<pre>5' .G GATCC.3' 3' .CCTAG G.5'</pre>	<pre>5' .T GATCA...3' 3' .ACTAG T...5'</pre>	<pre>5' ...GGA TCC...3' 3' ...CCT AGG...5'</pre>
	capete drepte	capete coezive	capete coezive	capete drepte



Capete coezive și rolul ligazelor

Enzimă de restricție	EcoRV	BamHI	BclI	PvuII
Capete generate	5' .GAT ATC.3' 3' .CTA TAG.5'	5' .G GATCC.3' 3' .CCTAG G.5'	5' .T GATCA...3' 3' .ACTAGT T...5'	5' ...GGA TCC...3' 3' ...CCT AGG...5'
Compatibilitate capete	5' .GATATC.3' 3' .CTATAG.5' 5' .GATGATCC.3' 3' .CTA G.5' 5' .GATGATCA...3' 3' .CTA T...5' 5' .GATTCC...3' 3' .CTAAGG...5'	5' G ATC.3' 3' CCTAGTAG.5' 5' .GGATCC.3' 3' .CCTAGG.5' 5' .GGATCA...3' 3' .CCTAGT...5' 5' G TCC...3' 3' CCTAGAGG...5'	5' T ATC.3' 3' ACTAGTAG.5' 5' .TGATCC.3' 3' .ACTAGG.5' 5' .TGATCA...3' 3' .ACTAGT...5' 5' T TCC...3' 3' ACTAGAGG...5'	5' ...GGA ATC.3' 3' ...CCT TAG.5' 5' ...GGAGATCC.3' 3' ...CCT G.5' 5' ...GGAGATCA...3' 3' ...CCT T...5' 5' ...GGATCC...3' 3' ...CCTAGG...5'

Legăturile de H formate mențin moleculele în contact și permit acțiunea **ligazelor**. Aceste enzime au capacitatea de a reface legătura fosfodiestică și deci continuitatea catenelor. În acest fel, două fragmente de ADN pot fi sudate una de cealaltă. Cel mai frecvent, un fragment conținând secvența de interes este sudat în vectorul acceptor, obținându-se o moleculă recombinată.

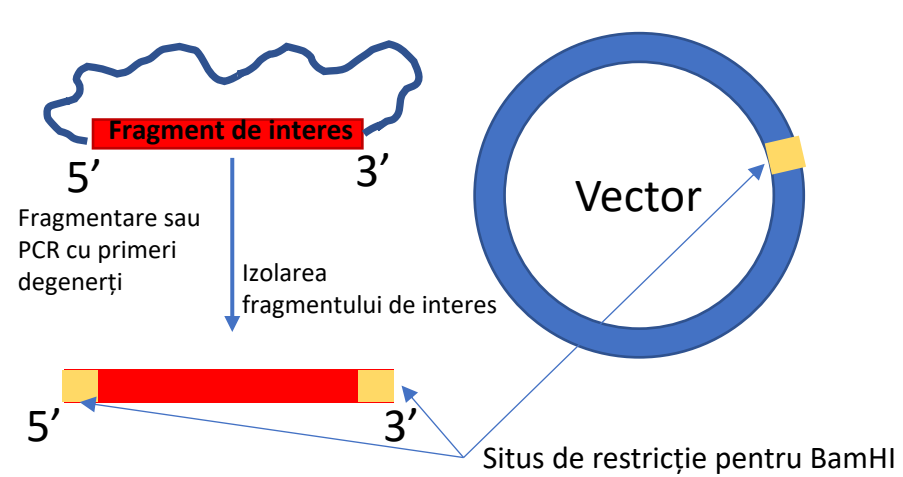


Tipuri de clonare

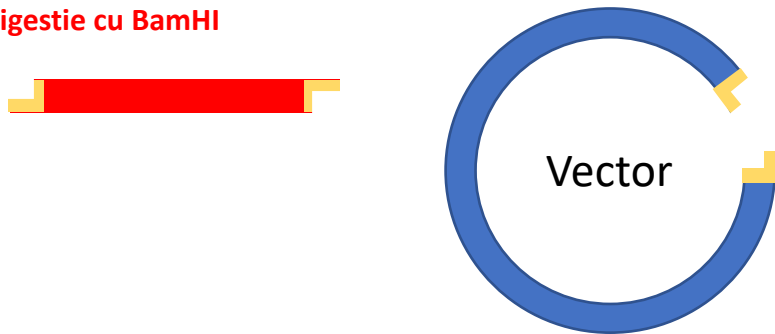
Pentru a putea utiliza enzimele de restricție pentru producerea unei molecule de ADN recombinat, este necesară existența de situsuri de restricție în poziții convenabile. Când acestea nu există, cel mai frecvent fragmentul de ADN ce se dorește a se clona este **amplificat printr-o reacție PCR** ce folosește **primeri degenerați**. Aceste oligonucleotide nu au secvența perfect complementară cu a ADN-ului de amplificat, ci ușor modificată pentru a include un situs de restricție pentru o enzimă dată. Deoarece primer-ul este inclus în toate catenele de ADN amplificate, acestea vor fi diferite de catenele template prin noul situs de restricție creat.

Cea mai simplă strategie de clonare constă din digestia vectorului și fragmentului de interes cu aceeași enzimă de restricție, ceea ce duce la obținerea de capete coezive compatibile care pot fi ligate. Abordarea poartă numele de **clonare oarbă**, deoarece **nu oferă un control foarte strict al orientării fragmentului în vector și de asemenea, vectorul se poate foarte ușor re-circulariza fără a prelua fragmentul de clonat**. Clonarea oarbă este una dintre primele strategii de clonare dezvoltată și foarte intens utilizată care, treptat, prin identificarea unui număr din ce în ce mai mare de enzime de restricție a fost înlocuită de așa-numita **clonare direcționată**. Aceasta presupune utilizarea a cel puțin două enzime pentru digestia fragmentului și vectorului. Prin digestia vectorului cu două enzime de restricție diferite care generează capete incompatibile, recircularizarea vectorului este împiedicată. Deoarece fragmentul este tăiat cu aceleași două enzime, el va putea fi ligat în vector și doar astfel se poate realiza recircularizarea acestuia și obținerea moleculei ADN recombinante. Legarea este de această dată strict coordonată prin alegerea enzimelor de restricție.

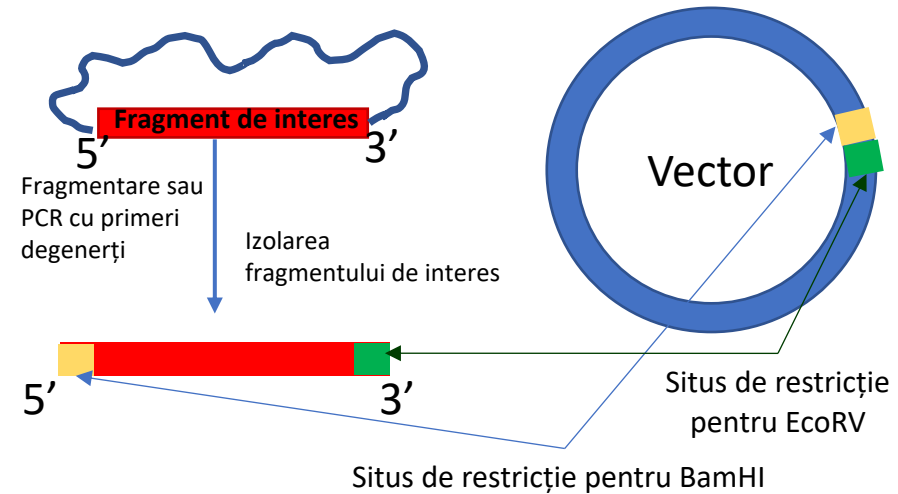
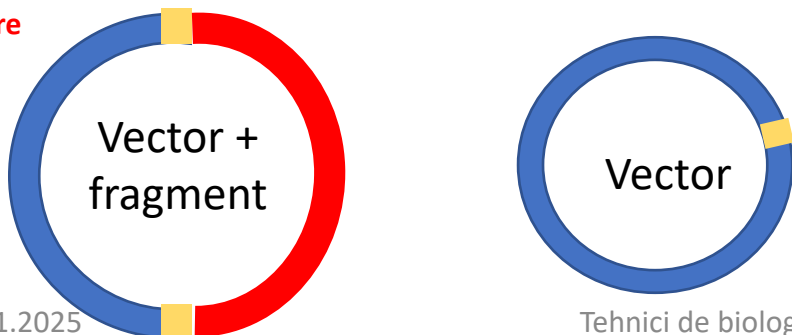
Clonare oarbă vs clonare direcționată



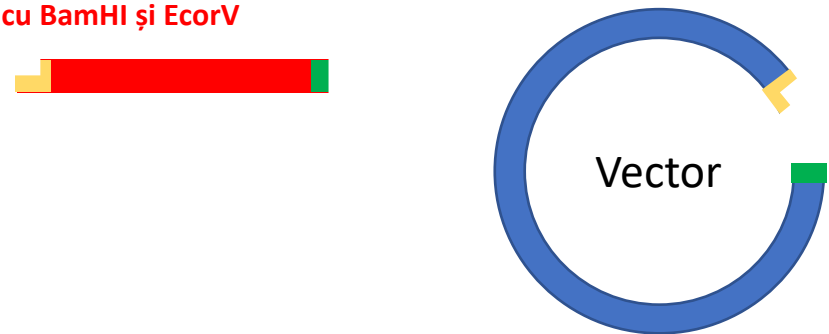
Digestie cu BamHI



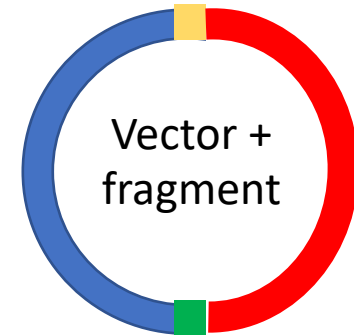
Ligare

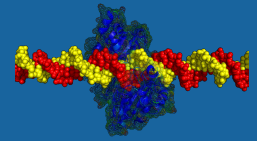


Digestie cu BamHI și EcorV



Ligare



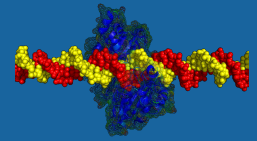


Cum aleg enzimele de restricție?

Alegerea enzimelor de restricție și localizarea acestor situs-uri de restricție pe primer trebuie să se facă ținând cont de următoarele elemente:

1. enzima să fie plasată în situs-ul de clonare multiplu al plasmidului;
2. gena de clonat trebuie să fie amplasată în situsul multiplu de clonare în așa fel încât să respecte cadrul de lectură specific vectorului pentru a permite expresia unei proteine recombinante;
3. să înlăture cât mai mult din situs-ul multiplu de clonare pentru ca proteina recombinată să fie cât mai puțin modificată;
4. să taie o singură dată în fragmentul de clonat, în situs-ul dorit; un program extrem de util pentru a analiza situs-urile de restricție existente într-un fragment ADN dat și pentru a alege judicios enzimele de restricție este **NEBCutter**.

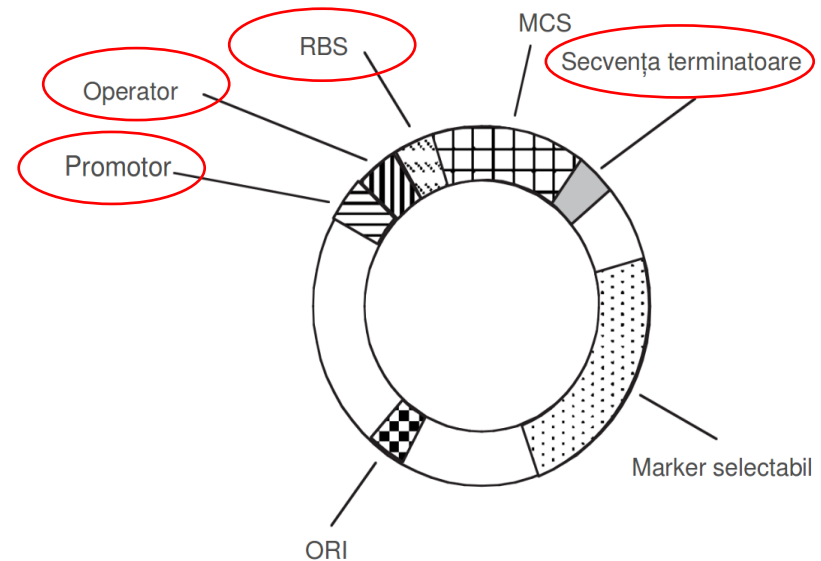
După obținerea moleculei recombinante, aceasta trebuie introdusă în celula gazdă. Deși există specii care pot să accepte molecule de ADN exogen în mod natural, *E. coli* nu este una dintre acestea. De aceea, celulele de *E.coli* trebuie aduse într-o stare artificială de competență prin aplicarea unui tratament chimic. Cea mai simplă metodă a fost descoperită în anul 1970 și constă în utilizarea clorurii de calciu. După realizarea transformării, celulele care conțin vectorul sunt selectate, cel mai frecvent, **prin utilizarea proprietăți specifice codificate de către markerul de selecție al plasmidului (de exemplu rezistența la antibiotice).**



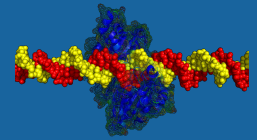
Exprimarea genelor clonate

Clonarea unui fragment de ADN într-un vector permite izolarea și multiplicarea respectivului fragment odată cu vectorul. Dacă fragmentul conține toată regiunea codificatoare a unei gene, informația genetică conținută de CDS poate fi utilizată pentru a sintetiza proteina codificată. Cel mai frecvent fragmentul clonat este pus sub controlul **secvențelor reglatoare existente pe plasmidul de expresie**. Acest lucru permite controlul strict al momentului și nivelului de expresie a genei clonate. Secvențele reglatoare din structura plasmidelor de expresie sunt obținute prin inginerie genetică și permit atingerea unor nivele de expresie ce depășesc viteza de siteză nativă din celule. Din acest motiv, spunem despre genele clonate că sunt **supraexprimate**.

În procesul de clonare cele mai frecvent CDS suferă mici modificări (prin crearea situsurilor de restricție de exemplu), de proteinele produse vor avea o secvență diferită de cele native – **proteine recombinante**.



Structura unui plasmid de expresie

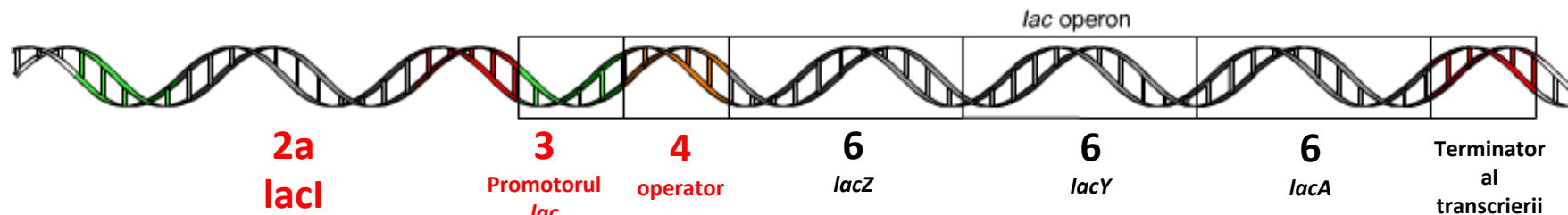


Exprimarea genelor clonate

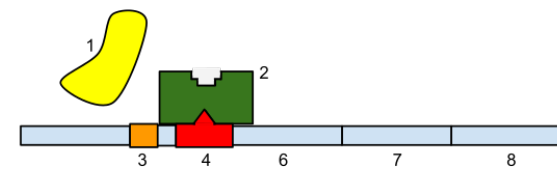
De departe cel mai folosit sistem pentru supraexpresia și obținerea proteinelor recombinante este bacteria *E. coli*, datorită faptului că necesită pentru cultivare o dotare foarte simplă și medii de cultură relativ ieftine.

Supraexpresia unei proteine recombinante în *E. coli* este strict dependentă de vectorii plasmidiali de expresie. Gena clonată în acești vectori este pusă sub controlul unui promotor puternic ce permite o verificare foarte strictă a intensității și momentului expresiei. Cei mai importanți promotori utilizabili în *Escherichia coli* sunt *lac*, *tac* și *lacUV5* din sistemul T7.

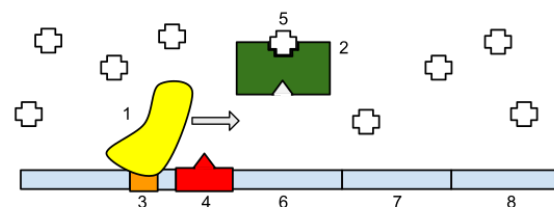
Structura și funcționarea operonului *lac*



Operonul *lac* represat



Operonul *lac* activat



1. - ARN polimeraza

2 – represorul *lacI*, codificat de 2a

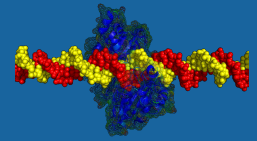
3 – promotorul operonului *lac*

4 - operator

5 – lactoză sau IPTG

6, 7, 8 – orf-uri ce codifică enzime din calea de degradare a lactozei

Elementele marcate cu roșu sunt prezente în plasmidele de expresie ce folosesc promotorii *lac*



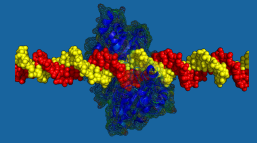
Exprimarea genelor clonate

Un promotor este absolut necesar, dar nu și suficient pentru a asigura un nivel bun de expresie al unei proteine exogene. Alte 2 componente necesare pentru asigurarea expresia unei proteine recombinante în *E. coli* sunt:

1. **existența unui semnal de terminare a transcrierii eficient**, ce asigură o mai mare stabilitate a ARN-ului mesager;
2. **diminua procesele de proteoliză**. *E. coli* prezintă numeroase sisteme proteazice localizate în citoplasmă, periplasmă sau asociate cu membranele externă și internă care au rolul de a inactiva proteinele exogene. Utilizarea unor tulpini de *E. coli* modificate genetic precum BL21, alături de cultivarea la temperaturi scăzute sunt două abordări care pot fi utilizate pentru a diminua neajunsurile fenomenelor de proteoliză.

E. coli este un organism procariot și din acest motiv utilizarea sa pentru producerea de proteine din EK prezintă o serie de dezavantaje. Celulele de *E. coli* nu pot procesa introni, nu pot realiza modificări post-transcriere complexe, precum glicozilarea, miristilarea, fosforilarea, nu pot forma un număr mare de punți disulfidice și nu prezintă sistemele specifice de tip chaperones necesare asamblării moleculelor multimerice. Șansele de obținere a unei proteine cu structură tridimensională nativă atunci când este supraexprimată în *E. coli* cresc dacă:

1. **organismul din care provine gena clonată este mai apropiat filogenetic de *E. coli***;
2. **proteina are masă moleculară redusă**, mai mică de 70 kDa;
3. **proteina nu are resturi de cisteină libere**;
4. **proteina nu are mai mult de 3-4 punți disulfidice intramoleculare**;
5. **nu necesită modificări post-transcriere** pentru activitate sau solubilitate.

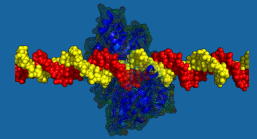


Condiții ce influențează supraexpresia

În general, pentru a mări randamentul de purificare și pentru a obține rapid cantități mari de proteină pură este de dorit ca gena clonată să fie exprimată cât mai puternic. Prin utilizarea unor promotori puternici precum *tac* sau *lac*, nivelul de expresie atins este ridicat și poate duce la destabilizarea întregului mecanism de sinteză proteică a celulei bacteriene. Ca măsură de apărare, celulele de *E. coli* depozitează proteina supraexprimată sub forma unor **corpi de incluziune**. Aceștia reprezintă **aglomerări masive cuprinzând, în general, o singură proteină inactivă, depliată**.

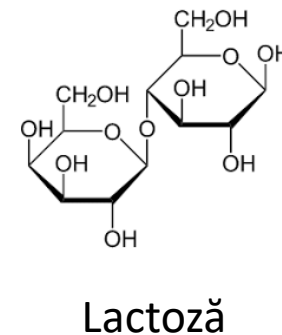
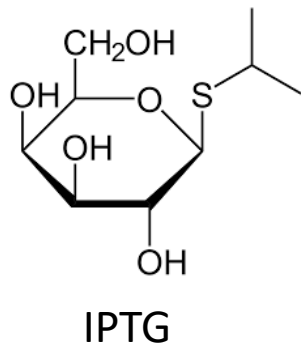
Esențial pentru producerea proteinelor recombinante în *E. coli* este realizarea unui echilibru între intensitatea expresiei și solubilitatea acestora. Acest echilibru poate fi controlat prin variația unor parametri de cultivare a microorganismului precum:

- **temperatura de cultivare** – temperaturi mai joase frânează metabolismul microorganismului și asigură nivele de expresie mai reduse; în general, se pornește de la temperatura de 35°C și se coboară gradual cu câte 2-3°C până la valoarea de 20°C; odată cu reducerea temperaturii perioada de incubare va trebui prelungită;
- **nivelul de agitare** – în timpul cultivării agitarea poate să influențeze solubilitatea proteinei supraexprimate prin nivelul de aerare al culturii care, la rândul său, influențează viteza sintezei proteice; în general, se utilizează o viteză de rotație de 190 rpm care poate fi diminuată, după caz, până la 90 rpm;

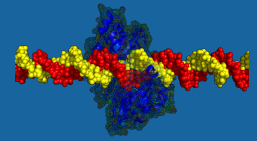


Condiții ce influențează supraexpresia proteinelor recombinante

- **nivelul de inducere a expresiei** – este controlat prin concentrația de agent inductor adăugat în mediu; pentru promotorii *lac* și *tac* agentul inductor este un derivat artificial al lactozei, izopropil β -D-1-tiogalactopiranozid sau prescurtat IPTG; cel mai frecvent, concentrația de IPTG utilizată în mediul de cultură este 1 mM, dar aceasta poate fi redusă până la 10 μ M;



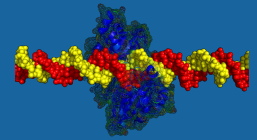
- **compoziția mediului de cultură** – adăugarea în mediul de cultură a unor agenți care produc stres osmotic precum sorbitol sau betaină poate conduce în unele cazuri la îmbunătățirea solubilității unor proteine exprimate sub formă de corpi de incluziune;
- **tulpina de *E. coli* utilizată** – distribuitori precum NEB, Fermentas sau Roche oferă o gamă variată de tulpini de *E. coli* modificate special pentru a permite expresia proteinelor exogene; astfel, tulpina BL21 (DE3) este recunoscută ca fiind mai indicată pentru producerea de proteine recombinante decât XL1 Blue.



Purificarea proteinelor prin IMAC

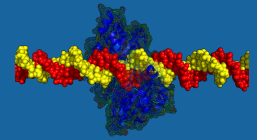
Proteinele se caracterizează printr-o variabilitate mare atât a structurii, cât și a proprietăților specifice. Din acest motiv a fost imposibil până acum să se realizeze un protocol de purificare valabil fără echivoc pentru orice moleculă proteică. Cunoștințele acumulate în domeniul purificării proteinelor au permis cel mult conturarea unor reguli și principii generale de urmat în scopul adaptării unei metode de purificare la proprietățile fizico-chimice ale proteinei de interes.

Revoluția produsă de tehnicile ADN-recombinat în biologia moleculară s-a resimțit în domenii extrem de variate, printre care și cel al purificării proteinelor. Tehnicile de manipulare a ADN-ului permit acum cercetătorului să modifice secvența și implicit structura proteinei de purificat pentru a-i conferi proprietăți specifice care să faciliteze purificarea. În acest sens, una dintre cele mai utilizate tehnici este cea care se bazează **pe atașarea la unul din capetele C sau N terminale ale proteinei de interes a unei „cozi” cu afinitate pentru suporturi imobilizate.** Această „coadă” are dimensiuni variate, putând fi reprezentată fie de un întreg domeniu proteic, fie doar de un fragment de câțiva aminoacizi. Proteina recombinată obținută va prezenta aceeași afinitate ca și „coada” pe care o conține, putând fi astfel purificată prin tehnici specifice



Exemple de cozi de fuziune

“Cozi” de fuziune	Metodă de purificare
Domenii proteice de fuziune	
MPB ¹	Afinitate față de amiloză
Glutation S-transferaza	Afinitate față de glutation
Proteina A	Afinitate față de IgG
Represorul lac	Afinitate față de operatorul lac
GBP ²	Afinitate față de galactoză
Cozi polipeptidice de fuziune	
Poli-His	IMAC ³
Poli-Asp	Cromatografie pe rășini anionice
Poli-Arg	Cromatografie pe rășini cationice
Poli-Cys	Afinitate pentru grupări tiolice
Strep-tag II	Afinitate pentru avidină sau streptavidină
¹ MBP—engl. Maltose-Binding Proteine ² GBP —engl. Galatose-Binding Protein ³ IMAC —cromatografie de afinitate pentru metale imobilizate (engl. Immobilized Metal Affinity Chromatography)	

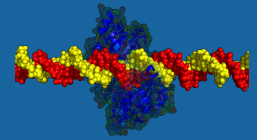


Purificarea proteinelor prin IMAC

Foarte intens utilizată pentru purificarea proteinelor este așa numita „**coadă**” **poli-His**, reprezentată printr-o polipeptidă **conținând 6-8 reziduuri de histidină cu afinitate foarte mare pentru Ni^{2+} sau Co^{2+}** . Față de celelalte „cozi” proteice sau polipeptidice, polipeptida poli-His are marele avantaj al dimensiunilor deosebit de mici. Aceasta face ca modificările aduse structurilor secundare și terțiare ale proteinei de purificat să fie minime și, drept urmare, modificările activității enzimatică native a proteinei purificate să fie extrem de reduse. Au fost semnalate și cazuri foarte rare în care coada are un efect benefic, măbind activitatea proteinei. Deși nu foarte frecvent, au fost raportate și situații în care efectul este unul negativ, ducând la diminuarea activității biologice.

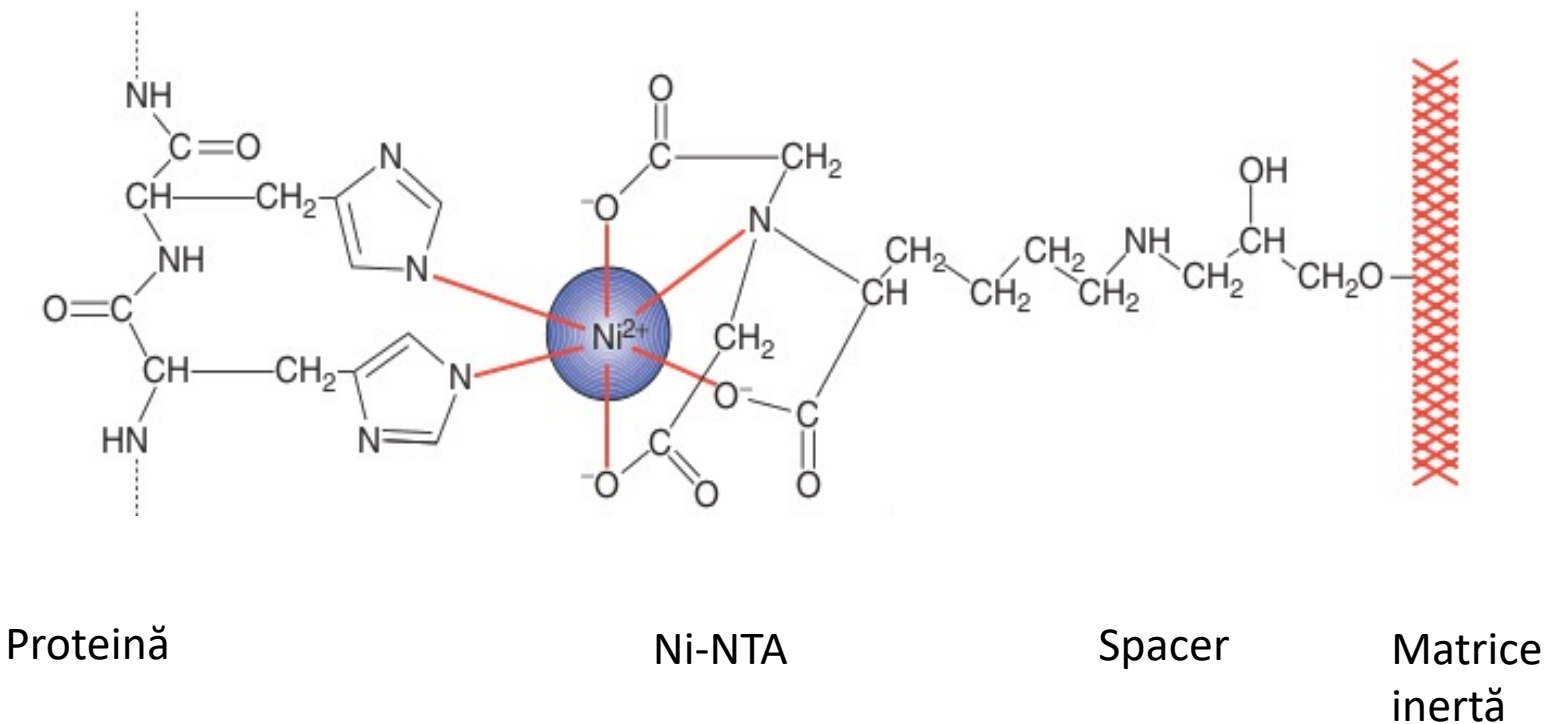
Tehnica de purificare care se bazează pe „coada” polipeptidică poli-His a fost descrisă pentru prima dată în anul 1975 și se bazează pe afinitatea pentru metalele tranziționale pe care această coadă o conferă proteinelor recombinante. Denumirea metodei de purificare este **cromatografie de afinitate pentru metale imobilizate** (engl. **Immobilized Metal Affinity Chromatography** –IMAC).

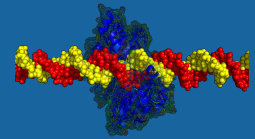
Întreaga separare cromatografică are la bază o matrice inertă pe care sunt imobilizați ionii unor metale tranziționale (Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} sau cel mai frecvent Ni^{2+}). Matricea suport este confecționată dintr-un material puternic hidrofil, inert din punct de vedere chimic și rezistent la atacul microorganismelor. Materialele cel mai frecvent utilizate pentru suportul cromatografic sunt **agaroza** și **Sephadex-ul** sub forma unor fragmente sferice, rigide și uniforme cu diametrul de 5-50 μm . Pe acest suport se fixează covalent **o grupare ce are proprietatea de a chelata ionul metalic**.



Purificarea proteinelor prin IMAC

Prima grupare chelatantă descrisă a fost **acidul nitrilotriacetic** (NTA), grupare ce este utilizată foarte frecvent și astăzi. NTA are 4 situsuri de coordonare și poate astfel lega foarte puternic ionii metalelor tranziționale. Suportul cromatografic cunoscut comercial sub denumirea de Ni-NTA se obține prin imobilizarea ionilor Ni^{2+} pe NTA. Prin legarea sa de matricea inertă, ionul Ni^{2+} își ocupă patru din cele șase valențe, celelalte două valențele rămase libere putând interacționa cu inelul imidazolic al resturilor de histidină de pe catena polipeptidică sau de pe coada poli-His.

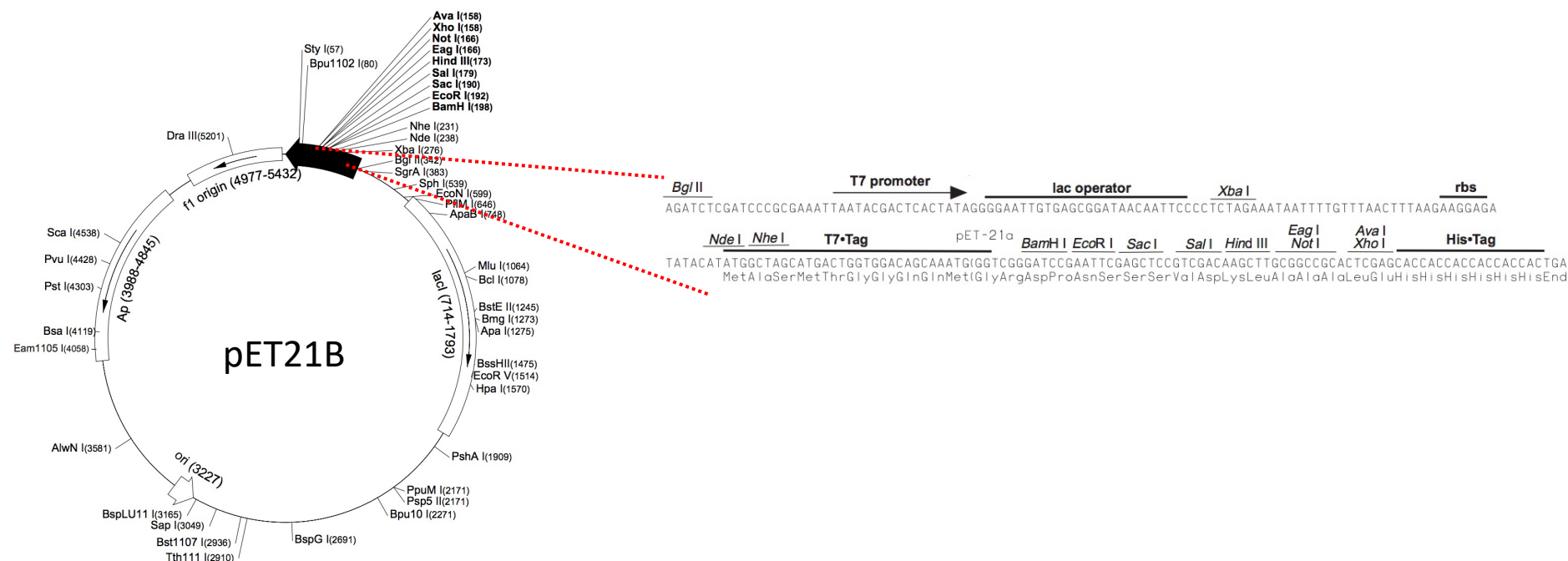




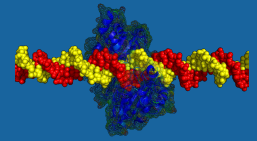
Purificarea proteinelor prin IMAC

Purificarea unei proteine recombinante prin IMAC presupune parcurgerea a **trei etape** distincte:

- clonarea genei care codifică proteina de interes în vectori de expresie specifici**– permite nu doar modificarea secvenței de aminoacizi a proteinei de interes în scopul introducerii cozii poli-His, ci și expresia ei controlată în organisme gazdă specifice (cel mai frecvent *E. coli*);



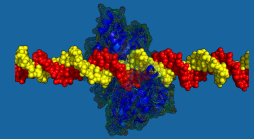
Vector ce permite expresia proteinelor recombinante cu o coadă polihistidinică și structura MCS



Purificarea proteinelor prin IMAC

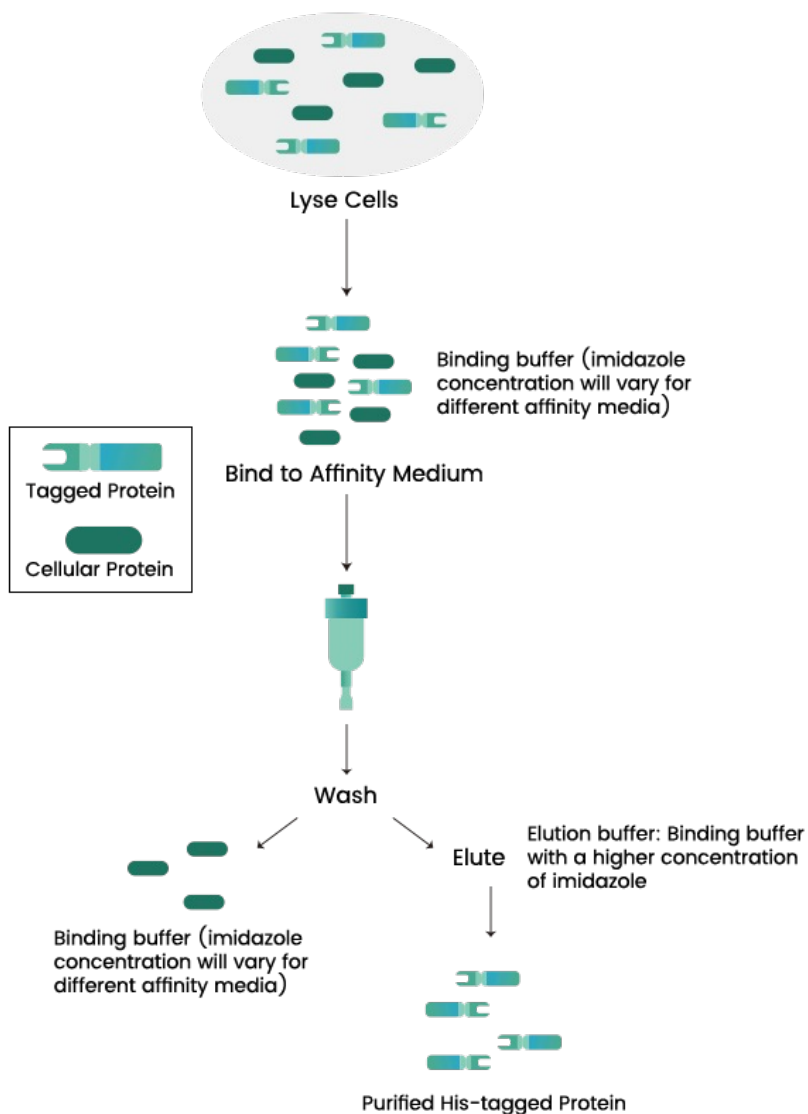
2. **identificarea condițiilor optime de supraexpresie a proteinei recombinante în organismul gazdă și testarea solubilității acesteia** – supraexpresia în organisme gazdă, altele decât cel din care provine proteina de interes, permite acumularea acesteia și obținerea unui randament de purificare bun; dezavantajul este că, uneori, pot apărea probleme privind stabilitatea și mai ales solubilitatea proteinei de interes; din acest motiv este esențială o etapă de selecție a condițiilor optime de expresie;
3. **expresia și purificarea propriu-zisă** – în funcție de solubilitatea proteinei țintă, purificarea prin IMAC se poate realiza în condiții native sau în condiții denaturante; în acest ultim caz, după purificare, este necesară introducerea unei etape suplimentare de repliere a proteinei în forma sa nativă.

Metode detaliate pentru fiecare dintre aceste etape sunt prezentate pe larg în Marius Mihășan • Marius Ștefan Zenovia Olteanu - Biologie Moleculară. Metode experimentale, Editura universității Alexandru Ioan Cuza din Iași; ISBN: 978-9737038166, pg. **181-201**



Purificarea proteinelor prin IMAC

Schema generală a purificării pp-zise prin IMAC



Avantaje:

- permite purificarea unor cantități de proteină de ordinul miligramelor;
- permite obținerea unui nivel de puritate foarte mare (90-95%) prin aplicarea unei singure etape de cromatografie;
- proteinele purificate au structura tridimensională nativă și funcția intacte.

Limitări:

- pentru a mări afinitatea cozii poli-His față de Ni^{2+} , faza mobilă are un conținut relativ mare de NaCl ceea ce poate duce la precipitarea unor proteine solubile prin fenomenul de salting-out;
- eluția se realizează cu imidazol în concentrații relativ mari (200-500 mM) ceea ce poate duce la precipitarea proteinei izolate; de asemenea, imidazolul este un puternic inhibitor al unor enzime precum monoamin-oxidazele;