



FUNKČNÍ VZOREK

**Plasmid pUbEx20 k produkci proteinů
pro komerční využití v heterologním
expresním systému *E.coli***

**RNDr. Lubomír Janda, Ph.D.
Mgr. Šárka Kobzová
Mgr. Adam Norek, Ph.D.**

5792
2019

Funkční vzorek 5792/2019

Plasmid pUbEx20 k produkci proteinů pro komerční využití v heterologním expresním systému *E.coli*.

Autoři:

RNDr. Lubomír Janda, Ph.D.

Mgr. Šárka Kobzová

Mgr. Adam Norek, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu: "Rozvoj systému podpory Proof - of - concept na VÚVeL" TG03010038. Dílčí projekt s názvem Vývoj vlastního heterologního produkčního a purifikačního systému pro hůře exprimovatelné proteiny v *E. coli*“ v rámci programu Technologické agentury ČR - program GAMA.

2019

ISBN 978-80-88233-86-2

Obsah

1	Úvod	3
2	Předmět funkčního vzorku	4
3	Vlastní popis funkčního vzorku	4
	Vlastní sekvence plasmidu	4
	Ověření funkčnosti konstruktů.....	7
4	Srovnání novosti postupů.....	9
5	Uplatnění funkčního vzorku	9
6	Ekonomické aspekty.....	9
7	Seznam použité literatury	9
8	Dedikace	10

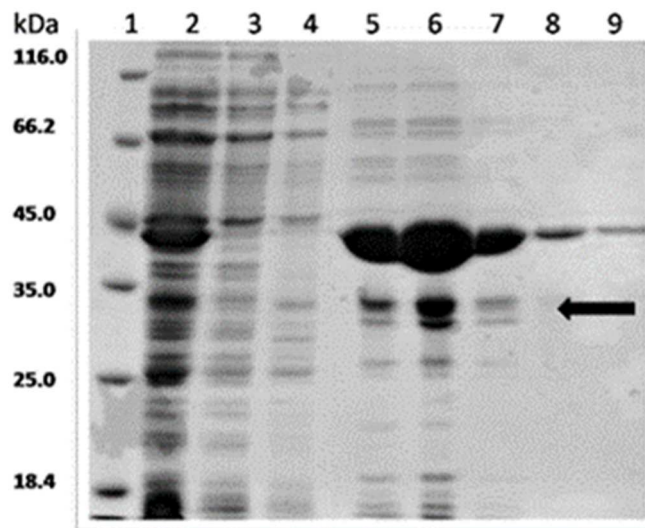
1 Úvod

Využití expresních plasmidů s inkorporovaným genem zájmu je jednou z nejčastějších technologií používanou pro produkci rekombinantních proteinů. Vnesení expresního vektoru do produkčního organismu a následná indukce tvorby proteinu ovšem může představovat značnou metabolickou zátěž vedoucí k nežádoucím efektům jako je tvorba inkluzních tělísek, zpomalení růstu či potlačení produkce cílové molekuly. K odstranění těchto nežádoucích efektů se využívají postupy pro optimalizaci kultivačních podmínek, jež jsou ovšem velmi náročné na časové, materiální a personální náklady. Zvláště v podmínkách poloprovozní či průmyslové produkce, kde je postup kultivace do značné míry dán technologickými podmínkami provozu, je snížení počtu proměnných v optimalizačním procesu nanejvýš žádoucí. (1, 4)

Tento proces v sobě zahrnuje nejen nalezení ekonomicky nejvýhodnějších podmínek pro růst samotného produkčního organismu, ale také omezení negativního dopadu vnesené genetické informace, indukce tvorby proteinu, zátěže spojené s nadměrnou transkripcí a translací, zahlcení kaskád umožňující transport a sbalení proteinu, dostupnost metabolitů a dalších podmínek zaručujících produkci proteinu v maximální míře a kvalitě. Optimalizace exprese proteinů založená na zhodnocení vlivu tzv. klíčových komponent kultivačního postupu je velmi dobře zvládnutelná v laboratorních podmínkách, kde základní limity představují zejména časový vklad a počet zvažovaných proměnných, u nichž sledujeme dopad na produkční schopnosti. V průmyslových, velkoobjemových, měřících je ovšem optimalizace limitována i praktickými aspekty provozu, jako jsou stávající technologie, dodavatelský řetězec, legislativní podmínky a výrobní normy, které jsou často nadřazené efektivnosti produkce. Z tohoto důvodu jsou postupně zaváděny expresní vektory a produkční kmeny, které do jisté míry snižují nutnost optimalizace některých parametrů mající vliv zejména na metabolický stres spojený s replikací vneseného plasmidu, transkripcí, translací a také s rychlostí sbalení exprimovaných proteinů a jejich rozpustností. Expresní vektor pro svoje fungování potřebuje počátek replikace (ori), selektovatelný marker (gen pro rezistenci) a vhodné místo pro inzerci genu jako je mnohočetné klonovací místo (MCS – multiple cloning site). (1, 2, 3, 4)

Prvním typem obecně platné úpravy expresního vektoru je vnesení rozdílných počátků replikace (pMB1, pSC101, pUC, ColE1), jež jsou díky rozdílu v regulaci replikace zodpovědné za finální počet kopií plasmidu v jednotlivé buňce mikroorganismu. (5, 6, 7, 8) Například pUC, pGEM vektory patří mezi vysokokopiové (až 700 kopií plasmidu na buňku), oproti tomu pMB1 nebo pSC101 patří k počátkům replikace s velmi nízkým počtem plasmidů na buňku (jednotky kopií). Celkový počet kopií pak má dopad nejen na velikost zátěže způsobené samotnou replikací vneseného plasmidu, ale i na rychlost produkce indukovaného proteinu při totožném množství induktoru a tím potažmo na potencionální přetížení translačního aparátu buňky a tvorbě nesprávně sbalených proteinů či jinak pozměněných molekul. Dalším typem časté modifikace expresního vektoru je zavedení fúzních proteinů, které usnadňují sbalování proteinu a prevenci vzniku nerozpustných agregátů např. GST, MBP, NusA, thioredoxin, ubikvitin, SUMO, GB 1. Tyto fúzní proteiny jsou často vybaveny afinitní kotvičkou (např. HisTag), které usnadňují purifikaci a také místem pro jejich odštěpení specifickou proteázou. Tyto a další modifikace expresních vektorů pak mají za cíl zvyšovat produkční kapacitu hostitelských mikroorganismů ve prospěch proteinu zájmu a minimalizovat nároky na optimalizační proces a usnadňovat purifikaci. Díky spolupráci s Vladimírem Rogovem (Goethe University Frankfurt), jsme připravili novou variantu expresního plasmidu (pUbEx15). Tento plasmid obsahuje kromě replikačního počátku (pMB1) také „univerzální“ fúzní protein s ubikvitinem. Jeho využitím došlo v prokaryotickém heterologním systému *E. coli* k výraznému posunu účinnosti exprese a purifikace. Z původní varianty plasmidu nesoucí

ubikvitin (pETM60 Ub) (9) se vylepšila afinita na His.TRAP kolonce a zvýšila se efektivita odštěpování fúzního proteinu díky vylepšení sekvence pro TEV proteázu. Tento plasmid byl připraven v rámci projektu „ Transfer technologií“ na Masarykově univerzitě; CZ.1.05/3.1.00/10.0216. Tento plasmid obsahoval na konci genu pro ubikvitin dva glyciny a za His.Tag místem tři glyciny. Tento plasmid byl konstruován pro odstranění fúzního proteinu pomocí Usp2 proteázy. Tato proteáza štěpí místa obsahující dva a více glycinů. Hostitelský kmen *E. coli* BL21 však přirozeně obsahuje gen pro endogenní proteázu ElaD. Plasmid pUbEx15 proto vykazoval díky této proteáze částečné odštěpení fúzního proteinu, což snížilo výtěžnost plasmidu.



Obrázek 1: Expese proteinu v plasmidu pUbEx15. Šipka na obrázku ukazuje produkt spontánně odštěpený díky endogenní proteáze ElaD

2 Předmět funkčního vzorku

Cílem předkládaného projektu bylo ověřit produkční potenciál nově definovaného expresního systému pUbEx20, umožňujícího produkci různých heterologních proteinů v *E. coli* s využitím standardizovaného kultivačního postupu. Souběžně byl získán přístup k expresnímu systému nezátíženého licenčními poplatky.

3 Vlastní popis funkčního vzoru

Vlastní sekvence plasmidu

>pUbEx20 (+)

5607 nt

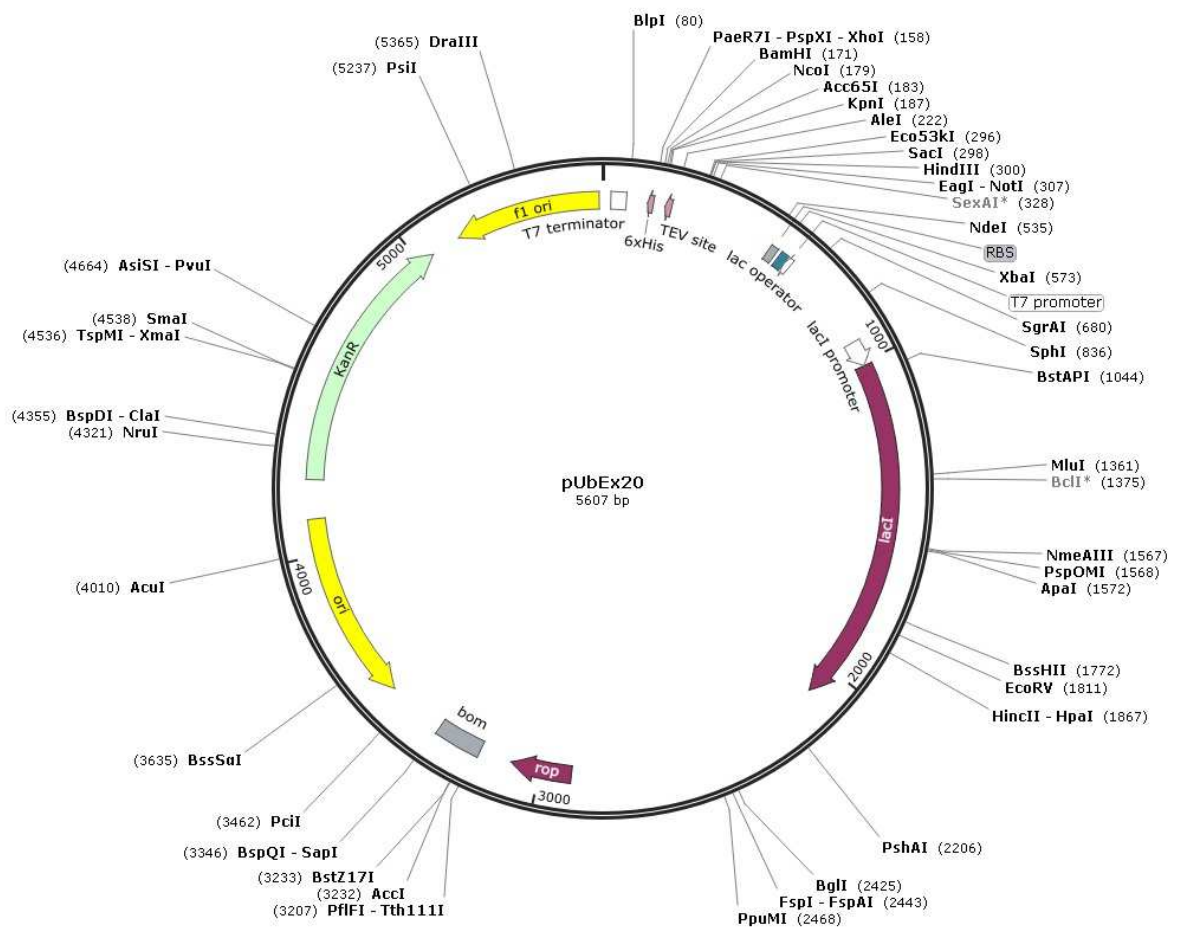
```

ATCCGGATATAGTTCCTCCTTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGTTATGCTAGTTATTGC
TCAGCGGTGGCAGCAGCCAACCTCAGCTTCCTTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGC
GACTGCGGCCGCAAGCTTGAGCTCCTGCAGCGGATCCAACCATGGTACCAGAACCAGACTGGAAGTACAGGTTTTTCGGCA
CCAGAGTGGTGGTGAGAACCAGAGTGGTGGTGGTACCCGTTGGTGGTGACCAGAGTGGTGGTGGTGGGCAGACTCGAG
CTGCAGAACCAGGTGCAGGGTAGATTCTTTCTGGATGTTGTAGTCAGACAGGGTACGACCGTCTTCCAGCTGTTTACCCG
CGAAGATCAGTTCCTGCTGGTCCGGCGGGATACCTTCTTTGTCCTGGATTTTCGCTTTAACGTTTTTCGATGGTGTCCAGAC
GGTTCAACTTCCAGGGTGATGGTTTTTACCGGTCAGGGTTTTAACGAAGATCTGCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTA
AACAAAATTATTTCTAGAGGGGAATTGTTATCCGCTCACAATCCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGCGGGATCGAG
ATCTCGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGA
CATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCCGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCCG
TGGCCGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGATGCACCATTCCTTGCGGCGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTA

```

CTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGAGATCCCGACACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTC
GCGGTATGGCATGATAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTACAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGCA
GAGTATGCCGGTGTCTTATCAGACCGTTTCCCGCTGGTGAACCAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGGAAAA
AGTGGAAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCTGA
TTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTCGCAAAATTGTCGCGGCGATTAAATCTCGCGCCGATCAACTG
GGTGCCAGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCA
ACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACTAATGTTT
CGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGC
GTGGAGCATCTGGTCGATTGGGTACCAGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCATTAAAGTCTGTCTCGGCGCGTCTGCG
TCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGT
CCGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCG
CTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGCGCGTTGGTGGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGA
AGACAGCTCATGTTATATCCCGCGTTAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCT
TGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCGTCTCACTGGTAAAAGAAAAACCACCCTG
GCGCCAAATACGCAAAACCGCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCAGCAGGTTTCCCGACTGGA
AAGCGGCGAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTAAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCGGATCTCGACCGATGCCCTTGAGA
GCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGACTTATGACTGTCTCTTTATCAT
GCAACTCGTAGGACAGGTGCCGCGAGCGCTCTGGGTCAATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCG
GCCTGTGCTTGGGTATTGGAATCTTGCACGCCCTGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAACGTTTCGGC
GAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCCTGTGCTTGGAGACCCGGCTAGG
CTGGCGGGGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGAGCGAACGTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGT
CTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGTCTTCCGTTTCCGTGTTTCGTAAGTCTGGAAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGC
ACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTG
GCATTGACCCTGAGTGATTTTTCTGTTCCCGCGCATCCATACCGCCAGTTGTTTACCCTCACAACGTTCAGTAACC
GGCATGTTTATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCGTTTTCATCGGTATCATACCCCATGAACAGAAAT
CCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCAAACAGGAAAAAACCGCCCTTAAACATGGCCCGCTTATCAGAAGCCAGACATT
AACGCTTCTGGAGAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGTTTACGACCACGCTGATG
AGCTTACCGCAGCTGCCTCGCGGTTTCGGTGTGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACA
GCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGC
CATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCA
CCATATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCTGCTCAC
TGACTCGCTGCGCTCGTCTGGTGGTGGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAT
CAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCG
TTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCAGCGTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT
ATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGT
CCGCTTTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCG
TCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCCGCGACCGCTGCGCCTTATCCGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAA
CCCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA
CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTT
ACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCA
GCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAA
ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATAACAAGGGGTGTTATGAGCCA
TATTCAACGGGAAACGCTTTGCTCTAGGCCGCGATTAATTTCAACATGGATGCTGATTATATGGGTATAAATGGGCTC
GCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACAT
GGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGAC
CATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTACCACTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCAGGTAT
TAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCATTTCGATTCTGTT
TGTAATGTCCTTTTAAACAGCGATCGGTATTTTCGCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGC

GAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGAAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCAC
 CGGATTCAGTCGTCACACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGAT
 GTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCATATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATT
 ACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGT
 TTTTCTAAGAATTAATTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAAAATAGGGGTTCGCGCACATT
 TCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATTTGTAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCAT
 TTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTGTTCCA
 GTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCC
 ACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCC
 CCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGG
 GCGTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCA
 TTCGCCA



Obrázek 1: Plasmidová mapa heterologního expresního *E. coli* vektoru. Ori – replikační počátek, KanR – gen pro kanamycinovou rezistenci, lacI – gen pro laktósový represor. Mapa obsahuje rozmístění restričních míst vůči začátku plasmidu.

BglII T7 promoter lac operator XbaI
 agatctcgatcccgcgaaatTAATACGACTCACTATAGGGgaattgtgagcggataacaattcccctctagaaataattttgtttaactt
 T7 PROMOTER PRIMER

rbs NdeI BglIII Ubiquitin gene
 taagaaggagatatacatatgcagatcttcggttaaaccctgaccggtaaaccatcacctggaagttgaaccgtctgacaccatcgaa
 M Q I F V K T L T G K T I T L E V E P S D T I E

aacgtaaagcgaataatccaggacaaagaaggtatcccgccggaccagcaggaactgatcttcgcggttaaacagctggaagacggtcgt
 N V K A K I Q D K E G I P P D Q Q E L I F A G K Q L E D G R

PstI XhoI 14 His Tag
 accctgtctgactacaacatccagaaagaatctaccctgcacctggttctgcagctcgagtctgccaccaccaccactctggtcaccac
 T L S D Y N I Q K E S T L H L V L Q L E S A H H H H S G H H

14 His Tag TEV site KpnI NcoI
 cacaccggtcaccaccaccactctggttctcaccaccactctggtgccgaaaacctgtacttccagtctggttctggtaccatggttggg
 H T G H H H H S G S H H H S G A E N L Y F / Q S G S G T M V G

BamHI PstI SacI HindIII NotI
 tccgctgcaggagctcaagcttgcggccgcagtcgagcaccaccaccaccactgagatccgctgctaacaagcccgaaggaagc
 S A A G A Q A C G R S R

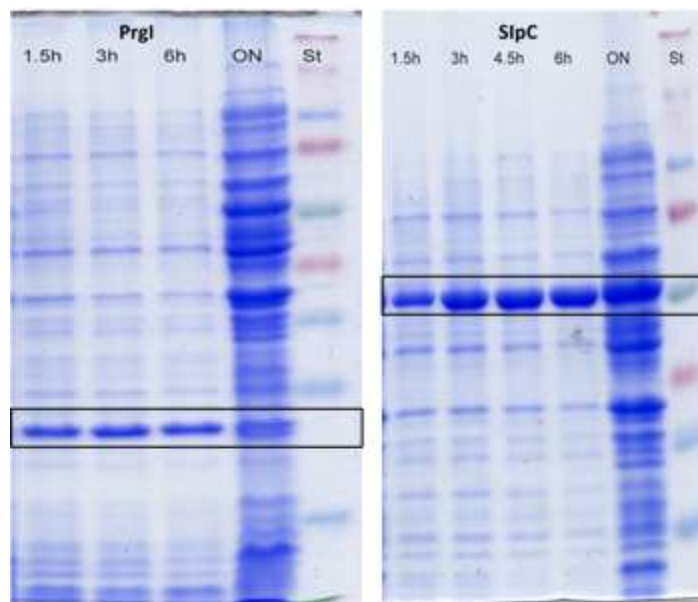
H H H H H H stop

T7 terminator
 tgagttggctgctgccCGCTGAGCAATAACTAGCAtaaccccttgggcctctaaacgggtcttgaggggttttttgctgaaagaggg
 T7 TERMINATOR PRIMER

Obrázek 2: Detail sekvence zobrazující důležité komponenty plasmidu jako je His Tag kotvička či gen pro ubikvitin v klonovacím místě.

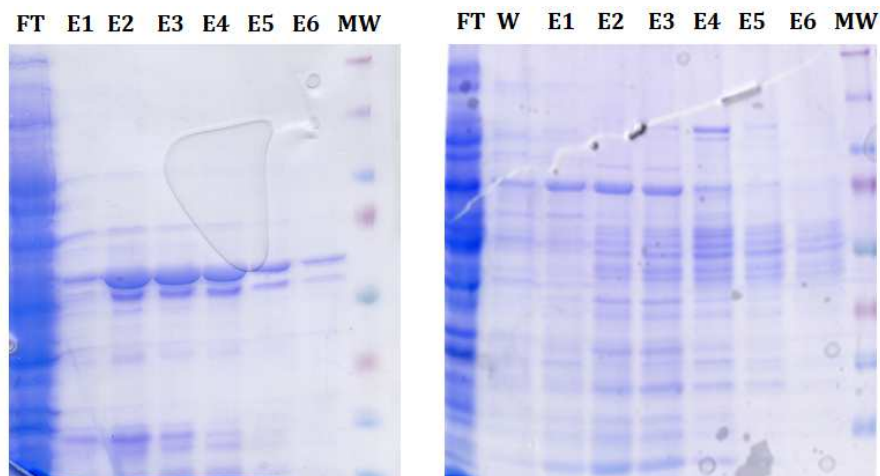
Ověření funkčnosti konstruktů

Příklad 1. Plasmid pUbEx20 byl použit pro přípravu dvou náročně exprimovatelných proteinů z bakterie *Salmonella typhimurium* (SlpC a PrgI), které se nepodařilo naklonovat v běžně dostupných plasmidech. Oba proteiny se podařilo nadprodukovat v dostatečné koncentraci pro další práci (TAČR gama, J. Gebauer)



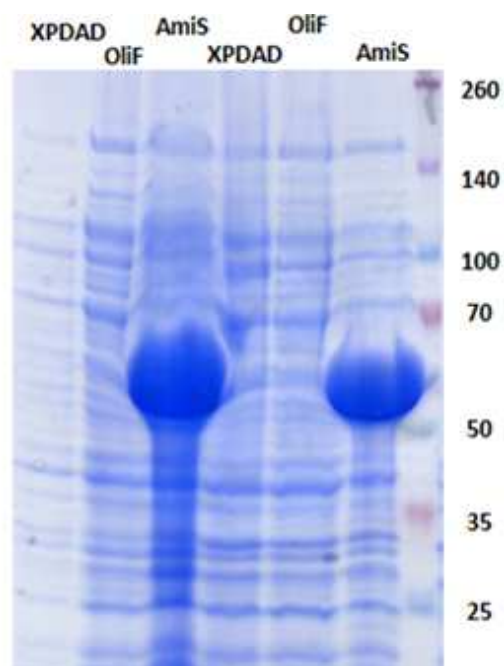
Obrázek 4: Expresse proteinu PrgI v různých časech a přes noc (SDS_PAGE vlevo). Expresse proteinu SlpC v různých časech a přes noc (SDS-PAGE vpravo).

Příklad 2. Plasmid pUbEx20 byl použit pro přípravu katalytické a C- koncové části CDK13 proteinu z myši domácí (*Mus musculus*). Oba proteiny se podařilo nadprodukovat v dostatečné koncentraci pro další práci



Obrázek 5: Expres katalytické domény myši CDK13 (SDS_PAGE vlevo) a C-koncové domény CDK13 (SDS-PAGE vpravo). FT – protein nezachycený na koloně, E1a E3 – eluce pomocí 150 mM imidazolu, E4 a E6 – eluce pomocí 300 mM imidazolu.

Příklad 3: Dále byly do plasmidu pUbEx20 klonovány geny z G+ bakterie *Lactobacillus salivarius* a to gen pro Oligopeptidázu F, gen pro Aminopeptidázu S a gen pro X-prolyl dipeptidyl aminopeptidázu. Všechny tři enzymy mají za standartních podmínek odlišnou výši exprese, která se při expresi projevila. Nejvyšší produkce byla u aminopeptidázy S, kde je produkce enzymu více jak 50%. U genu pro Oligopeptidázu F a genu pro X-prolyl dipeptidyl aminopeptidázu je potřeba upravit kultivační a expresní podmínky (teplota, čas indukce, apod.).



Obrázek 6: Expres tří exprimovaných proteinů X-PDAD (X-prolyl dipeptidyl aminopeptidázy), OliF (Oligopeptidázy F) a AmiS (Aminopeptidázy S). První tři vzorky byly indukovány po dobu 8h. Druhé tři vzorky byly indukovány po dobu 24h.

4 Srovnání novosti postupů

- Plasmid pUbEx20 byl upraven od plasmidu pUbEx15 v sekvenci kódující dva za sebou následující glycinu a to v místě za genem pro ubikvitin (obr. 3):
 - původní sekvence pUbEx15: -L-E-G-G-H-
 - nová sekvence pUbEx20: -L-E-S-A-H-
- a v sekvenci za His.Tag místem: původní sekvence pUbEx15: -S-G-G-G-T-M-
 - nová sekvence pUbEx20: -S-G-S-G-T-M-
- Dále bylo upraveno klonovací místo (MCS – Multiple cloning site), aby lépe vyhovovalo klonovací strategii (obr. 3).
- Původní pořadí míst pro restrikční nukleázy
- pUbEx15: KpnI-NcoI-BamHI-EcoRI-SacI-SalI-HindIII-NotI-XhoI
- Nové pořadí míst pro restrikční nukleázy
- pUbEx20 KpnI-NcoI-BamHI-PstI-SacI-SalI-HindIII-NotI

5 Uplatnění funkčního vzorku

Samotný expresní systém pUbEx20 je ze své podstaty univerzální nástroj nacházející se v technologickém postupu přípravy proteinů na samém počátku produkčního schématu a proto jej lze komercializovat přímo prostřednictvím licenční smlouvy o využití s biotechnologickými společnostmi zabývajícími se produkcí proteinů nebo prodejem expresních systémů třetím stranám. Dalším způsobem je nepřímá komercializace v rámci interních projektů kontrahovaného výzkumu zaměřených na přípravu proteinů a možnost komercializovat potencionálně zajímavé proteiny bez zatížení licenčními poplatky třetích stran či využít tento systém pro přípravu antigenů k imunizacím a komercializovat monoklonální protilátky či jiné vazebné molekuly.

6 Ekonomické aspekty

Daný konstrukt je možno prodat třetí straně, anebo je možné jeho použití v rámci pracoviště, což poskytuje možnost používání expresního systému bez vedlejších nákladů. Licenční náklady, vypočítané pro jeden protein s roční opcí se pohybují ve světě od 600 – 900 €.

7 Seznam použité literatury

1. **Jia B, Jeon CO.** High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biol.* 2016; 6: 160196.
<http://dx.doi.org/10.1098/rsob.160196>
2. **Celie P HN, Parret A HA, Perrakis A.** Recombinant cloning strategies for protein expression. *Current Opinion in Structural Biology.* 2016; 38: 145-154, ISSN 0959-440X
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.06.010>.
3. **Singha TK, Gulati P, Mohanty A, Pal Khasa Y, Kapoor RK, Kumar S.** Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: A review. *Process Biochemistry.* 2017; 55: 17-31. ISSN 1359-5113
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.026>.
4. **Ahmad I, Nawaz N, Darwesh NM, ur Rahman S, Mustafa MZ, Khan SB, Patching SB.** Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification.* 2018; 144: 12-18. ISSN 1046-5928
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.11.005>.

5. **Rossi M, Brigidi P, Gonzalez Vara y Rodriguez A, Matteuzzi D.** Characterization of the plasmid pMB1 from *Bifidobacterium longum* and its use for shuttle vector construction. *Research in Microbiology*. 1996; 147: 133-143. ISSN 0923-2508
[https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)80213-0](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)80213-0).
6. **Yamaguchi K, Masamune Y.** Autogenous regulation of synthesis of the replication protein in plasmid pSC101. *MGG Molecular & General Genetics*. 1985; 200(3), 362–367.
doi:10.1007/bf00425718
7. **Jeffrey V, Joachim M.** New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene*. 1991; 100: 189–194. doi:10.1016/0378-1119(91)90365-i
8. **Hershfield V, Boyer HW, Yanofsky C, Lovett MA, Helinski DR.** Plasmid ColE1 as a Molecular Vehicle for Cloning and Amplification of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1974; 71(9): 3455–3459. doi:10.1073/pnas.71.9.3455
9. **Rogov VV, Rozenknop A, Rogova NY, Löhr F, Tikole S, Jaravine V, Güntert P, Dikic I, Dötsch V.** A universal expression tag for structural and functional studies of proteins. *Chembiochem*. 2012 May 7;13(7):959-63. doi: 10.1002/cbic.201200045. Epub 2012 Mar 20.

8 Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu TAČR GAMA TG03010038.

VÚVeL 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz