

Mladá veda

Young Science



Špeciálne vydanie

Mladá veda

Young Science

MEDZINÁRODNÝ VEDECKÝ ČASOPIS MLADÁ VEDA / YOUNG SCIENCE

September 2017 (číslo 4)

Ročník piaty

ISSN 1339-3189

Kontakt: info@mladaveda.sk, tel.: +421 908 546 716, www.mladaveda.sk

Fotografia na obálke: Altenberger Dom, Nemecko. © Branislav A. Švorc, foto.branisko.at

REDAKČNÁ RADA

doc. Ing. Peter Adamišín, PhD. (Katedra environmentálneho manažmentu, Prešovská univerzita, Prešov)

doc. Dr. Pavel Chromý, PhD. (Katedra sociálnej geografie a regionálneho rozvoje, Univerzita Karlova, Praha)

prof. Dr. Paul Robert Magocsi (Chair of Ukrainian Studies, University of Toronto; Royal Society of Canada)

Ing. Lucia Mikušová, PhD. (Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, Slovenská technická univerzita, Bratislava)

doc. Ing. Peter Skok, CSc. (Ekomos s. r. o., Prešov)

prof. Ing. Róbert Štefko, Ph.D. (Katedra marketingu a medzinárodného obchodu, Prešovská univerzita, Prešov)

prof. PhDr. Peter Švorc, CSc., predseda (Inštitút histórie, Prešovská univerzita, Prešov)

doc. Ing. Petr Tománek, CSc. (Katedra verejnej ekonomiky, Vysoká škola báňská - Technická univerzita, Ostrava)

REDAKCIA

PhDr. Magdaléna Keresztesová, PhD. (Fakulta stredoeurópskych štúdií UKF, Nitra)

Mgr. Martin Hajduk (Inštitút histórie, Prešovská univerzita, Prešov)

RNDr. Richard Nikischer, Ph.D. (Ministerstvo pro místní rozvoj ČR, Praha)

Mgr. Branislav A. Švorc, PhD., šéfredaktor (Vydavateľstvo UNIVERSUM, Prešov)

PhDr. Veronika Trstianska, PhD. (Ústav stredoeurópskych jazykov a kultúr FSS UKF, Nitra)

Mgr. Veronika Zuskáčová (Geografický ústav, Masarykova univerzita, Brno)

VYDAVATEĽ

Vydavateľstvo UNIVERSUM, spol. s r. o.

www.universum-eu.sk

Javorinská 26, 080 01 Prešov

Slovenská republika

© Mladá veda / Young Science. Akékoľvek šírenie a rozmnožovanie textu, fotografií, údajov a iných informácií je možné len s písomným povolením redakcie.

VÝPOČET SLOŽENÍ GLYCERINOVÉHO ROZTOKU REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ PRO DLOUHODOBÉ SKLADOVÁNÍ

CALCULATION OF COMPOSITION OF GLYCEROL SOLUTION OF RECOMBINANT
PROTEINS FOR LONG – TERM STORAGE

Jana Vysoká¹

Autorka působí jako asistent na Katedře informatiky a aplikovaných věd při Vysoké škole technické a ekonomické v Českých Budějovicích. Ve svém výzkumu se věnuje tématice matematického modelování a je autorkou disertační práce s názvem Matematické modelování ve výuce na středních školách.

The author works as a lecturer at the Department of Informatics and Applied Sciences at the Institute of Technology and Business in České Budějovice. In her research she deals with the topic of mathematical modeling and is the author of a dissertation entitled Mathematical Modeling in Teaching in High Schools.

Abstract

This article discusses how to easily prepare a stock solution of the protein in desired concentration in the laboratory. Recombinant proteins supplied for production must be kept under conditions which ensure its stability. To increase the stability of proteins in liquid solutions is commonly used glycerol. Glycerol stabilizes the native structure of proteins and prevents their aggregation. Its use allows storage at higher temperatures ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ as compared to $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) and eliminates the necessity of preparing aliquots. Proteins stored without glycerol lose own activity after repeated thawing and refreezing. For long term storage solution is used 25% to 50% of glycerol. When preparing a stock solution of the protein in the laboratory it is necessary to solve the preparation of the solution with the concentration of the protein in liquid solution, the final desired protein concentration and the desired concentration of glycerol. For normal use, therefore it was necessary to create an auxiliary computation table, from which on the basis of input data - the protein concentration, volume of solution with a protein concentration glycerol solution for use, desired glycerol concentration and the desired protein concentration of – it is possible to determine the ratio of the individual components of the prepared solution. Calculating the composition of the solution through the table helps to avoid errors in the preparation of solutions that occur due to too many variables in the input

¹ Adresa pracoviště: RNDr. Jana Vysoká, Vysoká škola technická a ekonomická v Českých Budějovicích, Okružní 10, 370 01 České Budějovice
E-mail: vysoka@vstecb.cz

data or wrong combination of the input data. This procedure can also be successfully recommended for preparation of other solutions with more input variables and conditions. The table was made at the request of laboratory Protean Ltd. and is used with the full satisfaction of all laboratory personnel.

Key words: Recombinant proteins, stability, degradation, storage, storage solution, biologic activity, calculation of glycerol solution composition

Abstrakt

Tento článek se zabývá popisem způsobu, jak lze snadno připravit zásobní roztok proteinu v požadované koncentraci v laboratoři. Rekombinantní proteiny dodávané k produkci musí být udržovány v podmínkách, které zajišťují jejich stabilitu. Pro zvýšení stability bílkovin v kapalných roztocích se běžně používá glycerol. Glycerol stabilizuje nativní strukturu bílkovin a zabraňuje jejich agregaci. Jeho použití umožňuje skladování při vyšších teplotách ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve srovnání s $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) a eliminuje nutnost přípravy alikvotů. Proteiny skladované bez glycerolu ztrácejí svou vlastní aktivitu po opakovaném rozmrazování a zmrazování. Stabilita rekombinantních proteinů použitých pro výrobu léků, vakcín či diagnostických souprav je určujícím faktorem pro jejich životnost. Při přípravě zásobního roztoku proteinu v laboratoři je nutno řešit přípravu tohoto roztoku s ohledem na koncentraci daného proteinu ve vodném roztoku, požadovanou konečnou koncentraci proteinu a požadovanou koncentraci glycerolu. Pro běžné použití tedy bylo potřeba vytvořit pomocnou výpočetní tabulku, ze které se na základě vstupních dat - koncentrace proteinu, objemu roztoku s proteinem, koncentrace glycerolového roztoku k použití, požadované koncentrace glycerolu a požadované koncentrace proteinu – určí poměr jednotlivých složek připravovaného roztoku. Tento výpočet představuje hlavní cíl příspěvku. Tabulka pro výpočet byla vytvořena na žádost laboratoře Protean s.r.o. a jejím cílem bylo usnadnit práci laboratorních pracovníků.

Klíčová slova: Rekombinantní proteiny, stabilita, degradace, skladování, skladovací roztok, biologická aktivita, výpočet složení glycerolového roztoku

Úvod

Rekombinantní proteiny využívané v průmyslu, zdravotnictví či biotechnologiích jsou často vystaveny podmínkám velmi odlišným od jejich přirozeného prostředí, což může vést k jejich inaktivaci či degradaci. Nezbytnou podmínkou komerčního produktu nebo průmyslového procesu je stabilita jeho jednotlivých složek, čímž se řadí ke klíčovým problémům a musí být řešena s ohledem na předpokládané využití těchto makromolekul. Stabilita enzymů může ovlivnit ekonomickou realizovatelnost katalytických procesů. Stabilita rekombinantních proteinů použitých pro výrobu léků, vakcín či diagnostických souprav je určujícím faktorem pro jejich životnost.

Rekombinantní proteiny dodávané k výrobě tedy musí být uchovány za podmínek zajišťujících jejich stabilitu. Pro zvýšení stability proteinů ve vodných roztocích se běžně používá glycerol. Glycerol stabilizuje přirozenou strukturu proteinů a zabraňuje jejich agregaci. Jeho použití umožňuje skladování při vyšších teplotách ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oproti $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) a eliminuje nutnost přípravy alikvotů (malých dávek). Proteiny skladované bez glycerolu

ztrácejí při opakovaném rozmrazení a zamrazení aktivitu. Pro dlouhodobé skladování je používán roztok s 25 – 50 % glycerolem.

Při přípravě zásobního roztoku proteinu v laboratoři je nutno řešit přípravu tohoto roztoku s ohledem na koncentraci daného proteinu ve vodném roztoku, požadovanou konečnou koncentraci proteinu a požadovanou koncentraci glycerolu. Pro běžné použití tedy bylo potřeba vytvořit pomocnou výpočetní tabulku, ze které se na základě vstupních dat - koncentrace proteinu, objemu roztoku s proteinem, koncentrace glycerolového roztoku k použití, požadované koncentrace glycerolu a požadované koncentrace proteinu – určí poměr jednotlivých složek připravovaného roztoku. Tento výpočet představuje hlavní cíl příspěvku.

Faktory ovlivňující stabilitu proteinů

Pro uchovávání glycerolového roztoku je třeba vzít v úvahu některé faktory, které mohou mít vliv na stabilitu proteinů (Berg et al 2002 a Heller et al 1996) jako jsou

- **Teplota**

Většina proteinů má optimum pro svou biologickou funkci kolem 37 °C. Při teplotách nad 43 °C dochází většinou k různému stupni denaturace, nad 55 °C proběhne kompletní denaturace během 1 - 2 hodin a při 95 °C během několika minut. K denuraci a destabilizaci může dojít ovšem i při pokojové teplotě, ale to vlivem dalších faktorů. V přirozeném buněčném prostředí jsou proteiny chráněny dalšími proteiny (tzv. chaperony), které kontrolují složení terciální struktury. Tito "strážci" však v roztoku izolovaného rekombinantního proteinu chybí. Proto je třeba s proteiny pracovat na ledu, aby zůstaly aktivními.

- **Zmrazení a rozmrazení**

Opětovné zamrazování a rozmrazování proteinů vede k jejich degradaci, proto je třeba používat dávky (aliquoty) k jednotlivé aplikaci nebo použít glycerol k uchování v -20 °C.

- **Proteázy**

Proteázy jsou enzymy rozkládající proteiny. Většina je aktivní při teplotě kolem 37 °C. Některé proteiny mohou být degradovány v několika minutách. Aktivita proteáz je při nízkých teplotách omezena, což ovšem neznamená, že nejsou aktivní. Při přípravě proteinů je tedy třeba použít inhibitory proteáz, ovšem jejich výběr je nutno provést s ohledem na charakter daného proteinu a jeho další použití.

- **Bakterie**

Pokud se s proteiny nepracuje ve sterilním prostředí (což v běžném laboratorním provozu není obvyklé), mohou být vzorky kontaminovány bakteriemi. Pokud by proteiny měly být delší dobu uchovány při 4 °C, je nutno použít antibakteriální agens jako např. azid sodný s výslednou koncentrací 0,02 - 0,05 % [w/v].

- **pH**

Každý protein má pro svou biologickou aktivitu specifické pH. Již slabá změna pH může tuto aktivitu ovlivnit. Změna pH z hodnoty 7,4 na hodnotu 6,4 může vést k redukci aktivity o 90 %. Silně kyselé či zásadité prostředí vede k rychlé denuraci proteinů. Optimální hodnotou pro většinu proteinů je pH v rozmezí od 7,2 do 7,4.

- **Koncentrace proteinu**

Koncentrace proteinu neovlivňuje přímo jeho stabilitu, avšak při nízkých koncentracích (menších než 1 mg/ml) může docházet ke slabým vazbám na stěny použitých zkumavek a tím ke ztrátám proteinu.

- Obsah rozpustných solí v roztoku

Proteiny jsou biomolekuly, které se vyskytují ve fyziologickém prostředí s přesně vyváženým poměrem rozpustných solí. Příliš vysoká či nízká koncentrace solí může vést k vysrážení proteinu a jeho denaturaci.

- Organická rozpouštědla

Většina organických rozpouštědel denaturuje protein, ale primární struktura obvykle zůstane neporušena. Protein tak ztratí svou biologickou funkci, ale je možno ho použít k jiným účelům.

Skladování proteinů

Způsob skladování rekombinantních proteinů závisí na mnoha faktorech zahrnujících stabilitu proteinu, požadovanou dobu skladování a způsob využití proteinu, z něhož vyplývá požadavek na stupeň zachování biologické aktivity. Doba skladování při 4 °C se velice liší podle typu proteinu. Obzvláště enzymy bývají velmi citlivé a ke ztrátě aktivity může dojít během několika hodin. Inaktivace bývá způsobena agregací nebo chemickou destrukcí (Kim et al 2000).

Nejčastěji používanou metodou je skladování v zamraženém stavu při teplotě -20 °C nebo -80 °C. Při těchto teplotách je potlačena chemická degradace a vzorky zůstanou stabilní až 2 roky. Zmrazení ovšem může také způsobit denaturaci proteinů, ať vlivem stresu z nízké teploty, zakonzentrováním složek roztoku, formací krystalů nebo drastickou změnou pH. Pro zvýšení stability zmrazených proteinů se běžně používá glycerol, jenž stabilizuje přirozenou strukturu proteinů a zabráňuje jejich agregaci. Mechanismus jeho působení v zmrazených roztocích je stejný jako při zvýšení termodynamické stability vodných roztoků (Overall et al 2007).

Pokud jsou proteiny zmrazeny bez glycerolu, je třeba je rozdělit po malých dávkách k jednotlivým aplikacím. Použití glycerolu umožňuje dlouhodobé skladování a eliminuje nutnost přípravy alikvotů. Pro dlouhodobé skladování je používán roztok s 25 % až 50 % glycerolem. Při přípravě zásobního roztoku proteinu v laboratoři je nutno řešit přípravu tohoto roztoku s ohledem na koncentraci daného proteinu ve vodném roztoku, požadovanou konečnou koncentraci proteinu a požadovanou koncentraci glycerolu.

Výpočet a výsledky

Výpočet byl proveden prostřednictvím jednoduché excelovské tabulky se vzorci. Vstupní údaje jsou zadávány do buněk označených žlutou a červenou barvou, přičemž do žlutých buněk se doplňují hodnoty vzorku určeného k zmrazení a do červených buněk je zadávána požadovaná koncentrace výsledného roztoku viz Tabulka 1. V případě, že požadovanou koncentraci nelze namíchat, objeví se upozornění s vyznačením minimální hodnoty koncentrace glycerolu potřebné k výrobě výsledného roztoku s koncentrací w_3 (parametr $w_{\min}^2$).

Mám k dispozici		Požadují		Je třeba namíchat		
protein [ml]	5	zamrazit [%]	42	protein [ml]	5,00	
protein [mg/ml]	2	zamrazit [mg/ml]	1	glycerol [ml]	4,67	90 %
protein [%]	0	zamrazit [ml]	10,00	voda [ml]	0,33	
glycerol [%]	90					
glycerol [mg/ml]	0					
voda [%]	0					
glycerol vypočten [%]	84,00					

Tabuka 1 – Zadání parametrů a výpočet
Zdroj: Autor

Parametr $m1$ zastupuje objem proteinového roztoku, parametr $p1$ představuje vstupní koncentraci proteinu. Závislost koncentrace $w2_{\min}$ na parametru $p1$ a požadované koncentraci $w3$ a $p3$ je pak dána následujícím vztahem

$$w2_{\min} = w3p1/(p1 - p3), \quad (1)$$

přičemž $w2_{\min}$ je minimální hodnota koncentrace glycerolu taková, aby bylo možné dosáhnout požadované koncentrace roztoku. Jedná se o hodnotu „glycerol vypočten [%]”. Vyšší koncentrace pak musí být ředěna vodou. K odvození vztahu (1) byly použity následující rovnosti

$$m1w1 + m2w2_{\min} = (m1 + m2)w3$$

$$m1p1 + m2p2 = (m1 + m2)p3.$$

Na začátku procesu platí vždy $p2 = 0$, $w1 = 0$ a současně musí být splněna podmínka $p1 \geq p3$. Pro $p2 = 0$ pak platí následující vztah

$$m2 = m1(p1 - p3)/p3.$$

Při použití glycerolu s koncentrací vyšší než je minimální koncentrace daná hodnotou $w2_{\min}$, je nutné roztok naředit vodou. Výsledná hodnota $m2$ je pak dána následovně

$$m2 = m2.w2_{\min} / w2.$$

Parametr $m3$ představuje objem vody nutný k naředění glycerolu a má hodnotu rovnou

$$m3 = m2(w2 - w2_{\min}) / w2.$$



Rekapitulace výpočtu:	
Roztok 1: 0 % Glycerolu 2 mg/ml Proteinu 5 ml (vše zpracovat)	
Roztok 2: 90 % Glycerolu 0 mg/ml Proteinu	
Roztok 3: 42 % Glycerolu 1mg/ml Proteinu	
Mám	
protein [ml]	m1 = 5
protein [mg/ml]	p1 = 2
protein [%]	w1 = 0
glycerol [%]	w2 = 90
glycerol [mg/ml]	p2 = 0
voda [%]	0
Požaduji	
zamrazit [%]	w3 = 42
zamrazit [mg/ml]	p3 = 1
Namíchat	
protein [ml]	m1 = 5
glycerol [ml]	m2 = 4,67
glycerol [%]	w2 = 90
voda [ml]	m3 = 0,33
zamrazit [ml]	vypočteno
glycerol vypočten [%]	w2 _{min} %

Tabuka 2 – Popis řešení a příklad výpočtu
Zdroj: Autor

Závěr

Cílem tohto příspěvku bylo vypracovat algoritmus k výpočtu poměru jednotlivých složek k přípravě glycerinového roztoku rekombinantních proteinů pro dlouhodobé skladování. Tímto výsledkem bylo možno vyjít vstříc požadavkům jmenované laboratoře Protean s.r.o. Vytvořená tabulka s implementovanými vzorci, které byly v předchozí kapitole popsány, je v současnosti v dané firmě využívána k plné spokojenosti personálu laboratoře a zjednodušuje přípravu jednotlivých vzorků. Tento postup lze různými obměnami modifikovat a používat pak pro přípravu obdobných typů roztoků.

Tento článok odporúčal na publikovanie vo vedeckom časopise Mladá veda: Ing. Miroslava Burýšková, Ph.D.

Na tomto místě je vhodné vyjádřit poděkování společnosti Protean s.r.o., která věnovala mnoho energie na uvedení autorky do problematiky.

Použitá literatura

1. BERG, Jeremy, B., et al., 2002. *Biochemistry*, 5th edition. New York: W. H. Freeman. ISBN-10: 0-7167-3051-0.
2. HELLER, Martin, et al., 1996. *Effect of phase separating systems on lyophilized hemoglobin*. J. Pharm. Sci. 85:1358-1362.
3. KIM, Yong-sung, et al., 2000. *Thermodynamic modulation of light chain amyloid fibril formation*. J. Biol. Chem. 275:1570-1574.
4. OVERALL, Christopher, et al., 2007. *In search of partners: linking extracellular proteases to substrates*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8, 245-257. doi:10.1038/nrm2120.