

Abstrakt

Inkorporace nepřirozených aminokyselin (NNAA) je široce používaný způsob pro zavedení bioorthogonálních funkčních skupin do proteinů²⁶. Tyto funkční skupiny lze využít použitím click chemie, konjugací značených proteinů na afinitní nebo fluorescenční sondy. Méně rozšířené využití NNAA zahrnuje výzkum vlivu bioorthogonálních funkčních skupin na strukturně – funkční vztahy v značených proteinech⁴⁷. Pro výzkum těchto vztahů je zapotřebí exprimovat velké množství proteinu s maximální inkorporací NNAA.

V naší práci jsme nahrazovali methionin (Met) třemi NNAA: foto-methioninem (pMet), azidohomoalaninem (AHA) a homopropargylglycinem (HPG). Zkoumali jsme vliv těchto NNAA na růst prototrofních *E. coli* BL21 a Met-auxotrofních *E. coli* B834 v MM-M9 médiu. Sledovali jsme expresi cytochromu b₅ a MBP-GFP. Pro určení míry inkorporace jednotlivých NNAA do těchto rekombinantních proteinů jsme použili MALDI-ToF MS a LC-MS.

V porovnání s Met-auxotrofními *E. coli* B834, prototrofní *E. coli* BL21 exprimovaly výrazně vyšší množství cytochromu b₅ s pMet a AHA, avšak s nízkými inkorporacemi těchto NNAA. Situace byla opačná v B834, které exprimovaly výrazně nižší množství proteinu, avšak s inkorporací pMet od 50 – 70 % a AHA kolem 50 %. Oba bakteriální kmeny s HPG exprimovaly podobné množství cytochromu b₅ s porovnatelnou inkorporací od 50 – 80 %.

Naše zjištění poskytují informace pro výběr vhodného expresního systému pro expresi rekombinantních proteinů s maximální inkorporací NNAA a ukazují na rozdíly v naměřené inkorporaci NNAA pomocí MALDI-ToF MS a LC-MS.

Nepřirozené aminokyseliny, modifikace proteinů, hmotnostní spektrometrie