



Vervaardiging van vollengte H5 in *E. coli* en suiwing deur middel van VPVC

Authors:

D. Patini¹
N. Da Camara¹
G. Koorsen¹

Affiliations:

¹Department of Biokinetics,
University of Johannesburg,
South Africa

Correspondence to:

D. Patini

Email:

dmpatini1@gmail.com

Postal address:

Private Bag X11, Arcadia
0007, South Africa

How to cite this article:

Patini, D., Da Camara,
N. & Koorsen, G., 2014,
'Vervaardiging van vollengte
H5 in *E. coli* en suiwing
deur middel van VPVC',
*Suid-Afrikaanse Tydskrif
vir Natuurwetenskap en
Tegnologie* 33(1), Art.
#1227, 1 page. [http://
dx.doi.org/10.4102/satnt.
v33i1.1227](http://dx.doi.org/10.4102/satnt.v33i1.1227)

Note:

This paper was initially
delivered at the School of
Environmental Sciences
and Development of the
North-West University,
Potchefstroom Campus,
South Africa on 05 October
2012.

Copyright:

© 2014. The Authors.
Licensee: AOSIS
OpenJournals. This work
is licensed under the
Creative Commons
Attribution License.

Production of full-length H5 in *E. coli* and purification by FPLC. It has been suggested that full-length chicken H5 cannot be expressed in *E. coli*. We expressed codon-optimized H5 in *E. coli* BL21DE3, obtaining high levels of full-length H5. The protein was purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and two FPLC steps.

Die nukleosoom bestaan uit twee kopieë elk van die kernhistone H2A, H2B, H3 en H4 waarom ongeveer 146 bp DNS gedraai is. Die koppelhistoon H1/5 bind aan die nukleosoom en neutraliseer die negatiewe ladings op DNS wat tussen nukleosome lê. Sodoende kan naasliggende nukleosome teenmekaar pak sodat die ongeveer 2m-lange DNS-stringe in die mensgenoom in 'n selkern met 'n omtrek van 20 µm kan inpas. Rekombinante DNS-tegnologie het die afgelope drie dekades daarvoor gesorg dat biochemiese navorsing met rasse skrede vooruit gegaan het. Heterogene genetiese materiaal kan só in gas-organismes uitgedruk word om proteïene te vorm wat uit die gas-organisme gesuiwer kan word. Hoender-eritrosietchromatien is 'n gewilde modelsisteem om die struktuur en funksie van metasoön-chromatien te bestudeer. In hierdie model word nukleosome hoofsaaklik deur die koppelhistoon H5 gepopuleer. Dit is vroeër beweer dat 'n volledige H5 nie via rekombinante tegnologie in *E. coli* vervaardig kan word nie, maar slegs fragmente van die proteïene. Daar is aangevoer dat die bRNS vir H5 deur *E. coli* gevorm kan word, maar dat die translasië-proses in *E. coli* ontoereikend is om die hele proteïene te vervaardig. 'n Moontlike rede hiervoor is dat die karboksiel-terminale domein van H5 talle lisien- en arginien-kodons bevat wat volop in metasoöns voorkom, maar bykans ontbreek in bakterieë. Die translasië-masjienerie van *E. coli* word dus heel waarskynlik vinnig versadig tydens vervaardiging van H5, sodat die volle proteïene nie gemaak kan word nie. Ons het dus gehipotetiseer dat 'n sintetiese H5-konstruk waarin elke kodon geoptimaliseer is vir uitdrukking in *E. coli* en waarbinne die moontlikheid vir sekondêre struktuurvorming van die mRNS geminimaliseer is, deur *E. coli* uitgedruk behoort te word. 'n Konstruk is ontwerp en bekom vanaf GenScript in die VSA. Die konstruk is deur middel van snyding met die restriksieënsieme *NdeI* en *XhoI* na 'n pET22 vektor verskuif en geheg. Ná sifting van *E. coli* klone wat met laasgenoemde DNS getransformeer is, is positiewe klone geïdentifiseer. Die pET22-H5-vektor is uit 'n positiewe kloon geïsoleer en *E. coli* BL21DE3-selle is hiermee getransformeer. Die uitdrukking van H5 in BL21DE3-selle is vervolgens bestudeer deur die selle in kultuur te kweek onder optimale kondisies, die uitdrukking van H5 aan te skakel deur middel van induksie met isopropielthiogalaktosied (IPTG) en die vorming van proteïene te monitor deur middel van elektroforese deur 'n poli-akriëlamiedjel. Voorts het ons ons voorgeneem om H5 vanuit die *E. coli* selle te suiwer. Selle is geoes deur middel van sentrifugering en oopgebreek deur hoë-energie sonikasie. H5 is gesuiwer vanuit die *E. coli*-lisaat deur 'n drie-stap suiweringsregime bestaande uit kation-uitruilchromatografie, differensiële ammoniumsulfaatneerslag en hidrofobiese interaksie-chromatografie toe te pas (vinnige proteïene vloeistofchromatografie, VPVC, is hiervoor gebruik). Die identiteit van die gesuiwerde H5 is bevestig deur middel van massa-spektrometrie. Ons het bevind dat vol-lengte H5 in groot hoeveelhede deur *E. coli* vervaardig word deur van bogenoemde metodes gebruik te maak. Om vas te stel of ons metode om vol-lengte H5 te vervaardig en te suiwer uitgebrei kan word tot ander koppelhistone, het ons die uitdrukking en suiwing van H1.11L ('n ander hoender-koppelhistoon) aangepak. Ons het bevind dat ons strategie van sintetiese kodon-optimisering van die H1.11L geen, uitdrukking in *E. coli* BL21DE3-selle bemiddel deur die pET-sisteem en VPVC-suiwing suksesvol was. Die vervaardiging van vollengte H5 deur middel van rekombinante metodes verbreed die potensiaal van hoendereritrosiet-chromatien as modelsisteem om die struktuur en funksie van chromatien te bestudeer.

Read online:



Scan this QR
code with your
smart phone or
mobile device
to read online.