



Sortase A

Sortase A

(*Staphylococcus aureus*)

- Transpeptidase / Protein-Ligase -

Artikel Nr. E4400-01 **Größe** 20 µg

Packungsinhalt:

- 1 µg/µl Sortase A
- Sortase 10x Reaktionspuffer

1 x Reaktionspuffer:

50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 4 mM β-Mercaptoethanol.

Quelle:

- Rekombinant aus *Staphylococcus aureus*.
- Klonierung und Expression in *Escherichia coli*.

Modifikationen:

- Enthält eine C-terminale His6 - Markierung.
- Verkürzt (ohne N-terminalen, membranankernden Abschnitt).

Lagerung: Lagerung bei -20°C.

Das Protein ist für eine Dauer von mindestens 9 Monaten stabil.

Reaktionstemperatur: 20°C - 50°C

Sortase A besitzt sowohl Protein-Protein-Ligase / Transpeptidase als auch Cystein-Protease Aktivität.

Beschreibung:

- Sortase A (*S. aureus*) ist sowohl eine Transpeptidase ("Protein-Ligase") als auch eine Protease (4). Das Enzym ermöglicht die sequenzspezifische, posttranslationale Herstellung von Fusionsproteinen unter milden, physiologischen Bedingungen. Auch nicht-peptidische Biokonjugate, die über herkömmliche Klonierungstechniken nicht darstellbar sind, können via Sortase A - katalysierter posttranslatonaler Modifikation hergestellt werden.
- Sortase A schneidet die generische Erkennungssequenz LPXTG zwischen Threonin und Glyzin. Anschließend katalysiert das Enzym die Ausbildung einer Amid-Bindung zwischen der Carboxyl-Gruppe des Threonins und der Amino-Gruppe eines flüssigkeitsexponierten Glyzinrestes des Zielpeptids ("Protein-Ligase"). Das C-terminale Glyzin und alle nachfolgenden C-terminalen Aminosäuren des Ausgangs-peptides werden abgespalten.
- Als Substrate dienen Proteine mit einem frei zugänglichen, flüssigkeitsexponierten LPXTG - Erkennungsmotiv. Geeignete Zielpeptide besitzen eine flüssigkeitsexponiertes, N-terminales Glyzin, das als Nukleophil dient. Oligoglyzin ist ein effizientes Zielpeptid, an dessen C-Terminus funktionale Gruppen gebunden sein können.
- Die Erkennungssequenz LPXTG (optimiert für den Praxiseinsatz: LPETGG) kann entweder C-terminal oder innerhalb des Proteins in flexiblen, flüssigkeitsexponierten Schlaufen untergebracht sein, solange die Erkennungssequenz sterisch zugänglich für das Enzym ist.
- Sortase A toleriert den Einbau von Oligoglyzin-Resten, an denen C-terminale synthetische Substituenten gebunden sind. uf diese Weise erlaubt Sortase A die Ligation von Ausgangs-peptiden an native wie an nicht native Zielpeptide, an proteinogene wie auch an nicht-proteinogene ("nicht natürliche") Aminosäuren, an nicht-peptidische funktionale Gruppen wie Nukleinsäuren, Fluorophore, Farbstoffe, Antibiotika und Zuckerderivative (siehe 2, 3).
- Ermöglicht die Immobilisierung von Proteinen an feste Oberflächen (5), das Labelling der Zelloberfläche lebender Organismen (1), Zirkularisierung von Proteinen (6) und die posttranslationale Anbindung neuer, nicht genetisch codierbarer Funktionalitäten in Proteine (siehe 2, 3).
- N-terminales Labelling von Proteinen ist auch möglich, indem die LPXTG-Erkennungssequenz des Ausgangs-peptides auf den C-Terminus des Zielpeptides verschoben wird (3).
- Für hohe Reaktionseffizienz ist es erforderlich, dass sich die Glyzinposition des LPXTG-Erkennungsmotives nicht endständig am C-Terminus des Ausgangs-peptides befindet, sondern eine Aminobindung an wenigstens eine weitere Aminosäure trägt. Die C-terminale Erkennungssequenz minimaler Länge mit voller Funktionalität lautet LPETGG (1).

Qualitätskontrolle:

Sortase A ist in PAGE-Gelen zu mehr als 95% rein, liegt als einzelne Bande vor und weist keine unspezifische Proteaseaktivität auf.

Literatur:

1. Popp M. et al. (2009) *Curr. Protoc. Protein Sci.* 56: 15.3.1-15.3.9.
2. Proft T. (2010) *Biotechnol Lett.* 32(1):1-10.
3. Popp M. und Ploegh H. (2011) *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 5024 - 5032
4. Mao H. et al. (2004), *J Am Chem Soc* 126:2670-2671
5. Parthasarathy R. et al. (2007) *Bioconjug Chem* 18: 469-476
6. Antos J.M. et al. (2009) *J Biol Chem* 284: 16028-16036
7. Ton-That H. et al. (1999) *PNAS* 96, 22: 12424-12429

Sortase A

PROTEIN LIGATION - PROTOKOLL

Transpeptidase / Erkennungssequenz-spezifische, posttranslationale Proteinmodifikation:

Für Sortase A - vermittelte Proteinligation werden zwei Proteine benötigt, ein Substratprotein mit einem C-terminalen LPET - Motiv und ein Zielprotein mit zwei oder drei N-terminalen Glyzinresten. Beide Termini müssen flüssigkeitsexponiert und sterisch frei zugänglich für Sortase A sein.

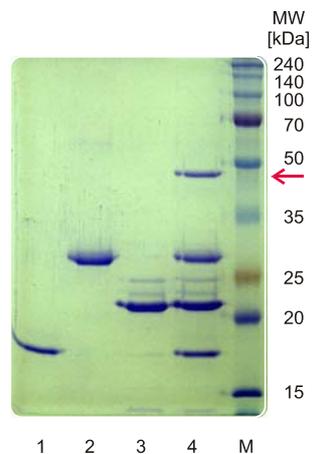


Abb. 1: Beispielreaktion für Sortase A - Aktivität, SDS-PAGE Gel.

Spur 1: rnpA Protein mit C-terminaler, partieller Sortase A Erkennungssequenz LPET (Substratprotein),
 Spur 2: GFP mit N-terminalen GGG - Aminosäure-Positionen (Zielprotein), erzeugt mittels TEV-Schnitt (Best.Nr. E4310),
 Spur 3: Sortase A Protein, 1 µg,
 Spur 4: alle Komponenten aus Spur 1,2,3 nach Inkubation für 60 min bei 30°C in 1x Reaktionspuffer.
 Die Position des neuen Fusionsproteins in Spur 4 ist mit einem roten Pfeil markiert.
 Marker: Perfect Color Protein Ladder (Best. Nr. E3215).

Beispielreaktion (20µl):

2 µl 10x Sortase A Puffer
 X µl Substratprotein A (mit Sortase-Erkennungsmotiv)
 X µl Zielprotein B (mit N-terminalem Glyzin / Nukleophil)
 0.1-1 µg Sortase A
 H₂O auf 20 µl

 Inkubation für 60 min bei 30°C.
 Experimenteller Nachweis der Sortase-Ligation durch SDS PAGE Gelelektrophorese.

Hinweis 1: Die Effizienz der Ligation ist abhängig von den absoluten Konzentrationen an Substrat- und Zielprotein, von deren Konzentrationsanteilen und von der Menge an eingesetzter Sortase A. Die höchsten Ligationsausbeuten werden während langer Inkubationszeiten erzielt (bis zu 8 Stunden). Die optimalen Reaktionsbedingungen für Sortase A sind ein pH-Bereich zwischen 7,5 und 9,0 sowie ein Temperaturbereich zwischen 20°C und 50°C. Alternativ eingesetzte Reaktionspuffer dürfen keine primären Amine wie z.B. Hydroxylamin enthalten.

Hinweis 2: Es gibt keine universellen Reaktionsbedingungen, die sich für jeden posttranslationalen Ligationsansatz gleichermaßen eignen. Die optimalen Reaktionsbedingungen sind abhängig von Natur, Struktur und Konformation von Substrat- und Zielprotein. Aus diesem Grund ist es erforderlich, die Reaktionsbedingungen auf die Zielproteine zu optimieren.

Hinweis 3: Der Prozess ist reversibel, da die Ligationsreaktion beständig erneut das Erkennungsmotiv regeneriert. Der Prozess kann unumkehrbar werden, indem das Erkennungsmotiv durch Konformationsänderungen des Fusionsproteins für Sortase A unzugänglich wird.



Sortase A

PCR-PRIMER-DESIGN

PCR Primer Design zur Einführung einer C-terminalen Sortase A – Erkennungssequenz

Die unten aufgeführte Sequenz ist für *E.coli*-Codonbelegung optimiert. Für andere Zielorganismen ist es möglicherweise erforderlich, die Codonbelegung entsprechend anzupassen.

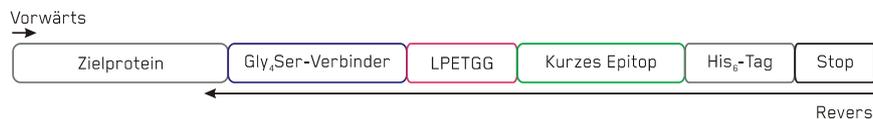
Sowohl die Gly4Lys – Verbindungssequenz als auch das HA-Epitop sind optionale, aber empfohlene Bestandteile der Sequenz. Mit Hilfe des Gly4Lys – "Abstandshalters" wird sichergestellt, dass die Sortase-Erkennungssequenz frei zugänglich für das Enzym bleibt. Es kann in einzelnen Fällen notwendig sein, die Länge der Verbindungssequenz zu variieren und ggf. zu verlängern, um einen ungehinderten Zugang von Sortase an die Erkennungssequenz zu gewährleisten.

Die optionale, endständige HA-Epitopmarkierung wird im Verlaufe der Sortase-Prozessierung abgetrennt. Anschließend kann die Effizienz der Reaktion durch Immunoblotting bestimmt werden. An Stelle des HA-Epitops können auch alternative Markierungen verwendet werden, beispielsweise das BirA – Akzeptorpeptid (MAGGLNDIFEAQKIEWHEDTGGGA).

Eine optionale His6-Markierung (DNA-Codons CAT oder CAC, sechs Wiederholungen, nicht Bestandteil der unten aufgeführten Beispielsequenz) kann zwischen der Epitopmarkierung und dem Stop-Codon eingefügt werden. Das ermöglicht die Aufreinigung des Zielproteins von abgetrennten, His6-markierten C-termini und von His6-markierter Sortase A über NiNTA-Zentrifugationssäulen.

G G G G S	L P E T G G	Y P Y D V P D Y A	*
Gly Gly Gly Gly Ser	Leu Pro Glu Thr Gly Gly	Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala	Stop
5'- GGC GGT GGC GGT AGC	CTG CCG GAA ACC GGC GGT	TAT CCG TAC GAT GTG CCG GAT TAT GCG	TAA -3'
3'- CCG CCA CCG CCA TCG	GAC GGC CTT TGG CCG CCA	ATA GGC ATG CTA CAC GGC CTA ATA CGC	ATT -5'
[Verbinder]	[Sortase Schnitt]	[HA Epitop Markierung]	

Schematische Übersicht über die Konstruktion des Sortase A – Substrates (nicht längenproportionale Übersicht):



Die DNA-Sequenz für die 5'-Erweiterung eines generischen, Sortase-Substrat codierenden reversen Primers lautet (*ohne* His₆-Appendix, 63 nt, *E.coli* Codonbelegung; ein genspezifischer Abschnitt (20 nt oder länger, revers) muss noch an das 3'-Ende des Primers angefügt werden) :

5'-TTA CGC ATA ATC CGG CAC ATC GTA CGG ATA ACC GCC GGT TTC CGG CAG GCT ACC GCC ACC GCC -3'

Mit His₆-Appendix lautet die Sequenz für die 5'-Erweiterung des generischen, Sortase-Substrat Primers (*mit* His₆-Appendix, 81 nt; ein genspezifischer Abschnitt (20 nt oder länger, revers) muss noch an das 3'-Ende des Primers angefügt werden):

Optimiert für *Escherichia coli* Codonbelegung:

5'-TTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG CGC ATA ATC CGG CAC ATC GTA CGG ATA
ACC GCC GGT TTC CGG CAG GCT ACC GCC ACC GCC -3'

Optimiert für *Homo sapiens* Codonbelegung:

5'-TCA ATG GTG ATG GTG ATG GTG GGC GTA GTC GGG CAC GTC GTA GGG GTA
TCC GCC GGT CTC GGG CAG GCT TCC GCC TCC GCC -3'