



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PŘÍPRAVA KONSTRUKTŮ PRO IZOLACI PROTEINŮ A JEJICH TESTOVÁNÍ

PREPARATION OF CONSTRUCTS FOR PROTEIN ISOLATION AND ITS TESTING

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Olha Osadchuk

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1291/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Olha Osadchuk**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Příprava konstruktů pro izolaci proteinů a jejich testování

Zadání bakalářské práce:

Literární rešerše, klonování a testování konstruktů pro izolaci proteinů, western blot analýza.

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Olha Osadchuk
student(ka)

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Tato práce je zaměřená na popis produkce rekombinantních proteinu. Pro studium dané problematiky byl zvolen protein p53, který je jedním z hlavních nádorových supresorových proteinu. Protein p53 je zodpovědný za regulaci mnoha genů, které mohou kontrolovat buněčný cyklus a replikaci DNA, a je nejčastěji mutovaným genem u nádorových onemocnění člověka. Pro danou práci byly zvoleny různé varianty bodových mutací proteinů p53, které mohou ovlivnit jeho vazebné vlastnosti a funkce. Znalosti mechanismu působení mutovaných p53 proteinů v buňce je důležité pro efektivní léčbu rakoviny.

V teoretické části jsou popsány vlastnosti proteinu a jednotlivé expresní systémy, metody Gateway klonování, a metody použité při purifikaci a izolaci proteinů (afinitní chromatografie, SDS-PAGE analýza a Western blot analýza). V experimentální části jsou popsány postupy přípravy expresních vektoru pomocí Gateway technologie, transformace do buněk a izolace plazmidové DNA. Klonováním byly připraveny tři expresní klony a po jejich transformaci do kompetentních buněk byla provedena izolace DNA.

Abstract

This study is focused on describing of recombinant protein production. Protein p53 was chosen, as one of the most important tumor suppressor proteins, for studying this issue. The p53 protein is responsible for the gene regulation, control of cell cycle and DNA replication. P53 is the most mutated gene in human cancer. Several point mutations of p53 protein was chosen for work with.

The theoretical part describes main properties of protein, expression systems, Gateway cloning system and methods of protein purification. In the experimental part are described the procedures of preparing of the expression vectors by Gateway technology, cell transformation and DNA plasmid isolation. Using cloning technology were prepared three expression clones, they were transformed into competent cells and after was done DNA isolation.

Klíčová slova

protein p53, Gateway klonování, purifikace proteinu

Keywords

p53 protein, Gateway cloning systém, protein purification

OSADCHUK, O. *Příprava konstruktů pro izolaci proteinů a jejich testování*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. XY s. Vedoucí bakalářské práce doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Václavu Brázdovi Ph.D. a také Mgr. Janu Coufalovi, Ph.D. za vše, co pro mě po dobu naší spolupráce udělali, především za cenné rady, trpělivost a pomoc při zpracování této práce. V neposlední řadě také děkuji Bc. Natalie Vadovičové za velkou pomoc a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Taky bych chtěla poděkovat Ing. Evě Brázdově Jagelské, Ph.D. a lidem z oddělení Biofyzikální chemie a molekulární onkologie Biofyzikálního ústavu Akademie věd ČR za výborné pracovní prostředí.

Obsah

1.	Úvod.....	6
2.	Teoretická část	7
2.1.	Proteiny	7
2.1.1.	Struktura a vlastnosti proteinu	7
2.1.2.	Funkce proteinů	8
2.1.2.1.	Proteiny regulující expresi genů	9
2.2.	Produkce proteinů	9
2.2.1.	Produkce rekombinantního proteinů	9
2.2.2.	Výhody produkce rekombinantních proteinů	10
2.2.3.	Jednotlivé expresní systémy	10
2.2.3.1.	Bakteriální expresní systémy	10
2.2.3.2.	Kvasinkové expresní systémy	10
2.2.3.3.	Hmyzí expresní systémy	11
2.2.3.4.	Savčí expresní systémy	11
2.2.4.	Příprava expresního plazmidu	11
2.2.4.1.	Subklonování	11
2.2.4.2.	Gateway	11
2.2.4.2.1.	PCR.....	12
2.2.4.2.2.	BP reakce	12
2.2.4.2.3.	LR reakce	13
2.2.4.3.	Sekvenování	14
2.2.5.	Vnesení plazmidů	14
2.3.	Purifikace proteinů	14
2.3.1.	Purifikační strategie	14
2.3.1.1.	Třífázová purifikační strategie	15
2.3.2.	Metody izolace proteinů	15
2.3.3.	Afinitní chromatografie	16
2.3.3.1.	SDS-PAGE	16
2.3.3.2.	Western Blotting	17
3.	Experimentální část.....	18
3.1.	Cíl práce	18
3.2.	Materiály a přístroje	19
3.2.1.	Enzymy	19
3.2.2.	Primery	19
3.2.3.	Plazmidy	19
3.2.4.	Ostatní materiál.....	19

3.2.5.	Laboratorní přístroje	19
3.2.6.	Chemikálie	19
3.3.	Metody	21
3.3.1.	BP reakce	21
3.3.2.	LR reakce	21
3.3.3.	Transformace	22
3.3.4.	Izolace plazmidové DNA	23
3.3.5.	Sekvenování	23
3.3.6.	Gelová elektroforéza	24
3.3.7.	Srovnání plasmidů používaných a vytvořených při Gateway klonování	25
4.	Výsledky a diskuze	26
4.1.	LR reakce	26
4.2.	Transformace	26
4.3.	Izolace DNA	29
4.4.	Sekvenování	31
4.5.	Srovnání plasmidů používaných a vytvořených při Gateway klonování	31
5.	Závěr	33
6.	Seznam použitých zdrojů	34
7.	Seznam zkratk	36

1. Úvod

Proteiny patří k nejdůležitějším látkám živého organismu. Jednou z hlavních funkcí proteinů je regulace genové exprese [1]. Nádorový supresorový protein p53, který je kódován genem *TP53*, plní mnoha důležitých funkcí – jako je například regulace genové exprese, reparace DNA, zastavení buněčného cyklu nebo apoptózu. Přibližně polovina případů nádorových onemocnění u člověka obsahuje mutaci proteinu p53. Jednotlivé bodové mutace p53 mohou ovlivnit jeho vazebné vlastnosti a tím i účinnost při opravě poškozené DNA [2].

Pomocí produkce rekombinantních proteinů je možno odhalit mnoho funkcí, vlastností a vliv mutací na funkci proteinu. Metoda přípravy rekombinantního proteinu pomocí molekulárního klonování umožňuje proteiny modifikovat a pomocí jednotlivých expresních systémů je možno vytvořit rekombinantní protein odvozený od konkrétního genu, nebo části genu. Pro vnesení a produkci proteinu do prokaryotických nebo eukaryotických buněk se používají expresní vektory, většinou se používají plazmidy [3].

Metoda Gateway spočívá v přípravě expresního vektoru pomocí dvou rekombinantních reakcí BP a LR. Při BP reakci se DNA připravená pomocí PCR vnáší BP klonázou do donorového vektoru za současného vyštěpení *ccdB* genu z donorového vektoru. Vytvořený výstupní vektor dále může být využit na produkci destinačního vektoru v LR reakci pomocí LR klonazy. Vytvořený expresní vektor se používá pro produkci rekombinantního proteinu. Výhodou použití systému Gateway je vysoká výtěžnost a flexibilita [4].

2. Teoretická část

2.1. Proteiny

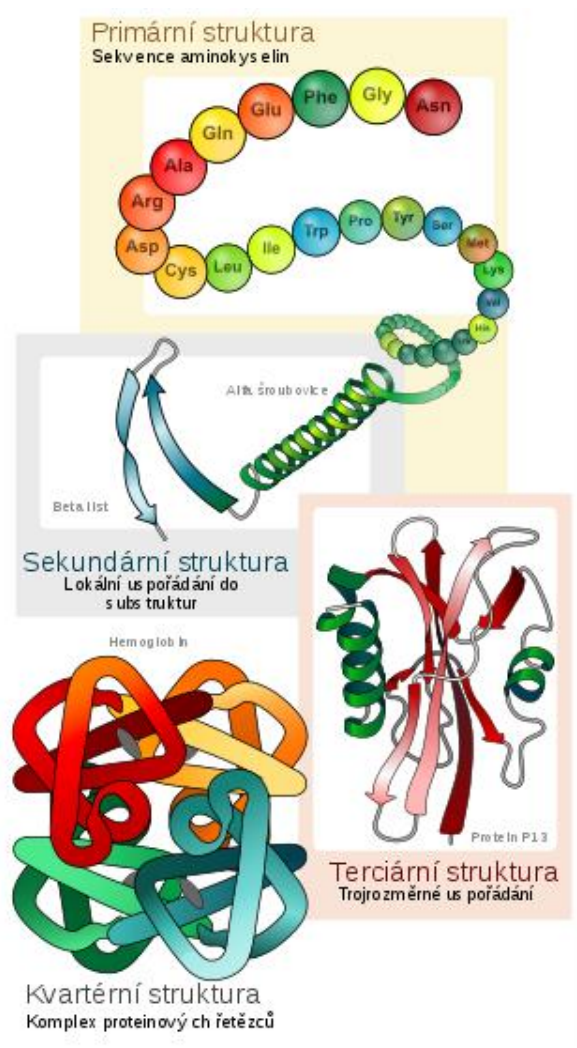
Proteiny jsou vysokomolekulární organické látky sestávající z aminokyselin spojených peptidickými vazbami.

2.1.1. Struktura a vlastnosti proteinu

Proteiny se skládají z různých kombinací 21 α -aminokyselin, složených do polypeptidového řetězce. Sekvence aminokyselin v proteinu odpovídá informacím obsaženým v genu daného proteinu. Tato informace je prezentována jako nukleotidová sekvence, přičemž jedna aminokyselina odpovídá jedné nebo více sekvencím tří nukleotidů, tzv. kodonů [5].

Kromě posloupnosti aminokyselin v polypeptidovém řetězci je taky velice důležitá trojrozměrná struktura, která vzniká během skládání proteinů. Tato struktura je udržována v důsledku interakce jednotlivých částí proteinu. Celkem se u proteinů rozlišují čtyři základní strukturní skupiny [5]. Primární strukturu představuje řetězec α -aminokyselin s peptidovou vazbou. Primární struktura je kódována určitým genem a určuje vlastnosti daného proteinu [6]. Sekundární strukturu představuje lokální uspořádání fragmentu polypeptidového řetězce, stabilizovaného vodíkovými vazbami a hydrofobními interakcemi. Nejrozšířenější typy prostorového uspořádání proteinů jsou α -helix (šroubovice, která má vodíkové můstky mezi aminokyselinou a karbonylovou skupinou v krocích každé 4 aminokyseliny) a β -skládaný list (několik aminokyselinových řetězců vzájemně rovnoběžně spojených vodíkovou vazbou). Ostatní prvky sekundární struktury zahrnují π -helix (šroubovice s vodíkovou vazbou každé třetí aminokyseliny) [6].

Terciární struktura je tvořena uspořádáním sekundární struktury propojenou mezi vedlejšími řetězci. Terciární struktura je obecně stabilizována nelokálními interakcemi, nejčastěji tvorbou hydrofobního jádra, stejně jako tvorbou vodíkových vazeb, solných můstků, jiných typů iontových interakcí, disulfidových vazeb mezi zbytky cysteinu. Vznikne globulární nebo fibrilární tvar proteinů [6]. Kvarterní struktura je struktura vyplývající z interakcí několika proteinových podjednotek. Kompletní struktura několika vzájemně propojených podjednotek, které společně provádějí společnou funkci, se nazývá proteinový komplex [6].



Obrázek 1. Základní úrovně strukturní organizace proteinů [7].

Proteiny jsou také charakterizovány izoelektrickým bodem (pI), což je kyselost pH, ve které molekula tohoto proteinu nese elektrický náboj. Čím více hydroxylových skupin v daném proteinu, tím vyšší má pI. Proteiny s pI menším než 7 jsou nazývány kyselými a více než 7 bazickými. Obecně platí, že pI je důležité pro funkci proteinu, takže proteiny, které se vážají na nukleové kyseliny, často patří k bazickým. Příkladem takových proteinů jsou histony [6]. Podle stupně rozpustnosti ve vodě jsou proteiny rozpustné (hydrofilní) a nerozpustné (hydrofobní). Poslední zahrnují většinu proteinů, které jsou součástí biologických membrán, tj. integrační membránové proteiny [8].

2.1.2. Funkce proteinů

Proteiny jsou jedny z nejdůležitějších komponentů živých organismů a jsou nezbytné pro jejich normální funkci. Díky proteinům se uskutečňuje metabolismus, jsou složky buněčných organel, fungují jako signální molekuly, receptory a protilátky. Hlavní funkce proteinů jsou metabolické, strukturní a informační. V metabolismu se představují jako enzymy, které jsou zodpovědné za katalýzu biologických reakcí. Jeden enzym je zpravidla schopen katalyzovat jednu specifickou reakci, jsou velice účinné a jejich aktivitu se dá regulovat [1].

Strukturní proteiny formují tvar buněk a tkání, regulují jejich vlastnosti, pružnost nebo umožňují pohyb řasinek. Tyto proteiny mohou tvořit dlouhé filamenty nebo vázat filamenty

tvořené jinými proteiny– některé strukturní proteiny jsou fibrilární, jiné tvoří vlákna polymerací globul proteinu za určitých podmínek. Mohou mít i ochrannou funkci, jako keratin, který se nalézá v nehtech, vlasech a kůži [9].

Většina proteinů se podílí na signalizačních procesech na intercelulární a intracelulární úrovni. Některé proteiny, hormony, neurotransmitery, růstové faktory jsou extracelulární signalizační molekuly, které přenášejí signál ven z buňky, kde byly syntetizovány, do jiných buněk, které se nachází v blízkosti buňky (neurotransmitery, růstové faktory) nebo ve vzdálených tkáních (hormony) [10].

Jiné molekuly zapojené do signalizačního systému jsou receptory, které mohou být jak membránové, tak cytoplazmatické proteiny. Jedna část molekuly receptoru vnímá signál, který je pomocí konformačních změn přenášen do jiné části molekuly, což aktivuje přenos signálu na jiné buněčné komponenty. V membránových receptorech se část molekuly, která se váže na signální molekulu, nachází na povrchu buněk a doména, která vysílá signál, uvnitř [11].

2.1.2.1. Proteiny regulující expresi genů

p53

p53 neboli protein 53 je zodpovědný za regulaci expresi mnoha genů, které kontrolují apoptózu, opravu DNA a růst buněk. Protein p53 je kódován u člověka genem *TP53*, který se nachází na krátkém úseku sedmnáctého chromozómu. Mutace genu *TP53* je přítomna v asi 50 % nádorových buněk. Kvůli tomu po poškození DNA nedochází k zastavení buněčného cyklu a/nebo apoptóze a nádorové buňce se tímto způsobem mohou hromadit mutace [12].

BRCA1

Protein BRCA1 je zakódován genem *BRCA1* a je zodpovědný za opravu poškozené DNA, homologní rekombinaci a transkripci. Název proteinů pochází z anglického “breast cancer 1”, což znamená rakovina prsu. Mutace BRCA1 je často přítomná u pacientů nemocných rakovinou prsu [13].

IFI16

Protein IFI16 patří k represorům, aktivátorům, fosfoproteinům. IFI16 je zapojený do biologických procesů jako je apoptóza, imunita, vrozená imunita, transkripce, regulace transkripce, polymorfismus a acetylace [14].

2.2. Produkce proteinů

Protein je molekula složená z aminokyselin, jejich pořadí v peptidovém řetězci je geneticky kódováno, a tento genetický kód je možno upravit. Tato vlastnost je široce používaná v biotechnologickém a farmaceutickém průmyslu pro produkci rekombinantních proteinů. Rekombinantní protein je tvořen díky začlenění genu kódujícího požadovaný protein z jiného organismu do genomu producenta, který pak je schopen produkovat tento protein [15].

2.2.1. Produkce rekombinantního proteinů

Nejpoužívanější způsob přípravy rekombinantních proteinů je pomocí molekulárního klonování. Tento proces se uskutečňuje pomocí expresních vektoru, které slouží k přepravě cizorodé DNA do hostitelské buňky. Pro dosažení vysokých výtěžků je nutné zvážit, jaký expresní systém bude vhodný pro produkci rekombinantního proteinu. Produkci proteinu ovlivňuje například velikostí rekombinantního proteinu, rozpustnosti proteinu a další faktory.

Nejběžnějším typem vektorů jsou plazmidy, které jsou tvořeny kruhovou dvouřetězcovou DNA, jsou schopné autonomní replikace a přenášejí se zpravidla při dělení do následujících generací [3].

2.2.2. Výhody produkce rekombinantních proteinů

V dnešní době poptávka po proteinech pro průmyslové a farmaceutické potřeby neustále roste, a s tím roste potřeba produkce proteinu ve velkém množství a za relativní nízkou cenu. Produkce rekombinantních proteinů umožnilo výrobu s vysokým výtěžkem. Pro rekombinantní expresi se používají různé druhy organismů, jak prokaryotické, tak eukaryotické. Nejběžněji používaným organismem pro rekombinantní expresi je bakterie *E. coli* díky tomu, že je velmi dobře popsána, relativně nenáročná na kultivaci, je cenově dostupná a rychle roste. Výhodou rostlinných organismů je jejich nízká cena a snadná manipulace, při použití rostlinných expresních systémů klesá možnost infekce živočišnými patogeny, ale jako nevýhody je možnost vzniku alergické reakce díky doprovodným příměsím.

2.2.3. Jednotlivé expresní systémy

Pomocí různých expresních systémů je možné vytvořit rekombinantní protein odvozený od konkrétního genu, nebo části genu. Expresní systémy lze rozdělit do dvou hlavních tříd, prokaryotní a eukaryotní.

2.2.3.1. Bakteriální expresní systémy

Bakteriální systém se používá pro klonování DNA a expresi rekombinantních proteinů. Nejpoužívanější zástupce tohoto systému je *Escherichia coli*. Výhodou systému je dobrá znalost tohoto systému a kultivačních podmínek, *E. coli* jsou schopné růst jak tekutých, tak na tuhých médiích v normální atmosféře při teplotách od 23 °C do 37°C. Při produkci rekombinantních proteinů v *E. coli* jsou obecně nejvyšší výtěžky a růst bakterii je dostatečně rychlý. Jako výhody jsou také: velký výběr klonovacích vektorů, dostupnost efektivních metod pro transformaci, izolaci DNA i rekombinantních proteinů, vysoké výtěžky, nízká cena [16].

Nicméně proteiny produkované *E. coli* nemají stejné posttranslační modifikace jako proteiny z eukaryotního expresního systému, protein tak může mít změněnou biologickou aktivitu, kontaminace lipopolysacharidem (endotoxin), přítomnost, kterého může být tolerována při aplikaci produktu *in vitro*, ale musí být odstraněna pro *in vivo* aplikace [16].

2.2.3.2. Kvasinkové expresní systémy

Kvasinky se používají jako nejjednodušší eukaryotický expresní systém. Lze je snadno kultivovat, podobně jako *E. coli*, ale jejich výhodou je možnost regulovat posttranslační modifikace. U systému nedochází k produkci bakteriálních endotoxinů, lze realizovat také jednoduše purifikace sekretovaných proteinů, je možná velkoobjemová kultivace a náklady jsou také relativně nízké [16].

Jako nevýhody systému lze uvést obtížnější regulaci genové exprese, glykosylace je odlišná od savčích buněk a je nižší výtěžek proteinů než u *E. coli* [16].

2.2.3.3. Hmyzí expresní systémy

Hmyzí expresní systém v sobě zahrnuje výhody jak eukaryontních, tak částečně i prokaryontních expresních systémů. Vnášení DNA do hostitelské buňky se uskutečňuje pomocí dvouvláknového DNA viru *Autographa californica* – bakuloviru. Tento expresní systém vnáší DNA kódující rekombinantní protein do kultury hmyzích buněk formou infekce rekombinovaným bakulovirem. Příprava, ověření a udržování dostatečného množství infekčních virových partikulí (viral stock) představuje nejnáročnější krok. Výhody bakulovirového expresního systému spočívají ve vysoké výtěžnosti produktu, nepřítomnosti endotoxinu a v podobnosti posttranslační modifikace proteinu s modifikací probíhající v savčích buňkách.

Nevýhodou hmyzích buněk jsou vyšší náklady na kultivaci a větší náročnost na čas i odbornou manipulaci [3],[16].

2.2.3.4. Savčí expresní systémy

Pro přípravu savčího proteinu může být nejvhodnější zvolit savčí expresní systém. U tohoto systému je předpoklad stejných posttranslačních modifikací, což je acylace, fosforylace, lipidizace, glykozylace, citrulinace, tvorba disulfidických můstků a mnoho dalších.

Problém exprese rekombinantních proteinů v savčích liniích spočívá ve vysoké finanční náročnosti a relativně nízkém výtěžku. Pro dosažení nejlepšího výtěžku je nutno připravit stabilně transfekovanou linii buněk u které se bude integrovaný genom množit společně s dělicími se buňkami. Selektace takovéto linie zpravidla trvá několik týdnů a je nutné expresi proteinů průběžně monitorovat, abych nedošlo k selektování klonu rezistentního na selekční marker, ale neprodukujícího dostatečné množství rekombinantního proteinu což může být způsobeno integrací části kódujícího rezistenci na selekční marker plazmidu nebo metabolickým potlačením produkce proteinů, který zatěžuje buňku [16].

2.2.4. Příprava expresního plazmidu

Expresní vektory slouží k přenosu cizorodé DNA do hostitelské buňky pro její replikaci nebo expresi. Nejpoužívanějším typem vektoru jsou plazmidy, cirkulární molekuly extrachromozomální DNA, schopné se autonomně množit a přenášet se na potomstvo [3]. Vektor musí nést sekvenční sekvence pro vlastní replikaci v hostitelské buňce (replikátor, selekční marker, klonovací místo), silné regulační oblasti pro expresi proteinu v zaklonovaném genu, klonovací místo tvořené řadou různých restričních míst a selekční markery [17].

2.2.4.1. Subklonování

Integrace genu do vektoru se provádí pomocí ligací. Nejdříve je nutná linearizace plazmidu čili rozštěpení kruhové molekuly DNA. Narušení kruhové struktury plazmidové DNA se provádí pomocí enzymu restriktázy a příslušného vhodného pufru, který umožňuje štěpení DNA. Poté dochází k vložení příslušného genu a jeho začlenění pomocí T4 DNA-ligázy. Pomocí Gen se do vektoru začlení a kovalentně se naváže [17].

2.2.4.2. Gateway

Gateway je komerčně dostupný expresní systém vyžívající rekombinaci mezi dvěma heterologními sekvencemi, která se provádí pomocí enzymu pocházejícímu z bakteriofága

lambda. Tento umožňuje začlenění fága do chromozomu *E.coli* a také přepínání mezi lytickým a lyzogenním cyklem. Tato metoda funguje na principu reversibilní rekombinantní reakce, kde odpadá použití restričních enzymů a nutnost purifikace PCR produktů po ligaci. Výhodou tohoto systému je to, že po vložení požadovaného genu do Gateway vektoru, tento může být přenesen do mnoha dalších expresních vektorů, což zvyšuje flexibilitu této metody. Tato metoda je navíc jednoduchá, vykazuje vysokou efektivitu (cca.99%), rychlá a provádí se za pokojové teploty.

Základem klonování Gateway technologií jsou BP a LR reakce, což je dvoukroková rekombinace vektoru ve specifických *att* místech [4].

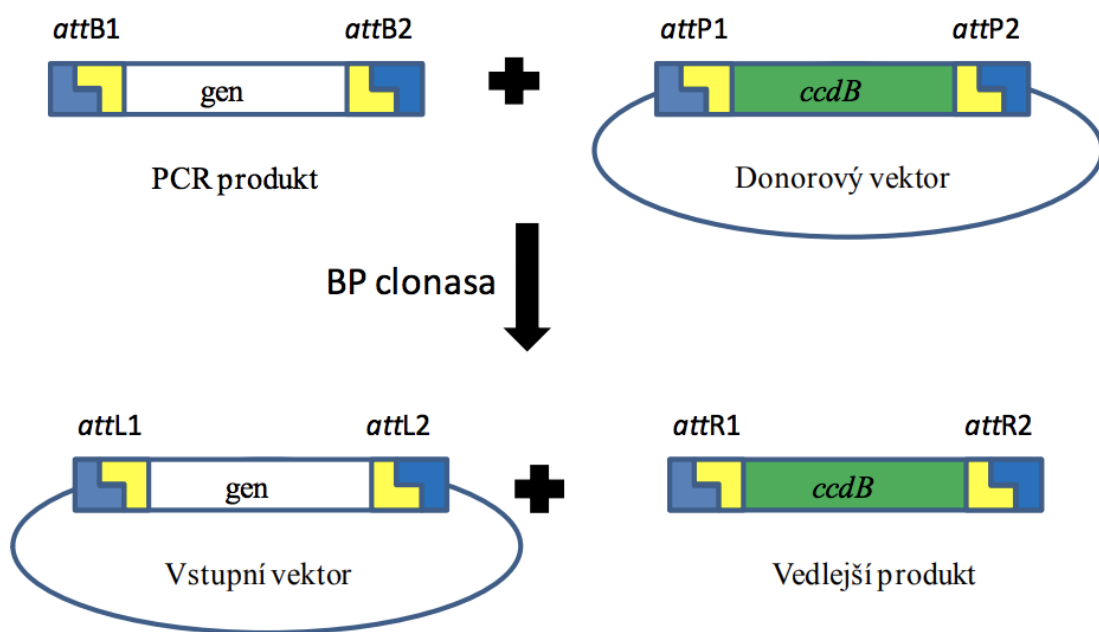
2.2.4.2.1. PCR

PCR (polymerátová řetězová reakce) je jednou z nejrozšířenějších metod v molekulární biologii. Principem této metody je namnožení potřebného úseku DNA replikací nukleových kyselin *in vitro*. Kopie úseku DNA jsou syntetizovány podle templátu enzymem DNA-polymerázou na základě komplementarity bází. Prvním krokem je denaturace dvouřetězcové DNA za vysoké teploty a vytvoření jednořetězcového templátu.

Chemický syntetizované krátké úseky oligonukleotidů, tzv. primery, se připojují ke komplementárním úsekům řetězců DNA, které budou amplifikovány, DNA-polymeráza pak nasyntetizuje nové vlákno DNA [18].

2.2.4.2.2. BP reakce

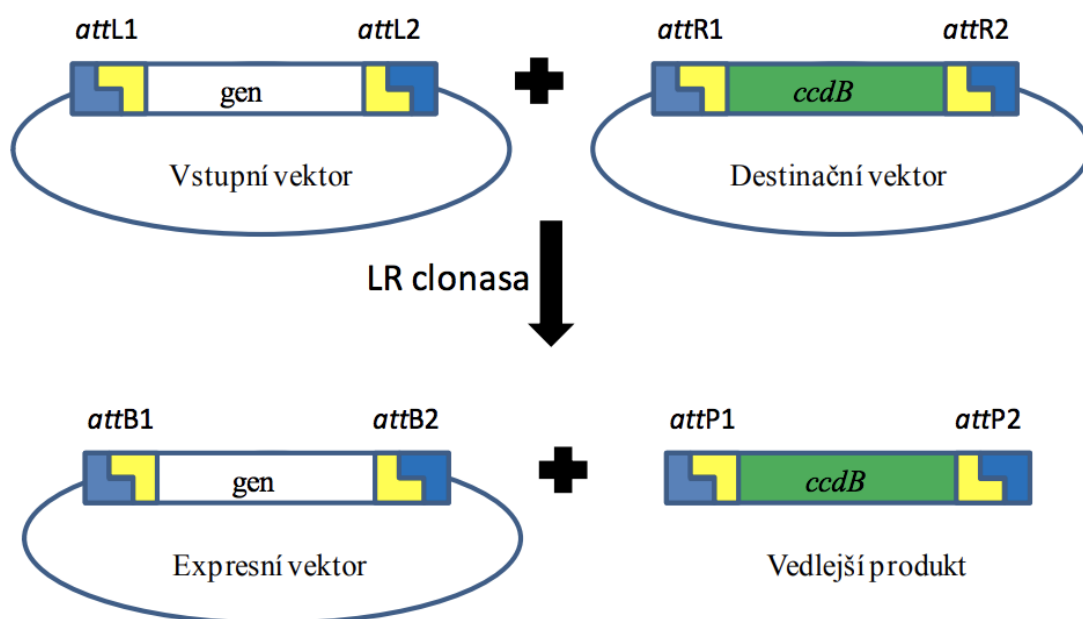
Prvním krokem technologie Gateway je příprava entry klonu (vysvětlit, co to je). Entry klony jsou produkty rekombinací donorového vektoru s PCR produktem požadovaného genu. Během BP reakce PCR produktem, který je ohraničen vždy dvěma místy *attB1* a *attB2*, dochází k rekombinaci s jinou molekulou DNA obsahující *attP* místo, ohraničeném místy *attP1* a *attP2*. Vektory, které se používají v této metodě nesou gen *ccdB*, zabraňující přežití buněk nesoucích prázdný vektor, a to tím způsobem, že toxický pro kmen *E.coli* produkt genu *ccdB* integruje s bakteriálním enzymem gyrázou, který je zodpovědný za správné vinutí DNA během replikace. Způsobené zlomy v DNA znemožňují její replikaci. Takže požadovaný gen se ohraničuje *attB* místy, která jsou vnesena pomocí specifického primeru, a jak je uvedeno na obrázku 2, pomocí BP klonasy dochází k rekombinaci mezi *ccdB* genem v donorovém vektoru a PCR produktem požadovaného genu. Výsledný produkt se nazývá výstupním vektorem, a námi požadovaný gen je ohraničen místy *attL1* a *attL2* [4].



Obrázek 2. Průběh BP reakce [19].

2.2.4.2.3. LR reakce

Dalším krokem je LR reakce. Během této reakce se výstupní vektor, připravený během BP reakce, integruje do destinačního vektoru. Působením LR klonázy je požadovaný gen vystřižen z výstupního klonu a přemístěn do destinačního vektoru za vzniku expresního klonu. Výsledkem této reakce je plazmid, který nese inzert, začleněný na místo genu *ccdB* a tím je zajištěno přežití buněk nesoucích vektor s inzertem [4].



Obrázek 3. Průběh LR reakce – příprava expresního vektoru [19].

2.2.4.3. Sekvenování

Po naklonování konstruktů a jejich izolaci je potřeba ověřit správnost klonování sekvencí. Je nutné zjistit, zda došlo k správnému vnesení konstruktů a zda nedošlo k vytvoření delecí, mutací nebo inserci nežádoucí DNA [20].

Nejčastěji používanou sekvenační technikou je v současné době automatická fluorescenční sekvenace. Toto je založeno na principu Sangerovy enzymatické metody kdy se používají značené primery nebo terminátory (dideoxynukleotidtrifosfáty). Poté dochází k detekci DNA pomocí kapilární elektroforézy, kdy jsou pomocí laserové detekce snímány 4 vlnové délky emitovaného záření a signály jsou zpracovány softwarem [20].

2.2.5. Vnesení plazmidů

Vnesení rekombinantní DNA do prokaryotické buňky označuje jako transformace, do eukaryotické buňky jako transfekce. Předpokladem pro přestup cizorodé DNA do buňky je permeabilizace buněčné membrány. Jsou dva klasické způsoby: chemický a elektrický. Chemický spočívá v tom, že pomocí chemických látek dojde k vytvoření chemokompetentních buněk, které jsou po přidání DNA snadno transformovatelné tepelným šokem. Elektrická metoda spočívá v použití ekletického pulzu pro dočasnou destabilizaci buněčné membrány, tzv. elektroporaci. Kromě těchto metod se k transfekci používají komplexy rekombinantních DNA s kationickými polymery nebo lipozomy, které se adují na buněčnou stěnu a pronikají přes cytoplazmatickou membránu nebo infekce rekombinantním bakulovirem [16].

Při selektování transformované nebo transfekované kolonie buněk je potřeba použít selekční marker k rozlišení transformovaných a transfekovaných kolonií buněk. Jako markery se používají geny kódující rezistenci k antibiotikům nebo nějakým toxickým látkám, které umožňují přežití požadovaných buněčných kolonií v kultivačním médiu s tímto selekčním markrem a vyselektují kolonie buněk, u nichž transformace či transfekce nebyla úspěšná. [16].

2.3. Purifikace proteinů

Purifikace proteinů je jeden z nejdůležitějších procesů v biotechnologii., Pro biotechnologické účely je žádoucí získání velkého objemu purifikovaných a chemicky čistých proteinů bez příměsí balastních látek, kterými jsou nukleové kyseliny, lipidy, sacharidy a ostatní proteiny [21].

Při proteinové purifikaci dochází nejčastěji k izolaci určitého proteinu z biologické tkáně či mikrobiální kultury při udržení jeho enzymatické aktivity. Důležitým krokem pro úspěšnou purifikaci je volba vhodné technologie a optimalizace procesu podle požadovaného produktu [21].

2.3.1. Purifikační strategie

Nejprve je potřeba sestavit postup purifikace, který bude záviset na použitém materiálu, potřebné čistotě výsledného produktu, obsahu potřebných látek a výsledném použití. Výběr vhodného výchozího materiálu je jedním z nejdůležitějších kroků, a musí být zvolen tak, aby byl výtěžek proteinů maximální při minimálních odběrech biologického materiálu [21].

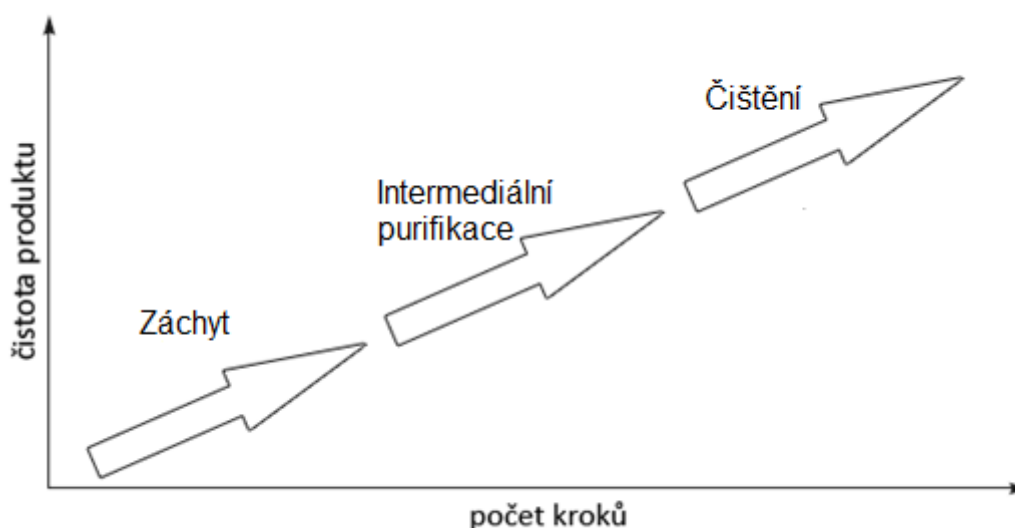
Většinou je potřeba použít několik kroků pro dosažení potřebné čistoty produktu. Tímto může dojít ke ztrátám, a proto je potřeba přihlídnout k efektivitě těchto kroků [21].

2.3.1.1. Třífázová purifikační strategie

Třífázová purifikační strategie je založena na třech základních fázích: záchyt, intermediální purifikace a čištění. Tato strategie je koncipována tak, aby zajistila co nejrychlejší vývoj purifikačních metodik, rychlé získání produktu a při tom byla dodržena ekonomická efektivita purifikačního procesu. Tento přístup je univerzální a je doporučen pro libovolnou vícekrokovou purifikaci proteinů.

Před začátkem celého procesu dochází k obvykle extrakci a homogenizaci biologického materiálu, pro dosažení stability produktu a jeho homogenizaci pro následnou purifikaci. V některých případech není potřeba tento provádět tyto kroky, a před samotnou chromatografií je ve vzorku pouze upravená iontová síla a pH.

Prvním krokem je záchyt. Během záchytu jsou z původního materiálu odstraněny hlavní nečistoty a produkt je částečně izolován. Rovněž dochází k zakoncentrování a stabilizaci vzorku tak, aby byla zachována biologická aktivita proteinů. V druhém kroku (intermediální purifikace) jsou odstraněny balastní kontaminanty, jako jsou nukleové kyseliny, ostatní proteiny, endotoxiny a viry. Posledním krokem (čištění) jsou odstraněny zbývající stopové nečistoty nebo blízké příbuzné substance a je dosažena výsledná čistota produktu. Jednotlivé kroky jsou zobrazené na obrázku Obrázek 4 [21].



Obrázek 4. Třífázová purifikační strategie [22].

Třífázová purifikační strategie nemusí probíhat vždy pouze ve třech krocích a je sestavena podle požadované výsledné čistoty a podle vlastností výchozího materiálu. [21], [22].

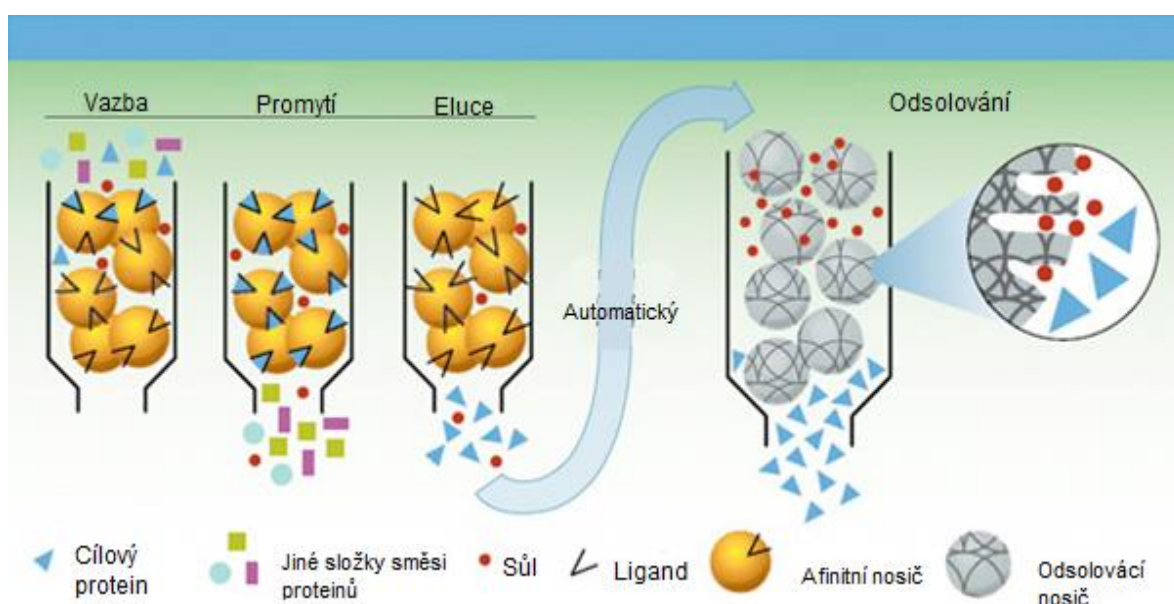
2.3.2. Metody izolace proteinů

Proteiny jsou většinou purifikovány pomocí chromatografických technik. Každá z těchto technik má odlišný způsob purifikace, a výběr metody kterou budeme používat závisí na požadovaných vlastnostech výsledného produktu. Vzhledem k tomu, že každá technika funguje podle určitého mechanismu a při tom má svá omezení, není možné jejich použití pro libovolný krok purifikace [22].

2.3.3. Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie odděluje proteiny na základě reverzibilních interakcí mezi proteinem a speciálním ligandem, umístěným na chromatografické matici. Tato metoda je unikátní a umožňuje separovat biomolekuly na základě jejich biologických funkcí nebo individuální chemické struktury. Tímto je umožněno oddělit aktivní molekuly od denaturovaných, a získat velký a čistý výtěžek molekul proteinů, které jsou přítomny v malých koncentracích a ve velkých objemech surového vzorku [23].

Afinitní chromatografie je obvykle prvním krokem purifikačního protokolu, díky své vysoké specifitě k pevně navázanému proteinu a tím odmytí ostatních složek buněčného lyzáátu nebo kultivačního média. Složka, která musí být oddělena, je specificky navázaná kovalentní vazbou na matrix kolony, při podmínkách příznivých pro jejich specifickou vazbu k ligandu. Nenavázané složky z výsledného vzorku jsou vymyty. Eluce se provádí specificky při použití konkurenčního ligandu nebo nesespecificky pomocí změny pH, iontové síly nebo polaritě. Výsledný protein se shromažďuje ve vyčištěné, koncentrované formě (Obrázek 5) [23].



Obrázek 5. Schéma afinitní chromatografie [24].

2.3.3.1. SDS-PAGE

SDS-PAGE analýza je laboratorní technika, která se využívá k separaci a vizualizaci proteinů podle jejich molekulové hmotnosti na základě jejich rozdílu v rychlosti migrace přes síťovou matici (gel) působením elektrického pole. Tato metoda využívá nespojitého polyakrylamidového gelu jako podpůrného média a sodium dodecyl sulfát k denaturaci proteinů.

SDS je detergent, který nese negativní náboj na svém povrchu a je schopen rozpouštět hydrofobní molekuly a narušit terciální strukturu proteinů. SDS pokrývá polypeptidový řetězec negativním nábojem, který maskuje vnitřní náboj na R-skupinách a váže se ho takové množství, které proporcionalně odpovídá molekulové hmotnosti proteinu. Jako výsledek dostáváme protein negativním elektrickým nábojem, který v elektrickém poli migruje k pozitivnímu pólu a je umožněna jeho separace.

Denaturované proteiny se po umístění do elektrického pole budou pohybovat směrem ke kladnému pólu, ale stejnou rychlostí, proto je třeba umístit proteiny do takových podmínek, které umožní pohyb k anodě v závislosti na jejich molekulové hmotnosti. Proto se používá gelová matrice, v daném případě polyakrylamid, který je chemický inertní a může být vyroben v různých koncentracích.

Pro vytvoření elektrického pole a vytvoření proudového napětí od katody k anodě přes gel je potřeba pufr. Většinou se používá Laemmliho systém pufrů, který se skládá ze dvou pufrů o různé hodnotě pH pro přípravu zaostřovacího a separačního gelu a jeden pufr tvořící elektrolyt. Systém se nastavuje pomocí zaostřovacího gelu o pH 6,8, pufrovaného pomocí Tris-HCl, rozdělovacího gelu o pH 8,8 pomocí Tris-HCl a pufru pro elektrodu o pH 8,3. Zaostřovací gel má nízkou koncentraci akrylamidu a separační gel má vyšší koncentraci, což umožňuje zpomalit pohyb proteinu.

Glycin, který je složkou polyakrylového gelu mění svůj náboj v závislosti na pH roztoku a této vlastnosti se využívá při elektroforéze. Negativně nabitě glycinové iony, které jsou obsažené v separačním gelu vstupují do zaostřovacího gelu, kde ztrácí svůj náboj a dochází k zpomalení jejich pohybu v elektrickém poli. Oproti tomu se ionty chlóru pohybují mnohem rychleji. Všechny proteiny v gelovém vzorku mají elektroforetickou pohyblivost, která je středem mezi extrémní pohyblivostí glycinu a Cl^- , takže když obě fronty procházejí jamkou vzorku, proteiny jsou koncentrovány do úzké zóny mezi Cl^- a glycinu [21], [25].

2.3.3.2. Western Blotting

Western blot je analýza používána pro oddělení a identifikaci proteinu pomocí ELFO na pevnou membránu. Při této technice se směs proteinů oddělí na základě specifické vazby protilátky [26].

Nejprve se vyextrahují proteiny z tkání nebo kultivovaných buněk a odstraní se kontaminující látky. Vzorky se pak separují podle molekulové hmotnosti gelovou elektroforézou na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE). Konečným krokem postupu western blotu je identifikace přítomnosti specifického proteinu. Vzhledem k tomu, že vrstva gelu je extrémně jemná, nejprve je potřeba přenést proteiny na tenkou nitrocelulóзовou membránu v procesu "blotting". Tento proces využívá proud pro přesun proteinu z gelu na membránu. Po přenosu proteinu na membránu se tento detekuje ve vzorku pomocí inkubace v roztoku se specifickou protilátkou. Tato protilátka je připojena k radioaktivnímu izotopu, snadno detekovatelnému enzymu nebo fluorescenčnímu barvivu. Označená protilátka označuje přítomnost proteinu jako diskretního pásu v dráze gelu. Porovnáním umístění proteinu na blotu se standardním proteinovým žebříkem se zjišťuje jeho specifické molekulové hmotnosti [17].

Látky, které se nenačly se odmyjí a tím zůstávají pouze navázané protilátky na požadovaný protein. Pro označení protilátek se používají enzymy, např. alkalická fosfatáza nebo křenová peroxidáza, které se da detekovat vizuálně pomocí konverze kolorimetrického substrátu (chromogenu) nebo díky změně chemiluminiscenčního substrátu, který je poté schopen emitovat snadno detekovatelné signály [27].

3. Experimentální část

3.1. Cíl práce

Cílem experimentální části této bakalářské práce bylo:

- Gateway klonování – LR reakce pro přípravu expresních klonů pro produkci proteinů
- transformace kompetentních buněk
- izolace plazmidové DNA
- ověření správnosti jednotlivých klonů sekvenováním

3.2. Materiály a přístroje

3.2.1. Enzymy

- Gateway BP Clonase II Enzyme Mix Thermo Fischer Scientific
- Gateway LR Clonase II Enzyme Mix Thermo Fischer Scientific
- Proteinase K (2 µg/µl) Thermo Fischer Scientific

3.2.2. Primery

- T7 forward primer (100 mM)
- T7 reverse primer (100 mM)

3.2.3. Plazmidy

- Gateway pDONR221 Vector Thermo Fischer Scientific
- Gateway pDEST17 Vector Thermo Fischer Scientific

3.2.4. Ostatní materiál

- DNA Žebříček 1 kb DNA Ladder New England Biolabs
- Nucleo Spin Plasmid NoLid Machery

3.2.5. Laboratorní přístroje

- Autokláv Microjet Enbio, Personal Microwave Autoclave
- Centrifuga Eppendorf 5804R
- Centrifuga stolní miniSpin, Eppendorf
- Elektroforetická vana Mini-SUB CELL GT, BIO-RAD
- Inkubátor QBT2, Grant
- Sada pipet Eppendorf Research
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000
- Termoblok Thermomixer Comfort Eppendorf
- Termostat Biological Thermostat BT 120M
- Transiluminátor UVT-28MP, Herolab
- Třepačka Orbital Shaker-Incubator, Biosan
- Váhy Sartorius TE 412
- Vortex Vortex 2 Genie, Scientific Industries
- Zdroj napětí POWER PAC BASIC, BIO-RAD
- Zobrazovací zařízení LCU-I, Herolab

3.2.6. Chemikálie

- Agaróza Oxoid
- Agaróza Serva
- Ampicilin BB Pharma
- EDTA Sigma Aldrich
- Ethanol Merck

- Glukoza Sigma-Aldrich
- Glycerol Serva
- Chlorid hořečnatý Sigma-Aldrich
- Chlorid vápenatý Penta
- Kyselina octová Merck
- NaCl Penta
- Síran hořečnatý Lach-Ner
- Tris Sigma Aldrich
- Trypton Duchefa Biochemie
- YEAST Duchefa Biochemie
- GelRed Nucleic Acid Gel Stain, Biotium

3.3. Metody

3.3.1. BP reakce

BP reakce nebyla provedena, protože pro produkci rekombinantního proteinu byly poskytnuty entry klony z laboratoře Thorstena Stiewa z Marburgu (Německo) [28].

Tabulka 1: Použité Entry klony.

Název	Označení v bakalářské práci	Koncentrace [ng/μl]
pENTRD-p53-S183AS185A	A	225,25
pENTR-p53RR-A344A	B	272,04
pENTR-p53EE-L344A	C	249,44
pENTRD-p53-S183DS185D	D	305,16

3.3.2. LR reakce

Pro provedení LR reakce byly použity klony připravené v Německu s označením A, B, C, D. Jako destinační vektor byl vybrán plazmid pDEST17.

Příprava TE pufru

Do 500 ml odměrné baňky se přidalo 5 ml 1M roztoku Trisu a 1 ml 0,5M roztoku EDTA. Odměrná baňka se doplnila po značku destilovanou vodou, pH bylo upraveno na hodnotu 7,9, roztokem NaOH.

LR

Množství přidaného entry klonu a destinačního vektoru bylo vypočítáno tak, aby bylo plazmidů ve směsi molárně stejně, což v tomto případě znamená 150 ng entry klonu a 300 ng destinačního vektoru. Entery klon, destinační vektor, TE pufr a LR klonáza byly smíchány a zvortexovány v množství uvedeném v tabulce Tabulka 2: do celkového objemu 10 μl.

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro LR reakce.

Vstupní klon	Množství klonu [μl]	pDEST17 [μl]	TE pufr [μl]	LR Klonáza [μl]
A	0,66	1,74	5,60	2
B	0,55	1,74	5,71	2
C	0,60	1,74	5,66	2
D	0,49	1,74	5,77	2

Vzorky se nechaly se inkubovat přes noc při teplotě 25°C. Po proběhnutí LR reakce byl přidán 1μl proteinázy K ke každému vzorku. Vzorky byly zvortexovány a stočeny pomocí centrifugy a následně se nechaly inkubovat 10 minut při 37°C.

3.3.3. Transformace

Pro transformaci byly použity kompetentní buňky *STBL3*.

Příprava *STBL3*

10 ml bakteriální kultury se kultivovalo v LB médiu v 100 ml Erlenmeyerově baňce při 37°C přes noc. 1 ml buněk byl následně přenesen do 50 ml LB média. Další inkubace probíhala 3 hodiny při 37°C na třepačce. Buňky byly následně přeneseny do vychlazených 50 ml zkumavek a byly následně inkubovány na ledu po dobu 10 min. Poté byly zkumavky centrifugovány při 6000 rpm po dobu 10 minut při 4°C. Supernatant byl odstraněn a pelet rozsuspendován v 10 ml vychlazeného 0,1M roztoku CaCl₂. Směs byla inkubovaná 25 minut na ledu a následně znovu centrifugována při 6000 rpm po dobu 10 minut při 4°C. Supernatant byl odstraněn, pelety byly rozsuspendovány v 1 ml 0,1M roztoku CaCl₂ a do suspenze bylo přidáno 0,2 ml 70% sterilního glycerolu. Po opatrném zamíchání na ledu směs byla rozdělena po 100 µl do ependorfeček a ependorfky byly následně zmrazeny v kapalném dusíku a uloženy do hlubokomrazicího boxu při -70°C.

Transformace

V každé vzorku bylo smícháno 50 µl kompetentních buněk *STBL3* s 8 µl transformovaného plazmidu po LR reakci. Směs se nechala inkubovat na ledu 30 minut. Poté se vzorky přenesly na termoblok a provedl se po dobu 40 vteřin tepelný šok při 42°C. Následně byly vzorky přeneseny na led a inkubovány na ledě po dobu 2 minut. Do každé ependorfky bylo přidáno po 1 ml SOC media předehřátého na 37°. Vzorky byly opatrně promíchané a nechaly se inkubovat na termobloku 1 hodinu při 37°C a 250 rpm.

Příprava SOC media

Pro přípravu 100 ml SOC media byly smíchány 2 g tryptonu, 0,5 g kvasinkového extraktu, 1 ml 1M NaCl a 25 ml 1M HCl. Směs byla doplněna na objem 100 ml destilovanou vodou. Vzniklý roztok se následně vyautoklávoval. Dále byla směs rozpipetovaná do ependorfeček o objemu 2 ml a do každé ependorfky se přidalo po 20 µl 1M glukosy, 10 µl 1M MgCl₂ a 10 µl 1M MgSO₄.

První kultivace buněk a příprava LB média

Pro přípravu 200 ml LB media bylo rozpuštěno 2 g NaCl, 2 g tryptonu, 1 g kvasinkového extraktu a 2,8 g agaru (výsledná koncentrace 1,4 %) v destilované vodě, doplněné do celkového objemu 200 ml. Směs byla vysterilizována v autoklávu. Do 200 ml vychladlého média bylo přidáno antibiotikum: 200 µl ampicilinu na 200 ml (výsledná koncentrace 100 µg/ml).

Po inkubaci byla směs buněk centrifugovaná při 0,1 x g, přebytek SOC média byl slit a zbylý objem buněk byl přenesen na Petriho misku s agarem. Roztěr bakteriální kultury na misce byl vždy proveden ve sterilní digestoři sterilní hokejkou. Vzorky se kultivovaly přes noc při 37°C v inkubátoru (max 16 hodin, poté byly přeneseny do chladničky).

Druhá kultivace buněk v LB médiu

Bylo připraveno tekuté LB médium stejným způsobem jako bylo popsáno v předchozí kapitole, ale bez přidání agaru. Do vysterilizovaného média bylo po vychladnutí přidáno

antibiotikum ampicilin tak, aby výsledná koncentrace byla 100 µg/ml. Médium bylo rozpipetováno po 5 ml do falkonek.

Z narostlých kolonií po první kultivaci buněk byla vždy vybrána jedna kolonie bez satelitních kolonií. Jedna polovina označené kolonie byla převedena do tekutého LB média a s druhou polovinou byl udělán křížový roztěr na pevném LB agaru s ampicilinem. Vzorky se kultivovaly 12 hodin při 37°C, a to buď na třepačce (tekuté LB) nebo v inkubátoru (pevné LB).

3.3.4. Izolace plazmidové DNA

5 ml zaočkovaného LB média s ampicilinem bylo přes noc ponecháno na třepačce při 140 rpm a 37 °C. Následující den bylo z narostlé kultury odebráno 500 µl, doplněno 713 µl 70% glycerolu a po důkladném promísení byla kultura uložena do hlubokomrazacího boxu na -80°C jako zásobní.

Zbytek narostlé kultury byl centrifugován při 11,000 x g po dobu 60 vteřin.

Plazmidová DNA byla izolována pomocí komerčního kitu NoLid® Nucleo Spin Plasmid.

Postup:

- 5 ml bakteriální kultury bylo stočeno při 11000 rpm po dobu 30 sekund, poté byl odstraněn supernatant.
- Pelet buněk byl rozsuspendován pipetou v 250 µl roztoku Buffer A1.
- Bylo přidáno 250 µl roztoku Buffer A2 a vzorky byly promíchány otočením zkumavky. Roztok se nechal inkubovat při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
- Ke směsi bylo přidáno 300 µl roztoku Buffer A3 a vzorky byly promíchány otočením zkumavky.
- Směs byla centrifugovaná při 11000 rpm po dobu 5 minut.
- Kolonka NucleoSpin® Plasmid Colum byla vložena do sběrné nádoby Collection Tube a supernatant z předchozího kroku v maximálním množství 750 µl byl nepipetován do kolony. Zkumavky byly centrifugované 1 minutu při 11000 rpm. Tekutina byla po centrifugaci odstraněna.
- Do kolony bylo nepipetováno 600 µl roztoku Buffer A4 a vzorky se stočily na centrifuze po dobu 1 minuty při 11000 rpm. Roztok byl po centrifugaci odstraněn. Tento promývací krok se opakoval ještě jednou.
- Kolonka bylo vysušena centrifugací po dobu 2 minut při 11000 rpm. Roztok byl po centrifugaci odstraněn.
- Kolony byly umístěny do nové zkumavky a do kolony bylo přidáno 30 µl roztoku Buffer AE a směs se nechala inkubovat se při 70°C 2 minuty. Následně byly vzorky stočeny při 11000 rpm po dobu 2 minut. Eluát obsahuje izolovanou DNA.
- Koncentrace naizolované DNA byla následně změřena na spektrofotometru.

3.3.5. Sekvenování

Pro sekvenování byly vzorky rozpipetované po 5 µl do dvou sad o koncentraci 80–100 ng plasmidu na jeden vzorek. Podle potřeby byly vzorky předem ředěny destilovanou vodou. K jedné sadě bylo přidáno 5 µl primeru označeného jako Forward T7, do druhé sady bylo přidáno stejné množství primeru s označením Reverse T7 terminator. Vzorky byly poslány na sekvenování firmě GATC biotech.

3.3.6. Gelová elektroforéza

Příprava nanášecího LB pufru

Pro přípravu 6x koncentrovaného LB pufru se v 500ml odměrné baňce smíchalo 200 g glycerolu, 1 g bromfenolové modři a 1 g xylencyanolové violeti. Odměrná baňka se doplnila po značku destilovanou vodou.

Příprava TAE pufru

Do litrové odměrné baňky se přidalo 242 g Trisu, 18,6 g EDTA a 57,1 ml kyseliny octové. Odměrná baňka se doplnila po značku destilovanou vodou.

Příprava vzorku pro elektroforézu

Vzorky pro kontrolu naizolované DNA byly připraveny smícháním plazmidové DNA s destilovanou vodou a LB pufrům podle tabulky Tabulka 3:.

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro elektroforézu.

Vzorek	Množství vzorku [μ l]	H ₂ O [μ l]	LB pufr [μ l]
A	2,22	7,78	1
B	0,46	9,54	1
C	2,38	7,62	1
D	2,94	7,06	1
pDEST17	0,58	9,5	1
Žebříček	1	9	1

Příprava agarózového gelu

Pro elektroforézu byl připraven 0,5 % gel. Do Erlenmeyerovy baňky bylo přidáno 0,5 g agarózy, 2 ml TAE pufru a objem byl doplněn na 100 ml destilovanou vodou. Směs se nechala rozvařit v mikrovlnné troubě. Po ochlazení byl do gelu přidán GelRed v množství 0,2 μ l. Gel byl nalit do předem sestavené vaničky a do gelu byl vložen hřeben. Po ztuhnutí byl gel přenesen do vany s pufrům a hřeben byl následně z gelu vyndán.

Elektroforéza

Vzorky byly nanesené na gel, elektroforetická vana byla připojena ke zdroji napětí a elektroforéza probíhala při konstantním napětí 80 V po dobu 80 minut při 4°C, poté napětí bylo zvýšeno na 110 V na dobu 20 minut. Vizualizace a odečtení výsledků DNA bylo provedeno pomocí UV-transiluminátoru.

3.3.7. Srovnání plasmidů používaných a vytvořených při Gateway klonování

Příprava vzorku

Vzorky pro porovnávací elektroforézu byly připraveny smícháním komponentu podle tabulky 4.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro elektroforézu.

Vzorek	Koncentrace [ng/ μ l]	Množství vzorku [μ l]	H ₂ O [μ l]	LB pufr [μ l]
pDONR221	465,30	0,220	9,780	2
Entryklon A	225,25	0,444	9,559	2
pDEST17	121,30	0,824	9,176	2
Expresní klon pDEST/A	178,00	0,562	9,438	2
Žebříček	500,00	0,500	4,500	1

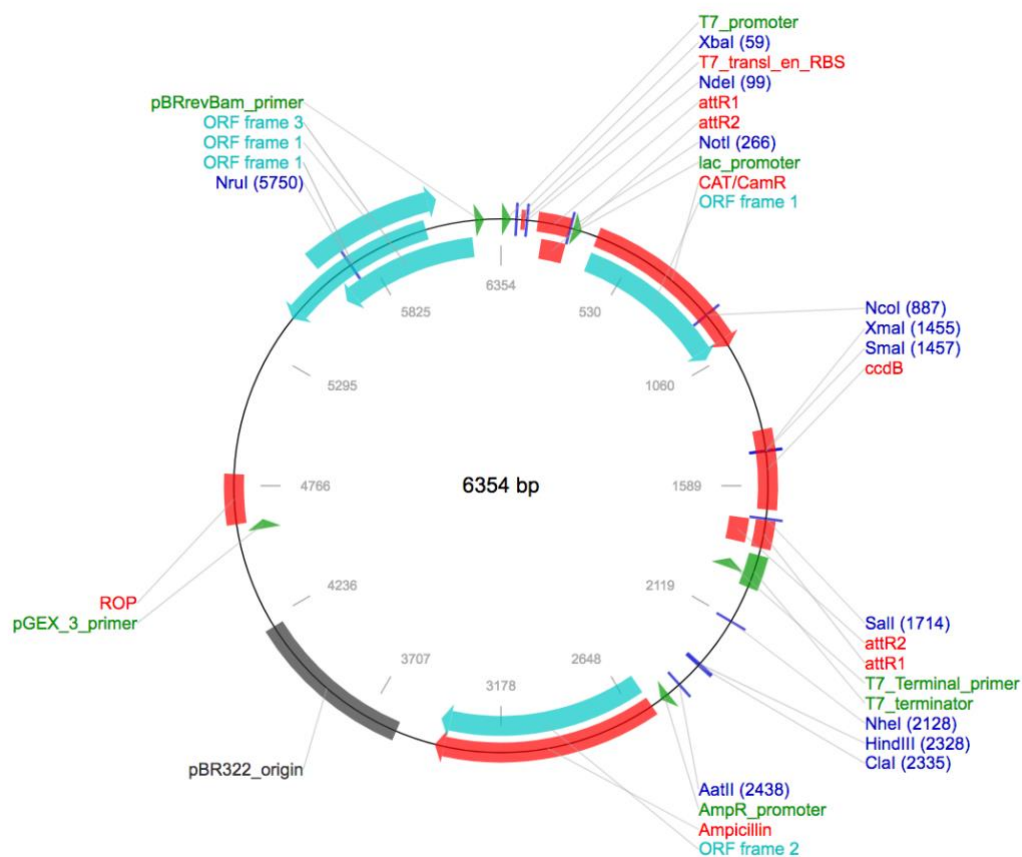
Elektroforéza

Pro elektroforézu byl zvolen 1 % agarózový gel předem připravený podle postupu uvedeném v předchozí kapitole. Elektroforéza probíhala 60 minut při napětí 100 V a při pokojové teplotě. Vizualizace a odečtení výsledků elektroforézy bylo provedeno pomocí UV-transiluminátoru.

4. Výsledky a diskuze

4.1. LR reakce

Během LR reakce dochází k rekombinaci mezi entry klonem obsahujícím *attL* místa a destinačním vektorem obsahujícím *attR* místa. Jako destinační vektor byl použit plazmid pDEST17 (mapa plazmidu Obrázek 6) kvůli přítomnosti hexahistidinové kotvy, která se používá pro purifikaci proteinů během afinitní chromatografie.

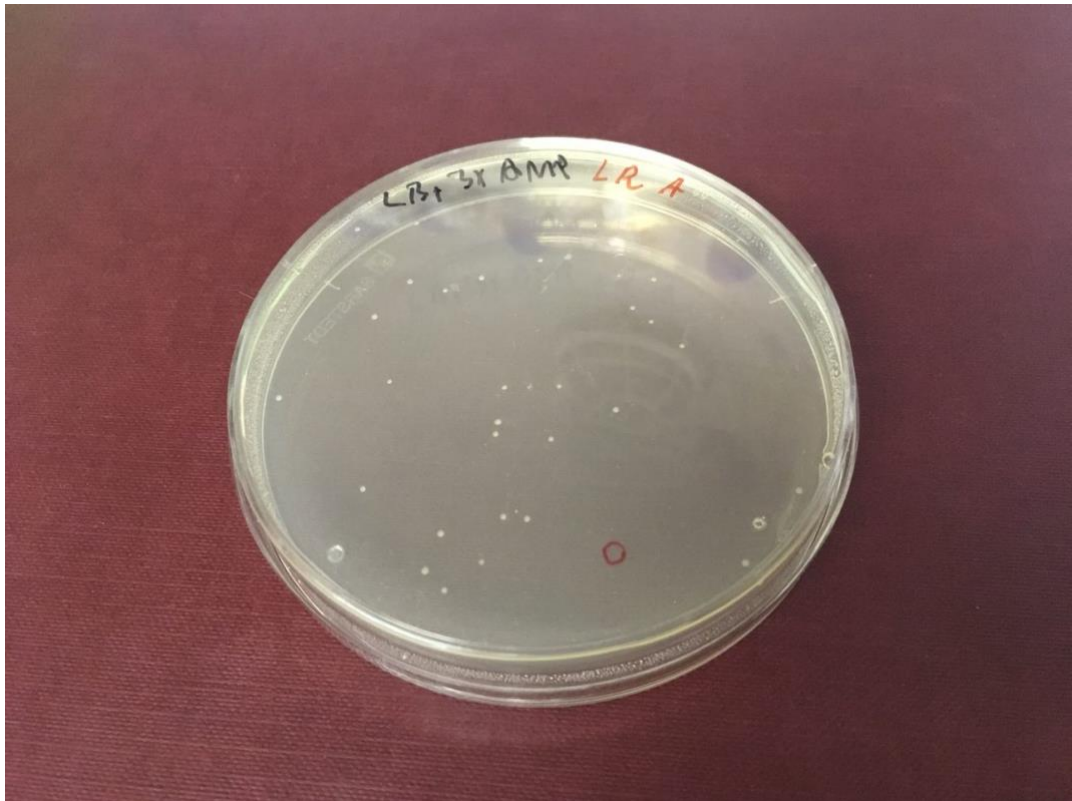


Obrázek 6. Mapa destinačního vektoru pDEST17 [29].

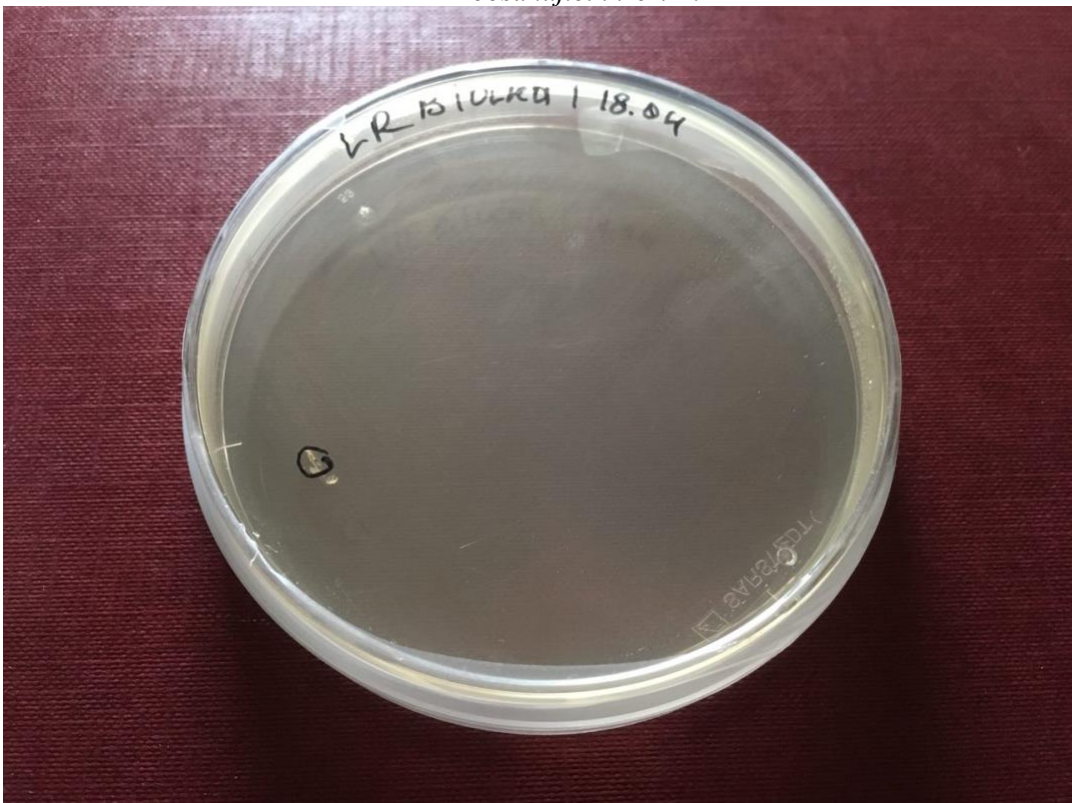
Byly připraveny varianty konečných konstruktů: pDEST17/A, pDEST17/C, pDEST17/D.

4.2. Transformace

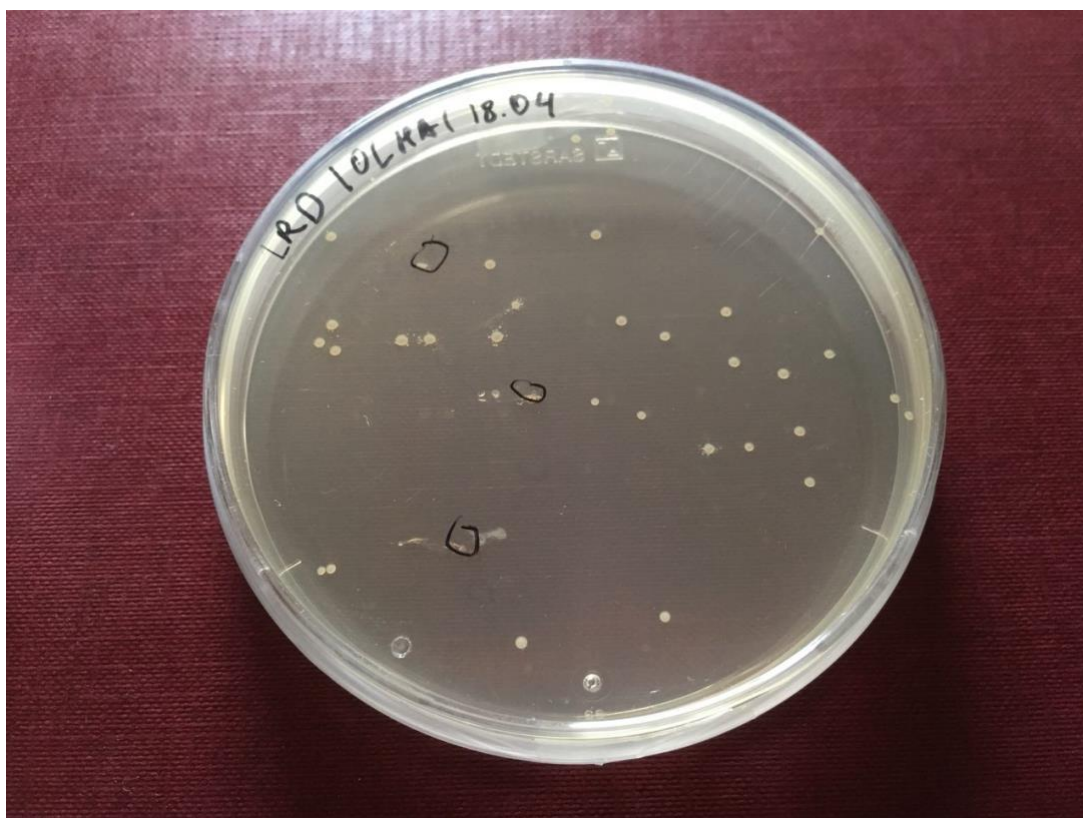
Po transformaci plazmidů získaných v LR reakci do kompetentních buněk *STBL3* došlo k selekci pozitivních kolonií na agarových plotnách s ampicilinem. Následně byly pro další kroky vybrány vždy kolonie bez satelitů. Po neúspěšných pokusech u vzorku D byly vybrány z každé misky další tři kolonie, celkem byla DNA izolována z šesti kolonií a tyto DNA jsme následně odeslali k sekvenaci.



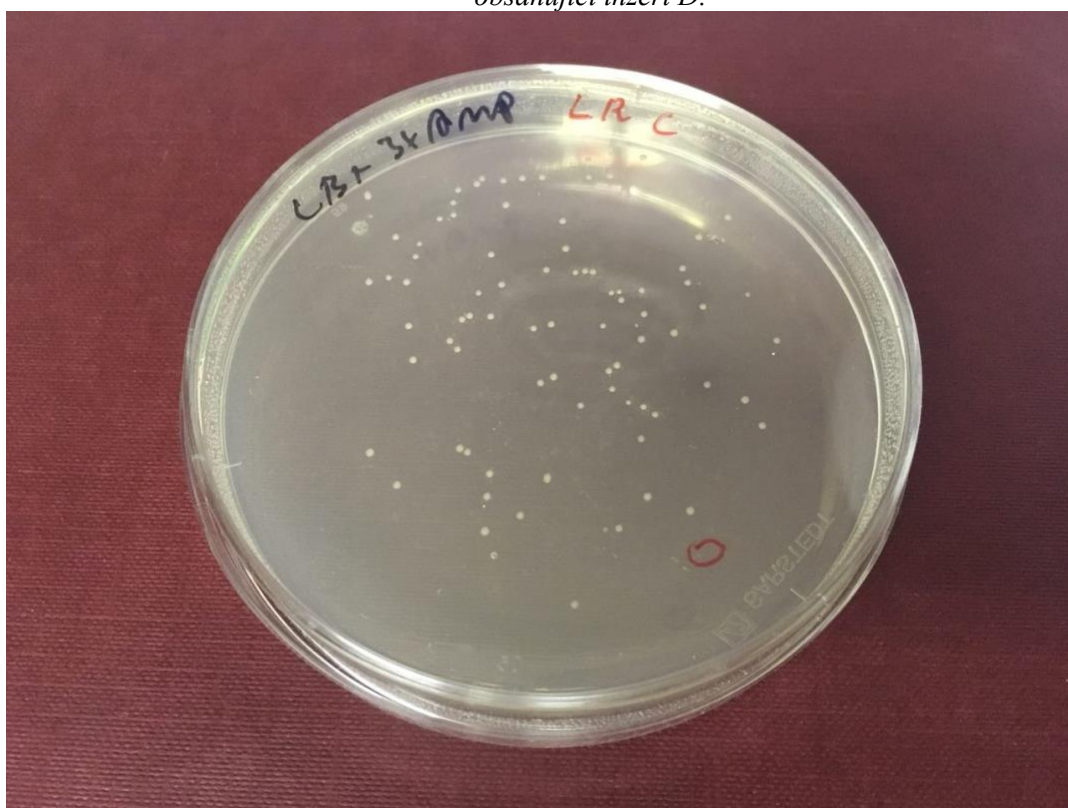
Obrázek 7. Kolonie narostlé po transformaci kompetentních buněk STBL3 LB agaru obsahující inzert A.



Obrázek 8. Kolonie narostlé po transformaci kompetentních buněk STBL3 LB agaru obsahující inzert B.



Obrázek 9. Kolonie narostlé po transformaci kompetentních buněk STBL3 na LB agaru obsahující inzert D.



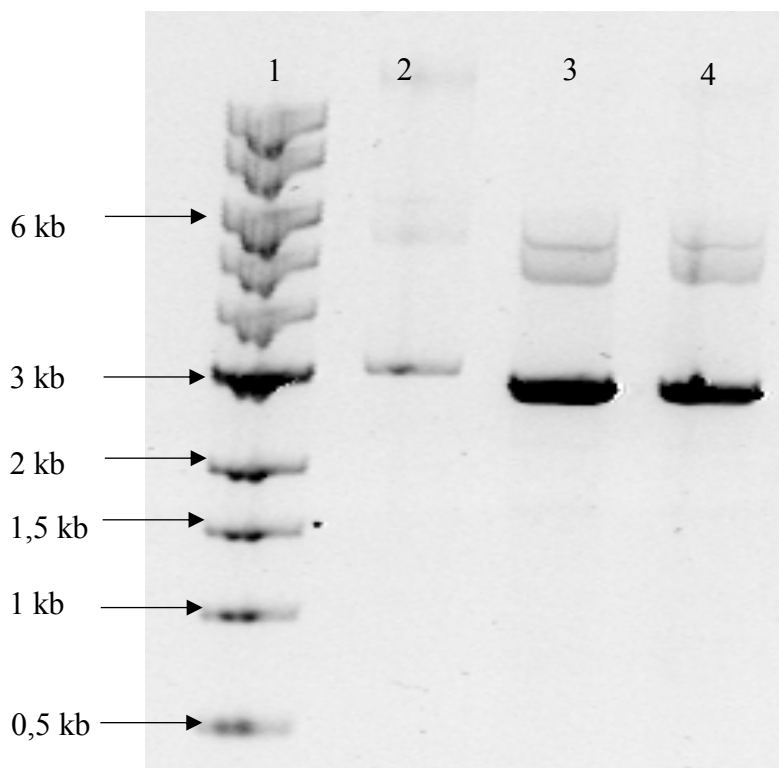
Obrázek 10. Kolonie narostlé po transformaci kompetentních buněk STBL3 na LB agaru obsahující inzert C.

4.3. Izolace DNA

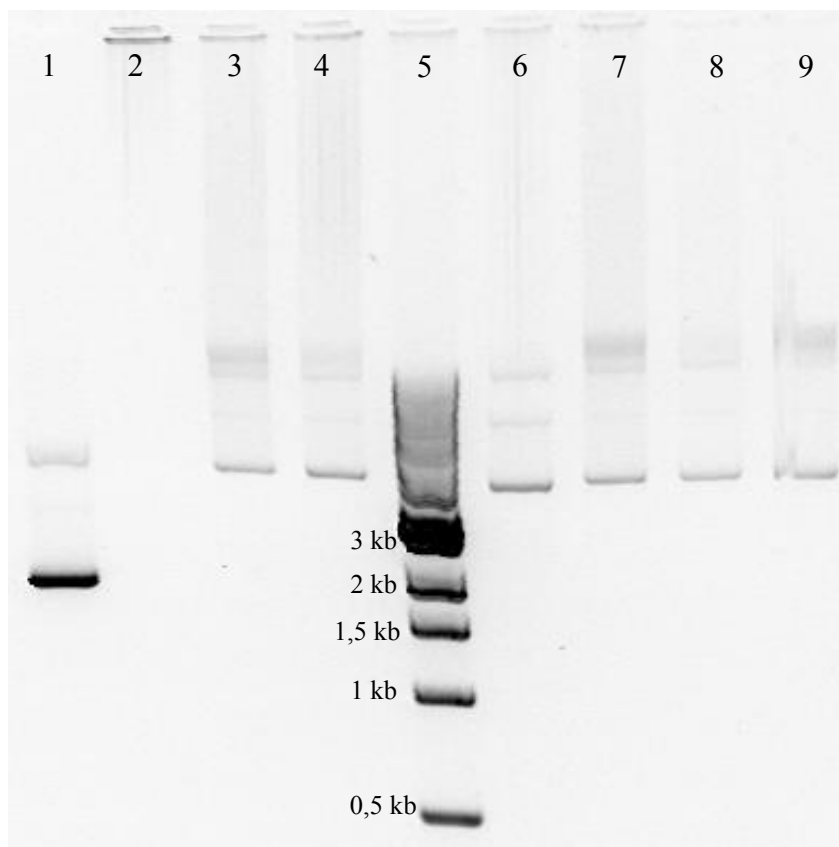
Plazmidovou DNA jsme následně izolovali pomocí komerčního kitu (přesný postup je popsán v podkapitole 3.6). Pro vyhodnocení izolace DNA byla použita elektroforéza v agarozovém gelu a následná detekce. Na obrázcích Obrázek 11 a Obrázek 12 jsou zobrazeny výsledky elektroforézy, kde jsou vidět rozdíly mezi jednotlivými konstrukty.

Použitý žebříček, umístěný ve startu č. 1 (Obrázek 11) a č. 5 (Obrázek 12), má rozsah velikostí 0,5 kb - 10 kb. Na obrázku 11 ve startu č. 2 byl umístěn plazmid pDEST17 (6,35 kb) pro porovnání velikostí plazmidu před a po rekombinaci. Během reakce došlo k výměně mezi *attL* místy v entry klonu a *attR* místy v destinačním vektoru pDEST17, a to za vzniku vedlejšího produktu s *ccdB* genem, který se používá pro selekci buněk. Sekvence, která se z destinačního vektoru při rekombinaci vyštěpí, má délku 1650 bází a sekvence, která je do destinačního vektoru vložena má délku 1250 bází. Z tohoto důvodu je na gelu vidět zvýšená mobilita plazmidů získaných LR reakcí (Obrázek 11 starty 3 a 4, Obrázek 12 starty 1-4 a 6-9). Na obrázku Obrázek 12 ve startu č. 6 byl umístěn plazmid pDEST17/C pro porovnání velikosti plazmidu připraveného během první provedené LR reakci a následujících LR reakci.

Vzhledem k tomu, že plazmidová DNA má kruhovou strukturu, molekuly jsou kompaktnější a putují gelem rychleji než lineární DNA o stejné délce. Kvůli této skutečnosti je třeba dávat pozor při porovnání velikosti plazmidů s použitým žebříčkem.



Obrázek 11. Výsledek izolace plazmidové DNA na 0,5 % agarozovém gelu. Vzorky obsahovaly 100 ng DNA. Start č. 1: DNA žebříček s rozsahem 0,5-10 kb; start č. 2: pDEST17; start č. 3: pDEST17/A; start č. 3: pDEST17/C.

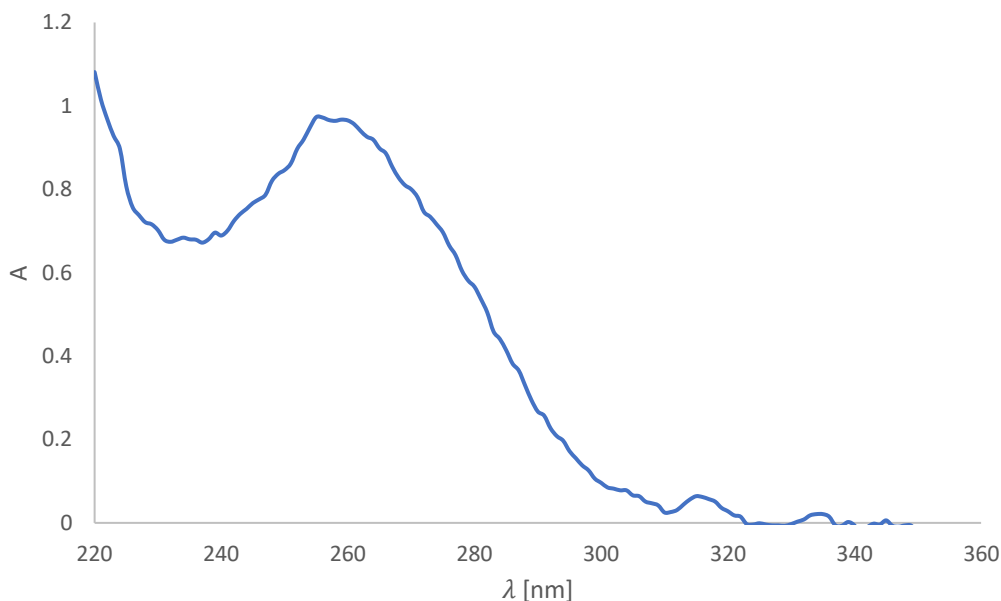


Obrázek 12. Výsledek izolace plazmidové DNA na 1 % agarozovém gelu. Vzorky obsahovaly 100 ng DNA. Start č. 1: pDEST17/B; start č. 2–4: pDEST/D; start č. 5: DNA žebříček s rozsahem 0,5–10 kb; start č. 6: pDEST17/C; start č. 7–9: pDEST17/D2.

Koncentrace vzorku byla změřena spektrofotometricky, závislost absorbance vzorku izolované plazmidové DNA pDEST17/D (1) na vlnové délce je uvedena na obrázku Obrázek 13. Koncentrace získané plazmidové DNA je uvedeno v tabulce Tabulka 5:

Tabulka 5: Koncentrace izolované plazmidové DNA.

Izolované DNA	Koncentrace [ng/μl]
pDEST17/A	45,00
pDEST17/C	42,00
pDEST17/D (1)	48,26
pDEST17/D (2)	55,54
pDEST17/D (3)	43,14
pDEST17/D2 (2)	25,71



Obrázek 13. Graf závislosti absorpance vzorku izolované DNA na vlnové délce pro pDEST17/D.

4.4. Sekvenování

Sekvenováním byly ověřeny připravené konstrukty. Data získaná po sekvenování byly zpracovány pomocí softwaru CLC Sequence Viewer 8 (QIAGEN Bioinformatics). Potřebný gen byl vždy vyhledáván pomocí specifických forward a revers sekvencí (Tabulka 6:). Celkem se podařilo úspěšně připravit konstrukty pDEST17/A, pDEST17/C, pDEST17/D a tyto konstrukty mohou být použité dále pro produkci proteinu.

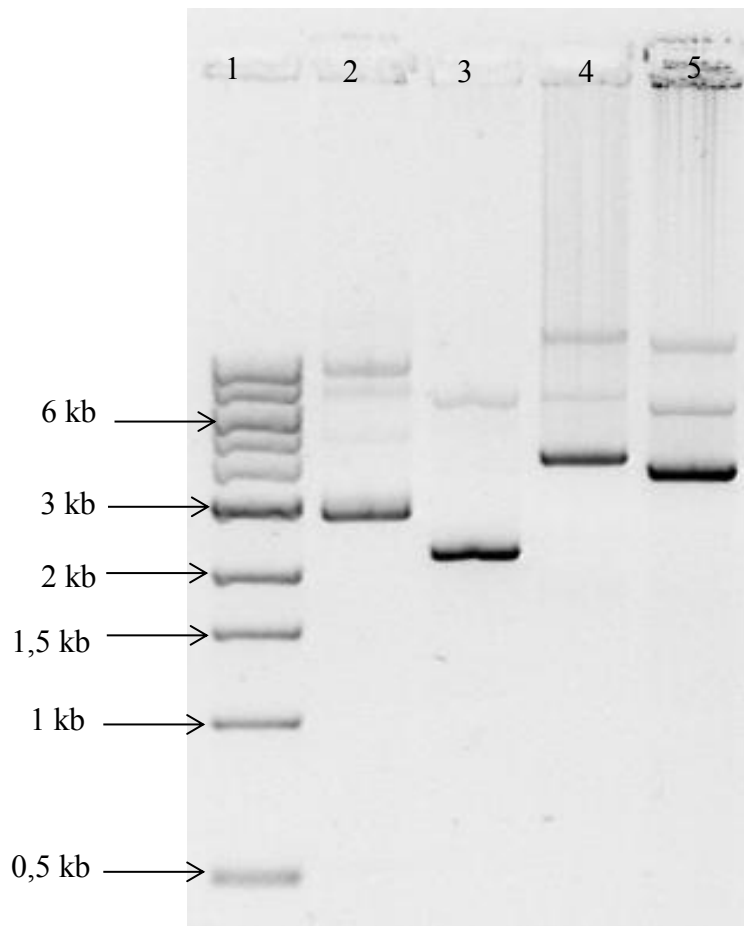
Po provedené transformaci vzorku D byly vybrány tři kolonie z každé misky, celkem šest kolonií. Sekvenováním byly ověřeny připravené konstrukty a úspěšně se podařilo připravit čtyři konstrukty: pDEST17/D (1), pDEST17/D (2), pDEST17/D (3), pDEST17/D2 (2).

Tabulka 6: Použité sekvence k vyhledávání genu.

Sekvence DNA	Hledaná sekvence
Foward	ATGGAGGAGCCGCAGTCAG
Revers	TCAGTCTGAGTCAGGCCCTT

4.5. Srovnání plasmidů používaných a vytvořených při Gateway klonování

Srovnávací elektroforéza byla udělaná kvůli porovnání velikosti jednotlivých plasmidů, entry klonů a expresních klonů. Vzorky mutovaných genů proteinu p53 použité pro bakalářskou práci měly přibližně stejnou velikost 1,25 kb. Na obrázku Obrázek 14 je gel srovnávací gel obsahující ve startu č. 2 pDONR221 jako počáteční donorový vektor pro BP reakci, ve startu č. 3 je entry klon pENTR221/p53 α jako výsledek BP reakce. Dále jsou umístěny ve startu č. 4 samotný pDEST17 a ve startu č. 5 výsledek LR reakce pDEST17/p53 α .



Obrázek 14. Výsledek izolace plazmidové DNA na 1 % agarozovém gelu. Vzorčky obsahovaly 100 ng DNA. Start č. 1: DNA žebříček s rozsahem 0,5-10 kb; start č. 2: pDONR221; start č. 3: entry klon pENTR221/p53 α ; start č. 4: pDEST17; start č. 5: pDEST17/A.

Na gelu je dobře vidět velikosti jednotlivých plazmidů a je možno porovnat a změny velikosti v DNA během procesu Gateway konování. Každý vektor má různé množství páru bázi a různou velikost *ccdB* genu. pDONR221 byl použit jako donorový vektor při BP reakci s produktem PCR, jeho velikost je 4,75 kb a jeho velikost vyštěpeného úseku obsahujícího *ccdB* gen je 2,25 kb. V průběhu BP reakce dojde k vyštípení *ccdB* genu z pDONR221 a zároveň je do něj vložen nový gen kódující p53 α (1,25 kb). Tímto procesem se tvoří pENTR (entry klon) o velikosti 3,76 kb. Při následné LR reakci byl použit jako destinační vektor plazmid pDEST17 o velikosti 6,35 kb a v tomto případě je velikost vyštěpené DNAs *ccdB* genem 1,65 kb. Po LR reakci byl vytvořen expresní vektor o velikosti 5,95 kb.

5. Závěr

Tato bakalářská práce se v teoretické části zabývá významem proteinů, jejich produkcí, Gateway klonováním a metodách purifikace proteinů. V experimentální části bylo provedeno Gateway klonování za účelem zisku mutantních forem proteinu p53. Protein p53 je významným tumor supresorovým proteinem a mutace v genu, který jej kóduje, je zodpovědná přibližně za polovinu případů vzniku nádorů [30].

Během LR reakce byla provedena rekombinace sekvence z entry klonů do plazmidu pDEST17. Zvolený destinační vektor pDEST17 umožňuje nejen expresi proteinu v bakteriálních buňkách, ale umožňuje i snadnou izolaci exprimovaného proteinu pomocí afinitní chromatografie, protože k exprimovanému proteinu přidá hexahistidinovou kotvu. Tato kotva je při purifikaci proteinů běžně využívána. Tato kotva je také následně využitelná pro detekci exprimovaného proteinu pomocí Westernového přenosu.

Po LR reakci byla provedena transformace do kompetentních buněk *STBL3* a následná selekce pozitivních kolonií na agarových plotnách. Úspěšně narostlé kolonie byly u všech vzorku, paralelně provedená negativní kontrola byla taktéž úspěšná. Pro vybrané kolonie bez satelitů byla provedena izolace plazmidové DNA. Kontrola expresních klonů byla provedena pomocí sekvenace. Celkem byly úspěšně připraveny 3 expresní klony. V případě entry klonu B nebyla úspěšně provedena LR reakce.

Připravené expresní klony budou použité pro následující expresi proteinu, a budou podkladem pro pokračování studia v navazující diplomové práci, která se bude týkat studia vlivu rozdílných mutací proteinu p53 na schopnost vazby k DNA.

6. Seznam použitých zdrojů

- [1] DOSTÁL, Jiří a kolektiv, *Lékařská chemie II – Bioorganická chemie*. 2., zcela přepracované vyd. Brno-Kraví Hora: Tisk Coprint, 2009, 166 s. ISBN 978-80-210-3789-2.
- [2] ZILFOU, J. T. a S. W. LOWE. Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biology*. 2009, **1**(5). DOI: 10.1101/cshperspect.a001883. ISBN 10.1101/cshperspect.a001883. Dostupné také z: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a001883>
- [3] RŮČKOVÁ, E, P MÜLLER a B VOJTĚŠEK. Expres a purifikace proteinů. *Klinická onkologie*. 2014, **27**(2), 92-97.
- [4] Gateway® Technology A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. *ThermoFisher.com*[online]. DE: Invitrogen [cit. 2018-03-01]. Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/gatewayman.pdf>
- [5] DAVID L. NELSON, MICHAEL M. COX, David L. Nelson, Michael M. Cox a [ILLUSTRATIONS SUSAN TILBERRY. ET AL.]. *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd ed., 7th printing. New York: Worth, 2003. ISBN 978-157-2599-314.
- [6] BRÄNDÉN, Carl-Ivar a John. TOOZE. *Introduction to protein structure*. 2nd ed. New York: Garland Pub., c1999. ISBN 978-0815323051.
- [7] LADYOFHATS. Main protein structure levels. Hamburg: LadyofHats, 2017 [cit. 2017-11-27]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Main_protein_structure_levels_uk.svg#/media/File:Main_protein_structure_levels_cs.svg
- [8] SINGER, S. J. The Structure and Insertion of Integral Proteins in Membranes. *Annual Review of Cell Biology*. 1990, **6**(1), 247-296. DOI: 10.1146/annurev.cb.06.110190.001335. ISSN 0743-4634.
- [9] ERICKSON, Harold P. Evolution of the cytoskeleton. *BioEssays*. 2007, **29**(7), 668-677. DOI: 10.1002/bies.20601. ISSN 02659247.
- [10] POVESHCHENKO, AF, VV ABRAMOV a VA KOZLOV. *Cytokine – factors of the neuroendocrine regulation*. *Usp Fiziol Nauk*. 2007, **38**(3), 40-46.
- [11] DUPRÉ, Denis J. a Terence E. HÉBERT. Biosynthesis and trafficking of seven transmembrane receptor signalling complexes. *Cellular Signalling*. 2006, **18**(10), 1549-1559. DOI: 10.1016/j.cellsig.2006.03.009. ISSN 08986568.
- [12] BRÁZDA, Václav, Jana ČECHOVÁ, Michele BATTISTIN, Jan COUFAL, Eva B. JAGELSKÁ, Ivan RAIMONDI a Alberto INGA. The structure formed by inverted repeats in p53 response elements determines the transactivation activity of p53 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017, **483**(1), 516-521. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.113. ISSN 0006291x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X16321738>
- [13] BRÁZDA, Václav, Lucia HÁRONÍKOVÁ, Jack C. C. LIAO, Helena FRIDRICHOVÁ a Eva B. JAGELSKÁ. Strong preference of BRCA1 protein to topologically constrained non-B DNA structures. *BMC Molecular Biology*. 2016, **17**(1), -. DOI: 10.1186/s12867-016-0068-6. ISSN 1471-2199. Dostupné také z: <http://bmcmolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12867-016-0068-6>
- [14] HÁRONÍKOVÁ, Lucia, Jan COUFAL, Iva KEJNOVSKÁ, et al. IFI16 Preferentially Binds to DNA with Quadruplex Structure and Enhances DNA Quadruplex Formation. *PLOS ONE*. 2016, **11**(6), e0157156-. DOI: 10.1371/journal.pone.0157156. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0157156>

- [15] ANDERSEN, Dana C a Lynne KRUMMEN. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002, **13**(2), 117-123. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00300-2. ISSN 09581669. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166902003002>
- [16] KŘUPKA, Michal. *Příprava a purifikace rekombinantních proteinů*. Olomouc, 2011. Dizertační práce. UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI LÉKAŘSKÁ FAKULTA, Ústav Imunologie.
- [17] Klonování. *LAB guide, Průvodce laboratíři* [online]. CZ, 2014 [cit. 2018-02-21]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/klonovani/>
- [18] PCR (polymerázová řetězová reakce). *Molekulární biologie VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat* [online]. BRNO: VFU Brno, 2011 [cit. 2018-02-19]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz
- [19] JOHNOVÁ, Patricie. Příprava plasmidových konstruktů pro studium lokalizace kukuřičných cytokinindehydrogenas. Olomouc, 2013. Bakalářská práce. UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI.
- [20] DIDI, Vojtěch. *METODY ANALÝZY GENOVÉ EXPRESE U ARABIDOPSIS THALIANA*. Brno, 2008. Bakalářská práce. MASARYKOVA UNIVERZITA Přírodovědecké fakulta.
- [21] PELCOVÁ, Vendula. *PURIFIKACE A CHARAKTERIZACE MEMBRÁNOVĚ VÁZANÉ REDUKTASY Z LIDSKÉ JATERNÍ TKÁNĚ*. Hradec Králové, 2006. Diplomová práce. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ.
- [22] SKARKA, Adam. *Purifikace a charakterizace vybrané lidské mikrosomální reduktasy*. Praha, 2008. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- [23] GE Healthcare, (2007). *Affinity Chromatography Principles and Methods*, Sweden
- [24] Affinity-tagged purification. In: *Bio-Rad Laboratories* [online]. [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/ru-ru/applications-technologies/introduction-affinity-chromatography?ID=MWHAVG4VY>
- [25] OSWALD, Nick. How SDS-PAGE Works. *Bitesizebio* [online]. Bitesizebio, 2008 [cit. 2018-03-05]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/580/how-sds-page-works/>
- [26] PATRISON, G. A. W. ANSORGE. *Molekular diagnostics*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2010, s. 431-444. ISBN 9780123745378.
- [27] YANG, Ping-Chang a Tahrin MAHMOOD. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012, 4(9), 429-. DOI: 10.4103/1947-2714.100998. ISSN 1947 -2714. Dostupné také z: <http://www.najms.org/text.asp?2012/4/9/429/100998>.
- [28] SCHLERETH, Katharina, Rasa BEINORAVICIUTE-KELLNER, Marie K. ZEITLINGER, et al. DNA Binding Cooperativity of p53 Modulates the Decision between Cell-Cycle Arrest and Apoptosis. *Molecular cell*. 2010, **48**(3), 356-368. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.02.037. ISBN 10.1016/j.molcel.2010.02.037. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276510003163>
- [29] Generated Plasmid Map. In: *Addgene* [online]. Sidney: Addgene [cit. 2018-04-22]. Dostupné z: <https://www.addgene.org/vector-database/2355/>
- [30] LENNARZ, William J. a M. Daniel LANE, ed. *Encyclopedia of biological chemistry*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2013. ISBN 978-012-3786-302.

7. Seznam zkratek

- *att* – specifická sekvence DNA u komponent, které se rekombinují při BP, respektive LR reakci (z angl. „attachment sites“)
- *BRC1* – gen kodující protein zodpovědný za opravu poškozené DNA, homologní rekombinaci a transkripci
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- *E. coli* – *Escherichia coli*
- EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
- ELFO – Elektroforéza
- LB – Luria-Bertani médium
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- SDS – dodecylsírán sodný
- SDS-PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsíránem sodným
- TAE – pufr složený z Tris pufru, kyseliny octové a EDTA
- TE – trisEDTA
- TP53 – gen kódující tumor-supresorový protein p53
- Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan