

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Pavel Sojka

Příprava vektorů pro heterologní expresi lidského cytochromu P450 1B1

Construction of vectors for heterologous expression of human cytochrome P450 1B1

Bakalářská práce

školitel: RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Václava Martínka, Ph.D., a všechny použité prameny jsem řádně odcitoval.

V Praze dne 20.3.2012

Poděkování

Chtěl bych vyjádřit poděkování svému školiteli RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D., za kvalitní vedení mého bakalářského projektu, ochotu při popisu problematiky a trpělivost při jejím řešení.

Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D., a Mgr. Janu Milichovskému za ochotu a vstřícnost při zasvěcování do metodiky molekulární biologie a rady při jejich uplatňování. Mé poděkování patří také RNDr. Markovi Ingrovi, Ph.D., za poskytnutí kmenů *Escherichie coli*.

V neposlední řadě bych chtěl rovněž poděkovat členům Laboratoře molekulární karcinogeneze a vývoje léčiv za vytvoření příjemného pracovního prostředí pro práci na tomto bakalářském projektu. Poděkovat bych chtěl také svým rodičům za podporu během studia.

Abstrakt

Laboratoř molekulární karcinogeneze a vývoje léčiv, pod jejíž záštitou byl tento projekt vypracován, se problematikou cytochromů P450 zabývá již delší dobu. Tyto enzymy se podílejí v drtivé většině na první fázi biotransformace jak xenobiotik, tak endogenních látek, méně často pak na syntéze např. látek steroidní povahy.

Práce se zabývá přípravou expresních vektorů založených na plasmidu pET-22b, vhodných pro přípravu lidské formy cytochromu P450 1B1 metodou heterologní exprese. Tento cytochrom P450 je přítomný v endoplasmatickém retikulu především extrahepatálních tkáních a jeho exprese je navíc indukována dioxiny a polycyklickými aromatickými uhlovodíky.

K přípravě vektoru byl použit gen pro lidský cytochrom P450 1B1, který byl pomocí metody PCR upraven. Na oba konce genu byla přidána štěpící místa pro restrikční endonukleasy a v jednom případě také úsek kódující histidinovou kotvu pro snadnější izolaci enzymu. Pomocí agarosové elektroforesy byl jak insert, tak štěpený plasmid verifikován a zároveň také purifikován k ligaci a následné transformaci konstruktů do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α .

Klíčová slova: cytochrom P450 1B1, karcinogeneze, plasmid, heterologní exprese

Abstract

The thesis was worked out in Laboratory of Molecular Carcinogenesis and Drug Development, which is focus on study of drug metabolizing enzymes including cytochromes P450. Cytochromes P450 are participating at initial phase of biotransformation of xenobiotics and endogenous substances and metabolism of several endogenous compounds, i.e. steroids.

This work is focused on construction of expression vectors, based on the plasmid pET-22b, suitable for heterologous expression of the human cytochrome P450 1B1. This enzyme is predominantly present in the endoplasmic reticulum of extra-hepatic tissues and its expression is induced by dioxins and polycyclic aromatic hydrocarbons. The human gene for cytochrome P450 1B1 was modified using PCR. The cleavage sites for restriction endonucleases were added to both ends of the gene. Another construct also contained N-terminal histidine tag to facilitate easier purification of the enzyme. Both insert and digested plasmids were verified using the agarose electrophoresis and used for ligation and transformation into competent cells (*E. coli* DH5 α). Final steps in construction was, however, not successful, probably due to low yields of DNA fragment extraction from agarose gels.

Key words: cytochrome P450 1B1, carcinogenesis, plasmid, heterologous expression

[In Czech]

Obsah

1. ÚVOD	9
1.1. BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK	9
1.2. MECHANISMUS REAKCE CYTOCHROMU P450	10
1.3. CYTOCHROM P450 1B1	11
1.3.1. <i>Struktura lidského cytochromu P450 1B1</i>	13
1.4. HETEROLOGNÍ EXPRESE	15
1.4.1. <i>Plasmid pOTB7</i>	16
1.4.2. <i>Plasmid pET-22b</i>	18
2. CÍLE	21
3. MATERIÁL A METODY	22
3.1. POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE	22
3.2. PŘÍSTROJE	23
3.3. METODY	24
3.3.1. <i>Příprava agarových ploten s antibiotiky</i>	24
3.3.2. <i>Výsev buněk na Petriho misky</i>	24
3.3.3. <i>Přeočkování vybraných kolonií metodou „single cell“</i>	24
3.3.4. <i>Přečištění fenolu</i>	25
3.3.5. <i>Izolace plasmidu alkalickou lyzí a extrakcí fenol -chloroformovou metodou</i>	25
3.3.6. <i>Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA</i>	27
3.3.7. <i>Polymerasová řetězová reakce – PCR</i>	27
3.3.8. <i>Izolace DNA pomocí srážení isopropanolem</i>	29
3.3.9. <i>Štěpení DNA restrikčními endonukleasami NdeI a HindIII</i>	30
3.3.10. <i>Agarosová elektroforesa</i>	30
3.3.11. <i>Izolace DNA z agarosového gelu pomocí komerčního kitu</i>	32
3.3.12. <i>Ligace</i>	33
3.3.13. <i>Transformace buněk E. coli DH5α</i>	33
3.3.14. <i>Transformace TSS („Transformation and storage solution“) buněk E. coli XLI MRF+</i>	34
4. VÝSLEDKY	35
4.1. IZOLACE PLASMIDU POTB7 NESOUCÍHO GEN PRO LIDSKÝ CYP1B1	35
4.2. POROVNÁNÍ SEKVENCÍ INZERTŮ PRO EXPRESI LIDSKÉHO CYP1B1	35
4.3. PCR AMPLIFIKUJÍCÍ GEN PRO hCYP1B1 SE ŠTĚPÍCÍMI MÍSTY	37
4.4. AMPLIFIKACE PLASMIDOVÉ DNA pET-22B.....	38
4.5. ŠTĚPENÍ PCR PRODUKTU, ČIŠTĚNÍ ŠTĚPENÉ DNA A JEJÍ STANOVENÍ	39
4.6. LIGACE A TRANSFORMACE	41
4.7. IZOLACE KONSTRUKTU A JEHO STANOVENÍ	42

4.8.	OVĚŘOVÁNÍ KONSTRUKTU	42
4.8.1.	<i>Agarosová elektroforesa štěpeného konstruktů</i>	43
4.8.2.	<i>Agarosová elektroforesa neštěpených konstruktů</i>	43
4.9.	TRANSFORMACE KONSTRUKTEM ZA ÚČELEM AMPLIFIKACE A JEHO STANOVENÍ.....	44
4.9.1.	<i>Agarosová elektroforesa ověřující ztrátu DNA při izolaci plasmidové DNA z 50 ml LB media</i>	45
4.9.2.	<i>Agarosová elektroforesa štěpených konstruktů z izolace z 50 ml LB media</i>	46
5.	DISKUSE	48
6.	ZÁVĚR.....	49
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	50

Seznam zkratek

A	adenin
A ₂₆₀	absorbance při 260 nanometrech
ANF	alfa-naftoflavon
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
bp	párů bází („Base Pairs“)
BSA	hovězí sérový albumin
C	cytosin
C470	cystein na 470. místě v proteinovém řetězci
c _{DNA}	koncentrace DNA
c _{in}	koncentrace insertu
c _{pl}	koncentrace plasmidu
CYP1B1	cytochrom P450 1B1
CYP1A2	cytochrom P450 1A2
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
h1B1- fw	primer pro forward bez histidinové kotvy
h1B1+HisFX - fw	primer pro forward s histidinovou kotvou
G	guanin
GTE	pufr obsahující glukosu, Tris-HCl, EDTA
hCYP1B1	lidský cytochrom P450 1B1
His6+FactorXa IEGR	cystein na 470. místě v proteinovém řetězci označení histidinové kotvy kódované šesti kodony kódující histidin (CAG) následovaná kodonem pro isoleucin (ATC), kyselinou glutamovou (GAG), glycinem (GAA) a argininem (AGG)
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kbp	tisíce párů bází („Base Kilopairs“)
LB media	Luria Brooth médium
mQ	deionizovaná voda

Mr	relativní molekulová hmotnost
MYOC genu	název genu kódující protein myocilin
n_{DNA}	látkové množství DNA
PCR	polymerasová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
Pfu polymerasa	DNA polymerasa z hypertermofilu <i>Pyrococcus furiosus</i>
reverse h1B1 - rv	primer pro reverse
RPM	otáčky za minutu („revolutions per minute“)
SDS	dodecylsírán sodný
T	thymin
TAE pufr	pufr obsahující Tris, octovou kyselinu a EDTA („Tris, acetic acid, EDTA“)
TE pufr	pufr obsahující Tris-HCl a EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiimin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSS	„transformation and storage solution“
v/v	„volume/volume“, objem látky v mililitrech ve 100 ml
V_{DNA}	objem DNA
V_{in}	objem insertu
V_{pl}	objem plasmidu
w/v	„weight/volume“, počet gramů látky ve 100 ml roztoku

1. Úvod

Již od dávných let se musely organizmy všeho druhu vypořádat s látkami jakéhokoli typu, které organizmu nepřinášely žádný prospěch nebo nesloužily jako zdroj energie či jako stavební materiál. Část těchto látek byla tělu vlastní – látky endogenní, ale drtivá část byly látky tělu nevlastní – xenobiotika. Druhá skupina těchto látek s postupem doby a modernizací s ní spojenou získávala nad tělu vlastním látkám čím dál větší převahu a protože se organizmus stále vyvíjí, tj. jeho DNA podléhá mutaci, která ještě oproti svému přirozenému výskytu graduje díky používání moderních technologií a syntéze nových látek, začaly vznikat různé isoformy proteinů, enzymy nevyjímaje. Část těchto isoform enzymů vzniklých důsledkem mutací participuje na první ze dvou, resp. tří fází degradace xenobiotik. Po první fázi degradace mohou ovšem díky isoformám enzymů vznikat pro organizmus o mnoho toxicitější metabolity oproti původnímu xenobiotiku, resp. endogenní látce, avšak původním smyslem vzniku těchto reakcí bylo naopak toxicitu snižovat. Tento jev bývá označován jako bioaktivace [13]. Metabolity vzniklé bioaktivací mohou se vznikem karcinogenních, mutagenních, senzibilizujících vlastností nebo vlastností toxických pro reprodukci poškozovat organizmus nejrůznějšími způsoby. Tato práce je příspěvkem k této problematice, kterou se dnes zabývá již řada vědců z celého světa.

1.1. Biotransformace xenobiotik

Cílem biotransformace látek je vyloučit nežádoucí látku z organismu. Vylučování bývá prováděno zejména močí a stolicí, případně vedlejšími, méně významnými způsoby jako potem nebo penetrací pokožkou. Protože se všechny děje v organizmech odehrávají ve vodném prostředí, biotransformací se organizmus kvůli snadnějšímu vylučování hydrofobních látek snaží zvýšit jejich hydrofilitu. V organizmech probíhá eliminace xenobiotik a endogenních látek ve třech fázích.

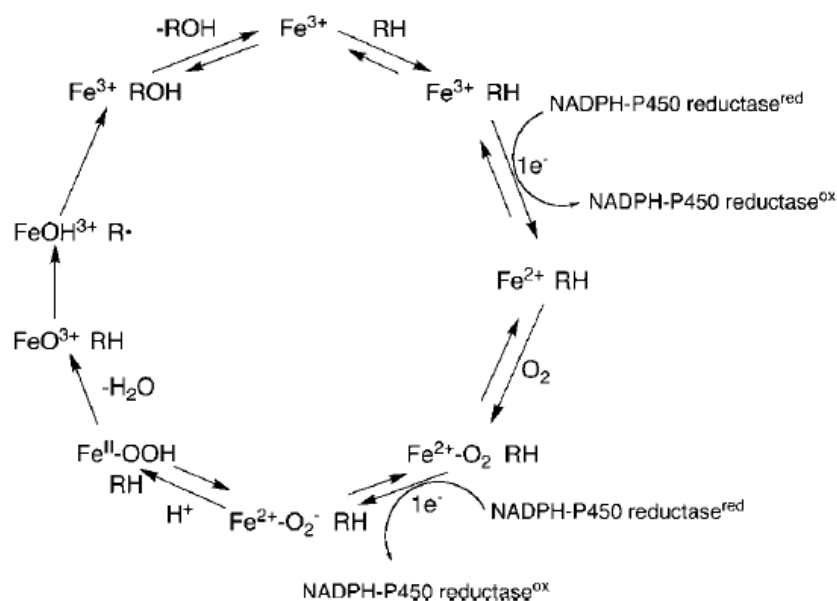
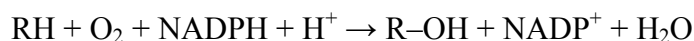
V první fázi biotransformace se organizmy snaží do vylučovaných látek zavést polární skupiny. Zavádění polárních skupin probíhá oxidačními (monooxygenasy, peroxidasy), redukčními (NADPH: CYP oxidoreduktasa, xanthinoxidasa) a hydrolytickými (esterasy, amidasy) reakcemi.

Na zavedených polárních skupinách v druhé dochází ke konjugaci s polárními eobiotiky (kyselina glukuronová; aktivní sulfát; sacharidy; glutathion a cystein; taurin a jiné aminokyseliny – glycin, alanin; acetátem) usnadňujícími vyloučení nežádoucí látky. Třetí fáze probíhá pouze u rostlin, jedná se o druhou konjugaci [32,33].

1.2. Mechanismus reakce cytochromu P450

Cytochromy P450 jsou součástí systému oxygenas se smíšenou funkcí. Tento systém se podílí na oxidačních reakcích I. fáze biotransformace s cytochromem P450 jako terminální oxygenasou. U eukaryotických organismů jsou umístěny spolu s NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasou, cytochromem b5 a NADH: cytochrom b5 reduktasou v membráně endoplasmatického retikula; u prokaryotických organismů jsou tyto složky rozpuštěné v cytoplasmě. Tyto enzymy patří do systému oxygenas se smíšenou funkcí, též monooxygenas, katalyzují výše zmíněný typ reakce pomocí molekulárního kyslíku. Při reakci se jeden jeho atom je začlení do molekuly substrátu a druhý je redukován podle rovnice 1 na vodu. Průběh této reakce je znázorněn na obrázku 1:

Rovnice 1:



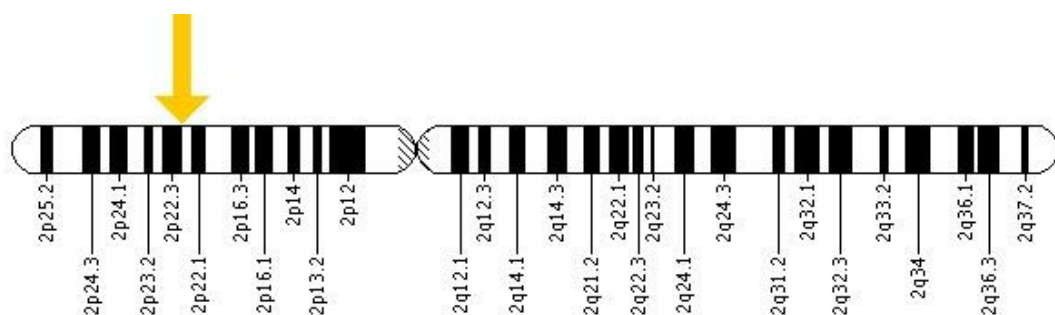
Obrázek 1 Schéma MFO systému. Převzato z [25].

Do okolí železa v hemu (protoporfyrinu IX), který je kofaktorem v CYP, jenž se nachází v aktivním centru enzymu, kde interaguje s cysteinovou sírou, se za současného odstoupení molekuly vody, která je navázána na ferri formu železa v neaktivním stavu, naváže substrát. Původní nízkospinový stav hexakoordinovaného železa přejde do pentakoordinovaného vysokospinového stavu, který má pozitivnější potenciál. Vysokospinový stav je díky vyššímu potenciálu redukován jedním elektronem pomocí NADPH: cytochrom P450 oxidoreduktasy na ferro formu, na kterou se může vázat kyslík, případně oxid uhelnatý.

Po navázání molekuly kyslíku na hem dochází působením stejného enzymu k druhé jednoelektronové redukci za vzniku peroxo-ferro formy, která je následně protonována za vzniku hydroperoxo-ferro formy. Poté dochází k redukci vzdálenějšího atomu kyslíku a následnému uvolnění vody z komplexu, železo přechází v oxo-ferri formu. Ve vzniklé oxo-ferri formě dochází k přesmyku na oxo-ferryl intermediát známý také jako „sloučenina I“ a následné oxygenaci substrátu a uvolnění produktu.

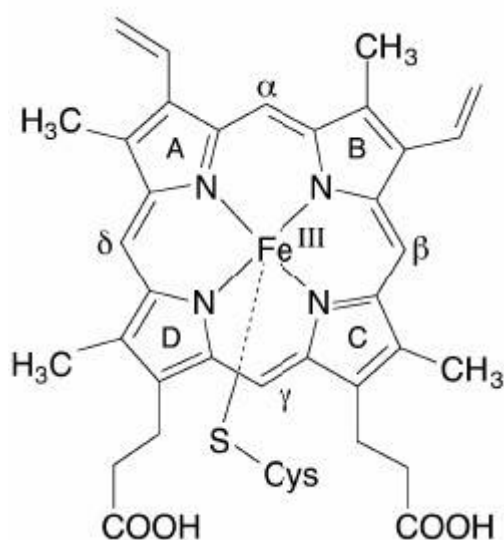
1.3. Cytochrom P450 1B1

Lidský cytochrom P450 1B1 je kódován na kratším rameni druhého chromosomu od páru bazí 38,294,745 do páru bazí 38,303,322 (obrázek 2) [4]. Gen obsahuje tři exony a dva introny. Otevřený čtecí rámeček genu dlouhého 1629 bp začíná až na druhém exonu. Gen neobsahuje konsenzuální TATA box, ale je pod kontrolou dioxin-responsivního enhanceru [5].



Obrázek 2 Gen pro lidský cytochrom P450 1B1 je umístěn na kratším rameni druhého chromosomu na pozici 22.2 (znázorněno žlutou šipkou). Převzato z [7].

Proteiny tohoto typu se řadí mezi metaloproteiny, resp. hemoproteiny. Neplní funkci přenašeče elektronů ani malých molekul typu O_2 , ale účastní se katalýzy, která využívá principu oxygenas se smíšenou funkcí. Konkrétně se řadí mezi oxygenasy, resp. monooxygenasy se systémem obsahujícím cytochrom P450 jako terminální oxidasu (Vedle toho ještě existují monooxygenasy flavinové). V tomto typu katalýzy hraje nemalou roli atom síry, který pochází z cysteinu (u hCYP1B1 je to C470) a který jako pátý ligand koordinuje ion železa v hemu (ferri-protoporfyrinu IX), v molekule cytochromu P450 (obrázek 3). Proto se těmto typům proteinů říká také hemthiolátové proteiny – enzymy s enzymologickým označením 1.14.14.1.



Obrázek 3 Interakce prosthetické skupiny cytochromů se sírou. Převzato z [12].

CYP1B1 se podílí na první fázi biotransformace oxidačními reakcemi, které katalyzuje monooxygenásovým systémem obsahujícím cytochrom P450 1B1. Skládá se z 543 aminokyselin. Za normálních okolností je v malém množství (asi 1% ze všech CYP) exprimován přibližně v 15 druzích lidské tkáně (např. ledviny, plíce, slezina, prostata, děloha, prsní žlázy, placenta) [3,13,19]. Za indukci CYP1B1 exprese jsou zodpovědné hlavně planární aromatické uhlovodíky, jejich deriváty a heterocyklické aminy [6,31]. Mezi jeho substráty patří například estradiol [29], 7-etoxyresorufin [30], rutakarpin [31].

Doposud bylo objeveno 63 alel CYP1B1, které se v drtivé většině liší pouze v jedné aminokyselině proti nemutované formě proteinu [2]. Důsledkem těchto mutací bývá

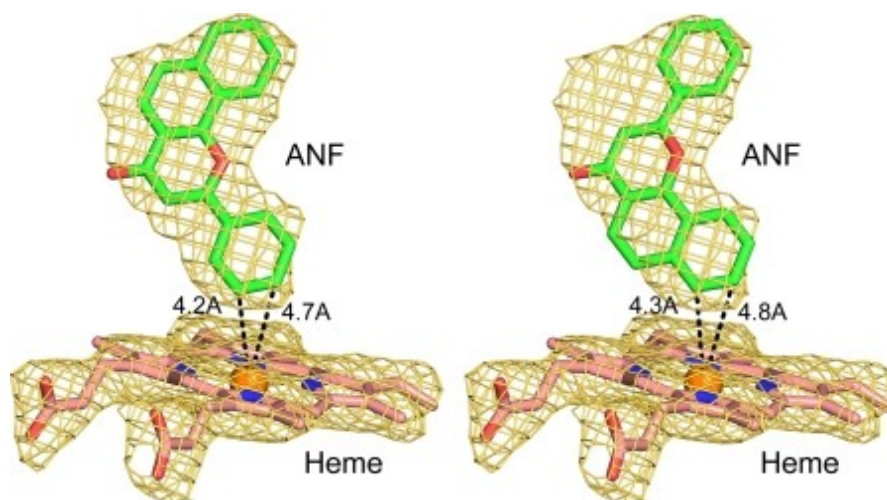
zvýšené riziko vzniku primárního vrozeného glaukomu u mladých lidí jakékoli národnosti nebo etnické skupiny [8,9,10,11].

Další nemocí, kterou mutace v hCYP1B1 mohou způsobovat je Petersova anomálie, při které je čočka zakalená, ba až neprůhledná. Toto onemocnění se nazývá šedý zákal [4].

Objevilo se také podezření, že mutant CYP1B1 (Leu432Val), jehož cDNA byla obsažena v mnou izolovaném plasmidu pOTB7, jenž byl použit v mé práci jako templát při PCR, způsobuje nádor tlustého střeva. Výzkum, který měl toto podezření potvrdit jej však nepotvrdil [22].

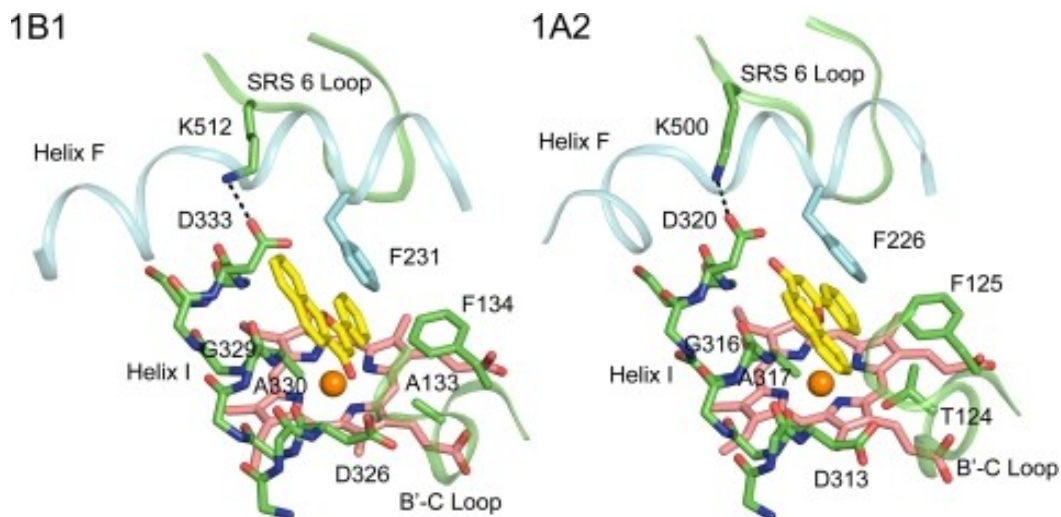
1.3.1. Struktura lidského cytochromu P450 1B1

Atomová struktura byla nalezena pomocí rentgenové krystalografie. Struktura byla stanovena s rozlišením 2,7 Å s alfa-naftoflavonem (obrázek 4), který byl při zjišťování struktury proteinu navázán v dutině aktivního místa jako substrát.



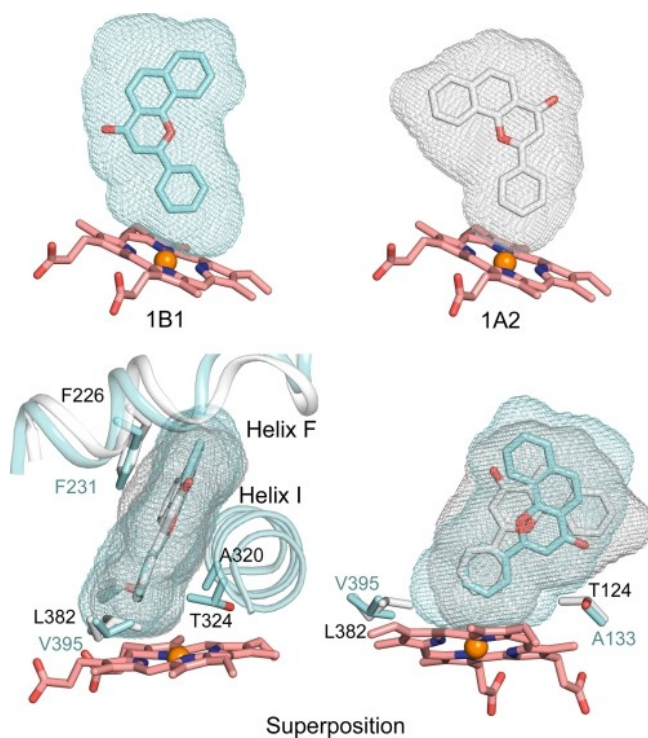
Obrázek 4 Pozice ANF v aktivním centru CYP1B1. Orientace na levé straně je pravděpodobnější než na pravé straně. Převzato z [21].

Přestože se aminokyselinové sekvence lidských cytochromů P450 1B1 a 1A2 liší, oba enzymy mají dutinu aktivního centra úzkou přibližně stejnou (obrázek 5), z čehož vyplývá, že budou metabolizovat substráty podobných ba až stejných struktur. Důkazem tohoto tvrzení je, že enzym přijímá rezidua relativně plochých konformací jak v enzymu CYP1B1, tak v enzymu CYP1A2.



Obrázek 5 Porovnání vazebných míst u CYP1B1 a CYP1A2. Převzato z [21].

Bylo zjištěno, že u CYP1B1 se ANF váže na enzym v dosti odlišné poloze než je tomu u CYP1A2 (obrázek 6). Tato skutečnost se v těchto dvou enzimech projevuje také různou konformací šroubovic B'-C, jež jsou stabilizovány vodíkovými vazbami. Rozdíly v enzimech jsou dány ostatními aminokyselinami, které se nacházejí v okolí reakčního centra a způsobují rozdílnou polohu ANF. Tyto změny v okolí reakčního centra způsobují nepatrné odlišnosti při volbě substrátu a inhibitoru pro enzym [21].



Obrázek 6 Rozdíly ve vazbě substrátu na oba enzymy. Převzato z [21].

1.4. Heterologní exprese

Heterologní exprese je metoda využívající hostitelský organismus nejčastěji k produkci proteinů, jenž pro daný organismus nejsou přirozené. Hostitelským organismem může být jak prokaryotická (bakterie), tak eukaryotická buňka (kvasinky, hmyzí, savčí nebo dokonce i transgenní rostlinná buňka). V praxi se však nejčastěji používají buňky bakteriální, mezi nejvíce užívané bakterie patří *E. coli* [23,24]. *E. coli*, resp. bakterie obecně bývají nejčastěji používány kvůli technickým a finančním stránkám (tabulka 1). Expres v bakteriích, konkrétně v *E. coli*, má dvě nevýhody. První nevýhodou je, že produkované proteiny neobsahují posttranslační úpravy; druhou nevýhodou je, že při nadměrné produkci proteinu se protein neskládá, ale tvoří agregáty ve formě inkluzních tělísek [23].

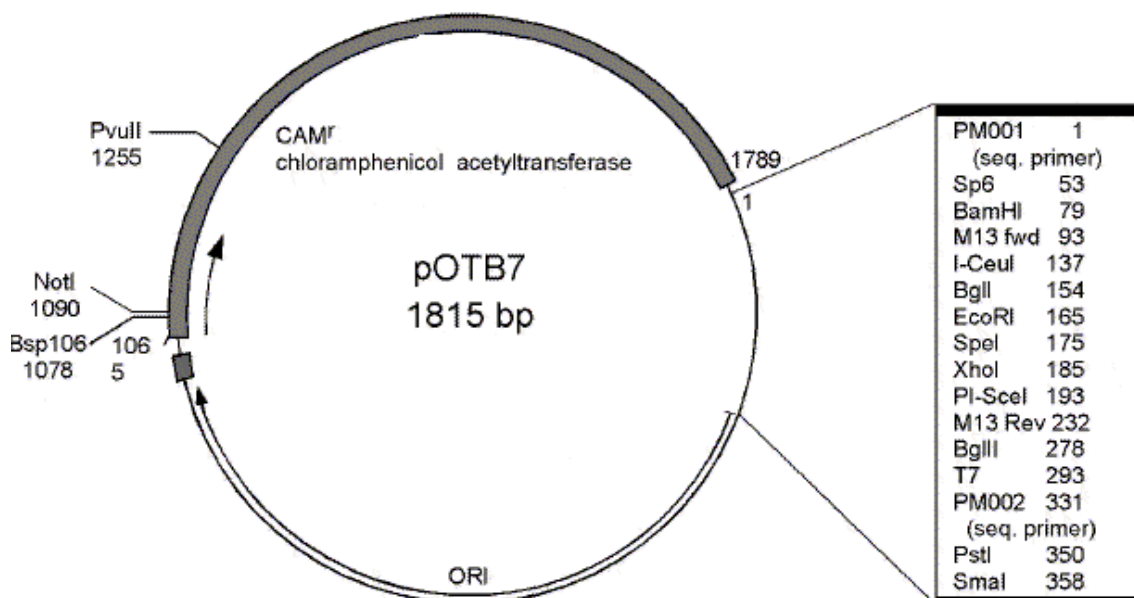
Tabulka 1: Shrnutí kladů a záporů heterologní exprese. Převzato z [14].

Charakteristika	<i>E. coli</i>	kvasinky	hmyzí buňky	savčí buňky
Buněčný růst	rapidní (30min)	rapidní (90min)	pomalý (18-24hod)	pomalý (24hod)
Požadavky na růstové medium	minimální	minimální	komplexní medium	komplexní medium
Cena růstového media	nízká	nízká	vysoká	vysoká
Množství exprimovaného proteinu	velké	malé až velké	malé až velké	malé nebo střední
Extracelulární exprese	sekrece do inkluzních tělísek	sekrece do media	sekrece do media	sekrece do media
Skládání proteinu	obvykle nutné dodatečné složení	v některých případech nutné dodatečné složení	řádné složené proteiny	řádné složené proteiny
Posttranslační modifikace				
N-glykosylace	-	vysoký obsah manosy	jednoduché, bez sialové kyseliny	+
O-glykosylace	-	+	+	+
fosforylace	-	+	+	+
acetylace	-	+	+	+
acylace	-	+	+	+
χ -karboxylace	-	-	-	+

Tato expresní metoda je u bakterií – hostitelského organismu založena na příjmu plasmidu v důsledku uměle vyvolaných nepříznivých životních podmínek nebo stresu, který z těchto nepříznivých podmínek pramení. Mezi nepříznivé životní podmínky, které usnadňují příjem plasmidu, patří snížená teplota nebo přítomnost vápenatých iontů. Hostitelský organismus přijme na základě těchto podmínek plasmid, který vedle rekombinantně vložené genetické informace, jenž kóduje cílový protein, obsahuje mj. také rezistenci na různá antibiotika, která slouží jako indikátor, který má za úkol usmrcením „odfiltrovat“ bakterie, které nepřijaly plasmid a tudíž ani rezistenci na antibiotikum, které je obsaženo v mediu, kde se daná bakteriální kultura pěstuje. V plasmidu je také přítomno klonovací místo, úsek DNA obsahující vysoké množství štěpících míst pro restriční endonukleasy, pomocí kterého je vkládán do plasmidu požadovaný gen. Následně slouží také pro ověření připraveného konstruktů.

1.4.1. Plasmid pOTB7

Plasmid pOTB7 (obrázek 7) byl vytvořen na základě plasmidu pOT2A, taktéž nesoucího rezistenci na antibiotikum chloramfenikol, do kterého byl zaligován fragment o velikosti 204 bp (obrázek 8).



Obrázek 7: Kruhová mapa plasmidu pOTB7. Převzato a upraveno z [28].

Štěpící místo attB1 je mezi místy BamHI a M13forward a štěpící místo attB2 je mezi místy BglII a M13 reverse. Tento 204 bp velký insert byl do plasmidu pOT2A zaligován pomocí již existujících míst XhoI a EcoRI. Štěpící místo XhoI bylo zničeno a EcoRI bylo zaměněno za místo BglII. Místo HindIII v plasmidu pOT2A bylo nahrazeno místem NotI. Důležitý je mj. fakt, že místa EcoRI a XhoI jsou reversní vzhledem k sekvenovacím primerům Sp6 a T7, narozdíl od vektoru pOT2A.



Obrázek 8: Insert vložený do plasmidu pOT2A za vzniku plasmidu pOTB7. Převzato z [18].

Plasmid se sekvenuje pomocí na 5' – konci pomocí M13 Forward primeru a na 3' – konci použitím M13 reversním primerem (obrázek 9) [17].

M13 forward (-21) 18-mer
 TGTA AACGA CGGCC AGT

M13 reverse 17-mer
 CAGGA AACAG CTATG AC

Obrázek 9: Primery pro sekvenaci plasmidu pOTB7. Převzato z [17].

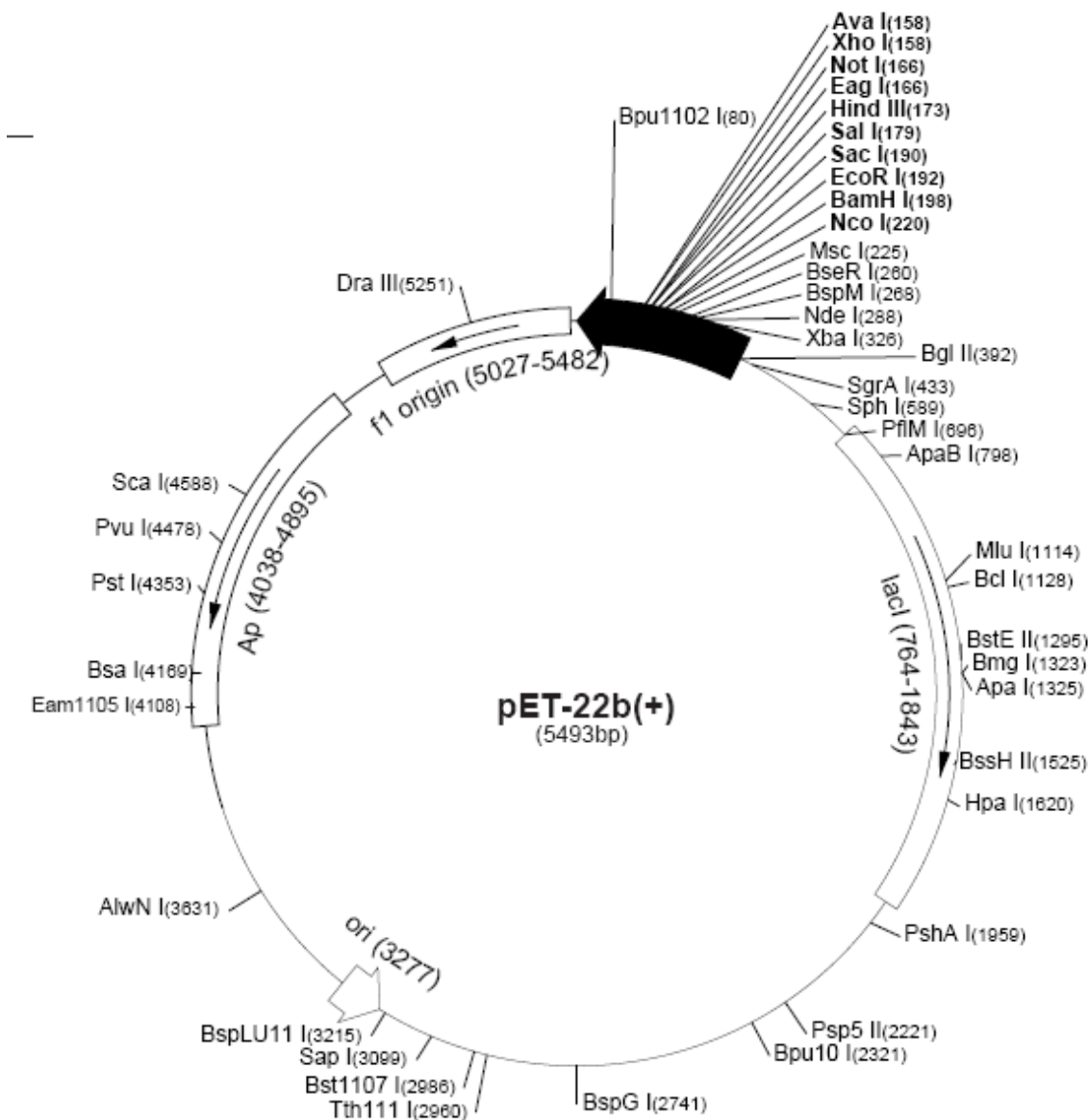
Tento plasmid, jenž v sobě obsahoval gen pro hCYP1B1, byl izolován z buněk *E. coli* a poté s ním bylo po jeho naředění prováděno PCR.

1.4.2. Plasmid pET-22b

Systém pET je momentálně nejvýkonnější systém vzniklý za účelem klonování exprese rekombinantních proteinů pomocí *E. coli*. Cílové geny jsou klonovány v plasmidu pET pod kontrolou silného promotoru bakteriofága T7; exprese je možná díky přítomnosti zdroje T7 RNA polymerasy v hostitelských buňkách. T7 RNA polymerasa je selektivní a aktivní prakticky ve všech buňkách, které se používají na přepis cílové genetické informace, avšak ne ve všech kmenech (např. *E. coli* DH5 α). Požadovaný proteinový produkt může tvořit více než 50% celkového množství proteinů v buňce již po pár hodinách po indukci. Jiná neméně důležitá schopnost tohoto systému je udržovat cílové geny v transkripčně neaktivním stavu. Expresní konstrukt je nejprve namnožen v bakteriálních kmenech neobsahujících T7 RNA polymerasu, a tudíž může předejít problémům s případnou toxicitou exprimovaného proteinu. Konstrukt je poté přenesen do kompetentních buněk obsahujících gen pro T7 RNA polymerasu, ve kterých dochází k expresi, jež je indukována přidáním IPTG. Kvůli přítomnosti dvěma typům promotoru na T7 RNA polymerase a existenci několika různých, vzájemně se lišících, kmenů kompetentních buněk existuje mnoho proměnných, které se musí při optimalizaci exprese brát v potaz [20].

Všechny vektory na bázi pET a společné produkty jsou dostupné jako designové nástroje vhodné pro klonování, expresi, detekci a purifikaci cílových proteinů [20].

Vektor pET-22b obsahuje v klonovacím místě předpřipravenou cílovou sekvenci, jež se přepíše na N-konec proteinu, pro export proteinu do periplasmatického prostoru (pelB) a zároveň také i histidinovou kotvu (přepisovanou na C-konec proteinu) sloužící pro snadnější zabudování do membrány. Unikátní štěpící místa jsou zobrazena na cyklické mapě (obrázek 10). Tato sekvence je očíslována na základě pBR322 dohody, která říká, že T7 expresní místo je na kruhové mapě v reversní podobě. Klonovací / expresní místo kódované vláknem, které T7 RNA polymerasa přepisuje, je zobrazeno níže (obrázek 11 a 12) [16].



Obrázek 10 Kruhová mapa plasmidu pET-22b. Převzato z [16].



pET-22b(+) cloning/expression region

Obrázek 11 Rovinná mapa plasmidu pET-22b. Převzato z [16].

pET-22b(+) sequence landmarks	
T7 promoter	361-377
T7 transcription start	360
<i>pelB</i> coding sequence	224-289
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-225
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	764-1843
pBR322 origin	3277
<i>bla</i> coding sequence	4038-4895
f1 origin	5027-5482

Obrázek 12 Popis k mapám plasmidu pET-22b. Převzato z [16].

2. Cíle

Hlavním cílem předkládané práce bylo připravit a ověřit konstrukty založené na vektoru pET-22b vhodné pro heterologní expresi lidského mikrosomálního cytochromu P450 1B1. Dílčími cíly pak bylo purifikovat klonovací vektor nesoucí lidský gen pro cytochrom P450 1B1, tento gen pak upravit vložením restrikčních míst pro endonukleasy a histidinovou kotvu a tyto varianty pak následně použít ke konstrukci expresního plasmidu.

3. Materiál a metody

3.1. Použitý materiál a chemikálie

Fermentas, Kanada: 2-Log DNA marker, hmotnostní standard pro SDS elektroforézu PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, Spectra™ Multicolor Broad Range Ladder

Fuka, Švýcarsko: methanol, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), akrylamid, 2-merkптоethanol, dodecylsulfát sodný (SDS)

Genomed, Německo: JETquik-Plasmid Miniprep Spin Kit, JETquik-Gel Extraction Spin Kit

Invitrogen, USA: SYBR Safe™ DNA Gel Stain

Lachema, Brno: MgCl₂, EDTA (chelaton 3), HCl, KH₂PO₄, KOH, NaOH, methanol, ethanol, glycerol, kyselina octová, chloroform, persíran amonný, isopropanol, fenol, isoamylalkohol, 8-hydroxychinolinu, polyethylenglykol 6000

Loba Feinchemie, Rakousko: tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

Lucigen, USA: *E. coli* BL21 C41(DE3), *E. coli* BL21 C43(DE3)

Metabion, Německo: oligonukleotidy

New England Biolabs, USA: HindIII (c = 20000 U/ml), EcoRI (c = 20000 U/ml), NdeI (c = 20000), pufru NEB 2 (10x koncentrovaný), pufru NEB 4 (10x koncentrovaný), BSA (100 x koncentrovaný), T4 DNA ligasa, pufr pro T4 DNA ligasu (10 x koncentrovaný), pUC19, pET22b

Serva, Německo: ampicilin, isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG), N, N, N', N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), Triton X-100, Coomassie Brilliant Blue R-250

3.2. Přístroje

Inkubátor	Automatic CO ₂ incubator IR 1500, Flow Laboratories
Autokláv	Varioklav 400E, H + P Laborortechnik GmbH
Sterilizér	MOV – 212S, SANYO
Předvážky	440 – 35N, Kern
Spektrofotometr	Helios α, Thermo spectronic Hewlett Packard 8453, Hewlett Packard
Analytické váhy	AEA 100g, Schoeller instruments
Vakuová odparka	DNA Speed Vac 110 DNA, SAVANT
Mikrovlnná trouba	KOR – 6L05, DAEVOO ELECTRONICS
Zdroj pro elektroforesu	EPS 301, electrophoresis power supllly, GE Healthcare Bio – sciences AB
Třepačka	Gallenkamp, Corbi – safe TS net wise
Centrifuga	Centrifuge 5415R, Eppendorf Stolní centrifuga, Labnet Allegra X-22R, Beckman Coulter
Ohřívač / Chladič bloků	LS1 V.668.161.520, VLM GmbH
Vodní lázeň	Julanbo TW2, Biotech
Vortex	Velp scientifica Rx. ³ , P – LAB a.s.
Laminární Box	Bio 126, Labox
Bezdotykový kahan	Gasprofiz SCS, VLD – TEC
Ohřívač / Chladič	ThermoE CHB – A4 – 9602
Termocykler	Techne FTGENE2D, LAB system Praha
Transluminátor	Dark reader transluminator DR-45H, Clare chemical research
Mrazák	Ultra low temperature freezer U410, New Brunswik Scientific Freezer MDF-U53V, Sanyo

3.3. Metody

3.3.1. Příprava agarových ploten s antibiotiky

Sterilní 1% (w/v) agar byl roztaven v mikrovlnné troubě. Z roztaveného agaru bylo odlito jeho potřebné množství (10 – 15 ml na jednu plotnu) do sterilní zkumavky Falcon (50 ml). Po zchladnutí agaru ve zkumavce bylo přidáno antibiotikum (chloramfenikol nebo ampicilin) v takovém množství, aby se v agaru dosáhlo jeho požadované koncentrace (30 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ chloramfenikolu, resp. 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ampicilinu). Směs agaru s antibiotikem byla promíchána a vylita do sterilních Petriho misek, kde se nechala ztuhnout. Misky s nalitou směsí agaru s antibiotikem byly ponechány na vodorovné ploše, dokud agar v Petriho miskách neztuhl.

3.3.2. Výsev buněk na Petriho misky

Sterilní špachtlí bylo odebráno asi 5 μl buněk *E. coli* DH5 α , které byly uchovávány v -80°C, obsahující plasmid s genem pro hCYP1B1. Buňky byly 100x naředěny sterilní mQ vodou (na objem 500 μl) a směs byla ručně promíchána. 100 μl této směsi bylo odpipetováno na ztuhlý, sterilní agar s antibiotikem v Petriho misce. Směs byla rozprostřena po celé ploše agaru a minutu ponechána zaschnout. Petriho misky byly otočeny dnem vzhůru a umístěny do inkubátoru (Automatic CO₂ incubator IR 1500) o teplotě 37°C, kde byly ponechány přes noc.

Čistota práce byla ověřena pomocí kontrolní Petriho misky, která byla připravena stejným způsobem jako Petriho miska, na kterou bylo odpipetováno 100 μl naředěných buněk, avšak s tím rozdílem, že na kontrolní Petriho misku byl místo buněk odpipetován stejný objem LB media.

Zbytek 100x naředěných buněk *E. coli* DH5 α byl uschován v -20°C.

3.3.3. Přeočkování vybraných kolonií metodou „single cell“

Z přes noc narostlé kultury na agaru v Petriho miskách byly označeny „single cell“ kolonie, jež byly dostatečně vzdáleny od ostatních kolonií. Tyto kolonie byly přeočkovány

do LB media s antibiotikem v požadované koncentraci. Pracovalo se ve sterilním prostředí laminárního boxu.

V plameni bezdotykového plynového kahanu byla vyžihána pinzeta, kterou bylo následně uchopeno párátka. Špičkou párátka byla vybraná „single cell“ kolonie přenesena do LB media s antibiotikem (chloramfenikol ($30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), resp. ampicilin ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)), které již bylo připraveno ve sterilní zkumavce Falcon (50 ml). Zkumavka Falcon s LB mediem, kam byla přenesena kolonie, byla s povoleným víčkem inkubována ve třepačce (Gallenkamp) při 37°C a 220 RPM přes noc. Takto získaná kultura byla použita na izolaci plasmidové DNA; část kultury byla uschována s glycerolem v -80°C pro další případné použití.

Agarové plotny byly obaleny parafilmem a uschovány v lednici (Indesit) pro případnou potřebu získání nové kultury.

3.3.4. Přechištění fenolu

Krystalický fenol (cca 20 ml) byl odebrán do zkumavky Falcon (50 ml), rozpuštěn v horké lázni (70°C), smíchán s 8-hydroxychinolinem (výsledná koncentrace 0,1% (w/v)) a se stejným objemem 1 M Tris/Cl pufru (pH 8). Směs byla protřepávána 10 – 15 minut a po ustálení byla odebrána vrchní vodná fáze. Pro dostatečnou čistotu fenolu bylo potřeba proces vytřepání zopakovat. Fenol byl uskladněn ve směsi s chloroformem a isoamylalkoholem (fenol:chloroform:isoamylalkohol = 25:24:1) v tmavé láhvi při 4°C a s hladinou 1 M Tris/Cl pufru nad roztokem fenolu.

3.3.5. Izolace plasmidu alkalickou lyzí a extrakcí fenol -chloroformovou metodou

Zkumavky Falcon s narostlou kulturou byly s dotažnými víčky vloženy do centrifugy (Allegra X-22R) a centrifugovány 20 – 30 minut při 4500 RPM (rotor 4250SX) a 4°C . Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována $200^* \mu\text{l}$ ledově vychlazeným roztokem GTE (50 mM glukosa; 25 mM TRIS-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA). Resuspendovaná peleta byla přenesena do sterilní mikrozukavky Eppendorf (1,5 ml) a ponechána stát 5 minut při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo přidáno $300^* \mu\text{l}$ čerstvě

připraveného „lyzačního pufru“ – roztok 0,2 M NaOH a 1% SDS (w/v) (200 μ l 5 M NaOH bylo smícháno se 4,3 ml sterilní mQ vody a 500 μ l 10% (w/v) SDS), obsah mikrozkušky byl promíchán několikerým jejím převrácením a směs byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo přidáno 200* μ l ledově vychlazeného draselno-acetátového pufru (pH 4,8; 3 M K⁺ a 5 M CH₃COOH / CH₃COO⁻) a směs byla otáčením mikrozkušky míchána po dobu 10 sekund, po promíchání byla inkubována 10 minut v ledové lázni.

Po inkubaci v ledové lázni byla směs centrifugována (Centrifuge 5415R Eppendorf) 10 minut při 15000g a teplotě 4°C. Supernatant byl přenesen do čisté, sterilní mikrozkušky Eppendorf (1,5 ml). K supernatantu byl přidán stejný objem směsi fenol/chloroform/isoamylalkohol v poměru 25:24:1 a směs byla centrifugována (Centrifuge 5415R Eppendorf) 2 minuty při 5400g a teplotě 4°C, vodná fáze byla přenesena do čisté, sterilní mikrozkušky Eppendorf (1,5 ml).

K vodné fázi byl přidán stejný objem isopropanolu, směs byla promíchána (Stolní centrifuga Labnet) a ponechána precipitovat 10 minut v ledové lázni. Po 10 minutách byla směs centrifugována (Centrifuge 5415R Eppendorf) 30 minut při 16100g a 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta promyta 200* μ l 70% etanolem (v/v) (podchlazeným na -20°C) a usušena na vakuové odparce (DNA Speed Vac 110 DNA).

Peleta byla rozpuštěna ve 100* μ l TE pufru (10 mM TRIS-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0), poté bylo ke směsi přidáno 0,5 μ l (pro 50 ml LB 1,5 μ l, pro 20 ml LB 1 μ l) RNasy A (10 mg . ml⁻¹) a směs byla inkubována (LS1 V.668.161.520) 40 minut při 37°C. Bylo přidáno 60* μ l PEG roztoku (20% (v/v) PEG 6000; 2,5 M NaCl) a ponecháno 1,25h v ledové lázni.

Směs byla centrifugována (Centrifuge 5415R Eppendorf) 15 minut při 15000g a 4°C, supernatant byl odstraněn a peleta promyta 200* μ l 70% etanolu (v/v) (podchlazeného na -20°C), následně byla sušena na vakuové odparce (DNA Speed Vac 110 DNA). Peleta byla rozpuštěna ve 20* μ l TE pufru (10 mM TRIS-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) nebo sterilní mQ vodě, v případě, že by byla získaná DNA posílána na sekvenaci, a získaný roztok plasmidové DNA byl uložen v -80°C. Před uložením DNA do -80°C bylo ještě provedeno spektroskopické stanovení její koncentrace.

Pozn: Návod na izolaci plasmidové DNA je psán pro izolaci z 10 ml LB media. Pro izolaci z jiného objemu LB media (20 ml, resp. 50 ml) byly objemy chemikálií označené * vynásobeny odpovídajícím koeficientem pro daný objem LB media, ze kterého byl plasmid izolován tj. 2 pro objem 20 ml, resp. 5 pro objem 50 ml.

3.3.6. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace plasmidové DNA byla stanovena spektrofotometrem Helios α (Helios α) nebo Hewlett Packard (Hewlett Packard 8453), pomocí kterého byly změřeny absorbance plasmidové DNA při třech vlnových délkách a dle vztahu (1) byla spočtena koncentrace a čistota izolovaného plasmidu.

Vztah (1) Výpočet koncentrace plasmidu pomocí spektroskopického stanovení

$$c = (A_{260} - A_{320}) * \text{ředění} * 50 \quad [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

Číslo 50 udává: Pokud je A_{260} rovna 1, potom je koncentrace DNA rovna $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Znečištění vzorků DNA bývá způsobeno hlavně proteiny absorbujícími monochromatické záření při 280 nm. Z tohoto důvodu je někdy užíváno tohoto vztahu, jenž určuje čistotu DNA. Tento vztah je dán následujícím poměrem: $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$. Doporučená hodnota spočteného poměru by měla ležet přibližně mezi hodnotami 1,7 – 2.

3.3.7. Polymerasová řetězová reakce – PCR

Byla provedena PCR upravující a amplifikující gen pro CYP1B1 v izolovaném plasmidu. Byly navrženy primery, pomocí kterých byly metodou PCR k genu přidány štěpící místa pro restrikční endonukleasy, a to jak na začátek, tak na konec genu. Na 5' – konec byla přidána štěpící místa pro endonukleasy EcoRI a NdeI, na 3' – konec pak štěpící místa pro endonukleasy XhoI, BamHI a HindIII. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 Primery použité v PCR upravující gen CYP1B1.

Název	Sekvence
forward h1B1- fw	5'- GACGAATTCATATGGGGACAAGCCTCAGCCCGAAC -3'
forward h1B1+HisFX - fw	5'- GACGAATTCATATGCATCATCATCATCACCATATCGAG GGAAGGGGGACAAGCCTCAGCCCGAAC -3'
reverse h1B1 - rv	5'- GCCAAGGAAACTTGCCAATAACTCGAGGATCCAAGCT TTAC -3'

Objednané roztoky primerů byly doplněny sterilní mQ vodou, jejíž množství bylo spočteno firmou, u které byly primery nechány syntetizovat, na koncentraci $100 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Z tohoto roztoku byl pětinasobným zředěním připraven zásobní roztok o koncentraci $20 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, který byl použit pro reakční směs PCR. Templátem pro tuto reakci byl plasmid izolovaný z původních buněk *E. coli* DH5 α , jak pro PCR DNA s histidinovou kotvou, tak pro PCR bez histidinové kotvy. Plasmid z původních buněk, obsahující gen pro CYP1B1, byl před přidáním do reakční směsi 50x zředěn.

Reakční směs pro PCR byla upravena dle [1] a obsahovala (jak pro směs s primerem s His6+*FactorXa IEGR*, tak pro směs s primerem bez His6+*FactorXa IEGR*):

- 1 μl templátu (50x ředěný)
- 1 μl primeru forward bez histidinové kotvy (s histidinovou kotvou); vždy o koncentraci $20 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
- 1 μl primeru revers
- 1 μl dinukleotidfosfátu (10 mM)
- 5 μl pufru pro Pfu polymerasy (10x koncentrovaný)
- 6 μl MgSO₄ (25 mM)
- 2 μl DMSO
- 1 μl Pfu polymerasy
- 32 μl sterilní mQ vody

Napipetované reakční směsi byly umístěny do termocykleru (Techne FTGENE2D), na němž byl nastaven program *b5*, na kterém se provedly menší úpravy.

Popis použitého programu *b5* (včetně úprav):

Část 1:

- teplota tání DNA: 94°C; 30"
- teplota nasednutí primeru na DNA: 57°C; 30"
- teplota polymerace DNA: 73°C; 2"

1. část byla nastavena na 30 cyklů

Část 2:

- teplota dopolymerování zbývajících DNA: 73°C; 6'

2. část byla nastavena na 1 cyklus

Část 3:

- teplota zastavení PCR: 6 °C na nekonečně dlouhou dobu

Víko termocykleru bylo vyhřáté na 103 °C

3.3.8. Izolace DNA pomocí srážení isopropanolem

K produktu PCR bylo přidáno 100 µl isopropanolu, směs byla ručně promíchána a centrifugována (Centrifuge 5415R Eppendorf) a následně ponechána precipitovat 10 minut v ledové lázni. Po 10 minutách byla směs centrifugována (Centrifuge 5415R Eppendorf) 10 minut při 16100g a 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta promyta 100 µl 70% etanolem (v/v) (podchlazeným na teplotu -20°C) a usušena na vakuové odparce (DNA Speed Vac 110 DNA).

Vysušená DNA byla rozpuštěna ve 20 µl sterilní mQ vodě a následně byla stanovena její koncentrace. Zbylé roztoky izolované DNA byly uschovány v -80°C.

3.3.9. Štěpení DNA restrikčními endonukleasami NdeI a HindIII

Do mikrozkušavek Eppendorf byla odpipetována směs (vždy s celkovým objemem 20 μ l):

Pro plasmid pET-22b

- 2 μ l NEB4 pufru
- 0,5 μ l NdeI
- 0,5 μ l HindIII
- 12 μ l plasmidu pET-22b
- 5 μ l sterilní mQ vody

Pro gen CYP1B1 bez histidinové kotvy

- 2 μ l NEB4 pufru
- 0,5 μ l NdeI
- 0,5 μ l HindIII
- 7 μ l DNA
- 10 μ l sterilní mQ vody

Pro gen CYP1B1 s histidinovou kotvou

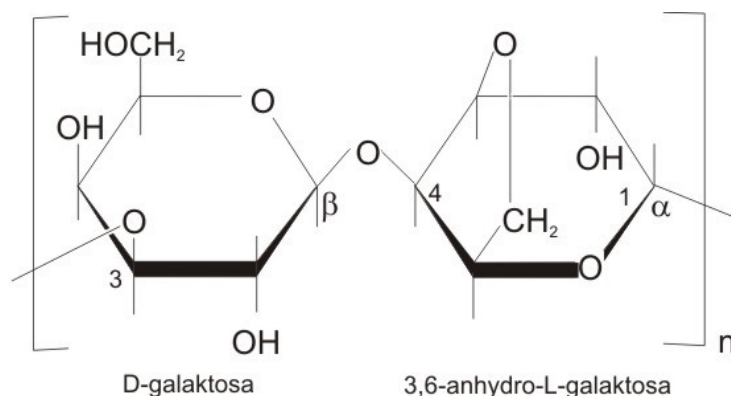
- 2 μ l NEB4 pufru
- 0,5 μ l NdeI
- 0,5 μ l HindIII
- 7 μ l DNA
- 10 μ l sterilní mQ vody

Mikrozkušavky se směsmi byly inkubovány 2h při 37°C v inkubátoru (Automatic CO₂ incubator IR 1500).

3.3.10. Agarosová elektroforesa

Na agarosovou elektroforesu a přípravu agarových ploten se používá agarosa, polysacharid izolovaný z červených řas. Je tvořen D-galaktosovými a 3,6-anhydro-L-

galaktosovými jednotkami, které se v molekule polymeru pravidelně opakují. Pro většinu suchozenmských organismů je neštěpitelný. Na rozdíl od kultivací, kde postačí levnější směs sacharidu z těch to řas – agar, pro agarosovou elektroforesu je nutná čistá agarosa (obrázek 13), která po ztuhnutí vytvoří síťovou strukturu, jež umožní rozdělení molekul DNA v závislosti na jejich velikosti [27].



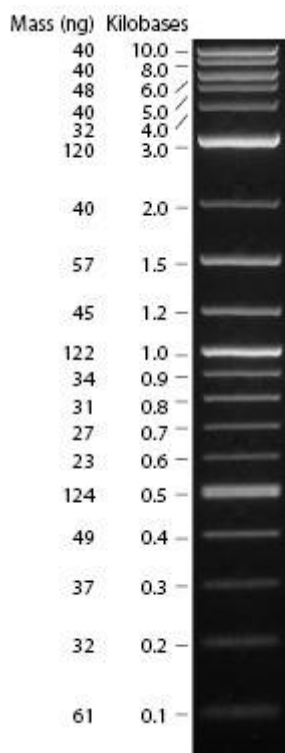
Obrázek 13 Polymerní molekula agarosy. Převzato z [26].

Byl připraven 1% (w/v) roztok agarosy rozpuštěním za horka 0,4 g agarosy ve 40 ml TAE pufru (40 mM TRIS, 20 mM octové kyseliny, 1 mM EDTA; pH 8,0). Po vychladnutí roztoku k němu byly přidány 2 μ l GEL GREEN (20000x zředěno), směs byla promíchána a opatrně nalita do elektroforetické vaničky s gumovými spacery na koncích, aby roztok nevytekl. Do gelu byl opatrně vložen hřeben, kterým byly z gelu odstraněny případné bublinky vniklé při nalévání roztoku do elektroforetické vaničky. Směs byla ponechána 25-30 minut tuhnout.

V době tuhnutí byly připraveny vzorky DNA s vzorkovým pufrům (40% sacharosa (w/v), 0,1% bromfenolová modř (w/v)), vždy v poměru 4:1 z pohledu DNA. Obdobným způsobem byla připravena směs standardu molekulových hmotností 2-Log DNA Ladder (1 díl standardu, 4 díly vzorkového pufru (2,5% ticoll 400 (w/v), 11 mM EDTA 3,3 mM TRIS-HCl, 0,017% SDS (w/v), 0,015% bromfenolová modř (w/v)) – 6x koncentrovaného a 19 dílů sterilní mQ vody).

Z již ztuhlého gelu byl opatrně vyndán hřeben a odstraněny gumové spacery, vanička byla vložena do elektroforetické aparatury a převrstvena TAE pufrům. Automatickou pipetou byly do jamek nanášeny vzorky. Elektroforesa probíhala při napětí 110 V po dobu 40 minut. Po skončení elektroforesy byl gel vyhodnocen na transluminátoru

(Dark reader transluminator DR-45H) podle standardu (obrázek 14), na kterém jsou komerční firmou NEB znázorněny relativní vzdálenosti vzhledem ke složení elektroforetického gelu [15]. Na elektroforesu bylo použito 0,25 µl standardu.



Obrázek 14 Marker 2-log DNA ladder. Převzato z [15].

3.3.11. Izolace DNA z agarosového gelu pomocí komerčního kitu

Na analytických vahách byly zváženy mikrozkušavky Eppendorf. Z agarosového gelu byla na transluminátoru skalpelem opatrně vyříznuta požadovaná DNA, která byla poté kvůli snadnějšímu rozpouštění ještě rozřezána na menší kousky. Rozřezaný gel s požadovanou DNA byl vložen do zvážené mikrozkušavky, jež byla znovu zvážena. Z rozdílu hmotností bylo vypočteno, v kolika µl roztoku L1 se má rozřezaný gel rozpustit. Na 100 mg gelu připadá 300 µl roztoku. Poté bylo postupováno dle návodu přiloženého u kitu „JET quick – Gel Extraction Spin Kit“ od firmy Genomed, pomocí něhož byla DNA z gelu izolována.

Po napipetování odpovídajícího množství roztoku L1 (obsahuje chloritan sodný) byla směs po dobu 15 minut zahřívána na ohřívači bloků (LS1 V.668.161.520), který byl přehřátý na teplotu 50°C. Po rozpouštění gelu byla tato směs přenesena na iontoměničové kolonky a celek byl centrifugován (Centrifuge 5415R, Eppendorf) 1 minutu při 12400g a

laboratorní teplotě. V případě, že byla hmotnost gelu vyšší než 250 mg, byla kolonka promyta ještě jednou 500 µl roztoku L1 a centrifugována při stejných podmínkách. Následně byla kolonka promyta 500 µl roztoku L2 (obsahuje chlorid sodný, TRIS, EDTA; pH 7,5). Celek byl centrifugován (Centrifuge 5415R, Eppendorf) 1,5 minuty při 12400g a laboratorní teplotě a následně centrifugován (Centrifuge 5415R, Eppendorf) ještě 1 minutu při 16100g a laboratorní teplotě. Na kolonku bylo následně naneseno 50 µl sterilní mQ vody o teplotě 70°C a po zasáknutí (cca 1 minuta) byla DNA eluována do čisté mikrozkušavky Eppendorf (1,5 ml) centrifugací po dobu 2 minut při 12400g při laboratorní teplotě.

3.3.12. Ligace

Do mikrozkušavek Eppendorf byla odpipetována ligační směs o celkovém objemu 20 µl. Poměr insert : plasmid byl asi 2:1 (výpočet objemu insertu, resp. plasmidu použitého při ligaci je uveden v kapitole Výsledky). Ligační směs (viz. níže) byla po napipetování promíchána zatřepáním mikrozkušavkou a inkubována po dobu 7h v termostatu (ThermoE CHB-A4-9602).

- 2 µl pufru pro T4 ligasu (10x koncentrovaný)
- 0,5 µl T4 ligasy
- 5 µl insertu
- 10 µl plasmidu
- 2,5 µl sterilní mQ vody

3.3.13. Transformace buněk *E. coli* DH5α

Kompetentní buňky *E. coli* DH5α byly vyndány z mrazáku (-80°C) a ponechány rozmrznout v ledové lázni. Z alikvotu o objemu 200 µl bylo přeneseno 100 µl buněk do nové, sterilní mikrozkušavky Eppendorf a k buňkám bylo přidáno 20 µl ligační směsi (případně 15 µl konstruktů při amplifikaci plasmidu), resp. 20 µl (15 µl) sterilní mQ vody (pro kontrolní buňky). Mikrozkušavky byly promíchány špičkou pipety bez nasátí a na 30 minut byly uloženy do ledové lázně. Poté byly mikrozkušavky vloženy na 90 sekund do

předeřátého ohřivače bloků na 42 °C (LS1 V.668.161.520), následně znovu na 2 minuty do ledové lázně.

Následně bylo přidáno ke všem buňkám 300 µl LB media (trojnásobek původního objemu buněk). Buňky s LB médiem byly inkubovány po dobu 1h v inkubátoru (Automatic CO₂ incubator IR 1500) při 37 °C, po inkubaci byla směs vyseta na předem připravenou agarovou plotnu s ampicilinem (100 µg . ml⁻¹). Plotny byly po vsáknutí směsi do agaru obráceny dnem vzhůru a umístěny na noc do inkubátoru (Automatic CO₂ incubator IR 1500) o teplotě 37 °C.

3.3.14. Transformace TSS („Transformation and storage solution“) buněk *E. coli* XL1 MRF+

Kompetentní buňky *E. coli* XL1 MRF+ byly vyndány z mrazáku (-80°C) a ponechány rozmraznout v ledové lázni. Z alikvoty o objemu 200 µl bylo přeneseno 100 µl buněk do nové, sterilní mikrozumavky Eppendorf a k buňkám byl přidán 1 µl plasmidu pET-22b, resp. 1 µl sterilní mQ vody (pro kontrolní buňky). Mikrozumavky byly promíchány špičkou pipety bez nasátí a 10 minut ponechány v ledové lázni. Následně bylo do mikrozumavek přidáno 300 µl LB media, obsah mikrozumavky byl znovu stejným způsobem promíchán a poté byly mikrozumavky vloženy na 10 minut do inkubátoru (Automatic CO₂ incubator IR 1500) o teplotě 37°C. Po inkubaci byla směs vyseta na předem připravenou agarovou plotnu s ampicilinem (120 µg . ml⁻¹). Plotny byly po vsáknutí směsi do agaru obráceny dnem vzhůru a umístěny na noc do inkubátoru (Automatic CO₂ incubator IR 1500) o teplotě 37 °C.

4. Výsledky

4.1. Izolace plasmidu pOTB7 nesoucího gen pro lidský CYP1B1

Jako zdroj genu pro lidský CYP1B1 byly použity kultury *E. coli* nesoucí plasmid s lidskou cDNA tohoto genu. Buňky uchovávané v glycerolu byly získány z databáze PlasmidID.

Z kolonií narostlých na Petriho misce s agarem obsahující antibiotikum chloramfenikol byly 3 přeočkovány do 10 ml LB media a inkubovány přes noc. Ze vzniklé kultury byla následně pomocí alkalické lýzy a izolace fenol-chloroformovou metodou izolována plasmidová DNA, tedy plasmid pOTB7, s lidským genem pro CYP1B1. Získaná DNA byla poté spektroskopicky stanovena (tabulka 3) a uschována v -80°C.

Tabulka 3 Výsledky spektroskopického stanovení plasmidu pOTB7.

Číslo bakteriální kolonie	1	2	3
A_{260}	0,104	0,121	0,102
A_{280}	0,058	0,069	0,056
A_{320}	0,001	0,002	0,001
$c_{DNA} [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}]$	2 580	2 981	2 530
$\frac{A_{260}}{A_{280}}$	1,79	1,75	1,82
$V_{DNA} [\mu\text{l}]$	16	16	16

Vzorek byl ředěn 501x.

Získané množství DNA bylo vysoké (jedná se o vysokokopiový plasmid), čistota plasmidu byla dostatečná pro jeho uchování i následnou amplifikaci.

4.2. Porovnání sekvencí inzertů pro expresi lidského CYP1B1

Pomocí metody PCR byly amplifikovány dva inserty (obrázek 15 a 16) prodloužené o štěpící místa pro restriční endonukleasy, pomocí kterých měl být gen vložen do plasmidu pET-22b a následně připraven konstrukt pro expresní pokusy. Jeden ze dvou

připravených insertů byl navíc rozšířen o histidinovou kotvu (6xHis) a štěpící místo pro proteasu FxoraXa (IEGR). Tato rozšíření by mohla usnadnit izolaci, po odštěpení kotvy lze získat protein identický s přirozenou formou lidského CYP1B1.

5' –
GACGAATTCATATGGGACAGCCTCAGCCCGAACGACCCTTGCCCGCTAAACCCGCTGTCCATCCAGCAGAC
CAGCTCCTGCTACTCCTGTTCGGTGTGGCCACTGTGCATGTGGGCCAGCGGCTGCTGAGGCAACGGAGGCGG
CAGCTCCGGTCCGCGCCCCCGGGCCCGTTTGCCTGGCCACTGATCGGAAACGCGGCGGCGGTGGGCCAGGCGG
CTCACCTCTCGTTCGCTCGCCTGGCGCGGCGCTACGGCGACGTTTTCCAGATCCGCTGGGCAGCTGCCCCAT
AGTGGTGTGAATGGCGAGCGCGCCATCCACCAGGCCCTGGTGCAGCAGGGCTCGGCCTTCGCGACCCGGCCG
GCCTTCGCCTCCTTCGCTGTGGTGTCCGGCGGCCGAGCATGGCTTTTCGGCCACTACTCGGAGCACTGGAAGG
TGCAGCGGCGCGCAGCCACAGCATGATGCGCAACTTCTTCACGCGCCAGCCGCGCAGCCGCCAAGTCTCTCGA
GGGCCACGTGTGAGCGAGGCGCGCAGCTGGTGGCGCTGTGGTGCAGCGGCAGCGCGGACGGCGCCTTCCTC
GACCCGAGGCCGCTGACCGTCTGGCCGTGGCCAAACGTCATGAGTGCCTGTGTTTCGGCTGCCGCTACAGCC
ACGACGACCCCGAGTTCCGTGAGCTGCTCAGCCACAACGAAGAGTTCGGGCGCACGGTGGGCGCGGGCAGCCT
GGTGGACGTGATGCCCTGGCTGCAGTACTTCCCAACCCGCTGCGCACCGTTTTCCGCGAATTCGAGCAGCTC
AACCGCAACTTCAGCAACTTCATCCTGGACAAGTTCTTGAGGCACTGCGAAAGCCTTCGGCCCGGGGCGCCG
CCCGCGACATGATGGACGCCTTTATCCTCTCTGCGAAAAGAAGGCGGCCGGGGACTCGCACGGTGGTGGCGC
GCGCTGGATTTGGAGAACGTACCGCCACTATCACTGACATCTTCGGCGCCAGCCAGGACACCCTGTCCACC
GCGCTGCAGTGGCTGCTCCTCCTCTTACCAGGTATCCTGATGTGCAGACTCGAGTGCAGGCAGAATTGGATC
AGGTTCGTGGGGAGGGACCGTCTGCCTTGTATGGGTGACCAGCCCAACCTGCCCTATGTCTTGGCCTTCCTTTA
TGAAGCCATGCGCTTCTCCAGCTTTGTGCCTGTCACTATTCTCATGCCACCACTGCCAACACCTCTGTCTTG
GGCTACCACATTTCCAAGGACACTGTGGTTTTTGTCAACCAGTGGTCTGTGAATCATGACCCAGTGAAGTGGC
CTAACCCGGAGAACTTTGATCCAGCTCGATTCTTGACAAGGATGGCCTCATCAACAAGGACCTGACCAGCAG
AGTGATGATTTTTTTCAGTGGGCAAAAGGCGGTGCATTGGCGAAGAACTTTCTAAGATGCAGCTTTTTTCTCTTC
ATCTCCATCCTGGCTCACCAAGTGCATTTTCAGGGCCAAACCCAAATGAGCCTGCGAAAATGAATTTTCAGTTATG
GTCTAACCATTAACCCAAAGTCATTTAAAGTCAATGTCACTCTCAGAGAGTCCATGGAGCTCCTTGATAGTGC
TGTCAAAATTTACAAGCCAAGGAACTTGCCAATAACTCGAGGATCCAAGCTTTAC – 3'

Obrázek 15 Sekvence genu CYP1B1 s přidáním restrikčními místy (na 5' konci EcoRI (fialově) a NdeI (zelené pozadí); na 3' konci XhoI (růžově), BamHI (hnědě) a HindIII (šedě)) sekvence čistého genu je na obrázku znázorněna červeně. Červené tučně zvýrazněné a podtržené báze jsou komplementárními náhradami za přirozeně vyskytující se báze kvůli vzniku vlásenek, na kterých se podílely přirozeně přítomné báze.

5' –

GACGAATT**CATATG**CATCATCATCATCACCAT**4TCG4GGG44GGGGGAC**AAGCCTCAGCCCGAACGAC
CCTTGGCCGCTAAACCCGCTGTCCATCCAGCAGACCACGCTCCTGCTACTCCTGTGGGTGCTGGCCACTGTGC
ATGTGGGCCAGCGGCTGTGAGGCAACGGAGGCGGCAGCTCCGGTCCGCGCCCCCGGGCCCCGTTTGGCTGGCC
ACTGATCGGAAACGCGGCGGGTGGGCCAGGCGGCTCACCTCTCGTTTCGCTCGCCTGGCGCGGCGTACGGC
GACGTTTTCCAGATCCGCTGGGCAGCTGCCCATAGTGGTGTGAATGGCGAGCGCGCCATCCACCAGGCC
TGGTGCAGCAGGGCTCGGCCTTCGCCGACCCGCGGCCTTCGCCTCCTTCGCTGTGGTGTCCGGCGGCCGAG
CATGGCTTTCGGCCACTACTCGGAGCACTGGAAGGTGCAGCGGCGCGCAGCCACAGCATGATGCGCAACTTC
TTCACGCGCCAGCCGCGCAGCCGCAAGTCCTCGAGGGCCACGTGCTGAGCGAGGCGCGGAGCTGGTGGCGC
TGCTGGTGGCGCGGAGCGGACGGCCTTCTCGACCCGAGGCCGCTGACCGTCTGGCCGTGGCCAAAGT
CATGAGTGCCGTGTGTTTCGGCTGCCGCTACAGCCACGACGACCCCGAGTTCCGCTGAGCTGCTCAGCCACAAC
GAAGAGTTCCGGGCGCACGGTGGGCGCGGCAGCCTGGTGGACGTGATGCCCTGGCTGCAGTACTTCCCCAACCC
CGGTGCGCACCGTTTTTCGCGCAATTTCGAGCAGCTCAACCGCAACTTCAGCAACTTCATCCTGGACAAGTTCTT
GAGGCACTGCGAAAGCCTTCGGCCCCGGGGCCGCCCCCGGACATGATGGACGCTTTATCCTCTCTGCGGAA
AAGAAGGCGGCCGGGACTCGCACGGTGGTGGCGCGGCTGGATTTGGAGAACGTACCGGCCACTATCACTG
ACATCTTCGGCGCCAGCCAGGACACCCTGTCCACCGCGCTGCAGTGGCTGCTCCTCCTCTTACCAGGTATCC
TGATGTGCAGACTCGAGTGCAGGCAGAATTGGATCAGGTCGTGGGGAGGGACCGTCTGCCTTGATGGGTGAC
CAGCCCAACCTGCCCTATGTCTTGGCCTTCTTTATGAAGCCATGCGCTTCTCCAGCTTTGTGCCTGTCACTA
TTCTCATGCCACCCTGCCAACACCTCTGTCTTGGGCTACCACATTCCCAAGGACACTGTGGTTTTTGTCAA
CCAGTGGTCTGTGAATCATGACCCAG**GTGA**AGTGGCCTAACCCGGAGAACTTTGATCCAGCTCGATTCTTGGAC
AAGGATGGCCTCATCAACAAGGACCTGACCAGCAGAGTGATGATTTTTTCAGTGGGCAAAAGGCGGTGCATTG
GCGAAGAATTTTAAGATGCAGCTTTTTCTCTTCATCTCCATCCTGGCTCACCAGTGCATTTCAGGGCCAA
CCCAAATGAGCCTGCGAAAATGAATTTTCAGTTATGGTCTAACCATTAACCCAAAGTCATTTAAAGTCAATGTC
ACTCTCAGAGAGTCCATGGAGCTCCTTGATAGTGTGTCCAAAATTTACAAGCCAAGGAACTTGCCAATAAC
TCGAGGATCCAAGCTTTAC – 3'

Obrázek 16 Sekvence genu CYP1B1 s přidáním restrikčních místy (na 5' konci EcoRI (fialově) a NdeI (zelené pozadí); na 3' konci XhoI (růžově), BamHI (hnědě) a HindIII (šedě)) sekvence čistého genu je na obrázku znázorněna červeně. Histidinová kotva je znázorněna tučným, černým písmem. Červené tučně zvýrazněné a podtržené báze jsou komplementárními náhradami za přirozeně vyskytující se báze kvůli vzniku vlásenek, na kterých se podílely přirozeně přítomné báze.

Oba inserty obsahují mutaci v bázi číslo 1294 (na obrázcích 15 a 16 vyznačen modrou barvou), kde je cytosin nahrazen guaninem. Tato mutace způsobuje změnu 432. kodonu. Důsledek mutace je záměna aminokyseliny leucinu za aminokyselinu valin. Mutace není vzhledem k obdobné povaze obou aminokyselin vážná, tudíž ani nebylo překročeno k její opravě.

4.3. PCR amplifikující gen pro hCYP1B1 se štěpicími místy

Byla provedena polymerasová řetězová reakce, která měla za úkol amplifikovat gen pro hCYP1B1 obsažený v plasmidu pOTB7, který byl použit jako templát, a přidat k němu štěpicí místa. Reakční směs byla po ukončení reakce purifikována metodou pomocí srážení isopropanolem. Vodné roztoky insertů byly následně stanoveny spektrofotometricky (tabulka 4) a uschovány v -80°C.

Tabulka 4 Výsledky spektroskopického stanovení insertů.

Insert	N	H
A_{260}	0,010	0,011
A_{280}	0,007	0,008
A_{320}	0,001	0,002
$c_{\text{DNA}} [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}]$	225	225
$\frac{A_{260}}{A_{280}}$	1,43	1,38
$V_{\text{DNA}} [\mu\text{l}]$	12	16

Vzorek byl ředěn 500x.

N ~ insert CYP1B1 bez histidinové kotvy

H ~ insert CYP1B1 s histidinovou kotvou

4.4. Amplifikace plasmidové DNA pET-22b

Z důvodu docházejících zásob plasmidu a jeho stáří byl připraven nový roztok tohoto plasmidu. Zásobní roztok plasmidu pET-22b byl transformován typem transformace TSS do buněk *E. coli* XL1 MRF+ rezistentních na ampicilin. Metodou „single cell colony“ byly do 50 ml LB media s koncentrací ampicilinu $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ přeočkovány 3 kolonie.

Z „overnight“ kultury byla odebrána část buněk, jež byly uchovány v 15% glycerolu a uloženy do -80° jako zásoba pro další množení plasmidu. Zbytek kultury byl použit pro izolaci plasmidu. Po izolaci byl plasmid spektrofotometricky stanoven (tabulka 5) a uschován v -80°C .

Tabulka 5 Výsledky spektroskopického stanovení plasmidu pET-22b.

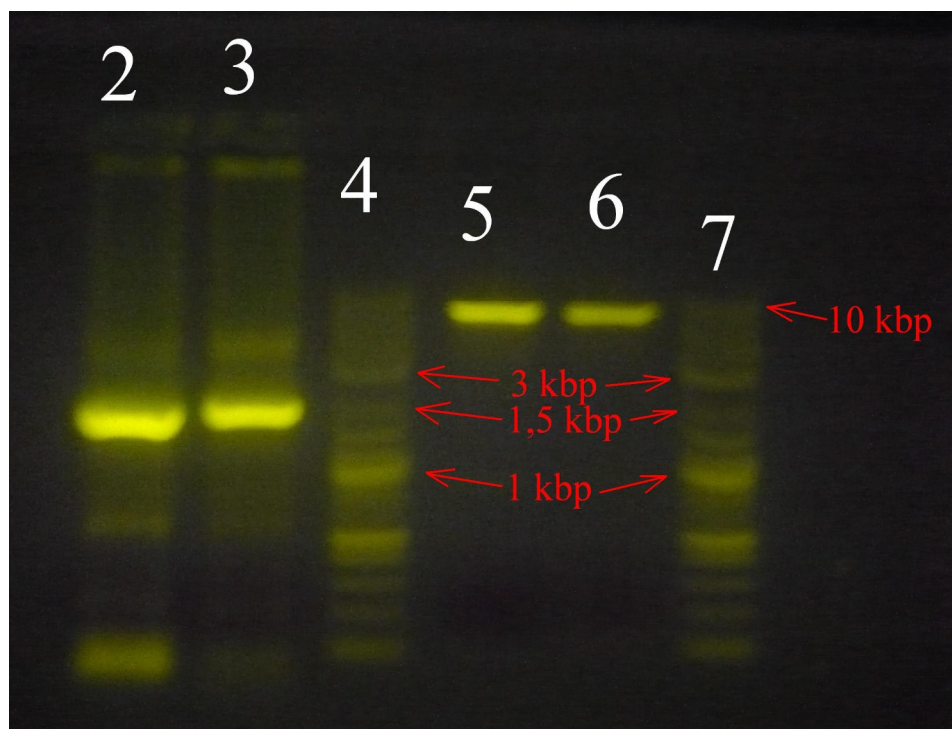
Číslo bakteriální kolonie	1	2	3a	3c
A_{260}	0,031	0,032	0,031	0,026
A_{280}	0,019	0,019	0,019	0,014
A_{320}	0,001	0,002	0,002	0,001
$c_{DNA} [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}]$	375	375	362,5	312,5
$\frac{A_{260}}{A_{280}}$	1,63	1,68	1,63	1,85
$V_{DNA} [\mu\text{l}]$	28	14	14	14

Vzorek byl ředěn 250x.

Bakteriální kolonie 3 byla během stanovení rozdělena, ale fragmenty již nebyly spojeny.

4.5. Štěpení PCR produktu, čištění štěpené DNA a její stanovení

Izolované a přečištěné produkty z PCR a plasmid pET-22b byly štěpeny restrikními endonukleasami NdeI a HindIII. Po ukončení štěpení byla reakční směs rozdělena pomocí agarosové elektroforesy (obrázek 17).



Obrázek 17 Agarosová elektroforesa štěpených insertů a plasmidu pET-22b.

Dráha 2: Štěpený insert CYP1B1 bez histidinové kotvy.

Dráha 3: Štěpený insert CYP1B1 s histidinovou kotvou.

Dráha 4: DNA marker. Popsán v metodách (kapitola 3.3.10).

Dráha 5: Štěpený insert pET-22b (P1).

Dráha 6: Štěpený insert pET-22b (P2).

Dráha 7: DNA marker.

Štěpené produkty z drah 2; 3; 5 a 6, tj. nejvýraznější proužky z drah, byly z gelu izolovány pomocí kitu „JET quick – Gel Extraction Spin Kit“ (při izolaci nebyla kolonka podruhé promyta roztokem L1, protože hmotnost vyříznutého gelu byla menší než 250 mg viz. metody) a stanoveny na spektrofotometru (tabulka 6) a uschovány v -80°C .

Tabulka 6 Výsledky spektroskopického stanovení DNA izolované po štěpení.

DNA	N	H	P1	P2
A_{260}	0,00563	0,00411	0,00163	0,00300
A_{280}	0,00557	0,00338	0,000515	0,00226
A_{320}	0,00184	0,00481	- 0,00172	0,00690
$\frac{A_{260}}{A_{280}}$	1,0	0,85	3,2	1,3
$c_{DNA} [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}]$	33,4	32,0	29,5	20,3
$m_{DNA} [\mu\text{g}]$	1 550	1 470	1 360	935
$c_{DNA} [\text{pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}]$	33,6	31,5	9,07	6,24
$V_{DNA} [\mu\text{l}]$	46	46	46	46

Vzorek byl ředěn 176x.

N ~ insert CYP1B1 bez histidinové kotvy

H ~ insert CYP1B1 s histidinovou kotvou

P1, P2 ~ pET-22b (frakce byly spojeny a roztok označen jako P)

4.6. Ligace a transformace

Štěpená a izolovaná DNA byla ligována z hlediska molárního poměru insert : plasmid 2 : 1. Obvyklé koncentrace DNA pro ligaci se pohybují ve stovkách $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, avšak v tomto případě byly výtěžky z izolace z gelu o řád nižší.

Směs byla ponechána ligoval, následně byla transformována do buněk *E. coli* DH5 α a po transformaci vyseta na agarové plotny v Petriho miskách s ampicilinem o koncentraci 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Na plotnách však nevyrostly žádné kolonie. Byl tedy učiněn pokus o snížení koncentrace ampicilinu o polovinu tedy na 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Na agarových plotnách vyrostlo průměrně 5 kolonií na každé misce (na kontrolách žádné). Na každé plotně byly vybrány dvě kolonie, které byly metodou „single cell colony“ přeočkovány do 20 ml LB media s koncentrací ampicilinu 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Bohužel, jak se však v pozdějších krocích ukázalo, s největší pravděpodobností se nejednalo o kolonie nesoucí požadovaný konstrukt.

4.7. Izolace konstruktů a jeho stanovení

Z narostlé „overnight“ kultury byly k indukci exprese izolovány dva druhy konstruktů na bázi pET-22b. První druh konstruktů by měl obsahovat gen pro hCYP1B1 a druhý tentýž gen, ale navíc prodloužený o histidinovou kotvu. Po izolaci byly konstruktů stanoveny na spektrofotometru (tabulka 7) a uloženy do -80°C .

Jedna „overnight“ kultura, v níž obsažené bakterie měly obsahovat konstrukt pro hCYP1B1 s histidinovou kotvou, v tomto mediu nenarostla.

Tabulka 7 Spektrofotometrické stanovení konstruktů na bázi pET-22b po jeho izolaci.

Konstrukt	N1	N2	H
A_{260}	0,123	0,136	0,181
A_{280}	0,033	0,042	0,061
A_{320}	0,005	0,008	0,008
$c_{\text{DNA}} [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}]$	2 950	3 200	4 325
$\frac{A_{260}}{A_{280}}$	3,73	3,24	2,97
$V_{\text{DNA}} [\mu\text{l}]$	36	36	36

Vzorek byl ředěn 500x.

N1 ~ konstrukt na bázi pET-22b s CYP1B1 bez histidinové kotvy izolovaný ze „single cell colony“ 1

N2 ~ konstrukt na bázi pET-22b s CYP1B1 bez histidinové kotvy izolovaný ze „single cell colony“ 2

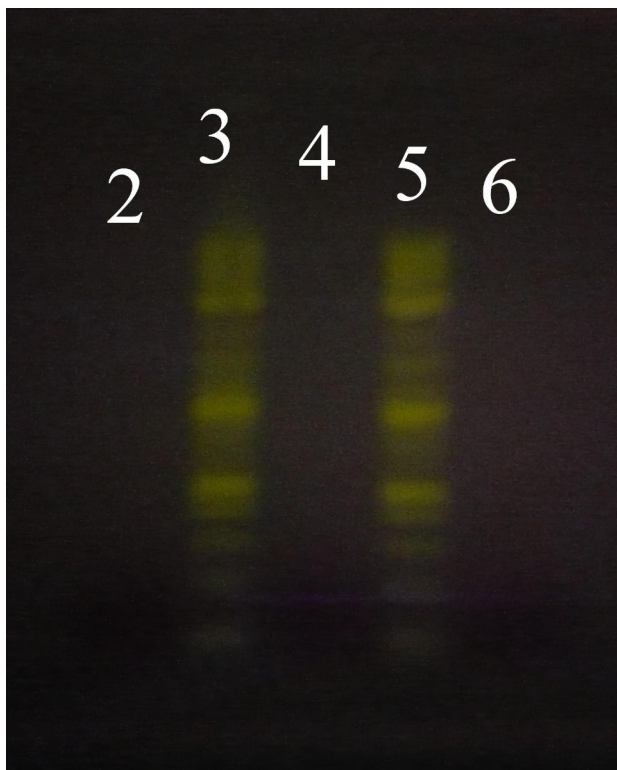
H ~ konstrukt na bázi pET-22b s CYP1B1 s histidinovou kotvou izolovaný ze „single cell colony“

4.8. Ověřování konstruktů

Bylo provedeno ověření unikátních štěpících míst v izolovaném konstruktů na bázi pET-22b jako jeden ze dvou důkazů potvrzujících přípravu cíleného produktu. Prvním důkazem je agarosová elektroforesa. Druhým důkazem je sekvenace konstruktů, ke které by bylo přikročeno na základě pozitivního výsledku agarosových elektrofores.

4.8.1. Agarosová elektroforeza štěpeného konstruktů

Po štěpení pomocí endonukleas NdeI a HindIII byla štěpící směs analyzována na pomoci agarosové elektroforezy (obrázek 18).



Obrázek 18 Agarosová elektroforeza štěpených konstruktů na bázi plasmidu pET-22b.

Dráha 2: Štěpený konstrukt N1.

Dráha 3: DNA marker.

Dráha 4: Štěpený konstrukt N2.

Dráha 5: DNA marker.

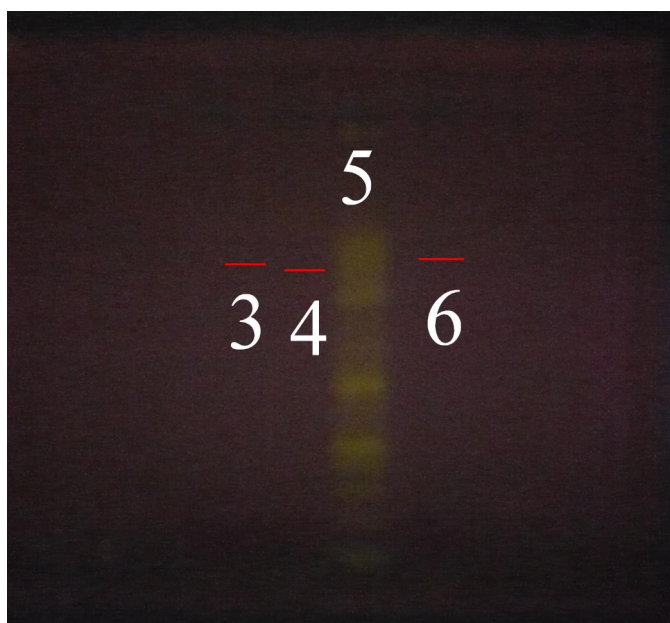
Dráha 6: Štěpený konstrukt H.

Čísla označují „single cell“ kolonie, ze kterých byl plasmid izolován.

Na elektroforetickém gelu byl zjištěn pouze marker, ostatní vzorky nevykazovaly přítomnost DNA.

4.8.2. Agarosová elektroforeza neštěpených konstruktů

Jak ukazuje obrázek 18, ve vzorcích konstruktů nebyla zaznamenána po štěpení restrikcími enzymy žádná DNA, bylo potřeba vyloučit kontaminaci endonukleas DNAsami či jejich nespecifickou aktivitu. Proto jsem znovu provedl agarosovou elektroforezu znovu, avšak tentokrát konstruktů nebyly štěpeny (obrázek 19).



Obrázek 19 Agarosová elektroforeza neštěpených konstruktů na bázi plasmidu pET-22b. Dráha 3: Neštěpený konstrukt N1. Dráha 4: Neštěpený konstrukt N2. Dráha 5: DNA marker. Dráha 6: Neštěpený konstrukt H. K analýze bylo použito 4 μ l vzorku DNA.

Na obrázku 19 je vidět, že vzorky obsahují jen velice malé množství DNA, které je na hranici detekce. Proužek DNA je na obrázku kvůli obtížné viditelnosti podtržen červenou čarou. Nachází se v oblasti mezi 5,0 a 6,0 kbp.

4.9. Transformace konstruktem za účelem amplifikace a jeho stanovení

Ověřování konstruktů sice nepřineslo pozitivní důkaz o přítomnosti očekávané DNA při elektroforese štěpeného konstruktů, avšak při elektroforese neštěpeného konstruktů se objevil sice jen jeden ze tří očekávaných proužků, ale ve správné oblasti gelu. Proto jsem přistoupil k transformaci bakterií *E. coli* DH5 α právě tímto konstruktem ve snaze amplifikovat jej a získat tak nový, další konstrukt pro ověřování cíleného produktu, jednak protože původní izolovaný konstrukt by na ověřovací pokusy nestačil, a jednak kvůli dostatečné zásobě plasmidu na expresní pokusy.

Po transformaci na agarových plotnách vyrostlo jen velmi málo kolonií (průměrně 5 kolonií na každé misce), z nichž byly na každé plotně vybrány dvě kolonie. Po izolaci byla

koncentrace DNA v roztoku konstruktů stanovena na spektrofotometru (tabulka 8) a poté byl konstrukt uložen v -80°C .

Tabulka 8 Spektrofotometrické stanovení konstruktů na bázi pET-22b po jeho izolaci.

konstrukt	N1	H1	N2 _#	H2 _# ^{*ELFO}
A_{260}	0,015	0,005	0,020	0,017
A_{280}	0,009	0,009	0,012	0,011
A_{320}	- 0,001	0,001	0,001	0,000
$\frac{A_{260}}{A_{280}}$	1,01	0,85	3,17	1,33
$c_{\text{DNA}} [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}]$	400	100	190	170
$V_{\text{DNA}} [\mu\text{l}]$	96	96	90	90

Vzorky konstruktů N1 a H1 byly ředěny 500x.

Vzorky konstruktů N2_# a H2_#^{*ELFO} byly ředěny 200x.

N ~ konstrukt CYP1B1 na bázi pET-22b bez histidinové kotvy

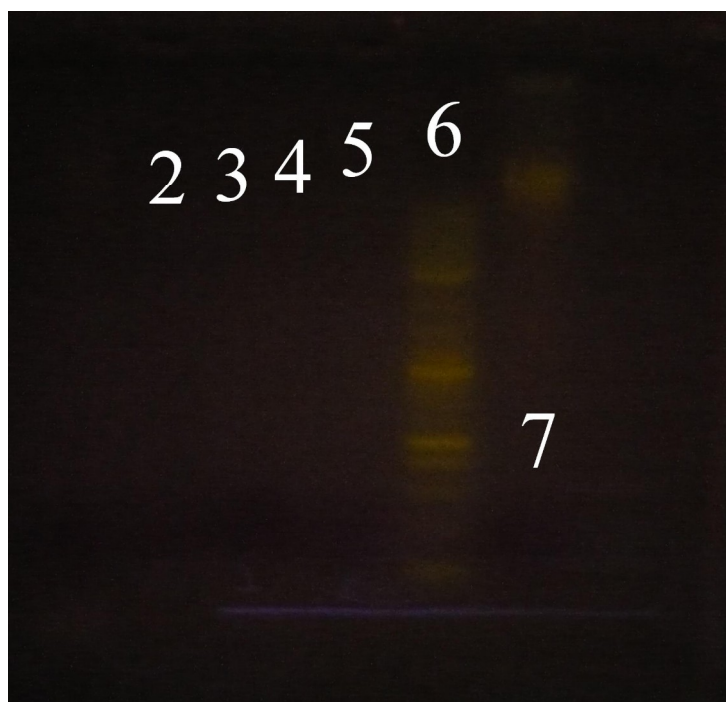
H ~ konstrukt CYP1B1 na bázi pET-22b s histidinovou kotvou

Číslo udává kolonii, ze které byl konstrukt izolován.

Množství a čistota získané DNA byly poměrně nízké. Bylo tedy potřeba ověřit zda nedochází k nežádoucím ztrátám plasmidové DNA během izolace.

4.9.1. Agarosová elektroforesa ověřující ztrátu DNA při izolaci plasmidové DNA z 50 ml LB media

Od této agarosové elektroforesy bylo očekáváno zjištění, v jakém kroku při izolaci plasmidové DNA vznikají ony významné ztráty většinového množství plasmidové DNA. Z posledních čtyř kroků izolace byly odebrány supernatanty, jenž byly jedenkrát naředěny a u kterých byla spolu s H2_#^{*ELFO} provedena elektroforetická analýza (obrázek 20).



Obrázek 20 Agarosová elektroforesa neštěpených konstruktů na bázi plasmidu pET-22b.
 Dráha 2: Vzorek 14 – supernatant: Roztok, který byl odebrán po přečištění vodné frakce z fenol-chloroformové extrakce chloroformem a v němž byla rozpuštěna, nyní již sražená, DNA s ledovým isopropanolem, který s pomocí nízké teploty DNA srazil.
 Dráha 3: Vzorek 15 – etanolový supernatant: Byl získán po promytí pelety a následnou centrifugací.
 Dráha 4: Vzorek 16 – supernatant: PEG s TE pufrům, získán centrifugací po rozpuštění pelety v TE pufru a následném srážení DNA s pomocí nízké teploty roztokem PEG pufru.
 Dráha 5: Vzorek 17 – etanolový supernatant: Byl získán po promytí pelety a následnou centrifugací.
 Dráha 6: DNA marker.
 Dráha 7: Neštěpený konstrukt H2_#^{*ELFO} izolovaný z 50 ml LB.
 K analýze bylo použito 10 μ l vzorku DNA a 24 μ l již naředěných vzorků supernatantů.

V drahách číslo 2; 3; 4; a 5 není viditelná DNA. Zdá se tedy, že během izolace nedochází ke ztrátám DNA. V dráze číslo 7 (finální preparát po izolaci DNA) byla sice DNA zaznamenána, ale její molekulová hmotnost je příliš velká (\gg 10 kbp), což by mohlo naznačovat na kontaminaci genomovou DNA, která nemusí být během izolace odstraněna.

4.9.2. Agarosová elektroforesa štěpených konstruktů z izolace z 50 ml LB media

Pro potvrzení domněnky, že vzorky s nízkou koncentrací DNA získané při izolaci konstruktů nejsou plasmidy, bylo provedeno kontrolní štěpení pomocí endonukleas (NdeI a

HindIII) za použití většího množství materiálu. Postup izolace byl zopakován s 50 ml buněčné kultury, DNA izolována a štěpena. Štěpená směs byla analyzována pomocí agarosové elektroforesy (obrázek 21).



Obrázek 21 Agarosová elektroforesa štěpených konstruktů na bázi plasmidu pET-22b.

Dráha 6: DNA marker.

Dráha 7: Štěpený konstrukt N2#.

Dráha 8: Štěpený konstrukt H2#.

Na obrázku 21 je vidět, že ačkoli byl vzorek konstruktů štěpen pomocí endonukleas, tak na elektroforetickém gelu je umístěn daleko výše než nejvyšší bod markeru, který znázorňuje hranici 10 kbp. Na gelu navíc není patrný žádný fragment s délkou odpovídající požadovanému insertu.

5. Diskuse

Gen pro lidský cytochrom P450 1B1 byl získán z konstruktů založeného na plasmidu pOTB7, který byl objednan z plasmidové banky PlasmidID (Harvard Medical School, Boston, USA). Přestože bakterie v glycerolové kultuře obsahující požadovaný konstrukt byly doručeny klasickou poštou, tedy při normální teplotě, byly vitální a bez problémů se je podařilo namnožit a izolovat z nich plasmidovou DNA. Množství DNA konstruktů založeného na pOTB7 (vysokokopiový klonovací plasmid) získané klasickým postupem bez použití kitu bylo poměrně vysoké, je to však vektor vhodný především pro klonování pomocí Gateway expresního systému firmy Life Technologies, nebylo tedy možné jednoduše přenést gen do vektoru pET22b používaného pro expresi v naší laboratoři. Bylo potřeba sekvenci upravit tak, že před a za gen pro lidský cytochrom P450 1B1 byla pomocí PCR vložena restrikční místa pro endonukleasy dostupné v laboratoři. Současně byl také připravován další konstrukt obsahující před vlastním genem pro CYP1B1 odštěpitelnou histidinovou kotvu, pro snazší izolaci proteinu. PCR byla úspěšná, podařilo se tak připravit požadované DNA s restrikčními místy pro endonukleasy NdeI a HindIII i „His-tag“. Jako problematrická se však ukázala nízká výtěžnost izolace této i plasmidové DNA z gelu po štěpení výše uvedenými endonukleasami. DNA měla buď velmi malou koncentraci, nebo nastala u štěpících endonukleas „star activity“, která veškerou přítomnou DNA rozštěpila. Druhou možností se podařilo dalším experimentem vyloučit. Malé množství takto získané DNA se patrně projevilo v problematrické ligaci, kde bylo získáno jen několik kolonií, u nichž se, bohužel až po sérii dalších experimentů, ukázalo, že neobsahovaly požadované konstrukty (lidské geny pro CYP1B1 a His6-CYP1B1). Bakteriální kmeny izolované po ligaci s největší pravděpodobností neobsahovaly žádný plasmid. Po opakovaných izolacích se podařilo vyloučit, že by tento plasmid byl ztracen při izolaci, bylo prokázáno, že plasmidová DNA nebyla přítomna ani v jednotlivých odpadních roztocích z izolace. V závěru izolace bylo získáno malé množství DNA obsahující však především vysokomolekulární fragmenty podstatně větší než 10 kpb, mohlo by se tedy jednat o genomovou DNA bakterie, která může být při použití alkalické lýze v kombinaci s fenol-chloroformovou metodou izolace také částečně srážena pomocí PEG 6000.

6. Závěr

Z obdržených bakteriálních buněk *E. coli* DH5 α byl izolován plasmid pOTB7 obsahující gen pro lidský cytochrom P450 1B1. Do genu byla vložena štěpící místa pro restriční endonukleasy a v jednom případě také úsek DNA kódující histidinovou kotvu a štěpící místo pro proteasu (Faktor Xa), upravený gen byl následně purifikován.

Bylo ověřeno, že při izolaci plasmidové DNA pomocí klasického postupu (fenol-chloroformové extrakce) tak, jak je prováděna v laboratoři, nedochází ke zdatelným ztrátám DNA. Příprava finálních expresních konstruktů založených na plasmidu pET-22b se však bohužel pravděpodobně v důsledku nízké účinnosti kitu na izolaci DNA z gelu v kombinaci s kontaminací rezistentními kmeny nezdařila. Plánuje se opakování pokusu o ligaci s použitím většího množství PCR produktu, který bude izolován pomocí jiného kitu (QIAEX II Gel Extraction Kit).

7. Seznam použité literatury

1. Dvořák M. (2008) Příprava vektoru pro heterologní expresi mutantního cytochromu P450 1A1 (Diplomová práce, Katedra biochemie, PřF UK, Praha).
2. Protein CYP1B1 URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q16678> [Přístup červenec 25, 2012].
3. Sutter TR, Tang YM, Hayes CL, Wo YY, Jabs EW, Li X, Yin H, Cody CW, Greenlee WF (1994) Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2: *J Biol Chem.* 269 (18), 13092-9.
4. Gen CYP1B1 URL: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=CYP1B1> [Přístup červenec 25, 2012].
5. Tang YM, Wo YY, Stewart J, Hawkins AL, Griffin CA, Sutter TR, Greenlee WF (1996) Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene: *J Biol Chem.* 271 (45), 28324-30.
6. Shimada T, Fujii-Kuriyama Y (2004) Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1: *Cancer Sci.* 95 (1), 1-6.
7. 2. chromozom URL: <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/CYP1B1.jpeg> [Přístup červenec 25, 2012].
8. Bassem A. Bejjani, Richard Alan Lewis, Karim F. Tomey, Kent L. Anderson, David K. Dueker, Monzer Jabak, William F. Astle, Brith Otterud, Mark Leppert, James R. Lupski (1998) Mutations in *CYP1B1*, the Gene for Cytochrome P4501B1, Are the Predominant Cause of Primary Congenital Glaucoma in Saudi Arabia: *Am. J. Hum. Genet.* 62, 325–333.
9. Colomb E, Kaplan J, Garchon HJ (2003) Novel cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) mutations in patients with primary congenital glaucoma in France: *Hum Mutat.* 22 (6), 496.
10. Stoilov IR, Costa VP, Vasconcellos JP, Melo MB, Betinjane AJ, Carani JC, Oltrogge EV, Sarfarazi M. (2002) Molecular genetics of primary congenital glaucoma in Brazil: *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43 (6), 1820-7.

11. Plásilová M, Stoilov I, Sarfarazi M, Kádasi L, Feráková E, Ferák V. (1999) Identification of a single ancestral CYP1B1 mutation in Slovak Gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma: *J Med Genet.* 36(4), 290-4.
12. Meunier, B., de Visser, S.P., Shaik, S. (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* 104(9), 3947 – 3980.
13. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* 93, 229-237.
14. Petr Galuszka prezentace Expresní systémy
URL:<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/cgi/8.pdf> [Přístup srpen 10, 2012]
15. Agarosový gel a DNA marker URL:
<http://www.neb.com/nebecomm/products/productN3200.asp> [Přístup červenec 19, 2012]
16. Plasmid pET-22b(+) URL: <http://wolfson.huji.ac.il/expression/commercial-vectors/pet-22b-map.pdf> [Přístup červenec 28, 2012]
17. Plasmid pOTB7 URL:
<http://bric.postech.ac.kr/myboard/print.php?id=1636&Board=protocol> [Přístup červenec 28, 2012]
18. Insert vložený do plasmidu pOT2A, ze kterého vzniknul plasmid pOTB7
<http://www.fruitfly.org/about/methods/pOTB7vector.html> [Přístup červenec 28, 2012]
19. Tsutomu Shimada, Carrie L. Hayes, Hiroshi Yamazaki, et al. (1996) Activation of Chemically Diverse Procarcinogens by Human Cytochrome P-450 1B1: *Cancer Res* 56, 2979-2984.
20. Novagen (1999) pET System Manual URL:
http://labs.fhcrc.org/hahn/Methods/biochem_meth/pet.pdf [Přístup červenec 28, 2012]
21. Wang A, Savas U, Stout CD, Johnson EF (2011) Structural characterization of the complex between alpha-naphthoflavone and human cytochrome P450 1B1: *J Biol Chem.* 286(7), 5736-43.
22. Xie Y, Liu GQ, Miao XY, Liu Y, Zhou W, Zhong DW (2012) CYP1B1 Leu432Val polymorphism and colorectal cancer risk among Caucasians: a meta-analysis: *Tumour Biol.* 33(3), 809-16.

23. Hui Duan, Mary A. Schuler (2006) Heterologous expression and strategies for encapsulation of membrane-localized plant P450s: *Phytochem Rev* 5, 507–523.
24. Bernaudat F, Frelet-Barrand A, Pochon N, Dementin S, Hivin P, et al. (2011) Heterologous Expression of Membrane Proteins: Choosing the Appropriate Host: *PLoS ONE* 6(12), e29191. doi:10.1371/journal.pone.0029191
25. Guengerich, F.P. (2008) Cytochrome p450 and chemical toxicology: *Chem. Res. Toxicol.* 21, 70-83.
26. Agarosa URL: <http://www.wikiskripta.eu/images/b/b4/Agarosa.jpg> [Přístup srpen 5, 2012]
27. Agar URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Agar> [Přístup srpen 5, 2012]
28. Mapa plasmidu pOTB7 URL: <http://kugi.kribb.re.kr/KUGI/doc/pOTB7/> [Přístup srpen 2, 2012]
29. Itoh T, Takemura H, Shimoi K, Yamamoto K (2010) A 3D model of CYP1B1 explains the dominant 4-hydroxylation of estradiol: *J Chem Inf Model.* 50(6), 1173-8.
30. Chang TK, Waxman DJ (2006) Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as substrate: *Methods Mol Biol.* 320, 85-90
31. Ueng YF, Don MJ, Jan WC, Wang SY, Ho LK, Chen CF (2006) Oxidative metabolism of the alkaloid rutaecarpine by human cytochrome P450: *Drug Metab Dispos.* 34(5), 821-7.
32. Ludmila Chromá, Martina Macková, Tomáš Macek, Václav Martínek, Marie Stiborová (2001) Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí: *Chem. listy* 95, 212 – 222.
33. Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc. Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace URL:
<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>
[Přístup srpen 5, 2012]

