

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biochemie

Praha 2011



Bakalářská práce

**Příprava expresního systému γ -laktamasy a otestování
exprese v E.coli**

**Preparation of expression system of γ -lactamase and
expression testing**

Monika Magyerková

Školitel: RNDr. Marek Ingr, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2.6.2011

.....

Monika Magyerková

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Marku Ingrovi, Ph.D. za odborné a pedagogické vedení, za zadání zajímavého tématu a všestrannou pomoc při vypracování bakalářské práce. Dále děkuji doc.Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. z ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně za cenné konzultace týkající se teoretické přípravy projektu.

Obsah

1. Úvod	9
1.1 γ -laktamasa.....	9
1.1.1 Stereospecifita γ -laktamasy	9
1.1.2 Izolované formy (+) γ -laktamasy.....	11
1.1.3 Termostabilní γ -laktamasa	12
1.1.4 Rekombinantně připravené γ -laktamasy.....	12
1.1.5 Stanovení aktivity γ -laktamasy	13
1.2 Polyvinylpyrrolidon	13
1.3 Syntéza genů	14
1.3.1 Historie syntézy genů.....	14
1.3.2 LCR.....	15
1.3.3 PCA.....	16
1.3.4 Syntéza genů ve dvou krocích metodou PCA	17
2. Cíl bakalářské práce	21
3. Materiál a metody.....	22
3.1 Materiál	22
3.2 Přístroje	24
3.3 Metody	24
3.3.1 Syntéza genu s využitím polymerázové řetězové reakce (PCR)	24
3.3.2 Dělení DNA pomocí elektroforesy v agarosovém gelu	28
3.3.3 Izolace DNA	28
3.3.4 Štěpení DNA.....	29
3.3.5 Ligace genu a jeho částí do vektorů.....	30
3.3.6 Transformace kompetentních buněk.....	30
3.3.7 Mini preparace	31

3.3.8	Sekvenace plazmidů	32
3.3.9	Testování exprese γ -laktamasy	32
3.3.10	Vyhodnocení exprese γ -laktamasy pomocí SDS PAGE elektroforézy	33
3.3.11	Oprava mutací.....	34
4.	Výsledky.....	37
4.1	Příprava syntonů pomocí PCR.....	37
4.2	Klonování syntonů do plazmidu pUC19.....	39
4.3	Oprava mutací	40
4.4	Spojení syntonů.....	43
4.5	Expresce rekombinantní γ -laktamasy v E. coli	43
4.6	Sekvenční analýza expresního plazmidu	47
5.	Diskuse	48
6.	Závěr.....	52
7.	Seznam použité literatury	53

Seznam použitých zkratek a symbolů

BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
bp	pár bazí
BSA	hovězí sérový albumin
cDNA	cyklická deoxyribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	Deoxynukleotidtrifosfáty
E. coli	Escherischia coli
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EtBr	ethidium bromid
EtOH	ethanol
H ₂ O	voda
HIV	human imunodeficient virus
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
IPTG	izopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
LCR	ligasová řetězová reakce (ligase chain reaction)
NEB pufr	Standardní reakční pufr dodávaný firmou New England BioLabs
OD ₆₀₀	optická hustota při vlnové délce 600 nm
PCA	polymerasové řetězové sestavování
PCR	polymerasová řetězová reakce
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Rev	gen viru HIV
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS PAGE	elektroforesa v prostředí dodecylsulfátu sodného na polyakrylamidovém gelu (sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis)
SYBR safe DNA Gel	Fluorescenční indikátor dvouvláknové DNA
Stain	
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin
Tris	tris(hydroxymethyl)-aminomethan

t-RNA

transferová ribonukleotidová kyselina

UV

ultrafialové žření

Abstract

γ -lactamase is an enzyme clearing five-membered lactam cycles. Polyvinylpyrrolidone (PVP) is one of its potential substrates. Degradation of PVP by γ -lactamase is being studied due to its eventual use in waste-water purifying plants. The aim of the work was to prepare a synthetic gene from the bacterium *Comamonas acidovorans* and to clone it into the expression vector pET22b. PCA method was used for the synthesis of the γ -lactamase gene. 1725 bp long sequence of the γ -lactamase gene was split into two parts (synthons) which were synthesized individually. After the synthesis restriction cleavage and ligation to the vector pUC19 were performed. Competent cells *E. coli*, strain DH5 α , were transformed by the obtained construct. After the sequence confirmation both synthons were cleaved by restriction endonucleases and connected by single-step ligation to the plasmid pET22b. Expression bacterial cells *E. coli*, strain BL21(DE3)RIL, were transformed by the recombinant plasmid containing the connected synthons and expression of the recombinant γ -lactamase was tested. Sequence of the clone producing a protein of the expected length was confirmed by sequencing analysis. The prepared plasmid will be used for the expression of recombinant γ -lactamase. (In English)

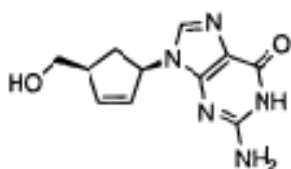
Abstrakt

γ -laktamasa je enzym štěpící pětičlenné laktamové cykly. Jedním z jejích potenciálních substrátů je polyvinylpyrrolidon (PVP). Degradace PVP γ -laktamasou je zkoumána s ohledem na využití v čistírnách odpadních vod. Cílem této práce proto bylo připravit synteticky gen γ -laktamasy z bakterie *Comamonas acidovorans* a provést jeho klonování do expresního vektoru pET22b. Pro syntézu genu γ -laktamasy byla použita metoda PCA. Sekvence genu γ -laktamasy o délce 1725 bp byla rozdělena do dvou částí (syntonů), které byly syntetizovány samostatně. Po syntéze bylo provedeno restriční štěpení a ligace do vektoru pUC19. Takto připravenými konstrukty byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5 α . Po ověření správnosti sekvencí byly oba syntony vyštěpeny restričními endonukleasami a spojeny jednokrokovou ligací do plazmidu pET22b. Rekombinantním plazmidem obsahujícím spojené syntony byly transformovány expresní buňky *E. coli* kmene BL21(DE3)RIL a byla testována exprese rekombinantní γ -laktamasy. Sekvence klonu produkujícího protein odpovídající délky byla potvrzena sekvenční analýzou. Připravený expresní plazmid bude použit pro produkci rekombinantní γ -laktamasy. (In Czech)

1. Úvod

1.1 γ -laktamasa

γ -laktamasa je enzym, který je schopen štěpit pětičlenné laktamové cykly. (γ -laktamem označujeme pětičetný cyklický amid. Obecně α , β , γ -laktamy označujeme cyklické amidy tříčetné, čtyřčetné a pětičetné.) Tento enzym je dlouhodobě předmětem výzkumu zejména s ohledem na jeho stereospecifické štěpení 2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu, což je bicyklická laktamová sloučenina, která se využívá pro syntézu karbocyklických nukleosidů [2]. Karbocyklické nukleosidy jsou analogy nukleosidů přírodních, které mají ribosový zbytek nahrazen cyklickou strukturou obsahující pouze uhlíkové atomy [6].



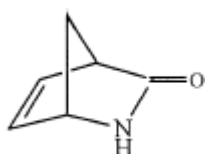
Obr. 1 Karbocyklický nukleosid Carbovir, obsahující cyklický zbytek pouze uhlíkovými atomy [5]

Tyto se často používají jako prekurzory léčiv, zejména antivirotik.

1.1.1 Stereospecifita γ -laktamasy

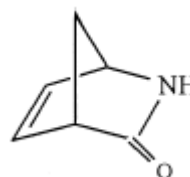
Využití γ -laktamasy spočívá ve stereospecifickém štěpení 2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu. Protože získávání izolovaných enantiomerů organickou syntézou není ekonomicky výhodné, je vhodnou metodou dělení racemátu stereospecifické enzymatické štěpení nežádoucího enantiomeru, přičemž druhý, žádoucí, zůstane nedotčen.

a)



(+)- γ -Lactam

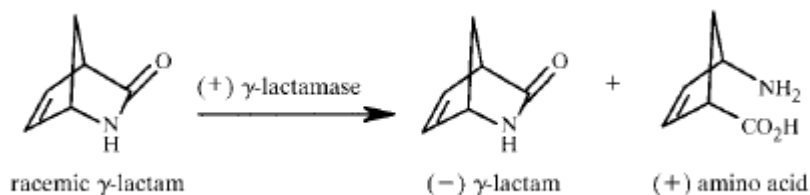
b)



(-)- γ -Lactam

Obr. 2 Enantiomerní formy γ -laktamu 2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu. a) (+)- γ -laktam; b) (-)- γ -laktam

Tato reakce je důležitá pro průmyslové využití, protože opticky čistý enantiomer [1(R),4(S)], označovaný též (-), může být použit jako stavební blok pro syntézu některých léčiv, např. přípravek proti HIV Carbovir nebo přípravek proti herpesvirům. Proto je průmyslově využívána taková forma γ -laktamasy, která štěpí enantiomer [1(S),4(R)], označovaný jako (+) ((+) γ -laktamasa). Funkce (+) γ -laktamasy je znázorněna na obr. 3.



Obr. 3 Stereospecifická katalytická reakce (+) γ -laktamasy. Vzniká žádoucí produkt (-) γ -laktam, přičemž enantiomer (+) γ -laktam je (+) γ -laktamasou rozštěpen [1].

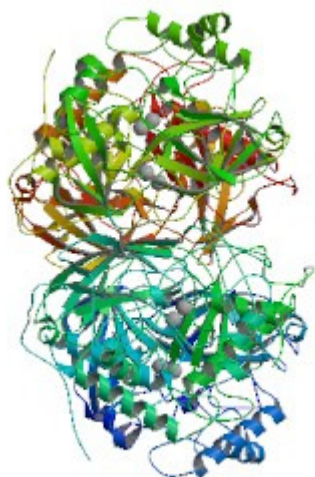
Gama laktamasa byla nalezena pomocí screeningu bakteriálních kmenů za použití N-acetyl-L-fenylalaninu jako jediného zdroje uhlíku. Tímto způsobem byly identifikovány kmeny produkující enzymy s amidasovou aktivitou. Tyto kmeny byly následně testovány na přítomnost gama laktamasové aktivity [2].

γ -laktamasa byla izolována v různých formách podle své stereospecifity. Z bakterie rodu *Rhodococcus* a byla izolována forma označovaná jako ENZA1 štěpící stereospecificky (–)-enantiomer a z bakterie *Pseudomonas solanacearum* forma ENZA20 štěpící (+)-enantiomer 2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu [3]. Dále byly izolovány varianty ENZA22 z *Pseudomonas fluorescens* (+) a ENZA 25 z bakterie rodu *Aureobacterium*.

1.1.2 Izolované formy (+) γ -laktamasy

Průmyslového využití dosáhla (+) γ -laktamasa z *Pseudomonas cepacia*. Tento enzym se však ukázal být v izolované formě velmi nestabilní a pro účely katalýzy v průmyslovém měřítku prakticky nepoužitelný. Proto byl pro přípravu čistého (–) γ -laktamu vyvinut katalyzátor na bázi celých bakteriálních buněk. Jelikož však měl řadu nedostatků plynoucích zejména z postupné lýze buněk, bylo stále žádoucí hledat stabilnější enzym, který by byl použitelný v katalytickém procesu v čisté formě. Nakonec byla objevena stejnými metodami screeningu, které byly použity při identifikaci enzymu původního, (+) γ -laktamasa z bakterie *Comamonas acidovorans*. U této γ -laktamasy byla prokázána termostabilita zachovávající poloviční aktivitu po 4-hodinové inkubaci v 60 °C.

Tato stabilnější forma (+) γ -laktamasy se sekvenčně částečně shoduje s některými hydrolytickými enzymy, např. ze 63% se shodovala s formamidásou z *Methylophilus methylotropus* a z 56% s acetamidázou z *Mycobacterium smegmatis*. Naopak nemá téměř žádnou sekvenční homologii s β -laktamasou. (+) γ -laktamasa z *Comamonas acidovorans* však narozdíl od uvedených enzymů neobsahuje sekvenci tzv. 'amidasového podpisu' GGSS(S/G)GS, což je konzervativní konsensus sekvence vlastní ostatním amidasám. (+) γ -laktamasa proto patří do odlišné skupiny hydrolytických enzymů. Pro tuto skupinu enzymů dosud neexistovala tří-dimenzionální struktura. S využitím rentgenové difrakce se predbežně zjistilo, že nativní struktura (+) γ -laktamasy je tetramer. Poznání této struktury bylo přínosné pro získání informací o její příbuznosti s ostatními amidasovými enzymy [1,2,3].



Obr. 4 Struktura γ -laktamasy získána z *Delftia acidovorans* [30]

1.1.3 Termostabilní γ -laktamasa

Termostabilní γ -laktamasa byla izolována z archebakterie *Sulfolobus solfataricus* MT4. Její poločas života je při 80°C 25 hodin. Při porovnání s amidasami z jiných bakterií měla 41-44% sekvenční identitu. Jedná se o amidasu obsahující konsensus sekvenci amidasového podpisu GGSS(S/G)GS, a to v místě 173-179, patří tedy do jiné rodiny enzymů než γ -laktamasa z *Comamonas acidovorans*. Nejvyšší aktivitu má k substrátu (+) 2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu, zatímco (–) enantiomer neštěpí. Je aktivní i vůči dalším amidovým substrátům, ale aktivita klesá s obsahem alkylových skupin. Jedná se tedy rovněž o (+) γ -laktamasu, která je pro svou termostabilitu dobře komerčně využitelná.

1.1.4 Rekombinantně připravené γ -laktamasy

γ -laktamasy z *Comamonas acidovorans* i *Sulfolobus solfataricus* byly připraveny rekombinantně v *E. coli*. V obou případech byla γ -laktamasa izolována jako rozpustný protein z buněčného supernatantu po rozrušení buněk a odstředění. Prvním krokem izolace bylo vysolování pomocí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dále hydrofobní chromatografie a gelová chromatografie. V případě γ -laktamasy z *Comamonas acidovorans* byla mezi oba chromatografické kroky zařazena ještě chromatografie na měničích aniontů [2,3]. .

1.1.5 Stanovení aktivity γ -laktamasy

Aktivitu γ -laktamasy lze stanovit více způsoby. Buď může být použito specifického stanovení štěpení (+) 2-azabicyklo[2.2.1]hept-5-en-3-onu, nebo lze stanovovat obecnou amidasovou aktivitu enzymu [2,3]. V prvním případě je vznikající reakční produkt stanovován pomocí HPLC, v druhém je detekován vznikající amoniak fenol-hypochloritovou metodou [33]. Popsána byla také stanovení dalších aktivit, které γ -laktamasy mohou mít, např. aktivita benzamidasová, nitrilasová a nitrilhydratasová, a také synthasová aktivita syntézy hydrazidu kyseliny benzoové z benzamidu a hydrazinu [4].

1.2 Polyvinylpyrrolidon

Polyvinylpyrrolidon (PVP) je homopolymer N-vinyl-2-pyrrolidonu, který se připravuje radikálovou polymerací monomeru.



Obr. 5 Struktura monomeru N-vinyl-2-pyrrolidonu a homopolymeru N-vinyl-2-pyrrolidonu [31]. a) monomer, b) homopolymer

Poprvé byl syntetizován Walterem Reppem v Německu v roce 1930 [7,8,9]. Bývá označován i řadou dalších názvů, např. povidon, polyvidon nebo krosvidon, komerčně se prodává pod názvy Luvitec, Kollidon, Plasdone a dalšími. PVP obsahuje γ -laktamový kruh, proto je možným substrátem γ -laktamasy.

PVP je rozpustný ve vodě a polárních rozpouštědlech. Je biologicky inertní, netoxický a stabilní v širokém rozsahu teplot a pH. V pevném skupenství ve formě prášku je silně hygroskopický, absorbuje vodu až do 40% své hmotnosti. Pro tyto své vlastnosti má široké použití ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu. Z mnoha

aplikací je možno uvést jeho použití jako pojiva při výrobě tablet, jako zahušťovacího činidla v kosmetických prostředcích, např. šamponech, a využívá se také při výrobě piva, neboť prostřednictvím vodíkových můstků váže v něm obsažené fenolické látky.

Jelikož je PVP biologicky inertní, nepodléhá samovolnému biologickému rozkladu. To způsobuje určité problémy v čističkách odpadních vod, kde je potřeba tento polymer nejdříve upravit tak, aby došlo k otevření γ -laktamového kruhu. To se obvykle provádí chemickou oxidací ozonem, peroxidem vodíku, Fe^{3+} nebo směsnými činidly obsahujícími uvedené látky. Možná je také fotodegradace UV zářením po adsorpci na povrchu TiO_2 . Další možnou cestou odstranění PVP z odpadních vod je jeho sorpce na povrchu pevných látek jako aktivní uhlí, jílu [10] nebo aktivovaný kal [11] z čistíren odpadních vod. Tyto metody jsou zatím předmětem výzkumu.

Protože PVP obsahuje γ -laktamový kruh, lze předpokládat, že jeho otevření je možné provést enzymaticky, tedy katalýzou γ -laktamasou. Je tedy na místě zkoumat, jestli bakterie, které gen pro tento enzym obsahují, jsou schopny štěpit γ -laktamový kruh a mohly by tedy být využity v čistírnách odpadních vod. V první fázi tohoto výzkumu je však třeba prozkoumat vlastnosti samotné γ -laktamasy vzhledem k polyvinylpyrrolidonu jako substrátu. Proto je cílem této práce vytvořit expresní systém pro produkci tohoto enzymu, který bude sloužit jako standardní materiál pro další práci.

1.3 Syntéza genů

Metoda automatizované chemické syntézy genů a jejich sestavování do dlouhých DNA sekvencí pomocí PCR a LCR umožnila syntézu nových genů a dokonce i syntézu celých genomů. Nasyntetizované geny jsou velmi užitečné, pokud je nedostupný primární genetický materiál nebo když je gen exprimován heterologním hostitelem a potřebuje optimalizaci kodonů. Syntéza genů umožňuje zavést do genu restriční místa, provádět cílenou metagenezi nebo tvořit geny pro chimérické proteiny. Využívá se pro návrhy DNA vakcín či syntézu nových biopolymerů a i [12,13].

1.3.1 Historie syntézy genů

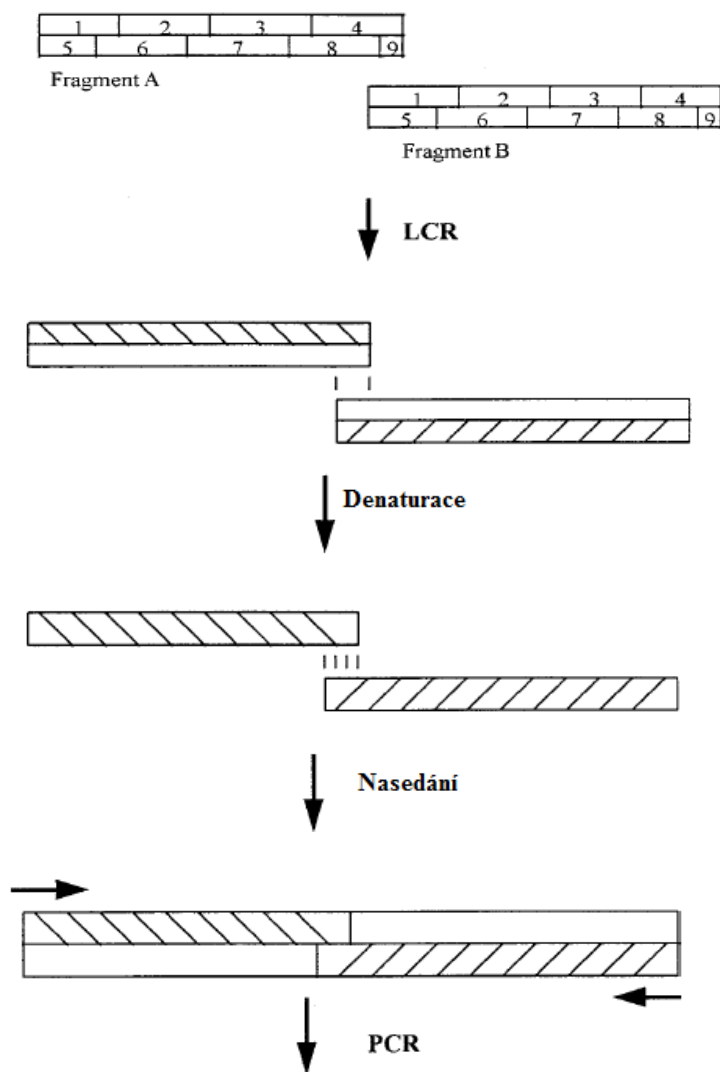
Chemická syntéza genů a genomů již v minulosti zaznamenala značné úspěchy, např. Khorana syntetizoval úplnou sekvenci strukturních genů pro t-RNA [17], Itakura a spol. syntetizovali a expimovali gen somatostatinu [18]. Tyto metody byly založeny na ligančním spojení vzájemně se překrývajících oligonukleotidů. Z historického hlediska je

zajímavou také metoda založená na použití restriční endonukleasy Fok I [15]. V roce 1990 Mandecki a spol. [16] provedli touto metodou syntézu plazmidu o velikosti 2,1 kb pomocí ligace 30 fragmentů. Metoda je nicméně poměrně složitá a relativně nespolehlivá, proto byla nahrazena jinými metodami.

Po prvních úspěšných pokusech se syntéza genů a genomů začala rychle rozvíjet. Mezi nejrozšířenější techniky patřily LCR (ligase chain reaction) [13] a PCA (polymerase cycling assembly) [19].

1.3.2 LCR

Prvním krokem přípravy úplné sekvence genů pomocí LCR je chemická syntéza oligodeoxyribonukleotidů (dále oligonukleotidů). Celá sekvence genu se v prvním kroku rozdělí do několika oligonukleotidů, které se vzájemně překrývají 15-25 bp komplementárními úseky. Tyto oligonukleotidy pokrývají celou sekvenci obou vláken DNA. S výjimkou oligonukleotidů na 5'-koncích řetězců musí být každý na svém 5'-konci fosforylován, aby mohlo dojít k ligační reakci. Spojování oligonukleotidů probíhá v teplotních cyklech skládajících se z fáze denaturační (nad 90 °C), hybridizační, tedy fáze vzájemného nasedání komplementárních sekvencí (50-60 °C), a ligační, kdy dochází ke spojení oligonukleotidů do řetězců DNA za katalýzy termostabilní DNA ligasou (cca 70 °C). Pokud je sekvence delší, je možné ji rozdělit do dvou či více vzájemně se překrývajících úseků, které jsou syntetizovány samostatně a až následně jsou smíchány a spojeny polymerací termostabilní DNA polymerasou (obr. 6, str. 17). Pro zvýšení výtěžku je pak možno ještě celou sekvenci amplifikovat pomocí PCR s využitím koncových oligonukleotidů. Touto metodou byl syntetizován např. gen pro leptin-L54 [13].



Kompletní sekvence

Obr. 6 Schéma genový syntézy LCR s následným spojením částí sekvence PCR [13] . 1. krok: ligace oligonukleotidů, které pokrývají kompletní sekvenci genu, 2. krok: denaturace, 3. krok: nasedání komplementárních sekvencí, 4. krok: PCR

1.3.3 PCA

Metoda PCA je v současnosti nejvyžívanější technikou syntézy genů, protože je snadno proveditelná a ekonomicky výhodná [14,20,21]. V literatuře ji můžeme najít i v mírně odlišných variantách pod jinými názvy, jako např. „overlap extension PCR“ (OE-PCR) nebo „dual asymmetrical PCR“ (DA-PCR) [14]. Je založena na skládání sekvence DNA z oligonukleotidů, které se vzájemně překrývají, ale na rozdíl od metody LCR

nepokrývají celou délku obou vláken, nýbrž jsou dosyntetizovávány pomocí DNA polymerasy metodou PCR. Pomocí PCR jsou tyto sekvence následně zesíleny pro dosažení dostatečného výtěžku produktu. Metodou PCA byl už v roce 1990 syntetizován 303 bp dlouhý gen pro protein Rev z viru HIV-2 [19]. Následně v roce 1995 Stemmer a spol. [20] syntetizovali 2,7 kb plazmid pomocí jednokrokové PCA.

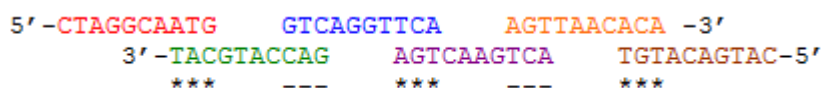
Smith a spol. [22] sestavili genom bakteriofága ϕ 174 o délce 5386 bp s využitím kombinace ligace chemicky syntetizovaných oligonukleotidů a PCA metody. V roce 2002 Cello a spol. [23] popsali postupnou syntézu 7,558 bp dlouhé cDNA pro Poliovirus pomocí kombinace ligace a PCA.

Kodumal a spol. [21] vyvinuli syntézu 5 kbp segmentů, která probíhala ve dvou krocích. Ze syntetických oligonukleotidů sestavili sekvence o délce 500-800 bp, které nazvali syntonny. Spojením těchto syntonů získali multisyntonové sekvence o délce kolem 5 kbp. Použitím konvenčních metod klonování spojili tyto multisyntonny genového klastru polyketidsyntasy 6-deoxyerythronolidu B do sekvence dlouhé 37,7 kbp. Ke spojování takto velkého množství syntonů byla použita speciální technika založená na plazmidech rezistentních vůči více antibiotikům.

V naší laboratoři byly v minulosti metodou PCA syntetizovány geny pro serinovou racemasu a cytochrom b5 [29, 24].

1.3.4 Syntéza genů ve dvou krocích metodou PCA

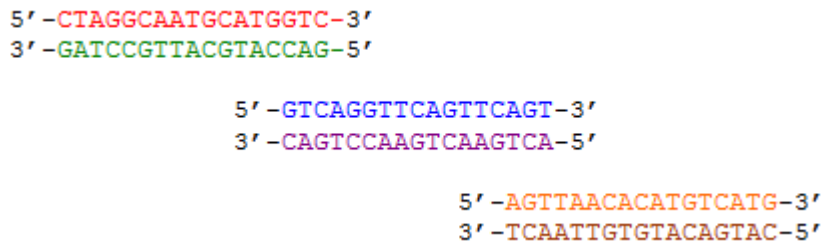
Princip metody spočívá v sestavení syntetizovaného úseku DNA ze vzájemně se překrývajících oligonukleotidů, které mohou nebo nemusí pokrývat celou délku obou jeho řetězců. Pro tento účel jsou používány oligonukleotidy o obvyklé délce 40-80 bází, které se vzájemně překrývají délkou 10-20 bází. Vzájemná orientace oligonukleotidů je znázorněna na obr. 7.



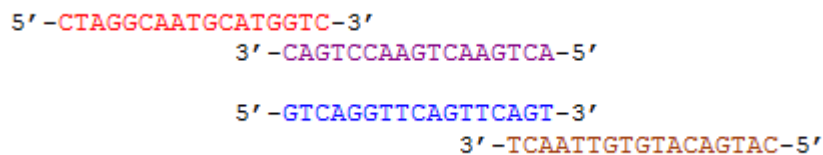
Obr. 7 Vzájemná orientace oligonukleotidů při sestavování syntetizovaného úseku DNA. Hvězdičky označují produktivní překryv 3'- konců, pomlčky neproduktivní překryv 5'- konců.

Oligonukleotidy dělíme na vnější (koncové) a vnitřní. Vnitřní oligonukleotidy jsou použity v první PCR, kde slouží zároveň jako primer i templát. Jejím výsledkem je sestavení vnitřní části syntetizované sekvence. Schéma tohoto procesu je znázorněno na obr. 8.

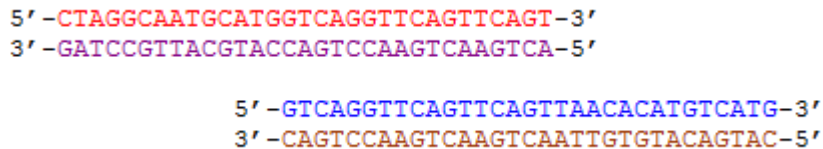
1. krok PCA.



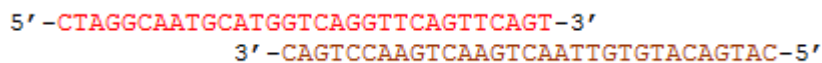
2. krok PCA.



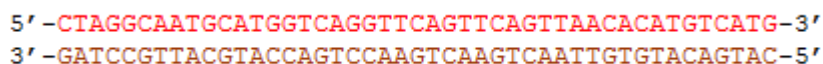
3. krok PCA.



4. krok PCA.



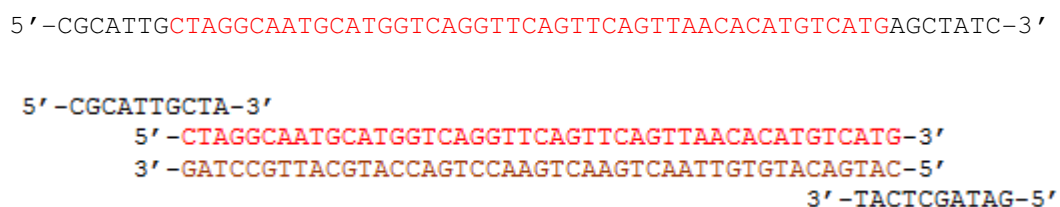
5. krok PCA.



Obr. 8 1. PCR reakce. Výsledkem této reakce je spojení vnitřní části genu.

Nejprve dojde ke spojení těch dvojic oligonukleotidů, které jsou orientovány 3'-konci proti sobě, a umožňují tedy polymeraci DNA. V dalších cyklech PCR jsou postupně spojovány tyto úseky do delších sekvencí, až než dojde k nasyntetizování celé vnitřní části.

Spojení genu s využitím vnějších primerů pomocí PCR.



Spojená kompletní sekvence genu.



Obr. 9 2. PCR reakce. Výsledkem této reakce je prodloužení sekvence genu pomocí vnějších oligonukleotidů a získání celé sekvence genu.

Protože výsledná reakční směs z první PCR obsahuje velký nadbytek nedosyntetizovaných molekul DNA, zatímco molekul správné délky je jen malá část, provádí se druhá PCR, jejímž cílem je amplifikovat právě jen kompletní DNA sekvence. V této PCR se použijí vnější oligonukleotidy jako primery a produkt první PCR jako templát. Protože vnější primery jsou komplementární k prvnímu a poslednímu vnitřnímu primeru, dojde k amplifikaci těch molekul, u nichž první PCR proběhla kompletně, zatímco nekompletní nebo špatně spojené molekuly amplifikovány nebudou. Výsledkem druhé PCR je tedy již kompletní syntetická molekula DNA (obr. 9).

Pokud je syntetizovanou sekvencí DNA gen, který má být použit k expresi rekombinantního proteinu, je žádoucí provést optimalizace použitých kodonů pro produkční organismus. To znamená, že u aminokyselin, které mají kodonů více, volíme jejich distribuci v souladu s distribucí ve vlastních genech daného organismu. To nám zaručí optimální využití t-RNA syntetizovaných buňkami tohoto organismu. Při expresi genů s neoptimalizovanými kodony totiž může dojít k vyčerpání t-RNA pro vzácné kodony (kodony, jejichž četnost výskytu v genech daného organismu je velmi nízká), což zpomaluje proces proteosyntézy rekombinantního proteinu. Tabulky distribucí kodonů pro jednotlivé organismy lze nalézt na stránkách Kazusa DNA Research Institute [25].

Nevýhodou syntézy DNA jsou mutace, které jsou způsobeny delecemi nebo záměnami v syntetizovaných oligonukleotidech. Pravděpodobnost výskytu chyby v sekvenci syntetizovaného úseku DNA roste s jeho délkou. Proto je vhodné provádět syntézu delších úseků DNA po kratších částech (syntonech), jejichž sekvenci ověříme sekvenační analýzou. Tyto syntony následně spojíme použitím restričního štěpení a ligace. V případě syntézy velmi dlouhých sekvencí délky několika tisíc bp můžeme využít speciální klonovací techniky založené na použití plazmidů s rezistencemi na různá antibiotika [21].

Faktorem, který může ovlivnit dobrý výsledek syntézy, jsou teploty tání překryvů jednotlivých oligonukleotidů. Při jejich návrhu je tedy třeba dbát na to, aby se tyto teploty vzájemně příliš nelišily. K teoretickému výpočtu teplot tání můžeme použít různých vzorců, které zohledňují vliv sekvence oligonukleotidů i prostředí, v němž se DNA vyskytuje [26]. Tyto vzorce jsou zakomponovány i v různých webových aplikacích [27] nebo automatizovaných programech určených pro kompletní návrh syntézy genů [28].

2. Cíl bakalářské práce

Cílem bakalářské práce byla:

1. Syntéza expresního systému γ -laktamasy pomocí PCR ve dvou krocích.
2. Otestování exprese γ -laktamasy v expresních buňkách E. coli.

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

Agarosa - Serva

Ampicilin - Léčiva

BSA - BioLabs

Bromfenolová modř - Sigma

Kyselina octová - Lachema

DNA marker 155-970 bp - Top Bio

DNA marker 200-1500 bp - Top Bio

DNA marker 2000-10000 bp - Ascoprot Biotech

dNTPs (10 mM) - Top Bio

EDTA - Sigma

Extrakční kit - NucleoSpin@Extract II - MACHEREY-NAGEL GmbH and Co. KG

Ethanol - Lach-ner

Glycerol - Lachema

LB agar - Sigma

LB bouillon - Sigma

Pfu polymerasa - Promega

Pfu pufr (10x) - Promega

Phusion polymerasa - Finnzymes

Phusion pufr (5x) - Finnzymes

Restrikční endonukleasy EcoRI, HindIII, BamHI, NdeI - New England BioLabs

Restrikční pufry NEB - New England BioLabs

SDS - Fluka

Tris-HCl - Fluka

T4 DNA ligasa - Takara

T4 DNA ligasový pufr - Takara

Izopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) - Biosynth AG

N, N, N, N-tetramethylethyldiamin (TEMED) - Fluka

Tris(hydroxymethyl)aminomethan - Fluka

Acrylamid - Fluka

N,N-methylen-bis-akrylamid - Fluka

Glycin - Fluka

Sacharosa – Sigma

Fenol - Fluka

Chloroform – Fluka

SYBR® Safe DNA - Invitrogen

Ethidium bromid – Sigma

Hydroxid sodný – Lach-Ner

Oligonukleotidy A1-A13; B1-B16 – East Port Praha s. r. o.

HPLC voda – ÚOCHB

3.2 Přístroje

Centrifugy - Heraeus Instruments, Biofuge Pico; Beckman Coulter™, Allegra™X-22R

Agarosová elektroforesa - Shelton Scientific, JSB - 30

SDS PAGE elektroforesa - Sigma

Inkubátor – Flow Laboratories

PCR - TECHNE, PROGEN

pH metr – JENWAY

Laboratorní předvážky - AND

Transiluminátor - Safe Imager™ blue light transilluminator, INVITROGEN

UV transluminator - ULTRAVIOLET TRANSLUMINATOR

Vodná lázeň - TECHNE TE-10D TEMPUNIT

Vortex - IKA® VORTEX GENIUS 3, IKA® Werkw GmbH & Co. KG

Orbitální inkubátor – Scholler Instruments, Gallenkamp

Autokláv – Thermo scientifics

3.3 Metody

3.3.1 Syntéza genu s využitím polymerázové řetězové reakce (PCR)

Na syntézu genu γ -laktamasy bylo navrženo 29 oligonukleotidů. Gen byl rozdělen kvůli velké délce na synton A a B. Synton A obsahoval 13 oligonukleotidů a synton B 16 oligonukleotidů. Syntézu jsme rozdělili do dvou PCR reakcí. V 1. PCR reakci byly spojeny vnitřní oligonukleotidy syntonu A i B. V 2. PCR reakci jsme použili koncové oligonukleotidy jako primery a produkt z první PCR reakce jako templát.

Roztok pro 1. PCR reakci syntonu A obsahoval 5 μ l 10x pufru pro Pfu polymerasu, 0,5 μ l Pfu polymerasy, 1 μ l 10 mM dNTP, 1 μ l každého 20 μ M oligonukleotidu (A2-A12),

31,5 μ l H₂O. Analogicky byla provedena 1. PCR reakce i pro synton B, rozdíl byl jenom v použitých oligonukleotidech (B2-B15).

Reakční podmínky pro: 1. PCR syntonu A a syntonu B

- | | |
|-----------------------|---|
| 1. program (1 cyklus) | 1. 90 °C 10 min – počáteční denaturace |
| 2. program (30 cyklů) | 1. 94 °C 30 s - denaturace
2. 50 °C 30 s – nasedání primerů
3. 73 °C 180 s – prodlužování |
| 3. program (1 cyklus) | 1. 73 °C 8 min – dokončení prodlužování |
| 4. program (1 cyklus) | 1. 4 °C - chlazení |

V 2. PCR reakci se jako templát použil produkt z první PCR reakce a jako primery byly použity první a poslední oligonukleotidy každého syntonu. Roztok pro 2. PCR reakci syntonu A obsahoval 5 μ l 10x pufru pro Pfu polymerasu, 0,5 μ l Pfu polymerasy, 1 μ l 10 mM dNTP, 1 μ l přímého primeru (první oligonukleotid), 1 μ l zpětného primeru (poslední oligonukleotid), 1 μ l templátu (produkt z první PCR reakce), 40,5 μ l H₂O. 2. PCR syntonu B byla provedena analogicky, přičemž jako templát byl vzat produkt 1. PCR syntonu B a jako primery oligonukleotidy 1 a 16 navržené pro tento synton.

Reakční podmínky pro: 2. PCR syntonu A a syntonu B

- | | |
|-----------------------|---|
| 1. program (1 cyklus) | 1. 90 °C 10 min – počáteční denaturace |
| 2. program (30 cyklů) | 1. 94 °C 30 s - denaturace
2. 49 °C 30 s – nasedání primerů
3. 73 °C 180 s – prodlužování |
| 3. program (1 cyklus) | 1. 73 °C 8 min – dokončení prodlužování |
| 4. program (1 cyklus) | 1. 4 °C - chlazení |

Tab. 1 Návrh oligonukleotidů pro synton A.

Pořadí	Oligonukleotidy syntonu A
1	5'- CTAGAATTCATATGATGACTATGATTACCCCAAGTCTTCACGCATCAGCGGGGCGAACGCTAGAAGATCCTTTCTTCCC -3'
2	5'- AGAAGATCCTTTCTTCCC AACAGCAATTGCAAGGTCAACACCATGGCCAGAACTTTGATTAAAGTTGATCTGAATCAGA -3'
3	5'- CCAAAC TGCCATCGGGATATCTGGATGCCATCTGTTATGGACCTGGGGCATATCATAAGGGCTCTGATT CAGATCAACTT -3'
4	5'- ATCCCGATGGCAGTTGGGTTGAGCCGGCGCGAATTTAAACTTGAAACGTACGATTGGACCGGTGGAGCTATTAAAAA -3'
5	5'- GTCCGCTCAGAAAATGAACCGTAGACAAATCGACGTCCCGTACATCTTCGGCAGAGTCGTCGTTTTTAATAGCTCCACCG -3'
6	5'- TTCATTTTCTGAGCGGACCGGTGGTGTAAAGGTGCGCAGCCGGGGATCTGCTGGTGGTGGACTTATTAGACATTGGA -3'
7	5'- AATCCACCACCATTTTGT TTTGCTAAAAAAGCCGTTGAAACCCACAGTGAATCATCGCGAGCTCCAATGTCTAATAAGTC -3'
8	5'- ACAAAATGGTGGTGGATT CCTCGATGAACACTTTCCGTTAGCACAAAAATCGATTGGGACTTTCACGGCATGTTACTA -3'
9	5'- ACACCCAATCAAACCCGATGAATCAGACCGCGAAGTTAACTCCCGGAATATGACGACTTTTAGTAAACATGCCGTGAA -3'
10	5'- CCGGGTTTGATTGGGTGTCTTCCAGATCCTAAAATGCTGGCTAGCTGGAATGAGCGTGAACCCGGCTGATCGCAACCGA -3'
11	5'- TCTGGCCGTTGTGGGCCGTCGTAGCATTAGCGGGTTTGTCTAAACCTGGTATCCGGTCTGGGTTCGGTTGCGATCAGGCCG -3'
12	5'- CGGCCACAACGGCCAGATGCAAGGAGAAGCACGCGATAAAGCGCGGCTGAGGGCGCTCGCACCGTGC CGCCGCGTGAG -3'
13	5'- GACAAGCTTGGATCCTCGGGACAAATCCTTGATATCACAGTTACCCCCGTGCTCACGGCGGGCACGGT -3'

Tab. 2 Teploty nasedání primerů pro synton A.

Pořadí překryvu	Teplota nasedání primeru (°C)
1	55,8
2	53,2
3	62,2
4	54,8
5	57,6
6	51,0
7	57,5
8	56,4
9	62,4
10	66,8
11	69,5
12	71,9

Tab. 3 Návrh oligonukleotidů pro synton B.

Pořadí	Oligonukleotidy syntonu B
1	5' - ACGGAATTCGGATCCC GCGTGT TTTTCCCCGTATATGTCGACGGGGCTGGGCTAAGCGTAGGTGATTTACATTTTTCACA -3'
2	5' - TGATTTACATTTTTCACAAGGTGACGGTGAGATCACATTTTGGGGCCTATCGAGATGCCCGGGTGGGTACACATGAAAG -3'
3	5' - GGACGGCTAAAAATCGGATTCTTAATGCCATATTTGGCCATACCTCCTTTAATCAGAGAAACTTTCATGTGTACCCACC -3'
4	5' - CCGATTTTAAAGCCGTCCCTATGACACCAAATTATCAGGGACTTCCTGATCTGCGTCGCCACCTGGGAGGGCGGAAAG -3'
5	5' - CCCGGTGACGTTCCGGCAAGCCAGGTGGTAACCCGCGATCCCTACCCGGCAGGGCAGCCTGCCCTTCCGCCCTCCCAGG -3'
6	5' - TGCCCGAACGTCAACGGGTGCCGGAAGAAATTAGACTGCAACGCCGTCGGGACTTCTGGCGGCCGGCCATGGAGCCCGT -3'
7	5' - TGTGCGGCGACTGCATGACGCAAGCAACCTGCGCGCCCGCCACGCCTCTGATGCGGTCCAGCACGGGCTCCATGGCCGGC -3'
8	5' - TCATGCAGTCGCCGCACATGGTGACTTTCGGCTTCGCCATCAGTCACACGGTCGCGGTACCAAGAAGATCACCATGGTC -3'
9	5' - TGGCGGATGACGGGTATCGTATGCCGAGAGACTTGCCTGGTCGATGGGCAGAGCCACCCCGACCATGGTGATCTTCTG -3'
10	5' - GATACCCGTCATCCGGATTTTGCTCGGGACGACCTTGCCTCCAATGACTACTACTGCGCCACACGCTGCAGCATCCAC -3'
11	5' - TAGGACGTCTCGGGCAGGTGCAGGACGGGACTGGTCGCACTCCGACTAGCCGCGCAACGCGTGGATGTGCAGCGTGT -3'
12	5' - CTGCCGCGAGACGTCCTAGACCGGCGTCTTCATCAGCCGTCGCGCGTGGCCGCGCCAGCCCTAATAGTGGGCACCG -3'
13	5' - GCCGCACGCGGCCACATGGCATGTGCACCCGGAGAGGTACCTGGGGCGCTAGTTGGTGTAGTCGGTGCCGCACTATTAGG -3'
14	5' - CATGTGGCCGCGTCCGGCCACCAGGGCTGTGCCACACCGTCAGGTTGCGGCTGTGTTCAGGGCCAGTAAGCGTGGTT -3'
15	5' - GGAGATATTCCAAGGGCGTTTTGTCCGGAATGTTTTGGCGCCATTAGGTGCAGTAACCGTGGAAACCACGCTTACTGGCCC -3'
16	5' - GTTAAGCTTCTCGAGTTAATGGGAGATATTCCAAGGGCG -3'

Tab. 4 Teploty nasedání primerů pro synton B.

Pořadí překryvu	Teplota nasedání primeru (°C)
1	50,4
2	57,5
3	58,5
4	66,5
5	69,0
6	72,0
7	67,0
8	56,9
9	63,4
10	65,3
11	65,5
12	62,2
13	71,2
14	64,6
15	59,3

3.3.2 Dělení DNA pomocí elektroforesy v agarosovém gelu

TAE pufri: 242 g Tris-HCl, 57,1 ml 99% CH₃COOH, 100 ml 0,5M EDTA, H₂O doplněná do 1 l, pH 8.0

vzorkový roztok: 40% sacharosa, 0,1% bromfenolová modř, 0,02% NaN₃

Pro přípravu 1,2% (w/v) gelu s fluorescenčním indikátorem SYBR Safe DNA gel stain, bylo naváženo 0,72 g agarosy a přidáno 60 ml TAE pufri a následně zahřátého v mikrovlnné troubě po dobu 60 s. Po vychladnutí gelu se přidalo 6 µl 10000x SYBR Safe DNA gel stain. Gel byl nalit do formy na nalévání gelů. Po ztuhnutí byl vyjmut hřeben, gel byl přenesen do elektroforetické vany a přelit 50x TAE pufrem. Do jamek byly napipetovány vzorky, ke kterým byl přidán vzorkový. Elektroforesa běžela 30 min při 110 V. Po ukončení elektroforesy byly proužky DNA na gelu zviditelněny excitací viditelným zářením v modré oblasti spektra, což vyvolalo emisi světla zelené barvy. Emitované světlo bylo pozorováno přes oranžový filtr, který nepropouští vlnové délky odpovídající excitačnímu záření, které by rušilo pozorování fluoreskujících proužků. Prosvícený gel byl vyfotografován digitálním fotoaparátem.

Příprava 1,2% (w/v) gelu s ethidium bromidem byla provedena obdobně, ale namísto Safe DNA gel stain bylo přidáno 60 µl 1000x EtBr (koncentrace 0,5 mg/ml).

3.3.3 Izolace DNA

Pro extrakci DNA z agarosového gelu byl použit kit od firmy MACHEREY-NAGEL GmbH and Co.KG, Nucleospin® Extract II.

Z gelu byl vyříznut fragment, který odpovídal velikosti vzorku. Vyříznutý gel byl vložen do mikrozkuhavky a zvážen na váhách. K 0,1 g gelu bylo přidáno 200 µl NT pufri. Mikrozkuhavka byla vložena do vodní lázně na 10 min při 55°C. Rozpuštěný gel byl převeden do izolační minikolonky, která byla vložena do centrifugy a odstředěna při 11000 × g 60 s. Do minikolonky se přidalo 700 µl NT3 pufri a následovalo odstředění při 11000 × g 60 s. Pro vysušení vzorku byla minikolonka centrifugována 2 min při 11000 × g. Nakonec bylo přidáno 15 µl TE pufri a vzorek byl odstředěn do mikrozkuhavky.

3.3.4 Štěpení DNA

Pro vyštěpení požadovaných DNA sekvencí byly použity restriční endonukleasy Eco RI a Hind III. K reakci byl použit NEB pufr 2, v němž byla aktivita obou enzymů nejvyšší.

Do první mikrozkušavky byly napipetovány 2 μ l 10x BSA, 2 μ l 10x NEB 2 pufru, 3 μ l plazmidu pUC 19, 0,5 μ l restriční endonukleasy Hind III, 0,5 μ l restriční endonukleasy Eco RI, 12 μ l H₂O.

Do druhé mikrozkušavky byly napipetovány 2 μ l 10x BSA, 2 μ l 10x NEB 2 pufru, 10 μ l insertu (spojený izolovaný synton A), 0,5 μ l restriční endonukleasy Hind III, 0,5 μ l restriční endonukleasy Eco RI, 5 μ l H₂O.

Do třetí mikrozkušavky byly napipetovány 2 μ l 10x BSA, 2 μ l 10x NEB 2 pufru, 10 μ l insertu (spojený, vyizolovaný synton B), 0,5 μ l restriční endonukleasy Hind III, 0,5 μ l restriční endonukleasy Eco RI, 5 μ l H₂O.

Mikrozkušavky byly odstředěny a vloženy do termostatu o teplotě 37 °C na 2,5 hodiny.

Po 2,5 hodinách byly vzorky nanášeny na gel se SYBR Safe DNA gel stain a vzorky DNA byly izolovány. Pro kontrolu izolace byla provedena agarosová elektroforesa na gelu s EtBr.

Pro spojení obou syntonů do plazmidu pET22b byl synton A štěpen restričními endonukleasami Nde I a Bam HI, synton B z restričními endonukleasami Bam HI a Hind III a plazmid pET22b restričními endonukleasami Nde I a Hind III.

Tab. 5 Sekvence DNA, které štěpí restriční endonukleasy.

Restriční endonukleasa	Sekvence
EcoRI	GAATTC
HindIII	AAGCTT
NdeI	CATATG
BamHI	GGATCC

3.3.5 Ligace genu a jeho částí do vektorů

Pomocí ligace byly spojeny vyštěpené fragmenty vektoru a genů.

Do celkového objemu 20 μ l bylo přidáno, 2 μ l plazmidu pUC 19, 15 μ l insertu (synton A), 2 μ l pufr- T4 DNA ligasový, 0,5 μ l T4 DNA ligasa, 0,5 μ l H₂O.

Pro synton B bylo přidáno stejné množství složek.

Do negativní kontroly bylo přidáno 2 μ l plazmidu PUC 19, 2 μ l pufr- T4 DNA ligasový, 0,5 μ l T4 DNA ligasa, 15,5 μ l H₂O.

Pro spojení obou syntonů do expresního plazmidu pET22b byly do celkového objemu přidány 2 μ l plazmidu pET22b, 7,5 μ l insertu (synton A), 7,5 μ l insertu (synton B), 2 μ l pufr - T4 DNA ligasový, 0,5 μ l T4 DNA ligasa, 0,5 μ l H₂O. A pro negativní kontrolu byly použity všechny složky kromě insertů.

3.3.6 Transformace kompetentních buněk

K transformaci byly použity kompetentní buňky DH5 α . Kompetentní buňky DH5 α byly rozmrazeny na ledě po dobu 10 minut. Mezitím byl zapálen plynový kahan. Do tří sterilních mikrozkuvek bylo přepipetováno po 100 μ l kompetentních buněk. Do jedné mikrozkuvky bylo přidáno 20 μ l negativní kontroly, která obsahovala jenom plazmid bez insertu. Do druhé mikrozkuvky bylo připipetováno 20 μ l vzorku, který obsahoval

plazmid z insertem (synton A). Do třetí mikrozkušavky bylo připipetováno 20 µl vzorku, který obsahoval plazmid s insertem (synton B). Všechny tři mikrozkušavky byly okamžitě dané na 30 minut na led. Následně byl proveden heatshock tak, že byly vzorky na 90 s vloženy do vodní lázně o teplotě 42°C a pak zpět na led na 60 s. Ke každému vzorku bylo přidáno 600 µl LB média. Vzorky byly několikrát otočené vzhůru dnem a vloženy do inkubátoru na 45 minut při 37 °C. Mezitím byly připraveny plotny s LB agarem. Připravený sterilní LB agar byl vložen na 3 minuty do mikrovlnné trouby až úplně roztál. LB agar byl ochlazen a k 45 ml LB agaru bylo připipetováno 45 µl ampicilinu, který byl následně rozlit na tři plotny po 10 ml. Po inkubaci byly vzorky stočeny na centrifuze při 5000 × g na 60 s. Z každé mikrozkušavky bylo odebráno 520 µl. Zbýlých 200 µl bylo nanesených na plotny a rozetřených. Plotny byly vloženy do inkubátoru na noc (alespoň na 14 hod) při 37 °C.

Ke kompetentním buňkám byl přidáný ligovaný plazmid pET22b, který obsahoval spojený gen γ laktamazy. Jako kontrola byl použit ligovaný plazmid pET22b bez insertu.

3.3.7 Mini preparace

Použité roztoky:

Roztok 1: 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM glukosa, pH 8,3

Roztok 2: 0,2 M NaOH, 1%SDS

Roztok 3: 3 M CH₃COOK, 2 M CH₃COOH

PBS: 10 mM PO₄³⁻, 100 mM NaCl, pH 7,2

TE pufr: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0

Narostlé kolonie bakterií byly odpíchány a přeočkovány na novou plotnu (master plate). Plotna byla vložena do inkubátoru a ponechána přes noc při 37 °C. Špičky s jednotlivými koloniemi byly vloženy do 50 ml sterilních plastových zkumavek, do kterých bylo přidáno 8-10 ml LB média a 8-10 µl ampicilinu. Zkušavky byly inkubovány přes noc v orbitálním inkubátoru při 37 °C. Následující den byly narostlé kultury odstředěny při 4500 × g, při 4°C 5 minut. Supernatant byl slit. K peletě bylo přidáno 500

µl PBS pufru. Vše bylo vortexováno. Resuspendované pelety byly přeneseny do mikrozkušavek a odstředěny při 7000 × g 2 minuty. Supernatant byl znovu slit a následně bylo přidáno 100 µl roztoku I. Vzorky byly vortexovány, poté k nim bylo přidáno 200 µl roztoku II, dále byly jemně zamíchány a po dobu 5 minut byly inkubovány při laboratorní teplotě. Ke vzorkům bylo přidáno 150 µl roztoku III, vzorky byly promíchány otočením a inkubovány 5 minut na ledu. Vzorky byly odstředěny při 16000 × g 5 minut. Supernatant byl přepipetován do nových mikrozkušavek. K supernatantu bylo přidáno 500 µl roztoku fenol/chloroform a protřepáno. Vzorky byly odstředěny při 16000 × g 5 minut. Ze vzorků byla odebrána horní vrstva do nových mikrozkušavek a bylo k nim přidáno 800 µl 96 % ethanolu. Vzorky byly protřepány a inkubovány 20 min při -20°C, následně odstředěny při 16000 × g 8 minut, zbylý supernatant byl odpipetován. Pelety byly opláchnuty 200 µl 70 % ethanolu. Ethanol byl odpipetován ze vzorku. Vzorky byly vysušeny při laboratorní teplotě (45 minut). Vyschlá peleta byla resuspendována v 100 µl TE pufru. K 50 µl vzorku byl přidán 1 µl RNasy a vzorek byl vložen na 30 minut do inkubátoru při 37°C. Zbylých 50 µl bylo ponecháno jako zásobní roztok. Vzorky byly štěpeny restriktivními endonukleasami pro ověření přítomnosti insertu v plazmidu. V případě plazmidu pUC19 byly použity restriktivní endonukleasy EcoRI a HindIII, v případě plazmidu pET 22b restriktivní endonukleasy NdeI a HindIII.

3.3.8 Sekvence plazmidů

Sekvenční analýza vytvořených konstruktů DNA byla prováděna v servisní sekvenční laboratoři PŘF UK Praha.

Tab. 6 Sekvence primerů používaných při sekvenaci DNA.

T7promoter	5´- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3´
T7terminator	5´ - GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3´
M13F	5´- GTA AAA CGA CGG CCA GT -3´
M13R	5´- AAC AGC TAT GAC CAT G -3´

3.3.9 Testování exprese γ-laktamasy

Z každé plotny byly odpíchnuty 2 kolonie, kterými bylo zaočkováno po 5 ml LB média a kultury byly inkubovány přes noc v orbitálním inkubátoru při 37 °C a 200 RPM. 20-ti µl každé narostlé kultury bylo zaočkováno 7 ml nového živného média a inkubováno

při 37 °C při 200 RPM. Každých 30 minut bylo z každé kultury odebráno 250 µl narostlých bakterií a zředilo 750 µl LB média. Na spektrofotometru byla u takto připraveného vzorku měřena optická hustota při 600 nm (OD600) oproti slepému vzorku (LB médium). Nárůsty bakterií byly měřeny každých 30 min, než dosáhly hodnoty absorbance cca 0,6. Následně bylo z každé kultury odebráno 50 µl vzorků pro SDS PAGE elektroforesu. Vzorky byly odstředěny a vzniklá peleta byla resuspendována v 20 µl vzorkového pufru na SDS PAGE elektroforesu. Každá kultura byla rozdělena na dvě poloviny. K jedné polovině byl přidán induktor izopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) do finální koncentrace 1 mM a druhá polovina byla ponechána bez přídavku induktoru. U všech vzorků byla měřena OD600 3 krát, vždy po 1 h. Po ukončení měření bylo z každé kultury odebráno 50 µl vzorků pro SDS PAGE elektroforesu. Vzorky byly odstředěny a vzniklá peleta byla resuspendována v 20 µl vzorkového pufru.

3.3.10 Vyhodnocení exprese γ -laktamasy pomocí SDS PAGE elektroforézy

Použité roztoky:

30,8% T, 2,6% C: 30 g akrylamid, 0,8 g N, N-methylenbisakrylamid, destilovaná voda na doplnění objemu do 100 ml

1,5 M Tris (pH 8,8): 18,2 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, destilovaná voda na doplnění objemu do 100 ml

0,5 M Tris (pH 6,8): 6,1 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, destilovaná voda na doplnění objemu do 100 ml

10% (w/v) SDS: 10 g SDS, destilovaná voda na doplnění objemu do 100 ml

10% (w/v) persíran amonný: 1 g persíran amonný, destilovaná voda na doplnění objemu do 10 ml

15% separační gel: 5,0 ml 30,8% T, 2,6% C, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,1 ml 10% (w/v) SDS, 0,1 ml 10% (w/v) persíran amonný, 0,004 ml TEMED, 2,3 ml H₂O

6% zaostřovací gel: 1,0 ml 30,8% T, 2,6% C, 1,25 ml 0,5 M Tris (pH 6,8), 0,06 ml 10% (w/v) SDS, 0,06 ml 10% (w/v) persíran amonný, 0,006 ml TEMED, 2,6 ml H₂O

5x elektrodový pufr (navážky na 500 ml): 0,125 M Tris (7,6 g), 200 mM glycin (37,5 g), 0,5 % (w/v) SDS (25 g)

6x vzorkový pufr: 3,5 ml 1M Tris (pH 6,8), 3,0 ml glycerol, 1 g SDS, 600 µl 2-merkptoethanol, 1,2 mg bromfenolová modř, destilovaná voda na doplnění objemu do 10 ml

Mezi dvě skla, která byla uchycena svorkami, bylo nalito 10 ml 15% separačního gelu, který byl převrstven destilovanou vodou. Po ztuhnutí gelu byla destilovaná voda odlita z gelu. Na separační gel bylo nalito 5 ml zaostřovacího gelu, do něhož byl vložen hřeben. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byla sklíčka uchycena do aparatury pro SDS PAGE elektroforesu, do které byl nalit elektrodový pufr. Vzorky byly inkubovány za bodu varu na vodní lázni 5 min a nadávkovány do drah připraveného gelu. Do první dráhy byl pipetován standard molekulových hmotností. Aparatura byla přikryta horním dílem a následně spuštěna při 130 V modrá zóna bromfenolové modři doputovala na konec gelu. Gel byl barven inkubací v barvicím roztoku po dobu 1 hodiny. Následně byl odbarven několikerým promytím odbarvovacím roztokem, až bylo všechno barvivo mimo proužky proteinů vymyto.

3.3.11 Oprava mutací

Do sekvence syntonu A byly nedopatřením při přepisu sekvence vneseny 2 mutace (záměny aminokyselin) a stejně tak i do syntonu B. Další náhodné mutace vznikly pravděpodobně v průběhu syntézy oligonukleotidů, případně v průběhu PCR reakcí. Proto bylo navrženo 5 opravných primerů, jejichž úkolem bylo mutace způsobené chybou přepisování překrýt.

Tab. 7 Sekvence opravných primerů na překrytí vnesených mutací.

GL_corr_1:	CTAGAATTCATATGACTATGATTACCCC
GL_corr_2:	GACCTGGGGGTTATCATAAGG
GL_corr_3:	ACGGCCCACATGGGCCAGATGC
GL_corr_4:	GTGGCGGGCGCGCACAGTGCTTGCGTC
GL_corr_5:	GTTAAGCTTCTCGAGTTAATGGGAGATCATCCAAGGGCG

Pro opravu mutací syntonu A byly provedeny 4 PCR. V 1. PCR byla připravena koncová sekvence (KS) syntonu A. Tato reakce obsahovala 1 µl templátu (klon 3), 1 µl opravného primeru GL corr 3, který sloužil jako přímý primer, 1 µl původního primeru oligonukleotid A13, který sloužil jako zpětný primer, 10 µl 5x pufru pro Phusion polymerasu, 0,5 µl Phusion polymerasy, 1 µl 10 mM dNTP a 35,5 µl H₂O. Vzniklá reakční směs byla izolována izolačním kitem a vyhodnocena gelovou elektroforesou.

V 2. PCR byla připravena počáteční sekvence (PS) syntonu A. Tato reakce obsahovala 1 µl templátu (klon 1), 1 µl opravného primeru GL corr 1, který sloužil jako přímý primer, 1 µl opravného primeru GL corr 2, který sloužil jako zpětný primer, 10 µl 5x pufru pro Phusion polymerasu, 0,5 µl Phusion polymerasy, 1 µl 10 mM dNTP a 35,5 µl H₂O. Vzniklá reakční směs byla izolována izolačním kitem a vyhodnocena gelovou elektroforesou.

3. PCR obsahovala 1 µl templátu (klon 1), 1 µl původního oligonukleotidu A4, který sloužil jako přímý primer, 1 µl KS, která sloužila jako zpětný primer, 5 µl 10x pufru pro Pfu polymerasu, 0,5 µl Pfu polymerasy, 1 µl 10 mM dNTP a 40,5 µl H₂O. Vzniklá reakční směs byla izolována izolačním kitem a byla použita jako primer v další PCR. Izolovaná směs byla vyhodnocena gelovou elektroforesou.

4. PCR obsahovala 1 µl templátu (klon 1), 1 µl PS, která sloužila jako přímý primer, 1 µl produktu z 3. PCR, který sloužil jako zpětný primer, 10 µl 5x pufru pro Phusion polymerasu, 0,5 µl Phusion polymerasy, 1 µl 10 mM dNTP a 35,5 µl H₂O. Reakční směs byla izolována a vyhodnocena gelovou elektroforesou.

Po provedení poslední PCR byla získána kompletní správná sekvence syntonu A.

Pro opravu mutací syntonu B byly provedeny 2 PCR. 1. PCR obsahovala 1 µl templátu (klon 5), 1 µl opravného primeru GL corr 4, který sloužil jako přímý primer, 1 µl opravného primeru GL corr 5, který sloužil jako zpětný primer 10 µl 5x pufru pro Phusion polymerasu, 0,5 µl Phusion polymerasy, 1 µl 10 mM dNTP a 35,5 µl H₂O. Reakční směs byla izolována izolačním kitem a byla použita jako primer v další PCR. Izolovaná směs byla vyhodnocena gelovou elektroforesou.

2. PCR obsahovala 1 µl templátu (klon 5), 1 µl původního oligonukleotidu B1, který sloužil jako přímý primer, 1 µl produktu z 2. PCR, který sloužil jako zpětný primer, 5 µl

10x pufru pro Pfu polymerasu, 0,5 μ l Pfu polymerasy, 1 μ l 10 mM dNTP a 40,5 μ l H₂O. Reakční směs byla izolována a vyhodnocena gelovou elektroforézou. Po provedení poslední PCR byla získána kompletní správná sekvence syntonu B.

Reakční podmínky zvolené pro: 1. a 2. PCR syntonu A, 1. PCR syntonu B.

- | | |
|-----------------------|--|
| 1. program (1 cyklus) | 1. 90 °C 10 min – počáteční denaturace |
| 2. program (30 cyklů) | 1. 94 °C 30 s - denaturace
2. 49 °C 30 s – nasedání primerů
3. 72 °C 60 s – prodlužování |
| 3. program (1 cyklus) | 1. 73 °C 8 min – dokončení prodlužování |
| 4. program (1 cyklus) | 1. 4 °C - chlazení |

Reakční podmínky zvolené pro 3. PCR syntonu A, 2. PCR syntonu B.

- | | |
|-----------------------|---|
| 1. program (1 cyklus) | 1. 90 °C 10 min – počáteční denaturace |
| 2. program (30 cyklů) | 1. 94 °C 30 s - denaturace
2. 50 °C 30 s – nasedání primerů
3. 73 °C 120 s – prodlužování |
| 3. program (1 cyklus) | 1. 73 °C 8 min – dokončení prodlužování |
| 4. program (1 cyklus) | 1. 4 °C - chlazení |

Reakční podmínky pro 4. PCR syntonu A.

- | | |
|-----------------------|--|
| 1. program (1 cyklus) | 1. 90 °C 10 min – počáteční denaturace |
| 2. program (30 cyklů) | 1. 94 °C 30 s - denaturace
2. 50 °C 30 s – nasedání primerů
3. 72 °C 60 s – prodlužování |
| 3. program (1 cyklus) | 1. 73 °C 8 min – dokončení prodlužování |
| 4. program (1 cyklus) | 1. 4 °C - chlazení |

4. Výsledky

4.1 Příprava syntonů pomocí PCR

Gen γ -laktamasy byl rozdělen do dvou částí označených synton A a synton B.

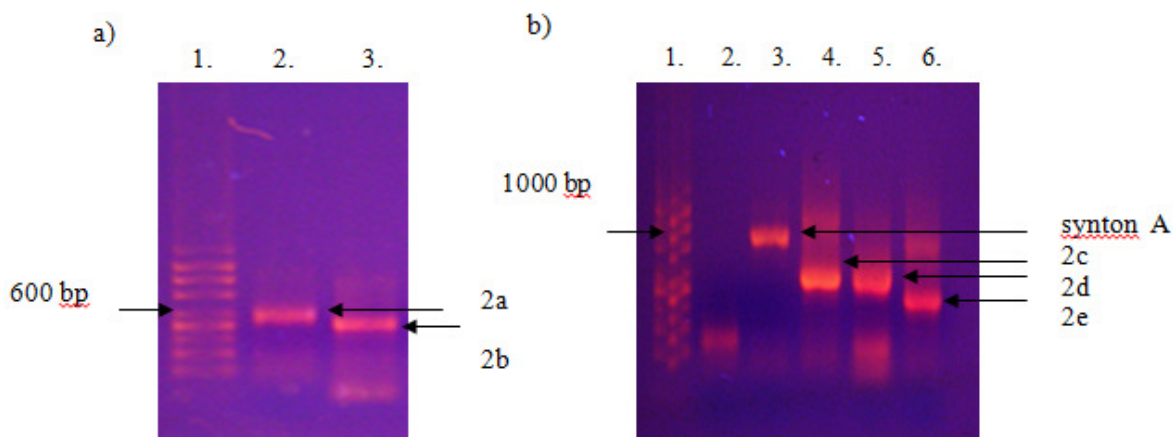
Pro oba syntony byla nejdříve provedena PCR reakce, do níž byly dány pouze vnitřní oligonukleotidy, tedy oligonukleotidy 2-13 pro synton A a 2-15 pro synton B. Touto reakcí vznikla směs produktů, která obsahovala širokou škálu různě dlouhých molekul DNA. Tyto nejsou pozorovatelné na agarosové elektroforese jako samostatné proužky, proto obrázek neuvádíme.

V 2. PCR reakci byla výsledná reakční směs z 1. PCR použita jako templát a byla provedena amplifikace pomocí koncových oligonukleotidů (primerů) každého syntonu, tedy oligonukleotidů 1 a 13 pro synton A a oligonukleotidů 1 a 16 pro synton B. Tato reakce však neposkytla ani v jednom případě očekávaný výsledek, proto bylo rozhodnuto provést nejdříve syntézu kratších úseků a ty následně spojit.

Pro synton A byly proto provedeny jiné 2 PCR reakce označené 2a a 2b, v nichž byla jako templát použita opět výsledná reakční směs z 1. PCR. V reakci 2a byly jako primery použity oligonukleotidy 1 a 9, v reakci 2b oligonukleotidy 6 a 13. Očekávané délky produktů byl 576 bp pro reakci 2a a 514 bp pro reakci 2b. Obě reakce poskytly produkty odpovídající očekávání (obr. 10a, str. 38).

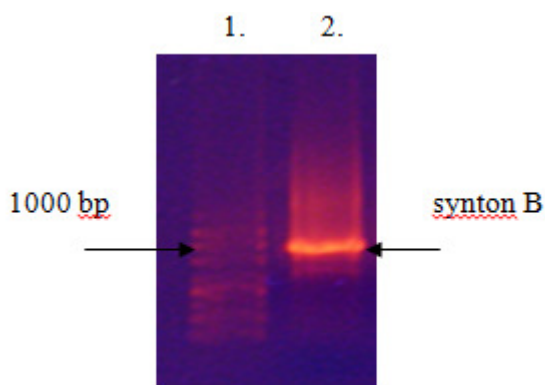
Pro synton B byly provedeny 3 PCR reakce označené 2c, 2d a 2e. V reakci 2c byly jako primery použity oligonukleotidy 2 a 9, v reakci 2d oligonukleotidy 6 a 13 reakci 2e oligonukleotidy 10 a 15. Očekávané délky produktů byl 514 bp pro reakci 2c, 514 bp pro reakci 2d a 390 bp pro reakci 2e. Všechny tři reakce poskytly produkty odpovídající očekávání (obr. 10b).

Produkty PCR reakci 2a-2e byly izolovány z agarosového gelu pomocí izolačního kitu a jejich identita byla ověřena agarosovou elektroforesou.



Obr. 10 Agarosová elektroforesa syntetizovaných částí syntonů A a B. a) 1. standard DNA (200, 300, 400, 500, 600, 800,1000,1200 a 1500 bp), 2. 2a syntonu A, 3. reakce 2b syntonu A; b) 1. standard DNA 200-1500 bp, 2. spojený synton A-nevyšla, 3. spojený synton A (100x zředěný), 4. 2c syntonu B, 5. reakce 2d syntonu B, 6. reakce 2e syntonu B.

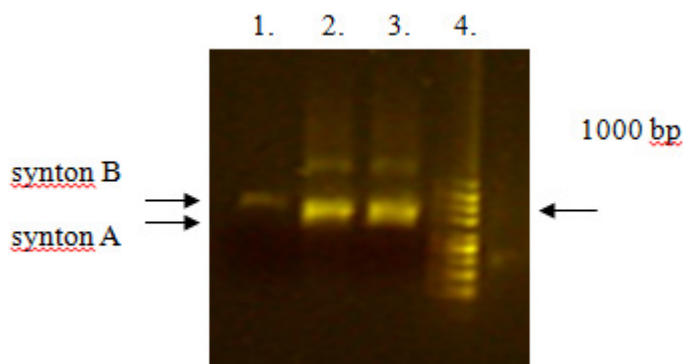
Z těchto fragmentů byly další PCR reakcí složeny kompletní syntony A a B. Pro synton A byla provedena PCR reakce obsahující produkty reakcí 2a a 2b jako templát a oligonukleotidy 1A a 13A jako primery (obr. 10b), pro synton B byly templátem produkty reakcí 2c, 2d a 2e a jako primery byly použity oligonukleotidy 1B a 16B (obr. 11). Obě reakce poskytly produkty očekávané délky. Ty byly následně izolovány pomocí agarosové elektroforesy a izolačního kitu.



Obr. 11 Agarosová elektroforesa syntonu B spojeného z fragmentů 2c, 2d a 2e. 1. standard DNA (200, 300, 400, 500, 600, 800,1000,1200 a 1500 bp), 2. spojený synton B

4.2 Klonování syntonů do plazmidu pUC19

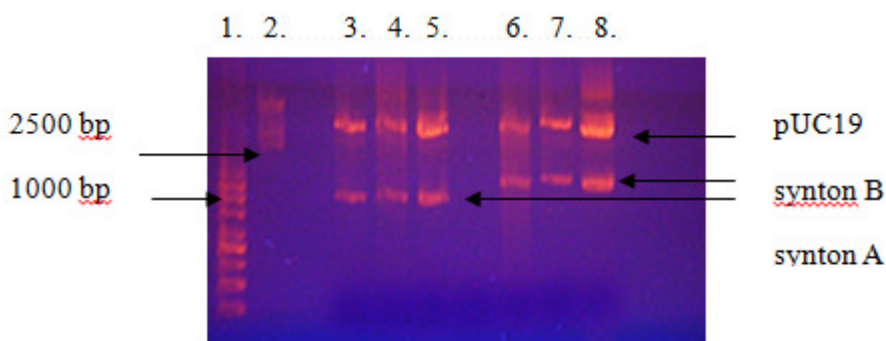
Izolované syntony a plazmid pUC19 sme si naštěpili restričníma endonukleasama EcoRI a HindIII. Po štěpení byla provedena izolace a vzorky byly nanesené na gelovou elektroforesu pro ověření výsledku (obr. 12).



Obr. 12 Agarosová elektroforesa rozštěpených syntonů A a B. 1. rozštěpený synton B, 2. a 3. rozštěpený synton A, 4. standard DNA (200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200 a 1500 bp)

Následně se provedla ligace syntonu A a plazmidu pUC19 a to samé bylo provedeno i pro synton B. Výsledná ligační směs byla použita k transformaci plazmidu do kompetentních buněk DH α 5.

Na plotně zaklonovaného syntonu A vyrostlo 5 kolonií, pro synton B vyrostli 3 kolonie. Na negativní kontrole nevyrostly žádné kolonie. Pro synton A byly vybrány 4 kolonie a pro synton B 3 kolonie. Těmito koloniemi byly zaočkovány nárůsty kultur pro minipreparaci plazmidové DNA. Zároveň byly přeočkovány na záložní plotnu (master plate). Z narostlých kultur byla izolována plazmidová DNA, jejíž správnost byla ověřena restričním štěpením enzymy EcoRI a HindIII. Výsledek štěpení byl analyzován agarosovou elektroforesou (obr. 13).



Obr. 13 Restrikční štěpení produktů ligace plazmidu pUC19 a syntonů A a B restrikčními endonukleasami EcoRI a HindIII, 1. standard DNA (200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200 a 1500 bp) a 2. standard DNA (2000, 2500, 3000, 4000, 6000, 8000 a 10000 bp), 3., 4. a 5. štěpený konstrukt obsahující synton A, klony 1, 2 a 3; 6., 7. a 8. rozštěpený konstrukt obsahující synton B, klony 4, 5 a 6

Do sekvenační laboratoře pro ověření správnosti sekvence byly poslané vzorky z drah 3. (klon 1), 4. (klon 2) a 5. (klon 3) odpovídající syntonu A a vzorky z drah 7. (klon 4), 8. (klon 5) a 9. (klon 6) odpovídající syntonu B. K sekvenaci plazmidu pUC19 byly použity primery M13F a M13R.

4.3 Oprava mutací

Sekvenční analýzou bylo zjištěno, že každý klon obsahuje několik mutací. Část těchto mutací vznikla v důsledku chyb při syntéze oligonukleotidů, případně v důsledku chybovosti použité DNA polymerasy. Bohužel se v sekvenci vyskytly i další mutace vzniklé mojí vlastní chybou při přepisování sekvence γ -laktamasy, kterou jsem neměla k dispozici v elektronické formě. Nejmenší počty mutací se vyskytovaly ve vzorcích z dráhy 3 (klon 1), 4 (klon 2) syntonu A a vzorku z dráhy 8 (klon 5) pro synton B. Vzorek z dráhy 5 (klon 3) syntonu A obsahoval správný konec sekvence.

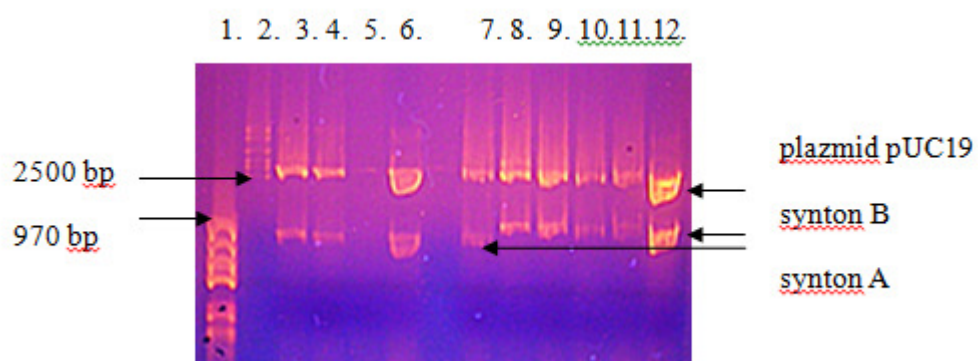
Na opravu bodových mutací vzniklých chybou při přepisu byly navrženy nové oligonukleotidy (GL corr 1-5). Tyto oligonukleotidy byly navrženy tak aby překryly mutace a byly použity k amplifikaci opravených syntonů pomocí PCR.

Pro opravu sekvence obou syntonů bylo navrženo několik reakcí. Pro synton A se v první reakci použil jako templát klon 1 a primery GL corr 1 a GL corr 2. Tato reakce

sloužila pro přípravu počáteční sekvence (PS) syntonu A. Ve druhé reakci se pro přípravu koncové sekvence (KS) syntonu A použil jako templát klon 3 a primery GL corr 3 a poslední původní oligonukleotid 13A. Reakční směs byla analyzována agarosovou elektroforesou. Proužky odpovídající velikostí našim fragmentům byly vyizolovány a použity v dalších reakcích. V třetí reakci byl jako templát použit opět klon 1 a jako primer byl použit původní oligonukleotid 4A a KS. Produkt z 3. PCR byl nanesen na agarosovou elektroforesu, izolován a následně použit jako primer ve čtvrté reakci spolu s PS. V této reakci byl jako templát použit klon 1. Tímto byl získán opravený synton A.

Pro synton B byl v první reakci jako templát použit klon 5 a primery GL corr 4 a GL corr 5. Tato reakční směs byla nanesena na gel a izolována. V druhé reakci byl produkt první reakci použit jako primer společně s původním oligonukleotidem 1B. Jako templát byl použit opět stejný klon 5. Tímto byl získán opravený synton B.

Opravené syntony byly zaklonovány do plazmidu pUC 19. Na plotně pro synton A narostlo 20 kolonií a pro synton B 40 kolonií. Na negativní kontrole narostlo 5 kolonií. Pro každý synton bylo zaočkováno do LB média po 5 koloniích, s nimiž byla následně provedena minipreparace. Po kontrolním štěpení restričními endonukleasami bylo na gelu vidět proužky odpovídající syntonům A a B a proužky odpovídající rozštěpenému plazmidu (obr. 14).



Obr. 14 Restriční štěpení plazmidu pUC19 se zaligovanými opravenými syntony A a B, restričními endonukleasami EcoRI a HindIII, 1. standard DNA 200-1500 bp (200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200 a 1500 bp), 2. standard DNA 2000-10000 bp (2000, 2500, 3000, 4000, 6000, 8000 a 10000 bp), 3.- 6. konstrukt obsahující synton A, klony 7, 8 a 9, 7. - 12. konstrukt obsahující synton, klony 10, 11 a 12

Na sekvenaci pro kontrolu správnosti sekvence byly poslány vzorky z drah 3, 4 a 6 pro synton A a vzorky z drah 8, 9 a 12 pro synton B. K sekvenci insertů v plazmidu pUC19 byly použity primery M13F a M13R. Správnost sekvence byla potvrzena pro vzorky z dráhy 4 pro synton A a z dráhy 2 pro synton B.

Kompletní sekvence γ -laktamasy s vyznačenými opravami:

MTMITPSLHASAGRTLE
DPFFPTAIARSTPWPETLIKVDLNQSPYD **N (M)**PQVH
NRWHPDIPMAVWVEPGAEFKLETYDWTGGAIKN
DDSAEDVRDVDLSTVHFLSGPVGVKGAQPGDLL
VVDLLDIGARDDSLWGFNGFFSKQNGGGFLDEHF
PLAQKSIWDFHGMFTKSRHIPGVNFAGLIHPGL
IGCLPDPKMLASWNERETGLIATDPDRIPGLAN
PPNATTAH **M (N)**GQMGGEARDKAAAEGARTVPPREHG
GNCDIKDLSRGSRVFFPVYVDGAGLSVGDHFS
QGDGEITFWGPIEMPGWVHMKVSLIKGGMAKYG
IKNPIFKPSPMTPNYQGLPDLRRHLGGRKGQAAL
PGRDRGLPPGLPERHRVPEEIRLQRRPGLLAAG
HGARAGPHQRRGGRA **Q (G)**CLRHAVA AHGDLRLRHQ
SHGRGTTEDHHGRGGS AHRPGQVSPAYDTRHPPF
ARGRPCPPMTTAPHAASTRCAASRSATSPRP
APAARRPRPASSARRAWPAPAPNSAAPTPTS
APGTSPGAHAMWPRAATRACATPSGCGCCSGASK
RGSTVTAPNGAKTFPTKRPW **M (N)**ISH.PRTLRRTN
DKGPRRGPLSCLAVPLSARRR.SRPAPASAGWR
TAAWPGA AFVDPRYRID

Obr. 15 Kompletní sekvence γ -laktamasy. S vyznačením míst, kde došlo k chybám přepisování. Chybná aminokyselina je uvedena v závorce.

4.4 Spojení syntonů

Bezchybné klony byly použity pro vyštěpení syntonů za účelem jejich následného spojení a vytvoření sekvence celého genu γ -laktamasy. Synton A byl vyštěpen restričními endonukleasami NdeI a BamHI, synton B restričními endonukleasami BamHI a HindIII. Výsledek štěpení byl analyzován agarosovou elektroforesou. Zároveň byl rozštěpen plazmid pET22b pomocí restričních endonukleas NdeI a HindIII. Oba syntony a plazmid byly izolovány pomocí agarosové elektroforesy a izolačního kitu.

Plazmid a oba syntony byly spojeny pomocí ligace tří fragmentů DNA, zároveň byla provedena negativní kontrola obsahující samotný plazmid. Produkty obou ligací byly následně použity k transformaci kompetentních buněk DH5 α . Na plotně s ligační reakcí vyrostlo cca 13 kolonií. Na negativní kontrole vyrostlo 7 kolonií. I přes nepříliš příznivý výsledek ligace bylo 5 kolonií přeočkováno do média a proveden nárůst kultury a následná minipreparace plazmidové DNA. Výsledek minipreparace byl ověřen restričním štěpením pomocí restričních endonukleas NdeI a HindIII (obr. 17). Štěpení potvrdilo správnost všech klonů, z nichž 3 byly použity k otestování exprese rekombinantní γ -laktamasy.

4.5 Exprese rekombinantní γ -laktamasy v *E. coli*

Ověřenými plazmidy ze správných klonů byly transformovány expresní kompetentní buňky BL21(DE3)RIL, navíc byla provedena kontrola s netransformovanými buňkami. Na všech třech plotnách vyrostlo cca po 80 koloniích (na negativní kontrole žádné kolonie nenarostly), z kterých byly přeočkovány do tekutého LB média 2 kolonie pro každý klon a nechány růst přes noc. Narostlé kultury byly přeočkovány do nového média a každých 30 minut byla jejich optická hustota měřena spektrofotometricky při 600 nm (OD_{600}). Nárůst byl prováděn do dosažení $OD_{600} = 0,6$. Hodnoty OD_{600} z této části nárůstu jsou shrnuty v tab. 8.

Tab. 8. Hodnoty OD₆₀₀ nárůstu kultur měřena každých 30 min.

klon/kolonie	30 [min]	60 [min]	90 [min]	120 [min]	150 [min]	180 [min]	210 [min]
1.1	0,012	0,024	0,080	0,132	0,196	0,436	0,732
1.2	-0,004	0,072	0,072	0,152	0,260	0,596	0,848
2.1	0,044	0,060	0,124	0,252	0,296	0,600	0,964
2.2	-0,004	0,024	0,112	0,156	0,232	0,472	0,728
3.1	0,048	0,076	0,100	0,236	0,388	0,704	1,212
3.2	0,028	0,040	0,076	0,188	0,324	0,596	0,952

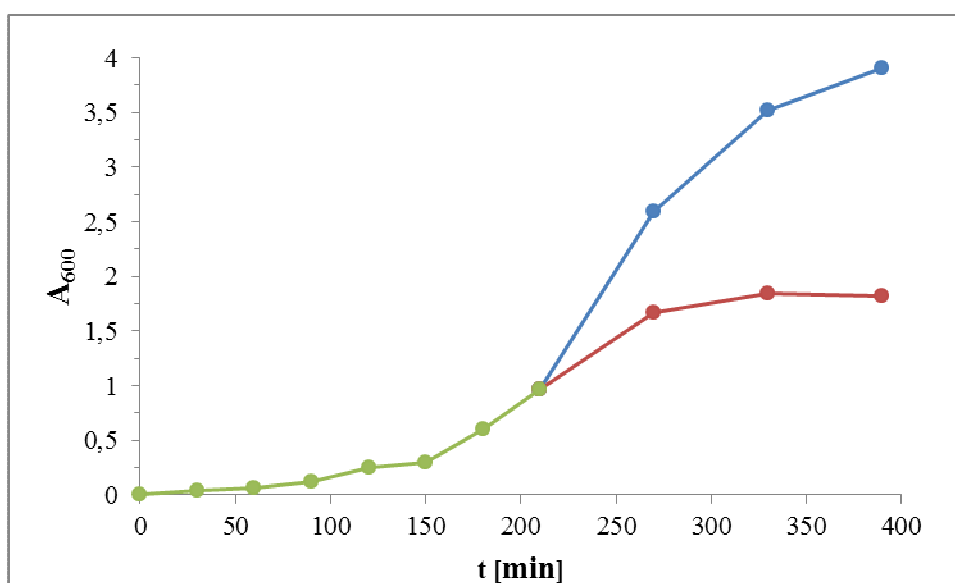
Každá narostlá kultura byla v této fázi nárůstu rozdělena na dvě stejné části. K jedné z nich byl přidán induktor IPTG, čímž byla spuštěna exprese rekombinantní γ -laktamasy. Druhá část byla ponechána jako slepý pokus. OD₆₀₀ byla dále monitorována v intervalech 1 h, výsledky jsou shrnuty v Tab. Kompletní růstové křivky pro klon 2.1 jsou znázorněny v grafu na obr 16.

Tab. 9. Hodnoty OD₆₀₀ nárůstu kultur měřena každých 60 min. bez přidaného induktora

klon/kolonie	60 [min]	120 [min]	180 [min]
1.1	2,036	3,384	3,616
1.2	2,252	3,376	3,572
2.1	2,600	3,524	3,912
2.2	2,184	3,352	3,728
3.1	2,844	3,412	3,444
3.2	2,360	3,676	3,684

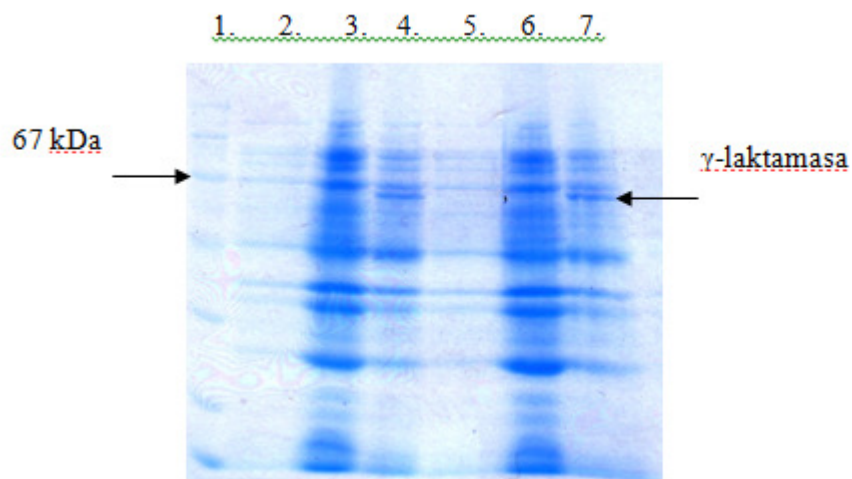
Tab. 10. Hodnoty OD_{600} nárůstu kultur měřena každých 60 min. s přidaným induktorem IPTG

klon/kolonie	60 [min]	120 [min]	180 [min]
1.1	1,556	1,868	2,276
1.2	1,720	2,228	2,808
2.1	1,668	1,844	1,820
2.2	1,188	1,364	1,436
3.1	1,692	1,992	2,104
3.2		1,672	1,948

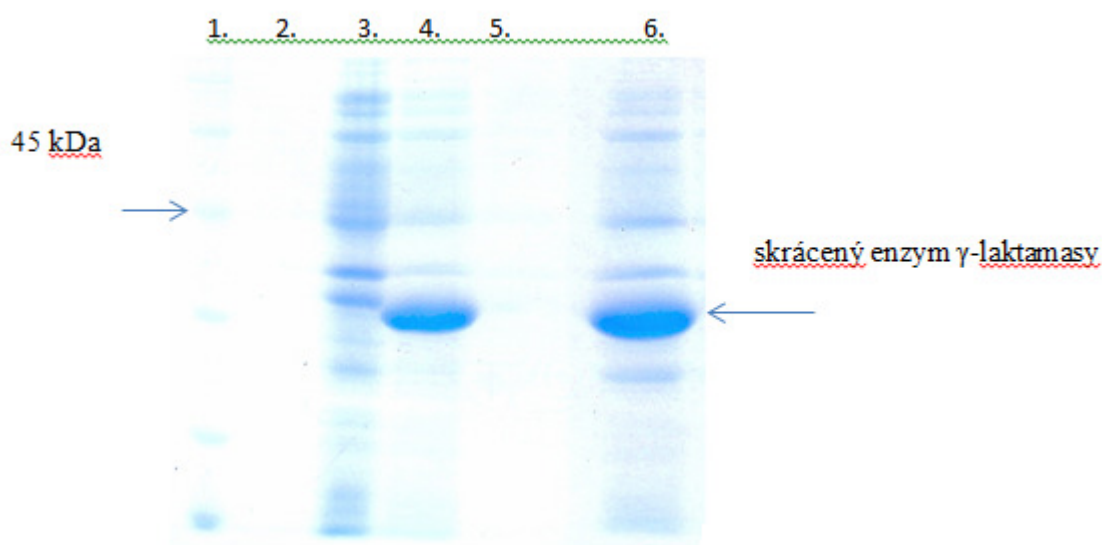


Obr. 16 Růstová křivka kultury bakterií exprimujících γ -laktamasu z připraveného expresního vektoru, klon 2.1, Zelená křivka odpovídá intervalu od zaočkování do indukce. Modrá křivka odpovídá části kultury, která nebyla indukovaná (slepý pokus). Červená křivka odpovídá kultuře indukované IPTG.

K vyhodnocení exprese γ -laktamasy byly odebrány vzorky kultur před indukcí, po indukci bez induktoru (slepý pokus) a po indukci s přidavkem induktoru. Po dokončení měřeného nárůstu všech kultur byly odebrané vzorky analyzovány pomocí SDS PAGE elektroforesy (obr. 17,18).



Obr. 17 Exprese γ -laktamasy v *E. coli*. Na gelu jsou vyhodnoceny klony 2.1. a 2.2. 1. standard (6,5; 14,3; 21; 29; 45; 67; 116; 200 kDa); 2. klon 2. 1. před indukcí; 3. klon 2. 1. - slepý neindukovaná kultura; 4. klon 2. 1. indukovaná kultura; 5. klon 2. 2. před indukcí; 6. klon 2. 2. - slepý neindukovaná kultura; 7. klon 2. 2. indukovaná kultura



Obr. 18 Exprese zkrácené formy γ -laktamasy v *E. coli*. Na gelu jsou vyhodnoceny klony 1.1. a 1.2. 1. standard (6,5; 14,3; 21; 29; 45; 67; 116; 200 kDa); 2. klon 1. 1. před indukcí; 3. klon 1. 1. - slepý neindukovaná kultura; 4. klon 1. 1. indukovaná kultura; 5. klon 1. 2. před indukcí; 6. klon 1. 2. - slepý neindukovaná kultura; 7. klon 1. 2. indukovaná kultura

4.6 Sekvenční analýza expresního plazmidu

Na gelu SDS PAGE elektroforesy byl v dráze 4 a 7 vidět proužek potvrzující expresi γ -laktamasy. Plazmidy odpovídající správným klonům byl poslán na sekvenční analýzu. K sekvenaci z plazmidu pET22b byly použity primery T7 promoter a T7 terminator. Tyto primery však nebyly dostačující na pokrytí celé sekvence. Proto byl klon 2.1 a 2.2 dále sekvenován s primery GL corr 1, GL corr 2 a GL corr 3, čímž byla chybějící část sekvence doplněna. Klon 3.1 a 3.2 dále sekvenován nebyl. Sekvenční analýza potvrdila správnost celé sekvence γ -laktamasy klonu 2.1 a 2.2.

5. Diskuse

γ -laktamasa je protein skládající se z 575 aminokyselin, jeho gen je tedy tvořen 1725 bázemi. Takto dlouhý gen je prakticky nemožné syntetizovat v jednom kuse přímo z oligonukleotidů. Účinnost tohoto postupu je totiž velice nízká z důvodu velkého množství překryvů oligonukleotidů, které na sebe musí správně nasednout, aby byla vytvořena odpovídající sekvence. Účinnost nasedání je kritickým faktorem zejména ve druhém kroku 1. PCR reakce, kdy musí dojít ke spojení vláken DNA vzniklých prodloužením na sebe nasednuvších oligonukleotidů z prvního kroku. Jelikož tyto molekuly již existují ve formě dvouvláknové DNA, proto po jejich denaturaci, kdy je reakční směs ochlazena na teplotu nasedání komplementárních úseků oligonukleotidů, dochází ke kompetici o možnost párování mezi překryvy oligonukleotidů dlouhými 18 bází a celými produkty prvního kroku dlouhými 142 bází. Odtud plyne, že nasedání překryvů bude ve značné nevýhodě. Proto účinnost složení celé sekvence s počtem překryvů exponenciálně klesá a při obzvláště velkém počtu oligonukleotidů už nemusí kompletní sekvence vzniknout vůbec. V následné 2. PCR pak nedojde k amplifikaci žádného produktu.

Proto jsme přistoupili k rozdělení sekvence genu γ -laktamasy do dvou částí, syntonů A a B, o délkách 813, resp. 969 bp včetně koncových pomocných sekvencí. I tyto délky jsou poměrně velké, za optimum lze považovat cca 500 bp, ale dali jsme přednost tomuto řešení před spojováním většího množství syntonů, které rovněž přináší komplikace.

Po provedení 2. PCR bylo zjištěno, že amplifikace genu neproběhla úspěšně. Po analýze produktů 2. PCR na gelové elektroforéze nebyly pozorovány žádné odpovídající proužky. Pravděpodobným důvodem byla právě velmi dlouhá sekvence syntonů. Z toho důvodu byl každý synton rozdělen na 2 části vhodnou volbou oligonukleotidů do 2. PCR reakce. Pro synton A syntéza těchto úseků DNA proběhla úspěšně. Pro synton B však ani tato syntéza úspěšná nebyla, proto byl daný synton rozdělen na tři části. To bylo dostačující, syntéza všech tří fragmentů proběhla úspěšně.

Spojení dvou, resp. tří částí syntonů A a B bylo dosaženo další PCR reakcí, kde jako primery vystupovaly koncové oligonukleotidy každého syntonu a jako templát směs jeho částí. Touto metodou byly nakonec připraveny oba syntony.

Ligace syntonů a plazmidu proběhla v malém výtěžku, což se nám projevilo při transformaci rekombinantního plazmidu do kompetentních buněk, neboť na agarových plotnách s bakteriemi *E. coli* transformovanými legačními produkty vyrostlo pouze cca 10 kolonií. Nárůst malého množství kolonií na plotně s živným médiem může mít sice více vysvětlení, ale jedním z pravděpodobných důvodů mohou být nedosyntetizované konce oligonukleotidů. Chemická syntéza oligonukleotidů totiž probíhá ve směru od 3'-konce k 5'-konci. Vzhledem k tomu, že oligonukleotidy byly velmi dlouhé (obvykle 80 bází), obsahovaly pravděpodobně velké množství nedosyntetizovaných 5'-konců. Pokud je totiž účinnost jednoho kroku syntézy 99% [21], je v souboru oligonukleotidů o délce 80 bází pouze 45% molekul o plné délce, všechny ostatní jsou zkráceny na 5'-konci o několik bází. Na 5'-koncích prvního a posledního oligonukleotidu byla navržena restriční místa pro klonování do vektoru pUC19. Chybějící konce restričních míst mohly znemožnit restriční štěpení a následnou ligaci syntonů a plazmidu. To mohlo vést k tvorbě malého množství kolonií při transformaci kompetentních buněk rekombinantním plazmidem.

Sekvence γ -laktamasy z *Comamonas acidovorans* nám nebyla k dispozici v elektronické formě, z níž by mohla být zkopírována a použita pro návrh syntézy genu. Proto musela být ručně přepsána z tištěného zdroje. Při prepisu této sekvence bohužel došlo k záměnám čtyř aminokyselin. Zároveň vznikly další mutace v důsledku náhodných záměn bází v syntetizovaných oligonukleotidech, které nastávají přibližně s pravděpodobností 0,3% [21]. Oba typy záměn byly opraveny pomocí PCR reakcí, v níž vhodné oligonukleotidy sloužily jako záplaty k překrytí těchto mutací. Na opravu mutací vzniklých v důsledku ručního přepisování musely být syntetizovány nové opravné oligonukleotidy, zatímco na opravu mutací náhodných lze použít oligonukleotidy již syntetizované. Třebaže pravděpodobnost výskytu mutace v těchto oligonukleotidech je stále stejná, pravděpodobnost zanesení další mutace do opraveného produktu je výrazně nižší než při primární syntéze, protože podstatná část syntonu je už pouze přepisována vysoce přesnou DNA polymerasou, jejíž procento vnesených mutací je podstatně nižší. Vhodně zvolenou sekvencí PCR amplifikací s příslušnými produkty byly nakonec oba syntony opraveny a správnost sekvence byla potvrzena sekvencí DNA.

Spojení obou syntonů bylo provedeno pomocí restriční endonukleasy BamHI, jejíž rozpoznávací sekvence byla vnesena na spojované konce obou syntonů. BamHI patří mezi restriční endonukleasy I. typu, které štěpí uvnitř sekvence, kterou rozpoznávají. Z toho

zároveň vyplývá, že po následném spojení kohezních konců se restrikční místo v sekvenci opět obnoví. Použití endonukleas tohoto typu má výhodu v tom, že se zpravidla jedná o velmi kvalitní enzymy, a navíc je možno v případě potřeby gen opět rozdělit. Nedostatkem této metody je, že restrikční místo musí být umístitelné dovnitř sekvence, jeho použití je tedy závislé na aminokyselinovém složení. Druhou možností je použití restrikčních endonukleas II. typu, které štěpí v definované vzdálenosti od rozpoznávané sekvence. Tato metoda je použitelná univerzálně a nezávisle na aminokyselinovém složení, jedinou omezující podmínkou je nepřítomnost restrikčního místa jinde v sekvenci. Restrikční místo po spojení syntonů zaniká, což má výhodu v případě, že potřebujeme spojovat více syntonů, protože v tomto případě nedochází k nežádoucí fragmentaci již spojených úseků.

V našem případě byla ke spojení použita ligace tří fragmentů DNA najednou, tedy obou syntonů a páteře expresního vektoru pET22b. Třebaže by se dalo očekávat, že tato ligace bude mít nižší účinnost než klasická ligace dvou fragmentů, byl její výsledek velice dobrý, počet narostlých kolonií po transformaci byl vyšší než u primárních ligací do pUC19. Pro případ neúspěchu této metody však byly připraveny i další dvě možné cesty spojení syntonů v plazmidu pUC19 tak, že by se vždy jeden synton přidal do plazmidu, který již obsahuje synton druhý. Zde by byly použity buď restrikční endonukleasy EcoRI a BamHI (přidání syntonu A do plazmidu se syntonem B) nebo BamHI a HindIII (přidání syntonu B do plazmidu se syntonem A). Takto spojený gen by pak byl přenesen do expresního plazmidu pET22b. Vzhledem k dobré funkčnosti ligace tří fragmentů však těchto metod nemuselo být použito.

Expresa γ -laktamasy byla testována v buňkách *E. coli* kmene BL21(DE3)RIL. K tomuto pokusu bylo zaočkováno celkem šest kultur, vždy po dvou od stejného klonu expresního vektoru. Kultury byly narůstány do $OD_{600} = 0,6$, poté byly rozděleny na poloviny a jedna z nich byla indukována IPTG. Nárůst byl prováděn další 3 h a byl monitorován spektrofotometricky a pomocí SDS PAGE elektroforesy. Z růstových křivek (Tab. 6, 7, 8 a Obr. 19) je patrné, že indukované kultury rostou od okamžiku indukce podstatně pomaleji než neindukované, což svědčí o tom, že dochází k intenzivní proteosyntéze. Ta spotřebovává podstatnou část energie, kterou buňka produkuje, proto je růst kultury značně omezený. Z analýzy na SDS PAGE elektroforese vyplývá, že dva klony produkují protein odpovídající velikosti γ -laktamasy. Tato exprese není příliš silná, přesto je pozorovatelný jasný rozdíl mezi indukovanými a neindukovanými buňkami. Třetí klon

naopak produkoval protein o velikosti asi poloviny γ -laktamasy, avšak jeho exprese byla velmi silná. Jedná se pravděpodobně o zkrácenou variantu γ -laktamasy vzniklou v důsledku vytvoření náhodného stop-kodonu při spojování syntonů. I když ligačními reakcemi zpravidla mutace nevznikají, v tomto případě patrně došlo k posunutí čtecího rámce a následnému vzniku stop-kodonu.

Všechny tři klony byly sekvenovány částečně s použitím primerů T7 promotor a T7 terminátor. Tato sekvenace potvrdily správnost podstatné části všech klonů v oblasti začátku a konce sekvence v rozsahu asi 700 bází z každé strany. Sekvenace střední oblasti, která nebyla původními sekvencemi pokryta, byla provedena za pomoci primerů původně určených pro opravy mutací, ale pouze u jednoho z klonů, kde probíhala exprese kompletního proteinu. Těmito sekvencemi byla potvrzena správnost celé sekvence tohoto klonu.

Otázka, proč je exprese proteinu relativně slabá, už nebyla z časových důvodů dále zkoumána. Je možné, že aktivní enzym nějakým mechanismem inhibuje proces proteosyntézy. Pravděpodobně ale neovlivňuje samotný růst buněk, protože růstová křivka je srovnatelná s růstovou křivkou klonu, který kompletní γ -laktamasu neprodukuje. Je ale také možné, že zkráceného produktu je produkováno více, protože je méně rozpustný a usazuje se v buňce v inkluzních tělískách, zatímco nativní γ -laktamasa zůstává rozpuštěna v cytoplazmě, kde její koncentrace nemůže dosáhnout tak vysokých hodnot. To je v souladu s publikovaným purifikačním postupem [2], kde je protein produkován rovněž jako rozpustný. Ověření jeho rozpustnosti, izolace proteinu a měření jeho aktivity již nebylo možné v rámci této práce provést, ale může být provedeno v budoucnu.

6. Závěr

Cílem této práce bylo připravit expresní vektor pro γ -laktamasu z bakterie *Comamonas acidovorans*. Tento gen byl rozdělen na dvě části (syntony). S využitím PCR byla ve dvou krocích provedena syntéza obou těchto částí, které byly poté klonovány do plazmidu pUC19. Těmito konstrukty byly transformovány kompetentních buňky *E. coli* DH5 α . Pomocí PCR byla provedena oprava zanesených mutací obou fragmentů. Opravené fragmenty byly spojeny v plazmidu pET22b a transformovány do expresních buněk *E. coli* BL21(DE3)RIL, v kterých byla provedena exprese γ -laktamasy s přídavkem i bez přídavku induktoru IPTG. Exprese γ -laktamasy byla vyhodnocena na SDS PAGE elektroforese. Exprese γ -laktamasy z připraveného expresního vektoru byla potvrzena a správnost sekvence byla ověřena sekvenční analýzou. Expresní vektor bude sloužit k přípravě rekombinantní γ -laktamasy, která bude použita ke studiím štěpitelnosti γ -laktamového cyklu polyvinylpyrrolidonu, což je nutný krok k zajištění jeho odbourání biologickými procesy.

7. Seznam použité literatury

1. Gonsalvez, I.S., Isupov, M.N., Littlechild, J.A.: *Acta Cryst.* **D57**, 284-286 (2001)
2. Taylor, S.J.C., Brown, R.C., Keene, P.A., Taylor, I.N.: *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2163-2168 (1999)
3. Toogood, H.S., Brown, R.C., Line, K., Keene, P.A., Taylor, S.J.C., McCagueb, R., Littlechild, J.A.: *Tetrahedron* **60**, 711–716 (2004)
4. Kobayashi, M., Fujiwara, Y., Goda, M., Komeda, H., Shimizu, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(22), 11986-11991 (1997)
5. Crimmins, M.T., King, B.W.: *J. Org. Chem.* **61**(13), 4192-4193 (1996)
6. Marcé, P., Díaz, Y., Matheu, M.I., Castellón, S.: *Organic Letters*, **10**(21), 4735-4738, (2008)
7. Klívar, S.: Diplomová práce: Možnosti sorbce PVP na biologické kaly, UTB, Zlín (2010)
8. Robinson, B.V., Sullivan, F.M., Borzelleca, J.F., Schwarzs, L., *PVP – A Critical Review of the Kinetics and Toxicology of Polyvinylpyrrolidone (Povidone)*, Lewis Publishers (1990)
9. Bühler, V.: *Polyvinylpyrrolidone Excipients For Pharmaceuticals, Povidone, Crospovidone And Copovidone*, Berlín (2005)
10. Blum A.E., Eberl D.D.: *Clay. Clay Miner.*, **52**, no. **5**, 589-602 (2004)
11. Fang H.H., Zheng, H.: *Environ Technol.*, **25**(7), 757-761 (2004)
12. Binkowski, B.F., Richmond, K.E., Kaysen, J., Sussman, M.R., Belshaw, P.J.: *Nucleic Acids Res.*, Vol. **33**, No. **6**, e55 (2005)
13. Au, L.C., Yang, F.Y., Yang, W.J., Lo, S.H., Kao, Ch.F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**(1), 200–203 (1998)
14. Young, L., Dong Q.: *Nucleic Acids Res.*, Vol. **32**, No. **7**, e59 (2004)
15. Mandecki W, Bolling TJ.: *Gene*, **68**(1), 101-107 (1988)
16. Mandecki, W., Hayden, M.A., Shallcross, M.A. & Stotland, E. *Gene* **94**, 103–107(1990)
17. Khorana, H.G., Yamada, T., Weber, H., Terao, T., RajBhandary, U.L., Otsuka, E., Kumar, A., Gupta, N.K., Buchi, H., Agarwal, K.L., et al: *J. Mol. Biol.* **72**, 209–217 (1972)

18. Itakura, K., Hirose, T., Crea, A.D., Riggs, A.D., Heyneker, H.L., Bolivar, F., Boyer, H.W.: *Science* 198, 1056–1063 (1977)
19. Dillon, P.J. & Rosen, C.A.: *BioTechniques* 9, 298–300 (1990)
20. Stemmer, W.P.C., Cramer, A., Ha, K.D., Brennan, T.M. & Heyneker, H.L.: *Gene* 164, 49–53 (1995)
21. Kodumal, S J., Patel, K.G., Reid, R., Menzella, H.G., Welch, M., Santi, D. V.: *PNAS*, vol. 101, no. 44, 15573–15578 (2004)
22. Smith, H.O., Hutchison, C.A., III, Pfannkoch, C. & Venter, J.C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15440–15445 (2003)
23. Cello, J., Paul, A.V. & Wimmer, E.: *Science* 297, 1016–1018 (2002)
24. Kotrbová, V., Aimová, D., Ingr, M., Borek-Dohalská, L., Martínek, V., Stiborová, M.: *Protein Expr Purif.* 66(2), 203-9 (2009)
25. <http://www.kazusa.or.jp/codon/>
26. Owczarzy, R., Ph.D. Thesis: Predictions of short DNA duplex thermodynamics and evaluation of next nearest neighbor interactions, UIC (1993)
27. <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>
28. <https://www.dna20.com/genedesigner2/>
29. Hoffman, H.E., Jirásková, J., Ingr, M., Zvelebil, M., Konvalinka, J.: *Protein Expr. Purif.* 63(1), 62-7 (2009)
30. <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2WKN>
31. <http://de.wikipedia.org/wiki/Polyvinylpyrrolidon>
32. Xiong, A.S., Peng, R.H., Zhuang, J., Gao, F., Li, Y., Cheng, Z.M., Yao, Q.H.: *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 522–540 (2008)
33. Silman, N.J., Carver, M.A., Jones, C.W.: *J. Gen. Microbiol.* 135, 3153-3164 (1989)
34. Laemmli U.K., *Nature* 227 (5259), 680-685 (1970)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a přímení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka a