

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE FARMACEUTICKÁ
FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**PŘÍPRAVA EXTRÉMĚ DLOUHÝCH cDNA PRO
EXPRESI REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Školitel specialista: PharmDr. Martina Šafářová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2006

Erik Juřencák

poděkování

Za všestrannou a obětavou pomoc, cenné rady a připomínky při vypracování diplomové práce děkuji Martině Šafářové PhD., rovněž Martinu Bunčekovi PhD. a PharmDr. Tomáši Šimůnkovi Ph.D.

OBSAH

Použité zkratky	3
1. Úvod	4
2. Teoretická část.....	5
2.1. PAPP-A	5
2.1.1. Fyziologie PAPP-A	7
2.1.2. proMBP	7
2.1.3. Vztah PAPP-A k faktorům IGF-I, IGF-II a IGFBP-4	8
2.1.4. Význam PAPP-A v patologii a diagnostice chorob	8
2.1.4.1. PAPP-A a detekce vrozených vývojových vad.....	8
2.1.4.2. PAPP-A a cévní choroby.....	9
2.1.4.3. PAPP-A a poraněná tkáň.....	9
2.2. Použité metody	10
2.2.1. Izolace nukleových kyselin	10
2.2.2. Reversní transkripce	10
2.2.3. Měření koncentrace nukleových kyselin spektrofotometricky	11
2.2.4. Klonování	11
2.2.5. Produkce proteinů in vitro.....	14
2.2.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	17
2.2.7. Hybridizace	18
2.2.8. Elektroforéza	18
2.2.9. Sekvence DNA	19
3. Cíl práce	20
4. Experimentální část	21
Materiál	21
Přístroje	22
Pomůcky	23
4.1. pracovní postupy	24
4.1.1. Získání cDNA PAPP-A.....	24
4.1.2. Namnožení jednotlivých úseků DNA.....	26
4.1.3. Klonování do plazmidu pCR4Blunt-TOPO	30
4.1.4. Klonování do plazmidu pQE-Trisyssem.....	34
4.1.5. Plazmid pSecTag2/HygroC.....	39
5. Výsledky.....	46
6. Diskuze.....	61
7. ZÁVĚR.....	62
8. Seznam použité literatury	63
9. Přílohy	66

Použité zkratky

PAPP-A	Pregnancy-associated plasma protein-A
IGF-I; IGF-II	Insuline – like growth factor –typ I, typ II
IGFBP-4	Insuline – like growth factor binding protein - 4
BF	bromfenolová modř
bp	base pair (pár bází)
cDNA	mRNA komplementární DNA
AK	aminokyselina
dATP	deoxyadenintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
EDTA	Ethylendiaminetetraoctová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
proMBP	Proform of major basic protein
HLE	Human leukocyte elastase
hs-CRP	hs-C reaktivní protein
IU	Mezinárodní jednotky
TNF- α	Tumor necrosis factor - α
IL-1 β	Interleukin-1 β
INF- γ	Interferon- γ
mRNA	messenger RNA (informační RNA)
M	Marker
KO	Kontrola
NAD	nikotinamidifosfát
ddNTP	Dideoxiribonukleotidtrifosfát
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RE	restrikční endonukleáza
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkriptáza
SDS	Dodecylsulfát sodný
T _a	Temperature of annealing (teplota annaelingu)
T _m	Temperature of melting (teplota tání)
HLE	Human leucocyte elastase (humánní leukocytární elastasa)
BSA	Bovine Serum Albumin (bovinní sérový albumin)

1. Úvod

Pregnancy – associated plasma protein – A (PAPP-A); též nazývaný pappalysin či IGFBP-proteasa - je vysokomolekulární protein, původně objevený v plazmě těhotných žen. PAPP-A štěpí IGFBP-2, 4 a 5 (insulin – like growth factor binding protein), a tím zvyšuje biodostupnost IGF (insulin – like growth factor) hlavního růstového faktoru (Laursen et al. 2001).

PAPP-A je používán ke screeningu Downova syndromu v 1. trimestru těhotenství (trisomie 21 chromosomu), Edwardsova syndromu (trisomie 18 chromosomu) a Patauova syndromu (trisomie 13 chromosomu) (Zima 2004; Wojdemann et al. 2006).

Teprve v posledních letech se ukazuje že tento protein má mimořádný význam také u mužů a negravidních žen (v koncentracích cca 100x nižších než v těhotenství; u žen nebývají hladiny PAPP-A ovlivněny menstruačním cyklem). Takto se dá využít jako nový marker akutního koronárního syndromu, ischemické choroby srdeční a patogeneze aterosklerózy (Beaudeau et al. 2003; Qin et al. 2006). Mírné zvýšení PAPP-A měřené supersenzitivními metodami je typické pro zjišťování nestabilní anginy pectoris a u akutního infarktu myokardu. Zvýšená exprese byla prokázána také v erodovaných rupturovaných aterosklerotických pásech, přičemž exprese ve stabilních plátech byla minimální. Sérové koncentrace PAPP-A korelují s echogenitou aterosklerotických plátů u symptomatických pacientů s hyperlipidémií (Zima 2004).

Také se mimo jiné účastní hojivých procesů při poranění kůže a má nemalý podíl na správném vývoji plodu a správném vývoji placenty (Zima 2004).

Cílem této práce bylo získání cDNA tohoto genu pro *in vitro* produkci cílového proteinu tak, aby byly zachovány jeho antigenní vlastnosti.

2. Teoretická část

2.1. PAPP-A

PAPP-A, Pregnancy-Associated Plasma Protein A, je placentární glykoprotein, který byl objeven v séru těhotných žen. Jeho fyziologická hladina se zvyšuje s gestačním stářím. Dřívější názory byly takové, že PAPP-A obsahuje pouze jeden polypeptidový řetězec, později bylo objeveno, že obsahuje dva odlišné řetězce v ekvimolárním množství. Jeden z těchto řetězců představuje PAPP-A a druhý je tvořen silně glykosylovanou podjednotkou proMBP (proform of eosinophil major basic protein), jenž je zapojen do obranných reakcí organismu. Více než 99 % cirkulujícího proteinu se vyskytuje vázáno pomocí disulfidických můstků jako tetrametr: 2x PAPP-A + 2x proMBP (Oxvig et al. 1994). V séru těhotných žen jsou tak přítomny dvě hlavní složky PAPP-A (m.h. 200 000) a proMBP (m.h. 2x 39 000). Sacharidy, včetně kyseliny uronové, tvoří 19 - 20% proteinu (Bischof 1979; Sivanandam et al. 2001). Tento komplex obsahuje zinek, a proto patří do rodiny metaloproteináz. Váže se i na heparin a je vychytáván chelatačními činidly (zinek) (Boldt et al. 2001). Je to endopeptidasa, která štěpí vazebné proteiny pro IGF (IGFBP-2, 4, 5), čímž modifikuje růstové procesy v těle (Oxvig et al. 1994; Laursen et al. 2001). PAPP-A obsahuje 1547 aminokyselin, 82 cysteinových reziduí. Gen kódující PAPP-A se skládá z 5423 bp a obsahuje 22 exonů. Tento gen se nachází na 9. chromozomu (9q33.1). Doposud bylo identifikováno čtrnáct variací tohoto proteinu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Zastoupení aminokyselin a sacharidů znázorňují Tab. 1. a Tab. 2 (Oxvig et al. 1994).

Tab. 1. Zastoupení aminokyselin v PAPP-A, proMBP a PAPP-A/proMBP

AK	PAPP-A		proMBP		PAPP-A/proMBP
	(mol %)	Rezidua	(mol %)	Rezidua	(mol %)
Asx	11,07	169	6,71	14	10,34
Thr	5,57	86	6,14	13	5,69
Ser	8,54	128	8,2	16	8,34
Glx	10,68	164	13,45	29	10,86
Pro	6,6	101	4,81	9	6,28
Cys	5,11	82	5,5	12	5,29
Gly	7,06	106	8,39	17	7,21
Ala	5,57	85	5,06	10	5,4
Val	6,54	101	5,79	12	6,39
Met	1,36	23	0,93	2	1,39
Ile	3,82	60	3,73	8	3,87
Leu	7,7	119	6,58	14	7,73
Tyr	3,37	53	2,8	6	3,43
Phe	3,75	58	3,44	7	3,72
Trp	1,81	27	3,93	8	1,92
His	3,75	60	2,65	5	3,66
Lys	3,75	61	2,85	5	3,78
Arg	3,95	64	8,05	19	4,71

Tab. 2. Sacharidové zastoupení v PAPP-A, proMBP a PAPP-A/proMBP .

Sacharid	PAPP-A	proMBP	PAPP-A/proMBP
Kyselina uronová	-	5,7	0,92
Xylosa	0,01	0,31	0,06
Fucosa	0,42	0,34	0,41
Mannosa	3,39	1,31	3,05
Glukosa	0,03	0,01	0,03
Galaktosa	1,87	9,56	3,11
N-Acetylglucosamin	4,52	15,74	6,34
N-Acetylgalaktosamin	0	1,43	0,23
N-Acetylneuraminová kyselina	3,09	4,18	3,27

2.1.1. Fyziologie PAPP-A

PAPP-A je fyziologicky produkován syncytiotrofoblastem, buňkami endometria, tlustého střeva, ledvin, Grafova folikulu, žlutého tělíska, varlat a je prokazatelný i v seminální tekutině (Oxvig et al. 1994).

Největší přínos má PAPP-A v průběhu těhotenství. V graviditě koncentrace stoupají již mezi 4. – 6. týdnem, přičemž na konci gravidity jsou hodnoty nejvyšší. V těhotenství produkuje protein PAPP-A do krve matky hlavně placenta a decidua (sliznice dělohy po celou dobu těhotenství – část z ní se podílí na vzniku placenty (Vokurka 2002).)

Předpokládaná funkce na rozhraní matka-plod je proteolýza IGFBP-4 a tedy lokální nárůst hladiny IGF v placentě, kde podporuje IGF–zprostředkovanou invazi trofoblastů do deciduy, podílí se také na regulaci steroidogeneze a na transportu aminokyselin a glukózy do choriových klků. IGFBP-4 proteolýza se odehrává na buněčné membráně trofoblastů, pravděpodobně k ní dochází zvýšením lokální biodostupnosti IGF pro příbuzné IGF membránové receptory (Sun et al. 2002; Giubuordenche et al. 2003).

Také v mozku byla zjištěna mRNA pro PAPP-A, ale zde se pravděpodobně nesyntetizuje v takovém množství, aby se protein dostal do cirkulace (Oxvig et al. 1994).

Při poranění se PAPP-A exprimuje ve fibroblastech a osteoblastech a zvyšuje hladinu IGF tím, že degraduje IGFBP-4. Aktivace proteinkinázy C v těchto buňkách vede k proteolýze IGFBP-4 a tím k uvolnění hojivých faktorů IGF-I a IGF-II. Biologická role komplexu PAPP-A/proMBP není dosud zcela jasná, ale nabízí imunosupresivní účinky, inhibuje komplement a částečně také inhibuje HLE (human leucocyte elastase) (Oxvig et al. 1994).

Komplex PAPP-A/proMBP je měřitelný i u negavidních žen a mužů. Takto se dá využít jako marker kardiovaskulárních onemocnění. Výrazný vzestup koncentrace v séru matky je od 7. týdne těhotenství a trvá po celou dobu gravidity (Oxvig et al. 1994)..

2.1.2. proMBP

ProMBP je fyziologický inhibitor volného PAPP-A, jeho mRNA se nachází v eosinofilech. V průběhu těhotenství jsou hlavním zdrojem placentární X-buňky (septální buňky odvozené z trofoblastu). Syntetizuje se jako pre-proMBP (222 aminokyselin), který je prekurzorem vysoce bazického a cytotoxického MBP. Prvních 15 aminokyselin představuje signální sekvenci a dalších 207 aminokyselin tvoří vlastní proMBP (typický pro cirkulaci u gravidních žen). Molekula obsahuje kyselou část o 90 aminokyselinách.

Bazický zralý MBP – konečný produkt eozinofilů - obsahuje 117 aminokyselin. ProMBP o m.h. 39 000 tvoří v těle komplexy s PAPP-A (2 : 2) a s angiotenzinem (2 : 2) (Oxvig et al. 1994; Sivanandam et al. 2004).

2.1.3. Vztah PAPP-A k faktorům IGF-I, IGF-II a IGFBP-4

IGF je peptid, který hraje důležitou roli při podpoře buněčné diferenciaci, proliferaci a také je v průběhu gravidity nezbytný pro správný vývoj plodu a placenty. IGF-I je exprimován cytotrofoblasty v placentárních klcích. IGF-II je silně syntetizován v intermediálních trofoblastech, zvláště pak v přední části přiléhající k deciduu. IGF-I je významný pro steroidogenezi v syncytiotrofoblastu, pro transport glukózy a aminokyselin do placentálních klků. IGF-II usnadňuje invazi extravilárních trofoblastů do decidua. IGF mají hypoglykemizující účinek, působí však i na růst, na nervový systém, na růst chondrocytů a skeletu, ovlivňuje angiogenezi aj. Na buněčné membráně trofoblastů je místem jejich účinku IGF-receptor (Vokurka 2002; Sun 2002).

Dostupnost IGF je regulována pomocí IGFBP-4, který vykazuje vysokou afinitu i vysokou specifitu k IGF a hraje tak důležitou roli v mnoha systémech (reprodukce, těhotenství, formování kostí a hojivé procesy, regulace funkce placenty). V průběhu těhotenství je IGFBP-4 produkován převážně na matčině straně decidua. Biodostupnost IGFBP-4 není ovlivňována pouze syntézou *de novo*, ale také jeho odbouráváním pomocí specifické proteázy PAPP-A (Sivanandam et al. 2004).

2.1.4. Význam PAPP-A v patologii a diagnostice chorob

2.1.4.1. PAPP-A a detekce vrozených vývojových vad

U některých chromosomálních abnormalit plodu bylo popsáno snížení PAPP-A v séru matky. U žen, které měly hladinu PAPP-A v 8. - 14. týdnu těhotenství o patnáct procent nižší, se zvýšilo riziko potratu, riziko velmi předčasného porodu, předčasného porodu, preeklampsie a narození mrtvého dítěte (Smith 2002; Ozer et al. 2005).

Z těchto důvodů se využívá vyšetření PAPP-A (a hCG-beta) ve screeningu vývojových vad plodu mezi 9-13. týdnem gravidity (tzv. kombinovaný test - společně s nuchální translucencí, senzitivita kombinovaného testu se pohybuje kolem 75-90 % při falešné pozitivitě <1%). V 1. trimestru gravidity je tento test používán ke screeningu Downova syndromu (trisomie 21 chromosomu), kde jsou jeho hodnoty sníženy (navíc je zvýšena hladina *inhibinu A*) (Bersinger et al. 2003), dále u Edwardsova syndromu (trisomie 18 chromosomu) a Patauova syndromu (trisomie 13 chromosomu), kdy hodnoty PAPP-A jsou

ve druhém trimestru významně sníženy (zatímco hodnoty inhibinu A jsou zachovány v normálu) (Wojdemann 2006). Výhodou vyšetření PAPP-A (společně s hCG-beta) oproti klasickému vyšetření (triple test v 13. týdnu gravidity) je tedy i nižší procento falešně pozitivních nálezů. Po vyšetření v prvním trimestru by samozřejmě mělo následovat i vyšetření v trimestru druhém (klasický triple test) (Wald 1999).

2.1.4.2. PAPP-A a cévní choroby

Protože je PAPP-A „prozánětlivý“ enzym s potenciální úlohou v procesu aterosklerózy, byla jeho koncentrace zkoumána v souvislosti se vznikem koronárních příhod. Bylo zjištěno, že pacienti s akutním koronárním syndromem mají hodnoty PAPP-A zvýšeny (hodnoty PAPP-A korelují s koncentrací hs-CRP a IGF-1) (Ozer et al. 2005). Zdá se, že zvýšené hodnoty PAPP-A u asymptomatických pacientů s významnou aterosklerózou mohou být vhodným markerem vysokého kardiovaskulárního rizika (ukazatelem nestability plátů, vzniku koronárních syndromů, ischemických mozkových příhod, atd.) (Crea, Andreotti. 2005) Hodnoty PAPP-A >10 mIU/l jsou z tohoto pohledu vysoce rizikové. Dnešní metody stanovení jsou schopny poskytnout až 90% senzitivitu a 81% specifitu (Beaudeau et al. 2003; Qin et al. 2006).

2.1.4.3. PAPP-A a poraněná tkáň

PAPP-A se vyskytuje jak v intaktní tak v poškozené kůži. Proces hojení poraněné kůže vyžaduje různé růstové faktory k regulaci normální odpovědi na poranění. Je mnoho důkazů o tom, že systém IGF má zvláštní úlohu v tomto procesu. Biologický účinek IGF je ovlivňován rodinou šesti IGF-vázajících proteinů (IGFBP). Některé studie, jak *in vitro* tak *in vivo*, prokázaly, že je PAPP-A rozhodující činitel pro buněčnou proliferaci jako odpověď na poranění a následné zánětlivé procesy (Reich et al. 2006).

PAPP-A indukuje proteolýzu IGFBP a tím v těchto buňkách umocňuje IGF-stimulaci růstu. Po poranění vzrůstá exprese PAPP-A v dermální vrstvě a tím se aktivují okolní fibroblasty a makrofágy (Oxvig et al. 1994; Reich et al. 2006).

Bylo prokázáno, že TNF- α , IL-1 β a IFN- γ mají vliv na expresi PAPP-A. TNF- α a IL-1 β jsou velmi silné stimulanty exprese genu v lidských fibroblastech. Již dvě hodiny po stimulaci pomocí TNF- α a IL-1 β se exprese PAPP-A mRNA významně zvýší (10 – 16 x vyšší). 48 hodin po stimulaci je ještě prokazatelný vliv TNF- α na expresi PAPP-A mRNA (3 – 4 x vyšší), ale 48 hodin po stimulaci pomocí IL-1 β je již exprese mRNA snížena až na bazální produkci (Oxvig et al. 1994; Reich et al. 2006).

Tento způsob regulace se dá prokázat měřením hladiny proteinu v kondiciovaném médiu. Experimenty, které se zabývaly odpovědí exprese na koncentraci TNF- α , ukázaly, že maximální účinnost je dosažena přibližně 1nM TNF- α u IL-1 β je tato hladina přibližně 30pM. Ve srovnání se stimulací exprese pomocí TNF- α a IL-1 β , má IFN- γ spíše inhibiční účinky s maximální účinností při koncentraci 1nM. IFN- γ je schopen zcela inhibovat stimulační účinky IL-1 β , ale nemá významný inhibiční vliv na stimulaci pomocí TNF- α . Z toho vyplývá, že mechanismus působení těchto látek na expresi genu, je odlišný. Kompletní inhibici lze dosáhnout také přidáním aktinomycinu D. Podobný způsob stimulace, jako je ve fibroblastech, můžeme pozorovat i ve svalových buňkách cév. Ačkoliv jsou fibroblasty a svalové buňky cév nepochybně hlavním zdrojem PAPP-A a cílem cytokinů, přesto jim mohou přispívat i jiné buněčné komponenty např. mikrořegy (Oxvig et al. 1994).

2.2. Použité metody

2.2.1. Izolace nukleových kyselin

Izolace je prvním krokem při práci s nukleovými kyselinami. Slouží k získání DNA (případně RNA) v nativním stavu z přirozeného materiálu v dostatečném množství a dostatečné čistotě. Nukleové kyseliny je třeba zbavit všech látek, které by mohli bránit účinnému a specifickému působení enzymů používaných při další práci s nukleovými kyselinami. Metoda je založena na změně rozpustnosti jednotlivých složek přirozeného materiálu pomocí určitého sledu jak chemických (detergenty, fenol, ethanol ...) tak enzymatických reakcí. V závislosti na tom, zda je cílem izolace DNA nebo RNA, se nežádoucí typ nukleové kyseliny odstraní příslušnou nukleázou a purifikační postup se opakuje.(Rozsypal et al. 2002; Ausubel et al. 1999).

2.2.2. Reversní transkripce

Reverzní transkriptázy se používají pro svou 5' \rightarrow 3' DNA polymerázovou aktivitu především k transkripci mRNA do cDNA. Substrátem však může být i DNA. Tak jako jiné DNA-polymerázy vyžaduje i reverzní transkriptasa k zahájení své činnosti DNA nebo RNA primer. Nejčastěji používanou variantou je oligo(dT)₁₂₋₁₈, tehdy se přepisuje všechna eukaryontní mRNA. Má-li být přepisována mRNA o známé sekvenci, užívá se primeru komplementárního ke 3' konci kódující části mRNA v délce obvykle 12 – 18 nukleotidů.Reverzní transkriptázy postrádají 3' \rightarrow 5' exonukleázovou aktivitu, pomocí níž by mohly odstraňovat chybně vložené nukleotidy (Sambrook a Russell 2001). Dalším

faktorem při výběru reverzní transkriptázy je reakční teplota. Protože velké molekuly RNA mají tendenci tvořit tzv. vlásenky, lze vyšší teplotou reakce dosáhnout rozrušení těchto sekundárních struktur. V současnosti se nejčastěji používají dva typy reverzních transkriptáz:

AMV (avian myeloblastosis virus) – RT izolovaná z viru ptačí myeloblastózy účinná i při teplotách nad 70 °C.

MoMLV (Moloney murine leukemia virus) – RT izolovaná z viru myší leukémie. Optimální teplota pro reakci je 37°C (Sambrook a Russell 2001). Někteří výrobci nabízejí modifikované AMV a MoMLV RT bez RNasa H aktivity. Posledně zmíněnou jsme použili při přípravě naší cDNA (Ausubel et al. 1999).

2.2.3. Měření koncentrace nukleových kyselin spektrofotometricky

Koncentraci a čistotu nukleových kyselin lze zjistit změřením absorbance při 260 nm (A_{260}) a 280 nm (A_{280}). Absorbance $A_{260} = 1$ jednovláknové RNA odpovídá koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$ a absorbance $A_{260} = 1$ dvouvláknové DNA odpovídá koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Tento poměr odpovídá měření nukleových kyselin rozpuštěných ve vodě.

Vztah pro výpočet koncentrace je:

$$c_{RNA} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{A_{260} \cdot 40}{D \cdot 1000} \quad c_{DNA} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{A_{260} \cdot 50}{D \cdot 1000}$$

kde D je ředění (např. zředí-li se roztok 50x, pak $D = 0,02$)

Čistotu nukleových kyselin lze vyjádřit poměrem $A_{260}:A_{280}$. Tento poměr je závislý na pH vody. V tomto nepufrovaném prostředí by se čistota měla být v rozsahu 1,5 - 1,9. V pufrovaném prostředí (pH = 7,5) 10 mM Tris.Cl je tento poměr v rozsahu 1,8 - 2,1.

2.2.4. Klonování

Klonováním DNA (klonováním genů) se rozumí tvorba klonů DNA tj. klon je soubor identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA, připravených např. množением rekombinantních molekul DNA v hostitelské buňce in vivo nebo pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) in vitro. Jako rekombinantní molekula se označuje taková molekula, která je vytvořená in vitro spojením cizorodé DNA a klonovacím vektorem. Klonovacím vektorem se rozumí taková molekula DNA, která je schopna se spojit s cizorodou molekulou DNA a s ní se autonomně replikovat v hostitelské buňce. Cizorodá DNA je jakýkoliv úsek DNA vložený do klonovacího vektoru. Tato DNA se nazývá insert (Rozsypal et al. 2002).

Klonování zahrnuje tři základní kroky:

- přípravu rekombinantní molekuly DNA
- přenos rekombinantní molekuly do hostitelské buňky
- selekci klonů obsahujících rekombinantní DNA

2.2.4.1. Příprava rekombinantních molekul DNA

Před vložením DNA do klonovacího vektoru je třeba vektor i vkládanou DNA vhodně upravit. Tyto úpravy spočívají především v úpravě konců vkládané DNA. Vzájemná komplementarita konců klonované DNA a naštěpeného vektoru zaručuje mnohem vyšší účinnost začlenění insertu než fragmentu se zarovnanými konci (též tupými nebo slepými) (Sambrook a Russell 2001).

Nejčastěji se komplementární konce připravují naštěpením vektoru a vkládaného fragmentu restriktivními endonukleasami, které tyto tzv. lepidivé konce tvoří. Výběr restriktázy závisí především na zvoleném plazmidu, který nabízí omezený počet restriktivních míst. Rozpoznávací sekvence pro restriktázy na klonovaném fragmentu mohou být již přítomny, jestliže se klonuje produkt z PCR, která byla prováděna s primery, při jejichž navrhování se s použitím daných restriktivních endonukleáz počítalo (Ausubel et al. 1999).

Podle povahy kohezivních konců je nutné přistoupit k dalším opatřením. Nejschůdnější situací je případ, kdy konce na jedné molekule (klonovaném fragmentu nebo insertu) nejsou komplementární. Pravděpodobnost recirkularizace vektoru bez vložení insertu je pak minimální. Vzájemně nekomplementární konce vzniknou, jestliže jsou použity dvě různé restriktázy (Sambrook a Russell 2001).

2.2.4.2. Ligace

Ligace představuje specifické spojování fragmentů DNA. K tomuto účelu se využívají enzymy, buď DNA ligasa bakteriofága T4 nebo méně účinná DNA ligasa E. coli. Tyto enzymy se liší v požadavcích na kofaktory. T4 DNA ligasa využívá jako zdroj ATP, zatímco DNA ligasa z E. coli využívá NAD. Oba tyto enzymy katalyzují tvorbu fosfodiesterových vazeb mezi sousedními 3'-hydroxylovými a 5'-fosfátovými konci v DNA.

T4 DNA ligasa je jediným dostupným enzymem, který účinně spojuje jak fragmenty s přečnívajícími komplementárními konci, tak i fragmenty s tupými konci. (Některé protokoly uvádějí, že lze zvýšit účinnost ligace přidáním RNA ligasy bakteriofága T4.)

DNA ligasa z *E. coli* není schopna za normálních reakčních podmínek spojovat tupé konce, ale produkuje nižší frekvenci chyb při spojování komplementárních konců – tj. má vyšší specifitu při spojování přečnávajících komplementárních konců (Rozsypal et al. 2002).

2.2.4.3. Transformace buněk

Přenesením rekombinantního plazmidu do bakterií (transformace) a jejich namnožením lze získat rekombinantní plazmid ve velkých množstvích. Nejčastěji to jsou buňky kmenů *E. coli*. Jedním ze způsobů přenosu je transformace. Transformací tepelným šokem jsou buňky nejprve uvedeny působením chloridu vápenatého a vyhladováním za chladu do tzv. stavu kompetence, v němž jsou po zahřátí schopny přijmout exogenní DNA. Dalším možným způsobem je elektroporace, při níž se buňky v roztoku obsahujícím rekombinantní DNA vystaví krátkému elektrickému pulzu o vysokém napětí, kterým jsou v buněčné stěně vytvořeny póry, jimiž DNA vstoupí do buněk (Sambrook a Russell 2001).

Po přenosu plazmidových molekul do hostitelské buňky je třeba tyto buňky identifikovat a odlišit je od buněk bez plazmidů a buněk do nichž byl plazmid přenesen bez cizorodé DNA. Jak již bylo zmíněno výše, téměř všechny plazmidy používané dnes v molekulárním klonování, obsahují sekvence pro selekci různými antibiotiky. Tak lze odlišit buňky, které přijaly nějaký plazmid (ať už s cizorodou DNA nebo bez) od buněk bez plazmidu. V praxi se tato selekce provádí růstem na půdách obsahujících příslušné antibiotikum (Ausubel et al. 1999).

2.2.4.4. Selekcce klonů

Odlišení buněk s rekombinantním plazmidem se provádí na základě několika metod. K těm nejčastějším patří alfa-komplementace. Vektor nese krátký segment laktóзовého operonu *E. coli* obsahující regulační sekvence a část genu (*lacZ*), jehož expresí vzniká aminoterminální fragment β -galaktozidázy. Do kódující sekvence je začleněno mnohočetné klonovací místo, které nepřerušuje čtecí rámeček. Vektory tohoto typu jsou používány v hostitelích, které kódují karboxyterminální fragment β -galaktozidázy. Ani jeden z polypeptidových fragmentů není sám o sobě aktivní, mohou se však spojovat za vzniku enzymově aktivního proteinu (tzv. alfa-komplementace). Bakterie, do nichž je přenesen plazmid bez insertu, tvoří aktivní β -galaktozidasu, jejíž tvorbu lze prokázat na plotnách s chromogenním substrátem 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktozidem (X-gal). Jeho rozkladem β -galaktozidasou vzniká produkt zbarvující bakteriální kolonie modře. Inzerce cizorodé DNA do klonovacího místa inaktivuje aminoterminální fragment

enzymu a ke komplementaci nedojde. Kolonie buněk s rekombinantním plazmidem jsou pak bílé. Indukce tvorby β -galaktozidázy je zajištěna izopropyl- β -D-tiogalaktózidem (IPTG), který se přidává do živného média. Další možností pro selekci buněk s rekombinantním plazmidem je tzv. inzerční inaktivace. Klonovací místo je umístěno v genu zodpovědném za rezistenci k antibiotiku. Inzerce cizorodé DNA do vektoru vede ke ztrátě funkce tohoto genu a buňky nesoucí rekombinantní plazmid se stanou k antibiotiku citlivé, čímž je lze odlišit od buněk obsahujících vektor bez cizorodé DNA, které jsou k antibiotiku rezistentní. V praxi se tato metoda provádí přetisknutím kolonií na plotny, které jsou obohaceny o dané selekční antibiotikum (Ausubel et al. 1999).

2.2.5. Produkce proteinů in vitro

2.2.5.1. Expresní systémy pro produkci rekombinantních proteinů

Obecně lze postup exprese rekombinantních proteinů vyjádřit takto: prvním krokem exprese cizího genu je inzerce tohoto genu do expresního vektoru, následuje přenos rekombinantního vektoru do vhodných hostitelských buněk, kultivace těchto buněk a indukce exprese. Konečným krokem je lýza buněk a SDS-PAGE analýza k ověření přítomnosti proteinu. Po produkci proteinu následuje jeho purifikace (Rozsypal et al. 2002).

Bakterie *E. coli* jsou v molekulární biologii velmi často používány jako hostitel pro produkci velkého množství proteinu kódovaného klonovaným genem. Jsou vhodným expresním systémem umožňujícím snadnou genetickou manipulaci. *E. coli* se rychle množí a rostou v nenáročných kultivačních médiích. Při expresi cizích genů v hostitelských buňkách *E. coli* je možné aplikovat velký výběr transkripčních a translačních kontrolních elementů. Při pečlivém výběru hostitelského kmene, vektorů a podmínek kultivace lze většinu rekombinantních proteinů v hostitelských buňkách *E. coli* klonovat a produkovat s vysokým výtěžkem. Optimální podmínky exprese jednotlivých proteinů je nutné stanovit empiricky. Expresi je možno provádět i v jiných expresních systémech jako jsou např. kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) nebo ve hmyzích buňkách (Sambrook a Russell 2001).

Na rozdíl od bakterií i kvasinek se v případě živočišných buněk proces vnesení izolované DNA nazývá transfekce, neboť pojem transformace v souvislosti s živočišnými buňkami znamená změnu vedoucí k jejich nekontrolovanému růstu (vzniku nádorových

buněk). Pro účinnou expresi je třeba zajistit umístění příslušného genu za silný promotor, který bude v použitých buňkách rozpoznán. Kromě promotoru je exprese závislá na enhancerech. Podobně jako v jiných případech se i zde používají selekční markery. Promotory mohou, ale také nemusí obsahovat TATA box (úsek DNA ležící v eukaryotickém promotoru v poloze -34 až -26 od startovacího nukleotidu, po navázání transkripčního faktoru je tato sekvence rozeznávána polymerasou (Vokurka 2002)).

Řadu let se používají promotory cytomegaloviru a simian viru 40 (SV 40). Sekvence, která zvyšuje výtěžek eukaryotické exprese, je polyadenylátový úsek, jehož připojení na 3'-konec je determinováno polyadenylačním místem (sekvence AAUAAA), které stabilizuje mRNA.

Obecně můžeme odlišit dva typy exprese:

Jedním způsobem je exprese genu integrovaného do chromosomu recipientních buněk. Zde bývá výhodou získání buněčné linie zajišťující stabilní (byť nižší) expresi.

Druhým způsobem je tzv. transientní exprese zajištěná transkripcí z přítomného plasmidu. Tento postup zpravidla zajišťuje větší míru exprese ale pouze po krátkou dobu a je závislý na počtu přítomných kopií plasmidu.

Klíčové vlastnosti většiny transientních expresních systémů jsou krátká doba pro produkci proteinu (dny), stabilita produktu, aplikovatelnost na širokém okruhu hostitelských buněk (M. Rumlová. 2003).

2.2.5.2. Klonovací plazmidy pro produkci rekombinantních proteinů

Klonovací vektory jsou kružnicové DNA o velikosti 2 – 15 kb schopné autonomní replikace, odvozené zejména od plazmidů a virů. Většina nových vektorů obsahuje kombinace sekvencí různého původu, včetně sekvencí eukaryotických chromozómů a sekvencí připravených uměle. K základním typům vektorů patří plazmidové vektory, vektory odvozené z bakteriofága lambda, kosmidy, vektory odvozené od bakteriofága M13, umělé kvasinkové chromozomy (YACs) (Rozsypal et al. 2002).

Účinnost přenosu plazmidu do buňky je nepřímě úměrná její velikosti. Menší plazmidy se snadno izolují a v buňkách dosahují vysokého počtu kopií. Plazmidy by se měly snadno a účinně přenášet do hostitelských buněk a měly by stabilně udržet klonovanou DNA při replikaci a uchovávání klonů (Ausubel et al. 1999).

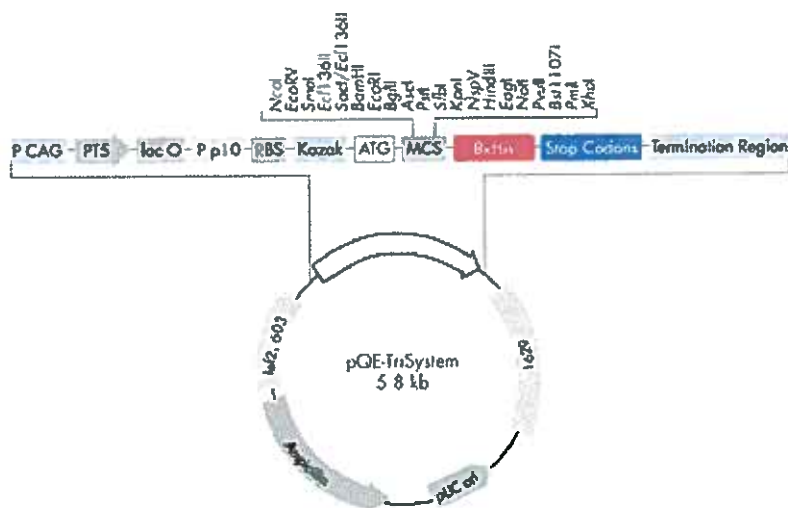
Plazmidy mají ve své sekvenci obsaženy geny, na základě jejichž fenotypového projevu je možné buňky nesoucí plazmid snadno vyselektovat. Nejčastěji se používají

geny, které buňkám propůjčují rezistenci k antibiotikům. Dalším úsekem je tzv. polyklonovací místo (polylinker) – úsek, který obsahuje více rozpoznávacích sekvencí pro RE. Jedinečnost těchto míst v plazmidu umožňuje začlenění klonované DNA. (Rozsypal et al. 2002).

Vybrané příklady expresních vektorů

pQE-Trisystem

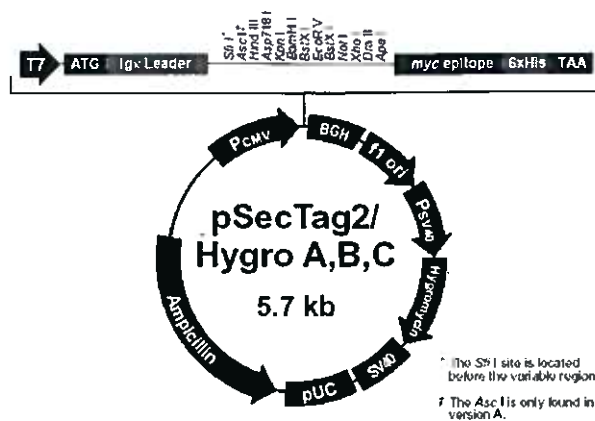
pQE-Trisystem (Obr. 4) je expresní vektor vhodný pro expresi rekombinantních proteinů. Tento vektor lze použít pro tři různé buněčné systémy: bakteriální, hmyzí a savčí buňky. Pro expresi proteinů v bakteriálním systému je v plazmidu využíván PT5 promotor a lac operon pro indukci exprese. Ve hmyzích buňkách je využita homologní sekvence AcNPV viru a silný p10 promotor. Dále je využíván pro expresi v savčích buňkách, čehož je dosaženo pomocí fúzního CMV-enhancer- β -aktin-promotoru a na něj navazující Kozakovy sekvence zahrnující ATG start kodon pro iniciaci translace. Purifikaci proteinu umožňuje polyhistidinová sekvence vložená za polyklonovací místo.



Obr. 4 pQE-TriSystem vektor slouží k produkci proteinů v bakteriálních, hmyzích a savčích buňkách (QIAGEN)

pSecTag2hygro

Plazmid pSecTag/HygroC je expresní vektor navržený pro stabilní expresi a sekreci proteinů v savčích buňkách (Obr.5). Protein je exprimován z tohoto plazmidu jako fúzní protein, na N-konci s myší signální sekvencí odvozenou z Ig kappa řetězce pro sekreci proteinu do média. Na C-konci obsahuje myc-epitop pro detekci proteinu pomocí specifické protilátky a šest histidinových zbytků pro purifikaci proteinu. Gen pro rezistenci k hygromycinu umožňuje selekci v savčích buňkách.



Obr. 5: pSecTag2HygroC slouží k produkci v savčích buňkách (Invitrogen)

2.2.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Vedle postupů založených na klonování ve vektorech lze molekuly amplifikovat rovněž technikou označovanou jako polymerázová řetězová reakce neboli PCR. Její podstatou je opakující se enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA, ke které dochází po připojení dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'OH konce směřují proti sobě. Jako primery se používají dva uměle připravené krátké oligonukleotidy o délce zhruba 18 - 30 bází, odvozené z koncových sekvencí DNA určené k amplifikaci. Po přidání termostabilní polymerázy a nukleotidů, probíhá syntéza nových řetězců na obou matricových řetězcích protisměrně. Tato metoda, která znamenala revoluci v metodice molekulární biologie, poskytuje až 10^6 násobné pomnožení během 2 – 3 hodin (Ausubel et al. 1999).

Tato reakce probíhá ve třech krocích :

1. denaturace dvouřetězcových molekul DNA (při teplotě : 94 – 98°C)
2. připojení primerů k odděleným DNA-řetězcům (při teplotě : 30 - 65°C)
3. polymerizační reakce (při teplotě : 65 - 75°C)

a vyžaduje :

- a) 2 oligonukleotidové primery komplementární k 3'-koncovým sekvencím obou komplementárních řetězců úseku, jenž má být amplifikován.
- b) Cílovou DNA, která slouží jako templát pro reakci. Jedná se o úsek izolované dvojřetězcové DNA, který zahrnuje sekvenci vymezenou oběma primery.
- c) Termostabilní DNA polymerasu, stálou i při teplotě 95°C.
- d) Směs všech čtyř deoxyribonukleotidů.
- e) Vhodný reakční pufr obsahující Mg^{2+} ionty, které jsou nezbytné pro aktivitu DNA polymerasy . (Rumlová et al. 2003)

Přesné časové intervaly a teploty se musí optimalizovat podle délky amplifikovaného úseku DNA a konkrétní sekvence primerů. Pro zahájení reakce stačí jen velmi malé množství molekul (teoreticky jediná), následně dochází ke zdvojení počtu molekul a následnému exponenciálnímu nárůstu počtu pomnoženého úseku DNA. Je tedy nutné zdůraznit, že pro PCR je nutno znát sekvence alespoň hraničních úseků fragmentu, který má být amplifikován. Pokud využíváme k namnožení DNA nejen PCR reakci ale i klonování v buňkách *E. coli*, stává se, že v průběhu replikace DNA dochází k chybnému vkládání nukleotidů, proto můžeme využít *proofreading* polymerázu, která dokáže pomocí své exonukleázové aktivity opravit malé mutace. Tato metoda dnes našla široké uplatnění v mnoha oborech. Reakce probíhá v zařízení nazývaném termocykler, což je programovatelný termostat, který musí být schopen rychlého a přesného přechodu mezi jednotlivými teplotami (Rozsypal et al. 2002)..

2.2.7. Hybridizace

Hybridizace je spojování jakýchkoliv dvou jednořetězcových nukleových kyselin (tedy DNA i RNA), které musí mít buď úplnou nebo částečnou komplementaritu bází. Této schopnosti se využívá k vyhledávání nukleotidových sekvencí v genových knihovnách a v cytologických preparátech, při mapování genomu, v diagnostice chorob atd. Hybridizační reakce lze provádět buď s izolovanými nukleovými kyselinami v roztoku, nebo po jejich přenosu na pevné podklady, nebo s DNA a RNA nacházejícími se v preparátech buněk a tkání. My jsme tuto metodu využívali prakticky při každé manipulaci s DNA, ať už při metodě PCR (začlenění primeru), klonování nebo při konečném spojení celého genu (Sambrook a Russell 2001).

2.2.8. Elektroforéza

Gelová elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a proteinů. Principem elektroforetické reakce je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny.

Z praktických důvodů se elektroforéza neprovádí přímo v roztoku ale na vhodném nosiči a tím bývá nejčastěji gel a to buď polyakrylamidový na menší úseky nukleových kyselin (100 – 1000 bp) nebo agarózový na delší segmenty nukleových kyselin (několik set – 50 kb). Tyto gely vytváří složitou síťovitou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. Rychlost pohybu

molekul je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Délku nukleové kyseliny si můžeme ověřit pomocí fragmentů o známé velikosti, které se nazývají *standards velikosti* neboli *hmotnostní standardy*.

Po proběhnutí elektroforézy je třeba identifikovat polohy rozdělených molekul, které nejsou pouhým okem viditelné, a proto se využívá zviditelnění vhodným barvivem – nejčastěji etidiumbromidem. Toto barvivo se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA a vytváří s ní komplex, jenž v ultrafialovém světle červeně fluoreskuje (Rozsypal et al. 2002)..

2.2.9. Sekvence DNA

Cílem sekvenování je stanovení primární struktury DNA. Základním požadavkem pro sekvenování je získat molekuly DNA s přesně definovanými konci. Nejčastěji používaným výchozím materiálem pro sekvenování DNA jsou proto restriční fragmenty klonované do vhodného klonovacího vektoru nebo fragmenty získané pomocí PCR.

Sekvenování se provádí dvěma způsoby, a to:

1. chemicky –

Podstatou této metody je specifické štěpení molekuly DNA chemickými činidly v místech baze určitého typu.

2. enzymaticky –

Provede se sekvenační reakce, která obsahuje DNA polymerázu a směs čtyř normálních dNTP. Některý z prekurzorů (nebo v některých případech primer) je radioaktivně značen pomocí ³²P,³³P,³⁵S či neradioaktivně fluorescenční značkou. Reakční směs také obsahuje malé množství 2',3'-ddNTP, který nese 3'-H atom místo 3'-OH skupiny. Jestliže je tato molekula inkorporována do rostoucího DNA řetězce, pak absence 3'-OH skupiny zajistí, že další růst řetězce je zcela nemožný. Když přidáme malé množství ddNTP do reakční směsi pro syntézu DNA, pak nastane kompetice mezi začleněním dNTP (prodlužování) a vzácným ale specifickým ddNTP (ukončení). Produktem této reakce je směs oligonukleotidových řetězců, jejichž délka je určena vzdáleností mezi 5'-koncem, na které nasedá primer, a 3'-koncem, který končí ddNTP. Použitím čtyř různých ddNTP (označených různou značkou nebo barvou) v reakční směsi získáme řetězce o různé délce zakončené na místě příslušného ddNTP (ddATP; ddTTP...). Tuto směs můžeme separovat pomocí elektroforézy a také můžeme autoradiograficky nebo pomocí fluorescence zjistit primární strukturu. Tak můžeme přečíst sekvenci genu ve směru 5'-3'-konec (Sambrook a Russell 2001).

3. Cíl práce

1. Získání cDNA PAPP-A

- 1.1. Vyhledání sekvence a návrh primerů pro jednotlivé PCR reakce
- 1.2. Reverzní transkripce s univerzálním a specifickým primerem z buněk placenty a HEP2 buněk

2. Namnožení jednotlivých úseků DNA

- 2.1. pappa_C = začátek genu
- 2.2. pappa_B = střed genu
- 2.3. pappa_II = konec genu

↓

- 2.4. Hybridizace úseků pappa_B a pappa_C → pappa_BC s následnou PCR reakcí

3. Klonování do plazmidu pCR4Blunt-TOPO

- 3.1. Vložení insertu pappa_II do pCR4Blunt-TOPO → pCR4Blunt/pappa_II
- 3.2. Vložení insertu pappa_BC do pCR4Blunt-TOPO → pCR4Blunt/pappa_BC

4. Klonování do plazmidu pQE-Trisystem

- 4.1. vložení pappa_II do plazmidu pQE-Trisystem
 - 4.1.1. Modifikace konců pappa_II sekvence pomocí PCR s primery pro vložení míst pro enzymy EcoR I a Xho I
 - 4.1.2. vložení insertu pappa_II do pCR4Blunt-TOPO → pCR4Blunt/pappa_II
 - 4.1.3. vložení insertu pappa_II pomocí enzymů EcoR I a Xho I do plazmidu pQE-Trisystem a příprava plazmidu pQE-Trisystem → pQE/pappa_II
- 4.2. vložení pappa_BC pomocí enzymů Bgl II a Xma I do plazmidu pQE/pappa_II_ex → pQE/pappa

5. Klonování do plazmidu pSecTag2/HygroC

- 5.1. Vložení insertu pappa_BC do plazmidu pCR4Blunt/pappa_II_in → pCR4Blunt/pappa
- 5.2. Modifikace konců PAPP-A sekvence pomocí PCR s primery pro vložení míst pro enzymy Hind II a Not I
- 5.3. Vložení insertu pappa_HN do pSecTag2/HygroC → pSecTag2/pappa_HN.

4. Experimentální část

Materiál

Buněčné a bakteriální kultury

bakteriální kmen *Escherichia coli* DH5 α , Clontech Laboratories, USA

růstová média a chemikálie pro kultivace bakterií: DIFCO, Francie: Tryptone peptone,

Bacto agar, Yeast extract

růstová média a chemikálie pro kultivace savčích buněk, PAA Laboratories, Rakousko:

DMEM, Ham's F12, fetální hovězí sérum, 10x DPBS, gentamicin

Kity pro molekulární biologii, plazmidy, enzymy a chemikálie

RNA izolovaná z lidské placenty a HEP-2 buněk (ve spolupráci s Katedrou farmakologie FaF)

Kity pro molekulární biologii:

Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Kit; Invitrek, Německo

QIAGEN plastid MIDI Kit; QIAGEN; Německo

DNA - Pure[™] Clean Up Kit; CPG, USA

Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit for Sequencing; Invitrogen, USA

BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, USA

DyeEX 2.0 Spin kit, QIAGEN, Německo

Elisa kit PAPP-A, Imunotech, ČR

Plazmidy:

pSecTag2/HygroA,B,C; Invitrogen, Německo

pQE-Trisystem; QIAGEN, Německo

Enzymy:

chemikálie pro PCR a ligaci:

T4 DNA (400 U/ml) ligasa; New England BioLabs, USA

Isis[™] DNA Polymerase (1U/ μ l), Q-Bio, Finsko

Finnzymes Phusion[™] (2U/ μ l), High-fidelity DNA polymerase, Finsko

M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H- 200U/ μ l, Finsko

primery pro PCR amplifikace insertů; GENERI BIOTECH, ČR

Restrikční enzymy:

New England BioLabs, USA:

BamH I, Bgl II, BstX I, EcoR I, Hinc II, Hind III, Nco I, Not I, Sca I, Xho I, Xma I, Xmn I

reakční pufr (10x): NEB2, NEB3, NEB4, pufr *BamH I*, *EcoRI*, *Udd*

10x BSA (10 mg/ml)

Markery molekulových hmotností:(mapy uvedeny v příloze č. 4)

100 bp Ladder; New England BioLabs, USA

1 kb Ladder; New England BioLabs, USA

1 kb Ladder; MBI Fermentas, Litva

Chemikálie

Agaróza pro DNA elektroforézu; Serva, Německo

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-gal); Serva, Německo

Disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA); Serva, Německo

Etanol; Lachema, ČR

Ethidium bromid; Sigma, Německo

Glycerol; Sigma, Německo

Hydroxid sodný; Lachema, ČR

Isopropylthiogalaktosid (IPTG); Serva, Německo

Kanamycin; Sigma, Německo

Kyselina boritá p.a.; Lachema, ČR

Kyselina chlorovodíková; Lachema, ČR

β -merkaptoetanol, Sigma, Německo

Sodná sůl bromfenolové modři; Serva, Německo

Sodná sůl ampicilinu; Serva, Německo

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; Lachema, ČR

Přístroje

centrifuga IEC Micromax (max.21000 x g), IEC, USA

chlazená centrifuga 4K15 (rotor č.11150 - max. 5525 x g), Sigma, Německo

chlazená centrifuga IEC Micromax RF (max.21000 x g), IEC, USA

inkubátor TCH 100, Laboratorní Přístroje Praha, ČR

kamera OCD, Ultra Lum, USA

laboratorní váhy AND HF200G a EK600H, AND, Japonsko

laminární box Fatran, ČR

mikrovlnná trouba, Electrolux, Francie
mrazicí box -70°C, Forma Scientific, USA
mrazicí boxy -20 °C, Ardo, Zanussi
sekvenátor ABI PRISM 3100, Applied Biosystems, USA
spektrofotometr na mikrotitrační destičky LM01A, Meopta, ČR
sterilní box AURA 2000 B.S., Bioair Instruments, Itálie
termoblok 285, IncuBlock™, Denville Scientific
termocyklér OmnigeneTR3 CM220, Hybaid, Velká Británie
termocykléry PTC 200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, USA
s blokem pro teplotní gradient
s dvěma bloky
tiskárna Video Grafic Printer, Sony, USA
třepací inkubátor, New Brunswick Scientific, USA
třepáčky (vortex) TK3S, TechnoKartell, Itálie
UV transluminátor, Ultra Lum, USA
UV-VIS spektrofotometr Cintra 10e, GBC, Austrálie
zařízení pro demineralizaci vody Milli-Q, Millipore, Francie
zařízení pro výrobu ledu GB 902, Brema Ice Makers, Itálie
zdroje elektrického proudu Power Pac 200 a Power Pac 300, BioRad, USA

Pomůcky

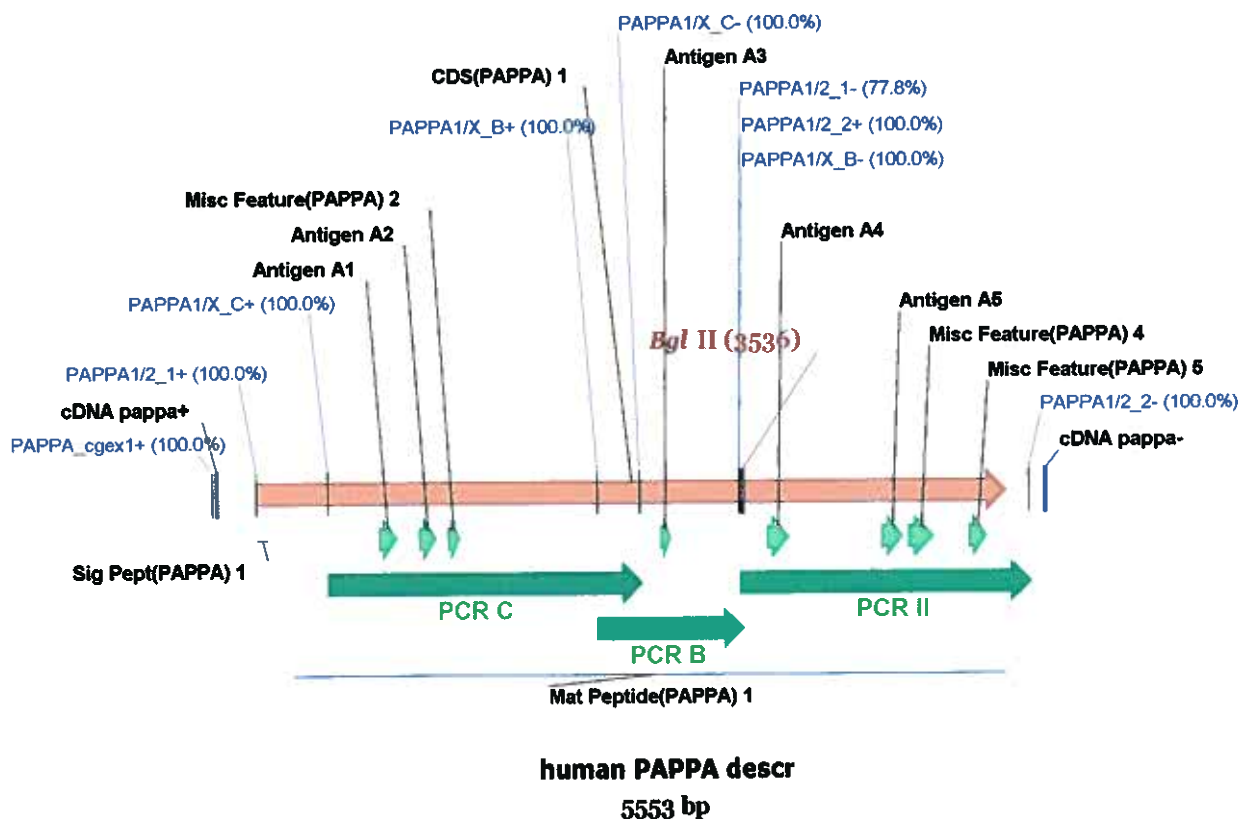
Erlenmayerovy baňky, kádinky, odměrné válce
latexové rukavice, nitrilové rukavice pro práci s ethidiumbromidem
mikrobiologické kličky, očkovací hokejky
mikropipety (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl) Kartell, Německo, Eppendorf,
Německo
mikrozskumavky (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml) Starstedt, Německo
Pertiho misky
pipetovací špičky, Starstedt, Německo
plynový kahan
sterilní párátka, pinzeta
sterilní serologické pipety, Corning, Německo a TPP, Švýcarsko
sterilní tuby (15 ml, 50 ml) TPP, Švýcarsko
sterilní kultivační lahve, misky, destičky pro tkáňové kultury, TPP, Švýcarsko

zařzení pro horizontální elektroforézu Hoefer HE 33, Hoefer Scientific Instruments, USA
 TaKaRa RecoChip, TaKaRa, Japonsko

4.1. pracovní postupy

4.1.1. Získání cDNA PAPP-A

DNA sekvence byla vyhledána pomocí internetové databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information). Sekvence všech primerů pro amplifikaci požadovaných genů byly navrženy na našem pracovišti pomocí počítačového programu Vector NTI® Suite. Navržené primery a místa jejich nasednutí znázorňuje Obr. 6. Zkoušeli jsme namnožit celou cDNA pomocí PCR reakce, což se nepovedlo, neboť se cDNA pro svou velikost nepomnožila. Namnožení cDNA se nezdařilo, ani když jsme cDNA zkusili pomnožit tak, aby se nám pomocí navržených primerů namnožila na dvě části. Optimální se ukázalo namnožení na tři úseky.



Obr. 6. PAPP-A mRNA lidské placenty. Modře jsou znázorněny primery, které jsme použili k namnožení jednotlivých úseků mRNA, černě jsou vyznačeny antigenní domény, červeně je vyznačen restriční enzym Bgl II, který jsme použili pro konečné složení genu (navrženo programem Vector NTI®).

4.1.1.1. Izolace celkové RNA pomocí RNeasy® Mini kitu

Tento kit je vhodný pro izolace celkové RNA z malých množství vzorků živočišných tkání a živočišných buněk. Lýza buněk je založena na použití guanidinium izothiokyanátu. RNA se izoluje technologií vazby RNA na silikagelovou membránu, ze které je následně eluována.

Celková RNA byla izolována z HEP 2 buněk. Ty byly kultivovány v DMEM médiu s 5% FBS a gentamicinem (50 µg/ml) v 25 cm² láhvi přisedlé při 37°C v atmosféře CO₂. Po trypsinizaci byly resuspendovány v 5 ml média a spočítány v Bürkerově komůrce. Potom byly buňky stočeny a sediment byl použit k izolaci. Izolaci z lidské placenty jsme provedli ve spolupráci s Katedrou farmakologie, FaF UK HK.

Postup izolace:

1. Sedimentované buňky byly resuspendovány v 350 µl RLT pufru do něhož bylo před použitím přidáno 3,5 µl β-merkptoethanolu.
2. Na vortexu se buňky homogenizovali 2 minuty.
3. Přidali jsme 350 µl ethanolu (70%) k homogenizovanému lyzátu a použitím pipety byla směs promíchána.
4. 700 µl vzorku se vpravilo na kolonku (RNeasy mini spin column), která byla předtím vložena do sběrné zkumavky (2-ml collection tube). Ta se po vyprázdnění použila v dalším kroku.
5. 700 µl pufru RW1 bylo nanášeno na kolonku a zcentrifugováno 15 sec při více jak 8000x g.
6. Kolonka byla vložena do nové sběrné zkumavky. Na kolonku se napipetuje 500 µl RPE pufru a 15 sec se centrifuguje při více jak 8000g. Sběrná zkumavka byla po vyprázdnění použita v dalším kroku.
7. Bylo nanášeno 500 µl RPE pufru na kolonku a centrifugovalo se 2 min při maximálních otáčkách.
8. Kolonku byla přenesena do nové sběrné zkumavky (1,5-ml collection tube) a na membránu bylo nanášeno 50µl vody prosté nukleáz. Aby se RNA vymyla, kolonka byla centrifugována 1 min při 8000x g.

4.1.1.2. Reverzní transkripce s univerzálním a specifickým primerem

Do autoklávované zkumavky jsme přidali 3,5 µl RNA, primer 1,25 µl (odpovídá 50 pmol) a směs jsme doplnili vodou prostou RN-ázy tak, aby bylo 15 µl směsi celkem. Směs jsme nechali inkubovat při 71 °C po dobu 5 minut. Ihned poté jsme ji uložili na led.

Zkumavku jsme stočili. Doplnili jsme vodu na 20 μ l. Ještě na ledu jsme přidali 0,5 μ l Rnasin (inhibitor), 5,0 μ l DTP, 2,5 μ l 10x pufr pro reverzní transkriptázu a nakonec jsme přidali reverzní transkriptázu M-MuLV RT, směs jsme opatrně promíchali a nechali jsme ji inkubovat 2 hodiny při 37 °C. Tuto reakci jsme provedli pro dva druhy RNA a to pro RNA placenty a pro RNA HEP2 buněk. Pro placentu jsme vybrali dva druhy primerů : oligo dT primer 98R6 (stejně jako u HEP2 buněk) a cDNA-pappa 180R8 primer. (Tab.3)

Tab.3 Složení reakčních směsí pro jednotlivé reverzní transkripce (v μ l).

Vzorek č.1

templát	RNA placenty (1 ng)
primer	oligo dT primer 98R6 (50 pmol/ μ l)

Vzorek č.2

templát	RNA placenty (0,29 μ g/ μ l)
primer	cDNA-pappa 180R8 (50 pmol/ μ l)

Vzorek č.3.

templát	RNA buněk HEP2 (0,2 μ g/ μ l)
primer	oligo dT primer 98R6 (50 pmol/ μ l)

Program nám pro namnožení pomohl vybrat a navrhnout primery PAPP1/X_C+ (*206S4) a PAPP1/X_C- (*206S5), PAPP1/X_B+ (*206S2) a PAPP1/X_B- (*206S3), PAPP1/2_2+ (*18515) a PAPP1/2_2- (*18516).

4.1.2. Namnožení jednotlivých úseků DNA

4.1.2.1. pappa_C = začátek genu

Pro amplifikaci části pappa_C jsme vybrali tyto primery: PAPP1/X_C+ (*206S4) a PAPP1/X_C- (*206S5). Bližší popis jednotlivých primerů je znázorněn v tabulce 4.

Tab.4 Zvolené primery PAPP1/X_C+ a PAPP1/X_C- a jejich charakteristika.

PAPP1/X_C+ (*206S4)		
délka : 20 bp	T _m = 61,7 °C	GC : 50,0 %
sekvence : 5'- GGC ATT CAC ACC ATC AGT GA -3'		
PAPP1/X_C- (*206S5)		
délka : 22 bp	T _m = 61,7 °C	GC : 50,0 %
sekvence : 5'- CAG TGG GAC ATC ACA GAA GAC A -3'		

Pro reakci jsme si zvolili jako templátovou NK cDNA lidské placenty a cDNA HEP-2 buněk. Teplota annealingu navržená programem byla 61,7 °C. Délka očekávaného produktu je 2052 bp. Pro nejvhodnější průběh PCR reakce jsme zvolili různé teploty (61,1; 63,2; 64,5 °C) annealingu a různou koncentraci Mg²⁺ iontů (1,5 a 3,0 mM). Složení reakční směsi uvádí Tab. 5.

Tab.5 Složení reakční směsi pro PCR pappA C (v μ l).

H ₂ O	10,5	9	úvodní denaturace :	95 °C	2 min
Pufr	1,5	1,5	denaturace :	95 °C	20 s
MgCl ₂	0	1,5	annealing :	58-65 °C	1 min
dNTP	2	2	polymerace :	72 °C	2 min
PAPPA1/X_C+	0,2	0,2	počet cyklů :	30 x	
PAPPA1/X_C-	0,2	0,2	závěrečná polymerace :	72 °C	10 min
Isis Pol	0,6	0,6			
DNA	1,4	1,4			

Produkty jsme po amplifikaci nanесли v množství 15 μ l reakční směsi a 3 μ l BF na 1% na agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas. Namnoženou DNA jsme izolovali z gelu pomocí metody TaKaRa RecoChip.

Izolace DNA z gelu metodou TaKaRa RecoChip

Po předchozí elektroforéze jsme přenesli agarózový gel na UV lampu. Před vybraným úsekem DNA (tj. dále od jamek) jsme gel rozřízli pomocí přiloženého nože a do vzniklé mezery jsme opatrně vložili TaKaRa RecoChip membránu. Gel jsme opět odnesli na elektroforézu. Po cca 5 min se DNA nachytala na membránku, membránu jsme vytáhli pinzetou a vložili do 2 ml zkumavky. Tu jsme centrifugovali při 5000 rpm po dobu 5 s. Takto lze získat 30 – 50 μ l DNA.

4.1.2.2. pappA_B = střed genu

Druhý pár primerů, PAPPA1/X_B+ (*206S2) a PAPPA1/X_B- (*206S3), jsme navrhli tak, aby amplifikoval střed genu. Primer PAPPA1/X_B- obsahuje sekvenci, která umožňuje štěpení pomocí enzymu Bgl II, čehož využijeme v pozdějším klonování. Úsek jsme pojmenovali pappA_B. Bližší popis jednotlivých primerů je znázorněn v tabulce 6.

Tab.6 Zvolené primery PAPPA1/X_B+ a PAPPA1/X_B- a jejich charakteristika.

PAPPA1/X_B+ (*206S2)		
délka : 20 bp	T _m = 59,9 °C	GC : 50,0 %
sekvence : 5'- TCG TGA AGC AGA AGG TCA TC -3'		
PAPPA1/X_B- (*206S3)		
délka : 26 bp	T _m = 59,9 °C	GC : 46,2 %
sekvence : 5'- AGA TCT ATC ACC TTG GTT CGA ACA AC -3'		

Jako templátovou DNA jsme zvolili cDNA lidské placenty a cDNA HEP-2 buněk. Optimální reakční teplota je 59,9 °C, délka produktu je 954 bp. Pro vhodnější průběh PCR reakce jsme zvolili různé teploty annealingu (60,0; 62,2 a 64,0°C) a různou koncentraci Mg²⁺ iontů (1,5 a 3,0 mM). Složení reakční směsi je stejné jako v minulém případě

(Tabulka 5) cyklus jsme nechali proběhnout 35x. Po amplifikaci byly produkty naneseny v množství 15 µl reakční směsi a 3 µl BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas. DNA jsme izolovali z gelu pomocí metody TaKaRa RecoChip.

4.1.2.3. pappa_II = konec genu

Třetí pár primerů, PAPP1/2_2+ (*18515) a PAPP1/2_2- (*18516), byl navržený tak, aby množil konec genu. Produkt jsme pojmenovali pappa_II. Bližší popis jednotlivých primerů je znázorněn v tabulce 7.

Tab.7 Zvolené primery PAPP1/2_2+ a PAPP1/2_2- a jejich charakteristika.

PAPP1/2_2+ (*18515)		
délka : 20 bp	T _m = 61,8 °C	GC : 55,0 %
sekvence : 5'- AGG TGT GTC GAA CCA AGG TG -3'		
PAPP1/2_2- (*18516)		
délka : 20 bp	T _m = 61,8 °C	GC : 55,0 %
sekvence : 5'- CCA ATG TGA GTC CTT CCT GG -3'		

Jako templátová DNA byla zvolena cDNA lidské placenty a cDNA HEP-2 buněk. Optimální reakční teplota je 61,8 °C, délka produktu je 1900 bp. Pro vhodnější průběh PCR reakce jsme zvolili různé teploty annealingu (58,0; 60,0; 62,2; 64,0 °C). Složení reakční směsi je stejné jako v minulém případě (Tabulka 5). Cyklus jsme nechali proběhnout 35x. Po amplifikaci jsme produkty nanesli na 1% agarózový gel s ethidium bromidem v množství 15 µl reakční směsi a 3 µl BF. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas. DNA jsme izolovali z gelu pomocí metody TaKaRa RecoChip.

4.1.2.4. Hybridizace úseků papp_B a papp_C → papp_{BC} s následnou PCR reakcí

Hybridizaci papp_B a papp_C umožnil překryv sekvence obou namnožených PCR fragmentů, jenž je znázorněn na Obr.7.

		PAPPA1/X _{B+} →				
2551	CCCAATGCC	TGCAGCCC	CAGGACACTG	GAGCCC	CTT GAGTAA	
	GGGTTACGGG	ACGTCGGGTA	GTCCTGTGAC	CTCGGGAGCA	CTTCGTCTTC	
2601	CTGA	TGTTGAACAG	CCCTGTAAGT	CCAGTGTC	CACCTGGAGC	
	CAGTAGGACT	ACAACCTTGT	GGGACATTCA	GGTCACAGGC	GTGGACCTCG	
2651	CCAAATTCAG	CTGTCAACCC	ACACACGGTT	CCTCCAGCCT	GCCCTGAGCC	
	GGTTTAAGTC	GACAGTTGGG	TGTGTGCCAA	GGAGGTCGGA	CGGGACTCGG	
2701	TCAAGGCTGC	TACCTCGAGC	TGGAGTTCCT	CTACCCCTTG	GTCCCTGAGT	
	AGTTCCGACG	ATGGAGCTCG	ACCTCAAGGA	GATGGGGAAC	CAGGGACTCA	
2751	CTCTGACCAT	TTGGGTGACC	TTTGTCTCCA	CTGACTGGGA	CTCTAGTGGA	
	GAGACTGGTA	AACCCACTGG	AAACAGAGGT	GACTGACCCT	GAGATCACCT	
2801	GCTGTCAATG	ACATCAAAC	GTTGGCTGTC	AGTGGGAAGA	ACATCTCCCT	
	CGACAGTTAC	TGTAGTTTGA	CAACCGACAG	TCACCCTTCT	TGTAGAGGGA	
2851	GGGTCCCTCAG	AATGTCTTCT	GTGATGTCCC	ACTGACCATC	AGACTCTGGG	
	CCCAGGAGTC	TACAGGAGC	GATGAGGAGC	TTGGTAG	TCTGAGACCC	
		← PAPPA1/X _C				

Obr. 7 Sekvence mRNA, jenž znázorňuje překryv úseků papp_C a papp_B. Tato část sekvence (červeně) nám umožnila hybridizovat části papp_B a papp_C. modře jsou vyznačena místa pro příslušné primery. (navrženo programem Vector NTI®)

Hybridizaci jsme provedli ihned po úvodní denaturaci přímo v reakční směsi pro PCR papp_{BC}. Pro namnožení celého úseku „BC“ jsme programem Vektor NTI® vybrali pro tuto reakci nový pár primerů : pQE_papp_{C+} (*213Z5) a již použitý PAPPA1/X_{B-} (*206S3). Charakteristika primerů je uvedena v tabulce 8.

Tab.8 Zvolené primery pQE_papp_{C+} a PAPPA1/X_{B-} a jejich charakteristika.

pQE_PAPPA_C+ (*213Z5)		
délka : 25 bp	T _m = 64 °C	GC : 60 %
sekvence : 5'-CCC GGG GCA TTC ACA CCATCA GTG A- 3'		
PAPPA1/X_B- (*206S3)		
délka : 26 bp	T _m = 59,9 °C	GC : 46,2 %
sekvence : 5'- AGA TCT ATC ACC TTG GTT CGA ACA AC -3'		

DNA, kterou jsme použili pro PCR reakci, je produkt předchozích PCR reakcí – papp_B a papp_C v hmotnostním poměru 1 : 2. Zvolená optimální teplota pro tuto reakci byla 64 °C, délka předpokládaného produktu papp_{BC} představuje 2713 bp. Pro

optimalizaci reakce jsme zvolili různé koncentrace Mg²⁺, a to 1,5 a 3,0 mM Mg²⁺.
Reakční profil a složení směsi uvádí Tab. 9.

Tab.9 Složení reakční směsi hybridizaci pappA B s pappA C a PCR pappA BC (v µl).

H ₂ O	26,4	22,4	úvodní denaturace :	95 °C	3 min
Pufr	4	4	hybridizace :	72 °C	30 s
MgSO ₄	0	4	denaturace :	95 °C	20 s
dNTP	2	2	annealing :	64 °C	1 min
pQE pappA C+	0,8	0,8	polymerace :	72 °C	3 min
PAPPA1/X B-	0,8	0,8	počet cyklů :	35 x	
Isis Pol	2	2	závěrečná polymerace :	72 °C	10 min
DNA	4	4			

Po amplifikaci byly produkty nanášeny v množství 40 µl reakční směsi a 6 µl BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder. DNA jsme izolovali z gelu pomocí metody TaKaRa RecoChip.

4.1.3. Klonování do plazmidu pCR4Blunt-TOPO

4.1.3.1. Vložení insertu pappA_{II} do pCR4Blunt-TOPO

Jako templátovou DNA jsme vybrali purifikovanou pappA_{II}, kterou jsme získali v předešlé PCR reakci při syntéze pomocí primerů PAPPA1/2₂₊ (*18515) a PAPPA1/2₂₋ (*18516). Tento insert (pappA_{II}) jsme vložili do vektoru pCR4Blunt-TOPO. Takto jsme dostali plazmid pCR4Blunt/pappA_{II}. Tento plazmid jsme zaklonovali do kompetentních buněk DH5-α.

Ligace

Dle Tab. 10 jsme smíchali vodu, insert a vektor a nechali jsme ji 20 minut stát při pokojové teplotě. Poté jsme přidali roztok CaCl₂ a směs jsme nechali 5 minut stát na ledu. Složení ligační směsi uvádí Tab. 10.

Tab.10 Složení ligační směsi (v µl).

		1.	2.
insert	pappA _{II}	1,5	4
salt solution		0,5	1
sterilní voda		0,5	0
vektor	pCR4Blunt-TOPO	0,5	1
celkový objem		3	6

Plazmid pCR4Blunt/pappA_{II} jsme vložili pomocí transformace do kompetentních ONE SHOT buněk, k selekci jsme použili kanamycin.

Transformace

Ke 3 μl ligační směsi jsme přidali 27 μl vody, promíchali a poté jsme přidali roztok kompetentních buněk a směs jsme nechali stát 30 minut na ledu. Během této doby jsme si předehřáli agarové misky s příslušným antibiotikem (Ampicilin o koncentraci 50 mg/ml pro low-copy plasmidy; 100 mg/ml pro high-copy plasmidy nebo Kanamycin o koncentraci 50 mg/ml pro plazmid pCR4Blunt-TOPO) a SOC médium, rozdělené po 1 ml, na 37 °C. V cykléru jsme provedli tepelný šok okamžitým zahřátím směsi na 42 °C po dobu 90 s. Poté jsme směs ihned přenesli na 5 – 10 minut na led. Buňky jsme přidali do SOC média a nechali jsme ji inkubovat ve vodorovné poloze 1 hodinu při 37 °C na třepačce. Směs jsme centrifugovali 2 minuty při 5000 rpm, vytvořila se nám peleta. Odpipetujovali jsme 700 – 800 μl a ve zbytku média jsme peletu rozpustili. Vyžíhanou hokejkou jsme nanесли kulturu na předehřáté agarové misky a nechali jsme ji inkubovat přes noc při 37 °C. Druhý den jsme kolonie přenesli sterilním párátkem na novou agarovou misku s antibiotikem (předehřátou na 37°C). Párátka jsme poté vhodili do tuby se 2 ml předehřátého LB média s antibiotikem. Misky jsme přes noc uložili k inkubaci při 37 °C, 2 ml tuby s LB médiem jsme nechali za stálého třepání inkubovat též při 37 °C přes noc. Z narostlých kultur jsme vyizolovali DNA, kterou jsme použili při ověření vložené sekvence.

Média a půdy:

SOC médium: 0,5 % (w/v) yeast extract; 2 % (w/v) trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM MgSO₄; 20 mM glukóza (100 kPa, 120 °C, 20 min)

LB médium: 0,5 % (w/v) yeast extract; 1 % (w/v) tryptone; 0,5 % (w/v) NaCl
Příprava: Promíchali jsme 5M roztok NaOH, upravili jsme pH na 7,0 a 20 min jsme ho autoklávovali (100 kPa, 120 °C, 20 min)

LB agar: na 1 litr LB média 15 g agarózy nebo bacto-agaru; ampicilin jsme přidali po autokláfování (100 kPa, 120°C, 20 min) a zchladnutí pod 50°C.

Izolace DNA po transformaci pomocí Kitu Invisorb® Spin Plasmid Mini Kitu

1. *E. coli* vyrostlé v jedné kolonii na pevné půdě jsme přeočkovali do 2 ml LB média s ampicilinem a nechali jsme ji kultivovat přes noc při 37°C v třepacím inkubátoru.
2. Ráno jsme bakterie zcentrifugovali 15 min při 5500x g za teploty 4°C. Supernatant jsme odstranili pečlivým odsátím a bakteriální peletu jsme resuspendovali ve 200 μl nesuspendačním roztoku

3. Přidali jsme 250 μ l lyzačního roztoku a pomalou inverzí jsme směs promíchali. (Tento krok nemá trvat déle než 5 min, aby nedošlo k lyze chromozomální DNA, která by se v případě rozštěpení nesrážela a kontaminovala by plazmidovou DNA.)
4. Přidali jsme 250 μ l stop roztoku a pomalou inverzí jsme směs promíchali. Potom jsme směs zcentrifugovali při maximálních otáčkách 3 min.
5. Supernatant jsme vložili do kolonky, přidali jsme 200 μ l spojovacího roztoku. Obrácením zkumavky s kolonkou jsme směs promíchali. Zcentrifugovali jsme ji 30 sec při 9500x g.
6. Filtrát jsme odstranili a kolonku jsme dali 750 μ l promývacího pufru PL. Zcentrifugovali jsme ji 30 sec při 9500x g.
7. Abychom odstranily zbytky promývacího pufru, centrifugovali jsme směs při maximálních otáčkách.
8. Kolonku jsme vložili do čisté zkumavky a na kolonku jsme nanесли 50 μ l elučního pufru. Po 2 min inkubování při laboratorní teplotě jsme směs 1 min centrifugovali při 9500x g.

Ověření klonování

Ověření jsme provedli pomocí restričních enzymů, které štěpí plazmid na úseky o známé délce. Tuto pak snadno odečteme po elektroforéze z gelu. K ověření jsme použili po pěti koloniích z každé misky. Jako kontrolní enzymy jsme vybrali BstX I a Nco I. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 11.

Tab.11 složení reakční směsi pro ověření klonování (v μ l).

Enzymy	BstX I		Nco I	
	0,1	1	0,1	1
10x pufr	1,5	15	1,5	15
10x BSA	0	0	0	0
Voda	10,4	1,4	10,4	104
DNA	3		3	
NEB pufr	3		4	
°C	55		37	
Fragmenty (bp)	tam:4548;1105;201 zpět:4241;1412;201		tam:3650;1595;609 zpět:2695;2550;609	
Kontrola (bp)	3767;976;436;33		linearizuje 5212	

Poznámka : Prázdný plazmid se oběma enzymy linearizuje na 3954 bp.

Po štěpení byly produkty nanесeny v množství 15 μ l reakční směsi a 3 μ l BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas. Takto jsme získali čistý plazmid pCR4Blunt/pappa_II_in (5212 bp).

4.1.3.2. Vložení insertu papp_a_BC do pCR4Blunt-TOPO

V této reakci je insertem hybridizovaný úsek papp_a_BC_{in}. Vektorem je pCR4Blunt-TOPO. Výsledný produkt jsme (pCR4Blunt/papp_a_BC_{in}) zaklonovali do kompetentních ONE SHOT buněk. Provedli jsme ligaci (postup viz výše). Složení ligační směsi udává Tab.12.

Tab.12 Složení ligační směsi (v μ l).

		1.	2.
insert	papp _a _BC _{in}	1,5	1,5
	salt solution	0,5	0,5
	sterilní voda	0,5	0,5
vektor	pCR4Blunt-TOPO	0,5	0,5
	celkový objem	3	3

Takto jsme si připravili pCR4Blunt/papp_a_BC_{in}. Tento plazmid jsme transformovali do DH5- α buněk. K této reakci jsme použili 2 μ l ligační směsi. Selekcii jsme provedli Kanamycinem (50 a 100 mg/ml). Kolonie jsme přenesli na novou misku a založili jsme si 2 ml tuby se zásobním roztokem. Poté jsme si klonování ověřili. K ověření jsme použili po čtyřech koloniích z každé misky. Složení reakční směsi a použité enzymy jsou uvedeny v tabulce 13.

Tab.13 složení reakční směsi pro ověření klonování (v μ l).

Enzymy	Xmn I		Nco I	
	0,05	0,5	0,1	1
10x pufr	1,5	15	1,5	15
10x BSA	1,5	15	0	0
Voda	7,95	79,5	9,4	94
DNA	4		4	
NEB pufr	2		4	
°C	37		37	
Fragmenty (bp)	tam:3412; 3255 zpět:4616; 2051		tam:2891;1775;1229;772 zpět:2875;1791;1229;772	
Kontrola (bp)	4611; 1395		3448; 1786; 772	

Poznámka: prázdný plazmid se oběma enzymy linearizuje na 3954 bp.

Po štěpení jsme produkty nanесли v množství 15 μ l reakční směsi a 3 μ l BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 2-Log DNA ladder NEB.

4.1.4. Klonování do plazmidu pQE-Trisystem

4.1.4.1. Vložení papp_a_II do plazmidu pQE-Trisystem

4.1.4.1.1. Modifikace konců papp_a_II sekvence pomocí PCR s primery provložením míst pro enzymy EcoR I a Xho I

Vložení restrikčních míst pro enzymy EcoR I a Xho I lze dosáhnout pomocí navržených primerů PAPP_A1/2_2_z TOPO+ (*206S0) a PAPP_A1/2_2_z TOPO- (*206S1), kde PAPP_A1/2_2_z TOPO+ obsahuje kódující sekvenci pro EcoR I a PAPP_A1/2_2_z TOPO- pro Xho I. Bližší charakteristiku primerů ukazuje Tab. 14.

Tab.14 Zvolené primery PAPP_A1/2_2_z TOPO+ a PAPP_A1/2_2_z TOPO- a jejich charakteristika.

PAPP _A 1/2_2_z TOPO+ (*206S0)		
délka : 25 bp	T _m = 64,5 °C	GC : 52 %
sekvence : 5'-GAA TTC GGT GTG TCG AAC CAA GGT G-3'		
PAPP _A 1/2_2_z TOPO- (*206S1)		
délka : 27 bp	T _m = 58,1 °C	GC : 59,3 %
Sekvence: 5'-CTC GAG TTT CCG GCT GTG TTC TTG GGC-3'		

Tučně je vyznačena kódující sekvence pro restrikční enzymy EcoR I a Xho I.

Jako maticí pro reakci jsme zvolili plazmid pCR4Blunt/papp_a_II_in z miniprepu (spin plastid MINI kit). Očekávaná délka produktu je 1723 bp. Optimální teplota annealingu je 64,5 °C. Pro optimalizaci jsme využili teplotní a koncentrační gradient. Zvolený gradient pro koncentraci Mg²⁺ představuje 1,5 a 3,0 mM roztok, pro teploty 62,3; 64,8 a 67,4 °C. Složení reakční směsi udává Tab. 15.

Tab.15 Složení reakční směsi pro PCR reakci (v µl).

H ₂ O	10,5	9	úvodní denaturace : 94 °C 2 min denaturace : 94 °C 30 s annealing : 60-68 °C 1 min polymerace : 72 °C 2 min počet cyklů : 30 x závěrečná polymerace : 72 °C 10 min
Pufr	1,5	1,5	
MgCl ₂	0	1,5	
dNTP	2	2	
PAPP _A 1/X B+	0,2	0,2	
PAPP _A 1/X B-	0,2	0,2	
Isis Pol	0,6	0,6	
DNA	1,4	1,4	

Po amplifikaci jsme produkty nanесли v množství 15 µl reakční směsi a 3 µl BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas. DNA jsme izolovali z gelu pomocí metody TaKaRa RecoChip.

Vložení insertu papp_{II}_ex do pCR4Blunt-TOPO

Jako templátová DNA byla zvolena purifikovaná papp_{II}_ex po namnožení pomocí primerů pro vložení restrikčních míst pro EcoR I a Xho I. Provedli jsme ligaci papp_{II}_ex do prázdného plazmidu pCR4Blunt-TOPO. Složení ligační směsi udává Tab. 16.

Tab.16 Složení ligační směsi (v μ l).

		1.	2.
insert	papp _{II} _ex	1,5	4
salt solution		0,5	1
sterilní voda		0,5	0
vektor	pCR4Blunt-TOPO	0,5	1
celkový objem		3	6

Připravili jsme si ligační směs a s tu jsme zaligovali do kompetentních ONE SHOT buněk. Selekcí jsme provedli ampicilinem (50 μ g/ml). Ověřili jsme pět kolonií z každé misky pomocí enzymů BamH I a Nco I. Složení restrikční směsi uvádí Tab. 17.

Tab.17 Složení reakční směsi pro ověření klonování pCR4Blunt/papp_{II}_ex (v μ l).

Enzymy	BamH I		Nco I	
	0,05	0,4	0,1	0,8
10x pufr	1,5	12	1,5	12
10x BSA	1,5	12	0	0
Voda	8,95	71,6	10,4	83,2
DNA	3		3	
NEB pufr	BamH I		4	
°C	37		37	
Fragmenty (bp)	5677		tam:3655; 2022; zpět:3122; 2555	
Kontrola (bp)	5019; 835		2695; 2550; 609	

Poznámka : BamH I neštěpí prázdný plazmid, Nco I linearizuje na 3954 bp.

Po štěpení byly produkty nanoseny v množství 15 μ l reakční směsi a 3 μ l BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas.

4.1.4.1.2. štěpení plazmidů pomocí enzymů EcoR I a Xho I → izolace papp_{II}_ex

Jako první krok jsme si připravili úsek DNA obsahující cílenou část genu papp_{II}_ex, který jsme následně vložili do produkčního plazmidu pQE-Trisystem. Tuto sekvenci získáme štěpením plazmidů pCR4Blunt/papp_{II}_ex a pQE-Trisystem pomocí restrikčních enzymů EcoR I a Xho I. Předpokládaná délka fragmentu papp_{II} je 1717 bp, plazmidu 5651 bp. Složení reakční směsi uvádí Tab. 18.

Tab.18 Složení reakční směsi pro štěpení plazmidu pomocí RE EcoR I a Xho I (v μ l).

Enzymy	pCR4Blunt/pappa_II_ex		pQE-Trisystem	
	EcoR I	Xho I	EcoR I	Xho I
	0,2	0,2	0,2	0,2
10x pufr	3		3	
10x BSA	3		3	
Voda	21,6		21,6	
DNA	2		2	
NEB pufr	EcoR I		EcoR I	
°C	37		37	
Fragmenty (bp)	1717 (12;12;3936)		5651bp	

Po štěpení jsme produkty nanесли v množství 30 μ l reakční směsi a 5 μ l BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas a DNA jsme izolovali z gelu pomocí metody TaKaRa RecoChip.

4.1.4.1.3. Vložení insertu *pappa_II* do plazmidu *pQE-Trisystem*

Získanou *pappa_II_ex* jsme zaligovali pomocí T4 DNA ligázy. Složení směsi udává Tab. 19.

Tab.19 Složení ligační směsi (v μ l).

DNA směs	30 ng insertu	45 ng insertu
vektor: pQE-Trisystem 50 ng	2,5 μ l	2,5 μ l
insert: <i>pappa_II_ex</i>	6	9
voda	8,5	5,5
pufr	2	2
T4 DNA ligasa	1	1
celkem	20	20

Smíchali jsme vodu, insert a vektor, po promíchání jsme přidali pufr a ligázu. Směs jsme nechali 20 minut stát při pokojové teplotě a pak jsme 3 μ l ligační směsi a 27 μ l vody použili pro transformaci do kompetentních DH5- α buněk. Selekcii jsme provedli Ampicilinem (50 μ g/ml). Provedli jsme ověření klonování pomocí enzymů BamH I a Hinc II (viz Obr.20). Složení kontrolní směsi znázorňuje tabulka 20.

Tab.20 Složení směsi pro ověření klonování (v µl).

Enzymy	BamH I		Hinc II	
	0,1	1	0,2	2
10x pufr	1,5	15	1,5	15
10x BSA	1,5	15	1,5	15
Voda	7,9	79	7,8	78
DNA	4		4	
NEB pufr	Udd		3	
°C	37		37	
Fragmenty (bp)	6350;999		4603;2746	
Kontrola (bp)	5766		3679;2087	

Po restrikci jsme produkty nanесли v množství 15 µl reakční směsi a 3 µl BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas.

4.1.4.2. vložení papp_a_BC_in do plazmidu pQE/papp_a_II_ex

Jako další krok jsme si připravili úsek DNA, který obsahuje část genu papp_a_BC_in. Tento úsek jsme vložili do produkčního plazmidu pQE/papp_a_II_ex. Sekvence, která umožnila zaklonování je zobrazena na Obr. 8.

3451	AGTATCTCAT	CAAGACCAGC	AATGCCCAGG	CTGGGTCATC	ATCGGACAGC
	TCATAGAGTA	GTTCTGGTCG	TTACGGGTCC	GACCCAGTAG	TAGCCTGTCC
		PAPPA1/2 2+-		BglII	
3501	CAGCAGCATC	CCAGGTGTGT	CGAACCAAGG	TCATAGATCT	CAGTGAAGGC
	GTCGTCGTAG	GGTCCACACA	GCTTGGTTCC	ACTATCTAGA	GTCACTTCCG
		- . PAPPA1/X_B-			
3551	ATTTCCCAGC	ATGCCTGGTA	CCCTTGCACC	ATCAGCTACC	CATATTCCCA
	TAAAGGGTCG	TACGGACCAT	GGGAACGTGG	TAGTCGATGG	GTATAAGGGT
3601	GCTGGCTCAG	ACCACTTTTT	GGCTCCGGGC	GTATTTTTCT	CAACCAATGG
	CGACCGAGTC	TGGTGAAAAA	CCGAGGCCCG	CATAAAAAGA	GTTGGTTACC

Obr. 8 Sekvence mRNA, jenž znázorňuje místo, které nám umožnilo složit celý gen. Zeleně je znázorněn úsek pro RE Bgl II, kterým jsme DNA sloučili. Modře jsou znázorněny místa pro příslušné primery. (navrženo programem Vector NTI®)

Cílenou část jsme si připravili štěpením plazmidu pCR4Blunt/papp_a_BC_in pomocí restrikčních enzymů Xma I a Bgl II. Předpokládaná délka fragmentu papp_a_BC_in je 2707 bp. plazmid 7322 bp (Tab. 21).

Tab.21 Složení reakční směsi pro štěpení plazmidu pCR4Blunt/pappa_BC_in (v µl).

	pCR4Blunt/pappa_BC		pQE/pappa_II_ex	
Enzymy	Xma I	Bgl II	Xma I	Bgl II
Enzymy	0,5	0,5	0,5	0,5
10x pufr	3	4	3	4
10x BSA	3	0	3	0
Voda	16,5	5,5	17,8	5,5
DNA	7	30	5,7	30
Celkem	30	40	30	40
NEB pufr	4	3	4	3
Fragmenty (bp)	2707 (3960)		7322	

Nejprve jsme plazmid štěpili pomocí enzymu Xma I při teplotě 37 °C přes celou noc. Následovala inaktivace enzymu při 65 °C po dobu 20 minut a purifikace na CPG kolonce.

Do zkumavky jsme nanесли 0,6 ml pryskyřice, kterou jsme před tím velmi opatrně promíchali. Zkumavku jsme stočili při 2900 rpm po dobu 1 min. Tekutinu jsme vylili a do středu pryskyřice jsme nanесли vzorek DNA. Kolonu jsme stočili (2900 rpm/5s). Takto jsme získali přečištěnou DNA.

Pak jsme teprve štěpili enzymem Bgl II při 37 °C přes noc. Po štěpení jsme produkty nanесли v množství 30 a 40 µl reakční směsi a 5-7 µl BF na 0,7% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas. DNA jsme izolovali z gelu pomocí metody TaKaRa RecoChip.

Ověření klonování plazmidu pQE/pappa

Získanou pappa_BC_in jsme použili pro ligaci a následné zaklonování do buněk DH5-α. Pro reakci jsme si zvolili T4 DNA ligázu. Složení reakční směsi uvádí Tab. 22.

Tab.22 Složení ligační směsi (v µl).

DNA směs	30 ng insertu	45 ng insertu
vektor: pQE/pappa_II_ex	3,3	3,3
insert: pappa_BC_in	2,8	4,2
voda	10,9	9,5
pufr	2	2
T4 DNA ligasa	1	1
celkem	20	20

Dle Tab. 22 jsme smíchali vodu, insert a vektor, po promíchání jsme přidali pufr a ligázu. Směs se nechala 20 minut stát při pokojové teplotě a pak se 3 µl ligační směsi a 27 µl vody použilo pro transformaci do kompetentních DH5-α buněk. Selekcce - Ampicilin (50 µg/ml). Udělali jsme miniprep pro čtyři kolonie z každé misky a provedly jsme ověření

jejich klonování pomocí enzymů Xho I a Xmn I. Složení kontrolní směsi znázorňuje tabulka 23.

Tab.23 Složení kontrolní směsi (v μ l).

Enzymy	Xho I		Xmn I	
	0,05	0,5	0,05	0,5
10x pufr	1,5	15	1,5	15
10x BSA	1,5	15	1,5	15
Voda	7,95	79,5	7,95	79,5
DNA	4		4	
NEB pufr	2		2	
°C	37		37	
Fragmenty (bp)	7518;2511		4392;;3453;2184	
Kontrola (bp)	5766		3582;2154	

Po restrikci jsme produkty nanесли v množství 15 μ l reakční směsi a 3 μ l BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas.

4.1.5. Plazmid pSecTag2/HygroC

4.1.5.1. vložení insertu papp_a_BC do plazmidu pCR4Blunt/papp_a_II → pCR4Blunt/papp_a

Připravili jsme si část obsahující cílený úsek genu papp_a_BC_{in}, který jsme následně vložili do plazmidu pCR4Blunt/papp_a_II_{in}. Tuto sekvenci jsme získali štěpením plazmidu pCR4Blunt/papp_a_BC_{in} pomocí restrikčních enzymů Not I a Bgl II. Předpokládaná délka fragmentu je 2726 bp. Připravili jsme si plazmid pCR4Blunt/papp_a_II_{in} štěpením pomocí stejných enzymů, předpokládaná délka je 5813 bp. Složení reakční směsi uvádí Tab. 24.

Tab.24 Složení reakční směsi pro štěpení plazmidu pCR4Blunt/papp_a_BC_{in} a pCR4Blunt/papp_a_II_{in} (v μ l).

Enzymy	pCR4Blunt/ papp _a _BC _{in}		pCR4Blunt/papp _a _II _{in}	
	Bgl II	Not I	Bgl II	Not I
	0,5	0,5	0,5	0,5
10x pufr	3		3	
10x BSA	3		3	
Voda	13		3	
DNA	10		20	
NEB pufr	3		3	
°C	37		37	
Fragmenty (bp)	2726 -3941		5813 -41	

Po štěpení jsme produkty nanесли v množství 30 μ l reakční směsi a 5 μ l BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas. DNA jsme izolovali z gelu pomocí metody TaKaRa RecoChip. Získanou papp_{BC}_in jsme použili pro ligaci a následné zaklonování do buněk. Pro reakci jsme si zvolili T4 DNA ligázu (NEB složení reakční směsi udává Tab. 25).

Tab.25 Složení ligační směsi (v μ l).

DNA směs	1.	2.
vektor: pCR4Blunt/papp _{II} _in	6	6
insert: papp _{BC} _in	11	8
voda	0	3
pufr	2	2
T4 DNA ligasa	1	1
celkem	20	20

Poté jsme 3 μ l ligační směsi a 27 μ l vody použili pro transformaci do kompetentních DH5- α . Buňky jsme selektovali Kanamycinem (50 μ g/ml). Ověřili jsme klonování pro 4 kolonie z každé misky pomocí enzymů Hinc II I a Xmn I. Složení kontrolní směsi znázorňuje tabulka 26.

Tab.26 Složení kontrolní směsi (v μ l).

Enzymy	Hinc II		Xmn I	
	0,2	2	0,1	1
10x pufr	1,5	15	1,5	15
10x BSA	1,5	15	1,5	15
Voda	7,8	78	7,9	79
DNA	4		4	
NEB pufr	3		2	
°C	37		37	
Fragmenty (bp)	5764;1243;1224; 308		4616;3923;	
Kontrola (bp)	5854		5854	

Po restrikci jsme výtěžek nanесли v množství 15 μ l reakční směsi a 3 μ l BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas.

4.1.5.2. Modifikace konců PAPP-A sekvence pomocí PCR s primery pro vložení míst pro enzymy Hind III a Not I

Vložení restrikčních míst pro enzymy Hind III a Not I lze dosáhnout pomocí navržených primerů PAPP_{HN}+ (*235E7) a PAPP_{HN}- (*235E8), kde PAPP_{HN}+

obsahuje kódující sekvenci pro Hind III a PAPPa_HN- pro Not I. Bližší charakteristiku primerů ukazuje tabulka 27.

Tab.27 Zvolené primery PAPPa_HN+ a PAPPa_HN- a jejich charakteristika.

PAPPa_HN+ (*235E7)		
délka : 30 bp	T _m = 61,5 °C	GC : 53,3 %
sekvence: 5'-CGA AGC TTG GGC ATT CAC ACC ATC		
AGT GAC-3'		
PAPPa_HN- (*235E8)		
délka : 29 bp	T _m = 61,5 °C	GC : 59,7 %
Sekvence: 5'-TTG CGG CCG CTT TCC GGC TGT GTT		
CTT GG-3'		

Tučně je vyznačena kódující sekvence pro restriční enzymy.

Jako templát pro reakci jsme zvolili plazmid pCR4Blunt/pappa linearizovaný pomocí enzymů Sca I, přečištěný na CPG kolonce a 20 x zředěný. Do reakce jsme přidali Phusion HF DNA polymerázu (Finnzymes). Předpokládaná délka produktu je 4420 bp. Optimální teplota annealingu je 61,5 °C. Pro zvýšení výnosu jsme využili teplotní gradient (61,0 a 64,0 °C). Složení směsi pro PCR reakci uvádí Tab. 28.

Tab.28 Složení reakční směsi pro modifikaci konců (v µl).

H ₂ O	10,5	9	úvodní denaturace :	98 °C	30 s
Pufr	1,5	1,5	denaturace :	98 °C	10 s
MgCl ₂	0	1,5	annealing :	61-64 °C	30 s
dNTP	2	2	polymerace :	72 °C	2 min
PAPPa1/X B+	0,2	0,2	počet cyklů :	30 x	
PAPPa1/X B-	0,2	0,2	závěrečná polymerace :	72 °C	10 min
polymerasa	0,6	0,6			
DNA	1,4	1,4			

Po amplifikaci jsme produkty nanесли v množství 15 µl reakční směsi a 3 µl BF na 0,7% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas. DNA jsme izolovali z gelu pomocí metody TaKaRa RecoChip. Takto jsme získali čistou pappa_HN pro vložení do plazmidu pCR4Blunt-TOPO.

Jako templát jsme použili purifikovanou pappa_HN, kterou jsme namnožili v předešlé PCR reakci. Tento insert vložíme do vektoru pCR4Blunt-TOPO. Složení ligační směsi udává tabulka 29.

Tab.29 Složení ligační směsi (v µl).

		1.
insert	pappa_HN	2
salt solution		0,5
sterilní voda		0
vektor	pCR4Blunt-TOPO	0,5
celkový objem		3

Tak získáme plazmid pCR4Blunt/pappa_HN. Tento plazmid jsme transformovali do kompetentních ONE SHOT buněk. Buňky jsme selektovali Kanamycinem (50 µg/ml). K ověření použili 4 kolonie. Ověření klonování jsme provedli pomocí RE Not I a Xmn I. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 30.

Tab.30 Složení reakční směsi pro ověření klonování (v µl).

Enzymy	Not I		Xmn I	
	0,2	2	0,1	1
10x pufr	1,5	15	1,5	15
10x BSA	1,5	15	1,5	15
Voda	7,8	78	7,9	79
DNA	4		4	
NEB pufr	3		2	
°C	37		37	
Fragmenty (bp)	tam:8354;20 zpět:4432;3942		tam:4962;3412 zpět:4616;3758	
Kontrola (bp)	5854		5854	

Produkty jsme nanesli v množství 15 µl reakční směsi a 3 µl BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas.

4.1.5.3. Vložení insertu pappa_HN do plazmidu pSecTag2/HygroC → pSecTag2/pappa_HN

Připravili jsme si úsek DNA obsahující gen pappa_HN a následně jsme ho vložili do připraveného plazmidu pSecTag2/HygroC (5688 bp). Tuto sekvenci jsme získali štěpením plazmidu pCR4Blunt/pappa_HN pomocí restričních enzymů Hind III a Not I. Předpokládaná délka fragmentu je 4413 bp. Takto jsme si připravili i plazmid psecTag2/HydroC (5688 bp). Složení směsi pro restrikci uvádí Tab. 31.

Tab.31 Složení reakční směsi pro štěpení plazmidu pCR4Blunt/pappa_HN (v µl).

Enzymy	pCR4Blunt/pappa_HN		pSecTag2/HygroC	
	Hind III 0,2	Not I 0,4	Hind III 0,2	Not I 0,4
10x pufr	3		3	
10x BSA	3		3	
Voda	3,4		21,4	
DNA	20		2	
NEB pufr	3		3	
°C	37		37	
Fragmenty (bp)	4413 (3941;20)		5688	

Po restrikci jsme produkty nanесли v množství 30 μ l reakční směsi a 5 μ l BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas a DNA jsme izolovali z gelu pomocí metody TaKaRa RecoChip. Produkt jsme zaligovali do plazmidu pSecTag2/HygroC. Složení reakční směsi udává Tab. 32.

Tab.32 Ligační směs (v μ l).

DNA směs	50 ng insertu
vektor: pQE-Trisystem 50 ng	3,6
insert: pappA HN	10
voda	3,4
pufr	2
T4 DNA ligasa	1
celkem	20

3 μ l ligační směsi a 27 μ l vody jsme smíchali pro transformaci do kompetentních DH5- α buněk. Selekcii jsme provedli ampicilinem (50 μ g/ml). Ověřili jsme klonování pro 4 kolonie z každé misky. Složení kontrolní směsi a kontrolní enzymy uvádí tabulka 33.

Tab.33 Složení kontrolní směsi (v μ l).

Enzymy	Xho I		Bgl II	
	0,05	0,4	0,1	0,8
10x pufr	1,5	12	1,5	12
10x BSA	1,5	12	0	0
Voda	7,95	79,5	6,4	94
DNA	4		4	
NEB pufr	2		3	
°C	37		37	
Fragmenty (bp)	568		6401	
	2533		3700	
Kontrola (bp)	5753		5753	

Produkty jsme nanесли v množství 15 μ l reakční směsi a 3 μ l BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas. Z ověřovaných kolonií jsme vybrali jednu správnou kolonii, za které jsme připravili zásobní roztok a pomocí MIDI kitu jsme vyizolovali DNA, stanovili jsme spektrofotometricky koncentraci (viz kap. 4.2). DNA jsme použili pro následnou sekvenaci a transfekci do savčích buněk pro produkci cílového proteinu. Produkci jsme ověřili metodu ELISA.

Izolace DNA pomocí Qiagen Plasmid Midi Kitu a příprava zásobních roztoků

1. Příprava startovací kultury: Inokulovali jsme 2 ml LB média s antibiotikem a 8 hod jsme ho inkubovali při 37°C na třepacím inkubátoru při 150 otáčkách/min.
2. Po 8-mi hodinové kultivaci jsme připravili dva 0,5 ml buněčné zásobní roztoky.
3. Startovací kulturu jsme naředili 1/500 do 25 ml LB média. Buňky jsme inkubovali 12 - 16 hodin při 37°C za třepání při 150 otáčkách/min. Objem třepací nádoby byl 4x větší než objem média.
4. Centrifugace 15 min 6000x g při 4 °C.
5. Peletu jsme resuspendovali ve 4 ml pufru P1 na vortexu.
6. Přidali jsme 4 ml pufru P2 a převrácením zkumavky 4 - 6x jsme směs jemně promíchali a při laboratorní teplotě jsme inkubovali 5 min. (ne déle než 5 min)
7. Přidali jsme 4 ml ledového pufru P3 a převrácením zkumavky 4 - 6x jsme směs jemně promíchali. 15 minut se inkubuje na ledu.
8. Centrifugace 45 min při 5500x g za teploty 4°C. Ihned poté jsme odsáli supernatant obsahující plazmidovou DNA do nové tuby.
9. Supernatant jsme znovu centrifugovali 45 min při 5500x g za teploty 4°C. Supernatant jsme odsáli do nové tuby.
10. Kolony QIAGEN-tip 100 jsme ekvilibrovali přidáním 4 ml pufru QBT, nechali jsme směs volně prokapat kolonou až meniskus dosáhl horní frity kolony.
11. Supernatant jsme nalili do kolony a nechali jsme kolonou volně prokapat.
12. Kolonu jsme promyli dvakrát 10 ml pufru QC.
13. DNA jsme vymyli 5 ml pufru QT.
14. DNA jsme precipitovali přidáním 3,5 ml (0,7 objemu) isopropanolu (lab. teplota) k eluované DNA. Směs jsme promíchali a centrifugovali 60 min při 5500x g za teploty 4°C. Supernatant jsme opatrně odstranili.
15. Peletu jsme promyli 2 ml 70% ethanolu a 20 min se centrifugovali při 5500x g. Supernatant jsme opatrně odstranili.
16. Peletu jsme usušili (její barva se změnila z bílé na průhlednou, nutné hlídat). DNA se rozpustili v příslušném objemu TE pufru, pH 8,0 nebo Tris-Cl, pH 8,5.

roztoky:

TE pufr pH 8,0:	10 mM TrisCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0
Roztok na zamrazení štoků:	65% glycerol (v/v)
	0,1 M MgSO ₄
	0,025 M Tris-HCl pH 8,0

sekvenace

Nejdříve jsme si pomocí elektroforézy určili koncentraci DNA na 0,7-1,5% agarózovém gelu. Nanesli jsme 3 µl plazmidové DNA z miniprepu. Udělali jsme si PCR reakci produktu a ten jsme pak přečistili na CPG kolonce. Porovnali jsme ji s kontrolním plazmidem Ko SEQ (1 µl).

Tab.39 Složení reakční směsi pro sekvenaci
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems

		¼
RRM	Ready reaction mix	2 µl
5xSP	5x Sequencing buffer	3 µl
primer	4 pmol plasmid	tj. 2 µl / 3 µl (2 pmol/µl)
DNA		200 ng plasmid
voda		do 20 µl

Tab. 40 Profil reakce pro sekvenování

úvodní denaturace :	95 °C	1 min
denaturace :	96 °C	10 s
annealing :	50 °C	5 s
polymerace :	64 °C	4 min
ochladit	4 °C	
počet cyklů :		30 x
ztočení		

Po sekvenační PCR jsme ke každému vzorku přidali 2,2% SDS do konečné koncentrace 0,2% (do 20 µl sekvenační reakce 2 µl), směs jsme důkladně promíchali a nechali jsme ji denaturovat (96°C/5min), zchladili jsme ji (25°C/10 min) a stočili.

Denaturovaný PCR produkt jsme přečistili pomocí DyeEx kolonek (QIAGEN). Jemným promícháním jsme v koloně resuspendovali pryskyřici, uvolnili jsme víčko (jemným pootočením, cca o ¼), odlomili jsme spodní uzávěr a kolonu jsme vložili do 2 ml zkumavky. Zkumavku jsme centrifugovali 750 xg / 3 min a kolonku jsme odstranili – eluát obsahuje čistou DNA). Vzorek jsme vysušili na kolotoči – cca 20 min. K čisté krystalické DNA jsme přidali 20 µl deionizovaného formamidu (HiDi), směs jsme důkladně rozpustili jemným pipetováním (10 – 15 min). Celý objem jsme nanesly na destičku a tu jsme dali na denaturaci při 95 °C / 5 min a poté jsme destičku ihned umístili na led.

Vlastní sekvenční analýza probíhá pomocí přístroje 3100-Avant™ Genetic, Applied Biosystem. Vyhodnocení získaných sekvenčních dat jsme provedli pomocí programu Seqencing analysis a porovnáním sekvencí s databází pomocí počítačového programu Vector NTI®

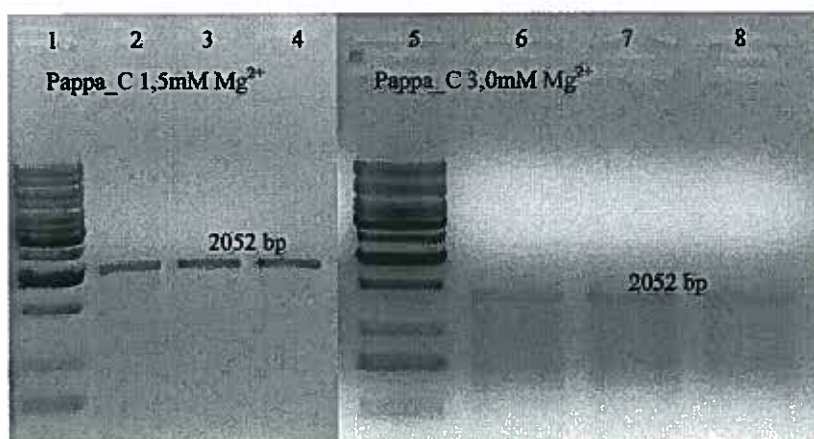
5. Výsledky

5.1. Namnožení jednotlivých úseků

Zkoušeli jsme namnožit celou cDNA pomocí PCR reakce, což se nepovedlo, neboť se cDNA nepomnožila. Namnožení cDNA se nezdařilo, ani když jsme cDNA zkusili pomnožit tak, aby se nám pomocí navržených primerů namnožila na dvě části. Optimální se ukázalo namnožení na tři úseky.

5.1.1. papp_a_C = začátek genu

Pomocí primerů PAPP_A1/X_C+ (*206S4) a PAPP_A1/X_C- (*206S5) jsme namnožili počáteční úsek cDNA – papp_a_C (2052 bp). Amplifikace probíhala v teplotním a koncentračním gradientu (viz experimentální část). Teplota na průběh reakce neměla výrazný vliv (Obr. 9), proto jsme zvolili jako optimální teplotu 64,5, kterou navrhl program Vector NTI[®]. Naopak, rozdíly v koncentraci hořečnatých iontů jsou na první pohled zřetelné, intenzita proužků znatelně klesá při vyšší koncentraci stejně tak, jako jejich ostrost, proto jsme zvolili koncentraci 1,5 mM Mg²⁺. Mnohem lépe se namnožily úseky cDNA pocházející z HEP-2 buněk.



Obr.9. PCR papp_a_C 1,5mM Mg²⁺ a 3,0mM Mg²⁺ pomocí primerů PAPP_A1/X_C+ (*206S4) a PAPP_A1/X_C- (*206S5)

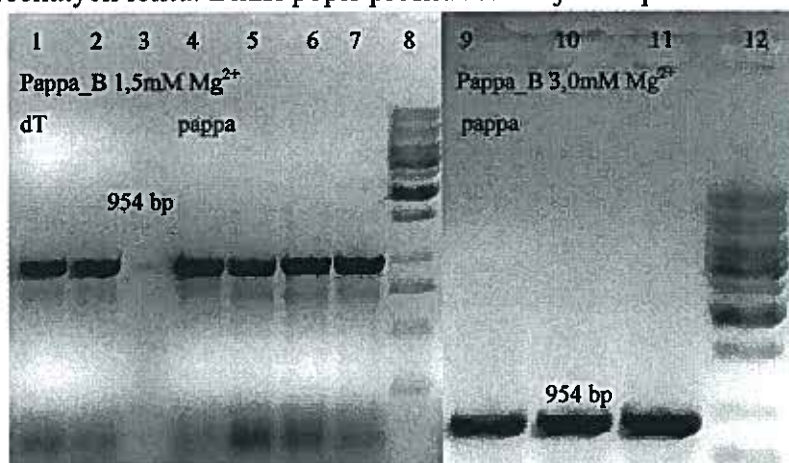
Legenda k Obr.9

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8
tann	M	61,1	63,2	64,5	M	61,1	63,2	64,5
Mg ²⁺		1,5				3		

Produkty jsme po amplifikaci nanесли v množství 15 μ l reakční směsi a 3 μ l BF na 1% na agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas. Fragment *pappa_C* jsme izolovali z gelu (jamka č. 4) a použili pro spojení s *pappa_B*.

5.1.2. *pappa_B* = střed genu

Pomocí primerů PAPP1/X_B+ (*206S2) a PAPP1/X_B- (*206S3) jsme namnožili úsek *pappa_B* (954 bp). Reakce proběhla za teplotního a koncentračního gradientu. Z gelu (Obr.10) bylo patrné, že vliv teploty ve zkoušeném rozmezí je malý, stejně jako vliv koncentrace hořečnatých iontů. Bližší popis profilu reakce je v experimentální části.



Obr.10. PCR *pappa_B* 1,5mM Mg²⁺ a 3,0mM Mg²⁺ pomocí primerů PAPP1/X_B+ (*206S2) a PAPP1/X_B- (*206S3)

Legenda k Obr.10:

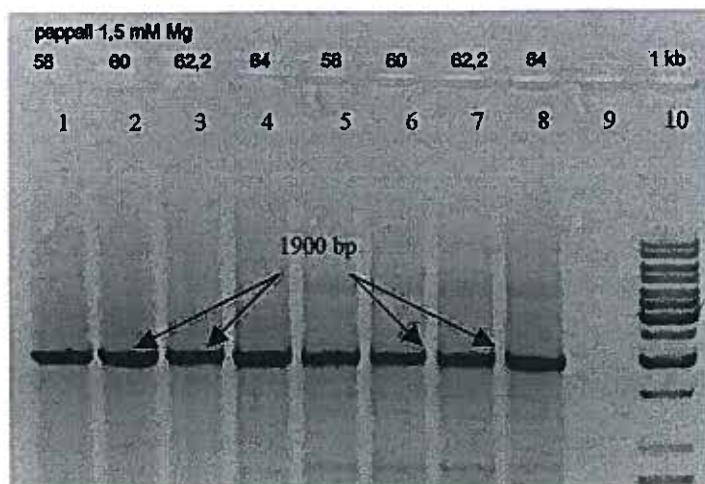
jamka	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12
tann	60	62,2	64	60	62,2	64	M	60	62,2	64	M
Mg ²⁺	1,5						3				

Tato část se mnohem lépe namnožila z cDNA placenty. Produkty jsme nanесли v množství 15 μ l reakční směsi a 3 μ l BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas. DNA jsme izolovali z gelu (jamka č. 9 a 10). Tento úsek jsme později hybridizovali s *pappa_C*.

5.1.3. *pappa_II* = konec genu

Po amplifikaci úseku lidské cDNA, za různých teplotních podmínek, pomocí primerů PAPP1/2_2+ (*18515) a PAPP1/2_2- (*18516) jsme produkty nanесли na 1% agarózový gel s ethidium bromidem v množství 15 μ l reakční směsi a 3 μ l BF. Elektroforeogram (Obr. 11) neprokázal významnější vliv teploty na průběh reakce, proto

jsme zvolili teplotu, kterou nám vybral program Vector NTI. Konečné shrnutí reakčního profilu viz.. Experimentální část Tab. 5.



Obr.11. PCR papp_{II} pomocí primerů PAPPAl/2_2+ (*18515) a PAPPAl/2_2- (*18516)

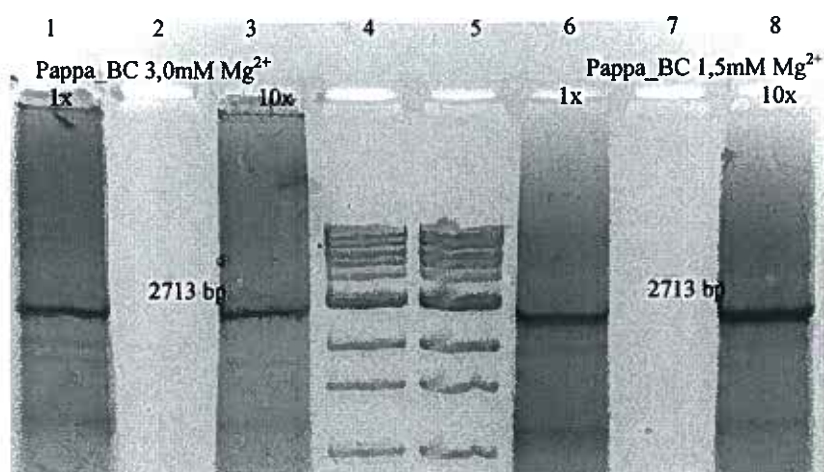
Legenda k Obr.11:

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
tann	58	60	62,2	64	58	60	62,2	64		
cDNA	dT				pappa					M

Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas. DNA jsme izolovali z gelu (jamky č.2, 3, 6 a 7) Takto jsme získali část papp_{II} pro další práci s plazmidy.

5.1.4. Hybridizace úseků papp_B a papp_C → papp_{BC} s následnou PCR reakcí

Z předchozích PCR reakcí jsme dostali vhodně pomnožené úseky papp_B a papp_C, které jsou nanoženy tak, aby se část jejich konců překrývala. Díky tomu lze tyto dva úseky pohodlně hybridizovat přímo v reakční směsi pro PCR. Templátové DNA jsme vložili do směsi v poměru 1:2. Pro tuto reakci jsme zvolili primery pQE_papp_C+ (*213Z5) a PAPPAl/X_B- (*206S3). Reakci jsme provedli za teplotního a koncentračního gradientu. Z Obr. 12 je patrný vliv koncentrace hořčičných iontů na průběh reakce, jenž je nepřímo úměrný. Je zde také vidět, že proužky na elektroforeogramu nejsou dostatečně ostré, nejspíš proto, že jsme do reakce přidali koncentrovanější templátovou DNA. Profil reakce je uveden v experimentální části.



Obr.12. Hybridizace a PCR pappa_BC pomocí primerů pQE_pappa_C+ (*213Z5) a PAPPAl/X_B- (*206S3)

Legenda k Obr.12

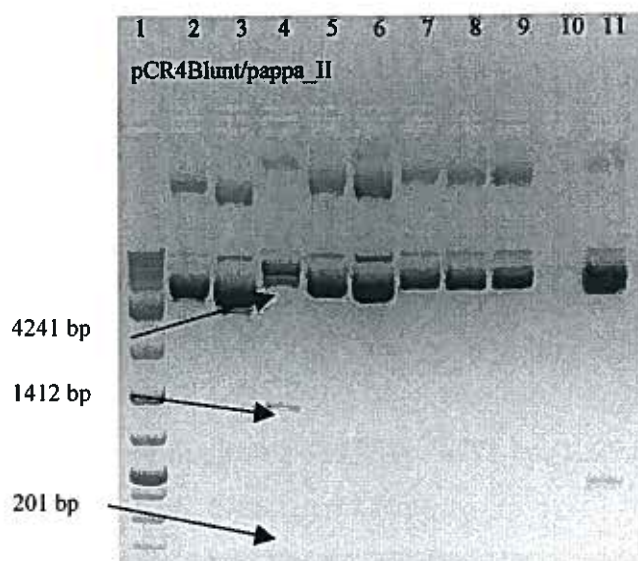
jamka	1	2	3	4	5	6	7	8
tann		64		M	M		64	
Mg ²⁺		3					1,5	

Po amplifikaci byly produkty nanесeny v množství 40 µl reakční směsi a 6 µl BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder NEB. Izolovali jsme jamky č. 3 a 6. Takto jsme získali úsek pappa_BC, který využijeme k pozdějšímu konečnému složení DNA pro pappa.

5.2. Plazmid pCR4Blunt-TOPO

5.2.1. Ověření klonování cílové sekvence plazmidu pCR4Blunt/pappa_II

Pro zaklonování do plazmidu pCR4Blunt-TOPO jsme jako insert vybrali purifikovaný PCR produkt pappa_II (viz. výše). Po transformaci jsme vybrali 4 kolonie z každé misky (vyrostlo cca 200 kolonií), ze kterých jsme izolovali a otestovali DNA pomocí restrikčních enzymů BstX I a Nco I. Hledaný klon je v jamce č. 4 (Obr. 13-14). Aby byla zajištěna specifita, použili jsme jako kontrolu (KO) plazmid pCR4Blunt/eno2. Enzym BstX I štěpil DNA na 3 fragmenty (na rozdíl od kontrolního plazmidu – 4 fragmenty). Restrikce tímto enzymem probíhala obtížně, proto jsou na elektroforeogramu vidět i jiné proužky (nedoštěpený plazmid). Enzym Nco I štěpil DNA také na 3 fragmenty, zatímco kontrolní vzorek pouze linearizoval.

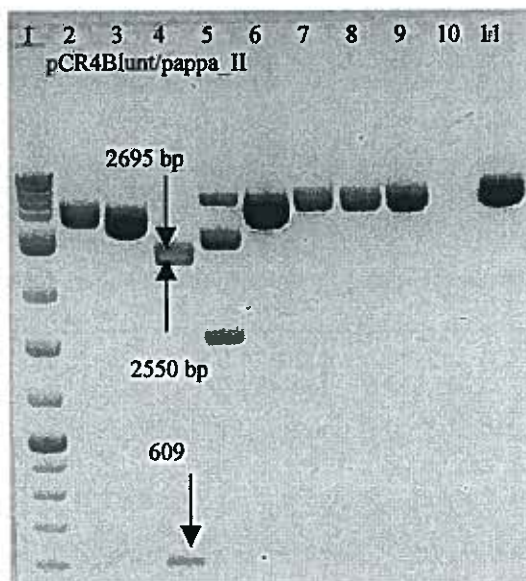


Obr.13. Ověření klonování pCR4Blunt/pappa_II pomocí enzymu BstX I

Legenda k Obr. 13

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
kolonie	M	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4		KO
enzym	BstX I										

A1-4 a B1-4 → vzorky kolonií, písmeno udává misku, ze které byla kolonie odebrána; číslo uvádí označení kolonie.



Obr.14. Ověření klonování pCR4Blunt/pappa_II pomocí enzymu Nco I

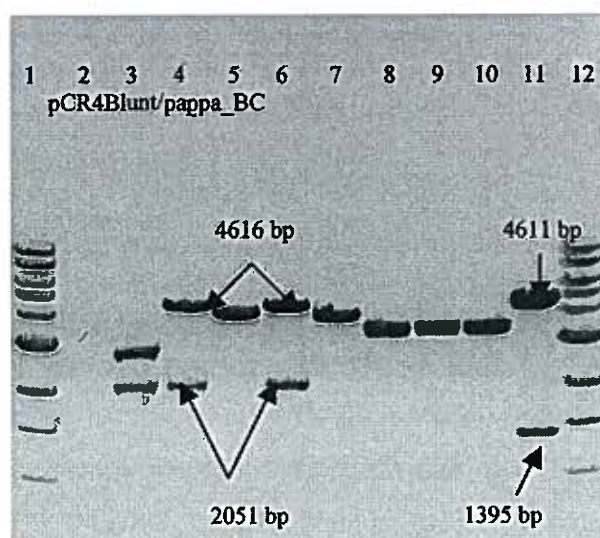
Legenda k Obr.14

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
kolonie	M	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4		KO
enzym	Nco I										

Takto jsme získali čistý plazmid pCR4Blunt/pappa_II_in (5212 bp), pro vložení restrikčních míst pro EcoR I a Xho

5.2.2. Ověření klonování cílové sekvence plazmidu pCR4Blunt/pappa_BC

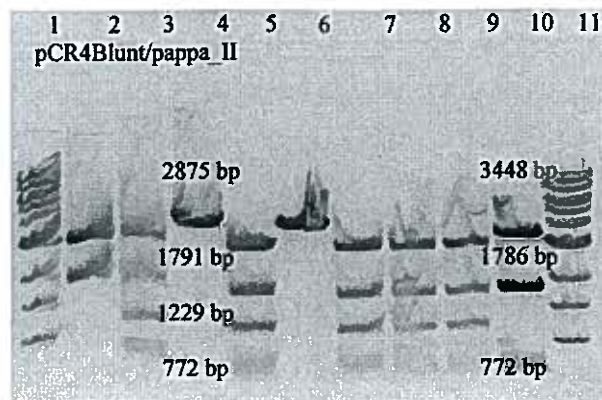
Pro zaklonování úseku cDNA pappa_BC (viz., výše) jsme zvolili plazmid pCR4Blunt-TOPO. Po transformaci vyrostlo na agarózové půdě s kanamycinem 60 bakteriálních kolonií. Pro otestování klonování jsme si vybrali 4 kolonie z každé misky. Plazmidovou DNA jsme izolovali a otestovali jsme ji restriktivními enzymy Xmn I a Nco I (Obr.15-16). Profil restriktivní reakce je uveden v experimentální části. Jako kontrolní vzorek jsme zvolili plazmid pCR4Blunt/pappa_C_in. RE Xmn I štěpí klon na dvě části (4616 bp a 2051 bp), kontrolní vzorek (KO) se štěpil také na dva fragmenty (4611 bp a 1395 bp). RE Nco I nám štěpil hybridní plazmid na 4 fragmenty (2857 bp, 1791 bp, 1229 bp a 772 bp), zatímco KO štěpil na 3 fragmenty (3448 bp, 1786 bp a 772 bp).



Obr.15. Ověření klonování pCR4Blunt/pappa_II pomocí enzymu Xmn I

Legenda k Obr. 15

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
kolonie	M		A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	KO	M
DNA			PBC1				PBC2					
enzym	Xmn I											



Obr.16. Ověření klonování pCR4Blunt/pappa_II pomocí enzymu Nco I

Legenda k Obr.16

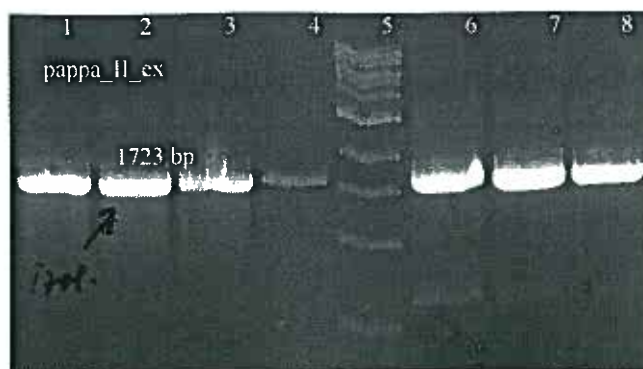
jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
kolonie	M	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	KO	M
DNA		PBC1				PBC2					
enzym	Nco I										

Takto jsme získali čistý plazmid pCR4Blunt/pappa_BC_in (6661 bp), který použijeme ke složení konečného genu (jamka č. 4 a 6).

5.3. Plazmid pQE-Trisystem

5.3.1. Modifikace konců pappa_II sekvence pomocí PCR s vložením míst pro enzymy EcoR I a Xho I

Jako templátovou DNA jsme si zvolili hybridní plazmid pCR4Blunt/pappa_II, který jsme získali z miniprepu. Amplifikace, se specifickými primery PAPP1/2_2_z TOPO+ (*206S0) a PAPP1/2_2_z TOPO- (206S1), které slouží k modifikaci konců pro restriční enzymy EcoR I a Xho I, probíhala za různých teplotních a koncentračních podmínek. Vliv teploty a koncentrace hořčnatých iontů nemá na průběh reakce větší význam. Profil reakce udává Tab. 18 (viz. experimentální část).



Obr.17. Modifikace konců *pappa_II* pomocí primerů PAPPAl/2_2_z TOPO+ (*206S0) a PAPPAl/2_2_z TOPO- (206S1)

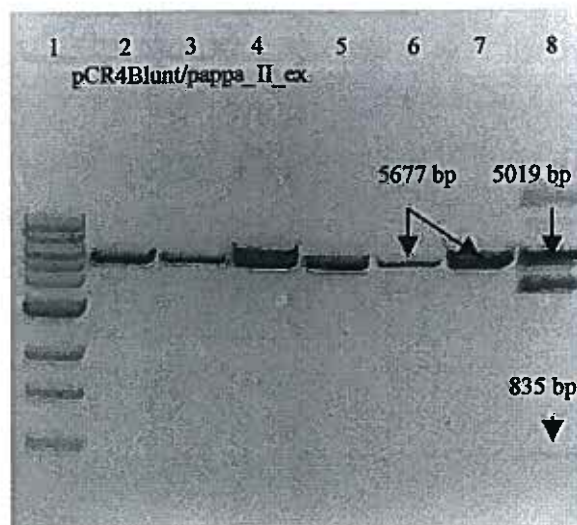
Legenda k Obr.17

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8
tann	62,3	64,8	67,4		M	62,3	64,8	67,4
Mg ²⁺	1,5					3		

Po amplifikaci jsme produkty z jamky č. 2 (Obr. 17) nanесли v množství 15 μ l reakční směsi a 3 μ l BF na 1% agarózový gel s ethidium bromidem. Jako hmotnostní standard jsme použili 1 kb ladder Fermentas. DNA jsme izolovali pomocí metody TaKaRa RecoChip. Takto upravený úsek vložíme do produkčního plazmidu pCR4Blunt-TOPO.

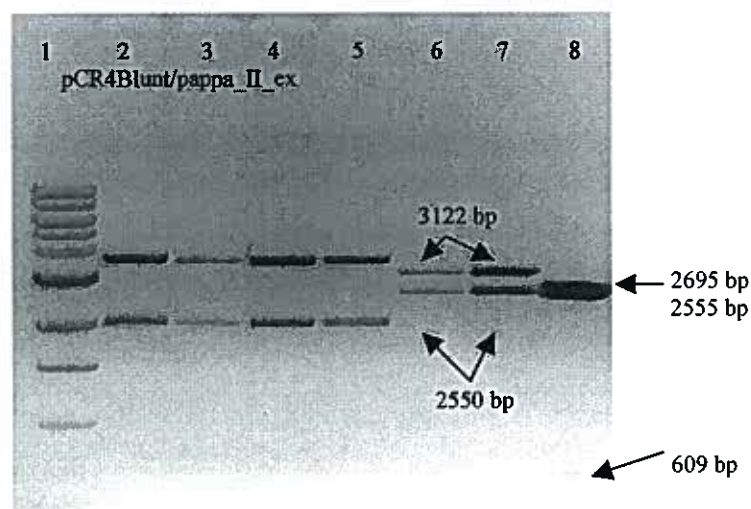
5.3.2. Ověření klonování cílové sekvence plazmidu pCR4Blunt/*pappa_II_ex*

Pro transformaci jsme použili insert *pappa_II_ex* z předchozí reakce. Koncentrace byla odhadnuta z gelu. Po transformaci vyrostlo na agarózové půdě s kanamycinem cca 130 bakteriálních kolonií. Pro ověření klonování jsme vybrali po 5 koloniích z každé misky. Plazmidovou DNA jsme izolovali a otestovali jsme ji pomocí RE BamH I a Nco I (Obr.18-19). Profil reakce je uveden v experimentální části. Jako KO jsme vybrali plazmid pCR4Blunt/*pappa_II_in*. RE BamH I hybridní plazmid linearizoval ne úsek o velikosti 5677 bp, KO však štěpil na fragmenty o velikosti 5019 bp a 835 bp (na elektroforeogramu je vidět více proužků, protože se nám zanesla část produktu z jamky č. 6 do jamky s KO). RE Nco I tento plazmid štěpil na fragmenty o velikosti 3122 bp a 2555 bp, KO se štěpila na 3 části (2695 bp, 2550 bp a 609 bp).



Obr. 18. Ověření klonování pCR4Blunt/pappa_II_ex pomocí enzymu BamH I
 Legenda k Obr. 18

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8
kolonie	M	1	2	3	4	5	6	KO
enzym	BamH I							



Obr.19. Ověření klonování pCR4Blunt/pappa_II_ex pomocí enzymu Nco I.
 Legenda k Obr. 19

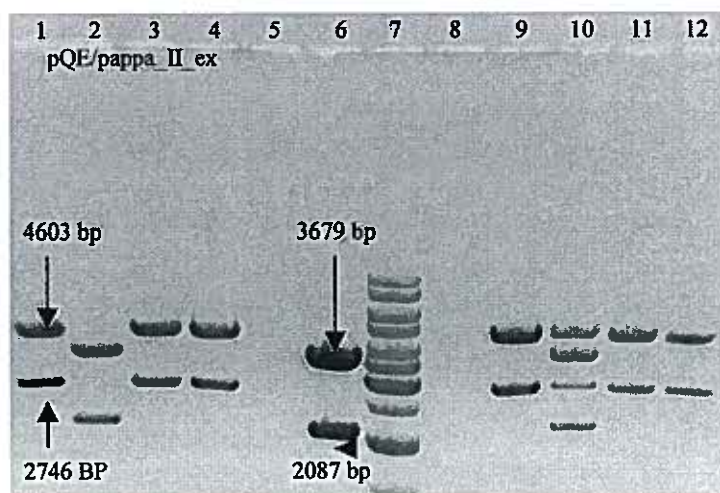
jamka	1	2	3	4	5	6	7	8
kolonie	M	1	2	3	4	5	6	KO
enzym	Nco I							

Takto získaný plazmid (jamka č. 6 a 7) použijeme pro vložení insertu pappa_II_ex (1723 bp) do plazmidu pQE-Trisystem (5651 bp).

5.3.3. Ověření klonování cílové sekvence plazmidu pQE/pappa_II_ex

Pro zaklonování insertu pappa_II_ex jsme si vybrali plazmid pQE-Trisystem pro transientní produkci proteinu v savčích buňkách. Po transformaci vyrostlo na agarózové

půdě s ampicilinem cca 50 bakteriálních kolonií. Profil reakce je uveden v experimentální části. Plazmidovou DNA ze 4 kolonií z každé misky jsme izolovali a otestovali jsme ji restrikčními enzymy BamH I a Hinc II. Jako KO jsme použili prázdný plazmid pQE-Trisystem. Bohužel elektroforeogram prvního enzymu (BamH I) nebylo možno použít, protože se nám plazmid dostatečně neštěpil, avšak z gelu jsme mohli rozpoznat, že požadovanému úseku odpovídal restrikční produkt z jamky č. 1 (Obr.20). Druhý RE Hinc II štěpil produkt na dva fragmenty o velikosti 4603 bp a 2746 bp, KO se štěpila také na dva fragmenty, ale o jiné velikosti (3679 bp a 2087 bp).



Obr.20. Ověření klonování pQE/pappa_II_ex pomocí enzymu Hinc II.

Legenda k Obr. 20

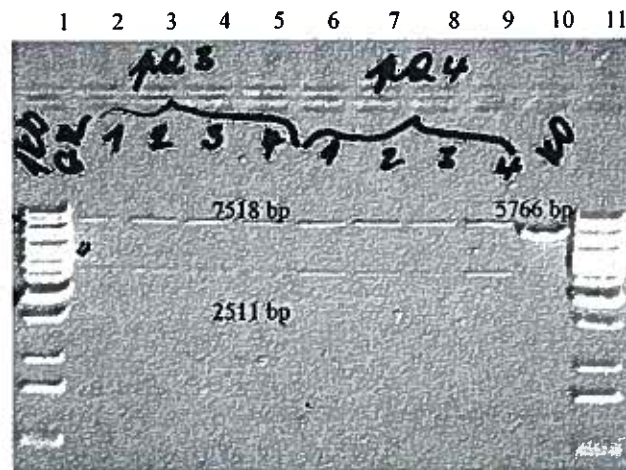
jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
kolonie	A1	A2	A3	A4		KO	marker			B1	B2	B3	B4
enzym	Hinc II												

Tento hybridní plazmid pQE/pappa_II_ex jsme využili pro složení genu a jeho produkci v savčích buňkách

5.3.4. Ověření klonování cílové sekvence plazmidu pQE/pappa

PAPP-A gen jsme složili až v hybridním plazmidu pQE/pappa_II_ex, do kterého jsme vložili insert pappa_BC_in, který jsme získali z hybridního plazmidu pCR4Blunt/pappa_BC_in. Profil reakce je uveden v experimentální části. Po transformaci vyrostlo na agaróзовé půdě s ampicilinem cca 300 bakteriálních kolonií. Plazmidovou DNA jsme izolovali ze 4 kolonií z každé misky a tyto jsme otestovali restrikčními enzymy Xho I a Xmn I (Obr. 21-22). Vložená sekvence vnesla do původního plazmidu nová rozpoznávací místa. RE Xho I štěpí hybridní plazmid na 2 fragmenty o velikosti 7518 bp a 2511 bp, zatímco KO pouze linearizuje na proužek o velikosti odpovídající 5766 bp. RE Xmn I rozdělí plazmid na 3 fragmenty o velikosti 4392 bp, 3453 bp a 2184 bp. KO se štěpí

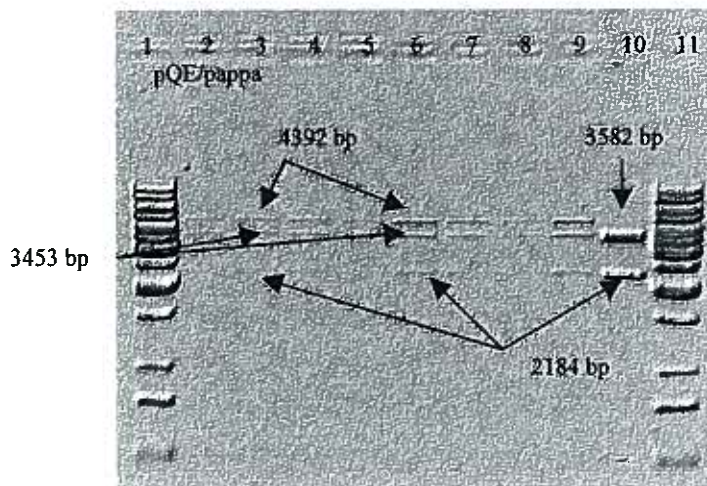
pouze na dvě části o velikosti 3582 bp a 2184 bp. Pro další práci jsme vybrali produkty z jamek č. 3 a 6, z nichž jsme připravili midiprep pQE/pappa. Koncentrace byla odhadnuta z gelu.



Obr..21. Ověření klonování pQE/pappa pomocí enzymu Xho I.

Legenda k Obr. 21

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
kolonie	M	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	KO	M
DNA		pQ3				pQ4					
enzym	Xho I										



Obr.22. Ověření klonování pQE/pappa pomocí enzymu Xmn I.

Legenda k Obr. 22

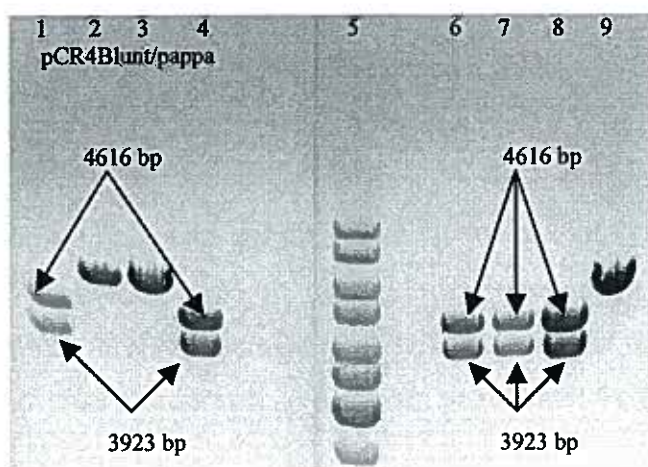
jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
kolonie	M	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	KO	M
DNA		pQ3				pQ4					
enzym	Xmn I										

Správnost modifikované sekvence DNA byla ověřena sekvenční analýzou. Takto jsme získali plazmid pQE/pappa pro transientní produkci v savčích buňkách.

5.4. Plazmid pSecTag2/HygroC

5.4.1. Ověření klonování cílové sekvence plazmidu pCR4Blunt/pappa

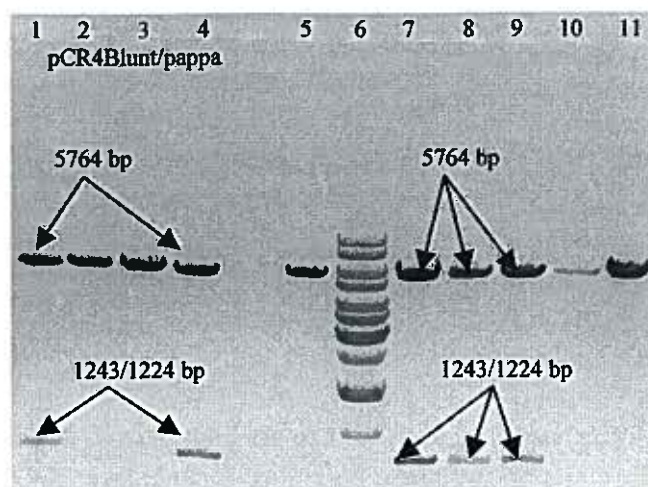
Při přípravě hybridního plazmidu pSecTag2/pappa_HN pro transienční expresi jsme si DNA pro PAPP-A nejdříve složili pomocí insertu pappa_BC_in a vektoru pCR4Blunt/pappa_II_in. Po transformaci vyrostlo na agarózové půdě s kanamycinem 30 bakteriálních kolonií. Profil reakce je uveden v experimentální části. Plazmidovou DNA (4 kolonie z každé mísky) jsme izolovali a otestovali jsme ji restrikcí enzymy Xmn I a Hinc II (Obr.23-24). RE Xmn I štepil plazmid na 2 fragmenty o velikosti 4616 bp a 3923 bp. KO (pCR4Blunt/pappa_II_in) se nám linearizoval (5854 bp). RE Hinc II štepil DNA na fragmenty o velikosti 5764 bp, 1243 bp, 1224 bp a 308 bp. Proužky 1243 bp a 1224 bp se nám na elektroforeogramu nerozdělily, protože jsou velikostně téměř totožné.



Obr.23. Ověření klonování pCR4Blunt/pappa pomocí enzymu Xmn I.

Legenda k Obr. 23

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9
kolonie	A1	A2	A3	A4	M	B1	B2	B3	B4
DNA	PC1					PC2			
Enzym	Xmn I								



Obr.24. Ověření klonování pCR4Blunt/pappa pomocí enzymu Hinc II.

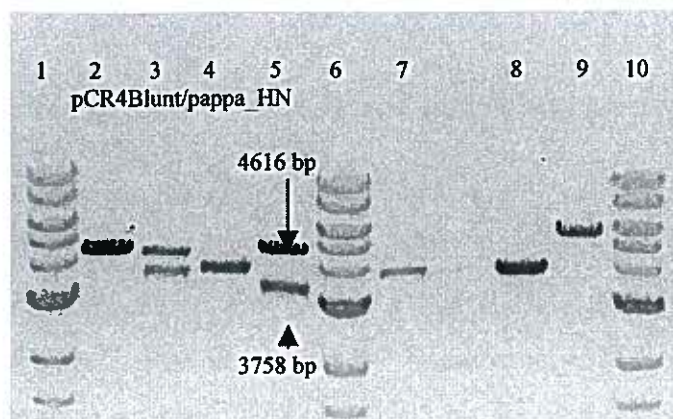
Legenda k Obr. 24

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
kolonie	A1	A2	A3	A4	KO	M	B1	B2	B3	B4
DNA	PC1						PC2			
Enzym	Xmn I									

Takto jsme získali plazmid pCR4Blunt/pappa. Tento hybridní plazmid jsme linearizovali pomocí RE Sca I a pak jsme ho ihned přečistili na CPG kolonce a 20x naředili. Produkt (4420 bp) jsme amplifikovali metodou PCR pomocí primerů, které nám umožnili vložit místa pro restriční enzymy Hind III a Not I (PAPPA_HN+ (*235E7) a PAPPA_HN- (235E8). Profil reakce je uveden v experimentální části. Produkt jsme izolovali z 0,7 % agaróзовého gelu pomocí metody TaKaRa RecoChip. Takto jsme získali úsek papp_{HN}, který jsme zaklonovali do plazmidu pCR4Blunt-TOPO.

5.4.2. Ověření klonování cílové sekvence plazmidu pCR4Blunt/pappa_{HN}

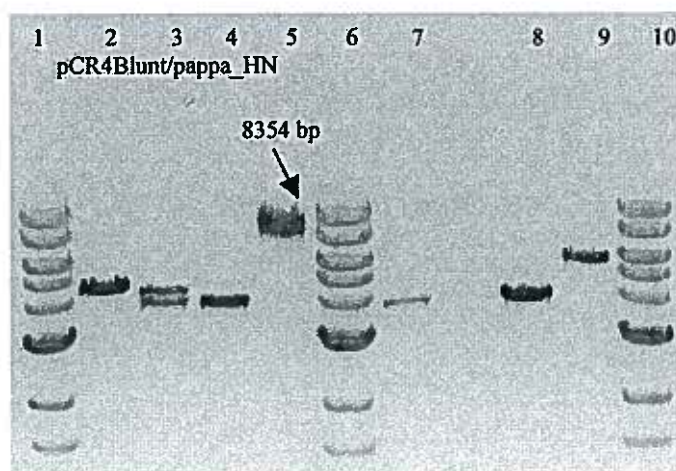
Provedli jsme transformaci do One Shot kompetentních buněk. Po transformaci vyrostly na agaróзовé půdě s kanamycinem bakteriální kolonie. Připravili jsme si miniprep pro 4 kolonie z každé misky. Plazmidovou DNA jsme izolovali a otestovali jsme ji restričními enzymy Xmn I a Not I (Obr. 25-26). Profil reakce je uveden v experimentální části. Jako KO jsme použili pCR4Blunt/pappa_{II_in}. RE Xmn I štěpil plazmid na 2 části o velikosti 4962 bp a 3758 bp. Druhý RE (Not I) štěpil hybridní plazmid na fragmenty o velikosti 8354 bp a 20 bp (na elektroforeogramu fragment o velikosti 20 bp není vidět). Oba restriční enzymy KO pouze linearizovaly (5854 bp).



Obr.25. Ověření klonování pCR4Blunt/pappa pomocí enzymu Xmn I.

Legenda k Obr. 25

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
kolonie	M	A1	A2	A3	B1	M	B2	B3	KO	M
DNA			PC1		PC2		PC2			
Enzym	Xmn I									



Obr.26. Ověření klonování pCR4Blunt/pappa pomocí enzymu Not I.

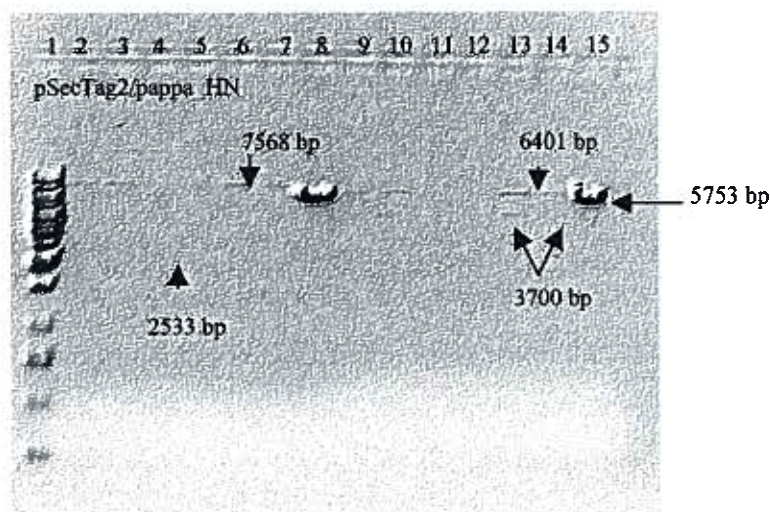
Legenda k Obr. 26

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
kolonie	M	A1	A2	A3	B1	M	B2	B3	KO	M
DNA			PC1		PC2		PC2			
Enzym	Not I									

Pro další práci jsme si vybrali klon z jamky č. 5. Takto jsme získali plazmid pCR4Blunt/pappa_HN, který jsme štěpili pomocí RE Hind II a Not I. Vyštěpený fragment pappa_HN jsme zaklonovali do pSecTag2/HygroC. Koncentrace byla odhadnuta z gelu.

5.4.3. Ověření klonování cílové sekvence plazmidu pSecTag2/pappa_HN

Po transformaci vyrostlo na agaróзовé půdě s ampilicinem cca 250 bakteriálních kolonií. Profil reakce je uveden v experimentální části. Plazmidovou DNA jsme izolovali a otestovali jsme ji restrikcími enzymy Xho I a Bgl II. Jako KO jsme zvolili prázdný plazmid pSecTag2/HygroC, jenž se oběma RE linearizoval (5753 bp). RE Xho I štěpil plazmid na 2 fragmenty o velikosti 7568 bp a 2533 bp. RE Bgl II štěpil hybridní plazmid také na 2 fragmenty o velikosti 6401 bp a 3700 bp. Klonování proběhlo úspěšně u vzorků 6 a 7 (Obr.27).



Obr.27. Ověření klonování pSecTag2/pappa_HN pomocí enzymů Xho I a Bgl II.

Legenda k Obr. 27

jamka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
kolonie	M	1	2	3	4	2	3	KO	1	2	3	4	2	3	KO	
DNA		PSB				PSA				PSB				PSA		
Enzym		Xho I							Bgl II							

Správnost modifikované sekvence DNA byla ověřena sekvenční analýzou. Takto jsme získali plazmid pSecTag2/pappa_HN, který jsme zaklonovali do savčích buněk.

6. Diskuze

Vyizolovali jsme mRNA pro PAPP-A z buněk placenty. Tato NK je příliš velká (5553 bp) na to, aby ji bylo možno namnožit jednoduše pomocí PCR, protože velké úseky DNA se množí pomocí metody PCR velmi obtížně. Proto jsme ji zkusili rozdělit na dva fragmenty pomocí specificky navržených primerů a PCR reakce. Ani po rozdělení genu na dvě části se ji nepodařilo úspěšně namnožit. Proto jsme ji zkusili rozdělit (opět pomocí specificky navržených primerů a metody PCR) na tři části, což se ukázalo být optimální.

Tyto úseky jsme označili *pappa_C* o velikosti 2052 bp (začátek genu), *pappa_B* o velikosti 954 bp (střed genu) a *pappa_II* o velikosti 1900 bp (konec genu). Označení vyplynulo z chronologie postupu při práci. Tyto podstatně menší fragmenty nám umožnili mnohem jednodušší namnožení cDNA. Po úspěšném namnožení a přečištění jednotlivých fragmentů jsme hybridizovali části *pappa_C* a *pappa_B* na úsek *pappa_BC* (2713 bp). Tento úsek cDNA jsme zaklonovali do vektoru pCR4Blunt-TOPO. Totéž jsme provedli i s částí *pappa_II*. Rekombinantní plazmid pCR4Blunt/*pappa_II_in* jsme použili jako templát pro PCR reakci, do které jsme přidali specifické primery pro modifikaci konců pro restriční enzymy EcoR I a Xho I, proto jsme ho označili *pappa_II_ex* (1723 bp). Tato modifikace nám umožnila pohodlné složení celého genu. Tento fragment jsme opět transformovali do plazmidu pCR4Blunt-TOPO. Rekombinantní plazmid pCR4Blunt/*pappa_II_ex* jsme štěpili pomocí RE EcoR I a Xho I, takto jsme si připravili i prázdný plazmid pQE-Trisystem, do kterého jsme vložili insert *pappa_II_ex* a v němž jsme celou DNA složili. Takto jsme dostali rekombinantní plazmid pQE/*pappa*, který jsme si transfekovali do hostitelských savčích buněk.

Pro zaklonování cílené nukleové kyseliny do plazmidu pSecTag2/HygroC jsme zvolili jiný postup. Napřed jsme si složili celou DNA v plazmidu pCR4Blunt-TOPO, upravili jsme pomocí PCR reakce konce cílené DNA a opět jsme ji zaklonovali do plazmidu pCR4Blunt-TOPO (pCR4Blunt/*pappa_HN*). Restričními enzymy jsme si připravili jak vektor pSecTag2/HygroC tak insert *pappa_HN*. Tyto dva úseky jsme ligovali a zaklonovali jako rekombinantní plazmid pSecTag2/HygroC, který jsme transfekovali do savčích buněk. Správnost modifikované sekvence jsme ověřili sekvenční analýzou. Transfekci a produkci v savčích buňkách jsem neprováděl, proto zde není uvedena.

7. ZÁVĚR

mRNA jsem dostal rozdělenou na 3 části (pomocí specificky navržených primerů a metody PCR), což se ukázalo být optimální (velké úseky DNA se množí velmi obtížně)

Tyto úseky jsme označili papp_{a_C}, papp_{a_B} a papp_{a_II}. Označení vyplynulo z chronologie postupu při práci. Tyto podstatně menší fragmenty nám umožnili mnohem jednodušší práci s cDNA. Po namnožení a přečištění jednotlivých úseků jsme úspěšně hybridizovali části papp_{a_C} a papp_{a_B} na fragment papp_{a_BC}.

Tyto úseky cDNA (papp_{a_II} a papp_{a_BC}) jsme zaklonovali do vektoru pCR4Blunt-TOPO. Rekombinantní plazmidy jsme využili pro další klonování do produkčních plazmidu pQE-Trisystem a pSecTag2/HygroC. Správnost modifikované sekvence jsme ověřili sekvenční analýzou, proteinovou produkci jsme ověřili pouze orientačně pomocí metody ELISA. Cílený gen se nám podařilo úspěšně namnožit i se všemi antigenními doménami. Transfekci a produkci v savcích buňkách jsem neprováděl.

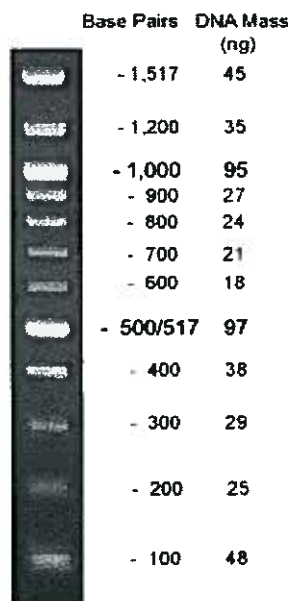
8. Seznam použité literatury

1. Ausubel F.M., B. R., Kingston R. E., Moore D.D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K.. Short protocols in molecular biology. New York, *John Wiley and Sons*, (1999)
2. Bischof, P. Purification and characterization of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A). *Arch Gynecol* (1979), **227**: 315-26.
3. Coligan, J. E., B. M. Dunn, et al., Eds. Current Protocols in Protein Science. New York, *John Wiley & Sons, Inc*, (2002)
4. Wald NJ: Integrated screening for Downssyndrome based on tests performed during the first and second trimesters. *NEJM*, (1999), **341**: 461-467
5. Beaudeau JL, Burc L, Imbert-Bismuth F, Giral P, Bernard M, Bruckert E Chapman MJ" Serumplasma pregnancy-associated protein A: a potential marker of echogenic carotid atherosclerotic plaques in asymptomatic hyperlipidemic subject at high cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, (2003), **23**:e7-10
6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> National Center for Biotechnology Information (NCBI).
7. Oxvig, C., O. Sand, et al. (1993). Circulating human pregnancy-associated plasma protein-A is disulfide-bridged to the proform of eosinophil major basic protein. *J Biol Chem* **268**: 12243-6.
8. Oxvig, C., O. Sand, et al. Isolation and characterization of circulating complex between human pregnancy-associated plasma protein-A and proform of eosinophil major basic protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1994), **1201**: 415-23.
9. Smith, G. C. S. S., E. J.; Crossley, J. A.; Aitken, D. A.; Cameron, A. D.; Connor, J. M.: Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein A and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. (2002), **87**: 1762-1767.
10. Sun, I. Y. Pregnancy-Associated Plasma Protein A Proteolytic Activity Is Associated with the Human Placental Trophoblast Cell Membrane, (2002), <http://icem.endojournals.org/cgi/content/full/87/11/5235>.
11. Zima T. PAPP-A (Pregnancy-associated plasma protein-A) význam v kardiologii a nefrologii. (2004)

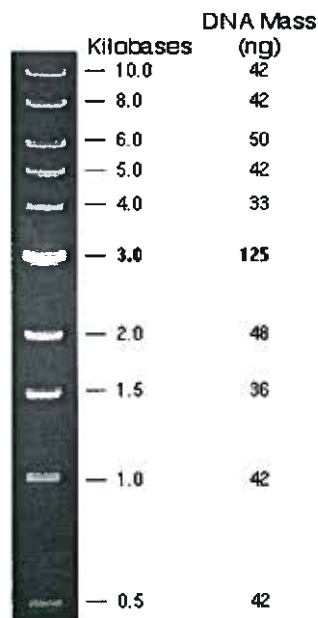
17. Rumlová M, Pačes V, Ruml T. Základní metody genového inženýrství VŠCHT-Praha, (2003), 1: 10-53
12. Qin QP, Kokkala S, Lund J, Tamm N, Qin X, Lepantalo M, Pettersson K. Immunoassays developed for pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in pregnancy may not recognize PAPP-A in acute coronary syndromes. *Clin Chem.* 2006 Mar;**52**: 398-404.
13. Wojdemann KR, Larsen SO, Rode L, Shalmi A, Sundberg K, Christiansen M, Tabor A. First trimester Down syndrome screening: distribution of markers and comparison of assays for quantification of pregnancy-associated plasma protein-A. *Scand J Clin Lab Invest.* 2006; **66**: 101-11.
14. Ozer KT, Kavak ZN, Gokaslan H, Elter K, Pekin T. Predictive power of maternal serum and amniotic fluid CRP and PAPP-A concentrations at the time of genetic amniocentesis for the preterm delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005 Oct 1;**122**: 187-90.
15. Rozsypal, S., J. Doškař, et al. Úvod do molekulární biologie. Brno, (2002)
16. Sambrook, J. and D. W. Russell, Eds. Molecular cloning: a laboratory manual, *Cold Spring Harbor, N.Y.*, (2001)
17. Vokurka M., Hugo. J. et al. Velký lékařský slovník, *MaxdorfJjesenius*, (2002)
18. Sivanandam AS, Mohan S, Kapur S, Kita H, Lau KH, Bagi G, Baylink DJ, Qin X. Covalent interaction between proform of eosinophil major basic protein (proMBP) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) is a cell-mediated event and required for proMBP inhibition of the catalytic activity of PAPP-A. *Arch Biochem Biophys.* 2004 Mar 15;**423**: 343-50.
19. Guibourdenche J, Frendo JL, Pidoux G, Bertin G, Luton D, Muller F, Porquet D, Evain-Brion D. Expression of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) during human villous trophoblast differentiation in vitro. *Placenta.* 2003 May;**24**:532-9.
20. Bersinger NA, Smarason AK, Muttukrishna S, Groome NP, Redman CW. Women with preeclampsia have increased serum levels of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), inhibin A, activin A and soluble E-selectin. *Hypertens Pregnancy.* 2003;**22**:45-55.
21. Laursen LS, Overgaard MT, Soe R, Boldt HB, Sottrup-Jensen L, Giudice LC, Conover CA, Oxvig C. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF:

- implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. *FEBS Lett.* 2001 Aug 24;**504**: 36-40.
22. Boldt HB, Overgaard MT, Laursen LS, Weyer K, Sottrup-Jensen L, Oxvig C. Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): classification as a metzincin. *Biochem J.* 2001 Sep 1;**358**:359-67.
 23. Resch ZT, Oxvig C, Bale LK, Conover CA. Stress-activated signaling pathways mediate the stimulation of pregnancy-associated plasma protein-A expression in cultured human fibroblasts. *Endocrinology.* 2006 Feb;**147**:885-90. Epub 2005 Nov 3.
 24. Crea F, Andreotti F. Pregnancy associated plasma protein-A and coronary atherosclerosis: marker, friend, or foe? *Eur Heart J.* 2005 Oct;**26**:2075-6.
 25. Spencer K, Cicero S, Atzei A, Otigbah C, Nicolaides KH. The influence of maternal insulin-dependent diabetes on fetal nuchal translucency thickness and first-trimester maternal serum biochemical markers of aneuploidy. *Prenat Diagn.* 2005 Oct;**25**:927-9.
 26. protokoly a materiály firem Qiagen, Invitrogen, TaKaRa, Vector NTI a CPG

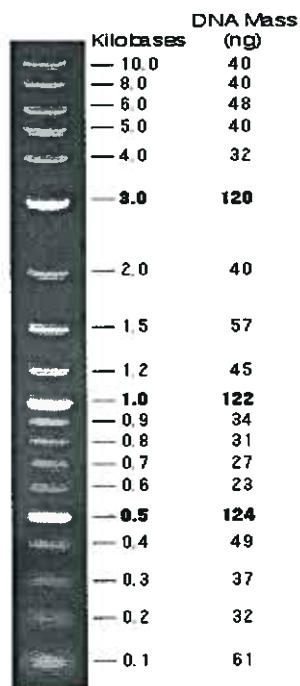
9. Přílohy



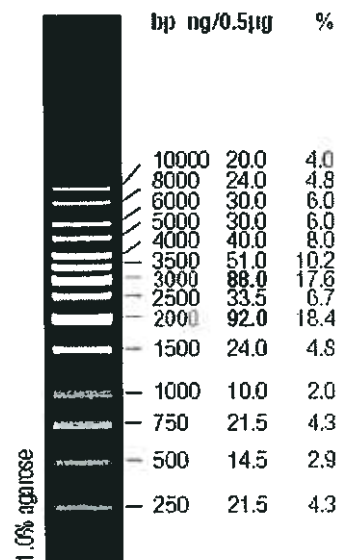
100 bp DNA ladder
NEB Biolabs
#N3231



1 kb DNA Ladder
NEB BioLabs
#N3232



2-Log DNA Ladder (0,1 – 10,0 kb)
NEB Biolabs
#N3200

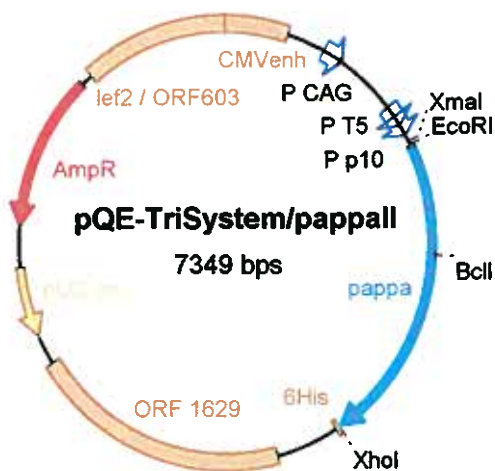


1.0% agarose
0.5µg/lane,
8cm length gel,
1X TAE, 7V/cm, 45min

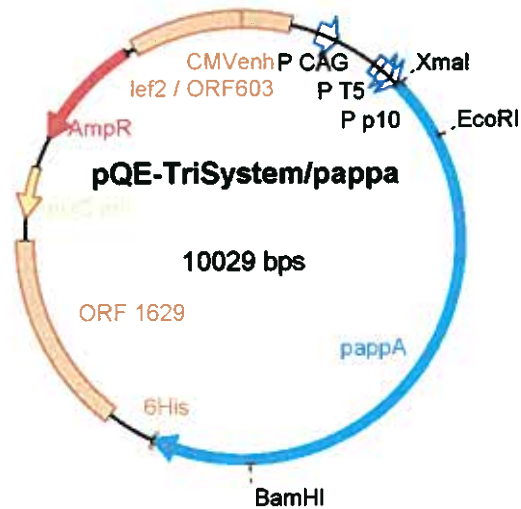
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder
MBI Fermentas
SM0311

Obr. 28 Použité markery

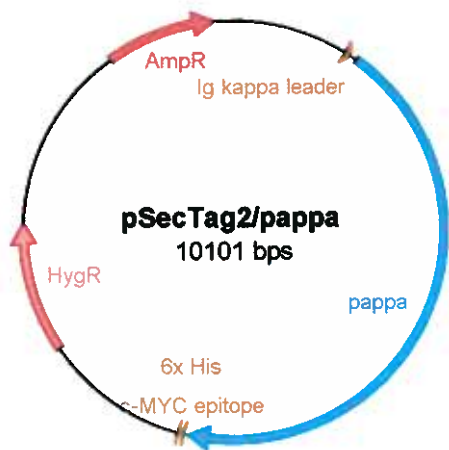
Používané rekombinantní plazmidy: pQE-Trisystem a pSecTag2/HygroC



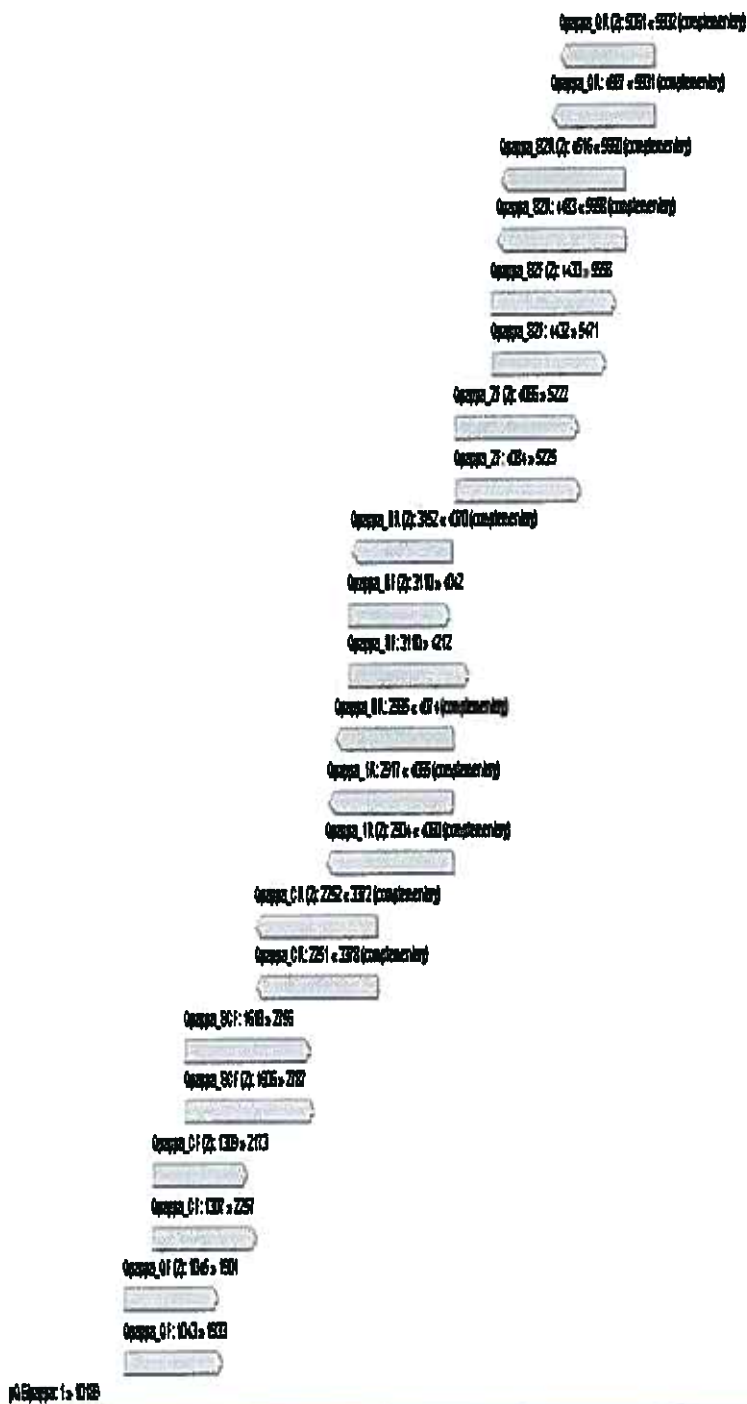
Obr. 29 Mapa plazmidu pQE-Trisystem s vloženou sekvencí papp_{II} (Vector NTI®)



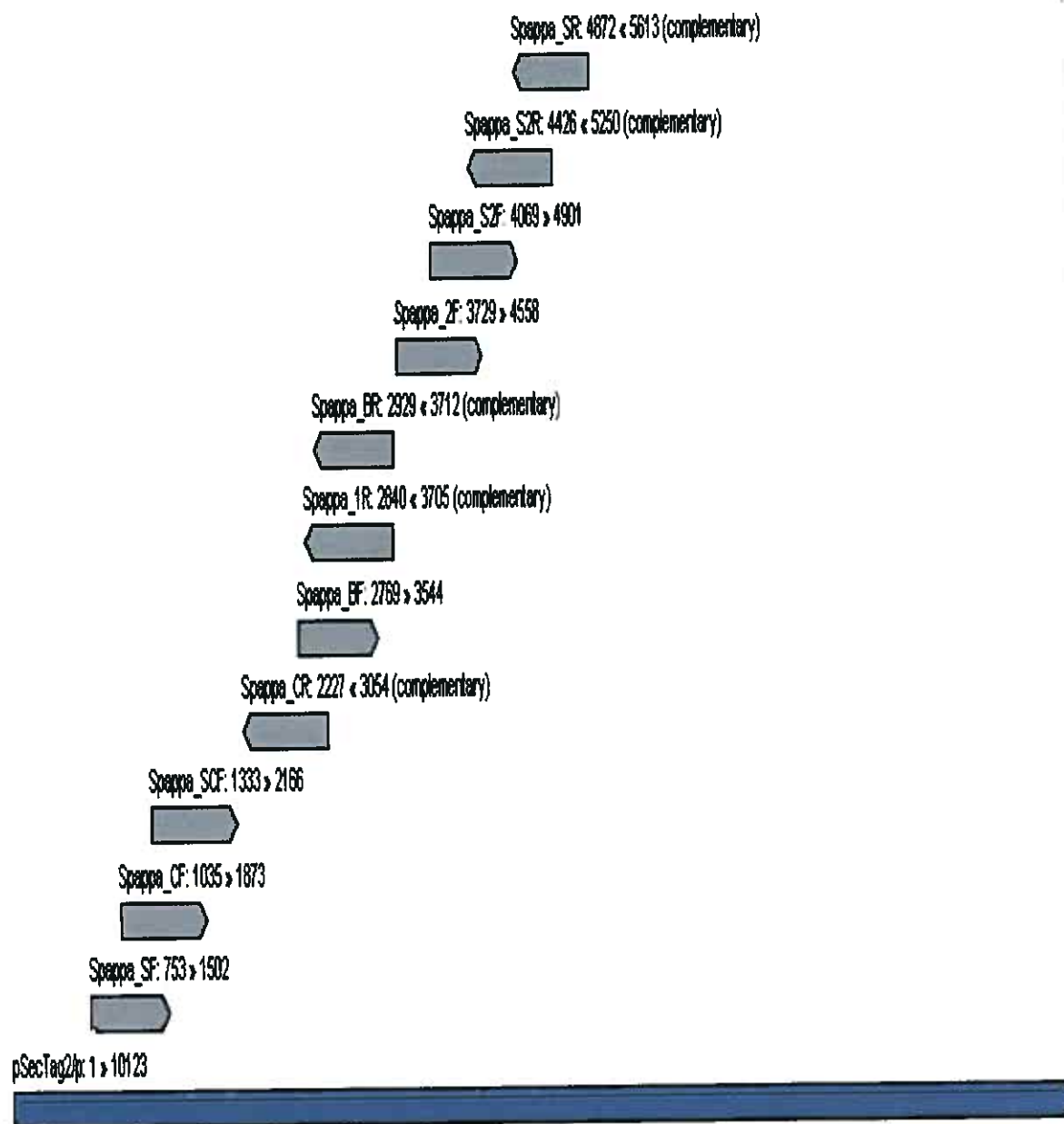
Obr. 30 Mapa plazmidu pQE-Trisystem s vloženou sekvencí papp_A (Vector NTI®)



Obr. 31 Mapa plazmiu pSecTag2/HygroC s vloženou sekvencí papp_A (Vector NTI®)



Obr. 32 Porovnání namnoženého úseku v rekombinantním plazmidu pQE/pappa dle srovnávacího programu pro vyhodnocování sekvencí. Modře je znázorněn celý plazmid, šedě jsou zvýrazněny reakce s jednotlivými primery (Vector NTI®).



Obr. 33 Porovnání namnoženého úseku v rekombinantním plazmidu pSecTag2/pappa dle srovnávacího programu pro vyhodnocování sekvencí. Modře je znázorněn celý plazmid, šedě jsou zvýrazněny reakce s jednotlivými primery (Vector NTI[®]).