

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Ondřej Skořepa

PŘÍPRAVA LENTIVIROVÉHO EXPRESNÍHO VEKTORU
S REPORTÉROVÝM GENEM

Preparation of lentiviral expression vector with reporter gene

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Praha 2014

PROHLÁŠENÍ

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

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 21. srpna 2014

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval RNDr. Ondřeji Vaňkovi, PhD. za odborné vedení mé bakalářské práce, mnohé konzultace a především za velikou trpělivost. Dále děkuji Mgr. Janu Bláhovi za poskytnutí materiálů pro experimentální část a za ochotu kdykoli pomoci a poradit. Chtěl bych také poděkovat celému osazenstvu laboratoře 204 za přátelské pracovní prostředí.

ABSTRAKT

Vedle rekombinantní exprese proteinů v prokaryotických buněčných liniích (*E. coli*) se dostávají do popředí systémy, které rychle, spolehlivě a stabilně produkují rekombinantní proteiny v lidských buněčných liniích. Ty zaručují vhodnou terciární strukturu a posttranslační modifikace požadovaných produktů. Jednou z možností, jak docílit produkce rekombinantních proteinů v lidských buněčných liniích, je použití lentivirových vektorů.

Tato práce popisuje přípravu lentivirového vektoru (plazmidu) Daedalus, který obsahuje konstrukt pro rekombinantní expresi sekretované alkalické fosfatázy. K přípravě požadovaného plazmidu byly použity metody založené na inzerci genu sekretované alkalické fosfatázy pomocí restričních endonukleáz a metody, založené na amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí, klonování bez restričního štěpení, přenosová polymerázová reakce a Gibsova reakce.

KLÍČOVÁ SLOVA

Lentivirus, Daedalus, SEAP, klonování DNA, plazmid

ABSTRACT

Besides recombinant protein expression in prokaryotic cell lines (*E. coli*), systems, that could quickly, reliably and stably produce recombinant proteins in human cell lines, come to the fore. These cell lines assure proper tertiary structure and post-translational modification of the desired products. One of the ways to achieve production of recombinant proteins in human cell lines is the use of lentiviral vectors.

This thesis describes the preparation of the lentiviral vector (plasmid) Daedalus, which contains a construct for recombinant expression of secreted alkaline phosphatase. For the preparation of the desired plasmid methods based on insertion of the secreted alkaline phosphatase gene using the restriction endonucleases and methods based on amplification by polymerase chain reaction (restriction-free cloning, transfer polymerase chain reaction and Gibson assembly) were used.

KEY WORDS

Lentivirus, Daedalus, SEAP, DNA cloning, plasmid

SEZNAM ZKRATEK

A ₂₆₀	Absorbance při vlnové délce 260 nm
A ₂₈₀	Absorbance při vlnové délce 280 nm
ALP	Alkalická fosfatáza
bp	Pár bází (jednotka délky DNA), z angl. base pair
BSA	Hovězí sérový albumin, z angl. bovine serum albumine
dATP	2'-deoxyadenosin trifosfát
dH ₂ O	Deionizovaná voda
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina, z angl. deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynukleotid trifosfáty, z angl. deoxynucleotide triphosphates
DTT	Dithiotreitol
dTTP	2'-deoxythymidin trifosfát
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
HEK293	Označení linie lidských embryonálních ledvinných buněk 293, z angl. human embryonic kidney cell line 293
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti, z angl. human immunodeficiency virus
IRES	Vnitřní místo pro vstup ribozomu, z angl. internal ribosome entry site
kbp	Kilobáze (jednotka o 1000 bází v DNA nebo RNA sekvenci)
LB	Kultivační médium, z angl. lysogeny broth
LIC	Metoda klonování, která může být prováděna nezávisle na restriční endonukleáze a DNA ligáze, z angl. ligase-independent cloning
PCR	Polymerázová řetězová reakce, z angl. polymerase chain reaction
r-protein	Rekombinantní protein
RF	Metoda klonování bez nutnosti štěpení restriční endonukleázou, z angl. restriction free
RNA	Ribonukleová kyselina, z angl. ribonucleic acid
SEAP	Sekretovaná alkalická fosfatáza, z angl. secreted alkaline phosphatase
SOB	Kultivační médium, z angl. super optimal broth
SOC	Kultivační médium, z angl. super optimal broth with catabolite repression
T _m	Teplota, při které se rozděluje dvoušroubovice DNA na dvě vlákna,

z angl. melting temperature

TPCR Klonovací metoda, z angl. transfer polymerase chain reaction

OBSAH

1	Teoretický úvod.....	- 10 -
1.1	Rekombinantní expresní systémy	- 10 -
1.2	Lidské buněčné linie	- 11 -
1.3	Transfekce	- 12 -
1.4	Metody virové transdukce.....	- 13 -
1.4.1	Lentivirové transdukční systémy.....	- 13 -
1.4.2	Lentivirový systém Daedalus	- 15 -
1.5	Sekretovaná alkalická fosfatáza jako repotrénový gen.....	- 16 -
1.6	Metody klonování založené na polymerázové řetězové reakci	- 17 -
1.7	Gibsova reakce.....	- 20 -
2	Cíle práce.....	- 21 -
3	Materiál.....	- 22 -
3.1	Přístroje a pomůcky	- 22 -
3.2	Enzymy	- 23 -
3.3	Pufry pro enzymy.....	- 23 -
3.4	Bakteriální kmeny.....	- 24 -
3.5	Vektory	- 24 -
3.6	Primery pro PCR.....	- 24 -
3.7	Kultivační média.....	- 25 -
3.8	Roztoky.....	- 25 -
3.9	Chemikálie	- 25 -
4	Metody.....	- 27 -
4.1	Příprava lentivirového vektoru	- 27 -
4.1.1	Příprava zásobního množství plazmidu.....	- 27 -
4.1.2	Měření čistoty a koncentrace plazmidové DNA.....	- 28 -
4.1.3	Agarózová elektroforéza.....	- 28 -
4.1.4	Extrakce DNA z agarózového gelu	- 29 -
4.1.5	Transformace tepelným šokem a rychlá transformace	- 29 -
4.1.6	Nízkoobjemová příprava plazmidové DNA	- 30 -
4.1.7	Sekvenování DNA	- 30 -
4.1.8	Štěpení restrikčními endonukleázami.....	- 31 -

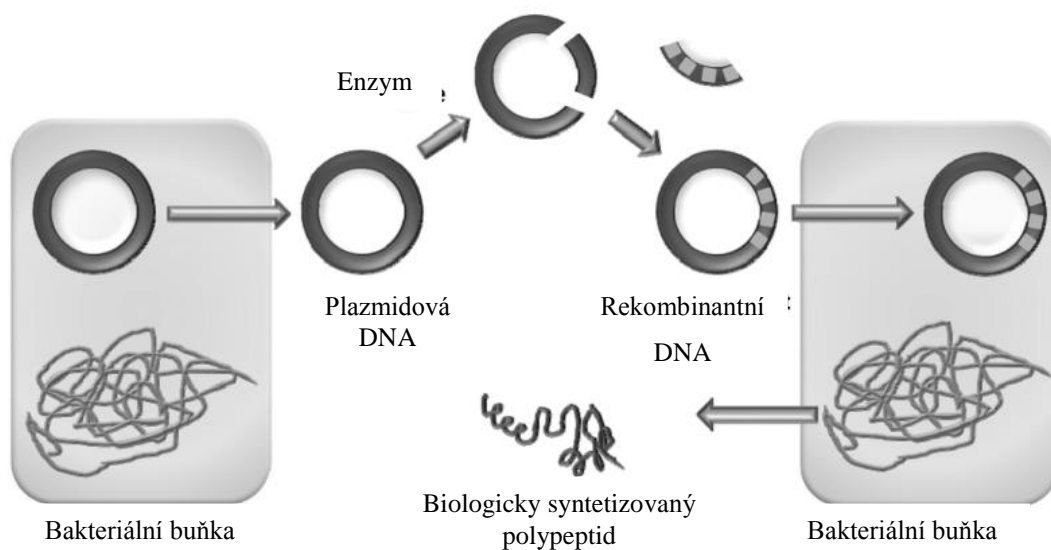
4.1.9	Štěpení methylované DNA.....	- 31 -
4.1.10	Srážení DNA	- 31 -
4.1.11	Klonování nezávislé na ligáze	- 32 -
4.1.12	Standardní klonování.....	- 33 -
4.2.	Polymerázová řetězová reakce.....	- 34 -
4.2.1	Standardně prováděná polymerázová řetězová reakce	- 34 -
4.2.2	Polymerázová řetězová reakce z kolonií	- 35 -
4.2.3	Přenosová polymerázová řetězová reakce.....	- 35 -
4.2.4	Amplifikace plazmidu Daedalus pro Gibsnovu reakci.....	- 36 -
4.2.5	Klonování bez restričního štěpení	- 36 -
5	Výsledky.....	- 38 -
5.1	Příprava lentivirového expresního plazmidu	- 38 -
5.1.1	Příprava zásobního množství plazmidu.....	- 39 -
5.1.2	Sekvenace	- 39 -
5.1.3	Kontrola štěpení DpnI, XhoI a BamHI.....	- 39 -
5.2	Klonování nezávislé na ligáze	- 40 -
5.2.1	První způsob klonování nezávislého na ligáze	- 41 -
5.2.2	Druhý způsob klonování nezávislého na ligáze	- 42 -
5.3	Standardní klonování	- 42 -
5.4	Amplifikace plazmidu Daedalus pro Gibsnovu reakci	- 45 -
5.5	Klonování bez restričního štěpení.....	- 46 -
5.6	Přenosová polymerázová řetězová reakce	- 47 -
6	Diskuse	- 51 -
7	Závěr.....	- 53 -
8	Seznam použité literatury	- 54 -

1 TEORETICKÝ ÚVOD

Až do sedmdesátých let dvacátého století byla DNA jednou z nejobtížněji analyzovatelných buněčných molekul. Tuto komplexní molekulu složenou z vláken spojených nukleotidů bylo možno studovat jen nepřímo. Dnes je situace zcela jiná a DNA se pro nás stala jednou z nejsnadněji analyzovatelných molekul. Nyní je možné izolovat specifický region v genomu, vyrobit téměř neomezené množství jeho kopií a gen poté využít k vložení do cíleného hostitelského organismu [1].

1.1 REKOMBINANTNÍ EXPRESNÍ SYSTÉMY

Dne 2. prosince 1980 přijal patentový úřad Spojených států jeden z nejvýznamnějších patentů v biotechnologii, známý jako Cohenův-Boyerův patent klonování rekombinantní DNA. Tomu předcházela série pokusů, jimiž se podařilo za použití restričních endonukleáz do plazmidu vložit cizorodý gen. Ten byl pomnožen v bakteriích, které následně produkovaly protein kódovaný cizorodým genem. Takto byl položen základ exprese rekombinantních proteinů (tzv. r-proteinů) (obr. 1) [2 - 4].



Obr. 1: Schéma rekombinantní exprese.

Gen, který chceme exprimovat, je vložen do plazmidu, kterým je následně transformován hostitelský organismus. Ten poté produkuje cílený polypeptid.

Převzato a upraveno z: [5]

Objevení a rozvoj polymerázové řetězové reakce (PCR, z anglického polymerase chain reaction) [6], restričního štěpení [7] a DNA sekvenování [8, 9], znamenaly průlom v genetickém inženýrství [1]. Díky těmto technikám můžeme nyní navrhovat a produkovat rekombinantní proteiny, ať už pro potřeby průmyslu, nebo jako farmaka. Tato odvětví si, na rozdíl od vědeckých laboratorních testů, žádají produkce s vysokým výtěžkem. Metoda rekombinantní exprese je založena na využití přirozeného proteosyntetického aparátu v hostitelských organizmech, kterých je možno v kultivačních médiích namnožit veliké množství, ať už jde o prokaryotické, či eukaryotické buněčné linie. Nejběžněji využívaným organismem pro rekombinantní expresi je nejlépe popsána bakterie *E. coli*, používaná pro svou nenáročnost na kultivační podmínky (a tím i cenovou dostupnost). K rekombinantní expresi jsou využívány i další organizmy, jednak jiné bakteriální linie, např. *B. subtilis*, nebo i kvasinky, vláknité houby, či hmyzí buněčné linie [10]. Rostlinné systémy nejsou pro produkci r-proteinů příliš rozšířené, přestože mají mnoho výhod. Mezi tyto výhody patří nízká pořizovací cena a také nízké riziko infekce živočišnými patogeny [11] naopak nevýhodou jsou některé posttranslační modifikace (glykosilace).

Farmaceutické využití rekombinantních proteinů z těchto organismů je limitováno především přítomností některých posttranslačních modifikací a terciálních struktur. V některých případech by takto „nekompatibilní“ proteiny mohly způsobovat alergické reakce. Z toho důvodu jsou pro mnohé rekombinantní exprese používány lidské buněčné linie [11], které produkují proteiny s přirozenou terciární strukturou a posttranslačními modifikacemi, jako jsou glykosylace, fosforylace, modifikace aminokyselin a další. Nevýhodou takových systémů je vysoká náročnost na vybavení a pořizovací cena.

1.2 LIDSKÉ BUNĚČNÉ LINIE

Lidské buněčné linie se s oblibou využívají právě kvůli produkci nativních r-proteinů. Často je využívána linie lidských ledvinných embryonálních buněk číslo 293 (HEK293, z anglického human embryonic kidney cell line 293) Tato linie byla vytvořena roku 1970 Frankem Grahamem. Linie byla odvozena z primárních lidských ledvinných buněk z potracených embryí, imortalizovaných transformací virovou DNA z adenoviru 5 [12].

1.3 TRANSFEKCE

Transfekcí se rozumí proces vložení cizorodé DNA do buňky. To může být provedeno mnoha způsoby. Většinou se využívají buď bakteriální vektory (plazmidy), nebo virové vektory (v tom případě mluvíme o transdukci), do kterých byly vloženy požadované geny. Plazmidy jsou do cílených buněk vkládány pomocí přirozené infekce, nebo pomocí fyzikálních či chemických metod. Mezi nejobvyklejší metody patří elektroporace, kdy je pomocí pulzů vysokého napětí dočasně zvýšena permeabilita buněčné membrány. Podobnou metodou je elektrická permeabilizace, která využívá nízkého napětí a pulzů o vysoké frekvenci. Na rozdíl od fyzikálních metod, jsou chemické metody méně náročné na vybavení. Navíc je nižší riziko usmrcení transfekovaných buněk. Mezi nejběžnější chemické metody patří lipofekce, kdy je plazmid uzavřen do lipozomu, který následně splývá s cílovou buňkou [13]. Dalším často využívaným postupem je precipitace DNA fosforečnanem vápenatým. Vzniklé mikročástice precipitátu jsou adsorbovány na buněčný povrch a poté endocytovány. Další možností transfekce je využití polyaminoamidových dendrimerů [14]. Ty jsou schopny dopravit kondenzovanou DNA do cílené buňky s minimální toxicitou.

Podle způsobu včlenění cizorodé DNA do hostitelského organismu rozlišujeme transfekci tranzientní a stabilní. Časově velice náročný postup stabilní transfekce spočívá v inkorporaci cíleného genu do genomu hostitelské buňky. Z transfekované kultury je poté vybrána jedna buňka s vhodnými vlastnostmi, např. vysokou produkcí rekombinantního proteinu. Ta je poté klonována a vzniklá buněčná linie je použita k produkci r-proteinu s vysokým výtěžkem. U tranzientní transfekce nedochází k začlenění cizorodé DNA do genomu. Tranzientní transfekce sice nemá tak vysoké a dlouhodobé výtěžky, ale je časově nesrovnatelně rychlejší (v řádech dnů, zatímco stabilní transfekce i v řádech měsíců). Tranzientně transfekovaná DNA se při mitóze nepřenáší na dceřiné buňky, proto je produkce r-proteinů časově omezená. Tranzientní transfekce se provádí především v malých objemech buněčné suspenze, ale i ve velkých, až stolitrových bioreaktorech. Množství r-proteinů produkovaných tranzientně transfekovanými buňkami postačuje pro jejich strukturní a funkční charakterizaci [15, 16].

1.4 METODY VIROVÉ TRANSDUKCE

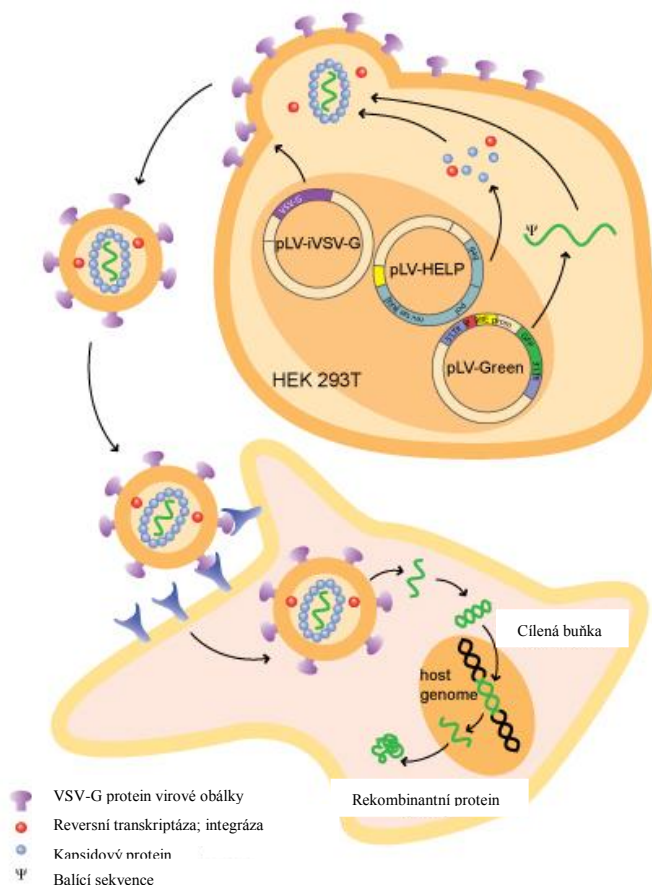
K přípravě virových vektorů jsou používány dvě skupiny virů. Ty jsou děleny podle toho, zda svůj genom zabudovávají do chromatinu hostitelské buňky (onkoretroviry, lentiviry), nebo jejich DNA přetrvává jako extrachromozomální jednotka v jádře (adenoviry). Virové vektory jsou velmi účinné. Jejich nevýhodou je omezená kapacita pro přenášenou DNA (kódující proteiny do velikosti přibližně 70 kDa) [17] a potenciální toxicita.

1.4.1 LENTIVIROVÉ TRANSDUKČNÍ SYSTÉMY

Lentivirové vektory byly odvozeny z virů, patřících do čeledi *Retroviridae*. Retroviry jsou čleď RNA virů, které přepisují svou genetickou informaci do DNA cílové buňky pomocí enzymu reverzní transkriptázy (obr. 2, str. 14). Lentivirové vektory jsou vhodné nástroje k přenosu genů, ať už v aplikovaném výzkumu, nebo v genové terapii. Mezi jejich hlavní výhody patří schopnost stabilní integrace DNA jak do dělicích se, tak do nedělicích se buněk, a dlouhodobá genová exprese.

V současnosti nejpoužívanější lentivirové vektory jsou odvozeny od viru lidské imunitní nedostatečnosti typu 1 (HIV-1 z anglického human immunodeficiency virus). Virus HIV je stále intenzivně studován, především kvůli terapii infekce HIV, a v současnosti je asi nejlépe prozkoumaným virem. Proto je nejčastěji používán právě ke konstrukci lentivirových vektorů. K témuž účelu byly použity i některé jiné lentiviry, například virus koňské infekční anémie (EIAV), či virus lidské imunitní nedostatečnosti typu 2 (HIV-2) [18].

Riziko při používání všech lentivirových vektorů je spojeno s podstatou retrovirového životního cyklu, založeného na integraci virového genomu do genomu hostitelské buňky. Po infekci tyto viry transkribují svou jednovláknovou RNA do dvouvláknového DNA intermediátu, proviru. Provirus poté může být včleněn do genomu hostitelské buňky [19].



Obr. 2: Schéma produkce lentivirového vektoru a následné transdukce.

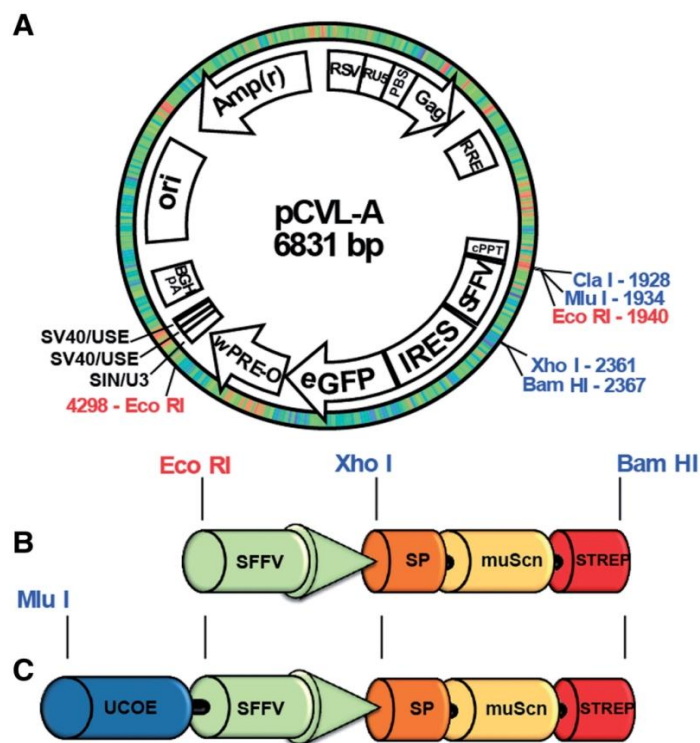
Pomocí tří plazmidů, transfekovaných do hostitelské buňky je produkován požadovaný lentivirový vektor, který může infikovat cílenou buňku. Požadovaný gen je vložen do genomu cílené buňky, která poté stabilně produkuje rekombinantní protein. Plazmid pLV-iVSV-G vytváří protein virové obálky a plazmid pLV-HELP vytváří proteiny virové kapsidy, do kterých je sbalena virová DNA obsahující požadovaný gen, produkovaná plazmidem pLV-Green.

Převzato a upraveno z: [20]

Aby se eliminovala rizika spojená s užíváním lentivirových vektorů, ale zároveň se zachovala vysoká transdukční účinnost, byl původní virový obal nahrazen obalem virové vezikulární somatidy G (VSV-G). Takto konstruovaný lentivirový vektor může být použit k transdukci téměř všech savčích buněk. Zároveň tyto lentiviry mohou být inaktivovány sérem v lidských buňkách. Odstraněním genů odpovídajících za virulenci bylo zamezeno generování a množení replikace schopných virů. Dalším krokem ke zvýšení bezpečnosti používání lentivirových vektorů byla delece genu kódujícího transkripční aktivátor Tat protein (trans-activating protein), který je zodpovědný za vysokou míru replikace HIV [19].

1.4.2 LENTIVIROVÝ SYSTÉM DAEDALUS

Lentivirový systém Daedalus, původně vyvinutý pro vlastní potřebu produkce nativně glykosilovaného savčího proteinu siderokalinu ke krystalografickému studiu na University of Washington v Seattlu, se stal nástrojem pro rekombinantní expresi proteinů v buněčné linii HEK293 Freestyle (linie uzpůsobená pro kultivaci v bezsérových médiích). Tento systém je schopen produkovat velké množství sekretovaného r-proteinu, který lze snadno purifikovat. Do vektoru Daedalus byl vložen zkrácený 0,7kbp UCOE (ubiquitous chromatin opening element) fragment (obr. 3). Jeho zabudováním do lentivirového vektoru bylo dosaženo zvýšené stabilní exprese rekombinantních proteinů o velikosti blízcí se 70 kDa. Do vektoru byl navíc vložen fluorescentní reportérový gen s vlastním vnitřním místem pro vstup ribozomu (IRES, z anglického internal ribosome entry site). Ten umožňuje rychlou detekci transdukovaných populací a měření relativní úrovně proteinové exprese [17].



Obr. 3: Mapa lentivirového vektoru použitého pro vývoj vektoru Daedalus

A: Lentivirový konstrukt pCVL-A,

B: Konstrukt bez sekvence UCOE

C: Konstrukt obsahující minimalizovaný úsek UCOE 0,7

Legenda: SP: signální peptid; UCOE: „ubiquitous chromatin opening element“; SFFV: „spleen focus-forming virus enhancer/promoter“; muScn: murin siderokalin; IRES: vnitřní místo pro vstup ribozomu.

Převzato a upraveno z [17]

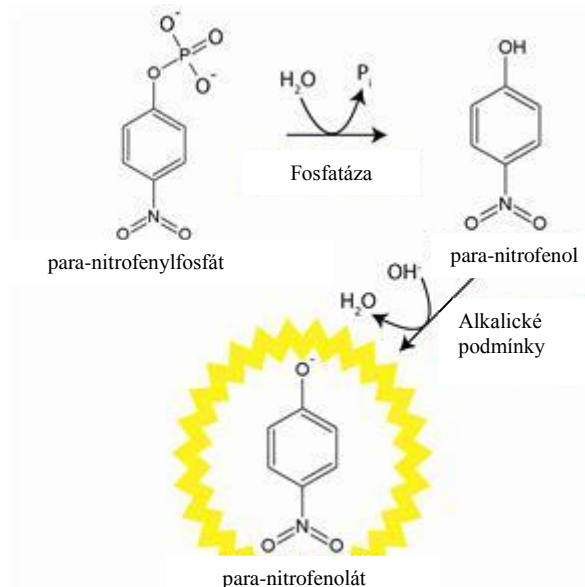
K vložení požadovaného genu se užívá restrikčních míst pro endonukleázu BsmBI. Tato místa ohraničují gen SacB, jenž způsobuje letalitu buněk, transformovaných tímto vektorem, jsou-li pěstovány v médiu s přidanou sacharózou. Sekvence SacB je poté nahrazena požadovaným genem. Plazmid navíc obsahuje gen rezistence na ampicilin. Oba tyto geny jsou využívány jako selekční znaky při získávání zásobního množství plazmidu Daedalus.

1.5 SEKRETOVANÁ ALKALICKÁ FOSFATÁZA JAKO REPORTÉROVÝ GEN

Abychom byli schopni zhodnotit výsledky optimalizace zavedeného expresního systému r-proteinů, je třeba zvolit vhodný gen, který transdukovaným buňkám udělí vlastnost, kterou můžeme snadno sledovat. Takové geny se nazývají reportérové a lze je dobře využít pro optimalizaci rekombinantní exprese. Reportérový gen musí být u sledovaných buněčných linií přítomen pouze v plazmidu (či virovém vektoru) a nesmí být původně přítomen v DNA transfekované (či transdukované) buňky. Sledovaný protein samozřejmě nesmí být pro buňku toxický.

Alkalická fosfatáza (ALP) (EC 3.1.3.1) je skupina hydrolytických enzymů, katalyzujících uvolňování anorganických fosfátů z organických fosfátových monoesterů za vzniku alkoholu. Optimálně působí při alkalickém pH (9,0 – 10,5). U člověka se vyskytuje ve čtyřech izoenzýmech, placentární, embryonální, střevní a tkáňově nespecifický. Jednotlivé izoenzymy lze snadno elektroforeticky separovat. Alkalická fosfatáza je hojně studována i pro klinické využití. Používá se ke stanovení některých kostních a nádorových onemocnění [21].

Pro eukaryotické rekombinantní exprese se s výhodou může používat sekretovaná alkalická fosfatáza (SEAP). Tento velmi stabilní protein byl zbaven membránové kotvy, proto je buňkou sekretován do kultivačního média, kde lze snadno stanovit již v malých koncentracích [22, 23]. Alkalická fosfatáza se stanoví reakcí vzorku média s para-nitrofenylfosfátem v alkalickém prostředí (obr. 4, str. 17). Produkt této reakce, para-nitrofenolát, lze stanovit spektrofotometricky při 410 nm.



Obr. 4: Reakce para-nitrofenylfosfátu katalyzovaná alkalickou fosfatázou

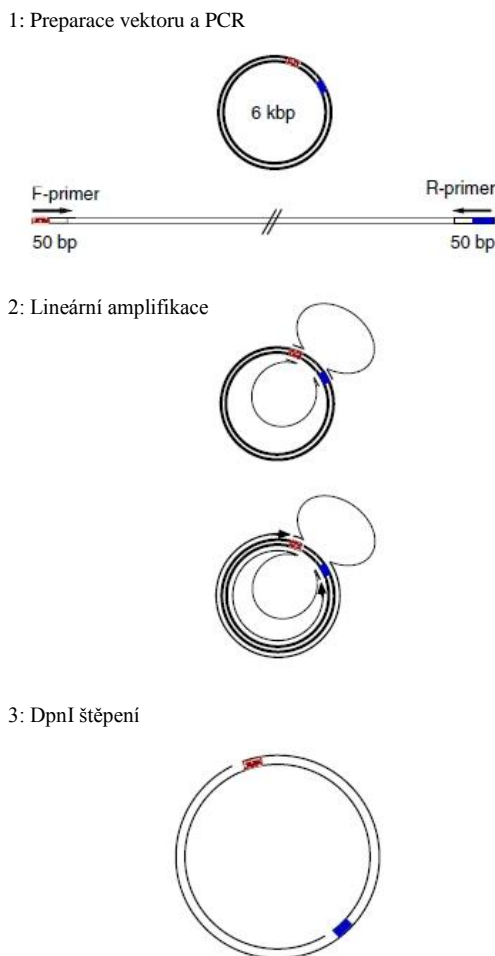
Para-nitrofenylfosfát v alkalickém prostředí za katalýzy alkalickou fosfatázou poskytuje barevný produkt, který je možno spektrofotometricky stanovit.

Převzato a upraveno z: [24]

1.6 METODY KLONOVÁNÍ ZALOŽENÉ NA POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCI

Klonování bez restričního štěpení (tzv. RF klonování, z anglického restriction-free cloning) představuje jednoduchou univerzální metodu, která umožňuje vložit DNA fragment do kteréhokoli požadovaného místa v cirkulárním plazmidu, nezávisle na restričních místech. Tato technika využívá PCR fragmentů, kódujících požadovaný gen, jako dvojice primerů v lineární amplifikaci celého plazmidu. RF klonováním lze vložit kompletní gen bez vzniku nežádoucích vedlejších produktů.

PCR amplifikace je uskutečněna ve dvou krocích (obr. 5, str. 18). V prvním kroku se vhodně navrženými oligonukleotidy amplifikuje požadovaný gen. Oligonukleotidy jsou obvykle dlouhé přibližně 50 párů bází a jsou navrženy tak, aby částí nasedaly na požadovaný gen a částí na cílový plazmid. Po prvním kroku máme k dispozici amplifikovaný gen s přesahem pro nasedání na plazmid. Tímto produktem je ve druhém kroku amplifikován celý plazmid. Výsledným produktem těchto reakcí je plazmid s požadovaným inzertem. Aby se z reakční směsi odstranil původní plazmid, je vhodné provést reakci s enzymem DpnI [25, 26].



Obr. 5: Schéma RF klonování

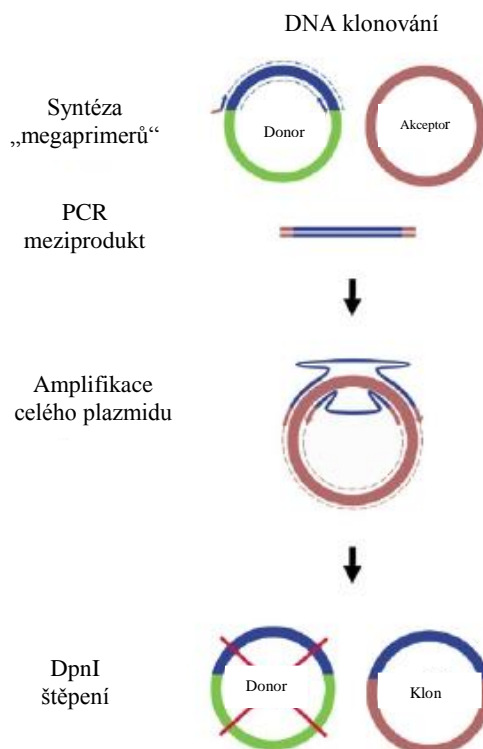
V prvním kroku je vhodně navrženými oligonukleotidy amplifikován požadovaný gen (1). Ve druhém kroku je tímto „superprimerem“ amplifikován celý plazmid (2). Produktem této reakce je plazmid s požadovaným genem. Reakční směs je poté štěpena enzymem DpnI (3), aby byl odstraněn původní plazmid.

Převzato a upraveno z: [25]

Enzym DpnI štěpí methylovanou DNA. Ta je produkována většinou běžných bakteriálních kmenů. Při PCR methylace neprobíhá, takže jsou DpnI štěpeny pouze původní plazmidy bez požadovaného genu. Metodou RF klonování je možné s vysokou účinností amplifikovat plazmidy o délce až 15 kbp [25].

Novější metoda přenosová polymerázová řetězová reakce (TPCR, z anglického transfer polymerase chain reaction) je založena na podobném principu. Stejně jako u RF klonování se z donorového plazmidu vhodně navrženými oligonukleotidy amplifikuje požadovaný gen, jehož pomocí je poté amplifikován celý plazmid (obr. 6, str. 19).

Výhoda této metody spočívá v tom, že je uskutečnitelná v jedné reakční směsi volbou vhodného teplotního programu bez potřeby purifikace prvního PCR produktu. Stejně jako u RF klonování je původní templát štěpen enzymem DpnI [27].



Obr. 6: Schéma TPCR

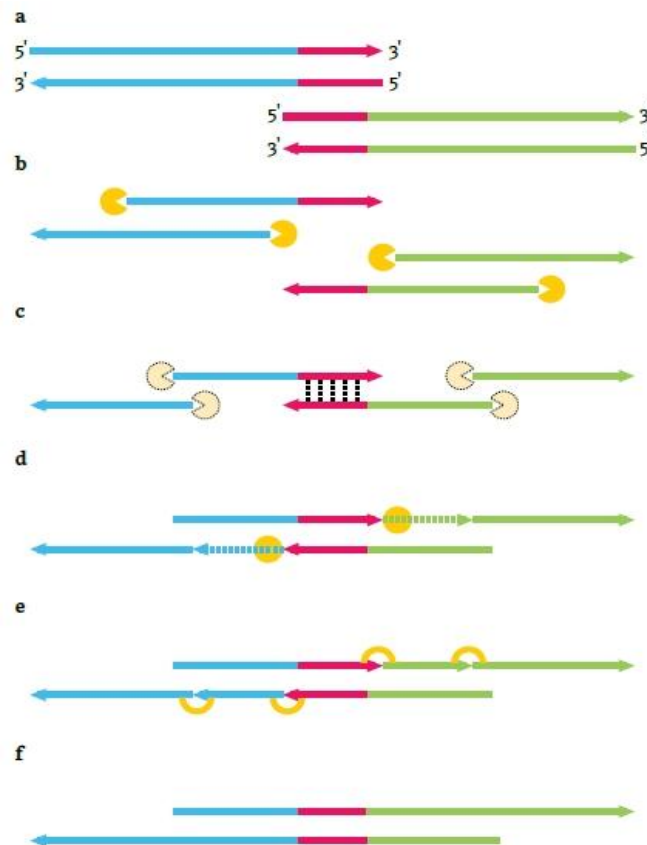
V prvním kroku je vhodně navrženými oligonukleotidy amplifikován z donorového plazmidu (modrozelený) požadovaný gen, kterým je ve stejné reakční směsi amplifikován celý plazmid (hnědý). Produktem této reakce je plazmid s požadovaným genem. Reakční směs je poté štěpena enzymem DpnI, aby byl odstraněn původní plazmid.

Převzato a upraveno z: [27]

Oligonukleotidy pro amplifikaci požadovaného genu se navrhují tak, aby T_m té části, která nasedá na gen, byla o trochu nižší, než T_m části, která nasedá na plazmid. Optimální koncentrace primerů pro TPCR je 10 – 20 nM, což je mnohem méně, než u běžných PCR (200 – 1000 nM). Zároveň je požadováno velmi malé množství donorového a cíleného plazmidu (10 ng). Metoda je tedy z ekonomického hlediska velmi výhodná. Teplotní program PCR se skládá ze dvou částí. V první části, obvykle o třinácti cyklech, se s nižší teplotou nasedání amplifikuje gen. Ve druhé části se ve dvaceti cyklech amplifikuje plazmid i s požadovaným genem [27].

1.7 GIBSNOVA REAKCE

Gibsova reakce (Gibson Assembly), je poměrně jednoduchým a rychlým nástrojem pro spojování většího množství DNA fragmentů. Podmínkou je, aby požadované spojované geny měly komplementární konce. Ty je možno ke genu připojit PCR s vhodně navrženými oligonukleotidy. V jedné zkumavce jsou všechny spojované DNA fragmenty inkubovány s T5 exonukleázou, která vytvoří na spojovaných fragmentech 3' jednolávkové komplementární přesahy. Tyto komplementární konce (obvykle o velikosti okolo 20 párů bází) na sebe nasedají a T5 exonukleáza je tepelně inaktivována. Chybějící část DNA je poté doplněna DNA polymerázou a pevně spojena DNA ligázou (obr. 7) [28].



Obr. 7: Schéma metody Gibsovy reakce

Dva fragmenty DNA s komplementárními konci (a) jsou smíchány v jedné zkumavce. T5 exonukleáza vytvoří jednolávkové komplementární přesahy (b), které na sebe nasedají (c) a T5 exonukleáza je tepelně inaktivována. Polymeráza doplní chybějící nukleotidy (d) a vlákna jsou spojena ligázou (e). Výsledkem je dvouvláknová DNA složená z původních dvou fragmentů (f).

Převzato a upraveno z: [29]

2 CÍLE PRÁCE

Cílem práce byla příprava lentivirového vektoru (plazmidu), obsahujícího konstrukt umožňující expresi proteinu sekretované alkalické fosfatázy.

3 MATERIÁL

3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Autokláv Varioklav 400 E	H+P Labortechnik GmbH, Německo
Automatické pipety	Discovery HTL, Polsko
Automatické pipety	Pipetman Gilson, USA
Centrifuga 5415 R	Eppendorf, Německo
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Universal 320 R	Hettich, Německo
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Fotoaparát Cyber-shot DSC W570	SONY, Japonsko
Gel/ PCR DNA Fragments Extraction Kit	Geneaid, USA
High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid, USA
Inkubátor IR 5000	Flow Laboratories, USA
Kahan Fuego	SCS VERKON, ČR
Laminární box Clean Air.	PMV, Nizozemí
Lednice 225 R	Calex, ČR
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Mikrocentrifuga MiniStar silverline	VWR, USA
Mrazicí box (-20 °C)	Calex, ČR
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
pH metr Φ 200	Beckman Coulter, USA
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Rotační vakuová odparka SpeedVac DNA 110	Savant, USA
Souprava pro agarózovou elektroforézu	Biokeystone, USA
Spektrofotometr NanoVue Plus GE	Healthcare, UK
Spektrofotometr UV/VIS UV4-500	UNICAM, UK
Termoblok LS1	VLM, Německo
Termocykler Progene	Techne, UK
Termocykler Techgene	Techne, UK
Třepačka Orbi-Safe TS	Gallenkamp, UK
Třepačka Multitron	Infors HT, Švýcarsko

UV prosvěcovací lampa (300 nm)	Ultra-Lum, USA
UV prosvěcovací lampa (312 nm)	Uvitec, UK
Vaňič	ETA, ČR
Vodní lázeň TW2	Julabo, Německo
Vortexový mixér VELP	Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA
Zdroj napětí EC 250-90 EC	Apparatus Corporation, UK
ZymoPure Maxi Prep Kit	Zymo Research, USA

3.2 ENZYMY

BamHI	New England Biolabs, USA
BclI	New England Biolabs, USA
BsmBI	New England Biolabs, USA
Deep Vent DNA polymeráza	New England Biolabs, USA
DpnI	New England Biolabs, USA
Phusion DNA polymeráza	New England Biolabs, USA
Q5 DNA polymeráza	New England Biolabs, USA
RNasa A	Serva, USA
T4 DNA Ligáza	New England Biolabs, USA
T4 DNA Polymeráza	New England Biolabs, USA
XhoI	New England Biolabs, USA

3.3 PUFRY PRO ENZYMY

NEBuffer 2	New England Biolabs, USA
NEBuffer 3.1	New England Biolabs, USA
NEBuffer 4	New England Biolabs, USA
Phusion HF reakční pufr	New England Biolabs, USA
Q5 reakční pufr	New England Biolabs, USA
Reakční pufr pro T4 DNA ligázu	New England Biolabs, USA
ThermoPol reakční pufr	New England Biolabs, USA

3.4 BAKTERIÁLNÍ KMENY

Z kompetentní *E. coli* DH5 α

Mgr. Jan Bláha, PřF UK, Praha

E. coli XL 10-Gold

Mgr. Jan Bláha, PřF UK, Praha

3.5 VEKTORY

Plazmid Daedalus

Dr. Ashok D. Bandaranayake PhD.,

University of Washington, Seattle

pTTo3c-SSH-SEAP

Dr. Yves Durocher PhD, CNRC, Montreal,
Canada

pTW5 (SEAP)

Bc. Edita Poláchová, PřF UK, Praha

3.6 PRIMERY PRO PCR

LV_SEQ_NEW_FW

5'- GCGCGCTTCTGCTTCCCG-3'

LV_SEQ_NEW_REV

5'- TATTCCAAGCGGCTTCGGCC-3'

LV_SEAP_FW

5'- CCTCTCGGCCTGCCTGTGCTACCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGC-3'

LV_SEAP_REV

5'- GGTTCCTCGCTTCCGCCATCACTGTCCTCCATGGTGATGGTGATGGTGATG-3'

LV_SEAP_XhoI_FW

5'- AAAAACTCGAGGCCACCATGCTGCTGCTGCTGC-3'

LV_SEAP_BclI_REV

5'- TTTTTTTGATCACTGTCCTCCATGGTGATGGTGATG-3'

LV_SEAP_TPCR_FW

5'-CTCGAGACCTCTCGGCCTGCCTGTGCTACCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGG
GC-3'

LV_SEAP_TPCR_REV

5'- TGA CTGGAAGTACAGGTTCTCGCTTCCGCCATCACTGTCCTCCATGGTGATGGTG
ATGGTGATG-3'

LV_SEAP_Gb_FW

5'- TCACCATGGAGGACAGTGATGGCGGAAGCGAGAACCTGTACTTCCAGTCA-3'

LV_SEAP_Gb_REV

AGCAGCAGCAGCAGCAGCATGGTAGCACAGGCAGGCCGAGAGGTCTCGAG-3'

SEAP_FW

5'-AAAAACCGGTCTGCTGCTGCTGCTGCTG-3'

SEAP_REV

5'-TTTTGGTACCTCACTGTCCTCCATGGTGATG-3'

pTW5_SEQ_REV

5'-AAGCAGCGTATCCACATAGCG-3'

pTT_FW

5'-TGATATTCACCTGGCCCGATCTG-3'

3.7 KULTIVAČNÍ MÉDIA

LB médium – 1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH = 7,4

SOC médium – 2% trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 0,05% NaCl, 0,02% KCl, 10mM

MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glukóza, pH = 7,0

3.8 ROZTOKY

LBamp – LB médium s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml

LBamp s 5% sacharózou – LB médium s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml a 5% sterilní sacharózou

Pufr pro agarózovou elektroforézu TAE – 40mM Tris, 20mM CH₃COOH, 1mM EDTA

Vzorkový pufr pro agarózovou elektroforézu – 30% glycerol, bromfenolová modř, TAE

Roztoky pro maxipreparaci plazmidové DNA Zymo Research, USA

Roztoky pro miniizolaci plazmidové DNA Geneaid, USA

Roztoky pro extrakci z gelu Geneaid, USA

Roztoky pro přečištění PCR produktů Geneaid, USA

3.9 CHEMIKÁLIE

1 kbp DNA standard New England Biolabs, USA

2-merkaptoethanol Sigma, USA

Agar Oxoid, Anglie

Agaróza Sigma, USA

Ampicilin Biotika, SR

BSA 10 × koncentrovaný New England Biolabs, USA

DMSO	New England Biolabs, USA
Combi PPP Master Mix	Top-Bio, Česká republika
dNTPs, 10 mM	Top-Bio, ČR
EDTA	Jersey Lab Supply, USA
Good View	Ecoli, Slovensko
Kvasničný extrakt	Imuna Pharm, SR
PCR MgSO ₄ , 100 mM	New England Biolabs, USA
PCR H ₂ O	Top-Bio, ČR
Q5 enhancer	New England Biolabs, USA
Ostatní běžné chemikálie	Lach-Ner, ČR

4 METODY

4.1 PŘÍPRAVA LENTIVIROVÉHO VEKTORU

Hlavním cílem práce byla příprava lentivirového vektoru (plazmidu), obsahujícího konstrukt umožňující expresi proteinu sekretované alkalické fosfatázy. Gen pro SEAP (inzert) bylo třeba získat pomocí PCR. Templáty pro tuto reakci byly plazmidy pTW5 (SEAP) a pTTo3c-SSH-SEAP. Pro vložení inzertu SEAP do lentivirového plazmidu Daedalus byly postupně použity metody klonování nezávislé na ligáze (LIC, z anglického ligase-independent cloning), standardní klonování, TPCR, RF klonování a Gibsnova reakce.

4.1.1 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO MNOŽSTVÍ PLAZMIDU

Buněčná suspenze Z kompetentních *E. coli* DH5 α (připravené pomocí soupravy Zymo Pure a umožňují rychlou transformaci) byla po 100 μ l smíchána ve vychlazené 1,5ml mikrozkuhavce s 2 μ l roztoku plazmidu Daedalus o koncentraci 1 μ g/ μ l a transformována metodou rychlé transformace (4.1.5). Poté byla směs ve sterilním laminárním boxu rozetřena na předehřátou (37 °C) Petriho misku s ampicilinem. Pro kontrolu bylo použito 100 μ l Z kompetentních *E. coli* DH5 α . Petriho misky s LB agarem byly předem připraveny rozvařením agaru v LB médiu (1,5% agar). Po zchladnutí přibližně na 50 °C byl přidán ampicilin do výsledné koncentrace 100 μ g/ml a směs byla nalita asi po 10 ml na misky, kde byla ponechána ke ztuhnutí. Misky s transformanty byly inkubovány přes noc ve 37 °C. Druhý den na ně byly pipetovány 2 ml LBamp a kolonie byly rozmíchány. Vzniklá suspenze byla pipetována do 2l sterilní Erlenmayerovy baňky s 500 ml LBamp a následně inkubována v třepačce 15 hodin při 37 °C a 220 ot/min.

Ve 250ml centrifugačních kyvetách bylo centrifugováno 150 ml bakteriální kultury při 4500 ot/min, 20 min a 4 °C. Bakteriální pelety byly ihned zpracovány pro extrakci DNA, nebo uchovány v - 20 °C pro pozdější využití. Plazmidová DNA byla extrahována pomocí komerční soupravy ZymoPure Maxi Prep. Supernatant byl slit a pelet resuspendován ve 14 ml roztoku P1. Bylo přidáno 14 ml lyzačního roztoku P2 a směs byla jemně promíchána. Po 3 min bylo přidáno 14 ml neutralizačního P3 roztoku a směs byla opět promíchána. Celá směs byla zfiltrována pomocí stříkačky a ZymoPure

filtru do 50ml sterilní zkumavky. Následně bylo přidáno 14 ml vazebného pufru a směs byla promíchána. Vzorek byl nalit na kolonku připojenou k vakuové pumpě a zfiltrován přes kolonku za sníženého tlaku. Kolonka byla následně promyta 5 ml roztoku „Wash 1“ a dvakrát 5 ml roztoku „Wash 2“. Kolonka byla poté umístěna do mikrozukavky a vysušena centrifugací při $10000 \times g$, 1 min. DNA byla eluována 400 μ l sterilní dH₂O předehřáté na 50 °C.

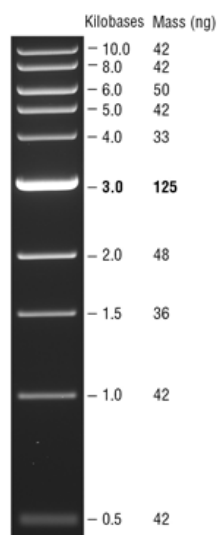
4.1.2 MĚŘENÍ ČISTOTY A KONCENTRACE PLAZMIDOVÉ DNA

Vzorek DNA byl $300 \times$ naředěn v dH₂O a jeho absorbance byla změřena při 280 a 260 nm za použití dH₂O jako slepého vzorku. Čistota vzorku byla spočtena poměrem A_{260}/A_{280} . Roztok čisté DNA má tento poměr roven 1,8. Odchytky od této hodnoty jsou způsobeny kontaminanty, např. bílkoviny, kdy je tento poměr větší než 1,8, či RNA, kdy je poměr absorbancí větší než 1,8. Koncentrace vzorku byla spočtena z empirického vztahu pro závislost absorbance DNA při 260 nm, která je v roztoku dvoušroubovice DNA o koncentraci 50 μ g/ml rovna 1.

Další možností měření koncentrace a čistoty bylo použití spektrofotometru Nano Vue Plus. Referenčním vzorkem byly 3 μ l sterilní dH₂O. Pro měření koncentrace a čistoty byly použity 3 μ l vzorku a hodnoty byly odečteny z displeje přístroje.

4.1.3 AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA

Obvykle používaný 0,8% gel pro agarózovou elektroforézu byl připraven povařením 0,52 g agarózy s 65 ml TAE v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí na přibližně 50 °C byly do roztoku přidány 3 μ l Good View barviva. Směs byla nalita do připravené aparatury s hřebenem a po zatuhnutí byl gel převrstven 200 ml dH₂O. Dle návodu bylo do rezervoáru s elektrodami nalito 65 ml a 180 ml TAE. Do jamek byly pipetovány vzorky obsahující desetinu objemu vzorkového pufru. Do jedné dráhy bylo pipetováno 5 μ l 1kbp standardu (obr. 8, str. 29). Elektroforéza probíhala 20 minut při napětí 150 V. K vizualizaci byla použita UV lampa a záření o vlnové délce 312 nm, nebo 300 nm. V případě preparativní elektroforézy byl vzorek ozařován jen nezbytně dlouhou dobu pro vyříznutí vzorku z gelu. Ten byl přenesen do 1,5ml mikrozukavky a ihned extrahován, nebo uchován při -20 °C.



Obr. 8: Vizualizace použitého DNA standardu.

1 kbp DNA standard vizualizovaný ethidium bromidem v 0,8% agarózovém gelu při celkové nanášece 5 μ g.

Převzato a upraveno z: [30]

4.1.4 EXTRAKCE DNA Z AGARÓZOVÉHO GELU

Extrakce z agarózového gelu byla provedena pomocí soupravy Geneaid Gel/ PCR DNA Fragments Extraction Kit [31] podle návodu od výrobce. Do mikrozkuhavky s vyříznutým vzorkem o hmotnosti do 300 mg bylo pipetováno 500 μ l roztoku DF. Byl-li vzorek těžší než 300 mg, byl rozdělen do dvou mikrozkuhovek a dále se postupovalo stejně. Směs byla krátce promíchána na vortexu a poté rozpouštěna 10 minut při 60 °C. Během inkubace byla směs několikrát promíchána. Vzorek byl poté pipetován do extrakční kolonky umístěné ve sběrné mikrozkuhavce a centrifugován 30 s při 16 000 \times g. Kolonka byla následně promyta 400 μ l roztoku „W1 Buffer“ a centrifugována 30 s při 16 000 \times g. Poté byla promyta 600 μ l roztoku „Wash Buffer“ (s přidaným ethanolom) a centrifugována za týchž podmínek. Dále byla kolonka vysušena centrifugací při 16 000 \times g po dobu 3 min. DNA byla eluována 50 μ l sterilní dH₂O přehřáté na 70 °C.

4.1.5 TRANSFORMACE TEPELNÝM ŠOKEM A RYCHLÁ TRANSFORMACE

Z kompetentní *E. coli* jsou uchovávány v 200 μ l alikvotách při – 80 °C. Potřebný počet alikvot byl rozmrazován 30 min v ledové lázni. Přibližně 100 μ l buněčné suspenze bylo ve vychlazené 1,5ml mikrozkuhavce smícháno s příslušným množstvím

roztoku plazmidu a ponecháno 10 minut v ledové lázni. Následně byly transformanty natřeny na Petriho misky s LB agarem.

Alikvoty *E. coli* kmenu XL 10-Gold byly ponechány na ledové tříšti aby rozmrzly. Buněčná suspenze byla následně pipetována po 50 μ l do vychlazených 1,5ml mikrozkušavek, smíchána s roztokem plazmidu a ponechána na ledové tříšti 30 minut. Tepelný šok byl proveden při 42 °C po dobu 30 s. Dále bylo přidáno 700 μ l přehřátého (37 °C) SOC média a transformanty byly inkubovány při 37 °C a třepání 220 ot/min po dobu 1 hod. Suspenze byla pipetována na přehřáté Petriho misky s SOB agarem a přidaným ampicilinem a dále inkubována přes noc při 37 °C.

4.1.6 NÍZKOOBJEMOVÁ PŘÍPRAVA PLAZMIDOVÉ DNA

Pro nízkoobjemovou přípravu plazmidové DNA bylo použito 5 ml bakteriální kultury *E. coli* DH5 α , popřípadě XL 10-Gold, transformované příslušným plazmidem. Tato kultura byla inkubována při 37 °C a 220 ot/min po dobu 15 hod. Plazmidová DNA byla z kultury extrahována pomocí Geneaid High-Speed Plasmid Mini Kit [32] dle návodu od výrobce. Kultura byla centrifugována při 16 000 \times g, bakteriální pelet byl resuspendován v 200 μ l roztoku PD 1. Následně bylo přidáno 200 μ l roztoku PD 2 a směs byla mírně promíchána. Po 2 min bylo přidáno 300 μ l roztoku PD 3, směs promíchána a centrifugována při 16 000 \times g po 3 min. Supernatant byl nanesen na kolonku a centrifugován 30 s při 16 000 \times g. Kolonka byla následně promyta 400 μ l roztoku „W1 Buffer“ a centrifugována 30s při 16 000 \times g. Poté byla promyta 600 μ l roztoku „Wash Buffer“ (s přidaným ethanolem) a centrifugována za týchž podmínek. Dále byla kolonka vysušena centrifugací při 16 000 \times g po dobu 3 min. DNA byla eluována 50 μ l sterilní dH₂O přehřáté na 70 °C.

4.1.7 SEKVENOVÁNÍ DNA

Vzorky pro sekvenování byly připravovány do 0,2ml PCR mikrozkušavek smícháním 10 ng plazmidové DNA Daedalus na každých 100 bp sekvenované oblasti společně s 1 μ l 5 μ M roztoku primeru LV_SEQ_NEW_FW, nebo LV_SEQ_NEW_REV. Roztok byl zředěn sterilní dH₂O na 14 μ l. Sekvence DNA byla prováděna v Laboratoři sekvenace DNA (Centrum servisních laboratoří biologické sekce, PřF UK) automatickým sekvenátorem 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) nebo 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

4.1.8 ŠTĚPENÍ RESTRIKČNÍMI ENDONUKLEÁZAMI

Štěpení DNA ve formě PCR produktů, či plazmidů bylo prováděno obvykle po dobu 2 hod. Při štěpení enzymem BsmBI reakce probíhala 4 hod. Reakční směs o objemu 20 μ l vždy obsahovala příslušné množství DNA, desetinu objemu reakčního pufru, popřípadě i BSA do výsledné koncentrace 0,1 mg/ml. Reakční směs byla doplněna na požadovaný objem sterilní dH₂O. Pro dosažení optimální teploty uvedené v tabulce 1 bylo použito termobloku či vodní lázně.

Tabulka 1: Reakční podmínky pro štěpení restrikčními endonukleázami

Enzym	Reakční pufr	Teplotní optimum
BsmBI	NEBuffer 3.1	55 °C
BamHI	NEBuffer 2, BSA	37 °C
BclI	NEBuffer 3.1	50 °C
XhoI	NEBuffer 2, BSA; NEBuffer 3.1	37 °C

V případě, kdy byly použity enzymy s různým teplotním optimem (XhoI a BclI), byla směs nejdříve inkubována na 37 °C po 1 hod, poté zahřáta na 50 °C, 1 hod. Tato reakce byla pufrována roztokem NEBuffer 3.1.

4.1.9 ŠTĚPENÍ METHYLOVANÉ DNA

Produkt TPCR (4.2.3) či RF klonování (4.2.5) o objemu 40 μ l byl smíchán se 2 μ l DpnI a inkubován při 37 °C, 2 hod. Část štěpeného produktu byla použita pro kontrolní agarózovou elektroforézu a také k transformaci buněčných linií *E. coli* XL 10-Gold. Pro kontrolu štěpení bylo použito 10 ng plazmidů Daedalus a pTW5 (SEAP). Každý roztok plazmidu byl smíchán s 2 μ l DpnI, 2 μ l NEBuffer 4 a doplněn na 20 μ l sterilní dH₂O. Reakční směs byla inkubována 2 hod při 37 °C a poté použita k transformaci *E.coli* DH5 α .

4.1.10 SRÁŽENÍ DNA

Produkt PCR SEAP_LIC o objemu 45 μ l byl srážen 5 μ l 3M roztoku octanu sodného a 125 μ l 96% ethanolu v -20 °C po dobu 30 minut. Sraženina byla oddělena centrifugací při 4 °C a 18 000 \times g a dekantací. Poté byla resuspendována v 200 μ l 70% ethanolu a centrifugována za týchž podmínek. Supernatant byl slit a sraženina vysušena v odpařovači. DNA byla rozpuštěna v 16 μ l sterilní dH₂O.

4.1.11 KLONOVÁNÍ NEZÁVISLÉ NA LIGÁZE

První způsob LIC klonování byl prováděn podle protokolu doporučeného pro plazmid Daedalus (který nám laskavě věnoval Dr. Ashok D. Bandaranayake PhD.). Linearizovaný plazmid byl přečištěn přes kolonku stejně, jako při preparaci z agarózového gelu (4.1.4) s tím rozdílem, že vzorek nebyl inkubován při 60 °C, ale po přidání 500 µl roztoku DF byl ihned nanesen na kolonku a dále bylo postupováno stejně. PCR produkt SEAP_LIC (inzert) byl přečištěn přes agarózový gel.

Pro štěpení linearizovaného plazmidu Daedalus (vektor) a inzertu byly v 1,5ml mikrozkuvkách na ledové lázni smíchány produkty T4 štěpné reakce dle tabulky 2 a doplněny sterilní dH₂O na 10 µl. Štěpení se nechalo probíhat 1 hod při 22 °C v kádince s vodou.

Tabulka 2: Reakční směs pro T4 štěpení PCR produktu SEAP_LIC a linearizovaného plazmidu Daedalus

	Reakce pro inzert	Reakce pro vektor
NEBuffer 2	1,0 µl	1,0 µl
BSA	1,0 µl	1,0 µl
dTTP (10mM)	-	2,5 µl
dATP (10mM)	2,5 µl	-
T4 polymeráza	0,2 µl	0,2 µl
PCR produkt	2,0 µl	-
Linearizovaný plazmid	-	150 ng

Dále byla připravena tato reakce: 5 µl T4 štěpeného vektoru bylo smícháno s 10 µl T4 štěpeného inzertu a ponecháno při 22 °C po 20 min. Dále bylo přidáno 10 µl 25mM EDTA o pH = 8 a směs byla inkubována při 22 °C, 5 min. Směsí bylo rychlou transformací (4.1.5) transformováno 100 µl *E. coli* DH5α. Transformanty byly natřeny na Petriho misky s LBamp agarem s 5% sacharózou a inkubovány 12 hod při 37 °C. Jako kontrola byly použity bakterie transformované ligační směsí, do které bylo místo inzertu pipetováno stejné množství sterilní dH₂O

Druhý způsob LIC klonování byl prováděn na základě návodu tzv. „ACEMBL SLIC“ [33]. V 1,5ml mikrozkuvkách byly na ledové lázni smíchány reakční komponenty podle tabulky 3, str. 33. Reakce byly doplněny sterilní dH₂O na objem 10 µl.

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro LIC podle návodu ACEMBL SLIC

	Reakce pro inzert	Reakce pro vektor
NEBuffer 2	1,0 µl	1,0 µl
BSA	1,0 µl	1,0 µl
dTTP (10mM)	-	2,5 µl
dATP (10mM)	2,5 µl	-
DTT (100mM)	0,5 µl	0,5 µl
Močovina (2M)	1,0 µl	1,0 µl
T4 polymeráza	0,2 µl	0,2 µl
PCR produkt	400 ng	-
Linearizovaný plazmid	-	400 ng

Reakce byly inkubovány při 22 °C, 30 min. Do každé reakce bylo pipetováno 0,5 µl 500mM EDTA a enzym byl inaktivován 25 min při 75 °C. Z každé reakční směsi bylo odebráno 2,5 µl, smícháno dohromady na vodní lázni a poté zahříváno na 65 °C po dobu 8 min. Následně byla mikrozkušavka s reakční směsí přemístěna do 500ml kádinky s vodou o teplotě 65°C a tam ponechána, aby vychladla na laboratorní teplotu. Ligační směsí bylo transformováno 100 µl bakteriální kultury *E. coli* DH5α stejným postupem jako v předchozím případě včetně negativní kontroly.

4.1.12 STANDARDNÍ KLONOVÁNÍ

Na přípravu plazmidu Daedalus obsahující inzert SEAP standardním klonováním bylo použito 16 µl sráženého PCR produktu SEAP_TC (4.1.10), který byl štěpen enzymy XhoI a BclI (4.1.8) a následně přečištěn agarózovou elektroforézou (4.1.4). Vektorem byl plazmid Daedalus, který byl štěpen enzymy XhoI a BamHI a přečištěn elektroforézou přes agarózový gel, ze kterého byly vyříznuty 4 pruhy. Vzorky štěpeného plazmidu po přečištění byly odpařeny na objem 10 µl a všechny použity pro ligaci s inzertem. Ligační reakce byly připraveny takto: k 10 µl vektoru a 12,5 µl inzertu v 1,5ml mikrozkušavce byly pipetovány 3 µl pufru pro T4 DNA ligázu a 4 µl sterilní dH₂O. Směs byla v 0,5l kádince zchlazena vodou na 16 °C a do reakce byl přidán 1 µl T4 DNA ligázy. Reakce probíhala 30 min. Touto ligační směsí bylo transformováno 100 µl bakteriální kultury *E. coli* DH5α. Transformované bakterie byly rozetřeny na Petriho misky s LBamp a 5% sacharózou.

4.2. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Během práce byla mnohokrát provedena PCR nejen pro amplifikaci inzertu SEAP, ale v různých obměnách i pro samotné klonování, či kontrolní PCR z bakteriálních kolonií.

4.2.1 STANDARDNĚ PROVÁDĚNÁ POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

PCR byla standardně prováděna v 0,2ml či 0,5ml PCR mikrozkumavkách, kde byly smíchány reakční pufrы s vodou, templátem a primery, jak je uvedeno v tabulce 4. Jako poslední byla přidána DNA polymeráza. Přehled složení reakčních směsí a DNA polymeráz je uveden v tabulce 5. Z reakční směsi byly odstraněny bublinky krátkou centrifugací (přibližně 20 s) a poté byla směs umístěna do termocykleru při teplotním programu, jenž byl standardně nastaven následovně:

- I. Inicializace 94 °C 5 min
- II. 30 × opakovaný cyklus:
 - a. Denaturace 94 °C 30 s
 - b. Nasedání primerů (65 °C) 30 s
 - c. Polymerace 72 °C (1 min)
- III. Závěrečná polymerace 72 °C 10 min
- IV. Uchování při 4°C

V závorkách jsou uvedeny hodnoty, které se u jednotlivých reakcí měnily v závislosti na délce amplifikovaného úseku a na T_m primerů.

Tabulka 4: Přehled templátů a primerů používaných pro různé typy PCR

	Templát	Produkt	Primery
SEAP pro LIC klonování	pTW5_SEAP	SEAP_LIC	LV_SEAP_FW LV_SEAP_REV
SEAP pro standardní klonování	pTW5_SEAP pTToc-SSH-SEAP	SEAP_TC	LV_SEAP_XhoI_FW LV_SEAP_BclI_REV
SEAP pro RF klonování s Q5 polymerázou	pTW5_SEAP	SEAP_RF	LV_SEAP_TPCR_FW LV_SEAP_TPCR_REV
RF klonování s Q5 polymerázou	Daedalus	Daedalus_SEAP_RF	SEAP_RF
TPCR	Daedalus pTW5_SEAP	Daedalus_SEAP_TPCR	LV_SEAP_TPCR_FW LV_SEAP_TPCR_REV
Plazmid pro Gibsnovu reakci	Daedalus	Daedalus_Gb	LV_SEAP_Gb_FW LV_SEAP_Gb_REV

Tabulka 5: Složení reakčních směsí pro PCR s různými DNA polymerázami v objemu 50 μ l

DNA polymeráza	Reakční pufr	PCR dNTPs	Jiné
Deep Vent	ThermoPol (10 \times)	1,5 μ l	1 μ l PCR MgSO ₄
Q5 Hot Start	Q5 (5x)	1,0 μ l	Q5 Enhancer; DMSO
Phusion	Phusion HF (5 \times)	1,0 μ l	DMSO

4.2.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE Z KOLONIÍ

Z jednotlivých Petriho misek bylo vybráno několik kolonií. Ty byly pomocí špičky automatické pipety přeneseny do 20 μ l reakční směsi složené z 10 μ l roztoku Combi PPP Master Mix, 2 μ l přímého a zpětného primeru a 6 μ l sterilní dH₂O. Toutéž pipetovací špičkou bylo následně zaočkováno 5 ml LBamp a kultura byla inkubována v 50ml plastové zkumavce s víčkem při 37 °C a 220 ot/min, 15 hod. Kultura byla takto připravena pro nízkoobjemovou přípravu plazmidové DNA.

PCR reakční směs byla umístěna do termocykleru při teplotním programu:

- I. 94 °C 5 min
- II. 30 \times opakovaný cyklus:
 - i. 94 °C 30 s
 - ii. 54 °C 30 s
 - iii. 72 °C 1 min, 40 s
- III. 72 °C 10 min
- IV. Uchování při 4°C

Vzorky PCR z kolonií byly posléze použity v agarózové elektroforéze.

4.2.3 PŘENOSOVÁ POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Na tři varianty reakce TPCR bylo v 0,5 μ l PCR mikrozkuhavce smícháno 10 ng plazmidu Daedalus, 10 ng plazmidu pTW5 (SEAP), 5 μ l primeru LV_SEAP_TPCR_FW a LV_SEAP_TPCR_REV, 1,6 μ l DNA polymerázy a dále byl přimíchán příslušný pufr, roztok dNTPs, případně další reaktanty podle tabulky 6. Reakční směs byla doplněna sterilní dH₂O na 50 μ l.

Tabulka 6: Množství roztoků přidaných do TPCR reakční směsi

Polymeráza	dNTPS	Reakční pufr	Další reaktanty
Deep Vent	1,0 μ l	5 μ l ThermoPol	1 μ l PCR MgSO ₄
Q5 Hot Start	1,5 μ l	10 μ l Q5	10 μ l Q5 Enhancer
Phusion	1,5 μ l	10 μ l Phusion HF	1,5 μ l DMSO

Teplotní program TPCR:

- I. 98 °C 1 min
- II. 13 × opakovaný cyklus:
 - i. 98 °C 30 s
 - ii. 60°C 1 min
 - iii. 72 °C 1 min, 30 s
- III. 20 × opakovaný cyklus:
 - i. 98 °C 30 s
 - ii. 72 °C 6 min
- IV. 72 °C 10 min
- V. Uchování při 4 °C

Vzorky TPCR byly posléze použity v agarózové elektroforéze a po štěpení DpnI i k transformaci *E.coli* XL 10-Gold.

4.2.4 AMPLIFIKACE PLAZMIDU DAEDALUS PRO GIBSNOVU REAKCI

Na PCR amplifikaci plazmidu Daedalus bylo v 0,5µl PCR mikrozkumavce smícháno 10 ng plazmidu Daedalus, 5 µl primeru LV_SEAP_Gb_FW a LV_SEAP_Gb_REV, 0,5 µl DNA polymerázy a dále byl přimíchán příslušný pufr, roztok dNTPs, případně další reaktanty podle tabulky 6. V jedné variantě reakce s Q5 polymerázou byl vynechán roztok Q5 Enhancer. Reakční směs byla doplněna sterilní dH₂O na 50 µl. Pro některé reakce byl přidán roztok DMSO do celkové koncentrace 3 %, 6 % a 9%.

Teplotní program amplifikace plazmidu Daedalus:

- I. 94 °C 5 min
- II. 30 × opakovaný cyklus:
 - i. 94 °C 30 s
 - ii. 72 °C 6 min
- III. 72 °C 10 min
- IV. Uchování při 4°C

Vzorky PCR amplifikace plazmidu Daedalus byly posléze použity v agarózové elektroforéze.

4.2.5 KLONOVÁNÍ BEZ RESTRIKČNÍHO ŠTĚPENÍ

Na RF klonování byla nejprve amplifikována část plazmidu pTW5 (SEAP) oligonukleotidy pro TPCR při teplotním programu popsáném v kapitole 4.2.1 s teplotou nasedání 62 °C, 30 s a dobou elongace 1 min 40 s. Vzorek byl přečištěn přes agarózový gel. Jeho koncentrace po přečištění byla 50 ng/µl a čistota $A_{260}/A_{280} = 1,39$.

Poté bylo v 0,5 µl PCR mikrokumavce smícháno 10 ng plazmidu Daedalus, 1 µl PCR produktu SEAP_RF, 0,5 µl Q5 DNA polymerázy, 10 µl Q5 reakčního pufru, 1,5 µl roztoku dNTPs a 10 µl Q5 Enhanceru. Reakční směs byla doplněna sterilní dH₂O na 50 µl.

Teplotní program RF klonování byl nastaven následovně:

- I. 94 °C 5 min
- II. 30 × opakovaný cyklus:
 - i. 94 °C 30 s
 - ii. 72 °C 6 min
- III. 72 °C 10 min
- IV. Uchování při 4°C

Vzorky RF klonování byly posléze použity v agarózové elektroforéze a po štěpení DpnI i k transformaci *E.coli* XL 10-Gold.

5 VÝSLEDKY

5.1 PŘÍPRAVA LENTIVIROVÉHO EXPRESNÍHO PLAZMIDU

Pro optimalizaci rekombinantní exprese v buněčných liniích HEK293 transdukovaných lentivirovým systémem Daedalus byl jako reportérový gen vybrán gen pro sekretovanou alkalickou fosfatázu. Tento protein je stanovitelný již v malých absolutních expresních výtěžcích. Nejprve ale bylo třeba připravit lentivirový cytosolický vektor obsahující tento gen. Sekvence celého plazmidu čítá asi 10 kbp. Sekvence nejbližšího okolí místa pro inzert je znázorněna na obrázku 9. Pro amplifikaci genu pro SEAP byly vybrány plazmidy pTTo3c-SSH-SEAP a pTW5 (SEAP). Z nich byl gen amplifikován oligonukleotidy, které byly navrženy tak, aby produkt reakce mohl být využit pro různé způsoby vložení do vektoru daedalus.

XhoI LIC SITE BsmBI Kozak SacB BsmBI LIC SITE +TEV GGS+8×His stop BamHI

5'-TCACTCGGCGCGCCAGTCCTCCGACAGACTGAGTCGCCCGCTCGAGACCTCTCG
 GCCTGCCTGTGCTTGAGACGACCATGCGTTCACTAT.....SacB.....TATTTAGTGACG
 TCTCA GCGGAAGCGAGAACC TGTACTTCCAGTCA GGAGGCAGTCATCACCATCA
 CCATCACCATCACTGAGGATCCGCTTGGTTCCAATCC-3'

MinzertGGSENLYFQ/SGGSHHHHHHHHstop

Obr. 9: Sekvence okolí místa pro inzert plazmidu Daedalus.

Postupně jsou barevně označena tato místa: tmavě zelená – místa pro restriční štěpení XhoI a BamHI; červená a světle zelená – místa pro LIC; šedivá – místo pro štěpení BsmBI; fialová – Kozakové sekvence; žlutá – SacB gen; modrá – sekvence histidinové kotvy, terminační kodon.

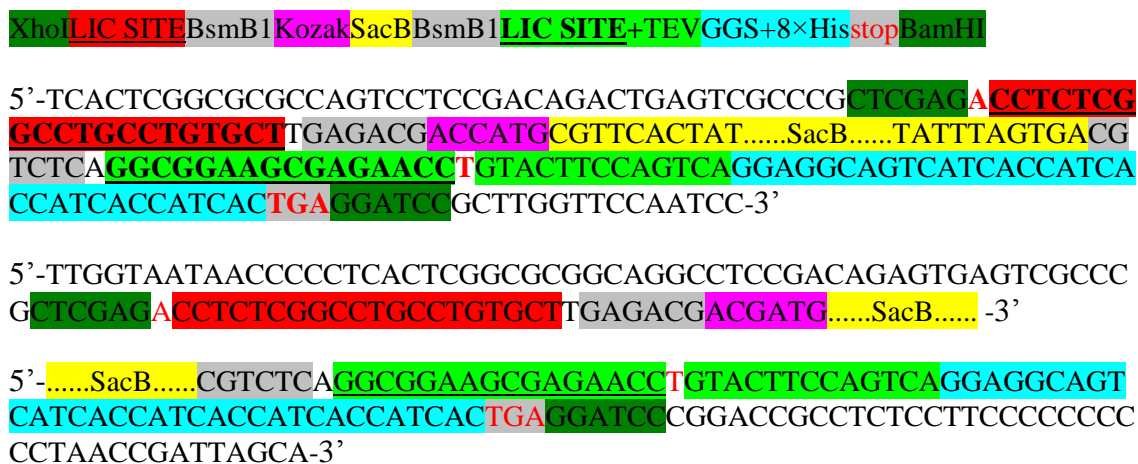
Inzert SEAP byl vkládán pomocí restričních míst do vektoru na místo SacB genu. Tento gen o velikosti přibližně 1,8 kbp způsobuje letalitu bakterií za přítomnosti sacharózy v kultivačním médiu. To bylo využito jako selekční znak – pokud tento gen nebyl z plazmidu vyštěpen, po následné transformaci by kolonie na médiu se sacharózou neměly narůst.

5.1.1 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO MNOŽSTVÍ PLAZMIDU

Pro experimenty bylo nejprve třeba připravit dostatečné množství plazmidu Daedalus. Zásobní roztok byl připraven v Z kompetentních *E. coli* DH5a postupem popsáným v kapitole 4.1.1. Bylo připraveno 400 µl roztoku plazmidu o koncentraci 1,3 µg/µl a čistotě $A_{260}/A_{280} = 1,79$.

5.1.2 SEKVENACE

Správnost sekvence plazmidu Daedalus v okolí místa pro inzert byla ověřena sekvenací (4.1.7) se sekvenačními oligonukleotidy LV__SEQ_NEW_FW a LV__SEQ_NEW_REV. Sekvenací bylo ověřeno (obr. 10), že v místech pro restriční štěpení není vložena mutace a inzert by mělo být možné vyštěpit příslušnými restričními endonukleázami.



Obr. 10: Porovnání známé sekvence vektoru s výsledkem sekvenace za účelem kontroly restričních míst. Shora: legenda k sekvenci; známá sekvence; výňatek ze sekvenace s přímým sekvenačním oligonukleotidem; dole totéž se zpětným sekvenačním oligonukleotidem.

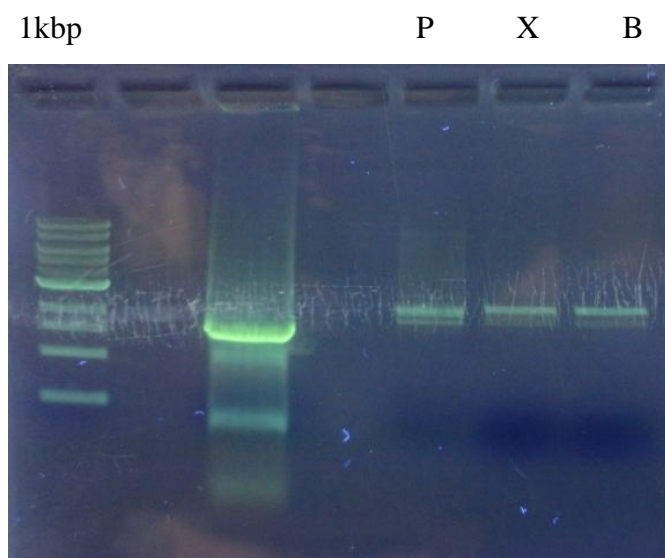
Postupně jsou barevně označena tato místa: tmavě zelená – místa pro restriční štěpení XhoI a BamHI; červená a světle zelená – místa pro LIC; šedivá – místo pro štěpení BsmBI; fialová – Kozakové sekvence; žlutá – SacB gen; modrá – sekvence histidinové kotvy, terminační kodon.

5.1.3 KONTROLA ŠTĚPENÍ DpnI, XhoI A BamHI

Protože se nedařilo linearizovat plazmid Daedalus, bylo třeba ověřit, zda restriční endonukleázy, které byly používány, jsou aktivní. K tomuto účelu byl použit plazmid pBSK+. Ten obsahoval restriční místa pro enzymy XhoI a BamHI. Těmito

enzymy byl plazmid štěpen po dobu 2 hod a výsledek vyhodnocen agarózovou elektroforézou (obr. 11)

U obou štěpení je zřetelný posun dál od čela elektroforézy, což značí, že plazmid byl úspěšně štěpen a enzymy jsou aktivní.



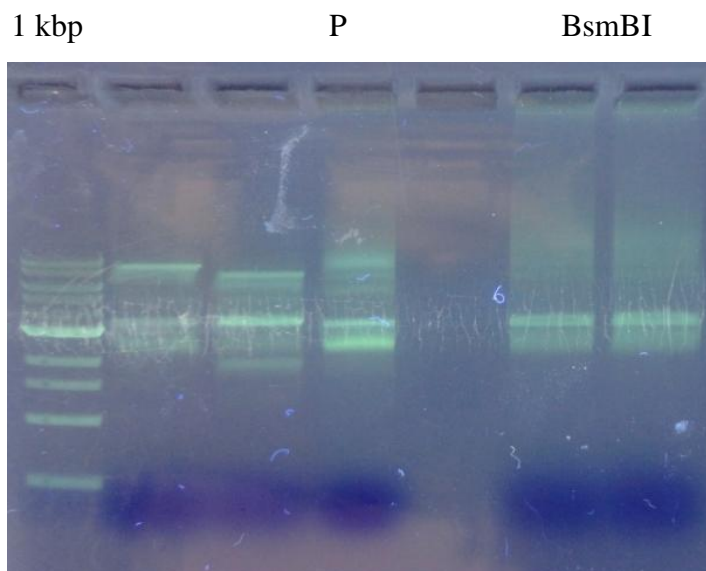
Obr. 11: Agarózová elektroforéza produktů kontrolního štěpení XhoI a BamHI.

1 kbp je DNA standard, v drážce P byl vzorek neštěpeného plazmidu, v drážce X byl vzorek plazmidu štěpeného XhoI, v drážce B byl vzorek plazmidu štěpeného enzymem BamHI.

Kontrolní reakce pro ověření aktivity DpnI byla uskutečněna štěpením plazmidu pTW5 (SEAP) a Daedalus, jak je popsáno v kapitole 4.1.9. Reakční směsi byly použity pro rychlou transformaci 100 μ l buněčné linie DH5 α a na miskách s LBamp agarem inkubovány 15 hod při 37 $^{\circ}$ C. Po této době na miskách nebyly zřetelné žádné kolonie, což značí, že plazmidy byly štěpeny a enzym DpnI je aktivní.

5.2 KLONOVÁNÍ NEZÁVISLÉ NA LIGÁZE

Reakce LIC byla provedena ve dvou variantách (4.1.11) Nejprve bylo třeba získat plazmid linearizovaný restriční endonukleázou BsmBI. Štěpení probíhalo v reakční směsi, složené z 1 μ g plazmidu Daedalus, 5 μ l NEBuffer 3.1, 2 μ l BsmBI. Směs byla doplněna sterilní dH₂O na 50 μ l. Štěpení probíhalo při 55 $^{\circ}$ C po dobu 4 hod. Výsledek reakce byl ověřen 0,8% agarózovou elektroforézou při 150 V, 20 min. Do jamek bylo nanášeno 5 μ l vzorků (obr. 12, str. 41).



Obr. 12: Agarózová elektroforéza produktu restrikce plazmidu enzymem BsmBI.

Zleva: 1 kbp je DNA standard, P je dráha s neštěpeným plazmidem, BsmBI jsou dvě dráhy BsmBI štěpeného plazmidu.

Jak je patrné z elektroforézy, štěpení BsmBI neproběhlo. Ani při opakovaných pokusech se nepodařilo dosáhnout lepšího výsledku. Plazmid o velikosti přibližně 10 kbp migruje v dráze P především ve formě přibližně odpovídající velikosti 2,5 kbp, pravděpodobně superšroubovice.

Inzert SEAP_LIC byl získán PCR z plazmidu pTW5 (SEAP) za použití oligonukleotidů LV_SEAP_FW a REV. Tyto primery částí nasedají na gen SEAP a zároveň obsahují sekvenci, která se na templát nepáruje, ale je určena pro štěpení T4 polymerázou k následné ligaci s vektorem. PCR s Deep Vent polymerázou proběhla při teplotním programu popsaném v kapitole 4.2.1 s teplotou nasedání 58 °C, 30 s a dobou elongace 1 min 40 s. Vzorek byl přečištěn přes agarózový gel. Jeho koncentrace pro přečištění byla 33 ng/μl a čistota $A_{260}/A_{280} = 1,45$.

5.2.1 PRVNÍ ZPŮSOB KLONOVÁNÍ NEZÁVISLÉHO NA LIGÁZE

Pro štěpení BsmBI linearizovaného vektoru a inzertu byly připraveny reakce tak, jak je popsáno v kapitole 4.1.11. Ligační směsí bylo rychlou transformací transformováno 100 μl *E. coli* DH5α. Transformanty byly natřeny na Petriho misky s LBamp agarem s 5% sacharózou a inkubovány 12 hod při 37 °C. Jako kontrola byly použity bakterie transformované ligační směsí, do které bylo místo inzertu pipetováno

totéž množství sterilní dH₂O. Na kontrolní misce nenarostly žádné kolonie, médium s ampicilinem tedy bylo připraveno správně. Na miskách s transformanty narostlo asi 10 kolonií. PCR z těchto kolonií se specifickými primery nepotvrdila přítomnost genu pro SEAP.

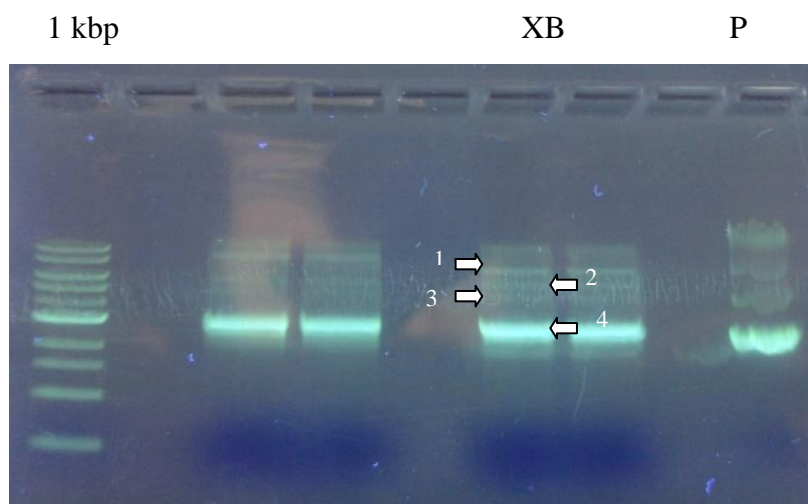
5.2.2 DRUHÝ ZPŮSOB KLONOVÁNÍ NEZÁVISLÉHO NA LIGÁZE

Druhý způsob LIC byl proveden postupem, který je podrobně popsán v kapitole 4.1.11. Transformanty byly natřeny na Petriho misky s LBamp agarem s 5% sacharózou a inkubovány 12 hod při 37 °C. Jako kontrola byly použity bakterie transformované ligační směsí, do které bylo místo inzertu pipetováno totéž množství sterilní dH₂O. Stejně jako u prvního způsobu na miskách s transformanty narostlo asi 10 kolonií. PCR z těchto kolonií se specifickými primery nepotvrdila přítomnost genu pro SEAP.

5.3 STANDARDNÍ KLONOVÁNÍ

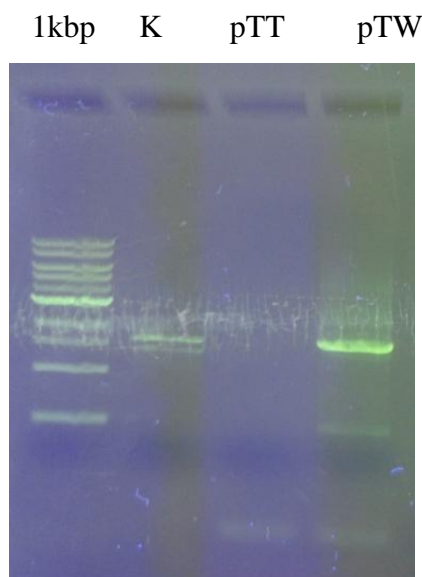
K přípravě plazmidu Daedalus obsahujícího inzert SEAP standardním klonováním bylo nejprve třeba linearizovat vektor restrikcí enzymy XhoI a BamHI. Štěpení bylo provedeno postupem, uvedeným v kapitole 4.1.8 po dobu 2 hodin. Štěpné produkty byly přečištěny přes 0,8% agarózový gel (4.1.4) ve dvou drahách a rozdělené pruhy 1 - 4 vyříznuty (na obr. 13, str.43, jsou označeny XB).

Pro amplifikaci inzertu SEAP_TC byly použity oligonukleotidy LV_SEAP_XhoI_FW a LV_SEAP_BclI_REV. Tyto primery částí nasedají na gen SEAP a zároveň obsahují sekvenci, která se na templát nepáruje, ale je určena ke štěpení restrikčními endonukleázami XhoI a BclI a k následné ligaci s vektorem. Enzym BclI neštěpí methylovanou DNA, proto byl vybrán pro štěpení PCR produktu, který methylován není. BclI vytváří přesahy na vlákně DNA, které jsou komplementární s přesahy vytvořenými BamHI. Tyto přesahy lze využít k následné ligaci stejně jako přesahy vytvořené enzymem XhoI.



Obr. 13: Agarózová elektroforéza produktu restrikce plazmidu enzymy XhoI a BamHI. Zleva: 1 kbp je DNA standard, XB jsou dvě dráhy XhoI a BamHI štěpeného plazmidu, P je dráha neštěpeného plazmidu. Čísly 1 – 4 jsou označené pruhy vyříznuté a extrahované pro další použití v klonování.

Templáty pro PCR byly plazmidy pTTo3c-SSH-SEAP a pTW5 (SEAP). Reakce byla uskutečněna Deep Vent polymerázou při teplotním programu popsaném v kapitole 4.2.1 s teplotou nasedání 56 °C po 30 vteřin a s dobou elongace 1 min 40 s. Produkt SEAP_TC se podařilo amplifikovat pouze z templátu pTW5 (SEAP), proto byl k dalším reakcím použit pouze tento templát (obr. 14).

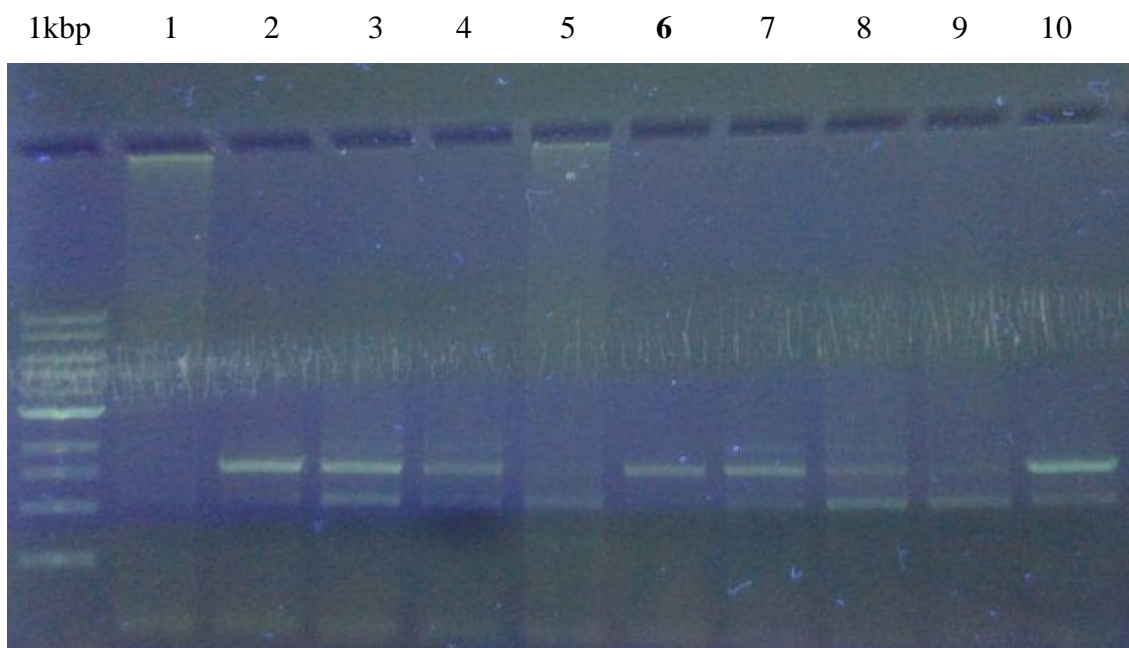


Obr. 14: Agarózová elektroforéza produktu PCR s templáty pTTo3c-SEAP a pTW5 (SEAP).

1 kbp je DNA standard, K je dráha PRC produktu SEAP_LIC, který je zde použit pro kontrolu, pTT je dráha PCR produktu s templátem pTTo3c-SSH-SEAP, pTW je PCR produkt s templátem pTW5 (SEAP).

Navazující postup standardního klonování je podrobně popsán v kapitole 4.1.12. Ligační směsí bylo transformováno 100 μ l bakteriální kultury *E. coli* DH5 α . Transformované bakterie byly rozetřeny na Petriho misky s LBamp a 5% sacharózou. Jako kontrola byly použity bakterie, transformované 50 ng neštěpeného plazmidu Daedalus a bakterie, které transformovány nebyly.

Na kontrolní misce s transformovanými bakteriemi kolonie narostly, na kontrolním vzorku bez plazmidu nikoli. Kolonie bakterií, transformovaných plazmidem Daedalus poukazují na nepříliš dobrou selektivitu genem SacB, neboť kolonie narostly, přestože byly kultivovány na médiu s 5% sacharózou. Na miskách transformantů, do jejichž ligační směsi byly použity plazmidy z vyříznutých pruhů č. 1, č. 2 a č. 3, nenarostly žádné kolonie. Na misce s transformanty, do jejichž ligační směsi byl použit plazmid vyříznutý z pruhu č. 4 (obr. 13, str. 43), narostlo přibližně 20 kolonií. Z nich bylo vybráno deset kolonií k PCR a k zaočkování 5 ml LBamp. PCR z kolonií (obr. 15) byla provedena postupem popsáným v kapitole 4.2.2 a byly použity primery LV_SEAP_FW a LV_SEAP_REV.

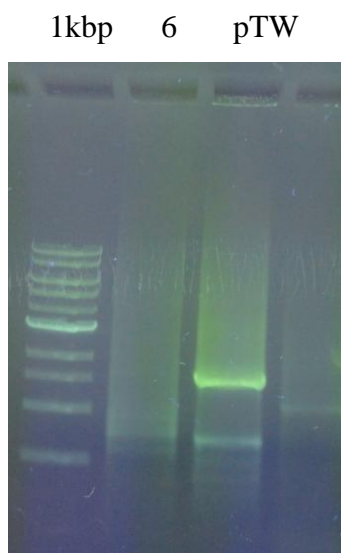


Obr. 15: PCR z kolonií ze standardního klonování.

1 kbp je DNA standard, čísla 1 – 10 značí dráhy s produkty PCR z kolonií, označených čísly 1 – 10.

PCR z kolonií vyšla pozitivně pro všechny kolonie, mimo kolonie č. 1 a č. 5. Z kolonie č. 6 byla izolována DNA (4.1.6) o koncentraci 33 ng/ μ l a čistotě

$A_{260}/A_{280} = 1,50$. S tímto vzorkem byla provedena PCR s oligonukleotidy, které specificky nasedají na SEAP, neboť primery použité na PCR z kolonií částí nasedají na lentivirový plazmid, a tak mohly poskytnout falešně pozitivní výsledek. PCR reakce tedy byla připravena postupem popsáním v kapitole 4.2.1 ze vzorku DNA z kolonie č. 6 s Deep Vent polymerázou, primery SEAP_FW a SEAP_REV, při teplotním programu popsáném v kapitole 4.2.1 s teplotou nasedání 54 °C po 30 vteřin a s dobou elongace 1 min 40 s. Táž reakce byla pro kontrolu provedena s plazmidem pTW5 (SEAP). Reakce se vzorkem z kolonie č. 6 neproběhla, kontrolní reakce proběhla (obr. 16). Z výsledků kontrolních reakcí bylo usouzeno, že výsledky předchozích PCR z kolonií s primery LV_SEAP_FW; REV, jsou opravdu pouze falešně pozitivní.



Obr. 16: PCR z izolované DNA z kolonie č. 6 a kontrolní PCR.

1 kbp je DNA standard, v dráze značené 6 je vzorek PCR z DNA z kolonie č. 6, dráha značená pTW obsahovala vzorek kontrolního PCR produktu se stejnými oligonukleotidy a plazmidem pTW5 (SEAP).

5.4 AMPLIFIKACE PLAZMIDU DAEDALUS PRO GIBSNOVU REAKCI

Pro Gibsnovu reakci bylo třeba nejprve amplifikovat plazmid Daedalus. K tomuto účelu byly oligonukleotidy navrženy tak, aby se částí párovaly s vektorem, který by jimi bylo možno amplifikovat, a aby druhou částí nasedaly na gen SEAP. Primery byly navřeny takto:

LV_SEAP_Gb_FW

5'-TCACCATGGAGGACAGT**GATGGCGGAAGCGAGAACCT**GTACTTCCAGTCA-3'

Oligonukleotid má celkem 50 bp, na plazmid nasedá 30 bp, Tm této části je 66 °C.

LV_SEAP_Gb_REV

5'-**CTCGAG****A****CCTCTCGGCCTGCCTGTGCT****A**CCATGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3'

5'-AGCAGCAGCAGCAGCAGCATGGTAGCACAGGCAGGCCGAGAGGTCTCGAG-3'

Oligonukleotid má celkem 50 bp, na plazmid nasedá 27 bp, Tm této části je 66 °C.

Plazmid byl s těmito oligonukleotidy použit k PCR amplifikaci, jak je uvedeno v kapitole 4.1.4. PCR s Deep Vent a Phusion polymerázou neposkytla žádný produkt. Stejně tak nebyl na agaróзовé elektroforéze zřetelný produkt PCR s Q5 polymerázou bez použití Q5 Enhanceru. Dále tedy byla používána jen Q5 polymeráza, která při použití Q5 Enhanceru poskytla směs produktů, které vytvořily viditelný spojitý pruh na agaróзовé elektroforéze. K dalším třem reakcím bylo pipetováno DMSO do celkové hmotnostní koncentrace 3 %, 6 % a 9 % namísto Q5 Enhanceru. Výsledek byl stejný, jako v předchozím případě při použití Q5 Enhanceru. Plazmid Daedalus se nepodařilo amplifikovat, takže další postup v Gibsnově reakci nebyl možný.

5.5 KLONOVÁNÍ BEZ RESTRIKČNÍHO ŠTĚPENÍ

Pro RF klonování a TPCR bylo třeba navrhnout nové oligonukleotidy tak, aby jednou částí nasedaly na gen pro SEAP a druhou částí na plazmid Daedalus. Oligonukleotidy byly navrženy takto:

LV_SEAP_TPCR_FW

5'-**CTCGAG****A****CCTCTCGGCCTGCCTGTGCT****A**CCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGC-3'

Oligonukleotid má celkem 57 bp, na gen SEAP nasedá 27 bp (fialová), Tm této části je 67 °C. Na plazmid nasedá 27 bp a Tm je 67 °C.

LV_SEAP_TPCR_REV

5'-CATCACCATCACCATCACCATGGAGGACAGGATGGCGGAAGCGAGAACCCT
GTACTTCCAGTCA-3'

5'-TGACTGGAAGTACAGGTTCTCGCTTCCGCCATCACTGTCCTCCATGGTGATGGTG
ATGGTGATG-3'

Oligonukleotid má celkem 64 bp, na gen SEAP nasedá 33 bp (fialová), T_m této části je 66 °C. Na plazmid nasedá 30 bp a T_m je 66 °C.

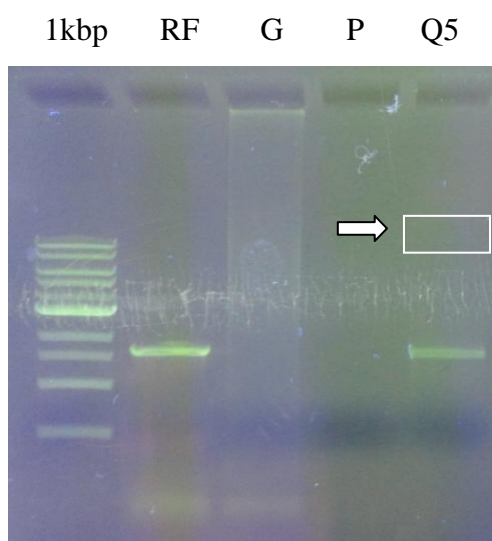
Těmito oligonukleotidy byl amplifikován produkt SEAP_RF, který byl po přečištění agarózovou elektroforézou (obr. 17, str. 48, označen RF) použit jako primer pro RF klonování. Přesný postup a teplotní program je uveden v kapitole 4.2.5. Produkt RF PCR byl poté štěpen enzymem DpnI a použit k transformaci *E.coli* XL 10-Gold. Transformace tepelným šokem byla provedena postupem uvedeným v kapitole 4.1.5. Pro transformaci bylo použito 3 µl a 5µl RF PCR produktu bez přidaného 2-merkptoetanolu. K další jedné transformaci bylo do 50 µl buněčné suspenze přidáno 0,8 µl 10% 2-merkptoetanolu a dále postupováno stejně. Kultury byly inkubovány na SOB agaru s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml. Pro kontrolu bylo použito 50 µl netransformované buněčné suspenze.

Misky s transformanty byly inkubovány 15 hod v 37 °C a druhý den zkontrolovány. Na žádné z misek nebyly přítomny kolonie, metoda tedy nebyla úspěšná.

5.6 PŘENOSOVÁ POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Stejně oligonukleotidy, jako v RF PCR byly použity i pro TPCR. Tato reakce, jejíž složení a teplotní program jsou podrobně uvedeny v kapitole 4.2.3, byla provedena se třemi různými DNA polymerázami (Deep Vent, Q5 Hot Start HF a Phusion HF). Reakce s Deep Vent a Phusion polymerázou nepřinesly žádný produkt. Při TPCR s Q5 polymerázou je zřetelně amplifikován gen pro SEAP z plazmidu pTW5 (SEAP). Na obr. 17, str. 48, je slabě zřetelný i pruh o velikosti přibližně 10 kbp. Produkty TPCR s Q5 polymerázou poté byly štěpeny DpnI k odstranění původních templátů. Směsí bylo poté transformováno 50 µl buněčné linie *E.coli* XL 10-Gold. Stejně jako u RF klonování byla buněčná linie transformována 3 µl produktu, 5 µl produktu a 3µl produktu s přídavkem 0,8 µl 10% 2-merkptoetanolu. Kultury byly inkubovány při

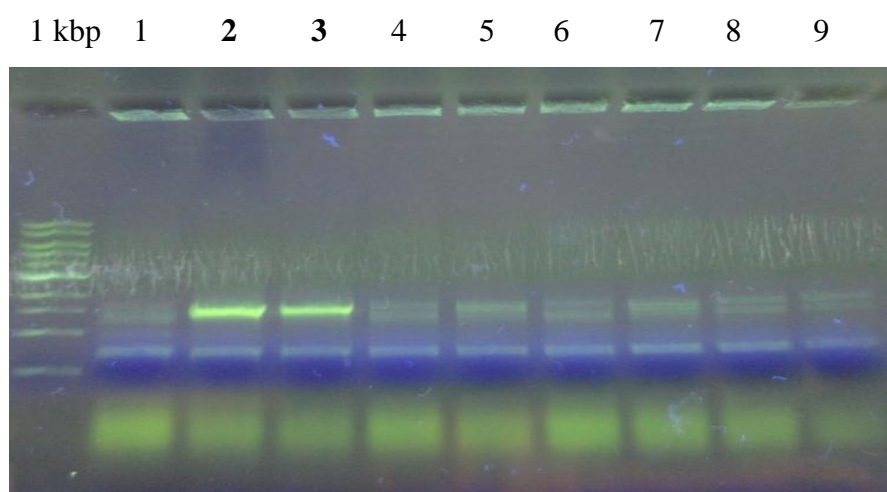
37 °C na SOB agaru s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml po dobu 15 hod.



Obr. 17: Agarózová elektroforéza produktů SEAP_RF a TPCR.

1 kbp je DNA standard, RF značí dráhu produktu SEAP_RF pro použití v RF klonování, v dráze značené G je kontrolní vzorek amplifikace plazmidu pro Gibsnovu reakci, P je dráha se vzorkem TPCR s Phusion polymerázou, Q5 je dráha pro vzorek TPCR s Q5 polymerázou.

Na všech miskách s koloniemi transformovanými TPCR produktem narostlo přibližně 50 kolonií. Z každé misky byly vybrány 3 kolonie (celkem tedy 9) pro PCR z kolonií a k zaočkování SOC média s ampicilinem. PCR z kolonií byla vyhodnocena agarózovou elektroforézou (obr. 18). Z kolonií č. 2 a 3 byla izolována plazmidová DNA a použita pro další kontrolní reakce.



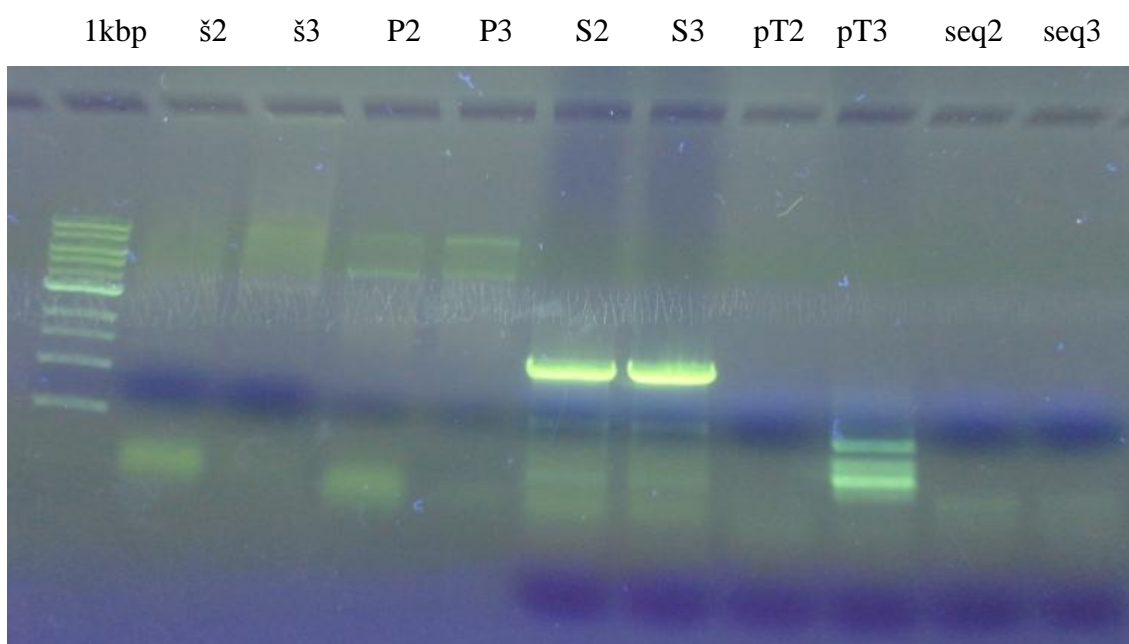
Obr. 18: Agarózová elektroforéza produktů PCR z kolonií transformovaných produktem TPCR.

1 kbp je DNA standard, čísla 1 – 9 značí čísla kolonií, ze kterých byla provedena PCR.

Koncentrace vzorku DNA z kolonie č. 2 byla 128 ng/μl, čistota $A_{260}/A_{280} = 2,08$. Koncentrace vzorku DNA z kolonie č. 3 byla 38 ng/μl, čistota $A_{260}/A_{280} = 2,08$. Pro kontrolu, zda se metodou TPCR podařilo připravit lentivirový vektor s genem pro SEAP, byly s plazmidovou DNA z kolonií č. 2 a 3 připraveny tyto reakce:

1. Restrikční štěpení enzymy BamHI a XhoI
2. PCR s primery specifickými pro gen SEAP (SEAP_FR; REV)
3. PCR s primery specifickými pro plazmid pTW5 (pTW5_SEQ_REV a pTT_FW)
4. PCR se sekvenačními oligonukleotidy pro plazmid Daedalus (LV_SEQ_NEW_FW; REV)

Pro PCR reakce byl použit Combi PPP Master Mix. Všechny kontrolní reakce byly vyhodnoceny agarózovou elektroforézou (obr. 19).



Obr. 19: Agarózová elektroforéza kontrolních reakcí provedených s DNA izolované z kolonií č. 2 a č. 3.

Zleva: v první drážce značené 1 kbp je DNA standard, š2 a š3 jsou vzorky štěpené XhoI a BamHI, P2 a P3 jsou samotné vzorky, S2 a S3 jsou vzorky PCR s primery specifickými pro SEAP, pT2 a pT3 jsou vzorky PCR s primery specifickými pro plazmid pTW5, seq 2 a seq3 jsou vzorky PCR se sekvenačními primery pro plazmid Daedalus.

Na fotografii z kontrolní elektroforézy je v obou drahách vzorku DNA patrný pruh o velikosti 6 kbp a 10 kbp. V drahách se vzorky z restričního štěpení je patrný pruh o velikosti přibližně 10 kbp a také velmi slabý pruh DNA o velikosti přibližně 1,5 kbp. PCR s oligonukleotidy specifickými pro SEAP proběhla u obou vzorků. PCR se sekvenčními oligonukleotidy pro lentivirový plazmid a pro plazmid pTW5 neproběhly. Z uvedeného vyplývá, že by mohlo jít o klony Daedalus s vloženým reportérovým genem SEAP. Správnost tohoto tvrzení bude třeba ještě ověřit sekvenováním.

6 DISKUSE

Cílem práce byla příprava lentivirového vektoru s reportérovým genem pro sekretovanou alkalickou fosfatázu. Tento vektor byl nejprve připravován standardním klonováním, poté metodami nezávislymi na restričním štěpení, RF klonováním, LIC klonováním, Gibsnovou reakcí a TPCR.

Plazmid Daedalus se během práce nepodařilo štěpit v dostatečném množství žádným z uvedených restričních enzymů (BamHI, XhoI a BsmBI). Ligační reakce tedy přirozeně nemohly proběhnout. Obtížné štěpení plazmidu bylo pravděpodobně způsobeno jeho nadšroubovicovou strukturou, kterou lze předpokládat z výsledku elektroforézy vzorku zásobního množství plazmidu (obr. 13, str. 43, označen P), kdy plazmid o velikosti asi 10 kbp putoval v gelu na stejné úrovni, jako pruh standardu o velikosti 3 kbp. Konformace takto stočeného plazmidu mohla způsobit nepřístupnost restričních míst pro příslušné enzymy. Tento jev byl již popsán pro štěpení enzymem BspMI [34]. Během práce jsem se pokusil nadšroubovici rozvinout sonikací sondou, či v ultrazvukové lázni, opakovaným zvýšením teploty, působením mikrovln, popřípadě změnou reakčního prostředí (pufru), ve všech případech ale bez výsledku. Další možností, jak rozvinout nadšroubovicovou strukturu DNA by mohlo být použití enzymu topoizomerázy I [35] a následného restričního štěpení. Topoizomeráza I ale během práce nebyla k dispozici. V případě neúspěchu přípravy plazmidu ostatními metodami by bylo možné tento pokus zvážít. Problém se štěpením je možné obejít tak, aby při přípravě plazmidu s genem pro SEAP nebylo třeba použít restričních endonukleáz. Jako vhodné byly zvoleny metody, založené na polymerázové řetězové reakci.

Gibsnova reakce vyžaduje jako vstupní materiál plazmid, amplifikovaný příslušnými oligonukleotidy. Ten se ale nepodařilo amplifikovat, přestože pro PCR byly použity tři různé DNA polymerázy a reakce byla upravována různým množstvím DMSO. Dalším postupem pro dosažení úspěšné amplifikace plazmidu by mohlo být přidání různého množství DMSO i do reakcí s polymerázami Deep Vent a Phusion. Případným řešením by mohlo být výrazné prodloužení doby elongace, neboť templát o velikosti 10 kbp může být svou strukturou značně komplikovaný, jak se ukázalo i při restričním štěpení, a mohl by zpomalit reakční rychlost DNA polymeráz.

Další možností přípravy požadovaného plazmidu bylo použití metod RF klonování a TPCR, které jsou si principiálně podobné, s tím rozdílem, že

u RF klonování se primer pro amplifikaci plazmidu s inzertem připravuje odděleně, zatímco u TPCR je v jedné reakci nejprve amplifikován primer, se kterým poté ve stejné reakční směsi proběhne amplifikace celého plazmidu. Při transformaci *E. coli* XL 10-Gold ligačními směsmi byly na kultivačních miskách nalezeny kolonie transformantů u TPCR metody (5.6). Mohlo by ale jít o falešně pozitivní výsledek, způsobený nedostatečným štěpením původních methylovaných plazmidů, které byly použity v reakci. Výsledek kontrolních reakcí z DNA izolované z TPCR kolonií napovídá, že by mohlo jít o požadovaný plazmid Daedalus s genem pro SEAP – na agarózové elektroforéze je zřetelný pruh odpovídající velikosti (obr. 19, str. 49) a navíc z tohoto vzorku úspěšně proběhla amplifikace genu SEAP se specifickými oligonukleotidy. Sekvenci takto získaných plazmidů je třeba ještě ověřit sekvencí se sekvenačními oligonukleotidy specifickými pro lentivirový plazmid.

7 ZÁVĚR

Lentivirový plazmid se nepodařilo linearizovat restrikcními endonukleázami, inzerce genu SEAP proto nebyla úspěšná.

Polymerázovou řetězovou reakcí se nepodařilo amplifikovat plazmid, metody Gibsova reakce a RF klonování proto nebyly úspěšné.

Metodou TPCR se podařilo připravit lentivirový plazmid který pravděpodobně obsahuje gen pro sekretovanou alkalickou fosfatázu.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ALBERTS, B.: *Molecular biology of the cell*. 4. vydání. New York: Garland Science, 2002.
- [2] COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y., BOYER, H. W., HELLING, R. B.: Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973. **70**(11): 4240-4244
- [3] COHEN, S. N., BOYER, H. W.: *Processes for Producing Biologically Functional Molecular Chimeras.*, Patent 42372242 US, 2. 12.1980.
- [4] HUGHES, S. S.: Making dollars out of DNA - The first major patent in biotechnology and the commercialization of molecular biology, 1974-1980. *Isis*, 2001, **92**(3): 541-575.
- [5] Polymers. www.mdpi.com [online]. [cit. 2014-08-21]. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/6/2/515/htm>
- [6] MULLIS, K. B.: *The polymerase chain reaction*. Nobel lectures, 1993. [cit. 2014-08-21]. Dostupné z: http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html
- [7] NATHANS, D.: *Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics*. Nobel lectures, 1978. [cit. 2014-08-21]. Dostupné z: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1978/nathans-lecture.pdf
- [8] SANGER, F.: *Determination of nucleotide sequences in DNA*. Nobel lectures, 1980. [cit. 2014-08-21]. Dostupné z: http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/sanger-lecture.pdf
- [9] GILBERT, W.: *DNA sequencing and gene structure*. Nobel lectures, 1980. [cit. 2014-08-21]. Dostupné z: http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/gilbert-lecture.pdf
- [10] SCHMIDT, F. R.: Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, **65**(4): 363-372.
- [11] DEMAIN, A. L., VAISHNAV, P.: Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 2009, **27**(3). 297-306

-
- [12] GRAHAM, F. L., SMILEY J., RUSSELL, W. C., NAIRN, R.: Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology*. 1977, **36**(1): 59-72.
- [13] SALTZMAN, W. M., LUO, D.: Synthetic DNA Delivery Systems. *Nature Biotechnology*. 2000, **18**(1): 33-37.
- [14] KUKOWSKA-LATALLO, J. F., BIELINSKA, A. U., JOHNSON, J., SPINDLER, R., TOMALIA, D. A., BAKER, J.R. Jr.: Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996, **93**(10): 4897-4902.
- [15] DUROCHER, Y.: High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Research*. 2002, **30**(2): 9e-9.
- [16] GIRARD, P., DEROUZAZI, M., BAUMGARTNER, G., BOURGEOIS, M., JORDAN, M., JACKO, B., WURM, F. M.: 100-liter transient transfection. *Cytotechnology*. 2002, **38**(1-2): 15-21.
- [17] BANDARANAYAKE, A. D., CORRENTI C., RYU B. Y., BRAULT M., STRONG R. K. a RAWLINGS D. J.: Daedalus: a robust, turnkey platform for rapid production of decigram quantities of active recombinant proteins in human cell lines using novel lentiviral vectors. *Nucleic Acids Research*. 2011, **39**(21) 143-143.
- [18] QUINONEZ, R., SUTTON, R.: Lentiviral Vectors for Gene Delivery into Cells. *DNA and Cell Biology* 2002, **21**(12), 937-951.
- [19] PAUWELS, K., GIJSBERS, R., TOELEN, J., SCHAMBACH, A., WILLARD-GALLO, K., VERHEUST, C., DEBYSER, Z., HERMAN, P.: State-of-the-Art Lentiviral Vectors for Research Use: Risk Assessment and Biosafety Recommendations. *Current Gene Therapy*. 2009, **9**(6): 459-474.
- [20] Lentiviral Vector Production and Cell Transduction Review. www.invivogen.com [online]. [cit. 2014-08-21]. Dostupné z: <http://www.invivogen.com/review-lentiviral-vectors>

-
- [21] GALSKI, H., FRIDOVICH, S. E., WEINSTEIN, D., De GROOT, N., SEGAL, S., FOLMAN, R., HOCHBERG, A. A.: Synthesis and secretion of alkaline phosphatase in vitro from first-trimester and term human placentas. *Biochemical Journal*. 1981, **194**(3): 857–866.
- [22] BERGER, J., HAUBER, J., HAUBER, R., GEIGER, R., CULLEN, B. R.: Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene*. 1988, **66**(1): 1-10.
- [23] CULLEN R. R.: Utility of the secreted placental alkaline phosphatase reporter enzyme. *Methods in Enzymology*. 2000, **326**(11): 159-164.
- [24] Phosphatase Assay. www.gbiosciences.com [online]. [cit. 2014-08-21].
Dostupné z: <http://www.gbiosciences.com/ResearchProducts/PhosphataseAssay-desc.aspx>
- [25] ENT, V. D. F., LÖWE, J: RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2006, **67**(1), 67-74.
- [26] UNGER, T., JACOBOVITCH, Y., DANTESS, A., BERNHEIM, R., PELEG, Y.: Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of Structural Biology*. 2010, **172**(1): 34-44.
- [27] ERIJMAN, A., DANTESS, A., BERNHEIM, R., SHIFMAN, J. M., PELEG, Y.: Transfer - PCR (TPCR): a highway for DNA cloning and protein engineering. *Journal of Structural Biology*. 2011, **175**(2): 171-177.
- [28] GIBSON, D. G., YOUNG, L., CHUANG R-Y., VENTER, J. C., HUTCHISON, C. A., HAMILTON, O, S.: Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*. 2009, **6**: 343-345.
- [29] Synthetic biology protocols www.synbio.org.uk[online]. [cit. 2014-08-21].
Dostupné z:
http://synbio.org.uk/gibson/downloads/files/GibsonAssembly_Draft5a.pdf
- [30] 1 kb DNA Ladder www.neb.com [online]. [cit. 2014-08-21]. Dostupné z:
<https://www.neb.com/products/n3232-1-kb-dna-ladder>
- [31] Oficiální návod výrobce k produktu Geneaid Gel/ PCR DNA Fragments Extraction Kit. *Geneaid* [online]. [cit. 2014-08-20]. Dostupné z:

-
- <http://www.geneaid.com/products/gel-extraction/gel-extraction-kit>
- [32] Oficiální návod výrobce k produktu High-Speed Plasmid Mini Kit. *Geneaid* [online]. [cit. 2014-08-20]. Dostupné z:
<http://www.geneaid.com/products/plasmid-dna-purification/plasmid-kit-miniprep>
- [33] NIE ,Y., BIENIOSSEK, C., BERGER, I.: *ACEMBL Expression System User Manual*. 2009. Dostupné z:
<http://www.embl.fr/research/services/berger/ACEMBL.pdf>
- [34] KINGSTON, I. J, GORMLEY, N.A., HALFORD, S.E.: DNA supercoiling enables the type IIS restriction enzyme BspMI to recognise the relative orientation of two DNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 2003, **31**(18): 5221-5228.
- [35] WANG, J. C.: DNA Topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry*. 1996, **65**: 635-692.

