

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
Katedra biochemie



**Příprava vektoru pro rekombinantní expresi lidského  
proteinu NKR-P1, receptoru NK buněk**

**Bakalářská práce**

**Školitel: Mgr. Ondřej Vaněk**  
**Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Karel Bezouška, CSc.**



**Praha 2007**

**Alena Hájková**

## Poděkování

Ráda bych zde poděkovala všem, kteří mi pomohli při vypracování této bakalářské práce. Děkuji zejména svému školiteli Mgr. Ondřeji Vaňkovi za odborné vedení, cenné rady, věnovaný čas a velkou trpělivost při vypracovávání této bakalářské práce.

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, CSc. za možnost vypracování bakalářské práce a cenné rady. Děkuji všem členům Laboratoře architektury proteinů MBÚ AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji také své rodině za podporu poskytovanou po celou dobu mého studia.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele Mgr. Ondřeje Vaňka a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 6. 6. 2007

Hájková  
Alena Hájková

## Seznam použitých zkratek

<b>bp</b>	páry bází
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin
<b>CD</b>	označení povrchových molekul leukocytů
<b>CRD</b>	sacharid vázající doména
<b>dd</b>	destilovaný, deionizovaný
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>dNTP</b>	deoxynukleotidtrifosfát
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>EtOH</b>	ethanol
<b>HLA</b>	hlavní lidský histokompatibilní komplex
<b>IFN</b>	interferon
<b>ITAM</b>	imunitní aktivační receptorový motiv tyrosinového typu
<b>ITIM</b>	imunitní inhibiční receptorový motiv tyrosinového typu
<b>KIR</b>	zabíječský receptor imunoglobulinového typu
<b>Klrb1</b>	označení povrchového buněčného receptoru
<b>LB</b>	název média dle Luria-Bertaniho
<b>MHC</b>	hlavní histokompatibilní komplex
<b>NaAc</b>	octan sodný
<b>NK</b>	přirozený zabíječ
<b>NKC</b>	komplex genů NK buněk
<b>NKR-P1</b>	označení povrchového buněčného receptoru
<b>NK-T</b>	přirozeně zabíječské T buňky
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce
<b>PEG</b>	polyethylenglykol
<b>rpm</b>	otáčky za minutu
<b>SDS</b>	dodecylsulfát sodný
<b>T4 PNK</b>	T4 polynukleotidkinasa
<b>Tris</b>	tris (hydroxymethyl) aminomethan

# Obsah

Seznam použitých zkratk	4
<b>1. ÚVOD</b>	<b>7</b>
1.1. Imunitní systém	7
1.2. Imunitní mechanismy	7
1.3. Buňky imunitního systému	8
1.4. NK buňky	8
1.5. Receptory NK buněk	9
1.6. NKR-P1	10
<b>2. CÍL PRÁCE</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIÁL</b>	<b>13</b>
3.1. Přístroje a pomůcky	13
3.2. Chemikálie	14
3.2.1. Enzymy	14
3.2.2. Bakteriální kmeny	15
3.2.3. Vektory	15
3.2.4. Primery pro PCR	15
3.2.5. Roztoky a média	15
<b>4. POUŽITÉ POSTUPY</b>	<b>17</b>
4.1. Fosforylace přímého primeru	17
4.2. PCR	17
4.3. Agarosová elektroforéza	18
4.4. Úprava inzertu restrikčním štěpením	18
4.5. Příprava linearizovaného plazmidu	18
4.6. Preparativní elektroforéza	19
4.7. Extrakce DNA z gelu pomocí kitu	19
4.8. Ligace	20
4.9. Transformace expresního vektoru do buněk	20
4.10. Rychlá izolace plazmidové DNA	20
4.11. Izolace plazmidové DNA - minipreparace	21
4.12. Štěpení restrikčními endonukleasami	21
4.13. Velkoobjemová produkce plazmidu	21

<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>24</b>
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>33</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>35</b>
<b>8. POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>36</b>

# 1. Úvod

## 1.1. Imunitní systém

**Imunitní systém** tvoří souhrn mechanismů zajišťujících integritu organismu rozeznáváním a likvidací cizích či vlastních potenciálně škodlivých struktur. Hlavní funkce se projevují jako:

- obranyschopnost – rozpoznání vnějších škodlivin, ochrana před vnějšími patogenními organismy a jejich toxiny
- autotolerance – rozpoznání a udržování tolerance vůči vlastním tkáním
- imunitní dohled – rozpoznání vnitřních škodlivin; průběžné odstraňování starých, poškozených a mutovaných buněk<sup>1</sup>.

## 1.2. Imunitní mechanismy

Imunitní systém využívá dva základní mechanismy a to mechanismus nespecifický (neadaptivní) a antigenně specifický (adaptivní). Imunitní reakce jsou zajišťovány různými druhy buněk a molekul a jejich vzájemnou spoluprací<sup>1</sup>.

Nespecifické mechanismy jsou evolučně starší, v určité formě jsou známy u všech mnohobuněčných organismů. Na přítomnost cizorodé látky reagují rychle a reakce nejsou podmíněny předchozím setkáním s danou látkou. Základní složky tvoří zejména buněčný a humorální systém. Buněčný systém reprezentují fagocytující a přirozeně cytotoxické (NK) buňky, humorální složku představuje zejména komplementový systém, lektiny, interferony a další sérové proteiny<sup>1</sup>.

Specifické mechanismy jsou evolučně mladší, známé až od obratlovců. Využívají imunologickou paměť, kdy je reakce podmíněna předchozím setkáním s daným antigenem. Systém využívá humorální a buněčně zprostředkované mechanismy, hlavní buněčný aparát představují protilátky a T-lymfocyty. Jejich hlavní funkce spočívá v likvidaci patogenů a toxických molekul, které produkují<sup>2</sup>. Specifická imunitní reakce je pomalejší, řádově trvá několik dní až týdnů<sup>1</sup>.

### **1.3. Buňky imunitního systému**

Základní funkční prvek imunitního systému tvoří bílé krvinky (leukocyty). V lidském těle jich je přibližně  $2 \times 10^{12}$  - cit. <sup>2</sup>. Vznikají z pluripotentních kmenových buněk uložených v kostní dřeni, které zde zůstávají v malém množství po celý život a působením různých faktorů diferenciují na dvě základní linie lymfocytů - myeloidní a lymfoidní <sup>1</sup>.

Z lymfoidní linie diferenciují B a T lymfocyty a NK buňky. Část T a B lymfocytů diferenciuje po setkání s antigenem na tzv. paměťové buňky, které v organismu přežívají i desítky let a tvoří základ imunologické paměti <sup>1</sup>.

Z myeloidní linie vznikají monocyty a granulocyty, které tvoří základ nespecifické části imunitního systému. Většinou jsou schopny fagocytózy, produkce cytokinů a jiných rozpustných mediátorů. Monocyty a zejména z nich vznikající dendritické buňky, mohou působit jako buňky prezentující antigen pro T - lymfocyty a stávají se tak součástí antigeně specifické části imunitní odpovědi. Z myeloidní linie diferenciují také erytrocyty a trombocyty, jejichž hlavní funkce nesouvisí s imunitním systémem <sup>1</sup>.

### **1.4. NK buňky**

NK buňky se oddělují z T-lymfocytární linie. Původně byly popsány jako buňky schopné zabít některé nádorové nebo virem infikované buňky bez předchozí stimulace nebo proliferace. Díky nepřítomnosti antigeně specifických povrchových receptorů se řadí k nespecifické složce imunitního systému <sup>2</sup>. Původně byly NK buňky identifikovány u myši a člověka, později byly nalezeny i u dalších obratlovců. Primitivnější formy byly nalezeny i u jednodušších živočichů jako jsou paryby a hlísti <sup>3</sup>.

Morfologicky jsou NK buňky velké granulární lymfocyty <sup>2,3</sup>. Jejich hlavním cytotoxickým nástrojem jsou cytotoxické granule obsahující perforin a granzymy. NK buňky se, spolu s interferonovým systémem, účastní obrany organismu proti virům, významně se uplatňují v protinádorovém dozoru a kontrole rozvoje metastáz <sup>1</sup>.

Věřilo se, že tolerance NK buněk vůči vlastním buňkám je založena na dostatečné produkci MHC glykoproteinů na jejich povrchu. Pokud NK buňka narazí na normální buňku, přechodně se na ni adhezuje pomocí řady nespecifických adhezivních molekul a po chvíli NK buněčné receptory najdou MHC molekuly, což dá NK buňce signál k odpoutání. Pokud však MHC molekuly nalezeny nejsou, aktivují se cytotoxické mechanismy a



podezřelá buňka je zabita. Toto dogma bylo vyvráceno díky objevu normální populace myších NK buněk, které nemají receptory specifické pro MHC glykoproteiny I. třídy. Je tedy zřejmé, že k NK buněčné autotoleranci přispívají i jiné inhibiční receptory<sup>11</sup>.

NK buňky zastávají v rámci imunitního systému také regulační funkci - jsou zdrojem cytokinů IFN -  $\gamma$ , IL - 3, M - CSF a dalších látek ovlivňujících diferenciaci některých efektorových buněk a hematopoézu<sup>1</sup>.

## **1.5. Receptory NK buněk**

Funkce NK buněk je regulována rovnováhou mezi aktivačními a inhibičními signálními receptory, které iniciují nebo inhibují jejich buněčnou aktivitu<sup>4,5</sup>.

NK buňky mohou být stimulovány různými aktivačními receptory, které využívají biochemicky odlišné signální dráhy<sup>5</sup>. Řada z nich je specifická pro MHC molekuly I. typu. U inhibiční formy zprostředkovává jejich akci motiv ITIM. Aktivační receptory mají oproti inhibičním zkrácenou cytoplazmatickou doménu postrádající ITIM, ale mohou být asociovány s aktivačním motivem ITAM<sup>7</sup>. Geny aktivačních i inhibičních receptorů patří do dvou velkých rodin: C-lektinové a imunoglobulinové. Obě rodiny jsou značně rozsáhlé a různorodé, zahrnují geny s proměnlivým stupněm příbuznosti<sup>8</sup>.

Geny lektinových receptorů NK buněk jsou soustředěny v oblasti nazývané NK genový komplex (NKC, z angl. natural killer complex). NKC jako první definoval Yokohama a kol. jako skupinu genů na myším chromosomu 6 kódujícím typ II. transmembránových proteinů<sup>7</sup>. Analogický komplex byl u potkanů lokalizován na chromosomu 4 a na lidském chromosomu 12p13.1.<sup>8, 9</sup>. Lidský NKC tvoří oblast cca 2 Mb na krátkém rameni chromosomu 12. Je zde obsaženo nejméně 18 genů pro receptory lektinového typu, z nichž většina byla nalezena na povrchu NK a NK/T buněk<sup>5</sup>. Lektinové domény jsou struktury často přítomné ve vazebných doménách buněčných receptorů imunitního systému. Lektiny lze definovat jako malé globulární bílkoviny s CRD o velikosti okolo 100 aminokyselin<sup>10</sup>. První zmínky o lektinech a jejich fyziologických funkcích u obratlovců pocházejí z přelomu 70. a 80. let<sup>9</sup>. Jedna ze tříd genů lektinových receptorů kóduje typ II. transmembránových proteinů s C-lektinovou doménou v extracelulární části<sup>5</sup>. Mezi tyto receptory patří také hNKR-P1 studovaný v této práci. C-lektiny rozeznávají MHC molekuly I. typu a jsou lokalizovány na konci centromery lidského NKC<sup>7</sup>.

Geny receptorů patřících do imunoglobulinové rodiny byly lokalizovány na lidském chromosomu 19.q13.4, obsahujícím geny pro receptory KIRs, které se nacházejí na povrchu NK buněk a některých T - buněk<sup>8</sup>. KIRs kódují glykoproteinové receptory, jejichž hlavními ligandy jsou u lidí HLA I. třídy<sup>4</sup>.

## **1.6. NKR-P1**

NKR-P1 je označení používané pro proteinový receptor NK buněk č.1 (z angl. natural killer receptor - protein 1), označovaný také jako CD161 (z angl. clusters of differentiation) nebo Klrb1 (z angl. killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1).

Patří mezi membránové glykoproteiny II. typu s charakteristickými vlastnostmi proteinů patřících do rodiny lektinů C-typu<sup>6, 11, 12</sup>. Byl prvním lektinovým receptorem nalezeným na NK buňkách, původně identifikovaným u potkanů jako disulfidicky vázaný protein<sup>12, 13</sup>.

U potkanů byly nalezeny 3, u myši dokonce 4 geny pro NKR-P1 kódující jak aktivační tak inhibiční formy receptoru. Naproti tomu lidský gen pro NKR-P1 byl nalezen pouze v jedné funkční formě<sup>6, 14</sup>.

Geny pro lidský ekvivalent (hNKR-P1) jako první popsal Lanier a kol.. Srovnáním aminokyselin lidského a myšičího NKR-P1 byla zjištěna podobnost v 46%<sup>11</sup>. Všechny potkaní NKR-P1 receptory obsahují v cytoplazmatické doméně CxCP motiv, který byl lokalizován i v cytoplazmatických doménách receptorů CD 4 a CD 8, kde interaguje s tyrosin kinasou rodiny Src – p56<sup>lck</sup>. Lidský NKR-P1 tento motiv nemá<sup>4</sup>. Receptor hNKR-P1 exprimují na svém povrchu nejen NK buňky, ale také část CD4<sup>+</sup> T - lymfocytů, část monocytů a některé dendritické buňky<sup>5</sup>. Vyskytuje se u 25 % dospělých T - buněk v periferní krvi a je přednostně exprimován na T - buňkách s paměťovým fenotypem<sup>12</sup>.

Nedávno byly popsány interakce některých členů myšičí NKR-P1 receptorové rodiny, které interagují s C - typem lektinových molekul. Na základě objasnění myšičích ligandů byl objeven ligand pro hNKR-P1. Je jím LLT1 (z angl. lectin like transcript), u kterého bylo prokázáno, že se specificky váže na hNKR-P1. LLT1 i NKR-P1 náleží do rodiny lektinů C - typu a nezávisle na sobě byly charakterizovány jako homodimery na buněčném povrchu. Zajímavý rysem vazby hNKR-P1/LLT1 je schopnost spouštět opačné signály v NK a T buňkách navzdory faktu, že se jedná o stejný receptor i ligand. Vazba LLT1 cílových buněk s NKR-P1 na NK buňkách snižuje jejich buněčnou toxicitu a produkci IFN- $\gamma$ , naopak vazba LLT1 s NKR-P1 na T buňkách zvyšuje produkci IFN -  $\gamma$ . Funkce

hNKR-P1 tedy závisí na druhu buněk, na nichž je exprimován. Jakým způsobem je umožněna rozdílná funkce receptoru na NK a T buňkách nebylo doposud dostatečně objasněno<sup>6, 11</sup>. Za zmínku stojí fakt, že hNKR-P1 je na T a NK/T buňkách exprimován mnohem častěji, než jiné receptory NK buněk<sup>11</sup>.

Lidská varianta lymfocytárního proteinu hNKR-P1 patří v Laboratoři architektury proteinů MBÚ AV ČR již delší dobu do skupiny intenzivně zkoumaných receptorů C-lektinového typu. Již dříve zde byl vytvořen konstrukt kódující část extracelulární domény hNKR-P1 od Gln<sub>80</sub> po Ser<sub>225</sub>. Tento konstrukt se však ukázal jako nevhodný pro další studie, jelikož z něj získaný protein nebyl dostatečně stabilní. Pravděpodobnou příčinou nestability byla přítomnost nukleotidů kódujících nejen CRD proteinu hNKR-P1 ale i tzv. krček. Mým cílem bylo proto vytvoření konstrukt, který by obsahoval pouze CRD proteinu hNKR-P1. Na základě homologního modelování s proteinem CD 69 (obr. č. 1) byla jako CRD vybrána pouze část začínající aminokyselinou Asn<sub>93</sub> a jako poslední aminokyselina byl vybrán Thr<sub>215</sub>.



**Obr. č. 1:** Model hNKR-P1 vytvořený na základě homologního modelování s proteinem CD 69.

Modře – extracelulární doména proteinu CD 69; Žlutě – předpokládaná extracelulární doména proteinu hNKR-P1; Červeně – oblasti obsažené v původním konstrukt hM1NKR-P1, o které byl nový konstrukt hM2NKR-P1 zkrácen. Obrázek poskytl Mgr. Ondřej Vaněk.

## 2. Cíl práce

**Cílem bakalářské práce bylo:**

- Připravit expresní vektor pro protein hNKR-P1
- Ověřit správnost připraveného expresního vektoru restrikčním štěpením
- Připravit zásobního množství expresního vektoru

## 3. Materiál

### 3.1. Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy *AND, USA*
- Automatické pipety *Gilson, USA*
- Centrifuga Allegra X-22R *Beckman Coulter, USA*
- Centrifuga MPW-375 *Mechanika Precyzyjna, Polsko*
- Centrifuga VSMC-13 *Shelton scientific, USA*
- Centrifuga Z 233 MK-2 *Hermle, Německo*
- Centrifuga stolní, Spectrofuge 16M *Edison, USA*
- Chladnička *Zannusi, Itálie*
- JETQUICK Gel Extraction Spin Kit *Genomed, Německo*
- JETQUICK Plasmid Purification Spin Kit *Genomed, Německo*
- Ledovač UBE 50-35 *Ziegra, Německo*
- Luminiscentní analyzátor LAS-1000 CH *Fuji photo film, Japonsko*
- Magnetická míchačka MM 2A *Lab.přístroje Praha, ČR*
- Mrazicí box (- 80 °C) Bio Freezer *Forma scientific, USA*
- Mrazicí box (- 20 °C) *Zannusi, Itálie*
- pH metr  $\Phi$  200 *Beckman, Německo*
- Předvážky HF-1200 G *AND, USA*
- Rotační vakuová odparka *Trigon, Francie*
- Souprava pro agarosovou elektroforézu *Sigma, USA*
- Spektrofotometr DU-70 *Beckman, Německo*
- Termocykler *Eppendorf, Německo*
- Termostat BT 120M *Lab.přístroje Praha, ČR*
- Třepačka *VELP Scientifica, Itálie*
- UV lampa UVGL-58 *Science Company, USA*
- Vortexový mixér *VELP Scientifica, Itálie*
- Zdroj deionizované vody Milli Q *Millipore, USA*
- Zdroj napětí BM 551 *Tesla, ČR*

## 3.2. Chemikálie

- Agar *Oxoid, Anglie*
- Agarosa *Jersey Lab Supply, USA*
- Ampicilin *Biotika, SR*
- Bromfenolová modř *Sigma, USA*
- BSA *New England Biolabs, USA*
- dNTP *Fermentas, Kanada*
- EDTA *Fluka, Švýcarsko*
- Ethanol *Lachema, ČR*
- Ethidiumbromid *Jersey Lab Supply, USA*
- Fenol *Reactiva, Rumunsko*
- Glukosa *Lachema, ČR*
- Glycerol *Sigma, USA*
- Chlorid sodný *Lachema, ČR*
- Chloroform *Lachema, ČR*
- Isoamylalkohol *Lachema, ČR*
- Isopropylalkohol *Lachema, ČR*
- Kvasničný extrakt *Imuna Pharm, ČR*
- Kyselina octová *Lachema, ČR*
- Octan sodný *Lachema, ČR*
- Polyethylenglykol,  $M_r = 8000$  g/mol *Fluka, Švýcarsko*
- Sacharosa *Lachema, ČR*
- Síran hořečnatý *Lachema, ČR*
- Standard pro agarosovou elektroforézu *New England Biolabs, USA*
- Tetracyklin *Lab scientific, USA*
- Tris *Serva, USA*
- Trypton *Oxoid, Anglie*

### 3.2.1. Enzymy

- Bst XI (10000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Dde I (10000 U/ml) *New England Biolabs, USA*

- Deep Vent DNA polymerasa (2000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Hind III (20000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Klenowův fragment *Fermentas, Kanada*
- Lysozym *Fluka, Švýcarsko*
- Nde I (20000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- RNAasa A (10 mg/ml) *Sigma, USA*
- T4 DNA ligasa (1000 U/μl) *Fermentas, Kanada*
- T4 polynukleotidkinasa (10000 U/ml) *New England Biolabs, USA*
- Xba I (20000 U/ml) *New England Biolabs, USA*

### 3.2.2. Bakteriální kmeny

- *E. coli*: XL 1-BLUE STRAIN *E. coli recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI'*ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)] *Stratagene, USA*

### 3.2.3. Vektory

- pRSET B (1 μg/μl) *Invitrogen, USA*

### 3.2.4. Primery pro PCR

- Reverzní primer hM2NKR-P1 REV *Generi Biotech, ČR*  
5' – TAT AAG CTT ATG TTA GTT CTT TTT GGC AG - 3'
- Přímý primer hM2NKR-P1 FW *Generi Biotech, ČR*  
5' – TGA ACT GCC CAA TAT ATT GGC – 3'

### 3.2.5. Roztoky a média

- **LB médium:** 1 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 1 % NaCl, pH = 7,4  
- použité koncentrace antibiotik:  
ampicilin 150 μg/ml (zásobní koncentrace 150 mg/ml)  
tetracyklin 12,5 μg/ml (zásobní koncentrace 5 mg/ml)

- **LB agar:** 1,5 % agar v LB médiu  
- použité koncentrace antibiotik:  
    ampicilin 150 µg/ml  
    tetracyklin 12,5 µg/ml
- **Pufř pro T4-DNA ligasu:** 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA, pH = 7,5 (*Fermentas, Kanada*)
- **EP pufř:** 10 mM Tris (pH = 8,0), 1 mM EDTA, 15 % sacharosa, 2 mg/ml lysozym, 0,2 mg/ml RNAasa, 0,1 mg/ml BSA
- **NEB2 pufř:** 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, pH = 7,9 (*New England Biolabs, USA*)
- **NEB3 pufř:** 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH = 7,9 (*New England Biolabs, USA*)
- **PCR pufř:** 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris - HCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 % Triton X-100, pH = 8,8 (*New England Biolabs, USA*)
- **Roztok L1:** NaClO<sub>4</sub>, NaAc, TBE (*Genomed, Německo*)
- **Roztok L2:** EtOH, NaCl, EDTA, Tris-HCl (*Genomed, Německo*)
- **Roztok G1:** 50 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNAasa A (*Genomed, Německo*)
- **Roztok G2:** 200 mM NaOH, 1% SDS (*Genomed, Německo*)
- **Roztok G3:** guanidin hydrochlorid, octan sodný (*Genomed, Německo*)
- **Roztok GX:** guanidin hydrochlorid (*Genomed, Německo*)
- **Roztok G4:** EtOH, NaCl, EDTA, Tris-HCl (*Genomed, Německo*)
- **Gel pro agarosovou elektroforézu:** 1% agarosa v TAE pufřu, 2 µl ethidiumbromid, resp. 1,1 % agarosa v TAE pufřu, 4 µl ethidiumbromid pro preparativní elektroforézu
- **TAE pufř (50x koncentrovaný):** 2 M Tris, 1 M CH<sub>3</sub>COOH, 50 mM EDTA
- **STOP pufř:** 50 % glycerol, bromfenolová modř, EtOH, TE pufř
- **TE pufř:** 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH = 8,0
- **Roztok I:** 50 mM glukosa, 25 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 10 mM EDTA
- **Roztok II:** 3 mM NaAc, 10 % CH<sub>3</sub>COOH



## 4. Použité postupy

### 4.1. Fosforylace přímého primeru

Ke 2  $\mu\text{l}$  0,1 M přímého primeru přidáno 42  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 5  $\mu\text{l}$  T<sub>4</sub> ligačního pufru a 1  $\mu\text{l}$  T<sub>4</sub> PNK. Inkubace 30 min při 37 °C.

### 4.2. PCR

PCR provedena v automatickém termocykleru. V tabulce č.1 je uvedeno nastavení jednotlivých cyklů v pořadí, v jakém následovaly.

Složení směsi pro PCR:

29,5 $\mu\text{l}$	ddH <sub>2</sub> O
1,5 $\mu\text{l}$	100 mM MgSO <sub>4</sub>
5 $\mu\text{l}$	PCR pufr (10x koncentrovaný)
1,5 $\mu\text{l}$	dNTP
6 $\mu\text{l}$	fosforylovaný přímý primer
5 $\mu\text{l}$	rev primer
1 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{M}$ templát
0,5 $\mu\text{l}$	DNA polymerasa I

**Tab. č. 1:** Hodnoty nastavené termocykleru

Počet cyklů	čas	teplota
1	2 minuty	94 °C
35	30 sekund	94 °C
	30 sekund	52 °C
	1 minuta	72 °C
1	10 minut	72 °C
1	10 h	4 °C

Produkt zakoncentrován srážením: k produktu přidáno na ledu 5  $\mu\text{l}$  3M NaAc (pH = 5.2) a 125  $\mu\text{l}$  čistého EtOH o  $T = -20\text{ }^\circ\text{C}$ . Inkubace 3 h při  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . Následuje centrifugace 20 min při 12 000 x g v předchlazeném rotoru. Pelety dosušeny ve vakuové rotační odparce a rozpuštěny v 17  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O

### **4.3. Agarosová elektroforéza**

Jako standard použit plazmid pRSET B naštěpený enzymem Dde I. Použité napětí 80 – 120 V. Složení gelu viz. Sekce 3.2.5..

### **4.4. Úprava inzertu restrikčním štěpením**

K neupravenému inzertu přidány 4  $\mu\text{l}$  NEB 2 pufru a 2  $\mu\text{l}$  enzymu Hind III. Inkubace 3 h při 37  $^\circ\text{C}$ .

### **4.5. Příprava linearizovaného plazmidu**

V tabulkách č. 2, 3, 4 jsou uvedena složení jednotlivých reakčních směsí použitých k restrikčním štěpením.

#### **I. restrikční štěpení enzymem Nde I**

**Tab. č. 2:** Složení reakční směsi pro restrikční štěpení enzymem Nde I:

ddH <sub>2</sub> O	NEB 2	Plazmid (1mg/ml)	Nde I
16 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	1,5 $\mu\text{l}$

Inkubace 3 h při 37  $^\circ\text{C}$

## II. Zarovnání Nde I míst Klenowovým fragmentem

**Tab. č. 3:** Složení reakční směsi pro doplnění restrikčních míst po Nde I Klenowovým fragmentem:

ddH <sub>2</sub> O	NEB 2	Naštěpený plazmid	dNTP (333 μmol)	Klenow.fr.
6 μl	1 μl	20 μl	3 μl	1 μl

Inkubace 15 min při laboratorní teplotě, následuje inhibice zahřátím na 75 °C po dobu 20 min.

## III. Restrikční štěpení enzymem Hind III.

**Tab. č. 4:** Složení reakční směsi pro restrikční štěpení enzymem Hind III:

ddH <sub>2</sub> O	NEB 2	lin. plazmid po zarovnání Klenow.fr.	Hind III
9 μl	1 μl	30 μl	1,5 μl

Inkubace 3 h při 37 °C.

## 4.6. Preparativní elektroforéza

Do vzorkovací jamky aplikováno 50 μl vzorku a 10 μl STOP pufru. Jako standard použit nenaštěpený plazmid pRSET B. Detekce vzorků v temnu pomocí dlouhovlnné UV lampy. Z gelu skalpelem vyřezány jednotlivé proužky a přeneseny do mikrozkumavky.

## 4.7. Extrakce DNA z gelu pomocí kitu

K extrakci použit průmyslově dodávaný set pro extrakci DNA z gelu pomocí kitu. Během extrakce byl přesně dodržen pracovní postup, dodaný firmou pro použití setu.

Stručně shrnuto, agarosa byla rozpuštěna pomocí roztoku L1 a oddělena od plazmidové DNA centrifugací přes mikrokolonku obsahující vrstvu silikagelu afinitně vážící DNA.

Dále byly v několika krocích pomocí roztoků L1 a L2 odstraněny nečistoty a poté byla navázaná plazmidová DNA eluována ddH<sub>2</sub>O.

#### **4.8. Ligace**

V tabulce č.5 je uvedeno složení použité ligační směsi.

**Tab. č. 5:** Složení ligační směsi:

Inzert	Linearizovaný plazmid	T4 ligační pufr	ddH <sub>2</sub> O	T4 DNA ligasa
10 µl	2 µl	2 µl	6 µl	1 µl

Inkubace 70 h při 4°C.

#### **4.9. Transformace expresního vektoru do buněk**

Transformace prováděna metodou tepelného šoku. 150 µl buněk pipetováno k připravenému expresnímu vektoru. Jako počátek transformace buňky ponechány 30 min na ledu, poté ponořeny na 50 vteřin do vodní lázně o teplotě 42 °C a ihned uloženy zpátky na led. Po 2 min přidán 1 ml LB media, inkubace 1 h při 37 °C. Transformované buňky odděleny centrifugací při 1000 x g a vysety na agarovou misku. Inkubace 15 h při 37 °C.

Vybrané kolonie přeneseny do 2 ml tekutého LB media s antibiotiky (použité koncentrace viz. sekce 3.2.5.). Inkubace 15 h při 37 °C v třepačce při 250 rpm. Z každé zkumavky odebrán 1 ml do mikrozukavky. Obsah mikrozukavek zcentrifugován při 12 000 x g, získané pelety buněk uchovávány v chladničce při 4 °C.

#### **4.10. Rychlá izolace plazmidové DNA**

Pelety transformovaných buněk resuspendovány v 30  $\mu$ l EP pufru . Resuspendované buňky uloženy na 10 min na led, poté 5 min povařeny a zcentrifugovány 3 min při 12 000 x g.

#### **4.11. Izolace plazmidové DNA - minipreparace**

Pro izolaci použita průmyslově dodávaná sada. Při izolaci byl přesně dodržen návod dodávaný výrobcem pro použití sady. Stručně shrnuto, z narostlé buněčné kultury pomocí centrifugace vytvořena peleta, která byla resuspendována v roztoku G1 a dále byly v několika krocích pomocí roztoků G2 a G3 buňky rozbity, vysrážena DNA bakteriálního chromosomu, rozpuštěny proteiny a plazmidová DNA navázána na afinitní mikrokolonku. Následně byly s využitím centrifugace odstraněny nečistoty promytím roztokem G4 a G5. V posledním kroku byla plazmidová DNA z kolony eluována ddH<sub>2</sub>O. Získané roztoky plazmidu uchovávány při – 20 °C.

#### **4.12. Štěpení restričními endonukleasami**

Do každé zkumavky pipetováno potřebné množství expresního vektoru, pufru doporučeného pro zvolené enzymy a každého z dvojice zvolených enzymů štěpících plazmidovou DNA. Následuje inkubace a ukončení štěpení přidáním vždy 3  $\mu$ l STOP pufru na 10  $\mu$ l objemu reakční směsi. Pro detekci výsledků využita agarosová elektroforéza. Vzhledem k individuálním vlastnostem použitých enzymů jsou konkrétní údaje uvedeny u jednotlivých štěpení v sekci 5.

#### **4.13. Velkoobjemová produkce plazmidu**

- Transformace vektoru do buněk metodou tepelného šoku (viz. sekce 4.9.) Narostlé buňky zcentrifugovány při 12 000 x g, pelet uskladněn při – 20 °C.
- Buňky resuspendovány v 10 ml roztoku I, poté zcentrifugovány 10 min při 2 300 x g a 4 °C . K supernatantu v čisté zkumavce přidáno 3,5 ml roztoku I obohaceného o lysozym (c = 5 mg/ml). Směs promíchána na vortexu, inkubace 5 min při laboratorní teplotě.

- Přidáno 7ml lyzačního roztoku (0,2 M NaOH v 1 % SDS). Směs promíchána na vortexu, inkubace 10 min na ledu.
- Přidáno 5,2 ml roztoku II, směs promíchána na vortexu, inkubace 10 min na ledu. Poté centrifugace 5 min při 13 000 x g a laboratorní teplotě. Supernatant přenesen do čisté zkumavky.
- K supernatantu přidáno 15 ml isopropanolu, inkubace 15 min při laboratorní teplotě. Následuje centrifugace 30 min při 4 °C a 12 000 x g. Získaný pelet omyt 70 % EtOH a volně dosušen na vzduchu.
- Pelet resuspendován v 0,5 ml TE pufru, vzniklá suspenze přenesena do mikrozukavky. Přidáno 10 µl RNAasy, inkubace 30 min při laboratorní teplotě.
- Přidáno 0,5 ml směsi fenol/chloroform (1:1), vzniklá směs 30 vteřin intenzivně vortexována. Následuje centrifugace 15 min při 12 000 x g a laboratorní teplotě. Vrchní fáze odebrána do čisté mikrozukavky.
- Přidáno 0,5 ml směsi chloroform/isoamylalkohol (49:1), vzniklá směs promíchána na vortexu a centrifugována 5 min při 12 000 x g a laboratorní teplotě. Vrchní fáze odebrána do čisté mikrozukavky.
- Přidáno 25 µl NaAc (3 M, pH = 5,2) a 625 µl 100 % EtOH. Srážení 30 min při - 70 °C. Poté centrifugace 5 min při 12 000 x g při - 4 °C. Peleta opláchnuta 70 % EtOH a volně dosušena na vzduchu. Poté resuspendována ve 160 µl ddH<sub>2</sub>O
- Přidáno 40 µl 4 M NaCl a 200 µl 13% roztoku PEG (Mr = 8000 g/mol). Inkubace 70 h při 4 °C. Poté centrifugace 30 min při 0 °C a 12 000 x g . Pelet resuspendován ve 100 µl TE pufru.
- Přidáno 100 µl fenolu, směs promíchána na vortexu a následně centrifugována 10 min při 13 000 x g a laboratorní teplotě. Vrchní fáze odebrána do čisté mikrozukavky.
- Přidáno 100 µl směsi fenol/chloroform (1:1), směs promíchána na vortexu a centrifugována 5 min při 13 000 x g a pokojové teplotě. Horní fáze odebrána do čisté mikrozukavky.
- Přidáno 100 µl směsi chloroform/isoamylalkohol (49:1), směs promíchána na vortexu a centrifugována 5 min při 13 000x g a laboratorní teplotě. Vrchní fáze odebrána do čisté mikrozukavky.
- Přidáno 10 µl NaAc (3 M, pH = 5,2) a 250 µl 95 % EtOH. Inkubace 30 min při - 80 °C. Poté centrifugace 5 min při 13 000x g a laboratorní teplotě. Pelety omyty 100 µl 70 %

EtOH a dosušeny v rotační vakuové odparce. Pelety resuspendovány v 300  $\mu$ l TE pufru. Zásobní roztok plazmidu uchováván při - 20 °C.

- Koncentrace získané plazmidové DNA stanovena spektrofotometricky. 5  $\mu$ l vzorku ředěno 995  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Absorbance měřena při 260 a 280 nm v křemenné kyvetě s optickou délkou 1 cm. Jako srovnávací vzorek použito 5  $\mu$ l TE pufru v 1 ml ddH<sub>2</sub>O. Při použití kyvety s optickou délkou 1 cm odpovídá absorbance měřená při 260 nm násobená deseti přibližně koncentraci DNA ve vzorku v jednotkách mg/ml. Pro stanovení čistoty DNA bylo využito rozdílu v absorpci záření nukleovými kyselinami při 260 a 280 nm. Pro čistou DNA je poměr  $A_{260}/A_{280}$  roven přibližně 1,8. Pokud je DNA znečištěna proteiny, hodnota poměru vlivem vzrůstající absorpce proteinů při 280 nm klesá.

## 5. Výsledky

Cílem této bakalářské práce bylo získat plazmid jako expresní vektor s vnesenou sekvencí kódující přesně vymezený úsek extracelulární části buněčného receptoru hNKR-P1, který je na obr. č. 2 vyznačen oranžovou barvou. Jako templát pro přípravu inzertu sloužil expresní vektor zahrnující plazmid pRSET B a inzert hM1NKR-P1 v rozmezí

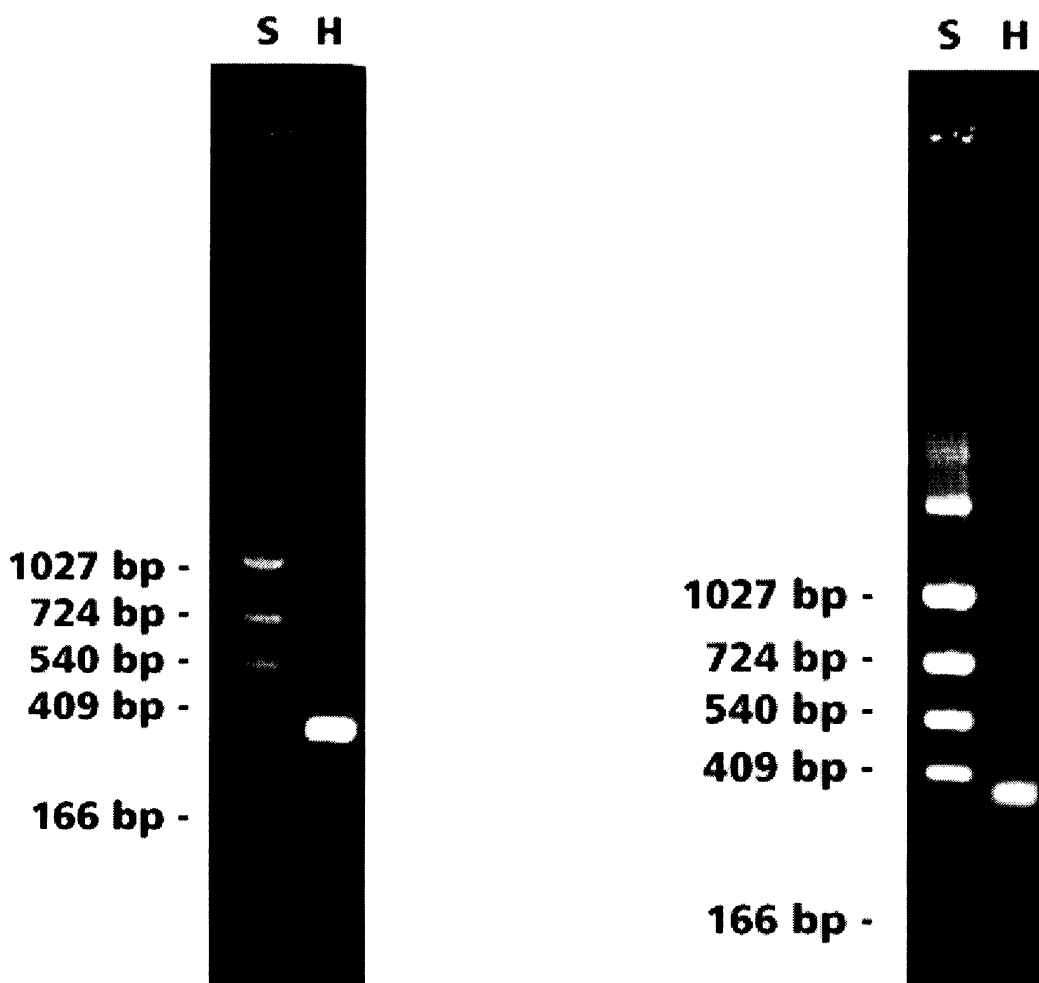
Gln<sub>80</sub> – Ser<sub>225</sub>. Tato sekvence je na obr. č. 2 vyznačena modrou a oranžovou barvou.

**MDQQAIIYAELNLPTDSGPSSPSSLPRDVCQSPWHQFALKLSCAGIILLVLV  
VTGLSVSVTSLIQKSSIEKCSVDIQQSR■KTTERPGLLNCPIYWQQLREKCLLF  
SHTVNPW■NSLADCSTKESLLLRDKDELHHTQNLIRDKALEFWIGL■FSLSE  
KNWKWI■GSEFLNSNDLEIRGDAKE■SCISISQTSVYSEYCSSTEIRWICQKELTP  
VRNKVYPDS**

**Obr. č. 2:** Sekvence aminokyselin lidského receptoru NKR-P1. **Zeleně** intracelulární část, **červeně** transmembránový úsek, **modře** oblasti obsažené v původním konstrukt hM1NKR-P1 o které byl nový konstrukt hM2NKR-P1 zkrácen, **oranžové** nový konstrukt hM2NKR-P1, **žlutě** cysteiny tvořící disulfidické můstky, ■ potenciální místa N-glykosylace.

Pomocí PCR byl replikován nový, zkrácený úsek extracelulární části hNKR-P1. Použité primery jsou uvedeny v sekci 3.2.4., přímý primer bylo potřeba nejprve fosforylovat. Díky fosforylaci zůstal fosfátový zbytek na 5' konci syntetizovaného řetězce a při ligaci umožnil spojení inzertu s vektorem. Pro získání dostatečného množství inzertů k další práci byl celý postup PCR proveden 2x. Jako kontrola správného provedení byla využita agarosová elektroforéza. Elektroforéza potvrdila očekávaný výsledek, tedy proužky lehce pod 400 párů bazí, očekávaná přesná velikost inzertů po PCR je 381 párů bazí (obr. č. 3a, 3b, str. 25).

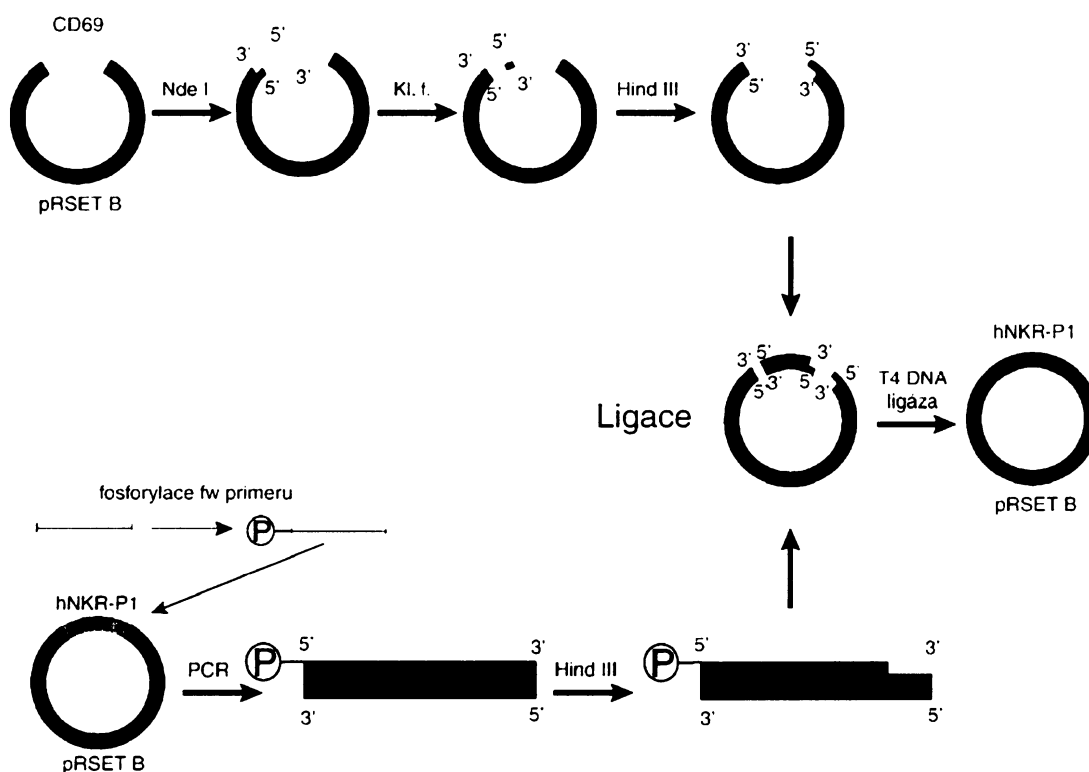




**Obr. č. 3a, 3b:** Kontrola správného provedení PCR agarosovou elektroforézou. H – vzorek inzertu po PCR, S - standard

Pro správnou orientaci při ligaci byl jeden konec získaného inzertu upraven pomocí restrikční endonukleasy Hind III, jejíž štěpné místo bylo součástí použitého reverzního primeru.

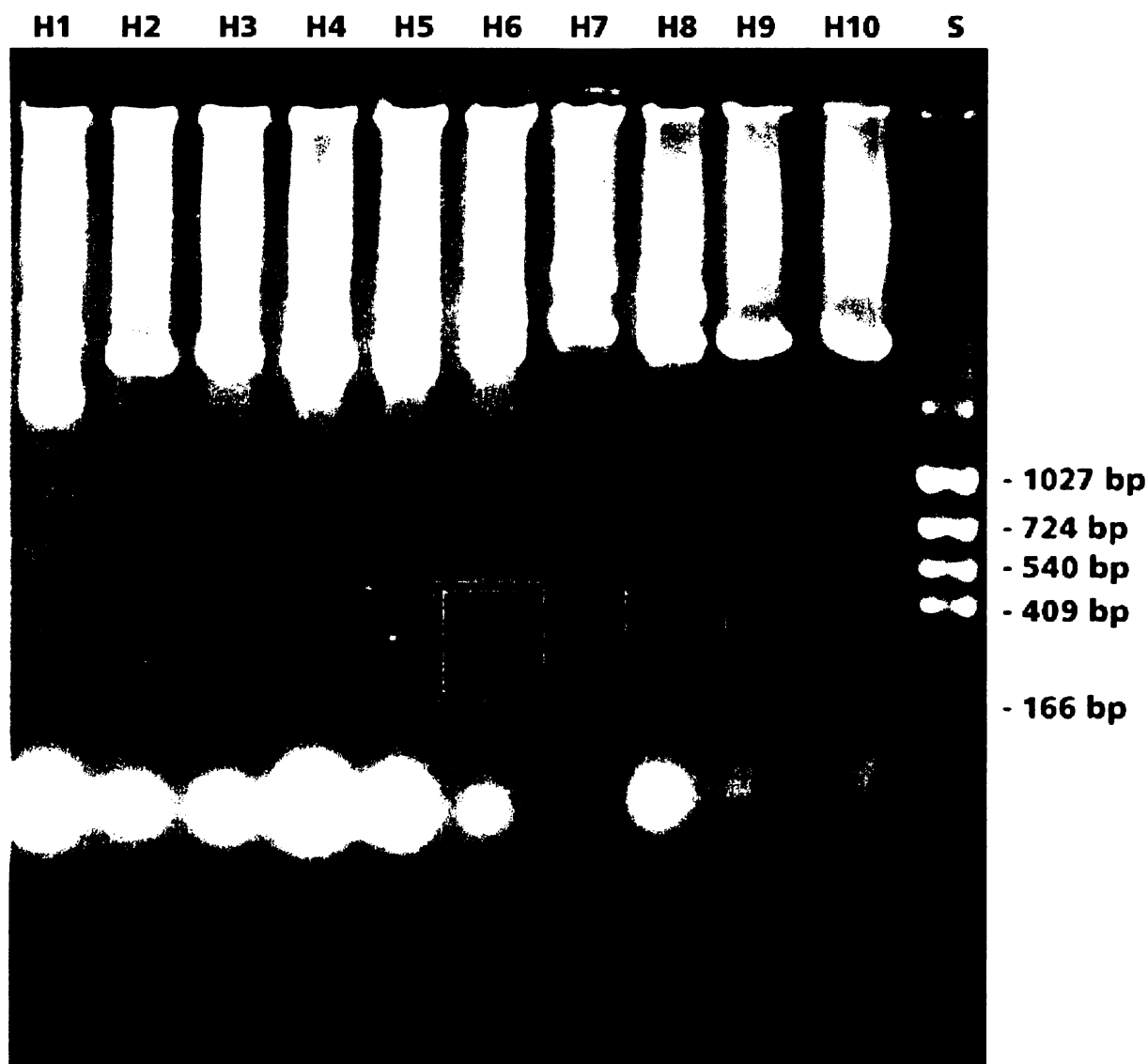
Jako expresní vektor byl zvolen plazmid pRSET B, s vloženou sekvencí kódující protein CD69, který obsahuje selekční marker zodpovědný za rezistenci vůči antibiotiku ampicilinu. Plazmid byl linearizován a jeho konce upraveny pomocí restrikčních enzymů a Klenowova fragmentu tak, aby byly komplementární k připravenému inzertu a mohla proběhnout úspěšná ligace. Linearizovaný plazmid i připravený inzert byly přečištěny preparativní elektroforézou, extrahovány z gelu a poté následovala vlastní ligace. Celý proces je schématicky znázorněn na obr. č. 4.



**Obr. č. 4:** Schématické znázornění procesu úprav a následné ligace plazmidu pRSET B a inzertu hNKR-P1

Takto připraveným expresním vektorem byly transformovány kompetentní bakterie *E. coli* XL 1 – BLUE nesoucí rezistenci vůči antibiotiku tetracyklinu. Transformace bakterií byla provedena metodou tepelného šoku. Transformované buňky byly vysety na agarové misky s antibiotiky. Buňky rostly po dobu 15 h, která se ukázala být až příliš dlouhou. Na misce narostlo asi 200 kolonií, z nichž většina již kolem sebe měla patrné sekundární kolonie. Sterilním párátkem bylo vybraných 10 ojedinele rostoucích primárních kolonií přeneseno do 2 ml LB média s antibiotiky a dále rozpěstováno do viditelného zákalu. Z narostlých buněk byl odebrán vždy 1 ml, ve kterém byly buňky centrifugací odděleny od média. Z buněk byla s využitím rychlé izolace zpřístupněna plazmidová DNA, která byla dále štěpena restrikčními enzymy Nde I a Hind III, kdy u správně transformovaných buněk mělo dojít k vyštěpení vneseného inzertu z plazmidu. K 10  $\mu$ l supernatantu obsahujícího plazmidovou DNA byl přidán 1  $\mu$ l NEB 2 pufru, 0,2  $\mu$ l enzymu Hind III a 0,2  $\mu$ l enzymu Nde I. Inkubace 3 h při 37 °C. Poté přidány 3  $\mu$ l STOP pufru. Naštěpená DNA byla

analyzována agarosovou elektroforézou (obr. č. 5). Podle výsledků elektroforézy byly vybrány kultury se správně transformovaným plazmidem.

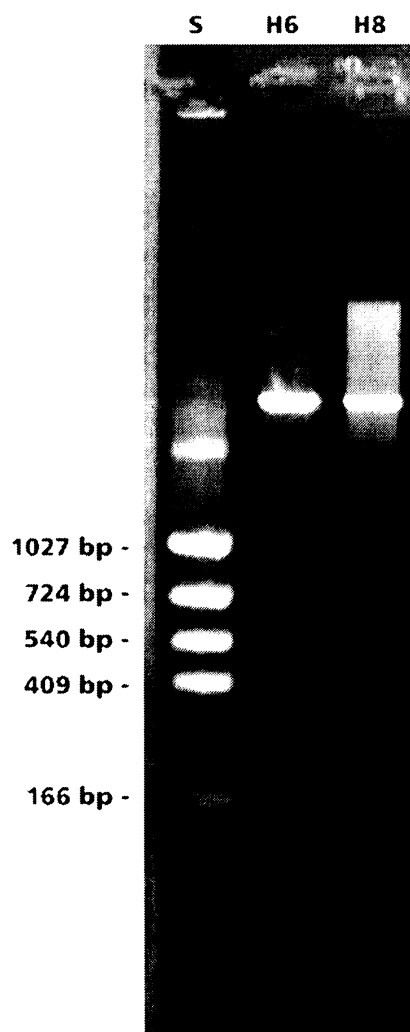


**Obr. č. 5:** Elektroforetický gel štěpení plazmidové DNA buněčných kultur transformovaných připraveným expresním vektorem (pRSET B + hM2NKR-P1) restrikčními enzymy Nde I + Hind III. Označení dráhy je shodné s označením buněčné kultury, S - standard.

Proužky očekávané velikosti pod 400 bp (přesná velikost očekávaného fragmentu 369 bp), které odpovídají velikosti vneseného inzertu jsou patrné u buněčných kultur H4 – H8. K další práci byly vybrány kultury H6 a H8, jejichž výsledek byl vyhodnocen jako nejlepší.

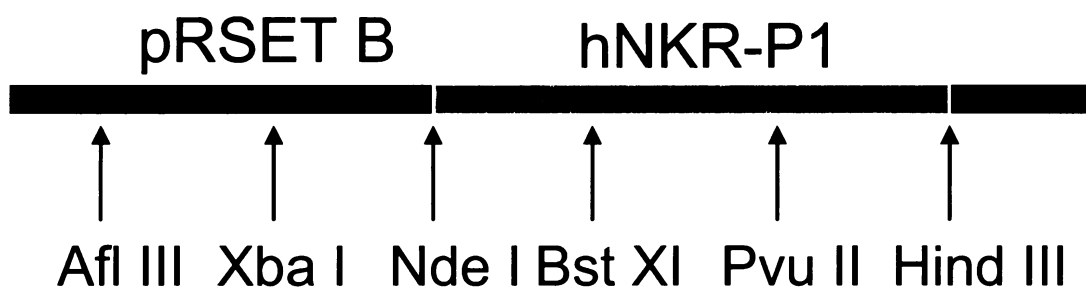
Z vybraných kolonií byla dále izolována plazmidová DNA pomocí minipreparace. Se získanými roztoky plazmidové DNA bylo opět provedeno kontrolní restrikční štěpení

enzymy Nde I a Hind III. Výsledek elektroforézy potvrdil úspěšnou transformaci u kultury označené H8. U kultury H6 se přítomnost inzertu již neprokázala, proto byla tato kultura z další práce vyloučena.



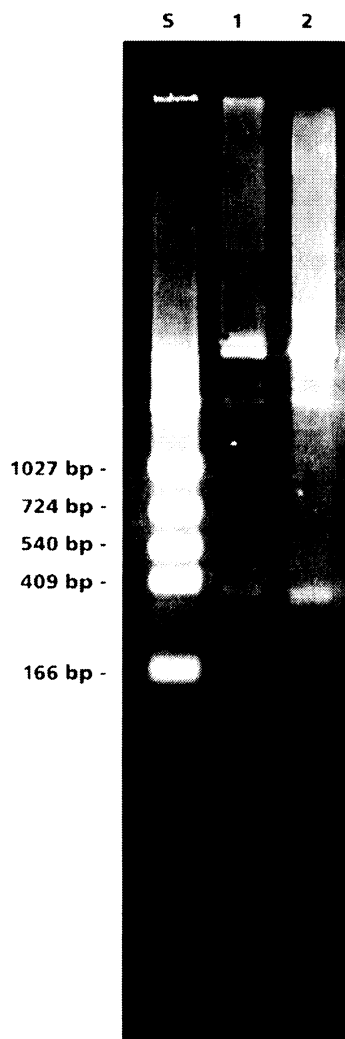
**Obr. č. 6:** Elektroforetický gel štěpení plazmidové DNA buněčných kultur H6 a H8 restrikčními enzymy Nde I + Hind III, S - standard

Podle známé nukleotidové sekvence plazmidu pRSET B a vneseného inzertu byly vyhledány enzymy, jejichž štěpné místo bylo v celém expresním vektoru obsaženo pouze jednou a zároveň bylo přítomno uvnitř, nebo dostatečně blízko, vneseného inzertu. Schématické znázornění nalezených restrikčních enzymů a umístění jejich restrikčních míst je znázorněno na obr. č. 7 (str. 29).



**Obr. č. 7:** Schéma vhodných restrikčních endonukleáz štěpicích pRSET B s inzertem hM2NKR-P1

Z možností naznačených na obr. č. 7 byly pro kontrolní restrikční štěpení vybrány dvojice enzymů: Bst XI + Hind III, poskytující fragment DNA o velikosti 355 bp a XbaI + Hind III, poskytující fragment DNA o velikosti 396 bp. Vždy k 10  $\mu$ l vzorku byl přidán 1  $\mu$ l NEB 2 pufru a 0,2  $\mu$ l každého z enzymů. K restrikční směsi obsahující enzym Xba I bylo pro správnou funkci enzymu přidáno 0,2  $\mu$ l BSA. Inkubace 3 h při 37 °C, směs obsahující enzym Bst XI byla po 1h inkubace při 37 °C umístěna na vodní lázeň o  $T = 55$  °C. Poté byly k oběma vzorkům přidány 3  $\mu$ l STOP pufru. Výsledky štěpení byly detekovány agarosovou elektroforézou (obr. č. 8, str. 30).

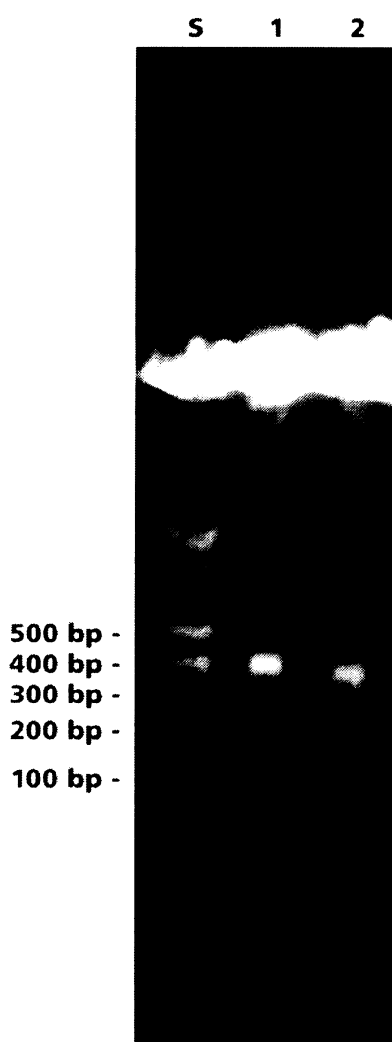


**Obr. č. 8:** Elektroforetický gel štěpení izolované plazmidové DNA z buněčné kultury H8 štěpené restričními enzymy Xba I + Hind III v dráze 1 a enzymy Bst XI + Hind III v dráze 2, S - standard

Přítomnost proužku o velikosti přibližně 400 bp v dráze 1 (přesná velikost očekávaného fragmentu 396 bp) a pozice proužku v dráze 2 odpovídající o několik desítek bp menší velikosti ve srovnání se vzorkem v dráze 1 (přesná velikost očekávaného fragmentu 355 bp) potvrdila správnost izolované plazmidové DNA.

Následně byla s buněčnou kulturou H8 uskutečněna velkoobjemová produkce plazmidu transformovaného do buněk *E. coli* XL 1 – BLUE. K transformaci bylo použito 10  $\mu$ l plazmidu a 40  $\mu$ l buněk. Narostlé kolonie byly rozpěstovány ve 200 ml tekutého LB média s antibiotiky. Se získanou plazmidovou DNA bylo provedeno restriční štěpení enzymy Nde I + Hind III a Bst XI + Hind III. K 5  $\mu$ l zásobního roztoku plazmidové DNA byly přidány 2  $\mu$ l pufru NEB 2, 2  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O a 1  $\mu$ l každého z dvojice vybraných enzymů. Inkubace směsi obsahující Nde I + Hind III 1 h při laboratorní teplotě, směs obsahující Bst

X1 + Hind III byla inkubována 30 min při 37 °C a dalších 30 min při 55 °C . Výsledky byly detekovány agarosovou elektroforézou (obr. č. 9).



**Obr. č. 9:** Elektroforetický gel štěpení připraveného expresního vektoru enzymy Nde I + Hind III v dráze 1 a enzymy Bst XI + Hind III v dráze 2, S - standard

Přítomnost proužků o velikosti přibližně 400 bp v dráze 1 (přesná velikost očekávaného fragmentu 396 bp) a méně než 400 bp v dráze 2 (přesná velikost očekávaného fragmentu 369 bp) potvrdila správnost připraveného plazmidu.

Koncentrace a čistota plazmidové DNA byly stanoveny spektrofotometricky při vlnové délce 260 a 280 nm. Získaná data jsou uvedena v tabulce č. 6 (str. 32). Poměr  $A_{260}/A_{280}$  charakterizuje čistotu plazmidové DNA, hodnota 1,73 odpovídá téměř čisté DNA.

**Tab. č. 6:** Naměřené hodnoty absorbance roztoku plazmidu, poměr  $A_{260}/A_{280}$  a koncentrace zásobního roztoku plazmidu

$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{280}$	c [mg/ml]
0,2503	0,1488	1,73	2,5

Celkový výtěžek činil přibližně 300  $\mu$ l roztoku plazmidu o koncentraci 2,5 mg/ml. Podařilo se získat přibližně 0,75 mg plazmidové DNA.



## 6. Diskuze

Cílem mé bakalářské práce bylo připravit expresní vektor pro protein hNKR-P1 v množství dostatečném pro rekombinantní expresi tohoto proteinu a navazující strukturní a vazebné studie.

Plazmid pRSET B obsahující inzert proteinu CD 69 byl vybrán jako expresní vektor kvůli následující rekombinantní expresi proteinu hNKR-P1, kde tento plazmid dává dobré výtěžky. V použitém expresním vektoru byla sekvence kódující protein CD 69 vložena pomocí restričních endonukleas Hind III a Nde I. Protein CD 69 byl pomocí těchto restričních míst opět vyštěpen a linearizovaný pRSET B byl připraven k ligaci s novým inzertem. Oba konce linearizovaného plazmidu by po vyštěpení proteinu CD 69 obsahovaly jednovláknové přesahy, což by mohlo způsobit špatnou orientaci nově vkládaného inzertu během ligace. Proto byl konec po štěpení enzymem Nde I zarovnan Klenowovým fragmentem, ten byl následně tepelně inhibován a až poté byl z linearizovaného plazmidu zcela odstraněn protein CD 69 vyštěpením enzymem Hind III. Linearizovaný plazmid tak obsahoval jeden konec tupý a jeden s jednovláknovým přesahem, čímž byla zajištěna správná orientace inzertu během ligace.

Inzert byl připraven metodou PCR z původního expresního vektoru kódujícího delší sekvenci extracelulární domény proteinu hNKR-P1. Přímý primer bylo nutné před vlastním provedením PCR fosforylovat. Díky tomu na 5' koncích získaného inzertu zůstal navázán fosfát, který následně umožnil ligaci s linearizovaným plazmidem. Bez přítomnosti fosfátové skupiny by ligace pravděpodobně vůbec neproběhla, nebo jen s velmi malým výtěžkem.

Pro přípravu plazmidu byly použity kompetentní buňky *E. coli* XL-1 BLUE. Buňky tohoto kmene patří k široce používaným pro klonování a amplifikaci rekombinantní DNA a byly s úspěchem použity již při přípravě předchozího konstrukt proteinu hNKR-P1. Kolonie se správně transformovaným plazmidem byly identifikovány restričním štěpením jejich plazmidové DNA, získané pomocí rychlé izolace. Při využití této metody se jedná spíše o rozbití buněk a zpřístupnění jejich obsahu, než o skutečnou izolaci plazmidové DNA. Získaná DNA je značně znečištěna zbylým obsahem buněk. Nicméně tato metoda je velice rychlá a dostupná, umožňuje rychlé orientační prozkoumání většího množství vzorku. Výsledky na gelu (viz. obr. č. 4, str. 27) nebyly dobře pozorovatelné patrně proto, že

aktivita enzymu Nde I není v přítomnosti sacharózy, která je součástí EP pufru využívaného při této metodě, příliš vysoká a získané výsledky tak nejsou příliš spolehlivé. Proto byla následně z vybraných kolonií izolována plazmidová DNA s využitím minipreparace. Při tomto postupu je plazmidová DNA získána v relativně krátkém čase, ale na rozdíl od rychlé izolace se zde již opravdu jedná o izolaci, takže získaná DNA je téměř čistá a výsledky mnohem přesnější. Z vybrané a restrikcí ověřené kolonie H8 bylo pomocí velkoobjemové produkce připraveno zásobní množství plazmidu. Získané množství 0,75 mg plazmidové DNA lze považovat za velmi dobrý výsledek. Dle předběžného plánu měl předpokládaný výtěžek činit přibližně 0,5 mg . Většího výtěžku bylo pravděpodobně dosaženo díky nárůstu velkého množství transformovaných buněk během inkubace v tekutém LB médiu. Množství plazmidu je dostatečné pro provedení mnoha expresních experimentů za účelem přípravy proteinu a jeho dalších studií.

## 7. Závěr

- Byl připraven expresní vektor kódující část extracelulární domény proteinu hNKR-P1 v rozmezí aminokyselin Asn<sub>93</sub> – Thr<sub>215</sub>
- Správnost připraveného expresního vektoru byla ověřena restričním štěpením
- Bylo připraveno 300  $\mu$ l roztoku plazmidu o  $c = 2,5$  mg/ml

## 8. Použitá literatura

1. Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*, Triton, Praha (2005)
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: *The molecular biology of the cell*, Garland Science, New York (2002), str. 1363 - 1366, 1392 - 1410, 1461 - 1462
3. Robertson M. J., Ritz J.: *Blood* 76, 2421 - 2438 (1990)
4. Lanier L. L.: *Annu. Rev. Immunol.* 16, 359 - 393 (1998)
5. Hofer E., Sobanov Y., Brostjan Ch., Lehrach H., Dūchler M.: *Immunol. Rev.* 181, 5 - 19 (2001)
6. Rosen D. B., Bettadapura J., Alsharifi M., Mathew P. A., Warren H. S., Lanier L. L.: *J. Immunol.* 176, 7796 - 7799 (2005)
7. Barten R., Torkar M., Haude A., Trowsdale J., Wilson M.J.: *Trends Immunol.* 22, 52 - 57 (2001)
8. Trowsdale J., Barten R., Haude A., Stewart C. A., Beck S., Wilson M. J.: *Imunol. Rev.* 181, 20 - 38 (2001)
9. Bezouška K.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 535 - 563 (2004)
10. Weis W. I., Taylor M. E., Drickamer K.: *Immunol. Rev.* 163, 19 - 34 (1998)
11. Aldemir H., Prod'homme V., Dumaurier M-J., Retiere Ch., Poupon G., Cazareth J., Bihl F., Braud V. M.: *J. Immunol.* 176, 7791 - 7795 (2005)
12. Lanier L. L., Chang C., Phillips J. H.: *J. Immunol.* 153, 2417 - 28 (1994)
13. Kogelberg H., Lawson A. M., Muskett F. W., Carruthers R. A., Feizi T.: *Protein Expr. Purif.* 20, 10 - 20 (2000)
14. Yokoyama W. M., Plougastel B. F. M.: *Nat. Rev. Immunol.* 3, 304 - 316 (2003)
15. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York (1989)

