

Opravný lístek k bakalářské práci „Analýza posttranslačních modifikací proteinů hmotnostní spektrometrií“

Předkladatel: Dominik Musil

Seznam zkratk, str. ix: PBS je fosfátový pufr s isotonickým roztokem soli.

Str. 40: 7.6 Stanovení luciferasové aktivity

Odstavec 2, str. 41: Stanovení luciferasové aktivity tedy poskytlo důkaz, že virové částice ve vzorku 3T6_pLUC vizualizované na snímku z TEM nejsou schopny po infekci zajistit produkci luciferasy a vznikly tedy pravděpodobně v důsledku kontaminace WT.

Transkripce je přepis genetické informace z DNA do RNA.

Odstavec 5, str. 2: Nejprve probíhá přepis genů z DNA do RNA a translace časných genů za vzniku časných proteinů, tzv. T-antigenů.

Odstavec 7, str. 2: Dostatečné množství časných proteinů (hlavně LT) způsobí přepnutí přepisu genetické informace z DNA do RNA z časné oblasti na replikaci viru [10], po které dochází k přepisu genů z DNA do RNA v pozdní oblasti.

Odstavec 2, str. 4: Nejdůležitějším z těchto T-antigenů je LT, který je zodpovědný hlavně za iniciaci a udržení replikace viru [10,17], dále je zodpovědný také za přepis genetické informace z DNA do RNA a spolu s MT se podílí na imortalizaci primárních buněk a jejich transformaci [3,18].

Odstavec 2: str. 4: Nicméně i LT se podílí na přepnutí přepisu genů z DNA do RNA z časné do pozdní oblasti.

Str. 15, použité chemikálie: TE pufr (Qiagen, Německo) – je Tris/EDTA pufr, běžně využívaný pro izolaci plasmidů pomocí MaxiPrep procedury.

Str. 16, použité přístroje: AMAXA (Lonza, Švýcarsko) je elektroporační přístroj pro elektroporaci plasmidů do bakteriálních buněk.

Str. 16, použité přístroje: UV transluminátor (BioLum, USA) je transluminační přístroj pro vizualizaci genetické informace separované pomocí elektroseparačních metod.

Str. 16, použité přístroje: Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA) je laboratorní přístroj pro míchání nebo třepání například kapalin v libovolných nádobách.

Str. 16, použité přístroje: VarioSkan Flash (Thermo Scientific, USA) je spektrofotometrický přístroj pro analýsu mikrotitračních destiček.

Str. 16, použité přístroje: VILBER Fusion FX (Vilber, Německo) je chemiluminiscenční/ fluorescenční přístroj pro vizualizaci různých látek (protein, DNA, RNA).

Str. 19, buněčné kultury a virová inokula: NIH-3T6 – linie myších fibroblastů (prof. Griffin, Royal Postgraduate School, London)

Str. 19, buněčné kultury a virová inokula: pMJG – plasmid obsahující celý MPyV genom (Kraucewitz et al., 1990).

Str. 19, buněčné kultury a virová inokula: pGL3 – plasmid obsahují gen pro luciferasu a gen pro ampicilin, transfekovaný do NIH-3T6 pro stanovení aktivity luciferasy (Promega).

Str. 19, buněčné kultury a virová inokula: pLUC – plasmid obsahující gen pro luciferasu (poskytnutý paní RNDr. Hanou Španielovou, Ph.D.)

Kapitola 6.3.2, str. 20: Isolace plasmidů pomocí Maxiprep procedury

Supernatant byl odstraněn a ze sedimentu byly izolovány plasmidy pomocí laboratorní soupravy Maxiprep Procedure (Qiagen) dle doporučeného návodu výrobce (Qiagen).

Kapitola 6.5.3, str. 25: Isopyknická centrifugace v rovnovážném CsCl gradientu

Kapitola 6.7.1, str. 29: Roztok A pro stanovení koncentrace metodou BCA dle literatury Smith P.K. et al., *Analytical Biochemistry* 150, 76-85 (1985). Složení je 0,16% kyselina vinná, 0,4% NaOH, 0,95% NaHCO₃, 2% Na₂CO₃, BCA v 0,1M NaOH.

Kapitola 6.7.2, str. 30: Příprava vzorku na SDS elektroforetickou separaci v polyakrylamidovém gelu

„Poté bylo odebráno 5 nebo 10 μ L supernatantu z daného vzorku.“ Množství 5 μ L bylo odebráno v případě optimalizace a kontroly na elektroforetickou separaci v polyakrylamidovém gelu. Množství 10 μ L bylo odebráno pro elektroforetickou separaci v polyakrylamidovém gelu vzorku, který byl později využit pro MALDI-TOF analýsu.

Kapitola 6.7.3, str. 30: Precipitace proteinů

V případě nízké koncentrace některých vzorků (WOP_pLUC+ a 3T6_pLUC+) bylo nezbytné jejich nabohacení. Pro optimalizaci byly použity vzorky, které neobsahovaly inhibitory fosfatas a které vznikly spojením frakcí 10-14 na základě refraktometrické analýsy (tab. 3, str. 35) a Dot-blot (obr. 10, str. 36). Jednalo se tedy o všechny vzorky vzniklé spojením těchto frakcí. K těmto vzorkům byl přidán acetonitril nebo aceton, který se ukázal být vhodnějším srážecím činidlem.

Kapitola 6.7.5, str. 31: Fixace a barvení po SDS-PAGE

Po ukončení SDS-PAGE byl gel barven Coomassie Brilliant Blue R250 (45% CH₃OH, 45% dH₂O, 10% CH₃COOH, 3g/L CBB-R50) na třepačce (Forma Scientific) po dobu minimálně 60 min s následným odbarvením pozadí roztoku obsahující ethanol, vodu a kyselinu octovou v poměru 50:40:10 (v/v/v).

Kapitola 6.8, str. 31: Příprava vzorku na MALDI-TOF

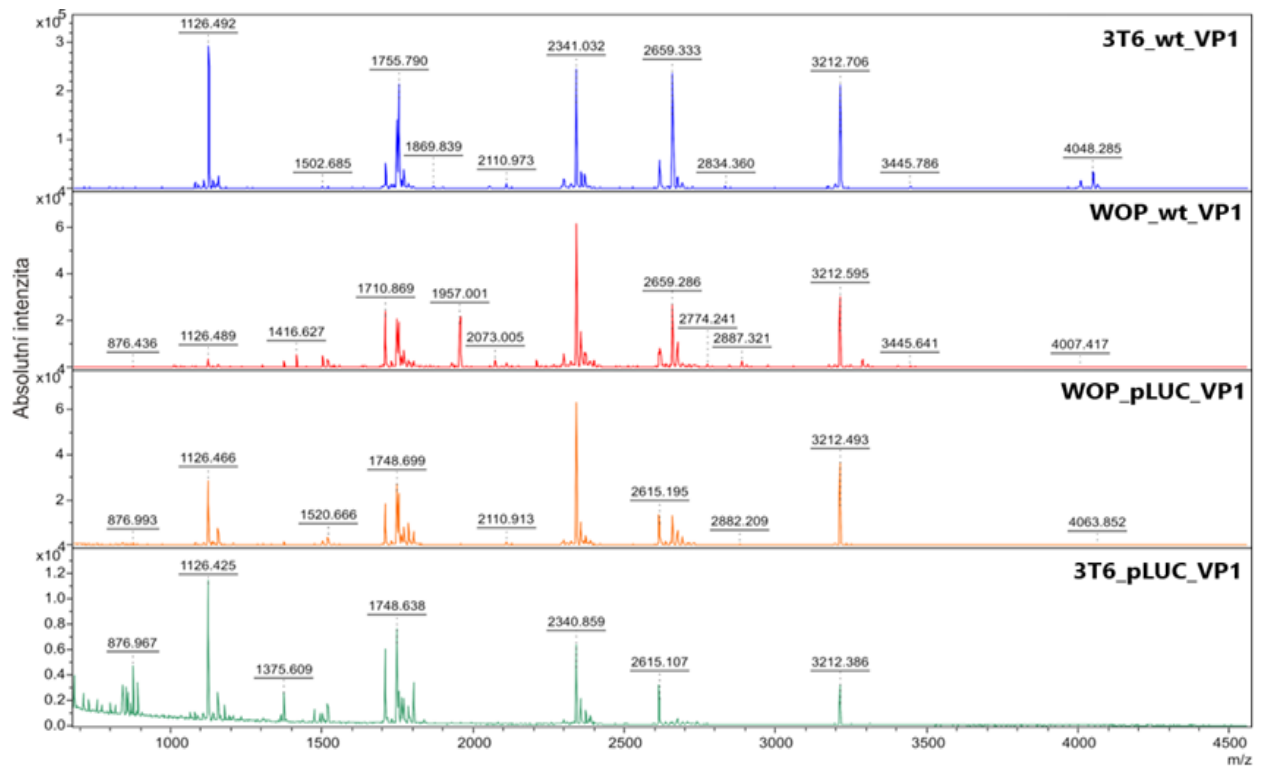
Po odstranění supernatantu byl gel vysušen v rotačním vakuovém koncentrátoru SPEED-VAC (Labconco) po dobu 10 minut a ke vzorku bylo přidáno 30 µL 50mM EtMf/100% ACN s přídavkem proteasy trypsinu (50 ng/µL).

Tab. 4, str. 41:

Tab. 4 – Stanovení luciferasové aktivity a normalizace množství luciferasy na koncentraci celkového proteinu v buněčných lysátech. Stanovení byla provedena pro virové částice ve vzorcích 3T6_WT/pLUC a WOP_WT/pLUC. Jako pozitivní kontrola byl pomocí turbofektu použit plasmid pGL3 obsahující gen pro luciferasu. Negativní kontrolou byly samotné savčí 3T6 buňky bez virových částic. $A_{\text{průměr}}$ je průměrná hodnota absorbance vzorků, c_{protein} [mg/mL] je koncentrace proteinů v buněčných lysátech. Normalizované množství luciferasy ve vzorcích byla stanovena v [mg] a v [%].

Vzorek	Stanovení luciferasové aktivity		Stanovení koncentrace buněčných lysátů a normalizace množství luciferasy				
	$A_{\text{průměr}}$	$A_{\text{průměr po odečtení blanku}}$	$A_{\text{průměr}}$	$A_{\text{průměr po odečtení blanku}}$	C_{protein} [mg/ml]	množství luciferasy [mg]	množství luciferasy [%]
3T6_WT	83,984	29,834	0,211	0,069	0,53	56,114	0,17
3T6_pLUC	75,866	21,716	0,245	0,102	0,79	27,363	0,08
WOP_WT	43,797	-10,353	0,214	0,071	0,55	0,000	0,00
WOP_pLUC	23305,781	23251,630	0,275	0,132	1,03	22646,730	67,01
PK	34273,304	34219,152	0,274	0,131	1,01	33796,800	100,00
NK	54,148	-0,002	0,381	0,238	1,85	0,008	0,01
BLANK	54,15	-	0,143	-	-	-	-

Graf 3, str. 48:



Graf 3 – Srovnání proteinových proužků VP1 MPyV pomocí MALDI-TOF. Graf zobrazuje výsledné MS spektrum pro celý protein VP1 u všech analyzovaných vzorků s virovými částicemi. Proteiny byly štěpeny trypsinem. Práce s MS byla provedena panem doc. RNDr. Miroslavem Šulcem, Ph.D.