

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Klonování, exprese a purifikace lidské AKR1C2

Vedoucí diplomové práce: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Hradec Králové, 2011

Veronika Tobolová

Za pomoc při řešení problémů, vstřícný přístup a cenné rady děkuji Prof. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D., dále děkuji PharmDr. Tomáši Šimůnkovi Ph.D., Mgr. Lucii Škarydové, Ph.D. a Aleně Pakostové za pomoc při řešení problémů a za skvělé zázemí. Děkuji také pracovišti Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (Kiel) za pomoc.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Veronika Tobolová

Školitel: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Název diplomové práce: Klonování, exprese a purifikace lidské AKR1C2

Kódová sekvence AKR1C2 dodaná ve vektoru pOTB7 byla metodou PCR pomnožena a pomocí alkalické lýze přečištěna. Následně zligována s vektorem TOPO 2.1. Kódová sekvence vložená do vektoru TOPO 2.1 byla transformována do kompetentních buněk *E. coli* a namnožena. Pro kontrolu proběhlé ligace a transformace byla provedena inkubace buněčné kultury s ampicilinem a inkubace kódové sekvence s restričními endonukleasami. Poté byly vzorky sekvence v TOPO 2.1 odeslány na sekvenaci.

V dalším kroku došlo k natrávení kódové sekvence v TOPO 2.1 a otevření zakoupeného vektoru pET-15b. Poté následovalo několik pokusů o ligaci sekvence s expresním vektorem pET-15b. Kontrola těchto kroků byla provedena pomocí transformace rekombinantní sekvence do buněk Hb 101, inkubace na živné půdě s antibiotikem a restrikce.

V závěru byl vektor s kódovou sekvencí vložen do kompetentních buněk BL-21 a provedena exprese. Po rozbití buněk za použití sonikace a natrávení lysozymem jsme mohli pozorovat výsledek pomocí SDS PAGE.

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Veronika Tobolová

Supervisor: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Title of diploma thesis: Cloning, expression and purification of human AKR1C2

The coding sequence of AKR1C2 inserted in vector pOTB7 was multiplied by PCR and purified by alkali hydrolysis. Then it was ligated together with TOPO 2.1 vector. Prepared sequence inserted in vector TOPO 2.1 was transformed into the competent *E. coli* cells and multiplied. To verify these steps we did incubation of cell culture with ampicillin and incubation of coding sequence with restriction endonucleases. The samples inserted in vector TOPO 2.1 were sent to do sequencing.

The next step was the digestion of the coding sequence inserted in vector TOPO 2.1 and the opening of purchased expressed vector pET-15b. Then a several attempts to ligation were made. The control of these steps was done by transformation of vector pET-15b with coding sequence into Hb101 cells, by incubation of transformed cells with antibiotics and by restriction sequence.

Finally, the vector with the coding sequence was transformed into competent BL-21 cells and the expression was done. The result of expression we could observe after sonication and digestion of the cells by lysosym using SDS PAGE.

Obsah

1. Úvod	9
2. Teoretická část	10
2.1. Aldoketoreduktasy	10
2.1.1. AKR nadrodina.....	10
2.1.2. Struktura nadrodiny AKR.....	11
2.1.3. Význam nadrodiny AKR.....	12
2.1.4. AKR1C2.....	13
2.2. Klonování	15
2.2.1. Princip klonování.....	15
2.2.2. Escherichia coli.....	16
2.2.2.1. Obecné vlastnosti.....	16
2.2.2.2. Kmeny.....	17
2.2.2.3. Využití v biotechnologii.....	17
2.2.3. PCR.....	18
2.2.3.1. Návrh primerů.....	19
2.2.3.2. Princip PCR.....	19
2.2.3.3. DNA polymerasy.....	20
2.2.4. Gelová elektroforéza.....	20
2.2.4.1. Gelová horizontální.....	21
2.2.4.2. SDS PAGE.....	21
2.2.5. Enzymy používané při manipulaci s DNA.....	23
2.2.5.1. Nukleasy.....	23
2.2.5.2. Ligasy.....	24
2.2.5.3. Polymerasy.....	25
2.2.5.4. Fosfatasy a kinasy.....	25
2.2.6. Příprava rekombinantního vektoru.....	25
2.2.6.1. Plasmidy.....	26
2.2.6.2. Bakteriofágy.....	27
2.2.7. Transformace.....	28
2.2.8. Selektce klonů.....	28
2.2.8.1. Identifikace rekombinantní DNA.....	29

2.2.8.2. Sekvenace nukleotidové sekvence.....	29
2.2.9. Izolace a purifikace plasmidové DNA.....	31
2.3. Expres	32
2.3.1. Expres v E. coli.....	33
3. Cíl práce	34
4. Experimentální část	35
4.1. Materiál	35
4.1.1. Biologický materiál.....	35
4.1.2. Chemikálie.....	35
4.1.3. Enzymy.....	37
4.1.4. Antibiotika.....	38
4.1.5. Ostatní.....	38
4.1.6. Připravované pufrы a média.....	38
4.2. Pomůcky	41
4.3. Přístroje	42
4.4. Metody	43
4.4.1. Malá purifikace plasmidu.....	43
4.4.2. Velká purifikace plasmidu.....	44
4.4.3. Příprava kompetentních buněk.....	45
4.4.4. Gelová elektroforéza na agarózovém gelu.....	45
4.4.5. PCR.....	47
4.4.6. Inkubace vzorku s restriční endonukleasou.....	47
4.4.7. Ligace kódové sekvence s vektorem TOPO 2.1.....	47
4.4.8. Restrikce kódové sekvence ve vektoru TOPO 2.1 pomocí restričních endonukleas	48
4.4.9. Natrávení vektoru TOPO 2.1 s kódovou sekvencí pomocí restričních endonukleas	49
4.4.10. Otevření vektoru pET-15b pomocí restričních endonukleas.....	49
4.4.11. Přečištění natráveného vektoru TOPO 2.1 a otevřeného vektoru pET-15b.....	49
4.4.12. Subklonace kódové sekvence z rozštěpeného vektoru TOPO 2.1 do otevřeného vektoru pET-15b.....	50
4.4.13. Transformace a namnožení rekombinantního pET-15b.....	51
4.4.14. Expres proteinu.....	52
4.4.15. SDS PAGE.....	53

4.4.16. Natrávení lysozymem a sonikace.....	54
5. Výsledky, diskuse.....	55
5.1. Příprava lidské AKR1C2.....	55
5.2. Ligace s vektorem TOPO 2.1.....	59
5.3. Subklonace kódové sekvence z vektoru TOPO 2.1 do vektoru pET-15b.....	62
5.4. Expresce proteinu AKR1C2.....	68
6. Závěr.....	71
7. Seznam použitých zkratk.....	72
8. Seznam použité literatury.....	75

1. Úvod

Ačkoliv se chování a vzhled živých organismů v mnoha ohledech liší, jejich genomy mají vždy podobné složení, založené na různé sekvenci nukleotidů, které utváří dlouhý řetězec DNA – deoxyribonukleonové kyseliny. Právě ona sekvence, zjednodušená do 4 písmen genetického kódu : A (adenin), T (thymin), C (cytosin), G (guanin), je nositelem genetické informace a má za následek společné i rozdílné vlastnosti živých tvorů.

Až do počátku 70tých let byla analýza molekuly DNA možná pouze nepřímo na základě mapování genů a sekvenování RNA a proteinů. Velký obrat nastal až se zavedením metod klonování DNA (1972-73 Boyer, Cohen, Berg), metody detekce specifických sekvencí (1975 Southern) a rychlých metod sekvenace DNA (1975-77 Gilbert, Sanger, Barrel, Maxam). Tyto a později objevené techniky umožňují manipulaci s DNA ve zkumavce i živém organismu prostřednictvím dnes již komerčně dostupných enzymů a způsobily tak revoluci ve zkoumání života a odstartovaly novou éru genetiky (1, 2011).

Nové poznatky znamenaly velký přínos především pro výzkum regulace jednotlivých genů, na jejichž základě bylo možno hledat souvislosti mezi odchylkami v regulaci genů a výskytem onemocnění (např. rakovina). Rozvoj zaznamenala také moderní biotechnologie, která pomocí genů vyrábí proteiny a jiné sloučeniny potřebné v medicíně.

Dalším významným mezníkem v biotechnologii byly 80. léta, která přinesla další důležitý objev – PCR (polymerase chain reaction). Tato metoda rozšířila možnosti analýzy DNA a značně usnadnila dříve obtížně proveditelné procesy.

Navzdory všem neuvěřitelným objevům, které nám přinesly poslední desetiletí, stojíme teprve na začátku velkého neznáma, které pro nás představuje genetické inženýrství. Zbývá proto jen doufat, že se nám do něj jednou podaří plně proniknout.

2. Teoretická část

2.1. Aldoketoreduktasy

Aldoketoreduktasy tvoří jednu ze tří skupin 1. třídy mezinárodní enzymatické klasifikace tzv. třídu oxidoredukas podílející se na oxidoredukčních reakcích s přírodními i cizorodými substráty. Patří do skupiny enzymů redukujících karbonylovou skupinu, jejichž třída byla původně rozdělena do dvou nadrodin dle jejich struktury a to na: alkoholdehydrogenasy s dlouhým řetězcem (MDR, medium-chain alcohol dehydrogenase/reductase) a na alkoholdehydrogenasy s krátkým řetězcem (SDR, short-chain alcohol dehydrogenase/reductase). Tyto nadrodiny mají různé 3D struktury a ve svém účinku jsou odkázány na katalýzu atomem zinku nebo katalýzu kyselinou či bází. (Jez et al., 1997)

2.1.1. AKR nadrodina

Později bylo zjištěno, že ne všechny oxidoreduktasy 1. třídy můžeme rozdělit do skupiny MDR a SDR a začala se nově formovat nadrodina třetí obsahující proteiny o podobné struktuře: tzv. nadrodina aldoketoreduktas. Jedná se o rychle rostoucí skupinu reduktas s NADP(H) preferencí, metabolizující steroidní uhlovodíky, prostaglandiny a další endogenní aldehydy a ketony stejně tak dobře jako xenobiotika. V současné době nadrodina AKR zahrnuje více než 150 enzymů, které jsou převážně monomerní s velikostí okolo 320 aminokyselin, jež třídíme do 15 rodin (AKR1-AKR15). Největší z nich je rodina AKR1, obsahující aldosoreduktasy, aldehydreduktasy, hydroxysteroid dehydrogenasy a steroidní 5 β reduktasy, která je dále rozdělena do pěti podrodin definovaných více než 60% shodou primární aminokyselinové struktury: (Ishikura et al., 2005)

AKR1A – savčí aldehydreduktasy

AKR1B – savčí aldosoreduktasy

AKR1C – hydroxysteroid dehydrogenasy(HSDs) a prostaglandin F syntasy

AKR1D – Δ^4 -3-ketosteroid-5 β -reduktasy

AKR1E – myší ketoreduktasy (Ishikura et al., 2005)

Mnoho savčích aldoketoreduktas se ukázalo jako zajímavé terapeutické cíle a léčiva založená na jejich struktuře znamenala přínos pro klinický výzkum. Např. aldosoreduktasa (EC 1.1.1.21) konvertuje cirkulující glukózu na sorbitol a hyperosmotický cukr, může tak hrát významnou roli v diabetické retino, neuro a nefropatii, zatímco její inhibitory mohou být užitečné v léčbě těchto komplikací. Dalšími významnými členy jsou 3 α -hydroxysteroid

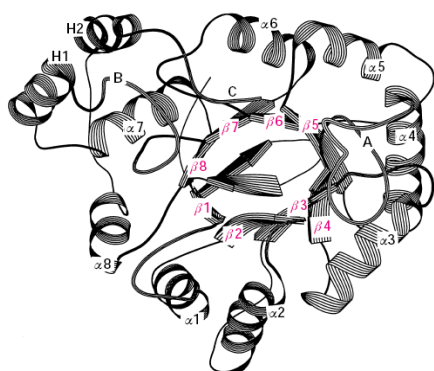
dehydrogenasa (EC 1.1.1.213) a prostaglandin F syntasa (EC 1.1.1.188), které jsou obě cílem nesteroidních antiflogistik a mohou se jejich prostřednictvím ovlivňovat jednotlivé stupně zánětu. (Jez et al., 1997)

Enzymy této nadrodiny se také aktivně zapojují do metabolismu steroidních hormonů a hrají důležitou roli jako spínače enzymatických reakcí. Řada z nich se totiž podílí na přeměně potenciálních hormonů na jejich inaktivní formy. Touto přeměnou pak regulují množství enzymu schopného navázat se na svůj receptor uložený v jádře cílové buňky. (Barski et al., 2008)

2.1.2. Struktura nadrodiny AKR

Rentgenová krystalografie ukázala shodnou strukturu proteinů této nadrodiny, podobnost můžeme nalézt jak v prostorovém uspořádání tak i v aminokyselinové sekvenci. (Couture et al., 2005)

Prostorová struktura má barelové uspořádání $(\alpha/\beta)_8$, kde 8 β skládaných listů je obklopeno 8 α šroubovicemi, které tvoří jakousi osnovu sudu. Samotné barelové uspořádání bývá přerušeno čtenými smyčkami a helixy jejichž počet, velikost a uspořádání jsou typické pro jednotlivé rodiny. Jednou z těchto variací je například i dlouhá smyčka mezi β_9 a α_7 strukturou u aldehydreduktas a aldosoreduktas (AKRs 1A a 1B), která se otevírá a zavírá nad vazbou nukleotidů a drží ji tak pevně na svém místě, což usnadňuje navázání NADPH. Délka této smyčky je variabilní u různých členů rodiny. Příkladem mohou být hydroxysteroid dehydrogenasy (AKR1Cs), kde je velice malý velikostní rozdíl mezi otevřenou a zavřenou formou. Otevření smyčky vážící NADPH a uvolnění kofaktoru je tedy limitujícím krokem v redukční kinetice AKRs. (Barski et al., 2008)



Obr. 1. Společná $(\alpha/\beta)_8$ barelová struktura AKRs. (Jez et al., 1997)

Také aminokyselinová sekvence vykazuje známky shody, striktní sekvenci můžeme u nadrodiny AKR pozorovat na 11 pozicích : Gly-22, Gly-45, Asp-50, Lys-84, Asp-112, Pro-119, Gly-164, Asn-167, Pro-186, Gln-190 a Ser-271. Shodu na dalších osmi pozicích můžeme sledovat u 41 proteinů nadrodiny AKR: Gly-20, Tyr-55, Gly-62, Leu-113, Trp-148, Gly-158, Glu-192 a Arg-276. Tyto společné aminokyseliny se podílí na vazbě kofaktoru, tvorbě aktivního místa a formování barelovitě 3D struktury. (Jez et al., 1997)

„Induced fit“ mechanismus

Jak již bylo uvedeno výše enzymy se podílí na metabolismu řady endogenních i exogenních látek různých struktur jako např: 4-hydroxynonenal, PAH (polycyklické aromatické uhlovodíky) a indanon. Všechny výše uvedené strukturně odlišné sloučeniny se váží do vazebného místa pro ligand, většinou hydrofobní vazbou. Logicky se tedy toto vazebné místo musí přizpůsobit tvaru rozdílných sloučenin. Tato schopnost měnit tvar vazebného místa v závislosti na ligandu byla prvně popsána u hexokinasy kvasinek a je označována jako „induced fit“ mechanismus. Tento mechanismus byl popsán u více členů nadrodiny AKR. (Couture et al., 2005)

2.1.3. Význam nadrodiny AKR

Charakteristická vlastnost AKRs je jejich schopnost redukovat aldehydy nebo ketony. Tyto karbonylové funkční skupiny jsou často součástí různých léčivých látek, můžeme je však také najít v potravě a setkáváme se s nimi i v polutantech. Schopnost tvorby aldehydů a ketonů má také naše tělo a to prostřednictvím metabolismu (např. pomocí CYP 450). Karbonylová skupina, obzvláště aldehydická se vyznačuje vysokou chemickou reaktivitou, redukce této skupiny prostřednictvím AKRs a konverze na alkohol tedy přirozeně snižuje reaktivitu sloučeniny, což má velký význam ve snížení karbonylové toxicity. (Barski et al., 2008)

Mezi přirozené substráty nadrodiny patří velké množství patologicky vytvořených sloučenin, mezi které můžeme zařadit produkty lipidové peroxidace, konečné produkty pokročilé glykosylace, ale taky sloučeniny, které tělo vytváří za fyziologických podmínek: prostaglandiny, steroidy, semialdehyd sukcinát (meziprodukt metabolismu GABA) nebo glukózu. Z uvedeného výčtu je zřejmé, že AKRs hrají velmi důležitou a rozsáhlou roli v metabolismu. (Barski et al., 2008)

Metabolismus xenobiotik

Metabolismus xenobiotik je běžně rozdělován do tří fází, jejichž cílem je inaktivace, zvýšení rozpustnosti hydrofóbních látek a vyloučení z organismu. I. fáze tzv. fáze biotransformace, která zavádí volné polární skupiny do molekuly xenobiotika, je lokalizována většinou v játrech, z části také v dalších tkáních především v místech vstupu a exkrece xenobiotik (placenta, plíce, střeva, kůže, ledviny). Enzymy podílející se na I. fázi metabolismu xenobiotik se také podílí na metabolismu endogenních látek, mají širokou substrátovou specifitu a mohou být snadno indukované. Typické jsou pro ně převážně oxidoredukční a hydrolytické reakce zprostředkované systémem hydrolas a monooxygenas. Fáze II. metabolismu xenobiotik zahrnuje reakce syntetické. Vznikají při nich konjugáty xenobiotika s endogenní sloučeninou (např. kyselina glukuronová, sulfát, acetát atd.), která zvýší polární charakter molekuly a umožní tak její exkreci. Třetí fáze poté zahrnuje transport substrátu a produktu přes cytoplasmatickou membránu.

AKRs jsou zahrnuty do I. fáze oxidačně/redukčních reakcí karbonylů vzniklých pomocí cytochromu P450, případně jiných enzymatických systémů. Obecně lze říci, že následnou redukcí karbonylové sloučeniny se sníží toxicita metabolického produktu (přeměna na méně reaktivní alkohol), ne vždy však toto chemické snížení aktivity koresponduje také se sníženým biologickým účinkem. (Barski et al., 2008)

2.1.4. AKR1C2

Obecné údaje

AKR1C2 je v literatuře popsán pod několika názvy, jako 3 α -hydroxysteroid dehydrogenasa typu 3, dále dihydrodiol dehydrogenasa 2, nebo aldoketoreduktasa 1C2. Velikost proteinu je 323 aminokyselin, kódující sekvence obsahuje 971 bazí. Zařazen je do nakrodiny AKR oxidoreduktas, konkrétně rodiny AKR1 a podrodiny AKR1C hydroxysteroid dehydrogenas. Jedná se o cytosolický enzym exprimovaný především v prostatě. (7, 2011)

Patří mezi čtyři rozpustné lidské 3 α -hydroxysteroid dehydrogenasy (3 α -HSD) spolu s AKR1C1, AKR1C3 a AKR1C4. Shoduje se s nimi v primární struktuře až z 86%. Gen kódující proteiny má lokalizaci na chromozomu 10p15-p14. Jejich hlavní úlohou je ovlivnění aktivity steroidních hormonů a jejich metabolitů na androgenové, estrogenové a progesteronové receptory. Jsou vysoce substrátově i orgánově specifické, zatímco AKR1C4 nalézáme převážně v játrech, AKR1C2 a 1C3 jsou vyjádřeny v prostatě a prsní žláze. (Penning et al., 2004)

Funkce

Podílí se na metabolismu steroidních hormonů, hlavně androgenních spolu s 5 α -reduktasou. 5 α -reduktasa odbourává testosteron (biologicky neúčinnou formu hormonu) na biologicky účinný 5 α -dihydrotestosteron (5 α -DHT) - který má za následek tvorbu sekundárních pohlavních znaků u mužů. Nadbytek 5 α -DHT a jeho účinky na androgenní receptory jsou spojovány se zvýšenou proliferací buněk a vedou od hyperplazie prostaty až nádorovému bujení. 5 α -DHT bývá dále odbourávána prostřednictvím 3 α -hydroxysteroid dehydrogenasy na 3 α -androstadiol, případně pomocí 3 β -hydroxysteroid dehydrogenasy na 3 β -androstadiol. Produkty této metabolické přeměny jsou dále konjugovány s kyselinou glukuronovou a vyloučeny. 3 α -hydroxysteroid dehydrogenasy jsou ovšem schopny také katalyzovat zpětnou reakci, při níž 3 α -androstadiol je přeměněn zpět na 5 α -DHT. Zmnožení právě těchto izoforem enzymů bylo pozorováno při benigní hyperplázii prostaty. Dosud byli identifikováni hlavní zástupci enzymů těchto oxidativních přeměn. Jedná se o členy nadrodiny SDR a převážně AKR. Potenciální kandidáti nadrodiny AKR jsou AKR1C1 – AKR1C4. Díky jejich schopnosti redukovat steroidní ketonickou skupinu nebo naopak oxidovat steroidní hydroxylovou skupinu, mohou přeměňovat aktivní pohlavní hormony na jejich inaktivní formy nebo katalyzovat reakci opačnou. Tímto mechanismem mohou regulovat aktivitu receptorů, které jsou těmito hormony aktivovány. Významnou roli hrají především AKR1C2 a AKR1C3, které jsou oproti ostatním členům nadrodiny AKR vysoce exprimovány v prostatě. Oproti zdravé tkáni byla v buňkách epitelu prostaty postižené nádorovým bujením nalezena zvýšená koncentrace AKR1C2. Pravděpodobně, se ale AKR1C2 v této tkáni podílí především na redukční eliminaci 5 α -DHT, která je závislá na typu epiteliálních buněk, které enzym produkují. Ovlivnění hladin AKR1C2 se tedy zdá být atraktivním cílem léčby rakoviny prostaty. (Rižner et al., 2003)

AKR1C2 a metabolismus xenobiotik

NNK (4-methylnitrosamino-1-(3pyridyl)-1-butanon) patří mezi nejsilnější karcinogeny vznikající přeměnou nikotinu během kouření. Je prokázaným karcinogenem vedoucím k rakovině plic. AKR1C2 se podílí spolu s 1C1, 1C4 a 1B10 na detoxikačním mechanismu tohoto karcinogenu, který zahrnuje redukci ketonické skupiny na odpovídající alkohol (butanol) – NNAL. Redukce je dále následována glukuronidací a následným vyloučením sloučeniny močí. NNAL-glukuronid je hlavním metabolitem a reprezentuje 39-100% celkového NNK nalezeného v moči kuřáků.(Atala, Maser, 2001)

S deaktivační cestou redukce kompetuje také cesta aktivační. Ta probíhá hydroxylací, které se účastní cytochrom P450. Aktivovaný NNK je pak schopen alkylovat DNA a hemoglobin. Schopnost aktivace a deaktivace NNK je individuální a zcela závislá na věku a genetickém polymorfismu jedince. (Barski et al., 2008)

Dalším xenobiotikem jehož metabolismu se účastní AKR1C2, je oracin. Patří mezi potenciální cytostatika, strukturně tento lék řadíme mezi isochinoliny. Farmakokinetické studie ukázaly, že oracin podléhá metabolické redukci za vzniku dihydrooracinu, který ruší terapeutické vlastnosti léčiva a naopak zvyšuje jeho toxicitu. Na této redukci se aktivně podílí mikrosomální enzym 11 β -hydroxysteroid dehydrogenasa typu I, v cytosolu pak redukce probíhá za asistence členů podrodiny AKR1C. Zahnutí inhibitorů právě těchto enzymů do terapie rakoviny, by znamenalo zvýšení účinku oracinu za současného snížení nežádoucích účinků. (Barski et al., 2008)

Enzymatická redukce karbonylu je významná v mnoha metabolických procesech vedoucích k inaktivaci nebo naopak k prodloužení účinku léčiv. Mezi nejvýznamnější zástupce léčiv, jejichž metabolismus je ovlivňován právě AKR1C2 můžeme také zařadit antihypertensivum befunolol, antagonisty opiátů naloxon a naltrexon, případně antipsychotikum haloperidol. Dále také cytostatika daunorubicin a doxorubicin, u kterých se AKR1C2 podílí na detoxikaci a rozvoji rezistence. (Barski et al., 2008)

2.2. Klonování

2.2.1. Princip klonování

Klonováním se rozumí vytváření identických kopií neboli klonů. Klonování DNA je tedy pomnožení určitého fragmentu DNA a je nezbytnou součástí genetického inženýrství. Objev metod klonování způsobil převrat a značně ulehčil techniky sekvenování DNA a z nich vycházející postupy regulace genů. (1, 2011)

Samotný proces můžeme rozdělit na dva typy:

1) klonování in vivo

Probíhá v hostitelském organismu schopném přijmout a několikanásobně pomnožit fragment cizí DNA. Klonování in vivo předchází vytvoření rekombinantní DNA, skládající se z klonovacího vektoru a sekvence fragmentu DNA, která má být pomnožena. Klonovacím vektorem se rozumí genetický element, schopný začlenit do

své struktury požadovaný úsek cizorodé DNA a spolu s ním se v hostitelském organismu autonomně replikovat, vytvářet klony. (1, 2011)

2) klonování in vitro

Metoda klonování in vitro je poněkud mladším způsobem klonování, který však značně ulehčil některé zdlouhavé a obtížně proveditelné metody in vivo.

Jedná se o metodu PCR (polymerase chain reaction), která je schopná i z nepatrného množství fragmentu DNA udělat velké množství kopií. Ty jsou syntetizovány na základě předlohy (matrice) pomocí DNA-polymerasy z přítomných 2-deoxyribonukleosidtrifosfátů. Nutností je znalost alespoň počáteční a koncové sekvence fragmentu, dle které jsou syntetizovány primery – iniciátory reakce.

Přestože objev PCR způsobil velký převrat a značně zjednodušil proces klonování, má tato metoda jisté omezení. Prvním je už zmíněná znalost počáteční a koncové sekvence, druhým pak velikostní omezení kopírovaných úseků. Úseky o větší délce (do 40kb) lze zkopírovat za pomoci speciálních technik, existuje však celá řada genů delších, zde si musíme vystačit s metodou in vivo. (1, 2011))

2.2.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli je základní prvek a modelový organismus celé řady biologických, mikrobiologických a biotechnologických studií. Výhoda spočívá v naprosté jednoduchosti a snadné manipulovatelnosti s organismem v průběhu různých pokusů, jejichž výsledky a metody se následně dají aplikovat i na organismy složitější.

2.2.2.1. *Obecné vlastnosti*

Escherichia coli je gramnegativní, fakultativně anaerobní, nesporulující bakterie obsahující cirkulární chromosom o velikosti cca 3×10^6 párů bazí. Buňky jsou většinou tyčinkovitého tvaru a velikosti okolo 2 μm a 0,5 μm v průměru. Přirozeně se vyskytuje ve střevě teplokrevných živočichů. Většina kmenů je neškodných, některé však mohou způsobit závažné onemocnění a otravy. Bakterie se neomezuje pouze na střevní prostředí, krátkodobě je schopná i existence mimo tělo. Díky této odolnosti, snadnému množení, růstu a manipulaci se z ní stal nejlépe prostudovaný modelový prokaryontní organismus, často využívaný v mikrobiologii a biotechnologii. (Rumlová, 2003)

2.2.2.2. Kmeny

Druh *E. coli* se vyznačuje velkým množstvím kmenů lišících se v různých vlastnostech. Většina z nich je detekovatelných pouze na molekulární úrovni, mohou však významně ovlivnit fyziologii a životní cyklus bakterie. Některé kmeny mohou například získat patogenní vlastnosti, jiné schopnost využívat různé substráty nebo získat schopnost rezistence na určité antimikrobní látky. Pro vložení a následnou syntézu DNA jsou nejvhodnější kmeny schopné zajistit stabilitu přijaté rekombinantní molekuly, to znamená kmeny zbavené schopnosti syntézy restričních endonukleas, které by mohly vloženou DNA degradovat. Narozdíl od vlastní genetické výbavy, vložená rekombinantní molekula totiž není před působením těchto enzymů chráněná metylací. (Rumlová, 2003)

Nejrozšířenějšími druhy používanými v laboratorním prostředí se staly nepatogenní B a K-12 kmeny. Tyto laboratorní kmeny jsou speciálně upraveny, tak aby vyhovovaly podmínkám, v nichž jsou kultivovány a maximálně usnadnily manipulaci s bakterií. Mezi tyto úpravy patří především minimalizace bakteriálního genomu, který následně obsahuje pouze geny nezbytně nutné k přežití a optimálnímu množení. V procesu exprese proteinů je užívanější B linie zahrnující buňky REL-606 a BL-21. Jejich fenotyp se vyznačuje řadou výhodných vlastností jako např: rychlejší růst v minimálním médiu, nižší produkce acetátu, vyšší exprese rekombinantních proteinů a nižší degradace těchto proteinů během procesu purifikace, díky sníženému počtu proteas. (Lee, 2009)

Při výběru vhodného kmene je tedy nutné vycházet z účelu, ke kterému má být použit. Pro usnadnění onoho výběru byla pro účely molekulární genetiky připravena celá řada mutantů, jejichž genotyp se obvykle udává jako seznam mutovaných alel. V manuálech zabývajících se metodami genového inženýrství je pak uveden takovýto seznam, který je navíc doplněn i projevy jednotlivých mutací ve fenotypu. Tyto kmeny jsou pak běžně komerčně dostupné a dodávané většinou společnostmi zabývajících se produkty pro molekulární genetiku. (Rumlová, 2003)

2.2.2.3. Využití v biotechnologii

V médiích bohatých na živiny poskytujících krom nezbytných minerálních látek také látky typu vitamínů, prekursorů nukleových kyselin a další metabolity, má *E. coli* nejrychlejší růst při 37 °C. Pro tento růst je důležitá dostatečně objemná baňka (optimální s 5x větším objemem než růstové médium) umožňující bezpečné třepání na třepáče a tím zavzdušnění média. Bakterie je však schopná růstu i v médiích chudších co se týče obsahu živin. Vystačí si i s pouhou glukózou jako jediným zdrojem uhlíku a energie a solemi sloužícími pro získání

dusíku, fosforu, síry a stopových prvků. Této skromnosti lze využít pro zvýšení citlivosti detekce, kdy pomocí živného média jsme schopni inkorporovat do produktů metabolismu značené prekursorů (^{15}N , ^3H , ^{35}S). (Rumlová, 2003)

Díky téměř dokonalé znalosti, dlouhodobé historii použití a snadné manipulovatelnosti hraje tento organismus významnou roli v moderním genetickém a biologickém inženýrství. Využívá se k celé řadě pokusů zahrnujících využití těchto buněk jako hostitelů pro rekombinantní plasmidy. Významná je především schopnost bakterie produkovat pomocí svého aparátu celou řadu heterogenních proteinů. Jedním z prvních byla právě produkce lidského inzulinu, která způsobila průlom v léčbě diabetu mellitus a usnadnila život velké skupině pacientů. (8, 2011)

2.2.3. PCR

PCR (polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce) je in vitro metoda pro rychlé a vysoce selektivní namnožení konkrétní nukleotidové sekvence.

Je založena na využití DNA polymerasy pro opakované kopírování templátové molekuly DNA. Syntéza je zahájena krátkými oligonukleotidy tzv. primery, které se za speciálně upravených podmínek párují s denaturovanou předlohovou DNA, každý s jiným vláknem původní dvouřetězcové molekuly DNA. Podmínkou pro použití této metody je známost alespoň počáteční a koncové sekvence fragmentu, dle kterých jsou syntetizovány primery. Pomocí těchto krátkých komplementárních předlohových molekul je díky DNA polymerasy syntetizováno velké množství kopií původního fragmentu. (Alberts et al., 2005)

Pro PCR je nezbytná přítomnost:

- 1) 2 oligonukleotidových primerů o velikosti cca 20 nukleotidů komplementárních k oběma koncům templátové DNA.
- 2) předlohové DNA, kterou chceme amplifikovat. Jedná se o dvouřetězcové vlákno obsahující množený úsek, který je ohraničený oběma primery.
- 3) termostabilní DNA polymerasu, stabilní při teplotě 95 °C.
- 4) směsi všech čtyř deoxyribonukleotidů.
- 5) pufru obsahující Mg^{2+} ionty nezbytné pro aktivitu DNA polymerasy.

(Rumlová, 2003)

2.2.3.1. Návrh primerů

Správný návrh primerů a jejich koncentrace je klíčovým parametrem rozhodujícím o úspěšném průběhu celé reakce. Existuje řada speciálních počítačových programů zabývajících se touto problematikou, které usnadňují vytvoření správné sekvence těchto oligonukleotidů.

Mezi základní požadavky na správný návrh patří:

- zpravidla obsah 18 – 24 nukleotidů
- bez obsahu sekundární struktury (nejsou v nich obsaženy inverzně se opakující sekvence)
- vyvážený poměr G/C a A/T párů
- vzájemná nekomplementárnost primerů (netvoří dimery)
- přijatelná a podobná teplota tání umožňující specifické „nasednutí“ na templát. Optimální je rozmezí mezi 55 °C - 65 °C. Větší procento G/C páru teplotu zvyšuje z důvodu existence trojné vazby mezi G a C.
- optimální koncentrace v reakci 0,1-0,6 μM
- na 5'-konec je možné přidat nekomplementární báze, například pro zavedení restrikčního místa. (Rumlová, 2003)

2.2.3.2. Princip PCR

Principem metody je opakování kroků: zahřívání (denaturace DNA), zchlazení (hybridizace), a syntéza a to v několika cyklech (obvykle 20-30). Na začátku máme reakční směs složenou z předlohové DNA, z primerů (v přebytku), DNA polymerasy a z volných deoxyribonukleotridifosfátů. Reakce je zahájena krátkým zvýšením teploty na 95 °C, při kterém dochází k oddělení původních dvou vláken molekuly DNA, následuje ochlazení na cca 55 °C a spárování DNA s primerem, který je v přebytku. V posledním kroku je z primerů, dle vzoru templátové DNA, syntetizován komplementární řetězec v přítomnosti DNA polymerasy a čtyř volných deoxyribonukleosidtrifosfátů, v tomto kroku je tedy teplota nastavená na optimum, při které je polymerasa nejvýkonnější (70 °C při použití Taq polymerasy). Celá reakce probíhá v termocykléru (programovatelném termostatu) schopném rychlého a přesného přechodu mezi jednotlivými teplotami. (Alberts et al., 2005)

Další cyklus je pak znovu zahájen denurací zvýšenou teplotou, kdy dojde k oddělení nově syntetizovaných řetězců DNA a celý proces se opakuje. V následujících krocích slouží i nově syntetizované molekuly DNA jako templáty, po každém cyklu se tedy zdvojnásobí původní množství molekul a reakce se řetězově šíří. (Alberts et al., 2005)

2.2.3.3. DNA polymerasy

Při PCR tedy dochází k vystavování makromolekul extrémním tepelným podmínkám, při kterých denaturuje dvoušroubovice DNA. Tyto podmínky by také způsobily nevratné poškození DNA polymerasy, která by se, při použití běžného enzymu, musela při každém cyklu znovu přidávat, což by značně zvýšilo náklady této metody. Problém řeší použití speciální DNA polymerasy, která byla izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Tato polymerasa je stabilní i při mnohem vyšších teplotách než eukaryontní DNA polymerasy, takže není denaturována vysokou teplotou v prvním kroku, a nemusí být tedy znovu přidávána po každém cyklu reakce. (Rumlová, 2003)

Taq polymerasa je enzym s polymerasovou aktivitou ve směru $5' \rightarrow 3'$ konce, postrádá tedy exonukleasovou aktivitu $3' \rightarrow 5'$. V praxi to znamená, že enzym není schopen opravovat chyby, které při replikaci vzniknou. Problém nastává hlavně při replikaci dlouhých sekvencí, kde se zvyšuje pravděpodobnost začlenění jedné nebo více nesprávných bazí do přepisované sekvence. Pro většinu reakcí je však tato přesnost dostačující, navíc výhodou enzymu Taq polymerasy je i jeho poměrně vysoká procesivita, což je schopnost syntetizovat dlouhé úseky DNA (až 10kb ~ tisíce deoxynukleotidů). (Rumlová, 2003)

Kromě Taq polymerasy existují i jiné polymerasy charakteristické svými specifickými vlastnostmi. Jedná se například o polymerasy Pwo (zdroj – *Pyrococcus woesei*) a Pfu (*Pyrococcus furiosus*). Ty se vyznačují navíc i $3' \rightarrow 5'$ exonukleasovou aktivitou díky níž jsou schopné opravy nesprávně inkorporovaných nukleotidů a jejich produkty jsou v důsledku této schopnosti několikanásobně přesnější. Nedostatkem je naopak jejich nižší procesivita. V praxi se často pro tuto nevýhodu používají směsi těchto enzymů, případně obohacené o stabilní faktory. (Rumlová, 2003)

Zajímavou polymerasou je také enzym izolovaný z bakterie *Thermus thermophilus* – tzv. Tht DNA polymerasa, jejíž předností je schopnost působení také jako reverzní transkriptasa (schopnost syntézy DNA dle předlohy RNA). (Rumlová, 2003)

2.2.4. Gelová elektroforéza

Jedná se o metodu molekulární biologie, která je založená na rozdílné migraci různých velkých makromolekul v gelu vloženém do elektrického pole. Makromolekuly jsou umístěny v žlábků plochého polyakrylamidového nebo agarózového gelu a při umístění do elektrického pole gelem migrují skrz mikroskopické póry k opačně nabitě elektrodě. Rychlost pohybu makromolekuly závisí na její velikosti, tedy schopnosti procházet gelem. Krátké úseky postupují rychleji, zatímco dlouhé jsou hustým gelem více zpomalovány. Na konci získáme

fragmenty rozdělené do tzv. „žebříčku“, kde jsou makromolekuly rozdělené v prouzcích dle svých velikostí. (Alberts et al., 2005)

Metoda se využívá k jednoduché a rychlé analýze velikosti DNA, případně jiných makromolekul. S její pomocí můžeme rychle ověřit velikost a vyloučit polámání makromolekuly, nebo zjistit její čistotu (absenci např. RNA), a také rozdělit jednotlivé fragmenty. (Alberts et al., 2005)

2.2.4.1. Gelová elektroforéza horizontální

Gel je tvořen z přírodního polysacharidu extrahovaného z mořských řas - agarózy, který se za horka rozpouští ve vodě (příp. pufru) a vzniká ochlazením na teplotu cca 40-45 °C. Velikost pórů je 100-300 nm, v závislosti na koncentraci. Většinou platí, že čím je analyzovaná molekula větší, tím menší je koncentrace použitého gelu. V praxi se nejčastěji používají gely o koncentraci 0,7 – 1%. Gely s příliš nízkou koncentrací jsou totiž velmi křehké a náročné na manipulaci, naopak hustším gelem hůř pronikají molekuly. Gel obvykle bývá horizontální, 3 – 6 mm silný, submerzní – tj. celý ponořený v pufru (obvykle Tris – borát - EDTA pufr = TBE pufr). (Šimůnek, 2009)

Vzorky se po umístění gelu do elektroforetické vany nanášejí do jamek smíchané s nanášecím pufrům, který obsahuje barvivo pro sledování migrace (nejčastěji bromfenolová modř) s příměsí glycerolu a sacharózy (napomáhají klesání na dno jamky). Kromě vzorků se do jamek nanáší velikostní (hmotnostní) markery (standarty), obvykle restriční fragmenty o známé délce tvořící „žebříček“ (ladder). (Šimůnek, 2009)

Po nanesení vzorků do gelu se vana připojí k elektrickému proudu, který pohání molekuly gelem.

Pro vizualizaci vzorků se použije např. fluorescenční barvivo (ethidiumbromid), které je možno přidat přímo do gelu před vylitím do formy nebo lze výsledek označit až po elektroforéze. Vizualizace se následně provádí pomocí UV transiluminátoru nebo automatického analyzátoru. (Šimůnek, 2009)

2.2.4.2. SDS PAGE

Polyakrylamidová elektroforéza (PAGE) je zahájena polymerací akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu pomocí volných radikálů v prostředí pufru. Poměr koncentrací obou výchozích složek určuje následně velikost pórů gelu. Ten bývá nejčastěji vertikální, úzký a nahoře opatřen žlábkou pro nanášení vzorku. Narozdíl od předchozího není zcela ponořen do pufru, ale uzavřen do umělohmotných sklíček s otevřenou pouze horní a spodní

hranou, které se umístí do nádržek s pufrem (tentýž, který byl použit při polymeraci). pH gelu závisí na typu vzorku, pro který má být použit, v případě dělení proteinů bývá pH okolo 9, aby měly molekuly celkový náboj záporný a pohybovaly se k anodě umístěné na dně nádržky. (Voet, 1995)

Polyakrylamidová elektroforéza se obvykle používá pro separaci menších molekul. Při použití PAGE u proteinů, je nejprve nutné rozrušit jejich sekundární a terciární strukturu, kterou bílkovina v prostoru zaujímá, pro snazší průnik gelem. Za tímto účelem se do gelu přidává SDS – sodium dodecyl sulphate, anionický detergent, ten se váže na polypeptidový řetězec za vytvoření negativně nabitého komplexu. Díky němu pak všechny aminokyseliny nesou stejný náboj a jsou rozděleny pouze dle svých velikostí. (Šimůnek, 2009)

Vizualizace následně probíhá ponořením gelu do kyselého roztoku obsahujícího barvivo (Coomassie brilliant blue) a alkohol. Dochází k denuraci proteinů a fixaci barvy za vzniku komplexu barvivo-protein. Přebytek barviva se odstraní promýváním kyselým roztokem. (Voet, 1995)

Diskontinuální elektroforéza

Metoda poskytující lepší rozlišení. Ostrost, a tím i rozlišovací schopnost, určuje výška sloupečku vzorku při průniku do gelu. Diskontinuální elektroforéza se proto skládá ze dvou gelů tzv. startovního a dělicího. Gely jsou podobného složení, liší se hlavně ve svém pH. Sloupečky vzorků jsou ve startovním gelu co nejvíce ztenčeny a zkoncentrovány, aby do dělicího gelu prošly v úzkých pásčích a tím zajistily vyšší přesnost. (Voet, 1995)

Startovní gel je připraven s pH až o dva řády nižším než dělicí. Při vložení gelu do elektrického pole, ionty elektrodového pufru vstupují do startovního gelu, kde ztrácí náboj, tím se sníží jejich mobilita, vytvoří se lokální nedostatek nabitých částic a vzroste odpor. Dle Ohmova zákona se pak musí v rámci zachování konstantního proudu zvýšit intenzita elektrického pole. V poli se zvýšenou intenzitou se pak molekuly pohybují rychleji, až do chvíle, kdy narazí na separační gel, ve kterém je dostatek nabitých částic. Větší počet nabitých molekul v dělicím gelu pak brání vstupu makromolekul, ty se zakoncentrovávají na rozmezí a do separačního gelu vstupují v podobě velmi úzkých proužků. Separační gel s vyšším pH dovoluje opětovnému vzniku nabitých iontů pufru, dělení zde dále probíhá normální elektroforézou. (Voet, 1995)

2.2.5. Enzymy používané při manipulaci s DNA

Enzymy jsou nezbytnými pomocníky při manipulaci s DNA. Jsou to proteiny, schopné už ve velmi malých koncentracích katalyzovat reakce, které by bez jejich pomoci probíhaly jen velmi obtížně. Můžeme je rozdělit do skupin dle typu reakce, kterou poskytují, řada z nich ale vykazuje různé aktivity, které svou povahou spadají do dvou i více těchto skupin.

2.2.5.1. Nukleasy

Nukleasy jsou enzymy rozrušující strukturu DNA degradací fosfodiesterových vazeb, spojujících nukleotidy. Dle místa odbourávání je dělíme na tzv. exonukleasy, odbourávající nukleotidy z konce molekuly a endonukleasy, které štěpí fosfodiesterovou vazbu uvnitř. (Brown, 2007)

Restrikční endonukleasy

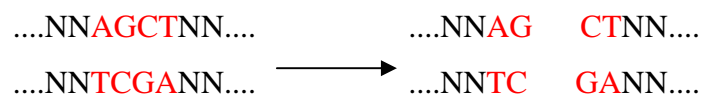
Restrikční endonukleasy jsou součástí tzv. restrikčně modifikačních mechanismů bakterií zahrnujících methylační aktivitu vlastní buněčné DNA k ochraně před degradací a restrikční aktivitu sloužící ke štěpení cizorodé DNA, která není chráněna. Velmi významný byl jejich objev pro metody genetického inženýrství. Tyto enzymy jsou vlastně zvláštním typem endonukleas, jejichž význam spočívá ve schopnosti štěpit vlákno v místě určité sekvence. Tato sekvence je označována jako restrikční místo a je specifická pro daný typ endonukleasy. Díky objevu restrikčních endonukleas a jejich specifických míst štěpení je možné předem předpovědět výsledek restrikce, případně ji směřovat do nám vyhovujících míst. (Brown, 2007)

Jsou známy tři typy restrikčních endonukleas. Typy I a III vykazují kromě modifikační i ATP-dependentní restrikční aktivitu. Bohužel enzymy těchto skupin nenašly praktické využití, protože přestože rozpoznávají určité sekvence, molekulu DNA štěpí mimo tyto rozpoznávací místa v nedefinované oblasti. Pro klonování jsou tedy nejvhodnější enzymy skupiny II, ty jsou přísně specifické a rozpoznávají symetrické sekvence (tzv. palindromové sekvence), což jsou úseky dvojitěvláknové DNA, mající v obou vláknech opačně orientovanou sekvenci. (Rumlová, 2003)

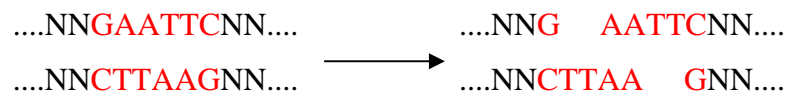
Mnoho endonukleas rozpoznává pouze konkrétní hexanukleotidová místa, některé si však vystačí jen se čtyřmi, pěti nebo naopak až osmi nukleotidovými sekvencemi. Soubor všech restrikčních míst molekuly DNA se označuje jako restrikční mapa a udává typ restrikčních endonukleas štěpících danou molekulu a polohu míst, ve kterých ke štěpení dochází. (Brown, 2007)

Vlastní štěpení často probíhá uprostřed rozpoznávacího místa, kdy enzym vytváří dva jednoduché dvouvláknové fragmenty původní molekuly s tzv. tupými konci. Jiné restriktivní endonukleasy jsou schopné rozstříhnout molekulu odlišným způsobem, kdy nejsou obě vlákna rozštěpena najednou ve stejném místě, ale s posunem o dva nebo čtyři nukleotidy. Při tomto způsobu štěpení dochází ke vzniku tzv. kohézních (přesahujících, lepivých) konců, kde jedno vlákno DNA přesahuje o pár nukleotidů vlákno druhé. Význam vytvoření kohézního konce spočívá v možnosti spojit k sobě dvě různé molekuly DNA, připravené stejnou restriktivní endonukleasou (tedy obsahující stejné, vzájemně komplementární konce). (Brown, 2007)

a) Produkce tupých konců



b) Produkce kohézních konců



Obr. 2. Konce vzniklé rozštěpením DNA různými restriktivními endonukleasami. a) tupý konec, b) kohézní konec. (Brown, 2007)

2.2.5.2. Ligasy

DNA ligasy jsou velmi důležité enzymy, nacházející se ve všech buňkách. Pro genetické inženýrství se nejčastěji používá ligasa izolovaná z bakterie *E. Coli*. Význam těchto enzymů spočívá ve schopnosti opravovat jednořetězcové zlomy, které se vyskytly na buněčné DNA, například vlivem předchozí replikace. Ligasy jsou tedy schopny vytvořit fosfodiesterovou vazbu mezi sousedícími nukleotidy. Této vlastnosti se využívá také při spojování dvou vláken molekuly DNA při vytváření rekombinantního vektoru. (Brown, 2007)

Enzym si však nedokáže molekuly, které mají být spojeny, sám najít a zachytit. Spojení (ligace) tedy závisí na náhodném setkání a přiblížení se dvou DNA tak, aby je enzym mohl k sobě připojit. Ligaci tedy logicky usnadňuje vyšší koncentrace obou molekul, která zvyšuje pravděpodobnost náhodného setkání. (Brown, 2007)

Dalším faktorem usnadňujícím spojení jsou právě kohezní konce vytvořené restriktivní endonukleasou. Pokud dojde k přiblížení se dvou fragmentů DNA, připravených stejnou endonukleasou, jsou jejich konce schopny, na základě komplementarity bazí, vytvořit mezi

sebou dočasné vodíkové vazby. Tím se prodlouží čas, který u sebe molekuly stráví, a během kterého je ligasa může trvale spojit. (Brown, 2007)

2.2.5.3. Polymerasy

Dalšími enzymy nezbytnými pro manipulaci s DNA jsou polymerasy. Tyto enzymy jsou schopny dle jednovláknové předlohy (matrice) syntetizovat druhé vlákno komplementární k matrici. Polymerasy můžeme rozdělit do několika skupin dle jejich aktivit, některé vedle schopnosti syntézy umí vlákno DNA také degradovat. Čehož se využívá hlavně při vyplňování zářezů (míst na dvouvláknové DNA, kde chybí některé nuklotidy jednoho vlákna). Nukleasa, zde nasedne na místo zářezu a dosyntetizovává prázdné místo, zároveň před sebou degraduje původní vlákno. (Brown, 2007)

Polymerázová aktivita je závislá na přítomnosti primeru, krátkého úseku DNA komplementárnímu k matrici, který nasedá na matrici a z něj pak polymerasa pokračuje v syntéze nového vlákna. Asi nejznámější polymerasou genetického inženýrství je Taq DNA-polymerasa z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, schopná snášet i vysoké teploty používané při PCR. (Brown, 2007)

2.2.5.4. Fosfatasy a kinasy

Alkalická fosfatasa je enzym patřící do skupiny hydrolas katalyzující uvolňování fosfátových skupin z 5' konce molekuly DNA. (Brown, 2007)

Kinasa je enzym působící opačně k fosfatase, je schopna přidávat fosfátové skupiny na volný 5' konec. Přidáním nebo odebráním fosfátové skupiny tyto enzymy regulují reaktivitu molekuly. (Brown, 2007)

2.2.6. Příprava rekombinantního vektoru

Pro vpravení, udržení a pomnožení cizorodé DNA v hostitelské buňce je nutný speciální nosič, tím nejčastěji bývá bakteriální plasmid nebo virový genom. Příprava rekombinantního vektoru spočívá v rozštěpení nosiče, pomocí restriční endonukleasy, jejíž rozpoznávací místo se v klonovacím vektoru vyskytuje pouze jednou. V tomto případě takovou, která je navíc schopná tvořit kohézní (lepivé) konce. Jejich přítomnost je důležitá pro následné spojení s fragmentem cizorodé DNA, která byla připravena štěpením stejnou restriční endonukleasou a obsahuje tedy na svých koncích sekvenci komplementární ke koncům rozštěpeného vektoru. Pro spojení molekul a vytvoření rekombinantní DNA je nutný

přídavek DNA ligasy. Díky ní dojde ke spárování vektoru s insertem a vyplnění zlomů v sekvenci DNA. Vzniká kruhová rekombinantní molekula. (Alberts et al., 2005)

Vektor

Klonovací element schopen pojmout úsek, který chceme klonovat, začlenit ho do své struktury a spolu s ním překonat buněčné bariéry a prostoupit do hostitelské buňky. Vektor musí mít vlastnost samostatné existence v hostitelské buňce, být imunní vůči degradujícím enzymům, aby nedošlo k jeho poškození, a zároveň být schopen vytvářet své kopie nezávisle na dělení hostitelské buňky. Těmto parametrům nejlépe vyhovují bakteriální plasmidy a bakteriofágy, případně kosmidy (kombinace plasmidu s fágem). Volba příslušného vektoru pak závisí na účelu, k němuž má být vektor použit. (Brown, 2007)

2.2.6.1. Plasmidy

Plasmidy jsou malé kruhové molekuly DNA o velikosti 1-250kb existující samostatně v bakteriální buňce. Nesou v sobě zakódovanou přídatnou často zvýhodňující genetickou informaci (rezistence k antibiotikům, schopnost štěpit neobvyklé substráty aj.). Aby mohl být plasmid použit jako klonovací vektor musí splňovat určitá kritéria: musí být schopen samostatné replikace a neměl by přesáhnout velikost do 10kb - s velkými plasmidy je obtížná manipulace během purifikace často dochází k nežádoucím zlomům jejich molekuly. (Brown, 2007)

Všechny plasmidy využívané pro metody genového inženýrství by měly obsahovat tři důležité sekvence:

- 1) replikační počátek, který umožňuje replikaci nezávislou na hlavní bakteriální DNA. Velké plasmidy nesou dokonce i geny pro enzymy vlastní replikace, malé využívají replikační aparát hostitele.
- 2) selekční marker, zajišťující zvýhodněný růst jedinců ho obsahujících (rezistence)
- 3) klonovací místo, kde se vkládá fragment cizorodé DNA (Rumlová, 2003)

Uměle konstruované plasmidy navíc mohou obsahovat tzv. polyklonovací místo (polylinker). Polylinker je umístěn mimo sekvenci důležitých genů a obsahuje těsně za sebou řazené restriční místa restričních endonukleas. Tyto místa jsou obsaženy v plasmidu v jediném exempláři, tudíž při jejich použití můžeme pohodlně vložit fragment do vektoru, aniž bychom porušili jeho strukturu. (Rumlová, 2003)

Důležitou roli v klonování hraje počet kopií plasmidu vyskytujících se v jedné buňce. Ten může být velmi rozmanitý (od 1 u velkých až po 50). Logicky čím více plasmidů se vyskytuje v buňce, tím více kopií vloženého fragmentu bylo pořízeno. (Brown, 2007)

Klasifikace plasmidů dle nesoucí genetické informace

- 1) Fertilní plasmidy – neboli F-plasmidy, nesou pouze tzv. tra-geny. Jedná se o geny stimulující sexuální spojení (konjugaci), při němž dochází k přenosu těchto plasmidů. Geny kódují vytvoření konjugačního kanálu mezi bakteriálními buňkami, skrz který plasmid přechází.
- 2) Rezistenční plasmidy (R-plasmidy) – nesoucí gen způsobující rezistenci k antibakteriálním látkám. Nositelé plasmidu mohou přežívat v prostředí dané antibakteriální látky, což je zvýhodňuje oproti nerezistentním buňkám.
- 3) Col plasmidy – s obsahem genů pro koliciny, proteiny zabíjející jiné bakterie.
- 4) Degradativní plasmidy – nositelé těchto plasmidů jsou schopni metabolizovat neobvyklé substráty (toluen, kys. salicylovou).
- 5) Virulentní plasmidy – propůjčující hostitelské buňce virulenci, tj. schopnost vyvolat onemocnění, či v rámci něho usmrtit hostitele. (Brown, 2007)

2.2.6.2. Bakteriofágy

Termínem bakteriofág se rozumí vir schopný infikovat bakterie. Struktura bakteriofágu je velice jednoduchá, jak bývá u viru zvykem, jedná se pouze o nukleosidovou kyselinu (DNA nebo RNA) obalenou kapsidou, neboli proteinovým obalem chránícím genetickou informaci. Infekce probíhá v několika krocích: adheze bakteriofága k povrchu buňky, zahození obalu a injektování nukleosidové kyseliny do hostitele s následným spuštěním replikace, transkripce, translace a tvorby proteinové kapsidy za využití aparátu hostitelské buňky. Konečným krokem je pak vytvoření a uvolnění dceřinných fágových částic. (Brown, 2007)

U některých fágů probíhá cyklus replikace, transkripce a translace velmi rychle za vytvoření nových virových částic a lýze hostitelské buňky – lytický cyklus. Fágová molekula DNA není v tomto případě v hostitelské buňce nikdy stabilní. Na rozdíl od lytického cyklu je infekce lyzogenním fágem mnohem pomalejší. Charakteristické je pro ni začlenění fágové genetické informace do bakteriálního genomu. Integrovaná fágová DNA pak přetrvává v hostitelské buňce po dobu až několika tisíc buněčných dělení. Časem se však z hostitelského genomu uvolní a fág přechází zpět do lytického režimu a rozkládá buňku. (Brown, 2007)

2.2.7. Transformace

Vstup izolované molekuly DNA do bakteriální buňky se nazývá transformace. Některé druhy bakterií jsou schopné přijmout DNA z růstového média. Tato DNA bývá nejčastěji po vstupu do buňky rozložena enzymatickým systémem bakterie. Jen malá část je schopna v hostitelské buňce přežít a dokonce se i replikovat. Jedná se o plasmidovou DNA s vlastním replikačním počátkem, který dokáže bakterie rozpoznat.

Metoda tepelného šoku

Ne všechny buňky jsou však schopny transformace, v přírodě se jedná spíše o náhodný proces než pravidlo, v laboratorních podmínkách proto musíme bakteriím s transformací trochu pomoci. V tomto směru byl významný náhodný objev, že buňky namočené v ledově studeném roztoku soli (CaCl_2) jsou ochotnější přijímat cizorodou DNA. Přesný mechanismus není detailněji objasněn, pravděpodobně dochází k modifikaci buněčné stěny bakterie, na kterou se následně naváže DNA, takto aktivované buňky (nazýváme kompetentní) jsou připraveny k vlastnímu procesu transformace, tedy přenesení navázané DNA z vnější strany bakteriální stěny do cytoplasmy. Přenos nastává po krátkém zvýšení teploty na $42\text{ }^\circ\text{C}$, kdy vlivem teplotního šoku vznikají póry v membránách bakterie a těmi prochází DNA dovnitř buňky. (Brown, 2007)

Elektroporace

Účinnější avšak také nákladnější alternativou teplotního šoku je tzv. elektroporace. Principem metody je vytvoření pórů vlivem silného elektrického šoku. Výtěžek této metody je vysoký, pohybuje se okolo 10^9 - 10^{10} transformátů na $1\text{ }\mu\text{g}$ plasmidové DNA. Nevýhodou je ale požadavek na speciální vybavení. (Rumlová, 2003)

2.2.8. Selekcce klonů

Plasmidy používané pro klonovací metody obvykle obsahují ve své sekvenci také úsek kódující nějakou odlišitelnou vlastnost, často pro bakterii výhodnou (rezistence k antibiotiku), pomocí které můžeme snadno rozlišit bakterie s vloženým vektorem od bakterií bez vektoru. Selekcii můžeme jednoduše provést kultivací vzorku na selekčním médiu např. s přídavkem antibiotika, kde porostou pouze bakterie s plasmidem nesoucím rezistenci vůči tomuto antibiotiku.

2.2.8.1. Identifikace rekombinantní DNA

Přítomnost vektoru v buňce nemusí vždy znamenat přítomnost požadované sekvence. Při spojování molekul otevřeného plasmidu s fragmentem DNA může dojít k řadě jiných případů. Plasmid se může znovu uzavřít bez včlenění cizí molekuly, nebo se mohou cizí molekuly spojovat samy se sebou apod.

První informaci o přítomnosti fragmentu lze zjistit na základě pohyblivosti molekuly v agarózovém gelu, tato metoda nám umožní porovnání velikosti prázdného vektoru s vektorem rekombinantním, jehož velikost by měla být logicky větší.

Inserční inaktivace

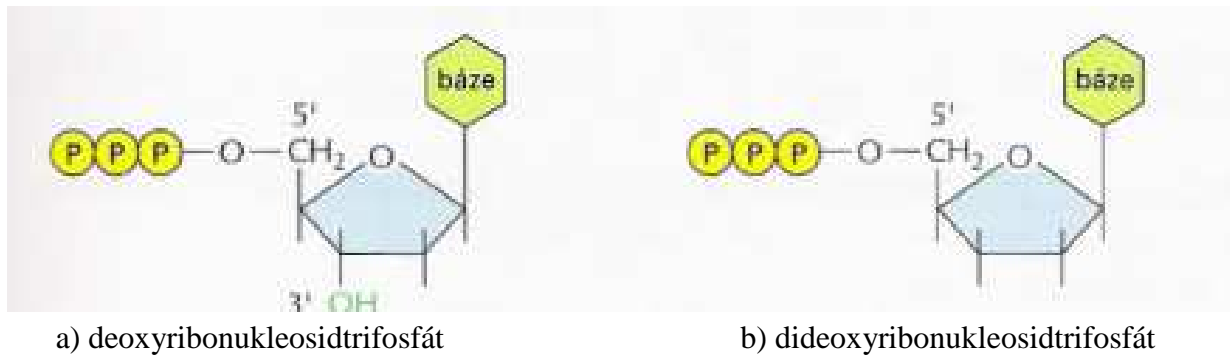
Další metodou pro ověření přítomnosti vložené DNA je metoda inserční inaktivace, kdy je insert vložen přímo do místa sekvence určitého genu. Vložením insertu se poruší integrita onoho genu a klony obsahující fragment začleněný do své struktury postrádají vlastnost, kterou gen kóduje. Příkladem může být inaktivace *lacZ* genu kódujícího část enzymu β -galaktozidasy, přerušení integrity způsobí neschopnost bakterie syntetizovat galaktozidasu. Při kultivování jedinců s nefunkčním genem β -galaktozidasy na živné půdě obsahující X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranozid), látku analogickou laktóze, zůstávají kolonie bezbarvé. Zatímco klony s funkčním genem (bez insertu) X-gal rozkládají za vzniku modře zbarveného produktu. (Brown, 2007)

2.2.8.2. Sekvence nukleotidové sekvence

Přestože jsou předchozí metody schopné detekovat jedince obsahující klonovací vektor a orientačně zjistit obsah fragmentu v tomto vektoru, nemůžeme si být jistí naprostou správností klonované sekvence. Pro konečné potvrzení se tedy používá metoda sekvenace, která zkontroluje replikovaný fragment bázi po bázi a odhalí tak případné mutace.

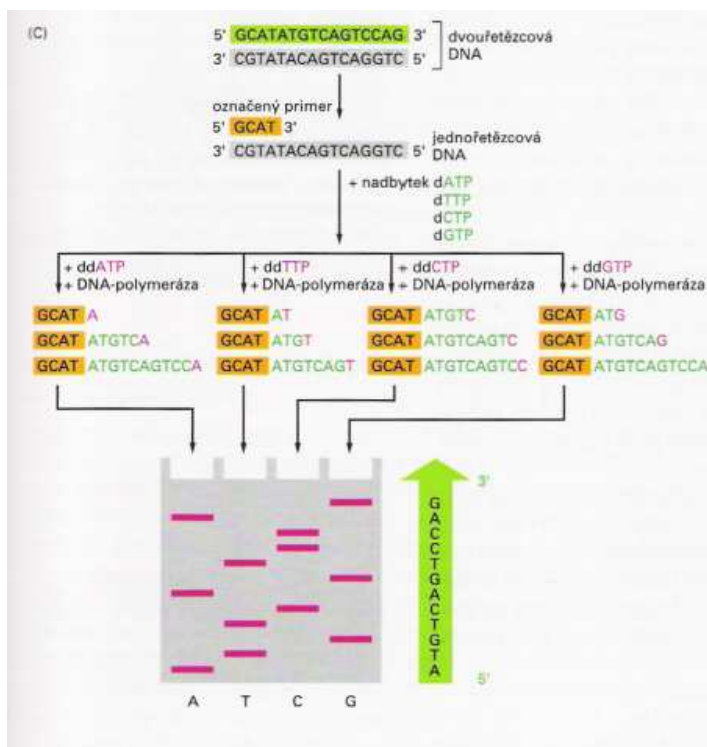
Celá metoda stojí na využití DNA-polymerasy a její schopnosti syntetizovat dle předlohy vlákno komplementární k matricovému. Nukleové kyseliny se skládají ze čtyř nahodile se opakujících nukleotidů, lišících se v dusíkové bázi – adenin, guanin, cytosin, thymin. Princip sekvenace spočívá ve čtyřech reakcích s DNA-polymerasou. V každé reakční směsi jsou právě stavební kameny nukleových kyselin tedy nukleosidtrifosfáty (adenosintrifosfát, guanosintrifosfát, cytidintrifosfát, thymidintrifosfát), navíc je v každé přidán jeden obměněný nukleotid ve formě dideoxyribonukleosidtrifosfátu, který při začlenění do struktury, ukončí syntézu dceřiného vlákna v místě daného nukleotidu.

Dideoxyribonukleosidtrifosfáty nemají volný 3' konec, proto při jeho přijetí do dceřiného vlákna syntéza nemůže pokračovat. (Alberts et al., 2005)



Obr. 3. a) deoxyribonukleosidtrifosfát, b) dideoxyribonukleosidtrifosfát (Alberts et al., 2005)

Po proběhnutí reakce je v každé zkumavce směs různě dlouhých fragmentů, vždy však končících stejným dideoxyribonukleotidem. Konečným krokem je následné provedení gelové elektroforézy jednotlivých směsí, která nám paralelně vedle sebe oddělí jednotlivé fragmenty reakcí dle velikosti. Z výsledku pak můžeme pohodlně odečíst polohu jednotlivých nukleotidů a určit sekvenci. (Alberts et al., 2005)



Obr. 4. Schéma enzymové metody sekvenování (Alberts et al., 2005)

2.2.9. Izolace a purifikace plasmidové DNA

Vlastní izolaci a purifikaci předchází pomnožení buněk a tím i genetické informace v nich uložené. Nejsnazší pomnožení a následnou manipulaci představuje pomnožení na tekutém LB médiu (Luria-Bertani). Což je nedefinované médium, jehož přesné složení není známo, protože se skládá ze dvou složek (trypton a kvasničný extrakt), představujících velmi složité směsi. Trypton představuje zdroj aminokyselin a malých peptidů, zatímco extrakt z kvasinek je bohatý na cukry, anorganické i organické látky. (Brown, 2007)

Vlastní purifikace je dnes usnadněná existencí celé řady komerčně dostupných souprav obsahujících už jednotlivé pufrы vhodné k přímému použití. Mezi základní kroky purifikace obecně patří: Příprava bakteriálního extraktu, lýze buněk, odstranění RNA a proteinů (oddělení kontaminujících látek), zahuštění. (Brown, 2007)

Příprava bakteriálního extraktu

Bakteriální extrakt je vlastně bakteriální koncentrát připravený centrifugací, kdy dochází k usazení bakterií na dně kyvety. Supernatant představující živné médium je po odstředění možné pohodlně slít a buňky resuspendovat v co nejmenším objemu. (Brown, 2007)

Lýze buněk

Abychom byli schopni izolovat buněčnou DNA, musíme nejprve odstranit bariéry, které představuje bakteriální stěna a buněčná membrána. Lýze je možná mechanickou nebo chemickou cestou. Při použití chemické cesty je nutno použít činidlo schopné zeslabit strukturu těchto bariér. K nejužívanějším patří lysozym – enzym vaječného bílku a lidských sekretů, popř. ethylendiamin tetraacetát (EDTA), který váže a odstraňuje ionty hořčíku ochraňující buněčné obaly. Často se využívá k účelům rozrušení bakteriálních obalů kombinace těchto látek posílená SDS (dodecyl sulfát sodný). Tento detergent na základě odstranění lipidů usnadňuje lýzi. (Brown, 2007)

Odstranění RNA a proteinů

Odstranění buněčných proteinů je založeno na chemickém vysrážení při neutralizaci silně alkalickým roztokem octanu draselného. RNA je z roztoku odstraněna degradací pomocí RNasy přidané ke směsi. Odstředěním pak můžeme nerozpustné sloučeniny oddělit od supernatantu, ve kterém se nachází převážně plasmidová DNA. Chromozomální DNA je

v buňce na několika místech přichycena k buněčné membráně, po centrifugaci proto zůstává v peletě. (Brown, 2007)

Oddělení kontaminujících látek

K důkladnějšímu přečištění dochází pomocí chromatografie na pryskyřičné koloně. Tato metoda využívá rozdílů v elektrickém náboji k separaci molekul. Uvnitř kolony se nachází kladně nabitá pryskyřice, ke které se váží negativně nabitá DNA, RNA i některé proteiny. Síly vázající molekuly k pryskyřici však nejsou stejné, lze je tedy promýváním roztoku soli o zvyšující se koncentraci od sebe rozdělit a to v pořadí: protein, RNA, DNA. Jímáním poslední frakce získáváme čistý roztok plasmidové DNA. (Brown, 2007)

Zahuštění

Posledním krokem v purifikaci plasmidové DNA je její zahuštění. Přidáním alkoholu k roztoku lze DNA vysrážet za vzniku bílé sraženiny. Centrifugací a následným rozpuštěním DNA v co nejmenším množství pufru získáváme koncentrovaný, čistý roztok plasmidové DNA, který jsme schopni uchovávat k pozdějšímu použití. Takto zahuštěnou DNA lze skladovat po několik týdnů v TE pufru při 4 °C, případně i několik let zmraženou na -20 °C až -70 °C. (Brown, 2007)

2.3. Exprese

Exprese genu je souhrn procesů, kterými se genetická informace uložená v DNA převede v reálně existující buněčnou strukturu nebo funkci. Zahrnuje přepis DNA do mRNA procesem transkripce a následně překlad z mRNA do aminokyselinové sekvence kódované DNA, případně postranlační úpravy.

V procesu klonování genů se termínem exprese rozumí: transformace rekombinantního vektoru, obsahujícího informaci o daném proteinu do speciálně upravených buněk, schopných pomocí svého aparátu syntetizovat daný protein. Zpravidla umožňuje získání obrovského množství požadovaného produktu z poměrně malého kultivačního objemu.

V praxi se nejčastěji používá *E. coli*, konkrétně bakterie BL-21 z kmene B, které, jak už bylo zmíněno, mají velký potenciál tvořit rekombinantní proteiny, jejichž nukleotidová sekvence byla do buněk vložena. (Lee, 2009)

2.3.1. Exprese v *E. coli*

Výhodou exprese je poměrně velký výtěžek a snadná kultivace na levném médiu. Celý proces začíná nejprve vložením rekombinantního vektoru do buňky. Tímto vektorem nejčastěji bývá plazmid obsahující silný promotor, jehož indukcí spustíme vysokou produkci mRNA nezbytnou pro následující produkci proteinu. Často se vyskytují systémy využívající tzv. *lac* promotor – promotor genu β -galaktosidasy *E. coli*. Promotor bývá negativně kontrolován tzv. *lac* represorem (produktem genu *lacI*) vážícím se na operátorovu sekvenci. K indukci tohoto *lac* promotoru se nejčastěji využívá IPTG (isopropyl- β -D-galaktopyranosid), který působí jako induktor promotoru spouštějící translaci. IPTG je do buněk snadno transportován a není jimi metabolizován. Strukturně se jedná o analog laktózy, který se rovněž může navázat na *lac* represor a tím mu zabránit jeho vazbě na promotor. V těsné blízkosti promotoru je pak umístěno polyklonovací místo, tak je zaručena blízkost promotoru s úsekem, který chceme pomnožit. (Rumlová, 2003)

Vlastní rekombinantní proteiny jsou pak buňkami produkovány a lokalizovány v cytoplazmě ve formě nerozpustných inkluzních tělísek. Takto vytvořené agregáty jsou odolné vůči působení intracelulárních proteas a navíc jsou snadno oddělitelné od ostatních rozpustných proteinů lokalizovaných v cytoplazmě. (Rumlová, 2003)

3. Cíl práce

Cílem práce bylo připravit rekombinantní protein AKR1C2 v aktivní formě s využitím expresního vektoru pET-15b. K dosažení cíle byla práce rozdělena do několika dílčích kroků:

- izolace kódové sekvence AKR1C2 ve vektoru pOTB7 z E. coli
- navržení primerů s restrikčními místy a amplifikace kódové sekvence metodou PCR
- ligace kódové sekvence AKR1C2 s vektorem Topo 2.1
- subklonace kódové sekvence z vektoru Topo do expresního vektoru pET-15b
- exprese proteinu v kompetentních buňkách BL-21
- rozbití buněk a izolace proteinu

4. Experimentální část

4.1. Materiál

4.1.1. Biologický materiál

Invitrogen, Carlsbad, Germany

Vektor TOPO 2.1

Kompetentní buňky E. coli pro vektor TOPO 2.1

New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany

BSA (bovine serum albumin)

Novagen, Darmstadt, Germany

Vektor pET-15b

Kompetentní buňky BL-21 pro vektor pET-15b

Promega, Madison, USA

Kompetentní buňky E.coli Hb 101

Source BioScience imaGenes, Berlin, Germany

Kódová sekvence AKR1C2 ve vektoru pOTB7

Forward primer s restrikčním místem pro restrikční endonukleasu Nde I

Reverse primer s restrikčním místem pro restrikční endonukleasu Xho I

Qiagen, Hilden, Germany

dNTP

4.1.2. Chemikálie

Appli Chem, Darmstadt, Germany

Akrylamid

Bis-akrylamid

Bromfenolová modř

Comassie blue

Ethidium bromid

Glycin

IPTG

Persíran amonný

Bio-Rad United Kingdom

Precision Plus Protein Standards All Blue

Invitrogen, Carlsbad, Germany

TOPO sůl

Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR

Chlorid vápenatý

Fosforečnan sodný

Hydroxid sodný

Isopropylalkohol

Kyselina chlorovodíková

Kyselina octová

New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany

Pufr pro T4 ligasu

Pufr pro restrikční endonukleasy: BamH I, Hind III, Nde I, Xho I - NEBuffer 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithithreitol, pH 7,9)

Penta, Chrudim, ČR

Ethanol 60%

Ethylalkohol

Kyselina boritá

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Penta, Praha, ČR

Chlorid sodný

Glycerol 85%

Promega, Madison, USA

Pufr pro SAP fosfatasu

Qiagen, Hilden, Germany

Chlorid hořečnatý

Pufr pro PCR

Pufr P1 (50 mM Tris-Cl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNasa A)

Pufr P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS w/v)

Pufr P3 (3,0 M octan draselný, pH 5,5)

Pufr QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % IPA v/v, 0,15 % Triton X-100 v/v)

Pufr QC (1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % IPA v/v)

Pufr QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 8,5, 15 % IPA v/v)

Sigma-aldrich chemie, Steinheim, Germany

EDTA

Serva, Heidelberg, Germany

Imidazol

Persíran amonný

Sodná sůl dodecylsulfátu

4.1.3. Enzymy

New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany

Restrikční endonukleasa Bamh I

Restrikční endonukleasa Hind III

Restrikční endonukleasa Nde I

Restrikční endonukleasa Xho I

T4 ligasa

Qiagen, Hilden, Germany

Ribonukleasa A (RNasa A)

Taq DNA polymerasa (Hot Star Taq DNA Poly)

Promega, Madison, USA

SAP fosfatasa – SHRIMP, CIAP

Sigma-aldrich chemie, Steinheim, Germany

Lysozym

4.1.4. Antibiotika

Sigma-aldrich chemie, Steinheim, Germany

Kanamycin sulfát

Sodná sůl ampicilinu

4.1.5. Ostatní

Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France

Bacto Agar

Bacto Tryptone

Bacto Yeast extract

Invitrogen, Carlsbad, Germany

SOC médium

New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany

Velikostní a hmotností standard: 2-log DNA ladder

Serva, Heidelberg, Germany

Agaróza

Sacharóza

4.1.6. Připravované pufry a média

Příprava pufků

Äkta pufr

20 mM Na ₂ PO ₄	3,60 g
500 mM NaCl	14,60 g
10 mM imidazol	0,34 g
10 % glycerol	56,00 g

TBE pufr

0,089 M Tris (10,781 g/l vody)

0,089 M kys. boritá (5,503 g/l vody)

0,002 M EDTA (0,745 g/l vody)

Postup: do kádinky navážíme suroviny dle tabulky a rozpustíme v 1 l redestilované vody.

TE (Tris-EDTA) pufr

1 M Tris (6,076 g/50 ml vody)

0,5 M EDTA (0,186 g/10 ml vody)

Postup: 50 ml 1 M Tris smícháme s 10 ml 0,5 M EDTA a doplníme redestilovanou vodou na 500 ml. Hodnotu pH upravíme konc. HCl na pH 8. Čirý roztok uchováváme v chladu.

Příprava LB média

LB médium

krypton 5,0 g

yeast extrakt 2,5 g

NaCl 5,0 g

Postup: navážky si rozpustíme v 450 ml redestilované vody. Pomocí 5 M NaOH upravíme pH na hodnotu 7. Doplníme na 500 ml redestilovanou vodou a autoklávueme. Čirý, žlutý roztok uchováváme v chladu.

Příprava roztoků

Roztok ampicilinu

Ampicilin 50 mg/ml

Postup: do falkonky jsme si navážili 100 mg ampicilinu a rozpustili ve 2 ml redestilované vody. Falkonku s roztokem ampicilinu uchováváme při -20 °C.

1 M IPTG

IPTG 0,2383 g

Postup: 0,2383 g IPTG rozpustíme v 0,8 ml redestilované vody a doplníme na 1 ml.

Příprava roztoků a pufrů pro SDS-polyakrylamidovou elektroforézu

4 M HCl

konc. HCl 88 ml

Postup: do 150 ml redestilované vody přidáme 88 ml HCl a doplníme redestilovanou vodou na 250 ml. Uchováváme v lednici.

1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8 (pufr pro separační gel)

Tris 18,5 g

Postup: Tris rozpustíme v 75 ml redestilované vody, pH upravíme pomocí 4 M HCl na 8,8 a doplníme v odměrné baňce na 100 ml redest. vodou. Uchováváme v chladu.

0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8 (pufr pro zaostřovací gel)

Tris 6,0 g

Postup: Tris rozpustíme v 75 ml redestilované vody, pH upravíme pomocí 4 M HCl na 6,8 a doplníme v odměrné baňce na 100 ml redestilovanou vodou. Uchováváme v chladu.

10 % SDS (Sodium dodecylsulfát)

SDS 10 g

Postup: SDS rozpustíme v 80 ml redestilované vody a v odměrné baňce doplníme na 100 ml. Uchováváme při laboratorní teplotě, v chladu hrozí riziko vysrážení.

10 % APS (persíran amonný)

APS 0,010 g

Postup: APS rozpustíme v odměrné baňce ve 100 ml redestilované vody. Neuchováváme, připravujeme těsně před použitím.

30 % AA (akrylamid) a 0,8 % bis-AA (bis-akrylamid)

akrylamid 30,0 g

bis-akrylamid 0,8 g

Postup: navážky rozpustíme ve 100 ml redestilované vody.

Elektrodový pufr

Tris	15,1 g
Glycin	72,0 g
SDS	5,0 g

Postup: Tris, glycin a SDS rozpustíme v 900 ml redestilované vody, pH upravíme 4 M HCl na 8,3. Doplníme redestilovanou vodou na 1000 ml.

0,5 % bromfenolová modř

bromfenolová modř	5,0 mg
-------------------	--------

Postup: doplníme vodou do 10 ml

Zásobní vzorkový pufr

bromfenolová modř 0,5 % (5 mg/10 ml redest. vody)	0,6 ml
0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8	1,0 ml
glycerol	2,0 ml
10% SDS	3,0 ml
redestilovaná voda	1,3 ml

10 % Kyselina octová

99 % kys. octová	50,5 ml
redestilovaná voda	449,5 ml

0,25 % Comassie blue (CBBG) v 10 % kys. octové

CBBG	0,25 g
10% kys. octová	100 ml

4.2. Pomůcky

V průběhu práce byly používány kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, skleněné zkumavky, zkumavky Falcon, mikrozukavky Eppendorf, centrifugační zkumavky Backman, Petriho misky, skleněné hokejky, automatické pipety a špičky Eppendorf, stojánky, nerezové lžičky, navažovací lodičky, parafilm, stopky, magnetické míchadla a další laboratorní pomůcky.

4.3. Přístroje

Analytické váhy Scaltec SBC22

Autokláv Vaposteri

Box s laminárním prouděním Chemos CZ Faster TWO 30

Centrifugy:

- Heraeus Biofuge stratos
- Eppendorf MiniSpin plus
- Hermle Z 100 M

Elektroforetický systém Chemos CZ model B2

Elektroforetický systém SDS-PAGE mini PROTEAN (Bio-Rad, USA)

Inkubátory:

- n-Biotek NB-205 se zabudovanou třepací jednotkou
- Memmert
- Eppendorf Thermomixer comfort

Magnetická míchačka Lavat

Mikrovlňná trouba Zanussi

Personal Thermal Cycler MJ Mini Bio-Rad

pH-metr Thermo Orion model 410A

Předvážky KERN KB

Skenovací stanice pro gely Gel Doc XR Bio-Rad

Spektrofotometry:

- Infinite M200 (Tecan)
- NanoDrop ND-1000

Sušárna Binder

Třepací zařízení Minishaker IKA MS2

Ultradestilační přístroj Milli Q (Prograd 2), Millipore

Ultrazvuková lázeň Ultrasonic compact cleaner UC 005 AJ1 Tesla

Vodní lázeň Thermo Haake P5

Výrobník ledu Scotsman AF 80

Hlubokomrazící box Herafreeze, Heraeus

4.4. Metody

4.4.1. Malá purifikace plasmidu

Namnožení *E. coli* s plasmidem

Jedná se o naočkování vybraných kolonií vyrostlých na Petriho misce do připraveného tekutého média, ve kterém probíhá rychlé dělení buněk, pro co nejvyšší výtěžnost následujícího přečištění.

Tekuté médium bylo připraveno z 30 ml LB média 30 μ l vodného roztoku ampicilinu. Po 2 ml byla směs rozpipetována do deseti předem připravených vysterilizovaných zkumavek. Sterilní špičkou pipety byla odebrána z Petriho misky vždy jedna kolonie. Kolonie byly vybírány bez „satelitů“, tak aby bylo zajištěno, že všichni jedinci umístění do jedné zkumavky jsou identičtí. Všechny 10 zkumavek bylo vloženo do inkubátoru a inkubováno při 37 °C, 180 rpm po dobu 3 hod.

Po 3 hodinách byly vzorky přelity po 1 ml do připravených deseti mikrozukumavek Eppendorf a stočeny při 13 000 rpm po dobu 1 min. Supernatant byl vylit a pelety se uchovaly v mrazáku pro další použití. Zkumavky se zbylým 1 ml byly uschovány při 4 °C.

Malá purifikace

Do mikrozukumavky Eppendorf se vzorkem bylo nejprve přidáno 50 μ l pufru P1 a pomocí vortexu byla vytvořena suspenze pelety. Pufr P1, mimo jiné obsahuje EDTA, která se podílí na lýzi buněčných obalů a enzym RNasu, degradující RNA, která by mohla znečistit výsledek. Bylo přidáno 50 μ l pufru P2, tzv. lyzačního pufru, který dokončí lýzi buněk díky SDS v něm obsaženém. Směs se důkladně protřepala, průběh reakce je možno pozorovat zpěněním obsahu zkumavek. Posledním přidaným pufrem byl pufr P3, tzv. neutralizační, upravující pH směsi. Po jeho přidání bylo možno pozorovat vytvoření bílé sraženiny. Směs byla stočena při 13 000 rpm po dobu 5 min. Důležitý pro nás byl supernatant obsahující plasmidovou DNA. Supernatant byl slit do předem připravených mikrozukumavek Eppendorf s 350 μ l 100 % ethanolu (přidáním vzorku se zředil na cca 70%). Plasmidová DNA byla vysrážena za vzniku bílé sraženiny a opět centrifugována při 13 000 rpm po dobu 7 min. Supernatant byl vylit a usazená DNA rozmíchána v 20 μ l TE pufru. Tímto posledním krokem byl vzorek zakoncentrován pro další použití. Vzorky v TE pufru je možno uchovávat při 4 °C.

4.4.2. Velká purifikace plasmidu

Namnožení *E. coli* s plasmidem

Buňky s obsahem plasmidu se začleněnou kódovou sekvencí byly nejprve namnoženy ve 2 ml LB média s obsahem 2 μ l roztoku ampicilinu. Inkubace proběhla ve sterilní skleněné zkumavce umístěné do třepacího inkubátoru nastaveného na 37 °C, 180 rpm, na dobu 3 hod. Poté se 1 ml přelil do sterilní Erlenmayerovy baňky obsahující 40 ml LB média s 40 μ l roztoku ampicilinu. Baňky byly uloženy do inkubátoru, předem vyhřátého na 37 °C a míchány za 180 rpm. Inkubace probíhala celou noc.

Druhý den ráno byl obsah přelit do centrifugační zkumavky Beckman a centrifugován při 4000 rpm, 4 °C po dobu 10 min. Supernatant byl vylit, pelety obsahující plasmidovou DNA je možno uchovávat při -20 °C.

Velká purifikace plasmidu

(provedena pomocí sady Quiagen Plasmid Purification Kits)

Peleta byla v kyvetě rozpuštěna ve 4 ml pufru P1 obsahujícího RNasu, protřepána a poté byly přidány 4 ml pufru P2, pomocí vortexu byl zpěněn obsah kyvety. Po protřepání byla směs inkubována 5 min při laboratorní teplotě s otevřeným víčkem. Po 5 min byly přidány 4 ml vychlazeného pufru P3, suspenze se promíchala a inkubovala 15 min na ledu. V kyvetě je možno pozorovat vznik bílé sraženiny obsahující buněčné zbytky a genomovou DNA. Vzorek byl centrifugován při 4 °C, 4000 rpm po dobu 10 min. Supernatant byl dále přečištěn pomocí chromatografie na pryskyřičné koloně. Kolona byla nejprve kalibrována 3 ml pufru QBT, dle návodu výrobce. Supernatant byl nalit na kolonu přes filtrační papír, aby se zabránilo znečištění kolony peletou, která by se mohla uvolnit ze stěny kyvety. Došlo k ukotvení plasmidové DNA a dalších případných nečistot ke koloně. Poté byla kolona 2x promyta 10 ml pufru QC, který z kolony uvolnil nežádoucí molekuly, frakce byla jímána do odpadu. Plasmidová DNA byla uvolněna pomocí 5 ml pufru QF. Tato jediná frakce byla jímána do sterilní zkumavky Falcon s předem napipetovanými 4 ml isopropylalkoholu (IPA), který vysráží plasmidovou DNA. Vzorek byl odstředěn při 4 °C, 4500 rpm po dobu 10 min. Supernatant byl vylit a peleta rozpuštěna ve 3 ml 70 % ethanolu. Následovala opět centrifugace při 4 °C, 4500 rpm po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a k peletě bylo přidáno 100 μ l TE pufru, ve kterém je DNA možno uchovávat při 4 °C.

4.4.3. Příprava kompetentních buněk

Příprava je nutná při použití buněk z mrazáku, kdy je jejich většina v tzv. „spícím módu“, transformace s neaktivovanými buňkami by pak byla málo aktivní.

Buňky jsme nechali krátce inkubovat na ledu. Do zkumavky s 1 ml LB média bylo přidáno 50 (100) μ l buněk a inkubováno přes noc v třepacím inkubátoru při 37 °C, 180 rpm. Druhý den ráno byla změřena absorbance při 595 nm oproti LB médiu. Absorbance by měla dosáhnout 0,4-0,6.

Z kultury bylo odebráno 100 μ l buněk (zbylý 1 ml je možno uschovat v lednici až 1 měsíc) a umístěno do 2 ml LB média a inkubováno 2-4hod při 37 °C a 180 rpm. Pravidelně po cca 30 min byla měřena absorbance při 595 nm oproti LB médiu, která by měla dosáhnout 0,4-0,6.

Z kultury byl odebrán 1 ml (zbylý 1 ml můžeme uschovat do lednice pro použití na max. 1-2 týdny), zchlazen na ledu a stočen při 13 000 rpm po dobu 10 s. Supernatant byl vylit a do zkumavky byl přidán 1 ml ledově vychlazeného sterilního 0,1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, směs byla vortexována a dána inkubovat 30 min na led. Poté byla směs opět stočena při 13 000 rpm po dobu 10 s, supernatant vylit a k peletě bylo přidáno 500 μ l ledově vychlazeného sterilního 0,1 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Peleta byla resuspendována poklepáním v ruce a zchlazena na ledu. Tím byla kultura hotová k dalšímu použití.

4.4.4. Gelová elektroforéza na agarózovém gelu

Příprava gelu

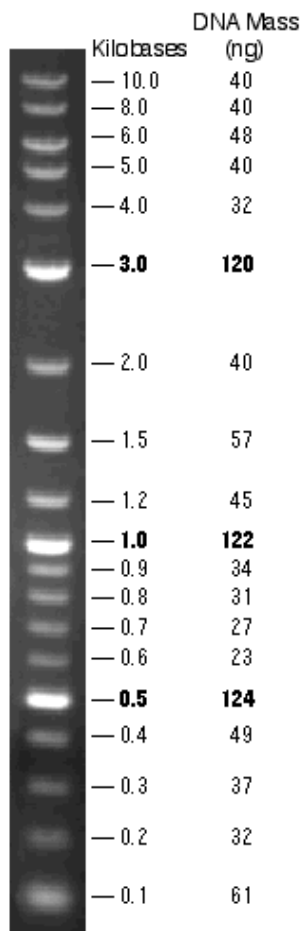
Pro metody molekulární biologie jsou nejpoužívanější 0,8 %, 1 % nebo 1,5 % gely. O vhodnosti koncentrace použitého gelu rozhoduje využití gelu. Při detekci menších fragmentů je vhodnější hustší gel, kterým malé molekuly neprojdou příliš rychle. Naopak při detekci velkých molekul by více koncentrovaný gel mohl příliš brzdit průběh elektroforézy.

Při přípravě gelu bylo Ehrlenmayerovy baňky naváženo 1,04 g (1,3 g, příp. 1,95 g) práškové agarózy, poté bylo přidáno 130 ml elektroforetického pufru TBE a 15 ml destilované vody, která slouží jako rezerva pro odpaření. Za občasného promíchání byla směs přivedena k varu v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění agarózy. Po mírném ochladnutí bylo do gelu přidáno 13 μ l ethidiumbromidu, fluorescenčního barviva pro vizualizaci výsledků. Takto připravený viskózní roztok se pořádně zamíchal a nalil do připravené formy s hřebínky ke ztuhnutí. Případně vzniklé bubliny byly odstraněny špičkou do rohu vzdálenějšího od hřebínku.

Gelová elektroforéza

Po ztuhnutí byl gel umístěn do elektroforetické vany, tak aby žlábký pro vzorek byly blíže ke katodě. Nukleové kyseliny nesoucí záporný náboj jsou totiž proudem unášeny od záporně nabitých elektrod směrem ke kladným. Gel byl následně zalit TBE pufrům tak, aby byl celý ponořen.

Vzorky byly smíchány s nanášecím pufrům (bromfenolová modř), který způsobí klesnutí vzorku na dno jamky a zároveň nám umožní sledovat průběh elektroforézy. Barvivo prochází gelem rychleji než vzorek, který nevidíme. Jakmile tedy barvivo dosáhne konce gelu je nutné proces ukončit, aby nám vzorky neunikly. Dle informací výrobce musí být nanášecí pufr ve výsledném roztoku 6x naředěn. Poměr pro smíchání vzorku s pufrům byl tedy 5:1. Do postranních jamek byl napipetován standard 2-log DNA ladder (Obr. 5.). Po ukončení nanášení vzorků byl uzavřen elektrický okruh připojením vany ke stabilizovanému zdroji napětí. Elektroforéza probíhala za podmínek konstantního proudu 100 mA po dobu 2 hod. Po ukončení byl gel přenesen na skenovací stanici.



Obr. 5. 2-log DNA ladder. (5, 2011)

Detekce

Výsledek byl pozorován na UV- transiluminátoru po ozáření UV světlem o vlnové délce 254 nm pomocí skenovací stanice Gel Doc.

4.4.5. PCR

Objednané primery byly nejprve naředěny dle návodu výrobce 10x. K 50 µl primeru bylo tedy přidáno 450 µl redestilované vody. Poté byl vytvořen reakční mix o objemu 500 µl o složení 10 µl forward primer, 10 µl reverse primer, 50 µl pufru, 10 µl dNTP, 10 µl naší DNA, 30 µl MgCl₂, 375 µl redestilované vody, 5 µl HotStarTag DNA Polymerasy (2,5 U). Reakční mix byl rozpipetován do osmi mikrozkušavek Eppendorf po 50 µl. Mikrozkušavky byly vloženy do termocykléru, kde se po aktivaci HotStarTagDNAPolymerasy (14 min při 95 °C) opakovaly 3 fáze po 1 min (95 °C, 65 °C-55 °C (8 teplot), 72 °C). Celkem do ukončení reakce proběhlo 35cyklů.

4.4.6. Inkubace vzorku s restriční endonukleasou

Do sterilní mikrozkušavky Eppendorf bylo napipetováno 5 µl DNA, 2 µl hovězího albuminu BSA (10x naředěný), 2 µl pufru pro BamH I, 10 µl redestilované vody a 1 µl BamH I. Reakční směs byla umístěna do inkubátoru zahřátého na teplotu 37 °C. Inkubace probíhala za občasného promíchání po dobu 1 hod. Reakce byla ukončena po hodině přenesením vzorků do nádoby s ledem. Snížení teploty ukončí aktivitu endonukleasy.

4.4.7. Ligace kódové sekvence s vektorem TOPO 2.1

Příprava Petriho misek

Na jednu misku je potřeba přibližně 30 ml živné půdy. Celkem bylo tedy připraveno 120 ml (2x zkumavky pro vzorky, 1x pozitivní kontrola, 1x negativní kontrola). Živné médium se skládá z cca 2,5 % agaru. Na 120 ml byly naváženy 3g agaru a doplněny 120 ml LB média. Agar se ve studeném LB médiu zcela nerozpouští, je nutné ho nejprve zahřát. Pro úplné rozpuštění a vysterilizování živné půdy, byl roztok autoklávován při 121 °C na 1hod. Po ukončení autoklávování musí roztok mírně zchladnout.

Roztok antibiotik, na které nese vektor TOPO 2.1 rezistenci byl připraven v kádince o složení 4,5 mg ampicilinu a 4,5 mg kanamycinu v 10 ml LB média. Po mírném ochladnutí živné půdy bylo odlito 30 ml do jedné z Petriho misek (pozitivní kontrola). Na této živné půdě tedy nejsou žádná antibiotika, buňky by zde měly růst bez ohledu na to zda vektor nesoucí

rezistenci přijali, či nikoliv. Tato kontrola nám ukazuje, že použité buňky jsou v pořádku a schopné růstu. Do zbytku živné půdy bylo přidáno 10 ml LB média s antibiotiky a po 30 min rozlito do zbylých Petriho misek. Je nutné nepřidávat antibiotika přímo do horkého roztoku z autoklávy. Vysoká teplota by totiž mohla porušit jejich strukturu a znehodnotit tak jejich funkci. Takto připravené Petriho misky pak můžeme uchovávat v igelitovém sáčku v lednici po dobu 14 dní.

Ligace s vektorem TOPO 2.1

Byla připravena ligační směs o složení 1 µl PCR produkt, 3 µl redestilované vody, 1 µl sůl, 1 µl TOPO 2.1. Směs se promíchala a inkubovala 30 min při laboratorní teplotě. Každých 5 min se lehce promíchala poklepáním prsty.

Transformace do kompetentních buněk E. coli

Po ukončení inkubace se do reakční směsi přidalo cca 50 µl bakterií Hb 101, které se po vyjmutí z freezeru (-80 °C) inkubovaly 30 min na ledu. Směs i s bakteriemi byla přenesena zpět na led, kde pokračovala v další 30 min inkubaci. Po ukončení následoval po dobu 30 s tzv. „heat shock“ na vodní lázni zahřáté na 42 °C, při kterém dochází rozevření pórů ve stěně buněk a přijmutí rekombinantního plasmidu. Přesně po 30 s byly buňky umístěny zpět na led na 5 min (zpětné zatažení pórů). Poté se ke směsi přidalo 250 µl SOC media a vše bylo uloženo do třepacího inkubátoru vyhřátého na 37 °C s nastavenými otáčkami na 100 rpm po dobu 60 min.

Po ukončení hodinové inkubace byly vzorky rovnoměrně rozprostřeny na připravené Petriho misky určené pro vzorky. Do zbylých dvou petriho misek pro pozitivní a negativní kontrolu byly umístěny prázdné buňky Hb 101 bez rekombinantního vektoru. Negativní kontrola, která obsahuje v živné půdě antibiotika, nám kontroluje jejich účinek na buňky. Při správném provedení by na této půdě neměly vyrůst, protože jedinci na tuto půdu umístění nenesou vektor pro rezistenci na ampicilin a kanamycin.

Petriho misky s buňkami se umístily do inkubátoru s teplotou 37 °C a hodinu inkubovaly dnem dolů, aby se bakterie lépe uchytily na půdu. Po hodině byly otočeny dnem vzhůru a inkubace pokračovala přes noc.

4.4.8. Restrikce kódové sekvence ve vektoru TOPO 2.1 pomocí restrikčních endonukleas

Pro restrikci byly vybrány restrikční endonukleasy BamH I a Hind III.

V mikrozkuhavce Eppendorf byla paralelně pro každou zvlášť připravena reakční směs.

Reakční směs pro BamH I: 5 µl DNA, 2 µl BSA (10x naředěný), 2 µl pufru pro BamH I, 10 µl redestilované vody, 1 µl BamH I.

Reakční směs pro Hind III: 5 µl DNA, 2 µl pufru pro Hind III, 12 µl redestilované vody, 1 µl Hind III.

Reakční směsi se inkubovaly 1 hod při 37 °C, po hodině byly pro ukončení aktivity enzymu přeneseny na led.

4.4.9. Natrávení vektoru TOPO 2.1 s kódovou sekvencí pomocí restričních endonukleas

Do mikrozkušavky Eppendorf byla připravena reakční směs: 2 µl pufru pro restriční endonukleasy č. 2, 2 µl hovězího albuminu BSA (10x naředěný), 1 µl Nde I, 1 µl Xho I, 2 µl TOPO 2.1 s kódovou sekvencí, 12 µl redestilované vody. Restrikce proběhla za inkubace v termomixéru při teplotě 37 °C po dobu 60 min. Na termomixéru byl nastaven program, který pravidelně po 10min spustil krátké promíchání 500 rpm.

4.4.10. Otevření vektoru pET-15b pomocí restričních endonukleas

Před vložením naší sekvence do vektoru si musíme vektor nejprve otevřít pomocí restričních endonukleas, jejichž restriční místa ohraničují naši sekvenci. Dosáhneme tím vytvoření stejných komplementárních lepivých konců na vektoru i na vkládané DNA, což nám usnadní následující ligaci.

Do mikrozkušavky Eppendorf byla připravena směs: 12 µl pufru pro restriční endonukleasy č. 2, 2 µl BSA (10x naředěný), 1 µl Nde I, 1 µl Xho I a 4 µl pET-15b. Vzniklá směs se mírně protřepala a inkubovala v termomixéru při 37 °C po dobu 60 min. Po ukončení inkubace je nutno přidat enzym fosfatasy, která znemožní opětovné spojení rozstříhnutých konců tím, že odstraní fosfátové skupiny z konců a sníží tak jejich vzájemnou reaktivitu: do směsi byly přidány 2 µl SAP fosfatasy, 6 µl SAP pufru a 32 µl redest. vody. Proběhla další inkubace při 37 °C po dobu 15 min.

4.4.11. Přečištění natráveného vektoru TOPO 2.1 a otevřeného vektoru pET-15b

Pro odstranění enzymů a jiných nečistot ze vzorků bylo provedeno přečištění pomocí reakčního kitu z firmy Quiagen dle speciálního návodu QUIAEX II protokol. Tento kit bývá používán pro přečištění a zakoncentrování fragmentů DNA o délce od 40 – 50 Kb z vodných roztoků bez použití fenolové extrakce nebo ethanolového srážení. Enzymy typu polymeras, restričních endonukleas a fosfatasy jsou však touto metodou poměrně dobře odstraněny.

K objemu mikrozkušavky bylo přidáno trojnásobné množství pufru QX1. Barva

roztoku by se měla změnit na žlutou, což nám indikuje správné pH. Pokud však barva roztoku namísto žluté je oranžová nebo mírně fialová, je nutno přidat 10 μ l 3 M acetátu sodného o pH 5 a promíchat. Bylo přidáno 16 μ l, předem resuspendovaného QUIAEX II (10 μ l pufru je nutné na 5 μ g DNA) a proběhla inkubace při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Směs je nutné každé 2 min promíchat vortexováním. Po inkubaci došlo k odstředění při 13 000 rpm po dobu 30 s a odstranění nepotřebného supernatantu. Peleta byla 2x promyta 500 μ l pufru PE (promývací pufr, součást kitu). K vyschlé promyté peletě bylo poté přidáno 20 μ l 10 mM Tris-Cl (pH 8,5), směs se promíchala na vortexu a při laboratorní teplotě inkubovala 5 min. Následovala centrifugace (30 s, 13 000 rpm), důležitý byl tentokrát supernatant, obsahující vektor, který byl odebrán do sterilní mikrozkušavky Eppendorf. Celý proces přidání 20 μ l 10mM Tris-Cl (pH 8,5) a odstředění byl ještě jednou zopakován, pro větší výtěžek reakce, a supernatanty spojeny.

4.4.12. Subklonace kódové sekvence z rozštěpeného vektoru TOPO 2.1 do otevřeného vektoru pET-15b

Příprava Petriho misek

Na jednu misku je potřeba přibližně 30 ml živné půdy. Celkem bylo tedy připraveno 120 ml (2x zkumavky pro vzorky, 1x pozitivní kontrola, 1x negativní kontrola). Byly naváženy 3 g agaru a doplněny 120 ml LB média. Roztok byl autoklávován 60 min při 121 °C. Po ukončení autoklávování a mírném vychladnutí (zhruba 50 °C) byla vytvořena miska pro pozitivní kontrolu a zbytek živné půdy byl smíchán s roztokem antibiotik v LB médiu (6 mg ampicilinu v 10 ml LB média). Viskózní roztok byl vylit do zbývajících tří Petriho misek. Takto připravené petriho misky je možno uchovávat v igelitovém sáčku při 4 °C po dobu 14 dní.

Subklonace do vektoru pET-15b

Do dvou mikrozkušavek Eppendorf byla napipetována reakční směs složená z příslušného množství vektoru pET-15b a natráveného vektoru TOPO 2.1. Množství bylo vypočítáno dle koncentrací jednotlivých vzorků pomocí vzorce:

$$m = m_v \times \text{velikost sekvence/velikost vektoru}$$

$$m \times 3 = y$$

kde: m – hmotnost sekvence (ng)

m_v – hmotnost vektoru (ng)

y – množství sekvence potřebné pro vložení do ligační směsi (ng)

velikost sekvence/vektoru (Kb)

Reakční směs by měla mít 10 μ l. Krom vektorů obsahuje dále 2 μ l master mixu (směs 5,5 μ l T4- DNA ligasy + 5,5 μ l pufru pro ligasu) a zbylý objem je doplněn redestilovanou vodou.

Nejprve byly do mikrozkušavky pipetovány vypočtená množství vektoru pET-15b, natráveného vektoru TOPO 2.1 a redestilované vody. Proběhla inkubace při 65 °C po dobu 3 min a poté 5 min na ledu. Po ukončení inkubací byl přidán master mix a následovala další inkubace nejméně 2 hod při laboratorní teplotě, každých 30 min byla směs lehce promíchána poklepáním prstem. Nakonec byla směs umístěna na 2min do termomixéru 65°C, poté 3min na led.

Transformace do Hb 101 kompetentních buněk E. coli

Do každé mikrozkušavky Eppendorf bylo pipetováno 100 μ l kompetentních buněk Hb 101 a ponecháno krátce (30 min) inkubovat na ledu. Mikrozkušavky byly poté vloženy do lázně o teplotě 42 °C na 90 s a přemístěny zpět na led po dobu 5 min. Poté bylo pipetováno 500 μ l LB média a mikrozkušavky byly umístěny do inkubátoru nastaveného na 37 °C, 110 rpm po dobu 1 hod. Po ukončení hodinové inkubace byly vzorky rovnoměrně rozprostřeny na připravené Petriho misky určené pro vzorky. Do zbylých dvou petriho misek pro pozitivní a negativní kontrolu byly umístěny prázdné buňky Hb 101 bez rekombinantního vektoru.

Petriho misky s buňkami se umístily do inkubátoru s teplotou 37 °C a hodinu inkubovaly dnem dolů, aby se bakterie lépe uchytily na půdu. Po hodině byly otočeny dnem vzhůru a inkubace pokračovala přes noc.

4.4.13. Transformace a namnožení rekombinantního pET-15b:

Ke 100 μ l kompetentních buněk Hb 101 byl přidán 1 μ l pET-15b. Proběhla 30 min inkubace na ledu a následoval tzv. „heat shock“ na vodní lázni o teplotě 42 °C na 90 s. Pro opětovné uzavření pórů buněčným membrán byla směs v mikrozkušavce Eppendorf umístěna opět na led na dobu 5 min. V předposledním kroku bylo pipetováno 500 μ l LB média a bakterie se ponechaly množit v inkubátoru při 37 °C při 110 rpm po dobu 1 hod. Po hodině

byla směs vylita do Ehrlenmeyerových baněk s 50 ml LB média a 50 µl roztoku ampicilinu a inkubována přes noc při 37 °C, 180 rpm.

4.4.14. Exprese proteinu

Transormace rekombinantního vektoru pET-15b do kompetentních buněk BL-21

Ke 100 µl buněk BL-21 byl přidán v mikrozkuhavce Eppendorf 1 µl vektoru s kódovou sekvencí. Směs se inkubovala 30 min na ledu. Následoval tzv. „heat shock“ ve vodní lázni zahřáté na 42 °C po dobu 45 s. Poté byly mikrozkuhavky přeneseny na 2 min na led. Nakonec bylo přidáno 400 µl LB média a inkubováno v třepacím inkubátoru 60 min při 37 °C, 250 rpm. Po hodině byla směs přelita do zkuhavky se 2 ml LB média s 2 µl roztoku ampicilinu a inkubována přes noc při 37 °C, 180 rpm. Druhý den ráno bylo z nainkubovaných buněk odebráno 0,5 ml a dáno do 20 ml LB média s amplicilinem. Spektrofotometrem byla změřena optická hustota při 600 nm a směs byla dále inkubována při 37 °C, 200 rpm. Vždy v půlhodinových intervalech byla inkubace přerušena a změřena optická hustota oproti čistému LB médiu. Inkubace byla zastavena poté, co dosáhla hustota hodnoty 0,5. Po ukončení inkubace bylo z kultury odebráno 150 µl, centrifugováno při 14 500 rpm po dobu 5 min, supernatant byl vylit a peleta uschována při -20 °C. Tento vzorek byl dále použit pro SDS PAGE jako vzorek pelety před indukci.

Indukce

Ke zbytku kultury bylo přidáno 20 µl 1 M IPTG a inkubováno v třepacím inkubátoru při 37 °C, 150 rpm po dobu 3 hod. Opět následovalo odebrání 150 µl vzorku, centrifugace a uschování při -20 °C (peleta po indukci). Zbývající kultura byla přenesena na led na 10 min, poté centrifugována ve Falconce zkuhavce při 5 000 rpm po dobu 15 min. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována ve 30 ml Äkta pufu.

Sonikace

Pro uvolnění proteinu vytvořeného v předchozím testu exprese musíme nejprve rozbít bakteriální buňky, které ho syntetizovaly. K rozrušení struktury buněk jsme použili sonikaci, která rozbije buněčné obaly, ale zároveň nepoškodí náš produkt.

Ultrazvuk byl nastaven na 70 % svého výkonu, sonikace byla prováděna v 30ti sekundových intervalech za současného chlazení ledem. Celý proces byl několikrát zopakován. Po rozbití buněk následovala ultracentrifugace při 110 000 rpm, 4 °C po dobu

70 min. Supernatant a peleta byli odděleni a uschováni pro SDS PAGE.

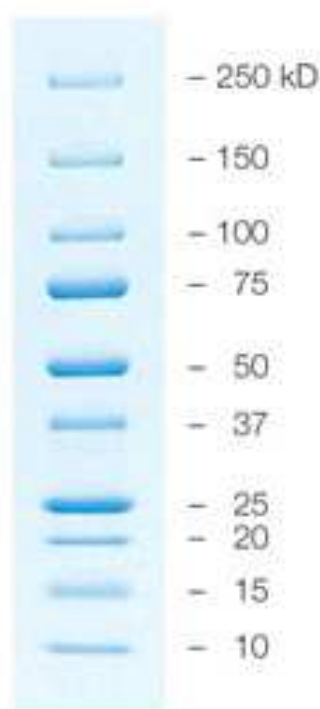
4.4.15. SDS PAGE

Příprava gelu

Pro přípravu separačního gelu bylo v kádince smícháno: 2,5 ml redestilované vody, 2,0 ml 30 % roztoku AA, 1,5 ml pufru 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 60 μ l 10% SDS a pro iniciaci polymerace bylo na závěr přidáno 30 μ l 10% APS, 3 μ l TEMED.

Pro přípravu zaostřovacího gelu bylo v kádince smícháno: 2,32 ml redestilované vody, 0,5 ml 30% roztoku AA, 938 μ l pufru 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 38 μ l 10 % SDS a pro iniciaci polymerace 20 μ l 10% APS, 4 μ l TEMED.

Separací gel byl napipetován mezi elektroforetická skla umístěná do nádoby přístroje, do cca $\frac{3}{4}$ jejich výšky. Roztok byl opatrně převrstven nasyceným isobutanolem a ponechán polymerovat alespoň 45min. Po ztvrdnutí spodního gelu byl isobutanol vylit a z prostoru mezi skly vypláchnut destilovanou vodou a vysušen filtračním papírem. Poté byl namíchán roztok pro zaostřovací gel a napipetován na separační gel až k hornímu okraji skel. Do zaostřovacího gelu byl opatrně zasunut hřebínek až po drážky a gel se ponechal ztuhnout (alespoň 1,5hod).



Obr. 6. Precision plus protein standards all blue. (6, 2011)

Elektroforéza

Elektroforetická skla s gelem byly umístěny do stojánku elektroforetické cely a spolu s ním přemístěny do vany. Do horního elektrodového prostoru se nalil do $\frac{3}{4}$ naředěný elektrodový pufr. Vzorky se smíchaly se vzorkovým puffrem s obsahem 2-merkptoethanolu (50 μ l/ml) v poměru 2:1 a na 3 min umístily do termobloku předehřátého na 95 °C. Poté byly připraveny k nanášení. Jako marker byl použit Precision plus protein standards all blue od firmy Bio-rad (Obr. 6.), který už byl přímo naředěn a rozpipetován ve zkumavkách Eppendorf po 5 μ l (množství použité na 1 gel).

Po nanesení vzorků a standardu byla elektroforetická vana přenesena do nádoby s ledem a připojena ke zdroji napětí. Prvních několik min bylo nastaveno napětí na 60-80 V (průchod vzorků zaostřovacím gelem a seřazení se na rozhraní). Po seřazení vzorků bylo napětí zvednuto na 100-120 V. Elektroforéza probíhala cca 1 hod.

Barvení

Gel byl uvolněn z přístroje a umístěn do umělohmotné krabičky s obsahem 0,25 % Comassie blue v 10 % kyselině octové. Barvení probíhalo 20 min při teplotě 50 °C v sušárně. Pro následné odbarvení byla použita 10 % kys. octová. Nejprve se gel pouze propláchl kyselinou a poté se do jejího roztoku ponořil na cca 30 min. Po 30 min se vždy vyměnila zabarvená kyselina octová za čistou. Proces odbarvení se opakoval dle potřeby 2-3x. Nakonec se vyměnila kyselina za čistou a gel se ponechal se na kývačce odbarvovat přes noc.

Detekce

Pro detekci byl gel přesunut na skenovací stanici Gel Doc UV transiluminátoru.

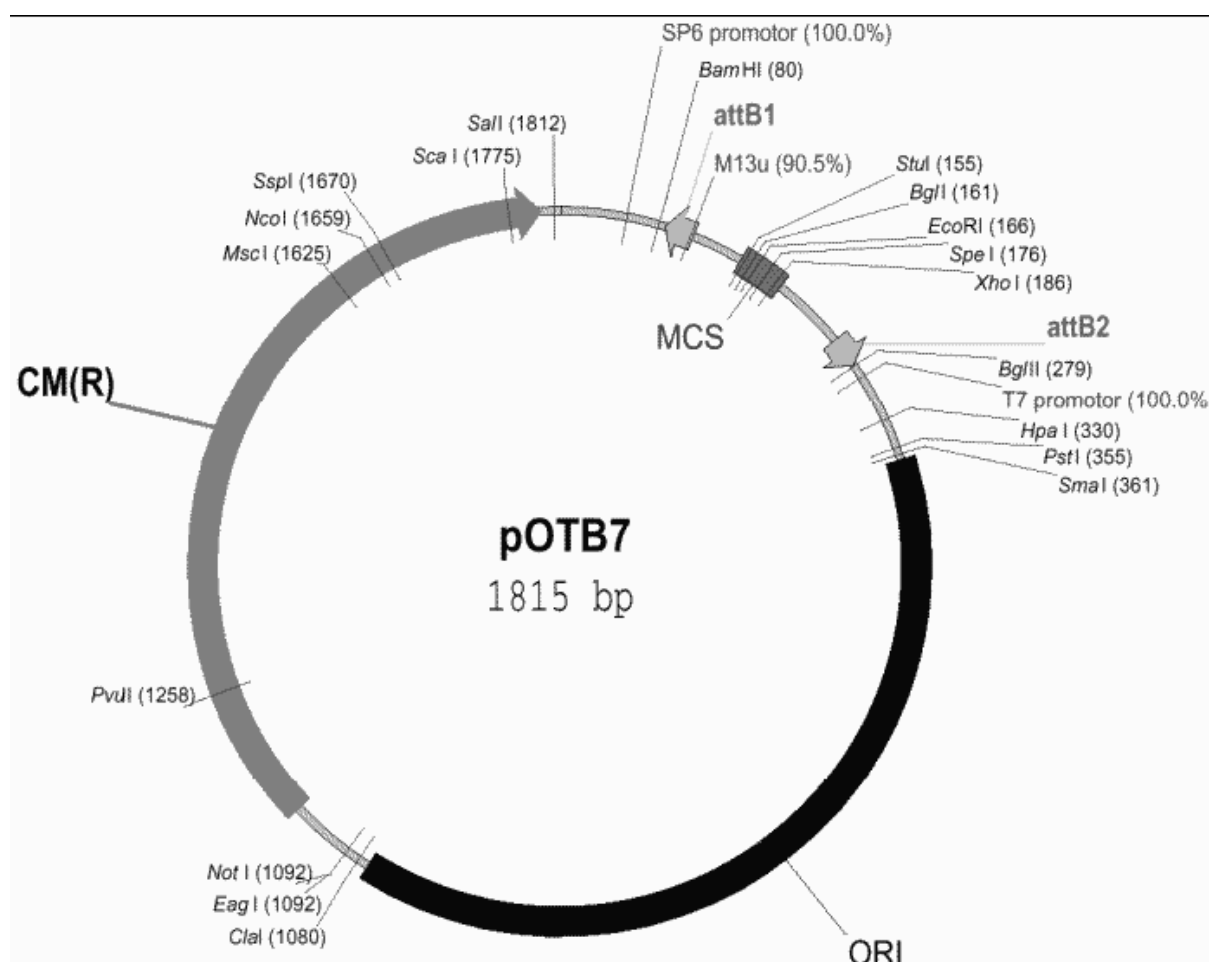
4.4.16. Natrávení lysozymem a sonikace

Peleta po ultracentrifugaci z předchozího pokusu byla rozpuštěna v 15 g lysozymu a 15 ml Äkta pufru (dle rady výrobce byl 1mg lysozymu/1ml pufru). Směs se inkubovala 30 min při laboratorní teplotě v termomixéru při 180 rpm. Poté byla přenesena na led a provedena sonikace.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Příprava lidské AKR1C2

Vlastní práce byla uskutečněna na enzymu z rodiny aldoketoreduktas AKR1C2, jehož nukleotidová sekvence byla předem známa. Sekvence, o přesné velikosti 971 bazí, byla spolu s primery objednána z firmy Imagenes pod kódem BC063574 a dodána ve vektoru pOTB7 (Obr. 7) v bakteriích *E. coli*.



Obr. 7. Vektor pOTB7. (2, 2011)

Nejprve bylo nezbytné zmnožit daný vektor s kódovou sekvencí metodou PCR. Proto byly spolu se sekvencí objednány také námi navržené primery pro polymerázovou řetězovou reakci.

Návrh primerů

Optimální délka primerů 20-30 bazí, pro lepší uchycení k matrici. Pro další práci s kódovou sekvencí je v primerech navrženo rozpoznávací místo pro restriční endonukleasu,

pomocí které budeme následně připravovat rekombinantní vektor. Hlavním expresním vektorem práce byl pET-15b, obsahující restrikční místo pro endonukleasy BamH I, Nde I a Xho I. Z důvodu současného štěpení naší sekvence nebylo možno BamH I použít.

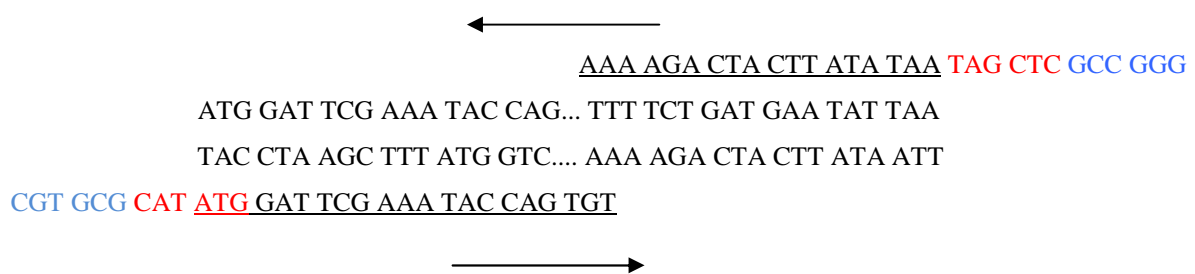
Restrikční místa pro Nde I: CAT ATG
GTA TAC

Restrikční místa pro Xho I: CTC GAT
GAG CTA

sekvence AKR1C2

ATG GAT TCG AAA TAC CAG..... TTT TCT GAT GAA TAT TAA
TAC CTA AGC TTT ATG GTC..... AAA AGA CTA CTT ATA ATT
počátek konec

Obr. 8. schéma sekvence AKR1C2



Obr. 9. Návrh primerů. Černě vyznačena sekvence komplementární se sekvencí AKR1C2, červeně vyznačena restrikční místa pro Nde I a BamH I. Modře znázorněno místo k navázání restrikční endonukleasy.

CGT GCG CAT ATG GAT TCG AAA TAC CAG TGT

začátek Nde I komplementární sekvence

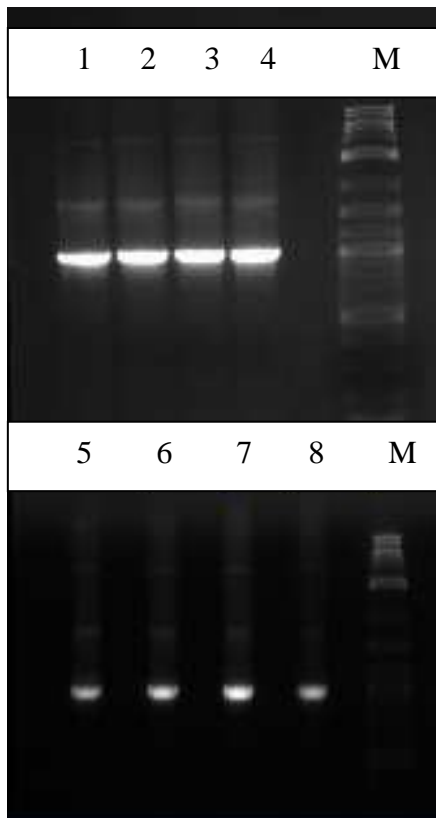
GGG CCG CTC GAT TTA ATA TTC ATC AGA AAA

začátek Xho I komplementární sekvence

Obr. 10. Ukázka návrhu forward a reverse primeru

Zakoupená sekvence byla nejprve v buňkách namnožena inkubací 1 ml LB media bez antibiotik se vzorkem *E. coli* obsahující sekvenci při 30 °C, 180 rpm po dobu 2,5 hod. Poté následovala inkubace v 50 ml LB media s 50 µl ampicilin (50 µg/ml) s 1 ml vzorku z předešlé inkubace při 37°C, 180 rpm, přes noc. Po inkubaci byla kultura stočena při 4 °C, 4000 rpm po dobu 10 min. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a z pelety izolovány plasmidy metodou velké purifikace (viz 6.4.2.)

Pro namnožení kódové sekvence byla použita metoda PCR (viz 6.4.5.) Celkem bylo připraveno osm vzorků. Program pro PCR byl nastaven tak, že každý vzorek měl jinou teplotu ve fázi připojení primerů. Teploty annealingu se pohybovaly v rozmezí 55 °C-65 °C. Pro kontrolu správnosti PCR byla použita gelová elektroforéza na 1 % agarózovém gelu (viz 6.4.4.), která nám potvrdila velikost 971 bází (Obr. 11.). Ukázalo se, že teplotní rozdíl při annealingu nemá příliš velký význam. Pro další práci byly vybrány vzorky č. 1 a 2.



Obr. 11. Agarózový gel s nanesenými vzorky (1-8)

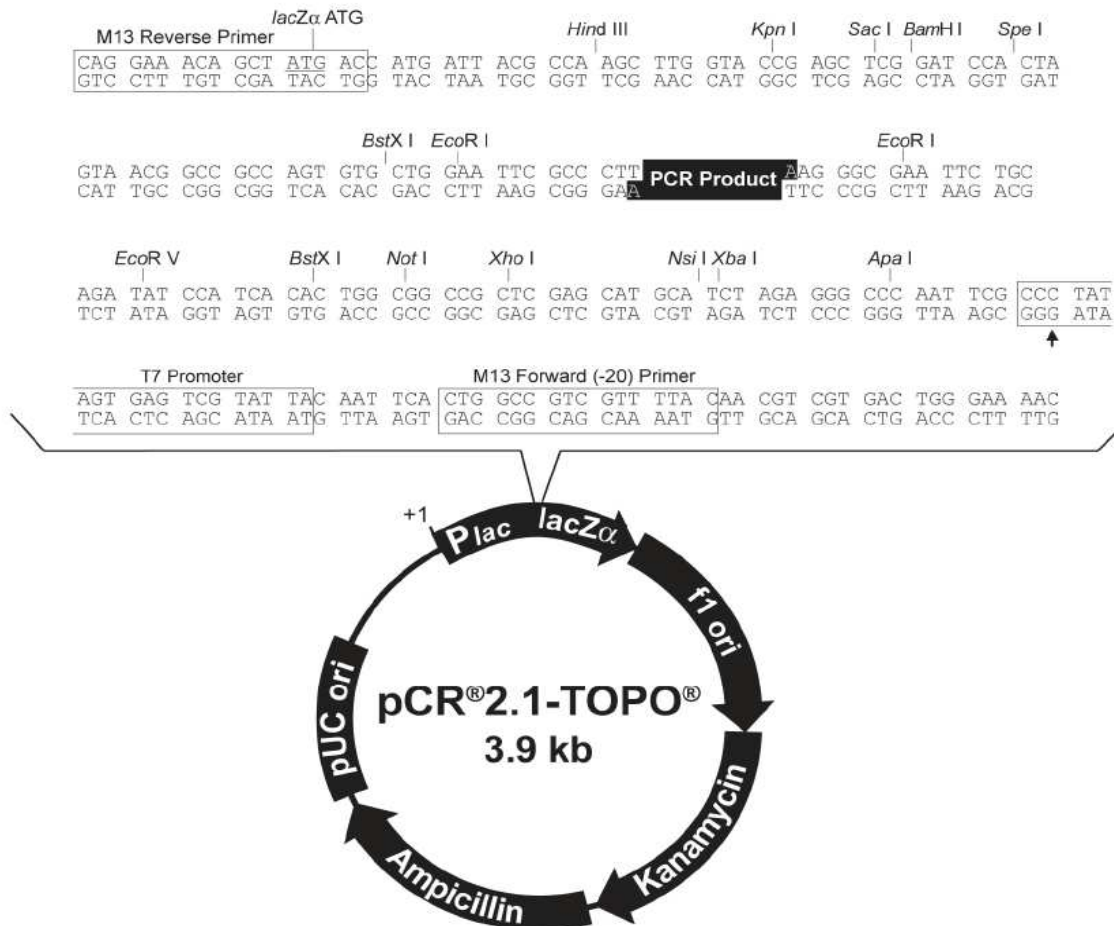
Vzorky č. 1 a 2 byly dále inkubovány s restriční endonukleázou BamH I (viz 6.4.6.) pro ověření kódové sekvence a naneseny na 1,5 % agarózový gel (viz 6.4.4.). Pozice fragmentů na gelu nám potvrdila velikost 658 bazí a 313 bazí (Obr. 12.), které odpovídají fragmentům po štěpení BamH I.



Obr. 12. Agarózový gel s nanesenými vzorky 1 a 2 po inkubaci s BamH I

5.2. Ligace s TOPO 2.1

Pro snazší přenos kódové sekvence do konečného vektoru byl zvolen mezikrok, ve kterém nejprve vytvoříme rekombinantní molekulu vektoru TOPO 2.1 (Obr. 13.). Vektor TOPO 2.1 umožňuje jednodušší ligaci s naší kódovou sekvencí.



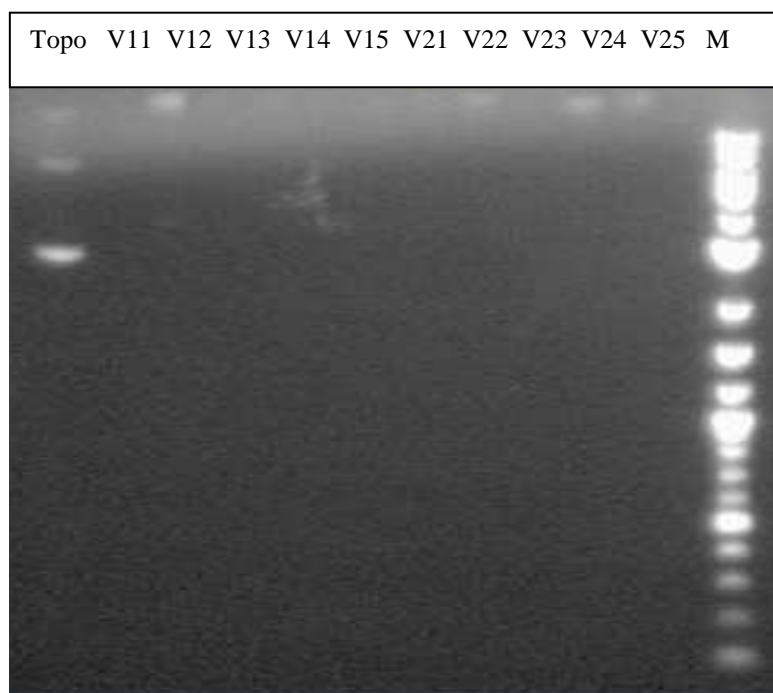
Comments for pCR®2.1-TOPO® 3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547
M13 reverse priming site: bases 205-221
Multiple cloning site: bases 234-357
T7 promoter/priming site: bases 364-383
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
f1 origin: bases 548-985
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
pUC origin: bases 3136-3809

Obr. 13. Vektor TOPO 2.1 (3, 2011)

Ligace (viz 6.4.7.) byla provedena zvlášť pro oba vzorky vybrané z PCR. Po noční inkubaci bylo možno na obou Petriho miskách pozorovat narostlé kolonie buněk. U některých se už dokonce vyskytovaly i nežádoucí satelitní kolonie. Obě kontroly vyšly dle očekávání. Sterilní špičkou pipety bylo z Petriho misky č. 1 (obsahující PCR produkt č.1) odebráno pět kolonií, které byly samostatně umístěny do pěti zkumavek (vzorky V11, V12, V13, V14, V15) pro namnožení buněk *E. coli* (viz 6.4.1.). Z Petriho misky č. 2 (obsahující PCR produkt č. 2) bylo odebráno také pět kolonií (vzorky V21, V22, V23, V24, V25). Inkubace probíhala 3 hod. Po 3 hod byl patrný zákal u všech zkumavek. Vzorky byly poté přečištěny pomocí malé purifikace (viz 6.4.1.) a naneseny na 0,8 % agarózový gel (viz 6.4.4.) spolu s prázdným vektorem TOPO 2.1 (Obr. 14.).

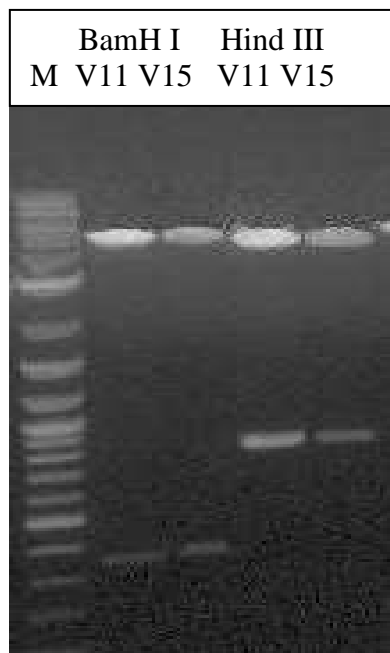
Výsledek byl velmi špatně viditelný, pozice jednotlivých vzorků na gelu neodpovídala předpokládané velikosti. V hledané pozici se nacházely slabé značky u zkumavek číslo V11 a V15, ostatní z neznámého důvodu zůstaly na startu. Další práce pokračovala právě s těmito vzorky.



Obr. 14 Agarózový gel se vzorky po ligaci s TOPO 2.1 a malé purifikaci (V11-V25).

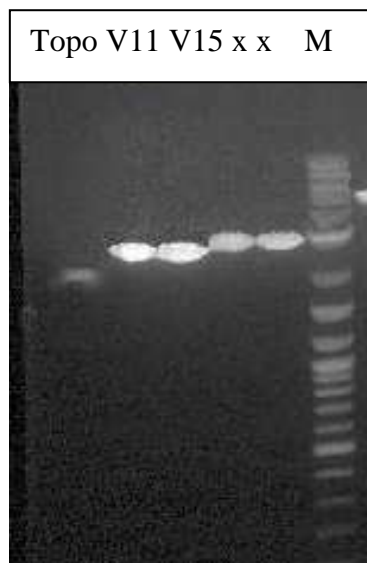
Správnost sekvence byla ověřena inkubací vzorků s restrikčními endonukleasami BamH I a Hind III (viz 6.4.8.) a výsledek nanesen na 1 % agarózový gel (viz 6.4.4.). Očekávané fragmenty pro BamH I byly 694 a 4177 bází nebo při opačném zapojení sekvence do vektoru 349 a 4522 bází. Fragmenty pro štěpení pomocí Hind III pak byly 304 a 4567 bází nebo 775 a 4096 bází. Výsledek na gelu (Obr. 15.) ukázal, že fragmenty po restrikci s BamH I

se nachází v oblasti mezi 0,3-0,4kb, což by odpovídalo předpokládaným fragmentům. Taktéž fragmenty pro restrikci s Hind III, se nachází v oblasti, která odpovídá velikosti fragmentů po štěpení Hind III.



Obr. 15. Agarózový gel se vzorky V11 a V15 po štěpení restrikními endonukleázami BamH I a Hind III.

Vzorky byly dále přečištěny metodou velké purifikace (viz 6.4.2.) a naneseny na 1% agarózový gel (viz 6.4.4.) (Obr. 16.). Gelová elektroforéza jednoznačně prokázala, že ligace s TOPO 2.1 i purifikace proběhly v pořádku .



Obr. 16. Agarózový gel se vzorky V11 a V15 po velké purifikaci

Vzorkům byla změřena koncentrace: V11=1099, 8 ng/μl

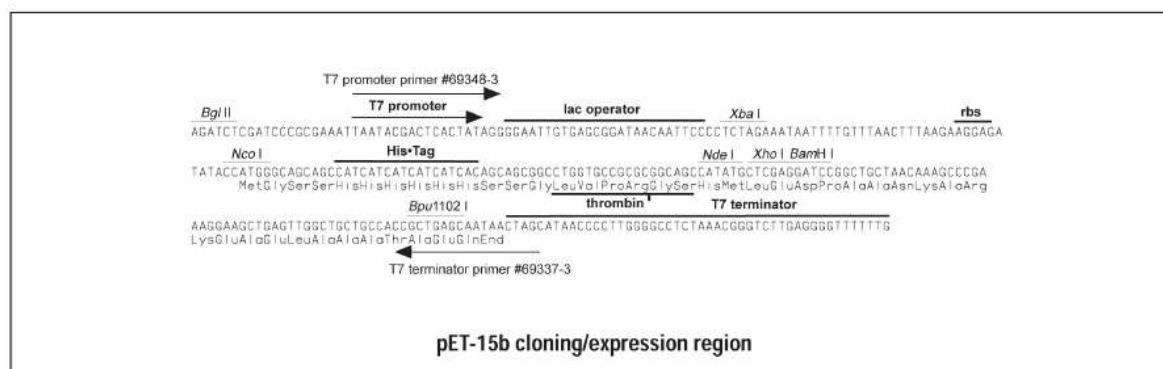
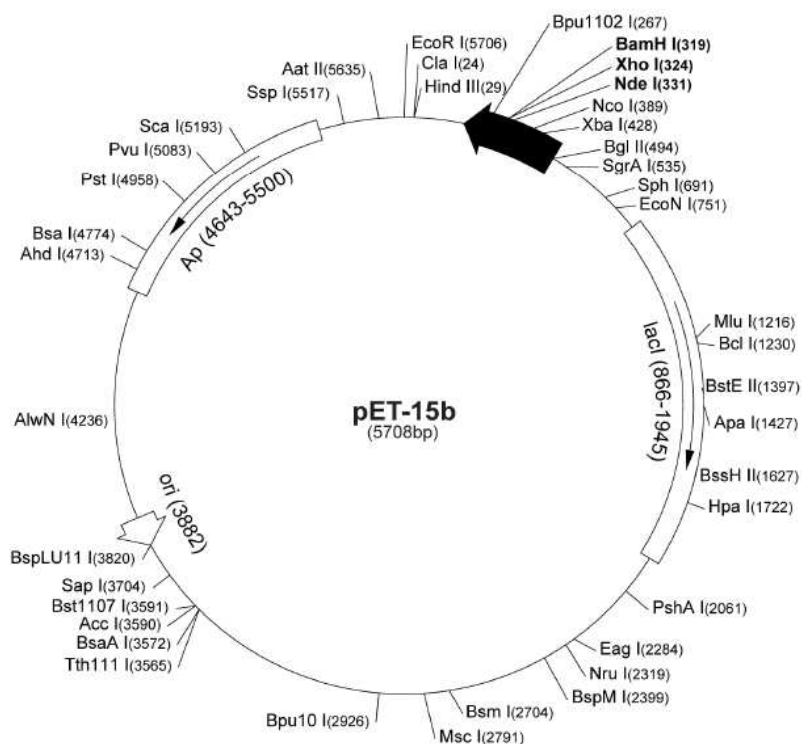
V15=1264, 7 ng/μl

Se vzorky V11 a V15 byla provedena sekvenace firmou Generi Biotech s.r.o. U obou vzorků byla potvrzena sekvenace.

5.3. Subklonace kódové sekvenace z vektoru TOPO do vektoru pET-15b

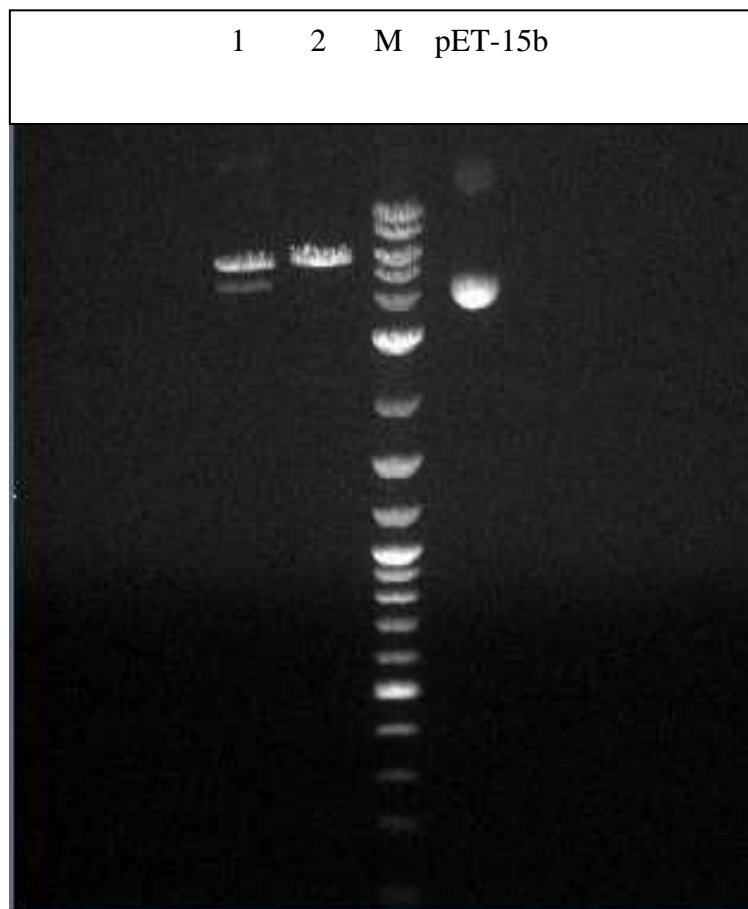
pET-15b sequence landmarks

T7 promoter	453-469
T7 transcription start	452
His [*] Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites (Nde I - BamH I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
bla coding sequence	4643-5500

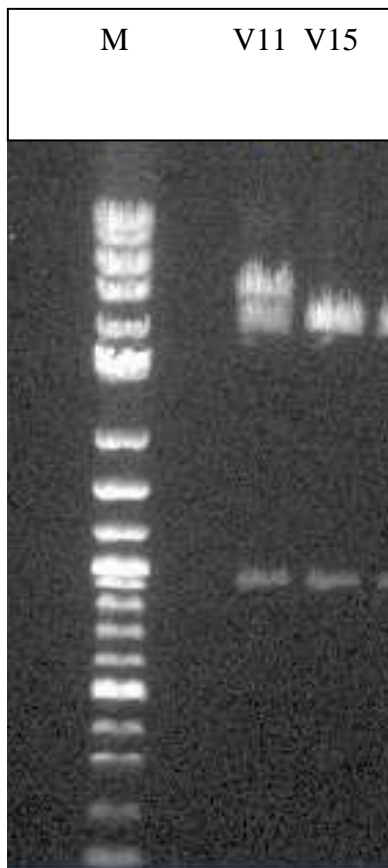


Obr. 17. vektor pET-15b. (4. 2011)

Vektor pET-15b (Obr. 17.) byl otevřen (viz 6.4.10.) a přečištěn dle návodu (6.4.11.), správné proběhnutí rozštěpení vektoru pET-15b jsme si ověřili gelovou elektroforézou (viz 6.4.4.) na 1 % agarózovém gelu (Obr. 18.) K ligaci byly použity oba vzorky kódové sekvence ve vektoru TOPO 2.1. Vektor TOPO 2.1 s kódovou sekvencí byl natráven (viz 6.4.9.) a přečištěn (viz 6.4.11.) , výsledek zkontrolován gelovou elektroforézou (viz 6.4.4.) na 1 % agarózovém gelu (Obr. 19.).



Obr. 18. Agarózový gel s naneseným otevřeným vektorem pET-15b (1, 2) a neroštěpeným vektorem pET-15b po přečištění



Obr. 19. Agarózový gel s nanesenými vzorky natrávené sekvence v TOPO 2.1 (V11, V15)

Pro výpočet ligační směsi byly vzorkům natráveného vektoru TOPO 2.1 s kódovou sekvencí a vzorkům po otevření vektoru pET-15b změřeny koncentrace:

pET-15b 1	→	51,13 ng/μl
pET-15b 2	→	36,36 ng/μl
V11	→	182,96 ng/μl
V15	→	113,96 ng/μl

Z důvodu rozdílných koncentrací našich vzorků, byly vzorky po natrávení naředěny pro snazší pipetování a počítání ligační směsi. Vzorky byly naředěny Tris-Cl pH 8,5 v poměru 1:9:

V11 – 1 μl vzorku do 9 μl Tris-Cl pH 8,5 → nová konc. – 18,2966 ng/ μl

V15 – 1 μl vzorku do 9 μl Tris-Cl pH 8,5 → nová konc. – 11,3966 ng/ μl

Výpočet ligační směsi

poměr 1(pET15b): 3 (sekvence)

$$m(\text{sekvence}) = m(\text{vektor}) \times \text{velikost sekvence} / \text{velikost vektoru}$$

$$m(\text{sekvence}) \times 3 = y \text{ ng (toto množství je potřeba vložit do ligační směsi)}$$

do ligační směsi je potřeba 50-100ng vektoru

$$\text{pET 15b č.1} = 51,1 \text{ ng} / \mu\text{l} \rightarrow 1,5 \mu\text{l} = 76,65 \text{ ng}$$

$$\text{pET 15b č.2} = 36,36 \text{ ng} / \mu\text{l} \rightarrow 2 \mu\text{l} = 72,72 \text{ ng}$$

V11 + pET-15b č. 1

$$m = 76,65 * 0,971 / 5,7 = 13,05 * 3 = 39,2 \text{ ng insertu}$$

$$18,2966 \dots 1 \mu\text{l}$$

$$39,2 \dots x \mu\text{l} = 2 \mu\text{l}$$

V15 + pET-15b č. 2

$$m = 72,72 * 0,971 / 5,7 = 12,38 * 3 = 37,2 \text{ ng}$$

$$11,3966 \dots 1 \mu\text{l}$$

$$37,2 \dots x \mu\text{l} = 3,2 \mu\text{l}$$

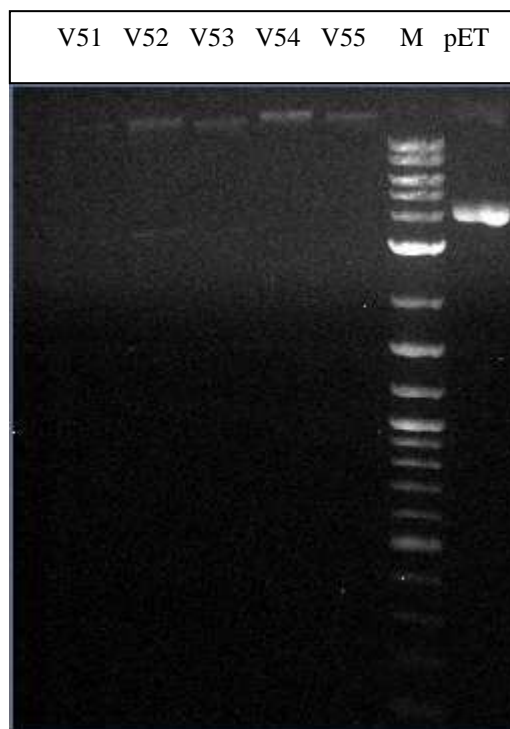
Tab. 1. Složení ligační směsi

	DNA (μl)	pET-15b (μl)	voda (μl)	Master mix (μl)
V11	2	1,5	4,5	2
V15	3,2	2	2,8	2
Pozitivní kontrola	0	1	7	2

Byla provedena ligace (viz 6.4.12.). Druhý den ráno byly na obou Petriho miskách pozorovatelné kolonie, obě kontroly vyšly dle očekávání. Větší kolonie byly na Petriho misce obsahující kódovou sekvenci V15, dále se proto pokračovalo se vzorky z této misky. Sterilní špičkou bylo odebráno pět kolonií (popsaných V51, V52, V53, V54, V55) a provedla se malá

purifikace (6.4.1.) s nanesením výsledků na 1 % agarózový gel (viz 6.4.4.) (Obr. 20).

Proces ligace se nezdařil, vzorky ukazovaly velikost vyšší než by měly. K otevření pET-15b byla použita starší fosfatasa, je tedy možné, že se nezdařilo odtržení fosfátové skupiny a namísto ligace vektoru s naší sekvencí došlo k ligaci 2 vektorů k sobě navzájem. Toto vysvětlení podporuje umístění proužků na gelu.



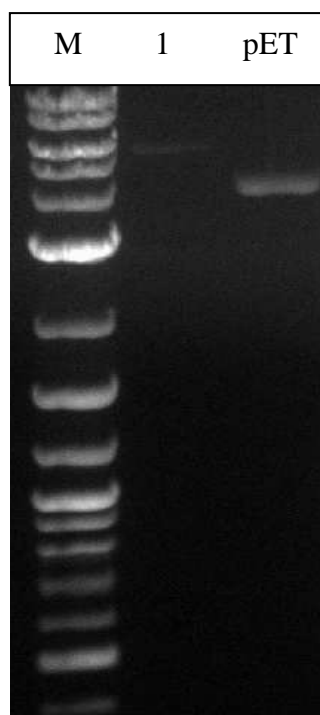
Obr. 20. Agarózový gel s nanesenými vzorky po ligaci s vektorem pET-15b, přečištěné malou purifikací (V51-V55)

Proces otevření pET-15b (6.4.10.) a ligace (6.4.12.) byly znovu zopakovány za použití nově objednaných alkalických fosfatasa SHRIMP a CIAP. Pro otevření vektoru pET-15b byly vytvořeny dvě reakční směsi, v jedné byla umístěna po restrikci fosfatasa SHRIMP, ve druhé pak CIAP, abychom mohli poměřit jejich účinnost. Po provedení malé purifikace (6.4.1.) a nanesení vzorků na 1% agarózový gel (6.4.4.) byly však proužky na gelu opět na stejných pozicích jako v předchozím případě. S největší pravděpodobností se nám nezdařila ligace s naší sekvencí a došlo ke spojení dvou molekul vektoru. Chybou funkce fosfatasa však můžeme vyloučit.

Celý pokus ligace byl znovu naposledy zopakován s prodloužením doby inkubace při vlastní ligaci a použitím nově objednaných buněk Hb 101. Proces však vedl opět ke stejnému výsledku.

S krokem ligace nám vypomohlo partnerské pracoviště (Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, Kiel). Výsledkem bylo zjištění, že převedení naší sekvence do vektoru pET-15b se nezdařila zřejmě díky až přílišné blízkosti restrikčních míst Nde I a Xho I, které se v praxi působením endonukleas nemohou rozstříhnout, protože zde chybí potřebný prostor pro působení enzymů. pET-15b se v praxi nedá správně rozštěpit při užití těchto endonukleas. Jednalo se tedy o chybu výrobce vektoru, který neuváděl nemožnost použití těchto dvou restrikčních míst současně.

Vytvořený rekombinantní vektor byl následně transformován do buněk (viz 6.4.13.) a přečištěn metodou velké purifikace (viz 6.4.2.). Pro kontrolu výsledku byly vzorky nanoseny na 1% agarózový gel (viz 6.4.4.). Výsledek (Obr. 21.) nám ukázal, že velikost vektoru s předpokládanou sekvencí je vyšší než velikost samotného vektoru. Můžeme tedy předpokládat, že se namnožení vektoru zdařilo.

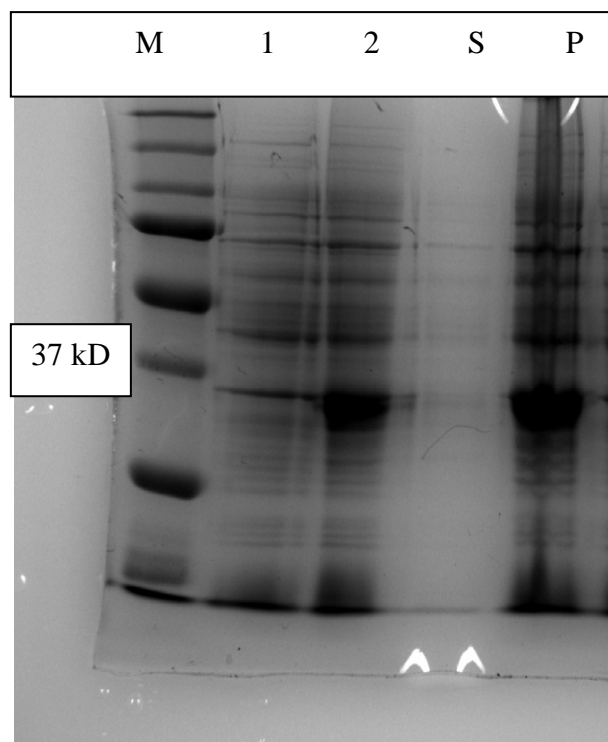


Obr. 21. Agarózový gel s naneseným vzorkem rekombinantního vektoru pET-15b (1) a s vektorem pET-15b

5.4. Expresse proteinu AKR1C2

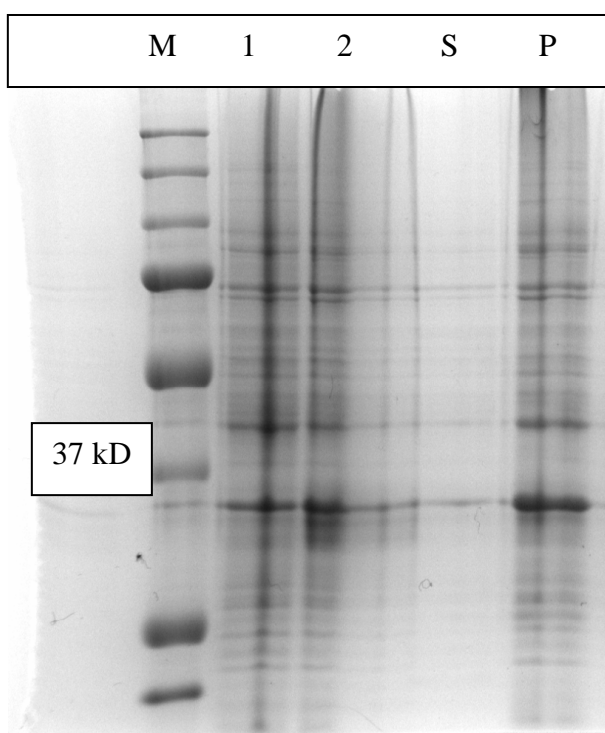
Byly připraveny kompetentní buňky BL-21 (viz 6.4.3.) a provedene exprese (viz 6.4.14.). Druhý den ráno bylo z nainkubovaných buněk odebráno 0,5 ml a dáno do 20 ml LB média s ampicilinem. Byla změřena optická hustota při 600 nm a vzorky byly dále inkubovány při 37 °C, 200 rpm. Inkubace byla vypnuta po 2 hod, kdy byla naměřena optická hustota 0,5126.

Se vzorky byla provedena indukce a sonikace (viz 6.4.14.). Ultrazvuk byl nastaven na 70 % svého výkonu, sonikace byla prováděna v 30ti sekundových intervalech za současného chlazení ledem. Vždy 30 s sonikace a 30 s přestávka s chlazením. Proces byl zopakován 10x. Vzorky byly naneseny na polyakrylamidový gel a provedena SDS PAGE (viz 6.4.15.). Výsledek (Obr. 22.) ukázal, že protein pravděpodobně zůstal v peletě, buňky nebyly dostatečně rozbity. V supernatantu se nachází jen zlomek produktu (velikost proteinu je okolo 37 kD).



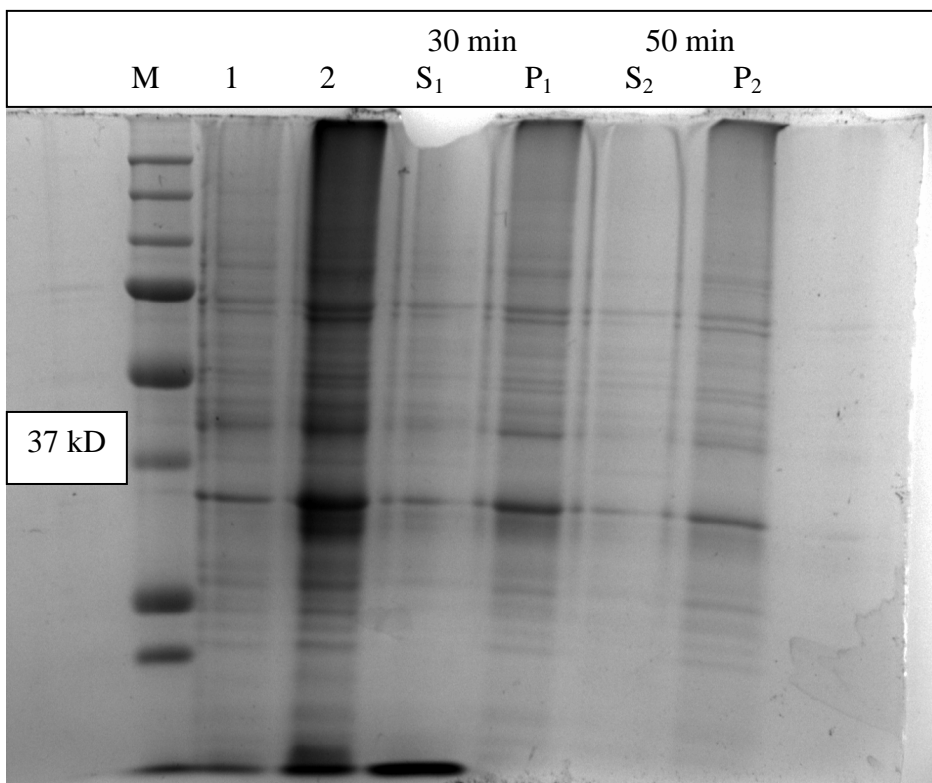
Obr. 22. Polyakrylamidový gel s nanesenými vzorky pelety před indukcí (1), pelety po indukcí (2), supernatantu po sonikaci (S) a pelety po sonikaci (P)

Pro lepší rozrušení buněčných obalů byl objednáán lysozym a provedeno natrávení lysosymem a sonikace (viz 6.4.16.). Ultrazvuk byl nastaven na 62-64 % svého výkonu, sonikace byla prováděna v 30ti sekundových intervalech za současného chlazení ledem. Vždy 30 s sonikace a 30 s přestávka s chlazením. Proces byl zopakován 20x. Vzorky byly opět naneseny na polyakrylamidový gel a provedena SDS PAGE (viz 6.4.15.) (Obr. 23). Většina proteinu však zůstala opět v peletě.



Obr. 23. Polyakrylamidový gel s nanesenými vzorky pelety před indukci (1), pelety po pelety po indukci (2), supernatantu po sonikaci (S) a pelety po sonikaci (P)

Pokus zopakován naposledy s prodloužením doby sonikace a natrávením lysosymem (viz 6.4.16.). Po natrávení lysosymem byl vzorek pro sonikaci rozdělen do dvou Falconek. Ultrazvuk byl nastaven na 60-65 % svého výkonu. V první zkumavce proběhla sonikace 1 min a 30s chlazení, proces byl opakován 30x. Ve druhé zkumavce pak proces opakován 50x. Se vzorky byla provedena SDS PAGE (viz 6.4.15.) (Obr. 24.)



Obr. 24. Polyakrylamidový gel s nanesenými vzorky pelety před indukcí (1), pelety po indukcí (2), supernatantu po sonikaci 30 min (S₁), pelety po sonikaci 30 min (P₁), supernatantu po sonikaci 50 min (S₂) a pelety po sonikaci 50 min (P₂)

Z důvodu slabého výkonu ultrazvuku, který nám byl k dispozici, jsme se spokojili s menším výtěžkem. Je však stále zřetelně viditelné, že většina proteinu zůstala v peletě. S největší pravděpodobností se tvoří inkluzní tělíčka, která zůstávají v peletě.

6. Závěr

Cílem diplomové práce bylo: klonování, exprese a purifikace lidské AKR1C2. Vlastní práce byla rozdělena do několika samostatných celků.

Prvním krokem bylo pomnožení a následná izolace zakoupené kódové sekvence ve vektoru pOTB7, který proběhl množním vektoru s kódovou sekvencí v bakteriích *E. coli*. Na tento krok navazovalo navržení primerů a amplifikace kódové sekvence pomocí metody PCR. Oba kroky proběhly úspěšně. Při metodě PCR byly postupně měněny teploty annealingu, které se pohybovaly v rozmezí 55 °C-65 °C. Ukázalo se však, že teplotní gradient nemá výrazný vliv na výsledek reakce. Vzorek pro další práci byl tedy po zmnožení pomocí PCR náhodně vybrán.

Po amplifikaci kódové sekvence bylo dalším úkolem vytvoření rekombinantního vektoru TOPO 2.1 nesoucího kódovou sekvenci. Proces ligace se zdařil. Následovala subklonace kódové sekvence z vektoru TOPO 2.1 do expresního vektoru pET-15b. Tento krok však bohužel ani po opakovaném provedení nebyl úspěšně dokončen. S procesem ligace nám vypomohlo partnerské pracoviště (Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, Kiel).

Neúspěch subklonace spočíval v přílišné blízkosti restrikčních míst Nde I a Xho I, které nebylo možno v praxi působením endonukleas rozstříhnout, z důvodu nedostatečného prostoru pro působení enzymů. Vektor pET-15b se tedy nedá správně rozštěpit při užití těchto endonukleas. Jednalo se o chybu výrobce vektoru, který neuváděl nemožnost použití těchto dvou restrikčních míst současně.

Po provedení ligace s expresním vektorem pET-15b byla sekvence transformována do kompetentních buněk BL-21, ve kterých proběhla exprese proteinu. Na expresi navazoval poslední krok rozbití buněk a izolace proteinu. Nejprve však byla nutná optimalizace procesu rozbití buněk. Z důvodu slabého výkonu ultrazvuku bylo přistoupeno před samotnou sonikací k natrávení buněk za použití lysozymu. Přestože byly upraveny podmínky izolace, většina vytvořeného proteinu zůstala v buněčných zbytcích. S největší pravděpodobností se tvoří inkluzní tělíška, která zůstávají v peletě. Proces izolace se v době dokončení diplomové práce dále optimalizoval.

7. Seznam použitých zkratek

A	Adenin
AA	Akrylamid
AKR	Aldoketoreduktasy
AMP	Ampicilin
APS	Persíran amonný
AR	Androgenní receptor
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparágová kyselina
BamHI	Restrikční endonukleasa izolovaná z bakterie <i>Bacillus amyloquefaciens</i>
BSA	Bovinní (hovězí) sérový albumin
C	Cytosin
CYP 450	Cytochrom P450
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxyribonukleotidtrifosfát
ddNTP	Dideoxyribonukleotidtrifosfát
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Mezinárodní kód pro označování enzymů (Enzyme Commission codes)
EcoRI	Restrikční endonukleasa izolovaná z bakterie <i>Escherichia coli</i> RY13
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
G	Guanin
GABA	γ -aminomáselná kyselina
Gln	Glutamin
Glu	Glutámová kyselina
Gly	Glycin
HindIII	Restrikční endonukleasa izolovaná z bakterie <i>Haemophilus influenzae</i>
HSDs	Hydroxysteroid dehydrogenasy
IPA	Isopropylalkohol
IPTG	Isopropyl- β -D-galaktopyranosid

KAN	Kanamycin
kb	Kilobáze
lac promotor	Promotor genu β -galaktosidasy <i>Escherichie coli</i>
LB medium	Luria-Bertani medium
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Marker při gelové elektroforéze (2-Log DNA Ladder)
MDR	Dehydrogenasy/reduktasy s dlouhým řetězcem (long-chain alcohol dehydrogenase)
mRNA	Ribonukleová kyselina kódující pořadí aminokyselin v proteinu (Messenger ribonucleic acid)
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NdeI	Restrikční endonukleasa izolovaná z bakterie <i>Neisseria denitrificans</i>
NNK	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNAL	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
PAGE	Gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PAH	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PCR	Polymerasová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
Pfu polymerasa	DNA polymerasa izolovaná z <i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	Záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
Pro	Prolin
Pufr P1	Rozpouštěcí pufr
Pufr P2	Lyzační pufr
Pufr P3	Neutralizační pufr
Pufr QBT	Ekvilibrační pufr
Pufr QC	Promývací pufr
Pufr QF	Eluční pufr
Pwo polymerasa	DNA polymerasa izolovaná z <i>Pyrococcus woesei</i>
RNA	Ribonukleová kyselina
RNasa A	Ribonukleasa A
rpm	Otáčky za minutu (rotation per minute)
SAP fosfatasa	Serum alkaline fosfatasa

SDR	Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem(short-chain alcohol dehydrogenase)
SDS	Dodecylsulfát sodný
Ser	Serin
T	Thymin
T4 ligasa	Ligasa izolovaná z bakteriofága T4
Taq polymerasa	Termostabilní DNA polymerasa izolovaná z termofilní bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
TBE pufr	Tris-borátový pufr
TE pufr	Tris-EDTA pufr
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tht polymerasa	DNA polymerasa izolovaná z <i>Thermus thermophilus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptofan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultrafialové (ultra violet) záření
XhoI	Restrikční endonukleasa izolovaná z bakterie <i>Xanthomonas holcicola</i>

8. Seznam použité literatury

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2005). *Základy buněčné biologie, Úvod do molekulární biologie buňky*. Nakl.: Espero Publishing, 2. vyd., 2005

Barski Oleg A., Tipparaju Srinivas M., and Bhatnagar Aruni (2008). *The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification*. *Drug Metab Rev.* 2008; 40(4): 553–624.

Blouin, K., Richard, C., Brochu, G., Hould, F.S., Lebel, S., Marceau, S., Biron, S., Luu-The, V., Tchernof A. J. (2006). *Androgen inactivation and steroid-converting enzyme expression in abdominal adipose tissue in men*. *Endocrinol.* (2006) 191(3):637-49

Brown T. A. (2007). *Klonování genů a analýza DNA*. Nakl.: UP Olomouc, 1. vyd., 2007

Couture Jean-Francois, De Jésus-Tran Karine Pereira, Roy Anne-Marie, Cantit Line, Côte Pierre-Luc, Legrand Pierre, Van Luu-The, Labrie Fernand, Breton Rock (2005). *Comparison of crystal structures of human type 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase reveals an “induced-fit” mechanism and a conserved basic motif involved in the binding of androgen*. *Protein Science* (2005), 14:1485–1497.

Ishikura Shuhei, Horie Kenji, Sanai Masaharu, Matsumoto Kengo, Hara Akira (2005). *Enzymatic Properties of a Member (AKR1C19) of the Aldo-Keto Reductase Family*. *Biol. Pharm. Bull.* 28(6) 1075—1078 (2005)

Jez Joseph M., Bennett Melanie J., Schlegell Brian P., Lewis Mitchell, Penning Trevor M. (1997). *Comparative anatomy of the aldo–keto reductase superfamily*. *Biochem. J.* (1997) 326, 625-636

Ji Q, Chang L, Stanczyk FZ, Ookhtens M, Sherrod A, Stolz A (2007). *Impaired dihydrotestosterone catabolism in human prostate cancer: critical role of AKR1C2 as a pre-receptor regulator of androgen receptor signaling*. *Cancer Res.* 2007 Feb 1;67(3):1361-9

Maser E, Stinner B, Atalla A. (2000). *Carbonyl reduction of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by cytosolic enzymes in human liver and lung*. Cancer Letters 2000;148:135–144.

Penning TM, Jin Y, Heredia VV, Lewis M. (2003). *Structure-function relationships in 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: a comparison of the rat and human isoforms*. J Steroid Biochem Mol Biol 2003;85:247–255.

Penning TM, Jin Y, Rizner TL, Bauman DR (2008). *Pre-receptor regulation of the androgen receptor*. Mol Cell Endocrinol Jan 16;281 (1-2):1-8

Penning TM, Jin Y, Steckelbroeck S, Lanisnik Rizner T, Lewis M (2004). *Structure-function of human 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins*. Mol Cell 2004 Feb 27; 215 (1-2):63-72

Rižner Tea Lanišnik, Hsueh K. Lin, Peehl Donna M., Steckelbroeck Stephan, Bauman David R., Penning Trevor M. (2003). *Human Type 3 3α-Hydroxysteroid Dehydrogenase (Aldo-Keto Reductase 1C2) and Androgen Metabolism in Prostate Cells*. Endocrinology 144(7):2922–2932

Rižner TL, Lin HK, Penning TM (2003). *Role of human type 3 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C2) in androgen metabolism of prostate cancer cells*. Chem Biol Interact. 2003 Feb 1;143-144:401-9.

Rumlová, M., Pačes, V., Ruml, T. (2003). *Základní metody genového inženýrství*. Praha 5: JPM Tisk s.r.o.

Sang Yup Lee (2009). *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*. Nakl.: Springer

Shiraishi, H., Ishikura, S., Matsuura, K., Deyashiki, Y., Ninomiya, M., Sakai, S., Hara, A. (1998). *Sequence of the cDNA of a human dihydrodiol dehydrogenase isoform (AKR1C2) and tissue distribution of its mRNA*. Biochem. J. (1998) Sep 1;334 (Pt 2):399-405

Šimůnek T. (2009). Přednáška molekulární biologie. *Metody molekulární biologie*. (2009)
Hradec Králové

Voet D., Voet J. (1995). *Biochemie*. Nakl.: Victoria Publishing, 1. vydání 1995

Wang Xuting, Chorley Brian N., Pittman Gary S., Kleeberger Steven R., Brothers John, Liu Gang, Spira Avrum, Bell Douglas A. (2010). *Genetic Variation and Antioxidant Response Gene Expression in the Bronchial Airway Epithelium of Smokers at Risk for Lung Cancer*. PLoS ONE 5(8): e11934. doi:10.1371/journal.pone.0011934

Wsol V., Szotakova B., Martin H. J., Maser E. (2007). *Aldo-keto reductases (AKR) from the AKR1C subfamily catalyze the carbonyl reduction of the novel anticancer drug oracin in man*. Toxicology 238 (2007) 111–118

Internetové zdroje

1. Internet, získáno: 13. leden 2011

<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/1kotrba.pdf>

2. Internet, získáno: 16. leden 2011

http://www.imagenes-bio.de/info/vectors/pOTB7_pic.shtml

3. Internet, získáno: 16. leden 2011

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1topo_map.pdf

4. Internet, získáno: 27. leden 2011

http://depts.washington.edu/bakerpg/plasmid_maps/pet15bm.pdf

5. Internet, získáno: 30. leden 2011

<http://www.neb.com/nebecomm/products/productN3200.asp>

6. Internet, získáno: 2. únor 2011

<http://www.biorad.com/prd/en/US/adirect/biorad?cmd=catProductDetail&vertical=LSR&country=US&lang=en&productID=161-0373>

7. Internet, získáno: 2. únor 2011

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AKR1C2&search=AKR+1C2&suff=txt>

8. Internet, získáno: 5. únor 2011

http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli#Role_in_biotechnology