

Klonování genu pro fágový endolyzin a ověření exprese endolyzinu

V průběhu reprodukčního cyklu bakteriofága se lytické enzymy uplatňují při iniciaci infekce, kdy vytvářejí v bakteriální buněčné stěně drobné léze, kterými se dovnitř buňky dostává fágová genomová nukleová kyselina. Lytické enzymy tohoto typu se vyskytují jako komponenty fágových částic, zejména fágových bičíků. Druhá skupina fágových lytických enzymů (endolyzinů a spolupůsobících holinů) se uplatňuje na konci reprodukčního cyklu fága, kdy se fágové potomstvo uvolňuje z hostitelské buňky. Tyto enzymy mají za následek rozsáhlou degradaci buněčné stěny bakterií. Katalytická doména lytických enzymů je tvořena jednou ze 4 typů hydroláz peptidoglykanu: endo- β -N-acetyl-glucosaminidázy a N-acetyl-muramidázy, jejichž cílem jsou cukerné složky peptidoglykanu; endopeptidázy, které štěpí peptidové vazby; a N-acetylmuramyl-L-alanin-amidázy, které hydrolyzují amidovou vazbu spojující cukernou složku a peptid. Lytická aktivita mnoha rekombinantních bakteriofágových enzymů je v současnosti studována jako nová třída antibakteriálních látek. Lytické enzymy je možné klonovat v různých bakteriálních klonovacích systémech, aniž by působily na buňku toxicky, protože v buňce není přítomen holin, díky kterému se lytický enzym dostává do periplazmatického prostoru k buněčné stěně.

Ve cvičení budeme pracovat s genem pro endolyzin fága 812F1 jehož velikost je 855 bp a enzym má velikost 284 aminokyselin, tedy jeho hmotnost je 31,5 kDa. Aktivita enzymu bude ověřena také pomocí zymogramu, kdy se do gelu na SDS PAGE přidává suspenze buněčných stěna bakterií *S. aureus*. Pokud je lytický enzym aktivní, v místě na gelu, které odpovídá, jeho molekulové hmotnosti se objeví lytická zóna na jinak mléčně matném gelu.

1. Příprava kompetentních buněk pro transformaci

Jako recipientních kmenů pro klonování cizorodé DNA se nejčastěji využívá kmenů *E. coli*, které byly mutacemi a metodami genového inženýrství upraveny tak, aby byly schopny s vysokou účinností přijímat externí DNA (většinou plazmidovou), umožňovaly její replikaci a udržovaly její původní strukturu (tj. nezpůsobovaly vyštěpování naklonované DNA) a dovolovaly selekci rekombinantních plazmidů. Podrobná charakteristika těchto kmenů (zejména jejich genotyp) bývá uváděna v katalogích firem a praktických příručkách.

Vlastní navození kompetence spočívá v pomnožení buněk příslušného kmene *E. coli* v tekutém živném mediu (např. LB bujonu) do exponenciální fáze růstu, převedení buněk do roztoku CaCl_2 , v němž se buňky ponechají několik hodin, během nichž dojde k jejich vyhladování a určitým změnám v buněčné stěně, umožňujícím přijmout externí DNA.

Takto připravené buňky lze použít buď bezprostředně, nebo se převedou do roztoku CaCl_2 s přísadkou glycerolu, v němž je možné buňky zamrazit na -70°C a použít později (takto připravené buňky lze uchovávat několik měsíců nebo i déle).

Organismy: Bakteriální kmen *E. coli* Top10F, *E. coli* BL21 (DE3)

Materiál: LB bujon, sterilní roztok 0,05 M CaCl₂ sterilní centrifugační zkumavky, denzitometr s příslušenstvím, chlazená centrifuga T23

Postup

1. 50 ml LB bujonu v Erlenmayerově baňce naočkujeme 2 ml bujonové kultury (18 hod/37°C) a inkubujeme při 37°C na třepačce do hustoty suspenze OD₆₀₀ = 0,3. (Kultivace cca 2 hod.)
2. Buněčnou kulturu vytemperujeme na 0°C v ledové vodní lázni a centrifugujeme 10 min/3000 rpm při 4°C. Od této chvíle nesmí teplota překročit 4°C!
3. Sediment buněk resuspendujeme v polovině objemu (25 ml) ledového roztoku CaCl₂ a ponecháme v lednici při 4°C přes noc.
4. Buňky centrifugujeme jako v bodě 2) a sediment resuspendujeme v 5 ml (obecně v 1/10 výchozího objemu kultury) roztoku CaCl₂.
5. Takto připravené kompetentní buňky lze používat přibližně jeden týden. Pro dlouhodobé uchování se k buněčné suspenzi přidá 1/10 objemu sterilního glycerolu (4°C!) a suspenze se zmrazí na -70°C.

2. Příprava plazmidového vektoru pET28 ke klonování

Jedním z běžně používaných expresních vektorů pro klonování v *E. coli* je bakteriální plazmidový vektor pET28 (viz obr.) jeho velikost je **5369 bp**. Gen pro rezistenci ke kanamycinu je využíván pro selekci transformant.

Jako hostitelské kmeny pro tento plazmidový vektor jsou používány kmeny *E. coli*. Pro klonovací experimenty je nutné použít kmenů, které jsou schopny alfa-komplementace (tj. nesoucí mutaci *lacZ* M15), např. *E. coli* Top10F, DH5α, JM83, JM101, NM522 aj.

K izolaci DNA vektoru je možné použít několika metod, poskytujících DNA o různém množství a čistotě. Optimální je připravit DNA purifikovanou přes kolonku (spin columns) s využitím některého **komerčního kitu**. Je možné však vycházet i z preparátů, připravených některou z mikrometod, při nichž se získá DNA v množství několika µg s dobrou citlivostí ke štěpení restrikcími endonukleázami a účinně spojovaná ligázou.

Naštěpení vektoru restriční endonukleázou

Materiál: Eppendorfovy zkumavky, mikrocentrifuga, automatické pipety, špičky, zařízení pro elektroforézu, transiluminátor, restriční endonukleázy, štěpící pufr, sterilní destil. voda, TE pufr, 70% a 100% etanol, QiaQuick PCR Purification Kit, purifikovaná DNA vektoru pET28 restriční endonukleázy *NcoI* a *BamHI*.

Nejdříve stanovíme orientačně koncentraci vektoru: 2 μ l roztoku DNA změříme na Nanodropu.

Koncentrace izolovaného vektoru:	
-----------------------------------------	--

6 μ g DNA vektoru pET28 naštěpíme v objemu 40 μ l reakční směsi příslušnou dvojicí RE (2 hod), abychom zabránili znovuspojení přecházejících konců. Postupujeme dle návodu k restriktázám. Pokud jsou koncentrace nízké, vynechá se objem vody.

Ponecháme si alespoň 10 μ l neštěpeného vektoru jako kontrolu

Reagencie	Množství (μ l)
Voda	
Pufr	
Vektor	
Enzym	
celkem	40 μl (objem restriktáz zanedbáváme)

Defosforylace

1. Defosforylace je nutná při přípravě inzertní DNA restričním štěpením použitím jednoho enzymu, ale také zabraňuje spojení nedoštěpených plazmidů

2. K přečištěné plazmidové DNA přidat 1/10 objemu 10x CIP pufru, alkalickou fosfatázu (1U na 100 pmol (2 μ g linearizované plazmidové DNA o velikosti 5 kb obsahuje asi 1,4 pmol 5'koncových fosfátů))

3. Inkubace 30 min/37 °C

4. Směs po štěpení a defosforylaci uložíme při – 20 °C

5. Směs nanese na 1,2 % preparativní agarózový gel a štěpenou defosforylovanou DNA extrahujeme z gelu prostřednictvím komerční sady QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).
Velikost plazmidu je 5369 bp.

Koncentrace štěpeného vektoru:	
---------------------------------------	--

3. Příprava inzertu

Jako cizorodou DNA lze pro klonování v pET vektorech použít DNA z jakéhokoliv organismu za předpokladu, že je tato DNA nativní a lze ji štěpit některou z restričních endonukleáz, jejíž štěpné místo se nachází v polylinkeru (velikost restričních fragmentů, které lze naklonovat, je max. asi 10 kbp). DNA, která není žádnou z těchto RE štěpena, by bylo nutné nejdříve upravit tak, aby její konce byly s některou z RE kompatibilní - např. připojením spojek, adaptoru nebo modifikací konců prostřednictvím PCR.

K naklonování lze použít DNA, která byla štěpena buď jednou RE, nebo dvěma různými RE - v tomto případě dojde k tzv. orientovanému začlenění restričního fragmentu do vektoru, což má řadu výhod, např. umožňuje restriční mapování a sekvencování z definovaného konce. Použití DNA štěpené dvěma enzymy zabraňuje její cirkularizaci a zvyšuje pravděpodobnost vzniku rekombinantních plazmidů při ligaci vektorové a cizorodé DNA.

Materiál: DNA z polyvalentního stafylokokového fága 812 F1.

- restriční endonukleázy *Nco*I a *Bam*HI, štěpící pufr 10× konc., destil. voda

- primer **EndoF1 NcoBam low** nesoucí *Nco*I-místo (5' - TAAG**CCATGG**CTAAGACTCAAGCAGAA-3') a primer **SH3upB** nesoucí *Bam*HI-místo (5' - ATAG**GGATCC**TTGAATACTCCCCAGG

3'), o koncentraci 10 pmol/ul, 10× konc. roztok dNTP, Taq DNA-polymeráza a příslušný reakční pufr, 50 mM MgCl₂, - automatické pipety, špičky, mikrozkuhavky, mikrocentrifuga, spektrofotometr, termocykler - zařízení pro elektroforézu a vyhodnocování gelů

Postup

1. Provedeme amplifikaci genu s primery, jejichž konce nesou rozpoznávací sekvence pro restriční endonukleázy *Nco*I a *Bam*HI.

Reakční směs:

Reagencie	Objem v µl do 25 µl	Do _____ µl
Deionizovaná voda	15,2	
Pufr pro PCR	2,5	
MgCl ₂	2,5	
dNTP	2,5	
Primery	2 x 0,05	
Taq DNA polymeráza	0,2	
Templátová DNA	2	

Program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	300	1
Denaturace	94	60	29
Připojení primerů	50	90	29
Prodlužování primerů	72	90	29
Závěrečné prodlužování primerů	72	600	1

2. Provedeme purifikaci PCR-produktu (viz protokol QIAquick PCR Purification Kit) a výsledný vzorek ověříme na agarózové gelové elektroforéze, současně změříme koncentraci DNA.

Koncentrace PCR produktu po přečištění:	
------------------------------------------------	--

3. Provedeme štěpení purifikovaného ampliconu restriktčními endonukleázami *NcoI* a *BamHI*:

V Eppendorf. zkumavce smícháme:

- **1-2 µg DNA** (x µl roztoku DNA)
- doplnit µl H₂O. Pokud jsou koncentrace nízké, vynechá se objem vody.
- 5 µl 10x konc. štěpícího pufru
- 5 jednotek restriktáz (asi 1 µl).

Obsah zkumavky dobře promícháme a krátce zcentrifugujeme v mikrofúze. Inkubujeme 2 hod při teplotě doporučené pro příslušné restriktázy (případně přes noc).

Reagencie:	Množství (µl)
DNA	
Voda	
Pufr	
Enzym	
Celkem	50 (objem enzymu zanedbáváme)

4. Zkumavku zahřejeme 5 minut na 56°C a necháme zchladit na pokojovou teplotu

6. Rozštěpenou DNA uložíme při -20°C

7. Provedeme purifikaci PCR-produktu (viz protokol QIAquick PCR Purification Kit) a změříme koncentraci štěpeného vektoru.

4. Ligace:

Nejsnadněji se klonují DNA-restriktční fragmenty, získané štěpením DNA dvěma různými RE. Pokud se liguje DNA po štěpením jednou RE, je vhodné provést defosforylaci vektoru, která podstatně snižuje jeho recirkularizaci a zvyšuje výtěžek rekombinantních molekul. Pokud se defosforylace neprovede, je možné výtěžek rekombinantních molekul zvýšit nastavením optimálního poměru koncentrací vektorové a cizorodé DNA - tento poměr se mění v závislosti na velikosti vektoru a klonovaného restriktčního fragmentu. Výpočet pro přesné stanovení koncentrací obou DNA je uveden v řadě příruček. Prakticky lze vyjít z poměru koncentrací **inzert:vektor 1:1, 3:1 a 5:1**, kde je značná pravděpodobnost, že některá z těchto směsí obsahuje poměr blízký se optimálnímu. K ligaci se nejčastěji používá T4-DNA-ligáza (případně i DNA-

ligáza z *E. coli*, která však nespojuje tupé konce). V reakční směsi o celkovém objemu se kombinuje obvykle 100-500 ng vektorové DNA se 100-500 ng cizorodé DNA. Ligační pufr je dodáván výrobcem jako 10x koncentrovaný roztok (jeho složkou je TRIS, DTT, BSA, ATP a Mg⁺⁺). Vlastní ligační reakce má teplotní optimum při 37°C - při této teplotě jsou však konce nestabilní (s tendencí k denaturaci), proto se ligace obvykle provádí při teplotách 16-25°C, kdy je soudržnost konců vyšší.

Výsledek ligační reakce je možné demonstrovat elektroforeticky: po ligaci se vytvoří kromě rekombinantních plazmidových molekul rovněž vysokomolekulární frakce DNA, kterou lze na gelu dobře rozpoznat: je důkazem, že enzym je aktivní. Materiál: DNA vektoru pET28 štěpená RE, cizorodá DNA štěpená RE, T4-DNA-ligáza, 10x ligační pufr, mikrozkušavky, aut. pipety, špičky, termostat na 16°C, mikrofuga

Koncentrace inzertu:	
Koncentrace plazmidu:	

Postup:

1. Připravíme ligační směsi obsahující různé poměry vektorové a cizorodé DNA (1:1, 3:1, 5:1, 1:3 a 1:5). Jako kontrolu použijeme štěpený plazmid, kdy objem inzertu nahradíme vodou. Každá směs má objem 10 µl a posléze se doplňuje pufrem do 20 µl:

- 100-500 ng vektorové DNA
- 100-500 ng cizorodé DNA
- destil. sterilní vodu (ad 10 µl).

(Případně dle návodu k ligáze)

$$ng \text{ Inzertu} = \frac{ng \text{ vektoru} * kb \text{ inzertu}}{kb \text{ vektoru}} * \frac{\text{inzert}}{\text{vektor}}$$

Vektor:Inzert	Vektor µl	Inzert µl	H ₂ O
1:1			
1:3			
1:5			
1:0			
0:1			

2. Směs zahřejeme 5 minut na 45°C - dojde k rozvolnění kohezních konců. Zchladíme na 4°C.

3. Přidáme:

- 5 µl 2x Rapid ligation Buffer
- 1U T4-DNA-ligázy

Nebo dle návodu příslušné ligázy (Pufr může mít jinou koncentraci).

4. Po promíchání inkubujeme 15 minut (můžeme 30 – 45 min.) při pokojové teplotě.

5. Transformace kompetentních buněk *E. coli* rekombinantní DNA

1. Do mikrozkušavky se napipetuje 200 μl kompetentních buněk. (V případě, že se používají buňky zmrazené na -70°C , nechají se pozvolna rozmraznout při pokojové teplotě.)
2. Zkušavka se umístí do ledové lázně.
3. Přidá se DNA (5 μl ligační směsi smíchá s TE pufrem do celkového objemu 10 μl , který se pak přidá ke kompetentním buňkám).
Přidáváme jednotlivě všechny ligační směsi (5 směsí), 10 μl TE pufru, 10 μl neštěpeného plazmidu ředěného TE pufrem, a celou procedurou necháme projít samotné kompetentní buňky.
4. Lehce se promíchá a ponechá v ledové lázni 30 minut.
5. Buňky se podrobí tepelnému šoku ponořením zkušavky na 1 min do vodné lázně 42°C , nebo 3 min / 37°C .
6. Zkušavka se přenesse do ledové lázně a přidá se 1 ml LB bujonu.
7. Následuje inkubace 1 hod při 37°C v třepacím termostatu.
8. Buňky se centrifugují 5 min při 1500 rpm (nebo 1 min při 6000 rpm).
9. Supernatant se slije - většinou však zůstane ve zkušavce asi 100 μl supernatantu, ve kterém lze buňky resuspendovat.
10. Suspenze se vyseje pomocí bakteriologické hokejky na agarové plotny (LB agar, obsahující Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$))

Kanamycin

Zás. roztok 50 mg/ml (1000 \times)

Výsl. koncentrace 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

6. Izolace DNA rekombinantních vektorů pEP28 (potenciálních klonů) metodou lyze varem (Holmes a Quigley, 1981).

Postup:

1. Bílé kolonie přeočkujeme na misky LBA s kanamycinem, a ve formě dlouhých proužků.
2. Druhý den z nárůstu kultury na Petriho misce odebereme párátkem asi 1-2 mm^3 a resuspendujeme v 350 μl STET pufru v epp. zkušavce. Odběr kultury párátkem provedeme tak, abychom neodebrali i část agaru.

3. Přidáme 25 μ l (10 mg/ml), (5 μ l o koncentraci 50 mg/ml, 50 μ l zásobního 5 mg/ml) roztoku lysozymu a dobře promícháme (protřepeme).
4. Zkumavku umístíme do lázně s vroucí vodou přesně na 1 minutu.
5. Zkumavku přeneseme do ledové vodní lázně.
6. Bakteriální lyzát zcentrifugujeme v mikrofuzi 10 min. při max. ot. a pokojové teplotě.
7. Sterilním párátkem odebereme viskózní sediment
8. K supernatantu přidáme 40 μ l 3M Na₃-acetátu(pH 5,2) a 420 μ l izopropanolu. Promícháme několikerým obrácením zkumavky. Zkumavku ponecháme 10 min při pokojové teplotě.
9. Obsah centrifugujeme 15 minut v mikrofuzi při max. otáčkách a 4°C. Supernatant odebereme pasterkou (pipetou) - je nutno odstranit veškerou tekutinu.
10. Přidáme 1 ml 70% etanolu, protřepeme a zcentrifugujeme 10 min v mikrofuzi. Supernatant odebereme, sediment opláchneme 100% etanolem (případně znovu zcentrifugujeme, jestliže se sediment uvolnil) a necháme oschnout v obrácené poloze při pokojové teplotě.
11. Sediment rozpustíme v 50 μ l (30 μ l) TE pufru.
12. Výsledek izolace ověříme na elektroforéze (Posun na gelu oproti původnímu neštěpenému plazmidu, elektroforéza na dlouhém gelu, aby došlo k odlišení).

STET

0,1 M NaCl

10 mM Tris.CL, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

5 % Triton X-100

8 % sacharóza

7. Ověření pozitivních klonů

1. Plazmidová DNA, u které lze předpokládat inzert, může být naředěna a bude u ní provedena PCR podle postupu z přípravy inzertu (viz výše).
2. Druhým způsobem pro ověření je štěpení restriktázami *NcoI* a *BamHI*. Štěpící směs se dá připravit dle postupu štěpení plazmidu.
3. Posunem na gelu oproti původnímu plazmidu (viz. bod 12, kapitoly 6.)

8. Transformace do expresních buněk

1. K 200 μ l kompetentních buněk přidáme 50 ng plazmidu s inzertem, který byl purifikován pomocí komerčního kitu.

9. Test citlivosti k rekombinantnímu endolyzinu

Příprava suspenze usmrcených buněk *S. aureus*

300 ml YT média s přidavkem 0,3 g glukózy a 1,5 mg thiaminchloridu naočkujeme 10 ml 18-ti hodinové kultury indikátorového kmene *S. aureus* a kultivujeme 12 hodin při 37 °C za intenzivního třepání. Buňky usmrtíme autoklávováním horkou parou 5 min. při 100 °C. Usmrcené buňky centrifugujeme 10 min při 5000 rpm a roztřepeme v 6 ml SM pufru (obecně 1/50 původního objemu). Suspenzi zamrazíme na -20 °C.

9.1. Ověření funkce endolyzinu funkčním testem na plotnách

1. Narostlé kolonie po transformaci buněk BL21(DE3) přerazítujeme nebo přeočkujeme v formě krátkých čárek na plotny s LB agarem s obsahem kanamycinu (50 μ g/ml) a IPTG (1 mM) nezbytného pro indukci T7 RNA-polymerázy.
2. Repliky ploten inkubujeme 6 až 18 hodin při teplotě 37 °C.
3. Buněčnou stěnu a membránu *E. coli* rozrušíme chloroformem, pracujeme v digestoři. Po nalití chloroformu na kousek buničité vaty položíme vatu na skleněnou podložku a přiklopíme miskou dnem vzhůru (plastová miska nebo agar se nesmí dotýkat buničité vaty). Páry chloroformu necháme působit 15 až 20 min. Po této době by se měl z rozrušených buněk *E. coli* uvolnit exprimovaný endolyzin.
4. Kolonie (čárky) přelijeme 3 ml 0,4 % měkkého vodního agaru s 200 – 250 μ l suspenze autoklávováním usmrcených buněk *S. aureus*. Vodní agar by neměl být příliš zakalený buňkami, aby byly lytické zóny rozpoznatelné.
5. Endolyzin se ponechá difundovat a působit 60 – 120 min při 30 °C. Po této inkubaci byly kolem pozitivních klonů *E. coli* patrné projasněné lytické zóny.

9.2. Zymogram:

Příprava vzorku:

1. Buňky se zaočkují do 20 ml tekutého LB bujónu s kanamycinem (50 µg/ml) a nechají se růst do $OD_{600}=0,5$
2. Do média se přidá IPTG do finální koncentrace 0,4 mM
3. Po 3 – 4 hodinové expresi se buňky stočí (4000 otáček/10min) a resuspendují se v 0,8 ml SM pufru
4. Buňky se sonikují na ledu 30 minut (Medium level 1 min. sonikace, 2 minuty pauza).
5. Po sonikaci se buňky stočí (4000 otáček/10min) a oddělí se supernatant od peletu. Supernatant i rozpuštěný pelet se použije na přípravu vorku pro SDS PAGE.

Zymogram

1. Připravíme gel pro SDS PAGE (viz. tabulky). Mezi skla aparatury nejdříve nalijeme separační 15% gel a po jeho utužení nalijeme 5% zaostřovací gel.
2. Paralelně připravíme gel bez přídavku buněčných stěn
3. Pro nanesení vzorků použijeme 4x koncentrovaný SDS nanášecí pufr (může být i 5x nebo 6x koncentrovaný), (200 mM Tris-Cl pH 6,8, 400 mM DTT, 8% SDS, 0,4% Bromfenolová modř, 35% glycerol). Připravíme 40 µl vzorku, necháme 10 minut zahřát na 95 °C. Vzorek nanese na gel.
4. Pro elektroforézu se použije Tris-glycinový elektroforetický pufr (25 mM Tris-Cl pH 8,3, 192 mM glycin, 0,1% SDS) při proudu 25 mA.
5. Gely po elektroforéze propláchneme po 10 deseti minutách 3x v destilované vodě.
6. Gel bez přidání buněčných stěn obarvíme a gel s buněčnými stěnami zalijeme renaturačním pufrem (100 mM Tris pH 7,5; Triton X-100 – 0,1%)

Složení 15% separačního gelu pro zymogram

Reagencie	Množství	Složení
H ₂ O	2 ml	
Resolving buffer 4x	2,3 ml	36,3g Tris.Cl; 200 ml H ₂ O; pH 8,8 (upraveno HCl)
Akrylamid 30%	4,5 ml	100 ml H ₂ O; 29,2 g akrylamid; 0,8 g N,N-metylenbisakrylamid
SDS 10%	90 µl	Dodecylsulfát sodný
APS 10%	90 µl	Persulfát amonný
Buňky <i>S. aureus</i>	100 µl	Buňky <i>S. aureus</i> SA812 usmrcené autoklávováním
TEMED	7 µl	N,N,N,N -tetramethylendiamin

Složení 5% zaostřovacího gelu pro zymogram

Reagencie	Množství	Složení
H ₂ O	2 ml	
Stacking buffer 4x	1 ml	3g Tris.Cl; 50 ml H ₂ O; pH 6,8 (upraveno HCl)
Akrylamid 30%	540 µl	100 ml H ₂ O; 29,2 g akrylamid; 0,8 g N,N-metylenbisakrylamid
SDS 10%	40 µl	Dodecylsulfát sodný
APS 10%	60 µl	Persulfát amonný
TEMED	5 µl	N,N,N,N -tetramethylendiamin

Složka buněčných stěn může být variabilní 100 – 200 µl. Tabulky na složení více gelů jsou k dispozici v laboratoři.

Schéma postupu:

