

## 1. úloha. Izolace restričních endonukleáz z bakteriálních buněk

Restriční endonukleázy (RE) jsou součástí restričně modifikačních systémů řady bakteriálních druhů. Jednou z jejich funkcí je degradace cizorodé DNA. Izolace RE z bakteriálních buněk je poměrně jednoduchá a obecně ji lze rozdělit do následujících kroků:

1. Kultivace bakteriálních buněk. Baktérie se pomnoží v tekutém živném mediu do exponenciální až pozdně exponenciální fáze růstu (růstové podmínky - tj. složení živného média a teplota - se zvolí podle konkrétního organismu).
2. Shromáždění buněk. Buňky se zcentrifugují při nízkých otáčkách a promyjí vhodným pufrům.
3. Lyza buněk. Buňky se zlyzují pomocí enzymů (někdy jen částečně nalyzují) a rozbijí. K lyzi buněk se nepoužívají detergenty (denaturace proteinů). K rozbití buněk se používá několika způsobů, z nichž nejčastější jsou:
  - osmotický šok
  - drcení buněk (balotina, skleněný prášek, oxid hlinitý aj.)
  - sonikace (představuje univerzální a nejpoužívanější způsob rozbití buněk)
4. Přečištění lyzátu. Lyzát se zbaví zbytků buněčných stěn a ribozómů centrifugací při vysokých otáčkách.
5. Odstranění nukleových kyselin (před odstraněním jsou NK substrátem řady nespecificky působících nukleáz a vedou ke zvýšení relativního podílu RE). NK se odstraňují vysražováním se streptomycinsulfátem nebo polyetyléniminem. Vzniklý precipitát se odstraní centrifugací. Zbytky streptomycinsulfátu a nízkomolekulární látky se odstraní dialýzou, případně promytím lyzátu na chromatografické koloně (např. heparin-agaróze). Takto lze RE rovněž zakoncentrovat.
7. Uchovávání extraktů. RE lze skladovat buď bez purifikace a zakoncentrování při 4°C (jako tzv. hrubý lyzát), nebo po pročištění a zakoncentrování ve vhodném pufru s 50% glycerolem při -20°C.

Poznámky k izolaci:

1. Během izolace nesmí teplota překročit 10°C (inaktivace RE!)
2. Sonikační roztok obsahuje merkaptoetanol, který je zdraví škodlivý!
3. Je vhodné k práci použít sterilní materiál; kontaminace mikroorganismy může vést k degradaci RE.
4. Při práci s ultrazvukem je třeba dodržovat bezpečnostní předpisy.

## Izolace restričních endonukleáz *Sau3AI* a *Sau96* z buněk *S. aureus*

Organismy: Bakteriální kmen *Staphylococcus aureus* PS 3A a *S. aureus* PS96.

Fág 3A, 96, lambda (nebo jejich DNA).

Materiál: Živný bujon (500 ml), promývací pufr (0,05 M TRIS.Cl, 0,015 M Na<sub>3</sub>citrát, pH 7,4), lyzostafin (200 U/ml), sonikační pufr (0,01 M TRIS.Cl, 0,01 M 2-merkaptoetanol), streptomycinsulfát (10% zás. roztok v sonikačním pufru), dialyzační hadice, agaróza, TAE elektroforetický pufr, nanášecí barvivo pro elektroforézu.

Přístroje: termostat, centrifuga T23, ultracentrifuga UP65, ultrazvukový sonikátor, zařízení pro elektroforézu, transiluminátor.

### Postup

1. 500 ml bujonu naočkujeme 25 ml 18h/37 °C bujonové kultury příslušného bakteriálního kmene a necháme inkubovat přes noc při 37 °C. ☺
2. Buňky zcentrifugujeme v centrifuze T23 při 6000 ot/min při 4°C, 10 min. Sediment buněk zvážíme (očekávaná hmotnost 2-3 g, minimální požadovaná hmotnost 1,5 g).
3. Sediment promyjeme promývacím pufr (1×) a zcentrigujeme jako v bodě 2) a resuspendujeme v 10 ml promývacího roztoku.
4. Přidáme roztok lyzostafinu do výsledné koncentrace 5U/ml a inkubujeme 15 min při 37 °C za občasného promíchání. Nesmí dojít k úplné lyzi - kontrolujeme vizuálně.
5. Buňky zcentrifugujeme 10 min při 5000 ot/min a 4 °C a sediment resuspendujeme v 10 ml sonikačního pufru.
6. Buněčnou suspenzi vychladíme v ledové vodní lázni (5 min) a buňky rozbijeme ultrazvukem (10× 30-sekundových intervalů - průběžně chladíme tak, aby teplota nepřekročila 10 °C !) ☺
7. Buněčné zbytky a ribozomy odstraníme centrifugací 1 hod při 35 000 ot/min , 4 °C v centrifuze UP65 (rotor 8x11 ml).
8. K supernatantu přidáme roztok streptomycinsulfátu do v ☺dné koncentrace 1% a ponecháme 1 hod při 4 °C. Sraženinu zcentrifugujeme 10 min při 30 000 ot/min, 4 °C na centrifuze UP65 (rotor 8× 11 ml).
9. Supernatant přeneseme do připravené dialyzační hadice (vařit 10 min. v roztoku uhličitanu sodného a potom 2× v destilované vodě) a dialyzujeme proti sonikačnímu pufru přes noc (4°C, 3× 500 ml pufru).
10. Jemný precipitát odstraníme centrifugací (5000ot/10 min, 4°C) a supernatant přeneseme do sterilní zkumavky a rozdělíme do několika alikvotních částí. Takto připravený hrubý extrakt uchováváme při 4°C (zůstává aktivní po dobu nejméně 1 roku).
11. Stanovíme aktivitu restričních enzymů přítomných v hrubém extraktu.

## Stanovení aktivity restričních endonukleáz *Sau3AI* a *Sau96*

Restriční endonukleázy *Sau3A* a *Sau96I* štěpí DNA fága lambda a rovněž DNA stafylokokových bakteriofágů, které byly propagovány na kmenech *S. aureus* nesoucích restričně modifikačními (RM) systémy odlišné od RM systémů přítomných v kmenech PS3A a PS96. Této skutečnosti lze využít k důkazu endonukleolytické aktivity enzymů přítomných v hrubých extraktech připravených v úloze č. 1.

Materiál: Hrubé extrakty připravené v úloze č. 1, DNA fága lambda (1 mg/ml), DNA stafylokokových fágů 3A, 96 a 71 (konc. 200-500 µg/ml), 50× konc. TAE elektroforetický pufr, agaróza, štěpící pufr 10× koncent., 6× konc. nanášecí barvivo,

Přístroje a zařízení: mikrocentrifuga, termostát, Eppendorfovy zkumavky, automatické pipety a špičky, zařízení pro elektroforézu, transiluminátor, fotoaparát.

### Postup

1. Do Eppendorfovy zkumavky napipetujeme:
  - 10 µl sterilní destil. vody
  - 5 µl roztoku DNA fága (lambda, případně některého ze stafylokokových fágů) (asi 1 µg)
  - 3 µl hrubého extraktu izolovaných RE
  - 2 µl 10× konc. štěpícího pufru (aktivitu ověřujeme v pufrch A, M a MULTI-CORE)Současně založíme reakční směs, v níž je hrubý extrakt nahrazen destil. vodou
2. Směs dobře promícháme pipetou a zcentrifugujeme 1 min.
3. Inkubujeme 2 hod při 37 °C.
4. Zahřejeme 5 min při 56 °C a necháme pomalu ochladit na pokojovou teplotu
5. Přidáme 3 ml nanášecího barviva a dobře promícháme pipetou
6. 20 ml roztoku nanese na 0,7 % agarozový gel a provedeme elektroforetické rozdělení (3-4 hod při 40 mA)
7. Gel přeneseme do barvicí lázně (TAE pufr obsahující 1 mg etidumbromidu/ml) a necháme barvit 0,5 hod.
8. Gel opláchneme destil. vodou (5 min) a pozorujeme pod UV světlem. Pořídíme fotografický záznam.

### Poznámky:

1. Etidumbromid je mutagen - pracujeme v rukavicích a na vyhrazeném místě.
2. Při práci s UV světlem chráníme oči a pokožku