

# Izolace restričních endonukleáz z bakteriálních buněk

- Příprava hrubého extraktu proteinů z produkčního bakteriálního kmene
  - Kultivace bakteriálních buněk
  - Shromáždění, promytí a stanovení výnosu
  - Lyze buněk sonikací
  - Částečná purifikace hrubého lyzátu
  - Průkaz enzymatické aktivity

# Poznámky k postupu

- Práce s velkým objemem potenciálně patogenního organismu *Staphylococcus aureus*
  - Buňky centrifugujeme v rotoru 6× 500 ml
  - Stanovení výtěžku buněk
  - Promytí v promývacím roztoku
- Příprava protoplastů, buňky nesmí lyzovat úplně
  - Množství lyzostafinu pro lyzi buněk dávkuje 15  $\mu$ l na 1 g buněk (koncentrace lyzostafinu 500  $\mu$ g/ml)
  - Inkubace na třepací lázni 37 C, vizuální kontrola
  - Převod do sonikačního pufru (práce s merkaptoetanolem – v digestoři)
  - Během následující izolace nesmí teplota překročit 10°C

# Poznámky k postupu

- Lyze buněk sonikací
  - při sonikaci chladíme v ledové lázni
  - Sonikace, dodržujeme bezpečnostní předpisy
- Odstranění zbytků buněk ultracentrifugací
  - ultracentrifugační kyvety 10 ml nutno vyvážit na předvážkách s přesností na 0,01 g
- Vysrážení DNA streptomycinem
  - provádíme ve sterilní kádince
  - precipitát odstraníme ultracentrifugací
- Dialýza a skladování extraktu
- Ověření aktivity

# Princip stanovení aktivity izolovaných restriktáz

- DNA fága 3A není štěpena restriktázou Sau3AI
- DNA fága 96 není štěpena restriktázou Sau96I
- Jiné fágové a bakteriální DNA jsou štěpeny oběma restriktázami
- Vybíráme optimální reakční pufr:  
A, M, MULTicore

# Výsledky v protokolu

- Stanovení výtěžku buněk
- Izolovaný hrubý extrakt rozplněný do alikvotů
- Gel se štěpenými fágovými DNA
- Stanovení optimálního reakčního pufu

# Modifikace konců DNA a klonování produktu PCR

- **Úloha demonstrující izolaci určitého genu z neznámého genomu s využitím degenerovaných primerů nesoucích restriční místa**
  - Příprava vektoru pBluescript  
izolace plazmidu → štěpení dvojicí RE (EcoRI a BamHI) → izolace linearizovaného vektoru z gelu → elektroforéza → stanovení koncentrace DNA
  - Příprava inzertu  
PCR → štěpení dvojicí RE (EcoRI a BamHI) → purifikace → elektroforéza → stanovení koncentrace DNA
  - Ligace a transformace
  - Skríníng klonů pomocí PCR nebo lyzí varem

# Obecné poznámky k postupu

- Příprava materiálu:
  - Kompetentní buňky
  - Neštěpená purifikovaná DNA vektoru
- K zabránění znovuspojení konců plazmidu štěpíme dvojicí restriktáz
- V průběhu experimentu zařazujeme vhodné kontroly
- Práci s GMO evidujeme dle předpisů

# Poznámky k postupu klonování

- PCR a štěpení inzertu a vektoru restriktázami
  - Příprava dostatečného objemu reakční směsi  
 $4 \times 25 \mu\text{l}$
  - Před štěpením RE produkt nutno purifikovat
  - Výběr vhodného pufru společného pro obě restriktázy
  - Purifikaci po štěpení RE provádíme současně s  
naštěpeným vektorem
  - Nenaštěpený vektor eliminujeme izolací  
linearizovaného vektoru z gelu z LMT agarózy



# Poznámky k ligaci

- Volba poměru inzertu a vektoru

$$\frac{\text{ng vektoru} \times \text{kb velikost inzertu}}{\text{kb velikost vektoru}} \times \text{molární poměr} \frac{\text{inzert}}{\text{vektor}} = \text{ng inzertu}$$

- V případě, že neznáme koncentraci:

	inzert		
vektor	1:3	1:1	3:1
	1:5		5:1

- Používáme rychlý ligační pufr s 10% PEG

# Poznámky k transformaci

- Z každé ligační směsi provádíme tři transformace (1, 3 a 5  $\mu$ l ligační směsi)
- Médium pro výsev:  
LBA obsahující 100  $\mu$ g/ml ampicilinu,  
40  $\mu$ g/ml Xgal a 0.1 mM IPTG
  - Zásobní roztoky: Ampicilin 100 mg/ml, Xgal 40 mg/ml, 0,1 M IPTG
- Kontroly:
  - Prázdný vektor = ověření frekvence transformace
  - Linearizovaný vektor = ověření, že nedochází k cirkularizaci bez inzertu
  - Bez DNA = ověření, že kompetentní buňky jsou citlivé k ampicilinu

# Skríning rekombinantních vektorů

1. Přeočkování kolonií ve formě dlouhých čárek na misky
2. Izolace plazmidu lyzí varem
3. Štěpení DNA dvojicí restriktáz
4. Elektroforéza
5. Ověření inzertu sekvencováním

# Výsledky v protokolu

- Kontrolní gely s inzertem a vektorem před a po štěpení
- Výsledky stanovení koncentrace inzertu a vektorem
- Výpočet složení ligační směsi
- Počty kolonií – modrobílý test
- Gel s rekombinantními vektory
- Sekvence inzertu
- Zamražení řádně označených klonů

# Klonování a exprese fágového lytického enzymu

- Úloha demonstrující expresní klonování a funkční test připraveného enzymu
  - Návrh sekvence primerů pro amplifikaci genu pro účely klonování v transkripčním fúzním vektoru
  - Příprava vektoru pSP72  
izolace plazmidu → štěpení dvojicí RE → defosforylace → izolace linearizovaného vektoru z gelu → elektroforéza → stanovení koncentrace DNA
  - Příprava inzertu  
vyštěpení dvojicí RE z pBluescript → izolace inzertu z gelu → elektroforéza → stanovení koncentrace DNA
  - Ligace a transformace
  - Přeočkování klonů na médium pro expresi a funkční test
  - Zymogram

# Obecné poznámky k postupu

- K dispozici budou:
  - Připravené kompetentní buňky DE3
  - purifikovaná DNA vektoru pSP72
  - Purifikovaná DNA pBluescript s inzertem (endolyzin)
  - Usmrcené autoklávované buňky *S. aureus*
- K zabránění znovuspojení konců plazmidu štěpíme dvojicí restriktáz a defosforylujeme
- Vektor neumožňuje provést modrobílý test
- V průběhu experimentu zařazujeme vhodné kontroly, vektor i inzert izolujeme z gelu
- Postup ligace – viz předchozí experiment
- Selektivní médium po transformaci obsahuje pouze ampicilin

# Výsledky v protokolu

- Kontrolní gely s inzertem a vektorem před a po štěpení
- Výsledky stanovení koncentrace inzertu a vektorem
- Výpočet složení ligační směsi
- Srovnání počtů kolonií po ligaci: samotný pSP72, pSP72 + inzert
- Gel s rekombinantními vektory
- Fotografie misky s funkčním testem
- Zamražení řádně označených klonů

# Metody přenosu DNA do buněk

- Elektroporace dvou typů plasmidů do *Staphylococcus aureus*
- Příprava kompetentních buněk
- Stanovení minimální inhibiční koncentrace antibiotik
- Příprava selekčních médií
- Izolace plasmidů z transformant
- Ověření plasmidů pomocí PCR



# Výsledky v protokolu

- Srovnání frekvence transformace obou plasmidů
- Výsledky MIC
- Srovnání dvou postupů přípravy kompetentních buněk
- Foto gelů