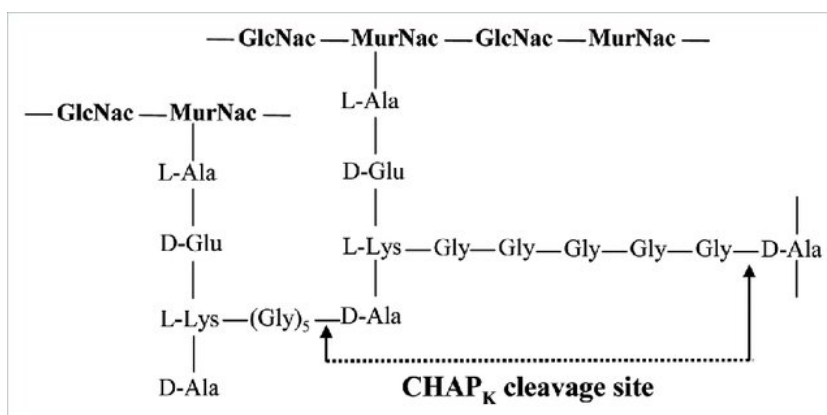


ODPOVĚDNÍ LIST A PROTOKOL K ÚLOZE Č. 1. Klonování genu pro endolyzin bakteriofága 812F1 ze *Staphylococcus aureus* – seznámení s expresním vektorem pET28a(+) – návrh konstruktů pro expresi endolyzinu.

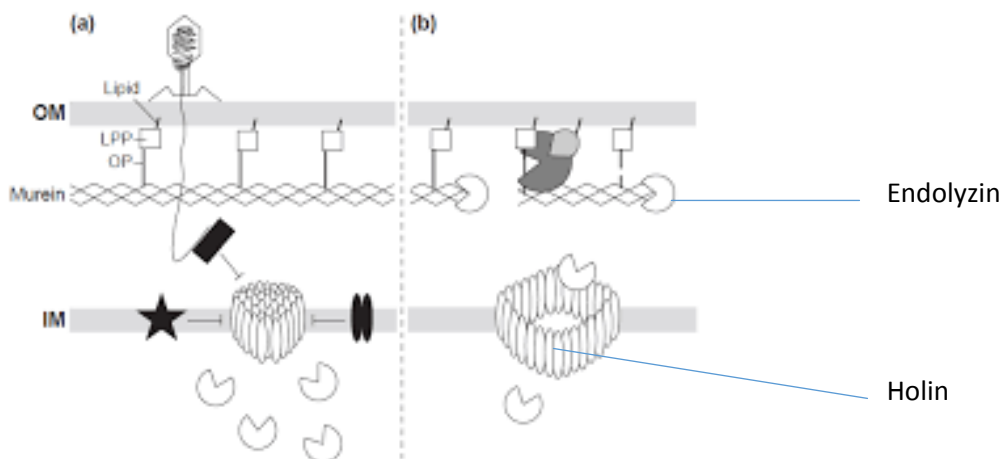
1. Jaká je funkce genu pro endolyzin *lysF1* a jaké další proteiny s endolyzinem interagují u přirozeného hostitele?

ODPOVĚĎ:

Gen kóduje bakteriofágový enzym, který má funkci peptidoglykan-hydrolázy a štěpí buněčnou stěnu hostitele (*Staphylococcus aureus*) v průběhu poslední fáze lytického cyklu.



Pro účinnou lyzi a degradaci buněčné stěny je potřebný holin, který se akumuluje v buněčné membráně a po dosažení kritické koncentrace tvoří póry, umožňující přístup endolyzinu k buněčné stěně, což vede ke smrti buňky.



2. Z jakých funkčních domén se endolyzin skládá? Uveďte pozice domén na proteinu a napište, jakou mají funkci (využijte např. InterPro, Pfam nebo CD-Search).

ODPOVĚĎ:

Skládá se ze dvou domén: CHAP (cysteine, histidine-dependent amidohydrolases/peptidases) s peptidázovou funkcí, štěpí peptidický můstek v peptidoglykanu. Popis např. zde

(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR007921/>) a SH3b (src Homology-3 – bacterial) doména má vazebnou funkci a zprostředkovává interakci proteinu se substrátem a zvýšení koncentrace v místě vazby. Role SH3b domény zatím není detailně prostudovaná, jiné teorie žikají, že imobilizuje endolyzin na zbytcích zlyzovaných buněk, aby nedocházelo k lyzi zvnějšku u dalších potenciálních hostitelů pro bakteriofága. Popis např. zde (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR003646/>).

3. Může rekombinantní endolyzin LysF1 způsobovat lyzi *E. coli* při expresi, a proč?

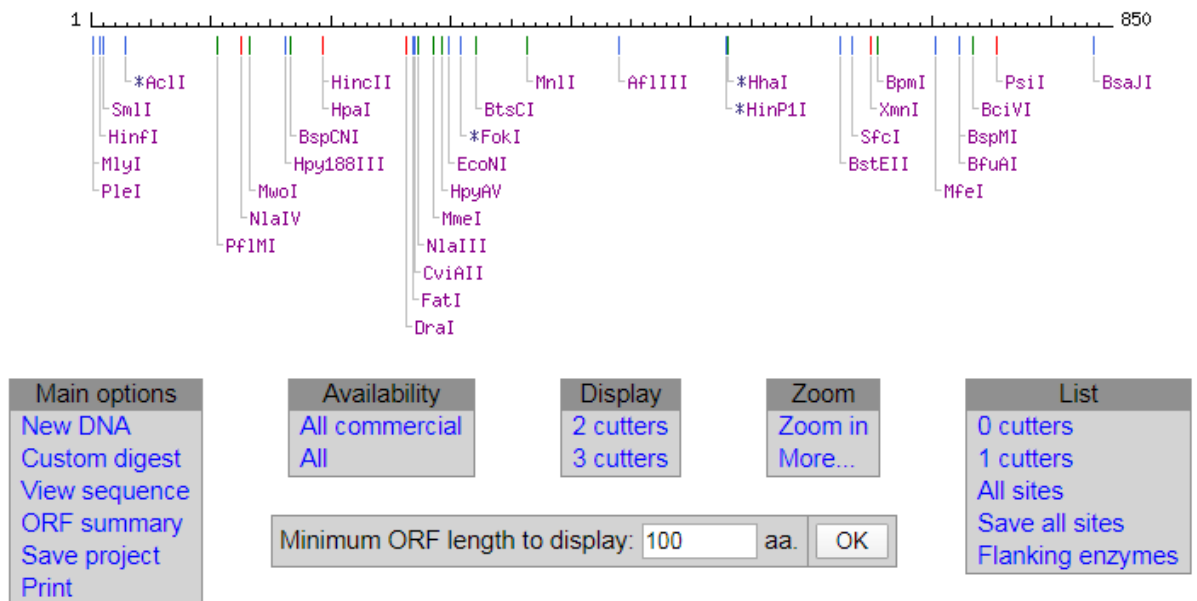
ODPOVĚĎ:

Nemůže, protože v systému není přítomen holin. Přesto, pro zajištění větší stability konstruktů, se doporučuje nejprve vytvořený konstrukt transformovat do buněk, které nejsou expresní (TOP10F') a po selekci klonů transformovat do expresních buněk (BL21).

4. Proveďte *in silico* restrikční analýzu předpokládaného genu pro fágový endolyzin pomocí nástroje NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

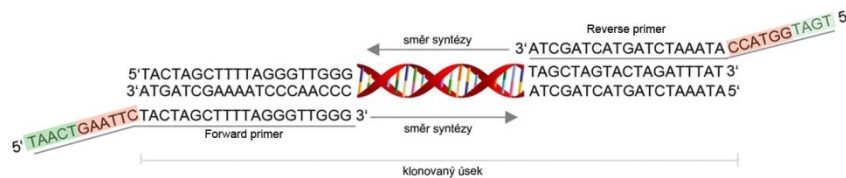
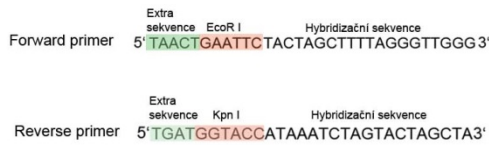
ODPOVĚĎ:

Gen štěpí následující enzymy, restriktazy NcoI a BamHI, se kterými plánujeme pracovat, gen neštěpí.

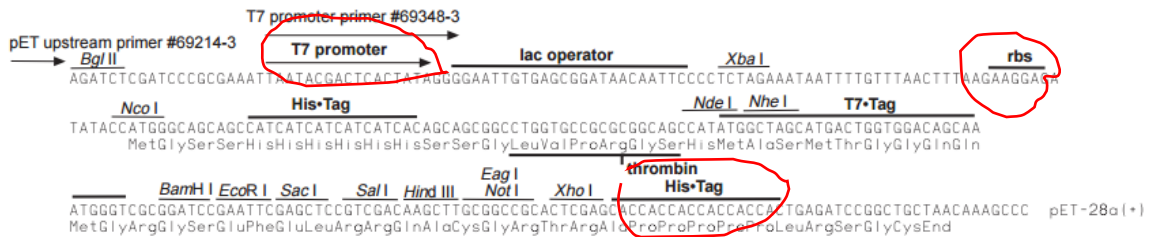


5. Navrhněte primery s vhodnými restrikčními místy tak, aby je bylo možné použít pro klonování genu pro fágový endolyzin LysF1 s His-tagem na C-konci – barevně znázorněte na sekvenci primerů restrikční místa, část komplementární ke genu pro endolyzin, případné nukleotidy navíc a případné nukleotidy pro změnu původní sekvence.

ODPOVĚĎ: Použijeme strategii modifikace konců produktu PCR prostřednictvím prodloužených 5'-konců primerů, které ponosou místa pro restrikční endonukleázy. Schématické znázornění návrhu primerů pro klonování s RE místy je na následujícím obrázku (sekvence je pouze příklad, ne z naší úlohy).



V dalším kroku prověříme sekvenci vektoru a restriktazy jejichž místa budou na 5'-koncích primerů vybíráme tak, aby konstrukt obsahoval důležité regulační signály pro expresi, tj. promotor, RBS, start-kodon, His-Tag na C-konci proteinu a stop-kodon.



Jelikož požadujeme His-Tag na C-konci proteinu, jedinou restriktažou, která připadá v úvahu na 3'-konci genu je NcoI. Na 5'-konci genu připadá v úvahu série restrikčních míst od BamHI až po XhoI.

Primer EndoF1 NcoBam low: nesoucí NcoI-místo
(5'- TAAGC↓CATGGCTAAGACTCAAGCAGAA -3')

Primer SH3upB: nesoucí BamHI místo
(5'- ATAG↓GATCCTTGAATACTCCCCAGG -3')

komplementární část: podtrženo, restrikční místa (RE): žlutě

Stojí za povšimnutí, že budoucí start kodon ATG je součástí restrikčního místa NcoI. Takto zajistíme zachování správného čtecího rámce klonovaného genu. Nukleotidy „navíc“ v primeru (černě) vyžadují restriktazy, které neumí štěpit DNA, pokud se jejich RE místo nachází bezprostředně na konci produktu PCR. Složení této sekvence je v podstatě libovolné, jen nesmí vést k tvorbě vlásenky a dimery primerů.

6. V sekvenci genu pro endolyzin fága 812F1 barevně znázorněte: start kodon, stop kodon, sekvenci komplementární k primerům navrženým pro klonování

>EF136588.1 Staphylococcus phage 812 strain phi812F1 putative holin and truncated endolysin genes, complete cds

TTAGAAGATTTAGATAACAAACAAATGTCTGAAGTTATCAAAAACTAAACCAAATTAATGAGTAAGTG
 TTAAATTAATATAGATAAACATGACCGACCTACTGTTATATTATTGTTAGAAATAAATATAATAGAAAG
 GTCGGTTTTTTAATGGCTAATGAACTAAACAACCTAAAGTTGTTGGAGGAATAAACCTTAGCACAAAGA
 ACTAAGAGCAAAACATTTTGGGTAGCAATTATATCAGCAGTAGCATTATTTGCTAACCAAATTTATAGGT
 GCTTTCCGGTTTAGACTACTCAGCTCAAATTTAGCAAGGTGTAATATTGTAGGTTCTATACTAACACTA
 TTAGCAGGTTTAGGTATTATTGTTGATAATAATACTAAAGGTCTTAAAGATAGTGATATTGTTCAAACA
 GACTATCTTAAACCTCGTGATAGTAAAGACCCTAATGAATTCGTTCAATGGCAAGCAAATGCAAATAAC
 ACTAGTACTTTTGGATAGACAGCTACGAAAACAATGCAGAACCTGACACAGATGATAGTGATGAAGTA
 CCTGCTATTGAAGATGAAATTTGATGGTGGTTTCAGCACCTTCTCAAGATGAAGAAGATACCGAGGAACAT
 GGTAAAGTATTTGCAGAGGAGGAAGTTAAGTAATGGCTAAGACTCAAGCAGAAATAAATAACGTTTAG
 ATGCTTATGCAAAAGGAACAGTAGATAGCCCTTACAGAGTTAAAAAAGCTACAAGTTATGACCCATCAT
 TTGGTGTAATGGAAGCAGGAGCCATTGATGCAGATGGTTACTATCACGCTCAGTGTCAAGACCTTATTA
 CAGACTATGTTTTATGGTTAACAGATAATAAAGTTAGAACTTGGGGTAATGCTAAAAGACCAAATTAAC
 AGAGTTATGGTACTGGATTTAAAATACATGAAAATAAACCTTCTACTGTACCTAAAAAAGGTTGGATTG
 CGGTATTTACATCCGGTAGTTTATGAACAGTGGGGTACATAGGTATTGTATATGATGGAGGTAATACTT
 CTACATTTACTATTTTAGAGCAAACTGGAATGGTTATGCTAATAAAAAACCTACAAAACGTGTAGATA
 ATTATTACGGATTAACCTCACTTCATTGAAATACCTGTAAGCAGGAACTACTGTTAAAAAAGAAACAG
 CTAAGAAAAGCGCAAGTACACCGGCAACTAGACCAGTTACAGGTTCTTGGAAAAAGAACCAGTACGGAA
 CTTGGTATAAACCGGAAAATGCAACATTTGTCAATGGTAACCAACCTATAGTAAGTAACTAGGTTCTC
 CATTCTTAAATGCTCCAGTAGGCGGTAACCTACCGGCAGGGGCTACAATTGTATATGACGAAGTTTGT
 TCCAAGCAGGTCACATTTGGATAGGTTATAATGCTTACAACGGTAACAGAGTATATTGCCCTGTTAGAA
 CTTGTCAAGGTGTTCCACCTAATCAAATACCTGGCGTTGCCTGGGGAGTATTCAAATAGAAATATAAAT
 TAGACGGATTTAAAATCCGTCTATTTTTTTTGCAAAAAAGTGTGACAAAATTAATACATAGTGTATA
 GTTATATATGTAATCAAATAAAGGAGGAATTACATGGCACTACTTTTAAACATATTTTGTATTTTATT

Start kodon: zeleně, stop kodon: červeně, komplementární sekvence k templátu: žlutě a podtrženo. Přirozený stop-kodon není součástí reverzního primeru, protože chceme aby sekvence byla přeložena až po His-Tag, kdy bude využit stop-kodon za His-Tagem na vektoru. Při návrhu reverzního primeru a připojování restričního místa věnujeme pozornost tomu, abychom zachovali správný čtecí rámec pro překlad His-Tagu (varianty plasmidu a-c se zde mohou lišit).

7. Uvedte vámi navrženou sekvenci konstruktů LysF1+His-tag od start kodonu až po stop kodon, ověřte translaci *in silico*. Jaká je délka genu a proteinu?

Start kodon: zeleně, velkými písmeny sekvence genu bez stop-kodonu, malými písmeny sekvence z vektoru, stop-kodon: červeně

ATGGCTAAGACTCAAGCAGAAATAAATAACGTTAGATGCTTATGCAAAGGAACAGTAGATAGCCCTTACA
 GAGTTAAAAAAGCTACAAGTTATGACCCATCATTGGTGAATGGAAGCAGGAGCCATTGATGCAGATGGTTA
 CTATCACGCTCAGTGTCAAGACCTTATTACAGACTATGTTTTATGGTTAACAGATAATAAAGTTAGAACTTGGG
 GTAATGCTAAAGACCAAATTAACAGAGTTATGGTACTGGATTTAAAATACATGAAAATAAACCTTCTACTGTA
 CCTAAAAAAGGTTGGATTGCGGTATTACATCCGGTAGTTATGAACAGTGGGGTACATAGGTATTGTATATG
 ATGGAGGTAATACTTCTACATTTACTATTTTAGAGCAAACTGGAATGGTTATGCTAATAAAAAACCTACAAA
 CGTGTAGATAATTATTACGGATTAACCTCACTTCATTGAAATACCTGTAAGCAGGAACTACTGTTAAAAAAGA
 AACAGCTAAGAAAAGCGCAAGTACACCGGCAACTAGACCAGTTACAGGTTCTTGGAAAAAGAACCAGTACGG
 AACTTGGTATAAACCGGAAAATGCAACATTTGTCAATGGTAACCAACCTATAGTAAGTAACTAGGTTCTCCAT
 TCTTAAATGCTCCAGTAGGCGGTAACCTACCGGCAGGGGCTACAATTGTATATGACGAAGTTTGTATCCAAGCA
 GGTACATTTGGATAGGTTATAATGCTTACAACGGTAACAGAGTATATTGCCCTGTTAGAAGTTGTCAAGGTGT
 TCCACCTAATCAAATACCTGGCGTTGCCTGGGGAGTATTCAAGgatccgaattcgagctccgtcgacaagcttgcggccgcat
 cgagcaccaccaccaccaccaccatga

Protein charakterizujeme např pomocí <https://web.expasy.org/protparam/>

Number of amino acids: 305

Molecular weight: 33700.87

Theoretical pI: 9.18

MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSFYRVKKAATSYDPSFGVMEAGAIADAGYYHAQCQDLITD

YVLWLTDNKVVRTWGNNAKDQIKQSYGTGFKIHENKPSTVPPKGGWIAVFTSGSYEQWGHIGI
 VYDGGNTSTFTILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVKAGTTVKKETAKKSAST
 PATRPVTGSWKNQYGTWYKPENATFVNGNQPIVTRIGSPFLNAPVGGNLPAGATIVYDE
 VCIQAGHIWIGYNAYNGNRVYCPVRTCQGVPPNQIPGVAVGVFKDPNSSSVDKLAAALEH
 HHHHH*

8. Uvedte vhodné reakční podmínky pro PCR s navrženými primery pro klonování, vezměte v úvahu T_m primerů, délku produktu, interakce primerů.

ODPOVĚĎ: Pokud je k dispozici ověřený protokol, je ideální řídit se tímto protokolem.

V opačném případě použijeme následující postup:

Vždy se však optimalizuje Annealing temperature – teplota pro hybridizace primerů a doba jejich prodlužování. Pro výpočet Annealing temperature je vhodné využít některý z online nástrojů – například T_m Calculator (ThermoFisher Scientific). Výstup po vložení komplementárních sekvencí primerů:

Results										
ID #1	Sequence #1	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	T_m °C	ID #2	Sequence #2	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	T_m °C	Annealing Temperature °C
Primer#1	ATGGCTAAGACTC AAGCAGAA	6472.3	218800.0	62.4	Primer#2	TTGAATACTCCCC AGG	4841.2	151100.0	54.6	54.6

Doporučovaná Annealing Temperature je pro tento pár primerů 54,6 °C.

Čas prodlužování primerů je výrobcem Taq-polymerázy doporučován 15 – 30 sekund na kb. Budeme-li počítat s 30 s na každou kb u našeho genu, vyjde nám optimální potřebný čas přibližně 25 s. Dále můžeme optimalizovat koncentraci $MgCl_2$.

9. V bodech popište další kroky klonování až po expresi fágového endolyzinu a funkční test pro ověření exprese.
- Štěpení vektoru i inzertu a defosforylace štěpeného vektoru
 - Ligace vektoru s inzertem
 - Transformace *E. coli* TOP10F', ověření pozitivních klonů
 - Přetřansformování do expresních buněk BL21
 - Indukce exprese pomocí IPTG a test citlivosti k rekombinantnímu endolyzinu na plotnách

----- **Protokol z praktické úlohy** -----

10. Uvedte koncentrace DNA stanovené na Nanodropu
- Koncentrace izolovaného vektoru
 - Koncentrace štěpeného vektoru po defosforylaci a purifikaci z gelu
 - Koncentrace PCR produktu po štěpení restriktázami a přečištění

Naměřené koncentrace použijeme v následujícím příkladu

11. Vypočítejte složení ligační směsi:

Máte vektor s délkou 5369 bp a inzert o velikosti 855 bp. Vektor má koncentraci 25 ng/μl, inzert 60 ng/μl. Kolik μl vektoru a inzertu dáte do 20 μl ligační směsi, pokud chcete dosáhnout molární poměr 1:3.

Trochu jiný vzorec, než jste měli v zadání:

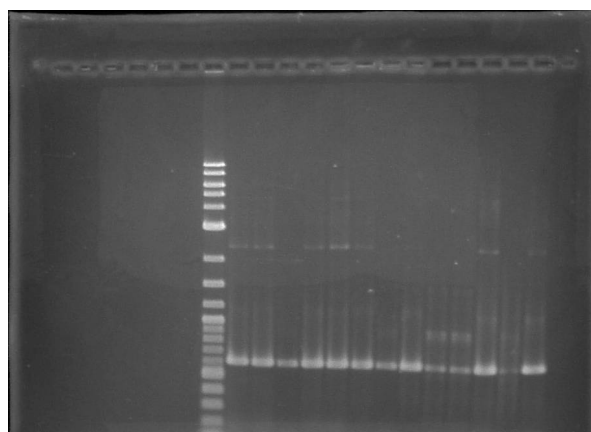
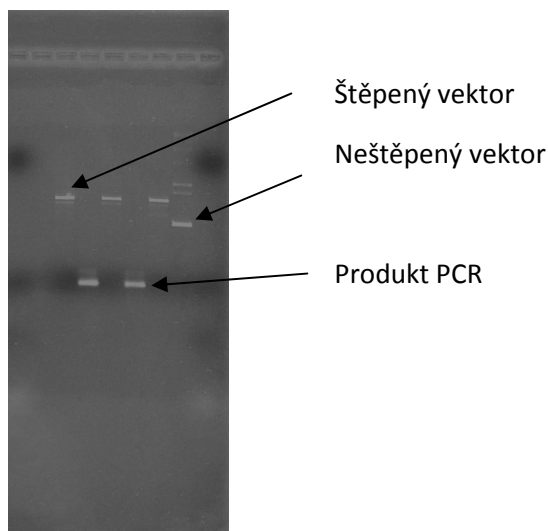
$$\frac{(\text{ng}) \text{ vektoru} \times (\text{kb}) \text{ velikost inzertu}}{(\text{kb}) \text{ velikost vektoru}} \times \text{molární poměr} \frac{\text{inzert}}{\text{vektor}} = \text{ng inzertu}$$

Na 25 ng (1 μl) vektroou přidáme do ligační směsi:

$[(25 \times 0,855)/5,369] \times 3/1 = 11,9 \text{ ng inzertu}$, tj. 0,2 μl uvažujeme-li koncentraci 60 ng/μl

12. Doložte a popište.

- Foto gelu se štěpeným vektorem s kontrolou
- Foto gelu s PCR produkty s kontrolou



Skríning klonů pomocí PCR z kolonií

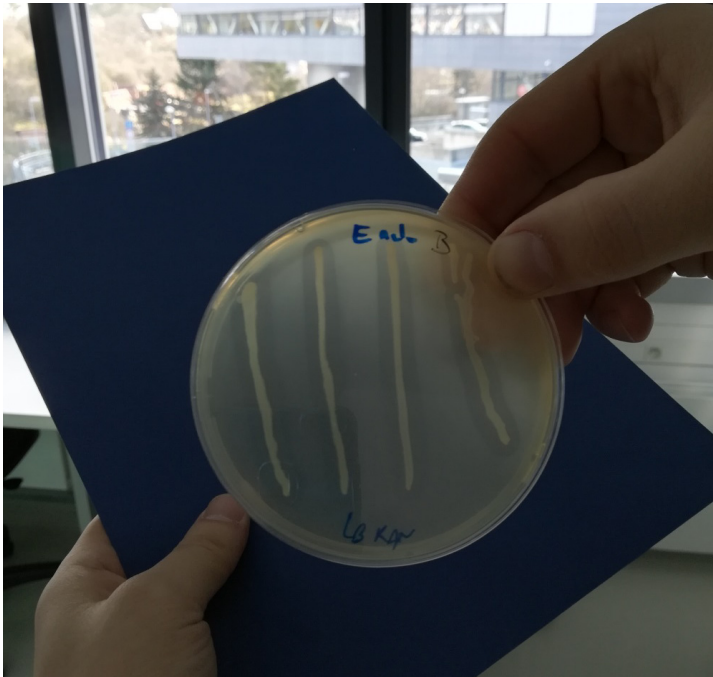
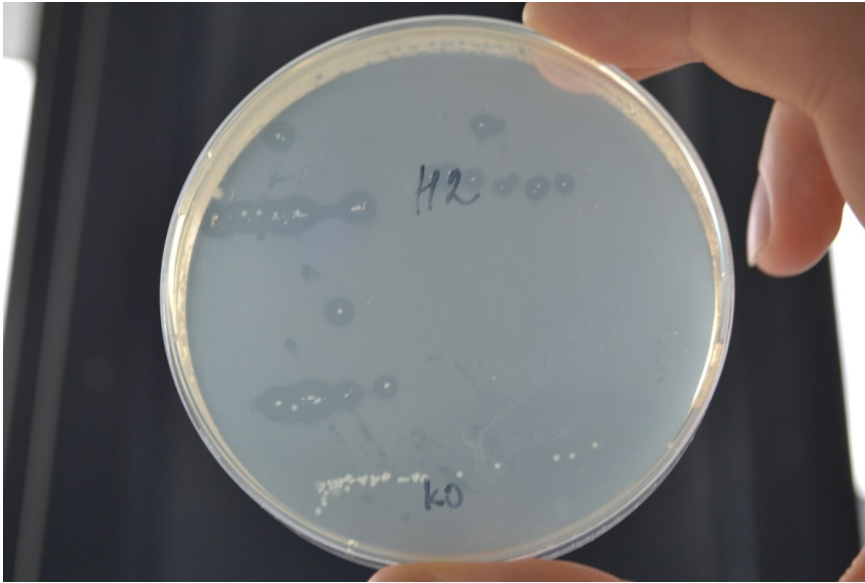
13. Doložte a popište foto ploten s transformovanými *E. coli* TOP10F s příslušnými kontrolami.

14. K čemu dochází při působení par chloroformu na expresní buňky *E. coli* v kterých je přítomen expresní vektor s naklonovaným genem pro endolysin.

Po přidání IPTG nejprve inkubujeme kulturu několik hodin, aby došlo k expresi. Potom působíme parami chloroformu, kdy dojde k narušení buněčné stěny a membrány *E. coli* a k uvolnění exprimovaného endolysinu. Lytickou aktivitu prokážeme přelitím plotny agarem s buněčnými stěnami stafylokoků.

15. Doložte a popište foto ploten s chloroformovým testem s příslušnými kontrolami.

Foto ploten s chloroformovým testem s příslušnými kontrolami. Kolem pozitivních klonů jsou patrné lytické zónky.

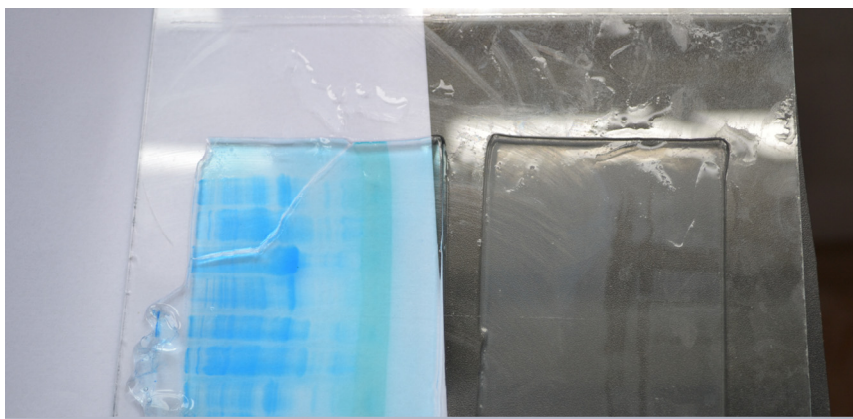
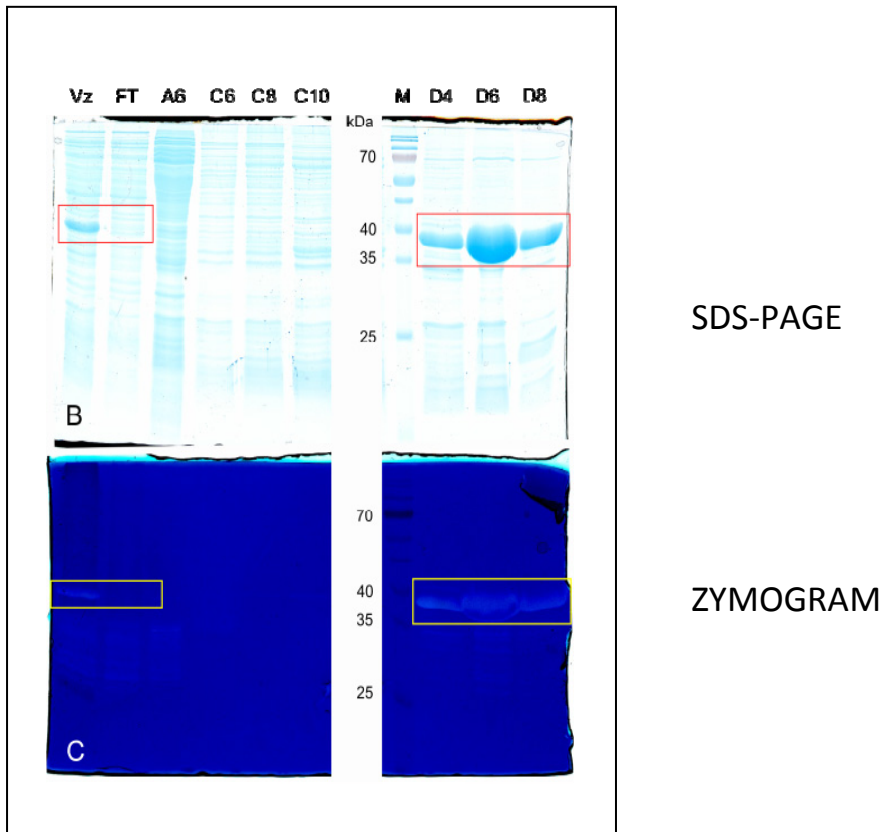


16. Doložte a popište foto zymogramu s příslušnými kontrolami.

Nahoře standardní SDS-PAGE gel obarvený Coomassie Brilliant Blue.

Dole zymogram – renaturovaný SDS-PAGE gel, do kterého jsou zalité buněčné stěny stafylokoka, obarvený metylénovou modří.

Vz, bakteriální proteiny po expresi; FT, proteiny z kultury BL21 bez plazmidu; M, marker; D4-D8, frakce purifikovaného proteinu



Zymogram studentů, kde renaturovaný gel není obarvený a lytická zóna je vidět přímo na úbytku zákalu buněčných stěn přidaných do gelu