

ÚLOHA č. 1. Klonování genu pro endolyzin bakteriofága 812F1 ze *Staphylococcus aureus* – seznámení s expresním vektorem pET28a(+) – návrh konstruktů pro expresi endolyzinu

Cílem úlohy je seznámit se podrobně s expresním vektorem pET28a(+) a navrhnout konstrukt pro expresi genu pro fágový endolyzin fága 812F1. V praktické části pak bude provedeno klonování genu pro endolyzin a dva různé funkční testy aktivity rekombinantního proteinu.

Vektory řady pET

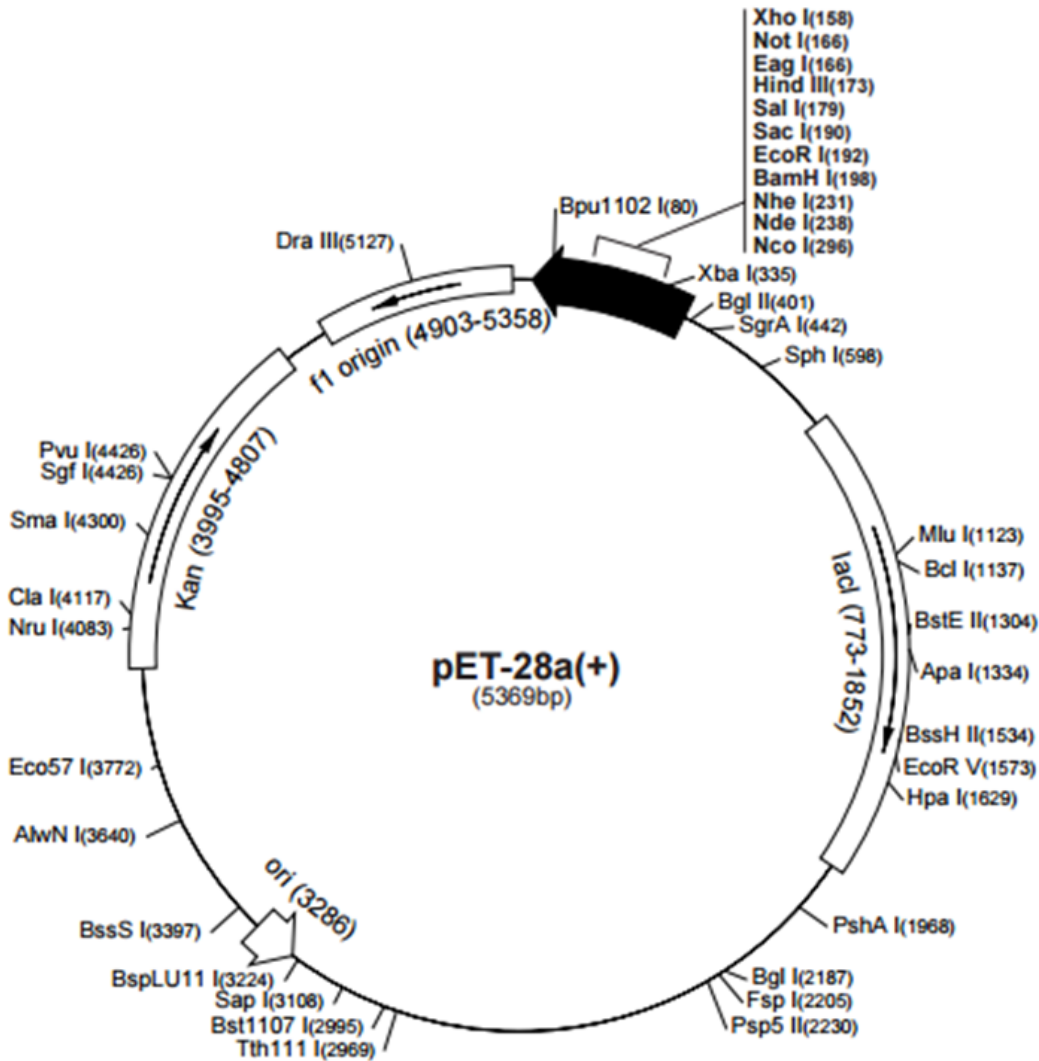
Vektory s označením pET byly vyvinuty pro klonování a expresi rekombinantních proteinů v *Escherichia coli*. Geny zájmu jsou exprimovány v plazmidech pET pod silným promotorem bakteriofága T7. Exprese je řízena T7 RNA polymerázou, která je kódována hostitelskou buňkou. T7 RNA polymeráza se vyznačuje vysokou selektivitou a aktivitou, cílový gen je exprimován s vysokou efektivitou. Požadovaný produkt klonovaného genu může tvořit více než 50% celkového buněčného proteinu po několika hodinách indukce. Další důležitá vlastnost pET systému je jeho nulová bazální exprese, nedochází k expresi klonovaného genu bez přítomnosti induktoru. V první fázi klonování se využívají hostitelské buňky bez genu pro T7 RNA polymerázu, čímž se eliminuje nestabilita plazmidu způsobená produkcí potenciálně toxických proteinů pro hostitelskou buňku. Nejprve je upravený vektor přenesen do neexpresních buněk *E. coli* (např. *E. coli* Top10F'). V druhém kroku je vektor transformací přenesen do expresních hostitelských buněk (např. *E. coli* BL 21) obsahujících gen pro T7 RNA polymerázu pod kontrolou *lacUV5* a exprese je indukována přidáním IPTG do kultivačního média.

U vektorů pET jsou k dispozici dva typy promotorů T7 a několik hostitelských kmenů, které se liší v tom, jak přísně potlačují hladiny bazální exprese, což poskytuje velkou flexibilitu a optimalizuje expresi široké škály cílových genů.

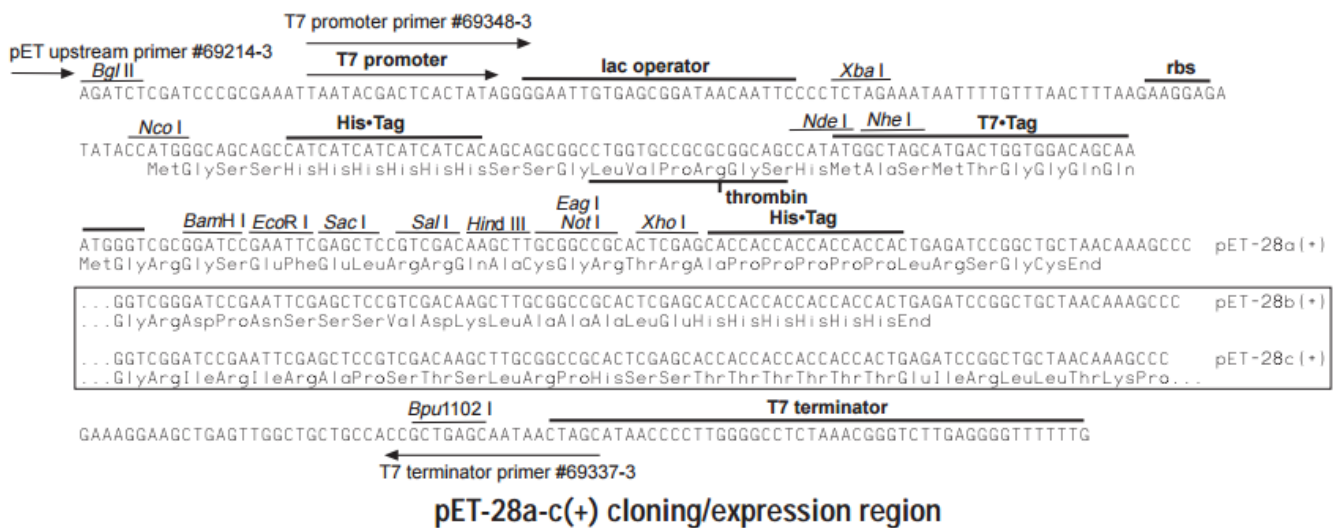
Vektor pET28a(+) je vhodný pro expresi proteinů s 6xHis-tag na N- nebo C-konci (**Obr. 1A**). Takto upravený konstrukt umožňuje efektivní purifikaci exprimovaného proteinu. Jedná se o 5369 bp velký vektor s dvěma počátky replikace – fágový počátek replikace (f1 ori, pozice: 4903-5358), plazmidový počátek replikace odvozený od vysoko-kopiových plazmidů ColE1/pBR322 (ori, pozice: 3285-3873).

Oblast pro klonování (**Obr. 1B**) se nachází za (kódující je komplementární řetězec) transkripčním terminátorem T7 (pozice: 26-73); obsahuje kromě řady restrikčních míst tyto sekvence:

- dvakrát 6xHis-tag (pozice: 140-157; 270-287) – značení proteinu na N nebo C konci
- T7 tag (pozice: 207-239) – peptid o 11 AMK, vedoucí sekvence z genu pro major capsid protein z bakteriofága T7; používá se jako značka v expresních vektorech, využívají se protilátky specifické pro T7 tag, které umožňují studium exprese rekombinantních proteinů (analog 6xHis-tag)
- Trombin site (pozice: 243-260) – restrikční místo pro trombin, rozštěpení rekombinantního proteinu, odstranění značek (T7 tag, 6xHis-tag)
- start kodon ATG jehož součástí je restrikční místo pro NcoI (pozice: 297-296)
- RBS (pozice: 307-312)
- *lac* operátor (pozice: 343-367) – vazba *lac* represoru, inhibice transkripce v *E. coli*
- T7 promotor (pozice: 368-386) – silný promotor fága T7
- Další geny na vektoru: promotor *lacI* a represor *lacI* (pozice: 773-1855), gen *rop* – kontrola počtu kopií plazmidů v buňce, gen pro rezistenci ke kanamicinu *kanR* – selekční marker



Obr. 1: Expresní vektor pET28a(+), A. mapa expresního vektoru pET28a(+)



Obr. 1: Expresní vektor pET28a(+), B. Detail sekvence „multiple cloning site“ s vyznačenými restričními místy a funkčními oblastmi

Gen pro fágový endolyzin

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-acetylglucosaminidázy 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** (přístupový kód GenBank F136588.1) **fága 812F1** (KJ206562.1), jehož velikost je **855 bp** a enzym má velikost 284 aminokyselin, tedy jeho hmotnost je **31,5 kDa**.

Sekvence endolyzinu

Kompletní sekvence genomu fága 812F1 volně přístupná v databázi NCBI pod přístupovým číslem **KJ206562.1**. Sekvence fágového holinu a endolyzinu volně přístupná v databázi NCBI pod přístupovým číslem **EF136588.1**.

Primery by měly být navrženy tak, aby na 3'konci obsahovaly sekvenci pro amplifikaci daného genu, na 5'konci restriční místa pro klonování do vektoru pET28a(+). Restriční místa v blízkosti konců primerů mohou vyžadovat prodloužení sekvence oligonukleotidu pro zajištění optimálního štěpení (viz manuál k restriktázám). Restriktázy použité pro klonování nesmí štěpit klonovaný gen. Restriční místa je nutné zvolit tak, aby byl ke genu připojený His-tag (součást vektoru pET28a(+)) pro následnou purifikaci. Gen musí být v blízkosti RBS, stop kodon se nachází za His-tagem. Pro expresi klonovaného genu a zároveň pro expresi His-tagu musí být zachován správný čtecí rámeček. Přirozený stop kodon genu pro endolyzin je třeba prostřednictvím primeru modifikovat na kodon pro jinou aminokyselinu, aby došlo k translaci genu včetně His-tagu. Primery musí splňovat všeobecné požadavky pro PCR reakci – podobné %GC, Tm.

Přehled pET vektorů včetně map vektorů je např. zde:

[https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet_and_duet_vectors_\(novagen\)](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet_and_duet_vectors_(novagen))

Sekvence a informace k vektoru: <https://www.addgene.org/vector-database/2565/>

Dostupný software pro práci s RE: <https://international.neb.com/> (Tools and Resources)

Dostupný software pro návrh primerů, stanovení vlastností primerů:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Software pro klonování, vizualizace plazmidových vektorů: SnapGene Viewer

<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>

Sekvence pET28a(+) ke stažení pro SnapGene Viewer:

[https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet_and_duet_vectors_\(novagen\)&plasmid=pET-28a\(%2B\)](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet_and_duet_vectors_(novagen)&plasmid=pET-28a(%2B))

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

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

ODPOVĚĎ:

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

ODPOVĚĎ:

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

ODPOVĚĎ:

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

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

6. V sekvenci genu pro endolysin 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

```
TTAGAAGATTTAGATAACAAACAAATGTCTGAAGTTATCAAAAAACTAAACCAAATTAATGAGTAAGTGTAAATTAATATAG
ATAAACATGACCGACTACTGTTATATTATTGTTAGAAATAAATAATAGAAAAGGTCGGTTTTTTAAATGGCTAATGAAACTA
AACAACTAAAGTTGTTGGAGGAATAAACCTTAGCACAAGAACTAAGAGCAAAACATTTTGGGTAGCAATTATATCAGCAGTA
GCATTATTTGCTAACCAAATTATAGGTGCTTTCCGGTTAGACTACTCAGCTCAAATGAGCAAGGTGTAATATTGTAGGTTTC
TATACTAACACTATTAGCAGTTTTAGGTATTATTGTTGATAATAATACTAAAGGCTTAAAGATAGTGATATTGTTCAAACAG
ACTATCTTAAACCTCGTGATAGTAAAGACCTAATGAATTCGTTCAATGGCAAGCAAATGCAAATAACACTAGTACTTTTGAG
ATAGACAGCTACGAAAACAATGCAGAACCTGACACAGATGATAGTGATGAAGTACCTGCTATTGAAGATGAAATGATGGTGG
TTCAGCACCTTCTCAAGATGAAGAAGATACCGAGGAACATGGTAAAGTATTTGCAGAGGAGGAAGTTAAGTAATGGCTAAGAC
TCAAGCAGAAATAAATAAACGTTTTAGATGCTTATGCAAAAGGAACAGTAGATAGCCCTTACAGAGTTAAAAAAGCTACAAGTT
ATGACCCATCATTTGGTGTAAATGGAAGCAGGAGCCATTGATGCAGATGGTTACTATCACGCTCAGTGTCAGACCTTATTACA
GACTATGTTTTATGGTTAACAGATAATAAAGTTAGAACTTGGGGTAAATGCTAAAGACCAAATTAACAGAGTTATGGTACTGG
ATTTAAAAATACATGAAAATAAACCTTCTACTGTACCTAAAAAAGGTTGGATTGCGGTATTTACATCCGGTAGTTATGAACAGT
GGGGTACATAGGTATTGTATATGATGGAGGTAATACTTCTACATTTACTATTTTAGAGCAAAACTGGAATGGTTATGCTAAT
AAAAACCTACAAAACGTGTAGATAATTATTACGGATTAACCTCATTGAAATACCTGTAAGCAGGAACACTACTGTTAA
AAAAGAAACAGCTAAGAAAAGCGCAAGTACACCGGCAACTAGACCAGTTACAGGTTCTTGGAAAAAGAACAGTACGGAACCT
GGTATAAACCGGAAAATGCAACATTTGTCAATGGTAACCAACCTATAGTAAGTAACTAGAAATAGGTTCTCCATTCTTAAATGCCTCA
GTAGGCGGTAACCTACCGGCAGGGCTACAATTGTATATGACGAAGTTTGTATCCAAGCAGGTCACATTTGGATAGGTTATAA
TGCTTACAACGGTAACAGAGTATATTGCCCTGTTAGAACTTGTCAAGGTGTTCCACCTAATCAAATACCTGGCGTTGCCTGGG
```

GAGTATTCAAATAGAAATATAAAATTTAGACGGATTTAAAATCCGTCATTTTTTTTTGCAAAAAAGTGTGACAAAATTAATAC
 ATAGTGTATAGTTATATATGTAATCAAATAAAGGAGGAATTACATGGCACTACTTTTAAACATATTTTGTATTTTTATT

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?
8. Uvedte vhodné reakční podmínky pro PCR s navrženými primery pro klonování, vezměte v úvahu T_m primerů, délku produktu, interakce primerů.
9. V bodech popište další kroky klonování až po expresi fágového endolyzinu a funkční test pro ověření exprese.

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

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

11. Vypočítejte složení ligační směsi:

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

$$\frac{\text{Množství inzertu (ng)}}{\text{Velikost inzertu (kb)}} = \frac{\text{Množství vektoru (ng)}}{\text{Velikost vektoru (kb)}}$$

12. Doložte a popište.
 - a. Foto gelu se štěpeným vektorem s kontrolou
 - b. Foto gelu s PCR produkty s kontrolou
 - c. Foto gelu s rekombinantními vektory izolovanými lyzí varem s kontrolami
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.
15. Doložte a popište foto ploten s chloroformovým testem s příslušnými kontrolami.
16. Doložte a popište foto zymogramu s příslušnými kontrolami.

PRACOVNÍ POSTUP K ÚLOZE - Klonování genu pro fágový endolyzin a ověření exprese endolyzinu

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 přídavkem 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 CaCl_2 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 $\text{OD}_{600} = 0,3$. (Kultivace cca 2 hod.)
2. Buněčnou kulturu vytemperujeme na 4°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 CaCl_2 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 CaCl_2 .
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

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', DH5 α , JM83, JM101, NM522, BL21 aj. Gen pro rezistenci ke kanamycinu je využíván pro selekci transformant.

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 mikrometodou alkalické lyze, při níž se získá DNA v množství několika μg s dobrou citlivostí ke štěpení restričními endonukleázami a účinně spojovaná ligázou.

3. 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 *Nco*I a *Bam*HI.

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

Koncentrace izolovaného vektoru:	
---	--

6 μg DNA vektoru pET28 naštěpíme v objemu 40 μl 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 μl neštěpeného vektoru jako kontrolu

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

4. Defosforylace

Defosforylace se používá pro zvýšení účinnosti klonování a zamezení znovuspojení vektoru aniž by došlo k začlenění inzertu.

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

2. Inkubace 30 min/37 °C

3. 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). **Jako kontrolu použijeme linearizovaný plazmid (5369 bp).**

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

5. 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 restrikčních endonukleáz, jejíž štěpné místo se nachází v polylinkeru (velikost restrikčních 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 restrikčního fragmentu do vektoru, což má řadu výhod, např. umožňuje restrikční 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.

- restrikční endonukleázy *NcoI* a *BamHI*, štěpící pufry 10× konc., destil. voda

- primer **EndoF1_NcoBam_low** nesoucí *NcoI*-místo a primer **SH3upB** nesoucí *BamHI*-místo, o koncentraci 10 pmol/ul, 10× konc. roztok dNTP, Taq DNA-polymeráza a příslušný reakční pufr, 50 mM MgCl₂, - automatické pipety, špičky, mikrozkuřavky, mikrocentrifuga, spektrofotometr, termocykler - zařízení pro elektroforézu a vyhodnocování gelů

Postup

1. Provedeme amplifikaci genu s primery, jejichž konce nesou rozpoznávací sekvence pro restrikční endonukleázy *NcoI* a *BamHI*.

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			
Připojení primerů			
Prodlužování primerů			
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 amplikonu restrikními 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 mikrofuze. 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.

6. Ligace:

Nejsnadněji se klonují DNA-restrikční 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 restrikčního 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 (Pufř může mít jinou koncentraci).

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

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

Připravený konstrukt nejprve transformujeme do buněk TOP10F', které neslouží k expresi. V těchto buňkách dochází k vysoké frekvenci transformace a konstrukt je možné ověřit např. sekvenováním.

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 pufřu, 10 μl neštěpeného plazmidu ředěného TE pufřem, 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 zkumavky na 1 min do vodné lázně 42°C, nebo 3 min /37° C.
6. Zkumavka 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 zkumavce asi 100 µl supernatantu, ve kterém lze buňky resuspendovat.
10. Suspenze se vyseje pomocí bakteriologické hokejky na agarové plotny (LB agar, obsahující Kanamycin (50 µg/ml)

Kanamycin: Zás. roztok 50 mg/ml (1000×), výsl. koncentrace 50 µg/ml

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

Jedná se o velmi rychlou mikrometodu izolace plasmidu, která slouží k ověření získaných klonů. Plazmidy nanášíme přímo na agarózový gel nebo provedeme restrikční endonukleázovou analýzu.

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 mm³ a resuspendujeme v 350 µl STET pufru v epp. zkumavce. Odběr kultury párátkem provedeme tak, abychom neodebrali i část agaru.
3. Přidáme 25 µl (10 mg/ml), (5 µl o koncentraci 50 mg/ml, 50 ul 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 mikrofuzě 10 min. při max. ot. a pokojové teplotě.
7. Sterilním párátkem odebereme viskózní sediment
8. K supernatantu přidáme 40 µl 3M Na₃-acetátu (pH 5,2) a 420 µl izopropanolu. Promícháme několikerým obrácením zkumavky. Zkumavku ponecháme 10 min při pokojové teplotě.

9. Obsah centrifugujeme 15 minut v mikrofuze 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 mikrofuze. 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.

STET pufr: 0,1 M NaCl; 10 mM Tris.Cl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 5 % Triton X-100; 8 % sacharóza

9. 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 *Nco*I a *Bam*HI. Štěpící směs se dá připravit dle postupu štěpení plazmidu.
3. Alternativně u vzorků s posunem na gelu oproti původnímu plazmidu primární strukturu konstruktů ověříme sekvenováním.

10. Transformace do expresních buněk

K 200 μ l kompetentních buněk přidáme 50 ng plazmidu s inzertem, který byl purifikován pomocí komerčního kitu. Dále postupujeme podle protokolu č. 7.

11. Test citlivosti k rekombinantnímu endolyzinu

Funkční test využívá degradaci buněčných stěn *S. aureus*, kterými formou dvouvrstvého agaru převrstvíme kolonie expresních buněk lyzované parami chloroformu.

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.

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 µg/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 µl 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.

12. Zymogram

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.

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 puftru
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 nanášení 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 μ l 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 μ l	Dodecylsulfát sodný
APS 10%	90 μ l	Persulfát amonný
Buňky <i>S. aureus</i>	100 μ l	Buňky <i>S. aureus</i> SA812 usmrcené autoklávováním
TEMED	7 μ l	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: