

## PRACOVNÍ POSTUP K ÚLOZE – Exprese a purifikace rekombinantního proteinu SH3b\_GFP

### 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  $\text{CaCl}_2$ , v němž se buňky ponechají několik hodin, během nichž dojde k jejich vyhladovění a určitým změnám v buněčné stěně, umožňujícím přijmout externí DNA.

Takto připravené buňky lze použít buď bezprostředně, nebo se převedou do roztoku  $\text{CaCl}_2$  s přídavkem glycerolu, v němž je možné buňky zamrazit na  $-70^\circ\text{C}$  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  $\text{CaCl}_2$  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/ $37^\circ\text{C}$ ) a inkubujeme při  $37^\circ\text{C}$  na třepačce do hustoty suspenze  $\text{OD}_{600} = 0,3$ . (Kultivace cca 2 hod.)
2. Buněčnou kulturu vytemperujeme na  $4^\circ\text{C}$  v ledové vodní lázni a centrifugujeme 10 min/3000 rpm při  $4^\circ\text{C}$ . Od této chvíle nesmí teplota překročit  $4^\circ\text{C}$ !
3. Sediment buněk resuspendujeme v polovině objemu (25 ml) ledového roztoku  $\text{CaCl}_2$  a ponecháme v lednici při  $4^\circ\text{C}$  přes noc.
4. Buňky centrifugujeme jako v bodě 2) a sediment resuspendujeme v 5 ml (obecně v 1/10 výchozího objemu kultury) roztoku  $\text{CaCl}_2$ .
5. Takto připravené kompetentní buňky lze používat přibližně jeden týden. Pro dlouhodobé uchování se k buněčné suspenzi přidá 1/10 objemu sterilního glycerolu ( $4^\circ\text{C}$ !) a suspenze se zmrazí na  $-70^\circ\text{C}$ .

## 2. Příprava plazmidového vektoru pET28\_SH3 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 $\alpha$ , 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  $\mu\text{g}$  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\_SH3 restriční endonukleázy *Hind*III a *Xho*I.

Nejdříve stanovíme orientačně koncentraci vektoru: 2  $\mu\text{l}$  roztoku DNA změříme na Nanodropu.

<b>Koncentrace izolovaného vektoru:</b>	
---	--

6  $\mu\text{g}$  DNA vektoru pET28 naštěpíme v objemu 40  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  neštěpeného vektoru jako kontrolu

Reagencie	Množství ( $\mu\text{l}$ )
Voda	
Pufr	
Vektor	
Enzymy	
<b>celkem</b>	<b>40 <math>\mu\text{l}</math></b> (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 $\mu\text{g}$  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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

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 (5 690 bp).**

<b>Koncentrace štěpeného vektoru:</b>	
---------------------------------------	--

## 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 spojku, 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.

## 6. Vyštěpení inzertu restrikční endonukleázou

**Materiál:** Eppendorfovy zkumavky, mikrocentrifuga, automatické pipety, špičky, zařízení pro elektroforézu, transiluminátor, restrikční endonukleázy, štěpící pufry, sterilní destil. voda, TE pufr, 70% a 100% etanol, QiaQuick PCR Purification Kit, purifikovaná DNA vektoru pET21\_GFP, restrikční endonukleázy *HindIII* a *XhoI*

Nejdříve stanovíme orientačně koncentraci vektoru: 2  $\mu\text{l}$  roztoku DNA změříme na Nanodropu.

<b>Koncentrace izolovaného vektoru s inzertem GFP:</b>	
--	--

6  $\mu\text{g}$  DNA vektoru pET21\_GFP naštěpíme v objemu 40  $\mu\text{l}$  reakční směsi příslušnou dvojicí RE (2 hod), abychom zabránili znovuspojení přečnávajících konců. Postupujeme dle návodu k restriktázám. Pokud jsou koncentrace nízké, vynechá se objem vody.

Ponecháme si alespoň 10  $\mu\text{l}$  neštěpeného vektoru jako kontrolu

Reagencie	Množství ( $\mu\text{l}$ )
Voda	
Pufr	

Vektor	
Enzymy	
<b>celkem</b>	<b>40 <math>\mu</math>l</b> (objem restriktáz zanedbáváme)

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

<b>Koncentrace inzertu GFP po přečištění:</b>	
---	--

## 7. Ligace:

Nejsnadněji se klonují DNA-restriční 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 restričního 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\_SH3 štěpená RE, cizorodá DNA (inzert GFP) štěpená RE, T4-DNA-ligáza, 10x ligační pufr, mikrozkumavky, aut. pipety, špičky, termostat na 16°C, mikrofuga

<b>Koncentrace inzertu (768 bp):</b>	
<b>Koncentrace plazmidu (5690 bp):</b>	

### 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  $\mu$ l a posléze se doplňuje pufrům do 20  $\mu$ l:

- 100-500 ng vektorové DNA
- 100-500 ng cizorodé DNA
- destil. sterilní vodu (ad 10  $\mu$ l).

(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 $\mu\text{l}$	Inzert $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> 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  $\mu\text{l}$  2x Rapid ligation Buffer

- 1U T4-DNA-ligázy

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

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

## 8. 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 mikroskopické pipety se napipetuje 200  $\mu\text{l}$  kompetentních buněk. (V případě, že se používají buňky zmrazené na -70°C, nechají se pozvolna rozmraznout při pokojové teplotě.)

2. Zkumavka se umístí do ledové lázně.

3. Přidá se DNA (5  $\mu\text{l}$  ligační směsi smíchá s TE pufrem do celkového objemu 10  $\mu\text{l}$ , který se pak přidá ke kompetentním buňkám).

Přidáváme jednotlivě všechny ligační směsi (5 směsí), 10 µl TE pufru, 10 µl neštěpeného plazmidu ředěného TE puftrem, 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
11. Inkubace 24-48 h/37 °C

## 9. Ověření klonů pomocí „Colony PCR“

### COLONY PCR

Používáme, pokud máme primery na amplifikaci klonovaného inzertu. Nejvhodnější je používat tzv. sekvenační primery pro daný vektor, tzn. Primery nasedající na sekvenci vektoru tak, že směřují z levé i pravé strany do sekvence inzertu. Velikost výsledného amplikonu nám pak velmi rychle ukáže, zda je inzert v očekávané velikosti a použijí se také jako výchozí pro kontrolní sekvenaci inzertu. Používáme OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (BioLabs). Připravíme jednu mastermix pro více vzorků, potom rozpipetujeme po 25/50 µl na reakci. Templát se v každé reakci liší, přidáváme až po rozpipetování.

Materiál: OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (BioLabs), pipety, špičky, mikrozskumavky na PCR, thermocycler, PCR H<sub>2</sub>O, primery: SH3up\_S, SH3low nebo M13uni (-21)  
TGTAATAVGACGGCCAGT, M13rew (29)CAGGAAACAGCTATGACC

#### Složení Master Mixu dle doporučení výrobce:

<u>Component</u>	<u>25 µl reaction</u>	<u>50 µl reaction</u>	<u>Final Concentration</u>
<u>10 µM Forward Primer</u>	<u>0.5 µl</u>	<u>1 µl</u>	<u>0.2 µM</u>

<u>10 <math>\mu</math>M Reverse Primer</u>	<u>0.5 <math>\mu</math>l</u>	<u>1 <math>\mu</math>l</u>	<u>0.2 <math>\mu</math>M</u>
<u>Template DNA</u>	<u>variable</u>	<u>variable</u>	<u>&lt; 1,000 ng</u>
<u>OneTag 2X Master Mix with Standard Buffer</u>	<u>12.5 <math>\mu</math>l</u>	<u>25 <math>\mu</math>l</u>	<u>1X</u>
<u>Nuclease-free water</u>	<u>to 25 <math>\mu</math>l</u>	<u>to 50 <math>\mu</math>l</u>	<u>&lt; 1,000 ng</u>

Jako templát použijeme **kolonii transformant**. Sterilní 100  $\mu$ l špičkou se jemně dotkneme kolonie (nenabrat agar) a resuspendujeme v reakční směsi.

**Thermocycling conditions for a routine PCR:**

<b>STEP</b>	<b>TEMP</b>	<b>TIME</b>
Initial Denaturation	94°C	10 minute (dojde k lyzi buněk varem)
30 Cycles	94°C 45-68°C 68°C	15-30 seconds 15-60 seconds 1 minute/kb
Final Extension	68°C	5 minutes
Hold	4-10°C	

Vždy použijeme pozitivní kontrolu (templátová DNA pro originální amplifikaci inzertu, pro ověření účinnosti PCR). Jako negativní kontrolu můžeme použít transformantu prázdného vektoru, pokud jsme používali prázdný vektor jako kontrolu transformace.

Klon ověřený colony PCR použijeme na izolaci plazmidu pomocí kitu.

Přítomnost plazmidu a naklonovaného inzertu se ověří na ELFO.

## 10. Transformace do expresních buněk *E. coli* BL21 (DE3)

K 200  $\mu$ l kompetentních buněk přidáme 50 ng plazmidu s inzertem, který byl purifikován pomocí komerčního kitu. Dále postupujeme podle protokolu č. 8.

## 11. Indukce exprese

1. Buňky s *E. coli* BL21 (DE3) (pET28\_SH3\_GFP) naočkujeme do 20 ml LB bujónu s kanamycinem (50  $\mu$ g/ml) a nechají se růst do  $OD_{600}=0,5$
2. Do média přidáme IPTG do finální koncentrace 0,4 mM
3. Inkubace 3-4 h při 30°C.
4. Buňky stočíme 4000 ot./10 min a resuspendujeme v 0,8 ml SM pufu.
5. Sonikace na ledu 30 min - medium level 1 min sonikace, 2 min pauza.
6. Po sonikaci se buňky stočí 4000 ot./10 min a oddělí se supernatant od peletu. Supernatant použijeme dále - purifikace proteinu.

## 12. Purifikace proteinu na FPLC (Fast protein liquid chromatography)



**Schéma postupu:**