

Návrh Primerů:

<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

FW: 5'- ATG CAG ACC CTC CTT GTG AGC -3' (5' CAG ACC CTC CTT GTG AGC TCG 3')

REV: 5'- GAT GAG CAA GGC GGT AGT GTT -3'

Analýza restrikčních míst:

<http://heimanlab.com/cut2.html>

NcoI (CCATGG) a XhoI (CTCGAG) neštěpí a BamHI (GGATCC) neštěpí

pET28a - bez N-tag a na C-konci HIS-tag

FW: 5' ATATA **CCATGG** **CCAGACCCTCCTTGTGAGCTCG** 3'

REV: 5' ATATA **CTCGAG** **GATGAGCAAGGCGGTAGTGTT** 3'

pET28a - bez C-tag a na N-konci HIS-tag + T7Tag + trombin

FW: 5' ATATA **GGATCC** **CAGACCCTCCTTGTGAGCTCG** 3'

REV: 5' ATATA **CTCGAG** **CTAGATGAGCAAGGCGGTAGT** 3'

Podmínky PCR:

95°C 2:30 1 x

95°C 10s

60°C 30s 40 x

72°C 60s

72°C 5 min 1 x

pET28a https://www.helmholtz-muenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-28a-c_map.pdf

Amplifikace Glukóza oxidázy z gDNA *Aspergillus niger*

Materiál:

Elizyme HS ROBUST MIX RED (Elisabeth Pharmacon)

Primery - GOx_cHIS_FW, GOx_cHIS_Rev, GOx_NHIS_FW, GOx_NHIS_Rev

PCR voda

Složení PCR reakční směsi (50 ul)

HS ROBUST MIX RED	25.0 ul
FW primer (10 uM)	2.0 ul
Rev primer (10 uM)	2.0 ul
PCR voda	16.0 ul
gDNA	5.0 ul

Teplotní protokol:

95°C	2:30	1 x
95°C	10s	
60°C	20s	40 x
72°C	50s	
72°C	5 min	1 x

Přečištění PCR produktu

Materiál: Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg) (https://international.neb.com/-/media/nebus/files/protocols/t1030_quick_protocol_card_monarch_pcrdna_cleanup.pdf?rev=a562d8f1f21741b0ac6d59ea9020cef3&hash=E4845F80E8B2BE925A09DAD6562A41EC)

Izolace plasmidu pET28a ze 3 ml kultury *E. coli*

Materiál: PureYield™ Plasmid Miniprep System

(https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protcards/pureyield-plasmid-miniprep-system-quick-protocol.pdf?rev=592591947f9c47efb5a576173f4f77f6&sc_lang=en)

Restrikční analýza

Materiál:

Restriktázy

NcoI-HF (<https://international.neb.com/products/r3193-ncoi-hf#Product%20Information>)

XhoI (<https://international.neb.com/products/r0146-xhoi#Product%20Information>)

BamHI-HF (<https://international.neb.com/products/r3136-bamhi-hf#Product%20Information>)

Vektor pET28a

Složení směsi RA (50 ul)

CutSmart buffer (10x)	5.0 ul
PCR produkt/vektor	15 ul
PCR voda	28 ul
NcoI-HF/ BamHI-HF	1.0 ul (10U)
XhoI	1.0 ul (10U)

Teplotní protokol: Inkubace při 37°C po dobu 1 hodiny

Izolace naštěpeného PCR produktu a plasmidu z agarózového gelu

Materiál: Monarch® DNA Gel Extraction Kit (https://international.neb.com/-/media/nebus/files/protocols/t1020_quick_protocol_card_monarch_dna_gel_extraction.pdf?rev=09308c01500f43c6a8589b01845765d9&hash=0FD4350A9DE2AEAC84913DB2A00140AF)

Ligace PCR produktu do vektoru pET28a

Materiál: Instant Sticky-end Ligase Master Mix (<https://international.neb.com/protocols/2012/08/27/protocol-transfer-master-mix-to-ice-prior-to-reaction-set-up-mix-tube-by-finger-flicking-before-u>)

Protokol:

1. Transfer master mix to ice prior to reaction set up. Mix tube by finger flicking before use.
2. Combine 100 ng of vector pET28a with a 3-fold molar excess of insert and adjust volume to 5 µl with dH₂O.
3. Add 5 µl of Instant Sticky-end Ligase Master Mix, mix thoroughly by pipetting up and down 7-10 times, and place on ice. The sample is now ready to be used for transformation.

Transformace vektoru po ligaci do NEB 5-alpha E. coli

Materiál:

NEB 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency) (<https://international.neb.com/products/c2987-neb-5-alpha-competent-e-coli-high-efficiency#Product%20Information>)

Protokol:

1. Thaw a tube of NEB 5-alpha Competent E. coli cells on ice for 10 minutes.
2. Add 2 µl of plasmid DNA to the cell mixture. Carefully flick the tube 4-5 times to mix cells and DNA. Do not vortex.
3. Place the mixture on ice for 30 minutes. Do not mix.
4. Heat shock at exactly 42°C for exactly 30 seconds. Do not mix.
5. Place on ice for 5 minutes. Do not mix.
6. Pipette 950 µl of room temperature SOC into the mixture.
7. Place at 37°C for 60 minutes. Shake vigorously (250 rpm) or rotate.
8. Warm selection plates to 37°C.
9. Spread 50-100 µl of each dilution onto a selection plate and incubate overnight at 37°C.

Výsledek sekvenace klonu EF20028811

ATTCCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATC
ACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGAT
CCCAGACCCTCCTTGTGAGCTCGCTTGTGGTCTCCCTCGCTGCGGCCCTGCCACACTACATCAGGAGCAATGGC
ATTGAAGCCAGCCTCCTGACTGATCCCAAGGATGTCTCCGGCCGCACGGTCGACTACATCATCGCTGGTGGAG
GTCTGACTGGACTCACCACCGCTGCTCGTCTGACGGAGAACCCCAACATCAGTGTGCTCGTCATCGAAAGTGG
CTCCTACGAGTCGGACAGAGGTCCTATCATTGAGGACCTGAACGCCTACGGCGACATCTTTGGCAGCAGTGTA
GACCACGCCTACGAGACCGTGGAGCTCGCTACCAACAATCAAACCGCGCTGATCCGCTCCGGAAATGGTCTCG
GTGGCTCTACTCTAGTGAATGGTGGCACCTGGACTCGCCCCACAAGGCACAGGTTGACTCTTGGGAGACTGT
CTTTGGAAATGAGGGCTGGAACCTGGGACAATGTGGCCGCTACTCCCTCCAGGCTGAGCGTGCTCGCGCACCA
AATGCCAAACAGATCGCTGCTGGCCACTACTTCAACGCATCCTGCCATGGTGTAAATGGTACTGTCCATGCCGG
ACCCCGCGACACCGGCGATGACTATTCTCCCATCGTCAAGGCTCTCATGAGCGCTGTGGAAGACCGGGGTGTT
CCCACCAAGAAAGACTTCGGATGCGGTGACCCCATGGTGTGTCCATGTTCCCAACACCTTGCACGAAGACC
AAGTGCCTCCGATGCCGCTCGCAATGGCTACTTCCAACCTACCAACGTCCCAACCTGCAAGTCTGACCGGA
CAGTATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCACCACCCCTCGTGCCGTTGGCGTGGAATTCGGCACCC
ACAAGGGCAACACCCACAACGTTTACGCTAAGCACGAGGTCCT

Výsledek sekvenace klonu EF20028823

ATTCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGTGTGTCCATGTTCCCAACACCTTG
CACGAAGACCAAGTGCCTCCGATGCCGCTCGCAATGGCTACTTCCCAACTACCAACGTCCCAACCTGCAAGT
CCTGACCGGACAGTATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCACCACCCCTCGTGCCGTTGGCGTGAA
TTCGGCACCCACAAGGGCAACACCCACAACGTTTACGCTAAGCACGAGGTCCTCCTGGCCGCGGGCTCCGCTG
TCTCTCCACAATCCTCGAATATCCGGTATCGGAATGAAGTCCATCCTGGAGCCCCTTGGTATCGACACCGTC
GTTGACCTGCCGCTCGGCTTGAACCTGCAGGACCAGACCACCGCTACCGTCCGCTCCCGCATCACCTCTGCTGG
TGCAGGACAGGGACAGGCCGCTTGGTTCGCCACCTTCAACGAGACCTTTGGTACTATTCCGAAAAGGCACAC
GAGCTGCTCAACACCAAGCTGGAGCAGTGGGCCGAAGAGGCCGTCGCCGTTGGCGGATTCCACAACACTACC
GCCTTGCTCATCCTCGAGCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTG
AGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGCCTCTAAACGGGTCTTGGAGGGTTT
TTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCG
GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTCCC
TTCCTTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAG
TGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTGTGTTTACGTAAGTGGGCCATCGCCCTGATAGA
CGGTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAG

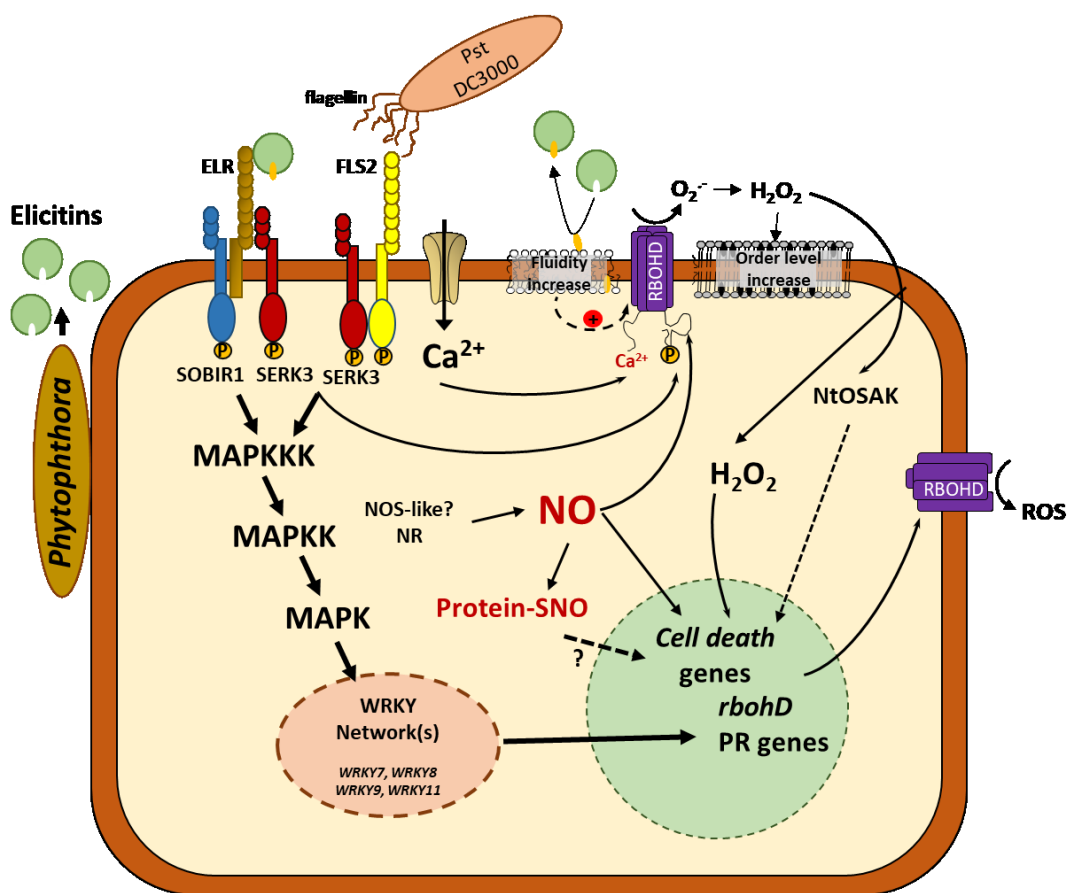
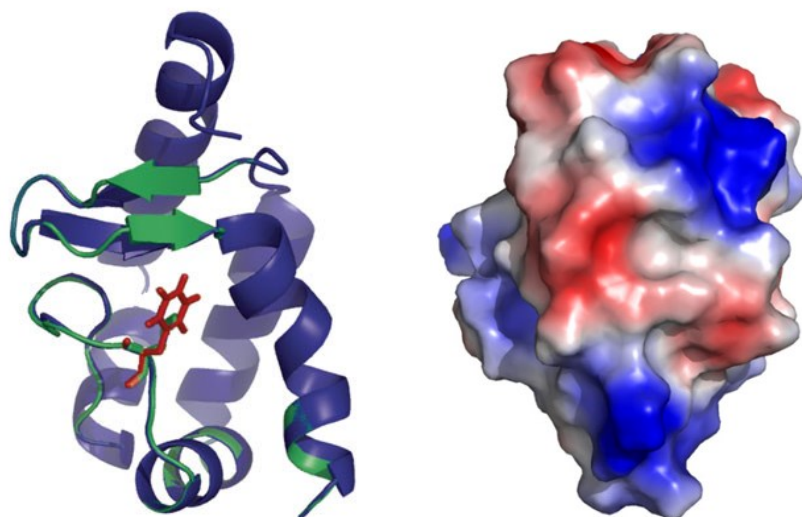


Schéma obranné reakce rostlin po rozpoznání elicitorů reprezentovaných elicitiny (β -cryptogein) a flagelinem



Struktura β -cryptogeinu

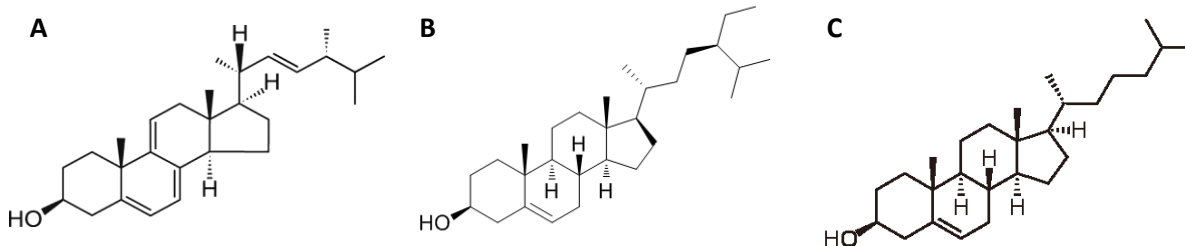
Fluorescenční měření přenosu DHE

V prvním měření bude analyzován transport sterolů mezi micelami. Principem je připravit dva druhy micel, mezi kterými by mohla probíhat výměna sterolů, a pomocí fluorescenčního měření kvantifikovat míru vlivu β -cryptogeinu na tento transport. Budou použity fluorescenční, samozhášivé micely tvořené dehydroergosterolem a nefluorescenční micely, obsahující dva různé sterolů. Měření je založeno na faktu, že dehydroergosterol podléhá jevu samozhášení, při výměně sterolů mezi dvěma druhy micel se od sebe molekuly dehydroergosterolu vzdálí, a fluorescence se tedy zvyšuje. Jako negativní kontrola bude použit aprotinin, což je podobně jako β -cryptogein malý bazický protein, který nevykazuje podobnou sterol transportní aktivitu. Měření bude prováděno na fluorimetru Fluoromax-4 od firmy Horiba (Horiba, Japonsko) při excitační vlnové délce 325 nm a emisní 370 nm. Budou prováděny tři sady měření, ve všech budou fluorescenční micely tvořeny dehydroergosterolem.

Nefluorescenční micely budou tvořeny pro první sadu měření cholesterolem, pro druhou beta-sitosterolem. Tyto steroly budou rozpuštěny v methanolu. Měření bude probíhat v kvetě s 1,2ml 10mM MES pufru o pH 7,0. Výsledná koncentrace DHE v měřené směsi bude 0,63 $\mu\text{mol/l}$ a výsledná koncentrace sterolů bude 3 $\mu\text{mol/l}$. Nejdříve bude měřen pouhý pufr, následně bude přidán DHE spolu s dalším sterolem v odpovídající koncentraci a bude změřena basální hodnota fluorescence, která odpovídá spontánnímu transportu, následně bude přidán β -cryptogein a bude měřena změna fluorescence. Rozdíl naměřené hodnoty od bazální bude odpovídat míře schopnosti β -cryptogeinu transportovat steroly mezi micelami.



Diagram fluorescenčního měření přenosu sterolů



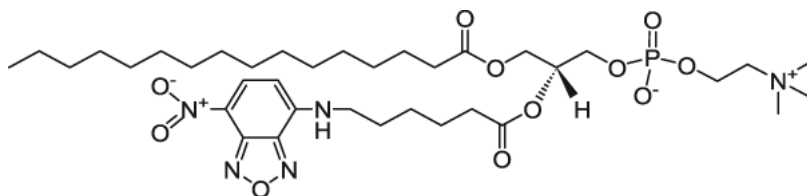
Struktura dehydroergosterolu (A), beta-sitosterolu (B) a cholesterolu (C)

Fluorescenční měření přenosu NBD-PC

V dalším experimentu bude měřena schopnost β -cryptogeuinu katalyzovat transport lipidů mezi akceptorovými a donorovými unilamelárními váčky. Váčky budou připraveny následujícím způsobem: pro donorové váčky bude 0,32 mg fluorescenčně značeného fosfatidylcholinu (NBD-PC), 0,08 mg fosfatidylserinu a 0,16 mg cholesterolu rozpuštěno v chloroformu. U akceptorových váček bude použit neznačený fosfatidylcholin (PC) místo značeného. Chloroform bude odpařen pod proudem dusíku. Po odpaření budou přidány 2 ml 10mM MES pufru a směs bude sonikována. Měření bude prováděno v 1,2ml MES pufru o pH 7,0 v míchané kyvetě. Excitační vlnová délka bude nastavena na 460 nm a emisní bude nastavena na 534 nm. Do každé kyvety bude přidáno 10 μ l směsi obsahující NBD-PC a 17 μ l směsi obsahující PC. Pro každé jednotlivé měření budou naměřeny hodnoty fluorescence před a po přidání β -cryptogeuinu a z nich bude následně spočten rozdíl.



Diagram fluorescenčního měření přenosu NBD-PC.



16:0-06:0 NBD PC (1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine)