

MASARYKOVA ZITA
PŘÍRODOVĚDEC TA
ÚSTAV BIO



PŘÍPRAVA LEKTINU PSL2 Z HRACHU SETÉHO (*PISUM SATIVUM*)

Diplomová práce

Bc. Helena Vondrová

Vedoucí práce: prof. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.

Brno 2016

Bibliografický záznam

Autor: Bc. Helena Vondrová
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav biochemie

Název práce: Příprava lektinu PSL2 z hrachu setého (*Pisum sativum*)

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Analytická biochemie

Vedoucí práce: prof. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.

Akademický rok: 2015/2016

Počet stran: 79 + 23

Klíčová slova: lektiny, PSL2, *E. coli*, *L. tarentolae*

Bibliografický záznam

Autor: Bc. Helena Vondrová
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav biochemie

Název práce: Příprava lektínu PSL2 z hrachu siateho (*Pisum sativum*)

Študijný program: Biochemia

Študijný obor: Analytická biochemia

Vedúci práce: prof. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.

Akademický rok: 2015/2016

Počet strán: 79 + 23

Klíčové slová: lektíny, PSL2, *E. coli*, *L. tarentolae*

Bibliographic Entry

Author: Bc. Helena Vondrová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Biochemistry

Title of Thesis: Preparation of lectin PSL2 from *Pisum sativum*

Degree programme: Biochemistry

Field of Study: Analytical Biochemistry

Supervisor: prof. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.

Academic Year: 2015/2016

Number of Pages: 79 + 23

Keywords: lectins, PSL2, *E. coli*, *L. tarentolae*

Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci produkce a purifikace hypotetického lektinu PSL2 a na jeho následné strukturně - funkční studie. Lektiny jsou proteiny reverzibilně vázající sacharidy. Mimo jiné se vyznačují i tím, že jsou schopny aglutinovat erytrocyty. Vyskytují se napříč živočišnou, rostlinnou, houbovou a bakteriální říší, včetně prvoků. Díky rozsáhlému výskytu a variabilitě funkcí a vlastností mají lektiny široké využití.

Na získání zmíněného proteinu PSL2 byly využity různé kmeny bakteriálních buněk *E. coli*, které byly transformovány dvěma druhy DNA konstruktů.

První konstrukt byl již dříve připraven v naší laboratoři. Obsahoval gen pro fúzní protein tioredoxin, který sloužil nejen jako protein napomáhající rozpustnosti cílového proteinu PSL2, ale zároveň i jako kotva, pomocí které byl tento rekombinantní protein purifikován.

Druhý konstrukt byl navržen a připraven v rámci této práce. Obsahoval gen pro vysoce rozpustný NusA fúzní protein, který sloužil na posun produkce cílového proteinu PSL2 do rozpustné formy. Na purifikaci proteinu PSL2 s NusA fúzním proteinem byly použity dvě oligohistidinové kotvy, které byly připojeny na N-konec sekvence pro gen *psl2*.

Pomocí takto modifikovaných buněk *E. coli* prostřednictvím dvou vybraných konstruktů byly optimalizovány podmínky produkce rekombinantního proteinu PSL2. Dále byla provedena optimalizace purifikace proteinu PSL2 pomocí metody FPLC s využitím metaloafinitní chromatografie na Ni-NTA koloně. Protein získaný purifikací byl podroben strukturně - funkčním studiím.

Na produkci proteinu PSL2 v eukaryotickém expresním organismu *L. tarentolae* byly také navrženy a připraveny dva konstrukty.

Abstrakt

Táto diplomová práca je zameraná na optimalizáciu produkcie a purifikácie hypotetického lektínu PSL2 a na jeho následné štruktúrne - funkčné štúdie. Lektíny sú proteíny reverzibilne viažuce sacharidy. Okrem iného sa vyznačujú aj tým, že sú schopné aglutinovať erytrocyty. Vyskytujú sa naprieč živočíšnou, rastlinnou, hubovou a bakteriálnou ríšou, vrátane prvokov. Vďaka rozsiahlemu výskytu a variabilite funkcií a vlastností majú lektíny široké využitie.

Na zisk spomínaného proteínu PSL2 boli využité rôzne kmene bakteriálnych buniek *E. coli*, ktoré boli transformované dvomi druhmi konštruktov.

Prvý konštrukt bol už skôr pripravený v našom laboratóriu. Obsahoval gén pre fúzny proteín tioredoxín, ktorý slúžil nielen ako proteín napomáhajúci rozpustnosti cieľového proteínu PSL2, ale zároveň aj ako kotva, pomocou ktorej bol tento rekombinantný proteín purifikovaný.

Druhý konštrukt bol navrhnutý a pripravený v rámci tejto práce. Obsahoval gén pre vysoko rozpustný NusA fúzny proteín, ktorý slúžil na posun produkcie cieľového proteínu PSL2 do rozpustnej formy. Na purifikáciu proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom boli použité dve oligohistidínové kotvy, ktoré boli pripojené na N-koniec sekvencie pre gén *psl2*.

Pomocou takto modifikovaných buniek *E. coli* prostredníctvom dvoch vybraných konštruktov boli optimalizované podmienky produkcie rekombinantného proteínu PSL2. Ďalej bola vykonaná optimalizácia purifikácie proteínu PSL2 pomocou metódy FPLC s využitím metaloafinitnej chromatografie na Ni-NTA kolóne. Proteín získaný purifikáciou bol podrobený štruktúrne – funkčným štúdiám.

Na produkciu proteínu PSL2 v eukaryotickom expresnom organizme *L. tarentolae* boli tiež navrhnuté a pripravené dva konštrukty.

Abstract

This thesis is focused on the production optimization and purification of the hypothetical PSL2 lectin and subsequent structural - functional studies. Lectins are proteins reversibly binding carbohydrates. Among other things, they are characterized by the fact that they are able to agglutinate erythrocytes. They are present across animal, plant, fungal and bacterial organisms, including protozoa. Thanks to their major occurrence and variability of functions and features, they have wide range of applications.

To obtain this PSL2 protein, various strains of *E. coli* cells were transformed by two kinds of constructs.

The first construct was previously prepared in our laboratory. It contained the gene for thioredoxin fusion protein, which is not only conducive to the protein solubility of the target PSL2 protein, but also works as a tag by which the recombinant protein can be purified.

A second construct was designed and prepared in this Master's thesis. It contained the gene for the highly soluble NusA fusion protein, which was used to advance the production of a target PSL2 protein in his soluble form. Two oligohistidine tags on the N-terminal sequence of the *psl2* gene were used to purify the PSL2 protein with NusA fusion protein.

Conditions for production of the recombinant PSL2 protein were optimized by the *E. coli* cells modified by the two selected constructs. Further, the optimization of the purification using the method FPLC with metaloaffinity chromatography was performed using Ni-NTA column. The protein obtained by purification was subjected to structural - functional studies.

Also, two constructs for production of the PSL2 protein in eukaryotic expression cells *L. tarentolae* were proposed and prepared.



MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2015/2016

Ústav: Ústav biochemie
Studentka: Bc. Helena Vondrová
Program: Biochemie
Obor: Analytická biochemie

Ředitel Ústavu biochemie PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s tématem:

Téma práce: Příprava lektinu PSL2 z hrachu setého (*Pisum sativum*)

Téma práce anglicky: Production of PSL2 lectin from *Pisum sativum*

Oficiální zadání:

Lektiny jsou proteiny vykytující se ve všech živých organismech, kde plní mnoho různých funkcí. Jejich základní schopností je specificky vázat sacharidové struktury. Rostlinné lektiny jsou největší a nejprostudovanější skupinou lektinů. Neplní jen funkci zásobní uvnitř rostlin, ale předpokládá se, že hrají roli v obranných mechanismech rostlin například proti bakteriím, plísním nebo hmyzu. U některých druhů luštěnin byly lektiny nalezeny v hlízkách kořenového systému. Některé studie naznačují, že tyto lektiny mohou napomáhat symbióze rostlin s bakteriemi rodu *Rhizobia*. Cílem diplomové práce bude příprava nového lektinu PSL2 z hrachu setého (*Pisum sativum*) v rekombinantní formě. Téma diplomové práce navazuje na předchozí experimenty produkce proteinu PSL2 v expresním organismu *Saccharomyces cerevisiae*, kde se ale nepodařilo protein produkovat v dostatečném množství. Cílem diplomové práce bude nalezení vhodného expresního systému a vhodných podmínek pro dosažení dostatečné produkce proteinu PSL2 pro další strukturně-funkční studie.

Jazyk závěrečné práce: slovenština

Vedoucí práce: prof. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Eva Dubská

Datum zadání práce: 20. 11. 2014

V Brně dne: 3. 11. 2015

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

Bc. Helena Vondrová
studentka

prof. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.
vedoucí práce

doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc.
zástupce ředitele Ústavu biochemie
pro pedagogické záležitosti

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať prof. RNDr. Michaele Wimmerovej, Ph.D. za odborné vedenie mojej diplomovej práce, špeciálne Mgr. Eve Dubskej a Mgr. Márii Pokornej za trpezlivosť, pomoc pri vypracovávaní, užitočné rady a dlhé konzultácie. Moja vďaka patrí aj ostatným členom skupiny Glykobiochémie. Ďakujem Vám za každú jednu poskytnutú radu a ochotu diskutovať nad vecami možnými aj nemožnými, za vytvorenie príjemného pracovného kolektívu.

V neposlednej rade moje veľké ďakujem patrí rodine a priateľom.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som svoju diplomovú prácu vypracovala samostatne s využitím informačných zdrojov, ktoré sú v práci citované.

Brno, 16.mája 2016

.....
Bc. Helena Vondrová

OBSAH

I. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	12
II. TEORETICKÁ ČASŤ	14
1. LEKTÍNY.....	14
1.1. <i>História.....</i>	14
1.2. <i>Základná charakteristika.....</i>	14
1.3. <i>Vlastnosti a využitie.....</i>	15
1.4. <i>Rastlinné lektíny.....</i>	16
1.5. <i>Lektíny húb a plesní.....</i>	20
1.6. <i>Živočíšne lektíny.....</i>	20
1.7. <i>Bakteriálne lektíny.....</i>	21
2. EXPRESNÉ SYSTÉMY	21
2.1. <i>Leishmania tarentolae.....</i>	21
2.2. <i>Escherichia coli.....</i>	24
III. CIELE PRÁCE.....	25
IV. PRAKTICKÁ ČASŤ	26
1. MATERIÁL A METÓDY	26
1.1. <i>Biologický materiál</i>	26
1.2. <i>Kultivácia buniek.....</i>	27
1.3. <i>Antibiotiká</i>	29
1.4. <i>Príprava konštruktov pre produkciu proteínu s oligohistidínovou kotvou</i>	29
1.5. <i>Transformácia E. coli kompetentných buniek teplotným šokom</i>	34
1.6. <i>Transfekcia L. tarentolae pomocou elektroporácie</i>	36
1.7. <i>Príprava vzoriek na sekvenáciu</i>	37
1.8. <i>Test a optimalizácia expresie rekombinantného proteínu PSL2 v bunkách E. coli ..</i>	38
1.9. <i>Test rozpustnosti produkovaného proteínu PSL2.....</i>	39
1.10. <i>SDS-PAGE</i>	39
1.11. <i>Imunobloting</i>	40
1.12. <i>Expresia proteínu PSL2 pre purifikáciu.....</i>	41
1.13. <i>Purifikácia s využitím metaloafinitnej chromatografie.....</i>	42
1.14. <i>Dialýza</i>	43
1.15. <i>Koncentrovanie proteínu.....</i>	43

1.16.	<i>CD spektroskopia</i>	43
1.17.	<i>Funkčné štúdie hypotetického lektínu PSL2</i>	44
2.	VÝSLEDKY A DISKUSIA	45
2.1.	<i>Príprava konštruktov pre produkciu proteínu s oligohistidínovou kotvou</i>	45
2.2.	<i>Reštrikčné štiepenie</i>	46
2.3.	<i>Transfekcia Leishmania tarentolae</i>	51
2.4.	<i>Test expresie pripravených konštruktov pre produkciu proteínu PSL2 v E. coli</i>	53
2.5.	<i>Test rozpustnosti produkovaného proteínu PSL2</i>	55
2.6.	<i>Produkcia proteínu PSL2 pre purifikáciu</i>	57
2.7.	<i>Purifikácia PSL2 s tioredoxínovou kotvou</i>	59
2.8.	<i>Imunobloting</i>	60
2.9.	<i>Purifikácia PSL2 s dvomi oligohistidínovými kotvami (N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_psl2)</i>	62
2.10.	<i>CD spektroskopia</i>	72
2.11.	<i>Testy aktivity</i>	72
V.	ZÁVER	75
VI.	SUMMARY	76
VII.	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	77
VIII.	PRÍLOHY	80

I. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AI	auto indukcia
ALP	alkaline phosphatase (alkalická fosfatáza)
APS	ammonium persulfate (persíran amónny)
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BHI	Brain-Heart Infusion médium
CD	cirkulárny dichroizmus
CI	cytoplasmic insoluble (nerozpustná časť bunkového lyzátu)
Con A	concanavalin A (konkanavalín A)
CRD	carbohydrate recognition domain (doména rozpoznávajúca sacharid)
CS	cytoplasmic soluble (rozpustná časť bunkového lyzátu)
dH ₂ O	destilovaná voda
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamid
dNTP	deoxyribonukleotidy
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylen diamin tetraacetyl acid (kyselina etyléndiamíntetraoctová)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (rýchla proteínová kvapalinová chromatografia)
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza)
GalNAc	<i>N</i> -acetyl-galakózamín
GlcNAc	<i>N</i> -acetyl-glukozamín
IDA	iminodiacetic acid (kyselina iminodioctová)
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktosid (izopropyl-β- <i>D</i> -tiogalaktozid)
kb	kilo base (kilo báz)
LB	lysogeny broth (Luria – Bertani médium)
<i>L. tarentolae</i>	<i>Leishmania tarentolae</i>
MCS	Multi-cloning site (multiklonovacie miesto konštruktu)
MS	Mass spectrometry (hmotnostná spektrometria)
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetyl neuraminic acid (kyselina <i>N</i> -acetylneuramínová)
Ni-NTA	Nickel - nitrilotriacetic acid (kyselina nitrilotrioctová viažuca ión niklu)
NTC	Nourseothricin

OD ₆₀₀	optická d enzita pri 600 nm
ON	o ver n ight (cez noc)
pb	p áry b áz
PBS	fosfátový pufer s chloridom sodným
PHYRE	P rotein H omology/analog Y R ecognition E ngine (nástroj rozpoznávajúci proteínovú homológiu a analógiu)
PCR	P olymerase C hain R eaction (polymerázová reťazová reakcia)
RE	r eštrikčné e nzýmy
rpm	r ounds p er m inute (otáčok za minútu)
SDS	S odium D odecyl S ulfate (dodecylsulfát sodný)
SDS-PAGE	S odium D odecyl S ulfate - P oly A crylamide G el E lectrophoresis (elektroforéza v polyakrylamidovom géli v prítomnosti SDS)
SOC	S uper O ptimal C atabolite médium
SPR	S urface P lasmon R esonance (povrchová plazmónová rezonancia)
TET	t etracyklín
TB	T errific B roth médium
TC	T issue C ulture (tkanivová kultúra)
TBE	T ris- B orát E DTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> - t etrametylétyléndiamín
ThioHP	H is- P atch T hioredoxín (tioredoxínová histidínová kotva)
Tris	Tris(hydroxymetyl)aminometán
WGA	lektín - W heat G erm A gglutinin
6xHIS	oligohistidínová kotva

II. TEORETICKÁ ČASŤ

1. Lektíny

1.1. História

Prvá zmienka o lektínoch siaha až do roku 1888. Pod názvom hemaglutiníny – proteíny schopné aglutinovať červené krvinky - sa o nich prvý raz zmienil Peter Hermann Stillmark vo svojej doktorskej práci na terajšej Tartuskej univerzite (Estónsko). Neskôr zo semena ricínového stromu *Ricinus communis* vyizoloval vysoko toxický hemaglutinín, ktorý pomenoval ricín. Ten sa stal následne komerčne dostupný ako modelový antigén (spolu s arbínom) pre imunologické štúdie. Ricín sa dostal do povedomia širokej verejnosti až v roku 1978 vďaka povestne známej „dáždnikovej vražde“ opozičného bulharského spisovateľa v exile Georgiho Markova. Následne sa uvažovalo o použití ricínu ako biologickej zbrane počas prvej svetovej vojny, cez 2. svetovú vojnu bola vyvinutá aj bomba, testovaná na britských vojakoch, ale nikdy nebola použitá na vojnové účely (1).

Po prvý raz bol hemaglutinín v čistej forme získaný až v roku 1919. Jamesom B. Sumnerom z Cornellovej univerzity (Ithaca, New York) ho vyizoloval vo forme kryštalického proteínu z rastliny *Canavalia ensiformis* a dal mu meno konkanavalín A (ConA) (1). Avšak, až v roku 1936 Sumner a Howell opísali lektínovú špecifickosť voči cukrom, kedy ako možný dôsledok hemaglutinácie ConA uviedli jeho reakciu s cukornými zložkami na povrchu erytrocytov (2).

Až v roku 1954 došlo k návrhu zmeny názvu Boydom a Shapleighom vďaka schopnosti aglutinínov rozlišovať rôzne krvné skupiny. Názov „lektíny“ je odvodený od latinského slova *legere*, čo v preklade znamená vybrať si. Tento termín bol neskôr zovšeobecnený na všetky cukor-špecifické aglutiníny neimunitného pôvodu bez ohľadu na ich zdroj alebo špecifickosť krvných skupín (3).

1.2. Základná charakteristika

Lektíny sú rozmanitou skupinou proteínov, ktoré vysoko špecificky a reverzibilne viažu sacharidové štruktúry. Štruktúrou sa najviac podobajú enzýmom aj napriek tomu, že nevykazujú enzymatickú aktivitu (4).

Lektíny zvyčajne obsahujú 2 a viac väzbových miest pre sacharidové jednotky, niektoré lektíny avšak vytvárajú oligomérne štruktúry s mnohonásobnými väzbovými miestami. Sacharid

s lektínom sú prepojené množstvom relatívne slabých interakcií (5). Patria sem hlavne vodíkové väzby, ktoré sú tvorené buď medzi –NH skupinou a hydroxylovou skupinou sacharidu, alebo medzi proteínovým atómom kyslíku a hydroxylovou skupinou sacharidu. Ďalej hydrofóbne interakcie a van der Waalsové sily. Nakoľko sú pomerne slabé, sú pomerne často sa vyskytujúce a zároveň môžu podstatne podporovať stabilitu väzby. Zriedkavo sa na väzbe medzi lektínom a sacharidom podieľajú aj iónové interakcie (6).

Spočiatku boli lektíny považované za výhradne rastlinné komponenty. V súčasnej dobe sú lektíny známe u všetkých druhov organizmov od vírusov a baktérií cez huby a plesne až po rastliny a živočíchy vrátane človeka (3).

1.3. Vlastnosti a využitie

Záujem o lektíny, od ich opísania postupne stúpal, práve vďaka ich všestrannému využitiu. Sú výbornými nástrojmi na detekciu, izoláciu a charakterizáciu glykokonjugátov, hlavne glykoproteínov pomocou tzv. „lectin microarray“. Je to relatívne nová metóda, určená na rýchlu a citlivú analýzu glykánov, ktorá využíva imobilizované lektíny na dobre definovanom substráte. Metóda môže byť vhodná pre testovanie kvality pri bio-technologickej produkcii rekombinantných ľudských proteínových liečiv (napr. protilátok) (7).

Využitie nachádzajú aj pri preskúvaní zmien, ktoré nastávajú na povrchu buniek počas fyziologických a patologických procesov. Lektíny slúžia aj ako histochemické a cytochemické reagenty na detekciu glykokonjugátov v tkanivových rezoch, alebo na mapovanie neurónových ciest. Taktiež sa využívajú na separáciu glykoproteínov, glykopeptidov a oligosacharidov pomocou afinitnej chromatografie. Počas tohto procesu sú imobilizované lektíny kovalentne naviazané na agarózu, siliku alebo na inú polymérnu stacionárnu fázu (7). Svoje využitie nachádzajú rovnako pri rozoznávaní druhov krvných skupín (1).

Najskôr boli využívané ako jednoduché rozpoznávacie nástroje na identifikáciu zhubných nádorov. Vo viacerých výskumoch sa však preukázalo, že lektíny majú aj protinádorový účinok. Ng a kol. vo svojom článku opisuje hemaglutinín izolovaný z plodníc húb *Flammulina velutipes*, ktorý je schopný inhibovať proliferáciu leukemických buniek L1210 (8, 9).

Teraz sa lektíny využívajú ako dôležité diagnostické a prognostické biomarkery nádorových ochorení. V dnešnej dobe sú skúmané aj ako potenciálne prostriedky na liečbu zhubných nádorov. Napriek ich antiproliferačnej aktivite sa lektíny môžu zúčastňovať komplikovaných mechanizmov, ako je zapájanie sa do rôznych signálnych dráh apoptózy a autofágie, čím sa ich využitie v tejto oblasti komplikuje (9).

1.4. Rastlinné lektíny

Rastlinné lektíny sú najdlhšie známou skupinou tohto druhu. Sú považované za veľmi komplexnú a heterogénnu skupinu proteínov ako z biochemického a fyzikálneho hľadiska, tak aj z pohľadu štruktúry a sekvencie (10).

Najčastejší výskyt je v semenách, ale nachádzajú sa aj v ostatných častiach rastlín, ako napríklad v listoch, luskoch, koreňoch alebo kôre. Ich syntéza prebieha na ribozómoch endolazmatického retikula (6).

V roku 1972 mal konkanavalín A ako prvý lektín, stanovenú primárnu sekvenciu aj 3D štruktúru pomocou X-ray kryštalografie (11).

Delenie rastlinných lektínov

Prvá klasifikácia rastlinných lektínov bola založená na glykánových sekvenciách, ku ktorým sa lektíny viazali najlepšie. Neskôr, ďalšie možné delenie tejto rozmanitejšej skupiny priniesol Kurt Drickamer v roku 1988, kedy opísal CRD (carbohydrate-recognition domain) lektínov. Hovorí, že cukor viažuca aktivita lektínov je daná len určitou časťou peptidu (12).

Lektíny rastlín sa s ohľadom na ich štruktúru delia do 4 hlavných skupín. Merolektíny, sú lektíny, ktoré majú iba jednu CRD doménu. Hololektíny, sú skupinou zahŕňajúcou lektíny, ktoré majú 2 alebo mnohознаčné CRD. Chymerolektíny, sú proteíny, obsahujúce viac CRD, majúcich ďalšiu biologickú alebo katalytickú aktivitu závislú na odlišnej doméne ako je CRD. Štvrtou veľkou skupinou rastlinných lektínov sú superlektíny, ktoré majú tiež aspoň 2 CRD, ale od hololektínov sa líšia tým, že dokážu rozpoznať štruktúrne nesúvisiace cukry (13).

Lektíny rastlín môžu byť delené do skupín aj podľa ďalších vlastností, pričom jedným z najbežnejších kritérií pre ich klasifikáciu je rozdelenie podľa monosacharidu (N-acetylneuramínová kyselina, D-manóza, N-acetyl-D-galaktozamín, D-galaktóza, N-acetyl-D-glukozamín, L-fukóza), ku ktorému prejavujú najvyššiu afinitu (6).

Obranná funkcia lektínov

Prítomnosť lektínov v rôznych častiach rastlinných tkanív zvyčajne zdôrazňuje ich dôležitosť. Jednou z možností ich funkcie je fyziologická konkrétne, hrajú obrannú rolu proti fytopatogénnym mikroorganizmom, hmyzu a byľožravcom. V skutočnosti bolo preukázané, že rastlinné lektíny sú cytotoxické, fungitoxické, s insekticídnymi vlastnosťami (*in vitro* aj *in vivo*) a zároveň sú vysoko toxické pre vyššie živočíchy (12).

Lektíny boli navrhnuté ako sľubné prostriedky proti hmyzím škodcom. Rôzne plodiny vrátane pšenice, tabaku a zemiakov boli úspešne geneticky modifikované. Takýto postup

by mohol byť prínosný pre ochranu hospodárskych rastlín proti škodcom (4). Všeobecne, produkcia transgénnych rastlín s vloženou rezistenciou proti hmyzu a herbicídom vo veľkom rozsahu nevykazuje negatívny vplyv na životné prostredie. Naopak, používanie takýchto rastlín by mohlo zlepšiť dopad na človeka a jeho životné prostredie, keďže ich pestovaním sa znižuje výroba a používanie insekticídov a herbicídov (13). Zaujímavým kandidátom pre takéto poľnohospodárske vylepšovanie je lektín z hrachu, ktorý ma extrémne nízku toxicitu pre cicavčie bunky (14). Je, však, potreba bližšieho štúdia tejto problematiky. Dôležité je zodpovedať, čo konkrétne spôsobujú lektíny v strave alebo aký efekt spôsobujú transgénne rastliny s pridanou vlastnosťou rezistencie voči hmyzu pri styku so škodcami priamo na poli (10).

Rezistencia lektínov voči proteolyze, ich prítomnosť v potrave a ich negatívny účinok pri požití

Jednou z najzaujímavejších a najdôležitejších vlastností rastlinných lektínov, ktorá súvisí aj s vyššie opísanou obrannou funkciou, je ich vysoká schopnosť stability pri pôsobení pH v širokom rozsahu. Sú odolné voči pôsobeniu proteáz a celkovo voči proteolyze aj v prípade, že sa už nenachádzajú v ich prirodzenom prostredí (10).

Toto tvrdenie potvrdzuje aj zistenie, že biologicky neporušený lektín WGA bol detegovaný vo výtoku zachytenom po ileostómii a vo fekálnych zbierkach ľudských subjektov konzumujúcich stravu s obsahom pšeničných klíčkov (15).

Orálne užívané rastlinné lektíny môžu zostávať v čiastočne nestrávenej podobe v čreve. Je vysoká pravdepodobnosť, že tam sa viažu na širokú škálu bunkových membrán a glykokonjugátov črevnej sliznice, čo môže viesť k rôznym škodlivým účinkom na samotnej sliznici, ako aj k poškodeniu črevnej bakteriálnej flóry alebo iných vnútorných orgánov (13). Mnoho lektínov spôsobuje priamo alebo nepriamo hlboké morfológické alebo fyziologické zmeny v tenkom čreve. Takéto zmeny spôsobujú zníženie funkcie absorpcie živín. Zaujímavý je preto fakt opísaný v štúdií Riosa a kol., kde sa uvádza, že ďaleko menšie množstvo lektínov prežíva *in vitro* liečbu s proteolytickými enzýmami (10).

Preto sa predpokladá, že lektíny môžu byť taktiež chránené pred proteolytickou degradáciou počas prechádzania cez črevo. Také lektíny sú potom schopné väzby na epiteliálne alebo lumen časti čreva. Lektíny, ktoré nie sú schopné sa viazať na črevnú mukózu nespôsobujú konzumentovi žiadne alebo len veľmi malé tráviace problémy. Škodlivé účinky lektínov tak definitívne závisia od ich stupňa rezistencie voči proteolytickej degradácii. Pri *in vitro* reakciách

môže byť takáto ochrana slabo kompenzovaná pomocou prídavku glukózy alebo Ca^{2+} a Mn^{2+} iónov do reakčnej zmesi (10).

Rastliny všeobecne obsahujú veľké množstvo výživných látok a stopových prvkov, ktoré sú dôležité a nevyhnutné pre mikroorganizmy, hlísty, hmyz a iné bezstavovce, ako aj pre vyššie živočíchy. Ľudská potrava je závislá na rastlinách a živočíchoch. Samotné zvieratá a ich prežitie je zase závislé na rastlinách (15).

Lektíny sa vyskytujú aj v najčastejšie jedlých plodinách ako sú rajčiny, zemiaky, fazuľa, hrášok, mrkva, čerešne, višne, sójové bôby, ryža, kukurica, cesnak, arašidy, huby, avokádo, červená repa, pór, kapusta, korenie, orechy, čaj alebo korenie. V skutočnosti, prítomnosť významného množstva aktívnych lektínov v čerstvých alebo spracovaných potravinách a nedostatok informovanosti verejnosti ohľadom škodlivých účinkoch diétnych lektínov na črevá a zdravie viedli k početným otravám jedlom. V minulosti bola väčšina hospitalizácií kvôli nedostatočne tepelne upraveným fazuliám, ktoré obsahujú lektíny. Hospitalizovaní ľudia mali rôzne tráviace problémy ako napr. nadúvanie, nevoľnosť, zvracanie alebo hnačky (10, (16).

Lektíny v hrachu siatom

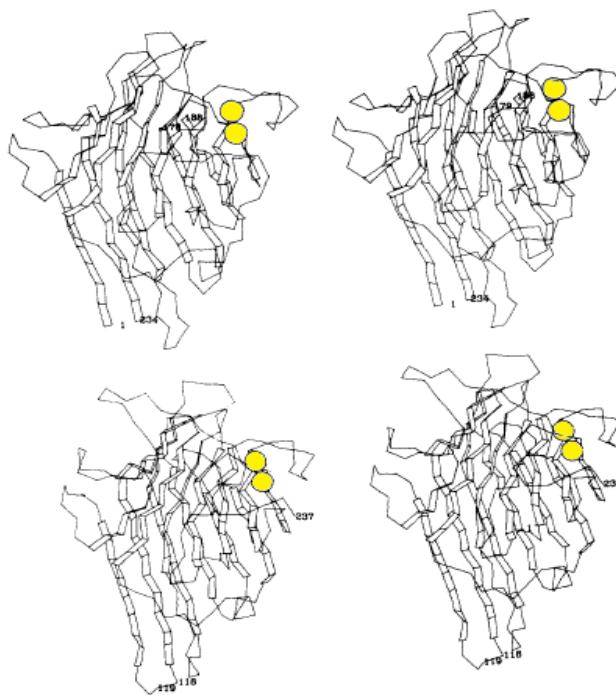
Lektíny sa v hrachu vyskytujú v lusku, v hojnom počte v semenách, ako aj v koreňoch a obranných štruktúrach tkanív. V semenách zastupujú úlohu zásobných a obranných proteínov. Ich funkcia v koreňoch nie je úplne jasná, uvažuje sa o ich úlohe v tvorbe uzlíkov (14).

PSL (*Pisum sativum* lektín) je metaloproteín zložený z dvoch monomérov. Monomérne jednotky tohto proteínu sú veľmi podobné lektínu ConA nielen sekundárnou a terciárnou štruktúrou, ale aj výskytom cys-peptidových väzieb a špecifickosťou voči Ca^{2+} a Mn^{2+} iónom. Rozdiely medzi týmito lektínmi sú hlavne v oblasti slučiek a na koncoch reťazcov (11, 18) (obrázok č. 1).

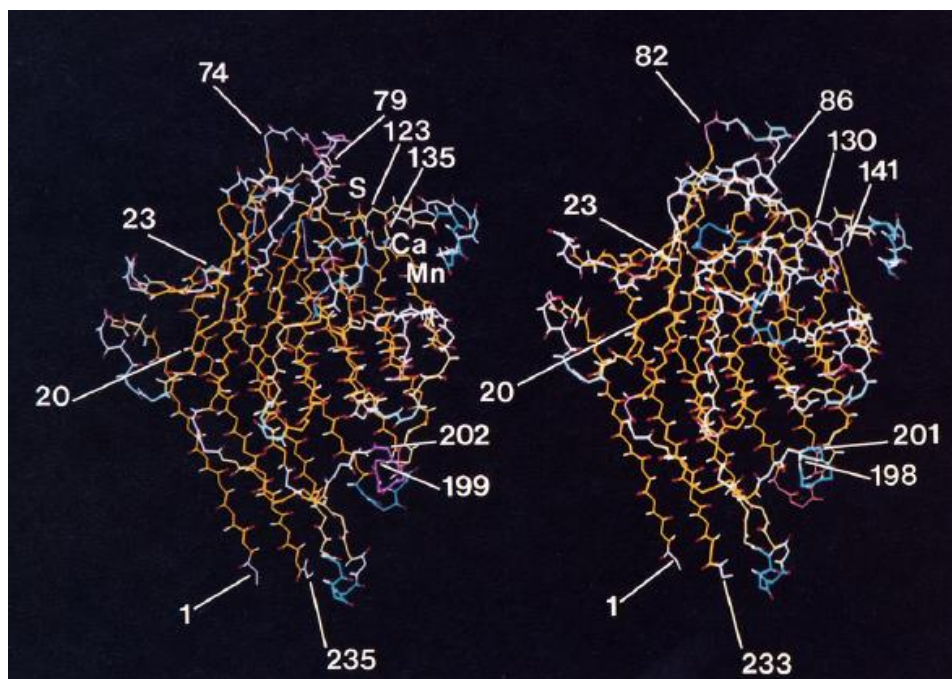
Boli predpovedané sekvencie 4 vegetatívnych homológov lektínu PSL a to Blec 1-4. Vegetatívne lektíny hrachu sú transkribované prinajmenšom 4 členmi vysoko konzervovanej multigénovej rodiny, ktorej členovia sú iba vzdialene príbuzní na základe aminokyselínovej sekvencie k lektínu PSL, ktorý obsahuje iba jeden transkribovaný gén. Všetky 4 homológy sú si sekvenčne veľmi podobné, tri z nich sú považované za nefunkčné gény. Blec 1 je iba v 38 % identický s PSL. Naopak, Blec 1 je sekvenčne identický s lektínom, študovaným v tejto práci, ktorý dostal pracovný názov PSL2. Polypeptid Blec 1 obsahuje 265 aminokyselín s predpokladanou molekulovou hmotnosťou 27,6 kDa (11,19).

PSL je špecifický pre väzbu manózy a glukózy. Toto sacharid viažuce miesto je zobrazené v štrbine na vrchu molekuly (Obrázok č. 2). Táto vlastnosť nie je opísaná u Blec 1,

ale pri porovnaní štruktúr týchto 2 lektínov je možné pozorovať podobnú štrbinu vykazujúcu aktivitu pre väzbu cukrov (18).



Obrázok č. 1: Stereo páry monomérov lektínu PSL (vrchná dvojica) a lektínu ConA (spodná dvojica) zobrazujúce pozíciu pre ligandy Ca^{2+} a Mn^{2+} iónov (krúžky) v kov viažucej slučke; koncové číslované časti reťazcov znázorňujú miesto pre proteínové spájanie; prevzaté a upravené z (11)



Obrázok č. 2: porovnanie známej štruktúry PSL monoméru (vľavo) s predikovanou štruktúrou Blec 1 (vpravo); žlté β -isty, fialové α -helixy; S je oblasť viažuca cukor; prevzaté a upravené z (18)

1.5. Lektíny húb a plesní

Do tejto veľkej skupiny eukaryotických organizmov spadajú nielen huby samotné, ale aj kvasinky a plesne (19).

Skoršie výskumy boli zamerané hlavne na ich základnú charakteristiku, možnú funkciu alebo na opis ich sacharidovej špecifickosti. V poslednej dekáde boli niektoré lektíny húb klonované, sekvenované a kryštalizované. Tieto lektíny sa v posledných rokoch začali intenzívnejšie skúmať kvôli ich protinádorovej, antiproliferačnej a imunomodulačnej aktivite (20).

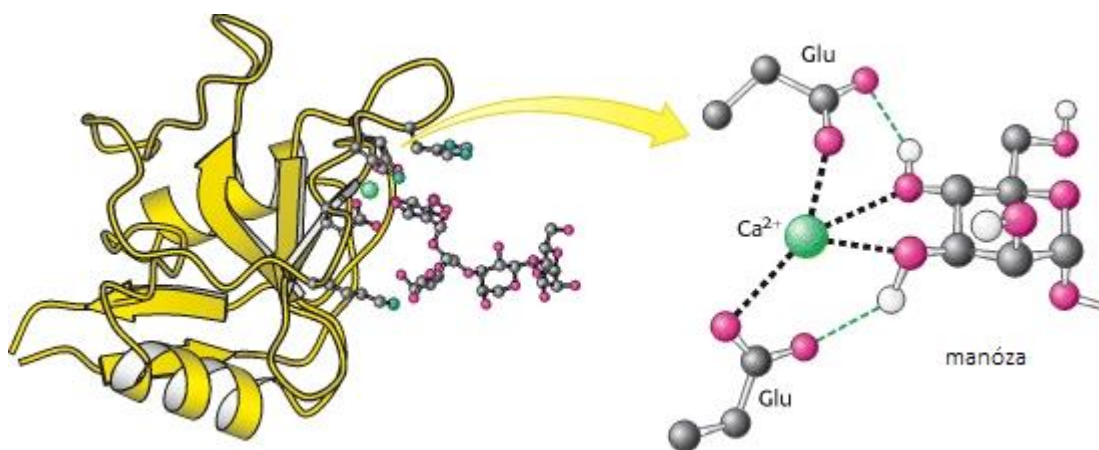
Napriek tomu, že sa lektíny našli v rôznych častiach húb (bazídie, konídie, mycélium), izolujú sa hlavne z plodníc (21).

Lektíny húb dokážu ovplyvňovať vzťahy medzi hubami a ostatnými organizmami. To, či bude vzťah medzi nimi parazitický alebo symbiotický určujú práve lektíny. Predpokladá sa, že majú dôležitú funkciu aj pri dormancii, raste a morfogéneze húb. Taktiež sa podieľajú na prechode parazitickej huby do hostiteľa, ako aj na tvorbe mycélia (22).

1.6. Živočíšne lektíny

Živočíšne lektíny boli nájdené u rôznych živočíchov nevyklučujúc človeka. Nevýhodou je, že je z nich vždy extrémne nízky výťažok. Hlavnou funkciou živočíšnych lektínov je sprostredkovanie kontaktu medzi bunkou, ktorá má na svojom povrchu lektíny s povrchom druhej bunky nesúcej na svojom povrchu sacharidy (23).

Lektíny živočíchov sa delia do 3 veľkých skupín. Jednou z nich je C typ (Obrázok č. 3 (vyžaduje vápnik)). Takéto lektíny majú zvyčajne okolo 120 aminokyselín. Vápenatý ión je v tomto prípade sprostredkovateľ spojenia medzi lektínom a sacharidom pomocou priamych interakcií cez sacharid-hydroxylové interakcie. Do druhej skupiny sa radia lektíny vyžadujúce voľné tioly. Táto skupina sa nazýva skupina S typ lektínov. Neskôr bola premenovaná na galektíny, pretože nie všetky lektíny boli tiol-dependentné. Medzitým boli osekvenované 2 lektíny rozpoznávajúce manózu-6-fosfát. Vo výsledku boli tieto lektíny zaradené do skupiny typu P-lektínov, pretože napriek ich homológii boli odlišné od ostatných. Lektíny boli časom viac skúmané a ich odlišnosti ich postupne delili do menších skupín (5, 24).



Obrázok č. 3: Štruktúra živočíšneho lektínu s CRD doménou typu C; Ca^{2+} ión sprostredkúva viazanie D-manóзовého zvyšku na lektín; obe glutamátové zvyšky proteínu sa viažu k vápenatému iónu a na cukor, zatiaľ čo ostatné proteínové reťazce tvoria vodíkové väzby s ďalšími hydroxylovými skupinami sacharidu; prevzaté a upravené (4)

1.7. Bakteriálne lektíny

V roku 1977 Ofek a kol. navrhli, že proteíny na povrchu baktérií s vlastnosťami podobnými lektínom môžu slúžiť ako adhezíny, ktoré viažu organizmy k živočíšnym bunkám. Neskôr bolo zistené, že *E. coli* nesie na svojom povrchu fimbrie typu 1, ktoré sú špecifické pre manózu a sú schopné aglutinovať červené krvinky (25). Napríklad vysokovirulentný typ fimbrií 1 uropatogenetickej *E. coli* nesie na svojom povrchu α -D-manozid špecifický lektín nazývaný FimH, ktorý je potrebný pri adhezívnom procese (26). Fimbrie typu 1 sú zvlášť efektívnymi adhezívnymi nástrojmi baktérií na sprostredkovanie kolonizácie na rôznych biotických a abiotických povrchoch. Sú uniformne rozložené na bakteriálnom povrchu buniek o dĺžke v rozmedzí 0,1 μm až 2,0 μm a šírke 7 nm (27).

Adhezíny mnohých patogénnych baktérií sú momentálne pokladané za potenciálne lektíny, aj keď bolo dokázané, že niektoré členy rodu *Staphylococcus* alebo *Streptococcus* produkujú adhezíny, ktoré nemajú lektínovú aktivitu a zároveň ostatné členy rovnakého rodu sú známe tým, že majú na svojom povrchu lektíny s adhezívnou funkciou (28).

2. Expresné systémy

2.1. *Leishmania tarentolae*

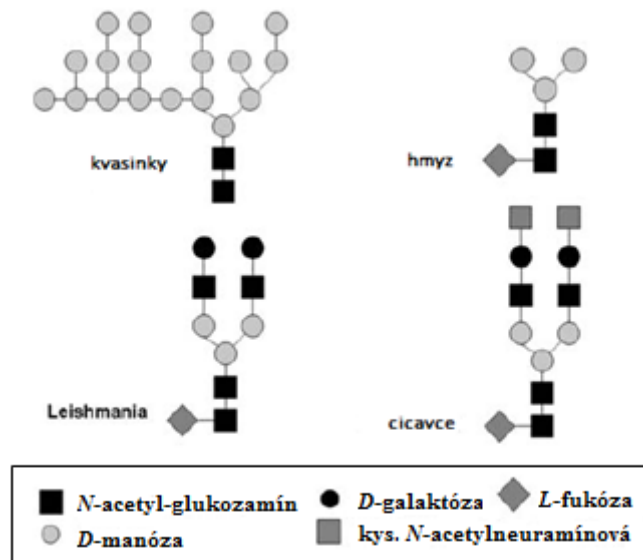
Trypanozómy patria do radu významných parazitických prvokov triedy bičíkovcov, do ktorého spadá rod *Leishmania*. Trypanozómy sú organizmy radiace sa medzi jedny

z najstarších skupín eukaryot, s veľkým počtom kmeňov, ktoré sú extra- a intracelulárnymi parazitmi človeka alebo hospodárskych zvierat. Spôsobujú vysilenie alebo smrteľné choroby. Vďaka svojmu všeobecne známemu vplyvu na zdravie je táto skupina jednou z najlepšie študovaných eukaryotických skupín po kvasniciach (29).

Organizmy rodu *Leishmania* sú intracelulárnymi parazitmi, vyskytujú sa v 88 krajinách na piatich kontinentoch. Ich výskyt nebol zaznamenaný v Austrálii a južnej Ázii, pretože pre komáre je tam príliš teplé a vlhké podnebie. Leishmánie u ľudí spôsobujú chorobu nazývanú leishmanióza (30).

***Leishmania tarentolae* ako expresný organizmus**

Bunky *Leishmania* ako expresné organizmy sú bohaté na glykoproteíny, ktoré môžu prispieť k celkovému výťažku proteínu o viac ako 10 % (31). Je predpoklad, že práve kvôli ich parazitickému životnému štýlu, oligosacharidové štruktúry ich glykoproteínov sú často podobné tým cicavčím glykoproteínom, ktoré zahŕňajú komplexný typ oligosacharidov s α -viazanými galaktózovými a fukózovými zvyškami (Obrázok č. 4) (32).



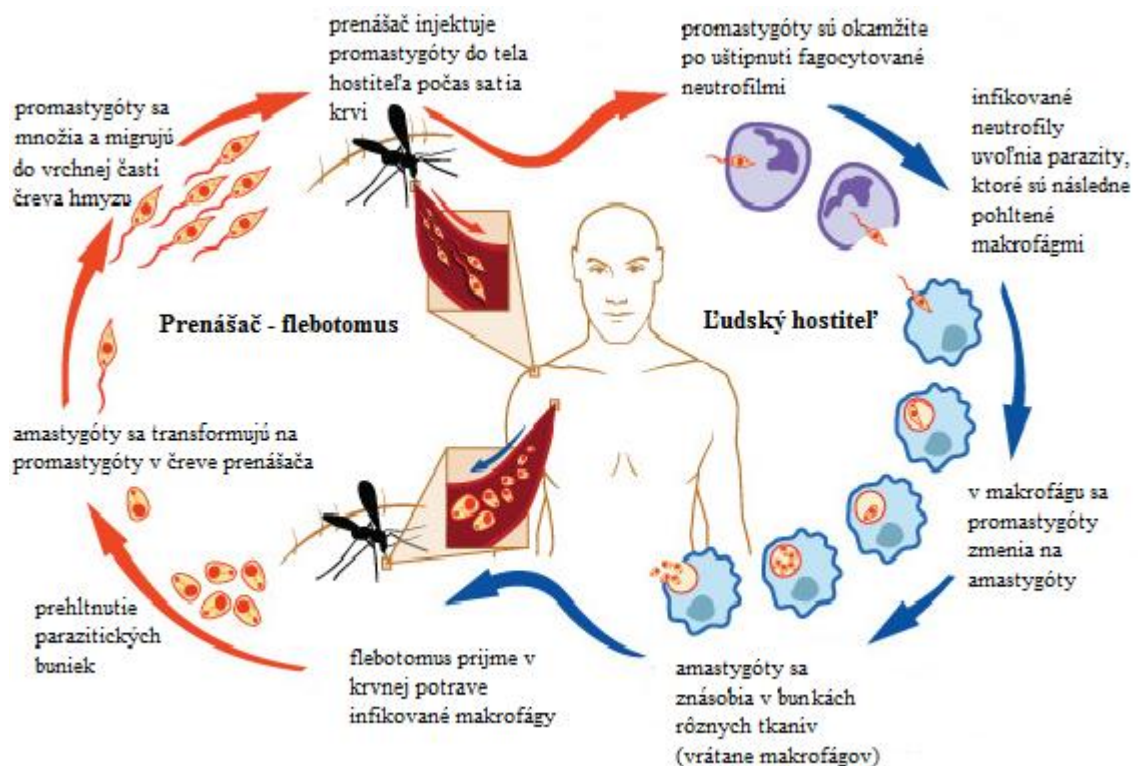
Obrázok č. 4: Porovnanie exprimovaných oligosacharidových štruktúr u glykoproteínov v bunkách *Leishmania* s oligosacharidmi glykoproteínov u cicavcov, resp. kvasiniek alebo hmyzu; prevzaté a upravené z 32

Bunky *Leishmania* dokážu produkovať homogénne N-glykány. Táto vlastnosť je prospešná hlavne vtedy, keď sa rekombinantné proteíny plánujú použiť na funkčné štúdie alebo farmaceutické účely. Jeho ďalšími jedinečnými vlastnosťami sú nielen ľahká genetická

manipulácia, ale aj priamočiara adaptácia na produkciu vo veľkom meradle alebo nízke nutričné požiadavky (31).

Životný cyklus

Leishmania sú parazitickými prvokmi s komplexným životným cyklom zahŕňajúcim dve vývojové formy. Tieto formy predstavujú adaptáciu na meniace sa podmienky životného prostredia, s ktorými sa parazity stretávajú v rámci svojich hostiteľov. Jedným z nich je cicavčí hostiteľ, ku ktorému sú patogénne a druhým hostiteľom je prenášač, ktorým je dvojkrídlovec (pakomárikovitý – Flebotomidae). *Leishmania* sa množia v bodavom hmyze v podobe extracelulárne a aktívne sa pohybujúcich bičíkatých buniek známych ako promastigóty (Obrázok č. 5), ktoré sú umiestnené hlavne v tráviacom trakte prenášača. Keď sa dostanú do cicavčieho hostiteľa počas satia krvi dvojkrídlým hmyzom, promastigóty sú pohltené neutrofilmi. Parazity uvoľnené neutrofilmi sú následne pohltené makrofágmi a v nich sa diferencujú do amastigótnej formy, ktorá už je bez bičíka. Následne sa amastigóty množia v bunkách ako aj v makrofágoch v rôznych tkanivách. V tejto fáze je možné určiť diagnózu. Cyklus sa následne opakuje požitím infikovaných makrofágov v krvi hostiteľa dvojkrídlým prenášačom (29).



Obrázok č. 5: Životný cyklus *Leishmania tarentolae*; prevzaté a upravené z (23)

Prejavy choroby

Existujú rôzne druhy buniek *Leishmania*, ktoré vyvolávajú rôzne typy nákaz. Evidovaných je 21 druhov a podľa prejavu choroby sa delia do 2 skupín: povrchové alebo útrobné. Na začiatku sa leishmanióza prejavuje ako nachladnutie. Neskôr sa k nim postupne pridávajú prejavy ako vysoké teploty, vredy na koži alebo slizniciach, zväčšenie pečene a sleziny alebo strata hmotnosti (30).

Napríklad choroba spôsobená *Leishmania tropica* tvorí tzv. suché vredy, ktoré vyúsťujú do kožných znetvorenín. Tie sú väčšinou lokalizované na tvári alebo na miestach nezahalených odevom. Rozšírená je okolo Stredozemného mora (India, stredná Ázia, južná Európa, severná Afrika, Blízky Východ). Inkubačná doba môže byť 2-3 týždne, ale aj niekoľko mesiacov alebo rokov. Veľmi závažne ochorenie (môže končiť smrťou) spôsobuje aj *Leishmania brasiliensis*. Zapríčiňuje kožnú a mukokutánnu leishmaniózu rozšírenú v Južnej Amerike. Začína ako kožné ochorenie a potom metastázuje do nasofaryngeálnych slizníc a iných miest na tvári (33).

2.2. *Escherichia coli*

Tieto jednoduché prokaryotické organizmy sa používajú ako modelové pre štúdium mnohých základných aspektov biochémie a molekulárnej biológie.

Sú to gram negatívne, fakultatívne anaeróbne tyčinkové baktérie, ktoré sa bežne vyskytujú v čreve teplokrvných živočíchov (34).

Väčšina kmeňov je neškodných, niektoré však môžu spôsobiť vážnu potravinovú otravu. Ich genóm sa skladá približne z 4,6 miliónov párov báz a kóduje okolo 4000 rôznych proteínov. Pre porovnanie – ľudský genóm je približne 1000-krát zložitejší a kóduje približne 100 tisíc rôznych proteínov. Experimenty sú uľahčované skutočnosťou, že *E. coli* sa množí pri optimálnych podmienkach každých 20 – 60 minút (35).

Existujú rôzne geneticky modifikované *E. coli* využívané pri laboratórnych experimentoch. Najviac obľúbený a často využívaný spôsob produkcie proteínov pomocou *E. coli* je T7 systém. Tento systém funguje tak, že expresný konštrukt obsahujúci gén záujmu klonovaný v smere transkripcie promótoru T7 je vnesený do T7 expresných buniek. Tie nesú chromozomálnu kópiu fágového génu pre T7 RNA polymerázu, ktorý je kontrolovaný lac promótorom. Po pridaní induktoru je T7 RNA polymeráza produkovaná a zameriava sa na transkripciu génu záujmu (36).

III. CIELE PRÁCE

- Vloženie sekvencií N-6xHis_TEV_*psl2* a TEV_*psl2* nesúcich gén pre hypotetický lektín PSL2 do konštruktov pET-44b a pLEXSY_IE_chlecherry4
- Test expresie génu pre produkciu rekombinantného proteínu PSL2 v bakteriálnych bunkách
- Optimalizácia produkcie rekombinantného proteínu PSL2 v bunkách *E. coli* v dostatočnom množstve
- Purifikácia a ďalšie štruktúrne - funkčné štúdie hypotetického lektínu PSL2

IV. PRAKTICKÁ ČASŤ

1. Materiál a metódy

1.1. Biologický materiál

Práca s bunkami prebiehala vždy v laminárnom boxe (Thermo Electron Industries) v sterilnom prostredí. Počas práce boli používané viaceré kmene geneticky modifikovaných bakteriálnych buniek druhu *Escherichia coli*, ako aj kmeň geneticky modifikovaných eukaryotických buniek druhu *Leishmania tarentolae*.

Modifikované konštrukty s vloženým génom pre hypotetický lektín PSL2 boli uchovávané v bakteriálnych bunkách *E. coli*, konkrétne v jej neexpresných kmeňoch XL1 (Stratagene) a DH5 α (Invitrogen).

Avšak expresia génu v bakteriálnych bunkách bola vykonávaná v expresných kmeňoch buniek *E. coli*: Arctic Express(DE3)RIL (Stratagene), BL21(DE3) (Stratagene), Tuner(DE3) (Novagen), Rosetta2(DE3)pLysSRare (Novagen).

V tejto práci bol najskôr používaný konštrukt pRSET A_Thio(HP)TEV_ *psl2*. (Invitrogen) Konštrukt obsahuje fúzny proteín tioredoxín o molekulovej hmotnosti 12 kDa, napomáhajúci rozpustnosti cieľového proteínu PSL2. Tioredoxín je zároveň modifikovaný, tak aby vytvoril kotvu s vysokou afinitou k dvojmočným kationom (napr. Ni²⁺), ktorá slúži na rýchlu purifikáciu rekombinantného proteínu PSL2 s využitím metaloafinitnej chromatografie. Spomínaný konštrukt bol používaný na produkciu proteínu v bunkách *E. coli*, ako aj na preklonovanie sekvencie TEV_ *psl2* do konštruktu pET-44b.

Konštrukt pET-44b (Novagen) je predurčený na produkciu cieľového proteínu s fúznym proteínom NusTagTM, ktorý zvyšuje rozpustnosť fúzných proteínových partnerov, keďže samotný NusA proteín je vysoko rozpustný. Konštrukt pET-44b na svojom N-konci obsahuje aj oligohistidínovú kotvu, ktorá rovnako ako tioredoxín, slúži na purifikáciu cieľového proteínu pomocou metaloafinitnej chromatografie.

Zo zásobných neexpresných buniek z predchádzajúcej práce, na ktorú bolo nadväzované, bol vyizolovaný modifikovaný konštrukt pMAT_N-6xHis_TEV_ *psl2* (Life Technologies). Ten bol použitý na preklonovanie sekvencie N-6xHis_TEV_ *psl2* do týchto dvoch druhov konštruktov: pET-44b, ktorý slúžil na produkciu PSL2 v *E. coli*, a do konštruktu pLEXS_Y_IE_blecherry4 (Jena Bioscience), ktorý bol modifikovaný pre tvorbu PSL2 v bunkách *Leishmania tarentolae*.

1.2. Kultivácia buniek

Práca s bunkami a médiami vždy prebiehala v sterilnom prostredí s využitím lamilárneho boxu (Thermo Electron Industries). Bunky sa v laboratórnych podmienkach kultivujú v sterilných médiách s dostatočným obsahom živín na ich rast a rýchle množenie. Boli pridávané aj antibiotiká pre zisk čistej kultúry. V tejto práci boli používané 4 druhy médií.

Pri transformácii buniek bolo používané vysoko výživné SOC médium, kultivácia všetkých kmeňov buniek *E. coli* prebiehala v tekutom LB médiu. Naopak, v prípade potreby kultivácie buniek staticky bolo použité pevné médium. Pre kultúru *L. tarentolae* bolo použité tekuté LEXSY BHI médium, ako aj pevné – agarové médium.

Médiá pre kultiváciu buniek *E. coli*

1.2.1.1. Tekuté LB médium

Kultivácia *E. coli* prebiehala v komerčne dostupnom LB médiu od firmy FORMEDIUM (20 g LB low salt zmesi o zložení: 5 g NaCl, 10 g trypton, 5 g kvasnicový extrakt na 1 l média). Pripravené bolo rozpustením 20 g zmesi v 1 l destilovanej vody. Pomocou 10 M NaOH bolo upravené pH na hodnotu 7,30.

Jednotlivé kolónie buniek boli zaočkované do tekutého LB média s prídavkom antibiotík (Tabuľka č. 3) a kultivované pri teplote 37 °C (200 rpm) do $OD_{600} = 0,4 - 0,6$. Pokiaľ sa v tomto médiu kultivovali zásobné kompetentné bunky *E. coli* s konštruktom pLEXSY_IE_blecherry4, bolo potrebné dbať na zníženú teplotu kultivácie buniek, a to 30 °C s prídavkom ampicilínu (výsledné koncentrácie v Tabuľke č. 3).

1.2.1.2. Pevné LB médium

Pevné médium bolo používané na kultiváciu buniek staticky na zisk jednotlivých kolónií. Jeho príprava spočívala v pridaní agaru (50 mg.ml^{-1}) do tekutého LB média.

Kultivačné Petriho misky s bunkami boli uložené do temperovanej miestnosti do 2.dňa (37 °C).

1.2.1.3. SOC médium

SOC je vysoko výživné médium, používané na regeneráciu buniek po transformácii (2% trypton; 0,5% Yeast Extract; 8,5 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl_2 ; 10 mM glukóza; pH 7,0). Médium bolo prefiltrované cez sterilný filter (0,22 μm) a skladované pri teplote -20 °C.

Médiá pre kultiváciu buniek *L. tarentolae*

1.2.1.4. Tekuté BHI médium

Pre kultiváciu buniek *L. tarentolae* LEXSY T7-TR bolo použité tekuté BHI médium (zloženie v Tabuľke č. 1). Bunky boli zaočkované do spomínaného média zo zásobných glycerolových bakteriálnych konzerv. Kultivácia vždy prebiehala v špeciálnych ventilovaných TC bankách v tme pri 26 °C. Do každého kultivačného média je nutné pridávať Hemín.

Na začiatok, pre rozrastenie kultúry sa bunky kultivujú staticky (naležato). Pasáž prebiehala 2x týždenne do sterilného BHI média s prídavkami, a to v pondelok v pomere 1:50 a v piatok v pomere 1:20. Pre udržanie T7 polymerázy a TET represorových génov v genóme hostiteľských buniek LEXSY T7-TR treba vždy pridať do média LEXSY Hygro a LEXSY NTC (do výslednej koncentrácie podľa Tabuľky č. 1).

Tabuľka č. 1: Zloženie BHI média pre kultiváciu *L. tarentolae*

Komponenty	Množstvo	Výsledná koncentrácia
Sterilné BHI médium	10 ml	37 g.l ⁻¹
NTC LEXSY	10 µl	100 µg.ml ⁻¹
Hygro LEXSY	10 µl	100 µg.ml ⁻¹
Pen-Strep	50 µl	10 000 U penicilín G sodnej soli, 10 000 µg.ml ⁻¹ streptomycín sulfátu v 0,85% fyziologickom roztoku
Hemín	23 µl	0,25% prasací Hemín v 50% trietanolamíne

1.2.1.5. Agarové misky

Na vysiatie buniek po transfekcii a získanie kolónií boli použité agarové misky, ktoré sa vždy pripravujú čerstvé. Zloženie a množstvo komponent pre prípravu 4 misiek je opísané v Tabuľke č.2.

Tabuľka č. 2: Zloženie agarových misiek pre kultiváciu *L. tarentolae*, typ skladovania jednotlivých komponent

Zložka	Množstvo	Skladovanie
Sterilné 2x LEXSY BHI (74 g/l)	35 ml	Laboratórna teplota
Neaktívne fetálne telacie sérum (FCS)	10 ml	-20 °C
1 M HEPES, pH 7,4	4 ml	4 °C
Pen-Strep	1 ml	-20 °C
Hemín (0,25% v 50% trietanolamíne)	0,23 ml	4 °C
LEXSY NTC	0,1 ml	-20 °C
LEXSY Hygro	0,1 ml	-20 °C
LEXSY Bleo	0,1 ml	-20 °C
Sterilný 2% agar	50 ml	Laboratórna teplota

Pre prípravu pevného média bolo potrebné jednotlivé zložky temperovať, aby médium nestuhlo predčasne. Sterilné 2x LEXSY BHI médium bolo vyhriate na 37 °C, sterilný 2% agar bol temperovaný pri 55 °C. Ostatné zložky média boli zmiešané zvlášť v 50 ml skúmavke. Následne boli všetky časti média zmiešané dohromady a prenesené do Petriho misiek v objeme 25 ml a boli ponechané uschnúť.

1.3. Antibiotiká

Počas experimentov boli do kultivačných médií pridávané antibiotiká v závislosti na rezistencii jednotlivých buniek a konštruktov (pozri Tabuľku č. 3).

Tabuľka č. 3: Rezistencia buniek a konštruktov

Bunky	Antibiotikum	Výsledná koncentrácia	Konštrukt	Antibiotikum	Výsledná koncentrácia
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	-	-	pRSET A	ampicilín	100 µg.ml ⁻¹
<i>E. coli</i> Tuner(DE3)	-	-			
<i>E. coli</i> Rosetta2(DE3) pLysRare	Chloramfenikol	34 µg.ml ⁻¹	pET-44b	ampicilín	100 µg.ml ⁻¹
<i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3)RIL	streptomycín	75 µg.ml ⁻¹	pMAT	ampicilín	100 µg.ml ⁻¹
DH5α	-	-			
XL1	-	-			
<i>L. tarentolae</i> LEXSY T7-TR	LEXSY NTC	100 µg.ml ⁻¹	pLEXSY _IE_ blecherry4	ampicilín	100 µg.ml ⁻¹
	LEXSY Hygro	100 µg.ml ⁻¹		LEXSY Bleo*	100 µg.ml ⁻¹
	Pen-Strep	Pozri Tabuľku č. 1			

*Selektívne antibiotikum, používané až pri klonálnej selekcii po transfekcii buniek LEXSY T7-TR

1.4. Príprava konštruktov pre produkciu proteínu s oligohistidínovými kotvami

Pre prípravu prvých dvoch konštruktov na produkciu proteínu PSL2 s oligohistidínovou kotvou buď na N-konci alebo C-konci v bunkách *E. coli* bol použitý konštrukt pET-44b (pozri Tabuľku č. 4). Tento konštrukt obsahuje gén pre NusA fúzny proteín, ktorý má napomáhať rozpustnosti cieľového proteínu.

Pre prípravu ďalších dvoch konštruktov (jeden s produkciou cieľového proteínu PSL2 do média a druhý s produkciou proteínu PSL2 do bunky) s oligohistidínovou kotvou len

na N-konci v bunkách *L. tarentolae* bol použitý konštrukt pLEXSY_IE_blecherry4 (pozri Tabuľku č. 4).

Prvý konštrukt bol navrhnutý tak, aby mal na N-konci 2 oligohistidínové kotvy. Zdrojovým konštruktom na získanie inzertu N-6xHis_TEV_psl2 bol konštrukt skôr pripravený v našom laboratóriu (pMAT_N-6xHis_TEV_psl2). Proteín získaný pomocou expície takto pripraveného DNA konštrukt pET-44b s dvomi oligohistidínovými kotvami na N-konci je v podobe: N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_psl2.

Druhý konštrukt pET-44b pre expíciu v *E. coli* bol navrhnutý s jednou oligohistidínovou kotvou na C-konci. Zdrojovým konštruktom pre získanie inzertu TEV_psl2 bol konštrukt pRSET A_Thio(HP)TEV_psl2 (tiež pripravený skôr v našom laboratóriu), pričom stop kodón génu *psl2* bol počas PCR reakcie nahradený kodónom, zodpovedajúcim alanínu. Výsledný proteín získaný pomocou expície takto pripraveného DNA konštrukt pET-44b s oligohistidínovou kotvou na C-konci je v podobe: TEV_psl2_6xHis.

Ďalšie dva konštrukty boli navrhnuté pre expíciu génu pre proteín PSL2 v *L. tarentolae*. Pre tieto bunky je určený špecifický konštrukt pLEXSY_IE_blecherry4, ktorý bol použitý na prípravu konštruktov pre produkciu proteínu PSL2 s oligohistidínovou kotvou na N-konci. Konštrukty boli navrhnuté tak, aby sa proteín produkoval buď do média (so signálnou sekvenciou) alebo do bunky (bez signálnej sekvencie). Zdrojovým konštruktom pre získanie inzertu pre konštrukty pLEXSY_IE_blecherry4 s expíciou génu do média ako aj do bunky bol už spomínaný konštrukt pMAT_N-6xHis_TEV_psl2.

Tabuľka č. 4: Použité primery a teploty nasadenia primerov pre získanie génu *psl2* (inzertu) z jednotlivých východiskových konštruktov

Templátová DNA pre PCR s vyznačeným cieľovým inzertom	Veľkosť inzertu <i>psl2</i>	Čísla primerov	Teplota nasadenia primerov	Cieľový konštrukt
pMAT_N-6xHis_TEV_psl2	768 pb	622 623	55 °C	pET-44b_ N-6xHis_NusA
pRSET A_Thio(HP)TEV_psl2 (bez 6xHis)	738 pb	624 625	58 °C	pET-44b_NusA_ C-6xHis
pMAT_N-6xHis_TEV_psl2	768 pb	626 627	58 °C	pLEXSY_IE_blecherry4 so sign. sekvenciou
pMAT_N-6xHis_TEV_psl2	768 pb	628 629	58 °C	pLEXSY_IE_blecherry4 bez sign. sekvencie

Izolácia plazmidov

Na izoláciu DNA plazmidov bola použitá prerastená kultúra buniek. Tá bola získaná kultiváciou neexpresných buniek *E. coli* s požadovaným zdrojovým alebo cieľovým plazmidom cez noc v 5 ml tekutého LB média s prídavkom príslušného antibiotika. Samotná izolácia bola vykonaná pomocou komerčne dodávanej súpravy GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), postupovalo sa podľa priloženého manuálu (37). Rozdiel oproti manuálu bol v poslednom kroku. Elúcia konštruktu bola realizovaná pomocou 50 µl sterilnej MiliQ vody zahriatej na 50 °C. Pre izoláciu cieľového nízkokópiového cieľového plazmidu pET-44b bol použitý NucleoBond® Xtra Midi Kit (MACHEREY-NAGEL). Koncentrácia plazmidov bola zmeraná spektrofotometricky (NanoDrop ND-1000, Coleman Technologies) pri vlnovej dĺžke 260 nm. Plazmidy boli uchovávané pri -20 °C.

Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Na amplifikáciu cieľového génu *psl2* s oligohistidínovými kotvami na N- alebo C-konci bola použitá PCR reakcia. Ako templáty boli použité sekvencie DNA konštruktov pMAT_N-6xHis_TEV_*psl2* a pRSET A_Thio(HP)TEV_*psl2*. Zloženie PCR zmesi je opísané v Tabuľke č.5, pričom boli použité priame a reverzné primery (Tabuľka č. 6) podľa aktuálne štiepeného templátu. Postup navrhovania jednotlivých primerov je opísaný v prílohe č.1. Priebeh reakcie je uvedený v Tabuľke č. 7. Na vizualizáciu PCR produktov bola použitá elektroforéza s 1% agarózovým gélom. Hlavný produkt o predpokladanej veľkosti cca 800 pb bol vyizolovaný a prečistený pomocou kitu MinElute Reaction Cleanup (Qiagen). Spektrofotometricky (NanoDrop ND-1000, Coleman Technologies) bola zmeraná čistota PCR produktov pri pomere absorbancií 260/280 nm a 260/230 nm; pri vlnovej dĺžke 260 nm bola zmeraná koncentrácia DNA. PCR produkty boli uchovávané pri -20 °C.

Tabuľka č. 5: Zloženie PCR zmesi

Zložka	Množstvo
10x konc.reakčný pufer pre PfuUltra I polymerázu (Agilent Technologies)	5 µl
dNTP mix (10 mM) (NEB)	1 µl
Templát	100 ng
Priamy primer (1 µM)	1 µl
Reverzný primer (1 µM)	1 µl
PfuUltra I polymeráza (2,5 U.µl ⁻¹) (Agilent Technologies)	1 µl
Sterilná MiliQ H ₂ O	Doplnené do 50 µl

Tabuľka č. 6: Navrhnuté primery pre prípravu jednotlivých konštruktov obsahujúcich gén *psl2* s N- a C-oligohistidínovými kotvami a použité restriktázy (Sigma-Aldrich)

Výsledný konštrukt	Primer č.	Primer	Sekvencia	Restriktáza
pET-44b N-6xHis_NusA- 6xHisTag_TEV_ <i>psl2</i>	622	priamy	5'GCC ACTAGT ATGAAATTC CATCACCATCACC 3'	<i>SpeI</i>
	623	reverzný	5'CG CTCGAG TAAAC CTGGGAAACGATG 3'	<i>XhoI</i>
pET-44b NusA_TEV_ <i>psl2</i> _ C-6xHis	624	priamy	5'CGG ACTAGT CCGGAGAA CCTGTATTTTCAGTCC 3'	<i>SpeI</i>
	625	reverzný	5' CCAAGCTT CGCAACC TGGGAAACGATG 3'	<i>HindIII</i>
pLEXSY-IE-blecherry4 B_N-6xHis_TEV_ <i>psl2</i> bez sign. sekv.(do bunky)	626	priamy	5'CGC CCATGG ATGAAAT TCCATCACCATCGAG 3'	<i>NcoI</i>
	627	reverzný	5'TT GCGGCCG CAAT TAA A CCTGGGAAACGATG 3'	<i>NotI</i>
pLEXSY-IE-blecherry4 M_N-6xHis_TEV_ <i>psl2</i> so sign. sekv.(do média)	628	priamy	5'GGC TCTAG ACAG ATG AAATT CCATCACCATCACGAG 3'	<i>XbaI</i>
	629	reverzný	5'AAATAT GCGGCCG TATAA ATTA AACCTGGGAAACGATG 3'	<i>NotI</i>

Tabuľka č. 7: Priebeh PCR reakcie

PCR	Počet cyklov	Teplota	Čas
Počiatočná denaturácia	1x	95 °C	2 min
Denaturácia	30x	95 °C	30 s
Nasadenie primerov		50,5 - 65 °C	30 s
Syntéza nových reťazcov		72 °C	1 min
Záverečné predĺžovanie	1x	72 °C	10 min

Gradientová PCR

Pre amplifikáciu génu *psl2* z konštruktu pRSET A_Thio(HP)TEV_*psl2* (bez 6xHis) určeného pre konštrukt pLEXSY_IE_blecherry4 bez sign. sekvencie bolo nutné spraviť gradientovú PCR aby sa zistila optimálna teplota nasadenia primerov (postup je uvedený v Tabuľke č.8).

Tabuľka č. 8: Priebeh reakcie gradientovej PCR

PCR	Počet cyklov	Teplota	Čas
Počiatočná denaturácia	1x	95 °C	2 min
Denaturácia	30x	95 °C	30 s
Nasadenie primerov		50 - 60 °C	45 s
Syntéza nových reťazcov		72 °C	1 min
Záverečné predĺžovanie	1x	72 °C	10 min

Reštrikčné štiepenie

Cieľové konštrukty ako aj PCR produkty boli štiepené pomocou reštrikčných endonukleáz (reštriktáz). Kvôli dosiahnutiu dostatočnej koncentrácie a čistoty DNA pre následnú ligáciu sa pracovalo vždy naraz s 3 – 4 alikvótmi PCR produktov/ štiepených cieľových vektorov. Počas práce boli použité viaceré reštriktázy – pozri Tabuľku č. 6. V Tabuľke č. 9 je uvedené zloženie reakčnej zmesi. Po zmiešaní jednotlivých komponent bol na samotné štiepenie použitý termoblok AccuBlock (Labnet) pri 37 °C po dobu 3 hodín. Nasledujúcim krokom bola denaturácie endonukleáz pri 60 °C po dobu 30 min.

Tabuľka č. 9: Zloženie zmesi na reštrikčné štiepenie

Reagencia	Množstvo
Konštrukt alebo inzert - obsahujúci gén <i>psl2</i> (max.20 µg)	x µg
10x koncentračný CutSmart pufer (NEB)	5 µl
Reštrikčná endonukleáza I (20 000 U.ml ⁻¹)	5 U/ 1 µg DNA
Reštrikčná endonukleáza II (20 000 U.ml ⁻¹)	5 U/ 1 µg DNA
Sterilná MiliQ H ₂ O	Doplnenie do 50 µl

Elektroforéza na agarózovom géli

Na separáciu a vizualizáciu PCR produktov a produktov reštrikčného štiepenia bola použitá agarózová elektroforéza s 1% agarózovými gémi. Gély boli pripravené zmiešaním 0,5 g agarózy v 50 ml 1x koncentrovanom TBE pufrí (0,089 M kyselina boritá, 31 0,098 M Tris/ HCl, 0,002 M EDTA), ktorý bol používaný aj ako elektródový pufer. Po rozvarení a čiastočnom ochladení zmesi bolo do gélu pridaných 2,5 µl fluorescenčného farbiva GelRed (Biotium). Gél bol ešte za tepla naliaty do aparatury H1-SET (Scie-Plas). Do jamiek stuhnutého gélu boli nanosené vzorky DNA o objeme 10 – 50 µl, ktoré boli predtým zmiešané s nanášacím pufrom (Loading Dye 5×, Qiagen) v pomere 4:1. Na každý gél bol nanosený jeden zo štandardov: 100 bp DNA Ladder (NEB) alebo 1 kb DNA Ladder (NEB) o objeme 5 µl. Výsledky elektroforézy (napätie 80 V, 45 minút) boli vizualizované pomocou stolného transluminátora (TCP-20.M, Vilber Lourmat).

Separovaná DNA bola vyrezaná a extrahovaná z gélu do roztoku s využitím komerčnej súpravy MinEluteTM Gel Extraction Kit (QIAGEN). Rozdiel oproti návodu bol v poslednom kroku. Kvôli zisku koncentrovanejšej DNA boli vzorky eluované dvakrát 10 µl sterilnej MiliQ vody ohriatej na 50 °C. Koncentrácia (absorbancia pri 260 nm) a čistota DNA (pomer absorbancií 260/280 nm a 260/ 230 nm) boli zmerané na spektrofotometri.

Ligácia

Získané fragmenty DNA (cieľového plazmidu a inzertu) ošetrené rovnakou dvojicou reštrikčných endonukleáz boli pomocou T4 DNA ligázy opätovne spojené v procese ligácie, ktorá prebiehala 16 hod pri 16 °C.

Zloženie ligačnej zmesi je uvedené v Tabuľke č. 10. Množstvo pridaného konštrukt bolo vždy rovnaké, zatiaľ čo množstvo génu *psl2* (vo vzorci ako inzert) záviselo na použitom pomere ($p = 1:1, 1:3, 3:1, 4:1$). Samotné množstvo inzertu bolo vypočítané pomocou vzorca:

$$\text{inzert [ng]} = p \cdot \text{plazmid [ng]} \cdot \text{inzert [pb]} / \text{plazmid [ng]}$$

Tabuľka č. 10: Zloženie ligačnej zmesi

Reagencia	Množstvo
Štiepený plazmid	200 ng
Štiepený inzert (gén <i>psl2</i>)	x ng
10× konc. reakčný pufer pro T4 DNA ligázu (NEB)	1 μl
T4 DNA ligáza (400 000 U·ml ⁻¹) (NEB)	0,5 μl
Sterilná MiliQ voda	Doplnené do 10 μl

1.5. Transformácia *E. coli* kompetentných buniek teplotným šokom

Do kompetentných buniek *E. coli* bola transformovaná buď ligačná zmes alebo pripravený konštrukt nasledovne. Ku 100 μl kompetentných buniek bolo pridaných 100 ng konštrukt (alebo ku 50 μl kompetentných buniek 10 μl ligačnej zmesi). Zmes bola 30 minút inkubovaná na ľade, potom nasledovalo zahriatie zmesi na 42 °C po dobu 45 sekúnd a jej opätovné schladenie na ľade po dobu 2 minút. Potom bol k zmesi pridaný 1 ml SOC média bez antibiotika. Bunky boli regenerované 1 hodinu pri 37 °C, 200 rpm. Na centrifugáciu bola použitá stolná centrifúga (Hettich Mikro 20) za podmienok 5 min/10 000 rpm. Vzniknutý bunkový pelet bol rozsuspendovaný v 100 μl supernatantu a zmes bola vysiatá na agarové misky s príslušným antibiotikom. Nasledovala kultivácia pri 37 °C cez noc.

Na tvorbu zásobných buniek obsahujúcich konštrukt po transformácii boli odškrabnuté kolónie a zaočkované do 5 ml tekutého LB média s príslušným antibiotikom. Zmes bola kultivovaná pri 37 °C 200 rpm do OD₆₀₀ ~ 0,5. Následne bolo k 800 μl buncovej kultúry pridaných 200 μl 80% sterilného glycerolu. Bunky boli uložené na -80 °C.

Kontrola úspešnosti transformácie *E. coli*

PCR kolónií

Táto metóda slúži na rýchle overenie prítomnosti konštruktú v kolóniách buniek *E. coli* po transformácii, keďže nie je nutná kultivácia buniek a izolácia konštruktú. Časť kolónie po transformácii bola pridaná do PCR zmesi (pozri Tabuľku č. 12). Počas práce boli používané priame primery (Sigma-Aldrich) zobrazené v Tabuľke č. 11. PCR kolónií bola uskutočnená na termocykléri (Thermal Cycler GenePro, Bioer) za podmienok zobrazených v Tabuľke č. 13. Produkty PCR reakcie kolónií boli vizualizované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy.

Tabuľka č. 11: Primery pre konštruktú pLEXY IE_blecherry4 (Jena Bioscience) a pET-44b (Sigma-Aldrich)

Číslo primeru	Typ primeru	Konštrukt	Sekvencia primeru
638	P1442 priamy	pLEXY IE_blecherry4	CCGACTGCAACAAGGTGTAG
639	A264 reverzný	pLEXY IE_blecherry4	CATCTATAGAGAAGTACACGTAAAAG
266	Coli down reverzný	pET-44b	TTTCACTTCTGAGTTCGGCATGG
402	T7 priamy primer	pET-44b	TAATACGACTCACTATAGGGG

Tabuľka č. 12: Zloženie reakčnej zmesi PCR kolónií

Reagencia	Množstvo
10x koncentrovaný Paq5000 pufor (Agilent Technologies)	5 µl
10 mM dNTPs (SERVA)	1 µl
10 µM priamy primer	1 µl
10 µM reverzný primer	1 µl
Paq5000 DNA polymeráza (5000 U.ml ⁻¹) (Agilent Technologies)	0,5 µl
Sterilná voda (MiliQ)	41,5 µl

Tabuľka č. 13: Priebeh reakcie PCR kolónií

PCR kolónií	Počet cyklov	Teplota	Čas
Počiatočná denaturácia	1x	95 °C	5 min
Denaturácia	30x	95 °C	20 s
Nasadenie primerov		55 °C	20 s
Syntéza nových reťazcov		72 °C	30 s
Záverečné predĺžovanie	1x	72 °C	5 min

Kontrolné reštrikčné štiepenie

Pre kontrolu úspešnosti transformácie bola použitá kultúra, ktorá zostala po vytvorení zásobných buniek ponechaná prerásť cez noc pri 37 °C, 200 rpm. Na ďalší deň z nej bol izolovaný konštrukt pomocou kitu u GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Reakčná zmes (zloženie v Tabuľke č. 14) bola štiepená pri 37 °C po dobu 3 hodín (XP cycler, Bioer). Produkty štiepenia boli vizualizované pomocou agarózovej elektroforézy použitím 1% gélu.

Tabuľka č. 14: Zloženie reakčnej zmesi pre kontrolné reštrikčné štiepenie

Reagencia	Množstvo
Konštrukt (100 µg.µl ⁻¹)	5 µl
NEBuffer CutSmart (NEB Biolabs) 10x koncentrovaný	1 µl
Reštrikčná endonukleáza I (20 000 U.ml ⁻¹)	0,4 µl
Reštrikčná endonukleáza II (20 000 U.ml ⁻¹)	0,4 µl
Sterilná voda (MiliQ)	3,2 µl
Celkový objem	10 µl

1.6. Transfekcia *L. tarentolae* pomocou elektroporácie

Pre efektívnu transfekciu bola kultúra hosťiteľských buniek kmeňa T7-TR viackrát pasážovaná do 10 ml čerstvého média. Pasážovanie vždy prebiehalo 2x týždenne v pomere 1:20 a 1:50.

- V prvý deň ráno pred samotnou transfekciou boli bunky pasážované v pomere 1:20 do 10 ml LEXSY BHI média, ktoré obsahovalo prídavok Hemínu, LEXSY NTC, LEXSY Hygro, Pen-Strep (do výslednej koncentrácie pozri Tabuľku č.1).
- Kultúra bola inkubovaná (tma, 26°C) v TC banke nastojato po dobu 3 dní (do večera).
- Večer v 3.deň bola preočkovaná kultúra v pomere 1:10 do 10 ml do rovnakého čerstvého média a banka bola ponechaná naležato ďalšie 2 dni (tma, 26°C).
- Po uplynutí 2 dní bola zmeraná optická denzita kultúry a bunky boli sledované pod optickým mikroskopom pri 17 °C (mikroskop IX81 s digitálnou kamerou DP72 (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan) pomocou programu CellSens Dimension).
- Pre úspešnú elektroporáciu by mali byť bunky vitálne a v tvare kvapky.
- Bunky boli stočené (3 min, 2000 g) a bolo odpipetovaných 6 ml supernatantu.
- Vo zvyšku média boli bunky rozsuspendované jemným poklepaním a uložené na ľade po dobu 10 min.
- Medzitým boli na ľade pripravené vzorky s DNA o objeme 1 - 10 µg vo vode (MiliQ) v maximálnom objeme 50 µl.

- Predchladené bunky v objeme 350 μl boli pridané do mikroskúmaviek s DNA a celý objem bol prenesený do elektroporačných kyviet na ľade. Boli použité elektroporačné kyvety (d = 4 mm).
- Elektroporácia prebiehala za podmienok podľa protokolu (Tabuľka č. 15) (Bio-Rad Gene-Pulser-Xcell Electroporation System w/ Shock-Pod CE Module 617BR1).

Tabuľka č. 15: Protokol pre vysokovoltážnu elektroporáciu

Vysoko-voltážny protokol pre elektroporáciu
d = 4 mm
V = 0,5 ml
1500 V
1,2 ms
50 Ω
2 pulzy 10s interval

- Kyvety boli po elektroporácii položené na ľad na 10 min
- Elektroporované bunky boli prenesené do 10 ml tekutého BHI média v Petriho miskách, kde boli inkubované do ďalšieho dňa v tme pri 26 °C ako statická kultúra.

Klonálna selekcia nanesením na stuhnuté médium

- Bunky po elektroporácii, ktoré boli poponechané rásť v tekutom BHI médiu boli na ďalší deň stočené (3 min, 2000 g).
- Médium bolo zliate a vo zvyšnom objeme boli bunky rozsuspendované poklepaním po stene 15 ml skúmavky.
- Bunky boli vysiate na čerstvo pripravené agarové platne (podľa Tabuľky č. 2)
- Bunky boli kultivované v tme pri 26 °C do narastenia plaku (7-9 dní).
- Bunky boli následne prekrižkované na ďalšie agarové platne a poponechané rásť 7-15 dní.

1.7. Príprava vzoriek na sekvenáciu

Sekvenácia DNA konštrukov je metóda, pomocou ktorej vieme priamo identifikovať vložený gén a skontrolovať správnosť klonovania. Vzorky boli pripravené zmiešaním konštruktovej DNA o koncentrácii 80 - 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ s 10 μl primeru priamy s molárnou koncentráciou 5 μM a v prípade potreby bola tak isto pripravená vzorka s reverzným primerom. Sekvenáciu vykonala firma GATC Biotech.

1.8. Test a optimalizácia expresie génu pre rekombinantný proteín PSL2 v bunkách *E. coli*

Na testovanie expresie génu pre proteín PSL2 s fúznym proteínom tioredoxínom na N-konci boli použité expresné bunky *E. coli* Arctic Express(DE3)RIL (Stratagene), BL21(DE3) (Stratagene), Tuner(DE3) (Novagen), Rosetta2(DE3)pLysSRare (Novagen). Zatiaľ čo na testovanie produkcie proteínu PSL2 s oligohistidínovou kotvou na N-konci boli použité expresné bunky *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene) a Tuner(DE3) (Novagen).

Zásobné bunky, transformované príslušným konštruktom boli očkované na pevné médium s príslušným antibiotikom a poponechané rásť cez noc pri 37 °C. Z nich bola vždy jedna kolónia zaočkovaná 10 ml LB média s príslušným antibiotikom. Následne boli kultivované pri 37°C, 200 rpm do OD₆₀₀ ~ 0,5. Expresia génu *psl2* bola indukovaná pomocou IPTG (isopropyl-β-D-1-tiogalaktopyranozid) (Carbosynth) pri zníženej teplote. Testované podmienky expresie sú uvedené v Tabuľke č. 17. Počas testovania boli odoberané vzorky pred indukciou a po indukcii v časových intervaloch. Vzorky odobraté po indukcii boli riedené na rovnakú optickú hustotu akú mali pred indukciou.

Tabuľka č. 16: Optimalizácia podmienok expresie génu na produkciu proteínu PSL2 s fúznym proteínom tioredoxínom

Konštrukt pRSET A_Thio(HP)TEV_psl2				
Expresný systém <i>E. coli</i>	C _{IPTG}	Teplota (°C)	Čas kultivácie (hod)	Objem (ml)
BL21(DE3) (Stratagene)	0,10 mM 0,25 mM 0,50 mM	18	15,20	10, 50
		25, 30	3,4,5	10
Tuner(DE3) (Novagen)		18	15,20	10
Rosetta2(DE3)pLysSRare (Novagen)		25, 30	3,4,5	10
		18	15,20	10
Arctic Express(DE3)RIL (Stratagene)		25, 30	3,4,5	10
	12	20,24	10	

Tabuľka č. 17: Optimalizácia podmienok expresie génu na produkciu proteínu PSL2 s dvomi oligohistidínovými kotvami a NusA fúznym proteínom

Konštrukt pET-44b_6xHis_NusA_6xHis_TEV_psl2				
Expresný systém <i>E. coli</i>	C _{IPTG}	Teplota (°C)	Čas kultivácie (hod)	Objem (ml)
BL21(DE3) (Stratagene)	0,25 mM 0,50 mM	16	Cez noc	10
		30	3	10
Tuner(DE3) (Novagen)		16	Cez noc	10
30		3	10	

Pre porovnanie celkového množstva proteínu v odobratých vzorkách pred indukciou (1 ml kultúry) a po indukcii boli vzorky stočené na centrifúge (1 min, 13 000 rpm/10 410 g). Pelet bol rozsuspodovaný v 50 μ l 4M močoviny a k nemu bolo pridaných 50 μ l 2x koncentrovaného vzorkového pufru (0,05 M Tris/ HCl, 10% glycerol, 2% SDS, 2 mM EDTA, 6% merkaptotanol, 0,2% brómfenolová modrá, pH 6,8). Následne boli vzorky denaturované pri 95 °C po dobu 5 min. Potom boli vzorky analyzované pomocou SDS-PAGE.

1.9. Test rozpustnosti produkovaného proteínu PSL2

Po optimalizácii expresie génu pre produkciu proteínu PSL2 bolo treba zistiť, či sa proteín produkuje v dostatočnej miere v rozpustnej forme. Po kultivácii vzoriek za daných podmienok boli odobraté 2 ml kultúry, nariadené na približne rovnaké OD₆₀₀ ~ 0,5. Potom boli vzorky centrifugované 3min, 8000 rpm/ 6869 g, 4 °C a pelet bol rozsuspodovaný v 200 μ l pufru (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 100 mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂, pH 7,5). Vzorky boli dezintegrované pomocou sklenených guľičiek opísaných v ďalšej kapitole.

Dezintegrácia buniek pomocou sklenených guľičiek

Vzorky získané v predchádzajúcom kroku boli ďalej dezintegrované pomocou FastPrep-24 (*MP BIOMEDICALS*) so sklenenými guľičkami (0,07-0,1 mm) (2x 20 s cyklus, 6 m.s⁻¹, medzi cyklami 5 minútové chladenie na ľade). Následne boli bunky stočené na centrifúge 1 min, 13 000 rpm (Minispin Plus, Eppendorf). Bola pripravená vzorka CS (rozpustná frakcia) zmiešaním 50 μ l supernatantu s 50 μ l 2x konc. vzorkového pufru. Pelet bol 2x premytý 1ml pufru (20 mM Tris/ HCl, 300 mM NaCl, 100 mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂, pH 7,5), rozsuspodovaný v 50 μ l 4 M močoviny. K zmesi bolo pridaných 50 μ l 1% SDS, a následne bola odobratá vzorka CI (nerozpustná frakcia). Odobraté vzorky boli denaturované 5 min pri 95 °C, analyzované SDS-PAGE.

1.10. SDS-PAGE

Počas práce boli používané aparatúry Mini-Protean 3 od firmy Bio-Rad, postupovalo sa podľa manuálu. Zloženie gélov je opísané v Tabuľke č. 18. Získané vzorky denaturovaných proteínov boli nanášané o objeme 5 – 15 μ l a štandard Unstained Protein Marker III 6,5 – 200 kDa (AppliChem) bol nanášaný o objeme 10 μ l. Samotná elektroforéza prebiehala pri konštantnom napätí 120 V v prítomnosti 1x koncentrovaného elektródového pufru (0,1% SDS, 25 mM Tris, 250 mM glycín, pH 8,3)

Tabuľka č. 18: Zloženie 10% polyakrylamidových gélov SDS-PAGE

Komponenty	Separáčny gél 10% (10 ml)	Koncentračný gél (5 ml)
MiliQ H ₂ O	4,0 ml	3,4 ml
30 % akrylamid	3,3 ml	0,83 ml
1,5 M Tris/ HCl (pH 8,8)	2,5 ml	x
1,0 M Tris/ HCl (pH 6,8)	x	0,63 ml
10 % SDS	100 ml	50 µl
10 % APS	80 ul	80 µl
TEMED	7 µl	5 µl

Po skončení elektroforézy boli proteíny na géli fixované 10 min vo fixačnom roztoku (30% izopropanol, 10% kyselina octová). Potom bol gél ofarbený pomocou Coomassie Blue (Tabuľka č. 19) alebo pomocou striebra (Tabuľka č. 20). Po odfarbení boli gély uchovávané v MiliQ vode alebo boli vysušené (postupovalo sa podľa manuálu) pomocou sušičky GelAir Dryer (Bio-Rad).

Tabuľka č. 19: Postup pri farbení gélu pomocou farbičky Coomassie Brilliant Blue R250

Krok	Čas
Farbiaci roztok (0,025% Coomassie Brilliant Blue R250, 50% metanol, 10% kys. octová)	Cez noc
Odfarbovací roztok (10% kys. octová, 40% etanol)	Do odfarbenia pozadia

Tabuľka č. 20: Postup pri farbení gélu pomocou striebra

Krok	Čas
Premytie destilovanou vodou	3x 5 s
60 ml 50% acetónu	5 min
100 µl 10% Na ₂ S ₂ O ₃ , 60 ml destilovanej vody	1 min
Premytie destilovanou vodou	3x 5 s
160 mg AgNO ₃ , 60 ml dH ₂ O, 0,6 ml 37% HCHO	8 min
Premytie destilovanou vodou	2x 5 s
60 ml 2% Na ₂ CO ₃ , 25 µl 37% HCHO, 25 µl 10% Na ₂ S ₂ O ₃	Do vyfarbenia
1% kyselina octová	30 s

1.11. Immunobloting

Imunobloting je metóda, pri ktorej sa proteíny z polyakrylamidového gélu prenášajú na nitrocelulózovú membránu pomocou elektrického prúdu. K špecifickej detekcii proteínov sa používajú protilátky.

V tomto prípade bola použitá primárna protilátka proti tioredoxínu (Tioredoxin 1 Polyclonal Rabbit Antibody (ThermoScientific)), ktorý je naviazaný na PSL2

proteín. Ako sekundárna protilátka bola použitá protilátka proti primárnej protilátke (Anti-Rabbit IgG-Alcaline Phosphatase (Sigma-Aldrich)).

Po prebehnutí SDS-PAGE bol polyakrylamidový gél namočený na 0,5 min do vody (dH₂O) a následne na 15 min do katódového pufru (25 mM Tris, 20 mM glycín, 20% metanol, pH 9,4) spolu s 8 filtračnými papiermi Whatman. Ostatných 8 filtračných papierov spolu s nitrocelulózovou membránou boli na 15 min namočené do anódového pufru (0,3 M Tris, 10% metanol, pH 10,4).

Na semi-dry blotovací systém (Trans-BlotTurbo Transfer System (Biorad)) boli naskladané filtračné papiere ekvilibrované v anódovom pufri, nitrocelulózová membrána a polyakrylamidový gél. Na vrch boli položené filtračné papiere ekvilibrované v katódovom pufri. Do uzavretej blotovacej súpravy bol pustený prúd ($I = 1,0 \text{ mA}$; 25 V; 30 min).

Nitrocelulózová membrána bola 2x ekvilibrovaná v 5 ml TBS pufru (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0). Potom bola premiestnená do blokovacieho pufru na 1 hod. V ďalšom kroku bola 3x 5 min premytá v TBST pufri (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20, pH 8,0) a vložená do roztoku primárnej protilátky (Tioredoxin 1 Polyclonal Rabbit Antibody (ThermoScientific), odporučené riedenie 1:1000 (10 ml TBST + 10 μl protilátky), v ktorom bola inkubovaná cez noc pri 4 °C.

Ďalší deň bola membrána premytá 3x 5 min v 20 ml TBST pufri, potom inkubovaná 1 hod v sekundárnej protilátke (Anti-Rabbit IgG-Alcaline Phosphatase (Sigma-Aldrich) odporučené riedenie 1:30 000 (30 ml TBST + 1 μl protilátky). Membrána bola následne premytá 2x 4 min v 15 ml TBST pufri, potom 2x 4 min v 15 ml TBS pufri. Ďalej bola membrána inkubovaná v roztoku s ALP substrátom (20 ml 0,1 M Tris, 0,5 mM MgCl₂, pH 9,5; + 100 μl 30 mg.ml⁻¹ BCIP v DMF + 100 μl 60 mg.ml⁻¹ tetrazóliová modrá v 70% DMF). Do 10 minút prebehla farebná reakcia. Membrána bola usušená.

1.12. Produkcia proteínu PSL2 s tioredoxínom na purifikáciu

Zásobné bunky *E. coli* BL21(DE3) s modifikovaným konštruktom pRSET A_Thio(HP)TEV_*psl2* boli zaočkované do 5 ml tekutého LB média s príslušným antibiotikom pre vytvorenie inokula (37 °C; 200 rpm; OD₆₀₀ ~ 0,5). Inokulum bolo následne preočkované do 250 ml LB média s prídavkom antibiotika. Bunky boli kultivované (18 °C; 19 hod; 0,1 mM IPTG).

Konštrukt pET-44b_6xHis_NusA_6xHis_TEV_*psl2* bol podobne kultivovaný v bunkách *E. coli* BL21(DE3), indukcia prebehla pomocou 0,5 mM/ 0,25 mM IPTG pri podmienkach 16 °C, 18 hod.

Po ukončení kultivácie boli bunky zozbierané a centrifugované za podmienok 10 min, 8 000 rpm/11806 g, 4 °C. Bunkový pelet bol rozsuspendovaný v pufri A a uskladnený pri -20 °C.

V rámci spolupráce s Mgr. Adamom Norkom z výskumnej skupiny „Štruktúra a dynamika proteínov“ z Centra štruktúrnej biológie (CEITEC) boli bunky *E. coli* kultivované pomocou fermentoru.

Najprv boli pripravené tzv. bakteriálne konzervy. Bunky Rosetta2(DE3)pLysSRare, ktoré obsahujú konštrukt pRSET A_Thio(HP)TEV_ *psl2* boli najprv zaočkované zo zásobných buniek do 3x 100 ml LB média s prídavkom príslušných antibiotík (výsledná c = 200 µg.ml⁻¹). Bunky boli kultivované cez noc, následne boli stočené (20 min, 6000 rpm/ 6641g). Supernatant bol zliaty a bunky boli rozsusednované v 4 ml 10% glycerolu. Takto pripravené bunky boli rozdelené do alikvótov po 1 ml, zmrazené tekutým dusíkom a uchovávané pri -80 °C.

Do 3 l TB média (Tryptone 36 g; Yeast extract 72 g; (NH₄)₂SO₄ 9,9 g; pH 6,8) s prídavkom 0,1 l fosfátového pufru (0,17 M KH₂PO₄; 0,72 M Na₂HPO₄) boli naočkované bunky zo zásobných bakteriálnych konzerv. Indukcia prebehla pomocou prídavku sacharidového roztoku v dvoch podobách za súčasného zníženia teploty (Tabuľka č. 21).

Tabuľka č. 21: Priebeh indukcie pomocou IPTG a pomocou autoindukcie počas kultivácie buniek na fermentore

Typ indukcie	Glukóza	Laktóza	MgSO ₄	1M IPTG	Zmena teploty
IPTG	2,5 g	0,0 g	0,15 g	0,5 ml	30 °C → 16 °C
Autoindukcia	0,5 g	2,0 g	0,15 g	0,0 ml	25 °C → 22 °C

Sonikácia

Zmrazené bunky získané z predchádzajúceho kroku boli poponechané cez noc rozmraziť pri 4 °C. Na ďalší deň boli dezintegrované na sonikátore (SONICSvibracell VCX500) pri podmienkach 2x 10 cyklov, 1 s pulz a 4 s pauza na ľade, amplitúda 40 %. Potom boli bunky centrifugované 45 min pri 4 °C, 14 000 rpm/21 036 g (centrifúga 16-16K, Sigma). Bunkový supernatant bol ďalej prefiltrovaný pomocou nesterilného filtra s veľkosťou pórov 0,45 µm (Roth). Vzorka bola udržiavaná na ľade.

1.13. Purifikácia s využitím metaloafinitnej chromatografie

Na purifikáciu proteínu PSL2 s fúznym proteínom tioredoxínom alebo s oligohistidínovými kotvami bola využitá metaloafinitná chromatografia s Ni-NTA maticou (Ni-NTA Superflow Cartridge, 5 ml (3 x 2 cm), Qiagen), navrhnutou pre FPLC purifikáciu za použitia prístroja ÄKTA Purifier (GE Healthcare) a programu Unicorn 5.11.

Kolóna bola najskôr premytá nanášacím pufrom (A). Vzorka získaná dezintegráciou bola nanášaná na kolónu prietokom $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, odmyvanie nezachytených frakcií bolo vykonané pomocou prietoku $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Nasledovala elúcia proteínu postupným zvyšovaním koncentrácie imidazolu obsiahnutom v elučnom (B) pufri. Z každej frakcie teoreticky obsahujúcej požadovaný proteín boli spracované vzorky pre SDS-PAGE zmiešaním vzorky s 2x vzorkovým pufrom v pomere 1:1. Pomocou elektroforézy bola zistená nielen prítomnosť vypurifikovaného proteínu, ale aj jeho čistota.

1.14. Dialýza

Vzorky, ktoré podľa výsledkov elektroforézy obsahovali proteín boli dialyzované 3x pomocou dialyzačného čreva (SnakeSkin, cut-off limit 3,5 kDa; Thermo Scientific) v chlade oproti purfu: (10 l) 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , pH 8,0 po dobu dvoch dní. Dialýza bola použitá na odstránenie imidazolu a EDTA, ktorými bol proteín PSL2 eluovaný z kolóny. U vzoriek po elúcii pomocou EDTA dialýza slúžila aj na navrátenie iónov kovov do roztoku proteínu, preto bol na začiatku dialýzy do čreva bol pridaný 30 mM CaCl_2 .

1.15. Koncentrovanie proteínu

Proteín bol koncentrovaný pomocou koncentračných skúmaviek (Vivaspin® 20), použitá membrána mala cut-off 10 000 Mr. Koncentrovanie prebiehalo pri podmienkach $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 8 000 rpm. Výsledná koncentrácia proteínu bola stanovená na nanodrope (NanoDrop ND-1000, Coleman Technologies). Na prípadné zakoncentrovanie proteínu z malého objemu boli použité koncentračné mikroskúmavky (Vivaspin® 500) s cut-off hodnotou 3 000 Mr za podmienok RT, 14 000 rpm.

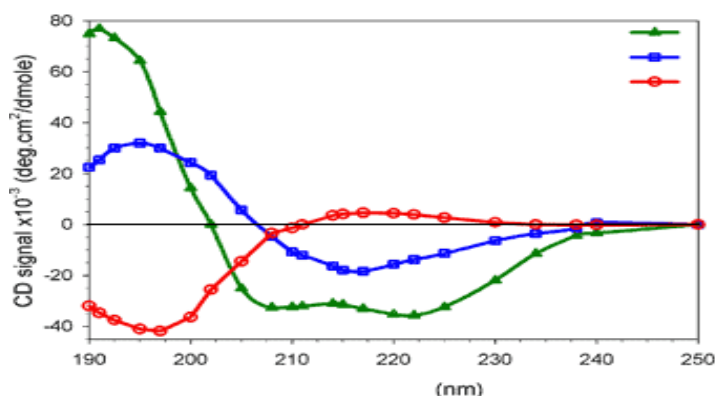
1.16. CD spektroskopia

Pri metóde spektroskopie cirkulárneho dichroizmu sa meria rozdielna absorbcia väzieb opticky aktívnych chirálnych molekúl pri prechode ľavostranného a pravostranného polarizovaného svetla (pozri na graf č.1). Metóda sa používa na sledovanej celkovej konformácie nukleových kyselín a proteínov.

V tomto prípade bola sledovaná sekundárnu štruktúru proteínu PSL2. Meranie prebiehalo priUV svetle v rozpätí vlnových dĺžok 180 – 250 nm. Výsledné CD spektrum je zložené z možných sekundárnych štruktúr proteínov: α -helixu, β -skladaného listu alebo náhodného kľbka.

Meranie vzoriek proteínu PSL2 po purifikácii v pufri (20 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , pH 8,0) prebiehalo na spektrofotometri J-810 (Jasco) vždy v 3 opakovaniach, rýchlosť

skenovania bola nastavená na $50 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ a rozpätie po 1 nm. Dáta boli vyhodnotené pomocou programu SpectraManager. Použité kremenné kyvety (Hellma), ktorých dĺžka optickej dráhy je 1 mm boli opatrne naplnené 200 μl vzorky obsahujúcej proteín PSL2 po hrane kyvety.



Graf č. 1: Špecifické krivky CD spektra pre jednotlivé sekundárne štruktúry; revzaté z [a](http://www.fbs.leeds.ac.uk/facilities/cd/) upravené z <http://www.fbs.leeds.ac.uk/facilities/cd/>

1.17. Funkčné štúdie hypotetického lektínu PSL2

Hemaglutinácia s použitím mikroskopu

Hemaglutinácia je dej, pri ktorom dochádza k zhlukovaniu povrchových aglutinogénov (antigénov) – poligosacharidových reťazcov pripojených na glykoforíny (integrálne membránové proteíny) – pri reakcii s aglutinínmi, v tomto prípade lektínmi. Povrchové antigény erytrocytov sú zodpovedné za rozlišovanie krvných skupín (A, B, AB a 0). Majú rovnaký základ, ktorý sa nazýva H antigén. Ten je zložený z *D*-galaktózy, GlcNAc a *L*-fukózy. Takýto antigén majú na svojom povrchu erytrocyty skupiny 0 (antigén 0). Krvná skupina A sa líši tým, že obsahuje základnú zostavu sacharidov a navyše GalNAc (antigén A). Krvná skupina B má na svojom povrchu okrem základu navyše *D*-galaktózu (antigén B). Jedinci so skupinou AB majú na povrchu erytrocytov naviazané antigény A aj B (38).

Pred samotným vykonaním experimentov bola krv stabilizovaná zmiešaním s protizrážajúcim činidlom citrátom sodným (3,8%), centrifugovaná, premytá 3x PBS pufrom (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH je $7,4 \pm 0,2$) a získané erytrocyty boli nariedené na 50% PBS pufrom.

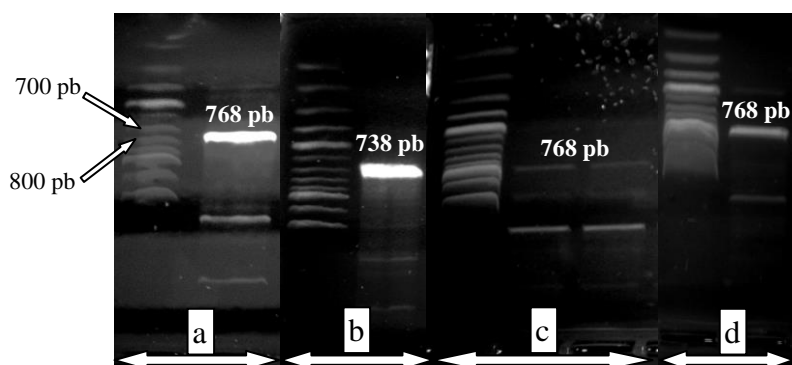
Na podložné sklíčko bolo napipetovaných 10 μl 50% erytrocytov a 10 μl vzorky. Obe zložky boli na sklíčku premiešané a poponechané reagovať po dobu 3 minút. Negatívna kontrola bola vytvorená zmiešaním krviniek a pufru v pomere 1:1. V rovnakom pomere bola vytvorená pozitívna kontrola s lektínom Con A ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Všetky pozorovania boli vykonané pri laboratórnej teplote pomocou optického mikroskopu s digitálnou kamerou (Levenhuk D2L) za využitia programu ToupView.

2. Výsledky a diskusia

2.1. Príprava DNA konštruktov pre produkciu proteínu s oligohistidínovými kotvami

PCR

Vyizolované 2 východiskové plazmidy, obsahujúce gény *psl2*, boli podrobené PCR reakcii, pre amplifikáciu tohto génu *psl2*. Prvým takýmto plazmidom bol pMAT⁻_N-6xHis_TEV_*psl2*, z ktorého bol amplifikovaný inzert N-6xHis_TEV_*psl2*, ktorý bol následne vložený do týchto cieľových konštruktov: pLEXSY_IE_blecherry4 so sign. sekvenciou, pLEXSY_IE_blecherry4 bez sign. sekvencie, pET-44b_N-6xHis_NusA. Druhý plazmid, použitý na amplifikáciu inzertu TEV_*psl2* bol pRSET A_Thio(HP)TEV_*psl2* (bez 6xHis). Získaný inzert bol preklonovaný do cieľového konštrukt pET-44b_NusA_C-6xHis. Vzorky boli vložené do dvoch termocyklérov s rozdielnym nastavením teploty nasadenia primerov. Teplota nasadenia primerov bola zvolená na základe štruktúry navrhnutých primerov (pozri Tabuľku č. 4). PCR produkty odpovedajúce očakávanej veľkosti génu (768/ 738 pb) boli vyrezané z gélu (Obrázok č. 6) a použité pre ďalšie reštrikčné štiepenie.



Obrázok č. 6: 1% agarózový gél s PCR produktami:

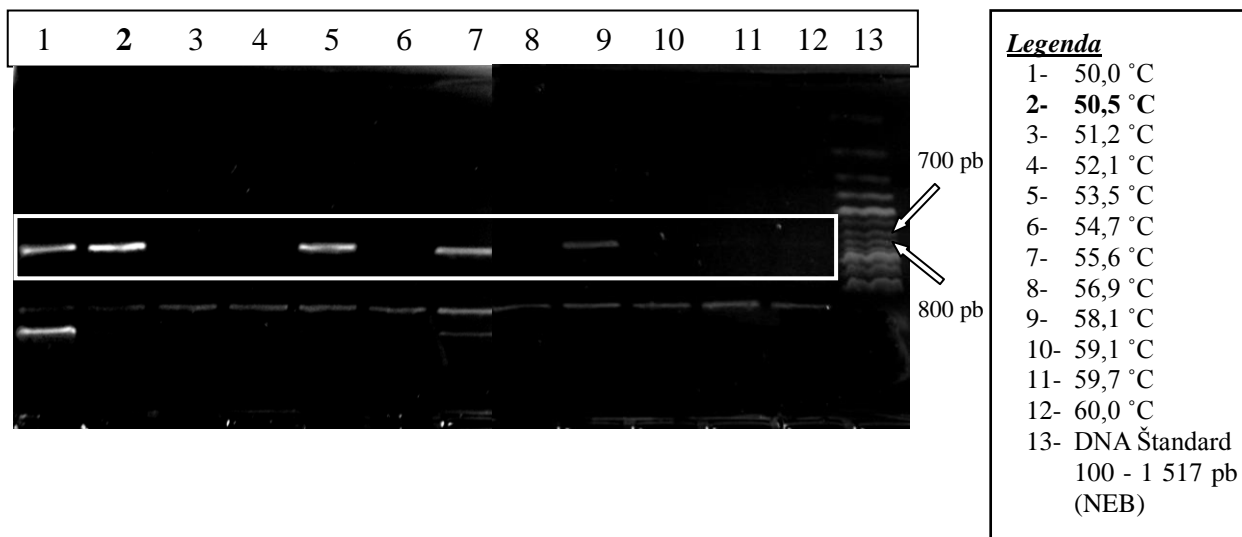
- N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_psl2* pre cieľový konštrukt pET-44b
- TEV_*psl2* pre cieľový konštrukt pET-44b
- N-6xHis_TEV_psl2* pre cieľový konštrukt pLEXSY_IE_blecherry4 bez sign. sekvencie
- N-6xHis_TEV_psl2* pre cieľový konštrukt pLEXSY_IE_blecherry4 so sign. sekvenciou

Použitý DNA štandard 100 - 1 517 pb (NEB)

Gradientová PCR

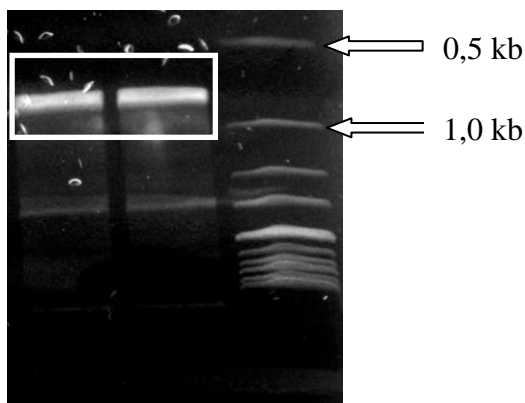
Pri PCR reakcii sa nepodarilo získať inzert TEV_*psl2* z východiskového plazmidu pRSET A_Thio(HP)TEV_*psl2* (bez 6xHis) určeného pre cieľový konštrukt

pLEXSY_IE_blecherry4 bez sign. sekvencie. Preto bola vykonaná gradientová PCR na zistenie optimálnej teploty nasadenia primerov (Obrázok č. 7).



Obrázok č. 7: 1% agarózový gél s PCR produktami TEV_psl2 po gradientovej PCR pre cieľový konštrukt pLEXSY_IE_blecherry4 bez sign. sekvencie, očakávaná veľkosť PCR produktu 768 pb, DNA štandard 100 – 1 517 pb (NEB)

Podľa Obrázku č. 7 bolo usúdené, že najvhodnejšia teplota nasadenia primerov č. 626 a 627 na templátovú DNA pRSET A_Thio(HP)TEV_psl2 (bez 6xHis) je 50,5 °C (jamka č.2). Na Obrázku č. 8 je zobrazený PCR produkt (inzert TEV_psl2) po optimalizácii.



Obrázok č. 8: 1% agarózový gél s PCR produktami TEV_psl2 po optimalizácii nasadenia primerov pre cieľový konštrukt pLEXSY_IE_blecherry4-sig. sekvencia, očakávaná veľkosť 768 pb, DNA štandard 0,5 – 10 kb (NEB)

2.2. Reštrikčné štiepenie

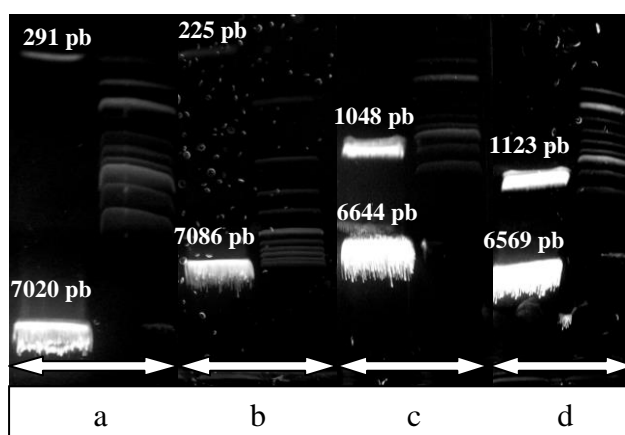
Štiepenie cieľových plazmidov

Vyizolované cieľové plazmidy boli podrobené reštrikčnému štiepeniu (podľa návodu opísaného v kapitole Reštrikčné štiepenie). V Tabuľke č.22 sú uvedené použité reštrikčné

enzýmy (RE) a očakávané veľkosti linearizovaných plazmidov a fragmentov vyštiepených z MCS. Výsledné štiepené plazmidy sú zobrazené na Obrázku č. 9.

Tabuľka č. 22: Očakávané veľkosti plazmidov pred štiepením a po štiepení, použité reštrikčné endonukleázy

Konštrukt	Veľkosť celého konštruktu	Použitá dvojica reštriktáz	Očakávaná veľkosť linerarizovanej plazmidovej DNA	Očakávaný vyštiepený fragment DNA
pET-44b_N-6xHis_NusA	7311 pb	<i>SpeI, XhoI</i>	7020 pb	291 pb
pET-44b_NusA_C-6xHis	7311 pb	<i>SpeI, HindIII</i>	7086 pb	225 pb
pLEXSYS_IE_blecherry4 so sign. sekvenciou	7692 pb	<i>XbaI, NotI</i>	6644 pb	1048 pb
pLEXSYS_IE_blecherry4 bez sign. sekvencie	7692 pb	<i>NcoI, NotI</i>	6569 pb	1123 pb



Obrázok č. 9: 1% agarózový gél: štiepenie cieľových plazmidov pomocou dvojice reštriktáz:

- pET-44b_N-6xHis_NusA*, štiepený RE: *SpeI, XhoI* (DNA štandard 100 – 1 517 pb (NEB))
- pET-44b_NusA_C-6xHis*, štiepený RE: *SpeI, HindIII* (DNA štandard 0,5 – 10 kb (NEB))
- pLEXSYS_IE_blecherry4* so sign. sekvenciou, štiepený RE: *XbaI, NotI* (DNA štandard 100 – 1 517 pb (NEB))
- pLEXSYS_IE_blecherry4* bez sign. sekvencie, štiepený RE: *NcoI, NotI* (DNA štandard 100 – 1 517 pb (NEB))

Reštrikčné štiepenie cieľových plazmidov prebehlo bez problémov. Na obrázku č. 9 je zobrazené, že štiepené plazmidy ako aj vyštiepené fragmenty z MCS svojimi veľkosťami odpovedajú očakávaným hodnotám. Linearizované plazmidové DNA boli z 1% gélov vyrezané. Kvôli zisku koncentrovanejších vzoriek boli spojené vždy 2 – 3 prúžky gélu a pomocou kitu (Gel Extraction, QIAGEN) boli vzorky extrahované do roztoku.

Štiepenie PCR produktov

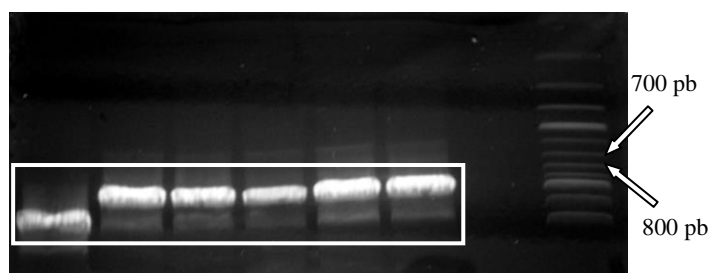
Štiepenie PCR produktov prebiehalo podľa opísaného návodu (Reštrikčné štiepenie). Takmer všetky PCR produkty boli úspešne naštiepené pomocou špecifickej dvojice restriktáz.

V tomto kroku sa z dôvodu nedostatočného množstva restriktázy *SpeI* nepokračovalo v príprave konštruktu pET-44b s oligohistidínovou kotvou na C-konci.

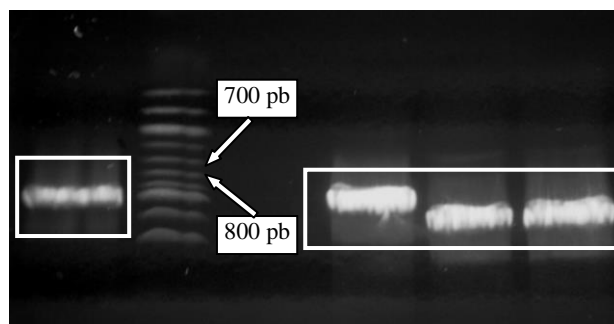
Kontrola úspešnosti transformácie buniek *E. coli* pripravenými konštruktami

2.2.1.1. PCR kolónií

Pre rýchle zistenie prítomnosti rekombinantného konštruktu v bunkách *E. coli* po transformácii kompetentných buniek, bola vykonaná PCR kolónií (postup a použité primery pozri v kapitole 0) v prípade transformovaných buniek pomocou rekombinantných plazmidov pLEXS_Y_IE_blecherry4 (s/ bez sign. sekvencie). Ak prebehli všetky predchádzajúce kroky v rámci klonovania správne, pomocou UV žiarenia bolo možné na 1% agarózovom géli pozorovať inzerť DNA sekvencie o približnej veľkosti 800 pb. Z gélov (Obrázky č. 10, 11) sa nedá jednoznačne učiť, či prebehla reakcie správne, lebo veľkosť prítomného prúžku DNA je väčšia ako predpokladaná. Preto boli jednotlivé kolónie použité pri PCR kolónií zaočkované do tekutého LB média a z prerastenej kultúry boli vyizolované DNA plazmidy. Tie boli použité pre kontrolné reštrikčné štiepenie rovnakou dvojicou restriktáz, aké boli použité pri procese klonovania.



Obrázok č. 10: PCR kolónií; konštrukt pLEXS_Y_IE_blecherry4_N-6xHis_psl2 bez sign. sekvencie (1% agarózový gél), očakávaná veľkosť vyštiepeného fragmentu cca 800 pb, DNA štandard 100 – 1 517 pb (NEB)



Obrázok č. 11: PCR kolónií; konštrukt *pLEXSY_IE_blecherry4_N-6xHis_psl2* so sign. sekvenciou, očakávaná veľkosť vyštiepeného fragmentu cca 800 pb, (1% agarózový gél), DNA štandard 100 – 1 517 pb (NEB)

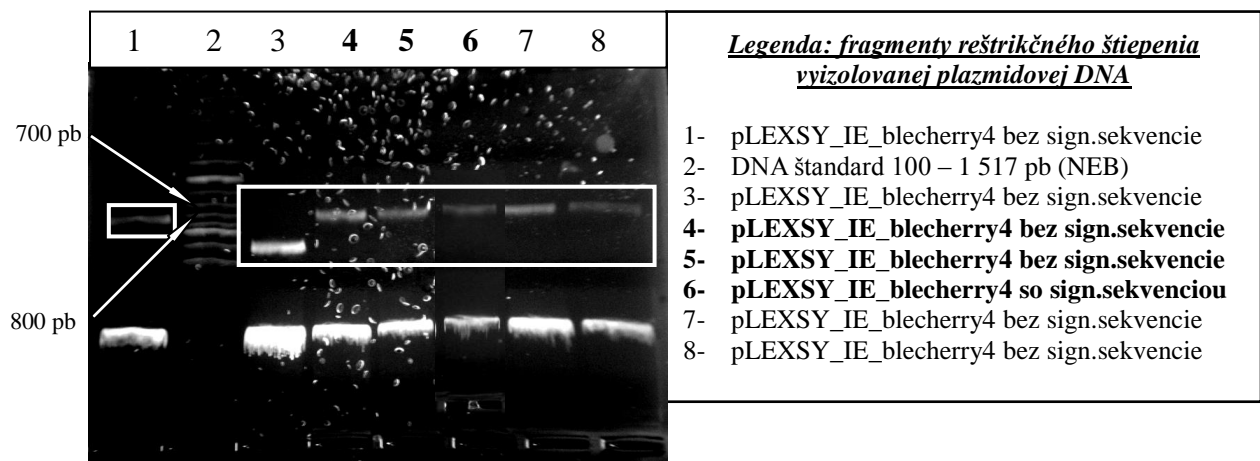
Kvôli nepresnosti výsledkov z PCR kolónií u konštruktov *pLEXSY_IE_blecherry4* (s a bez sign. sekvencie) bola kontrola úspešnosti transformácie buniek *E. coli* konštruktom *pET-44b_N-6xHis_NusA_6xHis_TEV__psl2* vykonaná iba pomocou kontrolného reštrikčného štiepenia.

2.2.1.2. Kontrolné reštrikčné štiepenie

Vyizolovaný DNA plazmid (*pLEXSY_IE_blecherry4_N-6xHis_psl2* s/ bez sign. sekvencie) z kolónií narastených po transformácii buniek *E. coli* bol analyzovaný aj pomocou kontrolného reštrikčného štiepenia.

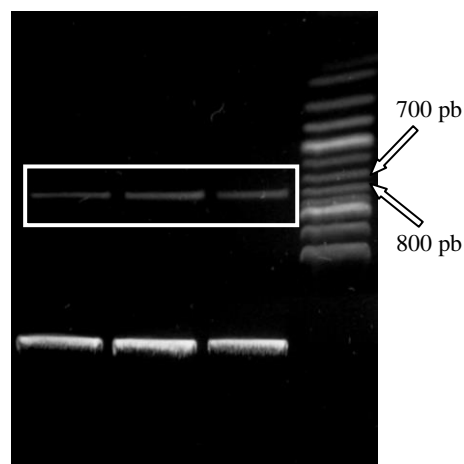
Na géli sú zobrazené vyštiepené fragmenty obsahujúce sekvenciu génu *psl2* o očakávanej približnej veľkosti 800 pb (Obrázok č. 12, jamky 1, 4-8). Z nich boli vybraté vzorky č. 4, 5, 6, ktoré boli podrobené sekvenácii. Pomocou tejto metódy bola potvrdená prítomnosť vloženého inzertu *N-6xHis_psl2* do konštruktov *pLEXSY_IE_blecherry4* bez sign. sekvencie (príloha č.2, 3) a *pLEXSY_IE_blecherry4* so sign. sekvenciou (príloha č.4).

V jamke č.3 sa nachádza prúžok o veľkosti cca 1100 pb, čo znamená že počas predchádzajúcich krokov klonovania nebol úspešne vyštiepený fragment (1123 pb) pomocou dvojice restriktáz z MCS, a preto nebol do konštruktú úspešne vložený požadovaný inzert obsahujúci gén pre proteín PSL2.



Obrázok č. 12: Kontrolné štiepenie konštruktov *pLEXSY_IE_blecherry4_N-6xHis_psl2* so/ bez sign. sekvencie po transformácii kompetentných buniek *E. coli*; obrázok zobrazuje vyštiepené fragmenty inzeru o predpokladanej veľkosti cca 800 pb (*N-6xHis_TEV_psl2*); v jamke č.3 je vyštiepený fragment z MCS o veľkosti cca 1000 pb - neobsahujúci gén *psl2* (1% agarózový gél), DNA štandard 100 – 1 517 pb (NEB)

Vyizolovaný DNA konštrukt *pET-44b_N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_psl2* z kolónii narastených po transformácii buniek *E. coli* bol tak isto podrobený kontrolnému reštrikčnému štiepeniu. Obrázok č. 13 znázorňuje vyštiepený inzert *6xHis_TEV_psl2* o približnej veľkosti 800 pb. Všetky 3 vzorky boli poslané na sekvenáciu, ktorá potvrdila prítomnosť inzeru (príloha č.5).



Obrázok č. 13: Kontrolné štiepenie konštruktov *pET-44b_N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_psl2* po transformácii buniek *E. coli*, vyštiepený fragment inzeru o predpokladanej veľkosti cca 800 pb (*N-6xHis_TEV_psl2*); (1% agarózový gél), DNA štandard 100 – 1 517 pb (NEB)

Výsledky kontroly úspešnosti transformácie a následné výsledky sekvenácie potvrdzujú, že sa podarilo pripraviť 3 konštrukty. Štvrtý konštrukt (*pET-44b C-6xHis_TEV_psl2*) nebol úspešne pripravený pre nedostatok restriktázy *SpeI*.

2.3. Transfekcia *Leishmania tarentolae*

Na produkciu proteínu PSL2 bol tento eukaryotický systém aj napriek časovej náročnosti experimentálnej práce zvolený vďaka tomu, že *L. tarentolae* sa radí medzi zložitejšie expresné organizmy. *L. tarentolae* obsahujú glykoproteíny veľmi podobné vyšším organizmom, vďaka ktorým sú schopné zvýšiť produkciu ako aj čistotu cieľového proteínu (31). Predpokladom bolo, že táto vlastnosť organizmu *L. tarentolae* bude vhodná pre proteín PSL2, ktorý je pôvodne z hrachu siateho.

Do buniek *L. tarentolae* boli podľa postupu transfekcie vnesené pripravené konštrukty pLEXSY_IE_blecherry4_N-6xHis_psl2 bez sign. sekvencie v objeme 50 μl o koncentrácii 181 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a pLEXSY_IE_blecherry4_N-6xHis_psl2 so sign. sekvenciou v objeme 30 μl o koncentrácii 323 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. V dôsledku nesprávne použitého nastavenia prístroja boli aplikované iné hodnoty (pozri Tabuľku č.23). Aj napriek tomu sa po elektroporácii pokračovalo klonálnou selekciou podľa návodu.

Tabuľka č. 23: Porovnanie vysoko-voltážneho protokolu s hodnotami v skutočnosti použitými na elektroporáciu

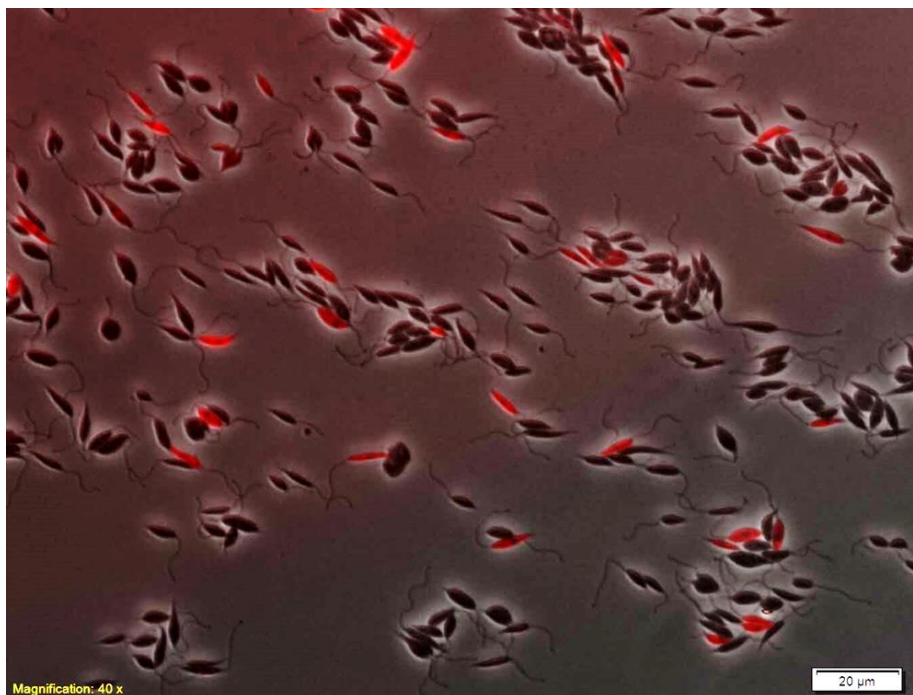
Vysoko-voltážny protokol pre elektroporáciu	
Správny protokol	Priebeh experimentu
d = 4 mm	d = 4 mm
V = 0,5 ml	V = 0,5 ml
1500 V	1490 V
1,2 ms	7 ms
50 Ω	200 Ω
2 pulzy 10s interval	2 pulzy 10s interval

Bunky elektroporované oboma druhmi konštruktov na miskách po prekrížkovaní nenarástli do 15 dní, preto boli kultivované ešte ďalších 7 dní na miskách, avšak s rovnakým výsledkom. Napriek tomu boli bunky z misiek s krížikmi ako aj z pôvodných misiek po transformácii zaočkované do 1 ml média bez tetracyklínu (jamky v bielom rámečku (zloženie média v Tabuľke č.1 s prídavkom LEXSY Bleo do výslednej koncentrácie 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)) a do 1 ml média s tetracyklínom (jamky v šedom rámečku (rovnaké zloženie média ako predtým + prídavok LEXSY Tet do výslednej koncentrácie 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)) použitím 12 jamkovej misky (Obrázok č. 14). Bunky boli kultivované staticky v tme pri 26 °C po dobu 14 dní. Po uplynutí tejto doby boli bunky skontrolované pod mikroskopom. Na základe vyžarovania červeného svetla pod vplyvom tetracyklínu (Obrázok č. 15) bolo usúdené, že bunky boli pomocou konštruktu pLEXSY_IE_blecherry4_N-6xHis_psl2 so sign. sekvenciou úspešne transfekované.

Bunky transfekované konštruktom pLEXYIE_blecherry4_N-6xHis_psl2 bez sign. sekvencie nenarástli. Transfekcia neprebehla úspešne pravdepodobne kvôli nesprávnemu nastaveniu prístroja pri elektroporácii. Z dôvodu nedostatku času sa nepodarilo experiment opakovať.

	1	2	3	4
A	-	+	-	+
B	-	+	-	+
C	-	+	-	+
	Bez tetracyklínu		S tetracyklínom	

Obrázok č. 14: Zobrazenie 12 jamkovej misky, do ktorej boli očkované bunky *L.tarentolae* po elektroporácii oboma konštruktmami: z misiek po transformácii (riadky A, B) ako aj z misiek po prekrížkovaní (riadok C); v šedej časti obrázku bol do média pridaný tetracyklín; značky -/+ znamenajú, označenie buniek zaočkovaných do média na miske (bunky s konštruktom pLEXYIE_blecherry4_N-6xHis_psl2 so sign. sekvenciou alebo bunky obsahujúce pLEXYIE_blecherry4_N-6xHis_psl2 bez sign. sekvencie)



Obrázok č. 15: *Leishmania tarentolae* po elektroporácii konštruktom pLEXYIE_blecherry4_N-6xHis_TEV_psl2 so sign.sekvenciou a následnej indukcii pomocou tetracyklínu vyžarujúce červené svetlo

2.4. Test expresie génu *psl2* vloženého do konštruktov pre produkciu proteínu PSL2 v *E. coli*

Konštrukt pRSET A_Thio(HP)TEV_*psl2*

Počas tohto testu boli používané kmene *E. coli* Arctic Express(DE3)RIL (Stratagene), BL21(DE3) (Stratagene), Tuner(DE3) (Novagen), Rosetta2(DE3)pLysSRare (Novagen).

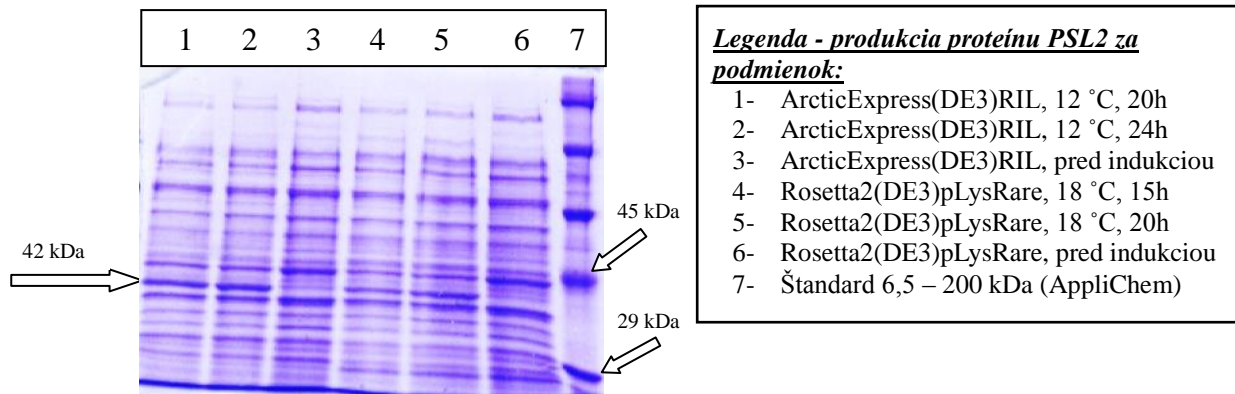
Bunky *E. coli* Arctic Express(DE3)RIL sú uspôsobené na produkciu proteínov pri nízkych teplotách, pretože ko-exprimujú šaperoníny adaptované na chlad - Cpn10 a Cpn60 z baktérie *Oleispira antarctica*. Tie majú 74% a 54% aminokyselinovú identitu so šaperóninmi z *E. coli* (GroEL a GroES šaperoníny). Bunky obsahujú konštrukty s extrakópiami tRNA génov, ktoré kódujú tRNA. Tie, ako signalizuje označenie „RIL“, samostatne rozpoznávajú kodóny arginínu AGA a AGG, izoleucínu – AUA, a leucínové kodóny CUA. Dostupné tRNA najčastejšie obmedzujú transláciu heterológnych proteínov z organizmov, ktoré majú AT- bohaté genómy. Vďaka tomu že, poskytujú vysokú aktivitu proteínového opätovného zbalenia pri teplotnom rozmedzí 4 – 12 °C, poskytujú potenciálne zvýšený výťažok aktívneho proteínu v rozpustnej forme (39).

Kmeň Rosetta2(DE3)pLysSRare je špecifický tým, že obsahuje kodóny, ktoré sa zriedka vyskytujú v *E. coli* - poskytuje tRNA pre 7 vzácných kodónov (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC a CGG). Tento kmeň exprimuje T7 lyzozým, ktorý ďalej potláča základnú expresiu T7 RNA polymerázy pred indukciou, tak stabilizuje pET rekombinantné cieľové proteíny, ktoré majú vplyv na bunkový rast a životaschopnosť (40).

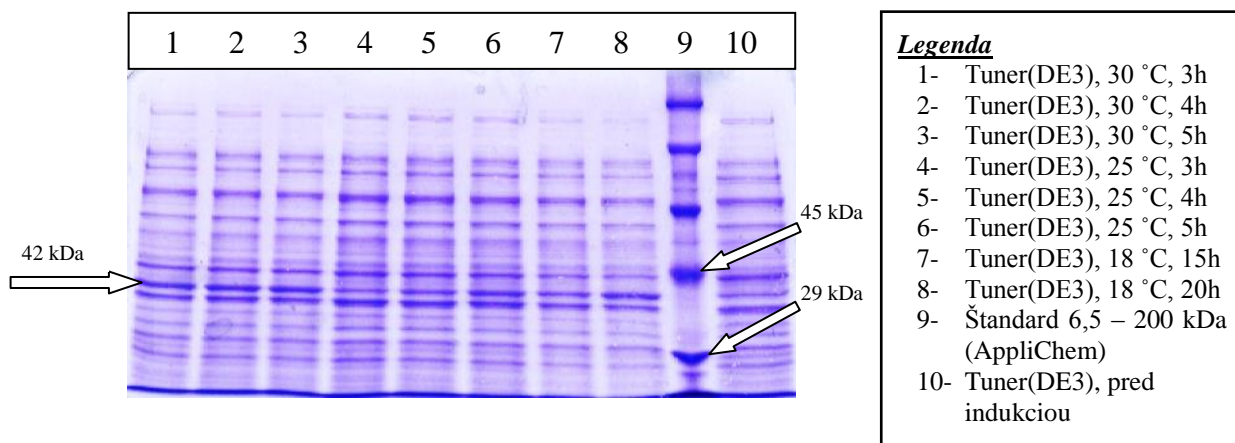
Výsledky optimalizácie celkovej produkcie proteínu PSL2 v týchto kmeňoch sú zobrazené na obrázkoch č. 16, 17, 18. Indukcia expresie génu *psl2* prebiehala vo všetkých experimentoch pomocou 0,1 mM IPTG. Očakávaná veľkosť produkovaného proteínu PSL2 s fúznym proteínom tioredoxínom je približne 42 kDa. Najvýraznejšia celková produkcia proteínu PSL2 bola v kmeni *E. coli* BL21(DE3), za podmienok indukcie 18 °C, 20 h (Obrázok č. 18 – 8. jamka). Ostatné výsledky celkovej produkcie proteínu PSL2 v rôznych kmeňoch *E. coli* naznačujú, že celková produkcia proteínu PSL2 je približne rovnaká.

Konštrukt pET-44b_N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_*psl2*

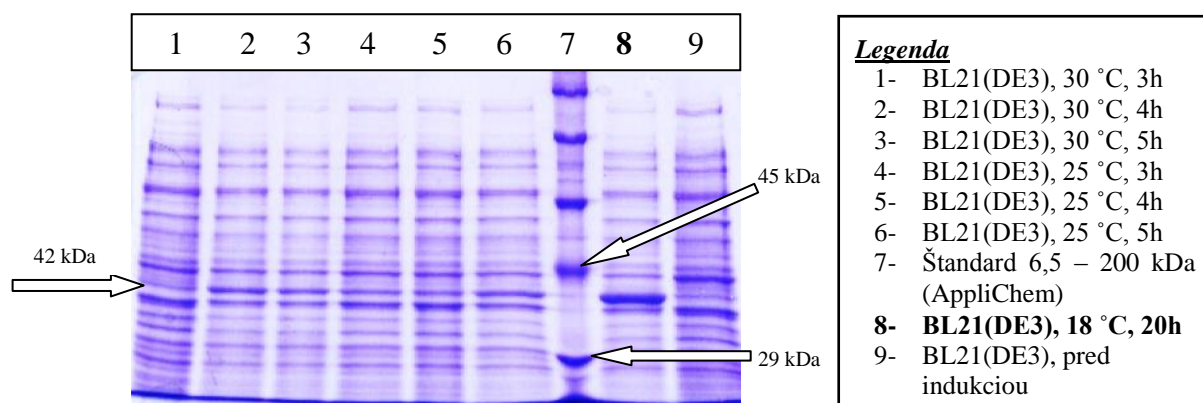
Nakoľko predchádzajúci konštrukt pRSET A_Thio(HP)TEV_*psl2* pri teste celkovej produkcie poskytoval skreslené výsledky – do celkovej produkcie proteínu PSL2 spadá aj proteín produkovaný v nerozpustnej forme, bol z tohto dôvodu vynechaný test celkovej produkcie proteínu PSL2 pre konštrukt pET-44b_N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_*psl2*.



Obrázok č. 16: Optimalizácia produkcie proteínu PSL2 s tioredoxínom v bunkách *E. coli* ArcticExpress(DE3)RIL a Rosetta2(DE3)pLysRare (10% polyakrylamidový gél)



Obrázok č. 17: Optimalizácia produkcie proteínu PSL2 s tioredoxínom v bunkách *E. coli* Tuner(DE3) (10% polyakrylamidový gél)



Obrázok č. 18: Optimalizácia produkcie proteínu PSL2 s tioredoxínom v bunkách *E. coli* BL21(DE3) (10% polyakrylamidový gél)

2.5. Test rozpustnosti produkovaného proteínu PSL2

Proteín PSL2 s tioredoxínom (pRSET A_Thio(HP)TEV_psl2)

Aj napriek tomu, že bola nájdená podmienka, počas ktorej je celková produkcia proteínu PSL2 vo viditeľne väčšom množstve ako pri ostatných podmienkach, bolo nutné zistiť jeho množstvo v rozpustnej forme. Preto boli vykonané rozsiahle testy rozpustnosti proteínu PSL2 v 3 bakteriálnych kmeňoch *E. coli* (pozri prílohu č. 6).

Pomocou testu rozpustnosti nebola nájdená podmienka, ktorá by mala výrazne väčší vplyv na produkciu proteínu PSL2 s tioredoxínom v rozpustnej forme. Výťažok tohto proteínu v rozpustnej forme bol pri každej testovanej podmienke takmer rovnaký. Na produkciu proteínu PSL2 s tioredoxínom pomocou fermentoru bol aj tak pre ďalšiu prácu vybraný kmeň buniek *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysSRare, práve vďaka jeho vlastnostiam.

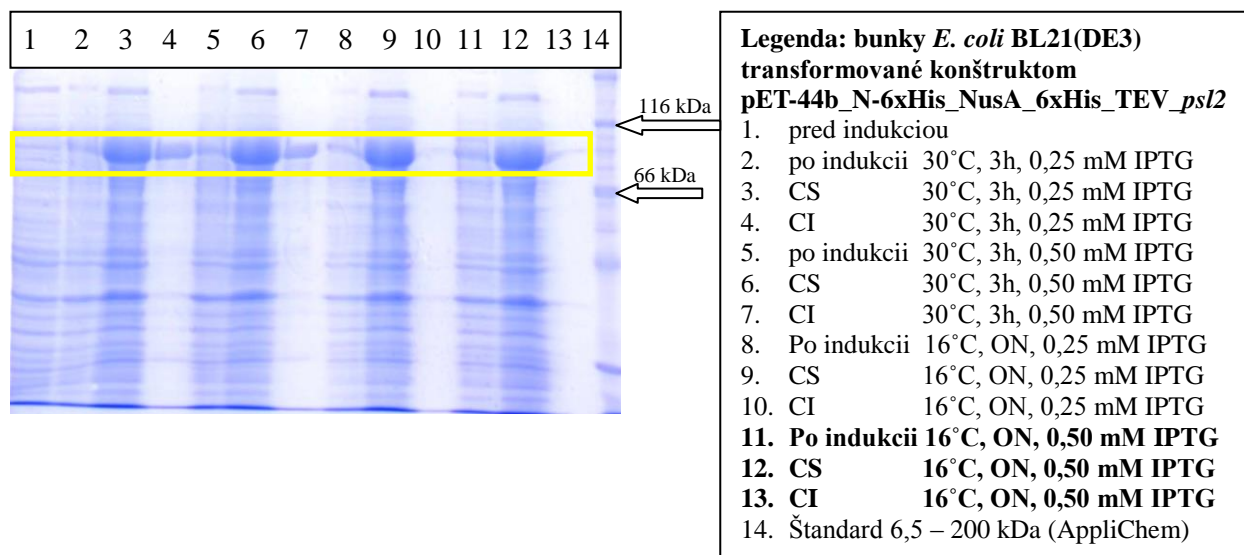
Proteín PSL2 s dvomi oligohistidínovými kotvami a NusA fúznym proteínom (pET-44b_N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_psl2)

Keďže pri predchádzajúcich testoch produkcie proteínu PSL2 nepreukázali kmene buniek *E. coli* Arctic Express(DE3)RIL a Rosetta2(DE3)pLysSRare vplyv na väčšiu produkciu proteínu PSL2, neboli pri teste rozpustnosti proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom použité.

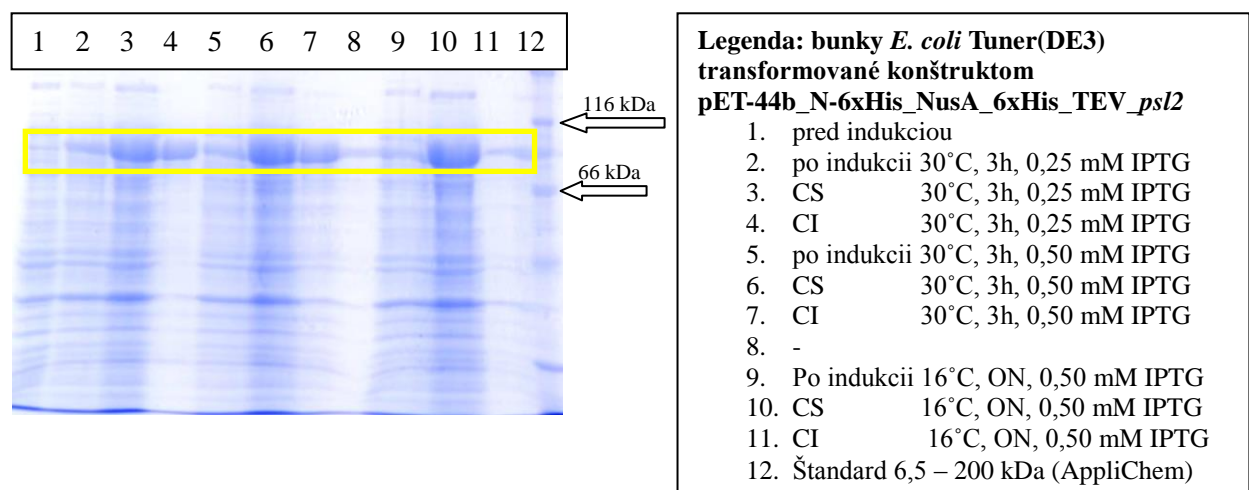
Testu rozpustnosti bol podrobený proteín PSL2 produkovaný dvomi kmeňmi buniek *E. coli*: BL21(DE3) a Tuner(DE3), ktoré boli transformované konštruktom pET-44b_N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_psl2.

U oboch kmeňoch buniek sa preukázalo, že prítomnosť NusA proteínu výrazne napomohla k posunu produkcie proteínu PSL2 do rozpustnej frakcie (pozri obrázky č. 19, 20).

NusA proteín sa bežne používa ako fúzny partner na pridelenie stability a vyššej rozpustnosti cieľového proteínu. Táto vlastnosť zvyšovať produkciu fúznych proteínov do rozpustnej fázy môže byť spojená s jeho vysokou vnútornou rozpustnosťou a biologickou aktivitou v *E. coli*. Tento fúzny partner spomaľuje transláciu, čím poskytuje proteínu viac času na zbalenie (41).



Obrázok č. 19: Test rozpustnosti proteínu *PSI2* s *NusA* fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami (veľkosť cca 86 kDa) v bunkách *E. coli* BL21(DE3) (10% polyakrylamidový gél)



Obrázok č. 20: Test rozpustnosti proteínu *PSI2* s *NusA* fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami (veľkosť cca 86 kDa) v bunkách *E. coli* Tuner(DE3) (10% polyakrylamidový gél) (ON = cez noc)

Na základe testu rozpustnosti boli vybrané pre ďalšiu prácu bunky *E. coli* BL21(DE3) a podmienky expresie: indukcia pomocou 0,50 mM IPTG, následné pestovanie buniek cez noc (ON) pri 16°C. Prítomnosť rekombinantného proteínu 6xHis_NusA_6xHis_TEV_psl2 bola potvrdená prostredníctvom analýzy pomocou hmotnostnej spektrometrie (MS) (pozri príloha č. 7, vzorka č.5).

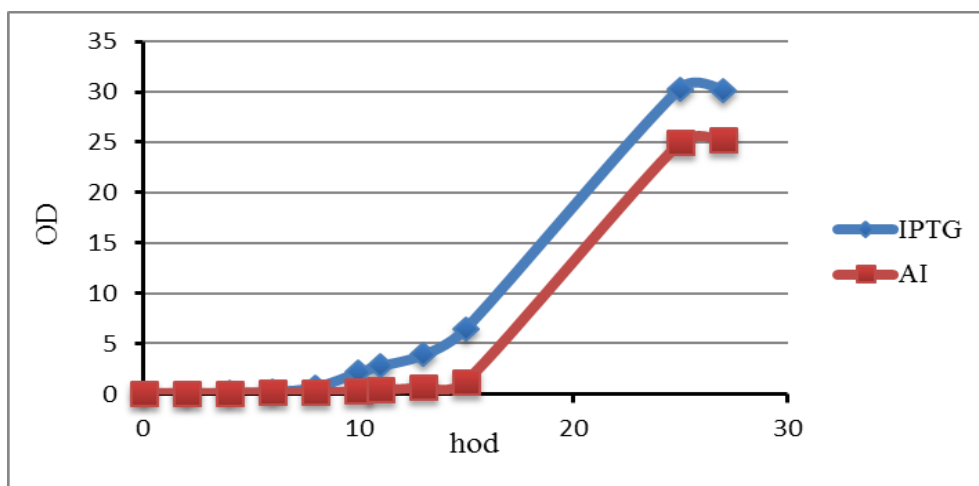
2.6. Produkcia proteínu PSL2 pre purifikáciu

Proteín PSL2 s tioredoxínom (pRSET A_Thio(HP)TEV_psl2)

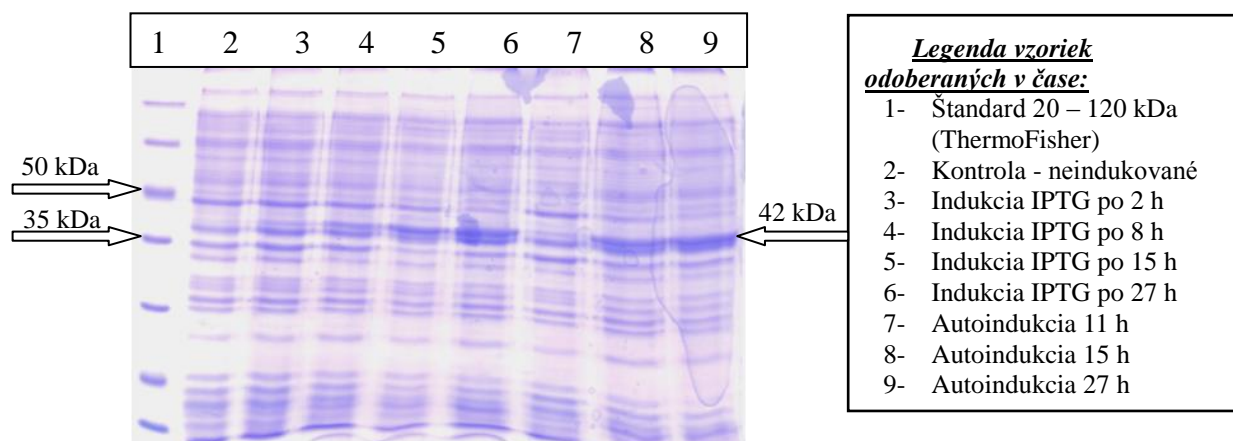
Podľa hodnoty celkovej produkcie proteínu PSL2 v bunkách bola na jeho produkciu vybratá podmienka *E. coli* BL21(DE3), 18 °C, 20 hod. Avšak produkcia proteínu PSL2 v rozpustnej forme bola pri týchto podmienkach príliš nízka.

Preto boli podľa testov rozpustnosti a na základe poznania vlastností buniek vybrané bunky Rosetta2(DE3)pLysSRare. Keďže produkcia proteínu PSL2 do rozpustnej frakcie počas kultivácie v malých objemoch bola nízka, bol na kultiváciu buniek použitý fermentor. Predpokladalo sa, že zväčšením množstva získaných buniek, by sa mal zvýšiť aj výtťažok proteínu PSL2. Táto metóda kultivácie bola prínosná v rôznych iných výskumoch, práve preto, že sme schopní za kratšiu dobu získať väčšie množstvo biomasy.

Vďaka spolupráci s pánom Mgr. Norkom bolo získané po autoindukcii ≈ 40 g mokrej masy z 3 l kultivačného média ($OD_{600} \sim 25$) a po indukcii pomocou IPTG ≈ 50 g mokrej masy z 3 l kultivačného média ($OD_{600} \sim 30$). Počas kultivácie, po indukcii IPTG, ako aj po autoindukcii boli odoberané vzorky v čase (v intervaloch po 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 25, 27 hod) pozri graf č. 2. Zvyšujúca sa produkcia proteínu PSL2 v čase bola potvrdená aj pomocou SDS-PAGE na 10% géli (obrázok č. 21).



Graf č. 2: Porovnanie nárastu hustoty kultúry buniek *E. coli* kmeňa Rosetta2(DE3)pLysSRare transformovaných konštruktom pRSET_Thio(HP)TEV_psl2 po autoindukcii (AI) a po indukcii pomocou IPTG v časových intervaloch 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 25, 27 hod (merané pri OD_{600})

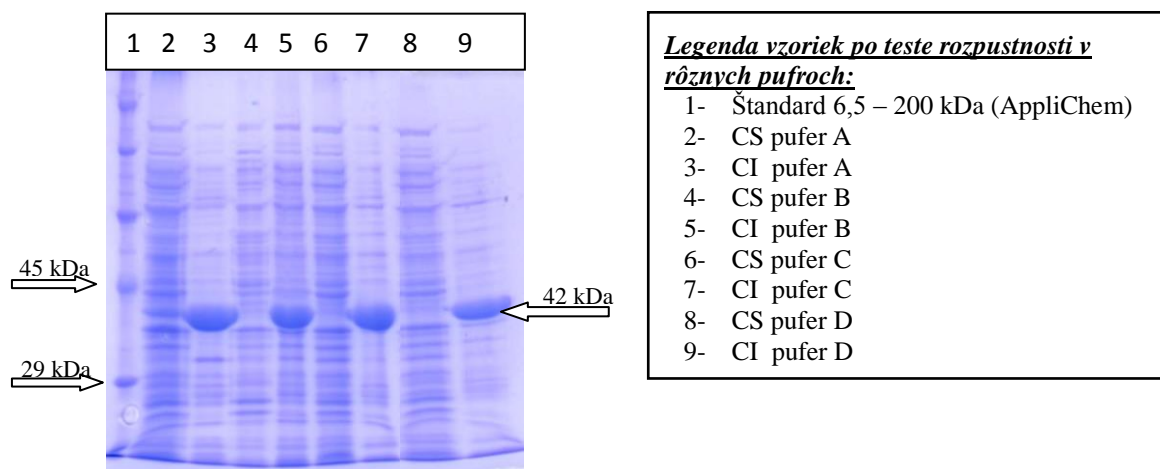


Obrázok č. 21: Porovnanie produkcie proteínu PSL2 s tioredoxínom v čase v bunkách *E. coli* kmeňa *Rosetta2(DE3)pLysSRare* transformovaných konštruktom *pRSET_Thio(HP)TEV_psl2* po autoindukcii a po indukcii pomocou IPTG v časových intervaloch (10% polyakrylamidový gél)

Prvotné testy zmeny rozpustnosti proteínu PSL2 s tioredoxínom v závislosti na pH sonikačného pufru, boli vykonané v Centre štruktúrnej biológie (CEITEC) vo výskumnej skupine „Štruktúra a dynamika proteínov“. Na našom pracovisku boli testy rozpustnosti tohto proteínu zopakované, pričom boli použité 4 rôzne pufre (pozri Tabuľku č. 24). Vo výsledku bol na polyakrylamidovom géli jediný viditeľný prúžok o veľkosti proteínu PSL2, a to vo vzorke s pufrom A (Obrázok č. 22). Tento pufer bol používaný v ďalších krokoch.

Tabuľka č. 24: Zloženie pufrov použitých pri teste rozpustnosti

A	B	C	D
0,1 M CAPSO	1 mM PMSF	0,05% Tween	5% glycerol
0,3 M NaCl	20 mM Tris/ HCl	20 mM Tris/ HCl	20 mM Tris/ HCl
0,1 mM CaCl ₂	0,3 M NaCl	0,3 M NaCl	0,3 M NaCl
0,1 mM MnCl ₂	0,1 mM CaCl ₂	0,1 mM CaCl ₂	0,1 mM CaCl ₂
pH 11,0	0,1 mM MnCl ₂	0,1 mM MnCl ₂	0,1 mM MnCl ₂
	pH 7,5	pH 7,5	pH 7,5



Obrázok č. 22: Test rozpustnosti proteínu PSL2 s tioredoxínom produkovaným pomocou buniek *E. coli* kmeňa *Rosetta2(DE3)pLysSRare* transformovaných konštruktom *pRSET_Thio(HP)TEV_psl2* v 4 rôznych pufroch (10% polyakrylamidový gél)

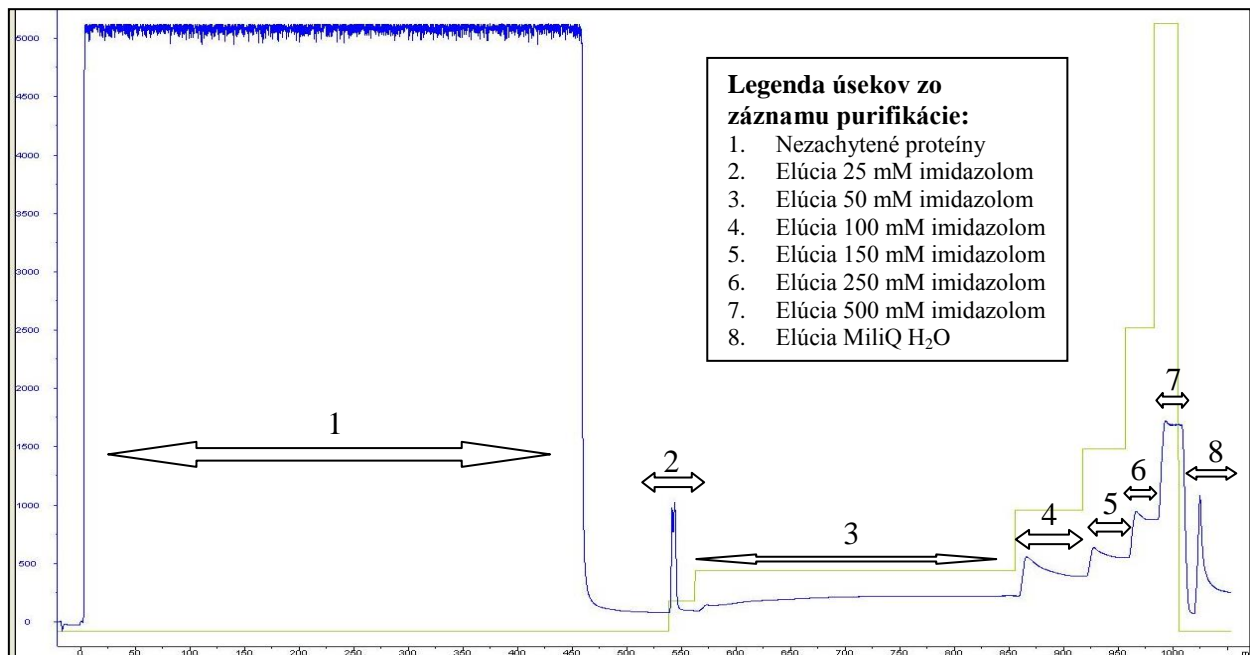
Proteín PSL2 s dvomi oligohistidínovými kotvami a NusA fúznym proteínom (N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_psl2)

Boli napestované bunky v objeme 500 ml, indukované a kultivované cez noc pri optimalizovaných podmienkach (*E. coli* BL21(DE3); 16°C; 0,50 mM IPTG). Získaný pelet bol rozsuspendovaný v 15 ml pufru (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 100 µM CaCl₂, pH 8,0). Bunky boli sonikované 2 x (10x (1s pulz + 4 s pauza)).

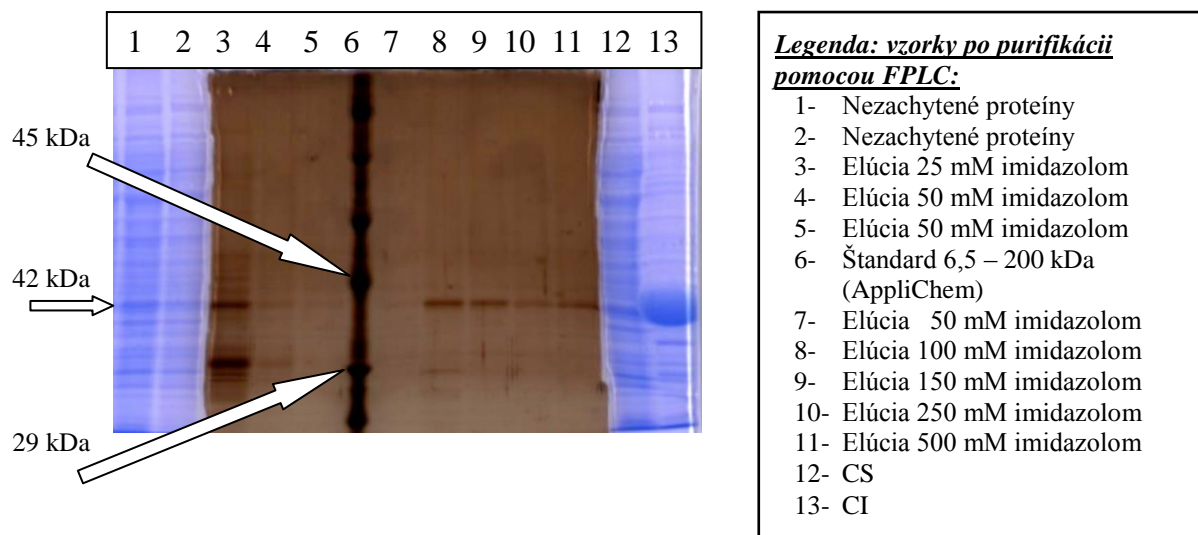
2.7. Purifikácia PSL2 s tioredoxínovou kotvou

Bunková hmota získaná po autoindukcii z kultivácie pomocou fermentoru bola rozsuspendovaná v 500 ml pufru A, zmes bola sonikovaná (amplitúda 40%, 3 hod (3s pulz + 4 s pauza) + 30 min (5s pulz + 6s pauza) za neustáleho chladenia 4 °C), centrifugovaná (40 min, 14 000 rpm, 4 °C) a prefiltrovaná cez nesterilný filter (0,45 µm). Lyzát o objeme 450 ml bol nanosený na Ni-NTA kolónu pomocou prietoku 0,6 ml.min⁻¹ po dobu 12,6 hodín. Bunkový lyzát bol udržiavaný na ľade. Počas purifikácie proteínu PSL2 (graf č. 3) bol použitý nanášací pufer A (0,1 M CAPSO; 0,3 M NaCl; 0,1 mM MnCl₂; 0,1 mM CaCl₂; pH 11,0) a elučný pufer B (0,5 M imidazol; 0,1 M CAPSO; 0,3 M NaCl; 0,1 mM MnCl₂; 0,1 mM CaCl₂; pH 11,0).

Počas purifikácie boli z Ni-NTA kolóny postupne zvyšujúcou sa silou imidazolu uvoľňované zachytené proteíny. Z každej frakcie boli vytvorené vzorky, ktoré boli podrobené SDS-PAGE (Obrázok č. 23). Proteíny na 10% polyakrylamidovom géli boli zviditeľnené pomocou Coomassie blue. Kvôli veľmi nízkej koncentrácii proteínu PSL2 vo vzorkách po elúcii imidazolom bola táto časť gélu ofarbená striebrom. Po vykonaní tohto kroku boli na géli pozorované prúžky proteínu o očakávanej veľkosti proteínu PSL2 s fúznym proteínom tioredoxínom (42 kDa). Vzorky z polyakrylamidového gélu boli poslané na MS analýzu. Počas čakania na výsledky bol vykonaný imunobloting s vybranými vzorkami z purifikácie proteínu PSL2 s tioredoxínom.



Graf č. 3: Záznam z purifikácie proteínu PSL2 s tioredoxínom produkovaného bunkami *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysSRare vykonanej pomocou metaloafinitnej chromatografie na Ni-NTA kolóne (5 ml (3 x 2 cm))

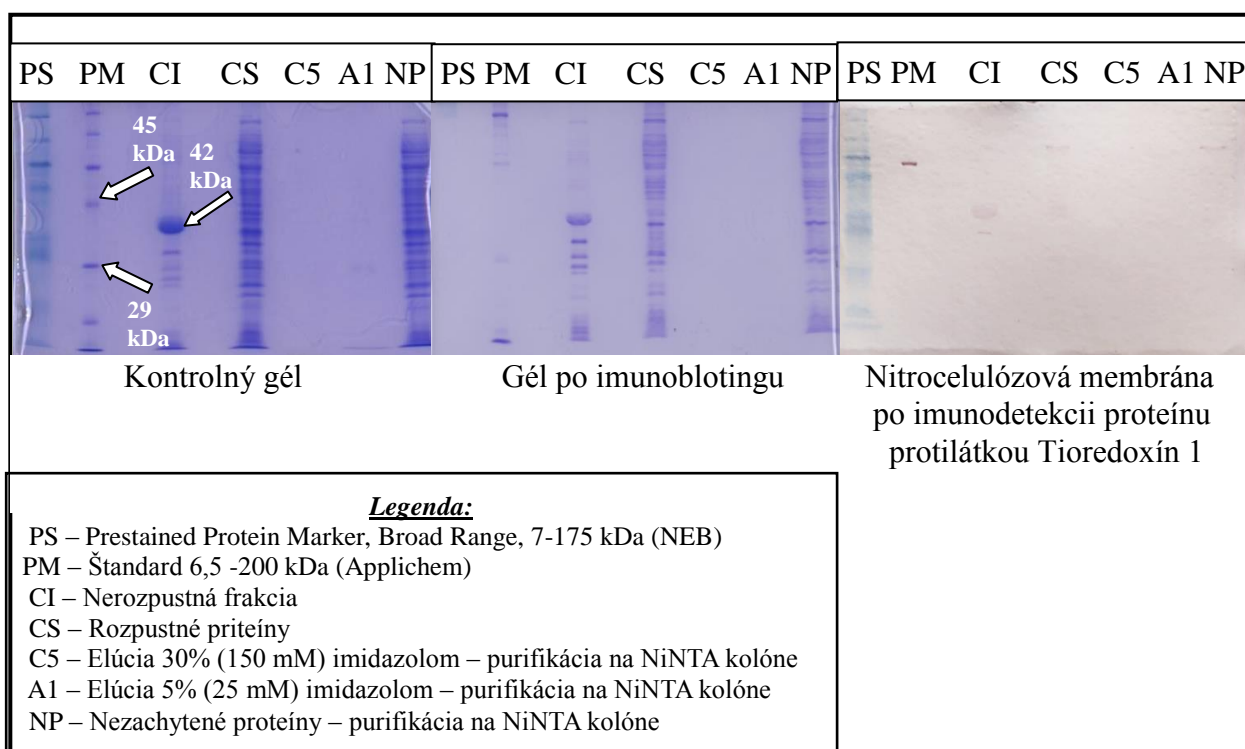


Obrázok č. 23: Výsledok SDS-PAGE so vzorkami odoberanými počas purifikácie proteínu PSL2 s tioredoxínom pomocou metaloafinitnej chromatografie s využitím Ni-NTA kolóny (10% polyakrylamidový gél)

2.8. Imunobloting

Pre potvrdenie prítomnosti proteínu PSL2 s tioredoxínom aspoň v minimálnom množstve vo vybraných vzorkách po purifikácii z predchádzajúcej kapitoly, boli niektoré vzorky po elúcii

imidazolom podrobené imunoblotingu. Vo výsledku (obrázok č. 24) sa však nepodarilo proteín PSL2 potvrdiť ani v jednej z elučných frakcií. Po imunodetekcii sa zobrazil slabý prúžok proteínu očakávanej veľkosti (42 kDa) vo frakcii nerozpustných proteínov (CI), čo potvrdzuje produkciu proteínu PSL2 s tioredoxínom v *E. coli*. Na membráne sa po imunitnej reakcii zobrazili aj iné proteíny v rozpustnej frakcii (CS). Keďže sa vizualizovali aj ostatné proteíny o rôznych veľkostiach, výsledky tohoto experimentu nemožno považovať za adekvátne. Nedosiahnutie očakávaných výsledkov mohlo byť spôsobené použitím polyklonálnej protilátky Tioredoxin 1 (Polyclonal Rabbit Antibody). Z toho dôvodu sa pre väčšiu špecifickosť reakcie používajú monoklonálne protilátky (42), ktoré avšak neboli k dispozícii.



Obrázok č. 24: Detekcia proteínu PSL2 s tioredoxínom vo vybratých vzorkách z purifikácie pomocou imunoblotingu za využitia protilátky tioredoxin 1 (10% polyakrylamidové gély)

Tento výsledok bol následne potvrdený aj výsledkami z MS analýzy. Prítomnosť proteínu PSL2 s fúznym tioredoxínom bola dokázaná len vo vzorkách v nenaviazaných proteínoch a v rozpustnej frakcii (pozri príloha č. 7, vzorky č.1 - 4). Prúžky s podobnou veľkosťou akú má proteín PSL2 s tioredoxínom viditeľné po ofarbení striebrom patria GAPDH z *Candida albicans*. GAPDH je klasický enzým glykolýzy, s ktorým sa pracuje v našom laboratóriu. Gén tohto enzýmu bol modifikovaný tak, aby obsahoval na oboch koncoch polyhistidínovú kotvu (43). Pravdepodobne bola Ni-NTA kolóna najprv použitá na purifikáciu tohto rekombinantného enzýmu, a následne na purifikáciu proteínu PSL2 s tioredoxínom, v dôsledku čoho bola

pozorovaná kontaminácia. Tá spôsobila skreslenie výsledkov purifikácie proteínu PSL2 s tioredoxínom.

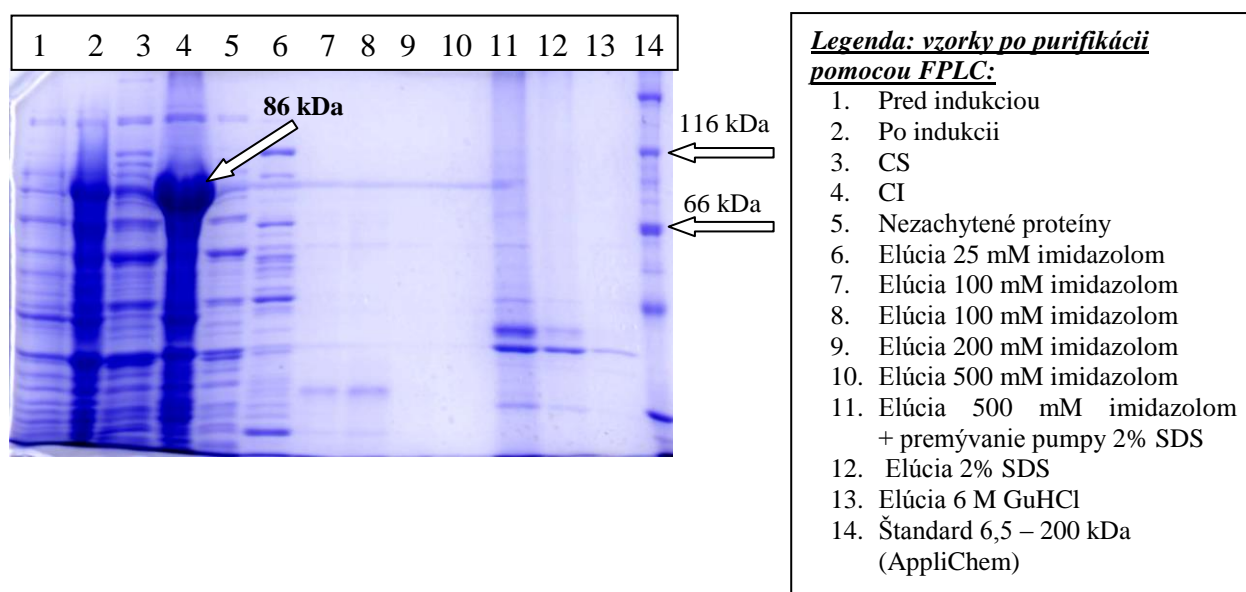
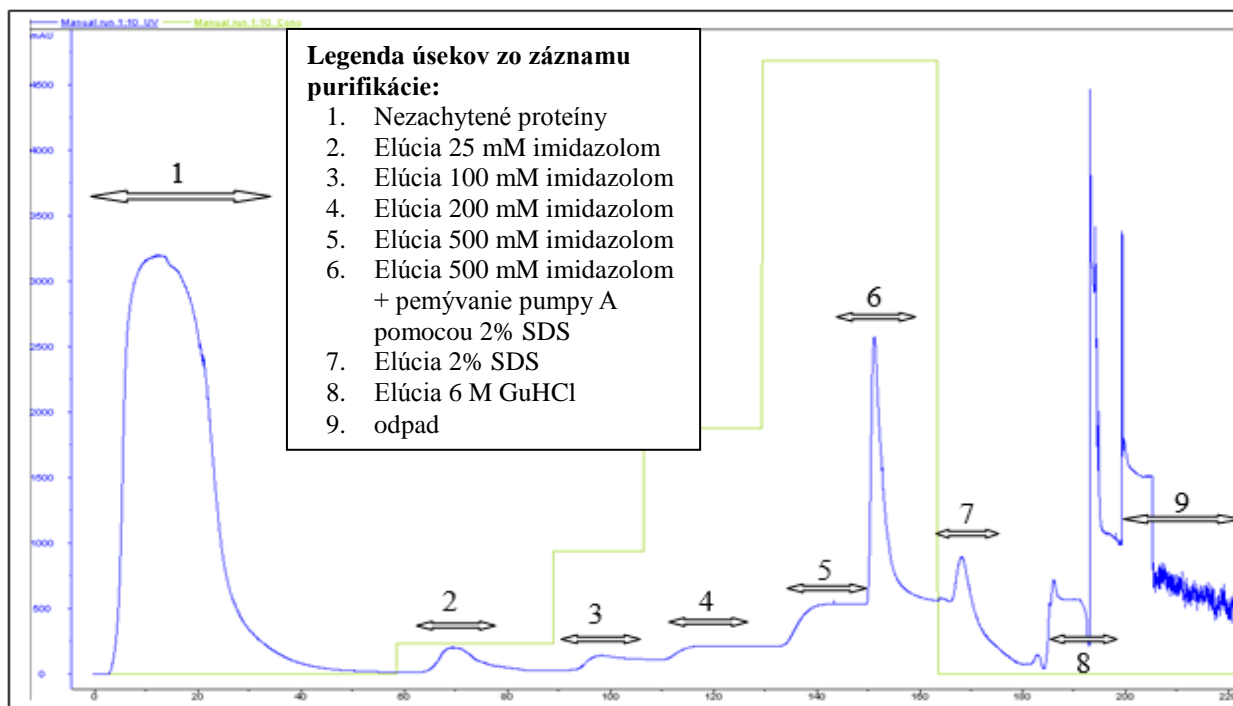
Odhliadnuc od prítomnosti kontaminácie, proteín PSL2 nebol prítomný vo vzorkách odoberaných počas elúcie imidazolom ani v malom množstve. Bola by možná optimalizácie podmienok purifikácie ale z časových dôvodov bolo od používania konštruktu pRSET A_Thio(HP)TEV_*psl2* pre získanie proteínu PSL2 upustené.

2.9. Purifikácia PSL2 s dvomi oligohistidínovými kotvami (N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_*psl2*)

Bunky *E. coli* kmeňa BL21(DE3) transformované pomocou konštruktu N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_*psl2* boli kultivované v 500 ml tekutého sterilného LB média. Takto získaná kultúra bola spracovaná a bunky boli rozsuspendované v 15 ml pufru A. Ďalej boli bunky dezintegrované (2,5 cyklu sonikácie) a centrifugované (45 min, 14000 rpm, 4 °C). So získaným lyzátom bola prevedená purifikácia použitím nanášacieho A pufru (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 100 μM CaCl₂, pH 8,0) a elučného pufru B (500 mM imidazol, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 100 μM CaCl₂, pH 8,0). Nanášanie vzorky (12 ml) na kolónu Ni-NTA bolo prevedené prietokom 0,3 ml.min⁻¹. Po nanesení vzorky na Ni-NTA kolónu prebiehali všetky ostatné kroky purifikácie pri prietoku 1 ml.min⁻¹.

Postupne zvyšujúca sa koncentrácia použitého imidazolu, spôsobovala na zázname (Graf č. 4) odpoveď v podobe píkov, ktoré mohli, ale nemuseli znamenať prítomnosť eluovaných proteínov, pretože aj samotný imidazol spôsobuje zmenu absorbancie. Keďže veľkosť píku nemusí znázorňovať prítomnosť proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom, na zistenie jeho zastúpenie v eluovaných frakciách a jeho čistoty, bola vykonaná elektroforéza eluovaných vzoriek.

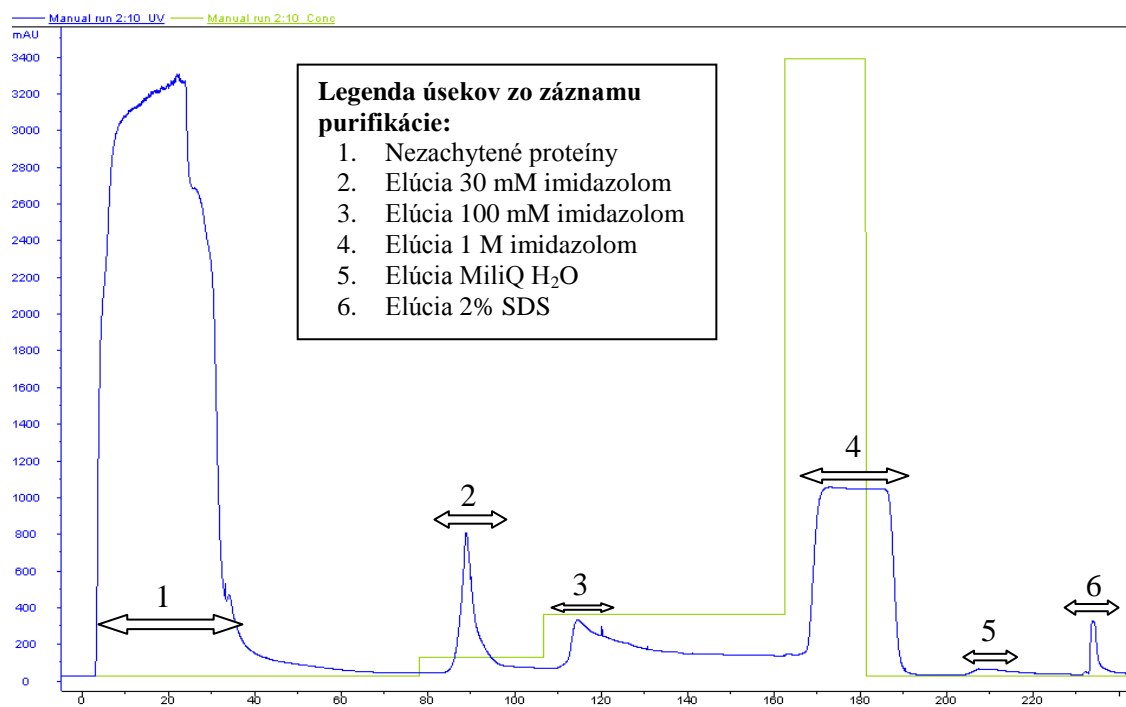
Obrázok č. 25 zobrazuje, že frakcie eluované pomocou imidazolu neobsahujú cieľový proteín PSL2 s NusA fúznym proteínom. V jamke č.4, ktorá reprezentuje podiel proteínu v nerozpustnej forme sa nachádza veľký prúžok proteínu, ktorý veľkosťou zodpovedá proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom (cca 86 kDa). Na základe podielu prítomnosti tohto proteínu v CS a CI frakciách (pozri v predchádzajúcej kapitole 2.5.2: Obrázok č. 19) bol vyvodený záver, že proteín je produkovaný výrazne, až výhradne, v rozpustnej forme. Avšak po porovnaní tohto záveru z testu rozpustnosti proteínu PSL2 s výsledkom vzoriek po purifikácii bolo usúdené, že pomocou purifikácie nebol získaný proteín PSL2 s NusA fúznym proteínom kvôli nedostatočnej dezintegrácii buniek.



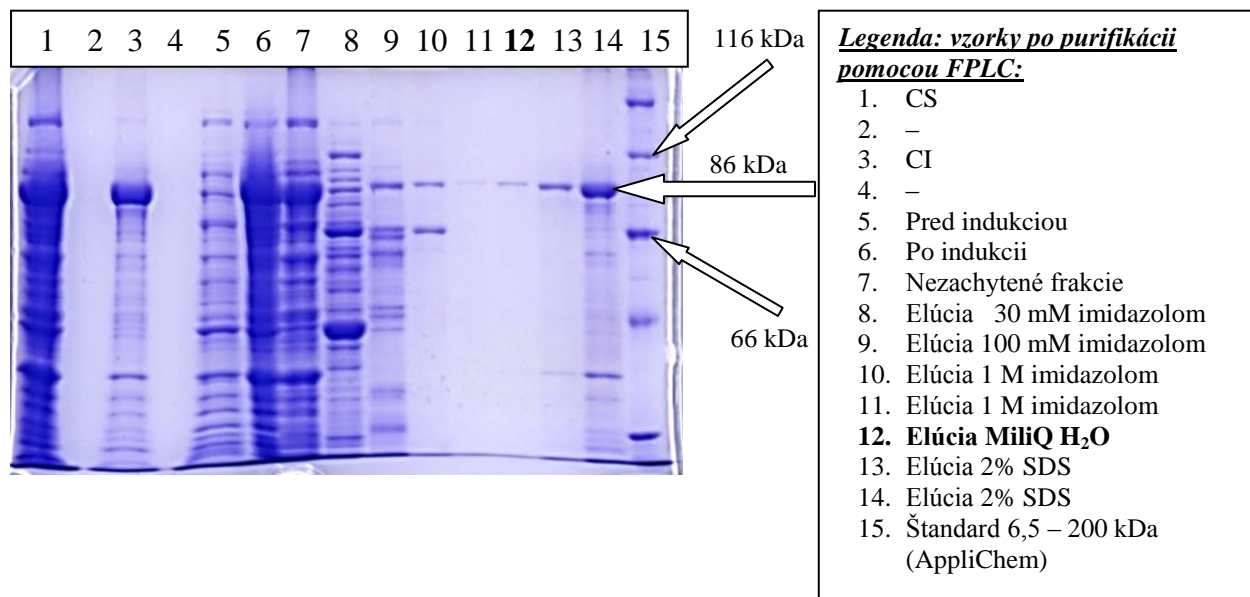
Obrázok č. 25: Gél po SDS-PAGE so vzorkami po 1. purifikácii proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami na Ni-NTA kolóne (10% polyakrylamidový gél)

Preto pri nasledujúcej purifikácii boli bunky sonikované vo väčšom objeme pufru A (25 ml). Sonikácia prebehla klasicky v dvoch cykloch. Nanášanie vzorky (23 ml) na kolónu Ni-NTA bolo vykonané za prietoku $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Purifikácia po nanesení vzorky prebiehala pri prietoku $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a pred 100% gradientom imidazolu bol zastavený prietok na 30 min. Na purifikáciu boli použité tie isté pufré ako pri predchádzajúcej purifikácii až na elučný pufer,

v ktorom bola zvýšená koncentrácia imidazolu na 1 M. Graf č. 5 zobrazuje píky, napovedajúce, z ktorých frakcií bolo treba odobrať vzorky pre vykonanie SDS-PAGE.



Graf č. 5: Záznam z 2. purifikácie proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami produkovaného bunkami *E. coli* BL21(DE3) vykonanej pomocou afinitnej chromatografie na Ni-NTA kolóne, (5 ml (3 x 2 cm))

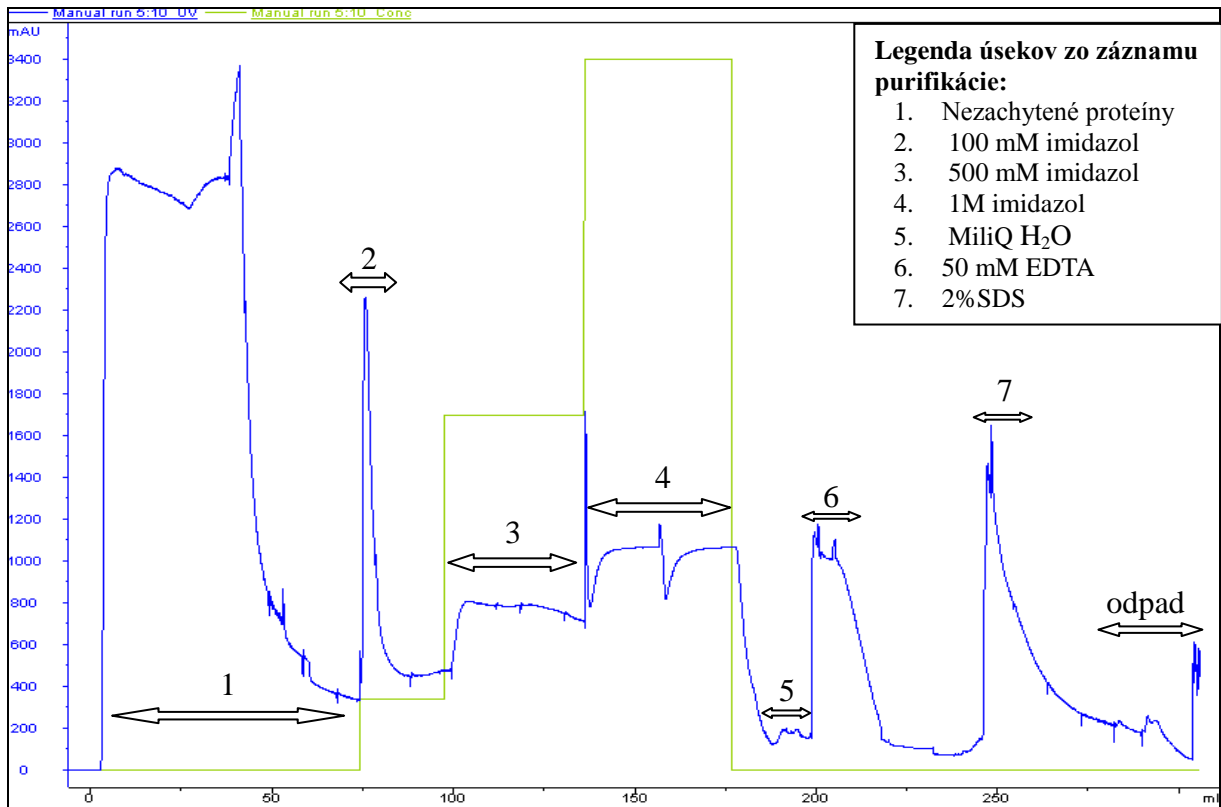


Obrázok č. 26: Gél po SDS:PAGE so vzorkami po 2. purifikácii proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami na Ni-NTA kolóne (10% polyakrylamidový gél)

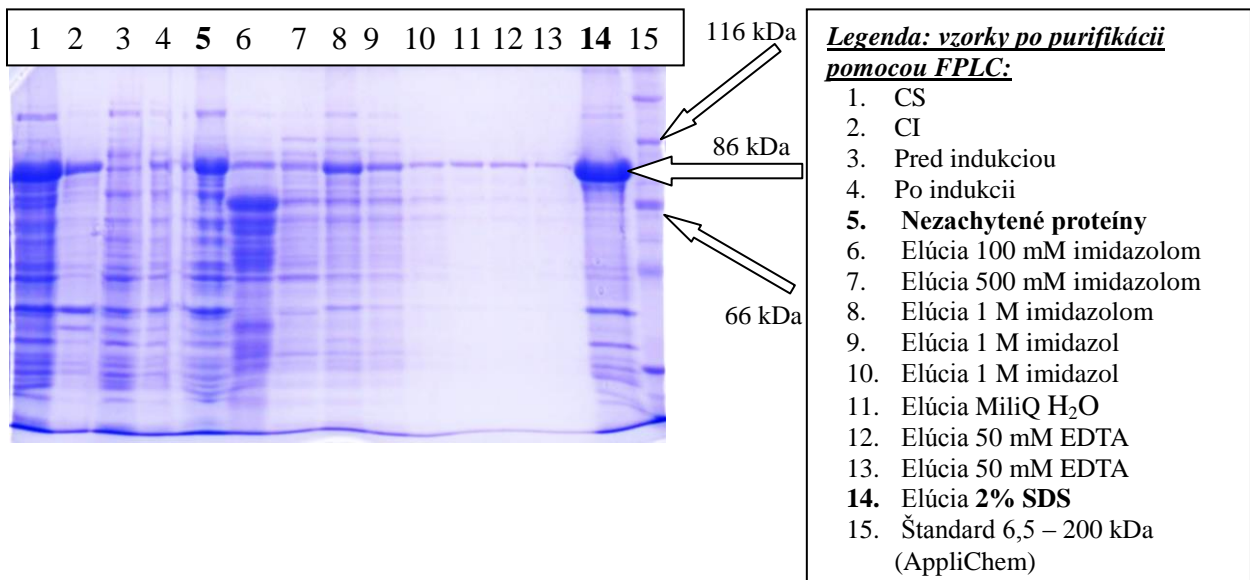
Obrázok č. 26 znázorňuje, že väčšina rekombinantného proteínu PSL2 o predpokladanej veľkosti cca 86 kDa je v nezachytených frakciách a vo frakciách po elúcii 2% SDS. Naopak,

tento proteín eluovaný pomocou 1 M imidazolu je vo veľmi nízkej koncentrácii a nevhodnej čistote. Preto bola pomocou koncentračných skúmaviek (Vivaspin® 20) zakoncentrovaná frakcia po elúcii MiliQ voľu (z 11 ml na 0,9 ml o $c = 0,32 \text{ mg.ml}^{-1}$).

Vzorka zakoncentrovaného proteínu PSL2 bola odovzdaná na vykonanie funkčných štúdií pomocou metódy povrchovej plazmónovej rezonancie (SPR) do zdieľaného laboratória inštitúcie Interakcie a kryštalizácie biomolekúl (CEITEC). Tento proteín nepreukazoval žiadnu väzbovú aktivitu k imobilizovaným sacharidom na použitých čipoch. Na podporu lepšieho zbalovania proteínu PSL2 a pre obmedzenie zachytávania nešpecifických proteínov na kolónu bola zvýšená koncentrácia solí v pufroch A aj B (150 mM \rightarrow 300 mM). Bunky BL21(DE3) transformované konštruktom N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_psl2 boli kultivované v 500 ml sterilného LB média. Pri dosiahnutí optimálnej optickej denzity ($OD_{600} \sim 0,5$) bola bunková kultúra indukovaná zníženou koncentráciou IPTG (0,25 mM), čím sa znížila rýchlosť tvorby proteínu PSL2 resp. jeho nadprodukcia. Tým bol získaný čas na lepšie a pomalšie zbalenie proteínu PSL2. Kultúra bola pred sonikáciou rozsuspendovaná v 40 ml pufru A. Sonikácia takto pripravených buniek prebiehala v 2 opakovaniach. Nanášanie lyzátu (40 ml) na kolónu Ni-NTA bolo vykonané za prietoku $0,3 \text{ ml.min}^{-1}$. Ostatné kroky purifikácie prebiehali pri prietoku 1 ml.min^{-1} . Pred 100% gradientom imidazolu bol pozastavený prietok po dobu 45 min. Na purifikáciu boli použité pufre: nanášací A pufer (20 mM Tris, 300 mM NaCl, $100 \mu\text{M CaCl}_2$, pH 8,0) a elučný B pufer (1M imidazol, 20 mM Tris, 300 mM NaCl, $100 \mu\text{M CaCl}_2$, pH 8,0), pričom bola na elúciu použitá aj 50 mM EDTA (v roztoku 20 mM Tris, 300 mM NaCl) (Graf č.6).



Graf č. 6: Záznam z 3. purifikácie proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami produkovaného bunkami *E. coli* BL21(DE3) vykonanej pomocou afinitnej chromatografie na Ni-NTA kolóne (5 ml (3 x 2 cm))



Obrázok č. 27: Gél po SDS-PAGE so vzorkami po 3. purifikácii proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami na Ni-NTA kolóne (10% polyakrylamidový gél)

Frakcie po elúcii pomocou EDTA boli dialyzované ((3 x 10 l) 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 8,0), pričom do čreva bol pridaný roztok 30 mM CaCl₂ pre navrátenie iónov Ca²⁺ do pufru, ktoré boli vyviazané EDTA. Získaný proteín PSL2 bol zakoncentrovaný

na 0,11 ml o $c = 1,02 \text{ mg.ml}^{-1}$. Tento proteín bol podrobený CD spektroskopii a hemaglutinácii. Proteín PSL2 po elúcii MiliQ vodou bol tiež zakoncentrovaný za zisku 0,8 ml o $c = 0,23 \text{ mg.ml}^{-1}$ (koncentrácia proteínu bola meraná spektrofotometricky pri 280 nm). Časť proteínu eluovaného MiliQ vodou bol tiež podrobený hemaglutinácii, CD spektroskopii a SPR. Zbytok proteínu eluovaného MiliQ vodou bol lyofilizovaný (Free Zone 6 (Labconco)) a zamrazený na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Pomocou MS analýzy bola potvrdená prítomnosť proteínu PSL2 s NusA proteínom v oboch vzorkách (príloha č. 8).

Väčšina PSL2 proteínu sa po purifikácii stále nachádza v nezachytenej frakcii a vo frakcii po elúcii 2% SDS (Obrázok č. 27). Táto skutočnosť sa dá vysvetliť rôznymi spôsobmi.

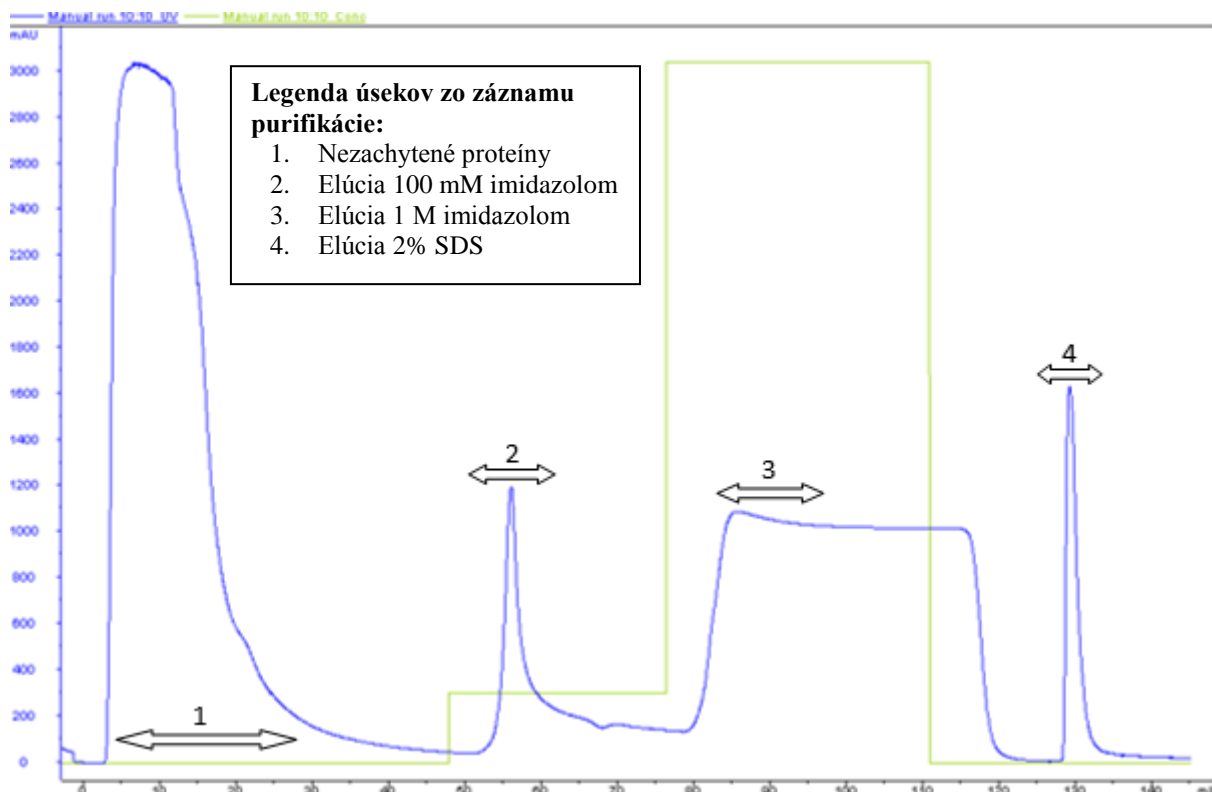
Prítomnosť proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom v nezachytených frakciách môže byť vysvetliteľná presiahnutou kapacitou kolóny, keďže proteín PSL2 s NusA fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami je veľký 84 kDa a pri naviazaní na kolónu sa uplatňujú stérické efekty. Rovnako v bunkovom lyzáte nanášanom na Ni-NTA kolónu môže byť rádovo zhodný pomer molárnych koncentrácií proteínu PSL2 a Ca^{+2} iónov, ktoré boli do pufru pridávané v podobe CaCl_2 ($c = 100 \text{ } \mu\text{M}$). To môže zapríčiniť, že Ca^{+2} ióny vytlačujú proteín PSL2 z väzbového miesta na kolóne. Tiež platí, že čím je nižšie pH pufru, tým je nižšia interakcia oligohistidínovej kotvy s matricou.

Pre overenie týchto hypotéz bol vykonaný porovnávací test (pozri Graf č. 7, Obrázok č. 28 a Graf č. 8, Obrázok č. 29), pri ktorom boli bunky BL21(DE3) obsahujúce konštrukt

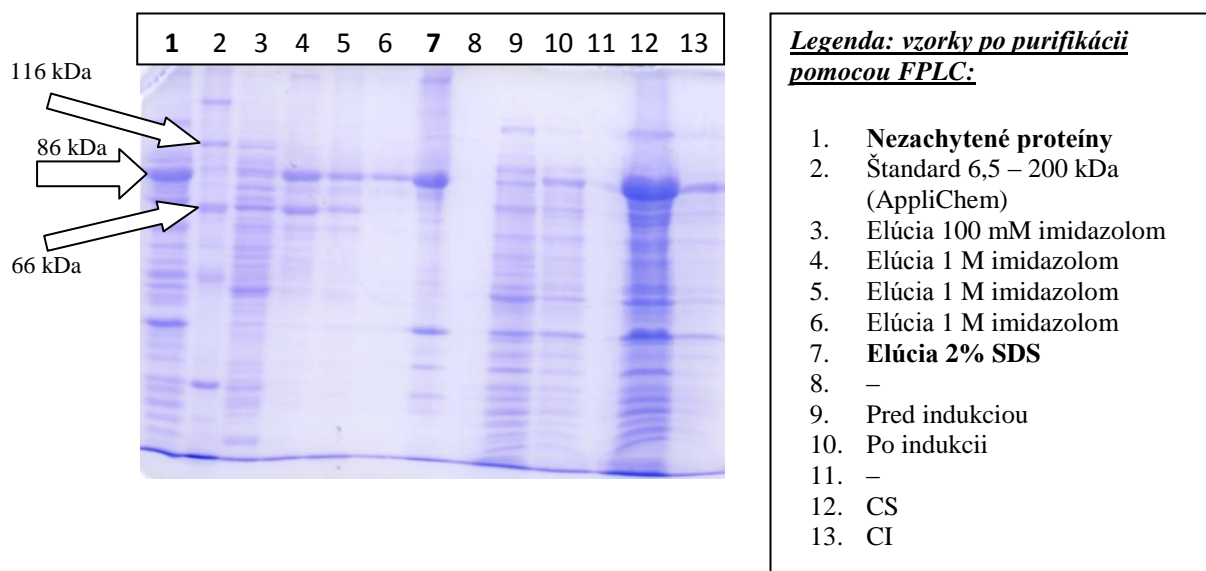
N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_psl2 sonikované v dvoch rozdielnych pufoch ($\neq \text{pH}$, s a bez prídavku Ca^{2+} iónov).

1. test - pufer A1: 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 100 μM CaCl_2 , pH 8,0
pufer B1: 1 M imidazol, 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 100 μM CaCl_2 , pH 8,0
2. test - pufer A2: 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 6,0
pufer B2: 1 M imidazol, 20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 6,0

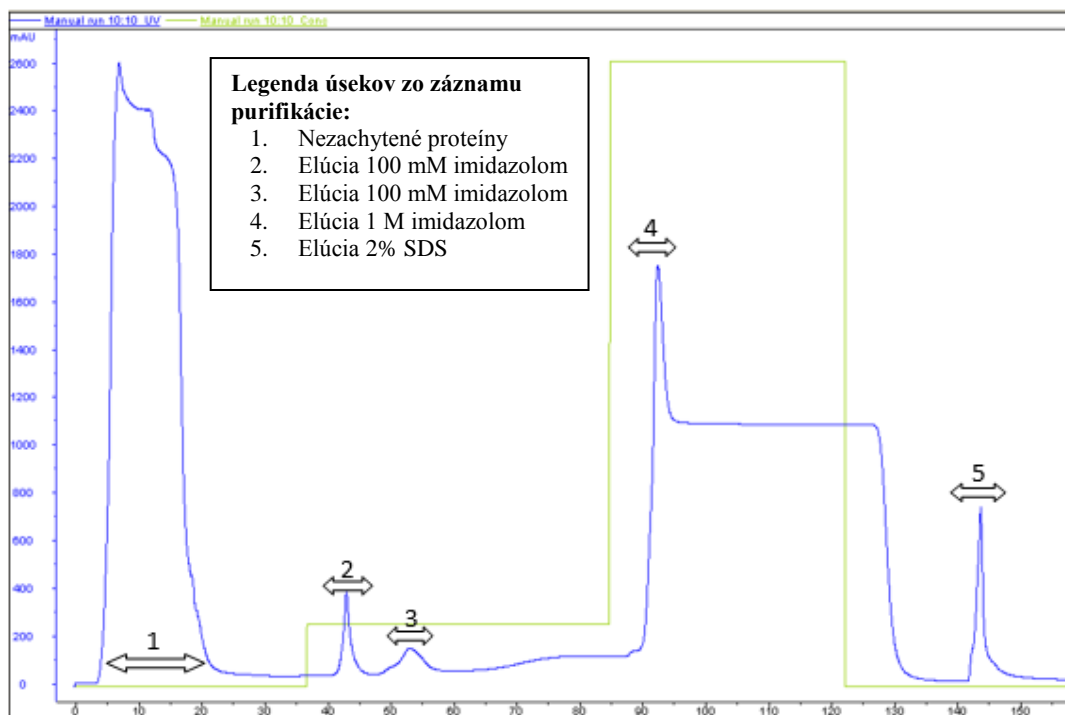
V oboch prípadoch bol pelet z 500 ml kultúry dezintegrovaný v dvoch opakovaniach, rozsuspendovaný v 40 ml pufru A (1 alebo 2). Na kolónu bol nanášaný bunkový lyzáat o zníženom objeme 10 ml (rýchlosťou prietoku $0,3 \text{ ml.min}^{-1}$, ostatné kroky purifikácie prebiehali za prietoku $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$) kvôli zisteniu vplyvu stérických efektov na väzbu proteínu PSL2 s dvomi oligohistidínovými kotvami na Ni-NTA kolónu.



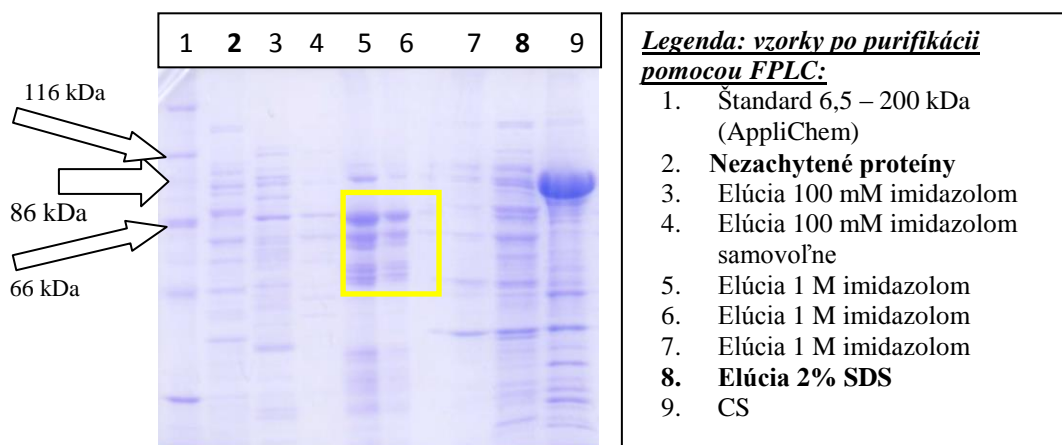
Graf č. 7: Záznam z 4. purifikácie proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami produkovaného bunkami *E. coli* BL21(DE3) vykonanej pomocou afinitnej chromatografie na Ni-NTA kolóne (5 ml (3 x 2 cm)), bunkový lyzát nanášaný v objeme 10 ml, pH 8,0



Obrázok č. 28: Gél po SDS-PAGE so vzorkami po 4. purifikácii proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami na Ni-NTA kolóne (10% polyakrylamidový gél)



Graf č. 8 Záznam z 5. purifikácie proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami produkovaného bunkami *E. coli* BL21(DE3) vykonanej pomocou afinitnej chromatografie na Ni-NTA kolóne (5 ml (3 x 2 cm)), bunkový lyzátn nanášaný v objeme 10 ml, pH 6,0



Obrázok č. 29: Gél po SDS-PAGE so vzorkami po 5. purifikácii proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami na Ni-NTA kolóne (10% polyakrylamidový gél)

Pri porovnaní grafov č. 7 a 8 napriek podobnému priebehu purifikácie, sa pri pH 6,0 púšťa relatívne málo nečistôt. Už v tomto kroku sa graf č. 8 výrazne líši, pretože po elúcii nečistôt 100 mM imidazolom (pík 2) sa samovoľne z kolóny pustili ďalšie proteíny, ktoré boli zaznamenané v podobe malého píku (pík 3). Naopak po elúcii pomocou 1M imidazolu sa vytvoril vysoký pík, ako odozva na pustenie sa ďalších proteínov z kolóny. Z Obrázka č.29 vyplýva, že proteíny, ktoré sa púšťali 1M imidazolom sú fragmenty proteínu PSL2 s NusA fúznym

proteínom a dvomi oligohistodínovými kotvami. Tento fakt bol potvrdený aj MS analýzy vybraných prúžkov zo žltého rámčeka (pozri príloha č. 9).

Po porovnaní veľkostí prúžkov (Obrázok č. 29) proteínov eluovaných pomocou 1M imidazolu (jamka č. 5 a 6) a po samovoľnej elúcii 100mM imidazolom (jamka č. 4) bolo usúdené, že fragmenty cieľového proteínu sa začali z kolóny púúšťať už pri nižšej koncentrácii imidazolu. Pomocou purifikácie pri pH 6,0 sa síce podarilo odstrániť proteín záujmu z nezachytených frackií a z frackie po elúcii pomocou 2% SDS, ale zároveň nízke pH spôsobilo jeho štiepenie ešte pred nanášaním na kolónu. Ak by sa aj naďalej uvažovalo o znižovaní pH pufru, muselo by sa preskúmať, aké pH by bolo pre proteín PSL2 optimálne.

Vďaka rozštiepeniu proteínu pri nízkom pH sa nepodarilo overiť teóriu o rádovo zhodnom pomere molárnych koncentrácií proteínu PSL2 a Ca^{+2} iónov.

V týchto dvoch purifikáciách bol v porovnaní s 3. purifikáciou na kolónu nanesený $\frac{1}{4}$ objem lyzátu ale na Obrázku č. 28 je znovu zobrazený veľký prúžok proteínu PSL2 v nezachytených frackiách. Tento výsledok popiera teóriu o tom, že v predchádzajúcich purifikáciách bola prekročená kapacita Ni-NTA kolóny.

Ďalšími možnosťami nenaviazania proteínu PSL2 na kolónu môže byť nesprávne zbalenie proteínu PSL2 pri dezintegrácii buniek alebo veľmi krátka doba počas ktorej je proteín PSL2 stabilný po sonikácii buniek. To by sa dalo riešiť prídavkami aditív alebo stabilizátorov do pufru.

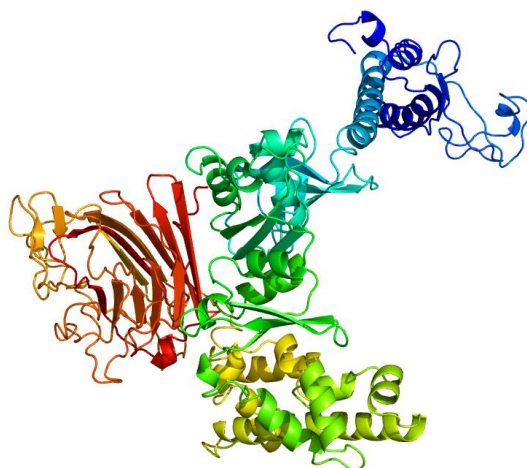
Naopak prítomnosť proteínu PSL2 vo frackii eluovanej 2% SDS môže byť spôsobená vysokou afinitou dvoch oligohistidínových kotiev ku Ni-NTA kolóne. Sila väzby medzi proteínom a iónom kovu je ovplyvnená viacerými faktormi. Patria sem dĺžka, pozícia a doba počas ktorej bola oligohistidínová kotva vystavená možnosti väzby na kolónu, typ použitého iónu a matrice a hodnoty pH pufru. Pre overenie tejto teórie by sa dali použiť kolóny s menšou afinitou ku histidínom a teda ku oligohistidínovej kotve. Táto afinita sa dá regulovať používaním rôznych chelatačných skupín naviazaných na matricu. Najpoužívanejšie sú IDA a NTA. Sila akou tieto matrice dokážu viazať ión (Ni^{2+}) je daná počtom väzieb. NTA je 4 mocná a IDA je 3 mocná. Obe viaš viažu Ni^{2+} pomocou 2 väzieb. Z tohto dôvodu má IDA nižšiu afinitu ku Ni^{2+} iónom, ktoré sa počas purifikácie môžu vyplavovať skôr.

Pre purifikáciu rekombinantných proteínov sa používajú Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ióny naviazané na spomínané chelatačné skupiny. Od Cu^{2+} vzrastá špecifickosť, ale klesá afinita ku proteínom. Mohol by sa použiť napríklad Co^{2+} ión, ktorý má nízku afinitu, a zároveň vytvára vysoko špecifickú väzbu, takže znižuje prítomnosť nežiadúcich proteínov v eluáte.

Ak by rekombinantný proteín PSL2 naozaj vykazoval silnú afinitu ku Ni^{2+} iónom na kolóne vďaka dvom oligohistidínovým kotvám, dala by sa využiť prítomnosť miesta pre TEV proteázu v rekombinantnom proteíne PSL2 (N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_PSL2), ktorá by odštiepila proteín PSL2 z kolóny v mieste medzi oligohistidínovými kotvami a samotným proteínom PSL2. Táto reakcia je avšak zdĺhavá a finančne náročná.

Proteín PSL2 môže byť už pri nanášaní na kolónu čiastočne vyzrážaný alebo zle zbalený (ako bolo vyššie spomenuté), a preto sa môže držať na kolóne inak ako cez oligohistidínovú kotvu. Takýto proteín sa po elúcii 2% SDS už len rozvoľní a pustí z kolóny. Ak by táto úvaha bola správna, nebolo by možné eluovať proteín PSL2 pomocou EDTA. Túto hypotézu potvrdzuje polyakrylamidový gél so vzorkami z 3. purifikácie (Obrázok č. 27), kedy sa proteín PSL2 eluoval pomocou EDTA len vo veľmi malom množstve. Tento výsledok značí, že proteín na kolóne pravdepodobne nedrží silno cez oligohistidínové kotvy, ale práve naopak, že kotvy pravdepodobne nie sú využívané na väzbu na kolónu a proteín sa na kolónu viaže inak ako cez oligohistidínové kotvy na svojich koncoch.

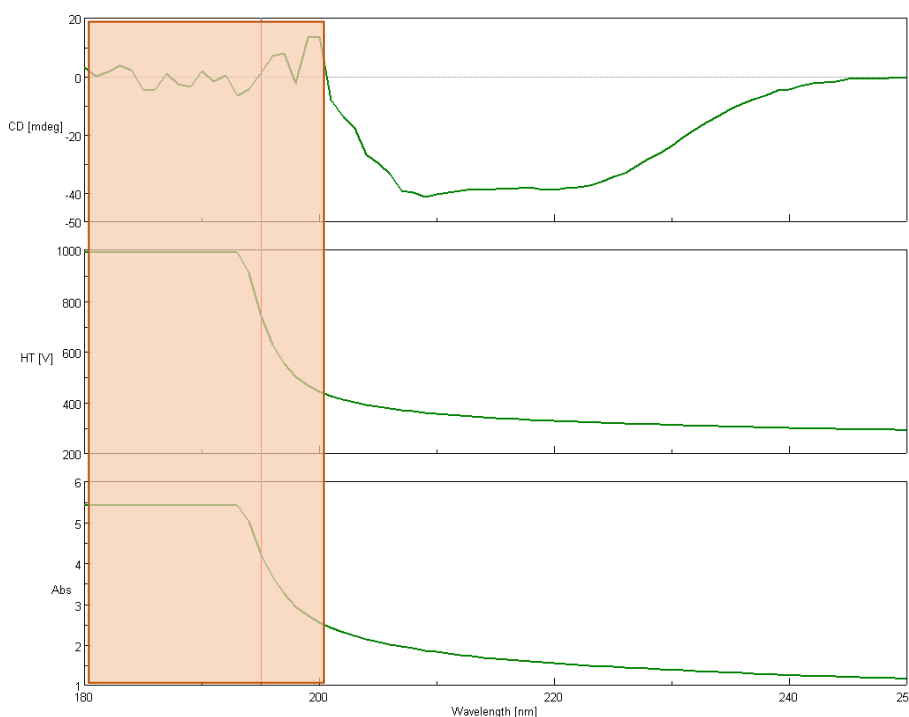
Aj napriek tomu, že sa sekvenáciou potvrdila správna príprava DNA konštruktu s vloženým génom *psl2* s oligohistidínovými kotvami na jeho N-konci, nemusí sa takýto rekombinantný proteín na kolónu nutne cez tieto kotvy viazať. To môže byť spôsobené zbalením proteínového N-/C-konca dovnútra proteínu (44). Avšak predikcia 3D štruktúry na základe aminokyselinového sekvenčného preloženia proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami pomocou bioinformatického nástroja Phyre2 (Obrázok č. 30) zobrazuje, že by sa proteín mal zbaľovať tak, aby jeho N- (červená farba) aj C- (modrá farba) koniec boli voľne prístupné. Tento program našiel 50% zhodu medzi proteínmi PSL2 o ConA (45).



Obrázok č. 30: predikovaná 3D štruktúra rekombinantného proteínu N-6xHis_NusA_6xHis_PSL2 na základe sekvenčnej podobnosti pomocou bioinformatického nástroja Phyre2 (45); dúhové zobrazenie od červenej (N-koniec) po modrú farbu (C-koniec)

2.10. CD spektroskopia

Pomocou CD spektroskopie bolo študované zbalenie proteínu PSL2 získaného z 3. purifikácie po elúcii pomocou EDTA ako aj po elúcii pomocou MiliQ vody. Graf č. 9 zobrazuje krivky z merania proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom ($c = 0,44 \text{ mg.ml}^{-1}$) po elúcii pomocou 50 mM EDTA. CD spektroskopickým meraniam boli podrobené vzorky po filtrácii (veľkosť pórov $0,2 \mu\text{m}$) ako aj vzorky nefiltrované. Proteín po elúcii MiliQ vodou poskytol podobné výsledky. Výsledky meraní potvrdzujú, že sa proteín PSL2 s NusA fúznym proteínom zbaľuje správne. Podľa tvaru kriviek je sekundárna štruktúra tohto proteínu z časti tvorená α -helixom a z časti β -skladaným listom. Program Phyre2 predikoval zloženie sekunárnej štruktúry proteínu PSL2 s NusA proteínom s 30 % obsahom β -skladaného listu a 34% obsahom α -helixu (Obrázok č. 30).






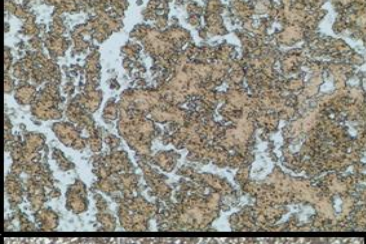
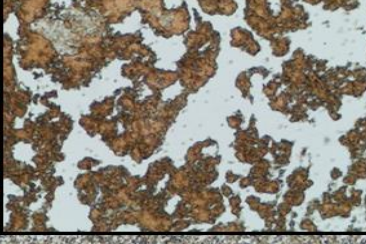
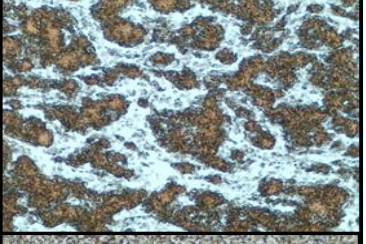

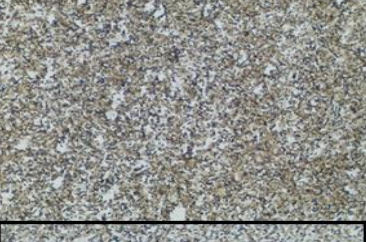



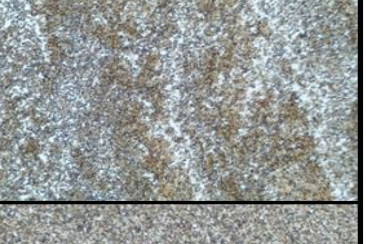



Graf č. 9: Výsledné krivky z CD spektroskopie - proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom a dvomi oligohistidínovými kotvami po elúcii pomocou 100 mM EDTA z 3. purifikácie, nefiltrovaná vzorka, $c = 0,44 \text{ mg.ml}^{-1}$, po odčítaní signálu pufu

2.11. Testy aktivity

Hemaglutinácia

Proteín PSL2 s NusA fúznym proteínom ($c = 1,02 \text{ mg.ml}^{-1}$) získaný z 3. purifikácie po elúcii pomocou 50 mM EDTA bol použitý na hemaglutinačné testy v koncentrovanej ako aj

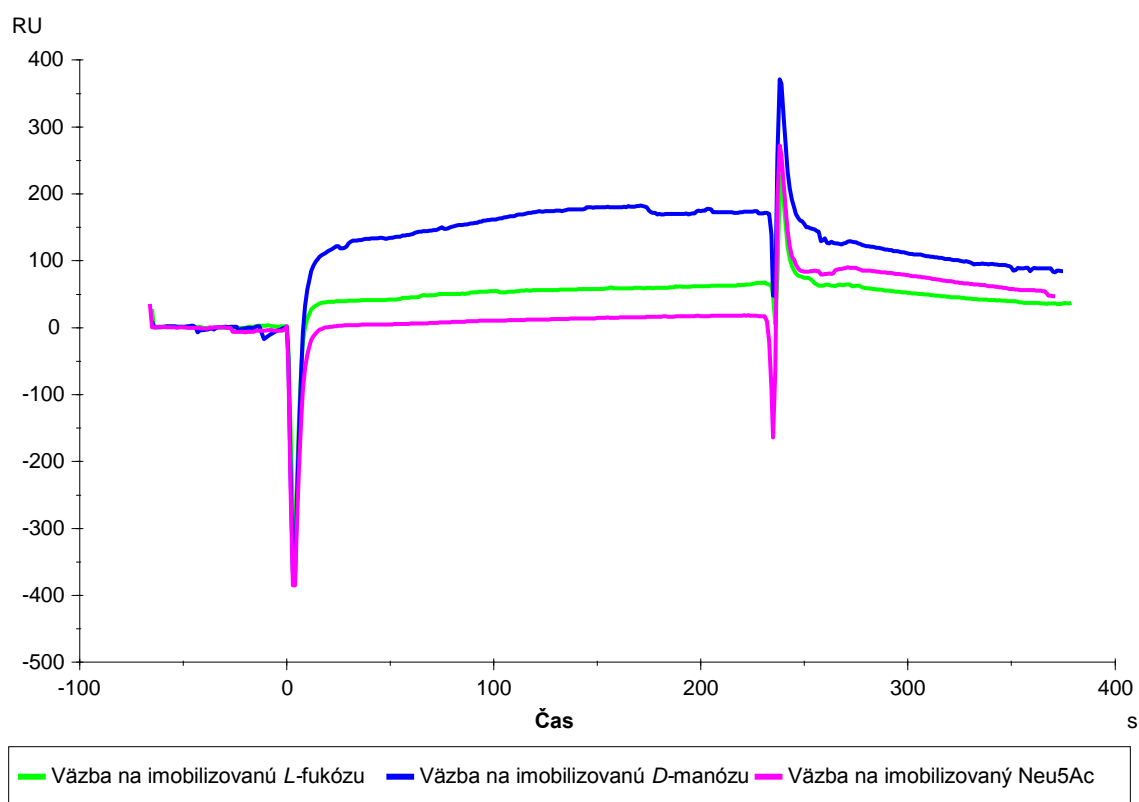
v zriedenej forme (riedenie 1:1 s pufrom A). Tak isto bol podrobený hemaglutinácii proteín PSL2 získaný z tej istej purifikácie elúciou pomocou MiliQ vody o c = 0,32 mg.ml⁻¹. Na experiment boli použité krvné skupiny A+, B+, 0-.

0-	A+	B+	
			N.K.
			P.K.
			0,5 mg.ml ⁻¹ PSL2 EDTA
			1 mg.ml ⁻¹ PSL2 EDTA
			0,23 mg.ml ⁻¹ PSL2 MiliQ

Obrázok č. 31: Výsledky hemaglutinácie pri použití krvných skupín 0-, A+, B+ s proteínom PSL2 s NusA fúznym proteínom a dvomi oligohistidinovými kotvami získaným elúciou pomocou EDTA; P.K. = pozitívna kontrola; N.K. = negatívna kontrola

Pri žiadnej podmienke neprebehla hemaglutinácia (Obrázok č. 31), čo môže byť spôsobené špecifickosťou voči iným cukrom ako tým, ktoré sú exponované na povrchu erytrocytov jednotlivých krvných skupín. Ako je spomínané v kapitole (Lektíny v hrachu siatom), PSL2 proteín by mohol byť špecifický voči *D*-manóze a *D*-glukóze.

Teória o možnej špecifickosti proteínu PSL2 voči *D*-manóze bola čiastočne testovaná aj v spolupráci so zdieľaným laboratóriom Interakcie a kryštalizácie biomolekúl (CEITEC).



Obrázok č. 32: SPR krivky proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom ($c = 0,32 \text{ mg.ml}^{-1}$), ktorý bol eluovaný MiliQ vodou, čip HC200M (Xantec)

Boli vykonané testy SPR na čipe HC200M (Xantec) (Obrázok č. 32). Najvyššia odozva väzby proteínu PSL2 s NusA fúznym proteínom, ktorý bol eluovaný MiliQ vodou ($c = 0,32 \text{ mg.ml}^{-1}$) je na kanáli s *D*-manózou. Pre potvrdenie interakcie by boli potrebné ešte ďalšie experimenty, na ktoré už nezostal čas.

V. Záver

Jedným z množstva lektínov, ktorým sa zaoberá výskumná skupina Glykobiochémie je hypotetický lektín PSL2. Na jeho prípravu a následné štruktúrne - funkčné štúdie bola zameraná táto diplomová práca.

Bolo nadviazané na predchádzajúce výsledky výskumu proteínu PSL2. Gén *psl2* bol v minulosti na našom pracovisku vložený do rôznych druhov DNA konštruktov určených na expresiu génu v odlišných expresných organizmoch. Proteín PSL2 v rozpustnej forme sa, avšak, pomocou takto modifikovaných buniek expresných organizmov *E. coli*, *P. pastoris* a *S. cerevisiae* nepodarilo získať v dostatočnom množstve.

V rámci diplomovej práce boli vykonané testy expresie génu *psl2* vloženého do konštruktov pRSET A_Thio(HP)TEV_*psl2* (vopred pripravený na našom pracovisku) v týchto 4 kmeňoch buniek *E. coli*: Arctic Express(DE3)RIL (Stratagene), BL21(DE3) (Stratagene), Tuner(DE3) (Novagen), Rosetta2(DE3)pLysSRare (Novagen). Napriek rozsiahlym testom produkcie proteínu PSL2 nebola úspešne nájdená podmienka pre tvorbu dostatočného množstva proteínu PSL2 v rozpustnej forme. Z toho dôvodu sa pristúpilo k dizajnu a príprave ďalších 4 konštruktov.

Bol vytvorený návrh na vloženie génu *psl2* v dvoch podobách do konštruktov pET-44b. Výhodou týchto konštruktov bolo, že obsahujú gén pre vysoko rozpustný NusA fúzny proteín. Prvý konštrukt bol navrhnutý s oligohistidínovou kotvou na C-konci, druhý konštrukt obsahoval na N-konci dve oligohistidínové kotvy. Oba konštrukty boli určené na produkciu proteínu PSL2 v bakteriálnych bunkách *E. coli*. Podarilo sa pripraviť konštrukt pET-44b_N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_*psl2*, ktorým boli transformované tieto kmene buniek *E. coli*: Arctic Express(DE3)RIL a Rosetta2(DE3)pLysSRare. Bola optimalizovaná produkcia proteínu PSL2 v rozpustnej forme, následne bol proteín purifikovaný a štruktúrne - funkčne testovaný.

Počas diplomovej práce boli pripravené ďalšie 2 konštrukty určené pre produkciu PSL2 proteínu v expresnom organizme *L.tarentolae*. Jeden z pripravených vektorov bol následne úspešne transfekovaný do buniek týchto prvokov.

VI. Summary

One of the lectins of interest of the research group Glycobiochemistry is the hypothetical lectin PSL2. This Master's thesis is focused on the preparation and subsequent structural - functional study of PSL2 protein.

We continued on previous research results of PSL2 protein production. *psl2* gene was formerly embedded into different types of DNA constructs designed for gene expression in different organisms in our laboratory. Using such modified expression organisms *E. coli*, *P. pastoris* or *S. cerevisiae* PSL2 protein was not obtained in his soluble form in sufficient quantity.

Testing the expression of the *psl2* gene which was inserted into the construct pRSET A_Thio (HP) TEV_ *psl2* (previously prepared in our workplace) in these 4 strains of *E. coli* Arctic Express (DE3) RIL (Stratagene), BL21 (DE3) (Stratagene), Tuner (DE3) (Novagen), Rosetta2 (DE3) pLysSRare (Novagen) were performed in this Master's thesis. Despite of the extensive testing of the PSL2 protein production a condition for the production of adequate quantity of PSL2 protein in his soluble form has not been successfully found. Because of this fact, it was decided to design and prepare another 4 constructs.

A design to insert two forms of gene *psl2* into construct pET-44b was created. The advantage of these constructs was a content of the gene for the highly soluble NusA fusion protein. The first construct was designed with oligohistidine tag at the C-terminus, the second construct contains two N-terminal oligohistidine tags. These two constructs were designed for the PSL2 protein production in bacterial cells of *E. coli*. The preparation of the construct pET-44b_N-6xHis_NusA_6xHis_TEV_ *psl2* was managed by which the transformation of these strains of *E. coli* cells: Arctic Express (DE3) RIL and Rosetta2 (DE3) pLysSRare was performed. PSL2 protein production in soluble form was optimized, then the protein was purified and the structural and functional tests were done.

Another 2 constructs for the production of the PSL2 protein in expression organisms *L.tarentolae* were prepared and designed during the Master's thesis. Subsequently, one of the prepared vectors was successfully transfected into cells of these protozoa.

VII. Zoznam použitej literatúry

1. Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 01. november 2004;14(11):53R – 62R.
2. Sumner JB, Howell SF. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J Bacteriol*. 01. august 1936;32(2):227–37.
3. Sharon N, Lis H. *Lectins*. Springer Science & Business Media; 2007. 464 s.
4. Lam SK, Ng TB. Lectins: production and practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 03. október 2010;89(1):45–55.
5. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Stryer L. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W.H. Freeman; 2002. 1 s.
6. Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem*. 02. február 2007;282(5):2753–64.
7. Hu S, Wong DT. Lectin microarray. *Proteomics Clin Appl*. február 2009;3(2):148–54.
8. Jiang Q-L, Zhang S, Tian M, Zhang S-Y, Xie T, Chen D-Y, et al. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. *Cell Prolif*. 01. február 2015;48(1):17–28.
9. Ng TB, Ngai PHK, Xia L. An agglutinin with mitogenic and antiproliferative activities from the mushroom *Flammulina velutipes*. *Mycologia*. 01. marec 2006;98(2):167–71.
10. Vasconcelos IM, Oliveira JTA. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*. 15. september 2004;44(4):385–403.
11. Einspahr H, Parks EH, Suguna K, Subramanian E, Suddath FL. The crystal structure of pea lectin at 3.0-Å resolution. *J Biol Chem*. 15. december 1986;261(35):16518–27.
12. Varki A, Etzler ME, Cummings RD, Esko JD. Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. V: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., editori. *Essentials of Glycobiology*. 2nd vyd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009
13. Van Damme E. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Crit Rev Plant Sci*. november 1998;17(6):575–692.
14. Harper SM, Crenshaw RW, Mullins MA, Privalle LS. Lectin Binding to Insect Brush Border Membranes. *J Econ Entomol*. 01. október 1995;88(5):1197–202.
15. Velkov VV, Medvinsky AB, Sokolov MS, Marchenko AI. Will transgenic plants adversely affect the environment? *J Biosci*. september 2005;30(4):515–48.
16. Edwards GA, Hopher A, Clerk SP, Boulter D. Pea lectin is correctly processed, stable and active in leaves of transgenic potato plants. *Plant Mol Biol*. júl 1991;17(1):89–100.

17. Brady PG, Vannier AM, Banwell JG. Identification of the dietary lectin, wheat germ agglutinin, in human intestinal contents. *Gastroenterology*. august 1978;75(2):236–9.
18. Noah ND, Bender AE, Reaidi GB, Gilbert RJ. Food poisoning from raw red kidney beans. *Br Med J*. 19. júl 1980;281(6234):236–7.
19. Sen D, Mandal DK. Pea lectin unfolding reveals a unique molten globule fragment chain. *Biochimie*. marec 2011;93(3):409–17.
20. Pak JH, Hendrickson T, Dobres MS. Predicted sequence and structure of a vegetative lectin in *Pisum sativum*. *Plant Mol Biol*. marec 1992;18(5):857–63.
21. Khan F, Khan MI. Fungal Lectins: Current Molecular and Biochemical Perspectives. *Int J Biol Chem*. 01. január 2011;5(1):1–20.
22. Varrot A, Basheer SM, Imberty A. Fungal lectins: structure, function and potential applications. *Curr Opin Struct Biol*. október 2013;23(5):678–85.
23. Hamshou M, Smagghe G, Van Damme EJM. Analysis of lectin concentrations in different *Rhizoctonia solani* strains. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 2007;72(3):639–44.
24. Pemberton RT. Agglutinins (lectins) from some british higher fungi. *Mycol Res*. 01. marec 1994;98(3):277–90.
25. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., editori. *Essentials of Glycobiology*. 2nd vyd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009
26. Ofek I, Doyle RJ. Bacterial Lectins as Adhesins. V: *Bacterial Adhesion to Cells and Tissues*. Springer US; 1994 [cit 07. máj 2016]. s. 94–135.
27. Lindhorst TK. CHAPTER 1. Small Molecule Ligands for Bacterial Lectins: Letters of an Antiadhesive Glycopolymer Code. V: Becer CR, Hartmann L, editori. *RSC Polymer Chemistry Series*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2015
28. Knight SD, Bouckaert J. Structure, Function, and Assembly of Type 1 Fimbriae. V: Lindhorst TK, Oscarson S, editori. *Glycoscience and Microbial Adhesion*. Springer Berlin Heidelberg; 2009
29. Ohlsen K, Oelschlaeger TA, Hacker J, Khan AS. Carbohydrate Receptors of Bacterial Adhesins: Implications and Reflections. V: Lindhorst TK, Oscarson S, editori. *Glycoscience and Microbial Adhesion*. Springer Berlin Heidelberg; 2008
30. Bañuls A-L, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. V: J.R. Baker RM and DR, editor. *Advances in Parasitology*. Academic Press; 2007
31. Heyneman D. Immunology of leishmaniasis. *Bull World Health Organ*. 1971;44(4):499–514.
32. Basile G, Peticca M. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol*. 25. september 2009;43(3):273–8.
33. Parodi AJ. N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology*. jún 1993;3(3):193–9.

34. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* september 2004;27(5):305–18.
35. Singleton P. *Bacteria in biology, biotechnology, and medicine* 36. Cooper GM. The Cell. 2nd vyd. Sinauer Associates; 2000.
37. E. coli Expression Strains Information | NEB [Internet]. [cit 07. máj 2016]. Cit z: <https://www.neb.com/products/competent-cells/e-coli-expression-strains/e-coli-expression-strains>
38. Manual GenElute Plazmid Miniprep Kit [Internet]. [cit 04. apríl 2016]. Cit z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/pln70bul.pdf>
39. Raymond KW. *General Organic and Biological Chemistry*. John Wiley & Sons; 2009. 1257 s.
40. ArcticExpress Competent Cells [Internet]. [cit 31. marec 2016]. Cit z: <http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=468>
41. 70956 | RosettaTM(DE3)pLysS Competent Cells - Novagen [Internet]. [cit 31. marec 2016]. Cit z: [http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Rosetta%e2%84%a2\(DE3\)pLysS-Competent-Cells,EMD_BIO-70956](http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Rosetta%e2%84%a2(DE3)pLysS-Competent-Cells,EMD_BIO-70956)
42. Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol.* 19. február 2014
43. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR J.* 01. január 2005;46(3):258–68.
44. Borotová P. Příprava a charakterizace glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy. 2015 [cit 10. máj 2016]. Cit z: https://is.muni.cz/auth/th/409183/prif_b/BakalarskaPraca_PBorotova.pdf
45. Fleková A. Klonování a charakterizace glykosyltransferas z lidského patogenu *Aspergillus fumigatus*. [cit 07. apríl 2016]. Cit z: https://is.muni.cz/auth/th/211761/prif_m/Diplomova_prace_Andrea_Flekova.pdf
46. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* jún 2015;10(6):845–58.

VIII. PRÍLOHY

Príloha č. 1

Návrh primerov pre konštrukt pET-44b N-6xHis NusA 6xHis TEV psl2

- Restriktázy: **SpeI HF** a **XhoI**

Pufer (100% activity):
CutSmart

Templát: pMAT N-6xHis TEV psl2:

His kotva

TEV proteáza

psl2

5' **ATG**AAATTC**CATCACCATCACCATCAC**GAGAACCTGTATTTTCAGTCC TTGTCCTTCAA
 CTTCCTTCAAAGATCACTCCAGGTAACACTGCTATCACATTGCAGGGTAACGCTAAGATTTTGG
 CTAACGGTGTTTTGGCTTTGACTAACTCCACTCAGATCCCACCACTACTACTTTCCCATCCA
 CTGGTAGAGCCTTGTACTCCACTCCAGTTCCATTGTGGGACTCTGCTACTGGTAACGTTGCTT
 CCTTCGTTACAAGTTTCTCCTTCGTCATCTTGAACCCATCCGGTAGAGTTCCAAGTACTGACGGT
 TGGTTTTCTTCATTGCTCCACCAGACACTGAGATCCCAACAACCTCCAATCCCAGTACTTGG
 GTGTTGTTGACTCCAAGACTTCCATCAACAGATTCGTTGGTTTGGAGTTCGACTTGTACGCTA
 ACTCCTTCGACCCTTACATGAGACACATCGGTATCGATATCAACTCCTTGATCTCCACTAAGA
 CTGTTAGATAACAACCTTCGTTTCCGGTTCCTTGACTAAGGTTACTATCATCTACGACTCCCAT
 CCAACACTTTGACTGCTGTTATCACTTACGAGAACGGTCAGATTTCCACTATCTCCCAGAAC
 GTTACTTGAAGGCTGTTTTGCCAAAGGACGTTTCCGTTGGTTTCTCCGCTACTTCCACTATT
 GCTGTTTCCCACAACATCCACTCTTGGTCCTTCACTTCCAACCTTGGAGGCTACTACTGGTAAC
 ATCGTTTCCCAGGTT**TAA** 3'

PRIMERY:

- priamy: č.622

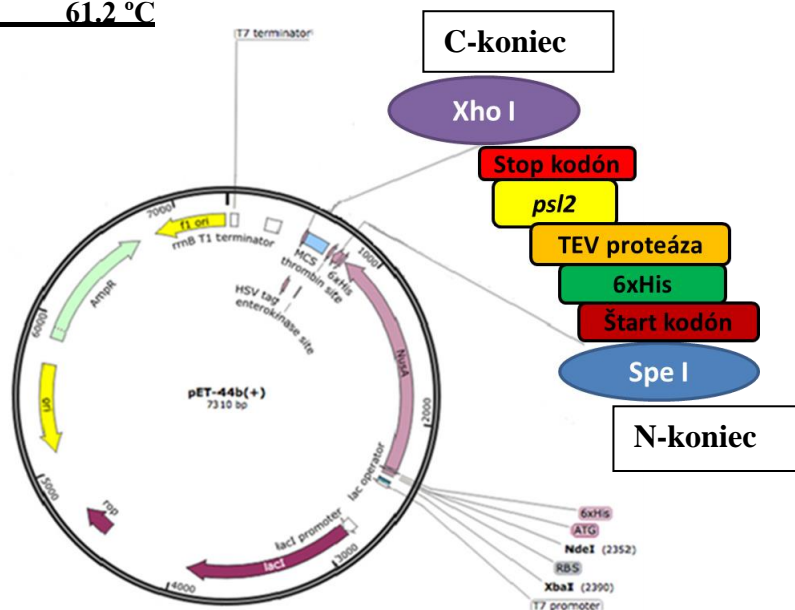
5' GCC**ACTAGT**ATGAAATTCATCACCATCACC 3'

Dĺžka 31
 Obsah GC 45.2 %
 T. topenia 60.4 °C

- reverzný: č.623

5' CG**CTCGAG**TAAACCTGGGAAACGATG 3'

Dĺžka 27
 Obsah GC 51.9 %
 T. topenia 61.2 °C



Návrh primerov pre konštrukt pET-44b C-6xHis TEV *psl2*

- Restriktázy: **SpeI HF** a **HindIII HF**

Pufer (100% activity):
CutSmart

Templát: **pRSET A Thio(HP)TEV *psl2* (bez 6xHis)**:

TEV protease

psl2

5' **GAGAACCTGTATTTTCAGTCC** TTGTCCTTCAACTTCCCAAAGATCACTCCAGGTAACACTG
CTATCACATTGCAGGGTAACGCTAAGATTTTGGCTAACGGTGTTTTGGCTTTGACTAACTCCA
CTCAGATCCCACCAACTACTACTTTCCCATCCACTGGTAGAGCCTTGACTCCACTCCAGTTC
CATTGTGGGACTCTGCTACTGGTAACGTTGCTTCCTTCGTTACAAGTTTCTCCTTCGTCATCTT
GAACCCATCCGGTAGAGTTCCAAGTACGCGTTTGGTTTTCTTCATTGCTCCACCAGACACTGA
GATCCCAAACAACCTCCCAATCCCAGTACTTGGGTGTTGTTGACTCCAAGACTTCCATCAACA
GATTCGTTGGTTTGGAGTTCGACTTGTACGCTAACTCCTTCGACCCTTACATGAGACACATCG
GTATCGATATCAACTCCTTGATCTCCACTAAGACTGTTAGATACAACTTCGTTTCCGGTTCCT
TGACTAAGGTTACTATCATCTACGACTCCCCATCCAACACTTTGACTGCTGTTATCACTTACG
AGAACGGTCAGATTTCCACTATCTCCAGAACGTTGACTTGAAGGCTGTTTTGCCAAAGGAC
GTTTCCGTTGGTTTCTCCGCTACTTCCACTATTGCTGTTTCCACAACATCCACTCTTGGTCCT
TCACTTCCAACCTGGAGGCTACTGGTAAACATCGTTTCCAGGTT**GCG** 3'

náhrada TAA stop
kodónu za Ala

PRIMERY:

- priamy: č.624

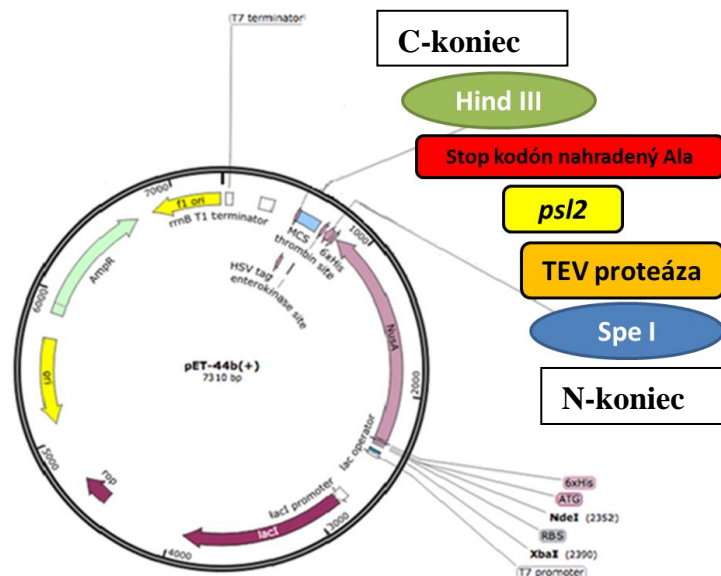
5' CGG**ACTAGT**CCGGAGAACCTGTATTTTCAGTCC 3'

Dĺžka 33
Obsah GC 51.5 %
T. topenia 63.4 °C

- reverzný: č.625

5' CC**AAGCTT**CGCAACCTGGGAAACGATG 3'

LENGTH 27
Obsah GC 55.6 %
T. topenia 63.7 °C



Návrh primerov pre pLEXSY-IE-blecherry 4 N-6xHis TEV *psl2* - sig.sekvencia

- Restriktázy: **NcoI** a **NotI-HF**

Puffer (100% activity):
CutSmart

Templát: pMAT N-6xHis TEV *psl2*:

His kotva	TEV proteáza	<i>psl2</i>
-----------	--------------	-------------

```

5'ATGAAATTCATCACCATCACCATCACGAGAACCTGTATTTTCAGTCC TTGTCCTTCAA
CTTCCCAAAGATCACTCCAGGTAACACTGCTATCACATTGCAGGGTAACGCTAAGATTTTGG
CTAACGGTGTTTTGGCTTTGACTAACTCCACTCAGATCCCACCAACTACTACTTTCCCATCCA
CTGGTAGAGCCTTGTACTCCACTCCAGTTCCATTGTGGGACTCTGCTACTGGTAACGTTGCTT
CCTTCGTTACAAGTTTCTCCTTCGTCATCTTGAACCCATCCGGTAGAGTTCCAAGTACGGTT
TGGTTTTCTTCATTGCTCCACCAGACACTGAGATCCCAAACAACCTCCAATCCCAGTACTTGG
GTGTTGTTGACTCCAAGACTTCCATCAACAGATTCTGTTGGTTTGGAGTTCGACTTGTACGCTA
ACTCCTTCGACCCTTACATGAGACACATCGGTATCGATATCAACTCCTTGATCTCCACTAAGA
CTGTTAGATAACAACCTTCGTTTCCGGTTCCTTGACTAAGGTTACTATCATCTACGACTCCCAT
CCAACACTTTGACTGCTGTTATCACTTACGAGAACGGTCAGATTTCCACTATCTCCAGAAC
GTTGACTTGAAGGCTGTTTTGCCAAAGGACGTTTCCGTTGGTTTCTCCGCTACTTCCACTATT
GCTGTTTCCCACAACATCCACTCTTGGTCCTTCACTTCCAACCTTGGAGGCTACTACTGGTAAC
ATCGTTTCCCAGGTTTAA 3'
    
```

sekrécia proteínu do BUNKY: bez signálnej sekvencie

PRIMERY:

- priamy: č.626

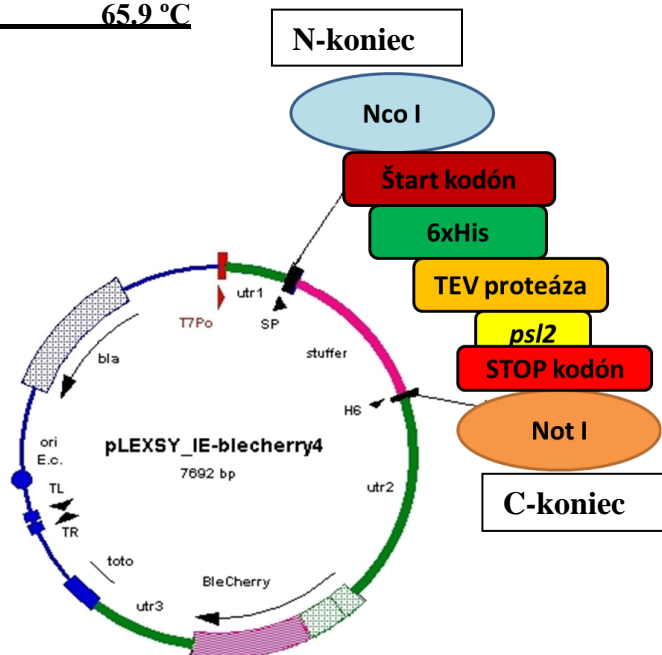
5' CGCCATGGATGAAATTCCATCACCATCGAG 3'

Dĺžka 31
Obsah GC 51.6 %
T. topenia 63.8 °C

- reverzný: č.627

5' TTGCGGCCGCAATTAACCTGGGAAACGATG 3'

Dĺžka 31
Obsah GC 51.6 %
T. topenia 65.9 °C



Návrh primerov pre pLEXSY-IE-blecherry 4 M N-6xHis TEV *psl2* + sig.sekvencia

- Restriktázy: **XbaI** a **NotI-HF**

Pufer (100% activity):
CutSmart

Templát: pMAT N-6xHis TEV *psl2*:

His kotva
TEV proteáza
psl2

```

5'ATGAAATTCATCACCATCACGAGAACCTGTATTTTCAGTCC TTGTCCTTCAA
CTTCCCAAAGATCACTCCAGGTAACACTGCTATCACATTGCAGGGTAACGCTAAGATTTTGG
CTAACGGTGTTTTGGCTTTGACTAACTCCACTCAGATCCCACCAACTACTACTTTCCCATCCA
CTGGTAGAGCCTTGTACTCCACTCCAGTTCCATTGTGGGACTCTGCTACTGGTAACGTTGCTT
CCTTCGTTACAAGTTTCTCCTTCGTCATCTTGAACCCATCCGGTAGAGTTCCAAGTACGGTT
TGGTTTTCTTCATTGCTCCACCAGACACTGAGATCCCAAACAACCTCCAATCCCAGTACTTGG
GTGTTGTTGACTCCAAGACTTCCATCAACAGATTCTGTTGGTTTGGAGTTCGACTTGTACGCTA
ACTCCTTCGACCCTTACATGAGACACATCGGTATCGATATCAACTCCTTGATCTCCACTAAGA
CTGTTAGATACAACTTCGTTTCCGGTTCCTTGACTAAGGTTACTATCATCTACGACTCCCCAT
CCAACACTTTGACTGCTGTTATCACTTACGAGAACGGTCAGATTTCCACTATCTCCAGAAC
GTTGACTTGAAGGCTGTTTTGCCAAAGGACGTTTCCGTTGGTTTCTCCGCTACTTCCACTATT
GCTGTTTCCCACAACATCCACTCTTGGTCCTTCACTTCCAAGTGGAGGCTACTACTGGTAAC
ATCGTTTCCCAGGTTTAA 3'
    
```

sekrécia proteínu do MÉDIA: so signálnou sekvenciou

- priamy: č.628

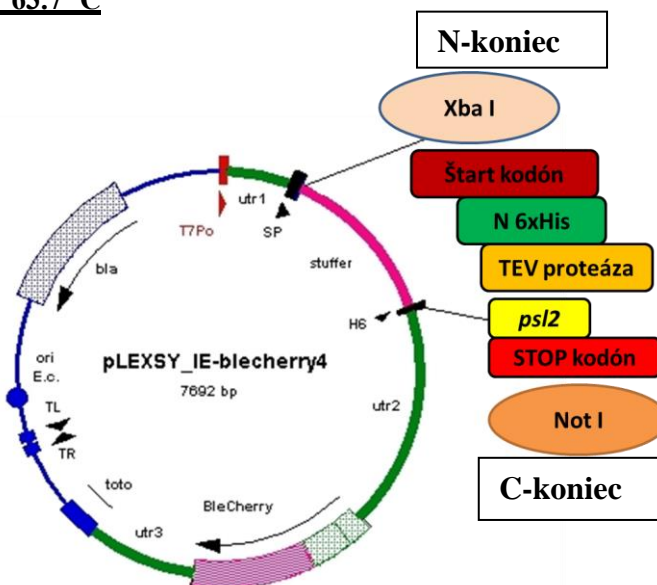
5' GGCTCTAGACAGATGAAATTCCATCACCATCACGAG 3'

Dĺžka 36
Obsah GC 47.2 %
T. topenia 63.2 °C

- reverzný: č.629

5' AAATATGCGGCCGCTATAAATTAAACCTGGGAAACGATG 3'

Dĺžka 39
Obsah GC 41 %
T. topenia 63.7 °C



Príloha č.2

Vzorka č.4: pLEXSY IE_blecherry4_N-6xHis_psl2 bez sign. sekvencie

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
navrh -----
výsledok GGGATGCTCCGCCTCGCTCGCACGCTCTTTCACGCTCCGGCTTTCCTTGCTGTGCCTTGC
          NcoI
navrh -----CGCCCATGGATGAAATTCCATCACCATCACCATCACGAGAACCTGTATTTTC
výsledok CACCAGATCTGCCATGGATGAAATTCCATCACCATCACCATCACGAGAACCTGTATTTTC
          * *****
navrh AGTCCTTGTCTTCAACTTCCCAAAGATCACTCCAGGTAACACTGCTATCACATTGCAGG
výsledok AGTCCTTGTCTTCAACTTCCCAAAGATCACTCCAGGTAACACTGCTATCACATTGCAGG
          *****
navrh GTAACGCTAAGATTTTGGCTAACGGTGTGTTTGGCTTTGACTAACTCCACTCAGATCCCAC
výsledok GTAACGCTAAGATTTTGGCTAACGGTGTGTTTGGCTTTGACTAACTCCACTCAGATCCCAC
          *****
navrh CAACTACTACTTTCCCATCCACTGGTAGAGCCTTGTACTCCACTCCAGTTCCATTGTGGG
výsledok CAACTACTACTTTCCCATCCACTGGTAGAGCCTTGTACTCCACTCCAGTTCCATTGTGGG
          *****
navrh ACTCTGCTACTGGTAACGTTGCTTCCCTTCGTTACAAGTTTCTCCTTCGTCATCTTGAACC
výsledok ACTCTGCTACTGGTAACGTTGCTTCCCTTCGTTACAAGTTTCTCCTTCGTCATCTTGAACC
          *****
navrh CATCCGGTAGAGTTCCAAGTACGGTTTGGTTTTCTTCATTGCTCCACCAGACACTGAGA
výsledok CATCCGGTAGAGTTCCAAGTACGGTTTGGTTTTCTTCATTGCTCCACCAGACACTGAGA
          *****
navrh TCCCAAACAAGTCCCAATCCCAGTACTTGGGTGTTGTTGACTCCAAGACTTCCATCAACA
výsledok TCCCAAACAAGTCCCAATCCCAGTACTTGGGTGTTGTTGACTCCAAGACTTCCATCAACA
          *****
navrh GATTCGTTGGTTTGGAGTTCGACTTGTACGCTAACTCCTTCGACCCTTACATGAGACACA
výsledok GATTCGTTGGTTTGGAGTTCGACTTGTACGCTAACTCCTTCGACCCTTACATGAGACACA
          *****
navrh TCGGTATCGATATCAACTCCTTGATCTCCACTAAGACTGTTAGATACAACCTTCGTTTCCG
výsledok TCGGTATCGATATCAACTCCTTGATCTCCACTAAGACTGTTAGATACAACCTTCGTTTCCG
          *****
navrh GTTCCTTGACTAAGGTTACTATCATCTACGACTCCCCATCCAACACTTTGACTGCTGTTA
výsledok GTTCCTTGACTAAGGTTACTATCATCTACGACTCCCCATCCAACACTTTGACTGCTGTTA
          *****
navrh TCACTTACGAGAACGGTCAGATTTCCACTATCTCCCAGAACGTTGACTTGAAGGCTGTTT
výsledok TCACTTACGAGAACGGTCAGATTTCCACTATCTCCCAGAACGTTGACTTGAAGGCTGTTT
          *****
navrh TGCCAAAGGACGTTTCCGTTGGTTTCTCCGCTACTTCCACTATTGCTGTTTCCCACAACA
výsledok TGCCAAAGGACGTTTCCGTTGGTTTCTCCGCTACTTCCACTATTGCTGTTTCCCACAACA
          *****
navrh TCCACTCTTGGTCCCTTCACTTCCAACCTGGAGGCTACTACTGGTAACATCGTTTCCCAGG
výsledok TCCACTCTTGGTCCCTTCACTTCCAACCTGGAGGCTACTACTGGTAACATCGTTTCCCAGG
          *****
```

navrh TTTAATTGCGGCCGCAA-----
výsledok TTTAATTTATAGCGGCCGCCCTCCTCCTCTTTCTTGTTCCCTTTCACGTCGCCTTCTCGG
***** **

NotI

navrh -----
výsledok TTGTAGCTGGCAGACGACGAGTCTTACTTTTACGTGTACTTCTCTATAGATGATGTATGA

navrh -----
výsledok TCTCTCTGCATGCGTGTTTCGTGCATGTGTCTGTGTGTTGTGAACGCGTTCGCTCTCGCCTC

navrh -----
výsledok AACTCTCCGCGTGAAAGGGTTTGACTGCCCATGATGCGTGTGAATATCACCGCGCAGGTA

navrh -----
výsledok CGATCCATCAACCATAATTTCGTTATTCTATTAGGCAATCATCGCGTAAGTAAACGCGCTT

navrh -
výsledok T

Príloha č.3

Vzorka č.5: pLEXSY IE blecherry4 N-6xHis *psl2* bez sign. sekvencia

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

navrh      -----
výsledok   NGATGCTCCGCTCGCTCGCACGCTCTTCACGCTCCCGGCTTTCCTTGCTGTGCCTTGCC

                NcoI

navrh      ----CGCCCATGGCGCATGAAATTCCATCACCATCACCATCACGAGAACCTGTATTTTCA
výsledok   ACCAGATCTGCCATGGATGAAATTCCATCACCATCACCATCACGAGAACCTGTATTTTCA
                *          *  *****

navrh      GTCCTTGTCCTTCAACTTCCCAAAGATCACTCCAGGTAACACTGCTATCACATTGCAGGG
výsledok   GTCCTTGTCCTTCAACTTCCCAAAGATCACTCCAGGTAACACTGCTATCACATTGCAGGG
                *****

navrh      TAACGCTAAGATTTTGGCTAACGGTGTTTTGGCTTTGACTAACTCCACTCAGATCCCACC
výsledok   TAACGCTAAGATTTTGGCTAACGGTGTTTTGGCTTTGACTAACTCCACTCAGATCCCACC
                *****

navrh      AACTACTACTTTCCCATCCACTGGTAGAGCCTTGTACTCCACTCCAGTTCATTTGTGGGA
výsledok   AACTACTACTTTCCCATCCACTGGTAGAGCCTTGTACTCCACTCCAGTTCATTTGTGGGA
                *****

navrh      CTCTGCTACTGGTAACGTTGCTTCCTTCGTTACAAGTTTCTCCTTCGTCATCTTGAACCC
výsledok   CTCTGCTACTGGTAACGTTGCTTCCTTCGTTACAAGTTTCTCCTTCGTCATCTTGAACCC
                *****

navrh      ATCCGGTAGAGTTCCAACCTGACGGTTTGGTTTTCTTCATTGCTCCACCAGACACTGAGAT
výsledok   ATCCGGTAGAGTTCCAACCTGACGGTTTGGTTTTCTTCATTGCTCCACCAGACACTGAGAT
                *****

navrh      CCCAAACAACCTCCCAATCCCAGTACTTGGGTGTTGTTGACTCCAAGACTTCCATCAACAG
výsledok   CCCAAACAACCTCCCAATCCCAGTACTTGGGTGTTGTTGACTCCAAGACTTCCATCAACAG
                *****

navrh      ATTCGTTGGTTTGGAGTTCGACTTGTACGCTAACTCCTTCGACCCTTACATGAGACACAT
výsledok   ATTCGTTGGTTTGGAGTTCGACTTGTACGCTAACTCCTTCGACCCTTACATGAGACACAT
                *****

navrh      CGGTATCGATATCAACTCCTTGATCTCCACTAAGACTGTTAGATACAACCTTCGTTTCCGG
výsledok   CGGTATCGATATCAACTCCTTGATCTCCACTAAGACTGTTAGATACAACCTTCGTTTCCGG
                *****

navrh      TTCCTTGACTAAGGTTACTATCATCTACGACTCCCCATCCAACACTTTGACTGCTGTTAT
výsledok   TTCCTTGACTAAGGTTACTATCATCTACGACTCCCCATCCAACACTTTGACTGCTGTTAT
                *****

navrh      CACTTACGAGAACGGTCAGATTTCCACTATCTCCCAGAACGTTGACTTGAAGGCTGTTTT
výsledok   CACTTACGAGAACGGTCAGATTTCCACTATCTCCCAGAACGTTGACTTGAAGGCTGTTTT
                *****

navrh      GCCAAAGGACGTTTCCGTTGGTTTCTCCGCTACTTCCACTATTGCTGTTTCCACAACAT
výsledok   GCCAAAGGACGTTTCCGTTGGTTTCTCCGCTACTTCCACTATTGCTGTTTCCACAACAT
                *****

navrh      CCACTCTTGGTCCTTCACTTCCAACCTGGAGGCTACTACTGGTAACATCGTTTCCCAGGT
výsledok   CCACTCTTGGTCCTTCACTTCCAACCTGGAGGCTACTACTGGTAACATCGTTTCCCAGGT
                *****
    
```

navrh TTAATTGCGGCCGCAA-----
výsledok TTAATTTATAGCGGCCGCCCTCCTCCTCTTTCTTGTTCCTTTCACGTCGCCTTCTCGGT
***** **

NotI

navrh -----
výsledok TGTAGCTGGCAGACGACGAGTCTTACTTTTACGTGTACTTCTCTATAGATGATGTATGAT

navrh -----
výsledok CTCTCTGCATGCGTGTTCGTGCATGTGTCCGTGTGTGTGTACGCGTGCCTCTCGCCTCA

navrh -----
výsledok GCTCTCCGCGTGAAAGGGTTTACTGCCCATGATGCGTGTGTATATCCACGCGCAGGCAC

navrh -----
výsledok GCACACACACCCACAAACACACACCAACGGGCACACCCAGGGCACACAAACGCATCTCA

navrh -----
výsledok AGGCCGAGCCGCATACGTCTCTCGCACGGGCTCCGTTTATTTGATCATGTAGTTGAGTAT

navrh -----
výsledok TAAATTGGGAAAGACAAAACTTATTATCTCGCATAATCCGGGTCCGAAAAAGTCGGATC

navrh -----
výsledok TTCTCCTCCTACTCTTCAGGCCAGCCAAGGGGCCATTGGGGTTGCCCTAACAACTAAGGA

navrh -----
výsledok CCAGTAGGGGGAGAAAGAGGGACATAAAAAGGATAATATCCTCCAATCAGTAAGGGTGGGA

navrh -----
výsledok CAAAAGATTTAAAACAGAGGACTAGGGTCTATTTATAAGGATAGAATCACGGGCGAAACA

navrh -----
výsledok ACGAAAACACACACCTCACAACACACCAACGAGAGAACCTATAGTGAGAGATTGAGGTAA

navrh -----
výsledok GCACAACAATGTGTGGTGAGGGGCCAGTCGGTATCGCTTACAAG

Príloha č.4

Vzorka č.6: pLEXSY IE blecherry4 N-6xHis *psl2* so sign. sekvencia

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
návrh -----
výsledok NGATGCTCTCGCTCGCTCGCACGCTCTTCACGCTCCTGCTTTCCTTGCTGTGCCTTGCCA

návrh -----
výsledok CCAGATCTGCCATGGCCTCGAGGCTCGTCCGTGTGCTGGCCGCCCATGCTGGTTGCAG
                                     XbaI
návrh ----- TGGCTCTAGACAGATGAAATTCATCACCATCACCA
výsledok CCGCCGTGTCCGGTCGACGCTGGCGCCTCTCTAGACAGATGAAATTCATCACCATCACCA
                                     *****

návrh TCACGAGAACCTGTATTTTCAGTCCTTGTCTTCAACTTCCCAAAGATCACTCCAGGTAA
výsledok TCACGAGAACCTGTATTTTCAGTCCTTGTCTTCAACTTCCCAAAGATCACTCCAGGTAA
                                     *****

návrh CACTGCTATCACATTGCAGGGTAACGCTAAGATTTTGGCTAACGGTGTGTTTGGCTTTGAC
výsledok CACTGCTATCACATTGCAGGGTAACGCTAAGATTTTGGCTAACGGTGTGTTTGGCTTTGAC
                                     *****

návrh TAACTCCACTCAGATCCCACCAACTACTACTTTCCCATCCACTGGTAGAGCCTTGCTACTC
výsledok TAACTCCACTCAGATCCCACCAACTACTACTTTCCCATCCACTGGTAGAGCCTTGCTACTC
                                     *****

návrh CACTCCAGTTCCATTGTGGGACTCTGCTACTGGTAACGTTGCTTCCTTCGTTACAAGTTT
výsledok CACTCCAGTTCCATTGTGGGACTCTGCTACTGGTAACGTTGCTTCCTTCGTTACAAGTTT
                                     *****

návrh CTCCTTCGTCATCTTGAACCCATCCGGTAGAGTTCCAAGTACGGTTTGGTTCCTTCAT
výsledok CTCCTTCGTCATCTTGAACCCATCCGGTAGAGTTCCAAGTACGGTTTGGTTCCTTCAT
                                     *****

návrh TGCTCCACCAGACACTGAGATCCCAAACAACCTCCAATCCAGTACTTGGGTGTTGTTGA
výsledok TGCTCCACCAGACACTGAGATCCCAAACAACCTCCAATCCAGTACTTGGGTGTTGTTGA
                                     *****

návrh CTCCAAGACTTCCATCAACAGATTGTTGGTTTGGAGTTCGACTTGACGCTAACTCCTT
výsledok CTCCAAGACTTCCATCAACAGATTGTTGGTTTGGAGTTCGACTTGACGCTAACTCCTT
                                     *****

návrh CGACCCTTACATGAGACACATCGGTATCGATATCAACTCCTTGATCTCCACTAAGACTGT
výsledok CGACCCTTACATGAGACACATCGGTATCGATATCAACTCCTTGATCTCCACTAAGACTGT
                                     *****

návrh TAGATACAACCTTCGTTTCCGGTTCCTTGACTAAGGTTACTATCATCTACGACTCCCCATC
výsledok TAGATACAACCTTCGTTTCCGGTTCCTTGACTAAGGTTACTATCATCTACGACTCCCCATC
                                     *****

návrh CAACACTTTGACTGCTGTTATCACTTACGAGAACGGTCAGATTTCCACTATCTCCCAGAA
výsledok CAACACTTTGACTGCTGTTATCACTTACGAGAACGGTCAGATTTCCACTATCTCCCAGAA
                                     *****

návrh CGTTGACTTGAAGGCTGTTTTGCCAAAGGACGTTTCCGTTGGTTTCTCCGCTACTTCCAC
```

výsledok CGTTGACTTGAAGGCTGTTTTGCCAAAGGACGTTTCCGTTGGTTTCTCCGCTACTTCCAC

návrh TATTGCTGTTTCCCACAACATCCACTCTTGGTCCTTCACTTCCAACCTGGAGGCTACTAC
výsledok TATTGCTGTTTCCCACAACATCCACTCTTGGTCCTTCACTTCCAACCTGGAGGCTACTAC

návrh TGGTAACATCGTTTCCCAGGTTTAATTTATAGCGGCCGCATATTT-----
výsledok TGGTAACATCGTTTCCCAGGTTTAATTGCGGCCGCCCTCCTCCTCTTCTTGTTCCTTT
***** ** * * * *

NotI

návrh -----
výsledok CACGTCGCCTTCTCGGTTGTAGCTGGCAGACGACGAGTCTTACTTTTACGTGTACTTCTC

návrh -----
výsledok TATAGATGATGTATGATCTCTCTGCATGCGTGTTTCGTGCATGTGTCCGTGTGTTGTGTAC

návrh -----
výsledok GCGTGCGTCTCGCCTCAGCTCTCCGCGTGAAAGGGTTTGACTIONGCCATGATGCGTGGGGT

návrh -----
výsledok ATTCCCCGCGCAAGGACCGAACAACACACACAACACCTACCTTATCAAGTTATAAACAG

návrh -----
výsledok GGATCTTAACCGTATTTCTTGGCAGAACCGAAACAATCCTCCACCCAGATCCCTCTATAT

návrh -----
výsledok TATAACTTAGGTATTACATAATCATATTGGAAAACCAGAACATAGTTACTAACTAATATC

návrh -----
výsledok TTCATACAAAAATCCATTATCCTTTGACT

Príloha č.5

Vzorka č.2: pET-44b N-6xHis NusA 6xHis TEV *psl2*

a. priamy

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
výsledok      GGGCGTATTGCTGGTCGGTGACGAGCGACTAGTATGAAATTCCATCACCATCACCATCAC
návrh         -----ATGAAATTCCATCACCATCACCATCAC
                *****

výsledok      GAGAACCTGTATTTTCAGTCCTTGTCTTCAACTTCCCAAAGATCACTCCAGGTAACACT
návrh         GAGAACCTGTATTTTCAGTCCTTGTCTTCAACTTCCCAAAGATCACTCCAGGTAACACT
                *****

výsledok      GCTATCACATTGCAGGGTAACGCTAAGATTTTGGCTAACGGTGTTTTGGCTTTGACTAAC
návrh         GCTATCACATTGCAGGGTAACGCTAAGATTTTGGCTAACGGTGTTTTGGCTTTGACTAAC
                *****

výsledok      TCCACTCAGATCCCACCAACTACTACTTTCCCATCCACTGGTAGAGCCTTGTACTCCACT
návrh         TCCACTCAGATCCCACCAACTACTACTTTCCCATCCACTGGTAGAGCCTTGTACTCCACT
                *****

výsledok      CCAGTTCATTGTGGGACTCTGCTACTGGTAACGTGCTTCCCTCGTTACAAGTTTCTCC
návrh         CCAGTTCATTGTGGGACTCTGCTACTGGTAACGTGCTTCCCTCGTTACAAGTTTCTCC
                *****

výsledok      TTCGTCATCTTGAACCCATCCGGTAGAGTTCCAACGACGGTTTGGTTTTCTTCATTGCT
návrh         TTCGTCATCTTGAACCCATCCGGTAGAGTTCCAACGACGGTTTGGTTTTCTTCATTGCT
                *****

výsledok      CCACCAGACACTGAGATCCCAAACAACCTCCCAATCCCAGTACTTGGGTGTTGTTGACTCC
návrh         CCACCAGACACTGAGATCCCAAACAACCTCCCAATCCCAGTACTTGGGTGTTGTTGACTCC
                *****

výsledok      AAGACTTCCATCAACAGATTTCGTTGGTTTGGAGTTCGACTTGACGCTAACTCCTTCGAC
návrh         AAGACTTCCATCAACAGATTTCGTTGGTTTGGAGTTCGACTTGACGCTAACTCCTTCGAC
                *****

výsledok      CCTTACATGAGACACATCGGTATCGATATCAACTCCTTGATCTCCACTAAGACTGTTAGA
návrh         CCTTACATGAGACACATCGGTATCGATATCAACTCCTTGATCTCCACTAAGACTGTTAGA
                *****

výsledok      TACAACCTCGTTTCCGGTTCCTTGACTAAGGTTACTATCATCTACGACTCCCCATCCAAC
návrh         TACAACCTCGTTTCCGGTTCCTTGACTAAGGTTACTATCATCTACGACTCCCCATCCAAC
                *****

výsledok      ACTTTGACTGCTGTTATCACTTACGAGAACGGTCAGATTTCCACTATCTCCCAGAACGTT
návrh         ACTTTGACTGCTGTTATCACTTACGAGAACGGTCAGATTTCCACTATCTCCCAGAACGTT
                *****

výsledok      GACTTGAAGGCTGTTTTGCCAAAGGACGTTTCCGTTGGTTTCTCCGCTACTTCCACTATT
návrh         GACTTGAAGGCTGTTTTGCCAAAGGACGTTTCCGTTGGTTTCTCCGCTACTTCCACTATT
                *****

výsledok      GCTGTTTCCCACAACATCCACTCTTGGTCTTCACTTCCAACCTGGAGGCTACTACTGGT
návrh         GCTGTTTCCCACAACATCCACTCTTGGTCTTCACTTCCAACCTGGAGGCTACTACTGGT
                *****

výsledok      AACATCGTTTCCAGGTTTAACTCGAGCACCACCACCACCACCTAATGTTAATTAAGT
návrh         AACATCGTTTCCAGGTTTAA-----
                *****

výsledok      TGGCGTTCCTAGGCTGATAAAACAGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGGGTGGTCCCAC
návrh         -----
```



```

*****
vysledok      GGAGCAATGAAGAAAACCAAACCGTCAGTTGGA ACTCTACCGGATGGGTTCAAGATGACG
navrh         GGAGCAATGAAGAAAACCAAACCGTCAGTTGGA ACTCTACCGGATGGGTTCAAGATGACG
*****

vysledok      AAGGAGAAACTTGTAACGAAGGAAGCAACGTTACCAGTAGCAGAGTCCCACAATGGA ACT
navrh         AAGGAGAAACTTGTAACGAAGGAAGCAACGTTACCAGTAGCAGAGTCCCACAATGGA ACT
*****

vysledok      GGAGTGGAGTACAAGGCTCTACCAGTGGATGGGAAAAGTAGTAGTTGGTGGGATCTGAGTG
navrh         GGAGTGGAGTACAAGGCTCTACCAGTGGATGGGAAAAGTAGTAGTTGGTGGGATCTGAGTG
*****

vysledok      GAGTTAGTCAAAGCCAAAACACCGTTAGCCAAAATCTTAGCGTTACCCTGCAATGTGATA
navrh         GAGTTAGTCAAAGCCAAAACACCGTTAGCCAAAATCTTAGCGTTACCCTGCAATGTGATA
*****

vysledok      GCAGTGTTACCTGGAGTGATCTTTGGGAAGTTGAAGGACAAGGACTGAAAATACAGGTTC
navrh         GCAGTGTTACCTGGAGTGATCTTTGGGAAGTTGAAGGACAAGGACTGAAAATACAGGTTC
*****

vysledok      TCGTGATGGTGATGGTGATGGAATTTCATACTATTCGCTTCGTCGCCGAACCAGCAAATA
navrh         TCGTGATGGTGATGGTGATGGAATTTCAT-----
*****

vysledok      TTACGGGCAGCCTTAATCATTGCTCCGGCTTTTTTCAGCAGGCAACCCTTCGAAATCGGCC
navrh         -----

vysledok      GGATCTTCAATGCCCTGTTCCGCTAGATCTTCCGACTTACGAACTCTACGGCCGGCCAGT
navrh         -----

vysledok      TTTAATTTTCGAGTGCTAGATCGTCCGCTTCTAGGTTTCAGGCGAATCGTCAACCCGGTTGT
navrh         -----

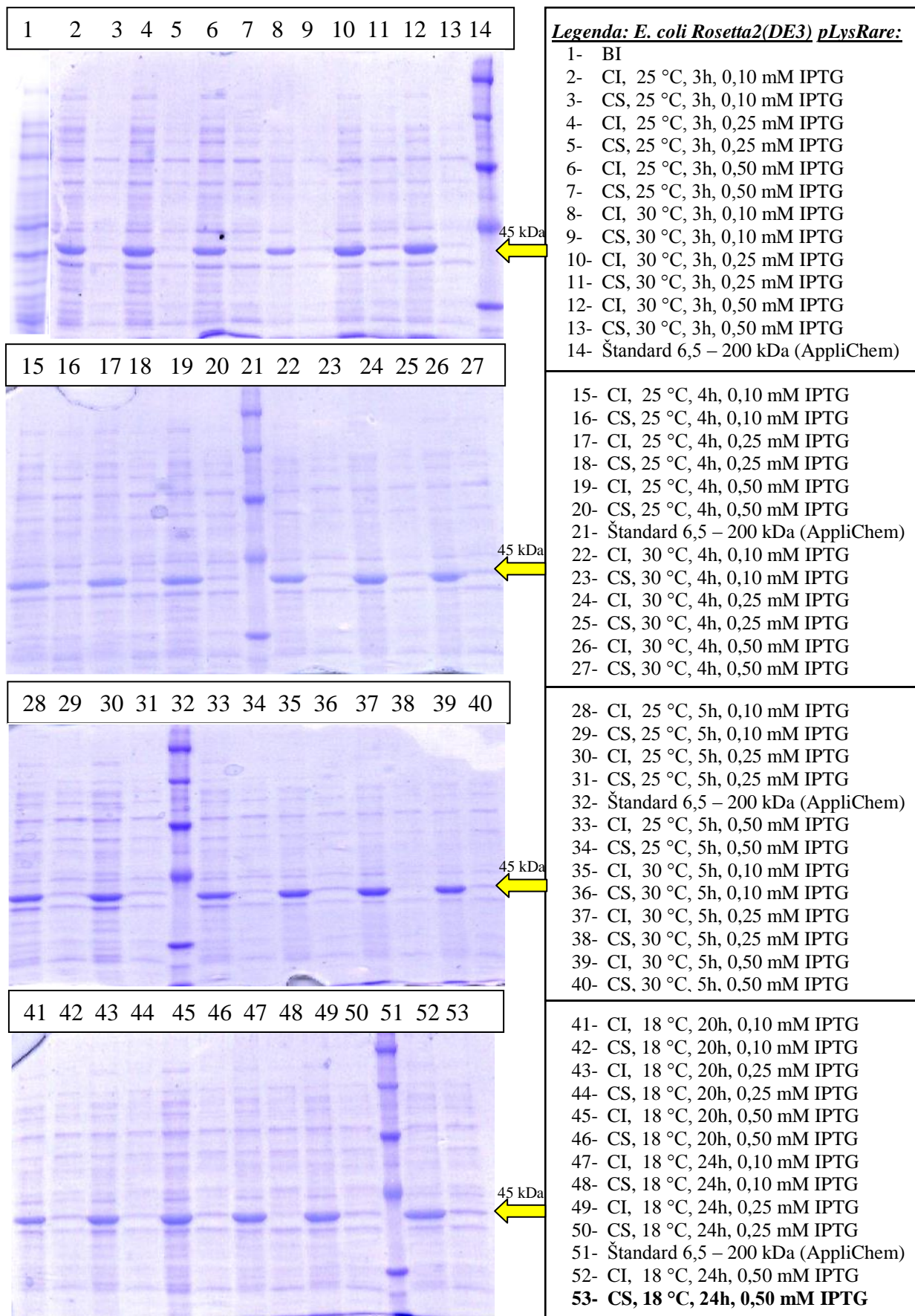
vysledok      TTGTCACCTAAGCCTTTCTTCCGTGAGCTGATCAGAGGTGTGCAATGGGTCTTTTTAGTC
navrh         -----

vysledok      GGTTGA
navrh         -----

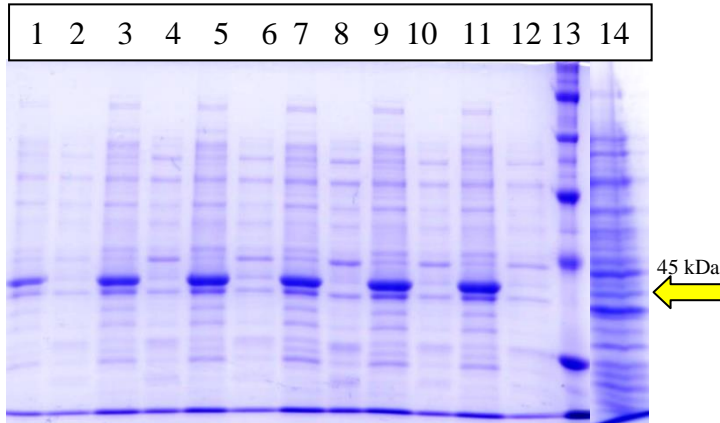
```

Príloha č.6

E. coli Rosetta2(DE3) pLysRare test rozpustnosti proteínu PSL2:

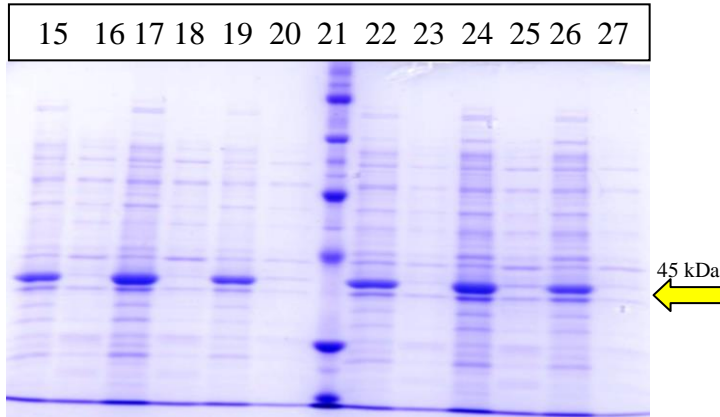


***E. coli* BL21(DE3) test rozpustnosti proteínu PSL2:**

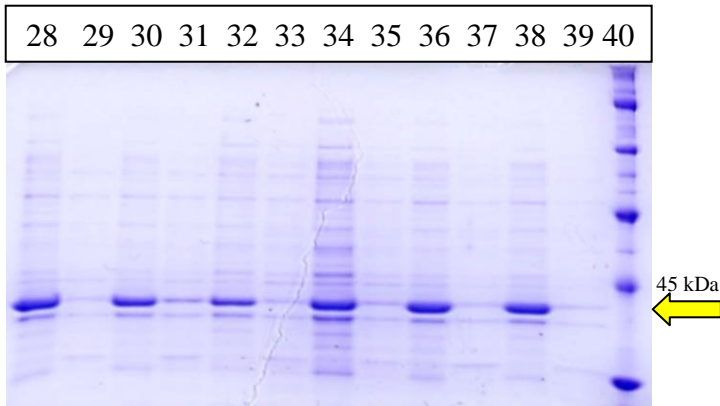


Legenda vzoriek *E. coli* BL21(DE3):

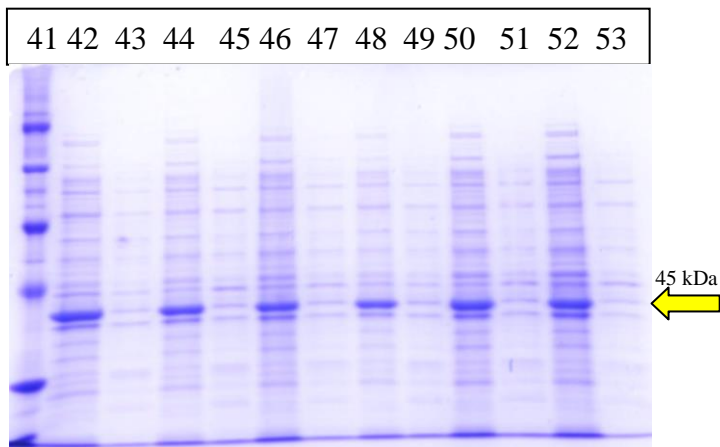
- 1- CI, 25 °C, 3h, 0,10 mM IPTG
- 2- CS, 25 °C, 3h, 0,10 mM IPTG
- 3- CI, 25 °C, 4h, 0,10 mM IPTG
- 4- CS, 25 °C, 4h, 0,10 mM IPTG
- 5- CI, 25 °C, 5h, 0,10 mM IPTG
- 6- CS, 25 °C, 5h, 0,10 mM IPTG
- 7- CI, 25 °C, 3h, 0,25 mM IPTG
- 8- CS, 25 °C, 3h, 0,25 mM IPTG
- 9- CI, 25 °C, 4h, 0,25 mM IPTG
- 10- CS, 25 °C, 4h, 0,25 mM IPTG
- 11- CI, 25 °C, 5h, 0,25 mM IPTG
- 12- CS, 25 °C, 5h, 0,25 mM IPTG
- 13- Štandard 6,5 – 200 kDa (AppliChem)
- 14- BI



- 15- CI, 25 °C, 3h, 0,50 mM IPTG
- 16- CS, 25 °C, 3h, 0,50 mM IPTG
- 17- CI, 25 °C, 4h, 0,50 mM IPTG
- 18- CS, 25 °C, 4h, 0,50 mM IPTG
- 19- CI, 25 °C, 5h, 0,50 mM IPTG
- 20- CS, 25 °C, 5h, 0,50 mM IPTG
- 21- Štandard 6,5 – 200 kDa (AppliChem)
- 22- CI, 30 °C, 3h, 0,10 mM IPTG
- 23- CS, 30 °C, 3h, 0,10 mM IPTG
- 24- CI, 30 °C, 4h, 0,10 mM IPTG
- 25- CS, 30 °C, 4h, 0,10 mM IPTG
- 26- CI, 30 °C, 5h, 0,10 mM IPTG
- 27- CS, 30 °C, 5h, 0,10 mM IPTG



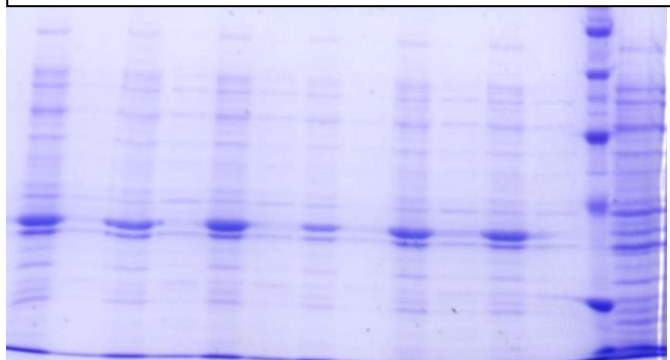
- 28- CI, 18 °C, 20h, 0,10 mM IPTG
- 29- CS, 18 °C, 20h, 0,10 mM IPTG
- 30- CI, 18 °C, 20h, 0,25 mM IPTG
- 31- CS, 18 °C, 20h, 0,25 mM IPTG
- 32- CI, 18 °C, 20h, 0,50 mM IPTG
- 33- CS, 18 °C, 20h, 0,50 mM IPTG
- 34- CI, 18 °C, 24h, 0,50 mM IPTG
- 35- CS, 18 °C, 24h, 0,50 mM IPTG
- 36- CI, 18 °C, 24h, 0,10 mM IPTG
- 37- CS, 18 °C, 24h, 0,10 mM IPTG
- 38- CI, 18 °C, 24h, 0,25 mM IPTG
- 39- CS, 18 °C, 24h, 0,25 mM IPTG
- 40- Štandard 6,5 – 200 kDa (AppliChem)



- 41- Štandard 6,5 – 200 kDa (AppliChem)
- 42- CI, 30 °C, 3h, 0,25 mM IPTG
- 43- CS, 30 °C, 3h, 0,25 mM IPTG
- 44- CI, 30 °C, 4h, 0,25 mM IPTG
- 45- CS, 30 °C, 4h, 0,25 mM IPTG
- 46- CI, 30 °C, 5h, 0,25 mM IPTG
- 47- CS, 30 °C, 5h, 0,25 mM IPTG
- 48- CI, 30 °C, 3h, 0,50 mM IPTG
- 49- CS, 30 °C, 3h, 0,50 mM IPTG
- 50- CI, 30 °C, 4h, 0,50 mM IPTG
- 51- CS, 30 °C, 4h, 0,50 mM IPTG
- 52- CI, 30 °C, 5h, 0,50 mM IPTG
- 53- CS, 30 °C, 5h, 0,50 mM IPTG

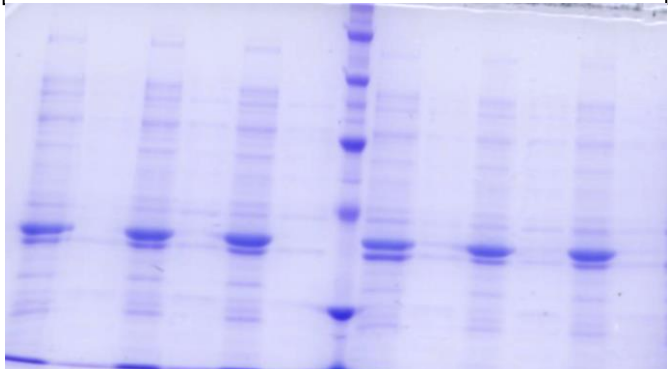
E. coli Tuner(DE3) test rozpustnosti proteínu PSL2:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



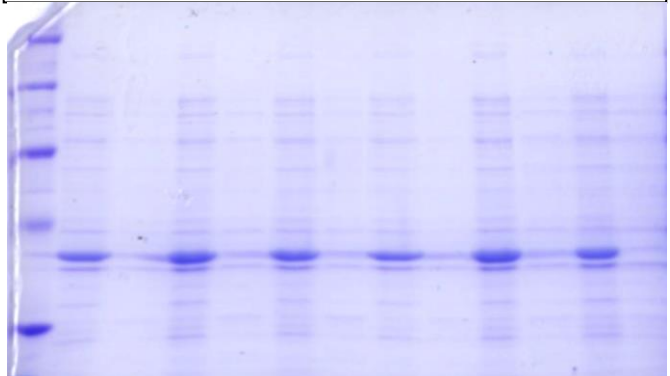
45 kDa
←

15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27



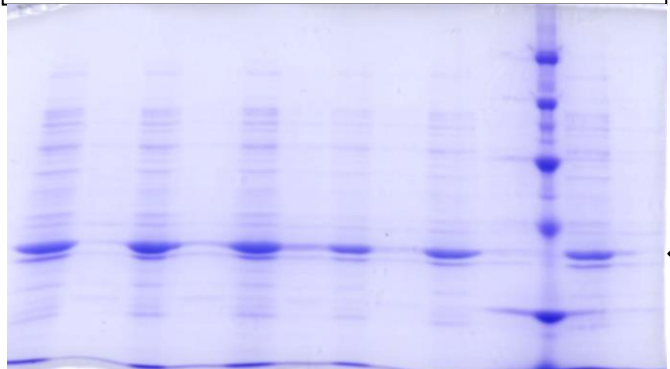
45 kDa
←

28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40



45 kDa
←

41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53



45 kDa
←

Legenda vzoriek E. coli Tuner(DE3):

- 1- CI, 25 °C, 3h, 0,10 mM IPTG
- 2- CS, 25 °C, 3h, 0,10 mM IPTG
- 3- CI, 25 °C, 4h, 0,10 mM IPTG
- 4- CS, 25 °C, 4h, 0,10 mM IPTG
- 5- CI, 25 °C, 5h, 0,10 mM IPTG
- 6- CS, 25 °C, 5h, 0,10 mM IPTG
- 7- CI, 25 °C, 3h, 0,25 mM IPTG
- 8- CS, 25 °C, 3h, 0,25 mM IPTG
- 9- CI, 25 °C, 4h, 0,25 mM IPTG
- 10- CS, 25 °C, 4h, 0,25 mM IPTG
- 11- CI, 25 °C, 5h, 0,25 mM IPTG
- 12- CS, 25 °C, 5h, 0,25 mM IPTG
- 13- Štandard 6,5 – 200 kDa (AppliChem)
- 14- BI

- 15- CI, 25 °C, 3h, 0,50 mM IPTG
- 16- CS, 25 °C, 3h, 0,50 mM IPTG
- 17- CI, 25 °C, 4h, 0,50 mM IPTG
- 18- CS, 25 °C, 4h, 0,50 mM IPTG
- 19- CI, 25 °C, 5h, 0,50 mM IPTG
- 20- CS, 25 °C, 5h, 0,50 mM IPTG
- 21- Štandard 6,5 – 200 kDa (AppliChem)
- 22- CI, 30 °C, 3h, 0,10 mM IPTG
- 23- CS, 30 °C, 3h, 0,10 mM IPTG
- 24- CI, 30 °C, 4h, 0,10 mM IPTG
- 25- CS, 30 °C, 4h, 0,10 mM IPTG
- 26- CI, 30 °C, 5h, 0,10 mM IPTG
- 27- CS, 30 °C, 5h, 0,10 mM IPTG

- 28- Štandard 6,5 – 200 kDa (AppliChem)
- 29- CI, 30 °C, 3h, 0,25 mM IPTG
- 30- CS, 30 °C, 3h, 0,25 mM IPTG
- 31- CI, 30 °C, 4h, 0,25 mM IPTG
- 32- CS, 30 °C, 4h, 0,25 mM IPTG
- 33- CI, 30 °C, 5h, 0,25 mM IPTG
- 34- CS, 30 °C, 5h, 0,25 mM IPTG
- 35- CI, 30 °C, 3h, 0,50 mM IPTG
- 36- CS, 30 °C, 3h, 0,50 mM IPTG
- 37- CI, 30 °C, 4h, 0,50 mM IPTG
- 38- CS, 30 °C, 4h, 0,50 mM IPTG
- 39- CI, 30 °C, 5h, 0,50 mM IPTG
- 40- CS, 30 °C, 5h, 0,50 mM IPTG

- 41- CI, 18 °C, 24h, 0,10 mM IPTG
- 42- CS, 18 °C, 24h, 0,10 mM IPTG
- 43- CI, 18 °C, 24h, 0,25 mM IPTG
- 44- CS, 18 °C, 24h, 0,25 mM IPTG
- 45- CI, 18 °C, 24h, 0,50 mM IPTG
- 46- CS, 18 °C, 24h, 0,50 mM IPTG
- 47- CI, 18 °C, 20h, 0,10 mM IPTG
- 48- CS, 18 °C, 20h, 0,10 mM IPTG
- 49- CI, 18 °C, 20h, 0,25 mM IPTG
- 50- CS, 18 °C, 20h, 0,25 mM IPTG
- 51- Štandard 6,5 – 200 kDa (AppliChem)
- 52- CI, 18 °C, 20h, 0,50 mM IPTG
- 53- CS, 18 °C, 20h, 0,50 mM IPTG

Príloha č.7

22. 2. 2016

Vzorky: Vondrová PSL2 + tioredoxin (pRSET A), PSL2 + 6xHis+NusA cca 86kDa (pET-44b)

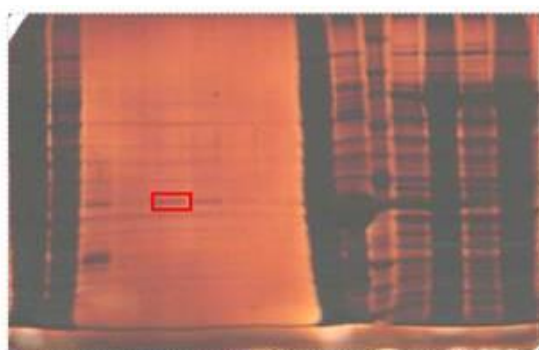
Gel: 1D, 10 %

In-gel digesce (trypsin, 40°C, 2 hod, bez R+A, V)

Analýza: MALDI MS/MS – databáze NCBI, taxonomie all entries

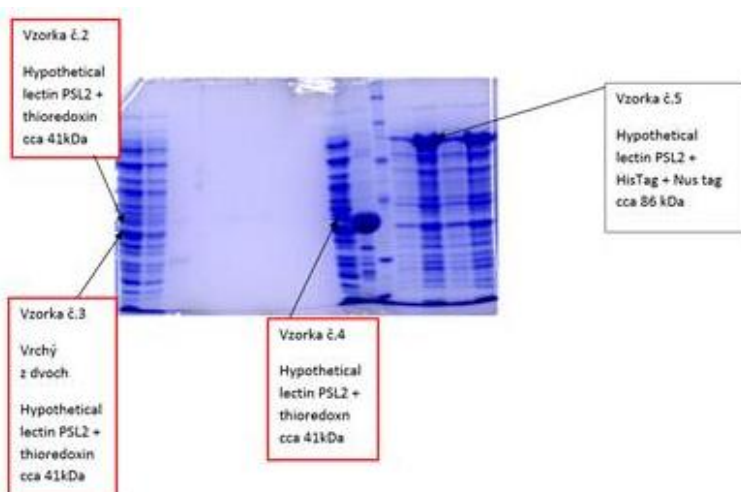
MALDI MS/MS – lokální databáze dodaných sekvencí, bez enzymové specifity

Dominantními složkami vzorků 2-4 jsou proteiny z *E. coli*, očekávaný protein PSL2 + tioredoxin byl identifikován pouze ve vzorcích 2 a 4. Ve vzorku 1 byl nalezen pouze GAPDH z *Candidy albicans*. Dominantní a jedinou detekovanou složkou vzorku 5 je očekávaný protein. Pro zlepšení pokrytí sekvence či detekci minoritních komponent vzorků by bylo možné provést ještě LC-MS/MS analýzu (dejte, prosím, vědět, zda má být provedena).



Vzorka č.1

Hypothetical lectin PSL2 + tioredoxin
cca 41kDa



Vzorek 1

1. gi|487460005 Mass: 35811 Score: **235** Matches: 3(2) Sequences: 3(2) pI = 6,6 12 %
type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Escherichia coli]

[Odpovídá několika formám proteinu.](#)

1. 382 Mass: 39349 Score: **290** Matches: 4(3) Sequences: 4(3) pI = 6,7 16 %
GAPDH Candida albicans

Vzorek 2

1. gi|26110363 Mass: 44822 Score: **651** Matches: 9(6) Sequences: 9(6) pI = 5,3 33 %
Elongation factor Tu [Escherichia coli CFT073]

Odpovídá několika formám proteinu.

2. gi|169172 Mass: 28487 Score: **222** Matches: 2(1) Sequences: 2(1) pI = 5,9 16 %
vegetative lectin [Pisum sativum]

Identifikace na 1 peptid se signifikantním MASCOT score. Odpovídá několika formám proteinu.

3. gi|148071 Mass: 11886 Score: **155** Matches: 2(1) Sequences: 2(1) pI = 4,7 27 %
thioredoxin [Escherichia coli]

Identifikace na 1 peptid se signifikantním MASCOT score. Odpovídá několika formám proteinu.

1. 1468 Mass: 39918 Score: **392** Matches: 5(5) Sequences: 5(5) pI = 5,4 23 %
Vondrova 1402 PSL2 thioredoxin (pRSET A)

Pokrytí sekvence (**potvrzené úseky**/nejisté úseky/nedetekované úseky):

1	MSDKIIHLTD	DSFDTDVLKA	DGAILVDFWA	HWCGPCK	MIA	PILDEIADEY
51	QGKLTVAKLN	IDHNPGTAPK	YGIRGIPTLL	LFKNGEVAAT	KVGALSKGQL	
101	KEFLDANLAG	SGSGENLYFQ	GSENLVYFQSL	SFNFPKITPG	NTAITLQGNA	
151	KILANGVLAL	TNSTQIPPTT	TFPSTGR ALY	STPVPLWDSA	TGNVASFVTS	
201	FSFVILNPSG	RVPTDGLVFF	IAPPDTEIPN	NSQSQYLGVV	DSKTSINRFV	
251	GLEFDLYANS	FDPYMRHIGI	DINSLISTKT	VRYNFVSGSL	TKVTIIYDSP	
301	SNTLTAVITY	ENGQISTISQ	NVDLKAFLPK	DVSVGFSAIS	TIAVSTTSTL	
351	GPSLPTWKLL	LVTSPFRFKE	A			

Vzorek 3

1. gi|335576468 Mass: 38383 Score: **1083** Matches: 8(7) Sequences: 8(7) pI = 4,7 45 %
outer membrane porin OmpF OmpF [Shigella flexneri J1713]

Odpovídá několika formám proteinu.

2. gi|26110363 Mass: 44822 Score: **75** Matches: 1(1) Sequences: 1(1) pI = 5,3 3 %
Elongation factor Tu [Escherichia coli CFT073]

Identifikace na 1 peptid. Odpovídá několika formám proteinu.

No results.

Vzorek 4

1. gi|26110363 Mass: 44822 Score: **493** Matches: 7(5) Sequences: 7(5) pI = 5,3 26 %
Elongation factor Tu [Escherichia coli CFT073]

Odpovídá několika formám proteinu.

2. gi|169172 Mass: 28487 Score: **371** Matches: 3(3) Sequences: 3(3) pI = 5,9 22 %
vegetative lectin [Pisum sativum]

Odpovídá několika formám proteinu.

3. gi|148071 Mass: 11886 Score: **307** Matches: 3(2) Sequences: 3(2) pI = 4,7 43 %
thioredoxin [Escherichia coli]

Odpovídá několika formám proteinu.

1. 1468 Mass: 39918 Score: **711** Matches: 8(7) Sequences: 8(7) pI = 5,4 32 %
Vondrova 1402 PSL2 thioredoxin (pRSET A)

Pokrytí sekvence (**potvrzené úseky**/nejisté úseky/nedetekované úseky):

1	MSDKIIHLTD	DSFDTDVLKA	DGAILVDFWA	HWCGPCK	MIA	PILDEIADEY
51	QGKLTVAKLN	IDHNPGTAPK	YGIRGIPTLL	LFKNGEVAAT	KVGALSKGQL	
101	KEFLDANLAG	SGSGENLYFQ	GSENLVYFQSL	SFNFPK	ITPG	NTAITLQGNA

151 KILANGVLAL TNSTQIPPTT TFPSTGRALY STPVPLWDSA TGNVASFVTS
 201 FSVVILNPSG RVPTDGLVFF IAPPDTEIPN NSQSQYLGVV DSKTSINRFV
 251 GLEFDLYANS FDPYMRHIGI DINSLISTKT VRYNFVSGSL TKVTIIYDSP
 301 SNTLTAIVITY ENGQISTISQ NVDLKAVLPK DSVVGFSA TS TIAVSTTSTL
 351 GPSLPTWKLL LVTSFPRFKE A

Vzorek 5

1. gi|545292061 Mass: 54863 Score: **1264** Matches: 14(10) Sequences: 14(10) pI = 4,5 49 %
transcription termination protein NusA [Escherichia coli]

[Odpovídá několika formám proteinu.](#)

2. gi|169172 Mass: 28487 Score: **345** Matches: 3(2) Sequences: 3(2) pI = 5,9 18 %
vegetative lectin [Pisum sativum]

[Odpovídá několika formám proteinu.](#)

1. 1469 Mass: 83894 Score: **2194** Matches: 26(22) Sequences: 25(22) pI = 4,8 48 %
Vondrova 1402 PSL2 6xHis NusA (pET-44b)

Pokrytí sekvence (**potvrzené úseky**/nejisté úseky/nedetekované úseky):

1 MGSSHHHHHH SSMNKEILAV VEAVSNEKAL PREKIFEALE SALATATKKK
 51 YEQEIDVRVQ IDRKSGDFDT FRRWLVVDEV TQPTKEITLE AARYEDESIN
 101 LGDYVEDQIE SVTFDRITTO TAKQVIVQKV REAERAMVVD QFREHEGEII
 151 TGVVKKVNRD NISLDLGNA EAVILREDML PRENFRPGDR VRGVLYSVRP
 201 EARGAQLFVT RSKPEMLIEL FRIEVPEIGE EVIEIKAAAR DPGSRAKIAV
 251 KTNDKRIDPV GACVGMRGAR VQAVSTELGG ERIDIVLWDD NPAQFVINAM
 301 APADVASIVV DEDKHTMDIA VEAGNLAQAI GRNGQNVRLA SQLSGWELNV
 351 MTVDDLQAKH QAEAHAAIDT FTKYLDIDED FATVLVEEGF STLEELAYVP
 401 MKELLEIEGL DEPTVEALRE RAKNALATIA QAQESLGDN KPADLLNLE
 451 GVDRDLAFKL AARGVCTLED LAEQGIDDLA DIEGLTDEKA GALIMAARNI
 501 CWFGEAMKF HHHHHENLY FQSLSFNFPK ITPGNTAITL QGNAKILANG
 551 VLALTNSTQI PPTTTFPSTG RALYSTPVPL WDSATGNVAS FVTSFVSVVIL
 601 NPSGRVPTDG LVFFIAPPDT EIPNNSQSQY LGVVDSKTSI NRFVGLFDL
 651 YANSFDPYMR HIGIDINSLI STKTVRYNFV SGSLTKVTII YDSPSNTLTA
 701 VITYENGQIS TISQNVDLKA VLPKDVSVGF SATSTIAVSH NIHSWSFTSN
 751 LEATTGNIVS QV

Príloha č.8

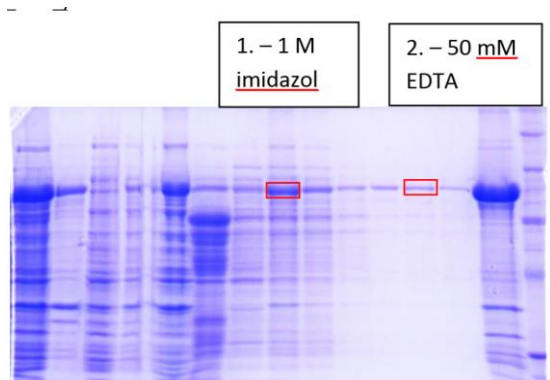
Vzorky: Vondrová – HisTag-NusA-HisTag-Tev-psl2

In-gel digestce (trypsin, 40°C, 2 hod, bez R+A, V)

Analýza: MALDI MS/MS – databáze NCBI, taxonomie all entries

MALDI MS/MS – lokální databáze dodaných sekvencí, bez enzymové specifity

V obou vzorcích byl jako dominantní a jediná detekovaná komponenta nalezen očekávaný protein. Rozdíly proti dodané sekvenci (deamidace N, oxidace W) mohou být důsledkem stáří vzorku. Ve vzorku 2 chyběl oproti vzorku 1 intenzivní signál peptidu 510-530 obsahujícího druhý His-tag, tento rozdíl v pokrytí sekvence se nepodařilo na základě získaných dat vysvětlit. Pro zlepšení pokrytí sekvence by bylo možné provést ještě podrobnější LC-MS/MS analýzu (dejte, prosím, vědět, zda má být provedena).



Vzorek 1

1. gi|545292061 Mass: 54863 Score: **2146** Matches: 20(13) Sequences: 19(13) pI = 4,5
46 %

transcription termination protein NusA [Escherichia coli]
Odpovídá několika formám proteinu.

2. gi|169172 Mass: 28487 Score: **112** Matches: 1(1) Sequences: 1(1) pI = 5,9
6 %

vegetative lectin [Pisum sativum]
Identifikace na 1 peptid. Odpovídá několika formám proteinu.

1. 1493 Mass: 83894 Score: **2250** Matches: 23(22) Sequences: 22(21) pI = 4,9
36 %

Vondrova 1480 HisTag_NusA_HisTag_Tev_psl2

Pokrytí sekvence (potvrzené/nejisté/ nedetekované úseky/detekované se změnou v sekvenci):

1	MGSSHHHHHH	SSMNKEILAV	VEAVSNEKAL	PR EKIFEALE	SALATATK KK
51	YEQEIDVRVQ	IDRKSDFDT	FRR WLVVDEV	TQPTKEITL E	AAR YEDESIN
101	LGDYVEDQIE	SVTFDR ITIQ	TAKQVIVQKV	REAERAMVVD	Q FREHEGEII
151	TGVVK KVNRD	NISLDLGNA	EAVILREDML	PRENFRPGDR	VRGVLYSVRP
201	EARGAQLFVT	RSKPEMLIEL	FRIEVPEIGE	EVIEIKAAAR	DPGSRAKIAV
251	KTNDKR IDPV	GACVGM RGAR	VQAVSTELGG	ERIDIVLWDD	NPAQFVINAM
301	APADVASIVV	DEDKHTMDIA	VEAGNLAQAI	GRNGQNVRLA	SQLSGWELNV
351	MTVDDLQAK H	QAEAHAAIDT	FTKYLDIDED	FATVLVEEGF	STLEELAYVP
401	MK ELLEIEGL	DEPTVEALRE	RAK NALATIA	QAQESLGDN	KPADDLLNLE
451	GVDRDLAFK L	AARGVCTLED	LAEQGIDDLA	DIEGLTDEKA	GALIMAARNI
501	CWFGDEAMK F	HHHHHENLY	FQSLSFNFPK	ITPGNTAITL	QGNAK ILADG
551	VLALTNSTQI	PPTTTFPSTG	RALYSTPVPL	WDSATGNVAS	FVTSFSFVIL

601 NPSGRVPTDG LVFFIAPPDT EIPNNSQSQY LGVVDSKTSI NRFVGLLEFDL
 651 YANSFDPYMR HIGIDINSLI STKTVRYNFV SGSLTKVTII YDSPSNTLTA
 701 VITYENGQIS TISQNVDLKA VLPKDVSVGF SATSTIAVSH NIHSWSFTSN
 751 LEATTGNIVS QV

Vzorek 2

1. gi|446953797 Mass: 54853 Score: **1572** Matches: 16(11) Sequences: 16(11) pI = 4,5 43 %
transcription termination protein NusA [Escherichia coli]

Odovídá několika formám proteinu.

2. gi|169172 Mass: 28487 Score: **121** Matches: 2(1) Sequences: 2(1) pI = 5,9 12 %
vegetative lectin [Pisum sativum]

Identifikace na 1 peptid se signifikantním MASCOT score. Odovídá několika formám proteinu.

1. 1493 Mass: 83894 Score: **1628** Matches: 22(16) Sequences: 22(16) pI = 4,9 35 %
Vondrova 1480 HisTag_NusA_HisTag_Tev_psl2

Pokrytí sekvence (potvrzené/nejisté/ nedetekované úseky/ detekované se změnou v sekvenci):

1 MGSSHHHHHH SSMNKEILAV VEAVSNEKAL PREKIFEALE SALATATKKK
 51 YEQEIDVRVQ IDRKSGDFDT FRRWLVVDEV TQPTKEITLE AARYEDESIN
 101 LGDYVEDQIE SVTFDRITIQ TAKQVIVQKV REAERAMVVD QFREHEGEII
 151 TGVVKKVNRD NISLDLGNA EAVILREDML PRENFRPGDR VRGVLYSVRP
 201 EARGAQLFVT RSKPEMLIEL FRIEVPEIGE EVIEIKAAAR DPGSRAKIAV
 251 KTNDKRIDPV GACVGMARGAR VQAVSTELGG ERIDIVLWDD NPAQFVINAM
 301 APADVASIVV DEDKHTMDIA VEAGNLAQAI GRNGQNVRLA SQLSGwELNV
 351 MTVDDLQAKH QAEAHAAIDT FTKYLDIDED FATVLVEEGF STLEELAYVP
 401 MKELLEIEGL DEPTVEALRE RAKNALATIA QAQESLGDN KPADDLLNLE
 451 GVDRDLAFKL AARGVCTLED LAEQGIDDLA DIEGLTDEKA GALIMAARNI
 501 CWFGEAMKF HHHHHHENLY FQLSFNFPK ITPGNTAITL QNAKILADG
 551 VLALTNSTQI PPTTTFPSTG RALYSTPVPL WDSATGNVAS FVTSFSFVIL
 601 NPSGRVPTDG LVFFIAPPDT EIPNNSQSQY LGVVDSKTSI NRFVGLLEFDL
 651 YANSFDPYMR HIGIDINSLI STKTVRYNFV SGSLTKVTII YDSPSNTLTA
 701 VITYENGQIS TISQNVDLKA VLPKDVSVGF SATSTIAVSH NIHSWSFTSN
 751 LEATTGNIVS QV

w = W + 2 oxidace

Príloha č.9

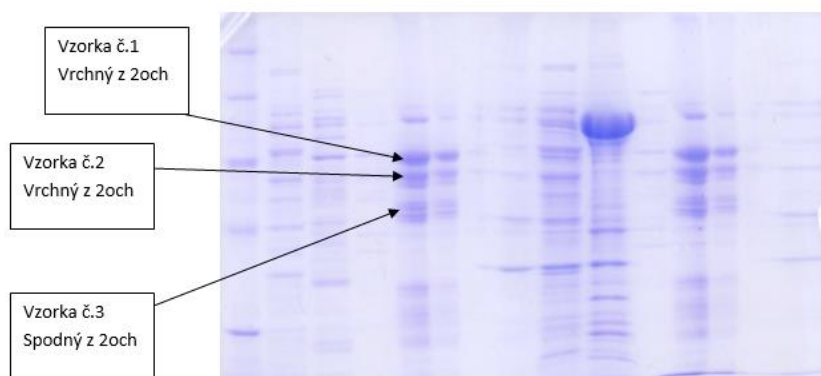
Vzorky: Pokorná - Psl2 + HisTag + NusTag + HisT

In-gel digesce (trypsin, 40°C, 2 hod, bez R+A, V)

Analýza: MALDI MS/MS – databáze NCBI, taxonomie all entries

MALDI MS/MS – lokální databáze dodaných sekvencí, bez enzymové specifity

Dominantní složkou všech tří vzorků jsou různé dlouhé N-terminální fragmenty očekávaného proteinu. Stopy jiného proteinu (z *E. coli*) byly pozorovány pouze ve vzorku 2.



Vzorky 1-3

1. gi|485893092 Mass: 54832 Score: **1570** Matches: 19(13) Sequences: 17(13) pI = 4,5 44 %
transcription termination protein NusA [Escherichia coli]

Odpovídá několika formám proteinu.

2. gi|18028158 Mass: 52000 Score: **119** Matches: 1(1) Sequences: 1(1) pI = 4,8 3 %
GroEL [Escherichia coli]

Identifikace na 1 peptid. Tento peptid byl nalezen pouze ve vzorku č. 2. Odpovídá několika formám proteinu.

1. 1530 Mass: 83894 Score: **1893** Matches: 27(24) Sequences: 25(22) pI = 4,9
37 %

Wimmerova 2003 Psl2, HisTag, NusTag, HisT

Pokrytí sekvence (potvrzené/nejisté/ nedetekované úseky):

Identifikované peptidy ve všech třech vzorcích/jenom ve vzorcích 1 a 2/jenom ve vzorku 1:

```
1  MGSSHHHHHH  SSMNKEILAV  VEAVSNEKAL  PREKIFEALE  SALATATKKK
51  YEQEIDVRVQ  IDRKSGDFDT  FRRWLVVDEV  TQPTKEITLE  AARYEDESIN
101 LGDYVEDQIE  SVTFDRITTQ  TAKQVIVQKV  REAERAMVVD  QFREHEGEII
151 TGVVKKVNRD  NISLDLGNA  EAVILREDML  PRENFRPGDR  VRGVLYSVRP
201 EARGAQLFVT  RSKPEMLIEL  FRIEVPEIGE  EVIEIKAAAR  DPGSRAKIAV
251 KTNDKRIDPV  GACVGMRGAR  VQAVSTELGG  ERIDIVLWDD  NPAQFVINAM
301 APADVASIVV  DEDKHTMDIA  VEAGNLAQAI  GRNGQNVRLA  SQLSGWELNV
351 MTVDDLQAKH  QAEAHAAIDT  FTKYLDIDED  FATVLVEEGF  STLEELAYVP
401 MKELLEIEGL  DEPTVEALRE  RAKNALATIA  QAQEEGLGDN  KPADDLLNLE
451 GVDRDLAFKL  AARGVCTLED  LAEQGIDDLA  DIEGLTDEKA  GALIMAARNI
501 CWFGEAMKF  HHHHHHENLY  FQSLSFNFPK  ITPGNTAITL  QGNAKILANG
551 VLALTNSTQI  PPTTTFPSTG  RALYSTPVPL  WDSATGNVAS  FVTSFSFVIL
601 NPSGRVPTDG  LVFFIAPPDT  EIPNNSQSQY  LGVDSKTSI  NRFVGLFDFL
651 YANSFDPYMR  HIGIDINSLI  STKTVRYNFV  SGSLTKVTII  YDSPSNTLTA
701 VITYENGQIS  TISQNVDLKA  VLPKDVSVGF  SATSTIAVSH  NIHSWSFTSN
751 LEATTGNIVS  QV
```