

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Příprava rekombinantního paralyzačního proteinu z jedu
parazitoidní vosičky *Habrobracon hebetor***

Diplomová práce

Bc. Barbora Martínková

Školitel: Prof. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

České Budějovice 2017

Martínková, B., 2017: Příprava rekombinantního paralyzačního proteinu z jedu parazitoidní vosičky *Habrobracon hebetor*. [Production of a paralysis protein from the venom of parasitoid wasp *Habrobracon hebetor*. Mgr. Thesis, in Czech.] 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Annotation:

A candidate protein from the venom gland of parasitoid wasp, *Habrobracon hebetor*, predicted to be responsible for the paralysis of lepidopteran caterpillars, was produced in baculovirus and bacterial expression systems. The function of both recombinant protein variants was confirmed by *in vivo* tests in *Galleria mellonella* larvae.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury ČR, číslo grantu P305/14-27816S.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím pouze pramenů a literatury uvedených v seznamu použité literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databázi STAG provozovanou Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této autorské práce.

Souhlasím také s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce.

Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací These.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 18.4.2017

Barbora Martínková

.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Michalu Žurovcovi, CSc. za trpělivost a čas, který mi věnoval při psaní mé diplomové práce a prof. RNDr. Daliboru Kodříkovi, CSc. za pomoc s purifikací proteinu. Mé poděkování patří i všem členům Laboratoře molekulární genetiky, nejvíce Mgr. Václavu Brožovi a Bc. Lence Rouhové za cenné rady a Ing. Michalovi Šerému, Ph.D. za pomoc s vyhodnocováním videozáznamů. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům za morální a finanční podporu během celého studia.

Obsah

1	ÚVOD.....	1
1.1	Parazitoidní vosičky.....	1
1.1.1	Endoparazitoidní vosičky	1
1.1.2	Ektoparazitoidní vosičky	2
1.2	Vosička <i>Habrobracon hebetor</i>	3
1.2.1	Druhová specifita jedu druhu <i>Habrobracon hebetor</i>	3
1.2.2	Účinky jedu druhu <i>Habrobracon hebetor</i>	3
1.3	Charakterizace jedu <i>Habrobracon hebetor</i>	4
2	CÍLE PRÁCE	7
3	MATERIÁL A METODY.....	8
3.1	Použité organismy.....	8
3.2	Příprava databází cDNA druhu <i>Habrobracon hebetor</i>	8
3.3	Analýza zhomogenizovaných jedových žláz druhu <i>Habrobracon hebetor</i>	8
3.4	Příprava rekombinantního proteinu v bakulovirovém expresním systému	9
3.4.1	Reverzní transkripce	9
3.4.2	Navržení primerů a úprava sekvence pomocí PCR.....	9
3.4.3	Klonování inzertu do vektoru pBluescript SK+	10
3.4.4	Klonování inzertu do vektoru pFastBac	11
3.4.5	Příprava bakulovirového „shuttle“ vektoru	12
3.4.6	Transfekce, příprava bakulovirových P1 a P2 zásobních roztoků.....	14
3.4.7	Infikování „High Five“ buněk P2 virovým zásobním roztokem.....	15
3.5	Příprava rekombinantního proteinu v bakteriálním expresním systému	15
3.5.1	Výběr expresního vektoru	15

3.5.2	Navržení primerů a úprava sekvence pomocí PCR.....	15
3.5.3	Klonování inzertu do vektoru pGEM-T Easy.....	16
3.5.4	Klonování inzertu do vektoru pRSET	16
3.5.5	Příprava kompetentních buněk	17
3.5.6	Transformace pRSETu do kmene BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL.....	17
3.5.7	Pilotní exprese rekombinantního proteinu.....	17
3.5.8	Exprese rekombinantního proteinu za upravených podmínek	18
3.5.9	Lýze bakteriálních buněk.....	18
3.6	Izolace rekombinantního proteinu pomocí afinitní chromatografie	19
3.7	SDS-PAGE	19
3.8	Dialýza izolátu proti 1× PBS	20
3.9	Purifikace roztoku proteinů kolonou C 18 – SEP PAK.....	20
3.10	Bradfordova reakce	21
3.11	Testování účinků rekombinantního proteinu na motýlích larvách.....	21
4	VÝSLEDKY.....	23
4.1	Výběr kandidátů toxinů.....	23
4.2	Bakulovirový expresní systém.....	24
4.2.1	Klonování	24
4.2.2	Transfekce, příprava P1 a P2 virových zásobních roztoků a výroba rekombinantního proteinu.....	25
4.2.3	Testování účinků média na larvách <i>Galleria mellonella</i>	27
4.3	Bakteriální expresní systém	28
4.3.1	Klonování	28
4.3.2	Výsledky pilotní exprese	29

4.4	Izolace rekombinantního proteinu a dialýza	31
4.5	Izolace rekombinantního proteinu a purifikace kolonou c 18 - SEP PAK	34
4.6	Testování účinků proteinu na larvách a statistické vyhodnocení.....	36
5	DISKUZE	39
5.1	Porovnání použitých expresních systémů	39
5.2	Porovnání purifikace izolátu	40
5.3	Srovnání 15% a gradientového gelu na SDS-PAGE	40
5.4	Účinnost rekombinantního proteinu	41
6	ZÁVĚR.....	43
7	SEZNAM LITERATURY	44
8	PŘÍLOHY	50
9	SEZNAM ZKRATEK	58

1 ÚVOD

1.1 Parazitoidní vosičky

Parazitoidní vosičky jsou malé organismy o velikosti cca 2 mm patřící do řádu Hymenoptera (Moreau et Asgari, 2015). Tato skupina hmyzu si vyvinula různé mechanismy, díky kterým je schopna podrobit si hostitele, a vytvořit tak vhodné podmínky pro vývoj svého potomstva. U parazitovaného hmyzu dochází většinou ke znehybnění, zastavení vývoje a následné smrti ve chvíli, kdy už není pro vývoj parazitoidea potřebný. Vosičky jsou často schopné deaktivovat imunitu hostitele a ovlivnit jeho chování (Beckage et Gelman, 2004). K tomu používají jedovou žlázu, která obsahuje směs proteinových a dalších složek. Typicky parazitují na motýlech (Lepidoptera) a dle místa kladení se dělí se do dvou skupin – ektoparazitoidní (samice klade vajíčka na povrch těla hostitele) a endoparazitoidní (vajíčka jsou nakladena dovnitř larvy). Ačkoliv byly nalezeny evolučně konzervované proteiny u obou těchto skupin, jed má pokaždé jiné složení a plní jiný účel (Moreau et Asgari, 2015).

1.1.1 Endoparazitoidní vosičky

Jed endoparazitoidních druhů většinou vůbec nezpůsobuje paralýzu (pokud ji způsobuje, pak se většinou jedná jen o krátkodobý jev), ani neblokuje vývoj hostitele. Tím, že endoparazitoidní vosičky umožňují motýlím larvám pokračovat ve vývoji, potřebují mechanismy na regulaci vývoje hostitelského druhu. Navíc tyto druhy vosiček jsou přímo vystaveny imunitním odpovědím hostitele, konkrétně enkapsulaci, což je pokrytí nakladených vajíček nebo larev vrstvami hemocytů. Enkapsulace bývá doprovázena melanizací, procesem, při kterém se kaskádou reakcí tvoří a ukládají fenolové intermediáty a melanin (Moreau et Asgari, 2015; Pennacchio et Strand, 2006).

Z těchto důvodů si endoparazitoidní vosičky vyvinuly různé mechanismy, kterým se vyhýbají aktivaci imunitní odpovědi hostitele, konkrétně se jedná například o kladení vajíček do takových tkání hostitele, ve kterých uniknou jeho pozornosti, nebo vylučování maternálních faktorů, látek napodobujících vlastní molekuly hostitele, díky kterým nevnímá nakladená vajíčka jako cizí materiál (Gatti et al., 2012).

Studie analyzující jed endoparazitoidního druhu *Pimpla turionella* odhalila, že jed obsahuje převážně proteiny s molekulovou hmotností od 20 do 106 kDa, z nichž část vykazuje enzymatickou aktivitu. Kromě toho byly v jedu nalezeny i další složky jako jsou mellitin a apamin (Uçkan et al., 2004). Mellitin je hemolytický peptid, který se vyskytuje mj. i v jedu druhu *Apis mellifera*. Toxin apamin, který je taktéž přítomný i ve včelím jedu, inhibuje iontové kanály hostitele (Messier et al., 1991; Raqhuraman et Chattopadhyay, 2007).

Zajímavostí je, že v případě endoparazitoidních vosiček se v jedu navíc často vyskytují viry nebo virům podobné částice (VLPs), které dokáží manipulovat fyziologii hostitele (Moreau et Asgari, 2015).

1.1.2 Ektoparazitoidní vosičky

Jedy ektoparazitoidních vosiček (na rozdíl od jedů endoparazitoidních druhů) způsobí většinou paralýzu a následné zastavení vývoje hostitele. Například toxiny přítomné v jedu vosičky *Philanthus triangulum* postihují centrální i periferní nervový systém, a toablokováním presynaptických i postsynaptických neuromuskulárních spojů (Piek, 1982). Druh *Eupelmus orientalis*, jehož jed vykazuje hyaluronidázovou a fosfolipidázovou aktivitu, způsobuje trvalou paralýzu a úplné zastavení vývoje hostitele, která se projevujeablokováním proteosyntézy. Zároveň ale absence rozkladu DNA svědčí o tom, že hostitel je stále živý (Periquet et al., 1997).

Hojně studovaným druhem ektoparazitoidních vosiček, kterým se zabývalo mnoho prací (Danneels et al., 2014; de Graaf et al., 2010; Rivers et al., 2006), je *Nasonia vitripennis*. Její jed se skládá převážně z aminů, peptidů a proteinů se střední nebo vyšší molekulovou hmotností (od 13 do 200 kDa). Mezi nízkomolekulární proteiny pak patří apamin a histamin. Analýza frakcí jedu, který byl podroben HPLC, naznačila, že za zastavení vývoje hostitele je zodpovědných více proteinů najednou (Rivers et al., 2006).

Zvláštností ze skupiny ektoparazitoidních vosiček je druh *Ampulex compressa*, který disponuje dvěma jedovými žihadly. První žihadlo slouží ke znehybnění přední části těla hostitele pomocíablokování postsynaptických spojů. Intoxikace druhým žihadlem u kořisti vyvolává dlouhotrvající netečnost (Libersat, 2003).

1.2 Vosička *Habrobracon hebetor*

1.2.1 Druhová specifita jedu druhu *Habrobracon hebetor*

Mezi nejznámější ektoparazitoidní vosičky patří *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) (Quistad, 1994). Tento druh parazituje nejčastěji na motýlích družích *Ephestia kuehniella*, *Plodia interpunctella*, *Ectomyelois ceratoniae* a *Galleria mellonella*, na jejichž larvy klade dospělá samice po paralýze až 20 vajíček, čímž zajistí krmení svých larev, které se dále vyvíjí na hostitelské kutikule (Borzoui et al., 2016). Paralýza zmíněných hostitelských druhů je úplná a nevratná. Zároveň se zjistilo, že na jiné motýlí druhy nemá jed žádný vliv jako je tomu například u zavíječe kukuřičného (*Pyrausta nubilalis*) nebo u dalších druhů hmyzu – japonského brouka (*Popilia japonica*) či švába *Oncopeltus fasciatus*. Taktéž byly objeveny druhy, u kterých je vliv jedu částečný, například *Archips cerasivorana*. Po napadení tohoto druhu parazitoidní vosičkou se paralýza dostavila později, než tomu bývá u typických hostitelů zmíněných výše, a navíc intoxikované larvy po zastavení pohybové aktivity stále reagovaly na mechanickou stimulaci (Beard, 1952).

1.2.2 Účinky jedu druhu *Habrobracon hebetor*

Toxické účinky jedu vosičky *Habrobracon hebetor* byly podrobně zkoumány hned v několika pracích (Beard, 1952; Kryukova et al., 2011; Kryukova et al., 2015; Sláma, 2012). Okamžitá paralýza hostitele, která může být dočasná, nebo trvalá, ukazuje na vysoký potenciál vosičkového jedu (Beard, 1952).

Práce Bearda (1952) ukázala, že se hostitelská larva zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) po bodnutí vosičkou *H. hebetor* hýbe necelou minutu na místě až dojde k úplné paralýze, po které larva nereaguje ani na hmatové podráždění, ani na elektrické stimuly. Určitý čas po nástupu celkové paralýzy jsou však viditelné nepravidelné a nekoordinované svalové fibrilace, které ale postupně vymizí. Zajímavostí je, že otrava jedem v počátečních fázích paralýzy nepostihuje srdce ani střevo. Ke zpomalení srdeční aktivity dochází až po několika dnech a smrt obvykle nastává buď v důsledku bakteriální infekce, která se vyskytne v ráně, nebo jako výsledek vysušení celého těla.

Současně bylo prokázáno, že jed vosičky *Habrobracon hebetor* mění aktivitu enzymu fenoloxidázy (PO), a to u každého hostitelského druhu jiným směrem. Na larvách organismu *Plodia interpunctella* bylo změřeno, že aktivita fenoloxidázy po bodnutí stoupá oproti

kontrole (Hartzer et al., 2005). Naopak u larev *Galleria mellonella* injikovaných vosičkovým jedem byl zaznamenán prudký pokles fenoloxidázové aktivity (PO) v hemolymfě a úbytek hemocytů s fenoloxidázovou aktivitou. První den po napadení vosičkou došlo ke snížení fenoloxidázové aktivity v hemolymfě *Galleria mellonella* na polovinu ve srovnání s kontrolou, druhý den byla pak aktivita PO třetinová oproti kontrole (Kryukova et al., 2011).

Zjistilo se také, že injikace jedu ovlivňuje melanizaci, konkrétně že u larev *Galleria mellonella* injikovaných jedem dochází k výrazně slabší melanizaci oproti kontrole (Kryukova et al., 2011). Melanizace, což je součást vrozeného imunitního systému, slouží jako obranný mechanismus při napadení patogenem nebo při poranění. Pro celý mechanismus melanizace je klíčová právě funkce enzymu fenoloxidázy, která katalyzuje sled reakcí vedoucích ke vzniku melaninu (Cerenius et Söderhäll, 2004).

Výsledky experimentů zkoumajících účinek vosičkového jedu na larvách *Galleria mellonella* tedy naznačují, že po napadení larev jedem dochází k potlačení imunity hostitele narušením fenoloxidázové kaskády a změnami v morfologii a životaschopnosti hemocytů, které se rovněž podílejí na imunitní odpovědi. Obzvlášť potlačení fenoloxidázové aktivity má pravděpodobně pro parazitující vosičky výhodu, a to proto, že fenoloxidázová kaskáda se účastní mj. v koagulaci hemolymfy a agregaci hemocytů (Kryukova et al., 2011).

S jedem vosičky *Habrobracon hebetor* jsme v naší laboratoři pracovali již dříve - používali jsme ho zejména jako prostředek paralýzy larev, u kterých byla analyzována srdeční aktivita.

1.3 Charakterizace jedu *Habrobracon hebetor*

Kromě analýz účinků jedu jako celku se vyskytly snahy blíže charakterizovat strukturu vosičkového jedu druhu *Habrobracon hebetor* včetně jeho složení. Již Beard (1952) zjistil, že jed je ve vodě rozpustný, odolný k vysušení a po opětovném rozpuštění ve vodě znovu vykazuje biologickou aktivitu. Jeho experimenty také naznačují, že jed je proteinové povahy, jelikož je teplotně labilní a po jeho vystavení teplotě 65 °Celsia dochází k jeho inaktivaci.

Při hledání konkrétních insekticidních složek jedu se však různí autoři značně rozcházejí. Spanjer et al. (1977) izolovali z jedu dva proteiny pomocí iontové chromatografie. Protein A má údajně molekulovou hmotnost 42 kDa a protein B 57 kDa a oba toxiny působí na nervosvalový přenos. Při zkoumání účinků použili druhy *Galleria mellonella* a *Apis mellifera*, přičemž se ukázalo, že *A. mellifera* je na rozdíl *G. mellonella*

více citlivá na toxin A než na toxin B. Současně upozorňují, že aktivita proteinu A tvoří jen část aktivity surového jedu.

Práce Vissera et al. (1983) indikuje, že jed obsahuje dva aktivní proteiny (A-MTX a B-MTX) s molekulovými hmotnostmi 43,7 a 56,7 kDa. Tyto proteiny byly charakterizovány ze surového jedu pomocí technik gelové chromatografie, chromatografie na iontoměničích a gelové elektroforézy. Také se ukázalo, že oba toxiny jsou rozkládány proteolytickými enzymy, ačkoliv toxin A-MTX se jeví jako stabilnější. Účinky obou proteinů stejně jako jejich složení se zdá být velmi podobné. Quistad et al. (1994) ale uvádí, že účinky obou těchto toxinů dohromady dosahují jen zhruba 2 % původní insekticidní aktivity.

Další práce (Slavnova et al., 1987) naznačuje, že v jedu byl nalezen aktivní protein s molekulovou hmotností 18 kDa, který má specifické účinky na neuromuskulární synapse (Sláma, 2012).

Quistad et al. (1994) identifikovali v jedu tři proteiny s molekulovou hmotností okolo 73 kDa, u kterých byla zároveň zjištěna částečná sekvence. Tyto tři proteiny se při použití různých izolačních technik jeví jako labilní, tudíž byla ke konečné purifikaci použita chromatografie na iontoměničích, která zároveň umožnila zachování biologické aktivity. Velikost toxinů byla zjištěna pomocí SDS-PAGE (Quistad et al., 1994). Aktivita všech tří proteinů byla testována na šesti druzích motýlích larev, přičemž dva proteiny (Brh-I a Brh-II) vykazovaly insekticidní účinky. Brh-II navíc působil biocidně na druh *Heliothis virescens*.

Kryukova et al. (2012) popisuje, že paralytické účinky jedu vosičky *Habrobracon hebetor* jsou zajišťovány minimálně třemi částečně charakterizovanými proteiny, které působí na nervovou soustavu a presynapticky blokují přenos signálů.

Publikované sekvence toxinů nalezených v jedu *Habrobracon hebetor* lze najít hned ve dvou základních patentech (Quistad et Leisy, 1996; Johnson et al., 1999).

Patent US 5554592 A (Quistad and Leisy, 1996), který navazuje na práci Quistada et al. (1994), obsahuje pět různých částečně osekvenovaných polypeptidových sekvencí (Brh-I až Brh-V). Tedy oproti práci Quistada et al. (1994) odhaluje další dva toxiny – Brh IV a Brh-V. Všechny pět polypeptidů bylo izolováno ze surového jedu jak pomocí chromatografie na iontoměničích, tak pomocí HPLC. Dle autorů patentu mají všechny zmíněné polypeptidy

paralytické a toxické účinky na hmyz (ačkoliv v publikaci Quistad et al. (1994) autoři neuvádějí, že by Brh- III vykazoval insekticidní účinky). Zároveň byly ozřejmeny částečné sekvence všech pěti polypeptidů N-terminálním sekvenováním a jejich velikosti demonstrovány použitím SDS-PAGE.

Patent US 5874298 A (Johnson et al., 1999) uvádí další sekvence toxinů, které mají neurotoxický efekt na hmyz. Obsahuje šest různých sekvencí, přičemž všechny tyto toxiny byly objeveny stejnými metodami, které popisuje Quistad et al. (1996), tzn. pomocí separačních metod, jež byly doplněny o SDS-PAGE a N-terminální sekvenování.

Existují i další patenty obsahující sekvence toxinů (například Johnson et al., 2000), které obsahují buď jen mírně modifikované (aktualizované) sekvence, nebo sekvence duplicitní.

Seznam sekvencí zmíněných v patentech je uveden v příloze VII.

2 CÍLE PRÁCE

- Příprava a charakterizace vybraného proteinu z vosičkového jedu (*Habrobracon hebetor*) v bakulovirovém expresním systému
- Příprava stejného proteinu v bakteriálním expresním systému
- Testování účinků získaného proteinu na vybraných motýlích larvách *Galleria mellonella*
- Statistické vyhodnocení paralytických účinků získaného proteinu

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité organismy

Kmen kompetentních buněk *E. coli* DH5 α

Kmen kompetentních buněk *E. coli* DH10Bac

Buněčná linie Sf9 odvozená z ovariálních buněk organismu *Spodoptera frugiperda*

Buněčná linie „High Five“ odvozená z ovariálních buněk organismu *Trichoplusia ni*

V. a VII. instar larev *Galleria mellonella*

3.2 Příprava databází cDNA druhu *Habrobracon hebetor*

Z cca 50 samičích jedových žláz byla v naší laboratoři vyizolována mRNA a reverzní transkripce přepsána do cDNA, čímž vznikla velká spousta fragmentů, na které byly přiligovány syntetické linkery. Takto vzniklé fragmenty byly na Ústavu molekulární genetiky v Praze osekvenovány a z překryvů byla poskládána celá databáze „kontigů“.

Tímto způsobem byly připraveny dvě databáze s pracovními názvy „WA“ a „TRINITY“. Databáze „WA“ byla vytvořena pyrosekvenováním (Roche 454) a databáze „TRINITY“, která je rozsáhlejší, pomocí Illumina (MiSeq) sekvenování.

3.3 Analýza zhomogenizovaných jedových žláz druhu *Habrobracon hebetor*

Surový jed byl v Laboratoři fyziologie hmyzu pomocí separačních metod (HPLC) rozdělen do několika frakcí za použití dvou různých kolon (Bio GFC a Bio PolyMA). Jednotlivé frakce byly testovány na larvách *Galleria mellonella*, a ty, které způsobovaly paralýzu, byly dále analyzovány na Ústavu chemie a biochemie PŘF JU pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF), čímž bylo nalezeno několik proteinů v každé frakci včetně jejich sekvence. Tyto sekvence byly poté anotovány pomocí homologie se známými sekvencemi v databázi Gen Bank za účelem vyloučení některých kandidátů. Ze zbylých proteinů byl nakonec vybrán jeden protein jako pravděpodobný spouštěč paralýzy, na základě identifikace dvěma nezávislými postupy. Jeho kódující sekvence identifikována

v naší databázi „kontigů“ cDNA byla následně získána reverzní transkripcí a použita pro výrobu tohoto proteinu.

3.4 Příprava rekombinantního proteinu v bakulovirovém expresním systému

3.4.1 Reverzní transkripce

RNA, která byla vyizolována z jedových žláz *Habrobracon hebetor*, byla použita pro přípravu cDNA reverzní transkripcí. Směs pro reverzní transkripci byla namíchána na 20 μ l pomocí kitu „PrimeScript RT Reagent Kit“ (Perfect Real Time) od firmy TaKaRa: 1 μ g RNA, 4 μ l pufru pro reverzní transkripci, 0,5 μ l inhibitoru RNáz, 1 μ l oligo dT primeru, 0,5 μ l reverzní transkriptázy, 1 μ l 10mM nukleotidů, 12 μ l „RNase free H₂O“.

3.4.2 Navržení primerů a úprava sekvence pomocí PCR

Dále byly na vybranou sekvenci navrženy primery, které částečně nasedaly na vybranou sekvenci cDNA a zároveň obsahovaly modifikované části na 5' koncích (Tab. 1). „Forward“ primer měl přidanou sekvenci pro restrikční místo KpnI a sekvenci Kozakové, „reverse“ primer pak sekvenci pro EcoRI a kotvičku „His-tag“, konkrétně šest histidinů za sebou, které byly potřeba k pozdější izolaci proteinu pomocí afinitní chromatografie.

Primer	Sekvence (od 5' ke 3' konci)
Fw	GGTACC GTGACC ATG AAATTCGTAATTTGCTTATCTCTG
Rv	CTTAAGAAT TACCACC ACTACCACCAC AGCTGAGCGTCCAAACCTAC

Tab. 1: Sekvence primerů použitých k modifikaci vybrané sekvence cDNA, žlutá část - restrikční místa, fialová část - sekvence Kozakové, zelená část - iniciační kodón, červená část - terminační kodón, modrá část - His-tag, černá část - sekvence nasedající na cDNA.

PCR byla použita pro úpravu obou konců vybrané sekvence.

Složení PCR reakce (50 μ l) pro úpravu sekvence bylo následující: 25,5 μ l ddH₂O, 10 μ l 5 \times „Phusion HF Reaction Buffer“ (New England BioLabs), 5 μ l templátu, 3 + 3 μ l „forward“ a „reverse“ primerů (5 μ M, Generi Biotech), 1,5 μ l DMSO (Thermo Fisher), 1 μ l 10mM dNTPs (Thermo Fisher), 0,5 μ l polymerázy Phusion (Thermo Fisher). Podmínky pro PCR jsou znázorněny v Tab. 2.

1. iniciační denaturace	94 °C	1 minuta
2. denaturace	94 °C	30 sekund
3. nasedání primerů	57 °C	30 sekund
4. extenze	72 °C	45 sekund
5. finální extenze	72 °C	5 minut
6. chlazení	16 °C	Časově neomezeno

Tab. 2: Definované podmínky pro PCR, kroky 2.-4. byly opakovány 30krát.

3.4.3 Klonování inzertu do vektoru pBluescript SK+

Ke klonování byl použit naší laboratoří připravený vektor pBluescript SK+, který byl rozštěpený restriční enzymem EcoRV na tupé konce a defosforylován.

PCR produkt byl přečištěn pomocí kitu „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche) podle návodu a poté fosforylován. Složení fosforylační směsi (100 µl) bylo následující: 88 µl DNA, 10 µl 10× reakčního pufru A for T4 polynukleotid kinázu (Thermo Fisher), 1 µl T4 polynukleotid kinázy (Thermo Fisher), 1 µl ATP.

Přečištěný a fosforylovaný PCR produkt byl od zbytku DNA z PCR reakce oddělen na gelové elektroforéze na gelu z 1% nízkotající agarózy, přičemž gel běžel zhruba 90 minut na 60 V. Proužek na gelu s inzertem byl vyříznut, rozpuštěn v 68 °C na bločku a 4× ředěn ddH₂O, aby mohl být ligován do pBluescriptu SK +.

Ligace probíhala v 16 °C přes noc a složení ligační směsi (20 µl) bylo následující: 10 µl ddH₂O, 5 µl inzertu (ve 4× ředěném nízkotající agaróze), 2 µl T4 DNA ligázy (New England BioLabs), 2µl 10× pufr pro T4 DNA ligázu (New England BioLabs).

Následovala transformace do kompetentních buněk DH5α - 10 µl ligační směsi bylo přidáno ke 100 µl rozmražených kompetentních buněk a inkubováno na ledu po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby byl proveden teplotní šok – vzorek byl ponořen do vodní lázně o teplotě 42 °C na 40 sekund a poté inkubován ještě jednu minutu na ledu. Celá směs byla poté přidána do 550 µl LB média bez antibiotik a třepána při 37 °C na 45 minut. Následně byl vzorek o celkovém objemu 660 µl rozdělen na agarové misky s konečnou koncentrací

ampicilinu 150 µg/ml, na které bylo zároveň přidáno 50 µl X-Gal pro modrobílou selekci kolonií. Příprava tekutého i tuhého LB média je popsána v příloze I.

Druhý den bylo náhodně vybráno několik bíle zbarvených kolonií a přeočkováno na nové misky. Třetí den byla u bíle narostlých kolonií ověřena přítomnost inzertu pomocí PCR. Templát pro PCR reakci byl vždy připraven odebráním části kolonie, smícháním s 50 µl ddH₂O a následným zahříváním na bločku na 95 °C po dobu pěti minut.

Směs pro PCR reakci měla následující složení: 5 µl „PPP Master mix“ (Top Bio), 3 µl ddH₂O, 3 + 3 µl „forward“ a „reverse“ primeru a 1 µl templátu. PCR produkty byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu. Jedna kolonie, u které se potvrdila přítomnost inzertu, byla nasazena do 20 ml LB média s výše zmíněnou koncentrací ampicilinu a přes noc kultivována ve 37 °C. Další den byl rekombinantní plazmid izolován ze 3 ml média pomocí kitu „High Pure Plasmid Isolation Kit“ dle návodu. Koncentrace vyizolovaného plazmidu byla určena spektrofotometricky pomocí nanodropu.

3.4.4 Klonování inzertu do vektoru pFastBac

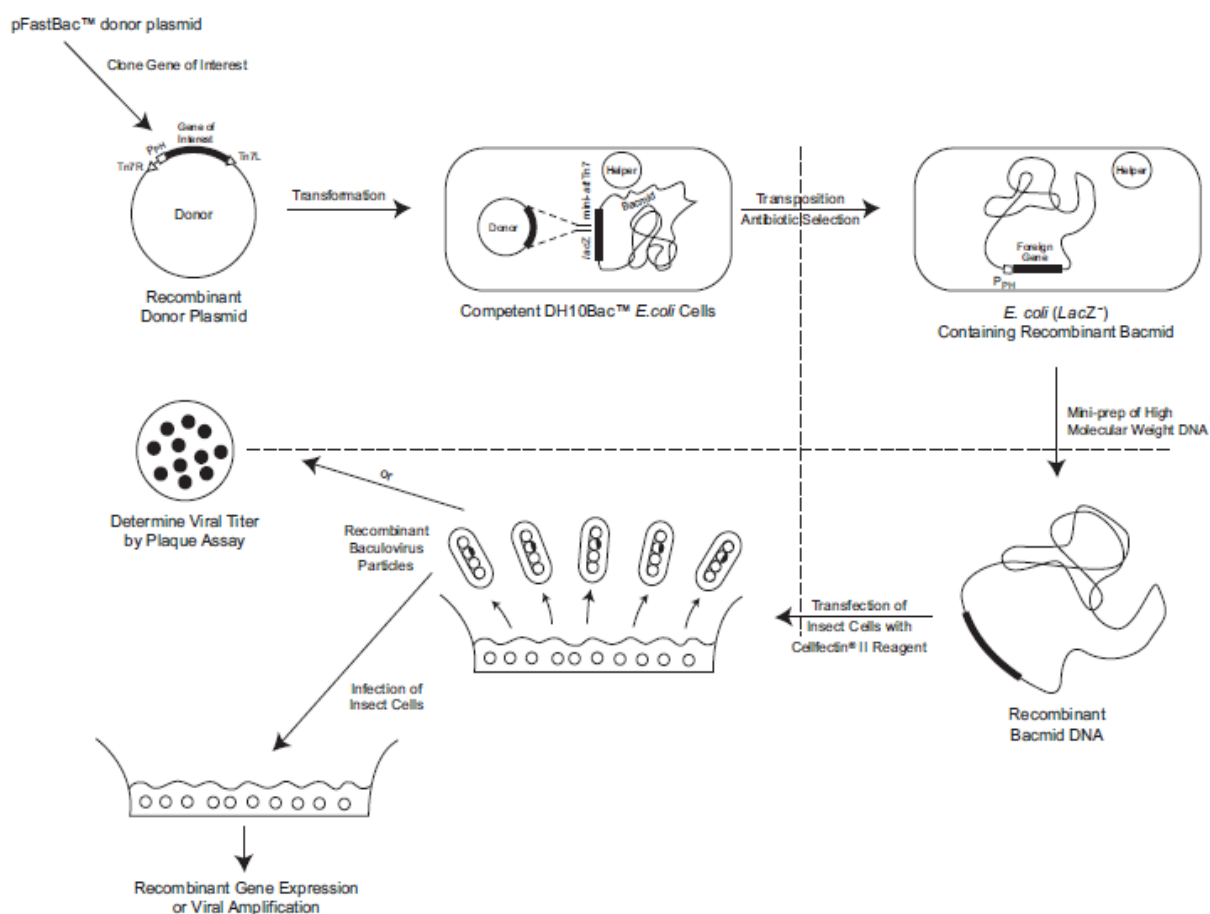
K dalšímu klonování byl použit vektor pFastBac, který byl již předem v naší laboratoři rozštěpen restrikázami KpnI a EcoRI a defosforylován.

Mezitím byl za použití těch samých restrikčních endonukleáz vyštěpen inzert z pBluescriptu SK+, přičemž oba tyto enzymy jsou rychloštěpící, tudíž štěpení bylo možné provést najednou, za 30 minut a v jednom pufru. Složení štěpící směsi (250 µl) bylo následující: 22 µg DNA, 25 µl 10× „FastDigest Buffer“ (Thermo Fisher), 10 + 10 µl restrikčních endonukleáz (KpnI a EcoRI), 119 µl ddH₂O.

Štěpený vzorek byl od vektoru opět oddělen na agaróze s nízkým bodem tání za stejných podmínek, jak je popsáno v předchozí kapitole, a část gelu obsahující inzert byla vyříznuta. Tento kousek gelu byl zahřátý na 68 °C a 4× naředěn ddH₂O. Následovala ligace inzertu do pFastBac, transformace celého vektoru do kompetentních buněk DH5α, vysévání na misky (s koncentrací ampicilinu 150 µg/ml), ověření přítomnosti inzertu, izolace a kontrolní sekvenování, kdy inzert byl osekvenován z obou stran pomocí primerů uvedených v Tab. 1. Všechny tyto kroky byly provedeny stejným způsobem a za totožných podmínek, jako je popsáno v předchozí kapitole. Jediný rozdíl spočíval v tom, že na misky nebyl použit X-Gal, protože vektor pFastBac neumožňuje modrobílou selekci.

3.4.5 Příprava bakulovirového „shuttle“ vektoru

V dalších krocích bylo postupováno podle návodu na expresi rekombinantního proteinu v bakulovirovém expresním systému dle výrobce (Thermo Fisher). Mechanismus exprese rekombinantního proteinu pomocí bakulovirového systému je znázorněn na Obr. 1.



Obr. 1: Shrnutí mechanismu přípravy rekombinantního proteinu za použití bakulovirového expresního systému (převzato z manuálu „Bac-to-Bac Baculovirus Expression System“ od firmy Thermo Fisher Scientific).

Po ověření správnosti sekvence inzertu byl vyizolovaný plasmid pFastBac transformován do kompetentních buněk *E. coli* DH10Bac, které obsahují pomocný plasmid zajišťující rekombinaci a bakulovirový „shuttle“ vektor (neboli „bakmid“, což je vektor, který může být amplifikován nejen v *E. coli*, ale také v hmyzích buňkách). K transformaci bylo použito 100 µl kompetentních buněk a 5 µl plasmidu pFastBac s koncentrací 200 pg/µl, směs byla ponechána 20 minut na ledu a poté byl proveden teplotní šok ve 42 °C na 45 sekund s následným zchlazením po dobu dvou minut na ledu. Po transformaci byly buňky třepány v 1 ml LB média čtyři hodiny ve 37 °C a poté vysety na agarové misky s přidaným

kanamycinem (50 µg/ml), gentamicinem (7 µg/ml) a tetracyklinem (10 µg/ml), barevným substrátem X-Gal (100 µg/ml) a IPTG (40 µg/ml) a inkubovány přes noc ve 37 °C. Pro zvýraznění modrobílé selekce byly misky ponechány 7 dní v chladu a poté byly bílé kolonie přeočkovány na nové misky a po kultivaci otestovány pomocí PCR (Tab. 3). Vzhledem k použitým primerům (Tab. 4), které nasedaly na sekvence v „bakmidu“, bylo možné ověřit, zda vybrané bílé kolonie nesou „bakmidovou“ sekvenci s inzertem, nebo bez něj.

1. iniciační denaturace	93 °C	3 minuty
2. denaturace	94 °C	45 sekund
3. nasedání primerů	55 °C	45 sekund
4. extenze	72 °C	5 minut
5. finální extenze	72 °C	7 minut
6. chlazení	16 °C	Časově neomezeno

Tab. 3: Definované podmínky pro ověření přítomnosti inzertu v „bakmidu“ pomocí PCR, kroky 2.-4. byly opakovány 35krát.

Primer	Sekvence
pUC/M13 Forward	5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'
pUC/M13 Reverse	5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'

Tab. 4: primery použité k ověření přítomnosti inzertu v „bakmidu“ (převzato z manuálu „Bac-to-Bac Baculovirus Expression System“ od firmy Thermo Fisher Scientific)

Pomocí kolonie, u které byla ověřena přítomnost inzertu v „bakmidu“, bylo inokulováno 100 ml LB média, které bylo třepáno přes noc ve 37 °C. Druhý den byl celý objem stočen a ze sedimentu byla provedena izolace „bakmidu“ za použití kitu „Plasmid Midi Kit“ od firmy QIAGEN. Inzert ve vyizolovaném „bakmidu“ byl zároveň osekvenován s využitím stejných primerů jako na PCR.

3.4.6 Transfekce, příprava bakulovirových P1 a P2 zásobních roztoků

Ověřený „bakmid“, který obsahoval správnou sekvenci konstruktů, byl pomocí transfekčního činidla „METAFACTENE PRO“ (Biontex) transfekován do buněčné linie Sf9. 3 µg „bakmidové“ DNA smíchané se 100 µl PBS byly přidány ke 12 µl transfekčního činidla „METAFACTENE PRO“ rozpuštěného ve stejném objemu PBS. Takto připravený vzorek byl inkubován 20 minut a poté přidán k 800 tis. Sf9 buněk ve 2 ml média TNM-FH (Sigma Aldrich) s přidáním 1,5% FBS. Po šesti hodinách bylo médium odsáto a vyměněno za čerstvé TNM-FH médium s přidáním 10% FBS a 1% antibiotiky (složení veškerých médií použitých ke kultivaci buněk je uvedeno v příloze III). Buňky byly inkubovány pět dní v inkubátoru v 27 °C a poté byly vzorky centrifugovány na 10 minut na 1 000 × g. Odebráním supernatantu vznikl P1 roztok, který obsahoval virové částice a byl dále využit k amplifikaci virového zásobního roztoku.

Nejprve byla namíchána koncentrační řada P1 zásobního bakulovirového roztoku (0,1 µl, 1 µl a 10 µl), který byl přidáván k Sf9 buňkám na 6-jamkové destičce, kdy na každé jamce bylo 800 tis. buněk ve 2 ml média. Při amplifikaci virového zásobního roztoku bylo používáno TNM-FH médium s přidáním 10% sérem a 1% antibiotiky v kombinaci s „EX-CELL 405 Serum-Free Medium for Insect Cells“ (Sigma Aldrich) v poměru 9:1. Buňky byly s P1 roztokem inkubovány ve 27 °C a po třech dnech bylo vyhodnoceno, který objem P1 roztoku z koncentrační řady je již dostačující k infikování všech buněk při multiplicitě infekce 0,1, tedy při kterém dochází ke zvětšení všech buněk. Zjištěný objem byl poté dosazen do vzorce uvedeného na Obr. 2, ze kterého byl vypočítán titr virového roztoku.

$$\text{Inoculum required (mL)} = \left(\frac{\text{MOI (pfu/cell)} \times \text{number of cells}}{\text{titer of viral stock (pfu/mL)}} \right)$$

Obr. 2: Vzorec pro výpočet titru virového zásobního roztoku (převzato z manuálu „Bac-to-Bac Baculovirus Expression System“).

Později byl tentýž vzorec použit pro výpočet objemu inokula P1 roztoku potřebného pro infikaci většího objemu (100 ml) buněk Sf9. Buňky byly inkubovány za stejných podmínek jako u přípravy P1 roztoku, pouze byla zkrácena doba inkubace na tři dny. Médium bylo odebráno a stočeno stejným způsobem. Supernatant, který byl odebrán, sloužil

jako P2 virový zásobní roztok, který má vyšší titr než roztok P1, a je potřebný pro infikování hmyzí buněčné linie „High Five“.

3.4.7 Infikování „High Five“ buněk P2 virovým zásobním roztokem

K samotné expresi rekombinantního proteinu docházelo v buňkách „High Five“, které byly infikovány P2 virovým zásobním roztokem při multiplicitě infekce 1 podle návodu dodavatele. Při expresi proteinu bylo použito pouze bezsérové médium (EX-CELL 405 Serum-Free Medium for Insect Cells). Po třech dnech inkubace v 27 °C bylo médium z buněk sklizeno a stočeno na 1 000 × g, supernatant byl odebrán a později použit k injikaci.

3.5 Příprava rekombinantního proteinu v bakteriálním expresním systému

3.5.1 Výběr expresního vektoru

Jako nejvhodnější bakteriální expresní systém byl zvolen kmen *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL (Agilent Technologies) v kombinaci s vektorem p-RSET. Tento vektor má T7 promotor pro expresi vybraného genu. Zmíněný bakteriální kmen kóduje T7 RNA polymerázu, která je reprimována, nicméně indukci lze provést jednoduše přidáním IPTG. Po přidání induktoru dochází k expresi T7 RNA polymerázy, která následně nasedá na T7 promotor, čímž je umožněna exprese vybraného genu (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/prset_man.pdf).

Zmíněný bakteriální kmen nese chloramfeniklovou rezistenci a oproti běžnému kmeni BL21 má tu výhodu, že obsahuje navíc kopie genů pro tRNA, které jsou jinak v obyčejném kmeni BL21 vzácné, a tudíž často limitují translaci. Konkrétně se jedná o geny pro tRNA rozpoznávající arginin, izoleucin, prolin a leucin (<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=484>).

3.5.2 Navržení primerů a úprava sekvence pomocí PCR

Byl navržen nový „forward“ primer, který obsahoval sekvenci pro restrikční místo NdeI a který nasedal těsně za signální sekvenci. Ta byla určena pomocí webové aplikace SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Použitý reverzní primer byl stejný jako ten, který byl využit při výrobě proteinu pomocí bakulovirového systému, tedy s přidanou sekvencí restrikčního místa EcoRI a šesti histidiny. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Tab. 5.

Primer	Sekvence (od 5' ke 3' konci)
Fw	ATCATATGGAGCGAACTCCAGATGGAACG
Rv	CTTAAGAATACCACCACTACCACCACAGCTGAGCGTCCAAACCTAC

Tab. 5: Sekvence primerů použitých k modifikaci vybrané sekvence cDNA, žlutá část - restrikční místa, fialová část – dva přidané nukleotidy pro zvýšení efektivity restrikční endonukleázy, červená část – stop kodón, modrá část – His-tag, černá část – sekvence nasedající na cDNA.

Po ověření funkčnosti primerů byl jako templát vybrán pBluescript a s použitím primerů a Taq polymerázy byla provedena PCR reakce. PCR produkt byl purifikován pomocí kitu „High Pure PCR Product Purification Kit“ a fosforylován.

3.5.3 Klonování inzertu do vektoru pGEM-T Easy

Vzhledem k použití Taq polymerázy, která tvoří „A převisy“ na 3' koncích fragmentů DNA, byl vybrán AT vektor pGEM T-Easy, který nese ampicilinovou rezistenci a stejně jako pBluescript umožňuje modrobílou selekci transformantů. Do zakoupeného linearizovaného vektoru byl vložen inzert, ligován přes noc při 4 °C a poté transformován do buněk DH5α. Pozitivní kolonie byla vyizolována a správnost inzertu byla ověřena sekvenováním s použitím primeru T7, který nasedá na sekvenci lemující MCS a jehož sekvence je uvedena v Tab. 6.

Primer	Sekvence (od 5' ke 3' konci)
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC

Tab. 6: Sekvence primeru T7, který byl použitý na sekvenování inzertu v pGem-T Easy.

3.5.4 Klonování inzertu do vektoru pRSET

Nejprve byl prázdný vektor pRSET namnožen v kompetentních buňkách (DH5α). Vyizolovaný vektor byl rozštěpen restriktázami NdeI a EcoRI.

Inzert vložený v pGem-T Easy byl vyštěpen pomocí restrikčních enzymů NdeI a EcoRI, pomocí gelové elektroforézy oddělen na nízkotající agaróze (1%) a následně byl ligován do prázdného a rozštěpeného vektoru pRSET. Po transformaci, vysetí na plotny a izolaci vektoru bylo opět provedeno kontrolní sekvenování s primerem T7, jehož sekvence je uvedena výše.

3.5.5 Příprava kompetentních buněk

Buňky *E. coli* kmene BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL, které jsou uchovávány v minus 80 °C, byly inokulovány na miskou a agarem s přidaným chloramfenikolem (35 µg/ml) a přes noc kultivován v termostatu ve 37 °C. Druhý den byla použita jedna kolonie k inokulaci 3 ml SOB média (složení je uvedeno v příloze I) s příměsí chloramfenikolu opět o stejné koncentraci a následná kultivace probíhala ve 37 °C osm hodin. Poté byl odebrán 1 ml média s bakteriemi a přidán do 200 ml růstového SOB média s příslušnou dávkou chloramfenikolu. Tato kultura byla třepána v 18 °C do doby, než bylo naměřeno OD₆₀₀ 0,6. Poté byla kultura rozdělena do kónických zkumavek po 40 ml, kde byla ponechána 10 minut na ledu a vzápětí stočena při 2 500 × g po dobu 15 minut při 4 °C. Z každé zkumavky byl odstraněn supernatant a sediment byl rozsuspendován v 13,3 ml transformačního pufru (viz příloha II). Následovala druhá, desetiminutová inkubace na ledu a poté stočení vzorků za stejných podmínek jako při první centrifugaci. Supernatanty byly odstraněny a sedimenty rozsuspendovány v transformačním pufru, tentokrát bylo použito 3,3 ml na zkumavku. Do každé zkumavky bylo přidáno ještě 250 µl DMSO kvůli následnému zamrazování. Takto připravené vzorky byly opět inkubovány 10 minut na ledu a poté byly připraveny 200µl alikvóty, které byly okamžitě zamrazeny v tekutém dusíku a následně uloženy do minus 80 °C.

3.5.6 Transformace pRSETu do kmene BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL

Transformace pRSET do tohoto bakteriálního kmene probíhala stejně jako předešlé transformace, pouze s tím rozdílem, že do média byl přidán ještě chloramfenikol (35 µg/ml), na který lze použítý kmen selektovat. Bakterie s transformovaným vektorem byly opět 45 minut třepány ve 37 °C. Poté byl celý objem (650 µl) rozdělen na agarové misky s přidaným ampicilinem (150 µg/ml) a chloramfenikolem (35 µg/ml) a vzorky byly kultivovány ve 37 °C přes noc. Druhý den byly vybrané kolonie přeočkovány a třetí den byla přítomnost inzertů v koloniích ověřena pomocí PCR a gelové elektroforézy.

3.5.7 Pilotní exprese rekombinantního proteinu

Pilotní exprese proteinu v bakteriích se provádí v menším měřítku a doporučuje se zejména pro identifikování optimálních podmínek pro pozdější exprese ve větším měřítku. Rozhodujícími faktory pro úspěšnou expresi jsou teplota, koncentrace induktoru (v tomto případě IPTG) a doba, po kterou je exprese indukována. Především teplota hraje roli při vzniku tzv. inkluzních tělísek, tedy nerozpustných agregátů tvořených cizorodými proteiny.

Právě vznik těchto tělísek obvykle znesnadňuje následnou manipulaci s rekombinantním proteinem (Rosano et Ceccarelli, 2014).

Při pilotní expresi byly všechny kroky provedeny dle návodu výrobce (pRSET manual). Jedna kolonie, která obsahovala inzert, byla vybrána a nasazena do LB média (tzv. „startovací“ kultura) se stejnou koncentrací antibiotik jako tomu bylo u agarových misek. Kultura byla kultivována přes noc a druhý den z ní bylo odebráno 10 ml na vytvoření glycerolových zásobních roztoků (ty byly připraveny smícháním 500 μ l média a 500 μ l 50% glycerolu). Zbytek média byl použit na inokulaci nového média, čímž bylo dosaženo optické hustoty (OD_{600}) 0,1. Tato nová kultura byla třepána při 200 otáčkách při 37 °C, až OD_{600} dosáhla 0,6.

Před přidáním IPTG, induktoru exprese, byl odebrán tzv. vzorek v čase t_0 , tedy vzorek před indukcí exprese rekombinantního proteinu. Následně bylo přidáno IPTG o finální koncentraci 0,3 mM a kultura byla nadále kultivována za stejných podmínek další čtyři hodiny jako dosud, přičemž každou hodinu byly odebrány alikvóty (t_1 až t_4). U vzorku t_4 tedy exprese trvala čtyři hodiny. Sedimenty ze vzorků t_0 až t_4 byly uchovávány v - 20 °C, poté byly zlyzovány pomocí lyzačního roztoku B-PER (Thermo Fisher) a analyzovány na SDS-PAGE.

3.5.8 Exprese rekombinantního proteinu za upravených podmínek

Exprese byla provedena stejným způsobem jako pilotní exprese, ale byly upraveny následující podmínky: koncentrace IPTG byla zvýšena na dvojnásobek, tedy na 0,6 mM. Čas, po který docházelo k expresi, byl prodloužen, exprese tedy celkově trvala pět hodin, a teplota pro růst kultury původně nastavena na 30 °C a teplota po přidání IPTG snížena na 25 °C. Po uplynutí pěti hodin od začátku indukce exprese byly sedimenty stočeny na 5 000 \times g na 10 minut a zamraženy na - 20 °C.

3.5.9 Lýze bakteriálních buněk

Získané sedimenty bakterií byly zváženy a poté zlyzovány pomocí lyzačního roztoku B-PER. Na 1 gram sedimentu byla přidána směs 5 ml B-PER, 10 μ l DNázy a 10 μ l lysozymu. Sedimenty byly důkladně rozsuspendovány a 15 minut inkubovány při pokojové teplotě. Následovala centrifugace na 15 000 \times g, po které došlo k oddělení rozpustných proteinů od těch nerozpustných, agregovaných do inkluzních tělísek. Supernatant tvořený rozpustnými proteiny byl odebrán za účelem izolace rekombinantního proteinu.

3.6 Izolace rekombinantního proteinu pomocí afinitní chromatografie

Protein byl izolován metodou IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography). Kolonka sloužící pro izolaci byla ekvilibrována podle návodu výrobce. 20 ml lyzátu bylo inkubováno s 30 ml vazebným pufrům a agarózou dobu po dobu dvou hodin. Poté byl lyzát přenesen na kolonku, aby postupně celý vzorek protekl přes sedimentující agarózu. Následně byla kolonka promývána a jednotlivé frakce byly měřeny na spektrofotometru při vlnové délce 280 nm, dokud nebyla absorbance menší než 0,05, přičemž hodnoty byly měřeny oproti referenčnímu vzorku (promývací pufr). Po odmytí nespecificky navázaných proteinů byl rekombinantní protein za současného měření absorbance eluován do připravených zkumavek po jednotlivých frakcích, kdy každá frakce obsahovala pět kapek. Z frakcí byly odebrány vzorky na SDS-PAGE, zbytek byl rozdělen do alikvót a zamražen v - 80 °C. Složení izolačních pufrů je k dohledání v příloze V.

3.7 SDS-PAGE

Vyizolované frakce byly jednotlivě analyzovány na polyakrylamidovém gelu (PAGE). Vzhledem k velikosti proteinu, který byl očekáván, byl nakonec použit buď zaostřovací gel v kombinaci s 15% separačním gelem, nebo zakoupený gradientový gel (4-20%) od firmy BIO-RAD.

Příprava separačního gelu (15%): v kádince bylo smícháno 3,75 ml dH₂O, 3,75 ml separačního pufru a 7,5 ml předem namíchaného roztoku akrylamidu a bis akrylamidu v poměru 29:1. Vzorek byl přivedením k varu zbaven vzduchových bublin a po zchlazení bylo přidáno 11,25 μl Temedu a 112 μl 10% APS. Vzorek byl přenesen do formy na SDS-PAGE a překryt isopropanolem, který byl zhruba po 15 minutách odstraněn.

Příprava zaostřovacího gelu: do kádinky bylo přidáno 4,5 ml dH₂O, 1,88 ml separačního pufru a 1,05 ml předem namíchaného roztoku akrylamidu a bis akrylamidu v poměru 29:1. Namíchaný roztok byl opět přiveden k varu, aby byl zbaven vzduchu, a ihned zchlazen na ledu. Poté bylo do roztoku přidáno 10 μl Temedu a 30 μl 10% APS, čímž došlo k polymeraci a vzorek byl ihned přenesen do formy na SDS-PAGE.

Vzorky, které byly nanášeny na gel, byly nejprve smíchány s nanášecím pufrům (6×) a zahřívány na bločku na 95 °C po dobu pěti minut, čímž se docílilo jejich denaturace. Do

jamek bylo, pokud není uvedeno jinak, nanášeno 20 µl vzorku. Pro zjištění orientační velikosti proužků bylo na každý gel použito 5 µl 10-250 kDa standardu molekulových hmotností (Thermo Fisher).

15% gel byl puštěn v 1× separačním pufru na 60 minut na 60 V a poté na 150 minut na 100 V, zatímco gradientový gel na cca 40 minut na 90 V a poté na 50 minut na 150 V. Polyakrylamidové gely byly obarveny v „Coomassie blue“ na třepačce přes noc a druhý den odbarvovány po dobu zhruba tři hodin v odbarvovacím roztoku opět za stálého třepání.

Složení zaostřovacího, separačního, nanášecího pufru a pufru, ve kterém byl gel umístěn, stejně jako složení barvicího a odbarvovacího roztoku je uvedeno v příloze VI.

3.8 Dialýza izolátu proti 1× PBS

Vybrané frakce s absorbcí nad 0,1 byly smíchány a zdialyzovány oproti 1× koncentrovanému PBS (složení je uvedeno v příloze IV) za účelem odstranění solí, především imidazolu, jenž se nachází v elučním pufru, a tudíž by interferoval s testováním rekombinantního proteinu na živých organismech (Megaw et al., 2015). Dialýza byla prováděna při 4° C v dialyzační membráně (SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 3.5K MWCO) dle návodu. Dialyzační roztok byl mezitím několikrát vyměňován.

Současně byl dialyzován i samotný eluční pufr, který měl v následujících krocích sloužit jako kontrola toho, že se všechny imidazol zdialyzoval a že injekce samotným elučním pufrem nemá vliv na testované organismy.

3.9 Purifikace roztoku proteinů kolonou C 18 – SEP PAK

Vybrané vyizolované frakce, ve kterých byla potvrzena přítomnost proteinu s velikostí větší než 10 kDa, byly purifikovány na koloně C 18 – SEP PAK. Kolona byla použita dle návodu – nejprve byla aktivována 10 ml roztokem B (tj. 60% CH₃CH a 0,1% trifluoroctová kyselina) a poté promývána 10 ml roztokem A (tj. 0,11% trifluoroctová). Smíchané frakce byly dvakrát promyty kolonou a poté byla kolona 10 ml roztoku A za účelem odmytí všech nespecificky navázaných látek. Nakonec následovalo ještě jedno promytí kolony, při kterém byl vzorek jímán a sloužil jako negativní kontrola. Zachycené proteiny na koloně byly následně eluovány roztokem B a na konci eluce bylo použito ještě 5 ml samotného acetonitrilu (CH₃CH). Eluovaný vzorek byl společně s negativní kontrolou odpařen na

„Speed-vac“ a poté byly oba vzorky rozpuštěny v PBS. Přítomnost přečištěného proteinu byla otestována na SDS-PAGE a koncentrace změřena pomocí Bradfordovy reakce.

3.10 Bradfordova reakce

Koncentrace vyizolovaného proteinu byla měřena pomocí Bradfordovy reakce podle návodu firmy BIO RAD.

Měření bylo prováděno na 96-jamkové destičce a jako proteinový pufr byl použitý 10× ředěný roztok PBS. Vzorek 10× ředěného proteinu o objemu 150 µl byl porovnáván se stejnými objemy ředící řady standardu, tj. BSA. Počáteční koncentrace standardu byla zvolena 0,1 mg/ml a poté v každém kroku dvakrát ředěna až na poslední koncentraci 0,000782 mg/ml. Tato ředící řada byla provedena ve třech opakováních. Do všech jamek bylo přidáno 150 µl Bradfordova činidla (BIO-RAD) a následně byla při vlnové délce 595 nm změřena absorbance všech vzorků na destičce.

Později byly vypočítány průměry naměřených absorbancí ze všech opakování ředící řady BSA a zaneseny do grafu. Díky získaným bodům vznikla standardní křivka ředění. Křivkou byla proložena přímka, která vyjadřuje závislost absorbance na koncentraci proteinu. Ze získané rovnice přímky byla vypočítána koncentrace rekombinantního proteinu odečtem z jeho naměřené absorbance.

3.11 Testování účinků rekombinantního proteinu na motýlích larvách

Účinky rekombinantního proteinu byly testovány dvěma způsoby: nejdříve bylo testováno médium z kultivace buněk „High Five“, které byly použity k bakulovirové expresi, a poté byl testován i samotný purifikovaný rekombinantní protein získaný z bakteriálního expresního systému.

Z chovu druhu *Galleria mellonella* byly vybrány ty larvy, které se nacházely v V., resp. VII. instaru a nevykazovaly žádné známky snížené aktivity nebo změněné melanizace. Larvy byly potřeny 70% ethanolem, aby se minimalizovalo riziko infekce, a vzápětí jim byl jednorázovou inzulinovou stříkačkou vpraven příslušný roztok.

Nejprve bylo otestováno médium z buněk „High Five“ použitých k expresi proteinu. Jako negativní kontrola bylo použito médium z buněk „High Five“, které byly kultivovány za stejných podmínek, ale nebyly nakaženy P2 virovým zásobním roztokem, tudíž nedocházelo k expresi rekombinantního proteinu. Aby mohl být účinek rekombinantního

proteinu srovnán s přírodním jedem, byl jako pozitivní kontrola použit právě 10× ředěný surový jed vosičky *Habrobracon hebetor*.

Surový jed byl v naší laboratoři připraven z 10 vypitvaných žláz, které byly zhomogenizovány, rozpuštěny v Ringerově roztoku a poté stočeny na 10 minut na 2 tis. × g. Supernatant byl odebrán a doplněn na Ringerovým roztokem na objem 500 µl. K samotné injikaci byl použit takto připravený přírodní jed, který byl 10× naředěn pomocí Ringerova roztoku.

Na otestování bylo celkově použito 21 larev v VII. instaru: sedm larev pro otestování média s exprimovaným proteinem, sedm pro ověření negativní kontroly a sedm pro otestování surového jedu. Do každé larvy bylo injikováno 20 µl a pohyblivost larev byla po injikaci vyhodnocena.

Vyizolovaný a purifikovaný protein z bakteriálního expresního systému byl testován na larvách V. instaru larev *Galleria mellonella*. Vzhledem k velikosti larev bylo použito jen 15 µl příslušného roztoku. Celkově bylo na otestování a statistické vyhodnocení použito 60 larev, které byly rozděleny do čtyř skupin. První skupině byl injikován 10× ředěný vosičkový jed, druhé rekombinantní protein, třetí BSA a čtvrté negativní kontrola získaná z promývání během purifikace proteinu. Injikace BSA sloužila jako kontrola, že jiný protein nemá na larvy žádný efekt a že neovlivňuje jejich pohyblivost.

Pohyblivost injikovaných larev byla zdokumentována po 20-40 minutách od injikace pomocí video analýzy. Larvy byly umístěny na 12-jamkové misky (vždy jedna larva do jedné jamky) a byla natočena 2-minutová videa. Poté bylo provedeno vyhodnocení videozáznamů pomocí softwaru „Activity detector“ (copyright: Ing. Michal Šerý, Ph.D.), který na základě obrazu zaznamenává změnu pixelů za sekundu, z čehož lze získat údaje o aktivitě testovaných larev.

Ke statistickému vyhodnocení byl použit Kruskal-Wallis test (neparametrická verze analýzy variance (ANOVA)).

4 VÝSLEDKY

4.1 Výběr kandidátů toxinů

Během HPLC provedené v Laboratoři fyziologie hmyzu byly v surovém jedu s použitím první kolony, Bio GFC, nalezeny dvě aktivní frakce (číslo 1 a 2), které působily na injikovaný hmyz paralyticky. Pomocí druhé kolony Bio PolyMA byly nalezeny také dvě aktivní frakce (číslo 9 a 10). Během následující analýzy frakcí na Ústavu chemie a biochemie PřF JU pomocí hmotnostní spektrometrie a následného hledání fragmentů v transkriptomu bylo nalezeno v každé frakci několik proteinů a zároveň byla určena sekvence aminokyselin.

Z těchto proteinů jsme pak vybírali kandidáty pro další výzkum. Sekvence byly nejprve na základě podobnosti se známými proteiny anotovány v databázi Gen Bank za účelem předběžné charakterizace, přičemž homologické sekvence pro většinu proteinů byly v databázi nalezeny. Očekávalo se, že hledaný toxin, popřípadě toxiny, nebudou databází rozpoznávány, jelikož se jedná zřejmě o velmi specifické sekvence, které doposud nebyly do Gen Banku zaneseny. Dále se předpokládalo, že se bude jednat o proteiny se signální sekvencí, jelikož by toxiny měly být sekretovány ven z buněk do jedové žlázy.

Celkově bylo nalezeno několik proteinů, které nebyly rozpoznány databází Gen Bank, z nichž jeden byl nalezen v aktivních frakcích víckrát (na koloně GFC ve frakci číslo 1 a na koloně Bio PolyMA ve frakci číslo 9) a měl signální sekvenci. Tento protein byl zároveň dříve nalezen Quistadem et al. (1994) jako možný kandidát toxického peptidu a jeho částečná sekvence N-konce byla uvedena v patentu. Byl tedy považován za nejsilnějšího kandidáta a očekávali jsme, že právě on je zodpovědný za paralýzu hmyzu.

Úplná sekvence tohoto proteinu s velikostí 11,1 kDa (Obr. 3), která byla poté nalezena v našem transkriptomu, mohla být použita pro výrobu rekombinantního proteinu.

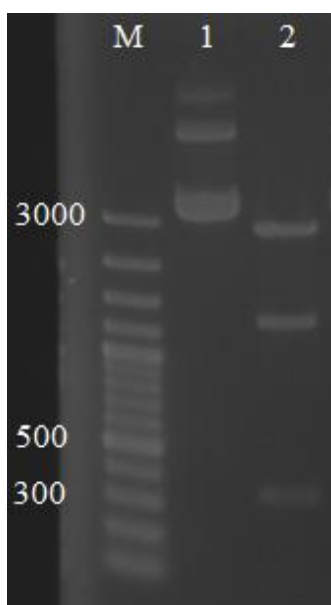
Sekvence je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přf JČU.
--

Obr. 3: Sekvence aminokyselin v nalezeném proteinu.

4.2 Bakulovirový expresní systém

4.2.1 Klonování

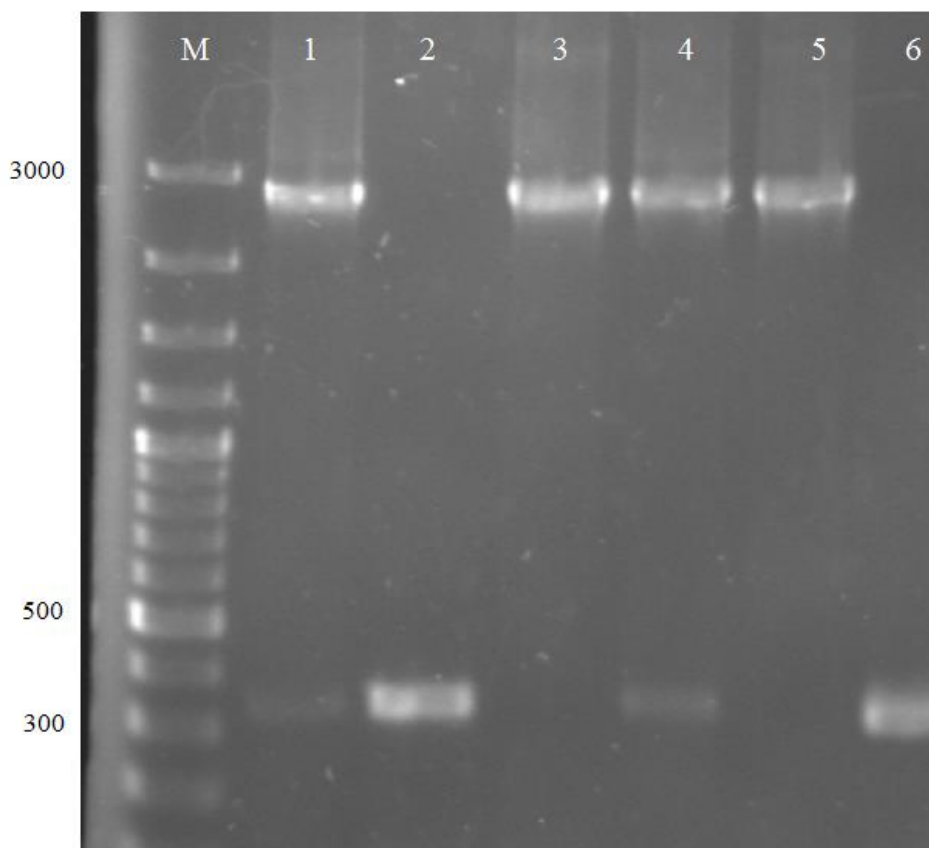
Reverzní transkripcí s využitím oligo(dT) primeru vznikla cDNA, která byla použita jako templát pro PCR reakci, díky které vznikl PCR produkt v podobě inzertu ohraničeného restrikčními místy KpnI a EcoRI. Přečištěný a fosforylovaný PCR produkt byl ligován do předem rozštěpeného a defosforylovaného vektoru pBluescript. Ligační směs byla transformována do kompetentních buněk DH5 α a následně bylo médium s buňkami rozetřeno na agarové misky s ampicilinem a barevným substrátem X-Gal. Bílé kolonie byly otestovány na přítomnost inzertu pomocí PCR a jedna pozitivní kolonie byla použita na izolaci rekombinantního plazmidu. Celkově bylo vyizolováno 22,8 μ g DNA, z čehož část byla poté použita na kontrolní štěpení plazmidu (Obr. 4).



Obr. 4: Ověření správnosti vyštěpení inzertu z vektoru rekombinantního plazmidu pomocí restrikčních enzymů KpnI a EcoRI. M – marker, 1 – rekombinantní plazmid, 2 – štěpený rekombinantní plazmid pBluescript pomocí KpnI a EcoRI.

Zkušební štěpení se ukázalo jako efektivní, tudíž byla provedena štěpící reakce do 250 μ l a produkty byly odděleny na nízkotající agaróze pomocí gelové elektroforézy. Inzert byl vyříznut, zahřát na bločku a 4 \times zředěn, aby mohla být provedena ligace do vektoru pFastBac rozštěpeného KpnI a EcoRI. Po transformaci a klonování inzertu ve vektoru pFastBac byl vektor izolován z jedné verifikované kolonie. Sekvenování ověřilo bezchybnost získaného inzertu.

Úspěšnost rekombinace v kompetentních buňkách DH10Bac byla ověřena PCR reakcí s použitím primerů pUC/M13 „forward“ a pUC/M13 „reverse“ (Obr. 5). Amplifikované sekvence byly odděleny na gelové elektroforéze. Samotná bakulovirová sekvence bez rekombinace je dlouhá přibližně 300 bp, zato sekvence po rekombinaci je 2 300 bp, navýšená ještě o velikost inzertu. Velikost PCR produktu by tedy měla být o něco větší než 2 600 bp.



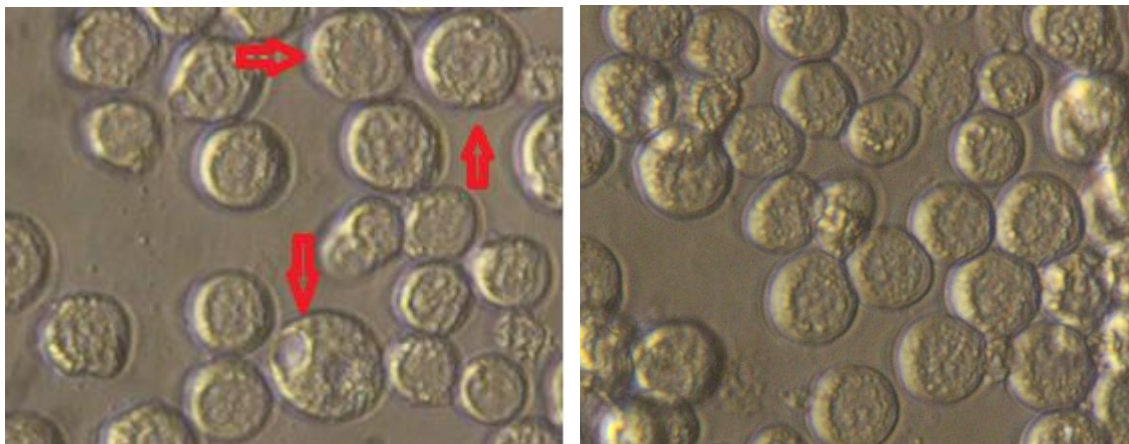
Obr. 5: Ověření úspěšnosti rekombinace v kompetentních buňkách DH10Bac. M – marker, 1-5 – testované kolonie, 6 - negativní kontrola (vyizolovaný „bakmid“ z kompetentních buněk DH10Bac, do kterých nebyl transformován pFastBac s inzertem). Pozitivní jsou kolonie 3 a 5.

Pozitivní kolonie byla vyizolována a sekvenování potvrdilo bezchybnost sekvence inzertu.

4.2.2 Transfekce, příprava P1 a P2 virových zásobních roztoků a výroba rekombinantního proteinu

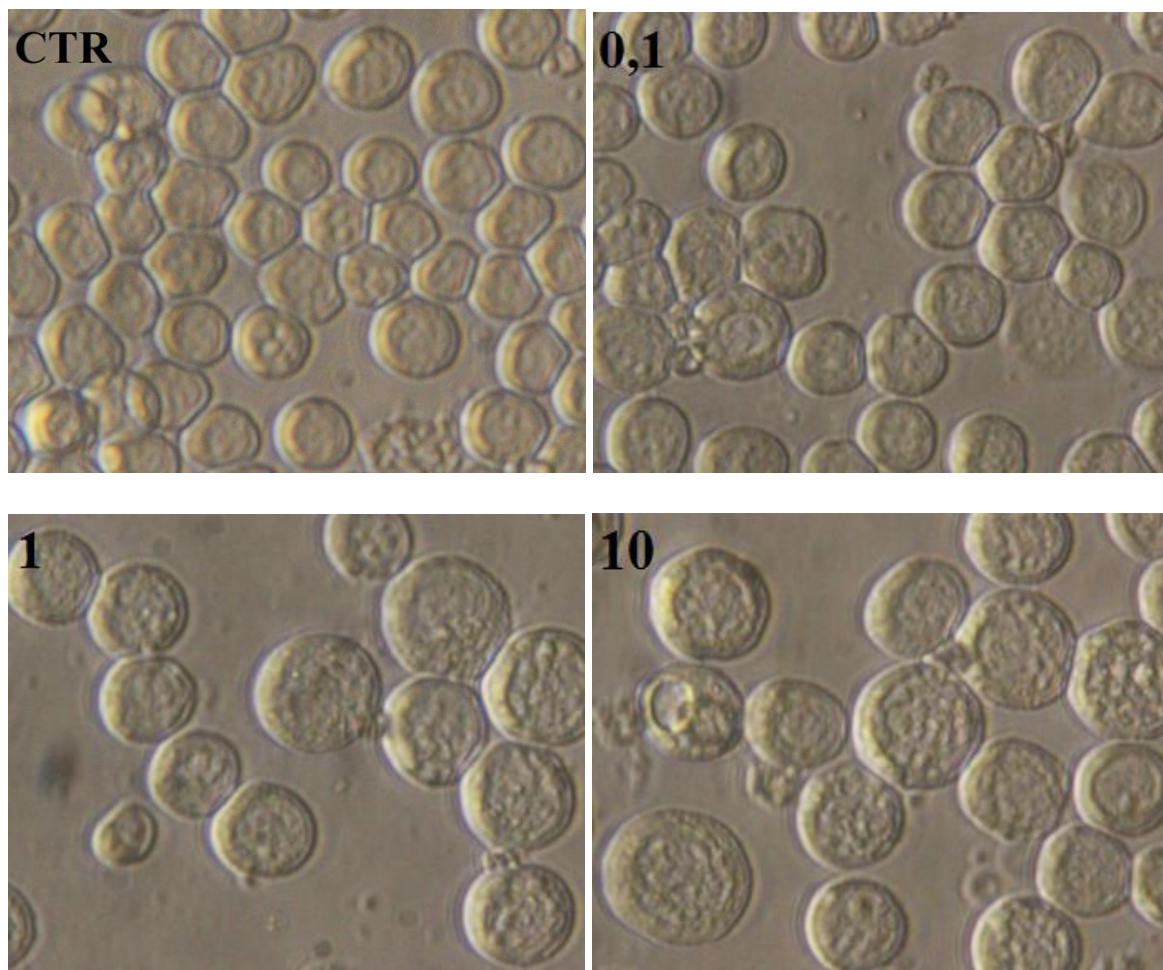
P1 virový zásobní roztok byl získán oddělením supernatantu od buněk pět dní po provedené transfekci. Protože se infekce projevuje zvětšením buněk, které se navíc přestávají množit, tak kvůli vyhodnocení účinnosti transfekce byly současně jako kontrola

kultivovány i Sf9 buňky, které nebyly transfekovány, tudíž by nemělo docházet k jejich zvětšování (Obr. 6).



Obr. 6: Červenou šipkou označené zvětšené infikované buňky vyfotografované 5. den po transfekci (vlevo), netransfekované buňky sloužící jako negativní kontrola (vpravo). Zvětšeno 200×.

Pro zvýšení titru virových částic byl vytvořen ještě P2 virový zásobní roztok. Sf9 buňky byly infikovány koncentrační řadou P1 zásobního roztoku za účelem titrace. K 800 tis. buněk bylo přidáno 0,1 μ l, 1 μ l a 10 μ l P1 roztoku. Buňky byly každý den sledovány a fotografovány a třetí den od transfekce byla dle jejich velikosti odhadnuta minimální koncentrace P1 roztoku, při které ještě dochází k infekci (Obr. 7). Bylo zjištěno, že nejnižší koncentrace P1 roztoku vyvolávající infekci při multiplicitě infekce 0,1 je 0,1 μ l. Tento objem byl dosazen do vzorce pro výpočet titru virového zásobního roztoku, který je uveden v metodice, a bylo spočítáno, že titr P1 roztoku činí 8×10^6 virových částic/ml.



Obr. 7: Porovnání jednotlivých koncentrací P1 virového zásobního roztoku použitých při výrobě P2 zásobního roztoku. CTR označuje negativní kontrolu, ke které nebyl přidán P1 roztok. Čísla (0,1, 1 a 10) označují objemy P1 roztoku v mikrolitrech, který byl přidán k SF9 buňkám. Zvětšeno 200×.

K expresi rekombinantního proteinu byla použita hmyzí buněčná linie „High Five“, která byla infikována P2 roztokem při multiplicitě infekce 1. Exprese probíhala v 10 ml média.

4.2.3 Testování účinků média na larvách *Galleria mellonella*

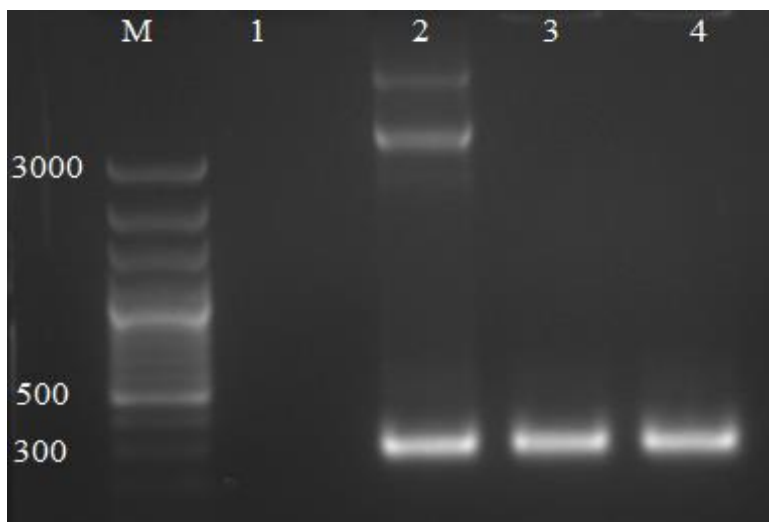
Pro funkční analýzu izolovaného proteinu bylo celkově vybráno 21 larev VII. instaru, které byly rozděleny do tří skupin po sedmi jedincích. První skupině bylo injikováno médium z „High Five“, ve kterých nedocházelo k expresi rekombinantního proteinu. Druhé skupině bylo injikováno médium sklizené z buněk, ve kterých k expresi docházelo, a třetí skupině byl injikován 10× ředěný vosičkový jed druhu *Habrobracon hebetor*. Všech sedm larev, do kterých bylo injikováno médium bez exprimovaného proteinu, se po injikaci

hýbalo. Naproti tomu všech sedm larev injikovaných jedem vosičky *Habrobracon hebetor*, bylo paralyzováno. Výrazně snížená hybnost byla také prokázána u čtyř ze sedmi larev injikovaných médiem s exprimovaným proteinem, účinnost byla tedy více než 50%. Tím jsme dokázali, že kandidátský protein je schopen způsobovat paralýzu larev. Protože výtěžky proteinu z bakulovirového expresního systému jsou nízké, rozhodli jsme se vyrobit protein v bakteriích.

4.3 Bakteriální expresní systém

4.3.1 Klonování

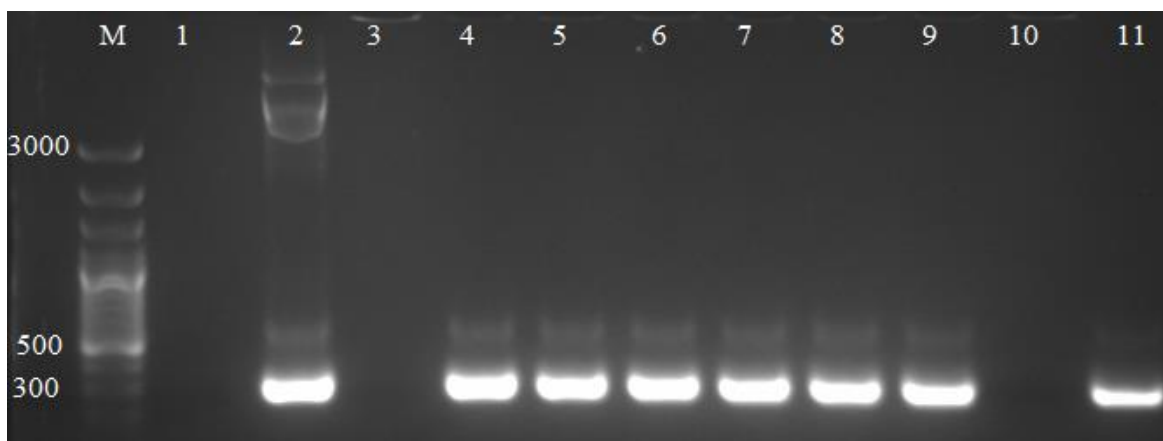
Přečištěný a fosforylovaný PCR produkt bez signálního peptidu byl ligován do linearizovaného vektoru pGEM-T Easy. Po transformaci vektoru do DH5 α byla transformační směs rozetřena na agarové misky s ampicilinem a narostlé bílé kolonie byly otestovány pomocí PCR kvůli ověření přítomnosti inzertu (Obr. 8).



Obr. 8: Ověření přítomnosti inzertu v rekombinantním plazmidu pGEM-T Easy. M – marker, 1 - negativní kontrola (PCR reakce bez templátu), 2- pozitivní kontrola (amplifikace inzertu v pBluescriptu), 3-4 – testované kolonie. Obě testované kolonie se ukázaly jako pozitivní.

Rekombinantní plazmidy z obou kolonií byly vyizolovány pomocí kitu „High Pure Plasmid Isolation Kit“ a poslány na osekvenování za použití primeru T7. Vzhledem k tomu, že obě sekvence byly v pořádku, izoláty byly smíchány, tudíž celkový výtěžek byl 14,2 μ g DNA. 8,6 μ g vektoru bylo rozštěpeno restrikcí enzymy NdeI a EcoRI a fragmenty byly odděleny na nízkotající agaróze. Část gelu s inzertem byla vyříznuta, zahřáta na bločku na

68 °C, 4× naředěna a ligována do expresního vektoru pRSETu štěpného stejnými restriktázami. Po transformaci a vysetí bakteriálních buněk na ampicilinové misky bylo otestováno 9 kolonií (Obr. 9).



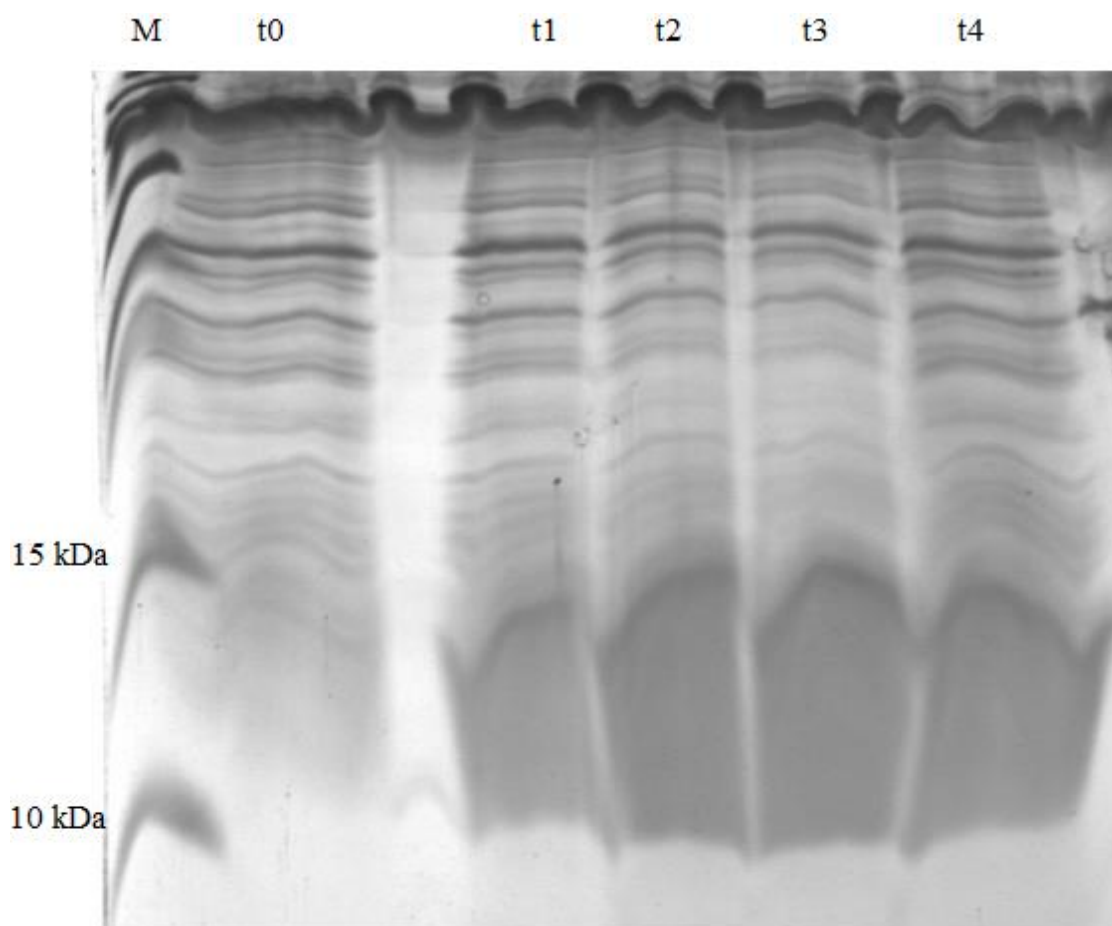
Obr. 9: Ověření přítomnosti inzertu v rekombinantním plazmidu pRSET v jednotlivých koloniích. M – marker, 1 – negativní kontrola (PCR reakce bez templátu), 2 - pozitivní kontrola (amplifikace inzertu v pBluescriptu), 3-11 – testované kolonie. Kolonie 4.-9. a 11. jsou pozitivní.

Pozitivní kolonie č. 1 byla vybrána pro izolaci vektoru a celkově bylo vyizolováno 10,8 µg DNA. Část vzorku byla odebrána a poslána na osekvenování pomocí primeru T7. Výsledky potvrdily, že sekvence amplifikovaného inzertu je správná, tudíž byla provedena transformace vektoru do předem připravených kompetentních buněk *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL. Médium s těmito kompetentními buňkami bylo vyseto na agarové misky s přidaným ampicilinem a chloramfenikolem a druhý den byla přítomnost inzertu v rekombinantním plazmidu prokázána pomocí PCR a gelové elektroforózy. Jedna pozitivní kolonie byla vybrána k expresi a také z ní byly po nasazení do LB média připraveny 50% glycerolové zásobní roztoky pro další exprese.

4.3.2 Výsledky pilotní exprese

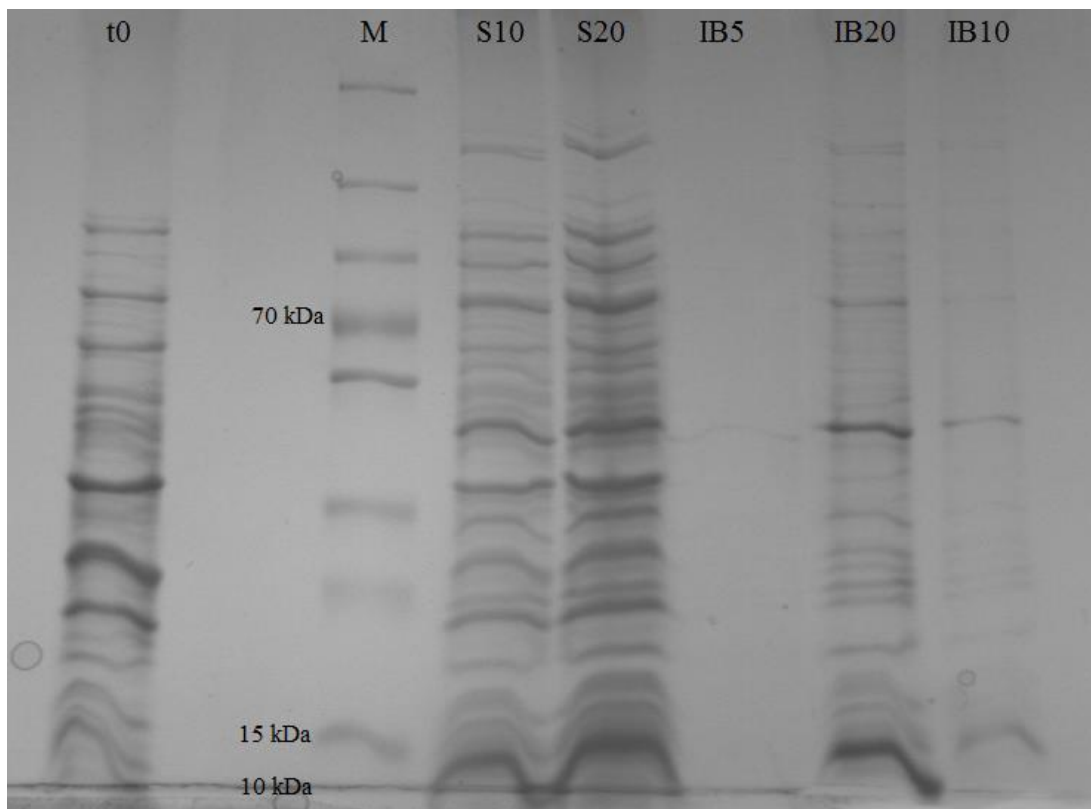
Pilotní exprese rekombinantního proteinu byla provedena za následujících podmínek: indukce pomocí 0,3mM IPTG, teplota při expresi 37 °C a trvání exprese jedna až čtyři hodiny, 1ml alikvóty média s bakteriemi byly tedy odebírány po jedné až čtyřech hodinách, stočeny, a sedimenty uchovávány v -20 °C. Zároveň byla odebrána i alikvóta před započítím indukce, vzorek byl označen jako t_0 . Všechny sedimenty vzorků t_0 až t_4 byly zlyzovány pomocí lyzačního pufru B-PER. Po následné inkubaci a centrifugaci došlo k oddělení

rozpuštěných proteinů nacházejících se v supernatantu a nerozpuštěných proteinů v sedimentu inkluzních tělísek, přičemž poměr supernatantu a tělísek byl zhruba 1:1 (kromě vzorku t_0 – zde se inkluzní tělíska nenacházela). K ověření přítomnosti rekombinantního proteinu v supernatantu vzorků t_0 až t_4 byl použitý 15% SDS-PAGE (Obr. 10).



Obr. 10: 15% SDS-PAGE, ověření přítomnosti rekombinantního proteinu po jednotlivých hodinách od indukce exprese (t_1 až t_4). M – marker, t_0 - negativní kontrola, u které nebyla indukována exprese, t_1 až t_4 – supernatanty vzorků, ve kterých byla indukována exprese po dobu jedné až čtyř hodin. Ve vzorcích t_1 až t_4 jsou vidět velmi výrazné proužky, jejichž velikost odpovídá 10kDa až 15kDa pruhům markeru. Naopak v negativní kontrole se žádný takový proužek nevyskytuje.

Zároveň bylo na SDS-PAGE porovnáváno množství vyrobeného proteinu v inkluzních tělískách a v supernatantu vzorku t_4 (Obr. 11). Inkluzní tělíska byla nejdříve zdenaturována v roztoku 8M močoviny, 10mM Trisu a 100mM NaH_2PO_4 . Na gel bylo přeneseno 5, 10, respektive 20 μl vzorku na jamku. Supernatantu bylo použito 10, respektive 20 μl na jamku. Jako negativní kontrola byl použit zlyzovaný sediment ze vzorku t_0 , tedy ze vzorku, ve kterém nebyla spuštěna exprese, tudíž nedocházelo k tvorbě rekombinantního proteinu.



Obr. 11: Gradientový gel (4-20%) testující přítomnost rekombinantního proteinu v supernatantu a inkluzních tělíčkách ve vzorku t_4 . T_0 - negativní kontrola, ve které nebyla indukována exprese, M – marker, S – supernatant ze vzorku t_4 , IB – inkluzní tělíčka ze vzorku t_4 , čísla značí počty mikrolitrů. Ve vzorcích t_4 s 10 μ l a 20 μ l supernatantu a 20 μ l inkluzních tělísek lze zpozorovat poměrně výrazné proužky, které naopak nejsou viditelné v negativní kontrole, tedy ve vzorku t_0 bez indukce exprese.

Analýza vzorků z pilotní exprese pomocí SDS-PAGE tedy ukázala, že opravdu dochází k produkci proteinu s velikostí o něco málo větší než 10 kDa. Zároveň nejvýraznější proužek byl nalezen u vzorku, ve kterém probíhala exprese nejdéle, tj. čtyři hodiny. Viditelné proužky se vyskytují i ve vzorku s inkluzními tělísky. Vzhledem k tomu, že jsou ale inkluzní tělíčka obtížně zpracovatelná při izolaci rekombinantního proteinu, byla u další exprese snížena teplota, jak bylo navrženo v návodu výrobce. Teplota byla upravena na 30 °C před indukcí a na 25 °C po indukci. V rámci ještě vyšších výtěžků proteinu bylo dále přidáváno 0,6mM IPTG místo 0,3mM a doba exprese byla prodloužena na pět hodin.

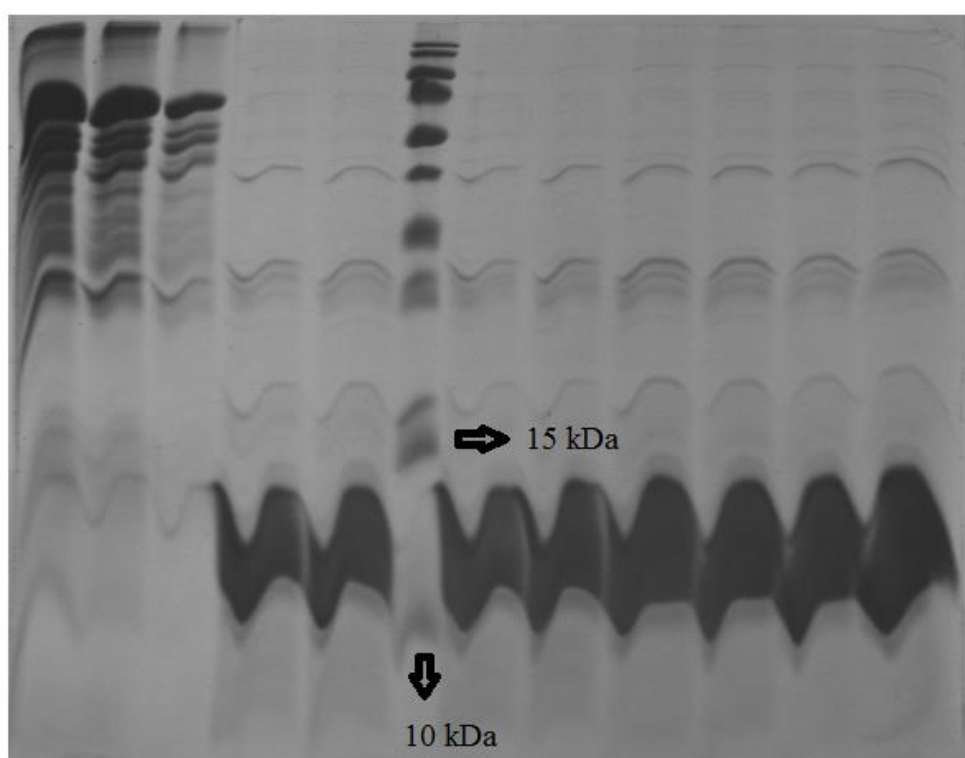
4.4 Izolace rekombinantního proteinu a dialýza

Při první purifikaci bylo vyzolováno 57 frakcí o pěti kapkách, přičemž hodnoty absorbance naměřené při vlnové délce 280 nm se pohybovaly od -0,17 do 0,88. Záporné

hodnoty byly naměřeny u počátečních frakcí, jelikož při na začátku eluce standardně dochází k vymývání promývacího pufru z kolonky, a ten má nižší absorbanci než pufr eluční, oproti kterému je absorbance vzorků měřena. Z vybraných frakcí byly odebrány vzorky na SDS-PAGE.

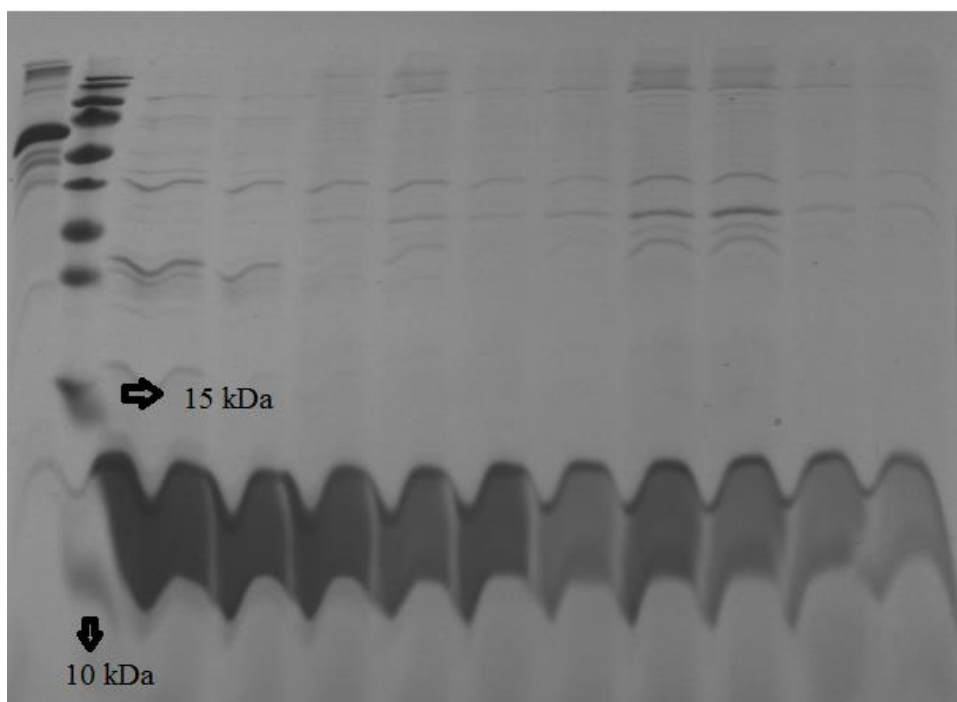
V rámci otestování frakcí vzniklých po purifikaci proteinu byly vyhotoveny dvě 15% SDS-PAGE (Obr. 12 a 13). Jako standard bylo použito BSA o absorbanci 0,6, 0,3 a 0,1. Očekávaná velikost rekombinantního proteinu by měla být 11,1 kDa.

BSA	BSA	BSA	7	8	M	9	10	11	12	13	14
0,6	0,3	0,1	0,07	0,12		0,12	0,13	0,13	0,13	0,13	0,12



Obr. 12: První 15% SDS-PAGE z frakcí získaných izolací rekombinantního proteinu. BSA – standard (pozitivní kontrola), M – marker, 7-14 – čísla testovaných frakcí. Spodní řada čísel značí naměřené absorbance. Ukázalo se, že všechny testované frakce vytvořily velmi výrazné proužky s velikostí o něco větší než 10 kDa. Naopak ve vzorku standardu (BSA) žádné takové proužky viditelné nejsou.

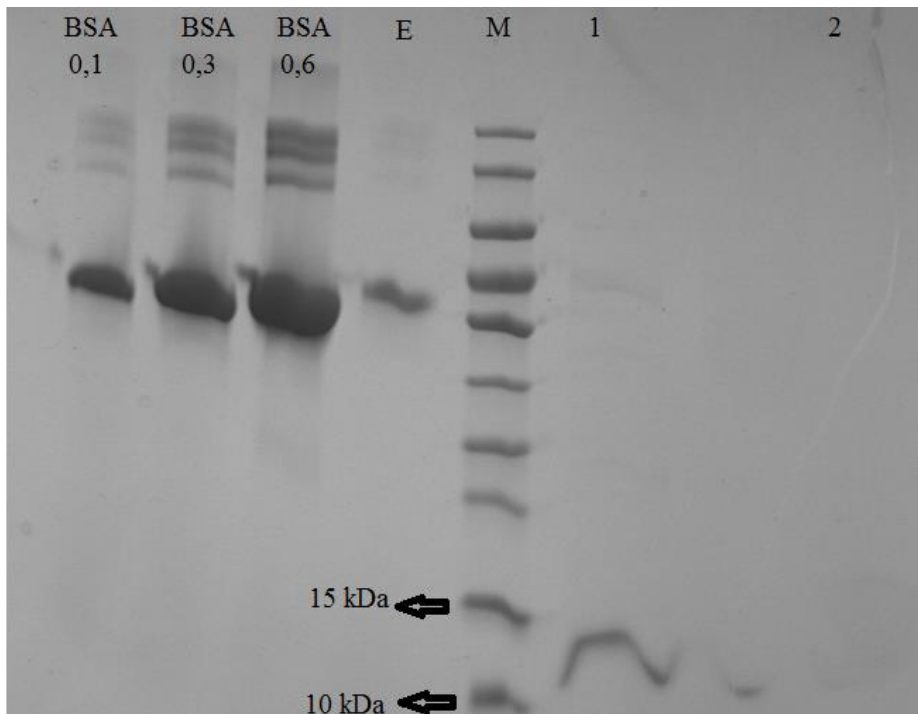
BSA	M	15	16	21	26	30	35	41	45	48	51
0,1		0,12	0,11	0,35	0,52	0,21	0,31	0,64	0,70	0,25	0,19



Obr. 13: Druhá 15% SDS-PAGE z frakcí získaných izolací rekombinantního proteinu. BSA – standard (pozitivní kontrola), M – marker, 15-51 – čísla testovaných frakcí. Spodní řada čísel značí naměřené absorbance. Ukázalo se, že všechny testované frakce vytvořily velmi výrazné proužky s velikostí o něco větší než 10 kDa. Naopak ve vzorku standardu (BSA) žádné takové proužky viditelné nejsou.

Vzhledem k tomu, že polyakrylamidový gel prokázal přítomnost proteinů o velikosti něco málo přes 10 kDa, všechny frakce, jejichž celkový objem činil 20 ml, byly spojeny a zdialyzovány v dialyzační membráně dle doporučení výrobce. Současně byly dialyzovány 2 ml samotného elučního pufru jako kontrola, že se opravdu všechen imidazol odstranil.

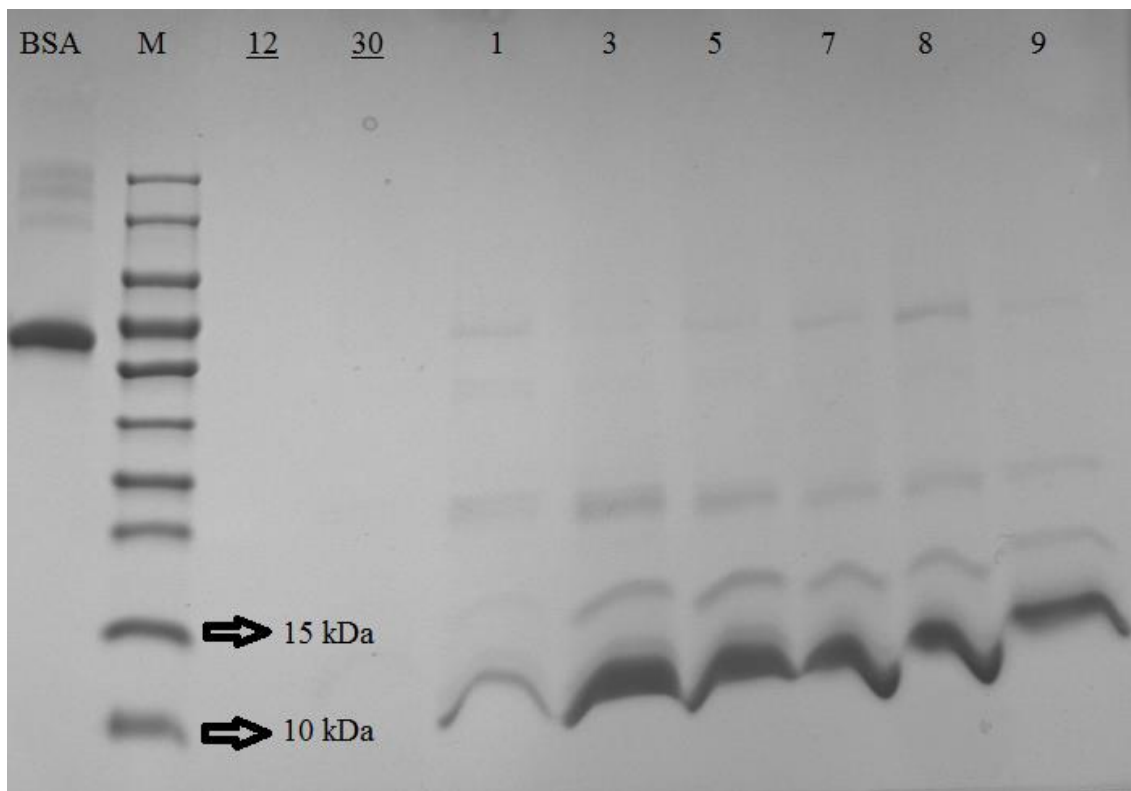
Absorbance rekombinantního proteinu při vlnové délce 280 nm byla po první izolaci a dialýze změřena na 0,027, přitom před dialýzou činila 0,3. Z toho lze usuzovat, že během dialýzy došlo k velkým ztrátám proteinu, na což poukazuje i SDS-PAGE srovnávající množství proteinu ve vzorku před a po dialýze (Obr. 14). Nízká koncentrace proteinu po dialýze byla prokázána i pomocí Bradfordovy reakce, kdy byla koncentrace stanovena na 0,017 mg/ml.



Obr. 14: Gradientový SDS-PAGE porovnávací vzorek před dialýzou a po dialýze. BSA – standard (pozitivní kontrola), E - negativní kontrola (eluční pufr po dialýze, který neobsahuje žádné proteiny), M – marker, 1 – vzorek před dialýzou, 2 – vzorek po dialýze. Gel prokázal přítomnost proteinu s velikostí nad 10 kDa ve vzorku před dialýzou. Naproti tomu ve vzorku po dialýze tento pruh není. Pozn.: Do jamky, kam byl nanášen eluční pufr, pravděpodobně přeteklo i část pozitivní kontroly, což vysvětluje proužek v negativní kontrole.

4.5 Izolace rekombinantního proteinu a purifikace kolonou C 18 - SEP PAK

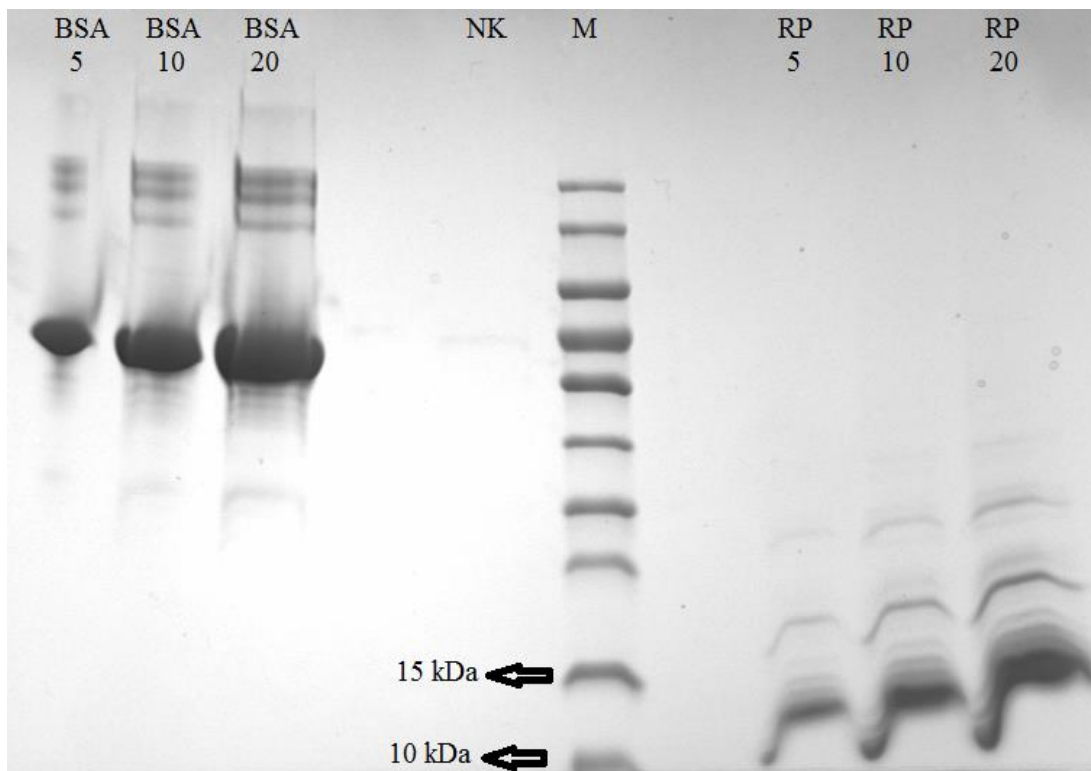
Vzhledem ke ztrátám proteinu při dialýze byla provedena další izolace, tentokrát z 1,5 gramu sedimentu. Bylo získáno celkem 9 frakcí, každá obsahovala cca 500 μ l. Tyto frakce byly otestovány na SDS-PAGE (Obr. 15).



Obr. 15: Ověření přítomnosti rekombinantního proteinu po druhé izolaci. BSA – standard (pozitivní kontrola), M – marker, 12 a 30 - negativní kontrola (frakce vzniklé během promývání nespecificky navázaných proteinů na kolonce), 1-9 – eluované frakce. U všech testovaných eluovaných frakcí se potvrdila přítomnost proteinu s velikostí přes 10 kDa.

Vybrané smíchané frakce z izolace byly spojeny a purifikovány na koloně 18 C – SEP PAK. Po klasickém promytí následovalo ještě jedno propláchnutí kolony, přičemž vzorek byl jímán a sloužil jako negativní kontrola, tedy ověření, že byl při promývání odstraněn všechen imidazol. Tato negativní kontrola by zároveň neměla obsahovat žádný protein.

Zachycené proteiny byly z kolony následně eluovány a eluovaný vzorek byl společně s negativní kontrolou odpařen na „Speed-vac“ a poté byly oba vzorky rozpuštěny ve 300 μ l sterilního PBS. Koncentrace proteinu byla pomocí Bradfordovy reakce stanovena na 2,5 mg/ml a vzorek byl zároveň otestován na SDS-PAGE (Obr. 16).



Obr. 16: Gradientový SDS-PAGE testující přítomnost rekombinantního proteinu po purifikaci na koloně C 18 – SEP PAK. BSA – standard (pozitivní kontrola) o koncentraci 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, NK - negativní kontrola (vzorek jímaný během promývání), M – marker, RB – rekombinantní protein o koncentraci 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Čísla značí počty nanášených mikrolitrů (předtím byly všechny vzorky naředěny nanášecím pufrem v poměru 1:1). Velikost proteinu ve vzorcích RB odpovídá očekávané velikosti rekombinantního proteinu.

Vzhledem k tomu, že SDS-PAGE potvrdila přítomnost přečištěvaného proteinu, mohl být tento protein následně injikován do larev *Galleria mellonella*.

4.6 Testování účinků proteinu na larvách a statistické vyhodnocení

K otestování účinků rekombinantního proteinu byl použit V. instar larev *Galleria mellonella*. Celkově bylo vybráno 60 larev a rozděleno do čtyř skupin po 15 jedincích. Každé larvě bylo následně injikováno 15 μl rekombinantního proteinu (o koncentraci 1,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), BSA o stejné koncentraci, 10 \times ředěného vosičkového jedu (1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), nebo negativní kontroly, která byla získána při promývání kolony během purifikace proteinu. Celkově bylo tedy injikováno 18,75 μg rekombinantního proteinu, respektive BSA na jednu larvu, nebo 22,5 μg přírodního jedu vosičky *Habrobracon hebetor*.

Po injikaci byly larvy umístěny do 12-jamkových misek a byla natočena 2-minutová videa, která byla později vyhodnocena v programu „Activity detector“.

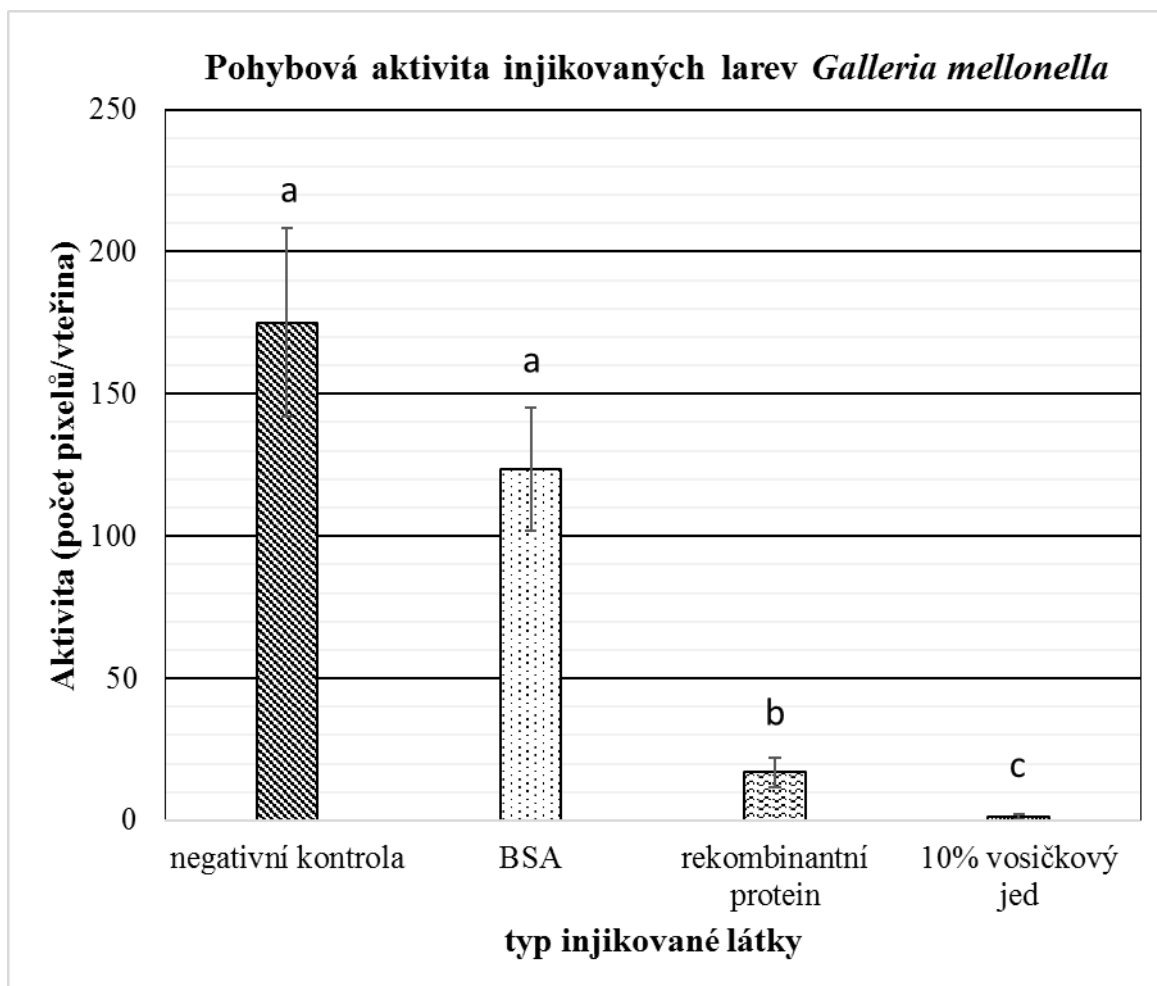
Tento program analyzuje pohyb larev, a to tak, že zaznamenává počet změn pixelů za sekundu pro každou larvu, z čehož lze získat údaje o aktivitě testovaných larev. Po analýze byly vypočítány průměry změn pixelů pro každou larvu a následně byly spočítány i průměry a standardní chyby průměru pro každou skupinu, které jsou vyneseny v Obr.17.

Protože ANOVA nemohla být použita kvůli narušení jejích předpokladů, zejména kvůli tomu, že variance mezi skupinami nebyly homogenní, byl ke statistickému vyhodnocení účinnosti proteinu nakonec použit Kruskal-Wallisův test, který se ukázal jako signifikantní ($p < 0,01$).

U larev, kterým bylo injikováno BSA, nebo negativní kontrola, nebylo zpozorováno žádné viditelné snížení pohybové aktivity (mírně rozdílná pohyblivost těchto dvou skupin, která však není statisticky průkazná, bývá běžně pozorována u jakýchkoliv dvou náhodně vybraných skupin larev, které nejsou ničím injikovány).

Pohyblivost všech larev, do kterých byl vpraven rekombinantní protein, byla naopak rapidně snížena oproti těm, do kterých byla vpravena negativní kontrola či BSA ($p < 0,05$). Stejně tak pohyblivost larev injikovaných $10\times$ ředěným vosičkovým jedem byla oproti těm, do kterých byla vpravena negativní kontrola či BSA, minimální ($p < 0,01$).

Tyto výsledky potvrdily, že je tento rekombinantní protein vyrobený v bakteriích funkční.



Obr. 17: Průměrný počet změněných pixelů za sekundu, který koresponduje s aktivitou injikovaných larev *Galleria mellonella*. Ke statistickému vyhodnocení byl použit Kruskal-Wallisův test, který prokázal signifikantní rozdíl mezi pohyblivostí larev injikovaných rekombinantním proteinem a larev, do kterých byla vpravena negativní kontrola či BSA („b“ - $p < 0,05$). Při porovnání larev injikovaných 10× ředěným vosičkovým jodem oproti kontrolám (BSA či negativní kontrola) byl test také signifikantní („c“ - $p < 0,01$).

Injikace larev rekombinantním proteinem také ukázala, že paralýza larev je dočasná a odeznívá zhruba po 20-30 minutách. Naproti tomu přírodní jed vosičky *Habrobracon hebetor* způsobuje trvalou paralýzu.

5 DISKUZE

5.1 Porovnání použitých expresních systémů

Nejprve byl rekombinantní protein exprimován v menším množství v bakulovirovém expresním systému a médium použité ke kultivaci buněk „High Five“ určených k expresi bylo využito k injikaci larev. Získané množství stačilo k ověření, že námi studovaný protein je zodpovědný za paralýzu larev. K samotné izolaci proteinu a následném ověření na SDS-PAGE bylo výhodnější produkovat rekombinantní protein ve větším množství jednodušší metodou, k čemuž byl vybrán bakteriální expresní systém.

Obecnou výhodou bakulovirového systému je fakt, že v něm lze vyrobit protein libovolné velikosti. Dále je použití tohoto systému vhodné v případě, že protein vyžaduje posttranslační modifikace jako je fosforylace, acetylace nebo glykosylace. Získané proteiny navíc bývají rozpustné a nebývá problém s jejich funkčností (viz příručka výrobce). Nevýhodou bakulovirového expresního systému je pracnost a vyšší provozní náklady.

V porovnání s BEVS (Baculovirus expression vectors system) je produkce proteinu v bakteriích o dost jednodušší, levnější a méně časově náročná. V porovnání s ostatními expresními systémy poskytuje obvykle vysoké výtěžky (Neubauer et Winter, 2001). Limitací je ale velikost proteinu a posttranslační modifikace. Bakteriální expresní systém navíc někdy poskytuje nesprávně sbalené nebo nerozpustné proteiny agregované v tzv. inkluzních tělískách (viz příručka výrobce), která jsou často obtížně zpracovatelná (Strandberg et Enfors, 1991). Nicméně, problém s těmito tělísky lze někdy řešit úpravou teploty (Bishai et al., 1987; Chalmers et al., 1990), popřípadě pH (Strandberg et Enfors, 1991).

Ještě vyšších výtěžků při produkci rekombinantního proteinu lze také dosáhnout optimalizací složení média nebo aplikováním různých kultivačních technik jako je např. využití fermentoru. Tyto postupy umožňují výtěžky až 190 g/l suché váhy bakteriálních buněk (Shiloach et Fass, 2005). Fermentory jsou doporučovány zejména při produkci proteinů ve velkém měřítku (Bernard et Payton, 2001). Oproti běžným třepačkám dovolují kultivaci ve větším objemu a jsou navíc uzpůsobeny i ke kontrole kultivačních parametrů jako jsou provzdušnění a pH, které v třepačce obvykle nemohou být sledovány (Abrahão-Neto et al., 1997). Obzvláště úprava pH může být výhodná právě při řešení problému s inkluzními tělísky.

5.2 Porovnání purifikace izolátu

Vyizolovaný protein byl nejprve purifikován pomocí dialýzy s použitím dialyzační membrány SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 3.5K MWCO. Vzhledem k obrovským ztrátám proteinu byla tato metoda později nahrazena purifikací roztoku s proteiny pomocí kolony C 18 – SEP PAK, kde k takovým ztrátám již nedocházelo, navíc je tato metoda rychlejší.

Přesný důvod ztráty proteinu ze vzorku během dialýzy není znám. Na vině může být lidský faktor, protože během dialýzy v membráně byly využívány klasické dialyzační svorky, které i přes dodržování pokynů zmíněných v návodu a soustavné kontrolování zvyšují pravděpodobnost ztráty proteinu. Alternativou snižující toto riziko jsou tzv. dialyzační kazety, které nevyžadují použití svorek ani klipsů a práce s nimi je obecně bezpečnější (viz příručka výrobce).

Dalšími důvody, kvůli kterým mohlo docházet ke ztrátám proteinu, je ulpívání proteinu na vnitřní straně membrány nebo jeho precipitace během dialýzy (Pesarrodonna et al., 2015). Je rovněž možné, že izolovaný protein má zvláštní strukturu, která mu zajišťuje snadné pronikání – zejména do nervové soustavy hostitele.

5.3 Srovnání 15% a gradientového gelu na SDS-PAGE

K ověření přítomnosti rekombinantního proteinu byly použity dva typy polyakrylamidových gelů – 15% ručně připravený gel a zakoupený gradientový gel, u kterého ve směru migrace molekul stoupá koncentrace akrylamidu od 4 % do 20 % (BIO-RAD). Obecně totiž platí, že při práci s menšími proteiny se doporučuje gel s vyšší koncentrací akrylamidu (viz příručka výrobce).

Ukázalo se, že protein té samé velikosti vytváří na těchto dvou použitých gelech různě výrazné proužky. Na 15% gelu se vždy vyskytovaly velmi široké proužky, u kterých lze jen obtížně určit přesnou velikost. Naproti tomu na gradientovém gelu jsou proužky užší.

Tento jev pravděpodobně souvisí s tím, že dělicí schopnost 15% a gradientového gelu, jehož koncentrace dosahuje až 20 %, se liší v důsledku rozdílné velikosti pórů. Se stoupající koncentrací akrylamidu klesá velikost pórů, kterými proteiny procházejí. Proteiny tedy putují gelem, dokud jim snižující se velikost pórů neznemožní další pohyb. Tím pádem přední část proužku je zpomalována více než zadní strana, jelikož putuje o něco menšími póry. Tento fakt vede k výslednému zostření proužku (Campbell et al., 1983, Walker, 1987).

5.4 Účinnost rekombinantního proteinu

Při testování účinků média získaného z hmyzích buněk, ve kterých probíhala exprese, se ukázalo, že médium po injekci způsobovalo znehybnění více jak 50 % injikovaných larev. Lze předpokládat, že účinnost samotného média získaného z hmyzích buněk, ve kterých probíhala exprese, nebude 100%, protože exprimovaný protein v médiu není vyizolovaný ani nijak zakonzentrováný.

Tuto domněnku potvrzuje i výsledek získaný z testování vyizolovaného a purifikovaného proteinu z bakteriálního expresního systému. Při injikování rekombinantního proteinu o koncentraci 1,25 mg/ml se totiž zjistilo, že paralýza nastala u 100 % injikovaných larev (do každé larvy bylo injikováno 15 μ l, tedy 18,75 μ g rekombinantního proteinu).

Současně se ukázalo, že paralýza není permanentní jako v případě injekce surového vosičkového jedu (15 μ l, tedy 22,5 μ g na larvu). Larvy po odeznění paralýzy způsobené rekombinantním proteinem nevykazují žádné známky intoxikace.

Je možné, že funkce rekombinantního peptidu je snížena v důsledku připojení histidinové kotvy k proteinu.

Alternativní vysvětlení tohoto jevu by mohlo být takové, že přírodní vosičkový jed může obsahovat více biologicky aktivních složek, které se podílí na intoxikaci. Často se jedná o soubor proteinů, peptidů, enzymů, aminů a dalších látek, které se nalézají v živočišných jedech a které jsou schopné rozvrátit imunitu hostitele, způsobit paralýzu či zastavit jeho vývoj (Perkin et al., 2015). Významnou roli hrají neurotoxiny, což jsou nejčastěji peptidy nebo proteiny, které ovlivňují nervový a muskulární systém hostitele, a tím způsobují paralýzu. V jedu jednoho druhu se často vyskytuje vícero neurotoxinů, které míří na různé molekulární cíle a většinou působí na přenos a šíření akčního potenciálu nebo brání uvolnění neurotransmiterů (Libersat, 2003).

Vícesložkové jedy ostatně najdeme u dalších vosiček a příbuzných organismů jako jsou čmeláci, včely a sršně (Argiolas et Pisano, 1984). Příkladem je ektoparazitoidní vosička *Nasonia vitripennis* (Rivers et al., 2006), endoparazitoidní druh vosičky *Pimpla turionella* (Uçkan et al., 2004), druhu včely *Apis mellifera* (Ziai et al., 1990) nebo druh čmeláka *Megabombus pennsylvanicus* (Argiolas et Pisano, 1984).

To, že by jed vosičky *Habrobracon hebetor* mohl být vícesložkový, připouští i dříve provedené studie analyzující tento jed. Spanjer et al. (1977) izolovali z jedu dva proteiny (protein A s molekulovou hmotností 42 kDa a protein B, který má 57 kDa), přičemž oba toxiny dle autorů působí na nervosvalový přenos. Práce Vissera et al. (1983) také uvádí, že jed obsahuje dva proteiny vykazující biologickou aktivitu (A-MTX a B-MTX).

Patent US 5554592 A (Quistad et Leisy, 1996) obsahuje pět různých sekvencí polypeptidů (Brh-I až Brh-V), které jsou biologicky aktivní. Quick (2015) naznačuje, že v jedu se nachází minimálně tři toxiny, které presynapticky blokují neurotransmise na neuromuskulárních spojích, a to znemožněním vylití presynaptických váček (Quick 2015).

Získaný protein o velikosti 11 kDa bude v naší laboratoři podrobně studován v dalších pokusech a bude využit pro testování detoxifikace organismu, vlivu na neuromuskulární synapse, neurosekrece atd.

6 ZÁVĚR

- Z jedu vosičky *Habrobracon hebetor* byl vybrán jeden protein, u kterého se předpokládalo, že by mohl způsobovat paralýzu hostitele, a tento kandidát byl následně vyroben v bakulovirovém expresním systému a v předběžných pokusech bylo zjištěno, že po injekci dokáže vyvolat paralýzu larev.
- Z důvodů získání většího výtěžku byl tento rekombinantní protein připraven později i v bakteriálním expresním systému. Vyrobený rekombinantní protein byl vyizolován pomocí afinitní chromatografie a purifikován na koloně 18 C - SEP PAK. Dále byl tento protein, jehož očekávaná velikost byla 11,1 kDa, analyzován na SDS-PAGE.
- V následných testech bylo injekcí rekombinantního proteinu do larev *Galleria mellonella* prokázáno, že tento protein způsobuje paralýzu larev, která trvá cca 20-30 minut. Naopak larvy, do kterých bylo injikováno BSA o stejné koncentraci či negativní kontrola, jež byla získána při purifikaci proteinu (a tedy protein neobsahovala), paralyzovány nebyly.

7 SEZNAM LITERATURY

Abrahão-Neto J., Infanti P., Vitolo M. (1997) Influence of pH, temperature and dissolved oxygen concentration on the production of glucose 6-phosphate dehydrogenase and invertase by *Saccharomyces cerevisiae*. Brazilian Journal of Chemical Engineering 14: doi.

Argiolas A., Pisano J. J. (1985) Bombolitins, a New Class of Mast Cell Degranulating Peptides from the Venom of the Bumblebee *Megabombus pennsylvanicus*. The Journal of Biological Chemistry 260(3): 1437-1444.

Beard R. L. (1952) The Toxicology of *Habrobracon* venom: A Study of Natural Insecticide. The Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven.

Beckage N. E., Gelman D. B. (2004) Wasp Parasitoid Disruption of Host Development: Implications for New Biologically Based Strategies for Insect Control. Annual Review of Entomology 49: 229–330.

Bernard A., Payton M. (2001) Fermentation and growth of *Escherichia coli* for optimal protein production. Current Protocols in Protein Science 5(5.3): doi.

Bishai W. R., Rappuoli R., Murphy J. R. (1987) High-level expression of a proteolytically sensitive diphtheria toxin fragment in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 169: 5140-5151.

Borzoui E., Naseri B., Mohammadzadeh-Bidarani M. (2016) Adaptation of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) to Rearing on *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Insect Science 16(1): 12.

Campbell W. P., Wrigley C. W., Margolis J. (1983) Electrophoresis of small proteins in highly concentrated and crosslinked polyacrylamide gradient gels. Analytical Biochemistry 129(1): 31-6.

Cerenius L., Söderhäll K. (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198: 116–26.

Danneels E. L., Gerlo S., Heyninck S., Van Craenenbroeck K., De Bosscher K., Haegeman G., De Graaf D. C. (2014) How the Venom from the Ectoparasitoid Wasp *Nasonia vitripennis* Exhibits Anti-Inflammatory Properties on Mammalian Cell Lines. *PloS One* 9(5): e96825.

De Graaf D. C., Aerts M., Brunain M., Desjardins C. A., Jacobs F. J., Werren J. H., Devreese B. (2010) Insights into the venom composition of the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* from bioinformatic and proteomic studies. *Insect Molecular Biology* 19(1): 11–26.

Gatti J-L., Schmitz A., Colinet D., Poirié M. (2012) Diversity of Virus-Like Particles in Parasitoids' Venom: Viral or Cellular Origin? In: Beckage N. E., Drezen J-M. (eds.) *Parasitoid Viruses: Symbionts and Pathogens*. Elsevier Inc., San Diego. Pp. 181–192.

Hartzer K. L., Zhu K. Y., Baker J. E. (2005) Phenoloxidase in larvae of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): Molecular cloning of the proenzyme cDNA and enzyme activity in larvae paralyzed and parasitized by *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 59(2): 67–79.

Chalmers J. J., Kim E., Telford J. N., Wong E. Y., Tacon W. C., Shuler M. L., Wilson D. B. (1990) Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing J3-lactamase or human epidermal growth factor. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 104-111.

Johnson J. H., Kral R. M. Jr., Krapcho K. (1999) Insecticidal toxins from *Bracon hebetor* nucleic acid encoding said toxin and methods of use. US patent 5874298 A.

Johnson J. H., Kral R. M. Jr., Krapcho K. (2000) 16 KDA insecticidal toxin from *Bracons hebetor*, nucleic acids encoding said toxin, and methods of use. US patent 6156539 A.

Kryukova N. A., Dubovskiy I. M., Chertkova E. A., Ya. L. Vorontsova Ya. L., Slepneva I. A., Glupov V. V. (2011) The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system, the generation of reactive oxygen species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology* 57: 796–800.

Kryukova N. A., Chertkova E. A., Semenova A. D., Glazachev Y. I., Slepneva I. A., Glupov V. V. (2015) Venom from the ectoparasitic wasp *Habrobracon hebetor* activates calcium-dependent degradation of *Galleria mellonella* larval hemocytes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 90(3): 117-30.

Libersat F. (2003) Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A* 189(7): 497-508.

Megaw J., Thompson T. P., Lafferty R. A., Gilmore B. F. (2015) *Galleria mellonella* as a novel *in vivo* model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Chemosphere* 139: 197–201.

Messier C., Mourre C., Bontempi B., Sif J., Lazdunski M., Destrade C. (1991) Effect of apamin, a toxin that inhibits Ca(2+)-dependent K⁺ channels, on learning and memory processes. *Brain Research* 551(1-2): 322-326.

Moreau S. J. M., Asgari S. (2015) Venom Proteins from Parasitoid Wasps and Their Biological Functions. *Toxins* 8: 2385–2412.

Neubauer P., Winter P. (2001) Expression and Fermentation Strategies for Recombinant Protein Production in *Escherichia Coli*. In: O-W. Merten et al. (eds.) *Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eucaryotic Cells*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp. 195–258.

Pennacchio F., Strand M. R. (2006) Evolution of Developmental Strategies in Parasitic Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 51: 233–258.

Periquet G., Bigot Y., Doury G. (1997) Physiological and Biochemical Analysis of Factors in the Female Venom Gland and Larval Salivary Secretions of the Ectoparasitoid Wasp *Eupelmus orientalis*. *Journal of Insect Physiology* 43(1): 69-81.

Perkin L. C., Friesen K. S., Flinn P. W., Oppert B. (2015) Venom gland components of the ectoparasitoid wasp, *Anisopteromalus calandrae*. *Journal of Venom Research* (6): 19-37.

Pesarrodona M., Unzueta U., Vázquez E. (2014) Dialysis: A Characterization Method of Aggregation Tendency. *Methods in Molecular Biology* (1258): 321-330.

Piek T. (1982) Delta-Philanthotoxin, a semi-irreversible blocker of ion-channels. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 72(2): 311-5.

Quistad G. B., Leisy D. J. (1996) Insecticidal toxins from the parasitic wasp, *Bracon hebetor*. US patent 5554592 A.

Quistad G. B., Nguyen Q., Bernasconi P., Leisy D. J. (1994) Purification and Characterization of Insecticidal Toxins from Venom Glands of the Parasitic Wasp, *Bracon hebetor*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24(10): 955-961.

Raghuraman H., Chattopadhyay A. (2007) Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Bioscience Reports* 27(4-5): 189-223.

Rivers D. B., Uçkan F., Ergin E. (2006) Characterization and biochemical analyses of venom from the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (hymenoptera: Pteromalidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 61(1): 24–41.

Rosano G. L., Ceccarelli E. A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5: 172.

Shiloach J., Fass R. (2005) Growing *E. coli* to high cell density—A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances* 23(5): 345–357.

Sláma K. (2012) Neuromuscular paralysis induced in insect larvae by the proteinic venom of a parasitic wasp. In: Berhardt, L.H. (eds.) *Paralysis: Causes, Classification and Treatments*. Series: Medicine and Biology 43. Nova Science Publishers Inc., New York. Pp 195-212.

Slavnova T. I., Antonov S. M., Magazanik L. G., Tonkikh A. K., Kosovskii A. V., Sadykov A. A., Abduvakhabov A. A. (1987) Effect of toxin from venom of the ichneumon *Habrobracon hebetor* (Say) on neuromuscular transmission in insects. *Doklady Akademii Nauk SSSR* 297: 492–494.

Spanjer W., Grosu L., Piek T. (1977) Two different paralysing preparations obtained from a homogenate of the wasp *Microbracon hebetor* (Say). *Toxicon* 15: 413–421.

Strandberg L., Enfors S-O. (1991) Factors Influencing Inclusion Body Formation in the Production of a Fused Protein in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 57(6): 1669-1674.

Uçkan F., Sinan S., Savaşçı Ş., Ergin E. (2004) Determination of Venom Components from the Endoparasitoid Wasp *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Annals of the Entomological Society of America* 97(4): 775-780.

Visser B. J., Labruyère W. T., Spanjer W., Piek T. (1983) Characterization of two paralysing protein toxins (A-MTX and B-MTX), isolated from a homogenate of the wasp *Microbracon hebetor* (Say). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 75(3): 523–530.

Walker J. M. (1984) Gradient SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology* 1: 57-61.

Ziai M. R., Russek S., Wang H-CH., Beer B., Blume A. J. (1990) Mast Cell Degranulating Peptide: A Multi-functional Neurotoxin. Journal of Pharmacy and Pharmacology 42(7): 457–461.

Internetové zdroje:

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

<http://www.genomics.agilent.com/>

<https://www.thermofisher.com/>

8 PŘÍLOHY

I. Média pro pěstování bakterií

tekuté LB médium (1 litr):

- pepton.....10 g
- NaCl.....10 g
- Kvasnicový extrakt.....5 g

tuhé LB médium (1 litr):

- pepton.....10 g
- NaCl.....10 g
- Kvasnicový extrakt.....5 g
- Agar.....15 g

SOB médium (1 litr):

- pepton..... 20 g
- kvasnicový extrakt..... 5 g
- NaCl.....0,5 g
- 1M MgSO₄.....20 ml
- 1M NaOH.....10 ml

pH bylo upraveno pomocí 10 ml NaOH na 7 a celkový objem doplněn na 1 litr. Po zkládání média bylo přidáno ještě 20 ml 1M MgSO₄, čímž bylo docíleno koncentrace 20mM.

II. Transfromace

Transformační pufr (100 ml):

- 10mM PIPES.....0,3024 g
- 15mM CaCl₂0,2205 g
- 250mM KCl.....1,865 g

pH bylo upraveno na 6,7 pomocí KOH. Po zklávkování bylo do pufru přidáno 5,5 ml 1M MnCl₂.

III. Média pro pěstování buněk

TNM-FH médium (500 ml) pro transfekci, výrobu P1 a P2 virového zásobního roztoku

- TNM-FH médium (Sigma Aldrich).....25,3 g
- NaHCO₃.....0,25 g

Upravení pH pomocí 45% roztoku KCl na 6,2. Do média použitého na transfekci bylo přidáno 1,5% FBS, do média na výrobu P1 a P2 roztoku bylo přidáno 10% FBS a 1% směs penicilinu a streptomycinu. Připravené médium bylo zfiltrováno.

EX-CELL médium (500 ml) pro výrobu P2 virového zásobního roztoku a expresi rekombinantního proteinu

- EX-CELL® 405 Serum-Free Medium (Sigma Aldrich).....15,4 g
- NaHCO₃.....0,17 g
- NaCl.....0,95 g
- Penicilin a streptomycin.....5 ml

Upravení pH pomocí 45% roztoku KCl na 6,4. Připravené médium bylo zfiltrováno.

IV. Dialýza

PBS 10× (1 liter):

- NaCl.....80 g
- KCl.....2 g
- NaH₂PO₄·2H₂O.....7,8 g
- Na₂HPO₄·2H₂O.....10 g

V. Izolační pufry

Vazebný pufr (1 liter):

- 50mM NaH₂PO₄ 6,90 g
- 250mM NaCl.....14,6 g
- 10mM imidazol.....0,68 g
- pH upraveno pomocí NaOH na 8,0

Promývací pufr (1 liter):

- 50mM NaH₂PO₄ 6,90 g
- 250mM NaCl.....14,6 g
- 20mM imidazol.....1,36 g
- pH upraveno pomocí NaOH na 8,0

Eluční pufr (1 liter):

- 50mM NaH₂PO₄ 6,90 g
- 250mM NaCl.....14,6 g

- 250mM imidazol.....17,0 g
- pH upraveno pomocí NaOH na 8,0

VI. PAGE

Zaostřovací pufr (1 litr)

- Tris base.....60,5 g
- SDS.....2 g
- dH₂O.....objem doplněn na 1 litr
- pH upraveno pomocí 5M HCl na 6,8

Separáční pufr (1 litr)

- Tris base.....181 g
- SDS.....4 g
- dH₂O.....objem doplněn na 1 litr
- pH upraveno pomocí 5M HCl na 8,8

6× SDS nanášecí pufr (100 ml):

- Tris (pH upraveno pomocí HCl na 6,8).....12,5 ml
- SDS.....10 g
- Glycerol.....30 ml
- β-merkaptoethanol.....5 ml
- bromophenolov  modř.....2 ml

SeparáčnÍ („running“) pufr (1 liter):

- Tris base.....30.3 g
- Glycin.....144 g
- SDS.....10 g

BarvicÍ roztok (100 ml):

- Methanol.....50 ml
- Kyselina octová.....10 ml
- ddH₂O.....40 ml
- Coomassie blue R-250.....0,25 g

Odbarvovací roztok (1 liter):

- Methanol.....50 ml
- Kyselina octová.....75 ml
- ddH₂O.....875 ml

VII. Seznam patentů s příloženými sekvencemi:

US 5554592 A (Quistad et Leisy, 1996)

>US 5554592 A/ NO:1

XTDFYYTDVIADQDFLLKQKKVFQLLYHVSQPXISNXXXFQXXLK

>US 5554592 A/NO:2

XHVQTYTADMDFKHKQKKIYHLFXXXXQ

>US 5554592 A/NO:3

XLDFDIVHAKDILGGIDNLA KGIXXAINKVXXVIXKVQXQA

>US 5554592 A/NO:4

MLKKVFLASLAIIVIKADTDFYYTDVIADQDFLLKQKKVFQLLYHVSQPDISNPELF
QEGLAYDIGANIDSYSNKDAVNHFLELYKFGFLPRGAIYSLYPKLLDET KALFKLF
YYAKDFDTFYKTALWARNRLNEGEFICAFYEAVIRRPDTEYLQLPPPYELYPYAFFN
SEVIEAAKNAKLYNKLVEGNSYIIYVNYSGWYLNRAYDTEMRVNYFLEDIGLNTFY
FFYRMDNPFWLSSEEFGLQKNLRGEEFLYVHK TLLNRYNLERLANGLEKIEEFLWE
GEFYPGYYPTMVYGNGLAYPQRPGMSRIPPYKYHYLRYIHDIEDRIST AIDLGYIIDS
DGSHHNISPEGLNLLGNIIEGNEDSCNKNFYHSLDWYGRKVLGFNLEPKTPYQVIPS
ALESFSTCMRDPAFYRLYNRYLSYWYRFKETLKPYSKNEIVFSDLKFESIAVDKLITY
FDYFDSTISNGLPITSKQDADNLMIKVRQSRLNNKHFTVHFALNSDKAQKVAIQFLFL
GPKYDALGNLLDFSESYKDFYEIDYWITDVNAGLNKLERTSHDFIFLMADRPSEIL
YKRVLKALDGSEKFMYYKKNLYGIPERLLL PKGKRAGSIFQLFAYVSPVTQPVTYKSR
VFGSYQYYMKPGGFPLDRPIYYPHFQGPNMFFKDIT IYHKTDVDPNATT

>US 5554592 A/NO:5

TDFYYTDVIADQDFLLKQKKVFQLLYHVSQP

Patent US 5874298 A (Johnson et al., 1999)

>US 5874298 A/NO:1

FNPETHRECKNYCAKEHGEEYRTWSFRYELGDIFKCVCTHGKNLMGSENYGKCRE
ACIQNHGAGGFKYAFPIYSEVPASWACICTQEKNKTFCIHACSEIHHKAPPKNPIVMK
NGQCYQDHRGVDRYCEVYMKFKDAKESI

>US 5874298 A/NO:2

IINGHDATEGQFPHMAYLQASAGKCSYVCGGALLTKKHIMTAAHCVAMHRTANIK
VALGVTDHFHNKPSMQQRKVEHIKVHSEYKGGRRKSLKNWYRSIHRTFTGPSGDKE
YNDIAIITLSQEVTLGPVVKTINLPPKSYRLPFDQDARLSGFGRTVIVKENDPIPPPTTH
LQWLDMKVLHSRDAIVTDSEFLADKEYGDGTWSNAAKGDSGSPLVKDNQVIGVA
VSVSDEEHTTRFQIVTYLDWIKKYAELA

>US 5874298 A/NO:3

LLIAGVASFNPETHRECKNYCAKEHGEEYRTWSFRYELGDIFKCVCTHGKNLMGSE
NYGKCREACIQNHGAGGFKYAFPIYSEVPASWACICTQEKNKTFCIHACSEIHHKAP
PKNPIVMKNGQCYQDHRGVDRYCEVYMKFKDAKESI

>US 5874298 A/NO:4

MHFFASILVCFLLGKAIHDVEGIINGHDATEGQFPHMAYLQASAGKCSYVCGGALL
TKKHIMTAAHCVAMHRTANIKVALGVTDHFHNKPSMQQRKVEHIKVHSEYKGGRR
KSLKNWYRSIHRTFTGPSGDKEYNDIAIITLSQEVTLGPVVKTINLPPKSYRLPFDQD
ARLSGFGRTVIVKENDPIPPPTTHLQWLDMKVLHSRDAIVTDSEFLADKEYGDGTW
SNAAKGDSGSPLVKDNQVIGVAVSVSDEEHTTRFQIVTYLDWIKKYAELA

>US 5874298 A/NO:5

FNPETHREXKNYXAKEHGEEYR

>US 5874298 A/NO:6

IINGHDATEGQFPHMAYLQASAG

Patent US 6156539 A (Johnson et al., 2000)

>US 6156539 A/NO:3 (aktualizovaná verze US 5874298 A/NO:3)

MKFLYLILLIAGVASFNPETHRECKNYCAKEHGEEYRTWSFRYELGDIFKCVCTHG
KNLMGSENYGKCREACIQNHGAGGFKYAFPIYSEVPASWACICTQEKNKTFCIHAC
SEIHHKAPPKNPIVMKNGQCYQDHRGVDRYCEVYMKFKDAKESI

9 SEZNAM ZKRATEK

BSA - bovinní sérový albumin

DMSO - dimethylsulfoxid

FBS – fetální bovinní sérum

IPTG - isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

X-Gal - 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside