

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Optimalizace exprese a purifikace fúzních konstruktů
ptačího reovirálního proteinu μ NS**

Bakalářská práce

Michael Janda

Školitelka: Mgr. Barbora Kaščáková, Ph.D.

České Budějovice 2023

Janda, M., 2023: Optimalizace exprese a purifikace fúzních konstruktů ptačího reovirálního proteinu μ NS. [Optimization of expression and purification of fusion constructs of avian reoviral protein μ NS. Bc. Thesis, in Czech.] – 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Optimization of conditions and cell type for expression of mNeon – μ NS, mCherry – μ NS and GFP – μ NS fusion proteins was studied. Mentioned proteins were produced. These produced proteins were purified by using affinity and anion-exchange chromatography.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích
dne 13. 4. 2023

.....

Podpis

Poděkování

Zde bych rád poděkoval své školitelce Mgr. Barboře Kašćákové, Ph.D. za odborné rady a věnovaný čas v průběhu vypracování této práce. Dále bych rád poděkoval prof. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. a Mgr. Michalu Kutému, Ph.D. za pomoc při výběru tématu a za možnost tuto práci zpracovat. V neposlední řadě děkuji své rodině a přítelkyni za pomoc a podporu po celou dobu studia.

Obsah

| | |
|---|----|
| 1 Úvod | 1 |
| 2 Ptačí reoviry..... | 2 |
| 2.1 Struktura viru | 3 |
| 2.2 Charakterizace ptačího reovirálního proteinu μ NS | 5 |
| 2.2.1 Srovnání savčího a ptačího reovirálního proteinu μ NS | 6 |
| 2.3 Tvorba virových inkluzí | 7 |
| 3 Alphafold | 10 |
| 4 Cíl práce..... | 11 |
| 5 Materiály a metodika | 12 |
| 5.1 Příprava plazmidů | 12 |
| 5.1.1 Gradientová PCR..... | 12 |
| 5.1.2 Analýza pomocí elektroforézy..... | 13 |
| 5.1.3 Amplifikace DNA pomocí PCR..... | 13 |
| 5.1.4 Izolace DNA | 15 |
| 5.1.5 Ligace a transformace do NEB® 5-alpha Competent E. coli..... | 15 |
| 5.1.6 Colony PCR..... | 16 |
| 5.1.7 Izolace plazmidů..... | 18 |
| 5.1.8 Izolace a namnožení plazmidů | 19 |
| 5.2 Transformace | 20 |
| 5.2.1 Transformace do BL21 (DE3) Competent E. coli | 20 |
| 5.2.2 Transformace do BL21-AI™ One Shot™ Chemically Competent E. coli | 21 |
| 5.2.3 Transformace do BL21 – CodonPlus (DE3) RIPL Competent Cells..... | 21 |
| 5.2.4 Transformace do ArcticExpress (DE3) Competent Cells..... | 21 |
| 5.3 Expres proteinů..... | 21 |
| 5.3.1 Pilotní exprese | 22 |
| 5.3.2 Expres ve velkém měřítku | 24 |

| | |
|---|----|
| 5.4 Analýza vzorků | 25 |
| 5.4.1 Příprava vzorků..... | 25 |
| 5.4.2 SDS – PAGE elektroforéza | 26 |
| 5.5 Purifikace..... | 27 |
| 5.5.1 Homogenizace | 27 |
| 5.5.2 Příprava pufrů | 27 |
| 5.5.3 Affinitní histidinová chromatografie | 27 |
| 5.5.4 Iontově výměnná chromatografie | 28 |
| 5.5.5 Analýza vzorků purifikace..... | 28 |
| 6 Výsledky | 29 |
| 6.1 Transformace fúzních konstruktů v pDEST 17 vektoru | 29 |
| 6.1.1 Transformace plazmidů do ArcticExpress (DE3) Competent Cells a jejich exprese | 29 |
| 6.1.2 Transformace plazmidů do BL21-CodonPlus Competent Cells a jejich exprese ... | 30 |
| 6.1.3 Transformace plazmidů do BL21-AI™ One Shot™ Chemically Competent E. coli a jejich exprese | 33 |
| 6.2 Příprava plazmidů fúzních konstruktů μ NS ve vektoru pASK IBA 37+ | 35 |
| 6.2.1 Gradientová PCR..... | 35 |
| 6.2.2 Amplifikace DNA pomocí PCR..... | 36 |
| 6.2.3 Colony PCR..... | 37 |
| 6.2.4 Izolace plazmidů | 38 |
| 6.3 Transformace a exprese fúzních konstruktů v pASK IBA 37+ vektoru | 39 |
| 6.4 Purifikace | 42 |
| 7 Diskuze | 50 |
| 8 Závěr..... | 52 |
| 9 Seznam použité literatury | 53 |
| 10 Přílohy | 56 |
| Příloha č. 1: Plotny s koloniemi buněk ArcticExpress (DE3) Competent Cells | 56 |
| Příloha č. 2: Buněčná kultura..... | 56 |

| | |
|--|----|
| Příloha č. 3: Výsledky pilotních expresí u BL21-CodonPlus Competent Cells..... | 57 |
| Příloha č. 4: Výsledky pilotních expresí u BL21 (DE3) Competent Cells..... | 57 |

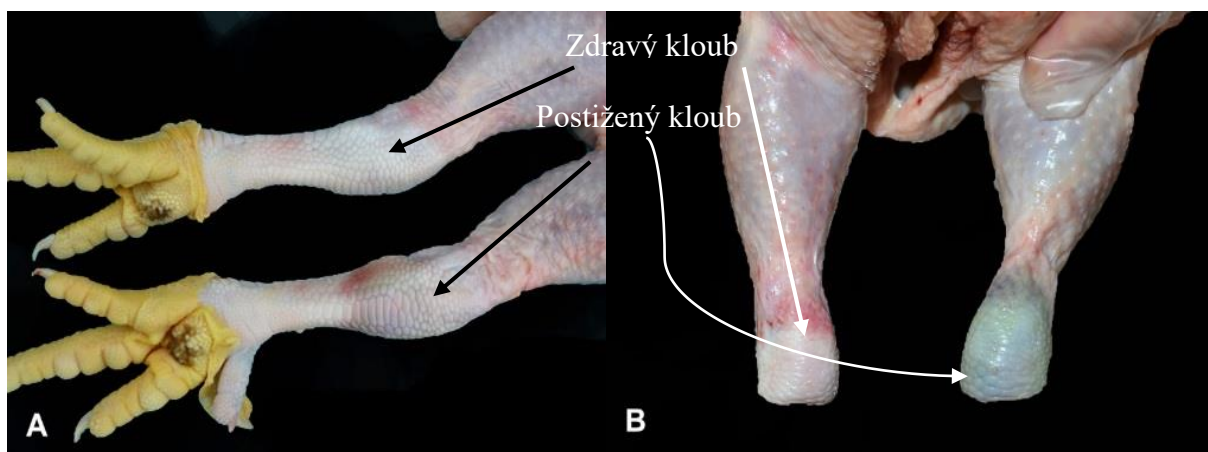
1 Úvod

Ptačí reoviry jsou velkým ekologickým a ekonomickým problémem při chovu drůbeže. Obecně se vždy předpokládalo, že ptačí reoviry mají stejnou strukturu jako savčí reoviry, proto dříve nebyla jejich struktura příliš zkoumána. Jednu věc mají totožnou, a to je tvorba virových inkluzí. Virové inkluze jsou struktury tvořené v hostitelských buňkách, ve kterém probíhá replikace. O virových inkluzích, v případě ptačího reoviru, není známo dostatečné množství informací. Jedná se ale o velmi důležité struktury, a tak je nutný další výzkum, jenž by byl přínosem k porozumění jejich funkce v průběhu infekce.

Tato práce se zabývá hledáním ideálních podmínek pro transformaci a následnou expresi fúzních proteinů μ NS. V průběhu práce byly použity různé typy buněk, rozdílné induktory a exprese probíhala za použití odlišných teplot. Následně byl protein purifikován pomocí vybraných chromatografických metod

2 Ptačí reoviry

Ptačí reoviry jsou součástí rodu *Orthoreovirus*, který patří do čeledě *Reoviridae*. (Mertens 2004). Jsou to důležité a nebezpečné patogeny ptáků působící významné ekonomické ztráty, především u drůbeže. Reovirální infekce drůbeže jsou celosvětové a předpokládá se, že každý komerční chov byl během své existence postižen tímto virem. Odhadem 85-90 % izolovaných reovirů není patogenních, i přes to však existují patogenní kmeny některých virů, které byly spojovány s mnoha chorobnými syndromy. Ve většině případech ale nelze prokázat, že je virus příčinou onemocnění. Výjimkou je virová artritida, známá také jako tenosynovitida. Ta postihuje nejvíce kuřata masného typu (brojler) ve věku od pěti do šestnácti týdnů. Nejnáchylnější jsou kuřata ve věku 7 týdnů. Virová artritida způsobuje otok hlezenních (tibiotarzálních – tarsometatarzálních) kloubů (Obr. 1). Při postižení těchto kloubů lze u kuřat pozorovat kulhání. Postižené klouby otékají a zanítí se, v nejzávažnějších případech dochází k ruptuře šlachy dvouhlavého lýtkového svalu a erozi kloubní chrupavky. Pokud jsou oba klouby postiženy vážně, pták se stává nepohyblivým. Někdy může být také natržena jedna nebo více šlach ohýbačů prstů. Přetržení šlachy ve ventrálním kloubu je doprovázeno krvácením a nazelenalým zbarvením kůže v místě kloubu (Obr. 1) (Pitcovski a Goyal 2019).



Obr. 1: Srovnání hlezenních kloubů u (A) zdravého a (B) nemocného kuřete

(Souza et al. 2018).

Ptačí reoviry jsou spojeny i s dalšími chorobnými stavy kuřat, přičemž působení viru na jedince je méně jasné a někdy dokonce nejisté. Patří sem například ulcerózní enteritida, různá respirační onemocnění, hepatitida a srdeční léze, které jsou spojené i s náhlými úhyny (Pitcovski a Goyal 2019; McFerran et al. 1976).

Nutno zmínit, že ptačí reoviry se neobjevují jen u drůbeže, ale i u ostatního ptactva. Mezi zaznamenané a studované případy patří například krocani, kde se reovirus také projevil chorobnými stavy, zejména tenosynovitidou (Sharafeldin et al. 2014).

2.1 Struktura viru

Savčí i ptačí reoviry sdílejí genom skládající se z 10 segmentů dvouvláknové RNA (dále dsRNA) obklopen dvouvrstvou kapsidou, která obsahuje řadu krátkých oligonukleotidů (Varela a Benavente 1994). Ptačí reoviry však na rozdíl od svých savčích protějšků nemají agregační aktivitu v erytrocytech a mohou vyvolat fúzi kultivovaných buněk (Varela et al. 1996).

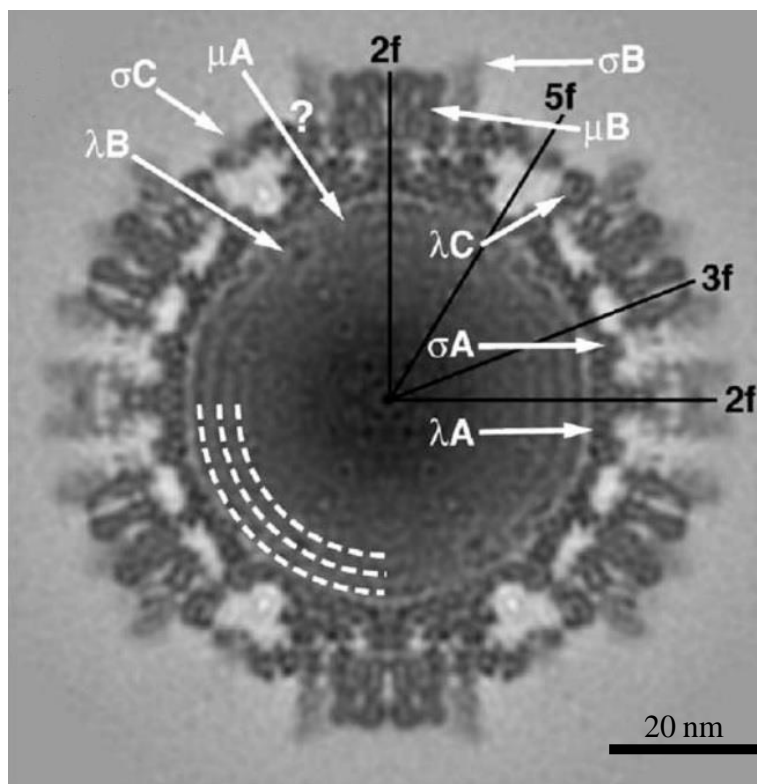
Segmenty jsou dále členěny do 3 velikostních tříd dle elektroforetické pohyblivosti: S (small=malé), M (medium=střední), L (large=velké) (Benavente a Martínez-Costas 2007). Tyto třídy můžeme dále rozdělit na menší segmenty. Existují tři segmenty L (L1, L2, L3), tři segmenty M (M1, M2, M3) a čtyři segmenty S (S1, S2, S3, S4). Zatímco segment L1 má nejnižší elektroforetickou mobilitu, segment S4 ji má analogicky nejvyšší.

Na základě své velikosti se dělí i proteiny kódované genomem do tří skupin: λ (velké), μ (střední), σ (malé). Každý protein analogicky patří do velikostních tříd (λ proteiny patří do L třídy, μ proteiny do třídy M a σ proteiny do třídy S). V genomu ptačího reoviru je exprimováno nejméně 12 primárních translačních produktů, z nichž osm jsou strukturální proteiny, které jsou začleněny do struktury viru. Zbývající čtyři proteiny jsou nestrukturní, jelikož jsou exprimovány v infikovaných buňkách, ale ne ve zralých reovirech (Benavente a Martínez-Costas 2007). Rozdělení proteinů, včetně uvedení jejich funkce a typu je uvedeno v Tab. I.

Tabulka I: Základní rozdělení a přehled funkcí proteinů ptačího reoviru (Benavente a Martínez-Costas 2007)

| Segment | Typ | Protein | Funkce |
|---------|--------------|------------------------------------|---|
| L1 | Strukturní | λA | Tvorba vnitřní membrány jádra |
| L2 | | λB | Pravděpodobná transkriptáza |
| L3 | | λC | Capping enzym |
| M1 | | μA | Pravděpodobný transkriptázový kofaktor |
| M2 | | μB μBN μBC | Penetrace hostitelské buňky |
| M3 | Nestrukturní | μNS μNSC μNSN | Formace virových inkluzí, vázání proteinů |
| S1 | Strukturní | σC | Přichycení viru k buňce |
| | Nestrukturní | p10 p17 | Fúzogenní Neznámá |
| S2 | Strukturní | σA | Vázání dsRNA, anti-interferonová aktivita |
| S3 | Strukturní | σB | Neznámá |
| S4 | Nestrukturní | σNS | Vázání ssRNA |

Dále je možné tyto proteiny rozdělit podle místa, kde se protein nachází. Ptačí reovir se skládá ze dvou kapsidů: vnitřního a vnějšího. Navíc se na struktuře viru nachází i tzv. trny (angl. turrets). Strukturu vnitřního kapsidu tvoří λA , λB , μA , σA . Struktura vnějšího kapsidu je tvořena proteiny μB , σB , σC . Součástí již zmíněných trnů je jako jediný protein λC . Všechny tyto proteiny jsou konečnými produkty translace. Jedinou výjimkou je μB , který se dále rozdělí na dvě části s N- nebo C- konci, tedy μBN a μBC . Struktura proteinu byla zachycena pomocí kryo-elektronového mikroskopu, viz. Obr. 2 (Zhang et al. 2005; Benavente a Martínez-Costas 2007)



Obr. 2: Struktura ptačího reoviru s označenou polohou strukturních proteinů (Zhang et al. 2005)

2.2 Charakterizace ptačího reovirálního proteinu μ NS

Protein μ NS, který je zakódován pomocí segmentu M3, patří mezi nestrukturní proteiny. Nestrukturní proteiny se nepodílí na samé struktuře viru, ale mají svou specifickou funkci. Mezi další proteiny náležící do nestrukturních proteinů patří σ NS, jehož kódování je zajištěno segmentem S4, a dále p10 a p17, jenž jsou oba zakódovány pomocí segmentu S1. Nestrukturní proteiny jsou obecně velmi důležité i přes to, že přímo nejsou ve struktuře viru. Jejich důležitost spočívá při morfogenezi a genové expresi (Touris-Otero et al. 2004).

Protein μ NS obsahuje 635 aminokyselin s molekulární hmotností 70,8 kDa a isoelektrickým bodem o hodnotě 6.19. Váže se na virovou mRNA a na virová jádra, naopak se neváže na viriony nebo meziproducty rozpadu při genové expresi (Becker et al. 2003).

Ptačí reoviry se replikují v globulárních cytoplazmatických inkluzích neboli ve viroplasmách, které obsahují strukturální i nestrukturní proteiny, ale nejsou obaleny kapsidami a nemají žádné organely. Při individuální expresi virových proteinů v transdukovaných buňkách bylo zjištěno, že μ NS je jediným proteinem, který dokáže vytvořit virové inkluze, i když je exprimován bez přítomnosti jiných virových faktorů. Tento fakt a skutečnost, že již zmíněné inkluze se podobají globulárním reovirovým inkluzím již infikovaných buněk,

naznačuje, že μ NS je minimálním virovým faktorem potřebným pro tvorbu inkluzí v infikovaných buňkách. Výzkum transdukovaných buněk, kde dochází ke koexpresi μ NS a dalších proteinů ukázalo, že μ NS hraje důležitou roli v raných fázích morfogeneze viru. Tato funkce spočívá v rozpoznávání a vázání proteinů pro virovou inkluzi, jenž je selektivní a časově regulovaný proces. μ NS zprostředkovává již zmíněný nábor proteinů do inkluzí σ NS a λ A, ale ne do jiných testovaných virových proteinů. Při expresi zkrácených forem μ NS v transdukovaných buňkách bylo dále zjištěno, že σ NS a λ A proteiny se váží na různá místa v C-terminální polovině sekvence μ NS. To naznačuje, že oba proteiny si navzájem nekonkurují při vazbě na μ NS a mohou se vázat do inkluze vazbou na stejnou molekulu μ NS (Benavente a Martínez-Costas 2007; Brandariz-Nuñez et al. 2010).

2.2.1 Srovnání savčího a ptačího reovirálního proteinu μ NS

Prvním rozdílem je délka proteinu. Savčí reovirální protein μ NS obsahuje o 86 aminokyselin více (721 aminokyselin). I přes to, že ptačí a savčí proteiny μ NS mají podobnou sekvenci aminokyselin, N-terminus savčího μ NS obsahuje přibližně 50 reziduí před C1 (coil1), které nejsou přítomny u ptačí formy proteinu μ NS. C1 je proteinový motiv, který se skládá ze dvou či více sekundárních struktur, v tomto případě α -helixů (Simm et al. 2021). Předpokládá se, že dané aminokyseliny jsou esenciální pro tvorbu inkluzí u savčích reovirů.

Na druhou stranu aminokyseliny ptačího μ NS ležící v oblasti 140-380 ovlivňují maturaci a velikost inkluze, tento segment nebyl ve spojitosti s velikostí inkluzí u savčího μ NS identifikován jako důležitý. Nicméně bylo zjištěno, že rezidua savčího μ NS v oblasti 41 až 172 mají určitou úlohu ohledně morfologie inkluze. Při odstranění této části jsou inkluze stejně velké, ale tvarově jsou více protáhlé a ohraničené. Podle všeho tento fakt nasvědčuje skutečnosti, že u μ NS savčího reoviru nedochází k samointegraci, ale závisí na integracích či schopnosti integrovat s cytoskeletálními proteiny hostitelské buňky. Srovnání sekvencí aminokyselin je uvedeno na Obr. 3 (Broering et al. 2005; Brandariz-Nuñez et al. 2010).

```

AAQ81873.1 1 MAS T . . . . . K W D K P M . . . . . S L S M S H D G S S I R . S A S Q F L S V P L S H S I P
AJE25926.1 MAS F K G F S A N T V P V S K A K R D I S S L A A T P G L R S Q S F T P S V D M S Q S R E F L T K A I E Q G S M S I P Y O H V N V

AAQ81873.1 40 I P P Q R R K T V . L L K F M I G D E L V T V Q G A L A P F D E Y W Y D N Q P L L A Q A V E M L A S A D R L R Q F E H Y E K F L L K K
AJE25926.1 P K V D R R K V V S L V V R P F S S G A F S I S C V I S P A H A Y L L E C L P Q L E Q A M A F V A S P E S F Q A S D V A K R F A I K P

AAQ81873.1 110 G H Q I T E I M N R L R L E F T D V L K V K M E A D A L P A L A Q Y . . . . . L M V G T L E A V S
AJE25926.1 G M S L Q D A I T A F I N F V S A M L K M T V T R Q N F D V I V A E I E R L A S T S V S V R T E E A K V A D E E L M L F G L D H R G

AAQ81873.1 150 . . T A P S P D A . . C V P V T S K I L A R Q Q T T A K S P G R T D E E Y N V I R S R F L T H E V F D L T S D L P G V Q P F M D M
AJE25926.1 P Q Q L D V S D A K G I M K A A D I Q T T H D V H L A P G V G N L D P E I Y N E G R F M F M Q H K P L A A D Q S Y F T L . . E T A D

AAQ81873.1 220 Y Y A T V F R A D S . . T G W C V Y R R K G L V I Y A P D E Q F S D L T I F S T R T T A S R E L Q L V . . A G D V V A C F D L M D
AJE25926.1 Y F K I Y E T Y D E H D G R M A D Q K Q S G L L C T K D E V L A E Q T I F K L D A P D D K T V H L L D R D D D H V V A R F T K V F

AAQ81873.1 280 V S D T A P S H H A S V Q E E R T L G T S K Y S N V T A N D H P L V F F S P S A L R W A I D H A C T D S L V S T R N I R V C V G I D
AJE25926.1 I E D V A P G H H A A Q R S G Q R S . . V L L D L . Y A N T Q V I S I T S A L R W V V K H G V S D G I V N R N I R V C V G F D

AAQ81873.1 340 P L V T R W T R D G V Q E A A L L M D D K L P S A G R . A R M A L R T L L L A R R S P M P S F L L G . A L K O S G G Q L L E H Y R C
AJE25926.1 P L Y T L S T H N G V S L C A L L M D E K L S V L N S A C R M T L R S L M K T G R D V D A H R A F Q R V L S O G Y T S L M C Y Y H P

AAQ81873.1 410 D A A N R Y G . . . . . I T V P T S H P P C S K C P E L K E Q T A K L S S S P T P K V D S S . . . . . V G P A V
AJE25926.1 S R K L A Y G . V L F L E R S N D V T D G I K L Q L D A S R Q C H E C P V L Q Q R K V V E L E K Q I L M Q K S I O S D F T P V A L Q P

AAQ81873.1 460 L L S K T A D L Q R A N R E T S I . . . . . K L V D V Q P A R E D H L L A Y L N E H V C V N A K D H E K G L L A R C N V
AJE25926.1 L L S Q L R E L S E V T R L Q M E L S R A Q S L N A Q L E A D V K S A Q S C S L D M Y L R H H T C I N G H A K E D E L L D A V R V

AAQ81873.1 510 S G D S I S S I L G Q R M K N R E R F E T R L R H E A S A E W E P R V E A L N Q E L A K A R V E Q O D M M T Q S L Q V L N E R D E L
AJE25926.1 A P D V R R E I M E K R S E V R Q G W C E R E L S K E A A A K C Q T V I D D L T L M N G K Q A Q E I T E L R D S A E K V E K Q I A E L

AAQ81873.1 580 L Q . . . . . E V D E L K R E L T L R S A N V R L N A D N H R M S R A T R V G D A F V S D V E P L P S G I P G E S K P S M E L E L V D
AJE25926.1 V S T I T Q N Q I T Y Q Q E L Q A L V A K N V E I D A L N Q R A K S L R I T P S L S A . . . . . T P I D S A D G V A D L L D

AAQ81873.1 DL . . . . .
AJE25926.1 F S V P T D E L

```

Obr. 3: Srovnání sekvence proteinu μ NS ptačího reoviru (AR) se sekvencí savčího proteinu μ NS (MR), červený obdélník značí výše zmíněných chybějících 13 reziduí. Aminokyseliny s červenou výplní značí shodné aminokyseliny u obou proteinů μ NS. Aminokyseliny které jsou psané červeně a jsou v modrém rámečku jsou si podobné (Touris-Otero et al. 2004).

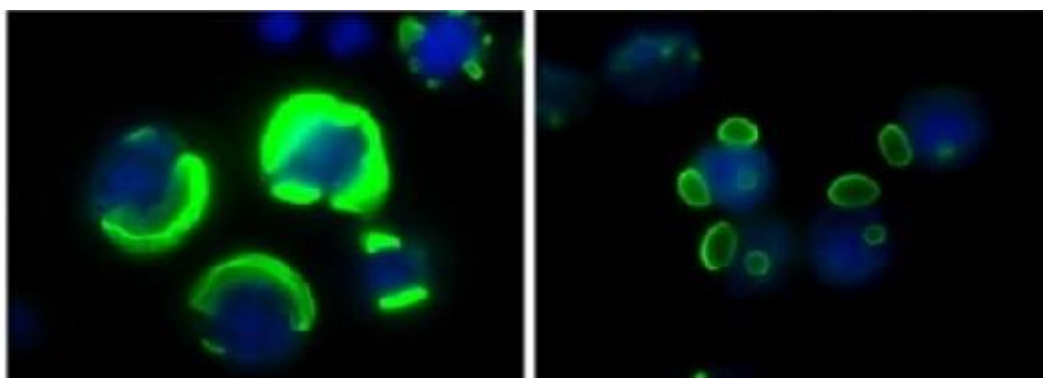
2.3 Tvorba virových inkluzí

Protein μ NS zahrnuje dva odhadované segmenty svinuté spirály, které jsou lokalizovány mezi pozicemi 451-472 a 540-599. Tyto segmenty byly rozpoznány pomocí programu MultiCoil, který odhalil existenci dvou heptapeptidových struktur. Tyto struktury jsou oddělené pomocí intervenční sekvence. Na základě těchto struktur se odhaduje tvorba

homo- či hetero-oligomerů (Touris-Otero et al. 2004).

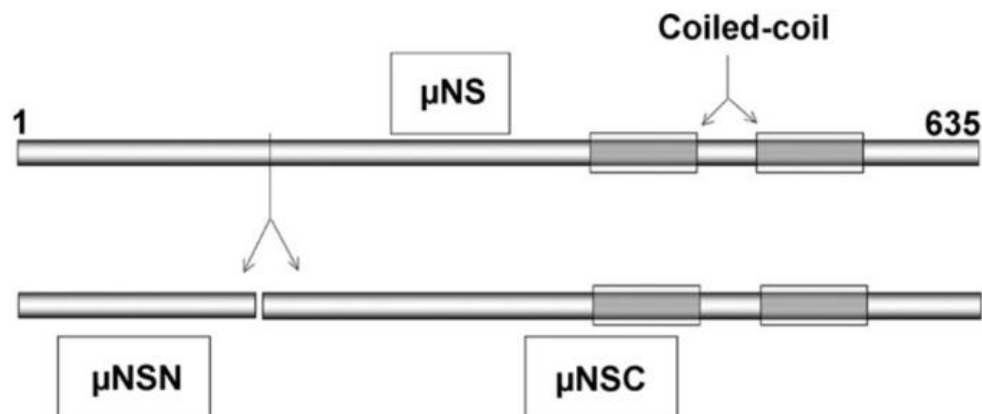
Bylo zkoumáno, zda a jakým způsobem jsou zkrácené formy μ NS schopny tvořit inkluze. Rezidua v oblasti 140-380 se mohou podílet na zrání inkluzí. Oblast, která je potřebná přímo pro tvorbu inkluzních tělísek, byla identifikována jako oblast zahrnující rezidua 448-635, jež obsahuje již zmíněné cívkovité spirály. Nakonec byla zkoumána úloha čtyř různých struktur v μ NS (448-635), dále nazývaná μ NS-Mi, při tvorbě inkluzního komplexu, což naznačuje, že C-terminální doména je hlavním faktorem určujícím počáteční směr kontaktu monomerů μ NS tvořící bazální oligomer, který řídí tvar a účinnost tvorby inkluze. Pokud jsou inkluze převážně vytvářeny interakcí μ NS- μ NS, každý monomer μ NS musí obsahovat několik samo-interagujících oblastí, důležitých pro tvorbu trojrozměrné sítě. Tato trojrozměrná síť je nezbytná pro tvorbu velkých inkluzí (Brandariz-Nuñez et al. 2010).

Při výzkumu výše zmíněného proteinu μ NS-Mi bylo zjištěno, že jím vytvářené inkluze jsou v porovnání z inkluzemi celého proteinu μ NS menší a více kulovité. To potvrzuje skutečnost, že rezidua 140-380, které nejsou součástí μ NS-Mi, ovlivňují velikost a morfologii inkluzí μ NS (viz Obr. 4) (Brandariz-Nuñez et al. 2010).

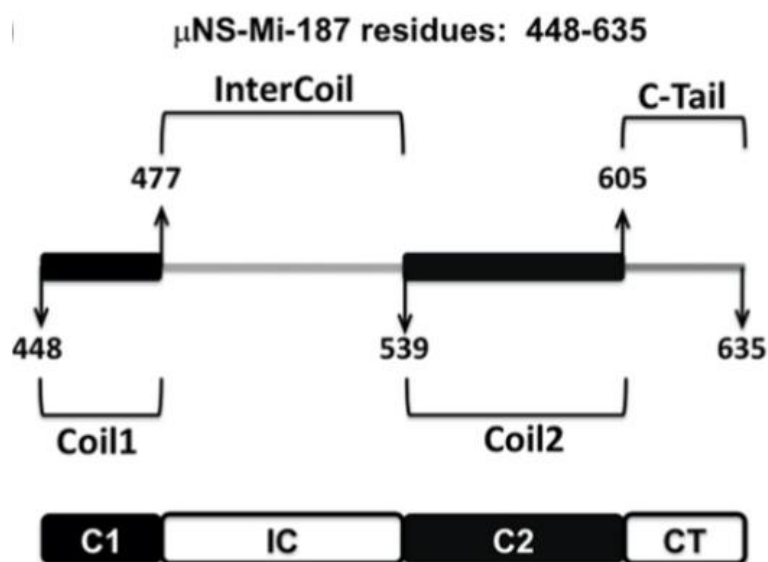


Obr. 4: Virové inkluze po 72 hodinách – vlevo protein μ NS, vpravo protein μ NS-Mi (Brandariz-Nuñez et al. 2010)

Zmiňovaný zkrácený protein má 4 segmenty: „coil“ 1 (C1), tzv. intercoil (IC), předpokládanou „coil“ 2 (C2) a nakonec krátký úsek označovaný jako C-tail (CT). V rámci této sekvence jsou zahrnuty také dvě aminokyseliny His570 a Cys572. Tyto aminokyseliny jsou univerzální, objevují se i u dalších druhů virů a jsou klíčovým faktorem pro úspěšnou tvorbu inkluzí. C1 je další velmi důležitou částí μ NS. Pokud bude daný segment deletován, k formaci inkluze nebude docházet. Další klíčovou částí je 30 reziduí na CT, jelikož hrají hlavní roli ve vazbě monomer-monomer (Brandariz-Nuñez et al. 2010). Struktura μ NS je zobrazena na Obr. 5. Schéma oblasti, kde se predikuje tvorba virových inkluzí na μ NS-Mi je uvedena na Obr. 6.



Obr. 5: Schéma sekvence proteinu μNS



obl

Obr. 6: Schéma oblasti, kde se predikuje tvorba virových inkluzí na μNS-Mi

3 Alphafold

Proteiny jsou pro život esenciální. Jejich funkci neovlivňuje pouze jejich složení z různých aminokyselin, ale jak bylo zjištěno, také jejich prostorové uspořádání. Dle proteinové databanky (<https://www.rcsb.org/>) k březnu 2023 již bylo objasněno více než 200 000 známých proteinových sekvencí. Jelikož určení struktury proteinu vyžaduje měsíce, někdy dokonce roky úsilí (Jumper et al. 2021).

AlphaFold je systém umělé inteligence vyvinutý společností DeepMind pro predikci proteinových struktur z aminokyselinových sekvencí. Tento způsob byl uznán jako řešení problému predikce proteinové struktury. Bezprecedentní přesnost a rychlost AlphaFold umožnila vytvoření rozsáhlé databáze strukturních predikcí ve velkém měřítku, známé jako AlphaFold Protein Structure Database. Tato otevřeně přístupná databáze poskytuje programový přístup a interaktivní vizualizaci předpokládaných atomových souřadnic, odhadů spolehlivosti jednotlivých reziduí a párových modelů a předpokládaných chyb. Počáteční verze AlphaFold DB obsahuje přes 360 000 předpokládaných struktur napříč 21 proteomy modelových organismů a brzy bude rozšířena tak, aby pokryla většinu z více než 100 milionů reprezentativních sekvencí z datového souboru UniRef90 (Varadi et al. 2022).

Zatímco fyzikální přístupy, jako jsou Rosetta a I-Tasser, jsou v současné době primárním paradigmatem pro predikci struktur pro jednotlivé proteinové sekvence, přístupy hlubokého učení, jako je AlphaFold, nabízejí řadu možných nových přístupů k vyřešení problému s řešením struktur proteinů (Jumper et al. 2021).

Vývoj a kontroverze kolem AlphaFold přivedly pozornost k potenciálu systémů umělé inteligence přispět k vědeckému objevu. I když jsou příspěvky AlphaFold považovány za důležité, není jasné, zda systémy umělé inteligence mají kvality nezbytné pro nezávislé objevování, protože nevytvářejí výzkumné otázky ani metody pro jejich řešení (Clark a Khosrowi 2022)

4 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je exprese a purifikace fúzních konstruktů ptačího reovirálního proteinu μ NS. Byly vybrány 3 konstrukty fúzních proteinů pHMGFP – μ NS, mNeon – μ NS, mCherry – μ NS. Tyto konstrukty byly transformovány do vybraných typů kompetentních buněk. Pro purifikaci byly vybrány standardní chromatografické metody.

5 Materiály a metodika

5.1 Příprava plazmidů

5.1.1 Gradientová PCR

Pro amplifikaci plazmidu byla na začátku stanovena vhodná teplota pro nasedání primeru, ta byla stanovena pomocí gradientové PCR. Do potřebného počtu mikrozkušavek určených pro PCR bylo vždy napipetováno 12,5 μ l PPP Master Mix pufru (150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl_2 , 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymeráza, barvivo, stabilizátory a přísady), 2,5 μ l Forward (F) – primeru o koncentraci 10 μ M, 2,5 μ l Reverse (R) – primeru o koncentraci 10 μ M, 1 μ l templátu DNA (μ NS pASK IBA37) o koncentraci 680,0 ng/ μ l a 7,5 μ l PCR vody. Teploty byly zvoleny následovně: 55,0 $^\circ\text{C}$, 55,6 $^\circ\text{C}$, 57,3 $^\circ\text{C}$, 58,2 $^\circ\text{C}$, 59,3 $^\circ\text{C}$, 60 $^\circ\text{C}$, 60,8 $^\circ\text{C}$, 61,9 $^\circ\text{C}$, 63,8 $^\circ\text{C}$, 65,0 $^\circ\text{C}$, 66,6 $^\circ\text{C}$, 68,0 $^\circ\text{C}$. Příprava plazmidů dle použitých F– a R – primerů u teplotního gradientu je zobrazena v Tab. II.

Tabulka II: Primery použité pro přípravu plazmidů

| Fúzní primer | GFP – μ NS | mNeon – μ NS | mCherry – μ NS |
|--------------|---|---|---|
| F – primer | 5' ATG GTA GGT CTC ATA TCA CAG ATC ATC CAC CAA TTC TTC CAT AGA TGG TTT C 3' | 5' ATG GTA GGT CTC AGC GCG GCG TGA TCA AGC CCG ACA T 3' | 5' ATG GTA GGT CTC AGC GCG GCG TGA TCA AGC CCG ACA T 3' |
| R – primer | 5' ATG GTA GGT CTC AGC GCG TGA GCA AGG GCG AGG AGG ATA A 3' | 5' ATG GTA GGT CTC AGC GCG TGA GCA AGG GCG AGG AGG ATA A 3' | 5' ATG GTA GGT CTC AGC GCG TGA GCA AGG GCG AGG AGG ATA A 3' |

Mikrozkušavky byly umístěny do termocykleru, jenž byl nastaven dle Tab. III.

Tabulka III: Podmínky gradientové PCR reakce pro zjištění ideální teploty

| Krok | Teplota | čas | počet cyklů |
|------------------------|---------------------------------|------------|-------------|
| počáteční denaturace | 94 °C | 30 sekund | 1x |
| Denaturace | 94 °C | 10 sekund | 30x |
| Annealing | gradient (55,0 °C – 68,0 °C) | 30 sekund | |
| Polymerizace | 72 °C | 75 sekund | |
| závěrečná polymerizace | 72 °C | 120 sekund | 1x |
| finální teplota | 16 °C | | |

Dále byla provedena analýza na agarózovém gelu. Dle výsledků byla zvolena teplota pro každý konstrukt, dle které byla provedena další amplifikace.

5.1.2 Analýza pomocí elektroforézy

Prvním krokem byla příprava 1% agarózového gelu. Do Erlenmayerovy baňky byl pomocí předvážek navážen 1g agarózy. Do odměrného válce bylo odměřeno 100 ml 1x TAE (Tris-acetát-EDTA) pufru a tento objem byl přelit do baňky s agarózou. Tato baňka byla vložena do mikrovlnné trouby a agar byl povařen do úplného rozpuštění agarózy. Baňka byla následně ochlazena pod tekoucí vodou na teplotu přibližně 55 °C. Do baňky bylo napipetováno 10 µl SERVA DNA Stain Clear G barvy a baňka byla promíchána. Agar byl následně přelit do předem připravené formy a byl do něho vložen hřebínek. Agar byl následně ponechán zatuhnout. Po zatuhnutí byl odebrán hřebínek a do aparatury byl nalit 1x TAE pufr tak, aby byly jamky gelu zcela ponořené. Celkem bylo vytvořeno 14 jamek. Do první jamky bylo vždy napipetováno 10 µl DNA Ladderu (Quick Load 1kb Protein Ladder). Do dalších jamek byly napipetovány vzorky. Po nanesení všech vzorků byla elektroforéza uzavřena, připojena ke zdroji elektrického napětí a zapnuta na napětí 100 V na přibližně 30 minut. Po uplynutí tohoto času a po dostatečné separaci DNA byl zdroj napětí odpojen. Gel byl přendán do UV – transiluminátoru a následně byl výsledek zaznamenán.

5.1.3 Amplifikace DNA pomocí PCR

Dalším krokem klonování byla amplifikace DNA pomocí PCR při teplotě zvolené z gradientové PCR. Byl připraven nutný počet PCR zkumavek o objemu 0,2 ml. Do nich byly postupně napipetovány komponenty podle Tab. IV. Finální objem byl vždy 50 µl. Jako poslední se vždy pipetovala polymeráza. Do poloviny zkumavek byl přidán 5x Q5 High GC Enhancer, u nějž se posuzoval lepší či horší výsledek amplifikace.

Tabulka IV: Reagenty pro amplifikaci pomocí PCR

| komponenty | finální koncentrace |
|--|--------------------------------|
| 5x Q5 reakční pufr | 1 x |
| 10 mM dNTPs | 200 μ M |
| 10 μ M F-primer (mNS_GFP_pASK-IBA37plus_F, (mNS_mNeonGreen+mCherry_pASK-IBA37plus_F) | 0,5 μ M |
| 10 μ M R-primer (mNS_fusion_pASK-IBA37plus_R) | 0,5 μ M |
| templát DNA (mNS_mNeon_pASK IBA37+, mNS_mCherry_pASK IBA37+, mNS_GFP_pASK IBA37+) | 50 ng |
| Q5 Hi-Fi DNA polymeráza | 0,02 U/ μ l |
| 5x Q5 High GC Enhancer | 1x nebo bez Ehnahceru |
| PCR H ₂ O | do finálního objemu 50 μ l |

Zkumavky o určitém složení byly vloženy do termocykleru a proběhla samotná PCR reakce. Podmínky v termocykleru jsou uvedeny v Tab. V.

Tabulka V: Podmínky termocykleru při amplifikaci DNA

| Krok | teplota | čas | počet cyklů |
|------------------------|---------|-----------|-------------|
| Počáteční denaturace | 98 °C | 30 sekund | 1x |
| Denaturace | 98 °C | 10 sekund | 30x |
| Annealing | 62 °C | 10 sekund | |
| Polymerizace | 72 °C | 25 sekund | |
| Závěrečná polymerizace | 72 °C | 2 minuty | 1x |
| finální teplota | 4 °C | | |

Znovu byl připraven 1% agarózový gel a vzorky byly analyzovány jako v předešlém případě (viz. Kapitola 5.1.2)

5.1.4 Izolace DNA

Z dokončeného agarózového gelu byly vyříznuty úseky gelů, kde bylo hledané DNA, a tyto úseky byly vloženy do mikrozkušavky o objemu 2ml. Od každého fúzního plazmidu byl vždy vybrán jeden úsek s enhancerem a jeden úsek bez enhanceru. Izolace obou typů byla prováděna totožně. Do zkumavek bylo přidáno 700 μ l NTI vazebního pufru (guanidin thiokyanát). Zkušavky byly vloženy do předehřátého termobloku o teplotě 50 °C. Zde byly ponechány celkem 10 minut do úplného rozpuštění agarózy. K zajištění úspěšného rozpuštění byl vzorek každé 2 minuty promíchán vortexem.

Do prázdné sběrné zkumavky byla vložena kolona (NucleoSpin Gel a PCR Clean-up kit). Na tuto kolonu bylo napipetováno 700 μ l rozpuštěného vzorku a zkumavka byla centrifugovaná po dobu 30 sekund a rychlosti otáček 11 000 rpm. Rozpuštěný gel tímto krokem protekl kolonou do sběrné zkumavky. Obsah sběrné zkumavky byl vylit do odpadu. Na kolonu se následně napipetoval zbytek rozpuštěného gelu a opakovala se centrifugace. Tímto krokem byla navázána DNA na kolonu. Kolona byla v dalším kroku promývána. Promývání bylo provedeno pomocí nanesení 700 μ l promývacího pufru NT3. Následně byl vzorek centrifugován na 30 sekund při rychlosti otáček 11 000 rpm. Po stočení byl roztok ve sběrné zkumavce vylit do odpadu. Následně se znovu opakovalo promývání identickým způsobem.

Po promytí byla kolona vysušena. Kolona společně se sběrnou zkumavkou byly umístěny do centrifugy na 2 minuty a rychlosti otáček 11 000 rpm. Takto vysušená kolona byla přemístěna ze sběrné zkumavky do čisté mikrozkušavky o objemu 1,5 ml. Na kolonu bylo napipetováno 30 μ l PCR vody a byla vložena do centrifugy na 1 minutu při rychlosti otáček 11 000 rpm. Tímto krokem byla eluována DNA do zkumavky. Kolona byla vyhozena do odpadu. Zkušavky s plazmidovou DNA byly umístěny na led.

Dalším krokem bylo změření koncentrace plazmidové DNA. To bylo provedeno pomocí přístroje NanoDrop – One (Thermo Fisher Scientific). Po změření se posuzovalo, jestli měl enhancer zásadní pozitivní vliv na amplifikaci. Zkušavky byly následně vloženy do mrazáku o teplotě -18 °C.

5.1.5 Ligace a transformace do NEB® 5-alpha Competent *E. coli*

Po rozmrazení plazmidové DNA byla provedena restrikce pomocí BsaI – HF enzymu, který byl smíchán s 1 μ g DNA a 5 μ l 10x NEB pufru. Poté byla přidána PCR voda do finálního objemu 50 μ l. Tato směs byla vložena do předehřáté třepačky o teplotě 37 °C na 15 minut. Následně byla směs převedena do předehřátého termobloku na 20 minut při teplotě 80 °C.

Ke katalýze defosforlyace byla použita rSAP (shrimp alkaline phosphatase) za využití

sady NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit od výrobce New England Biolabs. Vše bylo provedeno pomocí protokolu výrobce. Do PCR zkumavky bylo pipetou převedeno 2 μ l CutSmart pufru, 1 μ l rSAP a byl přidán 1 pmol DNA a směs byla doplněna PCR vodou do finálního objemu 20 μ l.

Následně byla provedena ligace pomocí T4 DNA ligázy. Byl určen molární poměr 1:3 mezi DNA vektorem a DNA insertem. Přesné výpočty byly provedeny pomocí kalkulačky od výrobce dostupný na jejich webových stránkách. Do PCR zkumavky bylo pipetou převedeno 2,19 μ l vektoru (pASK IBA 37+ c = 680 ng/ μ l) a příslušné množství insertů dle jejich zjištěné koncentrace. Dále byly přidány 2 μ l T4 DNA ligase pufru, 1 μ l T4 DNA ligázy a doplněno PCR vodou do finálního objemu 20 μ l. Takto připravené zkumavky byly promíchány pipetováním a poté krátce stočeny na centrifuze. Poté byly zkumavky inkubovány při 16 °C přes noc. Po inkubaci byly zkumavky vloženy do termobloku předehřátého na 65 °C po dobu 10 minut, tím došlo k jejich deaktivaci. Po vyndání zkumavek z termobloku byly zkumavky vloženy na led.

Po ligaci byl tento produkt transformován do NEB® 5-alpha Competent *E. coli*, jenž je derivátem DH5 α kompetentních buněk *E. coli*, od výrobce New England Biolabs. Transformace byla provedena pomocí protokolu od výrobce. Z mrazáku byly vytaženy buňky a byly ponechány 10 minut na ledu. Do buněk byly přidány 2 μ l ligačního produktu dle použitého konstruktů. Obsah zkumavek byl jemně promíchán a zkumavky byly položeny na 30 minut na led. Poté byl proveden teplotní šok pomocí vodní lázně při teplotě 42 °C na dobu přesně 30 sekund. Zkumavky byly následně opět převedeny na 5 minut na led. Dále bylo do zkumavek napipetováno 250 μ l SOC media předehřátého na pokojovou teplotu. Zkumavky byly vloženy do třepačky předehřáté na 37 °C. Zde byly za rychlosti 220 rpm ponechány po dobu 60 minut. Během průběhu inkubace byl předehřát potřebný počet ampicilinových ploten. Na ty byla rozdělena inkubovaná směs, a to vždy 50 μ l na jednu z ploten a zbytek na druhou z ploten. Tyto plotny byly přes noc inkubovány při teplotě 37 °C. Další den byly tyto plotny vloženy do lednice a byly připraveny pro další krok.

5.1.6 Colony PCR

Pro colony PCR byly použity plotny z předchozího kroku. Připravené plotny byly přeneseny do laminárního boxu a zde bylo připraveno pro každý konstrukt 13 mikrozkušavek. Do každé zkumavky bylo napipetováno 20 μ l PCR vody a do 12 z nich byla pomocí špičky vložena vždy jedna kolonie. Jedna zkumavka byla ponechána jako negativní kontrola, do té byla vložena sterilní špička, která se pouze dotkla plotny bez kolonie. Špičky byly ponořeny a lehce promíchány, aby došlo k uvolnění kolonií do vody. Špičky byly ve vodě ponechány.

V dalším kroku byla nachystána nová ampicilinová plotna a špičkami, které obsahovaly kolonie, byly na plotny namalovány křížky, které byly číselně označeny. Plotny byly poté vloženy do inkubátoru o teplotě 37 °C a byly inkubovány přes noc.

Voda s koloniemi, které se do ní ze špiček uvolnili, byla využita ke colony PCR jako templát DNA. Bylo připraveno dalších 13 zkumavek. Do zkumavek byly napipetovány jednotlivé komponenty. Tyto komponenty jsou uvedeny v Tab. VI.

Tabulka VI: Reakční komponenty použité při colony PCR

| Komponenty | objem |
|---|--------------------------------------|
| PPP MM reakční pufr | 12,5 µl |
| 10 µM F-primer (mNS_GFP_pASK-IBA37plus_F, (mNS_mNeonGreen+mCherry_pASK- IBA37plus_F) | 2,5 µl |
| 10 µM R-primer (mNS_fusion_pASK-IBA37plus_R) | 2,5 µl |
| templát DNA | 1 µl |
| PCR H ₂ O | doplnit do 24 µl finálního objemu |

Vzorky byly vloženy do termocykleru předehřátého na denaturační teplotu (94 °C).

Termocykler byl nastaven podle Tab. VII.

Tabulka VII: Podmínky colony PCR

| Krok | teplota | čas | počet cyklů |
|------------------------|---------|-----------|-------------|
| počáteční denaturace | 94 °C | 30 sekund | 1x |
| Denaturace | 94 °C | 10 sekund | 30x |
| Annealing | 62 °C | 30 sekund | |
| Polymerizace | 72 °C | 90 sekund | |
| závěrečná polymerizace | 72 °C | 2 minuty | 1x |
| finální teplota | 4 °C | | |

Byl připraven 1% agarózový gel (viz. Kapitola 5.1.2). Po amplifikaci vzorku pomocí PCR byly zkumavky umístěny na led. Do všech zkumavek bylo napipetováno

10 µl barviva (Gel Loading Dye, Purple, 6x). Do první jamky byl napipetován DNA ladder (Quick-Load 100 bp DNA Ladder). Do dalších jamek bylo napipetováno 30 µl vzorků. Pořadí vzorků bylo zaznamenáno. Následně byla elektroforéza uzavřena, připojena ke zdroji elektrického napětí a zapnuta na napětí 100 V na přibližně 30 minut. Po uplynutí tohoto času a po dostatečné separaci DNA byl zdroj napětí odpojen. Gel byl přemístěn do UV – transiluminátoru a následně byl výsledek zaznamenán.

5.1.7 Izolace plazmidů

Podle výsledků analýzy Colony PCR byly pro každý z plazmidů zvoleny vždy 3 kolonie z ampicilinových ploten s křížky. Do kultivačních zkumavek bylo převedeno pipetou 3 ml LB media a dále bylo napipetováno 3 µl ampicilinu o finální koncentraci 0,1 mM. Do každé kultivační zkumavky byla dodána příslušná kolonie pomocí plastové špičky z ploten s křížky. Inkubace byla provedena v třepačce při 37 °C a 220 rpm přes noc.

Ráno bylo přichystáno potřebné množství zkumavek o objemu 1,5 ml. Do každé zkumavky bylo pipetou převedeno vždy 1500 µl příslušné buněčné kultury. Všechny zkumavky byly vloženy do centrifugy na 30 sekund při rychlosti otáček 10000 rpm. Poté bylo slito oddělené LB medium a zkumavky byly doplněny dalším množstvím dané buněčné kultury. Po centrifugaci zůstal ve všech zkumavkách samotný buněčný pelet.

Poté byl z buněčného peletu izolován plazmid. K tomuto kroku byla využita komerčně dostupná sada NucleoBond Xtra plasmid purification od výrobce Macherey-Nagel, přičemž bylo postupováno podle protokolu od výrobce.

Ke každému peletu bylo do zkumavky pipetou převedeno 250 µl pufru A1 a 250 µl pufru A2. Poté byly zkumavky ponechány 5 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí daného času bylo napipetováno 300 µl pufru A3. Tento lyzát byl vložen do centrifugy a stáčen 10 minut při rychlosti otáček 11 000 rpm. Následně byly připraveny nové zkumavky s filtrem, na které byl napipetován supernatant, jenž byl získán centrifugací. Tyto zkumavky byly vloženy do centrifugy a stáčeny po dobu 1 minuty při rychlosti otáček 11 000 rpm, aby došlo k navázání DNA na membránu. Dále bylo nutné promýt zmíněnou membránu. V tomto případě bylo použito 600µl pufru A4. Následovalo vložení do centrifugy a stáčení po dobu 1 minuty při rychlosti otáček 11 000 rpm. Dalším krokem bylo vysušení membrány. Zkumavky byly vloženy do centrifugy a stáčeny při rychlosti otáček 11 000 rpm po dobu 2 minut. Po vysušení membrány byla eluována DNA. Eluace se provedla pomocí 50 µl ultračisté vody. Po přidání množství vody byla zkumavka s membránou převedena do čisté zkumavky a vložena do centrifugy. Zde byla stáčena po dobu 1 minuty při rychlosti 11 000 rpm. Poté byla koncentrace plazmidů změřena na přístroji NANODROP – ONE. Následně bylo provedeno

Sangerovo sekvenování. Plazmidy byly uskladněny v mrazáku při teplotě -18 °C.

5.1.8 Izolace a namnožení plazmidů

Podle výsledků analýzy Colony PCR byly pro každý z plazmidů zvoleny vždy 3 kolonie z ampicilinových ploten s křížky. Do Erlenmayerových baněk o objemu 500 ml bylo převedeno pipetou 150 ml LB media a dále bylo napipetováno 150 μ l ampicilinu. Do každé Erlenmayerovy baňky byla dodána příslušná kolonie pomocí plastové špičky z ploten s křížky. Inkubace byla provedena v třepačce při 37 °C a 220 rpm přes noc.

Ráno bylo přichystáno potřebné množství kónických zkumavek o objemu 50 ml. Do každé zkumavky bylo pipetou převedeno vždy 50 ml příslušné buněčné kultury. Všechny zkumavky byly vloženy do centrifugy na 10 minut při rychlosti otáček 4 200 rpm. Poté bylo slito oddělené LB medium a zkumavky byly doplněny dalším množstvím dané buněčné kultury. Po třech centrifugacích zůstal ve všech zkumavkách samotný buněčný pelet.

Poté byl z buněčného peletu izolován plazmid. K tomuto kroku byla využita komerčně dostupná sada NucleoBond Xtra plasmid purification od výrobce Macherey-Nagel, přičemž bylo postupováno podle protokolu od výrobce.

Ke každému peletu bylo do zkumavky pipetou převedeno 12 ml resuspenzačního pufru s RNázou A. Důkladné rozpuštění buněčného peletu v pufru bylo provedeno pomocí vortexu. Poté bylo do zkumavek pipetou převedeno 12 ml lyzačního pufru a obsah zkumavek byl promíchán otáčením zkumavek dnem vzhůru. Následně byl obsah zkumavek inkubován 5 minut při pokojové teplotě. Do kolon byly vloženy filtry, které byly poté zkalibrovány 25 ml ekvilibračního pufru. Ten byl pipetou nanášen na okraje filtrů a protékal do odpadních kádinek. Po uplynutí 5 minut bylo do zkumavek pipetou převedeno 12 ml neutralizačního pufru a zkumavky byly otáčeny dnem vzhůru tak dlouho, dokud nebyl jejich obsah bílý. Obsah zkumavek byl poté převeden na zkalibrované filtry. Ve chvíli, kdy byl veškerý roztok přefiltrován, byly filtry promyty 15 ml ekvilibračního pufru. Filtry byly odstraněny a do kolon bylo pipetou převedeno 25 ml promývacího pufru. Po jeho protečení byly pod kolony umístěny místo kádinek 15ml kónické zkumavky. Kolony byly promyty 10 ml elučního pufru, který protékal do těchto zkumavek. Poté do nich bylo pipetou převedeno 5 ml 100% isopropanolu a za použití vortexu byl obsah zkumavek promíchán. V dalším kroku byly všechny zkumavky vloženy do centrifugy na 60 minut při rychlosti otáček 4 200 rpm a teplotě 4 °C. Po skončení centrifugace byl pipetou odstraněn ze zkumavek pufr, a tak v nich zůstaly pouze pelety. K nim bylo pipetou převedeno vždy 2 ml 70% ethanolu a po rozpuštění byly roztok pipetou převedeny do 2ml zkumavek. Ty byly umístěny do centrifugy na 10 minut při rychlosti otáček 4 200 rpm. Poté byl pomocí pipety odstraněn ethanol a pelety byly ponechány

15 minut při pokojové teplotě, během této doby vyschly. Následně k nim bylo pipetou přivedeno vždy 100 μl PCR vody, v níž byly pelety rozpuštěny. Poté byla změřena koncentrace všech takto připravených plazmidů pomocí přístroje NanoDrop – One. Plazmidy byly uloženy do mrazáku o teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2 Transformace

K transformaci byly vybrány a následně otestovány celkem 4 typy kompetentních buněk *Escherichia coli*.

5.2.1 Transformace do BL21 (DE3) Competent *E. coli*

Jedním z typů kompetentních buněk, který byl při transformaci použit, byl BL21 (DE3) Competent *E.coli* Cells od výrobce New England Biolabs, který je veden pod katalogovým číslem C2527H. Transformace byla provedena dle návodu od výrobce.

Do buněk byly dodány plazmidy, které již byly naklonovány v klonovacím vektoru pDEST 17 a byly poskytnuty laboratoří strukturní chemie PřF JČU. Tyto plazmidy jsou uvedeny v Tab. VIII. Dále byly vytvořeny plazmidy, které byly naklonovány ve vektoru pASK IBA 37+. Jejich koncentrace je uvedena v Tab. IX.

Tabulka VIII: Přehled plazmidů pDEST 17 poskytnutých laboratoří strukturní chemie PřF JČU

| Plazmid | Koncentrace [$\text{ng}/\mu\text{l}$] |
|----------------------------------|---|
| mNeon - μNS pDEST17 | 47,2 |
| mCherry - μNS pDEST17 | 522 |
| GFP- μNS pDEST17 | 273 |

Tabulka IX: Přehled připravených plazmidů ve vektoru pASK IBA 37+

| Plazmid | Koncentrace [$\text{ng}/\mu\text{l}$] |
|---------------------------------------|---|
| mNeon - μNS pASK IBA 37+ | 349,5 |
| mCherry - μNS pASK IBA 37+ | 328,3 |
| GFP- μNS pASK IBA 37+ | 242,8 |

Zkumavky s kompetentními buňkami byly uloženy 10 minut na ledu. Poté byly k buňkám dodány plazmidy o výše uvedené koncentraci, a to objemu 1 μl . Směsi plazmidů s buňkami byly následně lehce promíchány, aby se předešlo destrukci buněk. Zkumavky byly

následujících 30 minut inkubovány na ledu. Po inkubaci byl proveden tepelný šok pomocí vodní lázně při teplotě 42 °C na přesně 10 sekund. Poté byly zkumavky opět ponechány 5 minut na ledě. Dále bylo do zkumavek napipetováno 250 µl SOC media zahřátého na pokojovou teplotu. Tyto zkumavky byly vloženy na 60 minut do třepačky, která byla předem nahřata na 37 °C při otáčkách 220 rpm. V průběhu tohoto kroku byly nahřaty ampicilinové plotny na 37 °C v inkubátoru. Po ukončení inkubace v třepačkách bylo na jednu z předpřipravených ploten napipetováno a poté rozetřeno očkovací hokejkou 50 µl obsahu zkumavky a na druhou plotnu byl převeden zbytek obsahu zkumavky. Tyto plotny byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C. Následující den ráno byly plotny přemístěny do lednice, čímž se zabránilo nadměrnému růstu kolonií. Plotny tak byly připraveny pro další využití

5.2.2 Transformace do BL21-AI™ One Shot™ Chemically Competent *E. coli*

U tohoto typu kompetentních buněk byl použit plazmid mCherry – µNS pDEST 17 dodaný laboratoří strukturální chemie PřF JČU o koncentraci 8248,9 ng/µl.

Při transformaci plazmidu do tohoto typu buněk je postup obdobný jako při transformaci do BL21 (DE3) Competent *E. coli*. Jedním z rozdílů je úprava trvání tepelného šoku, který je u tohoto typu buněk 30 sekund. Dále byla podle protokolu dle výrobce zkrácena doba inkubace v třepačce, a to na 30 minut.

5.2.3 Transformace do BL21 – CodonPlus (DE3) RIPL Competent Cells

Další použitou buněčnou kulturou byla BL21-CodonPlus Competent Cells. Zde byly dodávány do buněk plazmidy uvedené v kapitole 5.2.1.

Při transformaci plazmidu do tohoto typu buněk je postup stále shodný jako u transformace do BL21 (DE3) Competent *E. coli*. I zde jsou na druhou stranu určité rozdíly. Prvním z nich je změna délky tepelného šoku, a to na 20 sekund. Druhou změnou je rozdílná délka chlazení na ledu po tepelném šoku, a to pouze na 2 minuty. Následně je postup již identický.

5.2.4 Transformace do ArcticExpress (DE3) Competent Cells

Poslední z vybraných kompetentních buněk byly ArcticExpress (DE3) Competent Cells, kde byly použity stejné plazmidy jako v případě BL21 (DE3) Competent *E. coli*.

I zde je jedna odlišná podmínka od BL21 (DE3) Competent *E. coli* týkající se antibiotik použitých na plotnách. V případě těchto buněk je obsažen kromě ampicilinu i gentamicin. Ostatní podmínky transformace jsou identické.

5.3 Exprese proteinů

Pilotní exprese proteinů se prováděla se záměrem zjištění a určení vhodných

podmínek, které směřují k co nejvyšší expresi proteinu. Podmínky exprese byly provedeny dle protokolů k buněčným liniím a plazmidům, mezi ně se řadí například teplota při indukci, délka indukce nebo samotný induktor.

5.3.1 Pilotní exprese

Do dvou kónických zkumavek o objemu 50 ml bylo napipetováno 10 ml LB media a k tomuto mediu bylo dále převedeno pipetou antibiotikum ampicilin o výsledné koncentraci 1 mM. Tyto podmínky byly použity u BL21. Pro pilotní expresi ArcticExpress (DE3) Competent Cells byl k LB mediu přidán ampicilin o koncentraci 1 mM a gentamicin o koncentraci 2 mM. Do každé kónické zkumavky byla dodána kolonie pomocí plastové špičky z vybraných ploten z transformace plazmidu do buněk. Následně byla provedena inkubace přes noc ve třepačce při teplotě 37 °C a rychlosti otáček 220 rpm.

Další den byl připraven dostatečný počet kónických zkumavek o objemu 50 ml. Do zkumavek bylo napipetováno 15 ml LB media, ampicilin o koncentraci 1 mM a dále do nich byl pipetou převeden 1 ml inkubovaného media, poté byly tyto zkumavky umístěny do třepačky o teplotě 37 °C. Po 30 minutách byla změřena optická hustota (OD_{600}) roztoku oproti slepému vzorku, kterým byl 1 ml čistého LB media. Pokud byla dosažena požadovaná hodnota OD_{600} , tedy mezi hodnotami 0,4 – 0,6, mohlo se přejít na další krok. Pokud hodnota nebyla dostačující, tak se inkubované medium vrátilo do třepačky na nezbytně dlouhou dobu, dokud OD_{600} nedosáhne požadovaných hodnot.

Po dostatečném nárůstu OD_{600} byly zkumavky přesunuty do lednice na přibližně 15–30 minut až na buňky, které se dále inkubovaly při teplotě 30 °C, ty byly ponechány při pokojové teplotě. V tomto čase byly nachlazeny třepačky na nižší teploty (18 °C u všech typů buněk BL21 a 13 °C u ArcticExpress (DE3) Competent Cells) a dále byl jeden nastaven na 30 °C pro všechny typy buněk BL 21 . Před samotným vložením do třepaček byl odebrán 1 ml vzorku, který sloužil jako kontrolní vzorek v čase 0 hodin. Dalším krokem byla indukce. Indukce byla provedena pomocí převedení induktoru IPTG (izopropyl β -D-1-thiogalaktopyranozid) o výsledné koncentraci 1 mM u všech typů buněk. U buněk BL21-AI™ One Shot™ Chemically Competent *E. coli* byla využita 0,5 % L – arabinóza o výsledné koncentraci 1mM spolu. Induktor byl ve všech případech vložen pouze do poloviny zkumavek s buněčnou kulturou. Druhá polovina sloužila jako negativní kontrola. Poté proběhl samotný odběr vzorků. Vždy byl odebrán 1ml kultury indukované a 1ml kultury neindukované.

Přehled podmínek pilotní exprese je uveden v Tab. X a XI

Tabulka X: Přehled podmínek pilotní exprese s induktorem IPTG

| typ buněk | teplota | koncentrace IPTG | čas odběru vzorku |
|--|---------|------------------|-------------------|
| BL21 (DE3) Competent <i>E. coli</i> , BL21-CodonPlus Competent Cells, | 18 °C | 1 mM | po 3 hod. |
| | | 0 M | |
| | | 1mM | po 6 hod. |
| | | 0 M | |
| | | 1mM | přes noc |
| | | 0 M | |
| BL21-AI™ One Shot™ Chemically Competent <i>E. coli</i> | 30 °C | 1mM | po 2 hod. |
| | | 0 M | |
| | | 1mM | po 4 hod. |
| | | 0 M | |
| | | 1mM | po 6 hod. |
| | | 0 M | |
| ArcticExpress (DE3) Competent Cells | 13 °C | 1mM | po 6 hod. |
| | | 0 M | |
| | | 1mM | přes noc |
| | | 0 M | |
| | | 1mM | přes noc |
| | | 0 M | |

Tabulka XI: Přehled podmínek pilotní exprese s induktorem 0,5% L-arabinózou

| typ buněk | teplota | koncentrace 0,5% L-arabinózy | čas odběru vzorku |
|--|---------|---------------------------------|----------------------|
| BL21-AI™ One Shot™ Chemically Competent <i>E. coli</i> | 25 °C | 1mM | po 2 hod. |
| | | 0M | |
| | | 1mM | po 4 hod. |
| | | 0M | |
| | | 1mM | po 6 hod. |
| | | 0M | |
| | 30 °C | 1mM | po 2 hod. |
| | | 0M | |
| | | 1mM | po 4 hod. |
| | | 0M | |
| | | 1mM | po 6 hod. |
| | | 0M | |

Všechny odebrané vzorky byly v centrifugačních mikrozkmavkách vloženy do centrifugy na 1 minutu při otáčkách 14 000 rpm. Tímto krokem se oddělil buněčný pelet od LB media. Tento pelet byl vložen do mrazáku o teplotě -18 °C a byl tím připraven k další analýze.

5.3.2 Expres ve velkém měřítku

Dle analýzy výsledků z pilotní exprese (viz kapitola 5.4 Analýza vzorků) byly použity podmínky pro expresi ve velkém měřítku.

Do Erlenmayerových baněk o objemu 500 ml bylo převedeno pipetou 100 ml LB media a ampicilin o výsledné koncentraci 1 mM. Do každé Erlenmayerovy baňky byla dodána kolonie pomocí plastové špičky z vybraných ploten z transformace. Inkubace byla provedena v třepačce při 37 °C a 180 rpm přes noc.

Následující den byly připraveny plastové Erlenmayerovy baňky o objemu 2 l. Do těchto baněk bylo odměřeno 200 ml LB media a ampicilin o výsledné koncentraci 1 mM. Do každé zmíněné baňky bylo napipetováno 45 ml inkubované buněčné kultury. Dále byly Erlenmayerovy baňky vloženy na 60 minut do předehřátých třepaček o teplotě 37 °C a 220 rpm. Po uplynutí 60 minut bylo do Erlenmayerových baněk přidáno 600 ml LB media na celkový objem 800 ml a příslušné množství ampicilinu, aby byla jeho výsledná koncentrace stále 1 mM. Dále byla provedena inkubace o délce minimálně 30 minut. Po uplynutí tohoto

času se stanovila koncentrace buněčné kultury pomocí spektrofotometru OD₆₀₀. Jakmile se hodnota OD₆₀₀ nacházela mezi 0,5-0,6, byl ze všech roztoků různých typů buněk odebrán před samotnou indukcí 1ml vzorek, který byl umístěn na centrifugu o rychlosti 14 000 rpm na 1 minutu. Po centrifugaci byl zachován pouze buněčný pelet, který byl vložen do mrazáku o teplotě -18 °C pro pozdější analýzu. Poté byla započata indukce pomocí induktorů o stejné koncentraci jako u pilotní exprese (viz. Tab. X a Tab. XI).

Po indukci byly Erlenmayerovy baňky znovu umístěny do třepaček o teplotě 30 °C na 6 hodin u typů buněk BL21-AI™ One Shot™ Chemically Competent *E. coli*, BL21(DE3) Competent Cells a BL21-CodonPlus Competent Cells a o teplotě 13 °C na 24 hodin u ArcticExpress (DE3) Competent Cells.

Po uplynutí stanovených časů byly znovu odebrány 1ml vzorky jako před indukcí. Dalším krokem bylo přelití obsahu Erlenmayerových baněk do plastových centrifugačních lahví o objemu 2000 ml. Tyto lahve byly vloženy do centrifugy. Centrifugace byla provedena po dobu 30 minut, při teplotě 4 °C a rychlosti 4200 rpm. Po úspěšném usazení peletu na dně byla většina media vylita do odpadu a bylo zachováno pouze přibližně 20 ml. Pomocí tohoto objemu a použití sérologických pipet byl pelet na dně lahví resuspendován. Tyto resuspendované buňky byly pipetou převedeny do centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml. Znovu byla provedena centrifugace o rychlosti 4200 rpm, teplotě 4 °C na dobu 30 minut. Medium bylo vylito do odpadu a usazený pelet byl skladován v mrazáku při teplotě -80 °C.

5.4 Analýza vzorků

5.4.1 Příprava vzorků

Po provedení pilotní exprese byly mikrozukumavky s pelety vyndány z mrazáku na led. Do každé mikrozukumavky bylo po rozmražení přidáno 500 µl lyzačního pufru (400 mM NaCl, 100 mM KCl, 50 mM K₃PO₄, 10% glycerol, 0,5% Triton X-100; pH 7,8). Důkladné promíchání lyzačního pufru s peletem bylo provedeno pomocí vortexu. Mikrozukumavky byly následně vloženy do tekutého dusíku a byly vyndány až po úplném zmražení. Následně byly tyto zmražené mikrozukumavky vloženy do termobloku předehřátého na 42 °C. V tomto termobloku byl vzorek do kompletního rozpuštění. Tento proces byl opakován ještě dvakrát. Po posledním rozpuštění byly vzorky vloženy do centrifugy o teplotě 4 °C a rychlosti 14 000 rpm, kde byly stáčeny 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant přepipetován do nových mikrozukumavek a pelet zůstal v původních mikrozukumavkách. K supernatantům bylo následně napipetováno 166 µl 4x SDS (4x Laemmli pufr a β-merkaptoethanol v poměru 1: 0,1) pufru a do mikrozukumavek s pelety bylo přidáno 500 µl 1x SDS (125 µl 4x SDS, 375µl 1x PBS). Všechny mikrozukumavky byly resuspendovány pomocí vortexu. Vzorky poté byly

vloženy na 5 minut do termobloku, který byl předehřátý na 95 °C. Po uvaření byly vzorky připraveny k další analýze.

5.4.2 SDS – PAGE elektroforéza

Vzorky byly nanášeny na gel, který byl připravený dle Tab. XII.

Tabulka XII: Složení gelu při přípravě 1 kusu

| separační 10 % gel | | zaostřovací 5% gel | |
|--------------------|---------|--------------------|---------|
| 40% akrylamid | 1,17 ml | 40% akrylamid | 250 µl |
| H ₂ O | 2,47 ml | H ₂ O | 1,46 ml |
| 1,5M Tris (pH 8,8) | 1,25 ml | 1M Tris (pH 6,8) | 250 µl |
| 10% SDS | 50 µl | 10% SDS | 20 µl |
| 10% APS | 50 µl | 10% APS | 20 µl |
| TEMED | 5 µl | TEMED | 2 µl |

Tento gel byl připraven pomocí nalévacího rámečku a stojanu. Jako první byl připraven separační gel, který se nalil do nalévacího rámečku a zbývající nezaplněná část byla doplněna propanolem. Po zatuhnutí separačního gelu byl propanol vylit do odpadu a do formy se nalil gel zaostřovací. Poté byl do gelu vložen hřebínek. Po zatvrdnutí zaostřovacího gelu byl hřebínek vyndán a gel byl připraven k použití.

Byla připravena elektroforetická aparatura, do které byl nalit elektrodotový pufr (70 ml 10x SDS a 630 ml destilované H₂O).

Do jamek vytvořených pomocí hřebínku bylo postupně napipetováno 5 µl ladderu (PageRuler Unstained Protein Ladder od výrobce Thermo Fisher Scientific) a do následujících jamek byly napipetovány jednotlivé vzorky o objemu 10 µl. Po napipetování vzorků byla nádoba uzavřena a napojena na stejnosměrný proud o napětí 100 V po dobu 30 minut. Následně bylo napětí zvýšeno na 150 V a elektroforéza probíhala dále přibližně 60 minut. Po ukončení elektroforézy byly gely vloženy do skleněných misek, které obsahovaly 20 ml fixačního roztoku (50 % ethanolu, 2 % kyseliny fosforečné). Gely v tomto roztoku se inkubovali 30 minut. Poté byly gely vymývány v destilované vodě, a to dvakrát po dobu 10 minut. V posledním kroku byly gely ponechány v barvivu Coomassie Brilliant Blue nejlépe přes noc, ale výsledky jsou pozorovatelné již po hodině v daném barvivu. Druhý den byly gely vymyty pomocí destilované vody a následně vyfoceny a vyhodnoceny.

5.5 Purifikace

5.5.1 Homogenizace

Před každou purifikací byla nutná lýze buněk, aby došlo k uvolnění zkoumaného proteinu. Pelety, které vznikly expresí ve velkém měřítku, byly rozmrazeny. Byl připraven lyzační pufr (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 0,5 mM MgCl₂ a 1 tableta proteázového inhibitoru Protease Inhibitor Cocktail Tablets EDTA-Free od výrobce SIGMAFAST) o objemu 100 ml. Do každé zkumavky bylo přidáno 15 ml lyzačního pufru. Dále bylo napipetováno do každé zkumavky 1mM DNázy a 1mM RNázy. Pomocí vortexu byly usazené buňky odtrhnuté od dna a důkladně promíchány s pufrem. Poté byly buňky ponechány 20 minut na ledu.

Dalším krokem byla další narušení, a to za použití vysokého tlaku (French press). Po získání plně resuspendované směsi byly buňky přelity do centrifugačních zkumavek a stočeny na centrifuze o rychlosti otáček 40 000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 60 minut. Supernatant této centrifugace byl následně přelit do nové zkumavky a dále pomocí chromatografu purifikován.

5.5.2 Příprava pufrů

Pro účely použití vybraných chromatografických metod byly připraveny 4 pufrů. Složení těchto pufrů je uvedeno v Tab. XIII.

Tabulka XIII: Složení pufrů použitých při chromatografii

| ekvilibrační pufr A | eluční pufr B1 | eluční pufr B2 |
|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| 20 mM Tris | 20 mM Tris | 20 mM Tris |
| 100 mM NaCl | 100 mM NaCl | 1 M NaCl |
| 0,5 mM MgCl ₂ | 1 mM MgCl ₂ | 0,5 mM MgCl ₂ |
| pH 7,0 | 1 M Imidazol | pH 7,0 |
| | pH 7,0 | |

Prvním krokem bylo navážení surovin na předvážkách pro přípravu jednotlivých pufrů. Následně byly tyto chemikálie rozpuštěny pomocí magnetické míchačky v 80 % finálního objemu destilované vody. Po úplném rozpuštění bylo upraveno pH pomocí HCl a NaOH na finální hodnotu dle Tab. XIII. Pufrů byly doplněny do finálního objemu (u pufru A 1 l, u pufrů B1 a B2 0,5l). Pufrů byly dále přefiltrovány do lahví a odplyněny.

5.5.3 Afinitní histidinová chromatografie

Tento typ chromatografie byl proveden na přístroji ÄKTA Pure s využitím kolony HisTrap HP o objemu 5ml od výrobce GE Healthcare s obsahem iontů niklu (Ni^{2+}).

Před samotnou purifikací byla nutnost promýt kolonu ultračistou vodou po dobu 5 minut a při rychlosti průtoku 5 ml/min a dále kolonu ekvilibrovat pomocí použití pufrů, a to v pořadí A – B1 – A. Každý z těchto pufrů byl nanášen na kolonu 5 minut při rychlosti 5 ml/min. Následně se zvýšila rychlost průtoku na 20ml/min a 1 minutu byl na kolonu nanášen pufr A. Poté se snížila rychlost průtoku na 1 ml/min a na kolonu byl při této rychlosti nanášen vzorek.

Při nárůstu UV byly sbírány eluované proteiny do čisté zkumavky. Tento roztok byl označen jako „flowthrough“ (FT). Ten byl sbírán do hodnoty, kdy UV kleslo na přibližně 20 mAU. FT se odebralo a následně byla připravená nová kónická zkumavka. Do té byl sbírán tzv. soft – wash. Chromatograf byl eluován 5% B1 puforem, tedy 50mM imidazolem. UV následně vždy dosáhlo peaku, který klesal zpět do nízkých hodnot. Po klesnutí na základní hodnotu byl nastaven gradient pufru B1 na 100% během 20 minut, což způsobilo eluování proteinu do frakcí o objemu 1 ml. Po dosažení 100% pufru B1 byla frakcionace zastavena a zkumavky s frakcemi označeny a analyzovány, a následně uskladněny na 4 °C.

5.5.4 Iontově výměnná chromatografie

I při této chromatografii byl využit chromatograf ÄKTA Pure Systém, ale za použití kolony HiTrap Q HP (GE Healthcare).

Před samotnou purifikací byl systém promyt obdobně jako u chromatografie afinitní. Rozdílem bylo použití pufru B2 namísto pufru B1 (viz Tab. XIII). Purifikace samotná probíhala až na vynechání soft – washe zcela totožně. Frakce o objemu 1 ml byly znovu odebrány, označeny a analyzovány.

5.5.5 Analýza vzorků purifikace

Z FT, soft – washe a vybraných frakcí bylo odebráno 30 μl a pipetou převedeno do mikrozkušavek. K tomuto objemu bylo přidáno 10 μl 4x SDS. Následně byly mikrozkušavky vloženy do termobloku předehřátého na 95 °C na 1 minut. Poté byly stanoveny výsledky pomocí SDS PAGE – elektroforézy.

6 Výsledky

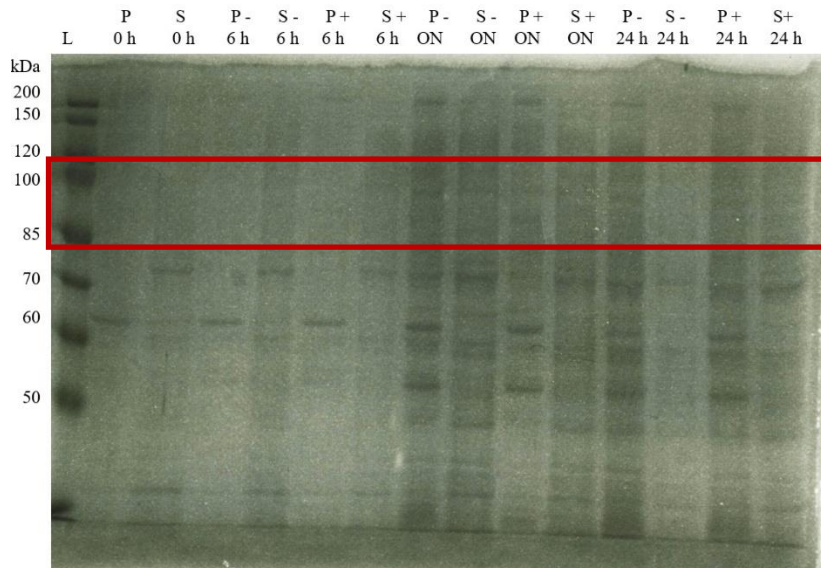
6.1 Transformace fúzních konstruktů v pDEST 17 vektoru

Nejprve byly použity plazmidy, které již byly naklonovány v klonovacím vektoru pDEST 17 a byly poskytnuty laboratoří strukturní chemie PřF JČU. Při použití těchto plazmidů nebyla exprese fúzních proteinů úspěšná. Z tohoto důvodu byly vytvořeny nové plazmidy, které byly naklonovány v klonovacím vektoru pASK IBA 37+ (viz. Kapitola 6.3).

6.1.1 Transformace plazmidů do ArcticExpress (DE3) Competent Cells a jejich exprese

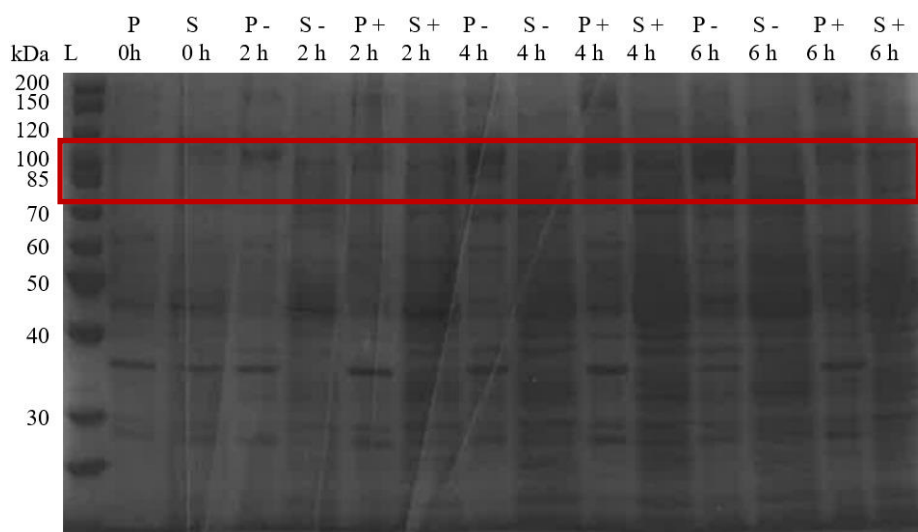
Plazmidy GFP – μ NS pDEST17 [242,8 ng/ μ l], mNeon – μ NS pDEST17 [349,5 ng/ μ l], mCherry – μ NS pDEST17 [328,3 ng/ μ l] byly transformovány do ArcticExpress (DE3) Competent Cells a inkubovány na plotnách s obsahem ampicilinu a gentamicinu. Příloha 1 zobrazuje, jak tyto plotny vypadaly.

Dalším krokem bylo provedení exprese. Při naprodukování buněk přes noc (dle kapitoly 5.3.1) nedošlo k produkci u konstruktu mCherry. Důvod je v tomto případě neznámý. Induktorem bylo IPTG. Po provedení pilotní exprese byly výsledky stanoveny pomocí SDS – PAGE elektroforézy. Tyto výsledky jsou na Obr.7 a Obr. 8.



Obr. 7: Pilotní exprese plazmidu GFP – μ NS pDEST 17 do ArcticExpress (DE3) Competent Cells při teplotě 13 °C. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu. (kDa – kilodalton, L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher), P – buněčný pelet, S – supernatant, ON – přes noc)

V tomto případě se ve vyznačeném úseku fúzní konstrukt GFP - μ NS pDEST 17 nenachází (předpokládaná molekulová hmotnost GFP - μ NS je cca 100 kDa). Exprese nebyla úspěšná ani při delší době inkubace.



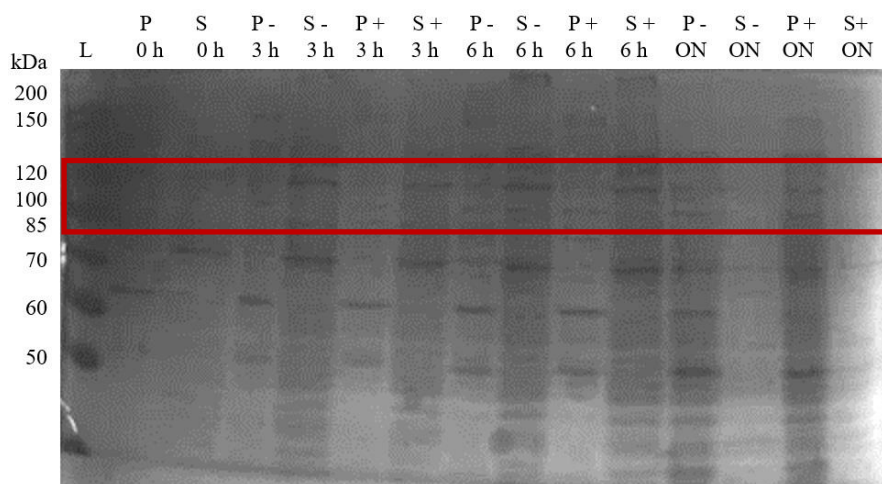
Obr. 8: Pilotní exprese plazmidu mNeon – μ NS pDEST 17 do ArcticExpress (DE3) Competent Cells při teplotě 13 °C. Při pipetování došlo k chybě a vzorek 0h nebyl nanesen na gel. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu. (kDa – kilodalton, L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher), P – buněčný pelet, S – supernatant, ON – přes noc)

I v tomto případě se ve vyznačeném úseku fúzní konstrukt mNeon - μ NS pDEST 17 nenachází (předpokládaná molekulová hmotnost mNeon - μ NS je cca 100 kDa). Exprese nebyla úspěšná ani při delší době inkubace.

6.1.2 Transformace plazmidů do BL21-CodonPlus Competent Cells a jejich exprese

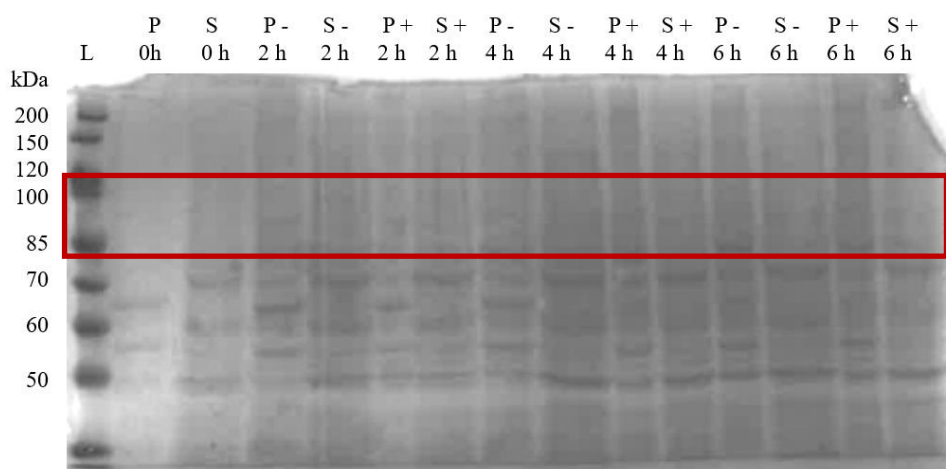
Plazmidy GFP – μ NS pDEST 17 [273 ng/ μ l], mNeon – μ NS pDEST 17 [47,2 ng/ μ l], mCherry – μ NS pDEST 17 [522 ng/ μ l] byly transformovány do BL21-CodonPlus Competent Cells a inkubovány na ampicilinových plotnách. Po inkubaci byla provedena pilotní exprese buněk. Buněčná kultura je zobrazena v příloze 2.

Induktorem bylo IPTG. Výsledky exprese byly analyzovány pomocí SDS – PAGE elektroforézy. Analyzované gely jsou zobrazeny na Obr. 9, Obr. 10 a Obr 11.



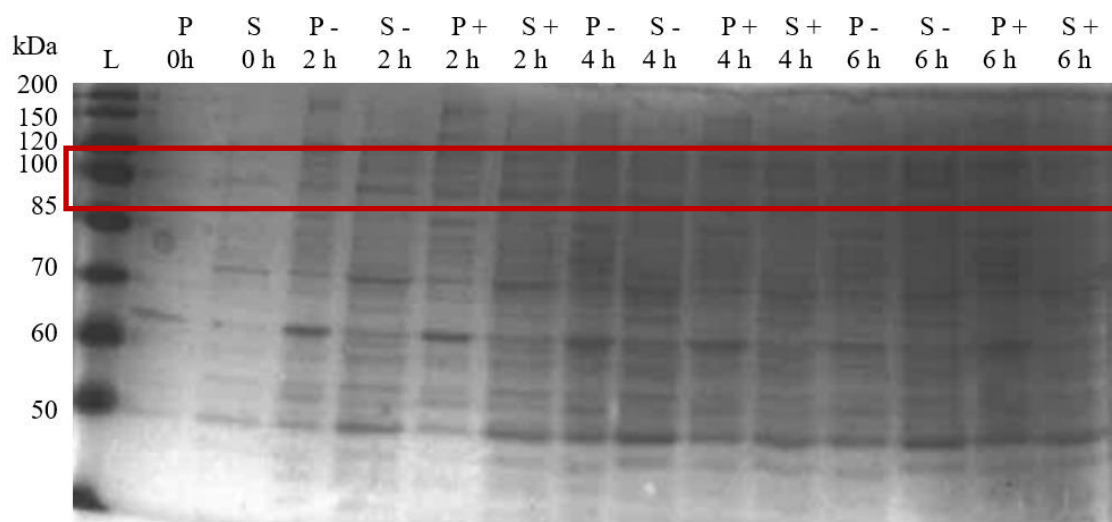
Obr. 9: Pilotní exprese GFP – μ NS pDEST 17 do BL21-CodonPlus Competent Cells při teplotě 18 °C. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu. (kDa – kilodalton, L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher), P – buněčný pelet, S – supernatant, ON – přes noc)

V tomto případě se ve vyznačeném úseku fúzní konstrukt GFP - μ NS pDEST 17 nenachází (předpokládaná molekulová hmotnost GFP - μ NS je cca 100 kDa). Exprese nebyla úspěšná ani při delší době inkubace.



Obr. 10: Pilotní exprese mNeon – μ NS pDEST17 do BL21-CodonPlus Competent Cells při teplotě 30 °C. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu. (kDa – kilodalton, L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher), P – buněčný pelet, S – supernatant, ON – přes noc)

Ani zde se ve vyznačeném úseku fúzní konstrukt mNeon - μ NS pDEST 17 nenachází (předpokládaná molekulová hmotnost mNeon - μ NS je cca 100 kDa). Exprese nebyla úspěšná ani při delší době inkubace.



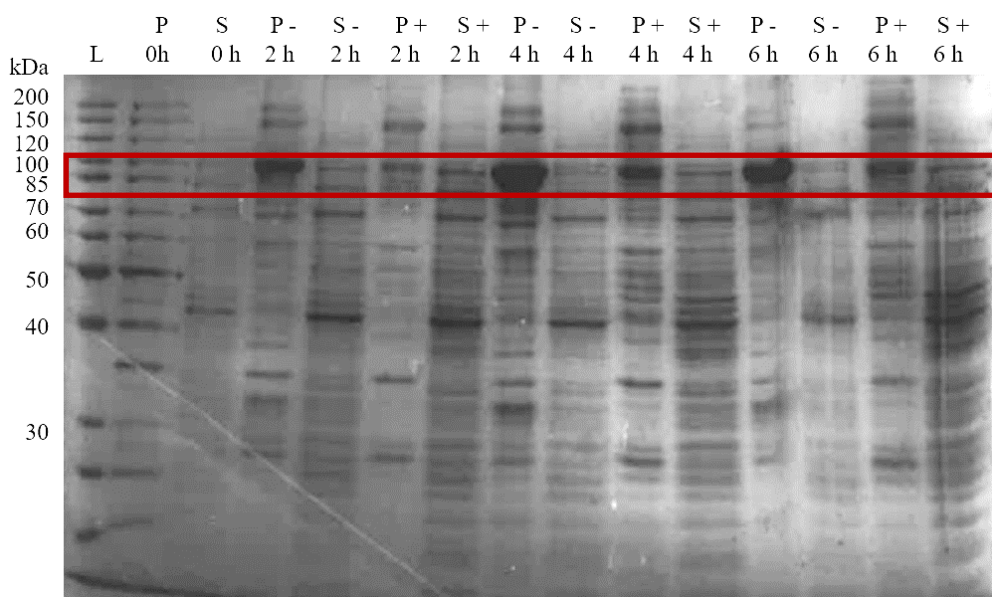
Obr. 11: Pilotní exprese mCherry – μ NS pDEST 17 do BL21-CodonPlus Competent Cells při teplotě 30 °C. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu. (kDa – kilodalton, L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher), P – buněčný pelet, S – supernatant, ON – přes noc)

I v tomto případě se ve vyznačeném úseku fúzní konstrukt mCherry - μ NS pDEST 17 nenachází (předpokládaná molekulová hmotnost mCherry - μ NS je cca 100 kDa). Exprese nebyla úspěšná ani při delší době inkubace.

6.1.3 Transformace plazmidů do BL21-AI™ One Shot™ Chemically Competent *E. coli* a jejich exprese

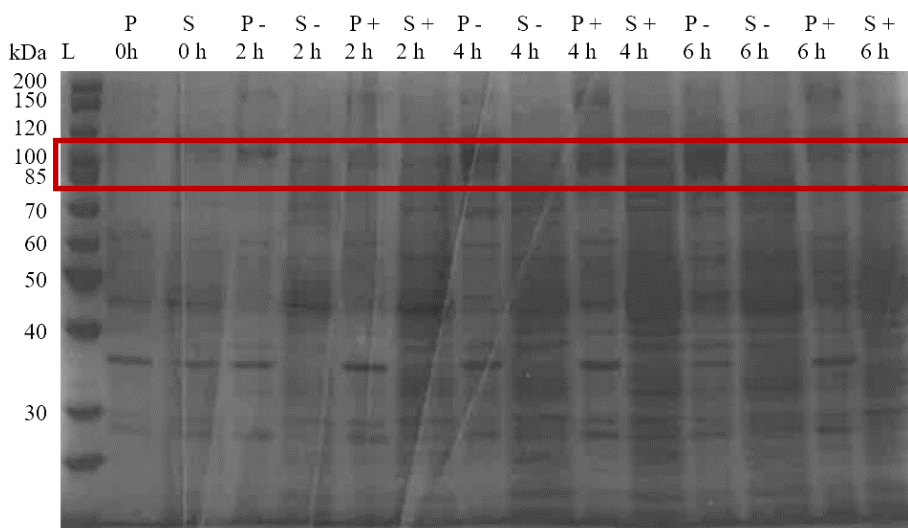
Plazmidy GFP – μ NS pDEST17 [273 ng/ μ l], mNeon – μ NS pDEST17 [47,2 ng/ μ l], mCherry – μ NS pDEST17 [522 ng/ μ l] byly transformovány do BL21-AI™ One Shot™ Chemically Competent *E. coli* a inkubovány na ampicilinových plotnách.

Po transformaci do buněk byla provedena exprese proteinu v LB mediu za použití induktoru IPTG. Výsledky byly analyzovány pomocí SDS – PAGE elektroforézy. Analyzované gely jsou zobrazeny na Obr. 12, 13 a 14.



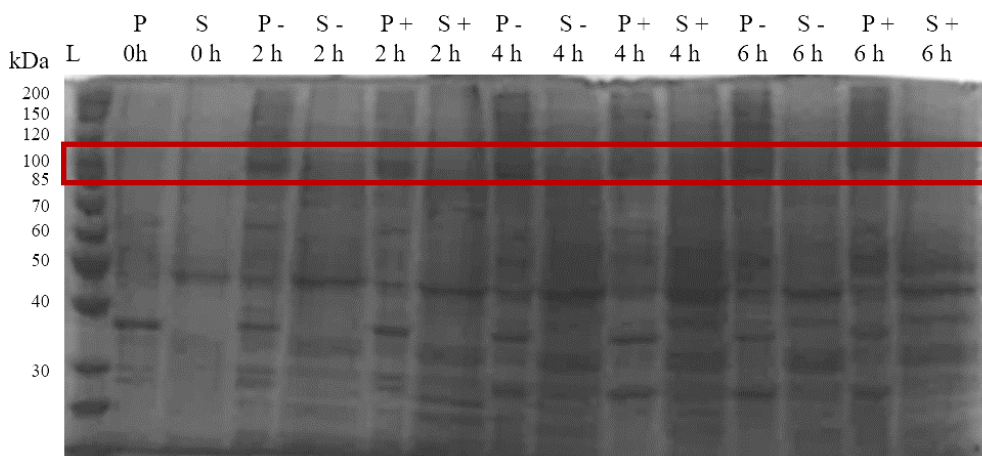
Obr. 12: Pilotní exprese GFP – μ NS pDEST 17 do BL21-AI™ One Shot™ Chemically Competent *E. coli* při 25 °C. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu (kDa – kilodalton, L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher), P – buněčný pelet, S – supernatant, ON – přes noc).

V tomto případě se ve vyznačeném úseku fúzní konstrukt GFP - μ NS pDEST 17 nenachází (předpokládaná molekulová hmotnost GFP - μ NS je cca 100 kDa). I přes zobrazení frakcí v indukovaném peletu o odpovídající molekulové hmotnosti bylo pomocí hmotnostní spektrometrie zjištěno, že se nejedná o požadovaný protein.



Obr. 13: Pilotní exprese mNeon – μ NS pDEST 17 do BL21-AI™ One Shot™ Chemically Competent *E. coli* při 25 °C. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu. (kDa – kilodalton, L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher), P – buněčný pelet, S – supernatant, ON – přes noc)

V tomto případě se ve vyznačeném úseku fúzní konstrukt mNeon - μ NS pDEST 17 nenachází (předpokládaná molekulová hmotnost mNeon - μ NS je cca 100 kDa). Exprese nebyla úspěšná ani při delší době inkubace.



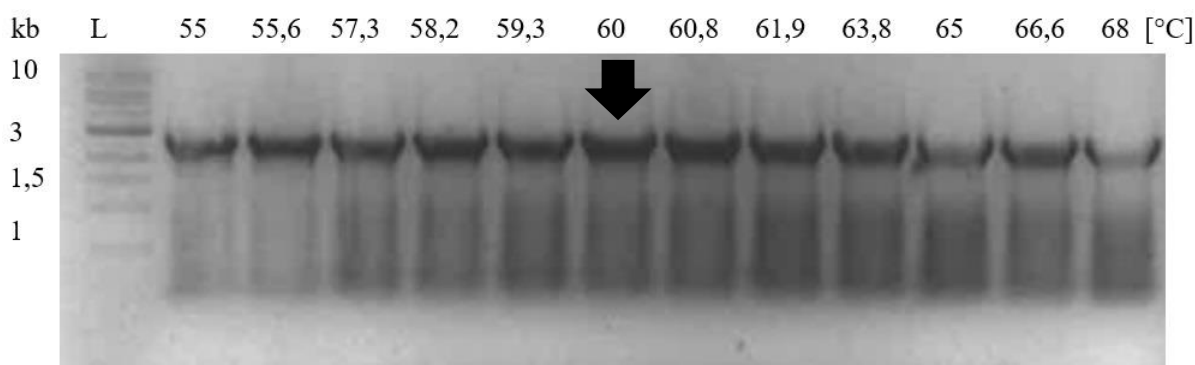
Obr. 14: Pilotní exprese mCherry – μ NS pDEST 17 do BL21-AI™ One Shot™ Chemically Competent *E. coli* při 25 °C. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu. (kDa – kilodalton, L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher), P – buněčný pelet, S – supernatant, ON – přes noc)

V tomto případě se ve vyznačeném úseku fúzní konstrukt mCherry - μ NS pDEST 17 nenachází (předpokládaná molekulová hmotnost mCherry - μ NS je cca 100 kDa). Exprese nebyla úspěšná ani při delší době inkubace.

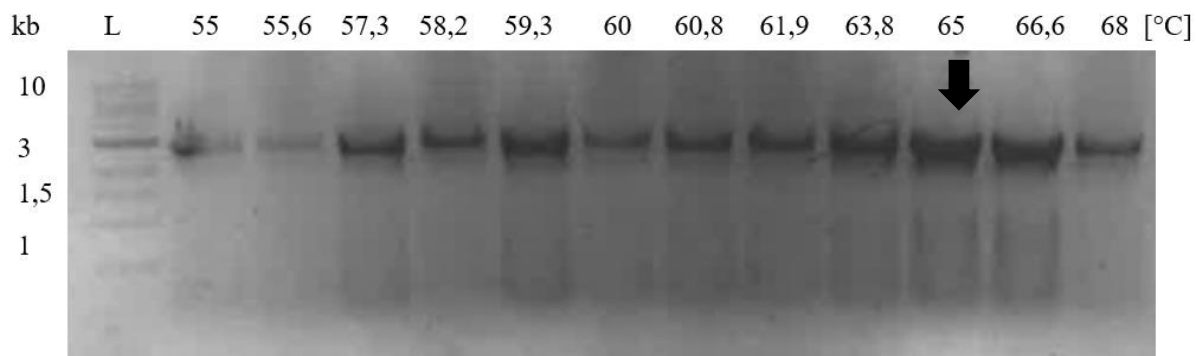
6.2 Příprava plazmidů fúzních konstruktů μ NS ve vektoru pASK IBA 37+

6.2.1 Gradientová PCR

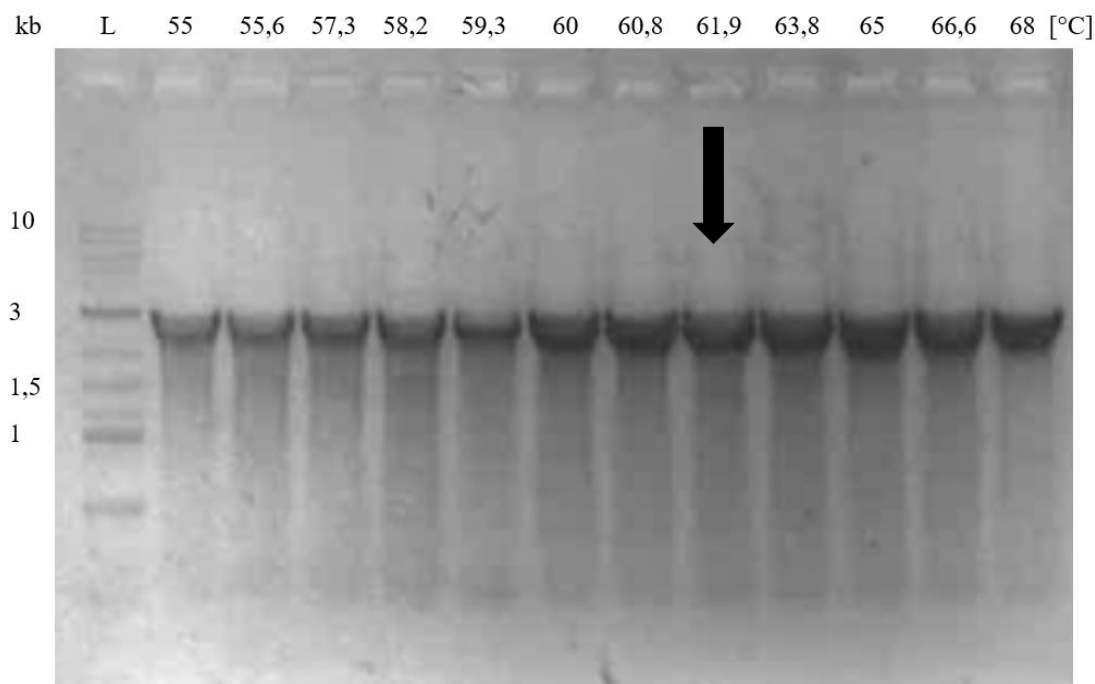
Při gradientové PCR byla zjištěna optimální teplota pro nasedání primerů. Teplota optimální pro nasedání primeru pro konstrukt GFP - μ NS pASK IBA37+ byla 60 °C, pro nasedání primeru pro konstrukt mNeon - μ NS pASK IBA37+ 65 °C a pro nasedání primeru pro konstrukt mCherry - μ NS pASK IBA37+ 61,9 °C. Gely gradientové PCR jsou analogicky zobrazeny na Obr. 15, 16 a 17.



Obr. 15: Gradientová PCR konstruktů GFP, s vyznačenou optimální teplotou (kb - kilobáze , L – Quick Load 1kb Protein Ladder)



Obr. 16: Gradientová PCR konstruktů mNeon, s vyznačenou optimální teplotou (kb - kilobáze , L – Quick Load 1kb Protein Ladder)



Obr. 17: Gradientová PCR konstruktů mCherry, s vyznačenou optimální teplotou (kb - kilobáze , L – Quick Load 1kb Protein Ladder)

6.2.2 Amplifikace DNA pomocí PCR

Po zjištění optimální teploty již bylo možné začít s amplifikací za optimální teploty, označované jako Q5 PCR. Produkt této reakce byl analyzován pomocí agarózového gelu. Dle těchto výsledků byla potvrzena produkce při optimální teplotě. Dále byla provedena izolace a přečištění vzorků. Poté byla stanovena koncentrace pomocí přístroje NanoDrop – One (Thermo Fisher Scientific). Koncentrace jsou uvedeny v Tab. XIV.

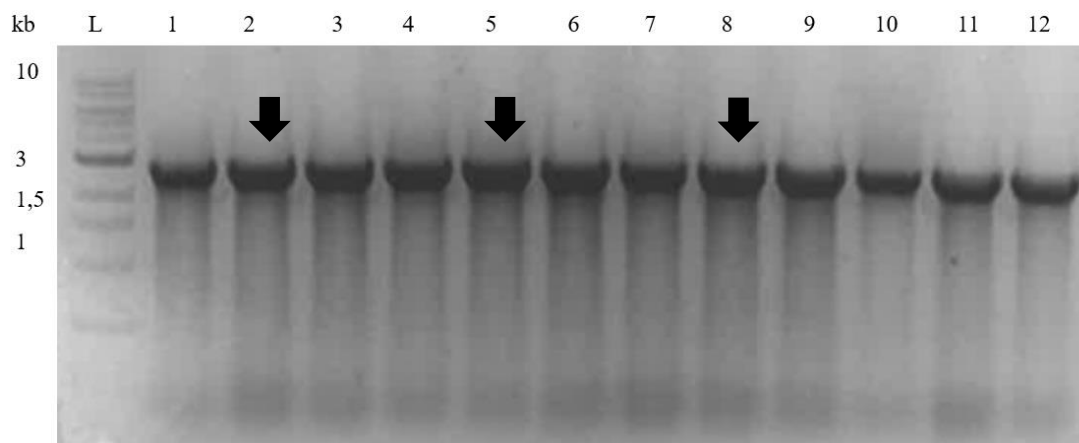
Tabulka XIV: Koncentrace a absorbance plazmidů

| Typ plazmidu | Enhancer | Koncentrace [ng/μl] | Absorbance [A260/A280] |
|--------------|----------|---------------------|------------------------|
| GFP 1 | Ano | 81,8 | 2,01 |
| GFP 2 | Ne | 64,4 | 1,87 |
| mNeon 1 | Ano | 78,2 | 2,11 |
| mNeon 2 | Ne | 83,3 | 1,87 |
| mCherry 1 | Ano | 96,5 | 2,12 |
| mCherry 2 | Ne | 93,8 | 1,88 |

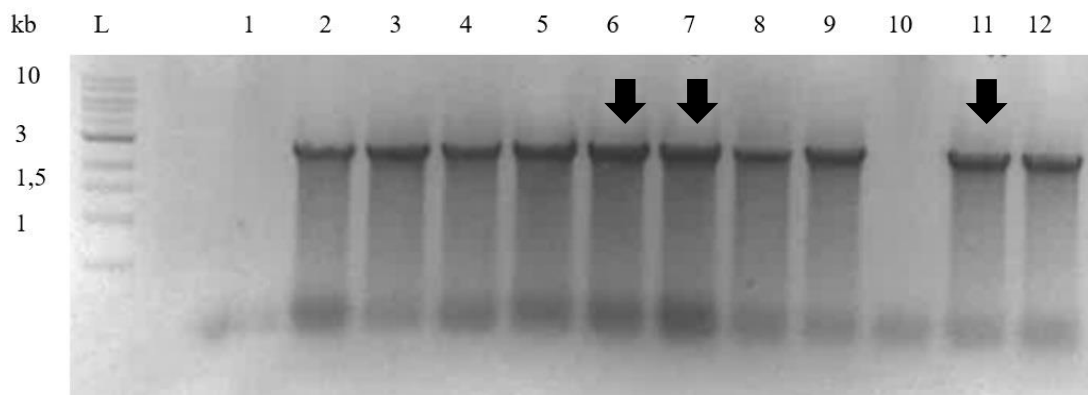
U všech typů plazmidů byly vybrány vzorky s nižší koncentrací, jelikož vykazovaly vyšší čistotu.

6.2.3 Colony PCR

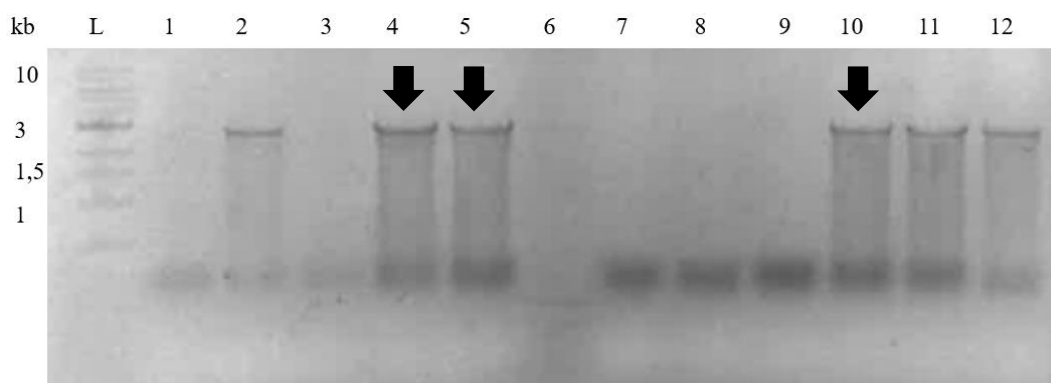
Po ligaci a transformaci do NEB® 5-alpha Competent *E. coli* byla provedena colony PCR. Vzorčky byly analyzovány na agarozovém gelu. Výsledky colony PCR můžeme u každého konstruktů vidět na Obr. 18, 19 a 20. Na obrázcích jsou znázorněny šipkami frakce, jimž odpovídající kolonie byly následně vybrány k izolaci plazmidu.



Obr. 18: Výsledek colony PCR u konstruktů GFP. Na obrázku jsou označeny frakce, u kterých bylo provedeno Sangerovo sekvenování (kb - kilobáze , L – Quick Load 1kb Protein Ladder)



Obr. 19: Výsledek colony PCR u konstruktů mNeon. Na obrázku jsou označeny frakce, u kterých byla provedeno Sangerovo sekvenování. (kb - kilobáze , L – Quick Load 1kb Protein Ladder)



Obr. 20: Výsledek colony PCR u konstruktů mCherry. Většina frakcí nemohla být použita z důvodu špatného nanesení. Na obrázku jsou označeny frakce, u kterých bylo provedeno Sangerovo sekvenování. (kb - kilobáze , L – Quick Load 1kb Protein Ladder)

6.2.4 Izolace plazmidů

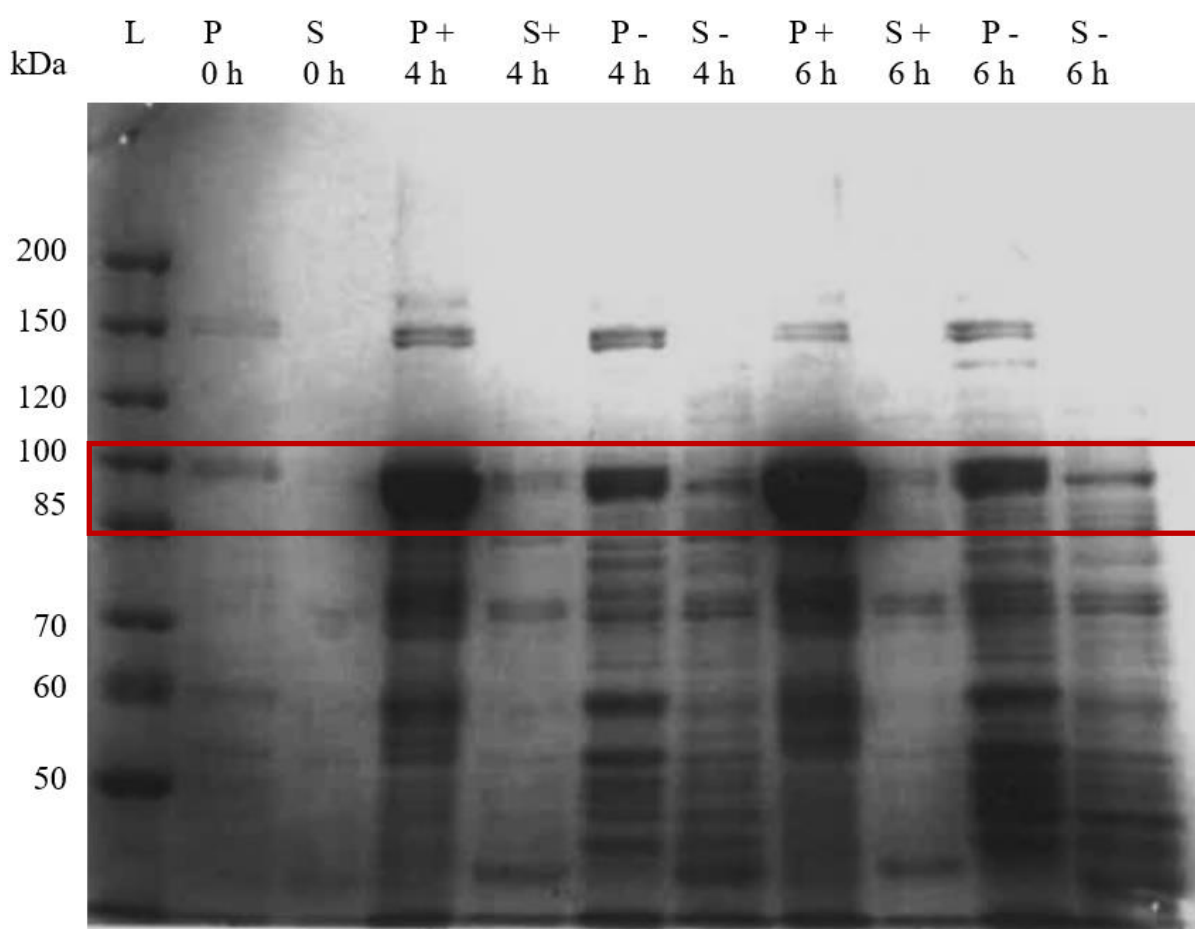
Po úspěšné izolaci připravených plazmidů byla změřena pomocí přístroje NanoDrop - One jejich koncentrace. Přehled koncentrací jednotlivých plazmidů navíc v závislosti na použité kolonii je uveden v Tab. XV.

Tabulka XV: Koncentrace a absorbance jednotlivých plazmidů

| Plazmid | Kolonie | Koncentrace [ng/μl] | Absorbance [A260/A280] |
|---------|---------|------------------------|---------------------------|
| GFP | 2 | 210,7 | 1,9 |
| | 5 | 214,8 | 1,9 |
| | 8 | 242,8 | 1,9 |
| mCherry | 4 | 328,3 | 1,89 |
| | 5 | 177,3 | 1,9 |
| | 10 | 174,3 | 1,9 |
| mNeon | 6 | 192,4 | 1,9 |
| | 7 | 207,6 | 1,89 |
| | 11 | 349,5 | 1,91 |

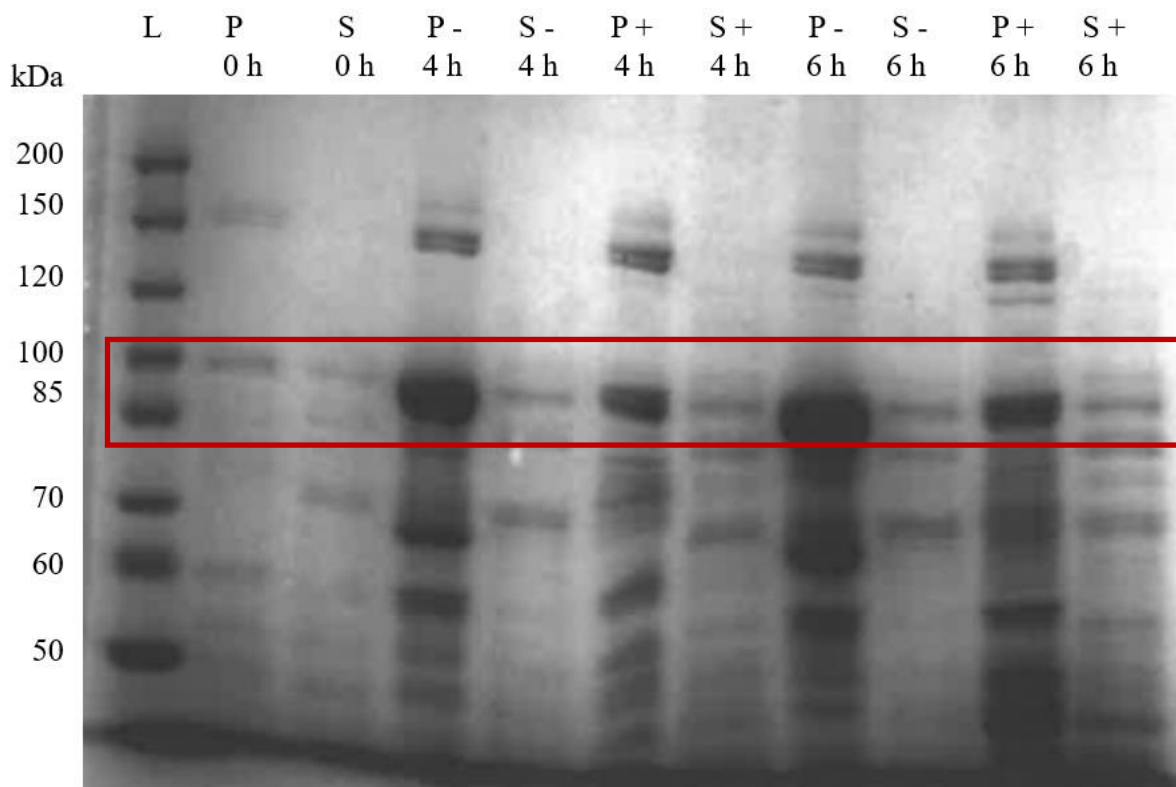
6.3 Transformace a exprese fúzních konstruktů v pASK IBA 37+ vektoru

Plazmidy GFP – μ NS pASK IBA 37+ [242,8 ng/ μ l], mNeon – μ NS pASK IBA 37+ [349,5 ng/ μ l], mCherry - μ NS pASK IBA 37+ [328,3 ng/ μ l] byly transformovány do BL21(DE3) Competent Cells a do BL21-CodonPlus Competent Cells a inkubovány na plotnách s obsahem ampicilinu. Dále byla provedena pilotní exprese u všech konstruktů za zvolených teplot (18 °C a 30 °C) Pro lepší přehlednost jsou zobrazeny pouze gely, které byly dále naprodukovány ve velkém měřítku, a to na Obr. 21, 22 a 23. Výsledky ze zbylých gelů pilotní exprese jsou v přílohách 3 a 4.



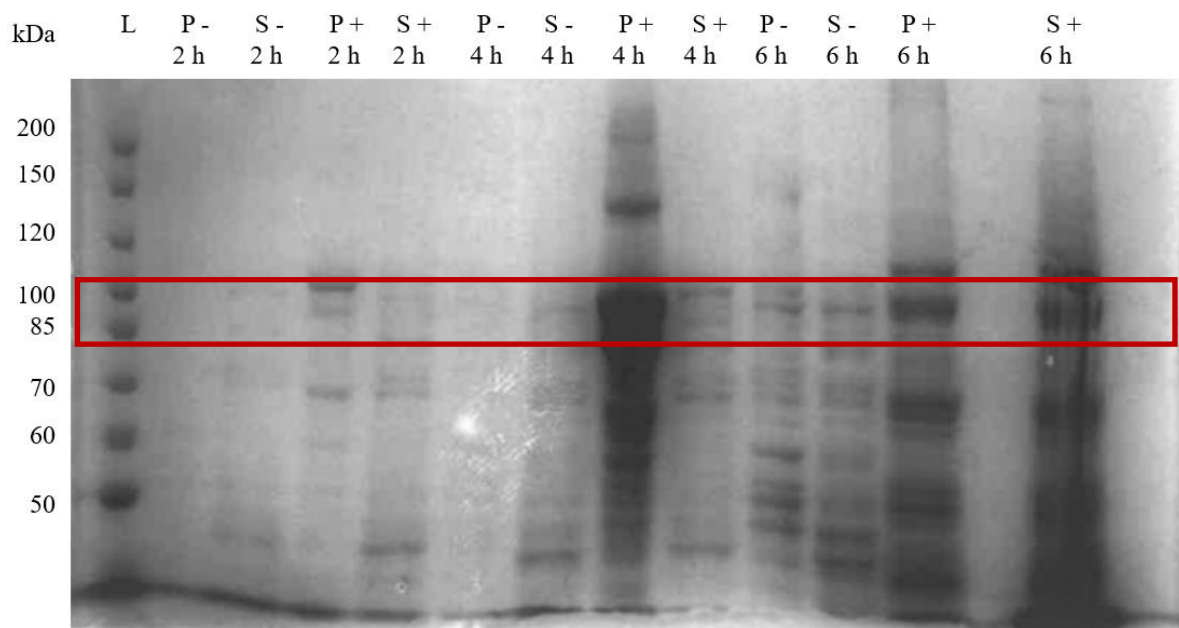
Obr. 21: Pilotní exprese GFP – μ NS BL21(DE3) Competent Cells při 30 °C. Na obrázku je vyznačena poloha proteinu GFP - μ NS (~100 kDa). Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu (kDa – kilodalton, L – U Unstained protein ladder (Thermo Fisher), P – buněčný pelet, S – supernatant)

V tomto případě se ve vyznačeném úseku fúzní konstrukt GFP - μ NS pASK IBA 37+ nachází (předpokládaná molekulová hmotnost GFP - μ NS je cca 100 kDa)



Obr. 22: Pilotní exprese mNeon – μ NS BL21(DE3) Competent Cells při 30 °C. Na obrázku je vyznačena poloha proteinu mNeon - μ NS (~100 kDa). Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu. (kDa – kilodalton, L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher), P – buněčný pelet, S – supernatant)

V tomto případě se ve vyznačeném úseku fúzní konstrukt mNeon- μ NS pASK IBA 37+ nachází (předpokládaná molekulová hmotnost mNeon - μ NS je cca100 kDa)



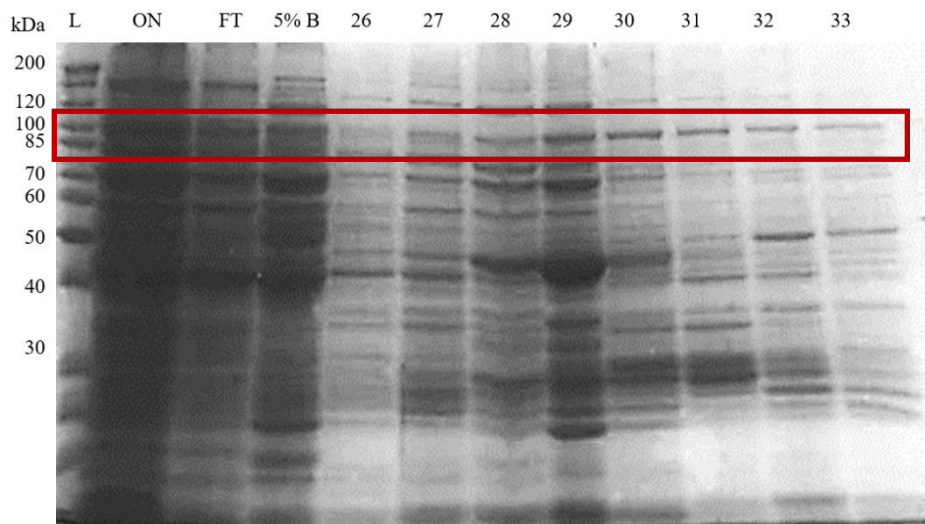
Obr. 23: Pilotní exprese mCherry – μ NS BL21(DE3) Competent Cells při 30 °C. Na obrázku je vyznačena poloha proteinu mCherry - μ NS (~100 kDa). Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu. (kDa – kilodalton, L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher), P – buněčný pelet, S – supernatant)

V tomto případě se ve vyznačeném úseku fúzní konstrukt mCherry - μ NS pASK IBA 37+ nachází (předpokládaná molekulová hmotnost mCherry - μ NS je cca 100 kDa)

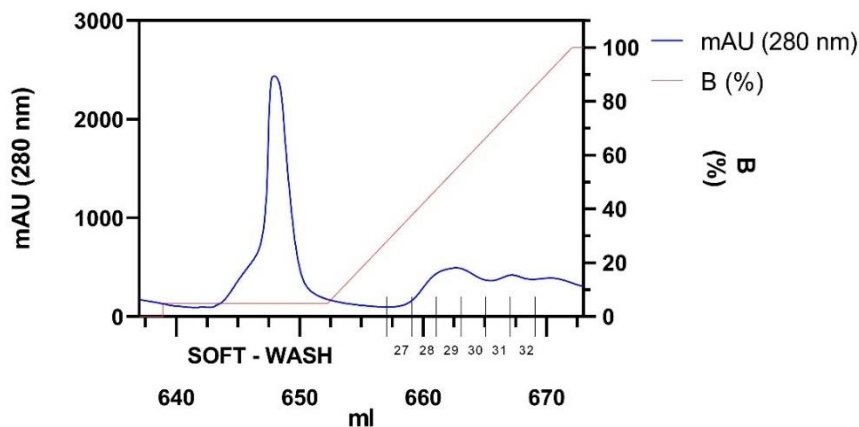
6.4 Purifikace

Jako první byla provedena histidinová afinitní chromatografie. Byla provedena u všech fúzních konstruktů proteinu μ NS, které byly transformovány do buněk BL21 (DE3) Competent Cells a tyto buňky byly následně exprimovány ve velkém měřítku při teplotě 30 °C a odebrány byly po 6 hodinách.

Na Obr. 24 je uveden výsledek histidinové afinitní chromatografie GFP - μ NS zobrazený pomocí SDS – PAGE elektroforózy společně s chromatogramem.



Histidinová afinitní chromatografie GFP - μ NS

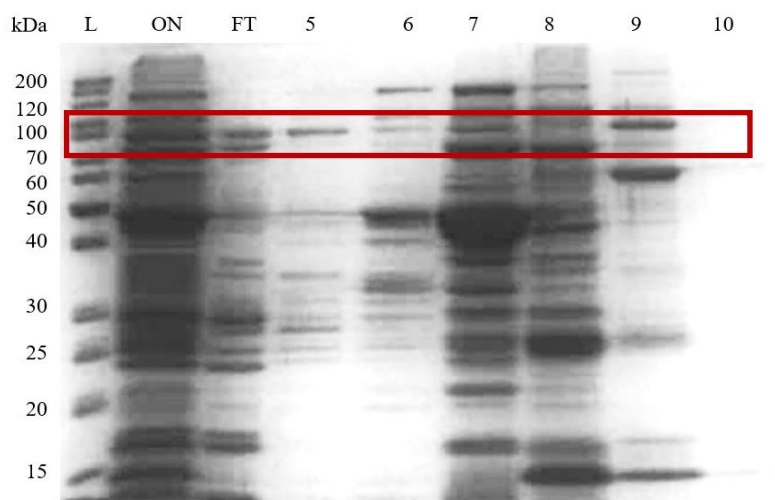


Obr. 24: Nahoře – Gel afinitní chromatografie GFP – μ NS. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu (~100 kDa) (kDa – kilodalton, L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher), ON – vzorek nanášený na kolonu, FT – flow – through, 5% B - tzv. soft wash – promytí 5 % pufrem B)

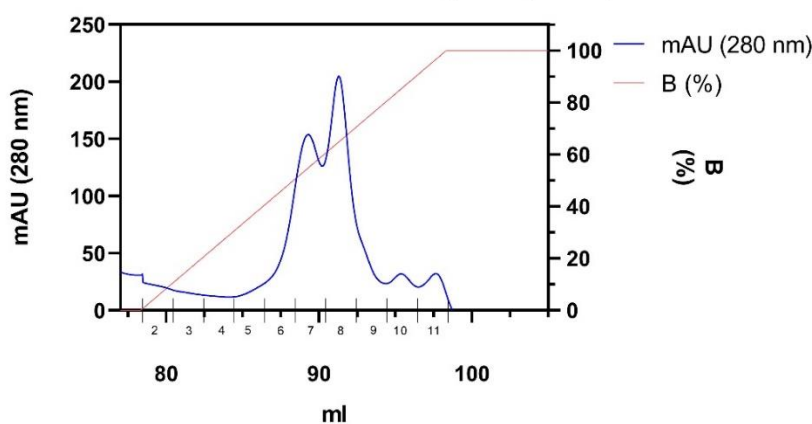
Dole – Chromatogram znázorňující peaky proteinu GFP – μ NS

Protein GFP - μ NS ve vektoru pASK IBA 37+ se nachází dle chromatogramu hlavně ve frakcích 29 a 30. Vysoká koncentrace je v roztoku, který byl promýván 5% pufrem B. V tomto roztoku se ale nenachází pouze hledaný protein, ale i různé nečistoty (viz. Obr. 24 nahore). Eluace proteinu začala při 30% pufru B a největší eluce byla při 40% pufru B.

Další chromatografií provedenou při purifikaci byla iontově výměnná chromatografie. Ta byla provedena z frakcí histidinové afinitní chromatografie obsahující zkoumaný protein. Tento gel společně s chromatogramem jsou zobrazeny na Obr. 25.



Iontově výměnná chromatografie GFP - μ NS z frakcí histidinové chromatografie (26-29)

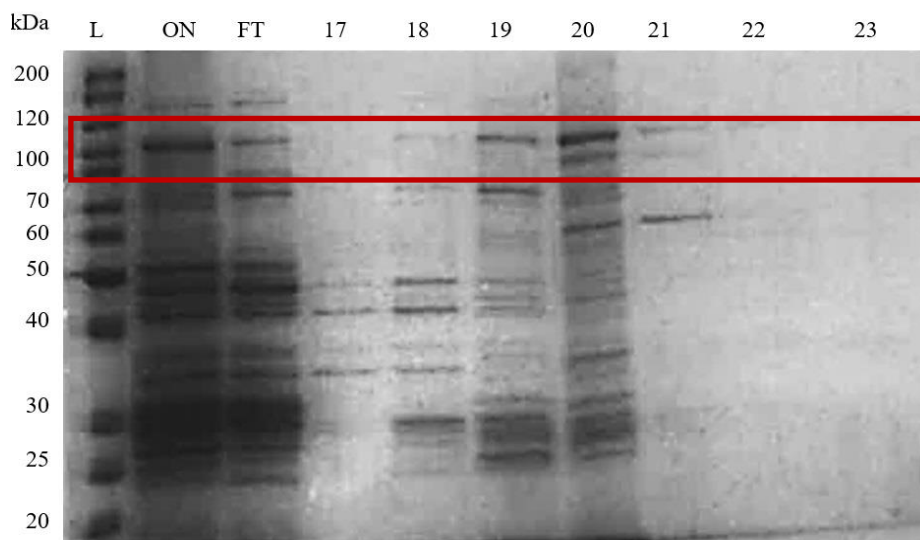


Obr. 25: Nahore – Iontově výměnná chromatografie GFP - μ NS provedená z frakcí 26 – 29 z afinitní chromatografie. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu (~100 kDa) (L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher))

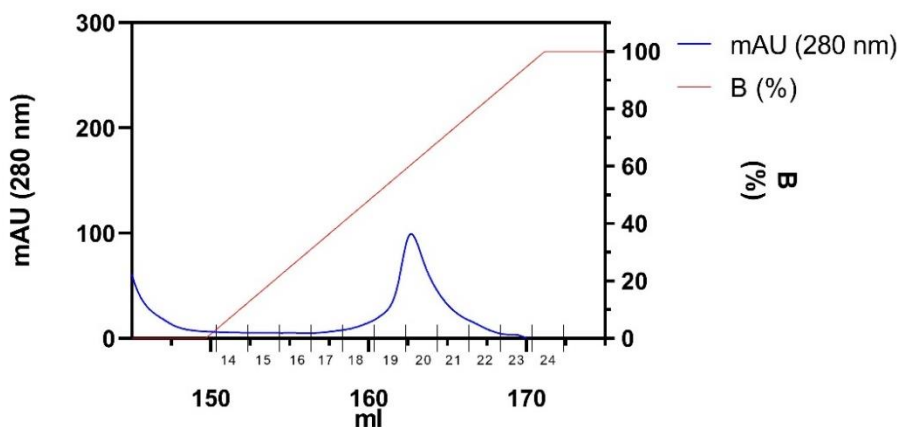
Dole – Chromatogram iontově výměnné chromatografie GFP - μ NS provedená z frakcí 26 – 29 z afinitní chromatografie

Protein GFP - μ NS ve vektoru pASK IBA 37+ se nachází dle chromatogramu hlavně ve frakcích 6, 7 a 8. Bohužel koncentrace byla velmi nízká. Proto byla purifikace označena jako nezdařená. Eluce proteinu začala při 45% pufru B, největší eluce byla při 75% pufru B.

Druhá polovina vybraných frakcí z histidinové chromatografie byla použita k iontové výměnné chromatografii. Výsledek této chromatografie společně s gelem je uveden na Obr. 26.



Iontově výměnná chromatografie GFP - μ NS z frakcí histidinové chromatografie (30-33)

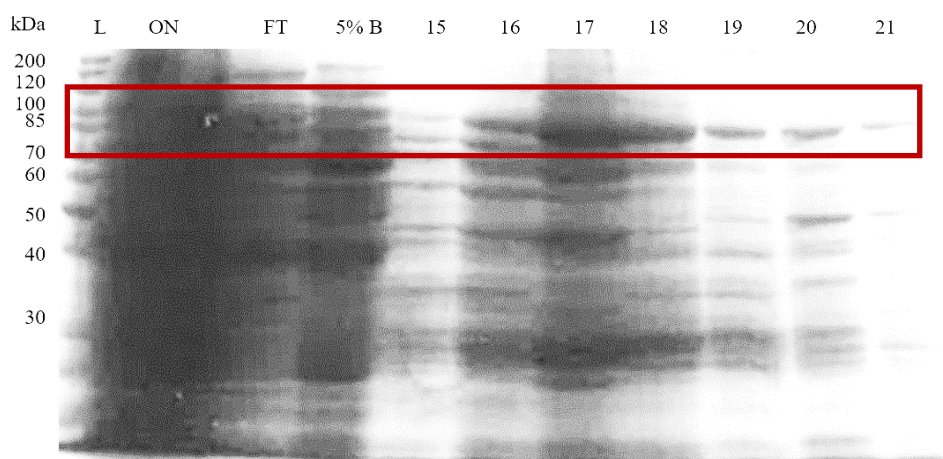


Obr. 26: Nahore – Iontově výměnná chromatografie GFP – μ NS provedená z frakcí 30 – 33 z afinitní chromatografie. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu (~100 kDa) (L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher))

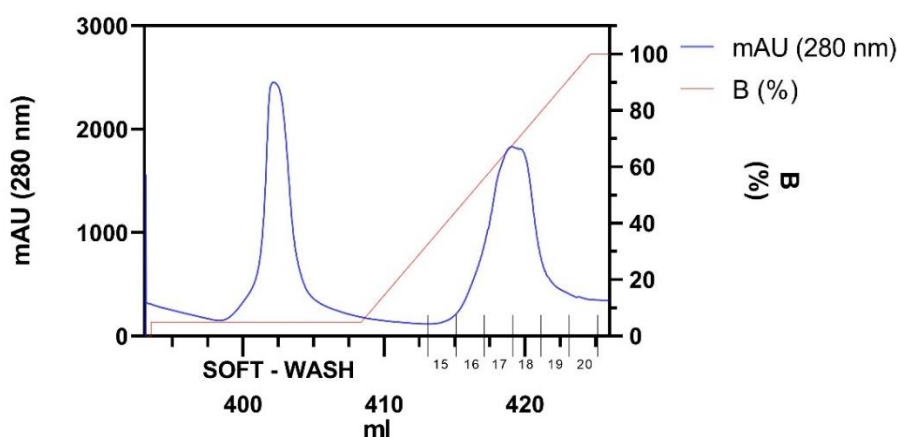
Dole – Chromatogram iontové výměnné chromatografie GFP - μ NS provedená z frakcí 30 – 33 z afinitní chromatografie

Protein GFP - μ NS ve vektoru pASK IBA 37+ se nachází dle chromatogramu hlavně ve frakcích 19 a 20. Bohužel koncentrace byla velmi nízká. Proto byla purifikace označena jako nezdařená. Eluce proteinu začala při 50% puftru B, největší eluce byla při 60% puftru B.

Na Obr. 27 je uveden výsledek histidinové afinitní chromatografie mNeon - μ NS zobrazený pomocí SDS – PAGE elektroforézy společně s chromatogramem.



Histidinová afinitní chromatografie mNeon - μ NS

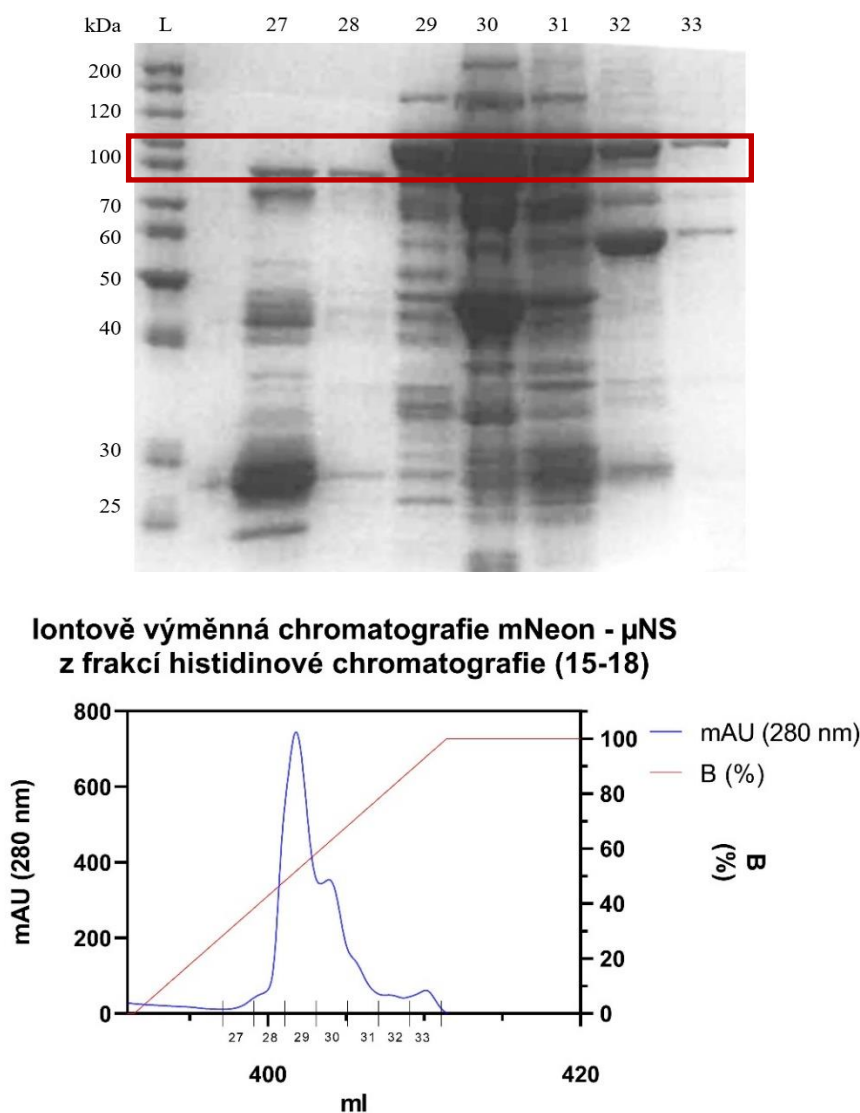


Obr. 27: Nahoře –Gel afinitní chromatografie mNeon – μ NS . Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu (~100 kDa) (kDa – kilodalton, L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher), ON – vzorek nanášený na kolonu, FT – flow – through, 5% B - tzv. soft wash – promytí 5 % pufrem B)

Dole – Chromatogram znázorňující peaky proteinu mNeon – μ NS Protein mNeon - μ NS ve vektoru pASK IBA 37+ se nachází dle chromatogramu hlavně

ve frakcích 17 a 18. Vysoká koncentrace je v roztoku, který byl promýván 5% pufrem B. V tomto roztoku se ale nenachází pouze hledaný protein, ale i různé nečistoty (viz. Obr. 27 nahoře). Eluace proteinu začala při 20% pufru B, největší eluce byla při 65 % pufru B.

Další chromatografií provedenou při purifikaci byla iontově výměnná chromatografie. Ta byla provedena z frakci histidinové afinitní chromatografie obsahující zkoumaný protein. Tento gel společně s chromatogramem jsou zobrazeny na Obr. 28.



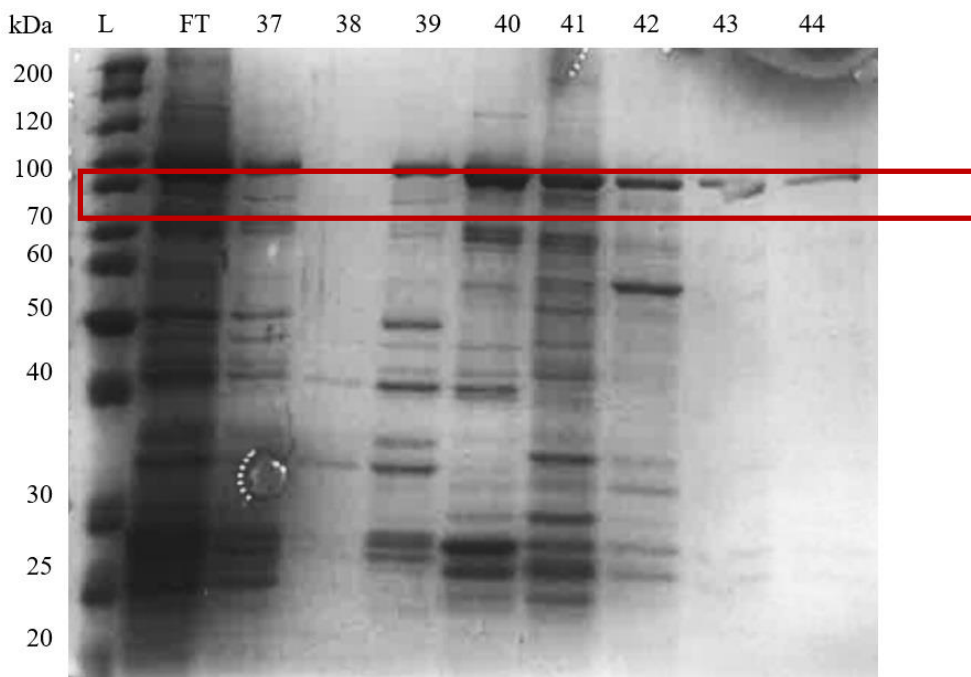
Obr. 28: Nahoře – Iontově výměnná chromatografie mNeon– μNS provedená z frakcí 4 – 8 z afinitní chromatografie. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu (~100 kDa)(L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher))

Dole – Chromatogram iontově výměnné chromatografie mNeon - μNS provedená z frakcí 4 – 8 z afinitní chromatografie

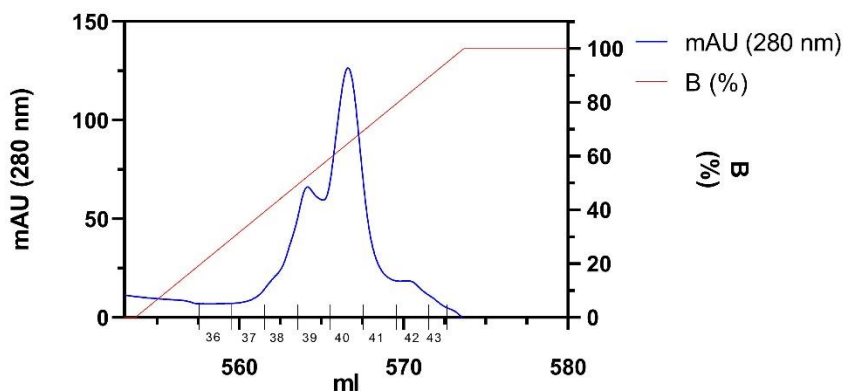
Protein mNeon - μNS ve vektoru pASK IBA 37+ se nachází dle chromatogramu hlavně

ve frakcích 29, 30 a 31. Eluce proteinu začala při 40% pufru B, největší eluce byla při 50% pufru B.

Druhá polovina vybraných frakcí z histidinové chromatografie byla použita k iontové výměnné chromatografii. Výsledek této chromatografie společně s gelem je uveden na Obr. 29.



Iontově výměnná chromatografie mNeon - μ NS z frakcí histidinové chromatografie (19-21)



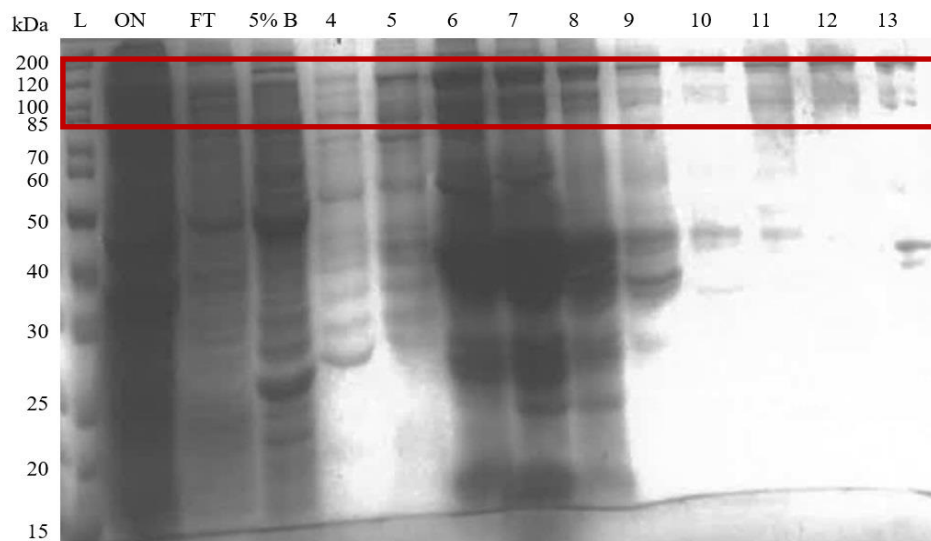
Obr. 29: Nahoře – Iontově výměnná chromatografie mNeon– μ NS provedená z frakcí 19 – 21 z afinitní chromatografie. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu (~100 kDa (L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher))

Dole – Chromatogram iontové výměnné chromatografie mNeon - μ NS provedená z frakcí 19 – 21 z afinitní chromatografie

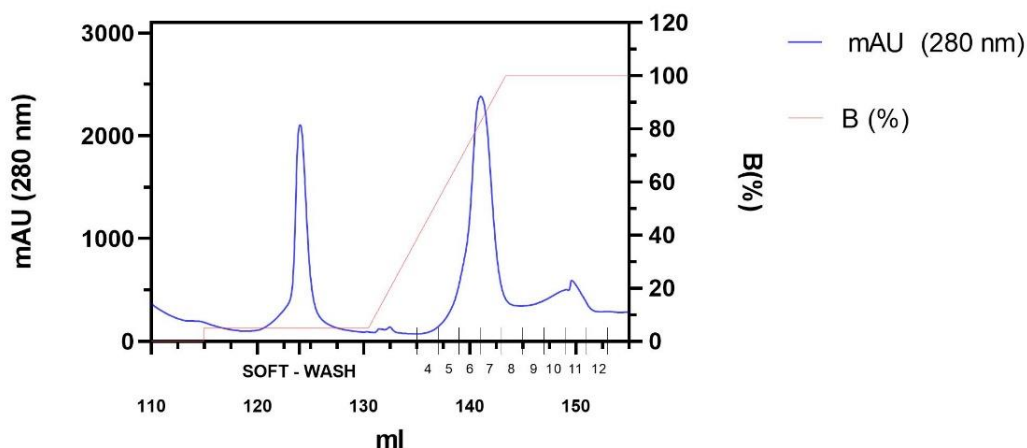
Protein mNeon - μ NS ve vektoru pASK IBA 37+ se nachází dle chromatogramu hlavně

ve frakcích 39 a 40. Eluce proteinu začala při 40% pufru B, největší eluce byla při 70% pufru B.

Na Obr. 30 je uveden výsledek histidinové afinitní chromatografie mCherry - μ NS zobrazený pomocí SDS – PAGE elektroforózy společně s chromatogramem.



Histidinová afinitní chromatografie mCherry - μ NS

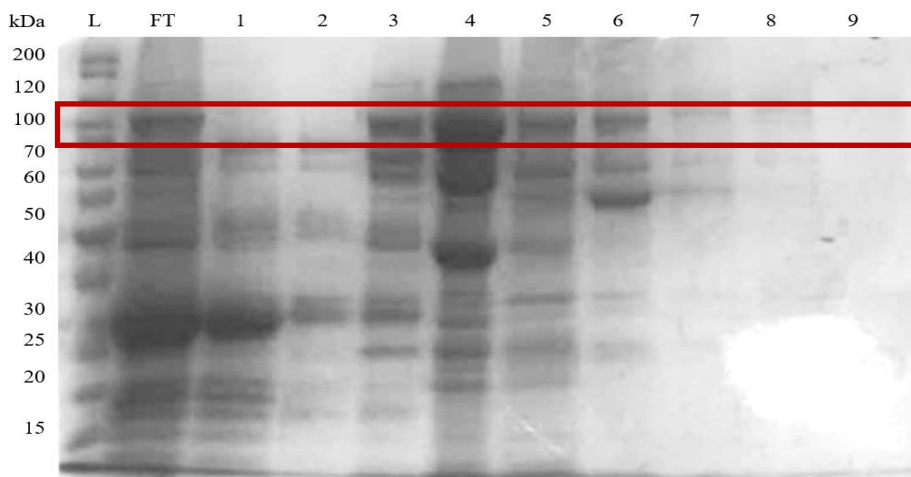


Obr. 30: Nahoře – gel afinitní chromatografie mCherry - μ NS. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu (~100 kDa) (kDa – kilodalton, L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher), ON – vzorek nanášený na kolonu, FT – flow – through, 5% B - tzv. soft wash – promytí 5 % pufrům B)

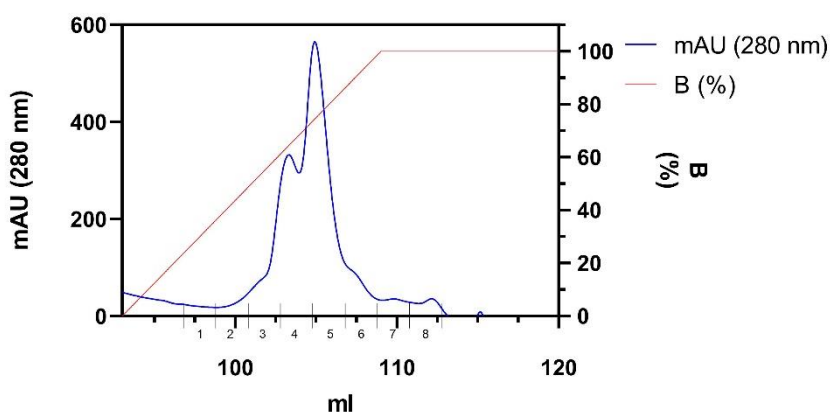
B – Chromatogram znázorňující peaky proteinu mCherry – μ NS

Protein mCherry - μ NS ve vektoru pASK IBA 37+ se nachází dle chromatogramu hlavně ve frakcích 6 a 7. Vysoká koncentrace je v roztoku, který byl promýván 5% pufrům B (soft – wash). V tomto roztoku se ale nenachází pouze hledaný protein, ale i různé nečistoty (viz. Obr. 30 nahoře). Eluce proteinu začala při 55% pufru B, největší eluce byla při 80% pufru B.

Další chromatografií provedenou při purifikaci byla iontově výměnná chromatografie. Ta byla provedena z frakcí histidinové afinitní chromatografie obsahující zkoumaný protein. Tento gel společně s chromatogramem jsou zobrazeny na Obr. 31.



Iontově výměnná chromatografie mCherry - μ NS z frakcí histidinové chromatografie (4-8)



Obr. 31: Nahore – Iontově výměnná chromatografie mCherry– μ NS provedená z frakcí 4 - 8 z afinitní chromatografie. Červené ohraničení značí předpokládanou polohu fragmentů fúzního proteinu (~100 kDa) (L – Unstained protein ladder (Thermo Fisher))

Dole – Chromatogram iontově výměnné chromatografie mCherry - μ NS provedená z frakcí 4 – 8 z afinitní chromatografie

Protein mCherry - μ NS ve vektoru pASK IBA 37+ se nachází dle chromatogramu hlavně ve frakcích 3, 4 a 5. Eluce proteinu začala při 50% pufru B, největší eluce byla při 80% pufru B.

7 Diskuze

Z výsledků SDS – PAGE vyplývá, že všechny fúzní proteiny byly exprimovány v buněčném peletu ve formě virových inkluzí, což je pro μ NS charakteristické (Brandariz-Nuñez et al. 2010).

I přes tuto skutečnost se podařilo proteiny purifikovat pomocí afinitní a iontově – výměnné chromatografie v solubilní frakci. Za účelem zvýšení zisku produkovaných proteinů se nabízí purifikace tzv. refoldingem proteinů produkovaných v inkluzních tělískách buněk, čímž by byla obnovena jejich enzymatická aktivita po jejich předešlé denaturaci. Ten je ale z časového hlediska velmi náročný. Snížení tvorby inkluzních tělísek může být dosaženo změnou růstových podmínek, např. teploty indukce, koncentrace induktoru nebo doba indukce. Alternativní cestou vedoucí ke snížení tvorby inkluzních tělísek v peletu je dodání organických přísad, jako je např. sorbitol nebo trehalóza (Yamaguchi a Miyazaki 2014).

Vektor pDEST 17 se ukázal v této práci jako problémový, jelikož se nezdařila produkce v různých typech buněk *Escherichia coli*. Problémem, ale nemusí být sám vektor ale právě buňky *E. coli* a to její sekvence („A-AAA-AAG“) v genu dnaX, která je označována jako klouzavá („slippery“) a způsobuje frameshift mutace, jenž posunují čtecí rámec. Díky těmto frameshift mutacím se snižuje úspěšnost exprese ve vektoru pDEST 17, který je na tyto mutace velmi náchylný. Místo attB1, jenž obsahuje sekvenci („AAA-AAA“) ve vektoru pDEST 17 je náchylný k posunu translace o jednu aminokyselinu zpět. Pravděpodobnost tohoto jevu je v případě klouzavých sekvencí, a to nejen u genu dnaX u *E.coli*, 25 – 60% .

To bylo potvrzeno metodou MALDI – ToF (Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s detektorem doby letu) (Belfield et al. 2007).

Při výzkumu proteinu μ NS či fúzních konstruktů byla zajištěna kvalitní a dle pozorovaných výsledků SDS PAGE elektroforézy i čistá produkce proteinů. Exprese byla prováděna dle jiných prací v buňkách hmyzu Sf9 transfekcí μ NS do rekombinantních bakulovirů a následnou infekcí buněk Sf9 transfekovaným rekombinantním bakulovirem. U těchto typů buněk docházelo i k tvorbě virových inkluzí způsobených právě proteinem μ NS, jenž byly analyzovány pomocí SDS PAGE elektroforézy a pozorovány pomocí fluorescenčních metod (Brandariz-Nuñez et al. 2010).

Pro tvorbu krystalů a následné krystalografické studie se vektor pASK IBA jeví jako vhodný. Při zisku čistých oligomerů se jeví jako problém cívkovitá spirála. Dle studie byl upraven vektor pASK IBA, a byla vytvořena N- a C- terminální fúze s leucinovým zipem GCN4. GCN4 je také útvar cívkovité spirály, pro kterou ale existují stabilní dimerní, trimerní a tetramerní formy. Při této studii byl vytvořen konstrukt, který obsahoval adhezín STM3691

ze *Salmonella enterica*, který obsahuje strukturu přerušovanou cívkovitými spirálami, obdobně jako μ NS. Funkce takto upraveného vektoru byla otestována a všechny zkoumané konstrukty v upraveném vektoru byly exprimovány ve velkém měřítku a umožnily tvorbu krystalů, které byly v difrakční kvalitě (Hernandez Alvarez et al. 2008).

8 Závěr

Expres proteinů za využití již připravených fúzních konstruktů GFP – μ NS, mNeon – μ NS a mCherry – μ NS ve vektoru pDEST17 a různých typů kompetentních buněk (BL21-AI™ One Shot™ Chemically Competent E. coli, BL21(DE3) Competent Cells, ArcticExpress (DE3) Competent Cells, BL21-CodonPlus Competent Cells) nebyla úspěšná.

Za účelem úspěšné exprese bylo nutné vytvořit nové plazmidy za použití nových F- a R-primerů a vektoru pASK IBA 37+. Po provedení amplifikace plazmidů a jejich transformaci do kompetentních buněk (BL21(DE3) Competent Cells, BL21-CodonPlus Competent Cells) proběhla již úspěšná exprese fúzních proteinů.

V této práci byla úspěšná exprese proteinů GFP – μ NS, mNeon – μ NS a mCherry – μ NS ve vektoru pASK IBA 37+. Všechny fúzní proteiny byly exprimovány ve velkém měřítku v BL21(DE3) Competent Cells při 30 °C po dobu 6 hodin. Při purifikaci nebyla dosažena vysoká čistota a výtěžnost fúzních proteinů mNeon – μ NS a mCherry – μ NS ve vektoru pASK IBA 37+. Výtěžnost fúzního proteinu mNeon – μ NS ve vektoru pASK IBA 37+ byla 3mg/800 ml LB media a výtěžnost fúzního proteinu mCherry– μ NS ve vektoru pASK IBA 37+ byla 2mg/800 ml LB media. Purifikace proteinu GFP– μ NS ve vektoru pASK IBA 37+ se nezdařila. Tato práce obsahuje návrhy metod vedoucích k vyššímu zisku fúzních proteinů a k zajištění vyšší čistoty.

9 Seznam použité literatury

BECKER, Michelle M., Timothy R. PETERS a Terence S. DERMODY, 2003. Reovirus σ NS and μ NS Proteins Form Cytoplasmic Inclusion Structures in the Absence of Viral Infection. *Journal of Virology* [online]. **77**(10), 5948–5963. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/jvi.77.10.5948-5963.2003

BELFIELD, Eric J., Richard K. HUGHES, Nicolas TSEMETZIS, Mike J. NALDRETT a Rod CASEY, 2007. The gateway pDEST17 expression vector encodes a -1 ribosomal frameshifting sequence. *Nucleic Acids Research* [online]. **35**(4), 1322–1332. ISSN 03051048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkm003

BENAVENTE, Javier a Jose MARTÍNEZ-COSTAS, 2007. Avian reovirus: Structure and biology. *Virus Research* [online]. **123**(2), 105–119. ISSN 01681702. Dostupné z: doi:10.1016/j.virusres.2006.09.005

BRANDARIZ-NUÑEZ, Alberto, Rebeca MENAYA-VARGAS, Javier BENAVENTE a Jose MARTINEZ-COSTAS, 2010. Avian Reovirus μ NS Protein Forms Homo-Oligomeric Inclusions in a Microtubule-Independent Fashion, Which Involves Specific Regions of Its C-Terminal Domain. *Journal of Virology* [online]. **84**(9), 4289–4301. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/jvi.02534-09

BROERING, Teresa J., Michelle M. ARNOLD, Cathy L. MILLER, Jessica A. HURT, Patricia L. JOYCE a Max L. NIBERT, 2005. Carboxyl-Proximal Regions of Reovirus Nonstructural Protein μ NS Necessary and Sufficient for Forming Factory-Like Inclusions. *Journal of Virology* [online]. **79**(10), 6194–6206. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/jvi.79.10.6194-6206.2005

CLARK, Elinor a Donal KHOSROWI, 2022. Decentring the discoverer: how AI helps us rethink scientific discovery. *Synthese* [online]. **200**(6), 1–26. ISSN 15730964. Dostupné z: doi:10.1007/s11229-022-03902-9

HERNANDEZ ALVAREZ, Birte, Marcus D. HARTMANN, Reinhard ALBRECHT, Andrei N. LUPAS, Kornelius ZETH a Dirk LINKE, 2008. A new expression system for protein crystallization using trimeric coiled-coil adaptors. *Protein Engineering, Design and Selection*

[online]. **21**(1), 11–18. ISSN 17410126. Dostupné z: doi:10.1093/protein/gzm071

JUMPER, John, Richard EVANS, Alexander PRITZEL, Tim GREEN, Michael FIGURNOV, Olaf RONNEBERGER, Kathryn TUNYASUVUNAKOOL, Russ BATES, Augustin ŽÍDEK, Anna POTAPENKO, Alex BRIDGLAND, Clemens MEYER, Simon A.A. KOHL, Andrew J. BALLARD, Andrew COWIE, Bernardino ROMERA-PAREDES, Stanislav NIKOLOV, Rishub JAIN, Jonas ADLER, Trevor BACK, Stig PETERSEN, David REIMAN, Ellen CLANCY, Michal ZIELINSKI, Martin STEINEGGER, Michalina PACHOLSKA, Tamas BERGHAMMER, Sebastian BODENSTEIN, David SILVER, Oriol VINYALS, Andrew W. SENIOR, Koray KAVUKCUOGLU, Pushmeet KOHLI a Demis HASSABIS, 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* [online]. **596**(7873), 583–589. ISSN 14764687. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-021-03819-2

MCFERRAN, J. B., R. M. MCCRACKEN, T. J. CONNOR a R. T. EVANS, 1976. *Isolation of viruses from clinical outbreaks of inclusion body hepatitis* [online]. 1976. ISSN 14653338. Dostupné z: doi:10.1080/03079457608418201

MERTENS, Peter, 2004. The dsRNA viruses. *Virus Research* [online]. **101**(1), 3–13. ISSN 01681702. Dostupné z: doi:10.1016/j.virusres.2003.12.002

PITCOVSKI, Jacob a Sagar M. GOYAL, 2019. Avian reovirus infections. *Diseases of Poultry* [online]. **19**(2), 382–400. ISSN 0253-1933. Dostupné z: doi:10.1002/9781119371199.ch11
SHARAFELDIN, Tamer A., Sunil K. MOR, Aschalew Z. BEKELE, Harsha VERMA, Sagar M. GOYAL a Robert E. PORTER, 2014. The role of avian reoviruses in turkey tenosynovitis/arthritis. *Avian Pathology* [online]. **43**(4), 371–378. ISSN 14653338. Dostupné z: doi:10.1080/03079457.2014.940496

SIMM, Dominic, Klas HATJE, Stephan WAACK a Martin KOLLMAR, 2021. Critical assessment of coiled-coil predictions based on protein structure data. *Scientific Reports* [online]. **11**(1), 1–18. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-91886-w
SOUZA, Suyene O., Silvia DE CARLI, Vagner R. LUNGE, Nilo IKUTA, Claudio W. CANAL, Saulo P. PAVARINI a David DRIEMEIER, 2018. Pathological and molecular findings of avian reoviruses from clinical cases of tenosynovitis in poultry flocks from Brazil. *Poultry Science* [online]. **97**(10), 3550–3555. ISSN 15253171. Dostupné

z: doi:10.3382/ps/pey239

TOURIS-OTERO, Fernando, José MARTÍNEZ-COSTAS, Vikram N. VAKHARIA a Javier BENAVENTE, 2004. Avian reovirus nonstructural protein μ NS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein σ NS to these structures. *Virology* [online]. **319**(1), 94–106. ISSN 00426822. Dostupné z: doi:10.1016/J.VIROL.2003.10.034

VARADI, Mihaly, Stephen ANYANGO, Mandar DESHPANDE, Sreenath NAIR, Cindy NATASSIA, Galabina YORDANOVA, David YUAN, Oana STROE, Gemma WOOD, Agata LAYDON, Augustin ZÍDEK, Tim GREEN, Kathryn TUNYASUVUNAKOOL, Stig PETERSEN, John JUMPER, Ellen CLANCY, Richard GREEN, Ankur VORA, Mira LUTFI, Michael FIGURNOV, Andrew COWIE, Nicole HOBBS, Pushmeet KOHLI, Gerard KLEYWEGT, Ewan BIRNEY, Demis HASSABIS a Sameer VELANKAR, 2022. AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research* [online]. **50**(D1), D439–D444. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkab1061

VARELA a Javier BENAVENTE, 1994. Protein Coding Assignment of Avian Reovirus Strain S113. *Journal of Virology* [online]. **68**(10), 6775–6777. Dostupné z: <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>

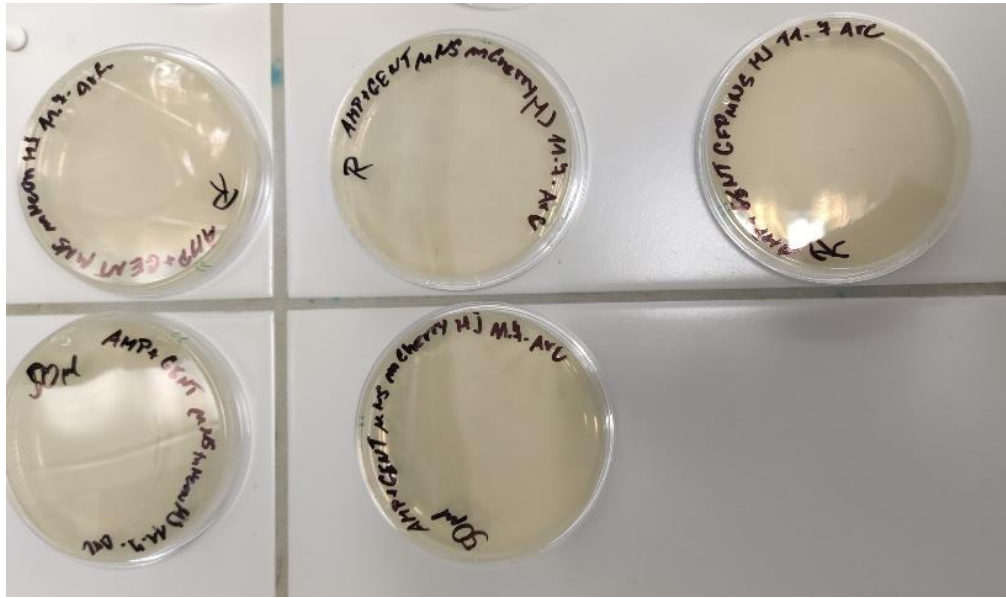
VARELA, R, J MARTÍNEZ-COSTAS, M MALLO a J BENAVENTE, 1996. Intracellular posttranslational modifications of S1133 avian reovirus proteins. *Journal of Virology* [online]. **70**(5), 2974–2981. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/jvi.70.5.2974-2981.1996

YAMAGUCHI, Hiroshi a Masaya MIYAZAKI, 2014. *Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies* [online]. 2014. ISSN 2218273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom4010235

ZHANG, Xing, Jinghua TANG, Stephen B. WALKER, David O'HARA, Max L. NIBERT, Roy DUNCAN a Timothy S. BAKER, 2005. Structure of avian orthoreovirus virion by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *Virology* [online]. **343**(1), 25–35. ISSN 00426822. Dostupné z: doi:10.1016/j.virol.2005.08.002

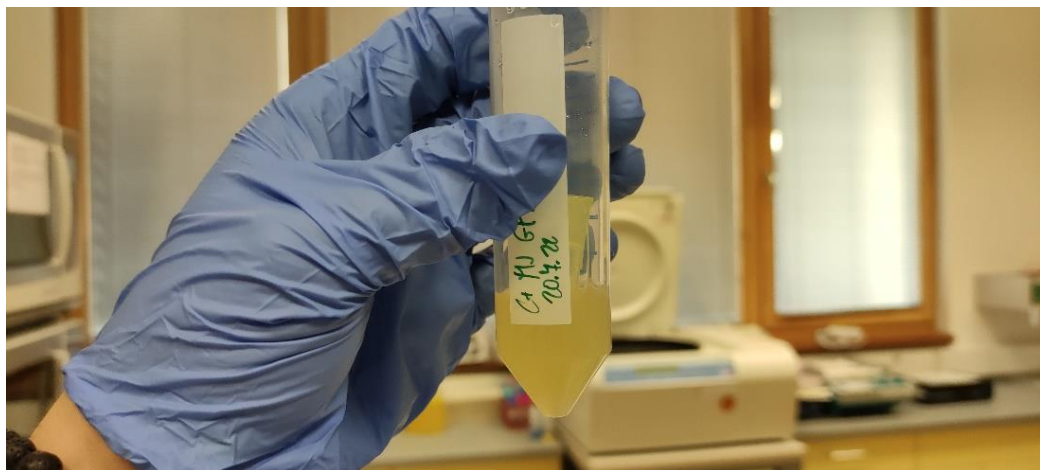
10 Přílohy

Příloha č. 1: Plotny s koloniemi buněk ArcticExpress (DE3) Competent Cells

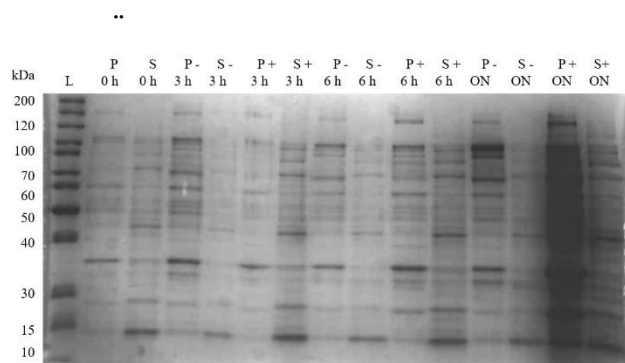


GFP – μ NS s objemem 50 μ l chybí z důvodu nevytvoření žádné kolonie.

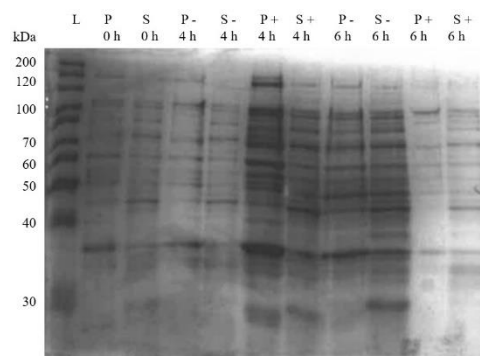
Příloha č. 2: Buněčná kultura



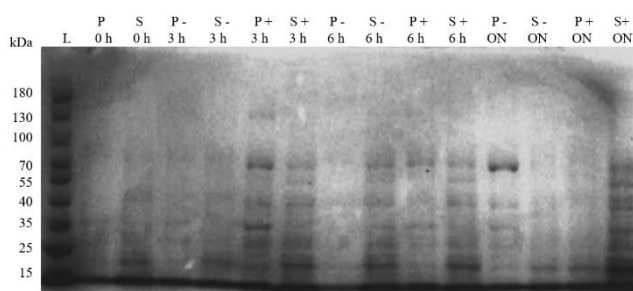
Příloha č. 3: Výsledky pilotních expresí u BL21-CodonPlus Competent Cells



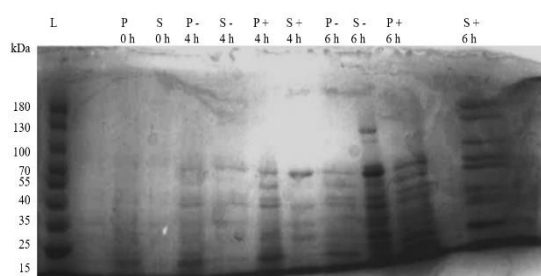
mCherry - μ NS při 18 °C



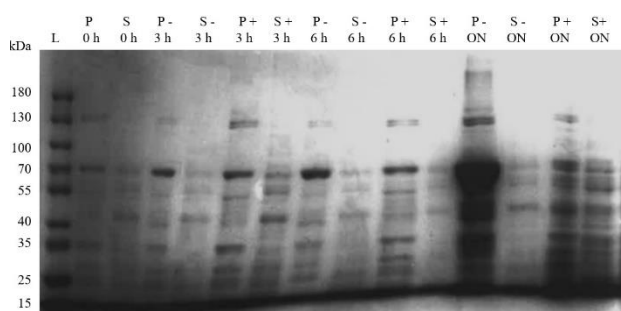
mCherry - μ NS při 30 °C



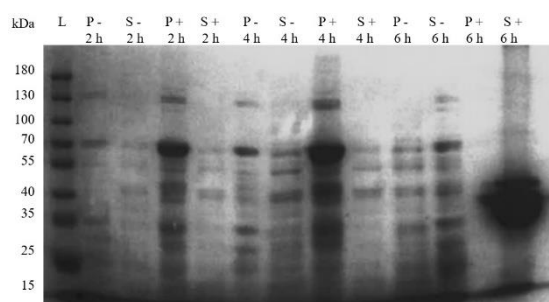
mNeon - μ NS při 18 °C



mNeon- μ NS při 30 °C

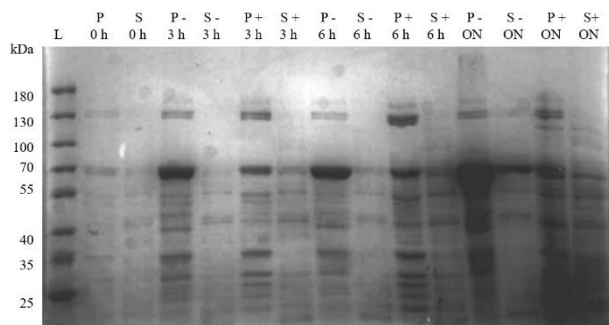


GFP - μ NS při 18 °C

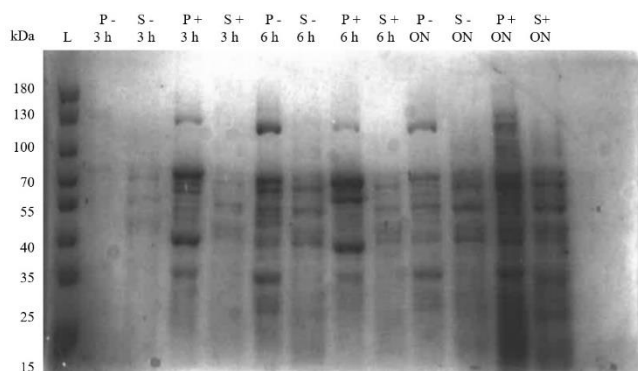


GFP - μ NS při 30 °C

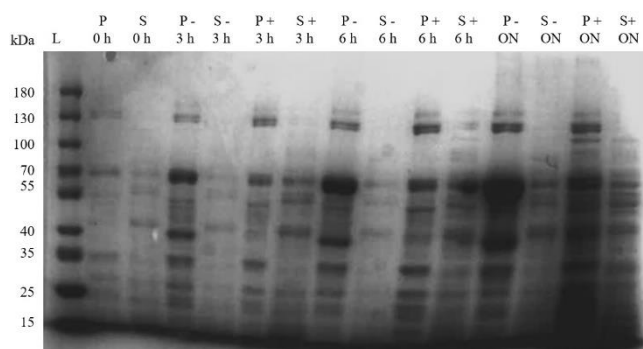
Příloha č. 4: Výsledky pilotních expresí u BL21 (DE3) Competent Cells



GFP - μ NS při 18 °C



mCherry- μ NS při 18 °C



mNeon - μ NS při 18 °C