

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

– Přírodovědecká fakulta –



**KLONOVÁNÍ A EXPRESE ČÁSTI GENU SER-2 BOURCE
MORUŠOVÉHO**

Bakalářská práce

Zpracovala: **Tereza Stašková**

Vedoucí práce: **prof. RNDr. František Sehnal, CSc.**
Dr. Alexander Sponner
Mgr. Robert Fedič Ph.D.

2009

Stašková, T., 2009: Exprese části genu *Ser-2* Bource morušového.

[Cloning and expression of a portion of *Bombyx mori Ser-2* gene. Bc.Thesis, in Czech.] – 51 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

A 897 bp section of *Bombyx mori Ser-2* gene was amplified, cloned into a bacterial expression vector, and used to prepare a recombinant sericin-like protein. The protein is expected to contain domain supporting growth of mammalian cells. It will be used in assays verifying this assumption; if confirmed, recombinant protein will be considered for preparations of scaffold guiding tissue reconstruction.

Práce byla financována z grantu GA AVČR IAA 5007402.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 5. května 2009

.....
Tereza Stašková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat prof. Františku Sehnalovi za umožnění účastnit se práce na projektu AVČR, současně za jeho ochotu a odbornou pomoc a materiální zázemí. Mé poděkování dále patří Dr. Alexandru Sponnerovi za odborné rady, trpělivost a pochopení při vedení praktické části práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Mgr. Robertu Fedičovi za pomoc při zpracovávání dat v konečné fázi práce. Mnohokrát děkuji ostatnímu kolektivu za podporu, pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí v laboratoři.

V Českých Budějovicích dne 5. května 2009

.....
Tereza Stašková

Obsah

1	Úvod.....	4
2	Literární přehled	6
2.1	Historická data	6
2.2	Původ hedvábí.....	6
2.3	Bourec Morušový (Bombyx Mori)	7
2.4	Struktura a funkce hedvábí	9
2.5	Sericiny	12
2.6	Využití hedvábí.....	13
3	Cíl práce	17
4	Materiál a metodika práce.....	18
4.1	Materiál	18
4.2	Metodika práce	19
5	Výsledky	29
5.1	Příprava cDNA pro zaklonování do expresního vektoru (protokol I)	29
5.2	Klonování inzertu	30
5.3	Ověřování správnosti inzertu	32
5.4	Příprava cDNA pro zaklonování do expresního vektoru (protokol II).....	33
6	Diskuse.....	35
7	Závěr	36
8	Přílohy.....	37
8.1	Sekvence plazmidu VII / pET160/GW/D-TOPO vektor	37
8.2	Sekvence plazmidu II / pGEM-T Easy vektor	39
8.3	Sekvence genu Ser-2 bource morušového	42
8.4	Mapa pET160/GW/D-TOPO vektoru (Invitrogen)	45
8.5	Mapa pGEM – T Easy vektoru (Promega)	46
8.6	Seznam zkratk	47
9	Citace	48

1 Úvod

Bourec morušový (*Bombyx mori*) patří do třídy hmyzu (Insecta), řádu motýlů (Lepidoptera) a čeledi bourcovitých (Bombycidae). Pro svou schopnost produkce hedvábí při spřádání kokonu se stal hospodářsky významným druhem a díky tomu též jedním z nejvíce domestikovaných zvířat.

Hedvábí je již téměř 5000 let využíváno v textilním průmyslu k výrobě látek. V poslední době jsou ale podrobně zkoumány i vlastnosti a struktura dalších komponent hedvábí, jež by mohly být využitelné v dalších oblastech průmyslu a biotechnologií.

Hedvábí je polymerní produkt párových snovacích žláz. Morfologicky dělíme žlázu na zadní (PSG), střední (MSG) a přední úsek (ASG). V PSG probíhá sekrece hlavní složky hedvábí, fibroinu. Fibroin ‚*sensu lato*‘ představuje vlastní skelet hedvábí a jeho uspořádání pak definuje pevnost a elasticitu příslušného hedvábného vlákna. Postupně bylo zjištěno, že těžký řetězec fibroinu (*H – fibroin*) je disulfickým můstkem spojen s lehkým řetězcem fibroinu (*L – fibroin*) a tento heterodimer je pomocí nekovalentních interakcí spojen s chaperoninem P25. Celý komplex vytváří sloupec gelu, který se posunuje do MSG. Tento úsek žláz je místem produkce skupiny glykoproteinů, sericinů, které obalují sloupec fibroinu. Při předení fibroin kondenzuje v elastický filament; pár filamentů (z pravé a levé žlázy) jsou prostřednictvím sericinů slepeny v jedno vlákno. Vnější vrstvy sericinů působí jako lepidlo při formování kokonu. Dalším produktem MSG jsou tzv. minoritní, či nestrukturální, komponenty, které pravděpodobně hrají roli při ochraně proti bakteriím a plísním (Nirmala et al. 2001)

Význam fibroinu v textilním průmyslu je všeobecně známý. Sericiny prozatím představovaly odpadní materiál, který je z hedvábí odstraňován procesem zvaným ‚deguming‘ (lázeň v horké vodě). Jen malá část získaných sericinů je využívána pro kosmetické účely. Postupně bylo zjištěno, že sericiny mají řadu dalších výborných vlastností, jako například odolnost proti UV záření, schopnost hydratace, baktericidní účinky, lepivost, antialergenita, podpora proliferace lymfocytů, nebo naopak inhibice buněk karcinomu tlustého střeva a dermatomu (Sehnal 2008). Díky těmto vlastnostem se sericiny dostaly do centra pozornosti velké řady laboratoří, biotechnologických a průmyslových firem.

Předložená práce je součástí průzkumu využití jednotlivých komponent sericinů, obzvláště jejich menších částí, pro výrobu nových biomateriálů a pro potřeby biomedicíny.

Specifickým cílem této práce bylo vytvoření rekombinantního proteinu pomocí amplifikace části genu *Ser-2*.

2 Literární přehled

2.1 Historická data

Hedvábí je přírodní materiál, který byl objeven v Číně přibližně 2600 let př.n.l. Jedna z mnoha legend o objevení hedvábí praví, že tehdy popíjela čínská císařovna Xi Ling Shi v zahradě pod morušovníkem svůj šálek čaje, když jí do hrnku spadl jeden zámotek hedvábí. Než si toho císařovna povšimla, v horkém čaji se z kokonu se začala uvolňovat jemná, ale zároveň pevná hedvábná vlákna. Císařovna si je začala namotávat prsty a tak v podstatě objevila technologii výroby hedvábí. Číňané začali motýla chovat a již v dávné historii vyšlechtili zkřížením dvou příbuzných druhů rodu *Bombyx* plně domestikovaného motýla *bource morušového*. Bourec a technologie výroby vzácného hedvábí se stali chráněným tajemstvím. Podle legendy bylo porušení výrobního tajemství dle císařského nařízení trestáno smrtí. Produkt nabyl zanedlouho hodnoty velmi cenného obchodního artiklu a vzácná látka se začala dovážet z Číny až do Persie a Říma. Výrobní tajemství se údajně podařilo udržet přes tři tisíce let. Teprve v 6. století n.l. přenesli dva mniši v duté holi vajíčka bource přes čínské hranice a výroba tolik cenného materiálu se přenesla až do Evropy (Hyde 1984). Od té doby se produkce a využití hedvábí stalo tradiční součástí života lidské společnosti.

2.2 Původ hedvábí

Hedvábí se v přírodě vyskytuje jako bílkovinný produkt životního cyklu mnoha zástupců kmene členovců (Arthropoda), jehož produkce je prokázána u jedinců tříd pavoukovci (Arachnida), hmyz (Insecta) a stonožky (Chilopoda). Hedvábí se řadí mezi tzv. strukturální proteiny, slouží tedy nejen jako stavební materiál pro ochranné a obranné účely (Insecta, Chilopoda), ale také pro výstavbu lovných sítí jako nástrojů k získávání potravy (Arachnida, Insecta). Fylogenetická analýza v rámci třídy hmyzu ukazuje, že schopnost sekrece hedvábí se během evoluce možná objevila nejprve u dospělců bezkřídlého hmyzu (Apterygota), u kterých samci zavěšují spermatofór na hedvábné vlákno (Craig 1997).

Schopností sekrece hedvábí vynikají především larvy řádů motýli (Lepidoptera) a chrostíci (Trichoptera), blanokřídlí (Hymenoptera), blechy (Siphonaptera) a další. Larvy uvedeného holometabolního hmyzu vytvářejí párovými snovacími žlázami směs proteinů, která je ve žlázách skladována jako gel, ale při předení rychle tuhne a přeměňuje se na pevné

hedvábné vlákno. Typické je předení pro larvy posledního instaru, které ukončily žír. Larva vytvoří kolem sebe hedvábný kokon, ve kterém se svleče v kuklu. Kokon slouží jako ochranná bariéra mezi kuklou a vnějším prostředím. Nejznámějším a z hlediska produkce hedvábí nejlépe prozkoumaným druhem hmyzu je právě bourec morušový (*Bombyx mori*). Strukturou a funkcí hedvábí tohoto druhu se budu dále zabývat.

2.3 Bourec Morušový (*Bombyx Mori*)

Bourec morušový (*Bombyx mori*) je hybridní druh motýla, který byl vyšlechtěn v Číně již křížením dvou příbuzných druhů rodu bourec (*Bombyx*); (Yoshitake et al., 1968). Na úkor vzniku ekonomicky výhodného domestikovaného křížence se stal plně závislý na lidské péči. Bourec morušový taxonomicky spadá do řádu motýli (*Lepidoptera*) a čeledi bourcovití (*Bombycidae*); (Encarta 1998).

Z charakteristiky dospělého jedince bource morušového je třeba uvést, že sice má vytvořená křídla, ale nelétá, je celkově málo pohyblivý, nepřijímá potravu a hyne během několika dní. Motýl má smetanově béžovou barvu danou obsahem pigmentů v šupinách. Pomocí tykadel citlivě vnímá pachy, zejména feromoc produkovaný neoplozenými samicemi. Rozpětí křídel je 3 - 5 cm, samička je dvakrát až třikrát větší a zároveň i těžší než sameček. Už během kuklového vývoje vytváří až 500 vajíček, která během krátkého života dospělé vyklade. Vajíčka lepí v jedné vrstvě k podkladu. Bourec prochází při vývoji přeměnou dokonalou, tzn. od vývojového stadia vajíčka přes larvu a kuklu až po stadium dospělé. U tropických kmenů bource běží jedna generace za druhou, u většiny komerčních kmenů (stejně jako u příbuzného divokého druhu *Bombyx mandarina*) je vývoj v zimním období přerušen diapauzou ve stádiu časného zárodka. Vystavení vajíček chladu během zimy je podmínkou pro ukončení diapauzy a obnovení zárodečného vývoje na jaře (Encarta 1998).

Životní cyklus bource začíná po naklazení několika set vajíček oplodněnou samicí bource. Za deset dní se z nich vylíhnou malé larvičky, zbarvené do hněda. Larvy procházejí pěti vývojovými instary, během nichž rychle rostou. V pátém instaru larva dosáhne maximální velikosti, přestane přijímat potravu a vyprázdní střevo, zbarví se bíle až do žluta, a vyhledá vhodné místo pro uchycení kokonu. Kokon vypřeде asi za 3 dny a uvnitř něho se svleče v

kuklu. Přibližně po 10 dnech dojde k dokončení metamorfózy a dospělý jedinec začne vylučovat proteolytické enzymy, které rozruší hedvábná vlákna kokonu a vytvoří otvor, kterým motýl vyleze ven. Délka života dospělého je neúměrná délce jeho vývoje. Během několika dní se samec se samicí spáří a po naklazení vajíček jejich životní dráha končí. Jak bylo uvedeno výše, bourec morušový je obvykle hmyz hibernující. Samičky vylíhnuté v dlouhém dni jsou délkou světla ovlivněné a produkují potomky, z jejichž vajíček se budou larvy líhnout až na jaře nadcházejícího roku (Encarta 1998).



Obrázek 1: Vývojová stádia bource morušového

Zleva: vajíčka, larva, kukla, dospělý jedinec (autor obrázku: Josef Dvořák)

Rozmnožování bource morušového vyžaduje pomoc člověka. Důvodem je neschopnost bource dostat se k jedinci opačného pohlaví na delší vzdálenost. Není to způsobeno nedostatkem feromonu produkovaných samicí, ani sníženou citlivostí feromonových receptorů u samečků, ale neschopností letu a celkově malou pohyblivostí u obou pohlaví. Při umělém odchovu jsou samci a samičky párovány v malém prostoru (obvykle v malých papírových pytlících), ve kterých může páření a kladení vajíček úspěšně proběhnout (Encarta 1998).

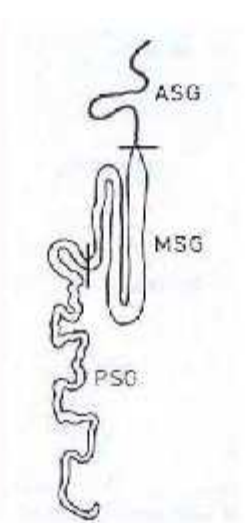
Potravou larev bource jsou primárně listy moruše bílé (*Morus alba*), které preferuje. Housenky ovšem striktně nevyžadují pouze tento druh stromů, ale vystačí si i s některými jinými druhy moruší, jako je např. moruše červená (*Morus rubra*), moruše černá (*Morus nigra*) nebo moruše čínská (*Morus cathayna*). V některých zemích jsou housenky až do třetího instaru krmeny uměle připravenou potravou, jejíž podstatnou částí jsou drcené morušové listy. Intenzivní žír probíhá pouze v larválním stádiu. Dospělý jedinec nemá plně

vyvinuté ústní orgány a nemůže přijímat potravu, proto v podstatě umírá nedostatkem živin a vyhladováním (Encarta 1998).

Nejbližším příbuzným Bource morušového je divoký druh z čeledi bourcovití bourec mandarína (*Bombyx mandarina*); (Savela 1998).

2.4 Struktura a funkce hedvábí

Produkce hedvábí u bource probíhá v larválním stádiu. Hedvábí vytváří modifikované labiální žlázy s vnější sekrecí, zvané též snovací žlázy, ve kterých se začne vytvářet směs několika druhů proteinů. Snovací žlázy jsou trubicovitý párový orgán ektodermálního původu. Maximální velikosti a funkce dosahující v průběhu posledního larválního instaru, tj. těsně před zakuklením. Žlázy tvoří jednovrstevný tubulární epitel, který se skládá z několika set obrovských, vysoce polyploidních buněk. Buňky jsou charakteristické svým velmi dobře vyvinutým hrubým endoplasmatickým retikulem a uspořádáním Golgiho



aparátu, jehož systém váčků a kanálků je zodpovědný za primární sekreci proteinů do žláзовého lumen (Akai 1984). Snovací žlázy můžeme po morfoloické stránce i z funkčního hlediska rozdělit na tři základní části (viz obr.1), tj. přední úsek (anterior silk gland, ASG), střední úsek (middle silk gland, MSG) a zadní úsek (posterior silk gland, PSG); (Nunome 1937).

Obrázek 2: Snovací žlázy bource morušového (autor obrázku: Robert Fedič)

PSG je dlouhý úsek snovacích žláz tvořen asi 500 vysoce polyploidními buňkami (Prudhomme et al., 1985), jehož funkcí je produkce dvou velkých kategorií proteinů. První kategorií se rozumí skupina nerozpustných fibroinů rozdělena na těžké řetězce fibroinů (H-fibroin) o přibližné molekulové hmotnosti 250 – 500 kDa a lehké řetězce (L-fibroin) o hmotnosti 25 kDa. Do druhé kategorie spadá protein P25, který se vyskytuje ve dvou formách o hmotnostech 27 a 31 kDa. Těžké a lehké řetězce fibroinu jsou navzájem spojeny

disulfidickými vazbami nezbytnými pro mezibuněčný transport nativního hedvábí (Yamaguchi et al. 1989). Protein P25 byl klasifikován jako pomocný protein zodpovědný za transport vysoce nerozpustného H-fibroin / L-fibroin heterodimeru a současné uskladnění komplexu proteinů v lumen snovací žlázy (Takei et al., 1987). V lumen jsou pak proteiny nahromaděny do sekrečních granul ve formě vysoce koncentrovaného gelu o zastoupení proteinů H-fibroin, L-fibroin a P25 v poměru 6:6:1 (Inoue et al., 2000).

MSG je širokým oddílem snovacích žláz složeným z přibližně 300 polyploidních buněk (Prudhomme et al., 1985), u kterého rozlišujeme tři funkční oblasti, distální, centrální a proximální. Produkty snovacích žláz sekretované v MSG nazýváme sericiny. Tímto názvem rozumíme skupinu rozpustných glykoproteinů bohatých na aminokyselinu serin (Gamo et al., 1977), jež mají nepostradatelnou funkci při spřádání kokonu. Adhezivní vlastnosti sericinů umožní slepení fibroinových filamentů v jedno vlákno a lepení vláken do stěny kokonu, který vytvoří ochrannou bariéru mezi kuklou a vnějším prostředím. Sericiny se navzájem liší stupněm glykosylace a velikostí molekul (Couple et al., 1987). Velikost translatovaných sericinových proteinů je různá, pohybuje se v rozmezí molekulové hmotnosti od 65 kDa až do 400 kDa. Sericinové proteiny jsou kódovány třemi geny označovanými jako *Ser-1*, *Ser-2* a *Ser-3*. První dva, *Ser-1* a *Ser-2*, podléhají alternativnímu sestřihu (Michaille et al., 1986). Zmapováním genů restrikčními endonukleázami bylo zjištěno, že existuje několik variant sestřihu a od nich odvozených mRNA a že se vzorec sestřihu genů v průběhu posledního larválního stadia BM mění (Michaille et al., 1986; Tripoulas & Samols (1986); Couple et al. 1987; Hamada (1987); Garel et al., 1997). Z toho vyplývá, že směs sericinů produkovaných na začátku spřádání má jiné složení než v konečné fázi spřádání kokonu.

Ser-1 gen je exprimován v distální a centrální oblasti MSG. Gen byl plně sekvenován (Couple et al., 1987). *Ser-1* má velikost 23 kb, obsahuje 9 exonů a alternativní sestřih primárního transkriptu dává vzniknout čtyřem mRNA o velikostech 2.8 kb, 4.0 kb, 9.0 kb a 10.5 kb (Michaille et al., 1990). Konečným produktem proteosyntézy jsou dva hlavní proteiny o velikostech 150 kDa (sericin P) a 400 kDa (sericin M). Sericin P je vylučován v distální oblasti MSG, sericin M v centrální oblasti (Takasu et al., 2002).

Ser-2 gen je exprimován v přední části MSG (Michaille et al., 1989). Transkript genu se v největší koncentraci objevuje v posledním instaru a jeho koncentrace klesá až k nule po ukončení žíru (Michaille et al., 1989, 1990; Takasu et al., 2002). Gen *Ser-2* obsahuje 13 exonů (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9a, 9b, 10a, 10b, a 11), které se liší svou velikostí od 28 bp až po 2574 bp (Kludkiewicz et al., 2009). Gen byl mapován restrikčními enzymy a bylo zjištěno, že podléhá alternativnímu sestřihu. Sestřih genu vykazuje dvě varianty, jehož produkty jsou dvě zralé mRNA o velikostech 3,1 a 5,6 – 6,4 kb, v závislosti na alelickém uspořádání (Michaille et al., 1990). Byly charakterizovány dva produkty sestřihu, jimiž jsou dva proteiny o velikostech 220 kDa a 130 kDa. Sekvenační analýza genu ukázala, že se na N-konci vyskytují silně repetitivní oblasti. C-konec genu není repetitivní oblastí, vyznačuje se bohatým obsahem aminokyseliny serinu (přibližně 18%) a hydrofilních aminokyselin.

Proteiny odvozené od genu *Ser-2* se vyznačují vysokou lepivostí a přilnavostí k povrchu (Kludkiewicz et al., 2009). Aminokyselinová sekvence zkoumaných proteinů byla porovnána s adhezivními proteiny mořského mlže Slávky jedlé (*Mytilus edulis*) a ukázalo se, že repetitivní sekvence kódovaná exonem 9a vykazuje pozoruhodnou podobnost (až 35% shodu) se sekvencí proteinů izolovaných z mušlí, které vlastní adhezivní proteiny využívají ve vodním prostředí pro pevné přilnutí na skalní povrch (Filpula et al. 1990).

Ser-3 gen je silně exprimovaný v předním oddíle MSG a nese informaci pro syntézu proteinu o molekulové hmotnosti 230 kDa (sericin A). Sericin A se vyznačuje repetitivními oblastmi bohatými na serin, což vede ke sníženému výskytu beta skládaného listu jako sekundární struktury proteinu. Protein má hydrofilní vlastnosti, a v porovnání se sericiny odvozenými od genu *Ser-1* vykazuje vyšší fluiditu molekuly (Takasu et al. 2007). Funkcí sericinu A je, společně se sericiny M a P, vytvářet skelet pro uchycení budoucího kokonu k okolí.

Minoritní komponenty hedvábí jsou malé proteiny produkované částečně v PSG, zejména ale, a některé z nich výlučně, v MSG. Mezi minoritní komponenty patří inhibitory proteáz a seroiny.

Inhibitory proteáz (antiproteázy) jsou proteiny, které potlačují působení proteolytických enzymů (proteáz), katalyzujících hydrolytické štěpení proteinů. V hedvábí bource

morušového byly analyzovány dva typy těchto inhibitorů a to BmSPI 1, BmSPI 2 (*Bombyx mori* silk proteinase inhibitor 1 a 2). Transkribovaná část genu pro BmSPI 1 má délku 443 nukleotidů a kóduje peptid o velikosti 76 aminokyselin (AA), z čehož 20 AA vytváří signální sekvenci. Zralý SPI 1 se skládá z 56 AA, má hmotnost 6056.7 Da a je typickým inhibitorem typu Kunitz, s argininem v pozici P1. Transkribovaná část genu obsahuje 260 nukleotidů a předpokládaná nativní délka peptidu je 58 AA. Finální BmSPI 2 o molekulové hmotnosti 3993 Da se skládá z 36 AA a představuje jednoduchou doménu inhibitoru Kazal – typu o unikátní struktuře. Syntéza BmSPI 1 a BmSPI 2 začíná v posledním larválním stádiu a postupně se zvyšuje až do upředení kokonu. Koncentrace těchto peptidů po upředení kokonu zůstává stále vysoká (Nirmala et al., 2001a, b).

Seroin 1 a Seroin 2 jsou proteiny o molekulové hmotnosti 9.9 a 10.3 kDa. Geny pro oba Seroiny jsou exprimovány jak v MSG, tak i v PSG. mRNA *seroinu 1* a méně jasně *seroinu 2* je shromažďována od posledního instaru až do stadia upředení kokonu, kdy má maximální zastoupení (Žurovec et al. 1998, Nirmala et al., 2001b).

Seroiny a proteázové inhibitory byly nejprve podrobně prostudovány u zavíječe voskového (*Galeria mellonella*). Později byly nalezeny homologické proteiny u bource morušového. Na základě podobností můžeme předpokládat, že syntéza inhibitorů proteáz je velmi důležitá pro všechny zástupce motýlů. Jelikož je exprese genů těchto nízkomolekulárních komponent hedvábí nejvyšší právě v období spřádání kokonu, předpokládá se, že funkce seroinů a proteázových inhibitorů souvisí právě s formováním a údržbou jeho tvorby. Z charakteristiky složení proteinů vyplývá, že by mohly zároveň sloužit jako ochrana kokonu před predátory a mikrobiálními infekcemi (Nirmala et al., 2001 b).

ASG je nejmenší oddíl snovacích žláz, jehož funkce u BM nebyla zatím podrobněji prostudována. V této části se do hedvábí přidávají pigmenty (např. karotenoidy způsobující žluté nebo oranžové zbarvení), podstatná je však úloha ASG pro koverzi fibroinového gelu ve filament.

2.5 Sericiny

Sericiny jsou z MSG vylučovány do lumen, kde se odděleně skladují okolo fibroinového sloupce po dny až týdny. Teprve během procesu spřádání kokonu, kdy je zahájena

polymerizace fibroinových filamentů, se začne měnit jejich konformační struktura. Tuhnutí sericinů musí probíhat postupně, jelikož je zárukou správné polykondenzace směsi proteinů. Jako první začne měnit svou strukturu vnitřní vrstva sericinů, která slepuje fibroinové provazce. Vrstva obsahuje sericiny odvozené od genů *Ser-3* a *Ser-2* a je zárukou toho, že se z amorfni hmoty stane pevné jednotné vlákno. Vnější vrstva sericinů odvozená od genu *Ser-2* a zejména *Ser-1* zůstává déle nezměněná a slouží jako materiál ke slepení vláken a vytvoření konstrukce kokonu. Výsledkem procesu spřádání hedvábí je kokon, jež se vyznačuje typickou krystalickou strukturou stavebních vláken. Proteinová analýza ukázala, že složení kokonu není uniformní. Zastoupení sericinů se v průběhu spřádání kokonu mění. Proto můžeme zámotek morfologicky rozdělit na tři vrstvy, vnitřní, střední a vnější. Vnější vrstva spřádána jako první ze všech obsahuje maximum sericinů, které ve výsledku tvoří asi 30% z celkových proteinů kokonu (Suzuki 1977). Ve střední vrstvě se obsah sericinů začíná postupně snižovat a minimální zastoupení nalezneme ve vrstvě vnitřní. Mechanismus postupného tuhnutí proteinů není ještě zcela objasněný. Důvod, že za složitým procesem stojí pouze odpařování vody vyvrací fakt, že nejprve kondenzuje vnitřní vrstva sericinů (Jin & Kaplan 2003). Reálnějším vysvětlením jevu je rozličná aminokyselinová sekvence a sekundární struktura proteinů, která byla analyzována rentgenovou difrakcí. Zatímco jsou vnitřní sericiny odvozené od genu *Ser-1* většinou uspořádány do β – skládaného listu, vnější sericiny exprimované genem *Ser-2* jsou spíše globulární a součástí sekvence jsou repetice nabitých aminokyselin (Huang et al., 2003).

2.6 Využití hedvábí

2.6.1 Separace a fibroinů a sericinů

Textilní průmysl je všeobecně nejznámějším, nejrozšířenějším a zároveň nejstarším odvětvím, kde jsou využívány kokony domestikovaného bource morušového pro produkci hedvábných nití a výrobu tkanin. Kokony bource morušového jsou ve výrobnách zpracovávány procesem zvaným deguminace (Narita K., 1954), což je ve své podstatě děj při kterém dojde k rozvolnění vláken a oddělení dvou hlavních proteinových komponent hedvábí, fibroinů a sericinů. V první fázi se kukly nechají usmrtit horkou párou, aby se při líhnutí imág zámotky neporušily. V dalším kroku se kokony ponoří do horkého slabě alkalické vody. Tím se z kokonu uvolní hedvábné vlákno, sestávající z páru fibroinových

filamentů a vnitřní vrstvy sericinů. Několik vláken se v spřádacím stroji spojí v hedvábnou nit použitelnou v textilním průmyslu. Sericiny vnější vrstvy vlákna zůstávají v roztoku a jsou jen z malé části využity pro kosmetický, případně farmakologický průmysl (Sehnal 2008). Množství sericinů získaných při zpracování kokonů se odhaduje na 50,000 tun ročně (Zhang 2002), což představuje ohromné množství bílkovinného materiálu, který by bylo možné využít.

Biomedicínská technika se stala vedle kosmetiky dalším možným odběratelem sericinů. Využití hedvábí má v medicíně již dlouhou historii a zájem o různé aplikace se poslední dobou stále zvyšuje. Příkladem je používání fibroinových vláken jako šicího materiálu v chirurgii, kde vynikají svou pevností, pružností, biokompatibilitou, antimikrobiálními účinky a dokonalou degradovatelností uvnitř organismu. Díky uvedeným vlastnostem se dále jeví jako vhodný pracovní materiál pro tkáňové inženýrství, kde může posloužit svým skeletem pro „*in vitro*“ výstavbu pojivových tkání, obzvláště chrupavek a kostí (Chang et al. 2007). Na rozdíl od kolagenových struktur, které sice vykazují podobné vlastnosti, ale jsou rychleji degradovány, fibroiny lépe stimulují proliferaci a růst chondrocytů (Chung and Burdick, 2007).

2.6.2 Průmyslové využití minoritních komponent hedvábí

Inhibitory bakteriálních proteáz a proteáz plísní by mohly být pro své antimikrobiální účinky použity při výrobě antiseptických preparátů, zahrnujících různé léky, desinfekční přípravky a činidla (Milner et al., 2007).

2.6.3 Využití sericinů

Sericiny vykazují řadu vlastností pomocí kterých získaly pověst tzv. slibných biomateriálů. Nejprve si pro své zvláčňující (Padamwar et al., 2005), antioxidantní a antibakteriální účinky (Sarovat et al., 2003; Zhaorigetu et al., 2003) našly své uplatnění v **kosmetice**. Na základě svého charakteru podporují regeneraci buněk a vypínání pleti. Proto se přidávají do nejrůznějších kosmetických přípravků, jako jsou zvláčňující pleťová mléka, krémy proti vráskám, regenerační vlasové balzámy, soli do koupele, pleťové masky atd. Odolnost před škodlivým UV zářením (Zhaorigetu et al., 2003) je další využitelnou vlastností sericinů, proto se staly součástí různých olejů a krémů na opalování.

Biotechnologie je oborem, který se též zabývá využitím sericinů v praxi. V průběhu času bylo prokázáno, že sericiny kromě rezistence na UV záření a potlačování oxidace, mohou lehce absorbovat, nebo naopak uvolňovat vlhkost a jsou přirozeně degradovatelné. Sericinové proteiny jsou schopny tzv. kopolymerizace, neboli vytváření prostorových sítí. Mohly by být smíchány s jinými makromolekulárními materiály, speciálně s umělými polymery, čímž by se vylepšily současné vlastnosti polymerních vláken. Vzhledem k uvedeným vlastnostem by mohl být tento materiál využíván k výrobě membrán, filtrů, různých tkaniv a vláken, či předmětů pro rozmanité účely (Zhang YQ. 2002). Známé jsou také adhezivní schopnosti sericinů, proto je výzkum zaměřen i tímto směrem. Vytváření lepidel jako jsou náplasti, nebo různá lepidla z antialergenního biomateriálu, by mohlo být přínosem nejen pro přecitlivělé jedince.

Farmaceutický průmysl je dalším odvětvím, kde se uvažuje o využití sericinů v praxi. U krys (*Rattus norvegicus*) byl pozorován pozitivní efekt sericinů rozpuštěných v roztoku na hojení porušené oční rohovky. Sericiny svými adhezivními vlastnostmi podporují buněčný cyklus a umožňují tím zvýšenou proliferaci buněk. V porovnání s klasickými roztoky solí, které se běžně přidávají do očních kapek, bylo zjištěno, že sericiny na rohovku působí efektivněji a vedou k rychlejšímu zhojení rány (Nagai et al., 2009).

Klinická biologie je oborem, pro který má studium sericinů obzvláštní význam. Oxidativní stres, zvýšená buněčná proliferace a následný vznik karcinomu tlustého střeva je dnes velmi závažnou a častou zdravotní komplikací. Experimentálně bylo prokázáno, že sericiny potlačují oxidativní stres a proliferaci buněk tlustého střeva a redukují velikost adenomů střevní sliznice. Účinek na redukci zhoubného karcinomu nebyl zatím pozorován (Zhaorigetu et al. 2001). Dále bylo prokázáno, že antioxidantní účinky sericinů též aktivně potlačují uměle vyvolanou nádorovou proliferaci kožních buněk a pomáhají k léčbě akutního poškození kůže UVB zářením (Zhaorigetu et al. 2003).

V biomedicínské praxi se do růstových médií pro tkáňové kultury běžně přidává hovězí plodové sérum, neboli bovinní sérum, jehož hlavní složkou je hovězí sérový albumin (bovine serum albumin / BSA). Díky svému složení BSA podporuje růst, dělení a přežívání buněk v uměle vytvořeném prostředí a je proto vhodným přísadkem kultivačních médií. Bovinní sérum ale není zdaleka vhodné pro všechny typy buněk.

Jelikož buňky bez přítomnosti média obohaceného BSA nejsou schopny přežívání, jako náhražka BSA byly do média přidány sericinové proteiny. Ukázalo se, že přežívání, růst i dělení krysích buněk langerhansových ostrůvků v přítomnosti sericinů je srovnatelné s přítomností BSA a produkce inzulínu v kultivovaných buňkách vykazuje fyziologické hodnoty (Morikawa M. et al. 2009). Kladný efekt sericinů je dán převážným zastoupením pozitivně nabitých aminokyselin v jejich řetězci, které ochotně přitahují negativně nabitou buněčnou stěnu. Tyto interakce vedou k lepšímu přichycení buněk na růstový substrát (Gotoh et al. 1998). Na základě uvedených informací můžeme proto mluvit o sericinech jako biomaterálu užitečném v boji proti diabetu z hlediska léčení diabetických pacientů, či výroby inzulínu potřebného ke snižování hyperglykémie.

Pozitivní vliv sericinů na buňky tkáňových kultur ovšem není pravidlem. Kompatibilita a způsob interakce závisí na aminokyselinové sekvenci použitého sericinu, která může být pro různé buňky unikátní. Další otázka se nabízí zejména tam, kde porovnáme působení jednoho produktu na dva zcela odlišné účely. V rozporu stojí cytostatický účinek na rakovinové buňky a proliferativní efekt na buňky tkáňové. Snahou této práce je právě vytvořit protein, který bude vykazovat některé z výše uvedených vlastností.

3 Cíl práce

Cílem bakalářské diplomové práce byla příprava vektorů pro přípravu rekombinantních peptidů kódovaných specifickými úseky genu *Ser-2*.

Jednotlivé kroky zahrnují:

- Amplifikace vybraného úseku cDNA genu *Ser-2*
- Klonování do expresního vektoru
- Ověření sekvence a orientace zaklonovaného insertu

4 Materiál a metodika práce

4.1 Materiál

- Celková RNA připravená z MSG plně vzrostlé, ale dosud žeroucí larvy bource morušového
- Pracovní kit – *Champion™ pET Directional TOPO®Expression Kits with Lumio™ Technology* (Invitrogen)
- Pracovní kit – *pGEM®-T Easy Vector System*
- *TOP 10 cells* – kompetentní buňky *Escherichia coli* (,TOPO expression kit‘)
- Buňky DH5α – kompetentní buňky *Escherichia coli* (Promega)
- Sekvence genu *Ser-2* bource morušového (viz příloha)
- Genově specifické primery
 - 2004IntF*: GAAAGGGAAAAATCCGAATCC
 - Basha 5 R*: GGTCATCATCGGATAAAGAC
- Expresní primery
 - Exp2004intF*: CACCGAAAGGGAAAAATCCGAATCC
 - Exp2004rev*: TCAGTCTTTATCCGATGATGACC
- Vektorově specifické primery
 - T7 Promoter Primer*: TAATACGACTCACTATAGGG
 - T7 Reverse Primer*: TAGTTATTGCTCAGCGGTGG
 - SP6 Promoter Primer*: TATTTAGGTGACACTATAG
- Oligo (dT)_n ,*TRIKANT*‘: TGAGCAAGTTCAGCCTGGTTA(T)₁₉

4.2 Metodika práce

4.2.1 Příprava cDNA pro zaklonování do expresního vektoru – protokol I.

4.2.1.1 Syntéza cDNA reverzní transkripcí z RNA

Pracovní potřeby: Pracovní kit *Superskript III* (Invitrogen)

Pracovní postup

1) Připravíme pracovní směs A.

Pracovní směs A	Reakce I. [μ l]
Primer <i>exp2004intF</i>	0,25
Primer <i>exp2004rev</i>	0,25
směs dNTP (2,5 mM)	4
Vzorek RNA	1

2) Inkubujeme 5 minut při 65 °C.

3) Inkubujeme 1 minutu na ledu.

4) Ke směsi A přidáme složky směsi B.

Pracovní směs B	Reakce I. [μ l]
Reakční pufr (5 \times)	4
0,1 M DTT	1
dsH ₂ O	1
, <i>Superscript III</i> '	1
Objem reakční směsi	12,5 μ l

5) Jemně promícháme, spustíme program RT – PCR.

Podmínky reakce

nasedání primerů, polymerace 60 minut při 55 °C

inaktivace enzymu 15 minut při 72 °C

držet při 4 °C

4.2.1.2 PCR, elektroforéza na agarózovém gelu, amplifikace PCR produktu

Pracovní potřeby: pracovní kit *TaKaRa TaqTM* (Takara)

a) Pracovní postup – PCR

1) Připravíme pracovní směs.

Pracovní směs	Reakce I. [μ l]
PCR pufr (10 \times)	2,5
dNTP směs (2,5 mM)	2
Primer <i>exp2004intF</i>	1
Primer <i>exp2004rev</i>	1
Vzorek cDNA	1
dsH ₂ O	17,5
r-Taq polymeráza	0,13
Objem reakční směsi	25 μ l

2) Spustíme PCR program (TH_10/45°C).

Podmínky reakce

denaturace 2 minuty při 94°C
denaturace 30 sekund při 94°C
nasedání primerů ... 30 sekund při 45°C
polymerace 45 sekund při 72°C
polymerace 10 minut při 72°C
držet při 4°C

} 30 \times

b) Pracovní postup – elektroforéza

- 1) Příprava 1,25% agarózového gelu: 1,25g agarózy rozpustíme ve 100ml 0,5 \times TAE v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí na 60°C do gelu přidáme 4 μ l ETBR a vlijeme do připravených forem s hřebínkem. Dokonale ztuhlý gel umístíme do elektroforetické aparatury a přelijeme TAE (0,5 \times).
- 2) PCR produkty smíchané s 2 μ l barvicího roztoku a standardní roztok napipetujeme do gelu, elektroforetickou aparaturu zapneme při 50V na 50 minut.

c) Pracovní postup – Amplifikace cDNA: Připravíme 5 shodných PCR reakcí (viz pracovní postup *PCR 4.2.1.2*), jako templát použijeme cDNA, elektroforézy na 1% agarózovém gelu.

4.2.1.3 Purifikace DNA z gelu

Pracovní potřeby: *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen)

Pracovní postup: Pracujeme dle protokolu *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen).

4.2.1.4 Měření koncentrace dsDNA pomocí spektrofotometru

Pracovní postup

- 1) Na spektrofotometru nastavíme vlnovou délku pro dsDNA (260 nm).
- 2) Proti kontrolnímu roztoku ve kterém byla DNA rozpuštěna změříme koncentraci.
- 3) Zkontrolujeme čistotu vzorku DNA na přítomnost proteinů poměrem absorbancí 260 / 280 nm.

4.2.1.5 Měření koncentrace dsDNA pomocí fluorimetru

Pracovní postup

- 1) Připravíme si kontrolní roztok A (H33258).
- 2) Pomocí pracovního roztoku ‚*Calf thymus DNA*‘ nakalibrujeme fluorimetr.
- 3) Proti roztoku A, ve kterém zároveň ředíme vzorek, měříme koncentrace vzorků dsDNA.

4.2.1.6 Sekvenování

Pracovní potřeby: pracovní kit *ABI PRISM® BigDye® Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems)

Pracovní postup

- 1) Vzorky DNA naředíme na koncentraci 28 ng · μl⁻¹.
- 2) Pro jednu reakci použijeme 7,5 μl vzorku.
- 3) Sekvenaci provede specializovaná laboratoř UMBR na přístroji *3130 xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) za použití primerů *T7 Promoter Primer* a *T7 Reverse Primer*.

4.2.1.7 Upravení konců cDNA, amplifikace cDNA

Pracovní potřeby: pracovní kit *Platinum® Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen)

Pracovní postup

- 1) Připravíme PCR pracovní směs.

Pracovní směs	1 reakce [μl]	4 reakce [μl]
PCR pufr(10 \times)	2,5	10
dNTP směs (2,5 mM)	3	12
50 mM MgSO ₄	0,5	2
Primer <i>Exp2004intF</i>	0,75	3
Primer <i>Exp2004rev</i>	0,75	3
Templát cDNA	1	4
dsH ₂ O	14	56
,enhancer' (10 \times)	2,5	10
Pfx polymeráza	0,2	0,8
Objem reakční směsi	25 μl	100 μl

- 2) Pro PCR použijeme program PCR program (TH_10/45°C).
- 3) Provedeme purifikaci PCR produktu z gelu dle návodu 4.2.1.3.
- 4) Změříme koncentraci PCR produktu.

4.2.2 Příprava plazmidu

Pracovní potřeby: Pracovní kit *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits with Lumio™ Technology* (Invitrogen)

4.2.2.1 Ligace templátové cDNA do expresního vektoru

Pracovní postup

- 1) Připravíme si reakční směs.

Pracovní směs	2 reakce [μl]
PCR produkt ($c= 1,23 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	4
Reakční směs	1
<i>pET160/GW/D-TOPO</i> vektor	1
Objem reakční směsi	6 μl

- 2) Inkubujeme 15 minut při pokojové teplotě.
- 3) Reakční směs umístíme na led.

4.2.2.2 Transformace plazmidu do bakteriálních buněk

Pracovní postup

- 1) Připravíme transformační reakci tak, že 3 μl reakční směsi napipetujeme do chemicky kompetentních TOP 10 buněk (*TOP 10 cells*), 3 μl směsi napipetujeme do kompetentních DH5 α buněk (Promega) a 3 μl kontrolního plazmidu (*pET160-GW/CAT plasmid*) přidáme do TOP 10 buněk.
- 2) Všechny tři transformační reakce inkubujeme 15 minut na ledu.
- 3) Reakce inkubujeme 30 sekund při 42 °C, poté okamžitě umístíme na led.
- 4) Do každé reakce přidáme 250 μl S. O. C. media.
- 5) Inkubujeme v třepačce 60 minut při 37 °C, rychlost třepání 180 rpm.
- 6) Z každé reakční zkumavky odebereme 100 μl a 200 μl bakteriální kultury, které poté vysejeme na LB agarové s přidavkem ampicilinu (výsledná koncentrace ampicilinu je 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)
- 7) Agary necháme inkubovat v termostatu při 37 °C přes noc.

4.2.2.3 Detekce klonované cDNA v bakteriálních koloniích

Pracovní postup

- 1) Mikrobiologickou kličkou nabereme část vybraných kolonií a vytřepeme ji v 25 μl dsH₂O.
- 2) Provedeme teplotní šok inkubací 5 minut při 95 °C a následným okamžitým ochlazením na ledu.
- 3) Centrifugujeme 10 minut, 13 000 rpm při 4 °C. Dále pracujeme se supernatantem.
- 4) Provedeme PCR .

Pracovní směs		8 reakcí [μl]	1 reakce [μl]	1 reakce [μl]
PCR pufr (10 ×)		20	2,5	2,5
směs dNTP (2,5 mM)		16	2	2
Primer <i>exp2004intF</i>		8	1	-
Primer <i>exp2004rev</i>		8	1	-
<i>T7 Promoter Primer</i>		-	-	0,6
<i>T7 Reverse Primer</i>		-	-	0,6
Bakteriální DNA	DH5α	8kolonií×10μl	-	-
	TOP 10	-	10	-
	kontrolní plazmid	-	-	10
dsH ₂ O		68,5	8,5	9,5
r-Taq polymeráza		1	0,125	0,125
Objem reakční směsi		200 μl	25 μl	25 μl

- 5) Spustíme PCR bakteriálních kolonií. Pro DH5α a TOP 10 kolonie použijeme program TH_10 (viz 4.2.1.2), při teplotě nasedání primerů 47 °C. Pro kontrolní plazmid použijeme ‚touch – down‘ PCR, program TH_16/TD48→41.

Podmínky reakce

denaturace 2 minut při 94°C
denaturace 30 sekund při 94°C
nasedání primerů ... 30 sekund při 48°C
polymerace 45 sekund při 72°C

} 14 ×, v každém cyklu snížit teplotu o 0,5 °C

denaturace 30 sekund při 94°C
nasedání primerů ... 30 sekund při 41°C
polymerace 45 sekund při 72°C

} 30 ×

polymerace 10 minut při 72°C
držet při 4°C

4.2.2.4 Izolace plazmidu z bakterií

Pracovní potřeby: pracovní kit *QIAprep® Miniprep Purification kit* (Qigen)

Pracovní postup: Pracujeme dle protokolu *Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit*.

4.2.3 Ověření správnosti inzertu

4.2.3.1 PCR

Pracovní postup: Provedeme PCR (program TH_16/TD48→41 viz 4.2.1.11.), za použití primerů *exp2004rev* a *T7 Promoter Primer* za účelem kontroly správné orientace inzertu ve vektoru.

4.2.3.2 Restrikční analýza specifickou endonukleázou XbaI

Pracovní potřeby: Restrikční enzym XbaI (TaKaRa), BSA

Pracovní postup

1) Připravíme reakční směs.

Pracovní směs	Reakce A. [μl]
puf. M (10 ×)	2
Vzorek (plazmid)	2
0,1% BSA	2
dsH ₂ O	13
XbaI (TaKaRa)	1
Objem reakční směsi	20 μl

2) Spustíme PCR program TH_18/EcoRI.

Podmínky reakce

restrikce..... 3 hodiny při 37°C

držet při 4°C

4.2.3.3 Kontrolní reakce genově specifických primerů s kontrolním negativním plazmidem (pET160-GW/CAT plasmid)

Pracovní postup: Provedeme PCR (TH_10 viz 4.2.1.2.) při 47 °C za použití primerů *exp2004fw* a *exp2004rev*. Jako templát použijeme kontrolní plazmid *pET160-GW/CAT* plasmid (Invitrogen), původní cDNA, *pET160/GW/D-TOPO* plasmid s požadovaným inzertem a *pET160/GW/D-TOPO* plasmid s jiným inzertem.

4.2.3.4 Sekvenování inzertu v plazmidu

Pracovní postup: Sekvenaci provede specializovaná laboratoř UMBR na přístroji *3130 xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) za použití primerů *T7 Promoter Primer* a *T7 Reverse Primer*.

4.2.4 Příprava cDNA pro zaklonování do expresního vektoru – protokol II.

4.2.4.1 Syntéza cDNA reverzní transkripcí z RNA

Pracovní potřeby: Pracovní kit *Superskript III* (Invitrogen)

a) Pracovní postup – reverzní transkripce / syntéza prvního vlákna DNA

1) Připravíme pracovní směs A.

Pracovní směs A	ReakceII. [μ l]
TRIKANT primer	2
dNTP směs (2,5 mM)	4
dsH ₂ O	5
Vzorek RNA	2

2) Inkubujeme 5 minuty při 65 °C.

3) Inkubujeme 1 minutu na ledu.

4) Ke směsi A přidáme složky směsi B.

Pracovní směs B	ReakceII. [μ l]
Reakční pufr (5 \times)	4
0,1 M DTT	2
Objem reakční směsi	19 μ l

5) Inkubujeme 2 minuty při 50 °C.

6) Přidáme 1 μ l *Superskriptu III*.

7) Spustíme program RT – PCR:

Podmínky reakce

nasedání primerů, polymerace 60 minut při 50 °C

inaktivace enzymu 15 minut při 70 °C

držet při 4 °C

b) Pracovní postup – syntéza dvouvláknové DNA

1) Spustíme PCR: Templát – ssDNA, primery – *2004IntF* a *Basha 5 R*, teplota nasedání primerů 55 °C.

2) Spustíme elektroforézu.

3) Provedeme purifikaci PCR produktu z gelu dle návodu 4.2.1.3.

4) Změříme koncentraci PCR produktu.

4.2.4.2 Sekvenování PCR produktu

Pracovní potřeby: Pracovní kit *Big Dye terminator v 1.1* (Applied Biosystems)

a) Pracovní postup – sekvenační PCR

1) Připravíme pracovní směs.

Pracovní směs	ReakceII.[μ l]
Reakční směs	2
Sekvenační pufr (5 ×)	1,5
Primer Basha5R	1
PCR produkt	1
dsH ₂ O	14,5
Objem reakční směsi	20 μ l

2) Spustíme PCR program TH_6/SEQ.

Podmínky reakce

denaturace1 minuta při 96 °C

denaturace10 sekund při 96 °C

nasedání primerů ...15 sekund při 51 °C

polymerace4 minuta při 60 °C

b) Pracovní postup – purifikace PCR produktu pro sekvenaci: Purifikaci provedeme dle kitu *Dye Ex 2.0 Spin kit* (Applied Biosystems).

c) Sekvenační reakce: Sekvenační reakci necháme provést ve specializované laboratoři ENTU na přístroji *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

4.2.4.3 Příprava plazmidu v kontrolním pGEM – T Easy vektoru

Pracovní potřeby: pracovní kit *pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega)

4.2.4.4 Ligace inzertu do pGEM – T Easy vektoru

Pracovní postup

1) Připravíme pracovní směs.

Pracovní směs	Reakce I. [μl]
Ligační pufr	5
T- Easy vektor	1
PCR produkt	1
T4 DNA ligáza	1
dsH ₂ O	2
Objem reakční směsi	10 μl

2) Pracovní směs inkubujeme přes noc při 4 °C.

4.2.4.5 Transformace vektoru do kompetentních bakteriálních buněk, kultivace buněk

Pracovní postup

- 1) Pracovní směs přeneseme do buněk.
- 2) Inkubujeme 10 minut na ledu.
- 3) Inkubujeme 1 minutu při 42 °C, přeneseme reakci na led a inkubujeme 2 minuty.
- 4) Přidáme 700 μl LB media, inkubujeme v třepačce 2 hodiny při 37 °C, 180 rpm.
- 5) Směs přeneseme na dva LB agary s přídatkem ampicilinu o koncentraci ampicilinu 100 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, 40 μl 2% X-gal a 14 μl 20% IPTG.
- 6) Inkubujeme v termostatu při 37°C přes noc.
- 7) Vybrané kolonie přeočkujeme na nový agar.
- 8) Inkubujeme v termostatu při 37 °C přes noc.

4.2.4.6 Izolace plazmidu

Pracovní postup

- 1) Vybrané kolonie bakterií pomnožíme v 5 ml LB media s přídatkem ampicilinu (výsledná koncentrace ampicilinu je 1 $\mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$).
- 2) Izolujeme plazmidovou DNA pomocí purifikačního kitu (viz [4.2.2.5](#)).

5 Výsledky

5.1 Příprava cDNA pro zaklonování do expresního vektoru (protokol I)

5.1.1 Syntéza cDNA

Pro syntézu dvouvláknové cDNA byla použita celková RNA o vyizolovaná ze snovací žlázy plně vzrostlé, ale dosud žeroucí larvy bource morušového. Reverzní transkripce byla provedena pomocí kitu *Superskript III* za přímého použití specifických expresních primerů *exp2004intF* a *exp2004rev* tzv. v „jednom kroku“, tzn. bez použití oligo (dT)_n. Expresní primery byly navrženy tak, aby se sekvenčně shodovaly s amplifikovaným úsekem genu *Ser-2* a vyhovaly požadavkům kitu *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits with Lumio™ Technology* (Invitrogen).

5.1.2 Amplifikace části genu

K amplifikaci úseku genu *Ser-2* byly použity opět primery *exp2004rev* a *exp2004intF*. Výsledkem PCR amplifikace bylo několik produktů, což vzhledem k repetitivnímu charakteru některých částí genu *Ser-2* nebylo překvapivé. Dva produkty nazvané horní a dolní (obr. 1) velikostně odpovídaly hledanému úseku a byly proto sekvenovány. V analyzovaném vzorku odpovídal hledané sekvenci horní pruh.



Obrázek 3: Výsledek amplifikace cDNA

Dráha S odpovídá standardu (*Gene Ruler 1kb DNA Ladder* – Fermentas), v dráze I. amplifikovaná cDNA vykazuje několik produktů o různé velikosti. ‚Horní pruh‘ a ‚Spodní pruh‘, které leží v rozmezí 750 – 1000 bp, přibližně odpovídají svou velikostí požadovanému inzertu.

5.1.3 Úpravy cDNA

Před zaklonováním do expresního vektoru bylo nutné prostřednictvím PCR s použitím platinové Pfx DNA polymerázy upravit PCR produkt tak, aby obsahoval tupé konce. Produkt byl izolován vyříznutím z gelu a následně purifikován.

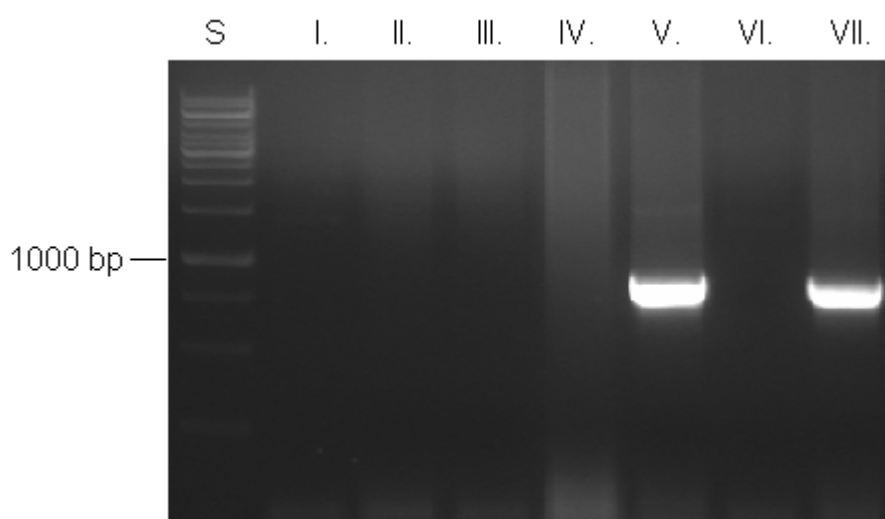
5.2 Klonování inzertu

5.2.1 Ligace do expresního vektoru

Pro ligaci do expresního vektoru byl použit systém, jež umožňuje přímé zaklonování PCR produktu do vektoru.. Principem reakce je vazba 5‘ upraveného konce PCR produktu s 3‘ koncem linearizovaného vektoru který obsahuje komplementární sekvenci. U používaného kitu *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits with Lumio™ Technology* je důležité dodržet přesný poměr mezi množstvím klonované cDNA a *pET160/GW/D-TOPO* vektoru. Proto byla koncentrace vzorku upravena tak, aby molární poměr vzorku k vektoru odpovídal 5 : 1.

5.2.2 Transformace plazmidu do bakteriálních buněk, kultivace

Rekombinantní plazmid byl zaklonován do dvou typů chemicky kompetentních bakteriálních buněk *Escherichia coli*, buněk TOP 10 (Invitrogen) a DH5- α (Promega). Ke kultivaci byly použity agarové plotny s přidaným ampicilinem, na kterém narostly pouze kolonie obsahující plazmid s genem pro rezistenci na uvedené antibiotikum. Jako další analýza narostlých kolonií byla v bakteriích pomocí PCR s použitím primerů *exp2004intF* a *exp2004rev* prokázána přítomnost plazmidu s klonovaným inzertem. Inzerty o očekávané velikosti asi 1kb se našly v koloniích V. a VII. (obr. 2).



Obrázek 4: Detekce inzertu pomocí PCR v plasmided izolovaných z bakteriálních kolonií

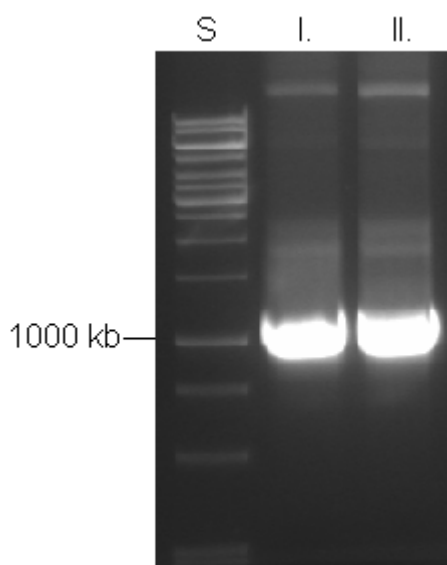
Dráha S odpovídá standardu (*Gene Ruler 1kb DNA Ladder* – Fermentas), dráhy I. – VII. jsou produkty PCR z kolonií. V koloniích I., II., III., IV. a VI. se nenašel žádný inzert, kolonie V. a VII. vykazují přítomnost inzertu o velikosti asi 1000.

5.3 Ověřování správnosti inzertu

5.3.1 Ověření správné orientace inzertu

Před následnou transformací do expresních buněk BL21 a produkcí požadovaného proteinu bylo nutné ověřit, zda je inzert zaklonován ve vektoru ve správné orientaci. Proto byla provedena oboustranná kontrola pomocí PCR s využitím kombinace primeru *exp2004rev* a *T7 Promoter Primer* za standardních teplotních a časových podmínek (program program

TH_16/TD48→41). Výsledek reakce potvrdil správnou orientaci inzertu u obou testovaných klonů. S použitím primeru ‚T7‘ mají inzerty očekávanou velikost 1112bp, tj. pruhy v oblasti 1kb (viz obr. 3, a příloha – sekvence).

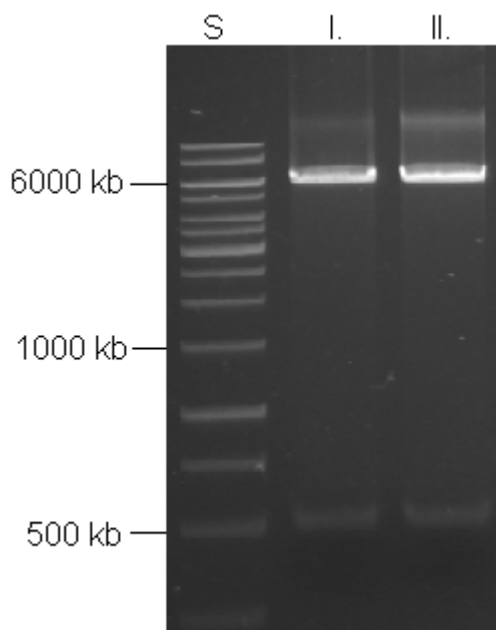


Obrázek 5: Orientace inzertu

Dráha S odpovídá standardu (*Gene Ruler 1kb DNA Ladder* – Fermentas), dráhy I. a II obsahují produkty PCR amplifikované pomocí primerů *exp2004rev* a *T7 Promoter Primer*. Velikost obou produktů je 1000bp, výsledek potvrzuje správnou orientaci obou inzertů.

5.3.2 Restrikční analýza

Jako další krok k ověření přítomnosti správného inzertu byla provedena analýza plazmidů přítomných v bakteriálních klonech V. a VII. pomocí restriktázy *XbaI*. Tento enzym štěpí sekvenci T'CTAG_A, která je přítomna jednou ve vektoru v místě 67 bp a jednou v inzertu v místě 316 bp. Oba produkty restrikční reakce byly detekovány na elektroforegramu a jejich velikost odhadnuta na 6000 bp a 500 bp. Výsledek splňuje očekávané velikosti produktů 486 bp a 6250 bp (viz obr. 4).



Obrázek 6: Restrikční analýza

Dráha S odpovídá (*Gene Ruler 1kb DNA Ladder* – Fermentas), dráhy I. a II. vykazují produkty štěpení plazmidů bakteriálních kolonií V a VII endonukleázou *Xba*I. Přítomnost produktů o přibližné velikosti 6000 bp a 500 bp odpovídá očekávání, že enzym štěpí jednou vektor v místě 170 bp a jednou inzert v místě 316 bp.

5.3.3 Sekvenační analýza

Inzert plazmidu z kolonie VII byl amplifikován za standardních reakčních podmínek PCR (viz metodika práce) pomocí *T7 Promoter* a *T7 Reverse* primerů a osekvenován. Ukázalo se, že inzert tohoto plazmidu neodpovídá cílové sekvenci cDNA, nýbrž jinému úseku genu *Ser-2* (viz Sekvence plazmidu VII). Tím se rozšířila možnost prověřit funkci různých částí sericinu 2, pro přesné splnění zadání bakalářské práce jsem však celý postup zopakovala. Pro porovnání jsem použila jiný expresní systém (*pGEM®-T Easy Vector System*).

5.4 Příprava cDNA pro zaklonování do expresního vektoru (protokol II)

5.4.1 Syntéza cDNA

Hledaná cDNA byla připravena znovu za použití kitu *Superskript III*, tentokrát byl zvolen tzv. „dvoukrokový“ postup, kde bylo nejprve syntetizováno první vlákno cDNA pomocí univerzálního primeru, tzv. ssDNA. Dvouvláknový inzert byl amplifikován primery

2004IntF a Basha5R. Sekvenování inzertu ve specializované laboratoři Entomologického ústavu prokázalo, že se skutečně jedná o hledaný úsek genu *Ser-2*.

5.4.2 Klonování do kontrolního vektoru

Inzert byl zaklonován do plasmidu *pGEM T – Easy* vektor (Promega) a jeho přítomnost prokázána sekvenováním za použití *SP6 Promoter Primer* a *T7 Reverse Primer*. Sekvenací bylo potvrzeno, že je ve vektoru zaklonován požadovaný inzert o správné nukleotidové sekvenci (viz Sekvence plazmidu II.).

6 Diskuse

Dvouvláknová cDNA byla připravena reverzní transkripcí pomocí kitu Superskript III, jehož výhodou je možnost přímého použití specifických primerů pro syntézu cDNA. Metoda by měla uspořit čas, snížit finanční náročnost a zvýšit specifitu reakce. Z gelu byly vyizolovány dva potencionálně specifické pruhy – PCR produkty. Velikost prvního produktu byla přibližně 797 bp, velikost druhého o 100 bp větší. Izolované produkty byly sekvenovány a potvrdilo se, že větší PCR produkt odpovídá požadovanému inzertu. Druhý, menší produkt je výsledkem alternativního sestřihu genu *Ser-2* a je rovněž vhodný pro další studium funkce různých částí bílkoviny Sericin 2 pomocí rekombinantních peptidů. Produkt o velikosti 897 bp byl klonován do expresního vektoru. Sekvenační analýza inzertu kupodivu prokázala, že expresní vektor obsahuje „druhý“ produkt o velikosti 797 bp. Příčinou záměny PCR produktů při klonování mohla být nekvalitní izolace DNA z gelu, v krajním případě záměna vzorků při purifikaci. Amplifikace dvou (ve skutečnosti i více) produktů je dobře pochopitelná. Amplifikovaná cDNA pochází z exonu 9, který je v genu *Ser-2* přítomen v plné délce (exon 9a) a ve zkrácené délce (exon 9b). Oba exony obsahují úseky umožňující nasedání primeru *exp2004rev*.

Pro přesné splnění zadání bakalářské práce byla znovu provedena syntéza cDNA, tentokrát běžnějším postupem. Nejprve byla provedena syntéza prvního vlákna cDNA za použití univerzálního primeru ‚*TRIKANT*‘ a následně proběhla tvorba dvouvláknového inzertu pomocí genově specifických primerů. PCR produkt byl izolován a zaklonován do kontrolního *pGEM T – Easy* vektoru. PCR produkt i vektor byly osekvenovány, čímž byl potvrzen správný postup práce a přítomnost požadovaného inzertu ve vektoru.

7 Závěr

- Pomocí reverzní transkripce a následné PCR byly syntetizovány 2 produkty (797 a 897 bp) z definovaných částí genu *Ser-2*.
- Produkt o velikosti 797 bp byl zaklonován do expresního vektoru (*pET160/GW/D-TOPO vector*).
- O něco větší produkt (897 bp) byl zaklonován do kontrolního vektoru (*pGEM T-Easy vector*) a je připraven pro ligaci do expresního vektoru.
- Obě části genu budou dále exprimovány v expresním bakteriálním systému *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits with Lumio™ Technology* (Invitrogen).
- U obou exprimovaných proteinů budou v následující práci testovány jejich vlastnosti.

8 Přílohy

8.1 Sekvence plazmidu VII / pET160/GW/D-TOPO vektor

8.1.1 Nukleotidová sekvence plazmidu VII

(zeleně označené: 6× His tag, modře označené: primery *exp2004intF* a *exp2004rev*)

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
VII.    ATGCATCATC ACCATCACCA TGGTGCTGGT GGCTGTTGTC CTGGCTGTTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90          100
VII.    CGGTGGCGGC GAAAACCTGT ATTTTCAGGG AATTATCACA AGTTTGTACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
VII.    AAAAAGCAGG CTCCGCGGCC GCCCCCTTCA CCGAAAGGGA AAAATCCGAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
VII.    TCCAACAAGA AAAGTCGTGA ATTTGAAAAT AAAGAAGCTG AATCTTCGAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
VII.    CTATAGGGAT AAGAATCGGT CAGTGAACAG TGGCTCGGAA CGCAAGAGTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260         270         280         290         300
VII.    CCGGTAAAGA CGAGGAGTAC AGTGAACAGA ACTCCAGTAA TAAATCCTTT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310         320         330         340         350
VII.    AACGACGGCG ATGCATCGGC TGACTACCAA ACCAAATCTA AGAAGGTTGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360         370         380         390         400
VII.    AAAGAATTCT GCCAGAGATA AAAAGGAAAA GGAAAAAACT GACACAAGAA
```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          410          420          430          440          450
VII. ATTCTGACGG AACGTACAAA ACTTCTGAGC GCGAAAAAGA ACAATCTTCT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          460          470          480          490          500
VII. AGAGTGAATC AAAGTAAGGG CAGCAACTCT CGGGATTCTT CGGAGTCAGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          510          520          530          540          550
VII. CAAATCTGGC CGAAAAGTGA ATAAAGAAAC AGAAACGTAC TCTGACAAAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          560          570          580          590          600
VII. ACGCGCAGAC TTCAGAAAGT GAACGTACTC AAAGTAAAGA TAACGGTGGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          610          620          630          640          650
VII. TTGAAAGAAA AAAGCTCGCA ATCTAAGAAT TACGGAAGAG ACGAGAAGTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          660          670          680          690          700
VII. CAGTGAAGAG AAGGAGAGGA GTTCCACTGG GAAGTTTGGA TCGAATGACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          710          720          730          740          750
VII. CCCGAGCACG TTCTACAAAA GCCGAAGAGG AACATGTCAG GAAGTCACAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          760          770          780          790          800
VII. GAAGAAACAC ATTCAGAGCA ACGAGAAAAA ACAAGATCTG ACGGAGTGAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          810          820          830          840          850
VII. TAAATACAAC GATGGTGATG AGCATTTCGA TTCAGACGAT ACAGAGAAGA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          860          870          880          890          900
VII. CTAAGCCTAA TGGCAGATCA CCATCGCATA AAGACACAGA GAAGGCTAAG

```

.....|.....||.....||.....| ...
 910 920 930
VII. CCTAACGACA **GGTCATCATC** **GGATAAAGAC** TGA

8.1.2 Aminokyselinová sekvence inzertu VII

E R E K S E S N K K S R E F E N K E A E S S T Y R D K N R S V N S G S E R
 K S S G K D E E Y S E Q N S S N K S F N D G D A S A D Y Q T K S K K V E K
 N S A R D K K E K E K T D T R N S D G T Y K T S E R E K E Q S S R V N Q S
 K G S N S R D S S E S D K S G R K V N K E T E T Y S D K D A Q T S E S E R
 T Q S K D N G G L K E K S S Q S K N Y G R D E K Y S E E K E R S S T G K F
 G S N D S R A R S T K A E E E H V R K S Q E E T H S E Q R E K T R S D G V
 T K Y N D G D E H F D S D D T E K T K P N G R S P S H K D T E K A K P N D
 R S S S D K D

8.2 Sekvence plazmidu II / pGEM-T Easy vektor

8.2.1 Nukleotidová sekvence plazmidu II

(**oranžově** označené: BstZ I, **modře** označené primery *2004IntF* a *Basha5R*)

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 10 20 30 40 50
II. **CGGCCG**CCTG GCGGCCGCGG GATTCGNT**GA** **AAGGGAAAAA** **TCCGAATCCA**

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 60 70 80 90 100
II. ACAAGAAAGT CGTGAATTTG AAAATAAAGA AGCTGAATCT TCGACCTATA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 110 120 130 140 150
II. GGGATAAGAA TCGGTCAGTG AACAGTGGCT CGGAACGCAA GAGTTCCGGT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 160 170 180 190 200
II. AAAGACGAGG AGTACAGTGN AACAGNAACT CCAGTAATAA ATCCTTTAAC


```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210          220          230          240          250
II. GACGGCGATG CATCGGCTGA CTACCAAACC AAATCTAAGN AAGGTTGAAA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260          270          280          290          300
II. AGAATTCTGC CAGAGATAAA AAGGAAAAGG AAAAAACTGA CACAAGAAAT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310          320          330          340          350
II. TCTGACGGAA CGTACAAAAC TTCTGAGCGC GAAAAAGAAC AATCTTCTAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360          370          380          390          400
II. AGTGAATCAA AGTAAGGGCA GCAACTCTCG GGATTCTCTG GAGTCAGACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          410          420          430          440          450
II. AATCTGGCCG AAAAGTGAAT AAAGAAACAG AAACGTACTC TGACAAAGAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          460          470          480          490          500
II. GCGCAGACTT CAGAAAGTGA ACGTACTCAA AGTAAAGAAA AAAAAAATAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          510          520          530          540          550
II. AGCGCCCAAG AATAAGGGCA AAAAGGGAAC CTCTACAGAA ACAGATGGAG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          560          570          580          590          600
II. TCACTAAGAA TGCTAGTAAG CAGAAGGAGA AGGTGCCTAA AGATGGAAGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          610          620          630          640          650
II. AAAAGCTCCA CGAATGATAG CGAAGGCAAA CAAAAAACA AAGACCAATC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          660          670          680          690          700
II. AAAGGGACAG AAAAATAATC AAGACGGACA AGACTCTTCG ACGAACGAAA

```

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 710 720 730 740 750
II. ATTCCAAAAA GACAGATGAT AATGTTGCAA AGAAAGAAGA ACCCAATAAT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 760 770 780 790 800
II. CAAAAGAGAG AACAAAAAGG AAAGACAAGA TGTGGCTCTA GGAAAACCTGA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 810 820 830 840 850
II. GAGTTCCAAA GCGAAAGAAG ATAGAAGCAA GAAAAGCACT ACCGATAAGG

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 860 870 880 890 900
II. ACCAGCGCGA CGACAAAAAA GATTCTCCAG CAAAAACATA GACAAGCCTA

.....|.....||.....||. .
 910 920
II. AAGATGGGTC ATCATCGGAT AAAGAC

8.2.2 Aminokyselinová sekvence inzertu II

E R E K S E S N K K S R E F E N K E A E S S T Y R D K N R S V N S G S E R
 K S S G K D E E Y S E Q N S S N K S F N D G D A S A D Y Q T K S K K V E K
 N S A R D K K E K E K T D T R N S D G T Y K T S E R E K E Q S S R V N Q S
 K G S N S R D S S E S D K S G R K V N K E T E T Y S D K D A Q T S E S E R
 T Q S K E K K N T A P K N K G K K G T S T E T D G V T K N A S K Q K E K V
 P K D G S K S S T N D S E G K Q K N K D Q S K G Q K N N Q D G Q D S S T N
 E N S K K T D D N V A K K E E P N N Q K R E Q K G K T R C G S R K T E S S
 K A K E D R S K K S T T D K D Q R D D K K D S S S K N I D K P K D G S S S
 D K D

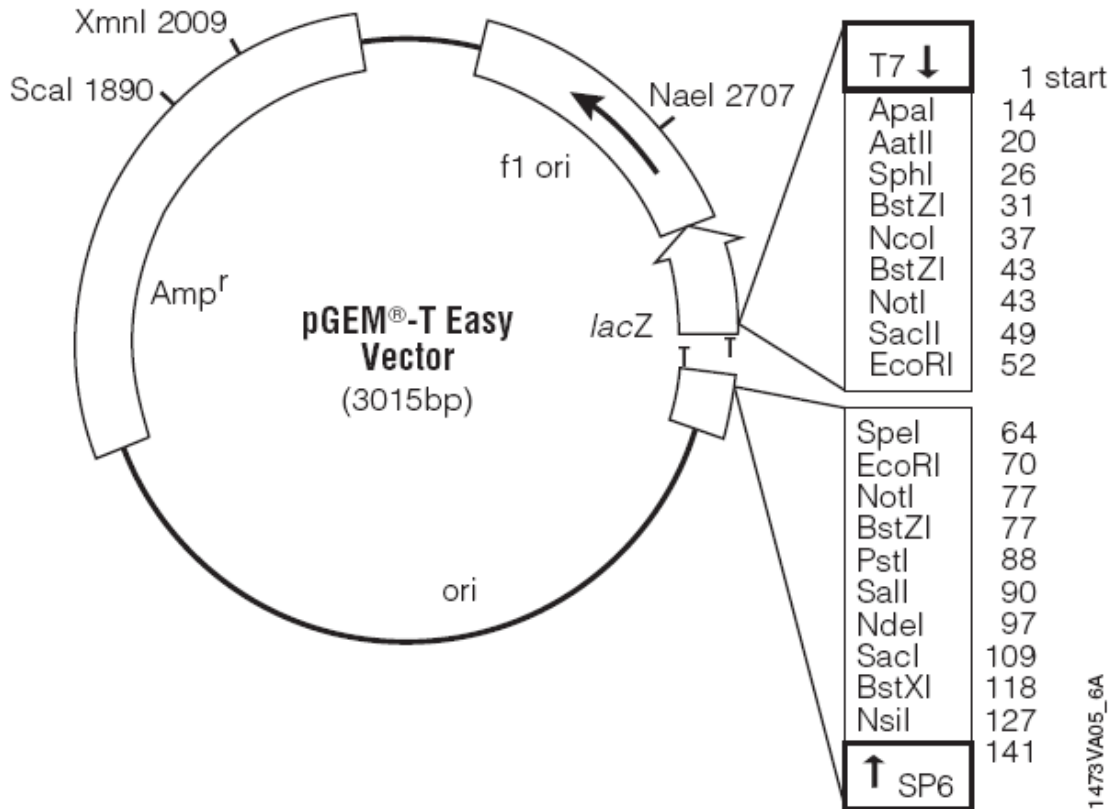
8.3 Sekvence genu Ser-2 bource morušového

(Barevně označená místa pro nasedání primerů. **Žlutě:** 2004IntF a exp2004intF, **zeleně:** Basha 5 R a exp2004rev)

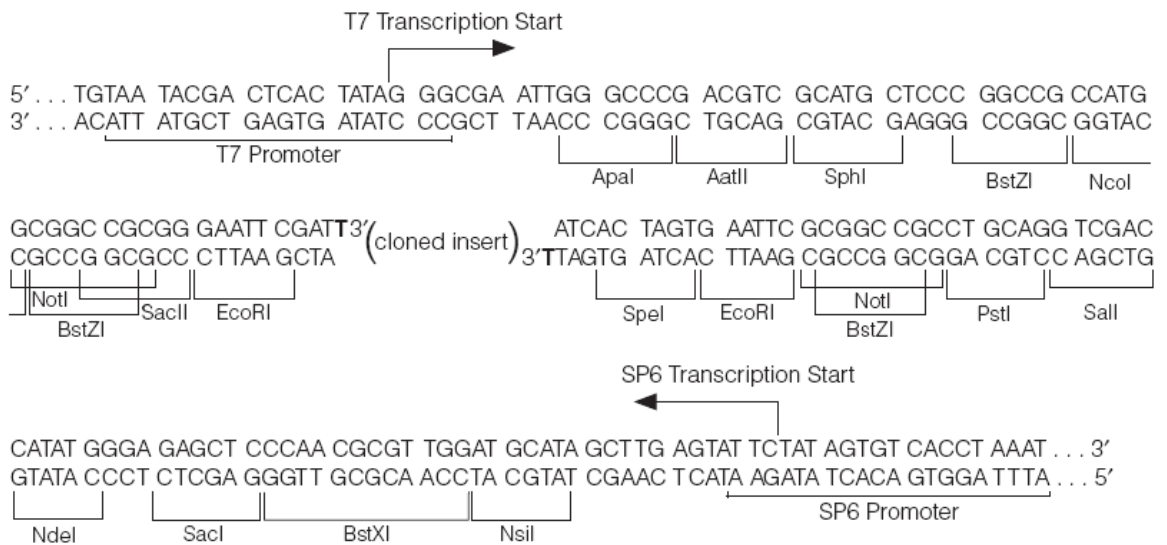
```
atgaagatcccatcactgctcttctgctgttctcttctgtggcgctggctgtgggtcaacgcattgcc
M K I P Y V L L F L V G V A V V N A L P
aatccacttttcgggggcttagttaaactcgcttagcaaaaaaaaaacaaatttttgaggac
N P L F G G L V K S L S K K K Q I F E D
aaatgtgaaaatctcaaagagaatgtgggtgaaaaatgtgaaaatctcaaagaaaacgtg
K F E N L K E N V G E K F E N L K E N V
ggtgaaaaagttgaaaatctcaaagagaatgtgggtgaaaaattagaaaatctcaaagag
G E K V E N L K E N V G E K L E N I K E
aaggctggagaaaaatgtgaaaatctcaaagacaatgttgagaaaaatgtgaaaatctc
K A G E K F E N L K D N V G E K F E N L
aaagacaatgttgagacaaattagaagcagctaaagaaaaagctggagaaatcaaaaag
K D N V G D K L E A A K E K A G E I K K
aaactagtggatgtcggcgaagatctgaaagacgagctcacggaagacaaaaataaag
K L V D V G E D L K D E L T E D K K I K
atatccatctcgaagacgaaggattgactttgaaaaagaaggatacaagtctgattac
I S I S K D E G L T L E K E G Y K S D Y
gatcgtaatgaatatgaagaacgcagatctgaacaccaggaggataacgacagcgacggc
D R N E Y E E R R S E H Q E D N D S D G
tcatacagcaaaaggttccgaatacgaataacggtgaaagagaaaagtgatgaagaacgt
S Y S K G S E Y E K Y G E E K Y E E R
aggaccacgacaagttctccattggcaagaacggtattagtgccgagcgaacgaaatca
R T H D K F S I G K N G I S A E R T K S
aagagaggtgaaagaaaagaagtcgaaggcgaatatgagaaagactacgaaaggaaagag
K R G E R K E V E G E Y E K D Y E R K E
aacaacggcggatcctccgaatattcagagagagaaagagagagtttgaaaaatcaaaa
N N G G S S E Y S E R E R E S L E K S K
gaaaggtacggcagcagtcgctctaaagtccttctcggtgggtaaatccggcttgaagaag
E R Y G E Q S S K S F S L G K S G L K K
caggataattcaaaatcgtattccgacaaggaagagtcgaaactggaaaaggaaaagaaa
Q D N S K S Y S D K E E S K L E K E K K
tatgaaaagaaaaaaaatcaacaatgaaaggcagtttagatgaagatgagaacgaaagg
Y E K K T K I N N E R Q L D E D E N E R
agaactgttgtagccgagatgagcaaggcaagatgaccaagccgagacgaccaaaagc
R T V V G R D E Q R Q D D Q S R D D Q S
cgagatgaccaaaagcgaagatgaggaaaactggcagcagcagatagtgacaaaaatagagga
R D D Q S Q D E E T G S D D S D K N R G
aaggatactgacgataaatattccgagacaggaaccaataaatcatcagaaacgaagaca
K D T D D K Y S E T G T N K S S E T K T
ggcaagcgtgatggctcgaagagcggcgtcacagtcgaaagggaaaaatccgaatccaac
G K R D G S K S G V T V E R E K S E S N
aagaaaagtcgtgaatgtgaaaataaagaagctgaatcttcgacctataggataagaat
K K S R E F E N K E A E S S T Y R D K N
cggctcagtgaaacagtggtcggcaacgcaagagttccggtaagacgaggagtacagtgaa
R S V N S G S E R K S S G K D E E Y S E
cagaactccagtaataaatcctttaacgacggcagatgcatcggctgactaccaaaccaaaa
Q N S N K S F N D G D A S A D Y Q T K
tctaagaaggttgaaaagaattctgcccagagataaaaaggaaaaggaaaaactgacaca
S K K V E K N S A R D K K E K E K T D T
agaaattctgacggaacgtacaaaacttctgagcgcgaaaaagaacaatcttctagagtg
R N S D G T Y K T S E R E K E Q S S R V
aatcaaaagtaaggcagcaactctcgggattcctcggagtcagacaaaatctggccgaaaa
N Q S A K G S N S R D S S E S D K S G R K
gtgaataaagaacgaacgtaactctgacaaaagacgcgcagactcagaaaagtgaacgt
V N K E T E T Y S D K D A Q T S E S E R
actcaaaagtaaaagaaaaaaaatacagcgcaccaagaataagggcaaaaagggaacctct
T Q S K E K K N T A P K N K G K K G T S
acagaacagatggagtcactaagaatgctagtaagcagaaggagaaggtgcctaaagat
T E T D G V T K N A S K Q K E K V P K D
```

ggaagtaaaagctccacgaatgatagcgaaggcaaacaaaaaaacaaagaccaatcaaag
G S K S S T N D S E G K Q K N K D Q S K
ggacagaaaaaatcaagcggacaagactcttcgcgcaacgaaaattccaaaaagaca
G Q K N N Q D G Q D S S T N E N S K K T
gatgataatgttgcaaaagaagaacccaataatcaaaagagagaacaaaaaggaaaag
D D N V A K K E E P N N Q K R E Q K G K
acaagatgtggctctaggaactgagagttccaaagcgaagaagatagaagcaagaaa
T R C G S R K T E S S K A K E D R S K K
agcactaccgataaagaccagcgcgacgacaaaaaagattcctccagcaaaaaacatagac
S T T D K D Q R D D K K D S S S K N I D
aagcctaaagatgggtcatcatcggataaagactcagagaaggctaagcctaacgcacaga
K P K D G S S S D K D S E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggctaagcctaacgcacagatcaccatcggataaa
S P S H K D T E K A K P N D R S P S D K
gacacagagaaggctaagcctaacgcacagttcaccatcgcataaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D S S P S H K D T E K A
aagcctaacgcacagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacgcacaga
K H N D R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaagcctaacgcacagatcaccatcgcataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggtaaaacctaacgcacagatcaccatcgcataaagacacagagaaggct
D T E K V K P N D R S P S H K D T E K A
aagcctaacgcacagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacgcacaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaagcctaacgcacagatcaccatcgtataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S Y K
gacacagagaaggctaagcctaacgcacagatcaccatcggataaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacggcagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacgcacaga
K P N G R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaagcctaacgcacagatcaccatcgcataaa
S P S D K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgcacagatcaccatcggatagagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D R D T E K A
aagcctaacgcacagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacggcaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N G R
tcaccatcggataaagacacagagaaggtaagcctaacgcacagatcaccatcgcataaa
S P S D K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgcacagatcaccatcggataaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacgcacagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacgcacaga
K P N G R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaagcctaacgcacagatcaccatcgcataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S Y K
gacacagagaaggctaagcctaacgcacagatcaccatcggataaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacggcagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacgcacaga
K P N G R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaagcctaacgcacagatcaccatcgtataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S Y K
gacacagagaaggctaagcctaacgcacagatcaccatcggataaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D R D T E K A
aagcctaacgcacagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacggcaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N G R
tcaccatcggataaagacacagagaaggtaagcctaacgcacagatcaccatcgcataaa
S P S D K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgcacagatcaccatcggataaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacgcacagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacgcacaga
K P N G R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaagcctaacgcacagatcaccatcgcataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S H K

8.5 Mapa pGEM – T Easy vektoru (Promega)



pGEM®-T Easy Vector



8.6 Seznam zkratek

AA / *amino acid* / aminokyselina

ASG / *anterior silk gland* / přední úsek snovacích žláz

BM / *Bombyx mori* / Bourec morušový

BSA / *Bovine serum albumin* / hovězí sérový albumín

cDNA / *complementary DNA* / DNA syntetizovaná reverzní transkripcí z RNA

dNTP / *deoxyribonucleotide triphosphate* / deoxyribonukleotidtrifosfát

dsDNA / *double strand DNA* / dvouvláknová DNA

dsH₂O / *deionized sterille watter* / deionizovaná sterilizovaná voda

DTT / *dithiothreitol*

ENTU / entomologický ústav (biologické centrum akademie věd České Republiky)

ELFO / *elektroforesis* / elektroforéza

ETBR / *Ethidium bromide*

GM / *Galeria mellonella* / Zavíječ voskový

H33258 / *bisBenzimide H 33258* / fluorescenční barvivo

IPTG / *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*

MSG / *middle silk gland* / střední úsek snovacích žláz

PCR / *polymerase chain reaction* / polymerázová řetězcová reakce

PSG / *posterior silk gland* / zadní úsek snovacích žláz

RT – PCR / *reverse transcription PCR* / reverzní transkripce

ssDNA / *single starnd DNA* / jednovláknová DNA

TAE / *Tris-acetate-EDTA*

UMBR / Ústav molekulární biologie rostlin (biologické centrum akademie věd České Republiky)

9 Citace

- Akai H.** (1984) The ultrastructures and functions of the silk gland cells of *Bombyx mori*, pp. 323-364. In: King R. C. and Akai H. (eds.) *Insect ultrastructure 2*. Plenum, New York
- Couble P., Michaille J.J., Couble M.L. and Prudhomme J.C.** 1987. Developmental switches of sericin mRNA splicing in individual cells of *Bombyx mori* silkgland. *Dev. Biol.* **124**: 431-440.
- Chang G., Kim H.-J., D. Kaplan D., Vunjak-Novakovic G., Kandel A.** 2007 Eur Spine J. 2007 November; **16**(11): 1848–1857.
- Cindy Chung and Jason A. Burdick** 2008 Engineering Cartilage Tissue *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**: 243-262
- Craig C.L.** (1997) Evolution of arthropod silks. In Mittelr TE, Radovsky FJ, Resh VH (eds), *Ann. Rev. Entomol.* **42**: 231-267.
- Dvořák J.** (2008) <http://www.biolib.cz/IMG/GAL/>
- Encarta** Concise Encyclopedia Articles (1998)
http://encarta.msn.com/encyclopedia_761578331_2/Butterflies_and_Moths.html#p63
- Fedič R., Žurovec M. and Sehnal F.** (2002) The silk of Lepidoptera. *J Insect Biotech Sericol* **71**: 1-15.
- Filpula D.R., Lee S. M., Link R.P., Strausberg S.L., Strausberg R.L.** (1990) Structural and functional repetition in a marine mussel adhesive protein. *Biotechnol. Prog.* **6** pp. 171-177.
- Gamo T., Inokuchi T. and Laufer H.** (1977) Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different sections of the silk gland in *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **7**: 285-295.
- Garel A., Deleage G., Prudhomme J. C.** (1997) Structure and organization of *Bombyx mori* Sericin 1 gene and of the Sericin 1 deduced from the sequence of the Ser 1B cDNA. *Insect Biochem Mol. Biol* **27**: 469-477.
- Gotoh Y., Tsukada M., Minoura N.** (1998) Effect of the chemical modification of the arginyl residues in *Bombyx mori* silk fibroin on the attachment and growth of fibroblast cells. *Journal of Biomedical Materials Research* **39**: 351–357.

- Hamada Y., Yamashita O., Suzuki Y.** (1987) Haemolymph control of sericin gene expression studied by organ transplantation. *Cell Differentiation* **20**: 65–76.
- Huang J., Valluzi R., Bini E., Vernaglia B. and Kaplan D.L.** (2003) Cloning, expression and assembly of sericin-like protein. *J. Biol. Chem* **278**: 46117-46123.
- Hyde N.** (1984) The queen of textiles. *National Geographic* **165**: 3-49.
- Inoue S., Tanaka K., Arisaka F., Kimura S., Ohtomo K. and Mizuno S.** (2000) Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol. Chem.* **275**: 40517-40528
- Jin H.J., Kaplan D.L.** (2003) Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature* **424**: 1057–1061
- Kludkiewicz B., Takasu Y., Fedic R., Tamura T., Sehnal F. and Zurovec M.** (2009) Structure and expression of the silk adhesive protein Ser2 (připraveno do tisku)
- Michaille J.J., Garel A. and Prudhomme J.-C.** (1989) The expression of five middle silk gland specific genes is territorially regulated v during the larval development of *Bombyx mori*. *Insect Biochem* **19**, 19-27.
- Michaille J.J., Couble P., Prudhomme J.C., Garel A.** (1986) A single gene produces multiple sericin messenger RNAs in the silk gland of *Bombyx mori*. *Biochimie* **68**: 1165–1173.
- Michaille J.J., Garel A., Prudhomme J.C.** (1990b) Cloning and characterisation on the highly polymorphic Ser2 gene of *Bombyx mori*. *Gene* **86**: 177–184.
- Milner M., Chrobotzek J., Zagórski-Ostojka W.** (2007). Engineered resistance against proteinases. *Acta Biochemica Polonica* **54**: 523-36.
- Morikawa M., Kimura T., Murakami M., Katayama K., Terada S., Yamaguchi A.** (2009) Rat islet culture in serum-free medium containing silk protein sericin. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* **16**(2): 223-8.
- Narita K.** (1954). *J. chem. Soc. Japan*, **75**, 1005.
- Nagai N., Murao T., Ito Y., Okamoto N. and Sasaki M.** (2009) Enhancing Effects of Sericin on Corneal Wound Healing in Rat Debrided Corneal Epithelium *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **5**: 933-936

- Nirmala X., Kodrik D., Žurovec M. and Sehnal F.** (2001a) Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. *Eur. J. Biochem.* **268**(7): 2064-73.
- Nirmala X., Mita K., Vanisree V., Žurovec M. and Sehnal F.** (2001b) Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* **10**(5): 437-445.
- Nunome J.**(1937) The silk gland development of *Bombyx mori*. *Bull. Appl. Zool.* 9, 68-92 (in Japanese).
- Padamwar M.N., Pawar A.P., Daithankar A.V., Mahadik K.R.** (2005) Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. *Journal of Cosmetics and Dermatology* **4**: 250– 257.
- Prudhomme J.C., Couble P., Garel J.P. and Daillie J.** (1985) Silk synthesis, pp 571-594. In Kerkut G. A. and Gilbert L. I. (eds) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **10**: Pergamon Press, Oxford
- Sarovart S., Sudatis B., Meesilpa P., Grady B.P., Magaraphan R.** (2003) The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment. *Review of Advanced Material Science* **5**: 193-198.
- Savela, Markku** (1998) <http://www.funet.fi/pub/sci/bio/life>
- Sehnal F.** (2008) Prospects of the practical use of silk sericins. *Entomol. Res.* 38 (Suppl. 1): S1-S8.
- Suzuki Y.** (1977) Differentiation of silk gland. A model system for the study of differential gene action. In: Beermann W (ed.) *Results and Problems in Cell Differentiation*, pp. 1–44. Springer-Verlag, Berlin/ Heidelberg.
- Takasu Y., Yamada H., Tamura T., Sezutsu H., Mita K., Tsubouchi K.** (2007) Identification and characterization of a novel sericin gene expressed in the anterior middle silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol.* **37**(11):1234-40.
- Takasu Y., Yamada H., Tsubouchi K.** (2002) Isolation of free main sericin components from the cocoon of the silkworm, *bombyx mori*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **66**(12): 2715-2718.
- Takei F., Kikuchi Y., Kikuchi A., Mizuno S. and Shimura K.** (1987) Further evidence for importance of the subunit combination of silk fibroin in its efficient secretion from the posterior silk gland cells. *J. Cell Biol.* **105**(1): 175-180.

- Tripoulas N.A., Samols D.** (1986) Developmental and hormonal regulation of sericin mRNA in the silkworm, *Bombyx mori*. *Developmental Biology* **116**: 328–336.
- Yamaguchi K., Kikuchi Y., Takagi T., Kikuchi A., Oyama F., Shimura K. and Mizuno S.** (1989) Primary structure of the silk fibroin light chain determined by cDNA sequencing and peptide analysis. *J. Mol. Biol.* **210**: 127-139.
- Yoshitake N.** (1968) Phylogenetic aspect on the origin of Japanese race of the silkworm *Bombyx mori* L. *Journal of sericological sciences of Japan* **37**: 83-87
- Zhang Y.Q.**(2002) Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnology Advances* **20**: 91–100.
- Zhaorigetu S., Sasaki M., Watanabe H., Kato N.** (2001) Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2- dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **65**: 2181–2186.
- Zhaorigetu S., Yanaka N., Sasaki M., Watanabe H., Kato N.** (2003) Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *J Photochem photobiol B* **71**: 11-7.
- Žurovec M., Yang C., Kodrik D. & Sehnal F.** (1998) Identification of a novel type of silk protein and regulation of its expression. *J. Biol. Chem.* **273**: 15423-15428.

