

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích
Katedra fyziologie živočichů

Magisterská práce



Studium sericinu 3 u *Bombyx mori* a zaklonování sericinu do *Escherichia coli*



Tomáš Krůček

Vedoucí práce: Mgr. Robert Fedič, Ph.D., Garant: Prof. RNDr. František Sehnal, CSc.

Březen 2011

Magisterská diplomová práce

Tomáš Krůček (2011): Studium sericinu 3 u *Bombyx mori* a zaklonování sericinu do *Escherichia coli*. Magisterská práce (Studies on the sericin 3 of *Bombyx mori* and cloned sericin into *Escherichia coli*. Mgr. Thesis in Czech - 73 p., University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This investigation aids to a number of previous studies on the sericins of *Bombyx mori*. One of the sericin genes, Sericin 3, was studied and five selected regions of this gene were cloned into *Escherichia coli* expression vector. Recombinant proteins (deduced MW ranging from 13 – 26 kDa) were isolated, analysed on SDS PAGE and purified.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a 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 diplomové 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, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 10.3.2011

.....
Tomáš Krůček

Poděkování:

Rád bych poděkoval všem, kteří se podíleli na sestavení a průběhu této práce. Nejvíce bych rád poděkoval svému školiteli Robertovi Fedičovi za pomoc při práci v laboratoři, při řešení různých postupů k dosažení kýženého cíle. V nemenší míře bych rád poděkoval panu Františku Sehnalovi za umožnění práce v naší laboratoři, za cenné rady a pomoc při sepisování této magisterské práce. Můj dík patří také členům laboratoře, na něž jsem se mohl s prosbou kdykoli obrátit a jsou jimi Klára Mičulková, Tereza Stašková a Eva Suchanová. Nakonec bych rád poděkoval své rodině, která mi je vždy oporou.

Obsah

1.	Úvod a literární přehled	1
1.1.	Bombyx mori modelový organismus	1
1.2.	Životní cyklus bource morušového.....	1
1.3.	Objev hedvábí a historie.....	2
1.4.	Hedvábí v živočišné říši.....	4
1.5.	Složení a produkce hedvábí.....	5
1.6.1.	Fibroiny	7
1.6.2.	P25	9
1.6.3.	Nízkomolekulární bílkoviny hedvábí	9
1.6.3.1.	Seroiny	9
1.6.3.2.	Proteázové inhibitory	10
1.6.4.	Sericiny.....	10
1.6.4.1.	Sericin 1 (Ser1).....	11
1.6.4.2.	Sericin 2 (Ser2).....	12
1.6.4.3.	Sericin 3 (Ser3).....	13
1.7.	Sericiny a jejich aplikace	13
2.	Cíle práce	17
3.	Metody	18
3.1.	Pokusný organismus <i>Bombyx mori</i> a jeho chov	18
3.2.	Získání žláz (snovacích) z housenek posledního instaru.....	18
3.3.1.	Izolace RNA	18
3.3.2.1.	Měření koncentrace RNA na spektrofotometru.....	19
3.3.2.2.	Měření koncentrace RNA na gelu.....	19
3.3.3.	Syntéza prvního vlákna cDNA	20
3.3.4.	PCR (polymerázová řetězová reakce) na přípravu PCR produktu.....	20
3.3.5.	Elektroforéza vzorků z PCR	22
3.3.6.	Gelová extrakce.....	22
3.3.6.1.	Stanovení koncentrace vyizolovaných produktů (DNA)	22
3.3.6.2.	Příprava vzorků na sekvenaci	22
3.3.7.	Ligace Produktů do Expresního vektoru	23
3.3.8.1.	Příprava Petriho misek se živným agarem.....	24
3.3.8.2.	Příprava elektrokompetentních buněk	24

3.3.8.3.	Transformace buněk.....	25
3.3.8.4.	Kontrola Transformovaných buněk na PCR.....	26
3.3.8.5.	Kontrola vzorků na elektroforéze.....	27
3.3.9.1.	Izolace plasmidové DNA	27
3.3.9.2.	Sekvenační reakce	27
3.3.9.3.	Příprava glycerolových stoků.....	27
3.3.10.	Expresce rekombinantních proteinů	28
3.3.11.	Western blot a Elektroforéza.....	29
3.3.12.1.	Čištění proteinu	31
3.3.12.2.	Elektroforéza vzorků z purifikace	31
3.3.12.3.	Měření koncentrace	31
3.3.13.	Dialýza pročištěných proteinů	31
3.3.14.	Lyofilizace.....	31
4.	Výsledky	32
4.1	Získání RNA a cDNA	32
4.2.	Izolace zájmových oblastí Sericinu 3	32
4.3.	Ligace a transformace	34
4.4.	Kontrola transformovaných kolonií.....	34
4.5.	Analýza rekombinantních proteinů	37
4.6.	Čištění proteinů pomocí afinitní chromatografie.....	39
4.7.	Přečištění rekombinantních proteinů dialýzou	41
5.	Diskuze	42
5.1.	Důvod pokusu.....	42
5.2.	Od izolace PCR produktu po transformaci	43
5.3.	Western Bloty.....	44
5.4.	Přečištěné proteiny	45
5.5.	Dialýza	46
6.	Závěr	47
7.	Seznam literatury	48
8.	Příloha	61
8.1.	Příloha č. 1. Použité primery	61
8.2.	Příloha č. 2. Použité chemikálie.....	61
8.3.	Příloha č. 3. Sericin 3	63
8.4.	Příloha č. 4. pET 151 schéma.....	67

8.5.	Příloha č. 5. Použité zkratky.....	67
------	------------------------------------	----

1. Úvod a literární přehled

1.1. *Bombyx mori* modelový organismus

Výzkumy japonských vědců na bourci morušovém počátkem 20. stol. zahájily éru využití tohoto druhu jako modelového organismu, který je co do významu v rámci hmyzu hned za drozofilou. Výzkumy provedené na bourci morušovém přispěly k poznání fyziologie hmyzu a vedly současně k mnoha objevům na poli genetickém a molekulárním. Znalost chemické a krystalické struktury hedvábí přispěla například k poznání peptidického složení a uspořádání β -listu (Pauling, Corey, 1953). Fibroinový gen byl mezi prvními eukaryotickými geny exprimovanými v nebuněčném systému a analýza těchto dějů částečně odhalila mechanismy regulace genů (Hui, Suzuki, 1995). Bourec morušový je také modelem pro vývoj nových prostředků proti škodlivým motýlům (The international Silkworm Genome Consortium 2008).

Zařazení: *Bombyx mori*

Říše: Animalia (živočichové)

Kmen: Arthropoda (členovci)

Třída: Insecta (hmyz)

Řád: Lepidoptera (motýli)

Čeleď: Bombycidae (bourcovití)

Rod: *Bombyx* (bourec)

Druh: *Bombyx mori* (bourec morušový)

1.2. Životní cyklus bource morušového

Základem života tohoto druhu je listí několika druhů moruší, z nichž je nejdůležitější moruše bílá (*Morus alba*). Sušené morušové listy a agar jsou též základem umělé potravy housenek. Celý vývoj od vylíhnutí vajíčka do zakuklení trvá u monovoltinních ras při vyšší letní teplotě 28-32 dnů a u menších bivoltinních ras 24-25 dnů. U nejmenších polyvoltinních ras s 6-8 generacemi do roka je vývoj ještě rychlejší. Vajíčka mají velikost 1,5 mm a váhu 0,7 mg. Tvar vajíčka je oválný, ze stran zploštělý a barvu hned po vykladení má běložlutou. Po 2-3 dnech získávají vajíčka modrošedou barvu. Líhnutí nastává při pokojové teplotě za 2 až 3



Obr. 1. Bourec morušový, imago.

Foto. Jeong Jong-Cheol



Obr. 2. Bourec morušový, larva. Foto.

Josef Dvořák

týdny. U monovoltinných a bivoltinných druhů je embryonální vývoj v raném stádiu přerušen diapauzou, jejíž ukončení vyžaduje alespoň dvouměsíční ochlazení vajíček na 5 °C. Při pokojové teplotě se vývoj vajíček zastaví až na 10 i více měsíců. Diapauzu je možné odstranit ponořením vajíček na 2 minuty do 65% kyseliny solné (koncentrovaný roztok ředěný vodou 2:1), pak je třeba vajíčka důkladně opláchnout vodou. Z aktivovaných vajíček se vylíhnou larvičky za 2-3 týdny. Líhne se více než 90% housenek, které se asi za 3 týdny zapředou a zakuklí. Z kukel se motýli líhnou 10.-12. den po zakuklení. Dospělí motýli nepřijímají potravu. Během 24 hodin dochází k páření a během dalších 48 hodin samičky nakladou něco mezi 300-450 vajíčky (Michajlov 1952; Krejčík 1936).

1.3. Objev hedvábí a historie

Bourec morušový je nejstarším a zdaleka nejvýznamnějším producentem komerčního hedvábí, a to už celých šest tisíc let. Hedvábí je získáváno i z jiných hedvábnotvorných mūr, ale jen v poměrně malé míře. Prapůvod hedvábí lze vysledovat do starověké Číny, patrně do provincie Šan-tung u Žlutého moře (Čechmánek, Hrabák 2006). Jedna z pověstí povídá, jak byl objev technologie spřádání hedvábí pouhým dílem náhody. Čínská princezna si hrála se zámotkem, který jí upadl do šálku čaje. Když se ho služebná snažila vylovit, začalo se odmotávat jemné vlákno (o průměru jen několika tisícín milimetru). Spojením několika vláken vznikla hedvábná nitka. V Číně na chovu bource usilovně pracovali a křížením divokého *B. mori* (dnes už nežije) s druhem *B. mandarina* (divoké populace jsou ve východní Asii poměrně běžné) a vytvořili dnešní hybridní druh *B. mori*, jehož život je plně závislý na lidské péči (Sehnal 2007). Bourec morušový, jak ho známe, byl vyšlechtěn k tvorbě kokonů. Dospělci nejsou schopni letu a jsou celkově velmi málo pohybliví. Také housenky málo lezou a zůstávají na listech, kterými se živí. Mají značnou spotřebu potravy a před kuklením využijí asi 20 % celkové tělesné biomasy na tvorbu hedvábí. V Číně měla patronát nad hedvábím císařská rodina. Za prozrazení jeho výroby či zpracování čekal jedince trest smrti (Čechmánek, Hrabák 2006). I přes tuto hrozbu se pěstování bource morušového a výroba hedvábí rozšířily ve 2. století n. l. do Japonska a Koreje, ve 4. století do střední Asie a od 6. století bylo již známo i na Peloponésu. O základech hedvábnictví v Evropě vypráví pověst, podle které dva mniši v 6. století propašovali vajíčka bource v dutinách bambusových holí do Cařihradu (dnešní Istanbul) a odtud dále na západ (Novák, Severa 1990). Hedvábí jako tkanina však bylo v Evropě známé nejpozději od počátku 2. století, kdy ho přiváželi obchodníci takzvanou hedvábnou stezkou. Tato stezka vedla z Číny přes Bagdád a východní Persii až do syrských přístavů, odkud hedvábí převážely lodě do Egypta a do Evropy.

Hedvábí bylo i na tehdejší poměry velmi drahým zbožím, jež si mohl dovolit jen ten nejbohatší. Cena byla vysoká hlavně v důsledku veliké vzdálenosti (přes 11 tis. km), po níž se hedvábí dopravovalo. Proto byly časté pokusy o získání vlastního hedvábí. Od 8. století je produkce hedvábí známa v Španělsku a od 13. stol. z Francie a Itálie. U nás je obchod s hedvábím znám od 14. stol., ale bourec morušový se zde začal chovat až v 17. stol. Na konci 19. stol. byla největším zpracovatelem hedvábí Francie a po ní Japonsko, kde roční produkce hedvábí činila 340 000 tun. I když je dnes výroba značně mechanizovaná, zůstává pracnou a z toho důvodu produkuje současné Japonsko jen asi tisíc tun hedvábí. Výroba se přesunula do rozvojových zemí, ve kterých je hedvábnictví zdrojem obživy pro mnoho milionů lidí. Bourec je v takových zemích, např. v některých oblastech Uzbekistánu, chován za velmi primitivních podmínek. Hedvábí zde vyprodukované se využívá například na šití županů, a tradičních plášťů (Hyde 1984).

Důvodů pro pomalé rozšíření chovu bource do Evropy a do světa bylo více, mezi nejdůležitější patří omezení císařskou rodinou v Číně a potravní specializace housenek bource morušového. Nepostradatelnou rostlinou pro bource morušového je morušovník, nejvíce se využívá morušovník bílý (*Morus alba*), pocházející z Číny. Se začátky chovu bource v Evropě se začínal pěstovat i morušovník, hlavně v teplejších oblastech. Hedvábí pro svou kvalitu a jisté přednosti bylo využíváno například v Číně jako cenina, obřadní roucha a spodní prádlo samurajů. Vedle textilií se hedvábí využívalo v chirurgii k šití ran a za druhé světové války bylo nepostradatelné pro výrobu padáků (Hyde 1984). Protože je hedvábí velmi pevné, lze ho použít i při výrobě neprůstřelných vest nebo pneumatik (Phillips a kol 2005). Dnes se hedvábí nahrazuje syntetickými vlákny, ale i tak má svou nezastupitelnou roli. Výroba je dnes převážně v rozvojových zemích, které poskytují levnější výrobní náklady. Skoro 80% veškerého hedvábí dnes pochází z Číny, dalšími velkými producenty jsou Indie a Brazílie. Objevují se snahy o využití geneticky modifikovaných bourců, kteří by spřádali vlákno s novými kvalitami (Hyde 1984).

Kromě hedvábí se bourec morušový ve východní Asii využívá v medicíně, kosmetice a jako pochutina. Konzumace larev a kukel byla v Číně písemně zaznamenána už před 3000 let (Zhang, Zhang 2001). Z hlediska výživy jsou housenky a kukly bource velmi kvalitní potravou, protože obsahuje dvakrát více bílkovin a základních aminokyselin než vepřové maso (Xia, Zhao 2003; Chen a kol. 2002 a, b). Bourec obsahuje také mnoho vitamínů, hormonů, chitin, mikroelementy a další látky (Xiong, Chen 1999), které mohou být využité jako strava pro kosmonauty (Yang a kol. 2009).

Housenky bource morušového produkují hedvábí v páru snovacích žláz, jejichž společný vývoj ústí ve snovací bradavce (spinneretu) na dolním pysku (labium). Z každé žlázy vychází jeden hedvábný filament, který je převážně tvořen bílkovinou nazvanou těžký fibroin. Je složen z 15 různých aminokyselin. Pár filamentů je při předení stmelováno v jedno vlákno bílkovinami zvanými sericiny. Jeden kokon obsahuje až 2000 m hedvábného vlákna. Při jeho zpracování však skoro polovina (převážně sericiny) přijde v niveč. Aby bylo možno vlákna spřádat a dále zpracovávat, je nutné je nejdříve odmotat z kokonů. Kukly, které jsou uvnitř, se usmrtí horkým vzduchem a kokony se pak mohou skladovat v suchém prostředí mnoho měsíců. Při spřádání se kokony asi na 5 min ponoří do slabě zásadité (mýdlové) vody zahřáté na 95 °C, ve které se odmyje část sericinů (Čechmánek 2006; Terada 2002). Surové hedvábí má nažloutlou barvu a je bez lesku. K získání 1kg hedvábí je zapotřebí zpracovat 50 tisíc kokonů (Čechmánek 2006).

1.4. Hedvábí v živočišné říši

Hedvábí produkuje přibližně tři sta tisíc druhů členovců. Tvorové produkující hedvábí využívají jeho tvorby z rozličných důvodů: opora spermií (Thysanura, Archeognatha), krytí vajíček (Psocoptera, Coleoptera, Odonata, Embiophera a Neuroptera), kokon (Thysanoptera, Hymenoptera, Coleoptera, Siphonaptera, Neuroptera), úkryt (Hemiptera) (10 Fletcher a kol 2002), tunely (Coleoptera, Embiophera), lov kořisti (coleoptera) a mnoho dalších (Sehnal, Akai i 1990; Craig 1997).

Komerčně se zámotky využívají asi od deseti druhů housenek, ale stále se hledají další možnosti (Sehnal 2007). Kromě nejznámějšího hedvábí z bource morušového známe dnes mnoho dalších, neméně významných druhů hedvábí pro přežití jejich majitelů, avšak méně důležitých pro člověka. Už starověcí Řekové znali hedvábí z bource *Pachypasa otus* dříve, než z bource morušového, a využívali ho v lékařství. Vlastnosti těchto vláken však nejsou tak kvalitní. Kromě bourců produkují hedvábí i mnozí další, například martináčovití (*Saturniidae*). Z nejvýznamnějších martináčů jde zejména o martináče dubového (*Antheraea pernyi*), martináče japonského (*Antheraea yamamai*), martináče hedvábného (*Samia cynthia*) a také martináče *Antheraea harti*. Všichni produkují hedvábí, které však nemá kvality bourčího. Například martináč japonský byl roku 1860 propašován z Japonska do Francie a dodnes je v mnoha oblastech Eurasie chován. Jeho housenky se živí dubovým listím. Martináč dubový pocházející z Mandžuska, kde se také dodnes hojně zpracovává. Jeho hedvábí tvoří hnědá hrubší vlákna. Z těchto vláken se šije běžné oblečení. Vyskytuje se také v Indii a Číně v polodivoké formě, kde ke sběru dochází ve volné přírodě. Tento druh se také

živí dubovým listím. Kromě těchto zmíněných oblastí ho najdeme také na Ukrajině a severním Kavkazu. Martináč hedvábný má svůj areál od Nepálu po Japonsko, od 19 stol. je zastoupen i v Evropě. Jeho potravu představuje ptačí zob (*Ligustrum*), šefík (*Syringa*), ovocné stromy různých druhů a pajasan (*Ailanthus*) (Čechmánek 2006).

Mnozí členovci tvoří hedvábí pro svou ochranu a lov. U dospělých pavouků je vlákno snováno k lovu a má podobu sítě (složené z několika typů hedvábí, různé na upevnění, v podobě silného vlákna, a různé na vlastní síť), do níž je lapána kořist, také mohou tvořit kokony na vajíčka. Vlákno k upevnění sítě je tak pevné, že předčí většinu dnes uměle připravených. Mladí pavouci některých druhů předou létací vlákna, s jejichž pomocí se nechají unášet větrem na nová stanoviště. Vyskytují se zejména jako „babí léto“ začátkem podzimu. Malé sítě k zachycení potravy předou i larvy některých chrostíků.

Pavouci jsou dokonalí spřádači. Mají až sedm typů hedvábí a odpovídající počet snovacích žláz. Hedvábné vlákno pavouků roste neuvěřitelně rychle na okraji snovací žlázy z rosolovité hmoty. Dochází k tomu bez potřeby organických rozpouštědel, vysokých tlaků a teplot, jaké jsou potřeba u umělých vláken. Většina pavouků obnovuje pavučiny každý den. Staré vlákno je externě natráveno a pozřeno v tekuté formě. Rozklad je stejně snadný a šetrný k životnímu prostředí, jako vznik vlákna. Hedvábí je směsí bílkovin a cukrů s příměsí tukových látek a tak se velmi snadno rozkládá. Pavouci stále opravují a tkají další a další sítě. Dnes díky vývoji, který jde rychle dopředu, byly připraveny bílkoviny hedvábí v bakteriích, kvasinkách, nebo hlízách bramborů. Komerčnímu využití se nejvíce přiblížila produkce hedvábí pavoučího typu v geneticky modifikovaných kozách, do kterých byl pod promotorem kaseinu vložen syntetický gen. Příslušná bílkovina byla sekretována do mléka a poměrně snadno zčásti vyčištěna. Po vstříknutí roztoku bílkoviny do metanolu bílkovina polymerovala ve vlákno nazvané „biosteel“, protože bylo dostatečně pevné, aby uneslo váhu člověka (Sehnal 2007).

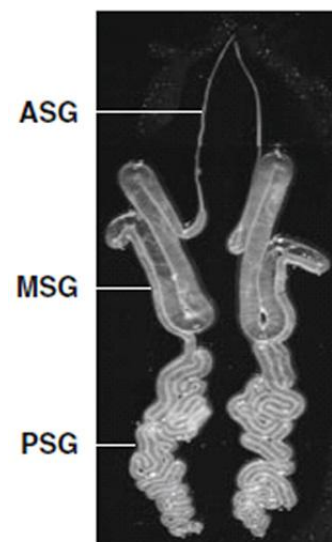
1.5. Složení a produkce hedvábí

Hedvábí produkované housenkami se skládá hlavně z fibroinu, z 20-30% sericinů, 1% solí a 2% vosků. Vosky hrají nejspíše roli vodního odpuzovače v kokonu (Fourier 1979; Voegeli a kol. 1993). Hedvábné vlákno se skládá ze dvou filamentů fibroinu, které jsou stmelené sericiny (Iizuka 1996; Cook 1964). Fibroiny i sericiny polymerují, při čemž jsou molekuly navíc uspořádány do repetitivních konformací jako je α helix, β listu a zkříženého β listu (Komatsu 1996). Hedvábí všech členovců je ektodermálního původu (Sehnal, Akai 1990) a je skladováno v podobě hydratovaného gelu uvnitř buněk, nebo častěji v

mezibuněčných prostorách (Rudall, Kenchington 1971). Gel polymerizuje v nerozpustná vlákna, jakmile přichází do kontaktu s vnějším prostředím (Willis a kol. 2005). Hedvábí je produkováno u různých druhů členovců v rozdílných tkáních, jako jsou dermální žlázy (Thysanura, Archeognatha a Embiophera), Malpigické trubice (Coleoptera, Ephemenoptera a Neuroptera), přídatné pohlavní žlázy (Coleoptera, Neuroptera a Mantodea), střevo (Thysanoptera) (Akai, Nagashima, Aoyagi 1993) a labiální žlázy (Lepidoptera, Trichoptera, Psocoptera, Siphonaptera, Hymenoptera a Diptera) (Sehnal, Akai 1990, Craig 1997). Také aminokyselinové složení hedvábí je u různých druhů hmyzu různé: *Bombyx mori* (Žurovec, Sehnal 2002) 45, 9% Gly a 30, 2% Ala, *Cotesia glomerata* (10 61) 38,4% Asn a 32,6% Ser, *Chironomus tentans* (Case a kol. 1997; Willis a kol. 2005) 21, 4% Ser a 39, 0% His, Arg a Lys. Jak je z těchto příkladů patrné, složení je značně odlišné.

Snovací žlázy bource morušového: SŽ slouží k produkci hedvábí a vznikly nezávisle u několika skupin členovců. Mohou být primárně vzniklé, jako epidermální vnořený orgán u klepítkačů či snovatek, nebo druhotně, jako odvozeniny z labiálních a v menší míře jiných žláz hmyzu. Snovací žláza bource morušového je přeměněná labiální žláza. Je vytvořena z jednovrstevného tubulárního žlaznatého epitelu s dvěma řadami buněk obklopujících lumen, podélně rozděleného na tři celky: zadní (PSG), střední (MSG) a přední (ASG). Buňky snovací žlázy jsou vysoce polyploidní s rozvětveným jádrem a s četnými jadérky (Mondal a kol. 2007). Dvě snovací žlázy se spojují dohromady blízko vývodu na snovací bradavce, odkud se vylučuje hedvábné vlákno (Magoshi a kol. 1985; Ilzuka 1985). Snovací žláza (SŽ) se táhne podél trávicí trubice.

(Mondal a kol. 2007) Fibroiny tvořící osový filament hedvábí jsou exprimovány pouze v PSG, zato lepící proteiny v MSG. Funkce ASG není zcela objasněna (Žurovec a kol. 1998; Nirmala a kol. 2001 a, b). U bource morušového je MSG dlouhá kolem sedmi centimetrů a obsahuje kolem 300 buněk. ASG měří kolem dvou centimetrů a je složena asi z 250 buněk, PSG je asi 15 centimetrů dlouhá a obsahuje přibližně 500 buněk (Akai a kol. 2005). Uvedené počty buněk vytvářejí SŽ od jejího vzniku v embryonálním vývoji – pak SŽ roste jen polyploidizací (Akai, 1984). Během postembryonálního vývoje dochází ke značnému zvětšení žláz (Ono 1951). Největšího růstu dosahuje SŽ v posledním larválním stádiu. Velikost žlázy se zvětšuje od 4% do 40% váhy těla (Sehnal, Akai 1990) u *Galleria mellonella* roste z 5,5%



Obr. 3. Struktura snovací žlázy bource morušového. Foto Masahiro Tomita (2011)

na 21% (Sehnal et al. 1983). Funkce SG je stimulována mozkovými neurohormony a sekrece vláknů je též pod kontrolou juvenilního hormonu a ecdysteroidů (Sehnal, Akai 1990).

Fibroinová osa hedvábného filamentu je u *B.mori*, *B. mandarina*, *G. mellonella*, *Dendrolimus spectabilis* a *Papilio xuthus* složena ze tří proteinů těžkého, lehkého fibroinu a jedné molekuly P25. L řetězec a P25 nebyly detekovány u *Antheraea yamamai*, *A. pernyi* a *Samia cythia ricini* (Tamura, Kubota 1989; Tanaka, Mizuno 2001). P25 je u bource m. spojen s L a H řetězci nekovalentními vazbami (Inoue a kol. 2000). Fibroiny jsou tvořeny v PSG a odtud transportovány do MSG, kde jsou skladovány jako viskózní gel obsahující 20-30% proteinu. Sericiny jsou tvořené v MSG a obklopují sericiny, avšak nemísí se s nimi. Proteiny jsou posunovány do ASG, kde jsou koncentrovány a startuje zde spřádací proces (Magoshi a kol. 1985). Během tohoto procesu fibroiny prodělávají řadu přeměn fází: z gelu na koloidní roztok solí, ten na tekuté krystaly, ty na vlákna, která jsou pod přísnou kontrolou pH (Tanaka a kol. 2001, Dicko a kol. 2004), mnohých kationtů (monovalentní i bivalentní) (Ochi a kol. 2002), vodního obsahu (dehydratace) a rozsahové tekutosti (Foo 2006). Tyto úpravy vedou k tvorbě finálního vlákna a optimalizaci energetické efektivity, podpořením transportu a skladováním fibroinů (Iizuka 1985). Během spřádání je fibroinová molekula při průchodu zužujícím se vývodem SŽ vystavena tlaku, který vede k uspořádání molekul. Průchod ASG je spojen s dehydratací a přechodem z tekuté krystalinní fáze na pevnou. Fibroin, díky amfifilickému motivu a hydrofobním blokům s hydrofilními koncovými bloky (Zhou a kol. 2000; Jin, Kaplan 2003) může zaujmout několik konformací: z buněk je vylučován v micelách (Jin, Kaplan 2003) a v lumenu žláz vykazuje tekutou krystalinitu (Iizuka 1964; Kerkam a kol. 1991; Knight, Vollrath 2002; Knight, Vollrath 2001), odpovědnou za polymeraci a orientaci molekul. Příčný tlak spolupůsobící se solí, pH a sericiny jsou považovány za nezbytné součásti v tvorbě fibroinu a uspořádání vláken. Role pH a solí (K^+ , Na^+ a Ca^{2+}) na fibroinovou reologii byla studována (Ochi a kol. 2002; Terry a kol. 2004;) v izolovaných vzorcích. Přirozený systém je značně složitější a účastní se ho i další proteiny jako například glykoprotein P25 k zformování základní jednotky (EU) (Inoue a kol. 2000). SG je během metamorfózy buď zčásti přeměněna na žlázu s jinou funkcí, nebo je zcela odbourána.

1.6.1. Fibroiny

Fibroiny tvořící hlavní složku hedvábí jsou u bource morušového hojně zkoumány a jsou rovněž hlavním cílem genetických modifikací (Capello a kol. 1990; Capello 1990). Fibroiny jsou tvořeny v PSG (Lucas, Rudall, 1968; Gamo a kol. 1977), v jejichž lumenu jsou přítomny

v koncentraci 12-15%. Fibroinový komplex glykoproteinů je složený z 6 molekul lehkého (L) a 6 molekul těžkého (H) řetězce o velikostech přibližně 391 kDa (Zhou a kol. 2000) a 25 kDa, kovalentně spojených disulfidickými můstky (Tanaka a kol. 1999; Yhou a kol. 2000; Inoue a kol. 2000). Třetí komponentou komplexu je protein nazvaný P25 nebo také fibrohexamerin. Pro tvorbu filamentu je podstatné složení H-fibroinu. V jeho repetitivní sekvenci se vyskytují krystalní i amorfní domény. Amorfní domény jsou charakteristické přítomností velkých aminokyselin (např. tyrosin), zatímco krystalní obsahují velké množství alaninu, glycinu a serinu (Vogeli a kol. 1993). Primární struktura H řetězce je charakteristická repetitivními hydrofobními sekvencemi: GAGAGS, GAGAGY a GAGAGVGY, odpovědných za antiparalelní formaci β listů uvnitř stočených vláken (Zhou a kol. 2000; Mita a kol. 1994). Formace β listu přispívá k unikátním mechanickým vlastnostem a stabilitě vypředených vláken (Cuniff a kol. 1994). Gen pro H fibroin je na 25. chromosomu (Kimura a kol. 1985) a obsahuje 1 intron. 5' konce, kódující oblasti tohoto genu, jsou v rámci řádu Lepidoptera konzervovány. Směrem od TATA boxu (-30 k -24) je 5' oblast (od A do E, A je nejbližší) pokrývající 200 bp důležitá pro maximální úroveň transkripce. C, D a E mají okolo 30-40 bp a jsou značně A, T bohaté (80%). Obsahují 10 bp opakující se repetitivní sekvenci podobnou konzervované sekvenci pro vázání, jako jsou u *Drosophila* homeodomenové proteiny (Hoey, Levine 1988; Desplan a kol. 1998). První exon je malý (67 bp) následovaný intronem (971 bp), přispívajícím k transkripční regulaci (Takyia a kol. 1997) a druhým exonem, jež je větší (15750 bp). Repetitivní oblast má vysoký obsah GC (přibližně 63%). Odvozená aminokyselinová sekvence obsahuje 5263 aminokyselin a má molekulární hmotnost 391367 Da a izoelektrický bod 4,22 (Zhou a kol. 2000). Gage a Maning (1980) navrhli model velké krystalní struktury přerušené menšími amorfními strukturami. Souhrnná genová struktura H fibroinu *Bombyx mori* je identická s H fibroinem *Galleria mellonella*. Další TATA box (-49 až -43) byl zjištěn v 5' stoupající oblasti, získanou náhodnou mutací. Standardní TATA box je pravděpodobně využíván na začátku larválního vývoje, když transkripce začíná. N a C sekvence terminálních oblastí *B. mori*, *G. mellonella* a *A. yamamai* mají velkou homologii mezi signálními peptidy a menší u druhého exonu (Fedič a kol. 2002). Disulfidické spojení L a H řetězce (Yamaguchi a kol. 1989; Tanaka a kol. 1999b) je podstatné pro efektivní sekreci fibroinu, jak bylo demonstrováno u mutace „naked pupa“ (Takei a kol. 1987; Mori a kol. 1995). Gen pro L fibroin je u bource morušového lokalizovaný na chromosomu 14 (Kimura a kol. 1985) a jeho celá délka je 13472 bp. Kódující oblast genu je složena ze sedmi exonů. Regulační 5' přílehlá oblast obsahuje kanonický TATA box a CAAT jeví podobnost s 5' oblastí H fibroinového genu. První exon obsahuje 41 bp nekódující a 36 bp kódující oblast

(Yamaguchi a kol. 1989). První intron je velký 8145 bp a tvoří okolo 60,5% celkové délky genu (Kikuchi et al 1992) a obsahuje mnoho repetitivních (Adams a kol. 1986, Wilson a kol. 1988). L fibroinové homologie byly nalezeny u *G. mellonella* (Žurovec a kol. 1995), *D. spectabilis* a u *P. xunthus* (Tanaka, Mizuno 2001).

1.6.2. P25

P25 je N-glykoprotein, který je podstatný pro vytvoření komplexu H a L fibroinu, se kterými P25 interaguje nekovalentními vazbami (Tanaka a kol. 1999a). Gen P25 bource morušového je 3500 nt (nukleotidů) dlouhý a zahrnuje pět exonů s 1173 nt (Couple a kol. 1985; Chevillard a kol. 1986). Regulační 5' oblast je podobná jako u H fibroinového genu s mnoha bloky homologie se sekvencemi, které spojují kanonickou TATA sekvenci a CAAT box (Couple a kol. 1985). *G. mellonella* má podobný P25 jako *Bombyx mori* (Yang a kol. 1998.) Geny P25 byly izolovány z *B. mori*, *B. mandarina* a *P. xunthus*. Identita mezi *B. mori* P25 a P25 homology u *D. spectabilis*, *G. mellonella* a *P. xunthus* je přibližně 50%. U *B. mori* a *B. mandarina* je rozdíl pouze v jednom aminokyselinovém zbytku (Tanaka a Mizuno 2001).

1.6.3. Nízkomolekulární bílkoviny hedvábí

Elektroforetické analýzy hedvábí odhalily přítomnost mnoha minoritních proteinů (Sasaki, Noda 1973; Shimura a kol. 1976; Kodrlik 1992). Akai (1997) poukázal u motýlích kokonů na dvě zajímavé vlastnosti: nejsou napadány bakteriemi, hmyzem, houbami, ani roztoči a housenky uvnitř jsou vzácně obětí predátorů a netrpí nemocemi během stádia přeměny. Předpokládá se, že některé proteiny mají antimikrobiální vlastnosti a některé zabraňují predátorům konzumovat kokony s housenkami uvnitř. Použití technik RT-PCR a EST Databáze (Mita a kol. 1999) odhalilo dvě nepříbuzné nestrukturální skupiny proteinů. Seroiny a proteázové inhibitory.

1.6.3.1. Seroiny

Nejdříve byly tyto nízkomolekulární komponenty charakterizovány u zavíječe voskového *G. mellonella* a nazvány seroiny (Nirmala a kol. 2001a). Poté se našel homolog u *B. mori* (Nirmala a kol. 2001b). *G. mellonella* má pouze jednu kopii seroinového genu, exprimující 1.2 kb mRNA, která kóduje protein o velikosti asi 23 kDa. (Žurovec a kol. 1998). U bource morušového se našly dva geny. Genu seroin-1 odpovídá cDNA o 769 nukleotidech a protein o 108 aminokyselinách. Kompletní cDNA genu seroin-2 obsahuje 1413 nukleotidů, které kódují 112 aminokyselinových zbytků. Proteiny jsou exprimovány souběžně

v PSG a MSG a homologické proteiny z jiných organismů nejsou známe. Seroinové geny *B. mori* zřejmě vznikly genovou duplikací následovanou mnoha delecemi a bodovými mutacemi (Nirmala a kol. 2001a). V porovnání galeriových a bourčích seroinů můžeme pozorovat podobnost v signální peptidové oblasti a v N terminální oblasti u sekretovaných proteinů. Podobnosti mohou být také nalezeny v pozicích malých aminokyselinových zbytků blízko karboxylového konce proteinu. Ale hlavní oblasti tří seroinů si nejsou podobné, což naznačuje genovou různorodost (Fedič a kol. 2002).

1.6.3.2. Proteázové inhibitory

Druhou skupinou nízkomolekulárních látek objevenou a popsanou u *B. mori*, je skupina dvou tříd proteinových inhibitorů. Až později se objevili homology i u *G. mellonella*. Jako první byla popsána neúplná sekvence BmSPI1 (Kurioka a kol. 1999). Kompletní cDNA je 394 nukleotidů dlouhá a kóduje malý protein přibližně 6 kDa, zahrnující 76 aminokyselinových zbytků. Vykazuje strukturální znaky inhibitorů Kunitzova typu. Druhý malý peptid je pojmenován BmSPI2 a patří mezi inhibitory Kazalova typu (Kurioka, Hirano 1995). Celá cDNA je 411 nukleotidů dlouhá a kóduje malý protein přibližně 4.7 kDa velký, obsahující 66 aminokyselin. BmSPI1 protein se značně podobá obdobnému inhibitoru *G. mellonella* GTI1 (55%), a BmSPI2 homologu GTI2 (44%). Předpokládá se, že se oba proteinové inhibitory BmSPI1 a 2 podílejí na ochraně kokonů proti predátorům a mikrobům (Nirmala a kol. 2001b).

1.6.4. Sericiny

Sericiny jsou tvořeny ve středním oddílu snovací žlázy bource (MSG) (Lucas, Rudall, 1968; Gamo a kol. 1977). Jedná se o albuminové proteiny s vysokým obsahem serinu (25-30%) (31 Case a kol. 1994). Většina ostatních aminokyselin je rovněž polárních. U bource morušového je zastoupení serinu a aspartové kyseliny přibližně 33,4% a 16,7% (Yu-Qink 2002). Velké zastoupení hydrofilních aminokyselinových zbytků propůjčuje sericinům rozpustnost v horké alkalické vodě. (Komatsu 1975 a Gamo a kol. 1977). Celkové množství hydrofilních aminokyselin v sericinu je 45,8%, z nichž je 42,3% polárních aminokyselin a 12,2% nepolárních aminokyselinových zbytků. (Vogeli a kol. 1993; Shaw, Smith 1951) Izoelektrický bod je něco kolem 4.0 díky více kyselým, než zásaditým aminokyselinovým zbytkům (Vogeli a kol. 1993). Velikost izolovaných sericinových molekul závisí na teplotě, času a pH (Yu-Qink 2002). 6-15 typů sericinových proteinů bylo extrahováno z hedvábí bource (Gamo a kol. 1977; Sprague 1975). Některé vycházejí ze stejného peptidu, ale mají

jiný stupeň glykosylace. (Grzelak 1995). U bource byly plně sekvenovány sericinové geny *Ser1*, *Ser2* a *Ser3*. Sericiny jsou flexibilně spojeny s hedvábnými filamenti a dělají hedvábí třpytivým a semitransparentním (Terada a kol. 2002). Sericinová frakce hedvábí je složena z na první pohled rozdílných, ale jinak v celku podobných peptidů charakteristických jejich rozpustností v horké vodě a vysokým obsahem serinu (Lucas, Rudall, 1968; Gamo a kol. 1977). Mnoho lidí se pokoušelo izolovat sericiny z kokonů, vždy s jiným výsledkem. Mosher (1934) extrahoval sericiny vroucí vodou při pH 4.1. Komatsu (1975) a Simizu (1941) se pokoušeli získat sericiny na základě různé rozpustnosti ve vařící vodě. Gamo (1973) však zjistil, že jsou sericiny degradovány vařící se vodou. Rozpustnost závisí také na složení sericinů, jestli jsou v β listu, nebo v α nesouvislé svinuté struktuře. Vyšší je v α nesouvislé struktuře a také pokud se přidá poly (Na akrylát) (Kataoka 1977; Zhu a kol. 1995). Na extrakci sericinů lze také použít enzymy jako alkylázy nebo alkalinní proteázy. (Pak 1977) Velikost extrahovaných sericinů je mezi 65- 400 kDa (Prudhomme a kol. 1985; Couble a kol. 1987; Sinohara 1979; Gamo 1982). Sericiny mají velký alelický polymorfismus. Ser1 a Ser2 produkují velmi rozdílné proteiny díky přítomnosti alternativních sestřihů genových transkriptů (Okamoto a kol. 1982). Sericinové transkripty jsou nalezeny během svlékání a dosahují maximální úrovně pár dnů před spřádáním kokonu. (Ishikawa, Suzuki 1985)

1.6.4.1. Sericin 1 (Ser1)

Ser1 byl částečně klonován a sekvenován před více než 20 lety (Okamoto a kol. 1982; Michaille a kol. 1986). Kompletní struktura byla dokončena (Garel a kol. 1997). Ser1 je složen z 9 exonů (Okamoto a kol. 1982; Michaille a kol. 1986) a je 23 kb dlouhý. Mechanismus alternativního sestřihu primárního transkriptu generuje 4 různé mRNA (Hamada a kol. 1987; Michaille a kol. 1989): 10.5, 9.0, 4.0 a 2.8/ 2.9kb dlouhé úseky (Michaille a kol. 1986; Fedič 1996). Sestřih (Garel a kol. 1997) primárního transkriptu 10.5 kb je tkáňově a vývojově specifický (Michaille a kol. 1990a; Hamada a kol. 1987; Michaille a kol. 1989; Couble a kol. 1987). Ser 1 polypeptidy mají od 76 do 330 kDa, včetně jedné nebo dvou repetitivních sekvencí s vysokým dílem serinovým repetitiv a dalších částí bez repetitiv. (Couble a kol. 1987; Michaille a kol. 1990). Během pátého instaru je Ser1 transkribován pouze ve 150 buňkách MSG. Zatímco úsek 2.8 kb mRNA je tvořen stále ve 42 buňkách přilehlých k PSG, 4.0, 10.5 a 9.0 kb úseky mRNA jsou tvořeny jeden po druhém ve zbývajících buňkách (Michaille a kol. 1990a). Všechny čtyři mRNA obsahují exony 1,2,7,8 a9 a mají identický 3' a 5' konec. (Michaille a kol. 1986). Exony 3,4,5 a 6 jsou alternativní. (Garel a kol. 1997). Tyto vlastnosti tvoří ze Ser1 dobrý model pro studium sestřihu. Kompletní sekvence cDNA Ser1 je (EMBL

Z48802) (Garel a kol. 1997). Velké centrální alternativní exony kódují vnitřní repetitivní sekvence. Velký centrální exon má 60 kopií 38 aminokyselinové opakující se oblasti (10 Garel a kol. 1997). Exon 6 je největší. Má velikost přibližně 6,5 kb, a je charakteristický 114 bp motivem, který se přibližně 60x opakuje. (Okamoto a kol. 1982). Repetice Ser1 proteinů mají vysoký obsah β listů v sekundární struktuře.(Garel a kol. 1997). Proteiny M a P detekované v extraktech sericinů (Takasu a kol. 2005) nejspíše vycházejí ze Ser1. Obsahují vysoký podíl serinu, glycinu a asparaginu z asparagové kyseliny (Takasu a kol. 2002). Produkty Ser1 jsou detekovány po druhém dnu posledního instaru a jejich hladina vzrůstá až do šestého dne (Takasu a kol. 2010).

1.6.4.2. Sericin 2 (Ser2)

Gen Ser2, který byl lokalizován na chromosomu 11 (Gamo 1982), obsahuje kolem 11 exonů a je vysoce polymorfní (Michaille a kol. 1990a,b; Kludkiewicz a kol. 2009). Ser2 kóduje dvě mRNA: jednu o velikosti 6.4, 5.4 nebo 5.0 kb (alelická variabilita) a druhou 3.1 kb, která je přítomna u larev všech haplotypů (Michaille a kol. 1990 a, b,). Z velké mRNA je zřejmě odvozen S2 polypeptid, který je přibližně 226.5 kDa velký a je tvořen v anteriorní části MSG (Gamo 1982; 17 Hou a kol. 2007). Pro Ser2 proteiny je typická repetice (ALTEKAKPNDRSPSHKDT) (Michaille a kol. 1990a,b). Sekundární struktura a způsob předpokládané polymerizace není znám. Není zcela vyloučeno, že se podílí na blokování polymerizace a přidržuje kokonová vlákna pohromadě (Takasu a kol. 2007). Ukazuje se, že produkty Ser2 nejsou hlavní složkou v obsahu kokonu (Takasu a kol. 2010) a že dochází ke ztrátě produktů Ser2 v MSG. Repetitivní motivy jsou složeny z 15 aminokyselin, z nichž pouze dvě jsou serinovými zbytky. Exprese Ser2 byla zaznamenána nejvíce v průběhu třetích a čtvrtých instarů. Nejvyšší úrovně dosahují Ser 2 proteiny čtvrtý den pátého instaru a šestý den již nejsou nalezeny. Zatímco sericin 1 a 3 jsou exprimovány v krátké periodě při snování kokonu, Ser2 je exprimován kontinuálně vyjma tohoto krátkého období. Sericin 2 tvoří pravděpodobně sericinový povlak larválního hedvábí v dřívějších stupních. U sericinu 2 se uvažuje o podpoře ekdyse a opoře při krmení (Takasu a kol. 2010). Sericin dva je bohatý na nabitě zbytky jako je lysin, kys. glutamová, asparagová a argininin. Tyto zbytky naznačují, že repetitivní oblasti sericinu tvoří β list (Levitt 1978). Jelikož není potřeba tvorby tuhé struktury sericinu v kokonu, není na přichycení k podkladu třeba zapotřebí β list (Kludkiewicz a kol. 2009).

1.6.4.3. Sericin 3 (Ser3)

Sericin byl objeven v databázi KAIKOBbase (<http://kaikoblast.dna.affrc.go.jp/>; Mita a kol. 2004), při hledání genu kódujícího částečně sekvenovaný protein označovaný sericin A. Bylo potvrzeno, že se gen exprimuje výhradně v anteriorní části MSG a produkuje 4,9 kb transkript. Primární struktura polypeptidu kóduvaného Ser3 genem souhlasí s aminokyselinovými sekvencemi peptidů získaných ze sericinu A (Takasu a kol. 2005). Aminokyselinové složení Ser3 peptidu a sericinu A souhlasí a proto bylo odvozeno, že Ser3 kóduje sericin A protein (Takasu a kol. 2007). Sericin 3 polypeptid obsahuje na serin bohatou repetitivní oblast, která byla nalezena i u peptidů Ser 1 (Okamoto a kol. 1982, Garel a kol. 1997). Ser3 je složen z 1271 aminokyselinových zbytků a 18 zbytků na N konci, které mají nejspíše funkci signálního peptidu (Gamo a kol. 1997; Garel a kol. 1997; Takasu a kol. 2002). Ser3 obsahuje 3 exony kódující z velké části repetice, složené z 86 a 8 aminokyselin. Sekundární struktura naznačuje přítomnost β listů, avšak nižší, než u Ser 1 (Takasu a kol. 2007). Struktura Ser3 naznačuje, že je více hydrofilní, než Ser1 (Garel a kol. 1997). Díky tekutosti se Ser3 protein vyskytuje ve vnější vrstvě roztoku proteinů v lumenu snovací žlázy, kde se uplatní jeho nízká schopnost krystalizace, vysoká tekutost a resistance k tuhnutí (Kataoka, Uematsu 1997). Takasu a kol. (2007) nemohou vysvětlit, proč se liší velikost Sericinu A od polypeptidu dedukovaného z cDNA. Sericin A má 230 kDa, naproti tomu má Ser3 polypeptid jen 120 kDa. Může to být způsobeno unikátním aminokyselinovým složením, jak je naznačeno například u Huang a kol.(2003), nebo sekundární modifikací proteinu. Sericin A je nerozpustný v teplé vodě. Ser3 proteiny se začínají tvořit od šestého dne pátého instaru a maxima dosahují sedmý (Takasu a kol. 2010).

1.7. Sericiny a jejich aplikace

Dnes se nachází další a další uplatnění sericinů díky jejich jedinečným vlastnostem. Sericiny mají schopnost tvorby gelu. Jednoprocentní vodný sericinový roztok tvoří gel při pH 6 až 7, při pokojové teplotě a tato rychlost vzrůstá se vzrůstající koncentrací sericinů a teplotou (Hirabayashi a kol. 1989; Hu, Zhu 1997; Zhu a kol. 1991). Při přidání látek jako pluronik nebo karbopol poskytují stabilní gel (Padamwar, Pawar 2003). Při výrobě je získáváno 50000 tun sericinů jako odpadní produkt, který je možno využít (Zhang 2002). Jednou z možností je náhrada telecího a plodového bovinního séra (FBS) v tkáňových kulturách. Tato séra mohou totiž obsahovat viry, priony nebo bovinní spongiformní encefalopatii (BSE), jež mohou být hrozbou pro člověka. Potřeba různých sér pro různé typy buněk zvyšuje náklady, které by odpadly při použití universálních sericinů (Terada a kol.

2002). Již jsou vytvořeny řady médií bez séra, v nichž se uplatňují třeba albumin, nebo insulin, ale nejde o univerzální média (Chang a kol. 1980; Murakami 1984). Testování sericinů na buněčné kultury ukázalo v některých případech stimulační vliv a to včetně hybridních buněk (Terada a kol. 2002). (Minomura a kol. 1995) ukázal, že film ze sericinů zajistil přichycení a proliferaci myších fibroblastů L-929. Sericiny působí jako antioxidanty proti lipidové peroxidaci (Kato a kol. 1998) a také jako inhibitor karcinogeneze nastartované buněčným stresem u myšního tlustého střeva (Sasaki a kol. 2000a). Sericinová dieta přispívá k lepší dostupnosti kovových iontů z potravy u krysy (Sasaki a kol. 2000b). Rekombinantní sericin zvyšuje mrazovou odolnost u *E. coli* (Tsujimoto a kol. 2001). Hned při výrobě hedvábí se extrahované sericiny mohou uplatnit jako barvivo (Terada a kol. 2002). Sericiny s nízkou molekulární hmotností pod 20 kDa nebo hydrolyzáty mají uplatnění v kosmetice (péče o vlasy i pokožku), zdravotních produktech a jako léky. Sericiny s vyšší molekulovou hmotností než 20 kDa se mohou použít na lékařské biomateriály, odbouratelné biomateriály, funkční biomembrány, složené polymery, funkční vlákna, hydrogely a tkaniny. Nízkomolekulární sericiny se získávají ve studené vodě v dřívějším stádiu snování hedvábí, na rozdíl od vysokomolekulárních, kde je to naopak. Sericiny jsou užitečné i pro zhodnocení kvality polyesteru, polyamidu a polyolefinu. Uplatnění nachází také jako povlak nebo do směsí pro přírodní a umělá vlákna, plasty a polymery. Sericiny samotné, nebo kombinované s fibroiny jsou užívány v péči o vlasy, pokožku a nehty. Při jejich použití v pleťových vodách, krémech a mastičkách se zvýší elasticita kůže a výsledky vykazují také protistárnoucí a protivráskové účinky. (Voegeli a kol. 1993; Yamada a kol. 1998; Ogawa, Yamada 1999; Henne Hoppe 1986). Padamwar a kol. (2002) poukázali na zvlhčující vlastnosti sericinového gelu, které se projeví snížením odporu kůže a obsahem hydroxyprolinu ve zrohovatělé vrstvě kůže při hydroxyprolinové zkoušce. Prášek obsahující 5-30% sericinu a 70-95% fibroinu po nanesení filmu na pokožku působil antistaticky a zvyšoval vlhkost. (Kirikawa a kol. 2000). Hydrolyzát sericinu působí kladně na záněty kůže. (Yasuda 1998). Sericin v opalovacím krému posiluje efekt UV filtru jako je triazin a ester kyseliny skořicové. (Yoshioka a kol. 2001). Vlasové a koupelové přípravky s příměsí sericinu redukují poškození vlasů navázáním se na povrch. (Hoppe 1984). Sericinové hydrolyzáty jsou účinné také jako kondicionéry. (Hata 1987).

Biodegradabilní materiály- Biodegradabilní materiály mohou být vyrobeny jako kombinace sericinů s pryskyřicemi (Annamaria a kol. 1998). Polyuretanové pěny zahrnující sericin mají dobré vlhkost absorbující a uvolňující vlastnosti (Nomura a kol. 1995). Polymerní filmy, pěny, lisované pryskyřice a vlákna obsahující sericin (0.01- 50 %). Další procedury naznačují použití sericinu obsahující polyurethan s výjimečnými mechanickými a termálními

vlastnostmi.(Hatakeyama, 1996). Výsledný polyurethan může být formován do filmu, vláken, nebo tvarovaných objektů. Polyurethan je levný, neboť obsahuje odpadní sericin. Metody na produkci dalších polymerů ze sericinů byly publikovány v (Fujita a kol. 1998; Sumitomo a kol. 1997).

Membrány - Tyto produkty slouží především k separaci látek v roztocích (reversní osmosa, dialýza, ultrafiltrace a mikrofiltrace), např. při odsolování vody, čištění vody, v biologických (Chisti 1998) a chemických procesech. Sericiny s fibroiny mohou být použity na tvorbu membrán na separační procesy. Samotný sericin nemůže tvořit membránu, ale jako kopolymer ano. Sericin obsahuje velké množství aminokyselin s polárními neutrálními funkčními skupinami. Membrány se sericiny jsou proto hydrofilní a trvale propustné pro vodu v tekutých vodních organických směsích. Mizoguchi a kol. (1991) popsali membránu s navázaným sericinem na další látky pro použití na separaci vody a ethanolu. Výsledný film je jen 130 μm silný. Akrylonitril se sericinem použitý na výrobu filmu odděluje organické látky od vody. (Yamada, Fuwa 1993a; 1994). Yamada a Fuwa (1993b) připravily trojvrstevnou membránu ze sericinu, epoxidové složky a ještě jedné komponenty na dělení racemických směsí. Gelový materiál produkovaný jako směs agaru nebo agarosy se sericinem, 20 kDa, může oddělit alkohol etherové směsi.(Yoshikawa a kol. 2001a).

Funkční Biomateriály - Je velice obtížné vnést sericin do membrány, která je dost pevná a elastická. Jednou z možností je vyrobit nezávislý film ze sericinu, který se připojí k membráně. Nakajima (1994) objevil, že film ze sericinu položený na vrstvě tekutých krystalů může orientovat molekuly krystalů a zajišťovat pokrivení displejů s tekutými krystaly. Sericin jako film se používá na povrch chladících zařízení, kde se uplatňuje jeho protimrznoucí efekt (Tanaka 2001). Užití takového filmu by mohlo být užitečné na silnicích, aby mráz neničil jejich povrch, do ledniček a podobně. Sericin může být použit jako nosič barev a jako ochrana pro různé předměty. Materiály zahrnující sericin jsou permeabilní, při schnutí, nemění tvar a dobře odolávají vlivům počasí. Film s 10-30% sericinu má dobré termální a mechanické vlastnosti. Namíchaný hydrogel ze sericinu nebo fibroinu a polyvinyl alkoholu absorbuje dobře vodu a má uvolňující a elastické vlastnosti (Yoshii a kol. 2000). Tento hydrogel může být použit na semena rostlin., medicínské materiály a obvaz na zranění. V roce 1978 Miyairi a Sugiura oznámily využití smíšených sericinů na film pro enzymovou imobilizaci s glutaraldehydem jako jednou z komponent. Tepelná stabilita, elektroosmotická resistance a stabilita imobilizované β -glukosidázy na filmu se sericinem byly vyšší, než na volný enzym. Mnoho autorů naznačilo využití sericinu pro enzymovou imobilizaci (D Asakura a kol.1992 a Demura a kol. 1992, Iwamoto a kol. 1995).

Lékařské biomateriály - Membrány složené ze sericinu a fibroinu jsou efektivním substrátem pro buněčnou proliferaci přilnavých zvířecích buněk a mohou být využity jako substrát pro kolagen. Minoura a kol. (1995) a Tsukada a kol. (1999) zkoumali přichycování a růst zvířecích buněk na filmu ze sericinu a fibroinu. Přichycení buněk bylo závislé na udržování minimálně 90% zastoupení sericinů v membráně. Sericinové a fibroinové filmy umožňují prostupnost pro kyslík a je naděje, že díky této vlastnosti se uplatní při výrobě umělých rohovek (Murase 1994), kontaktních čoček, cév a podobně. Sericin polymerizovaný s PAA (polyakrylová kyselina) a akrylamidem může absorbovat vlhkost až 180 x více, než váží (Akiyama a kol. 1993). Absorbující schopnost sericinu se zvýší použitím sericinu o molekulové hmotnosti nad 60 kDa. Biomateriály mají vyšší antikoagulační vlastnosti po ošetření sericiny a fibroiny (Tamada 1997). Kazuhisa a kol. (2001) zjistil, že sericin bohaté repetitivní sekvence v hydrolyzátu chrání proteiny v buňkách vystavených stresu z mrazu. Po zaklonování části sericinu do *Escherichia coli* se zvýšila její rezistence na mráz.

Funkční vlákna, tkaniny a výrobky - Vlastnosti vláken mohou být zlepšeny navázáním přírodních makromolekul, jako jsou chitin, chitosan, fibroin a sericin. Wakabayashi a Sugioka (1994) připravili polyesterová vlákna modifikovaná sericinem, která byla 5x více hygroskopická, než neupravený polyester. Více než 85% hygroskopicity zůstalo po padesáti praních. Podle Yamada a Nomura (1998) mohou vlákna s navázaným sericinem předejít obroušení kůže a vývoji vyrážek, protože jsou savá a kompatibilní s lidskou kůží (Takai 1999). Po navázání sericinů na gumu, může být tato guma méně agresivní a může se tak předejít podráždění třeba u rukavic a rukojetí na sportovní využití. (Ueda, Makita 2000).

2. Cíle práce

1. Připravit rekombinantní proteiny z vybraných úseků genu Sericin 3 bource morušového (kmen Diazo p50). K tomuto cíli vybrat repetitivní oblasti genu a zaklonovat je do vhodného expresního vektoru a buněk.
2. Najít vhodné podmínky pro expresi rekombinantních proteinů a pokusit se přechistit je pro použití v testech s tkáňovými kulturami.

3. Metody

3.1. Pokusný organismus *Bombyx mori* a jeho chov

Jako zdroj sericinů použit japonský kmen bource morušového Diazo p50.

Housenky bource byly chovány v plastových nádobách od prvního po poslední svlékání při pokojové teplotě (RT). Jako potrava byly podávány listy různých druhů moruší: *Morus alba*, *rubra*, *nigra*, které byly vždy co nejčerstvější. Prvním instarům stačí podávat pouze listy a starším již celé větvičky. Důležité je, aby větvičky nebyly mokré, neboť housenky jsou náchylnější k infekci. U posledních stádií je žír tak velký, že je třeba potravu kontrolovat každý den.

3.2. Získání žláz (snovacích) z housenek posledního instaru.

U posledního instaru jsou již patrné prosvítající snovací žlázy, které již zabírají podstatnou část těla housenek. V tomto stádiu došlo k narkotizaci housenek ve vodě. Po narkotizaci byly housenky připevněny na misku s voskem a zality fyziologickým roztokem Ringer (NaCl 9,1 g/l, KCl 0,52 g/l, CaCl₂·2H₂O 1,2 g/l, MgCl₂·6 H₂O 8 g/l, vše se rozpustí v destilované vodě). Pod lupou byly vypreparovány MSG žlázy spolu s ASG a zamraženy v tekutém dusíku. Poté byly zamražené žlázy přemístěny do -80°C.

3.3.1. Izolace RNA

Izolace byla prováděna ze zmražených MSG a ASG žláz.

Chemikálie: Trizol (invitrogen)

Na práci s RNA byly používány nástroje řádně vysterilizované. Pracovní prostor byl vyčištěn destilovanou a jarovou vodou a pokryt čistým filtračním papírem. Použití rukavic při práci s RNA je základ.

1. Ihned po vyndání žláz z -80 °C byly žlázy vloženy do třecí kádinky, která byla předtím vychlazená tekutým dusíkem.
2. Žlázy udržované neustále v tekutém dusíku byly homogenizovány tloučkem na co nejjemnější prášek. Bylo nutno dávat pozor na rozstříkující dusík.
3. Rozdrcený prášek přenesen vychlazenou lopatkou do 1,5 ml mikro zkumavek (Eppendorf, epp.) a přidán 1ml Trizolu/50-100 mg tkáně.
4. Inkubace 5 min. při pokojové teplotě do získání homogenního vzorku
5. Centrifuge při 1200xg 10min na 4 °C (pro odstranění nerozpustných součástí: tuku, proteinů, polysacharidů...).

6. Supernatant opatrně nepipetován do čisté epp.
7. Inkubováno 5 min. při RT.
8. Přidáno 200 µl chloroformu/1ml Trizolu.
9. Protřepáno rukou 15s a inkubace 15 min při RT.
10. Centrifugováno 1200xg 15 min na 4 °C (Oddělení spodní červené části ,střední a bezbarvé horní, obsahující RNA).
11. Horní vodní fáze přenesena do čisté epp.
12. Přidáno 0,5 ml izopropanolu/1ml Trizolu (na srážení RNA).
13. Promícháno a 10 min. inkubace při RT.
14. Centrifugováno 1200xg 10 min na 4 °C.
15. Supernatant odlit.
16. RNA promyta 1 ml 75% ethanolu/1 ml Trizolu.
17. Zvortexováno a centrifugace 7500g 5 min na 4 °C.
18. Ethanol slit a promytí s ethanolem zopakováno i s centrifuací.
19. Ethanol slit a zbytek odpipetován od peletu, pelet nechán oschnout 5-10 min, ale aby nepřeschl.
20. Pelet rozpuštěn v 50 µl RNA H₂O a inkubace 10 min na 55 °C, poté RNA zamrazena na -20 °C.

3.3.2.1. Měření koncentrace RNA na spektrofotometru

Měření provedeno na spektrofotometru (WPA LIGHTEAVE II) Jako slepý vzorek použita RNA H₂O a vzorky naředěny 50x (2 µl/ 48 µl RNA H₂O).

Koncentrace měřena při 260 nm.

Je-li absorbance rovna 1 při 260 nm, pak je koncentrace RNA rovna 40 µg/ ml.

3.3.2.2. Měření koncentrace RNA na gelu

1. Namíchán gel 1,25 % (Agarose I aMReSCO) rozpuštěno v 1x TAE pufru [20 ml 50x TAE naředěno v 980 ml demi. H₂O (demineralizovaná)]. 50x TAE [242 g Tris base, 57,1 ml ledové kys. Octové, 100 ml 0,5 M EDTA (ph. 8.0), doplněno do 1 l demi. H₂O].
2. Použito 1 µg celkové RNA s nanášecí barvičky (loading dye).
3. Vzorky (RNA) naneseny na gel spolu se srovnávacím markerem 1 Kbp.
4. V Elektroforéze použit pufr 1x TAE a puštěna nejdříve na 50 V na zaběhnutí a poté zesílena na 100V.

5. Po doběhnutí Elektroforézy ke gelu přidáno 8 μ l/100 ml ethidium bromidu (zásobní roztoku 10 mg/ml aMReSCO) na obarvení a zalito demi. H₂O, tak aby byl celý gel pod vodou.
6. Necháno barvit 15 min. na třepačku.
7. Voda slita a nahrazena několikrát čistou demi. H₂O a nakonec v demi. H₂O nechán gel 15 min. odbarvovat na třepačce.
8. Gel vyfocen.

3.3.3. Syntéza prvního vlákna cDNA

Potřebná koncentrace RNA na reakci 1 μ g, všechny kroky opět prováděny s pomůckami ošetřenými proti Rnázám (RNase free).

1. V epp. smícháno:
 - 3 μ l total RNA
 - 4 μ l 2,5 mM dNTP
 - 2 μ l TRIKANT primer
 - 4 μ l RNA H₂O
 - Celkem 13 μ l
2. Inkubace reakce 5 min při 65 °C
3. Inkubace na ledu 1 min
4. Přidáno:
 - 4 μ l 5x pufr na první vlákno (First Strand buffer)
 - 2 μ l 0,1 M DTT (invitrogen)
 - Celkem 19 μ l
5. Inkubace 2 min. při 50 °C.
6. Přidán 1 μ l Superscript II reversní transkriptáza (2000 U/ μ l).
7. Inkubace 60 min (lépe 90 min) při 50 °C.
8. Reakce zastavena při 15 min. na 70 °C.
9. Reakce vložena na led a k odstarnění RNA přidáno 0,3 μ l RNázy H (TaKaRa).
10. Inkubace 20 min. na 37 °C.

3.3.4. PCR (polymerázová řetězová reakce) na přípravu PCR produktu

Aby bylo možné Budoucí produkty zaklonovat do expresního vektoru, potřebného pro vnesení produktu do plasmidu, bylo potřeba, aby produkty měli tupé konce. Tupých konců dosáhneme použitím Pfx polymerázy (Platinum polymerase invitrogen). Objem PCR reakcí byl 25 μ l. Na reakce byla použita cDNA z bourec morušového z ASG a MSG a specifické primery (viz. příloha). Všechny reakce byly míchány na ledu

1. Na reakce byla nejdříve namíchána směs, do které byly později používané různé primery. Na jednu reakci byly použity následující reagenty v přesném pořadí.

5 µl	10x Pfx amplifikační pufr (amplification buffer invitrogen)
3 µl	2mM dNTP (Fermentas)
0,7 µl	10x PCR Enhancer (invitrogen)
0,5 µl	50 mM MgSO ₄ (invitrogen)
1 µl	cDNA
0,3 µl	<u>Pfx DNA polymerase 2,5 U/µl (invitrogen)</u>
Doplněna PCR H ₂ O do 23 µl	

2. Reakce byly rozpipetovány po 23 µl do PCR epp. (Eppendorf 200 µl) a bylo přidáno po 1 µl od každého ze dvou primerů (1µl Forwardový a 1 µl Reversní).
3. Reakce byly puštěny na několik programů, podle toho, jaké se použili primery (nasedací teplota) a podle délky předpokládaného produktu:

			<u>T nasedání primeru (délka elongace)</u>		
• Bm S3-1	Ser3-2fw+ (60)	+	Ser3-4rev (62,1)	62 (2min)	
• Bm S3-2	Ser3-2fw+ (60)	+	Ser3-2revS (61,3)	60 (45s)	
• Bm S3-3	Ser3-2fw+ (60)	+	Ser3-4rev (62,1)	62 (2min)	
• Bm S3-4	Ser3-2fw+ (60)	+	BMS3 rev5 (61,3)	60 (1min)	
• Bm S3-5	Ser3-4fwC (60,2)	+	Ser3-rev4 (59,2)	60 (2min)	

Na všechny reakce byla teplota víka na 99 °C a přehřátí. PCR Přístroj (XP Thermal Cycler BIOER)

- PCR na izolaci:
 - 94 °C.....2min
 - 94 °C.....15s
 - 62 °C.....45s
 - 68 °C.....3,5min
 - 68 °C.....7 min
 - 4 °C.....pauza
- Krok 2-4 opakován 34x

Teplota nasedání primerů a délka elongace měněny v závislosti na teplotě nasedání primerů a délce produktu (přibližně 1 min na 1tis. bp).

3.3.5. Elektroforéza vzorků z PCR

1. Namíchán gel 0,8 % (AGAROSE I aMReSCO), rozpuštěno v 1x TAE pufru [20 ml 50x TAE naředěno v 980 ml demi. H₂O] 50x TAE [242 g Tris base, 57,1 ml ledové kys. Octové, 100 ml 0,5 M EDTA (ph. 8.0), doplněno do 1 l demi. H₂O].
2. Ke gelu přimíchána rovnou barva SYBR Safe DNA gel stain (10 000x invitrogen) použití 1 µl/10ml gelu.
3. Použito 25 µl reakce a 5x nanášecí barvička (loading dye Fermentas)
4. Vzorky (RNA) naneseny na gel spolu se srovnávacím markerem 1 Kbp (0,1 µg/µl Fermentas).
5. V Elektroforéze použit pufr 1x TAE a puštěna nejdříve na 50 V na zaběhnutí a poté zesílena na 100V.
6. Gel rovnou vyfocen bez odbarvování.

3.3.6. Gelová extrakce

Pod UV byl gel vyříznut (co nejrychleji, aby nedošlo k poškození DNA) ostrou žiletkou. Gelový fragment byl zvážen a poté proveden postup přečištění podle kitu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

3.3.6.1. Stanovení koncentrace vyizolovaných produktů (DNA)

Použit Spektrofotometr (WPA LIGHTWAVE II). Vzorky naředěny 50x (2 µl/48 PCR H₂O). Na spektrofotometru nutno nastavit měřicí faktory:

dsDNA	50
RNA	40
ssDNA	33

Tab. 1. Měřicí faktory

Vzorky měřeny při 260/280 nm, aby se změřila jak koncentrace, tak čistota produktů (pokud 260/280 = 1,8-2,0 jde o čistý vzorek).

3.3.6.2. Příprava vzorků na sekvenaci

Sekvenace prováděna na přístroji ABI PRISM 3130xl od firmy Applied Biosystems
Analýza je založena na Sangerově metodě (Sanger a kol. 1977).

Templát naředěn v množství dle tabulky + 2,5 pmol primeru (primery použity specifické Forwardové, Reversní nebyly zapotřebí z důvodu krátkých produktů) + voda - celkový objem 7,5 µl - vše v 200 µl epp. Takto připravené vzorky byly poslány na sekvenaci.

Templát	Množství
PCR produkty:	
100-200 bp	0,5-1,5 ng
200-500 bp	1,5-5 ng
500-1000 bp	2,5-10 ng
1000-2000 bp	5-20 ng
>2000 bp	10-25 ng
ssDNA	12,5-25 ng
dsDNA	75-150 ng

Tab. 2. Ředění vzorků na sekvenační reakci

3.3.7. Ligace Produktů do Expresního vektoru

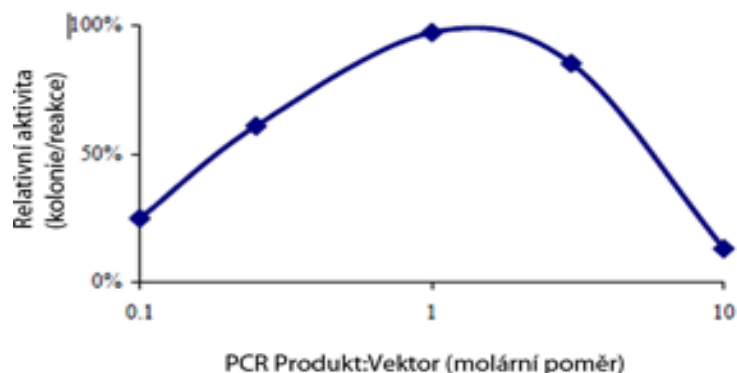
Pro ligaci použít kit: Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits Five-minute, directional TOPO® Cloning of blunt-end PCR products into vectors for high-level (in vitro), inducible expression in *E. coli* Catalog nos. K100-01, K101-01, K102-01, K151-01, K200-01.

Aby bylo možné PCR produkty zaligovat do vektoru, bylo nutné použít na izolaci DNA primery s přesahy CACC na 5' konec. Tyto konce později svou homologií nasednou na sekvenci expresního vektoru a pomocí ligázy se spojí.

Pro optimální množství templátu do reakce naředěny produkty podle:

$$\frac{\text{vektoru (ng)} \times \text{inzert (kb)} \times 2/1 (\text{vektor/inzert})}{\text{velikost vektoru (kb)}} = \text{množství produktu}$$

Produkty ředěny v molárním poměru inzert: vektor od 0,5/1 - 2/1. Velikost vektoru pET 151 je 5,8 Kb. Optimální je použít 1-5 ng 1kb PCR produktu, nebo 5-10 ng 2kb produktu pro největší množství kolonií.



Obr. 4. Průběh úspěšnosti transformovaných kolonií v závislosti na použitém poměru vektor: inzert v ligační reakci.

Ligační reakce namíchána pro elektrokompetentní buňky, zde je solný roztok naředěný:

PCR produkt.....0,5 - 4 μ l
 Solný roztok (1:4).....1 μ l
PCR H₂O.....doplněno do 5 μ l
 TOPO vektor.....1 μ l

Ligační reakce nechána přes noc (O/N) na 4 °C (pro vyšší množství zaklonovaných úseků)

3.3.8.1. Příprava Petriho misek se živným agarem

Na přípravu namíchán SELECTED AGAR (invitrogen) 15 g/l s LB BROTH, MILLER (LURIA-BERTANI) 25 g/l. Takto připravený roztok byl po částečném zchladnutí vyklávan a smíchán s antibiotiky, na která mají rezistenci buňky s vektorem:

Ampicilin (aMReSCO 100 mg/ml) - rezistence pET 151 vektoru (invitrogen)
 Tetracyklin (aMReSCO 5 mg/ml) - rezistence SURE buněk (STRATAGENE)

Takto namíchaný roztok byl nalit na Petriho misky ~ 20 ml/misku.

3.3.8.2. Příprava elektrokompetentních buněk

Zásobní roztok SURE buněk (STRATAGENE) inokulován na Petriho misku (s Ampicilinem) a kolonie nechny narůst O/N.

1. Další den byla kličkou odebrána 1 kolonie a naočkována startovací kultura do 10 ml 2XYT (900 ml demi. H₂O, 16 g Trypton, 10 g kvasnicový extrakt, 5 g

NaCl, nastavit pH na 7.0, dolít do 1l demi. H₂O a vykládat) media na 37 °C O/N na třepačku.

2. Ráno Startovací kulturou naočkován 1L 2 XYT media (předeřtáté na RT) a kultura dána třepat na 37 °C.
3. Měření optické denzity (OD), na 600 nm, kultury na spektrofotometru. Požadovaná OD je v rozmezí 0,4-0,6 (log fáze růstu). Jako slepý vzorek 2XYT.
4. Po dosažení optimálního OD buňky uloženy ihned na led a rozlity do 2x 250 ml centrifugačních nádob (vychlazených na 4 °C).
5. Centrifugace (HERMLE Z 383 K) 3500 rpm 25 min na 4 °C. Buňky uloženy na led a odstraněn supernatant (nutno pracovat velice rychle, buňky rychle vzlínají).
6. Buňky rozpuštěny v 200 ml vychlazené PCR H₂O .
7. Centrifugace 3500 rpm 25 min na 4 °C.
8. Supernatant odlit a buňky rozmíchány ve 100 ml vychlazené PCR H₂O.
9. Centrifugace 3500 rpm 25 min na 4 °C.
10. Supernatant odlit a buňky rozmíchány v 20 ml vychlazeného 10% glycerolu a přelity do 50 ml falkonek.
11. Centrifugace 3500 rpm 10 min na 4 °C.
12. Supernatant odlit a buňky rozmíchány v 0,5 ml vychlazeného 10% glycerolu.
13. Buňky umístěny na led a rozpipetovány po 45 µl do 1,5 ml epp. a ihned zamraženy v tekutém dusíku.
14. Buňky uloženy na -80 °C.

3.3.8.3. Transformace buněk

Na transformaci buněk byly použité SURE buňky připravené z chemicky kompetentních SURE 2 Supercompetent Cells (STRATAGENE) díky jejich odolnosti na nestabilní klony (v mém případě hodně repetitivně úseky). SURE 2 mají deletované a translokované úseky DNA a tak přijímají i nestabilní klony.

Před samotnou elektroporací buněk bylo třeba vychladit elektroporační kyvety, předeřtát LB medium na 37 °C a nastavit elektroporátor na 1700V (ependorf electroporator 2510).

1. Buňky SURE 2 (45 μ l) vyndané z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se nechali roztát na ledu.
2. K roztátým buňkám se přidal zaligovaný vektor, pro optimální transformaci je nejlepší přidat 10 pg/ μ l plasmidové DNA, pokud je DNA více, efektivita se snižuje. Já jsem zkoušel vždy 2 reakce s 1 a 3 μ l.
3. Po přidání DNA se směs jemně promíchala a napipetovala do kyvety.
4. Kyveta se vložila do elektroporátoru a provedla se transformace.
5. Ihned po transformaci se buňky odmyly z elektroporační kyvety předeřhřátým LB mediem (960 μ l) do 1,5 epp.
6. Buňky se nechali 1 h růst na třepačce při 225 rpm (repetition per minute) při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
7. Po hodině se buňky stočily na 3000xg (Labnet Spectarfuge 24 D) při RT na 1.5 min.
8. Odpipetováno 700 μ l od peletu buněk.
9. Buňky byly vysety na LB misky s příslušným antibiotikem (Ampicilin a Tetracyklin)
10. Buňky nechány narůst ON na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
11. Druhý den kolonie přenášeny pomocí špiček na nové LB misky (Ampicilin a Tetracyklin).

3.3.8.4. Kontrola Transformovaných buněk na PCR

Nejdříve rozpipetováno 13,5 μ l H_2O do 200 μ l epp. a špičkou odebrán kousek z kolonie buněk a rozmíchán v PCR H_2O . Poté se připravila PCR směs.

2,5	μ l	10x Dream taq buffer (Fermentas)
2	μ l	2 mM dNTP (Fermentas)
2	μ l	25 mM MgCl_2 (Fermentas)
0,2	μ l	Dream Taq DNA (Fermentas)
1	μ l	Forwardový primer T7
1	μ l	Reversní primer T7 rev

Takto namíchná směs rozpipetována do 200 μ l epp k PCR H_2O s rozpuštěným kouskem kolonie a PCR reakce byla puštěna na PCR cycler (XP Thermal Cycler BIOER) Teplota víka na předeřhřátí nastavena $99\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PCR program	95 °C.....5 min
	95 °C.....30 s
	60 °C.....30
	72 °C.....3,5 mi
	72 °C7
	4°C.....pauza
	Krok 2-4 opakován 35x

3.3.8.5. Kontrola vzorků na elektroforéze

Po doběhnutí reakce byly vzorky napipetovány na 0,8% agarózový gel a puštěna elektroforéza.

3.3.9.1. Izolace plasmidové DNA

U vybraných kolonií (určeno z předchozí PCR) nechány narůst LB (Ampicilin) inokulované kultury O/N na třepačce na 34 °C.

Další den provedena izolace plasmidové DNA pomocí kitu: PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits (invitrogen).

Jelikož je pET 151 „low copy plasmid“, izolace byla provedena z 10-15 ml LB (Ampicilin) inokulované kultury. Díky takto velkému množství buněk byly zdvojeny množství resuspenzačního pufru (R3) s RNázou A, lyzační pufru (L7) a precipitačního pufru (N3).

Na konci procedury byla DNA eluována 30-50 µl PCR H₂O nebo TE pufru (TE). Díky výskytu nerozpustných částic bylo nutno u každého vzorku opětovné stočení na centrifuze na 12000xg na 1 min na RT. Následně byl odpipetován supernatant do čisté 1,5 ml zkumavky a měřena koncentrace.

3.3.9.2. Sekvenační reakce

Sekvenační reakce byla namíchána viz. výše. Ds DNA potřebná koncentrace 75-150 ng. Jako primery použité T7 a T7 rev (u delších vzorků), specifické pro pET 151.

3.3.9.3. Příprava glycerolových stoků

Z kolonií ověřených sekvenováním byly připraveny zásobní glycerolové kultury.

Kolonie byly nechány narůst O/N v LB (Ampicilin). Druhý den ráno odebíráno 100 µl kultury a stočeno na 4000 rpm 2 min na RT. Supernatant byl slit a nahrazen 100 µl roztokem

glycerolu a LB (3:7). Buňky byly jemně rozmíchány a uloženy na -80 °C jako zásobní roztoky.

3.3.10. Exprese rekombinantních proteinů

U kladných sekvenačních reakcí z kontroly plasmidové DNA provedeno namnožení buněčných kultur pro pozdější použití. Buňky namnoženy jak na Western blot, tak na přečištění proteinu.

Pro použití buněk na izolaci proteinu bylo nejdříve nutné plasmidovou DNA vyizolovanou z buněk, a obsahující zaklonovanou sekvenci transformovat do expresních buněk (Rosetta BlueTM DE3 p Lys S kompetentní buňky Novagen) transformace stejná jako u Sure 2 buněk viz. výše pomocí elektroporátoru (Eppendorf electroporator 2510).

1. Plasmid bylo potřeba nejdříve naředit na 5-10 ng.
2. Buňky po transformaci nechány narůst 1 h na 37 °C na třepačce, poté se buňky stočily na 3000 x g na RT 1,5 min.
3. 700 µl media se odpipetovalo a 290 µl se inokulovala další kultura dále.
4. 10 µl se nanoslo na LB misku s příslušnými antibiotiky (Ampicilin a Tetracyklin) pro zjištění množství transformantů.

O/N nechalo namnožit 17 ml inokulovaných LB kultur s Rosseta buňkami (Ampicilin) na třepačce na 34 °C. Druhý den ráno 2 ml kultury přepipetovány do 25 ml LB (Ampicilin) a 15 ml do 500 ml LB (Ampicilin). Buňky dány růst na třepačku na 37 °C a pravidelně u nich kontrolována koncentrace na spektrofotometru. Po dosažení optimální OD (0.4 – 0.6) byl již postup odlišný:

1. K buňkám v 25 ml přidáno k 12,5 ml 12,5 µl IPTG (20% SERVA). IPTG slouží k aktivaci produkce proteinu v plasmidu. IPTG spustí expresi T7 RNA polymerázy z lac promotoru a tím je následně započata transkripce T7 promotoru s obsaženým genem).
 - Z neaktivovaných buněk odebrán 500 µl vzorek T0 a ztočen na 3000xg 1 min na RT. Poté byl slit supernatant a pelet zamražen na -20 °C.
 - Jak z neaktivovaných, tak z aktivovaných bylo odebíráno po 1-6 hodinách 500 µl buněk a ztočeno na 3000xg 1 min na RT. Supernatant byl odlit a pelety také zamraženy na -20 °C.
2. K buňkám z 500 ml kultury přidáno na 500 ml 500 µl IPTG (SERVA) Takto nechány růst buňky další 4 hod, kdy je jejich růst v log fázi, což bylo zjištěno z Provedených

western blotů. Po 4 hodinách buňky rozpipetovány po 50 ml do 50 ml falkonů a ztočeny na 3000 g 10 min na 4 °C. Poté slit supernatant a pelety zamraženy na -80 °C.

3.3.11. Western blot a Elektroforéza

Proveden z peletů T0-T5 z namnožených buněk.

1. Pelety rozmíchány v 500 μ l B-PER (Thermo 2 μ l Lysozyme (aMReSCO) + 1 ml B-PER) nebo v 500 μ l lysis pufru.
2. Sonikace (ULTRASONIC HOMOGENIZER, BIOLOGICS.INC.) vzorků 2 x 15 pulsů.
3. Ke vzorům přidáno 100 μ l 100% TCA na vysrážení vzorků a necháno O/N na 4 °C.
4. Centrifugace 13000 rpm 20 min na 4 °C.
5. Supernatant odpipetován a přidáno 200 μ l acetonu.
6. Centrifugace 13000 rpm 10 min na 4 °C.
7. Supernatant odpipetován a přidáno 200 μ l Acetonu.
8. Centrifugace 13000 rpm 10 min na 4 °C.
9. Supernatant odpipetován a přidáno 15 μ l 1x PBS(8 g NaCl, 0,24 g KH_2PO_4 , 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KCl doplnit do 1 litru a pH 7,4) a 5 μ l 4 x protein sample pufru.
10. Zahřát na 10 min s třepáním na termobloku na 90 °C.
11. Pokud se pelet nerozpustil byla provedena sonikace 15 impulzů a centrifugace 13 000 rpm 1 min RT.
12. Vzorky napipetovány na polyakrylamidový gel.

Příprava polyakrylamidového gelu:

1. Sestavena aparatura na gel.
2. Namíchán roztok na základní gel a napipetován.
3. Namíchán roztok na krycí gel a napipetován s vložením hřebínku.

	Základní gel 10 ml	Krycí gel 2 ml
H ₂ O	3,3	1,4
30 % Acrylamide – Bis (SERVA)	4,0	0,33
1,5 M Tris pufr (aMReSCO)	2,5	
1 M Tris pufr (aMReSCO)		0,25
10 % SDS()	0,1	0,02
10 % APS ()	0,1	0,02
TEMED (aMReSCO)	0,004	0,002

Tab. 3. Příprava polyakrilamidového gelu

1. Vzorky (20 µl napipetovány do jamek a jako marker použit Page Ruler Plus Prest. (Fermentas) 5 µl.
2. Jako pufr použit do Elektroforézy Running pufr 1 x (Tris base 3,02 g, glycin 18,8 g, 20 % SDS 5 ml a celé rozpustil vjednom litru demi. H₂O).
3. Puštěno nejdříve na zatáhnutí vzorků na 75 V a poté na 100V přibližně na 2 hodiny.
 - Pokud se nedělal Western blot, gely 15 min. fixovány ve Fixačním roztoku (450 ml H₂O, 450 ml methanol, 100 ml kys. octová) na třepačce, obarveny Comasee blue přibližně jednu hodinu, či déle. Nakonec odbarveny H₂O nebo fixačním roztokem. Nakonec gely vyfoceny.
 - Western blot
1. Poskládán sendvič s gelem z elektroforézy, který byl 10 až 15 min. promýván v 1 x blotovacím roztoku (10 x 144,1 g glycin, 30, 3 g Tris base rozpustit v 1 l demi. H₂O 1x 200 ml mathanol, 100 ml 10 x blotovací roztok a 700 ml demi. H₂O) na třepačce:

Sendvič: Černá destička, Houbička, 2 filtrační papíry, Gel, Membrána, 2 filtrační papíry, Houbička, Červená destička

Houbičky a filtrační papíry namočený do 1 x blotovacího roztoku, membrána namočena 10 s v methanolu, opláchnuta a namočena do 1 x blotovací roztoku. Sendvič byl sestaven a puštěn v 1x blotovacím roztoku v Elektroforéze na 100V 1 hod.. Elektroforéza se chladí na ledu.

Následující postup se provádí celý na ledu a třepačce.

2. Po doběhnutí se membrána promyla 15 min. v 1 x PBS na třepačce.
3. Vložena do blokovacího roztoku (2g Skim Milk, DifcoTM, ředěno ve 40 ml 1x PBS) O/N.
4. Membrána přelita na 2 hod. primární protilátkou (Monoklonal Anti- polyHistidine antibody produced in mouse SIGMA, ředěno 1:2000 v blokovacím pufru).
5. 3x promytí 1x PBS + 0,1% Tween na ¼ hod.
6. Membrána přelita na 1-1,5 hod sekundární protilátkou (Stabilized Goat Anti-Mouse IgG, (H+L), Peroxidase Conjugated Thermo, ředěno 1:5000).
7. 3x promytí 1x PBS + 0,1% Tween na ¼ hod.
8. Membrána vložena do fólie, obarvena na 5 min. v (ECL Western Blotting Substrate Thermo) a za nepřístupu světla.
9. Membrána vyfocena, poté byla obarvena Poncean S a odbarvena H₂O a opět vyfocena.

3.3.12.1. Čištění proteinu

Provedeno podle kitu Ni-NTA systém (Ni-NTA Purification System invitrogen) za nativních podmínek a bez použití imidazolu v Native Binding pufru. Pročištěné byly pelety z 500 ml buněčných kultur, ke kterým se po sonikaci přidalo PMSF (inhibitor serinových proteáz, aMReSCO) v koncentraci 0,5 mM.

3.3.12.2. Elektroforéza vzorků z purifikace

Provedena pomocí Polyakrylamidového gelu.

3.3.12.3. Měření koncentrace

Provedeno pomocí kitu (Thermo BCATM Protein Assay Kit).

3.3.13. Dialýza pročištěných proteinů

Přečištěno 200 µl proteinů pomocí kitu (GE Healthcare Mini Dialysis Kit 8 kDa cut-off) proti 1x PBS O/N na 4 °C.

3.3.14. Lyofilizace

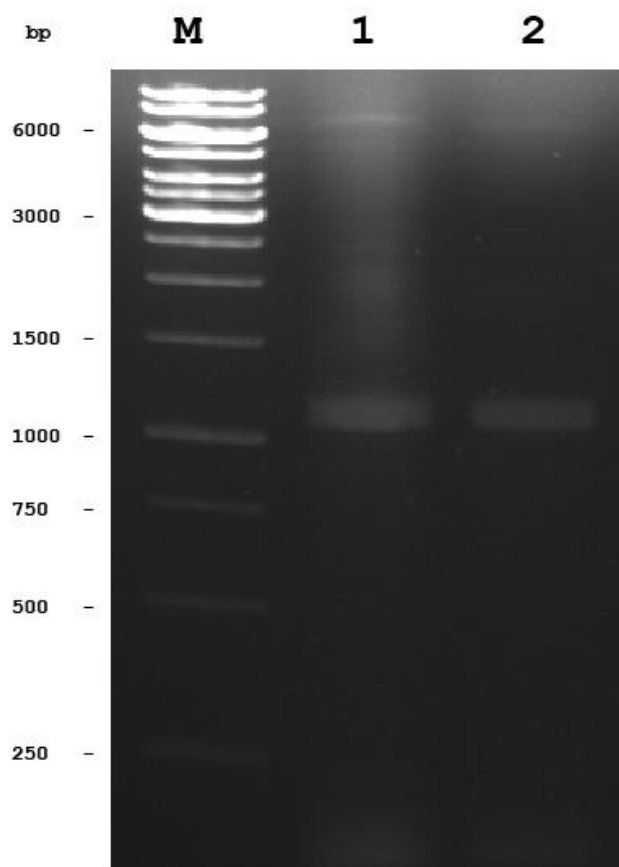
Zlyofilizovány vzorky jak dialyzované, tak i přečištěné pomocí přístroje: ALPHA 1-2 LD plus CHRIST.

Vzorky skladovány na -20 °C

4. Výsledky

4.1 Získání RNA a cDNA

RNA byla vyizolována ze snovacích žláz posledního larválního instaru bource morušového a následně pomocí reverzní transkripce přeložena do cDNA. Kontrola byla provedena na agarózovém gelu (1,25%) a na spektrofotometru. Ve výsledném roztoku byla RNA v koncentraci A. 493 ng/μl, B. 722 ng/μl.



Obr. 5. Ověření celkové RNA larev *Bombyx mori*

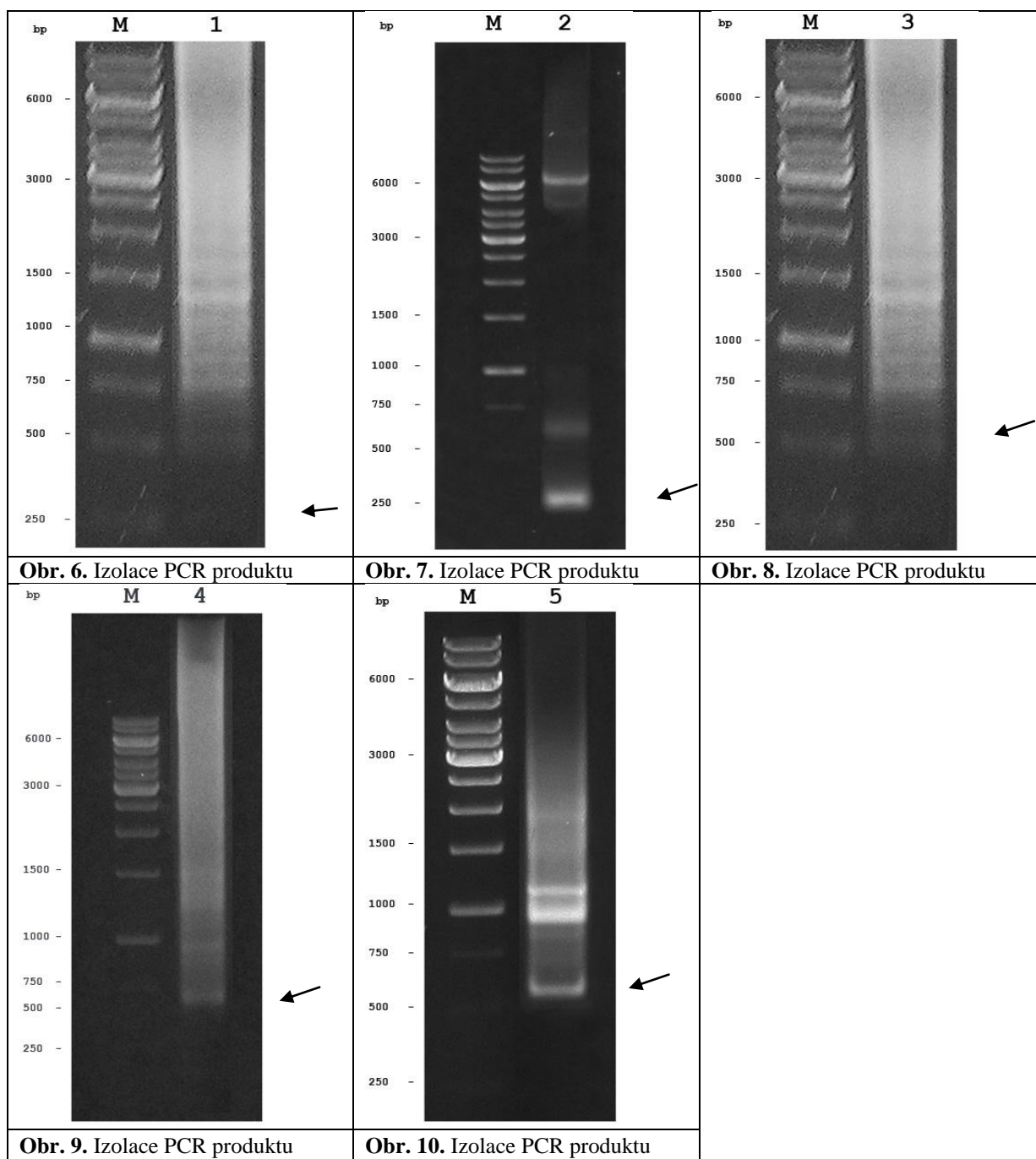
M - marker 1Kbp, 1 a 2 – RNA: 1 - 493 ng/ μl, 2 - 722 ng/μl

Na Obr. 5. jsou znatelné dva proužky o velikosti přibližně 1000 bp.a dva o velikosti 7000 bp.

4.2. Izolace zájmových oblastí Sericinu 3

Pomocí specifických primerů (viz oddíl Metody a příloha) použitých na PCR, jsme zmnožily vybrané části genu *Sericin 3*. Jako templát sloužilo cDNA z larev posledního instaru bource. Získané produkty jsem označil zkratkami druhu hmyzu, genu a pořadovými čísly x fragmentu cDNA: Bm Ser3-x. Amplifikace pěti fragmentů cDNA byla prokázána

elektroforetickou analýzou produktů PCR (obr. 6-10). Fragmenty pro expresi byly vybrány tak, aby obsahovaly aspoň jeden repetitivní úsek (viz níže).



Obr 6-10 Izolace PCR produktů z gelu. M – Marker 1 Kbp, 1 – Bm Ser 3-1, 2 – Bm Ser 3-2, 3 – Bm Ser 3-3, 4 – Bm Ser 3-4, 5 – Bm Ser 3-5. Na PCR použity primery viz Příloha

U produktů Bm Ser3-1 – Bm Ser3-5 se kromě očekávaných produktů objevilo i několik dalších, z nichž bylo často obtížné vyizolovat ty správné. Úseky byly vyizolovány rovnou pomocí Pfx polymerázy a tak odpadl krok reamplifikace.

Vyizolované produkty ověřené sekvenační reakcí pomocí specifických primerů viz metody.

Obrázek a vyizolovaný produkt	Délka produktu (bp)	Umístění produktu v sericinu 3
Obr 6. Bm Ser 3-1	267	2779-3045
Obr 7. Bm Ser 3-2	279	2521-2799
Obr 8. Bm Ser 3-3	525	2521-3045
Obr 9. Bm Ser 3-4	672	2521-3192
Obr 10. Bm Ser 3-5	528	3028-3555

Tab. 4. PCR produkty a jejich umístění v genu a délky

4.3. Ligace a transformace

K izolaci fragmentů genu *Ser3* byly primery prodlouženy o CACC konce a s jejich pomocí byly produkty také následně zaklonovány do expresního vektoru PET 151 (Invitrogen). Vektor s úseky sericinu 3 byl zaklonován do Sure II elektrokompetentních buněk

Všechny zaklonované úseky Bm S3 kódují hydrofilní proteiny se značným antigením indexem. Proteiny obsahují příslušnou oblast proteinu Sericin 3 a hexahistidinovou kotvičku, nutnou k důkazu exprese rekombinantního proteinu pomocí protilátky proti histidinu. Celková velikost proteinů je tedy

protein	Bm S3-1	BM S3-2	BmS3-3	BMS3-4	BmS3-5
Velikost (Da)	15 345	13 353	23 602	25 834	23 026

Tab. 5. Velikosti rekombinantních proteinů

Aminokyselinové složení zaklonovaných produktů Bm S3

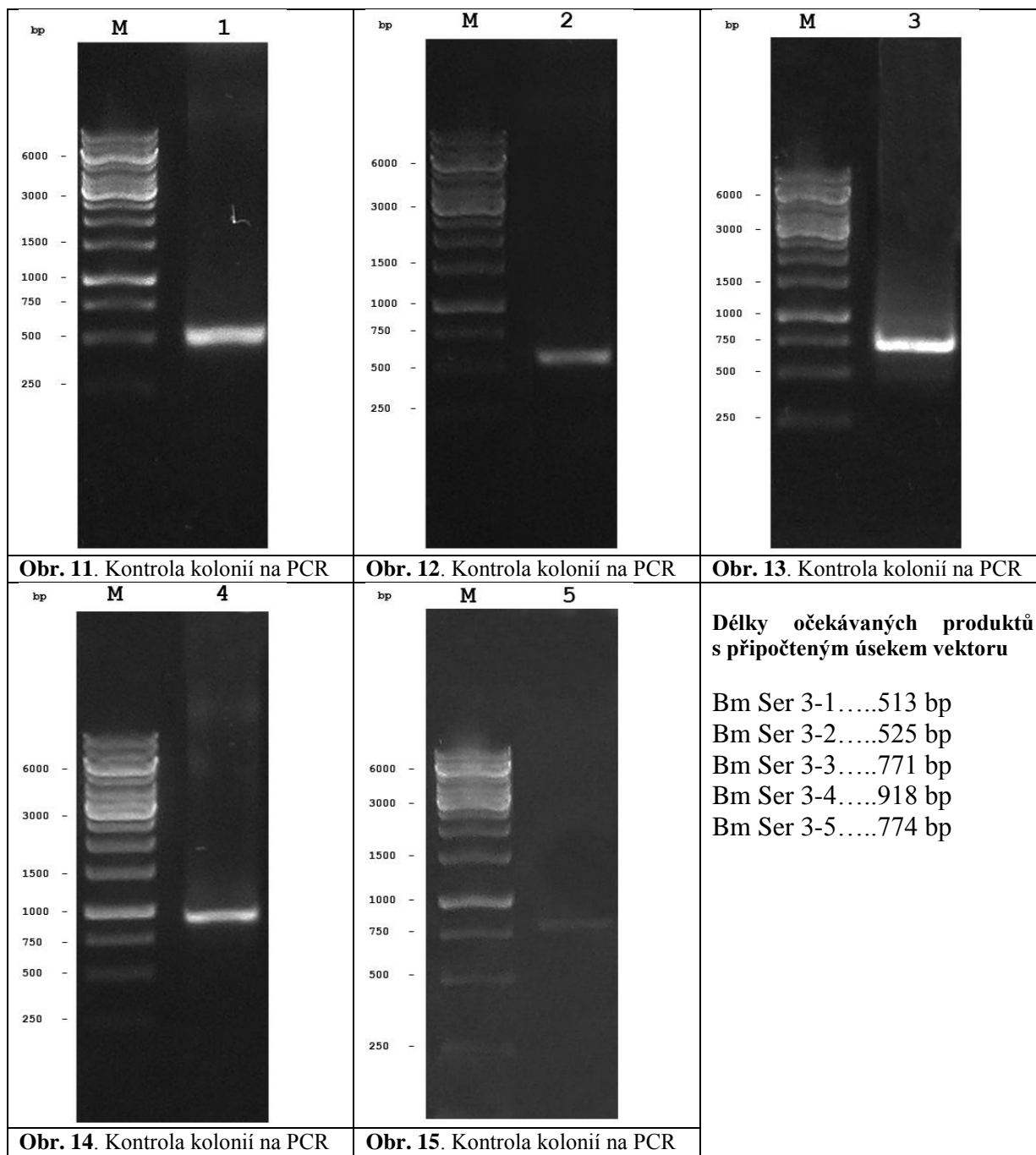
Zaklonovaný produkt	Počet aminokyselin	Početnost hlavních aminokyselin
Bm S3-1	89	Asn (N) 7, Asp (D) 7, Gly (G) 7, Lys (K) 9, Ser (S) 45
Bm S3-2	93	Asn (N) 7, Asp (D) 5, Gly (G) 13, Lys (K) 8, Ser (S) 46
Bm S3-3	175	Asn (N) 14, Asp (D) 13, Gly (G) 20, Lys (K) 16, Ser (S) 85
Bm S3-4	224	Asn (N) 16, Gln (Q) 16, Gly (G) 20, Lys (K) 20, Ser (S) 107
Bm S3-5	176	Ala (A) 19, Arg (R) 10, Gln (Q) 39, Lys (K) 13, Ser (S) 80

Tab. 6. Rekombinantní proteiny a jejich složení

4.4. Kontrola transformovaných kolonií

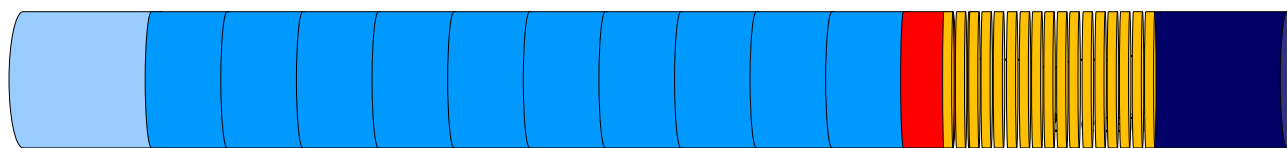
Kontrola byla provedena pomocí PCR a primerů T7 a T7 rev specifických pro expresní vektor pET 151. Všech pět PCR produktů se podařilo zaklonovat. Inzerty v plasmided byly

později ověřené i sekvenční reakcemi (viz příloha). U Bm Ser3-3 se nachází kromě očekávané délky produktu ještě jeden slabší o velikosti asi 500 bp. Všechny produkty jsou o 246 bp delší, než vlastní fragmenty genu Ser3, protože byly z expresního vektoru PET 151 v důsledku použitých primerů amplifikovány i přilehlé oblasti DNA.



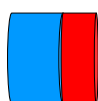
Obr 11-15 Kontrola zaligovaných produktů do PET 151 expresního vektoru a zaklonovaných produktů do Sure 2 elektrokompetentních buněk.

M- marker 1 Kbp, **1**-Bm Ser 3-1, **2** – Bm Ser 3-2, **3** – Bm Ser 3-3, **4** – Bm Ser 3-4, **5** – Bm Ser 3-5. Na PCR použity primery T7 a T7 rev viz příloha



Obr. 16. Rozdělení sericinu 3 podle Takasu a kol. (2007).

Sericin je složen ze tří nerepetitivních oblastí (označené barvami světle modrá na 5'konci, červená oddělující dvě repetitivní oblasti a tmavo modrá na 3'konci) a dvou repetitivních, z nichž první obsahuje 10 a druhá 18 opakovacích úseků.



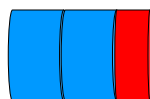
Bm S3-1

SKSSSSSQGKSASSSSSNEKSSQSSSNSSNNSKSSSQSSSSKNSSGSKGSGSS
ESGDKKSSSRGSSGDNSDDDOTDSARSNSKRSTSSD



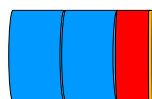
Bm S3-2

SKSSSSSQGKSASSSSSDEKSSQSNSSNNSKSSSQSSSSKNSSGSKGSGSE
ESSNGGSGSGRTGSAGGTDEDSDDSSGATKGNSSKSSSSS



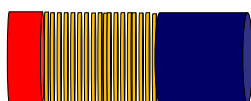
Bm S3-3

SKSSSSSQGKSASSSSSDEKSSQSNSSNNSKSSSQSSSSKNSSGSKGSGSE
ESSNGGSGSGRTGSAGGTDEDSDDSSGATKGNSSKSSSSSQGKSASSSSSDEK
SSQSNSSNNSKSSSQSSSSKNSSGSKGSGSSESGDKKSSSRGSSGDNSDD
QTDSARSNSKRSTSSD



Bm S3-4

SKSSSSSQGKSASSSSSDEKSSQSNSSNNSKSSSQSSSSKNSSGSKGSGSE
ESSNGGSGSGRTGSAGGTDEDSDDSSGATKGNSSKSSSSSQGKSASS
SSSNEKSSQSSSNSSNNSKSSSQSSSSKNSSGSKGSGSSESGDKKSSSRGSSG
DNSDDQTDARSNSKRSTSSDASTKKSSSRKSSNHRSSRSQQAHS
SSKQAQSSSSQQAQNSRSQQAHS



Bm S3-5

RSTSSDASTKKSSSRKSSNHRSSRSQQAHS
SSRSQQAHS
SSKQAQSSSSKQAQSSSSKQAQSSSSKQAQSSSSKQAQSSSSQQAQSSRSQ
QAHSRSQQAHS
SSKQAQSSSSKQAQSSSSKQAQSSSSKQAQSSSSKQAQSSSSQQAQSS
RSQQAHS
RSRSETDSKSS

Obr. 17. Studované úseky sericinu 3.

Schématicky je znázorněn příslušný úsek genu *Ser3* a vedle je v jednopísmenném kódu aminokyselin uvedena sekvence příslušného peptidického řetězce.

4.5. Analýza rekombinantních proteinů

Western blot byl proveden na O/N kulturách transformovaných buněk Rosetta Blue DE3 p-Lys, z kterých bylo odebráno 500 µl kultury, sonikováno a přesráženo pomocí TCA. Výsledky potvrdily, že všechny proteiny byly správně zaklonované. Produkce proteinů se měnila s časem (Obr. 18-22):

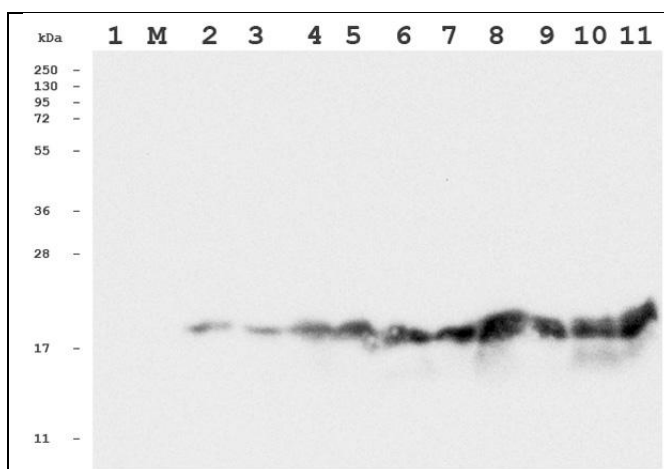
Bm S3- 1 znatelný nárůst produktu až do páté hodiny, kde růst stagnuje. Rozdíl indukovaných a neindukovaných buněk není téměř patrný

Bm S3-2. Je patrné, že produkt u indukovaných vzorků narůstá postupně do paté hodiny. Neindukovaný je v první hodině silnější než u indukovaný, v druhé hodině je slabší a ve třetí již protein není patrný.

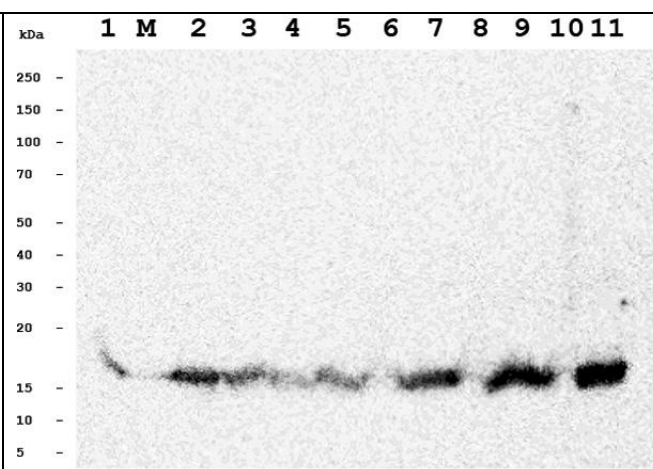
Bm S3-3, Velmi nepatrný nárůst produktu do třetí hodiny, poté produkt značně ubývá. Indukované vzorky mají horší nárůst než neindukované

Bm S3-4 V jamce číslo 3 chybí proužek T1I vzorku. Produkt roste do druhé hodiny, poté se ztrácí a vzrůsta opět čtvrtou a pátou hodinu. Rozdíl v indukovaných a neindukovaných vzorcích je u čtvrté a páté hodiny. Ve čtvrté narůstá indukovaný vzorek a v páté neindukovaný

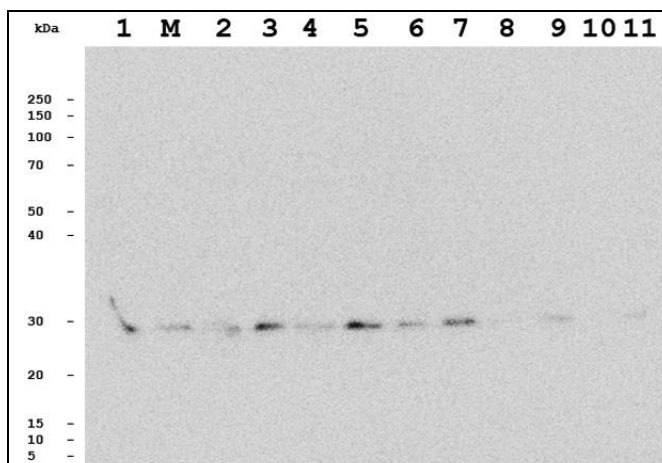
Bm S3-5 Od druhé hodiny produkty indukovaných a neindukovaných vzorku splývají. Produkt narůstá do páté hodiny. Narůstá stejně u indukovaných i neindukovaných kolonií. Vyskytuje se více různě velkých proteinů.



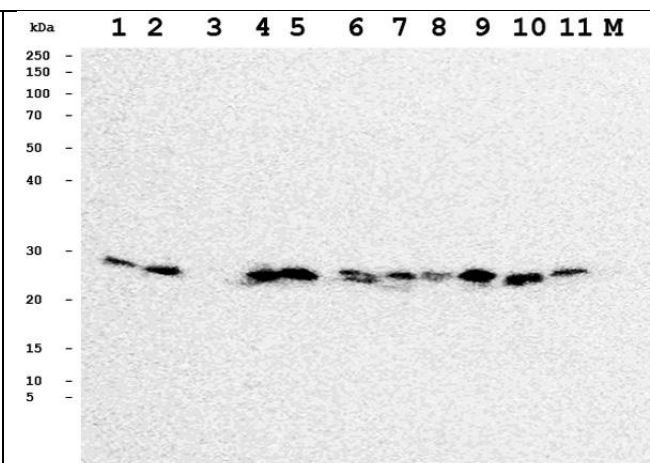
Obr 18. Bm S3-1 M- marker, 1-T0, 2- T1I, 3- T1, 4- T2I, 5- T2, 6- T3I, 7- T3, 8- T4I, 9- T4, 10- T5I, 11- T5



Obr 19. Bm S3-2 M- marker, 1-T0, 2-T1, 3-T1I, 4-T2, 5-T2, 6-T3, 7- T3I, 8-T4, 9- T4I, 10-T5, 11-T5I



Obr. 20. Bm S3-3 M- marker, 1-T0, 2- T1I, 3- T1, 4- T2I, 5-T2, 6- T3I, 7- T3, 8- T4I, 9- T4, 10- T5I, 11- T5



Obr. Bm S3 -4 M- marker, 1-T0, 2-T1, 3-T1I, 4-T2, 5-T2I, 6-T3, 7- T3I, 8-T4, 9- T4I, 10-T5, 11-T5I



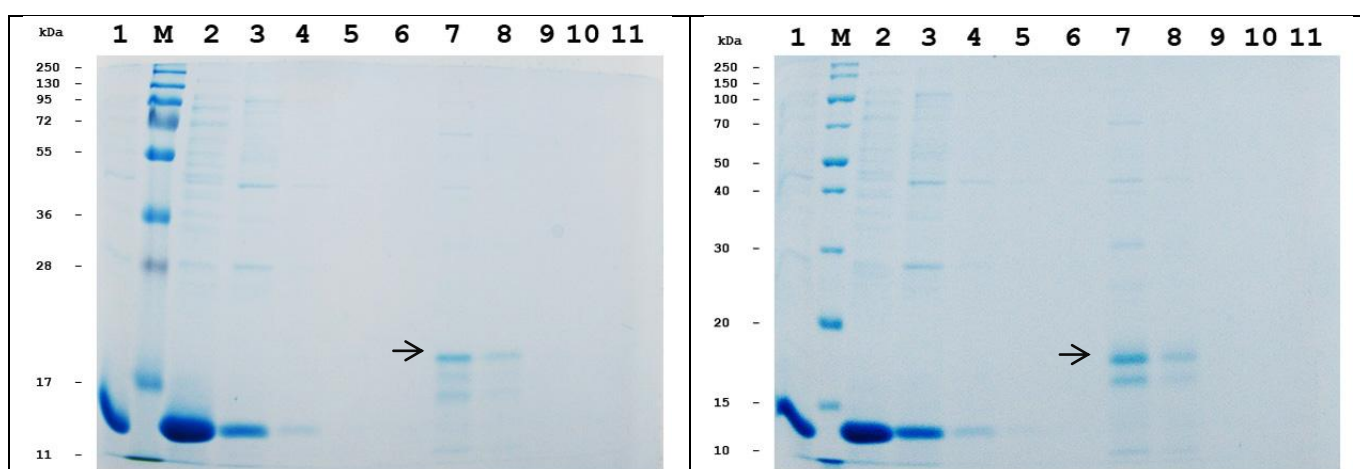
Obr. 22. Bm S3-5 M- marker, 1-T0, 2- T1I, 3- T1, 4- T2I, 5-T2, 6- T3I, 7- T3, 8- T4I, 9- T4, 10- T5I, 11- T5

Obr 18-22 Kontrola exprese zaklonovaných částí genu Ser 3 v buňkách Rozeta p-lys

I- po indukci pomocí IPTG po dosažení optimálního OD 04-06. Vzorky byly odebírány po 1 hodině po dobu pěti hodin, analyzovány pomocí PAGE, přeneseny na membránu a přítomnost hexahistidinu detekována imunochemicky (Western blot). Velikost reagujících produktů odpovídá očekávané velikosti rekombinantních proteinů.

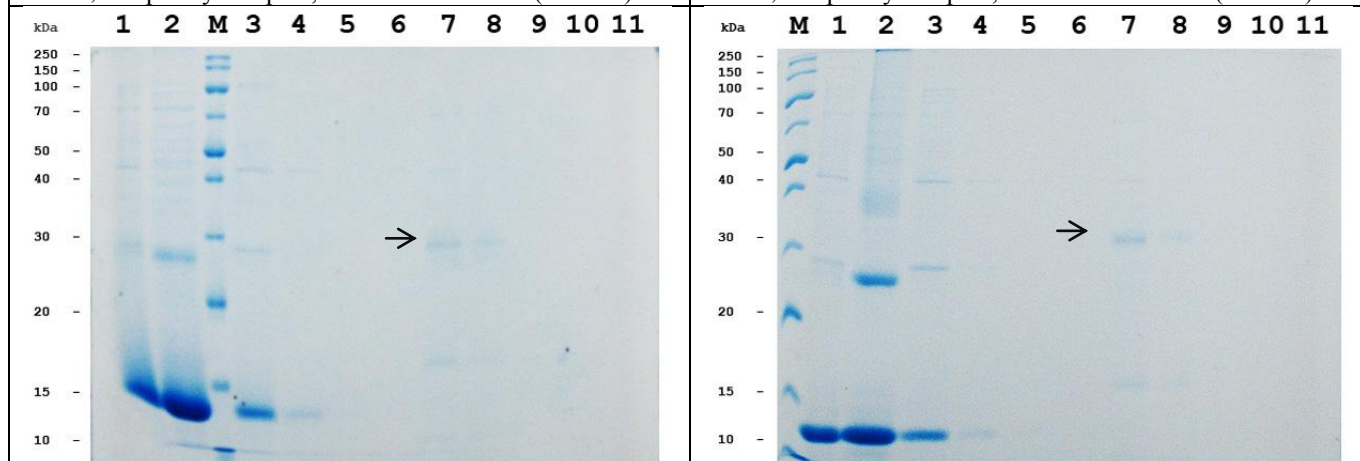
4.6. Čištění proteinů pomocí afinitní chromatografie

Bm S 3-1 – Bm S3-5 mají slabší proužek Lyzátové frakce, díky použití 5 μ l vzorku, na rozdíl od 15 μ l použitých v dalších reakcích. Tudíž Nenavázaná frakce má silnější proužek. Promývací frakce jsou nejsilnější v prvním (ze 4) promytí a v druhém jsou již slabší. Třetí promývací frakce není již patrná (došlo k odmytí nesvázané frakce). Eluční jsou nejsilnější v prvním mililitru elučního pufru, kdy se uvolnilo největší množství proteinů (vázaných na Ni-nTA partikulích). Druhá mililitrová frakce je již slabší a třetí není patrná. Protein se vyeluoval převážně v prvním a druhém mililitru elučního pufru (Obr. 23.-27.).



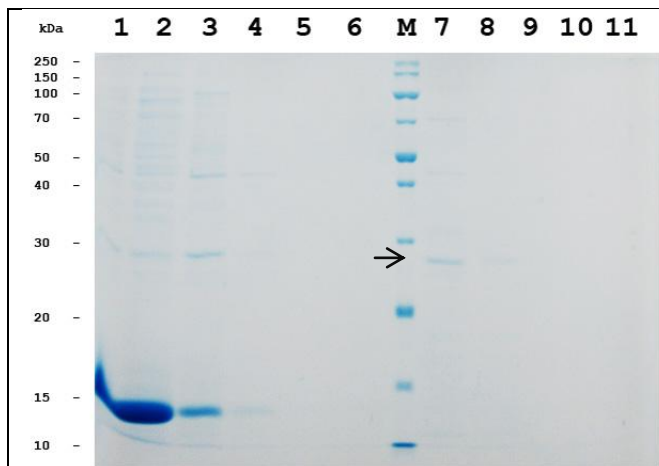
Obr. 23. Bm S3-1 M- marker, 1- lyzát, 2- Nenavázaná frakce, 3-6 promývací pufr, 7-11- eluční frakce (1x 5 ml)

Obr. 24. Bm S3-2 M- marker, 1- lyzát, 2- Nenavázaná frakce, 3-6 promývací pufr, 7-11- eluční frakce (1x 5 ml)



Obr. 25. Bm S3-3 M- marker, 1- lyzát, 2- Nenavázaná frakce, 3-6 promývací pufr, 7-11- eluční frakce (1x 5 ml)

Obr. 26. Bm S3-4 M- marker, 1- lyzát, 2- Nenavázaná frakce, 3-6 promývací pufr, 7-11- eluční frakce (1x5 ml)



Obr. 27. Bm S3-2 M- marker, 1- lyzát, 2- Nenavázaná frakce, 3-6 promývací puf, 7-11- eluční frakce (1x 5 ml)

Obr 23-27 Přečištění vyizolovaných proteinů přes Ni-NTA kolonku. Lyzát získaný z 500 μ l buněčných kultur (OD 0.5), **Nenavázaná frakce** je frakce proteklá přes kolonku, obsahující proteiny bez histidinové kotvičky, které se nenavázaly, Promývací puf (4x 8ml) slouží k odmytí zbylé nenavázané frakce na gelové partikule kolonky, **Eluční frakce** uvolňuje navázaný produkt z gelových partikulí. Eluční frakce (po 1ml)

Obr. 23. Bm S3-1 obsahuje proteiny o velikostech 70, 45, 18, 17, 16 a 12 Kda. Předpokládaný produkt je o velikosti 15345 Da.

Obr. 24. Bm S3-2 obsahuje proteiny o velikostech 70, 45, 32, 27, 17, 16, 12 a 5 Kda. Předpokládaný produkt je o délce 13352 Da.

Obr. 25. Bm S3-3 obsahuje proteiny o velikostech 70, 45, 29, 17 a 12 Kda. Předpokládaný produkt je o velikosti 23601 Da.

Obr. 26. Bm S3-4 obsahuje proteiny o velikostech 70, 45, 32, 16, 5 Kda. Předpokládaný produkt o velikosti 25833 Da.

Obr. 27. Bm S3-5 obsahuje proteiny o velikostech 70, 45, 28, 18, 12 Kda. Předpokládaný produkt o velikosti 23025 Da.

4.7. Přečištění rekombinantních proteinů dialýzou

Vzorky byly přečištěny proti 1x PBS. Na obrázcích je patrná vzrůstající koncentrace BSA standardů. U vzorků proteinů byly dialyzovány první mililitrové eluční frakce (a. chromatografie). Je patrné, že koncentrace vzorků před a po se významně neliší.

U všech proteinů je koncentrace před a po dialýze opticky stejná. Koncentrace Bm S3-5 a Bm S3-1 jsou stejné pod 0,5%. Bm S3-2 odpovídá přibližně 0,5%. Bm S3-4 a Bm S3-3 mají produkty velmi slabé. Po dialýze jsou viditelné opět další proteiny, uvedené výše. Koncentrace vzorků proteinů před dialýzou.

Koncentrace proteinů po přečištění přes Ni-NTA kolonku provedeno pomocí kitu:

Thermo BCATM Protein Assay Kit

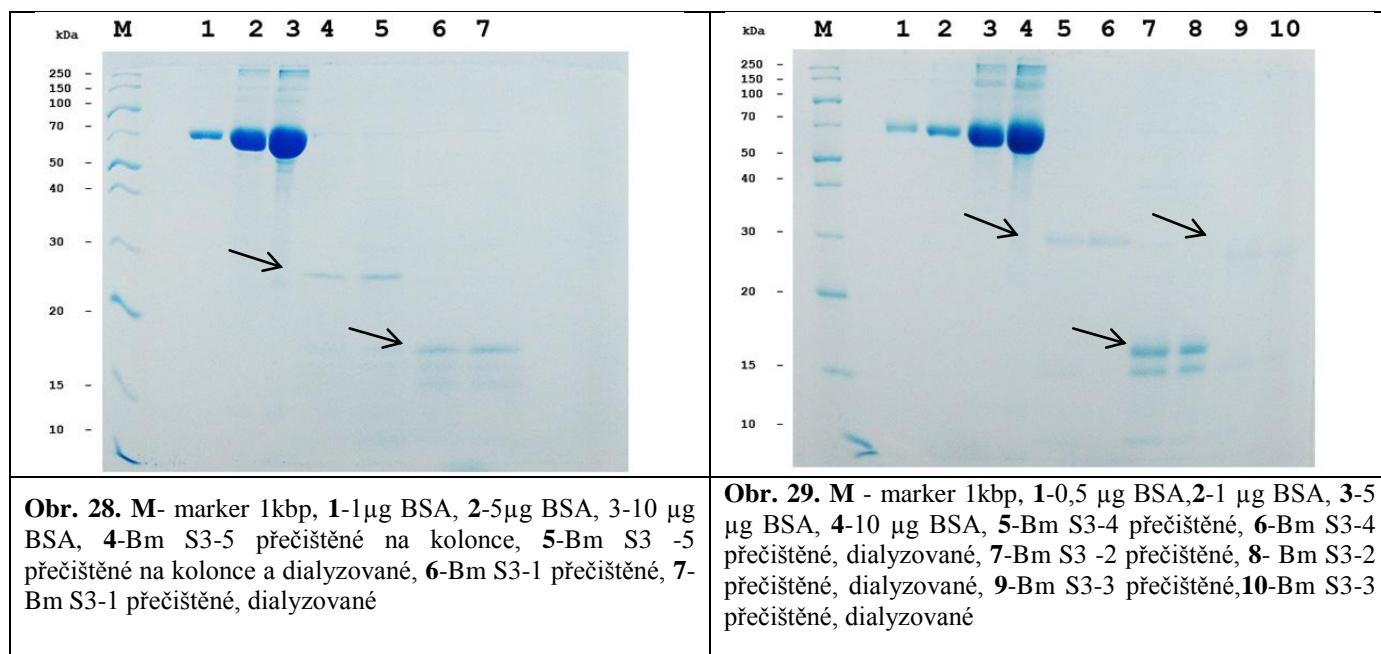
Koncentrace Bm S3-1 – 0,151 $\mu\text{g/ml}$

Bm S3-2 – 0,256 $\mu\text{g/ml}$

Bm S3-3 – 0,078 $\mu\text{g/ml}$

Bm S3-4 – 0,083 $\mu\text{g/ml}$

Bm S3-5 – 0,116 $\mu\text{g/ml}$



Obr. 28. a 29. Přečištění proteinů dialýzou

BSA – standard na určení koncentrace vzorků, Přečištěné – přečištěné vzorky na Ni-NTA kolonce, Dialyzované – přečištěné vzorky na Ni-nTa Kolonce + dialyzované přes: 8kDa dialyzační kolonky proti 1x PBS.

5. Diskuze

5.1. Důvod pokusu

Cílem mé práce bylo pokusit se zaklonovat vybrané úseky genu Sericin 3 z bource morušového (*Bombyx mori*) a získat příslušné rekombinantní proteiny. Tento gen, který byl identifikován teprve nedávno (Mita a kol. 2004), byl pro mou práci vybrán na základě specifických repetitivních sekvencí v kódovaném proteinu. Mita a kol. identifikovali Sericin 3 v databázi (<http://kaikoblast.dna.affrc.go.jp/>) na základě vysokého obsahu serinu. Ze sericinové frakce hedvábí byl izolován a částečně osekvenován protein označený písmenem A. Sekvence aminokyselin odpovídala nukleotidové sekvenci předpokládaného sericinového genu z databáze. Následná práce vedla k úplné identifikaci genu a ke zjištění časové a tkáňové specifity jeho exprese (Takasu a kol. 2007). Sericin 3 obsahuje dvě dlouhé repetitivní sekvence, které mohou souviset s lepkavou funkcí dobře známou u sericinů. Sericin 3 musí být obzvláště lepkavý, protože je produkován na samém začátku předení, kdy je třeba základ kokonu pevně upevnit k podkladu (větvičky apod.). Pro mou práci byl gen vybrán zejména proto, aby se zjistil jeho případný význam v biomedicíně uplatnění sericinů. Směsi sericinů jsou prodávány jako přísady do médií pro tkáňové kultury, ale neví se, která část sericinů je za příznivé působení sericinů na růst buněk odpovědná (Terada a kol. 2002). Cílem těchto studií je najít náhradu za bovinní séra, která se do kultur řady buněk musí přidávat. Většina dosavadních prací zkoumala buď směs sericinů a nebo fragmenty Sericinu 1.

Masakazu Takahashi a kol. (2005) zkoumali vliv částí sericinu 1 na růst Sf9 hmyzích buněk. Z jejich výsledků je patrné, že přidáním části sericinu 1, obsahující Tyr, nebo Trp se výrazně prodlouží vitalita buněk v mediu bez sera. Stále však z jejich pokusů vyplývá, že to nemusí být vše, co podporuje růst buněk, neboť životaschopnost buněk s přidáním části sericinu 1, obsahující Tyr nebo Trp, byla třetí den 31%. U buněk s přísadou sericinového hydrolyzátu bez sera byla 62% třetí den. Obecně se předpokládá, že obsah hydrofilních aminokyselin Ser a Thr zlepšuje životaschopnost buněk. Produkty ze sericinu bez Tyr a Trp, ale s obsahem Ser a Thr však nezlepšily životaschopnost buněk. I přes to, že mnou zkoumané produkty Sericinu 3 Tyr a Trp neobsahují, mohla by se zde nalézat jiná aminokyselina v optimální koncentraci. Sericiny by mohly také napomáhat přichycení buněk v kultuře k podkladu (Minomura a kol. 1995), jak bylo vyzkoušeno u myších fibroblastů. Důvodů pro potenciální budoucí využití je více. V neposlední řadě byl sericin 3 vybrán proto, že je pořád ještě dost neznámý a nikdo se ho nesnažil ještě zaklonovat a více testovat.

5.2. Od izolace PCR produktu po transformaci

Nejdříve jsem se snažil izolovat a zaklonovat celý sericin 3, dlouhý 3816 bází a kódující 1271 aminokyselin. Při použití klasické polymerázy (Taq Ferment) na izolaci produktu z cDNA z ASG a MSG byly produkty (proužky na gelu po elektroforéze) méně specifické, proto jsem použil Platinum polymerázu (Invitrogen). Proužky s touto polymerázou byly mnohem silnější než s použitím Taq polymerázy. S použitím Platinum polymerázy odpadla nutnost klonovat produkty do klasického vektoru a mohl jsem je zaklonovat přímo do expresního (PET 151 invitrogen). Klonování produktů s Taq polymerázou do vektoru p gem-TEAsy (Promega) a poté do One Shot Top 10 chemicky kompetentních buněk (Invitrogen) a XL 1 Blue chemicky kompetentních buněk (Stratagene) nebylo úspěšné. Na první pohled kolonie buněk s modro-bílou selekcí (kolonie s inzertem jsou bílé, jelikož mají přerušeny gen pro galaktosidázu, která štěpí galaktózu a po přidání X-Gal k buňkám (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) vznikají modré kolonie. Kolonie s přerušeným genem pro galaktosidázu nejsou schopny štěpit produkt a jsou bílé) vypadali jako ve velké míře pozitivní na inzert. Na misce vyrostlo hodně bílých kolonií. Jak se ukázalo na kontrolních PCR buňky a sekvenačních reakcích buňky měli zkrácený produkt, prázdné vektory (p gem-T Easy vektor Promega), nebo dokonce obsahovali vektory dva. Špatné výsledky mohou mít hned několik důvodů.

Inzerty mají velký podíl repetice, což způsobuje těžkosti při klonování (Jitka Sulitková magisterská práce). Sulitková J. se pokoušela zaklonovat gen MG-1 z *G. mellonella* do bakterií. Gen MG-1 obsahuje také velký podíl repetitivních sekvencí. Takto velký gen se tedy nepodařilo zaklonovat a musel být zkrácen na velikost těsně pod 600 bp. Tento produkt se již podařilo zaklonovat do Sure 2 buněk. V mé práci se mi nakonec podařilo zaklonovat pět úseků genu ser 3 o následujících velikostech:

Bm S3-1	- 267 bp
Bm S3-2	- 279 bp
Bm S3-3	- 525 bp
Bm S3-4	- 672 bp
Bm S3-5	- 528 bp

Důvody potíží při klonování s použitím Taq polymerázy lze těžko objasnit. Možná jsem používal špatné koncentrace produktu na ligační a klonovací reakci. Jak polymeráza, tak vektor, či buňky mohly mít problémy s repetitivními sekvencemi, které mohou vzájemně rekombinovat. Potíže s klonováním se mi podařilo vyřešit použitím Platinum polymerázy, zaligováním produktu do pET 151 expresního vektoru a poté do Sure 2 buněk (Stop

Unwanted Rearrangement Event buňky od firmy Stratagene). Tyto buňky umožňují klonování DNA s repetitivními. Jedná se o E. coli buňky s mutací v genu účastnícího se rekombinací, která při klonování velmi často pozměnění původní DNA delecemi a dalšími přestavbami. Proto se využívá E. coli Sure 2 pro repetitivní inzerty. Zmíněné zkrácení inzertu mohlo být právě způsobeno nevhodně zvoleným kmenem E. coli.

PCR produkty o výše uvedených délkách byly úspěšně vyizolovány a následně také osekvenovány. Sekvenování proběhlo úspěšně a tak jsem mohl produkty zaklonovat. Velmi důležité bylo ligovat produkty do vektoru (pET 151) ve správných koncentracích (viz část Metody). Nesprávné koncentrace nejspíše neumožnily ligaci – koncentrace ligovaného produktu byla nutná ke klonování. Proto jsem vždy vyzkoušel více koncentrací, aby se neplýtvalo se zaligovaným produktem. Ligační reakci jsem nechával přes noc na 4 stupních celsia pro zvýšení úspěšnosti ligování. Klony a před tím i izolované produkty z DNA jsem nechal osekvenovat. Čtyři produkty obsahovaly správný produkt, avšak Bm S3-3 místo sekvece a. NEKSSQSSSN obsahuje sekvenci b. DEKSSQSNSN, která je unikátní, protože obsahuje N místo D. Ve zbytku repetice je D, S místo N ve dvou opakováních. Jelikož se D a N vyskytují i v dalších opakováních pokusil jsem se zaklonovat takto pozměněný produkt. Zaklonované produkty mají antigenní index, který by umožnil přípravu protilátek. Produkty jsou velice dobře rozpustné ve vodě, což je dobré pro potencionální přípravu medií. Produkty Bm S3-1-3 mají přibližně padesátiprocentní obsah serinu a je zde velké zastoupení Asn, Asp, Gly a Lys, což je typické pro první skupinu repetice. Bm S3-5 obsahuje kolem padesáti procent serinu a Ala, Arg, Gln, a Lys, což odpovídá druhému typu repetice. Protein Bm S3-4 je kombinací obou repetitivních skupin a obsahuje kolem padesáti procent serinu a Asn, Gln Gly a Lys.

5.3. Western Blot

Plasmidy jsem zaklonoval do Roseta Blue DE3 p-LysS kompetentních buněk, jelikož bylo možné transformovat je s vysokou účinností na elektroporátoru. Expresi insertu jsem po indukci s IPTG zjistil ve všech případech, její průběh však byl odlišný:

Bm S3-1 neindukované a indukované kultivace poskytly přibližně stejný výtěžek, který rostl do čtvrté hodiny. Pátou hodinu charakterizovala nižší koncentrace produktu.

Bm S3-2 je patrné, že produkt u indukovaných vzorků narůstá postupně do páté hodiny. V první hodině je ho více v neindukovaných než v indukovaných buňkách, po druhé hodině inkubace je produktu méně a po třetí již protein není patrný. Proč produktu ubývá si nedokážeme vysvětlit. Nejspíše je degradován bakteriemi.

Bm S3-3 je patrné, že produkt z počátku stoupá a poté se u neindukovaných vzorků ztrácí. Po indukci lehce vzrůstá do třetí hodiny a pak také mizí. Ve všech případech je přírůstek velmi malý, což může být způsobeno délkou insertu. Produkty Bm S3-2 a 1, které obsahují část Bm S3- 3, mají větší přírůstky. Bm S3-4 obsahující stejnou část inzertu jako Bm S3-3 má více produktů. Malé množství produktu Bm S3-3 tedy může být důsledkem jeho citlivosti k bakteriálním proteázám.

Bm S3-4 je patrné, že produkty již po druhé hodině nejsou na vzestupu a spíše stagnují, a to jak u neindukovaných, tak u indukovaných vzorků. Nejspíše IPTG, které má aktivovat RNA polymerázu a transkripci vloženého genu (Studier a kol 1990, Dubendorff, Studier 1991), nemá zásadní vliv a aktivace transkripce je stimulována jiným mechanismem. Indukovaný vzorek první hodiny chybí – pravděpodobně jsem špatně napipetoval na gel.

Bm S3-5 neindukované kultivace obsahují rekombinantní produkt jen v první hodině. Ve čtvrté a páté hodině do neindukovaných vzorků nejspíše na gelu přešla část produktu z indukovaných vzorků. V nich množství produktu vzrůstá až do čtvrté hodiny a pak začíná klesat. Je patrné, že se zde nalézají více produktů o různých velikostech, což je možná důsledek štěpení proteázami.

U všech proteinů je po určité hodině patrné snížení produktu, což je nejpravděpodobněji způsobeno překročením fáze nejrychlejšího dělení buněk, vyčerpání média a degradací produktů. U všech proteinů je jejich relativní velikost (při srovnání s komerčními standardy) asi o čtyři kDa větší, než očekávaná.

5.4. Přechištěné proteiny

Na všech gelech je patrné menší množství produktu v lyzátu, než v nenavázané frakci. Tato diskrepance je způsobena rozdílem v množství vzorku naneseného na gel: zatímco lyzát se použilo pouze 5 μ l, u ostatních vzorků vždy 15 μ l. Produktu bylo poměrně hodně v první a druhé promývací frakci, v dalších se stal nedetekovatelným. Při vymývání z kolony, kdy se měl být uvolněn jen klonovaný produkt navázaný pomocí histidinové kotvičky na pryskyřici Ni-NTA, došlo k eluci i dalších proteinů. Některé proteiny měly stejnou velikost u všech vzorků 70, 45 a 12 Kda, což budou nejspíše proteiny bakterií, u Bm S3-4 12 kDa produkt chybí, ale může být tak slabý, že není patrný. Všechny délky produktů z Western blotů se zobrazily v přibližně stejné velikosti i na těchto gelech. Produkty mají opět velikost o asi čtyři kDa větší.

Bm S3-1 má mít produkt dlouhý přibližně 15,3 KDa, na gelu jsou však produkty 18, 17 a 16 kDa, z nichž je nejpravděpodobněji hledaným proteinem produkt 18 kDa, zatímco ostatní

jsou degradační produkty. Produkt je skoro o 3 kDa větší. Možným vysvětlením je přítomnost nějaké postranslační úpravy, vazby na jiný protein, nebo abnormální pohyblivosti proteinu během elektroforézy (např. v důsledku konformace molekuly, rozložení nabitých a nepolárních aminokyselin). Stejně příčiny připadají v úvahu i pro objasnění zdánlivě větší velikosti u ostatních rekombinantních proteinů.

Bm S3-2 má mít produkt o délce přibližně 13 kDa a na gelu je produkt 17 a 16 kDa, pravděpodobně správný je 17 kDa a 16 je trochu degradovaný produkt transgenu. Zaklonovaný produkt je možná větší díky postranslačním úpravám. Proteiny o velikosti 32, 27 a 5 kDa jsou nejspíše bakteriální produkty.

Bm S3-3 má být přibližně 23,6 kDa velký a na gelu má velikost pravděpodobně 29 kDa, což může být opět postranslačními úpravami. Dalšími produkty jsou 17 kDa, což bude možná produkt bakterie, nebo produkt zkráceného insertu.

Bm S3-4 má být přibližně 25,8 kDa velký, ale na gelu se jeví jako 32 kDa. Dále zde jsou produkty 16 a 5 kDa, což jsou buď bakteriální proteiny, nebo degradovaný rekombinantní produkt.

Bm S3-5 má být velký přibližně 23 kDa, na gelu je však v poloze 28 kDa. Produkt postranslačně upraven. Další produkt migruje na gelu jako 18 kDa protein – považujeme ho za degradovaný rekombinantní protein či za protein bakteriální.

5.5. Dialýza

Zahuštění koncentrace rekombinantních proteinů pomocí dialýzy nepřineslo převratný úspěch. K přibližnému určení koncentrace jsem použil standardní bovinní serum albumin (BSA) v koncentracích 0,5, 1, 5 a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ u rekombinantních proteinů Bm S3-2, -3 a -4. a koncentrace 1, 5 a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ byly naneseny u proteinů Bm S3-1 a -5. Při dialýze nedošlo k zásadním ztrátám rekombinantních množství proteinů, zůstaly však kontaminace dalšími proteiny. Jejich odstranění by se muselo řešit použitím dalších metod. Koncentrace proteinů odvozená ze srovnávacích vzorků přibližně odpovídá výsledkům měření na spektrofotometru.

6. Závěr

1. Podařilo se vyizolovat 5 vybraných úseků genu Sericin 3 bource morušového, *Bombyx mori*. U jednoho úseku byly ve srovnání s publikovanou sekvencí zjištěny dvě bodové mutace způsobující změnu kodonu. Všech pět úseků se podařilo zaklonovat ve správné orientaci do expresního vektoru

Bm S3-1 tvoří polovinu jedné repetice z počátku genu.

Bm S3-2 tvoří jednu úplnou repetici z počátku genu.

Bm S3-3 tvoří jednu a půl repetice z počátku genu.

Bm S3-4 tvoří jednu a půl repetice z počátku genu, střední nerepetitivní oblast a jednu repetici z konečné repetitivní oblasti genu.

Bm S3-5 tvoří celou druhou repetitivně oblast.

Části genu ověřené sekvenační reakcí se podařilo zaklonovat pomocí pET 151 expresního vektoru do elektrokompetentních buněk SURE 2. Zaklonované úseky obsahují histidinovou kotvičku, která slouží k prokázání produkce rekombinantního proteinu pomocí protilátek a k jeho čištění na Ni-NTA kolonce pomocí afinitní chromatografie³. Všechny úseky byly exprimovány pomocí elektrokompetentních expresních buněk Rozetta Blue DE3 p-LysS a úspěšně pročištěny pomocí Ni-NTA purifikačních kolonek. Pro důkladnější pročištění od solí byly proteiny bez velkých ztrát podrobeny dialýze proti 1x PBS. Proteiny obsahují příměs dalších proteinů, kterých se bude třeba postupně zbavit.

2. Tereza Stašková zkoušela účinek produktu Bm S3- 5 na buňky v kultuře (*Drosophila* wing imaginal disc cell line Cl8+) a zjistila zvýšenou adhezi buněk k podkladu.

Dále je třeba proteiny pročistit ve větším měřítku a vyzkoušet je na buněčné kultury.

7. Seznam literatury

- Adams D.S., Eickbush T.H., Herrera R.J., Lizardi P.M. (1986)** A highly reiterated family of transcribed oligo(A)-terminated interspersed DNA elements in the genome of *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol.*, 187: 465-478
- Akai H. (1984)** The ultrastructure functions of the silk gland cells of *Bombyx mori* In: R. C. King and H. Akai (eds.) *Insect Ultrastructure*, Vol.2.Plenum, New York: 323-364
- Akai H. (1997)** Anti-bacteria function of natural silk materials: *Int. J. wild Silkmoths Silk*, 3: 79-81
- Akai H., Nagashima T., Aoyagi S. (1993)** Ultrastructure of posterior silk gland cells and liquid silk in Indian tasar silkworm, *Antherae myllita* Drury (Lepidoptera • Saturniidae). *Int. J. insect morphol. Embryol.*, 22: 497-506
- Akai H.T., Nagashima T., Inoue S., Kobayashi I., Tarmura T. (2005)** Functional recovery of transgenic silk gland. 20th congress of international sericultural commission, Bangalore, India 15-18th December 119
- Annamaria S., Maria R., Tullia M., Silvio S., Orio C. (1998)** The microbial degradation of silk: a laboratory investigation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 42(4): 203-211
- Asakura T., Sakai H., Komatsu K., Kurioka S. (1992)** Carrier supporting immobilized physiologically active substance and production thereof. Japan Patent 04-053490A
- Capello J. (1990)** *Trends Biotechnol.*, 8: 309
- Capello J., Cris J., Dorman M., Mikolajczak M., Textor G., Marquet M., Ferrari F.A. (1990)** *Biotech. Prog.*, 6: 198
- Case S.T., Powers J., Hamilton R.,Burton (1994)** *M.J. Silk Polymers*, 544: 80
- Čechmánek Z., Hrabák R. (2006)** *Život motýlů střední Evropy*. Granit, s.r.o., Praha: 69-70
- Chang T.H., Steplewski Z., Koprowski H. (1980)** Production of monoclonal antibodies in serum free medium. *J. Immunol. Meth.*, 39: 369-375
- Chen Y.G., Zi M., Hai L.N., Zhang Y. (2002b)** Analysis of amino acids from silkworm chrysalis. *Yunnan Chem. Technol. China*, 6: 22-23
- Chen Z., Liao S., Li Q., Chen L., Wu Y., Yao X. (2002a)** Study on multivoltine yellow blood silkworm for edible and medicine utilization. *Silkworm Sci. China*, 28: 73-76
- Chevillard M., Deleage G., Couble P. (1986)** Aminoacid sequence and putative conformational characteristics of the 25KD silk protein of *Bombyx mori* *Sericologia*, 26: 435-449

- Chisti Y. (1998)** Strategies in downstream processing. In: Subramanian G., editor. Bioseparation and bioprocessing: a handbook, vol. 2. New York: Wiley-VCH, 3-30
- Cook J.G (1964)** Natural fibers of animal origin (Silk) ; Handbook of textile fibres. Marrow publishing Co. Ltd., England **3rd ed**, 154-165
- Couple P., Michaille J.J., Couple M.L., Prudhomme J.C. (1987)** Developmental switches of sericin mRNA splicing in individual cells of *Bombyx mori* silkgland.. Dev. Biol., 124: 431-440
- Couple P., Chevillard M., Moine A., Ravel-Chapuis P., Prudhomme J.C. Structural (1985)** Organization of the P25 gene of *Bombyx mori* and comparative analysis of its 5' flanking DNA with that of the fibroin gene. Nucleic Acids Res., 13(5): 1801-1814
- Craig C.L. (1997)** Evolution of arthropod silk. Annu Rev. Entomol., 42: 231-267
- Cunniff P.M., Fossey S.A., Auerbach M.A., Song J.W., Kaplan D.L., Adams W.W., Eby R.K., Mahoney D., Vezie D.L.(1994)** Polym.Adv.Technol., 5: 401
- Demura M., Takenoshita H., Asakura T., Sakai H., Kurioka A., Komatsu K., Kaneko M. (1992)** J.Seric. Sci. Jpn., 61(1): 66-72
- Desplan C., Theis J., O'Farrell P.H. (1988)** The Sequence Specificity of homeodomain-DNA Interaction. Cell, 54: 1081-1090
- Dicko C., Vollrath F., Kenny J.M., (2004)** Biomacromolecules,5: 704
- Dubendorff J.W., Studier F.W. (1991)** Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. J.Mol.Biol. May 5., 219(1): 45-59
- F.S., Nicklen, S. a Coulson, A.E. (1977)** DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.*, 74: 5463-5467
- Fedič R. (1996)** Characterisation of Sericin 1 Gene in *Bombyx mori*. (Bachelor theses)
- Fedič R., Žurovec M., Sehnal F. (2002)** The Silk of Lepidoptera. Journal of Insect Biotechnology and Serology, 71: 1-15
- Fletcher M.J., Kent., D.S. (2002)** Feeding by kahaono leafhoppers in silken shelters (Hemiptera: Cicadellidae: Typhlocybininae: Dikraneurini. Austral. Entomol. 29: 115-118
- Foo C.W.P., Bini E., Hensman J., Knight D.P., Lewis R., Kaplan D.L. (2006)** Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process., 82: 223
- Fourier A. (1979)** Quantitative data on the *Bombyx mori* L. silkworm. Biochimie., 61: 283-320

- Fujita T., Okubo M., Oonishi M. (1998)** Production of natural organic polymer compound having polymerizability imparted hereto. Japan Patent 10-195169A
- Gage L.P., Manning R.F. (1980)** Internal structure of the silk fibroin gene of *Bombyx mori*. I Fibroin gene consist of a homogenous alternating array of repetitious crystalline and amorphous sequences. J. Biol. Chem., 255: 9444-9450
- Gamo T. (1973)** Electrophoretic anylises of the protein extracted with disulphide cleavage from cocoons of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Jpn., 42: 17-23
- Gamo T. (1982)** Genetics variants of the *Bombyx mori* silkworm encoding sericin proteins of different length. Biochem. Genet., 20: 165-177
- Gamo T., Inokuchi T., 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
- Gamo T., Inokuchi T., Laufer H. (1977)** Polypepties 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 the *Bombyx mori* Sericin 1 gene and of the Sericins 1 deduced from the sequence of the ser1B cDNA. Insect biochem. Molec. Biol., 27(5): 469-477
- Grzelak K. (1995)** Control of expression of silk protein genes. Comp. Biochem. Physiol., 110: 671-681
- Hamada Y., Yamashita O., Suzuki Y. (1987)** Haemolymph control of sericin gene expression studied by organ transplation. Cell Differ, 20: 65-76
- Hata O. (1987)** Cosmetics containing sericin hydrolysates. Jpn Kokai Tokkyo Koho Jap 62036308 A2 (toKishu Sangyo K K Japan) 17 February 1987, Showa, P 7; Chem. Abstr., 106(26): 219374
- Hatakeyma H. (1996)** Biodegradable sericin-containing polyurethane and its production. Japan Patent 08-012738A
- Henne W., Hoppe U. (1986)** Light and screening composition. Ger Offen DE 3408406 A1 (to Beiersdrof A G Fed Rep Ger) P 14; Chem. Abstr., 104(6): 39519
- Hirabayashi K., Arai M., Zhu L.J. (1989)** Gelation of silk sericin. (Tokyo Agric Technol Univ, Tokyo 184, Jpan) *Nippon sanshigaku, Zasshi*, 58(1): 81-82
- Hoey T., Levine M. (1988)** Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in Drosophila. Nature, 332(6167): 858-861

- Hoppe U, Koerbaecher K., Roeckl M. (1984)** Hair and bath preparations containing sericin. Ger Offen DE 3233388 A1 (to Beiersdorf A G, Ger) P 15; Chem. Abst. 100: 215305
- Hou Y., Xia Q., Zhao P., Zou Y., et al. (2007)** Studies on middle and posterior silk glands of silkworm (*Bombyx mori*) using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37: 486-496
- Hu G., Zhu L.J. (1997)** Characteristics and structure of gel with fibroin and sericin, *Gongxueyuan Xuebao*, 14(3): 154-158
- Huang J., Valluzzi R., Bini E., Vernaglia B., Kaplan D.L. (2003)** Cloning, expression, and assembly of sericin-like protein. *J. Biol. Chem.* 278: 46117-46123
- Hui C.C., Suzuki Y. (1995)** Regulation of the silk protein genes and the homeobox genes in silk gland development. In *Molecular model Systems in the Lepidoptera* (M.R. Goldsmit and A.S. Wilkins, eds.), Cambridge University Press, 249-271
- Hyde N. (1984)** The queen of textiles. *National Geographic* 165: 3-49
- Iizuka E. (1964)** *Biorheology*, 3: 1
- Iizuka E. (1996)** Silk. (physicochemical properties), the polymeric materials encyclopedia. CRC Press
- Iizuka E. (1985)** *J.Appl.Polym. Sci.* 41: 173
- Inoue S., Tanaka K., Arisaka F., Kimura S., Ohtomo K., 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
- Ishikawa E., Suzuki Y. (1985)** Tissue- and stage-specific expression of sericin genes in the middle silk gland of *Bombyx mori*. *Dev. Growth Differ.*, 27: 73-82
- Iwamoto K., Noguchi T., Yeramoto A., Iizuka E. (1995)** Studies on physical properties of mixed membranes of silk sericin and syniotactic polyvinyl alcohol, and their ability to immobilize an enzyme. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 65(4): 427-434
- Jin H.J., Kaplan D.L. (2003)** *Nature*, 424: 1057
- Kataoka K.(1997)** The solubility of sericin in water. (*Seric Exp Stu*, Minist Agric For, Tokyo, Japan), *Nippon Sanshigaku Zasshi*, 46(3): 227-230
- Kataoka K., Uematsu I. (1977)** On the fiber formation of liquid silk in the spinneret. *Kobunshi Ronbunshu.*, 34: 457-464

- Kato N., Sato S., Yamanaka A., Yamada H., Fuwa N., Nomira M. (1998)** Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62: 145-147
- Kazuhisa T., Takagi H., Takahashi M., Yamada H., Nakamori S. (2001)** Cryoprotective effect of the serine-rich repetitive sequence in silk protein sericin. *J. Biochem.*, 129(6): 979-986
- Kerkam K., Viney C., Kaplan D.L., Lombardi S.J. (1991)** *Nature*, 349: 596
- Kikuchi Y., Mori K., Suzuki S., Yamaguchi K., Mizuno S. (1992)** Structure of the *Bombyx mori* fibroin light-chain-encoding gene: upstream sequence elements common to the light and heavy chain. *Gene*. Jan 15., 110(2): 151-8
- Kimura K., Oyama F., Ueda H., Mizuno S., Shimura K. (1985)** Molecular cloning of the fibroin light chain complementary DNA and its use in the study of the expression of the light chain gene in the posterior silk gland of *Bombyx mori*. *Experientia*, 41: 1167-1171
- Kirikawa M., Kasaharu T., Kishida K., Akiyama D (2000)** Silk protein micropowders for coating with excellent feeling, antistaticity and moisture absorbability and releasability and their manufacture., *Jpn Kokai Tokkyo Koho Jap 2000044598A2* (to Daiwa Spinning Co Ltd, Nippon Ind Ltd, Japan) 15 February 2000, P 8; *Chem. Abst.*, 132: 153320
- Kludkiewicz B., Takasu Y., Fedič R., Tamura T., Sehnal F., Žurovec M. (2009)** Structure and expression of the silk adhesive protein Ser2 in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39:938-946
- Knight D.P., Vollrath F. (2001)** *Naturwissenschaften*, 88: 179
- Knight D.P., Vollrath F. (2002)** *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 357: 155
- Kodrík D. (1992)** Small protein components of the cocoons in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) and *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). *Acta ent. Bohemoslov.*, 89: 269-273
- Komatsu K. (1975)** Studies on dissolution behaviors and structural characteristics of silk sericin. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 26: 135-256
- Komatsu K. (1996)** Silk (its formation, structure character, and utilization). *The polymeric materials encyclopedia*. CRC Press 1996
- Krejčák A. (1936)** *Chov bource morušového*. Nakl. Brázda, Praha 45
- Kurioka A., Yamazaki M., Hirano H. (1999)** Primary structure and possible function of trypsin inhibitor of *Bombyx mori*. *Eur. J. Biochem.*, 259: 120-126

- Kurioka A., Hirano H. (1995)** Partial amino acid sequence of a 11 kDa cocoon shell Kazal-type protein. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 64: 392-394
- Levitt M. (1978)** Conformational preferences of amino acids in globular proteins. *Biochemistry.*, 17: 4277-4285
- Lucas F., Rudall K.M. (1968)** Extracellular fibrous proteins: the silks. In *comprehensive Biochemistry*, 26B: 475-558
- Magoshi J., Magoshi Y., Nakamura S. (1985)** *J. Appl. Polym. Sci.: Appl. Polym. Symp.* 41:187
- Masahiro Tomita. (2011)** Transgenic silkworm that weave recombinant proteins into silk cocoon. *Biotech.*, 33: 645-654
- Michaille J., Garel A., Prudhomme J.C. (1990b)** Cloning and characterization of the highly polymorphic Ser2 gene of *Bombyx mori*. *Gene*, 86: 177-184
- 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 (1989)** The expression of five middle silk gland specific genes is territorially regulated during the larval development of *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 19: 19-27
- Michaille J.J., Garel A., Prudhomme J.C. (1990a)** Expression of Ser 1 and Ser2 genes in the middle silk gland of *Bombyx mori* during the fifth instar. *Sericologia*, 30: 49-6
- Michjlov M. (1952)** *Šelkovodstvo*. Selchozgiz, Moskva., 480
- Minomura N., Aiba S., Gotoh Y., Tsukada M., Imai Y. (1995)** Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein materials. *J. Biomed. Mater. Res.*, 29: 1215-1221
- Mita K., Ichimura S., James T.C. (1994)** *J. Mol. Evol.*, 38: 583
- Mita K., Kasahara M., Sasaki S., Nagayasu Y., Yamada T., Kanamori H., Namiki N., Kitagawa M., Yamashita H., Yasukochi Y., Kadono-Okuda K., Yamamoto K., Ajimura M., Ravikumar G., Shimomura M., Nagamura Y., Shin I. T., Abe H., Shimada T., Morishita S., Sasaki T. (2004)** The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res.*, 11: 27-35
- Mita K., Morymio M., Okano K., Shimada T., Maeda S. (1999)** The construction of EST-database for genome analysis of *Bombyx mori*. *RIKEN Rev.*, 22: 63-67
- Miyairi S., Sugiura M. (1978)** Properties of β -glucosidase immobilized in sericin membrane. *J. Ferment. Technol.*, 56(4): 303-308

- Mizoguchi K., Iwatsubo T., Aisaka N. (1991)** Separating membrane made of cross-linked thin film of sericin and production thereof. Japan Patent 03-284337A
- Mondal M., Trivedy K., Nirmal Kumar S. (2007)** The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - a review. *Caspian J. Env. Sci.* Vol. 5 No. 2: 63-76
- Mori K., Tanaka K., Kikuchi Y., Waga S., Mizuno S. (1995)** Production of chimeric fibroin-light chain polypeptide in fibroin secretion deficient naked pupa mutant of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Mol.Biol.*, 251: 217-228
- Mosher H. (1934)** The sericin fraction of silk. *Am. Silk Rayon J.*, 53: 43-44
- Murakami H. (1984)** Serum-free cultivation of plasmacytomas and hybridomas. In: DW Barnes, DA Sirbasku and GH Sato (Eds) *Methods for Serum-free Culture of Neuronal and Lymphoid Cells.* Alan R. Liss Inc., 197-206
- Murase M. (1994)** method for solubilizing and molding cocoon silk, artificial organ made of cocoon silk, and medical element made of cocoon silk. Japan patent 06-166850A
- Nakajima Y. (1994)** Liquid crystal element. Japan Patent 06-018892A
- Nirmala X., Kodřík D., Žurovec M., Sehnal F. (2001a)** Insect silk contains both a Kunitz-type and unique Kazal-type proteinase inhibitor. *Eur. J. Biochem.*, 268(7): 2064-2073
- Nirmala X., Mita K., Vanisree V., Žurovec M., Sehnal F. (2001b)** Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*: *Insect Mol. Biol.*, 10(5): 437-445
- Nirmara X., Kodřík D., Žurovec M., Sehnal F. (2001a)** Insect silk contains both a Kunitz-type and unique Kazal-type proteinase inhibitor. *Eur. J. Biochem.* 268(7): 2064-2073
- Nirmara X., Mita K., Vanisree V., Žurovec M., Sehnal F. (2001b)** Identification of four small molecular mass proteins in silk of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 10(5):437-445
- Nomura M., Iwasa Y., Araya h. (1995)** Moisture absorbing and desorbing polyurethane foam and its production. Japan Patent 07-292240A
- Novák I., Severa F. (1990)** Motýli. Aventinum, s.r.o. Praha: 58-59
- Ochi A., Nemoto N., Magoshi J., Ohyama E., Hossain K.S. (2002)** *J. Soc. Rheol. Jpn.*, 30: 289

- Ogawa A., Yamada H. (1999)** Antiaging cosmetic containing sericin or hydrolysates and saccharomyces extracts, Jpn Kokai Tokkyo Koho Jap. 11193210 A2 (to Noevier Co Ltd, Seiren Co Ltd Japan) P 9; Chem. Abstr., 131(7): 923508
- Okamoto H., Ishikawa E., Suzuki Y. (1982)** Structural analysis of Sericin genes. Homologies with fibroin gene in the 5' flanking nucleotide sequences. J. Biol. Chem., 257: 15192-15199
- Ono M. (1951)** Studies on the growth of the silk gland cell in silkworm larvae. Bull. Sericult. Exp. Stn. 13: 247-303
- Padamwar M. N., Daithankar A. V., Pisal S.S., Pawar A. P. (2002)** Evaluation of moisturizing efficiency of silk protein II: silk sericin, presented in sixty second World Cong of FIP,
- Padamwar M.N., Pawar A.P. (2003)** Preparation and evaluation of sericin gels containing choline salicylate, Indian Drugs, 40(9): 526-531
- Pak P.K. (1977)** A comparative study on the raw cocoons degumming by soap and protease, Sumyu Konghak Hoeji, 14(3): 94-98
- Pauling L., Corey R.B. (1953)** Two rippled-sheet configurations of polypeptide chains, and a note about the pleated sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 39: 253-256
- Phillips D.M., Drummy L.F., Naik R.R., Delong H.C., Fox D.M., Trulove P.C., Matz R.A (2005)** Silk fibers from an ionic liquid solution. J.Mater.Chem., 15: 4206
- Prudhomme J.C., Couble P., Garel J.P., Daillie J. (1985)** Silk synthesis. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (edited by Kerkut G.A. and Gilbert L.I.), 571-594
- Rudall K.M., Kenchington W. 197** Arthropod silks: The problem of fibrous proteins in animal tissues. Annu Rev. Entomol., 16: 73-96
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. Dec., 74(12): 5463-5467
- Sasaki M., Kato N., Watanabe H., Yamada H. (2000a)** Silk protein, sericin, suppresses colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in mice. Oncol. Rep., 7: 1049-1052
- Sasaki M., Yamada H., Kato N., (2000b)** Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats. Nutr. Res., 20: 1505-1511

- Sasaki T., Noda H. (1973)** Studies on silk fibroin of *Bombyx mori* directly extracted from the silk gland. I. Molecular weight determination in guanidine hydrochloride or urea solutions. *Biochim. Biophys Acta*, 310: 91-103
- Sehna F. (2007)** Hedvábná vlákna. **ROZRAZIL 08, 71, 72**
- Sehna F., Akai H. (1990)** Insect silk gland: Their types, development and function , and effects of environmental factors and morphogenetic hormones on them. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 19: 79-132
- Shaw J.T.B., Smith S.G. (1951)** Amino acid of silk sericin. *Nature.*, 4278: 745
- Shimura K., Kikuchi A., Ohmoto K., Katagata Y., Hyodo A (1976)** Studies on silk fibroin of *Bombyx mori*. I. fractionation of fibroin prepared from the posterior silk gland. *J. Biochem.*, 80: 693-702
- Simizu M. (1941)** X-ray studies on silkworm sericin. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 10: 441-474
- Sinohara H.(1979)** Glycopeptides isolated from sericin of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63 B: 87-91
- Sprague K. (1975)** The *Bombyx mori* silk proteins: characterization of large polypeptides. *Biochemistry .*, 14: 925-931
- Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W. (1990)** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Abstract. Methods Enzymol.*, 185: 60-89
- Sulitková J. (1999)** Charakterizace sericinových genů Zavíječe voskového (*Galleria mellonella L.*). Magisterská práce České Budějovice.
- Sumitomo K., Yamagoshi K., Tsukiyama T., Hori T. (1997)** Protein-containing polymer compound. Japan Patent 09-124796A
- Takahashi M., Tsujimoto K., Kato Y., Yamada H., Takagi H., Nakamori S. (2005)** A sericin-derived peptide protects Sf9 insect cells from death caused by acute serum deprivation..*Biotechnology Letters.*, 27: 893-8
- Takai Y. (1999)** Hydrophilic fiber and aggregate of the same and production thereof. Japan Patent 11-350352A
- Takasu Y., Hata T., Uchino K., Zhang Q. (2010)** Identification of Ser2 proteins as major sericin components in the non-cocoon silk of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. And Molecular Biology* 40: 339-344
- Takasu Y., Yamada H., Saito H., Tsubouchi K. (2005)** Characterization of *Bombyx mori* sericins by the partial amino acid sequences. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 74: 103-109

- 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 Bioch. Mol. Biol.*, 37: 1234-1240
- Takasu Y., Yamada H., Tsubouchi K.(2002)** Isolation of Three Main Sericin Components from the Cocoon of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(12): 2715-2718
- Takei F., Kikuchi Y., Kikuchi A., Mizuno S., 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
- Takuya S., Kokubo H., Suzuki Y. (1997)** Transcriptional regulatory elements in the upstream and intron of the fibroin gene bind three specific factors Pou-M1, Bm Fkh and FMBP-1. *Biochem. J.*, 321: 645-653
- Tamada Y. (1997)** Anticoagulant and its production. Japan Patent 09-227402A
- Tamura T., Kubota T. (1989)** A determination of molecular weight of fibroin polypeptides in the saturniid silkworms, *Antheraea yamamai*, *Antheraea pernyi*, and *Philosamia cynthia ricini* by SAD PAGE. In *Wild Silkmoths 88'* (eds. H. Akai and M. Kiguchi), *Natl. Inst. Sericult. Insect Sci.*, Tsukuba 67-72
- Tanaka K., Inoue S., Mizuno S. (1999a)** Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin producer by *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 269-276
- Tanaka K., Kajiyama N., Ishikura A., Waga S., Kikuchi A., Ohtomo K., Takagi T., Mizuno S. (1999b)** Determination of the side of disulphide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Biophys. Acta*, 1432: 92-103
- Tanaka K., Kajiyama N., Ishikura K., Waga s.,Kikuchi A., Ohtomo K., Takagi T., Mizuno S. (1999)** *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1432: 92
- Tanaka K., Mizuno S. (2001)** Homologues of fibroin L-chain and P25 of *Bombyx mori* are present in *Dendrolimus spectabilis* and *Papilio xuthus* but not detectable in *Antheraea yamamai*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 665-677
- Tanaka T. (2001)** Antifrosting method, antifrosting agent and snow melting agent. Japan Patent 2001-055562A
- Tanaka T., Magoshi J., Magoshi Y., Inoue S.I., Kobayashi M., Tsukada H., Nakamura S., (2001)** *Abstr. Pap. -Am. Chem. Soc.*, 221: 123

- Terada S., Nishimura T., Sasaki M., Yamada H., Miki M. (2002)** Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma. *Cytotechnology.*, 40: 3-12
- Terry A.E., Knight D.P., Porter D., Vollrath F. (2004)** *Biomacromolecules.*, 5: 768
- The International Silkworm Genome Consortium. (2008)** *Insect Biochem. And Mol. Biol.*, 38: 1036-1045
- Tsujimoto K., Takagi H., Takahashi M., Yamada H., Nakamori S. (2001)** Cryoprotective effect of the serine-rich repetitive sequence in silk protein sericin. *J. Biochem.*, 129: 979-986
- Tsukada M., Hayasaka S., Inoue K., Nishikawa S., Yamamoto S. (1999)** Cell culture bed substrate for proliferation of animal cell and its preparation. Japan Patent, 11-243948A
- Ueda K., Makita M. (2000)** Rubber molding having durable skincare property: Japan Patent 2000-169595A
- Vogeli R., Meier j., Blust R. (1993)** Sericin silk protein: unique structure and properties, *Cosmet Toilet*, 108: 101-108
- Wakabayashi S., Sugioka M. (1994)** Synthetic fiber improved in hygroskopicity. Japan Patent 06-017372A
- Willis J.H., Iconomidou V.A., Smith R.F., et al. (2005)** Cuticular proteins. In: Gilbert L.I., Iatrou K., Gill S., eds. *Comprehensive insect science*, Oxford, Elsevier, 4: 79-109
- Wilson E.T., Condliffe D.P., Sprague K.U. (1988)** Transcriptional properties of BmX, a moderately repetitive silkworm gene that is an RNA polymerase III template. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 624-631
- Xia W., Zhao D. 2003** The chrysalis of silkworm synthesizes to develop the present condition and technique. *J. Shaanxi Normal Univ. (Natural Science Edition China)*, 31: 265-269
- Xiong Y., Chen H. (1999)** The comprehensive utilization of silkworm chrysalis. *Nat Prod. Res. Dev. China*, 11: 82-85
- Yamada H., Fuha Y., Yuri O., Obayashi M., Arashima T. (1998)** Collagen formation promoters containing sericin, or its hydrolyzates and antiaging cosmetics, *Jpn Kokai Tokkyo Koho. JP 10226653 A2* (to Noevirco Ltd, Seiran co Ltd, Japan) P 8; *Chem. Abst.*, 129(14): 179985

- Yamada H., Fuwa N. (1994)** Protein-containing synthetic high molecular material and its preparation. Japan Patent 06-080741A
- Yamada H., Fuwa Y. (1993a)** Pervaporation membrane and production thereof. Japan Patent 05 -345118A
- Yamada H., Fuwa Y. (1993b)** Filter membrane and production thereof. Japan Patent 05-345117A
- Yamada H., Nomura M. (1998)** Fibrous article for contact with skin. Japan Patent 10-001872A
- Yamaguchi K., Kikuchi Y., Takagi T., Kikuchi A., Oyama F., Shimura K., Mizuno S. (1989)** Primary structure of the silk fibroin light chain determined by cDNA sequencing and peptide analysis. *J. Mol. Biol.*, 210: 127-139
- Yang C., Teng X., Žurovec M., Scheller K., Sehnal F. (1998)** Characterization of the P25 silk gene and associated insertion elements in *Galleria mellonella*. *Gene*, 209(1-2), 157-165
- Yang Y., Tang L., Tong L., Liu H. (2009)** Silkworm culture as a source of protein for humans in space. *Advances in Space Research China* 43: 1236-1242
- Yasuda N., Yamada H., Nomura M. (1998)** Sericin from silk as dermatitis inhibitor Jpn Kokai Tokkyo Koho Jap 10245345 A2 (to Seiran Co Ltd, Japan) Heisei, P 4; Chem. Abst., 129(16): 207197
- Yoshii F., Kume T., Makuuchi K., Sato F. (2000)** Hydrogel composition containing silk protein. Japan Patent 2000-169736A
- Yoshikawa M., Muramaki A., Okushita Y. (2001a)** A blend film containing agar or/and agarose, and sericin and production thereof. Japan Patent 2001-129371A
- Yoshioka M., Segawa A., Veda A., Omi S. (2001)** UV absorbing compositions containing fine capsules., Jpn Kokai Tokkyo Koho Jap 2001049233 A2 (to Seiwa Kasei K K Japan) P 14; Chem. Abst., 134(14): 197870
- Zhang F., Zhang Z. (2001)** Study on edible insect resources and their exploitation and utilization. *Resour. Sci. China* 23: 21-23
- Zhang Y.-Q. (2002)** Application of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotech. Advances*, 20: 91-100
- Zhou C.Z., Confalonieri F., Mediana N., Zivanovic Y., Esnault C., Yang T., Jacquet M., Janin J., Duguet M., Perasso R., Li Z.G. (2000)** *Nucleic acids Res.*, 28: 2413

- Zhou C.Z., Confaloniery F., Medina N., Zivanovic Y., Esnault C., Yang T., Jacquet M., Janin J., Duguet M., Perasso R., Li Z.G (2000)** Fine organization of Bombyx mori fibroin Heavy chain gene. *Nucleic Acid Res.*, 28: 2413-2419
- Zhu L.J., Arai M., Hirabayashi K. (1995)** Relationship between adhesive properties and structure of sericin in cocoon filament, *J. Sericult. Sci. Jap.*, 64(5): 420-426
- Zhu L.J., Hizahayashi K., Aari M (1991)** Geletion of sericin and its structure and properties., *Canye Kexue*, 17(1): 33-38
- Žurovec M., Sehnal F. (2002)** Unique molecular architecture of silk fibroin in the waxmoth, *Galleria mellonella*. *J. Biol. Chem.*, 277(25): 22639-22647
- Žurovec M., Vašková M., Kodřík D., Sehnal F., Kumaran A. (1995)** K Light-chain fibroin of *Galleria mellonella* L., 247(1): 1-6
- Žurovec M., Yang C., Kodřík D., Sehnal F. (1998)** Identification of novel type of silk protein and regulation of its expression. *J. Biol. Chem.*, 273(25): 15427-15428

8. Příloha

8.1. Příloha č. 1. Použité primery

BMS3 rev5	5'- TTAGCTACTATGAGCTTGCTGACTTCTGCTACT -3'
Ser3-2fw+	5'- CACCAGTAAGTCTTCCAGCAGTTCTCAA -3'
Ser3-rev4	5'- ACTGCTCTTACTATCTGTCTCACTTCTGC -3'
Ser3-4fwC	5'- CACCCGTTCCACAAGCTCTGATG -3'
Ser3-4rev	5'- CATCAGAGCTTGTGGAACG -3'
T7	5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'
T7 rev	5'- TAGTTATTGCTCAGCGGTGG -3'
Trikant	5'- TGAGCAAGTTCAGCCTGGTTA -3'

8.2. Příloha č. 2. Použité chemikálie

10 x Dream Taq Buffer	Fermentas
10 x PCR x Enhancer	invitrogen
10 x Pfx Amp Buffer	invitrogen
50 mM Mg SO4	invitrogen
5x, 6x Loading Dye	Fermentas
Acetic acid	Penta
Acetone	aMReSCO
Acrylamide-Bis	SERVA
Agar	invitrogen
Agarose I	aMReSCO
Albumin, Bovine (BSA)	aMReSCO
Amonium Persulfát (APS)	aMReSCO
Ampicilin Sodium salt	aMReSCO
B-PER	Thermo
Bromophenol Blue	aMReSCO
Ca Cl2.2H2O	SERVA
Comassie R Brilliant Blue G-250	aMReSCO
dNTP (Deoxi nukleotid triphosphate)	Fermentas
Dream Taq DNA Polymerase	Fermentas
DTT	invitrogen
EDTA	aMReSCO
Ehidium Bromide	aMReSCO
Ethanol	Penta
First Strand buffer	Invitrogen
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	Fermentas
Glycerin (glycerol)	Penta
Glycin	aMReSCO
Chloroform	Penta
Imidazol	aMReSCO
IPTG	SERVA
Izopropanol	Penta

KCl	aMReSCO
KH ₂ PO ₄	aMReSCO
LB Broth, Miller	aMReSCO
Lysozyme, Egg White	aMReSCO
Methanol	Penta
Mg Cl ₂ .6 H ₂	Sigma
MgCl ₂	Fermentas
NA ₂ HPO ₄	Sigma
NaCl	aMReSCO
Nuclease - Free Water	QIAGEN
Page Ruler Plus Prest.	Fermentas
Platinum Pfx DNA Polymerase	Invitrogen
PMSF	aMReSCO
Ponceau S	aMReSCO
Rnase H	TaKaRa
Skim Milk	Difco TM
Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)	aMReSCO
Sodium Hydroxid Pellets	aMReSCO
Sodium Phosphate Dibasic Anhydrous	aMReSCO
Sodium Phosphate Monobasic Anhydrous	aMReSCO
Superscript III	Invitrogen
SYBR Safe DNA gel strain	Invitrogen
TCA	SERVA
TEMED	aMReSCO
Tetracyklin Hydrochloride	aMReSCO
TRIS	aMReSCO
TRIzol reagent	Invitrogen
Tryptone	SERVA
Tween 20	aMReSCO
Yeast extract	SERVA
β-Mercaptoethanol	SERVA

8.3. Příloha č. 3. Sericin 3

1 atgaattgtaaagttgctctattcctgatagtggtctattgtagccgtccaggctctgcct
1 M N C K V A L F L I V A I V A V Q A L P

61 tgccaggaatctagaccgagacgctgcggttacagggtatggctgcgaggcggtcgaggc
21 C Q E S R P R R C G Y R Y G C G G G R G

121 aggggctctggtgtgagacgtctcgattcaggagcagatgacaaccaagggcgatcatgt
41 R G S G V R R L D S G A D D N Q G R S C

181 ctcgctcgggtggaagtgacagaatcaaatacagcaggactccgatgatcgtttatcagtaatc
61 L V G G S A E S N D E D S D D R L S V I

241 aataatactgaaggccacgctaccagcagcagcttcgatgagcaaagttctagcgcctaga
81 N N T E G H A T S S S F D E Q S S S A R

301 caaagcagtagctcgtaccagagccagtcatacaacaagattcttcaagtaccaatgaa
101 Q S S S S Y Q S Q S Y N K D S S S T N E

361 agcagtgatggaggctctgggttcgggcagaaccgggttcagcaggagaaaatggtgagaat
121 S S D G G S G S G R T G S A G E N G E N

421 tccgacgacagcagtggtgcgacaaaaggaatatagcagtaaatcttccagcagttctcaa
141 S D D S S G A T K G N S S K S S S S S Q

481 ggtcaaagcgcaagtagtagcagcagtgatgaaaaatcatctcagagcagcagtaatagt
161 G Q S A S S S S S D E K S S Q S S S N S

541 agcaacaacagtaaatcaagcagccaatcttccagtagccaaaacagttctggttctaag
181 S N N S K S S S Q S S S S Q N S S G S K

601 ggctcgggatcagaagaaagcagtaatggaggctctgggttcgggaagaaccgggttcagcg
201 G S G S E E S S N G G S G S G R T G S A

661 ggaggaactgatgaggattccgacgacagcagtggtgcgacaaaaggaatatagcagtaag
221 G G T D E D S D D S S G A T K G N S S K

721 tcttccagcagttctcaaggtcaaagcgcaagcagtagcagcagtgacgaaaactcatct
241 S S S S S Q G Q S A S S S S S D E N S S

781 cagagcagcagtaatagtagcaacaacagtaaatcaagcagccaatcttccagtgccaa
261 Q S S S N S S N N S K S S S Q S S S G Q

841 aacagttctggttctaagggctcgggatccgaagaaagcagtaatggaggctctggttcg
281 N S S G S K G S G S E E S S N G G S G S

901 ggaagaaacgggttcagtgaggaggaactgatgaggattccgacgacagcagtggtgcgaca
301 G R N G S V G G T D E D S D D S S G A T

961 aaaggaatatagcagtaaatcttccagcagctctcaaggtcaaagcgcaagcagtagcagc
321 K G N S S K S S S S S Q G Q S A S S S S

1021 agtgatgaaaaatcatctcagagcagcagtaatagtagcaacaacagtaaatcaagcagc
341 S D E K S S Q S S S N S S N N S K S S S

1081 caatcttccagtgccaaaacagttctggttctaagggctcgggatcagaagaaagcagt
361 Q S S S G Q N S S G S K G S G S E E S S
1141 aatggaggctctggttcgggaagaaacggttcagcgggaggaactgatgaggattccgac
381 N G G S G S G R N G S A G G T D E D S D
1201 gacagcagtggtgcgacaaaaggaaatagcagtaagtcttccagcagttctcaaggtcaa
401 D S S G A T K G N S S K S S S S S Q G Q
1261 agcgaagcagtagcagcagtgatgaaaaatcatctcagagcagcagtaatagtagcaac
421 S A S S S S S D E K S S Q S S S N S S N
1321 aacagtaaatcaagcagccaatcttccagtgccaaaacagttctggttctaagggctcg
441 N S K S S S Q S S S G Q N S S G S K G S
1381 ggatcagaagaaagcagtaatggaggctctggttcgggaagaaacggttcagcgggagga
461 G S E E S S N G G S G S G R N G S A G G
1441 actgatgaggattccgacgacagcagtggtgcgacaaaaggaaatagcagtaagtcttcc
481 T D E D S D D S S G A T K G N S S K S S
1501 agcagttctcaaggtcaaagcgcaagcagtagcagcagtgacgaaaaatcatctcagagc
501 S S S Q G Q S A S S S S S D E K S S Q S
1561 agcagtaatagtagcaacaacagtaaatcaagcagccaatcttccagtgccaaaacagt
521 S S N S S N N S K S S S Q S S S G Q N S
1621 tctggttctaagggctcgggatcagaagaaagcagtaatggaggctctggttcgggaaga
541 S G S K G S G S E E S S N G G S G S G R
1681 accggttcagcgggagaaactgatgaggattccgacgacagcagtggtgcgacaaaagga
561 T G S A G E T D E D S D D S S G A T K G
1741 aatagcagtaagtcttccagcagttctcaaggtaaaagtgaagcagtagcagcagtgac
581 N S S K S S S S S Q G K S A S S S S S D
1801 gaaaaatcatctcagagtagcagtaatagtagtaacaacagtaaatcaagcagtcaatct
601 E K S S Q S S S N S S N N S K S S S Q S
1861 tcgagtagcaacaatagttctggttctaagggctcgggatcagaagaaagcagtaatgga
621 S S S N N S S G S K G S G S E E S S N G
1921 ggctctggttcgggaagaaccggttcagcgggaggaagtgatgaggattccgacgacagc
641 G S G S G R T G S A G G S D E D S D D S
1981 agtggtgcgacaaaaggaaatagcagtaagtcttccagcagctctcaaggtcaaagcgca
661 S G A T K G N S S K S S S S S Q G Q S A
2041 agcagtagcagcagtgacgaaaaatcatcacagagcaacagtaatagtagcaataacagt
681 S S S S S D E K S S Q S N S N S S N N S
2101 aaatcaagtagccaatcttccagtagcaacaacagttctggttctaagggctcgggatca
701 K S S S Q S S S S N N S S G S K G S G S
2161 gaagaaagcagtaatggaggctctggttcgggaagaaccggttcagcgggaggaactgat
721 E E S S N G G S G S G R T G S A G G T D

2221 gaggattccgatgacagcagtggtgcgacaaaaggaatatagcagtaagtcttccagcagt
 741 E D S D D S S G A T K G N S S K S S S S

2281 tctcaaggtaaaagcgcaagcagtagcagcagtgacgaaaaatcatctcagagcagcagt
 761 S Q G K S A S S S S S D E K S S Q S S S

2341 aatagtagtaataacagtaaatcaagcagccaatcgtccagtagcaagaacagttctggt
 781 N S S N N S K S S S Q S S S S K N S S G

2401 tctaagggtcgggatcagaagaaagcagtaatggaggctctggttcgggaagaaccggt
 801 S K G S G S E E S S N G G S G S G R T G

2461 tcagcgggaggaactgatgaggattccgacgacagcagtggtgcgacaaaaggaatatagc
 821 S A G G T D E D S D D S S G A T K G N S

2521 agtaagtcttccagcagttctcaaggtaaaagcgcaagcagtagcagcagtgacgaaaa
 841 S K S S S S S Q G K S A S S S S S D E K

2581 tcatctcagagtaacagtaatagtagtaacaacagtaaatcaagcagtcaatcttcgagt
 861 S S Q S N S N S S N N S K S S S Q S S S

2641 agtaagaacagttctggttctaagggtcgggatcagaagaaagcagtaatggaggctct
 881 S K N S S G S K G S G S E E S S N G G S

2701 ggttcgggaagaaccggttcagcgggaggaactgatgaggattccgacgacagcagtggt
 901 G S G R T G S A G G T D E D S D D S S G

2761 gcgacaaaaggaatatagcagtaagtcttccagcagttctcaaggtaaaagcgcaagcagt
 921 A T K G N S S K S S S S S Q G K S A S S

2821 agcagcagtaacgaaaaatcatctcagagtagcagtaatagtagtaacaacagtaaatca
 941 S S S N E K S S Q S S S N S S N N S K S

2881 agcagtcaatcttcgagtagcaagaacagttctggttctaagggtcctggatcaagtga
 961 S S Q S S S S K N S S G S K G S G S S E

2941 agtggtgataaaaagtccagttctcgaggaagttctggtgacaactcagacgatgaccaa
 981 S G D K K S S S R G S S G D N S D D D Q

3001 actgattcagccagatcaaatagtaagcgttccacaagctctgatgcgtccactaaaaaa
 1001 T D S A R S N S K R S T S S D A S T K K

3061 agttcgtctagaaagagctccaaccacgtagtagcagaagtcagcaagctcatagtagc
 1021 S S S R K S S N H R S S R S Q Q A H S S

3121 agcagtaacaagcccaaagcagcagtagtcaacaagcccaaatagcagaagtcagcaa
 1041 S S K Q A Q S S S S Q Q A Q N S R S Q Q

3181 gctcatagtagcagaagtcagcaagctcatagtagcagcagtaacaagcccaaagcagc
 1061 A H S S R S Q Q A H S S S S K Q A Q S S

3241 agtagtaacaagcccaaagtagcagcagtaacaagcccaaagcagcagtagtaacaa
 1081 S S K Q A Q S S S S K Q A Q S S S S K Q

3301 gcccaaagtagcagtagtcaacaagcccaaagtagcagaagtcagcaagctcatagtagc
 1101 A Q S S S S Q Q A Q S S R S Q Q A H S S

3361 agaagtcagcaagctcatagtagcagcagtaaacaagcccaaagcagcagtagtaaaaa
1121 R S Q Q A H S S S S K Q A Q S S S S K Q

3421 gcccaaagtagcagcagtaaacaagcccaaagcagcagtagtaaaaaagcccaaagcagc
1141 A Q S S S S K Q A Q S S S S K Q A Q S S

3481 agtagtcaacaagcccaaagtagcagaagtcagcaagctcatagtagcagaagtgagaca
1161 S S Q Q A Q S S R S Q Q A H S S R S E T

3541 gatagtaagagcagtaaatagtggtggcatttctaatacatagcagtagaactgaacaaaag
1181 D S K S S N S G G H S N H S S R T E Q K

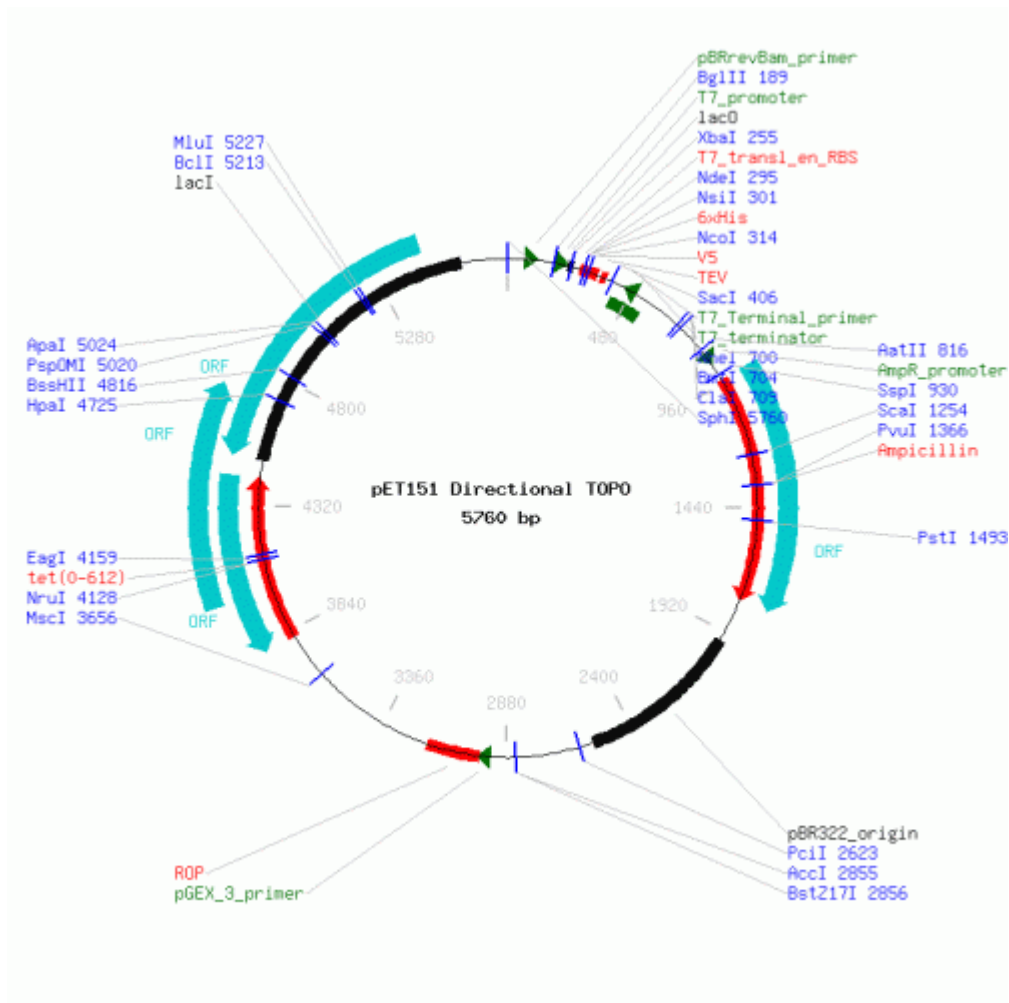
3601 agcagcgcaaaagcaatttcaagcagtgaaacagtcacagaatttctcaagcagttcacag
1201 S S A K A I S S S E Q S Q N F S S S S Q

3661 aaatctgccgaggccgctgatggatctgaaagcaccagtcagcaagtgaataactcgagc
1221 K S A E A A D G S E S T Q S A S E Y S S

3721 agccaatcaaaggccagtagcagtttttagcgcttcgagtgccagtgaaagttcttcatta
1241 S Q S K A S S S F S A S S A S E S S S L

3781 agcagcgacgtgaacttcgaagagaagaccgactaa
1261 S S D V N F E E K T D *

8.4. Příloha č. 4. pET 151 schéma



Obr. 30. pET 151 expresní vektor

8.5. Příloha č. 5. Použité zkratky

- RT.....pokojová teplota
 ASG.....přední oddíl snovací žlázy *Bombyx mori*
 MSG.....střední oddíl snovací žlázy *Bombyx mori*
 PSG.....zadní oddíl snovací žlázy *Bombyx mori*
 Epp.....ependorfka 200 μ l, 1,5 ml
 RNA H₂O.....Qiagen H₂O bez nukleáz
 Demi. H₂O.....demineralizovaná H₂O Sci-Aqua Rodei 200, vyklávaná
 Pcr H₂O.....demineralizovaná H₂O pufrovaná na pH 7 s 1M Tris, vyklávaná
 SŽ.....snovací žláza
 O/N.....přes noc