

**Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích**



Bakalářská práce

Exprese části genu *Ser-2* bource morušového

Zpracovala: **Klára Mičulková**

Vedoucí práce: **prof. RNDr. František Sehnal, CSc.**

Dr. Alexander Sponner

Mgr. Robert Fedič Ph.D.

2009

Mičulková K., 2009 Expres částí genu Ser-2 bource morušového. [Expression of a portion of *Ser-2 Bombyx mori* gene, Bc. Thesis, in Czech]- 41 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotace:

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

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

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

Tato práce byla financována z grantu GA AVČR IAA 5007402.

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat prof. Františku Sehnalovi za umožnění podílet se na tomto tématu, stejně tak i za materiální a odbornou pomoc. Dále bych chtěla poděkovat Dr. Alexandru Sponnerovi za trpělivé vedení mé práce, cenné rady a připomínky. V neposlední řadě také velmi děkuji Robertu Fedičovi za odbornou pomoc při dokončování mé práce a všem členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V Českých Budějovicích 5. května 2009

.....
Klára Mičulková

Obsah

1	HEDVÁBÍ	4
1.1	Objev a výroba hedvábí.....	4
1.2	Výskyt hedvábí v přírodě.....	6
1.3	Vlastnosti komerčně produkovaného hedvábí	7
1.4	Struktura hedvábí bource morušového	8
1.4.1	Proteiny tvořící filamenty - fibroiny a P25	8
1.4.2	Obalové proteiny - sericiny	9
1.4.3	Minoritní komponenty hedvábí	11
1.5	Vývoj bource morušového.....	11
1.5.1	Snovací žlázy bource morušového	13
1.6	Sericiny a jejich využití	15
2	CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	16
3	PRAKTICKÁ ČÁST.....	17
3.1	Materiál	17
3.2	Metodika.....	17
3.2.1	Izolace RNA	17
3.2.2	Syntéza cDNA.....	17
3.2.3	Primery	18
3.2.4	Polymerázová řetězová reakce	18
3.2.5	Klonování do expresního vektoru	19
3.2.6	Polymerázová řetězová reakce z bakteriálních kolonií	20
3.2.7	Sekvenování	21
3.2.8	Expres rekombinantního proteinu.....	21
3.2.9	Pilotní experiment a následná detekce proteinu.....	22
3.2.10	„Dot-Blot “	22
4	VÝSLEDKY.....	23
5	ZÁVĚR	29
6	CITACE A POUŽITÁ LITERATURA.....	30
7	PŘÍLOHY.....	36

1 Hedvábí

1.1 Objev a výroba hedvábí

První zmínky o hedvábí se objevují v Číně a spadají již do 3. tisíciletí př. n. l. Výroba hedvábí zůstala po staletí čínským tajemstvím a hedvábí se stalo v Číně měřítkem bohatství a určitou formou platidla. Podle jedné z legend došlo k objevu technologie výroby hedvábí náhodou, když čínská princezna seděla pod moruší a popíjela šálek čaje, do kterého jí spadl zámotek. Při snaze ho vytáhnout, zjistila, že se z něj odmotává jemné vlákno. Číňané se naučili tyto nitky spřádat do tkanin a začali cíleně chovat housenky, které tato vlákna produkovaly. Postupem doby vyšlechtili plně domestikovaný druh bource morušového (*Bombyx mori*, *Bombycidae*). Výrobní monopol na hedvábí si Čína udržela více jak dva tisíce let, pokus o vývoz technologie se trestal smrtí. Technologie se nejprve rozšířila do Koreje a začátkem našeho letopočtu do Japonska. Do Evropy se hedvábnictví údajně dostalo díky dvěma mnichům, kterým se podařilo propašovat vajíčka bource morušového v duté poustevnické holi (Hyde 1984). Od 7. století n. l. se hedvábnictví rozvíjelo hlavně v Byzantské říši. Díky obchodu s arabskými národy se hedvábí rozšiřovalo i na jih. Definitivně se jeho výroba rozšířila během křížových výprav, kdy křížáci po vyplenění Konstantinopole přivezli do západní Evropy i technologii výroby hedvábí.

Výroba hedvábí ovšem nebyla čistě čínskou záležitostí. Podle nedávných výzkumů se zjistilo, že hedvábí uměli lidé vyrábět již 4000 let př. n. l. na území dnešní Indie. Hedvábí bylo vyrobeno podobně jako v Číně, ale hedvábná vlákna pocházela od místních druhů nočních motýlů martináčů (*Anthereae*). Jde o první důkaz tak časně výroby hedvábí mimo Čínu, který zpochybňuje tradiční pohled, podle něhož je hedvábí výlučně čínským kulturním dědictvím (Good et al. 2009).

Výroba hedvábí se od starověku příliš nezměnila a sestává ze čtyř částí: pěstování morušovníku, jenž jsou potravou monofágních housenek, chov bourců morušových, namotávání hedvábného vlákna ze zámotku na cívky a tkaní hedvábných látek. Larvy bource se krmí listy moruší, případně umělou potravou, jejíž součástí jsou také listy moruší. Po zapředení do kokonu se larvy nebo již kukly zabíjejí horkým vzduchem při 80-85°C nebo párou, aby nedošlo k vylíhnutí motýla a tím k poškození hedvábného vlákna. Kokony se pak krátce namočí v teplé vodě, kde dojde k rozpuštění bílkovin slepujících

zámotek, a uvolněné hedvábné vlákno se s několika dalšími vlákny spojí do niti, která se navíjí a dále zpracovává. Z jednoho kokonu bource lze získat vlákno o délce 300-1200 metrů (Žurovec 1998). Pro představu, na výrobu jednoho kimona je potřeba hedvábí přibližně z 2100 kokonů.

Až do objevu nylonu během druhé světové války bylo hedvábí strategickou surovinou, například pro výrobu padáků. Od konce války je hedvábí často nahrazováno umělými vlákny. Přesto se v posledních 30 letech světová výroba hedvábí téměř zdvojnásobila. Hlavními producenty zůstávají stejně jako v minulých staletích Čína a Japonsko. Obě tyto země vyrobily více jak 50% světové produkce hedvábí. K významným producentům hedvábí řadíme také Indii (Good et al. 2009).

1.2 Výskyt hedvábí v přírodě

Hedvábí produkuje řada členovců ve specializovaných párových exokrinních žlázách (Sehnal a Akai 1990). Tyto žlázy nazývané snovací jsou ektodermálního původu. Pro larvy několika řádů hmyzu s proměnou dokonalou (Holometabola) je typická produkce hedvábí z trubicovitých labiálních žláz, které byly původně žlázami slinnými. Jejich změna na snovací zřejmě proběhla nezávisle v několika vývojových liniích Holometabol (Sehnal a Sutherland 2008). U společných předků chrostíků (*Trichoptera*) a motýlů (*Lepidoptera*) se hedvábí zřejmě objevilo před více než 250 miliony let (Yonemura et al. 2006). Mnoho druhů spřádá odolné kokony, v kterých se housenka zakuklí. Hedvábí jim tedy slouží pouze jako ochranný mechanismus.

Využití hedvábí je velmi různorodé. Například larvy některých chrostíků si pomocí hedvábí slepují písek, kousky rostlin a jiných materiálů do ochranných schránek, zatímco jiné druhy chrostíků si spřádají z hedvábí síť, do kterých chytají potravu. Housenky některých skupin motýlů předou téměř celý svůj život a žijí v zámočcích, které je chrání před nepřízní počasí a nepřáteli (Yonemura a Sehnal 2006), zatímco u jiných skupin je produkce hedvábí omezena na tvorbu kokonu, ve kterém se housenka kuklí. Tvorba ochranné schránky nebo kokonu před kuklením se vyskytuje téměř u všech chrostíků a motýlů. Po vytvoření kokonu podléhají snovací žlázy apoptóze.

Změna funkce hedvábí během ontogeneze je podmíněna změnou jeho složení, i když žlázy jsou jen jedny. Je to umožněno vývojovými změnami exprese některých genů, které kódují bílkoviny hedvábí a přesnou segregací těchto bílkovin v žlázách. Je to zásadní rozdíl od pavouků, kteří pro předání různého typu hedvábí využívají různé žlázy, které jsou většinou aktivní po celý život jedince. Mají až sedm typů žláz k produkci různých hedvábných vláken a proteinů s lepivým účinkem. Každý z těchto produktů slouží k jinému účelu a jeho vlastnosti jsou přizpůsobeny tomuto použití. Rozdílné typy hedvábných vláken slouží k výstavbě lovných sítí, k jejich uchycení k podkladu nebo k tvorbě ochranného zámočku. Proteiny s lepivými účinky zase slouží k přichycení kořisti na síti (Sponner 2007).

Mezi další zástupce, kteří spřádají hedvábí řadíme také blechy (*Siphonaptera*), mušky, svatojánské mušky a mouchy (*Diptera*), pilatky, mravence a včely (*Hymenoptera*).

1.3 Vlastnosti komerčně produkováného hedvábí

Komerční hedvábí se získává z méně než dvaceti druhů housenek (Peigler 1993). Zájem o hedvábí trvá již více než 5000 let, a to nejen pro jeho vlastnosti využívané v textilním průmyslu, pevnost a barvitelnost, ale také pro jeho použití v kosmetickém průmyslu při výrobě krémů, koupelových přípravků, pudrů, make-up a ve farmaceutickém průmyslu (Brooks 1989).

Hedvábné vlákno bylo zprvu ceněno především pro svůj lesk, který je způsobený odrazem světla od anizotropních vrstev. Později bylo vyhledáváno také pro svou dobrou absorpční schopnost, afinitu k barvení, dobré izolační vlastnosti, antikoagulační, vyživující a zvlhčující vlastnosti. Je odolné proti řadě chemických látek a z části vůči UV záření i patogenům. Hedvábí má výjimečné vlastnosti, v přírodě naprosto unikátní, které leckdy převyšují vlastnosti syntetických polymerů (Mondal 2007).

Mechanické vlastnosti hedvábí jsou odvozeny od jeho struktury. Základními vlastnostmi hedvábí jsou pevnost, roztažnost a pružnost. Pružnost měříme modulem pružnosti v tahu, čímž zjistíme, jaké zatížení vlákno v tahu vydrží. Hedvábí z bource morušového má modul pružnosti 15-17 GPa a tažnou sílu 610-690 MPa. Pavoučí hedvábí má modul pružnosti sice jen 1,75 GPa, ale v tahu se může protáhnout až o 26%. Syntetické polymery mají tažnou sílu jen 28-50 MPa. Hedvábí je proto díky své unikátní tažné síle vhodné jako materiál, který vydrží vnitřní zatížení v organismu. Kosti a šlachy mají jednotlivě tažnou sílu 150 a 160 MPa, což syntetické polymery nevydrží (Gandhi 2006).

Mezi velmi zajímavé biologické vlastnosti hedvábí patří biokompatibilita a proto bylo hedvábí dlouhou dobu ideálním materiálem pro chirurgické nitě. Objevilo se však několik znepokojujících zpráv, podle kterých někdy hedvábí vyvolává alergickou odpověď I. typu, kdy dochází ke komplikacím jako je astma a zvýšení imunoglobulinu E. Později bylo zjištěno, že za tuto senzibilitu jsou zodpovědné některé sericiny, jejichž odstranění během zpracování není přesně kontrolováno. Po jejich odstranění a nahrazení voskem či silikonem se již tato senzibilita neobjevila. Z toho důvodu je přírodní hedvábí potenciálně alergenní, ale po dostatečném „degumování“, což je proces odstraňující sericiny, je biokompatibilní (Gandhi 2006).

1.4 Struktura hedvábí bource morušového

Vlákno bource morušového má v průměru až 20 μm , většinou je však tenčí než 10 μm . Každé vlákno obsahuje tři skupiny proteinů: proteiny tvořící tzv. jádro vlákna, obalové proteiny a minoritní (nestrukturální) proteiny (Sinohara 1979).

Proteiny tvořící filamenty jsou sekretovány v zadním oddíle snovací žlázy a obsahují tři komponenty: vysokomolekulární těžký fibroin (H-fibroin, až 500 kDa), nízkomolekulární lehký fibroin (L-fibroin, asi 25 kDa) a glykoprotein P25 (ve dvou formách, u bource 27 a 31 kDa). Lehké a těžké řetězce fibroinu jsou spojeny disulfidickými můstky a P25 je pak k oběma řetězcům připojen nekovalentními interakcemi (Inoue et al. 2000). Tyto tři složky se hromadí v endoplasmatickém retikulu, vytvoří mikrofibrily v Golgiho vakuolách a poté jsou uvolněny jako sekreční granula do lumenu žlázy, kde jsou shromažďovány jako vysoce koncentrovaný gel (hedvábí I., α -šroubovice). Gel je posouván do střední části snovacích žláz, kde je obalován dalšími sekrečními produkty zvanými sericiny. Fibroiny i sericiny polymerizují do vlákna během vypřádání, kdy procházejí přední snovací žlázou a snovací bradavkou. Proces polymerizace nebyl dosud objasněn, jednou z podmínek je odčerpání vody, protažení na podstatně menší průměr (shearing) a patrně také změna iontových poměrů (hedvábí II., β -skládaný list). Filamenty se z fibroinů vytvářejí velice rychle a jejich polymerizace a vlastnosti závisejí na repetitivních motivech v H-fibroinu. Sericiny polymerizují se zpožděním: vnitřní sericiny slepují filamenty v jedno vlákno a vnější sericiny fungují jako lepidlo, kterým se vlákno pevně uchytí k podkladu a také se jím jednotlivá vlákna slepují do stěny kokonu (Sehnal 2008).

1.4.1 Proteiny tvořící filamenty - fibroiny a P25

Fibroiny jsou proteiny tvořící jádro hedvábného vlákna a jsou sekretovány výlučně v zadní části snovacích žláz. Skládají se ze tří podjednotek:

Těžký řetězec fibroinu

Těžký řetězec fibroinu (H-fibroin) je hlavní protein tvořící jádro hedvábného vlákna a jeho struktura určuje vlastnosti hedvábného vlákna. Gen H-fibroinu byl u bource morušového lokalizován na 25. chromozomu (Kimura et al. 1985) a jeho úplná sekvence

byla dokončena v nedávné době (Zhou et al. 2000). Obsahuje dva exony a jeden intron. První exon je malý 67 nukleotidů a je následovaný intronem (Takaya et al. 1997). Druhý exon je velký 15750 nukleotidů a jeho převážná část je tvořena repetitivními motivy. Uspořádání těchto motivů pak udává fyzikální vlastnosti daného typu hedvábného vlákna. Charakteristickým znakem genu H-fibroinu je vysoký obsah GC basí (63%).

Lehký řetězec fibroinu

Gen pro lehký řetězec fibroinu (L-fibroin) byl u bource morušového lokalizován na 14. chromozomu. Je tvořen sedmi exony, které jsou přerušeny šesti introny a celkově obsahuje 13472 nukleotidů (Kimura et al. 1985). L-fibroin je spojen s H-fibroinem disulfidickými můstky (Yamaguchi et al. 1989), tato disulfidická vazba je podstatná pro tvorbu filament, jak bylo dokázáno analýzou mutace tzv. „nahé kukly“ (Takei et al. 1987, Mori et al. 1995).

P25

P25 je glykoprotein, který se v závislosti na stupni glykosylace vyskytuje ve dvou formách (u bource 27 a 31 kDa). Tvoří pevnou strukturu díky intramolekulárním disulfidickým můstkům, ale s L a H fibroinovým komplexem je spojen nekovalentními interakcemi. U bource je gen P25 v jedné kopii, je téměř 3500 nt dlouhý a zahrnuje pět exonů o celkové velikosti 1173 nt (Couple et al 1985, Chevillard 1986b). Sekvence 5' konce vykazuje podobnost genu pro H-fibroin.

1.4.2 Obalové proteiny - sericiny

Sericiny jsou hlavní skupinou proteinů produkovaných ve střední části snovacích žláz MSG (MSG je odvozeno od middle silk gland). Jejich adhezivní vlastnosti umožňují slepování filamentů v jedno vlákno a slouží také k přilepování vláken k podkladu a k sobě navzájem.

Sericiny obsahují vysoké množství aminokyseliny serinu (16-42%) a také vyšší počet hydrofilních aminokyselinových zbytků, které způsobují jejich rozpustnost v horké alkalické vodě (Komatsu 1975, Gamo 1977). Tři sericinové geny kódují velkou rodinu sericinových proteinů. Gen *Ser-1* byl lokalizován na src lokusu 11. chromozomu (Doira 1983) a jeho struktura byla kompletně dokončena Garelem (1997). *Ser-1* je dlouhý 23 kb,

obsahuje devět exonů a kóduje čtyři mRNA o velikostech 2,8/2,9 kb, 4,0 kb, 9,0 kb a 10,5 kb (Garel et al. 1997, Michaille et al. 1986, Fedič 1996). *Ser-1* je transkribován nejvíce během pátého instaru v centrálním a distálním úseku MSG, celkem ve 150 buňkách. Čtyřicet dva buněk distálního úseku produkuje neustále *Ser-1* mRNA o velikosti 2,8 kb. Dalších 108 buněk během posledního larválního instaru postupně produkuje alternativním sestřihem mRNA o velikostech 4,0 kb, 10,5 kb a 9,0 kb (Michaille et al. 1986). Všechny čtyři transkripty sdílí exony 1, 2, 7, 8 a 9, takže mají identický 5' a 3' konec, zatímco exony 3, 4, 5 a 6 jsou alternativní (Garel 1997). Šestý exon je největší a skládá se přibližně z 60 opakování charakterizovaných motivy o 114 bp (Okamoto et al. 1982). *Ser-1* syntetizuje sericin o velikosti 150 kDa (sericin P) a 400 kDa (sericin M).

Gen *Ser-2* je lokalizován na lokusu Ser2 11. chromozomu (Gamo 1982). Je vysoce polymorfní a obsahuje 13 exonů, které mají velikost v rozmezí 28-2574 bp (Michaille et al. 1990a). Uspořádání exonů genu *Ser-2* je 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9a, 10a, 9b, 10b a 11 (Kissinger et al. 1990). Transkript *Ser-2* je exprimován převážně v proximální oblasti střední části snovací žlázy (Couple et al. 1987). *Ser-2* gen objevila Michaille et al. (1990a) a byl důkladně zmapován pomocí restriktáz EcoRI, HincII, KpnI, HincII a XbaI. Byl lokalizován jeho start transkripce a 3' konec a byl identifikován hlavní opakující se motiv, který je důležitý pro polymerizaci sericinů a jejich interakci s jinými proteiny (Huang et al. 2003). Jen určité oblasti sericinů jsou pravděpodobně zodpovědné za lepivost, přilnavost k substrátu a jejich mechanické vlastnosti (Teramoto and Miyazawa 2005). Každá alela genu *Ser-2* dává vzniknout alternativním sestřihem dvěma variantám mRNA. mRNA o velikosti 3,1 kb je přítomna u larev každého haplotypu. mRNA 5,0, 5,4 nebo 6,4 kb je závislá na alele (Michaille et al. 1990). Analýzy DNA odhalily, že mRNA jsou produkty alternativního sestřihu exonu 9a. *Ser-2* produkuje proteiny o velikosti 220 a 130 kDa. Je exprimován časněji než *Ser-1*.

Rozdíly v expresi a sestřihu sericinových genů v různých částech MSG se promítají do typů sekretovaných sericinů. Dlouhý zadní úsek MSG produkuje zejména protein o velikosti 150 kDa (sericin P), střední úsek protein o 400 kDa (sericin M), oba proteiny jsou kódovány genem *Ser-1*. Protein o velikosti 250 kDa (sericin A) je tvořen v proximální oblasti MSG a je produktem genu *Ser-2* (Takasu et al. 2002).

Další protein, který tvoří vnější vrstvu kokonu a vyskytuje se jen v první fázi předení, je pravděpodobně produktem genu *Ser-3*. *Ser-3* je exprimován v předním a středním úseku střední části snovacích žláz. Byl jako předešlé dva geny lokalizován na chromozomu 11. Mezera mezi *Ser-1* a *Ser-3* je okolo 2Mbp (Takasu et al. 2007).

1.4.3 Minoritní komponenty hedvábí

Jednotlivými analýzami kokonu se odhalila přítomnost několika dalších menších bílkovin s neznámou funkcí (Sasaki a Noda 1973, Shimura et al. 1976, Kodrik 1992). Akai (1997) upozornil na to, že hedvábí není napadáno bakteriemi, plísněmi, ani hmyzem. Kukly uvnitř kokonů jsou málokdy napadány predátory a netrpí ani nemocemi, přestože vývoj v kokonu může trvat i několik měsíců. Proto předpokládal, že malé bílkovinné složky hedvábí obsahují antimikrobiální látky a složky, které odpuzují predátory. Některé z těchto proteinů byly podrobeny dalšímu zkoumání. Byly objeveny seroiny, které jsou dvou typů. Seroin 1 je protein o molekulové hmotnosti 9,9 kDa a seroin 2 o 10,5 kDa. Geny obou seroinů jsou exprimovány v MSG a z malé části i PSG (posterior silk gland) (Žurovec et al. 1998, Nirmala et al. 2001b) Objeveny byly také proteázové inhibitory Kunitzova a Kazalova typu, které jsou účinné na některé houby a bakteriální proteázy (Nirmala et al. 2001a, Kludkiewicz et al. 2005).

1.5 Vývoj bource morušového

Hmyz dělíme na tři skupiny: ametabolní, hemimetabolní a holometabolní. U ametabolního hmyzu je proměna larev v dospělce postupná, u dvou ostatních skupin se vyskytuje metamorfóza. U hemimetabolního hmyzu se dospělec vyvíjí z larvy, která se od dospělce liší v podstatě jen nevyvinutými křídly a genitáliemi. Tyto orgány dosáhnou funkční velikosti během nedokonalé proměny (metamorfózy) larvy posledního instaru v dospělce. U holometabolního hmyzu vzniká dospělec přeměnou dokonalou, přes stádium kukly. Larvy se od dospělců často liší k nepoznání (např. housenka a motýl), protože imaginální orgány jako jsou křídla, genitálie, ale v některých případech i končetiny, složené oči aj. jsou u nich založeny uvnitř těla ve formě imaginálních terčků. Stádium kukly umožňuje překlenout obrovské morfologické a funkční rozdíly mezi larvou a dospělcem. Kukla, je zdánlivě obdobím klidu, uvnitř těla však ke konci posledního larválního instaru a během kuklení probíhá intenzivní morfogenéza (Chapman 1969). Zahrnuje histolýzu již nepotřebných larválních orgánů (včetně snovacích žláz) a dotváření orgánů imaginálních (např. křídla).

Bourec morušový (*Bombyx mori*, *Lepidoptera: Bombycoidea*) patří mezi

holometabolní hmyz. Dospělá samička klade 300-500 vajíček a brzy poté umírá (Encarta 1998). Vajíčka jsou žluté barvy a později tmavou. Po deseti dnech se začínají líhnout larvy, které mají na těle malé tmavé chloupky a intenzivně lezou. Po nalezení potravy se krmí a rostou přibližně 6 týdnů, přičemž se čtyřikrát svlékají. V posledním, pátém, larválním instaru housenky dosahují velikosti okolo 4 cm, přestávají žrát, vyprazdňují střevo a hledají vhodné místo k uchycení zámotku (kokonu). Larva nejprve vypřeде uchycení kokonu a pak pomalými pohyby hlavy po dráze ve tvaru osmičky kolem sebe během zhruba tří dnů vytvoří vodotěsný zámotek. Vykoná při tom statisíce krouživých pohybů hlavy. Bourec tráví jako kukla, chráněný bezpečím svého kokonu, dva týdny a pak se líhne jako dospělý motýl (Encarta 1998). Sekretem, zachovaným předních částí snovacích žláz, motýl zčásti rozpustí stěnu kokonu a vzniklým otvorem vyleze ven (Sehnal 1985). Dospělci mají rozpětí křídel 3-5 cm, nejsou však schopni letu. Na břicho má samička žlázu produkující feromon, který je pro samce signálem k vibraci křídel („třepetavý tanec“). Po vyhledání samičky nastává kopulace. Pomocí feromonu se samičky se samečkem snáze najdou (Pines 1997).



Obr. 1: Vývoj bource morušového. Larva posledního 5. instaru (vlevo), kukla bource v kokonu (uprostřed) a dospělá samička kladoucí vajíčka (vpravo). (autor. J. Dvořák)

Housenky bource morušového se živí výhradně listy moruše, ať už bílé (*Morus alba*) nebo černé (*Morus nigra*). Výjimečně lze vypěstovat linie přežívající i na salátu nebo listech pampelišky. V současnosti se většinou krmí umělou potravou. Potravu přijímají jen

během larválního stádia, kdy jejich hmotnost vzroste až devěttisíckrát (Encarta 1998). Larvy mají dobře vyvinuté kousací ústní orgány, zatímco dospělci mají reziduální savá ústa, nepřijímají potravu a po několika dnech hynou (Lepidoptera part 2 1997).

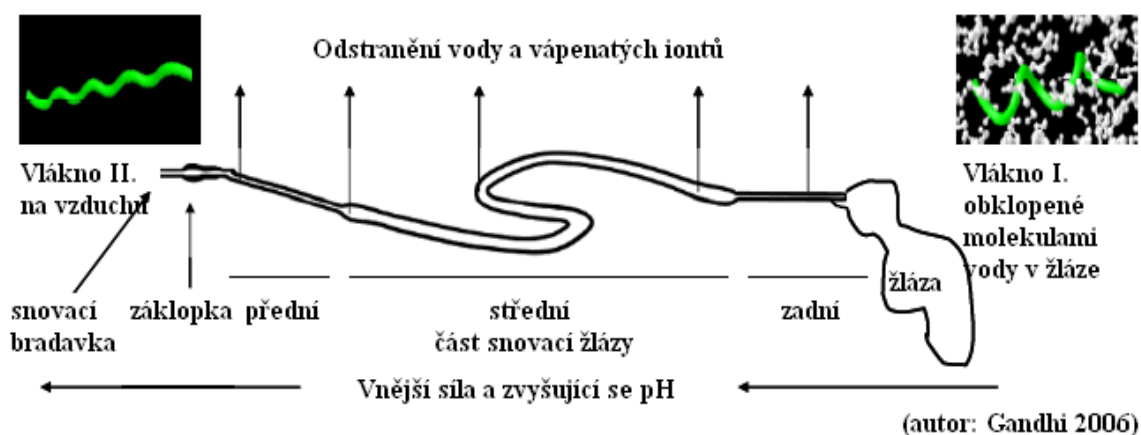
Negativním důsledkem dlouhodobé specializace bource morušového na hedvábí, je jeho úplná závislost na člověku. Larvy bource nejsou schopny udržet se na listech moruše, proto musí být krmeny. Dospělí bourci nejsou schopni přijímat potravu ani létat, špatně lezou a žijí jen krátce. Bez lidské péče by pravděpodobně selhalo vyhledávání samců a samic a tedy reprodukce (Herbinson-Evans 1997, Yoshitake 1968).

Bourec morušový se postupně stal důležitým modelovým organismem. Na proteinech těžkého řetězce fibroinu bource byla poprvé popsána β -sktruktura skládaného listu bílkovin (Pauling and Corey 1953). U bource byla rovněž objevena signální molekula vnímaná čichem a dostala jméno feromon (Pines 1997). Nyní se feromon bource označuje specifickým jménem bombykol.

1.5.1 Snovací žlázy bource morušového

Snovací žlázy jsou párový orgán ektodermálního původu. Jsou to modifikované labiální žlázy vznikající během embryogeneze invaginací několika desítek až stovek buněk do bazální oblasti labia. Vchlípené buňky se dělí a sestavují do řady. Již za 60 hodin po invaginaci získávají žlázy konečný tvar. První proteiny hedvábí se v lumen těchto žláz objeví za 132 hodin po invaginaci. Snovací žlázy jsou tvořeny asi dvěma tisíci buněk, ve kterých během larválního vývoje probíhá replikace DNA, ale nikoliv buněčné dělení. To vede ke vzniku vysoce polyploidních buněk (Akai 1984). S polyploidizací je spojen i další růst snovacích žláz, což vede ke značnému zvětšování buněk. Konečná ploidie se v různých částech orgánů liší: v zadním oddíle dosahuje zhruba 18 až 19, ve středním 19 až 20 a v předním jen 13 endomitotických cyklů. Sekreční polyploidní buňky obsahují jádra s četnými výběžky a uvnitř jader se nacházejí početná jádérka. Výzkumem snovacích žláz se zjistilo, že opakovaná syntéza hedvábí a jeho vylučování během života larvy, je provázena cyklickým zmnožením příslušných buněčných struktur, především endoplazmatického retikula a rozvojem Golgiho komplexu. Soustava mikrotubulů a mikrofibril slouží v buňkách k vnitrobuněčnému transportu sekrečních granulí (Prudhomme et al. 1985). Během vývoje larvy kolísá i produkce hedvábí a s tím souvisí také kolísání exprese genů potřebných k tvorbě hedvábí. Koncem pátého instaru se

v buňkách snovacích žláz bource výrazně mění složení tRNA. Hromadí se hlavně specifické tRNA, jejichž kodony se v sekrečních proteinech vyskytují s vysokou frekvencí. V době maximální syntézy proteinů, což je nejčastěji 8. den posledního instaru, je produkce glycinové, alanylové a serinové tRNA ve snovacích žlázách naprosto odlišná od produkce na začátku instaru (Goldsmith a Kafatos 1984).



Obr. 2: Snovací žláza bource morušového. V žláze je shromažďován koncentrovaný gel, který je pak posouván přes zadní, střední a přední část snovací žlázy do snovací bradavky. Při posunu je postupně odstraňována voda, vápenaté ionty jsou reabsorbovány a dochází ke zvyšování pH. Působením těchto změn a pomocí vnější síly, dochází k přeměně vlákna I. (α -šroubovice) na vlákno II. (β -skládaný list).

1.6 Sericiny a jejich využití

Sericiny jsou polypeptidy slepující a obalující fibroinové filamenty. Jsou rozpustné v horké mírně alkalické vodě. Vláknو uvolněné z kokonu tímto postupem sestává převážně z páru filamentů obklopených vrstvou vnitřních sericinů. Několik vláken je smotáno v surovou hedvábnou nit, zatímco rozpuštěné sericiny jsou odpadním produktem (Fabiani et al. 1996). Vývoj efektivní sericinové extrakce z odpadní vody umožňuje aplikaci sericinu v kosmetice a farmaceutickém průmyslu. Sericiny se dají použít jako lehce odbouratelné biomateriály pro produkci polymerů, lepidel, membrán a vláken pro průmyslové využití (Zhang 2002). UV pohlcující a mají zvlhčující vlastnosti, které opravňují jejich přidávání do pleťových krémů a vlasových produktů (Zhaorigetu et al. 2003). Léky z hedvábí jsou populární ve východní Asii a bylo již navrženo i několik lékařských aplikací sericinů např. použití sulfátových přípravků jako antikoagulanty (Tamada et al. 2004).

Sericiny o malé molekulové hmotnosti (≤ 20 kDa) jsou rozpustné ve studené vodě a objevují se v počátečních stádiích produkce hedvábí. Používají se nejčastěji v kosmetice do pleťových krémů a vlasových přípravků, produktů pro zdraví a léčiv. Peptidy sericinu o velké molekulové hmotnosti (≥ 20 kDa) jsou rozpustné jen v horké vodě a jsou získávány v pozdějším stádiu zpracování hedvábí, tzv. „degumování“. Slouží jako medicínské biomateriály, složky polymerů a hydrogelů (Zhang 2002).

Biomedicínské využití fibroinových i sericinových komponent hedvábí bylo podpořeno pokrokem v tkáňovém inženýrství a regulovanou kultivací různých typů kmenových buněk. Přípravky z hedvábí jsou prokazatelně vhodné k použití jako lešení pro funkční opravy tkání. Komerčního využití sericinů se dosáhlo při jejich užití jako náhrady hovězího séra v kultivačních médiích. Ukázalo se, že sericiny mají pozitivní vliv na buněčnou proliferaci mnoha typů buněk. Byla např. sledována i stimulace lidských kožních fibroblastů k lepší kompatibilitě se substrátem (Reimers nepublikováno).

Sericiny mohou být také využity jako zdroj proteinů pro kosmonauty (Yang 2009). Obsahují 18 druhů aminokyselin, z nichž je víc jak 90% dobře absorbováno lidským tělem. 17% z nich je tvořeno 8 aminokyselinami, které jsou pro člověka esenciální. Tyto hodnoty jsou vyšší než v běžném jídle (Zhang et al. 2002).

2 Cíl bakalářské práce

Vlastnosti sericinů záleží zejména na těch částech molekuly, které obsahují opakované motivy. Repetice určitých motivů jsou pravděpodobně zodpovědné za lepivost, přilnavost k substrátu a mechanické vlastnosti, zatímco jiné repetice mohou být důležité pro stimulaci buněčné proliferace. Objasnění funkce a možného praktického využití různých sericinů a jejich částí je možné pomocí rekombinantních proteinů, které lze připravit v dostatečném množství a v modifikacích cílených na verifikaci vztahů mezi strukturou a funkcí.

Cílem mé bakalářské diplomové práce byla příprava rekombinantního peptidu z části genu *Ser-2* v bakteriálním expresním systému. Předpokládá se pokračování práce zaměřené na vyčištění a funkční zkoušky rekombinantního proteinu. Pro práci byl vybrán úsek kódující oblast od nukleotidu 35 po nukleotid 397 (Kludkiewicz et al., 2009). Sekvence nukleotidů i odvozená peptidická sekvence jsou znázorněny v příloze č. 3.

3 Praktická část

3.1 Materiál

Jako materiál byly použity housenky bourců morušových japonského kmene Daizo p50, které byly po vylíhnutí chovány v plastových krabicích a krmeny listy bílé moruše při teplotě 24°C. Pro náš experiment byly použity larvy v posledním instaru.

3.2 Metodika

3.2.1 Izolace RNA

Pro izolaci celkové RNA byly použity snovací žlázy vypreparované z posledního larválního instaru *Bombyx mori* z japonského druhu Daizo p50, který byl anestetizován ponorem do vody. RNA byla izolována z MSG 1, 2 (MSG1-střední část jedné žlázy z párové snovací žlázy, MSG2-druhá část) a PSG (kontrola) pomocí Trizolu (Invitrogen). Na spektrofotometru byla změřena koncentrace RNA, pro další postup bylo použito 10 µg celkové RNA.

3.2.2 Syntéza cDNA

Syntéza prvního řetězce cDNA byla provedena ve dvou krocích pomocí kitu SuperScript III (Invitrogen), 1 reakce (20 µl):

50 µM oligo(dT)_n..... 1 µl

10 mM dNTP Mix..... 1 µl

Celkové RNA (220 ng/ µl)..... 2 µl

Doplnit H₂O do 13 µl

Inkubace 5 min při 65°C, pak ihned nejméně 1 min na led

5x pufr pro syntézu prvního řetězce cDNA4 µl

0,1 M DTT1 µl

H₂O 1 µl

SuperScript III RT 1 µl

Pipetováním jemně promíchat, inkubace 60 min při 50°C a 55°C, pak 15 min při 70°C.

Polymerázová řetězová reakce k amplifikaci cDNA:

10x PCR pufr 5 μ l
50 mM MgCl₂1,5 μ l
10 mM DTP Mix 1 μ l
5 pmol BM2ex0,3 μ l, (10 pmol exp2001 forward.....1 μ l)
5 pmol BMSer2.....0,3 μ l, (10 pmol exp2001 reverse.....1 μ l)
Tag DNA polymeráza (5U/ μ l)..... 0,4 μ l
cDNA(ze předešlé syntézy) 2 μ l
Doplnit do 50 μ l H₂O

Na termocykleru byl spuštěn program: 94°C 2 min, 94°C 30s, 47°C 30s, 72°C 40s 35 opakování. Pro expresní primery byl použit program „touch down“, kdy T_m 57°C klesala s každým cyklem o 0,5°C až na teplotu 48°C. Vzorky byly poté analyzovány na 1,25% agarózovém gelu. Elektroforéza byla prováděna při napětí 50V (Obr. 3). Produkty byly vyříznuty a purifikovány kitem MinElute Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen). Takto získaná DNA byla dále amplifikována v PCR s Pfx Platinum DNA polymerázou.

3.2.3 Primery

BM2Ex forward : 5'-GCGTGGCTGTGGTCAACG- 3'

BMSer2 reverse : 5'-CAGAGATCTGAAAGACGAGC- 3'

Exp2001 forward : 5'-CACCGGCGTGGCTGTGGTCAACG- 3'

Exp2001 reverse : 5'-TCACTCGTCTTTCAGATCTTC- 3'

T7 Promoter Primer 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

3.2.4 Polymerázová řetězová reakce

Pro zaklonování do expresního vektoru pET160/GW/D-TOPO musí mít náš PCR produkt tupé konce. Těch dosáhneme použitím Pfx Platinum DNA polymerázy (Invitrogen), která vytvoří požadované tupé konce.

2 reakce:

10 x Pfx Amplifikační pufr 5 μ l
2,5 mM dNTP Mix 3 μ l

50 mM MgSO ₄	1 µl
Templát DNA (10 pg – 200 ng)	1 µl
10 µM Primer 1 expBMSer2 rev	1, 5 µl
10 µM Primer 2 expBM2Ex fw	1, 5 µl
Platinum Pfx DNA polymeráza	0,6 µl
H ₂ O doplnit do objemu	50 µl

Na termocykleru (T300, Biometra) byl spuštěn program pro PCR „touch down“ : 94°C 5 min, 94°C 15 s, 55°C 30 s, 68°C 45 s, 68°C 10 min, 4°C pause. T_m byla snižována o 0,5°C až na teplotu 47°C. PCR produkt byl poté analyzován na 1, 25% agarózový gel a elektroforéza běžela při napětí 50V. Proužky v oblasti 362 bp (Obr. 4) byly vyříznuty a purifikovány MinElute Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen).

Byla změřena koncentrace DNA ve vzorku na spektrofotometru a tato DNA byla použita k zaklonování do expresního vektoru pET160/GW/D-TOPO. Je potřeba 1-5 ng 1 kb PCR produktu.

3.2.5 Klonování do expresního vektoru

The Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits (Invitrogen) řídí správné zaklonování PCR produktu do expresního vektoru pomocí tupých konců vytvořených Pfx DNA polymerásou. Reakce je provedena bez použití ligázy, post-PCR procedurách nebo vyžadování restrikčních enzymů. Reakce probíhá díky topoisomeráse I., která váže DNA ve specifických místech a rozštěpí fosfodiesterické vazby na 5'-CCCTT jednoho řezce (Shuman, 1991). Vznikne kovalentní vazba mezi 3' fosfátem rozštěpeného řetězce a tyrosinového zbytku topoisomerázy I. (Tyr - 274). Tato vazba je postupně atakována 5' hydroxyly původního rozštěpeného řetězce a topoisomeráza je uvolněna (Shuman 1994). V tomto systému je PCR produkt zaklonován přidáním 4 basí CACC k přednímu primeru, což bylo provedeno pomocí PCR s Pfx Platinum DNA polymerásou. Výsledný produkt je ověřen sekvenováním a zaklonován do expresního vektoru pET160/GW/D-TOPO a poté přenesen do buněk TOP10 *E. coli* kmen DH5α (uchovány v -80°C).

Klonování do expresního vektoru (1 reakce):

Čerstvý PCR produkt	1 µl (1 - 5 ng 1 kb PCR produktu)
Roztok soli	1 µl

Vektor pET160/GW/D-TOPO 1 μ l

Doplnit do 6 μ l H₂O

Reakce byla promíchána, inkubována 15 min při laboratorní teplotě a poté byla reakce dána na led. Z TOPO klonovací reakce byly přeneseny 3 μ l k TOP10 buňkám (slouží k pomnožení a udržení plasmidu) a byly inkubovány 10 min na ledu. Tepelný šok: 30 s při 42°C, okamžitě dát na led. Bylo přidáno 250 μ l S.O.C. media při lab. teplotě a pak byla reakce inkubována 1 hod na třepačce při 37°C. Po inkubaci byly buňky rozlity na dvě plotny s agarem (15 g Bacto agaru, Sigma na 1 l LB media, po sterilizaci a následném vychládnutí byl přidán AMP) a inkubovány do druhého dne při 37°C. Druhý den byly narostlé buňky rozočkovány na nové plotny a další den byla z klonů jedné kolonie provedena PCR.

3.2.6 Polymerázová řetězová reakce z bakteriálních kolonií

Tato PCR se provádí k rozlišení kolonií se správně zaklonovaným plasmidem, 1 reakce:

10x vyvíjecí pufr 2, 5 μ l

2, 5 mM dNTP Mix 2 μ l

10 μ M Primer 1 expBMSer2 rev 1 μ l

10 μ M Primer 2 expBM2Ex fw 1 μ l

Templát (jednotlivé kolonie rozsuspendované ve 20 μ l sH₂O) 10 μ l

rTag polymeráza (TaKaRa) 0,125 μ l

H₂O doplníme do 25 μ l

Vzorky byly vloženy do termocykleru (T300, Biometra) a byl spuštěn program: 94°C 2 min, 94°C 30 s, 47°C 30 s, 72°C 40 s, 35 opakování, 72°C 10 min. PCR produkt byl nanesen na 1, 25% agarózový gel (Obr. 5). Kolonie, u kterých bylo prokázáno vložení plasmidu ve správném směru, byly dále naočkovány do tekutého LB media (20 g Difco LB Broth Lennox, Sigma na 1 l H₂O, pH 7, po sterilizaci a ochlazení přidat 100 μ g AMP/1 ml LB media), z kterého byl poté plasmid izolován pro další práci kitem QIA prep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Po pomnožení v LB mediu byl plasmid použit do PCR reakce k ověření, zda obsahuje insert. Jako primery byly použity BM2Ex fw a BMSer2 rev. Byl použit následující program: 94°C 5 min, 94°C 30 s, 47°C 30 s, 68°C 30 s, 29 opakování, 72°C 10 min a primer T7 s expresním reversním primerem v programu 94°C 5 min, 94°C 30 s, 48°C 30 s, 72°C 40 s, 14 opakování, 94°C 30 s, 41°C 30 s, 72°C 40 s, 28 opakování,

72°C 10 min. Elektroforéza probíhala na 1,25% agarózovém gelu při 50V (Obr. 6). Produkty v očekávané velikosti 546 bp s primery T7 a expresním reversním byly vyříznuty a po purifikaci byl PCR produkt použit k sekvenci.

3.2.7 Sekvenování

Bylo provedano kitem BigDye Terminator 1.1 Cycle Sequencing Kit, 1reakce:

Templát 10 µl

5x pufr 1,5 µl

Směs oligonukleotidů..... 2 µl

5pM Primer T7 forward 1 µl

sH₂O doplnit do 20 µl

Na termocykleru (T300, Biometra) byl zapnut program: 96°C 1 min, 96°C 10 s, 50°C 15 s, 60°C 4 min, 35 opakování. Vzorky byly dále zpracovány dle manuálu DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen). Vlastní sekvenční reakce byla provedena na přístroji 3130xl Genetic Analyza (Applied Biosystems), (Obr. 7).

3.2.8 Exprese rekombinantního proteinu

Buňky BL21 Star (DE) kmene *E. coli* jsou specificky navrženy pro expresi genu regulovaných promotorem T7. Plasmid byl udržován v TOP10 buňkách a pro expresi byl přenesen do BL21 buněk. Buňky BL21 jsou uloženy v -70°C, před použitím je nutné je šetrně rozmrazit. Přidat 1 µl 10 ng DNA plasmidu do jedné zkumavky s buňkami BL21, velice jemně promíchat. Inkubace na ledu 30 min. Tepelný šok: 45°C 30 s, ihned na led. Pak bylo přidáno 250 µl S.O.C. media a uzavřená zkumavka byla inkubována 1 hod při 37°C na třepačce. 200 µl této reakce bylo poté rozlito na plotnu s agarem a AMP a kultivováno min. 24 hod při 37°C. 50 µl reakce bylo zamraženo ve 100 µl roztoku LB media s 30% glycerolem při -70°C. Plotny byly uchovány při 4-8°C, vzorky s TOP10 a BL21 buňkami v LB mediu s glycerolem byly uloženy v -80°C a všechny ostatní vzorky byly standardně uchovány při -20°C.

3.2.9 Pilotní experiment a následná detekce proteinu

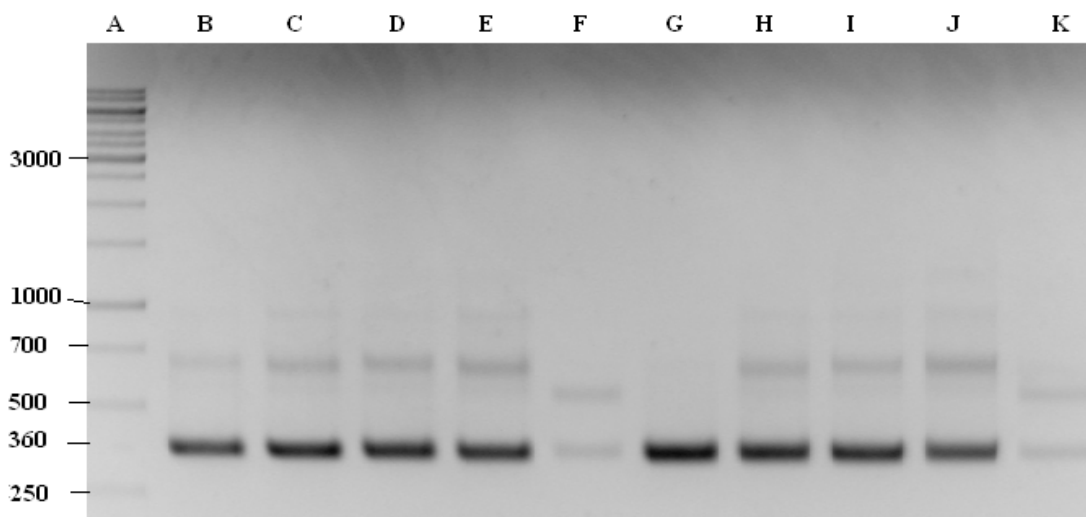
Bylo postupováno dle návodu (Invitrogen). Optická denzita OD buněk BL21v LB mediu s AMP byla měřena na spektrofotometru (BioPhotometer, Eppendorf, 8,5mm) a po dosažení požadované OD₆₀₀ 0,5-0,8 bylo přidáno 0,8M 20% IPTG k indukci exprese proteinu (0,5-1mM konečná koncentrace IPTG v kultuře buněk BL21). Po 4 hodinové inkubaci v 37°C byla provedena detekce proteinu použitím Lumio Green Detection Kit (Invitrogen). Využívá biarsenikální činidlo, které se váže na Lumio tag (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys) přítomný v expresním vektoru a jeho pomocí je detekován protein. Po navázání činidla na úsek s tetracysteinovým motivem vykazuje činidlo silnou fluorescenci a díky ní detekujeme protein na gelu. Elektroforéza běžela na komerčním 4-20% polyakrylamidovém gelu (BioRad) při 150V, 50W, po dobu 90 minut (Obr. 8).

3.2.10 „Dot-Blot “

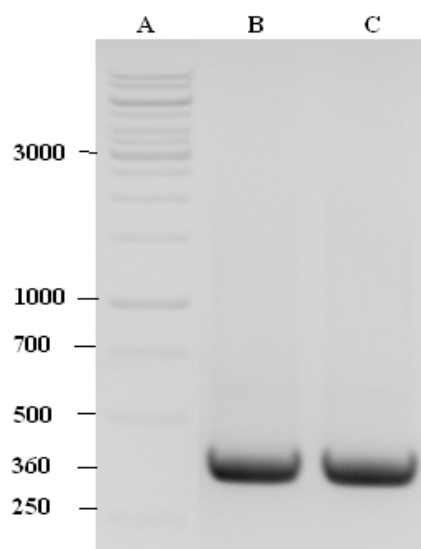
Na nitrocelulózovou membránu (cca 4 x 4 cm) byl nanesen bakteriální pelet z pilotního experimentu. Reakce byla provedena na dvou nitrocelulózových membránách, na jedné za použití blokovacího pufru PBS a na druhé byla reakce blokována v pufru TBS, stejně tak i kontroly. Dále bylo postupováno dle návodu Immunoblotting (Sigma-Aldrich). Jako primární protilátka byla použita myší monoklonální protilátka Anti-polyHistidin (Sigma-Aldrich, Clone HIS-1) v ředění 1:3000, sekundární protilátka byla použita z kitu SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo scientific) v ředění 1:10000 (Obr. 9).

4 Výsledky

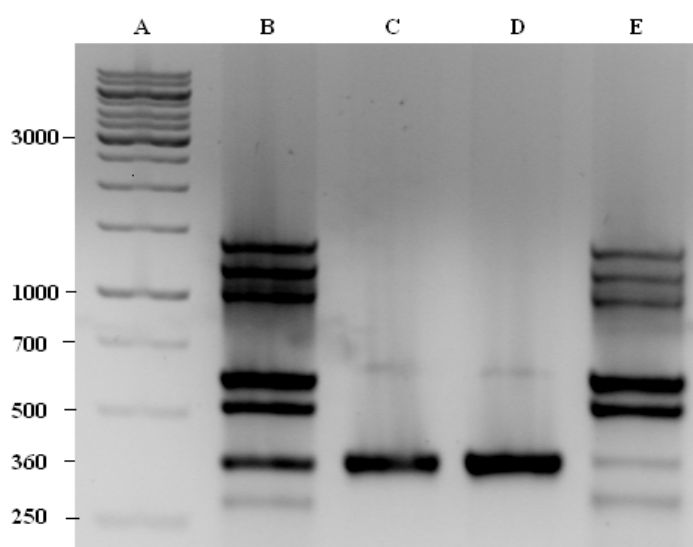
Pomocí obrázků dokumentuji schůdnost zvolených postupů. Komentář je omezen na popisy obrázků, což v této fázi výzkumu považuji za dostatečné.



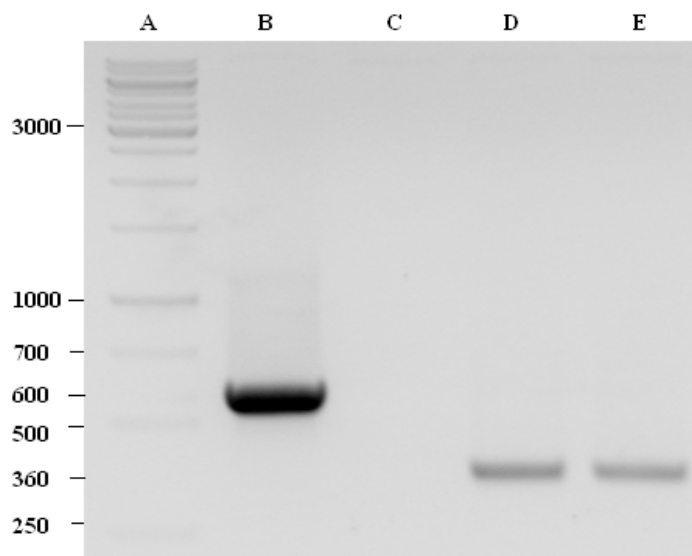
Obr. 3: Amplifikace hledané sekvence v cDNA připravené z různých částí snovacích žláz. V dráze **A** je standard (Gene Ruler, 1 kb DNA ladder, Fermentas), v ostatních drahách jsou amplifikované produkty. Dráhy **B-E** a **H-J** ukazují amplifikaci cDNA ze střední části snovacích žláz (MSG). Dráhy **F** a **K** demonstrují absenci příslušné cDNA v preparátu z koncové části snovacích žláz (PSG). Specifikace jednotlivých dráh, amplifikace při 55°C: **B** cDNA z MSG1, amplifikace s genově specifickými primery, **C**: MSG1 s expresními primery, **D**: MSG2 s genově specifickými primery, **E**: MSG2 s expresními primery. **F**: PSG (kontrola) s genově specifickými primery. Dráhy **G-K** odpovídají stejnému uspořádání jako dráhy **B-F**, ale reakce probíhala při 50°C.



Obr. 4: Amplifikace produktu pomocí PCR s Pfx Platinum DNA polymerázou a expresními primery. V dráze **A** je standard (Gene Ruler, 1 kb DNA ladder, Fermentas) V drahách **B** a **C** je amplifikace cDNA z MSG 1 a MSG 2.



Obr. 5: PCR z bakteriálních kolonií. V dráze **A** byl použit standard (Gene Ruler, 1 kb DNA ladder, Fermentas). V drahách **B-E** jsou kolonie bakteriálních buněk TOP10. DNA kolonií **B**, **C** a **D** obsahuje insert očekávané velikosti 362 bp.



Obr. 6: PCR k ověření správné orientace plasmidu v buňkách TOP10. Dráze **A** velikostní DNA standarty (Gene Ruler, 1 kb DNA ladder, Fermentas) **B:** plasmid z 1. kolonie buněk TOP10, PCR pomocí T7 forward primeru (odpovídá části plastidové DNA) a expresního reversního primeru prokazuje správnou orientaci (po purifikaci byl PCR produkt použit na ověření sekvence nukleotidů). **D:** tentýž plasmid s genově specifickými primery (prokazuje přítomnost zaklonované sekvence, nikoliv její orientaci). **C:** plasmid z 2. kolonie buněk TOP10, PCR pomocí T7 forward primeru (odpovídá části plasmidové DNA) a expresního reversního primeru-absence produktu ukazuje, že buňky této kolonie neobsahují insert ve správné orientaci. **E:** PCR plasmidové DNA z buněk 2. kolonie, použity byly genově specifické primery. Přítomnost produktu dokazuje, že buňky této kolonie obsahují plasmid se studovaným insertem, ten však není správně orientován (absence produktu v dráze C).

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60          70          80          90          100
TACATATGCA TCATCACCAT CACATGGAGS TGGKGGCTGT TGTCTCTGGCT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          110         120         130         140         150
GTTGCGGTGG CGGCGAAAAC CTGTATTTTC AGGGAATTAT CACAAGTTTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160         170         180         190         200
TACAAAAAAG CAGGCTCCGC GGCCGCCCCC TTCACCGGCG TGGCTGTGGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          210         220         230         240         250
CAACGCATTG CCAATCCAC TTTTCGGGGG CTTAGTTAAA TCGCTTAGCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          260         270         280         290         300
AAAAAAAACA AATTTTGGAG GACAAATTG AAAATCTCAA AGAGAATGTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          310         320         330         340         350
GGTGAAAAAT TTGAAAATCT CAAAGAAAAC GTGGGTGAAA AAGTTGAAAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          360         370         380         390         400
TCTCAAAGAG AATGTTGGTG AAAAATTAGA AAATATCAAA GAGAAGGCTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          410         420         430         440         450
GAGAAAAATT TGAAAATCTC AAAGACAATG TTGGAGAAAA ATMTGAAAAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          460         470         480         490         500
CTCAAAGACA ATGTTGGAGA CAAATTAGAA GCAGCTAAAG AAAAAGCTGG

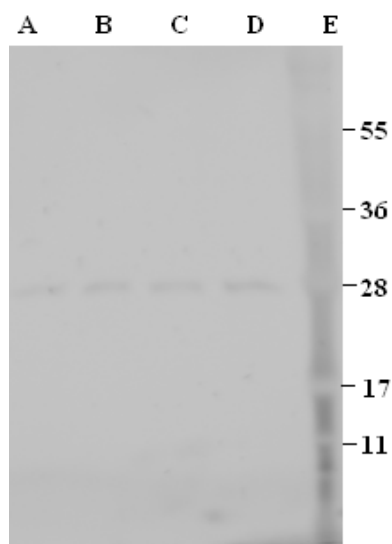
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          510         520         530         540         550
AGAAATCAAA AAGAACTAG TGGATGTCGG CGAAGATCTG AAAGACGAGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          560         570         580         590         600
GAAGGGTGG GCGCGCCGAC CCAGCTTTCT TGTACAAAGT GGTGATAATT

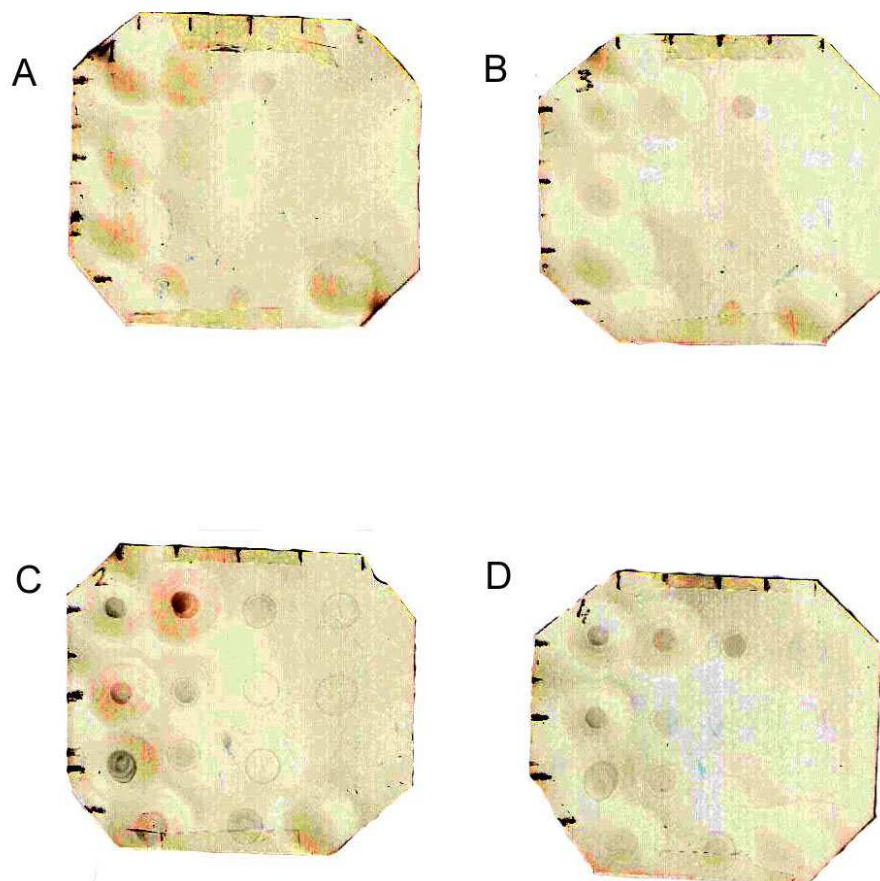
```

Obr. 7: Sekvence plasmidu z kolonie buněk TOP10 obsahujícího insert. Vektor pET160 (modře) s His tag (6x His, zeleně), Lumio tag (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys, červeně), primer T7 fw není na sekvenci viditelný, primer exp2001 rev (fialově), insert

(žlutě). Tato analýza prokazuje, že studovaná sekvence byla beze změn zaklonována do plasmidu a byla připravena k expresi rekombinantního proteinu, který bude možno detekovat a čistit pomocí hexahistidinové kotvy.



Obr. 6: Detekce proteinu pomocí Lumio Green Detection kitu. Dráhy **A-D** ukazují přítomnost exprimovaného proteinu o velikosti asi 28 kDa v bakteriálním peletu několika nezávislých kultur bakteriálních buněk. V dráze **E** byly použity proteinové standardy o uvedených velikostech (Page Ruler Plus, Prestained protein ladder).



Obr. 7: Dot-Blot. Byl analyzován bakteriální pelet z pilotního experimentu na nitrocelulózových membránách. **A** je negativní kontrola v blokujícím pufru PBS, **B** je negativní kontrola v blokujícím pufru TBS. **C** jsou vzorky bakteriálního peletu v PBS, **D** vzorky v TBS. Jako primární protilátka byla použita myší monoklonální protilátka v ředění 1:3000 (Sigma-Aldrich) a jako sekundární protilátka byla použita koňská anti-myší protilátka v ředění 1:10000 (Thermo scientific). U mebrán **C** a **D** je zřetelný pozitivní signál našeho peptidu, který obsahuje v sekvenci His tag, na který se váže primární protilátka.

5 Závěr

Předložené výsledky prokazují, že byla vybraná část kódující sekvence genu *Ser-2* ve správné orientaci zaklonována do plasmidu v expresním bakteriálním vektoru. Insert byl exprimován spolu s připojenou histidinovou kotvou, jejíž přítomnost umožnila důkaz produkce požadovaného peptidu. V další práci je třeba optimalizovat podmínky exprese proteinu a připravit ho dostatečné množství pro studium jeho fyzikálních vlastností, fyziologické funkce a případného praktického využití.

6 Citace a použitá literatura

- Adams D. S., Eickbush T. H., Herrera R. J. and 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.** (1976) Ultrastructural Morphology of Insects. University of Tokyo Press, 299 pp. (In Japanese).
- Akai H.** (1984) The ultrastructures and functions of the silk gland cells of *Bombyx mori*, pp. 323-364. In: King R. C. and Akai H. (eds.) *Insect ultrastructure 2*. Plenum, New York
- Akai H.** (1997) Anti-bacteria function of natural silk materials. *Int J Wild Silkmoths Silk* **3**: 79-81.
- Brooks G.** (1989) Silk proteins in cosmetics. *Drug and cosmetic industry*, **145**(4): 32-36
- Couble P., Chevillard M., Moine A., Ravel-Chapuis P. and Prudhomme J. C.** (1985) Structural 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.
- Couble P., Michaille J. J., Couble M. L. and Prudhomme J. C.** 1987. Developmental switches of sericin mRNA splicing in individual cells of *Bombyx mori* silkgland. *Dev. Biol.* **124**: 431-440.
- Doira H.** (1983) Linkage map of *Bombyx mori* – Status quo in 1983. *Sericologia* **23**: 245-269.
- Encarta** (1998) *Concise Encyclopedia Articles*. <http://encarta.msn.com>
- Engster M.** (1976) Studies on silk secretion in the trichoptera (f. Limnephilidae). I. Histology, histochemistry and ultrastructure of the silk gland. *J Morphol* **150**: 183-211
- Fabiani C., Pizzichini M., Spadoni M., Zeddita G.** (1996) Treatment of waste water from silk degumming process for protein recovery and water reuse. *Desalination* **105**: 1-9
- Fedič R., Žurovec M. and Sehnal F.** (2002) The silk of Lepidoptera. *J Insect Biotech Sericol* **71**: 1-15.

- Fedič R., Žurovec M. & Sehnal F.** (2002) The silk of Lepidoptera. *J. Insect Biotech. Sericol.* **71**: 1-15.
- Fedič R., Žurovec M., Sehnal F.** (2003) Correlation between fibroin amino acid sequence and physical silk properties. *J. Biol. Chem.* **278**: 35255-35264.
- Gamo T., Inokuchi T. and Laufer H.** (1977) Polypeptides of fibroin and sericin secreted from the different sections of the silk gland in *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **7**: 285-295.
- Gamo T.** (1982) Genetics variants of the *Bombyx mori* silkworm encoding sericin proteins of different length. *Biochem. Genet.* **20**: 165-177.
- Gandhi M. R.** (2006) Silk protein as biomaterial for tissue engineering application: Theoretical and experimental study
- Goldsmith M. R. and Kafatos F. C.** (1984) Developmentally regulated genes in silkworm. *Ann. Rev. Genet.* **18**: 443-487.
- Goldsmith M., Toru Shimada, and Hiroaki Abe** (2004) The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. *Annual Review of Entomology* **50**:71-100.
- Good I. L., Kenoyer J. M., Meadow R. H.** (2009) New evidence for early silk in the Indus civilization. *Archaeometry* **50**
- Garel A., Deleage G., Prudhomme J. C.** (1997) Structure and organization of *Bombyx mori* Sericin 1 gene and of the Sericin 1 deduced from the sequence of the Ser 1B cDNA. *Insect Biochem Mol. Biol* **27**: 469-477.
- Grimaldi and Engel** (2005) *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.
- Herbison-Evans** (1997) Don. *Lepidoptera Larvae of Australia*. <http://linus.socs.uls.edu.au>
- Hyde N.** (1984) The queen of textiles. *National Geographic* **165**: 3-49.
- Huang J., Valluzzi R., Bini E., Vernaglia B. and Kaplan D.L.** (2003) Cloning, expression and assembly of sericin-like protein. *J. Biol. Chem* **278**: 46117-46123.
- Chapman R. F.** (1969) *The insect, structure and function*
- Chevillard M., Deleage G. and Couble P.** (1986) Amino acid sequence and putative conformational characteristics of the 25KD silk protein of *Bombyx mori*. *Sericologia* **26**: 435-449.

- Inoue S., Tanaka K., Arisaka F., Kimura S., Ohtomo K. and Mizuno S.** (2000) Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol. Chem.* **275**: 40517-40528.
- Kimura K., Oyama F., Ueda H., Mizuno S. and 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.
- Kludkiewicz B., Kodrik D., Grzelak K., Nirmala X., Sehnal F.** (2005) Recombinant, structurally Unice Kazal-type proteinase inhibitor retains activity hen C-terminally extended and glycosylated. *Protein Expr Purif* **43**: 94-102
- Kodrik 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. Seric. Exp. Stn.* **26**: 135-256.
- Michaille J.J., Garel A. and Prudhomme J.-C.** (1990a) Cloning and characterization of the highly polymorphic ser2 gene of *Bombyx-mori*. *Gene* **86** (2): 177-184
- Michaille J. J., Garel A. and Prudhomme J. C.** (1990a) Expression of Ser1 and Ser2 genes in the middle silk gland of *Bombyx mori* during the fifth instar. *Sericologia* **30**: 49-60.
- Michaille J. J., Garel A. and Prudhomme J. C.** (1990b) Cloning and characterisation of the highly polymorphic Ser2 gene of *Bombyx mori*. *Gene* **86**: 177-184.
- Mita K., Ichimura S. and James T.C.** (1994) Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene. *J. Mol. Evol.* **38**: 583-592.
- Mita K. et. al.** (2004) The genome sequence of the silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Research* **11**: 27-35.
- Mondal M., Trvedy K. and Nirmal Kumar S.** (2007) The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori*. *Caspian J. Env. Sci.*, Vol. **5**, 63-76

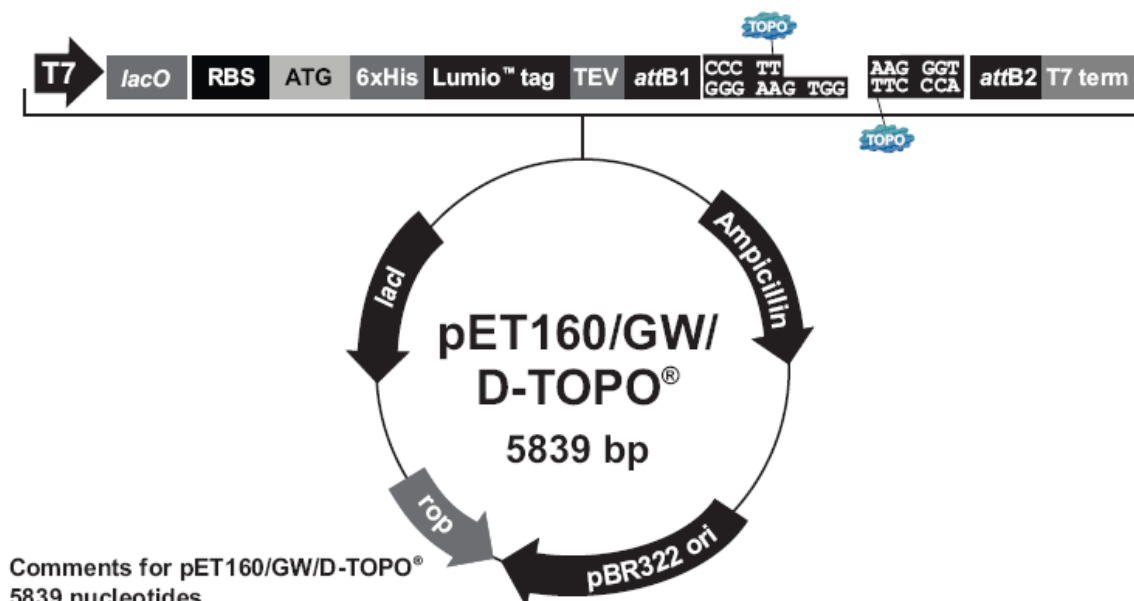
- Mori K., Tanaka K., Kikuchi Y., Waga S. and Mizuno S.** (1995) Production of chimeric fibroin-light chain polypeptide in a fibroin secretion deficient naked pupa mutant of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol.* **251**: 217-228.
- Nirmala X., Kodrik D., Žurovec M. and Sehnal F.** (2001a) Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. *Eur. J. Biochem.* **268**(7): 2064-73.
- Nirmala X., Mita K., Vanisree V., Žurovec M. and Sehnal F.** (2001b) Identification of four small molecular mass proteins in the silk of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* **10**(5): 437-445.
- Okamoto H., Ishikawa E. and Suzuki Y.** (1982) Structural analysis of sericin genes. Homologies with fibroin gene in the 5' flanking nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.* **257**: 15192-15199
- Peigler R.S.** (1993) Wild silks of the world. *Am. Entomologist* 39: 151-161.
- Pines M.** (1997) Pheromones and Mammals. <http://www.hhmi.org/senses/d/d230html>
- Prudhomme J. C., Couble P., Garel J. P. and Dailie J.** (1985) Silk synthesis, pp 571-594. In Kerkut G. A. and Gilbert L. I. (eds) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **10**: Pergamon Press, Oxford
- Sasaki S., Noda H.** (1973) Studies on silk fibroin of *Bombyx mori* directly extracted from the silk gland. II. Effect of reduction of disulfide bonds and subunit structure. *Biochem. Biophys. Acta* **310**: 91-103
- Sehnal F.** (1985) Growth and life cycle. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press. 1-86
- Sehnal F.** (2008) Prospects of the practical use of silk sericins. *Entomol. Res.* **38** (Suppl. 1): S1-S8.
- Sehnal F. and H. Akai.** (1990) Insect silk glands: Their types, development and function, and effects of environmental factors and morphogenetic hormones on them. *Int.J.Insect Morphol.Embryol.* **19**: 79-132.
- Sehnal F. & Žurovec M.** (2004) Construction of silk fiber core in Lepidoptera. *Biomacromolecules* **5**: 666-674.
- Sehnal F. and Sutherland T.** (2008) Silks produced by insect labial glands. *Prion* **2**: 1-9.
- Schuman S.** (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA TOPO isomerase. *J. Biol. Chem.* **269**: 3267-32684.

- Shimura K., Kikuchi A. Ohmoto K., Katagata Y. and 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.
- Sinohara H.** (1979) Glycopeptides isolated from sericin of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* **63B**: 87-91.
- Sponner A.** (2007) Spider silk as resource for future biotechnologies. *Entomological Research* **37**: 238-250
- Takasu Y., Yamada H., Tsubouchi K.** (2002) Isolation of free main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **66**(12): 2715-2718.
- Takasu Y, Yamada H, Tamura T, Sezutsu H, Mita K, Tsubouchi K.** (2007) Identification and characterization of a novel sericin gene expressed in the anterior middle silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol.* **37**(11):1234-40.
- Takuya S., Kokubo H. and 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.
- Takei, F., Kikuchi, Y., Kikuchi, A., Mizuno, S. and Shimura, K.** (1987) Further evidence for importance of the subunit combination of silk fibroin in its efficient secretion from the posterior silk gland cells. *J. Cell Biol.* **105**(1): 175-180.
- Tamada Y., Sano M., Niwa K., Imai T., Yoshino G.** (2004) Sulfation of sil protein sericin and anticoagulant activity of sulfated sericin. *J Biomater Sci Polym Ed* **15**: 667-671.
- Teramo H., Miyazawa M.** (2005) Molecular orientation behavior of silk sericin film as revealed by ATR infrared spectroscopy. *Genetics* **157**: 1277-1284.
- Wilson E. T., Condliffe D. P. and 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.
- Yamada H., Igarashi Y., Takasu Y., Saito H., Tsubouchi K.** (2004) Identification of fibroin-derived peptides enhancing the proliferation of cultured human skin fibroblasts. *Biomaterials* **25**: 467-472

- Yamaguchi K., Kikuchi Y., Takagi T., Kikuchi A., Oyama F., Shimura K. and Mizuno S.** (1989) Primary structure of the silk fibroin light chain determined by cDNA sequencing and peptide analysis. *J. Mol. Biol.* **210**: 127-139.
- Yang C., Teng X., Žurovec M., Scheller K. and Sehnal F.** (1998) Characterization of the P25 silk gene and associated insertion elements in *Galleria mellonella*. *Gene* **209**(1-2): 157-65.
- Yang Y., Tang L., Tong L., Liu H.** (2009) Silkworms culture as a source of protein for humus in space. *Advances in Space Research* **43**: 1236-1242.
- Yonemura N., Sehnal F., Mita K. and Tamura T.** (2006) Protein composition of silk filaments spun under water by caddisfly larvae. *Biomacromolecules* **7**: 3370-3378.
- Yonemura N. and Sehnal F.** (2006) The design of silk fiber composition in moths has been conserved for more than 150 million years. *J. Mol. Evol.* **63**(1): 42-53.
- Yoshitake N.** (1968) Phylogenetic aspekt on the origin of Japanese race of the silkworm *Bombyx mori* L. *Journal of sericological sciences of Japan* **37**: 83-87
- Zhang Y.** (2002) Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnology Advances* **20**: 91-100
- Zhaorigetu S., Yanaka N., Sasaki M., Watanabe H., Kato N.** (2003) Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-iduced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *J Photochem photobiol B* **71**: 11-7.
- Zhou C. Z., Confalonieri F., Medina N., Zivanovic Y., Esnault C., Yang T., Jacquet M., Janin M., Duguet M. and Perasso R.** (2000) Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acid Res.* **28**: 2413-2419.
- Žurovec M., Yang C., Kodrik D. and Sehnal F.** (1998) Identification of a novel type of silk protein and regulation of its expression. *J. Biol. Chem.* **273**(25): 15423-15428.
- Žurovec M.** (1990) Kandidátská disertační práce
- Lepidoptera Part 2. (1997) <http://www.ex.ac.uk/gjloamel/lepidop2.html>

7 Přílohy

Příloha1: Mapa a charakteristika vektoru pET160/GW/D-TOPO®



1 AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG CGGATAACAA
T7 promoter/priming site lac operator

61 TTCCCTCTA GAAATAATTT TGTTAACTT TAAGAAGGAG ATATACAT **ATG** CAT CAT
TAC GTA GTA
Met His His
RBS

118 CAC CAT CAC CAT GGT GCT GGT GGC TGT TGT CCT GGC TGT TGC GGT GGC
His His His His Gly Ala Gly Gly Cys Cys Pro Gly Cys Cys Gly Gly
6xHis tag Lumio™ tag

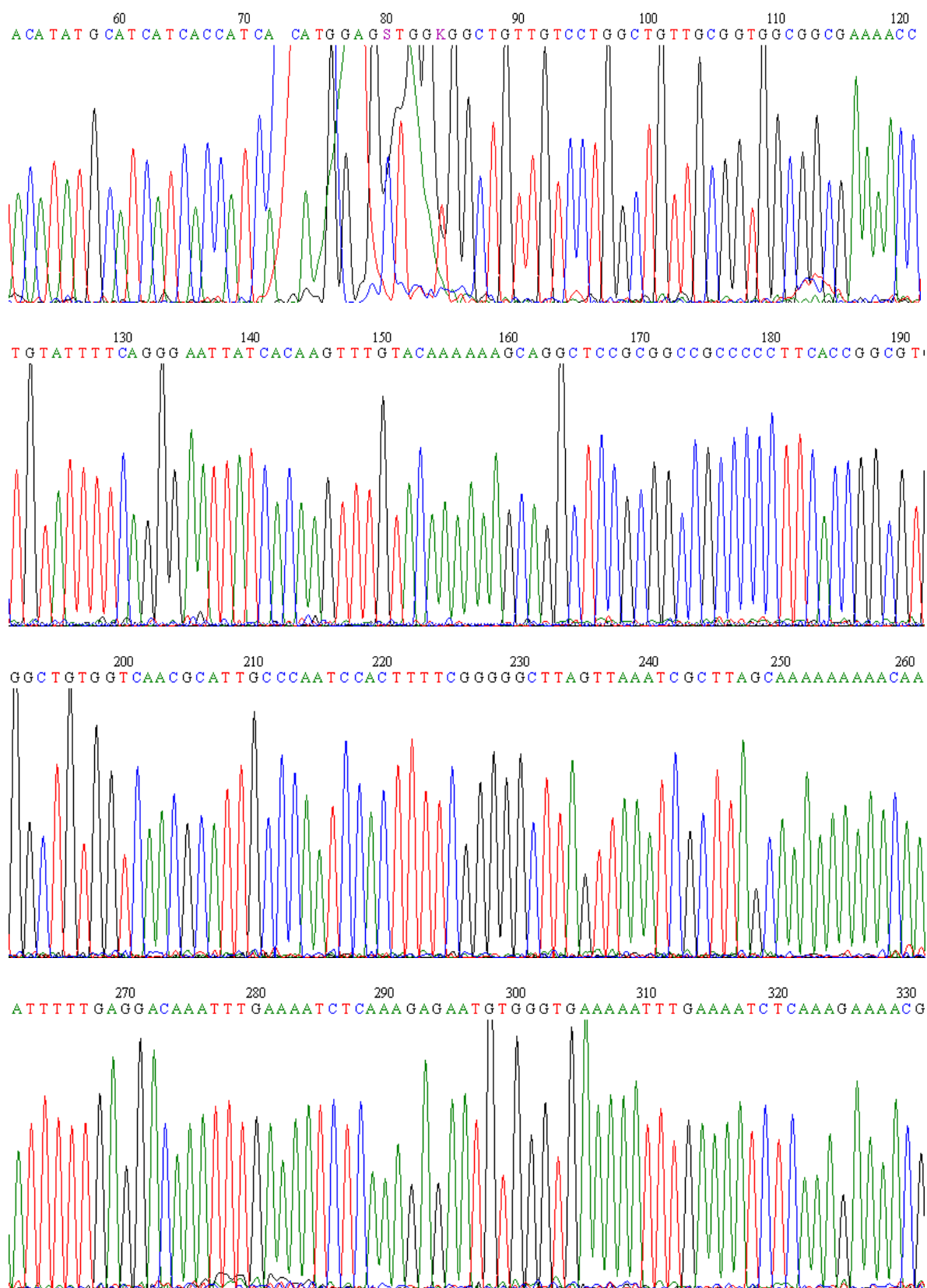
166 GGC GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGA ATT ATC ACA AGT TTG TAC AAA AAA
CCG CTT TTG GAC ATA AAA GTC CCT TAA TAG TGT TCA AAC ATG TTT TTT
Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ile Ile Thr Ser Leu Tyr Lys Lys
TEV recognition site attB1 site
TEV cleavage site

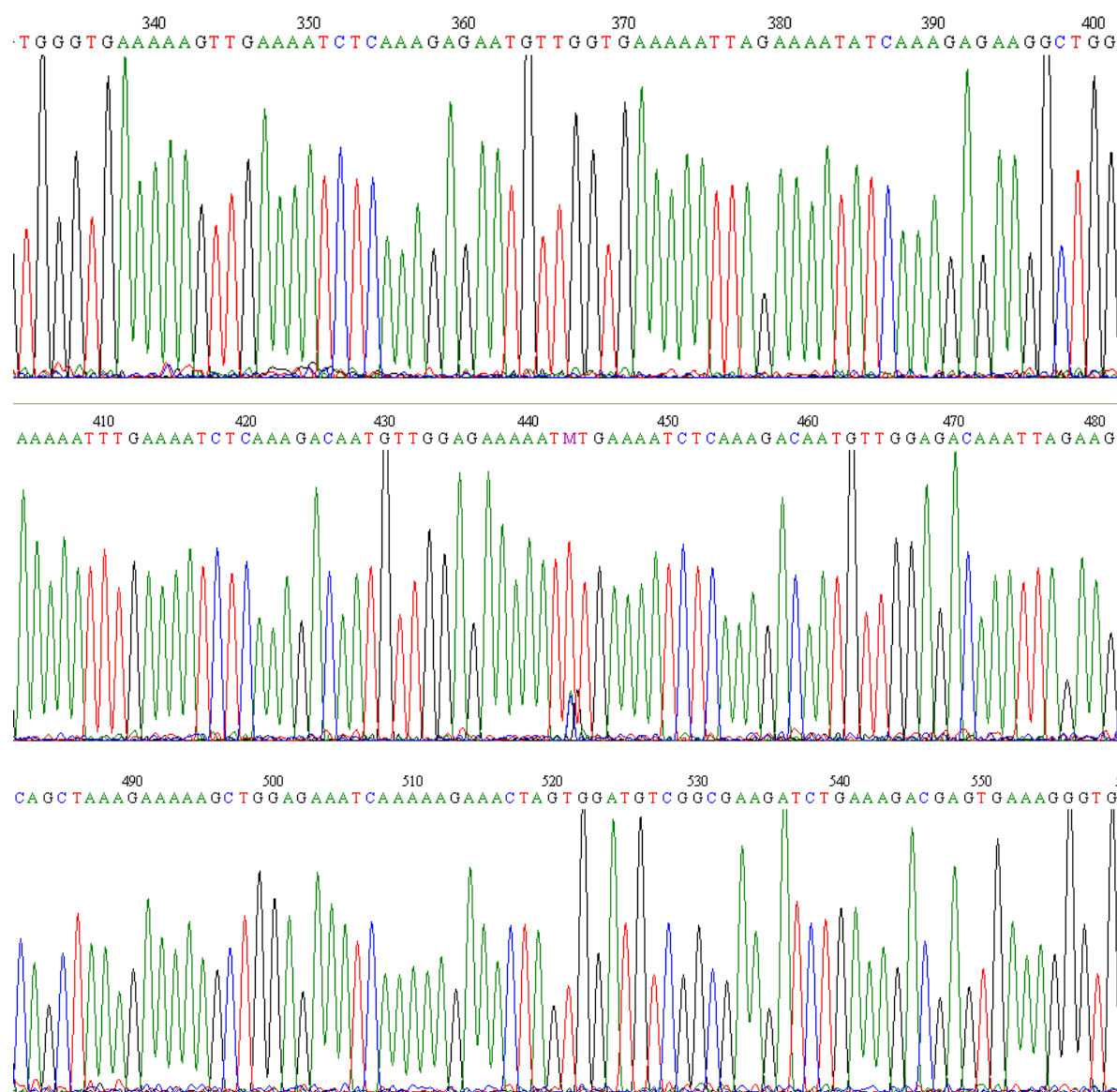
214 GCA GGC TCC GCG GCC GCC CCC TTC ACC ... AAGGGTGGGC GCGCCGACCC
CGT CCG AGG CGC CGG CGG GGG AAG TGG ... TTCCCACCG CGCGGCTGGG
Ala Gly Ser Ala Ala Ala Pro Phe Thr
PCR product
GTGG

261 AGCTTTCTTG TACAAAGTGG TGATAATTAA TTAAGATCAG ATCCGGCTGC TAACAAAGCC
TCGAAAGAAC ATGTTTCACC ACTATTAATT
attB2 site

321 CGAAAGGAAG CTGAGTTGGC TGCTGCCACC GCTGAGCAAT AACTAGCATA ACCCCTTGGG
T7 transcription termination region T7 reverse priming site

Příloha 2: Sekvence plasmidu po zaklonování do expresního vektoru





Příloha 3: Sekvence genu *Ser-2 Bombyx mori* (žlutě jsou označeny genově specifické primery, které vymezují část genu, jenž byla v této práci klonována a exprimována).

```

atgaagatcccatcacgtcttctgtgttccttgtgggcgtggctgtggtcaacgcattgccc
M K I P Y V L L F L V G V A V V N A L P
aatccacttttcgggggcttagttaaatcgcttagcaaaaaaaaaacaaatttttgaggac
N P L F G G L V K S L S K K K Q I F E D
aaatttgaaaaatctcaaagagaatgtgggtgaaaaatttgaaaaatctcaaagaaaacgtg
K F E N L K E N V G E K F E N L K E N V
ggtgaaaaagttgaaaatctcaaagagaatgttggtgaaaaattgaaaatatcaaagag
G E K V E N L K E N V G E K L E N I K E
aaggctggagaaaaatttgaaaatctcaaagacaatgttgagaaaaatttgaaaatctc
K A G E K F E N L K D N V G E K F E N L
aaagacaatgttgagacaaattagaagcagctaaagaaaaagctggagaaatcaaaaag
K D N V G D G K L E A A K E K A G E I K K
aaactagtggatgtcggcgaagatctgaaagacgagctcacggaagacaaaaataaag
K L V D V G E D L K D E L T E D K K I K
atatccatctcgaagacgaaggattgacttttagaaaaagaaggatacaagtctgattac
I S I S K D E G L T L E K E G Y K S D Y
gatcgtaatgaatatgaagaacgcagatctgaacaccaggaggataacgacagcgacggc
D R N E Y E E R R S E H Q E D N D S D G
tcatacagcaaaaggttcgaatacgaataacggtgaagaggaagatgaagaacgt
S Y S K G S E Y E K Y G E E K Y E E R
aggaccacgacaagttctccattggcaagaacggtattagtgcgagcgaacgaaatca
R T H D K F S I G K N G I S A E R T K S
aagagaggtgaaagaaaagaagtcgaaggcgaatatgagaaagactacgaaaggaaagag
K R G E R K E V E G E Y E K D Y E R K E
aacaacggcggtatcctccgaatatcagagagagaaagagagagtttgaaaaatcaaaa
N N G G S E Y S E R E R E S L E K S K
gaaaggttacggcgagcagtcgtctaatgctccttctcggttggtgaaatccggcttgaagaag
E R Y G E Q S S K S F S L G K S G L K K
caggataattcaaaatcgtattccgacaaggaagagtcgaaactggaaaaggaaaagaaa
Q D N S K S Y S D K E E S K L E K E K K
tatgaaaagaaaacaaaaatcaacaatgaaaggcagtttagatgaagatgagaacgaaagg
Y E K K T K I N N E R Q L D E D E N E R
agaactgttgtagcgcatgagcaaaaggcaagatgaccaaagccgagacgaccaagc
R T V V G R D E Q R Q D D Q S R D D Q S
cgagatgaccaaaaggcaagatgaggaaactggcagcgacgatagtgacaaaaatagagga
R D D Q S Q D E E T G S D D S D K N R G
aaggatactgacgataaatattccgagacaggaaccaataaatcatcagaaacgaagaca
K D T D D K Y S E T G T N K S S E T K T
ggcaagcgtgatggctcgaagagcggcgtcacagtcgaaagggaataatccgaatccaac
G K R D G S K S G V T V E R E K S E S N
aagaaaagtcgtgaatttgaaaataaagaagctgaatcttcgacctatagggataagaat
K K S R E F E N K E A E S S T Y R D K N
cggtcagtgaaacagtggtcggacgcaagagttccggtaaagacgaggagtacagtga
R S V N S G S E R K S S G K D E E Y S E
cagaactccagtaataaatcctttaacgacggcgatgcacggtgactaccaaaccaaa
Q N K S F N D S D G D A S A D Y Q T K
tctaagaaggttgaaaagaattctgccagagataaaaaggaaaaggaaaaaactgacaca
S K K V E K N S A R D K K E K E K T D T
agaaattctgacggaacgtacaaaacttctgagcgcgaaaaagaacaatcttctagagt
R N S D G T Y K T S E R E K E Q S S R V
aatcaaagtaaggcagcaactctcgggattcctcggagtcagacaaatctggccgaaaa
N Q S K G S N S R D S S E S D K S G R K
gtgaataaagaacagaaacgtactctgacaaagacgcgcagacttcagaaagtgaacgt
V N K E T E T Y S D K D A Q T S E S E R
actcaaagtaagaaaaaaaataacagcgcccaagaataagggcaaaaagggaacctct
T Q S K E K K N T A P K N K G K K G T S
acagaaacagatggagtcactaagaatgctagtaagcagaaggagaagggtgcctaaagat
T E T D G V T K N A S K Q K E K V P K D
ggaagtaaaagctccacgaatgatagcgaaggcaacaaaaaaacaaagaccaatcaaag
G S K S T N D S E G K Q K N K D Q S K
ggacagaaaaataatcaagacggacaagactcttcgacgaacgaaaattccaaaaagaca
G Q K N N Q D G Q D S S T N E N S K K T

```

gatgataatgttgcaaagaaagaagaacccaataatcaaaagagagaacaaaaaggaaaag
D D N V A K K E E P N N Q K R E Q K G K
acaagatgtggctctaggaactgagagttccaaagcgaagaagatagaagcaagaaa
T R C G S R K T E S S K A K E D R S K K
agcactaccgataaagaccagcgcgacgacaaaaaagattcctccagcaaaaacatagac
S T T D K D Q R D D K K D S S S K N I D
aagcctaaagatgggtcatcatcgataaagactcagagaaggctaagcctaacgacaga
K P K D G S S S D K D S E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggataaa
S P S H K D T E K A K P N D R S P S D K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagttcaccatcgcataaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D S S P S H K D T E K A
aagcataacgacagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacgacaga
K H N D R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaagcctaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggtaaacctaacgacagatcaccatcgcataaagacacagagaaggct
D T E K V K P N D R S P S H K D T E K A
aagcctaacgacagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacgacaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaagcctaacgacagatcaccatcgtataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S Y K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggataaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacggcagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacgacaga
K P N G R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaagcctaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggatagagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D R D T E K A
aagcctaacgacagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacggcaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N G R
tcaccatcggataaagacacagagaaggtaagcctaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S D K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggataaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacggcagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacgacaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaagcctaacgacagatcaccatcgtataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S Y K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggataaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacggcagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacggcaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N G R
tcaccatcggataaagacacagagaaggtaagcctaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S D K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggatagagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D R D T E K A
aagcctaacgacagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacgacaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaagcctaacgacagatcaccatcgtataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S Y K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggataaagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D K D T E K A
aagcctaacggcagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacgacaga
K P N G R S P S D K D T E K A K P N D R
tcaccatcgcataaagacacagagaaggtaagcctaacgacagatcaccatcgcataaa
S P S H K D T E K V K P N D R S P S H K
gacacagagaaggctaagcctaacgacagatcaccatcggatagagacacagagaaggct
D T E K A K P N D R S P S D R D T E K A
aagcctaacgacagatcaccatcggataaagacacagagaaggctaagcctaacggcaga
K P N D R S P S D K D T E K A K P N G R

ctttttaataaaaacctaagcatatc

