UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARIŠA GASPARINI

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARIŠA GASPARINI

PRIPRAVA REKOMBINANTNEGA POMOŽNEGA BAKTERIOFAGA ZA IZRAŽANJE REPORTERSKEGA PROTEINA NA POVRŠINI VIRUSNIH DELCEV

DESIGN OF A RECOMBINANT HELPER PHAGE FOR REPORTER PROTEIN DISPLAY ON THE SURFACE OF VIRAL PARTICLES

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča. Analizo nukleotidnih zaporedij molekul DNA je opravilo podjetje GATC Biotech, Konstanz, Nemčija. Plazmid pLP7/ P_{lac} -TorA-GFP nam je prijazno daroval prof. Kevin D. Young, Arkansas, ZDA.

Zahvale

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Tomažu Bratkoviču za možnost opravljanja magistrske naloge na področju farmacevtske biotehnologije in strokovno vodenje, svetovanje ter podporo pri njenem nastajanju. Posebna zahvala gre Petru Molku za pomoč, potrpežljivost in spodbudo pri delu.

Prisrčna zahvala tudi družini za podporo in razumevanje med študijem ter nastajanjem magistrskega dela.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča.

Ljubljana, 2013

Predsednik komisije za zagovor: prof. dr. Albin Kristl

Član komisije za zagovor: asist. dr. Stane Pajk

VSEBINA

POVZETEK	. I
ABSTRACT	II
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV	111
KRATICE IN OKRAJŠAVE ZA AMINOKISLINE	IV
1. UVOD	1
1.1 Predstavitev na bakteriofagu	. 1
1.1.1 Knjižnice fragmentov protiteles	5
1.1.1.1 Bakteriofagne predstavitvene knjižnice	5
1.1.1.2 Vrste fragmentov protiteles	6
1.1.1.3 Knjižnice scFv Tomlinson	8
1.2 Razvrščanje proteinov pri bakteriji <i>E. coli</i>	9
1.3 Fluorescenčni proteini 1	11
1.3.1 Zeleni fluorescenčni protein 1	13
1.3.2 Imunofluorescenca 1	14
2. NAMEN NALOGE	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1 Materiali	17
3.1.1 Kemikalije 1	17
3.1.2 Kompleti, oligonukleotidi, označevalci in reagenti	18
3.1.3 Biološki material 1	19
3.1.4 Pufri, raztopine in gojišča	21
3.1.5 Laboratorijska oprema	25
3.2. Povzetek eksperimentalnega dela	27
3.2.1 Shema poteka priprave vektorja f88-4	27
3.2.2 Shema poteka priprave pomožnega bakteriofaga f88-4/sfGFP za predstavitev sfGFP 2	27
3.2.3 Shema poteka priprave pomožnega bakteriofaga f88-4/TorA-sfGFP za prikaz sfGFP 2	28
3.2.4 Nadaljnje delo s pripravljenima pomožnima bakteriofagoma	29
3.3 Metode	31
3.3.1 Pomnoževanje in priprava bakteriofagnih vektorjev, plazmidov in bakteriofagov	31
3.3.1.1 Pomnoževanje vektorja f88-4	31
3.3.1.2 Pomnoževanje plazmida pGEM-T Easy/sfGFP	31
3.3.1.3 Pomnoževanje vektorja f88-4/sfGFP	31
3.3.1.4 Pomnoževanje vektorja f88-4/TorA-sfGFP	31
3.3.1.5 Pomnoževanje pomožnih bakteriofagov	32

3.3.1.6 Priprava bakterijskih kultur za pripravo fagmidnih virionov	. 32
3.3.1.7 Izolacija bakteriofagov iz prekonočnih bakterijskih kultur	. 32
3.3.2 Izolacija plazmidne in dvoverižne bakteriofagne DNA	. 32
3.3.3 Določitev koncentracije DNA	. 33
3.3.4 Ocena titra bakteriofagov	. 33
3.3.5 Etanolna precipitacija DNA	. 33
3.3.6 Razgradnja enoverižne bakteriofagne DNA z MBN	. 33
3.3.7 Restrikcija	. 33
3.3.7.1 Restrikcija bakteriofagnega vektorja f88-4 s HindIII in PstI	. 34
3.3.7.2 Restrikcija plazmida pGEM-T Easy/sfGFP s HindIII in PstI	. 34
3.3.7.3 Restrikcija bakteriofagnega vektorja f88-4/sfGFP s HindIII in XhoI	. 34
3.3.7.4 Restrikcija inserta P _{lac} -TorA s HindIII in XhoI	. 34
3.3.8 Agarozna gelska elektroforeza	. 34
3.3.9 Izolacija DNA iz agaroznega gela	. 35
3.3.10 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	. 36
3.3.10.1 PCR z začetnima oligonukleotidoma F-sfGFP-HindIII in R-sfGFP-PstI	. 36
3.3.10.2 PCR z začetnima oligonukleotidoma F-pLP7-P _{lac} -XhoI in R-pLP7-TorA-HindIII	. 36
3.3.10.3 PCR na osnovi kolonije	36
3.3.11 Ligacija	. 37
3.3.12 Transformacija	37
3.3.13 Modro-beli test	38
3.3.14 Določitev nukleotidnega zaporedja	. 38
3.3.15 Preverjanje izražanja scFv na površini bakteriofagov s testom ELISA	. 39
3.3.16 Označevanje bakteriofagov s FITC	39
3.3.17 Priprava sefaroznih delcev, aktiviranih s CNBr, za fluorescenčno mikroskopijo	40
3.3.17.1 Priprava kontrolnih sefaroznih delcev, aktiviranih s CNBr	40
3.3.17.2 Vezava BSA na sefarozne delce, aktivirane s CNBr	40
3.3.17.3 Vezava bakteriofagov na sefarozne delce	40
3.3.18 Fluorescenčna mikroskopija	40
3.3.18.1 Priprava bakterij za fluorescenčno mikroskopijo	41
3.3.18.2 Priprava bakteriofagov za fluorescenčno mikroskopijo	41
3.3.19 Ocena fluorescence pripravljenih bakteriofagov s testom FLISA	41
3.3.20 Preverjanje izražanja in vključevanja fuzijskega proteina sfGFP-pVIII v kapsido	
bakteriofaga	. 42
3.3.20.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaD	S-
$I A \cup L $	42

<i>3.3.20.2 Prenos western</i>
4. REZULTATI IN RAZPRAVA 44
4.1 Priprava (pomožnega) bakteriofaga za uvedbo zelenega fluorescenčnega proteina na kapsido rekombinantnih virusnih delcev
4.2 Priprava rekombinantnih virusnih delcev z uporabo pripravljenih pomožnih bakteriofagov
4.2.1 Makroskopska vizualna ocena izražanja sfGFP v bakterijskih celicah 46
4.2.2 Ocena izražanja sfGFP v bakterijskih celicah s pomočjo fluorescenčne mikroskopije 47
4.2.3 Makroskopska ocena prisotnosti sfGFP na bakteriofagnih delcih
4.3 Vgrajevanje zelenega fluorescenčnega proteina v kapsido rekombinantnih virusnih delcev 50
4.4 Ocena vezave pripravljenih bakteriofagov na tarčo s testom ELISA
4.5 Uvedba zelenega fluorescenčnega proteina na površino rekombinantnih virusnih delcev 55
5. SKLEP
6. VIRI IN LITERATURA
7. PRILOGE

POVZETEK

Tehnologija predstavitve na bakteriofagu omogoča izražanje najrazličnejših peptidov in proteinov, vključno s fragmenti protiteles, na površini bakteriofagov. S pomočjo bakteriofagnih knjižnic protiteles lahko poiščemo protitelesa za uporabo v raziskavah, in vitro ter in vivo diagnostiki in zdravljenju infekcijskih, avtoimunskih ter rakavih bolezni. Uspešna uvedba dodatnega reporterskega proteina na površino bakteriofaga s predstavljenim protitelesom oz. njegovim fragmentom bi omogočila pripravo dvojno označenih, t.i. bifunkcionalnih bakteriofagov v eni stopnji, brez dodatnih kemijskih modifikacij. Slednji bi bili kot alternativa fluorescenčno označenim protitelesom uporabni v imunofluorescenčnih tehnikah. Glavna prednost razvoja takšnega sistema v primerjavi z označenimi protitelesi bi bilo znižanje stroškov zaradi enostavne in hitre priprave, izolacije ter čiščenja bakteriofagov. Obenem bi knjižnice peptidov oz. proteinov, predstavljenih na površini bakteriofagov z reporterskim proteinom, omogočale hitrejšo in enostavnejšo selekcijo ligandov, ki bi jih lahko med drugim uporabili za razvoj učinkovin in proučevanje molekulskega prepoznavanja v bioloških sistemih. Bifunkcionalne bakteriofage bi lahko uporabili tudi za detekcijo analitov, kakršni so mikroorganizmi in toksini v telesnih tekočinah ter drugih vzorcih. Pogosto uporabljeni reporterski proteini so zlasti različne vrste fluorescenčnih proteinov, ki so jih s pristopi proteinskega inženirstva močno izpopolnili in prilagodili posameznim namenom uporabe.

V okviru magistrskega dela smo pripravili dvojno označen bakteriofag, ki ima na svoji površini hkrati predstavljen vezavni protein, ki specifično prepozna želeno tarčno molekulo, in reporterski protein, ki omogoča zaznavo vezanega bakteriofaga. Za reporterski protein smo izbrali izpopolnjeno obliko zelenega fluorescenčnega proteina (sfGFP) in pripravili dve različici pomožnega bakteriofaga za njegovo izražanje na površini: f88-4/sfGFP in f88-4/TorA-sfGFP. Rekombinantna pomožna bakteriofaga se razlikujeta le v signalnem zaporedju, ki usmerja sfGFP v periplazmo bakterije, kjer poteka sestavljanje virusnih delcev. Z njuno pomočjo smo pripravili bakteriofage, ki poleg fluorescenčnega proteina na površini predstavljajo še enoverižne fragmente variabilnih regij protiteles proti govejemu serumskemu albuminu ali humanemu leptinskemu receptorju. Primerjava fluorescence med gostiteljskimi bakterijami ter bakteriofagi pri obsevanju z ultravijolično svetlobo in rezultati prenosa western so pokazali, da je za uspešno predstavitev fluorescenčnega proteina na površini bakteriofaga sekretorna pot Tat ustreznejša od poti Sec. Protein smo po poti Tat usmerili s signalnim zaporedjem TorA pomožnega bakteriofaga f88-4/TorA-sfGFP. Ζ encimskoimunskim testom smo potrdili, da pripravljeni dvojno označeni bakteriofag ohrani sposobnost vezave na tarčni protein. Predstavitev obeh rekombinantnih proteinov (zelenega fluorescenčnega proteina in enoverižnega fragmenta variabilnih regij protiteles proti govejemu serumskemu albuminu) na površini bakteriofagnih delcev M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP in s tem bifunkcionalnost pripravljenega bakteriofaga smo potrdili s pomočjo fluorescenčne mikroskopije, s katero smo zaznali vezavo dvojno označenih bakteriofagov na sefarozne delce s kovalentno vezanim tarčnim govejim serumskim albuminom.

ABSTRACT

Phage display technology represents a useful molecular biology platform that allows the expression of peptides and proteins, including antibodies, on the surface of a bacteriophage. Phage display libraries of antibodies coupled with *in vitro* affinity selection offer a possibility to screen for specific antibodies which can be used for research purposes, *in vitro* and *in vivo* diagnostics, and therapy of infectious, autoimmune, and malignant diseases. One could create a double display (i.e. bifunctional) bacteriophage by displaying a reporter protein on the surface of an antibody-presenting bacteriophage. Detection and characterization of such bacteriophage is made easier by avoiding chemical modification and multi-step procedures. Instead, shorter alternative assays - such as the fluorescence-linked immunosorbent assay and fluorescence-activated cell sorting - could be used for that purpose. Moreover, a bifunctional bacteriophage allows for a rapid and straightforward selection of displayed peptides, and could therefore be used as a research tool in drug discovery and molecular recognition studies in biological systems, and as a probe for the detection of analytes, such as microorganisms and toxins in body fluids and other samples. Fluorescent proteins are popular reporter proteins as their variants can be engineered to meet specific purposes.

The aim of our research was to prepare a bifunctional bacteriophage that would concurrently display on its surface a binding protein, which would recognize and bind a specific target molecule, and a reporter protein, which would allow for the detection of the bound bacteriophage. We used superfolder green fluorescent protein (sfGFP) as a reporter protein to construct two variants of helper phage: f88-4/sfGFP and f88-4/TorA-sfGFP, differing only in signal peptide sequence directing sfGFP to the bacterial periplasm, where progeny phage particles are assembled. The helper phage were then used to prepare bifunctional bacteriophage displaying sfGFP and single-chain variable fragments against either bovine serum albumin or human leptin receptor. We established that the Tat secretory pathway is superior to the Sec pathway in terms of successful incorporation of the fluorescent protein in the bacteriophage capsid by comparing the fluorescence intensity of host bacteria and sfGFP-decorated bacteriophage exposed to ultra-violet light, and through interpretation of western blot assay results. We targeted the Tat pathway with f88-4/TorA-sfGFP helper phage bearing the encoded TorA signal sequence. The results of the enzyme-linked immunosorbent assay show that bifunctional bacteriophage is capable of binding the target protein. Display of both recombinant proteins (namely, the green fluorescent protein and the single-chain variable fragment against bovine serum albumin) on the surface of a M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP bacteriophage and thus bifunctionality of the prepared bacteriophage was demonstrated by fluorescence microscopy of sepharose beads coated with bovine serum albumin after incubation with the recombinant bacteriophage.

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

BSA	goveji serumski albumin (ang. ' <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin')	
CDR	komplementarnost določujoča področja (ang. ' <u>c</u> omplementarity- <u>d</u> etermining	
	regions')	
Da	dalton, enota za relativno molekulsko maso	
ddH ₂ O	ultra čista voda	
DMSO	dimetilsulfoksid	
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. ' <i>deoxyribonucleic acid</i> ')	
ELISA	encimskoimunski test (ang. ' <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ')	
FACS	ločevalnik/ločevanje celic na osnovi fluorescence (ang. ' <i>fluorescence-activated</i>	
	<u>cell sorting</u> ')	
FLISA	fluorescenčnoimunski test (ang. 'fluorescence-linked immunosorbent assay')	
FP	fluorescenčni protein (ang. 'fluorescent protein')	
FRET	prenos energije z resonanco fluorescence (ang. ' <i>fluorescence resonance energy transfer</i> ')	
GFP	zeleni fluorescenčni protein (ang. 'green fluorescent protein')	
HRP	hrenova peroksidaza (ang. ' <i>horseradish peroxidase</i> ')	
IPTG	izopropil-B-D-1-tiogalaktopiranozid, induktor gena za B-galaktozidazo	
IR	infrardeče	
(k)bp	(kilo)bazni par, enota za dolžino verige DNA	
LB	gojišče Luria-Bertani	
mAb	monoklonsko protitelo (ang. ' <u>m</u> onoclonal <u>antib</u> ody')	
MBN	nukleaza iz zlatega fižola (ang. ' <u>mung b</u> ean <u>n</u> uclease')	
MCS	območje z več mesti za kloniranje (ang. ' <i>multiple <u>c</u>loning <u>site</u>')</i>	
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom	
NK	negativna kontrola	
OD ₆₀₀	optična gostota pri 600 nm (ang. ' <u>optical density</u> ')	
PBS	fosfatni pufer s soljo (ang. ' <u>p</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline')	
PBST	fosfatni pufer s soljo z dodanim polisorbatom (Tween® 20)	
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. ' <i>polymerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction')</i>	
PEG	polietilenglikol	
РК	pozitivna kontrola	
RNA	ribonukleinska kislina (ang. ' <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid')	
scFv	enoverižni fragment variabilnih regij protiteles (ang. ' <u>single-chain variable</u> fragment')	
sfGFP	zeleni fluorescenčni protein z izbolišanim zvijaniem (ang. ' <i>superfolder GFP</i> ')	
SRP	delec, ki prepozna signalno zaporedje (ang. <i>'signal recognition particle'</i>)	
Tat	sekretorna pot dveh argininov (ang. ' <i>twin-arginine translocation</i> ')	
TY	gojišče iz triptona, kvasnega ekstrakta in NaCl	
TMB	3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidin	
U	enota za aktivnost encima, ki ustreza hidrolizi 1 umol substrata/min	
UV	ultravijolična svetloba	
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid, substrat za β-galaktozidazo	

KRATICE IN OKRAJŠAVE ZA AMINOKISLINE

А	Ala	alanin
R	Arg	arginin
Ν	Asn	asparagin
D	Asp	asparaginska kislina
С	Cys	cistein
F	Phe	fenilalanin
Q	Gln	glutamin
E	Glu	glutaminska kislin
G	Gly	glicin
Н	His	histidin
Ι	Ile	izolevcin
I L	Ile Leu	izolevcin levcin
I L K	lle Leu Lys	izolevcin levcin lizin
I L K M	lle Leu Lys Met	izolevcin levcin lizin metionin
I L K M P	lle Leu Lys Met Pro	izolevcin levcin lizin metionin prolin
I L K M P S	lle Leu Lys Met Pro Ser	izolevcin levcin lizin metionin prolin serin
I L K M P S Y	lle Leu Lys Met Pro Ser Tyr	izolevcin levcin lizin metionin prolin serin tirozin
I L K M P S Y T	lle Leu Lys Met Pro Ser Tyr Thr	izolevcin levcin lizin metionin prolin serin tirozin treonin
I L K M P S Y T W	lle Leu Lys Met Pro Ser Tyr Thr Thr	izolevcin levcin lizin metionin prolin serin tirozin treonin triptofan

1. UVOD

1.1 Predstavitev na bakteriofagu

Bakteriofagi so virusi, ki se razmnožujejo izključno v bakterijah. Sestavljeni so iz genske informacije v obliki linearne ali krožne, enoverižne ali dvoverižne ribo- (RNA) ali deoksiribonukleinske kisline (DNA), ki je obdana s proteinskim plaščem (kapsido). Glede na življenjski cikel ločimo litične (virulentne) in lizogene (temperatne) bakteriofage. Oboji za razmnoževanje izkoriščajo mehanizme bakterijskega gostitelja (1). Razmnoževanju litičnih bakteriofagov v bakterijski celici sledi liza celice, po kateri se novonastali bakteriofagi sprostijo v okolico. Lizogeni bakteriofagi pa vključijo svoj genom v gostiteljev genom, kjer se bakteriofagna DNA v obliki profagov pomnožuje hkrati z gostiteljevo DNA. Ob spremembi pogojev v gostiteljski celici lizogeni cikel preide v litičnega, saj prepis in prevajanje profagov vodi v nastajanje novih bakteriofage, ki se v bakterijski celici razmnožujejo kot litični bakteriofagi, vendar celice ne zapustijo z lizo. Nekateri izmed proteinov nitastih bakteriofagov namreč tvorijo kanalčke v celični membrani, skozi katere se novonastali bakteriofagi sproščajo v okolje (3).

Bakteriofagi imajo enostavno zgradbo in gensko sestavo ter za gojenje potrebujejo le ustrezno bakterijsko kulturo. V molekularni biologiji uporabljamo tehnologijo predstavitve na bakteriofagu, pri kateri na površini bakteriofaga predstavimo izbrani (tuji) peptid ali protein (dalje: peptid) ali nabor oz. knjižnico peptidov. Na ta način lahko poiščemo nove peptide ali spreminjamo lastnosti že znanih peptidov, saj lahko za predstavitev uporabimo naključne zapise za peptide, kromosomsko DNA, komplementarno DNA, celotne ali dele znanih peptidov (3, 4). Genski zapis za izbrani peptid vključimo v genski zapis bakteriofaga v obliki fuzije z genom za plaščni protein, ki se nahaja na površini bakteriofaga, kot prikazuje slika 1 (4-6). Predstavljeni peptid običajno izkazuje enake lastnosti kot prosti peptid, zato lahko posamezne bakteriofagne klone s predstavljenim peptidom, ki se veže na izbrano tarčo, uporabljamo v raziskovalne, diagnostične ali terapevtske namene (4, 7-10).





Za predstavitev peptidov na bakteriofagih najpogosteje uporabljamo nitaste bakteriofage (kot na primer bakteriofagi skupine Ff: M13, fl in fd), redkeje pa litične bakteriofage (kot na primer T4, T7 in λ) (5, 9). Prednosti nitastih bakteriofagov so majhen genom, v katerega lahko vstavimo tuj genski zapis; enostavno kloniranje in priprava bakteriofagnih knjižnic; prilagodljivi plaščni proteini, ki jih lahko deloma spremenimo in kljub temu ohranimo infektivnost; odpornost bakteriofagov proti številnim fizikalnim in kemijskim pogojem ter velika količina nastalih bakteriofagnih delcev, saj slednji ne povzročijo lize gostiteljske bakterije (3). Nitasti bakteriofagi skupine *Ff* so specifični za bakterijo *E.coli* s plazmidom F, ki vsebuje genski zapis za konjugativni pilus F. Tak bakteriofag okuži bakterijo tako, da se veže na pilus F na površini bakterije in nato v citoplazmo bakterije prenese svojo krožno enoverižno DNA (4, 11, 12). S pomočjo pomnoževalnih mehanizmov gostitelja nastane komplementarna veriga DNA, ki skupaj z matrično DNA tvori dvoverižno replikativno obliko (rfDNA). Replikativna oblika je osnova za sintezo nove enoverižne DNA in pomnoževanje ter prepis bakteriofagnih genov. Pri tem nastanejo novi plaščni proteini in proteini, ki sodelujejo pri prepoznavanju enoverižne bakteriofagne DNA ter sestavljanju in prenosu bakteriofagov preko bakterijske membrane. Lastnosti proteinov prikazuje preglednica I. Novi bakteriofagni delci nastanejo tako, da se kopije enoverižne DNA ob prehodu bakterijske membrane obdajo z novonastalimi plaščnimi proteini in se s sekrecijo izločijo iz bakterije (3, 4, 12).

Preglednica I: Značilnosti genov in proteinov nitastega bakteriofaga vrste *Ff*. Velikost proteina je prikazana kot število aminokislin (AK), ki sestavlja posamezni protein. Poleg naštetih genov vsebuje genom nitastega bakteriofaga še nekodirajoče področje, ki vsebuje mesto začetka podvojevanja in signal za sestavljanje virusnih delcev (3).

Gen	Protein	Velikost (AK)	Funkcija	Lokacija
Ι	Ι	348	sestavljanje	notranja membrana gostitelja
	XI	108	sestavljanje	notranja membrana gostitelja
II	II	409	pomnoževanje	citoplazma gostitelja
	Х	111	pomnoževanje	citoplazma gostitelja
III	III	406	strukturna	konec bakteriofaga
IV	IV	405	sestavljanje	zunanja membrane gostitelja
V	V	87	pomnoževanje	citoplazma gostitelja
VI	VI	112	strukturna	konec bakteriofaga
VII	VII	33	strukturna	konec bakteriofaga
VIII	VIII	50	strukturna	obod bakteriofaga
IX	IX	32	strukturna	konec bakteriofaga

Površino nitastega bakteriofaga sestavlja po 5 kopij plaščnih proteinov pIII, pVI, pVII in pIX ter nekaj tisoč kopij plaščnega proteina pVIII, kot prikazuje slika 2. Predstavitev izbranega peptida je mogoča na vsakem od plaščnih proteinov bakteriofaga in na spremenjenih ali dodatnih plaščnih proteinih. Za predstavitev peptidov na bakteriofagu najpogosteje izberemo plaščna proteina pIII in pVIII (3, 5, 12).



Slika 2: Shema nitastega bakteriofaga, ki ga sestavljajo plaščni proteini (pIII, pVI, pVII, pVIII in pIX) in krožna enoverižna DNA (9).

Za predstavitev peptidov na bakteriofagu uporabljamo bakteriofagne ali fagmidne vektorje. Bakteriofagni vektorji nosijo genski zapis za vse proteine, ki so potrebni za replikacijo in sestavljanje bakteriofaga (3, 4, 9). Genski vključek za izbrani peptid vgradimo v bakteriofagni vektor tako, da ga spojimo z genom za določen plaščni protein ali ga dodamo spojenega z dodatno kopijo zapisa za plaščni protein. V prvem primeru se izbrani peptid izrazi na vseh kopijah plaščnega proteina, v drugem pa se na površini bakteriofaga poleg rekombinantnega fuzijskega proteina nahaja tudi običajni plaščni protein. Opisana sistema predstavitve peptidov na površini bakteriofaga označujemo s 3 (pri katerem bakteriofag

poleg nativnega gena vsebuje še rekombinantno kopijo gena za plaščni protein pIII), ko gre za fuzijo s plaščnim proteinom III, sicer pa z 8 ali 88, ko gre za fuzijo s plaščnim proteinom VIII, kot prikazuje slika 3. Genski zapis za fuzijo izbranega peptida s plaščnim proteinom lahko nosijo tudi fagmidi (t. i. sistem 3+3 oz. 8+8) (4).



Slika 3: Slika prikazuje različne sisteme predstavitve na bakteriofagu. Za tip 3 (oz. 8) je značilno, da vsebuje samo rekombinanten (fuzijski) gen za kapsidni protein, zato se tuji peptid izrazi na vseh kopijah plaščnega proteina. Vektor tipa 33 (oz. 88) nosi tako zapis za fuzijski protein kot za nativni plaščni protein, pri sistemu tipu 3+3 (oz. 8+8) pa se zapisa za fuzijski in nativni plaščni protein nahajata na različnih genomih, tj. na fagmidu in genomu pomožnega bakteriofaga. Tako dobimo bakteriofage, pri katerih se rekombinantni peptid izrazi le na nekaterih kopijah plaščnega proteina. Številke odgovarjajo vrsti plaščnega proteina, na katerem je predstavljen izbrani peptid (4).

Fagmidi so plazmidi, ki vsebujejo tudi elemente genskega zapisa nitastih bakteriofagov. Običajno ne vsebujejo genskih zapisov za plaščne proteine, razen za fuzijski protein z izbranim peptidom. Fagmidi vsebujejo mesto začetka podvojevanja plazmidov, zato jih lahko na enak način kot plazmide pomnožujemo v bakterijski kulturi. Za predstavitev rekombinantega peptida na bakteriofagu, kar prikazuje slika 4, moramo tako bakterijsko kulturo okužiti s pomožnim bakteriofagom. Fagmidi namreč vsebujejo tudi mesto začetka podvojevanja bakteriofagne DNA, nimajo pa zapisov za proteine, potrebne za pomnoževanje bakteriofagov, ki jih priskrbijo pomožni bakteriofagi. Poleg tega fagmidi vsebujejo še zaporedje (t.i. signal za sestavljanje), ki omogoča vstavljanje fagmidne DNA v kapsido bakteriofagov (3, 4, 13). Večina nastalih bakteriofagov navadno vsebuje fagmidno DNA, njihovo površino pa sestavljajo običajni in fuzijski proteini, kot prikazuje slika 3. Nastane tudi nekaj delcev z genotipom in fenotipom pomožnih bakteriofagov, kar poskušamo omejiti z

uporabo pomožnih bakteriofagov z okrnjenim mestom začetka podvojevanja ali okrnjenim signalom za sestavljanje delcev (9).



Slika 4: Fagmid vsebuje mesto začetka podvojevanja plazmida in bakteriofaga, gen za odpornost proti antibiotiku ter za fuzijski protein, v katerem sta združena zapisa za tuji peptid in plaščni protein. Fagmid s transfekcijo vnesemo v bakterijsko kulturo *E. coli*. Pomnoževanju v bakteriji sledi okužba s pomožnim bakteriofagom, ki omogoči nastanek bakteriofagnih delcev, ki imajo fagmidno DNA, na površini pa predstavljajo tuji peptid (prirejeno po 13).

Velikost in valenca (številčnost) predstavljenega peptida sta odvisni od tipa predstavitve na bakteriofagu, izbranega plaščnega proteina, rastnih pogojev in morebitne proteolize (3, 5, 7). Tipe predstavitve prikazuje slika 3. V sistemu tipa 3 oz. 8 se izbrani peptid izrazi na vseh kopijah plaščnega proteina, kar v sistemu 8 pomeni izjemno visoko valenco. Na ta način lahko namreč na proteinu VIII predstavimo do nekaj tisoč peptidov, dolgih od 6 do 7 aminokislinskih ostankov (5, 8, 12). V sistemih 88 in 8+8 pride do predstavitve na nekaj sto plaščnih proteinih, medtem ko je prikaz v sistemih 33 in 3+3 monovalenten, kar pomeni, da se na površini izrazi največ en rekombinantni protein. Sistemi 33, 3+3 in 8+8 omogočajo predstavitev večjih peptidov in proteinov (4, 5).

1.1.1 Knjižnice fragmentov protiteles

1.1.1.1 Bakteriofagne predstavitvene knjižnice

Bakteriofagne predstavitvene knjižnice so zbirke peptidov ali proteinov, izraženih na površini bakteriofagnega delca. Genski zapis za izbrani peptid se nahaja znotraj odgovarjajočega bakteriofaga (6). Tako lahko na površini predstavljenim peptidom z afinitetno selekcijo, ki ji sledita test specifičnosti in sekvenciranje, hitro določimo primarno strukturo in funkcionalne lastnosti. Afinitetna selekcija bakteriofagne predstavitvene knjižnice se začne z inkubacijo knjižnice bakteriofagov z izbrano tarčo, ki je imobilizirana na trdni površini. Tarča je lahko receptor, encim, antigen ali druga struktura, na katero se vežejo le določene različice na bakteriofagu predstavljenih peptidov. Inkubaciji s tarčo sledi spiranje nevezanih in elucija vezanih bakteriofagov, ki jih nato pomnožimo v svežih bakterijskih kulturah. Opisani postopek, ki ga prikazuje slika 5, tri- do petkrat ponovimo, dokler ne dobimo bakteriofagnih delcev z želenimi vezavnimi lastnostmi in specifičnostjo. Z vsakim ciklom namreč obogatimo skupnost bakteriofagov, ki predstavljajo vezoče peptide. Vezavno specifičnost izbranih bakteriofagov običajno določimo z encimskoimunskim testom (ELISA, ang. '*enzyme-linked immunosorbent assay*'), zaporedje predstavljenega peptida pa s sekvenciranjem DNA inserta v bakteriofagnem ali fagmidnem vektorju (4, 5, 6).



Slika 5: Postopek afinitetne selekcije (A, B, C) in vmesnega pomnoževanja v bakterijski kulturi nekajkrat ponovimo. Nato bakteriofage izoliramo in jim določimo nukleotidno zaporedje inserta, ki kodira predstavljen (poli)peptid (prirejeno po 6).

1.1.1.2 Vrste fragmentov protiteles

Protitelesa ali imunoglobulini so topni glikoproteini, ki v telesu nastajajo v limfocitih vrste B in se vežejo na tujke ali telesu lastne snovi, ki bi lahko škodovali organizmu. Protitelesa delimo na pet razredov: G, M, A, D in E. Osnovo protitelesa razreda G sestavljata dve težki in dve lahki polipeptidni verigi, ki sta med seboj povezani z disulfidnimi vezmi. Verige vsebujejo konstantna (C) in variabilna (V) področja, kot prikazuje slika 6. Variabilna področja določajo specifičnost, raznolikost in afiniteto vezave na antigen. Poleg popolnih

protiteles lahko v terapevtske, diagnostične in raziskovalne namene uporabljamo tudi fragmente protiteles, katerih pridobivanje je hitrejše in cenejše, poleg tega jih lahko z metodami tehnologije rekombinantne DNA razmeroma enostavno modificiramo (14).



Slika 6: Struktura protitelesa in fragmentov protiteles. Prikazano je protitelo razreda IgG s konstantnimi (C_H1-3 in C_L) in variabilnimi težkimi (V_H) ter lahkimi (V_L) domenami.
Fragment Fab sestavljata variabilni težka (črna barva) in lahka (bela barva) domena ter konstantna domena lahke verige (C_L) ter prva konstantna domena težke verige (C_H1; siva barva). Fragment Fv sestavljata variabilni domeni težke (črna) in lahke (bela) verige.
Fragment scFv sestavljata variabilni domeni, povezani s peptidnim linkerjem (prirejeno po 7).

Na površini bakteriofagov lahko predstavimo fragmente protiteles, kakršni so Fab, Fv, scFv (enoverižni fragment variabilnih regij protiteles, ang. '<u>single-chain variable fragment</u>'), dsFv (z disulfidi stabilizirani variabilni fragmenti), dvojni fragmenti variabilnih regij protiteles (ang. '*diabodies*') in posamezne domene (npr. V_L, V_H). Fragment Fv zajema variabilne domene lahke (V_L) in težke (V_H) verige protitelesa, ki sta pri scFv povezani kovalentno preko krajše peptidne zanke ("linkerja"), pri dsFv pa preko disulfidnih vezi. Dvojni fragmenti variabilnih regij protiteles so dimeri scFv. Z dimerizacijo dveh različnih verig scFv izdelamo bispecifična dvojna protitelesa. Fragment Fab poleg variabilnih vsebuje tudi konstantno regijo lahke (C_L) in težke (C_H1) verige (7, 11, 14).

Pripravo knjižnice fragmentov protiteles prikazuje slika 7. Genske zapise za fragmente protiteles lahko dobimo (i) z reverzno transkripcijo mRNA iz limfocitov B imuniziranih živali oz. imunih ljudi, (ii) iz naivnih limfocitov B neimuniziranih ljudi oz. živali ali (iii) s sintezo, pri kateri *in vitro* preuredimo zapise za verige V_H in V_L ter uvedemo umetna hipervariabilna področja (CDR, ang. '<u>complementarity-determining regions</u>'), ki oblikujejo vezavna mesta za antigen na težkih in lahkih verigah (7, 11, 15, 16). V primeru knjižnice protiteles, ki jih dobimo z imunizacijo, nabor protiteles zajema vsa protitelesa proti antigenu, ki je sprožil imunski odziv, medtem ko je v ostalih primerih teoretično mogoče pripraviti protitelesa proti poljubnemu antigenu (11, 15).



Slika 7: Priprava bakteriofagne predstavitvene knjižnice protiteles. Genske zapise za lahke in težke verige protiteles pridobimo iz A) limfocitov B imuniziranih subjektov, B) naivnih limfocitov B ali C) s sintezo. Želene genske segmente (cDNA) pomnožimo s PCR ter jih naključno združene vnesemo v fagmidni vektor kot fuzijo s plaščnim proteinom. Pripravljeni bakteriofagi predstavljajo knjižnico bakteriofagov, ki na svoji površini izražajo različna protitelesa ali njihove fragmente (prirejeno po 16).

1.1.1.3 Knjižnice scFv Tomlinson

V knjižnicah Tomlinson (serije I in J) je v fagmidne vektorje shranjenih več kot 10^8 zapisov za različne fragmente scFv v obliki fuzije z genom za plaščni protein III. Fragmenta V_H in V_L sta povezana z glicinsko-serinsko peptidno verigo. Zgradbo takega fagmida prikazuje slika 8. Iz knjižnice lahko izoliramo veliko število fragmentov protiteles scFv, ki jih lahko uporabljamo na enakih področjih kot monoklonska protitelesa (ELISA, v pretočni citometriji pri ločevanju celic na osnovi fluorescence FACS, ang. '*fluorescence-activated cell sorting*' itd). Za selekcijo fragmentov protiteles uporabljamo imobilizirane antigene ali biotinilirane antigene v raztopini, ki jih vežemo na s streptavidinom prekrite delce. Po vezavi scFv na antigen izperemo nevezane bakteriofage in nato vezane bakteriofage eluiramo s pomočjo spremembe pH, s kompeticijo s prostim antigenom ali s proteolitično razgradnjo povezave med fragmentom in plaščnim proteinom. Eluirane bakteriofage nato pomnožimo v bakterijski kulturi *E. coli* in še dva- do trikrat ponovimo selekcijo ter pomnoževanje. Na

koncu izoliramo bakteriofage s scFv, ki se vežejo na izbrani antigen. Specifičnost vezave na antigen ocenimo s pomočjo testov, kakršen je encimskoimunski test (ELISA) (17).



Slika 8: Fagmidni vektor predstavitvenih knjižnic scFv Tomlinson. Fagmid vsebuje plazmidno (colE1 ori) in bakteriofagno (M13 ori) mesto začetka podvojevanja, gen za odpornost proti antibiotiku ampicilinu (amp), promotor *lac*, vezavno mesto za ribosom (RBS), signalno zaporedje (*pelB*), restrikcijska mesta za vstavljanje zapisov za verige V_H in V_L, zapis za peptidno verigo med verigama V_H in V_L (linker) ter zapis za plaščni protein pIII z označevalcem myc in zaključnim kodonom amber (amber) (17).

1.2 Razvrščanje proteinov pri bakteriji E. coli

Bakterija *E.coli* omogoča izražanje raznolikih rekombinantnih proteinov. Nastali proteini se lahko razvrščajo v citoplazmo, v celično membrano, v gojišče ali periplazmo, kot prikazuje slika 9.



Slika 9: Razvrščanje rekombinantnih proteinov pri *E. coli*. Proteini se lahko razvrščajo v citoplazmo, kjer se pogosto združujejo v inkluzijska telesa (A), v B) periplazmo, v C) gojišče ali v D) celično steno.

Z razvrščanjem rekombinantnih proteinov v citoplazmo dobimo velike količine rekombinantnega proteina, ki pa se lahko zaradi prehitrega nastajanja kopiči v citoplazmi v obliki inkluzijskih telesc. V citoplazmi je otežena tudi tvorba disulfidnih vezi znotraj rekombinantnega proteina. Pojavu inkluzijskih telesc se poskušamo izogniti s spremembo rastnih pogojev, sočasnim izražanjem šaperonov, uporabo različnih promotorjev za nadzor izražanja in drugimi ukrepi. Tvorbo disulfidnih vezi lahko nekoliko olajšamo z gensko manipulacijo reducirajočih encimov (18, 19).

Z izločanjem rekombinantnih proteinov v periplazmo ali gojišče bakterija proizvede manjšo količino proteinov kot v citoplazmi, vendar so taki proteini pogosteje pravilno zviti s pravilnim procesiranjem *N*-konca, stabilnejši, bolje topni in enostavnejši za čiščenje (18-20). Težave takega razvrščanja so predvsem nepopoln prenos proteina preko notranje membrane, nizka učinkovitost prenašalnih mehanizmov in razgradnja proteinov s proteolizo (20).

Razvrščanje rekombinantnih proteinov v periplazmo pri bakteriji *E. coli* poteka predvsem po t.i. sekretorni poti tipa II, ki jo prikazuje slika 10 (19, 20). Prenos preko notranje celične membrane določajo signalni peptidi na *N*-koncu proteina, ki protein usmerjajo k ustreznemu prenašalnemu proteinu (18). Protein Sec preko membrane prenaša nezvite proteine, ki jih do njega usmerjata (i) od SecB odvisna pot po translaciji ali (ii) pot delca SRP (delec, ki prepozna signal, ang. '<u>signal recognition particle</u>') hkrati s translacijo (20, 21). Taki proteini vsebujejo pretežno hidrofobno signalno zaporedje, kakršno je npr. zaporedje *pelB*, ki se odcepi med potovanjem proteina preko membrane (19). Pot Tat (ang. '*twin-<u>arginine</u> translocation*') omogoča prehod *zvitih* proteinov preko membrane ali njihovo vključitev v membrano. Taki proteini vsebujejo signalno zaporedje *TorA* (trimetilaminoksid reduktaze) (19, 22, 23). Pot Tat je ugodna predvsem za proteine, ki se zvijejo, še preden dosežejo prenašalec Sec, ali pa za zvitje potrebujejo reduktivno okolje in/ali citoplazemske komponente, kakršne so šaperoni (19, 22). Proteini se lahko po prenosu v periplazmo izločajo v gojišče, bodisi pasivno zaradi prepustnosti zunanje membrane bodisi aktivno s pomočjo specifičnih prenašalcev (20).



Slika 10: Preproteini se iz citoplazme v periplazmo prenesejo s pomočjo kompleksa prenašalnih proteinov vrste Sec ali Tat. Nezviti proteini potujejo do prenašalca Sec bodisi po translaciji (A) s pomočjo šaperona SecB bodisi hkrati s translacijo (B), kar usmerja delec SRP s pomočjo receptorja FtsY. Take proteine prepozna SecA in jih usmerja na poti preko membrane. Zvite proteine (C) z ustreznim signalnim zaporedjem prepozna in v periplazmo prenese proteinski kompleks Tat. V periplazmi signalne peptidaze od proteinov odcepijo signalna zaporedja, ki usmerjajo proteine k različnim prenašalcem (prirejeno po 24).

Izločanje rekombinantnih proteinov v gojišče zmanjša njihovo proteolitično razgradnjo in olajša njihovo izolacijo ter čiščenje. Nespecifično izločanje v gojišče dosežemo s povečanjem prepustnosti zunanje bakterijske membrane z mehansko, kemično ali encimsko obdelavo oziroma z uporabo bakterijskih mutant, ki imajo prepustnejše zunanje membrane. Izločanje rekombinantnih proteinov v gojišče dosežemo tudi s fuzijo le-teh s proteini zunanje membrane, kakršen je porin OmpF (ang. '<u>outer membrane protein F</u>'), ali proteini, kakršen je hemolizin, ki se izločajo v gojišče po sekretornem sistemu tipa I (19, 20). Za sekretorni sistem tipa I je značilen enostopenjski prenos proteinov v gojišče brez vmesnega zadrževanja v periplazmi (20).

1.3 Fluorescenčni proteini

Fluorescenca je fizikalni pojav, pri katerem molekula absorbira svetlobo krajše valovne dolžine in takoj nato odda svetlobo daljše valovne dolžine (25). Del molekule, ki povzroči obarvanost, imenujemo kromofor.

Fluorescenčni proteini (FP) so skupina fluorescirajočih proteinov, ki se v naravi nahajajo v morskih organizmih mehovcih (26-28). Fluorescenčne proteine lahko samostojno ali v obliki fuzije z želenim proteinom izražamo v različnih organizmih, tkivih ali celičnih linijah.

Fluorescenčni proteini za izražanje fluorescence ne potrebujejo fiksacije ali dodatka sekundarnih reagentov, temveč samo prisotnost kisika (26, 27, 29).

Fluorescenčni proteini imajo obliko sodčka β , ki obdaja kromofor na središčni vijačnici α in ga ščiti pred vplivi okolja (30-32). Strukturo zelenega fluorescenčnega proteina (GFP, ang. '*green fluorescent protein*') prikazuje slika 11. Po zvitju proteina v citoplazmi pride še do nastanka fluorescirajočega kromofora (21). Kromofor nastane po zaporedju avtokatalitičnih reakcij ciklizacije in oksidacije iz treh kovalentno povezanih aminokislinskih ostankov, ki tvorijo konjugiran sistem elektronov π . Poleg glicina, ki se pojavlja pri vseh fluorescenčnih proteinih, kromofor sestavljata še aromatska (najpogosteje tirozin) in poljubna aminokislina (31-33). Za fluorescenco sta pomembna še aminokislinska ostanka glutamin in arginin, ki kot del sodčka β obdajata kromofor in ga stabilizirata (31). S spremembami zgoraj omenjenih aminokislinskih ostankov vplivamo na valovno dolžino absorbirane in oddane svetlobe v kromoforu ter s tem na fluorescenco proteina (34).



Slika 11: Struktura zelenega fluorescenčnega proteina. Vidimo 11 verig sodčka β, ki obkrožajo vijačnico α v notranjosti. Kromofor v središču je predstavljen z modelom paličic in kroglic (26).

Poznamo cianaste, zelene, rumene in oranžno-rdeče fluorescenčne proteine, ki skupaj z umetno ustvarjenimi različicami obsegajo celoten vidni in bližnji infrardeči (IR) barvni spekter (30, 33). Taka spektralna raznolikost omogoča hkratno zaznavanje različnih barvno označenih struktur v vzorcu, kar izkorišča napredna tehnika mikroskopiranja na osnovi FRET (prenos energije z resonanco fluorescence, ang. '*fluorescence resonance energy transfer*') (26, 30). S FRET lahko ločimo strukture, ki so med seboj oddaljene za manj kot 10 nm, če emisijski spekter fluorofora prve strukture prekriva absorpcijski spekter fluorofora druge strukture. Uporabo fluorescenčnih proteinov v mikroskopiji poleg prostorske ločljivosti odlikujeta še časovna ločljivost, občutljivost in možnost moduliranja (27). Tako lahko danes različice fluorescenčnih proteinov uporabljamo za proučevanje značilnosti celičnega okolja in gibanje celic ter v obliki fuzijskih proteinov za proučevanje izražanja genov, interakcij, aktivnosti, gibanja ter pretvorbe proteinov, funkcije organelov in potovanja struktur v celicah, tkivih ali celotnih organizmih (26, 27, 30, 33, 35). Pri tem sledimo fluorescenci samostojnih FP ali fuzijskih proteinov, za katere želimo, da ohranijo značilnosti proučevanega proteina (27). Izbira FP je odvisna od želene stopnje ter valovne dolžine fluorescence, lokalizacije proučevane strukture, časovnega okvira proučevanega procesa, občutljivosti proučevane strukture na označevanje s FP in fotostabilnosti FP (29).

1.3.1 Zeleni fluorescenčni protein

Zeleni fluorescenčni protein (GFP) so kot prvi fluorescenčni protein odkrili v 60-ih letih prejšnjega stoletja v ožigalkarju vrste *Aequorea victoria* (26, 36). Njegovo strukturo prikazuje slika 11. Mono- ali dimerni protein iz več kot 200 aminokislin sestavljata 11-verižni sodček β in vijačnica α z aminokislinskimi ostanki Ser65-Tyr66-Gly67, ki tvorijo kromofor 4-(p-hidroksibenzilidin)-imidazolin-5-on (26, 27, 29, 33, 34). Kromofor nastane po nukleofilnem napadu α -aminske skupine glicina na karbonilno skupino serina, ki ji sledita odcep vode in oksidacija vezi α - β tirozina, da dobimo konjugiran sistem elektronov π . Protonirana oblika kromofora po ekscitaciji prehaja v neprotonirano, zato ima absorpcijski spekter GFP dva vrha, pri 395 nm in 475 nm, in emisijski vrh pri 508 nm, kot prikazuje slika 12 (26, 31, 34). Delež protonirane oblike se poveča pri višjih koncentracijah proteina, ki povzročajo njegovo agregacijo. GFP je občutljiv tudi na povišanje temperature (nad 20 °C) med zvijanjem, čeprav je zrel protein stabilen pri temperaturah od 15 °C do 65 °C (26). Težave pri zvijanju GFP nastopijo tudi ob fuziji s proteinom, ki je slabše topen ali nepravilno zvit (21).



Slika 12: S polno črto je prikazan absorpcijski spekter GFP z višjim vrhom pri 395 nm (protoniran kromofor) in nižjim pri 475 nm (neprotoniran kromofor). S prekinjeno črto je prikazan emisijski spekter GFP z maksimalno fluorescenco pri 508 nm (26).

Težave izvornega GFP z zvijanjem ob fuziji z drugim proteinom so poskušali odpraviti z usmerjeno mutagenezo po metodi fragmentiranja in premeščanja DNA ter tako pridobili njegovo robustnejšo različico, sfGFP (ang. '*superfolder green fluorescent protein*'). Odlikujeta jo večja odpornost proti termični ter kemijski denaturaciji in boljša kinetika zvitja, kar zmanjšuje agregacijo in delež nepravilno zvitih proteinov (37, 38). Delež izraženega proteina je povečan tudi zaradi večje odpornosti sfGFP na spremembe, ki jih prinašajo naključne mutacije. Fluorescenca sfGFP je sorazmerna koncentraciji fuzijskega proteina ne glede na njegovo topnost in pravilnost zvitja fuzijskega partnerja. Največ zaslug za to ima najverjetneje mutacija S30R, ki povzroči lokalne konformacijske spremembe, ki vodijo k povečani stabilizaciji strukture sodčka β zaradi tvorbe petčlenske intramolekularne ionske mreže. Strukturo vijačnice α s tvorbo dodatne vodikove vezi stabilizira mutacija Y39N. Shematsko razporeditev mutacij prikazuje slika 13. Kromofor sfGFP tvorijo aminokislinski ostanki Thr65-Tyr66-Gly67. Vrh v ekscitacijskem spektru sfGFP je pri 485 nm, emisija pa je največja pri 510 nm. Omenjene izboljšave sfGFP omogočajo širšo uporabo v raziskavah lokalizacije, FRET, zvijanja proteinov ter izdelavo novih fuzijskih proteinov, cepljenih proteinov in biosenzorjev (38).



Slika 13: Shematski prikaz razporeditev mutacij v sfGFP v primerjavi z izvornim proteinom GFP. Poleg predhodno znanih mutacij (označene s črnimi krogi) vsebuje sfGFP nove mutacije S30R, Y39N, N105T, Y145F, I171V in A206V (označene z zelenimi krogi) (prirejeno po 38).

1.3.2 Imunofluorescenca

Imunofluorescenca je laboratorijska metoda, pri kateri fluorescenčno označimo protitelo in nato sledimo njegovi vezavi na izbrani antigen. Fluorescenco lahko zaznamo s pomočjo fluorescenčnega ali konfokalnega mikroskopa in kvantificiramo z uporabo pretočnega citometra ali druge opreme (39). Protitelesa običajno označimo kemijsko s fluorescenčnim barvilom, kakršen je fluorescein izotiocianat (FITC), lahko pa tudi v obliki fuzije protitelesa s

fluorescenčnim proteinom (39-42). Fluorescenčno označena protitelesa uporabljamo za proučevanje lokalizacije izbranih struktur v celicah ali tkivih (imunocito- oz. imunohistokemija) in v diagnostiki za detekcijo za bolezen specifičnih antigenov v vzorcih tkiva ali telesnih tekočin, mikroorganizmov (povzročiteljev virusnih, bakterijskih in parazitskih okužb), specifičnih zaporedij kromosomske DNA in struktur, kot so amiloidi, lipidi ter mucin (39, 43).

2. NAMEN NALOGE

Tehnologija predstavitve na bakteriofagu ima izjemen pomen v molekularni biologiji in na področju odkrivanja novih učinkovin, saj lahko s pomočjo različnih pristopov presejanja bakteriofagnih knjižnic poiščemo ligande za uporabo v raziskavah, in vitro in in vivo diagnostiki ter peptidne vodnice za razvoj novih zdravilnih učinkovin. Doslej uveljavljene metode zaznavanja vezave bakteriofagov na izbrane tarče vključujejo predvsem posredno detekcijo s pomočjo označenih protiteles, usmerjenih proti kapsidnim proteinom bakteriofaga. S pomočjo zaznavanja reporterskega proteina dvojno označenih bakteriofagov bi močno poenostavili postopke selekcije bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic, ki jih uporabljamo za iskanje in proučevanje vezalcev encimov ter receptorjev, peptidnih zdravilnih učinkovin, fragmentov protiteles in drugih peptidov ali proteinov. Bakteriofage, ki se vežejo na izbrano tarčo in hkrati predstavljajo fluorescenčni reporterski protein, bi lahko zaznali s pomočjo fluorescenčne mikroskopije in s testi, kot sta FLISA in FACS. Omenjeni testi bi omogočili avtomatizacijo postopka selekcije in analize vezanih bakteriofagov, saj so enostavnejši in hitrejši od uveljavljenega testa ELISA. Hkrati bi dvojno označene bakteriofage lahko uporabili namesto označenih protiteles v raziskovalne ali diagnostične namene za prepoznavanje površinskih označevalcev ali drugih molekul. Uporaba različnih vrst fluorescenčnih proteinov v povezavi z različnimi predstavljenimi fragmenti protiteles bi omogočila hkratno vizualizacijo različnih označevalcev, medtem ko bi uporaba alternativnih reporterskih proteinov, kot je hrenova peroksidaza, lahko vodila k enostavnejši izvedbi imunskih testov. Dvojno označeni bakteriofagi prekašajo označena monoklonska protitelesa v enostavnosti, hitrosti in ceni priprave, poleg tega lahko na bakteriofagih predstavimo fragmente protiteles proti širšemu naboru antigenov in jih lažje oblikujemo glede na potrebe.

V okviru magistrskega dela želimo z metodo predstavitve na bakteriofagu pripraviti dvojno označen (bifunkcionalen) bakteriofag, ki bo na svoji površini hkrati predstavljal enoverižni fragment variabilne regije protiteles, ki se bo vezal na izbrano tarčno molekulo, in reporterski fluorescenčni protein (sfGFP), ki bo omogočal zaznavo vezanega bakteriofaga. V ta namen bomo pripravili pomožni bakteriofag za uvedbo reporterskega proteina na kapsido in z njegovo pomočjo pripravili dvojno označene bakteriofage. Izražanje fluorescenčnega proteina bomo ocenili makroskopsko v usedlini gostiteljskih bakterij in usedlini izoliranih bakteriofagov ter s fluorescenčno mikroskopijo, kjer bomo pregledali gostiteljske bakterije. Vgrajevanje fluorescenčnega proteina v kapsido bakteriofaga bomo preverili z NaDS-PAGE in prenosom western. Predstavitev enoverižnega fragmenta variabilnih regij protiteles na površini bakteriofaga bomo preverili s testom ELISA. Hkratno predstavitev in funkcionalnost obeh rekombinantnih proteinov na površini bakteriofagnih delcev bomo preverili s testom FLISA in s pomočjo fluorescenčne mikroskopije z opazovanjem sefaroznih delcev z vezanim tarčnim proteinom po inkubaciji z rekombinantnimi bakteriofagi.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec
3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
(X-gal)	
agar	Sigma-Aldrich Chemie GmBH, Taufkirchen,
	Nemčija
agaroza	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
akrilamid/bis(akrilamid)	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
ampicilin	Fluka, Buchs, Švica
barvilo SYBR Gold	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
barvilo SYBR Safe	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
D-galaktoza	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
dimetilsulfoksid (DMSO)	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
ditiotreitol (DTT)	Fluka, Buchs, Švica
etilendiamintetraocetna kislina (EDTA)	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
etanol, 96 %	Riedel-de Haën AG, Nemčija
etanol, 70 %	Riedel-de Haën AG, Nemčija
fluorescein izotiocianat (FITC)	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
glicerol	Fluka Chemie, Buchs, Švica
glicin	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
glukoza	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) – standard	Thermo Scientific, Rockford, IL, ZDA
1 mg/Ml	
HCl, 37 %	Fluka, Buchs, Švica
H ₂ SO ₄ , 95-97 %	Merck, Darmstadt, Nemčija
izopropanol	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, ZDA
izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG)	Promega, Madison, WI, ZDA
kanamicin	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
kemiluminiscenčni substrat SuperSignal™	Thermo Scientific, Rockford, IL, ZDA
West Dura	
KCl	Carlo Erba, Rodano, Italija
KH ₂ PO ₄	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, ZDA
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
kvasni ekstrakt Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson and Co., Sparks, MD,
	ZDA
metanol	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
NaCl	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Španija
Na ₂ HPO ₄	Fluka, Buchs, Švica

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Fluka, Buchs, Švica
nanašalno barvilo za gelsko elektroforezo	Fermentas, Burlington, Kanada
DNA Loading Dye (6X)	
NaOH	Fluka, Buchs, Švica
natrijev dodecil sulfat (NaDS)	Fluka, Buchs, Švica
ocetna kislina, koncentrirana	Merck, Darmstadt, Nemčija
polietilenglikol (PEG) 8000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Murska Sobota,
	Slovenija
saharoza	Fluka, Buchs, Švica
sefarozni delci, aktivirani s CNBr	GE Healthcare, Piscateway, NJ, ZDA
tetraciklin	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Chemie GmBH, Taufkirchen,
	Nemčija
tripton	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
tris(hidroksimetil)aminometan (Tris)	Riedel-de Haën AG, Nemčija
Tween® 20	Fluka, Buchs, Švica

3.1.2 Kompleti, oligonukleotidi, označevalci in reagenti

Komplet, oligonukleotid, označevalec ali reagent	Proizvajalec
5'-začetni oligonukleotid F-sfGFP-HindIII	Eurofins MWG Operon,
AAGCTTTGCCCGTAAAGGCGAAGAGCTGTTCACTG	Ebersberg, Nemčija
5'-začetni oligonukleotid R-sfGFP-PstI	Eurofins MWG Operon,
<u>CTGCAG</u> AGCCGCCTTTGTACAGTTCATCCATACCATGCG	Ebersberg, Nemčija
5'-začetni oligonukleotid F-T7	Eurofins MWG Operon,
TAATACGACTCACTATAGGG	Ebersberg, Nemčija
5'-začetni oligonukleotid R-SP6	Eurofins MWG Operon,
ATTTAGGTGACACTATAG	Ebersberg, Nemčija
5'-začetni oligonukleotid R-f88-98	Eurofins MWG Operon,
TGCCAATAGTAGCACCAACG	Ebersberg, Nemčija
5'-začetni oligonukleotid F-pLP7-P _{lac} -XhoI	Eurofins MWG Operon,
AATT <u>CTCGAG</u> TTAGCTCACTCATTAGGCACCCCA	Ebersberg, Nemčija
5'-začetni oligonukleotid R-pLP7-TorA-HindIII	Eurofins MWG Operon,
ATAT <u>AAGCTT</u> GCCGCTTGCGCCGCA	Ebersberg, Nemčija
knjižnica Tomlinson I + J	Source BioScience UK
	Ltd., Nottingham, ZK
komplet GenElute [™] Plasmid Miniprep	Sigma, St. Louis, MO,
	ZDA
komplet QIAEX® II Gel Extraction	Qiagen, Hilden, Nemčija
osnovna zmes za verižno reakcijo s polimerazo PCR Master Mix	Fermentas, Burlington,
(2x)	Kanada
označevalec velikosti Gene Ruler [™] 1 kbp DNA Ladder	Fermentas, Burlington,

	Kanada
označevalec velikosti Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder	Fermentas, Burlington,
	Kanada
označevalec velikosti Gene Ruler™ Low Range DNA Ladder	Fermentas, Burlington,
	Kanada
označevalec velikosti za proteinsko elektroforezo SeeBlue Plus2	Invitrogen, Carlsbad, CA,
Prestained Standard	ZDA

3.1.3 Biološki material

Plazmidni, fagmidni in bakteriofagni	Proizvajalec
vektorji	
pSEUDO/sfGFP	Pripravil J. Pinto s sod., Univerza v
	Groningenu, Groningen, Nizozemska (44)
Plazmidni vektor vsebuje gen za rezistenco	
proti eritromicinu. Plazmid pSEUDO/ sfGFP	
je vseboval še gen za protein sfGFP.	
pGEM®-T Easy	Promega, Madison, WI, ZDA
Plazmidni vektor vsebuje gen <i>lacZ</i> in gen za	
β-laktamazo. Lineariziran plazmid ima 3'-	
timidinski rep, ki preprečuje spajanje prostih	
koncev plazmida in poveča učinkovitost	
ligacije pomnožka PCR v plazmid.	
pLP7/ Plac -TorA-GFP	Pripravil in prijazno daroval Kevin D.
	Young, Univerza v Arkansasu, AR, ZDA
Fagmidni vektor pLP7 vsebuje gen $lacI^q$ za	(45)
lac-represor in gen za rezistenco proti	
kanamicinu. Darovani fagmid pLP7/P _{lac} -	
TorA-GFP je vseboval še zaporedje za	
signalni peptid TorA skupaj z zaporedjem za	
GFP pod nadzorom promotorja <i>lac</i> .	
pIT2/anti-BSA in pIT2/3L5	Iz knjižnice Tomlinson (I+J) izoliral Peter
1 1	Molek, Fakulteta za farmacijo, Univerza v
Fagmidni vektor pIT2 vsebuje gen za <i>lacZ</i> .	Liubliani (46)
gen za β-laktamazo in gen za plaščni protein	5 5 (/
pIII nitastega bakteriofaga. Fagmid	
pIT2/anti-BSA vsebuie genski zapis za	
enoverižni fragment variabilnih regii	
protiteles (scFv) proti goveiemu serumskemu	
albuminu (BSA, ang 'bovine serum	
albumin') Fagmid pIT2/3L5 vsebuje genski	
zapis za scFv proti humanemu leptinskemu	
receptoriu	
iceoptorju.	

f88-4	Pripravil in prijazno daroval George P. Smith
	s sod., Univerza v Missouriju, Columbia,
Bakteriofagni vektor f88-4 izhaja iz nitastega	MO, ZDA
bakteriofagnega vektorja fd-tet, v katerega so	
Smith in sod. vstavili dodatni rekombinantni	
gen za plaščni protein pVIII (rgVIII).	
Rekombinantni gen je pod vplivom	
promotorja <i>tac</i> , zato ga lahko induciramo z	
IPTG. Z indukcijo z 1 mM IPTG lahko	
dosežemo vgraditev približno 150-300	
rekombinantnih plaščnih proteinov v kapsido	
bakteriofaga. Rekombinantni gen vsebuje	
restrikcijski mesti za encima <i>Hind</i> III in <i>Pst</i>	
med kateri lahko vstavimo poliubni genski	
vklinček	
KM13	Del kompleta Knjižnice Tomlinson I + I
	Source BioScience UK Limited Nottingham
Pomožni bakteriofag KM13 izbaja iz	VB
hakteriofaga M13 KM13 nosi mutacijo	
Met40 Ile na genu gII. Znotraj mesta začetka	
podvojevanja M13 se nahajata mesto začetka	
podvojevanja P15A in gen za odpornost na	
kanamicin V prisotnosti fagmida ki vsebuje	
mesto začetka podvojevanja M13 diviega	
tipa ali f1, se v nove bakteriofagne delce	
vkliučuje predvsem enoverižna fagmidna	
DNA in se izloča v okolico.	
Bakterijski sev	Proizvajalec
E. coli TOP10	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
Genotip: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)	Kompetentne bakterije <i>E. coli</i> TOP10 je s
$\phi 80\Delta$ (lacZ) M15 $\Delta lacX74$ nupG recA1	kemijsko indukcijo pripravil Peter Molek,
araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16	Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija.
$rpsL(Str^R)$ endA1 λ^2	
Trajna kultura bakterij je bila shranjena v	
Trajna kultura bakterij je bila shranjena v tekočem gojišču LB s 25 % (v/v) glicerola	
Trajna kultura bakterij je bila shranjena v tekočem gojišču LB s 25 % (v/v) glicerola pri – 80 °C.	
Trajna kultura bakterij je bila shranjena v tekočem gojišču LB s 25 % (v/v) glicerola pri – 80 °C. <i>E. coli</i> TG1Tr	Del kompleta Knjižnice Tomlinson I + J,
Trajna kultura bakterij je bila shranjena v tekočem gojišču LB s 25 % (v/v) glicerola pri – 80 °C. <i>E. coli</i> TG1Tr	Del kompleta Knjižnice Tomlinson I + J, Source BioScience UK Limited, Nottingham,
Trajna kultura bakterij je bila shranjena v tekočem gojišču LB s 25 % (v/v) glicerola pri $- 80$ °C. <i>E. coli</i> TG1Tr Genotip: F' <i>traD36</i>	Del kompleta Knjižnice Tomlinson I + J, Source BioScience UK Limited, Nottingham, VB

 Δ (*lac-proAB*) Δ (*mcrB-hsdSM*)5, ($r_{K}m_{K}$) Trajna kultura bakterij je bila shranjena v

_

talzažam aniižžu LD a 25 0/ (zy/zy) alioanala	
tekocem gojiscu LB s 25 % (V/V) glicerola	
pri – 80 °C.	
E. coli K91BluKan	Prijazno daroval George P. Smith s sod.,
	Univerza v Missouriju, Columbia, MO, ZDA
Genetic: $E'(Kan^R) lac I 0 \Lambda(lac7)M15/thi$	-
$\frac{1}{1000} = \frac{1}{1000} + 1$	
I rajna kultura bakterij je bila shranjena v	
tekočem gojišču LB s 25 % (v/v) glicerola	
pri – 80 °C.	
E. coli ER2738	New England Biolabs, MA, ZDA
Genotip: $F' proA^+B^+ lacI^q \Lambda(lacZ)M15$	
$77f \cdot Tn10(Tet^R)/fhuA2 glnV A(lac-nroAB)$	
$22j1n10(1ee)$ jnull2 gint $\Delta(ue promb)$	
$m-1 \ge (nsus-m(TD))^{-1}$	
I rajna kultura bakterij je bila snranjena v	
tekočem gojišču LB s 25 % (v/v) glicerola	
pri – 80 °C.	
Ductoini	
Froieini	Proizvajalec
goveji serumski albumin (BSA)	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDA Sigma, St. Louis, MO, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4	ProizvajalecSigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDASigma, St. Louis, MO, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega	ProizvajalecSigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDASigma, St. Louis, MO, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDAR&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega receptorja za leptin s humano regijo Fc IgG	ProizvajalecSigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDASigma, St. Louis, MO, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDAR&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega receptorja za leptin s humano regijo Fc IgG (hLR-Fc)	ProizvajalecSigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDASigma, St. Louis, MO, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDAR&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega receptorja za leptin s humano regijo Fc IgG (hLR-Fc) mAb proti bakteriofagu M13_označeno s	Proizvajalec Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDA Sigma, St. Louis, MO, ZDA New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA R&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA GE Healthcare, Piscateway, NJ, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega receptorja za leptin s humano regijo Fc IgG (hLR-Fc) mAb proti bakteriofagu M13, označeno s brenovo peroksidazo	ProizvagalecSigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDASigma, St. Louis, MO, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDAR&D Systems, Minneapolis, MN, ZDAGE Healthcare, Piscateway, NJ, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega receptorja za leptin s humano regijo Fc IgG (hLR-Fc) mAb proti bakteriofagu M13, označeno s hrenovo peroksidazo	Froizvajalec Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDA Sigma, St. Louis, MO, ZDA New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA R&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA GE Healthcare, Piscateway, NJ, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega receptorja za leptin s humano regijo Fc IgG (hLR-Fc) mAb proti bakteriofagu M13, označeno s hrenovo peroksidazo mAb - kozie protitelo proti GFP (AB6673)	Proizvajalec Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDA Sigma, St. Louis, MO, ZDA New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA R&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA GE Healthcare, Piscateway, NJ, ZDA Abcam, Cambridge, ZK
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega receptorja za leptin s humano regijo Fc IgG (hLR-Fc) mAb proti bakteriofagu M13, označeno s hrenovo peroksidazo mAb - kozje protitelo proti GFP (AB6673) mAb – oslovsko protitelo proti koziemu	Proizvajalec Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDA Sigma, St. Louis, MO, ZDA New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA R&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA GE Healthcare, Piscateway, NJ, ZDA Abcam, Cambridge, ZK Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega receptorja za leptin s humano regijo Fc IgG (hLR-Fc) mAb proti bakteriofagu M13, označeno s hrenovo peroksidazo mAb - kozje protitelo proti GFP (AB6673) mAb – oslovsko protitelo proti kozjemu protitelesu, konjugirano s brenovo	Proizvajalec Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDA Sigma, St. Louis, MO, ZDA New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA R&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA GE Healthcare, Piscateway, NJ, ZDA Abcam, Cambridge, ZK Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega receptorja za leptin s humano regijo Fc IgG (hLR-Fc) mAb proti bakteriofagu M13, označeno s hrenovo peroksidazo mAb - kozje protitelo proti GFP (AB6673) mAb – oslovsko protitelo proti kozjemu protitelesu, konjugirano s hrenovo	ProizvagalecSigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDASigma, St. Louis, MO, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDAR&D Systems, Minneapolis, MN, ZDAGE Healthcare, Piscateway, NJ, ZDAAbcam, Cambridge, ZKSanta Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega receptorja za leptin s humano regijo Fc IgG (hLR-Fc) mAb proti bakteriofagu M13, označeno s hrenovo peroksidazo mAb - kozje protitelo proti GFP (AB6673) mAb – oslovsko protitelo proti kozjemu protitelesu, konjugirano s hrenovo peroksidazo	Proizvajalec Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDA Sigma, St. Louis, MO, ZDA New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA R&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA GE Healthcare, Piscateway, NJ, ZDA Abcam, Cambridge, ZK Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega receptorja za leptin s humano regijo Fc IgG (hLR-Fc) mAb proti bakteriofagu M13, označeno s hrenovo peroksidazo mAb - kozje protitelo proti GFP (AB6673) mAb – oslovsko protitelo proti kozjemu protitelesu, konjugirano s hrenovo peroksidazo nukleaza iz zlatega fižola (MBN)	ProizvagalecSigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDASigma, St. Louis, MO, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDAR&D Systems, Minneapolis, MN, ZDAGE Healthcare, Piscateway, NJ, ZDAAbcam, Cambridge, ZKSanta Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega receptorja za leptin s humano regijo Fc IgG (hLR-Fc) mAb proti bakteriofagu M13, označeno s hrenovo peroksidazo mAb - kozje protitelo proti GFP (AB6673) mAb – oslovsko protitelo proti kozjemu protitelesu, konjugirano s hrenovo peroksidazo nukleaza iz zlatega fižola (MBN) restrikcijski encim <i>Hind</i> III	ProizvagalecSigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDASigma, St. Louis, MO, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDAR&D Systems, Minneapolis, MN, ZDAGE Healthcare, Piscateway, NJ, ZDAAbcam, Cambridge, ZKSanta Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA
goveji serumski albumin (BSA) DNaza DNA-ligaza T4 fuzijski protein ektodomene humanega receptorja za leptin s humano regijo Fc IgG (hLR-Fc) mAb proti bakteriofagu M13, označeno s hrenovo peroksidazo mAb - kozje protitelo proti GFP (AB6673) mAb – oslovsko protitelo proti kozjemu protitelesu, konjugirano s hrenovo peroksidazo nukleaza iz zlatega fižola (MBN) restrikcijski encim <i>Hind</i> III restrikcijski encim <i>Pst</i> I	ProizvagalecSigma - Aldrich, St. Louis, MO, ZDASigma, St. Louis, MO, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDAR&D Systems, Minneapolis, MN, ZDAGE Healthcare, Piscateway, NJ, ZDAAbcam, Cambridge, ZKSanta Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDANew England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA

11	D C '		•	••• •
3.1.4	Putri,	raztopi	ne in	golišča
	,	1		

Pufer	Sestava in način priprave		
fosfatni pufer s soljo,	NaCl	3,2 g	
pH 7,4 in pH 8,3	KCl	0,08 g	
	Na ₂ HPO ₄	0,576 g	
	KH ₂ PO ₄	0,096 g	
	ddH ₂ O	-	

		400 mL
	Sestavine smo raztopili v ddH ₂ O ob mešanju z magnetnim mešalom. Pufru smo uravnali pH z NaOH oz. HCl, ga avtoklavirali in shranili pri sobni temperaturi.	
blokirni pufer mleka v prahu	mleko v prahu	500 mg
	PBS	10 mL
nufan za anizania zai taatih	Mleko v prahu smo raztopili v magnetnim mešalom.	pufru PBS ob mešanju z
puter za spiranje pri testin	0,1 % PDS1	50 I
ELISA	PBS	50 mL
	Tween [®] 20	50 μL
	0,05 % PBST PBS Tween® 20	50 mL 25 μL
	V nufer PBS smo odninetirali	Tween® 20 in dobro
	v puter i DS sino oupipetitan	
		1
puter za spiranje setaroznih	glicerol	
delcev	10 % PBS1	200 μL
	D-galaktoza	1 g
	PBS	do 20 mL
	Sestavine smo raztopili v PBS ob mešanju z magnetnim mešalom. Pufer smo filtrirali.	
sklopitveni pufer za	NaCl	292 mg
sefarozne delce	PBS pH 8,3	do 10 mL
	NaCl smo raztopili v pufru PBS ob mešanju z magnetnim mešalom.	
Tris-pufer z jodidom, pH 8,0	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM
	NaI	4 M
	ddH ₂ O	12 mL
	Sestavine smo raztopili v ddH 8,0. Pufer smo sterilizirali s fil temperaturi (24 °C), zaščiteneg	20. Uravnali smo vrednost pH tracijo in ga shranili pri sobni ga pred svetlobo.
pufer za kromogen substrat	citronska kislina monohidrat	21 g
tetrametil benzidin (TMB)	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	17,8 g
	ddH ₂ O	1 L
	Sestavine smo raztopili v ddH ₂ O in uravnali vrednost pH 5. Pufer smo hranili pri temperaturi 4 °C.	

pufer Tris-HCl, pH 8	10 mM Tris	0,121 g
	ddH ₂ O	100 mL
	Tris smo raztopili v ddH ₂ O in	s HCl uravnali vrednost pH.
	Pufer smo avtoklavirali	
elektroforezni nufer za	Tris	90.6 g
NaDS-PAGE	Glicin	132 g
NaDS-I AGE	NoDS	452 g
		Ju g
		dolL
	Sestavine smo raztopili v ddH	O. Pufer smo pred uporabo
	desetkrat redčili z dH ₂ O.	
pufer TAE	Tris	242 g
	0,5 M EDTA	100 mL
	ocetna kislina	57,1 mL
	Tris smo raztopili v ocetni kisl	ini in EDTA ter uravnali
	vrednost pH 8. Pufer smo pred	uporabo petdesetkrat redčili.
pufer za periplazemsko	Tris-HCl	50 mM
ekstrakcijo	saharoza	20 % (m/v)
	EDTA	1 mM
	ddH ₂ O	do 10 mL
	Sestavine smo raztopili v ddH	20 in uravnali vrednost pH 8.
Durate nin n	Sestavine smo raztopili v ddH	O in uravnali vrednost pH 8.
Raztopina	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave	20 in uravnali vrednost pH 8.
<i>Raztopina</i> 1 M IPTG	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave	2,383 g
<i>Raztopina</i> 1 M IPTG	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O	2,383 g 10 mL
<i>Raztopina</i> 1 M IPTG	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s
<i>Raztopina</i> 1 M IPTG	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri
<i>Raztopina</i> 1 M IPTG	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro temperaturi – 20 °C.	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri
Raztopina 1 M IPTG 2 % X-gal	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro temperaturi – 20 °C. X-gal	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri
Raztopina 1 M IPTG 2 % X-gal	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro temperaturi – 20 °C. X-gal dimetilformamid (DMF)	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri
Raztopina 1 M IPTG 2 % X-gal	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro temperaturi – 20 °C. X-gal dimetilformamid (DMF) X-gal smo raztopili v DME P	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri 0,2 g 10 mL
Raztopina 1 M IPTG 2 % X-gal	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro temperaturi – 20 °C. X-gal dimetilformamid (DMF) X-gal smo raztopili v DMF. Ro mikrocentrifusirka in začčitan	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri 0,2 g 10 mL aztopino smo razdelili v
Raztopina 1 M IPTG 2 % X-gal	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro temperaturi – 20 °C. X-gal dimetilformamid (DMF) X-gal smo raztopili v DMF. R mikrocentrifugirke in zaščiteno temperaturi – 20 °C	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri 0,2 g 10 mL aztopino smo razdelili v o pred svetlobo shranili pri
Raztopina 1 M IPTG 2 % X-gal	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro temperaturi – 20 °C. X-gal dimetilformamid (DMF) X-gal smo raztopili v DMF. R mikrocentrifugirke in zaščitene temperaturi – 20 °C.	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri 0,2 g 10 mL aztopino smo razdelili v o pred svetlobo shranili pri
Raztopina 1 M IPTG 2 % X-gal PEG/NaCl (20 % (m/v) PEG- 2000, 2.5 M N-Cl)	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro temperaturi – 20 °C. X-gal dimetilformamid (DMF) X-gal smo raztopili v DMF. R mikrocentrifugirke in zaščiteno temperaturi – 20 °C. PEG-8000 N-Cl	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri 0,2 g 10 mL aztopino smo razdelili v o pred svetlobo shranili pri 8,0 g
Raztopina 1 M IPTG 2 % X-gal PEG/NaCl (20 % (m/v) PEG- 8000, 2,5 M NaCl)	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro temperaturi – 20 °C. X-gal dimetilformamid (DMF) X-gal smo raztopili v DMF. R mikrocentrifugirke in zaščitene temperaturi – 20 °C. PEG-8000 NaCl ddH_0	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri 0,2 g 10 mL aztopino smo razdelili v o pred svetlobo shranili pri 8,0 g 5,85 g
Raztopina 1 M IPTG 2 % X-gal PEG/NaCl (20 % (m/v) PEG- 8000, 2,5 M NaCl)	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro temperaturi – 20 °C. X-gal dimetilformamid (DMF) X-gal smo raztopili v DMF. R mikrocentrifugirke in zaščiteno temperaturi – 20 °C. PEG-8000 NaCl ddH ₂ O	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri 0,2 g 10 mL aztopino smo razdelili v o pred svetlobo shranili pri 8,0 g 5,85 g do 40 mL
Raztopina 1 M IPTG 2 % X-gal 2 % X-gal PEG/NaCl (20 % (m/v) PEG- 8000, 2,5 M NaCl)	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro temperaturi – 20 °C. X-gal dimetilformamid (DMF) X-gal smo raztopili v DMF. R mikrocentrifugirke in zaščiteno temperaturi – 20 °C. PEG-8000 NaCl ddH ₂ O Sestavine smo raztopili v ddH	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri 0,2 g 10 mL aztopino smo razdelili v o pred svetlobo shranili pri 8,0 g 5,85 g do 40 mL
Raztopina 1 M IPTG 2 % X-gal PEG/NaCl (20 % (m/v) PEG- 8000, 2,5 M NaCl)	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro temperaturi – 20 °C. X-gal dimetilformamid (DMF) X-gal smo raztopili v DMF. R mikrocentrifugirke in zaščiteno temperaturi – 20 °C. PEG-8000 NaCl ddH ₂ O Sestavine smo raztopili v ddH avtoklavirali in shranili pri sob	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri 0,2 g 10 mL aztopino smo razdelili v o pred svetlobo shranili pri 8,0 g 5,85 g do 40 mL 20. Raztopino smo oni temperaturi (24 °C).
Raztopina 1 M IPTG 2 % X-gal 2 % X-gal PEG/NaCl (20 % (m/v) PEG- 8000, 2,5 M NaCl) raztopina kromogenega	Sestavine smo raztopili v ddH Sestava in način priprave IPTG ddH ₂ O IPTG smo raztopili v ddH ₂ O. I filtracijo in jo razdelili v mikro temperaturi – 20 °C. X-gal dimetilformamid (DMF) X-gal smo raztopili v DMF. R mikrocentrifugirke in zaščiteno temperaturi – 20 °C. PEG-8000 NaCl ddH ₂ O Sestavine smo raztopili v ddH avtoklavirali in shranili pri sob	2,383 g 10 mL Raztopino smo sterilizirali s ocentrifugirke ter shranili pri 0,2 g 10 mL aztopino smo razdelili v o pred svetlobo shranili pri 8,0 g 5,85 g do 40 mL 20. Raztopino smo oni temperaturi (24 °C). 50 % (v/v)

	Želen volumen TMB smo razredčili v enakem volumnu pufra	
	za TMB. Raztopino smo pripravili tik pred uporabo.	
raztopina za razbarvanje	95 % etanol	60 mL
	ocetna kislina	20 mL
	ddH ₂ O	do 100 mL
	D (' '''''''''''''''''''''''''''''''''	
	Raztopino smo pripravili	tik pred uporabo.
Goiišča	Sestava in način priprav	ρ
gojišče LB	penton	Δ σ
gojisee EB	kvasni ekstrakt	2. g
	NaCl	2 g 2 g
	ddH_O	2 g 400 mI
gojišče I B-Amp	tekoče gojišče I B	35 mI
gojisee ED Thiip	ampicilin	35 mL
gojijšče TV	tripton	3.2 g
	kvasni ekstrakt	5, 2 g 2 α
	NaCl	2 g 1 g
		$\frac{1}{2}$
gojijčča TV glukoza Amn	takoža gojičža TV	4.5 mI
gojisce i i -giukoza-Allip	20 % glukoza	4,5 IIIL 500 III
	20 % glukoza	500 µL
aniižča TV shikaza Ame		5 μL
gojisce i Y-giukoza-Amp-	20.0% alukasa	9 mL
Tet	20 % glukoza	
	ampicilin totus silulin	10 µL
gojisce i Y-IPIG-Amp-Tet		
	IPIG	$1 \ \mu L \ an \ 10 \ \mu L$
	ampicilin	10 µL
····	tetracikim	10 µL
agarno gojisce LB	pepton	l g
	kvasni ekstrakt	0,5 g
	NaCl	0,5 g
	agar	1,5 g
	ddH ₂ O	100 mL
agarno gojišće	tekoće gojišće LB	400 mL
LB- IPTG/X-gal	agar	6 g
	1 M IPTG	84 μL
	2 % X-gal	800 μL
agarno gojišče LB- Tet	pepton	2 g
	kvasni ekstrakt	1 g
	NaCl	1 g
	agar	3 g
	ddH ₂ O	200 mL

tetraciklin	400 µL

Sestavine smo raztopili v ddH₂O s pomočjo magnetnega mešala. Gojišča smo sterilizirali z avtoklaviranjem. Antibiotik (ampicilin ali tetraciklin), IPTG in X-gal smo dodali po ohladitvi gojišča po avtoklaviranju na pribl. 50 °C. Tekoča gojišča smo shranili pri sobni temperaturi (24 °C). Agarna gojišča smo pred strditvijo v komori z laminarnim pretokom zraka prelili v petrijevke s premerom 9 cm. Agarna gojišča smo hranili pri temperaturi 4 °C.

Sterilizacija pufrov, raztopin in gojišč z nasičeno vodno paro je potekala 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1 bar. Sterilizacijo s filtracijo smo opravili s sterilizacijskimi membranskimi filtri z velikostjo por 0,20 μm.

3.1.5 Laboratorijska oprema

Oprema	Proizvajalec
analitska tehtnica AB 104	Mettler Toledo, Küsnacht, Švica
avtoklav Systec 2540 EL	Bel-Art Products, Pequannock, NJ, ZDA
celica za vertikalno elektroforezo Mini	Bio-Rad, Richmond, CA, USA
Protean 3 Cell	
celica za prenos western Transblot Cell	Bio-Rad, Richmond, CA, USA
centrifuga Micro-centrifuge II GMC-060	Daihan Labtech Co., Namyangju, Južna
	Koreja
centrifugi 5804 (F-34-6-38) in	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
5415 R (F-45-24-11)	
ciklični termostat AB GeneAmp® PCR	Applied Biosystems, Forster City, CA, ZDA
System 2700	
čitalec mikrotitrskih plošč Tecan Safire	Tecan Group Ltd., Männedorf, Švica
elektroforezna kadička B1A Easy cast mini	Owl, Portsmouth, NH, ZDA
gel	
fluorescenčni mikroskop	Olympus America, Center Valley, PA, ZDA
magnetni mešalnik Rotamix 550 MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija
mikrotitrske plošče Nunc-Immuno [™] Module	Nunc, Roskilde, Danska
F8 MaxiSorp loose	
nitrocelulozna membrane Hybond TM ECL z	GE Healthcare, Piscateway, NJ, ZDA
velikostjo por 0,45 µm	
pH meter 691	Metrolum, Herisan, Švica
pipete (0,5-10; 10-100; 100-1000; 1000-5000	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
μL)	
precizna tehtnica Exacta 610 EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
prekrivna ploščica Nunc® Lab-Tek®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham,
	MA, ZDA
sistem za analizo in dokumentacijo gelov ter	Syngene, Frederick, MD, ZDA
membrane G-box	
spektrofotometer NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, DE,
	ZDA
--	------------------------------------
stresalnik Eppendorf Thermomixer Comfort,	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
1,5 mL	
stresalnik Vibromix 104 EV in 403 EV	Tehtnica, Železniki, Slovenija
ultrazvočna sonda Ultrasonic Processor 130	Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, ZDA
Watt	
vir napetosti elektroforezne kadičke	Novex, Frankfurt, Nemčija
powerEase 500	
zaščitena mikrobiološka komora LFVP 12	Iskra Pio, Šentjernej, Slovenija

3.2. Povzetek eksperimentalnega dela

3.2.1 Shema poteka priprave vektorja f88-4

Pomnožitev bakteriofagnega vektorja f88-4 v bakterijski kulturi E. coli TG1Tr (3.3.1.1) Izolacija dvoverižne vektorske DNA (3.3.2) in ocena koncentracije (3.3.3) Ţ Etanolna precipitacija vektorske DNA (3.3.5) in ocena koncentracije (3.3.3) Ţ Razgradnja enoverižne oblike DNA vektorja f88-4 z MBN (3.3.6) ↓ Etanolna precipitacija vektorske DNA (3.3.5) in ocena koncentracije (3.3.3) Ţ Zaporedna restrikcija vektorja s *Hind*III in *Pst*I (3.3.7.1) Agarozna gelska elektroforeza restrikcijske zmesi (3.3.8) in izolacija DNA dvojno rezanega vektorja (3.3.9) 3.2.2 Shema poteka priprave pomožnega bakteriofaga f88-4/sfGFP za predstavitev sfGFP Pomnožitev gena sfGFP in uvedba restrikcijskih mest s PCR z začetnima oligonukleotidoma F-sfGFP-HindIII in R-sfGFP-PstI (3.3.10.1) Agarozna gelska elektroforeza pomnožka (3.3.8), izolacija DNA sfGFP iz gela (3.3.9) in ocena koncentracije (3.3.3) Ţ Ligacija sfGFP v pGEM-T Easy (3.3.11) ↓ Transformacija: vnos pGEM-T Easy/sfGFP v E. coli TOP10 (3.3.12) Ţ Modro-beli test (3.3.13)

 \downarrow

27

Preverjanje ligacije in transformacije: PCR na osnovi kolonije (3.3.10.3) in agarozna gelska elektroforeza pomnožka (3.3.8) Ţ Priprava prekonočnih bakterijskih kultur (3.3.1.2) in izolacija plazmidne DNA (3.3.2) ter ocena koncentracije (3.3.3) L Potrditev nukleotidnega zaporedja s sekvenciranjem (3.3.14) Ţ Restrikcija plazmida pGEM-T Easy/sfGFP s HindIII in PstI (3.3.7.2) T Agarozna gelska elektroforeza restrikcijske zmesi (3.3.8) in izolacija sfGFP(HindIII/PstI) (3.3.9)↓ Ligacija sfGFP (*HindIII/PstI*) v dvojno rezan vektor f88-4(*HindIII/PstI*) (3.3.11) Ţ Transformacija: vnos f88-4/sfGFP v E. coli TOP10 (3.3.12) Ţ Preverjanje ligacije in transformacije: PCR na osnovi kolonije (3.3.10.3) in agarozna gelska elektroforeza pomnožkov (3.3.8) ↓ Priprava prekonočnih bakterijskih kultur (3.3.1.3) in izolacija dvoverižne oblike vektorja f88-4/sfGFP (3.3.2) ter ocena koncentracije (3.3.3) T Potrditev nukleotidnega zaporedja s sekvenciranjem (3.3.14) ↓ Transdukcija f88-4/sfGFP v E. coli K91BluKan (K91BK) (3.3.1.5) 3.2.3 Shema poteka priprave pomožnega bakteriofaga f88-4/TorA-sfGFP za prikaz sfGFP Izolacija vektorja f88-4/sfGFP (3.3.2) in ocena koncentracije (3.3.3) L Razgradnja enoverižne oblike DNA vektorja f88-4/sfGFP z MBN (3.3.6) ↓ 28

Zaporedna restrikcija s XhoI in HindIII (3.3.7.3) Ţ Agarozna gelska elektroforeza (3.3.8) in izolacija rezanega f88-4/sfGFP (*HindIII/XhoI*) iz gela (3.3.9) ter ocena koncentracije (3.3.3)Izolacija fagmidnega vektorja pLP7 (3.3.2) ↓ PCR z začetnima oligonukleotidoma F-pLP7-Plac-XhoI in R-pLP7-TorA-HindIII (3.3.10.2) .[Agarozna gelska elektroforeza (3.3.8) in izolacija pomnožka Plac-TorA iz gela (3.3.9) ter ocena koncentracije (3.3.3) Restrikcija s *Hind*III in *Xho*I (3.3.7.4) Ţ Agarozna gelska elektroforeza restrikcijske zmesi (3.3.8), izolacija Plac-TorA (HindIII/XhoI) iz gela (3.3.9) in ocena koncentracije (3.3.3) Î Ligacija: vnos Plac-TorA (HindIII/XhoI) v f88-4/sfGFP (HindIII/XhoI) (3.3.11) ↓ Transformacija: vnos f88-4/Plac-TorA-sfGFP v E. coli TOP10 (3.3.12) Ţ Preverjanje ligacije in transformacije: PCR na osnovi kolonije (3.3.10.3) in agarozna gelska elektroforeza pomnožkov (3.3.8) Priprava prekonočnih bakterijskih kultur (3.3.1.4) in izolacija dvoverižne oblike vektorja f88- $4/P_{lac}$ -TorA-sfGFP (3.3.2) ter ocena koncentracije (3.3.3) T Potrditev nukleotidnega zaporedja s sekvenciranjem (3.3.14) 3.2.4 Nadaljnje delo s pripravljenima pomožnima bakteriofagoma Priprava (3.3.1.5) in izolacija (3.3.1.7) bakteriofagov f88-4/sfGFP in f88-4/TorA-sfGFP

 \downarrow

29

Priprava bakteriofagov M13 s predstavljenima enoverižnima fragmentoma variabilnih regij protiteles (scFv) anti-BSA ali 3L5 (46) pod različnimi pogoji s pomožnimi bakteriofagi

- (3.3.1.6):
- KM13,
- f88-4/sfGFP in
- f88-4/TorA-sfGFP

↓

Izolacija bakteriofagov M13/anti-BSA/sfGFP in M13/3L5/sfGFP (3.3.1.7)

↓

Preverjanje izražanja scFv na površini bakteriofagov M13/anti-BSA/sfGFP in M13/3L5/sfGFP s testom ELISA (3.3.15)

 \downarrow

- Makroskopska vizualna ocena izražanja sfGFP v bakterijskih celicah in ocena prisotnosti sfGFP na bakteriofagnih delcih
 - b. Pregled fluorescence bakterij pod fluorescenčnim mikroskopom (3.3.18.1)
- c. Opazovanje sefaroznih delcev po inkubaciji z rekombinantnimi bakteriofagi s fluorescentnim mikroskopom (3.3.18.2)

d. Poskus ocene fluorescence s testom FLISA (3.3.19)

 \downarrow

Analiza izražanja in vključevanja fuzijskega proteina sfGFP-pVIII v virusno kapsido v odvisnosti od uvedenega signalnega zaporedja s pomočjo NaDS-PAGE (3.3.20.1) in WB

(3.3.20.2)

3.3 Metode

3.3.1 Pomnoževanje in priprava bakteriofagnih vektorjev, plazmidov in bakteriofagov

Pri pomnoževanju in pripravi bakteriofagnih vektorjev smo uporabili bakterijske kulture *E.coli*, ki smo jih pripravili na sledeč način:

- iz zamrznjene trajne kulture *E.coli* seva TG1Tr smo s sterilnim pipetnim nastavkom prenesli bakterije v erlenmajerico s 5 mL gojišča LB. Kulturo smo nato stresali preko noči (37 °C, 250 vrt./min);
- iz zamrznjene trajne kulture *E.coli* seva K91BluKan smo s sterilnim pipetnim nastavkom prenesli bakterije v erlenmajerico z 10 mL gojišča 2×TY, ki smo mu predhodno dodali kanamicin do končne koncentracije 100 μg/mL. Kulturo smo nato stresali 2,5 h (37 °C, 250 vrt./min).

3.3.1.1 Pomnoževanje vektorja f88-4

Bakterijsko kulturo *E.coli* seva TG1Tr (3.3.1; $OD_{600} \sim 0,6$) smo okužili z 2 µL bakteriofaga f88-4. Po 30 min inkubacije pri 37 °C smo dodali tetraciklin do koncentracije 0,2 µg/mL, nato pa kulturo 35 min stresali pri 37 °C in 250 vrt./min. Kulturo smo redčili z LB v razmerju 1:10 in 100 µL redčitve razmazali na agarno gojišče LB s tetraciklinom (20 µg/mL). Petrijevko smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Eno kolonijo s plošče smo precepili v 10 mL gojišča 2×TY s tetraciklinom (20 µg/mL) in stresali 8 h pri 37 °C in 250 vrt./min.

3.3.1.2 Pomnoževanje plazmida pGEM-T Easy/sfGFP

V 5 mL gojišča LB s 100 μg/mL ampicilina smo s sterilnim pipetnim nastavkom prenesli belo bakterijsko kolonijo *E.coli* TOP10/pGEM-T Easy/sfGFP z agarnega gojišča LB-Amp-IPTG/X-gal in inkubirali preko noči pri 37 °C ob stresanju pri 250 vrt./min.

3.3.1.3 Pomnoževanje vektorja f88-4/sfGFP

V 20 mL gojišča $2 \times TY$ z 20 µg/mL tetraciklina smo s sterilnim pipetnim nastavkom prenesli bakterijsko kolonijo *E. coli* TOP10/f88-4/sfGFP z agarnega gojišča LB-Tet in inkubirali preko noči pri 37 °C ob stresanju pri 250 vrt./min.

3.3.1.4 Pomnoževanje vektorja f88-4/TorA-sfGFP

V 30 mL gojišča 2×TY z 20 μg/mL tetraciklina smo s sterilnim pipetnim nastavkom prenesli bakterijsko kolonijo *E. coli* TOP10/f88-4/TorA-sfGFP z agarnega gojišča LB-Tet in stresali preko noči pri 37 °C ob stresanju pri 250 vrt./min.

3.3.1.5 Pomnoževanje pomožnih bakteriofagov

V po 20 mL gojišča 2×TY (s kanamicinom v primeru K91BK) smo dodali po 200 μ L prekonočne kulture ustreznega seva bakterije *E. coli* (*E. coli* K91BK oz. *E. coli* TG1Tr; 3.3.1) ter stresali (30 min, 37 °C, 250 vrt./min). Nato smo dodali bakteriofag f88-4/sfGFP oz. f88-4/TorA-sfGFP, tetraciklin (do koncentracije 0,2 μ g/mL) in IPTG (do koncentracije 1 mM) ter inkubirali (30 min, 37 °C). Po tem smo koncentracijo tetraciklina povišali do 20 μ g/mL in stresali preko noči (37 °C, 250 vrt./min).

3.3.1.6 Priprava bakterijskih kultur za pripravo fagmidnih virionov

Začetno bakterijsko kulturo smo pripravili tako, da smo 5 mL gojišča 2×TY z dodano glukozo (do 2 %) in ampicilinom (koncentracije 100 µg/mL) inokulirali z *E.coli* TG1Tr/pIT2*anti-BSA* in stresali do OD₆₀₀ ~ 0,4 – 0,6 (37 °C, 250 vrt./min). Nato smo dodali 5 µL izbranega pomožnega bakteriofaga (KM13, f88-4/sfGFP ali f88-4/TorA-sfGFP) in inkubirali 30 min pri 37 °C ob stresanju (250 vrt./min). Kulturo smo nato centrifugirali (3 min, 5.000 g), bakterije suspendirali v 30 mL gojišča 2×TY z ustrezno kombinacijo dveh antibiotikov ampicilin (100 µg/mL) in tetraciklin (20 µg/mL) oz. kanamicin (50 µg/mL) - ter različnimi koncentracijami IPTG (brez IPTG, 0,1 mM IPTG, 1 mM IPTG). Tako pripravljene kulture smo inkubirali preko noči pri temperaturi 30 °C ali 37 °C ob stresanju (250 vrt./min).

3.3.1.7 Izolacija bakteriofagov iz prekonočnih bakterijskih kultur

Prekonočno bakterijsko kulturo smo najprej centrifugirali (10 min, 4 °C, 10.000 vrt./min), supernatant prenesli v nov vsebnik in ponovno centrifugirali (1 min, 4 °C, 10.000 vrt./min). Usedlino smo zavrgli, supernatantu pa dodali 1/6 volumna 20 % PEG/2.5 M NaCl. PEG/NaCl z odtegnitvijo vode povzroči precipitacijo bakteriofagov. Precipitacijo smo izvajali na ledu najmanj 2 h. Sledilo je centrifugiranje (10 min, 4 °C, 10.000 vrt./min), supernatant smo zavrgli. Usedlino smo suspendirali v 1 mL pufra PBS, prenesli v mikrocentrifugirko in centrifugirali (5 min, 4 °C, 12.000 vrt./min), da smo odstranili netopne nečistote. Supernatant smo nato prenesli v novo mikrocentrifugirko in bakteriofage še enkrat precipitirali z dodatkom 1/6 volumna 20 % PEG/2.5 M NaCl (30 min – 1 h). Sledilo je centrifugiranje (10 min, 4°C, 12.000 vrt./min), supernatant smo zavrgli. Usedlino smo suspendirali v primerni količini (100-200 μ L) pufra PBS, centrifugirali (1 min, 11.000 vrt./min) in supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko.

3.3.2 Izolacija plazmidne in dvoverižne bakteriofagne DNA

Izolacijo smo izvajali po navodilih proizvajalca kompleta GenElute[™] HP Plasmid Miniprep Kit. Prekonočno kulturo rekombinantnih bakterij *E. coli* smo centrifugirali, odstranili supernatant, celice suspendirali v pufru z RNazo A in podvrgli različici alkalne lize z NaDS, ki ji je sledila adsorpcija DNA na silikagel v koloni v prisotnosti visoke koncentracije soli. Po spiranju nečistot smo plazmidno DNA eluirali z 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 (47).

Za večji izkoristek izolacije smo isti lizat na kolono adsorbirali dvakrat in elucijo izvedli s segretim (50-55 °C) pufrom. V primeru večje količine prekonočne bakterijske kulture (> 5 mL) smo uporabili sorazmerno večje količine reagentov. S tem smo iz kultur z bakteriofagnim vektorjem f88-4, kjer je večina DNA v celicah enoverižna, pridobili tudi dvoverižno replikativno obliko DNA (rfDNA).

3.3.3 Določitev koncentracije DNA

Koncentracijo DNA smo določali spektrofotometrično s pomočjo spektrofotometra NanoDrop 1000 (48). Kvaliteto izolacije smo ocenili na podlagi razmerij A_{260}/A_{280} (nizko razmerje nakazuje prisotnost proteinskih nečistot).

3.3.4 Ocena titra bakteriofagov

Titer bakteriofagov smo ocenili s pomočjo spektrofotometričnih podatkov z empirično formulo:

št. bakteriofagov/mL = $A_{260} \times 2,214 \times 10^{13}$ (49).

3.3.5 Etanolna precipitacija DNA

Etanolna precipitacija nam je omogočila koncentriranje raztopine DNA in sledečo zamenjavo pufra. Etanol zmanjša hidratacijo negativno nabitih molekul DNA, ki so zato bolj izpostavljene tvorbi ionskih interakcij ob prisotnosti kationov (npr. v obliki NaOAc), kar privede do precipitacije DNA. Precipitat smo očistili s spiranjem z razredčenim etanolom in nato posušili ter raztopili v izbranem pufru.

Vzorcu smo dodali desetino volumna 3 M NaOAc s pH 3,8, premešali in dodali 250 % volumna absolutnega etanola, premešali in za najmanj 20 min shranili pri -20 °C. Nato smo 20 min centrifugirali s 13.400 vrt./min pri 4 °C, odstranili supernatant, usedlino sprali s 500 μ L ohlajenega 70 % etanola in 10 min centrifugirali s 13.400 vrt./min pri 4 °C, odstranili supernatant in 30 min sušili pri sobni temperaturi (23 °C).

3.3.6 Razgradnja enoverižne bakteriofagne DNA z MBN

Nukleaza iz zlatega fižola (MBN, ang. '<u>mung bean nuclease</u>') je endonukleaza, ki nam je omogočila specifično razgradnjo enoverižnih bakteriofagnih molekul DNA. Vzorec (300 ng) smo obdelali z 10 U MBN v reakcijskem pufru za MBN glede na navodila proizvajalca (New England Biolabs®).

3.3.7 Restrikcija

Z restrikcijskimi endonukleazami smo po navodilih proizvajalca New England Biolabs® rezali plazmidne in fagmidne vektorje ter pomnožke verižnih reakcij s polimerazo. Restriktaze prepoznavajo specifična zaporedja DNA in cepijo DNA na znanih mestih znotraj ali ob prepoznavnem zaporedju tako, da dobimo predvidljive produkte restrikcije s topimi ali lepljivimi konci.

3.3.7.1 Restrikcija bakteriofagnega vektorja f88-4 s HindIII in PstI

Prvo reakcijo restrikcije vektorja (~2,5 μ g) smo izvedli z encimom *Hind*III (24 U) v ustreznem pufru (NEBuffer 2) v času 1 ure pri 37 °C. Po etanolni precipitaciji (glej 3.3.5) in raztopitvi DNA v 30 μ L ddH₂O smo izvedli restrikcijo enkrat rezanega vektorja f88-4 še z encimom *Pst*I (10 U) v ustreznem pufru (NEBuffer 3) v času 1 ure pri 37 °C.

3.3.7.2 Restrikcija plazmida pGEM-T Easy/sfGFP s HindIII in PstI

Izvedli smo dvojno restrikcijo plazmida (~8 μ g) z encimoma *Hind*III (84 U) in *Pst*I (36 U) v pufru NEBuffer 2 v času 2 ur pri 37 °C.

3.3.7.3 Restrikcija bakteriofagnega vektorja f88-4/sfGFP s HindIII in XhoI

Prvo reakcijo restrikcije vektorja (~2,5 μ g) smo izvedli z encimom *Xho*I (61 U) v ustreznem pufru (NEBuffer 4) v času 2 ur pri 37 °C. Po etanolni precipitaciji (glej 3.3.5) in raztopitvi DNA v 30 μ L ddH₂O smo izvedli še restrikcijo z encimom *Hind*III (10 U) v ustreznem pufru (NEBuffer 2) v času 1 ure pri 37 °C.

3.3.7.4 Restrikcija inserta Plac-TorA s HindIII in XhoI

Izvedli smo dvojno restrikcijo vključka (200 ng) z encimoma *Hind*III (20 U) in *Xho*I (40 U) v ustreznem pufru (NEBuffer 2) v času 2 ur pri 37 °C.

3.3.8 Agarozna gelska elektroforeza

Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverili uspešnost reakcij restrikcije in verižnih reakcij s polimerazo ter očistili produkte. Agarozni gel smo pripravili tako, da smo izbrano količino agaroze ob segrevanju raztopili v pufru 1×TAE, dodali barvilo SybrSAFE (v razmerju 1:10.000) in gel vlili v elektroforezno kadičko s pripravljenim glavničkom za žepke. Gostoto gela smo izbrali glede na velikost proučevanih fragmentov (0,7-2 % (m/v)). Ohlajeni gel smo potopili v kadičko s pufrom TAE in v žepke nanesli vzorce v nanašalnem pufru, ki vsebuje EDTA, glicerol, bromfenol modro in ksilen cianol. Elektroforeza je potekala 1,5 - 2 h pri električni napetosti 90 V. V primeru uporabe barvila SybrGOLD smo gel obarvali po elektroforezi po navodilih proizvajalca Invitrogen. Gel smo nato osvetlili pod svetlobo UV in

ga fotografirali z napravo G:BOX. Sorazmerno velikost ločenih vzorcev smo ocenili s pomočjo velikostnih označevalcev (Thermo Scientific DNA Ladders), ki smo jih izbrali glede na velikost proučevanih fragmentov.

Predmet ločevanja	Volumen	Premreženost	Čas ločevanja	Barvanje gela
	mešanice	gela		
f88-4/HindIII/PstI	25 µL	0,7 %	2 h	SybrGOLD
sfGFP po PCR	25 μL	1,5 %	1,5 h	SybrSAFE
E.coli TOP10/pGEM-	10 µL	1,5 %	1,5 h	SybrSAFE
T Easy/sfGFP po				
PCR				
sfGFP/HindIII/PstI	60 µL	1,5 %	1,5 h	SybrGOLD
E.coli TOP10/f88-	15 μL	1,5 %	1,5 h	SybrGOLD
4/sfGFP po PCR				
f88-	30 µL	0,8 %	1,75 h	SybrGOLD
4/sfGFP/XhoI/HindIII				
P _{lac} -TorA po PCR	50 µL	1,5 %	1,5 h	SybrSAFE
P _{lac} -	30 µL	1,5 %	1,5 h	SybrGOLD
TorA/XhoI/HindIII				
E.coli TOP10/f88-	10 µL	2 %	2 h	SybrSAFE
4/TorA-sfGFP po				
PCR				

Reakcijske mešanice smo izpostavili naslednjim pogojem agarozne gelske elektroforeze:

3.3.9 Izolacija DNA iz agaroznega gela

Z elektroforezo ločeno DNA (rezane plazmidne in bakteriofagne vektorje ter pomnožke verižnih reakcij s polimerazo) smo iz agaroznega gela izolirali in očistili z uporabo kompleta QIAEX II. S spatulo smo izrezali košček gela z želenim fragmentom DNA, ga prenesli v mikrocentrifugirko in izolirali ter očistili po navodilih proizvajalca. Proces temelji na solubilizaciji agaroze in specifični ter kvantitativni adsorpciji nukleinskih kislin na delce silikagela v prisotnosti visokih koncentracij soli. Med spiranjem odstranimo nevezane nečistote, kot so proteini, soli in agaroza, očiščeno DNA pa nato eluiramo s pufrom z nizko koncentracijo soli, kakršen je 10 mM Tris-HCl s pH 8,0 ali z vodo (50).

Za večji izkoristek izolacije smo elucijo izvedli z na 45-50 °C segretim pufrom Tris-HCl.

3.3.10 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, ang. '*polymerase chain reaction*') nam je omogočila pomnoževanje izbranega zaporedja DNA tako, da smo v reakcijsko zmes poleg matrične DNA dodali primerna začetna oligonukleotida, ddH₂O in osnovno zmes, ki je vsebovala termostabilno *Taq*-polimerazo, molekule deoksinukleozid trifosfatov (dNTP), magnezijeve ione in ustrezen reakcijski pufer. Količine reaktantov smo določili glede na priporočila proizvajalca osnovne zmesi za PCR, Promega (51). Reakcijsko zmes smo nato v cikličnem termostatu izpostavili sledečemu programu:

Trajanje	Temperatura	Proces	
6 min	95 °C	začetna denaturacija DNA	
45 s	94 °C	denaturacija DNA	ר
30 s	50-65 °C	prileganje začetnih oligonukleotidov	30-35 ciklov
45-50 s	72 °C	podaljševanje verig DNA	J
6 min	72 °C	zaključno podaljševanje verig DNA	-

Čas in temperaturo posameznih faz smo prilagodili dolžini in vrsti matrice ter talilni temperaturi začetnih oligonukleotidov. Pomnoženo DNA smo nato običajno analizirali in prečistili z agarozno gelsko elektroforezo.

3.3.10.1 PCR z začetnima oligonukleotidoma F-sfGFP-HindIII in R-sfGFP-PstI

Z uporabo začetnih oligonukleotidov F-sfGFP-*Hind*III in R-sfGFP-*Pst*I in matrične DNA (plazmid pSEUDO/sfGFP) smo s pomočjo reakcije PCR v 30 ciklih pomnožili gen za sfGFP in na njegova konca uvedli restrikcijski mesti za *Hind*III in *Pst*I. Temperatura prileganja je bila 55 °C.

3.3.10.2 PCR z začetnima oligonukleotidoma F-pLP7-P_{lac}-XhoI in R-pLP7-TorA-HindIII

S PCR z začetnima oligonukleotidoma F-pLP7- P_{lac} -XhoI in R-pLP7-TorA-HindIII smo na osnovi fagmida pLP7/ P_{lac} -TorA-GFP v 30 ciklih pomnožili insert P_{lac} -TorA in na njegova konca uvedli restrikcijski mesti za XhoI in HindIII. Temperatura prileganja je bila 62 °C, čas podaljševanja pa 20 s.

3.3.10.3 PCR na osnovi kolonije

S PCR na osnovi kolonije smo preverili uspešnost ligacij in transformacij. Celice posameznih kolonij smo v reakcijsko zmes prenesli s pipetnim nastavkom.

Pri preverjanju ligacije sfGFP v pGEM-T Easy in sledeče transformacije *E. coli* TOP10 smo uporabili začetna oligonukleotida F-T7 in R-SP6 ter izvedli 35 ciklov pomnoževanja s temperaturo prileganja 50 °C in časom podaljševanja 50 s. Pri preverjanju ligacije gena za sfGFP v vektor f88-4 in sledeče transformacije *E. coli* TOP10 smo uporabili začetna oligonukleotida F-sfGFP-*Hind*III in R-f88-98 ter izvedli 35 ciklov pomnoževanja s temperaturo prileganja 54 °C in časom podaljševanja 50 s.

Pri preverjanju ligacije inserta P_{lac} -TorA v vektor f88-4/sfGFP in sledeče transformacije *E. coli* TOP10 smo uporabili začetna oligonukleotida F-pLP7-P_{lac}-*Xho*I in R-sfGFP-*Pst*I ter izvedli 30 ciklov pomnoževanja s temperaturo prileganja 64 °C in časom podaljševanja 1 min.

3.3.11 Ligacija

Ligacija omogoča povezovanje dveh koncev DNA preko fosfodiestrskih vezi, zato smo jo uporabili za vstavljanje fragmentov DNA v plazmidni ali bakteriofagni vektor. Prileganje koncev izbrane DNA smo zagotovili z obdelavo obeh fragmentov DNA z enakima restrikcijskima encimoma. Obenem mora biti ustrezno tudi množinsko razmerje med insertom in vektorjem (plazmidom ali fagmidom) - običajno je insert v množinskem prebitku. Reakcijo smo izvajali glede na navodila proizvajalca DNA-ligaze 1 h pri sobni temperaturi (23 °C) (New England Biolabs®). Pri delu smo uporabljali DNA-ligazo T4, reakcijska zmes pa je vsebovala še ligacijski pufer, ddH₂0 in izbrani fragment DNA (insert) ter plazmidni ali bakteriofagni vektor, v katerega smo želeli vstaviti fragment DNA. V našem primeru so bili pari insertov in vektorjev:

- s PCR pomnoženi fragmenta sfGFP in plazmid pGEM-T Easy;
- z restrikcijskima encimoma *Hind*III in *Pst*I obdelana pomnožek sfGFP in vektor f88-4 ter
- z restrikcijskima encimoma *Hind*III in *Xho*I obdelana pomnožek P_{lac}-TorA in vektor f88-4/sfGFP.

3. 3.12 Transformacija

S toplotnim šokom smo v kompetentne bakterijske celice vnesli rekombinantno DNA v obliki plazmida ali dvoverižne fagne genomske DNA, ki se pomnožuje s pomočjo bakterijskih mehanizmov.

Kompetentne celice *E. coli* TOP10 smo transformirali s toplotnim šokom. Ligacijsko zmes smo dodali 200 μ L na ledu odtaljenih bakterij v mikrocentrifugirki in nežno premešali ter 20 min inkubirali pri 0 °C. Nato smo mikrocentrifugirko za 45 s postavili v vodno kopel s temperaturo 42 °C in zatem 2 min inkubirali na ledu. Transformiranim bakterijam smo dodali 800 μ L gojišča 2×TY in 45 min stresali z 250 vrt./min pri 37 °C. Nato smo 100 μ L suspenzije razmazali po agarnem gojišču v petrijevki, preostanek pa centrifugirali, odstranili supernatant,

usedlino suspendirali v 100 μ L gojišča 2×TY in nanesli na enako gojišče v petrijevki. Petrijevke smo preko noči inkubirali pri 37 °C in jih naslednji dan shranili pri 4 °C. Bakterije *E. coli* seva TOP10 smo transformirali:

- s 5 μL ligacijske zmesi pGEM-T Easy/sfGFP in nanesli na agarno gojišče LB-Amp/IPTG/X-gal;
- z 10 µL ligacijske zmesi f88-4/sfGFP in nanesli na agarno gojišče LB-agar/Tet ali
- z 9 µL ligacijske zmesi f88-4/TorA-sfGFP in nanesli na agarno gojišče LB-agar/Tet.

3.3.13 Modro-beli test

Z modro-belim testom smo glede na barvno reakcijo določili, katere bakterije so prejele plazmid z insertom. Plazmid pGEM-T Easy namreč znotraj gena *lacZ* vsebuje regijo z več mesti za kloniranje (MCS, ang. '<u>multiple cloning site</u>'), kjer plazmid lahko režemo in vstavljamo izbrane fragmente DNA. V njihovi odsotnosti se iz gena *lacZ* prepiše del encima β -galaktozidaza, ki ob indukciji z IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid) razcepi substrat X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid), kar vodi do modrega obarvanja. Do obarvanja ne pride, če je znotraj gena *lacZ* vstavljen fragment DNA, saj ne nastaja funkcionalen encim. Na agarnih gojiščih z IPTG in X-gal so kolonije bakterij, ki so sprejele plazmid z vstavljenim instertom, praviloma bele, v nasprotnem primeru pa modre.

Modro-beli test smo izvajali na agarnem gojišču LB-Amp/IPTG/X-gal. Po nanosu transformiranih bakterij smo petrijevke preko noči inkubirali pri 37 °C.

3.3.14 Določitev nukleotidnega zaporedja

Določitev nukleotidnega zaporedja je opravilo podjetje GATC Biotech z dideoksi metodo po Sanger-ju. Vzorce s preiskovano enoverižno DNA smo pripravili glede na navodila izvajalca sekvenciranja (52). Določeno nukleotidno zaporedje smo z želenim zaporedjem primerjali s pomočjo programske opreme ClustalW Multiple Sequence Alignment, dostopne na strežniku Clustal (53).

Pri določanju nukleotidnega zaporedja smo uporabili:

- začetni oligonukleotid F-T7-promoter za insert sfGFP v pGEM-T Easy;
- začetni oligonukleotid R-f88-98 za insert sfGFP v f88-4 in
- začetni oligonukleotid R-f88-98 za insert TorA-sfGFP v f88-4.

3.3.15 Preverjanje izražanja scFv na površini bakteriofagov s testom ELISA

Z encimskoimunskimi testi na trdnih nosilcih (ELISA) lahko kvalitativno ocenimo afinitete bakteriofagov do tarčne molekule. S testom ELISA smo preverili izražanje fragmentov protiteles scFv pri sledečih bakteriofagih:

- tarča je BSA: M13/anti-BSA, M13/anti-BSA-sfGFP, M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP,
- tarča je humani leptinski receptor (hLR): M13/3L5, M13/3L5/(TorA-)sfGFP.

Test smo izvedli tako, da smo na površino mikrotitrske ploščice najprej vezali BSA (40 μ g/mL) ali hLR (2,5 μ g/mL) ter mleko (5 % (m/v)) za kontrolo specifičnosti vezave (preko noči, 4 °C, 50 vrt./min). Naslednji dan smo tarčnim proteinom in kontroli dodali blokirni pufer (po 230 μ L 5 % mleka v PBS) in blokirali nezasedene površine vdolbinic (2 h, 23 °C, 50 vrt./min). Nato smo trikrat spirali s pufrom 0,1 % PBST. Sledil je nanos bakteriofagov s končnim titrom ~ 2,5×10⁹ bakteriofagov/mL (glej 3.3.4) v 90 μ L nanašalnega pufra (0,5 % mleka v 0,1 % PBST) in stresanje (1 h, 23 °C, 50 vrt./min). Vdolbinice smo trikrat spirali s po 280 μ L 0,1 % PBST. Nato smo v vsako vdolbinico odpipetirali po 200 μ L raztopine protitelesa proti M13, konjugiranega s hrenovo peroksidazo, redčenega v blokirnem pufru v razmerju 1:5.000. Ploščico smo ob rahlem stresanju inkubirali 1 h (24 °C, 50 vrt./min). Po štirikratnem spiranju vdolbinic s pufrom 0,1 % PBST smo v vsako vdolbinico odpipetirali po 200 μ L pripravljene raztopine substrata TMB. Hrenova peroksidaza katalizira pretvorbo substrata TMB do modro obarvanega produkta. Po nekaj minutah smo reakcijo ustavili z dodatkom po 50 μ L 2 M H₂SO₄. Absorbanco produkta smo izmerili pri 450 nm na merilcu Tecan.

3.3.16 Označevanje bakteriofagov s FITC

Del bakteriofagov M13/anti-BSA (in M13/3L5) smo označili s fluorescein izotiocianatom (FITC), ki reagira s primarnimi aminskimi skupinami.

Sveže izolirane bakteriofage smo najprej oborili po postopku 3.3.1.7 in oborjene bakteriofage M13/anti-BSA na koncu suspendirali v 200 µL PBS, bakteriofage M13/3L5 pa v 300 µL PBS. Po centrifugiranju (2 min, 4 °C, 10.000 g) smo supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 9 µL karbonatnega pufra s pH 8,9 in postopoma (po 5 µL) dodajali FITC v dimetilsulfoksidu (DMSO, 1 mg/mL) do 1/10 končnega volumna. Označevanje je potekalo pri sobni temperaturi (24 °C). Med posameznimi dodatki smo reakcijsko zmes stresali po 5 min pri 750 obr./min zaščiteno pred svetlobo. Po zadnjem dodatku FITC smo reakcijsko zmes stresali 1 h pri 650 obr./min in nato bakteriofage spet oborili po postopku

3.3.1.7. Oborjene označene bakteriofage smo nato suspendirali v 100 μL PBS. Bakteriofage M13/anti-BSA-FITC in M13/3L5-FITC smo shranili pri 8 °C, zaščitene pred svetlobo.

3.3.17 Priprava sefaroznih delcev, aktiviranih s CNBr, za fluorescenčno mikroskopijo

S CNBr aktivirani sefarozni delci omogočajo kovalentno vezavo ligandov, ki vsebujejo primarne aminske skupine, preko spontane reakcije z reaktivnimi cianatnimi skupinami, ki nastanejo po aktivaciji s cianogen bromidom. Sefarozne delce, aktivirane s CNBr, smo pred uporabo tretirali po navodilih proizvajalca GE Healthcare (54).

3.3.17.1 Priprava kontrolnih sefaroznih delcev, aktiviranih s CNBr

Sefarozne delce smo sprali po navodilih proizvajalca in nato aktivne skupine blokirali z 1 M Tris-HCl s pH 8,0 (45 min, 24 °C, 800 vrt./min). Nato smo delce spirali s sklopitvenim pufrom in jih suspendirali v PBS s pH 8,3.

3.3.17.2 Vezava BSA na sefarozne delce, aktivirane s CNBr

BSA v koncentraciji 5 mg/mL smo na sefarozne delce vezali po navodilih proizvajalca. Delce smo shranili pri 8 °C.

3.3.17.3 Vezava bakteriofagov na sefarozne delce

Po 10 μ L bakteriofagov M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP (pripravljenih s pomožnim bakteriofagom f88-4/TorA-sfGFP (3.2.3)) in M13/anti-BSA-FITC (3.3.16) smo redčili v 90 μ L raztopine 0,5% mleka v prahu in pufra za spiranje sefaroznih delcev. Po 100 μ L tako pripravljenih mešanic bakteriofagov smo dodali 40 μ L sefaroznim delcem z vezanim BSA oz. blokiranim delcem brez vezanega liganda in stresali (1 h, 50 vrt./min). Po vezavi smo sefarozne delce spirali trikrat s po 300 μ L pufra za spiranje sefaroznih delcev. Po zadnji odstranitvi pufra za spiranje smo delce suspendirali v po 50 μ L 0,1 % PBST.

3.3.18 Fluorescenčna mikroskopija

S pomočjo fluorescenčnega mikroskopa smo opazovali fluorescenco bakterij in bakteriofagov. Fluorescenčni mikroskop smo upravljali s pomočjo programske opreme XCELLENCE rt 1.1 (Build 2640) (Olympus).

Oznaka	Povečava	Kombinacija ekscitacijskih filtrov / ekscitacija	Intenziteta laserja	Čas ekspozicije	Nastavitev osvetlitve (min/max)
Nastavitev 1	100-kratna	DaFITxRED /	88,99 %	300 ms	210/420
	povečava in	FITC		(fluorescenca)/	
	imerzijsko olje	(ekscitacija pri		25 ms	
		492 nm)		(transmisija)	
Nastavitev 2	100-kratna	DaFITxRED /	88,99 %	300 ms	210/420
	povečava in	GFP		(fluorescenca)/	
	imerzijsko olje	(ekscitacija pri		25 ms	
		470 nm)		(transmisija)	
Nastavitev 3	20-kratna	DaFITxRED /	100 %*	800 ms	210/400
	povečava	FITC		(fluorescenca)/	
		(ekscitacija pri		15 ms	
		492 nm)		(transmisija)	
Nastavitev 4	100-kratna	DaFITxRED /	100 %	800 ms	210/400
	povečava in	GFP		(fluorescenca)/	
	imerzijsko olje	(ekscitacija pri		15 ms	
		470 nm)		(transmisija)	

Preglednica II: Nastavitve glavnih parametrov fluorescenčnega mikroskopa za opazovanje bakterij in sefaroznih delcev z vezanimi bakteriofagi.

* 23,13 % v primeru M13/anti-BSA/FITC zaradi močne fluorescence, ki jo oddaja FITC.

3.3.18.1 Priprava bakterij za fluorescenčno mikroskopijo

Za ogled bakterij pod fluorescenčnim mikroskopom smo prekonočne bakterijske kulture (*E. coli* ER 2738, *E. coli* TG1Tr/M13/anti-BSA/KM13, *E. coli* TG1Tr/M13/anti-BSA/f88-4/sfGFP, *E. coli* TG1Tr/M13/anti-BSA/f88-4/TorA-sfGFP) centrifugirali (10 min, 4 °C, 10.000 g), odstranili supernatant in s pipeto odvzeli bakterije iz usedline ter jih suspendirali v 200-500 μ L pufra PBS. Po 5 μ L suspenzije bakterij smo nato prenesli na ploščico Nunc® Lab-Tek® s 100 μ L 0,05% PBST.

3.3.18.2 Priprava sefaroznih delcev za fluorescenčno mikroskopijo

Po vezavi bakteriofagov na sefarozne delce po postopku 3.3.17.3 smo po 5 μ L pripravljene suspenzije delcev prenesli na ploščico Nunc® Lab-Tek® s 150 μ L 0,1% PBST.

3.3.19 Ocena fluorescence pripravljenih bakteriofagov s testom FLISA

S fluorescenčnoimunskim testom (FLISA, ang. '*fluorescence-linked immunosorbent assay*') na trdnem nosilcu smo želeli oceniti fluorescenco bakteriofagov M13/anti-BSA/sfGFP in M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP, pripravljenih pod različnimi pogoji, po vezavi na tarčno molekulo BSA.

Test smo izvedli tako, da smo na površino mikrotitrske ploščice najprej vezali BSA (40 μ g/mL) ter mleko (5 % (m/v)) za kontrolo vezave (preko noči, 4 °C, 50 vrt./min). Naslednji dan smo vdolbinice blokirali z dodatkom blokirnega pufra (po 230 μ L 5 % mleka v PBS; 2 h, 23 °C, 50 vrt./min). Nato smo jih trikrat spirali s pufrom 0,1 % PBST. Sledil je nanos bakteriofagov s končnim titrom ~ 2,5×10⁹ bakteriofagov/mL (glej 3.4) v 90 μ L nanašalnega pufra (0,5 % mleka v 0,1 % PBST) in stresanje (1 h, 23 °C, 50 vrt./min). Vdolbinice smo trikrat sprali s po 280 μ L 0,1 % PBST. Nato smo v vsako vdolbinico odpipetirali po 100 μ L pufra PBS. Fluorescenco raztopine smo izmerili pri 500 nm na merilcu Tecan.

3.3.20 Preverjanje izražanja in vključevanja fuzijskega proteina sfGFP-pVIII v kapsido bakteriofaga

Prisotnost sfGFP smo preverili v periplazemskem ekstraktu gostiteljskih bakterij, celičnem lizatu po periplazemski ekstrakciji, topni frakciji lizata, netopni frakciji lizata in na izoliranih bakteriofagih M13/anti-BSA, M13/anti-BSA/sfGFP in M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP. V postopku periplazemske ekstrakcije destabiliziramo membrano bakterij, kar nam omogoči ekstrakcijo proteinov iz periplazemskega prostora z uporabo hipertoničnega medija.

Po 10 mL prekonočnih kultur *E. coli* TG1/pIT2-antiBSA/f88-4/sfGFP, *E. coli* TG1/pIT2antiBSA/f88-4/TorA-sfGFP in *E. coli* TG1/pIT2-antiBSA/KM13 smo dodali ustrezno količino pufra za periplazemsko ekstrakcijo (50 mM Tris-HCl/20 % saharoza/1 mM EDTA pH 0,8) in rahlo stresali (1,5 h, 4 °C, 50 vrt./min). Po centrifugiranju (10 min, 4 °C, 10.000 g) smo periplazemski ekstrakt prenesli v novo mikrocentrifugirko, celice pa suspendirali v PBS. Sledila je liza celic z zamrzovanjem (5 min, -80 °C) in sonifikacijo; slednja je potekala skupaj 5 min v 5-sekundnih intervalih s premori po 10 s. Bakterijski lizat smo s centrifugiranjem (10 min, 4 °C, 10.000 g) ločili na topno in netopno frakcijo, ki smo jo suspendirali v PBS.

3.3.20.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS-PAGE)

Z NaDS-PAGE smo s pomočjo nanosov različnih proteinskih frakcij preverili prisotnost in nahajališče fuzijskega proteina sfGFP-pVIII. Zaradi denaturacije proteinov in nespecifične vezave NaDS na polipeptidno verigo pred nanosom se proteini na gelu ločijo izključno po velikosti.

V ogrodje za vlivanje gelov smo vpeli stekelci z razmakom 1,5 mm in mednju vlili 13 % ločevalni gel, preko katerega smo nanesli izopropanol. Po 1 h smo odlili izopropanol in na strjeni ločevalni gel vlili 5 % zbiralni gel z glavničkom, ki smo ga po 30 min odstranili in tako pridobili žepke za nanos vzorcev. Vzorce (10 μ L) smo pripravili s po 5,3 μ L trikratnega nanašalnega pufra in s po 2,7 μ L 1 M DTT ter jih 3 min toplotno denaturirali v vodni kopeli

pri 100 °C, jih narahlo centrifugirali in v celoti prenesli v žepke poliakrilamidnega gela. Elektroforeza je potekala 2 h pri napetosti 90 V.

3.3.20.2 Prenos western

Proteine po ločitvi z NaDS-PAGE s pomočjo električnega toka prenesemo na nitrocelulozno membrano, kar imenujemo prenos western. Nato po blokiranju nezasedenih področij na membrani s specifičnimi protitelesi detektiramo želeni antigen, npr. fuzijski protein.

Poliakrilamidni gel (3.3.20.1) smo po elektroforezi namočili v pufru za prenos, s katerim smo omočili tudi nitrocelulozno membrano, filtrirni papir in blazinice. V kaseto za mokri prenos smo po vrsti zložili blazinico, filtrirni papir, poliakrilamidni gel, membrano, filrirni papir in blazinico. Kaseto smo v kadičko za prenos western položili tako, da je bila membrana usmerjena proti anodi, ter jo prekrili s pufrom za prenos (4 °C). Prenos je potekal 1,5 h pri električni napetosti 100 V. Nitrocelulozno membrano smo nato preko noči blokirali v pufru za spiranje (0,05 % PBST) s 5 % (m/v) mleka v prahu. Zatem smo s pufrom za spiranje dvakrat sprali membrano in jo nato stresali (2 h, RT, 50 vrt./min) z redčenimi primarnimi kozjimi protitelesi proti zelenemu fluorescenčnemu proteinu (anti-GFP-Ab) v pufru za spiranje s 5 % (m/v) mleka v prahu (1:500). Nato smo s pufrom za spiranje trikrat sprali membrano, da smo odstranili presežna primarna protitelesa. Membrano smo nato inkubirali (1 h, RT, 50 vrt./min) s sekundarnimi protitelesi, označenimi s hrenovo peroksidazo, redčenimi v pufru za spiranje s 5 % (m/v) mleka v prahu (1:5.000). Sledilo je ponovno spiranje s pufrom za spiranje trikrat po 5 min. Za detekcijo proteinov smo uporabili kemoluminiscenčni substrat SuperSignal West Dura, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca (55). Membrano smo s substratom inkubirali 5 min pri sobni temperaturi in jo nato fotografirali z napravo za slikanje membran G:BOX (Syngene).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Priprava (pomožnega) bakteriofaga za uvedbo zelenega fluorescenčnega proteina na kapsido rekombinantnih virusnih delcev

Pripravili smo dve različici pomožnega bakteriofaga za izražanje zelenega fluorescenčnega proteina:

- f88-4/sfGFP z izvirnim zapisom za signalno zaporedje proteina VIII pred zapisom za rekombinantni fuzijski protein sfGFP-pVIII in
- f88-4/TorA-sfGFP z uvedenim zapisom za signalno zaporedje *TorA* pred zapisom za rekombinantni fuzijski protein sfGFP-pVIII.

Fragmenta DNA (zapisa za sfGFP ali za signalno zaporedje *TorA* in sfGFP) smo vstavili v regijo med restrikcijskima mestoma za encima *Nhe*I in *Xho*I (slika 14). Regijo z več mesti za kloniranje (MCS) bakteriofaga f88-4 prikazuje priloga 1.



Slika 14: Grafična predstavitev genoma bakteriofagnega vektorja f88-4. Označeni so genski zapisi za bakteriofagne proteine (gI - gX), za rekombinantni plaščni protein pVIII (rgVIII) in genska kaseta za odpornost proti tetraciklinu (tetR). Restrikcijska mesta za encime *Nhe*I, *Pst*I, *Hind*III in *Xho*I so označena z imenom in svetlo modro barvo.

Genski zapis za sfGFP smo vstavili med prepoznavni mesti za restrikcijska encima HindIII in PstI, tj. med zapisa za signalno zaporedje in rekombinantni protein pVIII bakteriofagnega vektorja f88-4. Uspešnost vključitve smo potrdili z določitvijo nukleotidnega zaporedja. Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje pomožnega bakteriofaga f88-4/sfGFP med restrikcijskima mestoma *Xho*I in *Nhe*I prikazuje priloga 2.

Genski zapis za signalno zaporedje *TorA* smo skupaj s promotorjem *lac* (P_{lac}) vstavili med restrikcijski mesti *Xho*I in *Hind*III pred zapis za rekombinantni fuzijski protein sfGFP*pVIII* v predhodno pripravljeni bakteriofagni vektor f88-4/sfGFP. Uspešnost vključitve smo potrdili z določitvijo nukleotidnega zaporedja. Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje pomožnega bakteriofaga f88-4/TorA-sfGFP med prepoznavnima mestoma za encima *Xho*I in *Nhe*I prikazuje priloga 3.

4.2 Priprava rekombinantnih virusnih delcev z uporabo pripravljenih pomožnih bakteriofagov

S pomočjo predhodno pripravljenih pomožnih bakteriofagov

- f88-4/sfGFP ali
- f88-4/TorA-sfGFP

smo poskusili pripraviti bakteriofagne delce, ki bi imeli na svoji površini hkrati izražena dva želena proteina:

- enoverižni fragment variabilnih regij protiteles (scFv), usmerjen bodisi proti BSA (anti-BSA) ali proti humanemu leptinskemu receptorju hLR (3L5) (46), v obliki fuzijskega proteina na *N*-koncu pIII in
- zeleni fluorescenčni protein (sfGFP) v obliki fuzijskega proteina na N-koncu pVIII.

Pri tem smo uporabili različne pogoje (navedeni v preglednici III). Tako smo dobili bakteriofage M13/anti-BSA/sfGFP in M13/3L5/sfGFP. Zaradi razločevanja smo bakteriofage, pripravljene s pomožnim bakteriofagom f88-4/TorA-sfGFP, označili kot M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP oz. M13/3L5/(TorA-)sfGFP, čeprav se signalni peptidi po translokaciji v periplazmo bakterije odcepijo od prvotno nastalih fuzijskih proteinov. Za kontrolo smo z uporabo pomožnega bakteriofaga KM13 pripravili bakteriofage s predstavljenima scFv anti-BSA (M13/anti-BSA) in 3L5 (M13/3L5), brez sfGFP.

Oznaka pogoja	Temperatura gojenja	Dodatek glukoze	Dodatek IPTG
a	30 °C	2 %	/
b	37 °C	2 %	/
с	30 °C	/	0.1 mM
d	37 °C	/	0.1 mM
e	30 °C	/	1 mM
f	37 °C	/	1 mM
g	30 °C	/	/

Preglednica III: Različni pogoji pomnoževanja bakteriofagov, na katere se sklicujemo v spodnjem besedilu.

4.2.1 Makroskopska vizualna ocena izražanja sfGFP v bakterijskih celicah

Izražanje sfGFP v gostiteljskih bakterijskih celicah smo ocenili makroskopsko. Celično usedlino, pridobljeno po centrifugiranju bakterijske kulture, v kateri smo pomnoževali bakteriofage, smo obsevali s svetlobo UV valovne dolžine 366 nm in fotografirali (sliki 15 in 16 ter priloga 4).

Z opazovanjem pod svetlobo UV smo vizualno potrdili prisotnost sfGFP v usedlini bakterijskih celic E. coli seva TG1Tr, v katerih smo pomnoževali bakteriofage M13/anti-BSA/sfGFP s pomočjo pomožnih bakteriofagov f88-4/sfGFP in f88-4/TorA-sfGFP (sliki 15 in 16). Z opazovanjem pod svetlobo UV smo vizualno potrdili tudi prisotnost sfGFP v usedlini bakterijskih celic E. coli seva TG1Tr, v katerih smo gojili bakteriofage M13/3L5/sfGFP s pomočjo pomožnega bakteriofaga f88-4/TorA-sfGFP (priloga 4). Iz slik 15 in 16 je razvidno, da usedlina takih bakterij opazno zeleno fluorescira v primerjavi z usedlino bakterij, v katerih smo gojili bakteriofage M13/anti-BSA s pomočjo pomožnega bakteriofaga KM13. Bakteriofage M13/anti-BSA smo izbrali za negativno kontrolo. Ob vizualni primerjavi usedlin bakterij, transformiranih s f88-4/sfGFP oz. f88-4/TorA-sfGFP, smo ugotovili, da usedlina pri uporabi f88-4/sfGFP fluorescira močneje, kar prikazuje slika 15. To najverjetneje pomeni, da je v bakterijah, okuženih s f88-4/sfGFP, prisotna večja količina funkcionalnega fluorescenčnega proteina. Slednji se morda bolj kopiči v bakterijski celici. Manj verjetna je razlaga, da je translokacija po poti Tat manj učinkovita in zato sfGFP v citoplazmi agregira ali denaturira, zato je fluorescenca bakterij, transformiranih s f88-4/TorA-sfGFP, manjša. Bakterijske usedline po gojenju ob dodatku IPTG fluorescirajo močneje v primerjavi z usedlinami kultur, gojenimi brez dodatkov oz. ob dodatku glukoze (slika 16 in priloga 4). Opažanja se ujemajo s pričakovanji, saj IPTG inducira izražanje gena za sfGFP, ki je pod vplivom promotorja lac (v primeru bakteriofaga f88-4/TorA-sfGFP) oz. tac (v primeru bakteriofaga f88-4/sfGFP), medtem ko glukoza očitno zavira izražanje tega gena. Pri

slednjem gre verjetno za posreden učinek (vpliv na izražanje represorja *lac*I), saj promotor *tac* ne vsebuje vezavne regije za transkripcijski aktivator CAP (ang. '*catabolite activator protein*'). Nižjo ali enako fluorescenco ob gojenju bakterij z dodatkom 1 mM IPTG v primerjavi z dodatkom 0,1 mM IPTG lahko pripišemo nasičenju transkripcijskih in translacijskih mehanizmov gostiteljske bakterije ob povečevanju koncentracije IPTG, zaradi česar se fluorescenca z dodajanjem IPTG več ne povečuje. Poleg tega lahko prehiter nastanek rekombinantnih polipeptidnih verig vodi v nastajanje nepravilno zvitih proteinov ali celo agregatov. Navsezadnje se lahko bakterije zaradi preobremenjenosti osnovnih celičnih procesov počasneje delijo in jih nastane manj, kar makroskopsko vidimo kot nižjo fluorescence. Temperatura pomnoževanja nima večjega vpliva na intenziteto fluorescence (priloga 4).



Slika 15: Usedlina po centrifugiranju bakterijskih kultur *E. coli* seva TG1Tr, v katerih smo pomnoževali bakteriofage M13/anti-BSA z uporabo pomožnih bakteriofagov KM13, f88-4/sfGFP in f88-4/TorA-sfGFP. Usedline smo opazovali pod svetlobo UV valovne dolžine 366 nm.



Slika 16: Usedlina po centrifugiranju bakterijskih kultur, v katerih smo pomnoževali bakteriofage M13/anti-BSA/sfGFP s pomočjo pomožnih bakteriofagov B) f88-4/sfGFP in C) f88-4/TorA-sfGFP. Za negativno kontrolo smo izbrali bakterijske kulture, v katerih smo pomnoževali bakteriofage M13/anti-BSA s pomočjo pomožnega bakteriofaga A) KM13. Na sliki so opisno prikazani tudi pogoji gojenja bakterijskih kultur (identični pogojem a, c, e in g v preglednici III). Usedline smo opazovali pod svetlobo UV valovne dolžine 366 nm.

4.2.2 Ocena izražanja sfGFP v bakterijskih celicah s pomočjo fluorescenčne mikroskopije

Pod fluorescenčnim mikroskopom smo opazovali fluorescenco bakterijskih celic *E. coli* seva TG1Tr, v katerih smo pomnoževali bakteriofage M13/anti-BSA/sfGFP s pomočjo pomožnih fagov f88-4/sfGFP in f88-4/TorA-sfGFP (sliki 17 in 18, prilogi 5 in 6). Na sliki 18 je kvantitativno predstavljena intenziteta fluorescence vzdolž posameznih celic, kar omogoča bolj objektivno primerjavo celic glede na intenziteto fluorescence. Za negativno kontrolo smo

izbrali neokužene bakterije *E. coli* seva ER2738 in bakterije *E. coli* seva TG1Tr s fagmidom pIT/*anti-BSA scFv*. Pri makroskopskem pregledu izražanja sfGFP v usedlinah bakterijskih celic po pričakovanjih nismo opazili značilnih razlik v intenziteti fluorescence glede na izbrani fragment scFv (bodisi anti-BSA bodisi 3L5), predstavljen na pIII. Zato fluorescence bakterij *E. coli* seva TG1Tr, v katerih smo pomnoževali bakteriofage M13/3L5/sfGFP, nismo posebej pregledali pod fluorescenčnim mikroskopskega pregleda primerljivi. Nastavitve fluorescenčnega mikroskopa prikazuje preglednica II.

Ugotovili smo, da posamezne bakterijske celice, v katerih smo pomnoževali bakteriofage M13/anti-BSA/sfGFP z uporabo pomožnih bakteriofagov f88-4/sfGFP in f88-4/TorA-sfGFP, fluorescirajo ob presvetlitvi s svetlobo laserjev z ekscitacijo valovne dolžine 470 nm in 492 nm, kar se ujema z absorpcijskimi lastnostmi fluorofora sfGFP, tj. maksimumom absorpcije pri 485 nm (38). Opažena fluorescenca je bila višja, če smo uporabili pomožni bakteriofag f88-4/sfGFP, kar se je ujemalo z makroskopsko vizualizacijo bakterijske usedline (npr. slika 15) in potrdilo naš sklep, da se v celicah, okuženih z f88-4/sfGFP, nahaja več proteina sfGFP.



Slika 17: Fotografije, ki smo jih posneli s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa pri nastavitvah 2 (preglednica II). Fotografije v zgornji vrsti prikazujejo presvetljene vzorce in v spodnji vrsti fluorescenco vzorcev. Razdelki prikazujejo bakterijske celice *E. coli* seva TG1Tr, v katerih smo pomnoževali bakteriofage M13/anti-BSA po infekciji s pomožnim bakteriofagom KM13, M13/anti-BSA/sfGFP po infekciji s pomožnim bakteriofagom f88-4/sfGFP in M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP po infekciji s pomožnim bakteriofagom f88-4/TorA-sfGFP.



Slika 18: Intenziteta fluorescence vzdolž bakterijske celice (dolžina bakterije – razdalja v slikovnih točkah) pri nastavitvah 2 (preglednica II). Predstavljeni so podatki za bakterije *E. coli* seva TG1Tr, v katerih smo pomnoževali bifunkcionalne bakteriofage z uporabo pomožnih bakteriofagov KM13, f88-4/sfGFP in f88-4/(TorA-)sfGFP.

4.2.3 Makroskopska ocena prisotnosti sfGFP na bakteriofagnih delcih

Prisotnost sfGFP na bakteriofagnih delcih smo ocenili makroskopsko s pregledom usedline oborjenih bakteriofagov pri obsevanju s svetlobo UV valovne dolžine 366 nm.

Z opazovanjem usedline oborjenih bakteriofagov smo vizualno ocenili, da se sfGFP izraža na bakteriofagih M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP (slika 19) in M13/3L5/(TorA-)sfGFP (priloga 7), ki smo jih pripravili s pomočjo pomožnega bakteriofaga f88-4/TorA-sfGFP. Fluorescenca bakteriofagov M13/anti-BSA/sfGFP, pripravljenih s pomožnim bakterofagom f88-4/sfGFP, je bila zelo šibka, manjša pa je bila tudi količina nastalih bakteriofagov. Po drugi strani (glej poglavje 4.2.2) je bila fluorescenca bakterijskih celičnih usedlin ob uporabi pomožnega bakteriofaga f88-4/sfGFP bolj intenzivna od fluorescence bakterijskih usedlin ob uporabi pomožnega bakteriofaga f88-4/TorA-sfGFP. Sklepamo, da se po okužbi celic s pripravljenim pomožnim bakteriofagom f88-4/sfGFP fuzijski protein sfGFP-pVIII manj uspešno prenaša v periplazmo in posledično manj uspešno vgrajuje v novonastale bakteriofagne delce, zato se kopiči v bakterijski celici. S tem smo pokazali, da je za predstavitev sfGFP na površini bakteriofaga pomembno, na katero sekretorno pot usmerimo fuzijski protein sfGFP-pVIII, kar se ujema z opažanji iz literature (26). Za uspešnejšo se je izkazala sekretorna pot Tat, kamor proteine usmerja signalno zaporedje TorA. Za negativno kontrolo smo izbrali bakteriofage M13/anti-BSA, ki smo jih pripravili s pomočjo pomožnega bakteriofaga KM13.



Slika 19: Oborjeni bakteriofagi pod svetlobo valovne dolžine 366 nm. Prikazani so bakteriofagi M13/anti-BSA, M13/anti-BSA/sfGFP in M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP.

Med bakteriofagi, pripravljenimi s pomožnim bakteriofagom f88-4/TorA-sfGFP, smo nekoliko močnejšo fluorescenco opazili pri tistih, ki smo jih gojili z dodatkom IPTG, čeprav je ob tem nastalo manj bakteriofagov (slika 20, priloga 7). Opažanja so se ujemala s pričakovanji, saj IPTG inducira prepisovanje gena za sfGFP-pVIII, ki je pod vplivom promotorja *lac*. Manjši izplen bakteriofagov lahko pripišemo počasnejšemu sestavljanju virusnih delcev zaradi vgrajevanja rekombinantnega fuzijskega proteina sfGFP-pVIII ter večje obremenjenosti transkripcijskih in translacijskih mehanizmov gostiteljske bakterijske celice.



Slika 20: Bakteriofagi M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP, ki smo jih pripravili pri 30 °C ob dodatku 1 mM IPTG in brez dodatka IPTG. Bakteriofage smo opazovali pod svetlobo valovne dolžine 366 nm.

4.3 Vgrajevanje zelenega fluorescenčnega proteina v kapsido rekombinantnih virusnih delcev

Prisotnost fuzijskega proteina sfGFP-pVIII na bakteriofagih M13/anti-BSA/sfGFP, pripravljenih z uporabo pomožnih bakteriofagov f88-4/sfGFP ali f88-4/TorA-sfGFP, smo preverili z NaDS-PAGE in sledečim prenosom western. Za negativno kontrolo smo izbrali bakteriofage M13/anti-BSA, pripravljene z uporabo pomožnega bakteriofaga KM13. Prisotnost sfGFP smo preverili v:

- periplazemskem ekstraktu gostiteljskih bakterij (slika 21 H in I),
- celičnem lizatu po periplazemski ekstrakciji (slika 21 A, B in C)
- topni frakciji lizata (supernatant po lizi bakterij in centrifugiranju; slika 21 D in E),
- netopni frakciji lizata (v pufru PBS suspendirana bakterijska usedlina po lizi bakterij in centrifugiranju; slika 21 - F in G) in
- na izoliranih bakteriofagih M13/anti-BSA in M13/anti-BSA/sfGFP, pripravljenih s pomožnimi bakteriofagi KM13, f88-4/sfGFP ali f88-4/TorAsfGFP (slika 21 - K, L in M).

Z NaDS-PAGE smo ločili proteine v naštetih frakcijah in s pomočjo velikostnega označevalca ocenili območje nahajanja lis iskanega fuzijskega proteina. Ločene proteine smo prenesli na nitrocelulozno membrano s postopkom prenosa western. Po prenosu smo med proteini na nitrocelulozni membrani specifično prepoznali fragment sfGFP s pomočjo primarnih protiteles proti GFP (anti-GFP-Ab). Slednja smo detektirali s sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo, in membrano omočili z raztopino kemiluminiscenčnega substrata. Fragment sfGFP smo tako zaznali kot svetleče lise v območju predvidene velikosti fuzijskega proteina sfGFP-pVIII (~ 32 kDa). Nitrocelulozno membrano z ločenimi in specifično prepoznanimi proteini prikazuje slika 21.



Slika 21: Izrez dela nitrocelulozne membrane po prenosu western. V stolpcih smo ločili proteine iz različnih bakterijskih razdelkov, naštetih v besedilu, v katerih smo gojili bakteriofage KM13 in M13/anti-BSA/sfGFP s pomočjo f88-4/sfGFP ali f88-4/TorA-sfGFP. V zadnjih stolpcih so bili ločeni kapsidni proteini iz bakteriofagov KM13 in M13/anti-BSA/sfGFP, pridobljenih s pomočjo f88-4/sfGFP ali f88-4/TorA-sfGFP. Označevalec velikosti smo označili z M (»marker«). Z barvnimi črticami smo označili približno velikost lis (modra - 35 kDa, zelena - 32 kDa, rožnata - 28 kDa).

Glede na lise stez B in F (slika 21) sklepamo, da z uporabo pomožnih bakteriofagov f88-4/sfGFP nastane večja količina fuzijskega proteina sfGFP-pVIII, ki se glede na rezultate prenosa western neuspešno vključuje v kapsido novonastalih bakteriofagnih delcev, saj na stezi L ni opaziti lise. Ta fuzijski protein se glede na nanosa F in H najverjetneje kopiči v citoplazmi gostiteljske bakterije, nekaj ga je tudi v periplazemskem prostoru. Lise v stolpcih B, D, F in H (modra barvna črtica pri ~ 35 kDa) se nahajajo višje od lise za fuzijski protein sfGFP-pVIII (zelena barvna črtica pri ~ 32 kDa), kar kaže na prisotnost nekoliko večjega proteina v teh frakcijah. Zaradi položaja in močne intenzitete lise v netopni frakciji sklepamo, da se fuzijski protein sfGFP-pVIII kopiči z nativnim signalnim zaporedjem (ss) vsidran v notranjo membrano. Razlog za to bi lahko bila motena translokacija v periplazemski prostor, kjer bi se sicer signalno zaporedje (ss) moralo odcepiti od fuzijskega proteina (ss-)sfGFPpVIII. Možna, a nepotrjena razlaga vključuje močno tendenco polipeptidne verige sfGFP po hitrem kotranslacijskem zvijanju v tridimenzionalno strukturo sodčka β, ki ne dovoljuje več transporta po poti Sec. V stolpcih od B do I je prisotna še lisa manjšega fragmenta (rožnata barvna črtica pri ~ 28 kDa) - verjetno gre za samostojen protein sfGFP, ki lahko nastane z proteolitsko odcepitvijo fragmenta pVIII od fuzijskega proteina sfGFP-pVIII. S pomožnimi bakteriofagi f88-4/TorA-sfGFP nastane manjša količina fuzijskega proteina, ki se relativno uspešno vključuje v kapsido novonastalih bakteriofagov, kar prikazuje lisa v stolpcu M. Kljub temu veliko fuzijskega proteina ostaja znotraj gostiteljske bakterije (stolpci C, E in G), vključno s periplazemskim prostorom (stolpec I). Domnevamo, da je prisotnost fuzijskega proteina v netopni frakciji (stolpec G) posledica agregacije prostega fuzijskega proteina sfGFP-pVIII. Za slednjo bi bil lahko odgovoren predvsem prosti (nevgrajen v kapsido) pVIII kot del fuzijskega proteina, saj sam sfGFP odlikuje dobra topnost (42, 43). Fuzijski protein je v periplazemskem prostoru pravilno zvit, kar nakazuje zelenkasto fluorescenčno obarvanje periplazemskega ekstrakta pri vidni svetlobi (ni prikazano).

Rezultati prenosa western potrjujejo, da je za vgrajevanje fuzijskega proteina sfGFPpVIII in s tem predstavitev sfGFP na kapsidi bakteriofaga ustreznejša prenašalna pot Tat, na katero pravilno zvit protein usmerimo s signalnim zaporedjem *TorA*. Nasprotno sekretorna pot Sec najverjetneje povzroči kopičenje fuzijskega proteina sfGFP-pVIII v citoplazmi gostiteljske celice. Boljšo uporabnost dvojno označenih bakteriofagov bi morda dosegli z uporabo druge različice fluorescenčnega proteina ali s posredno predstavitvijo reporterskega proteina, npr. z uporabo para obvitih vijačnic E/K, pri kateri bi bil fluorescenčni protein vezan na vijačnico E in plaščni protein pVIII označen z vijačnico K, obe pa bi se povezali po translaciji in translokaciji v periplazmi (21, 56-58).

4.4 Ocena vezave pripravljenih bakteriofagov na tarčo s testom ELISA

Pripravili smo dvojno označene bakteriofage, ki so na svoji površini izražali ustrezen scFv (anti-BSA ali 3L5), kar smo dokazali s testi ELISA (slika 22, prilogi 8 in 9).

S testom ELISA smo ocenili afiniteto vezave bakteriofagov M13/anti-BSA/sfGFP in M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP, ki smo jih pripravili s pomočjo bakteriofagov f88-4/sfGFP in f88-4/TorA-sfGFP, na BSA. Za pozitivno kontrolo smo uporabili bakteriofage M13/anti-BSA, pripravljene s pomožnim bakteriofagom KM13, za negativno kontrolo pa smo bakteriofage inkubirali nad površino, prekrito z mlekom. Ugotovili smo, da bakteriofagi M13/anti-BSA/sfGFP in M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP ohranijo sposobnost vezave na BSA, vendar v manjši meri v primerjavi z bakteriofagi M13/anti-BSA, ki predstavljajo zgolj scFv. Vzrok je najverjetneje obremenjenost transkripcijskih, translacijskih in transportnih mehanizmov gostiteljske bakterije, zato je pomembna optimizacija pogojev gojenja bakteriofagov. Razlika med vezavo na BSA pri različnih jakostih indukcije (0,1 oz. 1 mM IPTG) ni izrazita, vendar to lahko pripišemo nizkim vrednostim nasploh, ki so najverjetneje posledica uporabe veliko nižjega titra preiskovanih bakteriofagov, in možnemu zasičenju transkripcijskih mehanizmov ob povečevanju koncentracije IPTG. Slednje podpira tudi majhna razlika med vezavo kontrolnih bakteriofagov M13/anti-BSA na BSA pri različnih jakostih indukcije. Zlasti pa to velja v primeru okužbe s f88-4/sfGFP, kjer je rekombinantni gen za fuzijski protein sfGFP-pVIII pod vplivom promotorja tac, ki je ravno tako kot promotor lac (pred genom za scFv-pIII na fagmidu) pod nadzorom represorja lacI. Zato dodatek IPTG inducira izražanje obeh rekombinantnih genov, sfGFP-pVIII in scFv-pIII. Ker pa je hibridni promotor tac veliko bolj učinkovit (59), se ob dodatku IPTG verjetno pretežno prepisuje gen sfGFP-pVIII, kar se odraža v slabšem izražanju in predstavitvi scFv-pIII na bakteriofagih ter s tem slabši vezavi na tarčo BSA. To se kaže v nižji stopnji predstavitve scFv na površini M13/anti-BSA/sfGFP v primerjavi z M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP in M13/anti-BSA. Ugotovili smo, da bakteriofagi M13/anti-BSA/sfGFP in M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP uspešneje predstavljajo scFv proti BSA ob gojenju bakteriofagov brez dodatkov induktorja, kar velja tudi za kontrolne bakteriofage M13/anti-BSA. Domnevamo, da ob odsotnosti IPTG nastaja manj proteina sfGFP-pVIII, zato je nastajanje scFv olajšano v primerjavi z dodatkom IPTG, saj ne pride do zasičenja transkripcijskih in posttranskripcijskih mehanizmov. Promotor lac namreč omogoča nizko stopnjo izražanja izbranega proteina tudi v odsotnosti induktorjev, kakršen je IPTG.

V prihodnje bi bilo pri testih vezave smotrno uporabiti prilagojene količine dvojno označenih bakteriofagov relativno na količino enojno označenih bakteriofagov, saj domnevamo, da enostavna ocena titra z merjenjem absorbance ni bila dovolj natančna.



Slika 22: Rezultati testa ELISA, ki prikazuejo vezavo bakteriofagov, pripravljenih s pomožnim bakteriofagom KM13 (M13/anti-BSA), f88-4/sfGFP (M13/anti-BSA/sfGFP) in f88-4/TorA-sfGFP (M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP) pri temperaturi 30 °C in različnih pogojih indukcije izražanja rekombinantnih genov. V vdolbinice smo po vezavi tarče nanesli enak titer bakteriofagov (~ 2,5×10⁹; ocenjen spektrofotometrično). Detekcijo smo izvedli s protitelesi anti-M13-HRP. Na stolpčnem diagramu so prikazani standardni odkloni odzivov treh paralelk. Absorbanco (A) smo izmerili pri valovni dolžini 450 nm.

S testi ELISA smo ocenili tudi vezavo bakteriofagov M13/3L5/(TorA-)sfGFP na rekombinantni humani leptinski receptor (hLR). Rezultati, ki jih prikazuje priloga 9, kažejo, da smo na površini bakteriofagov izrazili tudi scFv, ki se vežejo na hLR, vendar bi morali zaradi nizkih vrednosti testa domnevo potrditi z uporabo višjega titra bakteriofagov M13/3L5/(TorA-)sfGFP.

4.5 Uvedba zelenega fluorescenčnega proteina na površino rekombinantnih virusnih delcev

Zeleni fluorescenčni protein sfGFP smo na rekombinantne virusne delce uvedli s pomočjo pomožnih bakteriofagov, ki omogočajo razvrščanje sfGFP-pVIII v periplazmo (mesto sestavljanja bakteriofagov) po dveh poteh:

- od SecB odvisna pot pri uporabi pomožnega bakteriofaga f88-4/sfGFP in
- alternativna pot Tat pri uporabi pomožnega bakteriofaga f88-4/TorA-sfGFP.

Razlike v izražanju sfGFP-pVIII in prisotnosti sfGFP na bakteriofagih zaradi različnega razvrščanja smo makroskopsko ocenili pri pregledu usedline bakterij in bakteriofagov pod svetlobo UV (v poglavju 4.2). Sklepali smo, da se sfGFP bodisi vključuje v novonastale bakteriofagne delce (pri uporabi pomožnega bakteriofaga f88-4/TorA-sfGFP) bodisi se pretežno kopiči v citoplazmi gostiteljskih bakterijskih celic (pri uporabi pomožnega bakteriofaga f88-4/sfGFP).

Predstavitev obeh rekombinantnih proteinov (sfGFP in scFv) na površini bakteriofagnih delcev M13/anti-BSA/sfGFP in M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP smo želeli oceniti s testom FLISA (slika 23). Rezultati testa FLISA so pokazali nekoliko bolj izraženo fluorescenco v vzorcih, kjer smo bakteriofage M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP vezali na tarčni protein BSA, v primerjavi z vezavo istih bakteriofagov na mleko, kar kaže na specifičnost vezave fluorescenčnih bakteriofago na BSA. Toda zaradi majhne razlike v zaznani fluorescenci med preiskovanimi bakteriofagi in bakteriofagi, ki smo jih uporabili za negativno kontrolo (M13/anti-BSA), na podlagi rezultatov testa FLISA ne moremo z gotovostjo trditi, da smo pripravili bifunkcionalen bakteriofag, ki prikazuje rekombinantna proteina sfGFP in scFv. Za boljše razmevanje rezultatov bi morali test ponoviti z višjim titrom preiskovanih bakteriofagov M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP in optimiziranimi pogoji merjenja fluorescence na primernejših mikrotitrskih ploščicah. Uspešno izvedena detekcija s testom FLISA bi olajšala avtomatizacijo selekcijskega procesa bakteriofagnih knjižnic ali diagnostičnih procesov, s tem pa bi se lahko izognili dolgotrajnejšim ter dražjim testom, kakršen je ELISA (60, 61).



Slika 23: Slika prikazuje rezultate testa FLISA. V vdolbinice smo vezali BSA in v njih nato inkubirali bakteriofage s scFv proti BSA, ki smo jih pripravili s pomočjo pomožnih bakteriofagov KM13 (negativna kontrola), f88-4/sfGFP in f88-4/TorA-sfGFP. Za negativno kontrolo smo vdolbinice blokirali z mlekom in v njih nato inkubirali iste bakteriofage.

Predstavitev obeh rekombinantnih proteinov (sfGFP in scFv) na površini bakteriofagnih delcev M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP smo posredno potrdili z opazovanjem sefaroznih delcev z vezanim tarčnim proteinom (BSA) po inkubaciji z rekombinantnimi bakteriofagi pod fluorescečnim mikroskopom (sliki 24 in 25). Pri tem smo uporabili bakteriofage, ki smo jih pripravili le s pomožnim bakteriofagom f88-4/TorA-sfGFP. Pri makroskopskem pregledu oborine bakteriofagov, pripravljenih s pomožnim bakteriofagi izkazujejo precej šibkejšo fluorescenco, iz česar smo sklepali, da niso primerni za zaznavo tarče na sefaroznih delcih in sledeče opazovanje s fluorescenčnim mikroskopom. Fluorescenco preiskovanih bakteriofagov smo primerjali s fluorescenco bakteriofagov, kovalentno označenih s fluorescenčnim barvilom FITC, ki pod mikroskopom močno fluorescirajo. Nastavitve fluorescenčnega mikroskopa med opazovanjem prikazuje preglednica II.

Iz slik 24 in 25 ter prilog 10 in 11 je razvidno, da je fluorescenca bakteriofagov M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP opazno višja od fluorescence bakteriofagov brez prisotnega sfGFP na površini. Najboljše rezultate smo dobili z ekscitacijo pri 492 nm, ki je blizu absorpcijskemu vrhu fluorofora sfGFP, tj. 485 nm (38). Pri uporabljenih nastavitvah tudi bakteriofagi M13/anti-BSA (brez sfGFP) najverjetneje izkazujejo določeno stopnjo intrinzične zelene fluorescence, ki pa je vsaj tri- do desetkrat manj intenzivna od zelene fluorescence bakteriofagov, ki predstavljajo sfGFP. Fluorescenca s FITC označenih bakteriofagov M13/anti-BSA (slika 24) je veliko močnejša od bakteriofagov s sfGFP, kar je pričakovano, saj je kemijsko označevanje bakteriofagov z že tako intenzivnim fluoroforom FITC zelo učinkovito. Z opazovanjem blokiranih sefaroznih delcev brez BSA po inkubaciji z bakteriofagi M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP smo pokazali, da je nespecifična vezava pripravljenih bakteriofagov na sefarozne delce pri uporabljenih eksperimentalnih pogojih zanemarljiva (sliki 24 in 25 ter prilogi 10 in 11). V tem primeru namreč ne zaznamo fluorescence, kakršno zaznamo v primeru vezave fluorescenčnih bakteriofagov, označenih z sfGFP, na sefarozne delce z vezanim BSA.

Z opisanimi poizkusi smo potrdili prisotnost obeh želenih proteinov, tj. scFv in sfGFP, na površini bakteriofagov M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP. Pokazali smo, da pripravljeni dvojno označeni bakteriofagi ohranijo sposobnost specifične vezave na tarčo zaradi predstavljenih enoverižnih fragmentov variabilnih regij protiteles in hkrati omogočajo vizualizacijo vezanih bakteriofagov s fluorescenčno mikroskopijo zaradi fluorescirajočega reporterskega proteina. Pripravljeni pomožni bakteriofag f88-4/TorA-sfGFP ima torej široko uporabnost, saj bi ga lahko v prihodnje uporabili za pripravo bakteriofagov s sočasno prikazanim poljubnim proteinom na plaščnem proteinu pIII. Dvojno označene bakteriofagne knjižnice bi s pomočjo testa FLISA omogočale sprotno oceno uspešnosti poteka afinitetne selekcije in hitro detekcijo ter osamitev pozitivnih klonov s pomočjo FACS. Obe metodi bi bili z uporabo dvojno označenih bakteriofagov hitrejši, cenejši in zaradi manjše porabe reagentov tudi okoljsko sprejemljivejši od trenutnih načinov detekcije in karakterizacije bakteriofagnih klonov (40, 41, 60, 61). Po opisanem principu dvojne predstavitve bi lahko pripravili z encimom ali fluorescenčnim proteinom označene bakteriofage s predstavljenimi že poznanimi fragmenti protiteles ali drugimi vezavnimi proteini proti želenim tarčnim molekulam. Zaradi enostavne detekcije bi z njimi lahko nadomestili označena monoklonska protitelesa v eksperimentalnih in diagnostičnih imunskih testih, saj bi bila optimizirana priprava dvojno označenih bakteriofagov cenejša, bolj prilagodljiva in bi lahko obsegala širši nabor tarčnih molekul. Po vezavi na tarčne molekule, imobilizirane na trdnih delcih ali mikročipih oz. prisotne v suspenziji celic, celični kulturi ali tkivih, bi lahko fluorescenco dvojno označenih bakteriofagov določili s pretočnim citometrom ali vizualizirali s fluorescenčnim mikroskopom. Pomožne bakteriofage, v katerih bi reporterski fluorescenčni protein zamenjali z encimom, kot je alkalna fosfataza, bi lahko uporabili za pripravo dvojno označenih bakteriofagov, ki bi jih po dodatku kromogenega substrata za encim uporabili za izvedbo encimskoimunskih ali imunohistoloških testov. Pomožne bakteriofage, v katerih bi reporterski protein zamenjali z efektorskim, bi lahko uporabili tudi za pripravo dvojno označenih bakteriofagov za ciljano eksperimentalno zdravljenje infekcijskih bolezni (7, 11, 42, 62-66).

M13/anti-BSA (sef)	M13/anti-BSA (sef)
M13/anti-BSA (sef-BSA)	M13/anti-BSA (sef-BSA)
. 00	
M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP (sef)	M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP (sef)
· 0	
M13/anti BSA/(TorA)sfGED	M12/anti BSA/(TarA)sfCED
(sef-BSA)	(sef-BSA)
80	
M13/anti-BSA/FITC (sef-BSA)	M13/anti-BSA/FITC (sef-BSA)

Slika 24: Fotografije, ki smo jih posneli s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa z nastavitvami 3 (preglednica II). Fotografije v levem stolpcu prikazujejo presvetljene vzorce, v desnem stolpcu pa fluorescenco vzorcev. Slika prikazuje sefarozne delce s kovalentno vezanim BSA (sef-BSA), na katere smo lovili bakteriofage M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP. Za negativno kontrolo smo delce inkubirali v prisotnosti bakteriofagov M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP. Za blokirane sefarozne delce (sef) inkubirali v prisotnosti bakteriofagov M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP. Za sfGFP. Za pozitivno kontrolo smo uporabili bakteriofage M13/anti-BSA/FITC.



Slika 25: Intenziteta zelene fluorescence po premeru sefaroznega delca v predstavljeni ravnini (slika 24). Predstavljeni so podatki za posamezen sefarozni delec z vezanim BSA, ki smo ga inkubirali v prisotnosti bakteriofagov M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP in M13/anti-BSA, in za blokiran sefarozni delec, ki smo ga inkubirali v prisotnosti bakteriofagov M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP.

5. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo pripravili pomožna bakteriofaga f88-4/sfGFP in f88-4/TorA-sfGFP za uvedbo reporterskega proteina tako, da smo zaporedje za izpopolnjeni zeleni fluorescenčni protein sfGFP vstavili v bakteriofagni vektor f88-4 kot fuzijo z enim od dveh genov za plaščni protein pVIII. Pomožna bakteriofaga smo nato uporabili za pripravo bakteriofagnih delcev s predstavljenim enoverižnim fragmentom variabilnih regij protiteles (scFv), ki je bil kot fuzija s plaščnim proteinom pIII zapisan v fagmidnem vektorju. Pripravljeni dvojno označeni bakteriofag M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP je na svoji površini predstavljal tako scFv proti govejemu serumskemu albuminu (BSA) kot fluorescirajoči reporterski protein sfGFP. Hkratne prisotnosti scFv proti humanemu leptinskemu receptorju (hLR) in reporterskega proteina sfGFP na površini pripravljenega bakteriofaga M13/3L5/(TorA-)sfGFP zaradi omejene količine tarčnega proteina nismo posebej dokazovali, a domnevamo, da bi bili rezultati podobni kot v primeru predstavitve scFv proti BSA.

S pomočjo primerjave fluorescence gostiteljskih bakterij in oborjenih bakteriofagnih delcev pri obsevanju z ultravijolično svetlobo ter z NaDS-PAGE s sledečim prenosom western smo ugotovili, da se sfGFP sicer vključuje v kapsido bakteriofagnih delcev, a je raven predstavitve relativno nizka. Potrdili smo, da je pri tem pomembna usmeritev k sekretorni poti Tat s signalnim zaporedjem *TorA*, ki smo ga vstavili pred zapis za fuzijski protein sfGFP-pVIII pomožnega bakteriofaga f88-4/TorA-sfGFP. S pomočjo encimskoimunskega testa smo ugotovili, da je scFv izražen na površini dvojno označenega bakteriofaga, vendar v manjši meri v primerjavi z bakteriofagom, ki predstavlja zgolj scFv.

Prisotnost obeh rekombinantnih proteinov na površini dvojno označenih bakteriofagov smo preverili s fluorescenčnoimunskim testom, ki pa ni dal jasnih rezultatov. Prisotnost in funkcionalnost obeh rekombinantnih proteinov na površini dvojno označenega bakteriofaga M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP smo potrdili s pomočjo fluorescenčne mikroskopije z opazovanjem fluorescence sefaroznih delcev z vezanim tarčnim proteinom po inkubaciji z rekombinantnimi bakteriofagi. Pripravljeni dvojno označeni bakteriofagi so izkazovali najmanj tri- do desetkrat bolj intenzivno zeleno fluorescenco od enojno označenih bakteriofagov, ki ne predstavljajo sfGFP.

Pripravljeni pomožni bakteriofag f88-4/TorA-sfGFP ima široko uporabnost, saj bi ga lahko v prihodnje uporabili za pripravo bakteriofagov s sočasno prikazanim poljubnim proteinom na proteinu pIII v raziskovalne, diagnostične in terapevtske namene.

60

6. VIRI IN LITERATURA

1. Bratkovič T, Preželj A: Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi. Farm vestn 2008; 59: 129-134.

2. Skurnik M, Strauch E: Phage therapy: Facts and fiction. Int J Med Microbiol 2006; 296: 5-14.

Russel M, Clackson T, Lowman HB: Introduction to phage biology and phage display.
V knjigi Practical Approach to Phage Display, 1. izdaja. Urednika: Clackson T, Lowman HB,
Oxford University Press, New York, 2004: 1-26.

4. Smith GP, Petrenko VA: Phage Display. Chem Rev 1997; 97: 391-410.

5. Bratkovič T: Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. Cell Mol Life Sci 2010; 67: 749-767.

6. Ph.D.[™] Phage Display Libraries, Instruction Manual E8100S, E8101S, E8192L, E8110S, E8111L, E8120S, E8121L; Verzija 1.0 (9/09); New England Biolabs®.

7. Azzazy HME, Highsmith WE: Phage display technology: clinical applications and recent innovations. Clin Biochem 2002; 35: 425-445.

8. Molek P, Štrukelj B, Bratkovič T: Peptide Phage Display as a Tool for Drug Discovery: Targeting Membrane Receptors. Molecules 2011; 16: 857-887.

9. Paschke M: Phage display systems and their applications. Appl Microbiol Biotechnol 2006; 70: 2-11.

10. Petrenko VA, Vodyanoy VJ: Phage display for detection of biological threat agents. J Microbiol Meth 2003; 53: 253-262.

11. Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC: Antibody phage display technology and its applications. Immunotech 1998; 4: 1-20.

 Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M: Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. Curr Issues Mol Biol 2011; 13: 51-76.

13. Qi H, Lu H, Qiu HJ, Petrenko V, Liu A: Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction. J Mol Biol 2008; 417: 129-143.

14. Weisser NE, Hall JC: Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. Biotechnol Adv 2009; 27: 503-520.

15. Carmen S, Jermutus L: Concepts in antibody phage display. Brief Func Genomic Proteomic 2002; 1: 189-203.

16. Willats WGT: Phage display: practicalities and prospects. Plant Mol Biol 2002; 50: 837-854.
17.Human Single Fold scFv Libraries I + J (Tomlinson I + J), Instruction Manual. Verzija1.0;Geneservice.Dostopnona:

http://www.lifesciences.sourcebioscience.com/media/143421/tomlinsonij.pdf.

18. Sorensen HP, Mortensen KK: Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. J Biotechnol 2005; 115: 113-128.

19. Choi JH, Lee SY: Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol 2004; 64: 625-635.

20. Mergulhao FJM, Summers DK, Monteiro GA: Recombinant protein secretion in Escherichia coli. Biotechnol Adv 2005; 23: 177-202.

21. Velappan N, Fisher HE, Pesavento E, Chasteen L, D'Angelo S, Kiss C, Longmire M, Pavlik P, Bradbury ARM: A comprehensive analysis of filamentous phage display vectors for cytoplasmic proteins: an analysis with different fluorescent proteins. Nucleic Acids Res 2010; 38: 1-16.

22. Paschke M, Hohne W: A twin-arginine translocation (Tat)-mediated phage display system. Gene 2005; 350: 79-88.

23. Speck J, Arndt KM, Muller KM: Efficient phage display of intracellularly folded proteins mediated by the TAT pathway. Protein Eng Des Sel 2011; 24: 473-484.

24. Hinton G, Jerez J, Karren J, Rupp T, Kim HJ, Bedingfield S, Peterson C, Hatch A, Porter R, Mortensen T: BioBricks without Borders. iGem 2009 Jamboree, Massachusetts: http://2009.igem.org/Team:Utah_State.

25. Kladnik R: Visokošolska fizika 2. del: Elektrika in atomika. DZS, Ljubljana, 1991.

26. Tsien RY: The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem 1998; 67: 509-544.

27. Tsien RY: New Fluorescent Readouts for Protein Interactions, Gene Expression, and Membrane Potential. V knjigi Chemosensors of Ion and Molecule Recognition. Urednika: Desvergne JP, Czarnik AW, Springer Netherlands, 1997; 808-828.

28. Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA: Fluorescent Proteins and their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. Physiol Rev 2010; 90: 1103-1163.

29. Patterson GH: Fluorescent Proteins for Cell Biology. V knjigi Reporter Genes: A Practical Guide. Urednik: Anson DS, Humana Press, Totowa, 2007; 47-80.

30. Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA: Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. Trends Biotechnol 2006; 23: 605-613.

31. Remington SJ: Green fluorescent protein: A perspective. Prot Sci 2011; 20: 1509-1519. 32. Stepanenko VO, Stepanenko VO, Shcherbakova DM, Kuznetsova IM, Turoverov KK, Verkhusha VV: Modern fluorescent proteins: from chromophore formation to novel intracellular applications. Biotechniques 2011; 51: 313-327.

Pahkomov AA, Martynov VI: GFP Family: Structural Insights into Spectral Tuning.
 Chem Biol 2008; 15: 755-764.

34. Miyawaki A, Nagai T, Mizuno H: Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering. Curr Opin Chem Biol 2003; 7: 557-662.

35. Snapp EL: Fluorescent proteins: a cell biologist's user guide. Trends Cell Biol 2009;19: 649-655.

36. Schultz C: Fluorescent Revelations. Chem Biol 2009; 16: 107-111.

37. Andrews BT, Schoenfish AR, Roy M, Waldo G, Jennings PA: The Rough Energy Landscape of Superfolder GFP is Linked to the Chromophore. J Mol Biol 2007; 373: 476-490.

38. Pedelacq JD, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC, Waldo GS: Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. Nat Biotechnol 2006; 24: 79-88.

39. Robinson JP, Sturgis J, Kumar GL: Immunofluorescence. V knjigi: Immunohistochemical Staining Methods, 5. izdaja. Urednika: Kumar GL, Rudbeck L, Dako, Carpinteria; 2009: 61-66.

40. Griep RA, van Twisk C, van der Wolf JM, Schots A: Fluobodies: green fluorescent single-chain Fv fusion proteins. J Immunol Method 1999; 230: 121-130.

41. Morino K, Katsumi H, Akahori Y, Iba Y, Shinohara M, Ukai Y, Kohara Y, Kurosawa Y: Antibody fusions with fluorescent proteins: a versatile reagent for profiling protein expression. J Immunol Method 2001; 257: 175-184.

42. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M: scFv Antibody: Principles and Clinical Applications. Clin Develop Immunol 2012; 2012: 1-15.

43. Babu RSA, Chandrasekar P, Chandra KLP, Reddy GS, Kumar KK, Reddy BVR: Immunofluorescence and its application in dermatopathology with oral manifestations: Revisited. J Orofacial Sci 2013, 5: 2-8.

44. Pinto JP, Zeyniyev A, Karsens H, Trip H, Lolkema JS, Kuipers OP, Kok J: pSEUDO, a genetic integration standard for Lactococcus lactis. Appl Environ Microbiol. 2011; 18: 6687-90.

45. Potluri L, Karczmarek A, Verheul J, Piette A, Wilkin JM, Werth N, Banzhaf M, Vollmer W, Young KD, Nguyen-Distèche M, den Blaauwen T: Septal and lateral wall

localization of PBP5, the major D,D-carboxypeptidase of Escherichia coli, requires substrate recognition and membrane attachment. Mol Microbiol 2010; 2:300-23.

46. Molek P, Vodnik M, Lunder M, Štrukelj B, Bratkovič T: Selection of scFvs targeting human leptin receptor. 10. srečanje Slovenskega biokemijskega društva z mednarodno udeležbo. Ljubljana, 15.-18. september 2013.

47. GenElute[™] HP Plasmid Miniprep Kit, User Guide, Catalog Nos NA0150S, NA0150, NA0160; Sigma-Aldrich[®]:

https://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/na0160bul.pdf.

48. NanoDrop 1000 Spectrophotometer, V3.7 User's Manual, Revised 7/08, Thermo Fisher Scientific©: http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf.
49. Lee CM, Iorno N, Sierro F, Christ D: Selection of human antibody fragments by phage display. Nat Protoc 2007; 11: 3001-3008.

50. QIAEX®IIHandbook,Revised4/12,Qiagen©:http://www.qiagen.com/resources/Download.aspx?id=13d33145-9f64-426a-a43b-394211d8cf2b&lang=en&ver=1.394211d8cf2b&lang=en&ver=1.

51.GoTaq® PCR Core Systems, Instructions for use of products M7660, M7665, M7650andM7655,Revised3/09,Promega:http://worldwide.promega.com/~/media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/GoTaq%20PCR%20Core%20Systems%20Protocol.pdf.Sources/Protocol.pdf.

52. Single Read Sequencing – Sample Requirements. GATC Biotech Inc. 2013, dostopno na naslovu URL: http://www.gatc-biotech.com/en/support/support/dna-konzentrationund-volumen/single-read-sequencing.html.

53. Programska oprema ClustalW2. EMBL-EBI 2013, dostopno na naslovu URL: http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/.

54. CNBr-activated Sepharose[™] 4B, Instructions 71-7086-00 AF, GE Healthcare: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314787424 814/litdoc71708600AF_20110831144357.pdf.

SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Instructions 37071, 34075,
 34076 (0648.9), Pierce Biotechnology: http://www.piercenet.com/instructions/2160648.pdf.

56. Tripet B, Yu L, Bautista DL, Wong WY, Irving RT, Hodges RS: Engineering a de novo-designed coiled-coil heterodimerization domain for the rapid detection, purification and characterization of recombinantly expressed peptides and proteins. Protein Eng 1996; 9: 1029-1042.

64

57. Cabantous S, Nguyen HB, Pedelacq JD, Koraichi F, Chaudhary A, Ganguly K, Lockard MA, Favre G, Terwilliger TC, Waldo GS: A New Protein-Protein Interaction Sensor Based on Tripartite Split-GFP Association. Sci Rep 2013; 3: 1-9.

58. De Crescenzo G, Litowski JR, Hodges RS, O'Connor-McCourt MD: Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. Biochem 2003; 42: 1754-1763.

59. De Boer HA, Comstock LJ, Vasser M: The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. Proc Natl Acad Sci 1983; 80: 21-25.

60. Velappan N, Clements J, Kiss C, Valero-Aracama R, Pavlik P, Bradbury ARM: Fluorescence linked immunosorbent assays using microtiter plates. J Immunol Methods 2008; 336:135-143.

61. Oelshlaeger P, Iyer-Srikant S, Lange S, Schmitt J, Schmid RD: Fluorophor-linked immunosorbent assay: a time- and cost-saving method for the characterization of antibody fragments using a fusion protein of a single-chain antibody fragment and enhanced green fluorescent protein. Anal Biochem 2002; 309: 27-34.

62. Alley SC, Okeley NM, Senter PD: Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. Curr Op Chem Biol 2010; 15: 529-537.

63. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM: Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. Nat Rev Drug Discov 2010; 9: 767-774.

64. Niculescu-Duvaz I, Springer CJ: Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review. Adv Drug Delivery Rev 1997; 26: 151-172.

65. Pavoni E, Vaccaro P, D'Alessio V, De Santis R, Minenkova O: Simultaneous display of two large proteins on the head and tail of bacteriophage lambda. BMC Biotechnol 2013; 13: 79-95.

66. Schirrman T, Meyer T, Schutte M, Frenzel A, Hust M: Phage Display for the Generation of Antibodies for Proteome Research, Diagnostics and Therapy. Molecules 2011; 16: 412-426.

7. PRILOGE

Priloga 1

Regija z več mesti za kloniranje (MCS) bakteriofaga f88-4. Zaporedje za želeni peptid vstavimo med restrikcijski mesti za *Hind*III in *Pst*I po odstranitvi vmesnega zaporedja med njima.

mesto 5647 v nukleotidnem zaporedju bakteriofaga fd-tet \downarrow *Xho*I AGCTCGAGCTTACTCCCCA

tac promotor TCCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTC območje začetka prevajanja gena VIII TTAATGGAAACTTCCTC ATG AAA AAG TCT TTA Κ Κ S L М GTT CTT AAA GCA TCT GTT GCT GTT GCG ACT CTT GTT V S V L Κ А V А V А Т L *Hin*dIII **PstI** \downarrow \downarrow vmesno zaporedje CCT ATG CTA^AGC TTT GCC AAC GTC CCT GCA^GAA GGT GAT GAC CCG GCT AAA S F A ^ N V Ρ Е А Κ Ρ М L А G D D Ρ mesto cepitve signalne peptidaze GCT GCT TTT GAC TCT CTT CAG GCT TCT GCT ACT GAA TAC ATC GGC TAC GCT Α Α F D S L 0 Α S Α Т Е Y Ι G Y А TGG GCT ATG GTG GTT GTT ATC GTT GGT GCT ACT ATT GGC ATC AAA CTT TTC G Α Т Ι G Κ F W Α М V V V Ι V Ι L AAA AAA TTC ACT TCT AAA GCG TCT Κ Κ F S Κ S Т А trpA terminator NheI TAATG AACTCAGATACCCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTT AAGCTAGCTT ↑ mesto 5980 v nukleotidnem

zaporedju bakteriofaga fd-tet

Nukleotidno zaporedje pomožnega bakteriofaga f88-4/sfGFP med restrikcijskima mestoma *XhoI* in *NheI*. Podčrtana so restrikcijska mesta (zaporedja, ki jih prepoznajo restrikcijske endonukleaze). Barve označujejo pomembne dele zaporedja.

XhoI	
CTCGA^GCTTACTCCCCATCCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGGAA	7
TTGTGAGCGGATAACAATTTCTTAATGGAAACTTCCTCATGAAAAAGTCTTTAGTTCTTAAA	Ā
HindIII	1
GCATCTGTTGCTGTTGCGACTCTTGTTCCTATGCT <u>A^AGCTT</u> TGC <mark>CGTAAAGGCGAAGAGC</mark>	2
TGTTCACTGGTGTCGTCCCTATTCTGGTGGAACTGGATGGTGATGTCAACGGTCATAAGTTI	2
TCCGTGCGTGGCGAGGGTGAAGGTGACGCAACTAATGGTAAACTGACGCTGAAGTTCATCTG	L.
TACTACTGGTAAACTGCCGGTACCTTGGCCGACTCTGGTAACGACGCTGACTTATGGTGTTC	2
AGTGCTTTGCTCGTTATCCGGACCATATGAAGCAGCATGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCG	L.
GAAGGCTATGTGCAGGAACGCACGATTTCCTTTAAGGATGACGGCACGTACAAAACGCGTGC	2
GGAAGTGAAATTTGAAGGCGATACCCTGGTAAACCGCATTGAGCTGAAAGGCATTGACTTTA	A
AAGAAGACGGCAATATCCTGGGCCATAAGCTGGAATACAATTTTAACAGCCACAATGTTTAC	2
ATCACCGCCGATAAACAAAAAATGGCATTAAAGCGAATTTTAAAATTCGCCACAACGTGGA	A
GGATGGCAGCGTGCAGCTGGCTGATCACTACCAGCAAAACACTCCAATCGGTGATGGTCCTG	r,
TTCTGCTGCCAGACAATCACTATCTGAGCACGCAAAGCGTTCTGTCTAAAGATCCGAACGAG	,
AAACGCGATCATATGGTTCTGCTGGAGTTCGTAACCGCAG PstI	
CGGGCATCACGCATGGTATGGATGAACTGTACAAAGGCGGCT <u>CTGCA^G</u> AAGGTGATGACCC	7
GGCTAAAGCTGCTTTTGACTCTCTTCAGGCTTCTGCTACTGAATACATCGGCTACGCTTGGG	L L
CTATGGTGGTTGTTATCGTTGGTGCTACTATTGGCATCAAACTTTTCAAAAAATTCACTTCI	С
AAAGCGTCTTAATG NheI	
AACTCAGATACCCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTT	
TCCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAA: promotor tac	
ATGAAAAAGTCTTTAGTTCTTAAAGCATCTGTTGCTGTTGCGACTCTTGTTCCTATGCTAAG	r n
CTTTGC: gen za nativni signalni peptid proteina pVIII	-
CGTAAATACAAA: gen za sfGFP	
GAAGGTGATGACCCCGCCTAAAGCTGCTTCTTGACTCTCTCAGGCTTCTGCTACTGAATACAT	п

Aminokislinsko zaporedje fuzijskega proteina ss-sfGFP-pVIII:

MKKSLVLKASVAVATLVPMLSFARKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNG KLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKD DGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNSHNVYITADKQKNGIKAN FKIRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSVLSKDPNEKRDHMVLLEFVTA AGITHGMDELYKGGSAEGDDPAKAAFDSLQASATEYIGYAWAMVVVIVGATIGIKLFKKFTS KAS

Nukleotidno zaporedje pomožnega bakteriofaga f88-4/TorA-sfGFP med restrikcijskima mestoma *Xho*I in *Nhe*I. Podčrtana so restrikcijska mesta (zaporedja, ki jih prepoznajo restrikcijske endonukleaze). Barve označujejo pomembne dele zaporedja.

*Xho*I CTCGA^GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATG TTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGA **ATTCACCCAGGAGGTAACAAGATGGCCAATAACGATCTCTTTCAGGCATCACGTCGGCGTTT** TCTGGCACAACTCGGCGGCTTAACCGTCGCCGGGATGCTGGGGCCGTCATTGTTAACGCCGC *Hind*III GACGTGCGACTGCGGCGAAGCGGCA^AGCTTTGCCCCGTAAAGGCGAAGAGCTGTTCACTGG GCGAGGGTGAAGGTGACGCAACTAATGGTAAACTGACGCTGAAGTTCATCTGTACTACTGGT AAACTGCCGGTACCTTGGCCGACTCTGGTAACGACGCTGACTTATGGTGTTCAGTGCTTTGC TCGTTATCCGGACCATATGAAGCAGCATGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGGAAGGCTATG TGCAGGAACGCACGATTTCCTTTAAGGATGACGGCACGTACAAAACGCGTGCGGAAGTGAAA TTTGAAGGCGATACCCTGGTAAACCGCATTGAGCTGAAAGGCATTGACTTTAAAGAAGACGG CAATATCCTGGGCCATAAGCTGGAATACAATTTTAACAGCCACAATGTTTACATCACCGCCG ATAAACAAAAAATGGCATTAAAGCGAATTTTAAAATTCGCCACAACGTGGAGGATGGCAGC GTGCAGCTGGCTGATCACTACCAGCAAAACACTCCAATCGGTGATGGTCCTGTTCTGCTGCC AGACAATCACTATCTGAGCACGCAAAGCGTTCTGTCTAAAGATCCGAACGAGAAACGCGAT CATATGGTTCTGCTGGAGTTCGTAACCGCAGCGGGCATCACGCATGGTATGGATG PstI AACTGTACAAAGGCGGCTCTGCA^GAAGGTGATGACCCGGCTAAAGCTGCTTTTGACTCTCT TCAGGCTTCTGCTACTGAATACATCGGCTACGCTTGGGCTATGGTGGTTGTTATCGTTGGTG CTACTATTGGCATCAAACTTTTCAAAAAATTCACTTCTAAAGCGTCT NheI CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATA: promotor P_{lac} ATGGCCAATAACGATCTCTTTCAGGCATCACGTCGGCGTTTTCTGGCACAACTCGGCGGCTT AACCGTCGCCGGGATGCTGGGGCCGTCATTGTTAACGCCGCGACGTGCGACTGCGGCGCAAG **CGGCA**: genski zapis za signalno zaporedje *TorA* CGTAAA...GTACAAA: genski zapis za sfGFP CCTGCAGAAGGTGATGACCCGGCTAAAGCTGCTTTTGACTCTCTTCAGGCTTCTGCTACTGA ATACATCGGCTACGCTTGGGCTATGGTGGTTGTTATCGTTGGTGCTACTATTGGCATCAAAC TTTTCAAAAATTCACTTCTAAAGCGTCT: genski zapis za zreli rekombinantni pVIII

Aminokislinsko zaporedje fuzijskega proteinaTorA-sfGFP-pVIII:

MANNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRATAAQAASFARKGEELFTGVVPILVE LDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFARYPDHMK QHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKL EYNFNSHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLST QSVLSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYKGGSAEGDDPAKAAFDSLQASATEYIGY AWAMVVVIVGATIGIKLFKKFTSKAS--TQIPSPPNERAFF-AS

Usedline po centrifugiranju bakterijskih kultur, obsevane s svetlobo UV valovne dolžine 366 nm. V bakterijskih kulturah smo gojili bakteriofage M13/3L5/sfGFP s pomočjo pomožnega bakteriofaga f88-4/TorA-sfGFP pri pogojih od a do f, ki jih prikazuje preglednica III.



Fotografije, ki smo jih posneli s fluorescenčnim mikroskopom z nastavitvami 1 (preglednica II). Fotografije v zgornji vrsti prikazujejo presvetljene vzorce in v spodnji vrsti fluorescenco vzorcev. Razdelki prikazujejo bakterije *E. coli* seva ER2738 (neokužene z oznako 0) in seva TG1Tr s fagmidom pIT/*anti-BSA scFv*, ki smo jih nato uporabili za pripravo bakteriofagov M13/anti-BSA s pomožnim bakteriofagom KM13, M13/anti-BSA/sfGFP s pomožnim bakteriofagom f88-4/sfGFP in M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP s pomožnim bakteriofagom f88-4/sfGFP.



Intenziteta vzdolž bakterijske celice (dolžina bakterije – razdalja v slikovnih točkah) pri nastavitvah 1 (preglednica II). Predstavljena je intenziteta fluorescence bakterijskih celic *E. coli* seva ER2738 (neokužene z oznako 0) in seva TG1Tr, v katerih smo pomnoževali bakteriofage M13/anti-BSA s pomožnim bakteriofagom KM13, M13/anti-BSA/sfGFP s pomožnim bakteriofagom f88-4/sfGFP in M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP s pomožnim bakteriofagom f88-4/TorA-sfGFP.



Oborjeni bakteriofagi M13/3L5/(TorA-)sfGFP pod svetlobo UV valovne dolžine 366 nm. Bakteriofage smo gojili pod pogoji od a do f, ki jih prikazuje preglednica III.



Rezultati testa ELISA, ki prikazujejo vezavo bakteriofagov M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP, pripravljenih pri različnih pogojih indukcije izražanja rekombinantnih genov. Titra bakteriofagov nismo uskladili. V vdolbinice smo kot tarčo vezali goveji serumski albumin (BSA), za negativno kontrolo pa smo vdolbinice blokirali z mlekom. Za pozitivno kontrolo smo uporabili bakteriofage M13/anti-BSA. Detekcijo smo izvedli s protitelesi anti-M13-HRP. Absorbanco (A) smo izmerili pri valovni dolžini 450 nm.



Rezultati testa ELISA: vezavo bakteriofagov M13/3L5/(TorA-)sfGFP pri različnih pogojih indukcije izražanja rekombinantnih genov. Titra bakteriofagov nismo uskladili. V vdolbinice smo kot tarčo vezali humani leptinski receptor (hLR), za negativno kontrolo pa smo v vdolbinice vezali BSA. Detekcijo smo izvedli s protitelesi anti-M13-HRP. Absorbanco (A) smo izmerili pri valovni dolžini 450 nm.



Fotografije, ki smo jih naredili s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa z nastavitvami 4 (preglednica II). Fotografije v zgornji vrsti prikazujejo presvetljene vzorce in v spodnji vrsti fluorescenco vzorcev. Slika prikazuje sefarozne delce z vezanim BSA, ki smo jih inkubirali v prisotnosti bakteriofagov M13/anti-BSA in bakteriofagov M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP ter blokirane sefarozne delce brez BSA, inkubirane v prisotnosti bakteriofagov M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP.



Intenziteta fluorescence po premeru sefaroznega delca v prikazani ravnini (slika 13) z nastavitvami 4 (preglednica II). Predstavljeni so podatki za posamezen sefarozni delec z vezanim BSA, ki smo ga inkubirali v prisotnosti bakteriofagov M13/anti-BSA in M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP ter blokiran sefarozni delec brez BSA, ki smo ga inkubirali v prisotnosti bakteriofagov M13/anti-BSA/(TorA-)sfGFP.

