

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA RADIN

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA RADIN

**VREDNOTENJE SPOSOBNOSTI VEZAVE PEPTIDOV, IZOLIRANIH IZ
BAKTERIOFAGNIH PEPTIDNOPREDSTAVITVENIH KNJIŽNIC, NA
POLISTIREN**

**ASSESSMENT OF BINDING ABILITY OF PEPTIDES, ISOLATED FROM PHAGE-
DISPLAYED PEPTIDE LIBRARIES, ON POLYSTYRENE**

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča. Določitev nukleotidnih zaporedij DNA molekul je opravilo podjetje Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Nemčija.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju doc. dr. Tomažu Bratkoviču za možnost opravljanja magistrskega dela na področju farmacevtske biotehnologije, deljeno znanje, strokovnost in usmerjanje pri delu. Posebna zahvala gre Mihi Vodniku za potrpežljivost, dostopnost in pomoč tekom nastajanja magistrske naloge. Hvala tudi članici komisije doc. dr. Nataši Karas Kuželički, ki me je opozorila na neustreznost t-testa pri statistični obdelavi.

Zahvalila bi se rada tudi svoji družini, še posebej staršem, ki so mi omogočili študij in mi stali ob strani v vseh lepih in slabih trenutkih. Hvala tudi Laurensu, za moralno podporo in razumevanje med nastajanjem tega dela

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča, mag. farm.

Ljubljana, 2013

Predsednica magistrske komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Članica magistrske komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički

KAZALO

POVZETEK	I
ABSTRACT.....	II
SEZNAM OKRAJŠAV.....	III
KRATICE IN OKRAJŠAVE ZA AMINOKISLINE.....	IV
1. UVOD.....	1
1.1 IMOBILIZACIJA PROTEINOV NA TRDNE NOSILCE.....	1
1.2 POLISTIRENSKA POVRŠINA	2
1.2.1 Fizikalna imobilizacija	4
1.2.2 Kemijske metode imobilizacije	5
1.2.3 Uporaba genskega inženirstva pri imobilizaciji proteinov.....	7
1.3 AFINITETNI PODALJŠKI ZA VEZAVO NA POLISTIRENSKO POVRŠINO.....	9
1.3.1 Razvoj peptidov z afiniteto do polistirena	10
1.3.2 Znani peptidi z afiniteto do polistirena.....	11
1.3.3 Primeri uporabe afinitetnih podaljškov za vezavo na polistirensko površino	13
2. NAMEN NALOGE	15
3. MATERIALI	16
3.1 LABORATORIJSKA OPREMA	16
3.2 KEMIKALIJE	17
3.3 KOMPLETI, OLIGONUKLEOTIDI, OZNAČEVALCI IN REAGENTI.....	18
3.4 GOJIŠČA, PUFRI IN RAZTOPINE.....	20
3.5 BIOLOŠKI MATERIAL	25
4. METODE.....	27
4.1 NACEPITEV BAKTERIJ NA TRDNO GOJIŠČE IN PRIPRAVA BAKTERIJSKIH KULTUR.....	27
4.1.1 Nacepitev bakterij na agarno gojišče LB	27
4.1.2 Priprava prekončne bakterijske kulture	27
4.1.3 Priprava bakterijske kulture <i>E. coli</i> ER2738 za pomnoževanje bakteriofagov	27
4.2 POMNOŽEVANJE IN IZOLACIJA BAKTERIOFAGOV M13.....	27
4.3 TITRIRANJE BAKTERIOFAGOV.....	28
4.4 OCENA AFINITETE POSAMEZNIH BAKTERIOFAGNIH KLONOV DO POLISTIRENA S TESTOM ELISA	28
4.4.1 Relativna primerjava afinitete bakteriofagnih klonov do polistirena	28
4.4.2 Statistična analiza rezultatov.....	29
4.5 VPLIV POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI IN SOLI V PUFRU ZA SPIRANJE NA VEZAVO BAKTERIOFAGOV NA POLISTIREN	29
4.6 VPLIV SPIRANJA S KISLIM PUFROM NA VEZAVO BAKTERIOFAGOV NA POLISTIREN	30
4.7 VEZAVA BAKTERIOFAGOV NA RAZLIČNE POLISTIRENSKE POVRŠINE	30
4.8 VPLIV BLOKIRANJA NA VEZAVO BAKTERIOFAGOV	30
4.9 UVEDBA RESTRIKCIJSKEGA MESTA ZA <i>SacII</i> V PLAZMID pET-28A/B-SPA S TEHNIKO PCR S PREKRIVAJOČIMI ZAPOREDJI (OVERLAP-EXTENSION PCR).....	31
4.9.1 Uvedba restriksijskega mesta za <i>SacII</i>	31
4.9.2 Agarozna gelska elektroforeza produktov reakcij PCR.....	32
4.9.3 Izolacija amplikonov iz agaroznega gela	33
4.9.4 Ligacija amplikona C v vektor pGEM-T Easy.....	33
4.9.5 Transformacija kompetentnih bakterijskih celic <i>E. coli</i> TOP10 z ligacijsko zmesjo	33
4.9.6 Izolacija plazmida iz prekončne kulture <i>E. coli</i> TOP10	34

4.9.7	<i>Pomnoževanje gena</i>	35
4.9.8	<i>Restrikcija plazmidov pGem-T Easy/C in pET-28/B-SpA</i>	35
4.9.9	<i>Agarozna gelska elektroforeza restriksijske zmesi</i>	36
4.9.10	<i>Izolacija rezanega plazmida pET-28a in iz pGEM-T Easy/C izrezanega inserta C iz agaroznega gela</i>	36
4.9.11	<i>Ligacija inserta C v vektor pET-28a</i>	36
4.9.12	<i>Transformacija kompetentnih bakterijskih celic E. coli DH5-α z ligacijsko zmesjo</i>	36
4.9.13	<i>Izolacija plazmida pET-28a/C iz prekonočne kulture E. coli DH5-α</i>	36
4.10	PRIPRAVA GENSKIH KONSTRUKTOV ZA IZRAŽANJE S PEPTIDI OZNAČENIH B-DOMENO PROTEINA A	37
4.10.1	<i>Restrikcija plazmida pET-28a/C</i>	37
4.10.2	<i>Agarozna gelska elektroforeza restriksijske zmesi</i>	38
4.10.3	<i>Izolacija rezanega plazmida pET-28a/C iz agaroznega gela</i>	38
4.10.4	<i>Ligacija insertov 5, 6 in 10 v vektor pET-28a/C</i>	38
4.10.5	<i>Pomnoževanje gena</i>	38
4.10.6	<i>Transformacija kompetentnih bakterijskih celic E. coli DH5-α z ligacijsko zmesjo</i>	38
4.10.7	<i>Izolacija plazmida pET-28a/C+insert iz prekonočne kulture E. coli DH5α</i>	39
4.10.8	<i>Transformacija kompetentnih bakterijskih celic E. coli BL21 s plazmidom izoliranim iz E. coli DH5α</i>	39
4.11	TESTNO IZRAŽANJE REKOMBINANTNEGA FUZIJSKEGA PROTEINA PEPTID 3-B-SPA	39
4.12	POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI SDS (SDS PAGE)	40
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	41
5.1	PRIMERJAVA VEZAVE BAKTERIOFAGNIH KLONOV N1-10 IN N1-6 NA POLISTIREN	41
5.2	KVALITATIVNA OCENA AFINITETE BAKTERIOFAGNIH KLONOV DO POLISTIRENA	42
5.3	VPLIV SPIRANJA Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI POVRŠINSKO AKTIVNE SNOVI IN SOLI NA VEZAVO BAKTERIOFAGOV NA POLISTIREN	45
5.4	VPLIV SPIRANJA S KISLIM PUFROM NA VEZAVO BAKTERIOFAGOV NA POLISTIREN	46
5.5	PRIMERJAVA VEZAVE NA RAZLIČNE MIKROTITRSKE PLOŠČICE	47
5.6	UVEDBA RESTRIKCIJSKEGA MESTA ZA SACII V PLAZMID pET-28A/B-DOMENA S TEHNIKO PCR S PREKRIVAJOČIMI ZAPOREDJI (ANG. OVERLAP-EXTENSION PCR)	49
5.7	PRIPRAVA GENSKIH KONSTRUKTOV ZA IZRAŽANJE S PEPTIDI OZNAČENIH B-DOMEN PROTEINA A	53
5.8	TESTNO IZRAŽANJE FUZIJSKIH PROTEINOV V E. COLI	57
6.	SKLEP	59
7.	LITERATURA	61

POVZETEK

Plastične nosilce kot podlago uporabljamo pri številnih proteomskih analizah, ki so ključne pri odkrivanju funkcije in razumevanju delovanja proteinov. Učinkovitost testa na trdnem nosilcu pogojuje mestno-specifična imobilizacija proteina v nativni konformaciji in z ohranjeno biološko aktivnostjo. Za imobilizacijo proteinov na podlago so danes v rabi številne metode, ki temeljijo na fizikalnih, kemijskih ali bioloških interakcijah. Ker pa te niso brez pomanjkljivosti, stremimo k razvoju novih imobilizacijskih metod. Ena izmed obetavnih možnosti je uporaba polistiren-vezočih peptidov, ki se zaradi svoje afinitete do polistirena, pogosto pojavijo kot lažno pozitivni rezultati afinitetnih selekcij na različnih tarčah. Z uporabo le-teh kot afinitetnih podaljškov bi dosegli mestno-specifično imobilizacijo na neobdelano polistirensko površino.

V okviru magistrske naloge smo primerjali vezavne afinitete peptidov, izoliranih iz bakteriofagnih peptidopredstavitvenih knjižnic, na polistiren. Pokazali smo, da se peptid HWGMWSY (klon N1-10), ki je bil v literaturi omenjen kot ligand za različne tarče, veže na polistiren primerljivo kot znani ligand polistirena WHWRLPS (klon N1-6). Izključili smo možnost vezave na blokirno sredstvo (posneto mleko, BSA) in zavrgli verjetnost, da se na polistiren veže sam bakteriofagni delec.

Z relativno primerjavo afinitet sedmih bakteriofagnih klonov smo poleg klonov N1-6 in N1-10 kot vezalec polistirena identificirali še peptid HSWLWWP (klon N1-5). Kljub temu da omenjeni trije peptidi vsebujejo več triptofanskih aminokislinskih ostankov ter motiv WXXW (kjer je X katerakoli aminokislina), ki sta značilnosti polistiren-vezočih peptidov, jih ti lastnosti ne razlikujeta od ostalih testiranih peptidov. Kaj je ključna lastnost, ki vpliva na vezavo na polistiren, nismo odkrili. V nadaljnjih testih ELISA smo ovrednotili vpliv različnih metod spiranja na obseg vezave klonov N1-5, N1-6 in N1-10 na polistiren. Rezultati so pokazali, da so se testirani kloni v vseh primerih boljše vezali na polistiren kot kontrolni kloni. Ko smo proučili obseg vezave na različne mikrotitrne ploščice (MaxiSorp, PolySorp, EIA/RIA in ploščice za celične kulture) je bila vezava najmanjša na močno hidrofobni površini PolySorp ploščic, vezava na ostale tri ploščice pa se je le malo razlikovala.

Da bi proučili možnost uporabe peptidov predstavljenih na klonih N1-5, N1-6 in N1-10 kot afinitetnih podaljškov za vezavo modelnega proteina (domene B stafilokoknega proteina A (B-SpA)) na polistiren, smo pripravili genski konstrukt z zapisom za s polistiren-vezočim peptidom označeno B-SpA. Poskus izražanja fuzijskega proteina je bil neuspešen.

ABSTRACT

Plastic surfaces are used in various microplate-based techniques for proteome analyses, which are crucial for identifying and understanding the role of numerous proteins. The efficiency of solid support assays is based on site-specific immobilization of proteins with preserved biological function. Methods in use for immobilization of proteins on solid surfaces utilize physical, chemical and biological interactions. Their drawbacks, however, motivate the development of new immobilization methods. The use of polystyrene-binding peptides first isolated as target unrelated peptides in selections on different targets, as affinity tags, holds high potential as a method for protein immobilization to unmodified polystyrene surface.

In the context of our work we compared the binding affinities of peptides, isolated from phage display libraries, on polystyrene. We have shown that the polystyrene binding capability of peptide HWGMWSY (clone N1-10) which has been isolated in selections on different targets, is the same as the binding of a previously confirmed plastic binder WHWRLPS (clone N1-6). We excluded the possibility of binding on blocking reagents (skimmed milk, BSA) and the binding of the bacteriophage particle itself.

After comparing the relative binding affinities of seven bacteriophage clones, we identified, in addition to N1-6 and N1-10, a new plastic binder HSWLWWP (clone N1-5). All three plastic-binding peptides are rich in tryptophane residues and two contain the amino acid motif WXXW (in which X represents any amino acid), both of which are characteristic of plastic binders. However, the same features were present in other peptides as well. Which characteristic is essential for binding to polystyrene remains an open question for further research. In further tests we compared the effect of different washing conditions on the binding of clones N1-5, N1-6 and N1-10 to polystyrene. The results have shown that the binding of tested clones on polystyrene was always higher than the binding of control clones. Additionally, we also compared the extent of binding on different microtiter wells (MaxiSorp, PolySorp, EIA/RIA and tissue culture plates). Binding was lowest onto hydrophobic surface of PolySorp microtiter wells, the extent of binding on the remaining three surfaces differed only scarcely.

To test the possible use of peptides N1-5, N1-6 and N1-10 as affinity tags for binding a model protein (B domain of staphylococcal protein A (B-SpA)) on polystyrene, we designed and cloned a gene construct encoding the B-SpA tagged with polystyrene-binding peptides. However, the attempt to express the fusion protein was unsuccessful.

SEZNAM OKRAJŠAV

BSA	goveji serumski albumin (ang. <i>bovine serum albumin</i>)
B-SpA	domena B stafilokoknega proteina A
Da	dalton, enota za relativno molekulsko maso
ddH ₂ O	ultra čista voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimskoimunski test (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
HRP	hrenova peroksidaza (ang. <i>horseradish peroxidase</i>)
IPTG	izopropil-tio-β-D-galaktopiranozid, induktor gena za β-galaktozidazo
(k)bp	(kilo)bazni par, enota za velikost DNA
LB	bakterijsko gojišče (ang. <i>lysogeny broth</i>)
mAb	monoklonsko protitelo
OD ₆₀₀	optična gostota pri 600 nm (ang. <i>optical density</i>)
PBS	fosfatni pufer s soljo (ang. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PBST	fosfatni pufer s soljo z dodanim polisorbatom-2 (Tween [®] 20)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	polietilenglikol
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
U	enota za aktivnost encima, ustreza hidrolizi 1 μmol substrata/min
vt./min	število vrtljajev na minuto
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid, substrat za β-galaktozidazo

KRATICE IN OKRAJŠAVE ZA AMINOKISLINE

A	Ala	alanin
R	Arg	arginin
N	Asn	asparagin
D	Asp	asparaginska kislina
C	Cys	cistein
Q	Gln	glutamin
E	Glu	glutaminska kislina
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
L	Leu	levcin
K	Lys	lizin
M	Met	metionin
F	Phe	fenilalanin
P	Pro	prolin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
W	Trp	triptofan
Y	Tyr	tirozin
V	Val	valin

1. UVOD

1.1 Imobilizacija proteinov na trdne nosilce

Projekt »Človeški genom« (ang. *Human Genome Project*) je z objavo nukleotidnega zaporedja človeškega genoma postavil temelje za razvoj novih vej znanosti. Ocenjujejo, da se v človeškem genomu nahaja okoli 23000 genov, ki se s prepisovanjem DNA in prevajanjem mRNA izrazijo v veliko večje število proteinov (1). Proteomika je polje raziskav, ki se ukvarjajo s karakterizacijo v genomu kodiranih proteinov. Naloge proteomike so, da razvrsti in karakterizira vse proteine, ki so kodirani v DNA, prouči regulacijo in raven izražanja proteinov, določi strukturo vsakega posameznega proteina, prouči njihove interakcije z drugimi proteini in biomolekulami ter za vsak protein ugotovi njegovo vlogo (2).

Za potrebe proteomske analize je bilo razvitih veliko tehnik, med katerimi številne vključujejo uporabo mikronosilcev, mikroploščic in mikročipov. Za učinkovitost analitskih sistemov na trdnih nosilcih je nujno potrebna mestno-specifična imobilizacija proteina (3). Imobilizacija je pritrditev tarčnih molekul na podlago (4), ki pa lahko privede tudi do neželene izgube biološke aktivnosti imobilizirane molekule. Pri encimih lahko pride do zmanjšane katalitične aktivnosti, v primeru protiteles pa do zmanjšane spobnosti vezave antigena. Izguba biološke aktivnosti je lahko posledica denaturacije proteina zaradi fizikalnih ali kemijskih dejavnikov, ki jim je med postopkom imobilizacije protein podvržen (4, 5). Za izgubo aktivnosti pa so lahko krive tudi spremembe v mikrookolju, ki nastanejo zaradi interakcije med proteinom in površino (4).

Uspešnost imobilizacije poleg metode in lastnosti proteina pogojujejo tudi lastnosti same podlage. Površina idealne podlage je inertna, preprečuje nespecifično adsorbcijo in vsebuje enakomerno porazdeljene funkcionalne skupine, preko katerih poteka imobilizacija, kar zagotavlja selektivnost (na površino se veže le želena molekula brez ostalih komponent vzorca) in homogenost (imobilizirane molekule so vse enako usmerjene in enakomerno porazdeljene po podlagi) (6).

Obstaja splošna potreba po razvoju novih metod za imobilizacijo proteinov, ki bi omogočale pritrditev na podlago preko specifičnega mesta na proteinu in s tem pravilno orientacijo imobiliziranih molekul. Zaželeno je, da aminokislina ali del molekule, preko katerega poteka imobilizacija, nima oz. ima le majhen vpliv na biološki učinek proteina, saj to omogoča ohranitev njegove biološke funkcije (4).

Za imobilizacijo proteinov najpogosteje uporabljamo plastične nosilce, v glavnem iz polistirena. Uporabljamo jih pri imunokemijskih testih (npr. encimskoimunski test (ELISA)), pri presejanju bakteriofagnih predstavitev knjižnic, itd. (7).

1.2 Polistirenska površina

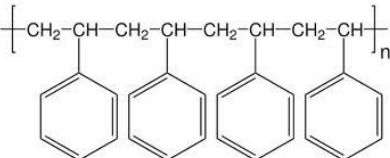
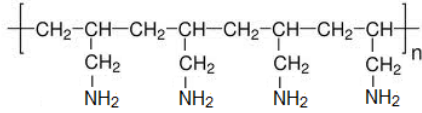
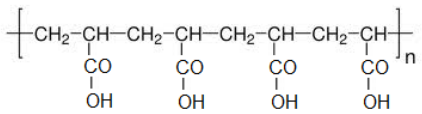
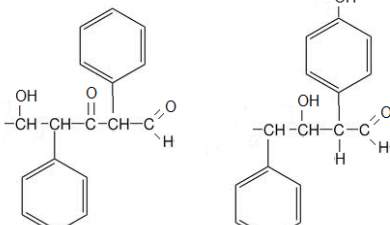
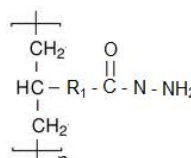
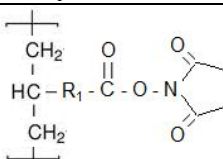
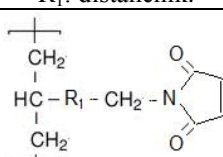
Polistiren je sintetični polimer stirena in je odličen material za proizvodnjo mikrotitrskih ploščic. Enostavno se oblikuje, proteini se nanj zlahka adsorbirajo, hkrati pa je odporen proti večini kemikalij. Ima odlične optične lastnosti, je brezbarven in enotne sestave, zato sta absorbanca in fluorescenca ozadja v spektroskopskih analizah nizki (8).

Naravna, neobdelana polistirenska površina je zaradi aromatskih benzenovih obročev hidrofobna in lahko veže proteine le preko hidrofobnih interakcij. Primerna je za vezavo večjih proteinskih molekul (> 20 kDa), kot so na primer protitelesa, ki imajo večja hidrofobna področja, s katerimi lahko vstopajo v interakcije s površino. Z različno obdelavo lahko polistirensko površino modificiramo in s tem omogočimo vezavo širšega nabora proteinov (preglednica I) (9).

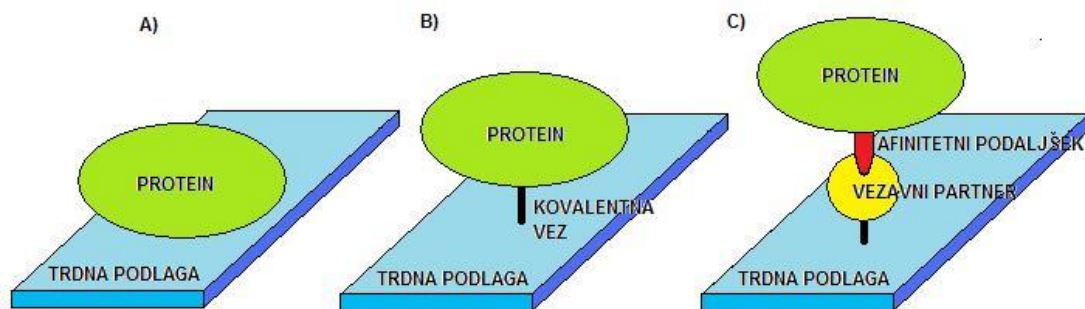
Hidrofobno površino s karboksilnimi skupinami, s katerimi proteini tvorijo ionske interakcije, dobimo po obsevanju z γ -žarki. Tako obdelana površina omogoča vezavo srednje velikih (> 10 kDa) in velikih proteinov s kationskimi skupinami in hidrofobnimi področji. Če na površino namesto aromatskega benzenovega obroča uvedemo pozitivno nabite aminske skupine, lahko z uporabo pufrov z ustreznim pH nanjo z ionskimi interakcijami vežemo manjše negativno nabite proteine. Ker površina ni več hidrofobna, je imobilizacija večjih hidrofobnih molekul onemogočena. Tako površino lahko uporabljamo tudi za kovalentno vezavo proteinov z različnimi funkcionalnimi skupinami (primarna aminska, tiolna in karboksilna skupina) preko bifunkcionalnih povezovalnih molekul (glutaraldehyd, karboimid) (9).

Proizvajalci mikrotitrskih ploščic so razvili številne metode, s katerimi lahko na površino polistirena kovalentno vežejo različne funkcionalne skupine. Nekaj od teh je prikazanih v preglednici I. Na tržišču je na voljo širok razpon podlag, od katerih pa so omenjene le nekatere.

Preglednica I: Vrste polistirenskih površin. Povzeto po (8, 9, 10).

<i>Struktura</i>	<i>Modifikacija površine</i>
	neobdelan hidrofoben polistiren.
	aminiran polistiren
	polistiren, na katerega so z γ -sevanjem vnesene karboksilne skupine
	površina, obdelana s pomočjo razelektritve plazme (v reaktivnem plinu)
 <p>R_1: distančnik.</p>	polistiren s površinskimi hidrazidnimi skupinami (primeren za vezavo biomolekul s karboksilno skupino)
 <p>R_1: distančnik.</p>	polistiren s površinskimi N-oksicukcinimidnimi skupinami (primeren za vezavo biomolekul z amsko skupino)
 <p>R_1: distančnik</p>	polistiren s površinskimi maleimidnimi skupinami (primeren za vezavo biomolekul s tiolno skupino)

Danes poznamo več metod za imobilizacijo proteinov in jih v grobem delimo na fizikalne ter kemične metode in metode, ki vključujejo uporabo genskega inženiringa (slika 1).



Slika 1: Načini imobilizacije proteinov. A) Direktna adsorpcija, B) Kemijska vezava - med podlago in proteinom se tvori kovalentna vez, C) Imobilizacija preko afinitetnega podaljška, ki se veže na imobiliziran vezavni partner.

1.2.1 Fizikalna imobilizacija

Najenostavnejša in najcenejša metoda imobilizacije je direktna adsorpcija proteina na plastično površino. Adsorpcijo omogočajo različne interakcije, ki se tvorijo med proteinom in polistirensko površino. Šibke van der Waalove vezi nastanejo zaradi neenakomerne razporeditve in gibanja elektronov v molekulah. Tvorijo se med molekulami s stalnimi ali induciranimi začasnimi dipoli, ki so posledica gibanja elektronov. Lahko se pojavijo med katerimakoli atomoma, ki sta v neposredni bližini (2). Elektrostatske interakcije se tvorijo med skupinami z nabojem, delujejo pa lahko tudi med nabojem in nevtralnimi skupinami (11). Hidrofobne interakcije s površino pa lahko nastanejo kadar so v molekuli proteina prisotna hidrofobna področja. Do privlačnih interakcij pride, ker v polarnih topilih (voda) hidrofobna področja težijo k združitvi zaradi t.i. hidrofobnega efekta (4,5).

Stopnja adsorpcije je odvisna od lastnosti proteina in površine ter pogojev adsorpcije. Proteini se najpogosteje na trdno površino adsorbirajo z naključno orientacijo in so nagnjeni h konformacijskim spremembam, zaradi česar postanejo funkcionalna mesta nedostopna za molekule, ki interagirajo z imobiliziranim proteinom (12). Ena ključnih lastnosti, ki vpliva na stopnjo adsorpcije je aminokislinska sestava (5). Prisotnost hidrofobnih ali hidrofilnih aminokislinskih ostankov v molekuli lahko, glede na lastnost podlage, vezavo izboljša ali oteži. Podobno velja tudi za aminokislinske ostanke z nabojem, ki omogočajo tvorbo elektrostatskih interakcij. V primeru nasprotno nabite površine in proteina je vezava močnejša, če ima površina enak naboj kot protein, pa je vezava otežena.

Aminokislinska sestava na adsorpcijo proteinov vpliva tudi posredno, saj primarna zgradba določa strukturo in stabilnost proteina. Vodikove vezi, ki se tvorijo med polarnimi aminokisljinami v strukturi, so pomembne pri oblikovanju sekundarne strukture. Terciarno strukturo proteina pa stabilizira več različnih interakcij. Med najpomembnejšimi so hidrofobne interakcije med nepolarnimi stranskimi verigami proteina, ki so navadno v

notranjosti proteina. Pri nekaterih proteinih so v strukturi poleg nekovalentnih interakcij prisotne tudi kovalentne disulfidne vezi, ki povezujejo med seboj sicer bolj oddaljene cisteinske ostanke v polipeptidni verigi (2,11). Če je protein močno stabiliziran, bo adsorpcija le-tega manjša, saj težje pride do spremembe konformacije in nepolarnih interakcij s površino. Hitreje in bolje se adsorbirajo proteini, ki so zaradi manj stabilne strukture bolj podvrženi konformacijskim spremembam (5,11). Velikost ni najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na vezavo. Kljub temu pa se večji proteini prej adsorbirajo na površino, razlog za to je predvsem večje število vezavnih mest na proteinu (5).

Fizikalna adsorpcija je enostavna in cenovno ugodna metoda, a ni brez slabosti. Protein med procesom adsorpcije zaradi konformacijskih sprememb pogosto denaturira, kar vodi v izgubo biološke aktivnosti adsorbiranega proteina. Molekula proteina je na površino velikokrat pripeta preko več točk, s čimer je onemogočena njena gibljivost. Fizikalna adsorpcija ni mestno-specifična, zato imobiliziran protein v mnogih primerih ni pravilno usmerjen. Nepravilna orientacija pa lahko povzroči, da aktivno mesto ni dostopno za ligande. Možno je tudi odpuščanje adsorbiranih molekul s površine nosilca (13). Problem predstavlja tudi nespecifičnost metode, saj se lahko iz vzorca adsorbirajo tudi neželene molekule. Vse te lastnosti so velikokrat razlog za izbiro druge imobilizacijske metode.

1.2.2 Kemijske metode imobilizacije

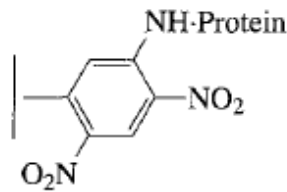
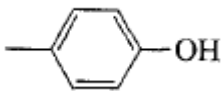
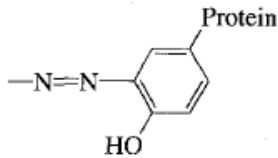
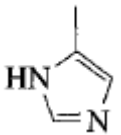
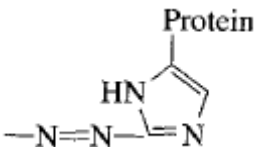
Pripenjanje proteinov na površino s kemijskimi metodami temelji na tvorbi močnih kovalentnih ali koordinacijskih vezi med proteinom in površino (4). Kemijsko sklapljanje zahteva ostrejša reakcijska pogoja za pripenjanje proteinov kot direktna adsorpcija, kar pa lahko vodi v signifikantno izgubo aktivnosti. Še dodatno k temu prispevajo kovalentne in koordinacijske vezi, ki se tvorijo med proteinom in površino, saj pogosto spremenijo konformacijo proteina.

Za imobilizacijo proteinov najpogosteje izkoriščamo lizinske ostanke, ki se ponavadi nahajajo na zunanji strani proteina in katerih aminske skupine so dobri nukleofili. V številnih proteinih se nahaja več lizinskih ostankov, kar pomeni, da se lahko protein s površino poveže na več mestih, kar omeji konformacijsko fleksibilnost proteina. Zmanjšana gibljivost pa je lahko vzrok za zmanjšano aktivnost. Prisotnost več vezavnih mest na proteinu predstavlja verjetnost, da bo populacija imobiliziranih molekul precej heterogena (4, 14), saj so molekule lahko na površino pripete preko različnih mest in so zato različno orientirane.

Drug aminokislinski ostanek, ki ga pogosto uporabljamo za sklapljanje proteina na površino, je cistein. Cistein ima tiolno skupino in lahko tvori disulfidne vezi. Proste tiolne skupine

cisteina lahko uporabimo za vezavo na podlago. Cistein je bolj primeren za mestno-specifično imobilizacijo proteinov kot lizin, saj je pogostost pojavljanja cisteina v proteinih bistveno manjša kot lizina (4). Za kemijsko sklapljanje pa lahko izkoriščamo tudi fenolni obroč tirozina in imidazolni obroč histidina, ki vstopata v reakcijo diazotiranja (preglednica II).

Preglednica II: Aminokislina udeležene pri kovalentni vezavi na površino in način vezave. Povzeto po (4).

<i>Aminokislina</i>	<i>Reaktivna skupina</i>	<i>Reakcija</i>	<i>Produkt</i>
ε-amino skupina Lys in N-končna amino skupina	- NH ₂	Diazotiranje Tvorba peptidne vezi Arlacija Alkiliranje Tvorba Shiffove baze Amidiniranje	—N=N—Protein $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—C—NH—Protein} \end{array}$  $\text{—CH}_2\text{—NH—Protein}$ —CH=N—Protein $\begin{array}{c} \text{NH}_2^+ \\ \parallel \\ \text{—C—NH—Protein} \end{array}$
Cys, tiolna skupina	- SH	Alkiliranje Tvorba sulfidne vezi Tvorba vezi z živim srebrom	—CH ₂ —S—Protein —S—S—Protein —Hg—S—Protein
Karboksilna skupina aspartata in glutamata in C-končna karboksilna skupina	- COOH	Tvorba peptidne vezi	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—NH—C—Protein} \end{array}$
Fenolna skupina Tyr		Diazotiranje	
Imidazolni obroč His		Diazotiranje	

Med kemijskimi metodami imobilizacije je potrebno omeniti še biotiniziranje. To je postopek pripenjanja biotina na proteine in druge makromolekule. Proteine označene z biotinom lahko enostavno imobiliziramo na površino prekrito z avidinom ali streptavidinom. Interakcija med biotinom in avidinom je izredno močna in odporna na skrajne vrednosti pH, visoko temperaturo, organska topila in denaturirajoče reagente. Kemično biotiniziranje najpogosteje izvajamo na aaminskih skupinah lizina. Pri tem uporabljamo N-hidroksisukcinimidne estre (NHS-estre), ki s primarnimi aaminskimi skupinami tvorijo stabilno vez. Ti so brez naboja zato jih je pred uporabo najprej potrebno raztopiti v organskem topilu ter jih nato počasi dodajati v vodno raztopino vzorca. Ker so NHS-estri netopni v vodi, so v uporabi tudi sulfo-NHS-estri, s katerimi lahko biotiniziramo proteine v vodnih raztopinah. Tetrafluorofenilne estre pa uporabljamo pri bolj alkalnem pH, hkrati pa so bolj odporni proti hidrolizi v vodnih raztopinah (15). Slabost te metode je heterogena populacija produktov, ki jih dobimo, saj ne moremo izbirati, katera aminska skupina v molekuli bo vstopala v reakcijo (4)

Kemijske metode imobilizacije nam omogočajo večji nadzor nad orientacijo imobiliziranega proteina, kar dosežemo na več načinov. S funkcionalizacijo tarčne molekule in/ali modifikacijo površine lahko imobiliziramo protein preko specifičnega mesta na proteinu na točno določeno lokacijo na površini. Mestno-specifična imobilizacija pa je mogoča tudi v primeru, ko ima protein le eno reaktivno aminokislino v strukturi. Funkcionalizacija v tem primeru ni potrebna. Slabosti kemijskih metod sklapljanja so že omenjena izguba biološke aktivnosti proteina, nespecifična imobilizacija v primeru več reaktivnih aminokislin na površini in v povezavi s tem tudi vezava preko več mest. Kljub temu, da so vezavna mesta na površini trdnega nosilca enakomerno razporejena, lahko pride do nehomogene razporeditve imobiliziranih molekul po podlagi, za kar so odgovorne morebitne nespecifične interakcije med proteinskimi molekulami. Kemijske metode so dražje, potrebna je funkcionalizacija površine in včasih samega proteina (4).

1.2.3 Uporaba genskega inženirstva pri imobilizaciji proteinov

V zadnjih letih pri imobilizaciji proteinov vse pogosteje uporabljamo tehnike genskega inženirstva. S pomočjo mestno-specifične mutageneze lahko v aminokislinsko zaporedje proteina vnesemo specifičen aminokislinski ostanek, preko katerega nato imobiliziramo protein. Najpogosteje je to vnos prostega cisteina, ki nato z imobilizacijsko površino tvori disulfidno vez. S tem dosežemo mestno specifično imobilizacijo brez izgube aktivnosti proteina. Ta pristop je najprimernejši za proteine, ki v svojem aminokislinskem zaporedju cisteina nimajo. Lahko pa ga uporabimo tudi na proteinih, ki v svoji strukturi cistein že imajo,

a ta ni udeležen v zagotavljanju biološke aktivnosti in ohranjanju strukture. V tem primeru native cisteine najprej zamenjamo z drugo aminokislino, nato pa uvedemo cistein na želeno mesto (4).

Drug pristop doseganja mestno-specifične imobilizacije z uporabo tehnik genskega inženirstva je uvedba afinitetnih podaljškov (ang. *affinity tags*) (4,12,16). Proteinu, ki ga želimo imobilizirati, na N- ali C-konec pripnemo peptid z afiniteto do neke tarčne molekule. Fuzijske proteine s pripetimi afinitetnimi podaljški dobimo z ligacijo DNA-zaporedij, ki kodirajo dodaten oligopeptid, na 5' ali 3' konec gena. Produkt izražanja takšnega genskega konstrukta je protein, ki ima na N- ali C- koncu pripet afinitetni podaljšek. Fuzijski protein lahko načrtujemo tudi tako, da je afinitetni podaljšek možno odcepiti z encimsko ali kemijsko reakcijo, kar nam omogoča kasnejšo izolacijo nativnega proteina (4). Uporaba afinitetnih podaljškov je pogosta v kromatografskih tehnikah, ki jih uporabljamo za izolacijo in čiščenje rekombinantnih proteinov. Poznamo pa tudi veliko imobilizacijskih metod, ki temeljijo na specifični vezavi imobiliziranega vezavnega partnerja in afinitetnega podaljška na proteinu.

Eden od pristopov, s katerim lahko dosežemo mestno-specifično imobilizacijo s pripravo proteinskih konstruktov, temelji na afiniteti biotina do avidina in streptavidina (12). Pri pripravi biotiniziranih konjugatov s kemijskimi metodami dobimo heterogeno populacijo produktov (4). Čiščenje in izolacija enotne populacije biotiniziranega produkta iz heterogenega nabora produktov sta težavna in dolgotrajna. Temu problemu se izognemo tako, da za pripenjanje biotina na specifično mesto na protein uporabimo tehnike genskega inženirstva (4). Primer je priprava fuzijskega proteina s peptidom, ki ga prepozna encim biotin holoencim sintaza. Le-ta na omenjeni peptid veže eno molekulo biotina, s čimer dobimo protein, na katerem je biotin pripet na točno določenem mestu (4, 17). Biotiniziran protein imobiliziramo na avidin, streptavidin ali monomerne avidinske podlage in s tem dosežemo mestno-specifično imobilizacijo. Nadgradnja tega sistema je uporaba afinitetnega podaljška Streptag II. Streptag je oktapeptid, WSHPQFEK, ki je bil razvit kot afinitetni podaljšek za čiščenje proteinov na streptavidinskih kolonah. Z visoko afiniteto se pri fizioloških pogojih veže na Strep-Tactin, streptavidin s specifičnimi mutacijami na mestih 44, 45 in 47, ki omogočajo večjo kapaciteto vezave (16).

Protein označen z afinitetnim podaljškom FLAG-tag (DYKDDDDK) lahko imobiliziramo na polistiren prekrit s proteinom A, na katerega je vezano monoklonsko protitelo, ki prepozna FLAG. Protein A prepozna regijo Fc imunoglobulinov in omogoča usmerjeno vezavo monoklonskih protiteles (12).

Za imobilizacijo lahko izkoriščamo tudi specifično vezavo glutation-S-transferaze (GST) na glutation. Specifično interakcijo med tema molekulama pogosto uporabljamo pri izolaciji fuzijskih proteinov z GST. Pred imobilizacijo je polistirensko površino najprej potrebno prekriti s plastjo proteinov, na katere kovalentno vežemo glutation, ki nato interagira z GST na fuzijskem proteinu (12).

Za imobilizacijo proteinov na druge podlage je bilo razvitih še več drugih afinitetnih podaljškov, kot sta na primer vezavna domena za hitin (ang. *chitin-binding domain*), ki omogoča vezavo na podlago iz hitina in domena za vezavo celuloze (ang. *cellulose-binding domain*), ki jo uporabljamo kot afinitetni podaljšek za imobilizacijo fuzijskih proteinov na celulozne podlage (16,18). Uspešno so bili imobilizirani tudi fuzijski proteini s kalmodulinom v vlogi afinitetnega podaljška. Slednji se veže na imobilizirane fenotiazine, vezava pa je reverzibilna, saj jo lahko prekinemo s kelatnimi ligandi, ki vežejo kalcijeve ione (npr. EGTA) (19). Za čiščenje rekombinantnih proteinov pogosto uporabljamo polihistidinski podaljšek (His-tag). Metoda se imenuje kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija (ang. *immobilized metal affinity chromatography, IMAC*) in temelji na tvorbi kompleksov med polihistidinskim podaljškom in kovinskimi ioni, kot so Zn^{2+} , Ni^{+2} , Co^{+2} ali Cu^{+2} (16).

Na voljo je še veliko drugih afinitetnih podaljškov, ki jih danes uporabljamo predvsem na področju čiščenja in izolacije rekombinantnih proteinov z afinitetno kromatografijo. Raziskujejo pa tudi že nove načine njihove uporabe, med drugim tudi na področju imobilizacije proteinov na trdne nosilce.

1.3 Afinitetni podaljški za vezavo na polistirensko površino

Med številnimi metodami za imobilizacijo proteinov je direktna adsorpcija najpreprostejša in pogosto uporabljana. Njeno uporabnost pa omejuje zmanjšanje ali izguba biološke aktivnosti proteina, bodisi zaradi konformacijskih sprememb ali napačne usmerjenosti imobilizirane molekule. Izgubo aktivnosti proteinov po imobilizaciji lahko zmanjšamo z mestno-specifično imobilizacijo z afinitetnimi podaljški. Vsi do sedaj uporabljeni afinitetni podaljški pa zahtevajo modifikacijo površine ali predhodno imobilizacijo neke druge molekule, ki nastopa v vlogi vezavnega partnerja (20). Afinitetni podaljški, ki bi izkazovali visoko afiniteto do polistirenske površine, bi omogočali mestno-specifično imobilizacijo proteina preko direktne adsorpcije (20). Do sedaj je poznanih nekaj peptidov z afiniteto do polistirena (glej poglavje 1.3.2). Na protein bi jih lahko vezali z genskim inženirstvom na C- ali N-konec. Ta metoda imobilizacije bi imela nekaj prednosti. V prvi vrsti bi kot podlago za imobilizacijo lahko uporabili neobdelan polistiren, saj ne bi potrebovali specifičnih funkcionalnih skupin ali

dodatnih vezavnih partnerjev, kar bi pomenilo nižjo ceno samega postopka. Hkrati pa bi dosegali mestno specifično imobilizacijo in pravilno orientacijo proteina. Slabost tega pristopa pa sta dolgotrajna priprava fuzijskega proteina in odsotnost komercialno dostopnega vektorja, s katerim bi bila priprava le-tega olajšana. Peptidi z afiniteto do polistirena so šele na začetku svoje poti na področju imobilizacije proteinov in le nekateri izmed njih so bili preizkušeni v vlogi afinitetnih podaljškov.

1.3.1 Razvoj peptidov z afiniteto do polistirena

Število peptidov z afiniteto do polistirena, ki bi jih lahko uporabili kot afinitetne podaljške za vezavo na podlago, v zadnjih letih narašča predvsem zaradi uporabe peptidnopredstavitvenih tehnik in bioloških kombinatoričnih knjižnic (21). Peptidi z afiniteto do polistirena opisani v literaturi, so bili selekcionirani iz različnih bakteriofagnih in bakterijskih peptidnopredstavitvenih knjižnic.

S postopkom presejanja lahko iz raznolike populacije klonov v bakteriofagni peptidnopredstavitveni knjižnici, izselekcijamo klone, ki se vežejo na želeno tarčo. Pri presejanju bakteriofagno knjižnico inkubiramo z imobilizirano tarčo. Nevezane bakteriofagne klone odstranimo z več koraki spiranja, preostale pa eluiramo in pomnožimo v gostiteljskih bakterijah. Pomnožene klone uporabimo za nadaljne kroge selekcije. Presejanje ponovimo še dva- do trikrat, nato izoliramo posamezne klone ter določimo njihove vezavne lastnosti. Cilj selekcije je izolacija tistih klonov, ki se na tarčo vežejo z visoko afiniteto (21, 22). Po podobnem principu poteka tudi delo z bakterijskimi predstavitenimi knjižnicami. Peptide z afiniteto do polistirena lahko izoliramo z afinitetno selekcijo na polistirenskih ploščicah, pogosto pa se pojavijo tudi kot neželeni »s tarčo nepovezani peptidi« (and. *target unrelated peptides*) v selekcijah na drugih tarčah (23).

Identifikacija peptidov, ki se vežejo na trdne površine, se je povečala po ugotovitvi, da so tehnike presejanja peptidnopredstavitvenih knjižnic, ki so jih do tedaj uporabljali predvsem za identifikacijo peptidov za vezavo na organske molekule, lahko uporabne tudi pri iskanju peptidov z afiniteto do trdnih površin. Brown je s presejanjem bakterijskih (*E. coli*) peptidnopredstavitvenih knjižnic identificiral peptide, ki se vežejo na površine obdane z zlatom (24). Belcher in sodelavci pa so nato iz komercialno dostopne bakteriofagne peptidnopredstavitvene knjižnice izolirali peptide, ki se vežejo na polprevodnike (25). Kasneje so bile podobne študije izvedene tudi na drugih anorganskih in sintetičnih materialih vključno s polistirenom (26).

Postopek presejanja peptidnopredstavitvenih knjižnic za identifikacijo peptidov, ki se vežejo na anorganske materiale, je enak iskanju vezalcev proteinskih tarč. Glavna razlika je, da moramo še poseben poudarek dati na izbiro tarčnega materiala (26). Poznamo več vrst polistirenskih površin z različnimi lastnostmi. Peptid, ki se veže na neobdelano polistirensko površino, ne bo nujno izkazoval enake afinitete tudi do modificiranega polistirena.

1.3.2 Znani peptidi z afiniteto do polistirena

Skoraj vsi proteini se do neke mere vežejo na polistiren. Kljub temu pa določeni peptidi kažejo višjo afiniteto do polistirenskih površin kot drugi (23). Pogosta strukturna lastnost peptidov z afiniteto do polistirena je vsebnost večjega števila aromatskih aminokislinskih ostankov, predvsem tirozina in triptofana, ki omogočajo nastanek hidrofobnih interakcij (27, 28). Prvi so o peptidih, ki se vežejo na plastiko, izoliranih po presejanju bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic, poročali Adey in sodelavci (27). Izolirali so bakteriofagne klone, ki se vežejo na polistirenske mikrotitrne ploščice. Opisani peptidi niso imeli podobnega aminokislinskega zaporedja, vsi pa so bili bogati z aromatskimi aminokislinami (Tyr in Trp) in pri večini je bil prisoten motiv WXXW (kjer je X katerakoli aminokislina). Ti peptidi so se na površino vezali tako v prisotnosti tarčnega proteina, kot tudi na prazne polistirenske ploščice. Vezava je potekla tudi, ko so površino mikrotitrskih ploščic blokirali s posnetim mlekom ali govejim serumskim albuminom (BSA), kar dokazuje, da so omenjeni kloni izolirani zgolj zaradi svoje afinitete do polistirena in ne do blokirnega sredstva. Peptide s podobnimi motivi pa so izolirali še nekateri drugi avtorji v selekcijah z različnimi tarčami, kar je pripeljalo do sklepa, da prisotnost motiva WXXW v aminokislinskem zaporedju pripomore k vezavi na polistiren (27, 29, 30).

Gebhardt in sodelavci so izolirali dve različni skupini peptidov, dolgih 10 aminokislin, ki so se na polistiren vezali tudi v prisotnosti blokirnih sredstev in površinsko aktivnih snovi (29). Prvo skupino peptidov so predstavljali peptidi, pri katerih je bil opazen ponavljajoči se motiv WXXWXXXW oz. WXXW, niso pa vsebovali tirozina in fenilalanina. V drugi skupini so bili peptidi, ki so vsebovali tako triptofan, kot tudi tirozin in fenilalanin, niso pa imeli skupnih motivov.

Več raziskovalnih skupin je izoliralo peptid HWGMWSY kot domnevni vezalec različnih tarč, kar je nakazovalo na možnost, da je razlog za njegovo ponavljajočo izolacijo njegova afiniteta do drugih komponent testnega sistema. Po primerjavi njegovih vezavnih lastnosti s peptidom WHWRLPS, ki je bil predhodno že prepoznani kot vezalec plastike (31), je bilo potrjeno, da se tudi ta veže na neblokirano polistirensko površino (30). Oba peptida vsebujeta

aromske triptofanske ostanke, ki lahko interagirajo s hidrofobnim polistirenom, pri prvem pa je prisoten tudi prej omenjeni motiv WXXW.

Pri iskanju peptidov za vezavo na streptavidin so Caparon in sodelavci izolirali skupino peptidov brez afinitete do tarče (32). Najverjetnejši razlog za izolacijo teh peptidov, v katerih je opazen motiv WHXW, je njihova afiniteta do polistirena.

Anni in sodelavci so pri iskanju peptidov za vezavo na epitope, ki nastanejo zaradi metabolitov etanola na proteinih, izolirali peptid z aminokislinskim zaporedjem FHENWPS (33). Ta peptid ni vezal pričakovane tarče; ugotovili pa so, da se veže na polistirensko površino. Motiv FHXXW je potencialen vezalec polistirena (27, 30), saj so tudi za peptid z aminokislinskim zaporedjem FHWTWYW v laboratorijih New England Biolabs ugotovili vezavo na polistiren (34).

V neki drugi študiji so z namenom razvoja afinitetnega podaljška za pripenjanje na polistirenske površine izolirali peptide, ki so bili na N-koncu bogati s triptofanskimi, tirozinskimi in fenilalanilnimi ostanki. Vsi so vsebovali bazične aminokislinske ostanke, sicer pa niso izkazovali skupnih motivov. Najpogosteje izoliran klon je imel aminokislinsko sekvenco FKFWLYEHVIRG (35).

Prav tako so, z namenom iskanja peptidov, ki se vežejo na polistiren, Sakiyama in sodelavci iz bakterijske flagelarne knjižnice FliTrx izolirali peptide, ki so bili bogati s hidrofobnimi aminokislinskimi ostanki in so vsebovali dve ali tri bazične aminokislinske, npr. KGLRGWREMISL (20). Na podlagi te študije so Kumada in sodelavci želeli izolirati peptide s še večjo afiniteto do polistirena z namenom doseganja gostejše imobilizacije modelnega proteina (36). Po 10 krogih presejanja so izolirali 15 klonov, katerih aminokislinska zaporedja so se razlikovala. Peptidi so bili v glavnem sestavljeni iz bazičnih in alifatskih aminokislinskih ostankov, ki so se v peptidih nahajali blizu skupaj. Najmočnejšo vezavo je izkazoval peptid RAFIASRRIKRP.

Preglednica III: Pregled peptidov z afiniteto do polistirena. V preglednici so predstavljena aminokislinska zaporedja nekaterih peptidov z afiniteto do polistirena, ki so jih izolirale različne raziskovalne skupine. Poudarjene so aromatske aminokisliline, z rumeno pa je označen značilni motiv. Povzeto po (27,30).

<i>Aminokislinsko zaporedje</i>	<i>Opazen motiv</i>	<i>Vir</i>
WG W PT W GW T GGDAR H PSA P EA H	WXXW	(27)
SRT W V L W I RY	WXXW	(29)
H W G M W S Y	WXXW	(30)
W H W W Y WALDR	WHXWXW	(32)
SA W V R W G R V W	WXXWXXXW	(29)
F H E N W PS	FHXXW	(33)
F H W T W Y W	FHXXW	(34)
W G Y V F H GWNL	Brez ponavljajočega motiva	(29)
KGLRG W REMISL	Brez ponavljajočega motiva	(20)
RA F IASRRIKRP	Brez ponavljajočega motiva	(36)
F K F W L Y E H V IRG	Brez ponavljajočega motiva	(35)
W H W RLPS	Brez ponavljajočega motiva	(31)
I Y Y P F F V W G NYANGLLSP G H V YSS N F I PLY M Q R EVSP	Brez ponavljajočega motiva	(27)

Vsi zgoraj naštetih peptidi so bolj ali manj bogati z aromatskimi aminokislinskimi ostanki. Kljub vsemu pa vsebnosti večjega števila tirozinskih in triptofanskih ostankov ne smemo smatrati kot pravilo, ki opredeljuje peptide z afiniteto do polistirena. Mnogi peptidi, bogati s tirozinom in triptofanom, so vezalci specifičnih proteinskih tarč in se na polistiren vežejo le minimalno ali pa sploh ne (27).

1.3.3 Primeri uporabe afinitetnih podaljškov za vezavo na polistirensko površino

Peptidi, za katere so potrdili, da se vežejo na polistiren, so potencialni afinitetni podaljški za direktno adsorpcijo proteinov na trdno površino.

V praksi so na polistirensko površino preko afinitetnega podaljška, RAFIASRRIKRP, ki se veže na polistiren, uspešno imobilizirali encim glutation-S-transferazo (GST). Na C- konec GST so vezali afinitetni podaljšek in tako pripravljen fuzijski protein uporabili za razvoj encimskoimunskega testa (36, 37). Imobiliziran encim je ohranil biološko aktivnost, hkrati pa so dosegli tudi mestno-specifično adsorpcijo (36, 38). Ista raziskovalna skupina je na opisan način uspešno imobilizirala tudi enoverižni fragment variabilne regije protitelesa (scFv), ki veže C-reaktivni protein (CRP) (39) in cistein sintazni kompleks bakterije *E. coli*, kjer so preko afinitetnega podaljška na površino vezali encim O-acetilserin (tiol)-liazo (40).

Druga skupina je uporabila isti afinitetni podaljšek (RAFIASRRIRRP) za imobilizacijo oligopeptidov, ki so bili izselekcioniirani iz bakterijske peptidnopredstavitvene knjižnice eCPX (CytomX Therapeutic, San Francisco, CA, USA) kot vezalci zaščitnega antigena *Bacillus anthracis*. Afinitetni podaljšek so preko gibljivega distančnika (Gly)₄ vezali na C- ali N- konec omenjenih peptidov. Fuzijski proteini imobilizirani na polistirensko površino so ohranili vezavno afiniteto do antigena (41).

Izboljšano imobilizacijo rekombinantnega antigena *ENV*, ki ga prepoznajo specifična protitelesa proti virusu HIV-1, so z uporabo afinitetnega podaljška FKFVLYEHVIRG dosegli Feng in sodelavci (35) Uporabo istega afinitetnega podaljška so preizkusili tudi na sistemu streptavidin-biotin za imobilizacijo streptavidina na površino, a rezultati niso pokazali izboljšane vezave (35).

Uporaba afinitetnih podaljškov z afiniteto do polistirena je še v fazi preizkušanja. Potreben je izbor polistiren-vezočega peptida, ki bi ga lahko komercialno uporabljali kot afinitetni podaljšek. Le-tega je potrebno optimizirati, da bo primeren za imobilizacijo širokega nabora molekul. Ob tem je potreben razvoj metode za enostavno in hitro pripravo fuzijskih proteinov s polistiren-vezočimi peptidi. In ključno, nujen je razvoj metod za rutinsko imobilizacijo tako označenih proteinov. Kljub temu ima uporaba peptidov z afiniteto do polistirena kot afinitetnih podaljškov za vezavo na polistirensko površino velik potencial, da postane učinkovita in pogosto uporabljena metoda imobilizacije proteinov.

2. NAMEN NALOGE

Plastične nosilce, v glavnem v obliki polistirena, pogosto uporabljamo kot podlago za imobilizacijo proteinov. Za imobilizacijo proteinov na polistiren je bilo v preteklosti razvitih veliko metod, ki temeljijo na fizikalni adsorpciji, kemijski vezavi ali posredni vezavi preko afinitetnih podaljškov. Čeprav so pogosto v uporabi, imajo metode nekatere pomanjkljivosti. Pri imobilizaciji lahko pride do izgube biološke aktivnosti, posredne metode pa zahtevajo uporabo dodatnih vezavnih partnerjev.

Nekatere izmed teh pomanjkljivosti bi lahko odpravili z uporabo polistiren-vezočih peptidov kot afinitetnih podaljškov, s čimer bi dosegli usmerjeno vezavo neposredno na polistirensko površino.

V našem laboratoriju so v selekcijah proti grelinu iz bakteriofagnih peptidopredstavitvenih knjižnic izolirali kratke peptide, ki so v svojem aminokislinskem zaporedju vsebovali več aromatskih aminokislin in se niso vezali na tarčno molekulo. V okviru magistrske naloge bomo raziskali ali se omenjeni peptidi vežejo na polistiren in ali so potencialno uporabni kot afinitetni podaljški za imobilizacijo na polistiren.

Vezavo sedmih bakteriofagnih klonov, ki predstavljajo peptide, podobne nekaterim znanim polistiren-vezočim peptidom iz literature, na polistiren bomo ocenili z encimskoimunskim testom (ELISA). Klone, ki bodo izkazovali najvišjo afiniteto do polistirena, bomo uporabili v nadaljnjih testih ELISA, s katerimi bomo ovrednotili vpliv različnih načinov blokiranja in spiranja vdolbinic mikrotitrne ploščice na obseg vezave. Primerjali bomo tudi obseg vezave na različne polistirenske mikrotitrne ploščice. V nadaljevanju bomo pripravili še fuzijski protein s polistiren-vezočim peptidom, kjer bomo kot modelni nosilni protein uporabili domeno B stafilokoknega proteina A (B-SpA).

3. MATERIALI

3.1 Laboratorijska oprema

<i>Oprema</i>	<i>Proizvajalec</i>
Analitska tehtnica AB 104	Mettler Toledo, Küssnacht, Švica
Avtoklav Systemc 2540 EL	Bel-Art Products, Pequannock, NJ, ZDA
Centrifuga Micro-centrifuge II GMC-060	Daihan Labtech Co., Namyangju, Južna Koreja
Centrifugi 5804 (F-34-6-38) in 5415 R (F-45-24-11)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Ciklični termostat AB GeneAmp® PCR System 2700	Applied Biosystems, Forster City, CA, ZDA
Čitalec mikrotitrskih plošč Tecan Safire	Tecan Group Ltd., Männedorf, Švica
Elektroforezna kadička B1A Easy cast mini gel	Owl, Portsmouth, NH, ZDA
Magnetni mešalnik Rotamix 550 MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Mikrotitrške plošče Nunc-Immuno™ Module F8 MaxiSorp loose	Nunc, Roskilde, Danska
Mikrotitrške plošče Nunc-Immuno™ PolySorp	Nunc, Roskilde, Dansk
Mikrotitrške plošče Costar EIA/RIA Plate	Corning Incorporated, Corning, NY, ZDA
Mikrotitrške plošče TPP Zellkultur Testplatte 96F	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švica
Mikrovalovna pečica	LG, Seul, Južna Koreja
pH meter 691	Metrohm, Herisan, Švica
Pipete (0,5-10; 10-100; 100-1000; 1000-5000 µL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Precizna tehtnica Exacta 610 EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Sistem za analizo in dokumentacijo gelov ter membran G-box	Syngene, Frederick, MD, ZDA
Spektrofotometer NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Delaware, ZDA

Spektrofotometer UV/VIS Lambda Bio +	PerkinElmer, Wellesly, MA, ZDA
Stresalnik Eppendorf Thermomixer Comfort, 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Stresalniki Vibromix 314 EVT, Vibromix 403 EVT in Vibromix 104 EV	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Ultrazvočna sonda	Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois, ZDA
Vir napetosti za elektroforezne kadičke PowerEase 500	Novex, Frankfurt, Nemčija
Zamrzovalnik	Sanyo Electric Biomedical Co., Tokio, Japonska
Zaščitena mikrobiološka komora LFVP 12	Iskra Pio, Šentjernej, Slovenija

3.2 Kemikalije

<i>Kemikalije</i>	<i>Proizvajalec</i>
3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Agar	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija
Agaroz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Ditiotreitol (DTT)	Fluka, Buchs, Švica
EDTA	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
Etanol, 96%	Riedel-de Haën AG, Nemčija
Glicerol	Fluka Chemie, Buchs, Švica
Glicin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemčija
Goveji serumski albumin (BSA) – standard 1 mg/mL	Thermo Scientific, Rockford, IL, ZDA
HCl	Fluka, Buchs, Švica
H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid)	Promega, Madison, WI, ZDA
Kanamicin	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
KCl	Carlo Erba, Rodano, Italija
KH ₂ PO ₄	J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, ZDA
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija

Kloramfenikol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija
Kvasni ekstrakt Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, ZDA
Metanol	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
MgCl ₂ · 2H ₂ O	Fluka, Buchs, Švica
NaCl	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Španija
Na ₂ HPO ₄	Fluka, Buchs, Švica
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Fluka, Buchs, Švica
NaOH	Fluka, Buchs, Švica
Nanašalno barvilo za gelsko elektroforezo – DNA Loading Dye (6x)	Fermentas, Burlington, Kanada
Natrijev dodecilsulfat (SDS)	Fluka, Buchs, Švica
Ocetna kislina, koncentrirana	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
Poliakrilamid	Sigma
Polietilenglikol 8000 (PEG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Murska Sobota, Slovenija
SYBR Safe	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
Tetraciklin	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija
Tripton	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
Tris (tris(hidroksimetil)aminometan)	Reidel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
Tween® 20	Fluka, Buchs, Švica
X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid)	Sigma, St. Louis, MO, ZDA

3.3 Kompleti, oligonukleotidi, označevalci in reagenti

<i>Kompleti, reagenti, oligonukleotidi, označevalci</i>	<i>Proizvajalec</i>
5'-začetni oligonukleotid F-pET-28: 5'-AGATCTCGATCCCGCGAAAT-3'	Eurofins MWG Synthesis GmbH, Nemčija
3'-začetni oligonukleotid R- <i>Hind</i> III:	Eurofins MWG Synthesis

5'- TTTTAAGCTTTGGATGAAACCATTG-3'	GmbH, Nemčija
5'-začetni oligonukleotid T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Eurofins MWG Synthesis GmbH, Nemčija
5'-začetni oligonukleotid F- <i>Sac</i> II: 5'-TTATATCCGCGGGCGGTGGAAGTGCTGATA- ACAAATTCAACAAAGAAC-3'	Eurofins MWG Synthesis GmbH, Nemčija
3'-začetni oligonukleotid R- <i>Sac</i> II: 5'-ACTTCCACCGCCCGCGGATATAACCATGGTA- TATCTCCTTCTTAAAG-3'	Eurofins MWG Synthesis GmbH, Nemčija
začetni oligonukleotid SP6: 5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'	Eurofins MWG Synthesis GmbH, Nemčija

Vsi začetni oligonukleotidi so bili pripravljene v koncentraciji 5 μ M.

oligonukleotid 5c: 5'-CATGGGTCATTTCGTGGCTGTGGTGGCCTGC-3' oligonukleotid 5nc: 5'-AGGCCACCACAGCCACGAATGACC-3' oligonukleotid 6c: 5'-CATGGGTTGGCATTGGCGTCTTCCTTCTGC-3' oligonukleotid 6nc: 5'-AGAAGGAAGACGCCAATGCCAACC-3' oligonukleotid 10c: 5'-CATGGGTCATTGGGGGATGTGGAGTTATGC-3' oligonukleotid 10nc: 5'-ATAACTCCACATCCCCCAATGACC-3'	Eurofins MWG Synthesis GmbH, Nemčija
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
QIAEX® II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Nemčija
PCR Master Mix (2x)	Fermentas, Burlington, Kanada
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega, Madison, WI, ZDA
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 Prestained Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
--	-------------------------------

3.4 Gojišča, pufri in raztopine

<i>Gojišče</i>	<i>Sestava in način priprave</i>
Gojišče LB	<p>8 g LB Broth Base:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 4 g kvasnega ekstrakta ▪ 2 g peptona ▪ 2 g NaCl <p>400 mL prečiščene vode (ddH₂O)</p> <p>Navedene količine sestavin smo raztopili v danem volumnu ddH₂O ter na magnetnem mešalu mešali, dokler se vse sestavine niso raztopile. Raztopino smo nato avtoklavirali in shranjevali pri sobni temperaturi.</p>
Agarno gojišče LB	<p>400 mL gojišča LB</p> <p>6 g agarja</p> <p>Navedene količine sestavin smo združili in mešali na magnetnem mešalu mešali, dokler se agar ni raztopil. Raztopino smo avtoklavirali ter še vročo v komori z laminarnim pretokom zraka vlili v petrijevke s premerom 9 cm. Ohlajena agarna gojišča smo hranili pri 4 °C.</p>
Gojišče LB-agarozna (agarozni "top")	<p>250 mL gojišča LB</p> <p>1,231 mL 1 M MgCl₂</p> <p>1,75 g agaroze</p> <p>Navedene količine sestavin smo združili in mešali na magnetnem mešalu. Mešanico smo avtoklavirali in v komori z laminarnim pretokom zraka v centrifugirke vlili 40 mL alikvot. Gojišče smo shranili pri sobni temperaturi.</p>

<p>Selektivno agarno gojišče LB/tetraciklin</p>	<p>20 µL 20 mg/mL tetraciklina 130 µL gojišča LB petrijevka z agarnim gojiščem LB</p> <p>V 1,5 mL mikrocentrifugirki smo redčili založno raztopino tetraciklina v gojišče LB ter 150 µL raztopine aseptično razmazali po agarnem gojišču LB.</p>
<p>Selektivno agarno gojišče LB/kanamicin</p>	<p>6 µL 100 mg/mL kanamicina 144 µL gojišča LB</p> <p>V 1,5 mL mikrocentrifugirki smo redčili založno raztopino kanamicina v gojišče LB ter 150 µL raztopine aseptično razmazali po agarnem gojišču LB.</p>
<p>Diferencialno agarno gojišče LB/IPTG/X-gal</p>	<p>400 mL agarne gojišča LB 84 µL 1 M IPTG 800 µL 2% X-gal</p> <p>Agarno gojišče LB smo avtoklavirali in ga ohladili na 70 °C ter vanj dodali ustrezni količini IPTG in X-gal. Raztopino smo dobro premešali in v komori z laminarnim pretokom zraka vlili v petrijevke s premerom 9 cm. Ohlajena agarna gojišča smo shranili pri 4 °C.</p>
<p>Diferencialno agarno gojišče LB/IPTG/X-gal/ampicilin</p>	<p>Diferencialno agarno gojišče LB/IPTG/X-gal 800 µL 50 mg/mL ampicilina</p> <p>Gojišče smo pripravili po postopku za diferencialno agarno gojišče LB/IPTG/X-gal s to razliko, da smo poleg IPTG in X-gal v raztopino pred vlivanjem v petrijevke dodali še ustrezno količino ampicilina. Gojišča smo shranili pri 4 °C.</p>

<i>Pufer</i>	<i>Sestava in način priprave</i>
Fosfatni pufer s soljo (PBS), pH = 7,4	<p>3,2 g NaCl 0,08 g KCl 0,576 g Na₂HPO₄ 0,096 g KH₂PO₄ 400 mL ddH₂O</p> <p>Navede količine sestavin smo raztopili v danem volumnu ddH₂O ob mešanju na magnetnem mešalu. pH smo uravnali na 7,4 z NaOH oziroma HCl. Raztopino smo nato avtoklavirali in shranjevali pri sobni temperaturi.</p>
Pufer za spiranje (PBST)	<p>0,05 % PBST</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 50 mL PBS ▪ 25 µL Tween[®] 20 <p>0,1 % PBST</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 50 mL PBS ▪ 50 µL Tween[®] 20 <p>0,5 % PBST</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 50 mL PBS ▪ 250 µL Tween[®] 20 <p>0,1 % PBST + 0,4 M NaCl</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 50 mL PBS ▪ 50 µL Tween[®] 20 ▪ 1,16 g NaCl <p>Ustrezno količino Tween[®] 20 smo odpipetirali v 50 mL pufra PBS in zmešali na magnetnem mešalu. Pri zadnjem pufru smo v 0,1 % PBST na magnetnem mešalu raztopili ustrezno količino NaCl.</p>

<p>Pufer za kromogen substrat tetrametilbenzidin (TMB)</p>	<p>21 g citronske kisline monohidrata 17,8 g Na₂HPO₄×2H₂O 1L ddH₂O</p> <p>Navedene količine sestavin smo raztopili v danem volumnu ddH₂O ter uravnali pH raztopine na 6. Pufer smo hranili pri 4 °C.</p>
<p>Pufer TAE 50×, pH = 8</p>	<p>242 g Trisa 57,1 mL koncentrirane očetne kisline 100 mL 0,5 M EDTA ddH₂O do 1000 mL</p> <p>Navedene količine sestavin smo zmešali ter dodali ddH₂O do 1 L. Z NaOH oziroma očetno kislino smo uravnali pH raztopine na 6. Pufer smo hranili na sobni temperaturi in ga pred uporabo 50 krat redčili z ddH₂O.</p>
<p>Blokirni pufer z mlekom (1 % mleko v PBS)</p>	<p>200 mg posnetega mleka v prahu 20 mL pufra PBS</p> <p>Navedeno količino posnetega mleka v prahu smo raztopili v ustreznem volumnu pufra PBS.</p>
<p>2M glicinski pufer za spiranje, pH = 2,2</p>	<p>3,75 g glicina 250 mg BSA 250 mL ddH₂O</p> <p>Navedene količine sestavin smo raztopili v danem volumnu ddH₂O ob mešanju na magnetnem mešalu. S HCl smo uravnali pH na 2,2. Pufer smo shranjevali pri sobni temperaturi.</p>
<p>Elektroforezni pufer za SDS-PAGE</p>	<p>30,2 g Trisa 144 g glicina 10 g natrijevega dodecilsulfata (SDS) 1 L ddH₂O</p> <p>Navedene sestavine smo raztopili v ustreznem volumnu ddH₂O.</p>

	Pufer smo pred uporabo desetkrat redčili.
--	---

<i>Raztopina</i>	<i>Sestava in način priprave</i>
1M raztopina IPTG	2,383 g IPTG 10 mL ddH ₂ O Predpisano količino IPTG smo raztopili v danem volumnu ddH ₂ O. Raztopino smo sterilizirali s filtracijo ter jo v mikrocentrifugirkah shranjevali pri -20 °C.
2 % raztopina X-gal	0,2 g X-gal 10 mL DMF Predpisano količino X-gal-a smo raztopili v 10 mL DMF. Raztopino smo shranjevali v mikrocentrifugirkah pri -20 °C
PEG/NaCl (20 % PEG-8000, 2,5 M NaCl)	8,0 g PEG-8000 5,85 g NaCl ddH ₂ O do 40 mL Navedeni količini sestavin smo raztopili v ddH ₂ O ob mešanju na magnetnem mešalu. Raztopino smo avtoklavirali in shranjevali pri sobni temperaturi.
Raztopina kromogenega substrata TMB	50 % (v/v) TMB 50 % (v/v) pufra za TMB Raztopino smo pripravili tik pred uporabo.
Raztopina za razbarvanje	60 mL 95 % etanola 20 mL očetne kisline ddH ₂ O do 200 mL Raztopino smo pripravili tik pred uporabo.

3.5 Biološki material

<i>Bakteriofagni kloni</i>	
N1-1 (WHFSWWP) N1-2 (HWWTWA) N1-4 (WHWWPGM) N1-5 (HSWLWWP) N1-6 (WHWRLPS) N1-10 (HWGMWSY) N1-16 (SSSTWWA) V oklepaju so zapisana aminokislinska zaporedja na površini bakteriofagov predstavljenih peptidov, ki izkazujejo nespecifično vezavo na polistiren.	Bakteriofagne klone N1-1, N1-2, N1-4, N1-5, N1-6, N1-10 in N1-16 je v okviru doktorskega dela iz knjižnice Ph.D.-7 (New England BioLabs) izoliral Miha Vodnik.
BI, bakteriofagni klon brez inserta	Izoliran v našem laboratoriju iz bakteriofagne knjižnice Ph.D.-7
L4 Aminokislinsko zaporedje na površini bakteriofaga predstavljenega peptida ASVQERK ne izkazuje nespecifične vezave na polistiren.	Bakteriofagni klon L4 je v okviru doktorskega dela iz knjižnice Ph.D.-7 (New England BioLabs) izoliral Miha Vodnik. Peptid ASVQERK se veže na protitelesa C-18, usmerjena proti grelinu (Santa Cruz Biotechnology).

<i>Bakterijski sev</i>	<i>Proizvajalec</i>
<i>E. coli</i> ER2738	New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA
<i>E. coli</i> TOP10	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
<i>E. coli</i> DH5 α	New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA
<i>E. coli</i> BL21	Novagen (Merck KgaA), Darmstadt, Nemčija

Trajne kulture bakterij so bile shranjene v zmesi glicerola (25 % (v/v)) in tekočega gojišča LB pri -80°C.

<i>Protitelo, encimi</i>	<i>Proizvajalec</i>
DNAza	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
Restriksijska endonukleaza <i>SacII</i> (aktivnost 20000 U/mL)	New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA
Restriksijska endonukleaza <i>NcoI</i> (aktivnost 10000 U/mL)	New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA
Restriksijska endonukleaza <i>BglII</i> (aktivnost 10000 U/mL)	New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA
Restriksijska endonukleaza <i>HindIII</i> (aktivnost 20000 U/mL)	New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA
DNA ligaza T4	New England Biolabs, Ipswich, MA, ZDA
mAb proti bakteriofagu M13, konjugirano s hrenovo peroksidazo (HRP/anti-M13)	GE Healthcare, Little Chalfont, Združeno kraljestvo

4. METODE

4.1 Nacepitev bakterij na trdno gojišče in priprava bakterijskih kultur

4.1.1 Nacepitev bakterij na agarno gojišče LB

Trajno kulturo bakterij *E. coli* ER2738 smo odtalili in tisočkrat redčili z gojiščem LB. 50 μ L tako pripravljene kulture smo razmazali na selektivno agarno gojišče LB/tetraciklin. Robove petrijevke smo zatesnili s parafilmom ter jo inkubirali preko noči pri 37 °C. Tako pripravljene bakterijske kolonije smo do 14 dni hranili pri 4 °C in jih uporabljali za pripravo bakterijskih kultur. Tudi druge bakterijske seve smo pripravljali na podoben način, uporabljali smo gojišča z ustreznim antibiotikom.

4.1.2 Priprava prekonočne bakterijske kulture

V penicilinke z 10 mL gojišča LB smo dodali ustrezen antibiotik. V tako pripravljeno gojišče smo s sterilno konico pipetnega nastavka precepili eno kolonijo z agarne gojišča. Kulturo smo nato z 250 vrt./min stresali preko noči pri 37 °C.

4.1.3 Priprava bakterijske kulture *E. coli* ER2738 za pomnoževanje bakteriofagov

Za pomnoževanje bakteriofagov smo uporabljali 100 \times redčeno prekonočno bakterijsko kulturo. V 20 mL gojišča LB smo dodali 20 μ g/mL tetraciklina in 200 μ L prekonočne bakterijske kulture.

4.2 Pomnoževanje in izolacija bakteriofagov M13

Pomnoževanje bakteriofagov poteka v bakterijskih celicah. Bakteriofag M13 se veže na gostiteljsko celico in vanjo vnese svojo nukleinsko kislino. S pomočjo bakterijskih replikacijskih mehanizmov se bakteriofagi pomnožijo in nato sprostijo v gojišče, ne da bi pri tem povzročili lizo bakterijske celice.

Izbrane bakteriofagne kloni smo prenesli v bakterijsko kulturo *E. coli* ER2738 za pomnoževanje bakteriofagov (4.1.3) in to stresali 4,5 h z 200 vrt./min pri 37 °C. Nato smo bakterijsko kulturo 10 min centrifugirali pri 4 °C z 10000 vrt./min in usedlino (posedle bakterijske celice) zavrgli. Supernatant smo prenesli v čisto centrifugirko in ga ponovno centrifugirali pri istih pogojih. Usedlino smo zavrgli, supernatant prenesli v čisto centrifugirko in dodali šestino volumna PEG/NaCl. Centrifugirko smo preko noči inkubirali pri 4 °C, da je

poteklo izsoljevanje bakteriofagov. Po obarjanju bakteriofagov smo zmes 15 min centrifugirali pri 4 °C z 10000 vrt./min, s čimer smo ločili oborjene bakteriofage od gojišča. Supernatant smo zavrgli, usedlino pa suspendirali v 1 mL PBS. Vsebino smo prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirke in 5 min centrifugirali pri 4 °C z 10000 vrt./min. Usedlino, ki vsebuje v PBS netopne nečistote, smo zavrgli, supernatant pa prenesli v čisto mikrocentrifugirko. Supernatantu smo ponovno dodali šestino volumna PEG/NaCl ter inkubirali na ledu 1 h, s čimer smo ponovno oborili bakteriofage. Po inkubaciji smo zmes 10 min centrifugirali pri 4 °C z 10000 vrt./min. Supernatant smo zavrgli, usedlino pa suspendirali v 100 µL zmesi glicerol/PBS (1:1) in centrifugirali 5 min pri 4 °C z 10000 vrt./min. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in to shranili pri -20 °C. Pomnožene bakteriofage smo uporabljali za določitev titra bakteriofagov (4.3) in za preverjanje afinitete do polistirena (4.4-4.8).

4.3 Titriranje bakteriofagov

V sterilne 10 mL centrifugirke z okroglim dnom smo nalili 3-4 mL gojišča LB-agaroz, ki smo ga pred tem stalili v mikrovalovni pečici. To smo do uporabe termostatirali na 52 °C. Z gojiščem LB smo pomnožene bakteriofage redčili do $10^7\times$, $10^8\times$ in $10^9\times$. 200 µL sveže bakterijske kulture *E. coli* ER2738 smo dodali 10 µL posameznih redčitev pomnoženih bakteriofagnih klonov. Bakterijsko kulturo z bakteriofagnimi kloni smo prenesli v raztaljeno gojišče LB-agaroz, dobro premešali in prelili na diferencialno agarno gojišče LB/IPTG/X-gal, ki smo ga predhodno termostatirali pri 37 °C. Petrijevke smo zatesnili s parafilmom ter gojišče inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo prešteli modre plake in izračunali titer bakteriofagnih klonov (enačba 1, kjer je *red.* redčitev bakteriofagnega klona).

$$\text{Titer bakteriofaga [pfu/mL]} = \left[\frac{\text{red.} \cdot \text{število plakov}}{10 \mu\text{L}} \right] \cdot 1000 \quad (\text{Enačba 1})$$

4.4 Ocena afinitete posameznih bakteriofagnih klonov do polistirena s testom ELISA

4.4.1 Relativna primerjava afinitete bakteriofagnih klonov do polistirena

Afinitete bakteriofagnih klonov do polistirena smo ovrednotili z uporabo testa ELISA. Uporabili smo mikrotitrne ploščice F8 Maxisorp Loose (Nunc, Roskilde, Danska). Posamezne bakteriofagne klone smo s PBS redčili do koncentracije 5×10^9 pfu/100 µL. V mikrotitrne ploščice smo nanесли po 100 µL ustrezne redčitve bakteriofagov in stresali 1 h s 50 vrt./min pri sobni temperaturi, da je potekla adsorpcija bakteriofagov, delali smo v treh

ponovitvah. Poleg sedmih klonov z domnevno afiniteto do polistirena (N1-1, N1-2, N1-4, N1-5, N1-6, N1-10 in N1-16) smo uporabili še dve negativni kontroli in sicer bakteriofagni klon brez inserta (BI), ki na površini ne izraža peptida, in bakteriofagni klon L4, ki se s predstavljenim peptidom veže na protitelesa proti grelinu. Afiniteto smo ocenili relativno, glede na negativni kontroli. Po vezavi smo vdolbinice trikrat sprali z 200 μ L 0,1 % PBST. Med posameznimi spiranji smo ploščice 4-5 min stresali s 100 vrt./min pri sobni temperaturi. Nezasedeno površino mikrotitrskih ploščic smo 2 h blokirali z 280 μ L 1 % posnetega mleka ob stresanju s 50 vrt./min pri sobni temperaturi. Nato smo vdolbinice dvakrat sprali z 200 μ L 0,1 % PBST. V vdolbinice smo nanegli 100 μ L raztopine protiteles HRP/anti-M13, ki smo jo predhodno redčili z 1 % posnetim mlekom 1:5000. Ploščice smo stresali 1h s 50 vrt./min pri sobni temperaturi. Vdolbinice smo nato petkrat sprali z 200 μ L 0,1 % PBST in v vsako nanegli po 200 μ L raztopine kromogenega substrata TMB. V primeru pozitivne vezave se je raztopina obarvala modro, saj je potekla oksidacija TMB, ki jo katalizira hrenova peroksidaza. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 50 μ L 2 M H_2SO_4 . Raztopini, ki se je obarvala rumeno, smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm in relativno ocenili količino vezanih fagov.

4.4.2 Statistična analiza rezultatov

Afiniteto vezave na polistiren smo ocenili relativno glede na negativni kontroli. Da smo preverili ali obstaja statistično značilna razlika med vezavo negativnih kontrol (BI in L4) in testiranimi bakteriofagnimi kloni (N1-1, N1-2, N1-4, N1-5, N1-6, N1-10 in N1-16) smo izvedli enojno analizo varianc (ang. *one way ANOVA*) in Tukey-jev test. Statistično analizo rezultatov smo izvedli z računalniškim programom Microsoft Office Excel.

4.5 Vpliv površinsko aktivne snovi in soli v pufru za spiranje na vezavo bakteriofagov na polistiren

Vpliv spiranja z različnimi koncentracijami površinsko aktivne snovi in soli na vezavo bakteriofagov na polistiren smo preučili na treh bakteriofagnih klonih, ki so v predhodnem poskusu izkazali najvišjo afiniteto do polistirena (N1-5, N1-6 in N1-10). Za negativno kontrolo smo uporabili bakteriofagni klon brez inserta (BI). Vezavo izbranih bakteriofagnih klonov smo izvedli kot je opisano pod točko 4.1.1. Po vezavi smo posamezne vdolbinice trikrat sprali z 200 μ L 0,1 %, 0,05 %, 0,5 % PBST in 0,1 % PBST z dodatkom 0,4 M NaCl. Vezane bakteriofage smo detektirali z monoklonskimi protitelesi, ki so bila konjugirana s HRP, kot je opisano pod točko 4.4.1.

4.6 Vpliv spiranja s kislim pufrom na vezavo bakteriofagov na polistiren

Bakteriofagne klone N1-5, N1-6, N1-10 in BI smo vezali na mikrotitrne ploščice, kot je opisano pod točko 4.4.1. Spiranje smo izvedli na tri različne načine; vdolbinice smo sprali:

- a) trikrat z 200 μ L 0,05 % PBST,
- b) enkrat z 200 μ L 0,2 M glicinskega pufra (pH 2,2), nato dvakrat z 200 μ L 0,05 % PBST ali
- c) trikrat z 200 μ L 0,2 M glicinskega pufra (pH 2,2) z vmesnim spiranjem z 200 μ L 0,05 % PBST.

Vmesno spiranje z 0,05 % PBST med posameznimi spiranji z 0,2 M glicinskim pufrom (pH 2,2) smo izvedli zato, da smo nevtralizirali okolje. Nevtralizacija je potrebna zaradi nizke stabilnosti bakteriofagov M13 pri zelo nizkih vrednostih pH. Med posameznimi spiranji smo plošče 4-5 min stresali s 100 vrt./min pri sobni temperaturi. Vezane bakteriofage smo nato detektirali, kot je opisano pod točko 4.4.1.

4.7 Vezava bakteriofagov na različne polistirenske površine

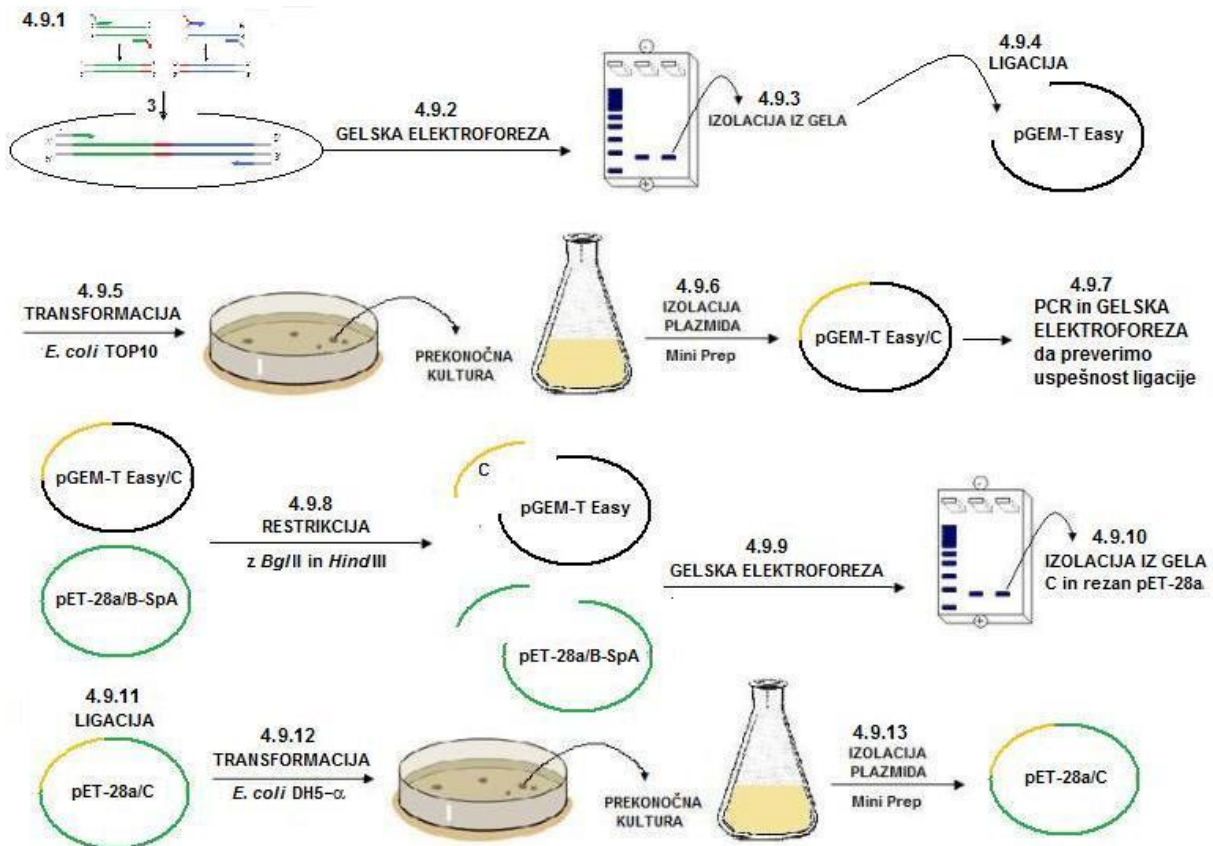
Uporabili smo štiri različne polistirenske mikrotitrne ploščice: F8 MaxiSorp Loose (Nunc, Roskilde, Danska), PolySorp (Nunc, Roskilde, Danska), Costar EIA/RIA Plate (Corning, NJ, ZDA) in TPP Zellkultur Testplatte 96F (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švica). Razlike med površinami so opisane v poglavju 5.5. Bakteriofagne klone N1-5, N1-6, N1-10, L4 in BI smo vezali na mikrotitrne ploščice in izvedli test ELISA, kot je opisano pod točko 4.4.1.

4.8 Vpliv blokiranja na vezavo bakteriofagov

Vdolbinice mikrotitrskih ploščic F8 MaxiSorp Loose smo 2 uri blokiral z 280 μ L 1 % posnetega mleka, 1 % BSA ali PBS. Bakteriofagne klone N1-6, N1-10 in L4 smo z ustreznimi blokirnimi pufri redčili do koncentracije 5×10^9 pfu/100 μ L. V mikrotitrne ploščice smo nanegli po 100 μ L redčitve bakteriofagov in stresali 1 h s 50 vrt./min pri sobni temperaturi, da je potekla vezava bakteriofagov, delali smo v treh ponovitvah. Vdolbinice smo nato petkrat sprali z 200 μ L ustreznega pufra (z 1 % posnetim mlekom, 1 % BSA, 0.05 % PBST in PBS), z vmesnim 4-5 min stresanjem s 100 vrt./min pri sobni temperaturi. V vdolbinice smo nanegli 100 μ L raztopine protiteles HRP/anti-M13, ki smo jo predhodno redčili z 1 % posnetim mlekom 1:5000. Ploščice smo stresali 1h s 50 vrt./min pri sobni temperaturi. Vdolbinice smo

nato petkrat spirali z 200 μ L PBS. Vezane bakteriofage smo detektirali, kot je opisano pod točko 4.4.1 ter tako relativno ocenili količino vezanih fagov.

4.9 Uvedba restriksijskega mesta za *SacII* v plazmid pET-28a/B-SpA s tehniko PCR s prekrivajočimi zaporedji (Overlap-extension PCR)



Slika 2: Shematična predstavitev postopka uvedbe restriksijskega mesta za *SacII* v plazmid pET-28a/B-SpA.

4.9.1 Uvedba restriksijskega mesta za *SacII*

Kot izhodni konstrukt smo uporabili plazmid pET-28a z vstavljenim genom za B-domeno stafilokoknega proteina A (pET-28a/B-SpA) (42). V prvi reakciji PCR smo kot matrično DNA uporabili plazmid pET-28a/B-SpA in oligonukleotida F-pET-28 in R-*SacII*.

V drugi reakciji PCR smo kot matrično DNA prav tako uporabili plazmid pET-28a/B-SpA in oligonukleotida F-*SacII* in R-*HindIII*. Prvi dve reakciji PCR smo po programu (preglednica IV) v cikličnem termostatu izvajali 30 ciklov.

V tretji reakciji PCR smo za matrico uporabili amplikona prve in druge reakcije ter oligonukleotida F-pET-28 in R-*HindIII*. Kot negativno kontrolo smo uporabili reakcijsko zmes brez DNA. Tretja reakcija PCR je v cikličnem termostatu potekala 35 ciklov.

Produkt tretje reakcije PCR (insert C) smo izolirali iz agaroznega gela, ga vstavili v plazmid pGEM-T Easy in nato prenesli v pET-28a.

Preglednica IV: Sestava reakcij PCR in temperaturni programi.

<i>PCR reakcija</i>		<i>Program reakcije PCR</i>		
		<i>Čas</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Št. ciklov</i>
A)	pET-28a/B-SpA 20 ng F-pET-28 1 µL R-SacII 1 µL 12,5 µL PCR Master Mix, 2x voda brez nukleaz do 25 µL	5 min 30 s 1 min	96°C 96°C 51°C	30
B)	pET-28a/B-SpA 20 ng F-SacII 1 µL R-HindIII 1 µL 12,5 µL PCR Master Mix, 2x voda brez nukleaz do 25 µL	90 s 10 min	72°C 72°C	30
C)	amplikona prve in druge reakcije kot matrična DNA (10 ng + 10 ng) F-pET-28 1 µL R-HindIII 1 µL 12,5 µL PCR Master Mix, 2x voda brez nukleaz do 25 µL			35

4.9.2 Agarozna gelska elektroforeza produktov reakcij PCR

Ustreznost dolžine ampikonov smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Ločbo smo izvajali na 1,5 % agaroznem gelu. 0,45 g agaroze smo zatehtali v 50 mL erlenmajerico ter dodali 30 mL TAE pufra in erlenmajerico pokrili z urnim steklom. Zmes smo segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se agarozna ni povsem raztopila. Raztopino agaroze smo nekoliko ohladili ter ji nato dodali še 3 µL barvila SYBR Safe. Raztopino smo vlili v elektroforezno kadičko, vstavili glavniček, zaščitili pred svetlobo in počakali, da se strdi. Vzorce za nanos smo pripravili tako, da smo reakcijskim zmesem dodali 1/6 volumna nanašalnega pufra za elektroforezo. Označevalca velikosti smo za nanos pripravili tako, da smo 2 µL označevalca velikosti dodali 2 µL nanašalnega pufra za elektroforezo in 8 µL vode brez nukleaz. Iz strjenega agaroznega gela smo odstranili glavniček ter v kadičko nalili pufer TAE do oznake. V vdolbinice smo nanosili vzorce (zmes po reakciji PCR, reakcijsko zmes brez matrične DNA kot negativno kontrolo in označevalca velikosti Gene Ruler™ Low Range Ladder). Elektroforeza je potekala pri napetosti 90 V približno dve uri. Fragmente smo detektirali z UV-svetlobo na transluminatorju.

4.9.3 Izolacija amplikonov iz agaroznega gela

Pod UV-svetlobo smo s spatulo iz agaroznega gela izrezali košček s fragmentom ustrezne dolžine ter ga prenesli 1,5 mL mikrocentrifugirko. Izolacijo smo izvedli z uporabo kompleta QIAEX[®] II. Agarozni smo dodali pufer QX1 po načelu 1:3 = gel:pufer in vodo v razmerju 1:2 = gel:voda. Uporabljali smo vodo brez nukleaz. Nato smo dobro premešali suspenzijo silikagela na vibracijskem mešalniku. Po 10 μ L suspenzije smo dodali vzorcem in zmes inkubirali 10 min pri 50 °C. Inkubacija je potrebna za raztopitev agaroze in vezavo DNA na delce silikagela. Zmes smo vsaki 2 min premešali, da smo zagotovili homogeno suspenzijo. Pri tem koraku je pomembno, da je pH nižji od 7,5. Pregled nad ustreznim pH nam omogoča pH indikator v pufru QX1, ki mora biti rumene barve. Ob dvigu pH se barva spremeni v oranžno in vijolično kar pomeni, da moramo pH uravnati na ustrezno vrednost s 3 M natrijevim acetatom s pH 5,0. Vzorce smo nato centrifugirali 30 s z 10000 vrt./min. Supernatant smo previdno odstranili s pipeto in ga zavrgli. Usedlino, v kateri se je nahajala DNA, smo sprali s 500 μ L pufru QX1. Usedlino smo suspendirali z mešanjem na vibracijskem mešalniku. Nato smo vzorce ponovno centrifugirali 30 s z 10000 vrt./min. V tem koraku spiranja smo odstranili ostanke agaroze. Usedlino smo nato dvakrat sprali s 500 μ L pufru PE. Usedlino smo ponovno suspendirali z mešanjem na vibracijskem mešalniku. Vzorce smo po tem centrifugirali 30 s z 10000 vrt./min. S tem korakom spiranja smo odstranili preostale soli. Supernatant smo previdno odstranili in ga zavrgli. Usedlino smo 10 do 15 min sušili v komori z laminarnim pretokom zraka dokler ta ni postala bele barve. Nato smo DNA eluirali z dodatkom 20 μ L 10 mM Tris-HCl (pH 8,5). Usedlino smo suspendirali z mešanjem na vibracijskem mešalniku ter nato inkubirali 5 min pri 50 °C. Vzorce smo centrifugirali 30 s z 10000 vrt./min ter supernatant prenesli v čisto mikrocentrifugirko. Koncentracijo DNA v eluatu smo določili spektrofotometrično.

4.9.4 Ligacija amplikona C v vektor pGEM-T Easy

V 0,5 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 5 μ L ligacijskega pufru 2x Rapid Ligation Buffer, 1 μ L odprtega vektorja pGEM-T Easy (50 ng/ μ L), 2 μ L (15 ng) amplikona C, 1 μ L vode in 1 μ L DNA-Ligase T4 (končni volumen 10 μ L) in zmes inkubirali preko noči pri 4 °C.

4.9.5 Transformacija kompetentnih bakterijskih celic *E. coli* TOP10 z ligacijsko zmesjo

Kompetentne bakterije *E. coli* TOP10 so bile shranjene na -80 °C. Iz zamrzovalnika smo jih postavili na led, da so se počasi odtalile. Bakterijam smo dodali 5 μ L ligacijske zmesi ter jih

30 min inkubirali na ledu. Nato smo mikrocentrifugirko za 45 s prenesli v termostat na 42 °C ter nato takoj nazaj na led. V tem koraku so bakterije sprejele plazmid. Po 5 min smo bakterijam dodali 800 µL gojišča LB ter kulturo 1 uro inkubirali pri 37°C. Po inkubaciji smo bakterije nacepili na selektivno agarno gojišče LB/IPTG/X-gal/ampicilin. 100 µL bakterij smo s sterilizirano spatulo po Drigalskem aseptično razmazali na agarno gojišče LB/IPTG/X-gal/ampicilin. Preostalih 900 µL bakterij smo centrifugirali 5 min s 5000 vrt./min pri 4 °C. 800 µL supernatanta smo odstranili, preostalih 100 µL koncentriranih bakterij pa smo prav tako razmazali po agarnem gojišču LB/IPTG/X-gal/ampicilin. Petrijevke smo zatesnili s parafilmom in jih inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo iz bele kolonije na agarnem gojišču LB/IPTG/X-gal/ampicilin pripravili prekonočno kulturo v gojišču LB/ampicilin, kot je opisano pod točko 4.1.2.

4.9.6 Izolacija plazmida iz prekonočne kulture *E. coli* TOP10

Iz prekonočne kulture transformiranih bakterij smo izolirali plazmid pGEM-T Easy/C z uporabo kompleta GenElute Plasmid Miniprep. 1,5 mL prekonočne kulture *E. coli* TOP10 smo 1 min centrifugirali (vsa centrifugiranja so potekala z 10000 vrt./min pri 4 °C). Supernatant smo odstranili in postopek ponovili še trikrat. Usedlino v mikrocentrifugirki smo suspendirali v 200 µL raztopine za suspendiranje (Resuspension Solution). Nato smo dodali 200 µL pufra za lizo (Lysis Buffer) in vsebino premešali z rahlim obračanjem mikrocentrifugirke. Pazili smo, da reakcija ni potekala več kot 5 min. Zmesi smo dodali 350 µL nevtralizacijskega pufra (Neutralization/Binding Buffer), narahlo premešali in 10 min centrifugirali. Ostanke celic, proteini, lipidi, SDS in kromosomska DNA se oborijo, plazmidna DNA ostane v supernatantu. Pred naslednjim korakom smo pripravili kolono, to smo storili tako, da smo nanjo nanесли 500 µL Column Preparation Solution in centrifugirali 1 min. Nato smo na kolono nanесли 650 µL celičnega lizata in centrifugirali 1 min. Sledilo je spiranje kolone: najprej smo nanесли 500 µL Wash Solution 1 in centrifugirali 1 min. Kolono smo nato sprali s 750 µL Wash Solution 2 in centrifugirali 1 min. Kolono smo nato še enkrat prazno centrifugirali 1 min, da smo odstranili ostanke etanola. Kolono smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in plazmidno DNA eluirali s 50 µL Elution Solution ter še zadnjič centrifugirali 1 min. Koncentracijo izolirane DNA smo določili z UV-spektrofotometrom NanoDrop. Izoliran plazmid smo shranili pri -20 °C

4.9.7 Pomnoževanje gena

Da bi preverili ali je ligacija pravilno potekla, smo del plazmida z vstavljenim genom pomnožili z reakcijo PCR z dvema paroma začetnih oligonukleotidov. V prvo 0,2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 12,5 μ L osnovne zmesi za PCR, 1 μ L začetnega oligonukleotida F-pET-28, 1 μ L začetnega oligonukleotida R-*Hind*III, 2 μ L ligacijske zmesi in 8,5 μ L vode brez nukleaz. V drugo 0,2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 12,5 μ L osnovne zmesi za PCR, 1 μ L začetnega oligonukleotida T7, 1 μ L začetnega oligonukleotida SP6, 2 μ L ligacijske zmesi in 8,5 μ L vode brez nukleaz. Kot negativno kontrolo smo namesto ligacijske zmesi uporabili vodo in vse štiri začetne oligonukleotide. V cikličnem termostatu smo izvedli 35 ciklov reakcije (preglednica V).

Preglednica V: Program reakcije PCR

Čas	Temperatura	Korak
5 min	96 °C	Aktivacija Taq DNA polimeraze
30 s	96 °C	Denaturacija
30 s	45 °C	Prileganje začetnih oligonukleotidov
60 s	72 °C	Podaljševanje verige
10 min	72 °C	Zaključevanje

Produkte reakcije PCR smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo na 1,5 % gelu, kot je opisano pod točko 4.9.2.

4.9.8 Restrikcija plazmidov pGem-T Easy/C in pET-28/B-SpA

Plazmida pGEM-T Easy/C in pET-28a/B-SpA smo razrezali z restriksijskima encimoma *Bgl*III in *Hind*III. Za izvedbo restrikcije smo ustrezne količine (preglednica VI) odpipetirali v 1,5 mL mikrocentrifugirke. Najprej smo dodali pufer nato plazmid. Encime smo dodali na koncu. Restriksijsko zmes smo inkubirali 3 h pri 37°C.

Preglednica VI: Sestava restriksijske zmesi

Plazmid pGEM-T Easy/C ali pET-28a/B-SpA	~ 1600 ng ~ 970 ng
<i>Bgl</i> III	2,0 μ L
<i>Hind</i> III	1,0 μ L
Buffer R (Fermentas)	5,0 μ L

4.9.9 Agarozna gelska elektroforeza restrikcijske zmesi

Ali je restrikcija pravilno potekla, smo preverili z gelsko elektroforezo, kot je opisano pod točko 4.9.2. Ločbo restrikcijske zmesi s plazmidom pGEM-T Easy/C smo izvajali na 2,0 % agaroznem gelu (0,6 g agaroze v 30 mL TAE pufra), ločbo restrikcijske zmesi s plazmidom pET-28a/B-domena pa na 1,2% agaroznem gelu (0,36 g agaroze v 30 mL TAE pufra).

4.9.10 Izolacija rezanega plazmida pET-28a in iz pGEM-T Easy/C izrezanega inserta C iz agaroznega gela

Po ločbi smo iz agaroznih gelov izrezali lineariziran plazmid pET-28a in insert C, ter ju iz gela izolirali s kompletom za izolacijo iz gela QIAEX[®] II po postopku opisanem pod točko 4.9.3.

4.9.11 Ligacija inserta C v vektor pET-28a

V 0,2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 6,7 μ L plazmida pET-28a (~ 100 ng), 10,3 μ L inserta C (~ 20 ng), 2 μ L pufra za DNA-ligazo T4 in 1 μ L DNA-ligaze T4 (skupni volumen 20 μ L) in zmes inkubirali preko noči na 16 °C. S tem smo dobili plazmid pET-28a/C, ki vsebuje gen za domeno B stafilokoknega proteina A in vstavljeno restrikcijsko mesto za *SacII*.

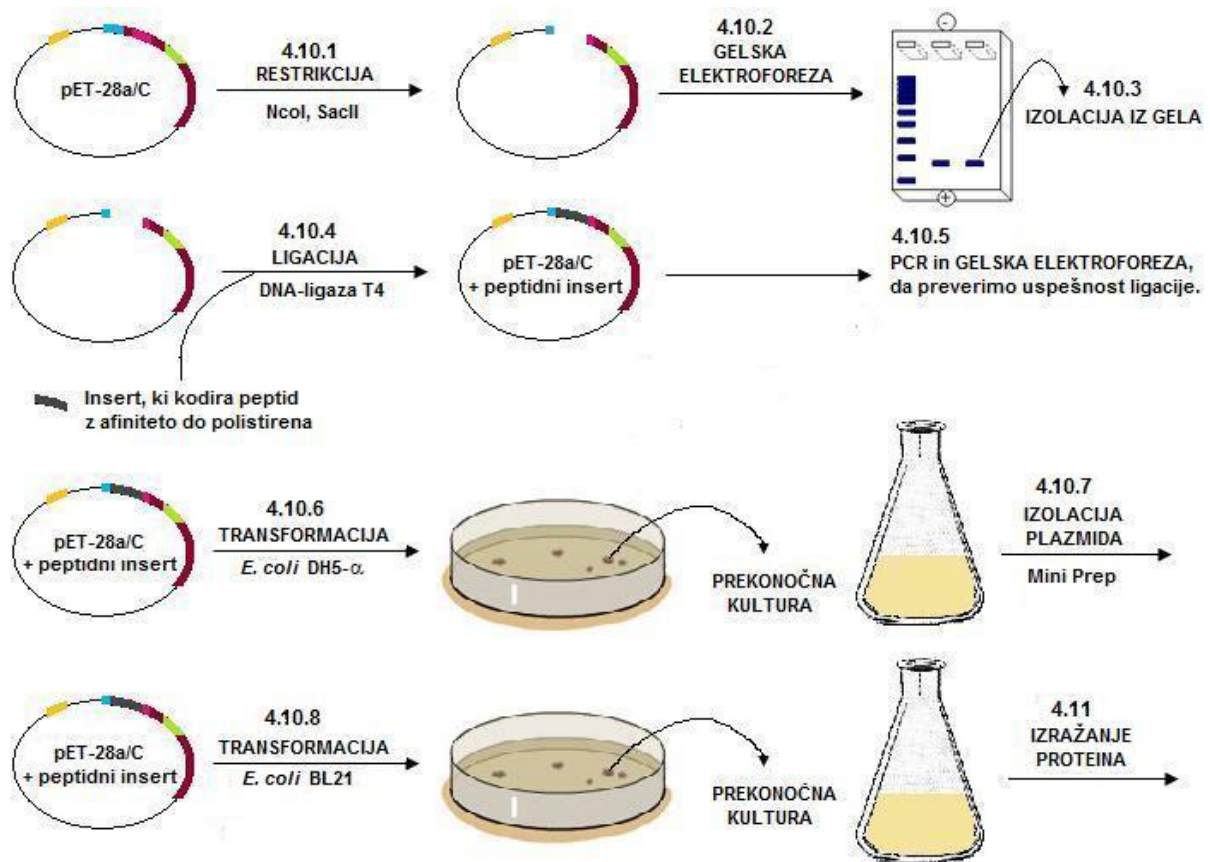
4.9.12 Transformacija kompetentnih bakterijskih celic *E. coli* DH5- α z ligacijsko zmesjo

Transformacijo plazmida pET-28a/C v kompetentne celice *E. coli* DH5- α smo izvedli po enakem postopku kot transformacijo kompetentnih bakterijskih celic *E. coli* TOP10 pod točko 4.9.5, s to razliko, da smo v tem primeru bakterije razmazali agarnem gojišču LB/kanamicin. Naslednji dan smo iz kolonij, ki so zrasle na agarnem gojišču pripravili prekonočne kulture v tekočem gojišču LB/kanamicin, kot je opisano pod točko 4.1.2.

4.9.13 Izolacija plazmida pET-28a/C iz prekonočne kulture *E. coli* DH5- α

Izolacijo plazmida pET-28a/C iz prekonočne kulture *E. coli* DH5- α smo izvedli po enakem postopku opisanem pod točko 4.9.6. Izolirane plazmide smo poslali na določitev nukleotidnega zaporedja.

4.10 Priprava genskih konstruktov za izražanje s peptidi označenih B-domeno proteina A



Slika 3: Shema postopka priprave genskega konstrukta za fuzijski protein peptid-B-SpA. Na skici plazmida sta označeni restrikcijski mesti *NcoI* (modra) in *SacII* (rožnata), prepoznavna mesta za *R-HindIII* (zelena) in F-pET-28 (rumena). S temno vijolično je označen gen, ki kodira B-domeno. Siva barva predstavlja insert, ki kodira peptid z afiniteto do polistirena.

4.10.1 Restrikcija plazmida pET-28a/C

Plazmid pET-28a/C smo razrezali z restrikcijskima encimoma *SacII* in *NcoI*. Za izvedbo restrikcije smo ustrezne količine (preglednica VII) odpipetirali v 1,5 mL mikrocentrifugirke. Najprej smo dodali vodo in pufer, nato plazmid. Encime smo dodali na koncu. Restrikcijsko zmes smo inkubirali 1 h pri 37 °C.

Preglednica VII: Sestava restrikcijske zmesi.

Plazmid pET-28a/C	~ 1000 ng
<i>SacII</i>	1,5 µL
<i>NcoI</i>	2,0 µL
NEBuffer 4	3,0 µL
Voda	do 30 µL

4.10.2 Agarozna gelska elektroforeza restrikcijske zmesi

Produkte restrikcije smo ločili na 1,5% agaroznem gelu po postopku opisanem pod točko 4.9.2.

4.10.3 Izolacija rezanega plazmida pET-28a/C iz agaroznega gela.

Izolacijo iz agaroznega gela smo izvedli, kot je opisano pod točko 4.9.3.

4.10.4 Ligacija insertov 5, 6 in 10 v vektor pET-28a/C

V 0,2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 15 μ L (~80 ng) plazmida pET-28a/C, 1 μ L oligonukleotida 5c (~3 ng), 1 μ L oligonukleotida 5nc (~3 ng), 2 μ L pufra za DNA-ligazo T4 in 1 μ L DNA-ligaze T4 (celokupni volumen 20 μ L) ter zmes inkubirali preko noči pri 16 °C. Postopek smo ponovili še z uporabo oligonukleotidnih parov 6c in 6nc ter 10c in 10nc.

4.10.5 Pomnoževanje gena

Da bi preverili ali je ligacija pravilno potekla smo del plazmida z vstavljenim genom pomnožili z reakcijo PCR. V 0,2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 12,5 μ L osnovne zmesi za PCR, 1 μ L začetnega oligonukleotida F-pET-28, 1 μ L začetnega oligonukleotida R-*Hind*III, 2 μ L ligacijske zmesi in 8,5 μ L vode brez nukleaz. Kot negativno kontrolo smo namesto ligacijske zmesi uporabili vodo, kot kontrolo pa nerezan plazmid pET-28a/C.

V cikličnem termostatu smo izvedli 35 ciklov reakcije (preglednica VIII).

Preglednica VIII: Program reakcije PCR

Čas	Temperatura	Korak
5 min	96 °C	Aktivacija Taq DNA polimeraze
30 s	96 °C	Denaturacija
1 min	51 °C	Prileganje začetnih oligonukleotidov
90 s	72 °C	Podaljševanje verige
10 min	72 °C	Zaključevanje

Velikost produkta reakcije PCR smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo po postopku opisanem pod točko 4.9.2.

4.10.6 Transformacija kompetentnih bakterijskih celic *E. coli* DH5- α z ligacijsko zmesjo

Transformacijo kompetentnih celic *E. coli* DH5- α z ligacijsko zmesjo smo izvedli po enakem postopku kot transformacijo kompetentnih bakterijskih celic *E. coli* TOP10 pod točko 4.9.5, s

to razliko, da smo v tem primeru bakterije razmazali po agarnem gojišču LB/kanamicin. Ker smo uporabili selektivno gojišče s kanamicinom, so na plošči zrastle le tiste bakterije, ki so sprejele plazmid. Naslednji dan smo iz kolonij, ki so zrastle na agarnem gojišču, pripravili prekonočne kulture v tekočem gojišču LB/kanamicin, kot je opisano pod točko 4.1.2.

4.10.7 Izolacija plazmida pET-28a/C+insert iz prekonočne kulture E. coli DH5 α

Izolacijo plazmida pET-28a/C+insert 5 (ali insert 6 ali insert 10) iz prekonočne kulture *E. coli* DH5- α smo izvedli po postopku opisanem pod točko 4.9.6.

4.10.8 Transformacija kompetentnih bakterijskih celic E. coli BL21 s plazmidom izoliranim iz E. coli DH5 α

Transformacijo kompetentnih celic *E. coli* BL21 s plazmidom pET-28a/C+insert smo izvedli po enakem postopku kot transformacijo kompetentnih bakterijskih celic *E. coli* TOP10 pod točko 4.9.5. s to razliko, da smo v tem primeru bakterije razmazali po agarnem gojišču LB/kanamicin/kloramfenikol. Naslednji dan smo iz kolonij, ki so zrastle na agarnem gojišču, pripravili prekonočne kulture v tekočem gojišču LB/kanamicin kot je opisano pod točko 4.1.2. Kulture smo uporabili za pripravo trajnih kultur in izražanje rekombinantnih proteinov.

4.11 Testno izražanje rekombinantnega fuzijskega proteina peptid 3-B-SpA

V penicilinke smo odmerili 20 mL gojišča LB, 12 μ L 50 mg/mL kanamicina, 20 μ L 34 mg/mL kloramfenikola in 200 μ L prekonočne kulture *E. coli* BL21. Delali smo v dveh paralelkah. Kulturi smo stresali z 250 vrt./min pri 37 °C do vrednosti OD₆₀₀ med 0,4 in 0,5. Ko smo dosegli željeno gostoto celic, smo eni kulturi dodali 20 μ L 1 M IPTG tako, da je bila njegova koncentracija v kulturi 1 mM. IPTG dodamo kot induktor transkripcije. Kulturi smo nato stresali 4 ure pod istimi pogoji. Po pomnoževanju smo kulturama izmerili vrednost OD₆₀₀ in ju 10 min centrifugirali s 5000 vrt./min, supernatant smo zavrgli, usedlino pa sprali tako, da smo jo resuspendirali v 3 mL hladnega PBS in ponovno centrifugirali 10 min s 5000 vrt./min. Spiranje smo ponovili še dvakrat. Po zadnjem spiranju smo odstranili supernatant in usedlino zamrznili pri -20 °C. Naslednji dan smo usedlino odtalili in jo suspendirali v volumnu PBS, ki smo ga izračunali po spodnji enačbi (enačba 2).

$$V(PBS) = OD_{600} \cdot 190 \mu L \quad (\text{Enačba 2})$$

Po 1 mL posameznega vzorca smo prenesli v 2-mL mikrocentrifugirke in bakterijske celice lizirali z ultrazvokom (pogoji: trajanje 3 min, 30% amplituda, 5-s pulzi z 10-s premori).

Po soniciranju smo vzorcem dodali DNazo do končne koncentracije 20 $\mu\text{g/mL}$ in inkubirali 15 min pri sobni temperaturi. Vzorce smo 10 min centrifugirali z 10000 vrt./min in ločili topno frakcijo (supernatant) od netopne frakcije (usedlina). Prisotnost našega proteina smo preverili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti SDS (SDS PAGE).

4.12 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS PAGE)

Najprej smo pripravili ločevalni gel (preglednica IX) in 3 mL le-tega s pipeto nanesti med stekelci komore za vlivanje gela. Na vrh smo nanesti 1 mL izopropanola, da smo preprečili stik gela z zrakom. Ko se je ločevalni gel strdil smo pripravili še zbiralni gel (preglednica IX), ga odpipetirali med stekelci do vrha in vstavili glavniček.

Preglednica IX: Sestava ločevalnega in zbiralnega gela za SDS PAGE.

<i>Sestavina</i>	<i>Ločevalni gel (15%)</i>	<i>Zbiralni gel (5%)</i>
40% poliakrilamid	1,35 mL	0,3125 mL
1 M Tris (pH 6,8)	/	0,3125 mL
1 M Tris (pH 8,8)	0,9 mL	/
10% amonijev persulfat	0,036 mL	0,025 mL
10% SDS	0,036 mL	0,025 mL
TEMED	0,00144 mL	0,0025 mL
H ₂ O	1,278 mL	1,825 mL

Ko se je nanašalni gel strdil, smo gel vstavili v kadičko, dolili elektroforezni pufer, odstranili glavniček in nanesti vzorce. Proteine v vzorcih smo morali pred nanosom denaturirati. 8 μL nanašalne zmesi sestavljene iz 5,3 μL nanašalnega pufera in 2,7 μL 1 M DTT, smo dodali 10 μL vzorca ter vse skupaj v vreli vodi prekuhali 3 min, kar je povzročilo razvitje proteinov. Na gel smo nanesti neinducirano netopno frakcijo, neinducirano topno frakcijo, inducirano netopno frakcijo, inducirano topno frakcijo in označevalec velikosti. SDS PAGE smo izvajali 2 uri pri napetosti 90 V. Gel smo nato najprej 45 min barvali s Coomassie Brilliant Blue in potem razbarvali z raztopino za razbarvanje.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

V poskusu selekcije peptidnih ligandov hormona grelina so iz bakteriofagne predstavitvene knjižnice Ph.D.-7 v našem laboratoriju izolirali skupino peptidov (preglednica X), ki so pri testih vezave na grelin dajali dvoumne rezultate. Peptidi vsebujejo aminokislinske motive, ki so podobni vezalcem na polistiren. Med izoliranimi peptidi se WHWRLPS veže na polistiren (31), HWGMWSY pa naj bi se vezal na različne proteinske in neproteinske molekule, a naši rezultati kažejo, da se prav tako veže na polistiren (30).

Da bi to potrdili, smo najprej primerjali vezavo bakteriofagnih klonov N1-10 (HWGMWSY) in N1-6 (WHWRLPS) ter negativne kontrole na polistirenske mikrotitrne ploščice pri različnih pogojih blokiranja in spiranja.

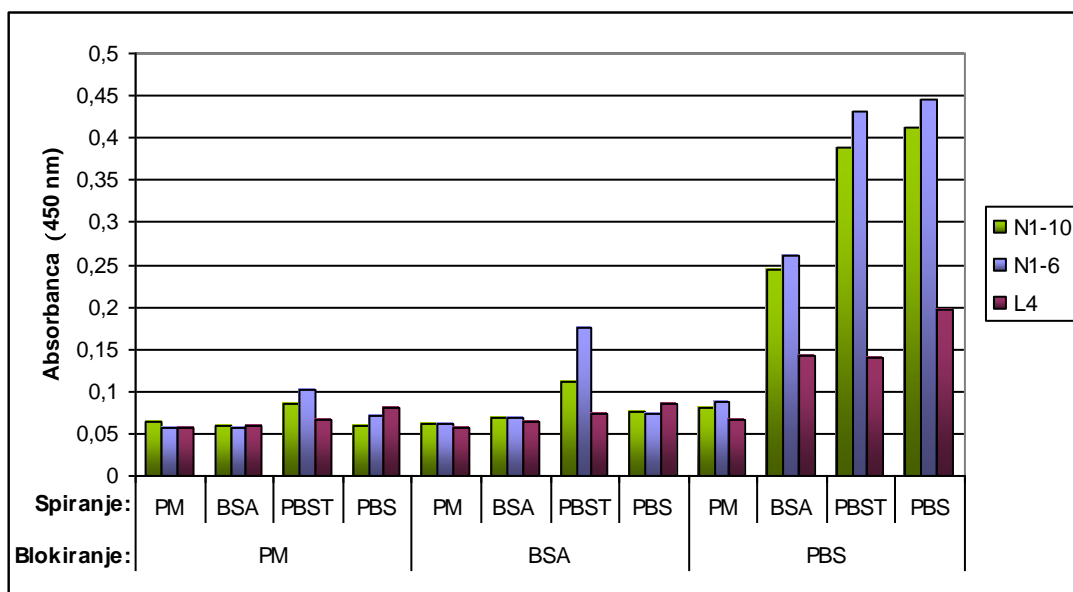
Preglednica X: Seznam testiranih bakteriofagnih klonov z aminokislinskimi zaporedji predstavljenih peptidov.

<i>Oznaka klona</i>	<i>Aminokislinsko zaporedje peptida</i>
N1-1	WHFSWWP
N1-2	HWWTWA
N1-4	WHWWPGM
N1-5	HSWLWWP
N1-6	WHWRLPS
N1-10	HWGMWSY
N1-16	SSSTWWA

5.1 Primerjava vezave bakteriofagnih klonov N1-10 in N1-6 na polistiren

Bakteriofagni klon N1-10 (HWGMWSY) se je v testu ELISA, pri katerem smo uporabili različne kombinacije pufrov za blokiranje in spiranje, obnašal zelo podobno kot klon N1-6 (WHWRLPS), za katerega je iz literature poznano, da se veže na polistiren. Kot negativno kontrolo smo uporabili klon L4 (ASVQERK), pri katerem nismo pričakovali vezave na polistiren, saj se specifično veže na protitelesa proti humanemu grelinu (neobjavljeni rezultati). Rezultati kažejo, da je vezava bakteriofagov bistveno večja na neblokiranih ploščicah (PBS), kar kaže na to, da se bakteriofagi vežejo direktno na polistiren in ne na blokirno sredstvo (slika 4). Vezava bakteriofagov, kjer smo kot blokirno sredstvo uporabili posneto mleko (PM), je bila manjša kot vezava v neblokiranih vdolbinicah (PBS) in

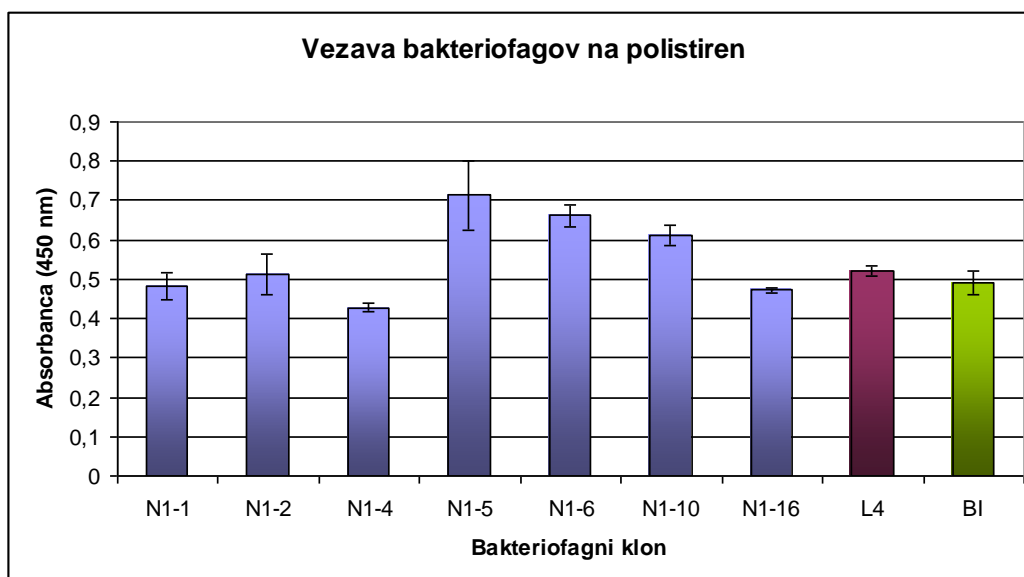
primerljiva vezavi bakteriofagov v vdolbinicah, kjer smo kot blokirno sredstvo uporabili BSA. Izbira pufra za spiranje ni bistveno vplivala na vezavo na blokirane ploščice. Na neblokiranih ploščicah je bila vezava najnižja, ko smo v pufru za spiranje uporabili posneto mleko. Nižja vezava je opazna tudi, ko smo v pufru za spiranje uporabili BSA. Ti rezultati nakazujejo, da molekule blokirnega sredstva tekmujejo za vezavna mesta na površini ploščic, pri čemer je posneto mleko bolj učinkovito. Kontrolni klon L4 je manj odporen na spiranje kot testirana klona N1-6 in N1-10, kar smo tudi pričakovali. Na podlagi teh rezultatov lahko potrdimo, da se klona N1-6 in N1-10 dejansko vežeta na polistiren.



Slika 4: Vpliv različnih blokirnih sredstev in vpliv spiranja z različnimi pufrmi na vezavo bakteriofagov (30).

5.2 Kvalitativna ocena afinitete bakteriofagnih klonov do polistirena

Dva izmed sedmih izoliranih bakteriofagnih klonov (preglednica X) sta se vezala na polistiren, preostali pa so vsebovali podobne peptidne motive, ki bi prav tako lahko izkazovali afiniteto do polistirena. Zato smo afinitete vseh bakteriofagnih klonov do polistirena primerjali relativno s testom ELISA z negativnima kontrolama L4 in BI. Bakteriofagni klon brez inserta (BI) na svoji površini nima prikazanega nobenega peptida, zato smo z njim preverjali možnost vezave samega bakteriofagnega delca na polistirensko površino. Po primerjavi izmerjenih vrednosti absorbanc med posameznimi bakteriofagnimi kloni smo ugotovili, da se poleg že omenjenih klonov N1-6 in N1-10, tudi klon N1-5 na polistiren veže statistično značilno močnejše kot kontrolna klona (slika 5). Preostali štirje kloni se niso značilno razlikovali od kontrolnih klonov, zato jih v nadaljne teste vezave nismo vključili.



Slika 5: Vezava bakteriofagnih klonov na polistiren. Z modro so predstavljeni odzivi testiranih bakteriofagnih klonov z vijolično odziv bakteriofagnega kлона L4, ki ne izkazuje afinitete do polistirena, z zeleno pa je predstavljen odziv bakteriofagnega kлона brez inserta. Interval napak predstavlja standardno deviacijo treh meritev.

Z uporabo statističnega testa enojne analize varianc (ang. *one-way ANOVA*) smo najprej preverili ali se vezave posameznih klonov razlikujejo. Rezultati so pokazali, da se vezave posameznih klonov med seboj razlikujejo, $p = 5,37E-07$ ($p < 0,05$). S tem testom pa ne moremo ugotoviti med katerimi kloni prihaja do razlik.

Da bi ugotovili med katerimi kloni prihaja do signifikantne razlike v vezavi, smo izvedli še Tukey-jev test. Rezultat je pokazal, da obstaja statistično značilna razlika med vezavo kontrolnih klonov L4 ter BI in testiranih klonov N1-5, N1-6 ter N1-10 (preglednica XI). Ti rezultati kažejo, da se bakteriofagni kloni N1-5, N1-6 in N1-10 vežejo na polistiren izključno zaradi lastnosti peptida, ki ga predstavljajo na površini.

Preglednica XI: Rezultati Tukey-jevega testa (vrednost HSD = 0,1142; ang. *honestly significant difference*) kažejo, da je statistično značilna razlika med vezavo bakteriofagnih klonov N1-5, N1-6 in N1-10 in kontrolnima klonoma. Razlika srednjih vrednosti je manjša od 0,1142, kar pomeni, da lahko zavržemo ničelno hipotezo (t.j. da med vezavo bakteriofagnih klonov N1-5, N1-6 ter N1-10 in kontrolnima klonoma ni statistično značilne razlike) oz. potrdimo, da je razlika v vezavi značilna. M = srednja vrednost, SD = standardna deviacija.

<i>Testirani bakteriofagni kloni</i>	<i>Kontrolni bakteriofagni kloni</i>	<i>Razlika srednjih vrednosti</i>
N1-1 (M = 0,483, SD = 0,033)	L4 (M = 0,522, SD = 0,013)	0,0382
	BI (M = 0,491, SD = 0,030)	0,0077
N1-2 (M = 0,512, SD = 0,052)	L4	0,0097
	BI	0,0207
N1-4 (M = 0,427, SD = 0,011)	L4	0,0942
	BI	0,0638
N1-5 (M = 0,714, SD = 0,088)	L4	0,1925
	BI	0,2229
N1-6 (M = 0,661, SD = 0,028)	L4	0,1398
	BI	0,1702
N1-10 (M = 0,611, SD = 0,026)	L4	0,0896
	BI	0,1200
N1-16 (M = 0,473, SD = 0,006)	L4	0,0485
	BI	0,0181

Vsi testirani peptidi so v svojem aminokislinskem zaporedju vsebovali dva ali več triptofanskih ostankov. Pogostost teh v strukturi naj bi predstavljala večjo verjetnost, da se bo peptid vezal na polistiren, saj se med hidrofobnim polistirenom in aromatskimi aminokislinskimi ostanki lahko tvorijo hidrofobne interakcije (23). Iz naših rezultatov je razvidno, da prisotnost aromatskih aminokislin v strukturi ni zadostno merilo za vezavo na polistiren. Peptid N1-4 tako vsebuje kar tri triptofanske ostanke pa kljub temu izkazuje najnižjo vezavo. Motiv WXXW (kjer je X katerakoli aminokislina), ki je značilen za polistiren-vezoče peptide, je opazen tako pri peptidih, ki se na polistiren vežejo, kot tudi tistih pri katerih vezave nismo opazili. Sklepamo lahko, da poleg triptofanov in omenjenega motiva tudi druge aminokisliline v peptidih prispevajo k interakcijam s polistirenom. Slednje potrjujejo tudi znani polistiren-vezoči peptidi, ki v svojem aminokislinskem zaporedju ne vsebujejo aromatskih aminokislin, npr. RAFIASRRIKRP (36). Prav tako pa je potrebno poudariti, da pogostost aromatskih aminokislin v peptidu ne pomeni, da se ta ne bo vezal na specifično tarčo. Kot primer lahko navedemo peptid HKWPWW, ki se veže na signal za sestavljanje (ψ) virusa HIV-1 (ang. *HIV-1 packaging signal*) (43).

Peptid SSSTWWA (klon N1-16) se na polistiren ni vezal; najverjetneje zaradi vsebnosti štirih zaporednih hidrofilnih ostankov na N-končnem delu (SSST). Ta del molekule je izrazito

hidrofilen, kar otežuje vezavo na hidrofoben polistiren. Vezave na polistiren nista izkazovala tudi peptida WHFSWWP in HWWTWA (klona N1-1 in N1-2), a na podlagi opravljenih poskusov težko podamo razlago tega.

Vsi trije polistiren-vezoči peptidi, HSWLWWP, WHWRLPS in HWGMWSY (kloni N1-5, N1-6 in N1-10), vsebujejo triptofanske ostanke. V dveh (izraženih na klonih N1-5 in N1-10) je opazen motiv WXXW, za katerega so potrdili, da je pomemben za vezavo na polistiren in je opazen tudi pri drugih polistiren-vezočih peptidih opisanih v literaturi (27, 29, 30). Peptid izražen na klonu N1-6, vsebuje aminokislinski motiv WXW, ki naj bi bil tudi odgovoren za vezavo na polistiren.

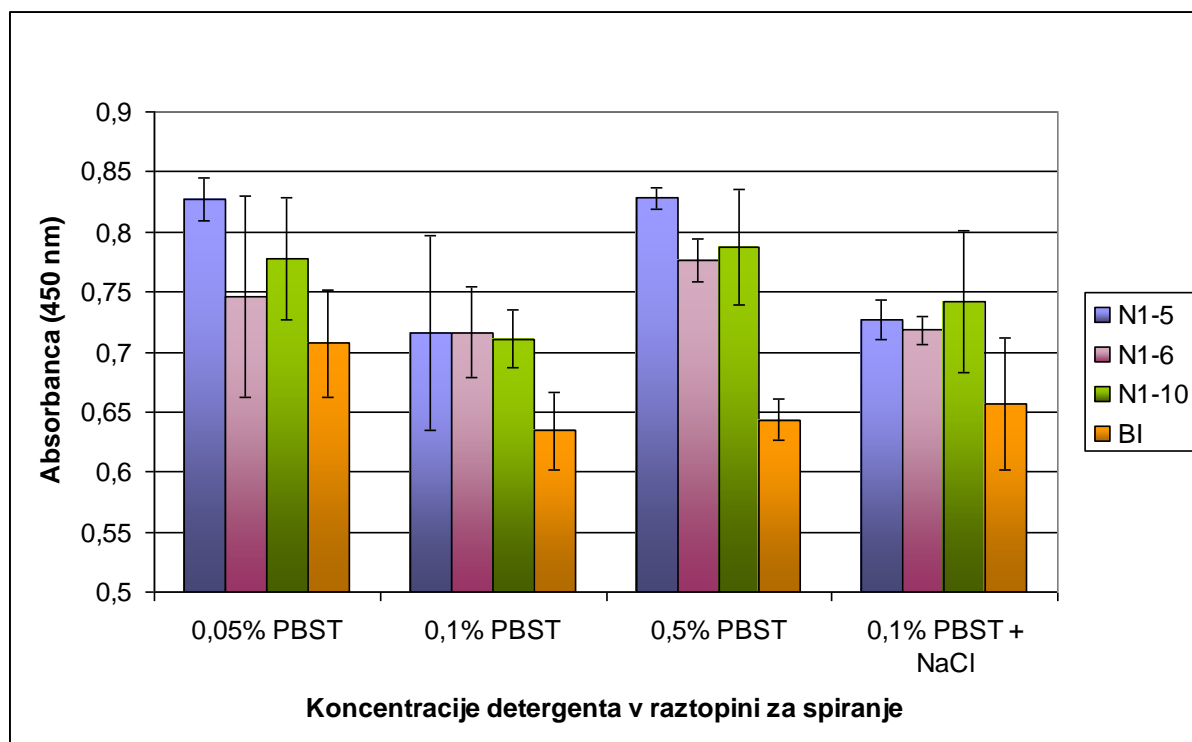
5.3 Vpliv spiranja z različnimi koncentracijami površinsko aktivne snovi in soli na vezavo bakteriofagov na polistiren

S testom ELISA smo ocenili vpliv spiranja z različnimi koncentracijami površinsko aktivne snovi Tween[®] 20 in soli na vezavo bakteriofagov N1-5, N1-6, N1-10 in BI na polistiren. Rezultati ne kažejo jasne odvisnosti med koncentracijo Tweena-20 v pufru za spiranje in vezavo bakteriofagov (slika 6). V skladu s pričakovanji smo pri zvišanju koncentracije Tweena-20 z 0,05 % na 0,1 % opazili zmanjšano vezavo bakteriofagov na polistiren pri vseh štirih klonih. Največja razlika v vezavi je bila opazna pri klonu N1-5, kar lahko pomeni, da je ta najmanj odporen na spiranje s Tweenom-20. Spiranje z višjo koncentracijo površinsko aktivne snovi je imelo najmanjši vpliv na vezavo klona N1-6.

Ko smo za spiranje uporabili pufer z 0,5 % Tweena-20, se je vezava klonov N1-5, N1-6 in N1-10 v nasprotju z našimi pričakovanji povečala glede na spiranje s pufrom z 0,1 % Tweena-20. Vezava kontrolnega klona BI se pri tem ni spremenila. Sklepamo, da pride z višanjem koncentracije detergenta v pufru za spiranje do nastanka micelov (kritična micelarna koncentracija Tweena-20 pri 25°C je 0,6 mM oz. 0,0067% v/v (44)), kar zmanjša število molekul površinsko aktivne snovi, ki bi interagirale z bakteriofagi oziroma polistirensko površino in tako ovirale vezavo. To rezultira v močnejši vezavi klonov, ki imajo afiniteto do polistirena, medtem ko do povečane nespecifične vezave samih bakteriofagnih delcev (klon BI) ne pride. Razlika med vezavo testiranih klonov in negativno kontrolo BI je bila največja, ko smo za spiranje uporabili pufer s koncentracijo Tweena-20 0,5 %, kar pomeni, da je nespecifična adsorpcija bakteriofagnega delca takrat najmanjša.

Ko smo primerjali spiranje z 0,1 % PBST in 0,1 % PBST z dodatkom NaCl, smo ugotovili, da je bila vezava bakteriofagnih klonov na polistiren v prisotnosti soli nekoliko močnejša.

Povečana koncentracija soli tako ni pripomogla k boljšemu spiranju fagov, ampak je pričakovano celo nekoliko okrepila hidrofobni efekt, s katerim se peptidi vežejo na polistiren.



Slika 6: Vpliv spiranja z različnimi koncentracijami površinsko aktivne snovi in soli na vezavo bakteriofagov na polistiren. Z modro, vijolično in zeleno so predstavljeni posamezni bakteriofagni kloni, ki se vežejo na polistiren, z oranžno pa je predstavljen klon brez inserta in predstavlja negativno kontrolo. Interval napak predstavlja standardno deviacijo treh meritev. Na osi x so predstavljeni različni pogoji spiranja.

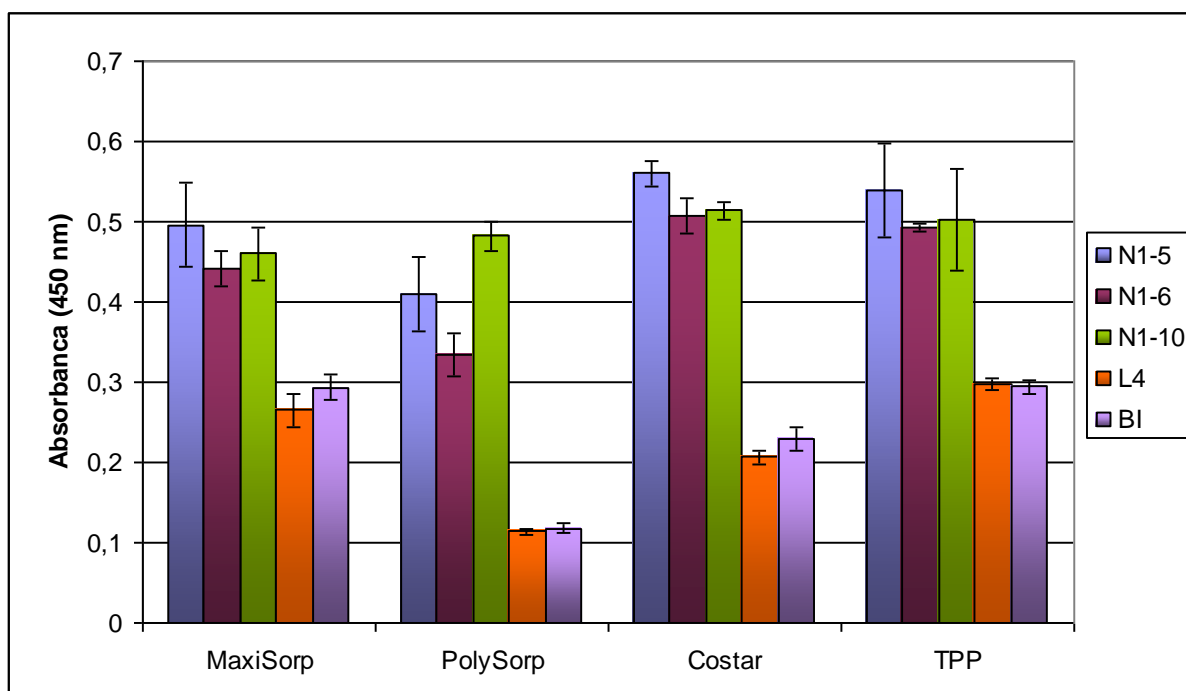
5.4 Vpliv spiranja s kislim pufrom na vezavo bakteriofagov na polistiren

Kisle pufre, običajno 0,2 M glicinski pufer s pH 2,2, pri afinitetnih selekcijah iz bakteriofagnih predstavitev knjižnic pogosto uporabljamo za nespecifično elucijo bakteriofagov s tarče. Zato smo s testom ELISA želeli oceniti vpliv spiranja s kislim pufrom na vezavo bakteriofagov na polistiren. Pričakovali smo, da se bo v vsakem koraku spiranja s kislim pufrom odstranilo več bakteriofagov, pri čemer bodo kloni z afiniteto do polistirena bolj odporni na spiranje kot kontrole. Toda naši rezultati niso dali pričakovane povezave med številom korakov spiranja s kislim pufrom in vezavo bakteriofagov (rezultati niso prikazani). Sklepamo, da kisli pufer moti samo detekcijo; najverjetneje vezavo protiteles zaradi spremembe naboja proteinov. ELISA ni ustrezna metoda za vrednotenje vpliva spiranja s kislim pufrom na vezavo bakteriofagov na polistiren.

5.5 Primerjava vezave na različne mikrotitrne ploščice

Da bi ugotovili, kako sama površina mikrotitrskih ploščic vpliva na vezavo bakteriofagov smo izvedli test ELISA na štirih različnih mikrotitrskih ploščicah: MaxiSorp, PolySorp, Costar EIA/RIA in TPP ploščice za tkivne kulture. Površina MaxiSorp ploščic je bolj hidrofilna in primerna za vezavo proteinskih molekul, ki vsebujejo tako hidrofilna kot hidrofobna področja. Površina ploščic PolySorp je bolj hidrofobna in primerna za vezavo proteinskih molekul, ki so bolj hidrofobne narave (8). Ploščice Costar EIA/RIA imajo visoko vezavno afiniteto do srednje velikih (> 10 kDa) in večjih biomolekul z ionskimi skupinami in hidrofobnimi regijami (10). Površina ploščic TPP Zellkultur platten pa je hidrofilna in negativno nabita (45).

Pri vseh štirih uporabljenih mikrotitrskih ploščicah smo opazili podoben vzorec vezave (slika 7). Kloni z afiniteto do polistirena se na vse štiri ploščice vežejo močnejše kot oba kontrolna klona, kar smo potrdili s statistično obdelavo. Enojna analiza varianc je pri vseh štirih mikrotitrskih ploščicah pokazala, da obstaja med vezavo klonov signifikantna razlika ($p < 0,05$). Z naknadnim Tukey-jevim testom smo pokazali, da se kloni z afiniteto do polistirena na vse ploščice vežejo močnejše kot kontrolna klona (preglednica XII).



Slika 7: Primerjava adsorpcije bakteriofagov na različne mikrotitrne ploščice. Z modro, temno vijolično in zeleno so predstavljeni posamezni bakteriofagni kloni, ki se vežejo na polistiren. Kontrolni sta predstavljeni z oranžno (L4) in svetlo vijolično (BI). Interval napak predstavlja standardno deviacijo treh meritev.

Preglednica XII: Rezultati Tukey-jevega testa za vezavo na različne mikrotitrne ploščice. Pri vseh klonih je opazna statistično značilna razlika med vezavo testiranega klona in kontrolnih klonov. HSD (ang. *honestly significant difference*).

Testirani bakteriofagni kloni	Kontrolna bakteriofagna klona	Mikrotitrne ploščice			
		MaxiSorp (HSD= 0,0836)	PolySorp (HSD= 0,0688)	Costar EIA/RIA (HSD= 0,0399)	TPP (HSD= 0,1049)
		Razlika srednjih vrednosti	Razlika srednjih vrednosti	Razlika srednjih vrednosti	Razlika srednjih vrednosti
N1-5	L4	0,2310	0,2960	0,3536	0,2420
	BI	0,2030	0,2917	0,3307	0,2451
N1-6	L4	0,1760	0,2201	0,3001	0,1952
	BI	0,1480	0,2158	0,2773	0,1984
N1-10	L4	0,1944	0,3682	0,3074	0,2045
	BI	0,1664	0,3639	0,2845	0,2076

Najslabšo vezavo klonov N1-5 in N1-6 z afiniteto do polistirena smo opazili, ko smo uporabili ploščice PolySorp, katerih površina je močno hidrofobna. Iz tega lahko sklepamo, da so za vezavo na polistiren poleg hidrofobnih vezi nujno potrebne tudi druge interakcije. Ker je selekcija bakteriofagnih klonov potekala na ploščicah MaxiSorp, nižja vezava na PolySorp ploščice ni presenetljiva. K boljši vezavi teh dveh klonov na ploščice MaxiSorp v primerjavi s ploščicami PolySorp je verjetno prispevala prisotnost hidrofilnih ostankov serina in histidina v peptidih, saj so ploščice MaxiSorp bolj hidrofilne narave. Bakteriofagni klon N1-10 se je na vse ploščice vezal v primerljivem obsegu.

Najnižjo nespecifično vezavo bakteriofagnih delcev smo opazili pri ploščicah PolySorp. Obe kontroli (L4 in BI) sta se najmočneje vezali na ploščice TPP, nekoliko manj pa na ploščice MaxiSorp in Costar.

Relativno močno vezavo vseh klonov na ploščice Costar EIA/RIA in TPP lahko pripišemo lastnosti površine, ki ima veliko kapaciteto za vezavo molekul. Slednje kljub različni obdelavi in drugačnim lastnostim ploščic, pripomore k večji vezavi testiranih bakteriofagnih klonov.

S Tukey-jevim testom smo tudi ugotovili, da je vezava najbolj specifična na ploščice Costar EIA/RIA, najmanj pa na ploščice MaxiSorp (preglednica XII).

5.6 Uvedba restriksijskega mesta za *SacII* v plazmid pET-28a/B-domena s tehniko PCR s prekrivajočimi zaporedji (*ang. Overlap-extension PCR*)

Da bi ugotovili ali označba proteina s peptidom, ki izkazuje afiniteto do polistirena, izboljša adsorpcijo modelnega proteina na polistirensko površino, smo B-domeno stafilokoknega proteina A (B-SpA) na N-koncu označili s po enim od treh peptidov, ki se vežejo na polistiren.

Genski konstrukt smo pripravili v vektorju pET-28a. Kot izhodišče smo uporabili plazmid, v katerega smo v našem laboratoriju že predhodno vstavili gen za B-SpA (42); nukleotidno zaporedje izhodnega konstrukta je podano na sliki 8.

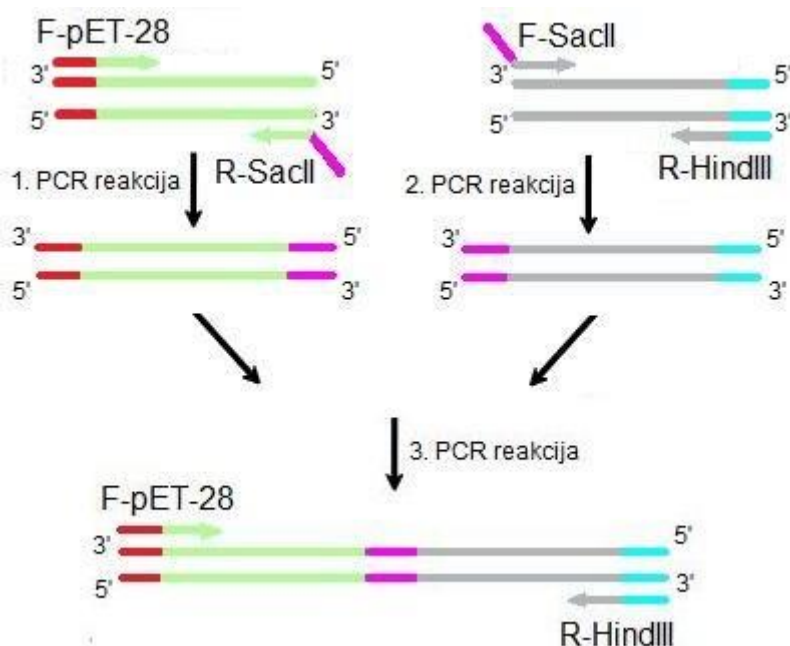
Nukleotidno zaporedje izhodnega konstrukta:

```
CGGCGTAGAGGATCGAGATTCGATCCC GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAAT TCCCTCTAGAAATAATT  
TTGT TTAAC TTAAGAAGGAGATATA CCATGGCTGATAACAAATTCAACAAGAACAACAAAATGCTTTCTA  
TGAAATTTTACATTTACCTAACTTAAATGAAGAGCAACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAA  
AAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCACAA  
GCACCAAAACTCGAGCACCCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCC GAAAGGAAGCTGAGT TGGCTGCTGCCCCGC  
TGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACCGGTC TTGAGGGGT TTTTGGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT
```

Slika 8: Z rdečo je označeno restriksijsko mesto za *BglIII*, podčrtano je nukleotidno zaporedje F-pET-28. Z rumeno je označeno restriksijsko mesto za *NcoI*, z modro restriksijsko mesto za *HindIII* s podčrtanim zaporedjem na katero se veže R-*HindIII*. S poudarjenim tiskom je označeno nukleotidno zaporedje B-SpA.

Gen za B-SpA je bil v plazmid pET-28a vstavljen preko restriksijskih mest *NcoI* in *XhoI*. Da bi lahko na N-končni del gena dodali še zapis za polistiren-vezoči peptid, smo pred restriksijsko mesto *NcoI* vstavili še restriksijsko mesto za *SacII*.

Restriksijsko mesto za *SacII* smo uvedli s tehniko PCR s prekrivajočimi zaporedji (slika 9). Najprej smo z dvema reakcijama PCR pomnožili želena odseka gena. V prvi reakciji smo kot začetna nukleotida uporabili F-pET-28 in R-*SacII*, v drugi pa F-*SacII* in R-*HindIII*. S tem smo na konec zapisa za izbrana odseka gena vnesli prekrivajoča podaljška z ustreznim restriksijskim mestom. Tretjo reakcijo PCR smo izvedli s produktoma prvih dveh reakcij in kot začetna nukleotida uporabili F-pET-28 in R-*HindIII*. Tako smo dobili pomnožen gen za B-domeno z dodanim restriksijskim mestom za *SacII* (slika 10, C), ki smo ga nato ligirali v vektor pGEM-T Easy.



Slika 9: Shema vnosa restrikcijskega mesta za *Sac*II (vijolične barve) v plazmid pET-28a/B-SpA s tehniko PCR s prekrivajočimi zaporedji (ang. *Overlap-extension PCR*).

A) Nukleotidno zaporedje produkta prve reakcije PCR F-pET-28 + R-*Sac*II (134 nukleotidov):

AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACATATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC CCTCTAGAAA
 TAATTTTGT TTAAC TTTAAGAAGGAGATATA **CCATGG**TTATAT **CCGCGG**GCGGTGGAAGT

B) Nukleotidno zaporedje produkta druge reakcije PCR F-*Sac*II + R-*Hind*III (128 nukleotidov):

TTATAT **CCGCGG**GCGGTGGAAGTGCTGATAACAATTC AACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATTTTA
 CATTACCTAACTTAAATGAAGAGCAACGCAATGTTTCATCCA **AAGCTT**AAAA

C) Nukleotidno zaporedje produkta tretje reakcije PCR F-pET-28 + R-*Hind*III (239 nukleotidov):

AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACATATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC CCTCTAGAAA
 TAATTTTGT TTAAC TTTAAGAAGGAGATATA **CCATGG**TTATAT **CCGCGG**GCGGTGGAAGTGTGCTGATAACAAT
 TCAACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATTTTACATTTACTAACTTAAATGAAGAGCAACGCAATGTT
 TCATCCA **AAGCTT**AAAA

Slika 10: Z rumeno je označeno restrikcijsko mesto za *Nco*I, z vijolično restrikcijsko mesto za *Sac*II, podčrtano je nukleotidno zaporedje F-*Sac*II, z modro je označeno restrikcijsko mesto za *Hind*III, podčrtano je nukleotidno zaporedje na katerega se veže R-*Hind*III. Z rdečo je označeno restrikcijsko mesto za *Bgl*II, podčrtano je nukleotidno zaporedje F-pET-28.

Ustreznost produkta tretje PCR reakcije (slika 10, C) smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (slika 11). Fragment, ki je ustrezal pričakovani dolžini, ~240 baznih parov, smo iz gela izolirali z uporabo kompleta za izolacijo iz gela QIAEX[®] II. S spektrofotometrom NanoDrop smo eluatu izmerili absorbanco in na podlagi tega ocenili koncentracijo (7,86 ng/μL). Izolirani fragment DNA smo nato ligirali v vektor pGEM-T Easy ter z ligacijsko zmesjo transformirali kompetentne celice *E. coli* Top10.



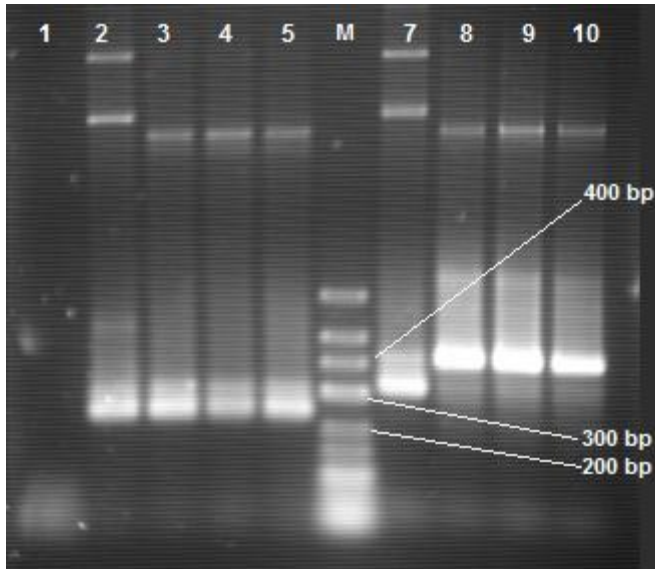
Slika 11: Slika agaroznega gela po 3. reakciji PCR. Na gel smo nanegli (od leve proti desni): produkt tretje reakcije PCR (v prvi dve vdolbinici), reakcijsko zmes brez matrične DNA, ki je predstavljal negativno kontrolo (NK) in Gene Ruler™ Low Range Ladder (M).

Kolonije, ki so zrastle po transformaciji na agarjem gojišču LB/IPTG/X-gal/ampicilin, smo uporabili za pripravo prekonočnih kultur za izolacijo plazmidne DNA. Izoliranim plazmidom pGem-T Easy/C smo koncentracijo in čistost določili spektrofotometrično.

Preglednica XIII: Rezultati določitve koncentracije in čistosti izoliranih plazmidov pGem-T Easy/C s spektrofotometrom NanoDrop.

<i>Plazmid</i>	<i>Koncentracija</i>	<i>Čistost (A260/A280)</i>
pGem-T Easy/C_1	65,90 ng/μL	1,75
pGem-T Easy/C_2	38,98 ng/μL	1,86
pGem-T Easy/C_3	41,32 ng/μL	1,83
pGem-T Easy/C_4	31,69 ng/μL	1,94

Da bi preverili ustreznost izoliranega plazmida, smo izvedli kontrolni PCR z dvema različnima paroma začetnih oligonukleotidov. Pričakovan produkt reakcije PCR, kjer smo kot začetna oligonukleotida uporabili F-pET-28 in R-HindIII, je dolg 239 bp, pričakovana dolžina produkta reakcije PCR, kjer smo kot začetna oligonukleotida uporabili T7 in SP6, pa je 418 bp. Produkte smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo (slika 12).



Slika 12: Slika agaroznega gela po kontrolni reakciji PCR. Na gel smo nanegli (od leve proti desni): negativna kontrola (NK – vsi štirje začetni oligonukleotidi, brez matrične DNA), produkt reakcije PCR z začetnima oligonukleotidoma F-pET-28 in R-*HindIII* (vdolbinice 2-5), Gene Ruler™ Low Range Ladder (M), produkt reakcije PCR z začetnima oligonukleotidoma T7 in SP6 (vdolbinice 7-10).

Iz slike lahko vidimo, da smo dobili produkte ustrezne dolžine pri treh od štirih plazmidov pGEM-T Easy/C. Le-te (pGEM-T Easy/C_2, pGEM-T Easy/C_3, pGEM-T Easy/C_4) smo poslali na določitev nukleotidnega zaporedja, da smo se prepričali o ustreznosti inserta. Rezultati določitve nukleotidnega zaporedja so pokazali, da le plazmid pGEM-T Easy/C_3 nosi pričakovan insert (slika 13).

Nukleotidno zaporedje pGEM-T Easy/C_3:

AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACATATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTAGAAAT
 AATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGTTATAT**CGCGG**GCGGTGGAAG**TGCTGATAACAAAT**
TCAACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATTTTACATTTACCTAACTTAAATGAAGAG
CAACGCAATGGTTTCATCCAAGCTT

Slika 13: Nukleotidno zaporedje inserta v plazmidu pGEM-T Easy/C_3. Z rdečo je označeno restrikcijsko mesto za *Bgl*II, podčrtano je nukleotidno zaporedje F-pET-26. Z rumeno je označeno restrikcijsko mesto za *Nco*I, z vijolično restrikcijsko mesto za *Sac*II, podčrtano je nukleotidno zaporedje F-*Sac*II, z modro je označeno restrikcijsko mesto za *Hind*III, podčrtano je nukleotidno zaporedje na katerega se veže R-*Hind*III. S poudarjenim tekstom je označen del nukleotidnega zaporedja, ki kodira B-SpA.

Pripravljen genski konstrukt smo nato iz klonirnega plazmida pGEM-T Easy vstavili v ekspresijski plazmid pET-28a/B-SpA. Vzoredno smo izvedli restrikcijo plazmidov pET-28a/B-SpA in pGEM-T Easy/C_3 z restrikcijskima encimoma *Bgl*II in *Hind*III. Zmesi po restrikciji smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo na 1,2 % gelu (sliki nista prikazani). Iz gela smo izolirali 5199 bp dolg fragment, ki je pripadal ogrodju plazmida pET-28a/B-SpA in 235 bp dolg fragment C iz plazmida pGEM-T Easy/C_3. Oba izolirana fragmenta smo nato združili in z ligacijo dobili vektor pET-28a/C. Z ligacijsko zmesjo smo transformirali kompetentne celice *E. coli* DH5- α in iz prekončne kulture izolirali plazmid ter določili

njegovo nukleotidno zaporedje. S tem postopkom smo pridobili plazmid pET-28a z vstavljenim genom za B-SpA in dodatnim restrikcijskim mestom za *SacII* (slika 14).

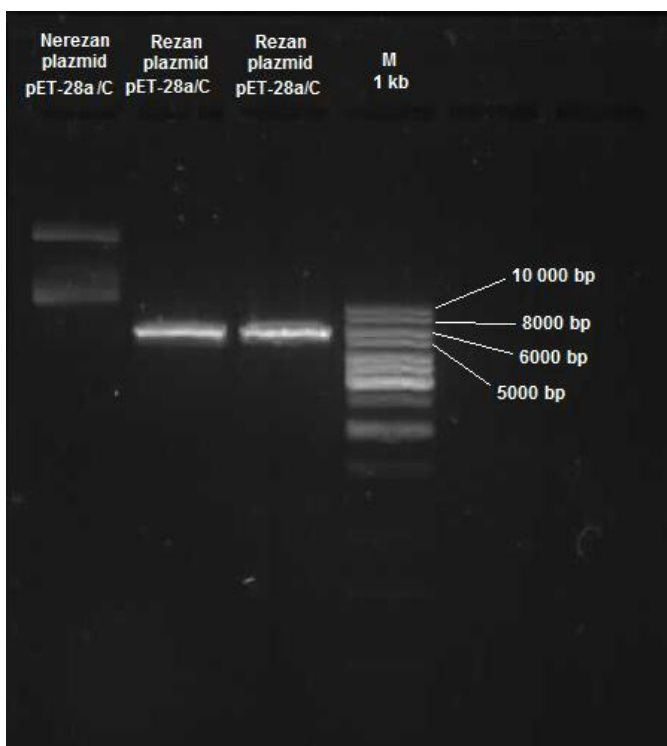
Nukleotidno zaporedje pET-28a/C:

```
CGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACA
ATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGTTATATCCGCGGCGCGGTGGAA
GTGCTGATAACAAATTCACAAAGAACAACAAATGCTTTCTATGAAATTTTACATTTACCTA
ACTTAAATGAAGAGCAACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAAAAGATGACCCAAG
```

Slika 14: Nukleotidno zaporedje inserta v plazmidu pET-28a/C. Z rdečo je označeno restrikcijsko mesto za *BglII*, podčrtano je nukleotidno zaporedje F-pET-28. Z rumeno je označeno restrikcijsko mesto za *NcoI*, z vijolično restrikcijsko mesto za *SacII*, podčrtano je nukleotidno zaporedje F-*SacII*, z modro je označeno restrikcijsko mesto za *HindIII*, podčrtano je nukleotidno zaporedje na katerega se veže R-*HindIII*. S poudarjenim tiskom je označen del nukleotidnega zaporedja, ki kodira B-SpA.

5.7 Priprava genskih konstruktov za izražanje s peptidi označenih B-domen proteina A

Ustrezen vektor z vstavljenim restrikcijskim mestom za *SacII* (pET-28a/C) smo uporabili za pripravo genskih konstruktov za izražanje s peptidi označenih B-domen proteina A. Izvedli smo restrikcijo plazmida pET-28a/C z restrikcijskima encimoma *SacII* in *NcoI*, s čimer smo dobili fragment dolg 5368 bp. Velikost fragmentov po restrikciji smo preverili z gelsko elektroforezo (slika 15).



Slika 15: Slika agaroznega gela po restrikciji. Na gel smo nanegli (od leve proti desni): izvorni nerezan plazmid pET-28a/C kot kontrolo, da je restrikcija potekla, dva vzorca rezanega plazmida pET-28a/C in Gene Ruler™ 1 kbp DNA Ladder (M).

Na sliki lahko vidimo, da je restrikcija uspešno potekla pri obeh vzorcih, saj se obe lisi nahajata med 5000 in 6000 bp. Manjši izrezan fragment (15 bp) na gelu ni viden.

Rezan plazmid smo nato izolirali iz agaroznega gela z uporabo kompleta QIAEX[®] II. Koncentracijo izoliranega plazmida smo določili spektrofotometrično.

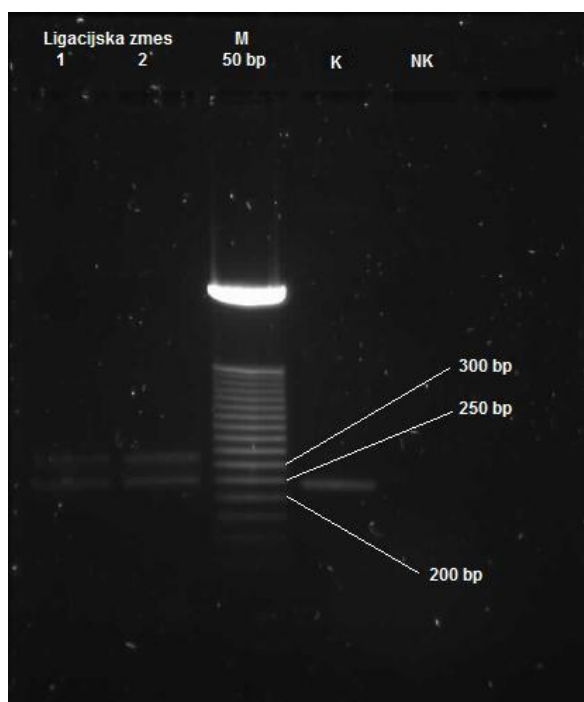
Preglednica XIV: Koncentracija rezanega plazmida pET-28a/C po izolaciji iz gela.

Plazmid po restrikciji	Koncentracija
pET-28a/C (1)	6,1 ng/ μ L
pET-28a/C (2)	5,9 ng/ μ L

V tako pripravljen plazmid smo ligirali inserte 5, 6 in 10, ki kodirajo polistiren-vezoče peptide.

Da smo dobili gen za peptid, smo v ligacijsko zmes poleg vektorja, pufra in ligaze dodali komplementarna enoverižna DNA-oligonukleotida, ki sta kodirala peptid. Le-ta sta se pred procesom ligacije združila in na 5'- ter 3'-koncu tvorila komplementarna štrleča konca za neposredno ligacijo v vektor.

Da bi preverili ali je ligacija pravilno potekla, smo izvedli kontrolni PCR, kjer smo kot začetna oligonukleotida uporabili F-pET-28 in R-*Hind*III. Velikost pomnoženih fragmetnov smo preverili z gelsko elektroforezo (slika 16).

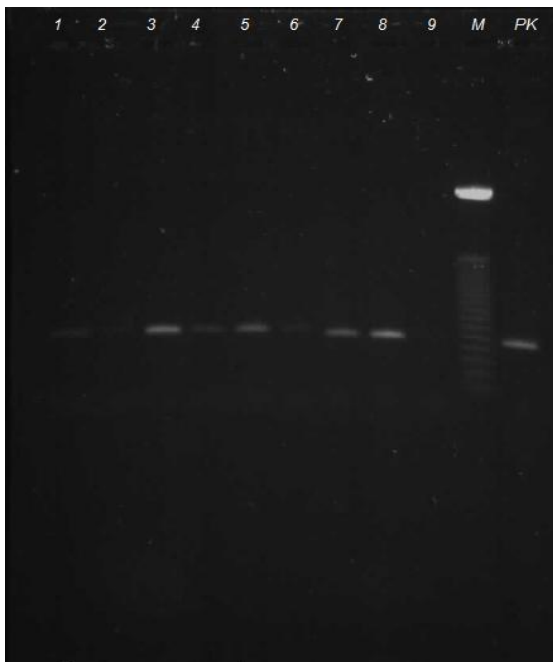


Slika 16: Slika agaroznega gela analize ampikonov po ligaciji inserta 6 v vektor pET-28a/C. Na gel smo nanegli (od leve proti desni): dva vzorca PCR, kjer smo kot matrično DNA uporabili ligacijsko zmes, označevalec velikosti Gene Ruler[™] 50 bp DNA Ladder (M), nerezan izvorni plazmid pET-28a/C brez inserta je predstavljal kontrolo (K), kot negativno kontrolo (NK) pa smo uporabili vzorec PCR, kjer smo namesto matrične DNA uporabili vodo.

Po ligaciji smo pričakovali fragment, ki je večji od izvornega nerezanega plazmida brez inserta. Na gelu lahko vidimo, da sta ampikona, ki pripadata spodnji lisi, pri vzorcih

ligacijske zmesi velika ~250 bp in torej malo višje kot lisa pri kontroli, nerezanemu plazmidu. Ker je vstavljen insert kratek, 25 bp, nismo pričakovali bolj opazne razlike.

Z ligacijsko zmesjo smo izvedli transformacijo kompetentnih bakterijskih celic *E. coli* DH5- α . Selekcijo transformiranih celic smo izvedli z uporabo agarnega selektivnega gojišča LB/kanamicin. Plazmid nosi zapis, ki omogoča celicam, da izrazijo odpornost proti kanamicinu, tako so na gojišču zrasle le tiste celice, ki so plazmid sprejele. Na gojišču je preko noči zraslo ~10 kolonij, ki smo jih uporabili za pripravo prekonočnih kultur za izolacijo plazmida. Koncentracijo izoliranih plazmidov smo določili s spektrofotometrom Nano Drop. Da bi preverili ustreznost plazmidov smo izvedli PCR, kjer smo kot začetna oligonukleotida uporabili F-pET-28a in R-*Hind*III. Produkta po reakciji PCR smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo na 1,5 % gelu (slika 17).



Slika 17: Slika agaroznega gela po kontrolni reakciji PCR z izoliranimi plazmidi pET-28a/C+insert 5. Na gel smo nanegli (od leve proti desni): izolirani plazmidi 1-9, Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (M), pozitivna kontrola (PK) vsebuje plazmid pET-28a/C brez inserta.

Da bi preverili ali je med procesi ligacije, transformacije in pomnoževanja v bakterijah prišlo do mutacij, smo izbrane vzorce poslali na določitev nukleotidnega zaporedja. Bakterije *E. coli* BL21 smo transformirali s plazmidi, katerih nukleotidna zaporedja so bila pravilna (prikazano spodaj) in izvedli testno izražanje proteina.

Rezultati analize nukleotidnih zaporedij so pokazali, da imata ustrezna nukleotidna zaporedja le plazmida z insertoma 5 in 6 (slika 18). Pri plazmidu pET-28a/C z insertom 10 je med samim procesom najverjetneje prišlo do mutacije (slika 19). Uspeli smo potrditi N-končno zaporedje gena na nukleotidnem nivoju (slika 19, bralni okvir 1). Reakcije sekveniranja nismo ponavljali. Zaradi nepravilnosti pa testnega izražanja fuzijskega proteina s tem peptidom nismo izvedli.

Nukleotidno zaporedje pET-28a/C+insert 5:

```
GAAATTTGTTTACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGGTCATTTCGTGGCTGTGGTGGCCTGCGGGCGGTGGAAGGTGC  
TGATAACAAATTC AACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATTTACATTTACCTAACTTAAAT  
GAAGAGCAACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAG  
CAGAAGCTAAAAGCTAAATGATGCACAAGCACCAAAACTCGAGCACCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGC  
T...
```

Aminokislinsko zaporedje:

```
M G HSWLWWP A G G G S A D N K F N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E E Q R N  
G F I Q S L K D D P S Q S Q N L L A E A K K L N D A Q A P K L E H H H H H H
```

Nukleotidno zaporedje pET-28a/C+insert 6:

```
AATTCCTCTAATATTTTGTACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGTTGGCATTGGCGTCTTCCTTCTGGCGGGC  
GGTGGAAGTGCTGATAACAAATTC AACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATTTACATTTACCT  
AACTTAAATGAAGAGCAACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTA  
ACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAGCTAAATGATGCACAAGCACCAAAACTCGAGCACCACCACCACCACCAC  
TGAGATCCGGCT...
```

Aminokislinsko zaporedje:

```
M G WHWRLPS A G G G S A D N K F N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E E Q R N  
G F I Q S L K D D P S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K L E H H H H H H
```

Slika 18: S sivo je poudarjeno nukleotidno zaporedje, ki kodira spodaj preveden peptid. Z zeleno je označeno nukleotidno zaporedje, ki kodira polistiren-vezoči peptid (aminokislinsko zaporedje označeno z zeleno). S poudarjenim tiskom je označeno nukleotidno zaporedje, ki kodira B-SpA, podčrtano aminokislinsko zaporedje.

Nukleotidno zaporedje pET-28a/C+insert 10:

```
TnTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGTCATTGGGGGAnnnGGAGTTATGCGCGGGCGGTGGAAGTGCTGATAACAA  
ATTCAACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATTTACATTTACCTAACTTAAATGAAGAGCAA  
CGCAATnGnTTTCATCCAAAGCTTAAAAnnATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCT  
AAAAGCTAAATGATGCACAAGCACCAAAACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCT  
AACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGG  
GTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAnnGGAGGAACATATCCGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCG  
CGGCGGGnGTGnnGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTGCTTTCTCCCTT  
CCTTTCTGCCACGTTCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAnTCGnGGGCTCCCTTTAGGGTTCnATTTAGTGCTnT
```

Aminokislinsko zaporedje:

Bralni okvir 1, lahko prepoznamo začetek proteina:

```
M G HWGXSY A G G G S A D N K F N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E E Q R N  
X F H P K L K X Stop P K P K R Stop P F S R S Stop K A K Stop C T S T K T R A P P P P  
P L
```

Bralni okvir 2, prepoznamo zadnji del proteina:

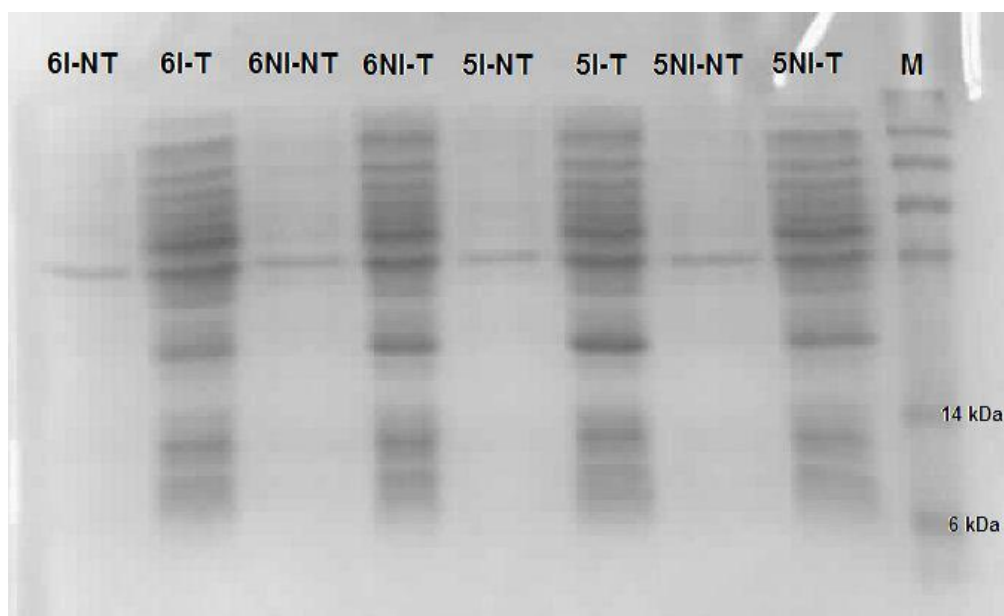
```
W V I G G X G V M R A V E V L I T N S T K N N K M L S M K F Y I Y L T Stop M K S N A X  
X F I Q S L X D P S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K L E H H H H H H Stop
```

Slika 19: S sivo je poudarjeno nukleotidno zaporedje, ki kodira spodaj preveden peptid. V primeru tega proteina je verjetno prišlo do mutacije. Z zeleno je označeno nukleotidno zaporedje, ki naj bi kodiralo polistiren-vezoči peptid (aminokislinsko zaporedje označeno z zeleno). S poudarjenim tiskom je označeno nukleotidno zaporedje, ki kodira B-SpA, podčrtan del aminokislinskega zaporedja.

5.8 Testno izražanje fuzijskih proteinov v *E. coli*

E. coli BL21 smo transformirali s plazmidoma pET-28a/C+insert 5 in pET-28a/C+insert 6. Selekcijo transformiranih celic smo izvedli na agarnem gojišču LB/kanamicin. Bakterijske celice, ki so plazmid sprejele, so pridobile tudi odpornost proti kanamicinu. Na gojišču so tako zrasle le celice, ki so plazmid sprejele. Kolonije, ki so zrasle na trdnem gojišču, smo uporabili za pripravo prekonočnih kultur potrebnih za izvedbo testnega izražanja fuzijskih proteinov.

Testno izražanje proteina peptid 5-B-domena oz. peptid 6-B-domena smo izvedli v gojišču LB pri 37 °C. Delali smo v dveh paralelkah; pri eni smo izražanje inducirali z dodatkom IPTG, pri drugi pa ne. Prisotnost proteina v topni in netopni frakciji obeh paralelk smo preverili s SDS-PAGE (slika 20).



Slika 20: Slika ločbe celičnih proteinov s SDS-PAGE po testni ekspresiji. Nanosi na gel iz desne proti levi: označevalec velikosti SeeBlue Plus2 (M), neinucirana topna (5NI-T) in netopna (5NI-NT) frakcija celic z vektorjem pET-28a/C+insert 5, inducirana topna (5I-T) in netopna (5I-NT) frakcija celic z vektorjem pET-28a/C+insert 5, neinucirana topna (6NI-T) in netopna (6NI-NT) frakcija celic z vektorjem pET-28a/C+insert 6, inducirana topna (6I-T) in netopna (6I-NT) frakcija celic z vektorjem pET-28a/C+insert 6.

Na sliki ni jasno vidne razlike med inducirano in neinducirano paralelko. Prav tako v induciranih frakcijah ni izrazite lise, ki bi ustrezala velikosti našega proteina (~6,6 kDa). Vzroka za neuspešno testno izražanje nismo uspeli identificirati kljub ponovljenemu postopku. Ker protein B-SpA v našem laboratoriju v bakteriji *E. coli* rutinsko izražamo, je krivec za neuspeh najverjetneje polistiren-vezoči peptid.

Za neuspelo izražanje obstaja več možnih razlag. Protein, ki ga želimo izraziti, je lahko toksičen za samo gostiteljsko celico. Kljub temu da so bili peptidi prikazani na površini bakteriofagnega delca, ki se je pomnoževal v *E. coli*, toksičnosti ne moremo popolnoma izključiti. Med pomnoževanjem bakteriofagov fuzijski protein peptid-pIII kotranslacijsko potuje na mesto sestavljanja fagov (periplazma oz. notranja membrana *E. coli*), po izražanju proteina (peptid 5-B-domena oz. peptid 6-B-domena) pa naj bi se ta nahajal v citosolu. Da bi preverili možno toksičnost našega proteina, bi bilo smiselno izvesti ekspresijo še v kakšnem drugem ekspresijskem sistemu. Možen vzrok za neuspešno izražanje gena so lahko tudi mutacije ekspresijskega vektorja, vendar s sekveniranjem pripravljenih plazmidov nismo zaznali sprememb v nukleotidnih zaporedjih, ki obdajajo 5'- in 3'-konec gena.

Drug problem, ki se lahko pojavi pri izražanju rekombinantnih proteinov, je tvorba inkluzijskih telesc. To so netopni agregati proteinov, ki se tvorijo v citoplazmi gostiteljske celice (*E. coli*) kot posledica prekomernega izražanja. Če pride do tvorbe inkluzijskih telesc, le-te detektiramo v netopni frakciji. V našem primeru se netopne frakcije induciranih in neinduciranih paralelk ne razlikujejo, zato je verjetnost, da se naš protein izraža v obliki inkluzijskih telesc, zelo majhna.

Rekombinantni proteini, ki jih izražamo v *E. coli* in drugih gostiteljskih celicah pogosto izhajajo iz drugih organizmov in jih celične proteaze lahko prepoznajo kot tujke ter jih hitro razgradijo. Slednje lahko rezultira v nizkih izkoristkih ekspresije. Kljub temu da so B-SpA večkrat uspešno izrazili v ekspresijskem sistemu, ki smo ga uporabili pri našem delu, pa obstaja možnost, da polistiren-vezoči peptid spremeni lastnosti B-SpA in protein naredi dovzetnejšega za proteolitično razgradnjo. Vprašanje ali se naš protein sploh izraža, bi lahko rešili z izvedbo analize s prenosom western, kjer bi protein detektirali s protitelesi usmerjenimi proti afinitetnemu podaljšku His-tag. V čem dejansko tiči razlog, pa ostaja odprta tema za nadaljno raziskavo.

6. SKLEP

Pri afinitetnih selekcijah na različnih tarčah včasih namesto specifičnih vezalcev izoliramo peptide z afiniteto do drugih komponent testnega sistema. V poskusu selekcij vezalcev hormona grelina so v našem laboratoriju izolirali sedem peptidov, katerih aminokislinsko zaporedje je spominjalo na vezalce polistirena. V okviru te magistrske naloge smo se namenili proučiti, ali se izolirani bakteriofagi, ki izražajo omenjene peptide, dejansko vežejo na polistiren, ovrednotiti vpliv različnih dejavnikov na vezavo in preveriti, ali so peptidi uporabni kot afinitetni podaljški za vezavo na polistiren.

S testom ELISA smo pokazali, da se peptid HWGMWSY (klon N1-10), ki je bil v literaturi omenjen kot ligand za različne tarče, veže na polistiren primerljivo močno kot znani ligand polistirena WHWRLPS (klon N1-6). Izključili smo možnost vezave bakteriofagov na blokirno sredstvo (posneto mleko, BSA), poleg tega pa smo pokazali tudi, da je za vezavo odgovoren predstavljen peptid in ne sam bakteriofagni delec.

Z relativno primerjavo afinitet sedmih bakteriofagnih klonov smo poleg klonov N1-6 in N1-10 identificirali še klon N1-5 (s predstavljenim peptidom HSWLWWP), ki izkazuje višjo afiniteto do polistirena kot kontrolna klona. Vsi testirani peptidi so v svojem aminokislinskem zaporedju vsebovali dva ali več triptofanskih ostankov, ki povečajo verjetnost vezave na polistiren. Motiv WXXW, ki je značilen za polistiren-vezoče peptide, je bil opazen tako pri peptidih, ki se na polistiren vežejo, kot tudi tistih pri katerih vezave nismo potrdili. Poleg triptofanskih ostankov in omenjenega motiva k vezavi na polistiren prispevajo tudi drugi aminokislinski ostanki, kaj je ključnega pomena za vezavo, pa naši rezultati ne razkrivajo. V prihodnosti bi lahko izvedli dodatne teste vezave, kjer bi primerjali, kako prisotnost različnih nearomatskih aminokislin v peptidih z več triptofani vpliva na vezavo.

V nadaljevanju smo proučili vpliv različnih pufrov za spiranje na vezavo klonov N1-5, N1-6 in N1-10 na polistiren. Ko smo uporabili pufre z različno koncentracijo površinsko aktivne snovi Tweena 20, smo ugotovili, da povečanje koncentracije Tweena 20 z 0,05 % na 0,1 % vezavo zmanjša, pri povečanju koncentracije na 0,5 % pa se je vezava ponovno povečala. To je lahko povezano z nastankom micelov v pufru za spiranje, s čimer je zmanjšano število molekul Tweena 20, ki bi interagirale z bakteriofagi oziroma polistirensko površino in tako ovirale vezavo. Rezultati tudi kažejo, da spiranje z visoko koncentracijo detergenta (0,5 %) ni smiselno, saj ne prispeva bistveno k zmanjšanju nespecifične vezave bakteriofagov. Ko smo primerjali spiranje z 0,1 % PBST in 0,1 % PBST z dodatkom NaCl, smo ugotovili, da je bila

vezava bakteriofagnih klonov na polistiren v prisotnosti soli nekoliko močnejša, najverjetneje zaradi okrepljenega hidrofobnega efekta. Ocena vpliva spiranja s kislim pufrom na obseg vezave ni bila uspešna, saj se je ELISA izkazala kot neustrezna metoda za vrednotenje le-tega.

Z uporabo štirih različnih mikrotitrskih ploščic (MaxiSorp, PolySorp, Costar EIA/RIA in TPP), smo želeli preveriti vezavo na različne površine. Testirani peptidi so se najslabše vezali na močno hidrofobno površino PolySorp ploščic, vezava na ostale tri ploščice pa se je le malo razlikovala. Zanimivo bi bilo preveriti ali se preostali štiri kloni, ki se na ploščice MaxiSorp (le-te smo uporabili pri primerjavi vezavnih afinitet vseh sedmih klonov) niso vezali, morda z višjo afiniteto vežejo na katere od ostalih treh ploščic.

Polistiren-vezoče peptide bi lahko uporabljali kot afinitetne podaljške za adsorpcijo proteinov na polistiren. Da bi preučili, ali bi s peptidi HSWLWWP, WHWRLPS in HWGMWSY (kloni N1-5, N1-6 in N1-10) povečali adsorpcijo modelnega proteina B-SpA na polistiren, smo pripravili genski konstrukt, ki nosi zapis za fuzijski protein peptid-B-SpA. Kljub uspešno pripravljenemu genskemu konstrukt pa je bil poskus izražanja fuzijskega proteina neuspešen. Vzroka za neuspešno ekspresijo nismo uspeli identificirati. Izražanje bi lahko poskusili izvesti v drugem ekspresijskem sistemu ali pa bi zamenjali vektor. Morda bi bilo smiselno uporabiti drug modelni protein, v literaturi je npr. opisana glutation-S-transferaza, označena s polistiren-vezočim peptidom (36).

7. LITERATURA

1. Križaj I.: Metode za analizo proteoma. Proteomika. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 31. januar in 1. februar 2008. Dostopno na svetovnem spletu: http://bio.ijs.si/~krizaj/events/Krizaj_pdf1.pdf (21.03.2013)
2. Boyer R.: Temelji biokemije. Ljubljana: Študentska založba, 2005. Knjižna zbirka Scripta.
3. Kindermann M., George N., Johnsson N., Johnsson K.: Covalent and selective immobilization of fusion proteins. *Journal of the American Chemical Society* 2003; 125: 7810-7811
4. Rao S.V., Anderson K.W., Bachas L.G.: Oriented immobilization of proteins. *Microchimica Acta* 1998; 128: 127-143.
5. Nakanishi K., Sakiyama T., Imamura K.: On the adsorption of proteins on solid surfaces a common but very complicated phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2001; Vol. 91, No. 3: 233-244
6. Cha T., Guo A., Jun Y., Pei D., Zhu X.-Y.: Immobilization of oriented protein molecules on poly(ethylene glycol)-coated Si(111). *Proteomics* 2004; 4: 1965-1976
7. Menendez A., Scott J.K.: The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. *Analytical Biochemistry* 2005; 336: 145-157
8. Thermo Scientific Microtiter Plate Guide. Dostopen na svetovnem spletu: http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_25447.pdf (24.1.2013)
9. Gibbs J.: Immobilization principles – selecting the surface, ELISA Technical Bulletin (1). Corning Life Sciences. Dostopen na svetovnem spletu: <http://catalog2.corning.com/lifesciences/media/pdf/elisa1.pdf> (24.1.2013)
10. Corning Microplate Selection Guide for assay and drug discovery. Dostopen na svetovnem spletu: http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/productselectionguide_microplates11_02_cls_mp_014.pdf (24.1.2013)
11. Dietschweiler C.: Protein adsorption at solid surfaces. Dostopno na svetovnem spletu: http://www.up.ethz.ch/education/term_paper/termpaper_hs07/Dietschweiler_rev_termpaper_hs07.pdf (13.3.2013)

12. Nakanishi K., Sakiyama T., Kumada Y., Imamura K., Imanaka H.: Recent advances in controlled immobilization of proteins onto surface of solid substrate and its possible application to proteomics. *Current Proteomics* 2008; 5: 161-175
13. Hlady V., Buijs J.: Protein adsorption on solid surfaces. *Current Opinion in Biotechnology* 1996; 7(1): 72-77
14. Domen P.L., Nevens J.R., Krishna Mallia A., Hermanson G.T., Klenk D.C.: Site-directed immobilization of proteins. *Journal of Chromatography A* 1990; 510: 293-302
15. Biotinylation. Dostopno na svetovnem spletu: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=84EBE112-F871-4CA5-807F-47327153CFCE#introduction> (28.6.2013)
16. Terpe K.: Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003; 60: 523-533
17. Beckett D., Kovaleva E., Schatz P.J.: A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Science* 1999; 8: 921-929
18. Benešová E., Králová B.: Affinity interactions as a tool for protein immobilization. Dostopno na svetovnem spletu: http://cdn.intechopen.com/pdfs/33047/InTech-Affinity_interactions_as_a_tool_for_protein_immobilization.pdf (20.3.2013)
19. Daunert S., Bachas L.G., Schauer-Vukasinovic V., Gregory K.J., Schrifft G., Deo S.: Calmodulin-mediated reversible immobilization of enzymes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2007; 58 (1): 20-7
20. Sakiyama T., Ueno S., Imamura K., Nakanishi K.: Use of a novel affinity tag selected with a bacterial random peptide library for improving activity retention of glutathione S-transferase adsorbed on a polystyrene surface. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2004; 28: 207-214
21. Thomas W.D., Golomb M., Smith G.P.: Corruption of phage-display libraries by target-unrelated clones: diagnosis and countermeasures. *Analytical Biochemistry* 2010; 407 (2): 237-240
22. Pande J., Szewczyk M.M., Grover A.K.: Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances* 2010; 28: 849-858
23. Vodnik M., Zager U., Strukelj B., Lunder M.: Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. *Molecules* 2011; 16: 790-817
24. Brown S.: Metal-recognition by repeating polypeptides. *Nature biotechnology* 1997; 15: 269-272

25. Whaley S.R., English D.S., Hu E.L., Barbara P.F., Belcher A.M.: Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly. *Nature* 2000; 405: 665-668
26. Baneyx F., Schwartz D.T.: Selection and analysis of solid-binding peptides. *Current Opinion in Biotechnology* 2007; 18: 312-317
27. Adey N.B., Mataragnon A.H., Rider J.E., Carter M., Kay B.B.: Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries. *Gene* 1995; 156: 27-31
28. Brammer L.A., Bolduc B., Kass J.L., Felice K.M., Noren C.J., Fitzsimons Hall M.: A target-unrelated peptide in an M13 phage display library traced to an advantageous mutation in the *gene II* ribosome-binding site. *Analytical Biochemistry* 2008; 373: 88-98
29. Gebhardt K., Lauvrak V., Babaie E., Eijnsink V., Lindqvist B.H.: Adhesive peptides selected by phage display: characterization, applications and similarities with fibrinogen. *Peptide Research* 1996; 9: 269-278
30. Vodnik M., Strukelj B., Lunder M.: HWGMWSY, an unanticipated polystyrene binding peptide from random phage display libraries. *Analytical Biochemistry* 2012; 424, (2): 83-86
31. Huang J., Ru B., Li S., Lin H., Guo F.-B.: SAROTUP: scanner and reporter of target-unrelated peptides. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; 2010: 101932
32. Caparon M.H., De Ciechi P.A., Devine C.S., Olins P.O., Lee S.C.: Analysis of novel streptavidin-binding peptides, identified using a phage display library, shows that amino acids external to a perfectly conserved consensus sequence and to the presented peptides contribute to binding. *Molecular Diversity* 1996; 1(4): 241-246
33. Anni H., Nikolaeva O., Israel Y.: Selection of phage-display library peptides recognizing ethanol targets on proteins. *Alcohol* 2001; 25: 201-209
34. New England Biolabs: Ph.D.TM Phage Display Libraries. Instruction Manual, Version 1.1. Dostopno na svetovnem spletu: <http://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/BDA9A6DB00DC42E8B93A8D8FBD08C49B/Datacards%20or%20Manuals/manualE8100.pdf> (30.4.2013)
35. Feng B., Dai Y., Wang L., Tao N., Huang S., Zeng H.: A novel affinity ligand for polystyrene surface from a phage display random library and its application in anti-HIV-1 ELISA system. *Biologicals* 2009; 37: 48-54
36. Kumada Y., Tokunaga Y., Imanaka H., Imamura K., Sakiyama T., Katoh S., Nakanishi K.: Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the orientated immobilization of proteins. *Biotechnology Progress* 2006; 22: 401-405

37. Kumada Y., Katoh S., Imanaka H., Imamura K., Nakanishi K.: Development of a one-step ELISA method using an affinity peptide tag specific to hydrophilic polystyrene surface. *Journal of Biotechnology* 2007; 127: 288-299
38. Kumada Y., Kuroki D., Yasui H., Ohse T., Kishimoto M.: Characterization of polystyrene-binding peptides (PS-tags) for site-specific immobilization of proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2010; 109(6): 583-587
39. Kumada Y., Hamasaki K., Shiritani Y., Nakagawa A., Kuroki D., Ohse T, Hwan Choi D., Katakura Y., Kishimoto M.: Direct immobilization of functional single-chain variable fragment antibodies (scFvs) onto a polystyrene plate by genetic fusion of a polystyrene-binding peptide (PS-tag). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009; 395: 759-765
40. Kumada Y., Zhao C., Ishimura R., Imanaka H., Imamura K., Nakanishi K.: Protein-protein interaction analysis using an affinity peptide tag and hydrophilic polystyrene plate. *Journal of Biotechnology* 2007; 128: 354-361
41. Kogot J.M., Sarkes D.A., Val-Addo I., Pellegrino P.M., Stratis-Cullum D.N.: Increased affinity and solubility of peptides used for direct peptide ELISA on polystyrene surfaces through fusion with a polystyrene binding peptide tag. *BioTechniques* 2012; 52: 95-102
42. Bratkovič T., Berlec A., Popovič T., Lunder M., Kreft S., Urleb U., Štrukelj B.: Engineered staphylococcal protein A's IgG-binding domain with cathepsin L inhibitory activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 349: 441-445
43. Dietz J., Pustowka A., Kaur A., Koch J., Mensch S., Stein S., Grez M., Divita G., Mély Y., Schwalbe H., Dietrich U.: Optimization and antiviral analysis of peptide ligands for the HIV-1 packaging signal PSI. *Retrovirology* 2006; 3 (Suppl. 1): S58.
44. Dostopno na svetovnem spletu: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=02050606> (28.6.2013)
45. TPP Tissue culture plates. Dostopno na svetovnem spletu: http://www.tpp.ch/page/produkte/10_zellkultur_schale.php?lang=EN (28.6.2013)