

Molekularne podstawy bakteryjnej patogenezy



Prof. dr hab. Elżbieta Katarzyna Jagusztyn - Krynicka

dr Renata Godlewska
dr Agnieszka Wszyńska
dr Anna Łasica
mgr Anna Grabowska
mgr Paweł Łaniewski
mgr Paula Roszczenko

UNIwersytet Warszawski
Instytut Mikrobiologii, Zakład Genetyki Bakterii

SPIS TREŚCI

I. HODOWLA <i>HELICOBACTER PYLORI</i> I <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i> ORAZ WYBRANE TESTY DIAGNOSTYCZNE	3
I.1. METODY HODOWLI <i>H. PYLORI</i>	3
I.2. DIAGNOSTYKA <i>H. PYLORI</i>	4
I.3. METODY HODOWLI <i>C. JEJUNI</i>	5
I.4. DIAGNOSTYKA <i>C. JEJUNI</i>	5
I.5. IDENTYFIKACJA SZCZEPÓW <i>HELICOBACTER PYLORI</i> , <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i> , <i>CAMPYLOBACTER COLI</i> , <i>ESCHERICHIA COLI</i>	6
I.6. HORYZONTALNA METODA WYKRYWANIA OBECNOŚCI I OZNACZANIA LICZBY <i>CAMPYLOBACTER SPP.</i> – METODA OPRACOWANA PRZEZ POLSKI KOMITET NORMALIZACYJNY	7
II. MOLEKULARNE METODY STOSOWANE W DIAGNOSTYCE I EPIDEMIOLOGII	8
III. FUNKCJONALNA CHARAKTERYSTYKA CZYN. WIRULENCJI. MUTAGENEZA	10
III.1. MUTAGENEZA <i>C. JEJUNI</i> 72Dz/92 W GENIE <i>CJAA</i>	10
III.2. MUTAGENEZA SPECYFICZNA CO DO MIEJSCA	17
III.2.1. MUTAGENEZA SPECYFICZNA CO DO MIEJSCA W GENIE <i>CJAA</i>	18
III.2.2. PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA MUTAGENEZY SPEC. CO DO MIEJSCA	22
A. Ocena aktywności kwaśnej fosfatazy	22
B. Ukierunkowana mutageneza cysteiny motywu <i>LAAC</i> białka <i>CjaA</i>	24
IV. WPLYW POTRANSLACYJNYCH MODYFIKACJI NA AKTYWNOŚĆ BIAŁEK I PROCESY WIRULENCJI	30
IV.1. GLIKOZYLACJA BIAŁKA <i>CJAA</i>	30
IV.2. WPROWADZANIE MOSTKÓW DWUSIARCZKOWYCH	32
V. ANALIZA WPLYWU ŚRODOWISKA NA POZIOM EKSPRESJI GENÓW. GENY REPORTEROWE	34
V.1. FUZJE Z GENEM REPORTEROWYM <i>LACZ</i>	34
VI. NADPRODUKCJA I OCZYSZCZANIE REKOMBINOWANYCH BIAŁEK; KOMPLEKSY BIAŁKOWE	38
VII. ZASTOSOWANIE METOD BIOINFORMATYCZNYCH W ANALIZIE WIRULENTNYCH BIAŁEK	42
A. PODSTAWOWE ZAGADNIENIA BIOINFORMATYKI	42
B. ANALIZA BIOINFORMATYCZNA WYBRANYCH BIAŁEK <i>C. JEJUNI</i> I <i>H. PYLORI</i>	43

I. HODOWLA *HELICOBACTER PYLORI* I *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ORAZ WYBRANE TESTY DIAGNOSTYCZNE

I.1. METODY HODOWLI *H. PYLORI*

Helicobacter pylori jest bakterią mikroaerofilną i wymaga do wzrostu atmosfery o obniżonej zawartości tlenu (5-15%) i podwyższonej zawartości dwutlenku węgla (10 %). Taki skład powietrza uzyskuje się zamykając szalki lub kolby z posianymi bakteriami w pojemnikach – tzw. anaerostatach, w których umieszcza się saszetki (CampyGen) zawierające związki doprowadzające do ustalenia odpowiedniego składu atmosfery (absorpcja atmosferycznego tlenu z jednoczesnym wydzieleniem dwutlenku węgla).

Do hodowli używa się bogatych podłoży, dodatkowo wzbogacanych przez dodanie krwi końskiej (podłoża stałe) lub surowicy bydlęcej (podłoża płynne).

Podłoża stałe: Blood Agar Base No 2, Brucella Agar lub BHI Agar (*Brain Heart Infusion*) z dodatkiem 10% krwi końskiej.

Podłoża płynne: TSB (*Tryptone Soya Broth*) dodatkowo uzupełniony tryptonem lub Brucella Broth. Do podłoży dodaje się 5 % surowicy bydlęcej (FBS).

Pożywki uzupełnia się zestawem antybiotyków (końcowe stężenia w podłożu):

wankomycyna	12,5 µg/ml,
polimyksyna	1,25 µg/ml,
trimetoprim	6,25 µg/ml,
amfoterycyna B	2,5 µg/ml.

Hodowlę prowadzi się w 37°C, bakterie rosną co najmniej **48 godzin**.



Przygotowanie hodowli *H. pylori*:

1. 8,5 g podłoża Blood Agar Base rozpuścić w 200 ml wody destylowanej i wysterylizować przez autoklawowanie.
2. Gorące podłoże schłodzić do temperatury 50-55°C.
3. Do kolby dodać 0,4 ml zestawu antybiotyków selekcyjnych oraz 20 ml krwi końskiej.
4. Tak przygotowane podłoże rozlać do szalek Petriego i pozostawić do zastygnięcia.
5. Na szalki wysiać bakterie *H. pylori*. Zaszczepione szalki umieścić w anaerostacie.
6. Saszetkę CampyGen włożyć do anaerostatu. Zamknąć szczelnie anaerostat i umieścić go w termostacie na 37°C. Inkubować 2 dni.

I.2. DIAGNOSTYKA *H. PYLORI*

Jest wiele dostępnych i używanych testów wykrywających infekcję *H. pylori* u ludzi. Wybór testu jest uzależniony od lekarza, pacjenta (wieku, ogólnego stanu zdrowia) i możliwości placówki zdrowia. Na ćwiczeniach poznamy dwa z nich - test ureazowy i test serologiczny.



Test ureazowy:

Test wykrywa aktywność enzymatyczną ureazy, charakterystyczną dla komórek *H. pylori*. Ureaza katalizuje rozkład mocznika do amoniaku i dwutlenku węgla. Test wymaga pobrania wycinka śluzówki żołądka pacjenta. Za jego pomocą wykrywa się obecność amoniaku w podłożu, na które kładzie się pobrany wycinek. Amoniak odpowiada za zmianę pH, która z kolei powoduje zmianę koloru podłoża. W trakcie ćwiczeń zamiast wycinka stosować będziemy czystą hodowlę *H. pylori*.

1. Na papierowy krążek znajdujący się w teście ureazowym do wykrywania *H. pylori* nalać kilka kropli wody destylowanej.
2. Z otrzymanej szalki z hodowlą *H. pylori* pobrać eżą niewielką ilość materiału i przenieść na zwilżony krążek.
3. Obserwować zmiany koloru krążka, odczytać wynik testu.



Test serologiczny:

Zakażenie *H. pylori* ma charakter chroniczny i charakteryzuje się podwyższonym poziomem specyficznych przeciwciał klasy IgG długo utrzymujących się we krwi pacjenta (nawet do dwóch lat po zakończeniu leczenia). Prezentowany na ćwiczeniach test diagnostyczny pozwala wykryć specyficzne przeciwciała anty-*Helicobacter pylori* (IgG) we krwi.

Wykonać test diagnostyczny według załączonej przez producenta instrukcji.

I.3. METODY HODOWLI *C. JEJUNI*

Campylobacter jejuni jest również bakterią mikroaerofilną, wymagającą do wzrostu takiego samego składu atmosfery jak *H. pylori*. Hodowlę prowadzi się także w anaerostatach, używając saszetek CampyGen.

Do hodowli używa się podłoża stałego Blood Agar Base No 2 lub Müllera-Hintona (MH) z dodatkiem 7,5% odwłóknionej krwi baraniej lub końskiej, podłoża stałego saponinowego (podłoże BHI z dodatkiem 5% krwi baraniej zlizowanej 10% saponiną) oraz stałego lub płynnego BHI (*Brain-Heart Infusion*). Pożywki uzupełnia się zestawem antybiotyków Campylobacter Selective Supplement (Blaser-Wang) firmy Oxoid w składzie:

wankomycyna	5,0 mg
polimyksyna	1,250 I.U.
trimetoprim	2,5 mg
amfoterycyna B	1,0 mg
cefalotyna	7,5 mg

Ilości antybiotyków dotyczą objętości podłoża 500 ml.
Hodowlę prowadzi się w 42°C.



Przygotowanie hodowli *C. jejuni*:

1. 8,5 g podłoża Blood Agar Base rozpuścić w 200 ml wody destylowanej i wysterylizować przez autoklawowanie.
2. Gorące podłoże schłodzić do temperatury 50-55°C.
3. Do kolby dodać 1 ml zestawu antybiotyków selekcyjnych Campylobacter Selective Supplement oraz 15 ml krwi końskiej.
4. Tak przygotowane podłoże rozlać do szalek Petriego i pozostawić do zastygnięcia.
5. Na szalki wysiać bakterie *C. jejuni*. Zaszczepione szalki umieścić w anaerostacie.
6. Saszetkę CampyGen włożyć do anaerostatu.
7. Zamknąć szczelnie anaerostat i umieścić go w termostacie na 42°C. Inkubować 24 godziny.

I.4. DIAGNOSTYKA *C. JEJUNI*

Wykrywanie i identyfikacja *C. jejuni* oparte są na wyhodowaniu bakterii z próbki kału lub (rzadziej) krwi pacjenta. Powszechnie stosowane są także testy API.



Test hippuranowy:

Test hippuranowy wykrywa aktywność enzymatyczną hippuranazy (aminohydrolaza *N*-benzoiloglicyny), katalizującej hydrolizę wiązania

peptydowego znajdującego się w kwasie hippuranowym z uwolnieniem kwasu benzoesowego i glicyny. Obecność hippuranazy jest charakterystyczna dla komórek *C. jejuni*.

1. 0,4 ml 1% roztworu hippuranu sodu zmieszać z niewielką ilością bakterii (zdrapanych eżą z szalki).
2. Inkubować w 37°C przez 2 godziny.
3. Na zawiesinę bakterii nawarstwić 0,2 ml 3,5% roztworu ninhydryny rozpuszczonej w mieszaninie 1:1 acetonu i butanolu.
4. Obserwować aktywność hippuranidazy *C. jejuni*.

I.5. IDENTYFIKACJA SZCZEPÓW *HELICOBACTER PYLORI*, *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, *CAMPYLOBACTER COLI*, *ESCHERICHIA COLI*



Identyfikacja otrzymanych szczepów:

1. Otrzymane szczepy wysiać na następujące podłoża: BA i LB. Szalki inkubować w 37°C w warunkach mikroaerobowych i tlenowych.
2. Wykonać test hippuranowy i test na obecność ureazy.
3. Przeprowadzić reakcję amplifikacji PCR ze starterami:
wersja A: Mu1 + Mu2 + Mu3 + Mu4
wersja B: CC1 + CC2
wersja C: hipOR2 + hipOF2

Spodziewane wielkości fragmentów DNA to:

wersja A: 773 pz dla *C. jejuni* oraz 364 pz dla *C. coli*

wersja B: 500 pz dla *C. coli*

wersja C: 700 pz dla *C. jejuni*

Uzyskane wyniki wstawić do poniższej tabelki i na ich podstawie zidentyfikować otrzymane szczepy.

			I	II	III	IV
wzrost w warunkach tlenowych	LB	37°C				
		42°C				
	BA z krwią	37°C				
		42°C				
wzrost w warunkach mikroaerobowych	LB	37°C				
		42°C				
	BA z krwią	37°C				
		42°C				
wzrost w warunkach mikroaerobowych w 37°C		antybiotyki Cj				
		antybiotyki HP				
test ureazowy						
test hippuranowy						
PCR	Mu1+Mu2+Mu3+Mu4					
	CC1+CC2					
	hipOR2+hipOF2					
	596up+596low					

I.6. HORYZONTALNA METODA WYKRYWANIA OBECNOŚCI I OZNACZANIA LICZBY *CAMPYLOBACTER* SPP. – METODA OPRACOWANA PRZEZ POLSKI KOMITET NORMALIZACYJNY.

Metoda ta ma zastosowanie do badania żywności i pasz oraz próbek środowiskowych z obszaru produkcji żywności i obrotu żywnością. Badana próbka jest wstępnie inkubowana w płynnej pożywce namnażającej (Bolton broth). Tak uzyskana hodowla jest przesiewana na dwie różne pożywki selektywne. W kolejnym etapie kolonie przypuszczalnie należące do *Campylobacter* są przesiewane na nieselektywną pożywkę, po czym potwierdza się ich przynależność do rodzaju stosując badanie mikroskopowe i odpowiednie testy biochemiczne oraz testy wzrostowe. Dodatkowo można wykonać identyfikację gatunkową drobnoustrojów rodzaju *Campylobacter* z użyciem specyficznych testów biochemicznych czy odpowiednio dobranych starterów do reakcji amplifikacji.



Wykrywanie obecności pałeczek *Campylobacter* w mięsie drobiowym:

Schemat sposobu postępowania:

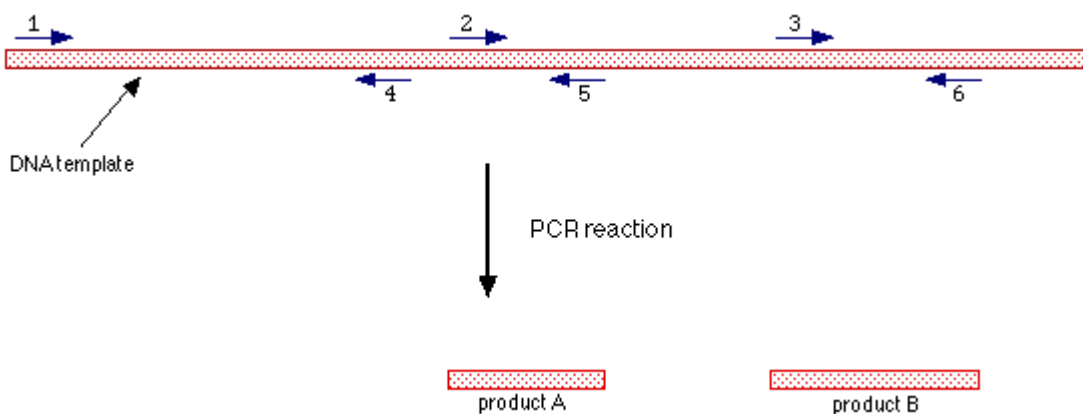
1. Odważyć mięso wraz ze skórą (2 g) i pociąć na małe kawałki
2. Dodać do 18 ml bulionu Boltona (płynna pożywka namnażająca)
3. NAMNAŻANIE: Inkubacja w atmosferze mikroaerobowej w temperaturze 37°C przez 4 do 6 h, a następnie w temperaturze 41,5°C przez 44 h ±4 h.
4. IZOLOWANIE: wysiać odpowiednie rozcieńczenia na dwie pożywki: pożywkę agarową z węglem drzewnym, cefoperazonem i dezoksycholanem (mCCD) oraz BA No. 2.
5. Inkubacja w atmosferze mikroaerobowej w temperaturze 41,5°C przez 44 h ±4 h.
6. Obserwacja i ocena morfologii kolonii.

II. MOLEKULARNE METODY STOSOWANE W DIAGNOSTYCE I EPIDEMIOLOGII

Jedną z metod wykorzystywanych w analizie podobieństwa szczepów drobnoustrojów jest RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), czyli metoda losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA. Została ona po raz pierwszy zastosowana w 1990 r. przez Williama i wsp. W RAPD, w reakcji amplifikacji stosuje się jeden krótki, losowo zsyntetyzowany starter (5-15 nukleotydów). Przyłącza się on do obu nici DNA w wielu miejscach generując powstanie od kilku do kilkunastu produktów amplifikacji.

Amplifikację przeprowadza się w stosunkowo niskiej temperaturze przyłączania startera ($T_a = 35-45^\circ\text{C}$), co umożliwia jego hybrydyzację do nie w pełni homologicznych sekwencji matrycowych.

Profil elektroforetycznego rozdziału produktów reakcji RAPD jest charakterystyczny dla każdego z analizowanych szczepów. Podobieństwo wzorów uzyskanych w tym teście pozwala na wstępną ocenę pokrewieństwa badanych szczepów.



Ryc. 1. Schemat metody.



Genotypowanie szczepów *Enterobacteriaceae* oraz szczepów *Neisseria meningitidis*

1. Przygotować mieszaniny reakcyjne PCR wg. schematu podanego poniżej (tab. 1)
2. Probówki z dokładnie wymieszanymi składnikami umieścić w aparacie PCR i przeprowadzić reakcję amplifikacji zgodnie z parametrami podanymi w tabeli 1.
3. Namnożony DNA rozdzielić w 1% żelu agarozowym (*Enterobacteriaceae*) bądź 2% żelu agarozowym (*Neisseria meningitidis*) i porównać profil elektroforetyczny fragmentów DNA analizowanych szczepów.

Tab. 1. Parametry reakcji PCR stosowanych do genotypowania szczepów *Enterobacteriaceae* oraz szczepów *Neisseria meningitidis*

Przedmiot badań	Primer:	Skład mieszaniny reakcyjnej	Warunki kolejnych etapów PCR
<i>Enterobacteriaceae</i> 7 szczepów: 1250/07 - A 2715/07 - B 2716/07 - C 2717/07 - D 2718/07 - E 2719/07 - F 2720/07 - G	AP1 - 1 AP7 - 2 1247 - 3 1254 - 4 1283 - 5	Bufor bez MgCl ₂ (10x) 1 µl MgCl ₂ (25 mM) 1 µl dNTP (1 mM) 1 µl Taq DNA polimeraza 0,1 µl Primer (50 mM) 0,2 µl Matryca 1 µl Woda 5,7 µl <u>Końcowa objętość 10 µl</u>	predenaturacja: 94°C, 5 min 35 cykli: 94°C, 15 s 35°C, 30 s 72°C, 2 min zakończenie: 72°C, 7 min
<i>Neisseria meningitidis</i> 6 szczepów: 603/03 - H 8286/99 - I 2727/00 - J 1920/03 - K 274/02 - L 2028/03 - M 1113/05 - N 562/05 - O 4406/05 - P	1254 - 4 1283 - 5 1281 - 6	Bufor bez MgCl ₂ (10x) 1,5 µl MgCl ₂ (25 mM) 1,5 µl dNTP (1 mM) 1,5 µl Taq DNA polimeraza 0,25 µl Primer (50 mM) 1 µl Matryca 1 µl Woda 8,25 µl <u>Końcowa objętość 15 µl</u>	predenaturacja: 94°C, 5 min 5 cykli: 94°C, 15 s 35°C, 30 s 72°C, 30 s 30 cykli: 94°C, 15 s 55°C, 15 s 72°C, 30 s zakończenie: 72°C, 7 min

III. FUNKCJONALNA CHARAKTERYSTYKA CZYNNIKÓW WIRULENCJI - MUTAGENEZA

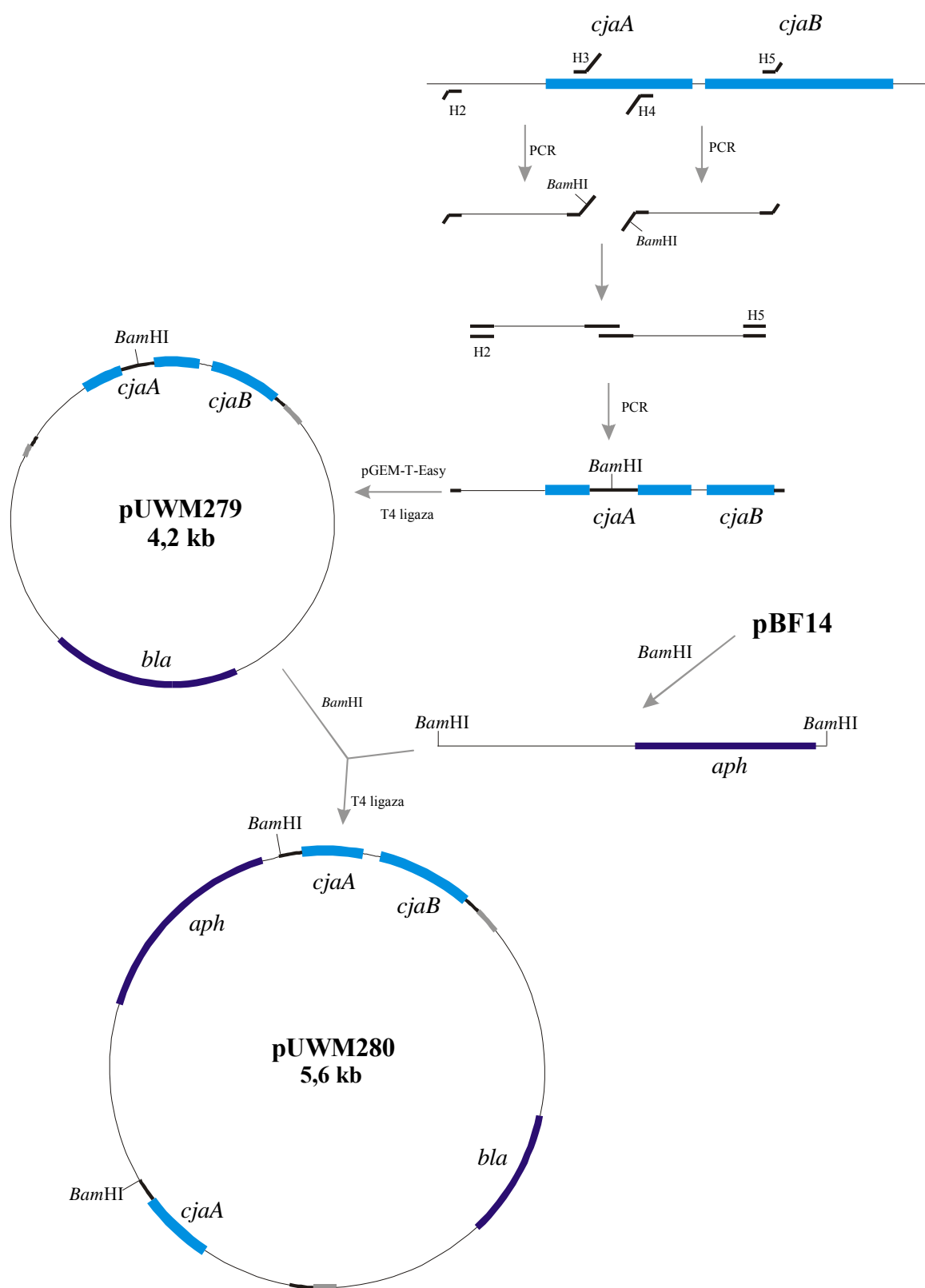
Mutageneza to jedno z użytecznych narzędzi biologii molekularnej służących do badania funkcji genu w komórce bakteryjnej. Do tego celu można również wykorzystać analizę komputerową (*in silico*) lub analizę fenotypu komórek nadprodukcujących produkt interesującego nas genu. Niejednokrotnie dopiero zastosowanie wszystkich trzech strategii prowadzi do uzyskania pełnych i wiarygodnych wyników.

III.1. MUTAGENEZA *C. JEJUNI* 72Dz/92 W GENIE *CJAA*

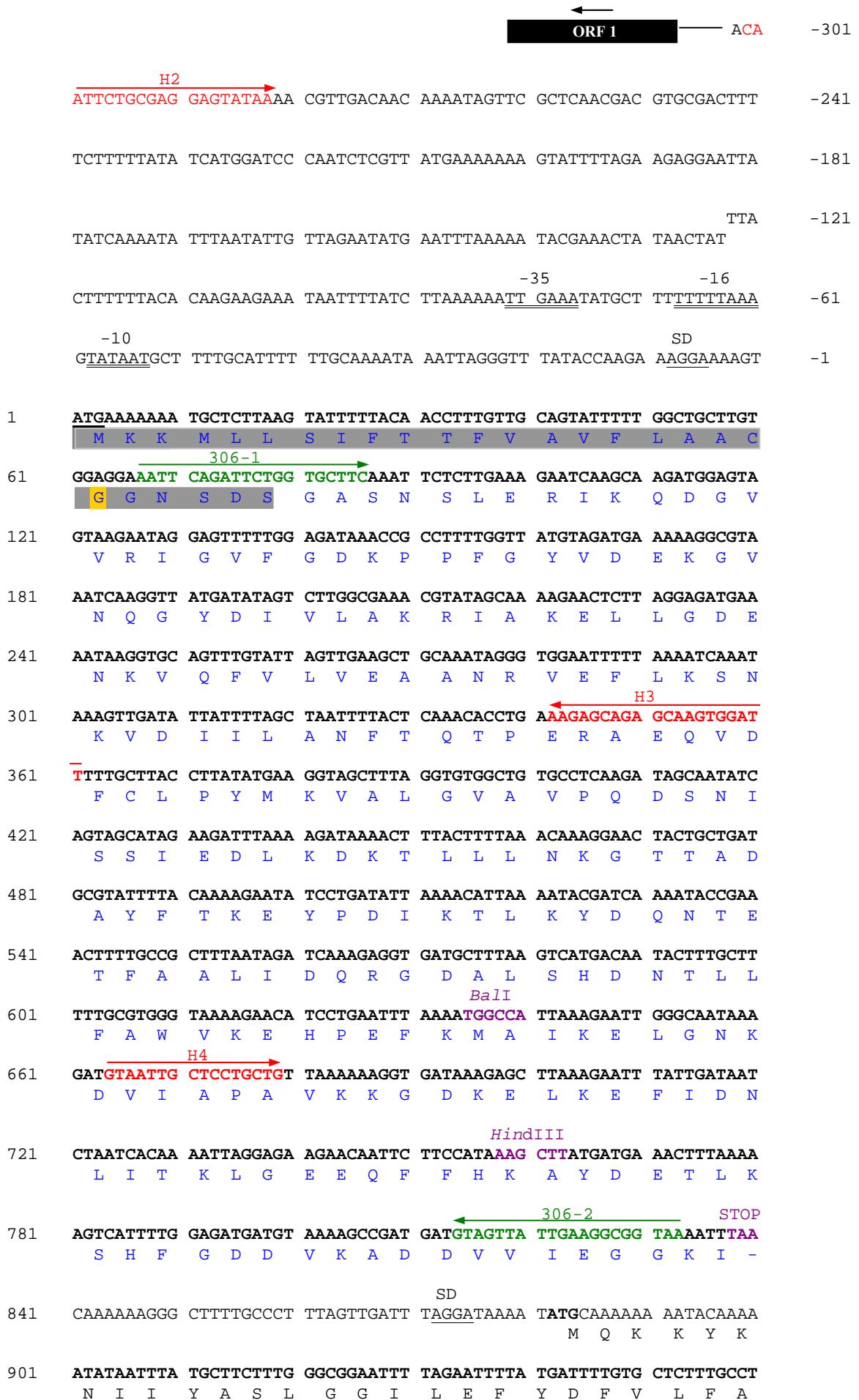
W ramach ćwiczeń przedstawiamy jedną z metod konstrukcji mutanta, gdzie materiałem doświadczalnym będzie gen *cjaA* *C. jejuni* 72Dz/92, kodujący 30 kDa immunopozytywne białko.

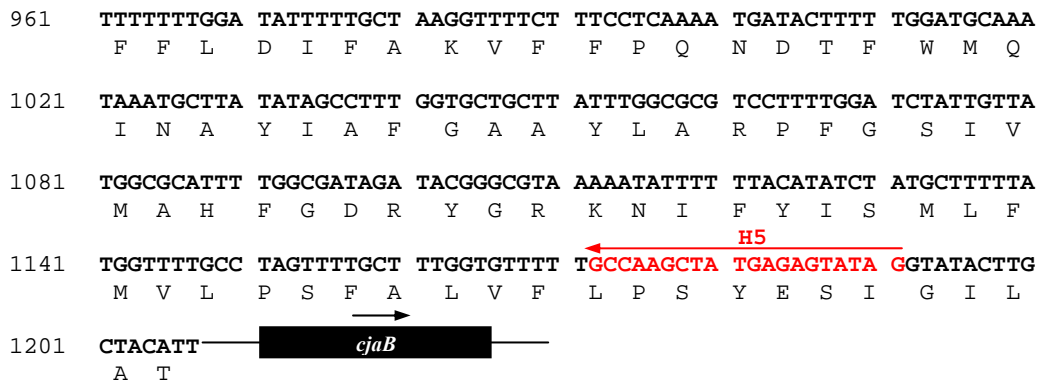
Konstrukcję izogenicznego **delecyjnego** mutanta w genie *cjaA* metodą “**gene replacement**” należy przeprowadzić wykorzystując przygotowany uprzednio samobójczy plazmid (pUWM280). Poszczególne etapy jego konstrukcji opisano poniżej i przedstawiono schematycznie na Ryc. 2. Sekwencje starterów użytych w reakcjach PCR umieszczono w Tab. 2., zaznaczono je również na Ryc. 3.

W pierwszym etapie konstrukcji zamplifikowano techniką PCR dwa fragmenty DNA flankujące centralny region genu *cjaA* wielkości 302 pz (Ryc. 2 i 3). W reakcjach zastosowano dwie pary starterów (H2 i H3; H4 i H5), a jako matrycę chromosomowy DNA *C. jejuni* 72Dz/92. Startery H3 i H4 posiadają dodany na 5' końcach region wzajemnie komplementarny, w obrębie którego zaplanowano miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez endonukleazę *Bam*HI. W wyniku dwóch niezależnych reakcji otrzymano odcinki DNA o wielkościach odpowiednio 663 pz i 528 pz. Produkty PCR oczyszczono z żelu agarozowego, a następnie ich mieszaninę użyto jako matrycę w kolejnej reakcji amplifikacji. Jako startery zastosowano jedynie “zewewnętrzne” oligonukleotydy: H2 i H5. Zsyntetyzowany produkt PCR, o długości ok. 1191 pz zawiera delecję (302 pz) w genie *cjaA* oraz centralnie położoną sekwencję rozpoznawaną przez restryktazę *Bam*HI. Oczyszczony z żelu fragment DNA ligowano z wektorem pGEM-T-Easy. Zrekombinowany plazmid oznaczono pUWM279. Następnie w unikatowe miejsce restrykcyjne *Bam*HI wstawiono kasetę zawierającą gen warunkujący oporność komórek na kanamycynę (Ryc. 4). Kasetę wycięto z plazmidu pBF14, który jest wektorem **wahadłowym** (replikującym się zarówno w komórkach *E. coli* jak i *C. jejuni*) zawierającym kasetę Km^r oflankowaną licznymi miejscami restrykcyjnymi (Ryc. 5). Tak otrzymano docelowy konstrukt do mutagenezy, który nazwano **pUWM280**.



Ryc. 2. Schemat i szczegóły konstrukcji wektora samobójczego służącego do mutagenезy *C. jejuni* w genie *cjaA*.





Ryc. 3. Sekwencja nukleotydoma fragmentu DNA *C. jejuni* 72Dz/92 zawierającego gen *cjaA*.

Obszar zacieniowany stanowi sekwencja sygnałna. Na rysunku zaznaczono również sekwencje promotorowe (-10, -16 i -35), kodon “stop”, miejsce wiązania rybosomów (SD) oraz startery wykorzystywane na ćwiczeniach.

Tab. 2. Stosowane oligonukleotydy.

Nazwa	Sekwencja startera*
H2	5' AGTCTAGAGTTAAGACGCTCCTCATATT 3'
H3	5'ACCCGGGATCGATGGATCCGAATCCACTTGCTCTGCTCTT 3'
H4	5'CGGATCCATCGATCCCGGGTAGATGTAATTGCTCCTGCTG 3'
H5	5' ATCTCGAGCTATACTCTCATAGCTTGGC 3'
306-1	5' ACA GGATCCGAATTCAGATTCTGGTGCTTC 3'
306-2	5' ACAGGATCCTTACCGCCTTCAATAACTAC 3'
kanL	5' TATCACCTCAAATGGTTCGCTGGG 3'
kanR	5' GGGGATCAAGCCTGATTGGGAGA 3'

- wytłuszczono regiony komplementarne do DNA *C. jejuni*

Mutagenezę *C. jejuni* w genie *cjaA* należy przeprowadzić wprowadzając do komórek **samobójczy** (nie replikujący się w komórkach *Campylobacter*) plazmid pUWM280 techniką elektroporacji. Izolowane elektroporanty Km^r będą zawierać w chromosomie zinaktywowany gen *cjaA* w miejscu dzikiego allelu. Zjawisko podwójnego “crossing-over” należy potwierdzić metodą PCR stosując różne kombinacje starterów: 306-1, 306-2, kanL i kanR.



Sprawdzenie poprawności konstruktów do mutagenezy:

1. Otrzymany od asystenta DNA plazmidu pUWM280 strawić odpowiednią restryktazą (patrz: Ryc. 2) Mieszanina reakcyjna powinna zawierać: 1-17 µl DNA, 2 µl 10x stężonego buforu (charakterystyczny dla danego enzymu) oraz 1 µl enzymu. W miarę potrzeby mieszaninę uzupełnić wodą do końcowej objętości 20 µl.
2. Trawienie prowadzi się w 37°C przez 1,5 godz. lub 10 min w przypadku zastosowania enzymów Fast Digest. Następnie strawiony DNA rozdzielić w żelu agarozowym.



Elektroporacja komórek *C. jejuni* 72Dz/92:

1. Otrzymane od asystenta komórki kompetentne *C. jejuni* 72Dz/92 rozmrozić w lodzie i dodać 2 μ l (ok. 1-2 μ g) DNA plazmidu samobójczego pUWM280.
2. Mieszaninę przenieść do schłodzonej kuwety elektroporacyjnej 0,1 cm i przeprowadzić elektroporację stosując następujące parametry: 0,7 kV, 600 Ω , 25 μ F.
3. Bakterie zawiesić (wypłukać z kuwety) w 1 ml podłoża BHI, odwirować a następnie zawiesić w 150 μ l podłoża BHI.
4. Elektroporanty wysiać na szalkę stałego podłoża BHI (lub innego podłoża do hodowli *Campylobacter*) i inkubować w warunkach mikroaerofilnych przez 5 godzin (lub przez noc) w 42°C (etap wyrażania).
5. Następnie zmyć bakterie z szalki przy pomocy 1 ml płynnego podłoża BHI, odwirować, zawiesić w 150 μ l podłoża BHI i całość wysiać na szalkę z podłożem selekcyjnym zawierającym kanamycynę (30 μ g/ml). Bakterie inkubować w 42°C w warunkach mikroaerofilnych przez 2-3 dni.



Potwierdzenie prawidłowości konstrukcji otrzymanego mutantu *C. jejuni* 72Dz/92 w genie *cjaA* metodą PCR:

W celu potwierdzenia prawidłowego przebiegu mutagenyzy w genie *cjaA* każdy zespół studentów wykonuje reakcję PCR wykorzystując wybraną parę starterów - jeden z wariantów zamieszczonych w tabeli poniżej. Należy obliczyć wielkość spodziewanych fragmentów DNA, produktów reakcji amplifikacji. Matrycą w reakcjach amplifikacji będzie DNA chromosomowy mutantów uzyskanych przez poszczególne zespoły. Materiał do izolacji (mutant wysiany na podłożu stałym) zespoły otrzymają od asystenta.

L.p.	Matryca	Starter lewy	Starter prawy
1	DNA szczepu dzikiego	306-1	306-2
2	DNA mutantu	306-1	306-2
3	DNA mutantu	306-1	kanL
4	DNA mutantu	306-1	kanR
5	DNA mutantu	306-2	kanL
6	DNA mutantu	306-2	kanR
7	DNA mutantu	kanR	kanL
8	DNA szczepu dzikiego	kanR	kanL



Izolacja chromosomowego DNA metodą “chelexowa”:

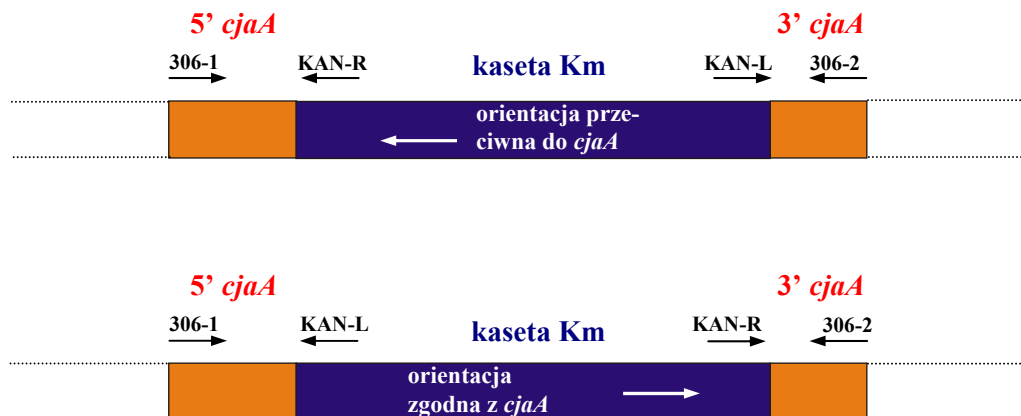
1. Bakterie zebrać z szalki eżą (1 pełne “oczko”)
2. Zawiesić w 600 μ l TE, odwirować (5 min., 12 tys. obr/min.) i ponownie zawiesić w 100 μ l TE
3. Dodać 50 μ l 10% chelexu i gotować 10 min.
4. Do nowej probówki zebrać górną warstwę, w której znajduje się DNA chromosomowy.



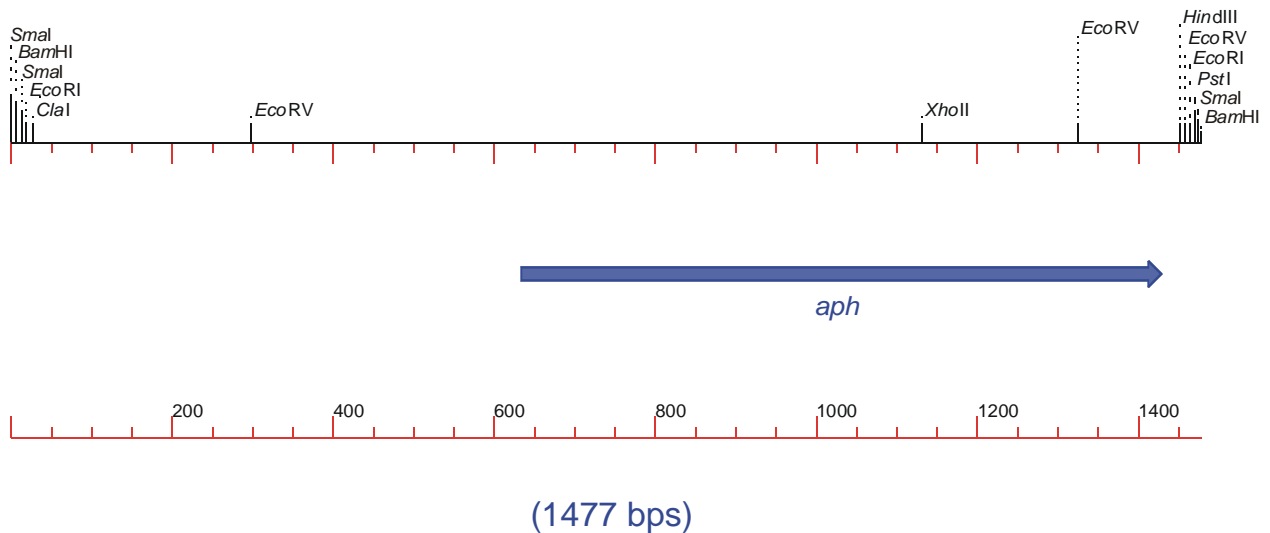
PCR

1. Po wyizolowaniu chromosomowego DNA należy przygotować mieszaniny reakcyjne PCR w następujących proporcjach:
 - 1 μ l DNA chromosomalnego szczepu mutanta,
 - 1 μ l startera lewego,
 - 1 μ l startera prawego,
 - 2 μ l dNTP,
 - 5 μ l buforu dla polimerazy,
 - 39 μ l wody
 i jako ostatni dodawany składnik 1 μ l termostabilnej polimerazy DNA.
2. Probówki z dokładnie wymieszanymi składnikami umieścić w aparacie PCR i przeprowadzić reakcję amplifikacji zgodnie z parametrami:
 - temperatura wiązania starterów 55°C,
 - czas wiązania starterów 30’’
 - czas wydłużania starterów 150’’.

Sekwencje starterów znajdują się w Tab. 2., a pozycje starterów zaznaczono na sekwencji DNA zawierającej gen *cjaA* - Ryc. 3.



Ryc. 4. Schemat uszkodzonego allelu genu *cjaA* (wstawka plazmidu pUWM280), umiejscowienie starterów użytych w reakcji PCR.



Ryc. 5. Fragment DNA plazmidu pBF14 zawierający gen *aph*.

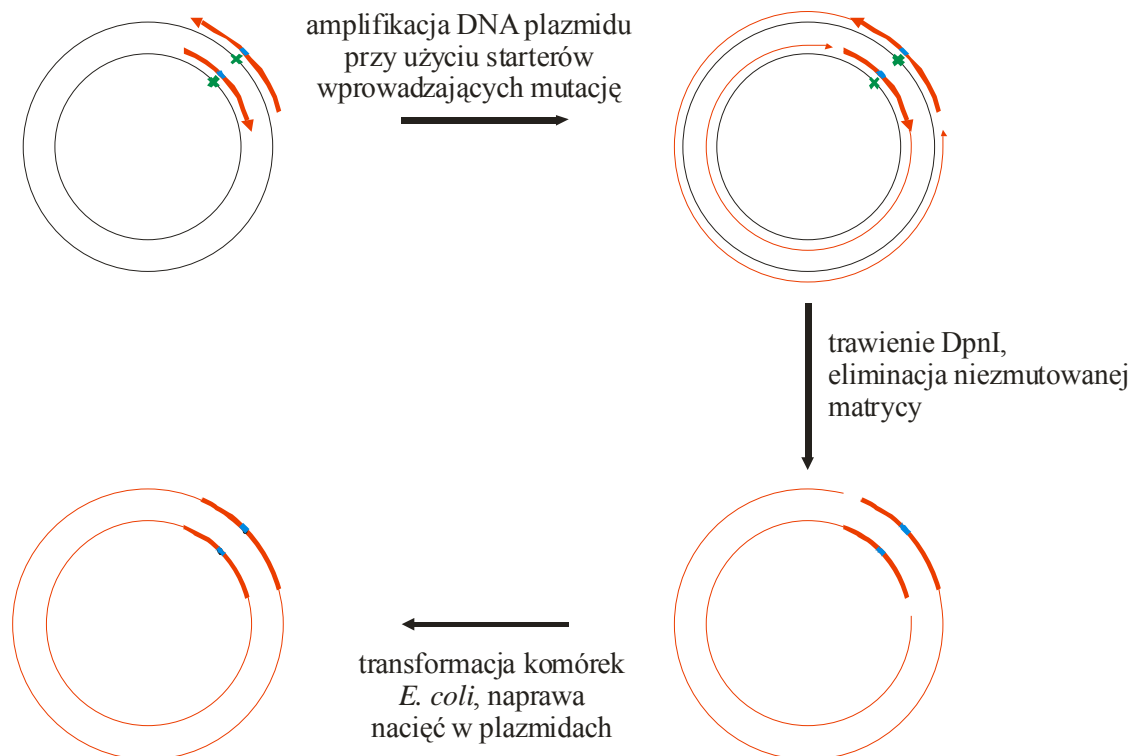


Elektroforeza w żelu agarozowym preparatów DNA uzyskanych w reakcji PCR:

1. Przygotować 0,8% (zapewnia rozdział cząsteczek wielkości ok. 0,5-10 kb) żel agarozowy w buforze TAE (40 mM Tris pH 7,6; 5 mM octan sodu; 1 mM EDTA).
2. Do dołków żelu nanieść 10 µl mieszaniny poreakcyjnej PCR. Przed nałożeniem do prób dodać 1/6 objętości barwnika (0,25% błękit bromofenolowy, 30% glicerol w wodzie). Preparaty poszczególnych reakcji amplifikacji nanosić zgodnie z kolejnością podaną w tabeli.
3. Elektroforezę przeprowadzać do momentu osiągnięcia przez barwnik 1/2 długości żelu. Żel barwić w roztworze bromku etydyny o stężeniu końcowym 0,5 µg/ml. Rozdzielony DNA oglądać w świetle UV o długości fali 300 nm. Obliczyć wielkość produktów reakcji PCR powstałych w poszczególnych reakcjach amplifikacji przeprowadzanych na poprzednich ćwiczeniach.

III.2. MUTAGENEZA SPECYFICZNA CO DO MIEJSCA

Do przeprowadzenia mutagenazy ukierunkowanej zostanie wykorzystana metoda Quik Change Site-Directed Mutagenesis, której schemat przedstawiono na Ryc. 6.



Ryc. 6. Schemat metody Quik Change Site-Directed Mutagenesis.

Jako matryca, w reakcji PCR, wykorzystywany jest plazmidowy DNA. Do wprowadzenia zmiany stosowane są startery komplementarne do sekwencji obu nici (każdy z nich zawiera zaplanowaną mutację). W reakcji amplifikacji (przeprowadzona z użyciem polimerazy *Pfu* z *Pyrococcus furiosus*) powstają kopie obydwu nici plazmidu, które mogą ze sobą hybrydyzować tworząc dwuniciową strukturę z niepokrywającymi się przerwami. W kolejnym etapie w wyniku zastosowania restryktazy DpnI rozpoznającej jedynie zmetylowane sekwencje DNA eliminowane są rodzicielskie, niezmutowane plazmidy (produkty reakcji PCR powstałe *in vitro* nie są metylowane). Tak uzyskany DNA wprowadzany jest następnie na drodze transformacji do komórek *E. coli*, w których zostają naprawione nacięcia i plazmidy ulegają replikacji. Izolowany z komórek transformantów DNA plazmidowy poddać należy analizie sekwencyjnej.

Zasady tworzenia starterów stosowanych do wprowadzania mutacji punktowych:

1. Startery powinny być komplementarne do sekwencji obu nici (każdy z nich powinien zawierać zaplanowaną mutację);
2. Długość starterów powinna zawierać się w zakresie 25 – 45 pz, a T_m starterów winna być większa lub równa 78°C . T_m oblicza się stosując następujący wzór:

$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ zmian}$, gdzie:

N to długość startera w pz

wartości %GC i % zmian są liczbami całkowitymi;

4. Wprowadzana zmiana powinna być zaplanowana w środku startera (10-15 pz prawidłowej sekwencji nukleotydowej z obu stron wprowadzanej mutacji);
5. Optymalna zawartość par GC nie powinna być mniejsza niż 40%;
6. Startery powinny na końcu 3' mieć jedną lub kilka par G lub C.

III.2.1 MUTAGENEZA SPECYFICZNA CO DO MIEJSCA W GENIE CJAA

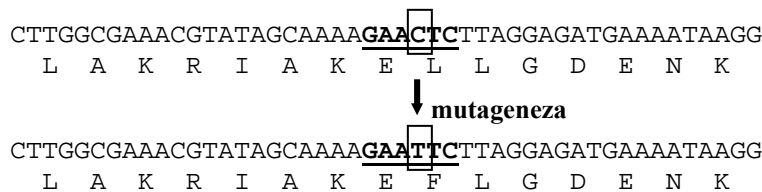
W ramach ćwiczeń w reakcji PCR jako matryca zostanie wykorzystany DNA plazmidu pUWM76. Do wprowadzenia zmiany, której efektem będzie „pojawienie się” miejsca rozpoznawanego przez restryktazę EcoRI, użyte zostaną startery komplementarne do sekwencji obu nici „insertu”: **Af_Eco1** oraz **Af_Eco2**. Każdy z nich zawiera zaplanowaną mutację.

sekwencje starterów:

Af_Eco1 5' GCGCAAACGTATAGCAAAAGAACTC**TTAGGAGATGAAAATAAGG 3'**

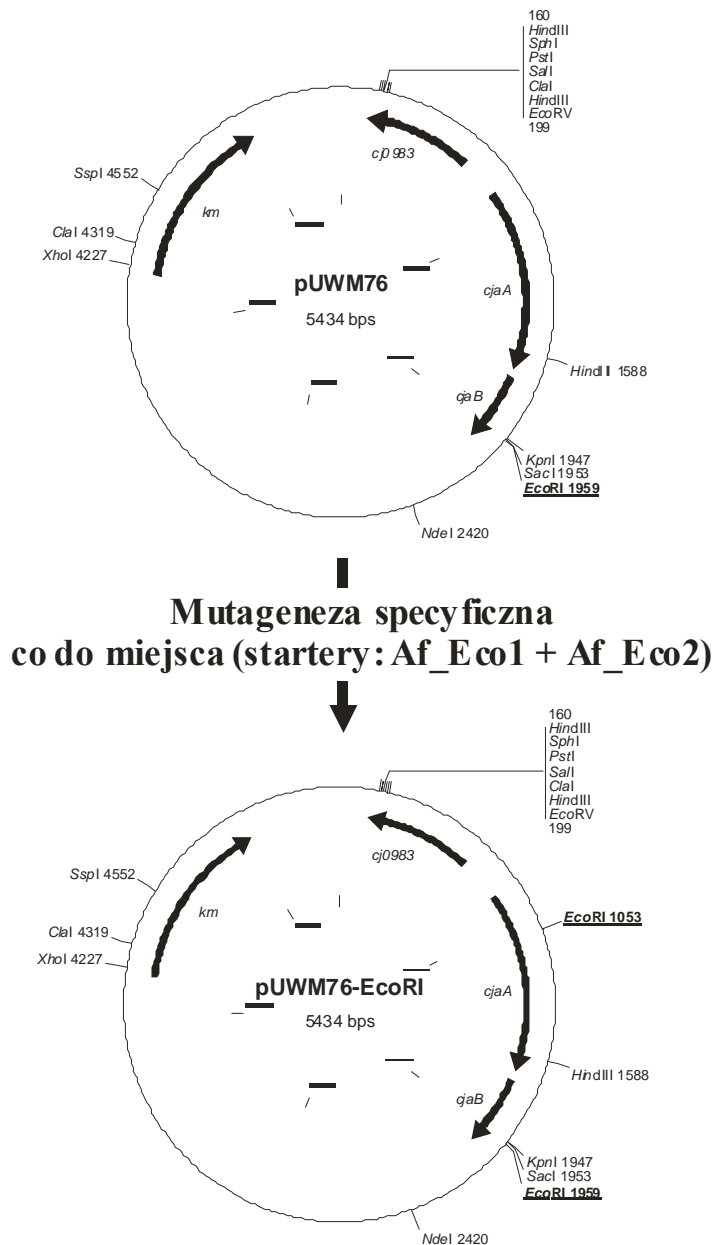
Af_Eco2 5' CCTTATTTTCATCTCCTAAGAATTCTTTTGCTATACGTTTCGCC 3'

Cytozyna w pozycji 879 wstawki zastąpiona zostanie tyminą. Dzięki tym zmianom powstanie sekwencja nukleotydowa GAATTC. Pociągnie to za sobą zmianę aminokwasu w pozycji 76 (leucyna zastąpiona zostanie fenyloalaniną) (Ryc. 7, 8).



Ryc. 7. Fragment sekwencji nukleotydowej „wstawki” plazmidu pUWM76 poddany mutagenezie specyficznej co do miejsca.

Wprowadzenie zmiany zostanie potwierdzone na drodze analizy restrykcyjnej (trawienie przy użyciu EcoRI).



Ryc. 8. Schemat mutagenesy specyficznej co do miejsca prowadzący do powstania miejsca EcoRI w obrębie sekwencji kodującej gen *cjaA*.



PCR:

Mieszaninę reakcyjną należy przygotować wg. następującego schematu:

- x μ l (5-50 ng) DNA plazmidowego,
- x μ l (125 ng) startera 1,
- x μ l (125 ng) startera 2,
- 2 μ l dNTP,
- 5 μ l 10x buforu dla polimerazy,
- woda do 50 μ l

i jako ostatni dodawany składnik 1 μ l polimerazy *Pfu* (2,5 u/ μ l).

Warunki reakcji:

liczba cykli	temperatura	czas
1	95°C	30 sek
12-18	95°C	30 sek
	55°C	1 min
	68°C	2 min/ kb

rodzaj mutacji	liczba cykli
zmiana nukleotydu	12
zmiana pojedynczego aminokwasu	16



Trawienie DpnI:

1. Mieszaninę reakcyjną należy przygotować wg. następującego schematu:
17 μ l produktu PCR,
2 μ l 10x buforu dla DpnI,
1 μ l DpnI.
2. Reakcję prowadzić w 37°C przez 1 godzinę.



Transformacja komórek *E. coli* (metoda wapniowo-rubidowa):

A. Przygotowanie komórek kompetentnych:

1. Nocną hodowlę *E. coli* zaszczyć w stosunku 1:100 do nowej porcji pożywki i hodować z intensywnym wytrząsaniem do uzyskania OD₆₀₀ 0,4-0,5.
2. Hodowlę schłodzić przez 5 minut w lodzie i wirować przy 5000 obr /min w 4°C.
3. Osad otrzymany z 20 ml hodowli zawiesić w 10 ml oziębionego roztworu I do transformacji i ponownie wirować w tych samych warunkach.
4. Po usunięciu supernatantu osad zawiesić w 2 ml roztworu II do transformacji.
5. Komórki kompetentne poporcjować po 200 μ l i zamrozić w roztworze II do transformacji z dodatkiem 10% glicerolu. Przechowywać je w -70°C.

Roztwór I: 10 mM MOPS (pH 7,0); 10 mM RbCl;

Roztwór II: 100 mM MOPS (pH 6,5); 50 mM CaCl₂; 10 mM RbCl.

B. Transformacja bakterii:

1. Do 200 μ l zawiesiny komórek kompetentnych dodać plazmidowy DNA (20 - 200 ng).
2. Po 15 minutach inkubacji w lodzie komórki poddać szokowi cieplnemu w 43°C przez 50 sekund, dodać 1 ml płynnego podłoża LB.

3. Przed posiewem na odpowiednie podłoże selekcyjne (LB+Km 40 µg/ml) bakterie inkubować przez 40 minut w 37°C bez wytrząsania.



Izolacja plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej:

1. Osad z 1,5 ml nocnej hodowli bakteryjnej na podłożu pełnym zawiesić w 100 µl zimnego roztworu I i inkubować 5 minut w temperaturze pokojowej.
2. Dodać 200 µl roztworu II, wymieszać przez kilkukrotne odwrócenie próbki (aż do całkowitej lizy komórek – nie wortexować) i inkubować w lodzie 5 minut.
3. Dodać 150 µl roztworu III, wymieszać i po 5 minutach w lodzie zwirować.
4. Do zebranego supernatantu dodać 1 ml 96% alkoholu etylowego.
5. Preparat wirować 15 minut, osad przemyć 70% etanolem, wysuszyć i zawiesić w buforze TE (objętość 20–50 µl).

Roztwór I: 50 mM glukoza; 25 mM Tris HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA (pH 8,0);

Roztwór II: 0,2 N NaOH; 1 % SDS;

Roztwór III: 3 M octan potasu; 5 M lodowaty kwas octowy; pH 4,8



Trawienie DNA plazmidowego enzymem EcoRI:

1. Mieszaninę reakcyjną należy przygotować wg. następującego schematu:
10 µl produktu PCR,
2 µl 10x buforu dla EcoRI,
7 µl H₂O,
1 µl EcoRI.
2. Reakcję prowadzić w 37°C przez 1 godzinę. 20 minut przed zakończeniem trawienia dodać 1 µl RN-azy (1 mg/ml).



Elektroforeza w żelu agarozowym produktów trawienia EcoRI:

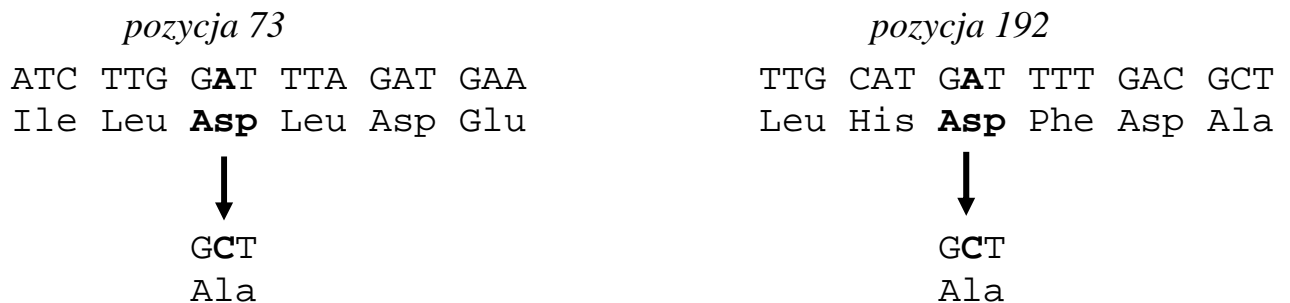
1. Przygotować 0,8 % żel agarozowy w buforze TAE (40 mM Tris pH 7,6; 5 mM octan sodu; 1 mM EDTA).
2. Do dołków żelu nanieść całość mieszaniny reakcyjnej. Przed nałożeniem do prób dodać 1/6 objętości barwnika (0,25% błękit bromofenolowy, 30% glicerol w wodzie).
3. Elektroforezę przeprowadzać do momentu osiągnięcia przez barwnik 1/2 długości żelu. Żel barwić w roztworze bromku etydyny o stężeniu końcowym 0,5 µg/ml. Rozdzielony DNA oglądać w świetle UV o długości fali 300 nm.

III.2.2. PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA MUTAGENEZY SPECYFICZNEJ CO DO MIEJSCA.

A. Ocena aktywności kwaśnej fosfatazy w mutantach białka HP1285 *Helicobacter pylori*.

Komputerowa analiza porównawcza modelu struktury trzeciorzędowej białka HP1285 i dostępnych baz danych wskazywała, że HP1285 należy najprawdopodobniej do rodziny kwaśnych niespecyficznych fosfataz. Teoretycznie określono aminokwasy znajdujące się w centrum aktywnym.

W celu sprawdzenia poprawności stworzonego *in silico* modelu przeprowadzono ukierunkowaną mutagenезę genu HP1285. Mutagenезie poddano dwa kodony kodujące kwas asparaginowy (pozycja 73 i 192). Adenina będąca drugim nukleotydem tripletu kodującego asparaginian (GAT) została zastąpiona cytozyną, co spowodowało powstanie kodonu kodującego alaninę (GCT).



Asparaginian jest aminokwasem o ładunku ujemnym. Jego zamiana na prosty aminokwas o ładunku obojętnym, jakim jest alanina, zwłaszcza w centrum aktywnym enzymu, może mieć wpływ na reaktywność białka, np. może spowodować osłabienie lub całkowite uniemożliwienie wiązania substratu w centrum katalitycznym białka.

Wykonanie ćwiczenia:

Aktywność fosfatazy mierzy się w lizatach komórkowych uzyskanych przez sonikację komórek bakteryjnych. W każdym lizacie oznaczono całkowitą zawartość białek metodą Bradforda. Do pomiaru aktywności enzymatycznej należy pobrać 0,05 mg białka.

Pomiar aktywności kwaśnej fosfatazy zostanie przeprowadzony w ekstraktach komórkowych następujących szczepów bakteryjnych:

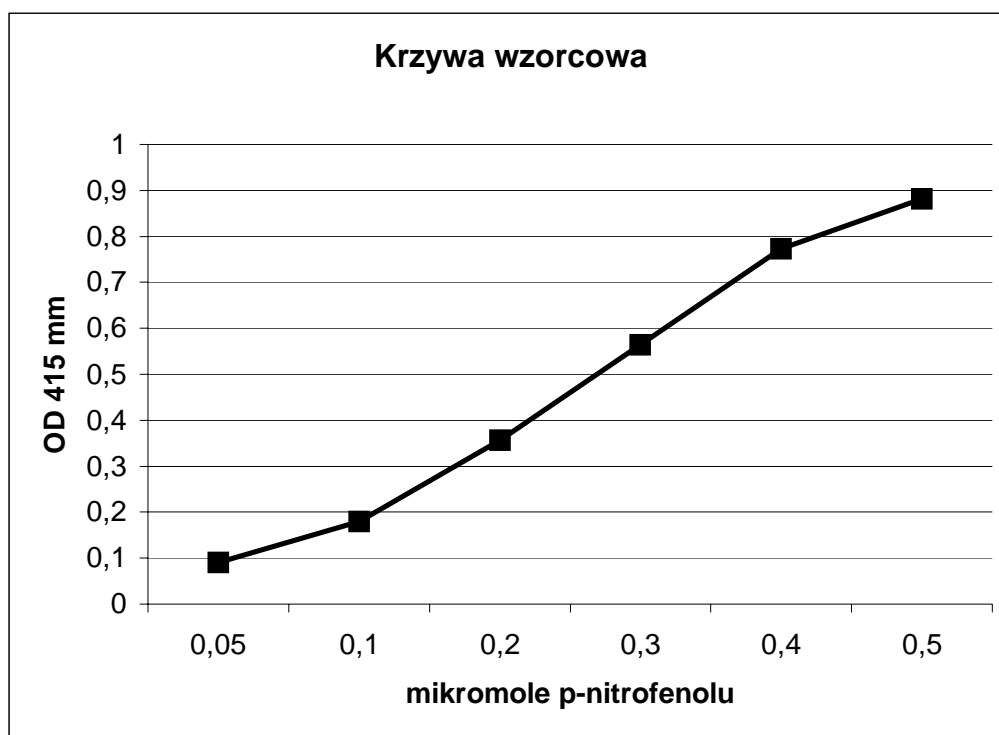
- *E. coli*/ pBluescript (kontrola negatywna);
- *E. coli*/pUWM314 – białko HP1285 z kwasem asparaginowym w pozycji 73 zamienionym na alaninę;
- *E. coli*/pUWM315 - białko HP1285 z kwasem asparaginowym w pozycji 192 zamienionym na alaninę;
- *E. coli*/pUWM192 - „dzika” wersja białka HP1285;
- *E. coli*/LppC – kwaśna fosfataza LppC pochodząca z *Streptococcus equisimilis* (kontrola pozytywna).

Test aktywności enzymatycznej przeprowadzony zostanie w 0,1 M octanie sodu |o pH 5,6 w 37°C. Jako substrat w reakcji stosowany jest fosforan *p*-nitrofenolu (*p*NPP). Związek ten hydrolizowany jest przez kwaśną fosfatazę do *p*-nitrofenolu i ortofosforanu nieorganicznego (P_i). Reakcję zatrzymuje dodanie 0,2 N NaOH, który powoduje powstanie związku o żółtym zabarwieniu.



Oznaczenie aktywności kwaśnej fosfatazy:

1. Przygotować następującą mieszaninę:
100 µl badanej próby;
50 µl roztworu pNPP;
350 µl buforu octanowego pH 5,6.
2. Mieszaninę inkubować 30 min. w 37°C.
3. Zatrzymać reakcję przez dodanie 0,5 ml 0,2 N NaOH.
4. Aktywność fosfatazy ocenić spektrofotometrycznie, przy długości fali 415 nm, mierząc ilość uwalnianego *p*-nitrofenolu. Wyniki podać w mikromolach uwolnionego pNP/minute/miligram białka, korzystając z krzywej wzorcowej (Ryc. 9).

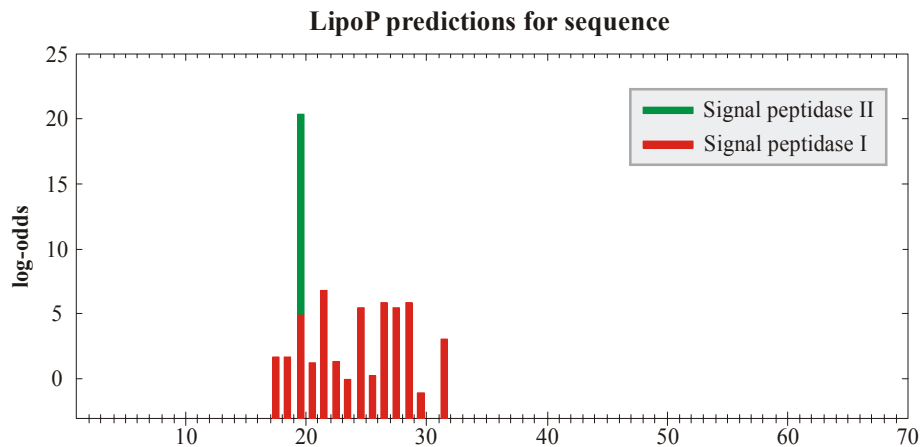


Ryc. 9. Krzywa wzorcowa.

B. Ukierunkowana mutagenезa cysteiny motywu LAAC białka CjaA

Analiza komputerowa sekwencji aminokwasowej białka CjaA wykazała na jej końcu aminowym obecność sekwencji sygnałnej. W jej obrębie wyróżnić można region polarny (n) składający się z aminokwasów posiadających dodatnio naładowane grupy (MKK) oraz 13 aminokwasowy odcinek hydrofobowy (MLLSIFTTFVAVF), za którym występuje zgodny w 100% z sekwencją konsensusową ([LV][ASTVI][AGS]↓[C]) charakterystyczny dla lipoprotein motyw LAA↓C. Tetrapeptyd ten rozpoznaje peptydaza II - enzym hydrolizujący wiązanie między cysteiną i poprzedzającym ją aminokwasem. Na końcu aminowym białka CjaA stwierdzono także obecność sekwencji rozpoznawanej przez sygnałną peptydazę I. Najbardziej prawdopodobne miejsce cięcia dla tego enzymu znajduje się między dwoma resztami glicyny w obrębie sześćioaminokwasowego motywu G↓GNSDS (pozycja 21-26) (Ryc. 10). Analiza komputerowa nie dała więc jednoznacznej odpowiedzi dotyczącej procesowania białka CjaA - może być ono lipoproteina lub też rozpuszczalnym białkiem peryplazmatycznym nie związanym z błoną.

A.



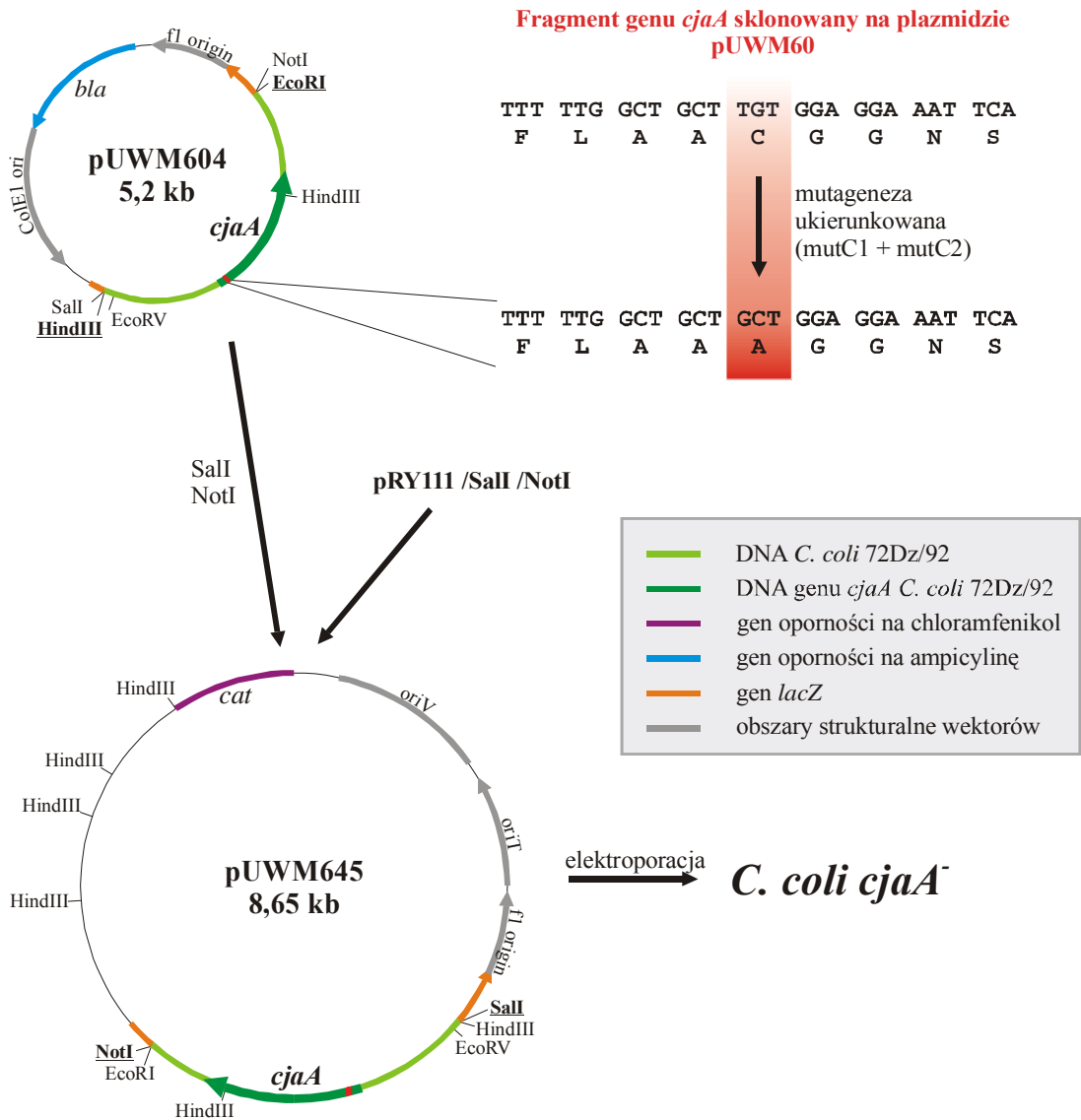
B.



Ryc. 10. Analiza N-końca sekwencji aminokwasowej białka CjaA.

A. Przewidywania dotyczące obecności sekwencji sygnałnej na końcu aminowym białka CjaA uzyskane przy użyciu LipoP 1.0 Server. Na czerwono zaznaczono potencjalne miejsca cięcia sygnałnej peptydazy I, na zielono zaś sygnałnej peptydazy II. **B.** Sekwencja sygnałna białka CjaA z zaznaczonymi poszczególnymi regionami.

Wstępnym etapem procesowania prolipoprotein jest modyfikacja cysteiny polegająca na dołączeniu do niej części lipidowej. Koniec aminowy dojrzałego białka ma więc hydrofobowy charakter i jego obecność umożliwia zakotwiczenie lipoproteiny w osłonach komórki. W eksperymencie frakcjonowania wykazano lokalizację białka CjaA w błonie wewnętrznej komórek *Campylobacter*. Postanowiono sprawdzić, jaki efekt będzie miało zastąpienie cysteiny występującej w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez peptydazę II (LAAC) prostym aminokwasem o ładunku obojętnym, jakim jest alanina. Zmiana ta, jeśli CjaA w komórkach *Campylobacter* jest lipoproteiną, powinna wpłynąć na jego umiejscowienie w komórce.



Ryc. 11. Schemat mutagenazy specyficznej co do miejsca i konstrukcja plazmidu wahadłowego zawierającego gen *cjaA* kodujący proteinę z mutacją cysteiny. Sekwencja zmutowanego obszaru genu *cjaA* została zaznaczona kolorem czerwonym.

Do przeprowadzenia mutagenazy ukierunkowanej wykorzystano metodę QuikChange Site-Directed Mutagenesis. Jako matrycę, w reakcji PCR wykorzystano plazmid pUWM60 ze sklonowanym genem *cjaA* ze szczepu *C. coli* 72Dz/92. Do

wprowadzenia zmiany w triplecie kodującym cysteinę wykorzystano startery komplementarne do sekwencji obu nici „insertu” (gen *cjaA*): mutC1 oraz mutC2. Każdy z nich zawierał zaplanowaną mutację. Tymina będąca pierwszym nukleotydem tripletu kodującego cysteinę (TGT) została zastąpiona guaniną, zaś guanina - drugi nukleotyd tej trójki – cytozyną. Dzięki zmianom tym powstał triplet kodujący alaninę (GCT). Konstrukt kodujący białko CjaA, w którym cysteina w pozycji 20 została zastąpiona przez alaninę, nazwano **pUWM604**. Na Ryc. 11. przedstawiono fragment sekwencji nukleotydowej genu *cjaA* i aminokwasowej jego produktu, w którym przeprowadzono ukierunkowaną mutagenezę.

W kolejnym etapie gen *cjaA* z wprowadzonymi zmianami przeklonowano do wahadłowego plazmidu pRY111, zdolnego do replikacji zarówno w komórkach *E. coli* jak i *Campylobacter*. Uzyskany konstrukt, nazwany **pUWM645**, wprowadzono następnie drogą elektroporacji do komórek *C. coli* 72Dz/92 z unieczynnionym genem *cjaA*. Schemat konstrukcji obu plazmidów przedstawia Ryc. 11.

Wykonanie ćwiczenia:

Ćwiczenie polega na ocenie lokalizacji „dzikiej” oraz zmutowanej wersji białka CjaA metodą Western-blot. Szcepek *C. coli* 72Dz/92 *cjaA*⁻ z wprowadzonym rekombinowanym plazmidem **pUWM645** posłuży do określenia lokalizacji zmutowanej wersji białka CjaA. Kontrolę stanowić będzie szcepek *C. coli* 72Dz/92 *cjaA*⁻ niosący plazmid **pUWM638**. Jest to wektor wahadłowy, pochodny pRY111, zawierający dziką kopię genu *cjaA* *C. coli* 72Dz/92.

Białka błony zewnętrznej (OM) i wewnętrznej (IM) rozdzielono wykorzystując różnice w rozpuszczalności obu błon w lauroilosarkozynianie sodowym (nierozpuszczalna frakcja zawiera białka błony zewnętrznej – OMP, rozpuszczalna zaś białka błony wewnętrznej – IMP). W trakcie ćwiczeń przeprowadzona zostanie jedynie izolacja białek peryplazmatycznych.



Izolacja białek peryplazmatycznych - szok chloroformowy:

1. Osad z 1,5 ml nocnej hodowli komórek *Campylobacter* zawiesić w 50 µl podłoża LB, po czym dodać 20 µl chloroformu. Całość intensywnie wymieszać.
2. Próby inkubować 15 min w temperaturze pokojowej, po czym dodać 150 µl 10 mM Tris (pH 7,5). Próby wirować 20 min przy 6000 x g. Białka peryplazmatyczne obecne w supernatancie przechowywać w – 20°C.



Analiza frakcji białkowych w żelu poliakryloamidowym (SDS PAGE):

Przygotowanie frakcji białkowych

1. Do 100 μ l roztworu zawierającego białka peryplazmatyczne wyizolowane metodą szoku chloroformowego dodać 100 μ l buforu lizującego (2x) i wymieszać.
2. Próbkę ogrzewać w 100°C przez 5 min.
3. Na żel nanosić 10 μ l przygotowanej mieszaniny.

bufor lizujący 2X (przechowywany w małych porcjach w -20°C):

Przygotowanie żelu poliakryloamidowego:

1. Dokładnie umyć szyby aparatu detergentem, wysuszyć i odtłuścić etanolem 96 %, złożyć szyby.
2. Do wcześniej przygotowanego roztworu akrylamidów o stężeniu 12% (żel separacyjny – patrz: Tab. 3) dodać odpowiednią ilość TEMEDu, dokładnie wymieszać i niezwłocznie wlać między szyby do poziomu około 1-1,5 cm od górnej krawędzi wyciętej szyby. Na powierzchnię nawarstwić wodę. Pozostawić do polimeryzacji najlepiej przez noc.
3. Po całkowitej polimeryzacji żelu separacyjnego usunąć wodę z powierzchni żelu. Pozostałe krople usunąć bibułą nie dotykając żelu. Następnie nalać roztwór akrylamidów o stężeniu 4% dokładnie wymieszanego z odpowiednią ilością TEMEDu (żel zagęszczający – patrz: Tab. 3). W górnej części umieścić grzebień. Końce zębów powinny znajdować się nie głębiej niż w połowie odległości od granicy żelu separacyjnego. Należy upewnić się czy przy zębach grzebienia nie ma pęcherzyków powietrza.
4. Po całkowitej polimeryzacji wyjąć ostrożnie grzebień, odpiąć klipsy, wyjąć dolną przekładkę, żel zaś umieścić w aparacie do elektroforezy według wskazówek asystenta. Całość zalać buforem do elektroforezy. Dołki przepłukać buforem przy pomocy strzykawki.

Tab. 3. Skład żelu zagęszczającego i separacyjnego.

STĘŻENIE ŻELU	SEPARACYJNY 12%	ZAGĘSZCZAJĄCY 4%
Objętość aparatu	5 ml	2,5 ml
Akrylamid –bisakrylamid 30% roztwór (29:1)	2 ml	0,33 ml
Tris 8,8 1 M.	1,95 ml	---
Tris 6,8 1 M.	---	0,312 ml
SDS 10 %	50 μ l	25 μ l
APS 10 %	27 μ l	19 μ l
H ₂ O	1 ml	1,845 ml
TEMED	7,5 μ l	3,5 μ l



UWAGA: AKRYLAMID JEST NEUROTOKSYCZNY

Bufor do elektroforezy: 0,025 M Tris pH 8,3; 0,192 M glicyna; 0,1% SDS

5. Do dołków żelu poliakryloamidowego nanieść wolno przy pomocy strzykawki Hamiltona próbki białek. Do jednego z dołków nanieść 5 μ l białek markerowych.
6. Elektroforezę przeprowadzać przy stałym napięciu dla mini-aparatu 70 V w żelu zagęszczającym i 150 V w żelu separacyjnym aż do momentu osiągnięcia przez barwniki dolnej granicy żelu.

Elektrotransfer białek z żelu poliakryloamidowego na membranę nitrocelulozową:

1. Przygotować: foliową maskownicę z wyciętym otworem o wielkości żelu, 4 kawałki bibuły Watman o wymiarach o 2-3 mm większych niż wymiary żelu oraz arkusz nitrocelulozy o wymiarach odpowiadających wymiarowi żelu (rękawiczki!!!).
2. Żel wypłukać w wodzie w celu usunięcia nadmiaru SDS.
3. Zwilżyć elektrody aparatu wodą destylowaną.
4. Umieścić maskownicę na dolnej elektrodzie.
5. Umieścić dwa arkusze bibuły Watman zwilżonych buforem do transferu tak by zakrywały otwór maskownicy (przygotować 50 ml buforu do transferu).
6. Na bibule umieścić po środku nitrocelulozę zamoczoną w buforze do transferu, następnie żel ułożyć starannie na nitrocelulozie jednym ruchem. Nie wolno zdejmować raz położonego żelu.
7. Całość przykryć dwoma warstwami bibuły Watman zwilżonymi buforem do transferu
8. Zamknąć aparat przykrywką z elektrodą górną i podłączyć do zasilacza ustawiając natężenie prądu wyliczone według wzoru: wymiary żelu w $\text{cm}^2 \times 0,8$
9. Elektrotransfer przeprowadzać przez 45 min.

UWAGA: Wszystkie czynności należy wykonywać w rękawiczkach.

bufor do transferu: 25 mM Tris pH = 8,3; 20% metanol; 192 mM glicyna

Immunoblotting:

1. Po elektrotransferze białek z żelu poliakryloamidowego zablokować wolne miejsca na nitrocelulozie umieszczając membranę w roztworze odłuszczonego mleka w buforze do blokowania - 10 min.

2. Przeprowadzić reakcję z surowicą anty-CjaA (królicza) (I przeciwciała) w buforze do blokowania - 1 godzinę lub przez noc. Rozcieńczenie surowicy 1:500.
3. Przepłukać nitrocelulozę w buforze do płukania - 3 razy po 5 min.
4. Przeprowadzić reakcję z przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko króliczym IgG (I przeciwciała przygotowano przez szczepienie królików oczyszczonym białkiem CjaA) skoniugowanymi z alkaliczną fosfatazą w buforze do blokowania - 30 minut. Rozcieńczenie przeciwciał 1:15000.
5. Przepłukać membranę w buforze do płukania - 2 razy po 5 min.
6. Przepłukać w buforze dla alkalicznej fosfatazy - 5 min.
7. Wywołać w roztworze odczynników NBT i BCIP w buforze dla alkalicznej fosfatazy. Określić masę immunopozytywnych białek porównując je ze standardem.

bufor do blokowania: 100 mM Tris pH = 8,0; 0,04 % Tween 20;
3% odtłuszczone mleko krowie

bufor do płukania: 100 mM Tris pH = 8,0; 0,04 % Tween 20

roztwór odczynników NBT/BCIP: 1,65 mg/ml NBT; 0,825 mg/ml
BCIP; 100 mM Tris pH = 9,5; 100 mM NaCl;
5 mM MgCl₂

bufor dla alkalicznej fosfatazy: 100 mM Tris pH = 9,5; 100 mM NaCl;
5 mM MgCl₂

UWAGA: wszystkie roztwory należy przygotować używając wody dejonizowanej

IV. WPŁYW POTRANSLACYJNYCH MODYFIKACJI NA AKTYWNOŚĆ BIAŁEK I PROCESY WIRULENCJI

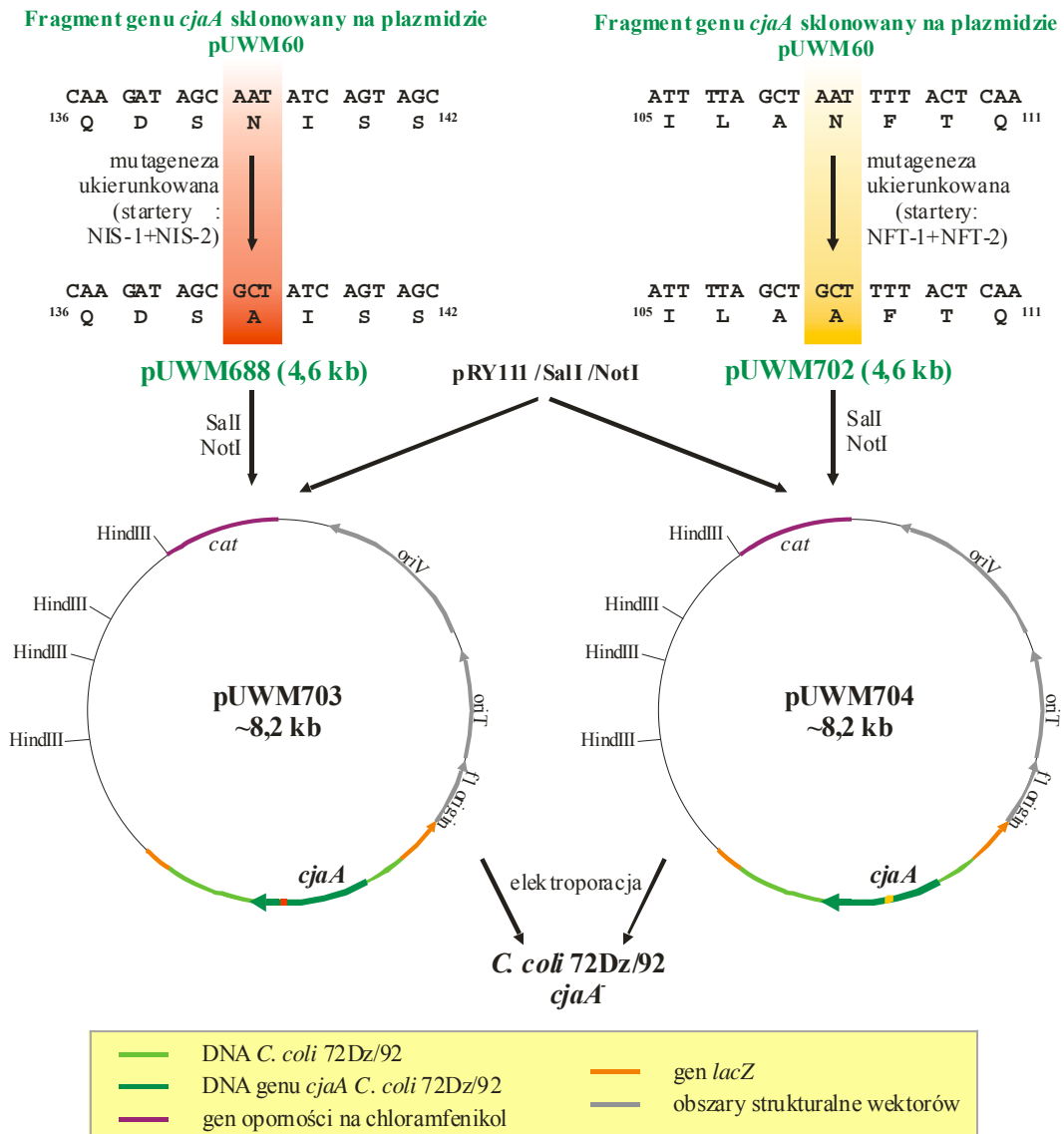
IV.1. GLIKOZYLACJA BIAŁKA CJA A

Badania ostatnich lat udokumentowały, że w komórkach bakteryjnych obecne są białka zawierające kowalencyjnie związane łańcuch cukrowy, tzw. glikoproteiny, choć długi czas uważano, że glikozylacja jest procesem typowym wyłącznie dla komórek eukariotycznych. Występowanie takiej potranslacyjnej modyfikacji stwierdzono w komórkach wielu rodzajów bakterii patogennych (np.: *Borrelia*, *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Helicobacter* i in.) a podlegają jej głównie białka powierzchniowe będące jednocześnie istotnymi czynnikami wirulencji (piliny, flagelliny, adhezyny). Przyłączenie oligomerów cukrowych może zachodzić przez wiązanie z resztą amidową asparaginy ściśle konserwowanego motywu Asn-X-Ser/Thr, gdzie X może być dowolnym aminokwasem za wyjątkiem proliny i hydroksyproliny (N-glikozylacja), lub grupą hydroksylową seryny lub treoniny (O-glikozylacja). Jak dotąd stwierdzono, że N-glikozylacja jest charakterystyczna jedynie dla dwu rodzajów mikroorganizmów: *Campylobacter* i *Wolinella*.

Białko CjaA jest białkiem, które w komórkach *Campylobacter* występuje w postaci dwóch form nieznacznie różniących się ciężarem molekularnym (o ok. 2 kDa), podczas gdy w komórkach *E. coli* występuje w postaci jednej formy o ciężarze molekularnym odpowiadającym ciężarowi molekularnemu proteiny o większej ruchliwości elektroforetycznej w komórkach *Campylobacter*.

W sekwencji aminokwasowej białka CjaA odnaleziono potencjalne miejsca glikozylacji, zarówno typu O jak i N. Białko CjaA szczepu *C. coli* 72Dz/92 posiada dwa motywy Asn-X-Ser/Tre (108-NFT-110 oraz 139-NISS-142) i ok. 20 reszt aminokwasowych potencjalnie podlegających O-glikozylacji.

Zmianę asparaginy motywów potencjalnie modyfikowanych przez dołączenie oligomeru cukrowego na alaninę przeprowadzono na drodze mutagenyzy ukierunkowanej co do miejsca. Spodziewano się, że jeśli Asp jest akceptorem glikanu, to jej zastąpienie innym aminokwasem uniemożliwi zajście N-glikozylacji białka CjaA. Zmutowane geny *cjaA*, sklonowane na plazmidzie wahadłowym pRY111, wprowadzono metodą elektroporacji do komórek izogenicznego mutantu *cjaA*. Schemat konstrukcji przedstawia Ryc. 12.



Ryc. 12. Schemat konstrukcji plazmidów pUWM703 i pUWM704.

W trakcie ćwiczeń efekt mutacji przeanalizowany zostanie metodą Western blot przy użyciu specyficznej surowicy anti-CjaA.



Analiza frakcji białkowych w żelu poliakryloamidowym (SDS PAGE):

Przygotowanie frakcji białkowych

1. Zwirować 1,5 ml bakteryjnych hodowli, po czym osad zawiesić w 100 µl wody i dodać 100 µl buforu lizującego (2x). Wymieszać.
2. Próbkę ogrzewać w 100°C przez 5 min.
3. Na żel nanosić 10 µl tak przygotowanej mieszaniny.

bufor lizujący 2X (przechowywany w małych porcjach w -20°C):

Analiza frakcji białkowych w żelu poliakryloamidowym

W żelu poliakryloamidowym rozdzielić białka następujących szczepów:

1. białka *C. coli* 72Dz/92 *cjaA*⁻ / pUWM703 (NIS→AIS);
2. białka *C. coli* 72Dz/92 *cjaA*⁻ / pUWM704 (NFT→AFT);
3. białka *C. coli* 72Dz/92 *cjaA*⁻ / pUWM739 (dzika kopia genu *cjaA*).

Elektroforezę, elektrotransfer białek z żelu poliakryloamidowego na membranę nitrocelulozową oraz identyfikację przeprowadzić wg. Przepisu zamieszczonego na stronach 27-29.

IV.2. WPROWADZANIE MOSTKÓW DWUSIARCZKOWYCH

Wprowadzenie natywnych mostków dwusiarczkowych do łańcucha polipeptydowego jest kluczowe w procesie zwijania niektórych białek. Proces wprowadzania mostków dwusiarczkowych *in vivo* jest wspomagany katalitycznie. W komórkach *E. coli* ma on miejsce na terenie peryplazmy i zachodzi z udziałem białek systemu Dsb (ang. *disulfide bond formation*) uczestniczących w dwu szlakach metabolicznych: utleniania i izomeryzacji /redukcji. Za wprowadzenie mostków dwusiarczkowych do łańcucha polipeptydowego odpowiedzialne są białka szlaku utleniania: DsbA i DsbB. Natomiast proces rearanzacji nieprawidłowo wprowadzonych wiązań zachodzi z udziałem białek szlaku izomeryzacji/redukcji tj. DsbC, DsbD i DsbG.

Szczepy bakterii z uszkodzonym systemem Dsb wykazują fenotyp plejotropowy. Unieczynnienie systemu Dsb wpływa na obniżenie wirulencji wielu gatunków bakterii patogennych tj. *Bordetella pertussis*, *Shigella flexnerii*, *Vibrio cholerae* czy *Campylobacter jejuni*.

Potencjalnymi substratami białek systemu Dsb są białka pozacytoplazmatyczne, posiadające w swojej sekwencji aminokwasowej więcej niż jedną cysteinę. Geny kodujące białka szlaku utleniania Dsb *C. jejuni* znajdują się w dwóch regionach chromosomu (patrz ryc 15.).

Gen *ast* koduje arylosulfatazę (Ast), enzymem katalizujący reakcję hydrolizy wiązania estrowego syntetycznych estrów siarczanowych fenoli i przeniesienia grupy siarczanowej z substratu na fenolowy akceptor. Arylosulfataza jest białkiem peryplazmatycznym, posiadającym w swojej sekwencji aminokwasowej 4 reszty cysteinowe. Enzym ten jest jednym z czynników wirulencji bakterii powodujących choroby przyzębia z rodziny *Campylobacter-Wolinella*. Możliwość przeprowadzenia jakościowego i ilościowego pomiaru aktywności enzymu pozwoliła na jego zastosowanie jako genu reporterowego do monitorowania ekspresji genów.

W trakcie ćwiczeń zostanie przebadany wpływ unieczynnienia systemu Dsb na aktywność enzymu Ast. Pomiar zostanie przeprowadzony w szczepie dzikim *C. jejuni* NCTC 11168, *C. jejuni* 81176 oraz w mutantach *C. jejuni* 81176 *dsbB*⁻ i *C. jejuni* 81176 *dsbA1*⁻.

Oznaczenie jakościowe aktywności enzymu Ast polega na wysianiu bakterii posiadających aktywny enzym na podłoże zawierające chromogeniczny substrat, który pod wpływem działania Ast zabarwia kolonie bakterii na kolor zielono-niebieski.



Pomiar aktywności arylosulfatazy – oznaczenie jakościowe:

Przygotowanie podłoża:

1. 8 g podłoża Blood Agar Base rozpuścić w 200 ml wody destylowanej i wysterylizować przez autoklawowanie.
2. Gorące podłoże schłodzić do temperatury ok. 50°C i dodać 5-bromo-4-chloro-3-indolilosiarczanu potasu (stężenie końcowe: 100µg/ml) (XS)
3. Tak przygotowane podłoże rozlać do szalek Petriego i pozostawić do zastygnięcia

Oznaczenie aktywności Ast:

1. Na przygotowane szalki zawierające chromogeniczny substrat, wysiewamy odpowiednie szczepy *C. jejuni*
2. Po 48 godzinach hodowli obserwujemy różne zabarwienia kolonii bakteryjnych.

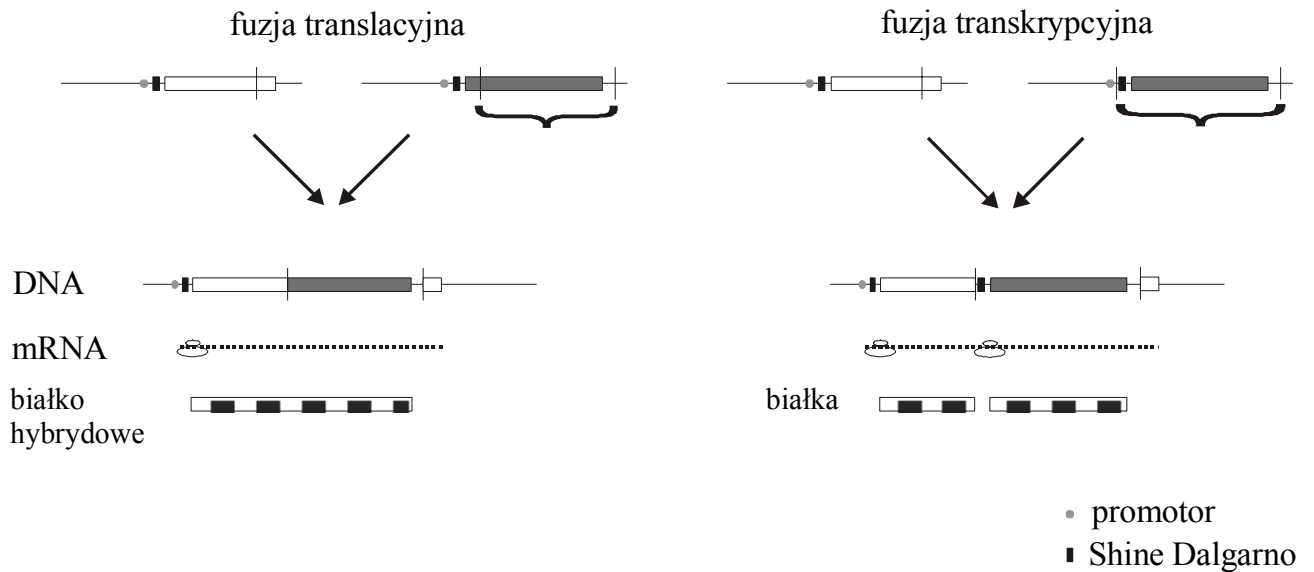
V. BADANIE EKSPRESJI GENÓW – GENY REPORTEROWE

Fuzje genowe powstają przez połączenie przynajmniej dwóch otwartych ramek odczytu we zgodnej orientacji i pożądanej kolejności. Ekspresja połączonych genów zachodzi wówczas z sekwencji promotorowych jednego z nich. Wyróżniamy dwa rodzaje fuzji: transkrypcyjną i translacyjną.

Fuzję, w której każdy z genów posiada własny kodon inicjacyjny (start translacji) i sekwencję wiązania rybosomów (Shine Dalgarno), nazywamy **fuzją transkrypcyjną** lub operonową. Podczas transkrypcji takiej fuzji powstaje wspólny mRNA, a wskutek niezależnej translacji poszczególnych genów - białka, które zachowują swą oryginalną wielkość (Ryc. 14).

W przypadku **fuzji translacyjnej** jedynie pierwszy z ciągu genów tworzących fuzję dysponuje sekwencją wiązania rybosomów (SD) oraz kodonem startu translacji. Wszystkie geny tego typu fuzji są transkrybowane z jednego promotora jako wspólny mRNA, którego translacja powoduje powstanie hybrydowego białka, zwanego **białkiem fuzyjnym**. Warunkiem powstania fuzji translacyjnej jest zachowanie zgodnej ramki odczytu fragmentów łączonych genów (Ryc. 14).

Fuzje genowe znalazły szereg zastosowań w biologii molekularnej.



Ryc. 14. Schemat konstrukcji fuzji genowych.

V.1. FUZJE Z GENEM REPORTEROWYM *LACZ*

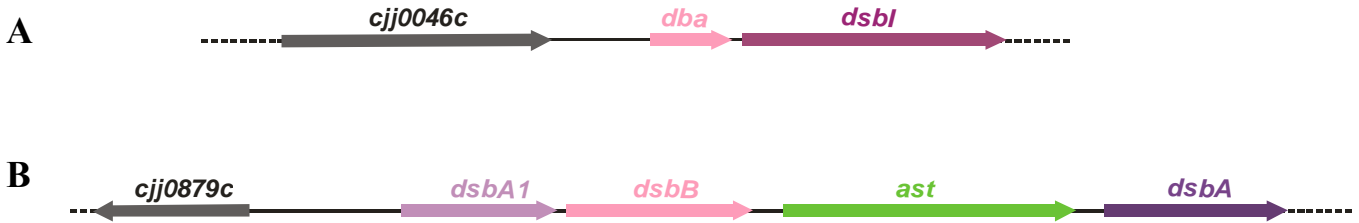
Gen reporterowy to pozbawiony sekwencji promotorowych gen, którego ekspresję można łatwo monitorować. Geny reporterowe posiadają sekwencję Shine Dalgarno i kodon startu translacji. Jeśli ORF badanego genu (lub tylko jej część) zostanie zastąpiony otwartą ramką odczytu genu reporterowego, to gen reporterowy będzie podlegał takim sygnałom regulacyjnym jak gen badany. Przykładem genów reporterowych są: β -galaktozydaza, lucyferaza, transacetylaza chloramfenikolowa, białko GFP (*green fluorescent protein*) i wiele innych.

Analiza procesów transkrypcyjnych genów systemu Dsb *Campylobacter jejuni*.

Genomowy DNA bakterii rodzaju *Campylobacter* i *Helicobacter* charakteryzuje się wysoką zawartością par AT (65-70%), odgrywających znaczącą rolę w regionach promotorowych genów bakteryjnych. Badanie ekspresji genów *Campylobacter* (np. *C. jejuni*) w modelowym organizmie *E. coli* niesie ryzyko przypadkowego odczytywania przez system transkrypcji sekwencji bogatych w pary AT jako regionów promotorowych, np. rejon „-10” (TATA). Z tego względu w badaniach dotyczących regulacji transkrypcji genów najbardziej wiarygodnym wynikiem jest aktywność transkrypcyjna potencjalnych promotorów w naturalnym gospodarzu.

Geny szlaku utleniania Dsb *C. jejuni* zlokalizowane są w dwóch regionach chromosomu (Ryc. 15):

- region *dba-dsbl*
- region *dsbA2-dsbB-ast-dsbA1*

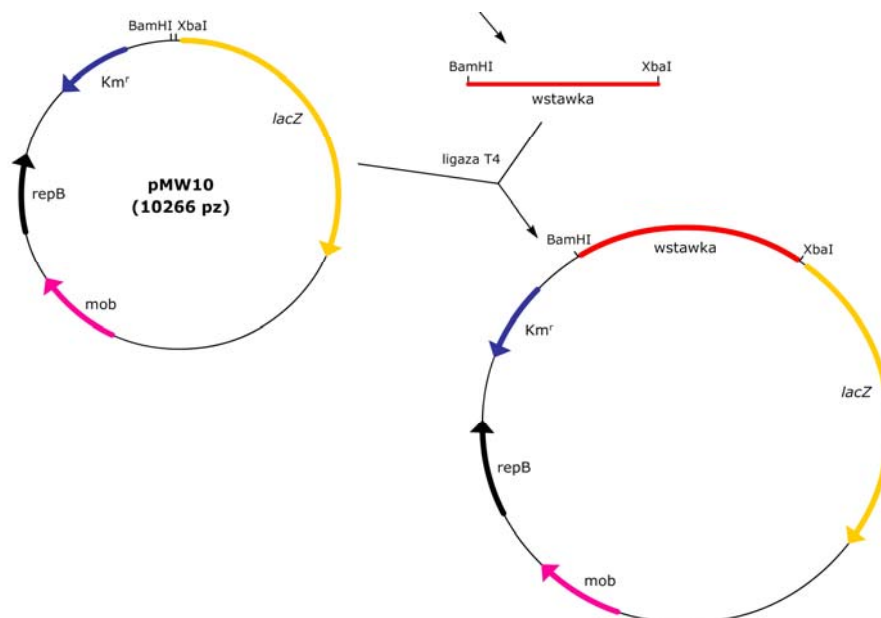


Ryc. 15. Organizacja genetyczna regionów genomu *C. jejuni* kodujących geny *dsb*.
A. Region *dba-dsbl*.
B. Region *dsbA2-dsbB-ast-dsbA1*.

Analiza sekwencji nukleotydowych fragmentów DNA genomowego *C. jejuni*, zawierających geny *dba-dsbl* oraz *dsbA2-dsbB-ast-dsbA1* sugerowała, że mogą one tworzyć wspólne jednostki transkrypcyjne. W eksperymentach mających na celu analizę transkrypcji hipotetycznych operonów w komórkach *E. coli* oraz *C. jejuni* wykorzystano pozbawiony promotora gen reporterowy *lacZ*, kodujący enzym β -galaktozydazę. Skonstruowano rekombinacyjne plazmidy różniące się między sobą długością odcinka DNA *C. jejuni* klonowanego powyżej genu *lacZ*. Schemat konstrukcji przedstawiono poniżej (Ryc. 16, 17, 18).

Wszystkie konstrukty powstały na bazie wahadłowego plazmidu pMW10, replikującego się zarówno w komórkach *E. coli* jak i *Campylobacter jejuni*.

Skonstruowane plazmidy wahadłowe, zawierające fuzje transkrypcyjne z genem *lacZ*, zostały wprowadzone do komórek *C. jejuni* 480 metodą elektroporacji.

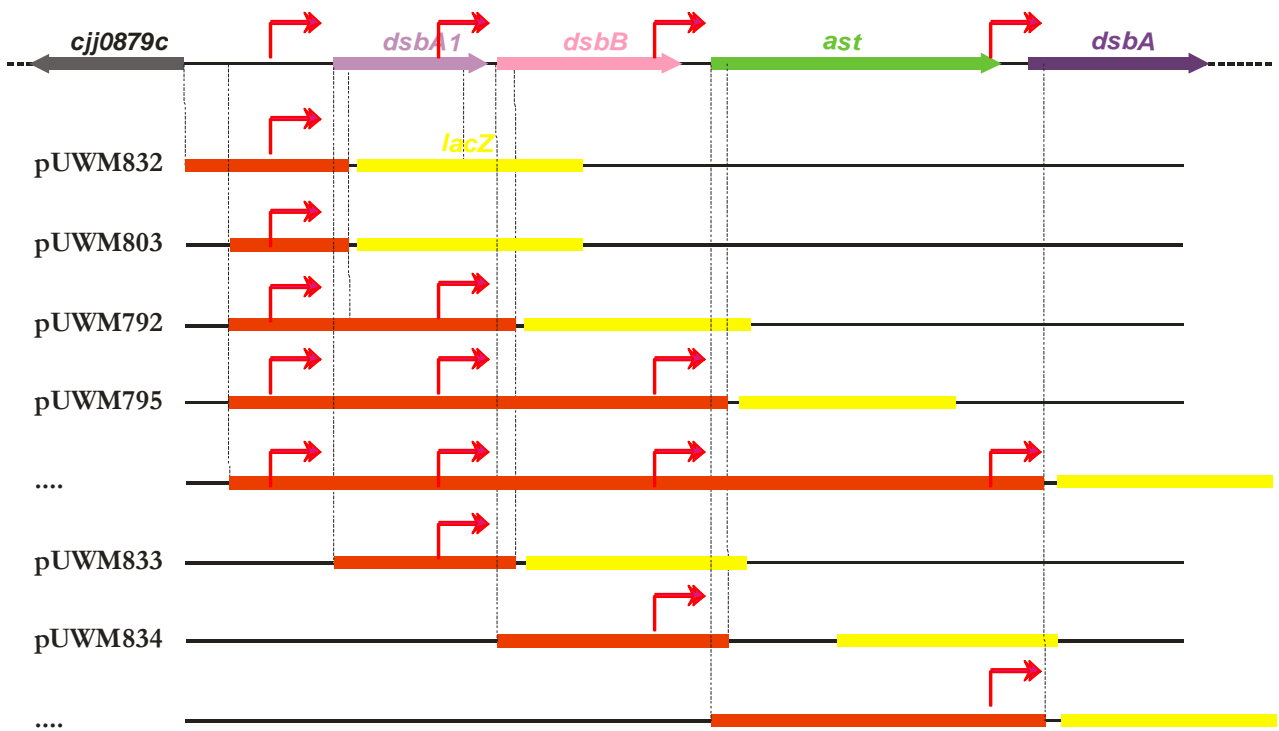


Ryc. 16. Schemat konstrukcji fuzji transkrypcyjnych na bazie pMW10, służących do analizy siły promotorów *C. jejuni* w komórkach *E. coli* i *C. jejuni*.





Wszystkie skonstruowane plazmidy wahadłowe zawierające fuzje transkrypcyjne z genem *lacZ* zostały wprowadzone do komórek *C. jejuni* 480 metodą elektroporacji.

Regiony DNA istotne dla ekspresji genów *Campylobacter*:

- sekwencja Shine-Dalgarno AGGA, typowa także dla genów *E. coli* (zazwyczaj kilka do kilkunastu nukleotydów przed kodonem start)
- sekwencje konsensusowe: -35 (TTTAAGTnTT), -16 (TTTTTTTG) i -10 (TATATT) rozpoznawane przez RNA polimerazę związaną z głównym czynnikiem sigma.



Ryc. 18. Schemat fuzji transkrypcyjnych do badania ekspresji genów *dsbA1-dsbB-ast-dsbA C. jejuni*.

-  - hipotetyczne promotory genów *dsbA* i *dsbB*
-  } - geny *C. jejuni*
-  } - geny *C. jejuni*
-  - gen reporterowy *lacZ*



Pomiar aktywności β -galaktozydazy metodą Millera:

- 1a. Nocne hodowle bakterii *E. coli* odmłodzić szczepiąc świeże podłoże 1:50 i hodować do uzyskania fazy logarytmicznej (OD 0,3-0,7).
- 1b. W przypadku komórek *Campylobacter* użyć 15-16 godzinnej hodowli na podłożu stałym. Komórki bakteryjne zawiesić w podłożu płynnym w ilości takiej aby OD 600 zawierało się w granicach 0,3-0,7.
2. Do 100 μ l zawiesiny bakterii dodać 100 μ l chloroformu - zworteksować. Dodać 900 μ l buforu Z i 50 μ l 0,1 % SDS, ponownie zworteksować.
3. Przygotowaną mieszaninę inkubować w 28°C przez 5 minut, po czym dodać 200 μ l ONPG (4 mg/ml w buforze fosforanowym, pH 7,0).
4. Kontynuować inkubację w temperaturze 28°C aż do wystąpienia żółtego zabarwienia.
5. Reakcję przerwać przez dodanie 500 μ l 1 M Na₂CO₃.
6. Zmierzyć absorbancję próby przy dwóch długościach fali: A₅₅₀ i A₄₂₀.

Aktywność β -galaktozydazy obliczyć według wzoru:

$$\frac{1000 \times (\text{OD}_{420} - 1,75 \times \text{OD}_{550})}{t \times V \times \text{OD}_{600}}$$

t czas trwania reakcji (min)
V objętość hodowli zawiesiny bakterii (ml)

VI. NADPRODUKCJA I OCZYSZCZANIE REKOMBINOWANYCH BIAŁEK; KOMPLEKSY BIAŁKOWE

Oczyszczanie rekombinowanego białka *Helicobacter pylori* metodą chromatografii powinowactwa.

Białko HP0377 o masie ok. 25 kDa nie zostało do tej pory funkcjonalnie scharakteryzowane. Przeprowadzone analizy *in silico* wskazują, że posiada ono dwie charakterystyczne cechy białek systemu Dsb (domenę tioredoksynową oraz motyw katalityczny CXXC). HP0377 zawiera 24 aminokwasową sekwencję sygnałną (przewidzianą przez program SignalP), która umożliwia jego lokalizację na terenie peryplazmy *Helicobacter pylori*. Bioinformatyczne bazy danych (KEGG, NCBI) klasyfikują białko HP0377 jako ortolog białka DsbC *E. coli*, które uczestniczy w procesie prawidłowego wprowadzania mostków disiarkowych w peryplazmie tego mikroorganizmu

Zbadanie funkcji fizjologicznej badanego białka przewidywanej na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej oraz oddziaływań z innymi białkami wymaga uzyskania wysoce oczyszczonego preparatu białkowego.

Zrekombinowane białko HP0377 *Helicobacter pylori* na swym C-końcu zawiera sekwencję kodującą oligopeptyd histydynowy. Fuzyjne białko można oczyścić metodą chromatografii powinowactwa na złożu Ni-NTA agarose.

Przygotowanie konstrukcji wykorzystanych do oczyszczania białek.

Peryplazmatyczne białka bakterii gramujemnych posiadają w swojej sekwencji aminokwasowej tzw. sekwencje sygnałne, które są rozpoznawane a następnie odcinane podczas transportu białka przez błonę wewnętrzną komórki do peryplazmy. Sekwencje sygnałne nie są jednak takie same dla wszystkich bakterii gramujemnych i mogą nie być funkcjonalne w innym gospodarzu jak np. *Escherichia coli*, i tym samym nadprodukcja białka w peryplazmie tego mikroorganizmu nie byłaby możliwa. Dlatego też, postanowiono dołączyć do białka HP0377 pozbawionego 24 aminokwasów N- końca, sekwencję sygnałną PelB, której wpływ na wydajność transportu do peryplazmy został wcześniej udowodniony.

Fragment genomu *H. pylori* 26695 zawierający otwartą ramkę odczytu genu *hp0377*, pozbawioną fragmentu kodującego sekwencję sygnałną, namnożono w reakcji PCR, stosując startery *hp377exI* i *hp377exII*. Startery zostały zaprojektowane w taki sposób, żeby na ich 5' końcach znajdowały się miejsca cięcia dla enzymów restrykcyjnych (*hp377exI* – *NcoI*, *hp377exII* – *XhoI*), które umożliwiły stworzenie fuzji translacyjnej genu *hp377* z odcinkami DNA kodującymi: oligopeptyd zawierający sześć tandemowo ułożonych histydyn-6HIS (znacznik histydynowy) oraz sekwencję sygnałną PelB. Produkt tych manipulacji - plazmid pUWM374, wtransformowano do szczepu *E. coli* BL21.

Oczyszczanie białka rekombinowanego.



Przygotowanie hodowli bakteryjnych – indukcja IPTG:

1. Przygotować nocne hodowle badanego szczepu (*E. coli* BL21/pUWM374) na podłożu LB uzupełnionym antybiotykiem (ampicylina 100 µg/ml).
2. Hodowle odmłodzić. Zaszczepić 40 ml identycznego podłoża 2 ml nocnej hodowli. Inkubować z wytrząsaniem w 37°C przez około 30-60 min do osiągnięcia odpowiedniego OD ($A_{600} \sim 0.6$).
3. Pobrać 1 ml próbkę (nie zaindukowana hodowla), komórki odwirować i zawiesić w 50 µl wody, dodać 50 µl 2x buforu lizującego. Próbkę zamrozić do czasu analizy metodą SDS-PAGE.
4. Do reszty hodowli dodać IPTG (stężenie końcowe 1-5 mM). Hodować około 3 godz.
5. Pobrać 1 ml próbkę (zaindukowana hodowla). Postępować z nią identycznie jak podano w punkcie 3.
6. Hodowle odwirować (4000xg, 20 min). Osad przetrzymywać w -20°C.



Przygotowanie hodowli bakteryjnych – autoindukcja:

Autoindukcja jest alternatywną dla indukcji IPTG metodą pozwalającą na otrzymanie nadekspresji białek. Metoda ta jest oparta na zdolności bakterii do wykorzystywania różnych źródeł węgla, a także negatywnej regulacji ekspresji genów poprzez represję kataboliczną.

1. Po transformacji wysiać bakterie na podłożu LB z 1% glukozą.
2. Bakterie z pojedynczej kolonii zaszczepić do podłoża ZYP-0.8G (podłożu ZY z dodatkiem 0.8% glukozy - zazwyczaj wystarczy 10 ml) i inkubować z wytrząsaniem w 37°C przez min. 4 h. Pobrać 1 ml próbkę (nie zaindukowana hodowla), komórki odwirować i zawiesić w 50 µl wody, dodać 50 µl 2x buforu lizującego. Próbkę zamrozić do czasu analizy metodą SDS-PAGE.
3. Hodowlę przenieść do podłoża ZYP-5052 (podłożu ZY z dodatkiem 0.5% glicerolu, 0.05% glukozy, 0.2% laktozy; 1:200) i inkubować z wytrząsaniem przez całą noc.
4. Rano pobrać 1 ml próbkę (zaindukowana hodowla). Postępować z nią identycznie jak podano w punkcie 2. Resztę hodowli zwirować. Z osadu można oczyszczać białka.

Podłoża:

- **ZY:** 2 g trypton; 1 g ekstrakt drożdżowy; do 200 ml H₂O
- **20 x NPS:** 1.32 g (NH₄)₂SO₄; 2.72 g KH₂PO₄; 2.84 g Na₂HPO₄; do 20 ml H₂O
- **25% glicerol:** 5 g glicerol; do 20 ml H₂O
- **1 M MgSO₄**
- **20% laktoza**
- **20% glukoza**

	5 ml	10 ml	20 ml	50 ml	Końcowe stężenie
ZY	do 5 ml	do 10 ml	do 20 ml	do 50 ml	-
1 M MgSO₄	5 μl	10 μl	20 μl	50 μl	1 mM
20% glukoza	200 μl	400 μl	800 μl	2 ml	0.8%
20xNPS	250 μl	500 μl	1 ml	2.5 ml	1x
Km (25 mg/ml)	20 μl	40 μl	80 μl	200 μl	100 μg/ml
Cm (25 mg/ml)	5 μl	10 μl	20 μl	50 μl	25 μg/ml
Ap (50 mg/ml)	5 μl	10 μl	20 μl	50 μl	50 μg/ml

	10 ml	20 ml	50 ml	350 ml	Końcowe stężenie
ZY	do 10 ml	do 20 ml	do 50 ml	do 350 ml	-
1 M MgSO₄	10 μl	20 μl	50 μl	350 μl	1 mM
25% glicerol	200 μl	400 μl	1 ml	7 ml	0.5%
20xNPS	500 μl	1 ml	2.5 ml	17.5 ml	1x
20% glukoza	25 μl	50 μl	125 μl	875 μl	0.05%
20% laktoza	100 μl	200 μl	500 μl	3.5 ml	0.2%
Km (25 mg/ml)	40 μl	80 μl	200 μl	1.4 ml	100 μg/ml
Cm (25 mg/ml)	10 μl	20 μl	50 μl	350 μl	25 μg/ml
Ap (50 mg/ml)	10 μl	20 μl	50 μl	350 μl	50 μg/ml



Przygotowanie lizatów bakteryjnych i oczyszczanie białka metodą chromatografii powinowactwa (warunki natywne):

1. Rozmrozić osad bakteryjny (15 min, w lodzie); komórki zawiesić w buforze do przemywań stosując 3 ml buforu na gram mokrej masy bakterii.
2. Sonikować komórki 6 x 10 sek. (200–300 W) z 10 sek. przerwami dla schłodzenia zawiesiny.
3. Odwirować pozostałości komórek (10000 x g, 10 min) w 4°C. Do dalszej analizy zachować supernatant.

4. Pobrać 10 μ l supernatantu, dodać do niego 10 μ l 2x buforu do lizy, zamrozić do momentu analizy białek metodą SDS-PAGE.
5. Do 100 μ l lizatu dodać 50 μ l 50 % zawiesiny złoża odpukanego uprzednio z etanolu (dwukrotne przemycie w buforze do przemywań), mieszać łagodnie 1 minutę, zwirować, zachować supernatant.
6. Przemyć złożo 2x 0.5 ml buforem do przemywań. Zebrać frakcje, zatrzymać do dalszej analizy - SDS-PAGE.
7. Wymyć białka ze złoża przemywając 3 x 0,05 ml buforu do wymywania. Oddzielnie zbierać poszczególne frakcje. Zachować do dalszej analizy metodą SDS-PAGE.

bufor do przemywań: 50 mM bufor fosforanowy, 0,3M NaCl, 10 mM imidazol

bufor do wymywania: 50 mM bufor fosforanowy, 0,3M NaCl, 250 mM imidazol



Analiza frakcji białkowych w żelu poliakryloamidowym (SDS PAGE):

W żelu poliakryloamidowym rozdzielić uzyskane frakcje białkowe. Elektroforezę przeprowadzić wg. przepisu zamieszczonego na stronie 27. Żel wybarwić Coomassie.

VII. ZASTOSOWANIE METOD BIOINFORMATYCZNYCH W ANALIZIE WIRULENTNYCH BIAŁEK.

A. PODSTAWOWE ZAGADNIENIA BIOINFORMATYKI.

- katalogowanie informacji biologicznych (bazy danych, bazy danych sekwencji i wyszukiwanie sekwencji, anotacji, danych numerycznych w bazach danych)
- analiza sekwencji DNA (składanie sekwencji, anotacja, wyszukiwanie sekwencji kodujących, regulatorowych i repetytywnych, motywów, markerów)
- analiza sekwencji genomów, porównywanie genomów, ustalanie ewolucyjnych relacji pomiędzy zbiorami sekwencji / organizmów (drzewa filogenetyczne)
- genotypowanie (używane między innymi do wyszukiwania genów odpowiedzialnych za choroby genetyczne, w ustalaniu ojcostwa, kryminalistyce)
- analiza ekspresji genów (głównie analiza danych z mikromacierzy)
- analiza sekwencji białek, nazywana też proteomiką (porównywanie sekwencji, wyszukiwanie domen i motywów, przewidywanie własności fizyko-chemicznych, drugo- i trzecio-rzędowej struktury białka, lokalizacji w obrębie komórki, analiza danych z eksperymentów spektroskopowych)
- katalogowanie funkcji genów/białek, analiza dróg metabolicznych (np. metabolizm lipidów) oraz dróg sygnałowych (np. od receptora na powierzchni komórki, poprzez kaskadę kinaz do czynników transkrypcyjnych)
- modelowanie układów biologicznych (np. kinetyka szeregu reakcji enzymatycznych w komórce)
- wirtualne dokowanie (ang. *virtual docking*) - np. używając trójwymiarowej struktury aktywnego centrum enzymu ("zamek" albo "kieszonka" ang. *pocket*) przeszukuje się w komputerze tysiące małych cząsteczek, z których kilka-kilkanaście ('kluczy') będzie miało kształt mieszczący się w centrum aktywnym. Pierwszy krok w kierunku odkrywania nowych leków.
- inne: np (komputery DNA morfometria / analiza obrazu)

B. ANALIZA BIOINFORMATYCZNA WYBRANYCH BIAŁEK *C. JEJUNI* I *H. PYLORI*

W niniejszej części przeprowadzimy kilka podstawowych i, mam nadzieję ciekawych, analiz bioinformatycznych. Należąc do nich będą:

- podstawowa analiza sekwencji białka (lokalizacja komórkowa, miejsca modyfikacji, występowanie motywów sekwencyjnych itp.)
- poszukiwanie sekwencji homologicznych
- analiza stopnia pokrewieństwa w rodzinie białek (analiza metodą CLANS)
- budowa teoretycznego modelu białka (modelowanie homologiczne), ocena jakości modelu (MetaMQAP) i interpretacja modelu.

PLAN ĆWICZEŃ

1	24.11 (wtorek)	Mechanizmy patogenezy bakterii rodzaju <i>Campylobacter</i> i <i>Helicobacter</i> : Identyfikacja gatunków
2	26.11 (czwartek)	Molekularne metody stosowane w diagnostyce i epidemiologii: RAPD
3	01.12 (wtorek)	Funkcjonalna charakterystyka czynników wirulencji: mutageneza
4	03.12 (czwartek)	Funkcjonalna charakterystyka czynników wirulencji: mutageneza c.d.
5	8.12 (wtorek)	Funkcjonalna charakterystyka czynników wirulencji: mutageneza c.d.
6	10.12 (czwartek)	Wpływ potranslacyjnych modyfikacji na aktywność białek i procesy wirulencji
7	15.12 (wtorek)	Analiza wpływu środowiska na poziom ekspresji genów. Geny reporterowe.
8	17.12 (czwartek)	Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanych białek. Kompleksy białkowe.
9	05.01 (wtorek)	Powtórka
10	07.01 (czwartek)	Wycieczka: Centrum Zdrowia Dziecka Al. Dzieci Polskich 20 http://www.czd.pl
11	12.01 (wtorek)	Wycieczka: Narodowy Instytut Leków ul. Chełmska 30/34
12	14.01 (czwartek)	Proteomika (sala 14A)
13	19.01 (wtorek)	Wycieczka: Instytut Gruźlicy ul. Płocka 26 http://www.igichp.edu.pl/
14	21.01 (czwartek)	kolokwium