

# BAKTERIÁLNÍ GENETIKA V EXPERIMENTECH

MB140P72

- **RNDr. Irena Lichá, CSc.**
  
- Katedra genetiky a mikrobiologie, č.m. 110A
- Viničná 5, Praha 2, 128 44
  
- **tel.: 2 2195 1714**
- **e-mail: [licha@natur.cuni.cz](mailto:licha@natur.cuni.cz)**
- **<http://www.natur.cuni.cz/molbio/licha>**
  
- **literatura:**
- Molecular Genetics of Bacteria, Snyder and Champness, 2<sup>nd</sup> ed. 2003, (ASM Press), část III kapitoly 10,11,12,13 část IV kapitola 14.
- Prokaryotic genetics, Joset, F., Guespin-Michel, J. (Blackwel), 1993, kapitoly 13,14,15.
- Aktuální separáty
- **web:**
  - <http://els.wiley.com> (jen z univerzitních PC) (<http://www.els.net>)
  - jednotlivé citované práce

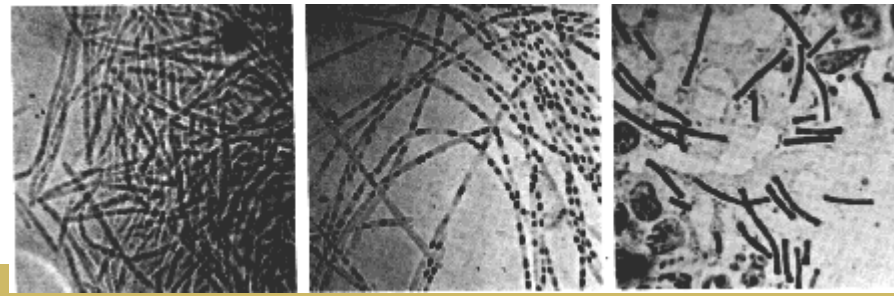
# Bakteriální genetik

Kurz bakteriální genetiky by Vás měl seznámit se základními problémy klasické genetiky.

**Důvody** proč, byste se měli s nimi měli seznamovat jsou hned dva.

- **První** – získat povědomí o tom jak Vám metody bakteriální genetiky mohou pomoci řešit biologické problémy na molekulární úrovni
- 
- **Druhý** - umožnit Vám správně interpretovat výsledky druhých jejichž práce budete studovat.
- **Třetí** – seznámit se s experimentálními přístupy v řešení konkrétních úloh.

# „Trocha historie“



- Přístupy řešení se vyvíjejí s dostupnými technikami
  - ▣ Vizualizace, mol. biol., atd.
- Milníky:

**Table 1.2** *Giants of the early days of microbiology and their major contributions*

<i>Investigator</i>	<i>Nationality</i>	<i>Dates<sup>a</sup></i>	<i>Contributions</i>
Robert Hooke	English	1664	Discovery of microorganisms (fungi)
Antoni van Leeuwenhoek	Dutch	1684	Discovery of bacteria
Edward Jenner	English	1798	Vaccination (smallpox)
Louis Pasteur	French	Mid- to late 1800s	Mechanism of fermentation, defeat of spontaneous generation, rabies and other vaccines, principles of immunization
Joseph Lister	English	1867	Methods for preventing infections during surgeries
Ferdinand Cohn	German	1876	Discovery of endospores
Robert Koch	German	Late 1800s	Koch's postulates, pure culture microbiology, discovery of agents of tuberculosis and cholera
Sergei Winogradsky	Russian	Late 1800s to mid-1900s	Chemolithotrophy and chemoautotrophy, nitrogen fixation, sulfur bacteria
Martinus Beijerinck	Dutch	Late 1800s to 1920	Enrichment culture technique, discovery of many metabolic groups of bacteria, concept of a virus

<sup>a</sup>The year in which the key paper describing the contribution was published, or the date range in which the investigator was most scientifically active.

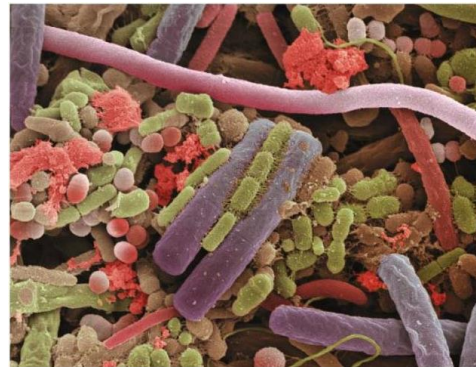
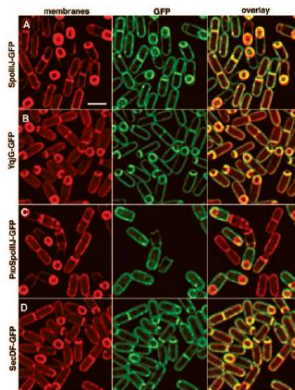
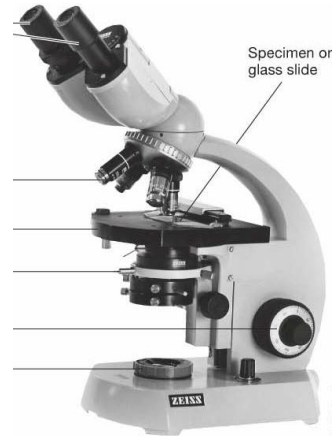
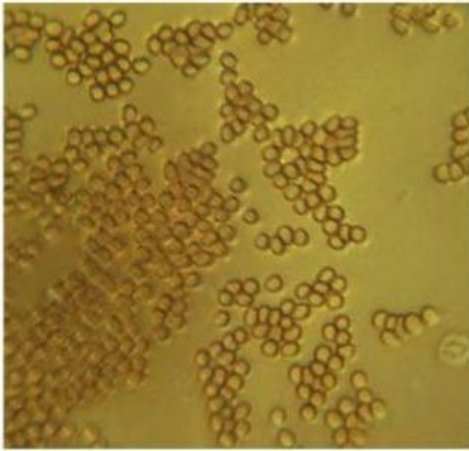
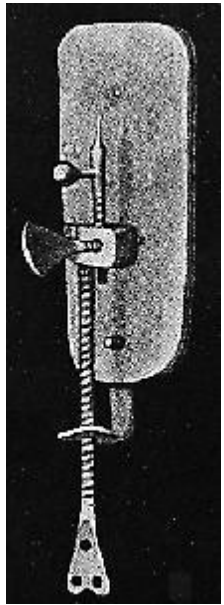
# „Trocha historie“ - Nobelovy ceny.

**Table 1.4** Some Nobel laureates in the era of molecular microbiology<sup>a</sup>

Investigator(s)	Nationality	Discovery/Year <sup>b</sup>
George Beadle, Edward Tatum	American	One gene–one enzyme hypothesis/1941
Max Delbrück, Salvador Luria	German/Italian	Inheritance of characteristics in bacteria/1943 ←
Joshua Lederberg	American	Conjugation and transduction in bacteria/1946/1952 ←
James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins	American/British	Structure of DNA/1953 ←
François Jacob, Jacques Monod, Andre Lwoff	French	Gene regulation by repressor proteins, operon concept/1959
Sydney Brenner	British	Messenger RNA, ribosomes as site of protein synthesis/1961
Marshall Nirenberg, Robert Holley, H. Gobind Khorana	American/Indian	Genetic code/1966
Howard Temin, David Baltimore, and Renato Dulbecco	American/Italian	Retroviruses and reverse transcriptase/1969
Hamilton Smith, Daniel Nathans, Werner Arber	American/Swiss	Restriction enzymes/1970 ←
J. Michael Bishop, Harold Varmus	American	Cancer genes (oncogenes) in retroviruses/1972
Paul Berg	American	Recombinant DNA technology/1973 ←
Roger Kornberg	American	Mechanism of transcription in eukaryotes/1974
Fred Sanger	British	Structure and sequencing of proteins, DNA sequencing 1958/1977
Carl Woese <sup>c</sup>	American	Discovery of <i>Archaea</i> /1977
Stanley Prusiner	American	Discovery and characterization of prions/1981
Sidney Altman, Thomas Cech	American	Catalytic properties of RNA/1981
Barry Marshall, Robin Warren	Australian	<i>Helicobacter pylori</i> as cause of peptic ulcers/1982
Luc Montagnier, Françoise Barré-Sinoussi, Harald zur Hausen	French/German	Discovery of human immunodeficiency virus as cause of AIDS/1983
Kary Mullis	American	Polymerase chain reaction/1985 ←
Andrew Fire, Craig Mello	American	RNA interference/1998

# „Trocha historie“

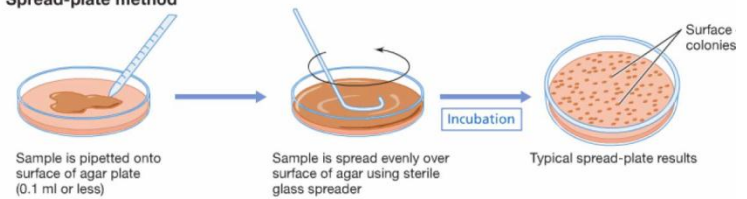
- Je důležitá pochopit vývoj poznání x kam se to ubírá.
- Úzce spojeno s vývojem technik - vizualizace



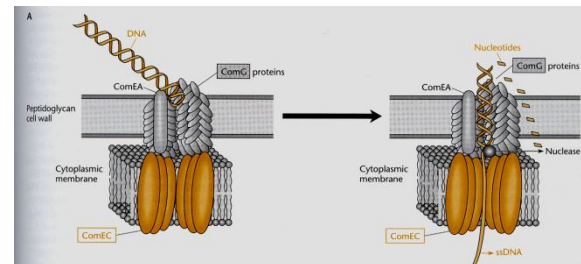
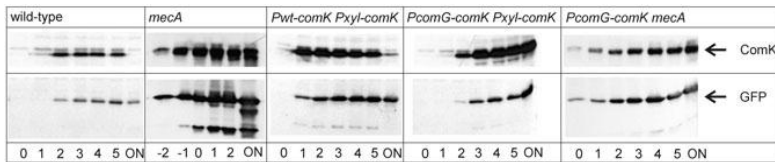
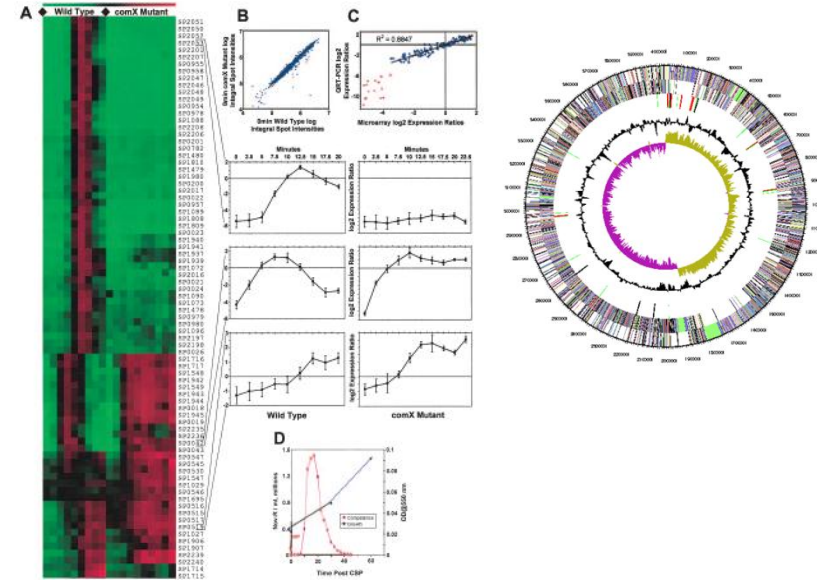
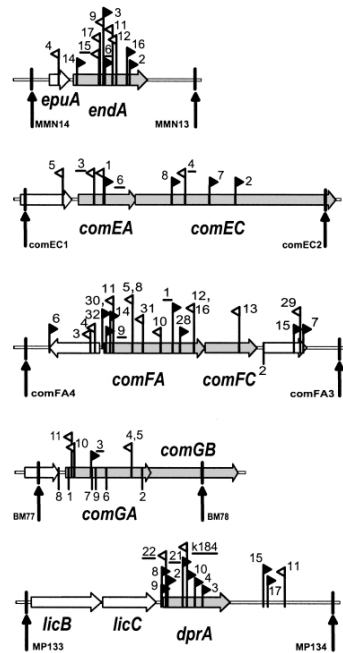
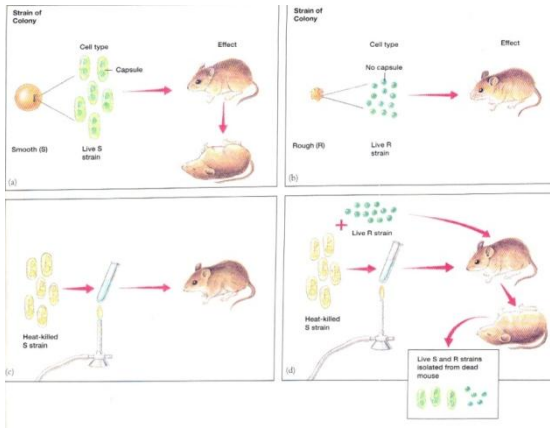


# „Trocha historie“

Spread-plate method



□ Experimentální přístupy – od pozorování přes molekulárně biologické až po genomické techniky.



# Genetika umožňuje studovat systém *in vivo*:

## Organizaci genů:

vytváření a charakterizace mutant umožňuje studovat-

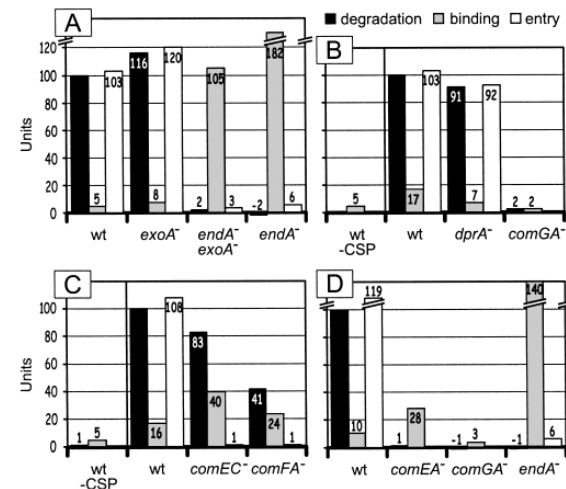
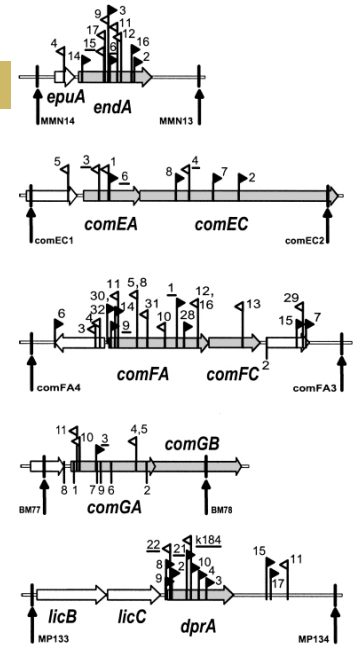
- počet genů zapojených do určitého procesu
- jejich relativní uspořádání a transkripční organizaci

Dříve - např. objevení metabolických drah, rekombinace,

- Nespecifická mutagenese a následná analýza mutant komplementací a vzájemným křížením
- Test alelismu –určuje zda dvě mutace jsou alelické či nikoliv
  - určení počtu genů odpovědných za fenotyp

F' *lacZ-lacY*<sup>+</sup> / *lacZ*<sup>+</sup>*lacY*<sup>-</sup> - komplementuje se na WT

F' *lacZ*<sup>-</sup>*lacY*<sup>+</sup> / *lacZ*<sup>-</sup>*lacY*<sup>+</sup> - zůstává Lac<sup>-</sup>





# Genetika umožňuje studovat systém *in vivo*:

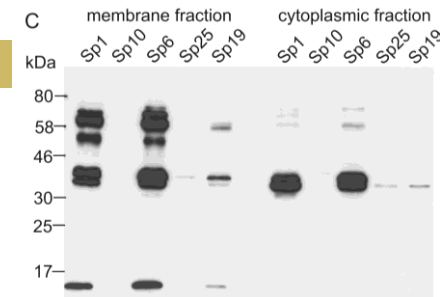
## □ Funkční studie:

### ▣ biochemická studie mutanta

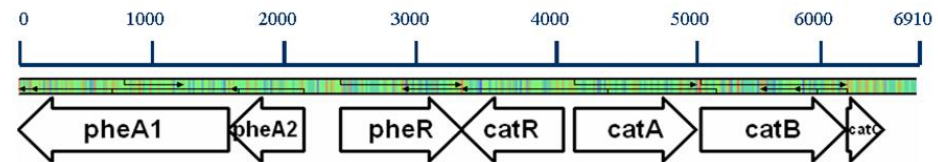
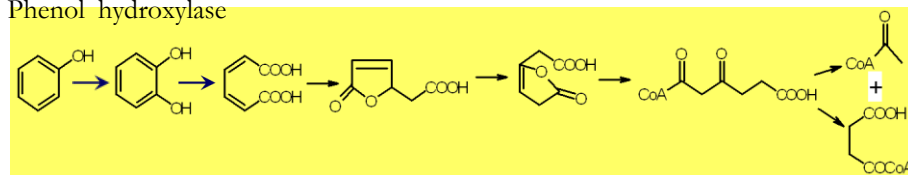
- který byl geneticky charakterizován a definován jako defektní v jednom genu – vytvořený cílenou mutagenezí
- umožňuje studovat: - indikaci role produktu změněného genu v metabolismu *in vivo*-
  - korelace genu a jeho proteinového produktu potvrzuje jeho biochemickou aktivitu *in vivo*; -potvrzení genomických studií

### ▣ studium metabolických drah;

- analýza metabolitu akumulovaného u mutanta umožňuje a koreluje mutaci s biochemickým dějem.



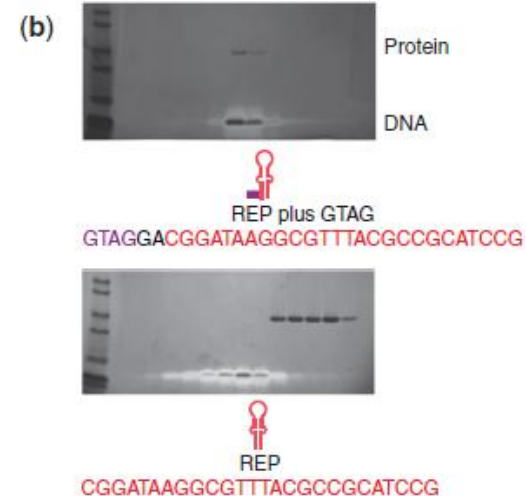
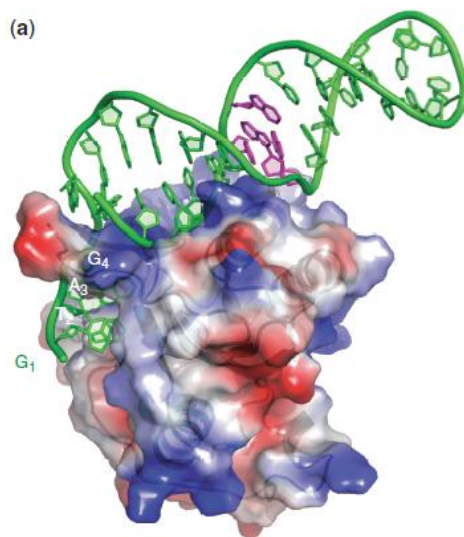
Phenol hydroxylase



# Genetika umožňuje studovat systém *in vivo*:

## □ Strukturní studie:

- mohou objasnit závislosti struktury a funkce proteinu
- Cílená mutagenese, bodové mutace-
  - biochemické charakterizace řady mutant, které jsou pozměněny v genu sledovaného produktu.
  - Zvláště výhodné je to u proteinů, u nichž byla stanovena struktura rentgenovou (X-ray) krystalografií a je známa jejich 3-D struktura.

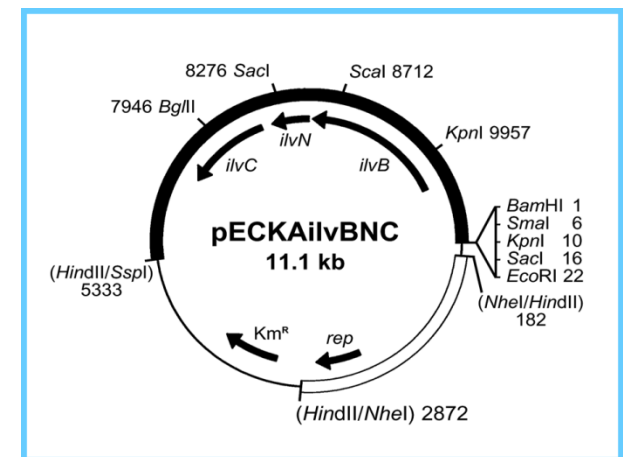
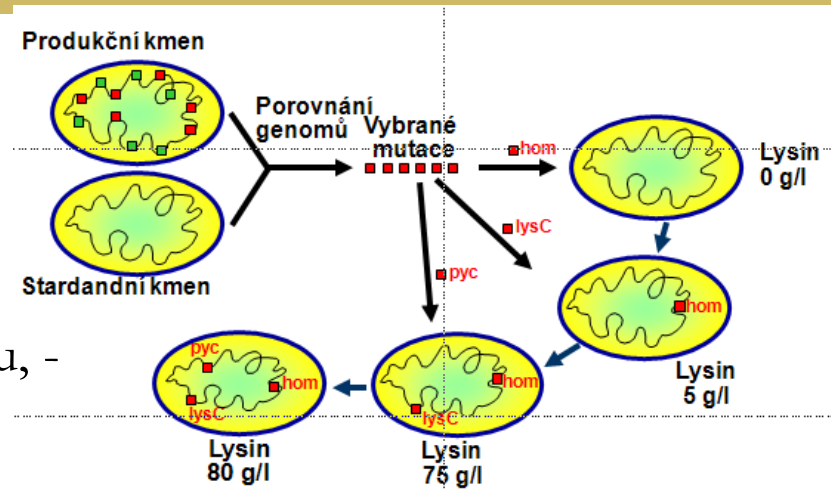


# Genetika umožňuje studovat systém *in vivo*:

## □ Biotechnologie:

### □ Vytváření mutant s žádoucími vlastnostmi –

- zvýšená produkce žádaného metabolitu, -
  - Nespecifická mutageneze – izolace nadprodukčních mutant
  - Cílená – znalost metabolické dráhy
- produkce modifikovaného metabolitu,
  - Cílená, vnášení celých genů
- vytváření zcela nové látky organismu nevlastní.
  - Vnášení celých genů



# Genetika umožňuje studovat systém *in vivo*:

## □ Regulace genové exprese

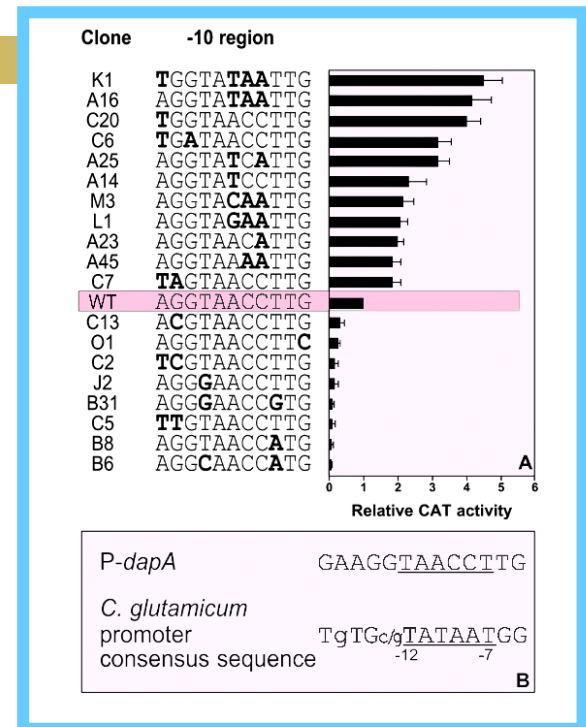
- v popředí zájmu studia v postgenomické době
- proces při kterém je exprese genu zapínána/vypínána
- různé podmínky, různý fyziologický stav

## □ Důvody regulace exprese genů

- exprese jen aktuálně potřebných genů a globální regulace biochemických dějů v celé buňce
  - reakce na změnu vnějšího prostředí
  - součást procesu vývoje – (sporulace)

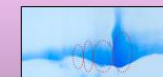
## □ Formy studia

- kombinace genově inženýrských a genetických přístupů
- funkční studie musí být doplněny experimenty *in vitro*



## Identifikace míst fosforylace fosfoglukosamin-mutasy GlmM

1. rozměr pH 3-5.6
2. rozměr 12,5% AA gel



GlmM (WT) Coomassie blue barvený gel - fosforylace s <sup>32</sup>P-ATP

→ 3 fosforylované izoformy



GlmM (WT) autoradiogram (expozice 2 dny) - fosforylace s <sup>32</sup>P-ATP



S101AGlmM (mut) Coomassie blue barvený gel - fosforylace s <sup>32</sup>P-ATP

→ 2 fosforylované izoformy



S101AGlmM (mut) autoradiogram (expozice 2 dny) - fosforylace s <sup>32</sup>P-ATP

# In vitro x in vivo

■ In vitro – molekulárně biologickými, biochemickými i genově inženýrskými metodami.

■ Výhody.

■ Jednodušší systém, enzymová aktivita, kofaktory

■ Nevýhody:

■ Nepojme všechny souvislosti, artefakty

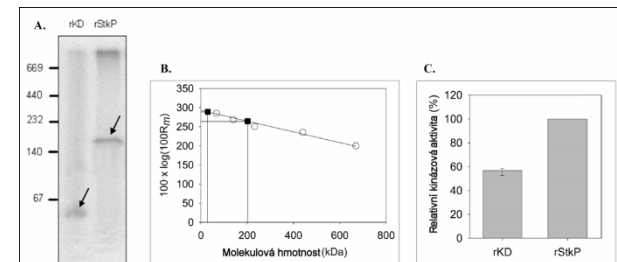
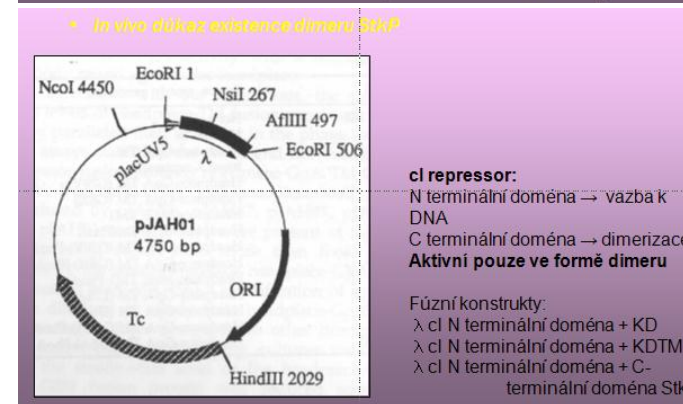
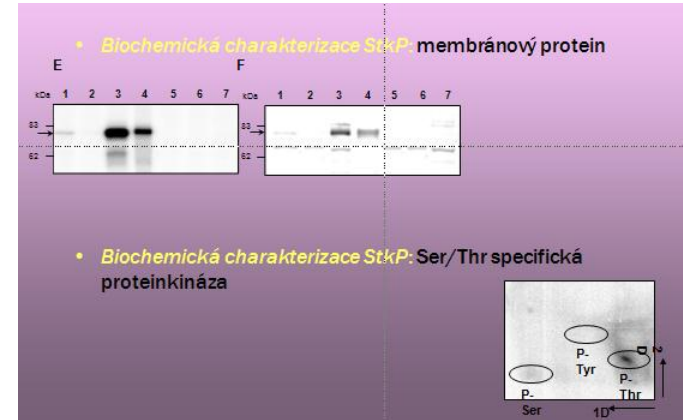
■ In vivo – kombinace genově inženýrských metod s klasickou genetikou.

■ Výhody.

■ Průkaznější důkazy, Komplexní pojetí

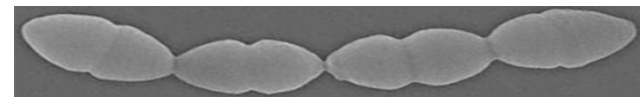
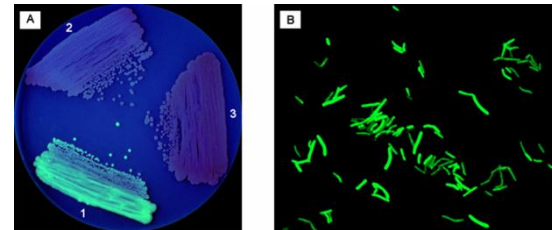
■ Nevýhody.

■ Interakce s ostatními ději – příliš mnoho proměnných



# Bakterie jsou různé

- Modelové mikroorganismy:
  - *E. coli* – klonovací, expresní mikroorganismus –
    - indukovaná kompetence, vektory odvozené od CoEL1 a F1,  $\lambda$  fága, Lac jako reportér,
    - Model  $G^-$  - konjugace, většina biochemických a mol. biol. dějů, stresová adaptace, mobilní elementy.
  - *Bacillus subtilis* – původně též jako klonovací x nestabilní vektory, přirozená kompetence, bakteriofágy
    - Model pro  $G^+$  - sporulace, kompetence, diferenciace buněk, bistabilita, komunikace v koloniích, divoké x laboratorní kmeny
- Průmyslově významné mikroorganismy:
  - Korynebakterie, -
    - patogenní kmeny - *C. diphtheriae*, *C. jeikeium*,
    - nepatogenní kmeny: *C. glutamicum* – producent AK
  - Streptomycety
    - Producenti antibiotik
- Medicínsky významné mikroorganismy:
  - Streptococcus
    - Gram-pozitivní extracelulární lidský patogen, - přirozená kompetence
      - virulentní formy způsobují sekundární infekce: záněty nosohltanu, zánět středního ucha, pneumonie, endokarditida, meningitidy, sepse
      - v nevirulentní formě kolonizuje horní cesty dýchací
      - hlavními virulenčními faktory jsou polysacharidové pouzdro, neuraminidáza a pneumolysin



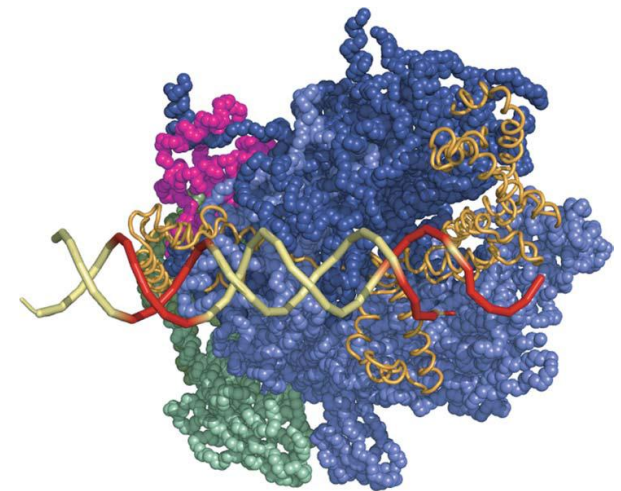
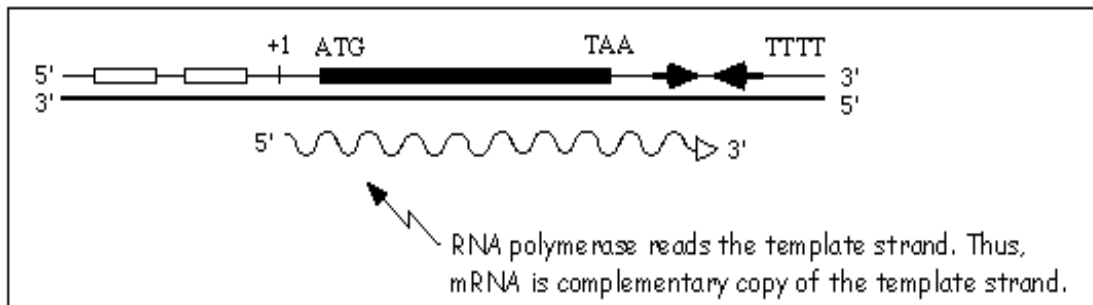
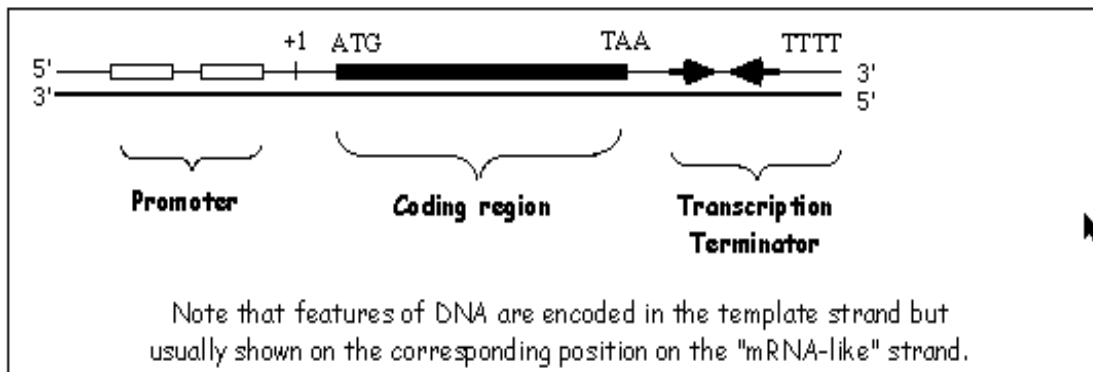


# Sylabus

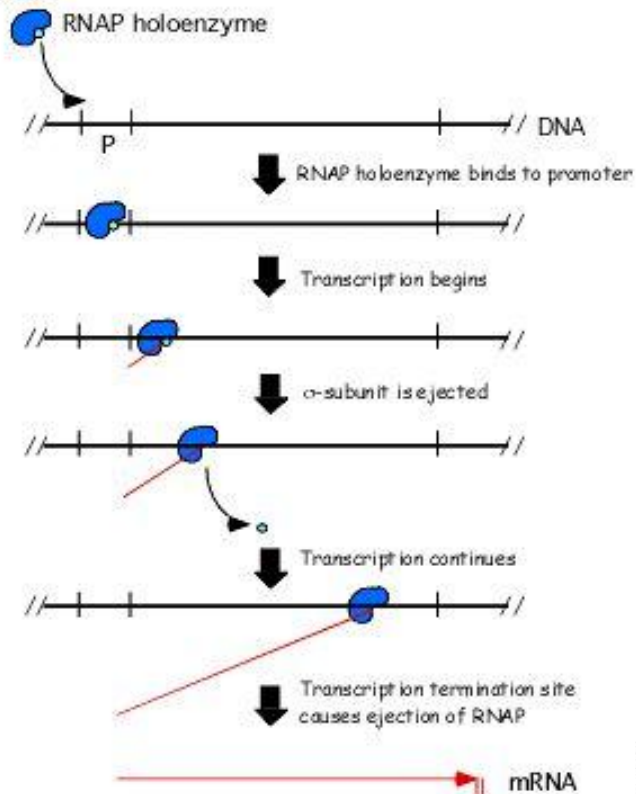
- 2.10.2012 – Úvod, cíl přednášky - metodika genetického výzkumu, jak co prokázat pomocí genetických přístupů. Základní genetické manipulace – opakování, Genetická analýza forward x reverse, Specifická x nespecifická mutagenese, In vivo x in vitro experiment
- 9.10. 2012 - Příprava mutant využitelných v genetické analýze a studiu regulace
- 16. 10. 2012 - způsoby genetických analýz vybraných základních regulačních mechanismů na transkripční úrovni. Negativní, pozitivní, regulace
- 23.10. 2012 - Postranskripční úroveň - Antisense RNA –RNA teploměry –Riboswitch – CRISPR, MITES
- 30.12.2012 - Globální regulační dráhy I : katabolická represe – globálně regulační protein – pozitivní, negativní regulace malými molekulami – cAMP, cGMP, ppGpp, cdiGMP,
- 6.11.2012 –Globální regulační dráhy II: limitace dusíkem, atenuace, hladovění na fosfor – kinázy, regulace syntézy ribosomů a tRNA – komplexní regulace
- 13.11.2012 – Streptococcus – Fosforylace proteinů u bakterií: Přenos signálu fosforylací proteinů - studium Ser/Thr kinasa– dependentní fosforylační kaskády -Dr. Branny
- 20.11.2012 – Corrynebacterie – Techniky a nástroje analýzy a modifikace genů - Příprava kmenů produkujících aminokyseliny. (Dr. Pátek)
- 27.11.2012 -Streptococcus - Kompetence pro genetickou transformaci, Metody analýzy mechanismu navození stavu kompetence - proteomika, transkriptomika). (Dr. Branny)
- 4.12.2012 - Muropeptidy jako signální molekuly – nový typ signalizace (Dr. Branny)
- 11.12. 2012 – Genetické přístupy u Bacillus sp: Obecně stresová odpověď – CodY, sigmaB, Sporulace – příklad kompartmentizace -
- 18.12.2011 - Analýza mikrobiálních populací: Metagenomické přístupy, bezkultivační přístupy, konstrukce BAC a fosmidových knihoven,

# Struktura bakteriálního genomu

- Organizace typického strukturního genu u bakterií.

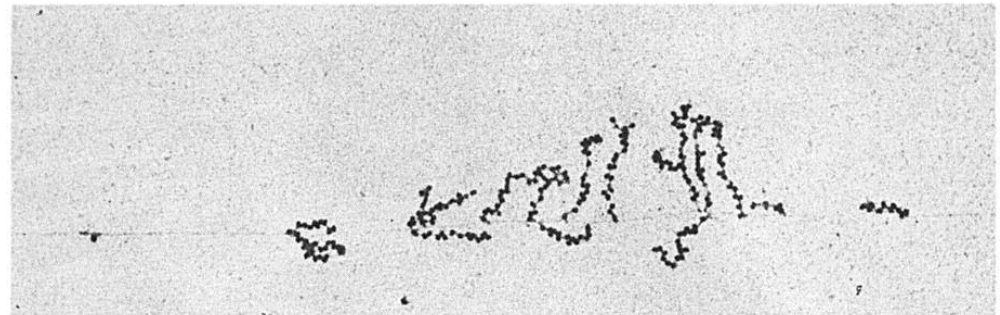
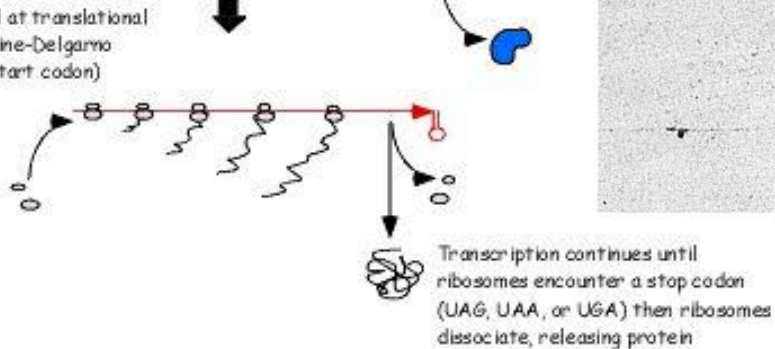


## Transcription:



## Translation:

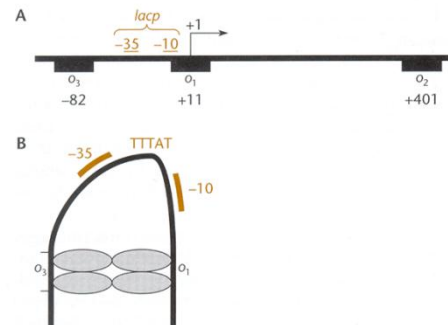
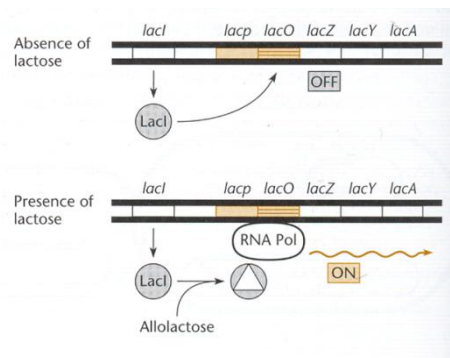
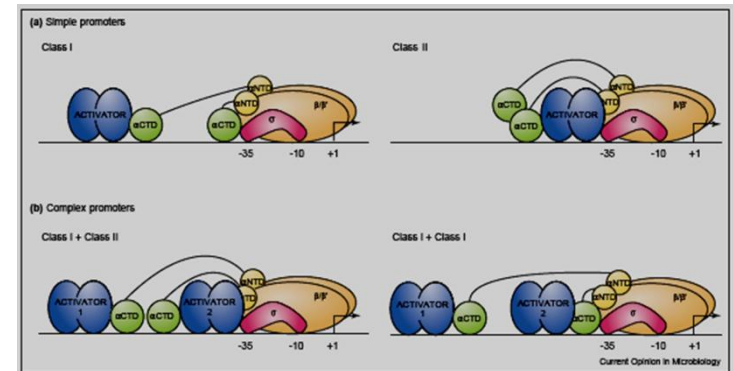
Ribosomes bind at translational start sites (Shine-Delgarno sequence and start codon)



Note that although not shown in this cartoon, translation begins soon after the mRNA transcript is made.

# Kontrola genové exprese

- Organizace *souvisejících* genů do klastrů
- Koordinovaná kontrola *souvisejících* genů
  - ▣ operonový model
- Polycistronní mRNA
- Kontrola na transkripční úrovni -
  - ▣ regulační proteiny kontrola transkripce
    - určité podmínky – indukibilní geny
  - ▣ Genetickou analýzou *lac* operonu vytvořen model – platný dodnes



# Kontrola genové exprese

## □ Kontrola na translační úrovni -

▣ struktury mRNA regulují iniciaci translace, terminaci transkripce

- nízkomolekulární látky, teplota, antisense RNA, proteiny

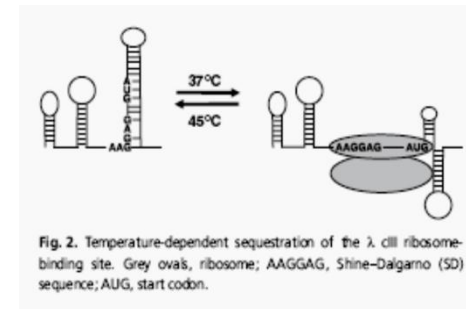
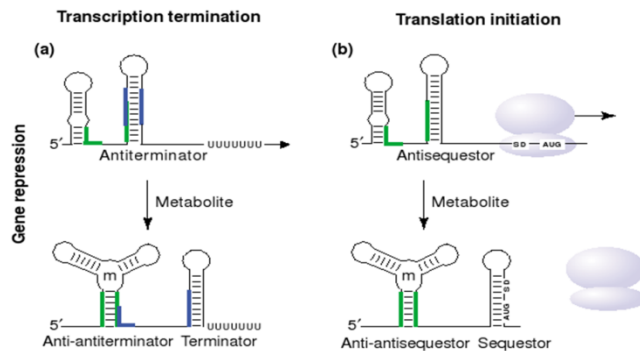
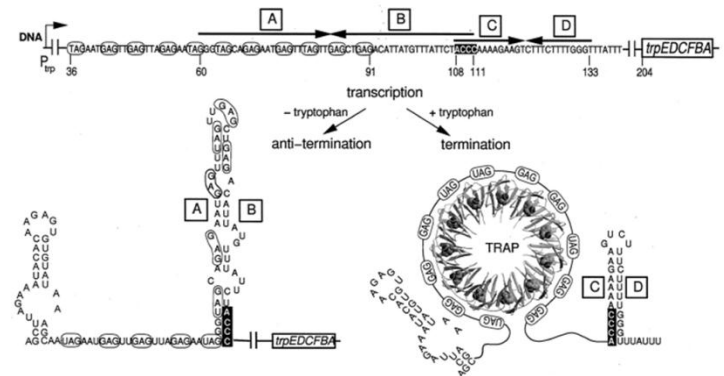
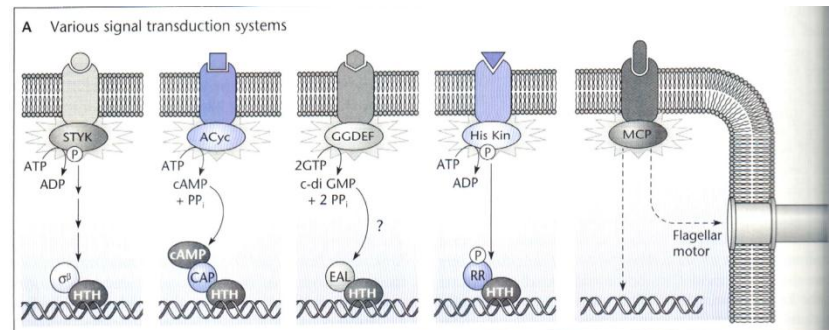


Fig. 2. Temperature-dependent sequestration of the  $\lambda$  cIII ribosome-binding site. Grey ovals, ribosome; AAGGAG, Shine-Dalgarno (SD) sequence; AUG, start codon.

## □ Kontrola na postranslační úrovni –

▣ Kovalentní modifikace proteinů



# Vytváření mutací

Mutanty jsou esenciálním předpokladem pro jakoukoliv genetickou studii, pro strukturu genů, i jejich funkčních závislostí

## □ **Nespecifická mutagenese -**

mutace v mnoha genech a následná selekce mutanty defektní v daném fenotypu

- **předpoklad:** vypracování selekční strategie
- **použití:** při studiu děje, jehož molekulární podstatu neznáme
- **metody:** UV záření, mutagenní látky, inserce transposonů

## □ **Specifická mutagenese -**

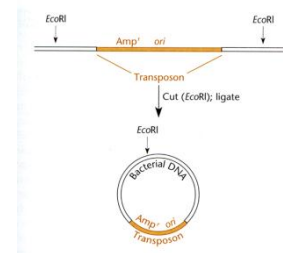
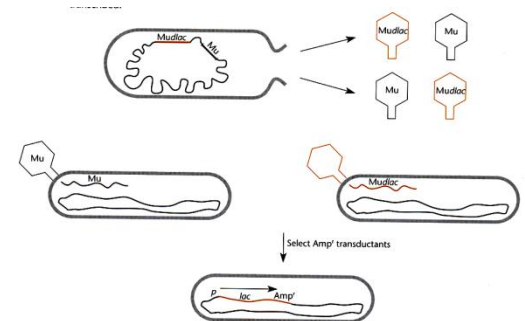
cílená změna určitého genu a následné sledování vlivu na fenotyp

- **Předpoklad:** nutná znalost sekvence příslušného úseku DNA
- **použití:** při identifikaci neznámé biochemické funkce sekvenovaného genu (čtecího rámce).
- **metody:** specifické delece a inserce pomocí restričních enzymů, záměny basí metodami cílené mutagenese (site-direct).



# Nespecifická mutagenese

- 1. krok – výběr mutačního způsobu
  - vytvoření mnoho nespecifických mutací v celé populaci
    - typ mutace – výběr mutagenu
- 2. krok – selekční strategie
  - vyselektování fenotypové knihovny
    - přímá nebo vnesením selekčního markeru
- 3. krok – lokalizace mutace
  - Přiřazení fenotypu ke genotypu
    - genetické metody – komplementace, specifická transdukcce
    - genově inženýrské – příprava genových knihoven, PCR, hybridizace, sekvenace
    - Kombinace obou



# Vytváření cílených mutant

## □ Princip

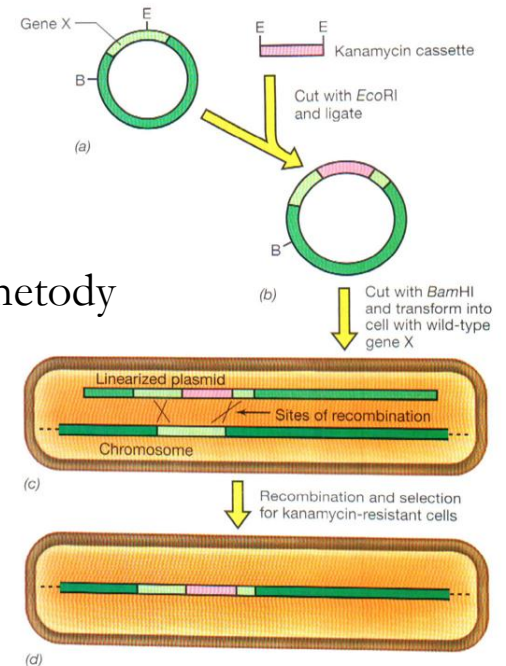
- na základě homologie integrace pozměněné alely vedoucí ke změně studovaného genu (knock out, delece, změna funkce)
- vyvinuty metody jak přenést gen z vektoru na chromosom
  - integrační plazmidy (nereplikují se v daném organismu)
  - Nekompatibilní plazmidy
  - Rekombinantní fágy

## □ Použití

- vytváření cílených mutant - studium funkce genů
  - mutanty vybraného genu na základě znalosti jeho sekvence
- vyřazení genů
  - vkládáním rezistentních kazet
  - delecí genů
- vytváření duplikací genů – komplementace
  - rekombinací Campbellova typu s jedním crossing overem se inkorporuje celý plazmid (není stálá mutace).
- pomocí speciálních plazmidů studium regulace z promotorů
  - plazmidy mají homologii s genem ne nezbytným (u *B. subtilis* amylasa)

# Vytváření cílených mutant

- **1. krok** - vytvoření konstruktů – rekombinantní techniky
  - bodová mutace
  - delece
  - inserce kazety
  - fúze promotoru s reportérovým genem
  - fúze genu s reportérovým genem
- **2. krok** – vnesení mutace do chromosomu – genetické metody
  - systémy výměny allel
  - závisí na studovaném organismu
    - plazmidy
    - Fágy
- **3. krok** – izolace žádaného mutantu



# Studium regulace

- **Regulace genové exprese**
  - v popředí zájmu studia v postgenomické době
  - proces při kterém je exprese genu zapínána/vypínána
  - různé podmínky, různý fyziologický stav
- **Důvody regulace exprese genů**
  - exprese jen aktuálně potřebných genů
  - reakce na změnu vnějšího prostředí
  - součást procesu vývoje – (sporulace)
- **Formy regulace**
  - regulace na transkripční úrovni – regulace syntézy RNA – nejefektivnější
  - postranskripční regulace - všechny regulace po transkripci RNA
  - regulace na translační úrovni – RNA konstituivně, za určitých podmínek není translatována – atenuace, asRNA

# Studium regulace

- Vytváření genových fúzí
  - Transkripční fúze
  - Plazmidy -
    - jeden gen je fúzován (přiřazen) k promotoru druhého genu
    - oba geny jsou transkribovány do jedné mRNA ale vytvářejí dva proteiny.
    - Deriváty transpozonů
    - obsahují reportérový gen (*lac*, *lux* atd.) s vlastní oblastí iniciace translace.
  - Translační fúze
    - Plasmidy - ORF dvou proteinů jsou fúzovány dohromady a vytvářejí jeden společný ORF – vznik jednoho fúzního proteinu.
    - Deriváty transpozonů obsahují reportérový gen (*lac*, *lux* atd.) ale bez oblasti iniciace translace.

# Genové fúze – reportérové geny

- Reportérové geny – geny jejichž aktivita je snadno detekovatelná a kvantifikovatelná
- Transkripční fúze
- Vlastnosti
  - ▣ **Detekovatelnost** – nesmí interferovat s genetickým pozadím ani prostředím
  - ▣ **Citlivost** – záleží na typu experimentu – strukturní geny x regulační geny, kultivace v tekutém mediu, pevné půdy, enviromentální pokusy – nejcitlivější i jedna buňka
  - ▣ **Spolehlivá kvantifikace**
  - ▣ **Specifická aktivita**
  - ▣ **Schopnost reagovat na změny** transkripce – kompromis mezi citlivostí a stabilitou. Stabilní reportéry nereagují na oscilující změny transkripce



# Genové fúze – reportérové geny

- **lacZ** –  $\beta$  –galaktozidáza – štěpí laktozu na glukosu a galaktozu

- Stanovení kolorimetricky – v tekutém mediu i na pevném

- x-gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside



- ONPG - 2-Nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside

- Fluorescentní nebo luminiscentní stanovení (Bronstein I., et al. 1994, Anal Biochem. 219, 169.)

- Řádově citlivější

- Studium regulací v jedno druhových kulturách –

- některé bakterie mají  $\beta$  –galaktozidázaovou aktivitu (mutanty),

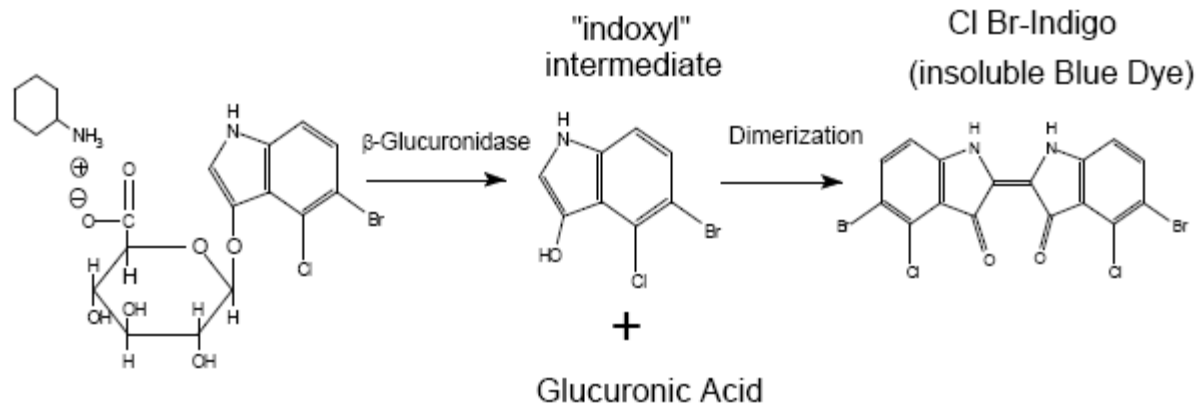
- sensitivní k pH a vyšší teplotě

- nevhodný k měření rychlých změn v transkripci

(Atlas R.M. et al. BioTechniques. 12,706. Burlage, R.S. et al. Annu. Rev. Microbiol. 48,291.)

# Genové fúze – reportérové geny

- ***gusA*** – (*uidA*) –  $\beta$ -glucuronidase - štěpí široké spektrum glucuronidů
  - Chromogenní substrát –
    - X-gluc - *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucuronidide
    - X-GlcA - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide
- Těž fluorescentní pigment –
- Použití převážně u patogenních rostlinných virů, symbioty rostlin (tam kde nelze *lacZ*),
- U enviromentálních bakteriálních populací též omezeno



# Genové fúze – reportérové geny

- ***xylE*** – catechol-2,3-oxygenasa – přeměna catecholu na 2- hydroxymuconic semialdehyd –
  - žlutý pigment – spektrofotometrické stanovení
  - nalezen u Pseudomonad – nevyskytuje se nikde jinde
  - nevýhoda – stabilita závislá na fyziologickém stavu bakterie a dostupnosti kyslíku
- **Bioluminescence** – *luxCDABE* operon z *Vibrio fischeri*
  - světlo emitující reakce (*luxAB*) – v přítomnosti alifatického aldehydu (substrát, *luxCDE*) a zdroje redukčních ekvivalentů – FMNH<sub>2</sub> a O<sub>2</sub>
  - aerobní prostředí, aktivně rostoucí buňky
  - vhodný pro studium genové exprese *in situ*
    - minimální pozadí
    - kvantifikace luminometrem nebo protony měřící přístroje
  - stabilní reportér – není vhodný pro rychlé změny transkripce
- ***cat*** – resistance k chloramfenikolu –chloramphenicol acetyl transferasa

# Genové fúze – reportérové geny

- **Fluorescentní proteiny** – Errampalli 1999, J. Microbiol. Methods 35, 187,
  - **GFP** – green fluorescent protein – jellyfish *Aequorea victoria* – absorbuje fialové světlo při maximu 395 nm a emituje zelené světlo s maximem 509 nm – první používaný
    - Kvantifikace fluorescenční spektroskopii a konfokální laserovou mikroskopií
    - Použití pro jednotlivou buňku – lokalizace proteinů
    - Vhodný pro nerostoucí buňky
    - Odolný proti mnoha denaturantům, proteázám, odolný proti teplotě (65 °C), formaldehydu
    - Vhodný pro elektronovou mikroskopii
  - **Barevné varianty** – rozdílné excitační a emisní vlnové délky
    - Možnost použít několik najednou pro různé geny – metoda FRET
    - Žlutý ( 513,527) , tyrkysový ( 453,501), modrý (385,445),
    - Modifikované GFP – red shifted S65T (395, 490) – více fluorescentní i odolný

# Značení proteinů

- Nestabilní varianty GFP –
  - obsahují N-terminální peptid - AANDENYLAA – označení pro proteasy
  - Alterace 3 aa na C – konci LVA, AAV, ASV – stabilita v *E. coli* – 40, 60, 100 min.
  - Snižuje se citlivost – dobrý kompromis mezi citlivostí a schopností reagovat na změny transkripce
- Obecně bakteriální buňky tolerují nízké koncentrace GFP
- Některé kmeny vysoké hladiny netolerují – degradace konstruktů – důvod neznámý
  - použití k lokalizaci
- RFP – red - izolovaný z mořských korálů
  - „Divoký“ protein – fluorescenční aktivita až po několika hodinách po transkripci

# Značení proteinů

- Typy značek
  - ▣ Translační fúze s epitopy – komerčně dostupné protilátky (Sigma, Roche)
- **FLAG** – arteficielní 8 aa zbytek
- **HA** – 9 aa zbytek odvozený od chřipkového hemaglutininu
- **C-Myc 10** aa zbytek odvozený od lidského c-myc onkogenu