

# Restrikcijska analiza plazmida pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN

---

Slišković, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:057005>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Ana Slišković**

7349/BT

**Restriksijska analiza plazmida pRS40cN, pRS52cN,  
pRS53cN i pRS55cN**

ZAVRŠNI RAD

**Predmet:** Genetičko inženjerstvo

**Projekt:** Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina  
(IP-2018-01-9717)

**Mentor:** prof.dr.sc. Ivan Krešimir Svetec

**Zagreb, 2020.**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u sklopu projekta *Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina (IP-2018-01-9717)*, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivana Krešimira Sveteca.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno - biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**  
**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**  
**Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama**  
**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

### **Restriksijska analiza plazmida pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN** ***Ana Slišković, 58210210***

**Sažetak:** Pod pojmom restriksijska analiza, u molekularnoj genetici i genetičkom inženjerstvu, podrazumijeva se analiza DNA korištenjem restriksijskih enzima, odnosno endonukleaza koje cijepaju DNA u točno određenim sekvencijama. Stoga su ovi enzimi nezamjenjivi u genetičkom inženjerstvu i mnogim molekularno-genetičkim metodama koje imaju primjenu u dijagnostici, filogeniji i identifikaciji organizama. U ovom radu je restriksijskom analizom potvrđena struktura prethodno konstruiranih plazmida pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN. U tu su svrhu plazmidi najprije izolirani i pročišćeni iz velikih volumena kultura bakterije *Escherichia coli*, a zatim cijepani odgovarajućim restriksijskim enzimima te podvrgnuti elektroforezi u agaroznom gelu. Na temelju rezultata analize potvrđeno je da restriksijske mape svih plazmida odgovaraju njihovoj stvarnoj strukturi.

**Ključne riječi:** *Escherichia coli*, plazmid, restriksijska analiza, restriksijski i modifikacijski enzimi

**Rad sadrži:** 27 stranica, 6 slika, 2 tablice, 45 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Ivan Krešimir Svetec

**Pomoć pri izradi:** Angela Matanović, mag. ing.

**Datum obrane:** 1. rujna 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biology and Microbial Genetics**  
**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

### **Restriction analysis of plasmids pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN and pRS55cN**

***Ana Slišković, 58210210***

**Abstract:** In molecular genetics and genetic engineering, the term restriction analysis refers to the analysis of DNA molecules using restriction enzymes, endonucleases that cleave DNA in specific nucleotide sequences. Therefore, these enzymes are indispensable in genetic engineering, as well as in many molecular genetic methods that are used in diagnostics, phylogeny and identification of organisms. In this paper, restriction analysis was used to confirm the structure of previously constructed plasmids pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN and pRS55cN. For this purpose, the plasmids were first isolated and purified from large volumes of *Escherichia coli* cultures, then digested with appropriate restriction enzymes and subjected to agarose gel electrophoresis. Based on the results of the analysis, it was confirmed that the restriction maps of all plasmids correspond to their actual structure.

**Keywords:** *Escherichia coli*, plasmid, restriction analysis, restriction and modification enzymes

**Thesis contains:** 27 pages, 6 figures, 2 tables, 45 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Associate Professor Ivan Krešimir Svetec, PhD

**Technical support and assistance:** Scientific Assistant Angela Matanović, mag. ing.

**Defence date:** September 1<sup>st</sup> 2020

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. Restriksijski enzimi i restriksijsko-modifikacijski sustavi</b> .....	2
2.1.1. Otkriće restriksijsko-modifikacijskih sustava .....	3
2.1.2. Nomenklatura restriksijskih enzima i klasifikacija restriksijsko-modifikacijskih sustava..	4
2.1.3. Primjena restriksijskih enzima.....	7
<b>2.2. Bakterija <i>Escherichia coli</i> u genetičkom inženjerstvu</b> .....	8
<b>2.3. Plazmidni vektori u genetičkom inženjerstvu</b> .....	9
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	11
<b>3.1. Materijali</b> .....	11
3.1.1. Mikroorganizam.....	11
3.1.2. Plazmidi.....	11
3.1.3. Hranjive podloge .....	13
3.1.4. Otopine .....	13
3.1.5. Kemikalije i enzimi.....	15
<b>3.2. Metode</b> .....	16
3.2.1. Uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i> .....	16
3.2.2. Izolacija plazmidne DNA iz velikog volumena kulture .....	16
3.2.3. Pročišćavanje DNA fenolizacijom.....	17
3.2.4. Taloženje DNA pomoću amonijevog acetata .....	17
3.2.5. Cijepanje DNA restriksijskim enzimima .....	17
3.2.6. Gel-elektorforeza .....	17
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	18
<b>4.1. Izolacija plazmida pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN iz velikog volumena</b> .....	18
<b>4.2. Restriksijska analiza plazmida pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN</b> .....	19
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	22
<b>6. LITERATURA</b> .....	23

# 1. Uvod

Postojanje restrikcijsko-modifikacijskih (RM) sustava značajno je otkriće u molekularnoj genetici i molekularnoj biologiji bakterija jer RM sustavi imaju ulogu u obrani bakterija od bakteriofaga. Međutim, ovo otkriće omogućilo je i razvoj genetičkog inženjerstva jer je dokazano postojanje restrikcijskih enzima, odnosno endonukleaza koje cijepaju dvolančanu DNA. Neki od ovih enzima posebno su interesantni jer prepoznaju točno određeni redoslijed nukleotida te DNA cijepa na točno određenom mjestu i na točno određeni način. Zbog toga ovi enzimi imaju nezamjenjivu ulogu u genetičkom inženjerstvu i molekularnoj dijagnostici. Uz korištenje DNA-ligaza i drugih modifikacijskih enzima, metodama genetičkog inženjerstva moguće je precizno spajati i kombinirati fragmente DNA iz bilo kojeg organizma, mijenjati postojeće i kreirati nove gene. U ovim postupcima ogromnu ulogu ima bakterija *Escherichia coli* i plazmidi koji se u njoj mogu replicirati. Plazmidi koji se koriste u genetičkom inženjerstvu su male kružne dvolančane molekule DNA, a u njih se mogu ugraditi prirodni ili genetičkim inženjerstvom konstruirani fragmenti DNA koji se potom mogu unijeti u organizam koji se želi genetički modificirati. Pritom je bakterija *E.coli* najčešće korišten domaćin za konstrukciju takvih rekombinantnih plazmida, a ujedno je i najvažniji modelni organizam u istraživanjima molekularne biologije i molekularne genetike bakterija.

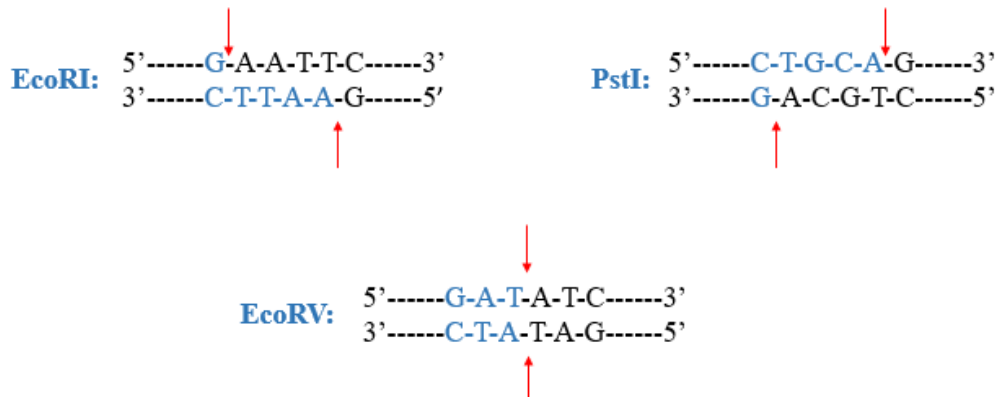
U ovom radu, restrikcijski su enzimi korišteni za analizu plazmida pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN koji su konstruirani u sklopu projekta Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina (IP-2018-01-9717). Plazmidi su propagirani te izolirani iz bakterije *E. coli*, a restrikcijska je analiza provedena kako bi se potvrdilo da su u plazmid pRS40cN uspješno insertirana različita ishodišta replikacije, odnosno da su uspješno konstruirani plazmidi pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN koji će se u nastavku istraživanja koristiti kao vektori za transformaciju nekonvencionalnih vrsta kvasaca.

## 2. Teorijski dio

### 2.1. Restriksijski enzimi i restriksijsko-modifikacijski sustavi

Restriksijskim se enzimima naziva velika skupina enzima koji služe za cijepanje molekule DNA te su nezamjenjivi u genetičkom inženjerstvu i molekularnim bioznanostima kao što su molekularna biologija i biotehnologija. Restriksijski su enzimi zapravo endonukleaze koje cijepaju dvolančanu molekulu DNA, a dio su takozvanog restriksijsko-modifikacijskog sustava. Kao što samo ime kaže, restriksijsko-modifikacijski sustavi se sastoje od dvije komponente; restriksijske, koju čini restriksijski enzim i modifikacijske, koju čini metilaza. Ovaj sustav djeluje na način da restriksijski enzim prepoznaje i cijepa stranu DNA koja uđe u bakterijsku stanicu, ali ne može cijepati vlastitu bakterijsku DNA, koja je prethodno modificirana, odnosno metilirana djelovanjem metilaze. Taj mehanizam djelovanja štiti bakterijsku stanicu od infekcije stranom DNA, primjerice prilikom infekcije bakteriofagom.

Ovisno o karakteristikama, restriksijski enzimi svrstani su u četiri skupine od kojih najveću primjenu, zbog svoje jednostavnosti, imaju enzimi skupine II. Oni cijepaju dvolančanu DNA na točno određenom mjestu, unutar ili u neposrednoj blizini specifičnog slijeda nukleotida. Specifični slijed nukleotida kojeg prepoznaje restriksijski enzim naziva se restriksijsko mjesto. Fragmenti DNA nastali nakon restrikcije mogu imati ravne, 5'-isturene ili 3'-isturene krajeve (Slika 1).



**Slika 1.** Primjeri restriksijskih mjesta i načina cijepanja DNA. Enzim EcoRI ostavlja 5'-isturene krajeve, enzim PstI ostavlja 3'-isturene krajeve, a EcoRV ravne krajeve. Strelice označavaju mjesto na kojemu se cijepa fosfodieterska veza, pri čemu na 5'-kraju ostaje fosfatna, a na 3'-hidroksilna skupina



### 2.1.1. Otkriće restriksijsko-modifikacijskih sustava

Prva otkrića restriksijsko-modifikacijskih sustava opisana su u nizu istraživanja pedesetih godina 20. stoljeća. Ideju o postojanju staničnog mehanizma koji štiti bakterije od infekcije stranom DNA potakli su eksperimenti u kojima je uočena velika varijabilnost u infektivnosti bakteriofaga (Luria i Human, 1952; Bertani i Weigle, 1953). Infektivnost bakteriofaga (faga) je njegova sposobnost da uspješno inficira te lizira bakterijske stanice, a mjera za infektivnost je takozvani titar faga, odnosno broj infektivnih čestica u 1 mL lizata stanica. Raspon titra faga može biti primjerice od  $10^4$ /mL do  $10^{10}$ /mL, gdje  $10^4$ /mL predstavlja malu infektivnost, a  $10^{10}$ /mL veliku infektivnost. U navedenim je istraživanjima uočeno da titar faga značajno varira u ovisnosti o soju bakterije u kojemu je prethodno umnožen. Bertani i Weigle (1953) su u nizu eksperimenata ustanovili da fag  $\lambda$ , koji je umnožen u soju K bakterije *E. coli*, daje visoki titar i na soju K-12 i na soju C bakterije *E. coli*. Međutim ako je fag  $\lambda$  umnožen na soju C dati će visok titar na soju C ali značajno niži titar na soju K-12 (tablica 1). Navedeni podaci doveli su do zaključka da tijekom umnažanja na različitim sojevima bakterije *E. coli* dolazi do modifikacije na genomu faga, ali ta modifikacija nije rezultat mutacije jer je reverzibilna, odnosno varira ovisno o soju u kojemu je fag umnožen. Do promjene u infektivnosti dolazi nakon samo jednog ciklusa umnažanja na soju C ili soju K-12, što također dokazuje da nije riječ o mutaciji.

**Tablica 1.** Rezultati određivanja infektivnosti bakteriofaga  $\lambda$  na sojevima K12 i C bakterije *E. coli* (Bertani i Weigle, 1953).

Soj <i>E. coli</i> iz kojega je priređena suspenzija faga $\lambda$	Titar faga na soju <i>E. coli</i>	
	K-12	C
K-12	$2,3 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{10}$
C	$3,2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^{10}$

Ugradnjom radioaktivnog izotopa  $^{32}\text{P}$  u DNA bakteriofaga  $\lambda$ , uzgojenog na K-12 soju *E. coli*, dokazano je da se DNA faga razgradi nedugo nakon infekcije, odnosno ulaska u stanice soja B. Također je uočeno kako stanice tog soja *E. coli* razgrađuju stranu bakterijsku i plazmidnu DNA, što je dovelo do zaključka da u stanicama postoji nukleazna aktivnost koja razgrađuje te inaktivira stranu DNA i time štiti bakterijsku stanicu od infekcije (Dussoix i Arber, 1962). U skladu s tim, Meselson i Yuan (1968) su prvi izolirali endonukleazu iz soja K koja razgrađuje DNA faga  $\lambda$ .

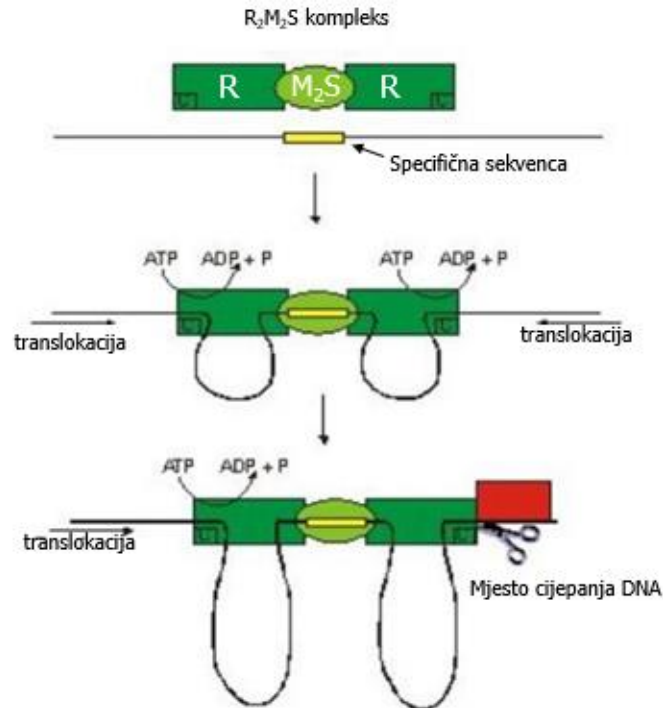
Ovakvi enzimi koji uzrokuju smanjenje, odnosno restrikciju infektivnosti bakteriofaga, nazvani su restrikcijski enzimi. Daljnja su razmatranja načina razgradnje strane DNA dovela do pretpostavke da restrikcijski enzim uvodi lom u lanac DNA na specifičnoj sekvenci koju također prepoznaje i modifikacijski enzim. Specifično je mjesto opisano kao niz od 6 do 8 nukleotida, te je predložen model prema kojemu unutar specifičnog mjesta postoji simetrija (Arber i Linn, 1969). Molekula strane DNA može izbjeći djelovanje restrikcijskog enzima ukoliko je specifična sekvenca prethodno modificirana. U nizu daljnjih istraživanja otkriveno je da je enzim zaslužan za tu modifikaciju metiltransferaza koja metilira određene baze na specifičnoj sekvenci (Gold i sur., 1963; Smith i sur., 1972). Endonukleaze i metiltransferaze *in vivo* surađuju u obliku restrikcijsko-modifikacijskog sustava bakterija (RM sustav). RM sustavi bakterije osim vlastitog genoma mogu metilirati genom faga te on potom visokim titrom inficira bakteriju koja ima taj isti RM sustav zbog modifikacije na specifičnoj sekvenci koju prepoznaje restrikcijski enzim. To saznanje objašnjava rezultate prethodno opisanog eksperimenta u kojemu fag  $\lambda$ , umnožen u soju K-12 bakterije *E. coli*, daje izrazito visok titar na tom istom soju. No ukoliko je fag  $\lambda$  umnožen u soju C, neće doći do te modifikacije pa se stanice soja K-12 pomoću svoga RM sustava mogu uspješno obraniti od infekcije faga, dajući pritom znatno niži titar faga.

### **2.1.2. Nomenklatura restrikcijskih enzima i klasifikacija restrikcijsko-modifikacijskih sustava**

Prvi prijedlog za nomenklaturu restrikcijsko-modifikacijskih sustava (RM sustav) dali su Smith i Nathans (1973). Prvo slovo u nazivu predstavlja prvo slovo roda, dok sljedeća dva slova predstavljaju prva dva slova vrste organizma u kojemu je RM sustav identificiran. Nakon toga slijedi oznaka za specifični soj domaćina. Ukoliko određeni soj ima više različitih R-M sustava u ime se dodaju rimski brojevi. Na primjer sustav iz soja K-12 *Escherichia Coli* dobiva ime EcoKI, a sustavi iz soja *Haemophilus influenzae* nazivaju se HindI, HindII, HindIII itd. S obzirom da se RM sustavi sastoje od restrikcijskih (endonukleaza) i modifikacijskih enzima (metiltransferaza), pojedinačni se enzimi označuju prefiksom R ili M uz ime sustava.

RM sustavi su najprije podijeljeni u dvije skupine na osnovu složenosti strukture i potrebnih kofaktora (Boyer, 1971). Uz nove spoznaje o funkcijama pojedinih sustava te otkrića novih sustava, kriteriji za kategorizaciju su prošireni te je, uz proširenje prve dvije skupine u podskupine, dodana treća skupina (Yuan, 1981). Naknadno je opisana i četvrta skupina koja obuhvaća restrikcijske enzime koji cijepaju samo modificirane sekvence (Roberts i sur., 2003).

RM sustavi skupine I multifunkcionalni su enzimi najčešće izgrađeni od pet podjedinica: dvije R, dvije M te jedne S podjedinice (Dryden i sur., 2001). Za navedene podjedinice kodiraju tri gena nazvana *hsd* (eng. Host specificity determinant): *hsdR*, *hsdM* i *hsdS*. Specifična sekvenca koju prepoznaju sastoji se od dva specifična slijeda nukleotida koji su odvojeni nizom od 6 do 8 nespecifičnih baza, npr. *EcoKI* prepoznaje sekvencu: 5' AAC 6N GTGC 3', gdje N predstavlja bilo koju bazu (Kan i sur., 1979). Prvi dio sekvence se sastoji od 3 do 4 baze dok se drugi dio uglavnom sastoji od 4 do 5 baza. Podjedinica S zaslužna je za prepoznavanje specifične sekvence te se sastoji od dvije domene koje prepoznaju po jednu od dvije komponente specifične sekvence DNA (Fuller-Pace i Murray, 1986). Dvije M podjedinice zaslužne su za modifikacijsku aktivnost za koju je potreban kofaktor S-adenozil-metionin koji je donor u reakciji metilacije. Podjedinice M vezanjem na podjedinicu S tvore M<sub>2</sub>S trimer koji ima metiltransferaznu aktivnost. Svi poznati enzimi iz prve skupine metiliraju po jedan adenin unutar specifične sekvence u oba lanca DNA. Za provođenje reakcije potrebno je okretanje ciljane baze iz strukture uzvojnice DNA te uvlačenje baze u unutrašnjost enzima (Su i sur., 2005). Metiltransferazna aktivnost enzima se pokreće ukoliko je specifična sekvenca DNA hemimetilirana. Podjedinice R posjeduju aktivnosti restrikcije i translokacije, a na M<sub>2</sub>S trimer se vežu preko M podjedinica te kataliziraju restrikciju DNA uz prisutnost ATP-a i Mg<sup>2+</sup>. Iako se R podjedinice vežu na specifično mjesto, dvolančani se lomovi uvode na promjenjivim mjestima udaljenim i do nekoliko tisuća baza zbog translokacije DNA (slika 2) uslijed koje se javljaju petlje u strukturi DNA (Yuan i sur., 1980). Restrikcija se događa ukoliko je specifična sekvenca nemetilirana što omogućuje razlikovanje strane DNA od DNA domaćina. RM sustavi skupine I dijele se na pet podskupina imenovanih A do E (Chin i sur., 2004), a podjela je temeljena na genetičkoj komplementaciji, primjerice mutanti s mutacijama u alelima koji kodiraju za *EcoKI* i *EcoBI* međusobno se komplementiraju dajući sojeve s funkcionalnim RM sustavima, što znači da su ta dva sustava srodna i spadaju u istu podskupinu (Murray, 2000).



**Slika 2.** Mehanizam djelovanja RM sustava skupine I. M<sub>2</sub>S trimer prepoznaje specifičnu sekvencu DNA na koju se zatim veže, a podjedinice R translociraju molekulu te cijepaju DNA (Pennadam i sur., 2004).

Druga skupina RM sustava obuhvaća veliki broj restrikcijskih i modifikacijskih enzima koji funkcioniraju kao dva samostalna enzima. Metiltransferaze iz skupine II RM sustava djeluju samostalno kao monomeri, a za aktivnost im je potreban kofaktor S-adenozil-L-metionin. Restrikcijske endonukleaze iz skupine II najčešće su homodimeri ili homotetrameri te cijepaju nemetiliranu dvolančanu DNA na točno određenom mjestu, unutar ili u neposrednoj blizini specifične sekvence koju prepoznaju. Kao kofaktor koriste dvovalentne katione, većinom Mg<sup>2+</sup> ione (Smith i Wilcox, 1970) ili u rjeđim slučajevima Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> i Co<sup>2+</sup>ione (Gasiunas i sur., 2008). Ovisno o sekvenci koju prepoznaju, potrebnim kofaktorima i drugim karakteristikama enzimskog djelovanja, restrikcijski se enzimi dijele na podskupine A, B, C, E, F, G, H, M, P, S i T (Roberts i sur., 2003). Predstavnici podskupine IIP, kao što su HindIII, EcoRI te EcoRV, uvode dvolančane lomove unutar specifičnih palindromskih sekvenci te imaju najveću primjenu u genetičkom inženjerstvu, dok neki enzimi prepoznaju asimetrične sekvence (podskupina IIA). Palindromske sekvence sadrže isti slijed nukleotida na komplementarnim lancima, čitano u smjeru iste polarnosti. Takve sekvence sadrže os simetrije tako da su dvije baze koje su jednako udaljene od osi simetrije su uvijek komplementarne (Arber i Linn, 1969).

RM sustavi skupine III čine multifunkcionalni, uglavnom oligomerni enzimi za čije podjedinice kodiraju geni *mod* i *res* (Iida i sur., 1983). Modifikacijska podjedinica (Mod) prepoznaje specifične sekvence DNA te metilira samo jedan lanac, dok druga podjedinica (Res) ima restriksijsku aktivnost (Hadi i sur., 1983). Podjedinice su najčešće povezane u Res<sub>2</sub>Mod<sub>2</sub> ili Res<sub>1</sub>Mod<sub>2</sub> komplekse, dok dimer Mod<sub>2</sub> samostalno funkcionira kao metiltransferaza (Janscak i sur., 2001, Wyszomirski i sur., 2012). Enzim se veže na dvije kopije specifične sekvence koje su inverzno orijentirane te mogu biti međusobno udaljene i do nekoliko kb (Meisel i sur., 1992). Za provođenje restrikcije potrebna je prisutnost ATP-a te se DNA cijepa na udaljenosti 24-28 parova baza nizvodno od jedne od sekvenci. Najbolje opisani predstavnici ove skupine su EcoP1 i EcoP15 za koje kodiraju bakteriofag P1 te plazmid p15B.

Skupinu IV čine enzimi koji cijepaju samo modificiranu DNA. Takvi restriksijski enzimi prepoznaju uglavnom neuobičajeno modificirane baze na stranoj DNA koje se razlikuju od modifikacija prisutnih na DNA molekulama domaćina. Cijepanje DNA se provodi na nespecifičnim mjestima udaljenim od prepoznatih baza tako da su produkti cijepanja DNA fragmenti varijabilne duljine. Najdetaljnije je opisan enzim McrBC koji prepoznaje metilirane citozine te za restrikciju DNA ovisi o GTP-a, dok ATP inhibira navedenu reakciju (Sutherland i Raleigh, 1992). Također su poznati enzimi koji prepoznaju hidroksimetilirane te glukozil-hidroksimetilirane baze (Bair i Black, 2007).

### **2.1.3. Primjena restriksijskih enzima**

Zbog izrazite specifičnosti i jednostavnog mehanizma rada, široku primjenu u metodama genetičkog inženjerstvu pronašli su restriksijski enzimi skupine IIP koji prepoznaju i uvode dvolančane lomove na točno određenom mjestu unutar palindromske sekvence DNA ili u njenoj neposrednoj blizini. Karakteristika tih enzima da cijepaju DNA na fiksnim pozicijama, pri čemu nastaju fragmenti specifičnih duljina, omogućila je analizu različitih molekula DNA pomoću poliakrilamidne i agarozne gel-elektroforeze. Prvi enzim korišten u tu svrhu bio je HindII, kojim su Danna i Nathans (1971) analizirali DNA Simian Virus 40. Enzimi skupine IIP cijepaju palindromske sekvence, duljine 4 do 8 pb, u osi simetrije ili uz pomak. Ukoliko se dvolančani lom uvodi van osi simetrije nastaju „ljepljivi“, odnosno 3'- ili 5'- istureni jednolančani krajevi (slika 1) što omogućuje jednostavno spajanje različitih fragmenata DNA s komplementarnim krajevima pomoću DNA ligaze. Cohen i suradnici su 1973. godine uspješno konstruirali biološki funkcionalan plazmid povezavši fragmente različitih plazmida pocijepanih restriksijskim enzimima te njime

transformirali stanice *E. coli*. Navedena istraživanja pokrenula su razvoj genetičkog inženjerstva, omogućivši transfer gena od interesa iz različitih vrsta u radne mikroorganizme te pojednostavljenu proizvodnju molekula od interesa. Kao primjer se može uzeti ekspresija gena u *E. coli* koji kodiraju za humane proteine kao što su inzulin i hormon rasta (Goeddel i sur., 1979, Martial i sur., 1979).

Osim restrikcijskih enzima skupine II, koji su najzastupljeniji u genetičkom inženjerstvu, primjenu su pronašli restrikcijski enzimi drugih skupina. Primjerice enzimi skupine IV, zbog karakterističnog cijepanja DNA koja ima različite modifikacije citozina, imaju potencijalnu primjenu u istraživanjima epigenetike. Enzim McrBC je korišten u istraživanju modifikacija genoma iz tumorskog tkiva ljudi (Ordway i sur., 2006). Enzimi iz skupine I se prilikom restrikcije specifično vežu na DNA te translociraju molekulu DNA kroz vezani enzimski kompleks. Ta motorička aktivnost enzimskog kompleksa potakla je istraživanja pojedinačnih enzimskih molekula. Demonstrirano je da „motor“ može pomicati magnetno zrno mikrometarske veličine koje je vezano na molekulu DNA preko udaljenosti od nekoliko mikrometara. Navedeni molekularni motor (R podjedinica enzima) bi se mogao integrirati u mikročipove kako bi pomicao magnetno zrno prema senzoru, koji bi zatim proizvodio električni signal. Time bi se kreirao izrazito osjetljiv biosenzor koji bi mogao pratiti pojedinačne molekule DNA (Youell i Firman, 2008).

## **2.2. Bakterija *Escherichia coli* u genetičkom inženjerstvu**

Bakterija *Escherichia coli* je najvažniji modelni organizam u istraživanjima molekularne genetike i molekularne biologije bakterija, te je nezamjenjiva u genetičkom inženjerstvu jer se koristi kao domaćin za konstrukciju i umnažanje rekombinantnih plazmida. To je gram-negativna, fakultativno anaerobna, štapičasta bakterija duljine oko 1  $\mu\text{m}$  i širine oko 0,4  $\mu\text{m}$ , no ti brojevi mogu značajno varirati ovisno o soju. *Escherichia coli* je bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*, dio je normalne crijevne mikrobiote sisavaca. Nastanjuje donji dio gastrointestinalnog trakta, odnosno debelo crijevo gdje može proizvoditi vitamin K2 (Bentley i Meganathan, 1982). Prvi ju je otkrio i opisao njemački pedijatar i bakteriolog Theodor Escherich 1885. godine. U samim počecima genetičkih istraživanja *E. coli* je bila najčešće korišten modelni organizam zahvaljujući brzom rastu na kemijski definiranim hranjivim podlogama i kratkom generacijskom vremenu od 20 minuta. Sojevi bakterijske vrste *E. coli* imaju raznolika svojstva, a pojedini sojevi mogu biti patogeni te uzrokovati bolesti kao što su dijareja, dizenterija, meningitis te infekcije mokraćnog sustava (Kaper i sur., 2004). Najznačajniju primjenu u laboratorijskim istraživanjima imaju soj B

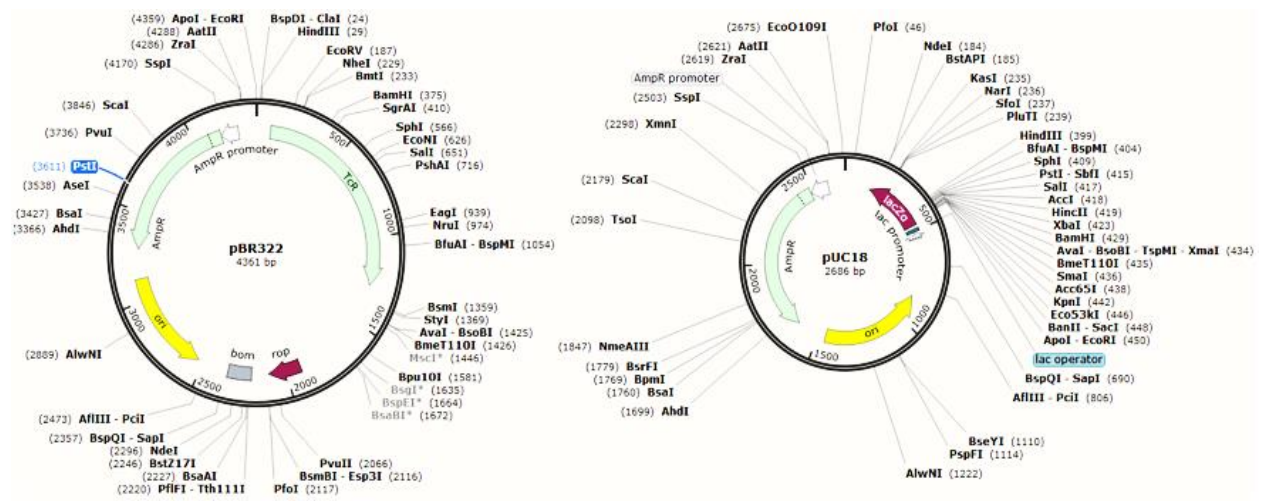
i soj K-12, čiji je genom sekvencioniran 1997. godine što je omogućilo velik napredak u molekularno biološkim i molekularno genetičkim istraživanjima, ali i značajan napredak genetičkog inženjerstva. Genom soja K-12 *E. coli* sastoji se od kružne dvolančane molekule DNA duljine 4,639,221 parova baza. Identificirano je 4288 gena koji kodiraju za proteine te oni čine 87,8% genoma, 0,8% genoma kodira za RNA molekule, 0,7% čine nekodirajuća ponavljanja dok otprilike 11% genoma čine regulatorne i druge sekvencije (Blattner i sur., 1997). Većina sojeva koji se danas koriste u laboratorijima su mutanti sojeva B i K-12, a neki od poznatijih mutanata su HB101, DH5α, XL1-Blue i JM103. Mutacije se najčešće uvode u svrhu povećanja efikasnosti transformacije, stabilnosti plazmida i proizvedenih proteina, smanjenja rekombinacije plazmida, dobivanja auksotrofnih mutanata te omogućavanja odabira upravo onih kolonija koje sadrže željeni rekombinantni plazmid.

*Escherichia coli* je univerzalni domaćin za kloniranje DNA, korištena je u eksperimentima koji su doveli do otkrića restrikcijskih enzima te razvoja metoda za uvođenje ciljanih genetičkih modifikacija u žive organizme (opisano u poglavlju 2.1.). Danas se, između ostalog, koristi kao glavni domaćin za ekspresiju eukariotskih gena u svrhu dobivanja korisnih rekombinantnih proteina. Prije razvoja metoda genetičkog inženjerstva i primjene bakterije *E. coli* kao proizvodnog organizma, željene protein bilo je potrebno izolirati iz velikih količina životinjskog i biljnog tkiva, no primjena *E. coli* je omogućila proizvodnju uz velike prinose iz znatno manjih količina biomase (Rosano i Ceccarelli, 2014).

### **2.3. Plazmidni vektori u genetičkom inženjerstvu**

Pojam plazmid, kao naziv za ekstrakromosomalni nasljedni materijal, prvi je predložio Joshua Lederberg je 1952. godine. Plazmidi su najčešće kružne molekule dvolančane DNA, a rjeđe su jednolančane ili linearne molekule DNA. U stanicama mogu postojati u više kopija, a uglavnom ih se može naći u prokariotima, najčešće bakterijama, iako mogu postojati i u nižim eukariotima. Plazmidi posjeduju sposobnost kontrolirane replikacije neovisne o bakterijskom kromosomu zahvaljujući sekvenci *ori*, odnosno ishodištu replikacije. Također mogu sadržavati gene zaslužne za prijenos plazmida u druge jedinice, antibiotsku rezistenciju, rezistenciju na teške metale, produkciju toksina i slično (del Solar i sur., 1998).

U genetičkom se inženjerstvu koriste kao vektori za prijenos gena iz jednog organizma u drugi. Naime plazmidi imaju takozvano višestruko mjesto za kloniranje (eng. MCS – multiple cloning site), odnosno kratku sekvencu nukleotida koja sadrži veći broj restrikcijskih mjesta. MSC omogućava korištenje restrikcijskih enzima kako bi se u plazmid ugradio željeni gen, odnosno insert. Plazmid se zatim koristi za transformaciju domaćina u kojemu se replicira, a željeni gen se eksprimira. Osim toga, plazmidi imaju i gene, odnosno sekvencije koje omogućavaju selekciju stanica koje sadrže plazmid kao i stanica koje sadrže plazmid sa željenim insertom, odnosno plazmid željene strukture. Među prvim suvremenijim plazmidima koji su se koristili u genetičkom inženjerstvu je plazmid pBR322, a danas se koriste plazmidi poput pUC18 i pUC19. Plazmid pBR322 je jedan od prvih konstruiranih plazmidnih vektora, to je kružna molekula dvolančane DNA duljine 4361 para baza, a sadrži gene za rezistenciju na antibiotike tetraciklin i ampicilin, te veliki broj jedinstvenih restrikcijskih mjesta, odnosno mjesta za restrikcijske enzime koji ovaj plazmid cijepaju na samo jednom mjestu. Neka od tih jedinstvenih restrikcijskih mjesta se nalaze unutar regija koje kodiraju za rezistenciju na antibiotike, ugradnjom fragmenata DNA dolazi do inaktivacije gena za rezistenciju što omogućuje jednostavnu selekciju plazmida koji sadrže insert (Bolivar i sur., 1977). Plazmidi pUC18 i pUC19 sadrže gen za rezistenciju na ampicilin, što omogućuje selekciju stanica domaćina koje sadrže plazmid, te MSC unutar gena *lacZα*, što omogućuje razlikovanje stanica koje sadrže plazmid sa insertom od onih koje sadrže plazmid bez inserta (Yanisch-Perron i sur., 1985). Ova dva plazmida se međusobno razlikuju po orijentaciji polilinkera (MSC). Restrikcijske mape plazmida pBR322 i pUC18 prikazane su na slici 3.



**Slika 3.** Restrikcijske mape plazmida pBR322 i pUC18. Na mapama su prikazana jedinstvena restrikcijska mjesta, a ostala objašnjenja se nalaze u tekstu.



## 3. Materijali i metode

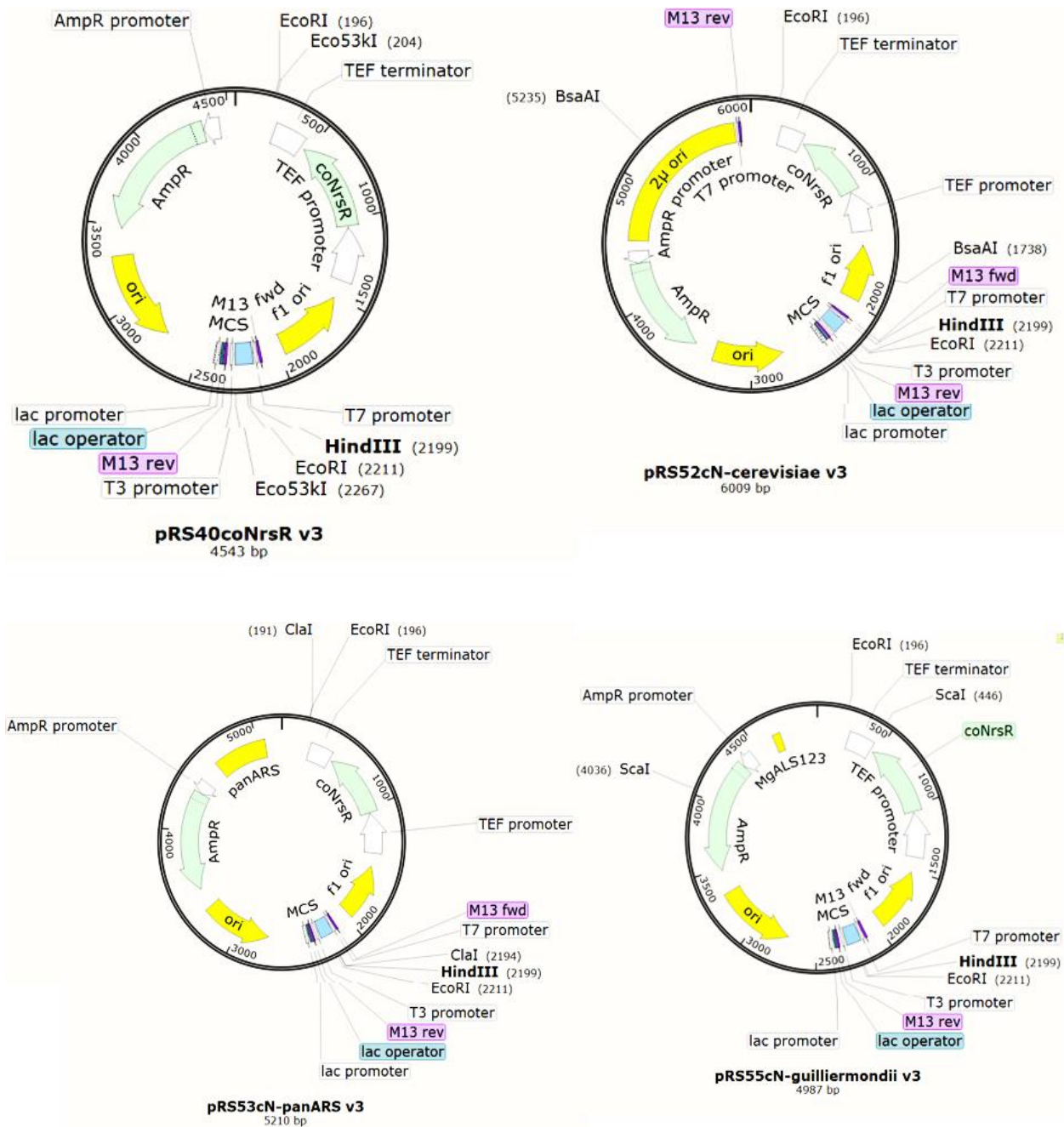
### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Mikroorganizam

U ovom je radu korištena bakterija *Escherichia coli*, soj C3040 (NEB® Stable Competent *E. Coli*) genotipa: F' *proA B lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15 zcf::Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str<sup>R</sup>) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)*. Korištene su 4 različite trajne kulture ovoga soja koje sadrže plazmide pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN.

#### 3.1.2. Plazmidi

Plazmidi korišteni u ovom radu su pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN, a prethodno su konstruirani u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama. Navedeni plazmidi mogu se propagirati u bakteriji *E. coli*. Svi plazmidi sadrže gen *coNrs* za rezistenciju na antibiotik nurseotricin koji je pod regulacijom *TEF* promotora iz kvasca *Eremothecium gossypii*, gen za rezistenciju na ampicilin *AmpR*, *ori* ishodište replikacije u *E. coli*, višestruko mjesto za kloniranje MSC te ishodište replikacije iz bakteriofaga f1 (*f1 ori*). Svi plazmidi, osim plazmida pRS40cN, sadrže različita ishodišta replikacije u kvascima. Plazmid pRS52cN sadrži *2μ* sekvencu koja je dobivena iz plazmida pGP564 (Jones *i sur.*, 2008). Plazmid pRS53cN sadrži sekvencu *panARS* iz genoma kvasca *K. lactis* (Liachko i Dunham, 2013). Plazmid pRS55cN sadrži sekvencu *MgARS* iz genoma kvasca *M. guilliermondii* (Foureau *i sur.*, 2013). Na slici 4 su prikazane mape plazmida na kojima su označeni svi navedeni geni, promotori, ishodišta replikacije kao i restrikcijska mjesta za enzime korištene u ovom radu.



**Slika 4.** Restriksijske mape plazmida pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN. Prikazana su restriksijska mjesta enzima korištenih za restriksijsku analizu.

### 3.1.3. Hranjive podloge

LB (kruta kompletna podloga):

bakto-tripton	10,0 g/L
kvašček ekstrakt	5,0 g/L
NaCl	10,0 g/L
Ampicilin	2,5 mL/L
agar	15,0 g/L
destilirana voda	

LB (tekuća kompletna podloga):

bakto-tripton	10,0 g/L
kvašček ekstrakt	5,0 g/L
NaCl	10,0 g/L
Ampicilin	5,0 mL/L
destilirana voda	

Hranjive podloge se pripremaju na način da se kruti sastojci otope u destiliranoj vodi te se steriliziraju u autoklavu 20 minuta pri 120 °C. Nakon sterilizacije se u ohlađene podloge dodaje ampicilin iz osnovne otopine.

### 3.1.4. Otopine

Ampicilin (20 mg/mL)

Amonijev acetat (8 M)

Glukoza (40 g/L)

EDTA (0,5 M; pH 8,0):

186,1 g EDTA·2H<sub>2</sub>O se otopi u 80 mL destilirane vode, pH se podesi pomoću NaOH (oko 2 g peleta) te se tikvica dopuni destiliranom vodom do oznake od 100 mL

Tris-HCl (1 M):

12,1 g Tris-a se otopi u 80 mL destilirane vode, pH se podesi se pomoću koncentrirane otopine HCl te se tikvica dopuni destiliranom vodom do oznake od 100 mL.

GTE-pufer:

glukoza	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM

TE pufer (pH 8,0):

Tris HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

NaOH/SDS:

NaOH	0,2 mol/L
SDS	10,0 g/L

Kalijev acetat (3 M):

Otopina se priprema na način da se u 60 mL 5 M otopine kalijeva acetata doda 11,5 mL hladne octene kiseline i 28,5 mL destilirane vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na temperaturi od 4 °C.

RNA-za:

Ribonukleaza A se otopi u 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) i 15 mM NaCl do koncentracije 10 mg/mL te se zagrijava 15 minuta u kipućoj vodenoj kupelji. Nakon hlađenja do sobne temperature čuva se na -20 °C.

TBE-pufer (10x):

Tris	108 g
borna kiselina	55 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	40 mL
destilirana voda	do 1000 mL

TBE-pufer za gel-elektroforezu se priprema u 10x koncentriranom obliku te se naknadno razrjeđuje na željenu koncentraciju dodatkom destilirane vode.

Agarozni gel (0,7%):

Agarozna	0,7 g
TBE-pufer (1x)	100 mL

Etidijev bromid:

Osnovna otopina priprema se u koncentraciji od 10 mg/mL, ne sterilizira se i čuva na 4 °C u tamnoj boci. Otopina za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom 50 µL osnovne otopine u 1 L destilirane vode i također čuva u tamnoj boci

Fenol:

Redestilirani fenol se otapa pri 67 °C i zasićen je jednakim volumenom TE pufera (pH 8,0). Ne sterilizira se i čuva se u tamnoj boci pri 4 °C

Kloroform/izoamilni alkohol:

Korištena je smjesa kloroforma i izoamilnog alkohola u volumnom omjeru 24:1. Otopina se ne sterilizira i čuva se pri 4 °C

### **3.1.5. Kemikalije i enzimi**

Agar:	<i>Biolife, Milano</i>
Agaroz:	<i>Appligene, Strassbourg</i>
Amonijev acetat:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Apsolutni etanol:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Borna kiselina:	<i>Fisher Scientific, Pittsburgh</i>
EDTA:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Etidijev bromid:	<i>Roche Applied Science, Indianapolis</i>
Fenol:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Glukoza:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Gel loading dye, purple 6X:	<i>New England Biolabs, Ipswich</i>
Izopropanol:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Izoamilni alkohol:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Kalijev acetat:	<i>Acros Organics, New Jersey</i>
Kloroform:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Kvašćev ekstrakt:	<i>Biolife, Milano</i>
Ribonukleaza A:	<i>Sigma Chemical Co., St. Louis</i>
Restrikcijski enzimi i odgovarajući puferi:	<i>New England Biolabs, Ipswich</i>
SDS:	<i>Merck, Hohenbrunn</i>
Tris: Tris Ultra Pure:	<i>Sigma Chemical Co., St. Louis</i>
Standard za elektroforezu	<i>New England Biolabs, Ipswich</i>

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Uzgoj bakterije *Escherichia coli***

Trajne se kulture *E. coli* čuvaju u zamrzivaču pri -70 °C. Na krute se podloge u Petrijevim zdjelicama prenese mali dio trajne kulture pomoću mikrobiološke ušice. Bakterijska kultura se nacjepljuje tehnikom do iscrpljenja kako bi se dobile pojedinačne kolonije. Kulture se na krutim podlogama inkubiraju 16 sati pri 37 °C, odnosno do pojave pojedinačnih kolonija. Nakon inkubacije, pojedinačne se kolonije s krutih podloga precijepu u 4 mL tekuće podloge mikrobiološkom ušicom. Epruvete s 4 mL tekuće podloge se inkubiraju 16 sati u tresilici pri 37 °C i 175 o/min. Kulture se nakon inkubacije precijepu u Erlenmayerove tikvice s 0,5 L tekuće LB podloge koje se inkubiraju na tresilici pri 37 °C i 200 o/min. Nakon 18 sati inkubacije slijedi postupak izolacije plazmidne DNA.

### **3.2.2. Izolacija plazmidne DNA iz velikog volumena kulture**

Plazmidna se DNA izolira iz 0,5 L tekuće kulture. Tekuća kultura se prelije u kivete koje se zatim tariraju. Kivete se centrifugiraju 5 minuta pri 5000 o/min i 4 °C. Supernatant se nakon centrifugiranja pažljivo odlije te se talog u polovini kiveta resuspendira dodatkom po 2,4 mL hladnog GTE pufera. Suspenzija stanica se prenese u preostale kivete, resuspendira se ostatak taloga stanica te se kivete inkubiraju 5 minuta u ledu. Daljnji postupak se provodi u polovini početnog broja kiveta. U svaku se kivetu doda 4,8 mL otopine NaOH/SDS uz miješanje okretanjem nakon čega slijedi inkubacija u ledu 5 minuta. Zatim se u svaku kivetu, uz miješanje okretanjem, doda 7,2 mL hladne otopine kalijevog acetata. Kivete se 20 minuta inkubiraju u ledu i zatim 20 minuta centrifugiraju pri 4 °C i 10 000 o/min. Supernatant se pipetom pažljivo prenese u staklene Corex kivete te se u svaku od njih doda 8,5 mL izopropanola. Vrh kivete se oblijepi parafilmom kako bi se sadržaj promiješao okretanjem. Kivete se zatim tariraju zajedno s gumenim adapterima za centrifugu te se 20 minuta centrifugiraju pri 10 000 o/min. Supernatant se nakon centrifugiranja pažljivo odlije, unutrašnjost kivete se posuši vakuum sisaljkom te se talog suši uz plamenik dok ne postane bezbojan. Osušeni talog se u jednoj od kiveta resuspendira u 300 µL TE pufera uz dodatak 8 µL RNA-ze. Sadržaj te kivete se zatim pipetom prenese u sljedeću, talog se resuspendira pomoću pipete te se postupak ponovi kako bi se talog DNA iz sve 4 kivete resuspendirao u volumenu od 300 µL. Nakon što se talog u potpunosti otopi, suspenzija se prenese u Eppendorf epruvetu.

### **3.2.3. Pročišćavanje DNA fenolizacijom**

Nakon postupka izolacije DNA iz velikog volumena kulture slijedi pročišćavanje suspenzije DNA metodom fenolizacije. U 300  $\mu\text{L}$  suspenzije doda se 150  $\mu\text{L}$  smjese kloroforma i izoamilnog alkohola i 150  $\mu\text{L}$  fenola. Smjesa se centrifugira 5 minuta na 10 000 o/min nakon čega se izdvoji gornja faza te se volumen namjesti na 300  $\mu\text{L}$  dodatkom TE pufera. Postupak se ponovi nekoliko puta, sve dok je vidljiv talog proteina između dvije faze. Kada talog proteina više nije vidljiv, u suspenziju se doda 300  $\mu\text{L}$  smjese kloroforma i izoamilnog alkohola, ponovi se centrifugiranje te se izdvoji gornja faza.

### **3.2.4. Taloženje DNA pomoću amonijevog acetata**

Nakon postupka fenolizacije potrebno je istaložiti DNA. U epruvetu se doda 100  $\mu\text{L}$  8 M otopine amonijevog acetata i 800  $\mu\text{L}$  etanola te se promiješa okretanjem. DNA se preko noći taloži na temperaturi od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kada se DNA istaloži, slijedi centrifugiranje 20 minuta pri 10 000 o/min, supernatant se pažljivo odlije, unutrašnjost epruvete se posuši vakuum sisaljkom, talog se suši uz plamenik do obezbojenja. Talog se resuspendira u 50  $\mu\text{L}$  TE pufera zagrijavanjem 20 minuta u vodenoj kupelji pri  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.5. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima**

Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima provedeno je prema uputama proizvođača, korištenjem originalnog pufera za pojedini enzim. Restrikcijska se otopina pripremi u volumenu od 10  $\mu\text{L}$ ; dodatkom 1  $\mu\text{L}$  pufera, 0,3  $\mu\text{L}$  restrikcijskog enzima, 0,2  $\mu\text{L}$  suspenzije DNA i 8,5  $\mu\text{L}$  vode. Svi korišteni enzimi imaju koncentraciju 20 U/ $\mu\text{L}$ . S obzirom da je raspon masa DNA u restrikcijskim otopinama od 0,1  $\mu\text{g}$  do 0,6  $\mu\text{g}$ , korišteno je 0,3  $\mu\text{L}$  enzima, odnosno oko 6 jedinica enzima. Reakcija restrikcije se provodi 60 minuta pri temperaturi od  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.6. Gel-elektroforeza**

Gel-elektroforeza korištena je za provjeru uspješnosti izolacije, kao i restrikcije DNA. Za elektroforezu je korišten 0,7 postotni agarozni gel koji se priprema otapanjem 0,7 g agaroze u 100 mL TBE pufera (1x) u laboratorijskoj boci. Boca se zatvori čepom i zagrijava 2 do 3 minute u mikrovalnoj pećnici s povremenim miješanjem sve dok se ne otopi sva agarozna. Gel se ohladi do temperature oko  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  te se izlije na nosač gela koji je prethodno oblijepljen samoljepljivom trakom i na koji je postavljen češalj za formiranje jažica. Nakon što se gel skrutne, skinu se samoljepljiva traka, nosač se prenese u kadicu za elektroforezu i pažljivo se izvadi češalj. U kadicu se zatim ulije TBE (1x) pufer tako da pufer u potpunosti prekrije površinu gela. Uzorci DNA se s

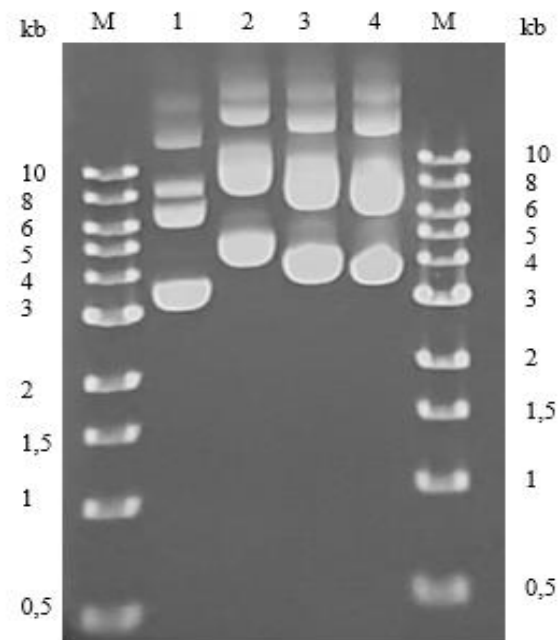
bojom za nanošenje uzoraka miješaju u omjeru od 1:6 te se unose u jažice pomoću mikropipete. Elektroforeza se provodi pri naponu od 40 V, a trajanje ovisi o koncentraciji agaroze u gelu te veličini fragmenata DNA. Gel se nakon elektroforeze inkubira 20 do 30 minuta u otopini etidijevog bromida te se osvijetli UV svjetlošću na transiluminatoru i fotografira kroz crveni filter.

## 4. Rezultati i rasprava

Cilj ovog rada bio je izolirati plazmide pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN iz bakterije *E. coli* i provesti njihovu restrikcijsku analizu.

### 4.1. Izolacija plazmida pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN iz velikog volumena

Izolacija svakog plazmida provedena je po protokolu za izolaciju plazmidne DNA iz velikog volumena opisanom u poglavlju 3.2.2. Nakon izolacije provedeno je pročišćavanje uzorka izolirane DNA prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3. Provjera uspješnosti izolacije i pročišćavanja plazmidne DNA provedena je gel-elektroforezom u 0,7 postotnom agaroznom gelu (poglavljje 3.2.6.), a rezultati gel-elektroforeze prikazani su na slici 5.



**Slika 5.** Provjera uspješnosti izolacije plazmidne DNA iz velikog volumena kultura bakterije *E. coli*. M – standard (fragmenti DNA u rasponu dužine od 0,5 do 10 kb), 1 - plazmid pRS40cN, 2 - plazmid pRS52cN, 3 - plazmid pRS53cN, 4 – plazmid pRS55cN.



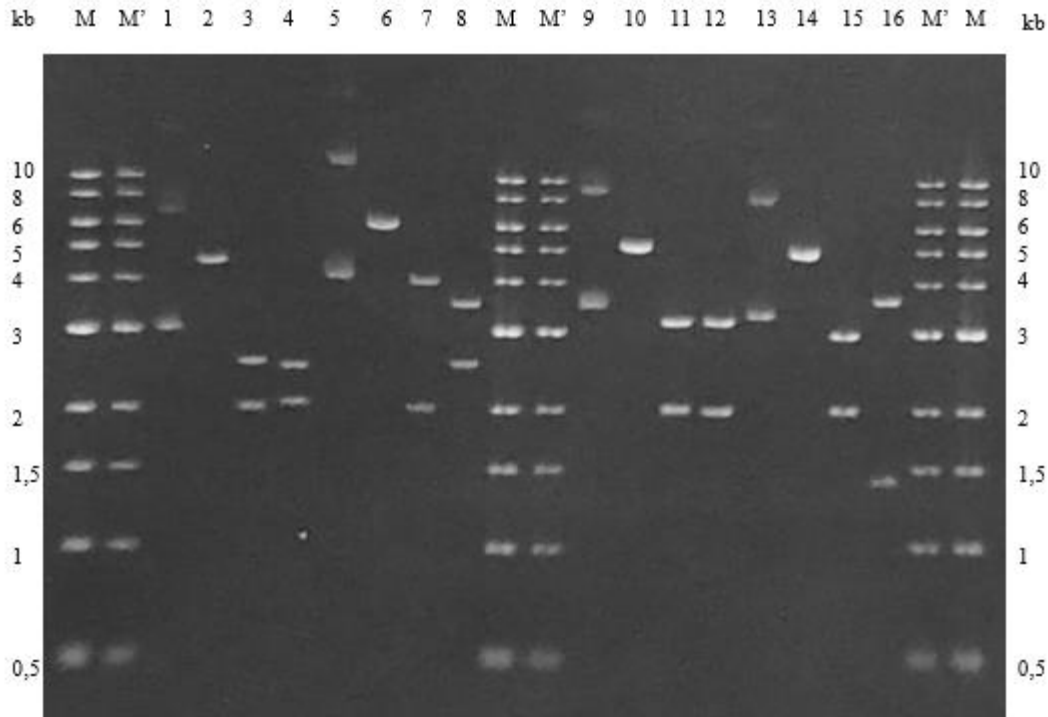
U jažicama 1, 2, 3 i 4 vidljive su po 3 vrpce (Slika 5). Vrpce koje migriraju najbrže, odgovaraju superuzvijenoj konformaciji plazmidne DNA. Vrpce koje se nalaze u sredini odgovaraju konformaciji otvorenog kruga koja migrira sporije od superuzvijenog oblika plazmidne DNA iste veličine. Vrpce koje se nalaze pri vrhu gela najvjerojatnije sadrže genomsku DNA. Na gelu nisu vidljive vrpce koje bi odgovarale lineariziranom obliku plazmida niti je vidljiva RNA što ukazuje na to da je DNA iz uzoraka uspješno pročišćena. Također je vidljivo da izolirana DNA u jažici 1 migrira brže od ostalih, što odgovara plazmidu pRS40cN koji je najmanji. Izolirana DNA iz uzorka u jažici 2 migrira najsporije jer je plazmid pRS52cN najveći.

## 4.2. Restriksijska analiza plazmida pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN

U svrhu provedbe restriksijske analize, plazmidi su pocijepani s nekoliko restriksijskih enzima, kao što je to prikazano u tablici 2. Svi su plazmidi pocijepani enzimom HindIII, koji ih cijepa na samo jednom mjestu kako bi se procijenila ukupna duljina svih plazmida. Također su za svaki plazmid korištena po dva enzima koja cijepaju na dva restriksijska mjesta. Svaki je plazmid tretiran enzimom EcoRI. Za restriksijsku analizu plazmida pRS40cN korišten je i enzim Eco53kI, za plazmid pRS52cN korišten je enzim BsaAI, za plazmid pRS53cN enzim ClaI, a za plazmid pRS55cN enzim ScaI. Mape plazmida sa restriksijskim mjestima korištenih enzima prikazane su na slici 4 u poglavlju 3, u tablici 2 prikazane su očekivane veličine fragmenata plazmidne DNA nakon restrikcije, a rezultati restriksijske analize na slici 6.

**Tablica 2.** Očekivane duljine fragmenata DNA nastalih cijepanjem plazmida restriksijskim enzimima

	<b>pRS40cN</b>	<b>pRS52cN</b>	<b>pRS53cN</b>	<b>pRS55cN</b>
<b>HindIII</b>	4543 pb	6009 pb	5210 pb	4987 pb
<b>EcoRI</b>	2015 pb, 2528 pb	2015 pb, 3994 pb	2015 pb, 3195 pb	2015 pb, 2972 pb
<b>Eco53kI</b>	2063 pb, 2480 pb			
<b>BsaAI</b>		2512 pb, 3497 pb		
<b>ClaI</b>			2003 pb, 3207 pb	
<b>ScaI</b>				1397 pb, 3590 pb



**Slika 6.** Rezultat restrikcijske analize plazmida pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN. **M** – 4  $\mu$ L standarda za elektroforezu, **M'** – 2  $\mu$ L standarda, **1** – nepocijepani plazmid pRS40cN **2** – pRS40cN / enzim HindIII, **3** – pRS40cN / enzim EcoRI, **4** – pRS40cN / enzim Eco53kI, **5** – nepocijepani plazmid pRS52cN, **6** – pRS52cN / enzim HindIII, **7** – pRS52cN / enzim EcoRI **8** – pRS52cN / enzim BsaAI, **9** – nepocijepani plazmid pRS53cN, **10** – pRS53cN / enzim HindIII, **11** – pRS53cN / enzim EcoRI, **12** – pRS53cN / enzim ClaI, **13** – nepocijepani plazmid pRS55cN, **14** – pRS55cN / enzim HindIII, **15** – pRS55cN / enzim EcoRI, **16** – pRS55cN / enzim ScaI. S lijeve i desne strane gela prikazane su veličine fragmenata DNA iz standarda za elektroforezu.

Na prikazu rezultata restrikcijske analize (slika 6) vidljivo je da svi fragmenti DNA odgovaraju očekivanim fragmentima iz tablice 2, te da je stvarna struktura plazmida upravo onakva kakva je i prikazana na mapama plazmida sa slike 4 (Materijali i metode).

Plazmidi korišteni u ovom radu konstruirani su u sklopu projekta Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina (IP-2018-01-9717), a koristit će se za transformaciju nekonvencionalnih, odnosno ne-Saccharomocles vrsta kvasaca kao vektori za ekspresiju željenih gena u odabranim vrstama. Naime, pojedini nekonvencionalni kvasci pogodniji su za uzgoj na lignoceluloznim hidrolizatima jer uspješnije koriste alternativne izvore ugljika i mogu biti otporniji na neke inhibitore rasta. Međutim, ovi kvasci često su nedovoljno istraženi pa

za mnoge od njih ishodišta replikacije nisu poznata, a pojedine vrste koriste nekonvencionalni genetički kod zbog čega ne postoje plazmidi koji se u njima mogu samostalno replicirati i koristiti kao ekspresijski vektori. Rezultati ovog rada potvrđuju da su u plazmid pRS40cN uspješno inserirana različita ishodišta replikacije, odnosno da su uspješno konstruirani plazmidi pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN te će se u nastavku istraživanja ustanoviti koje je od ovih ishodišta replikacije aktivno u odabranim vrstama nekonvencionalnih kvasaca.

## 5. Zaključak

Plazmidi pRS40cN, pRS52cN, pRS53cN i pRS55cN uspješno su izolirani iz 500 mL suspenzije bakterije *Escherichia coli*, te je restrikcijskom analizom potvrđeno da njihova stvarna struktura odgovara njihovim mapama.

## 6. Literatura

- Arber, W., Linn, S. (1969) DNA Modification and Restriction. *Annual Review of Biochemistry* **38**, 467-500
- Bair, C. L., & Black, L. W. (2007) A type IV modification dependent restriction nuclease that targets glucosylated hydroxymethyl cytosine modified DNAs. *Journal of molecular biology*, **366**, 768–778.
- Bertani, G., & Weigle, J. J. (1953). Host controlled variation in bacterial viruses. *Journal of Bacteriology*, **65**, 113–121.
- Bentley, R., & Meganathan, R. (1982). Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological reviews*, **46**, 241–280.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science*, **277**, 1453–1462
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., & Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**, 95–113
- Boyer, H. W. (1971) DNA Restriction and Modification Mechanisms in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **25**, 153-176
- Chin, V., Valinluck, V., Magaki, S., & Ryu, J. (2004). KpnBI is the prototype of a new family (IE) of bacterial type I restriction-modification system. *Nucleic acids research*, **32**, e138.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**, 3240–3244.
- Danna, K., & Nathans, D. (1971). Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **68**, 2913–2917.

- Dryden, D. T., Murray, N. E., Rao, D. N. (2001) Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* **29**, 3728-3741
- Dussoix, D., & Arber, W. (1962). Host specificity of DNA produced by Escherichia coli: II. Control over acceptance of DNA from infecting phage  $\lambda$ . *Journal of Molecular Biology*, **5**(1), 37–49.
- Foureau, E., Courdavault, V., Navarro Gallón, S., Besseau, S., Simkin, A., Crèche, J., Atehortúa, L., Giglioli-Guivarc'h, N., Clastre, M., and Papon, N. (2013). Characterization of an autonomously replicating sequence in Candida guilliermondii. *Microbiological Research*, **168**(9), 580-588.
- Fuller-Pace, F. V., & Murray, N. E. (1986). Two DNA recognition domains of the specificity polypeptides of a family of type I restriction enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**(24), 9368–9372.
- Gasiunas, G., Sasnauskas, G., Tamulaitis, G., Urbanke, C., Razaniene, D., & Siksnys, V. (2008). Tetrameric restriction enzymes: expansion to the GIY-YIG nuclease family. *Nucleic acids research*, **36**(3), 938–949.
- Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., & Riggs, A. D. (1979). Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**(1), 106–110.
- Gold, M., Hurwitz, J., & Anders, M. (1963). The enzymatic methylation of RNA and DNA, II. On the species specificity of the methylation enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **50**(1), 164–169.
- Hadi, S. M., Bächli, B., Iida, S., & Bickle, T. A. (1983). DNA restriction--modification enzymes of phage P1 and plasmid p15B. Subunit functions and structural homologies. *Journal of molecular biology*, **165**(1), 19–34.
- Iida, S., Meyer, J., Bächli, B., Stålhammar-Carlemalm, M., Schrickel, S., Bickle, T. A., & Arber, W. (1983). DNA restriction--modification genes of phage P1 and plasmid p15B. Structure and in vitro transcription. *Journal of molecular biology*, **165**(1), 1–18.

- Janscak, P., Sandmeier, U., Szczelkun, M. D., & Bickle, T. A. (2001). Subunit assembly and mode of DNA cleavage of the type III restriction endonucleases EcoP1I and EcoP15I. *Journal of molecular biology*, **306**(3), 417–431.
- Jones, G., Stalker, J., Humphray, S., West, A., Cox, T., Rogers, J., Dunham, I. and Prelich, G. (2008). A systematic library for comprehensive overexpression screens in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Methods*, **5**(3), 239-241.
- Kan, N. C., Lautenberger, J. A., Edgell, M. H., & Hutchison, C. A., 3rd (1979). The nucleotide sequence recognized by the *Escherichia coli* K12 restriction and modification enzymes. *Journal of molecular biology*, **130**(2), 191–209.
- Kaper, J., Nataro, J. & Mobley, H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 123–140
- Lederberg, J. (1952). Cell Genetics and Hereditary Symbiosis. *Physiological Reviews*, **32**(4), 403–430
- Liachko, I., and Dunham, M. J. (2014). An Autonomously Replicating Sequence for use in a wide range of budding yeasts. *FEMS Yeast Research*, **14**(2), 364–367.
- Luria, S. E., & Human, M. L. (1952). A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses. *Journal of bacteriology*, **64**(4), 557–569.
- Martial, J. A., Hallewell, R. A., Baxter, J. D., & Goodman, H. M. (1979). Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, **205**(4406), 602–607
- Meisel, A., Bickle, T. A., Krüger, D. H. & Schroeder, C. (1992). Type III restriction enzymes need two inversely oriented recognition sites for DNA cleavage. *Nature*, **355**(6359), 467-469.
- Meselson, M., & Yuan, R. (1968). DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature*, **217**(5134), 1110–1114.
- Murray N. E. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiology and molecular biology reviews* **64**(2), 412–434.

- Ordway, J. M., Bedell, J. A., Citek, R. W., Nunberg, A., Garrido, A., Kendall, R., Stevens, J. R., Cao, D., Doerge, R. W., Korshunova, Y., Holemon, H., McPherson, J. D., Lakey, N., Leon, J., Martienssen, R. A., & Jeddelloh, J. A. (2006). Comprehensive DNA methylation profiling in a human cancer genome identifies novel epigenetic targets. *Carcinogenesis*, **27**(12), 2409–2423.
- Pennadam, S. S., Firman, K., Alexander, C., & Górecki, D. C. (2004). Protein-polymer nanomachines. Towards synthetic control of biological processes. *Journal of nanobiotechnology*, **2**(1), 8.
- Roberts, R. J. et al. (2003) 'A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes', *Nucleic Acids Research*, **31**(7), 1805–1812.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, **5**, 172.
- Smith, H. O., & Wilcox, K. W. (1970). A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties. *Journal of molecular biology*, **51**(2), 379–391
- Smith, H. O., & Nathans, D. (1973). Letter: A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. *Journal of molecular biology*, **81**(3), 419–423.
- Smith, J. D., Arber, W., & Kühnlein, U. (1972). Host specificity of DNA produced by Escherichia coli. XIV. The role of nucleotide methylation in in vivo B-specific modification. *Journal of molecular biology*, **63**(1), 1–8.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., & Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews* **62**(2), 434–464.
- Su, T. J., Tock, M. R., Egelhaaf, S. U., Poon, W. C., & Dryden, D. T. (2005). DNA bending by M.EcoKI methyltransferase is coupled to nucleotide flipping. *Nucleic acids research*, **33**(10), 3235–3244.
- Sutherland, E., Coe, L., & Raleigh, E. A. (1992). McrBC: a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease. *Journal of molecular biology*, **225**(2), 327–348.



- Wyszomirski, K. H., Curth, U., Alves, J., Mackeldanz, P., Möncke-Buchner, E., Schutkowski, M., Krüger, D. H., & Reuter, M. (2012). Type III restriction endonuclease EcoP15I is a heterotrimeric complex containing one Res subunit with several DNA-binding regions and ATPase activity. *Nucleic acids research*, **40**(8), 3610–3622.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) 'Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors', *Gene*, **33**(1), 103–119.
- Yuan, R., Hamilton, D. L., & Burckhardt, J. (1980). DNA translocation by the restriction enzyme from *E. coli* K. *Cell*, **20**(1), 237–244.
- Yuan R. (1981). Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. *Annual review of biochemistry*, **50**, 285–319.
- Youell, J., & Firman, K. (2008). EcoR124I: from plasmid-encoded restriction-modification system to nanodevice. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, **72**(2), 365–377.

Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

*Ana Šlišković*

ime i prezime studenta