

# Kloniranje dijela genoma bakteriofaga lambda u plazmide pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR

---

**Mihaljević, Ante**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:028349>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-15**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Ante Mihaljević**

7400/BT

**Kloniranje dijela genoma bakteriofaga lambda u  
plazmide pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR**  
**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Genetičko inženjerstvo

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

**Zagreb, 2019**

## 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

### Kloniranje dijela genoma bakteriofaga lambda u plazmide pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR

*Ante Mihaljević, 58210525*

**Sažetak:** Cilj rada bio je klonirati odabrani fragment genoma bakteriofaga lambda u plazmide pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR, i tako konstruirati plazmide pRS40 coKanR+L, pRS40 coHyrR+L i pRS40 coNrsR+L koji će se u budućnosti koristiti u eksperimentalnom sustavu za istraživanje učestalosti homologne rekombinacije u nekonvencionalnim (*ne-Saccharomyces*) kvascima. U svrhu konstrukcije navedenih plazmida, odabrani fragment genoma bakteriofaga lambda umnožen je lančanom reakcijom polimeraze (metoda PCR) te pocijepan restrikcijom endonukleazom HindIII. Tako pripremljeni insert ligiran je s plazmidima koji su također linearizirani enzimom HindIII, a osim toga i defosforilirani. Za selekciju transformanata koji u plazmidima sadrže insert korištena je selekcija plavo-bijelo. Nakon transformacije dobiveno je nekoliko bijelih kolonija iz kojih je izolirana plazmidna DNA, međutim, na temelju rezultata gel-elektroforeze pokazano je da plazmidi izolirani iz transformanata ne sadrže insert. Pretraživanjem literature i analizom funkcije svakog gena koji se nalazi na umnoženom fragmentu genoma bakteriofaga lambda utvrđeno je da se na njemu nalazi gen koji kodira za peptid dugačak 86 aminokiselina koji prilikom indukcije profaga ubija stanice domaćina. Stoga je najvjerojatnije prisutnost ovog gena onemogućila uspješno kloniranje željenog fragmenta DNA.

**Ključne riječi:** *ne-Saccharomyces* kvasci, homologna rekombinacija, kloniranje dijela genoma bakteriofaga lambda

**Rad sadrži:** 25 stranica, 6 slika, 3 tablice, 37 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

**Datum obrane:** 4. lipnja 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

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

### **Cloning of DNA fragment from lambda genome into plasmids pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR and pRS40 coNrsR**

***Ante Mihaljević, 58210525***

**Abstract:** The aim of this paper was to clone the selected fragment of lambda genome into plasmids pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR and pRS40 coNrsR, and thus construct plasmids pRS40 coKanR+L, pRS40 coHyrR+L and pRS40 coNrsR+L which will be used in the experimental system for studying the efficiency of homologous recombination in unconventional (non-*Saccharomyces*) yeast. For the purpose of constructing said plasmids, the selected fragment of lambda genome was amplified by polymerase chain reaction (PCR method) and cleaved by restriction endonuclease HindIII. The thus-prepared insert is ligated with plasmids which are also linearized with the enzyme HindIII and, furthermore, dephosphorylated. Selection of transformants that contain plasmids with insert was carried with blue-white screening. After the transformation, several white colonies were obtained from which plasmid DNA was isolated, however, based on the results of gel electrophoresis, it was shown that plasmids isolated from transformants did not contain an insert. By searching the literature and analyzing the function of each gene located on a multiplied fragment of lambda genome, it has been found that there is a gene encoding the 86 amino acids long peptide responsible for lysis of the host cells after prophage induction. Therefore, most likely the presence of this gene did not allow successful cloning of the desired DNA fragment.

**Keywords:** cloning of DNA fragment from lambda genome, homologous recombination, non-*Saccharomyces* yeast,

**Thesis contains:** 25 pages, 6 figures, 3 tables, 37 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, Ph.D.

**Technical support and assistance:** assistant professor Marina Svetec Miklenić, Ph.D.

**Defence date:** June 4<sup>th</sup> 2019

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Kvasci.....	2
2.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	2
2.1.2. ne- <i>Saccharomyces</i> kvasci.....	4
2.3. Genetička rekombinacija i genetičko inženjerstvo kvasca.....	6
2.4. Oplemenjivanje sojeva kvasaca metodama genetičkog inženjerstva.....	7
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	9
3.1. Materijali .....	9
3.1.1. Mikroorganizmi .....	9
3.1.2. Plazmidi.....	9
3.1.3. Oligonukleotidi.....	10
3.1.4. Otopine za gel-elektroforezu.....	11
3.1.5. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA.....	11
3.1.6. Hranjive podloge.....	12
3.1.7. Kemikalije i enzimi .....	13
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Lančana reakcija polimerazom.....	14
3.2.2. Restrikcija i modifikacija DNA.....	14
3.2.3. Gel-elektroforeza.....	14
3.2.4. Izolacija DNA iz agaroznog gela.....	15
3.2.5. Transformacija bakterije <i>Escherichia coli</i> elektroporacijom.....	15
3.2.6. Izolacija plazmidne DNA iz bakterije <i>Escherichia coli</i> (mini-prep).....	15
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	17
4.1. Izolacija i restriksijska analiza plazmida pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR.....	17
4.2. Umnažanje fragmenta iz genoma bakteriofaga lambda lančanom reakcijom polimeraze.....	18
4.3. Kloniranje umnoženog fragmenta genoma bakteriofaga lambda u plazmide pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR i analiza dobivenih transformanata.....	19
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	22
<b>6. LITERATURA</b> .....	23

## 1. UVOD

Do danas je opisano više od 1500 različitih vrsta kvasaca (Kurtzman i sur., 2011) od kojih su samo neki pronašli svoju biotehnološku primjenu, a najznačajniji od njih je *Saccharomyces cerevisiae*. Tradicionalno se naziv „kvasac“ odnosi isključivo na *S. cerevisiae* što zapravo najbolje pokazuje njegovu važnost i dominantu zastupljenost kao radnog mikroorganizma u tradicionalnim fermentacijskim procesima, ali i kao modelnog mikroorganizma za proučavanje bioloških procesa u eukariotskim stanicama. Konkretno, *S. cerevisiae* se kao radni mikroorganizam koristi u proizvodnji etanola, pekarstvu, vinarstvu i pivarstvu, ali i u proizvodnji heteroloških proteina i metabolita zahvaljujući razvoju genetičkog inženjerstva. Iako je važnost kvasca *S. cerevisiae* nedvojbeno, njegova dominantna zastupljenost kao radnog mikroorganizma u prehrambenoj industriji nema znanstvenu već povijesnu podlogu odnosno njegova primjena započela je tisućama godina prije same akumulacije znanstvenih spoznaja o samim kvascima i fermentacijskim procesima. Posljednjih godina počela se posvećivati velika pozornost ne-*Saccharomyces* kvascima kako bi se istražio njihov potencijal za biotehnološku primjenu u konvencionalnim i nekonvencionalnim fermentacijskim procesima. Ne-*Saccharomyces* kvasci, s obzirom na veliku biološku raznolikost, posjeduju čitav niz različitih fizioloških karakteristika koje bi mogle biti interesantne za biotehnološku primjenu. Kvasci s poželjnim karakteristikama mogli bi zamijeniti neke od trenutno korištenih kvasaca u pojedinim fermentacijskim procesima s obzirom na to da se kao radni mikroorganizmi ne koriste sojevi s optimalnim svojstvima pa je samim time prostor za unaprjeđivanjem postojećih fermentacijskih procesa jako velik. Ne-*Saccharomyces* kvasce za koje se pokaže da posjeduju poželjne karakteristike može se oplemeniti metodama genetičkog inženjerstva i na taj način prilagoditi zahtjevima određenog fermentacijskog procesa.

Međutim, glavni problem u primjeni metoda genetičkog inženjerstva kod ne-*Saccharomyces* kvasaca je taj što je u mitotičkim stanicama ovih kvasaca učestalost homologne genetičke rekombinacije često daleko manja nego u laboratorijskim sojevima kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Naime, zbog niske učestalosti homologne genetičke rekombinacije, fragment DNA koji se unese u stanicu, unatoč tome što sadrži DNA koja je homologna određenom mjestu u kvašćevu genomu, ugrađuje se u nasumično mjesto unutar genoma, a to bitno otežava uvođenje preciznih odnosno ciljanih genetičkih promjena.

Budući da je mogućnost uvođenja ciljanih genetičkih promjena bitna za izbor ne-*Saccharomyces* kvasca koji će se koristiti kao radni organizam u biotehnološkom procesu, cilj rada bio je konstruirati tri plazmida koji će kasnije biti dio eksperimentalnog sustava za određivanje uspješnosti uvođenja ciljanih genetičkih promjena u ne-*Saccharomyces* kvascima općenito.

Konkretno, u tri plazmida (pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR) koji nose gene za rezistenciju na tri antibiotika (koji se mogu koristiti za selekciju transformiranih ne-*Saccharomyces* kvasaca) kloniran je određeni dio genoma bakteriofaga lambda korištenjem osnovnih tehnika genetičkog inženjerstva kao što su izolacija DNA, korištenje restrikcijskih i modifikacijskih enzima, te PCR.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Kvasci

Kvasci su jednostanični eukariotski organizmi koji naseljavaju različite ekološke niše kao što su voda, tlo, zrak, površina biljaka i plodova. Morfološki su vrlo različiti, a najzastupljeniji su okrugli, ovalni i elipsoidni oblici stanica. Kvasci spadaju u carstvo gljiva (*Fungi*). Carstvo gljiva podijeljeno je na jedanaest odjeljaka (*Phylum*) od kojih samo *Ascomycota* i *Basidiomycota* obuhvaćaju kvasce. Mogu se razmnožavati vegetativno pupanjem ili poprečnom diobom (fisijom) odnosno spolno sporama. Spore se kod askomiceta nazivaju askospore, a tvorevine u kojima nastaju askusima dok, s druge strane, bazidiomiceti stvaraju bazidiospore u bazidijama. Kvasci koji se razmnožavaju nespolno nazivaju se anamorfnim kvascima, oni koji se razmnožavaju spolno nazivaju se teleomorfnim kvascima, a holomorfnim kvasci su oni koji se razmnožavaju i spolno i nespolno. Industrijski najzanimljiviji kvasci većinom pripadaju odjeljku *Ascomycota*, a samo pojedini odjeljku *Basidiomycota* (Grba, 2010).

#### 2.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *S. cerevisiae* jednostanični je eukariotski organizam koji raste u obliku pojedinačnih ovalnih stanica promjera 5 do 7  $\mu\text{m}$  pri čemu veličina stanica ovisi o fazi rasta i ploeditetu. Pripada carstvu gljiva (*Fungi*) odnosno odjeljku *Ascomycota*. Široka upotreba u tradicionalnim biotehnologijama – proizvodnja vina, piva, alkoholnih pića i biomase učinila je kvasac vrlo zanimljivim, jeftinim i lako dostupnim mikroorganizmom i za temeljna znanstvena istraživanja (Svetec i Zgaga, 2010). Ono što prvenstveno omogućuje tako široku primjenu kvasca *S. cerevisiae* kao radnog mikroorganizma u tradicionalnim fermentacijskim procesima je GRAS (engl. Generally Recognized as Safe) status odnosno činjenica da nije štetan za ljudsko zdravlje. Divlji sojevi kvasca pronađeni su na površini zrelog voća, u gastrointestinalnom sustavu, na površini tijela kukaca i toplokrvnih životinja, u tlu na različitim područjima svijeta pa čak i u vodenoj okolini (Martini, 1993). Primjenom genetičkog inženjerstva i metoda klasične genetike konstruirani su različiti sojevi kvasca *S. cerevisiae*. Laboratorijski sojevi kvasca divljeg tipa u eksponencijalnoj fazi

rasta imaju generacijsko vrijeme od približno 90 min kada se uzgajaju na kompletnoj hranjivoj podlozi YPD (1% kvašćev ekstrakt, 2% pepton, 2% glukoza), a približno 140 minuta na kemijski definiranoj hranjivoj podlozi pri temperaturi od 30 °C. Optimalna temperatura za rast kvasca je u rasponu od 28 do 30 °C, a maksimalna gustoća kulture koja se postiže kod uzgoja u optimalnim uvjetima u tekućoj hranjivoj podlozi je  $2 \times 10^8$  st/mL (Sherman, 2002). Kolonije su vidljive 2 do 3 dana nakon nacjepljivanja na YPD podlogu. Kvasac je sposoban fermentirati monosaharide (glukoza, maltozu, trehalozu) i disaharide (saharozu) veoma brzo, trisaharid maltotriozu sporije, rafinozu samo djelomično, a pentoze i disaharid laktozu ne može fermentirati (Grba, 2010). Preferencijalno metabolizira heksoze kao što su glukoza i fruktoza. Šećere kao što su saharoza, maltoza i galaktoza ne metabolizira u prisutnosti glukoze. (Carlson, 1987). Fakultativni je anaerob što znači da može rasti uz prisutnost kisika, ali i bez njega. U prisutnosti kisika odvija se mitohondrijski transportni lanac i oksidativna fosforilacija pri čemu se glukoza konvertira u CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O uz oslobađanje energije. U anaerobnim uvjetima, kao što je slučaj kod alkoholne fermentacije, kvasac raste sporije jer se energija proizvodi samo procesom glikolize, šećeri se u tom slučaju prevode u intermedijere kao što su etanol, glicerol i CO<sub>2</sub>. (Ishtar Snoek and Steensma, 2007; Bekatorou i sur., 2006).

Kvasac *S. cerevisiae* prvi je eukariotski organizam kojem je sekvencioniran genom. Haploidna stanica kvasca sadrži 16 kromosoma veličine od 200 do 2000 kb, plazmid 2 $\mu$  veličine 6,318 kb i mitohondrijsku DNA veličine 70 do 76 kb. Genom kvasca sadrži 6183 ORF-ova (otvoreni okvir čitanja) dužih od 300 pb s tim da se za približno 5800 njih pretpostavlja da kodiraju za proteine. Broj ORF-ova je veći ako se uzmu u obzir sekvence kraće od 300 pb. Za razliku od genoma većine višestaničnih organizmima genom kvasca je vrlo kompaktan odnosno 72% ukupne sekvence čine geni, a tek 3,8% čine introni. Prosječna duljina kvašćevog gena iznosi 1,45 kb. (Sherman, 2002). Haploidne stanice kvasca mogu biti **a** ili  **$\alpha$**  tipa parenja, dok su, s druge strane, diploidne stanice **a/ $\alpha$** -tipa parenja. Dvije haploidne stanice različitog tipa parenja mogu konjugirati pri čemu nastaje diploidna stanica. Haploidne i diploidne stanice kvasca mogu se razmnožavati vegetativno pupanjem, ali samo diploidne stanice (**a/ $\alpha$** -tip parenja) mogu se razmnožavati spolno odnosno mejozom pri čemu nastaju četiri haploidne spore (askospore) od kojih su dvije  **$\alpha$** , a dvije **a** tipa parenja. Sporulaciju potiču nedostatak izvora dušika i prisutnost nefermentabilnog izvora ugljika kao što je acetat (Grba, 2010). Ako se spore inokuliraju na bogatu hranjivu podlogu, germinirati će i iz njih će se razviti haploidne stanice kvasca (Dickinson i Schweizer, 2004).

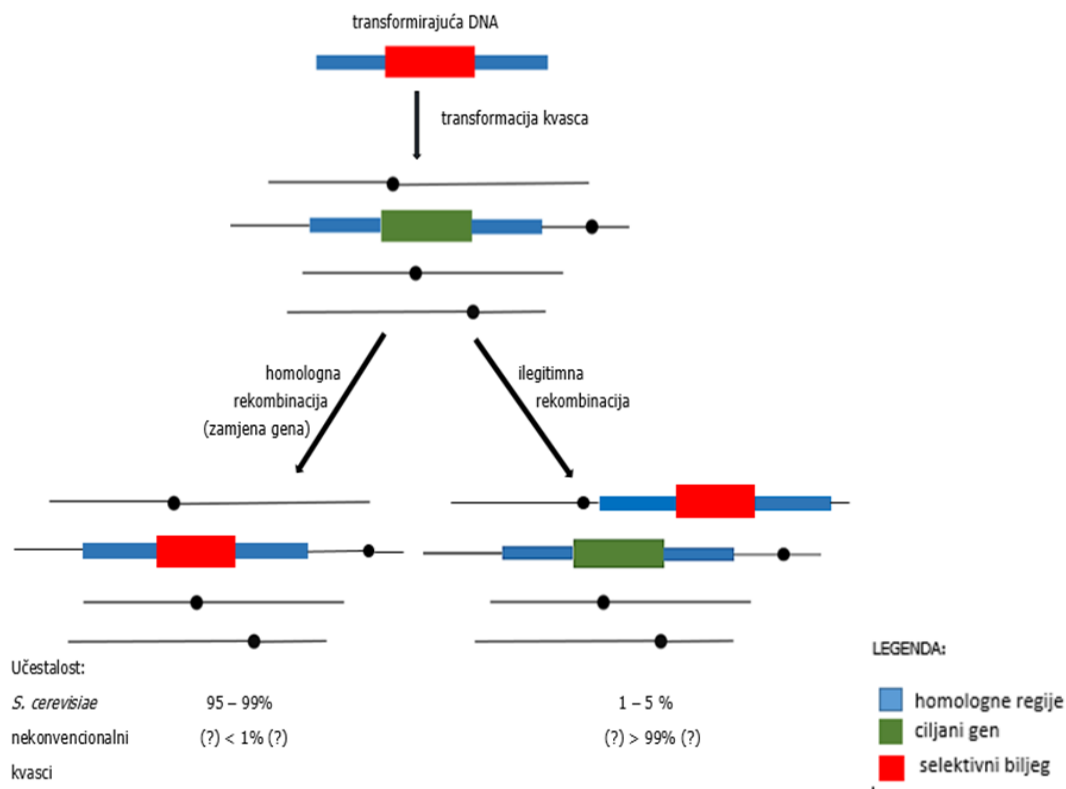


### 2.1.2. Ne-*Saccharomyces* kvasci

Pojam „ne-*Saccharomyces* kvasci“ obuhvaća sve kvasce osim *S. cerevisiae* pa je to zapravo poprilično širok pojam i uključuje mnogo različitih vrsta kvasaca koji se općenito smatraju kontaminantima u fermentacijskim procesima. Ne-*Saccharomyces* kvasci se mogu promatrati kao izvor alternativnih metaboličkih puteva za iskorištavanje različitih supstrata i tvorbu odgovarajućih produkata. Biološka raznolikost ovih kvasaca je velika pa postoje mnoge vrste koje posjeduju korisna i neuobičajena metabolička obilježja, potencijalno korisna za biotehnošku primjenu (Lucas, 2017) pa tako primjerice neki kvasci mogu metabolizirati nekonvencionalne izvore ugljika kao što su biopolimeri, pentoze, alkoholi, polioli, ugljikovodici, masne kiseline i organske kiseline (Bekatorou i sur., 2006). S obzirom na to da se moderni biotehnološki procesi sve više usmjeravaju prema korištenju alternativnih izvora ugljika odnosno sirovina, svojstva koja posjeduju različiti ne-*Saccharomyces* kvasci su itekako poželjna. Primjer takve sirovine su lignocelulozne sirovine. Lignoceluloza je građena prvenstveno od hemiceluloze, lignina i celuloze. Hidrolizom hemiceluloze nastaju znatne količine pentoznih šećera, ponajprije ksiloze i arabinoze, koje divlji sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ne mogu fermentirati, osim redukcije izrazito male količine ksiloze u ksilitol (Olofsson i sur., 2008). Kao alternativa genetičkim modifikacijama kvasca *S. cerevisiae* moguća je primjena kvasaca koji posjeduju prirodnu sposobnost fermentacije pentozna (rodovi *Candida* i *Pichia*), međutim u tom slučaju glavni je nedostatak manji stupanj konverzije supstrata u produkt (Walker, 2009). Dodatno, neki kvasci iz rodova *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* i *Torulopsis* mogu koristiti metanol kao jedini izvor ugljika odnosno energije (Bekatorou i sur., 2006). *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces marxianus* posjeduju industrijski relevantna obilježja kao što su korištenje laktoze kao primarnog izvora ugljika zbog čega bi mogli naći svoju primjenu u mliječnoj industriji i proizvodnji biogoriva (Porro i sur., 1999). *Yarrowia lipolytica* je alkan-asimilirajući kvasac koji posjeduje visoki potencijal za primjenu u proizvodnji derivata masnih kiselina odnosno lipida (Blazeck i sur., 2014; Tai i Stephanopoulos, 2013). *Hansenula polymorpha* je termotolerantni kvasac sposoban prevoditi glukozu i ksilozu u etanol pri temperaturi od 45°C do 50°C (Suwannarangsee i sur., 2010). Efikasna proizvodnja bioetnola iz lignoceluloznih sirovina zahtijeva prethodnu obradu prije same fermentacije na relativno visokim temperaturama (~50°C) (Tabka i sur. 2006), pa tako fermentacija pri visokim temperaturama značajno smanjuje troškove hlađenja kao i rizik od kontaminacija (Anderson i sur., 1986). Važno svojstvo nekih ne-*Saccharomyces* kvasaca (*K. lactis*, *P. pastoris* i *Y. lipolytica*...) je to da su, za razliku od kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, Crabtree negativni odnosno ne provode alkoholnu fermentaciju pri aerobnim uvjetima

(Handerson i Block, 2014). To svojstvo može biti povoljno za povećanje proizvodnje biomase u aeriranim kulturama jer se izvor ugljika u tom slučaju ne troši za proizvodnju etanola.

Za razliku od kvasca *S. cerevisiae*, u ne-*Saccharomyces* kvasaca, DNA koja se unese u stanicu puno češće podliježe ilegitalnoj (nehomolognoj) nego homolognoj rekombinaciji pa je zbog toga uspješnost uvođenja ciljanih genetičkih modifikacija u ne-*Saccharomyces* kvascima puno manja nego u kvascu *S. cerevisiae* (Vogl i sur., 2003). Naime, kao što je prikazano na slici 1, uspješnost genskog ciljanja u nekonvencionalnim i ne-*Saccharomyces* kvascima često je manja od 1 % te ide maksimalno do 30 % (Näätsaari i sur., 2012). Nasuprot tome, uspješnost genskog ciljanja u modelnim kvascima *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* gotovo uvijek je veća od 95 %, ovisno o eksperimentalnom sustavu. Tako je primjerice, uspješnost ciljanja gena u kvascu *S. cerevisiae* veća od 70 % kada fragment DNA za zamjenu gena na svojim krajevima ima svega 30 do 50 pb koji su homologni s okolinom ciljnog gena (Guldener i sur., 1996). Nasuprot tome, uspješnost genskog ciljanja u različitim nekonvencionalnim kvascima (Satyanarayana i Kunze, 2009; Branduardi i sur., 2008) kao što su *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia stipitis* i *Kluyveromyces lactis* obično je manja od 1% uz istu duljinu homologije na krajevima DNA koja se unosi u stanicu u svrhu ciljanja odnosno inaktivacije gena. Prema tome, za uspješno ciljanje gena u nekonvencionalnim kvascima potrebno je da se na krajevima transformirajućeg fragmenta DNA nalaze homologije duljine od 200 pb do 2000 pb (Klinner i Schafer, 2004).



**Slika 1.** Uspješnost zamjene gena u kvascu *S. cerevisiae* i nekonvencionalnim kvascima

### 2.3. Genetička rekombinacija i genetičko inženjerstvo kvasca

U najširem smislu, genetička rekombinacija je rekombiniranje odnosno preraspoređivanje genetičkog materijala unutar jedne te iste ili između dviju ili više različitih molekula DNA. S obzirom na molekularni mehanizam i sekvence DNA koje međusobno rekombiniraju, genetička rekombinacija može se podijeliti na mjesno-specifičnu, homolognu i ilegitalnu (nehomolognu) (Takata, 1998). Mjesno specifična rekombinacija događa se između točno određenih sekvenci koje prepoznaju specifični enzimi. S obzirom na stupanj homologije (identičnosti) između regija DNA koje rekombiniraju genetička rekombinacija može biti homologna ili ilegitalna. Tako se homologna rekombinacija događa između sekvenci identičnih ili gotovo identičnih redosljeda nukleotida te je proporcionalna identičnosti i duljini homolognih regija DNA. S druge strane ilegitalna rekombinacija događa se između regija DNA koje su potpuno različite ili imaju jako kratke regije homologije od svega nekoliko parova baza.

Posebno važnu biološku ulogu ima homologna rekombinacija jer omogućuje pravilnu raspodjelu homolognih kromosoma tijekom mejoze i formiranja gameta. Ovaj proces sukladan je mejozi u kvascu kada iz jedne diploidne stanice nastaju četiri haploidne spore. Također je interesantno da mejotičku rekombinaciju potiču dvolančani lomovi koji nastaju djelovanjem staničnih enzima i tako osiguravaju pravilnu segregaciju kromosoma (O'Driscoll i Jeggo, 2006). Mejotička rekombinacija doprinosi i genetičkoj varijabilnosti vrsti koje se spolno razmnožavaju jer može uključivati recipročnu izmjenu genetičkog materijala („crossing-over“) između homolognih kromosoma i/ili konverziju gena (nerecipročnu izmjenu genetičkog materijala) kao i pojavu te popravak heterodupleksne DNA (dvolančane DNA koja sadrži nesparene i krivo sparene baze).

Genetička rekombinacija je, osim toga, proces koji omogućuje popravak dvolančanog loma, letalnog oštećenja DNA koje je za stanicu najopasnije. Interesantno je da se dvolančani lomovi u mitotičkim stanicama većine eukariotskih organizama, pa tako i čovjeka, popravljaju ilegitalnom rekombinacijom, odnosno nehomolognim spajanjem krajeva DNA (NHEJ – „nonhomologous end joining“) dok se u kvascu *S. cerevisiae* dominantno popravljaju homolognom rekombinacijom (Pâques i Haber, 1999). Zbog ove osobitosti, kvasac *S. cerevisiae* je organizam u kojemu je genska terapija, odnosno uvođenje ciljanih genetičkih modifikacija izrazito uspješno. Naime, fragment DNA koji se unese u stanicu, kvasac prepoznaje kao vlastitu oštećenu DNA (koja ima dvolančani lom) te je popravljiva homolognom rekombinacijom. Stoga, ukoliko se na krajevima ovog fragmenta DNA nalazi sekvenca homologna nekoj regiji u genomu kvasca, uneseni fragment usmjerava se upravo u to mjesto kvašćevog genoma. Zahvaljujući tome, genska terapija, odnosno uvođenje ciljanih genetičkih promjena metodama genetičkog inženjerstva u kvascu *S. cerevisiae* provodi se rutinskim metodama. Zbog toga je kvasac *S. cerevisiae* i modelni organizam za

istraživanje molekularnih mehanizama homologne genetičke rekombinacije, a dobiveni rezultati omogućavaju razvoj i unaprjeđenje metodologije za provođenje „genske terapije“ i u drugim organizmima. Međutim, treba reći da je u primjeni genske terapije otkriće CRISPR/Cas sustava u bakterija otvorilo potpuno nove vidike (Barrangou et al., 2007).

#### **2.4. Oplemenjivanje sojeva kvasaca metodama genetičkog inženjerstva**

Unatoč ogromnoj raznolikosti među kvascima, često je potrebna kombinacija fenotipskih svojstava koja se ne može naći u prirodi da bi se zadovoljili specifični zahtjevi fermentacijske industrije. Dodatni stupanj raznolikosti može se postići različitim metodama za oplemenjivanje sojeva kao što su mutageneza, križanje, fuzija protoplasta i usmjerena evolucija (Steensels i sur. 2014). Kvasci nastali primjenom navedenih metoda ne smatraju se genetički modificiranim organizmima (GMO) što je prednost u odnosu na primjenu metoda genetičkog inženjerstva u svrhu oplemenjivanja kvasaca. Osim toga, navedene metode ne zahtijevaju poznavanje genetičke pozadine za fenotipsko svojstvo od interesa. Mana ovih metoda je njihova nepreciznost i nakupljanje nasumičnih mutacija koje nemaju pozitivan učinak. Alternativa mutagenezi, križanju, fuziji protoplasta i usmjerenoj evoluciji je primjena metoda genetičkog inženjerstva koje omogućuju preciznije promjene genotipa i nadilaženje stupnja raznolikosti koje pružaju mutacije i križanje jer se neke fenotipske karakteristike mogu postići isključivo metodama genetičkog inženjerstva. Genetičko inženjerstvo omogućava prijenos i kombiniranje genetičkog materijala ne samo između organizama različite vrste nego čak i između organizama koji taksonomski pripadaju različitim carstvima. Moguća je i konstrukcija te sinteza umjetnih fragmenta DNA točno određenog redoslijeda nukleotida, cijelih kromosoma i genoma (Gibson i sur., 2008; Dymond i sur., 2011). Osim toga, metodama genetičkog inženjerstva, određeni dio genetičkog materijala organizama može se mijenjati precizno, uz minimalizaciju nasumičnih, nekontroliranih i neželjenih promjena u ostatku genoma. (Steensels i sur., 2014).

U slučaju za potrebom ekspresije novih gena (iz drugih organizama ili sintetiziranih) u kvascu *S. cerevisiae*, koriste se replikativni i integrativni plazmidi. Replikativni plazmidi sadrže ishodište replikacije pa se u stanici samostalno repliciraju bez ugradnje u genom kvasca, dok nereplikativni plazmidi ne sadrže ishodište replikacije pa se ugrađuju u genom. Postoji više različitih replikativnih vektora koji se u stanici kvasca održavaju u različitom broju kopija pa su tako YCp plazmidi (sadrže ishodište replikacije iz kromosomske DNA i centromeru) prisutni unutar stanici u 1 - 2 kopije, a primjerice YEp (sadrži centromeru i ishodište replikacije plazmida 2 $\mu$ ) u 10 - 40 kopija (Clarke i Carbon, 1980; Christianson i sur., 1992; Romanos i sur., 1992). Postoje i umjetni kvašćevi kromosomi (YAC – yeast artificial chromosome) koji sadrže centromeru, ishodište

replikacije i telomere. U kvascu *S. cerevisiae* moguće je usmjeriti integraciju strane (egzogene) DNA u bilo koje mjesto unutar genoma, ali se često usmjerava u gene koji kodiraju za ribosomalnu RNA (Lopes i sur., 1989) i delta elemente (Sakai i sur., 1990; Lee i Da Silva, 1997). Ako se u genom želi ugraditi više kopija jednog te istog gena, prednost ima ugradnja strane DNA u delta elemente, koji su raspršeni po genomu kvasca, s obzirom na to da su disperzno ponovljene sekvence stabilnije od uzastopno ponovljenih (Da Silva i Srikrishnan, 2012). Genetičko inženjerstvo sofisticirana je metodologija koja se iz dana u dan dodatno unaprjeđuje te služi na dobrobit čovjeka i već ima široku primjenu, primjerice u farmaceutskoj industriji.

### 3. MATERIJALI I METODE

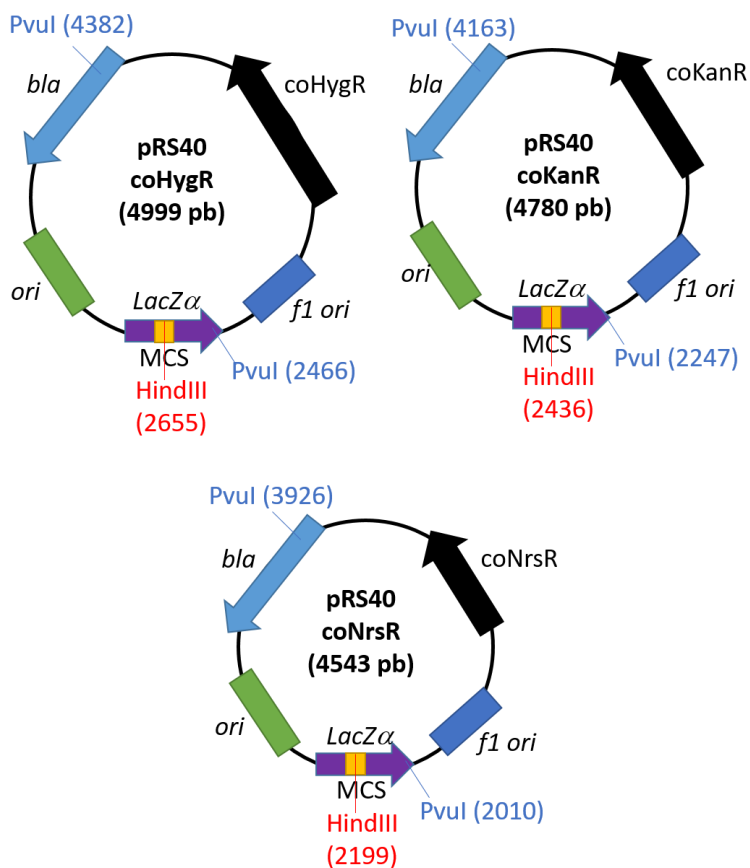
#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

U ovom radu korištena je bakterija *Escherichia coli*, soj NEB® Stable, genotipa F' *proA+B+lacI*<sup>q</sup>  $\Delta(lacZ)M15$  *zzf::tn10* (Tet<sup>R</sup>)  $\Delta(ara-leu)$  7697 *araD139 fhu A*  $\Delta lacX74 galE15 e14-$   $\Phi80dlacZ\Delta M15$  *recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str<sup>R</sup>) rph spoT1*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBc)$  („New England Biolabs“, Ipswich, SAD).

##### 3.1.2. Plazmidi

U ovom radu korištena su tri plazmida, pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR (slika 2). Sva tri plazmida - pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR sadrže *ori*, *f1 ori*, MCS (Multiple Cloning Site) i gen *bla*, a međusobno se razlikuju po genima *KanR*, *HyrR* i *NrsR* (selektivni biljezi za selekciju transformanata kvasca na podlozi s antibioticima kanamicinom, higromicinom i norsotricinom). Sekvenca *ori* omogućuje replikaciju plazmida u bakteriji *Escherichia coli*, *f1 ori* omogućuje izolaciju plazmida u jednolančanom obliku, MCS regija bogata je jedinstvenim restrikcijskim mjestima i služi za ugradnju inserta u plazmidni vektor, gen *bla* služi kao biljeg za selekciju transformanata bakterije *E. coli* na podlozi s ampicilinom. U navedenim plazmidima MCS se nalazi unutar gena *LacZ $\alpha$*  što omogućuje selekciju plavo-bijelo za odabir transformanata kod kojih se u MCS ugradio insert. Naime, ukoliko se stanice koje nose ove plazmide nacijepe na hranjivu podlogu uz dodatak X-gal i IPTG, kolonije će biti plave boje jer je gen *LacZ $\alpha$*  aktivan. Međutim, ukoliko se u MCS ugradi insert kojim se gen *LacZ $\alpha$*  inaktivira, kolonije će biti bijele boje.



**Slika 2.** Restriksijske mape plazmida pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR koji su korišteni u ovom radu. Naznačena su restriksijska mjesta HindIII i PvuI relevantna za ovaj rad.

### 3.1.3. Oligonukleotidi

Za lančanu reakciju polimerazom, u svrhu umnažanja fragmenta genoma bakteriofaga  $\lambda$  korištene su četiri početnice koje su prikazane u tablici 1.

**Tablica 1.** Početnice lambda-F i lambda-R

Velikim tiskanim slovima označen je dio početnice komplementaran određenom dijelu genoma bakteriofaga  $\lambda$ , a malim tiskanim slovima dio početnice koji nije komplementaran i koji sadrži restriksijsko mjesto za HindIII označeno crvenim slovima.

Počelnica	Sekvenca (5' - 3')
lambda-F	tatcgt <b>aagctt</b> CGTCACCCACATGCTGTACT
lambda-R	gtcatg <b>aagctt</b> TAGAGATGGTCTTGGGGCGA

### 3.1.4. Otopine za gel-elektroforezu

TBE-pufer (10x):

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

Agarozni gel (0,8 %):

agaroz	0,8 g
TBE-pufer (1x)	100 mL

Boja za nanošenje uzoraka (6x):

bromfenol-plavo	0,25 g
ksilen cijanol FF	0,25 g
glicerol	30,0 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	20 mL
SDS	1,0 g
destilirana voda	do 1000 mL

Osnovna otopina etidijeva bromida:

etidijev bromid	10 mg/mL
-----------------	----------

Otopina za vizualizaciju DNA

etidijev bromid	0,5 µg/L
-----------------	----------

### 3.1.5. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA:

Otopina amonijeva acetata (8 M):

amonijev acetat	61,66 g
deionizirana voda	100 mL

Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 4°C.

Otopina RN-aze:

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



Otopina kalijeva acetata (3 M):

otopina kalijeva acetata (5 M)	60 mL
octena kiselina	11.5 mL
deionizirana voda	28.5 mL

Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 4°C.

GTE-pufer:

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

Otopina se priprema neposredno prije upotrebe.

NaOH/SDS:

NaOH	200 mM
SDS	10 g/L

### **3.1.6. Hranjive podloge**

LB (kompletna podloga):

bacto-tripton	10,0 g/L
kvašćev ekstrakt	5,0 g/L
natrijev klorid	10,0 g/L

Osnovna otopina ampicilina (koncentracija 20 mg/mL) sterilizirana filtracijom dodaje se u krutu hranjivu podlogu, ohlađenu na 58 °C, do konačne koncentracije od 50 µg/mL, odnosno u tekuću hranjivu podlogu, neposredno prije upotrebe, do konačne koncentracije od 100 µg/mL.

SOC:

bacto-tripton	2,0 mg
kvašćev ekstrakt	500 mg
NaCl	60 mg
KCl	20 mg
MgCl <sub>2</sub>	200 mg
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	250 mg
glukoza	360 mg
destilirana voda	do 100 mL

### 3.1.7. Kemikalije i enzimi

Agar: „Biolife“, Milano, Italija

Agarozna: „Appligene“, Illkirch, Francuska

Amonijev acetat: „Kemika“, Zagreb, Hrvatska

Apsolutni etanol: „Kemika“, Zagreb, Hrvatska

Borna kiselina: „Fisher Scientific“, Pittsburgh, SAD

DNA bakteriofaga  $\lambda$ : „Fermentas International Inc.“, Ontario, Kanada

Deoksiribonukleotidi: “New England Biolabs” Ipswich, SAD

EDTA: „Kemika“, Zagreb, Hrvatska

Etidij bromid: „Roche Applied Science” Indianapolis, IN, SAD

FastAP fosfataza: “New England Biolabs” Ipswich, SAD

Glicerol: „Carlo Erba Reagents“, Rodano, Italija

Izopropanol: „Kemika“, Zagreb, Hrvatska

Kalijev acetat: „Acros Organics“, New Jersey, SAD

Komplet kemikalija za izolaciju DNA iz gela: “New England Biolabs” Ipswich, SAD

Komplet kemikalija za PCR: “New England Biolabs” Ipswich, SAD

Komplet kemikalija za izolaciju plazmida iz malog volumena bakterijske kulture: “New England Biolabs” Ipswich, SAD

Kvašćev ekstrakt: „Biolife“, Milano, Italija

Pepton: „Biolife“, Milano, Italija

Restriksijski enzimi i njihovi puferi: “New England Biolabs” Ipswich, SAD

Ribonukleaza A: „Sigma-Aldrich“, Buchs, Švicarska

SDS: „Merck“, Hohenbrunn, Njemačka

T4 DNA-ligaza: “New England Biolabs” Ipswich, SAD

Tris: „Sigma-Aldrich“, Buchs, Švicarska

Q5 polimeraza: “New England Biolabs” Ipswich, SAD

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction – PCR)

Lančanom reakcijom polimerazom umnožen je željeni fragment genoma bakteriofaga  $\lambda$  koristeći početnice navedene u tablici 1. Reakcijska smjesa sadržavala je po 2,5  $\mu$ L otopine svakog primera (10  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ L otopine Q5 DNA polimeraze (2000 U/mL), 0,2  $\mu$ L otopine kalupa, 10  $\mu$ L pufera (5x) za PCR, 1  $\mu$ L otopine dNTP-a (10  $\mu$ M) i 33,3  $\mu$ L deionizirane vode. Umnažanje se odvijalo u 30 ciklusa prema uvjetima koji su dani u tablici 2. Za provođenje reakcije korišten je uređaj Mastercycler Personal s grijanim poklopcem (Eppendorf, Hamburg).

**Tablica 2.** Uvjeti provođenja PCR-a Q5 DNA polimerazom

	Temperatura/°C	Trajanje
Početna denaturacija	98	30 s
Denaturacija	98	10 s
Sparivanje početnica	68	20 s
Sinteza	72	1,5 min
Završna sinteza	72	5 min

### 3.2.2. Restrikcija i modifikacija DNA

Restriksijski enzimi HindIII i PvuI, T4 DNA-ligaza i DNA fosfataza korišteni su prema uputama proizvođača.

### 3.2.3. Gel-elektroforeza

Gel elektroforeza provođena je u uređaju za vodoravnu elektroforezu. Pripremljeni i na 50°C ohlađeni 0,8% agarozni gel izlije se u kalup kojem su krajevi oblijepljeni samoljepljivom trakom. U kalup se prije izlijevanja stavi češljčić kako bi se nakon skrućivanja agaroze formirale jažice. Izlivena agarozna ostavi se na sobnoj temperaturi određeno vrijeme kako bi se skrutnula, a potom se kalup s gelom uroni u kadnicu za elektroforezu (Bio-Rad, SAD) u kojoj se nalazi 1 x TBE pufer i izvadi se češljčić. Određeni volumen pripremljenih uzoraka potrebno je otpipetirati u jažice gela pritom pazeći da se uzorci ne prelijevaju izvan jažica. U jednu jažicu nanosi se standard koji se sastoji od fragmenata DNA poznate duljine. Nakon nanošenja uzoraka i standarda u jažice potrebno je uključiti izvor napona struje i provoditi elektroforezu uz određenu voltažu sve dok se migracijsko bojilo ne približi suprotnom rubu gela. Nakon završene elektroforeze, gel se inkubira

tijekom 20 minuta u otopini etidijevog bromida, osvijetli UV svjetlošću na transiluminatoru i fotografira kroz crveni filter.

#### **3.2.4. Izolacija DNA iz agaroznog gela**

Izolacija fragmenata DNA iz gela provedena je prema uputama proizvođača kompleta kemikalija „QIAquick Gel Extraction Kit“. Dio gela u kojem se nalaze željeni fragmenti se izreže špatulicom, izvaže i otopi u 3 volumena pufera QG. Da bi se agarozna otopila smjesa se inkubira 10 min pri temperaturi od 50°C nakon čega je potrebno dodati 1 volumen izopropanola. Dobivena otopina nanese se na kolonu za izolaciju DNA, a potom centrifugira pri 10 000 okretaja/min u trajanju od 1 min. Kolonu je potrebno isprati s 500 µL pufera QG, a zatim s 750 µL pufera PE kako bi se uklonila zaostala agarozna. Na kraju se DNA ispiri s kolone pomoću 30 µL pufera EB centrifugiranjem pri 10 000 okretaja/min tijekom 1 min.

#### **3.2.5 Transformacija bakterije *E. coli* elektroporacijom**

Prethodno pripremljene i zamrznute (-70°C) kompetentne stanice *E. coli* inkubiraju se nekoliko minuta na ledu nakon čega se u epicu sa kompetentnim stanicama doda 1-2 µL DNA otopljene u puferu male ionske jakosti. Homogenizirana suspenzija kompetentnih stanica i DNA ostavi se na ledu 1 minutu i nakon toga prenese u kivetu za elektroporaciju ohlađenu na ledu. Kiveta se umetne u elektroporator i kroz nju se provede visokovoltažni puls od 2,5 kV u trajanju od 5 milisekundi nakon kojeg se suspenzija stanica, što je brže moguće, prenese u 1 mL SOC tekuće hranjive podloge i promiješa mikropipetom. Potom slijedi inkubacija elektroporiranih stanica tijekom jednog sata u tresilici pri 37 °C i 300 min<sup>-1</sup>, a nakon inkubacije naciepljivanje određenog volumena suspenzije na odgovarajuću selektivnu hranjivu podlogu na kojoj će izrasti transformanti.

#### **3.2.6. Izolacija plazmidne DNA iz bakterije *Escherichia coli* (mini-prep)**

3 mL bakterijske kulture centrifugira se 1 minutu na 10000 okretaja/min. Talog stanica se otopi u 120 µL hladnog pufera GTE. Suspenzija stanica inkubira se 3 minute u ledu nakon čega se dodaje 240 µL hladnog NaOH/SDS i 360 µL hladnog kalijevog acetata uz miješanje okretanjem mikrokivete između svakog koraka. Nakon toga slijedi inkubacija na ledu tijekom 10 minuta i zatim centrifugiranje pri 10000 okretaja/min tijekom 10 min. 650 µL supernatanta odvaja se u praznu mikrokivetu nakon čega je potrebno dodati 390 µL izopropanola i promiješati okretanjem

mikrokivete. Otopina se centrifugira 10 minuta na 10000 okretaja/min, nakon čega se odlije supernatant. Vakuum sisaljkom se odsiše ostatak supernatanta iz mikrokivete te se talog stanica suši uz plamenik 10 - 15 minuta. Potom se u mikrokivetu dodaje 101  $\mu$ L TE pufera s RN-azom (100:1) i inkubira 10 minuta na temperaturi od 70°C. Nakon što se talog stanica otopi, u mikrokivetu je potrebno dodati 33  $\mu$ L 8M otopine amonijevog acetata i 266  $\mu$ L 96% etanola te promiješati okretanjem mikrokivete. DNA se taloži na temperaturi od -20 °C tijekom noći. Nakon toga slijedi centrifugiranje tijekom 10 minuta na 10000 okretaja/min. Supernatant se odbaci, zaostale kapljice u mikrokiveti uklone se vakuum sisaljkom, a talog DNA suši se uz plamenik 10-15 minuta i nakon toga otopi u 20  $\mu$ L pufera TE.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

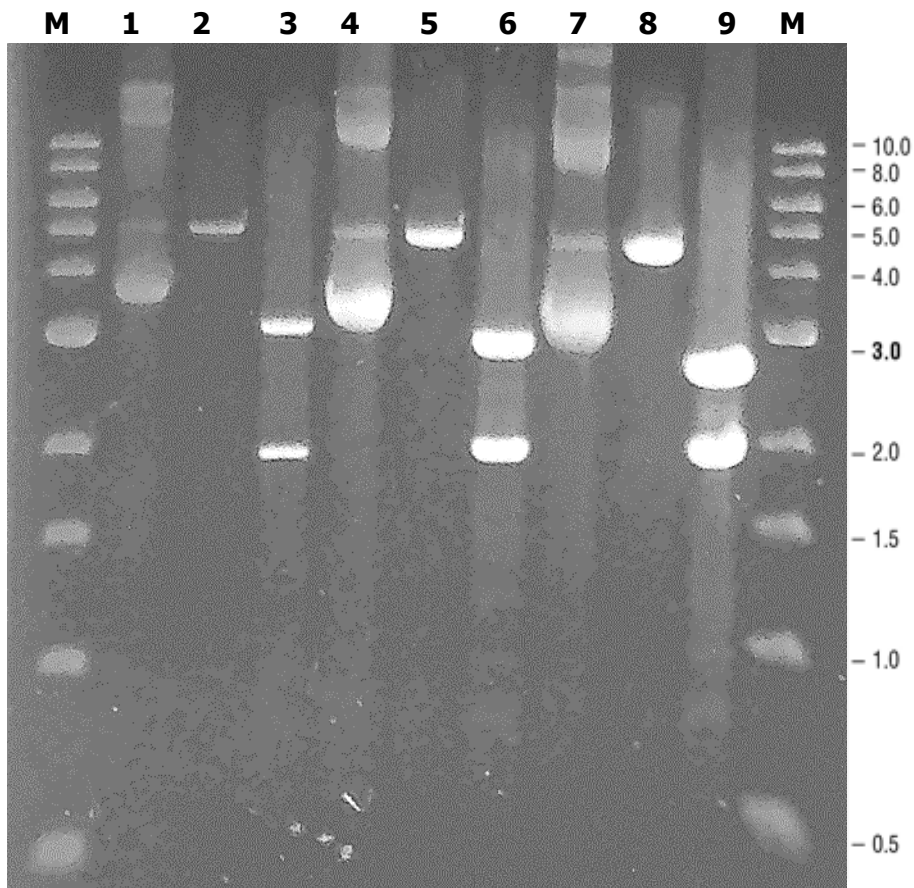
Cilj ovog rada bio je u plazmide pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR klonirati fragment genoma bakteriofaga  $\lambda$ . Tako konstruirani plazmidi pRS40 coKanR+L, pRS40 coHyrR+L i pRS40 coNrsR+L koristiti će se u kasnijim istraživanjima kao eksperimentalni sustav za proučavanje uspješnosti homologne rekombinacije u nekonvencionalnim kvascima. U tu svrhu najprije je restriksijskom analizom provjerena struktura navedenih plazmida, te su plazmidi linearizirani restriksijskom endonukleazom HindIII (poglavlje 4.1.). Zatim je iz genoma bakteriofaga  $\lambda$  umnožen fragment DNA kojim će se navedeni plazmidi proširiti. Umnoženi fragment također je pocijepan restriksijskim enzimom HindIII (poglavlje 4.2.). Nakon izolacije iz agaroznog gela, provedena je ligacija svakog od navedenih plazmida sa umnoženim fragmentom genoma bakteriofaga  $\lambda$ , te transformacija bakterija *E. coli*. Za odabir transformanata koji bi mogli sadržavati insert korištena je selekcija plavo-bijelo na podlozi sa dodanim X-gal i IPTG. Iz dobivenih bijelih kolonija izolirana je plazmidna DNA, te je provedena gel elektroforeza prema kojoj je utvrđeno da dobiveni plazmidi ne sadrže željeni insert (poglavlje 4.3.).

### 4.1. Izolacija i restriksijska analiza plazmida pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR

Izolacija svakog od plazmida provedena je korištenjem metode za izolaciju plazmidne DNA iz malog volumena kulture bakterije *E. coli* (poglavlje 3.2.6.). Struktura izoliranih plazmida provjerena je restriksijskom analizom pomoću restriksijskih endonukleaza HindIII i PvuI čija su mjesta cijepanja plazmida pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR prikazana na slici 2. Očekivane duljine fragmenata plazmida pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR pocijepanih restriksijskim endonukleazama HindIII i PvuI navedena su u tablici 3. Rezultat restriksijske analize prikazan je na slici 3.

**Tablica 3.** Očekivana duljina fragmenata nastalih cijepanjem plazmida pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR pomoću enzima HindIII i PvuI.

	<b>pRS40 coKanR</b>	<b>pRS40 coHyrR</b>	<b>pRS40 coNrsR</b>
<b>HindIII</b>	4780 pb	4999 pb	4543 pb
<b>PvuI</b>	1916 pb, 2864 pb	1916 pb, 3083 pb	1916 pb, 2627 pb

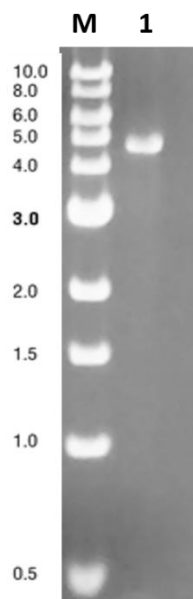


**Slika 3.** Rezultat agarozne gel-elektroforeze plazmidne DNA pocijepane restrikcijskim enzimima 1-neporezani plazmid pRS40 coHygR, 2-pRS40 coHygR/HindIII, 3-pRS40 coHygR/PvuI, 4-neporezani plazmid pRS40 coKanR, 5-pRS40 coKanR/HindIII, 6-pRS40 coKanR/PvuI, 7-neporezani plazmid pRS40 coNrsR, 8-pRS40 coNrsR/HindIII, 9-pRS40 coNrsR/PvuI, M-marker za gel elektroforezu

Iz rezultata prikazanih na slici 3 vidljivo je da su sve duljine fragmenata u skladu s očekivanima, te je potvrđena struktura plazmida pRS40 coKanR, pRS40 coHygR i pRS40 coNrsR.

#### **4.2. Umnažanje fragmenta iz genoma bakteriofaga lambda lančanom reakcijom polimeraze**

Fragment genoma bakteriofaga lambda umnožen je pomoću početnica lambda-F i lambda-R kao što je opisano u poglavlju 3.2.1. Očekivana veličina fragmenta umnoženog PCR-om iznosi 4637 pb. Uspješnost umnažanja provjerena je gel-elektroforezom (slika 4).



**Slika 4.** Uspješnost umnažanja fragmenta genoma bakteriofaga lambda.

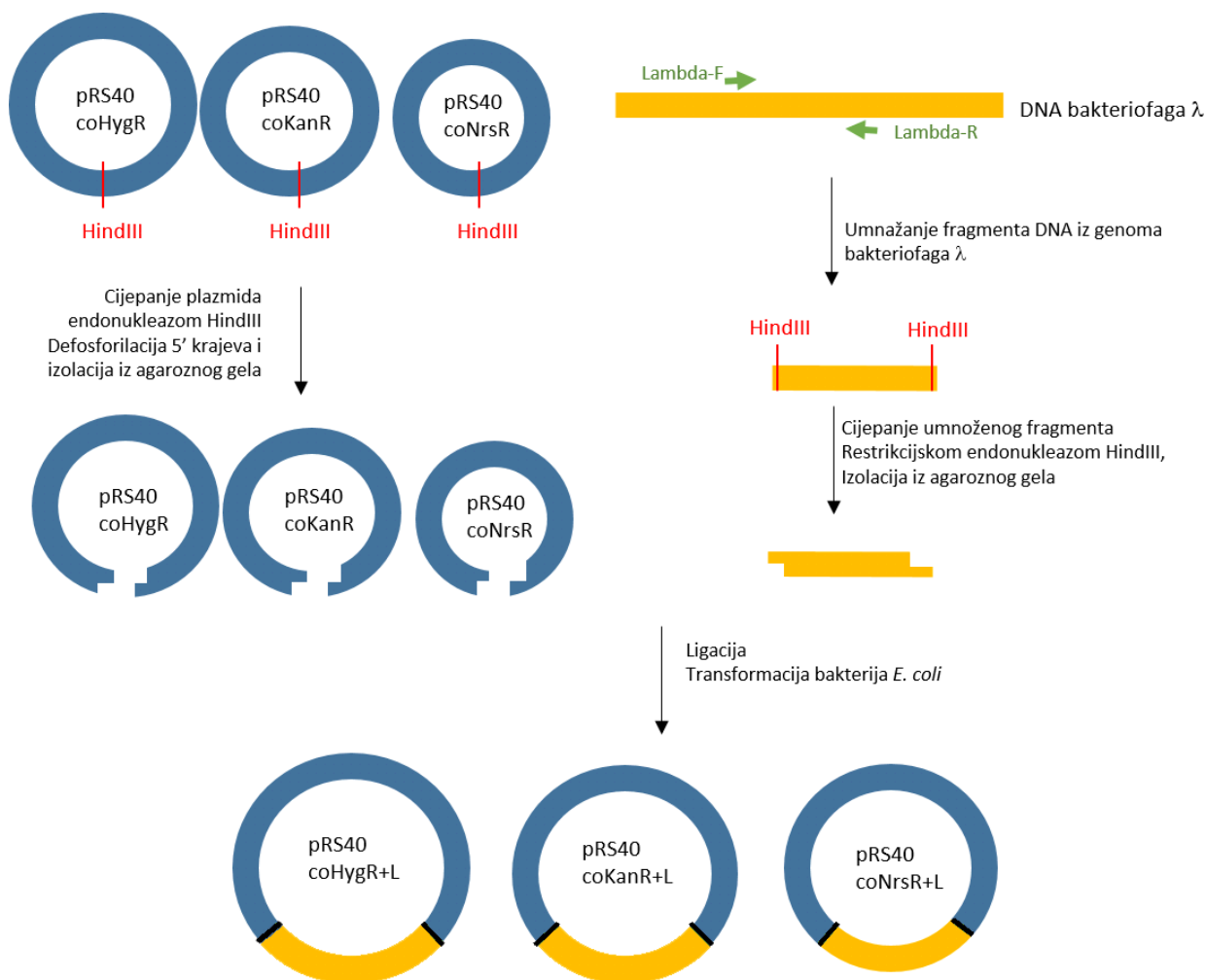
M – marker za gel elektroforezu, 1 – fragment genoma bakteriofaga lambda umnožen PCR-om

Iz rezultata gel-elektroforeze prikazanog na slici 4 može se zaključiti da je željeni fragment genoma bakteriofaga lambda uspješno umnožen lančanom reakcijom polimeraze.

#### **4.3. Kloniranje umnoženog fragmenta genoma bakteriofaga lambda u plazmide pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR i analiza dobivenih transformanata**

Kao što je vidljivo iz sekvence početnica prikazanoj u tablici 1, početnice lambda-F i lambda-R na svojim 5' krajevima imaju nadodana restrikcijska mjesta koje prepoznaje enzim HindIII. Stoga se fragment umnožen iz genoma bakteriofaga lambda može pocijepati na svojim krajevima restrikcijskom enzimom HindIII, te zatim klonirati u restrikcijsko mjesto HindIII na plazmidima pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR. Shematski prikaz konstrukcije proširenih plazmida prikazan je na slici 5.

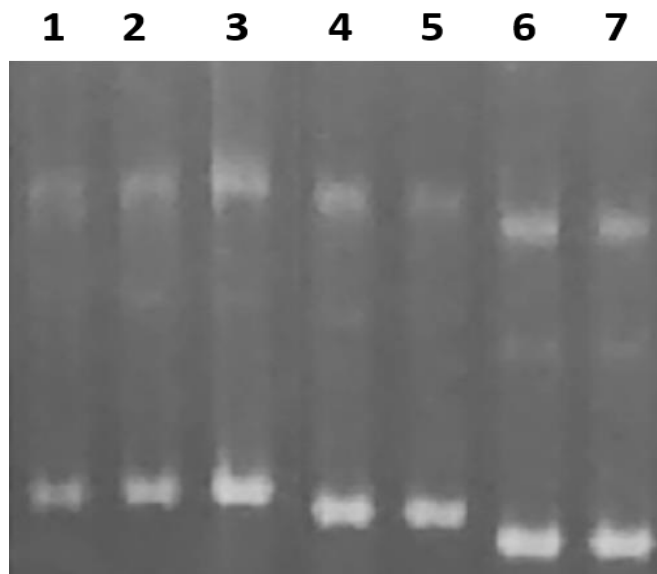




**Slika 5.** Shema konstrukcije plazmida pRS40 coKanR+L, pRS40 coHyrR+L i pRS40 coNrsR+L.

Nakon cijepanja restriksijskim enzimom HindIII, plazmidi pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR bili su tretirani fosfatazom kako bi se sa 5'-krajeva pocijepanih plazmida uklonili fosfati. Linearizirani defosforilirani plazmidi su potom izolirani iz agaroznog gela (poglavlje 3.2.4.). Umnožen fragment genoma bakteriofaga lambda također je pocijepan restriksijskom endonukleazom HindIII i izoliran iz agaroznog gela. Nakon toga provedena je ligacija umnoženog fragmenta genoma bakteriofaga lambda s lineariziranim defosforiliranim plazmidima, te je sa ligacijskim smjesama transformirana bakterija *E. coli*. S obzirom na to da se restriksijsko mjesto HindIII na plazmidima pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR nalazi na polilinkeru koji je smješten unutar gena  $LacZ\alpha$  (slika 2), moguća je selekcija plavo-bijelo kako bi se odabrali oni transformanti koji u plazmidu sadrže željeni fragment genoma bakteriofaga lambda. Stoga su transformanti *E. coli* selekcionirani na hranjivoj podlozi dodatkom ampicilina, X-gal i IPTG. Na opisani način dobiveni su transformanti bakterije *E. coli* od kojih je svega nekoliko bilo bijele boje, što bi moglo ukazivati da plazmid prisutan u navedenim kolonijama nosi željeni fragment genoma bakteriofaga lambda. Stoga je iz bijelih kolonija izolirana plazmidna DNA, te je provedena

gel-elektroforeza nepocijepane izolirane DNA kako bi se usporedila duljina dobivenih plazmida s duljinom plazmida pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR (slika 6). Naime, ukoliko je umnoženi fragment genoma bakteriofaga lambda uspješno kloniran u ove plazmide, njihova bi se duljina trebala gotovo udvostručiti.



**Slika 6.** Rezultat izolacije plazmidne DNA iz transformanata i usporedba izoliranih plazmida s plazmidima pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR.

1 – plazmid pRS40 coHyrR, 2 i 3 – plazmidi izolirani iz bijelih kolonija dobivenih transformacijom s ligacijskom smjesom lineariziranog plazmida pRS40 coHyrR i inserta,

4 – plazmid pRS40 coKanR, 5 – plazmid izoliran iz bijele kolonije dobivene transformacijom s ligacijskom smjesom lineariziranog plazmida pRS40 coKanR i inserta,

6 – plazmid pRS40 coNrsR, 7 – plazmid izoliran iz bijele kolonije dobivene transformacijom s ligacijskom smjesom lineariziranog plazmida pRS40 coNrsR i inserta.

Kao što je vidljivo na slici 6, plazmidi izolirani iz dobivenih transformanata jednake su veličine kao i plazmidi pRS40 coKanR, pRS40 coHyrR i pRS40 coNrsR iz čega se može zaključiti da ne sadrže željeni insert. Provedeno je detaljno pretraživanje dostupne literature o svakom pojedinom genu koji se nalazi na fragmentu DNA umnoženom iz genoma bakteriofaga lambda, te je utvrđeno da fragment sadrži gen koji kodira za peptid dug 86 aminokiselina i koji prilikom indukcije profaga ubija stanice domaćina (bakteriju *E. coli*; <https://www.uniprot.org/uniprot/P03758>, pristupljeno 20.04.2019.). Stoga je, najvjerojatnije, prisutnost ovog gena onemogućila uspješno kloniranje željenog fragmenta DNA.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Nekonvencionalni kvasci imaju izuzetan biotehnološki potencijal. Međutim, da bi se on mogao iskoristiti, potrebno je najprije razviti metode za transformaciju i preciznu genetičku modifikaciju genoma ovih kvasaca.
2. Prilikom kloniranja određenog fragmenta DNA potrebno je provesti detaljnu analizu jer je moguće da fragment nosi neki gen koji je toksičan za domaćina (bakteriju *E. coli*). U tom slučaju moguće je za kloniranje željenog fragmenta koristiti nekog drugog domaćina, npr. bakteriju *Lactococcus lactis*.

## 6. LITERATURA

- Anderson PJ, McNeil K, Watson K. 1986. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Applied and Environmental Microbiology*
- Barrabgou, R. i sur., (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315, 1709-1712.
- Bekatorou A, Psarianos C, Koutinas AA. Production of food grade yeasts. *Food Technol Biotech*, 2006, 44, 407-415.
- Blazeck, J. i sur., 2014. Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production *Nat. Commun.* 5, 3131
- Branduardi P, Smeraldi C, Porro D (2008) Metabolically engineered yeasts: 'potential' industrial applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 15: 31–40.
- Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH & Hieter P (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110: 119–122
- Clarke L i Carbon J (1980) Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* 287: 504–509
- Da Silva NA i Srikrishnan S (2012) Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 12: 197–214
- Dickinson JR. 2004. Life cycle and morphogenesis. In: Dickinson JR and Schweizer M eds. *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. London: T&F, pp. 1-19.
- Carlson M. Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species. *J. Bacteriol*, 1987, 169, 4873-4877.
- Dymond JS, Richardson SM, Coombes CE et al. (2011) Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature* 477: 471–476
- Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, Zaveri J, Algire MA, Moodie M, Montague MG, Venter JC, Smith HO & Hutchison CA 3rd (2008) One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *P Natl Acad Sci USA* 105: 20404–20409
- Grba, S. (2010) *Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Plejada d.o.o, Zagreb.
- Guldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 24: 2519–2524.
- Henderson CM, Block DE. 2014 Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*.

<https://www.uniprot.org/uniprot/P03758>, pristupljeno 20.04.2019.

- Ishtar Snoek IS and Steensma HY. Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2007, 24, 1-10.
- Klinner U, Schafer B (2004) Genetic aspects of targeted insertion mutagenesis in yeasts. *Fems Microbiology Reviews* 28: 201–223.
- Kurtzman, C.P., J.W. Fell and T. Boekhout. 2011. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th edn. Elsevier, Amsterdam (in press).
- L. Näätäsaari, B. Mistlberger, C. Ruth, T. Hajek, F.S. Hartner (2012) A. Glieder Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology
- Lee FW i Da Silva NA (1997) Improved efficiency and stability of multiple cloned gene insertions at the delta sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 339–345.
- Lucas, C. (2017) *Old Yeast-New Questions*, str. 87-116
- Martini A. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Wine Res*, 1993, 4, 165-176
- Matijašević, Z., Alačević. (1990) *Genetika mikroorganizama*, 1.izd., Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Olofsson K., Bertilsson M., Liden G., (2008) A short review on SSF – an interesting
- Pâques, F., Haber, J.E. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 349-404
- Porro D, Bianchi MM, Brambilla L et al. (1999) Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts. *Appl Environ Microbiol* 65: 4211–4215.
- Process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks (objavljeno online
- Romanos MA, Scorer CA & Clare JJ (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8: 423–488
- Sakai A, Shimizu Y & Hishinuma F (1990) Integration of heterologous genes into the chromosome of *Saccharomyces cerevisiae* using a delta sequence of yeast retrotransposon Ty. *Appl Microbiol Biotechnol* 33: 302–306
- Satyanarayana T, Kunze G (2009) *Yeast biotechnology: diversity and applications*: Springer. 151–168.
- Sherman, F. (2002) *Getting Started with Yeast*. *Methods Enzymol*, 350, 3-41
- Steensels J., Snoek T., Meersman E., Nicolino MP, Voordeckers K., Verstrepen K.J. (2014) Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity
- Suwannarangsee, S. i sur., 2010. Characterization of alcohol dehydrogenase 1 of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 497-507
- Svetec, I.K., Zgaga, Z. (2010) *Genetika kvasaca i primjena genetičkih istraživanja u oplemenjivanju industrijskih kvasaca*. U: *Kvasci u biotehnologiji* (Grba, S., ured.) Plejada d.o.o., Zagreb, str. 19-41.

Tabka MG, Gimbert I, Monod F, Sigoillot JC. 2006. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulose xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology*.

Tai, M., Stephanopoulos, G., 2013. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production, *Metab. Eng.* 15, 1-9

Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Iwai, Y.Y., Shinohara, A., Takeda, S. (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal* 17

Vogl i sur. (2013) New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris* *Curr. Opin. Biotechnol.* 24. 1094-1101

Walker, G.M. (2009) Yeasts. U: Desk encyclopedia of microbiology, 2. izd., (Schaechter, M. ured.) Elsevier Inc., Dundee, str. 1174-1189

## 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.*

Ante Mihaljević

ime i prezime studenta