Konstrukcija sojeva kvasca sa pojačanom ekspresijom odabranih gena

Djedović, Elvis

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:930728

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-06**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Elvis Djedović
7172/BT

Konstrukcija sojeva kvasca sa pojačanom ekspresijom odabranih gena

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Genetičko inženjerstvo
Mentor: doc. dr. sc. Anamarija Štafa

Zagreb, 2018.

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

Konstrukcija sojeva kvasca sa pojačanom ekspresijom odabranih gena

Elvis Djedović, 0058208065

Sažetak: Proizvodnja bioetanola na škrobnim sirovinama nije ekonomična te se javila potreba za novim, obnovljivim sirovinama poput lignocelulozних materijala. Lignocelulozne sirovine složenog su sastava, a građene su od celuloze, hemiceluloze i lignina, spojeva koje kvasac ne može metabolizirati radi čega je prvo nužno provesti predtretman, to jest hidrolizirati sirovine. Hidrolizom ne dolazi samo do oslobađanja fermentabilnih šećera nego i do nastanka slabih kiselina i derivata furana koji djeluju kao inhibitori rasta. Zbog toga je za proizvodnju bioetanola na lignocelulozним hidrolizatima potreban proizvodni soj kvasca koji daje visoki prinos etanola, ali koji je također i otporan na inhibitore rasta. U ovome radu prirodni izolat kvasca, koji proizvodi bioetanol na lignocelulozним hidrolizima, transformiran je plazmidima koji omogućuju pojačanu ekspresiju gena za koje utvrđeno da povećavaju rezistenciju na inhibitore rasta, a prisutnost plazmida potvrđena je molekularnom analizom hibridizacijom po Southern-u.

Ključne riječi: inhibitori rasta, kvasac, lignocelulozne sirovine, plazmid, transformacija
Rad sadrži: 28 stranica, 7 slika, 3 tablica, 49 literaturnih navoda
Jezik izvornika: Hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10000 Zagreb
Mentor: doc. dr. sc. Anamarija Štafa
Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Anamarija Štafa
Datum obrane: 16. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory of Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Construction of yeast strains overexpressing selected genes

Elvis Djedović, 0058208065

Abstract: The production of bioethanol on raw starch materials is not economical and there is a need for renewable raw materials such as lignocellulose. Lignocellulose is composed of complex compounds such as cellulose, hemicellulose and lignin. These compounds can not be directly metabolized by yeast. Therefore, it is first necessary to hydrolyze raw materials during pretreatment. Unfortunately, hydrolysis does not release only fermentable sugars, but it also releases weak acids and furan derivatives which act as growth inhibitors. Because of this, production of bioethanol on lignocellulosic hydrolysates requires adapted yeast strain(s). Those strains give high yields of ethanol and they are also resistant to growth inhibitors. In this thesis, a natural yeast isolate which produces bioethanol on lignocellulosic hydrolates, is transformed with plasmids, that allow overexpression of genes shown to increase resistance to growth inhibitors, and the presence of plasmids is confirmed by Southern blotting.

Keywords: growth inhibitor, yeast, lignocellulosic material, plasmid, *transformation*

Thesis contains: 28 pages, 7 figures, 3 tables, 49 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic (pdf format) version deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Assist. Prof. Anamarija Štafa, Ph.D.

Technical support and assistance: Assist. Prof. Anamarija Štafa, Ph.D.

Defence date: July 16th 2018.

1. Uvod 1
2.Teorijski dio 2
2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* 2
2.2. Transformacija kvasca i uvođenje genetičkih modifikacija 3
2.3. Upotreba kvasca *S. cerevisiae* u biotehnologiji 5
2.3.1. Proizvodnja bioetanola iz lignocelulozних sirovina 5
3. Materijali i metode 7
3.1. Materijali 7
3.1.1. Plazmidi 7
3.1.2. Mikroorganizmi 9
3.1.3. Priprema i sastav hranjivih podloga i otopina 9
3.1.3.1. Hranjive podloge 9
3.1.3.2. Otopine 10
3.2. Metode 13
3.2.1. Izolacija plazmidne DNA iz velikog volumena (MAXI prep) 13
3.2.2. Gel elektroforeza 14
3.2.3. Transformacija kvasca pomoću litijevog acetata 14
3.2.4. Izolacija genomske DNA kvasca 14
3.2.5. Hibridizacija po Southern-u 15
3.2.5.1. Obrada gela 15
3.2.5.2. Prijenos DNA sa gela na membranu 15
3.2.5.3. Predhibridizacija i hibridizacija 15
3.2.5.4. Vizualizacija hibridizacijskog signala 15
4.Rezultati i rasprava 17
4.1. Provjera strukture i restrikcijska analiza izolirane plazmida 17
4.2. Transformacija soja Zup ura 19
4.3. Provjera transformanata hibridizacijom po Southern-u 19
5. Zaključci: 23
6. Literatura 24

1. Uvod

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je mikroorganizam iz odjeljka askomiceta koji se koristi u temeljnim istraživanjima kao modelni eukariotski organizam, ali ima i veliku primjenu u klasičnoj i modernoj biotehnologiji.

Visoka cijena fosilnih goriva te klimatske promjene uzrokovane izgaranjem naftnih prerađevina, dovele su do potrebe za proizvodnjom goriva iz prirodnih izvora (Yang i Wiman, 2007). Proizvodnja bioetanola prve generacije, koristeći škrobne sirovine koje se mogu koristiti i kao hrana (Limayem i Ricke, 2012) nije etična te se proizvodnja bioetanola druge generacije temelji na korištenju široko rasprostranjenih lignocelulozних sirovina koje čine otpad u poljoprivrednoj i u drvnoj industriji. Lignocelulozne sirovine sastoje se od celuloze, hemiceluloze i lignina, spojeva koje kvasac ne može direkno metabolizirati pa je potrebno provesti predtretman sirovina kako bi se oslobodili fermentabilni šećeri. No, kao produkt predtretmana, u lignocelulozним hidrolizatima nalaze se i slabe organske kiseline i derivati furana koji imaju inhibitorno djelovanje na rast kvasaca i fermentaciju zbog čega je za proizvodnju bioetanola potrebno koristiti robustne sojeve kvasaca rezistentne na prisutne inhibitore.

U ovome radu korišten je soj Zup ura, auksotrof za uracil, derivat prototrofnog soja Zup izoliranog iz proizvodnog pogona Sladorana d.o.o. Soj Zup ura, transformiran je plazmidima koji omogućuju pojačanu ekspresiju gena *GSH1, CTA1, FLR1, YAP1, YDR541C, YML131W, ZWF1, ATR1* za koje je u literaturi navedeno da povećavaju rezistenciju kvasca na inhibitore rasta, kako bi se konstruirao soj kvasca koji je još otporniji na inhibitore rasta i primjenjiv u industriji za proizvodnju bioetanola.

2.Teorijski dio

2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* jednostanični je eukariotski mikroorganizam s heterotrofnim fermentativnim metabolizmom koji spada u carstvo *Fungi.* Jedan je od najčešće korištenih modelnih organizama za istraživanje gotovo svih procesa u eukariotskoj stanici jer brzo raste, nepatogen je, jeftin za uzgoj, a u njegov genom lagano je unijeti precizne genetičke modifikacije.

Kvasac ima stabilan haploidni i diploidni životni ciklus. Veličina stanica varira u fazama rasta od soja do soja. Diploidni sojevi kvasca sadrže lokuse *MATα* i *MAT**a*** i nemaju mogućnost promjene tipa parenja te je za njih karakteristično razmnožavanje vegetativnim pupanjem, no mogu ulaziti i u proces mejotičke diobe pri čemu iz jedne diploidne stanice nastaju četiri haploidne askospore. Haploidni sojevi kvasca mogu biti homotalični i heterotalični. Dok su sojevi izolirani iz prirodnih staništa najčešće homotalični, to jest mijenjanju tip parenja nakon svake diobe, heterotalični sojevi nemaju mogućnost promjene tipa parenja. Haploidni sojevi mogu biti **a** ili α tipa parenja, a njihova promjena omogućena je genima *HO*, *HMLα* i *HMR**a*** (Harashima i sur., 1974). Gen odgovoran za promjenu tipa parenja je *HO* koji kodira za endonukleazu koja uzrukuje dvolančane lomove u lokusu *MAT*. Dvolančani lom u lokusu *MAT* popravlja se homolognom rekombinacijom, na temelju informacije koja se nalazi u lokusima *HMLα* i *HMR**a*** koji se nalaze s uzvodno i nizvodno od lokusa *MAT.* Ako se u lokusu *MAT* nalazi sekvenca identična lokusu *HMLα,* dvolančani lom se popravlja prema lokusu *HMR**a***. Kada se u lokusu *MAT* nalazi sekvenca identična lokusu *HMR**a***, za popravak dvolančanog loma koristi se lokus *HMLα* (Haber, 2012).

U kompletnim kompleksnim podlogama (podloga YPD), generacijsko vrijeme je oko 90 minuta dok je u kemijski definiranim podlogama otprilike 140 minuta (Rose i Harrison, 1987), a na generacijsko vrijeme utječu pH vrijednost podloge, dodatak faktora rasta, temperatura i aeracija. Sojevi se kraće vrijeme mogu čuvati na krutim ili u tekućim hranjivim podlogama na 4 °C, pri čemu zadržavaju vijabilnost kroz nekoliko mjeseci, a neograničeno se mogu čuvati spremanjem u 20 % glicerol na -80 °C.

Prvi eukariotski organizam čiji je genom kompletno sekvencioniran bio je upravo kvasac *S. cerevisiae*. Haploidna stanica ima 16 kromosoma, čija se veličina kreće u rasponu od 200 do 2,200 kilobaza. Genom je veličine 12 052 kilobaza, a bioinformatičkom analizom detektiran je 6,604 otvorenih okvira čitanja koji kodiraju za proteine sa više od 100 aminokiselina. Kvaščev genom je kompaktan i približno je 78 % gena okarakterizirano u različitim eksperimentima, dok 10% genoma je nepotvrđene strukture, a 12% nije okarakterizirano (Saccharomyces

genome database). Sekvencioniranjem je otkriveno da kvasac *S. cerevisiae* sadrži 262 tRNA gena, ribosomalnu RNA kodira 120 kopija jednostruko ponavljajućeg niza koji se nalazi na kromosomu XII. Genom kvasca sadrži i transpozone i retrotranspozone koji, ovisno o soju, variraju u veličini i lokaciji u genomu, a u većini prirodnih izolata kvasca *S. cerevisiae* prisutan je i 2-μm kružni plazmid.

2.2. Transformacija kvasca i uvođenje genetičkih modifikacija

Transformacija je proces unošenja egzogene DNA u stanicu, no iako kvasac *S. cerevisiae* nije prirodno kompetentan, razvijeno je nekoliko metoda kojima se strana DNA može unijeti u stanicu, što je osnova za uvođenje ciljanih genetičkih modifikacija.

Metode koje se koriste za transformaciju kvasca *S. cerevisiae* su transformacija protoplastiranjem, transformacija pomoću litijevog acetata i elektroporacija. Jedna od prvih razvijenim metoda za transformaciju kvasca uključuje razgradnju stanične stijenke pomoću enzima zimolijaze, pri čemu nastaju protoplasti koji se moraju čuvati u izotoničnoj otopini. Nakon dodatka egzogene DNA, protoplasti se nacjepljuju u podlogu u kojoj dolazi do regeneracije stanične stijenke (Hinnen i sur., 1978). Iako rezultira visokom efikasnošću transfomacije, zbog kompleksnosti rada s protoplastima, u laboratorijima se ova se metoda najčešće ne koristi rutinski. Transformacija kvasca pomoću litijevog acetata jednostavnija je metoda koja je razvijena nakon što je otkriveno da monovalentni kationi, kao što su Na^+, K^+, Rb^+, Cs^+ i Li^+, pospješuju učinkovitost transformacije. Ovakav utjecaj monovalentnih kationa objašnjava se kaotropnim efektom, koji uzrokuje prekid interakcija između molekula vode, čime se smanjuje se hidrofobnost okoline i povećava stabilnost većih makromolekula kao što je DNA (Norcum i sur., 1991). Dokazano je i da dodatak polietilenglikola i duži temperaturni šok također povećavaju efikasnost transfomacije, a relativno jednostavan protokol može dodatno modificirati kako bi se transformirali i prirodni izolati kvasca koji, u usporedbi s laboratorijskim sojevima, teže primaju stranu DNA. Tijekom elektroporacije povećava se permeabilnost stanične stijenke i membrane jer dolazi do nastanka mikropora kroz koje DNA može ući u stanicu, a efikasnost transformacije pri elektroporaciji izrazito je visoka (Karube i sur., 1985). Bitno je naglasiti da se mnogi prirodni izolati kvasca *S. cerevisiae* teže transformiraju od laboratorijskih sojeva te je često potrebno dodatno optimizirati metodu transformacije.

Pri transformaciji koriste se selektivni biljezi koji omogućuju učinkovitu selekciju transformiranih stanica (stanica koje su primile stranu DNA). Kao selektivni biljezi koriste se geni koji ili omogućuju rezistenciju transformiranih stanica na antibiotike ili geni koji komplementiraju specifične nutritivne zahtjeve auksotrofnih mutanata tj. mutanata koji ovise

o određenoj tvari rasta (Pronk, 2002). Jedan od najčešće korištenih selektivnih biljega pri radu s kvascem je gen *URA3,* koji kodira za enzim orotidin-5'- fosfat dekarboksilazu nužan za sintezu pirimidina, a transformacijom sojevi postaju prototrofi za uracil i mogu rasti na hranjivoj podlozi koja ne sadrži uracil.

Za transformaciju kvasca koristi se nekoliko vrsta plazmidnih vektora:

I. **Yeast episomal plasmid (YEp)** su vektori koji se koriste u svrhu osnovnih istraživanja i u biotehnologiji. Učinkovitost transformacije je ovisna o stabilnosti plazmida koja je relativno mala (Romanos i sur., 1992). Ovi plazmidi sadrže ishodište replikacije iz kvaščevog plazmida *2μ* i samostalno se repliciraju u velikom broju kopija (50 do 100 po haploidnoj stanici) (Primrose i Twyman, 2006).

II. **Yeast replicating plasmids (YRp)** su vektori koji nose sekvence *ori* koja omogućuje replikaciju u bakteriji *E. coli* i regiju *ARS* (autonomna replikativna sekvenca) koji omogućuje replikaciju plazmida u stanici kvasca. Iako je efikasnost transformacije ovim plazmidima izrazito efikasna, transformanti koj sadrže ove plazmide su nestabilni jer ne dolazi do pravilne segregacije plazmida YRp u stanice kćeri (Primrose i Twyman, 2006).

III. **Yeast centromere plasmids(YCp)** su vektori koji sadrže regiju *ori*, ishodište replikacije u bakteriji *E. coli* i regije *ARS* i *CEN*. Regija *ARS* djeluje kao ishodište replikacije, dok je regija *CEN* zaslužna za pravilnu segregaciju (Huang i Kowalski, 1993). Ovi vektori su mitotički stabilni, njihova segregacija prati mendelova načela, a u stanici se nalaze u malom broju što je poželjno za ekspresiju gena čiji produkt, u većim koncetracijama, djeluje toksično na stanicu (Primrose i Twyman, 2006).

IV. **Umjetni kvaščev kromosom (YAC)** je linearni oblik vektora koji nalikuje normalnom kvaščevom kromosomu. Krajevi lineariziranih kromosoma imaju telomere koje čuvaju genetički materijal od degradacije u stanici, a nastali su kloniranjem telomera u plazmide YRp (Burke i sur., 1987). Osim telomera sadrže i regiju *ARS/CEN4*, regiju *ori*, i selektivne biljege za selekciju na hranjivim podlogama (Primrose i Twyman, 2006).

CRISPR/Cas9 nova je metoda genetičke modifikacije koja omogućuje zamjenu, deleciju, ugradnju ili translokaciju cjelokupnih dijelova kromosoma. CRISPR/Cas9 sustav potiče iz bakterija, koje ga koriste za obranu od virusne DNA uvođenjem dvolančanih lomova u odgovarajuće sekvence u virusnoj DNA. Za aktivnost CRISPR/Cas9 sustava potrebne su tri komponente: Cas9 protein, trans aktivna RNA (trRNA) i CRISPR RNA (engl. crRNA, Jinek i sur., 2012). U tipu II CRISPR metode, sustav je usklađen s djelovanjem dviju molekula tracrRNA i crRNA koje se nalaze unutar kompleksa proteina Cas9. Nakon što sekvence molekula uspostave komplementaciju sa stranom DNA, u kompleksu dolazi do aktiviranja endonukleaze

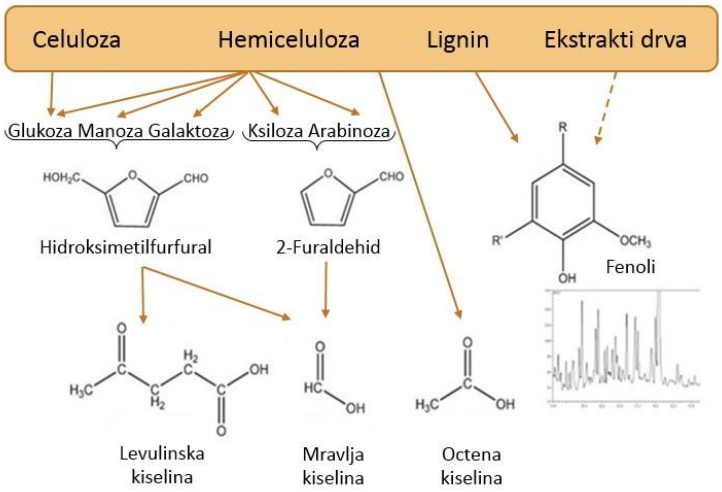
koja stvara dvolančane lomove u ciljanim regijama, a popravak endogene DNA se radi prema komplementarnoj sekvenci koju možemo proizvoljno izvesti (Charpentier i Doudna, 2013). Daljnje modifikacije CRISPR/Cas9 sustava korištenjem sgRNA (engl. single guide RNA), RNA molekule koja sadrži i crRNA i trRNA, još su povećale učinkovitost uvođenja dvolančanih lomova u ciljne regije i učinile su ovaj sustav rutinskom metodom za uvođenje ciljanih genetičkih promjena u genome različitih organizama.

2.3. Upotreba kvasca *S. cerevisiae* u biotehnologiji

Kvasci se pri obradi hrane i proizvodnji alkoholnih pića koriste već stoljećima, a danas se u biotehnologiji koriste za sintezu metabolita, rekombinantnih proteina te za *in vivo* biotransformacije. Iako je kvasac *S. cerevisiae* najčešće korišten, neke druge vrste kao na primjer *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia stipitis* i *Kluyveromyces marxianus,* provode određene bioprocese s većom efikasnošću ili izlučuju rekombinantne proteine u podlogu čime se olakšava pročišćavanje produkta i smanjuju troškovi proizvodnje (Brondyk i sur., 2009).

2.3.1. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina

Pri rastu kvasca *S. cerevisiae* na podlogama koje sadrže visoku koncentraciju jednostavnih ugljikohidrata, najčešće glukoze i saharoze, kao produkt fermentacije nastaje etanol. Kao izvor ugljikohidrata za proizvodnju bioetanola prve generacije korištene su škrobne sirovine, no zbog sve veće potrebe za hranom pojavljuje se potreba za korištenjem alternativnih izvora ugljikohidrata. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina pokazuje se kao najbolje rješenje za proizvodnju goriva iz obnovljivih izvora energije (Kullander, 2010). Lignocelulozne sirovine složenog su kemijskog sastava, sastoje se od celuloze, hemiceluloze i lignina, koje kvasac ne može direktno metabolizirati. Celulozu čine β-1,4- povezane molekule glukoze, dok hemicelulozu čine β-1,4- povezane molekule ksiloze uz prisustvo arabinoze i glukonska kiselina. S druge strane, lignin se sastoji od hidroksiliranih i metiliranih fenilpropanoida, koji su unakrsno povezani kako bi osigurali čvrstoću i hidrofobnost strukture stanične stijenke (Slika 1.). U svrhu oslobađanja fermentabilnih šećera iz lignoceluloznih sirovina koriste se različiti tipovi predtretmana, no predtretmanom se oslobađaju i pentoze, koje kvasac *S. cerevisiae* ne može metabolizirati, ali i različiti spojevi, kao što su slabe kiseline i derivati furfurala, koji djeluju kao inhibitori rasta i fermentacije (Kim i Hahn, 2013).



Slika 1. Shematski prikaz nastanka inhibitora rasta mikroorganizama prilikom obrade lignoceluloznih sirovina. Preuzeto iz Jönsson i sur., 2013.

Upravo zbog nastanka inhibitora rasta i ferementacije tijekom predtretmana lignoceluloznih sirovina, u novije vrijeme počinju se genetički modificirati proizvodni sojevi kvasca *S. cerevisiae* kako bi istovremeno koristili različite izvora ugljika, i biti što manje inhibirani prisustvom inhibitora rasta.

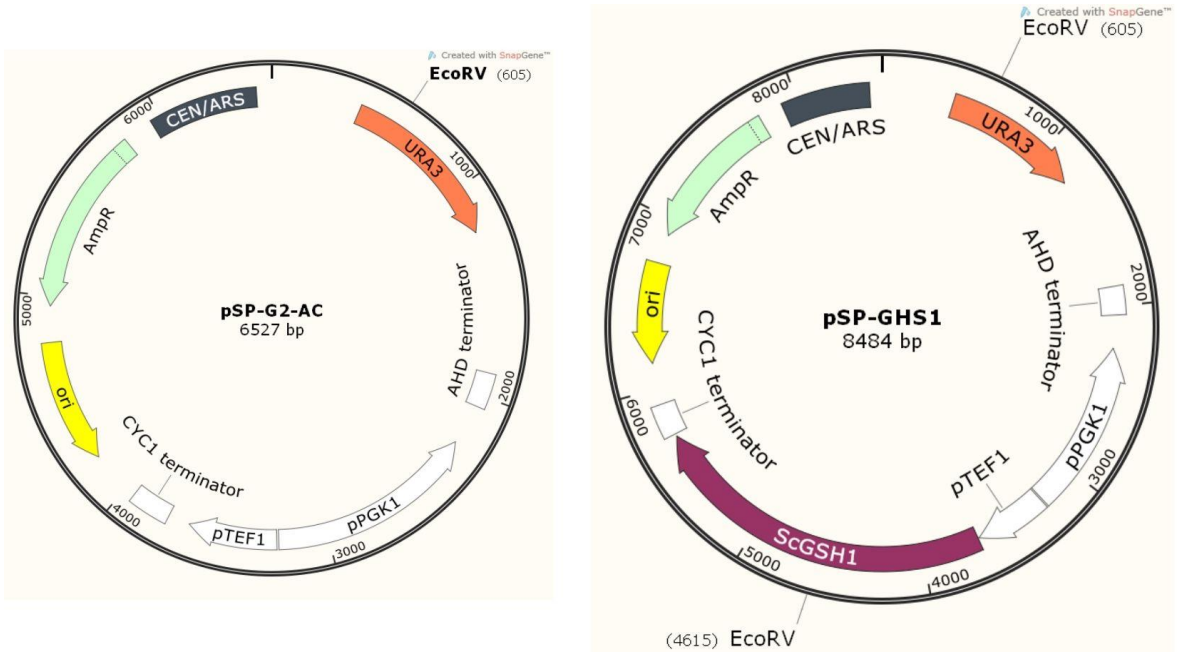
Za produkte nekih gena pokazano je da potiču rezistenciju kvasca na inhibitore rasta: gen *YAP1* kodira za transkripcijski faktor Yap1 koji kontrolira ekspresiju više od 32 gena koji sudjeluju u odgovoru stanice na oksidativni stres i vodikov peroksid (Lee i sur., 1999); geni *ATR1* i *FLR1,* kodiraju za transmembranske proteine Atr1 i Flr1, koji je dijelovi transmembranskih pumpi koja izbacuju štetne spojeve iz stanice (Kanazawa i sur., 1988); Alriksson i sur., 2010); gen *ZWF1* nosi informaciju za sintezu enzima koji sudjeluju u metaboličkom putu pentoza fosfata, bitnom za toleranciju stanica kvasca na furfurale (Gorisch, 2005); gen *GSH1* kodira za γ-glutamilcistein sintetazu i sadrži regulatorno mjesto koje je inducirano u prisutnosti oksidirajućih supstanci (Ask i sur., 2013); gen *YDR541C* koji kodira za enzim skupine ABC („ATP vezajuće kazete") proteina (Gottesman i Pastan, 1993) te enzimi iz ove skupine imaju ulogu pumpi za uklanjanje veće količine štetnih spojeva.

3. Materijali i metode

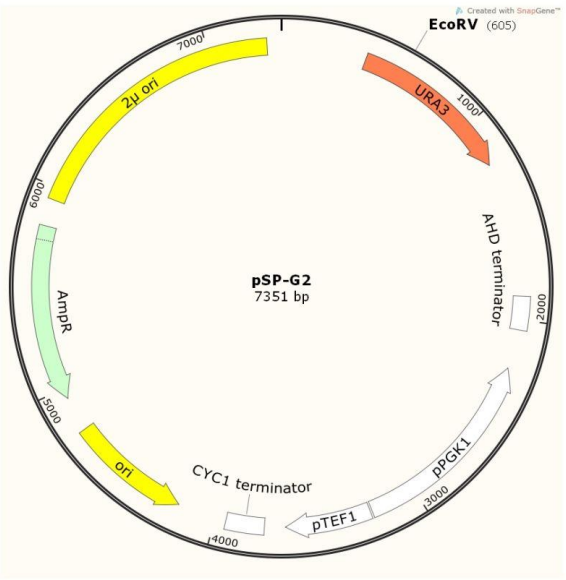
3.1. Materijali

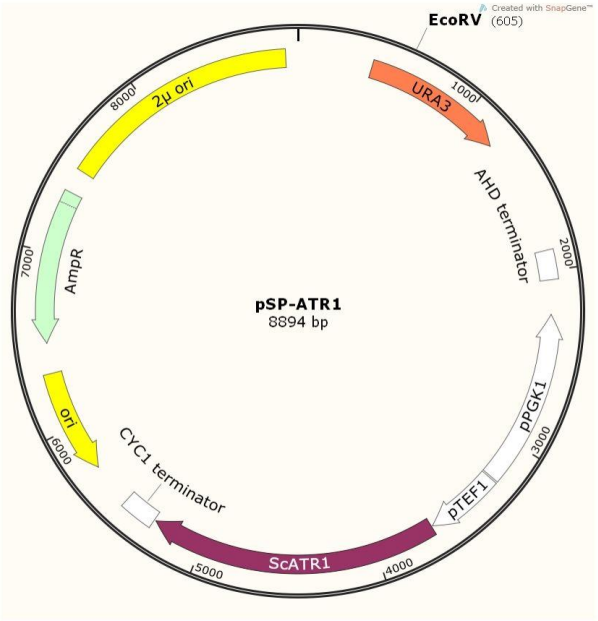
3.1.1. Plazmidi

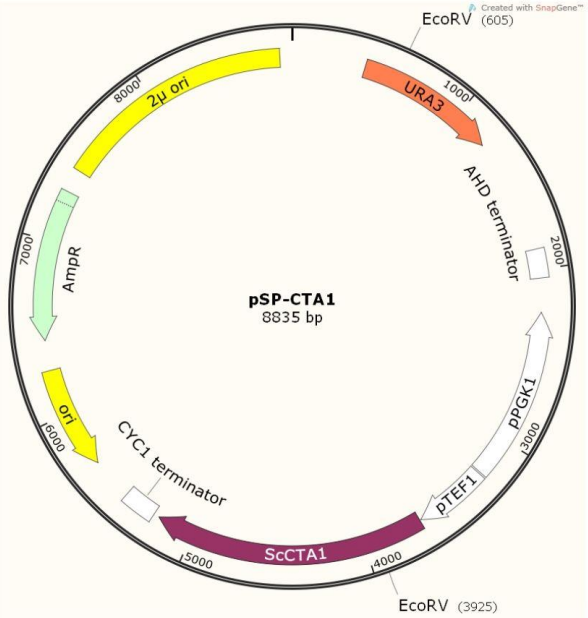
U ovome radu korišteni su plazmidi pSP-G2-AC i pSP-GSH1 (Slika 2.), pSP-CTA1, pSP-FLR1, pSP-YAP1, pSP-YDR541C, pSP-YML131W, pSP-ZWF1, pSP-G2 i pSP-ATR1 (Slika 3.) iz zbirke laboratorija. Navedeni plazmidi sadrže regiju *ori,* koja omogućuju replikaciju u bakteriji *Escherichia coli,* i gen *bla* koji kodira za enzim β-laktamazu te je odgovoran za rezistenciju transformiranih stanica bakterije *E. coli* na antibiotik ampicilin. Dodatno, svi plazmidi sadrže gen *URA3* koja omogućuje selekciju transformiranih stanica kvasca na podlogama koje ne sadrže uracil. Plazmidi pSP-G2-AC i pSP-GHS1 (Slika 2.) sadrže regiju *ARS-CEN*, koja omogućuju replikaciju i pravilnu segregaciju plazmida u stanice kćeri, dok svi ostali plazmidi sadrže *2μ* ishodište replikacije zahvaljujući kojem se plazmidi u stanicama kvasca nalaze u većem broju kopija.

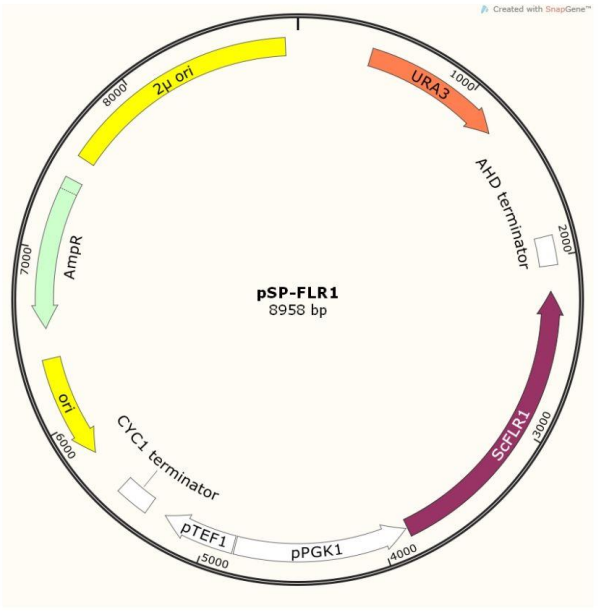


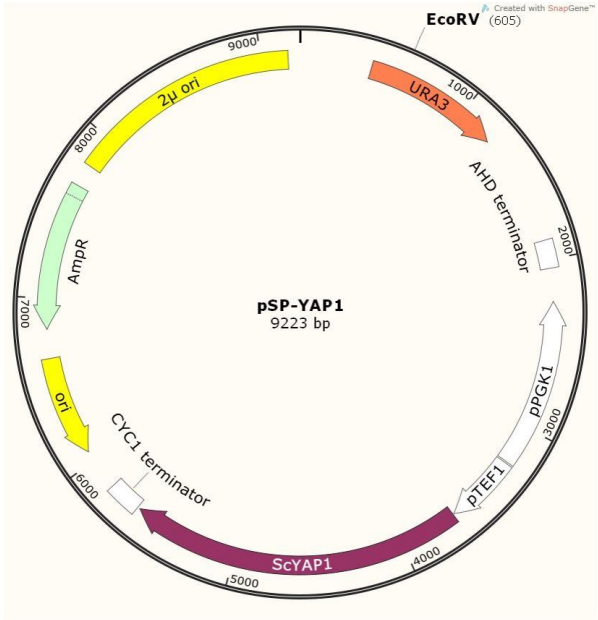
Slika 2. Mape plazmida pSP-G2-AC i pSP-ATR1 s obilježenim regijama i restrikcijskim mjestima bitnim za ovaj rad.

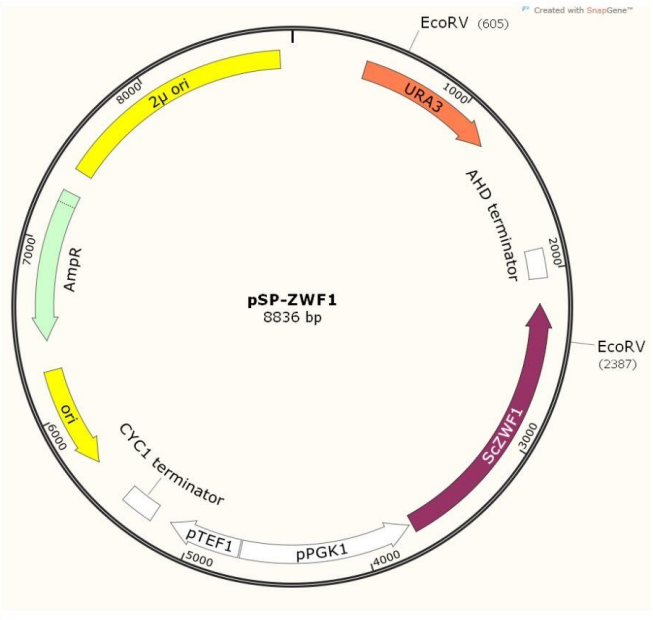

Created with SnapGene™
EcoRV (605)
2µ ori
URA3
AHD terminator
AmpR
pSP-G2
7351 bp
ori
CYC1 terminator
pPGK1
pTEF1
7000
1000
2000
3000
4000
5000
6000

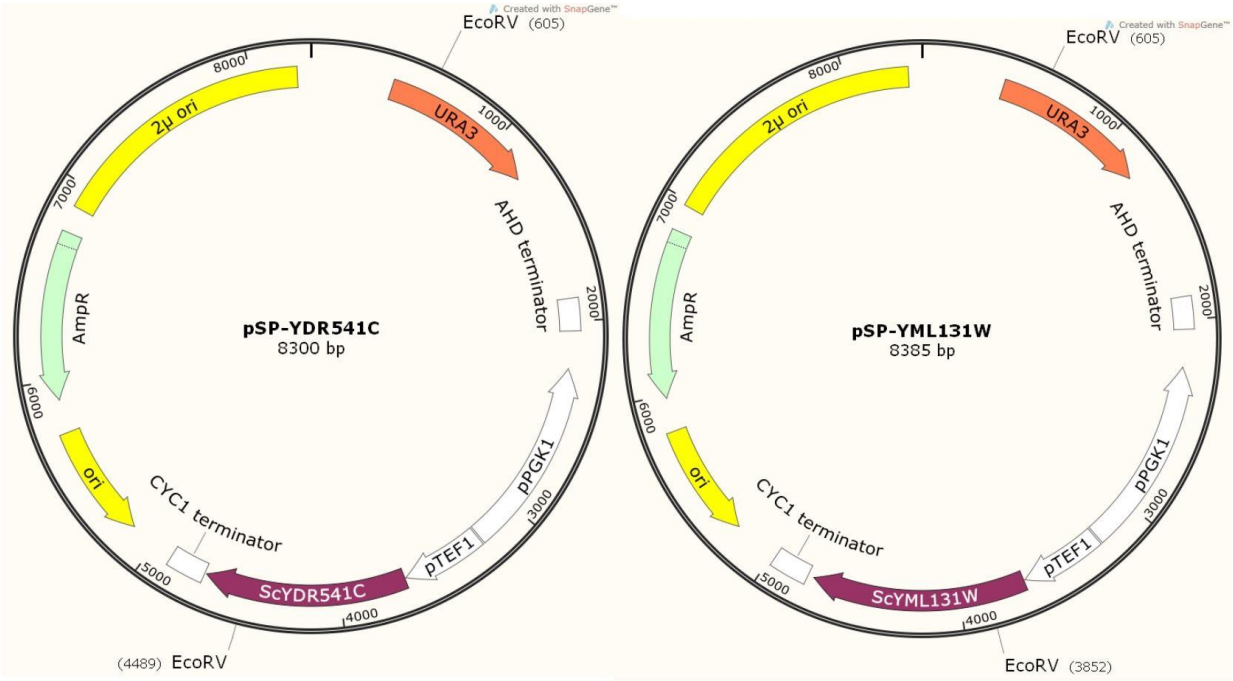

Created with SnapGene™
EcoRV (605)
2µ ori
URA3
AHD terminator
AmpR
pSP-ATR1
8894 bp
ori
CYC1 terminator
pPGK1
pTEF1
ScATR1
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000


Created with SnapGene™
EcoRV (605)
2µ ori
URA3
AHD terminator
AmpR
pSP-CTA1
8835 bp
ori
CYC1 terminator
pPGK1
pTEF1
ScCTA1
EcoRV (3925)
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000


Created with SnapGene™
EcoRV (605)
2µ ori
URA3
AHD terminator
AmpR
pSP-FLR1
8958 bp
ori
CYC1 terminator
pTEF1
pPGK1
ScFLR1
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000


Created with SnapGene™
EcoRV (605)
2µ ori
URA3
AHD terminator
AmpR
pSP-YAP1
9223 bp
ori
CYC1 terminator
pPGK1
pTEF1
ScYAP1
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000


Created with SnapGene™
EcoRV (605)
2µ ori
URA3
AHD terminator
AmpR
pSP-ZWF1
8836 bp
EcoRV
(2387)
ori
CYC1 terminator
pTEF1
pPGK1
ScZWF1
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000



Slika 3. Mape plazmida pSP-G2 i njegovih derivata s obilježenim regijama i restrikcijskim mjestima bitnim za ovaj rad.

3.1.2. Mikroorganizmi

Polazni soj kvasca (Zup) prototrof je izoliran iz pogona Sladorana d.o.o. U ovom soju su, pomoću tehnike CRISPR/Cas9, inaktivirane sve kopije gena *URA3* pri čemu je konstruiran soj Zup ura, auksotrofni mutant za uracil koji je korišten u ovom radu.

3.1.3. Priprema i sastav hranjivih podloga i otopina

3.1.3.1. Hranjive podloge

U slučaju pripreme krute hranjive podloge, nakon dodatka demineralizirane vode u podlogu se dodaje određena količina agara. Za uzgoj sojeva kvasca koristi se kompleksna podloga YPD (engl. Yeast-Peptone-Dextrose), a za uzgoj transformanata se koristi kemijski definirana hranjiva podloga bez uracila.

Sve hranjive podloge i otopine se tokom eksperimenta steriliziraju u autoklavu 15 minuta pri temperaturi od 121 °C na nadtlaku od 2 bara.

YPD podloga:

Bakto-pepton	20 g L^{-1}
Ekstrakt kvasca	10 g L^{-1}
Glukoza	20 g L^{-1}
Agar	20 g L^{-1}

Kemijski definirana podloga bez uracila:

Izvor dušika iz kvasca (ne sadrži amonijev sulfat i aminokiseline)	1,7 g L^{-1}
Amonijev sulfat	5,0 g L^{-1}
Glukoza	20,0 g L^{-1}
D.O. (praškasta smjesa aminokiselina i nukleinskih baza)	1,3 g L^{-1}
Agar	25,0 g L^{-1}

Praškasta smjesa aminokiselina i nukleinskih baza:

Adenin (hemisulfatna sol)	2,5 g
L-arginin (HCl)	1,2 g
L-asparaginska kiselina	6,0 g
L-glutaminska kiselina	6,0 g
L-histidin	1,2 g
L-leucin	3,6 g
L-lizin (mono-HCl)	1,8 g
L- metionin	1,2 g
L-fenilalanin	3,0 g
L-serin	22,5 g
L-treonin	12,0 g
L-triptofan	2,4 g
L-tirozin	1,8 g
L-valin	9,0 g

3.1.3.2. Otopine

Otopine za izolaciju plazmidne DNA

TE pufer pH=8

Tris-Cl 1 M (pH=8)	10 mM
EDTA 0,5 M (pH=8)	1 mM

NaOH (SDS)

NaOH 6 M	3,305 mL
SDS 10%	86,66 mL
Destilirana voda	do 100 mL

Otopine za gel elektroforezu

Agarozni gel (0,8%)

U ovome radu za gel elektroforezu korišten je 0,8% agarozni gel

TBE pufer (10x)

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

TBE pufer (1x)

Priprema se razrijeđivanjem TBE pufera (10x) destiliranom vodom.

Bojilo za nanošenje uzorka

Bromfenol plavo	0,03%
Ksilen cijanol FF	0,03%
Glicerol	60%
SDS	1%
EDTA 0,5 M (pH=8)	100 mM

Otopine za transformaciju

TRAFO MIX

PEG_{4000} 50 %	64 mL
LiAc 1 M pH=7,0-7,4	20 mL
Tris HCl 1 M pH=7,5	0,8 mL
EDTA 0,5 M pH=8,0	0,16 mL
Destilirana voda	do 100 mL

Otopine za restrikciju DNA

Otopine za restrikciju pripremljene su prema uputama proizvođača restrikcijskih enzima („Pharmacia Biotech", San Francisko, SAD; „New England Biolabs", Ipswich, MA, SAD).

Otopine za izolaciju genomske DNA kvasca

SCE

Sorbitol	0,2 g
Natrijev citrat	29,4 g
EDTA 0,5 M	44,66 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Zimoliaza

Zimoliaza 20- T	500 mg
Glicerol 50%	97,4 mL
Destilirana voda	do 100 mL

STE

1 M Tris HCl pH= 8,0	10 mL
0,5 M EDTA pH=8,0	10 mL
10 % SDS	5 mL
Voda	do 100 mL

Ribonukleaza A

RNAza A	10 mg/µL
1 M Tris-HCl pH=7,5	10 mM
NaCl	15 mM

Otopine za hibridizaciju po Southernu

Predhibridizacijska i hibridizacijska otopina

Digoksigeninom obilježene sonde za hibridizaciju DNA	1 g
SSC (20x)	25 mL
Natrijev-lauril sarkozin	1 mL
SDS 10 %	200 µL
Destilirana voda	do 100 mL

Otopina A

SSC (20x)	10 mL
SDS 10 %	1 mL
H_2O	do 100 mL

Otopina B

SSC (20 x)	0,5 mL
SDS (10 %)	1,0 mL
Destilirana voda	98,5 mL

Pufer 1

Tris-HCl (1 M; pH 7,4)	10 mL
NaCl (5 M)	3 mL
Destilirana voda	do 100 mL

Pufer 2

Otopanje smjese za sprječavanje nespecifičnih reakcija („blocking reagent“) u puferu 1 do koncentracije od 10 g/L.

Pufer 3

Tris-HCl (1 M; pH 9,7)	10 mL
NaCl (5 M)	2 mL
MgCl (1 M)	5 mL
Deionizirana voda	do 100 mL

Otopina za detekciju:

Pufer 3	10 mL
NBT	45 µL
X-fosfat	17,5 µL

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija plazmidne DNA iz velikog volumena (MAXI prep)

Nacjepljena je jedna kolonija, uzgojena na krutoj hranjivoj podlozi, u 15 mL tekuće podloge LB sa ampicilinom te je kultura uzgajana preko noći na 37 °C uz aeraciju. Nakon inkubacije, prekonoćnom kulturom volumena 15 mL nacjepljeno je 500 mL tekuće podloge LB koja sadrži i antibiotik ampicillin je kultura inkubirana na 37°C uz aeraciju. Kompletni uzgojeni sadržaj preliven je u kivete i centrifugiran na 5000 okretaja min^{-1} pri 4°C. Supernatant je odliven, a kivete sa talogom su stavljene u posudu sa ledom. Talog je resuspendiran u 1 mL TE pufera, inkubiran 10 minuta u ledu te resuspendiran u 5 mL otopine NaOH/SDS. Kivete su ponovno inkubirane 10 minuta u ledu je dodano 3,75 mL 3M NaAc (pH 4,8) i sadržaj je promješan okretanjem i inkubiran u ledu daljnjih 15 minuta. Uzorci su centrifugirani 25 minuta na 12000 okretaja min^{-1} te je supernatant prebačen u nove kivete. Centrifugiranje se ponavlja još dva puta nakon čega se DNA taloži dodatkom 0,6 volumena izopropanola. Uzorci se prvo inkubiraju 15 minuta na sobnoj temperature i nakon toga centrifugiraju pri 10000 okretaja/min i 25°C. Supernatant se odlije, a kivete se posuše vakum sisaljkom. Talog se zatim resuspendira sa 0,5 mL TE pufera i 2 µL RNAaze. Sadržaj se ostavi u vodenoj kupelji 15 minuta na 70 °C te se nakon toga mora ohladiti na sobnu temperaturu.

U svaku mikrokivetu dodaje se 250 µL fenola i 250 µL izoamilnog alkohola te se sadržaj snažno promiješa. Nakon centrifugiranja pri 12000 okretaja min^{-1}, gornji sloj prenese se u novu mikrokivetu te se postupak ponavlja više puta, dok se između gornjeg i donjeg sloja više ne pojavljuje bijeli proteinski talog. U zadnjem koraku, nakon prebacivanja gornjeg sloja, dodaje se 400 µL izoamilnog alkohola te se sadržaj snažno promiješa. Nakon centrifugiranja pri 12000 okretaja min^{-1}, gornji sloj prenese se u novu mikrokivetu i DNA se taloži 1/3 volumena 8 M amonijevog acetata i dvostrukim volumenom etanola i centrifugira pri 12000 okretaja/minuti. Supernatant se odlije, a talog se osuši vakum sisaljkom i otapa u 50 do 100 µL TE pufera.

3.2.2. Gel elektroforeza

Gel elektroforeza se najčešće provodi u 0,8% agaroznom gelu. Otopina agaroze pri sobnoj temperaturi je u krutom stanju pa se mora rastopiti zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici. Potpuno rastopljeni gel, ohlađen na 50 °C, izlijeva u kalupe sa češljićem kako bi se formirale jažice prilikom hlađenja. Kad se gel ohladi i skrutne, stavi se u kadicu za horizontalnu gel elektroforezu i nadopuni se TBE puferom tako da se na vrhu gela formira tanak sloj pufera.

Gel elektroforeza se provodi najčešće pri 60 V, a nakon elektroforeze DNA se vizualizira na transiluminatoru nakon bojanja etidijevim bromidom.

3.2.3. Transformacija kvasca pomoću litijevog acetata

Jedna kolonija kvasca nacjepljena je u 100 mL tekuće YPD podloge i uzgaja se do gustoće od $2{,}4 \cdot 10^7$ st mL^{-1}. Sadržaj se prenese u kivete i centrifugira 5 minuta pri 4000 okretaja min^{-1} na 22 °C. Supernatant se odlije te se talog resuspendira u 30 mL sterilne vode i ponovno centrifugira pri istim uvjetima. Supernatant se ponovno odlije i talog se resuspendira u 900 µL demineralizirane vode. Talog se ponovo resuspendira u 900 µL vode te se prebaci po 100 µL u mikrokivete. Mikrokivete se centrifugiraju 5 minuta na 3000 okretaja min^{-1} te se supernatant pažljivo ukloni. Na talog se dodaje do 10 µL plazmidne DNA i 350 µL otopine za transfomaciju (trafo mix) i smjesa se resuspendira. Sadržaj se inkubira 40 minuta na 42 °C te 40 minuta na 28 °C. Mikrokivete se centrifugiraju 3 minute pri 3000 okretaja min^{-1} na 22 °C te se supernatant ukloni. Talog se resuspendira u 300 µL tekućeg YPD-a te se kvasci inkubiraju 30 minuta na 28 °C radi oporavka. Nakon inkubacije, stanice se centrifugiraju, supernatant se uklanja, stanice se resuspendiraju u 200 µL vode i kompletan sadržaj nacjepljuje se na hranjive podloge bez uracila i inkubirati 2-3 dana pri 28 °C.

3.2.4. Izolacija genomske DNA kvasca

Transformanti se nacjepe i uzgajaju u 4 mL selektivne hranjive podloge bez uracila kroz 2 dana na tresilici pri 28°C. Kultura se centrifugira 5 minuta pri 3000 okretaja min^{-1}. Supernatant se odlije, a talog se resuspendira sa 3 mL destilirane vode te se suspenzija vorteksira. Postupak centrifugiranja se ponavlja te se talog resuspendira u 3 mL SCE pufera. Suspenzija se centrifugira 5 minuta na 3000 okretaja min^{-1} i supernatant se odlije. Talog se resuspendira u 130 µL SCE tako da ukupni volumen bude 200 µL i prebaci se u mikrokivete. Suspenziji stanica dodaje se 20 µL zimoliaze-20-T i inkubira jedan sat na 37 °C, nakon čega se dodaje 800 µL STE i sadržaj se promiješa laganim okretajima. Uzorci se inkubiraju tijekom 20 min na 70°C, a zatim se ohlade u ledu. U suspenziju se dodaje 200 µL 5 M kalijevog acetata; pH=4,8 i ostavi se minimalno 90 minuta u ledu, nakon čega se centrifugira 30 minuta pri 15000 okretaja min^{-1} na 4 °C. 970 µL supernatanta prebaci se u nove eppendorfice i DNA se talozi

dodatkom 630 µL izopropanola. Uzorci se centrifugiraju 20 minuta na 14000 okretaja min^{-1} pri 4 °C. Supernatant se odlije, talog DNA se osuši i otopi u 300 µL TE pufera u vodenoj kupelji na 70 °C. Taloženje DNA se provodi sa 8 M NH_4Ac i 96% etanolom tijekom dva sata na -20 °C nakon čega se uzorci centrifugiraju 20 minuta na 14000 okretaja min^{-1} pri 4 °C. Talog je potrebno otopiti u 50 µL TE pufera i 0,5 µL RNaze.

3.2.5. Hibridizacija po Southern-u

U ovome radu metoda hibridizacije DNA po Southern-u se provodi sa digoksigenin obilježenom probom. Proba se sintentizira pomuću kompleta kemikalija za neradioaktivno obilježavanje digoksigeninom, a hibridizacijski signal se vizualizira sa kolorimetrijskom metodom prema uputama proizvođača („Roche Applied Science")

3.2.5.1. Obrada gela

Nakon provedene gel elektroforeze, obojani gel se inkubira 30 minuta u 0,25 M HCl-u, ispere u demineraliziranoj vodi i inkubira u 1 M NH_4Ac i 0,4 M NaOH 30 minuta.

3.2.5.2. Prijenos DNA sa gela na membranu

Prijenos DNA sa gela na membranu proveden je pomoću aparature za vakuum transfer. U uređaj za vakuum transfer prvo se stavi Watman papir, pa pozitivno nabijena membrane te gel. Uključi se aparatura za vakuum transfer te se gel prelije 0,4 M NaOH. Transfer DNA sa gela na membranu traje jedan sat nakon čega je potrebno uspostaviti atmosferski tlak, ukloniti otopinu NaOH i gel ukloniti s membrane. Membrana se inkubira 15 minuta u 1 M NH_4Ac, nakon čega se DNA fiksira 30 minuta na 120 °C.

3.2.5.3. Predhibridizacija i hibridizacija

Membrana se inkubira s predhibridizacijskom otopinom na 65 °C, uz potresanje minimalno 3 sata. Hibridizacijska otopina s probom denaturira se u vrućoj vodenoj kupelji te se hladi u posudi sa ledom 5 minuta. Nakon minimalno 3 sata inkubacije, otopina za predhibridizaciju zamjeni otopinom za hibridizaciju i inkubira na 65 °C preko noći.

3.2.5.4. Vizualizacija hibridizacijskog signala

Višak probe s membrane uklanja se inkubiranjem u otopini A tijekom 5 minuta nakon čega se membrana inkubira dva puta po 30 minuta pri 65 °C u otopini B. Membrana se zatim ispere u 100 mL pufera 1 te inkubira 1 sat na sobnoj temperaturi u puferu 2. Nakon toga, membrana se inkubira 30 min u novih 15 mL pufera 2 kojem je dodano 3 µL otopine alkalne fosfataze i kompleksa antitijela i onda ispere dva puta u puferu 1. Membrana se na kraju ispere

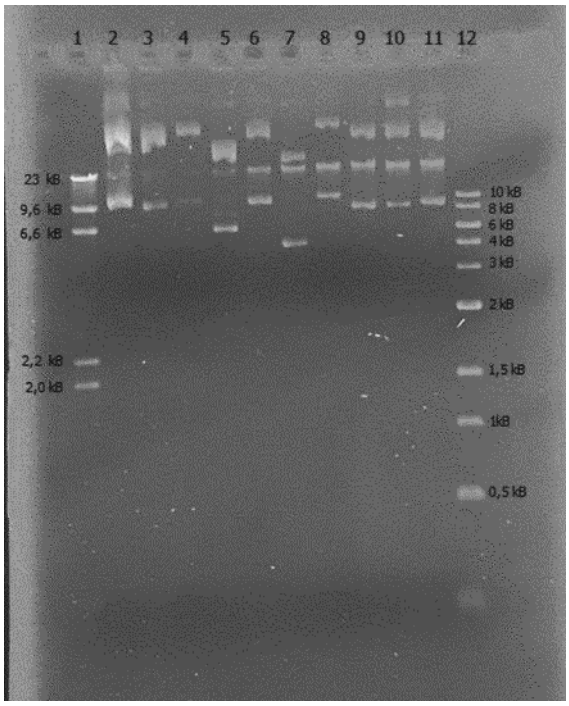
u puferu 3 i stavlja u najlonsku vrećicu sa otopinom za detekciju i inkubira u mraku na 37 °C do pojave vrpci.

4.Rezultati i rasprava

Cilj ovoga rada je bio transformirati soj kvasca Zup ura plazmidom pSP-G2 i njegovim derivatima koji nose gene *GSH1, ATR1, CTA1, FLR1, YAP1, YDR541C, YML131W* i *ZWF1* čija pojačana ekspresija pozitivno utječe na rezistenciju kvasca na inhibitore rasta prisutne u lignoceluloznim hidrolizatima (poglavlja 4.1. i 4.2). Nakon transfomacije, izolirana je DNA Ura^+ transformanata, a prisustvo plazmida potvrđeno je hibridizacijom po Southern-u (poglavlje 4.3.).

4.1. Provjera strukture i restrikcijska analiza izolirane plazmida

Prije transformacije bilo je potrebno provjeriti strukturu plazmida (Slike 2 i 3), koji će biti korišteni za transformaciju kvasca Zup ura. Nakon izolacije, provedena je gel elektroforeza kružnih plazmida (Slika 4).



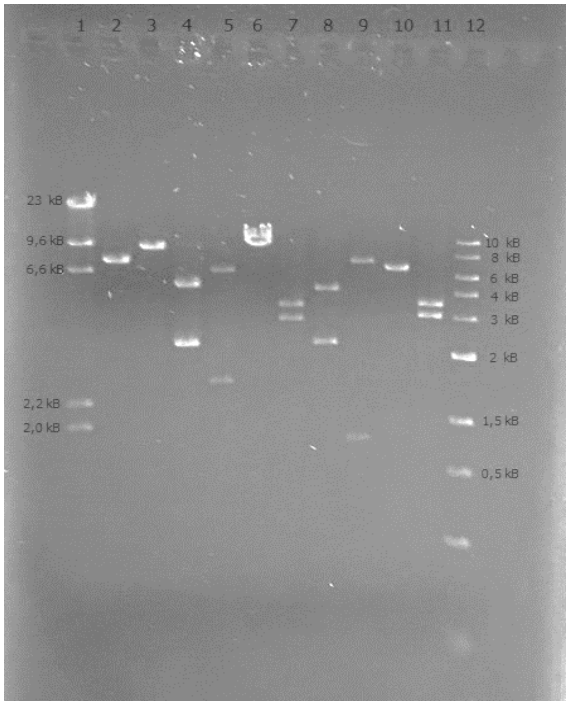
Slika 4. Provjera izolacije plazmidne DNA. Jažica 1-DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII; 2- plazmid pSP-G2, 3- plazmid pSP-ATR1, 4- plazmid pSP-CTA1, 5- plazmid pSP-FLR1, 6- plazmid pSP-YAP1, 7- plazmid pSP-YDR541C, 8- plazmid pSP-YML121W, 9- plazmid pSP-ZWF1, 10- plazmid pSP-G2-AC, 11- plazmid pSP-GSH1, 12- NEB 1 kB marker.

U svim jažicima vidljivo je nekoliko vrpci čime je potvrđeno da je DNA uspješno izolirana. Gornje vrpce prestavljaju plazmidnu DNA u obliku otvorenog kruga, srednje lineariziranu DNA, dok donje vrpce predstavljaju superzavijenu plazmidnu DNA koja najbrže putuje kroz agarozni gel.

Kako bi se provjerila struktura izoliranih plazmida, DNA je pocijepana restrikcijskom endonukleazom EcoRV, očekivane veličine fragmenata DNA prikazane su u tablici 1, a rezultati gel elektroforeze na slici 5.

Tablica 1. Očekivane veličine fragmenata nastalih cijepanjem plazmida restrikcijskom endonukleazom EcoRV.

Plazmid	Veličina fragmenata (pb)
pSP-G2	7351
pSP-ATR1	8894
pSP-CTA1	5515, 3320
pSP-FLR1	6386, 2572
pSP-YAP1	9223
pSP-YDR541C	4416, 3884
pSP-YML121W	3247, 5138
pSP-ZWF1	7054, 1782
pSP-G2-AC	6527
pSP-GSH1	4474, 4010



Slika 5. Restrikcijska analiza plazmida. Jažica 1-DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII; 2- plazmid pSP-G2, 3- plazmid pSP-ATR1, 4- plazmid pSP-CTA1, 5- plazmid pSP-FLR1, 6- plazmid pSP-YAP1, 7- plazmid pSP-YDR541C, 8- plazmid pSP-YML121W, 9- plazmid pSP-ZWF1, 10- plazmid pSP-G2-AC, 11- plazmid pSP-GSH1, 12- NEB 1 kB marker.

Plazmide pSP-G2, pSP-ATR1, pSP-YAP1 i pSP-G2-AC, koji se nalaze u drugoj, trećoj, šestoj i desetoj jažici, restrikcijska endonukleaza EcoRV cijepa samo na jednom mjestu i

nastaje jedan fragment. Plazmide pSP-CTA1, pSP-FLR1 pSP-YDR541C, pSP-YML121W, pSP-ZWF1 i pSP-GSH1, koji se nalaze u jažicama četiri, pet, sedam, osam, devet i jedanaest restrikcijska endonukleaza EcoRV cijepa na dva mjesta te se očekuju dvije vrpce. Veličine fragmenata nastalih cijepanjem plazmida endonukleazom EcoRV (Slika 5), odgovoraju očekivanim (Tablica 1) čime je potvrđena njihova struktura.

4.2. Transformacija soja Zup ura

Soj Zup ura, auksotrofni mutant ovisan o uracilu, transformiran je plazmidima pSP-G2-AC, pSP-GSH1, pSP-CTA1, pSP-FLR1, pSP-YAP1, pSP-YDR541C, pSP-YML131W, pSP-ZWF1, pSP-G2 i pSP-ATR1 prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.3., a transfomanti su selekcionirani kao uracil prototrofi. U (Tablica 2) navedena je količina DNA korištena za transformaciju kvasca Zup ura i broj dobivenih transformanata.

Tablica 2. Broj transformanata dobiven transformacijom soja Zup ura replikativnim plazmidima.

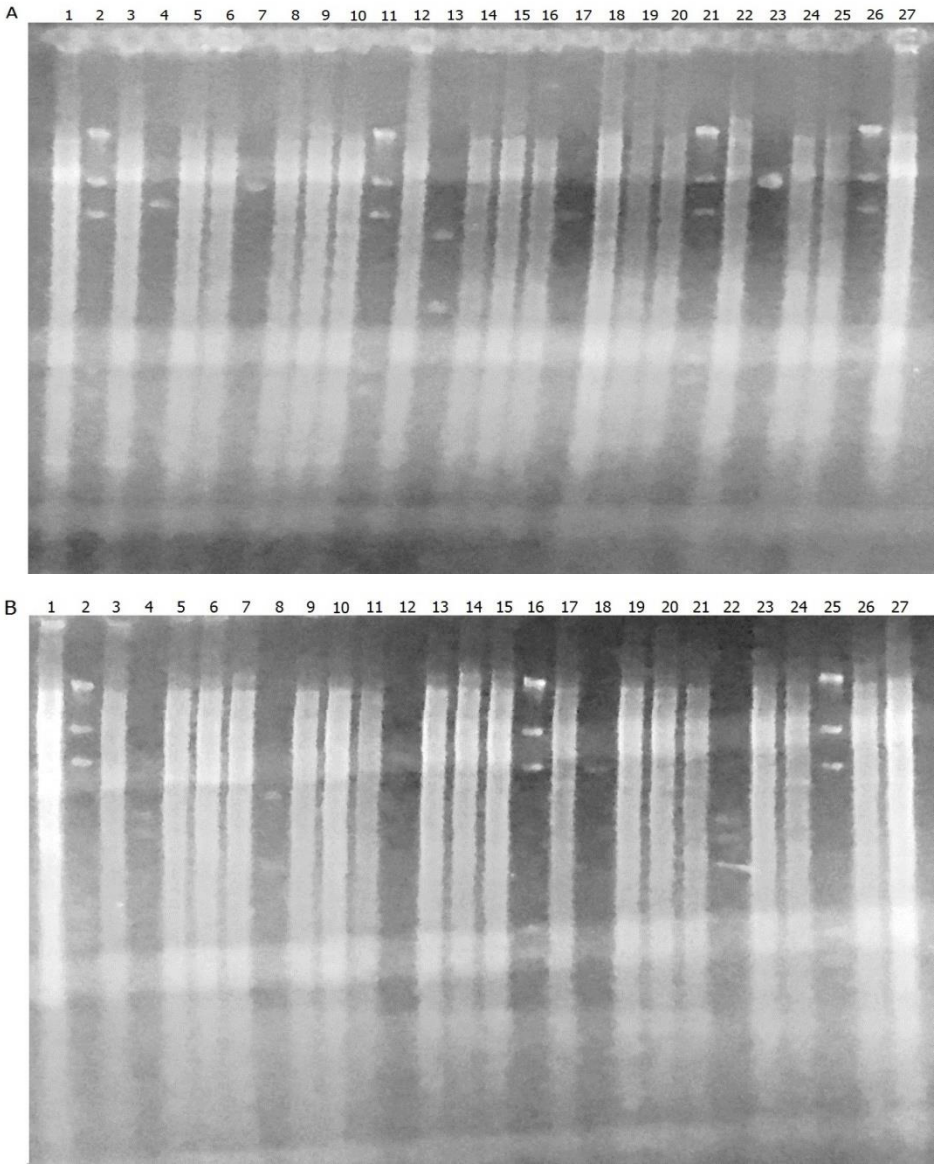
Plazmid	**Masa plazmidne DNA (ng)**	
	200	**1000**
pSP-G2	17	2242
pSP-ATR1	23	635
pSP-CTA1	44	4351
pSP-FLR1	262	693
pSP-YAP1	73	425
pSP-YDR541C	6	15
pSP-YML121W	99	1739
pSP-ZWF1	45	2261
pSP-G2-AC	96	743
pSP-GSH1	1108	4873

Dobiveni su transformanti sa svih 10 različitih plazmida (Tablica 2), no može se uočiti da broj transformanata varira ovisno o vrsti plazmida, iako su za transfomaciju korištene približno jednake količine DNA. Ovakav rezultat može se objasniti i funkcijom pojedinačnih gena. Naime, gen *GSH1* kodira za γ-glutamilcistein sintetazu (poglavlje 2.3.1.), nakupljanje glutationa pokazuje se kao najefikasnija metoda zaštite stanice od oksidativnog stresa (Tablica 2).

4.3. Provjera transformanata hibridizacijom po Southern-u

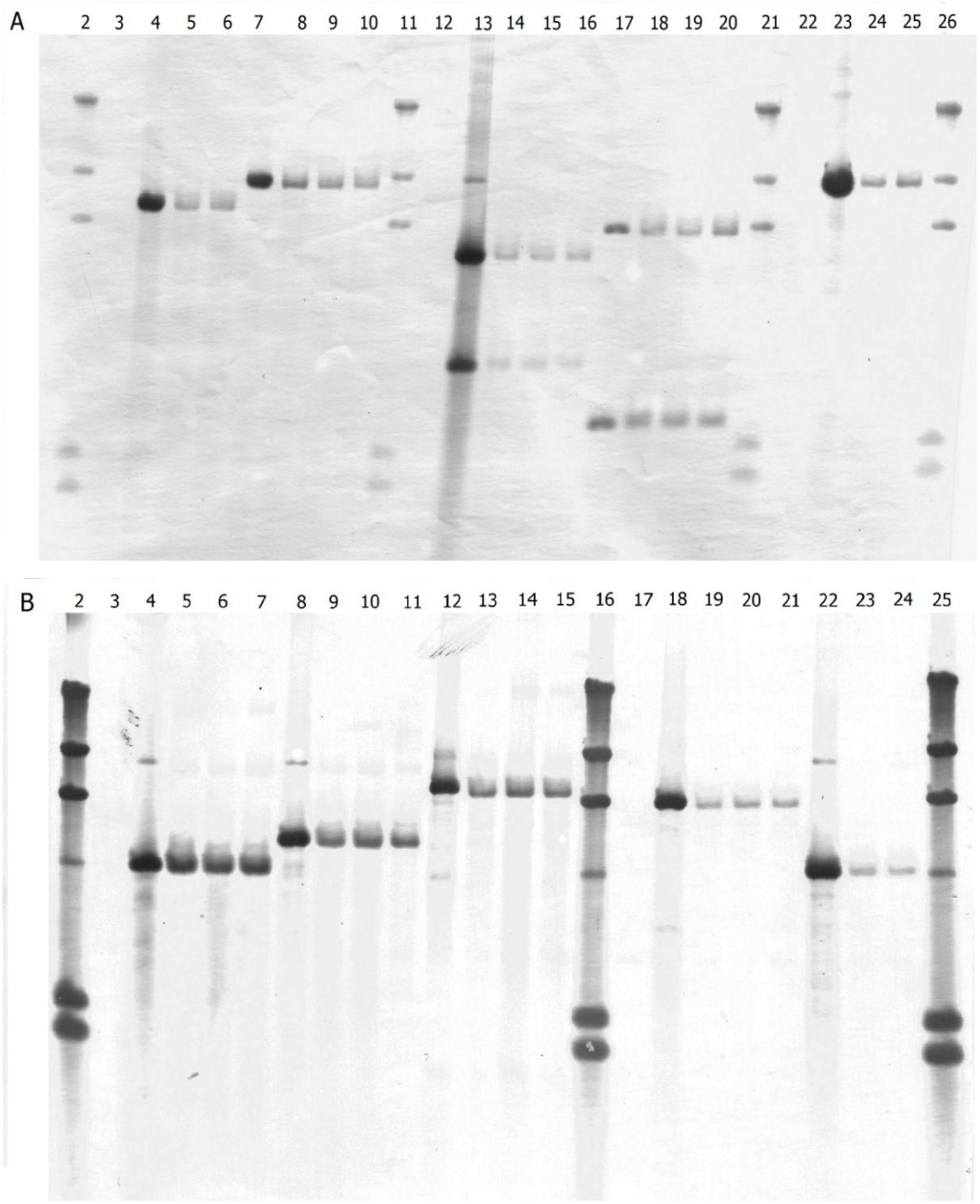
Kako bi se potvrdilo prisustvo replikativnih plazmida u transformantima fenotipa Ura^+, izolirana je cjelokupna genomska DNA, a kao kontrole korištene su genomska DNA soja Zup, izoliranog iz pogona Sladorana d.o.o. Županja, netransfomiranog soja Zup ura i plazmidi izolirani iz bakterije *E. coli.* Nakon izolacije, DNA je pocijepana restrikcijskom endonukleazom

EcoRV, koja je prethodno i korištena za provjeru strukture plazmida prije transformacije (poglavlje 4.1.), a rezultati gel elektroforeze prikazani su na slici 6.



Slika 6. Gel elektroforeza genomske DNA transformanata, netransfomiranog soja i plazmida izoliranih iz bakterije *E. coli*. Gel **A**: jažica 1–genomska DNA soja Zup; 2, 11, 21 i 26–DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII; 3, 12, 22 i 27– genomska DNA kvasca Zup ura; 4 – plazmid pSP-G2 izoliran iz bakterije *E. coli i* 5, 6 – genomska DNA transformanata; 7- plazmid pSP-ATR1 izoliran iz bakterije *E. coli* i 8 ,9, 10– genomska DNA transformanata; 13 – plazmid pSP-CTA1 izoliran iz bakterije *E. coli* i 14, 15 i 16 - genomska DNA transformanata; 17 – plazmid pSP-FLR1 izoliran iz bakterije *E. coli* i 18, 19, 20 – genomska DNA transformanata; 23- plazmid pSP-YAP1 izoliran iz bakterije *E. coli*;I 24, 25 – genomska DNA transformanata. Gel **B**: 1 i 27–genomska DNA soja Zup; jažice 2, 16 i 25–DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII; 3, 17 i 26– genomska DNA kvasca Zup ura; 4 – plazmid pSP- YDR541C izoliran iz bakterije *E. coli i* 5, 6, 7 – genomska DNA transformanata; 8- plazmid pSP- YML121W izoliran iz bakterije *E. coli* i 9 ,10, 11– genomska DNA transformanata; 12 – plazmid pSP- pSP-ZWF1 izoliran iz bakterije *E. coli* i 13, 14, 15 - genomska DNA transformanata; 18 – plazmid pSP-G2-AC izoliran iz bakterije *E. coli* i 19, 20, 21 – genomska DNA transformanata; 22- plazmid pSP-GSH1 izoliran iz bakterije *E. coli* i 23, 24 – genomska DNA transformanata. Izolirana DNA pocijepana je restrikcijskom endonukleazom EcoRV.

Na slici 6. može se uočiti da je uspješno izolirana DNA, ali nije moguće vidjeti plazmidnu DNA u uzorcima izoliranim iz Ura$^+$ transformanata. Upravo zbog toga bilo je potrebno napraviti hibridizaciju po Southern-u pri čemu je plazmidna okosnica, koja sadrži regije *ori* i *bla*, korištena kao digoksigeninom obilježena proba za hibridizaciju (poglavlje 3.2.4., Slika 7).



Slika 7. Molekularna analiza transformanata. Membrana **A**: jažice 2, 11, 21 i 26–DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII; 3, 12, 22 i 27– genomska DNA kvasca Zup ura; 4 – plazmid pSP-G2 izoliran iz bakterije *E. coli i* 5, 6 – genomska DNA transformanata; 7- plazmid pSP-ATR1 izoliran iz bakterije *E. coli* i 8 ,9, 10– genomska DNA transformanata; 13 – plazmid pSP-CTA1 izoliran iz bakterije *E. coli* i 14, 15 i 16 - genomska DNA transformanata; 17 – plazmid pSP-FLR1 izoliran iz bakterije *E. coli* i 18, 19, 20 – genomska DNA transformanata; 23- plazmid pSP-YAP1 izoliran iz bakterije *E. coli*;I 24, 25 – genomska DNA transformanata. Membrana **B**: jažice 2, 16 i 25 –DNA bakteriofaga λ pocijepana endonukleazom HindIII; 3, 17 i 26– genomska DNA kvasca Zup ura; 4 – plazmid pSP- YDR541C izoliran iz bakterije *E. coli i* 5, 6, 7 – genomska DNA transformanata; 8- plazmid pSP- YML121W izoliran iz

bakterije *E. coli* i 9 ,10, 11– genomska DNA transformanata; 12 – plazmid pSP- pSP-ZWF1 izoliran iz bakterije *E. coli* i 13, 14, 15 - genomska DNA transformanata; 18 – plazmid pSP-G2-AC izoliran iz bakterije *E. coli* i 19, 20, 21 – genomska DNA transformanata; 22- plazmid pSP- GSH1 izoliran iz bakterije *E. coli* i 23, 24 – genomska DNA transformanata. Izolirana DNA pocijepana je restrikcijskom endonukleazom EcoRV, a kao DIG obilježena proba korištena je plazmidna okosnica s regijama *ori* i *bla*.

Iz rezultata hibridizacije po Southern-u (Slika 7) može se uočiti da je se hibridizacijski signal pojavio u svim uzorcima, osim u netransformiranom soju kvasca Zup, što je u skladu s očekivanjima. Dodatno, hibridizacija po Southern-u izrazito je osjetljiva metoda, koja se može koristiti i za dokazivanje prisustva plazmida koji se u stanici nalazi u samo nekoliko kopija.

5. Zaključci:

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Soj kvasca Zup ura može se uspješno transformirati metodom pomoću litijevog acetata.

2. Broj transformanata dobivenih transformacijom plazmidima koji sadrže istu plazmidnu okosnicu, a razlikuju se samo u genu koji se pojačano eksprimira, osim o masi plazmidne DNA ovisi i o funkciji produkta određenog gena.

3. Hibridizacija po Southern-u pouzdana je i osjetljiva metoda za potvrdu prisustva replikativnih plazmida nakon transformacije kvasca.

6. Literatura

Alriksson B., Sárvári Horváth I., Jönsson L. J. (2010) Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor and multridrug resistance genes conveys enhanced resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Process Biochemistry* **45**, 264-271.

Ask M., Mapelli V., Höck H., Olsson L., Bettiga M. (2013) Engineering glutathione biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* increases robustness to inhibitors in pretreated lignocelullosic materials. *Microbial Cell Factories* **12**, 87-96.

Beall D. S., Ohta K., Ingram L. O. (1991) Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **38:**296-303.

Beggs J. D. (1978) Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* **257**:104-108.

Branduardi P., Longo V., Berterame N. M., Rossi G., Porro D. (2013) A novel pathway to produce butanol and isobutanol in *Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology for Biofuels* **6**:68.

Brondyk W. H. (2009) Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. *Methods in Enzymology* **463**: 131–147.

Bolivar F., Backman K. (1979) Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods in Enzymology* **68**:245–267.

Bolotin A., Quinquism B., Sorokin A., Ehrlich S. D. (2005) Clustered regularly interspaced short palindorme repeats (CRISPRs) have spacers of extra chromosomal origin. *Microbiology Society Journals* **151**, 2551-2561.

Bonnefoy N., Fox T. (2002) Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria *Methods in Enymology* **350**, 97-111.

Broach J. R., Jones E. W., Pringle J. R. (1991) The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics, 10. Izd., Cold Spring, Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Bortesi L., Fischer R. (2015) The CRISPR system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances* **33**, 41-52.

Boopathy R., Bokang H., Daniels L. (1993) Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **11:**147-150.

Burke D. T., Carle G. F., Olson M. V. (1987) Cloning of large segmets of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236**, 806 -13.

Charpentier E., Doudna J. A. (2013) Rewriting a genome, *Nature* **495**, 50-51.

Cho R. J., Cambell M. J., Winzeler E. A., Steinmetz L., Conway A., Wodicka L., Wolfsberg T. G., Gabrielian A. E., Landsman D., Lockhart D. J., Davis R. W.(1898) A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Molecular Cell* **2**, 65

Chundawat S. P. S., Beckham G. T., Himmel M. E., Dale B. E. (2011) Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Review Chemical and Biomolecular Engineering* **2** (6.1-6.25).

Daehee Kim, Ji-Sook Hahn (2013) Roles of the Yap1 Transcription Factor and Antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*'s Tolerance to Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural, Which Function as Thiol-Reactive Electrophiles Generationg Oxidative Stress. *Applied and Enviromental Microbiology* **79**, 5069-5077

Delgenes J. P., Moletta R., Navarro J. M. (1996) Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme Microbial Technology* **19:**220-225.

Delorme E. (1989) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Applied and Enviromental Microbiology* **55**; 2242-6.

Feng Z., Zhang B., Ding W., Liu X., Yangm L. Y., Wei P. i sur. (2013) Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research* **23**, 1229-1232.

Fu Y., Sanderm J. D., Reyon D., Cascio V. M., Joung J. K. (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using tuncated guide RNAs. *Nature Biotechnology* **32**: 279-284.

Gietz R. D., Woods R. A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology* **350**:87-96.

Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S. G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546.

Gorisch S. W., Dien B. S., Nichols N. N., Slininger P. J., Liu Z. L., Skory C. D. (2005) Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes *ZWF1*, *GND1*, *RPE1*, and *TKL1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Enviromental Microbiology* **71**: 339-349.

Gottesman M. M., Pastan I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review Chemical and Biomolecular Engineering* **62**: 385–427

Guthrie C., Fink G. R. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology* (Academic Press, San Diego)**194**: 1–932.

Haber J. E. (2012) Mating-Type Genes and *MAT* Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**: 33-64

Harashima S., Nogi Y., Oshima Y. (1974) The genetic system controlling homothallism in Saccharomyces yeasts. *Genetics* **77**: 639-650.

Hinnen A., Hicks J. B., Fink G. R. (1978) Transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **75**: 1929-1933.

Huang R. Y., Kowalski D. (1993) A DNA Unwindind element and an ARS consensus comprise a replication origin within a yeast chromosome. *The EMBO Journal* **12**: 4521-31.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821.

Jönsson L. J., Alriksson B., Nilvebrant N. O. (2013) Bioconversion of lignocelullose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels* **6**: 16-25.

Kanazawa S., Driscoll M., Struhl K. (1988) *ATR1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Molecular and Cellular Biology* **8**: 664-673.

Karube I., Tamiya E., Matsuoka H. (1985) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts by high electric pulse. *FEBS Letters* **182**: 90-94.

Kullander S. (2010) Food Security: crops for people not for cars. *Ambio* **39**: 249-256

Kurtz J. E., Exinger F., Erbs P., Lund. R. (1999) New insights into pyrimidine salvage pathway of *Saccharomyces cerevisiae. Current Opinion in genetics & development* **36**: 130-6

Larsson S., Reimann A., Nilvebrant N. O., Jönsson L. J. (1999) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **77-79**: 91–103.

Lee J., Gordon C., Lagniel G., Spector D., Garin J., Labarre J., Toledano M. B. (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 16040-16046

Limayem A., Ricke S. C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspective, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* **38**: 449-467.

Norcum M.T. (1991) Structural analysis of the high molecular mass aminoacyl-tRNA synthetase complex. Effects of neutral salts and detergents. *The Journal of Biological Chemistry* **266** :15398-405

Pooja N. S., Sajeev M. S., Jeeva M. L., Padmaja G. (2018) Bioethanol production from microwave-assisted acid or alkali-pretreated agricultural residues of cassava using separate hydrolysis and fermentation (SHF). *Biotechology of Biofuels* **8**: 69-10.

Romanos M. A., Scorer C. A., Clare J. J. (1992) Foreign gene expression in yeast: *a review. Yeast* **8**: 423–488.

Sambrook J., Russel D. W. (2001) Molecular cloning: A Laboratory manual, 3. Izd., Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York.

Primrose S. B., Twyman R. (2006) Priciples of Gene Manipulation and Genomics, 7. Izd., Wiley-Blackwell, Oxford.

Tamarin R. H. (2001) Principles of genetics, 7. Izd., McGraw-Hill Publishers, New York.

Wellman A. M., Stewart G. G. (1973) Storage of brewing yeasts by liquid nitrogen refrigerator *Applied Microbiol*ogy **26**: 577-83.

White J. (1954) Yeast technology, 1. Izd, J. Wiley and Sons Inc., New York.

Wheals A. E., Rose A. H., Harrison J. S. (1987) The Yeast Vol. 1, Biology of yeasts, 2 izd.*, Academic Press, New York* , str. **283**.

Yang B., Wyman C. E. (2008) Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol, *Biofuels Bioproducts Biorefining*, **2**, 26-40

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

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.

Elvis Đaković

ime i prezime studenta