

Uporaba lančane reakcije polimerazom u sintezi fragmenta DNA za inaktivaciju kvašćevog gena YKU70

Potkonjak, Leo

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:230236>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



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

Leo Potkonjak
0058217505

**Uporaba lančane reakcije polimerazom u sintezi
fragmenta DNA za inaktivaciju kvašćevog gena *YKU70***

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Genetičko inženjerstvo

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

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Uporaba lančane reakcije polimerazom u sintezi fragmenta DNA za inaktivaciju kvašćevog
gena *YKU70*

Leo Potkonjak, 0058217505

Sažetak:

Cilj rada bila je sinteza disrupcijske kazete za izbacivanje gena *YKU70* iz genoma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* homolognom rekombinacijom. Nakon izolacije genomske DNA određenog soja tog kvasca, kazeta je sintetizirana umnažanjem sekvence *yku70::KanMX4* pomoću lančane reakcije polimerazom. Uspješnost umnažanja potvrđena je restrikcijskom analizom produkta i gel elektroforezom.

Ključne riječi: PCR, *Saccharomyces cerevisiae*, homologna rekombinacija, zamjena gena, restrikcijska analiza

Rad sadrži: 24 stranice, 7 slika, 1 tablicu, 17 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

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

Datum obrane: 7. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Using the Polymerase Chain Reaction to Synthesise a DNA Fragment Capable of Inactivating
the *YKU70* Gene

Leo Potkonjak, 0058217505

Abstract: The objective of this project was the synthesis of a specific DNA fragment which can be used to replace the *YKU70* gene in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* by means of homologous recombination. After isolating the DNA of a specific strain of this yeast, the fragment was synthesised by amplifying the *yku70::KanMX4* sequence using the polymerase chain reaction. The success of the amplification was confirmed by restriction analysis and gel electrophoresis.

Keywords: PCR, *Saccharomyces cerevisiae*, homologous recombination, gene replacement, restriction analysis

Thesis contains: 24 pages, 7 figures, 1 table, 17 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Ivan-Krešimir Svetec, PhD, Associate Professor

Technical support and assistance: Marina Svetec Miklenić, PhD

Thesis defended: July 7, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Lančana reakcija polimerazom	2
2.2. Primjena PCR-a za kvantitativnu analizu	6
2.3. Preparativna primjena PCR-a	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. Materijali.....	10
3.1.1. Mikroorganizam.....	10
3.1.2. Hranjive podloge.....	10
3.1.3. Otopine.....	11
3.1.4. Oligonukleotidi	12
3.1.5. Restriksijski enzimi	13
3.1.6. Kemikalije i enzimi.....	13
3.2. Metode	14
3.2.1. Uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
3.2.2. Izolacija DNA iz kulture kvasca u tekućoj hranjivoj podlozi.....	14
3.2.3. Elektroforeza na agaroznom gelu	15
3.2.4. Lančana reakcija polimerazom	15
3.2.5. Cijepanje DNA restriksijskim enzimima.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Izolacija DNA iz kulture kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
4.2. Umnažanje sekvence DNA lančanom reakcijom polimerazom	19
4.3. Restriksijska analiza disrupcijske kazete <i>yku70::KanMX4</i>	21
5. ZAKLJUČAK	22
6. POPIS LITERATURE	23

1. UVOD

Lančana reakcija polimerazom (*eng. Polymerase chain reaction*, PCR) relativno je jednostavna i pouzdana metoda umnažanja određene sekvence DNA. Za provedbu reakcije potrebno je poznavanje slijeda nukleotida i duljine željene sekvence, odnosno amplikona. Reakcijska otopina sadrži DNA kalup iz kojeg se željena sekvenca umnaža, dvije početnice (*eng. primer*), termorezistentnu DNA polimerazu i sva četiri deoksiribonukleotida (deoksiadenozin, deoksigvanozin, deoksicitidin i deoksitimidin trifosfati) otopljeni u deioniziranoj vodi te pufer za polimerazu. Sama reakcija sastoji se od najčešće trideset ciklusa tijekom kojih se zahvaljujući promjenama temperature izmjenjuju koraci denaturacije DNA, hibridizacije početnica i sinteze DNA. Promjene temperature postižu se uporabom uređaja za PCR (*eng. Thermocycler*), a točne temperature i duljina trajanja pojedinih koraka u jednom ciklusu PCR-a ovise o duljini amplikona, duljini i redosljedu nukleotida početnica te o svojstvima odabrane DNA polimeraze. Termorezistentne polimeraze koje se koriste pri provedbi metode PCR međusobno se razlikuju po brzini polimerizacije i vjernosti sinteze DNA. Najčešće se koristi *Taq* polimeraza (Garibyan i Avashia, 2013).

Produkte lančane reakcije polimeraze moguće je analizirati kako bi se utvrdila prisutnost neke sekvence u uzorku pa se PCR koristi u dijagnostici za detekciju genetičkog materijala patogena ili u forenzici za identifikaciju DNA nepoznatog podrijetla, često i u sklopu neke od metoda za detekciju polimorfizama DNA poput VNTR (*eng. variable number of tandem repeats*) i AFLP (*eng. amplified fragment length polymorphism*). Dodatkom oligonukleotidnih sonda u reakcijsku otopinu moguće je metodom kvalitativne PCR (qPCR) odrediti početan broj kalupa DNA u uzorku (Heid i sur., 1996). Osim analitičke, standardna metoda PCR ima i značajnu preparativnu primjenu, a uporabom specifičnih početnica moguće je metodom PCR provesti *in-vitro* mutagenezu ili uvesti određene sekvence na rubove amplikona.

Za potrebe ovoga rada metoda PCR je korištena za umnažanje lokusa *YKU70* iz genoma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u kojem je kodirajući dio gena *YKU70* zamijenjen sekvencom KanMX4, odnosno sekvence *yku70::KanMX4*. Umnoženi fragment DNA se može koristiti kao disrupcijska kazeta za zamjenu kodirajuće DNA ciljanog gena *YKU70* selektivnim biljekom KanMX4 u genomu kvasca, te selekciju transformanata na hranjivoj podlozi s antibiotikom geneticinom.

2. TEORIJSKI DIO

Lančana reakcija polimerazom (*eng. polymerase chain reaction*, PCR) jedna je od najšire korištenih laboratorijskih metoda za rad s nukleinskim kiselinama, a zbog jednostavnosti provedbe te visoke specifičnosti i osjetljivosti pronašla je primjenu između ostaloga i u mikrobiologiji, genetičkom inženjerstvu, dijagnostici i forenzici. Metoda PCR može se osim u dijagnostičke svrhe, to jest u detekciji određene sekvence u uzorku, koristiti i u preparativne svrhe, na primjer ako se umnoženi fragment koristi za ugrađivanje u vektor ili ako se u njega žele uvesti određene promjene (mutacije). Modifikacijom metode omogućuje se i određivanje prisutnog broja kopija amplificirane sekvence u uzorku prije početka reakcije.

2.1. Lančana reakcija polimerazom

Za provođenje metode PCR potrebno je pripremiti reakcijsku otopinu koju sačinjavaju DNA iz koje se umnaža određeni fragment (kalup), početnice za sintezu DNA, otopine četiriju deoksiribonukleotid trifosfata (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), pufer za DNA polimerazu, MgCl₂ koji je obično sastavni dio tog pufera i termorezistentna DNA polimeraza (Mullis i Faloona, 1987).

Kalup je uzorak DNA koji sadrži ili se sumnja da sadrži ampikon – interesantnu sekvencu čije je umnažanje konačni cilj provedbe lančane reakcije polimerazom. Ampikoni najčešće imaju duljinu između 2 i 3 kb (kilobaza), a zbog smanjenog prinosa izbjegava se umnažanje sekvenci duljih od 5 kb pomoću standardne PCR.

Početnice (*eng. primers*) su kratke (najčešće između 10 i nekoliko desetaka nukleotida) molekule jednolančane DNA koje se u određenim uvjetima sparuju s komplementarnim regijama na kalupu čime nastaje supstrat pogodan za polimeraznu aktivnost DNA polimeraze. Početnice moraju imati međusobno sličnu duljinu i udio gvanina i citozina a ne smiju biti komplementarne jedna drugoj. Također je važno da nemaju mogućnost stvaranja sekundarne strukture i uzastopna ponavljanja istog nukleotida. Početnicama homologne regije na kalupu moraju biti uzvodno i nizvodno od ciljane regije i to na različitim lancima kako bi hibridizirane početnice bile okrenute jedna prema drugoj svojim 3' krajevima.

Pufer za polimerazu osigurava konstantnu pH vrijednost i ionsku jakost tijekom reakcije, a najčešće se koristi pufer Tris-HCl. Komercijalno dostupni puferi za polimerazu već sadrže i magnezijeve ione nužne za rad DNA polimeraze u obliku $MgCl_2$.

Komercijalno je dostupan relativno velik broj različitih polimeraza za primjenu u metodi PCR, a izbor optimalne polimeraze ovisi o željenoj preciznosti sinteze DNA. Koriste se isključivo termostabilne polimeraze čija je prednost činjenica da zadržavaju aktivnost i nakon uzastopnog zagrijavanja iznad $90\text{ }^\circ\text{C}$ tako da ih nije potrebno dodavati nakon svakog koraka denaturacije DNA. Najčešće uporabljivana polimeraza za metodu PCR s ciljem detekcije određene sekvence DNA u uzorku je *Taq* polimeraza izvorno izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus* (Erich i sur., 1988). Budući da *Taq* polimeraza nema 3'-5' egzonukleaznu aktivnost (*eng. proofreading*) povećana je vjerojatnost pojave točkastih mutacija unutar amplificirane sekvence. U slučaju kada će produkti PCR-a biti korišteni za npr. ekspresiju umnoženih gena, koristi se neka od termostabilnih polimeraza koje posjeduju tu aktivnost, na primjer *Pfu*, izvorno izolirana iz arheje *Pyrococcus furiosus*.

Sama reakcija odvija se u posebno konstruiranom uređaju za PCR (*thermocycler*). Iako postoje i uređaji izvedeni tako da se uzorak prenosi između odvojenih komora određene temperature, uglavnom se koriste oni u kojima se statični uzorak grije i hladi prema unaprijed određenom programu.

Reakcijska otopina se najprije zagrijava na temperaturu veću od $90\text{ }^\circ\text{C}$ kako bi se dva lanca kalupa razdvojila i tako se omogućio pristup dušičnim bazama. Ovaj korak može trajati između 15 sekundi i nekoliko minuta. Nakon početne denaturacije kalupa provodi se određen broj ciklusa (najčešće 30) lančane reakcije polimerazom. Povećani broj ponavljanja rezultira većom količinom produkta, iako se rast broja kopija nakon određenog broja ciklusa usporava i konačno prestaje. Svaki ciklus se sastoji od tri koraka: denaturacija, hibridizacija i sinteza DNA (Saiki i sur., 1986).

DNA se denaturira zagrijavanjem otopine na temperaturu veću od temperature taljenja DNA. Temperatura taljenja DNA ovisi o duljini sekvence i udjelu AT i GC parova baza u njoj, a tijekom provedbe metode PCR uzimaju se kao i tijekom početne denaturacije temperature iznad $90\text{ }^\circ\text{C}$. Budući da je u ovim naknadnim koracima denaturacije riječ o razdvajanju lanaca relativno kratkih sekvenci, ovaj korak obično traje između 5 i 15 sekundi.

Hibridizacija (*eng. annealing*) u kontekstu lančane reakcije polimerazom podrazumijeva sparivanje početnica sa komplementarnim regijama na lancima kalupa, odnosno produkata

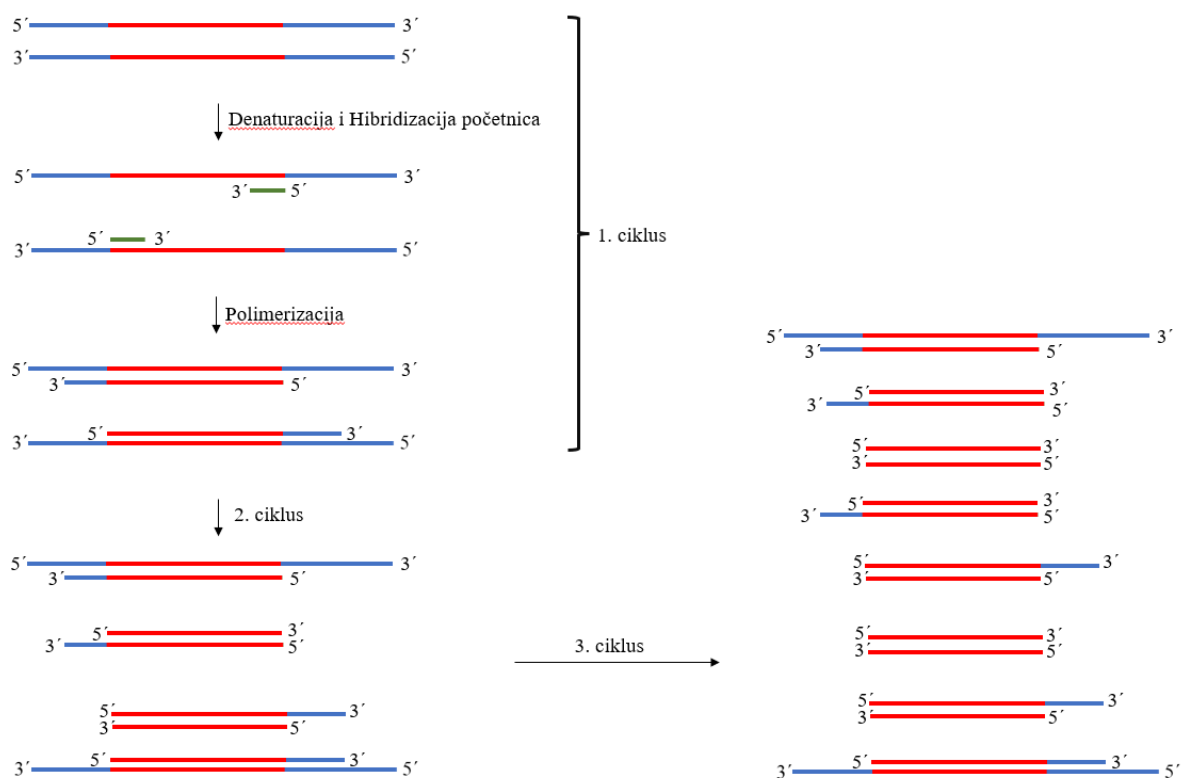
prethodnih ciklusa. Kako bi se smanjila vjerojatnost pogrešnog sparivanja i nastanka neželjenih produkata, ovaj korak se odvija pri optimalnoj temperaturi za sparivanje određenog para početnica (temperatura sparivanja, eng. *annealing temperature*). Temperatura sparivanja u pravilu je oko 5 °C niža od temperature taljenja (eng. *melting temperature*, T_m), a T_m je temperatura pri kojoj će 50 % oligonukleotida biti komplementarno sparano s kalupom. Temperaturu taljenja oligonukleotida moguće je izračunati na osnovi njihove duljine, udjela citozina i gvanina te koncentracije u reakcijskoj otopini. Komplementarno sparivanje početnica i kalupa se provodi u trajanju između 10 sekundi i pola minute.

Kako bi se spriječio početak polimerizacije sa nespecifično sparenim početnicama tijekom zagrijavanja, a prije postizanja poželjne temperature čime bi nastali nepoželjni produkti razvijene su takozvane *Hot-start* DNA polimeraze. Ovakve polimeraze postaju aktivne tek nakon početne denaturacije u uređaju za PCR, tj. pri prvom zagrijavanju na temperaturu iznad 90 °C. Sličan učinak može se postići i dodavanjem oligonukleotida i antitijela koji svojim vezanjem inaktiviraju enzim dok se ne odvoje djelovanjem povišene temperature, kao i imobilizacijom potrebnih metalnih iona u vosku koji se otapa zagrijavanjem.

Sinteza, odnosno polimerizacija je centralni korak lančane reakcije polimerazom tijekom kojeg se na sekvenci od interesa unutar denaturirane DNA sintetiziraju komplementarni lanci. Temperatura pri kojoj se odvija polimerizacija odgovara optimalnoj temperaturi za aktivnost korištene polimeraze i navedena je u dokumentaciji priloženoj uz enzim (npr. za *Taq* polimerazu optimalna temperatura iznosi 72 °C). Trajanje ovoga koraka određeno je prvenstveno duljinom sekvence koju se amplificira i brzinom rada polimeraze koja je također navedena u spomenutoj dokumentaciji.

Kao što je ranije navedeno, ova tri koraka ponavljaju se najčešće 30 puta, a nakon zadnjeg ciklusa se provodi završna sinteza. Faza završne sinteze odvija se pri istoj temperaturi kao i ranije provedena polimerizacija i traje nekoliko minuta.

Na slici 1 vidljivo je da tijekom PCR-a nastaju tri vrste produkta. U reakcijskoj otopini na kraju prevladavaju produkti koji u oba lanca sadrže samo amplificiranu sekvencu koja je omeđena početnicama jer njihov broj nakon četvrtoga ciklusa raste eksponencijalno. Slijede ih produkti koji sadrže jedan takav lanac i jedan lanac nastao prekinutom sintezom na kalupu, a najmanje je produkata koji sadrže jedan od izvornih lanaca kalupa čiji broj je neovisan o broju ciklusa, odnosno dva puta je veći od izvornog broja kalupa (Mullis i Faloona, 1987).



Slika 1. Shematski prikaz različitih produkata prvih triju ciklusa lančane reakcije polimerazom, uz raščlambu prvoga ciklusa na korake denaturacije, sparivanja početnica i polimerizacije

Prethodnom provedbom reverzne transkripcije moguće je metodom PCR umnožiti sekvence prisutne u RNA, na primjer gen bez introna. Za reverznu transkripciju također su potrebne početnice, a mogu se koristiti specifične za sekvencu koju se želi amplificirati ili početnice nasumičnih sekvenci, ovisno o uzorku i cilju provođenja amplifikacije.

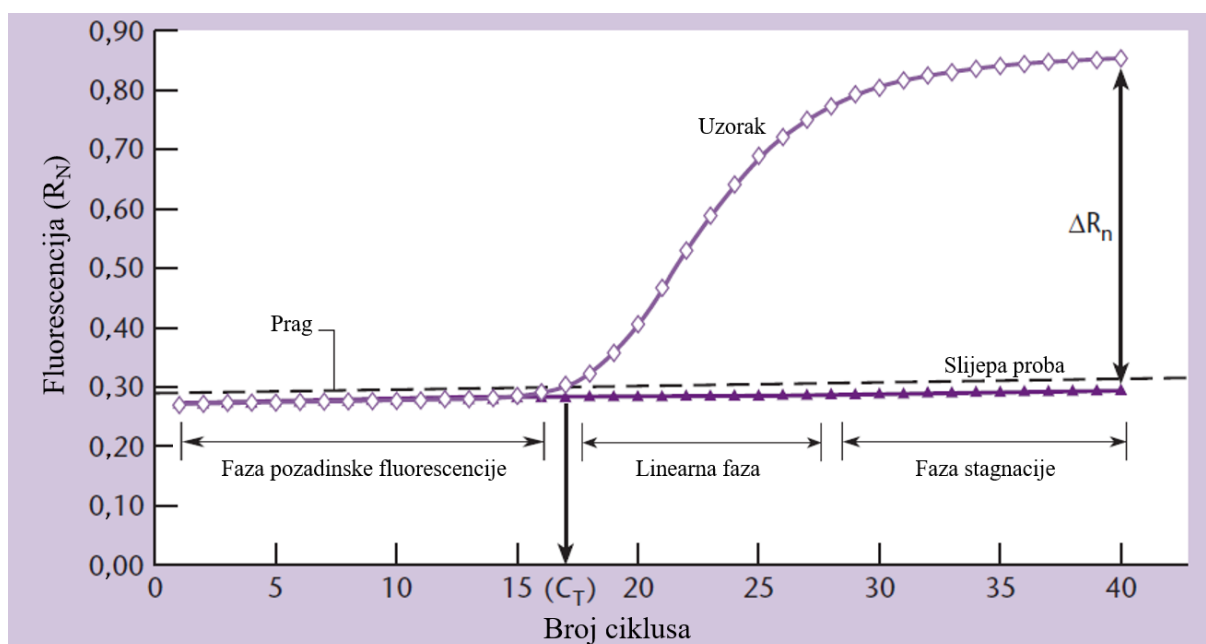
Uspješnost provedenog PCR-a može se provjeriti gel elektroforezom, čime se potvrđuje prisutnost umnoženog fragmenta očekivane veličine.

2.2. Primjena PCR-a za kvantitativnu analizu

Uz određene modifikacije, lančanu reakciju polimerazom moguće je koristiti za određivanje početnog broja amplikona u uzorku. Metode PCR koje se koriste za kvantifikaciju nazivaju se qPCR (*eng. quantitative PCR*), a najčešće se osnivaju na mjerenju povećanja fluorescencije koju uzrokuje amplifikacija DNA pa su razvijeni uređaji koji mogu paralelno mjeriti tu promjenu i izmjenjivati pojedine korake ciklusa PCR-a. Osim toga, dostupne su i sonde (*eng. probes*) koje zahvaljujući oligonukleotidnoj građi imaju sposobnost povećanja fluorescencije uzorka isključivo u ovisnosti o količini prisutnih kopija amplificirane sekvence.

Prednost kontinuiranog praćenja povećanja broja amplikona (*Real-Time PCR*) u odnosu na analizu uzorka nakon provedenih svih ciklusa (*End-Point PCR*) leži u činjenici da je moguće određivanje broja kopija tijekom takozvane linearne faze u kojoj postoji pouzdanija povezanost logaritma prisutnog broja kopija s njihovim izvornim brojem i brojem provedenih ciklusa (Osborn i Smith, 2008). Naravno, pouzdanost metode ovisiti će o specifičnosti vezanja sonde i parametrima lančane reakcije.

Za određivanje broja kopija određene sekvence u uzorku metodom qPCR najprije je potrebno izraditi baždarni dijagram pomoću standardnih otopina koje sadrže točno poznat broj kopija iste te sekvence. Na tom dijagramu prikazana je linearna ovisnost broja ciklusa PCR-a potrebnih da se postigne određena kritična razina fluorescencije (C_T) o logaritmu broja kopija. Na slici 2 prikazana je kinetika tipične lančane reakcije polimerazom s istaknutim fazama tijekom reakcije i relevantnim razinama fluorescencije. Kritična razina fluorescencije i pripadajući C_T mogu se proizvoljno uzeti iz linearnog područja rasta broja kopija amplikona tijekom PCR-a, a često je riječ o prvom iznosu fluorescencije većem od praga pozadinske fluorescencije koja je prisutna od početka reakcije. U uzorcima s većim početnim brojem kopija ta će vrijednost biti postignuta nakon manje ponovljenih ciklusa.



Slika 2. Kinetika lančane reakcije polimerazom, odnosno ovisnost intenziteta fluorescencije o broju provedenih ciklusa. Tijek reakcije podijeljen je na tri faze: Faza pozadinske fluorescencije u kojoj porast broja kopija ne uzrokuje zamjetni porast fluorescencije, Linearna faza u kojoj broj kopija raste eksponencijalno uz mjerljiv porast fluorescencije i Faza stagnacije u kojoj efikasnost umnažanja pada zbog zasićenja. (prema Primrose i Twyman, str. 30)

Najčešće uporabljivana sonda za qPCR je *TaqMan*, oligonukleotid koji na 5' kraju ima vezan izvor fluorescencije (reporter), a na 3' kraju prigušivač, odnosno *quencher* – skupinu koja apsorbira energiju i na taj način maskira fluorescenciju sonde. Sekvenca između dviju skupina komplementarna je dijelu jednog od lanaca umnažane sekvence tako da se sonda tijekom koraka hibridizacije početnica veže na kalup između mjesta vezanja početnica. Budući da polimeraze koje se koriste za PCR imaju 5'-3' egzonukleaznu aktivnost, hidrolizirati će *TaqMan* sondu i time fizički odvojiti reporter od prigušivača te omogućiti detekciju povećanja fluorescencije (Heid i sur., 1996).

Jedna od alternativa *TaqMan* sondama su sonde izvedene tako da uzvodno i nizvodno od regije komplementarne kalupu imaju međusobno komplementarne sekvence koje im međusobnim povezivanjem omogućuju stvaranje sekundarne strukture, odnosno ukosnice. Ukoliko se sonde nalaze u toj konformaciji, izvor fluorescencije će biti u neposrednoj blizini prigušivača. Prilikom denaturacije kalupa i nastalih produkata PCR-a sonda gubi sekundarnu strukturu i komplementarno se sparuje s DNA u uzorku što ima za posljedicu udaljavanje dviju skupina

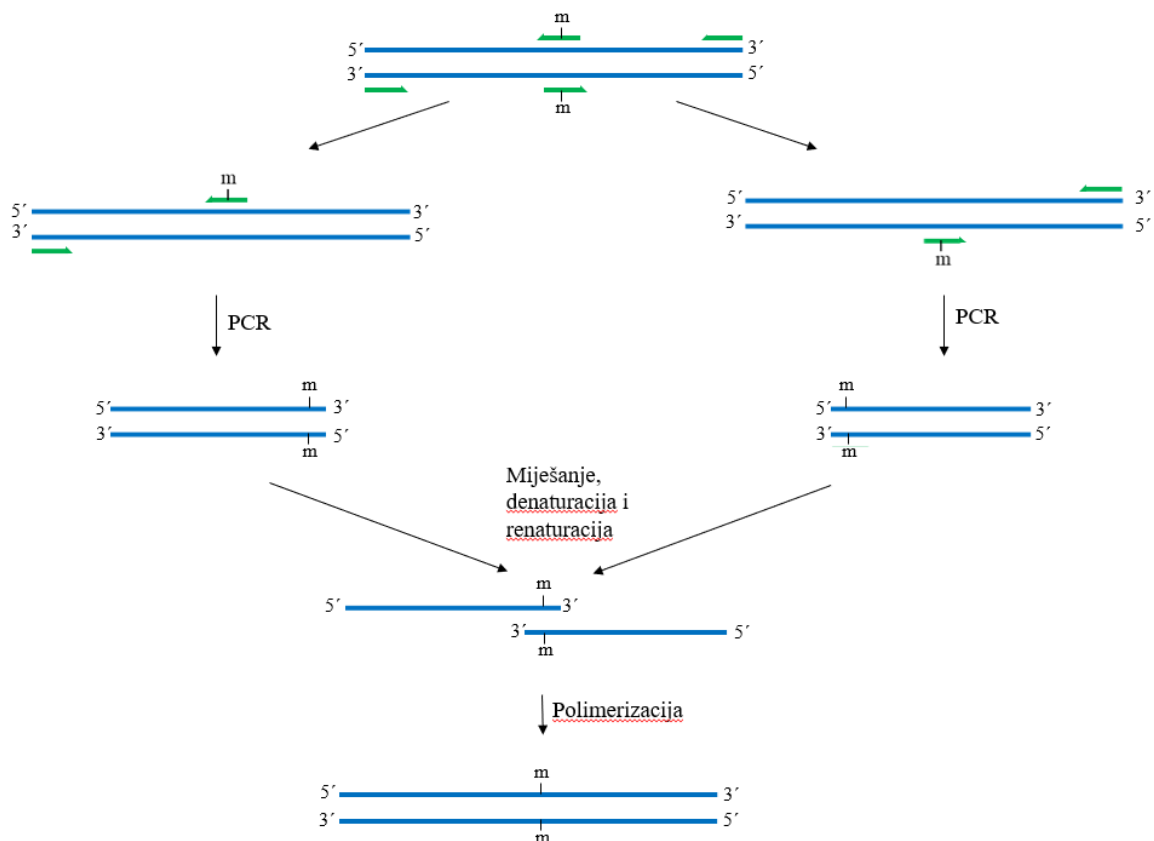
na njenim krajevima. Nakon više provedenih ciklusa broj dostupnih sekvenci za sparivanje biti će veći, pa će biti moguće detektirati fluorescenciju većeg broja sonda (Tyagi i Kramer, 1996). Poseban slučaj sonde sa strukturom ukosnice su takozvane škorpionske sonde čija je glavna značajka da su vezane za jednu od početnica za PCR. Nakon polimerizacije i denaturacije, hlađenjem na temperaturu sparivanja početnica dolazi i do komplementarnog sparivanja 5' kraja sonde s novosintetiziranom regijom. Ovime nastaje sekundarna struktura u kojoj su fluorescentna skupina i prigušivač dovoljno udaljeni da bi se detektirao fluorescentni signal (Thelwell i sur., 2000). Iako ovakve sonde imaju manju vjerojatnost pogrešnog sparivanja od *TaqMan* sonde što bi impliciralo i veću vjerodostojnost rezultata, danas je u upotrebi gotovo isključivo prisutna upravo metoda *TaqMan*.

Budući da se na 5' krajeve svih navedenih sonda mogu vezati međusobno različite fluorescentne grupe, ovom metodom moguće je odrediti relativne količine dvaju različitih kalupa u uzorku, uz uvjet da se amplificiraju s istom efikasnošću. Kombinacija reverzne transkripcije i qPCR pogodna je metoda za određivanje broja kopija mRNA prisutne u uzorku, odnosno razine ekspresije pojedinog gena.

2.3. Preparativna primjena PCR-a

Primjenom početnica za PCR koje nisu u potpunosti komplementarne regijama na kalupu moguće je dobiti produkte koji imaju izmijenjen redoslijed nukleotida.

Jedan primjer toga je dodavanje polihistidinske oznake na krajeve proteina. Cilj metode je konstrukcija ekspresijskih sustava za proizvodnju funkcionalnih proteina koji se jednostavno izdvajaju iz kompleksnih smjesa kao što su homogenizirana kultura stanica proizvodnog organizma ili biotehnoški izmijenjena hranjiva podloga. Naime, proteini koji na jednom od svojih krajeva imaju nekoliko histidinskih ostataka (*His-tag*) ulaze u specifične interakcije sa ionima nikala pa ih je moguće izolirati afinitetnom kromatografijom sa tim ionima kao ligandom (Hochuli i sur., 1988). *His-tag* je moguće ugraditi i na C- i na N-terminalni kraj proteina, a izbor ovisi o izloženosti krajeva pri nativnoj konformaciji proteina, njihovoj mogućoj uključenosti u njegovu aktivnost te o dostupnim metodama naknadnog uklanjanja same oznake. Insert za ekspresiju proteina s ovakvom oznakom na N-terminalnom dijelu može se sintetizirati pomoću PCR-a ako jedna od početnica na 5' kraju sadrži početni kodon kojega slijedi određeni broj kodona histidina, a zatim i sekvenca koja je komplementarna rubnom dijelu ampikona i služi kao klica za sintezu DNA.



Slika 3. Uvođenje točkaste mutacije pomoću metode PCR s mutagenim početnicama

Još jedna interesantna primjena PCR-a je in-vitro mutageniza, odnosno uvođenje željene mutacije na točno određenome mjestu unutar sekvence DNA uporabom mutagenih početnica. Ova metoda zahtijeva provođenje dviju paralelnih lančanih reakcija u odvojenim reakcijskim otopinama. Kao što je vidljivo na slici 3, ampliconi ovih dviju reakcija su regije neposredno uzvodno odnosno nizvodno od mjesta na koje se želi uvesti mutacija. To mjesto nalazi se u oba amplicona u području komplementarnog sparivanja početnica. Posljedično tome, jedna od početnica korištena u prvoj reakciji komplementarna je jednoj od početnica u drugoj reakciji. Ove početnice nisu u potpunosti komplementarne pripadajućim regijama na kalupu, odnosno izmijenjeno im je nekoliko nukleotida kako bi tijekom ciklusa lančane reakcije polimerazom došlo do zamjene nukleotida na tim mjestima. Produkti dviju reakcija se zatim izmiješaju i podvrgnu denaturirajućim uvjetima. Renaturacijom dolazi do sparivanja različitih lanaca u središnjem mutiranom dijelu te je dodatkom polimeraze moguće sintetizirati početnu sekvencu DNA, ali sa željenom mutacijom (Ho i sur., 1989).

Ovisno o prirodi amplificirane sekvence i konačnoj namjeni produkta reakcije, moguća je i preparativna primjena nemodificirane metode PCR, primjerice za dobivanje većeg broja kopija određene sekvence DNA prisutne u uzorku.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizam

Za potrebe ovoga rada korišten je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, soj YMR284W, genotipa *MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 yku70::KanMX4*.

3.1.2. Hranjive podloge

Za uzgoj kvasca korištena je YPD hranjiva podloga s geneticinom u krutom i tekućem obliku. Kruta podloga pripremljena je na slijedeći način:

Bacto pepton	20 g/L
Yeast extract	10 g/L
Glukoza	20 g/L
Agar	20 g/L
Destilirana voda	do 250 mL

Nakon autoklaviranja 15 minuta pri 120 °C u podlogu je dodan 1 mL otopine geneticina koncentracije 50 mg/mL.

Tekuća podloga pripremljena je slično kao i kruta:

Bacto pepton	20 g/L
Yeast extract	10 g/L
Glukoza	20 g/L
Destilirana voda	do 50 mL

Autoklavirana je pri jednakim uvjetima, a 200 µL otopine geneticina dodano je neposredno prije nacjepljivanja.

3.1.3. Otopine

SCE pufer:

Sorbitol	1 M
Natrijev citrat	0,1 M
EDTA	0,12 M

Zimoliaza 20-T:

Zymolyase 20-T	15 mg
Glicerol (400 mg/mL)	2,4 mL
Deionizirana voda	600 μ L

STE pufer:

SDS	5 g/L
Tris-HCl (pH 8.0)	0,1 M
EDTA (pH 8.0)	0,005 M

Kalijev acetat (3 M, pH 4.8):

Kalijev acetat (5 M)	60 mL
Ledena octena kiselina	11,5 mL
Deionizirana voda	28,5 mL

TE pufer (pH 8.0):

Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA (pH 8.0)	0,5 M

RNaza:

Ribonukleaza A	0,3 g
TE pufer (pH 8.0)	15 mL

Pripremljena otopina zagrijava se 15 minuta u kipućoj vodi nakon čega se ohladi na sobnu temperaturu.

Amonijev acetat (8 M):

Izvaže se 61,66 g krutog amonijevog acetata i otopi u 100 mL deionizirane vode.

TBE puffer (10X):

Tris	108 g
Borna kiselina	55 g
EDTA (0.5 M, pH 8)	40 mL
Deionizirana voda	do 1000 mL

Agarozni gel (0,8 %):

U 100 mL 10 puta razrijeđenog TBE puffera otopi se 0,8 g agaroze. Otapanje se pospješuje zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici nakon čega se otopina ohladi i izlije u prethodno pripremljen kalup u kojem se formira gel.

Puffer za uzorke (6x):

Bromfenol plavo	0,25 g
Ksilen cijanol FF	0,25 g
Glicerol	30,0 g
SDS	1,0 g
EDTA (0,5 M, pH 7.4)	20,0 mL
Destilirana voda	do 1000 mL

Etidij-bromid:

Otopina etidij-bromida koja se koristi za vizualizaciju DNA na gelu priprema se razrjeđivanjem 50 µL početne otopine čija je koncentracija 10 mg/mL sa 1 L deionizirane vode.

3.1.4. Oligonukleotidi

Za potrebe provođenja lančane reakcije polimerazom opisane u ovom radu korištene su slijedeće početnice za sintezu DNA:

YKU70-F, čiji redoslijed nukleotida je 5'-TTTGAGATTTCTATCCTCGAGGAG-3', i

YKU70-R, čiji redoslijed nukleotida je 5'-CTTGATAATGATAGAGGTGAGCC-3'

3.1.5. Restriksijski enzimi:

Restriksijska analiza provedena je pomoću endonukleaza *NcoI* i *ScaI*.

3.1.6. Kemikalije i enzimi

Izopropanol:	Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
Etanol (96%):	Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija
Tris:	Acros Organics, New Jersey, SAD
Glicerol:	Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
Kalijev acetat:	Acros Organics, New Jersey, SAD
Amonijev acetat:	Lach-ner, Neratovice, Češka
SDS:	Merck, Hohenbrunn, Njemačka
Borna kiselina:	Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija
Agaroz (Agarose NA):	Pharmacia, Kopenhagen, Danska
Zimolijaza (Zymolyase 20-T):	Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan
Ribonukleaza A:	Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
Etidij-bromid:	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Njemačka
Geneticin (Geneticin G-415 Sulphate):	Life Tehnologies, Carlsbad, SAD
EDTA:	Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija
DNA bakteriofaga λ :	Fermentas, Vilnius, Litva
Sastojci hranjive podloge:	Biolife, Milan, Italija Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija
Komplet kemikalija za PCR:	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države
Komplet kemikalija za restriksijsku analizu:	Fermentas, Vilnius, Litva

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac uzgojen na krutoj hranjivoj podlozi precijepi se u tekuću tako da se sterilnom mikrobiološkom ušicom jedna kolonija prebaci u epruvetu s 3 mL podloge s geneticinom. Suspenzija se promiješa vorteksiranjem te inkubira na tresilici pri 28 °C. Kultura dostiže stacionarnu fazu nakon 3 dana.

3.2.2. Izolacija DNA iz kulture kvasca u tekućoj hranjivoj podlozi

Nakon miješanja vorteksiranjem 1 mL kulture prebaci se u kivetu te centrifugira 3 minute pri 5000 o/min. Nakon uklanjanja supernatanta, na talog se dodaje još 1 mL kulture te se centrifuga ponavlja pri istim uvjetima. Istaložene stanice kvasca ispiru se dodatkom 1 mL deionizirane vode u kivetu, nakon čega slijedi miješanje vorteksiranjem i centrifugiranje pri gore navedenim uvjetima. Ispiranje se ponovi ukupno dva puta vodom i dva puta SCE puferom, uz odbacivanje supernatanta nakon svakog centrifugiranja. Konačni talog suspendira se u 200 µL SCE pufera uz dodatak 20 µL otopine zimolijaze. Smjesa se promiješa okretanjem te inkubira 1 h na 37 °C.

Po završetku inkubacije u kivetu se dodaje 800 µL STE pufera, sadržaj se ponovno izmiješa okretanjem te najprije inkubira 20 min na 70 °C, a zatim ohladi 10 min na ledu. Ohlađenoj smjesi doda se 200 µL otopine kalijevog acetata te ju se nakon miješanja ostavi preko noći na 4°C.

Proteini se istalože centrifugiranjem 20 min pri 12000 o/min. U novu kivetu se prebaci 930 µL supernatanta uz dodatak 660 µL izopropanola. Dobivena suspenzija se centrifugira pri istim uvjetima, supernatant se odbacuje, a ostatci tekućine pažljivo se uklone vakuum sisaljkom. Istaložene nukleinske kiseline suspendiraju se u 300 µL TE pufera te im se dodaje 1 µL otopine RNaze nakon čega se smjesa ostavlja na inkubaciji pri 70°C. Po završetku reakcije otopini se dodaje 100 µL amonijevog acetata i 800 µL 96 %-tnog etanola. Smjesa se dobro promiješa i centrifugira 20 min pri 12000 o/min, supernatant se odbacuje, a ostatci tekućine uklanjaju vakuum sisaljkom i sušenjem blizu otvorenog plamena.

Istaložena DNA kvasca otopi se u 50 µL TE pufera.

3.2.3. Elektorforeza na agaroznom gelu

Gel-elektroforeza provedena je kao provjera uspješnosti izolacije DNA, odnosno lančane reakcije polimerazom te prilikom restrikcijske analize umnoženog fragmenta. Za njeno provođenje korišten je uređaj *Mini-sub cell GT* tvrtke *Bio Rad*.

Pripremljena i ohlađena 0,8 %-tna otopina agaroze u TBE puferu izlije se u kalup čiji su krajevi zatvoreni ljepljivom trakom. Na za to predviđeno mjesto na kalupu umetne se češljic, a otopina se ostavi da se skrutne čime nastaje gel. Gel se stavi u kadicu uređaja za elektroforezu i prelije TBE puferom. Češljic se izvadi, a u nastale jažice stavljaju se uzorci prethodno pomiješani s migracijskim bojilom. Elektroforeza se provodi pri 8-12 V/cm, a njeno trajanje se određuje prema kretanju bojila kroz gel.

Po završetku elektroforeze gel se 20 minuta inkubira u otopini etidij-bromida i fotografira pod ultraljubičastim svjetlom transiluminatora.

3.2.4. Lančana reakcija polimerazom

Za provedbu Lančane reakcije polimerazom korišten je set za PCR tvrtke *New England Biolabs* koji sadrži polimerazu *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* (M0491) i uređaj *Mastercycler personal* s grijanim poklopcem (*Eppendorf*, Hamburg).

Reakcijska otopina pripremi se prema uputi proizvođača:

Deionizirana voda	32,5 µL
Pufer (10 X)	10 µL
Oligonukleotid YKU70-F (10 µM)	2,5 µL
Oligonukleotid YKU70-R (10 µM)	2,5 µL
DNA kalup	1 µL
Otopina deoksiribonukleotida (2 mM)	1 µL
Polimeraza	0,5 µL

Nakon što je dobro izmiješana, otopina se stavlja u uređaj za PCR, a sama reakcija odvija se u uvjetima prikazanim u tablici 1.

Tablica 1. Uvjeti provođenja PCR

Korak	Trajanje	Temperatura (°C)
Početna denaturacija	30 s	98
Denaturacija	5-10 s	98
Sparivanje početnica	10-30 s	63
Sinteza DNA	20-30 s/kb	72
Završna sinteza	120 s	72
Hlađenje		4-10

Uspješnost lančane reakcije polimerazom provjeri se gel elektroforezom.

3.2.5. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

Restrikcijska analiza provedena je s dva enzima: *NcoI* i *ScaI*.

Za svaki enzim pripremi se reakcijska otopina slijedećeg sastava:

DNA	7 μ L
Deionizirana voda	6,3 μ L
Pufer	1,5 μ L
Restrikcijski enzim (10 U/ μ L)	0,2 μ L

Otopine se inkubiraju preko noći na 37 °C nakon čega se pripremaju uzorci za gel elektroforezu.

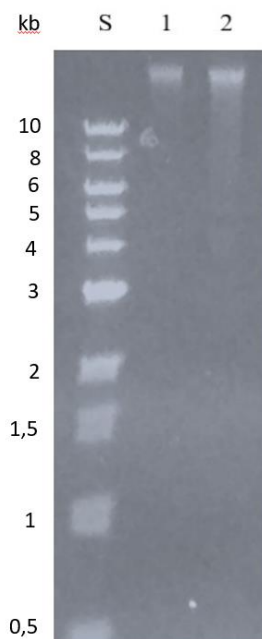
4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovoga rada bila je sinteza disrupcijske kazete – fragmenta DNA čiji su krajevi homologni rubnim regijama gena *YKU70*, što omogućuje inaktivaciju tog gena pomoću homologne rekombinacije. Stoga je najprije bilo potrebno izolirati genomsku DNA *Saccharomyces cerevisiae* odgovarajućeg soja YMR284W čiji genom sadrži regiju *yku70::KanMX4*, što znači da mu je kodirajuća DNA gena *YKU70* zamijenjena s KanMX4, selektivnim biljekom koji omogućuje rezistenciju na antibiotik geneticin (poglavlje 4.1.), a zatim umnožiti željeni fragment DNA pomoću PCR-a (poglavlje 4.2.). Struktura umnožene disrupcijske kazete provjerena je restrikcijskom analizom (poglavlje 4.3.).

Uspješnost svakog koraka sinteze provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu, a cjelokupnog postupka restrikcijskom analizom pomoću enzima *NcoI* i *ScaI*.

4.1. Izolacija DNA iz kulture kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Dvije kolonije kvasca precijepljene su u po 3 mL tekuće hranjive podloge s geneticinom i uzgojene do stacionarne faze. Genomska DNA izolirana je metodom opisanom u poglavlju 3.2.2. Uspješnost izolacije provjerena je gel-elektroforezom na 0,8 %-tnom agaroznom gelu. Rezultati elektroforeze prikazani su na slici 4.

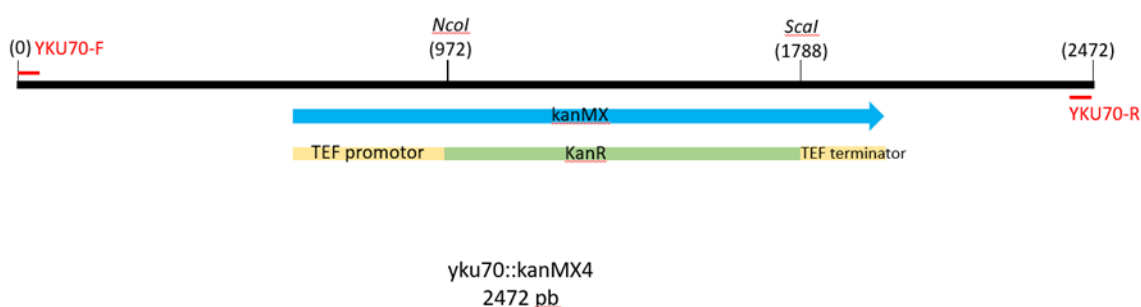


Slika 4. Rezultati gel elektroforeze provedene nakon izolacije DNA iz kulture kvasca. S – standard (*Quick-Load® 1 kb DNA Ladder* tvrtke *New England Biolabs*), 1 i 2 – Uzorci izolirane DNA (vlastita fotografija)

Na gelu je vidljiva po jedna vrpca za svaki uzorak, i to u području fragmenata većih od 10 kilobaza. Ovo je očekivan rezultat i potvrđuje da je genomska DNA kvasca uspješno izolirana. Naime, tijekom izolacije genomske DNA iz stanica kvasca prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2., DNA se uslijed miješanja, centrifugiranja i pipetiranja pokida na fragmente veličine između 40 i 50 kilobaza (Sambrook and Russel, 2001.) koji su vidljivi u jednoj vrpici na 0,8 %-tnom agaroznom gelu

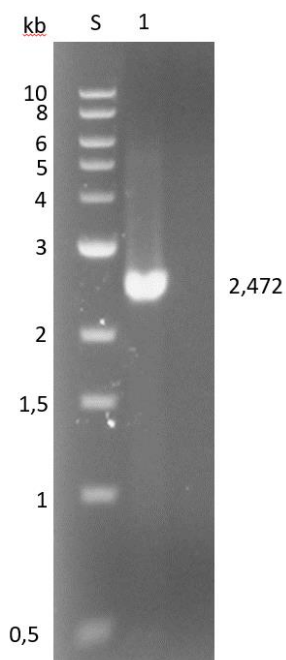
4.2. Umnažanje sekvence DNA lančanom reakcijom polimerazom

Lančana reakcija polimerazom provedena je postupkom koji je opisan u poglavlju 3.2.4. U reakciji su korištene početnice YKU70-F i YKU70-R (poglavljje 3.1.4.). Mjesta sparivanja početnica vidljiva su na shematskom prikazu disrupcijske kazete (slika 5), a veličina nastalog produkta je 2472 parova baza. Kao što je prikazano na slici, osim selektivnog biljega KanMX4 umnožene su i sekvence koje se u genomu soja YMR284W nalaze uzvodno i nizvodno i koje su homologne s regijama uzvodno i nizvodno od kodirajuće DNA gena *YKU70*. Takva disrupcijska kazeta će u kasnijim istraživanjima u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama poslužiti za konstrukciju sojeva kvasca bez gena *YKU70*. Naime, uslijed homologne rekombinacije između disrupcijske kazete i genoma kvasca može doći do zamjene gena (eng. Gene replacement) i ugradnje markera KanMX4 na mjesto gena *YKU70* (Paques i Haber, 1999.).



Slika 5. Struktura umnožene disrupcijske kazete za inaktivaciju kvašćevog gena *YKU70*. Na slici su prikazana mjesta vezanja početnica za umnažanje te restrikcijska mjesta relevantna za restrikcijsku analizu, kao i struktura gena kanMX4.

Uspješnost reakcije PCR, odnosno umnažanja željenog fragmenta DNA provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu čiji je rezultat prikazan na slici 6.



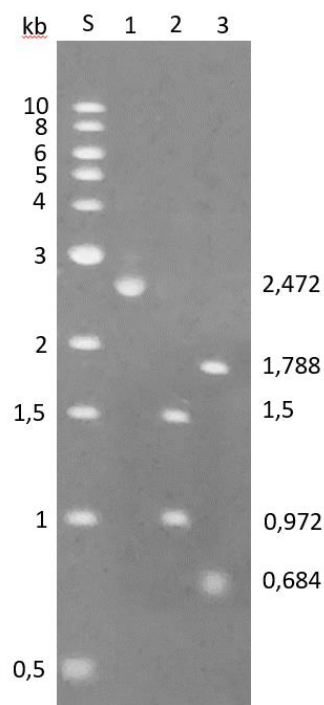
Slika 6. Rezultati gel-elektroforeze provedene nakon lančane reakcije polimerazom. S – standard (*Quick-Load® 1 kb DNA Ladder* tvrtke *New England Biolabs*), 1 – Uzorak reakcijske otopine nakon provedene PCR (vlastita fotografija)

Na gelu je vidljiva jedna vrpca čija duljina odgovara očekivanoj duljini produkta PCR-a. Stoga je umnažanje sekvence *yku70::KanMX4* uspješno provedeno, a da bi se to dodatno potvrdilo provedena je i restrikcijska analiza umnoženog fragmenta DNA.

4.3. Restriksijska analiza disrupcijske kazete *yku70::KanMX4*

Pri restriksijskoj analizi umnožene disrupcijske kazete korištene su restriksijske endonukleaze *NcoI* i *ScaI* čija su mjesta cijepanja prikazana na slici 5. Sukladno restriksijskoj mapi, umnožena sekvenca sadrži po jedno restriksijsko mjesto za svaki od tih enzima te su očekivane duljine nastalih fragmenata 1500 i 972 parova baza prilikom cijepanja s *NcoI*, odnosno 1788 i 684 parova baza u slučaju restrikcije pomoću *ScaI*.

Reakcijske otopine pripremljene su prema uputama proizvođača kako je prikazano u poglavlju 3.2.5. i inkubirane preko noći. Rezultat restriksijske analize prikazan je na slici 7.



Slika 7. Restriksijska analiza produkta lančane reakcije polimerazom enzimima *NcoI* i *ScaI*
S – standard (*Quick-Load® 1 kb DNA Ladder* tvrtke *New England Biolabs*), 1 – Nepocijepani produkt PCR, 2 – Produkt PCR-a tretiran endonukleazom *NcoI*, 3 – Produkt PCR tretiran endonukleazom *ScaI* (vlastita fotografija)

Vidljivo je da su duljine fragmenata DNA dobivenih cijepanjem endonukleazama *NcoI* i *ScaI* u skladu s očekivanim duljinama. Restriksijskom analizom potvrđeno je da je lančanom reakcijom polimerazom umnožena sekvenca *yku70::KanMX4*.

5. ZAKLJUČAK

Sinteza disrupcijske kazete za inaktivaciju gena *YKU70* kvasca *Saccharomyces cerevisiae* uspješno je provedena, što je potvrđeno gel elektroforezom i restrikcijskom analizom dobivenog produkta.

6. POPIS LITERATURE

Erlich H, Gelfand D, Saiki R (1988) Specific DNA amplification, *Nature* 331, 461–462, <https://doi.org/10.1038/331461a0>

Garibyan L, Avashia N (2013) Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR), *Journal of Investigative Dermatology* 133: 1–4 , <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams P (1996) Real time quantitative PCR, *Genome Res* 6: 986–994, <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>

Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene* 77: 51–59, [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90358-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90358-2)

Hochuli E, Bannwarth W, Döbeli H, Gentz R, Stüber D (1988) Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent, *Bio/Technology* 6: 1321–1325, <https://doi.org/10.1038/nbt1188-1321>

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol.* 155: 335–350, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)

NEB (2022) PCR Using Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (M0491). NEB-New England Biolabs, <https://international.neb.com/protocols/2013/12/13/pcr-using-q5-high-fidelity-dna-polymerase-m0491>. Pristupljeno 7. svibnja 2022.

Osborn MA, Smith CJ (2008) Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology, *FEMS Microbiology Ecology* 67: 6–20, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>

Pâques F, Haber JE (1999) Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology reviews* 63: 349–404, <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.349-404.1999>

Primrose SB, Twyman RM (2006) Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7 izd., Blackwell Publishing, Hoboken, str. 26.-35.

Promega (2022) PCR Amplification, A comprehensive introduction to PCR and qPCR methods, including video tutorials and example protocols. Promega corporation, <https://worldwide.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/pcr-amplification/>.
Pristupljeno 3. lipnja 2022.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* 230: 1350–1354, <https://doi.org/10.1126/science.2999980>

Sambrook JF, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 izd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Thelwell N, Millington S, Solinas A, Booth J, Brown T (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection, *Nucl. Acids Res.* 28: 3752–3761, <https://doi.org/10.1093/nar/28.19.3752>

ThermoFisher (2022) PCR Setup – Six Critical Components to Consider. ThermoFisher Scientific, <https://www.thermoFisher.com/hr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations>.
Pristupljeno 7. svibnja 2022.

Tyagi S, Kramer FR (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridisation, *Nature Biotechnol.* 14: 303–308, <https://doi.org/10.1038/nbt0396-303>

Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečna M, Neužil P (2020) PCR past, present and future, *BioTechniques* 69: 317–325, <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>

Izjava o izvornosti

Ja, Leo Potkonjak izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Leo Potkonjak

Vlastoručni potpis