

Transformacija bakterije *Escherichia coli* plazmidima pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV

Habek, Erik

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:159:383323>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Erik Habek

0058216123

**Transformacija bakterije *Escherichia coli* plazmidima
pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV**

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

Transformacija bakterije *Escherichia coli* plazmidima

pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV

Erik Habek, 0058216123

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je transformirati bakteriju *Escherichia coli* plazmidima pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV, te potvrditi uspješnost transformacije restriksijskom analizom plazmidne DNA izolirane iz odabranih transformanata. Navedeni plazmidi nose gene koji kodiraju za R-specifičnu alkohol-dehidrogenazu i NADH-oksidadzu. Bakterija *E. coli* je transformirana i plazmidom pLS poznate koncentracije kako bi se odredila uspješnost transformacije. Iz nasumično odabranih transformanata dobivenih transformacijom plazmidima pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV izolirana je plazmidna DNA. Uspješnost izolacije ovih plazmida provjerena je agaroznom gel elektroforezom, a izolirana DNA podvrgnuta je restriksijskoj analizi kojom je potvrđeno da je bakterija *E. coli* uspješno transformirana plazmidima pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV.

Ključne riječi: *E. coli*, genetička transformacija, plazmidi pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV, elektroforeza, restriksijska analiza

Rad sadrži: 26 stranica, 6 slika, 5 tablica, 20 literaturna navoda, 0 priloga

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

Rad predan: lipanj 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

Transformation of bacteria *Escherichia coli* with pUC-GW-RadH AND pUC-GW-NoxV plasmids

Erik Habek, 0058216123

Abstract:

The aim of this study was to transform bacteria *Escherichia coli* with plasmids pUC-GW-RadH and pUC-GW-NoxV, and to confirm the transformation success by restriction analysis of plasmid DNA isolated from selected transformants. The plasmids carry genes encoding for R-specific alcohol-dehydrogenase and NADH-oxidase. Bacteria *E. coli* was additionally transformed with the plasmid pLS of known concentration to determine the transformation efficiency. Plasmid DNA was isolated from randomly selected transformants obtained by transformation using plasmids pUC-GW-RadH and pUC-GW-NoxV. The success of the isolation was confirmed by agarose gel electrophoresis. The isolated plasmid DNA was subjected to restriction analysis, which confirmed that bacteria *E. coli* was successfully transformed with plasmids pUC-GW-RadH and pUC-GW-NoxV.

Keywords: *E. coli*, genetic transformation, plasmids pUC-GW-RadH and pUC-GW-NoxV, electrophoresis, restriction analysis

Thesis contains: 26 pages, 6 figures, 5 tables, 20 references, 0 supplements

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: prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec

Technical support and assistance: doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Thesis delivered: June 2022

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BAKTERIJA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	2
2.2. BAKTERIJSKI PLAZMIDNI VEKTORI U GENETIČKOM INŽENJERSTVU	3
2.3. TRANSFORMACIJA BAKTERIJSKIH STANICA ELEKTROPORACIJOM	4
2.4. AGAROSNA GEL ELEKTROFOREZA	5
2.5. RESTRIKCIJSKA ANALIZA PLAZMIDNE DNA	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO	7
3.1. MATERIJALI	7
3.1.1. Mikroorganizam.....	7
3.1.2. Plazmidni vektori i inserti.....	7
3.1.3. Restriksijski enzimi	9
3.1.4. Hranjive podloge.....	10
3.1.5. Kemikalije i enzimi.....	11
3.1.6. Otopine.....	11
3.2. METODE.....	13
3.2.1. Transformacija bakterije <i>Escherichia coli</i> elektroporacijom.....	13
3.2.2. Selekcija i uzgoj transformiranih bakterija <i>Escherichia coli</i>	13
3.2.3. Izolacija plazmidne DNA iz bakterije <i>Escherichia coli</i> iz malog volumena	14
3.2.4. Cijepanje plazmidne DNA restriksijskim enzimima	15
3.2.5. Elektroforeza u agaroznom gelu i vizualizacija DNA	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
4.1. TRANSFORMACIJA BAKTERIJE <i>E. COLI</i>	16
4.2. GEL ELEKTROFOREZA KRUŽNIH PLAZMIDA	19
4.3. RESTRIKCIJSKA ANALIZA.....	21
5. ZAKLJUČAK	23
6. POPIS LITERATURE.....	24

1. UVOD

Rastuća potražnja za sofisticiranim biotehnološkim proizvodima kao što su spojevi koji se primjerice koriste u prehrambenoj industriji, veterini i medicini, nameću kontinuiran razvoj i napredak u tehnikama genetičkog i biokemijskog inženjerstva. Stoga se metodama genetičkog inženjerstva konstruiraju proizvodni sojevi mikroorganizama odgovarajućih biotehnoloških karakteristika.

Cilj ovog završnog rada je transformirati bakteriju *Escherichia coli* plazmidima pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV, te provjeriti uspješnost transformacije, odnosno potvrditi postojanje navedenih plazmida u stanicama bakterije *E. coli*. Plazmid pUC-GW-RadH nosi gen RadH koji potječe iz bakterije *Lactobacillus brevis*, te kodira za sintezu proteina R-specifične alkoholne dehidrogenaze, a plazmid pUC-GW-NoxV nosi gen NoxV izvorno iz bakterije *Lactobacillus plantarum* koji kodira za sintezu proteina NADH oksidaze. Postupci genetičke transformacije provedeni su metodom elektroporacije, transformanti su selekcionirani na podlozi koja sadrži antibiotik ampicilin. Uspješnost transformacije potvrđena je elektroforezom kružnih plazmida i restrikcijskom analizom. Navedeni plazmidi koristit će se u budućim istraživanjima u svrhu genetičke modifikacije nekonvencionalnih kvasaca.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterija *Escherichia coli*

Bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*) jedan je od najraširenijih modelnih organizama u genetičkim, mikrobiološkim i ekološkim istraživanjima. Ova nesporogena, gram-negativna i fakultativno-anaerobna bakterija štapićastog oblika prilagodila se tijekom evolucije uvjetima probavnog trakta sisavaca na suživot s ostalim bakterijskim vrstama crijevne flore (Hudault i sur., 2001). Bakterija *E. coli* može rasti na mnogim prirodnim i kemijski definiranim (sintetskim) podlogama. Takva sposobnost prilagodbe temeljena je na heterofermentativnim aktivnostima u anaerobnim uvjetima i kataboličkoj represiji koja omogućuje postupno korištenje različitih ugljikohidrata kao izvora ugljika (Ammar i sur., 2018). Stanica bakterije *E. coli* u prosjeku je dugačka 2,0 μm , široka od 0,25 do 1,0 μm , te volumena od 0,6 do 0,7 μm^3 , a zbog prilagodbe na život u probavnom traku toplokrvnih životinja optimalna temperatura rasta joj je 37 °C (Britannica Online Encyclopedia, 2015).

Genom bakterije *E. coli* se tijekom evolucije mijenjao i prilagođavao zahvaljujući točkastim mutacijama, duplikacijama dijelova genoma i horizontalnom prijenosu DNA što ga je učinilo iznimno prilagodljivim (Lawrence i Ochman, 1998). Genom bakterije *E. coli* sadrži oko 4,6 milijuna parova baza, te približno 4000 do 5500 gena (Serres i sur., 2001). Stanice bakterije *E. coli* mogu sadržavati ekstrakromosomalnu DNA u obliku plazmida koji mogu nositi gene za proteine potrebne za preživljavanje u nepovoljnim uvjetima, pa stoga i biti rezistentne na više različitih antibiotika (Hayes, 2003).

Prvi soj bakterije *E. coli* čiji je genom u cijelosti sekvencioniran je soj K12, te se danas konstruirani mutanti ovog soja koriste kao domaćini za rekombinantne plazmide u genetičkom inženjerstvu (Blattner i sur., 1997). Osim toga, sojevi bakterije *E. coli* konstruirani metodama genetičkog inženjerstva koriste se kao proizvodni sojevi u proizvodnji mnogih sofisticiranih proizvoda uključujući različite enzime, protutijela i cjepiva (Cornelis, 2000).

2.2. Bakterijski plazmidni vektori u genetičkom inženjerstvu

Bakterijski plazmidni vektori su genetički modificirani prirodni bakterijski plazmidi koji se često koriste u svrhu ekspresije jednog ili više gena ili cijelog biosintetskog puta. Plazmidi spadaju u skupinu ekstrakromosomalne bakterijske DNA koja se može samostalno replicirati u bakterijskoj stanici (Smillie i sur., 2010). U prirodi bakterijski plazmidi često nose gene koji su ključni za opstanak bakterijske stanice u nepovoljnom okruženju. Plazmidi s genima za rezistenciju na antibiotike koriste se i u genetičkom inženjerstvu jer uzgoj stanica bakterija na podlozi s antibiotikom omogućuje selekcioniranje kolonija bakterija u čijim stanicama se nalazi željeni plazmid nakon transformacije (Arnak i sur., 2016). Danas je komercijalno dostupan širok izbor plazmidnih vektora. (Nora i sur., 2019). Plazmidni vektori sadržavaju specifične regije DNA koje su potrebne da bi se mogli koristiti u genetičkom inženjerstvu, a neke najvažnije regije su:

- ishodište replikacije (ori, eng. origin of replication): regija DNA koja omogućuje samostalnu replikaciju, odnosno umnažanje plazmida unutar bakterijske stanice (del Solar i sur., 1998)
- MSC (eng. Multiple Cloning Site; polilinker, mjesto za kloniranje): regija DNA koja sadržava veći broj jedinstvenih restrikcijskih mjesta pogodnih za ugradnju inserta (DNA koja se ugrađuje u plazmid)
- selektivni marker: najčešće gen koji daje bakteriji rezistenciju na neki antibiotik (Manna i sur., 2013)
- lacZ: gen koji kodira za beta-galaktozidazu, a omogućava takozvanu „plavo-bijelu selekciju“, razlikovanje stanica koje sadrže vektor sa insertom od onih koje sadrže vektor bez inserta.

U većini plazmidnih vektora inserti DNA su veličine do 15 kb (Casali i Preston, 2003). Jedna od važnih uloga bakterijskih vektora u genetičkom inženjerstvu je ekspresija stranih gena u bakteriji. Bakterije omogućavaju jednostavan i ekonomski isplativ način proizvodnje mnogih vrijednih spojeva. Primjer komercijalne primjene plazmidnih vektora je bakterijski soj transformiran plazmidom koji sadržava insert gena za proizvodnju ljudskog hormona inzulina. Danas je proizvodnja inzulina znatno pojeftinjena primjenom bakterijske kulture za njegovu proizvodnju. (Baeshen i sur., 2014).

2.3. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom

Transformacija elektroporacijom je mikrobiološka metoda kojom se pomoću električnog pulsa povećava propusnost stanične membrane omogućavajući time molekulama DNA ulazak u stanicu. Prilikom transformacije bakterijskih stanica elektroporacijom, smjesa prethodno pripremljenih kompetentnih stanica i slobodne DNA u puferu niske ionske jakosti (npr. 10 %-tni glicerol) podvrgava se električnom pulsu u specijalnoj kiveti s metalnim pločicama. Jačina električnog pulsa ovisi o svojstvima stanice, električnom otporu medija i širini otopine u kiveti. Tipičan električni puls je jačine 2 do 8 kV/cm, a trajanje električnog pulsa je oko 5 ms (Micro-Pulser Electroporation Apparatus Operating Instructions and Application Guide, 165-2100).

Bakterijske stanice prije i poslije elektroporacije izložene su znatnom fizičkom i metaboličkom stresu, te zahtijevaju iznimno pažljivo rukovanje. Do trenutka elektroporacije kompetentne bakterijske stanice se čuvaju u otopini glicerola pri temperaturi od -70 °C, što omogućuje minimalno 6 mjeseci stabilnog skladištenja stanica. Suspenziju stanica prije same elektroporacije potrebno je otopiti na ledu do temperature od +4 °C. Nakon elektroporacije potrebno je osigurati optimalne uvjete preživljavanja zbog visokog metaboličkog stresa dodavajući u kivetu 1 ml hranjive podloge SOC (eng. Super Optimal broth with Catabolite repression) koji pospješuje preživljavanje transformiranih bakterija. Vrijeme između elektroporacije i dodavanja hranjive podloge SOC je ključno za preživljavanje stanica. Dodavanje hranjive podloge SOC suspenziji stanica samo 1 minutu nakon električnog pulsa smanjuje preživljenje stanica 3 puta u odnosu na slučaj dodavanja hranjive podloge SOC izravno nakon električnog pulsa (Dower i sur., 1988.).

2.4. Agarozna gel elektroforeza

Agarozna gel elektroforeza je najčešće korištena metoda za razdvajanje i vizualizaciju fragmenata DNA u biokemijskim, molekularno-biološkim i molekularno-genetičkim laboratorijima. Pritom se kružne molekule DNA iste veličine mogu razdvojiti temeljem različite konformacije dok se linearnim fragmentima DNA, pomoću elektroforeze, može relativno precizno odrediti veličina (broj parova baza), jer postoji definirana ovisnost između duljine fragmenta i brzine njegove migracije kroz gel, pri čemu veći fragmenti migriraju sporije jer teže prolaze kroz pore gela. Molekule migriraju kroz stacionarni nosač (agarozu) u puferiranoj otopini određene ionske jakosti (Lee i sur., 2012).

Gustoća gela određuje veličinu pora koje se formiraju u njemu, te time definiraju veličine molekula koje će se moći razdvojiti elektroforezom. Prilikom elektroforeze upotrebljava se agarozu niskog tališta što omogućava jednostavniju pripremu gela. Koncentracija agaroze u gelu može varirati od 0,5 % do 2 %. U procesu otapanja agaroze i pripreme gela koristi se isti pufer kao i tijekom elektroforeze. Najčešće se koriste TAE (sadrži Tris-acetat) i TBE pufer (sadrži Tris-borat) (Lee i sur., 2012).

Veličine fragmenata koji se mogu razdvojiti i uobičajenom agaroznom elektroforezom su od 100 pb do 25 kb. Ovisno o tipu i veličini fragmenata koje je potrebno razdvojiti postoje i specijalne izvedbe agarozne gel elektroforeze koje se, ovisno o potrebama, provode u nednaturirajućim ili denaturirajućim uvjetima (Lee i sur., 2012).

Uzorci otopine DNA za elektroforezu unose se u prethodno formirane jažice u gelu. Tijekom elektroforeze uzorci nukleinskih kiselina zbog negativnog naboja migriraju od negativne elektrode prema pozitivnoj. Radi praćenja tijekom elektroforeze, uzorcima se dodaje migracijsko bojilo koje olakšava unošenje uzorka u jažice gela, jer uzorak oboji i čini ga specifično težim od pufera za elektroforezu, te omogućuje procjenu približne pozicije fragmenata DNA tijekom elektroforeze. Migracijsko bojilo često se sastoji od dvije komponente/boje koje u gelu migriraju različitim brzinama. Kao komponente migracijskog bojila često se koriste ksilen cijanol koji daje plavo obojenje i bromfenol plavo koji daje ljubičasto obojenje. Za optimalne uvjete tijekom provođenja elektroforeze molekule DNA rezolucije veće od 2 kb u gelu standardne gustoće potrebno je osigurati naboj od 5 V/cm do 8 V/cm (Sambrook i Russell, 1982).

Elektroforeza se zaustavlja isključivanjem uređaja iz napajanja električnom energijom, te slijedi vizualizacija vrpca u agaroznom gelu. Jedna od najčešćih metoda vizualizacije DNA u agaroznom gelu je korištenje fluorescirajućih molekula, kao što je etidij bromid koji

interkalira u strukturu DNA, te pod UV-svjetlom valne duljine 365 nm oslobađa narančasto-crvenu boju (Lee i sur., 2012).

2.5. Restriksijska analiza plazmidne DNA

Restriksijska analiza plazmidne DNA provodi se najčešće u svrhu potvrde konstrukcije, odnosno strukture plazmida, a provodi se elektroforezom nakon cijepanja plazmida restriksijskim endonukleazama. Osim toga, restriksijska analiza se može koristiti i u svrhu određivanja približne strukture plazmida ili detekcije određenih plazmida u nekom uzorku kao što je čista ili mješovita bakterijska kultura. Pri ugradnji inserta u vektor važno je da vektor i insert imaju ravne ili međusobno kompatibilne („ljepljive“, komplementarne) krajeve koji se mogu ligirati pomoću DNA-ligaze. Odgovarajućom restriksijskom analizom, odnosno korištenjem restriksijskih enzima može se odrediti broj i orijentacija inserata u vektoru. (Southern, 1979.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

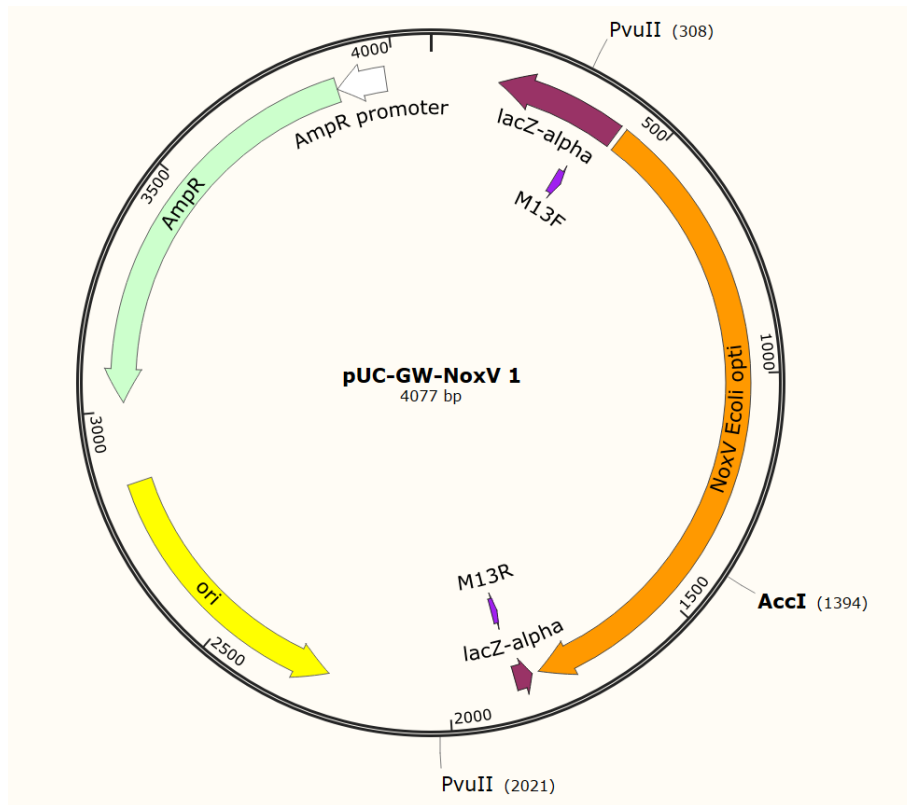
3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizam

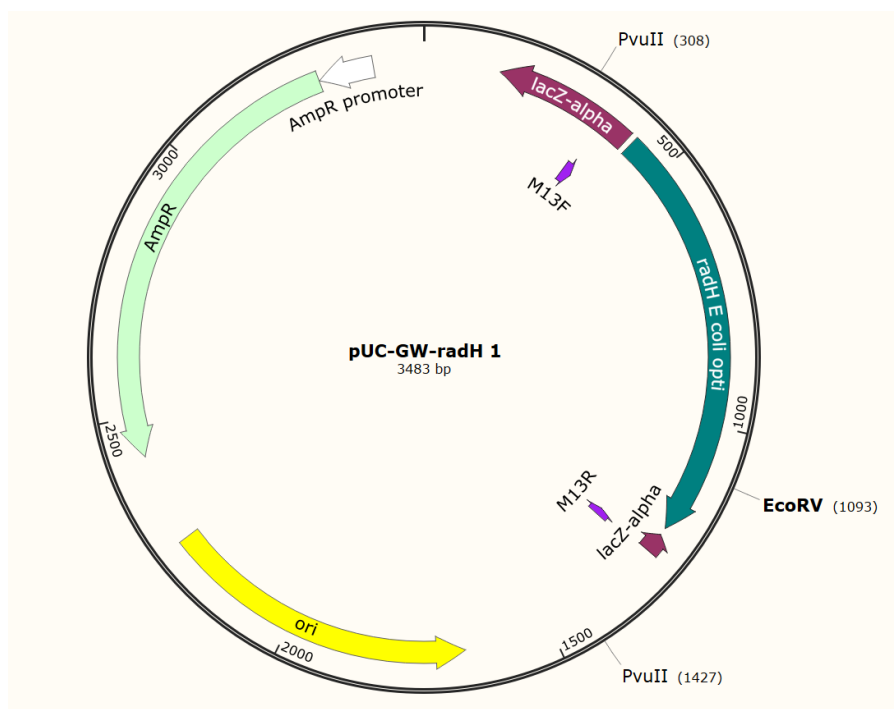
U radu je korištena bakterija *Escherichia coli* soj DH5 α genotipa *fhuA2 lac(del)UI69 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

3.1.2. Plazmidni vektori i inserti

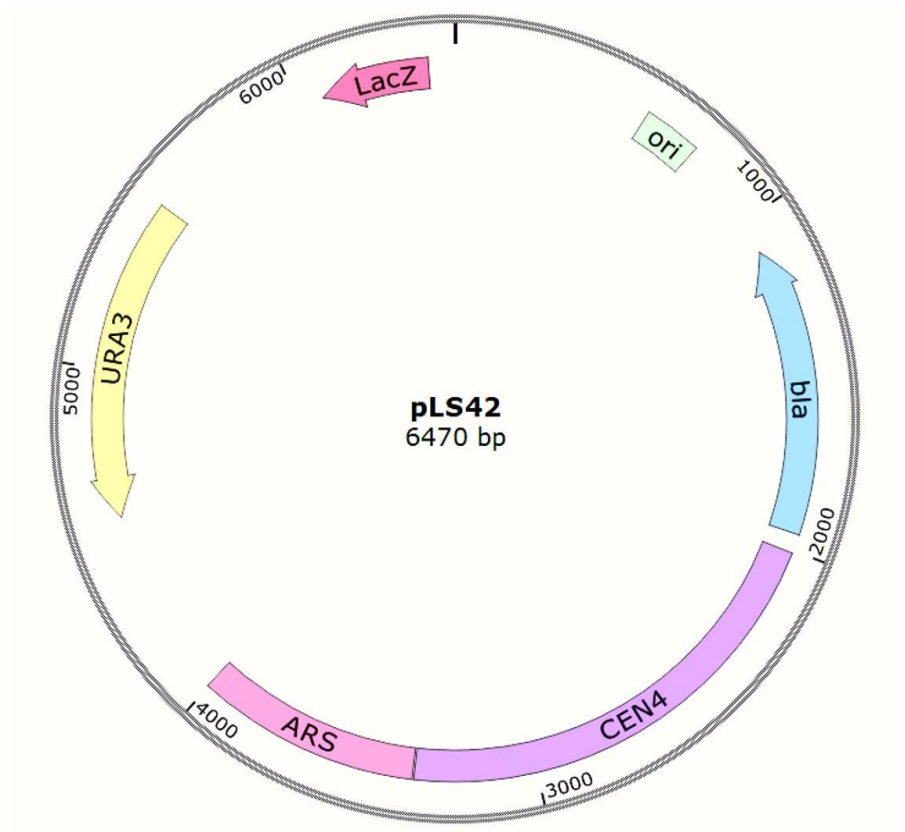
Bakterija *E. coli* transformirana je pomoću dva plazmida: pUC-GW-NoxV (Slika 1) i pUC-GW-radH (Slika 2). Oba plazmida sadrže ishodište replikacije za bakteriju *E. coli* (ori) koje omogućava samostalno repliciranje plazmida unutar bakterije *E. coli*, te regije Amp^R i Amp^R promotor koje omogućavaju sintezu proteina β -laktamaze. Sinteza β -laktamaze omogućavaju bakteriji rezistenciju na antibiotik ampicilin. Plazmidi se razlikuju prema insertu koji se u njima nalazi – gen NoxV ili gen RadH. Gen NoxV kodira za NADPH-oksidazu, dok gen RadH kodira za R-specifičnu alkohol dehidrogenazu. Navedeni plazmidi koristit će se u budućim istraživanjima u svrhu genetičke modifikacije nekonvencionalnih kvasaca. Inserti u plazmidu su umetnuti unutar regije lacZ-alpha koja može biti korištena u plavo-bijeloj selekciji transformanata. Također, korišten je plazmid pLS (Slika 3) za utvrđivanje uspješnosti transformacije.



Slika 1. Mapa plazmida pUC-GW-NoxV



Slika 2. Mapa plazmida pUC-GW-RadH



Slika 3. Mapa plazmida pLS

3.1.3. Restriksijski enzimi

Restriksijski enzimi korišteni za provođenje restriksijske analize su: AccI, PvuII i EcoRI. Cijepanje DNA provedeno je prema uputama proizvođača (New England Biolabs Inc.). Restriksijski enzimi čuvaju se u puferiranoj 50 %-tnoj otopini glicerola na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.4. Hranjive podloge

Sve hranjive podloge su sterilizirane u autoklavu 20 min na temperaturi od 121 °C. Čuvaju se na sobnoj temperaturi.

Sastav krute kompletne hranjive podloge LB (Luria-Bertani) s ampicilinom za uzgoj transformanata bakterije *E. coli*:

Agar	4,5 g
Ampicilin	750 µL
Bacto-tripton	3 g
Kvašćev ekstrakt	1,5 g
NaCl	3 g

Volumen: nadopunjeno destiliranom vodom 300 mL

Korištena otopina ampicilina (koncentracije 20 mg/mL) dodaje se u ohlađenu krutu hranjivu podlogu pri temperaturi od 58 °C do konačne koncentracije od 50 µg/mL.

Tekuća LB podloga:

Bacto-tripton	1 g
Kvašćev ekstrakt	0,5 g
NaCl	1 g

Volumen: nadopunjeno destiliranom vodom 100 mL

Hranjiva podloga SOC (eng. Super Optimal broth with Catabolite repression) za rekuperaciju bakterije *E. coli*:

Glukoza	360 mg
Bacto-tripton	2 g
Kvašćev ekstrakt	500 mg
NaCl	60 mg
KCl	20 mg
MgCl ₂	200 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250 mg

Volumen: nadopunjeno destiliranom vodom 100 mL

3.1.5. Kemikalije i enzimi

1 kb DNA Ladder: „New England Biolabs“, Ipswich, SAD
Agaroz: „Liofilchem“, Abruzzi, Italija
Ampicilin: „Sigma Aldrich, Darmstadt“, Njemačka
Bacto-tripton: „Biolife“, Milano, Italija
Borna kiselina: „Sigma Aldrich, Darmstadt“, Njemačka
Etidij bromid: „Sigma Aldrich, Darmstadt“, Njemačka
EDTA: „Sigma Aldrich, Darmstadt“, Njemačka
Glukoza: : „Sigma Aldrich“, Darmstadt, Njemačka
Kvašćev ekstrakt: „Biolife“, Milano, Italija
Komplet kemikalija za izolaciju plazmidne DNA: „New England Biolabs“, Ipswich, SAD
Restriksijski enzimi i odgovarajući puferi: „New England Biolabs“, Ipswich, SAD
Tris: „Sigma Aldrich, Darmstadt“, Njemačka
λ DNA-HindIII Digest: „New England Biolabs“, Ipswich, SAD

3.1.6. Otopine

TBE-pufer (10x):

Tris	108 g
Borna kiselina	55 g
EDTA (0.5 M; pH 8.0)	40 mL
Destilirana voda do 1000 mL	

Agarozni gel (0.8 %) za gel-elektroforezu:

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

Otopine plazmidne DNA nanošene za gel elektroforezu (x4):

Otopina izolirane plazmidne DNA	2 μL
Destilirana voda	4 μL
Migracijsko bojilo (6x koncentrirano)	1 μL

Otopina za elektroporaciju stanica bakterije *E. coli*:

Suspenzija bakterije <i>E. coli</i>	40 μ L
Otopine plazmidnih vektora (x2):	
Otopina pUC-GW-NoxV (4 μ g/10 μ L)	1 μ L
Otopina pUC-GW-RadH (2 μ g/10 μ L)	1 μ L
Otopina pUC-GW-Amp (1 ng/ μ L)	1 μ L

U kontrolnu otopinu nije dodana otopina plazmidnog vektora.

Nadopunjeno 1 mL hranjive podloge SOC nakon elektroporacije.

Otopina DNA standarda nanošena za gel elektroforezu:

λ DNA-HindIII Digest (100 ng/ μ L)	1 μ L
ili	
1 kb DNA Ladder (500 ng/ μ L)	0,5 μ L
Migracijsko bojilo (6x koncentrirano)	1 μ L
Destilirana voda	4 μ L

Otopina izolirane plazmidne DNA nanošena za gel elektroforezu:

Otopina izolirane plazmidne DNA	2 μ L
Migracijsko bojilo (6x koncentrirano)	1 μ L
Destilirana voda	4 μ L

Restriksijska otopina:

Otopina izolirane plazmidne DNA	2 μ L
Odgovarajući pufer za provođenje restrikcije	1 μ L
Otopina restriksijskog enzima	0,2 μ L
Destilirana voda	6,8 μ L

Otopina za vizualizaciju DNA

Etidijev bromid 0,5 μ g/L	1 L
-------------------------------	-----

3.2. Metode

3.2.1. Transformacija bakterije *Escherichia coli* elektroporacijom

Kompetentne stanice bakterije *E. coli* izvade se iz zamrzivača na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ i otope na ledu. U $40\text{ }\mu\text{L}$ suspenzije kompetentnih stanica doda se $1\text{ }\mu\text{L}$ otopine plazmidne DNA otopljene u puferu male ionske jakosti. Za određivanje uspješnosti elektroporacije koristio se plazmid pLS. Uz uzorke u kojima su dodani plazmidi pripremljena je kontrola u čiju suspenziju bakterije *E. coli* nije dodana otopina plazmidnog vektora. Smjesa kompetentnih stanica bakterije *E. coli* i plazmida promiješa se pipetiranjem i inkubira na ledu 1 minutu, te se zatim prenese u ohlađenu kivetu za elektroporaciju. Na elektroporatoru se odabere parametar električnog napona za bakteriju *E. coli* ($2,50\text{ kV}$). Prilikom transformacije zabilježi se postignuta vrijednost električnog napona i vrijeme trajanje električnog pulsa u svakom pojedinom uzorku (Tablica 3). Neposredno nakon električnog pulsa suspenzija stanica resuspendira se dodatkom 1 mL hranjive podloge SOC. Suspenzije se zatim inkubiraju 1 h na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2. Selekcija i uzgoj transformiranih bakterija *Escherichia coli*

Nakon inkubacije suspenzije bakterijskih stanica (suspenzija za transformaciju) jedan sat pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, suspenzija je nacijepljena na krutu hranjivu podlogu LB s ampicilinom na način da je na jednu podlogu nacijepljeno $5\text{ }\mu\text{L}$, na drugu $50\text{ }\mu\text{L}$, a na treću preostali volumen suspenzije. Nacijepljivanje je provedeno pomoću staklenih kuglica, a nacijepljene hranjive podloge inkubirane su preko noći pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Potom su porasle kolonije transformanata nacijepljene u po 5 mL tekuće hranjive podloge LB s ampicilinom i to po dvije kolonije za svaki plazmid (pUC-GW-NoxV i pUC-GW-RadH). Nacijepljene tekuće hranjive podloge (ukupno 4) inkubirane su preko noći na tresilici pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3. Izolacija plazmidne DNA iz bakterije *Escherichia coli* iz malog volumena

Iz 5 mL prekonoćne kulture, bakterijske stanice izdvoje se centrifugiranjem 45 sekundi na 8000 okretaja/min. Za izolaciju plazmidne DNA korišten je komercijalni set kemikalija i kolonice (Monarch® Plasmid DNA Miniprep Kit) proizvođača New England Biolabs Inc., te je postupak proveden prema uputama proizvođača. Talog stanica resuspendira se u 200 μ L pufera za resuspenziju B1. Resuspendirani talog se primiješa pipetiranjem, te se doda 200 μ L pufera za lizu B2. Sastav mikrokivete pažljivo se promiješa okretanjem 5 do 6 puta prateći promjene u boji, prozirnosti i viskoznosti, te se potom inkubira pri sobnoj temperaturi 1 minutu. Pri tome otopina u mikrokiveti poprima prozirnu ružičastu boju i viskoznu teksturu što je indikacija uspješne lize bakterijskih stanica.

Nakon inkubacije u sastav mikrokivete dodaje se 400 μ L neutralizacijskog pufera B3 i promiješa se okretanjem. Miješanjem otopina promijeni svoju boju u žutu i stvori se talog proteina. Potom se vrši inkubacija pri sobnoj temperaturi 2 minute i centrifugira se 2 do 5 minuta pri 8000 okretaja/min. Nakon centrifugiranja supernatant pažljivo se prebaci u kolonu za filtraciju centrifugiranjem, koja dolazi s korištenim kitom za plazmidnu izolaciju, potom se centrifugira 1 minutu pri 8000 okretaja/min i odbaci se filtrat. Kolonica se ispere sa 200 μ L pufera za ispiranje 1, a zatim s 400 μ L pufera za ispiranje 2. Nakon ispiranja kolonica se premjesti u čistu sterilnu mikrokivetu, a na vrh se doda 30 μ L pufera za eluciju, inkubira se 1 minutu pri sobnoj temperaturi i centrifugira se 1 min pri 8000 okretaja/min. Po završetku centrifugiranja u mikrokiveti nalazi se otopina izolirane plazmidne DNA.

3.2.4. Cijepanje plazmidne DNA restrikcijskim enzimima

Restrikcijske otopine za cijepanje restrikcijskim endonukleazama PvuII, AccI i EcoRI pripremljene su prema uputama proizvođača (New England Biolabs Inc.) i inkubirane preko noći u vodenoj kupelji na 37 °C. Palindromske sekvence nukleotida koje prepoznaju navedene restrikcijske endonukleaze i njihov način cijepanja prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Korišteni restrikcijski enzimi i odgovarajuće palindromske sekvence DNA

Restrikcijski enzim	Palindromska sekvenca cijepanja
PvuII	5'...CAG [▼] CTG...3' 3'...GTC [▲] GAC...5'
AccI	5'...GT [▼] MKAC...3' 3'...CAKM [▲] TG...5'
EcoRI	5'...G [▼] AATTC...3' 3'...CTTAA [▲] G...3'

Dodatna nomenklatura nukleotida: M=A ili C, K = G ili T

3.2.5. Elektroforeza u agaroznom gelu i vizualizacija DNA

U svrhu razdvajanja izolirane plazmidne DNA korištena je agarozna horizontalna gel elektroforeza u TBE puferu. Agarozni gel za elektroforezu je pripremljen zagrijavanjem 0,8 %-tne otopine agaroze u TBE puferu nekoliko puta do vrenja sve dok nije došlo do potpunog otapanja agaroze. Tako pripremljeni agarozni gel ohladi se na sobnoj temperaturi do oko 50 °C i zatim se ulijeva u kalup u koji je umetnut češljic za formiranje jažica. Nakon skrućivanja gel se postavi u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazi TBE pufer radne koncentracije. Gel treba u potpunosti biti uronjen u pufer.

Nakon elektroforeze agarozni gel je inkubiran 15 min u otopini etidij bromida u prostoriji bez svjetla nakon čega se pomoću transiluminatora gel izloži UV svjetlu i fotografira kroz crveni filter za dobivanje slike gela s vidljivim vrpčama DNA.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je transformirati bakteriju *E. coli* plazmidima pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV. Transformacija je provedena elektroporacijom (Poglavlje 4.1.), a transformanti su selekcionirani na hranjivoj podlozi s ampicilinom. Uz transformaciju plazmidima pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV, bakterija *E. coli* transformirana je i plazmidom pLS poznate koncentracije kako bi se odredila uspješnost transformacije. Odabrane kolonije transformanata dobivenih transformacijom plazmidima pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV nacijepnjene su u tekuću hranjivu podlogu s ampicilinom, te je iz njih izolirana plazmidna DNA. Potom su transformanti, odnosno uspješnost transformacije, provjereni elektroforezom kružnih plazmida (Poglavlje 4.2.) i restrikcijskom analizom (Poglavlje 4.3.).

4.1. Transformacija bakterije *E. coli*

Transformacija bakterije *E. coli* provedena je prema uputama proizvođača uređaja za elektroporaciju (elektroporator MicroPulser™ Electroporation Apparatus, BioRad) (Poglavlje 3.2.1.). Koncentracije otopina pojedinih plazmida korištenih za transformaciju prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Koncentracije otopina plazmida korištenih za transformaciju.

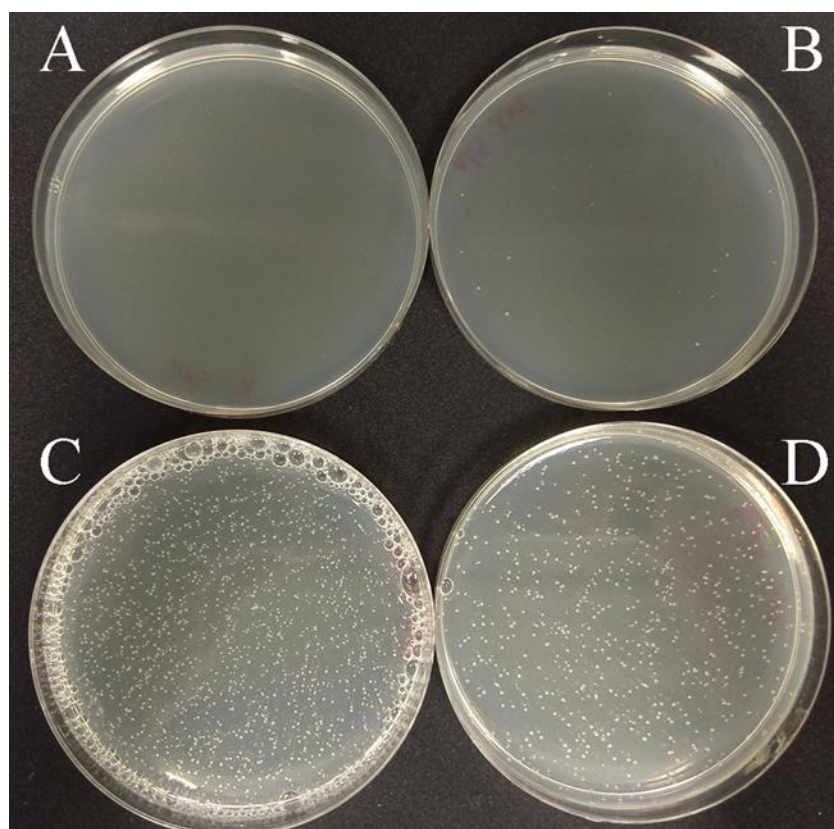
Plazmid	Koncentracija
Kontrola bez DNA	0 µg/µL
pLS	0,001 µg/µL
pUC-GW-RadH	0,2 µg/µL
pUC-GW-NoxV	0,4 µg/µL

Za transformaciju bakterije *E. coli* korišten je po 1 µL otopine određenih plazmida koji su navedeni u Tablici 2, a uvjeti elektroporacije bakterijskih stanica tijekom transformacije prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti elektroporacije bakterije *E. coli* pri transformaciji

Plazmid	Električni napon	Trajanje električnog pulsa
Kontrola bez DNA	2,50 kV	5,60 ms
pLS	2,47 kV	5,70 ms
pUC-GW-RadH	2,49 kV	5,40 ms
pUC-GW-NoxV	2,49 kV	5,50 ms

Nakon provedene transformacije, suspenzije bakterijskih stanica naciepljene su na krute hranjive podloge kao što je to opisano u Poglavlju 3.2.2. i inkubirane su preko noći pri 37 °C. Na Slici 4 prikazane su odabrane hranjive podloge nakon inkubacije.



Slika 4. Krute hranjive podloge naciepljene s transformiranim bakterijskim stanicama, nakon prekononoćne inkubacije. A) uzorak bez DNA, B) transformanti dobiveni transformacijom s plazmidom pLS, C) transformanti dobiveni transformacijom s plazmidom pUC-GW-NoxV, D) transformanti dobiveni transformacijom s plazmidom pUC-GW-RadH.

Kao što je bilo i očekivano, kada u suspenziju za transformaciju nije dodana DNA (negativna kontrola), nije dobiven niti jedan transformant (Slika 4, A). Na temelju broja poraslih transformanata nakon transformacije izračunata je uspješnost transformacije prema slijedećim formulama:

Volumen suspenzije stanica za transformaciju

= volumen suspenzije kompetentnih bakterija E. coli + volumen otopine plazmidne DNA +
volumen SOC hranjive podloge = 0,040 mL+0,001 mL+1 mL=1,041 mL

$$\text{Uspješnost transformacije} = \frac{\text{broj transformanata}}{\mu\text{g DNA}}$$

$$= \frac{\text{broj transformanata}}{\mu\text{g DNA}} \times \frac{\text{volumen transformacijske suspenzije [mL]}}{\text{nacijepljeni volumen na podlozi [mL]}}$$

Uspješnost transformacije s otopinom plazmida pLS

$$= \frac{16 \text{ transformanata}}{0,001 \mu\text{g}} \times \frac{1,041 \text{ mL}}{0,005 \text{ mL}} = 3,331 \times 10^6 \text{ transformanata}/\mu\text{gDNA}$$

Uspješnost transformacije s otopinom plazmida pUC-GW-RadH

$$= \frac{350 \text{ transformanata}}{0,2 \mu\text{g}} \times \frac{1,041 \text{ mL}}{0,005 \text{ mL}} = 3,644 \times 10^5 \text{ transformanata}/\mu\text{gDNA}$$

Uspješnost transformacije s otopinom plazmida pUC-GW-NoxV

$$= \frac{760 \text{ transformanata}}{0,4 \mu\text{g}} \times \frac{1,041 \text{ mL}}{0,005 \text{ mL}} = 3,956 \times 10^5 \text{ transformanata}/\mu\text{gDNA}$$

Uspješnosti transformacije postignute s pojedinim plazmidima prikazane su u Tablici 4.

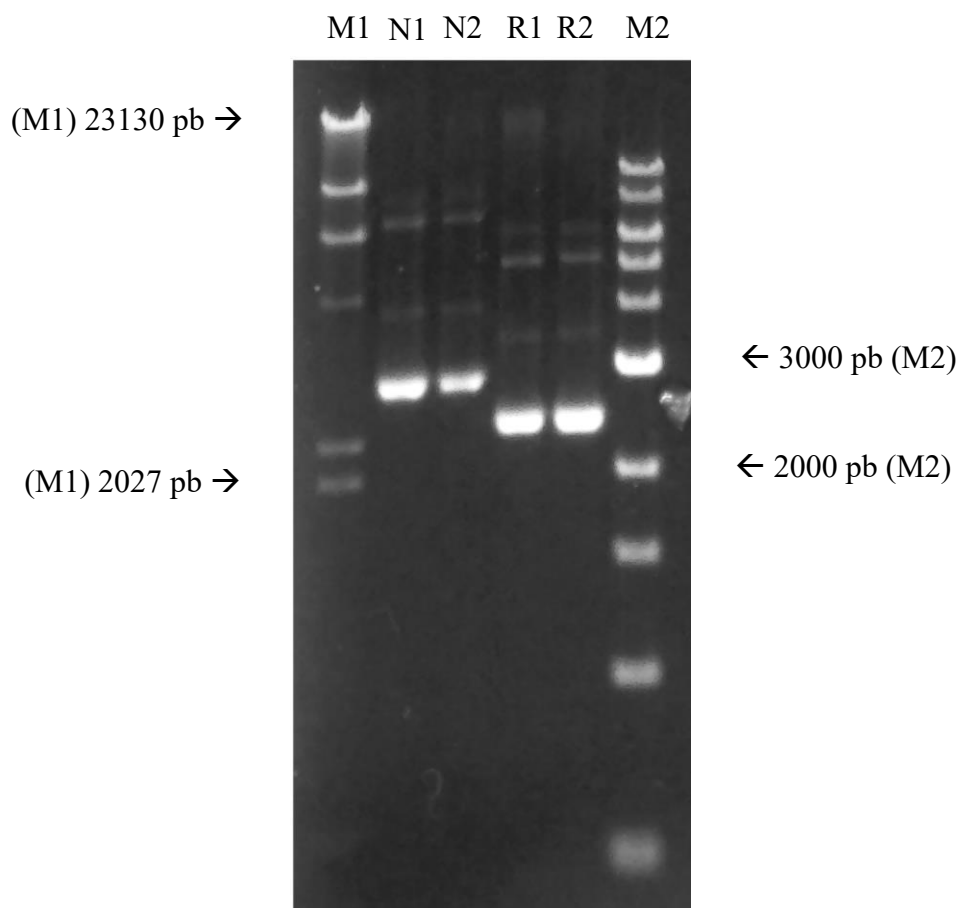
Tablica 4. Uspješnosti transformacije postignute s plazmidima pLS, pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV

Plazmid	Uspješnost transformacije
pLS	$3,331 \times 10^6$ transformanata/ μgDNA
pUC-GW-RadH	$3,644 \times 10^5$ transformanata/ μgDNA
pUC-GW-NoxV	$3,956 \times 10^5$ transformanata/ μgDNA

U svrhu izolacije i provjere strukture plazmida pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV, po dvije kolonije transformanata dobivenih transformacijom ovim plazmidima nacijepljene su u 5 mL krute hranjive podloge LB s ampicilinom i inkubirane preko noći na tresilici

4.2. Gel elektroforeza kružnih plazmida

Nakon uzgoja u tekućoj hranjivoj LB podlozi s ampicilinom, iz dva nasumično odabrana transformanta dobivena transformacijom s plazmidom pUC-GW-NoxV i dva nasumično odabrana transformanta dobivena transformacijom s plazmidom pUC-GW-RadH, izolirana je plazmidna DNA prema uputama proizvođača seta kemikalija za izolaciju plazmida (Monarch® Plasmid DNA Miniprep) (Poglavlje 3.2.3.). Uspješnost izolacije plazmida provjerena je elektroforezom u 0,8%-tnom agaroznom gelu (Slika 5).



Slika 5. Rezultat gel elektroforeze izoliranih kružnih plazmida

M1 – standard za gel elektroforezu (DNA bakteriofaga lambda pocijepana restrikcijom enzimom HindIII)

N1, N2 – plazmidna DNA iz transformanata dobivenih plazmidom pUC-GW-NoxV

R1, R2 – plazmidna DNA iz transformanata dobivenih plazmidom pUC-GW-RadH

M2 – standard za gel elektroforezu (NEB 1kb DNA ladder).

Iz rezultata prikazanih na Slici 5 vidi se da je plazmidna DNA uspješno izolirana. Zbog razlike u veličini, plazmidi pUC-GW-NoxV i pUC-GW-RadH (Slika 1 i Slika 2, Poglavlje 3.1.2.) tijekom elektroforeze migriraju različitim brzinama. Budući da je manji, plazmid pUC-GW-RadH migrira nešto brže (Slika 5, uzorci R1 i R2), a plazmid pUC-GW-NoxV sporije (Slika 5, uzorci N1 i N2).

4.3. Restriksijska analiza

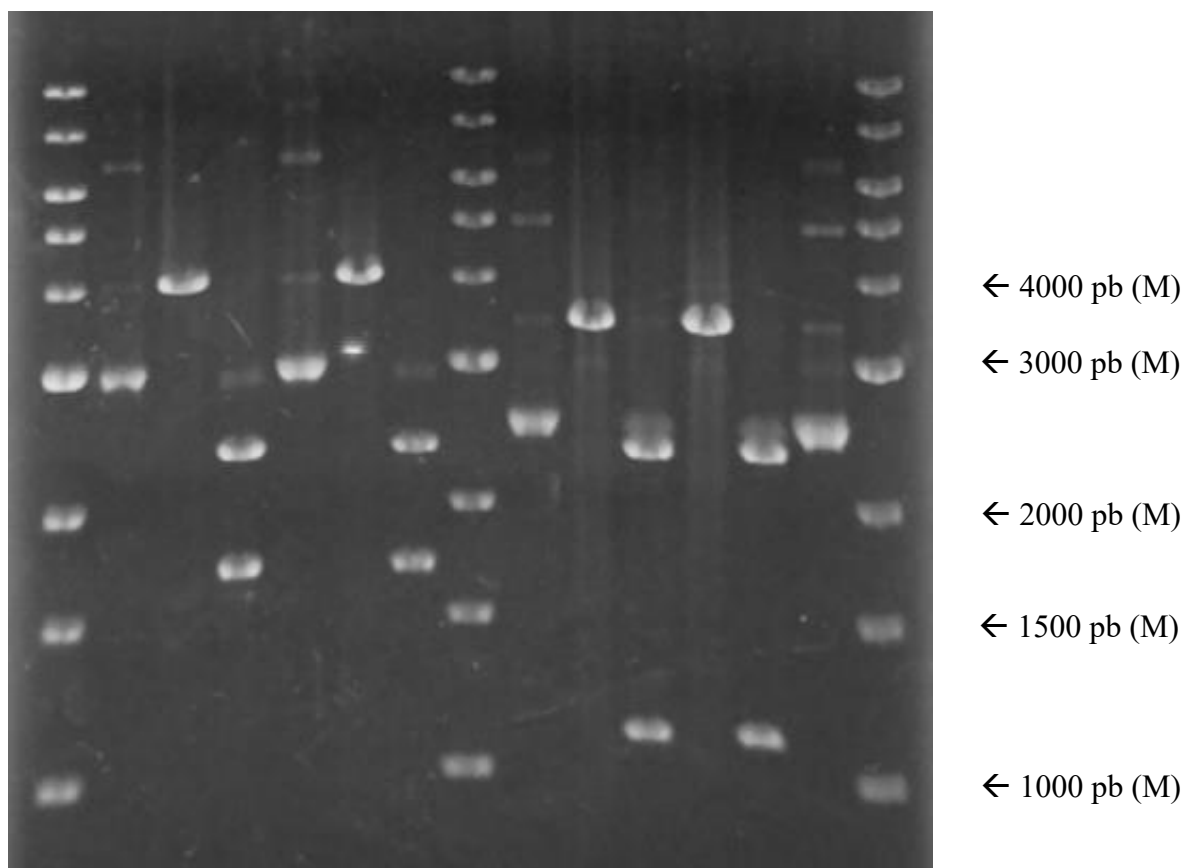
U svrhu provjere strukture plazmida pUC-GW-NoxV i pUC-GW-RadH, provedena je njihova restriksijska analiza s ciljem da se ustanovi da li rezultati restriksijske analize odgovaraju mapama plazmida koje su prikazane na Slici 1 i Slici 2. Plazmid pUC-GW-NoxV je pocijepan restriksijskim enzimima PvuII i AccI, a plazmid pUC-GW-RadH restriksijskim enzimima PvuII i EcoRI. U Tablici 5 prikazane su očekivane duljine fragmenata za plazmide pUC-GW-NoxV i pUC-GW-RadH nakon cijepanja odgovarajućim restriksijskim enzimima.

Tablica 5. Očekivane duljine fragmenata plazmida nakon restriksijske analize na temelju njihovih mapa (Slika 1 i Slika 2).

Plazmid	PvuII	AccI	EcoRI
pUC-GW-NoxV	2364 pb i 1713 pb	4077 pb	/
pUC-GW-RadH	2346 pb i 1119 pb	/	3483 pb

Budući da restriksijski enzim PvuII oba plazmida cijepa na dva mjesta, nakon restrikcije s ovim enzimom očekuju se po dva fragmenta. Osim toga, enzim AccI cijepa samo plazmid pUC-GW-NoxV, a enzim EcoRI cijepa samo plazmid pUC-GW-RadH, i to samo na jednom mjestu. Stoga cijepanjem ovim enzimima nastaje samo po jedan fragment DNA čija je veličina jednaka veličini plazmida. Rezultati restriksijske analize plazmida pUC-GW-NoxV i pUC-GW-RadH prikazani su na Slici 6.

M N1 N2 N3 N1 N2 N3 M R1 R2 R3 R2 R3 R1 M



Slika 6. Rezultat restrikcijske analize plazmida pUC-GW-NoxV i pUC-GW-RadH

M – standard za gel elektroforezu (NEB 1kb DNA ladder)

N1 – nepocijepani plazmid pUC-GW-NoxV

N2 – plazmid pUC-GW-NoxV pocijepan s AccI

N3 – plazmid pUC-GW-NoxV pocijepan s PvuII

R1 – nepocijepani plazmid pUC-GW-RadH

R2 – plazmid pUC-GW-RadH pocijepan s EcoRI

R3 – plazmid pUC-GW-RadH pocijepan s PvuII

Iz rezultata restrikcijske analize (Slika 6) vidi se da je duljina fragmenata plazmidne DNA nastalih cijepanjem plazmida pUC-GW-NoxV i pUC-GW-RadH restrikcijskim enzimima PvuII, EcoRI i AccI u skladu s očekivanim duljinama fragmenata (Slika 1 i Slika 2, Tablica 5). Ovaj rezultat potvrđuje da su se plazmidi pUC-GW-NoxV i pUC-GW-RadH stabilno replicirali u bakteriji *E.coli* soja DH5 α , te se transformanti dobiveni u ovom radu mogu koristiti za umnažanje i izolaciju ovih plazmida za potrebe daljnjeg znanstveno-istraživačkog rada.

5. ZAKLJUČAK

Bakterija *Escherichia coli* soja DH5 α uspješno je transformirana plazmidima pUC-GW-NoxV i pUC-GW-RadH. Navedeni plazmidi uspješno su umnoženi i izolirani iz bakterijskih kultura, a njihova struktura potvrđena je restrikcijskom analizom. Stoga se transformanti dobiveni u ovom radu mogu koristiti za umnažanje i izolaciju navedenih plazmida.

6. POPIS LITERATURE

Ammar, E.M., Wang, X., Rao, C.V. (2018) Regulation of metabolism in *Escherichia coli* during growth on mixtures of the non-glucose sugars: arabinose, lactose, and xylose. *Sci. Rep.* [online] **8**, 609, <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-18704-0>>. Pristupljeno 25. svibnja 2022.

Arnak, R., Altun, B., Tosato, V., Bruschi, C.V. (2016) Multiple Antibiotic Resistance Plasmids Allow Scalable, PCR-Mediated DNA Manipulation and Near-Zero Background Cloning. *Food Technol Biotechnol. Food Technol. Biotechnol.* **54**, 257-265. doi: 10.17113/ftb.54.03.16.4230

Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M., Ramadan, H. A., Saini, K. S., Redwan, E. M. (2014) Cell factories for insulin production. *Microbial cell factories. Microb. Cell Fact* [online] **13**, 141, <<https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>>. Pristupljeno 29. svibnja 2022.

Blattner, F.R., Plunkett, G., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1462. doi: 10.1126/science.277.5331.1453.

Britannica Online Encyclopedia (2015) Facts about *E. coli*: dimensions, as discussed in bacteria: Diversity of structure of bacteria, <<https://www.britannica.com/science/bacteria/Diversity-of-structure-of-bacteria>>. Pristupljeno 25. svibnja 2022.

Casali, N., Preston, A. (2003) *E. Coli* Plasmid Vectors: Methods and Applications. 6. izd., Humana Press, Totowa

Cornelis, P. (2000) Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments *Current Opinion in Biotechnology. Current Opinion in Biotechnology* [online] **11**, 450-454. <[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00131-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00131-2)>. Pristupljeno 27. svibnja 2022.

del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M.J., Espinosa, M., Díaz-Orejas, R. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 434-464. doi: 10.1128/MMBR.62.2.434-464.1998

Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145. doi: 10.1093/nar/16.13.6127.

Hayes, F. (2003) The Function and Organization of Plasmids. *Methods Mol Biol.* **235**, 1-17. doi: 10.1385/1-59259-409-3:1.

Hudault, S., Guignot, J., Servin, A.L. (2001) *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut.* **49**, 47-55. doi:10.1136/gut.49.1.47

Lawrence, J.G., Ochman, H. (1998) Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **16**, 4-7. doi: 10.1073/pnas.95.16.9413

Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.Y., Kim, Y.H. (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Vis. Exp.* **62**, 3923. doi: 10.3791/3923

Manna, S., Harman, A., Accari, J., Barth, C. (2013) Altering the selection capabilities of common cloning vectors via restriction enzyme mediated gene disruption. *BMC Res. Notes.* **6**, 85, doi: 10.1186/1756-0500-6-85

Nora, L. C., Westmann, C. A., Martins-Santana, L., Alves, L. F., Monteiro, L., Guazzaroni, M. E., Silva-Rocha, R. (2019) The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. *Microbial biotechnology. Microb. Biotechnol.* **12**, 125–147. doi: 10.1111/1751-7915.13318

Reddy, M. (2004) Positive selection system for identification of recombinants using alpha-complementation plasmids. *Biotechniques.* **37**, 948-952. doi: 10.2144/04376ST03

Sambrook, J., Russell, D. (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3. izd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Serres, M.H., Gopal, S., Nahum, L.A., Liang, P., Gaasterland, T., Riley, M. (2001) A functional update of the *Escherichia coli* K-12 genome. *Genome Biol.* **2**, članak broj: research0035.1. doi: 10.1186/gb-2001-2-9-research0035

Smillie, C., Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P., de la Cruz, F. (2010) Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 434-452. doi: 10.1128/MMBR.00020-10.

Southern, E. (1979) Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol.* **68**, 152-176. doi: 10.1016/0076-6879(79)68011-4