

Izolacija plazmida pBAD-HheC, pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV iz velikog volumena kulture bakterije *Escherichia coli*

Vasung, Emma Karolina

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:159:045114>

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 Nutricionizam**

**Emma Karolina Vasung
0058215771**

**Izolacija plazmida pBAD-HheC, pUC-GW-RadH i
pUC-GW-NoxV
iz velikog volumena kulture bakterije *Escherichia coli***

ZAVRŠNI RAD

Genetičko inženjerstvo

Mentor: doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizma

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Izolacija plazmida pBAD-HheC, pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV iz velikog volumena
kulture bakterije *Escherichia coli*
Emma Karolina Vasung, 0058215771**

Sažetak: Plazmidi su iznimno važni u genetičkom inženjerstvu, gdje se upotrebljavaju kao vektori, tj. molekule DNA koje omogućuju umnožavanje kloniranog fragmenta DNA u stanici domaćinu. U genetičkom inženjerstvu *E. coli* se koristi kao univerzalan domaćin za kloniranje. Cilj ovog rada bio je izolirati plazmide pBAD-HheC, pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV iz velikog volumena bakterije *Escherichia coli*. Nakon izolacije i pročišćavanja plazmidne DNA, provedena je gel-elektroforeza radi provjere uspješnosti izolacije. Stvarna struktura izoliranih plazmida provjerena je restrikcijskom analizom pomoću dva restrikcijska enzima. Veličina dobivenih fragmenata nakon cijepanja bila je u skladu s restrikcijskim mapama plazmida.

Ključne riječi: *Escherichia coli*, plazmid, izolacija, ekspresijski vektor

Rad sadrži: 22 stranica, 7 slika, 2 tablica, 18 literaturnih 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: doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Datum obrane: 13. rujan 2022

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Isolation of plasmids pBAD-HheC, pUC-GW-RadH and pUC-GW-NoxV from a large volume of
Escherichia coli culture

Emma Karolina Vasung, 0058215771

Abstract: Plasmids play an important role in genetic engineering; they are used as vectors, i.e., DNA molecules which allow the cloned DNA fragment to be propagated in the host cell. In genetic engineering, *E. coli* is used as a universal host for cloning. The aim of this work was to isolate the plasmids pBAD-HheC, pUC-GW-RadH and pUC-GW-NoxV from a large volume of *E. coli* culture. Following the isolation and purification of the plasmid DNA, gel-electrophoresis was used to determine whether the DNA isolation was successful. The actual structure of the isolated plasmids was confirmed using restriction enzyme analysis. The size of the cleaved fragments matched the restriction maps of the plasmids.

Keywords: *Escherichia coli*, plasmid, isolation, expression vector

Thesis contains: 22 pages, 7 figures, 2 tables, 18 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: Marina Svetec Miklenić, PhD

Thesis defended: 13. rujan 2022

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Bakterija <i>Escherichia coli</i>	2
2.2. Plazmidni vektori.....	3
2.3. Ekspresijski vektori u <i>E. coli</i>	4
2.4. Promotori u ekspresijskim vektorima	5
2.5. Seleksijski markeri u ekspresijskim vektorima	5
2.6. Afinitetne oznake u ekspresijskim vektorima	6
2.7. Sojevi <i>E. coli</i> za ekspresiju rekombinantnih proteina.....	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	7
3.1. Materijali.....	7
3.1.1. Mikroorganizmi	7
3.1.2. Plazmidi	7
3.1.3. Restriksijski enzimi	9
3.1.4. Hranjiva podloga.....	9
3.1.5. Otopine.....	9
3.1.5.1. Otopine za izolaciju i pročišćavanje dna	9
3.1.5.2. Otopine za gel-elektroforezu	11
3.1.6. Kemikalije i enzimi.....	12
3.2. Metode	13

3.2.1. Uzgoj bakterije <i>Escherichia coli</i>	13
3.2.2. Izolacija plazmidne DNA iz velikog volumena kulture bakterije <i>E. coli</i>	13
3.2.3. Pročišćavanje DNA fenolizacijom i taloženje DNA.....	13
3.2.4. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima	14
3.2.5. Gel-elektroforeza	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. Izolacija plazmida pBAD-HheC, pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV.....	15
4.2. Restrikcijska analiza plazmida pBAD-HheC, pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV	17
5. ZAKLJUČAK	19
6. POPIS LITERATURE	20

1. UVOD

Plazmidi su iznimno važni u genetičkom inženjerstvu, gdje se upotrebljavaju kao vektori, tj. molekule DNA koje omogućuju umnožavanje kloniranog fragmenta DNA u stanici domaćinu. U tu se svrhu plazmidna DNA reže pomoću restrikcijskih endonukleaza, a na mjestu reza se insertira odabrani gen. Plazmid pBR322 jedan je od prvih plazmida koji se koristio u genetičkom inženjerstvu, a danas se koriste suvremeni plazmidi poput pUC19.

Bakterija *Escherichia coli* je najčešće korišten domaćin za kloniranje, a ujedno je i najvažniji modelni organizam u istraživanjima molekularne biologije i molekularne genetike bakterija. *E. coli* je dio normalne crijevne mikrobiote sisavaca te je važna za sintezu vitamina K i B12. Sojevi bakterijske vrste *E. coli* imaju raznolika svojstva, a pojedini sojevi mogu biti patogeni te uzrokovati bolesti kao što su dijareja, dizenterija i infekcije mokraćnog sustava (Kaper i sur., 2004).

Cilj ovog rada je izolirati tri plazmida: pBAD-HheC, pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV iz velikog volumena kulture bakterije *Escherichia coli*. Izolirani plazmidi koristit će se u daljnim istraživanjima u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama za kloniranje i ekspresiju kloniranih gena u bakteriji *E. coli*. Uspješnost izolacije plazmida nužno je provjeriti gel-elektroforezom, a provedena je i restrikcijska analiza izoliranih plazmida kako bi se potvrdilo da li njihova struktura odgovara restrikcijskim mapama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterija *Escherichia coli*

Escherichia coli je prokariotski organizam iz porodice *Enterobacteriaceae*. To je gram-negativna, fakultativno anaerobna, nesporogena štapićasta bakterija. Otkrio ju je pedijatar i bakteriolog Theodor Escherich 1885. godine. Stanice *E. coli* prosječno su dugačke 2-6 μm i široke 1,1-1,5 μm . Postoji velik broj različitih sojeva ove bakterije s različitim karakteristikama. U znanstvenim istraživanjima se najčešće koriste nepatogeni sojevi B i K-12. Ova bakterija se koristi kao modelni organizam u molekularnoj biologiji i genetici te se pomoću metoda genetičkog inženjerstva iz *E. coli* uspješno izoliraju genski produkti poput inzulina. *Escherichia coli* lako se uzgaja iz više razloga: optimalna temperatura za rast *E. coli* je 37 °C, generacijsko vrijeme je 20 minuta što omogućuje da se uzgoji veliki broj stanica u kratkom vremenu te se može uzgajati u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Također, lako se transformira s bakteriofagom λ i plazmidnom DNA (Idalia i Bernardo, 2017).

Genom bakterije *E. coli* sastoji se od jedne molekule kružne dsDNA, dugačak je oko $4,6 \cdot 10^6$ parova baza i potpuno je sekvencioniran 1997. godine. Bakterija ima oko 4290 gena čija je prosječna duljina 950 parova baza. Geni koji kodiraju za proteine čine 87,8% genoma, 0,8% kodira za RNA molekule, 0,7% genoma čine nekodirajuća ponavljanja dok 11% čine regulatorne i druge sekvencije (Blattner i sur., 1997).

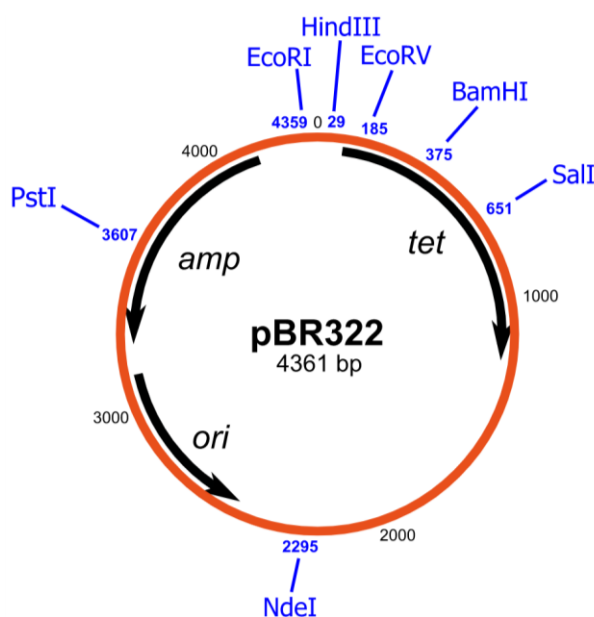
U genetičkom inženjerstvu *E. coli* se koristi kao univerzalan domaćin za kloniranje, ali ne koristi se divlji tip bakterije, već odgovarajući genetički modificirani sojevi. Neke od uobičajenih mutacija koje genetički modificirani sojevi imaju su: metilacija GATC sekvencije, mutacija gena *lacZ*, delecija fragmenta od *lac* operona do operona *proAB*, mutacija u genima *ung* i *dut* itd. Mutacije se najčešće uvode u svrhu povećanja efikasnosti transformacije, stabilnosti plazmida i proizvedenih proteina te smanjenja rekombinacije plazmida.

E. coli se koristi kao domaćin za heterolognu ekspresiju proteina jer je dobro istražena, lako se njome manipulira, postoji više različitih metoda i vektora za ekspresiju, te je njen uzgoj jednostavan i jeftin (Hyvonen, 2004). Međutim, postoje i nedostaci koje treba uzeti u obzir prilikom izbora *E. coli* kao domaćina. Naime, bakterija nema većinu posttranslacijskih modifikacija (proteoliza, disulfidne veze) koje eukariotske stanice imaju, te u njoj ne može doći do izrezivanja introna. Uz to, pojedine sekvencije unutar introna su slične terminatorima zbog čega dolazi do preranog prekida transkripcije.

2.2. Plazmidni vektori

Plazmidi su relativno male kružne ekstrakromosomske molekule DNA. Sadrže ishodište replikacije te dodatne gene koji mogu utjecati na fenotip i genotip bakterije poput gena koji su odgovorni za rezistenciju na antibiotik, gene koji kodiraju za antimikrobne proteine i gene za toksine. Bogatstvo genetičkih informacija koje nose plazmidi, njihov utjecaj na mikrobne populacije i njihov potencijal da djeluju kao prirodni vektori za kloniranje potaknuli su dodatna istraživanja plazmida. Iz povijesne perspektive, tri su glavna razloga pridonijela razvoju istraživanja plazmida: jednostavna genetička organizacija, mogu se lako izolirati i manipulirati *in vitro* i, budući da plazmidi nisu esencijalni domaćinu, manipulacija njima ne bi trebala imati štetne posljedice na domaćina (del Solar i sur., 1998).

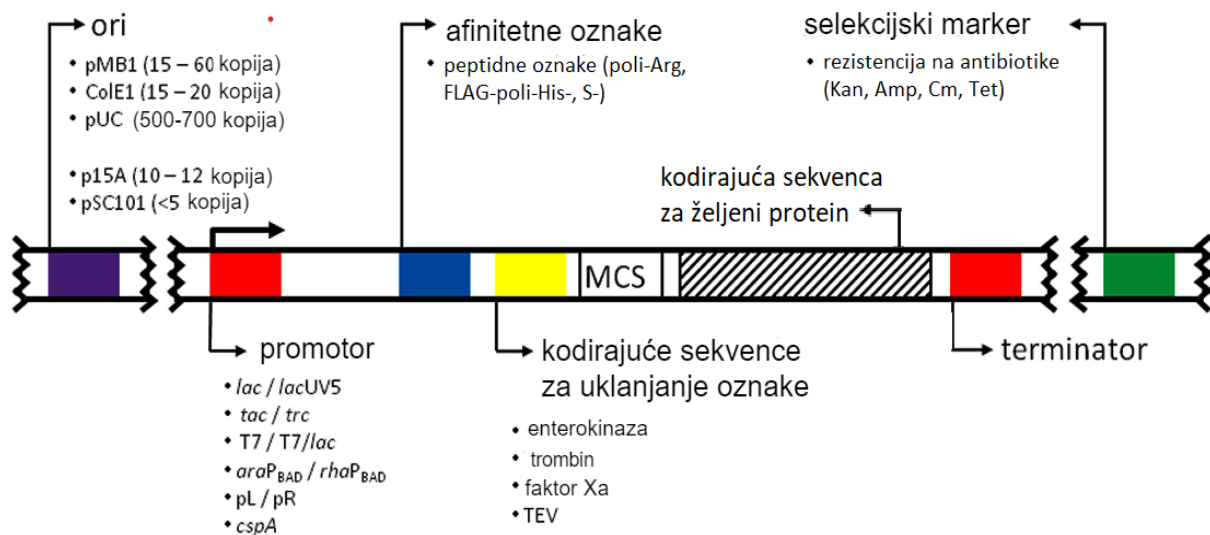
U genetičkom inženjerstvu plazmidi se koriste kao vektori, odnosno to su DNA molekule u koje se jednostavno može inserirati fragment DNA u svrhu umnažanja u stanici domaćina. Osnovna svojstva dobrog vektora su samostalna replikacija u bakteriji *E. coli*, velik broj kopija po stanici odnosno efikasna replikacija, jednostavan izolacija iz *E. coli*, mala molekulska masa, višestruko mjesto za kloniranje (MCS) te jednostavna selekcija stanica koje sadrže vektor i stanica koje sadrže vektor s insertom. Jedan od prvih plazmidnih vektora koji se koristio u genetičkom inženjerstvu je plazmid pBR322. Konstruiran je 1977. godine, sadrži 4361 parova baza te regije za rezistenciju na ampicilin i tetraciklin. Ugradnjom fragmenta DNA unutar regije za rezistenciju na jedan od antibiotika, dolazi do inaktivacije tog gena i na taj način je omogućena selekcija plazmida koji sadrže insert (Bolivar i sur., 1977).



Slika 1. Restriksijska mapa plazmida pBR322

2.3. Ekspresijski vektori u *E. coli*

Glavni element svakog ekspresijskog vektora je promotor pod čiju regulaciju će biti kloniran ORF koji kodira za neki heterologni protein od interesa, te i sekvencije potrebne za regulaciju promotora. Također uz promotor se obično nalazi mjesto za vezanje ribosoma koje potiče translaciju. Uz promotor i mjesto za vezanje ribosoma, plazmid ima i selektivni marker, obično gen koji kodira za rezistenciju na antibiotik (Riggs, 2018). Svaki ekspresijski vektor sadrži i ishodište replikacije koje osigurava održavanje plazmida u njegovom domaćinu. Uz navedene elemente, mnogi ekspresijski vektori imaju dodatne regije koje olakšavaju proizvodnju i pročišćavanje proteina, poput sekvencija koje omogućavaju sekreciju proteina izvan stanice, afinitetnih oznaka i sekvencija koje pospješuju topivost proteina.



Slika 2. Struktura ekspresijskog vektora. Prikazani su elementi prisutni u većini ekspresijskih vektora. Afinitetne oznake i kodirajuće sekvence za njihovo uklanjanje prikazane su proizvoljno na N-terminalnom kraju radi jednostavnosti. MCS – višestruko mjesto za kloniranje (Rosano i Ceccarelli, 2014).

2.4. Promotori u ekspresijskim vektorima

Promotori utječu na prinos proteina regulirajući dva ključna aspekta u ekspresiji heterolognih gena: brzinu transkripcije nakon dodatka induktora i razinu represije prije indukcije. Idealni promotor ne bi trebao dopustiti bazalnu ekspresiju i trebao bi omogućiti sintezu velikih količina mRNA (jaki promotor) nakon indukcije. Postoji više od 10 različitih promotora koji se koriste za proizvodnju rekombinantnih proteina: jaki ili slabi promotori, konstitutivni ili fakultativni promotori, kemijski ili toplinski inducibilni promotori (Rosano i sur., 2019).

Promotori korišteni u *E. coli* ekspresijskim vektorima mogu se podijeliti u tri kategorije ovisno o njihovom podrijetlu i funkcioniranju: (1) Promotori iz *E. coli* – *lac*, *trp*, *tac*, *trc*, *ara*, (2) Viralni promotori – λ L, λ R, T5, (3) Promotori koji trebaju svoju RNA-polimerazu – T7, T7lac. Primjeri iz sve tri kategorije danas se mogu naći u komercionalnim vektorima (Hyvonen, 2004).

2.5. Seleksijski markeri u ekspresijskim vektorima

Seleksijski markeri dodaju se u plazmid kako bi se spriječio rast stanica koje ne sadrže plazmid. Kada govorimo o bakteriji *E. coli* u tu svrhu najčešće se koriste geni za rezistenciju na antibiotike. Na primjer, produkt gena *bla* je periplazmatski enzim koji inaktivira β -laktamski prsten β -laktamskih antibiotika i tako omogućava rezistenciju na ampicilin. Međutim, budući da se β -laktamaza kontinuirano luči, dolazi do razgradnje antibiotika i za nekoliko sati ampicilin je gotovo iscrpljen (Korpimaki i sur., 2003). To stvara problem jer se tijekom uzgoja povećava broj stanica bez plazmida. Također, veliki problem stvaraju i cijene pojedinih antibiotika te opasnost od širenja gena za antibiotsku rezistenciju u okoliš, o čemu se treba osobito voditi računa.

Zbog navedenih problema, razvijeni su novi plazmidni sustavi bez antibiotika. Ovi se sustavi temelje na konceptu ovisnosti o plazmidu, fenomenu koji se javlja kada stanice bez plazmida ne mogu rasti ili živjeti (Peubez i sur., 2010). Na primjer, esencijalni gen može se ukloniti iz bakterijskog genoma i zatim se insertirati u plazmid. Dakle, nakon diobe stanica, bakterije bez plazmida umiru. Iako se opisana metoda pokazala uspješnom, sustavi ekspresije temeljeni na ovisnosti o plazmidima još uvijek nisu široko rasprostranjeni.

2.6. Afinitetne oznake u ekspresijskim vektorima

Afinitetne oznake su proteini kodirani na ekspresijskom vektoru koji zajedno sa željenim rekombinantnim plazmidom čine fuzijski protein. Preduvjet za visokoučinkovito pročišćavanje je dodavanje fuzijske oznake na N- ili C-kraju rekombinantnih proteina. Optimalna afinitetna oznaka mora ispunjavati ove kriterije: oznaka mora omogućiti jednostavnu detekciju ekspresije proteina, visoku ekspresiju i topljivost proteina i laku izolaciju proteina iz *E. coli* (Jia i Jeon, 2016). Najčešće korištena oznaka za pročišćavanje je histidinska oznaka koju čine 6 do 10 histidina dodanih na N- ili C-kraj ekspimiranog proteina. Histidinska oznaka rijetko utječe na strukturu ili funkciju fuzijskih proteina te omogućuje denaturirajuće pročišćavanje.

2.7. Sojevi *E. coli* za ekspresiju rekombinantnih proteina

Izbor sojeva koji se koriste za ekspresiju rekombinantnih proteina također utječe na razinu ekspresije, topljivost i prinos proteina. Različiti sojevi *E. coli* olakšavaju ekspresiju proteina koji sadrže disulfidne veze i proteina toksičnih za *E. coli*. Štoviše, koekspresija s određenim genima poboljšava ekspresiju posttranslacijski modificiranih proteina (Jia i Jeon, 2016). Neki od sojeva koji se koriste u ovu svrhu prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Glavne karakteristike sojeva koji se koriste za proizvodnju rekombinantnih proteina (Jia i Jeon, 2016)

<i>SOJ E. coli</i>	<i>KARAKTERISTIKE</i>
<i>BL21(DE3)</i>	Najčešće korišten soj, ali moguća je neinducirana ekspresija potencijalno toksičnih proteina.
<i>BL21Star(DE3)</i>	U soju je povećana stabilnost mRNA stoga je moguća jača ekspresija proteina.
<i>Rosetta(DE3)</i>	Ovaj soj pojačava ekspresiju proteina koji sadrže kodone koji se rijetko koriste u <i>E. coli</i> .
<i>Lemo21(DE3)</i>	Soj omogućuje podesivu ekspresiju teško topljivih proteina te je moguće dobiti topljivije, pravilno savijene proteine.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

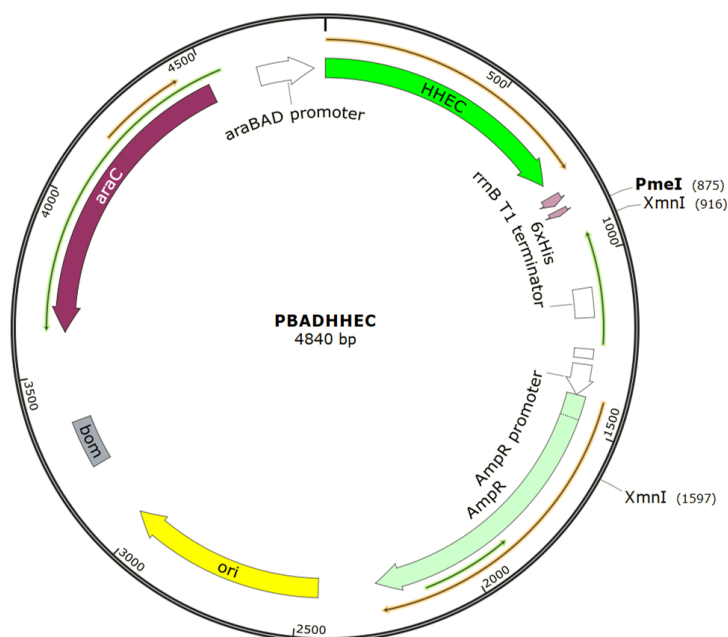
3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

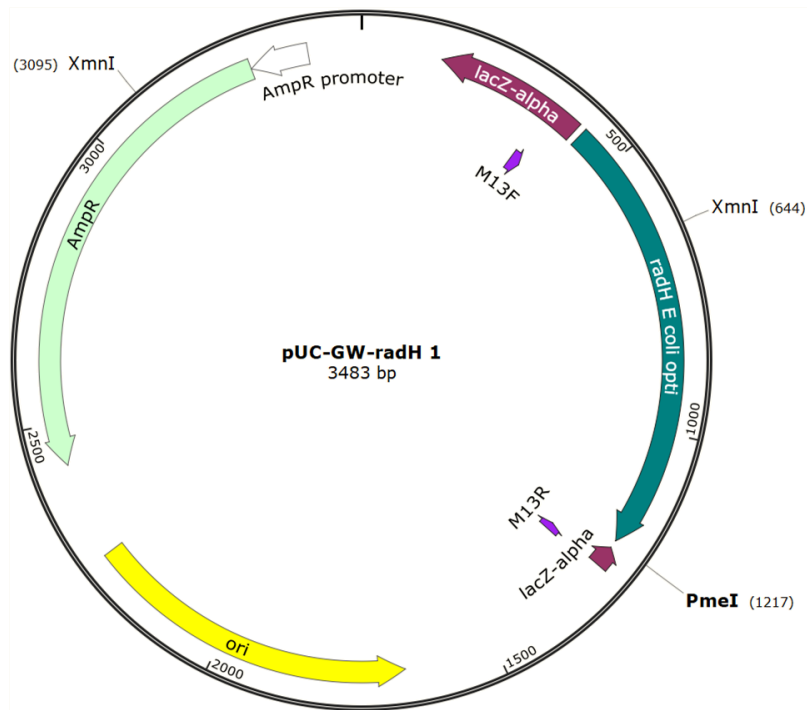
U ovom radu je korištena bakterija *Escherichia coli*, soj DH5 α , genotipa: *supE44 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* („Stratagene“, La Jolla, CA, SAD).

3.1.2. Plazmidi

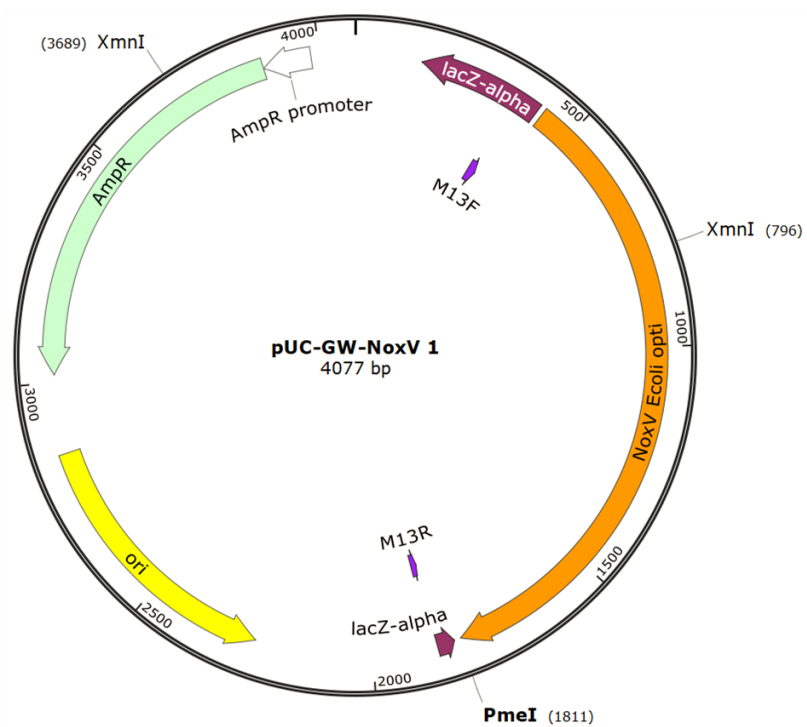
U ovom radu korištena su tri plazmidna vektora: pBAD-HheC (Slika 3.), pUC-GW-RadH (Slika 4.) i pUC-GW-NoxV (Slika 5.). Ovim plazmidnim vektorima zajednički su regija *ori* koja omogućuje replikaciju plazmida u bakteriji *Escherichia coli* i gen *bla* koji kodira za enzim β -laktamazu i služi kao genetički marker za selekciju transformanata zato što omogućuje bakteriji rezistenciju na antibiotik ampicilin. Plazmidima pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV zajednički je i gen *lacZ* koji kodira za enzim β -galaktozidazu. Uz to, plazmidi sadrže određene gene HheC (kodira za halohidrin-dehalogenazu), RadH (kodira za R-specifičnu alkohol-dehidrogenazu) ili NoxV (kodira za NADPH-oksidadazu) koji će u daljnjim istraživanjima u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama biti eksprimirani u bakteriji *E. coli*.



Slika 3. Mapa plazmida Pbad-HeC. Na slici su označena mjesta cijepanja restriksijskih enzima korištenih u ovom radu za restriksijsku analizu.



Slika 4. Mapa plazmida pUC-GW-RadH. Na slici su označena mjesta cijepanja restrikcijskih enzima korištenih u ovom radu za restrikcijsku analizu.



Slika 5. Mapa plazmida pUC-GW-NoxV. Na slici su označena mjesta cijepanja restrikcijskih enzima korištenih u ovom radu za restrikcijsku analizu.

3.1.3. Restriksijski enzimi

U ovom radu korištena su dva restriksijska enzima: *PmeI* i *XmnI* za restriksijsku analizu. Enzimi su korišteni prema uputama proizvođača (New England Biolabs, USA).

3.1.4. Hranjiva podloga

Korištena je LB (tekuća kompletna podloga) za uzgoj bakterije *Escherichie coli*. Pripremljene su četiri tekuće podloge od 100 mL na sljedeći način:

Bacto-tripton	1,00 g
Kvašćev ekstrakt	0,50 g
Natrijev klorid	1,00 g

Kruti sastojci hranjive podloge otope se u destiliranoj vodi. Hranjive podloge steriliziraju se u autoklavu 15 min na 121°C. Nakon što se hranjiva podloga ohladi na 40°C dodaje se 500 µL otopine ampicilina, koja je prethodno sterilizirana filtracijom (koncentracija 20 mg/mL).

3.1.5. Otopine

3.1.5.1. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA

GTE-pufer:

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

NaOH/SDS:

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

Otopina se priprema neposredno prije upotrebe.

RNA-za:

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

Kalijev acetat (3 M):

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

TE pufer (pH 8,0):

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

Glukoza (40 g/L)

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

186,1 g EDTA·2H₂O otopi se u 80 mL destilirane vode, pH se podese dodatkom natrijevog hidroksida (približno 2 g peleta) te se tikvica dopuni destiliranom vodom do 100 mL.

Tris-HCl (1 M):

12,1 g Tris-a otopi se u 80 mL destilirane vode. Dodatkom koncentrirane otopine HCl podese se vrijednost pH te se tikvica dopuni destiliranom vodom do 100 mL.

Fenol:

Redestilirani fenol zasićen je jednakim volumenom TE pufera. Otapa se pri 67 °C. Ne sterilizira se i čuva se u tamnoj boci pri 4 °C.

Izoamilni alkohol/kloroform:

Korištena je smjesa izoamlinog alkohola i kloroforma u volumnom omjeru 1:41.
Ne sterilizira se i čuva se pri 4 °C.

Amonijev acetat (8 M)

3.1.5.2. Otopine za gel-elektroforezu

TBE-pufer (10x):

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

Pufer za gel elektroforezu priprema se u 10x koncentriranom obliku te se naknadno razrjeđuje do željene koncentracije destiliranom vodom. Sterilizacija nije potrebna.

Agarozni gel:

Agarozni gel priprema se otapanjem agaroze u TBE-puferu (1x). Koncentracija agaroze u gelu kreće se od 7 do 20 g/L, ovisno o potrebi. Za 0,7 % -tni agarozni gel, 0,7 g agaroze otopi se u 100 mL TBE-pufera (1x).

Etidijev bromid:

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

3.1.6. Kemikalije i enzimi

Bacto-tripton:	<i>Biolife, Milano</i>
Kvašćev ekstrakt:	<i>BD Biosciences Advanced Bioprocessing, USA</i>
Natrijev klorid:	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Glukoza:	<i>Kemika, Zagreb</i>
EDTA:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Tris: Tris Ultra Pure:	<i>Sigma Chemical Co., St. Louis</i>
SDS:	<i>Merck, Hohenbrunn</i>
RNA-za:	<i>Sigma Chemical Co., St. Louis</i>
Kalijev acetat:	<i>Acros Organics, New Jersey</i>
Glukoza:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Fenol:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Izopropanol:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Etanol:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Izoamilni alkohol:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Kloroform:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Amonijev acetat:	<i>Kemika, Zagreb</i>
Kalijev acetat:	<i>Acros Organics, New Jersey</i>
Agaroz:	<i>Appligene, Strassbourg</i>
Borna kiselina:	<i>Fisher Scientific, Pittsburgh</i>
Etidijev bromid:	<i>Roche Applied Science, Indianapolis</i>
Restriksijski enzimi:	<i>New England Biolabs, Ipswich</i>
Standard za gel elektroforezu:	<i>New England Biolabs, Ipswich</i>

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj bakterije *Escherichia coli*

Tri različite kulture *E. coli* s krute hranjive podloge precijepu se u 100 mL tekuće hranjive LB podloge sa dodatkom ampicilina pomoću mikrobiološke ušice, koja je prije naciepljivanja sterilizirana kratkotrajnim zadržavanjem u plamenu. Kulture se nakon naciepljivanja inkubiraju na tresilici pri 37 °C do stacionarne faze rasta.

3.2.2. Izolacija plazmidne DNA iz velikog volumena kulture bakterije *E. coli*

Plazmidna DNA se izolira iz 100 mL tekuće kulture bakterije *E. coli*. Tekuća kultura se prelije iz Erlenmeyerove tikvice u kivete. Prije centrifugiranja kivete se tariraju. Bakterijska kultura se centrifugira 5 minuta na 5000 o/min pri 4 °C. Supernatant se nakon centrifugiranja temeljito ukloni vakuom sisaljkom, a talog se resuspendira dodatkom 2,4 mL hladnog GTE pufera. Suspenzija stanica se inkubira 5 minuta u ledu. Nakon toga se suspenziji stanica dodaje 4,8 mL otopine NaOH/SDS i promiješa se okretanjem kivete dvadesetak puta. Otopina NaOH/SDS pripremi se dodatkom 666 µL NaOH, 2 mL SDS i 17,33 mL destilirane vode. Zatim se u svaku kivetu doda 7,2 mL hladne otopine kalijevog acetata uz miješanje okretanjem. Kivete se inkubiraju 20 minuta u ledu i nakon toga se centrifugiraju 20 minuta na 10 000 o/min pri 4 °C. Supernatant se pažljivo odpipetira u nove kivete i dodaje se 8,5 mL izopropanola. Vrh kivete se oblijepi parafilmom i sadržaj se promiješa okretanjem. Otopina se centrifugira na 10 000 o/min 20 minuta. Supernatant se temeljito ukloni vakuom sisaljkom te se talog nukleinskih kiselina suši uz plamenik 10-15 minuta. Talog se zatim otopi u 300 µL TE pufera i 10 µL RNA-ze te se resuspendira pomoću pipete. Suspenzija se prenese u Eppendorf kivetu i čuva se u zamrzivaču.

3.2.3. Pročišćavanje DNA fenolizacijom i taloženje DNA

U 400 µL uzorka doda se 200 µL fenola i 200 µL smjese izoamilnog alkohola i kloroforma u omjeru 1:24. Smjesa se snažno promiješa i centrifugira 1 minutu na 10 000 o/min. Nakon centrifugiranja vidljiv je prsten proteina. Gornja vodena faza pipetom se prenese u novu Eppendorf kivetu te se postupak fenolizacije ponavlja sve dok nema vidljivog taloga proteina između dvije faze. Kad talog proteina više nije vidljiv, dodaje se 400 µL smjese izoamilnog alkohola i kloroforma. Zatim se suspenzija centrifugira te se odvoji gornja faza.

Nakon postupka fenolizacije DNA se prebaci u novu Eppendorf kivetu i taloži se pomoću etanola i 8 M amonijevog acetata. U 300 μL DNA doda se 100 μL amonijevog acetata i 800 μL 96% etanola zatim se promiješa okretanjem kivete. Uzorci se centrifugiraju 15 minuta na 10 000 o/min te se supernatant brzo odlije. Zaostale kapljice supernatanta uklone se pomoću vakuum sisaljke potom se talog suši uz plamenik 10-15 minuta. Talog se zatim otopi u 50 μL sterilne deionizirajuće vode.

3.2.4. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

Restrikcijska analiza uključuje cijepanje DNA restrikcijskim enzimima i elektroforezu pocijepane DNA, a ovdje se provodi kako bi se provjerila uspješnost izolacije plazmidne DNA i provjerila njena struktura. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima provedeno je prema uputama proizvođača (New England Biolabs, USA). Ukratko, restrikcijska otopina priprema se dodatkom 0,2 μL restrikcijskog enzima, 2 μL plazmidne DNA, 1 μL 10x koncentriranog originalnog pufera za pojedini restrikcijski enzim te dodatkom 6,8 μL vode kako bi volumen restrikcijske otopine iznosio 10 μL . Reakcija restrikcije provodi se u vodenoj kupelji pri 37°C 60 minuta.

3.2.5. Gel-elektroforeza

U ovom radu provedene su dvije horizontalne gel-elektroforeze. Jedna gel-elektroforeza provedena je kao dio restrikcijske analize, dok je druga gel-elektroforeza korištena za provjeru uspješnosti izolacije plazmidne DNA. Gel-elektroforeza provodi se u 0,7 %-tnom agaroznom gelu. 0,7 g agaroze otopi se u 100 mL TBE-pufera (1x). Kako bi se agarozna potpuno otopila, smjesa se kratko zagrijava u mikrovalnoj pećnici u više navrata uz miješanje. Postupak je završen kad više nisu vidljiva zamućenja otopine zbog neotopljene agaroze. Agarozni gel ostavi se na sobnoj temperaturi da se ohladi na oko 60 °C. Zatim se pripremi nosač gela, na način da se krajevi nosača oblijepe ljepljivom trakom te se umetne češalj za formiranje jažica. Ohlađeni agarozni gel ulije se u pripremljeni nosač i ostavi se na sobnoj temperaturi 5-10 minuta. Kad se gel skrutne odlijepe se ljepljive trake, nosač se zajedno s gelom prenese u kadicu za elektroforezu i pažljivo se izvadi češalj za formiranje jažica. U kadicu za elektroforezu ulije se TBE pufera dovoljno da prekrije čitav gel. 3 μL DNA promiješa se pomoću mikropipete s bojom za nanošenje uzoraka u odnosu 5:1 i nanese se u slobodnu jažicu. Kao standard se koriste fragmenti DNA u rasponu dužine od 0,5 do 10 kb. Nakon nanošenja standarda i uzoraka na

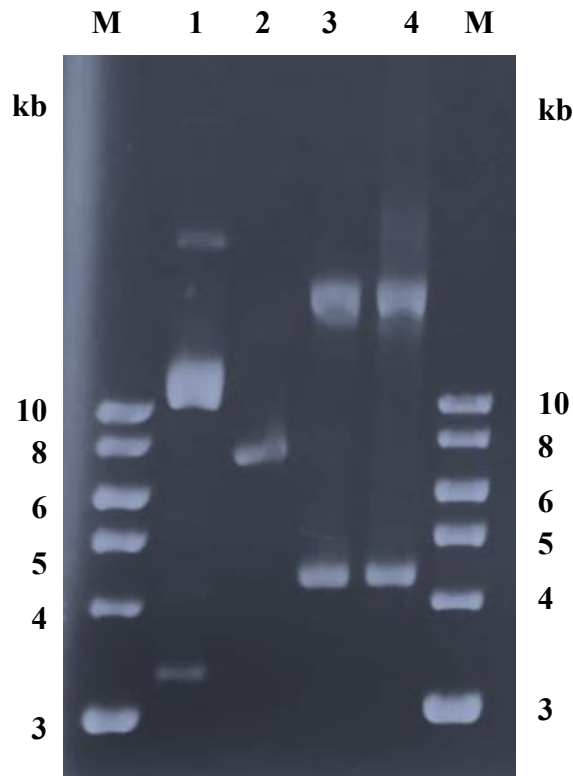
kadicu za elektroforezu stavi se poklopac, priključe se elektrode te se uključi struja. Elektroforeza se provodi pri naponu od 40 V sve dok se migracijsko bojilo ne približi suprotnom rubu gela. Trajanje gel-elektroforeze ovisi o veličini fragmenata DNA i koncentraciji agaroze u gelu. Nakon završene elektroforeze, gel se inkubira u otopini etidij bromida 15-20 minuta, postavi se na transiluminator, osvijetli se UV svjetlom te se fotografira kroz crveni filter.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je izolirati tri plazmida: pBAD-HheC, pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV iz velikog volumena kulture bakterije *Escherichia coli* (poglavlje 4.1.) koji će u daljnjim istraživanjima u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama biti eksprimirani u bakteriji *E. coli*. Postupkom gel-elektroforeze provjerena je uspješnost izolacije navedenih plazmida te je provedena njihova restrikcijska analiza (poglavlje 4.2.).

4.1. Izolacija plazmida pBAD-HheC, pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV

Po jedna kolonija bakterije *E. coli* sa plazmidima pBAD-HheC, pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV precijepljene su s krute hranjive podloge u 100 mL tekuće hranjive podloge. Iznimno, za plazmid pBAD-HheC uzgoj je proveden u dvije paralelne tikvice. *E. coli* je uzgojena do stacionarne faze rasta. Nakon toga proveden je postupak izolacije plazmidne DNA opisan u poglavlju 3.2.2. te su iz izolirane DNA proteini uklonjeni fenolizacijom nakon čega je DNA pretaložena pomoću amonijevog acetata i etanola kao što je opisano u poglavlju 3.2.3. Gel elektroforezom na 0,7 % agaroznom gelu provjerena je uspješnost izolacije plazmida (Slika 6.)



Slika 6. Provjera uspješnosti izolacije plazmidne DNA iz bakterije *E. coli*. M – standard za gel-elektroforezu (fragmenti DNA duljine 3-10 kb) **1** – plazmid pUC-GW-NoxV, **2** – plazmid pUC-GW-RadH, **3** – plazmid pBAD-HheC (izolacija iz tikvice 1), **4** – plazmid pBAD-HheC (izolacija iz tikvice 2). S lijeve i desne strane gela prikazane su veličine fragmenata DNA iz standarda za elektroforezu.

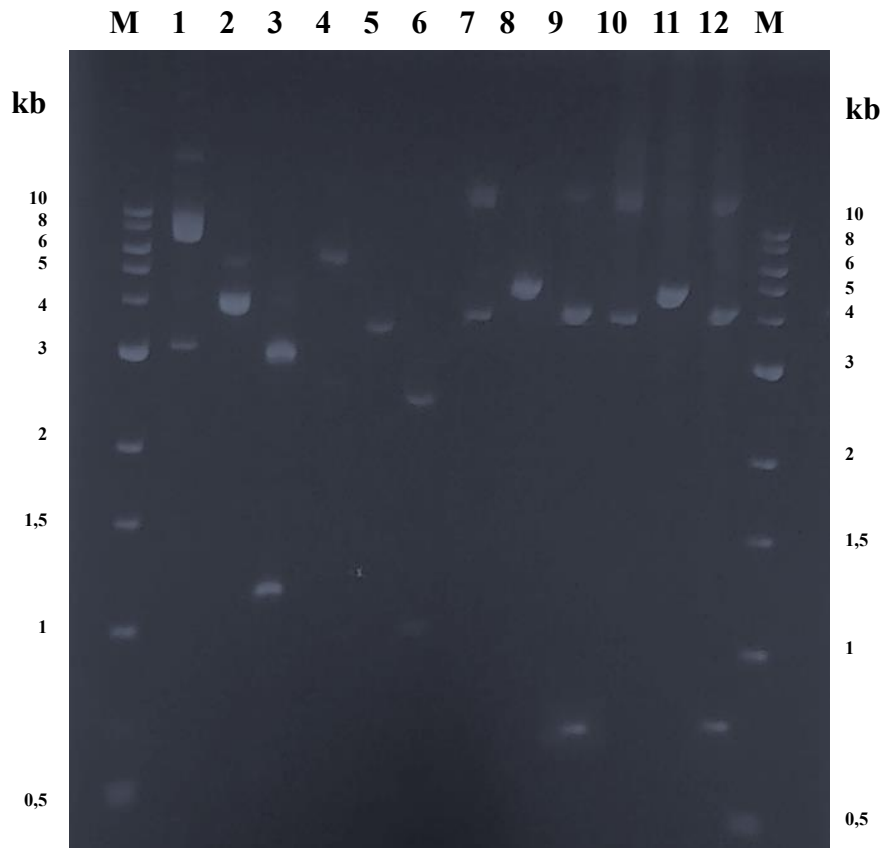
Iz rezultata gel-elektroforeze prikazanog na slici 6. vidi se da je plazmidna DNA uspješno izolirana u sva četiri uzorka zato što na gelu nisu vidljive vrpce koje odgovaraju lineariziranom plazmidu niti je vidljiva RNA. U jažici 1 vidljive su 3 vrpce, u jažici 2 jedna vrpca, a u jažicama 3 i 4 dvije vrpce. Obzirom da su u jažicama 3 i 4 vidljive iste vrpce može se zaključiti da se radi u istom plazmidu (pBAD-HheC). Također, obzirom na intenzitet vrpce, vidljivo je da je masa izoliranog plazmida u jažici 2 manja od ostalih plazmida. Vrpce koje migriraju sporije odgovaraju konformaciji otvorenog kruga (relaksirana DNA), a brže migriraju vrpce koje odgovaraju konformaciji superzavijenog monomera. Budući da je provedena gel-elektroforeza nativnih plazmida nije moguće odrediti njihovu veličinu.

4.2. Restriksijska analiza plazmida pBAD-HheC, pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV

Za restriksijsku analizu plazmida korištena su dva restriksijska enzima (*PmeI* i *XmnI*). Restriksijski enzim *PmeI* cijepa izolirane plazmide na jednom mjestu u palindromskim sekvencijama, dok enzim *XmnI* cijepa plazmide na dva restriksijska mjesta. Nakon cijepanja enzimom *PmeI* može se procijeniti duljina izoliranih plazmida, a nakon cijepanja enzimom *XmnI* nastaju dva fragmenta različite duljine. Očekivana duljina svih fragmenata prikazana je u tablici 2. Rezultati restriksijske analize prikazani su na slici 7.

Tablica 2. Očekivane duljine fragmenata plazmidne DNA nastalih cijepanjem plazmida restriksijskim enzimima *PmeI* i *XmnI*

	pBAD-HheC		pUC-GW-RadH		pUC-GW-NoxV	
<i>PmeI</i>	4840 pb		3483 pb		4077 pb	
<i>XmnI</i>	681 pb	4159 pb	1032 pb	2451 pb	1184 pb	2893 pb



Slika 7. Rezultati restrikcijske analize plazmida pBAD-HheC, pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV. **M** – standard za elektroforezu, **1** – nativni plazmid pUC-GW-NoxV, **2** – pUC-GW-NoxV / enzim PmeI, **3** – pUC-GW-NoxV / XmnI, **4** – nativni plazmid pUC-GW-RadH, **5** – pUC-GW-RadH / enzim PmeI, **6** – pUC-GW-RadH / enzim XmnI **7** – nativni plazmid pBAD-HheC, **8** – pBAD-HheC / PmeI, **9** – pBAD-HheC / XmnI, **10** – nativni plazmid pBAD-HheC, **11** – pBAD-HheC / PmeI, **12** – pBAD-HheC / XmnI. S lijeve i desne strane gela prikazane su veličine fragmenata DNA iz standarda za elektroforezu.

Dobivene vrpce na gelu u skladu su s očekivanim veličinama fragmenta te je restrikcijskom analizom potvrđeno da stvarna struktura plazmida odgovara strukturi prikazanoj na mapama plazmida (Slika 3., Slika 4., Slika 5.) u poglavlju Materijali.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti da su plazmidi pBAD-HheC, pUC-GW-RadH i pUC-GW-NoxV uspješno izolirani iz velikog volumena kulture bakterije *Escherchia coli*. Restrikcijom analizom potvrđena je njihova struktura koja odgovara restrikcijским mapama.

6. POPIS LITERATURE

Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley i sur. (1997). The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. In *Science* (Vol. 277, Issue 5331, pp. 1453–1462). American Association for the Advancement of Science.

<https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>

Baneyx, F., (1999) Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Elsevier Science* (Vol. 10, pp. 411-421) [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00003-8)

Chen, X., Zhou, L., Tian, K., Kumar, A., Singh, S., Prior, B. A., & Wang, Z. (2013). Metabolic engineering of Escherichia coli: A sustainable industrial platform for bio-based chemical production. In *Biotechnology Advances* (Vol. 31, Issue 8, pp. 1200–1223).

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.02.009>

Daegelen, P., Studier, F. W., Lenski, R. E., Cure, S., & Kim, J. F. (2009). Tracing Ancestors and Relatives of Escherichia coli B, and the Derivation of B Strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, 394(4), 634–643.

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.022>

Hyvonen, M. (2004) E.coli Expression Systems. *Research Techniques Lectures* <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~marko/methods>. Pristupljeno 25.07.2022.

Bolivar, F., Rodriguf, R. L., Greene, P. J., Betlaci-I, M. C., Heyneker, H. B., Boyer, H. W., Crosa, J. H., & Falkow, S. (1977). CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF NEW CLONING VEHICLF_ ~ II. A MULTIPURPOSE CLONING SYSTEM (Recombinant DNA; molecular cloning plasmid vector; EK2 host-vector system). In *Gene* (Vol. 2).

Idalia, V.-M. N., & Bernardo, F. (2017). *Escherichia coli* as a Model Organism and Its Application in Biotechnology. In *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/67306>

Jia, B., & Jeon, C. O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Current status and future perspectives. In *Open Biology* (Vol. 6, Issue 8). Royal Society of London. <https://doi.org/10.1098/rsob.160196>

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 2, Issue 2, pp. 123–140). <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

Korpimäki, T., Kurittu, J., & Karp, M. (n.d.). *Surprisingly fast disappearance of h-lactam selection pressure in cultivation as detected with novel biosensing approaches*. www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Leksikografski zavod Miroslav Krleža, (2021) Plazmidi - *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=48665> Pristupljeno 1. 9. 2022.

Peubez, I., Chaudet, N., Mignon, C., Hild, G., Husson, S., Courtois, V., de Luca, K., Speck, D., & Sodayer, R. (2010). *Antibiotic-free selection in E. coli: new considerations for optimal design and improved production*. <http://www.microbialcellfactories.com/content/9/1/65>

Peränen, J., Rikkonen, M., Hyvönen, M., Kääriäinen, L. (1996). T7 Vectors with a Modified T7lacPromoter for Expression of Proteins in *Escherichia coli*. In *Analytical Biochemistry* (Vol. 236, Issue 2, pp. 371-373). Elsevier. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0187>

Riggs, P. D. (2018). Overview of Protein Expression Vectors for *E. coli*. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 17(1). <https://doi.org/10.1002/cpet.23>

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 5, Issue APR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. In *Protein Science* (Vol. 28, Issue 8, pp. 1412–1422). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>

Science Learning Hub (2014) *E. coli* – the biotech bacterium.

<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1899-e-coli-the-biotech-bacterium> Pristupljeno 27. 8. 2022.

Solar, G. del, Giraldo, R., Mari'a, M., Jesu', J., Ruiz-Echevarri'a, J., Echevarri'a, E., Espinosa, M., Ramo', R., Di'az, R., & Di'az-Orejas, D. (1998). Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. In *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* (Vol. 62, Issue 2). <http://mibr.asm.org/>

Izjava o izvornosti

Ja Emma Karolina Vasung 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.

Vasung EK
