

Priprema elektrokompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli* MC1061

Ajduković, Karla

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:159:183147>

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

Karla Ajduković
7902/N

PRIPREMA ELEKTROKOMPETENTNIH STANICA
BAKTERIJE *Escherichia coli* MC1061

ZAVRŠNI RAD

Predmet: 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 mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Priprema elektrokompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli* MC1061

Karla Ajduković, 7902/N

Sažetak: Genetička transformacija jest ulazak strane DNA u stanicu iz njene neposredne okoline. Razlikujemo više metoda transformacije poput kemijske metode, biolističke, transformacije pomoću ultrazvuka (sonoporacije), „tribos“ transformacije i elektrotransformacije (elektroporacije). U ovom radu detaljnije je opisana metoda elektroporacije, transformacija koja se temelji na primjeni kratkog pulsa visokog napona. Elektroporacija je jedna od najučinkovitijih metoda transformacije kod bakterija *Escherichia coli*. Cilj ovog rada bio je pripremiti elektrokompetentne stanice bakterije *Escherichia coli* soja MC1061 te provjeriti kompetentnost pripremljenih stanica transformacijom s plazmidom pLS42.

Ključne riječi: *Escherichia coli*, elektroporacija, kompetentnost, transformacija, uspješnost

Rad sadrži: 20 stranica, 7 slika, 3 tablice, 13 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. rujna 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: Nutrition

Preparation of electrocompetent cells of the bacterium *Escherichia coli*

Karla Ajduković. 7902/N

Abstract:

Genetic transformation involves the entry of foreign DNA into the cell. We distinguish several transformation methods such as chemical method, biolistic method, sonic transformation (sonoporation), “tribos” transformation and electrotransformation (electroporation). Electrotransformation, transformation based on the application of a short puls of high voltage is described in more detail in this work. Electroporation is one of the most effective transformation methods when it comes to *Escherichia coli*. The aim of this study was to prepare electrocompetent cells of *Escherichia coli* strain MC1061 and to check the competence of the prepared cells by transformation with plasmid pLS42.

Keywords: *Escherichia coli*, electroporation, competence, transformation, efficiency

Thesis contains: 20 pages, 7 figures, 3 tables, 13 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: doc. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Thesis defended: Semptember 13, 2022.

1	Sadržaj	
1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	2
2.1.	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	2
2.2.	PLAZMIDI.....	2
2.3.	METODE ZA GENETIČKU TRANSFORMACIJU BAKTERIJSKIH STANICA.....	3
2.3.1.	KEMIJSKA METODA TRANSFORMACIJE.....	4
2.3.2.	BIOLISTIČKA METODA TRANSFORMACIJE.....	5
2.3.3.	TRANSFORMACIJA POMOĆU ULTRAZVUKA (SONOPORACIJA).....	5
2.3.4.	„TRIBOS“ TRANSFORMACIJA.....	5
2.3.5.	ELEKTROPORACIJA.....	5
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	8
3.1.	MATERIJALI.....	8
3.2.	METODE.....	11
4.	REZULTATI I RASPRAVA	15
5.	ZAKLJUČCI	18
6.	POPIS LITERATURE	19

1. UVOD

Escherichia coli već je desetljećima izuzetno važan modelni organizam u laboratoriju i radni organizam u industriji. Pri tome, razna istraživanja koja se provode pomoću ove bakterije, kao i njena široka primjena u biotehnološkoj proizvodnji, često zahtijevaju kloniranje i ekspresiju heterolognih gena koji se unose transformacijom (D. Hanahan i sur.). Neke od prednosti korištenja bakterije *E. coli* u istraživanju i industriji su njezina sposobnost brzog rasta na jeftinim hranjivim podloga i dostupnost molekularnih alata za izvođenje genetičkih manipulacija, kao i dobro poznavanje njezina genoma.

Otkrivanje učinkovitih načina uvođenja DNA u bakterijske stanice od velike je važnosti u genetičkom inženjerstvu i molekularnoj biologiji. U nekoliko slučajeva, kao npr. *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae*, uočena je prirodna kompetencija. Međutim, velika većina bakterijskih vrsta ne pokazuje prirodnu kompetentnost, tj. sposobnost preuzimanja strane DNA iz okoline. Ta činjenica potaknula je intenzivnu potragu za metodama pomoću kojih, posebnim tretmanima, možemo potaknuti kompetenciju stanica (Yoshida i Sato, 2009). U ovom radu detaljnije je opisana metoda transformacije *Escherichia coli* elektroporacijom.

Cilj ovog rada bio je pripremiti elektrokompetentne stanice bakterije *Escherichia coli* soja MC1061 te provjeriti efikasnost pripreme stanica transformacijom s plazmidom pLS42.

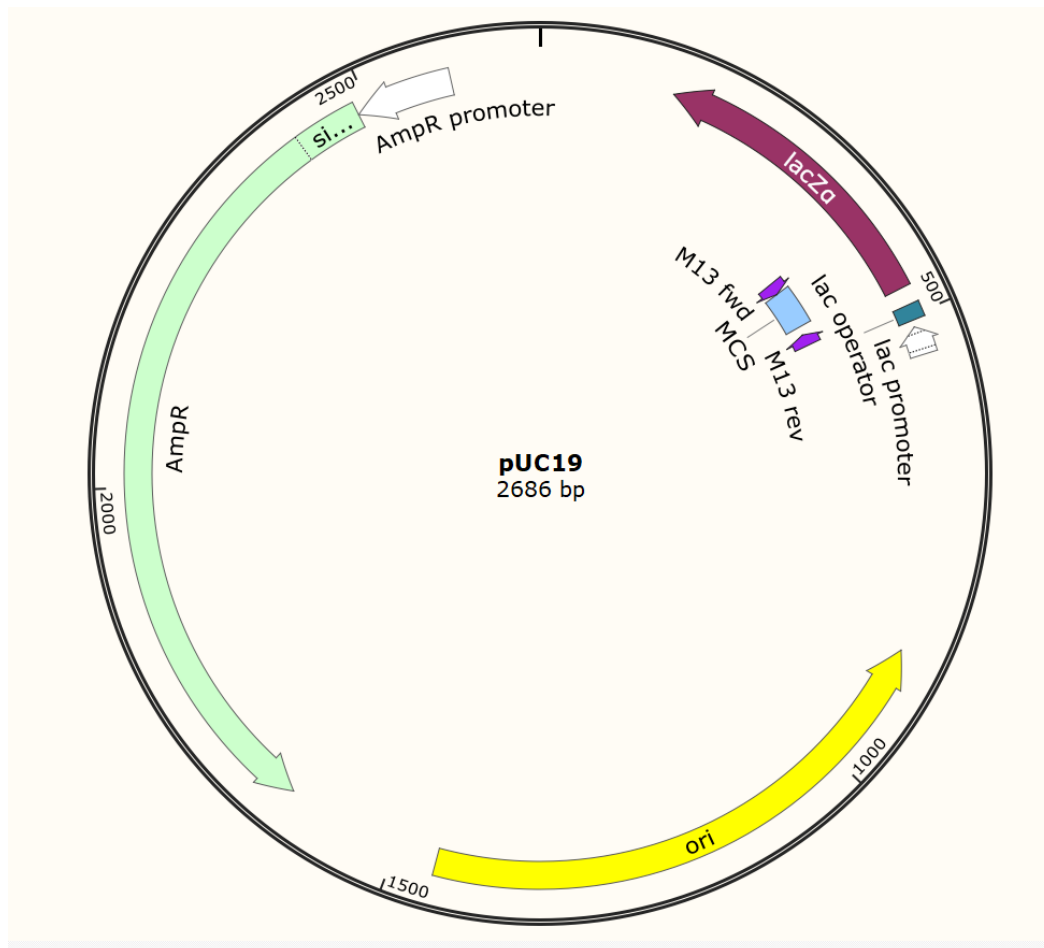
2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Escherichia coli*

Bakterija *Escherichia coli* je fakultativno anaerobna, nesporogena, gram-negativna bakterija štapićaste strukture. Pripada porodici *Enterobacteriaceae*, razredu *Gammaproteobacteria*. Pod optimalnim uvjetima rasta generacijsko vrijeme joj iznosi 20 minuta što omogućuje uzgoj velikog broja stanica u kratkom vremenu. Kroz povijest se pokazala kao vrlo koristan modelni organizam u istraživanju molekularne genetike i biologije te nam je dala brojne informacije o tome kako živa stanica funkcionira. Mnogi sustavi za manipulaciju genima razvijeni su upravo korištenjem *E. coli* kao bakterije domaćina, proizvođači brojne enzime i druge industrijske proizvode. Analiza sekvence genoma *E. coli* prvi put je objavljena 1997. godine, što je potaknulo dodatna istraživanja i od tada je sekvencionirano više od 4800 genoma *E. coli*. Ipak, ne smijemo zaboraviti da je *E. coli* patogeni organizam pa se ipak trebaju uzeti u obzir određene mjere opreza pri rukovanju s njom. (Yang i sur., 2017)

2.2. Plazmidi

Plazmidi su relativno male, kružne molekule DNA koje se u stanici mogu samostalno replicirati jer imaju vlastito ishodište replikacije neovisno o stanici domaćinu. Postoje brojni prirodni plazmidi, ali ih isto tako vrlo često konstruiramo tehnikama genetičkog inženjerstva i stoga su nam izuzetno važan i koristan alat. Osnovna svojstva dobrog plazmida su mala molekulska masa, samostalna replikacija u bakteriji, jednostavna izolacija iz bakterije, više jedinstvenih mjesta za restrikciju i jednostavna selekcija transformanata (Nicholl, 2008.). Tipične sekvencije koje se mogu naći na plazmidnom vektoru za bakteriju *E. coli* prikazane su na slici 1, na primjeru plazmida pUC19. Plazmid mora sadržavati ishodište replikacije kako bi se mogao samostalno umnažati u bakteriji (sekvencija *ori*), te gen koji će omogućiti selekciju transformanata u odnosu na netransformirane stanice. Na primjeru plazmida pUC19 radi se o sekvenciji Amp^R koja omogućava rezistenciju transformanata na antibiotik ampicilin. Uz to, moderni plazmidni vektori sadrže MCS (eng. multiple cloning site) što je sintetska sekvencija u kojoj se nalazi mnogo jedinstvenih restrikcijskih mjesta za kloniranje. MCS se može nalaziti unutar fragmenta gena LacZ, što će omogućiti selekciju transformanata kod kojih je u vektoru uspješno insertiran neki fragment.



Slika 1. Restriksijska mapa plazmida pUC19. Na mapi su označene tipične sekvencije na bakterijskom plazmidnom vektoru. Detaljna objašnjenja se nalaze u tekstu (vlastita fotografija).

2.3. Metode za genetičku transformaciju bakterijskih stanica

Poput konjugacije i transdukcije, transformacija je tip horizontalnog prijenosa gena (prijenos genetičkog materijala između dviju stanica koje nisu u odnosu majka - kćer). Označava ulazak slobodne DNA iz okoline u stanicu pri čemu sam proces nije potpomognut direktnim kontaktom dviju stanica ili nekim drugim posrednikom (npr. virusom). Da bi se sama stanica mogla transformirati mora imati sposobnost primiti DNA iz okoline, točnije mora biti kompetentna za primitak DNA. Rijetke vrste su prirodno kompetentne, odnosno nije ih potrebno ni na koji način obrađivati da bi primile DNA. Takve vrste vrlo često imaju posebne receptore na površini stanica upravo za tu svrhu. *Escherichia coli* je bakterija koja nije prirodno kompetentna što znači da je potrebno provesti poseban postupak pripreme stanica. Kako će se taj postupak provesti, ovisi o tome koju metodu planiramo koristiti za transformaciju. Za *E.*

coli najčešće se koristi ili kemijska metoda transformacije, koja uključuje tretman stanica određenim kemikalijama, ili elektroporacija koja se temelji na primjeni kratkog pulsa viskog napona pri čemu stanice postaju tranzijentno permeabilne za prolaz DNA.

Uz navedeno, razlikujemo još nekoliko metoda transformacije; biolističku, transformaciju pomoću ultrazvuka i noviju, „tribos transformaciju“, temeljenu na Yoshida efektu, o kojima će biti riječ u nastavku (Yoshida i Sato, 2009).

2.3.1. Kemijska metoda transformacije

Utvrđeno je nekoliko kemijskih metoda koje potiču transformaciju stanice. Najraširenije metode transformacije uključuju obradu s CaCl_2 za *E. coli* i transformaciju bakterijskih protoplasta izazvanu polietilen glikolom (PEG). Na stanice obrađene s CaCl_2 primjenjuje se toplinski šok (heat – shock), preciznije, stanice se inkubiraju u vodenoj kupelji pri 42 °C. S obzirom da je optimalna temperatura za rast *E. coli* 37 °C, 42 °C predstavlja toplinski šok. (Yoshida i Sato, 2009).

Mehanizam kojim dolazi do same transformacije bakterijske stanice i dalje nije potpuno razjašnjen. Prilikom kemijskih metoda transformacije bakterije *Escherichia coli* uslijed tretmana s polivalentnim kationima i niske temperature (inkubacije transformacijske smjese u ledu) najvjerojatnije dolazi do tranzijentnog otvaranja membranskih kanalića. Kratkotrajno izlaganje transformacijske smjese toplinskom šoku pri visokoj koncentraciji iona najvjerojatnije uzrokuje velik influks ekstracelularnog medija u bakterijsku stanicu, pri čemu se unosi i DNA iz okoline. Nakon toplinskog šoka, stanice se otprilike dva generacijska vremena (60 min) inkubiraju u bogatom neselektivnom tekućem mediju kako bi se osigurala visoka vijabilnost transformanta, te ujedno omogućila ekspresija gena koji će osigurati preživljavanje transformanta na selektivnom mediju s antibiotikom.

Prednosti korištenja kemijske metode za pripremu kompetentnih stanica su jednostavnost, relativno dobra efikasnost transformacije i to što za ovu metodu nije potrebna skupa specijalizirana oprema kao u slučaju elektroporacije (Green i Rogers, 2013; Swords, 2003.).

2.3.2. Biolistička metoda transformacije

Biolistička transformacija omogućuje izravno uvođenje strane DNA ili RNA u stanice. U ovoj metodi, strana DNA ili RNA se oblaže česticama volframa ili zlata i zatim se čestice oslobađaju velikom brzinom iz genskog pištolja pomoću plina helija visokog tlaka i izravno prodiru u stijenke stanice domaćina. Ova metoda je općeprihvaćena metoda transformacije eukariota, kao što su biljne i životinjske stanice, međutim trenutno pokazuje nisku uspješnost kada se primjenjuje kod bakterija i drugih prokariota (Yoshida i Sato, 2009). Neovisno o tome, biolistička metoda transformacije istražuje se kod onih bakterija koje su pokazale otpornost prema drugim metodama transformacije. Pri takvim je istraživanjima bakterija *E. coli* u prvom redu poslužila kao modelni organizam za optimiranje biolističke metode unosa DNA, te se pokazalo da su parametri uspostavljeni za biolističku transformaciju *E. coli* primijenjivi na širi spektrar bakterijskih vrsta (Smith i sur., 1992).

2.3.3. Transformacija pomoću ultrazvuka (sonoporacija)

Korištenje ultrazvuka je idealan pristup za transformaciju plazmidima i intenzivno je proučavan u kontekstu eukariotske transformacije. Sonoporacija je metoda koja koristi ultrazvuk za stvaranje pora u staničnoj membrani kako bi omogućila ulazak DNA u stanicu. Uspješnost ove metode transformacije ovisi o intenzitetu, učestalosti i trajanju pulsa (Yoshida i Sato, 2009).

2.3.4. „Tribos“ transformacija

Metoda uvođenja genetskog materijala u stanicu pomoću sile trenja klizanja i igličastog materijala nanoveličine, nazvana je tribos transformacija. Tribos transformacija temelji se na Yoshida efektu. Yoshida efekt definiran je kao stvaranje kompleksa koji uključuju bakterijske stanice, od kojih je svaka „probodena“ igličastim materijalom nanoveličine u polju sile trenja formirane na sučelju hidrogela. Hidrogel, materijal koji tvori sučelje, igličasti materijal nanoveličine, bakterijske stanice, sila trenja klizanja i izvor energije koji osigurava silu trenja ,ključni su za stvaranja prije spomenutog kompleksa (Mitsudome i sur., 2014).

2.3.5. Elektroporacija

Elektroporacija (ili elektrotransformacija) *E. coli* je popularna alternativa tradicionalnoj kemijskoj metodi transformaciji. Na stanice se primjenjuje struja visokog napona, koja privremeno permeabilizira membranu i omogućuje ulazak DNA ili drugih malih molekula.

Glavne prednosti elektroporacije u odnosu na transformaciju kemijskom metodom su veća uspješnost unosa plazmidne DNA i brža priprema kompetentnih stanica. Elektroporacija je široko primjenjiva. Mehanizam kojim se inducira privremenu permeabilnost membrane nije do kraja razjašnjen, osobito u slučaju bakterija. Tehnika je uspješno primijenjena na preko 100 vrsta bakterija, uključujući i gram-pozitivne, gram-negativne i kiselo otporne bakterije kao i na patogene za ljude i/ili druge životinje. Uspješnost elektroporacije uvelike varira. Najčešće se koristi protokol koji je optimiziran za nekoliko sojeva bakterije *E. coli* i može generirati 10^9 do 10^{11} transformanata/ μg plazmidne DNA (Miller, 1994). Nasuprot tome, neke bakterijske transformiraju se sa znatno nižom efikasnošću, a pojedine vrste još uvijek nisu uspješno transformirane. U mnogim slučajevima, međutim, niska uspješnost elektroporacije može se povećati sustavnom evaluacijom nekoliko ključnih varijabli koje su opisane u nastavku.

Za većinu bakterijskih vrsta, najveća uspješnost elektroporacije postiže se kada se prekine uzgoj bakterija od početnih do srednjih vrijednosti logaritamske, odnosno eksponencijalne faze rasta. Za *E. coli*, kako stanice dosežu stacionarnu fazu rasta, uspješnost naglo opada. Nadalje, uz nekoliko iznimaka, najveća uspješnost elektroporacije postiže se transformacijom sa superzavijenim plazmidima koji se autonomno repliciraju. Međutim, ukoliko se koristi integrativni plazmid kod kojeg je za uspješnu transformaciju neophodna ugradnja u genom domaćina, efikasnost transformacije bit će najveća ukoliko se plazmid linearizira, npr. cijepanjem pomoću restriksijske endonukleaze i takav koristi za transformaciju bakterije.

U brojnim vrstama, uključujući i *E. coli*, uspješnost elektroporacije po molu plazmida, smanjuje se kako se veličina plazmida povećava. Dok koncentracija DNA (plazmida) ima suprotan učinak. Povećanjem koncentracije DNA, povećava se i vrijednost uspješnosti transformacije te se pri višim koncentracijama DNA do 80% preživjelih stanica se transformira (MicroPulser Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide)

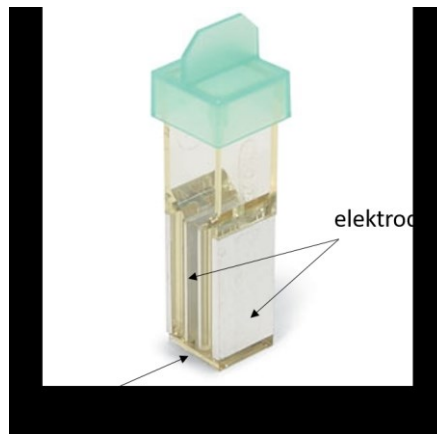
Uz sve navedeno, kako bi uspješnost elektroporacije bila što bolja, bitno je spomenuti kako uklanjanje hranjive podloge iz suspenzije stanica utječe na uspješnost. Naime, elektroporacija se provodi s uzorcima u medijima visoke otpornosti (>600 ohms). Otpornost predstavlja mjeru otpora protoku struje u električnom krugu. Iz tog razloga, pri pripremi elektrokompetentnih stanica, stanice bi trebalo isprati najmanje tri puta vodom ili neionskim otopinama kao što su glicerol, sorbitol ili polietilen glikol. Neuspjeh temeljitog uklanjanja hranjive podloge iz

suspenzije stanica može dovesti do ometanja prolaska struje kroz suspenziju i iskrenja uzorka tijekom elektroporacije. Tijekom pripreme elektrokompetentnih stanica, ali i samog postupka transformacije elektroporacijom, kivete sa stanicama se ohlade i čuvaju u lednu, na temperaturi od 0°C do 4°C. Uspješnost elektroporacije izuzetno je ovisna o temperaturi te opada i do 100 puta ukoliko se postupak provede pri sobnoj temperaturi (Green i Sambrook, 2020).

Uspješnost elektroporacije se može optimizirati mijenjanjem nekoliko parametara na elektroporatoru koji su empirijski određeni kao optimalni za određene vrste stanica. Slika 2. prikazuje elektroporator MicroPulser koji se sastoji od generatora struje (pulsa) i šok komore u koju se umeće kiveta s ugrađenim elektrodama (slika 3). Transformacijska smjesa (smjesa kompetentnih stanica i otopine DNA) stavlja se u kivetu za elektroporaciju koja se postavlja između elektroda i provodi se struja koja prolazi kroz uzorak. Elektroporacija *Escherichia coli* općenito se provodi pri naponu od 1,8 kV pri elektroporaciji stanica u kivetama širine 0,1 cm i pri naponu od 2,5 kV kada se elektroporacija provodi u kivetama širine 0,2 cm. Ovi elektroporacijski parametri su unaprijed programirani u MicroPulser kao programi Ec1 (V=1,8 kV) i Ec2 (V=2,5 kV) u postavkama. Vrijeme provođenja pulsa postavljeno je na 5 ms pri radu s uzorcima visokog otpora.



Slika 2. Elektroporator MicroPulser proizvođača BioRad (preuzeto iz MicroPulser Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide)



Slika 3. Kiveta za elektroporaciju. U dno kivete, u prostor za uzorak između dviju elektroda nanosi se transformacijska smjesa. (preuzeto iz <https://www.bio-rad.com/en-hr/sku/1652092-gene-pulser-micropulser-electroporation-cuvettes-0-2-cm-gap?ID=1652092>)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

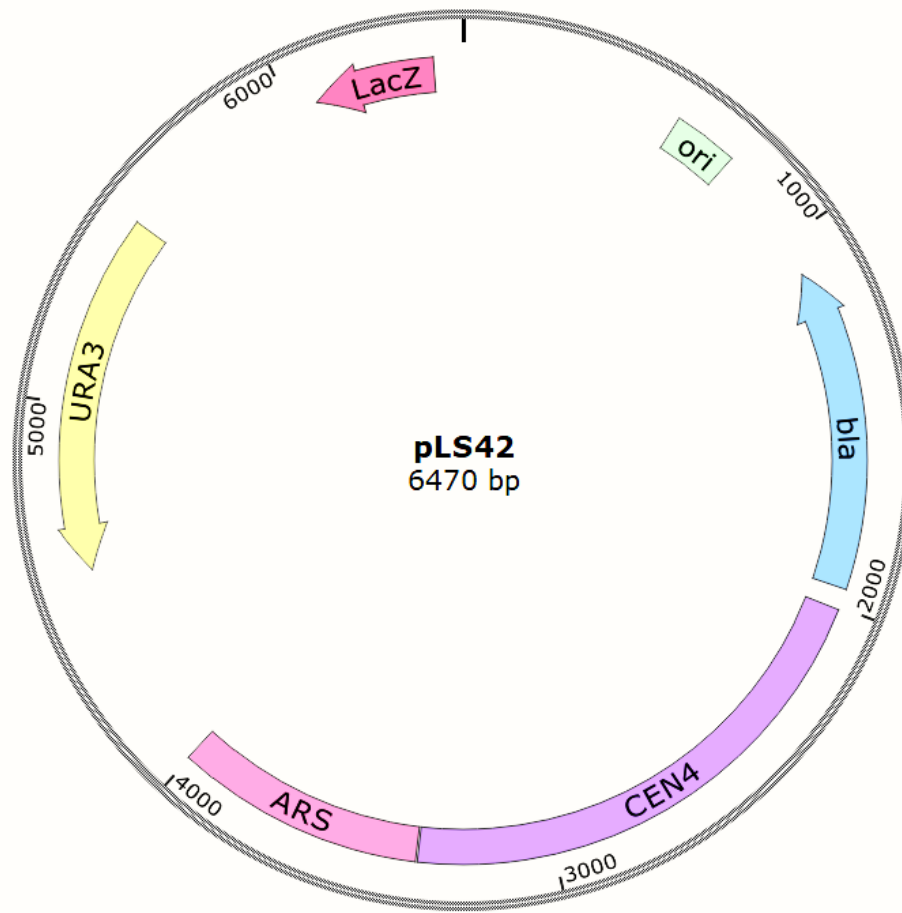
3.1.1 Mikroorganizam

U ovom radu korištena je bakterija *Escherichia coli* soja MC1061 genotipa *araD139 Del(araA-leu)7697 Del(lac)X74 galK16 galE15(GalS) lambda- e14- mcrA0 relA1 rpsL150(strR) spoT1 mcrB1 hsdR2*.

3.1.2. Plazmidi

U ovom radu korišten je plazmid pLS42 za određivanje efikasnosti transformacije kompetentnih stanica *E. coli* (slika 4). Plazmid pLS42 dugačak je nešto manje od 6,5 kb. Sadrži regiju *ori* („origin of replication“) koja predstavlja ishodište replikacije i omogućuje njegovo umnažanje u bakteriji *E. coli*. Također sadrži i gen *bla* koji kodira za enzim β – laktamazu i omogućuje rezistenciju na antibiotik ampicilin. Ampicilin je penicilinski antibiotik, a enzim β – laktamaza cijepa β – laktamski prsten penicilinskih antibiotika i na taj način omogućuje rezistenciju. Ovo svojstvo je važno jer se na taj način omogućava selekcija transformanata koju su primili DNA. Kao što slika 3. prikazuje, plazmid sadrži i sekvence ARS i CEN4 te gen URA3 potekle iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Uz navedeno, sadrži gen *LacZ*, koji kodira

za β -galaktozidazu, koja hidrolizira β – glikozidnu vezu između monosaharida galaktoze i njenog organskog dijela. Ova sekvencija na plazmidu omogućuje α -komplementaciju pomoću koje možemo izabrati one transformante kod kojih je unutar regije LacZ došlo do ugradnje nekog inserta. Za određivanje efikasnosti transformacije korištena je prethodno pripremljena otopina ovog plazmida koncentracije 1ng/ μ l.



Slika 4. Mapa plazmida pLS42. Detaljna objašnjenja prikazana su u tekstu (vlastita fotografija).

3.1.3. Hranjive podloge

Hranjive podloge pripremaju se prema recepturi danoj u donjim tablicama (tablice 1., 2. i 3.), te se steriliziraju postupkom autoklaviranja 15 minuta, pri 121°C. Ukoliko je potreban dodatak ampicilina, on se dodaje u ohlađenu podlogu (na oko 40 °C) i to 562,5 uL antibiotika ampicilina koncentracije 20 mg/ml na 100 ml podloge..

Tablica 1. Sastav krute hranjive LB podloge (standardna kompleksna)

Bacto tryptone	2,5 g
Yeast extract	1,25 g
NaCl	2,5 g
Agar	3,75 g
Destilirana voda	nadopuniti do 250 ml

Tablica 2. Sastav tekuće hranjive LB podloge

Bacto tryptone	2,5g
Yeast extract	1,25g
NaCl	2,5g
Destilirana voda	nadopuniti do 250ml

Tablica 3. Sastav SOC hranjive podloge

KCl	20,0 mg
NaCl	60,0 mg
MgCl ₂	200,0 mg
Bacto tryptone	2,0 g
Yeast extract	500,0 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250,0 mg
glukoza	360,0 mg
Destilirana voda	Do 100 ml

3.1.2. Otopine

10% (v/v) Glicerol: razrijeđen s vodom u omjeru 1:9

Steriliziran postupkom autoklaviranja 15 minuta pri 121 °C, čuva se u hladnjaku na temperaturi do 4 °C.

3.1.3. Kemikalije i enzimi

Bacto Tryptone:	Biolife, Italja
Yeast extract:	Becton, Dickinson and Company, Belgija
NaCl:	Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
KCl	Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
MgCl ₂	Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
Glukoza	Biolife, Italija
Agar:	Liofilchem, Italija
Glicerol:	Gram-mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska

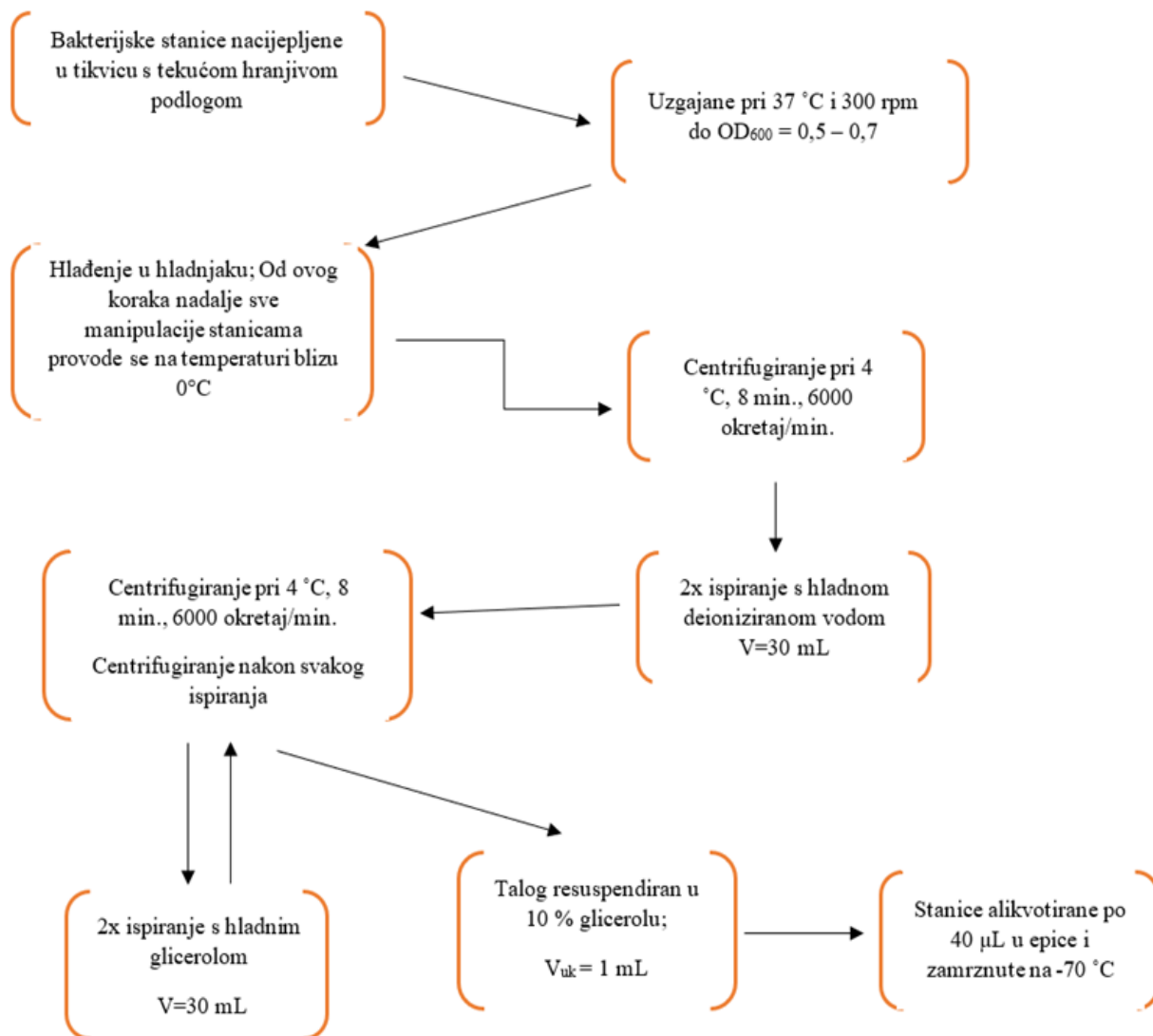
3.2. Metode

3.2.2. Uzgoj bakterije *E. coli*

U tekuću hranjivu podlogu nacijepljena je jedna kolonija bakterija *E. coli* pomoću mikrobiološke ušice. Uzgoj u tekućoj podlozi se provodi na tresilici, pri 37°C i 300 rpm do odgovarajuće gustoće stanica. Uzgoj na krutoj hranjivoj podlozi provodi se u termostatu na 37°C preko noći.

3.2.3. Priprema kompetentnih stanica

Na slici 5 prikazan je shematski prikaz pripreme elektrokompetentnih stanica koji je detaljnije opisan u daljnjem tekstu.

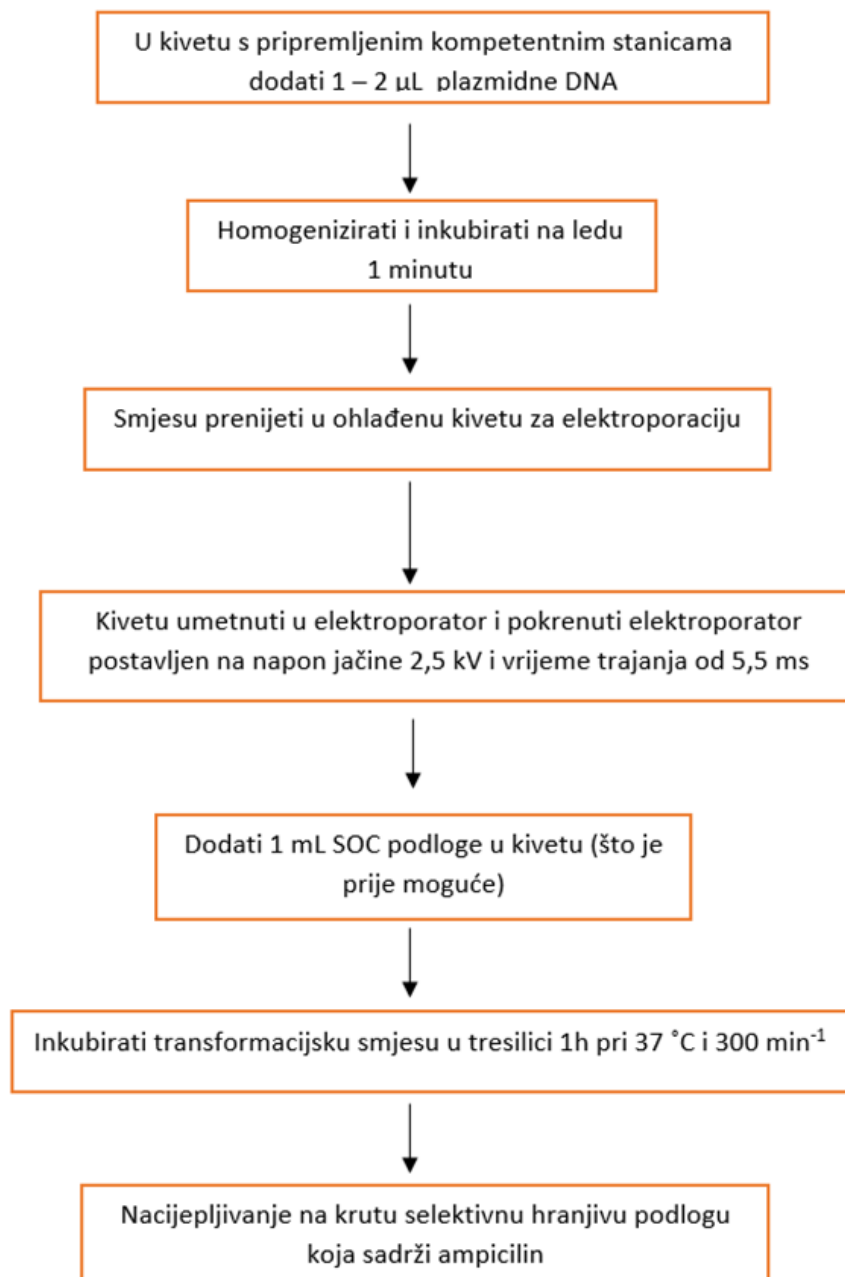


Slika 5. Shematski dijagram postupka pripreme elektrokompetentnih stanica bakterije *E. coli*. (vlastita fotografija).

Stanice *Escherichia coli* naciyepljene su u tekuću hranjivu podlogu i uzgajane na tresilici pri 37 °C i 300 rpm do vrijednosti $OD_{600} = 0,5 - 0,7$. Vrijednost OD_{600} označava vrijednost optičke gustoće suspenzije pri 600 nanometara i mjeri se pomoću spektrofotometra. Kada je ta vrijednost između 0,5 i 0,7 stanice su u eksponencijalnoj fazi. Nakon uzgoja tikvicu sa stanicama u eksponencijalnoj fazi rasta potrebno je staviti u hladnjak. Također svo korišteno laboratorijsko posuđe, kao i korištene otopine (glicerol, voda), ohladiti u ledu. Centrifugirati stanice u hladnoj centrifugi pri 4 °C, 8 minuta na 6000 okretaja/minuti. Zatim isprati stanice s hladnom deioniziranom vodom i hladnim sterilnim glicerolom. Prvo je potrebno dva puta isprati stanice deioniziranom vodom volumena 30 mL, a zatim isprati dva puta sterilnim glicerolom volumena 30 mL. Poslije svakog ispiranja slijedi centrifugiranje pri 4°C, 8 minuta na 6000 okretaja/min, a nakon svakog centrifugiranja potrebno je izliti supernatant, pažljivo kako se ne bi odlio talog bakterijskih stanica. Talog je, nakon posljednjeg centrifugiranja, resuspendiran u 10% glicerolu tako da ukupni volumen bude 1 mL i stanice su alikvotirane po 40 µL u sterilne Eppendorf kivete i zamrznute na -70°C do trenutka elektroporacije.

3.2.4. Transformacija

Prethodno pripremljen alikvot kompetentnih stanica *E. coli* je, prije elektroporacije, potrebno otopiti na ledu, na temperaturu od 0 °C, nakon čega se u Eppendorf kivetu doda 1 uL DNA, otopljene u puferu male ionske jakosti ili u deioniziranoj vodi. Takva smjesa se homogenizira miješanjem s pipetom i inkubira na ledu 1 minutu. Nakon toga, pripremljena smjesa se prenese u ohlađenu kivetu za elektroporaciju koja je prethodno također ohlađena na ledu, pri tom pazeći da ne zaostanu mjehurići zraka u kivetu. Kiveta se umetne u elektroporator i započne se s elektroporacijom. Kroz kivetu se provede puls visokog napona, jačine 2,5 kV, u trajanju od 5,50 milisekundi, nakon čega se, što je prije moguće, doda 1 mL SOC tekuće hranjive podloge i promiješa pipetom (vremenski period između provođenja pulsa i dodavanja SOC podloge je presudan za oporavak stanica *E. coli* i važno je da bude što je moguće kraći. Dobivena suspenzija stanica se inkubira na tresilici jedan sat, pri 37 °C i 300 min⁻¹ i potom se naciyeplji određeni volumen na krutu selektivnu hranjivu podlogu, koja sadrži ampicilin. Uzgoj stanica provodi se preko noći na 37°C i slijedeći dan vidljivi su transformanti *E. coli*. Shematski dijagram postupka elektroporacije prikazan je na slici 6.



Slika 6. Shematski dijagram postupka elektroporacije (vlastita fotografija).

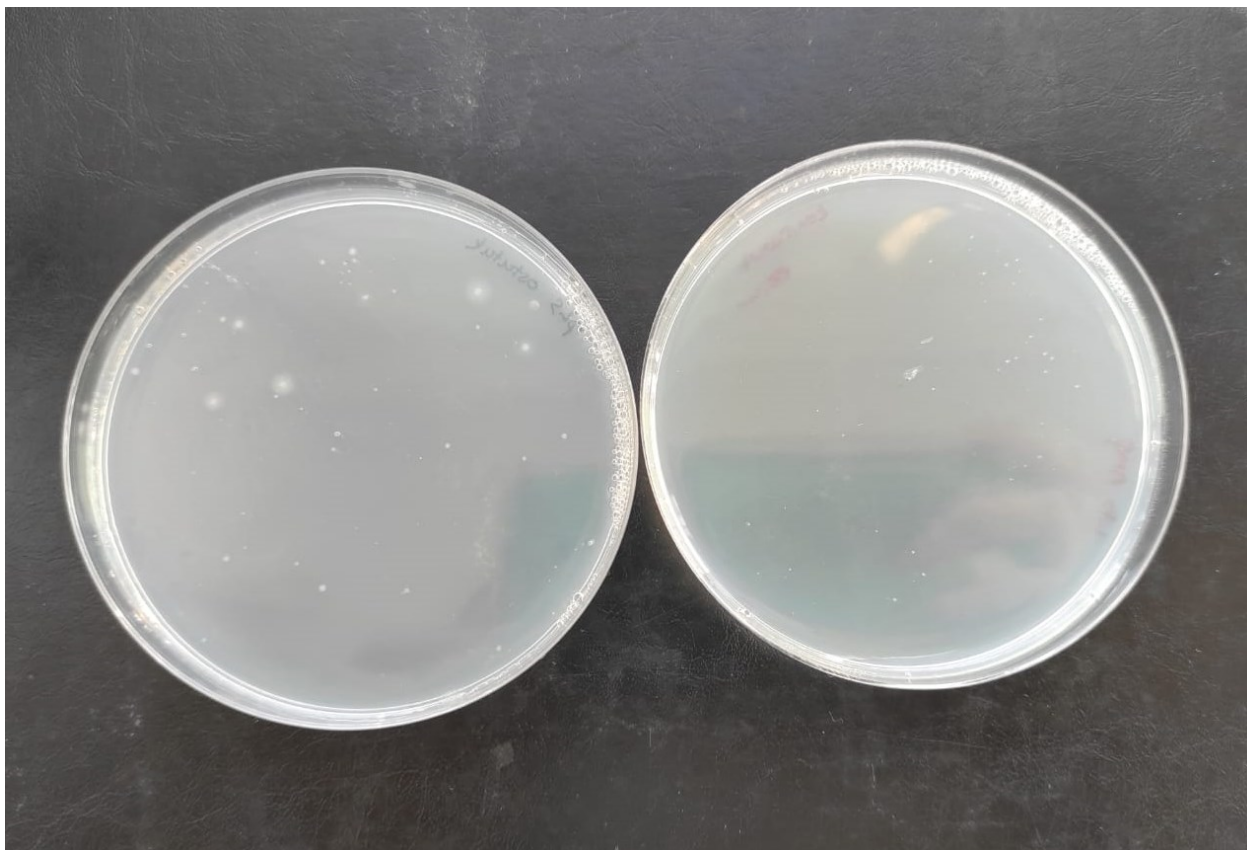
4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bila je priprema elektrokompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli* soja MC1061 te provjera efikasnosti transformacije pomoću plazmida pLS42.

Obzirom da bakterija *Escherichia coli* nije prirodno kompetentna, potrebno je provesti poseban postupak pripreme, kako bi mogla primiti genetski materijal iz okoliša, odnosno da bismo ju mogli transformacijskom smjesom transformirati. U poglavlju 3.2.2. objašnjeno je na koji način su kompetentne stanice pripremljene, a sam postupak transformacije opisan je u poglavlju 3.2.3., pri čemu je za transformaciju korišten plazmid pLS42 (mapa plazmida prikazana je na slici 2), a transformanti su selekcionirani naciepljivanjem na hranjivu podlogu s ampicilinom.

Kao što je navedeno u poglavlju 3.2.2. u naciepljenoj kulturi mjerena je optička gustoća pri 600 nm pomoću spektrofotometra koji mjeri količinu svjetlosti koja je prošla ili se apsorbirala u uzorku. Optička gustoća uzorka mjeri se kako bi se otprilike odredilo u kojoj su fazi rasta stanice u uzorku. Kao što je već navedeno u poglavlju 3.2.2. optimalne vrijednosti optičke gustoće za transformaciju uključuju interval od 0,5 – 0,7, zato što su tada stanice *E. coli* u eksponencijalnoj fazi rasta i postižu se najbolji rezultati uspješnosti transformacije. Postupak pripreme kompetentnih stanica u ovom eksperimentu započeo je kada je vrijednost OD₆₀₀ iznosio 0,55.

Pripremljeno je unupno deset Eppendorf kiveta sa po 40 µl kompetentnih stanica od čega su se tijekom ovog rada iskoristile dvije. Prvi uzorak stanica korišten je za provjeru kompetentnosti pomoću plazmida pLS42, dok je drugi korišten kao kontrola s kojom je proveden cjelokupni postupak transformacije, osim što je umjesto otopine DNA dodana voda. Nakon naciepljivanja na hranjivu podlogu s ampicilinom porastao je određen broj stanica iz prve kivete dok na drugoj hranjivoj podlozi gdje je naciepljena kontrola ne bi smjela porasti nijedna stanica. Na taj način provjerava se da se tijekom postupka pripreme kompetentnih stanica kultura nije kontaminirala, bilo nekim sojem *E. coli* koji je već rezistentan na ampicilin, ili bilo kojom drugom kontaminacijom koja bi mogla porasti na toj podlozi. Rezultati transformacije su prikazani na slici 7. Pri tome su cjelokupni volumeni transformacijskih smjesa naciepljeni su na po jednu krutu LB podlogu s dodatkom ampicilina.



Slika 7. Rezultati transformacije bakterije *E. coli*. Na Petrijevoj zdjelici lijevo prikazan je rezultat transformacije s 1 ng plazmida pLS42, dok je desno prikazan rezultat kontrole u kojoj pri transformaciji nije dodana DNA (vlastita fotografija).

Kao što je vidljivo iz rezultata transformacije, u kontrolnom uzorku bez DNA nije došlo do porasta kolonija, pa se stoga može zaključiti da je eksperiment uredno proveden te da nisu prisutne kontaminacije. U uzorku u koji je pri transformaciji dodan volumen od 1 μg otopine plazmida koncentracije 1 ng/ μg poraslo je ukupno 23 transformanta iz čega se može izračunati efikasnost transformacije, te ocijeniti kompetentnost pripremljenih stanica.

Efikasnost transformacije je mjera kompetentnosti stanica i odražava uspješnost pripreme kompetentnih stanica i izvođenja same transformacije. Nakon svake nove pripreme kompetentnih stanica određuje se njihova kompetentnost pomoću standardnog plazmida kako bi se imao uvid je li priprema dobro napravljena. Efikasnost transformacije izračunava se na

način da se ukupni broj transformanata u transformacijskoj smjesi podijeli s masom DNA korištenom za transformaciju izraženom u μg .

$$E = \frac{\text{ukupni broj transformanata u transformacijskoj smjesi}}{\text{masa DNA korištena za transformaciju } (\mu\text{g})}$$

Ukupni broj transformanata je 23, a masa DNA (plazmida) korištena za transformaciju iznosi 1 ng, pa je stoga efikasnost transformacije $2,3 * 10^4$ transformanata / μg . Ovakva efikasnost transformacije nešto je niža od očekivane. Naime, kao što je već navedeno, efikasnost transformacije bakterije *E. coli* elektroporacijom može biti i do 10^9 do 10^{11} transformanata/ μg plazmidne DNA (Miller, 1994), a uobičajeno u Laboratoriju iznosi oko 10^7 transformanata/ μg . Stoga stanice nisu primjerene za postupke kloniranja, ali ukoliko se transformiraju s replikativnim kružnim plazmidima, može se očekivati da će se korištenjem stanica pripremljenih u ovom radu u daljnjim istraživanjima dobiti zadovoljavajući broj transformanata.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih eksperimenata i rasprave može se zaključiti slijedeće:

1. Postupak pripreme elektrokompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli* soja MC1061 uspješno je proveden.
2. Efikasnost transformacije elektrokompetentnih stanica iznosi $2,3 \cdot 10^4$ transformanata/ug plazmidne DNA.

6. POPIS LITERATURE

Blount, Z. D. (2015) The Natural History of Model Organisms: The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife* DOI: 10.7554/eLife.05826

Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* 16, 6127–6145

Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). Transformation of *Escherichia coli* by Electroporation. *Cold Spring Harbor protocols*, 2020(6), 101220. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101220>

Green, R., Rogers, E. J. (2013). Transformation of chemically competent *E. coli*. *Methods in enzymology*, 529, 329–336. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00028-8>

<https://www.news-medical.net/life-sciences/E-coli-as-a-Model-Organism.aspx> Pristupljeno 5. rujna 2022.

Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M., Byappanahalli, M., Yan, T. Ishii, S. (2017), Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J Appl Microbiol*, 123: 570-581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>

Lurquin, P.F. (1997), Gene Transfer by Electroporation, *Molecular Biotechnology*, vol 7, 5-35
MicroPulser Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide:
<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006174B.pdf> Pristupljeno 30. kolovoza 2022.

Miller JF. Bacterial transformation by electroporation. *Methods Enzymol.* 1994;235:375-85.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35156-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35156-2)

Nicholl, DST (2008) *An Introduction To Genetic Engineering*, 3. izd.

Smith, F. D., Harpending, P. R., Sanford, J. C. (1992). Biolistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells. *Journal of general microbiology*,

138(1), 239–248. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-1-239>

Swords, W.E. (2003). Chemical Transformation of *E. coli*. U: Casali, N., Preston, A. (ed) *E. coli* Plasmid Vectors. *Methods in Molecular Biology*TM, vol 235. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-409-3:49>

Woodall, C.A. (2003). Electroporation of *E. coli*. In: Casali, N., Preston, A. (eds) *E. coli* Plasmid Vectors. *Methods in Molecular Biology*TM, vol 235. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-409-3:55>

Yoshida, N., Sato, M. (2009), Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies, *Appl Microbiol Biotechnol* 83:791–798 <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2042-4>

Izjava o izvornosti

Ja, Karla Ajduković 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.

Vlastoručni potpis