

# Konstrukcija plazmida pBAD-NoxV

---

Šubar, 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:183781>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-03**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Karla Šubar**  
0058215217

## **Konstrukcija plazmida pBAD-NoxV**

**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 Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### Konstrukcija plazmida pBAD-NoxV

Karla Šubar, 0058215217

**Sažetak:** Tehnologija rekombinantne DNA je skup molekularno - genetičkih metoda koje omogućuju uvođenje preciznih genetičkih promjena u živu stanicu ili organizam u svrhu konstrukcije rekombinantnih molekula DNA. Primjena ove tehnologije u biologiji i srodnim znanostima rezultirala je mnogim revolucionarnim otkrićima. U ovom radu spomenutim metodama konstruiran je plazmid pBAD – NoxV. Plazmid je konstruiran ugradnjom fragmenta (inserta) DNA izdvojenog iz plazmida pUC – GW – NoxV, koji sadrži gen *NoxV Ecoli Opti*, u okosnicu plazmida pBADHHEC koji je korišten kao vektor te sadrži gene za rezistenciju na antibiotik ampicilin, ishodište replikacije u bakteriji *Escherichia coli*, gen *araC* i promotor *araBAD*. Iz odabranih transformanata bakterije *E. coli* izolirana je plazmidna DNA čija je struktura provjerena restrikcijском analizom. Rezultati analize su potvrdili uspješnu konstrukciju plazmida pBAD - NoxV.

**Ključne riječi:** *Escherichia coli*; konstrukcija plazmida; restrikcijска analiza; transformacija

**Rad sadrži:** 25 stranica, 8 slika, 0 tablica, 26 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:** 19. rujna 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

Construction of plasmid pBAD- NoxV

Karla Šubar, 0058215217

**Abstract:** Recombinant DNA technology is a set of molecular-genetic methods that enable precise genetic changes to be introduced into a cell or organism for the purpose of constructing recombinant DNA molecules. The application of this technology in biology and related sciences has resulted in many revolutionary discoveries. In this work, the plasmid pBAD – NoxV was constructed using by mentioned methods. The plasmid was constructed by incorporating a fragment (insert) of DNA isolated from the plasmid pUC - GW - NoxV containing the NoxV Ecoli opti gene into the backbone of the plasmid pBADHHEC, which was used as a vector and contains genes for resistance to the antibiotic ampicillin, the origin of replication in the Escherichia coli bacterium, the araC gene and the araBAD promoter. From the selected transformants, plasmid DNA was isolated and subjected to restriction analysis. The result of the analysis confirmed the successful construction of the plasmid pBAD - NoxV.

**Keywords:** *Escherichia coli*; plasmid construction; restriction analysis; transformation

**Thesis contains:** 25 pages, 8 figures, 0 tables, 26 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:** September 19, 2022

## Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO .....   | 2  |
| 2.1. KLONIRANJE POMOĆU RESTRIKCIJSKIH ENZIMA .....                                     | 2  |
| 2.2. KLONIRANJE POMOĆU IIS SUSTAVA (GOLDEN GATE I MoCLO) .....                         | 2  |
| 2.3. GATEAWAY REKOMBINACIJSKO KLONIRANJE .....   | 4  |
| 2.4. SKLAPANJE FRAGMENTA PO GIBSONU (GIBSON ASSEMBLY).....                             | 4  |
| 2.5. TOPO KLONIRANJE .....   | 5  |
| 2.6. KLONIRANJE NEOVISNO O VEZANJU.....  | 5  |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....  | 6  |
| 3.1. MATERIJALI.....   | 6  |
| 3.1.1. MIKROORGANIZMI .....  | 6  |
| 3.1.2. PLAZMIDI.....   | 6  |
| 3.1.3. HRANJIVE PODLOGE I OTOPINE.....   | 7  |
| 3.2. METODE .....  | 11 |
| 3.2.1. CIJEPANJE DNA RESTRIKCIJSKIM ENZIMIMA .....                                     | 11 |
| 3.2.2. ELEKTROFOREZA U AGAROSNOM GELU .....  | 11 |
| 3.2.3. IZOLACIJA VEKTORA I INSERTA IZ AGAROSNOG GELA .....                             | 11 |
| 3.2.4. LIGACIJA VEKTORA I INSERTA .....  | 12 |
| 3.2.5. PRIPREMA KOMPETENTNIH STANICA BAKTERIJE <i>E. COLI</i> ZA ELEKTROPORACIJU ..... | 12 |
| 3.2.6. TRANSFORMACIJA BAKTERIJE <i>E. COLI</i> ELEKTROPORACIJOM .....                  | 12 |
| 3.2.7. IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA IZ TRANSFORMANATA.....                                  | 13 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA.....   | 14 |
| 4.1. KONSTRUKCIJA PLAZMIDA pBAD-NoxV .....   | 14 |
| 4.2. PROVJERA KONSTRUKCIJE PLAZMIDA pBAD – NoxV .....                                  | 19 |
| 5. ZAKLJUČCI.....  | 22 |
| 6. POPIS LITERATURE .....  | 23 |

## 1. UVOD

Tehnologija rekombinantne DNA predstavlja niz molekularno – genetičkih metoda uz pomoć kojih je moguće izmijeniti DNA neke stanice. Danas je vrlo raširena te nalazi primjenu u biotehnologiji, medicini te fundamentalnim i primijenjenim znanstvenim istraživanjima. Razdoblje rekombinantne DNA tehnologije je započelo otkrićem restrikcijskih enzima, 70. -tih godina prošlog stoljeća. Restrikcijske endonukleaze su enzimi koje bakterijska stanica koristi u obrani za razgradnju strane DNA, a prepoznaju određenu sekvenciju (palindrom) te cijepaju na tome mjestu te se na taj način dobivaju fragmenti koji se kasnije koriste za dobivanje rekombinantne DNA.

Princip konstrukcije rekombinantnih molekula DNA bazira se na ugradnji željenog fragmenta molekule DNA koji može potjecati iz jednog ili više različitih organizama, a kojeg nazivamo insert, u vektor. Vektori su molekule DNA u koje se jednostavno može insertirati fragment DNA u svrhu umnažanja u stanici domaćina. Postupak se sastoji od izolacije strane DNA te izrezivanja željenog fragmenta i vektorske DNA pomoću restrikcijskih enzima te zatim ugradnje željene DNA u vektor pomoću DNA ligaze. Vektor s ugrađenom stranom DNA je rekombinantni vektor. Vektor se zatim ubacuje u stanicu domaćina gdje dolazi do umnožavanja stvarajući velik broj kopija strane DNA (Delić, 2004).

Kao stanica domaćin najčešće se koristi bakterija *Escherichia coli* u koju se unose vektori sa raznim genima čijom ekspresijom nastaju proteini. Takve genetički modificirane bakterije se koriste za proizvodnju lijekova, cjepiva, za čišćenje okoliša od zagađivača, za ubijanje kukaca nametnika i slično.

Cilj ovog rada je konstrukcija plazmida pBAD – NoxV, pri čemu je potrebno ORF gena *NoxV* koji kodira za NADPH oksidazu izdvojiti iz plazmida pUC-GW-NoxV, te staviti pod regulacije *araBAD* promotora u okosnici plazmida pBAD-HheC koji će poslužiti kao vektor .

## 2. TEORIJSKI DIO

Konstrukcija rekombinantnih plazmida i fragmenata DNA može se provesti pomoću različitih metoda koje se mogu podijeliti u dvije kategorije: *in vitro* i *in vivo* sklapanje rekombinantne DNA (Kang i Kim, 2021; Aubry i sur., 2019; Juhas i Ajioka, 2017; Li i sur., 2017;). Pristupi *in vitro* i *in vivo* kloniranja i sklapanja fragmenata uključuju: metode posredovane restrikcijским enzimima kao što su sustavi tipa IIS i klasično kloniranje restrikcijским enzimima (Chen i sur., 2013; Engler i sur., 2009); metode temeljene na rekombinaciji kao što su Gateway kloniranje i sklapanje fragmenata po Gibsonu (eng. „*Gibson assembly*“; Gibson i sur., 2009), te metoda temeljena na topoizomerazi i kloniranju neovisnom o ligaciji (eng. *ligation independant cloning*, LIC). U slučaju kloniranja jednog željenog fragmenta u vektor najčešće se koriste klasična metoda kloniranja pomoću restrikcijских enzima, te metoda pomoću topoizomeraze, dok su ostale ovdje opisane metode najkorisnije u slučaju potrebe istovremenog kloniranja većeg broja fragmenata.

### 2.1. Kloniranje pomoću restrikcijских enzima

Molekularno kloniranje temeljeno na restrikcijским enzimima (endonukleazama) je "klasična" metoda kloniranja. Restrikcijški enzimi cijepaju dvolančanu DNA (dsDNA) na određenim specifičnim mjestima u DNA – restrikcijским mjestima. Svaki pojedini restrikcijški enzim prepoznaje specifično restrikcijško mjesto i cijepa ga na točno određen, predvidiv način. Pri tome, nakon cijepanja dvolančane DNA, krajevi mogu biti ravni (tupi) ili imati 3' ili 5' istureni jednolačani kraj. Dva dijela DNA koji imaju komplementarne krajeve ili koji sadrže oba kraja ravna, mogu se ligirati pomoću T4 DNA ligaze. Velika većina plazmida koji se koriste za kloniranje i ekspresiju DNA sadrži sadrži polilinker (MCS, eng. multiple cloning site) – sintetsku regiju DNA s većim brojem jedinstvenih restrikcijških mjesta za najčešće korištene restrikcijške enzime, što olakšava kloniranje inserata u taj dio vektora.

### 2.2. Kloniranje pomoću endonukleaza tipa IIS (Golden Gate i MoClo)

Sustavi kloniranja koji se temelje na restrikcijским endonukleazama tipa IIS koriste specifično svojstvo ovih endonukleaza, a to je da one cijepaju dsDNA na određenoj

udaljenosti od mjesta prepoznavanja. Takav način cijepanja dsDNA se koristi za stvaranje kompatibilnih krajeva (pri cijepanju nastaju jednolančani istureni krajevi dugi 4 nukleotida) koji se zatim mogu spariti tijekom postupka kloniranja. Prednost IIS sustava kloniranja je da se cijeli postupak kloniranja većeg broja fragmenata (digestija i ligacija) može prevesti u samo jednoj reakciji i s jednim restriksijskim enzimom tipa IIS, a, budući da će dobiveni krajevi biti različiti na različitim fragmentima, može se sačuvati usmjerenost reakcije kloniranja. Pri tome, obzirom da se mjesta restriksijskih endonukleaza tipa IIS mogu naći u cijeloj sekvenci DNA, važno je provjeriti da nema dodatnih mjesta prepoznavanja unutar fragmenata koji se cijepaju i sastavljaju. Najčešće korišteni sustavi temeljeni na endonukleazama tipa IIS su Golden Gate i MoClo modularno kloniranje (Lu i sur., 2021.).

Metoda za kloniranje Golden Gate se oslanja na korištenje odgovarajućeg vektora kod kojeg cijepanjem s restriksijskom endonukleazom tipa IIS ostaju istureni krajevi dok se odgovarajuća mjesta prepoznavanja za enzim te sekvencija koja će rezultirati komplementarnim krajevima onima na vektoru, na krajeve inserta najčešće dodaje umnažanjem pomoću odgovarajućih početnica koje željene sekvencije DNA imaju nadodane na svoje 5' krajeve (Gearing, 2015).

Sustav MoClo (modularno kloniranje) sastoji se od tri seta vektora za kloniranje (razine 0, 1 ili 2) koji se mogu koristiti u tri uzastopna koraka. Prije početka, mogu se umetnuti fragmenti DNA koji sadrže osnovne dijelove (promotore, kodirajuće sekvence i terminatore) u pojedinačne plazmide. U prvom koraku kloniranja, kompatibilni vektori razine 0 usmjerenom se sastavljaju u vektor razine 1 tako stvarajući jednu transkripcijsku jedinicu (npr. promotor, 5'UTR, kodirajuća regija i terminator se sparuju u jednu jedinicu). Zatim, do šest dobivenih modula razine 1 može se ponovno na sličan način sastaviti u vektor razine 2, tvoreći tako funkcionalni genetički sklop. Kombiniranje višestrukih vektora razine 2 u završnom koraku sklapanja dopušta stvaranje još složenijih konstrukata, a jedini ograničavajući faktor jest mogućnost domaćina *E. coli* da stabilno replicira i održava konačni plazmid nakon transformacije.



### 2.3. Gateway rekombinacijsko kloniranje

Gateway rekombinacijsko kloniranje je metoda kloniranja koja se temelji na rekombinaciji. Glavna prednost je u tome što se premještanje dijela DNA iz jednog plazmida u drugi vrši putem samo jedne reakcije rekombinacije pritom pojednostavljujući proces i smanjujući vrijeme potrebno za kloniranje. Fragment DNA koji se želi klonirati u plazmid mora sadržavati specifična mjesta za rekombinaciju na svojim krajevima, pa tako fragment DNA prvo mora biti omeđen sa specifičnim Gateway mjestima attB1 i attB2. Ovaj se fragment zatim može klonirati u donorski plazmid koji sadrži kompatibilna attP mjesta (stvarajući ulazni klon) pomoću odgovarajuće rekombinaze. Ulazni klon sada ima rekombinirana attL mjesta koja omeđuju fragment DNA. Sada kada je fragment DNA kloniran u donorski plazmid, može se brzo prebaciti u bilo koji kompatibilni odredišni vektor, koji sadrži attR mjesta putem enzima LR klonaze. Dakle, željeni fragment se može klonirati u donorski plazmid, a zatim se može lako premjestiti u još niz plazmida (Kurtis i Grossniklaus 2003; Van Mullem i sur 2003; Karimi i sur. 2002; Loftus i sur. 2001).

### 2.4. Sklapanje fragmenata po Gibsonu

Sklapanje fragmenata po Gibsonu (*eng. Gibson assembly*) koristi svojstva tri uobičajena enzima: 5' egzonukleaze, polimeraze i ligaze. Prvo 5' egzonukleaza uklanja nukleotide s 5' krajeva fragmenata DNA stvarajući dugačke 3' jednolančane krajeve koji se spajaju jedan s drugim zbog svoje homologije. DNA polimeraza zatim zatvara prazninu koju je stvorila 5' egzonukleaza na način da sintetizira DNA te na kraju ligaza povezuje dobivene fragmente kako bi se stvorila jedna dvolančana DNA. U metodi sklapanja fragmenata po Gibsonu fragmenti DNA s homologijom od 20-40 parova baza na svojim krajevima mogu se lako povezivati u jednoj izotermnoj reakciji. Glavna prednost ove metode je ta što omogućuje jednostavno sklapanje višestrukih fragmenata DNA u odabranoj orijentaciji, a nedostatak ovog sustava je to što ova metoda najbolje funkcionira kada se kombiniraju fragmenti DNA veličine preko 200 parova baza (Phytilla, 2016).

## 2.5. TOPO kloniranje

TOPO kloniranje je metoda kloniranja DNA koja ne koristi restrikcijske enzime ili ligaze. Fragment koji se klonira ovom metodom potrebno je umnožiti pomoću Taq polimeraze pri čemu ona ostavlja jedan nukleotid adenzina (A) na 3' kraju PCR produkta. Komplementarni 3' istureni kraj s timinom (T) nalazi se u prethodno lineariziranom izrezanom TOPO na čijim 3'-krajevima je vezan enzim DNA topoizomeraza. Topoizomeraza djeluje kao ligaza koja povezuje kompatibilne krajeve fragmenta umnoženog PCR-om i TOPO vektora. TOPO kloniranje stoga ne treba restrikcijske enzime ili egzogeni ligazu što omogućuje brz i jednostavan način kloniranja. Glavni nedostatak TOPO kloniranja je taj što je dostupno vrlo malo plazmidskih TOPO okosnica, a i učinkovitost može varirati ovisno o korištenoj polimerazi te o tome što se istureni adenin degradira tijekom vremena, dodatno smanjujući učinkovitost reakcije (Swanson, 2016).

## 2.6. Kloniranje neovisno o ligaciji

Kloniranje neovisno o ligaciji (*eng. ligation independant cloning, LIC*) oslanja se na 3'-5' egzonukleaznu aktivnost T4 DNA polimeraze.

Metoda LIC ne zahtijeva mjesno – specifičnu rekombinaciju ili korak ligacije, što ga čini jednostavnom, jeftinom i brzom metodom kloniranja. LIC ovisi o dodatku samo jednog slobodnog dNTP u reakciju te će u njegovoj prisutnosti T4 polimeraza djelovati kao egzonukleaza sve dok na jednolančanom kraju ne bude izložena baza koja je komplementaran slobodnom nukleotidu. T4 polimeraza zatim nadodaje slobodni dNTP na 3' kraj prema komplementarnom kalupu polimeraznom aktivnošću, te nakon toga zastaje s replikacijom obzirom da nisu dostupni drugi dNTPovi. Dobiveni jednolančani krajevi dugi su 10-12 nukleotida na 5' kraju i vektora i inserta, te moraju biti komplementarni. Takvi krajevi se u otopini komplementarno sparuju, ali nakon sparivanja i dalje sadrže lomove. Tako dobiveni produkt može se unijeti transformacijom u *E. coli*, a lomovi se zatim popravljaju *in vivo* tijekom replikacije. Nedostatak metode LIC jesu poteškoće pri sastavljanju fragmenata DNA s ponavljajućim sekvencama i DNA koja završava sekvencama koje tvore složene sekundarne strukture (Gearing, 2015).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

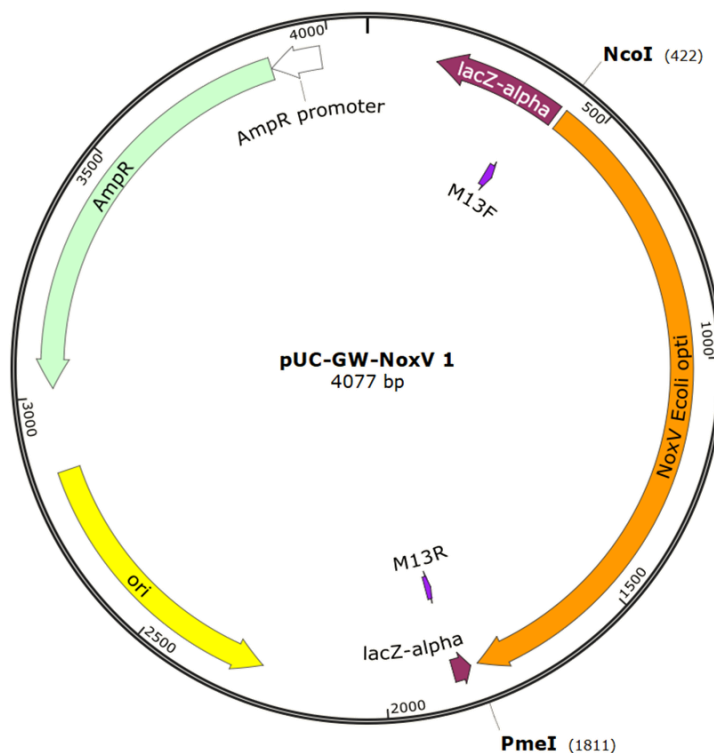
#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

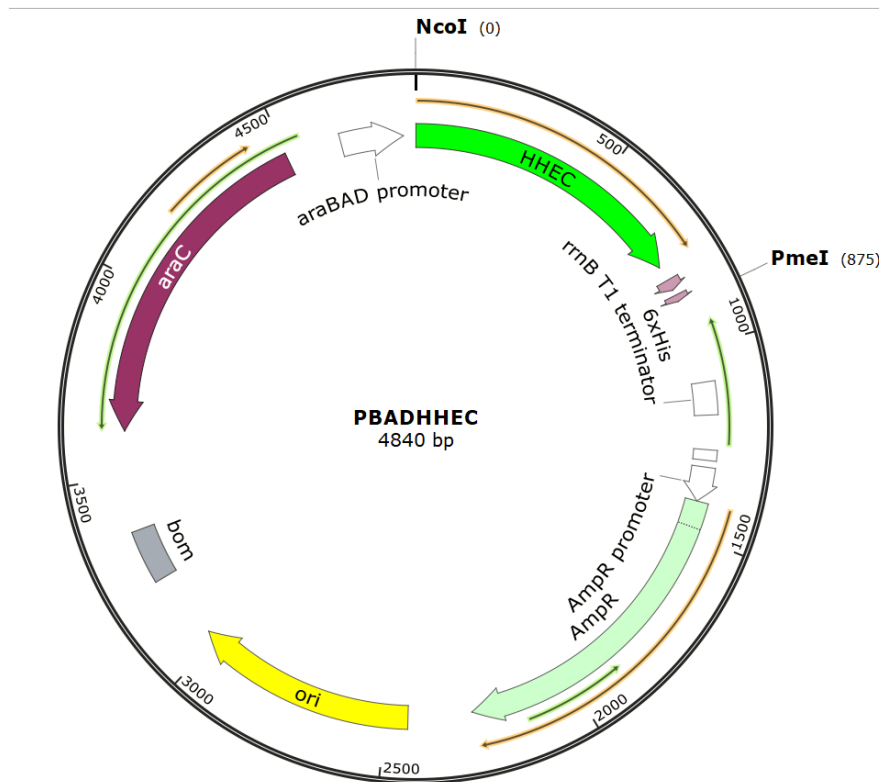
U radu je za pripremu stanica i transformaciju korištena bakterija *Escherichia coli* soja DH5a genotipa: *fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

##### 3.1.2. Plazmidi

Tijekom rada korištena su dva plazmida pUC-GW-NoxV (slika 1) i pBAD-Hhec (slika 2) te oba sadržavaju ishodište replikacije (*ori*) koje im omogućuje umnažanje u bakteriji *E. coli* te oba imaju restrikcijska mjesta NcoI i PmeI. Plazmid pUC-GW-NoxV uz navedeno sadrži i gene *lacZ – alpha* i *NoxV Ecoli opti*, a plazmid pBAD-Hhec sadrži osim navedenog još i gene *hhec* te *araC*. Zbog prisutstva gena *bla* koji kodira za rezistenciju na antibiotik ampicilin, bakterije koje su uspješno transformirane plazmidom su rezistentne su na antibiotik ampicilin.



Slika 1. Restriksijska mapa plazmida pUC-GW-NoxV



Slika 2. Restriksijska mapa plazmida pBAD-HheC

### 3.1.3. Hranjive podloge i otopine

Podloge i otopine korištene u ovom radu steriliziraju se u autoklavu 20 min na 121°C i čuvaju na sobnoj temperaturi (ukoliko nisu napomenuti drugačiji uvjeti) ili se pripremaju iz sterilne deionizirane vode i sterilnih otopina. Krute podloge imaju isti sastav kao i tekuće, ali sadrže 25,0 g L<sup>-1</sup> agara koji se dodaje prije sterilizacije.

#### 3.1.3.1. Podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli*

LB (kompletna podloga):

kvašćev ekstrakt 5,0 g L<sup>-1</sup>

bacto-tripton 10,0 g L<sup>-1</sup>

NaCl 10,0 g L<sup>-1</sup>

Izrada podloge s ampicilinom: Ampicilin se dodaje u sterilnu podlogu iz osnovne otopine sterilizirane filtracijom (koncentracija 20,0 mg mL<sup>-1</sup>) do konačne

koncentracije od  $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  za krutu podlogu (koja je ohlađena na  $58^\circ\text{C}$ ), odnosno do konačne koncentracije od  $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  za tekuću podlogu.

SOC:

KCl 20,0 mg

NaCl 60,0 mg

MgCl<sub>2</sub> 200,0 mg

bacto-tripton 2,0 g

kvašćev ekstrakt 500,0 mg

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 250,0 mg

glukoza 360,0 mg

destilirana voda do 100,0 mL

### **3.1.3.2. Reakcijska otopina za cijepanje plazmida**

plazmidna DNA 10,0  $\mu\text{L}$

pufer 3,0  $\mu\text{L}$

enzim PmeI 0,3  $\mu\text{L}$

enzim NcoI 0,3  $\mu\text{L}$

destilirana voda 16,4  $\mu\text{L}$

### **3.1.3.3. Otopina za pripremu kompetentnih stanica**

Glicerol (10 vol%):

Pro analysi, predestiliran, razrijeđen s vodom u omjeru 1:9. Sterilizira se autoklaviranjem na  $121^\circ\text{C}$ , 15 minuta, čuva se na  $4^\circ\text{C}$ .

#### **3.1.3.4. Ligacijska otopina**

vektor 5,0  $\mu\text{L}$

insert 5,0  $\mu\text{L}$

10x koncentrirani pufer 2,0  $\mu\text{L}$

ligaza 1,0  $\mu\text{L}$

voda 7,0  $\mu\text{L}$

#### **3.1.3.5. Restriksijska otopina za cijepanje plazmida radi provjere**

DNA 4,0  $\mu\text{L}$

pufer 1,5  $\mu\text{L}$

voda 9,2  $\mu\text{L}$

#### **3.1.3.6. Otopine za gel-elektroforezu**

EDTA (0,5 M; pH 8,0) 40,0 mL

destilirana voda do 1000,0 mL

borna kiselina 55,0 g

TBE-pufer (10x): Tris 108,0 g

Pufer za gel-elektroforezu se priprema u koncentriranom obliku i zatim naknadno razrjeđuje destiliranom vodom do željene koncentracije.

Priprema agaroznog gela: Agarozni gel se priprema otapanjem agaroze u TBE-puferu (1x) pripremljenim razrjeđivanjem TBE-pufera (10x). Ovisno o potrebi, koncentracija agaroze u gelu može iznositi 7,0 – 20,0 g L<sup>-1</sup>.

Boja za nanošenje uzorka:

brom-fenol-plavo 2,5 g L<sup>-1</sup>

ksilen-cijanol 2,5 g L<sup>-1</sup>

Otopina se čuva pri 4°C i nije je potrebno sterilizirati.

Etidijev bromid:

Osnovna otopina priprema se u koncentraciji od 10,0 mg mL<sup>-1</sup>, nije ju potrebno sterilizirati i čuva se na 4°C u zatamnjenoj boci. Otopina za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom 50,0 µL osnovne otopine u 1,0 L destilirane vode i također se čuva u zatamnjenoj boci.

### **3.1.3.7. Kemikalije i enzimi**

Agaroz: Appligene, Strassbourg.

EDTA: Kemika, Zagreb.

Enzimi za cijepanje i modifikaciju DNA:

Etidijev bromid: Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.

Sastojci hranjivih podloga: Difco, Detroit

Merck, Darmstadt.

Sigma Chemical Co., St. Louis.

Komplet kemikalija za izolaciju DNA iz gela: New England Biolabs, USA

Kemikalije za pripremu ostalih otopina: Sigma Chemical Co., St. Louis,

Kemika, Zagreb,

Alkaloid, Skopje.

Standard: New England Biolabs, USA

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima**

Restrikcijski enzimi NcoI, PmeI, PvuI i NdeI korišteni su prema uputama proizvođača New England Biolabs (USA), kao i njihovi puferi u pripremi restrikcijske otopine.

### **3.2.2. Elektroforeza u agaroznom gelu**

Elektroforeza u agaroznom gelu je provedena u aparaturi za elektroforezu. Otopljeni agarozni gel se ohladi na oko 50°C te se izlije u nosač gela u koji je prethodno postavljen češljic koji omogućuje formiranje jažica. Nakon što se gel stvrdne, nosač gela se postavi u kadnicu za elektroforezu. U nju se ulije TBE (1x) pufer tako da sloj pufera iznad gela bude visok oko 1 mm. Nakon što se gel stvrdne, iz njega se izvadi češljic. Uzorci DNA se pomiješaju s bojom za nanošenje uzoraka u omjeru 6:1 i unesu mikropipetom u jažice na gelu. Elektroforeza se najčešće provodi pri naponu od 60 V do 70 V u vremenu 1 – 4 h (ovisno o koncentraciji agaroze u gelu i veličini analiziranih fragmenata DNA). Po završetku elektroforeze gel se inkubira u otopini etidij-bromida 15 – 20 min na tamnom mjestu, nakon čega se osvijetli UV svjetlom na transiluminatoru i po potrebi fotografira.

### **3.2.3. Izolacija vektora i inserta iz agaroznog gela**

Za izolaciju dobivenih fragmenata DNA iz agaroznog gela korišten je komplet kemikalija Monarch® DNA Gel Extraction Kit (proizvođača BioLabs) te je izolacija provedena prema uputama. Komad agaroznog gela koji sadrži željeni fragment DNA izreže se iz gela, izvaže i otopi u 4 volumena otopine pufera za otapanje gela (100,0 µg gela je volumen od 100,0 µl). Smjesa se inkubira 5- 10 min na 37-55°C (obično 50 °C) te se povremeno miješa na vorteksu u svrhu potpunog otapanja agaroznog gela. Otopina se nanese na kolonu za izolaciju DNA. Proveđe se centrifugiranje 1 min. Slijedi ispiranje kolone dodatkom 200,0 µL pufera za ispiranje uz centrifugiranje od 13 000 rpm . Filtrat se odbaci, a kolona još jednom



centrifugira ponovno na 13 000 rpm . DNA se s kolone ispere dodatkom 6,0  $\mu$ L ili više pufera za eluciju i pohrani.

#### **3.2.4. Ligacija vektora i inserta**

Ligacijska smjesa priprema se u kiveti prethodno ohlađenoj na 0°C te uronjenoj u usitnjeni led i sadrži 5,0  $\mu$ L DNA inserta, 5,0  $\mu$ L DNA vektora, 2,0  $\mu$ L pufera(10x), 1,0  $\mu$ L DNA ligaze i 7,0  $\mu$ L destilirane vode. Kontrolna smjesa se priprema na isti način osim što se umjesto inserta stavlja 5,0  $\mu$ L destilirane vode. Ligacija se provodi pri 16°C preko noći ili na sobnoj temperaturi 2 sata.

#### **3.2.5. Priprema kompetentnih stanica bakterije *E. coli* za elektroporaciju**

Tekuća kultura bakterije *E. coli* volumena 500,0 mL uzgaja se na 300 min<sup>-1</sup> /37°C do trenutka kada OD<sub>600</sub> suspenzije dosegne vrijednost 0,5 – 0,7. Zatim se kultura hladi na ledu 20 min. Nadalje se sve manipulacije stanicama provode na temperaturi blizu 0°C, a i svo korišteno laboratorijsko posuđe prethodno se ohladi u ledu. Stanice se centrifugiraju 15 min/4000 min<sup>-1</sup> /4°C, nakon čega se talog ispire u hladnom 10%-tnom glicerolu, prvo u volumenu od 500,0 mL, a zatim u volumenu od 250,0 mL i naposljetku u volumenu od 20,0 mL. Pelet stanica se resuspendira u 1,0 – 2,0 mL hladnog 10%-tnog glicerola te se potom suspenzija razdijeli u alikvote volumena 40,0  $\mu$ L koji se pohrane na -70°C.

#### **3.2.6. Transformacija bakterije *E. coli* elektroporacijom**

Neposredno prije elektroporacije alikvot stanica se ostavi na ledu kako bi postigao temperaturu od 0°C, nakon čega se u njega dodaje 1,0 – 2,0  $\mu$ L DNA otopljene u puferu niske ionske jakosti kao što je TE pufer. Nakon homogenizacije i inkubacije na ledu u trajanju od 1 minute uz miješanje, smjesa se prenese u ohlađenu kivetu na ledu za elektroporaciju. Kiveta se umetne u otvor na elektroporatoru. Kroz nju se provede visokovoltažni puls od 2,5 kV u trajanju od 5 milisekunda nakon kojeg se stanice brzo resuspendiraju u 1,0 mL medija SOC. Dobivena suspenzija inkubira

se 1 h/300 min<sup>-1</sup> pri 37°C. Nakon inkubacije 200,0 µL suspenzije nacijepi se na pripremljenu krutu LB hranjivu podlogu uz dodatak ampicilina.

### **3.2.7. Izolacija plazmidne DNA iz transformanata**

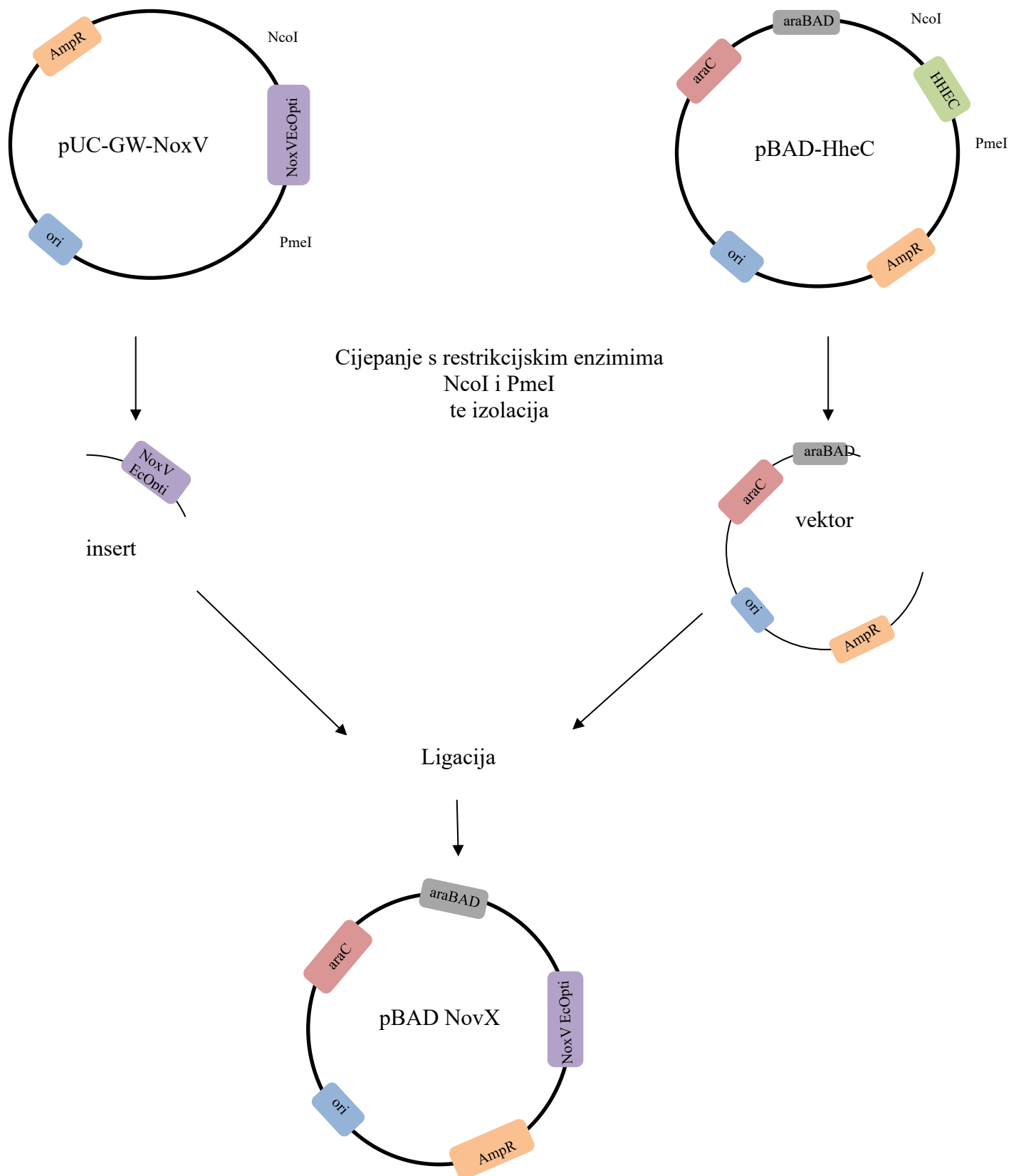
Alikvot bakterijske kulture volumena 4,0 mL centrifugira se na 13 000 rpm 30 sekundi . Talog se resuspendira u 200,0 µL pufera za resuspenziju plazmida, a supernatant se odbacuje. U otopinu se dodaju 200,0 µL plazmidnog pufera za lizu te se preokrene epruveta nježno 5-6 puta. Zatim se neutralizira lizat s 400,0 µL pufera za neutralizaciju i potom se lizat razbistri centrifugom 2-5 minuta pri 13 000 rpm. Supernatant se pažljivo prenese u spin kolonu i ponovno centrifugira 1 minutu te se nakon toga odbaci protočni dio i umetne se kolonica u epruvetu za prikupljanje te se doda 200,0 µL pufera za ispiranje koji uklanja zaostalu RNA i proteine te se centrifugira 1 minutu. Zatim se ponovno doda 400,0 µL pufera za ispiranje i opet centrifugira 1 minutu. Nakon toga premjestimo kolonu u čistu epruvetu te dodamo 30,0 µL pufera za ispiranje DNA i centrifugiramo ponovno 1 minutu za eluciju DNA.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je konstruirati plazmid pBAD-NoxV koristeći plazmide pUC-GW-NoxV i pBAD-HheC . Iz plazmida pUC-GW-NoxV je bilo potrebno izolirati insert, a plazmid koji je korišten za vektor je pBAD-HheC. Postupci u konstrukciji plazmida opisani su u poglavlju 4.1., a način provjere konstruiranog plazmida je opisan u poglavlju 4.2.

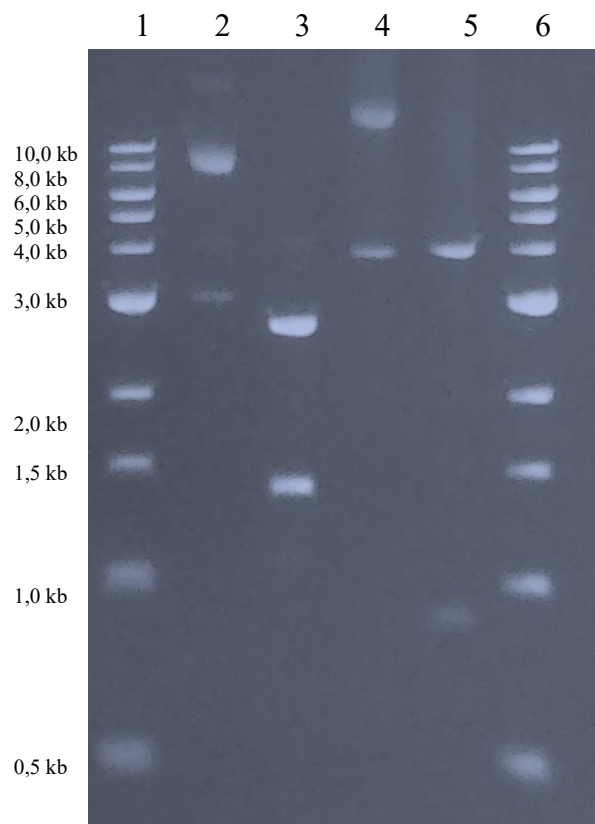
### 4.1. Konstrukcija plazmida pBAD-NoxV

Pri konstrukciji plazmida pBAD-NoxV (slika 7) kao vektor je korišten dio plazmida pBAD-HHEC koji nosi ishodište replikacije (*ori*), gen koji omogućava rezistenciju na ampicilin (*bla*), te gen *araC* i *araBAD* promotor koji omogućava inducibilnu ekspresiju heterolognih gena u *E. coli*. Pod kontrolu toga promotora potrebno je klonirati ORF gena *NoxV* koji kodira za NADPH oksidazu, a koji potječe iz bakterije *Lactococcus lactis* i čiji je sastav kodona optimiziran za ekspresiju u *E. coli*. U tu svrhu, insert koji nosi ORF gena *NoxV* potrebno je izdvojiti iz plazmida pUC-GW-NoxV. Shema konstrukcije ovog plazmida prikazana je na slici 3, a pojedini koraci detaljno su objašnjeni u nastavku.



Slika 3. Shema konstrukcije plazmida pBAD NoxV. Ljubičastom bojom je označen insert. Oba plazmida su pocijepana s restriksijskim enzimima NcoI i PmeI. Izolirani su insert i vektor te je potom napravljena ligacija kojom je konstruiran pBAD - NoxV te je transformirana *E. coli*.

Konstrukcija plazmida je započela linearizacijom plazmida pUC-GW-NoxV i pBAD-HHEC što je napravljeno pomoću restrikcijskih enzima NcoI i PmeI. Nakon što je napravljena restrikcija, uspješnost restrikcije je provjerena gel-elektroforezom na 0,8% agaroznom gelu na način kako je opisano u poglavlju 3.2.2.(slika 4).

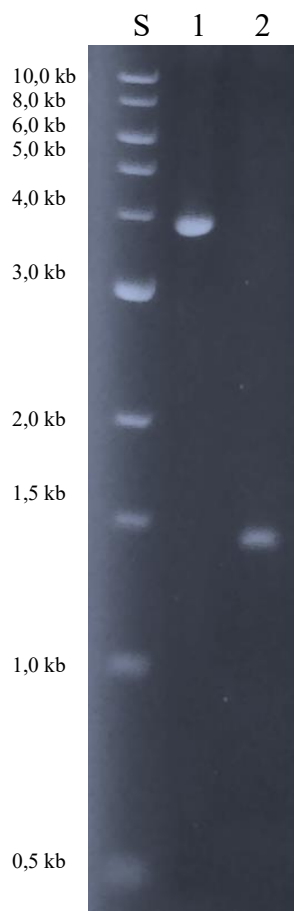


Slika 4. Provjera uspješnosti cijepanja vektora s NcoI i PmeI. U jažicama: 1 – standard, 2 - neporezani plazmid pUC-GW-NoxV, 3 – pUC-GW-NoxV porezan s NcoI i PmeI, 4 – neporezani plazmid pBAD-HheC, 5 - pBAD-HheC porezan s NcoI i PmeI, 6 -standard.

Na gelu je u jažici broj 2 vidljiva deblja vrpca u samom vrhu gela pa stoga možemo zaključiti da je ta DNA neporezana. U jažici broj 3 može se jasno vidjeti dvije vrpce stoga možemo zaključiti da je plazmid pUC-GW-NoxV porezan restrikcijskim enzimima PmeI i NcoI te usporedbom sa standardom zaključujemo da su te 2 vrpce očekivane veličine (1,4 kb i 2,6 kb). U jažici broj 4 su vidljive dvije vrpce, vrpca na samom vrhu gela su ostaci DNA, a vrpca veličine oko 4,0 kb je neporezani plazmid

pBAD-HheC. U jažici broj 5 su vidljive 2 vrpce te one prikazuju plazmid pBAD-HheC porezan restriksijskim enzimima PmeI i NcoI, a usporedbom sa standardom zaključujemo da su vrpce i očekivane veličine (0,8 kb i 4,0 kb).

Za daljnji postupak konstrukcije plazmida potrebni su porezani vektor i insert te su nakon restrikcije oni izolirani iz agaroznog gela na način opisan u poglavlju 3.2.3., a uspješnost izolacije je provjerena gel elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu (slika 5)



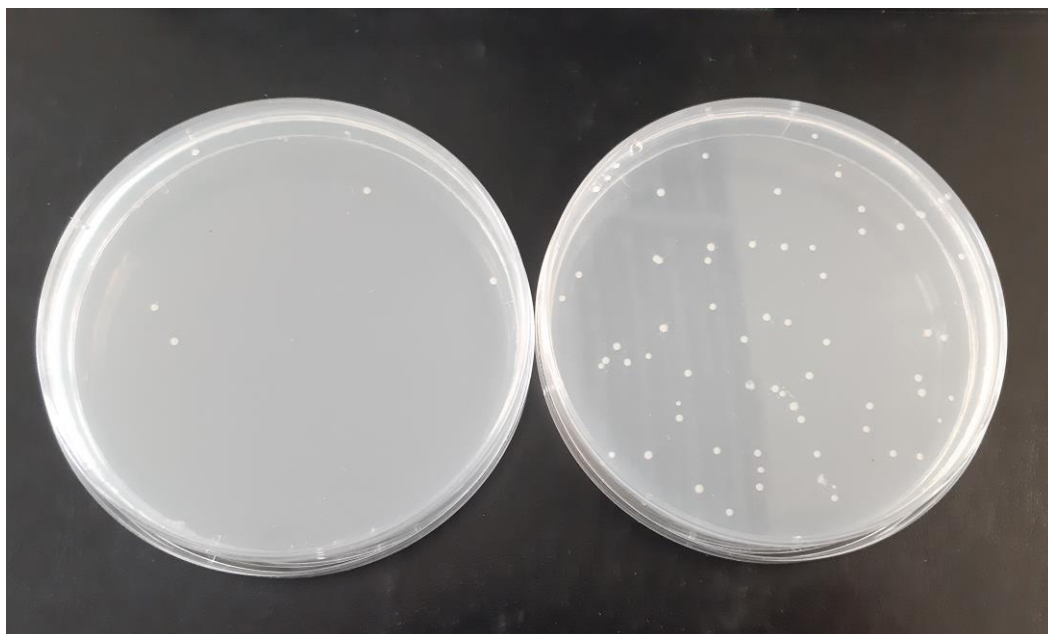
Slika 5. Provjera uspješnosti izolacije porezanih vektora i inserta iz agaroznog gela.

U jažicama: S – standard, 1 - porezani vektor pBAD-HheC i 2 - porezani insert plazmida pUC-GW-NoxV nakon izolacije iz agaroznog gela.

Na gelu je jasno vidljiva samo jedna vrpca u jažici broj 1 te se može zaključiti da je izolirana samo porezana DNA vektora te usporedbom sa standardom u jažici S je vidljivo da ta vrpca u jažici 2 pripada vektoru jer se nalazi u ravni s fragmentom DNA standarda veličine 4,0 kb. U drugoj jažici se nalazi također samo 1 vrpca te se

može zaključiti da je izoliran samo dio plazmida koji će poslužiti kao insert u daljnim koracima konstrukcije. Usporedbom sa standardom u jažici S vidljivo je da vrpca u jažici 2 pripada očekivanom insertu jer se nalazi u ravnini s fragmentom DNA standarda veličine 1,4 kb.

Kako bi se u daljnjim koracima umetnuo insert u vektor napravljena je ligacija kako je opisano u poglavlju 3.2.4. S ligacijskom smjesom potrebno je transformirati bakteriju *Escherichia coli*, ali ona sama nije kompetentna odnosno ne može primiti genetski materijal iz okoliša te ju je potrebno učiniti kompetentnom kako bi je mogli transformirati s konstruiranim plazmidom. Kompetentne stanice su pripremljene na način kako je opisano u poglavlju 3.2.5. Ligacijskom smjesom je transformirana bakterija *Escherichia coli* koristeći metodu elektroporacije opisanu u poglavlju 3.2.6. Nakon transformacije, na jednu krutu hranjivu podlogu s ampicilinom naciepljena je 1/10 ukupnog volumena transformacijske smjese, a na drugu ostatak volumena transformacijske smjese. Podloge su inkubirane na 37°C preko noći, a rezultat transformacije prikazan je na slici 6.

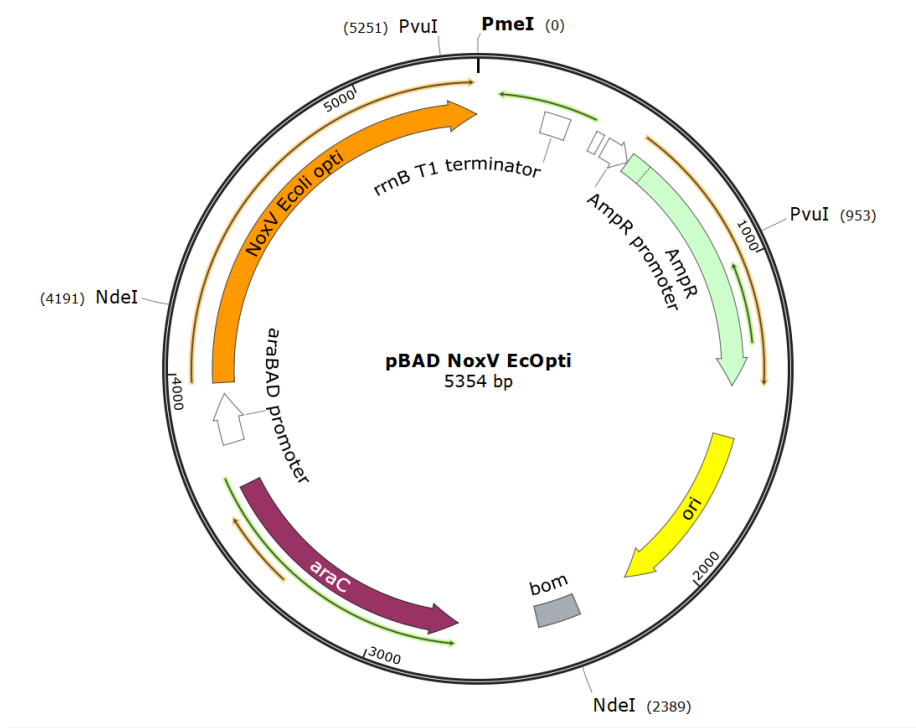


Slika 6. Rezultat transformacije *E. coli* s ligacijskom smjesom. Lijevo na slici su prikazane porasle kolonije u većem razrjeđenju (1/10 ukupnog volumena transformacijske smjese), a s desne strane u manjem razrjeđenju (ostatak volumena transformacijske smjese). (vlastita fotografija)

Nakon selekcije transformanata na podlozi s ampicilinom, odabrana su 2 transformanta koja su potom uzgojena u tekućoj LB hranjivoj podlozi radi izolacije i provjere konstruiranog plazmida.

#### 4.2. Provjera konstrukcije plazmida pBAD – NoxV

Nakon što je konstruiran plazmid pBAD – NoxV napravljena je restrikcijska analiza kako bi se provjerila struktura konstruiranog plazmida. Mapa konstruiranog plazmida s relevantnim restrikcijskim mjestima prikazana je na slici 7. Restrikcijska analiza detaljno je objašnjena u nastavku.



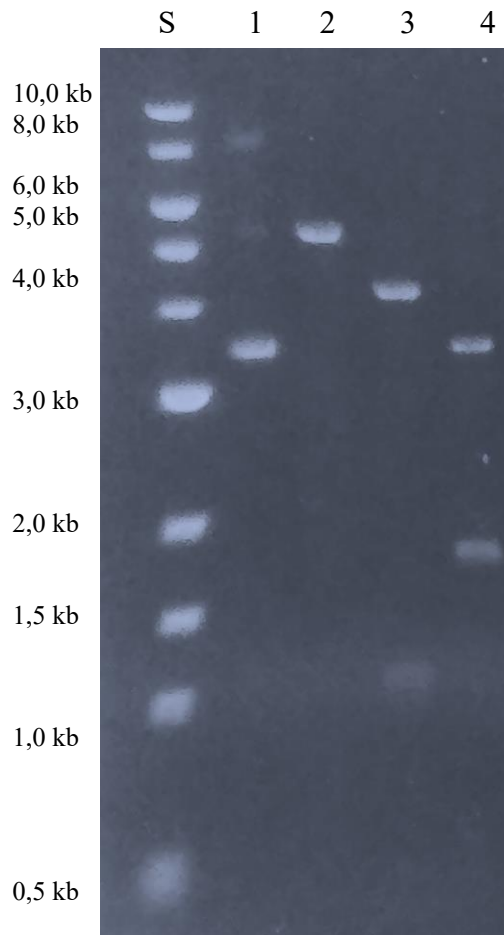
Slika 7. Restrikcijska mapa plazmida pBAD NoxV

Prvo je potrebno provjeriti jesu li transformanti sadržavali plazmid pBAD- NoxV na način da se izolira njihova plazmidna DNA, što je i napravljeno na način kako je opisano u poglavlju 3.2.7. Uspješnost izolacije plazmidne DNA provjerena je gel – elektroforezom na 0,8% agaroznom gelu.

Izolirani plazmid je zatim porezan restrikcijskim endonukleazama PmeI, PvuI i



NdeI kako je opisano u poglavlju 3.2.7. Provjera uspješnosti napravljena je gel – elektroforezom na 0,8% agaroznom gelu (slika 8).



Slika 8. Provjera uspješnosti cijepanja s restrikcijskim endonukleazama PmeI, PvuI i NdeI.

U jažicama: S – standard, 1 - neporezani plazmid pBAD - NoxV, 2 – pBAD - NoxV porezan s PmeI, 3 – pBAD - NoxV porezan s PvuI, 4 – pBAD – NoxV porezan s NdeI.

U jažici broj 1, u kojoj se nalazi neporezana plazmidna DNA. U jažici broj 2 je također jasno vidljiva samo jedna vrpca, a usporedbom sa standardom u jažici S vrpca iz jažice 2 se nalazi u ravnini s fragmentom DNA standarda veličine 5,0 kb, pa se stoga može zaključiti da je dobiven linearizirani plazmid pocijepan PmeI restrikcijskom endonukleazom jer za taj enzim postoji samo jedno restrikcijsko mjesto na plazmidu. U jažici broj 3 su jasno vidljive dvije vrpce te usporedbom sa standardom u jažici S se te dvije vrpce nalaze u ravnini fragmenata DNA

standarda veličine 4,0 kb i 1,0 kb, pa stoga možemo zaključiti da je plazmid porezan na 2 restrikcijska mjesta pomoću restrikcijske endonukleaze PvuI te su dobiveni fragmenti očekivane veličine. U posljednjoj odnosno jažici broj 4 su također vidljive dvije vrpce te usporedbom sa standardom u jažici S se one nalaze u ravnini fragmenata 3,5 kb i 1,8 kb, pa stoga možemo zaključiti da je plazmid porezan na 2 restrikcijska mjesta pomoću endonukleaze NdeI i da su dobiveni fragmenti očekivane veličine.

Usporedbom rezultata gel – elektroforeze i restrikcijske mape konstruiranog plazmida pBAD – NoxV može se zaključiti da je restrikcija plazmida s restrikcijskim endonukleazama bila uspješna te da su dobiveni fragmenti očekivane veličine.

## **5. ZAKLJUČCI**

1. Temeljem dobivenih rezultata te provedene rasprave može se zaključiti da je plazmid pBAD - NoxV uspješno konstruiran.

## 6. POPIS LITERATURE

Anonymus (2015) Molecular Cloning Techniques, <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/cloning/>. Pristupljeno 28. kolovoza 2022.

Anonymous (2022) Tehnologija rekombinantne DNA ili genetičko inženjerstvo, <https://www.genetika.biol.pmf.hr/docs/sadrzaj/20-poglavlje/tehnologija-rekombinantne-dna-ili-geneticko-inzenjerstvo/>. Pristupljeno 28. kolovoza 2022.

Aubry, C., Pernodet, J. L., and Lautru, S. (2019). Modular and integrative vectors for synthetic biology applications in *Streptomyces* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 85:e00485-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00485-19>

Chen, W. H., Qin, Z. J., Wang, J., and Zhao, G. P. (2013). The MASTER (methylation-assisted tailorable ends rational) ligation method for seamless DNA assembly. *Nucleic Acids Res.* 41:e93. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt122>

Curtis, M.D. and Grossniklaus, U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 133: 462–469. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027979>

Delić Vladimir (2004, siječanj) Trideset godina genetičkog inženjerstva: kako je došlo do otkrića. HUGI – Hrvatska udruga genetičkih inženjera, <http://www.hugi.hr/files/delic.pdf>. Pristupljeno 28. kolovoza 2022.

Denyer, S.P., Hodges, N., Gorman, S.P. (2004) Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology, 7. izd., Wiley-Blackwell, Oxford.

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.

Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2009). Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS One* 4:e5553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005553>

Gardlo, N. (2012) Pseudopalindromi u DNA - utjecaj na stabilnost genoma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (istraživački rad), Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Gearing M. (2015) Plasmids 101: Golden Gate Cloning - Addgene Blog, [https://blog.addgene.org/plasmids-101-golden-gate-cloning?\\_ga=2.227163549.1675805618.1662574471-1741473259.1661704362](https://blog.addgene.org/plasmids-101-golden-gate-cloning?_ga=2.227163549.1675805618.1662574471-1741473259.1661704362). Pristupljeno 1. rujan 2022.

Gearing M. (2015) Plasmids 101: Sequence and Ligation Independent Cloning – Addgene Blog, [https://blog.addgene.org/plasmids-101-sequence-and-ligation-independent-cloning?\\_ga=2.164656575.1675805618.1662574471-1741473259.1661704362](https://blog.addgene.org/plasmids-101-sequence-and-ligation-independent-cloning?_ga=2.164656575.1675805618.1662574471-1741473259.1661704362). Pristupljeno 7. rujan 2022.

- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., and Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Juhas, M., and Ajioka, J. W. (2017). High molecular weight DNA assembly in vivo for synthetic biology applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 277–286. <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1141394>
- Kang, H. S., and Kim, E. S. (2021). Recent advances in heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* hosts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 69, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.016>
- Karimi, M., Inze, D., and Depicker, A. 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7: 193–195. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02251-3)
- Li, L., Jiang, W. H., and Lu, Y. H. (2017). New strategies and approaches for engineering biosynthetic gene clusters of microbial natural products. *Biotechnol. Adv.* 35, 936–949. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.007>
- Loftus, S.K., Larson, D.M., Watkins-Chow, D., Church, D.M., and Pavan, W.J. 2001. Generation of RCAS vectors useful for functional genomic analyses. *DNA Res.* 8: 221–226. <https://doi.org/10.1093/dnares/8.5.221>
- NEB (2015) Monarch® DNA Gel Extraction Kit Protocol. NEB – New England BioLabs, <https://international.neb.com/protocols/2015/11/23/monarch-dna-gel-extraction-kit-protocol-t1020>. Pristupljeno 8. srpnja 2022.
- NEB (2015) Monarch® Plasmid DNA Miniprep Kit Protocol. NEB – New England BioLabs, <https://www.neb.com/protocols/2015/11/20/monarch-plasmid-dna-miniprep-kit-protocol-t1010>. Pristupljeno 15. srpnja 2022.
- NEB (2020) Ligation Protocol with T4 DNA Ligase. NEB – New England BioLabs, <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/dna-ligation-with-t4-dna-ligase-m0202>. 10. srpnja 2022.
- NEB (2022) Quick-Load® 1 kb DNA Ladder. NEB – New England BioLabs, <https://www.neb.com/products/n0468-quick-load-1-kb-dna-ladder#Product%20Information>. Pristupljeno 8. srpnja 2022.
- Phytillia, B. (2016) Plasmids 101: Gibson Assembly and Other Long-Homology Based Cloning Methods – Addgene Blog. [https://blog.addgene.org/plasmids-101-gibson-assembly?\\_ga=2.173240739.1675805618.1662574471-1741473259.1661704362](https://blog.addgene.org/plasmids-101-gibson-assembly?_ga=2.173240739.1675805618.1662574471-1741473259.1661704362). Pristupljeno 2. rujana 2022.
- Swanson, L. Plasmids 101: TOPO Cloning – Addgene Blog. [https://blog.addgene.org/plasmids-101-topo-cloning?\\_ga=2.5519795.1675805618.1662574471-1741473259.1661704362](https://blog.addgene.org/plasmids-101-topo-cloning?_ga=2.5519795.1675805618.1662574471-1741473259.1661704362). Pristupljeno 7. rujana 2022.

Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X., and Vandenhoute, J. 2003. Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast* **20**: 739–746. <https://doi.org/10.1002/yea.999>

Žunar, B. (2011) Međuovisnost intrakromosomske rekombinacije i duplikacije kromosoma u kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (istraživački rad), Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

## **Izjava o izvornosti**

Ja \_\_\_\_\_ Karla Šubar \_\_\_\_\_ 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