

Konstrukcija plazmida pBAD-RadH

Rohlik, Franciska

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:438504>

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
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Franciska Rohlik
0058214636

Konstrukcija plazmida pBAD-RadH

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Genetičko inženjerstvo

Mentor: izv.prof. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Konstrukcija plazmida pBAD-RadH

Franciska Rohlik, 0058214636

Sažetak: *Escherichia coli* jedan je od najpoznatijih i najvažnijih modelnih mikroorganizama. Zbog dobrog poznavanja genetike i biologije ove bakterije, njezinog kratkog generacijskog vremena te jednostavnih uvjeta uzgoja, koristi se kao domaćin za biotehnološku proizvodnju raznih kemikalija. Razvoj velikog broj tehnika genetičkog inženjerstva bio je usmjeren upravo na ovu korisnu bakteriju, te se stoga danas njezinim genomom može relativno lako manipulirati. Cilj ovog rada je konstruirati plazmid pBAD-RadH, ekspresijski plazmid za bakteriju *E. coli* na kojem se pod kontrolom inducibilnog araBAD promotora nalazi gen RadH koji kodira za R-specifičnu alkohol-dehidrogenazu. Uspješnost konstrukcije plazmida pBAD-RadH potvrđena je elektroforezom i restrikcijskom analizom.

Ključne riječi: *Escherichia coli*, konstrukcija plazmida, restrikcijski enzimi, transformacija

Rad sadrži: 27 stranica, 8 slika, 0 tablica, 33 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: izv. prof. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Datum obrane: 14. srpanj 2023.

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-RadH

Franciska Rohlik, 0058214636

Abstract: *Escherichia coli* is one of the best known and most important model microorganisms. Due to a good knowledge of the genetics and biology of this bacterium, its short generation time and simple growing conditions, it was used as a host for the biotechnological production of various chemicals. The development of a large number of genetic engineering techniques was aimed precisely at this useful bacterium, and therefore today its genome can be relatively easily manipulated. The aim of this work is to construct the plasmid pBAD-RadH, which is an expression plasmid for the bacterium *E. coli* on which, under the control of the inducible araBAD promoter, there is the RadH gene that encodes R-specific alcohol dehydrogenase. The success of the construction of the plasmid pBAD-RadH was verified by electrophoresis and restriction analysis.

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

Thesis contains: 27 pages, 8 figures, 0 tables, 33 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: izv.prof.. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Thesis defended: July 14th 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i> KAO MODELNI ORGANIZAM	2
2.2. <i>ESCHERICHIA COLI</i> KAO DOMAĆIN U GENETIČKOM INŽENJERSTVU.....	3
2.2.1. REKOMBINACIJA <i>IN VIVO</i> POMOĆU λ -RED SUSTAVA	3
2.2.2. MULTIPLEKSNI AUTOMATIZIRANI GENOMSKI INŽENJERING	4
2.2.3. EKSPRESIJA REKOMBINANTNIH PROTEINA U <i>E. COLI</i>	5
3. EKSPERIMENTALNI DIO	7
3.1. MATERIJALI	7
3.1.1. MIKROORGANIZMI	7
3.1.2. PLAZMIDI	7
3.1.3. RESTRIKCIJSKI ENZIMI.....	8
3.1.4. HRANJIVE PODLOGE	9
3.1.5. OTOPINE	9
3.1.5.1. OTOPINE ZA GEL-ELEKTROFOREZU.....	9
3.1.5.2. OTOPINE ZA IZOLACIJU I PROČIŠĆAVANJE DNA	10
3.1.6. KEMIKALIJE I ENZIMI	12
3.2. METODE.....	12
3.2.1. CIJEPANJE PLAZMIDNE DNA RESTRIKCIJSKIM ENZIMIMA	12
3.2.2. GEL ELEKTROFOREZA U AGAROZNOM GELU	12
3.2.3. IZOLACIJA FRAGMENTA DNA IZ GELA	13
3.2.4. LIGACIJA I TRANSFORMACIJA BAKTERIJE <i>E. COLI</i> ELEKTROPORACIJOM.....	13
3.2.5. SELEKCIJA I UZGOJ TRANSFORMIRANIH BAKTERIJA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	14
3.2.6. IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA IZ TRANSFORMANATA <i>E. COLI</i>	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. KONSTRUKCIJA PLAZMIDA pBAD-RadH	15
4.2. PROVJERA USPJEŠNOSTI KONSTRUKCIJE PLAZMIDA pBAD-RadH	18
5. ZAKLJUČAK	22
6. POPIS LITERATURE	23

1. UVOD

Escherichia coli jedna je od najbolje okarakteriziranih bakterija te se pokazala kao odličan modelni organizam i domaćin za provođenje metoda genetičkog inženjerstva. Kratko generacijsko vrijeme, brzi rast stanica, nezahtjevni uvjeti uzgoja, mogućnost prilagodbe te činjenica da se tom bakterijom može lako genetički manipulirati samo su neke od prednosti koje su od velike koristi u istraživanjima zbog uštede vremena ali i resursa.

Cilj ovog eksperimentalnog rada bio je konstruirati plazmid pBAD-RadH. Restriksijskim enzimima pocijepani su plazmidi pBAD-HheC i pUC-GW-RadH te su njihovom izolacijom iz agaroznog gela dobiveni potrebni fragmenti za pripremu ligacijske smjese. Nakon ligacije pomoću T4 DNA ligaze, elektroporacijom je transformirana bakterija *E. coli*, a transformanti su selekcionirani na podlozi s ampicilinom. Izolacijom plazmidne DNA iz dobivenih transformanata te provođenjem restriksijske analize potvrđeno je da je plazmid pBAD-RadH uspješno konstruiran.

2. TEORIJSKI DIO

Modelni organizam je organizam koji se koristi za proučavanje specifičnih bioloških procesa koji se u tim organizmima odvijaju na analogan način kao i procesi u ljudskim stanicama ili organizmu. Modelni organizmi obično se koriste u područjima istraživanja kao što su biokemija, fiziologija, genetika, evolucija, razvojna biologija i neuroznanost, te pomoću njih dobivamo uvid u biološke sustave na razini stanice, tkiva i organa (Strachan i Read, 2011). Modelni organizmi biraju se na temelju njihovog kratkog generacijskog vremena, jednostavnog održavanja i reprodukcije u laboratorijskom okruženju ili mogućnosti konstrukcije mutanata za proučavanje određenih osobina ili bolesti. Raspon modelnih organizama koji se mogu koristiti je iznimno velik, proteže se od mikroba do primata; vrste tih organizama razlikuju se po složenosti i upotrebi. Naravno, ako je neki modelni organizam evolucijski udaljen od čovjeka, količina informacija koja se može prikupiti o ljudskim biološkim procesima ograničena je na najočuvanije aspekte stanične funkcije i temeljne stanične procese. Neki od najpoznatijih modelnih mikroorganizama su bakterija *Escherichia coli* i kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (Strachan i Read, 2011).

2.1. *Escherichia coli* kao modelni organizam

Bakterija *Escherichia coli* jedan je od najraširenijih modelnih organizama u raznim genetičkim, mikrobiološkim i ekološkim istraživanjima. *Escherichia coli* štapičasta je gram-negativna, fakultativno-anaerobna bakterija koju je otkrio Njemački bakteriolog Theodor Escherich (Feng i sur., 2002). Zahvaljujući opsežnim istraživanjima i razvoju, *E. coli* postala je jedan od najbolje okarakteriziranih organizama uopće. Osim što je jedan od najpoznatijih modelnih organizama, ujedno je i jedan od najvažnijih organizama koji se koriste u industriji upravo zbog bogatog biokemijskog i fiziološkog znanja o samoj bakteriji, njezinog brzog rasta, jednostavnih uvjeta uzgoja te sposobnosti da prilagodi svoj metabolički status specifičnim potrebama tijekom proliferacije, diferencijacije i aktivacije kao odgovor na različite podražaje ili kao odgovor na stresna stanja (NIH, 2016). Koristila se kao domaćin za industrijsku proizvodnju raznih kemikalija, uključujući tripotofan, fenilalanin, treonin, lizin, nukleotide, sukcinat, itakonsku kiselinu, polihidroksibutiat i 1,3-PDO (Meyer i Schmidhalter, 2012).

2.2. *Escherichia coli* kao domaćin u genetičkom inženjerstvu

Uz sve ranije navedene karakteristike, bitno je naglasiti i da se sa *E. coli* može lako genetički manipulirati, što povećava sposobnost proučavanja njezine fiziologije kao i stvaranja novih fenotipova. Veliki broj tehnika molekularnog kloniranja i genetičkih alata razvijeno je upravo pomoću *E. coli* (Meyer i Schmidhalter, 2012). Postoji dosta razloga za odabir *E. coli* kao domaćina, neki od njih su već spomenuti brzi rast stanica, sposobnost prilagodbe itd. Dodatno, činjanica da stanice *E. coli* ne flokuliraju tijekom rasta u kulturi olakšavaju rad s ovom bakterijom. Osim toga, *E. coli* je domaćin za određene viruse čije proučavanje je postavilo temelje molekularne biologije (Cairns i sur., 1966.) i osiguralo mnoge alate za genetičke i biotehnološke manipulacije te bakterije. Što se tiče biofarmaceutске primjene, objavljeno je da je od više od 100 rekombinantnih proteinskih proizvoda na tržištima SAD-a i Europe, 34% njih eksprimirano u *E. coli* (Meyer i Schmidhalter, 2012). Godine 1998. sekvenciran je K soj MG-1655 *E. coli* (Blattner i sur., 1997.), a dosad su potpuno sekvencionirana 484 soja *E. coli* (NCBI, 2018). *Escherichia coli* K-12 i blisko srodan soj *E. coli* B glavni su domaćini za proizvodnju rekombinantnih proteina u akademskim i industrijskim laboratorijima (Assenberg i sur., 2013; Gopal i Kumar, 2013; Russo, 2003). Osim poznate sekvencije genoma, *E. coli* kao pogodnog domaćina u genetičkom inženjerstvu karakteriziraju i dostupni alati za genetičku transformaciju molekulama DNA konstruiranim *in vitro*, ali i preciznu modifikaciju genoma ili umjetnih bakterijskih kromosoma (eng. Bacterial Artificial Chromosome BAC) *in vivo*. Neke metode za uvođenje preciznih modifikacija u molekulama DNA u *E. coli in vivo* opisane su u narednim poglavljima.

2.2.1. Rekombinacija *in vivo* pomoću λ -Red sustava

Rekombinacija *in vivo* pomoću sustava λ -Red temelji se homolognoj rekombinaciji između linearnih fragmenata DNA i genoma bakterije. Ovaj sustav pokazao se izuzetno učinkovitom i svestranom strategijom za modifikacije genoma (Datsenko i Wanner, 2000). Sustav λ -Red osniva se na genima bakteriofaga λ inseritiranim u genom recipijentne bakterije *E. coli*, zaslužnim za homolognu rekombinaciju: *exo*, *beta* i *gam*. Fragment DNA koji se želi ugraditi u genom unosi se kao linearni fragment omeđen homolognim krajevima. Gam sprječava bakterijsku nukleazu RecBCD da degradira linearne fragmente DNA. Egzonukleaza Exo degradira oba kraja linearne molekule u smjeru 5'-3'. ,a nastale jednolančane krajeve veže

protein Beta, nakon čega dolazi do ugradnje linearne DNA u ciljno mjesto. Geni se mogu izbaciti zamjenom ciljanog gena kazetom koja nosi gen za rezistenciju na antibiotik, a koja je omeđena kratkim mjestima za prepoznavanje flipaze, a zatim se antibiotski marker može ukloniti pomoću enzima flipaza rekombinaze. Međutim, to ostavlja FRT ožiljak unutar genoma, što može biti problematično za korištenje u nekim primjenama. Sustav λ -Red koristi se u konstrukciji sojeva za delecije gena (Shen i sur., 2011.), uvođenje točkastih mutacija (Heermann i sur., 2008.) i umetanja (Kuhlman i Cox, 2010.), te za prilagodbu sekvencija promotora (Alper i sur., 2006.) i povećanje učinkovitosti CRISPR-a (eng. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR) (Jiang i sur., 2015). Ove metode u kojima se koriste rekombinacijski proteini faga lambda za kataliziranje zamjene funkcionalnog gena s nefunkcionalnim ili na drukčiji način izmijenjenom kopijom često se zajedničkim imenom nazivaju rekombinacijski inženjering (eng. *recombineering* – skovano od riječi *recombination* i *engineering*). Navedene metode rezultirale su i nastankom kolekcije Keio, kolekcije od oko 3800 sojeva, od kojih svaki nosi deleciju jedinstvenog neesencijalnog gena (Baba i sur., 2006; Yamamoto i sur., 2009). Rekombinacijski inženjering i drugi slični pristupi također su omogućili konstrukciju sojeva *E. coli* K-12 koji nemaju profage, ostatke profaga i transpozone (Posfai i sur., 2006.).

2.2.2. Multipleksni automatizirani genomski inženjering

Multipleksni automatizirani genomski inženjering (eng. *Multiplex Automated Genome Engineering*, MAGE) je tehnika editiranja genoma koja omogućava relativno brzo editiranje DNA koje rezultira višestrukim promjenama raspoređenih na razna mjesta po genomu. MAGE se može nazvati oblikom ubrzane evolucije jer stvara različite stanice s mnogo varijacija istog izvornog genoma tijekom više generacija. MAGE je učinio editiranje genoma mnogo bržim, jeftinijim i lakšim za istraživače koji rade na stvaranju organizama s novim funkcijama koje mogu koristiti u razne svrhe, kao što je proizvodnja kemikalija i lijekova, razvoj biogoriva ili daljnje proučavanje i razumijevanje gena koji mogu uzrokovati štetne mutacije kod ljudi. (Wang i sur., 2009.). Strategija MAGE-a uključuje elektroporaciju domaćina s više kratkih jednolančanih DNA (eng. *singlestranded DNA*, ssDNA) koje imaju regije homologne specifičnim ciljnim mjestima u genomu. Pojedine elektroporirane stanice uspješno ugrade različite jednolančane DNA, što u konačnici dovodi do širokog raspona varijacija izvornog

genoma u populaciji stanica. Istraživači podvrgavaju stanice kroz više ciklusa diobe, dodajući svaki put više ssDNA s raznim mutacijama. Mutacije nisu same po sebi korisne ili štetne za stanice, već mogu stvoriti raznolikost u populaciji i potaknuti evoluciju. Primjerice, Wang i sur. (2009.) upotrijebili su MAGE za editiranje genoma bakterije *Escherichia coli* kako bi konstruirali soj koji će pojačano proizvoditi likopen, antioksidansa s potencijalnim antikancerogenim svojstvima. Kako bi to učinili, autori su uveli mutacije na dvadeset i četiri različita mjesta unutar genoma *E. coli*, gdje su očekivali da će mutacije imati najveći učinak. Proces su ponavljali trideset pet ciklusa i rezultirao je s 15 milijardi novih sojeva bakterija, svaki soj s jedinstveno modificiranim genomom. Prema autorima, neke od bakterija proizvele su čak pet puta više likopena nego što su očekivali.

Pretjeranom ekspresijom λ -Red ssDNA vezujućeg proteina Beta sprječava se degradacija ssDNA nakon što uđe u stanicu, a ona zatim podliježe homolognoj rekombinaciji što rezultira modificiranim genomom domaćina. Uz to, korištenje ssDNA komplementarne kasnećem lancu replikacijske viljuške rezultira 10-100 puta većom učinkovitošću ugradnje od slučaja kada je ssDNA komplementarna vodećem lancu (Ellis i sur., 2001.). Optimalna duljina ssDNA je između 70 i 90 nukleotida, ali može biti i kraća od 30 nukleotida (Erler i sur., 2009.). Uz to, delecija gena *mutS* iz genoma domaćina važan je čimbenik. MutS je komponenta sustava za popravak nesparenih i krivo sparenih baza (eng. *Mismatch Repair*, MMR), a u stanici obavlja popravak krivo sparenih baza, insercija i delecija duljine 1-6 nukleotida (Modrich, 1991.). Očekivano, prisutnost endogenog MMR-a značajno smanjuje učinkovitost zamjene alela posredovanog oligonukleotidima (Modrich, 1991.; Wang i sur., 2011.).

2.2.3. Ekspresija rekombinantnih proteina u *E. coli*

Kao što je već navedeno, bakterija *E. coli* jedan je od najznačajnijih domaćina za ekspresiju rekombinantnih proteina, kako za znanstveno-istraživačke, tako i za industrijske i medicinske namjene. Između ostalog, razlog tome jesu dostupnost ekspresije jakih promotora i mogućnost visokog broja kopija gena. Treće, važna je i mogućnost inducibilne ekspresije gena. Proces proizvodnje rekombinantnog proteina obično uključuje fazu rasta stanica u odsutnosti ekspresije, zatim indukciju ekspresije gena putem transkripcijskih regulatornih elemenata, infekcijom ili aktivacijom virusa. Ekspresijski vektori razvijeni su na temelju malog broja dobro proučenih sustava promotora gena, koji su ostali popularni do danas (Baneyx, 1999.).

Fag lambda PL promotor jedan je od najjačih poznatih promotora. U kombinaciji s represorom osjetljivim na temperaturu (cI847), promotor PL može se inducirati promjenom temperature, pri čemu se izbjegava upotreba kemijskih induktora (Remaut i sur., 1983.). Pojavom istraživanja na razini genoma, pojavila se potreba za pojednostavljenjem procesa kloniranja. Razvile su se nove metode da bi se omogućilo kloniranje fragmenata DNA umnoženih PCR-om u vektore bez prethodnog cijepanja restrikcijskim enzimima i kloniranja svakog fragmenta u zasebni vektor. Ove metode uključuju varijante kloniranja neovisnog o ligaciji i mjesno-specifičnoj rekombinaciji (Hartley i sur., 2000.). Ako postoji potreba za ponovljenim kloniranjem istog fragmenta u različite vektore, metode temeljene na rekombinazi omogućuju prijenos inserta DNA provjerenog slijeda na nemutagen način (Bernard i sur., 1994.). Već je dugo poznato da pokušaji ekspresije pojedinačnih polipeptida u heterolognim stanicama mogu biti neuspješne jer nativna struktura proteina zahtijeva heterooligomerizaciju. U takvim se slučajevima primjenjuju različite tehnike koekspresije nekoliko komponenti proteinskih kompleksa - proteini se eksprimiraju na jednom plazmidu ili se kombiniraju različiti kompatibilni plazmidi u bakterijskoj stanici. Nedavno razvijeni sustavi za rekombiniranje višestrukih sekvenca za kodiranje u jedan plazmid omogućuju učinkovito i sustavno generiranje proteinskih kompleksa u *E. coli* (Haffke i sur., 2015.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

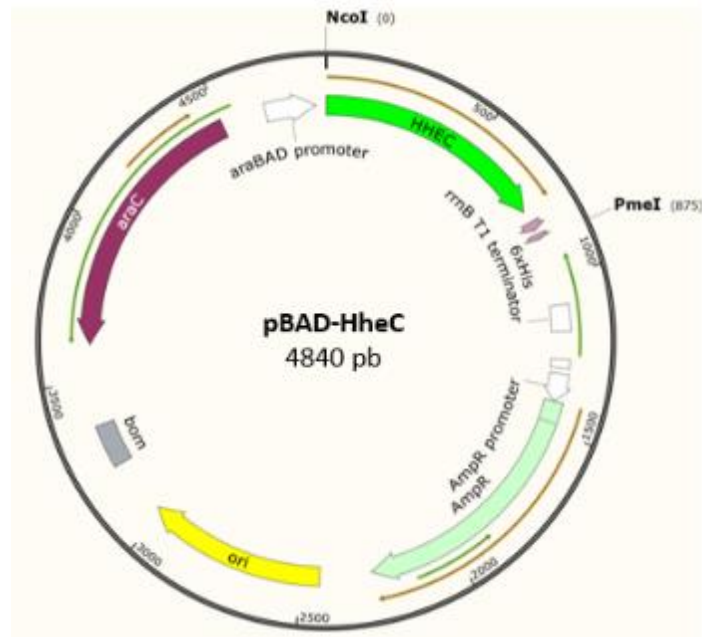
3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

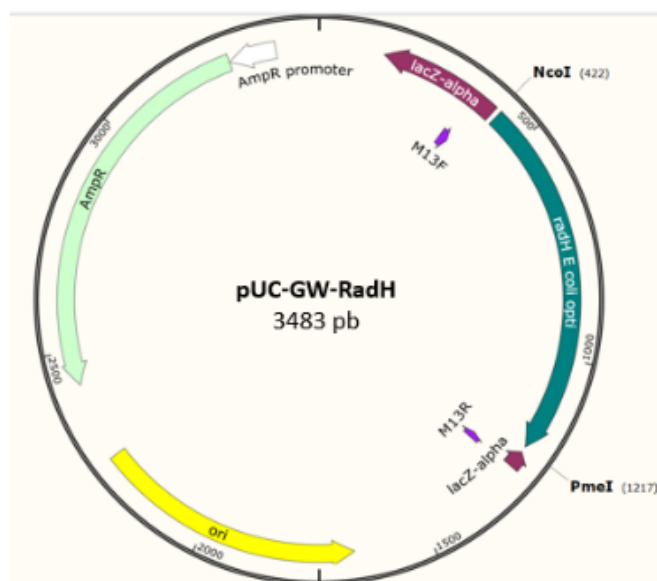
U radu je korištena bakterija *Escherichia coli* soja DH5 α genotipa: *fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

3.1.2. Plazmidi

U ovom završnom radu korištena su dva plazmida, pBAD (slika 1) i pUC-GW-RadH (slika 2). Oba plazmida imaju ishodište replikacije za bakteriju *E. coli* (*ori*) koje omogućava njihovo umnažanje. Osim toga, plazmidi sadrže regije Amp^R i Amp^R promotor koje omogućavaju sintezu proteina β -laktamaze te posljedično tome i rezistenciju na antibiotik ampicilin. Plazmid pBAD sadrži *araBAD* promotor koji kontrolira metabolizam L-arabinoze bakterije *E. coli*, a razina ekspresije gena eksprimiranog s tog promotora može se kontrolirati koncentracijom arabinoze u hranjivoj podlozi. Gen RadH koji se nalazi na plazmidu pUC-GW-RadH kodira za R-specifičnu alkohol dehidrogenazu. Nadalje, pUC-GW-RadH sadrži regiju *lacZ*-alpha koja omogućava plavo-bijelu selekciju transformanata. Na restrikcijskim mapama oba plazmida prikazana su restrikcijska mjesta *NcoI* i *PmeI* pomoću kojih su plazmidi pocijepani tijekom izrade ovog rada.



Slika 1. Mapa plazmida pBAD-HhcC



Slika 2. Mapa plazmida pUC-GW-RadH

3.1.3. Restriksijski enzimi

Restriksijski enzimi korišteni za provođenje restriksijske analize su: NcoI, PmeI, SspI i EcoRV. Cijepanje DNA provedeno je prema uputama proizvođača restriksijskih enzima (New England Biolabs Inc.).

3.1.4. Hranjive podloge

Sve hranjive podloge steriliziraju se u autoklavu na temperaturi od 121°C 20 minuta te se čuvaju na sobnoj temperaturi ukoliko nije drugačije napomenuto.

Sastav LB (Luria-Bertani) podloge s ampicilinom za uzgoj bakterije *Escherichia Coli*:

Bakto-tripton	10,0 g/L
Kvašćev ekstrakt	5,0 g/L
NaCl	10,0 g/L

Otopina ampicilina sterilizirana filtracijom (koncentracija 20 mg/mL) i agar dodaju se u krutu hranjivu podlogu (ohlađenu na 58°C) do konačne koncentracije od 50 µg/mL. Odnosno, otopina ampicilina sterilizirana filtracijom dodaje se neposredno prije upotrebe u tekuću hranjivu podlogu do konačne koncentracije od 100 µg/mL.

Hranjiva podloga SOC (eng. Super Optimal broth with Catabolite repression):

Kvašćev ekstrakt	500 mg
Glukoza	360 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	250 mg
MgCl ₂	200 mg
NaCl	60 mg
KCl	20 mg
Bakto-tripton	2,0 mg
Destilirana voda	do 100 mL

3.1.5. Otopine

3.1.5.1. Otopine za gel-elektroforezu

TBE-pufer (10x):

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

Pufer za gel-elektroforezu priprema se u koncentriranom obliku te se naknadno razrjeđuje destiliranom vodom do željene koncentracije. Nije potrebno provoditi proces sterilizacije.

Agarozni gel (0,8%) za gel elektroforezu:

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

Agarozni gel priprema se otapanjem agaroze u TBE-puferu (1x). TBE-pufer (1x) priprema se razrjeđenjem TBE-pufera (10x).

Boja za nanošenje uzorka:

Brom-fenol plavo	2,5 g/L
Ksilen-cijanol	2,5 g/L

Otopinu nije potrebno sterilizirati, čuva se na temperaturi od 4°C.

Boja za vizualizaciju DNA:

Etidijev bromid	0,5 µg/L
-----------------	----------

Otopina etidijeva bromida za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom 50 µL osnovne otopine etidijeva bromida u 1L destilirane vode te se čuva u tamnoj boci. Osnovna otopina etidijeva bromida priprema se u koncentraciji od 10 mg/mL, ne provodi se proces sterilizacije te se također čuva u tamnoj boci na temperaturi od 4°C.

3.1.5.2. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA

Otopina amonijeva acetata (8M):

Amonijev acetat	61,66 g
Destilirana voda	100 mL

Otopina se sterilizira procesom filtracije te se čuva na temperaturi od 4°C.

Otopina ampicilina:

Ampicilin	20 mg/mL
-----------	----------

Otopina se sterilizira procesom filtracije te se čuva na temperaturi od 4°C.

Otopina RN-aze:

Ribonukleaza A otopi se u 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) i 15 mM natrijevu kloridu do konačne koncentracije 10 mg/mL te se zagrije 15 minuta u kipućoj vodenoj kupelji. Nakon hlađenja do sobne temperature čuva se na -20°C.

Otopina kalijeva acetata (3M):

Otopina kalijeva acetata (5M)	60 mL
Octena kiselina	11,5 mL
Destilirana voda	28,5 mL

Otopina se sterilizira procesom filtracije te se čuva na temperaturi od 4°C.

Otopina GTE-pufera:

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

Otopinu je potrebno pripremiti neposredno prije uporabe.

Otopina Tris-HCl (1M):

Potrebno je otopiti 12,1g Tris-a u 80mL destilirane vode. pH vrijednost otopine podese se dodatkom koncentrirane HCl te se volumen otopine dopuni do 100mL. Približne količine kiseline za pojedine pH vrijednosti iznose:

pH 7,4	7,0 mL
pH 7,6	6,0 mL
pH 8,0	4,2 mL

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

186,1g EDTAx2H₂O otopi se u 80mL destilirane vode. pH vrijednost otopine podese se dodatkom NaOH te se volumen otopine dopuni do 100mL.

Otopina TE-pufera (pH 8,0 ili pH 7,4):

Tris-HCl (pH 8,0 ili pH 7,4)	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mL

Otopina NaOH/SDS:

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

3.1.6. **Kemikalije i enzimi**

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

3.2. **Metode**

3.2.1. **Cijepanje plazmidne DNA restriksijskim enzimima**

Cijepanje plazmidne DNA restriksijskim enzimima provedeno je prema uputama proizvođača (New England Biolabs Inc.).

3.2.2. **Gel elektroforeza u agaroznom gelu**

Gel-elektroforeza provodi se u uređaju za vodoravnu elektroforezu u TBE puferu. Otopljen agarozni gel ohlađen na oko 50°C izlije se u kalup koji je prethodno oblijepljen s samoljepljivom trakom. Agarozni gel ostavi se na sobnoj temperaturi dok se ne skrutne, zatim se izvadi češljčić koji se umetnuo da bi se formirale jažice, te se kalup s gelom uroni u kadnicu za elektroforezu. U kadnicu se ulije TBE pufer tako da gel bude u potpunosti uronjen u pufer. Uzorci DNA se pomiješaju s bojom za nanošenje uzoraka u omjeru 6:1 i unesu mikropipetom u jažice na gelu pritom pazeći da se uzorci ne prelijevaju izvan jažica. U jednu jažicu dodaje se standard za gel-elektroforezu koji se sastoji od fragmenata DNA poznate duljine. Nakon nanošenja uzoraka i standarda u jažice uključuje se izvor struje i provodi elektroforeza. Agarozni gel se nakon elektroforeze inkubira 15 min u otopini etidij bromida u prostoriji bez svjetla te

se pomoću transiluminatora gel izloži UV svjetlu i fotografira kroz crveni filtar za dobivanje slike gela s vidljivim vrpčama DNA.

3.2.3. Izolacija fragmenata DNA iz gela

Izolacija fragmenata DNA iz agaroznog gela provedena je prema uputama proizvođača (New England Biolabs Inc.) kompleta Monarch® DNA Gel Extraction Kit. Pomoću špatulice izreže se dio gela u kojem se nalazi željeni fragment, višak agaroznog gela pažljivo se odstrani te se željeni dio premjesti se u kivetu za centrifugu od 1,5 mL i izvaže. Potom se dodaju 4 volumena pufera za otapanje gela u epruvetu u kojoj se nalazi gel. Uzorak se inkubira na temperaturi od 55°C, periodično preokrećući epruvetu dok se agarozni gel u potpunosti ne otopi. Zatim se otopina nanese na kolonu za izolaciju DNA, provede se centrifugiranje u trajanju od jedne minute te se odbaci filtrat. Potrebno je isprati kolonu pa se dodaje 200 µL pufera za ispiranje DNA i centrifugira se pri 13000 rpm jednu minutu. Ponovi se ispiranje još jednom, odnosno ponovno se doda 200 µL pufera za ispiranje DNA i centrifugira se pri 13000 rpm. Nakon završetka ispiranja, kolona se prebacuje u čistu kivetu pritom pazeći da kolona ne dođe u kontakt sa filtratom. Dodaje se 6 µL pufera za eluiranje DNA, pričekava jedna minuta te se centrifugira jednu minutu pri 13000 rpm da bi se eluirala DNA.

3.2.4. Ligacija i transformacija bakterije *E. coli* elektroporacijom

Ligacijska smjesa priprema se u kiveti prethodno ohlađenoj na 0°C te uronjenoj u usitnjeni led. Smjesa sadrži 5,0 µL DNA inserta, 5,0 µL DNA vektora, 2,0 µL pufera(10x), 1,0 µL DNA ligaze i 7,0 µL destilirane vode. Kontrolna smjesa pripremi se istim postupkom, ali se umjesto inserta stavlja 5,0 µL destilirane vode. Ligacija se provodi pri 16°C preko noći ili na sobnoj temperaturi 2 sata.

Kompetentne stanice *E. coli* koje su prethodno pripremljene i zamrznute na temperaturi od -70°C izvade se iz zamrzivača i inkubiraju se nekoliko minuta na ledu. Zatim se u 40 µL suspenzije kompetentnih stanica doda 1-2 µL otopine plazmidne DNA otopljene u puferu male ionske jakosti (TE puferu). Smjesa kompetentnih stanica bakterije *E. coli* i plazmida promiješa se pipetiranjem, homogenizirana suspenzija kompetentnih stanica i DNA ostavi se na ledu 1 min te se prenese u kivetu za elektroporaciju ohlađenu na ledu. Kiveta se umetne u otvor na elektroporatoru i kroz nju se provede puls od 2,5 kV u trajanju od 5 milisekundi nakon kojeg

se stanice brzo resuspendiraju u 1 mL medija SOC i promiješa mikropipetom. Dobivena suspenzija inkubira se pri 37 °C i 300 min⁻¹ u trajanju od jednog sata. Nakon inkubacije naciepljuje se odgovarajući volumen suspenzije na pripremljenu krutu LB hranjivu podlogu uz dodatak ampicilina.

3.2.5. Selekcija i uzgoj transformiranih bakterija *Escherichia coli*

Nakon inkubacije suspenzija je naciepljena na krutu hranjivu podlogu LB s ampicilinom tako da je na jednu podlogu naciepljeno 5 µL a na drugu 50 µL suspenzije.

Kolonije transformanata koje su izrasle, prebačene su u 4 mL tekuće hranjive podloge LB s ampicilinom (LB-Amp podloge). Naciepljene tekuće hranjive podloge inkubirane su preko noći na tresilici pri 37 °C.

3.2.6. Izolacija plazmidne DNA iz transformanata *E. coli*

Za izolaciju plazmidne DNA korišten je set Monarch® Plasmid DNA Miniprep Kit te je postupak proveden prema uputama proizvođača (New England Biolabs Inc.).

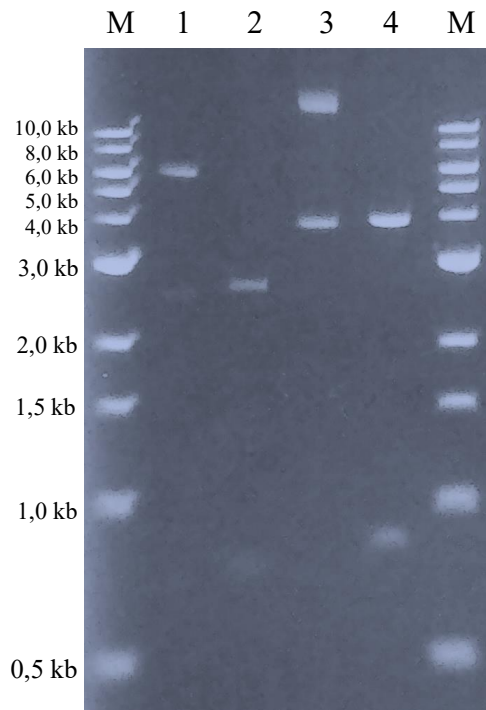
Bakterijske stanice *E. coli* izdvoje se iz 4 mL prekonoćne kulture centrifugiranjem 45 sekundi na 13000 rpm. Talog stanica resuspendira se u 200 µL pufera za suspenziju, a supernatant se odbacuje. Zatim se doda 200 µL pufera za lizu te se mikrokiveta u kojoj se nalazi uzorak preokrene 5-6 puta da bi se sadržaj mikrokivete promiješao, pritom se obrati pozornost na boju otopine kao i viskoznost i bistroću. Boja se treba promijeniti u tamno ružičastu a otopina postati bistra i viskozna. Nakon miješanja, otopina se inkubira na sobnoj temperaturi jednu minutu. Nakon inkubacije dodaje se 400 µL pufera za neutralizaciju u mikrokivetu te se otopina promiješa preokretanjem. Zatim se vrši inkubacija pri sobnoj temperaturi 2 minute te se centrifugira 5 minuta pri 13000 rpm. Nakon centrifugiranja, supernatant se oprezno prebaci u kolonu te se centrifugira 1 min pri 13000 rpm i odbaci se filtrat. Kolonica se ispiri sa 200 µL pufera za ispiranje da bi se uklonili RNA, proteini i endotoksini; onda se ponovno doda 400 µL pufera za ispiranje. Potrebno je centrifugirati 1 min pri 13000 rpm nakon dodatka prvog kao i drugog pufera za ispiranje. Nakon ispiranja, kolonicu je potrebno premjestiti u čistu sterilnu mikrokivetu, a na vrh dodati 30 µL pufera za eluciju. Inkubira se 1 minutu pri sobnoj temperaturi i centrifugira se 1 min pri 13000 rpm.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog završnog rada bio je konstruirati plazmid pBAD-RadH i to ligacijom fragmenta dugačkog 795 pb izdvojenog iz plazmida pUC-GW-RadH koji nosi ORF gena RadH sa fragmentom dugačkim 3965 pb izdvojenog iz plazmida pBAD-HheC, a koji čini plazmidnu okosnicu. Na ovaj način, ORF gena HheC se uklanja iz vektora pBAD, te se pod kontrolu araBAD promotora klonira gen RadH koji kodira za R-specifičnu alkohol dehidrogenazu. Plazmid pBAD-RadH koristit će se u daljnjim istraživanjima za ekspresiju R-specifične alkohol dehidrogenaze u bakteriji *E. coli*. Uspješnost konstrukcije plazmida provjerena je elektroforezom i restrikcijskom analizom.

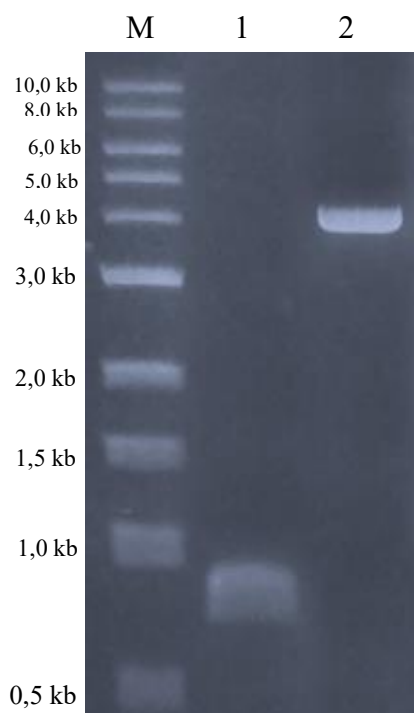
4.1. Konstrukcija plazmida pBAD-RadH

Da bi se plazmid pBAD-RadH konstruirao, najprije su plazmidi pBAD-HheC i pUC-GW-RadH pocijepani restrikcijskim enzimima. Restrikcijski enzimi NcoI i PmeI cijepaju plazmid pBAD-HheC (slika 1.) na dva fragmenta, fragment dužine 875 pb i fragment dugačak 3965 pb. Restrikcijski enzimi NcoI i PmeI također cijepaju plazmid pUC-GW-RadH (slika 2.) na dva fragmenta, manji fragment dužine 795 pb i veći fragment dužine 2688 pb. Da bi potvrdili uspješnost provedene restrikcije, provedena je agarozna gel-elektroforeza plazmidne DNA pocijepane restrikcijskim enzimima. Usporedbom dobivenih rezultata sa standardom, odnosno markerom koji se nalazi u jažici M potvrđeno je da su dobiveni željeni fragmenti (slika 3.).



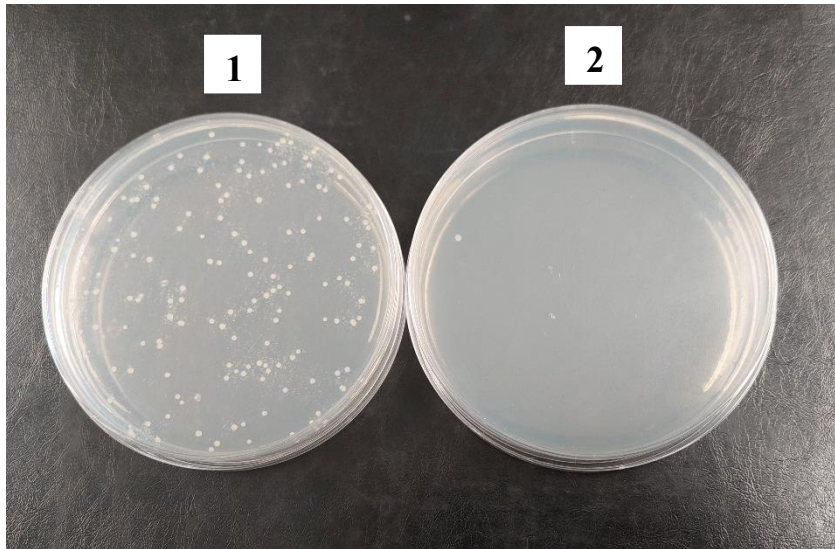
Slika 3. Rezultati agarozne gel-elektroforeze plazmidne DNA pocijepane restriksijskim enzimima. U jažicama se nalaze slijedeći uzorci: M - marker, 1 - neporezani plazmid pUC-GW-RadH, 2 - pGW-RadH porezan s NcoI i PmeI, 3 - neporezani plazmid pBAD-HheC, 4 - pBAD-HheC porezan s NcoI i PmeI, M - marker.

Nakon provedenog cijepanja, fragmenti DNA za konstrukciju plazmida pBAD-RadH izolirani su iz agaroznog gela. Iz plazmida pUC-GW-RadH potrebno je izdvojiti fragment dug 795 pb, a iz plazmida pBad-HheC potrebno je izdvojiti fragment dug 3965pb. Izolacija se provodi metodom opisanom u poglavlju 3.2.3, a uspješnost izolacije provjerena je gel-elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu (slika 4.). Usporedbom dobivenih vrpca sa markerom koji se nalazi u jažici M za koji su nam poznate veličine vrpca, vidljivo je da su izolirani fragmenti očekivanih veličina.



Slika 4. Provjera uspješnosti izolacije porezanog vektora i inserta iz agaroznog gela. Redoslijed uzoraka u jažicama: M - marker, 1 - porezani insert pGW-RadH nakon izolacije iz agaroznog gela, 2 - porezani vektor pBAD-HheC nakon izolacije iz agaroznog gela.

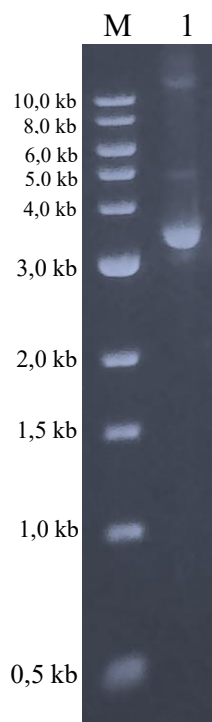
Nakon što je potvrđena uspješna izolacija porezanih fragmenata DNA iz gela, provedena je ligacija izoliranih fragmenata i transformacija bakterije *E. coli* elektroporacijom, kao što je opisano u poglavlju 3.2.4. Transformiraju se kompetentne stanice *E. coli* koje su prethodno pripremljene i zamrznute na temperaturi od -70°C ; a nakon elektroporacije stanice se inkubiraju i zatim se određeni volumen suspenzije naciepljuje na kompletnu hranjivu podlogu s ampicilinom na kojoj izrastu transformanti. Na jednu krutu hranjivu podlogu naciepljeno je $5\ \mu\text{L}$ a na drugu $50\ \mu\text{L}$ suspenzije te su na slici 5. prikazane hranjive podloge nakon što su na njima izrasle kolonije transformanata. Budući da su na krutoj hranjivoj podlozi s ampicilinom izrasle kolonije transformanata, to potvrđuje uspješnost provedene ligacije i transformacije bakterije *E. coli* elektroporacijom kao i uspješnu selekciju i uzgoj transformiranih stanica bakterije *E. coli*.



Slika 5. Rezultat transformacije *E. coli* ligacijskom smjesom. Na krutu hranjivu LB podlogu sa ampicilinom označenu sa brojem 1 naciepljeno je 50 μ l transformacijske smjese, a na podlogu 2 naciepljeno je 5 μ l transformacijske smjese.

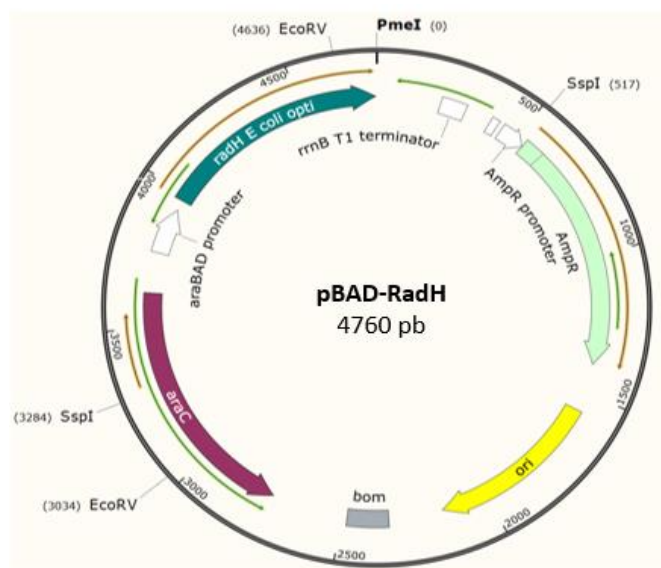
4.2. Provjera uspješnosti konstrukcije plazmida pBAD-RadH

Kako bi se potvrdilo da dobiveni transformanti zaista sadrže željeni plazmid pBAD-RadH, bilo je potrebno umožiti stanice nasumično odabranog transformanta, izolirati plazmidnu DNA i provesti restrikcijsku analizu. Odabrana kolonija naciepljena je u 4 ml tekuće hranjive podloge s ampicilinom (LB-Amp podloga). Proveo se postupak izolacije plazmidne DNA iz transformanta *E. coli* kao što je opisano u poglavlju 3.2.6. te je uspješnost izolacije plazmidne DNA provjerena je gel-elektroforezom na 0,8% agaroznom gelu (slika 6.). Iz slike je vidljivo da je plazmidna DNA uspješno izolirana.



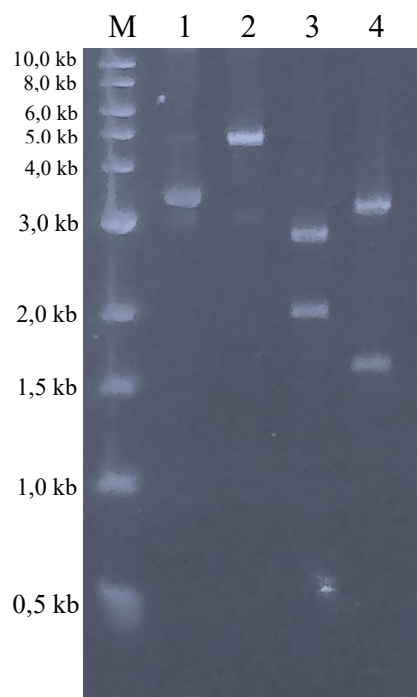
Slika 6. Provjera uspješnosti izolacije plazmidne DNA iz transformanata. Na gelu se nalaze slijedeći uzorci: M - marker za gel elektroforezu, 1 - plazmidna DNA izolirana iz transformanta *E. coli*

Nakon izolacije plazmidne DNA potrebno je potvrditi da je ta izolirana plazmidna DNA zapravo željeni plazmid pBAD-RadH. Da bi se provjerila struktura izoliranog plazmida, provedena je restrikcijska analiza. Zbog lakše vizualizacije očekivanog plazmida i njegove strukture, na slici 7. prikazana je restrikcijska mapa plazmida pBAD-RadH. Na slici su prikazana restrikcijska korištena za analizu plazmidne DNA izolirane iz transformanta *E. coli*.



Slika 7. Mapa plazmida pBAD-RadH. Prikazana restrikcijska mjesta relevantna su za restrikcijsku analizu.

Restrikcijski enzim *PmeI* cijepa plazmid pBAD-RadH samo na jednom mjestu za razliku od restrikcijskih enzima *SspI* i *EcoRV* koji plazmid sijeku na dva mjesta. Budući da restrikcijski enzim *PmeI* cijepa plazmid pBAD-RadH na jednom mjestu, on će ga samo linearizirati te se očekuje duljina fragmenta od 4760 pb. Kada se plazmid pocijepa restrikcijskim enzimom *SspI* očekuju se dva fragmenta, duljina 2767pb i 1993pb. Restrikcijski enzim *EcoRV* također cijepa plazmid pBAD-RadH na dva mjesta te se očekuju dva fragmenta, duljina 1602pb i 3158pb. Na slici 8. prikazani su rezultati provedene restrikcijske analize.



Slika 8. Provjera uspješnosti cijepanja s restriksijskim endonukleazama *PmeI*, *SspI* i *EcoRV*
 Redoslijed uzoraka u jažicama: M - marker, 1 - neporezani pBAD-RadH, 2 - pBAD-RadH
 porezan s *PmeI*, 3 - pBAD-RadH porezan s *SspI*, 4 - pBAD-RadH porezan s *EcoRV*

Ovom restriksijskom analizom potvrđeno je da izolirani plazmid pBAD-RadH ima očekivanu strukturu u skladu s njegovom restriksijskom mapom te je time i potvrđena uspješna konstrukcija plazmida pBAD-RadH.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je plazmid pBAD-RadH uspješno konstruiran.

6. POPIS LITERATURE

Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR, Stephanopoulos G (2006) Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and Production. *Science* **314**, 1565–1568. [10.1126/science.1131969](https://doi.org/10.1126/science.1131969)

Assenberg R, Wan PT, Geisse S and Mayr LM (2013) *Current Opinion in Structural Biology*, 3. izd., Elsevier Ltd., Amsterdam, str. 393–402.

Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M i sur. (2006) Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* **2**, 2006.0008 <https://doi.org/10.1038/msb4100050>

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

Bernard P, Gabant P, Bahassi EM, Couturier M (1994) Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* **148**, 71-74. [10.1016/0378-1119\(94\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90235-6)

Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J i sur. (1997) The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* **277**, 1453–1462. [10.1126/science.277.5331.1453](https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453)

Cairns J, Stent GS, Watson JD (1966) *Phage and the Origins of Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences the USA* **97**, 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>

Ellis HM, Yu D, DiTizio T, Court DL, (2001) High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**, 6742–6746. <https://doi.org/10.1073/pnas.121164898>

Erler A, Wegmann S, Elie-Caille C, Bradshaw CR, Maresca M, Seidel R i sur. (2009) Conformational adaptability of Red β during DNA annealing and implications for its structural relationship with Rad52. *Journal of Molecular Biology* **391**, 586–598. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.06.030>

Feng P, Weagant S, Grant M, Burkhardt W, (2002) Bacteriological Analytical Manual, 8. izd., AOAC International, Gaithersburg, Md. str. 68-104.

Gopal GJ, Kumar A (2013) Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli. *Protein Journal* **32**, 419–425. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>

Haffke M, Marek M, Pelosse M, Diebold ML, Schlattner U, Berger I i sur. (2015) Characterization and production of protein complexes by co-expression in Escherichia coli. *Methods in Molecular Biology* **1261**, 63 - 89. [10.1007/978-1-4939-2230-7_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2230-7_4)

Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research* **10**, 1788 - 1795. [10.1101/gr.143000](https://doi.org/10.1101/gr.143000)

Heermann R, Zeppenfeld T, Jung K (2008) Simple generation of site-directed point mutations in the Escherichia coli chromosome using Red(R)/ET(R) Recombination. *Microbial Cell Factories* **7**, 14. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-14>

Jiang Y, Chen B, Duan C, Sun B, Yang J, Yang S (2015) Multigene editing in the Escherichia coli genome via the CRISPR-Cas9 system. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 2506 - 2514. <https://doi.org/10.1128/AEM.04023-14>

Kuhlman TE, Cox EC (2010) Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs, *Nucleic Acids Research* **38**. [10.1093/nar/gkp1193](https://doi.org/10.1093/nar/gkp1193)

Meyer H, Schmidhalter DR, (2012) Innovations in Biotechnology, INTECH, mjesto izdavanja nije poznato, str. 211–250.

Modrich P, (1991) Mechanisms and biological effects of mismatch repair, *Annual Review of Genetics* **25**, 229 - 253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.25.120191.001305>

NCBI (2018) Genome Assembly and Annotation report. NCBI - National Center for Biotechnology information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/167> .
Pristupljeno 11. lipnja 2023.

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 27. 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 27. 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> .
Pristupljeno 27. 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 27. srpnja 2022.

NIH (2016) NIH Guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules. NIH - National Institutes of Health, https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/NIH_Guidelines.html#_Appendix_C-II-A_Exceptions

Posfai G, Plunkett G III, Feher T, Frisch D, Keil GM, Umenhoffer K i sur. (2006) Emergent properties of reduced-genome Escherichia coli. *Science* **312**, 1044–1046.
[10.1126/science.1126439](https://doi.org/10.1126/science.1126439)

Remaut E, Stanssens P, Fiers W (1983) Inducible high level synthesis of mature human fibroblast interferon in Escherichia coli. *Nucleic Acids Research* **11**, 4677 - 4688.
<https://doi.org/10.1093/nar/11.14.4677>

Russo E (2003) The birth of biotechnology. *Nature* **421**, 456–457. <https://doi.org/10.1038/nj6921-456a>

Shen CR, Lan E I, Dekishima Y, Baez A, Cho KM, Liao JC (2011) Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 2905–2915. <https://doi.org/10.1128/AEM.03034-10>

Strachan T, Read A, (2011) *Human Molecular genetics*, 4. izd., Garland Science, New York

Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR i sur, (2009) Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature* **460** (7257), 894–898. <https://doi.org/10.1038/nature08187>

Wang HH, Xu G, Vonner AJ, Church G (2011) Modified bases enable high-efficiency oligonucleotide-mediated allelic replacement via mismatch repair evasion. *Nucleic Acids Research* **39**, 7336–7347. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr183>

Yamamoto N, Nakahigashi K, Nakamichi T, Yoshino M, Takai Y, Touda Y i sur. (2009) Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants. *Molecular Systems Biology* **5**, 335. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.92>

Izjava o izvornosti

Ja Franciska Rohlik 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