Uvođenje mutacije u gen SCW4 iz kvasca Saccharomyces cerevisiae pomoću PCR metode

Vučenović, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:159:596211

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Ivan Vučenović

6655/PT

UVOĐENJE MUTACIJE U GEN *SCW4* IZ KVASCA *Saccharomyces cerevisiae* POMOĆU PCR METODE

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biokemija

Mentor: prof.dr.sc. Renata Teparić

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za biokemiju

UVOĐENJE MUTACIJE U GEN *SCW4* IZ KVASCA *Saccharomyces cerevisiae* POMOĆU PCR METODE

Ivan Vučenović, 6655/PT

Sažetak PCR (lančana reakcija polimeraze) je metoda koja omogućava selektivno, brzo i osjetljivo umnažanje željenog slijeda nukleotida DNA. Kroz tri stupnja reakcije dobije se kao produkt željena sekvenca DNA u velikom broju kopija. U ovom radu je PCR korišten za uvođenje mutacija u gen *SCW4* kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na način da su konstruirana dva fragmenta od kojih je jedan sadržavao sekvence uzvodno, a drugi nizvodno od mjesta mutacije. Mutacija se odnosila na deleciju dijela gena koji kodira za 126 aminokiseline na N-terminalnom kraju proteina Scw4. Dobiveni fragmenti su zatim drugim krugom PCR-a spojeni u jedan konstrukt budući da su međusobno komplementarni u dijelu gena neposredno uzvodno i nizvodno od deletiranog dijela u nativnom genu. Dobiveni konstrukt je zatim TA-ligacijom unesen u plazmid kojim je transformirana bakterija *E. coli* u kojoj je umnožen i iz koje je uspješno izoliran.

Ključne riječi: PCR, *Saccharomyces cerevisiae*, uvođenje mutacije, *SCW4*

Rad sadrži: 34 stranice, 14 slika, 1 tablicu, 27 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv.prof. dr. sc. Renata Teparić

Rad predan: rujan, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Food Technology

Department for Chemistry and Biochemistry

Laboratory for Biochemistry

INTRODUCING MUTATION IN *Saccharomyces cerevisiae* GENE *SCW4* USING PCR METHOD

Ivan Vučenović, 6655/PT

Abstract: PCR (polymerase chain reaction) is a method enabling rapid, selective and sensitive amplification of the DNA sequence. As a result, after three reaction steps, PCR product contains large number of copies of the target DNA sequence. In this experiment, PCR was used to introduce mutation in the *SCW4* gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. First PCR was used for creating two fragments, one fragment contained sequence upstream of mutation position in gene sequence, and the second fragment contained sequence downstream of mutation position. Mutation consisted of deletion of the part of the gene encoding for 126 aminoacids in N-terminal part of Scw4 protein. Two products of first PCR were combined into one final construct, since they are complementary in sequence upstream and downstream of the deleted region. This fragment is then introduced into the plasmid using TA-ligation method and plasmid obtained was used for transformation of *E. coli*. In the end, the plasmid containing mutated form of *SCW4* gene was successfully multiplied and isolated from transformed bacteria.

Keywords: PCR, *S. cerevisiae*, mutation, *SCW4*

Thesis contains: 34 pages, 14 figures, 1 table, 27 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD Renata Teparić, associate professor

Thesis delivered: September, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

2. TEORIJSKI DIO.....2

2.1. PCR (polimerazna lančana reakcija).....2

2.1.2. Provođenje pcr-a.....2

2.1.3. PCR smjesa.....4

2.1.4. Optimizacija PCR-a.....6

2.1.5. Detekcija i analiza PCR produkta.....7

2.1.6. Vrste PCR-a.....8

2.1.7. Primjena PCR-a.....12

2.2. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* 13

2.2.1. Scw4 protein.....14

3. EKSPERIMENTALNI DIO 15

3.1. Materijali 15

3.1.1. Kemikalije.....15

3.1.2.Oligonukleotidi.....15

3.1.3.Plazmidi.....16

. 3.1.4. Soj bakterija.....18

3.1.5. Hranjiva podloga za uzgoj bakterija.....18

3.2. Metode 19

3.2.1. PCR metoda za uvođenje mutacije u gen *SCW4* 19

3.2.2. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu 23

3.2.3. Pročišćavanje fragmenata DNA umnoženih PCR-om.....23

3.2.4. TA-ligacija fragmenta DNA.....23

3.2.5. Transformacija kompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli* 24
3.2.6. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije *Escherichia coli* („mini-prep“).....24
3.2.7. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima 24

4. REZULTATI 25

4.1. Uvođenje mutacije u gen *SCW4* pomoću PCR-a 25

5. RASPRAVA 29

6. ZAKLJUČCI 31

7. LITERATURA 32

1. UVOD

PCR (lančana reakcija polimeraze) je metoda koja se koristi u različitim područjima znanosti, a omogućava brzu i uspješnu amplifikaciju DNA molekule te tako daje dovoljnu količinu željenog produkta koji onda služi za daljnja istraživanja. PCR produkt nastaje umnožavanjem ciljane sekvence DNA pomoću oligonukleotida (tzv. početnica) koji su komplementarni dijelu te sekvence. Nakon vezanja početnica na lance DNA, slijedi sinteza DNA koju provodi enzim DNA polimeraza i tako nastaje PCR produkt. Od početka korištenja metode do danas, PCR se neprestano unaprijeđuje i prilagođava prema zahtjevima i ciljevima određenog istraživačkog rada. Za njegovo otkriće je 1993.godine Kary Mullis dobio Nobelovu nagradu, a danas se koristi kao standardna metoda u laboratorijima diljem svijeta.

PCR između ostalog nudi mogućnost uvođenja različitih mutacija u gen u svrhu ispitivanja građe i fukcije proteina za koji gen kodira. Da bi se provela mutageneza pomoću PCR-a, potrebno je poznavati ciljanu sekvencu DNA kako bi se mogli konstruirati oligonukleotidi pomoću kojih će se uvesti mutacija. Jedan od eukariotskih organizama kojem je sekvencioniran cijeli genom je kvasac *S. cerevisiae*, koji često služi kao modelni organizam u genetičkim istraživanjima i do sad su konstruirani njegovi brojni mutanti.

U ovom radu je pomoću PCR-a uvedena mutacija u gen *SCW4* kvasca *S. cerevisiae* delecijom dijela gena koji kodira za 126 aminokiselina na N-terminalnom kraju proteina Scw4. Nakon uvođenja mutacije u gen provedena je TA-ligacija dobivenog DNA fragmenta sa plazmidom te provjera uspješnosti uvođenja mutacije restrikcijskom analizom konstruiranog plazmida koji je prethodno umnožen u bakteriji *E. coli* i iz nje izoliran.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PCR (polimerazna lančana reakcija)

PCR je metoda koja se koristi da bi se relativno mali dio DNA umnožio u veliki broj identičnih kopija u *in vitro* uvjetima, a konstruirana je na temelju prirodne replikacije DNA u stanicama. Kako se radi o preciznoj, brzoj i jeftinoj tehnici danas se provodi rutinski u laboratorijima u različite svrhe istraživanja. PCR je omogućio otkrivanje genomske strukture različitih organizama i dao mogućnost amplifikacije i najkompleksnijih genoma (Saiki i sur., 1989)

Polimerazna lančana reakcija koristi se od 1984. godine kada ju je američki znanstvenik Kary Mullis opisao za umnažanje DNA bez kloniranja u *in vitro* uvjetima, za što je 1993. dobio i Nobelovu nagradu (Bruce i sur., 1999). Tehnika replikacije DNA korištenjem dviju početnica je bila poznata od prije, opisao ju je Gobind Khorana 1971. godine (Joshi i Deshpande, 2011), ali je razvoj te ideje bio ograničen problemima u sintezi početnica i pročišćavanju enzima DNA polimeraze. Danas se PCR smatra jednom od najvažnijih tehnika u molekularnoj biologiji.

2.1.2. Provođenje PCR-a

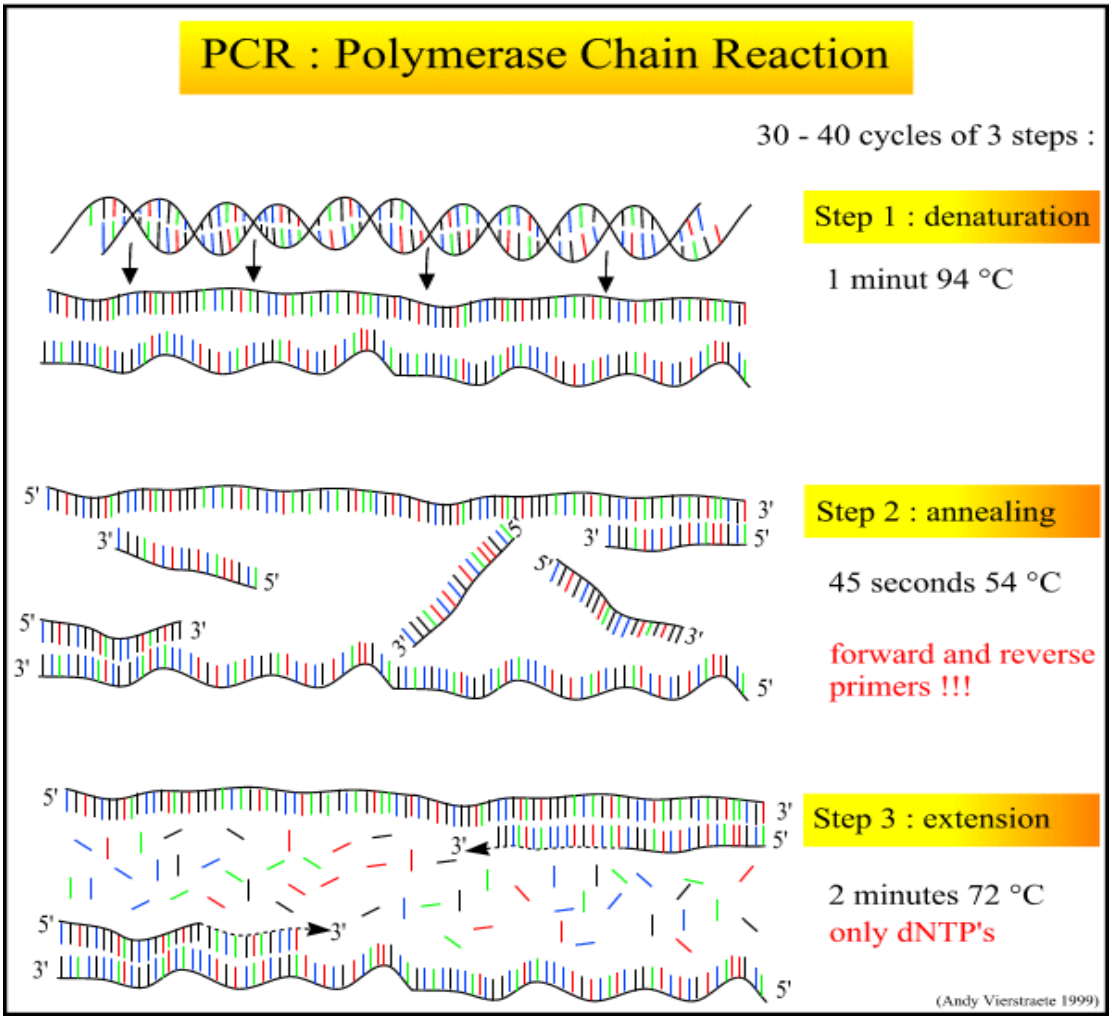
Standardni PCR se provodi kroz tri osnovna stupnja koja su kontrolirana temperaturom i vremenom trajanja.

Prvi korak je inicijalno denaturiranje DNA pri temperaturi od 95 ^{0}C u kojem dolazi do razdvajanja lanaca DNA zbog pucanja slabih vodikovih veza te sada dvije jednolančane DNA služe kao kalupi za amplifikaciju.

U drugom koraku se temperatura procesa smanjuje na "melting temperature", vrijednost koja se računa prema forumuli temeljenoj na odnosu GC i AT parova baza unutar sekvence početnica. Postizanjem izračunate temperature dolazi do vezanja početnica (hibridizacije) na onaj lanac DNA koji sadrži sekvencu komplementarnu sa početnicom. Početnice su nakon povezivanja suprotno orjentirane u odnosu na ciljanu sekvencu DNA što omogućava normalnu sintezu DNA. Ovaj korak obično traje od 15 do 60 sekundi. Samo snižavanje temperature sa 95^{0}C se provodi u jako kratkom vremenu i na taj način se sprječava renaturacija dva lanca DNA.

Slijedi proces sinteze komplementarnog lanca DNA koji se provodi uglavnom na temperaturi od 72 ^{0}C koja je optimalna za aktivnost Taq polimeraze (DNA polimeraze), a samo trajanje se određuje ovisno o duljini fragmenta (vrijeme trajanja od jedne minute odgovara duljini sintetiziranog fragmenta od 1kb).

Tri opisana koraka čine jedan ciklus PCR metode. Na kraju ciklusa dobiju se dvije dvolančane DNA (Slika 1). Povećanjem broja ciklusa dobiva se određeni broj kopija DNA, tako se nakon 30 ciklusa dobije oko milijun kopija ciljanog dijela DNA molekule.



Slika 1. Shematski prikaz PCR-a (http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html, Pristupljeno: 20.08.2016.)

Cijela metoda provodi se u uređaju koji se naziva Thermocycler, a njegova funkcija je da precizno i brzo zagrijava ili hladi PCR smjesu prema zadanim temperaturama te da održava temperature kroz zadano vijeme (Slika 2).



Slika 2. Uređaj za PCR (Thermocycler)

(Anonymous 2, http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z723312?lang=en&region=HR, Pristupljeno 21.08.2016.)

2.1.3. PCR smjesa

PCR se uspješno provodi miješanjem određenih reagensa u točno određenim koncentracijama. To su pufer za DNA polimerazu, smjesa sva 4 dNTP-a, enzim DNA polimeraza, početnice i ciljana DNA koja služi kao kalup za sintezu.

Pufer

DNA polimeraze zahtijevaju prisutnost Mg^{2+} iona za sintezu DNA pa pufer u kojem se provodi reakcija mora sadržavati točno određenu koncentraciju magnezija što ovisi o tipu DNA polimeraze koja se koristi (optimalna koncentracija 1.2–1.3 mM slobodnog Mg^{2+}). Najčešće se koristi Tris-HCL pufer koji utječe na pH reakcijske smjese tako da pri višim temperaturama samog postupka utječe na smanjenje pH što pospješuje aktivnost polimeraze. Optimalni su puferi sa pKa vrijednosti od 6 do 7. KCl pospješuje vezanje početnica na jednolančane DNA, ali previsoka koncentracija može dovesti do pogrešnog sparivanja.

Većina proizvođača uz određenu polimerazu preporučuje i određeni pufer istog proizvođača,dok neki proizvode pufere bez primjerice magnezija pa je potrebno ekperimentalno odrediti optimalnu koncentraciju za željenu reakciju.

Nukleotidi

Da bi polimeraza mogla sintetizirati novi lanac DNA prema kalupu, potrebna su joj sva 4 dNTP-a u ekvimolarnim koncentracijama. Koncetracija koja se preporučuje je 200 μM. Više koncentracije dNTP-a uzrokuju veće pogreške polimeraze u sintezi novog lanca DNA, a manje koncentracije nisu preporučljive zbog povećanja 3'→5' egzonukleazne aktivnosti DNA polimeraze što može dovesti do degradacije jednolančane DNA (kao što su početnice) (Mcpherson i Moller, 2006).

Početnice

Početnice (″primeri″) se naručuju od proizvođača koji sintetiziraju oligonukleotide sa željenom sekvencom. Obično su početnice sastavljene od 16 do 30 oligonukleotida komplementarnih određenoj sekvenci DNA koju želimo umnožiti. Ovakvim konstruiranjem početnica omogućava se kopiranje točno određene sekvence originalne DNA. Dva najvažnija parametra pri konstruiranju početnica su specifičnost vezanja i efikasnost amplifikacije. Specifičnost se obično kontrolira samom duljinom fragmenta i temperaturom koja se primjenuje u "annealing" fazi PCR-a. Oligonukleotidi od 18 do 24 baze pokazuju najbolju specifičnost. Donju granicu duljine početnica je nužno odrediti jer početnica pokazuje 4 puta veću specifičnost sa svakim dodanim nukleotidom (Dieffenbach i sur., 1993). Određivanje maksimalne duljine početnica nije nužno budući da kod duljih početnica na specifičnost vezanja najveći utjecaj imaju reakcijski uvjeti.

Pri konstrukciji početnica bitan je i njihov 3' kraj jer on utječe na moguće krivo sparivanje početnice sa ciljanom DNA, a ako je par početnica komplementaran na 3' kraju, onda dolazi do tzv. "primer-dimer" kompleksa koji rezultira pojavom samih početnica kao PCR produkta. Na 5' kraj početnica se u slučajevima kloniranja gena mogu dodati restrikcijske sekvence te se tako odabire mjesto zasijecanja DNA endonukelazama.

Polimeraza

DNA polimeraza je enzim koji ima nekoliko funkcija, a one najvažnije su popravljanje i replikacija DNA (Arthur Kornberg i sur., 1995). Za PCR metodu koriste se DNA-ovisne polimeraze ili RNA-ovisne polimeraze (reverzne transkriptaze). Kod biranja određene

polimeraze za PCR potrebno je poznavati efikasnost sinteze određene polimeraze i vjernost kopiranja kalupa. Na efikasnost utječe procesivnost enzima koja je veća što je veći afinitet enzima za kalup, u ovom slučaju DNA lanac koji želimo umnožiti. Polimeraza započne replikaciju i disocira sa supstrata nakon određenog broja umetnutih baza. Nakon toga sintezu nastavlja druga molekula enzima i to se događa dok sinteza nije završena. Najčešće korištena polimeraza, Taq polimeraza (94 kDa), izolirana je iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*, a opisana je 1969. godine te je homolog DNA polimerazi 1 bakterije *E.coli* (Saiki i sur., 1998; Eom i sur., 1996). Optimalna aktivnost enzima je na temperaturi od 72 do 75^0C, a poluživot na 95^0C je 40 min, što ga čini iskoristivim za 50 ciklusa PCR-a. Osim Taq polimeraze, za PCR se koriste i njezine različite rekombinantne verzije.

Ciljana DNA

Za PCR metodu, moguće je koristiti DNA različitog podrijetla (genomska DNA čovjeka, DNA biljnog tkiva, bakterijska DNA...). Najvažnije je da je uzorak DNA dovoljno pročišćen da se ne bi ometala aktivnost polimeraze te da u PCR smjesi ne bude prevelika koncentracija početne DNA. Poželjno je da u smjesi bude od 10^4 do 10^6 molekula DNA kako bi se postupak mogao odvijati s najvišom efikasnošću.

2.1.4. Optimizacija PCR-a

Za uspješno provođenje PCR-a potrebno je da temperatura i trajanje sva tri koraka, čistoća i koncentracija reagensa budu optimalni. Kod prvog korištenja novih početnica obično se reakcija provodi prema standardnim uvjetima ovisno o duljini početnica i omjeru AT i CG parova baza. Ukoliko pri tim uvjetima ne dođe do stvaranja željenog produkta, onda se počinje sa mijenjanjem temperature, broja ciklusa i trajanja pojedinog ciklusa. Druga optimizacija može uključivati podešavanje koncentracije iona Mg^{2+} koji tvore kompleks sa dNTP-om i utječu na aktivnost polimeraze. Postupnim povećanjem koncentracije Mg^{2+} iona može se pratiti aktivnost polimeraze kako bi se došlo do optimalne koncentracije magnezija u PCR smjesi. Uzrok maloj količini PCR produkta ili nedostatku istog može biti i nedovoljna koncentracija polimeraze, ali i denaturacija polimeraze na visokim temperaturama kroz dulje vrijeme. Što se podešavanja temperature tiče, bitno je da temperatura prvog koraka bude dovoljno visoka da dođe do razdvajanja lanaca dvostruke DNA. U "annealing" fazi u pravilu nešto viša temperatura dovodi do specifičnijeg vezivanja početnica na lanac DNA, a smanjenje temperature dovodi do mogućnosti pogrešnog vezivanja. Ipak, nepostojanje PCR produkta može značiti i da je

temperatura u "annealing" fazi previsoka pa se taj korak treba provoditi na nešto nižoj temperaturi. Do poteškoća u dobivanju određenog produkta može doći i zbog dugog stajanja PCR smjese na sobnoj temperaturi i temperaturama ispod 70°C zbog mogućnosti nespecifičnog sparivanja početnica međusobno ili početnica sa kalupom. Takvi kompleksi su onda supstrat za DNA polimerazu i na kraju PCR-a se pojavljuju kao nepoželjni produkti. Jedno od rješenja za taj problem je da se smjesa odmah nakon dodavanja svih reagensa zagrije na određenu temperaturu (iznad 70^0C) te da se u tako zagrijanu smjesu doda DNA polimeraza. Također, jako je bitno da sva oprema koja se koristi za pripremu PCR smjese bude sterilna, kao i svi reagensi koji moraju biti visoke čistoće kako ne bi postojala mogućnost kontaminacije smjese stranom DNA (McPherson i Moller, 2006).

2.1.5. Detekcija i analiza PCR produkta

PCR produkt se najčešće detektira pomoću elektroforeze provedene u agaroznom gelu. Produkt je DNA molekula koja se tijekom elektroforeze pod utjecajem struje kreće kroz agarozni gel ovisno o veličini i naboju. Kako nam je poznato kolika bi duljina dobivene DNA trebala biti, na gel se stavlja i standard koji nam omogućava utvrditi duljinu dobivenog produkta. Nakon elektoforeze gel se inkubira u otopini etidijevog-bromida i zatim promatra pod UV svjetlom te se usporedbom vidljivih vrpci uzorka i standarda može zaključiti da li je dobivena željena veličina produkta

Da bi se sa sigurnošću moglo reći da je nakon PCR-a dobivena točno određena molekula DNA, nakon elektroforeze može se provesti tzv. ″Southern Blot″ analiza. Ova metoda se provodi tako da se DNA pocijepa sa restrikcijskim enzimima te se zatim dobiveni fragmenti razdvoje gel elektroforezom. Nakon razdvajanja, fragmenti se denaturiraju te se sad jednolančane DNA fiksiraju na specijalne nitrocelulozne filtere ili najlonske membrane. Slijedi inkubacija ovako pripremljene DNA sa DNA probom. DNA proba je jednolančana DNA sa poznatom sekvencom koja tijekom inkubacije hibridizira sa sebi komplementarnim dijelom DNA koja se ispituje. Kompleks koji nastaje se dalje može testirati autoradiografijom i tako se dobije uvid u strukturu PCR produkta (Sabelli, 1988).

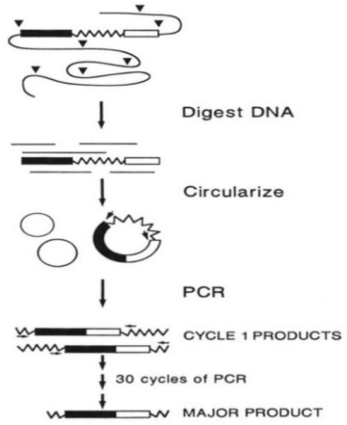
Druga opcija je restrikcija produkta endonukleazama koje zasijecaju DNA lanac na poznatom mjestu i na taj način se dobiveni fragmenti zatim mogu detektirati pomoću elektroforeze. Nešto rjeđe se koristi sekvencijska analiza jer zahtijeva više vremena i veće troškove, ali daje najpouzdanije rezultate. Sekvencijska analiza daje uvid u točan redoslijed nukleotida u lancu

DNA. Postoji nekoliko načina sekvencioniranja, a nakon PCR-a se koristi uglavnom direktno sekvencioniranje PCR produkta. Za ovu metodu potrebno je da je DNA (PCR produkt) denaturiran što se postiže zagrijavanjem uzorka i zatim brzim smrzavanjem da ne bi došlo do renaturacije. Za sekvencioniranje se koristi jedna početnica koja hibridizira sa jednolančanom DNA. Hibrid koji nastaje je supstrat za DNA polimerazu koja počinje sintezu DNA. Osim što su u smjesi za sekvencioniranje dostupna sva četiri dNTP-a, dodaje se i jedan od četiri ddNTP-a. U drugu smjesu se dodaju sva četiri dNTP-a i drugi ddNTP i tako redom. Primjerice, u smjesu u kojoj se nalazi ddATP, njega će polimeraza ugraditi umjesto dATP-a kada dođe do timina na DNA kalupu. Budući da ddATP-u nedostaje 3'-OH skupina, ne može se formirati fosfodiesterska veza pa se zaustavlja replikacija tj. on služi kao terminator replikacije. Konstruiranjem velikog broja ovakvih fragmenata koji završavaju sa ddNTP-om i njihovom daljnom analizom dobije se uvid u slijed nukleotida u DNA (PcPherson i Moller, 2006).

2.1.6. Vrste PCR-a

Inverzni PCR

Inverzni PCR koristi se za amplifikaciju nepoznatih regija DNA koje se nalaze uz poznate sekvence. Metoda se zasniva na cijepanju DNA restrikcijskim enzimima koji zasijecaju lanac u poznatim sekvencama. Nastaju fragmenti od nekoliko kb koji se spontano ligiraju i nastaju kružne DNA koje se onda koriste za PCR. Nepoznata sekvenca se amplificira korištenjem dviju početnica koje se povezuju s poznatom sekvencom i orjentirane su u suprotnim smjerovima. Na kraju se dobije linearni DNA fragment koji sadrži i sekvencu presječenu restrikcijskim enzimom (Sambrook i Russell, 2006).



Slika 3. Shematski prikaz inverznog PCR-a

(Anonymous 3, http://www.academia.edu/3266734/Types_of_PCR, Pristupljeno: 21.08.2016.)

Multiplex PCR

Kod ove metode se u reakcijskoj smjesi dolazi do amplifikacije više ciljanih sekvenci iste DNA molekule korištenjem većeg broja različitih parova početnica. Također, moguće je u reakcijskoj smjesi imati i više različitih DNA molekula sa odgovarajućim početnicama, ali onda se povećava mogućnost hibridizacije i pogrešnog sparivanja početnica. Metoda je prije svega korisna jer uštađuje vrijeme za dobivanje više različitih PCR produkata (Henegariu i sur., 1997).

Nested PCR

Ova PCR metoda omogućava veću specifičnost amplifikacije. Umjesto jednog para početnica koriste se dva seta početnica. U prvom koraku s jednim parom početnica umnožava se željena sekvenca DNA i dobiveni produkt zatim ide u PCR smjesu sa drugim parom početnica čije je mjesto vezanja drugačije nego onog para iz prve reakcije. Na ovaj način se u prvom koraku dobije produkt pomoću vanjskih početnica na koji se onda u drugom koraku vežu unutarnje početnice i na kraju se dobije kraći PCR produkt. Korištenjem dva seta početnica smanjuje se mogućnost pogreške amplifikacije (McPherson, Moller, 2006).

''Methylation-specific'' PCR (MSP PCR)

Koristi se za detekciju metiliranih baza u CpG regijama genomske DNA. Ciljana DNA se tretira natrij bisulfitom čime se nemetilirani citozin konvertira u uracil, komplementaran adenozinu iz početnica. Slijede dvije amplifikacije. Jedan set početnica se veže na DNA koja ima uracil (nakon konverzije), a drugi set početnica se veže na citozin koji je bio metiliran prije dodatka natrijeva bisulfita. MSP PCR daje uvid u metilacijski status promotorskih CpG otoka koji su važni za regulaciju ekspresije gena kod sisavaca (Ku i sur., 2011).

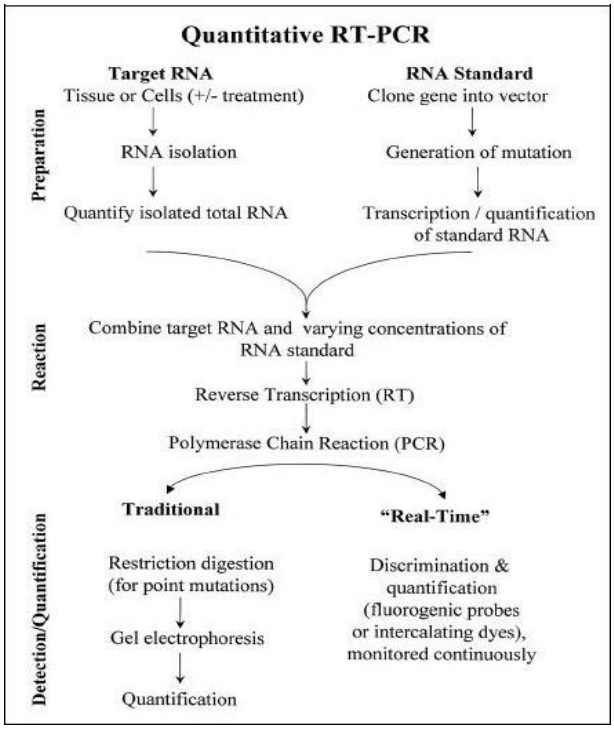
˝Hot-start˝ PCR

Koristi se za smanjenje vjerojatnosti nespecifične amplifikacije. Može se provoditi mehanički tako da se cijela PCR smjesa zagrije na temperaturu denaturacije (oko 94^0C) i onda se doda DNA polimeraza te se tako osigura da nije došlo do pogrešne aktivnosti polimeraze dok je smjesa na sobnoj temperaturi ili dok se zagrijava. Također, može se provoditi i uz pomoću modificirani Taq polimeraze koja je inaktivna na temperaturama nižima od temperature denaturacije. Ovakav PCR se koristi zbog mogućnosti nespecifičnog sparivanja početnica međusobno ili početnica s DNA kalupom pri nižim temperaturama. Budući da su takvi kompleksi također supstrati za DNA polimerazu, oni se nakon amplifikacije također pojavljuju kao produkti, ali to su neželjeni produkti PCR-a (McPherson i Moller, 2006).

Reverzna transkripcija PCR (RT-PCR)

Koristi se za amplifikaciju DNA iz RNA. Potrebna je oligonukleotidna početnica za inicijaciju sinteze kružne DNA molekule koji se veže na RNA te se sinteza odvija pomoću RNA-ovisne DNA polimerazne aktivnosti enzima reverzne transkriptaze (Freeman i sur., 1999). Dobivena DNA molekula se onda dalje koristi za standardni PCR.

RT-PCR koristi se za određivanje nivoa ekspresije gena i određivanje sekvence RNA transkripta. Također, ako je poznata sekvenca DNA onda se RT-PCR-om mogu odrediti lokacije introna i eksona u genu (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz RT-PCR-a (Anonymous 3, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9894600 Posjećeno 23.08.2016.)

Kako je PCR tehnika koja se neprestano razvija od kad je otkrivena, postoje još mnoge metode koje pospješuju dobivanje željenog produkta i smanjuju različite interferencije. Svaka se metoda razvijala prema potrebama znanstvenika pri izvođenju istraživačkog rada u određene svrhe.

2.1.7. Primjena PCR-a

PCR ima primjenu u različitim znanstvenim područjima i svakodnevno se koristi u molekulranoj biologiji, medicini, genetičkom inženjerstvu, forenzici itd.

Jedna od mogućnosti koje nudi PCR metoda je uvođenje mutacije u ciljanu molekulu DNA. Mutacija može uključivati deleciju određenog dijela sekvence gena ili inserciju sekvence ili točkastu mutaciju. Ovim se načinom može utvrditi odnos između strukture i funkcije proteina, istražiti molekulske interakcije (enzim-supstrat, antitijelo-antigen...) kao i *in vivo* regulacija ekspresije gena.

PCR se koristi redovito u kliničkoj mikrobiologiji i mikrobiologiji hrane. Velika prednost PCR-a u odnosu na standardne metode koje se koriste u tom području, osim kratkog vremena trajanja i potrebe za minimalnom količinom uzorka, je to što se PCR-om detektiraju i kvantificiraju nukleinske kiseline mrtvih i živih patogena dok standardne metode uzimaju u obzir samo žive patogene. Danas se u prehrambenoj industriji PCR također koristi za otkrivanje podrijetla pojedinih komponenti hrane kako bi potrošači bili upućeni u moguću prisutnost određenih alergena, kao i za prisutnost GMO-a (Mafra i sur., 2008). Tako je PCR metodom napravljena amplifikacija fragmenta iz gena alergena koji se nalazi u lješnjaku i detektirana je količina tog alergena od 0.001% u komercijalnom prehrambenom proizvodu (Holzhauser i sur., 2000).

U forenzici, primjerice u određivanju krvnog srodstva PCR se koristi za amplifikaciju ponavljajućih regija unutar DNA sekvence koje se nazivaju mikrosateliti i nasljeđuju se kroz generaciju. Ipak ova metoda je pogodna za određivanje krvnog srodstva, ali ne i za točno otkrivanje o kakvom srodstvu je riječ. PCR je najvažnije otkriće za forenziku u kasnim godinama 20.st. (Morling, 2009).

U medicini PCR je našao između ostalog primjenu u otkrivanju infektivnih bolesti i različitih tumora. Primjerice, u dijagnostici virusne zaraze HIV-om koristi se RT-PCR koji je izrazito osjetljiv na najmanje količine virusne RNA u stanici. Budući da je poznata sekvenca HIV virusa, konstruirane su početnice pomoću kojih se amplificira DNA nastala reverznom transkripcijom iz RNA virusa. Ukoliko virus nije prisutan u stanici, PCR test je negativan, odnosno nije prisutan PCR produkt (Erlich i sur., 1991).

Na području dijagnostike tumora, PCR omogućava otkrivanje kromosomalnih abnormalnosti i specifičnih somatskih mutacija onkogena koje karakteriziraju pojedine vrste tumora. PCR je od

izrazite važnosti za projekt *Human Genome Project,* kako u mapiranju tako i u sekvencioniranju humanog genoma (Erlich i sur., 1991).

2.2. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je eukariotski mikroorganizam iz kraljevstva Fungi kojeg je prvi put izolirao Emil Mrak 1983. godine (Mortimer i Johnson, 1986). Najpoznatiji je po svojoj važnosti u prehrambenoj industriji kao osnovna komponenta za proces fermentacije (konverzije šećera u alkohol), a u te svrhe se koristi nekoliko tisuća godina. Kvasac korišten za fermentaciju vina je pronađen u uzorku koji potječe od 3150.g.pr.Kr. (Landry i sur., 2006). Osim toga, koristi se i kao modelni organizam za proučavanje biokemijskih procesa u stanicama te je od izrazite važnosti za istraživanje ljudskog genoma jer većina gena *S. cerevisiae* pokazuje homologiju sa humanim genima. Još jedna prednost je što ima kratko generacijsko vrijeme (90 minuta) i izmjenu haploidne i diploidne generacije.

Stanična stijenka kvasca osigurava stanici mehaničku i osmotsku sabilnost, daje joj čvrstoću i omogućava komunikaciju s okolinom (Smith i sur., 2000). To je dvoslojna tvorevina čiji je jedan sloj građen od hitina i glukana (odgovorni za mehaničku čvrstoću), a manoproteini čine drugi sloj. Stijenka čini oko 20 % suhe tvari stanice, a u svom sastavu sadrži do 90 % ugljikohidrata i oko 10% proteina (Fleet, 1991). Što se tiče proteina (manoproteina), trenutno ih je poznato oko 30, ali njihove uloge u stanici su uglavnom nepoznate. Čak se uklanjanjem nekih od manoproteina iz stijenke nisu dokazale nikakve značajne promjene za normalno funkcioniranje stanične stijenke.

Daljnjim istraživanjem manoproteina ustanovljeno je da se oni vežu na dva načina u staničnu stijenku. Tako prvu skupinu čine proteini koji se kovalentno vežu na glukanski sloj stanične stijenke, a oni se još dijele na tzv. GPI i PIR proteine. GPI proteini vezani su preko glikozilfosfatidilinozitolnog ostatka (GPI sidra) na β-1,6-glukan, a iz stijenke se uglavnom ekstrahiraju tretmanom sa glukanazama. Pir-proteini su za glukan vezani esterskom vezom između gama-karboksilne grupe specifičnog ostatka glutaminske kiseline proteina, koja se

nalazi unutar ponavljajuće sekvence koja je specifična za ovaj tip proteina, te hidroksilne grupe glukoze iz β-1,3-glukana stijenke (Ecker i sur., 2006). Ovi proteini se ekstrahiraju pomoću NaOH (Mrša i Tanner, 1997) jer je veza alkalno labilna. Nekovalnetno vezani proteini čine drugu skupinu manoproteina, a oni se izoliraju iz stanične stijenke vrućim SDS-om uz dodatak β-merkaptoetanola.

2.2.1. Scw4 protein

Ovaj protein se prvo svrstavao u nekovalentno vezane proteine stanične stijenke i iako je jedan od najzastupljenijih iz te skupine, njegova uloga je i dalje nepoznata. Pokazuje značajnu razinu homologije sa Bgl2 proteinom koji je prvi izolirani nekovalnetno vezani protein stanične stijenke pa se pretpostavlja da i on ima glukan-remodelirajuću funkciju u stanici, ali to nije dokazano u *in vitro* uvjetima (Teparić i sur., 2010). Daljnjim istraživanjem je otkriveno da se Scw4 protein veže i kovalentno u staničnu stijenku jer je izoliran iz stijenke pomoću NaOH kao i ostali kovalentno vezani proteini PIR porodice (Teparić i sur., 2007). Iako nije sigurno zbog čega se Scw4 veže na dva načina u stijenku, pretpostavlja se da su za to odgovorne postranslacijske modifikacije jer su u sekvenci proteina pronađena specifična mjesta za procesiranje proteinom Kex2p i japsinskim proteazama.

Zanimljivo je da Scw4 nema specifičnu sekvencu kao drugi PIR proteini koji se vežu kovalentno u staničnu stijenku pa se pretpostavlja da postoji i treći način kovalentnog vezivanja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

-agar - Liofilchem Diagnostic (Roseto degli Abruzzi, Italija)

-kvaščev ekstrakt, baktotripton – Biolife (Milano, Italija)

-λ DNA standard za elektroforezu

-restrikcijski enzimi XbaI i SacI, T4 ligaza, Taq DNA polimeraza

-ampicilin – Roth (Karlsruhe, Njemačka)

Sve ostale kemikalije korištene pri eksperimentalnom radu nabavljene su od standardnih dobavljača i analitičke su čistoće.

3.1.2. Oligonukleotidi

Oligonukleotidne početnice su korištene za deleciju dijela sekvence *SCW4* gena PCR metodom.

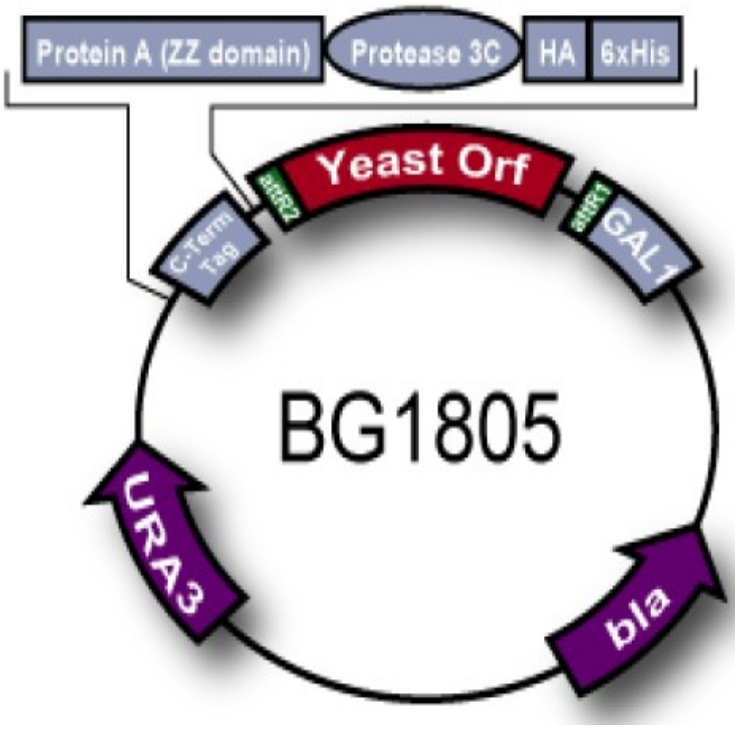
Tablica 1. Oligonukleaotidi korišteni za PCR metodu

Početnica	**Sekvenca**
delta126 SCW4 F	TTATCTGCTGCTACTCTTGCTGCTGTCAGCAGCTTTGCCTCTGGTGTC
delta126 SCW4 R	GACACCAGAGGCAAAGCTGCTGACAGCAGCAAGAGTAGCAGCAGATA AAAG
Xba SCW4 R	ATGATGATGTCTAGATTCATTGGATAG
galprom F	GCTGGAGCTCCACCGCGGGAACGGATTAGAAGCC

3.1.3. Plazmidi

pBG1805

U eksperimentalmom dijelu je za uvođenje mutacije u gen *SCW4* PCR metodom korišten plazmid pBG1805. Ovaj plazmoid sadrži *ori* ishodište replikacije što mu omogućava samostalno umnažanje u bakteriji *E.coli*. Također, sadrži i gen BLA koji kodira za enzim β-laktamazu koji omogućava bakterijama preživljavanje na podlozi s ampicilnom pa se na taj način može vršiti selekcija transformiranih bakterijskih stanica na hranjivim podlogama. *SCW4* gen se nalazi pod kontrolom promotora GAL (slika 5).

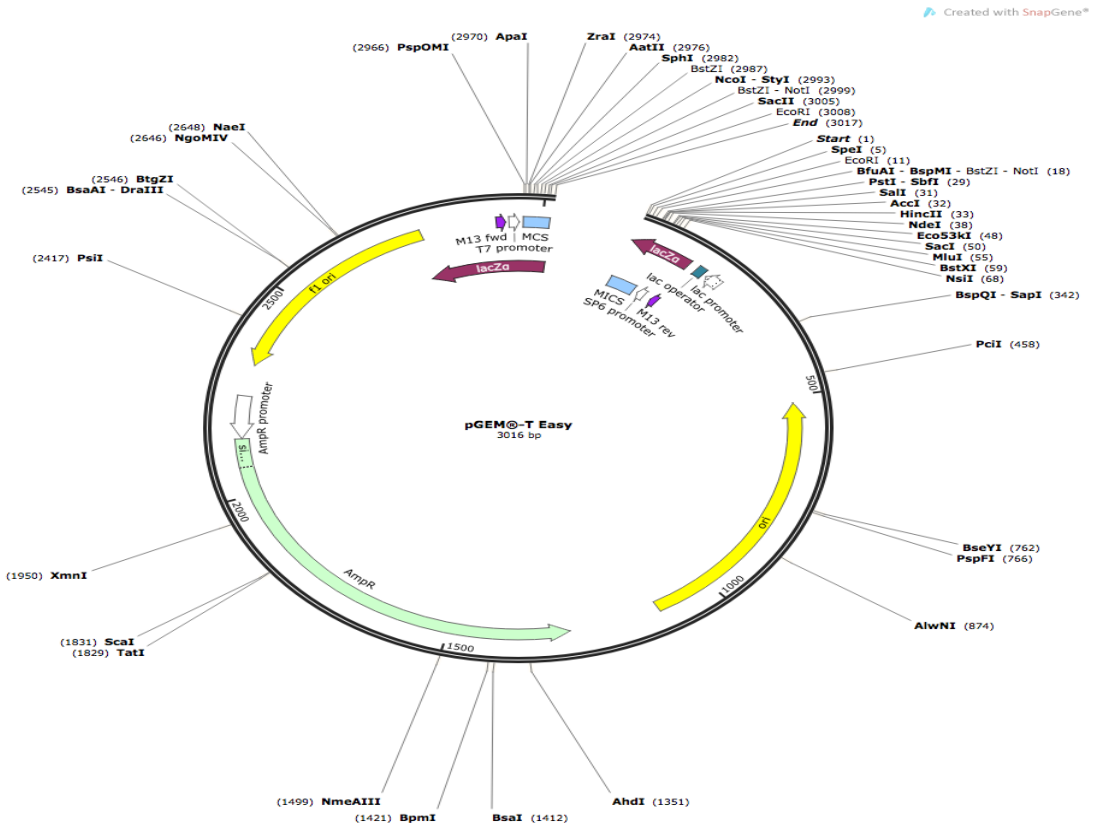


Slika 5 . Plazmid pBG1805 (Anonymous 4, dharmacon.gelifesciences.com., Pristupljeno: 24.08.2016.)

pGEM-T Easy

Ovaj plazmid korišten je za TA ligaciju fragmenata DNA koji su dobiveni PCR metodom.

pGEM-T Easy je linearan vektor i na svojim 3'-terminalnim krajevima ima nespareni timidin. Kako fragmenti dobiveni PCR metodom na krajevima sadrže adenin, omogućena je uspješna ligacija sa vektorom. Plazmid pGEM-T Easy sadrži još i gen za rezistenciju na ampicilin pa omogućava selekciju transformiranih bakterija *E. coli* na hranjivoj podlozi sa tim antibiotikom (Slika 6).



Slika 6 pGEM-T Easy plasmid
(https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/ta_and_gc_cloning_vectors/pGEM-T_Easy_(linearized)/, Pristupljeno: 24.08.2016.)

3.1.4. Soj bakterije

E. coli koja je korištena za transformaciju ima genotip: DH5α F- Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk - , mk +) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1 (Life Technologies)

3.1.5. Hranjiva podloga za uzgoj bakterija

Prije transformacije *E. coli* je uzgajana na krutoj i tekućoj LB podlozi. Tekuća podloga sadržavala je kvaščev ekstrakt (φ = 0,05), baktotripton (φ = 0,01), NaCl (φ = 0,05), a kruta baktotripton (φ = 0,01), kvaščev ekstrakt (φ = 0,05), NaCl (φ = 0,05), agar (φ = 0,015).

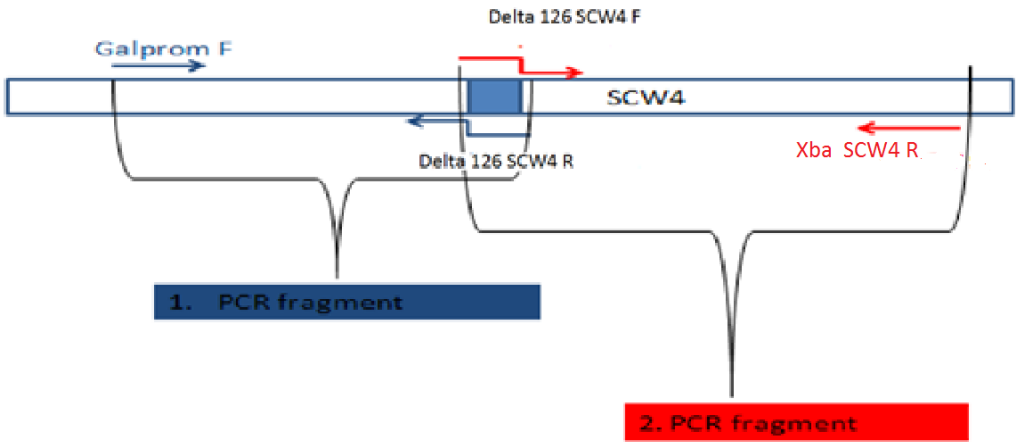
Nakon što su bakterijske stanice tranformirane pomoću plazmida koji nosi i gen za rezistenciju na ampicilin, u hranjivu LB podlogu je dodan i ampicilin u koncentraciji 100 μg/mL.

3.2. METODE

3.2.1. PCR metoda za uvođenje mutacije u gen *SCW4*

Uvođenje mutacije u gen *SCW4* pomoću PCR-a metodom "megapočetnice" provedeno je u tri koraka. Metoda se temelji na činjenici da početnice nisu potpuno komplementarne kalupu te se na taj način uvode mutacije u ciljani gen.

U prvom koraku korišten je kao kalup plazmid pBG1805 *SCW4* te parovi početnica Δ126 SCW4 R i GalpromF te Δ126 SCW4 F i Xba SCW4 R. Dobivena su 2 PCR produkta. Prvi PCR produkt nazvan $\Delta126_1$ (589 pb) dobiven je pomoću parova početnica Δ126 SCW4 R i GalpromF s kojima je umnožen dio promotorske regije i početak gena *SCW4*, a nije umnožen dio gena koji želimo izbaciti jer u toj sekvenci početnica nije komplementarna kalupu (plazmidu pBG1805 *SCW4).* Drugi PCR produkt nazvan $\Delta126_2$ (822 pb) dobiven je s početnicama Δ126 SCW4 F i Xba SCW4 R s kojima je umnožen dio gena nizvodno od mjesta u koje je unešena mutacija u gen *SCW4* (Slika 7).



Slika 7 Unošenje mutacije u SCW4 gen metodom PCR-a-1.stupanj. Plavim pravokutnikom je označena regija u SCW4 genu koja se želi izbaciti

Reakcijska smjesa za prvi PCR sadržavala je :

0,3 µL plazmida pBG1805 *SCW4*

0, 5 µL pufer za Taq polimerau (10x koncentriran)

1 µL smjese sva četiri dNTP-a,

1 µL svake od odgovarajućih početnica

1 µL Tag polimeraze

40,7 µL vode

PCR je proveden kroz tri ciklusa sa različitim brojem ponavljanja.

Prvi ciklus sastojao se od denaturacije plazmidne DNA kroz 5 minuta pri temperaturi od 95^0C, komplementarnog sparivanja početnica na kalup kroz 1,5 minutu na temperaturi od 60 ^{0}C i na kraju sinteze DNA na 72 ^{0}C kroz 1 minutu i 20 sekundi.

Drugi ciklus koji je ponovljen 5 puta je imao iste uvjete kao prvi, osim što je denaturacija provedena kroz 45 sekundi.

Završno umnažanje produkata je ponovljeno 30 puta pri čemu se denaturacija odvijala ponovno kroz 45 sekundi na 95 ^{0}C, amplifikacija je provedena na 67^0C kroz 1,5 minutu te sinteza DNA na 72 ^{0}C kroz 1 minutu i 30 sekundi.

Dobivena su dva PCR produkta ($\Delta126_1$ i $\Delta126_2$) koja su provjerena pomoću DNA elektroforeze te su nakon toga pročišćena iz gela sa kitom za pročišćavanje prema uputama proizvođača (QIAquick PCR purification Kit; „Qiagen“, Valenca, CA, USA).

Kako su dva dobivena produkta međusobno komplementarna u sekvenci u kojoj početnice nisu bile komplementarne s kalupom, u sljedećem koraku je provedeno povezivanje dva PCR produka u jedan konstrukt nazvan Δ126. Za to je bilo potrebno odrediti koncentraciju pojedinog fragmenta nakon pročišćavanja da bi znali koliki volumen uzorka uzimamo za sljedeći PCR kako bi u novoj smjesi za PCR imali ekvimolarne količine fragmenata.

Koncentracija je određena tako da je mjerena apsorbancija (za $\Delta 126_1$ i $\Delta 126_2$) pri 260 nm. Iz dobivene vrijednosti apsorbancije izračunata je koncentracija fragmenata prema formuli: $\gamma = A_{260} \cdot f \cdot 50 \frac{\mu g}{mL}$ u kojoj je f faktor razrjeđenja, a faktor 50 μg/mL je koncentracija DNA pri kojoj je A_{260} jednak 1.

Uz pomoć dobivene vrijednosti masene koncentracije, volumen za oba fragmenta koji treba dodati za novi PCR izračunat je prema formuli:

$$V = L \cdot \frac{M}{\gamma}$$

L- duljina fragmenta (kb)

M-recipročna vrijednost sume duljina fragmenata (1/kb) koji se koriste u ovom koraku PCR-a,

Sad u drugom koraku fragmenti dobiveni prvim PCR-om služe jedan drugom kao kalup i povezuju se preko komplementarne sekvence koja je mutirana.

Reakcijska smjesa za drugi PCR:

1, 4 μL $\Delta 126_1$ (1.produkt)

0, 97 μL $\Delta 126_2$ (2.produkt)

5 μL pufer za Taq polimerazu (10x koncentriran)

1 μL smjese sva 4 dNTP-a

0, 5 μL Taq polimeraze

41, 13 μL vode

PCR je proveden tako da je denaturacija trajala 45 sekundi pri 95^0C, amplifikacija je pri 69^0C trajala 1,5 minutu, a sinteza DNA je pri 72^0C trajala 1 minutu i 40 sekundi. Ciklus je ponovljen 15 puta.

Nakon 15 cikusa iz drugog PCR-a uzet je alikvot od 10 µL reakcijske smjese i dodan u novu PCR smjesu u koju su sada dodane "vanjske" početnice GalpromF i Xba SCW4 R. Uvjeti reakcije su ostali isti, ali je umjesto 15, napravljeno 30 ciklusa (Slika 8).

Reakcijska smjesa za posljednji PCR:

10 µL reakcijske smjese iz prethodnog PCR-a

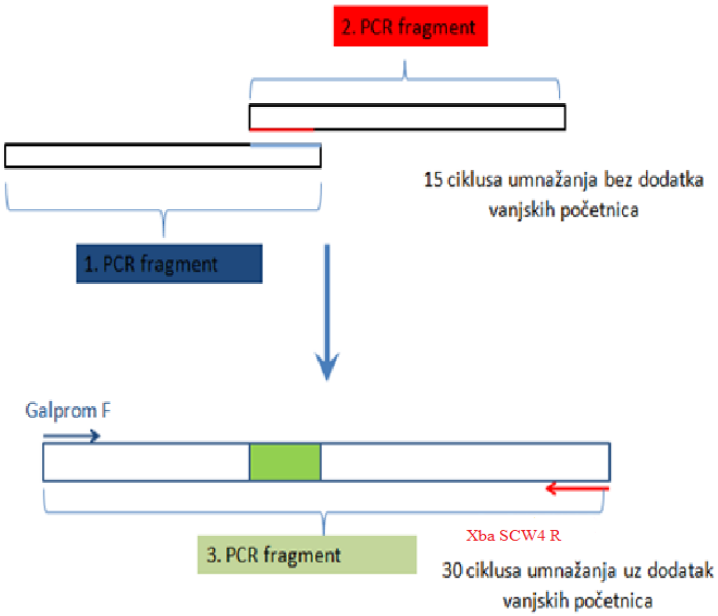
5 µL pufera za Taq polimerazu (10x koncentrirani)

1 µL smjese sva 4 dNTP-a

po 1 µL ″vanjskih″ početnica (Galprom F i Xba SCW4 R)

0, 5 µL Taq polimeraze

3, 5 µL vode



Slika 8 . Unošenje mutacije u SCW4 gen metodom PCR-a-2. stupanj. Plavom i crvenom bojom označeni su djelovi dobivenih fragmenata koji nisu komplementarni kalupu, ali jesu međusobno što omogućava njihovo spajanje u završni PCR produkt. Zelenom bojom označen je komplementarni dio dvaju fragmenata.

Dobiveni posljednji PCR produkt je ponovno podvrgnut provjeri na elektoforezi i nakon toga pročišćavanju.

3.2.2. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Elektroforeza je provođena za provjeru produkta nakon PCR-a u agaroznom gelu (1%), koji je pripremljen otapanjem agaroze uz zagrijavanje u TAE puferu (40 mmol/L TRIS-HAc pH 8,0; 1 mmol/L EDTA). Nakon polimerizacije gela i nanošenja uzoraka, elektroforeza je trajala oko 45 minuta pri naponu od 80 V. Nakon polimerizacije gela i nanošenja uzoraka, elektroforeza je trajala oko 45 minuta pri naponu od 80 V. Nakon toga je gel uronjen u otopinu etidij-bromida (1mg/L) na 15 minuta i zatim su pod UV-svjetlom na transiluminatoru (Hoefer, Macrovue UVis-20) bile vidljive DNA vrpce. Vrpce PCR produkata uspoređivane su sa standardnom λ DNA. .

3.2.3. Pročišćavanje fragmenata DNA umnoženih PCR-o

Nakon što je fragment provjeren na elektroforezi, slijedi pročišćavanje fragmenta pomoću kita za pročišćavanje, a postupak se vrši prema uputama proizvođača (QIAquick PCR purification Kit; „Qiagen“, Valenca, CA, USA).

3.2.4. TA-ligacija fragmenta DNA

Provedena je ligacija PCR produkta sa linearizniranim vektorom pGEm-T Easy. Prije toga je određena koncentracija fragmenta mjerenjem apsorbancije pri 260 nm kako bi u ligacijskoj smjesi mogli imati omjer koncentracije fragmenta i vektora 3:1.

Volumen je izračunat preko formule:

$$\mathrm{m\ (PCR\ fragm.)} = \frac{\mathrm{m\ (vektor, ng)} \cdot \mathrm{duljina\ (PCR\ fragment, kb)}}{\mathrm{duljina\ (vektor, kb)}} \cdot \mathrm{omjer\ fragment{:}\ vektor}$$

$$\mathrm{V(PCR\ fragment)} = \frac{\mathrm{m\ (PCR\ fragment)}}{\gamma\ \mathrm{(PCR\ fragment)}}$$

Ukupni volumen ligacijske smjese bio je 10 µL,a sastojala se od :

1 µL plazmida pGEM-T Easy

2 µL pufera za T_4 ligazu

1 µL T_4 ligaze

1,17 µL PCR fragmenta

1,83 µL vode

Smjesa je inkubirana preko noći na 4 ^{0}C.

3.2.5. Transformacija kompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli*

U Eppendofrici koja je na ledu nalazi se 50 µL suspenzije kompetentnih stanica. Dodano je 10 µL DNA (produkt TA-ligacije) i smjesa je inkubirana na ledu 30 minuta. Nakon toga je proveden "heat shock" od 20 sekundi na 42 ^{0}C te je zatim eppendorfica vraćena u led na 2 minute. Dodano je zatim 950 µL LB-a (prethodno termostatiranog na 37 ^{0}C) i sve je skupa inkubirano kroz 1 sat na 37 ^{0}C.

200 µL suspenzije je nacijepljeno na jednu krutu LB podlogu s ampicilinom, dok je na drugu nacijepljen ostatak koji je resuspendiran. Ploče su preko noći inkubirane na 37^{0}C.

3.2.6. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije *Escherichia coli* („mini-prep“)

Izolacija plazmida provedena je iz stanica *E. coli* nacijepljenjih u tekuću LB podlogu s ampicilnom nakon inkubacije preko noći na 37 ^{0}C. Izolirani su pomoću Qiaprep Miniprep kita prema uputama proizvođača („Qiagen“,Valencia, CA, USA)

3.2.7. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima SacI i XbaI provedeno je prema uputama proizvođača restrikcijskih enzima („New England Biolabs“ Ipswich, MA, SAD).

U početnu smjesu dodano je 3 µL plazmida koji je izoliran iz *E. Coli,* 0.5 µL SacI enzima, 1 µL pufera za SacI i 5,5 µL vode te je smjesa inkubirana na 37^{0}C kroz 30 minuta. Nakon toga je u istu smjesu dodano 0,5 µL XbaI enzima, 1,5 µL pufera za XbaI i 3 µL vode. Smjesa je ponovno inkubirana na 37^{0}C, ali kroz 60 minuta.

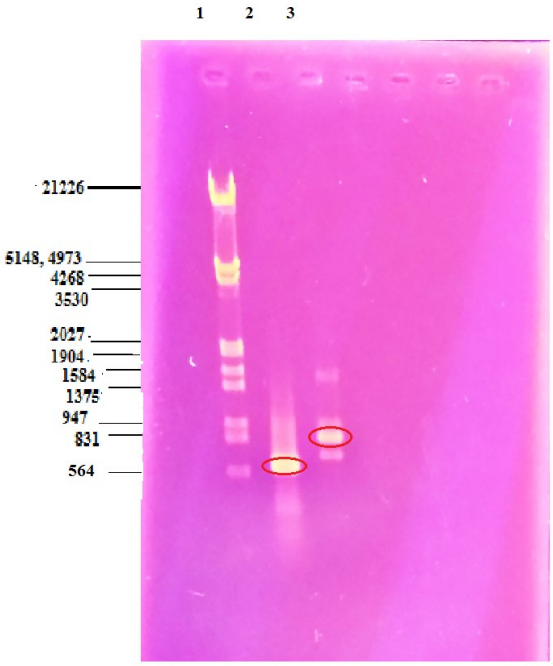
4. REZULTATI

Cilj ovog rada je bio uvesti mutaciju u gen *SCW4* kvasca *S.cerevisiae* pomoću lančane reakcije polimeraze. Mutacija se odnosi na deleciju dijela gena koji kodira za 126 aminokiselina sa N-terminalnog kraja proteina Scw4. Nakon uvođenja mutacije konstruiran je plazmid koji je umnožen u *E.coli* i iz nje izoliran te je napravljena restrikcijska analiza plazmida.

4.1. Uvođenje mutacije u gen SCW4 pomoću PCR-a

PCR-om je pomoću početnica Galprom F i Δ126 Scw4 R konstruiran prvi PCR produkt koji obuhvaća dio gena uzvodno od sekvence u koju je unesena mutacija (prema uvjetima koji su navedeni). Drugi PCR produkt je konstruiran pri istim uvjetima pomoću početnica Xba Scw4 R i Δ126 Scw4 F koji sadrži dijelove gena nizvodno od sekvence u koju je unesena mutacija.

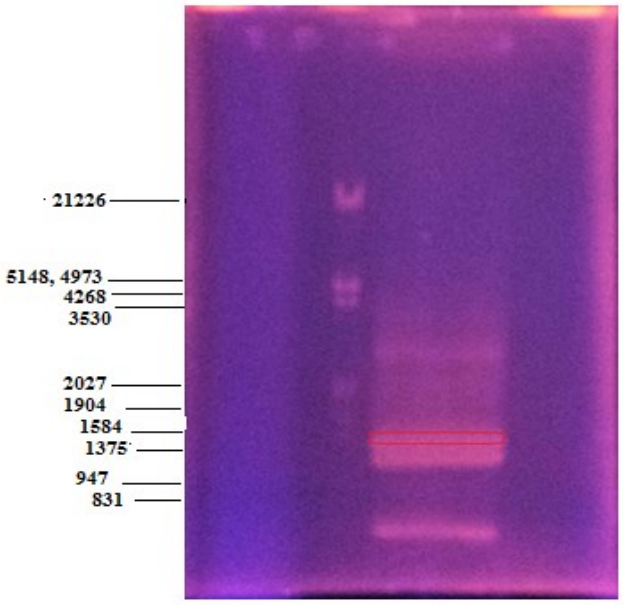
Fragmenti dobiveni PCR-om su zatim provjereni na elektrforezi (Slika 9) i pročišćeni pomoću kita za pročišćavanje PCR produkta prema uputama proizvođača (QIAquick PCR purification Kit; „Qiagen“, Valenca, CA, USA).



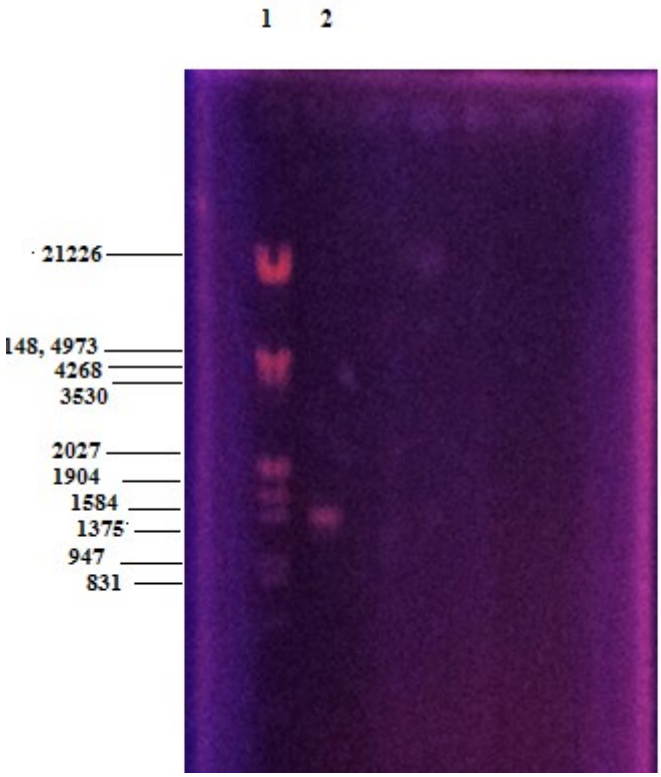
Slika 9. Elektroforetska analiza 1.kruga PCR-a. Uzorak: **1**.standard, **2**. $\Delta 126_1$ (589pb), **3**. $\Delta 126_2$ (829 bp)

Pročišćene fragmente zatim je trebalo povezati u konstrukt od 1411 bp (Δ126) koji je zapravo gen *SCW4* sa unesenom mutacijom. Povezivanje je bilo moguće zato što početnice Δ126 SCW4 F i Δ126 SCW4 R nisu bile komplementarne sa kalupom u sekvenci koju smo htjeli mutirati, ali su u tom dijelu međusobno komplementarne pa su fragmenti koji su dobiveni prvim PCR-om zapravo služili jedan drugom kao kalup u sljedećem krugu PCR-a. Na kraju je bilo potrebno PCR smjesi dodati i ″vanjske″ početnice Galprom F i Xba SCW4 R kako bi dobili željeni broj kopija mutiranog gena.

Nakon provjere na elektroforezi, 2. Produkt PCR-a (Δ126) je pročišćen tako da je cijeli volumen smjese za iz drugog PCR-a stavljen na gel za elektroforezu (Slika 10), a pročišćavanje je provedeno kako je opisano u "Materijali i metode". Nakon pročišćavanja, ponovno je provedena elektroforetska analiza (Slika 11).

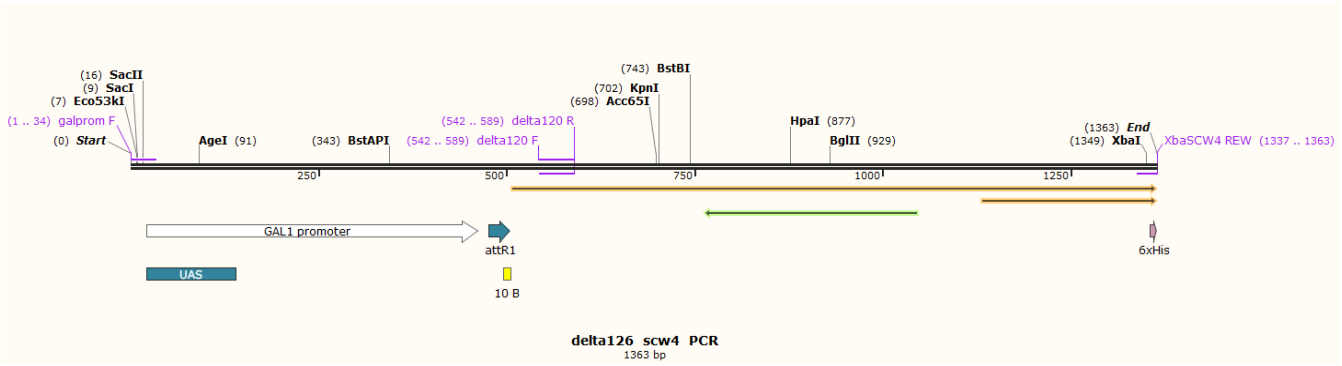


Slika 10. Elektroforetska analiza cjelokupnog volumena smjese iz 2. kruga PCR-a za izolaciju fragmenta iz gela. 1. standard **2**. Produkti 2. kruga PCR-a (fragment (1411 bp) koji je zaokružen je pročišćen)

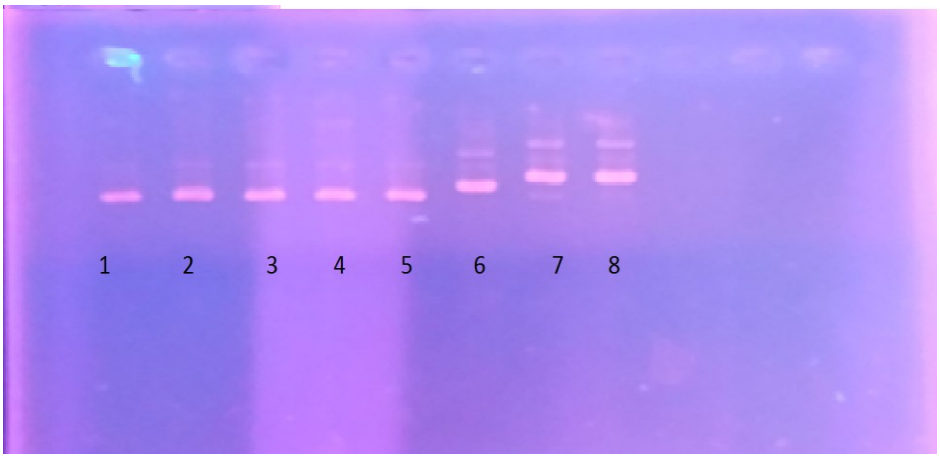


Slika 11. Pročišćeni produkt 2.kruga PCR-a **1.** Standardn **2**. Pročišćeni produkt 2.kruga PCR-a

Nakon pročišćavanja, konstrukt Δ126 (Slika 12) je TA-ligacijom ligiran u plazmid pGEM-T Easy kojim je transformirana *E.coli.* Iz odabranih kolonija poraslih na selektivnoj podlozi s ampicilinom izoliran je plazmid i detektiran pomoću elektroforeze (Slika 13).

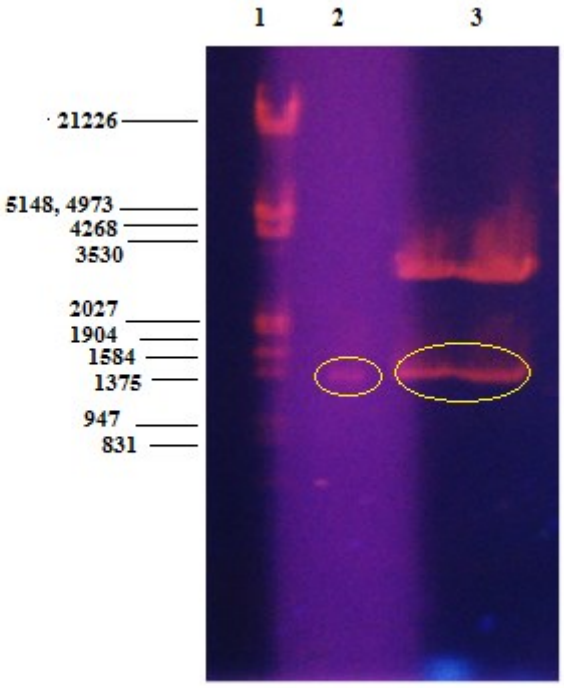


Slika 12. PCR fragment 126 za ligaciju u TA plazmid



Slika 13. Elektroforetska analiza, plazmid izoliran iz odabranih kolonije transformirane *E. coli* porasle na selektivnoj podlozi. Označeno brojevima 1-8

Na kraju je napravljena restrikcijska analiza plazmida označenim brojm **7**. Plazmid je pocijepan sa SacI i XbaI enzimima i nakon toga analiziran elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu (Slika 14). Dobivene su dvije vrpce na gelu od kojih donja prestavlja Δ126 *SCW4*, a gornja vektor pGEM-T Easy



Slika 14. Restrikcijska analiza pGEM-T Easy Δ126 SCW4. 1.standard, **2**. Δ126 , **3**. pGEM-T Easy Δ126 SCW

5. RASPRAVA

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je metoda koja se koristi u različitim znanstvenim područjima u različite istraživačke svrhe. Svrha PCR-a je dobivanje željenog produkta (molekula DNA) u velikom broju kopija kako bi se mogli provesti daljnji eksperimenti u istraživačkom radu. U osnovi se metoda zasniva na amplifikaciji ciljane sekvence DNA molekule na način da se u prvom koraku PCR smjesa (sadrži ciljanu DNA koja služi kao kalup, početnice, enzim DNA polimerazu, pufer za DNA polimerazu, smjesu sva četiri dNTP-a te vodu) zagrijava na temperaturu na kojoj se denaturira DNA molekula koja služi kao kalup, zatim u sljedećoj fazi snižavanjem temperature dolazi do povezivanja početnica sa DNA lancem u sekvenci koja je komplementarna samoj početnici. Na kraju u trećem stupnju dolazi do sinteze DNA pomoću enzima DNA polimeraze kao što se to odvija u uvjetima *in vivo*. Poznavanjem redoslijeda baza u lancu DNA otvara se mogućnost kreiranja različitih početnica kako bi se umnožili točno određeni dijelovi lanca koji se onda koriste u razne svrhe. Osim toga, moguće je pomoću početnica uvoditi i mutacije u DNA molekulu koje su u tom slučaju djelomično komplementarne ciljanoj DNA. Mutiranje gena pomoću PCR-a služi otkrivanju funkcionalnih i gradivnih svojstava proteina za koji gen kodira, a upravo činjenica da se mutirani gen dobiva kao produkt u velikom broju kopija omogućava daljnja ispitivanja na samom proteinu.

Kako bi se ispitala uspješnost uvođenja mutacije pomoću PCR-a, korišten je kvasac *Saccharomyces cerevisiae,* organizam kojem je sekvencioniran cijeli genom. Preciznije, korišten je njegov gen *SCW4* koji kodira za protein Scw4 kojem se osim funkcije u staničnoj stijenci istažuje i uzrok dvostrukog načinja vezanja u stijenku (kovalentno i nekovalentno vezanje). Mutacija je uvedena pomoću PCR metode "megapočetnice" kroz dva koraka s ciljem deletiranja sekvence koja kodira za 126 aminokiselina na N-terminalnom kraju proteina Scw4. U prvom koraku korištene su početnice koje su djelomično komplementarne kalupu DNA, odnosno nisu komplementarne s kalupom u onom dijelu lanca koji treba biti deletiran. Kao kalup korišten je plazmi pBG1805 *SCW4* u obje PCR smjese. Iz jedne smjese dobiven je produkt koji je sadržavao sekvencu nizvodno od regije koja treba biti deletirana, a iz druge smjese dobiven produkt koji sadrži sekvencu uzvodno od mjesta mutacije. Iako početnice nisu komplementarne kalupu u mjestu uvođenja mutacije, one su u tom dijelu međusobno komplementarne. Iz tog razloga je u drugom krugu bilo moguće konstruirati cijeli *SCW4* gen

sa uvedenom mutacijom te dodavanjem vanjskih početnica umnožiti mutirani gen u veliki broj kopija te je taj produkt nazvan ∆126. Svaki PCR produkt je provjeren elektroforezom u agaroznom gelu. Da bi se provjerila uspješnost uvođenja mutacije u gen *SCW4*, iz ∆126 i vektora pGEM-T-Easy TA-ligacijom je konstuiran plazmid pGEM-T-Easy. Dobivenim plazmidom je transformirana bakterija *E. coli* iz koje je umnoženi plazmid izoliran („miniprep"-Materijali i metode) te je na kraju napravljena restrikcijska analiza kojom je potvrđeno da je konstrukt ∆126 uspješno ligiran u plazmid pGEM-T-Easy.

6. ZAKLJUČCI

Upotrebom PCR metode provedena je delecija dijela sekvence gena *SCW4*.

Mutirani gen je uspješno ligiran u plazmid TA-ligacijom.

7. LITERATURA

.

Anonymous 1, http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html , Pristupljeno: 20.08.2016.

Anonymous 2,

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z723312?lang=en&region=HR, Pristupljeno: 21.08.2016.

Anonymous 3, http://www.academia.edu/3266734/Types_of_PCR , Pristupljeno: 21.08.2016.)

Anonymous 4, dharmacon.gelifesciences.com. Pristupljeno: 24.08.2016)

Anonymous 5,
https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/ta_and_gc_cloning_vectors/pGEM-T_Easy_(linearized)/, Pristupljeno: 24.08.2016.

Dieffenbach, C.W., Lowe,T.M., Dveksler, G.S., (1993), General concepts for PCR primer design. PCR Methods Appl. **3**, 30-37

Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mrša, V., Tanner, W., (2006) Pir proteins of *Saccharomyces* cerevisiae are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. J. Biol. Chem. 28; **281**(17), 11523-11529.

Eom, S.H., Wang, J., Steitz ,T.A., (1996), Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. Nature. **382**, 278-281.

Erlich, H.A. , Gelfand ,D., Sninsky, J.J., (1991) , Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. Science. **252**, 1643-1651

Fleet, G.H., (1991) Cell wall. U: The Yeasts (Rose, A.H., Harrison, J.S.), Academic Press, London, str. 199-277

Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E., (1999), Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. BioTechniques. **26**, 112-125

Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H., (1997), Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. BioTechniques. **23**, 504-511

Joshi, M., Deshpande, J.D., (2011) Polymerase chain reaction: methods, principles and application. Int. Jour. Of Biomed. Research. 1, 81-97

Ku, J.L., Jeon, Y.K., Park, J.G., (2011), Methylation-specific PCR. Methods Mol. Biol. **791**, 23-32

Landry, C.R., Townsend, J.P., Hartl, D.L., and Cavalieri, D. (2006), Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Ecology. **15**, 575–591

Mafra, I., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Oliviera, M.B.P.P., (2008), Food authentication by PCR-based methods. Eur Food Res Technol. **227**, 649–665

Mcpherson, M.J., Moller, S.G., (2006), 2.izd., Taylor and Francis, Abingdon

Morling, N., (2009), PCR in forensic genetics. Biochem Soc Trans. **37**, 438-40

Mortimer, R.K., and Johnston, John R., (1986), Genealogy of Principal Strains of the Yeast Genetic Stock Center. Genetics. **113**, 35-43

Mrša, V., Seidl, T., Gentzsch, M., Tanner, W. (1997) Specific labeling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. **15**,1145-1154.

Sabelli, P.A., (1988), Southern Blot Analysis. U: Molecular Biomethods Handbook, (Rapley, R., Walker, J.M., ured.), Humana Press, Totowa, str. 77-87

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., (1998) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. **239**, 487-491

Saiki, R.K., (1989), The Design and Optimization of the PCR. U: Principles and Applications for DNA Amplification, (Erlich, H.A., ured.), Palgrave Macmillan, Ujedinjeno Kraljevstvo, str. 7-16

Sambrook, J., Russel, D.W., (2006), Inverse PCR. Cold Spring Harb. Protoc. doi:10.1101/pdb.prot3487

Smith, A.E., Zhang, Z., Thomas, C.R., Moxham, K.E., Middelberg, A.P. (2000) The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 97, 9871-9874.

Teparić, R. i sur., (2010) Proteins in the *S.cerevisiae* Cell Wall. Food Technol.Biotechnol. **48**, 317-328.

Teparić, R., Stuparević, I., Mrša V., (2007) Binding assay for incorporation of alkaliextractable proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Yeast. **24**, 259-266