# Kloniranje gena ATR1, FLR1, GSH1 i YAP1 iz kvasca Saccharomyces cerevisiae soj UWOPS87-2421 u bakteriji Escherichia coli

**Arambašić, Kristian**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2015**

*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:159:890856

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

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 Biotehnologija**

Kristian Arambašić

6659/BT

# Kloniranje gena *ATR1*, *FLR1*, *GSH1* i *YAP1* iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj UWOPS87-2421 u bakteriji *Escherichia coli*

ZAVRŠNI RAD

Modul: Genetičko inženjerstvo

Nositelj: izv. prof. dr. sc. Ivan-Krešimir Svetec

Zagreb, 2015.

## Sadržaj

**1.UVOD....1**
**2. TEORIJSKI DIO....2**
2.1. Tehnologija rekombinantne DNA .... 2
2.2. Plazmidi....2
2.3. Enzimi koji se koriste u genetičkom inženjerstvu ....3
2.3.1. Restrikcijske endonukleaze....3
2.3.2. DNA-ligaze ....4
2.3.3. Alkalna fosfataza....4
2.3.4. DNA-polimeraze ....4
2.4. Bakterija *Escherichia coli* ....5
2.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR) ....6
2.6. Gel-elektroforeza nukleinskih kiselina ....6
**3. MATERIJALI I METODE....8**
3.1. Materijali ....8
3.1.1. Mikroorganizmi ....8
3.1.2. Plazmidni vektori ....8
3.1.3. Oligonukleotidi....9
3.1.4. Otopine za gel-elektroforezu....10
3.1.5. Otopine za pripremu kompetentnih stanica i transformaciju....10
3.1.6. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA....11
3.1.7. Podloge za uzgoj bakterije *Escherichia coli* ....11
3.1.8. Kemikalije i enzimi ....12
3.2. Metode....13
3.2.1. Lančana reakcija polimerazom....13
3.2.2. Restrikcija i modifikacija DNA....13
3.2.3. Gel-elektroforeza....13
3.2.4. Izolacija DNA iz agaroznog gela ....14
3.2.5. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom....15
3.2.6. Transformacija bakterije *Escherichia coli* elektroporacijom....15
3.2.6.1. Priprema kompetentnih stanica....15
3.2.6.2. Elektroporacija ....15
3.2.7. Izolacija plazmidne DNA iz bakterije *Escherichia coli* (mini-prep)....15
**4. REZULTATI I RASPRAVA....17**
4.1. Umnažanje gena *FLR1, ATR1, YAP1* i *GSH1* metodom PCR-a ....18
4.2. Kloniranje gena *ATR1, FLR1, YAP1* i *GSH1*....19
4.3. Restrikcijska analiza konstruiranih plazmida ....26
**5. ZAKLJUČAK....29**
**6. LITERATURA ....30**

**DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Završni rad**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno – biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**

**Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama**

# Kloniranje gena *ATR1, FLR1, GSH1* i *YAP1* iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj UWOPS87-2421 u bakteriji *Escherichia coli*

**Kristian Arambašić, 6659/BT**

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je klonirati gene *ATR1*, *FLR1*, *YAP1* i *GSH1* za koje je poznato da povećavaju otpornost kvasca na različite inhibitore rasta i fermentacije. Stoga su navedeni geni umnoženi lančanom reakcijom polimerazom iz soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* UWOPS87-2421 koji je otporniji na inhibitore rasta od laboratorijskih sojeva. Produkti lančane reakcije polimerazom ligirani su s odgovarajućim, prethodno lineariziranim plazmidima (pSP-G2 i pSP-G2-AC) te su ligacijske smjese korištene za transformaciju bakterije *Escherichia coli*. Iz transformiranih bakterija izolirani su plazmidi te je restrikcijskom analizom dokazano da su od četiri navedena gena uspješno klonirani geni *ATR1*, *YAP1* i *GSH1*.

**Ključne riječi:** *ATR1*, *GSH1*, *FLR1*, *YAP1*, kloniranje, *Escherichia coli*, plazmid, *Saccharomyces cerevisiae*, inhibitori rasta i fermentacije

**Rad sadrži:** 32 stranice, 12 slika, 6 tablica, 24 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 Ivan-Krešimir Svetec

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Anamarija Štafa, viši asistent

**Datum:** rujan 2015.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Final work**

**University of Zagreb**
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**
**Undergraduate studies Biotechnology**
**Department of Biochemical Engineering**
**Laboratory of Biology and Microbial Genetics**

# Cloning genes *ATR1, FLR1, GSH1* i *YAP1* from yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain UWOPS87-2421 into bacteria *Escherichia coli*

**Kristian Arambašić, 6659/BT**

**Abstract:** The aim of this paper was to clone genes *ATR1*, *FLR1*, *YAP1* and *GSH1*. These genes are already known to increase the resistance of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to different growth and fermentation inhibitors. Genes *ATR1*, *FLR1*, *YAP1* and *GSH1* were amplified by PCR from strain UWOPS87-2421 which shows higher tolerance to the inhibitors than laboratory strains. PCR products were ligated with corresponding, previously linearized plasmids (pSP-G2 and pSP-G2-AC) and ligation mixture was used to transform bacteria *Escherichia coli*. Restriction analysis of plasmids isolated from transformed bacteria showed that *ATR1*, *YAP1* and *GSH1* genes were successfully cloned.

**Keywords:** *ATR1*, *GSH1*, *FLR1*, *YAP1*, cloning, *Escherichia coli*, plasmid, *Saccharomyces cerevisiae*, growth and fermentation inhibitors
**Thesis contains:** 32 pages, 12 figures, 6 tables, 24 references
**Original in:** Croatian
**Final work in printed and electronic (pdf format) version deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb
**Mentor:** associate prof. Ivan–Krešimir Svetec, Ph.D.
**Technical support and assistance:** Anamarija Štafa, Ph.D.
**Thesis delivered:** September 2015

# 1. UVOD

Područje genetičkog inženjerstva jedno je od najbrže rastućih i najperspektivnijih područja u industriji i znanosti. Ubrzan razvoj počinje 1972. godine kada je Paul Berg konstruirao prve rekombinantne molekule DNA kombinirajući DNA virusa SV40 i DNA bakteriofaga lambda (Berg i sur., 1972), a jedno od značajnijih dostignuća bilo je 2010. godine kada je konstruiran cijeli bakterijski genom (Gibson i sur., 2010). Tehnike manipulacije molekulama DNA otvorile su put razvoju mnogih znanstvenih disciplina i tehnologija poput sintetičke biologije i konstrukcije transgenih biljaka i životinja te su u kratkom vremenu postale glavno oruđe za poboljšanje i stvaranje novih proizvodnih organizama.

Jedna od primjena genetičkog inženjerstva je i modifikacija sojeva kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kako bi bili otporniji na inhibitore koji nastaju tijekom razgradnje lignocelulozne sirovina. Povećanjem otpornosti kvasca na inhibitore rasta i fermentacije, povećava se produktivnost i ekonomska isplativost procesa proizvodnje etanola iz lignocelulozne sirovina. U prijašnjim istraživanjima dokazano je da prekomjernom ekspresijom gena *FLR1* kvasac postaje otporniji na inhibitore koniferil aldehid i HMF (5-hidroksimetil-2-furanaldehid). Prekomjernom ekspresijom gena *ATR1* kvasac postaje otporniji na koniferil aldehid, a prekomjernom ekspresijom gena *YAP1* na koniferil aldehid, HMF i hidrolizat smreke koji sadrži veliki broj različitih inhibitornih komponenti (Alriksson i sur., 2010). Također, dokazano je da pojačana ekspresija gena *GSH1*, koji je uključen u metabolički put glutationa, općenito podiže otpornost kvasca na inhibitore nastale tijekom proizvodnje etanola iz lignocelulozne sirovina (Ask i sur., 2013).

Cilj ovog rada bio je klonirati gene *FLR1, ATR1* i *YAP1* u plazmid pSP-G2 i gen *GSH1* u plazmid pSP-G2-AC. Navedeni geni umnoženi su lančanom reakcijom polimerazom iz genoma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj UWOPS87-2421 koji je otporniji na inhibitore rasta i fermentacije od laboratorijskih sojeva, a kao mikroorganizam domaćin korištena je bakterija *Escherichia coli.* Konstruirani plazmidi koristit će se sklopu projekta u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu za istraživanje otpornosti kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na različite inhibitore koji nastaju razgradnjom lignocelulozne sirovina.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Tehnologija rekombinantne DNA

Tehnologija rekombinantne DNA, odnosno genetičko inženjerstvo je skup tehnika koje omogućuju uvođenje točno određenih genetičkih promjena u živoj stanici ili organizmu. Pomoću tehnika genetičkog inženjerstva konstruiraju se nove molekule DNA kombiniranjem dviju ili više različitih molekula DNA, odnosno njihovih fragmenata. Polazne molekule DNA mogu potjecati iz istog ili više različitih organizama, no pri tome treba obratiti pozornost na razlike između genetičkog materijala prokariotskih i eukariotskih organizama. Princip konstrukcije rekombinantnih molekula DNA bazira se na ugradnji željenog fragmenta molekule DNA, kojeg nazivamo insert, u vektor. Vektori su molekule DNA u koje se jednostavno može insertirati fragment DNA u svrhu umnažanja u stanici domaćina. Tehnike koje se pritom neizostavno koriste su cijepanje DNA pomoću restrikcijskih enzima i ligacija pocijepanih molekula DNA pomoću DNA-ligaza.

Tehnologija rekombinantne DNA danas je vrlo raširena te nalazi primjenu u biotehnologiji, medicini te fundamentalnim i primjenjenim znanstvenim istraživanjima. U biotehnologiji se koristi za proizvodnju farmaceutika, povećanje prinosa određenog metabolita, konstrukciju genetički modificiranih biljaka te poboljšanje svojstava hrane i drugih industrijskih proizvoda. U medicini se koristi za razvoj novih lijekova, cjepiva te proizvodnju hormona i proteina.

Neki primjeri primjene tehnologije rekombinantne DNA su: (i) zamjena inzulina izoliranog iz životinja koji je izazivao imunosni odgovor s humanim inzulinom umetanjem ljudskog gena za inzulin u bakteriju *Escherichia coli* ili kvasac *Saccharomyces cerevisiae;* (ii) Gen za Bt toxin iz bakterije *Bacillus thuringiensis* uveden u više od 50 biljnih vrsta (Adang, 1991, Gelernter, 1990), a ekspresija ovog gena pruža zaštitu od insekata; (iii) uvedena je biotehnološka proivodnja humanog hormona rasta pomoću bakterije *Escherichia coli* kao zamjena za tehnički zahtjevno, skupo i riskantno pročišćavanje iz hipofize.

### 2.2. Plazmidi

Najčešći vektori u tehnologiji rekombinantne DNA su plazmidi, odnosno kružne dvolančane molekule DNA čija veličina varira od nekoliko tisuća parova baza do više od 100 kilobaza, a u prirodi se nalaze u prokariotskim organizmima, kvascima i nekim višim eukariotima. Takvi plazmidi sadrže vlastito ishodište replikacije što znači da se repliciraju

neovisno o kromosomskoj DNA te je njihov broj kopija u stanici reguliran različitim mehanizmima.

Plazmidi koji se koriste kao vektori trebaju imati ove karakteristike: (i) mala molekulska masa; (ii) prisutnost u velikom broju kopija u stanici; (iii) samostalna replikacija; (iv) jednostavna izolacija; (v) jednostavna selekcija stanica koje sadrže vektor; (vi) jednostavna selekcija vektora koji sadrže insert; (vii) postojanje polilinkera.

Polilinker ili Multiple Cloning Site (MCS) je segment DNA veličine nekoliko desetaka parova baza, a ponekad i više od 100 parova baza, koji može sadržavati desetak jedinstvenih restrikcijskih mjesta i izuzetno je koristan u genetičkom inženjerstvu zbog širokog izbora restrikcijskih mjesta u koja se može uklonirati insert. Za selekciju stanica koje sadrže vektor upotrebljavaju se genetički markeri koji kodiraju za rezistenciju na određeni antibiotik ili za sintezu određene tvari rasta za koju je korišteni mikroorganizam auksotrof. Za selekciju vektora koji sadrži insert najčešće korištena metoda je α-komplementacija (Ullmann i sur., 1968). Ova metoda temelji se na komplementaciji između 3'- i 5'-kraja gena *lacZ* koji kodira za β-galaktozidazu. Aktivni oblik β-galaktozidaze je tetramer i hidrolizira laktozu na glukozu i galaktozu. Uklanjanjem aminokiselina 11 do 41 iz β-galaktozidaze (*lacZΔM15* mutacija u genomu bakterije *Escherichia coli*) ovaj enzim više ne može formirati tetramer i zbog toga više nije funkcionalan (Langley i sur., 1975), no transformacijom bakterije *Escherichia coli* koja sadrži ovu mutaciju plazmidom u koji je ukloniran fragment DNA koji kodira za aminokiseline 1 do 59 β-galaktozidaze, dolazi do komplementacije i stvaranja funkcionalnog enzima (Ullmann i sur., 1978, Langley i sur., 1975). U slučaju uspješne α-komplementacije, narasle kolonije će nakon dodatka 5-bromo-4-kloro-3-indoil-β-D-galaktopiranozida (X-gal) koji je supstrat za β-galaktozidazu i izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG) koji je induktor operona *lacZ*, biti plave boje. Plavo obojenje kolonija se javlja zbog cijepanja X-gal-a na galaktozu i 5-bromo-4-kloro-3-hidroksiindoil (iz kojeg spontano nastaje plavi netopljivi produkt). Insertiranje određenog fragmenta DNA u polilinker uzrokuje inaktivaciju gena *lacZ* (pomicanjem okvira čitanja gena ili pojavom STOP kodona) te nastaju kolonije bijele boje.

## 2.3. Enzimi koji se koriste u genetičkom inženjerstvu

### 2.3.1. Restrikcijske endonukleaze

Restrikcijske endonukleaze su enzimi koji prepoznaju i cijepaju fosfodiesterske veze u molekuli DNA u palindromskim slijedovima nukleotida, a koriste se za cijepanje željenih fragmenata DNA, linearizaciju vektora i restrikcijsku analizu (Roberts i sur., 2003). Palindromi su kratke, specifične i simetrične sekvencije unutar molekule DNA čiji komplementarni lanci,

u smjeru iste polarnosti, imaju isti redoslijed nukleotida. Postoji puno restrikcijskih enzima koji prepoznaju različite palindrome te su zbog toga vrlo korisni u tehnologiji rekombinantne DNA, a izoliraju se iz bakterija i arheja gdje su sastavni dio restrikcijsko-modifikacijskih sustava koji služe za obranu od virusa. Da bi restrikcijski enzimi postali komercijalno dostupni potrebno je korištenjem metoda genetičkog inženjerstva klonirati gen koji kodira za sintezu određenog restrikcijskog enzima u bakteriju *Escherichia coli*.

### 2.3.2. DNA-ligaze

DNA-ligaze su enzimi koji kataliziraju povezivanje OH-skupine na 3'-kraju i fosfatne skupine na 5'-kraju molekule DNA formiranjem fosfodiesterskih veza (Shuman, 2009). Ovi enzimi u stanicama eukariota i prokariota odgovorni su za ligaciju (spajanje) jednolančanih i dvolančanih lomova u DNA te imaju važnu ulogu u replikaciji molekula DNA. Zbog njihove mogućnosti da povezuju fragmente DNA, DNA-ligaze neizostavni su enzimi u genetičkom inženjerstvu. Najčešće korištene ligaze u genetičkom inženjerstvu su T4 DNA-ligaza koja je izolirana iz bakteriofaga T4 i DNA-ligaza izolirana iz bakterije *Escherichia coli*. T4 DNA-ligaza može ligirati ravne i komplementarne isturene krajeve DNA oligonukleotida, RNA i RNA-DNA hibrida, no ne i jednolančanih nukleinskih kiselina te joj je za aktivnost neophodan ATP kao kofaktor. DNA-ligaza izolirana iz bakterije *Escherichia coli* djeluje samo na komplementarne isturene krajeve DNA te joj je za aktivnost potreban $NAD^+$ kao kofaktor.

### 2.3.3. Alkalna fosfataza

Alkalna fosfataza je hidrolaza koja vrši defosforilaciju, odnosno uklanja fosfatnu grupu sa nukletioda, proteina i alkaloida. Primjena ovog enzima u genetičkom inženjerstvu obuhvaća uklanjanje fosfata sa 5'-kraja DNA kako bi se spriječila religacija pocijepane DNA ili kako bi se molekula DNA održala u linearnom obliku te uklanjanje fosfata sa 5'-kraja kako bi se kasnije provelo označivanje krajeva DNA pomoću radioaktivnog fosfata.

### 2.3.4. DNA-polimeraze

DNA-polimeraze su enzimi koji kataliziraju sintezu dvolančane molekule DNA iz jednolančane DNA (kalup). Oni djeluju tako da produžuju 3'-OH kraj već postojećeg kratkog slijeda nukleotida (početnica) komplementarnim sparivanjem baza s kalupom DNA. Početnice su komplementarno vezane na kalup i bez postojeće OH skupine na 3'-kraju sinteza ne može početi. Od polimeraza koje se koriste u genetičkom inženjerstvu važno je spomenuti termostabilne polimeraze koje se koriste za sintezu dvolančane DNA pomoću lančane reakcije polimerazom (engl. PCR – Polymerase Chain Reaction) i Klenow fragment. Taq polimeraza je termostabilna polimeraza izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*, a optimalna temperatura joj je 75 °C do 80 °C (Lawyer i sur., 1993). Ova polimeraza specifična je po tome

što na dvolančanoj molekuli DNA koja je produkt lančane reakcije polimerazom ostavlja 3'-A isturene krajeve. Jedan od nedostataka Taq polimeraze je to što nema lektorirajuću aktivnost te zbog toga ima nisku preciznost sinteze DNA. Lektorirajuća aktivnost jako povećava preciznost sinteze molekula DNA pomoću DNA-polimeraze jer ako DNA-polimeraza ugradi pogrešan nukleotid, ona zaustavlja sintezu DNA, uklanja posljednji pogrešno ugrađeni nukleotid i zamjenjuje ga ispravnim. Klenow fragment je modificirana DNA polimeraza I iz bakterije *Escherichia coli* kojoj je jedna podjedinica uklonjena te stoga pokazuje 5'-3' polimeraznu i 3'-5' egzonukleaznu aktivnost u odnosu na DNA polimerazu I koja ima i 5'-3' egzonukleaznu aktivnost. Metodama genetičkog inženjerstva konstruirane su termorezistentne DNA polimeraze koje imaju lektorirajuću aktivnost i koje mogu ugrađivati modificirane nukleotide u DNA, a jedna od polimeraza koje su konstruirane tako da imaju lektorirajuću aktivnost je polimeraza Q5.

### *2.4.* Bakterija *Escherichia coli*

Bakterija *Escherichia coli* jedan je od najistraženijih i najčešće korištenih mikroorganizama u molekularnoj biologiji i genetičkom inženjerstvu. Iako postoje neki patogeni sojevi koji mogu uzrokovati probleme u urogenitalnom traktu, u genetičkom inženjerstvu koriste se nepatogeni sojevi (npr. *Escherichia coli* soj K12). *Escherichia coli* je gram-negativna, fakultativno anaerobna, štapićasta bakterija iz porodice *Enterobacteriae* koju nalazimo u donjem probavnom traktu toplokrvnih organizama (Singleton, 1999). Ona je nesporogen mikroorganizam dug oko 2 μm, promjera 0.25 do 1 μm. Ova bakterija se u laboratorijskim uvjetima može uzgajati na krutoj i tekućoj hranjivoj podlozi koja sadrži izvor ugljika, dušika, fosfora i soli potrebnih za rast te ima generacijsko vrijeme od oko 20 minuta pri optimalnoj temperaturi od 37 °C. Genom laboratorijskog soja *Escherichia coli* soj K12 sekvenciran je 1997. godine i sastoji se od kružne dvolančane molekule DNA dugačke 4,6 milijuna parova baza (Blattner i sur., 1997).

Stanice bakterije *Escherichia coli* izmjenjuju genetski materijal horizontalnim i vertikalnim prijenosom gena. Vertikalni prijenos gena je prijenos genetskog materijala s jedne generacije na drugu biološkim procesom diobe, a horizontalni prijenos gena je prijenos genetskog materijala između različitih stanica iste ili različite vrste transformacijom, konjugacijom i transdukcijom. Transformacija označava prijenos DNA ulaskom slobodne DNA u stanicu bez potrebe za direktnim kontaktom između stanica ili nekim drugim posrednikom (npr. virus), a stanice koje su sposobne prihvatiti molekule DNA iz svog okoliša nazivaju se kompetentne stanice. Stanice bakterije *Escherichia coli* nisu prirodno kompetentne,

već ih se mora određenim laboratorijskim postupcima učiniti kompetentnima. Transformacija se u laboratoriju najčešće izvodi postupkom elektroporacije gdje se pomoću kratkog električnog pulsa visokog napona plazmidna DNA unosi u kompetentne stanice (Dower i sur., 1988).

### 2.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

PCR (Polymerase Chain Reaction) je metoda koja omogućava umnažanje točno određenog dijela DNA. Metoda je razvijena 1983. godine te je od tada nezamjenjiva tehnika u svakom molekularno-genetičkom ili molekularno-biološkom laboratoriju. Pomoću lančane reakcije polimerazom mogu se umnožiti fragmenti DNA dugački 100 parova baza do 10 kilobaza, iako postoje metode kojima se može umnožiti i do 40 kilobaza (Cheng i sur., 1994). Za provođenje PCR-a potreban je DNA kalup, minimalno dvije početnice, deoksiribonukleotidi, termostabilna DNA-polimeraza, pufer za DNA-polimerazu i PCR uređaj. Početnice su oligonukleotidi dugački 12 do 30 nukleotida koji se komplementarno sparuju s DNA kalupom lijevo i desno od regije koju želimo umnožiti tako da su 3'-krajevi početnica okrenuti jedan prema drugome. Termostabilna DNA-polimeraza potrebna je jer zadržava svoju aktivnost nakon izlaganja visokim temperaturama tijekom lančane reakcije polimerazom i na taj način pojednostavljuje postupak i omogućuje veću učinkovitost PCR-a (Saiki i sur., 1988).

Jedan ciklus reakcije sadrži tri koraka: (i) denaturacija DNA kalupa, odnosno pucanje vodikovih veza između komplementarno sparenih baza djelovanjem visoke temperature, ovaj korak traje 30 sekundi na temperaturi 94 °C do 95 °C; (ii) komplementarno sparivanje početnica na DNA kalup lijevo i desno od ciljane regije za umnažanje , ovaj korak traje do 1 minutu na temperaturi 50 °C do 65 °C (5 °C do 20 °C ispod $T_m$ vrijednosti početnica); (iii) sinteza DNA pomoću termostabilne DNA polimeraze, sinteza DNA se provodi na temperaturi 70 °C do 72 °C, a vrijeme provođenja ovisi o duljini fragmenta (oko 1min / kb). Ciklus se ponavlja 25 do 35 puta ovisno o željenoj količini DNA te se prije prvog ciklusa provodi početna denaturacija DNA na temperaturi 94 °C do 95 °C tijekom 5 minuta, a nakon zadnjeg ciklusa završna sinteza DNA na temperaturi 70 °C do 72 °C tijekom 10 minuta.

### 2.6. Gel-elektroforeza nukleinskih kiselina

Gel-elektroforeza nukleinskih kiselina je tehnika koja se najčešće koristi za razdvajanje fragmenata DNA i RNA molekula na temelju njihove duljine odnosno molekulske mase, ali pri određenim uvjetima brzina migracije nukleinskih kiselina ovisi o njihovoj tercijarnoj strukturi i GC/AT sastavu. Ova tehnika primjenjuje se u dijagnostičke svrhe za

provjeru bilo kojeg koraka tijekom kloniranja i preparativne svrhe za izolaciju željenog fragmenta DNA. Gel-elektroforeza provodi se u električnom polju u kojem fragmenti nukleinskih kiselina, s obzirom da su negativno nabijeni, migriraju prema pozitivnom polu kroz neki nosač uronjen u pufer koji služi kao elektrolit.

Kraći fragmenti, odnosno manje molekule DNA, migriraju brže jer lakše prolaze kroz pore nosača. Brzina kojom se fragmenti kreću kroz nosač ovisi o mnogo faktora. Jedan od faktora je koncentracija nosača; što je koncentracija nosača veća, to je kretanje fragmenata DNA sporije. Konformacija nukleinskih kiselina također ima veliki utjecaj na brzinu kretanja; na primjeru migracije plazmida kroz nosač možemo zaključiti da kružne molekule koje sadrže jednolančani lom (konformacija otvorenog kruga) putuju najsporije, kružne molekule u superzavijenoj konformaciji putuju najbrže, a linearne molekule putuju brže od konformacije otvorenog kruga, ali sporije od superzavijene konformacije.

Kao nosači za gel-elektroforezu najčešće se koriste agarozni gel i poliakrilamidni gel. Agarozni gel se koristi u koncentracijama 0.3 % do 2 (rijetko 5) %, a omogućava razdvajanje fragmenata nukleinskih kiselina veličine 100 parova baza do 25 kilobaza. Poliakrilamidni gel koristi se u koncentracijama 3,5 % do 20 %, a omogućava razdvajanje fragmenata DNA i RNA koje se razlikuju u veličini za samo jedan nukleotid. Gel-elektroforeza u kojoj se koristi poliakrilamidni gel kao nosač najčešće se provodi u denaturirajućim uvjetima. Tijekom nanošenja uzoraka u jažice gela, zajedno sa uzorkom nukleinskih kiselina, nanosi se i migracijsko bojilo. Migracijska bojila sadrže komponente čije su brzine migracije kroz nosač ekvivalentne sa brzinom migracije dvolančane DNA određene duljine te se prema tome određuje kada treba zaustaviti gel-elektroforezu kako uzorak ne bi izašao iz gela. Za vizualizaciju nukleinskih kiselina u gelu koristi se otopina etidij-bromida (Olmsted III, Kearns, 1977). Etidij-bromid interkalira u strukturu dvostruke zavojnice DNA, a vezanjem s DNA njegova fluorescencija se pojačava. Ova fluorescencija postaje vidljiva pod UV svjetlom jer etidij bromid apsorbira UV svjetlost i kao odgovor na ovu ekscitaciju emitira narančastu svjetlost.

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. Materijali

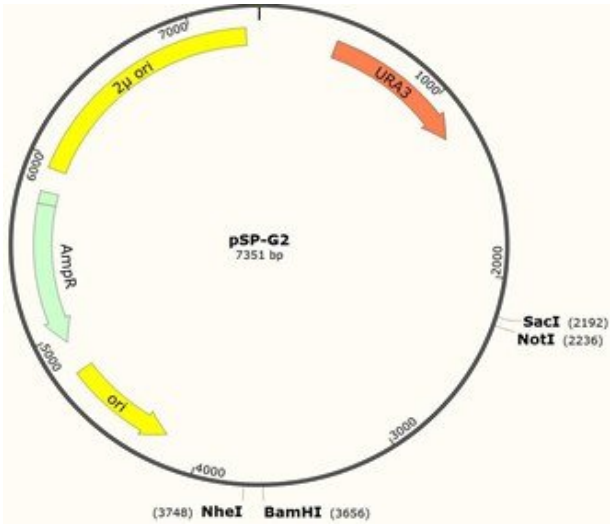
### 3.1.1. Mikroorganizmi

Za pripremu kompetentnih stanica i transformaciju konstruiranim plazmidima korištena je bakterija *Escherichia coli* soj DH5α genotipa *upE44ΔlacU169 (ϕ80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* („Stratagene“, La Jolla, CA, SAD).

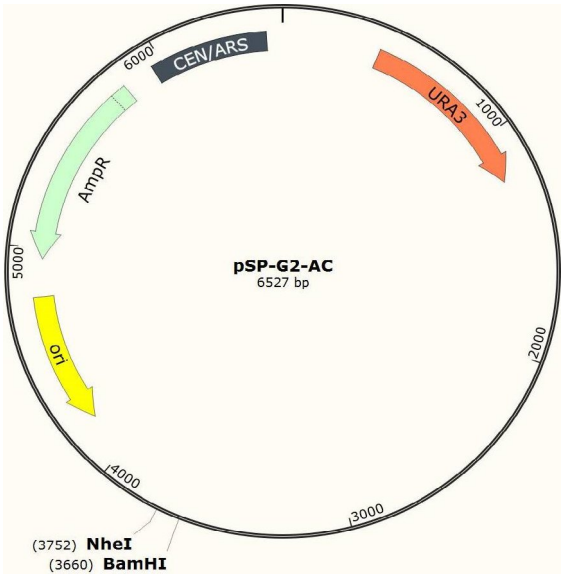
Za izolaciju genomske DNA i umnožavanje gena *FLR1, ATR1, YAP1* i *GSH1* lančanom reakcijom polimerazom korišten je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* soj UWOPS87-2421 izoliran iz cvijeta kaktusa *Opuntia megacantha* na Havajima (Liti i sur., 2009, Cubillos i sur., 2009), a kupljen je od National Collection of Yeast Cultures (Norwich, Ujedinjeno Kraljevstvo)

### 3.1.2. Plazmidni vektori

Korištena su dva plazmidna vektora, pSP-G2 (Slika 1.) i pSP-G2-AC (Slika 2.). Oba plazmida sadrže ishodište replikacije (*ori*) koje omogućuje umnožavanje u bakteriji *Escherichia coli*, regiju *URA3* koja omogućuje selekciju transformanata kvasca *Saccharomyces cerevisiae* te gen koji kodira za β-laktamazu (*bla*) koja omogućuje selekciju transformanata bakterije *Escherichia coli* zahvaljujući njihovoj rezistenciji na antibiotik ampicilin. Jedina razlika između ova dva plazmida je ta da plazmid pSP-G2 sadrži 2μ ishodište replikacije (*2μ ori*) dok je u plazmidu pSP-G2-AC ova regija metodama genetičkog inženjerstva zamijenjena sa regijom *ARS/CEN*. Proteini za koje kodira 2μ ishodište replikacije odgovorni su za održavanje visokog broja kopija plazmida u stanici, a regija *ARS/CEN* odgovorna je za održavanje niskog broja kopija plazmida u stanicama.




**Slika 1.** Mapa plazmida pSP-G2. Označene su regije DNA i restrikcijska mjesta relevantna za ovaj rad.




**Slika 2.** Mapa plazmida pSP-G2-AC. Označene su regije DNA i restrikcijska mjesta relevantna za ovaj rad.

### 3.1.3. Oligonukleotidi

U ovom radu korišteno je 8 oligonukleotida čiji je pregled dan u tablici 1. Navedeni oligonukleotidi korišteni su kao početnice za umnažanje gena *ATR1, FLR1, YAP1* i *GSH1* lančanom reakcijom polimerazom.

**Tablica 1.** Oligonukleotidi korišteni za umnažanje gena *FLR1, ATR1, YAP1 i GSH1* lančanom reakcijom polimerazom. U stupcu „SEKVENCIJA (5'-3')“ velikim slovima su istaknuta odgovarajuća restrikcijska mjesta, a u stupcu „RESTRIKCIJSKI ENZIM“ restrikcijski enzim koji prepoznaje to restrikcijsko mjesto.

| OLIGONUKLEOTID | SEKVENCIJA (5'-3') | RESTRIKCIJSKI ENZIM | GC UDIO (%) | Tm (°C) |
|---|---|---|---|---|
| ScFLR1-r | gagaGAGCTCctactcctctgtgtacgaag | *Sac*I | 53 | 63 |
| ScFLR1-f | gagaGCGGCCGCtatggtatacacttcaacgt | *Not*I | 53 | 67 |
| ScATR1-r | gagaGCTAGCctaagccacagtgcaatcg | *Nhe*I | 55 | 66 |
| ScATR1-f | gagaGGATCCatgggcaatcagtcattagt | *Bam*HI | 47 | 63 |
| ScYAP1-r | gagaGCTAGCccgctttagttcatatgct | *Nhe*I | 48 | 63 |
| ScYAP1-f | gagaAGATCTatgagtgtgtctaccgcc | *Bgl*II | 50 | 58 |
| ScGSH1-r | gaggACTAGTaggagtttaacatttgctttc | *Spe*I | 39 | 55 |
| ScGSH1-f | gagaAGATCTatgggactcttagctttgg | *Bgl*II | 45 | 56 |

### 3.1.4. Otopine za gel-elektroforezu

TBE-pufer (10x):

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

Boja za nanošenje uzoraka (6x):

| | |
|---|---|
| Bromfenol-plavo | 0,25 g |
| Ksilen cijanol FF | 0,25 g |
| Glicerol | 30,0 g |
| EDTA (0,5 M; pH 8,0) | 20 mL |
| SDS | 1,0 g |
| Destilirana voda | do 1000 mL |

Agarozni gel (0,8 %):

0,8 g agaroze otopi se u 100 mL TBE-pufera (1x)

Etidij bromid:

Osnovna otopina se pripremi u koncentraciji od 10 mg/mL, ne sterilizira se i čuva se pri 4°C u tamnoj boci. Pri otapanju je obavezna upotreba dvostrukih nitrilnih rukavica. Otopina za vizualizaciju DNA se priprema dodatkom 50 µL osnovne otopine na 1 L destilirane vode i također se čuva u tamnoj boci.

### 3.1.5. Otopine za pripremu kompetentnih stanica i transformaciju:

Glicerol (10 vol%):

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

### 3.1.6. Otopine za izolaciju i pročišćavanje DNA:

Amonijev acetat (8 M):

61,66 g amonijevog acetata se otopi u 100 mL destilirane vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 4°C.

RNA-za:

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

Kalijev acetat (3 M):

Korištena otopina je 3 M u odnosu na kalij i 5 M u odnosu na acetat, a pripravlja se tako da se u 60 mL 5 M otopine kalijeva acetata doda 11.5 mL ledene octene kiseline i 28.5 mL vode. Otopina se sterilizira filtracijom i čuva na 4°C.

GTE-pufer:

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

Priprema se iz sterilnih otopina neposredno prije upotrebe.

NaOH/SDS:

| | |
|---|---|
| NaOH | 200 mM |
| SDS | 10 g/L |

Otopina se ne sterilizira. Priprema se neposredno prije upotrebe.

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

LB (kompletna podloga):

| | |
|---|---|
| Bacto-tripton | 10,0 g/L |
| Kvaščev ekstrakt | 5,0 g/L |
| Natrijev klorid | 10,0 g/l |

Ampicilin se dodaje u sterilnu podlogu iz osnovne otopine sterilizirane filtracijom (koncentracija 20 mg/mL) do konačne koncentracije od 50 µg/mL za krutu podlogu koja je ohlađena na 58 $^{o}$C, odnosno do konačne koncentracije od 100 µg/mL za tekuću podlogu.

SOC:

| | |
|---|---|
| Bacto-tripton | 2,0 mg |
| Kvaščev ekstrakt | 500 mg |
| NaCl | 60 mg |
| KCl | 20 mg |
| $MgCl_2$ | 200 mg |
| $MgSO_4$ x $7H_20$ | 250 mg |
| Glukoza | 360 mg |
| Destilirana voda | do 100 mL |

### 3.1.8. Kemikalije i enzimi

Agaroza: BMA
DNA bakteriofaga λ: Fermentas
EDTA: Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija
Etidij bromid: SIGMA
Tris: Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija
Amonijev acetat: Kemika, Zagreb
Glicerol: Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija
Komplet kemikalija za PCR: New England Biolabs, Beverly
Komplet kemikalija za izolaciju DNA iz gela: Qiagen, SAD
Borna kiselina: Fisher
Izopropanol: Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
Deoksiribonukleotidi: New England Biolabs (NEB)
Q5 polimeraza: NEB
T4 DNA-ligaza: NEB
FastAP fosfataza: NEB
Izopropanol: Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
Apsolutni etanol: Novokem, Zagreb
Ribonukleaza A: Sigma Chemical Co., St. Louis
SDS: Merck, Hohenbrunn, Njemačka

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction - PCR)

Metodom lančane reakcije polimerazom umnoženi su geni *FLR1, ATR1, YAP1* i *GSH1* iz genoma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj UWOPS87-2421. Oligonukleotidi koji su korišteni kao početnice navedeni su i opisani u tablici 1., a uvjeti pri kojima se PCR provodio navedeni su u tablici 2.

**Tablica 2.** Uvjeti provođenja PCR-a s polimerazom Q5

| KORAK | TEMPERATURA | TRAJANJE |
|---|---|---|
| Početna denaturacija | 94 °C | 4 minute |
| Denaturacija | 94 °C | 40 sekundi |
| Komplementarno sparivanje početnica | Za *ATR1* 62 °C<br>Za *FLR1* 58 °C<br>Za *GSH1* 59 °C<br>Za *YAP1* 60 °C | 20 sekundi |
| Sinteza DNA | 72 °C | 1 minuta i 15 sekundi |
| Završna sinteza | 72 °C | 5 minuta |
| Hlađenje | 22 °C | 2 minute |

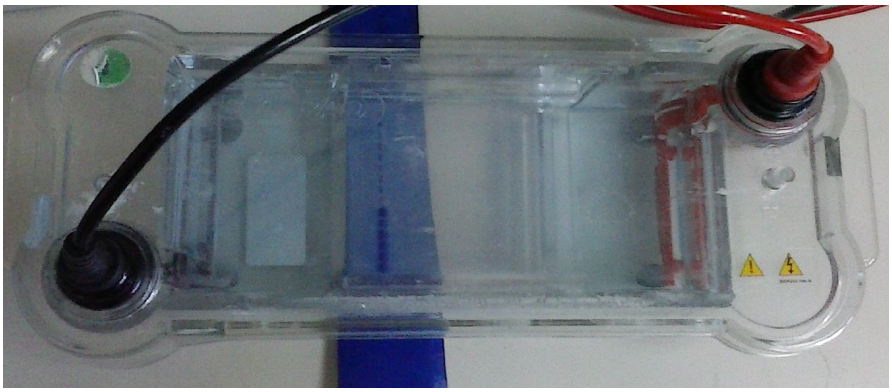
### 3.2.2. Restrikcija i modifikacija DNA

Restrikcijski enzimi, T4 DNA-ligaza i DNA fosfataza korišteni su prema uputama proizvođača.

### 3.2.3. Gel-elektroforeza

U ovome radu korištena je horizontalna agarozna gel-elektroforeza. Korišten je 0,8 % - tni agarozni gel dobiven otapanjem 0,8 g agaroze u 100 mL TBE pufera u tikvici. Kako bi se agaroza u potpunosti otopila u TBE puferu, tikvicu valja zatvoriti i zagrijavati, a kada se otopina razbistri, tikvica se ostavi da se ohladi na oko 60 °C. Ohlađena otopina agaroze ulije se u kadicu za elektroforezu (*Bio-Rad*, SAD) koja se prethodno detaljno očisti, oblijepi samoljepivom trakom i u koju se umetne češljić za tvorbu jažica. Nakon što se gel skrutne, uklone se trake i izvuče češljić, te se kadica stavi u uređaj za elektroforezu u koji se ulije pufer TBE kako bi se prekrio čitavi gel (Slika 3). U svrhu vizualnog praćenja elektroforeze uzorci DNA pomiješaju se s migracijskim bojilom u omjeru 6:1 te se takva smjesa nanese mikropipetom u jažicu gela. U dijagnostičke svrhe elektroforeza se u ovom radu provodila pri naponu od 70 V u vremenu od oko 1 sat, a u preparativne svrhe postupak elektroforeze se provodio pri naponu 10 do 40 V kroz 10 do 16 sati. Nakon završene elektroforeze, gel se

inkubira u otopini etidijevog bromida 15 do 20 min, osvijetli UV svjetlošću na transiluminatoru i fotografira kroz crveni filtar.



**Slika 3.** Kadica za gel-elektroforezu proizvođača *Bio-Rad.* Uzorci DNA naneseni su u jažice mikropipetom.

### 3.2.4. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Nakon provedene preparativne gel-elektroforeze, vrpca DNA izreže se iz gela pomoću špatule i stavi u eppendorf kivetu (mikrokivetu) od 1,5 mL te se u mikrokivetu ulije pufer QX1 čiji volumen ovisi o veličini fragmenta DNA koji se želi izolirati iz gela. Za fragmente DNA veličine 100 pb do 4 kb dodaje se 3 volumena pufera QX1 u odnosu na volumen izrezanog gela (gel se izvaže te se uzima da je masa od 1 g jednaka volumenu od 1 mL). Potom se u mikrokivetu doda suspenzija kuglica QIAEX II (10 µL za masu DNA $\leq$ 2 µg) i promiješa mikropipetom. Dobivena suspenzija inkubira se 10 minuta na temperaturi od 50 °C uz povremeno miješanje na vorteksu kako bi se agarozni gel u potpunosti otopio te se zatim centrifugira 3 minute na 5000 okretaja $min^{-1}$. Nakon centrifugiranja odbacuje se supernatant, dodaje 500 µL pufera QX1 u mikrokivetu i resuspendira talog mikropipetom. Potom se ova suspenzija centrifugira 3 minute na 5000 okretaja $min^{-1}$. Nakon centrifugiranja odlije se supernatant, doda 500 µL pufera PE uz resuspendiranje taloga mikropipetom te se još jednom centrifugira i odlije supernatant nakon završetka centrifugiranja (dodavanje pufera PE, centrifugiranje i odlijevanje supernatanta ponavlja se još jednom). Talog koji je ostao u mikrokiveti nakon zadnjeg centrifugiranja suši se na zraku dok ne poprimi bijelu boju te se zatim u mikrokivetu dodaje 20 µL pufera TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH=8) ili vode kako bi eluirali DNA sa kuglica. Dobivena suspenzija inkubira se 5 minuta na sobnoj temperaturi (fragmenti DNA $\leq$ 4 kb) ili 5 minuta na 50 °C (fragmenti DNA veličine 4 do 10 kb). Nakon inkubacije, suspenzija se centrifugira 3 minute na 5000 okretaja $min^{-1}$ i supernatant, u kojem se nalazi pročišćena DNA, se otpipetira mikropipetom u čistu mikrokivetu.

### 3.2.5. Taloženje DNA amonijevim acetatom i etanolom

Određenom volumenu otopine DNA doda se 1/3 volumena amonijeva acetata (8,0 M) i 8/3 volumena apsolutnog etanola i ostavi 4 do 16 sati na temperaturi od -20 °C. Zatim slijedi centrifugiranje pripremljene otopine 20 minuta na 11000 okretaja $min^{-1}$ pri temperaturi od 4 °C. Supernatant se odlije te se zaostale kapljice u mikrokiveti odsišu vakuum sisaljkom. Talog DNA se suši u blizini plamenika nakon čega se u mikrokivetu doda željeni volumen sterilne deionizirane vode ili pufera TE i ostavi 20 minuta na 70 °C kako bi se talog DNA otopio.

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

#### 3.2.6.1. Priprema kompetentnih stanica

Jednom kolonijom bakterije *Escherichia coli* nacijepi se 500 mL tekuće hranjive podloge te se kultura inkubira na tresilici pri 300 okretaja $min^{-1}$ i 37 °C do trenutka kada $OD_{600}$ suspenzije dosegne vrijednost 0,5 do 0,7. Od ovog koraka nadalje sve manipulacije koje uključuju stanice provode se na ledu te se koriste ohlađene otopine. Suspenzija stanica se centrifugira 15 minuta na 4000 okretaja $min^{-1}$ i 4 °C, nakon čega se talog ispire u hladnom 10 % -tnom glicerolu, najprije u volumenu od 500 mL, zatim u volumenu od 250 mL i naposljetku u volumenu od 20 mL. Pelet stanica resuspendira se u 1 do 2 mL hladnog 10 %-tnog glicerola, a suspenzija stanica se razdijeli u alikvote volumena 40 µL koji se pohrane na temperaturu od -70 °C.

#### 3.2.6.2. Elektroporacija

Neposredno prije elektroporacije zaleđena suspenzija stanica se otopi na ledu te se doda 1 do 2 µL DNA otopljene u puferu male ionske jakosti. Nakon toga, suspenzija se promiješa mikropipetom, ostavi na ledu 1 minutu i prenese u prethodno na ledu ohlađenu kivetu za elektroporaciju. Kiveta se umetne u elektroporator i kroz nju se provede visokovoltažni puls od 2,5 kV u trajanju od 5 milisekundi nakon kojeg se suspenzija stanica brzo prenese u 1 mL medija SOC i promiješa mikropipetom. Suspenzija elektroporiranih stanica ostavi se 1 sat u tresilici koja rotira brzinom od 300 okretaja $min^{-1}$ pri 37 °C. Nakon inkubacije 50 µL suspenzije nacijepi se na krutu LB hranjivu podlogu s ampicilinom. Preostalih 950 µL suspenzije centrifugira se 5 minuta na 3000 okretaja $min^{-1}$, nakon centrifugiranja odbaci se 600 µL supernatanta te se talog resuspendira mikropipetom i nacijepi na osušenu LB hranjivu podlogu s ampicilinom. Nacijepljene ploče inkubiraju se dva dana na temperaturi od 37 °C.

### 3.2.7. Izolacija plazmidne DNA iz bakterije *Escherichia coli* (mini-prep)

Alikvot bakterijske kulture volumena 3 mL centrifugira se 1 minutu na 10000 okretaja $min^{-1}$. Supernatant se odbacuje, a talog stanica se otopi u 120 µL hladnog pufera GTE. Suspenzija

stanica se inkubira 2 minute u ledu te se zatim u suspenziju dodaju 240 µL hladnog NaOH/SDS i 360 µL hladnog kalijevog acetata (nakon svakog koraka suspenzija se promiješa okretanjem mikrokivete). Zatim se suspenzija hladi na ledu 10 minuta i centrifugira 10 minuta na 11000 okretaja $min^{-1}$ i 4 °C. Talog proteina se odbacuje, a dio supernatanta volumena 650 µL odvaja se u praznu mikrokivetu te se miješa s 390 µL izopropanola okretanjem mikrokivete. Otopina se centrifugira 20 minuta na 10000 okretaja $min^{-1}$ i 4 °C, nakon čega se odlije supernatant. Vakuum sisaljkom se odsiše ostatak supernatanta iz mikrokivete te se talog stanica suši uz plamenik 10 do 15 minuta. Potom se u mikrokivetu dodaje 200 µL pufera TE s RN-azom i ostavi 5 minuta na temperaturi od 70 °C. Suspenzija stanica se promiješa mikropipetom i ponovno ostavi 5 minuta na 70 °C kako bi se talog stanica u potpunosti otopio. Nakon što se talog stanica otopi, u mikrokivetu se dodaje 67 µL amonijevog acetata i 540 µL etanola te promiješa okretanjem mikrokivete. DNA se taloži na temperaturi od 4 °C tijekom 3 sata te se zatim suspenzija centrifugira 20 minuta na 10000 okretaja $min^{-1}$ i 4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant se odbaci i zaostale kapljice u mikrokiveti uklone pomoću vakuum sisaljke. Zatim se talog DNA suši uz plamenik 10 do 15 minuta i otopi u 30 µL pufera TE.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

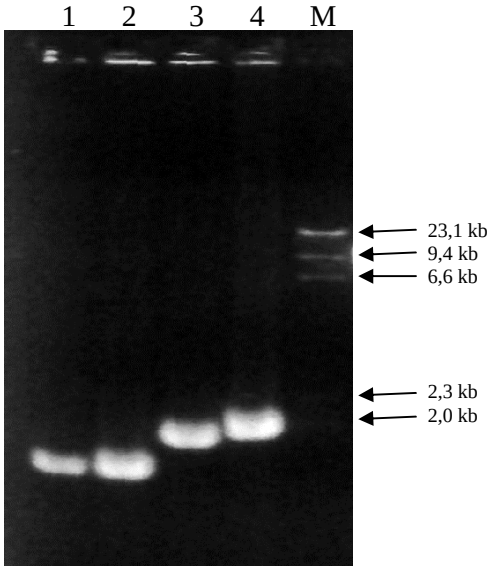
Cilj ovog rada bio je klonirati gene *ATR1, FLR1* i *YAP1* u plazmid pSP-G2 te gen *GSH1* u plazmid pSP-G2-AC. Navedeni geni umnoženi su lančanom reakcijom polimerazom iz genoma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj UWOPS87-2421 (poglavlje 3.2.1.). Potom su umnoženi geni ligirani s odgovarajućim vektorima, što je rezultiralo odgovarajućim plazmidima (Tablica 3.). Detaljan postupak kloniranja gena *ATR1, FLR1, YAP1* i *GSH1*, odnosno konstrukcije plazmida pSP-FLR1, pSP-ATR1, pSP-YAP1 i pSP-G2-AC-GSH1 opisan je u poglavljima 4.1. i 4.2., a za provjeru uspješnosti kloniranja gena i konstrukcije navedenih plazmida provedena je restrikcijska analiza opisana u poglavlju 4.3.

**Tablica 3.** Odgovarajući vektori i inserti korišteni za konstrukciju plazmida

| VEKTOR | INSERT | PLAZMID |
|---|---|---|
| pSP-G2 | gen *ATR1* | pSP-ATR1 |
| pSP-G2 | gen *FLR1* | pSP-FLR1 |
| pSP-G2 | gen *YAP1* | pSP-YAP1 |
| pSP-G2-AC | gen *GSH1* | pSP-G2-AC-GSH1 |

### 4.1. Umnažanje gena *FLR1, ATR1, YAP1* i *GSH1* metodom PCR-a

Geni *FLR1, ATR1, YAP1* i *GSH1* umnoženi su lančanom reakcijom polimerazom kao što je opisano u poglavlju 3.2.1., a kao kalup za sintezu DNA korištena je genomska DNA kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj UWOPS87-2421 koja je već prethodno bila izolirana. U svrhu provjere uspješnosti umnažanja navedenih gena lančanom reakcijom polimerazom provedena je gel-elektroforeza u 0,8%-tnom agaroznom gelu (Slika 4.).




**Slika 4.** Provjera uspješnosti umnažanja gena *FLR1, ATR1, YAP1* i *GSH1* lančanom reakcijom polimerazom. 1 - gen *ATR1*; 2 - gen *FLR1*; 3 - gen *YAP1*; 4 - gen *GSH1;* M - DNA bakteriofaga λ pocijepana s *Hind*III korištena kao standard

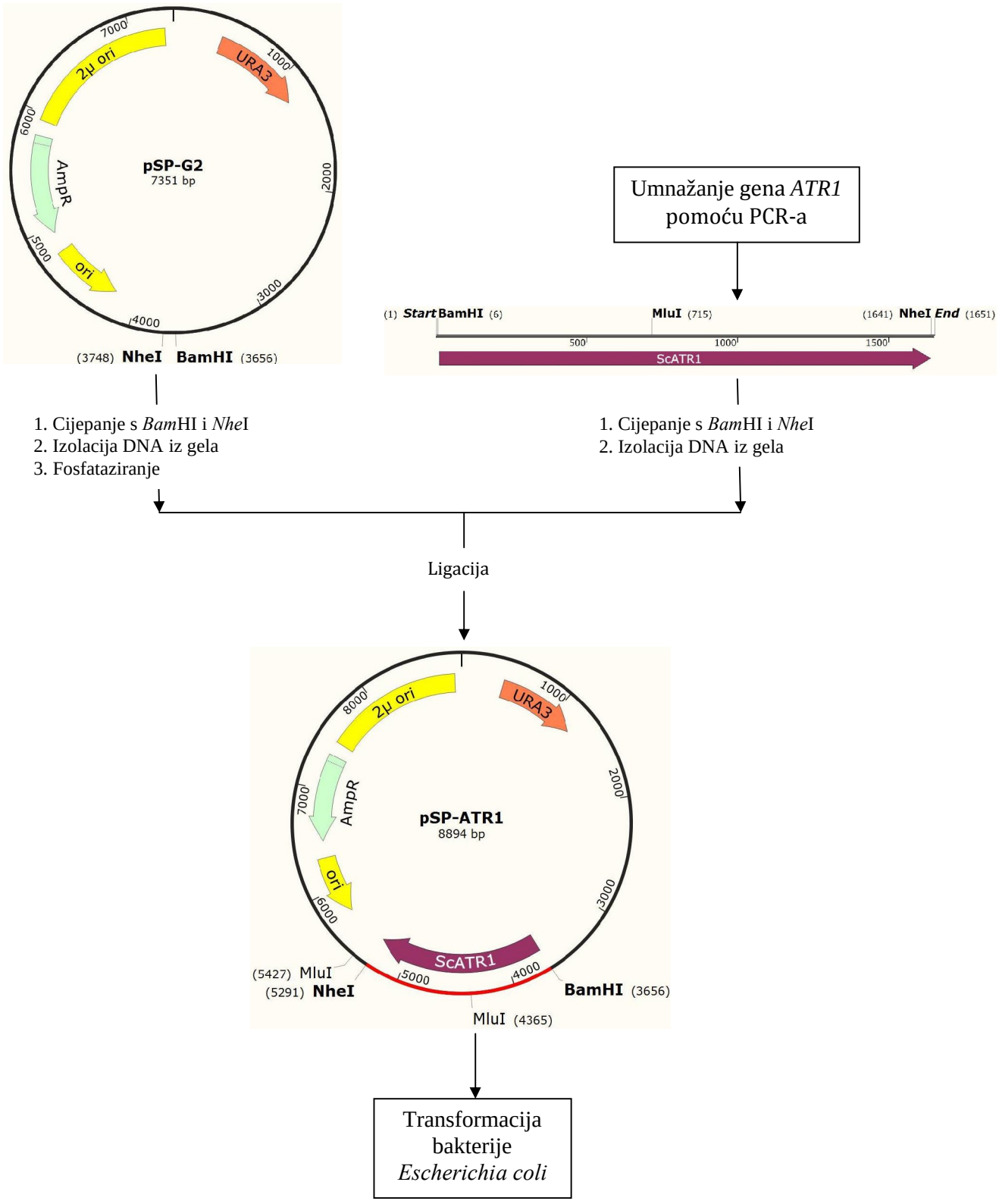
Iz rezultata prikazanih na slici 4. vidi se da su sva 4 umnožena fragmenta (*ATR1* (1650 bp), *FLR1* (1671 bp), *YAP1* (1979 bp) i *GSH1* (2064 bp)) imala odgovarajuću veličinu i na temelju toga se može zaključiti da su geni uspješno umnoženi lančanom reakcijom polimerazom.

### 4.2. Kloniranje gena *ATR1, FLR1, YAP1* i *GSH1*

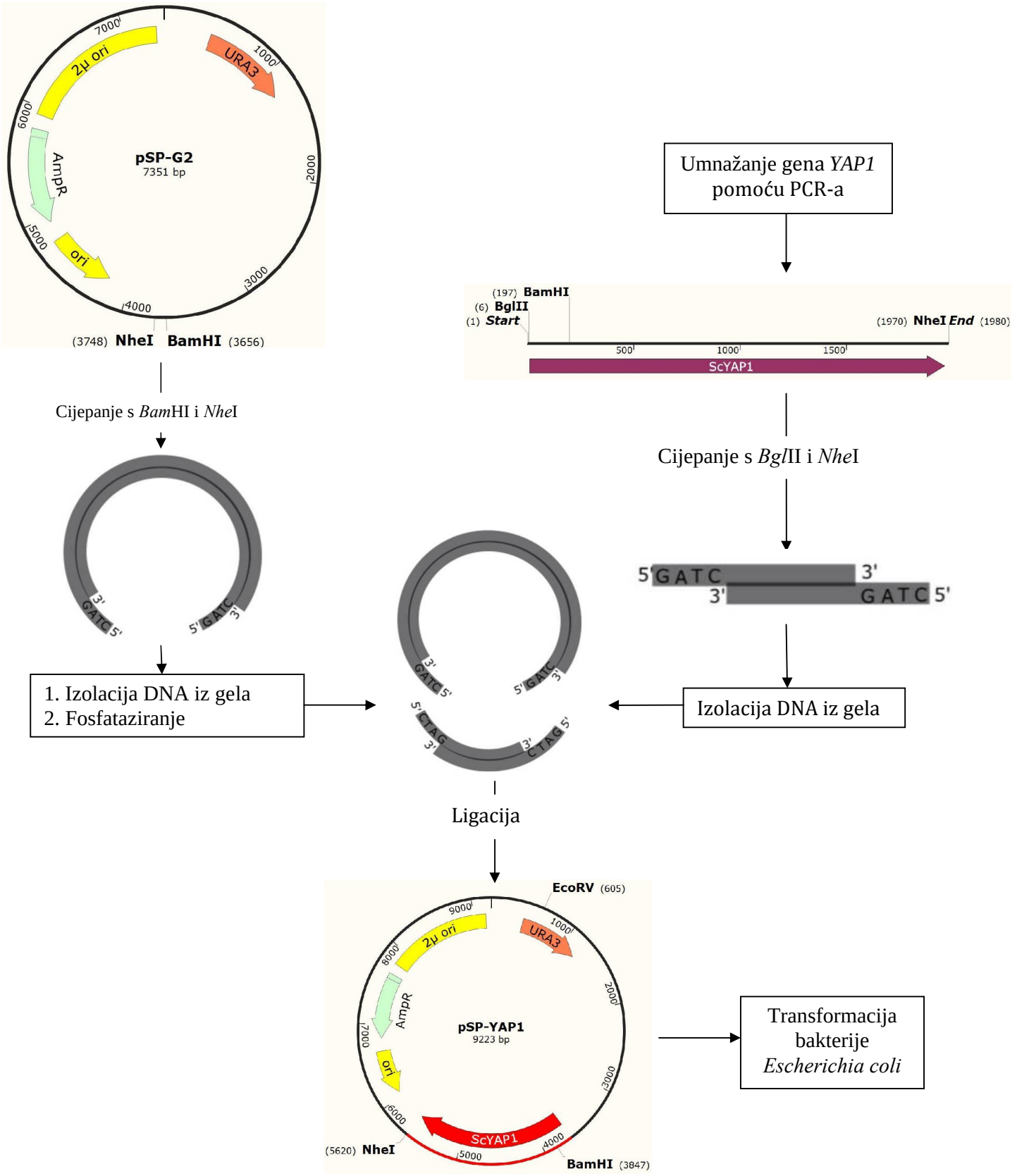
Geni *ATR1, FLR1, YAP1* klonirani su u vektor pSP-G2, a gen *GSH1* kloniran je u vektor pSP-G2-AC (Tablica 3.). Kloniranje gena *ATR1* prikazano je na slici 5.; vektor pSP-G2 pocijepan je restrikcijskim enzimima *Bam*HI i *Nhe*I što je rezultiralo lineariziranim vektorom veličine 7259 parova baza. Uspješnost cijepanja vektora restrikcijskim enzimima provjerena je gel-elektroforezom (Slika 9.). Gen *ATR1* umnožen je lančanom reakcijom polimerazom (provjera uspješnosti umnažanja gena PCR-om prikazana je na slici 4.) te je pocijepan restrikcijskim enzimima *Bam*HI i *Nhe*I. DNA vektora i inserta izolirana je iz gela (Slika 10.) te su lineariziranom vektoru pSP-G2 DNA fosfatazom uklonjene fosfatne grupe sa 5'-krajeva. Potom su vektor pSP-G2 i gen *ATR1* ligirani pomoću T4 DNA-ligaze, a ligacijskom smjesom transformirana je bakterija *Escherichia coli*. Kloniranje gena *FLR1, YAP1* i *GSH1* napravljeno je analognim postupkom, no korišteni su drugi restrikcijski enzimimi za cijepanje vektora i inserata (Tablica 4.). Kloniranje gena *YAP1* prikazano je na slici 6.; kloniranje gena *GSH1* prikazano je na slici 7., a kloniranje gena *FLR1* prikazano je na slici 8. Pojedini koraci u kloniranju detaljno su objašnjeni u nastavku.

**Tablica 4.** Restrikcijski enzimi korišteni za cijepanje vektora i inserata u provedenim kloniranjima.

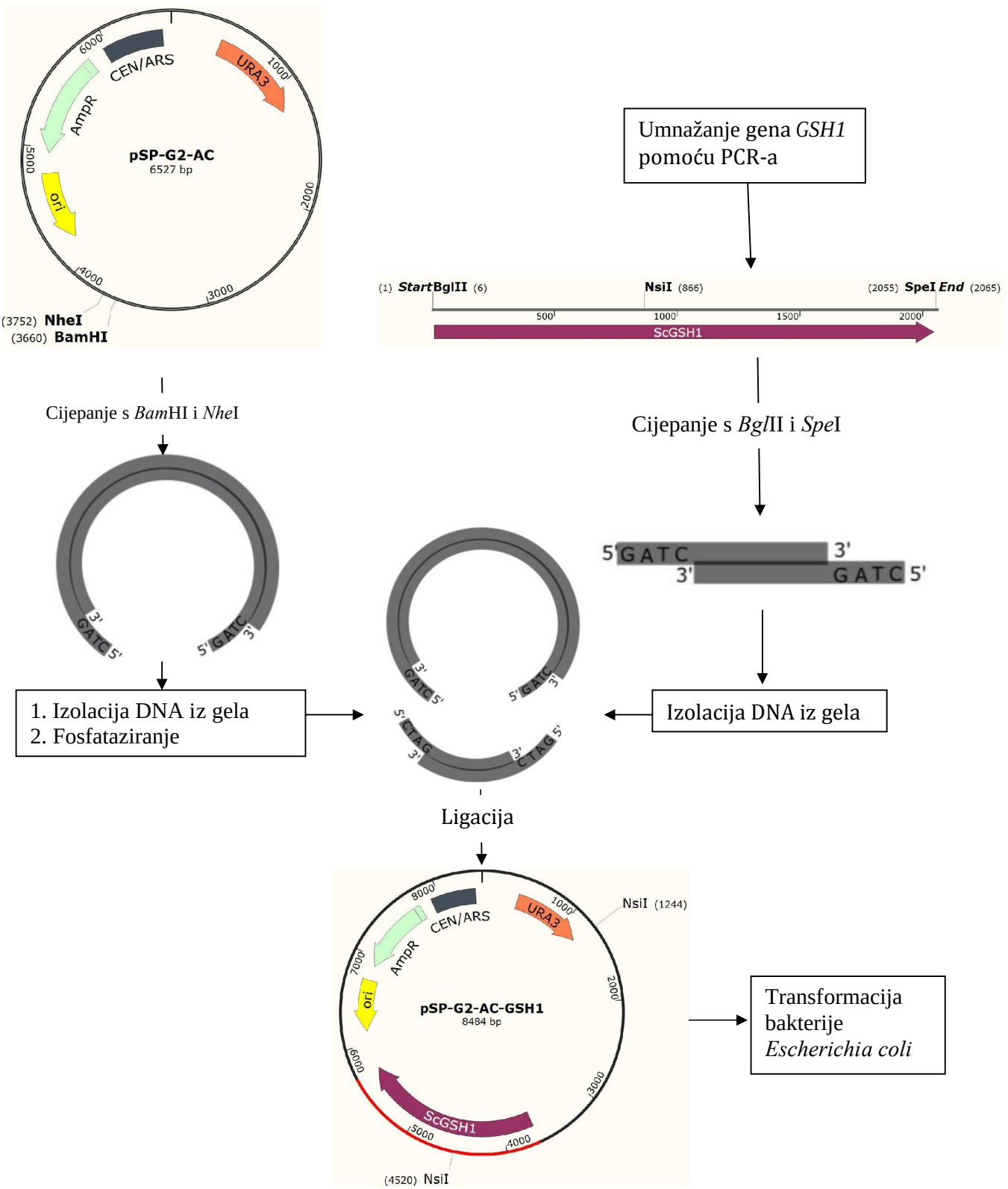
| | Restrikcijski enzimi korišteni za cijepanje vektora | Restrikcijski enzimi korišteni za cijepanje inserta |
|---|---|---|
| Kloniranje gena *ATR1* | *Bam*HI i *Nhe*I | *Bam*HI i *Nhe*I |
| Kloniranje gena *FLR1* | *Not*I i *Sac*I | *Not*I i *Sac*I |
| Kloniranje gena *YAP1* | *Bam*HI i *Nhe*I | *Bgl*II i *Nhe*I |
| Kloniranje gena *GSH1* | *Bam*HI i *Nhe*I | *Bgl*II i *Spe*I |



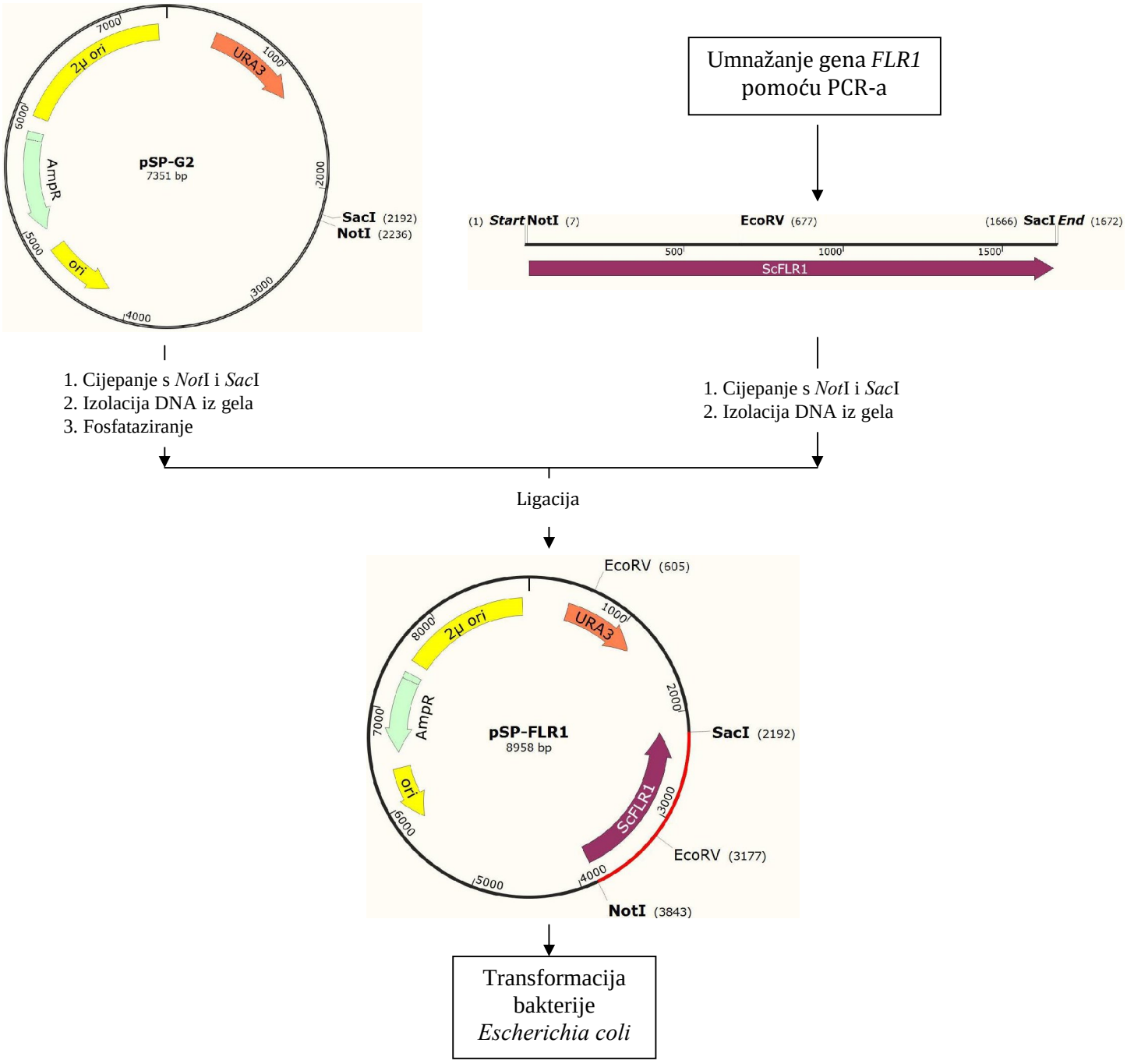

**Slika 5.** Shematski prikaz postupka kloniranja gena *ATR1* u vektor pSP-G2. Označene su regije DNA i restrikcijska mjesta relevantna za ovaj rad.




**Slika 6.** Shematski prikaz postupka kloniranja gena *YAP1* u vektor pSP-G2. Označene su regije DNA i restrikcijska mjesta relevantna za ovaj rad.



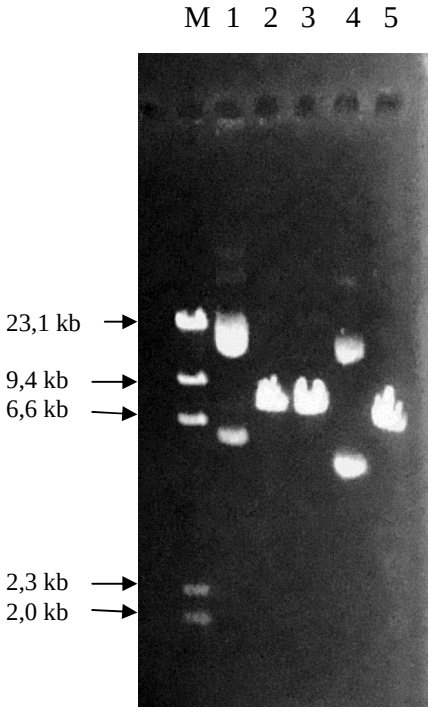

**Slika 7.** Shematski prikaz postupka kloniranja gena *GSH1* u vektor pSP-G2-AC. Označene su regije DNA i restrikcijska mjesta relevantna za ovaj rad.




**Slika 8.** Shematski prikaz postupka kloniranja gena *FLR1* u vektor pSP-G2. Označene su regije DNA i restrikcijska mjesta relevantna za ovaj rad.

Kloniranje gena *ATR1, FLR1, YAP1* i *GSH1* započeto je cijepanjem vektora i inserata restrikcijskim enzimima kao što je navedeno u tablici 4. Kako bi provjerili uspješnost cijepanja vektora restrikcijskim enzimima provedena je gel-elektroforeza u 0,8 %-tnom agaroznom gelu (Slika 9.). Uspješnost cijepanja inserata restrikcijskim enzimima nije provjeravana gel-

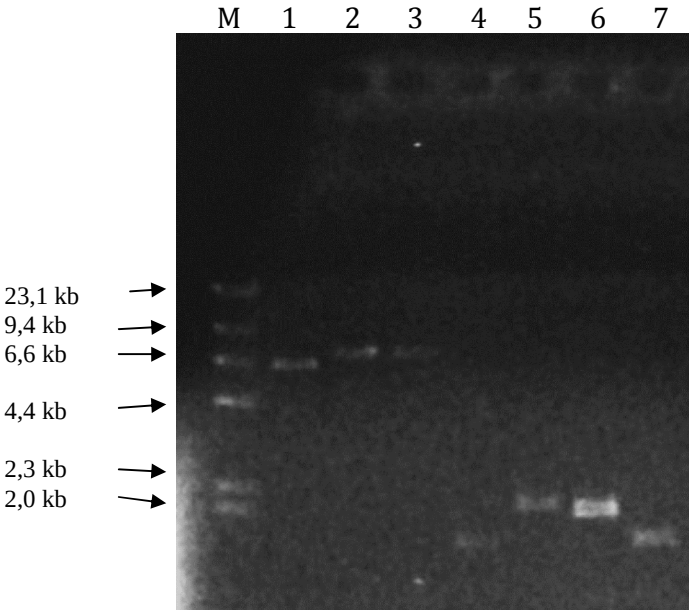
elektroforezom u agaroznom gelu jer promjena u veličini inserata nakon cijepanja restrikcijskim enzimima nije bila dovoljna da bi se vidjela na agaroznom gelu.




**Slika 9.** Provjera uspješnosti cijepanja vektora pSP-G2 restrikcijskim enzimima *Bam*HI i *Not*I te provjera uspješnosti cijepanja vektora pSP-G2-AC restrikcijskim enzimom *Bam*HI. M - DNA bakteriofaga λ pocijepana s *Hind*III; 1 - kružni vektor pSP-G2; 2 - vektor pSP-G2 pocijepan s *Bam*HI; 3 - vektor pSP-G2 pocijepan s *Not*I; 4 - kružni vektor pSP-G2-AC; 5 - vektor pSP-G2-AC pocijepan s *Bam*HI

Iz rezultata prikazanih na slici 9. vidi se da su veličine vrpci u jažicama 2 i 3 u skladu s mapom vektora pSP-G2 (Poglavlje 3.1.2., slika 1.). Također, u jažici 5 vidi se jedna vrpca čija je veličina u skladu s mapom vektora pSP-G2-AC (Poglavlje 3.1.2., slika 2.). Iz ovih rezultata može se zaključiti da je cijepanje vektora pSP-G2 restrikcijskim enzimima *Bam*HI i *Not*I i vektora pSP-G2-AC restrikcijskim enzimom *Bam*HI bilo uspješno.

Pocijepani vektori i inserti izolirani su iz agaroznog gela pomoću seta za izolaciju DNA iz gela QIAEX II Gel Extraction Kit kao što je opisano u poglavlju 3.2.4. Uspješnost izolacije provjerena je gel-elektroforezom u 0,8 %-tnom agaroznom gelu (Slika 10.).




**Slika 10.** Provjera uspješnosti izolacije DNA iz agaroznog gela. M - DNA bakteriofaga lambda pocijepana s *Hind*III; 1 - vektor pSP-G2-AC pocijepan s *Bam*HI i *Nhe*I; 2 - vektor pSP-G2 pocijepan s *Bam*HI i *Nhe*I; 3 - vektor pSP-G2 pocijepan s *Not*I i *Sac*I; 4 - gen *FLR1* pocijepan s *Not*I i *Sac*I; 5 - gen *GSH1* pocijepan s *Bgl*II i *Spe*I; 6 - gen *YAP1* pocijepan s *Bgl*II i *Nhe*I; 7 - gen *ATR1* pocijepan s *Bam*HI i *Nhe*I.

Iz rezultata prikazanih na slici 10. vidi se da su vektori i inserti uspješno izolirani iz agaroznog gela.

Nakon izolacije iz agaroznog gela, DNA je istaložena te su vektori tretirani FastAP DNA fosfatazom koja uklanja fosfatne skupine sa 5'-kraja linearnih molekula DNA te na taj način onemogućava religaciju vektora nakon dodatka DNA-ligaze. Defosforilacija vektora provodila se 10 minuta na 37 °C u PCR uređaju, a potom je fosfataza inaktivirana povišenjem temperature na 75 °C i održavanjem ove temperature tijekom 5 minuta.

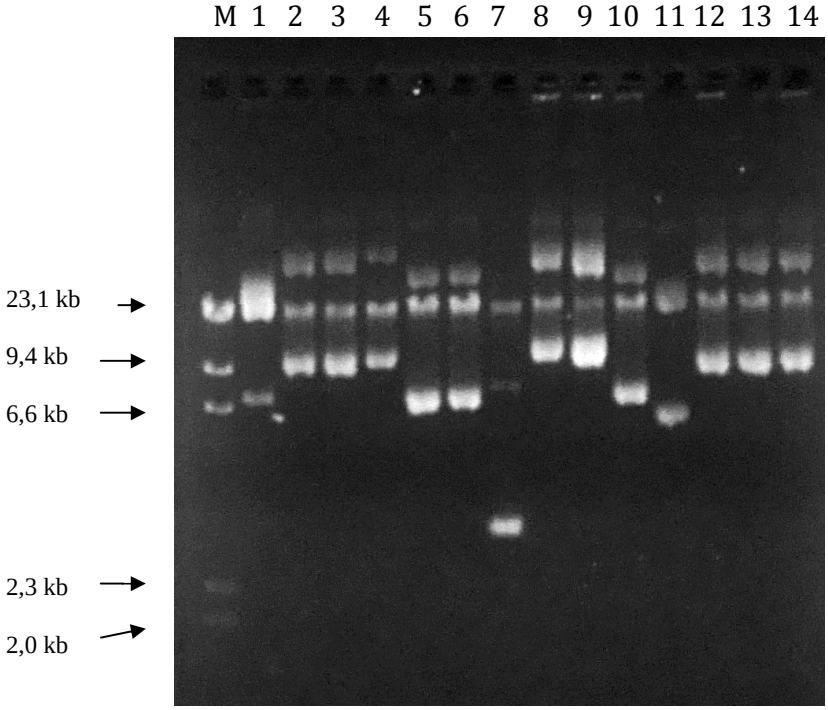
Odgovarajući vektori i inserti ligirani su T4 DNA-ligazom na način kao što je prikazano u tablici 3. Potom je ligacijskim smjesama transformirana bakterija *Escherichia coli* metodom elektroporacije (Poglavlje 3.2.6.). Transformanti su selekcionirani na podlozi s ampicilinom, a rezultati transformacije prikazani su u tablici 5.

**Tablica 5.** Rezultati transformacije bakterije *Escherichia coli* ligacijskim smjesama

| | Transformacija s pSP-ATR1 | Transformacija s pSP-YAP1 | Transformacija s pSP-FLR1 | Transformacija s pSP-G2-AC-GSH1 |
|---|---|---|---|---|
| Broj naraslih transformanata | 23 | 55 | 3 | 3 |

### 4.3. Restrikcijska analiza konstruiranih plazmida

U svrhu provjere uspješnosti konstrukcije plazmida provedena je restrikcijska analiza. Od svakog transformanta bakterije *Escherichia coli* 3 kolonije su uzete za daljnju analizu. Svaka kolonija uzgojena je u tekućoj podlozi i iz njih je izolirana plazmidna DNA (Poglavlje 3.2.7.). Kružni plazmidi prije restrikcije podvrgnuti su gel-elektroforezi kako bi se provjerila uspješnost izolacije plazmidne DNA iz transformanata bakterije *Escherichia coli* (Slika 11.)



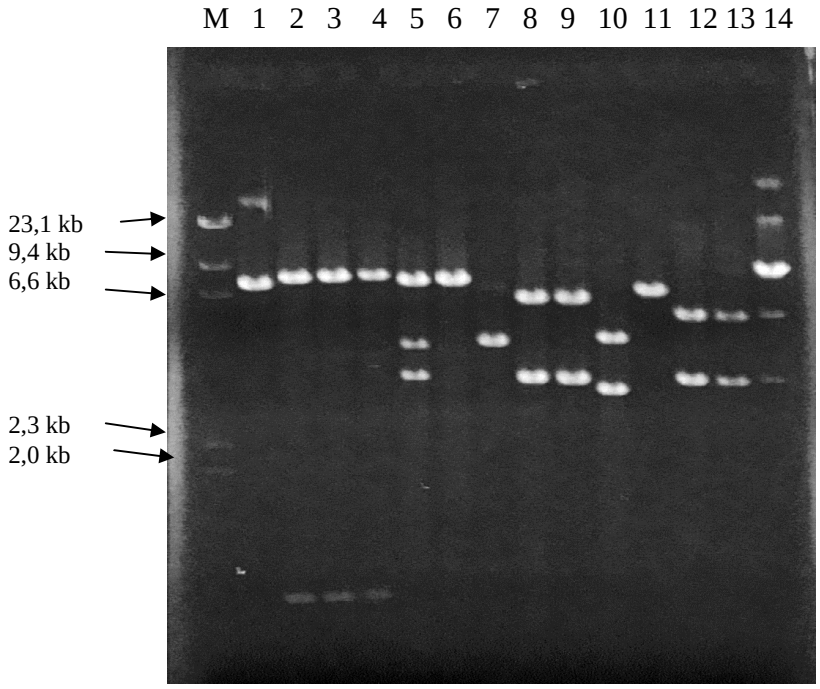

**Slika 11.** Provjera uspješnosti izolacije kružnih plazmida iz transformanata bakterije *Escherichia coli.* M - DNA bakteriofaga lambda pocijepana s *Hind*III; 1 – vektor pSP-G2; 2,3 i 4 - plazmid pSP-ATR1; 5,6 i 7 – plazmid pSP-FLR1; 8,9 i 10 – plazmid pSP-YAP1; 11 - vektor pSP-G2-AC; 12,13 i 14 - plazmid pSP-G2-AC-GSH1

Iz rezultata na slici 11. vidi se da je izolacija plazmidne DNA uspješno obavljena. Može se zaključiti da plazmidi koji se nalaze u jažicama 2, 3 i 4 vjerojatno sadrže insert *ATR1* jer su veći od vektora pSP-G2. Plazmidi koji se nalaze u jažicama 5 i 6 vjerojatno ne sadrže insert *FLR1* jer je njihova veličina približno jednaka veličini vektora pSP-G2, a isto se može zaključiti i za plazmid u jažici 7 koji je manji od vektora pSP-G2. U jažicama 8 i 9 nalaze se plazmidi koji vjerojatno sadrže insert *YAP1* jer su veći od vektora pSP-G2, dok je u jažici 10 plazmid čija je veličina jednaka veličini vektora pSP-G2 pa vjerojatno ne sadrži insert *YAP1*. U jažicama 12, 13 i 14 nalaze se plazmidi koji su veći od vektora pSP-G2-AC pa se može zaključiti da vjerojatno sadrže insert *GSH1*.

Restrikcijska analiza provedena je da bi provjerili uspješnost konstrukcije plazmida pSP-ATR1, pSP-FLR1, pSP-YAP1 i pSP-G2-AC-GSH1. Za analizu su uzeti svi izolirani plazmidi navedeni na slici 11., a restrikcijska analiza provedena je u skladu s tablicom 6. Položaji restrikcijskih mjesta na plazmidima prikazani su na slici 5 (pSP-ATR1), slici 6 (pSP-YAP1), slici 7 (pSP-G2-AC-GSH1) i slici 8 (pSP-FLR1). Kako bi se provjerila uspješnost cijepanja konstruiranih plazmida restrikcijskim enzimima, provedena je gel-elektroforeza na 0,8%-tnom agaroznom gelu (Slika 12.).

**Tablica 6.** Upotrijebljeni restrikcijski enzimi za restrikcijsku analizu konstruiranih plazmida. Prikazane su veličine fragmenata koji nastaju cijepanjem plazmida odgovarajućim restrikcijskim enzimom.

| | Plazmid pSP-ATR1 | Plazmid pSP-YAP1 | Plazmid pSP-FLR1 | Plazmid pSP-G2-AC-GSH1 |
|---|---|---|---|---|
| Upotrijebljeni restrikcijski enzimi | *Mlu*I | *Bam*HI i *Eco*RV | *Eco*RV | *Nsi*I |
| Veličine fragmenata koji nastaju (bp) | 1062 + 7832 | 3242 + 5981 | 2572 + 6386 | 3276 + 5204 |




**Slika 12.** Rezultati restrikcijske analize konstruiranih plazmida. M - DNA bakteriofaga lambda pocijepana s *Hind*III; 1 - kružni vektor pSP-G2; 2,3 i 4 – plazmid pSP-ATR1 pocijepan s *Mlu*I; 5,6 i 7 – plazmid pSP-FLR1 pocijepan s *Eco*RV; 8,9 i 10 – plazmid pSP-YAP1 pocijepan s *Bam*HI i *Eco*RV; 11 - kružni vektor pSP-G2-AC; 12,13 i 14 - plazmid pSP-G2-AC-GSH1 pocijepan s *Nsi*I

U jažicama 2, 3 i 4 vidljive su dvije vrpce. Njihova veličina može se procijeniti prema standardu i iznosi 7,8 kb i 1,0 kb što je u skladu s očekivanim veličinama fragmenata navedenim u tablici 6. te se može zaključiti da je plazmid pSP-ATR1 uspješno konstruiran. U jažicama 5, 6 i 7 vide se vrpce čija veličina nije u skladu s očekivanim veličinama fragmenata koji nastaju cijepanjem plazmida pSP-FLR1 restrikcijskim enzimom *Eco*RV (Tablica 6.) te se može zaključiti da plazmid pSP-FLR1 nije konstruiran. Cijeli postupak je ponovljen i gen *FLR1* je uspješno kloniran (nije prikazano u ovom radu). U jažicama 8 i 9 vide se dvije vrpce čije veličine, usporedbom sa standardom, iznose 6,3 kb i 3,4 kb što je u skladu s očekivanim veličinama fragmenata (Tablica 6.) te slijedi zaključak da je plazmid pSP-YAP1 konstruiran. U jažici 10 ne nalaze se fragmenti očekivanih veličina te u ovom slučaju gen *YAP1* nije uspješno ukloniran u vektor pSP-G2. U jažicama 12, 13 i 14 vide se dva fragmenta veličine 5,4 kb i 3,3 kb što odgovara očekivanim veličinama (Tablica 6.) te se može zaključiti da je konstrukcija plazmida pSP-G2-AC-GSH1 uspješno obavljena. U jažici 14 restrikcijski enzim *Nsi*I nije pocijepao sve plazmidne molekule DNA te se može vidjeti i neporezani kružni plazmid pSP-G2-AC-GSH1.

## 5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Iz genoma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* soj UWOPS87-2421 lančanom reakcijom polimerazom umnoženi su geni *ATR1*, *FLR1*, *YAP1* i *GSH1.*
2. Geni *ATR1*, *YAP1* i *GSH1* uspješno su klonirani i pohranjeni u plazmidni vektor u bakteriji *Escherichia coli.*

## 6. LITERATURA


Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Chang, S.Y., Landre, P.A., Abramson, R.D., Gelfand, D.H. (1993) High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length Thermus aquaticus DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl.* **2** (4), 275–87.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., i sur. (2000) Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman, Section 7.1, DNA Cloning with Plasmid Vectors [online], http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21498/. Pristupljeno 25. svibnja 2015.

Del Solar, G., Espinosa, M. (2000) Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol. Microbiol*. **37**, 492-500.

Langley, K.E., Villarejo, M.R., Fowler, A.V., Zamenhof, P.J., Zabin, I. (1975) Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **72** (4), 1254–1257.

Wilson, R.H., Morton, S.K., Deiderick, H., Gerth, M.L., Paul, H.A., Gerber, I., Patel, A., Ellington, A.D., Hunicke-Smith, S.P., Patrick, W.M. (2013) Engineered DNA ligases with improved activities in vitro. *Protein Eng Des Sel*., **26**(7), 471-8.

Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science (New York, N.Y.)* **277** (5331), 1453–62.

Roberts, R.J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A.S., Bickle, T.A., Bitinaite, J., Blumenthal, R.M., Degtyarev, S.K., Dryden, D.T.F., Dybvig, K., Firman, K., Gromova, E.S., Gumport, R.I., Halford, S.E., Hattman, S., Heitman, J., Hornby, D.P., Janulaitis, A., Jeltsch, A., Josephsen, J., Kiss, A., Klaenhammer, T.R., Kobayashi, I., Kong, H., Krüger, D.H., Lacks, S., Marinus, M.G., Miyahara, M., Morgan, R.D., Murray, N.E., Nagaraja, V., Piekarowicz, A., Pingoud, A., Raleigh, E., Rao, D.N., Reich, N., Repin, V.E., Selker, E.U., Shaw, P.-C., Stein, D.C., Stoddard, B.L., Szybalski, W., Trautner, T.A., Van Etten, J.L., Vitor, J.M.B., Wilson, G.G., Xu, S. (2003) A

nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* 31, 1805–1812.

Shuman, S. (2009) DNA Ligases: Progress and Prospects. *J. Biol. Chem.* 284 (26), 17365–17369.

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

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.

Ullmann, A., Jacob, F., Monod, J. (1968) On the subunit structure of wild-type versus complemented beta-galactosidase of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 32 (1), 1–13.

Singleton, P. (1999) Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine. 5th Edition, Wiley, Hoboken, 444-454.

Olmsted III, J., Kearns, D.R. (1977) Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry* ***16*** (16), 3647-3654.

Cheng, S., Chang, S.Y., Gravitt, P., Respess, R. (1994) Long PCR. *Nature* **369**, 684-685.

Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., … Louis, E.J. (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*, **458**(7236), 337–341.

Cubillos, F.A., Louis, E.J., Liti, G. (2009) Generation of a large set of genetically tractable haploid and diploid *Saccharomyces* strains. *FEMS Yeast Research*, **9**, 1217–1225.

Jackson, D.A., Symons, R.H., Berg, P. (1972) Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **69**(10), 2904–2909.

Gibson, D.G., Glass, J.I., Lartigue, C., Noskov, V.N., Chuang, R.Y., Algire, M.A., Benders, G.A., Montague, M.G., Ma, L., Moodie, M.M., Merryman, C., Vashee, S., Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E.A., Young, L., Qi, Z.Q., Segall-Shapiro, T.H., Calvey, C.H., Parmar, P.P., Hutchison, 3rd, C.A., Smith, H.O., Venter, J.C. (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* **329**(5987), 52–56.

Alriksson, B., Horváth, I.S., Jönsson, L.J. (2010) Overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor and multidrug resistance genes conveys enhanced resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitors, *Process Biochemistry* **45** (2), 264-271.

Ask, M., Mapelli, V., Höck, H., Olsson, L., Bettiga, M. (2013) Engineering glutathione biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* increases robustness to inhibitors in pretreated lignocellulosic materials. *Microbial Cell Factories* **12**, 87.

Adang, M. J. (1991) *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: gene structure, action, and utilization. *Biotechnology for biological control of pests and vectors*, 3-24.

Gelernter, W.D. (1990) Targeting insecticide-resistant markets: new developments in microbial-based products. *ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)*.

Primrose, S.B., Twyman, R. (2006) Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7. izd., Wiley-Blackwell, Oxford.

Gellert, M., Little, J.W., Oshinsky, C.K., Zimmerman, S.B. (1968) Joining of DNA Strands by DNA Ligase of *E. coli*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **33**, 21–26.