



MARJANCA  
STARČIČ ERJAVEC

DARJA  
ŽGUR-BERTOK

**TEORETIČNE OSNOVE  
IN NAVODILA ZA VAJE  
PRI PREDMETU  
MOLEKULSKA  
BIOLOGIJA  
GENOV**

**Izdajatelj**

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Teoretične osnove in navodila za vaje pri predmetu molekulska biologija genov

Ljubljana, 2017

**Avtorici**

prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec, Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov

prof. dr. Darja Žgur-Bertok, Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov

**Recenzenta**

prof. dr. Bronislava Črešnar, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

prof. dr. Jože Pungerčar, Institut Jožef Stefan, Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti

**Univerzitetni učbenik je izdan kot e-knjiga (pdf), dostopen preko Repozitorija Univerze v Ljubljani.**

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

577.21(075.8)(076.5)(0.034.2)

STARČIČ Erjavec, Marjanca

Teoretične osnove in navodila za vaje pri predmetu Molekulska biologija genov [Elektronski vir] / Marjanca Starčič Erjavec, Darja Žgur-Bertok. - El. knjiga. - Ljubljana : Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2017

Način dostopa (URL): <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=91484>

ISBN 978-961-6822-42-8 (pdf)

1. Žgur-Bertok, Darja

289822208

**Univerza v Ljubljani  
Biotehniška fakulteta  
Oddelek za biologijo**

**TEORETIČNE OSNOVE  
IN NAVODILA ZA VAJE  
PRI PREDMETU  
MOLEKULSKA  
BIOLOGIJA  
GENOV**

**Marjanca STARČIČ ERJAVEC**

**Darja ŽGUR-BERTOK**

Ljubljana, 2017





## KAZALO VSEBINE

KRATICE IN OKRAJŠAVE.....	9
PREDGOVOR IN ZAHVALA .....	11
BAKTERIJA <i>Escherichia coli</i> .....	13
BAKTERIOFAG P1 .....	15
MOLEKULSKO KLONIRANJE.....	17
GENSKO URAVNAVANJE PRI BAKTERIJAH.....	22
KONJUGACIJA .....	25
TRANSDUKCIJA.....	29
TRANSFORMACIJA.....	31
TRANSPOZICIJA .....	33
KONJUGATIVNA TRANSPOZICIJA .....	36
NAVODILA ZA VARNO DELO PRI VAJAH.....	39
ŠTUDENTSKO SOGLASJE O VARNOSTI .....	41
VAJA 1 – UPORABA MOLEKULSKEGA KLONIRANJA ZA ANALIZE GENOMA: Priprava klonov s promotorji .....	43
VAJA 2 –URAVNAVANJE GENSKEGA IZRAŽANJA: Promotor <i>PtraJ</i> in $\beta$ - galaktozidazni test.....	53
VAJA 3 – URAVNAVANJE GENSKEGA IZRAŽANJA: Plazmid pRK100 in konjugacija .....	58
VAJA 4 - UPORABA TRANSDUKCIJE ZA PRIPRAVO SEVOV Z MINIMALNIMI SPREMEMBAMI: Prenos mutiranega gena med sevi.....	62
TEORETIČNE OZ. RAČUNALNIŠKE NALOGE .....	66
REŠITVE NALOG .....	70
NAVODILA ZA PRIPRAVO KONČNEGA POROČILA .....	74
LABORATORIJSKI PRIROČNIK .....	77
NOMENKLATURA V BAKTERIJSKI GENETIKI .....	77
GOJIŠČA .....	79
ANTIBIOTIKI .....	81
PUFRI IN RAZTOPINE .....	82
KEMIJSKE FORMULE IZBRANIH KEMIČALIJ .....	85
LITERATURA.....	91



## KAZALO SLIK IN TABEL

Slika 1: Risbe strukture molekule DNA .....	11
Slika 2: <i>Escherichia coli</i> in njej odkritelj .....	13
Slika 3: Genom bakterije <i>E. coli</i> .....	14
Slika 4: Fag P1 in njegov odkritelj .....	15
Slika 5: Genom faga P1 .....	15
Slika 6: Shematski prikaz načinov pomnoževanja faga P1 .....	16
Slika 7: Shematski prikaz kloniranja kromosomske DNA z uporabo plazmidnega vektorja .....	17
Slika 8: Shematski prikaz vektorja pUC19 in njegovega poliklonskega mesta .....	18
Slika 9: Shematski prikaz vektorja pAlter-1 .....	19
Slika 10: Shematski prikaz vektorja pCB267 .....	19
Slika 11: Molekularni model strukture restrikcijskega encima EcoRI .....	20
Slika 12: Shematski prikaz genske fuzije <i>lacZ</i> z operonom <i>nif</i> .....	21
Slika 13: Shematski prikaz aktivacije transkripcije z aktivatorji .....	22
Slika 14: Shematski prikaz inaktivacije transkripcije z represorji .....	22
Slika 15: Shematski prikaz uravnavanja izražanja gena z dvokomponentnim sistemom .....	23
Slika 16: Shematski prikaz monocistronske (A) in policistronske (B) mRNA .....	23
Slika 17: Shematski prikaz regulona .....	23
Slika 18: Shematski prikaz laktoznega operona .....	24
Slika 19: Shematski prikaz uravnavanja laktoznega operona .....	24
Slika 20: Shematski prikaz plazmida F in področja <i>tra</i> .....	25
Slika 21: Shematski prikaz nastanka sevov Hfr in F' .....	26
Slika 22: Shematski prikaz konjugacije .....	27
Slika 23: Shematski prikaz naravnega konjugativnega plazmida pRK100 .....	28
Slika 24: Shematski prikaz splošne transdukcije .....	29
Slika 25: Shematski prikaz specializirane transdukcije .....	29
Slika 26: Shematski prikaz transformacije po Gramu pozitivne bakterije .....	31
Slika 27: Shematski prikaz transformacije po Gramu negativne bakterije .....	31
Slika 28: Shematski prikaz vnosa DNA v celico z elektroporacijo .....	32
Slika 29: Shematski prikaz struktur IS in Tn .....	33
Slika 30: Shematski prikaz transpozona Tn10 .....	34
Slika 31: Shematski prikaz transpozona Tn1721 .....	34
Slika 32: Shematski prikaz transpozicije .....	35
Slika 33: Shematski prikaz konjugativnega transpozona Tn916 .....	36
Slika 34: Shematski prikaz konjugativne transpozicije .....	37
Slika 35: Restrikcijski vzorec pMS10 po rezanju v različnih restrikcijskih reakcijah ...	67
Slika 36: Prepoznavna mesta za restrikcijske encime na transpozonu Tn1725 .....	67
Slika 37: Strukturna formula etidijevega bromida .....	85
Slika 38: Strukturna formula EDTA .....	85
Slika 39: Strukturna formula tris .....	85
Slika 40: Strukturna formula tritona X-100 .....	86
Slika 41: Strukturna formula CTAB .....	86
Slika 42: Strukturna formula SDS .....	86
Slika 43: Strukturna formula fenola, kloroforma in izoamil alkohola .....	86
Slika 44: Strukturna formula etanola in izopropanola .....	86
Slika 45: Strukturna formula X-gal .....	87
Slika 46: Strukturna formula X-P .....	87

Slika 47: Strukturna formula IPTG .....	87
Slika 48: Strukturna formula ONPG .....	88
Slika 49: Strukturna formula laktoze .....	88
Slika 50: Strukturna formula ampicilina .....	89
Slika 51: Strukturna formula tetraciklina .....	89
Slika 52: Strukturna formula nalidiksične kisline .....	89
Slika 53: Strukturna formula kloramfenikola .....	89
Slika 54: Strukturna formula streptomicina .....	90
Slika 55: Strukturna formula kanamicina .....	90
Tabela 1: Vektorji in gostitelji .....	18
Tabela 2: Oznake v genotipih sevov, uporabljenih na vajah .....	78
Tabela 3: Kratice, založne in delovne koncentracije antibiotikov .....	81

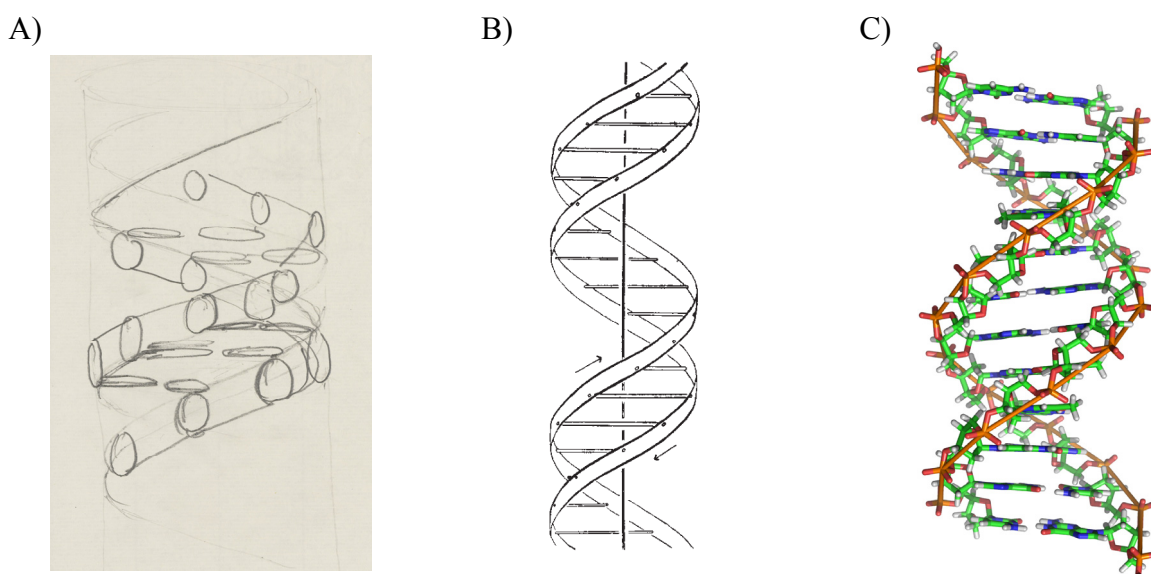
## KRATICE IN OKRAJŠAVE

<b>A</b>	absorbanca
<b>AK</b>	aminokislina
<b>Ap</b>	ampicilin
<b>Bp</b>	bazni par
<b>°C</b>	stopinje Celzija
<b>CTAB</b>	<i>N</i> -cetil- <i>N,N,N</i> -trimetilamonijev bromid
<b>DMF</b>	dimetilformamid
<b>dNTP</b>	deoksiribonukleozid-trifosfat
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EAEC</b>	enteroagregativne bakterije <i>E. coli</i>
<b>EDTA</b>	etilendiamin tetraocetna kislina
<b>EHEC</b>	enterohemoragične bakterije <i>E. coli</i>
<b>EIEC</b>	enteroinvazivne bakterije <i>E. coli</i>
<b>EPEC</b>	enteropatogene bakterije <i>E. coli</i>
<b>ETEC</b>	enterotoksiogene bakterije <i>E. coli</i>
<b>EtOH</b>	etanol
<b>ExPEC</b>	zunajčrevesni patogeni sevi <i>E. coli</i> (angleško » <b>extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i></b> «)
<b>FKI</b>	fenol, kloroform, izoamil alkohol
<b>G</b>	gram
<b>Glc</b>	glukoza
<b>h</b>	ura
<b>Hfr</b>	visoka pogostost rekombinacije (angleško » <b>high frequency of recombination</b> «)
<b>IPEC</b>	črevesni patogeni sevi <i>E. coli</i> (angleško » <b>intestinal pathogenic <i>E. coli</i></b> «)
<b>IS</b>	insercijsko ali vstavitveno zaporedje (angleško » <b>insertion sequence</b> «)
<b>KI</b>	kloroform, izoamil alkohol
<b>Kn</b>	kanamicin
<b>konc.</b>	koncentracija
<b>LB</b>	bogato bakterijsko gojišče, ki ga je sestavil Giuseppe Bertani (angleško » <b>lysogeny broth</b> «)
<b>M</b>	molarnost
<b>MG</b>	minimalno gojišče
<b>min</b>	minuta
<b>mL</b>	mililiter
<b>μL</b>	mikroliter
<b>μm</b>	mikrometer
<b>MNEC</b>	bakterija <i>E. coli</i> , ki povzroča meningitis (angleško » <b>meningitis-associated <i>E. coli</i></b> «)
<b>MNNG</b>	metil-nitro-nitrozogvanidin
<b>Nal</b>	nalidiksična kislina
<b>NTEC</b>	nekrotoksične bakterije <i>E. coli</i> (angleško » <b>necrotoxic <i>E. coli</i></b> «)
<b>obr./min</b>	obrati na minuto
<b>p. n.</b>	preko noči ali prekonočna
<b>s</b>	Sekunda
<b>SDS</b>	natrijev dodecilsulfat
<b>SEPEC</b>	bakterija <i>E. coli</i> , ki povzroča sepso (angleško » <b>sepsis-associated <i>E. coli</i></b> «)
<b>Sm</b>	streptomycin
<b>STET</b>	saharoza, tris, EDTA, triton
<b>subsp.</b>	podvrsta (» <b>subspecies</b> «)
<b>TBE</b>	tris, borat, EDTA
<b>Tc</b>	tetraciklin

**TE** tris, EDTA  
**Tn** transpozon  
**UPEC** uropatogena bakterija *E. coli* (angleško »uropathogenic *E. coli*«)  
**w.t.** divji tip (angleško »wild type«)

## PREDGOVOR IN ZAHVALA

Le malo je dogodkov, razkritij v znanosti, za katere bi se lahko reklo, da so imeli res velike in daljnosežne posledice. Eno od takšnih razkritij je bilo prav gotovo odkritje strukture molekule DNA, ki sta jo leta 1953 objavila James D. Watson in Francis F. Crick. Z objavo tega članka tudi pravimo, da se je rodila molekulska biologija, ki je do danes dala že mnoga pomembna spoznanja, od katerih je marsikatero bilo vredno in je tudi prineslo Nobelovo nagrado. Razvoj molekulske biologije vse od začetka leta 1953 pa do danes je bil izreden in ga spodnja slika po svoje lepo prikazuje.



**Slika 1: Risbe strukture molekule DNA**

**A)** Risba Francis H. Cricka. Vir slike je Wikimedia. **B)** Risba Francisove žene Odile, ki je bila objavljena v znamenitem članku Watson JD & Crick FH (1953). **C)** Sodobna računalniško narisana risba. Vir slike je Wikipedia.

Molekulska biologija genov je tisti del molekulske biologije, ki se ukvarja z geni. Kot taka je molekulska biologija genov pomembna za mnogo področij, saj daje odgovore na temeljna vprašanja genetike ter hkrati ponuja neštete in nepričakovane možnosti uporabe v praktične namene.

Vaje v tem učbeniku so sestavljene tako, da dobite pregled čez vse pomembne tehnike in metode molekulske biologije genov in se pri tem lahko poglobite v način razmišljanja, zgradbo poskusov in delovni vsakdan molekulskih biologov. Učbenik je sestavljen tako, da je na začetku na kratko povzeta teorija, ki je pomembna za te vaje. Sledijo postopki posameznih vaj in teoretične naloge, ki so z vajami povezane. Na koncu je še laboratorijski priročnik, ki med drugim povzema tudi "kuharske recepte" za posamezna gojišča, pufre ...

Avtorici se prisrčno zahvaljujeta prof. dr. Guentherju Koraimannu z Inštituta za molekularne bioznanosti iz Gradca za možnost gostovanja in sodelovanja pri pedagoškem procesu njihovega inštituta in tako seznanitve z vajo iz molekulskega kloniranja promotorjev. Dr. Kristini Schild s tega inštituta gre tudi zahvala za osnutke slik uporabljenih v poglavju gensko uravnavanje pri bakterijah. Vsekakor pa sta h

končni obliki učbenika, s svojo strokovnostjo in temeljitostjo ter nasveti ob recenziji, veliko prispevala tudi oba recenzenta, prof. dr. Bronislava Črešnar z Inštituta za biokemijo Medicinske fakultete v Ljubljani in prof. dr. Jože Pungerčar iz Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani. Tudi njima gre pristrčna zahvala.

Avtorici upava, da vam bo ta učbenik v pomoč v času študija in tudi kdaj kasneje.

Vsem v spodbudo pa še lep slovenski pregovor:

**Kar ti v glavi ostane, ti nihče ne vzame.**



## BAKTERIJA *Escherichia coli*

To bakterijsko vrsto je leta **1885** odkril nemški bakteriolog **Theodor Escherich**. Takrat jo je poimenoval *Bacterium coli commune*. Kasneje so, na čast odkritelju, rod *Bacterium* preimenovali v rod *Escherichia*. Bakterijski rod *Escherichia* uvrščamo v družino *Enterobacteriaceae*.

*Escherichia coli* (*E. coli*) je paličasta po Gramu negativna bakterija, velika **1,1–1,5 μm × 2,0–6,0 μm**. Je **fakultativen anaerob** in **kemoorganotrof**. Optimalno raste pri 37 °C. Živi v črevesju ljudi in živali s stalno telesno temperaturo, kjer je del normalne črevesne mikrobiote. Njen pomen za gostitelja je v tem, da sintetizira **vitamin K** in **vitamine skupine B** ter varuje ekološko nišo pred patogenimi bakterijami.

A)



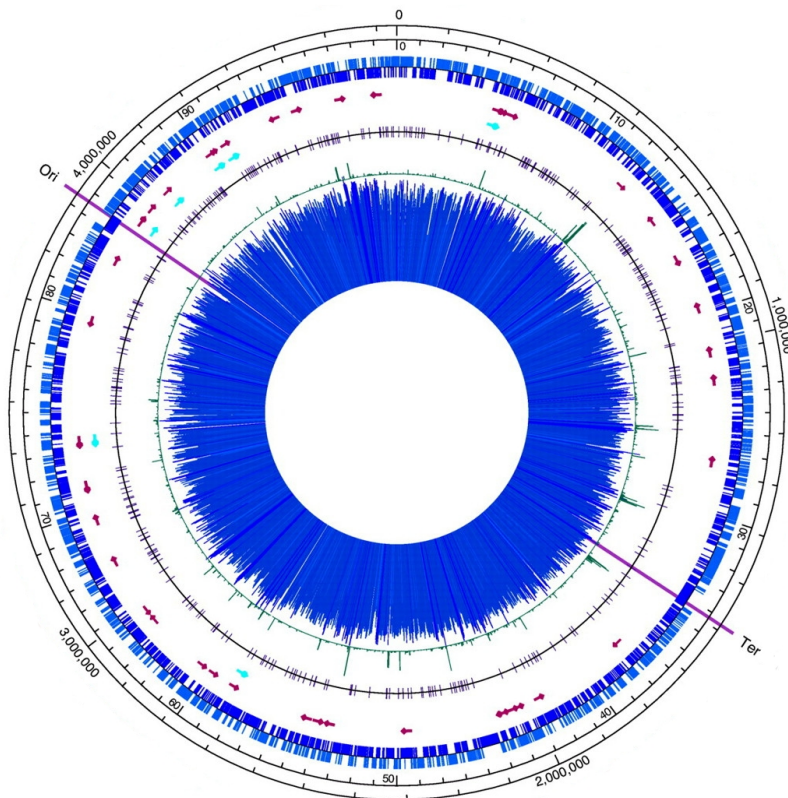
B)



**Slika 2: *Escherichia coli* in njej odkritelj**

A) Premer celice bakterije *E. coli* na sliki je okoli 1 μm. Vir slike je medmrežna stran <http://www.wadsworth.org/databank/ecoli.htm>. B) Theodor Escherich (1857–1911). Vir slike je medmrežna stran <http://www.cgpipeline.com/bgikbov/theodor-escherich.html>.

Že leta 1983 so predlagali, da bi **določili celotno zaporedje** genoma *E. coli*. Za določitev nukleotidnega zaporedja so potrebovali 6 let, čemur je sledila še anotacija. Leta 1997 so v reviji »Science« znanstvenik Blattner in sodelavci objavili članek z nukleotidnim zaporedjem celotnega genoma laboratorijskega seva *E. coli*, seva K-12. Ugotovili so, da ima kromosom K-12 nukleotidno zaporedje, dolžine 4.639.221 bp, ki imajo zapis za 4.288 proteinov. Geni z zapisi za mRNA zavzemajo 87,8 % genoma, geni za tRNA in rRNA 0,8 %, nekodirajoče nukleotidne ponovitve predstavljajo 0,7 % genoma in približno 11 % genoma je namenjenih za uravnavanje izražanja genov in druge funkcije.



### Slika 3: Genom bakterije *E. coli*

Prikazana karta kromosoma *E. coli* je karta seva K-12 MG1655 (4.639.221 bp). Kromosomska karta je povzeta po Blattner FR in sod. (1997).

Sevi *E. coli*, ki sintetizirajo virulentne dejavnike, so **patogeni** in lahko povzročijo različna obolenja: drisko in grižo, vnetje sečnika in ledvic, pljučnico, vnetje možganskih ovojnic ...

Razlikujemo dve večji skupini patogenih sevov *E. coli*: **črevesni patogeni** sevi (IPEC), ki povzročajo črevesne bolezni, in **zunajčrevesni patogeni** sevi (ExPEC), ki povzročajo okužbe drugih delov telesa. Vsaka od skupin ima značilne virulentne dejavnike. Med virulentnimi dejavniki razlikujemo: adhezine/fimbrije, toksine, sisteme za privzem železa in sisteme za izogibanje imunskemu sistemu gostitelja. V obeh skupinah patogenih *E. coli* razlikujemo različne podtipe – t. i. virotipe/patotipe, ki imajo svoj specifični nabor virulentnih dejavnikov. V skupini IPEC so naslednji virotipi/patotipi: enterotoksigene bakterije *E. coli* (ETEC), enteropatogene *E. coli* (EPEC), enteroinvazivne *E. coli* (EIEC), enterohemoragične *E. coli* (EHEC), enteroagregativne *E. coli* (EAEC) in nekrotoksične *E. coli* (NTEC). V skupini ExPEC so naslednji virotipi/patotipi: uropatogene bakterije *E. coli* (UPEC), *E. coli*, ki povzroča meningitis (MNEC) in *E. coli*, ki povzroča sepsa (SEPEC). Genomi patogenih sevov *E. coli* so večji – UPEC-sev UTI89 ima 5.065.741 bp, EHEC-sev EDL933 (serotip O157:H7) ima 5.528.445 bp.

Naravni sevi imajo zelo pogosto tudi zunajkromosomske krožne molekule DNA, ki se lahko samostojno podvojujejo, t. i. **plazmide**. Tudi plazmidi imajo pogosto zapise za dejavnike virulence in za odpornosti bakterij proti različnim antibiotikom.

## BAKTERIOFAG P1

Bakteriofag P1 je virus specifičen za bakterijo *E. coli*. Leta **1951** ga je izoliral **Giuseppe Bertani**, ki je sestavil tudi gojišče, ki ga danes poznamo kot gojišče LB. Po morfologiji je P1 podoben fagu T4, po fiziologiji pa fagu  $\lambda$ . Fag P1 ima okoli 85 nm veliko ikosaedrično glavo in 220 nm dolg rep s šestimi repnimi izrastki.

A)



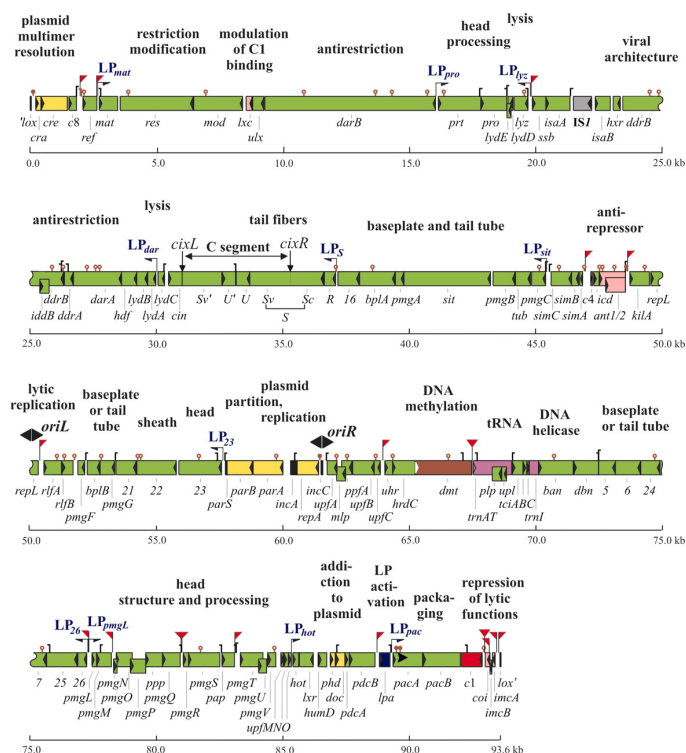
B)



**Slika 4: Fag P1 in njegov odkritelj**

A) Posnetek faga P1 pod elektronskim mikroskopom je povzet po sliki na <http://bio.classes.ucsc.edu/bio1051/EXERCISES/P1/introduction.pdf>. B) Giuseppe Bertani ali za prijatelje Gio ali Joe Bertani v letu 1952. Vir slike je medmrežna stran <http://www.estherlederberg.com/EImages/Cold%20Spring%20Harbor/frames%20Bertani%20GioBertani%2012-52.html>.

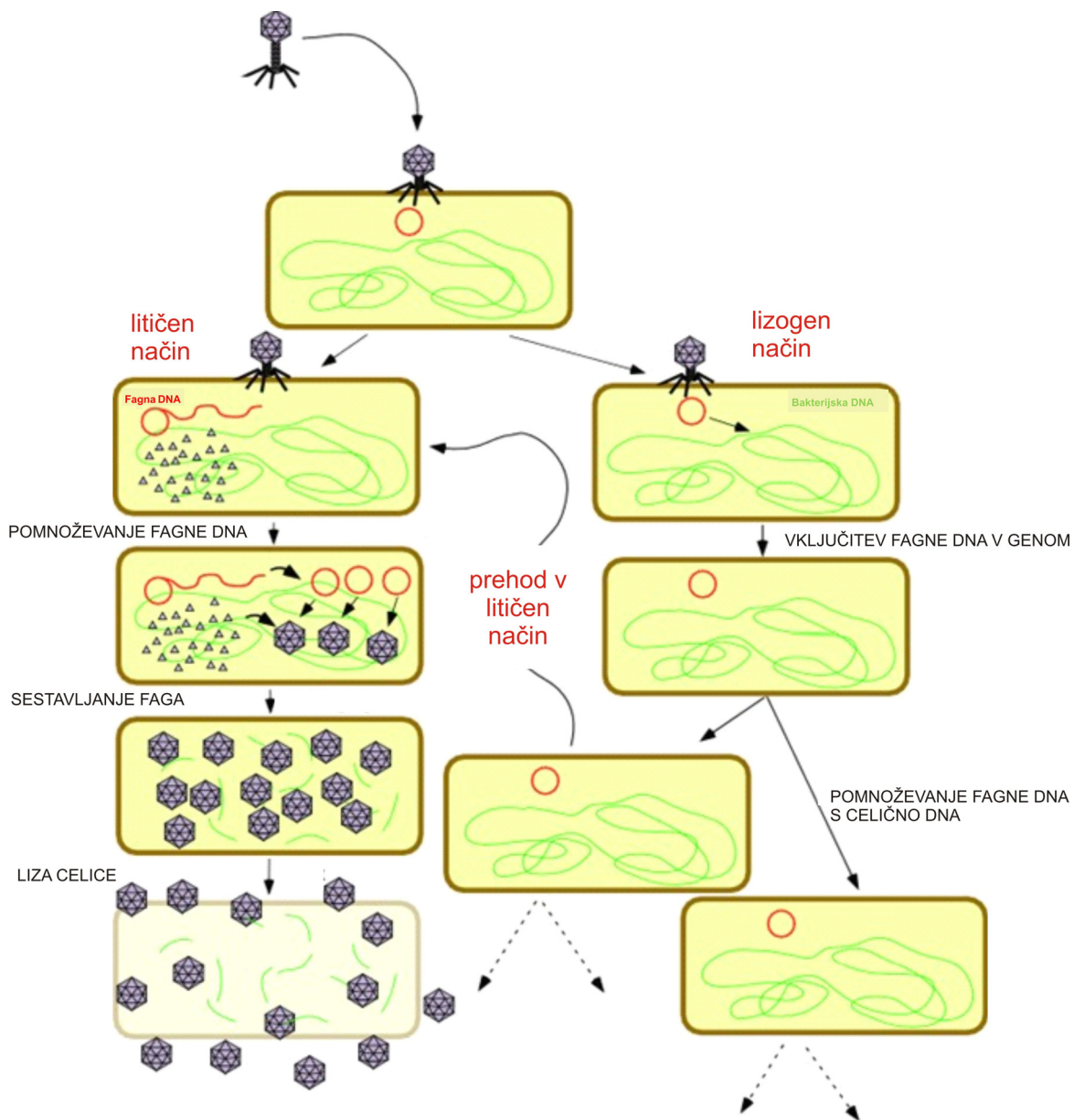
V glavi ima dvoveržno linearno DNA, dolgo približno 94 kb.



**Slika 5: Genom faga P1**

Okvirčki na karti fagnega genoma predstavljajo posamezne gene. Slika je iz članka Łobocka MB in sod. (2004).

V genomu tega faga, dolžine 93.601 bp, je vsaj 117 genov, razporejenih v 45 operonov. Fag se v gostiteljski celici pomnožuje na litičen ali lizogen način. Po vstopu v gostiteljsko celico se linearni fagni genom pretvori v krožno obliko in deluje v celici kot plazmid.



**Slika 6: Shematski prikaz načinov pomnoževanja faga P1**

Fag P1 ima lahko tako litičen kot lizogen način svojega pomnoževanja. Za splošno transdukcijo uporabljamo fage, ki imajo samo litični način pomnoževanja. Vir osnutka slike je medmrežna stran <http://www.jpboeret.eu/biologie/images/transduction.jpg>.

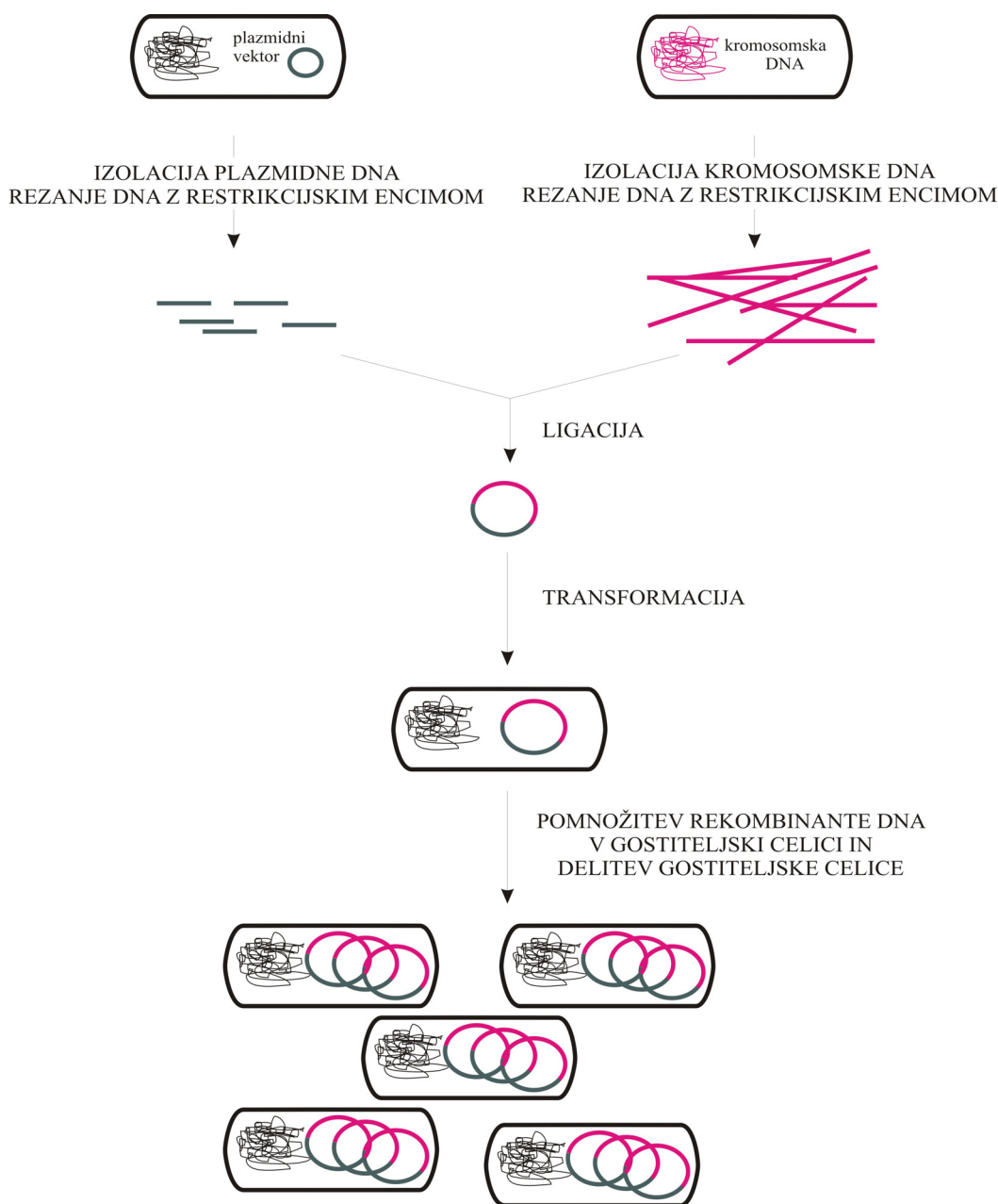


## MOLEKULSKO KLONIRANJE

**Molekulsko kloniranje** (tehnologija rekombinantne DNA, genetsko inženirstvo) vključuje **izolacijo** določenega **dela DNA** in njegovo **pomnoževanje** v veliko število kopij.

Pri kloniranju del DNA (vključek ali insert) iz nekega organizma združimo z vektorjem, tako dobljeno rekombinantno DNA nato vnesemo v gostiteljske celice, kjer se rekombinantna DNA pomnoži in jo iz njih lahko izoliramo v velikih količinah.

**Vektor** je molekula DNA, v katero vključimo insert in ki ima sposobnost, da se sama ali z vključenim insertom podvaja v ustrezni gostiteljski celici.



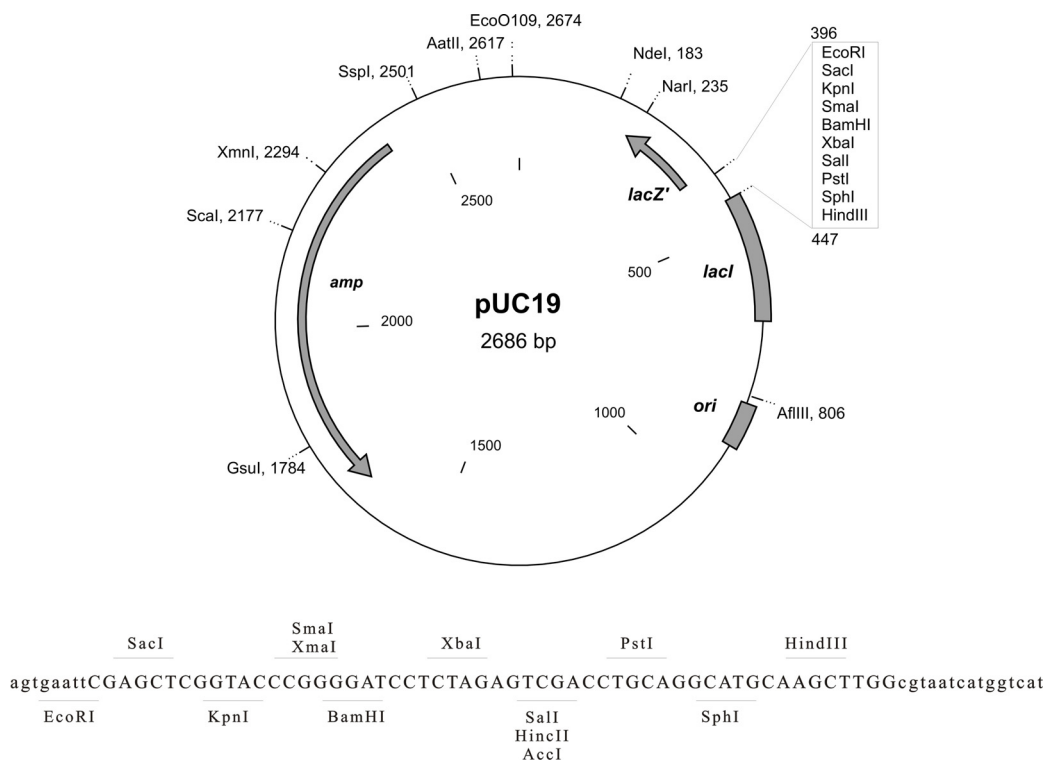
Slika 7: Shematski prikaz kloniranja kromosomske DNA z uporabo plazmidnega vektorja

**Tabela 1: Vektorji in gostitelji**

VEKTOR	DOLŽINA INSERTA, KI GA LAHKO VKLJUČIMO	GOSTITELJ
plazmid, fagmid	≤ 10 kb	bakterije, sesalske celice
virus	5–100 kb	bakterije, žuželčje in sesalske celice
kozmid	30–40 kb	bakterije
BAC	100 kb	bakterije
YAC	≤ 1 Mb	kvasovke

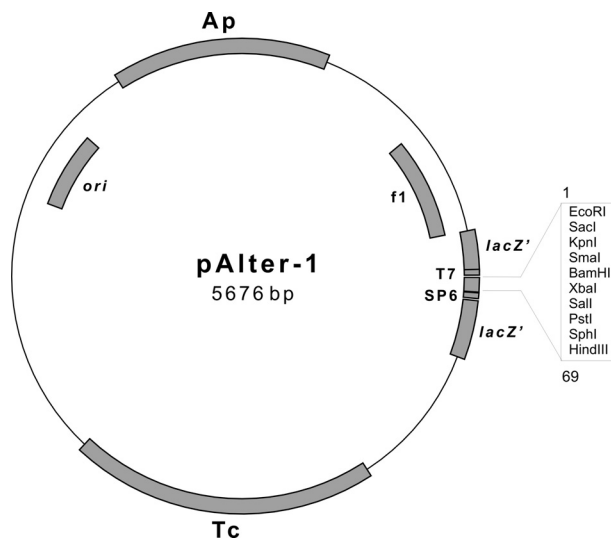
Najpogosteje uporabljamo plazmidne vektorje. Zaželjene lastnosti plazmidnega vektorja so naslednje:

1. je majhen;
2. ima replikacijsko regijo, ki omogoča pomnoževanje plazmidov v celici do določenega števila kopij;
3. ima čim daljše poliklonsko mesto;
4. ima zapis, ki omogoča selekcijo (zapis za odpornost proti enemu ali več antibiotikom), in
5. ima zapis, ki omogoča razlikovanje med celicami s plazmidi in celicami z rekombinantnimi plazmidi (zapis za  $\alpha$ -komplementacijo).



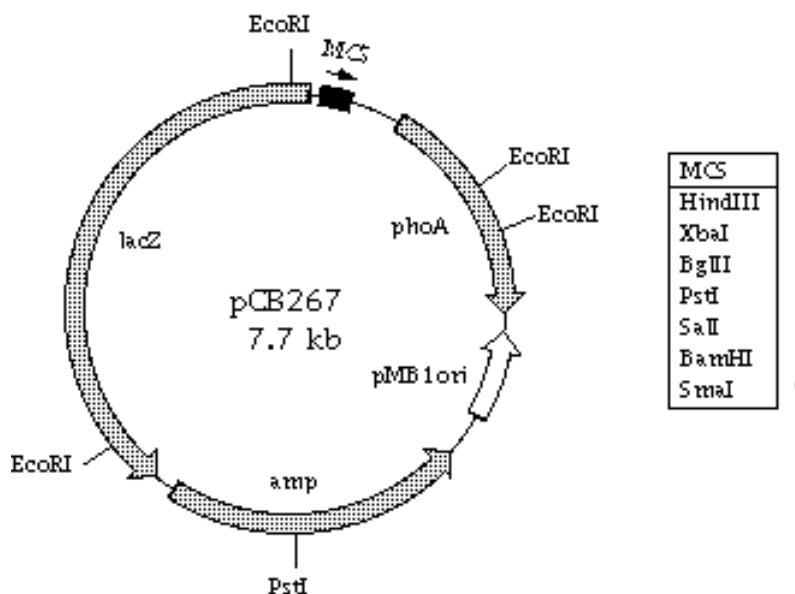
**Slika 8: Shematski prikaz vektorja pUC19 in njegovega poliklonskega mesta**

Na karti plazmida so prikazani gen za  $\beta$ -laktamazo (*amp*), katerega produkt omogoča celici s tem plazmidom, da je odporna proti ampicilinu, del laktoznega operona *lac* (*lacZ'*, *lacI'*), ki omogoča razlikovanje bakterij s plazmidi z inserti ob bakterij s plazmidi brez insertov, replikacijsko področje (*ori*), restrikcijska mesta in poliklonsko mesto.



**Slika 9: Shematski prikaz vektorja pAlter-1**

Na karti plazmida so prikazani poliklonsko mesto, na katerega koncih se nahajata promotor T7 in SP6, ki omogočata izražanje vključka, del laktoznega operona *lac* (*lacZ'*), ki omogoča razlikovanje bakterij s plazmidi z inserti ob bakterij s plazmidi brez insertov, replikacijsko področje (*ori*), začetek podvajanja nitastega (filamentoznega) faga f1, gen za odpornost bakterij proti tetraciklinu (Tc), gen za β-laktamazo (Ap), ki je v izhodiščni obliki vektorja mutiran in ne omogoča odpornosti bakterij proti ampicilinu, saj se ta vektor lahko uporablja tudi za mestno specifično *in vitro* mutagenozo z oligonukleotidi. V takem primeru se v postopku mutagenoze dodajo trije začetni oligonukleotidi: začetni oligonukleotid z mutacijo, ki se prilega mestu vključka, ki ga želimo mutirati, začetni oligonukleotid z mutacijo v genu za tetraciklinsko odpornost, ki se prilega genu za tetraciklinsko odpornost, ter začetni oligonukleotid, ki se prilega mutaciji gena za β-laktamazo in tako omogoča povrnitev odpornosti proti ampicilinu. Po mestno specifični *in vitro* mutagenezi z vsemi tremi začetnimi oligonukleotidi s selekcijo na gojišču z ampicilinom zrastejo celice, ki imajo v citoplazmi plazmid z mutiranim vključkom – takšne celice so namreč sedaj odporne proti ampicilinu in občutljive za tetraciklin.



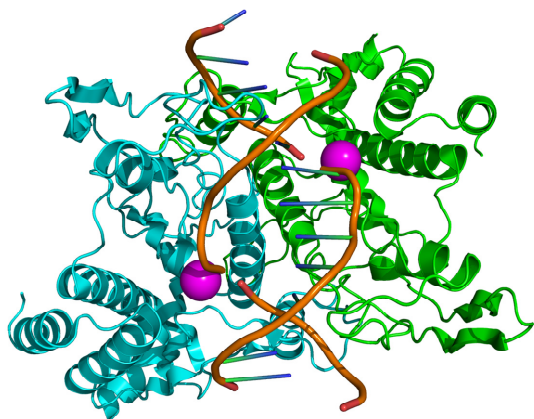
**Slika 10: Shematski prikaz vektorja pCB267**

Plazmidni vektor pCB267 je vektor, ki omogoča preučevanje promotorjev. Poliklonskemu mestu (na sliki označen kot MCS) tako na levi kot na desni strani sledi zapis za reporterski protein, na levi strani 3.075 bp dolg gen za β-galaktozidazo (*lacZ*) in na desni strani je 1.485 bp dolg gen za alkalno fosfatazo (*phoA*). Zapis *amp* (860 bp) kodira β-laktamazo, ki daje bakterijam odpornost proti ampicilinu. Replikacijska regija plazmida izhaja iz plazmida pMB1. Vir slike je podatkovna baza vektorjev za kloniranje, dostopna na: <https://shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/>.

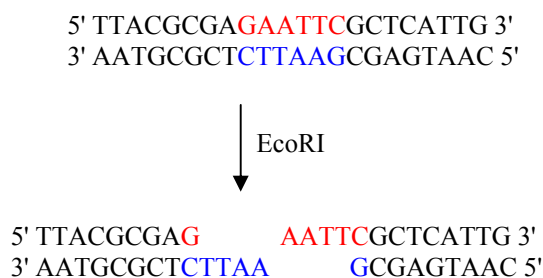
Za vključitev inserta DNA v vektor sta potrebni dve vrsti encimov:

1. **Restriksijski encimi**, ki režejo DNA v specifičnih nukleotidnih zaporedjih, in
2. **DNA-ligaze**, ki povežejo konce DNA med seboj.

A)



B)



**Slika 11: Molekularni model strukture restriksijskega encima EcoRI**

A) Restriksijski encim je homodimer, sestavljen iz dveh enakih podenot. Za delovanje potrebuje dva iona  $Mg^{2+}$ . Vir slike je Wikipedia. B) Restriksijski encim EcoRI prepozna nukleotidno zaporedje 5'-GAATTC-3', kjer reže med G in A ( $G\downarrow AATTC$ ). Tako nastanejo t. i. štrleči konci.

Pri molekularnem kloniranju uporabljamo tudi naslednje encime:

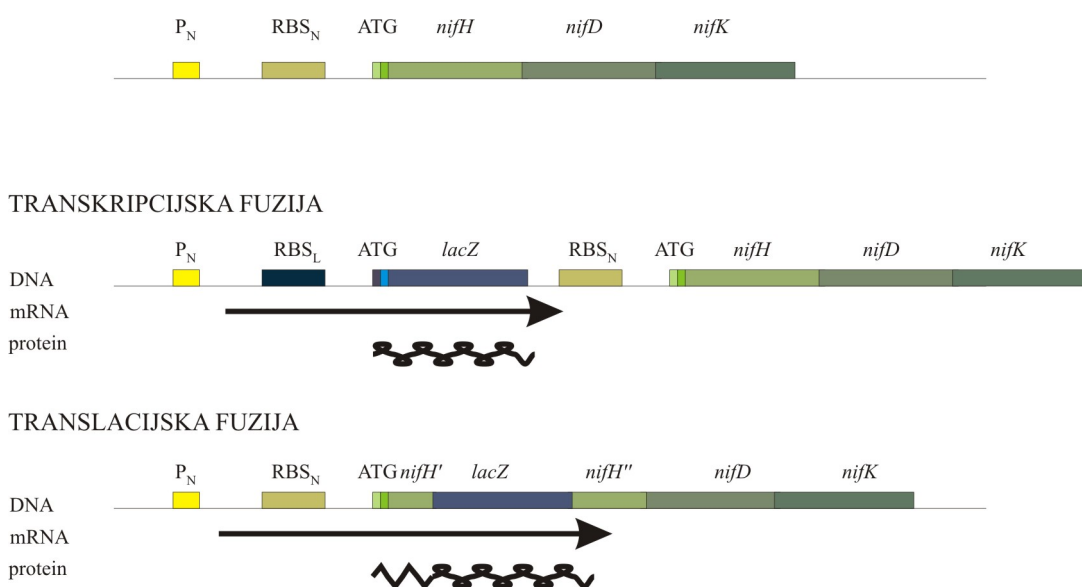
- **DNA-polimeraze**, ki sintetizirajo verige DNA,
- **RNaze**, ki razgrajujejo molekule RNA,
- **fosfataze**, ki odcepijo fosfat s 5'-konca DNA,
- **polinukleotid-kinaze**, ki prenesejo fosfate na 5'-konec DNA ali RNA,
- **reverzne transkriptaze**, ki RNA prepisujejo v komplementarno DNA (cDNA),
- **eksonukleaze**, ki postopno odcepljajo nukleotide s 5'- ali 3'-koncev verige molekule DNA, in
- **metilaze**, ki vežejo metilno skupino na baze v DNA.

Rekombinantno DNA lahko vnesemo v gostiteljske celice na različne načine.

**Genomska knjižnica** vsebuje restriksijske fragmente celotnega genoma nekega organizma, vključene v ustrezen vektor in pomnožene v gostiteljskem organizmu. Kadar vse molekule mRNA nekega organizma, organa/ tkiva ali celične kulture pretvorimo v komplementarne dvovertične DNA (cDNA) in le-te kloniramo, dobimo **knjižnico cDNA**.



Z molekulskim kloniranjem lahko pripravljamo tudi **genske fuzije**. O genski fuziji govorimo takrat, ko direktno povežemo dva gena, preučevanega in poročevalskega. Poročevalski gen ima zapis za lastnost, katere izražanje zlahka opazimo v gostiteljskem organizmu (npr. gen *lacZ* z zapisom za  $\beta$ -galaktozidazo). Za poročevalski gen je značilno, da mu manjka del informacije in se zato njegov produkt sam po sebi ne more sintetizirati. Šele ko se poročevalski gen z gensko fuzijo poveže z nekim drugim genom, pridobi vso potrebno informacijo, da se lahko izraža. Izražanje poročevalskega gena je torej odvisno od uravnavanja (regulacije) gena, s katerim se je združil. Fuzije uporabljamo vedno, kadar je težko preučevati aktivnost promotorja nekega gena (produkta preučevanega gena se ne da zlahka zaznati) in tako fuzije genov zelo olajšajo preučevanje uravnavanja izražanja genov.



**Slika 12: Shematski prikaz genske fuzije *lacZ* z operonom *nif***

Poročevalski gen *lacZ* ima zapis za lastnost, katere izražanje zlahka opazimo -  $\beta$ -galaktozidaza. V primeru transkripcijske fuzije poročevalski gen nima lastnega promotorja, ampak se prepisuje s preučevanega promotorja ( $P_N$ ), ima pa lastne ribosomsko vezavno mesto ( $RBS_L$ ) in iniciacijske signale. V primeru translacijske fuzije poročevalskemu genu manjkajo tudi ribosomsko vezavno mesto in iniciacijski signali.

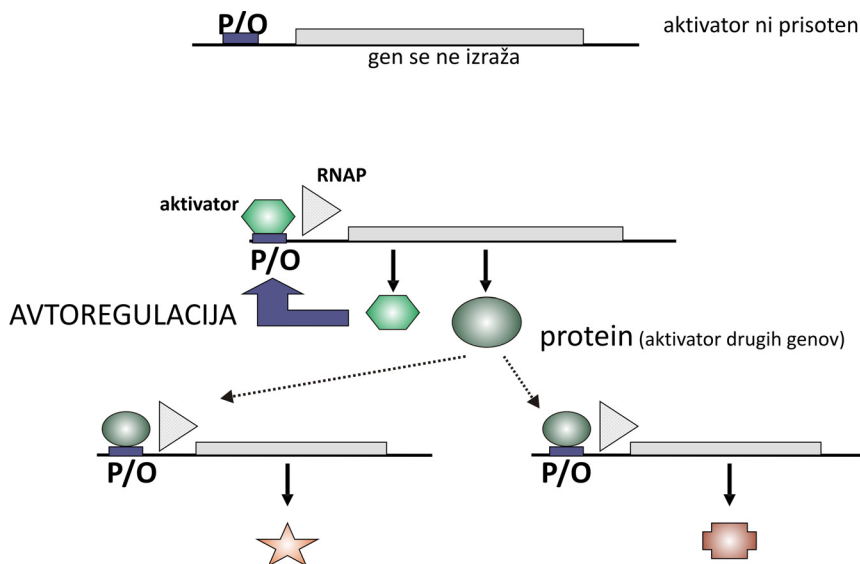
Poznamo dva tipa genskih fuzij:

1. **Transkripcijska fuzija:** poročevalski gen nima lastnega promotorja, produkt nastane, če se poveže s promotorjem preučevanega gena. Z njo preučujemo uravnavanje na ravni transkripcije.
2. **Translacijska ali proteinska fuzija:** poročevalskemu genu manjkajo vsi signali za izražanje genov, vključno z iniciacijskim kodonom, in produkt nastane, če se poveže čim bližje signalom za izražanje preučevanega gena. Produkt poročevalskega gena, ki se je sintetiziral v takem primeru, je himerni protein, sestavljen iz N-končnega dela prepisanega iz gena, ki ga preučujemo, in C-končnega dela prepisanega iz poročevalskega gena. Na ta način preučujemo uravnavanje na ravni translacije.

Genske fuzije lahko pripravimo tudi s specialno sestavljenimi transpozoni.

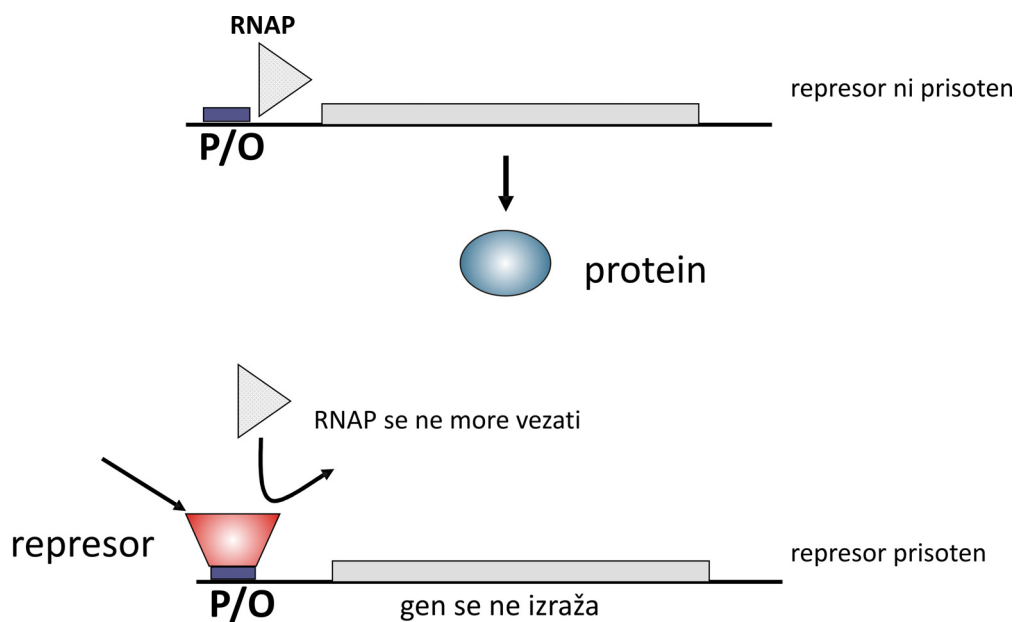
## GENSKO URAVNAVANJE PRI BAKTERIJAH

V bakterijah poteka uravnavanje izražanja genov tako na ravni transkripcije kot na ravni translacije. Zelo pogosto je uravnavanje na ravni iniciacije transkripcije. Različni načini genskega uravnavanja v bakterijah so prikazani na spodnjih slikah.



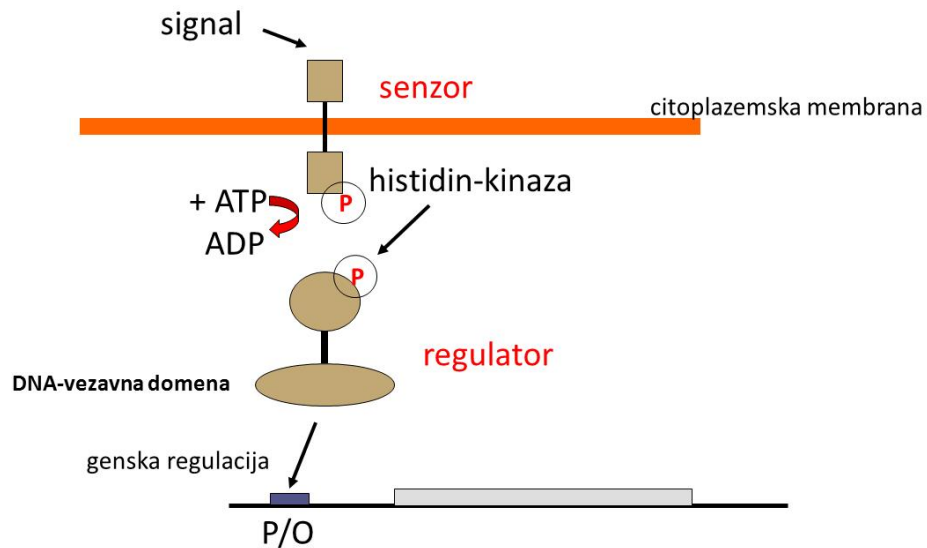
**Slika 13: Shematski prikaz aktivacije transkripcije z aktivatorji**

Pomen kratic na sliki: P/O – promotorsko-operatorsko področje; RNAP – RNA-polimeraza.



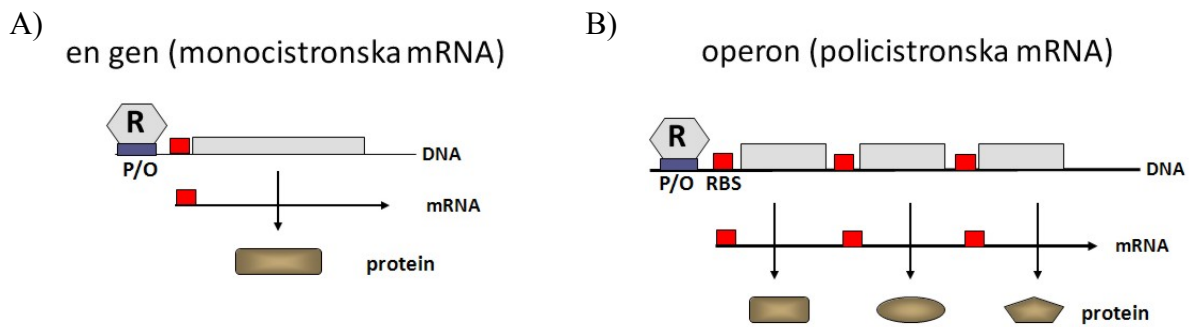
**Slika 14: Shematski prikaz inaktivacije transkripcije z represorji**

Pomen kratic na sliki: P/O – promotorsko-operatorsko področje; RNAP – RNA-polimeraza.



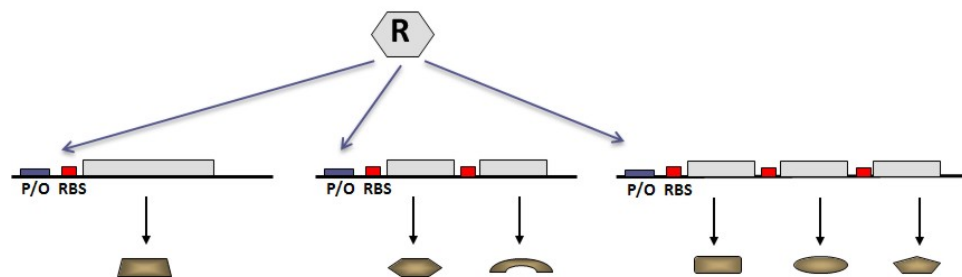
**Slika 15: Shematski prikaz uravnavanja izražanja gena z dvokomponentnim sistemom**  
 Pomen kratice na sliki: P/O – promotorsko-operatorsko področje.

En regulator lahko vpliva na izražanje enega samega gena (monocistronska mRNA) ali pa na izražanje več genov (policistronska mRNA).



**Slika 16: Shematski prikaz monocistronske (A) in policistronske (B) mRNA**  
 Pomen kratic na sliki: R – regulator; P/O – promotorsko-operatorsko področje; RBS – ribosomsko vezavno mesto.

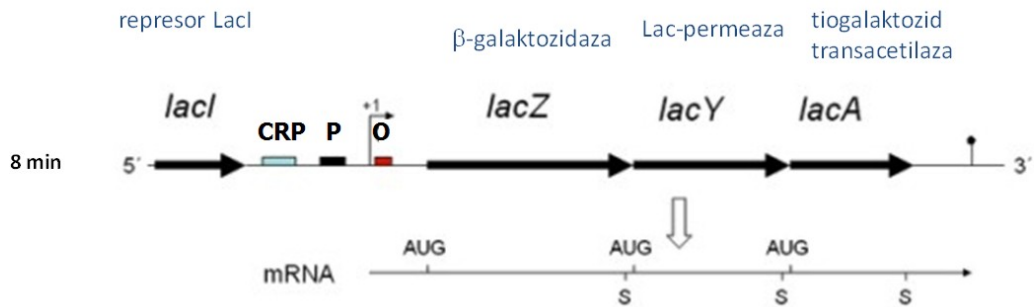
V primeru, da en regulator deluje na promotorsko-operatorska področja več različnih genov/operonov, takšen regulator deluje na **regulon**.



**Slika 17: Shematski prikaz regulona**  
 Pomen kratic na sliki: R – regulator; P/O – promotorsko-operatorsko področje; RBS – ribosomsko vezavno mesto.

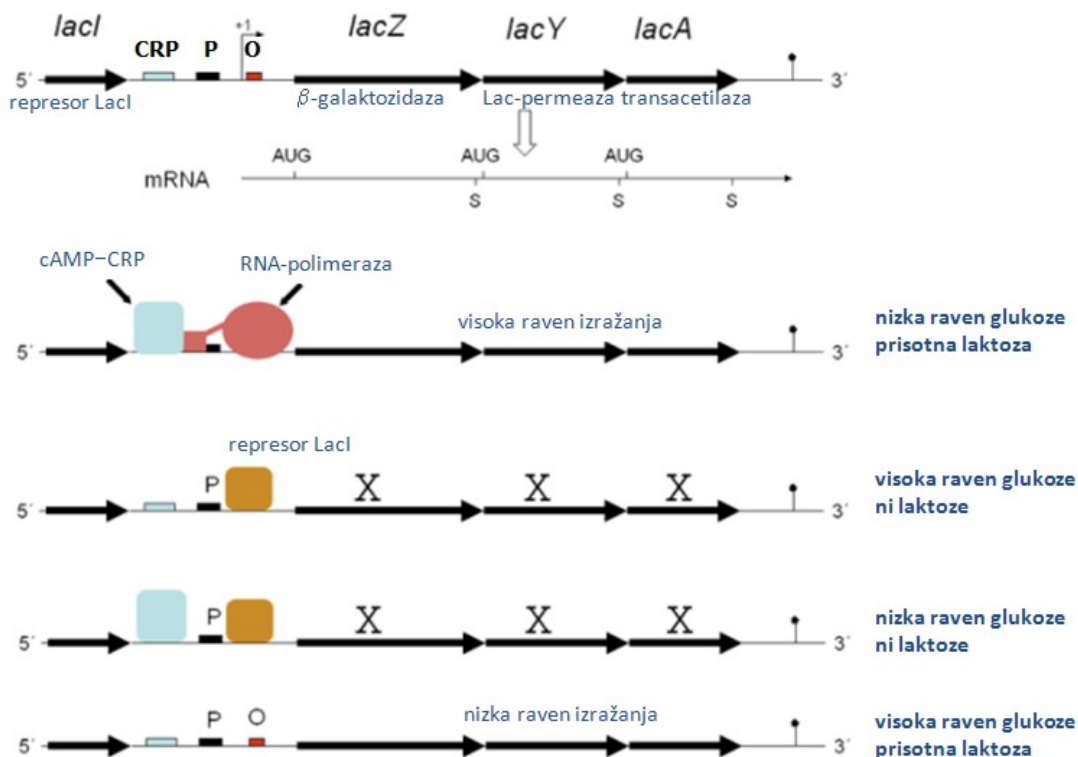
Pri bakterijah je veliko dobro preučenih in ilustrativnih primerov genskega uravnavanja. Eden od njih je uravnavanje izražanja laktoznega operona.

Struktura laktoznega operona je prikazana na spodnji sliki.



Slika 18: Shematski prikaz laktoznega operona

Laktozni operon je zelo natančno in optimalno uravnavan. S tem lahko bakterije izrabljajo vir ogljika, ki je trenutno prisoten v gojišču. Operon je tako negativno uravnavan z represorjem LacI, ki preprečuje izražanje laktoznega operona, če v gojišču ni laktoze, kot tudi pozitivno uravnavan s cAMP–CRP, ki zaznava raven glukoze v gojišču.

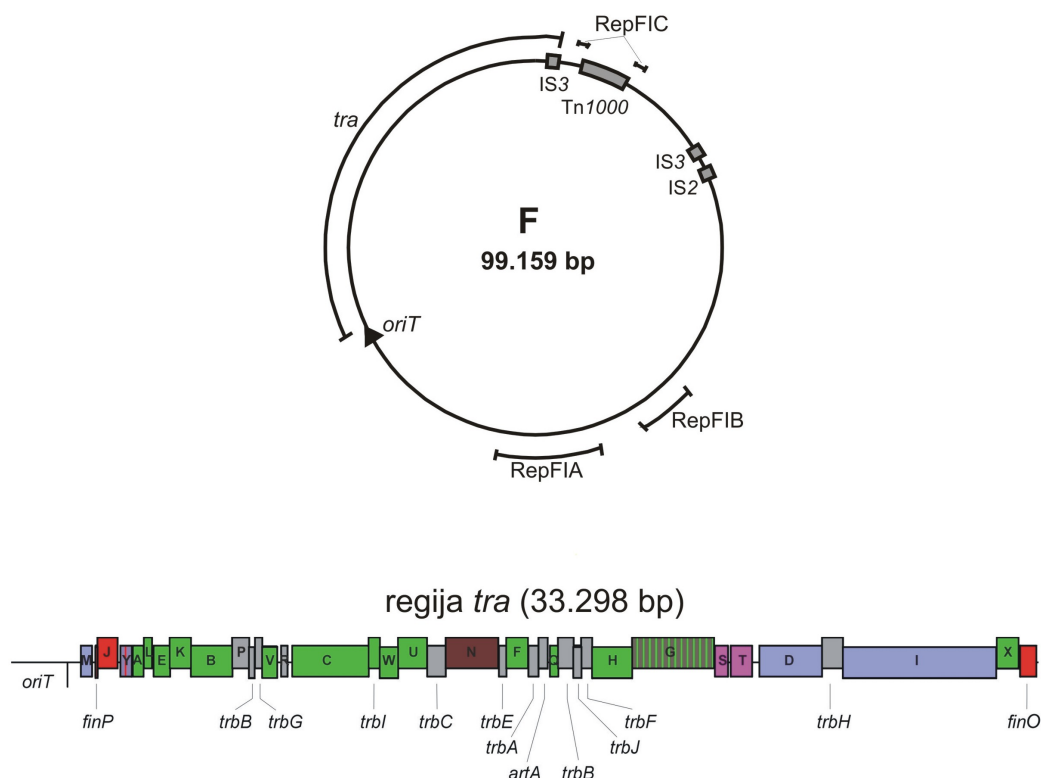


Slika 19: Shematski prikaz uravnavanja laktoznega operona

Vir slike je Wikipedia.

## KONJUGACIJA

Konjugacija je prenos DNA, do katerega pride ob neposrednem stiku dveh bakterijskih celic. Vsa informacija, potrebna za konjugacijo (geni za uravnavanje konjugacije, za pile, za prenos DNA, za stabilizacijo prenosa, za površinsko izključitev), je zapisana na **konjugativnih plazmidih**. Najbolje preučen konjugativni plazmid je **plazmid F** (slika 20).



**Slika 20: Shematski prikaz plazmida F in področja *tra***

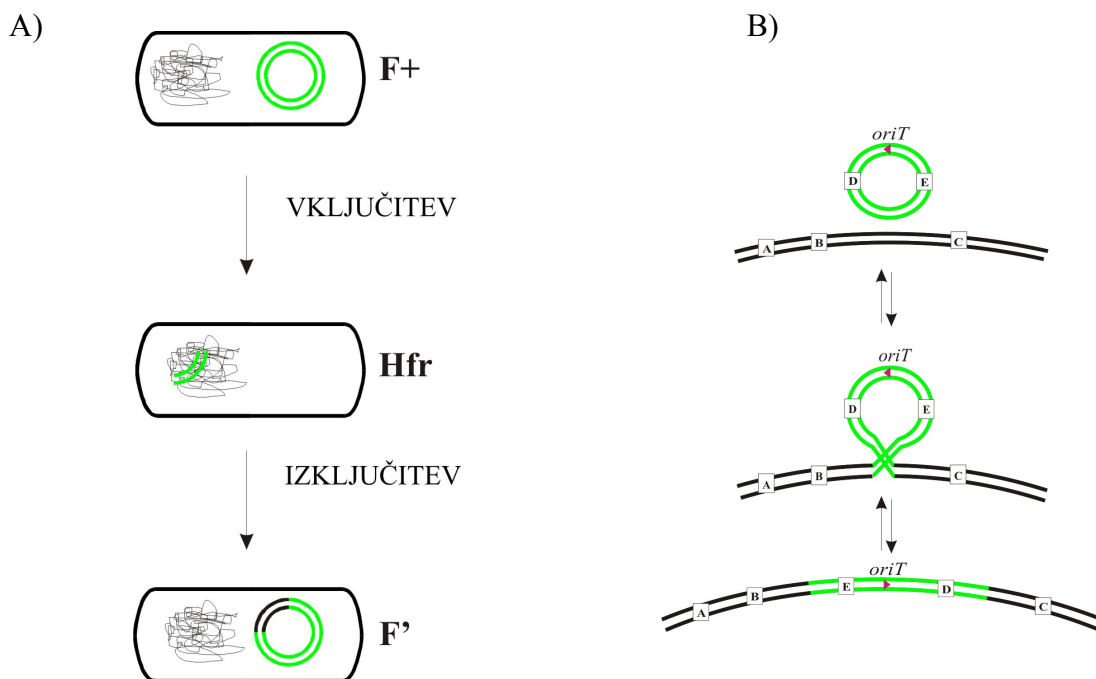
Shema plazmida F prikazuje struktura področja: področje *tra*, replikacijska zaporedja RepFIA, RepFIB in RepFIC ter transpozicijske elemente IS2, IS3 in Tn1000. Na podrobnejši shemi področja *tra* (dolgo približno 33 kb) so označeni posamezni geni.

V laboratorijih konjugacijo izvajamo na več načinov:

1. v tekočem gojišču,
2. z razmazom na plošči,
3. z odtisom preko žameta.

Oznake, povezane s konjugacijo:

- F+** donorski sev
- F-** recipientski sev
- Hfr** sev z vključenim konjugativnim plazmidom v kromosom
- F'** sev s konjugativnim plazmidom, ki ima tudi nekaj (bakterijske) kromosomske informacije

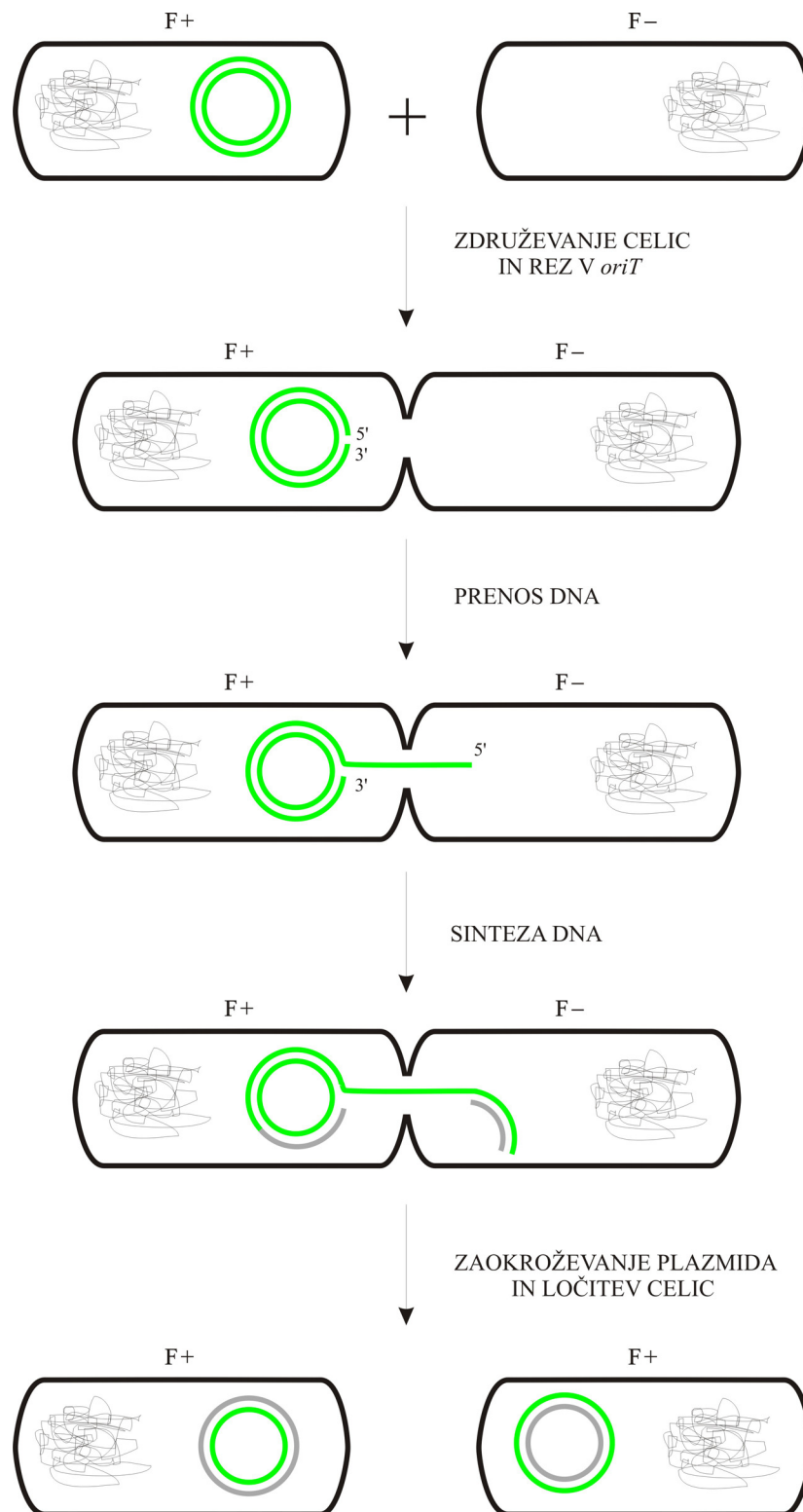


**Slika 21: Shematski prikaz nastanka sevov Hfr in F'**

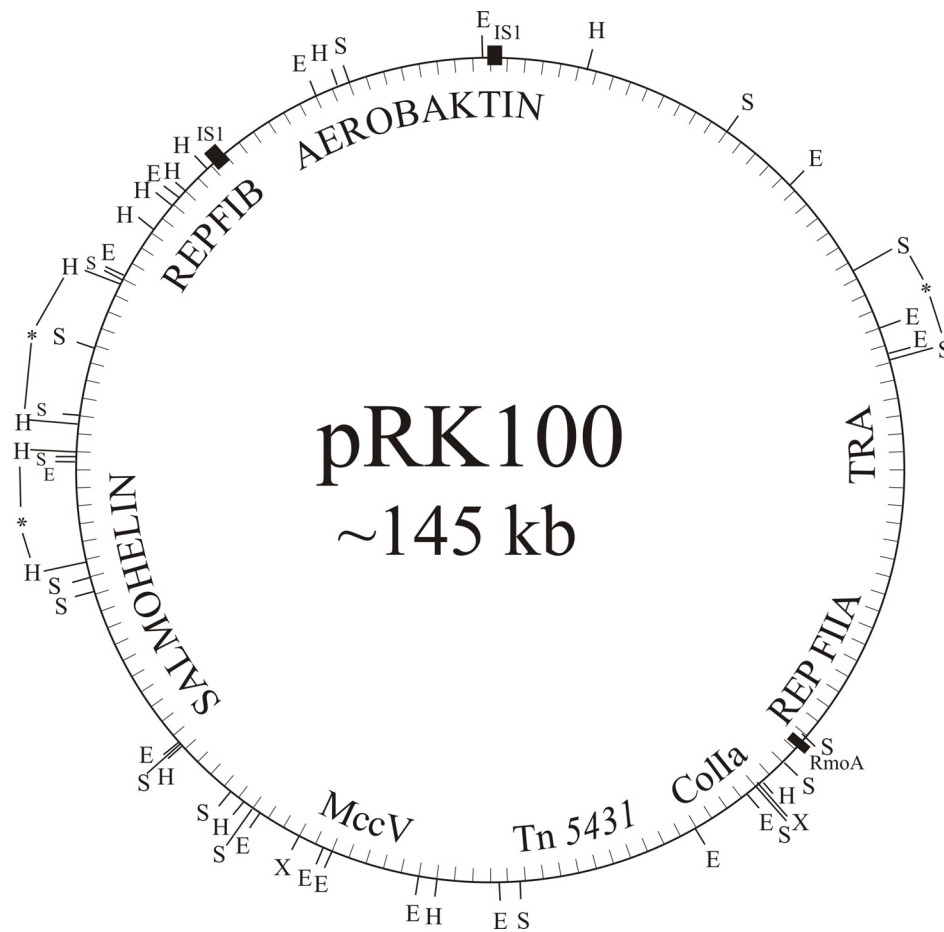
A) V eni od  $10^5$  celic se konjugativni plazmid vključi v kromosom, takšno celico označimo Hfr. Plazmid, ki je vključen v kromosom, se lahko iz kromosoma tudi izključi. Izključitev lahko poteka pravilno in se izključi samo konjugativen plazmid – takšne celice postanejo iz Hfr spet običajne F+. Izključitev pa lahko poteka tudi tako, da se skupaj s konjugativnim plazmidom izključijo tudi sosednji deli gostiteljevega kromosoma. Tak konjugativni plazmid, ki ima v strukturi poleg svoje informacije tudi kromosomske gene, označimo kot F'. B) Vključitev in izključitev plazmida v/iz kromosoma potekata s homologno rekombinacijo. Črke označujejo področja nekaterih genov. Prikazano je tudi mesto začetka prenosa DNA v konjugaciji (*oriT*).

Faze konjugacije pri bakterijah so:

1. **Neposreden stik in zblíževanje** donorske ( $F^+$ ) in recipientske celice ( $F^-$ ), kar omogočajo F-pili;
2. **mobilizacija prenosa**, ko pride v donorju na specifičnem mestu (*oriT*) do reza v eni od verig DNA F-faktorja;
3. **prenos** enoverižne linearne molekule DNA s 5'-kncem iz donorja v recipienta in **hkratna sinteza** manjkajoče verige DNA v donorju in recipientu;
4. prenesena linearna molekula DNA (dvoverižna) se **zaokroži** in s tem nastane funkcionalni plazmid.



Slika 22: Shematski prikaz konjugacije



**Slika 23: Shematski prikaz naravnega konjugativnega plazmida pRK100**

Plazmid pRK100 je bil izvorno najden v sevu KS533 bakterije *E. coli*, ki so ga izolirali iz bolnika z okužbo sečil. Plazmid je konjugativen (regija *tra*) in ima dve aktivni replikacijski regiji iz inkompatibilnostne skupine IncF, replikacijsko regijo RepFIB in replikacijsko regijo RepFIIA. Ima zapisa za dva sistema za privzem železa, za aerobaktin in salmohelin. Transpozon Tn5431 ima dva gena za antibiotični odpornosti – zapis za odpornost proti ampicilinu in zapis za odpornost proti tetraciklinu. Plazmid ima tudi zapisa za dva bakteriocina, kolicin Ia (Colla) in mikrocin V (MccV). Bakteriocini so toksini, ki delujejo na bakterije, ki so ozko sorodne bakteriji, ki sintetizira bakteriocine.

Uspešnost konjugacije ovrednotimo s frekvenco konjugacije, ki jo lahko izračunamo na dva načina:

$$\text{frekvenca} = \frac{\text{št. transkonjugiranih celic}}{\text{št. celic recipienta}}$$

$$\text{frekvenca} = \frac{\text{št. transkonjugiranih celic}}{\text{št. celic donorja}}$$

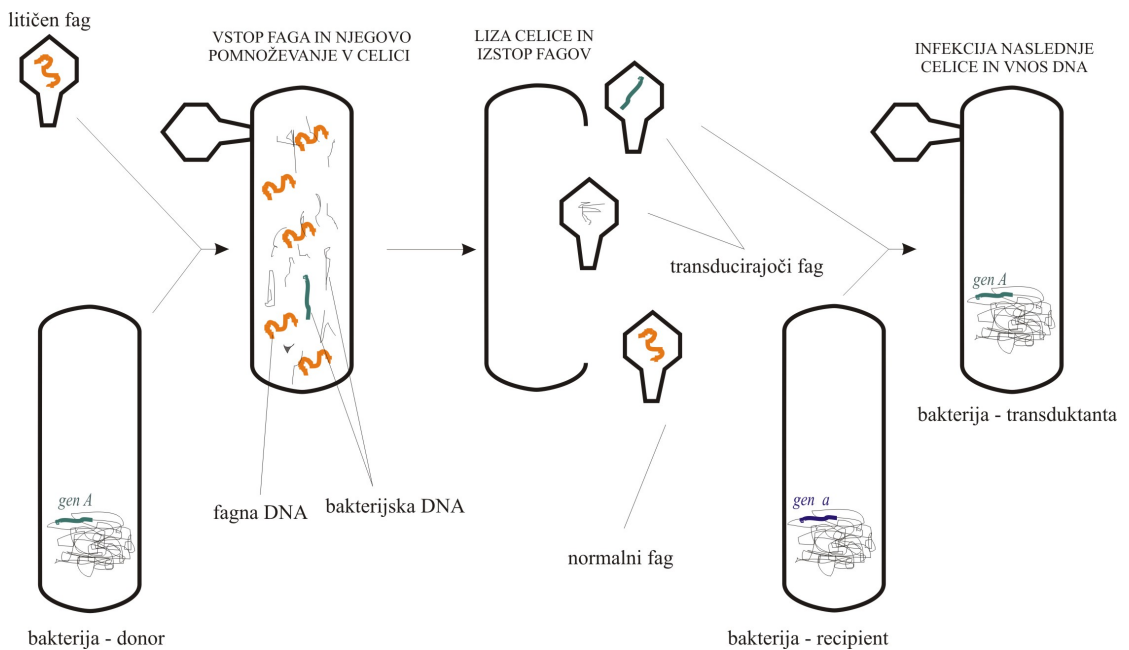


## TRANSDUKCIJA

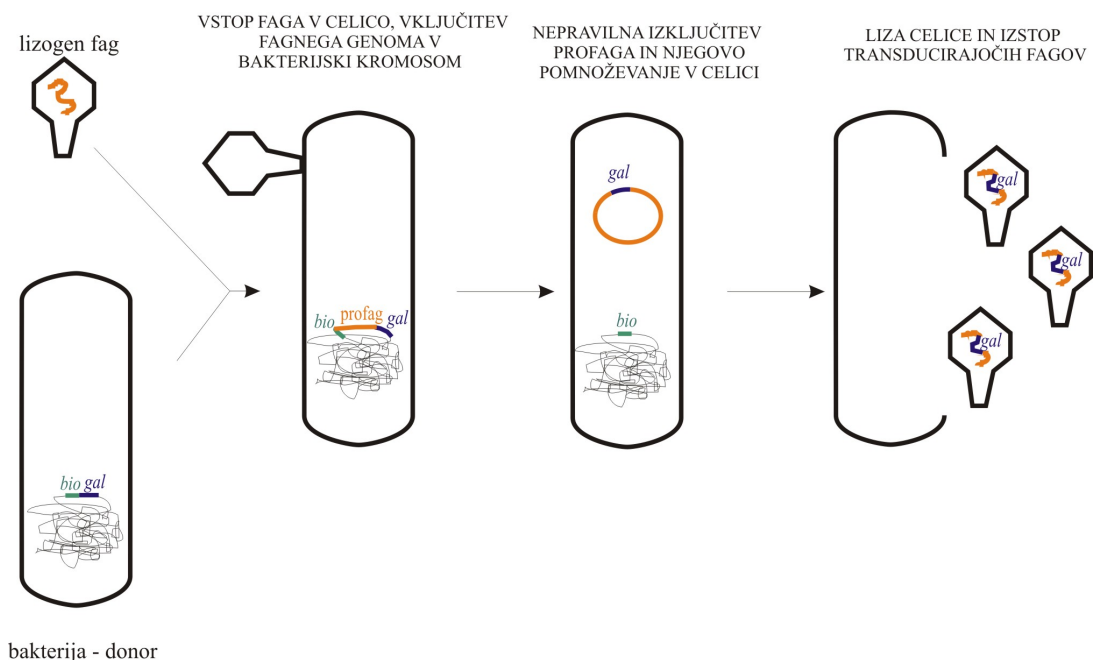
Transdukcija je **prenos** DNA iz ene bakterijske celice v drugo bakterijsko celico z **bakteriofagom**.

Transdukcija poteka v treh fazah:

1. **Vstop** bakteriofaga v donorsko celico;
2. **izstop** bakteriofaga z delom bakterijske DNA iz donorske celice;
3. **vnos** DNA donorske celice v drugo, recipientsko celico.



Slika 24: Shematski prikaz splošne transdukcije



Slika 25: Shematski prikaz specializirane transdukcije

Znana sta dva tipa transdukcije:

1. **Stabilna** transdukcija – prenesena DNA se v celici ohrani;
2. **abortivna** transdukcija – prenesena DNA se sčasoma izgubi.

Ločimo dve obliki transdukcije:

1. **Splošno** transdukcijo – prenos **katerega koli** dela DNA;
2. **specializirano** transdukcijo – prenos **specifičnega** dela DNA.

Uporabnost splošne transdukcije:

1. Kartiranje s fagi;
2. priprava sevov z minimalnimi spremembami.

Uporabnost specializirane transdukcije:

1. Za prenos specifičnega dela DNA.

Transdukcija lahko poteka z različno multipliciteto infekcije. Multipliciteta infekcije pomeni razmerje med bakteriofagi in bakterijami v transduksijski zmesi. Običajno transdukcijo izvajamo z multipliciteto infekcije med 0,1 in 1. Multipliciteta infekcije 0,1 pomeni, da je razmerje bakteriofagov in bakterij v transduksijski zmesi 1 : 10, torej 10 bakterijam smo dodali 1 bakteriofag. Multipliciteta infekcije 1 pa pomeni, da je bilo v zmesi razmerje med bakteriofagi in bakterijami 1 : 1.

Uspešnost transdukcije navajamo s frekvenco transdukcije, ki jo izračunamo po formuli:

$$\text{frekvenca} = \frac{\text{št. transduciranih celic}}{\text{št. fagov}}$$

Frekvenca transdukcije  $10^{-5}$  tako pomeni, da je vsak  $10^5$  fag bil transducirajoči delec, ki je prenašal želeno informacijo.

## TRANSFORMACIJA

Transformacija je sprejem in ohranitev (zadržanje) prenesene proste DNA v celici.

Glavne faze transformacije so:

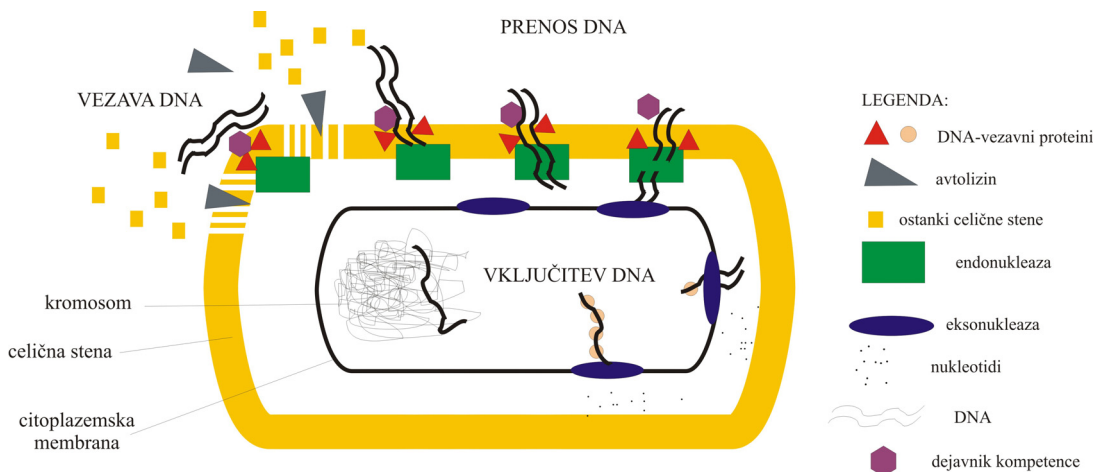
1. **Vezava** DNA na zunanost celice;
2. **prenos** DNA preko celične stene;
3. **vklučitev** prenesene DNA v genom recipienta.

Prenesena DNA se lahko ohrani (zadrži) v celici na dva načina:

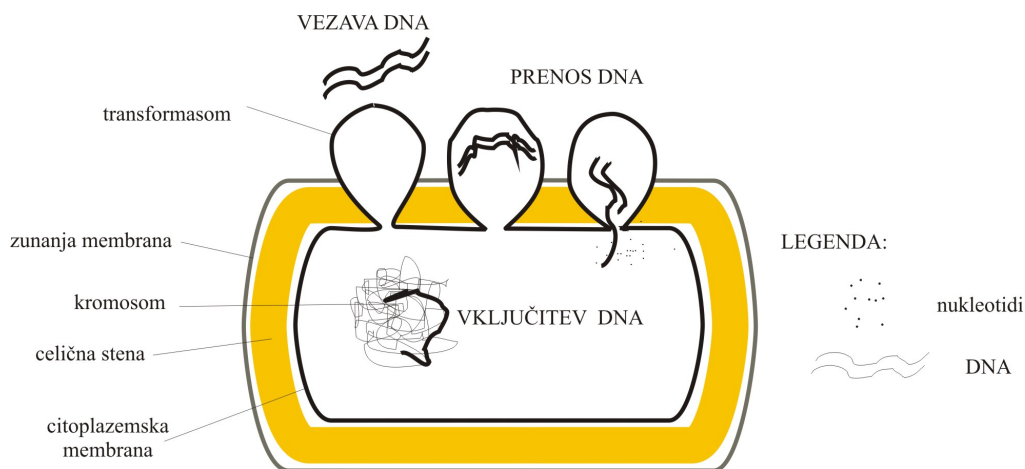
1. Kot **replikon**, ki se sam podvaja;
2. z **rekombinacijo** se vključi v replikon, ki je že v celici.

Ločimo dve obliki transformacije:

1. **Naravna** ali fiziološka transformacija;
2. **umetna** transformacija.



**Slika 26: Shematski prikaz transformacije po Gramu pozitivne bakterije**



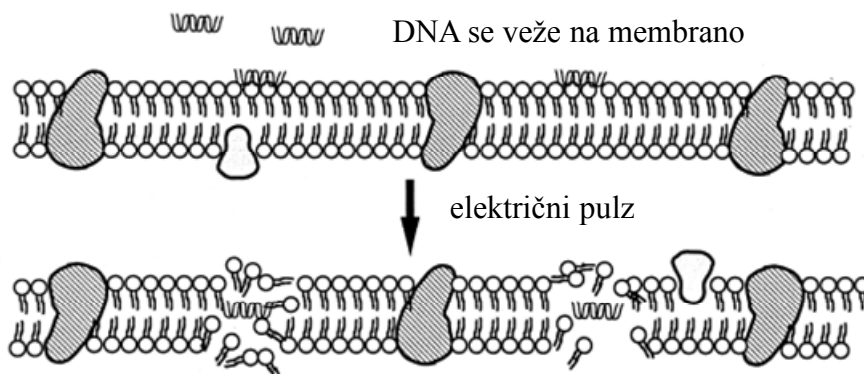
**Slika 27: Shematski prikaz transformacije po Gramu negativne bakterije**

Ena od ključnih razlik v poteku transformacije po Gramu negativne in po Gramu pozitivne bakterije je pojav transformasomov pri po Gramu negativnih bakterijah.

Celice, ki so sposobne sprejema tuje DNA, se imenujejo **kompetentne** celice. Pri **naravni** transformaciji postanejo celice kompetentne v določenem – specifičnem času svojega življenja. Pri **umetni** transformaciji pa celice izpostavimo specifičnim pogojem. Pogosto jih izpostavimo različnimi solem, predvsem CaCl<sub>2</sub>, nizki temperaturi (4 °C) in toplotnemu šoku (42 °C). Funkcija CaCl<sub>2</sub> je, da pomaga pri adsorpciji DNA z membrano (nevtralizira negativen naboja molekule DNA in povzroči prerazporeditve lipopolisaharidov), nizka temperatura poveča rigidnost membranskih struktur, namen toplotnega šoka pa je, da prehodno zniža membranski potencial, pri čemer DNA lažje vstopi v citoplazmo.

**Elektroporacija** je postopek priprave kompetentnih celic z električnim tokom. Celice, ki jih bomo uporabili v elektroporaciji, predhodno izpostavimo sterilni destilirani H<sub>2</sub>O in ledu. Zaradi elektroporacije namreč ne sme biti prisotnih nobenih soli.

Pri elektroporaciji zaradi delovanja električnega toka nastanejo v celični membrani pore, skozi katere lahko v celično citoplazmo vstopi DNA. Po prenehanju delovanja električnega toka se pore v membrani ponovno zaprejo.



**Slika 28:** Shematski prikaz vnosa DNA v celico z elektroporacijo

Uspešnost transformacije lahko izražamo s frekvenco ali z učinkovitostjo. Formuli sta:

$$\text{frekvenca} = \frac{\text{št. transformiranih celic}}{\text{št. celic}}$$

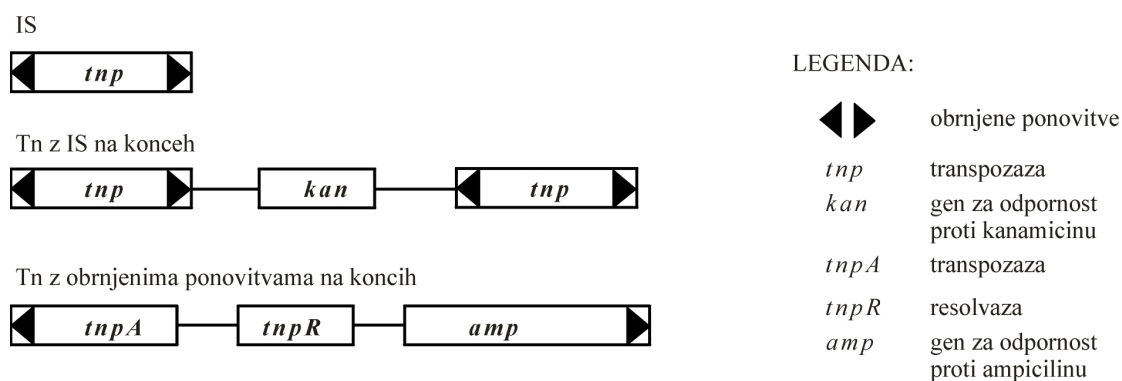
$$\text{učinkovitost} = \frac{\text{št. transformiranih celic}}{\mu\text{g DNA}}$$

## TRANSPOZICIJA

Transpozicija je prenos dela DNA z **enega** mesta na **drugo** mesto v **istem genomu**. Določen del DNA, ki se prenese, označimo kot **transpozicijski element**.

Poznamo dva tipa transpozicijskih elementov:

1. **Insercijska zaporedja (IS)** – enostavni; in
2. **transpozone (Tn)** – sestavljeni transpozicijski elementi.



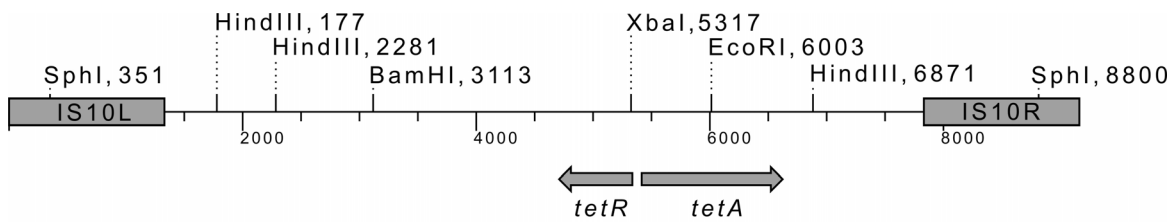
Slika 29: Shematski prikaz struktur IS in Tn

IS imajo na koncih kratke obrnjene ponovitve, dolžine približno 10–40 bp. V osrednjem delu imajo zapis, ki je potreben za transpozicijo (gen za transpozazo).

Tn imajo poleg zapisa, potrebnega za transpozicijo, še zapis za kakšno drugo lastnost, npr. za odpornost proti določenemu antibiotiku.

Razlikujemo dva večja razreda Tn:

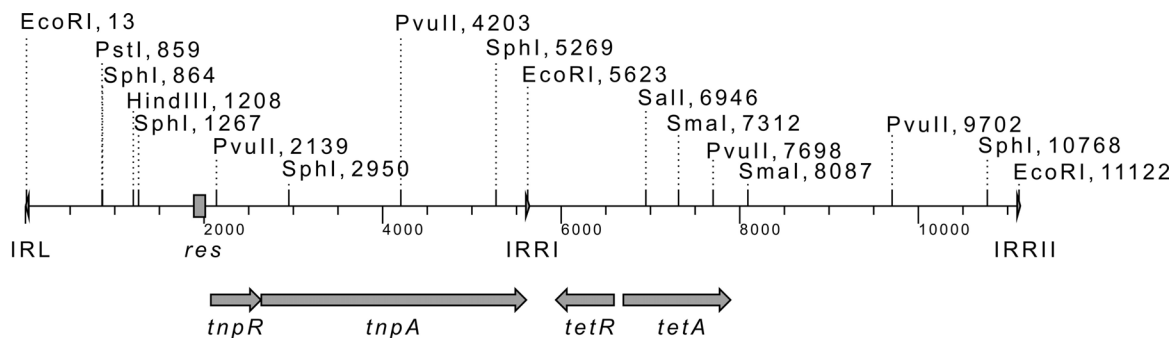
1. Tn, ki imajo na vsakem koncu po en IS-element, pri čemer sta zaporedji IS v isti orientaciji (direktna ponovitev IS), kot je npr. Tn9, ali, kar je pogosteje, v nasprotni orientaciji (obrnjena ponovitev IS), kot sta npr. Tn5 in Tn10 (slika 32),
2. Tn, ki imajo na obeh koncih krajši obrnjeni ponovitvi (IR – angleško »inverted repeat«), dolžine 30–40 bp, kot npr. Tn3, Tn21, Tn1721 (slika 33).



### Tn10 (9.147 bp)

#### Slika 30: Shematski prikaz transpozona Tn10

Na karti transpozona so označena restrikcijska mesta nekaterih pogosteje uporabljenih restrikcijskih encimov. Enota na narisanim merilu je 500 bp.



### Tn1721 (11.139 bp)

#### Slika 31: Shematski prikaz transpozona Tn1721

Na karti transpozona so označena restrikcijska mesta nekaterih pogosteje uporabljenih restrikcijskih encimov. Enota na narisanim merilu je 500 bp.

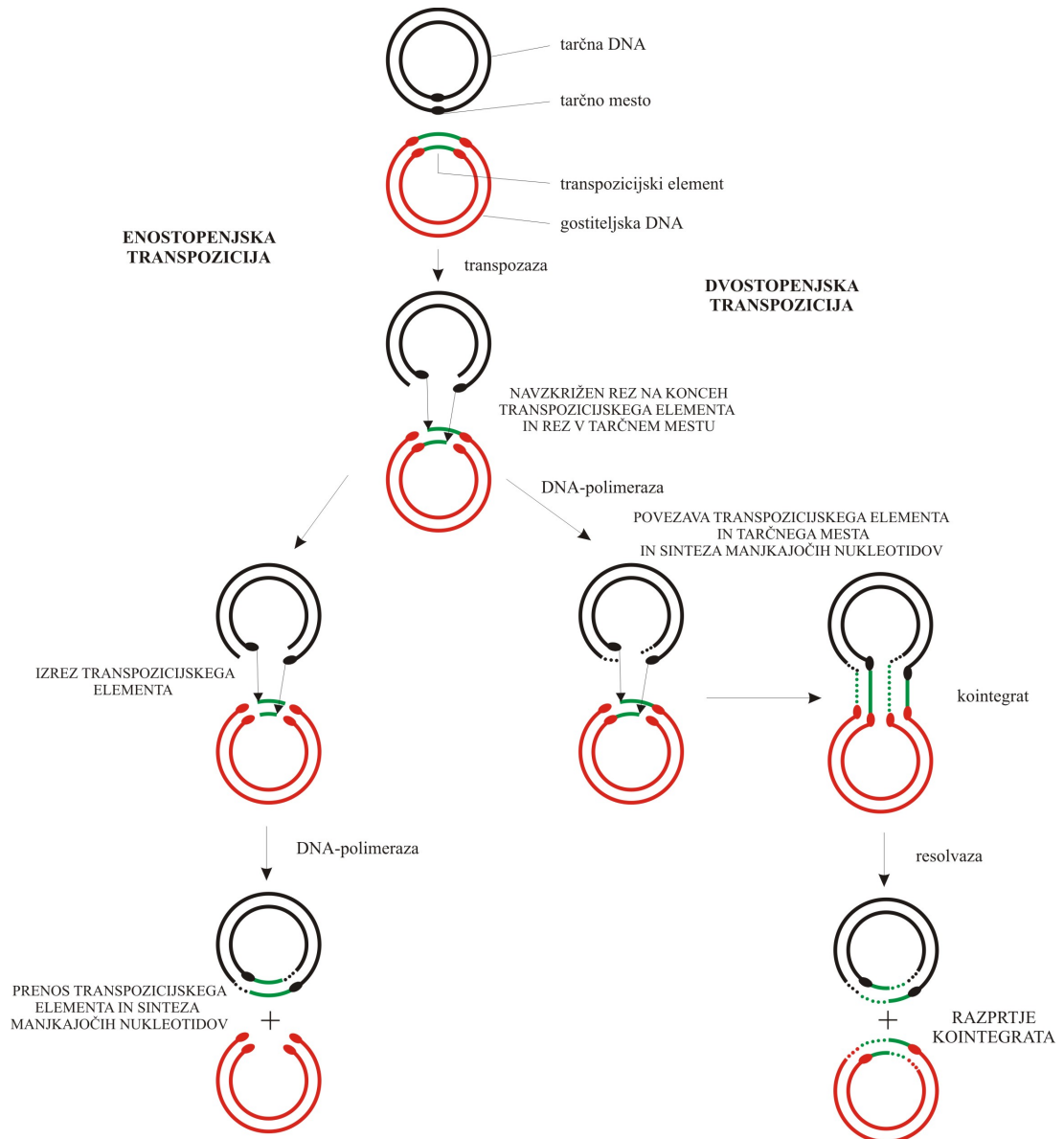
Transpozicija lahko poteka brez podvojitve ali s podvojitvijo transpozicijskega elementa (slika 34).

Stopnje transpozicije brez podvojitve transpozicijskega elementa so:

1. **Navzkrižen (stopničast) rez** na dvojni verigi na koncih transpozicijskega elementa in **rez** na tarčnem mestu,
2. **izrez** transpozicijskega elementa in
3. **prenos** transpozicijskega elementa v tarčno mesto ter **sinteza** manjkajočih nukleotidnih zaporedij.

Stopnje transpozicije s podvojitvijo transpozicijskega elementa so:

1. **Navzkrižen (stopničast) rez** na dvojni verigi na koncih transpozicijskega elementa in **rez** na tarčnem mestu,
2. **povezava** prostih koncev transpozicijskega elementa in tarčnega mesta (nastanek **kointegrata**), **sinteza** manjkajočih nukleotidnih zaporedij in
3. **razprtje** kointegrata.



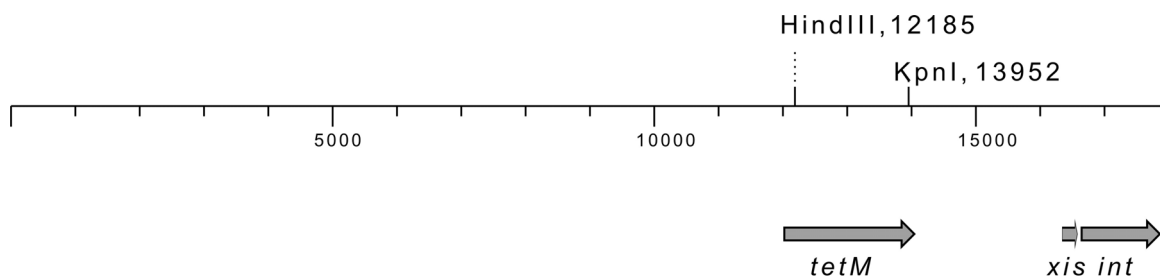
Slika 32: Shematski prikaz transpozicije

Uporaba transpozicijskih elementov:

1. **Mutiranje** genov;
2. **kartiranje** kromosomov (mesto podobnosti za Hfr, ugotavljanje razporeditve genov v operonu);
3. **prenašalci** regij podobnosti, restrikcijskih mest za encime, različnih zaporedij;
4. **genske fuzije** (transkripcijska fuzija, translacijska fuzija).

## KONJUGATIVNA TRANSPOZICIJA

**Konjugativna transpozicija** je medcelično ali znotrajcelično premikanje transpozicijskega elementa v obliki krožnega intermediata. **Konjugativni transpozoni** so elementi DNA bakterij, ki se lahko premikajo znotraj genoma, kakor tudi s konjugacijo v drugo celico. V prvem primeru gre za **znotrajcelično** (intracelularno), v drugem pa za **medcelično** (intercelularno) transpozicijo (slika 36).



### Tn916 (18.032 bp)

#### Slika 33: Shematski prikaz konjugativnega transpozona Tn916

Od pogosteje uporabljenih restrikcijskih encimov (BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, PvuII, SalI, SmaI, SphI in XbaI) Tn916 režeta samo dva – na karti Tn916 sta označeni njuni restrikcijski mesti. Enota na narisnem merilu je 500 bp.

Za konjugativno transpozicijo oz. konjugativne transpozone velja, da so neke vrste himere. Konjugativni transpozoni namreč združujejo lastnosti transpozonov, plazmidov in bakteriofagov.

Konjugativni transpozoni so podobni transpozonom po tem, da se lahko izključijo in vključijo v DNA. Razlikujejo pa se od transpozonov po načinu, kako proces poteka, saj imajo kovalentno zaprt krožni intermediat in ob njihovi vključitvi ne pride do podvojitve tarčnega mesta.

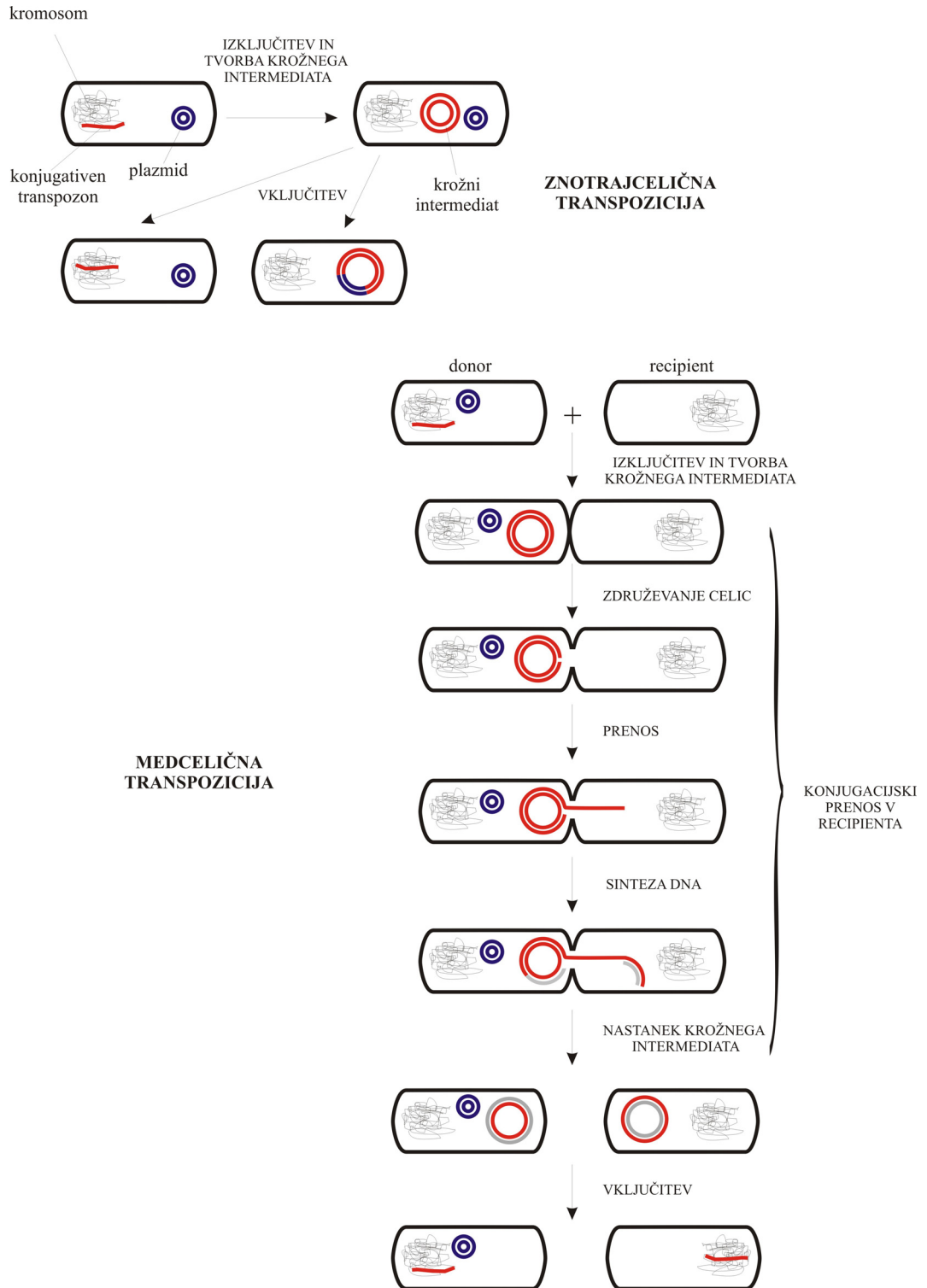
Konjugativni transpozoni so podobni plazmidom po tem, da tvorijo krožni intermediat in se prenašajo v recipienta s konjugacijo. Od njih pa se razlikujejo po tem, da se krožni intermediat ne podvaja, vsaj ne v gostiteljih, ki so jih do sedaj preučili.

Konjugativni transpozoni so podobni tudi fagom, ker se lahko vključijo v kromosom in izključijo iz njega podobno kot temperirani (“zmerni”) fagi, ki imajo tudi krožne intermediate DNA. Z določitvijo zaporedij DNA integraz nekaterih konjugativnih transpozonov so ugotovili, da jih zaradi podobnosti lahko uvrstimo v družino lambda integraz. V nasprotju s fagi pa konjugativni transpozoni ne tvorijo virusnih delcev, ki bi se prenašali s transdukcijo.



Prenos konjugativnih transpozonov lahko razdelimo v naslednje faze:

1. **Izključitev** iz genoma in tvorba krožnega **intermediata**;
2. **vklučitev** krožnega intermediata na neko drugo mesto v isti celici **ali** njegov **prenos** s procesom konjugacije v drugo celico, v recipienta;
3. **synteza komplementarne verige** preneseni enoverižni DNA v donorju in recipientu in **vklučitev** v genom.



Slika 34: Shematski prikaz konjugativne transpozicije



## NAVODILA ZA VARNO DELO PRI VAJAH

### 1. Lokacija izvedbe vaj

Vaje Molekulske biologije genov na Oddelku za biologijo potekajo v dveh vajalnicah: v biokemijsko-genetski vajalnici (prostor: Z.2.25) in v genetski vajalnici (prostor: Z.2.10).

### 2. Dovoljeno največje število študentov v skupini pri vajah

V vajalnici se lahko zadržuje le tolikšno število študentov, kot je predvideno oz. to omogoča prostorska in opremska kapaciteta vajalnice.

### 3. Uporabljena oprema na vajah

Uporabljajo se mikroorganizmi, ki so vključeni v posameznih vajah. Nekateri izmed njih so potencialno patogeni. Uporabljajo se tudi vsa oprema, pripomočki in sredstva, ki so potrebni za izvedbo posameznih vaj (avtomatske pipete, gelske elektroforeze ...).

### 4. Nevarnosti za človeka

Delo z opremo, pripomočki in sredstvi, ki so potrebni za izvedbo vaj, lahko povzroči telesne poškodbe (gorilniki, steklovina ...). Delo s kemikalijami ima lahko toksične učinke in povzroči alergije. Nekatero kemikalije in svetloba UV so mutageni dejavniki. Svetloba UV povzroča tudi hude poškodbe oči in poškodbe kože.

### 5. Nevarnosti za okolje in prebivalstvo

Sprostitev uporabljenih kemikalij v okolje je lahko nevarna in predstavlja nevarnost tudi za prebivalstvo. Nekateri mikroorganizmi, ki se jih uporablja na vajah, so potencialno patogeni, zato lahko njihova sprostitve v okolje ogrozi prebivalstvo.

### 6. Zaščitni ukrepi in pravila obnašanja

Pred začetkom vaj se študenti seznanijo z navodili za varno delo z mikroorganizmi, sredstvi, opremo, kemikalijami in pripomočki. Med praktičnim poukom se lahko študenti zadržujejo le v prostorih, ki so predvideni za opravljanje tega pouka. Samostojno sprehajanje študentov po drugih prostorih ni dovoljeno. V vseh prostorih, kjer se opravlja praktični pouk, je potrebno vzdrževati red in čistočo. Delo z mikroorganizmi poteka s sterilno tehniko. Velja načelo, da je vsaka mikrobnna kultura, tudi taka z nepatogenimi mikroorganizmi, lahko nevarna (možnost vzporedne ali naknadne okužbe z obligatnimi ali potencialno patogenimi mikroorganizmi). Pri uporabi opreme, sredstev in pripomočkov je potrebno upoštevati navodila za varno delo, ki jih izda proizvajalec opreme, sredstev in pripomočkov. Obleke, torbe in drugo opremo, razen tiste, ki jo nujno potrebujejo pri delu (zvezki, pisala, priročniki za vaje), študenti puščajo zunaj laboratorija. V vajalnicah in drugih prostorih, namenjenih izvedbi laboratorijskih vaj, se nosi zaščitna obleka (halja) in po potrebi rokavice. Izven prostorov, namenjenih vajam, je nošenje halje prepovedano. Nosi se zaprta obutev (odprti natikači in sandali niso dovoljeni). Dolge lase je potrebno povezati in fiksirati v zatilju. Prehranjevanje in pitje v laboratoriju ni dovoljeno. K ustom ni dovoljeno prinašanje nobenega dela opreme ali nerazkuženih rok. Pipetiranje z usti je v mikrobiološkem laboratoriju prepovedano. Za pipetiranje se uporabljajo avtomatske pipete in pipetorji s filtri. Vse rane na odkritih delih telesa morajo biti prekrte (obvezane in/ali pokrite z rokavicami). Roke si operemo pred vstopom in pred vsakim zapuščanjem laboratorija. Standardni postopek pranja rok je pod tekočo vodo in ob uporabi ustreznega baktericidnega detergenta. Delovni pulti se pred in po uporabi

razkužijo s 70-odstotnim etanolom ali drugim razkužilom. Seznanite se z mestom shranjevanja naslednjih nujnih pripomočkov (prva pomoč, gasilni aparat, zaporni ventil za plin, mesto za izpiranje oči). Vse postopke izvedite tako, da zmanjšate nevarnost razlivanja ali nastanek aerosolov. To posebno velja za ožiganje bakterioloških zank, s katerimi smo prenašali bakterijsko kulturo. Ostanke kulture na zanki je treba najprej posušiti v zgornjem delu plamena, kjer je temperatura nižja, in šele ko se ostanki kulture posušijo, spustimo zanko nižje nad osrednji stožec plamena in počakamo, da popolnoma zažari. Uporaba ostrih predmetov je omejena na postopke, pri katerih ni druge možnosti. Iz laboratorija ni dovoljeno odnašati ne predmetov in ne mikrobnih kultur brez dovoljenja voditelja vaj – asistenta. Plinske gorilnike se zapre, kadar niso v uporabi. Po koncu vaj se preveri, ali je zaprt plinski ventil na mizi in ali je zaprt plinski dotok pod mizo. Rezultate dela se sproti zapisuje.

### **7. Dezinfekcija in odstranjevanje odpadnega materiala**

Delovne površine se pred in po delu dezinficirajo z ustreznim dezinfekcijskim sredstvom (70 % etanol ali kakšno komercialno dezinfekcijsko sredstvo). Pred in po delu se roke umije z milom in dezinficira z antiseptikom. Odstranjevanje odpadkov je urejeno tako, da ločujemo nekužne od kužnih odpadkov. Vse odpadke odlagamo na zanje določena mesta. V steklene kozarce odlagamo nastavke za avtomatske pipete in mikrocentrifugirke. V posebne steklene kozarce odlagamo nastavke za avtomatske pipete in mikrocentrifugirke, če so bili v stiku z organskimi topili. V posebne steklene kozarce odlagamo uporabljene zobotrebnice. Steklene pipete odlagamo v plastične odlagalnike. Vse, kar je potrebno avtoklavirati, odlagamo na za to določeno mesto. Ostri predmeti (škarje, skalpeli, britvice) imajo svoje mesto v kartonasti škatli. Razbito steklovino in druge ostre predmete odlagamo v zbiralnike z oznako ostri predmeti. Uporabljene žametne krpe odlagamo v plastično vedro z razkužilom.

### **8. Ukrepi v primeru nezgode in prva pomoč**

Če se vam dogodi kakršna koli nesreča, nemudoma obvestite asistenta. Ob manjših razlilih natakните rokavice, popivnajte razlilje s papirno brisačo in vse prelijte z razkužilom. Pustimo 10 minut in nato pobrišemo mesto. Uporabljene papirnate brisače odložimo v odlagalnike za avtoklaviranje. Oskrbimo tudi najmanjše rane. Ogenj, ki nastane zaradi požara ali eksplozije, pogasimo. Če je potrebno, pokličemo gasilce. V primeru zastoja utripa srca ali dihanja pričnemo z oživljanjem in poiščemo zdravniško pomoč (tel. 112). Pri nezgodah s sredstvi je potrebno ukrepati skladno z navodili o ukrepih in prvi pomoči, ki jih izdaja proizvajalec sredstev.

### **9. Možne posledice neupoštevanja navodil**

Zaradi neupoštevanja navodil se ogroža lastno zdravje in zdravje ljudi v okolici, ogroža se tudi naravno okolje. Zaradi neupoštevanja navodil lahko pride do poškodbe opreme, pripomočkov in sredstev.

### **10. Odgovornosti**

Za varno delo je odgovoren vsak posameznik, ki je na vajah. Tehnično osebje je odgovorno za pravilen transport in odstranjevanje odpadkov. Asistent je odgovoren za potek vaj in upoštevanje navodil za varno delo.

## ŠTUDENTSKO SOGLASJE O VARNOSTI

*V laboratoriju, v katerem boste delali, boste prišli v stik s potencialno patogenimi mikroorganizmi in zdravju škodljivimi kemikalijami. Pri delu uporabljamo mednarodno priporočena varnostna navodila. Prosimo vas, da ta navodila upoštevate in se jih držite. Zavarujte sebe, svoje kolege in učitelje pred okužbo.*

*Da boste varni:*

- 1. Uživanje hrane, pitje, uporaba kozmetike, žvečilnih gumijev ali tobačnih izdelkov je najstrožje prepovedano. Nošenje kratkih hlač in odprte obutve je prepovedano. Vstavljanje kontaktnih leč v laboratoriju ni dovoljeno. Ves nepotreben pribor in opremo pustite pred laboratorijem. Nikoli ne uporabljajte laboratorija sami.*
- 2. Podvežite lase do ramen. Ves čas v laboratoriju se z rokami ne dotikajte obraza. Ničesar ne dajajte v usta (svinčnik ...). V laboratoriju je obvezno nošenje zaščitne obleke (halje). Odprte rane si zaščitite.*
- 3. Oglejte si mesto, kjer je na voljo gasilni aparat. V primeru požara prenehajte z delom, vse odložite in se umaknite. Pokličite pomoč.*
- 4. Oglejte si, kje je mesto za spiranje oči. Oči si vedno spirajte s hladno vodo.*
- 5. Razkužite svoje delovno mesto pred začetkom in po koncu dela. Preden zapustite laboratorij, si temeljito operite roke.*
- 6. Z vsemi mikrobnimi kulturami ravnajte skrajno skrbno. Upoštevajte, da lahko vsak mikroorganizem povzroči obolenje. NIKOLI ne pipetirajte z usti. Takoj obvestite vodjo vaj, če ste razlili ali ste se polili z mikrobnno kulturo. Mikrobne kulture nikoli ne smejo iz laboratorija.*
- 7. Ves uporabljeni material odlagajte na ustrezna mesta ali v posode.*
- 8. Strogo upoštevajte navodila za delo s plinskim gorilnikom.*
- 9. Strogo upoštevajte navodila za delo v digistoriju.*
- 10. Strogo upoštevajte navodila za delo z elektroforezo.*

*Prebral/a sem gornja navodila in se jih bom držal/a.*

*Ime in priimek:*

*Podpis:*

*Datum:*



## VAJA 1 – UPORABA MOLEKULSKEGA KLONIRANJA ZA ANALIZE GENOMA: Priprava klonov s promotorji

S to vajo želimo klonirati promotorje in ugotoviti njihovo aktivnost v različnih pogojih.

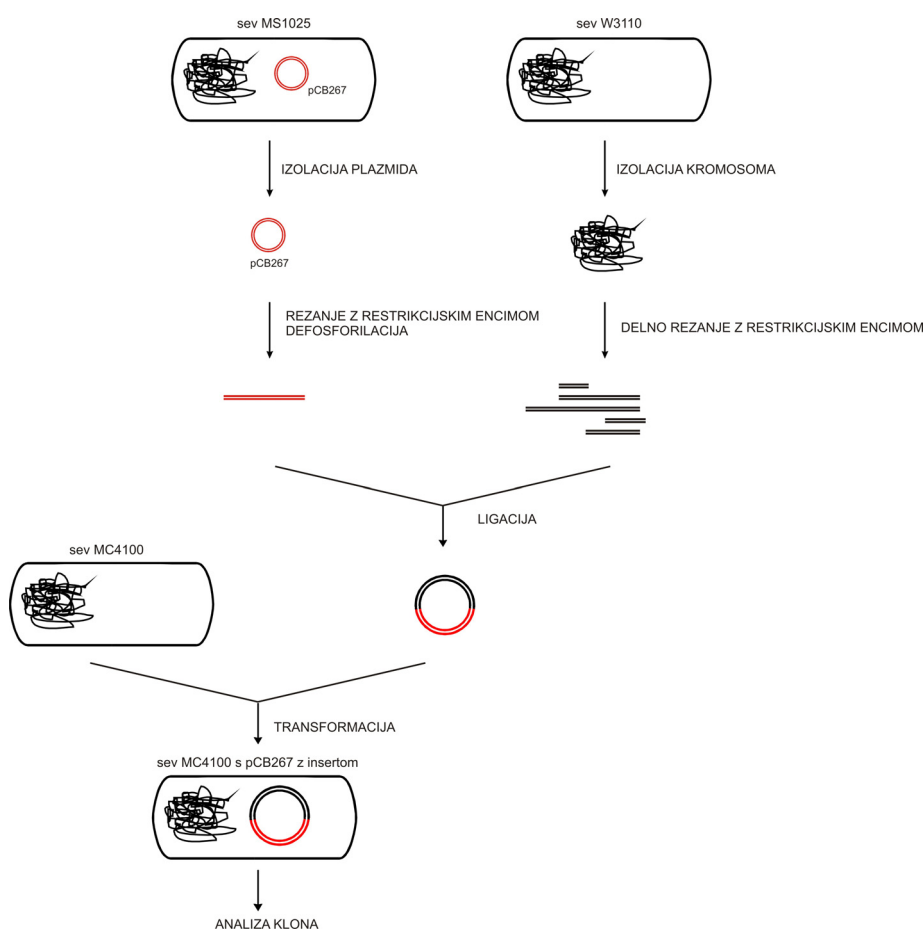
### Bakterijski sevi:

**MS1025** = DH5 $\alpha$  s plazmidom pCB267 (Ap<sup>r</sup>, 100  $\mu$ g/mL)

**MC4100** = *araD139*  $\Delta$ (*argF-lac*)*U169 rpsL150 relA1 flbB5301 ptsF25 deoC1* (Sm<sup>r</sup>, 150  $\mu$ g/mL)

**W3110** = F<sup>-</sup>  $\lambda^-$  *rph-1 INV(rrnD, rrnE)*

Shema poteka vaje:



### 1. dan

#### **Priprava prekonočne kulture bakterijskega seva MS1025**

S sterilno zanko prenesi kolonijo bakterijskega seva *E. coli* MS1025 s trdnega gojišča v 5 mL tekočega gojišča LB Ap. Gojišče ob stresanju inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 2. dan

#### **Prenos in priprava prekonočne kulture bakterijskega seva MS1025 v večjem volumnu**

Odvzemi toliko prekonočne kulture seva MS1025, da bo, po prenosu v sveže gojišče, redčitev 1:500. Prenesi tako v 25 mL svežega tekočega LB Ap, kot tudi v 10 mL svežega tekočega gojišča LB Ap. Obe gojišči ob stresanju inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 3. dan

#### **Izolacija plazmida pCB267**

Izoliraj plazmid pCB267 iz 25 mL bakterijske kulture seva MS1025 s kompletom »QIAGEN Plasmid Midi Kit«. Pri izolaciji upoštevaj navodila v priročniku proizvajalca »QIAGEN Plasmid Purification Handbook«, str. 19–23.

Izoliraj plazmid pCB267 iz 2 mL bakterijske kulture seva MS1025 s spodaj opisanim postopkom za izolacijo plazmidne DNA z alkalno denaturacijo.

#### **IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA Z ALKALNO DENATURACIJO**

Centrifugiraj **2 mL** bakterijske kulture 2 min pri 13.000 obr./min in sobni temperaturi. Odlj supernatant in njegov ostanek previdno odstrani z avtomatsko pipeto. Bakterijske celice resuspendiraj v **100 µL ledeno hladne raztopine I**. Suspenziji dodaj **200 µL sveže pripravljene raztopine II**. Inkubiraj **5 min** na ledu. Suspenziji dodaj **150 µL ledeno hladne raztopine III in takoj** premešaj z obračanjem. Inkubiraj še **15 min** na ledu. Po inkubaciji centrifugiraj **10 min** pri 13.000 obr./min in 4 °C. Prenesi **400 µL** supernatanta v novo mikrocentrifugirko in dodaj **enak volumen zmesi fenol/kloroform/izoamil alkohol**. Premešaj in ponovno centrifugiraj 5 min. Vodno fazo zopet prenesi v novo mikrocentrifugirko in dodaj **enak volumen zmesi kloroform/izoamil alkohol**. Premešaj in ponovno centrifugiraj 5 min. Vodno fazo zopet prenesi v novo mikrocentrifugirko in plazmidno DNA obori z dodatkom **2,5-kratnega volumna 96 % etanola**. Centrifugiraj 10 minut pri 13.000 obr./min in 4 °C. Odlj supernatant in oborini dodaj **1 mL 80 % etanola**. Premešaj ter centrifugiraj 5 min pri 13.000 obr./min in sobni temperaturi. Odstrani ves etanol ter oborino osuši do suhega pri 37 °C. Izolirani plazmidni DNA dodaj **25 µL pufra TE z RNazo**. Izolirano DNA hrani v zamrzovalniku (–20 °C).

**OPOZORILO:** Vse delo s fenolom in kloroformom mora potekati ob uporabi rokavic in v digestoriju!



## Priprava prekončne kulture bakterijskega seva MC4100

S sterilno zanko prenesi kolonijo bakterijskega seva *E. coli* MC4100 s trdnega gojišča v 5 mL tekočega gojišča LB. Gojišče ob stresanju inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 4. dan

#### Preverjanje uspešnosti izolacije plazmida pCB267

Preveri uspešnost izolacije plazmidne DNA pCB267 z agarozno gelsko elektroforezo s spodaj opisanim postopkom.

#### PRIPRAVA AGARozNEGA GELA in GELSKA ELEKTROFOREZA

Pripravi 1 L pufra  $0,5 \times$  TBE iz založne raztopine  $5 \times$  TBE. Odvzemi 30 mL pufra  $0,5 \times$  TBE in ga prenesi v 100 mL erlenmajerico. Vanjo dodaj ustrezno količino **agaroze**, ki je določena z dolžino fragmentov DNA, ki jih želiš ločiti.

Konc. agaroze v gelu (%)	Ločljivost DNA (kb)
0,3	60–5
0,6	20–1
0,7	10–0,8
0,9	7–0,5
1,2	6–0,4
1,5	4–0,2
2,0	3–0,1

Erlenmajerico s pufrom in agarozo prenesi v mikrovalovno pečico in jo previdno segrevaj toliko časa, da se agarozna raztopi. Ko je agarozna raztopljena, nadomesti vodo, ki je izparela, z destilirano vodo. Nato raztopljeni agarozni dodaj **1,3  $\mu$ L 10 mg/mL raztopine etidijevga bromida** in premešaj. V času, ko se erlenmajerica z raztopljeno agarozo ohlaja, pripravi nosilec za gel s primernim glavničkom. Ko je raztopljena agarozna ohlajena do  $\sim 60$  °C (lahko držiš v orokavičeni dlani), gel razlij na nosilec in počakaj, da polimerizira. Ohlajeni gel prenesi v elektroforetsko kadičko in ga prelij z  $0,5 \times$  TBE.

V mikrocentrifugirko z **vzorcem DNA** dodaj ustrezno količino **6  $\times$  raztopine barvila za nanos** in pomešaj. Zmes vzorca in barvila prenesi v jamico agaroznega gela. Na gel nanesi tudi raztopino fragmentov DNA znanih koncentracij in dolžin. Elektroforetsko kadičko priključi na električno polje ustrezne jakosti. Po končani elektroforezi gel osvetli z UV in ga analiziraj.

Na gel nanesi 5  $\mu$ L vzorca izolirane plazmidne DNA z dodanim 1  $\mu$ L  $6 \times$  raztopine barvila za nanos. Z merjenjem absorbance pri 260 nm in 280 nm v spektrofotometru določi količino in čistost izolirane DNA. Uporabi postopek opisan na naslednji strani.

## SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE KOLIČINE IN ČISTOSTI DNA

V mikrocentrifugirko prenesi najprej **995  $\mu\text{L}$  sterilnega 10 mM TrisCl, pH 7,0**, in nato **5  $\mu\text{L}$**  izoliranega plazmida, ki mu želiš določiti koncentracijo in čistost. Dobro premešaj. Tako redčeno plazmidno DNA prenesi v kvarčno kiveto in v spektrofotometru izmeri absorbanco (A) pri valovni dolžini 260 nm in pri valovni dolžini 280 nm.

Koncentracijo DNA izračunaj iz podatka, da  $A_{260} = 1$  predstavlja koncentracijo **50  $\mu\text{g}$  DNA v 1 mL merjenega vzorca**. Izolirana DNA je dovolj čista, če je razmerje  $A_{260}/A_{280} = 1,8\text{--}2,0$ .

### Linearizacija plazmida pCB267

Plazmid pCB267 reži z restrikcijskim encimom BamHI. Pripravi si 20  $\mu\text{L}$  restrikcijske zmesi:

- 2  $\mu\text{g}$  plazmidne DNA
- 2  $\mu\text{L}$  10  $\times$  pufra za BamHI
- 0,4  $\mu\text{L}$  restrikcijske endonukleaze BamHI (10 U/ $\mu\text{L}$ )
- do 20  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O

Restrikcijsko zmes inkubiraj preko noči pri 37 °C v peščeni kopeli.

### Priprava kompetentnih celic seva MC4100

Za pripravo kompetentnih celic seva MC4100 uporabi spodaj opisani postopek.

#### PRIPRAVA KOMPETENTNIH CELIC ZA TRANSFORMACIJO

**0,5 mL** prekončne bakterijske kulture seva prenesi v 50 mL predhodno ogretega tekočega gojišča LB v 500-mL erlenmajerici in ob stresanju inkubiraj pri 37 °C do koncentracije 10<sup>8</sup> celic/mL ( $A_{600} = 0,5\text{--}0,6$ ). **35 mL** kulture prenesi v ohlajeno centrifugirko in inkubiraj 10 min na ledu. V tem času pripravi 10 mikrocentrifugirk z **23  $\mu\text{L}$  87 % glicerola** (zaradi viskoznosti glicerola avtomatsko pipeto nastavi na 25  $\mu\text{L}$  in pipetiraj zelo počasi). Mikrocentrifugirke z glicerolom prenesi na led do uporabe. Centrifugirke z bakterijsko kulturo po inkubaciji centrifugiraj 10 min pri 5.000–10.000 obr./min in temperaturi 4 °C. Odlj supernatant v odlagalnik, z avtomatsko pipeto odstrani ostanek supernatanta. Bakterijske celice resuspendiraj v **7 mL ledeno hladnega 0,1 M CaCl<sub>2</sub>**. Inkubiraj 10 min na ledu. Centrifugiraj 10 min pri 5.000–10.000 obr./min in 4 °C. Odlj supernatant in odstrani ostanek supernatanta. Resuspendiraj bakterijske celice v **1 mL 0,1 M ledeno hladne raztopine CaCl<sub>2</sub>**. Kompetentne celice lahko uporabiš takoj ali pa jih po **100  $\mu\text{L}$**  prenesi v ohlajene mikrocentrifugirke z glicerolom, rahlo premešaj ter celice do uporabe shrani pri –80 °C.

## 5. dan

### **Priprava vektorja pCB267**

Na 1 % agarozni gel nanesi 15  $\mu\text{L}$  z restrikcijskim encimom BamHI rezanega plazmida pCB267 z ustrežno količino  $6 \times$  raztopine barvila za nanos in izvedi agarozno gelsko elektroforezo. Preostanek plazmida shrani pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Lineariziran vektor izreži iz gela in ga očisti s kompletom »GeneJet Gel Extraction Kit« po navodilih proizvajalca. Koncentracijo DNA izmeri spektrofotometrično z enakim postopkom kot prejšnji dan.

Očiščen plazmid shrani pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

5'-konce očiščenega vektorja defosforiliraj z alkalno fosfatazo SAP. Za defosforilacijo vektorja pripravi 20  $\mu\text{L}$  reakcijsko zmes:

- 1  $\mu\text{g}$  plazmidne DNA
- 2  $\mu\text{L}$   $10 \times$  reakcijskega pufra za alkalno fosfatazo SAP
- 1  $\mu\text{L}$  alkalne fosfatze SAP (1 U/ $\mu\text{L}$ )
- do 20  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$

Zmes dobro premešaj, na kratko centrifugiraj in inkubiraj 30 min pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  v peščeni kopeli. Defosforiliran vektor očisti s kompletom »GeneJet PCR purification kit« po navodilih proizvajalca. Na koncu uporabi 30  $\mu\text{L}$  elucijskega pufra. Očiščen defosforiliran plazmid shrani pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Uspešnost priprave vektorja preveri z agarozno gelsko elektroforezo v agaroznem gelu z 1 % koncentracijo agaroze. Vzorec za elektroforezo pripravi tako, da k 5  $\mu\text{L}$  očiščene plazmidne DNA dodaš 1  $\mu\text{L}$   $6 \times$  raztopine barvila za nanos in pomešaš. Na osnovi fragmentov DNA znanih koncentracij, ki jih tudi naneseš na gel, oceni koncentracijo DNA defosforiliranega in očiščenega vektorja pCB267 v gelu.

### **Izvedba testne transformacije**

Testno transformacijo izvedi s postopkom opisanim na naslednji strani.

## TRANSFORMACIJA KOMPETENTNIH CELIC S PLAZMIDNO DNA

Mikrocentrifugirki s **100 µL** kompetentnih bakterijskih celic dodaj **1–10 µL 10–100 ng izoliranega plazmida**, premešaj ter inkubiraj **30 min na ledu**. Mikrocentrifugirko s celicami in DNA prenesi v vodno kopel pri **42 °C**. Inkubiraj **90 s**. Mikrocentrifugirko takoj prenesi na **led** in inkubiraj **1–2 min**. Dodaj **400 µL gojišča LB** ter ob stresanju inkubiraj **60 min** pri **37 °C**. Po inkubaciji razmaži 100 µL celic z Drigalskijevo spatulo po selekcijski plošči LB Ap in inkubiraj preko noči pri 37 °C ali preko konca tedna pri sobni temperaturi.

### 6. dan

#### **Učinkovitost testne transformacije**

Preglej plošče LB Ap, ki so se inkubirale preko noči, preštej število kolonij ter izračunaj učinkovitost po spodnji formuli.

$$\text{učinkovitost} = \frac{\text{št. transformant}}{\mu\text{g DNA}}$$

#### **Priprava prekončne kulture bakterijskega seva W3110**

S sterilno zanko prenesi kolonijo bakterijskega seva *E. coli* W3110 s trdnega gojišča v 5 mL tekočega gojišča LB. Gojišče ob stresanju inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 7. dan

#### **Izolacija kromosomske DNA bakterijskega seva W3110**

Iz prekončne kulture bakterijskega seva W3110 izoliraj kromosomsko s postopkom po Gaastri, opisanim na naslednji strani.

### IZOLACIJA BAKTERIJSKE KROMOSOMSKE DNA (Wim Gaastra)

Odvzemi **2 mL** bakterijske prekonočne kulture in jo prenesi v 2 mL mikrocentrifugirko ter centrifugiraj 10 min pri 6.000 obr./min in sobni temperaturi. Odlij supernatant ter ostanek odstrani z avtomatsko pipeto. Bakterijske celice resuspendiraj v **1 mL raztopine TEG/lizocim** (2 mg/mL lizocima je dodano v TEG tik pred uporabo). Inkubiraj **10 min** pri sobni temperaturi. Suspenziji dodaj **50 µL 10 % raztopine SDS**. Premešaj in inkubiraj **10 min** pri sobni temperaturi. Po inkubaciji dodaj **20 µL 10 mg/mL raztopine proteinaze K** in inkubiraj pri **55 °C**, da postane raztopina jasna (če je potrebno, lahko inkubiraš preko noči). Po inkubaciji obori DNA z dodatkom **107 µL (1/10 volumna) 3 M NaOAc (pH = 5,3)** in **1070 µL ledeno hladnega izopropanola**. Obe fazi nežno premešaj z obračanjem mikrocentrifugirke. DNA se bo obarjala in postala vidna kot belkast klobčič. Oborjeno DNA prenesi v novo mikrocentrifugirko in jo raztopi v **1 mL TE (pH = 7)**. Raztapljanje oborjene DNA lahko poteka tudi nekaj minut pri 37 °C ali pa preko noči pri 4 °C. Ko je DNA raztopljena, ponovno dodaj **50 µL 10 % raztopine SDS** in **20 µL 10 mg/mL raztopine proteinaze K** ter inkubiraj pri **55 °C**, 10 min. Po inkubaciji dodaj **enak volumen zmesi fenol/kloroform/izoamil alkohol** in nežno premešaj ter inkubiraj **10 min pri sobni temperaturi**. Centrifugiraj 10 min pri 10.000 obr./min. Po centrifugiranju zgornjo, vodno fazo z DNA (brez nečistoč!) prenesi v novo mikrocentrifugirko in dodaj **enak volumen zmesi fenol/kloroform/izoamil alkohol**. Premešaj in ponovno centrifugiraj 10 min. Vodno fazo z DNA zopet prenesi v novo mikrocentrifugirko in postopek s fenolom/kloroformom/izoamil-alkoholom ponovi tolikokrat, da po centrifugiranju med obema faza ne bo več vidne vmesne faze z nečistočami (interfaza). Očiščeni vodni fazi z DNA dodaj **enak volumen zmesi kloroform/izoamil alkohol** in ponovno centrifugiraj. Vodno fazo prenesi v novo mikrocentrifugirko in DNA obori z dodatkom **0,6-kratnega volumna izopropanola** ali **2,5-kratnega volumna 96 % etanola**. Centrifugiraj 10 min pri 13.000 obr./min in 4 °C. Odlij supernatant in oborini dodaj **1 mL 80 % etanola**. Premešaj ter centrifugiraj 5 min pri 13.000 obr./min in sobni temperaturi. Odstrani ves etanol ter oborino DNA osuši do suhega v odprti mikrocentrifugirki pri 37 °C. Izolirano kromosomsko DNA raztopi v **100 µL pufra TE z RNazo**.

OPOZORILO: Vse delo s fenolom in kloroformom mora potekati ob uporabi rokavic in v digestoriju!

Prisotnost kromosomske DNA v vzorce preveri z elektroforezo v agaroznem gelu (0,7 % agaroz). Vzorec za elektroforezo pripravi tako, da 5 µL DNA pomešaš z 1 µL 6 × raztopine barvila za nanos. Spektrofotometrično določi količino izolirane DNA (str. 46).

### 8. dan

#### **Delno rezanje kromosomske DNA bakterijskega seva W3110**

Za delno rezanje izolirane kromosomske DNA bakterijskega seva W3110 uporabi restriksijsko endonukleazo Bsp143I. Pripravi 60 µL restriksijske zmesi:

- ~ 1 µg kromosomske DNA
- 6 µL 10 × pufra za Bsp143I
- 0,4 µL restriksijske endonukleaze Bsp143I (10 U/µL)
- do 60 µL H<sub>2</sub>O

Restriksijsko zmes inkubiraj 5, 10, 15 oz. 10, 15, 20 min pri 37 °C v peščeni kopeli. Po inkubaciji pri 37 °C restriksijski zmesi odvzemi 15 µL in prenesi v novo mikrocentrifugirko ter restriksijski encim v zmesi toplotno inaktiviraj z 20-minutno inkubacijo pri 65 °C. Z agarozno gelsko elektroforezo preveri uspešnost delnega rezanja kromosomske DNA. Vzorec za elektroforezo pripravi tako, da 5 µL rezane DNA pomešaš z 1 µL 6 × raztopine barvila za nanos. Za kloniranje promotorjev uporabi tisto rezano genomsko DNA, katere fragmenti bodo dolgi okoli 2–5 kb.

### **Ligacija fragmentov kromosomske DNA z vektorjem pCB267**

Pripravi dve ligacijski zmesi po 10 µL. V eni uporabi iz gela očiščeno DNA vektorja pCB267, rezano z encimom BamHI, ki je nisi defosforiliral, v drugi uporabi očiščeno DNA vektorja pCB267, rezano z encimom BamHI, ki si jo defosforiliral. Vsaka od 10 µL ligacijske zmesi naj vsebuje:

- ~100 ng DNA vektorja pCB267
- 3–5 × več fragmentov z Bsp143I rezane kromosomske DNA
- 1 µL 10 × pufra za ligacijo
- 1 µL T4-ligaze (1 U/µL)
- do 10 µL H<sub>2</sub>O

Ligacijske zmesi premešaj, kratko centrifugiraj in inkubiraj preko noči pri 16 °C.

### **9. dan**

#### **TRANSFORMACIJA KOMPETENTNIH CELIC Z LIGACIJSKO ZMESJO**

K **100 µL** kompetentnih bakterijskih celic v mikrocentrifugirki dodaj **5 µL ligacijske zmesi vektorja in fragmentov kromosomske DNA**, premešaj ter inkubiraj **30 min** v ledu. Mikrocentrifugirko s celicami in DNA prenesi v vodno kopel pri 42 °C. Inkubiraj **90 s**. Mikrocentrifugirko takoj prenesi v led in inkubiraj **1–2 min**. Dodaj **400 µL gojišča LB** ter ob stresanju inkubiraj **60 min** pri 37 °C.

Da boš lahko določil titer bakterij v transformacijski zmesi, izvedi redčitev transformacijske zmesi. Po inkubaciji **10 µL** transformacijske zmesi redči do redčitve 10<sup>-4</sup> in 10<sup>-5</sup> v redčitveni vrsti (10 oz. 100 µL bakterij prenašaš v 990 oz. 900 µl fiziološke raztopine) ter po 100 µL redčene kulture prenesi na ploščo LB ter z Drigalskijevo spatulo razmaži do posameznih kolonij.

Za selekcijo transformant prenesi **100 µL oz. 200 µL transformirane bakterijske kulture** na selekcijsko gojišče LB Ap in z Drigalskijevo spatulo razmaži do posameznih kolonij. Preostalo transformacijsko zmes centrifugiraj 1 min pri 13.000 obr./minuto. Odlj supernatant in oborino resuspendiraj v 100 µL gojišča LB ter razmaži na drugo selekcijsko gojišče LB Ap.

Vse plošče inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 10. dan

Preštej število kolonij na ploščah, izračunaj frekvenco transformacije za vsako ligacijsko zmes.

Transformante prenesi s sterilnim zobotrebcem na gojišče LB Ap. Ploščo inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 11. dan

Transformante na plošči LB Ap z odtisom preko žameta prenesi na dva seta plošč s štirimi različnimi gojišči: MG glc Ap X-gal in MG Ap X-fosfat ter LB Ap X-gal in LB Ap X-fosfat. En set plošč inkubiraj preko noči pri sobni temperaturi in drugi set plošč inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 12. dan

Preveri obarvanost kolonij na različnih gojiščih. Za posamezne kolonije podaj razlago o aktivnosti kloniranih promotorjev. Preštej število belih in modro obarvanih kolonij na posameznih ploščah in izračunaj delež modro obarvanih kolonij za vsako gojišče pri obeh temperaturah.

V 10 mL tekočega gojišča LB Ap prenesi s sterilno zanko izbrano modro kolonijo ter ob stresanju inkubiraj gojišče preko noči pri 37 °C.

### 13. dan

S kompletom »GeneJet Plasmid Miniprep kit« izoliraj plazmidno rekombinantno DNA iz prekonočne bakterijske kulture.

Pripravi 20 µL restrikcijske zmesi:

- 14 µL plazmidne rekombinante DNA
- 2 µL 10 × restrikcijskega pufra za EcoRI
- 3,6 µL H<sub>2</sub>O
- 0,4 µL restrikcijske endonukleaze EcoRI (10 U/µL).

Restrikcijsko zmes inkubiraj preko noči pri 37 °C v peščeni kopeli.

Pripravi tudi reakcijsko zmes, v kateri namesto plazmidne rekombinante DNA uporabiš DNA nerekombinantnega plazmida pCB267. Tudi to restrikcijsko zmes inkubiraj preko noči pri 37 °C v peščeni kopeli.

#### **14. dan**

Z agarozno gelsko elektroforezo (1 % agaroz) preveri uspešnost rezanja DNA v obeh restrikcijskih zmesih. Na gel nanesi tudi nerezano plazmidno rekombinantno DNA in nerezano nerekombinantno plazmidno DNA. Na osnovi fragmentov DNA znanih dolžin oceni dolžino inserta v rekombinantni DNA.



## VAJA 2 –URAVNAVANJE GENSKEGA IZRAŽANJA: Promotor *PtraJ* in $\beta$ -galaktozidazni test

S to vajo bomo preverjali vpliv globalnih regulatorjev IHF in Crp na aktivnost promotorja *PtraJ* z  $\beta$ -galaktozidaznim testom. Za to bomo uporabili izogene bakterijske seve: sev MC4100 w. t., sev MC4100 z mutacijo v genu *himA* (gen za  $\alpha$ -podenoto IHF) in sev MC4100 z mutacijo v genu *crp* (gen za Crp).

### Bakterijski sevi:

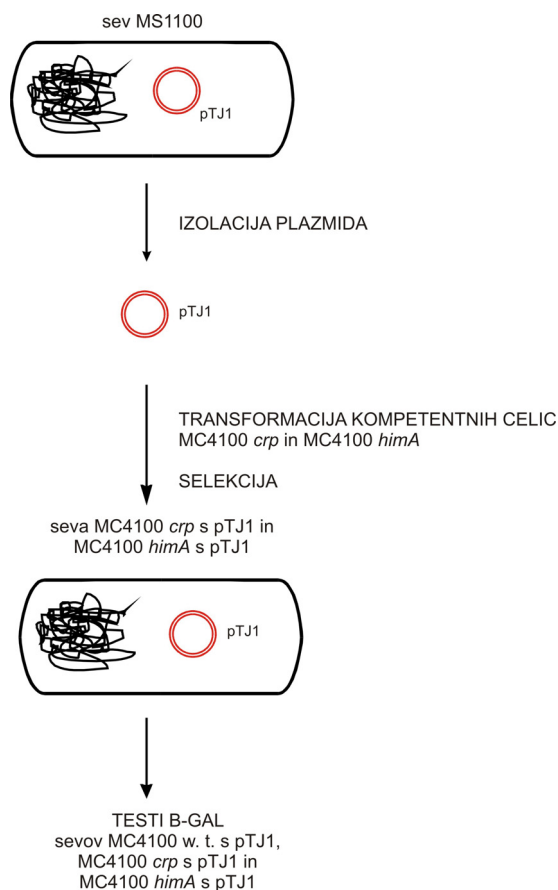
**MC4100** = *araD139*  $\Delta$ (*argF-lac*)*U169 rpsL150 relA1 flbB5301 ptsF25 deoC1* ( $\text{Sm}^r$ , 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

**MS1100** = MC4100 w.t. s plazmidom pTJ1 ( $\text{Ap}^r$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

**MS1041** = MC4100  $\Delta$ *crp*:: $\text{Cm}^r$  ( $\text{Cm}^r$ , 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

**MS1046** = MC 4100  $\Delta$ 82 [*himA*]:: $\text{Tc}^r$  ( $\text{Tc}^r$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Shema poteka vaje:



### 1. dan

#### **Priprava prekonočne kulture bakterijskega seva MS1100**

S sterilno zanko prenesi kolonijo bakterijskega seva *E. coli* MS1100 s trdnega gojišča v 5 mL tekočega gojišča LB Ap in ob stresanju inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 2. dan

#### **Izolacija plazmida pTJ1**

Plazmid pTJ1 izoliraj z metodo, ki vključuje STET in CTAB (spodaj opisan postopek).

#### **IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA S STET IN CTAB**

Prenesi 1,5 mL kulture seva, iz katerega želiš izolirati plazmidno DNA, v mikrocentrifugirko. Centrifugiraj jo v mikrocentrifugi 1 min. Z avtomatsko pipeto odstrani ves supernatant. Bakterijske celice resuspendiraj v **200 µL** pufra **STET**. Dobro premešaj ter dodaj **4 µL lizocima** (50 mg/mL). Inkubiraj 5 min pri sobni temperaturi. Mikrocentrifugirko s suspenzijo inkubiraj 45 s pri **100 °C** in centrifugiraj 10 min v mikrocentrifugi. S sterilnim zobotrebcem odstrani usedlino (zobotrebec z usedlino odvrzi v odlagalnik) in preostalemu supernatantu dodaj **8 µL 5 % CTAB**. Centrifugiraj 5 min v mikrocentrifugi ter z avtomatsko pipeto odstrani ves supernatant. Usedlino resuspendiraj v **300 µL 1,2 M NaCl** in premešaj na mešalu. Plazmidno DNA obori z dodatkom **750 µL 96 % etanola** pri sobni temperaturi. Premešaj z obračanjem mikrocentrifugirke. Centrifugiraj 10 min v mikrocentrifugi. Odstrani ves supernatant ter oborini plazmidne DNA dodaj **1 mL 80 % etanola**. Centrifugiraj v mikrocentrifugi ter odstrani ves supernatant. Oborino plazmidne DNA osuši v odprti mikrocentrifugirki pri **37 °C**. Oborini dodaj **25 µL** pufra **TE** z dodano **RNazo** (50 µg/mL). Izolirano DNA hrani v zamrzovalniku (−20 °C).

#### **Preverjanje uspešnosti izolacije pTJ1**

Uspešnost izolacije pTJ1 preveri z gelsko agarozno elektroforezo, kot je opisano v Vaji 1 (4. dan). Izoliran plazmid pTJ1 shrani pri −20 °C do nadaljnje uporabe.

### 3. dan

#### **Priprava prekonočne kulture bakterijskih sevov MS1041 in MS1046**

S sterilno zanko prenesi kolonijo bakterijskega seva *E. coli* MS1041 in MS1046 (izogeni sevi MC4100) v 5 mL tekočega gojišča LB. Gojišču z bakterijami seva MS1041 dodaj 25 µg/mL Cm in gojišču z bakterijami seva MS1046 *himA* dodaj 10 µg/mL Tc ter ob stresanju inkubiraj preko noči pri 37 °C.

## Razsolitev izoliranega pTJ1 z dializo na nitroceluloznem membranskem filtru

Razsolitev izoliranega pTJ1 izvedi s spodaj opisanim postopkom.

### RAZSOLITEV Z DIALIZO NA NITROCELULOZNEM MEMBRANSKEM FILTRU

Dno stekleno petrijevko prekrij z destilirano vodo (debelina vodnega sloja približno 1 cm). S sterilno kovinsko pinceto prenesi majhen krožen membranski nitrocelulozni filter z 0,025  $\mu\text{m}$  porami (Millipore, ref VSWP02500) na vodno površino. Pri tem pazi, da je svetleča se stran membrane obrnjena navzgor. Raztopino DNA, ki jo želiš razsoliti, prenesi na sredino nitroceluloznega membranskega filtra in pokrij petrijevko s pokrovom, da preprečiš izhlapevanje. Inkubiraj na delovnem pultu pri sobni temperaturi 30 min. Po inkubaciji razsoljeno raztopino DNA prenesi v mikrocentrifugirko in hrani do uporabe pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 4. dan

### Priprava celic sevov MS1041 in MS1046 za elektroporacijo

Pripravi celice izogenih sevov MC4100 (sev MS1041 in MS1046) za elektroporacijo s spodaj opisanim postopkom.

### MINIPRIJAVA CELIC ZA ELEKTROPORACIJO

**1 mL** prekončne bakterijske kulture seva prenesi v 100 mL predhodno ogretega tekočega gojišča LB v 500-mL erlenmajerici in ob stresanju inkubiraj pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  do koncentracije  $10^8$  celic/mL ( $A_{600} = 0,5-0,6$ ). Kulturo z ustreznim  $A_{600}$  inkubiraj 15 min na ledu. **1 mL** ohlajene kulture prenesi v ohlajeno mikrocentrifugirko in centrifugiraj 1 min pri 13.000 obr./min in  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Odlj supernatant v odlagalnik in z avtomatsko pipeto odstrani ostanek supernatanta. Bakterijske celice resuspendiraj v **1 mL ledeno hladne sterilne destilirane  $\text{H}_2\text{O}$** . Postopek centrifugiranja in resuspendiranja ponovi še 2-krat. Po drugem centrifugiranju resuspendiraj v **160  $\mu\text{L}$  ledeno hladne sterilne destilirane  $\text{H}_2\text{O}$** . Tako pripravljene celice uporabi za elektroporacijo. (Če bi celice želeli hraniti za kasnejšo uporabo, bi jih po zadnjem centrifugiranju morali namesto v hladni sterilni destilirani vodi resuspendirati v 160  $\mu\text{L}$  ledeno hladnega 10 % glicerola in jih hraniti pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### Elektroporacija celic sevov MS1041 in MS1046 s plazmidom pTJ1

Plazmid pTJ1 vnese v celice sevov MS1041 in MS1046, ki si jih predhodno pripravil za elektroporacijo. Elektroporacijo izvedi s postopkom, opisanim na naslednji strani.

## ELEKTROPORACIJA BAKTERIJSKIH CELIC S PLAZMIDNO DNA

Mikrocentrifugirki s **160  $\mu$ L** celic, pripravljenih za elektroporacijo, dodaj **1  $\mu$ L plazmidne DNA**, premešaj ter inkubiraj **2 min na ledu**. Vsebino mikrocentrifugirke prenesi v ohlajeno elektroporacijsko kiveto. Kiveto obriši in jo prenesi v elektroporator. Celice izpostavi **5 ms napetosti 1.700 V**. Po elektroporaciji v kiveto dodaj 1 mL gojišča SOC in vso vsebino kivete prenesi v mikrocentrifugirko. Ob stresanju inkubiraj **60 min pri 37 °C**. Po inkubaciji izvedi selekcijo.

Za selekcijo transformant prenesi 100  $\mu$ L bakterijske kulture na selekcijsko gojišče LB Ap Sm, in jo razmaži z Drigalskijevo spatulo. Preostalo elektroporacijsko zmes centrifugiraj 1 min pri 13.000 obr./min. Odlj supernatant in oborino resuspendiraj v 100  $\mu$ L gojišča LB ter razmaži na drugo selekcijsko gojišče LB Ap Sm. Vse plošče inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 5. dan

#### **Preverjanje uspešnosti transformacije kompetentnih celic sevov MC4100 s pTJ1**

Na selekcijskih gojiščih LB Ap Sm preštej kolonije ter prenesi s sterilno zanko transformante s plazmidom pTJ1 na nove plošče selekcijskega gojišča LB Ap X-gal in jih razmaži do posameznih kolonij. Gojišča inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 6. dan

#### **Priprava prekonočnih kultur za $\beta$ -galaktozidazni test**

Prenesi eno kolonijo bakterij sevov MC4100 w.t. s pTJ1, MC4100 *crp* s pTJ1 in MC4100 *himA* s pTJ1 v 5 mL tekočega gojišča LB z ustreznimi antibiotiki (MC4100 w.t. s pTJ1 v LB Ap, MC4100 *crp* s pTJ1 v LB Ap Cm in MC4100 *himA* s pTJ1 v LB Ap Tc) in inkubiraj preko noči pri 37 °C ob stresanju.

### 7. dan

#### **$\beta$ -galaktozidazni test**

Odvzemi toliko bakterijske prekonočne kulture, da bo, po prenosu v 5 mL svežega ogretega tekočega gojišča LB, redčitev 1 : 500 in ob stresanju inkubiraj pri 37 °C do  $A_{600} \cong 0,4$ . Ko doseže bakterijska kultura  $A_{600} \cong 0,4$ , ponovno odvzemi toliko bakterijske kulture, da bo, po prenosu v 10 mL svežega ogretega tekočega gojišča LB, redčitev 1 : 500. Iz ponovno redčene bakterijske kulture takoj odvzemi vzorec za prvo

meritev  $\beta$ -galaktozidazne aktivnosti (postopek opisan na naslednji strani). Preostanek kulture ob stresanju inkubiraj pri 37 °C. Iz te kulture odvzemi vzorec za meritev  $\beta$ -galaktozidazne aktivnosti še 3-krat. Ne pozabi pripraviti tudi vzorednega vzorca brez bakterijske kulture, ki ga boš potreboval za umeritev spektrofotometra!

### **$\beta$ - GALAKTOZIDAZNI TEST**

**2 mL** bakterijske kulture prenesi v 2 mL mikrocentrifugirko in 15 min inkubiraj v ledu. **1 mL** ohlajene bakterijske kulture uporabi za meritev  $A_{600}$ . **1 mL** ohlajene bakterijske kulture centrifugiraj 10 min pri 5.000 obr./min. Odlj supernatant. Celice resuspendiraj v **1 mL pufra Z**. Suspenziji dodaj **20  $\mu$ L kloroforma** in 10  $\mu$ L 0,1 % **SDS** ter 15 s mešaj na mešalu. Pripravi reakcijsko zmes, sestavljeno iz **0,5 mL bakterijske suspenzije** in **0,5 mL pufra Z**. Po 5-minutni inkubaciji zmesi pri 28 °C zmesi dodaj **0,2 mL ONPG** in dobro pretresi. Inkubiraj pri 28 °C najmanj 15 min oziroma do pojava rumene obarvanosti in zatem dodaj **0,5 mL 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$** , da prekineš reakcijo. Izmeri absorbanco pri 420 in 550 nm.

Število enot  $\beta$ -galaktozidaze (1 enota encima  $\beta$ -galaktozidaze je tista količina encima, ki v 1 min hidrolizira 1 nmol ONPG pri 28 °C in pH = 7) izračunaj po spodnji enačbi:

$$B = \frac{A_{420} - 1,75 \times A_{550}}{t \times V \times A_{600}} \times 1000$$

B = št. enot  $\beta$ -galaktozidaze  
 $A_{420}$  = absorbanca pri 420 nm  
 $A_{550}$  = absorbanca pri 550 nm  
 $A_{600}$  = absorbanca pri 600 nm  
t = čas v minutah  
V = volumen bakterijske kulture v reakcijski zmesi v mL

Izračunaj število enot  $\beta$ -galaktozidaze in nariši graf!

### VAJA 3 – URAVNAVANJE GENSKEGA IZRAŽANJA: Plazmid pRK100 in konjugacija

S to vajo bomo preverjali vpliv globalnih regulatorjev IHF in Crp na frekvenco konjugativnega prenosa plazmida pRK100. Tudi pri tej vaji bomo uporabili izogene bakterijske seve: sev MC4100 w. t., sev MC4100 z mutacijo v genu *himA* (gen za  $\alpha$ -podenoto IHF) in sev MC4100 z mutacijo v genu *crp* (gen za Crp).

#### Bakterijski sevi:

**MC4100** = *araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flbB5301 ptsF25 deoC* (Sm<sup>r</sup>, 150 μg/mL)

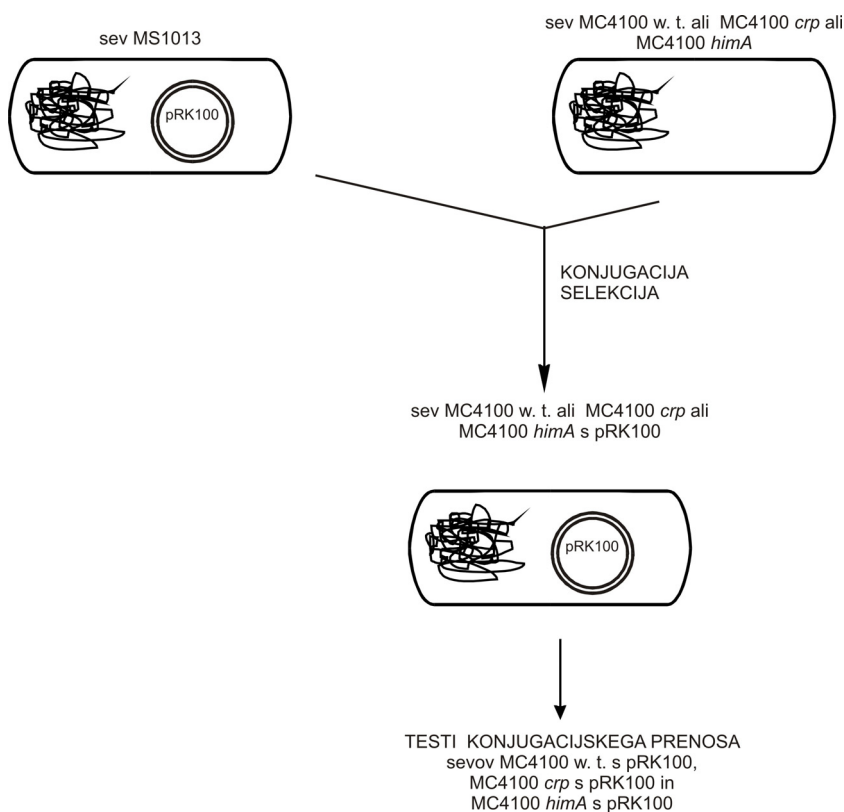
**MS1041** = MC4100  $\Delta crp::Cm^r$  (Cm<sup>r</sup>, 25 μg/mL, Sm<sup>r</sup>, 150 μg/mL)

**MS1046** = MC 4100  $\Delta 82 [himA]::Tc^r$  (Tc<sup>r</sup>, 10 μg/mL, Sm<sup>r</sup>, 150 μg/mL)

**MS1013** = DH5 $\alpha$  s plazmidom pRK100 (Ap<sup>r</sup>, 100 μg/mL; Tc<sup>r</sup>, 10 μg/mL)

**DH5 $\alpha$**  = *supE44 ΔlacU169 Φ80lacZΔM15 hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1* (Nal<sup>r</sup>, 25 μg/mL)

Schema poteka vaje:



### 1. dan

#### **Konjugacijski prenos plazmida pRK100 v izogene bakterijske seve MC4100**

Kolonijo sev MS1013, ki je donor plazmida pRK100 in kolonijo recipientskega seva MC4100 w. t. oz. MC4100 *crp* oz. MC4100 *himA* razmaži s sterilno zanko po isti plošči LB tako, da lahko bakterije obeh sevov med seboj pridejo v stik. Ploščo inkubiraj preko noči pri 37 °C.

Izvedi še kontrolo selekcijskih gojišč LB Ap Sm za konjugante, tako da s sterilno zanko ločeno premažeš donorski in recipientski sev na selekcijsko gojišče LB Ap Sm. Inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 2. dan

#### **Selekcija za konjugante po konjugacijskem prenosu plazmida pRK100 v seve MC4100**

S sterilno zanko postrgaj iz plošče LB prejšnjega dne konjugacijsko zmes donorja, recipienta in konjugant. Bakterije na zanki dobro razmaži po plošči selekcijskega gojišča LB Ap Sm. Ploščo inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 3. dan

#### **Prenos bakterijskih celic poraslih na selekcijskem gojišču po konjugaciji v izogene seve MC4100 na sveže selekcijsko gojišče**

Kolonijo, zraslo na selekcijskem gojišču LB Ap Sm, prenesi s sterilno zanko na novo selekcijsko gojišče LB Ap Sm in razmaži po plošči do posameznih kolonij. Ploščo inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 4. dan

#### **Priprava prekonočnih kultur bakterijskih sevov za kvantitativen konjugacijski prenos za ovrednotenje vpliva mutacij na frekvenco konjugacije**

Kolonijo bakterijskih donorskih sevov, seva MC4100 w.t. s pRK100, seva MC4100 *crp* s pRK100 in seva MC4100 *himA* s pRK100 s sterilno zanko prenesi s trdnega gojišča v 10 mL tekočega gojišča LB z ustreznimi antibiotiki in ob stresanju inkubiraj preko noči pri 37 °C.

Kolonijo bakterijskega recipientskega sev DH5 $\alpha$  prenesi s sterilno zanko s trdnega gojišča v 10 mL tekočega gojišča LB in ob stresanju inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 5. dan

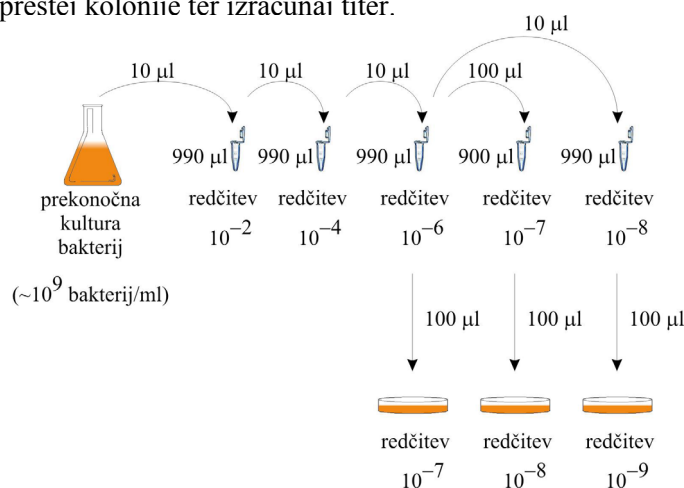
#### **Kvantitativen konjugacijski prenos za ovrednotenje vpliva mutacij na frekvenco konjugacije**

Odvzemi toliko prekonočne bakterijske kulture, da bo, po prenosu v 5 mL svežega tekočega ogretega gojišča LB, redčitev 1 : 100 in ob stresanju inkubiraj 2 h pri 37 °C. Po 2-urni inkubaciji pripravi konjugacijske zmesi, tako da pomešaš 0,05 mL donorja (MC4100 w.t. s pRK100 ali MC4100 *crp* s pRK100 ali MC4100 *himA* s pRK100) in 0,45 mL recipienta (sev DH5 $\alpha$ ) in 0,5 mL svežega gojišča LB ter inkubiraj 2 h pri 37 °C, da poteka konjugacija (brez stresanja!). Za kontrolo inkubiraj 2 h pri 37 °C tudi ločeno 0,5 mL donorske in recipientske kulture, ki si jima dodal 0,5 mL svežega gojišča LB.

Da boš lahko izračunal frekvenco konjugacije, določi titer recipientskega in donorskega seva (spodaj opisan postopek). Da boš lahko določil titer, redči do redčitve  $10^{-4}$  in  $10^{-5}$  v redčitveni vrsti ter po 100  $\mu$ L redčene kulture prenesi na ploščo LB ter z Drigalskijevo spatulo razmaži do posameznih kolonij.

#### **DOLOČITEV ŠTEVILA BAKTERIJ V MILILITERU KULTUR (TITER)**

Bakterijsko kulturo, ki ji želiš določiti titer, redči v redčitveni vrsti **do zelene redčitve**, ki je odvisna od pričakovane gostote celice (npr. prekonočno kulturo redčimo do  $10^{-8}$ ). Redči s fiziološko raztopino in uporablaj mikrocentrifugirke. Redči v korakih po 100  $\times$  oz. 10  $\times$ . Pri vsaki redčitvi celice dobro premešaj. Iz zelenih razredčin redčitvene vrste prenesi po 100  $\mu$ L na ploščo LB in razmaži z Drigalskijevo spatulo. Inkubiraj preko noči pri 37 °C in naslednji dan preštei kolonije ter izračunaj titer.



**Redčitvena vrsta prekonočne bakterijske kulture**



Po 2-urni inkubaciji vse bakterijske konjugacijske zmesi nanesi na ustrezna selekcijska gojišča LB Ap Nal ter jih inkubiraj preko noči pri 37 °C.

**6. dan**

Preveri rast kolonij na selekcijskih gojiščih (v primeru nanosa kontrolnih paralelk konjugacije na selekcijska gojišča ne sme biti rasti!), preštej število kolonij na selekcijskih gojiščih in izračunaj frekvenco konjugacije.

## VAJA 4 - UPORABA TRANSDUKCIJE ZA PRIPRAVO SEVOV Z MINIMALNIMI SPREMEMBAMI: Prenos mutiranega gena med sevi

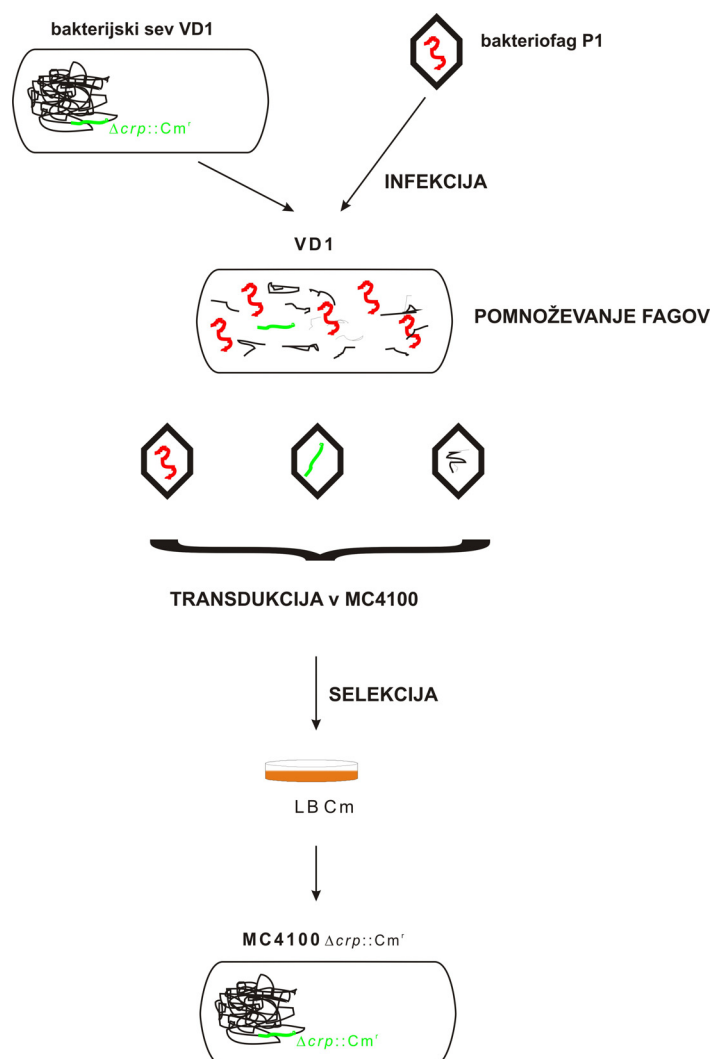
S to vajo želimo pripraviti sev MC4100 z mutacijo v genu *crp* (zapis za globalni regulator Crp) s prenosom mutirane DNA iz donorskega seva z mutacijo v genu *crp* s fagom P1.

### Bakterijski sevi:

**VD1** = nelizogen sev GS1068 (GS1068 = GS162  $\Delta crp::Cm^r$   $\lambda$ -lizogen) ( $Cm^r$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ )

**MC4100** = *araD139*  $\Delta(argF-lac)U169$  *rpsL150* *relA1* *flbB5301* *ptsF25* *deoC1* ( $Sm^r$ , 150  $\mu\text{g/mL}$ )

Shema poteka vaje:



### 1. dan

#### **Priprava prekonočne kulture bakterijskega seva VD1**

S sterilno zanko prenesi sev bakterije *E. coli* VD1 (nelizogen GS1068) v 5 mL tekočega gojišča LB Cm. Gojišču dodaj 25  $\mu$ L 1 M CaCl<sub>2</sub> in ob stresanju inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 2. dan

#### **Prenos bakterijskega seva VD1**

20  $\mu$ L prekonočne kulture seva VD1 prenesi v sveže gojišče – v 5 mL tekočega gojišča LB Cm. Gojišču dodaj 25  $\mu$ L 1 M CaCl<sub>2</sub> in ob stresanju inkubiraj preko noči pri 37 °C.

#### **Določitev titra bakteriofaga P1**

Določi titer bakteriofaga P1 s spodaj opisanim postopkom.

#### **DOLOČITEV TITRA BAKTERIOFAGA P1**

Pripravi R-mehki agar: raztopi ga in prenesi po 2,5 mL v manjše epruvete in inkubiraj v termobloku pri 46 °C. V fiziološki raztopini redči bakteriofagni lizat P1 (končne redčitve v redčitveni vrsti od –3 do –7) in ga po 0,1 mL vsake redčitve prenesi v mikrocentrifugirke z 0,1 mL neredčene prekonočne bakterijske kulture indikatorskega seva. Predhodno adsorpcijo fagov izvedi z inkubacijo 20 min v vodni ali peščeni kopeli pri 37 °C. Po inkubaciji dodaj zmes faga in bakterijskih celic v 2,5 mL R-mehkega agarja v termobloku, dobro premešaj in prelij na predgrete R-plošče. Plošče inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 3. dan

#### **Določitev titra bakteriofaga P1**

Preštej plake na R-ploščah in na osnovi tega izračunaj titer bakteriofagov P1.

#### **Priprava lizata bakteriofaga P1 za transdukcijo – 1. del**

100  $\mu$ L prekonočne kulture bakterijskega seva VD1 prenesi v 5 mL tekočega gojišča LB Cm. Gojišču dodaj 25  $\mu$ L 1 M CaCl<sub>2</sub> in inkubiraj ob stresanju 2 h pri 37 °C.

Po 2-urah uporabi bakterije seva VD1 za razmnoževanje kulture bakteriofagov. Prenesi 1 mL bakterijske kulture seva VD1 v mikrocentrifugirko in mu dodaj 10<sup>7</sup> fagov ter

inkubiraj 20 min pri 37 °C v vodni ali peščeni kopeli (predhodno adsorpcijo fagov na bakterijske celice VD1). Preostalo bakterijsko kulturo VD1 inkubiraj preko noči ob stresanju pri 37 °C.

Po 20-minutni predhodni adsorpciji fagov na bakterijske celice VD1 prenesi vso zmes fagov in bakterij v 2,5 mL R-top agarja (46 °C) in prenesi na R-plošče.

Plošče inkubiraj preko noči pri 37 °C.

#### **4. dan**

##### **Prenos seva VD1**

20 µL prekonočne kulture seva VD1 prenesi v sveže gojišče – v 5 mL tekočega gojišča LB Cm. Gojišču dodaj 25 µL 1 M CaCl<sub>2</sub> in ob stresanju inkubiraj preko noči pri 37 °C.

##### **Priprava lizata bakteriofaga P1 za transdukcijo – 2. del**

S spatulo postrgaj mehki agar preko noči inkubiranih plošč in speri površino plošče z 1 mL LB. Prenesi v 2-mL mikrocentrifugirko in dodaj 0,5 mL kloroforma, 10 min mešaj na namiznem mešalu (vorteks) in 20 min inkubiraj pri sobni temperaturi. Po inkubaciji centrifugiraj 10 min pri 10.000 obr./min. (Transducirajoči fagi so v supernatantu!). Supernatant prenesi v novo mikrocentrifugirko in do uporabe shrani pri 4 °C.

#### **5. dan**

##### **Določitev titra bakteriofaga P1**

Določiti titer bakteriofaga P1 (glej postopek opisan 2. dan).

##### **Priprava prekonočne kulture bakterijskega seva MC4100**

S sterilno zanko prenesi kolonijo seva bakterije *E. coli* MC4100 s trdnega gojišča v 5 mL tekočega gojišča LB in ob stresanju inkubiraj preko noči pri 37 °C.

#### **6. dan**

##### **Transdukcija bakterijskega seva MC4100 z bakteriofagom P1/VD1**

Prenesi 1 mL prekonočne kulture seva MC4100 v mikrocentrifugirko, centrifugiraj 1 min pri 13.000 obr./min, odlij supernatant in resuspendiraj v 1 mL pufru MC.

Ob stresanju inkubiraj 15 min pri 37 °C.

V mikrocentrifugirko prenesi 0,1 mL suspenzije bakterijskih celic v pufri MC in 0,1 mL fagnega lizata. Pripravi tudi ustrezni kontroli (0,1 mL suspenzije celic + 0,1 mL LB in 0,1 mL fagnega lizata + 0,1 mL LB).

Predhodno adsorpcijo fagov na bakterijske celice izvedi z inkubacijo 20 min v vodni ali peščeni kopeli pri 37 °C.

Po inkubaciji dodaj 0,2 mL 1 M Na-citrata in celice razmaži z Drigalskijevo spatulo na selekcijsko ploščo z gojiščem LB Cm. Plošče inkubiraj preko noči pri 37 °C.

### 7. dan

Preveri rast kolonij na selekcijskih gojiščih (v primeru nanosa kontrolnih paralelk transdukcije na selekcijska gojišča ne sme biti rasti!), preštej število kolonij na selekcijskih gojiščih in izračunaj frekvenco transdukcije.

## TEORETIČNE OZ. RAČUNALNIŠKE NALOGE

### Naloga 1:

Raztopino I pripravi iz 1,8 g glukoze, 0,788 g TrisCl, 0,744 g EDTA in vode do 200 mL. Koliko odstotna (%) je glukoza, koliko molarna (M) sta TrisCl in EDTA?

$Mr(\text{TrisCl}) = 157,6$ ;  $Mr(\text{EDTA}) = 372,2$

### Naloga 2:

Raztopina II mora biti vedno sveže pripravljena po receptu: 1 % SDS in 0,2 N NaOH. Koliko mL 10 % SDS in koliko mL 10 N NaOH potrebujete za 10 mL raztopine II?

### Naloga 3:

Raztopino III ste pripravili iz 60 mL 5 M K-acetata in 11,5 mL ledocetne kisline ter vode do 100 mL? Koliko gramov (g) K-acetata ste odtehtali in koliko molarna (M) je očetna kislina?

$Mr(\text{K-acetat}) = 98,14$ ;  $Mr(\text{ledocetna}) = 60,05$

### Naloga 4:

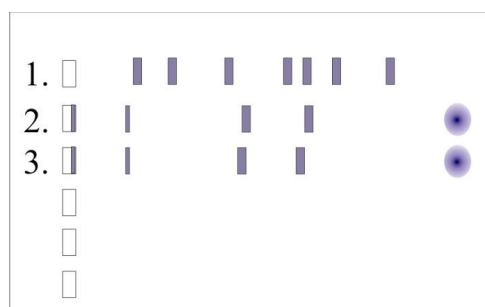
Pufer za RNazo pripravi iz 0,0788 g Tris, 0,04383 g NaCl, 0,1 M Na-fosfatnega pufru in vode do 50 mL. Koliko odstotna (%) sta Tris in NaCl in koliko mL 1 M Na-fosfatnega pufru potrebuješ?

### Naloga 5:

Za elektroforezo potrebujete 30 mL 2 % agaroznega gela. Za pufer si pripravi 1 L  $10 \times$  TBE po receptu: 10,8 % baza Tris, 5,5 % borove kisline in 0,02 M EDTA (pH = 8). Na voljo imate kristalizirano bazo Tris, 20 % borovo kislino in 0,5 M EDTA. Kako si boste to pripravili?

### Naloga 6:

Spodaj je skicirana slika gela. V prvo jamico gela je bila vnesena lestvica fragmentov DNA naslednjih dolžin: 11 kb, 5 kb, 2 kb, 1,3 kb, 1 kb, 0,8 kb in 0,2 kb. V drugo jamico ste vnesli izolat, pridobljen po postopku za izolacijo plazmidne DNA s STET in CTAB iz seva KS1. V tretjo jamico ste vnesli izolat, pridobljen po postopku za izolacijo plazmidne DNA s STET in CTAB iz seva KS2. Razvili ste elektroforezo in pod UV ste videli več lis.

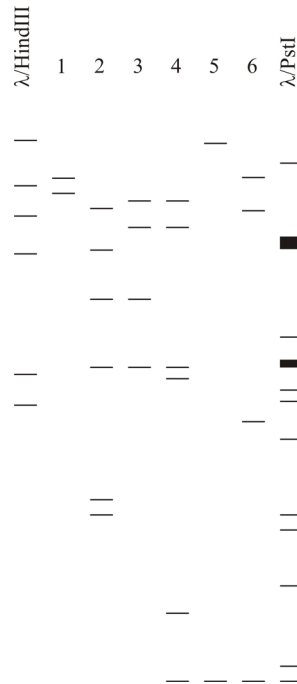


a) Na skici gela označi posamezne lise!

b) Kateri sev je imel večji plazmid?

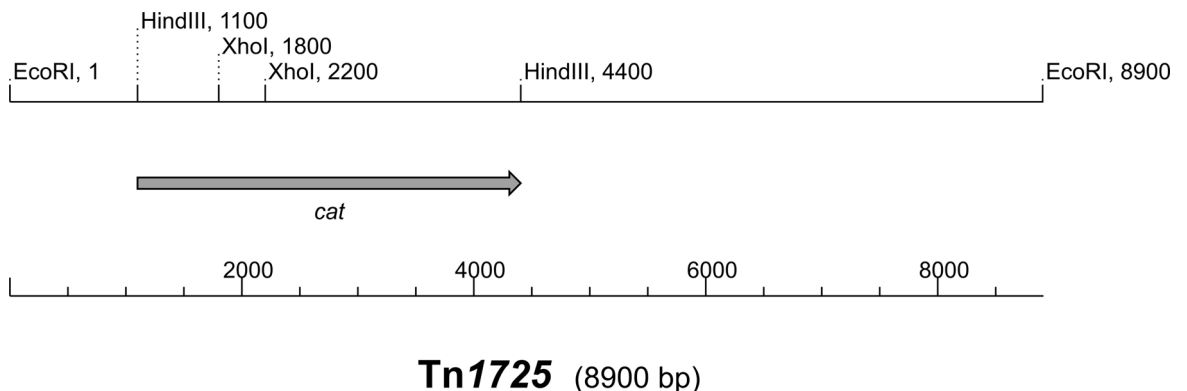
## Naloga 7: Restriksijski fragmenti plazmida pMS10

Plazmid pMS10, ki ima transpozon Tn1725, smo rezali v reakcijskih zmesih z različnimi restriksijskimi encimi, enkrat samo z EcoRI, enkrat samo s XhoI, enkrat samo s HindIII, pa v kombinaciji HindIII in XhoI, pa v kombinaciji EcoRI in HindIII ter v kombinaciji EcoRI in XhoI. Na osnovi dobljenih fragmentov plazmida, ki so vidni v gelu pri posameznih restriksijskih zmesih, ugotovite, katera restriksijska reakcija je bila vnesena v katero jamico.



**Slika 35: Restriksijski vzorec pMS10 po rezanju v različnih restriksijskih reakcijah**

Dolžine fragmentov standarda v kb:  $\lambda$ /HindIII: 23,1; 9,4; 6,5; 4,3; 2,3 in 2,0 ter  $\lambda$ /PstI: 11,5; (5-4,5); 2,8; (2,5-2,4); 2,1; 1,9; 1,7; 1,1; 1,0; 0,8; 0,5 in 0,4.



**Slika 36: Prepoznavna mesta za restriksijske encime na transpozonu Tn1725**

## Naloga 8: Inaktivacija encima

Po defosforilaciji plazmidnega vektorja z alkalno fosfatazo nisi imel časa takoj izvesti čiščenja defosforiliranega vektorja. Kako lahko zaustaviš reakcijo defosforilacije?

**Naloga 9:**

Poišči nukleotidno zaporedje promotorja *traJ* plazmida pRK100 in ga analiziraj:

- vezavna mesta za uporabljena začetna oligonukleotida
- vezavna mesta za CRP, H-NS, Lrp
- element UP
- promotorsko zaporedje
- Shine-Dalgarnovo zaporedje
- začetek prepisovanja mRNA za TraJ
- začetek prevajanja mRNA v TraJ
- začetek prepisovanja *finP*
- konec prepisovanja *finP*

**Naloga 10:**

Kolikšna je dolžina PCR-produkta *PtraJ* plazmida pRK100, če smo za namnožitev *PtraJ* uporabili naslednji par začetnih oligonukleotidov:

PtraJ-1 (5'-CGGGATCCTCCAAAAAATGATGATGAAT-3') in

PtraJ-2 (5'-GCTCTAGAATAGGAACCTCCTCACAAG-3')?

**Naloga 11:**

Za vstavitvev promotorja *PtraJ* v poliklonsko mesto plazmida pCB267 smo uporabili restriksijska encima BamHI in XbaI. Kakšni so konci DNA po rezanju pCB267 in *PtraJ* z restriksijskima encimoma BamHI in XbaI? Kako na teh mestih izgleda rekombinantna molekula pCB267::*PtraJ*? Kako dolg je insert v pCB267?

**Naloga 12:**

Za izolacijo plazmidne DNA potrebujete raztopino STET, ki je sestavljena iz 8 % saharoze, 0,1 % Tritona X-100, 50 mM EDTA (pH = 8), 50 mM Tris (pH = 8). Na razpolago imate: saharozo v prahu, tekoč 100 % Triton X-100, 0,5 M EDTA (pH = 8) in 1 M Tris (pH = 8). Pripravi si 0,5 L tega pufra.

**Naloga 13:**

Pufer STET ste pripravili iz 70 g saharoze, 0,875 mL Tritona X-100, 175 mL 0,25 M EDTA, 21,87 mL 2 M Tris in vode do 250 mL. Koliko je odstotna (%) raztopina saharoze in tritona, koliko je molarna (M) raztopina EDTA in Tris v pufri STET?

**Naloga 14:**

Koliko kratna je raztopina iz naloge 13 v primerjavi z raztopino iz naloge 12? Koliko raztopine iz naloge 13 bi vzeli namesto 200  $\mu$ L raztopine iz naloge 12?

**Naloga 15:**

Koliko gramov (g) CTAB potrebujete za 100  $\mu$ L 5 % CTAB?



**Naloga 16:**

Koliko gramov (g) NaCl potrebujete za 0,5 L 1,2 M NaCl?

$M_r(\text{NaCl}) = 58,5$

**Naloga 17:**

Kako bi pripravili 200 mL 80 % etanola?

**Naloga 18:**

Kakšno je redčenje prekonočne bakterijske kulture, če v 5 mL gojišča preneseš 100  $\mu\text{L}$  bakterijske kulture?

**Naloga 19:**

Kakšna je končna koncentracija  $\text{CaCl}_2$  v gojišču, če 25  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{CaCl}_2$  dodaš v 5 mL gojišča LB?

**Naloga 20:**

Podatki o rasti kulture MC4100 (vrednosti  $A_{600}$ ) po prenosu prekonočne kulture v sveže gojišče so zbrani v spodnji tabeli:

Čas inkubacije (min)	$A_{600}$
0	0,059
15	0,065
30	0,086
45	0,112
55	0,142
65	0,181
70	0,209

Iz podatkov tabele izračunaj, kakšen je generacijski čas bakterijske kulture. Predvidi, kdaj bo bakterijska kultura dosegla  $A_{600} = 0,4$ .

## REŠITVE NALOG

### Rešitev naloge 1:

0,9 % glukoza, 0,025 M TrisCl in 0,01 M EDTA

### Rešitev naloge 2:

1 mL 10 % SDS, 0,2 mL 10 N NaOH ter voda do 10 mL

### Rešitev naloge 3:

29,44 g K-acetata, 4,9 M očetna kislina

### Rešitev naloge 4:

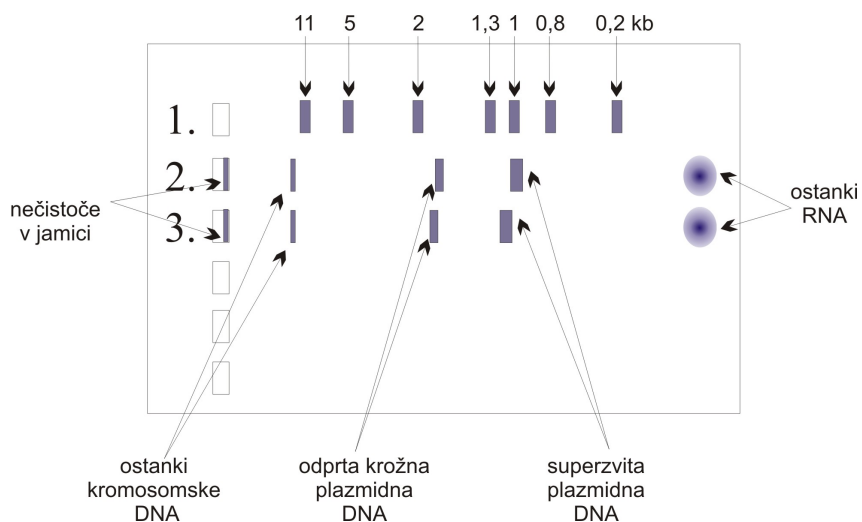
0,157 % Tris, 0,086 % NaCl in 5 mL 1 M Na-fosfatnega pufra

### Rešitev naloge 5:

108 g Tris, 275 mL borove kisline, 40 mL EDTA, voda do 1 L;  
0,6 g agaroze

### Rešitev naloge 6:

a)



b) KS2

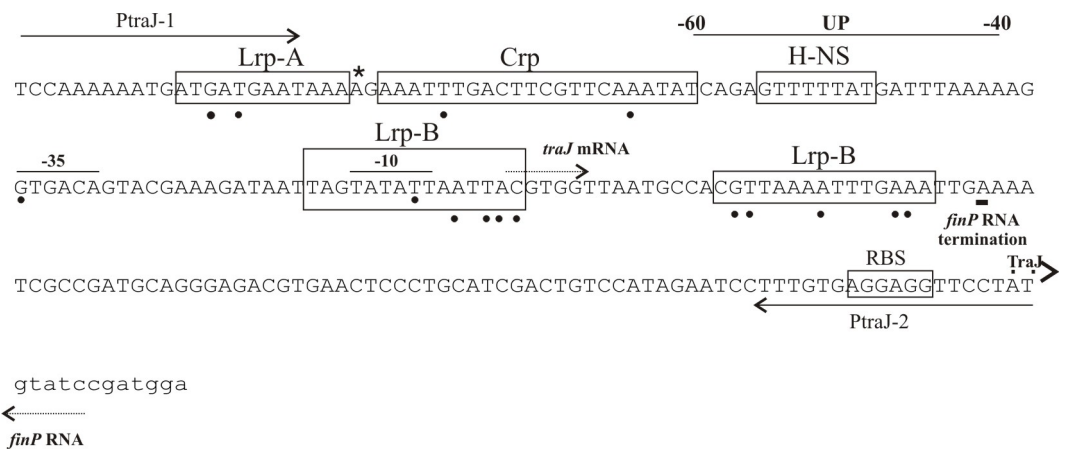
**Rešitev naloge 7:**

1. EcoRI
2. EcoRI+HindIII
3. HindIII
4. HindIII+XhoI
5. XhoI
6. EcoRI+XhoI

**Rešitev naloge 8:**

Po inkubaciji pri 37 °C reakcijsko zmes lahko toplotno inaktiviramo z inkubacijo 15 min pri 65 °C.

**Rešitev naloge 9:**



**Rešitev naloge 10:**  
226 bp.

**Rešitev naloge 11:**

**BamHI:**

5' ...G<sup>^</sup>G A T C C...3'  
3' ...C C T A G<sup>^</sup>G...5'

po rezanju

5' ...G G A T C C...3'  
3' ...C C T A G G...5'

**XbaI:**

5' ...T<sup>^</sup>C T A G A...3'  
3' ...A G A T C<sup>^</sup>T...5'

po rezanju

5' ...T C T A G A...3'  
3' ...A G A T C T...5'

*PtraJ* po rezanju BamHI in XbaI:

GATCCTCCAAAAATGATGATGAAT-----CTTTGTGAGGAGGTTTCCTATT  
GAGGTTTTTTTACTACTACTTA-----GAAACACTCCTCCAAGGATAAGATC

pCB267 po rezanju BamHI in XbaI:

-T GATCC-  
-AGATC G-

Rekombinantna molekula:

-TCTAGAATAGGAACCTCCTCACAAG-----ATTCATCTATCATTTTTTTGGAGGATCC-  
-AGATCTTATCCTTGGAGGAGTGTTTC-----TAAGTAGATAGTAAAAACCTCCTAGG-

Dolžina inserta brez restrikcijskih mest je 210 bp.

**Rešitev naloge 12:**

40 g saharoze, 0,5 mL Tritona X-100, 50 mL 0,5 M EDTA, 25 mL Tris, voda do 0,5 L

**Rešitev naloge 13:**

28 % saharoza, 0,35 % Triton X-100, 0,175 M EDTA, 0,175 M Tris

**Rešitev naloge 14:**

3,5 ×, 57,14 μL

**Rešitev naloge 15:**

5 mg CTAB in voda do 100 μL

**Rešitev naloge 16:**

35,1 g NaCl in voda do 0,5 L

**Rešitev naloge 17:**

166,7 mL 96 % etanola in voda do 200 mL

**Rešitev naloge 18:**

1 : 50

**Rešitev naloge 19:**

Končna koncentracija CaCl<sub>2</sub> je 5 mM.

**Rešitev naloge 20:**

Generacijski čas na podlagi izmerjenih A<sub>600</sub> se izračuna po formuli:

$$t_{\text{gen}} = \left( \frac{\log A_2 - \log A_1}{0,301 \times \Delta t} \right)^{-1}$$

## NAVODILA ZA PRIPRAVO KONČNEGA POROČILA

Končna predstavitev za vsako vajo zajema štiri glavne dele: Uvod, Materiali in metode, Rezultati in Diskusija.

### UVOD

V uvodu se predstavijo znana dejstva, pojmi in podatki, ki se navezujejo na opravljeno delo. Namen uvoda je, da povzame informacije, ki so potrebne za razumevanje rezultatov oziroma da se lahko rezultate uvrsti v pravo luč.

V njem se povzameta tudi namen in cilje vaje.

### MATERIAL IN METODE

Posamezne metode in z njimi povezan material, ki so se uporabili za pridobitev rezultatov, se prikažejo v obliki delovnih shem.

### REZULTATI

Vsi rezultati, ki so povzeti v tabelah, se zapisujejo na eno mesto pred in po decimalki. Vse slike gelov morajo imeti legendo, iz katere je razvidno, kaj je bilo vneseno v posamezno jamico. Vsaka tabela in slika mora imeti svoj naslov in biti v tekstu opisana in povzeta.

### DISKUSIJA

Na vse rezultate se v diskusiji pogleda "z razdalje" – iz ptičje perspektive. Rezultate se poskuša ovrednotiti s stališča, kaj resnično novega prispevajo. V tem delu se ne navaja ponovno metod in materiala, tj. ne opisuje se postopkov, s katerimi smo pridobili rezultate.

### IN ŠE NEKAJ NAPOTKOV:

#### 1. Ločila

- ločila, kot so vejice in pike, se držijo besede (npr. **XXXX.** in ne xxxx .) in potem jim sledi presledek (npr. **XXX, yy** in ne xxx ,yy)

- oklepaja se držita tistega, kar oklepata, npr. **XXX (yyy) ZZZ** in ne xxx( yyy )zzz

#### 2. Uporaba predlogov s/z:

- predlog **S** se uporablja pred nezvenečimi soglasniki, ki so:

**c, č, f, h, k, p, s, š in t;**

- predlog **Z** se uporablja pred zvonečimi soglasniki, ki so:

**b, d, g, j, l, m, n, r, v, z in ž**

in pred vsemi samoglasniki (**a, e, i, o in u**).

3. Ker imamo reko Savo in ne Savo reko, imamo tudi zmeraj naslednji vrstni red:

**gen *proB*** in ne *proB* gen

**plošča LB** in ne LB plošča ,...

4. Vsako sliko gela opremi z **legendo**, kar pomeni, jamice na sliki gela oštevilči in pod sliko v legendi zapišete, kaj je bilo v vsako jamico nanoseno.

5. Zapis latinskih bakterijskih imen:

- latinska imena bakterijskih vrst so vedno **v kurzivi**
- latinskih imen bakterijskih vrst ne sklanjamo, npr. ne zapišemo »izolirali smo

*Escherichia coli*«, ampak zapišemo »**izolirali smo**

**bakterijo *Escherichia coli***«

- skrajšan zapis latinskega imena je **s presledkom** med okrajšanim rodovnim imenom in vrstnim imenom, npr. ***E. coli***

6. Zapis transpozicijskih elementov:

oznaka Tn ali IS je v pokončnem tisku, tej oznaki neposredno sledi številka, ki pa je v

kurzivi, npr. **Tn10** ali **Tn1731**

**7. Zapis genov (operonov):**

Vse oznake genov so v kurzivi, npr. *proAB, leu, tra*

**8. Predlogi ob besedah rezistenten, senzitiven, odporen, občutljiv**

Rezistenten, odporen **PROTI**

senzitiven, občutljiv **ZA**

**9. Enote:**

vse oznake enot se s presledkom ločijo od svoje številke, npr.

**2 %** gel, **138 bp**, **20 mM** raztopina, **4 °C**

**10. Da nek plazmid, kromosom ima oz. kodira določeno informacijo,**

**NIKOLI** ne povejte z besedo **NOSI!!!!**

**11. V slovenščini imamo decimalno vejico** in ne decimalne

pike, torej **1,5 kb** in ne 1.5 kb.

**12. Še nekaj pripomb:**

epica → mikrocentrifugirka

eza → zanka

Drigalskijeva spatula (ne z malo in ne hokejka); spatula je poimenovana po raziskovalcu (Wilhelm von Drigalski)



## LABORATORIJSKI PRIROČNIK

### NOMENKLATURA V BAKTERIJSKI GENETIKI

Nomenklatura v bakterijski molekularni genetiki temelji na članku Demerec M in sod. (1966).

Bakterije označujemo tako po genotipu kot po fenotipu. V osnovi genotipskega poimenovanja je načelo, da zapišemo samo tiste genotipske lastnosti, ki se ločijo od referenčnega seva. Za *E. coli* je referenčni sev K-12, katerega nukleotidno zaporedje genoma je v celoti poznano in so geni oz. odprti bralni okviri določeni.

Navajamo samo mutirane gene oziroma gene, ki se razlikujejo od referenčnega seva. Pravilo je, da je vsak gen označen s tričrkovno oznako, iz katere lahko razberemo pomen oz. funkcijo gena. Te tri črke so pisane v poševnem tisku in vse tri z malo začetnico. Različni geni, ki sodelujejo v skupni biokemijski poti (niso nujno v skupnem operonu), se med seboj ločijo po črkah, ki sledijo tričrkovni oznaki gena (npr. *proA*, *proB* ... ali *lacZ*, *lacY* ...).

Vsako mutacijo, ki je dobro definirana in poznana, v genu označimo in ji pripišemo edinstveno številčno oznako (npr. *lacZ19*). Na podlagi te številke lahko poiščemo reference in preverimo, za kakšno in kako dobljeno mutacijo gre. Mutacije, za katere ne vemo točno, v katerem genu neke metabolne poti se nahajajo, označimo tako, da izpustimo črko, ki označuje gen (npr. *lac-5*).

V genotipskem zapisu lahko tudi navedemo, za kakšen tip mutacije gre (npr.  $\Delta$ , delecija;  $\Phi$ , fuzija; *proA::Tn10*, vključitev transpozicijskega elementa v poznan gen; *zae::Tn10*, vključitev transpozicijskega elementa v nepoznan gen ...).

Proteine zapisujemo z enako tričrkovno kodo kot gene, ki imajo zapise zanje, s to razliko, da je prva črka pisana z veliko začetnico in so vse črke pokončne (npr. ProA, protein gena *proA*).

Fenotipske lastnosti zapisujemo z enako tričrkovno kodo kot proteine, le da pri tem z znakom + ali – nakažemo na izraženost lastnosti (Pro<sup>+</sup>, sposoben sinteze prolina; Pro<sup>-</sup>, ni sposoben sinteze prolina). Kadar ne poznamo genetske osnove določene fenotipske lastnosti, lahko to zapišemo s kodo, ki označuje fenotipsko lastnost (npr. Str<sup>r</sup>, odporen proti antibiotiku streptomycinu).

Zelo uporabna in priročna medmrežna stran za iskanje informacij o pomenu posameznih genotipskih in fenotipskih oznak je stran <http://ecocyc.org/>. To je vstopna stran medmrežne enciklopedije genov in metabolizma seva K-12.

Tabela 2: Oznake v genotipih sevov, uporabljenih na vajah

OZNAKA	POMEN (FENOTIPSKI ZAPIS)
<i>ara</i>	operon za razgradnjo arabinoze ( <b>Ara<sup>-</sup></b> )
<i>argE</i>	gen za acetilornitinsko deacetilazo ( <b>Arg<sup>-</sup></b> )
<i>argG</i>	gen za argininosukcinatno sintetazo ( <b>Arg<sup>-</sup></b> )
<i>endA</i>	gen za DNA-specifično endonukleazo I ( <b>End<sup>-</sup></b> )
<i>gal</i>	operon za razgradnjo galaktoze ( <b>Gal<sup>-</sup></b> )
<i>gpt</i>	gen za gvanin-hipoksantin-fosforiboziltransferazo ( <b>Gpt<sup>-</sup></b> )
<i>gyrA96</i>	mutiran gen za podenoto A DNA-giraze ( <b>Nal<sup>r</sup></b> )
<i>his</i>	operon za biosintezo histidina ( <b>His<sup>-</sup></b> )
<i>hlyA</i>	gen za hemolizin A ( <b>Hly<sup>-</sup></b> )
<i>hsdR</i>	gen za podenoto restriktaze EcoK ( <b>Hsd<sup>-</sup></b> )
<i>ilv</i>	operon za biosintezo izolevcina in valina ( <b>Ile<sup>-</sup>, Val<sup>-</sup></b> )
<i>int</i>	gen za fagno integrazo ( <b>Int<sup>-</sup></b> )
<i>lac</i>	operon za razgradnjo laktoze ( <b>Lac<sup>-</sup></b> )
<i>lacA</i>	gen za galaktozid-acetiltransferazo ( <b>Lac<sup>-</sup></b> )
<i>lacI</i>	gen za represorski protein laktoznega operona ( <b>LacI<sup>-</sup></b> )
<i>lacY</i>	gen za galaktozid-permeazo ( <b>Lac<sup>-</sup></b> )
<i>lacZ</i>	gen za $\beta$ -galaktozidazo v laktoznem operonu ( <b>Lac<sup>-</sup></b> )
<i>leuB</i>	gen za $\beta$ -izopropilmalat-dehidrogenazo ( <b>Leu<sup>-</sup></b> )
<i>mal</i>	operon za razgradnjo maltoze ( <b>Mal<sup>-</sup></b> )
<i>metA</i>	gen za homoserin-transsukcinilazo ( <b>Met<sup>-</sup></b> )
<i>metB</i>	gen za cistationin $\gamma$ -sintazo ( <b>Met<sup>-</sup></b> )
<i>mtl</i>	operon za razgradnjo manitola ( <b>Mtl<sup>-</sup></b> )
<i>purE</i>	gen za katalitsko podenoto fosforibozilaminoimidazol-karboksilaze ( <b>Ade<sup>-</sup></b> )
<i>proA</i>	gen A prolinskega operona ( <b>Pro<sup>-</sup></b> )
<i>proB</i>	gen B prolinskega operona ( <b>Pro<sup>-</sup></b> )
<i>proAB</i>	gena A in B prolinskega operona ( <b>Pro<sup>-</sup></b> )
<i>recA</i>	gen za protein RecA ( <b>Rec<sup>-</sup></b> )
<i>relA</i>	gen za ATP:GTP 3'-pirofosfotransferazo (tj. (p)ppGpp-sintetazo) ( <b>Rel<sup>-</sup></b> )
<i>rpsL</i>	gen za S12-protein 30S-ribosomske podenote ( <b>Sm<sup>r</sup></b> )
<i>supE</i>	gen za supresorsko tRNA stop kodona UAG ( <b>SupE<sup>-</sup></b> )
<i>thi</i>	operon za biosintezo tiamina (tj. vitamina B <sub>1</sub> ) ( <b>Thi<sup>-</sup></b> )
<i>thr</i>	operon za biosintezo treonina ( <b>Thr<sup>-</sup></b> )
<i>trp</i>	operon za biosintezo triptofana ( <b>Trp<sup>-</sup></b> )
<i>xyl</i>	operon za razgradnjo ksiloze ( <b>Xyl<sup>-</sup></b> )
$\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15	fuzija z genom <i>lacZ</i> , ki ima delecijo
$\Delta$ ( <i>gpt-lac</i> )	delecija dela od (vključno) gena <i>gpt</i> do (vključno) operona <i>lac</i>
$\Delta$ <i>lacU169</i>	delecija (izpad) celotnega operona <i>lac</i>

Vse, kar se sterilizira z avtoklaviranjem, se avtoklavira 15 minut pri 120 °C.

## **GOJIŠČA**

### **Luria-Bertanijevo gojišče (LB)**

ekstrakt kvasovke.....0,5 %  
tripton.....1 %  
NaCl.....1 %

Za pripravo 1 L tekočega gojišča vse sestavine najprej raztopimo v 900 mL vode in šele nato dopolnimo do 1000 mL. Avtoklaviramo in ohladimo. Gojišče je tekoče do približno 50 °C. Šele ko je gojišče ohlajeno, lahko dodamo antibiotike.

Za pripravo trdnega gojišča, plošč, moramo sestavinam pred raztapljanjem dodati še 15 g/L agarja.

### **Hranilni agar**

Difco Bacto-nutrient broth.....0,8 %  
NaCl.....0,5 %  
agar.....1,5 %

Za pripravo 1 L gojišča vse sestavine najprej raztopimo v 900 mL vode in šele nato dopolnimo do 1000 mL. Avtoklaviramo, ohladimo in vlijemo v petrijevke.

### **Minimalno gojišče A**

Za pripravo 1 L plošč iz minimalnega gojišča ločeno avtoklaviramo 200 mL H<sub>2</sub>O in 100 mL 10 × A v eni erlenmajerici ter 700 mL H<sub>2</sub>O in 12 g agarja v drugi. Po avtoklaviranju raztopino ohladimo v topli kopeli (50 °C), da se ne strdi. V prvo erlenmajerico (s solmi) dodamo sladkor (5 mL 40 % glukoze za 1 L gojišča), aminokislino (4 mL 10 mg/mL aminokislino za 1 L gojišča) in antibiotike. Premešamo ter dolijemo raztopljeni agar iz druge erlenmajerice. Ponovno premešamo ter vlijemo na plošče.

1 L 10 × A pripravimo:

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>..... 10 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 105 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 45 g  
Na-citrat × 5 H<sub>2</sub>O..... 5 g  
MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O ..... 1 g

Vse sestavine najprej raztopimo v 500 mL vode in nato dolijemo vodo do 1000 mL.

### **Mehki agar**

Difco Bacto-nutrient broth ..... 0,8 %  
NaCl.....0,5 %  
agar ..... 0,7 %

Za pripravo 1 L mehkega agarja vse sestavine najprej raztopimo v 900 mL vode in šele nato dopolnimo do 1000 mL. Avtoklaviramo, ohladimo in vlijemo v transfuzijske steklenice. Pred uporabo ga v mikrovalovki raztopimo.

**R-mehki agar**

10 g triptona  
8 g NaCl  
1 g ekstrakta kvasovke  
8 g agarja  
in 1 L destilirane vode.

Avtoklaviramo in po avtoklaviranju še dodamo 2 mL 1 M CaCl<sub>2</sub> in 5 mL 20 % glukoze.

**R-plošče**

10 g tritona  
8 g NaCl  
1g ekstrakta kvasovke  
12 g agarja  
in 1 L destilirane vode.

Avtoklaviramo in po avtoklaviranju dodamo še 2 mL 1 M CaCl<sub>2</sub> in 5 mL 20 % glukoze ter vlijemo v petrijevke.

## ANTIBIOTIKI

Tabela 3: Kratice, založne in delovne koncentracije antibiotikov

ANTIBIOTIK	KRATICA	založna konc.	konc. v gojišču
kanamicin	Kn, Kan	10 mg/mL	30 µg/mL
ampicilin	Ap, Amp	100 mg/mL	100 µg/mL
tetraciklin	Tc, Tet	10 mg/mL	10 µg/mL
kloramfenikol	Cm, Cam	50 mg/mL	25 µg/mL
nalidiksična kislina	Nal	100 mg/mL	25 µg/mL
streptomicin	Sm, Str	100 mg/mL	150 µg/mL

### Priprava raztopin antibiotikov

Kanamicin raztopimo v vodi in ga steriliziramo s filtracijo skozi filter s premerom por 0,22 µm. Hranimo ga pri -20 °C.

Ampicilin raztopimo v vodi in ga steriliziramo s filtracijo skozi filter s premerom por 0,22 µm. Hranimo ga pri -20 °C.

Tetraciklin raztopimo v 96 % etanolu. Ni ga potrebno sterilizirati. Hranimo ga v temi (zavit v alufolijo) pri -20 °C. Ne uporabljamo ga v gojiščih, ki vsebujejo ione Mg<sup>2+</sup>, ker le-ti izničujejo njegovo delovanje.

Kloramfenikol raztopimo v 96 % etanolu. Ni ga potrebno sterilizirati. Hranimo ga pri -20 °C.

Nalidiksično kislino raztopimo v 1 N NaOH. Ni je potrebno sterilizirati. Hranimo jo pri -20 °C.

Streptomicin raztopimo v vodi in ga steriliziramo s filtracijo skozi filter s premerom por 0,22 µm. Hranimo ga pri -20 °C.

## PUFRI IN RAZTOPINE

### **Raztopina I**

50 mM glukoza..... 50 mM  
TrisCl (pH 8) ..... 25 mM  
EDTA (pH 8)..... 10 mM

Avtoklaviramo in hranimo pri 4 °C.

### **Raztopina II**

NaOH.....0,2 N  
SDS..... 1 %

Pripravimo zmeraj sveže.

### **Raztopina III**

5 M K-acetat..... 60 mL  
ledocetna kislina ..... 11,5 mL  
H<sub>2</sub>O ..... 28,5 mL

Avtoklaviramo in hranimo pri 4 °C.

### **Fenol/kloroform/izoamil alkohol**

Zmes fenol/kloroform/izoamil alkohol pripravimo v razmerju 25 : 24 : 1. Kot antioksidacijsko sredstvo fenola dodamo hidroksikinolin. Po premešanju zmes centrifugiramo 30 min pri 4000 obr./min.

### **Kloroform/izoamil alkohol**

Zmes kloroform/izoamil alkohol pripravimo v razmerju 24 : 1.

### **TE**

TrisCl (pH 8)..... 10 mM  
EDTA (pH 8) ..... 1 mM

Raztopino avtoklaviramo.

### **0,5 M EDTA**

EDTA..... 186,1 g  
H<sub>2</sub>O ..... 800 mL

Kemikalijo EDTA najprej raztopimo v 700 mL vode. S približno 20 g NaOH<sub>(s)</sub> uravnamo pH na 8, saj se EDTA ne raztopi, dokler pH ni približno 8. Dolijemo vodo do 1000 mL. Raztopino avtoklaviramo.

### **RNaza**

#### Priprava založne raztopine:

Raztopimo RNazo A do končne koncentracije 10 mg/mL v 10 mM TrisCl (pH 7,5) in 15 mM NaCl. Inkubiramo 15 min pri 100 °C. Pustimo, da se počasi ohladi do sobne temperature, nato jo razdelimo v alikvote in shranimo pri -20 °C.

Za uporabo jo redčimo s pufrom TE do končne koncentracije 50 µg/mL.

### **5 × TBE**

baza Tris.....54 g  
borova kislina.....27,5 g  
0,5 M EDTA (pH 8)..... 20 mL

Dolijemo H<sub>2</sub>O do 1000 mL. Raztopino avtoklaviramo. Puffer TBE hranimo pri sobni temperaturi. Če ga hranimo dolgo, nastane oborina in ni več uporaben.

### **10 mg/mL etidijevega bromida**

V 100 mL vode dodamo 1 mg etidijevega bromida in mešamo z magnetnim mešalom več ur, da se barvilo raztopi. Hranimo ga pri 4 °C, zavitega v aluminijasto folijo.

### **0,1 M CaCl<sub>2</sub>**

CaCl<sub>2</sub> raztopimo v polovični količine vode in dopolnimo ter avtoklaviramo. Do uporabe ga hranimo pri 4 °C.

### **TEG/lizocim**

glukoza.....50 mM  
TrisCl (pH 8).....25 mM  
EDTA (pH 8) .....10 mM

Avtoklaviramo in hranimo pri 4 °C. Tik pred uporabo dodamo 2 mg/mL lizocima.

Op. TEG brez lizocima je v bistvu Raztopina I za plazmidno izolacijo.

### **10 % SDS**

SDS raztopimo v vodi. Ni ga potrebno avtoklavirati.

### **10 mg/mL proteinaze K**

Proteinazo K raztopimo v vodi in steriliziramo s filtracijo. Raztopino hranimo pri -20 °C.

### **6 × raztopina barvila za nanos**

bromfenol modro .....0,25 %  
ksilen cianol.....0,25 %  
saharoza .....40 %

Vse sestavine raztopimo v H<sub>2</sub>O.

### **X-gal**

Založno raztopino X-gal pripravimo tako, da 20 mg X-gal raztopimo v 1 mL *N,N*-dimetilformamida (DMT).

Dodajamo ga lahko kar na pripravljeno ploščo z gojiščem (40 µL pripravljene raztopine razmažemo z Drigalskijevo spatulo) ali pa v pripravljeno avtoklavirano, na okoli 50 °C ohlajeno gojišče (2,5 mL pripravljene raztopine na 1 L gojišča).

### **1 M TrisCl**

TrisCl raztopimo v vodi in uravnamo pH na želeno vrednost ter avtoklaviramo.

### **X-fosfat**

Založno raztopino X-fosfat pripravimo tako, da 20 mg X-fosfata raztopimo v 1 mL DMF. Dodajamo 2 mL založne raztopine na 1 L gojišča.

Za intenzivnejšo barvo lahko v gojišče poleg X-fosfata dodamo tudi NBT, in sicer v razmerju X-fosfat : NBT = 1 : 2. NBT je nitromodro-tetrazolijev klorid, katerega založna koncentracija je 50 mg/mL, topi pa se v 70 % dimetilformamidu (DMF).

**Fiziološka raztopina (0,9 % NaCl)****1,2 M NaCl****5 M NaCl**

Ustrezno količino NaCl raztopimo v polovičnem potrebnem volumnu vode, dopolnimo ter avtoklaviramo.

**0,1 M MgSO<sub>4</sub>**

MgSO<sub>4</sub> raztopimo v vodi.

**Pufer Z**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O..... 0,06 MNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O..... 0,04 M

KCl ..... 0,01 M

MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O..... 0,001 M

β-merkaptetanol..... 0,05 M

pH raztopine uravnamo na vrednost 7.

Hranimo pri 4 °C.

**2-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid  
(orto-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid =  
ONPG)**

Raztopino pripravimo v koncentraciji  
4 mg/mL ONPG v pufru Z.

Do uporabe jo hranimo pri 4 °C.

**1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**

Raztopino pripravimo v deionizirani vodi.

Do uporabe hranimo pri 4 °C.

**0,1 M CaCl<sub>2</sub>****1 M CaCl<sub>2</sub>**

CaCl<sub>2</sub> raztopimo v polovični potrebni  
količine vode in dopolnimo ter  
avtoklaviramo. Do uporabe ga hranimo pri  
4 °C.

**STET**

saharoza..... 8 %

TrisCl (pH 8,0)..... 10 mM

EDTA (pH 8,0) ..... 1 mM

Triton X-100 ..... 5 %

Vse sestavine raztopimo v vodi in  
avtoklaviramo.

**5 % CTAB**

CTAB raztopimo v vodi ob segrevanju do  
65 °C in mešanju.

**Pufer MC**0,1 M MgSO<sub>4</sub>5 mM CaCl<sub>2</sub>

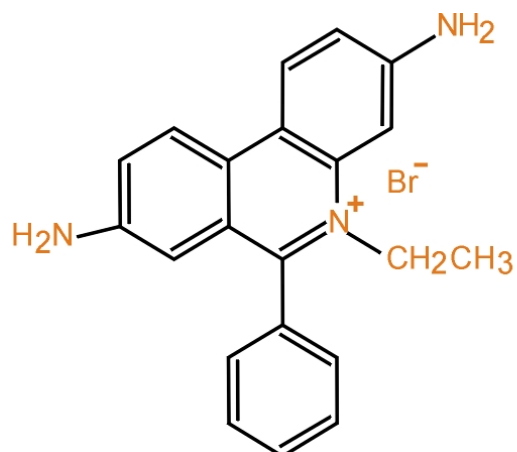
Raztopino pripravimo v vodi,  
avtoklaviramo in hranimo pri 4 °C.

**1 M Na-citrat**

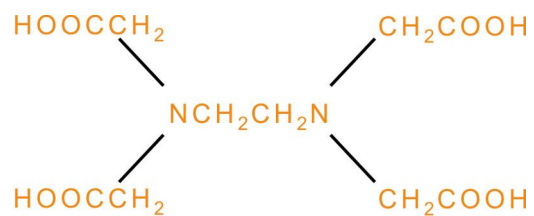
Na-citrat raztopimo v polovični količini  
potrebne vode in dopolnimo ter  
avtoklaviramo. Do uporabe hranimo pri 4 °C.



## KEMIJSKE FORMULE IZBRANIH KEMIKALIJI

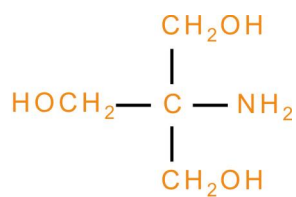


Slika 37: Strukturna formula etidijevega bromida



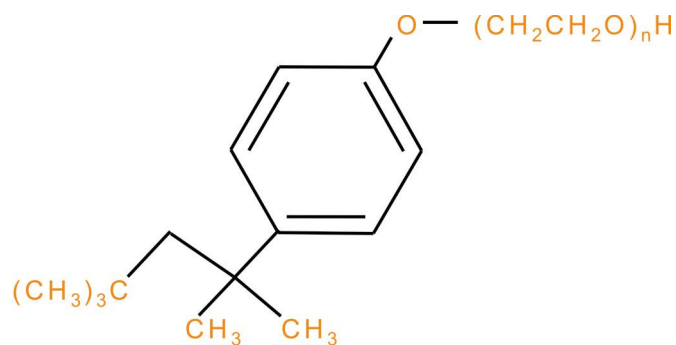
Slika 38: Strukturna formula EDTA

EDTA je okrajšava za etilendiamin tetraocetna kislina.



Slika 39: Strukturna formula tris

Tris je okrajšava za tris-(hidroksimetil)-aminometan oz. za 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol.



**Slika 40: Strukturna formula tritona X-100**

Nevtralni detergent triton X-100 je *t*-oktil-fenoksi-polietoksi etanol oz. polietilenglikol mono-*p*-(1,1,3,3-tetrametil-butil)-fenil eter. CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O v nepolarnem repu se približno 9,5-krat ponovi.



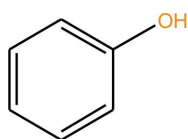
**Slika 41: Strukturna formula CTAB**

CTAB je okrajšava za cetiltrimetil amonijev bromid. Je kationski detergent.

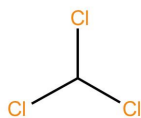


**Slika 42: Strukturna formula SDS**

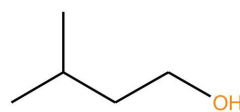
SDS je okrajšava za natrijev dodecilsulfat. Je anionski detergent.



fenol

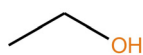


kloroform

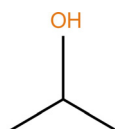


izoamil alkohol

**Slika 43: Strukturna formula fenola, kloroforma in izoamil alkohola**

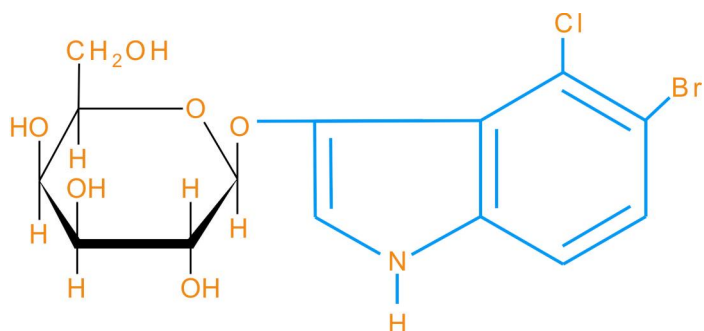


etanol



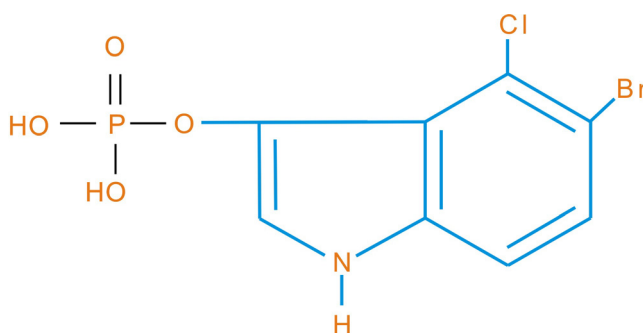
izopropanol

**Slika 44: Strukturna formula etanola in izopropanola**



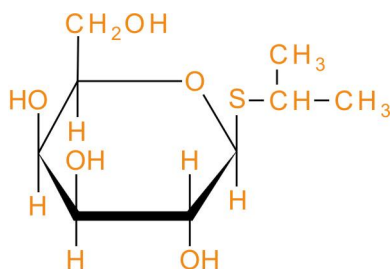
**Slika 45: Strukturna formula X-gal**

X-gal je okrajšava za 5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -*D*-galaktopiranozid. Del X (5-bromo-4-kloro-3-indolil-) molekule X-gal je na sliki obarvan modro. Po odcepu skupine X zaradi delovanja encima  $\beta$ -galaktozidaze nastane 5-brom-4-kloro-3-hidroksi-indol, ki se oksidira v indigo, ki je modre barve.



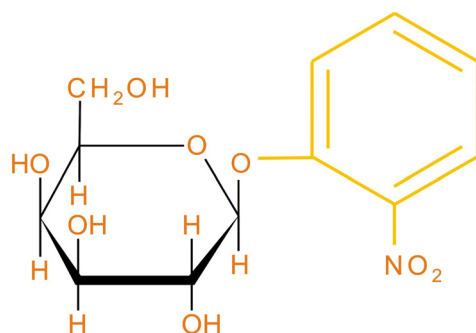
**Slika 46: Strukturna formula X-P**

X-P je okrajšava za 5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat. Del X (5-bromo-4-kloro-3-indolil-) molekule X-gal je na sliki obarvan modro. Po odcepu skupine X zaradi delovanja encima alkalne fosfataze nastane 5-brom-4-kloro-3-hidroksi-indol, ki se oksidira v indigo, ki je modre barve.



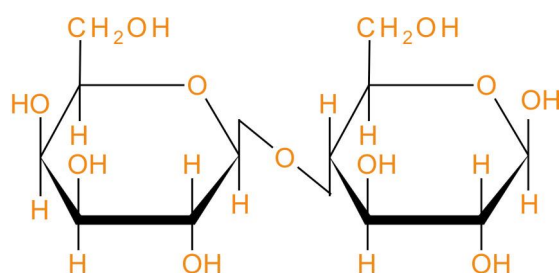
**Slika 47: Strukturna formula IPTG**

IPTG je okrajšava za izopropil- $\beta$ -*D*-tiogalaktopiranozid.



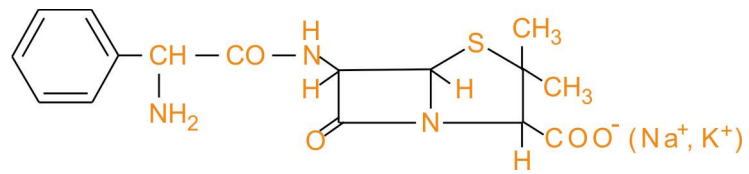
**Slika 48: Strukturna formula ONPG**

ONPG je okrajšava za *o*-nitrofenilgalaktozid oz. *orto*-nitrofenil- $\beta$ -*D*-galaktopiranozid. Del *o*-nitrofenil molekule ONPG je na sliki obarvan rumeno. Po odcepu skupine *o*-nitrofenil zaradi delovanja encima  $\beta$ -galaktozidaze nastane *o*-nitrofenol, ki je rumene barve.

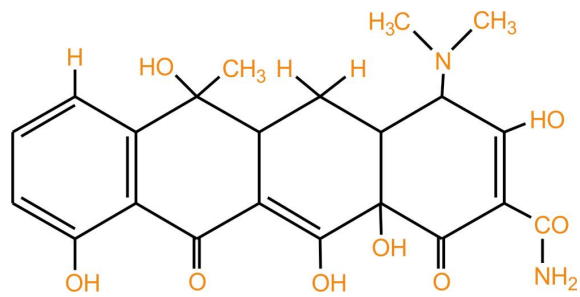


**Slika 49: Strukturna formula laktoze**

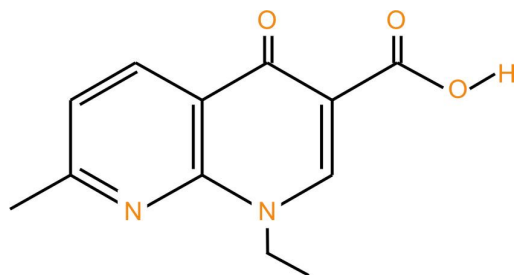
Laktoza je  $\beta$ -*D*-galaktopiranozil-(1-4) $\beta$ -*D*-glukopiranoza.



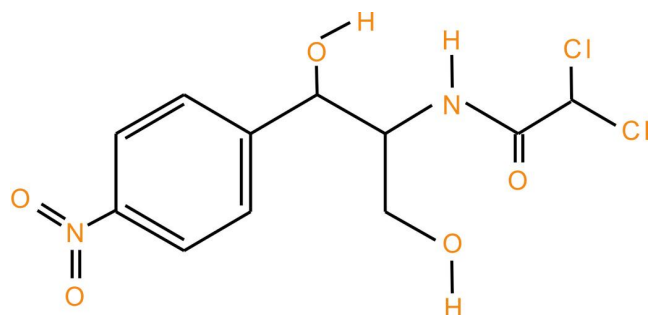
Slika 50: Strukturna formula ampicilina



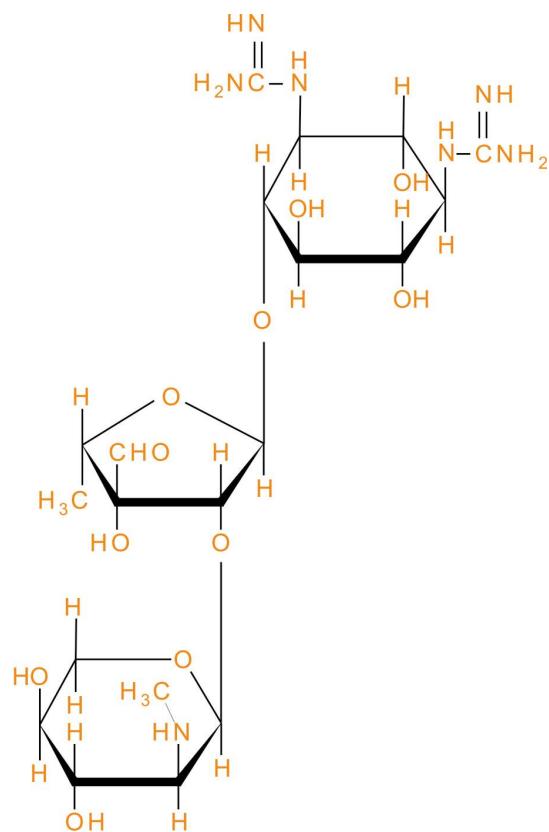
Slika 51: Strukturna formula tetraciklina



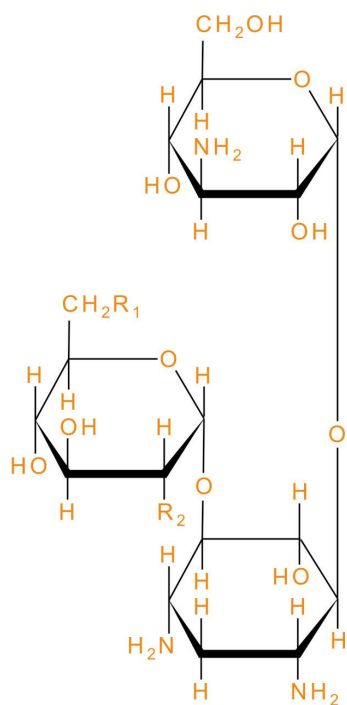
Slika 52: Strukturna formula nalidiksične kisline



Slika 53: Strukturna formula kloramfenikola



Slika 54: Strukturna formula streptomicina



Slika 55: Strukturna formula kanamicina

Kanamycin je v različnih oblikah: kanamicin A ima  $\text{NH}_2$  za  $\text{R}_1$  in  $\text{OH}$  za  $\text{R}_2$ , kanamicin B ima  $\text{NH}_2$  za  $\text{R}_1$  in tudi za  $\text{R}_2$  in kanamicin C, ki ima  $\text{OH}$  za  $\text{R}_1$  in  $\text{NH}_2$  za  $\text{R}_2$ .

## LITERATURA

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1992): Short Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates in John Wiley & Sons, New York.

Birge, E.A. (2006): Bacterial and Bacteriophage Genetics. Springer Science + Business Media, Inc., New York.

Blattner, F.R., Plunkett, G. 3rd, 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* 277: 1453–1474.

Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000): One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640–6645.

Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J. & Hauptman, P.E. (1966): A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* 54: 61–76.

Derbise, A., Lesic, B., Dacheux, D., Ghigo, J.-M. & Carniel, E. (2003): A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Imm. Med. Microbiol.* 38: 113–116.

Gubina, M. & Ihan, A. (2002): Medicinska bakterijologija z imunologijo in mikologijo. Medicinski razgledi, Ljubljana.

Hardy, K.G. (1987): Plasmids. A Practical Approach. IRL Press, Oxford.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T. (1994): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore.

Johnson, J.R. (1991): Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4: 80–128.

Kaper, J.B., Nataro, J.P. & Mobley, H.L.T. (2004): Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 123–140.

Konisky, J. (1982): Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Ann. Rev. Microbiol.* 36: 125–144.

Łobocka, M.B., Rose, D.J., Plunkett, G. 3rd, Rusin, M., Samojedny, A., Lehnerr, H., Yarmolinsky, M.B. & Blattner, F.R. (2004): Genome of bacteriophage P1. *J. Bacteriol.* 186: 7032–7068.

Miller, J.H. (1972): Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, New York.

- Miller, J.H. (1992): A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Mühldorfer, I. & Hacker, J. (1994): Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. Microb. Pathog. 16: 171–181.
- Orskov, F. & Orskov, I. (1992): *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. Can. J. Microbiol. 38: 699–704.
- Pelczar, M.J. Jr., Chan, E.C.S. & Krieg, N.R. (1986): Microbiology. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Salyers, A.A. & Whitt, D.D. (1994): Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach. ASM Press, Washington, D.C.
- Sambrook, J., Maniatis, T. & Fritsch, E.F. (1989): Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Schild, S., Starčič Erjavec, M., Khoury, C. & Schild, K. (2012): Molekularbiologische Übungen I. SS12. Institut für molekulare Biowissenschaften. University of Graz.
- Schleif, R. (2000): Regulation of the *L*-arabinose operon of *Escherichia coli*. Trends Genet. 16: 559–565.
- Smith, H. (1992): Virulence determinants of *Escherichia coli*: present knowledge and questions. Can. J. Microbiol. 38: 747–752.
- Snyder, L. & Champness, W. (2007): Molecular Genetics of Bacteria. ASM Press, Washington, D.C.
- Starčič, M., Žgur-Bertok, D., Jordi, B.J., Wösten, M.M., Gaastra, W. & van Putten, J.P. (2003): The cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein complex regulates activity of the *traJ* promoter of the *Escherichia coli* conjugative plasmid pRK100. J. Bacteriol. 185: 1616–1623.
- Watson, J.D. & Crick, F.H. (1953): Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171: 737–738.
- Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Argetsinger Steitz, J. & Weiner, A.M. (1987): Molecular Biology of the Gene. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park.