

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta *za kemijo in kemijsko tehnologijo*



**Marko Dolinar**

# **MOLEKULSKO KLONIRANJE**

NAVODILA ZA VAJE

**Ljubljana, 2016**

## **MOLEKULSKO KLONIRANJE – navodila za vaje**

*Avtor* prof. dr. Marko Dolinar

*Recenzentki* prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec in asist. dr. Helena Čelešnik

*Izdala in založila* Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo  
Ljubljana, 2016

*Za založbo* prof. dr. Matjaž Krajnc

*Jezikovni pregled* Mojca Bajc, prof.

*Oblikovanje in risbe* prof. dr. Marko Dolinar

*Urednica* doc. dr. Barbara Modec

1. spletna izdaja, 2016

*Dostopna na* <http://www.fkkt.uni-lj.si/sl/zalozba-ul-fkkt/spletna-knjigarna/>

© (2016) Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

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

602.7(075.8)(076)(0.034.2)

577.21(075.8)(076)(0.034.2)

DOLINAR, Marko, 1961-

Molekulsko kloniranje [Elektronski vir] : navodila za vaje / Marko Dolinar. - 1. spletna izd. - El. knjiga. - Ljubljana : Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2016

Način dostopa (URL): <http://www.fkkt.uni-lj.si/sl/zalozba-ul-fkkt/spletna-knjigarna>

ISBN 978-961-6756-65-5 (pdf)

283844352

## PREDGOVOR

Predmet Molekularno kloniranje v 3. letniku univerzitetnega študijskega programa Biokemija je zasnovan izrazito praktično, kar je razvidno že iz deleža vaj, ki obsegajo več kot polovico kontaktnih ur pri predmetu. Prva zasnova vaj izhaja iz predbolonjskega študija, ko smo jih v nekoliko širši obliki izvajali pri predmetu Tehnologija rekombinantne DNA. V teku let smo vaje skupaj z asistenti, ki so jih vodili, izpopolnjevali, navodila pa dopolnjevali do današnje oblike.

Od vsega začetka sem se pri vajah, kjer študentje pripravite svoje prve gensko spremenjene organizme, želel približati načinu dela, s kakršnim se boste srečali tudi kasneje pri svojem raziskovalnem delu. Vaje so, ko jih pogledate kot celoto, nanizane v večstopenjski eksperiment, pri katerem morate zapis za inhibitor cisteinskih proteinaz vnesti v ekspresijski vektor, ga vnesti v celice bakterije *Escherichia coli* in nato inducirati izražanje zapisa ter preveriti, ali je do izražanja res prišlo in ali je rekombinantni protein aktiven. V raziskovalnem laboratoriju bi tak poskus izvedli v približno dveh tednih, na vajah pa se bo delo razpotegnilo skozi približno pol semestra.

Čeprav bi si verjetno študentje želeli, da bi izvajali vaje, ki bi sledile najnovejšim smernicam v molekularni biologiji in biotehnologiji, so seveda taki poskusi prezahtevni tako časovno kot glede opreme in potrebnega znanja. Kljub temu da so tehnike, ki jih boste uporabili, stare več desetletij, se še vedno rutinsko uporabljajo in velik del študentov biokemije bo take poskuse izvajal pri pripravi diplomskih in kasneje magistrskih nalog in doktorskih raziskovalnih projektov.

Vsa pretekla leta so navodila za vaje pri tem predmetu izhajala kot na spletu dostopna datoteka, kar ste študentje sprejeli z odobravanjem. Tej praksi se tudi zdaj, ko bo delo v svoji končni obliki recenzirano in uradno izdano, ne bomo odpovedali. Vsako leto bomo navodila dopolnili s podatki, ki se nanašajo na posamezno leto, vsebina vaj pa se gotovo vsaj nekaj let ne bo spreminjala.

Pri pripravi teh navodil so tako ali drugače sodelovali številni asistenti, ki so vodili vaje v preteklih letih, h končni verziji pa je največ prispevala dr. Vera Župunski, ki vaje vodi zadnja leta, za kar se ji še posebej zahvaljujem. Za natančno branje in recenziranje tega dela se zahvaljujem prof. dr. Marjanci Starčič Erjavec in asist. dr. Heleni Čelešnik, ki imata sami veliko praktičnih izkušenj z raziskovalnim in pedagoškim delom na področju, ki ga obravnavajo vaje iz Molekularnega kloniranja.

Upam, da boste navodila s pridom uporabili ne samo pri pripravi na vaje, njihovi izvedbi in pripravi na zaključni kolokvij, pač pa tudi kasneje, ko boste poskuse opravljali samostojno.

Marko Dolinar

september 2016



## KAZALO

SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV	5
UVOD	7
Biolška varnost, laboratorijska varnost in laboratorijski red	7
Ravnanje v primeru razlitij reagentov ali mikrobnih kultur	8
Označevanje vzorcev in raztopin	8
Ravnanje z odpadki	8
Pogosti postopki	9
Sterilizacija	9
Dokončanje dela	9
Poročila	10
Ocenjevanje	10
Odsotnost z vaj	11
EKSPERIMENTALNO DELO – ZASNOVA VAJ	13
1. vaja: Uporaba računalnika pri molekularnem kloniranju	15
2. vaja: Izolacija večjih količin plazmidov iz bakterijskih celic	20
3. vaja: Kloniranje DNA	23
Rezanje DNA z restrikcijskimi endonukleazami	23
Izolacija DNA iz agaroznega gela	26
Ligacija	29
Priprava kompetentnih celic	30
Transformiranje bakterijskih celic in določanje učinkovitosti transformacije	31
Analiza transformant in prenos vektorja v ekspresijski bakterijski sev	33
4. vaja: Izražanje zapisa za kokošji cistatin v bakterijah <i>Escherichia coli</i>	36
Indukcija izražanja	37
Analiza indukcije	39
Test inhibitorne aktivnosti na papain s substratom BANA	43
5. vaja: Določanje nukleotidnega zaporedja	45
6. vaja: Prenos fragmentov DNA iz elektroforeznega gela na membrano	48
TEHNIČNI DODATEK	49
Obarvanje DNA iz etanola ali izopropanola	49
Koncentriranje vodnih raztopin nukleinskih kislin z butanolom	50
Agarozna gelska elektroforeza	50
Poliakrilamidna gelska elektroforeza	51
Gojišča za bakterije	52
Napotki za uporabo centrifug	52
Sterilizacija	53
Antibiotiki	53
Ocena gostote bakterijskih kultur	53

Tabelarni prikaz genetskega koda	54
Fizikalnokemijske značilnosti nukleinskih kislin	55
Seznam izbranih restrikcijskih endonukleaz in njihove značilnosti	56
<b>ZBIRKA NALOG IZ MOLEKULSKEGA KLONIRANJA</b>	<b>58</b>

## SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

AGE	agarozna gelska elektroforeza
APS	amonijev persulfat
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
IPTG	izopropil $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
min	minuta
NaDS	natrijev dodecilsulfat
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
RT	sobna temperatura
TAE	tris-acetat-EDTA
TBE	tris-borat-EDTA
TEMED	tetrametiletildiamin
tris	tris(hidroksimetil)aminometan
V	volt; volumen
r/min	vrtljaji na minuto





# UVOD

## BIOLOŠKA VARNOST, LABORATORIJSKA VARNOST IN LABORATORIJSKI RED

Vse laboratorijske vaje, ki jih boste sami izvedli, vključujejo praktično delo z gensko spremenjenimi organizmi (GSO). Delo z njimi je zakonsko urejeno in zahteva upoštevanje določenih pravil. To pomeni, da morate biti dobro seznanjeni z delovnimi postopki in s potencialnimi nevarnostmi takega dela. Pred začetkom vaj se boste morali vpisati v »Seznam osebja« in s podpisom potrditi, da se boste na vaje pripravili in da razumete naravo dela z GSO v zaprtih sistemih. O varnostnih vidikih dela z GSO vam bom predaval na prvih urah predmeta Molekulska kloniranje.

Upošteвайте laboratorijski red, ki velja na FKKT. Poleg napisanih pravil je treba upoštevati tudi zdravo pamet. V laboratoriju je seveda prepovedano uživati hrano, pijačo, prepovedano je tudi nanašanje kozmetičnih sredstev. Roke si je treba umiti po vsakem stiku z mikroorganizmi in reagenti, najmanj pa po koncu vaje.

Pred prvo vajo si oglejte, kje so najbližji gasilni aparat, umivalnik, papirne brisače in kako ravnati v primeru evakuacije laboratorija. Pri delu z dražečimi in mutagenimi snovmi obvezno uporabljajte zaščitne rokavice. Uporaba (zapete) halje in zaščitnih očal je pri delu obvezna na vseh vajah, ki jih opravljate na FKKT. Oblečila puščajte v študentski garderobi in osebnih predmetov ne postavljajte na delovni pult.

Vaje boste izvajali skupaj s še enim kolegom. Delali boste z majhnimi količinami labilnih vzorcev in z živimi organizmi, torej s sistemi, ki se odzivajo na naše napake. Potrudite se, da boste delali čim bolj zavzeto in da bo napak čim manj.

Pazite na pravilno odlaganje pipet: nikoli jih ne puščamo v raztopinah in nikoli jih ne obračamo tako, da je nastavek višje kot prožilo. Natančno pipetiranje je ena od osnovnih spretnosti v laboratoriju; če dvomite v svojo natančnost ali pravilnost dela, si vzemite čas in se ob pomoči tehnika ali asistenta izpopolnite v pipetiranju – najbolje s pomočjo tehtnice. Pri delu tudi pazite, da čimbolj zmanjšate nastajanje aerosolov. Pipetiranje enakih vzorcev lahko vedno opravite z istim nastavkom, vse dokler se z nastavkom niste dotaknili kakšne druge raztopine ali predmeta. Majhne volumne pipetirajte na stene mikrocentrifugirke, nato pa raztopine s kratkim centrifugiranjem spravite na dno. Tako se izognete menjavanju nastavkov za vsak naslednji vzorec. Po vsakem centrifugiranju reakcijskih mešanic je treba mikrocentrifugirko pretresti s prsti, da se snovi z različnimi gostotami (encimi so pogosto shranjeni v glicerolu) med seboj premešajo.

Vse steklenice in druge posode, ki imajo pokrov ali zamašek, naj bodo odprte čim krajši čas. Enako velja za škatle s sterilnimi nastavki za pipete.

Encime, nukleotide in začetne oligonukleotide hranimo zunaj zmrzovalnika oziroma hladilnika čim krajši čas, pa še takrat jih imamo do uporabe postavljene na ledu. Po uporabi jih tehnik ali asistent takoj vrne v hladilnik.

Ob vsakršnih dvomih glede ravnanja z aparaturami, reagenti in vzorci vprašajte asistenta ali tehnika.

## **RAVNANJE V PRIMERU RAZLITIJ REAGENTOV ALI MIKROBNIH KULTUR**

Če se razlije katera od nevarnih snovi (npr. pufer), jo popivajte s papirnato brisačo, mokre brisače pa odvrzite v običajne smeti. Če je treba, površino še sperite z vodo in nato obrišite do suhega.

Pri razlitju kislin, baz ali organskih spojin, ki so lahko nevarne za zdravje, o razlitju takoj obvestite asistenta ali tehnika. Ukrepajte z glavo; majhne količine poskusite vsaj za silo popivnati in pazite, da s snovjo ne pride v stik tudi kolega, ki razlitja morda ni opazil. Če je treba, takoj začnite z zračenjem laboratorija skozi digestorij.

Razlite kulture, ki vsebujejo žive mikroorganizme, je treba popivnati, brisače pa dati v odpad za sterilizacijo. Površino nato pobrišite z razkužilom in obrišite do suhega. Za razkuževanje pultov uporabite 70-odstotni etanol, za večje količine pa 1-odstotno raztopino Virkona-S ali drugega razkužila.

O razbiti steklovini prav tako obvestite tehnika ali asistenta, da jo nadomestimo. Pazite na drobce stekla! Razbito steklovino zbiramo ločeno od ostalega odpada.

## **OZNAČEVANJE VZORCEV IN RAZTOPIN**

Vsak vzorec, ki ga pripravite, mora biti označen, da ga bo mogoče kadarkoli nedvoumno prepoznati. To velja za raztopine, celične kulture in drugo. Oznaka mora vsebovati kratek opis, datum in ime osebe, ki je vzorec pripravila. Le tako se lahko izognemo zamenjavam, ki bi privedle do uporabe napačnih vzorcev in neuspešnih poskusov.

Petrijevke z gojišči označujemo z vodoodpornim flomastrom na spodnji strani (kjer je agar), ker jih inkubiramo obrnjene na pokrov. Na petrijevko napišite vrsto gojišča, oznako seva, ki ste ga nacepili, datum in vaše začetnice ali drugo nedvoumno identifikacijsko oznako.

Nekatere mikrocentrifugirke imajo matirano polje, namenjeno za pisanje. Izogibajte se označevanju pokrovčkov, ker jih boste pogosto pritiskali ob zapiranju in s tem zbrisali napis.

## **RAVNANJE Z ODPADKI**

Vse vzorce, ki niso več uporabni, vsebujejo pa mikrobiološki material, ki bi se bil sposoben razmnoževati, je treba sterilizirati kemično ali termično. Uničujemo tudi ostanke DNA in antibiotikov, ki so termolabilni. Odpadna gojišča s celicami odlagamo v škatlo za incineracijo. Tja ne odlagajte drugih odpadkov. Drobne suhe odpadke (mikrocentrifugirke in nastavke), ki so bili v stiku z mikroorganizmi ali jih še vsebujejo, zbiramo v plastičnih čašah na pultih. Ostanke odcentrifugiranih gojišč lahko zberemo tudi v erlenmajerici, v kateri smo celice gojili. Epruvete, v katerih so rasle bakterije, pustite v stojalih na pultih. Po koncu vsake vaje jih bo tehnik ali asistent pobral in odnesel v pralnico, ker jih bomo avtoklavirali in s tem termično inaktivirali gensko spremenjene organizme.

Gele, ki so obarvani z etidijevim bromidom, položite v plastično vrečko (so nad elektroforeznim pultom), ki jo nato zavežete in odložite v škatlo za incineracijo.

Plastični potrošni material za enkratno uporabo, ki ni bil v stiku z mikroorganizmi, DNA ali nevarnimi organskimi topili, odvržemo med komunalne odpadke.

Ostanke organskih topil (razen alkoholov) zbiramo v za to določeno posodo v digestoriju. Za odstranjevanje teh kemikalij je odgovoren tehnik.

Kadar koli ste v dvomu glede ravnanja z odpadnimi snovmi, vprašajte asistenta ali tehnika.

## **POGOSTI POSTOPKI**

Postopki, ki jih boste pogosto uporabljali, so: pipetiranje (tudi zelo majhnih volumnov), tehtanje in tariranje, centrifugiranje, precepljanje in gojenje mikroorganizmov, priprava elektroforeznih gelov, izvajanje elektroforez vključno z detekcijo obarvanih nukleinskih kislin ali proteinov, obarjanje DNA ... Precej teh postopkov poznate z vaj iz predhodnih let študija in v teh navodilih niso posebej obravnavani. Nekaj postopkov pa je na kratko razloženih v dodatku na koncu navodil.

Pri centrifugiranju pogosto ni posebej navedeno, katero centrifugo uporabite in pri katerih obratih. Kadarkoli imate vzorce v količinah, manjših od 1,5 ml in delate poskus v mikrocentrifugirkah, uporabite ustrezno mikrocentrifugo s standardnim rotorjem. Če ni drugače navedeno, centrifugirate pri polnih obratih oz. pri 14.000 g.

Pri centrifugiranju morajo biti vzorci, ki si v rotorju ležijo nasproti, uravnoteženi. Mikrocentrifugirke postavimo v rotor vedno tako, da je repek, s katerim je pritrjen pokrovček, obrnjen navzgor. Tako vemo, kje je usedlina, tudi če je ta prozorna ali je je tako malo, da je ne moremo videti s prostim očesom.

## **STERILIZACIJA**

Vse snovi, ki bodo v stiku z živimi mikroorganizmi, in vse snovi, ki vsebujejo žive mikroorganizme, pa jih ne rabimo več, steriliziramo. Trdne odpadke za sterilizacijo na Katedri za biokemijo FKKT UL steriliziramo z incineracijo, za kar skrbi pogodbeni zunanji izvajalec. Tekoče odpadke avtoklaviramo, torej inkubiramo v vodni pari pri povišanem tlaku (20 min pri 121 °C).

Steriliziramo tudi raztopine, v katerih bi se lahko naselili mikroorganizmi iz okolja, in steklovino, ki jo uporabljamo pri delu z mikroorganizmi. Najpogostejši način sterilizacije tekočin je z avtoklaviranjem. Steklovino lahko steriliziramo v avtoklavu, lahko pa tudi v suhem sterilizatorju (2 h pri 180 °C). Raztopine, ki so nestabilne pri visoki temperaturi, pa steriliziramo s filtracijo skozi pore premera 0,20 µm. Za sterilizacijo skrbi tehnik. Vzorci za sterilizacijo morajo biti označeni: material za avtoklaviranje z avtoklavirnim trakom, za suho sterilizacijo in filtriranje pa z nalepljeno oznako, ki se jo da zlahka odstraniti tik pred sterilizacijo.

Steriliziranje cepilnih zank poteka s prežarevanjem, steklene triangle (spatule po Drigalskem) za razmaz kulture pa steriliziramo v 70-odstotnem etanolu, ki ga nad plamenom zažgemo. Pri sterilizaciji je treba paziti na to, da se zanke in triangleri ohladijo na temperaturo gojišča, preden se dotaknete živih celic. Plamen iz gorilnika v sterilni komori mora biti zmanjšan do take mere, da ne more škodovati sterilnemu filtru nad delovno površino.

Vratove steklenic z gojišči in erlenmajeric s kulturami pred odpiranjem in zapiranjem ožgemo nad gorilnikom, da uničimo mikroorganizme, ki bi se tam zadrževali, in da ustvarimo tok toplega zraka navzgor, s čimer preprečimo padanje kontaminant v posodo z gojiščem ali v kulturo.

## **DOKONČANJE DELA**

Vzorce, ki jih shranjujete do naslednje vaje in ki jih je treba inkubirati, sterilizirati, zamrzniti ... oddajte tehniku ali asistentu. Preverite, da so nedvoumno označeni.

Delovni pult mora biti po koncu dela pobrisan, steklovina, ki ni bila v stiku z mikroorganizmi, pa sprana. Operite si roke. Aparature bo izključil asistent.

## **POROČILA**

Po opravljeni vaji napišite poročilo, ki naj bo pripravljeno smiselno in naj na kratko pokaže, kaj ste v poskusu naredili, asistent pa mora iz tega razbrati, da razumete obravnavano snov.

Poročila napišete za naslednje tri vaje:

- *Uporaba računalnika pri molekulskem kloniranju*
- *Kloniranje DNA*
- *Indukcija izražanja zapisa za rekombinantni protein*

Poročilo sestavlja naslednje: Ime in priimek študenta, naslov vaje, namen dela (v enem ali dveh stavkih), rezultate in razpravo.

Pri vajah, za katere ste reagente pripravili sami, izjemoma vključite tudi poglavje Materiali in/ali Metode, v katerem napišite, kako ste pripravili (zatehtali, razredčili, sterilizirali ...) kateri reagent. Pri vajah, kjer ste sami sestavili reakcijo (torej ni v celoti napisana v navodilih), dodajte tudi shemo pipetiranja. Ne opisujte postopka vaje, metode, teoretičnih osnov itd., ki so opisane v navodilih za vaje.

Rezultati so vsi podatki, ki ste jih dobili med vajo, pa tudi vsa opažanja, ki prispevajo k razjasnitvi naloge.

Razprava vsebuje razlago rezultatov. Če niste prišli do pričakovanega rezultata, poskušajte razložiti, kaj je temu razlog (ali je bila predpostavka napačna, ali so bili reagenti neustrezni, ali je prišlo do napake (katere?) v izvedbi postopka ...).

Predlagam vam, da napisano poročilo ponovno pozorno preberete in popravite napake, ki ste jih naredili pri pisanju. Včasih poročila vsebujejo poleg pravopisnih napak tudi neverjetne izjave, ki bi jih (upam) opazili, če bi poročilo vsaj enkrat prebrali. Na domači strani vaj boste našli povezavo do nekaterih čudnih in napačnih izjav ([http://web.fkkt.uni-lj.si/biokemija/TrDNA/TrDNAv\\_citati1.html](http://web.fkkt.uni-lj.si/biokemija/TrDNA/TrDNAv_citati1.html)) iz poročil preteklih let, ki so lahko dobra osnova za preverjanje razumevanja.

Poročil asistent morda ne bo uspel popravljati sproti, jih bo pa vsekakor, preden pridete na kolokvij. Ni vam treba pisati poprav poročil ali česa podobnega; kar bo označeno kot nepravilno, čudno napisano ..., naj vam bo samo vodilo za pisanje naslednjih poročil in v pomoč pri učenju.

V navodilih se na koncu opisov nalog večkrat pojavljajo vprašanja, ki so samo pripomoček za vaše lastno preverjanje razumevanja. Nanja ni treba odgovarjati pisno v poročilu.

## **OCENJEVANJE**

Poročila z vaj bo asistent pregledal in ocenil. Povprečje ocen poročil bo prispevalo 10 % končne ocene predmeta. Poročila, ki jih bo asistent dobil z zamudo, bodo ocenjena z odbitkom 0,5 do 2 ocen (npr. poročilo, napisano za 9, dobi oceno 7), in sicer tako, da poročila, ki prispejo z zamudo do 3 ur, oceni 0,5 ocene nižje, poročilo z zamudo 3–72 ur z eno oceno nižje in z zamudo več kot 72 ur 2 oceni nižje.

Poročila boste prinesli asistentu v pisarno ali pa jih oddate v študentskem laboratoriju na Katedri za biokemijo v dogovorjenem času.

Poročila morate pisati samostojno. Nič ni narobe, če slike ali preglednice pripravite skupaj. Vseeno pa besedilo napišite sami. Če asistenti pri pregledovanju poročil ugotovijo, da so deli poročil pri več kolegih zelo podobni, bodo ocene soavtorjev znižali za 1 do 3 ocene, odvisno od obsega prepisanih (ali soustvarjenih) poročil. Če bo šlo za prepisane dele iz poročil iz preteklih let, bodo seveda odbitek lahko pripisali samo vam.

Snov z vaj bo vključena v pisni izpit (kot poseben list z vprašanji), če boste na pisnem delu uspešni, pa boste prišli še na ustni del kolokvija (~ 30 min). Pisni in ustni del prispevata po polovico ocene kolokvija iz vaj. Na pisni izpit lahko pride le, kdor je oddal vsa poročila. Na ustni del kolokvija pridete samo, če ste

dosegli na pisnem delu kolokvija vsaj 40-odstotni uspeh. Če niste, boste morali ponovno pisati tudi teoretični del izpita. Ocena kolokvija predstavlja 35 % končne ocene predmeta.

Enotna skupna ocena predmeta je sestavljena iz ocene za poročila (10 %), ocene kolokvija (pisni in ustni del skupaj, 35 %), ocene za seminar (5 %) in ocene izpita iz teorije (50 %). Pogoj je, da iz teorije dosežete vsaj 50-odstotni uspeh, da ste opravili vse obveznosti in da seštevku po formuli (z upoštevanimi deleži za posamezne obveznosti) znesse vsaj 49 %.

## **ODSOTNOST Z VAJ**

Prisotnost na vajah je obvezna, razen v primeru višje sile (hujša bolezen), kar pa morate dokazati z zdravniškim potrdilom. Manjkajoče poskuse bo treba nadomestiti po koncu semestra individualno.



## EKSPERIMENTALNO DELO – ZASNOVA VAJ

Delo na vajah iz Molekulskega kloniranja boste izvajali v računalniški učilnici (1. vaja) in v študentskem laboratoriju, ki je del zaprtega sistema za delo z gensko spremenjenimi organizmi na Katedri za biokemijo (vaje 2–4). Dve vaji sta demonstracijski (vaji 5 in 6) in bosta na vrsti med opravljanjem preostalih vaj, ko bodo tekle reakcije.

Z računalniško vajo boste spoznali postopke, ki so potrebni pred začetkom dela v laboratoriju, ko želimo vstaviti vključek v nek vektor. Ko se boste preselili v laboratorij, boste delali z vektorjem, ki ga bo za vas izoliral tehnik po postopku, opisanem v 2. vaji. Čeprav te vaje ne boste sami izvedli, je vključena v navodila, saj sta v njej predstavljena oba vektorja, s katerima boste opravili osrednji del vaj, vaji 3 in 4.

Delali boste z dvema vektorjema, od katerih eden vsebuje zapis za kokošji cistatin, drugi pa je ekspresijski vektor. Pri 3. vaji boste iz prvega vektorja izrezali fragment, ki nosi zapis za cistatin, ekspresijski vektor pa boste rezali z enakima encimoma, da boste v nadaljevanju vanj lahko z ligazo vstavili izolirani zapis za cistatin. Dobljeni rekombinantni ekspresijski vektor boste vnesli v bakterijske celice, ki jih boste predhodno pripravili kompetentne. Sledila bo analiza rekombinantnega vektorja, ki ga boste s hitrim postopkom izolirali iz transformant. Pri 4. vaji boste preverili, ali transformante proizvajajo rekombinantni protein, in če ga, koliko, kje je lociran, je topen ali ne in ali je aktiven.

S sivo so napisani tisti deli, ki jih sami ne opravljate, so pa smiselno dopolnilo vaj, ki vam dajejo širši vpogled v celoten postopek ali metode, ki so del molekulskega kloniranja.

Z oranžno so napisani namigi, ki vam bodo pomagali pri lažjem reševanju nalog.





## 1 Uporaba računalnika pri molekularnem kloniranju

Za delo z nukleotidnimi in aminokislinskimi zaporedji obstaja vrsta računalniških orodij. Nekatere ste spoznali že lani pri predmetu Biokemijska informatika. Poleg javno dostopnih strežnikov obstaja tudi več komercialnih programov za delo z zaporedji. Nekateri so zelo dragi (več tisoč EUR), nekateri so napisani samo za določene operacijske sisteme, drugi zelo kompleksni in zahtevajo dobro poznavanje ukazov in možnosti. Za osnovno delo pa niso nujno potrebni, kar boste videli tudi na današnji vaji.

Izhodišče vaje je, da poiščete nukleotidni zaporedji klonirnega vektorja in zapisa za protein (inserta), ki ga boste vstavili v vektor. V realnem eksperimentu je treba vektor rezati z restrikcijskimi endonukleazami, ki dajo konce, kompatibilne konce na insertu. Ker zapisi za proteine sami po sebi nimajo koncev, ki bi bili kompatibilni vektorju, je treba na konce zapisov dodati adapterje z restrikcijskimi mesti ali pa insert vstavimo v vektor preko topih koncev. Paziti je treba, da v notranjosti inserta ni prepoznavnih mest za encime, preko katerih želimo insert vstaviti v vektor. Po ligaciji inserta v vektor bi v laboratoriju sledila transformacija bakterijskih celic, selekcija klonov in restrikcijska analiza rekombinantnih vektorskih molekul. Računalniška vaja se s tem delom poskusa ne ukvarja, boste pa postopek izvedli pri laboratorijski vaji.

Če bi v nadaljevanju želeli zapis za protein prenesti iz klonirnega v ekspresijski vektor, bi bilo treba ponovno najti ustrezna restrikcijska mesta, preko katerih bi izrezali insert in ga vstavili v vektorsko ogrodje. Prilaganja koncev lahko opravimo s pomočjo PCR, pri čemer na konca zaporedij obeh začetnih oligonukleotidov dodamo restrikcijska mesta. Pri ekspresijskih vektorjih je treba paziti na ohranitev bralnega okvira (npr. če vektor že vključuje kodirajoče segmente, ki jih želimo pripeti zapisu za 'naš' protein). Pomembno je tudi, da v ekspresijski vektor prenesemo samo kodirajoče zaporedje in da pazimo na začetni metioninski triplet – če je že na vektorju, ga ne vključujemo z insertom. Enako velja za proteine s signalnim zaporedjem: če je signalno zaporedje že zapisano na vektorju ali če želimo rekombinantni protein dobiti v citoplazmi, potem segmenta, ki zapisuje signalni peptid, ne prenašamo v ekspresijski vektor.

Pred nami je torej več nalog:

- najti nukleotidno zaporedje vektorja pUC19
- najti nukleotidno zaporedje mRNA za lizocim kokoši (*Gallus gallus*)
- izvesti restrikcijsko analizo tega zaporedja in določiti, katera mesta so primerna za vnos v vektor pUC19
- v urejevalniku besedila vstaviti zaporedje zapisa za lizocim v vektor pUC19
- načrtati taka oligonukleotida za pomnoževanje zapisa za lizocim, da bomo zapis lahko vnesli v vektor pET-22b med točno določeni restrikcijski mesti

## Izvedba vaje po stopnjah

**A. Poiščite nukleotidno zaporedje vektorja pUC19 in ga shranite v mapo Molekulsko kloniranje na namizje. Mapo ustvarite sami.**

**Poiščite tudi plazmidno karto tega vektorja in določite njegove lastnosti!**

Zaporedja DNA so shranjena v zbirkah zaporedij. Za vektorje obstaja več zbirk, ki pa so večinoma nepopolne in ne vsebujejo nekaterih najpogosteje uporabljenih vektorjev, ki so jih razvila biotehnoška podjetja. V splošnih zbirkah nukleotidnih zaporedij pa se pojavljajo imena priljubljenih vektorjev tako pogosto, da je število zadetkov preveliko za racionalno iskanje.

Dokler je bilo število vektorjev sorazmerno majhno, so obstajale posebne zbirke podatkov o njih, vendar jih niso redno obnavljali in so postopno postale neuporabne. Zato poskusite najti nukleotidno zaporedje vektorja pUC19 v eni od splošnih zbirk nukleotidnih zaporedij. Začetek iskanja naj bo na strani ameriškega Državnega centra za biotehnoške informacije NCBI, kjer iščemo nukleotidna zaporedja (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

**Namig:** članek, v katerem so opisali vektor, je bil objavljen leta 1985, eden od treh avtorjev pa je bil **Joachim Messing**. Poiščite med zadetki pravo zaporedje! Dolgo je 2686 bp. Označite celotno nukleotidno zaporedje in ga prenesite v urejevalnik besedila ter shranite v za to določeni mapi kot datoteko z imenom pUC19seq.docx (FASTA format!).

Zgolj iz nukleotidnega zaporedja je nemogoče razbrati, kateri deli zapisujejo za posamezne funkcije, ki jih zapisuje zaporedje. Pri vektorjih si za lažjo predstavo o ključnih regijah, ki definirajo uporabnost vektorja pri molekularnem kloniranju, pomagamo z grafičnimi prikazi, vektorskimi kartami. Zato zdaj poiščite na internetu plazmidno karto vektorja pUC19! Žal ni na voljo nobene popolne zbirke plazmidnih kart, zato moramo vsak plazmid poiskati posebej, najbolje pri proizvajalcu ali pa iščemo po celotnem spletu, kar ni vedno učinkovito. Vektor pUC19 je bil vrsto let med najpogosteje uporabljenimi klonirnimi vektorji in so ga prodajala različna biotehnoška podjetja.

Med katalogi proizvajalcev je verjetno najpogosteje uporabljan katalog proizvajalca NewEngland BioLabs, ker ima veliko tehničnih podatkov, med njimi tudi plazmidne karte, slike polilinkerskih regij in sezname restrikcijskih mest na vektorjih. Spletni katalog tega proizvajalca najdete na naslovu <http://www.neb.com>.

Do podatkov o vektorjih pridete tako, da v zavihku TOOLS AND RESOURCES izberete povezavo na orodje »DNA sequences and maps tool«. V razpredelnici poiščite vektor pUC19 in si oglejte plazmidno karto (»Map«) in tabelo restrikcijskih mest (»Site«).

Zdaj lahko odgovorite na spodnja vprašanja.

- 
1. Kakšne vrste vektor je pUC19? Ali ga lahko pridobimo kot ssDNA?
  2. Ali lahko z njegovo pomočjo pridobivamo rekombinantne proteine?
  3. Je vektor pUC19 uporaben za modro-beli test?
  4. Kam na vektorju se vežeta sekvenčna oligonukleotida? *Sekvenčna oligonukleotida uporabljamo za določanje zaporedja vključka v vektorju pUC19, zato želimo ugotoviti, kje v vektorju sta zaporedji, na kateri se ta dva oligonukleotida vežeta. Pomagajte si s predhodno shranjenim nukleotidnim zaporedjem celotnega vektorja. Zaporedji sekvenčnih oligonukleotidov sta: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' in 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'*
  5. Izpišite si zaporedje restrikcijskih mest v polilinkerski regiji – samo ta mesta namreč pridejo v poštev za vnos fragmenta.
-

## **B. V naslednji nalogi morate v vektor pUC19 ligirati cDNA za lizocim kokoši (*Gallus gallus*).**

V eksperimentu bi v laboratoriju naprej izolirali mRNA, to obratno prepisali v cDNA in ligirali v vektor. Da bi se lahko odločili, katera mesta so primerna za vnos v vektor, morate najprej vedeti, katera mesta so neuporabna – tista, ki se pojavljajo znotraj cDNA ali na vektorju, a izven polilinkerske regije.

**Poiščite nukleotidno zaporedje celotne cDNA za kokošji lizocim in ga shranite kot datoteko v formatu docx. Potem izvedite restrikcijsko analizo kodirajočega zaporedja in primerjajte ugotovljena mesta z mesti na vektorju pUC19!**

Nukleotidna zaporedja iščemo običajno v bazah, kot sta GenBank ali EMBL. Tokrat začnite spet na strani NCBI, kjer ste prej iskali zaporedje vektorja, zdaj pa poiščite nukleotidno zaporedje kokošnjega lizocima. Verjetno boste dobili več kot 400 zadetkov, med njimi pa morate poiskati tistega, ki vsebuje zaporedje celotne cDNA za lizocim. Zaporedje shranite v formatu FASTA kot datoteko *cistatin.docx* in si oglejte njegove značilnosti v opisu nad nukleotidnim zaporedjem. Včasih kodirajoča regija zajema samo del predstavljenega zaporedja (obstajata 5'- in 3'-neprevajajoče se zaporedje), zato je treba paziti na meje regij.

Latinsko ime kokoši je *Gallus gallus*. Če želite dobiti zaporedje cDNA, morate iskati z izrazom »mRNA«. Ne pozabite, da imajo evkariontski geni pogosto introne, zato ne morete iskati po genomskih regijah. Celotno zaporedje je dolgo 584 bp.

Orodje za restrikcijsko analizo boste našli na strani <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>. Nukleotidno zaporedje kokošnjega lizocima prenesite v ustrezno okno in opravite restrikcijsko analizo z encimi, ki prepoznajo zaporedje, dolgo vsaj 6 bp, in ki režejo vsaj enkrat, a ne več kot dvakrat.

Na vrsti je virtualno ligiranje v Wordu!

### **Zapis za kokošji lizocim vstavite v zaporedje pUC19 preko ustreznih restrikcijskih mest.**

Naravna nukleotidna zaporedja imajo redko konce, ki so primerni za ligiranje brez predhodne prilagoditve. Običajno konce spremenimo s PCR, tako da na oba pomnoževalna oligonukleotida dodamo zaporedja, ki jih prepoznajo restriktaze. Če ne gre drugače, pa lahko fragmente vstavimo preko topih koncev. Najdite jih v polilinkerski regiji pUC19 in izvedite 'ligiranje', na vrhu zapisa za rekombinantni plazmid pa napišite, katera mesta ste uporabili, da boste zaporedje oziroma konstrukt lažje razumeli tudi čez nekaj mesecev (ali let, ko bo treba poskus razložiti kakšnemu kolegu).

---

*Odgovorite še na naslednja vprašanja:*

- 6. Po kakšnem postopku bi pridobili cDNA, če je vaš začetni material 1 g tkiva?*
  - 7. Katero tkivo bi bilo najprimernejše za izolacijo mRNA?*
  - 8. Zakaj restrikcijskih mest, ki se pojavljajo znotraj vključka, ne moremo uporabiti za vstavljanje vključka v vektor?*
  - 9. V datoteko *cistatin.docx* prilepite še restrikcijsko karto tega zaporedja.*
  - 10. Poglejte zadetke na restrikcijski karti in določite tista mesta, ki jih ne moremo uporabiti za vnos zapisa za lizocim v vektor pUC19, nato pa še tista, ki bi bila uporabna!*
  - 11. Zaporedje vektorja pUC19 z vključenim zapisom za *cistatin* shranite v formatu *.docx* pod novim imenom. Označite vse dele nukleotidnega zaporedja DNA z znano funkcijo.*
-

V nadaljevanju se bomo posvetili novemu poskusu, v katerem bomo uporabili ekspresijski vektor in zapis za protein, ki ga bomo vanj vstavili.

**C. Načrtajte taka začetna oligonukleotida za pomnoževanje zapisa za lizocim, da boste zapis lahko vnesli v vektor pET-22b med mesti *Bam*HI (G/GATCC) in *Hind*III (A/AGCTT)!**

Naloga ima več delov: najprej je treba izvedeti čim več o vektorju – poiščite torej podatke o njem; predvsem vam bo prišla prav plazmidna karta. Vektor je razvila in ga prodaja družba Novagen (poiščite pET-22b Novagen – na iskani strani poiščite zaporedje in plazmidno karto pod Supporting Documentation).

Spomnite se splošnih napotkov za sestavo začetnih oligonukleotidov za PCR! Delu, ki se hibridizira s ssDNA na začetku oz. koncu zapisa za lizocim, morate dodati zaporedje, ki predstavlja prepoznavno regijo za restriktazo (*Bam*HI oz. *Hind*III), pri tem pa morate paziti na bralni okvir, saj je vektor pET-22b fuzijski vektor!

Poskusite torej načrtati približno 20 nt dolga oligonukleotida, ki imata vsaj 50 % zaporedja, ki se prilega zapisu za lizocim, preostanek pa vsebuje prepoznavni regiji za restriktazi. Nekatere restriktaze učinkovito režejo šele, če je pred ali za prepoznavno regijo še ena ali več baz (večinoma dve ali tri). Več o tem najdete v katalogu podjetja NewEngland BioLabs (<http://www.neb.com/>). Na 5'-koncu oligonukleotidov zato dodajte potrebno število baz. Te bodo olajšale vezavo restriktaz in hkrati nekoliko ščitile nujna zaporedja na oligonukleotidu pred delovanjem eksonukleaz. Do pravih informacij se morate najprej prebiti (organizacija ukazov se pogosto spreminja, zato boste morda morali poiskati ustrezno alternativno pot): v zavihku TOOLS AND RESOURCES izberete povezavo Usage guidelines/Tips, kjer poiščete iskano temo: Cleavage close to the end of DNA fragments.

Pri sestavljanju pazite na bralni okvir! Ta se ne sme spremeniti, vendar se ob tem lahko zgodi, da bo konstrukt zato daljši, kar pomeni, da bo rekombinantni protein na N-koncu imel kakšno aminokislino več. Izbor te dodatne aminokislina je stvar posebnega razmisleka – glede na naravo fuzije je treba misliti na to, da bo proteaza (če je konstrukt take vrste) fuzijski del še vedno lahko odcepljala.

*Kadar ne načrtujete oligonukleotidov za kasnejše ligiranje v fuzijske vektorje, pa problem ne nastaja zaradi bralnega okvira, pač pa moramo pri načrtovanju paziti, da ne pozabimo na začetni ATG (AUG → Met), kjer se bo začela biosinteza proteina. Prav tako je pomembna razdalja med mestom za vezavo ribosoma in startnim ATG, pa tudi možnost nastajanja sekundarnih struktur mRNA na začetku zaporedja, kar običajno privede do znižanja ravni izražanja.*

Ko imate prvi načrt za oligonukleotid pripravljen, pod nukleotidno zaporedje napišite še aminokislinsko in preverite prehod med vektorjem in insertom. Pazite tudi, da ob načrtovanju ni kje prišlo do vstavitve stop-kodonov ali pa do nastanka neželenih restriktacijskih mest na prehodu med zaporedjema lizocima in vektorja!

Prvi načrt morate zdaj preveriti, da ugotovite, (1) kakšna je za načrtani oligonukleotid  $T_m$ , (2) delež posameznih baz, (3) verjetnost za nastajanje zank ali dimerov. Vse to lahko bistveno vpliva na učinkovitost PCR. Za preverjanje lastnosti oligonukleotidov je na voljo več programov. Nekaj najpreprostejših je na voljo tudi na internetu.

Na strežniku Medicinske fakultete Univerze Northwestern (ZDA) je nekoliko resnejši program za računanje  $T_m$  na naslovu: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>. Prednost tega programa je, da lahko upošteva (4) koncentracijo NaCl, ki vpliva na izračunano vrednost, vrne pa tudi podatek o možnih (5) homodimerih. Drug zahtevnejši program je OligoAnalyzer 3.1 na

naslovu <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>. Preverite, kako dobro ste načrtali oligonukleotida. Če je treba, lahko dodate ali odvezmete kakšno bazo na koncih. Pri analizi dimerizacije upoštevajte, da so predvsem nevarni tisti dimeri, ki se prilegajo na 3'-koncih (zakaj? (6)), zato lahko stanje izboljšamo s podaljševanjem ali krajšanjem tega konca.

Pri raziskovalnem delu je smiselno, da z bioinformatičnim orodjem BLAST preverite, ali se začetni oligonukleotid, ki ste ga načrtali, lahko veže še na kakšno drugo tarčo v vzorcu, iz katerega boste pomnoževali iskano DNA. Ker to orodje poznate še z vaj pri predmetu Biokemijska informatika, tega postopka tokrat ne bomo ponavljali.

---

*12. Načrt za oligonukleotida shranite v mapo pod imenom oligi4.docx! Vključite ugotovitve (1–6) iz predzadnjih dveh odstavkov.*

---

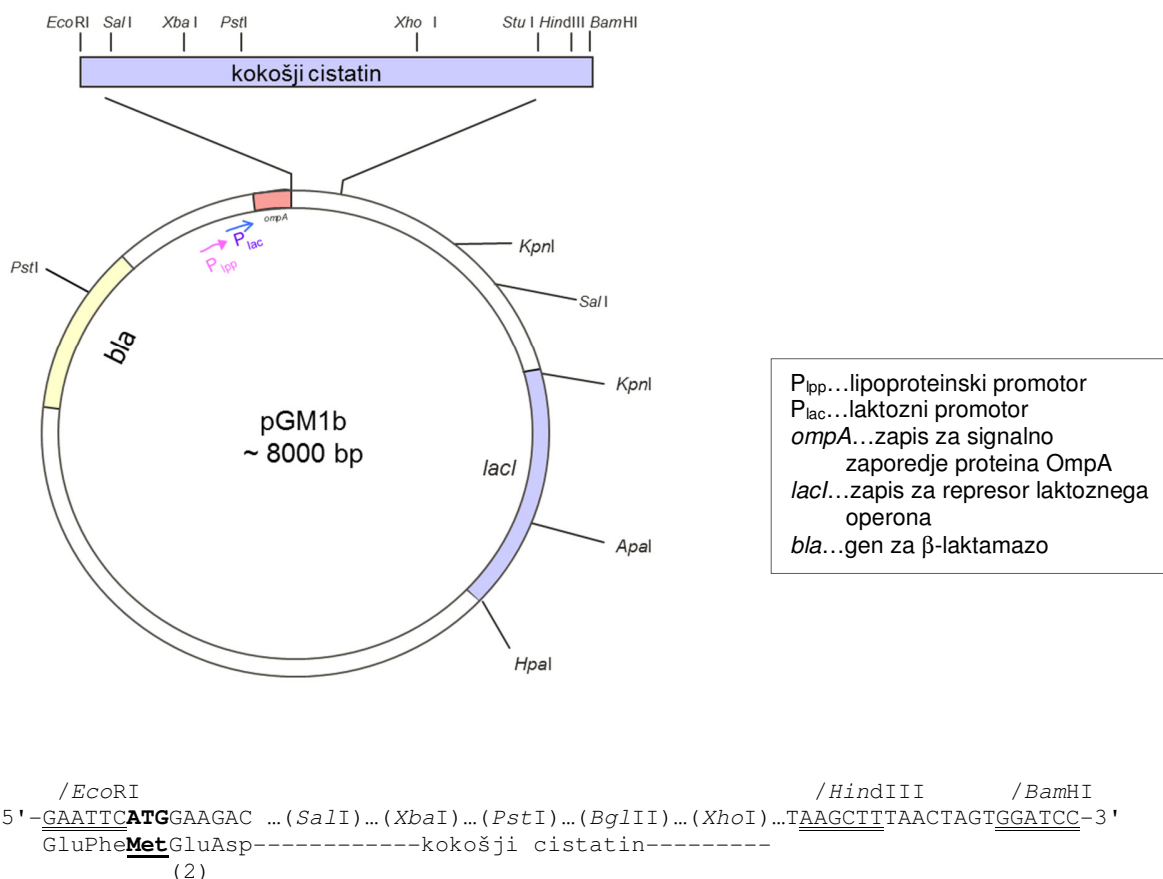
S tem je računalniška vaja končana. Podoben postopek je treba izvesti vsakič, ko se lotimo dela z novim proteinom ali zapisom zanj. Pogosto pa bi, predvsem če delamo s proteini iz človeka ali miši, preden se lotimo izolacije mRNA in pretvorbe v cDNA, še preverili, ali ni mogoče zaporedja, ki nas zanima, dobiti v kakšni zbirki klonov. Za akademske ustanove so stroški bistveno manjši kot reagenti, ki bi bili potrebni za pripravo cDNA in iskanje pravega zaporedja. Izhodišče za iskanje je lahko zbirka dbEST, ki jo najdete na naslovu <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>, z identifikacijsko oznako klonov pa potem iščemo po straneh inštitucij, ki skrbijo za hranjenje in razpošiljanje klonov. Ker zaporedja večinoma niso v celoti preverjena, se lahko zgodi, da naročeni klon nima pričakovanega zaporedja, zato običajno naročamo po dva neodvisna klona za vsako zaporedje in pred delom z njim natančno preverimo restriktivno sliko in nukleotidno zaporedje inserta, s katerim bomo delali. Če je restriktivna slika pričakovana, analiziramo še nukleotidno zaporedje.

## 2 Izolacija večjih količin plazmidov iz bakterijskih celic

Postopki za pripravo večjih količin plazmidov (nekaj deset do nekaj sto  $\mu\text{g}$ ) so v osnovi podobni postopkom za izolacijo le nekaj  $\mu\text{g}$  plazmidov, vendar je izvedba drugačna zaradi večjih volumnov, ki so zato potrebni. Običajno so zahteve po čistosti večje kot pri mini izolacijah, zato pogosto uvedemo dodatne stopnje čiščenja.

Izolirali bomo dva vektorja, pGM1b in pET-32a, ki ju bomo kasneje uporabili za poskus prenosa fragmenta v močan ekspresijski vektor (3. vaja). Plazmid pGM1b je vektor na osnovi ekspresijskega vektorja pIN-III-ompA z zapisom za varianto kokošjega cistatina (glej sliko 2.1), vektor pET-32a pa je prokariontski fuzijski ekspresijski plazmidni vektor s promotorjem T7 (slika 2.2). V vektor pET-32a boste pri naslednji vaji vstavili kodirajoči fragment iz plazmida pGM1b.

Plazmid pGM1b je sicer ekspresijski vektor, pri katerem je zapis za cistatin uveden tik za zaporedjem, ki zapisuje signalni peptid. Bakterije sintetizirajo inhibitor cisteinskih proteinaz cistatin v citoplazmi, nato pa se prenese v periplazmo, vendar so količine sorazmerno majhne. S prenosom kodirajočega zaporedja v vektor pET-32a bi lahko pridobili večje količine rekombinantnega inhibitorja v fuzijski obliki z možnostjo odcepa fuzijskega dela s trombinom ali enterokinazo.



Slika 2.1: Shematski prikaz vektorja pGM1b in nukleotidni zaporedji 5'- in 3'-konca inserta.



Za pripravo večjih količin plazmida (predvidoma 30–50 µg vsakega) smo izbrali razbijanje celic z ionskim detergentom v alkalnem (v osnovi je to metoda z alkalno lizo). *Alternativna metoda vključuje liziranje bakterijskih ovojnic z lizocimom in neionskim detergentom, čemur sledi kratko prekuhavanje vzorca. Pri večjih volumnih celičnih lizatov je to stopnjo težko ponovljivo in kontrolirano izvesti.*

V ključni izolacijski stopnji NaDS raztopi membrane, NaOH pa reverzibilno denaturira nukleinske kisline. Ko raztopino nevtraliziramo z dodatkom K-acetata, se kratka plazmidna DNA renaturira, kromosomska DNA in proteini pa se oborijo skupaj z NaDS, ki s K-ioni tvori netopen kompleks.

#### Postopek:

1. Nacepite seva *E. coli* z izbranimi plazmidoma v po 5 ml gojišča LB z antibiotikom ampicilinom. Inkubirajte preko noči pri 37 °C in 250 r/min.
2. Prekonočno kulturo redčite 1 : 100 v ~ 45 ml ustreznega gojišča. Stresajte preko noči v litrski erlenmajerici pri 37 °C in 250 r/min.
3. Naslednji dan odcentrifugirajte celice (10 min pri 6000 g in RT).
4. Resuspendirajte usedlino z zbranimi celicami v 1 ml pufru GTE (50 mM glukoza, 25 mM tris/HCl, pH 8, 10 mM EDTA).
5. Dodajte 170 µl lizocima (20 mg/ml); inkubirajte 10 min pri RT.
6. Dodajte 1,7 ml sveže pripravljene mešanice NaDS/NaOH (vsebuje 1 % NaDS in 0,2 M NaOH), premešajte in inkubirajte na ledu 10 min.
7. Dodajte 1,3 ml 3 M K-acetata, premešajte in inkubirajte na ledu 10 min.
8. Centrifugirajte 16 min pri 12 000 g in 4 °C.
9. Supernatant (pričakujemo ga približno 5 ml, vendar morate volumen natančno izmeriti) prenesite v svežo centrifugirko, dodajte 15 µl RNaze A (50 mg/ml) in inkubirajte 15 min pri 37 °C.
10. Dodajte 0,6 V izopropanola; nekajkrat obrnite in inkubirajte pri RT 5 min.
11. Centrifugirajte 10 min pri 12 000 g in RT.
12. Sperite usedlino z 0,5 ml 70-odstotnega EtOH; kratko centrifugirajte pri 15 000 g, odsesajte EtOH in usedlino posušite na zraku.
13. Usedlino raztopite v 300 µl 10 mM pufru tris/HCl, pH 9, in raztopino prenesite v mikrocentrifugirko. Odcentrifugirajte neraztopljeni material (3 min pri polnih obratih) ter ga shranite za morebitno kasnejšo elektroforezno analizo, raztopino pa prenesite v označeno svežo mikrocentrifugirko ter shranite.

#### Raztopine:

pufer GTE (za 100 ml): 0,9 g glukoze, 2,5 ml 1 M tris/HCl pH 8, 2 ml 0,5 M EDTA, voda do 100 ml.

NaDS/NaOH: 250 µl 10-odstotnega NaDS, 250 µl 2 M NaOH, 2 ml dH<sub>2</sub>O.

3 M K-acetat: 29,4 g K-acetata, 5 ml očetne kisline, voda do 100 ml.

#### Oprema:

Stresalnik (37 °C), namizna centrifuga, mikrocentrifuga, inkubator (37 °C)

Potrebujete še stiroporno škatlo z zdrobljenim ledom.



### 3 Kloniranje DNA

V naslednjih poskusih bomo izhajali iz obeh vektorjev, ki sta opisana v prejšnjem poglavju. Iz njiju bomo ustvarili rekombinantno vektorsko molekulo. Zapis za kokošji cistatin bomo z dvema restriktazama izrezali iz vektorja pGM1b in ga s pomočjo ligaze vstavili v vektor pET-32a, ki ga bomo predhodno obdelali z istima dvema restriktazama. S tem pa DNA še nismo klonirali; dobljeni ligacijski produkt moramo vstaviti v bakterijske celice v procesu transformacije.

#### 3.1 Rezanje DNA z restriktazami

Gre za encimsko reakcijo, ki je skupaj z ligacijsko reakcijo omogočila prve uspešne korake v tehnologiji rekombinantne DNA. V tej vaji boste z istim parom encimov rezali ekspresijski vektor in plazmid z zapisom za kokošji cistatin.

Za reakcijo vzamemo po 0,5 pmol vektorja pET-32a in po 2 pmol pGM1 (za preračun količin upoštevajte, da 1 bp ustreza 650 Da). Iz praktičnih razlogov izvajamo reakcijo v majhnih volumnih, najbolje med 15 in 50  $\mu$ l. Pomembno je, da volumen encimov v reakciji ne presega 10 % celotnega volumna, saj so encimi shranjeni v 50-odstotnem glicerolu, ta pa v koncentracijah, večjih od 5 %, lahko vpliva na specifičnost delovanja restriktaz. V reakciji je vedno prisoten tudi reakcijski pufer, ki ga proizvajalci encimov pripravljajo v 10 $\times$  končni koncentraciji in ga moramo torej v reakcijo dodati 10 % končnega volumna.

Koliko encima potrebujemo, je odvisno od njegove aktivnosti (navedena je na etiketi), števila prepoznavnih mest na DNA, ki jo režemo, ter temperature in časa rezanja. Običajno reakcija teče 1 uro pri 37 °C (obstajajo pa tudi encimi, ki so učinkoviti le pri nižjih ali višjih temperaturah: npr. *Sma*I pri 25 °C, *Taq*I pri 75 °C). Za analitske poskuse, pri katerih pride le do linearizacije plazmida ali izreza enega fragmenta, zanima pa nas le elektroforezna slika, reakcijo običajno izvedemo z do 1  $\mu$ g plazmida in z 1  $\mu$ l encima, kar v veliki večini primerov zadošča, da reakcija poteče v celoti. Kadar pa imamo v reakciji večje količine DNA, moramo potrebno količino encima izračunati. Pri izračunu upoštevamo definicijo encimske aktivnosti (glej priloženo deklaracijo ali podatke iz kataloga proizvajalca), velikost plazmida, ki ga režemo, in število restriktaznih mest.

Enota encimske aktivnosti je za večino restriktaznih encimov definirana kot množina encima, ki v 1 uri v celoti razreže 1  $\mu$ g DNA bakteriofaga  $\lambda$ . Ker encimi režejo DNA faga  $\lambda$  na različnem številu mest, to bistveno vpliva na izračun. Razpredelnice z encimi in številom mest, ki jih režejo na fagu  $\lambda$ , najdete v prilogi. Npr. encim *Eco*RI reže DNA faga  $\lambda$  na 5 mestih. Tako torej v celoti razreže v 1 uri 1  $\mu$ g DNA faga  $\lambda$  (48 502 bp) 5-krat. Ker analiziramo plazmide, ne pa faga, moramo najprej preračunati, koliko bo isti encim rezal precej manjših molekul plazmida. Najbolj logično je, da preračunamo molarna razmerja. Ker 1 pmol DNA faga  $\lambda$  ustreza  $48\,502 \times 0,65$  kDa = 31,53 MDa, 1 pmol ustreza 31,53  $\mu$ g. 1  $\mu$ g DNA faga  $\lambda$  torej predstavlja 1/31,53 ali 0,0317 pmol. Pomagajte si tudi s podatki iz seznama fizikalnokemijskih lastnosti nukleinskih kislin v Dodatku teh navodil za vaje.

Račun je naslednji:

- 1 U *Eco*RI razreže v 1 h pri 37 °C na 5 mestih 0,0317 pmol DNA.
- Če bi bilo samo 1 mesto rezanja, bi encim torej razrezal 5-krat več DNA, to je 0,16 pmol DNA.
- Za rezanje 1 pmol plazmida pUC19 (navajam kot primer) na 1 mestu bi torej potrebovali 1/0,16 U = 6,25 U encima *Eco*RI. Plazmid pUC19 ima dolžino 2686 bp, kar pomeni, da bomo s to količino encima lahko razrezali  $2686 \text{ bp} \times 0,65 \text{ ng/bp} = 1,75 \mu\text{g}$  DNA.

Krožne molekule DNA, kakršne so plazmidi, so v celici zaradi delovanja topoisomeraz večinoma prisotne v dodatno zviti obliki. Zaradi kompaktnosti dodatno zvite DNA pa številni encimi DNA s tako konformacijo ne morejo rezati enako uspešno kot DNA v sproščeni konformaciji ali DNA, ki je linearna. V katalogih proizvajalcev moramo poiskati podatek o tem, kako učinkoviti so encimi, ko delujejo na dodatno zvito DNA, in to upoštevati pri preračunih potrebnih količin. Nekaj podatkov najdete tudi v Dodatku.

Kadar moramo razrezati večje količine plazmida, običajno naredimo preračun potrebnih količin encimov za enourno reakcijo. Ker pa ne moremo natančno vedeti, ali ni morda našemu encimu aktivnost padla zaradi večkratnega zamrzovanja/tajanja, starosti ... in kako čista je v resnici DNA, ki jo režemo, navadno čas delovanja encima podaljšamo na 2 h. Če se izkaže, da je potrebna količina encima za rezanje v 1 h velika (tu gre za subjektivno oceno, ki je odvisna od cene encima, volumna reakcije itd.), naredimo preračun za delovanje encima 2 h, inkubiramo pa v resnici 4 ure. Encimi so pri 37 °C različno stabilni, tako da po nekaj urah delovanja tudi njihova aktivnost že precej upade. Stabilnost pa je od encima do encima različna; nekateri proizvajalci so stabilnost posameznih encimov določili v poskusu in te podatke navajajo (običajno v prilogah h katalogu).

Kadar moramo DNA rezati samo z enim encimom, zadošča izračun potrebnih količin, izbor najprimernejšega pufra in izvedba reakcije. Če pa moramo DNA rezati z dvema različnima encimoma, moramo ugotoviti, ali sta med seboj kompatibilna glede pufra. Največji proizvajalci restriktaz so pripravili kompatibilnostne tabele in preproste programe (npr. <https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>), ki nam povedo, kako aktivni so encimi v posameznih standardnih reakcijskih pufrih in kateri pufer priporočajo za hkratno rezanje s pari encimov. Restriktaze se glede reakcijskih pogojev med seboj ne razlikujejo pretirano, tako da lahko za večino encimov uporabimo enega izmed 4–6 standardnih pufrov (odvisno od proizvajalca). Večina proizvajalcev je razvila tudi pufre, ki omogočajo dokaj učinkovito rezanje DNA za skoraj vse restrikcijske encime, ki jih ponujajo. Vseeno pa za nekatere restriktaze obstajajo specialni pufri, ker v standardnih niso v celoti specifični (imajo tako imenovano 'star-aktivnost'). Zato je treba pred uporabo encima vedno preveriti, kakšna je njegova aktivnost v izbranih reakcijskih pogojih.

Najbolj zanesljivo je rezati z vsakim encimom v pogojih, ki so zanj optimalni, kar pomeni, da DNA režemo s prvim encimom v priporočenem pufru, potem pa DNA oborimo ali očistimo preko posebnih nosilcev. V drugi stopnji DNA raztopimo v vodi in dodamo pufer, ki je optimalen za drugi encim, ter drugo restriktazo. Po prvi stopnji je pametno odvzeti alikvot vzorca in z elektroforezo preveriti, ali je res prišlo do popolnega rezanja. Če ni, dodamo več prvega encima ali podaljšamo čas inkubacije, če pa je bilo rezanje popolno, lahko nadaljujemo poskus z rezanjem z drugim encimom.

Kadar nismo prepričani, ali smo za rezanje izbrali prave pogoje, ali pa dvomimo, če je DNA, ki jo režemo, dovolj čista, da ne bo motila encimske aktivnosti, izvedemo navzkrižno rezanje. DNA razdelimo na dva alikvota in vsak alikvot režemo z enim od encimov v pogojih, ki smo si jih izbrali. Po končanem rezanju alikvot nanesimo na agarozni gel in izvedemo elektroforezo. Če dokažemo, da je vsak encim v celoti rezal DNA v izbranih pogojih, lahko pri teh pogojih izvedemo tudi reakcijo z drugim encimom.

V našem primeru bomo rezali vso določeno količino najprej s prvim encimom, potem pa še z drugim (torej ne bo šlo za navzkrižno rezanje). Po prvi stopnji poskusa bomo učinkovitost rezanja preverili z elektroforezo, in če bomo ugotovili, da se je mobilnost DNA spremenila in potuje vsa v obliki ene lise, bomo nadaljevali z rezanjem z drugim encimom. Če bo na gelu še opaziti ostanke drugih konformacijskih oblik, bomo dodali še nekaj prvega encima in nadaljevali z reakcijo.

Encimi so na voljo najpogosteje v koncentracijah 10 U/ $\mu$ l, včasih tudi 5 U/ $\mu$ l ali 20 U/ $\mu$ l. Za današnji poskus preračunajte, koliko encima potrebujete, potem pa si pripravite reakcijsko shemo. Preden izvedete reakcijo, pokažite izračun količin asistentu, da ga pregleda!

Reakcijska shema za 1. stopnjo rezanja:

Optimalne količine za rezanje so 0,5 pmol pET-32a in 2 pmol pGM1b. S temi količinami lahko izvedete vse nadaljnje poskuse, ki vključujejo tudi potrebne kontrole.

plazmid pET-32a	$\mu$ g	$\mu$ l	plazmid pGM1b	$\mu$ g	$\mu$ l
reakcijski pufer (10 $\times$ )		$\mu$ l	reakcijski pufer (10 $\times$ )		$\mu$ l
<i>Eco</i> RI (10 U/ $\mu$ l)	U	$\mu$ l	<i>Eco</i> RI (10 U/ $\mu$ l)	U	$\mu$ l
voda		$\mu$ l	voda		$\mu$ l
skupaj			skupaj		
koncentracija DNA			koncentracija DNA		
reakciji bosta tekli 1 h pri 37 °C					

Medtem ko teče 1. restriksijska reakcija, pripravite 0,8-odstotni agarozni gel z malimi žepki za nanos DNA. Pripravite tudi kompetentne celice *E. coli* dveh sevov: DH5 $\alpha$  in BL21[DE3], ki bodo pripravljene za transformiranje z rekombinantnim plazmidom.

Po 1 h odzemetite toliko reakcijske mešanice, da bo vsebovala 400 ng DNA, dopolnite z vodo do 10  $\mu$ l in dodajte 2  $\mu$ l 6 $\times$  nanašalnega pufru ter nanesite na 0,8-odstotni agarozni gel. Kot kontrolo nanesite še ustrezno količino nerezanega plazmida (pET-32a in pGM1b), na robu vsake vrste nanosov pa naj bo standard velikosti.

Tako, zdaj smo oba plazmida šele linearizirali. Poskus bomo nadaljevali z rezanjem istih plazmidov še z drugim encimom, tako da se bo iz pGM1 sprostil fragment, ekspresijski vektor pa bo pripravljen za vnos tega fragmenta.

Kadar sta prvi in drugi encim kompatibilna glede pufru, lahko s poskusom nadaljujemo tako, da samo dodamo drugi encim in po potrebi dopolnimo s puffrom in vodo. Ne pozabite, da encimov ne sme biti več kot 10 % skupnega volumna reakcijske mešanice. Če pa prvi in drugi encim nimata kompatibilnih pufov, je treba med obema reakcijama DNA oboriti ali kako drugače očistiti (na primer z uporabo 'steklenega mleka' – to je preko vezave DNA na steklo v prahu v pogojih visoke ionske moči). V našem primeru oba encima delujeta v puffru R (encima sta od proizvajalca Fermentas), zato pufru ne bo treba zamenjati.

Reakcijska shema za 2. stopnjo rezanja:

plazmid 1			plazmid 2		
ostanek reakc. meš. iz 1. stopnje		$\mu$ l	ostanek reakc. meš. iz 1. stopnje		$\mu$ l
<i>Hind</i> III (5 U/ $\mu$ l)	U	$\mu$ l	<i>Hind</i> III	U	$\mu$ l
reakcijski pufer (10 $\times$ )		$\mu$ l	reakcijski pufer (10 $\times$ )		$\mu$ l
voda		$\mu$ l	voda		$\mu$ l
skupaj			skupaj		

Izpolnjeni reakcijski shemi vključite v poročilo!

Po drugi stopnji rezanja vzorce shranite pri –20 °C ali pa vzorcem dodajte potrebno količino nanašalnega pufru in shranite do naslednje vaje v hladilniku.

## 3.2 Izolacija DNA iz agaroznega gela

Za izolacijo DNA iz agaroznega ali poliakrilamidnega gela obstaja več različnih metod. Za večje količine visokomolekularne DNA je primerna elektroelucija, pri kateri košček gela z DNA prenesemo v dializno črevo skupaj s svežim elektroforeznim pufrom. Električni tok nato povzroči potovanje nabite DNA iz gela v pufer, DNA pa na koncu oborimo z etanolom. V zadnjem času najpogosteje uporabljamo komercialne komplete reagentov, ki večinoma temeljijo na principu vezave DNA na stekleni prah (v suspenziji 'stekleno mleko') ali na silikatne membrane v pogojih visoke ionske moči. Pri uporabi takih nosilcev se (po spiranju in zamenjavi pufra) DNA sprosti z nosilca in preide v vodno fazo.

Alternativna možnost je, da DNA, ki je v elektroforeznem gelu, vežemo na pozitivno nabite membrane, ki jih vstavimo v gel tik pred liso, ki predstavlja želeno DNA. Elektroforezo priklopimo za nekaj minut, tako da se DNA iz gela premakne na membrano. DNA nato eluiramo s pufrom z visoko ionsko močjo. Izolacija iz LMP-agaroze (*low melting point*), ki se stali pri temperaturi, nižji od denaturacijske temperature DNA, je še ena od možnosti, prav tako kot nekatere preproste metode. Taka je na primer metoda 'zmrzni in stisni' (angl. freeze-and-squeeze), pri kateri rezino agaroze zamrzujemo in nato stisnemo, da se iz nje izcedi pufer, ki vsebuje tudi DNA. Obstajajo tudi encimi, ki razgradijo agarozo (gelaze), tako da DNA ostane v pufru brez gela.

Vzorci z vektorjem pGM1b po drugem rezanju z restriktazo nanese na 1,5-odstotni agarozni gel (veliki tanki žepki), z vektorjem pET-32a pa na 1-odstotni agarozni gel (mali debeli žepki); na robu nanese standard velikosti. Če je volumen vzorcev po restriktacijski reakciji prevelik, DNA predhodno oborite (postopek je v Dodatku) ali skoncentrirajte z butanolom (tudi ta tehnika je opisana v Dodatku), ki bo iz raztopine DNA odvil nekaj vode – posvetujte se z asistentom.

Vklopite elektroforezo, in ko so fragmenti na elektroforeznem gelu dovolj ločeni, ločevanje zaustavite in gel na kratko obarvajte. Barvanje in opazovanje gela z UV-svetlobo naj bo čim krajše, da zmanjšamo možnost uvedbe mutacij v DNA. Opazujte tako, da gel ostane na mizici iz pleksi stekla. Nato s spatulo izrežite čim ožji košček agaroze, ki vsebuje tista fragmenta DNA, ki ju boste v nadaljevanju ligirali, torej zapis za kokošji cistatin (dolg je približno 370 bp) in linearizirani ekspresijski vektor pET-32a.

Za izolacijo DNA bomo uporabili metodo vezave na nabito membrano po spodnjem postopku. *Na koncu ocenite koncentracijo izolirane DNA, če je izkoristek izolacije iz gela 70 %.*

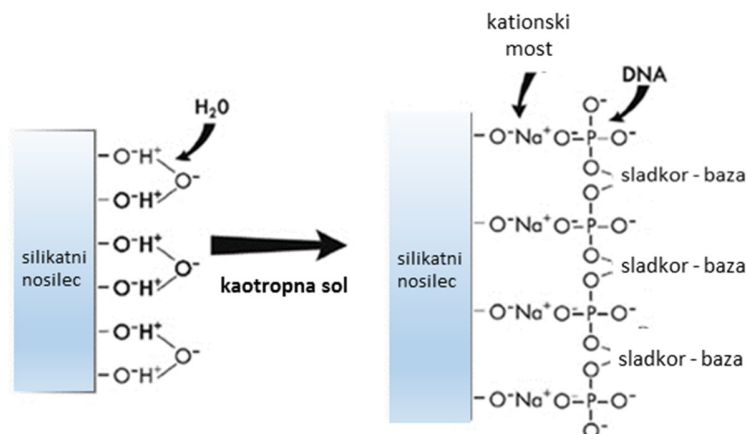
### **Postopek za izolacijo DNA iz agaroznega gela z uporabo kompleta reagentov innuPREP Gel Extraction Kit (Analytik Jena)**

#### Komplet reagentov vsebuje:

- raztopino za raztapljanje gela (vsebuje koncentrirano raztopino kaotropnih soli)
- raztopino za izboljšano vezavo DNA na nosilec
- raztopino za spiranje
- elucijski pufer
- kartuše z nosilcem (filtrom) in plastične zbiralne epruvete

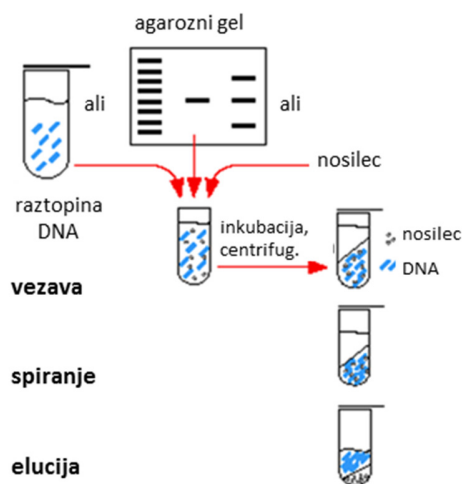
#### Princip:

DNA se v prisotnosti kaotropnih soli veže na aktivirane silikatne delce (slika 3.1). Nečistoče speremo, DNA pa eluiramo z nosilca z rahlo alkalnim pufrom (slika 3.2).



**Slika 3.1: Princip vezave DNA na silikatni nosilec.**

([http://photoscience.la.asu.edu/photosyn/courses/BIO\\_343/lab/fig2-3.jpg](http://photoscience.la.asu.edu/photosyn/courses/BIO_343/lab/fig2-3.jpg))



**Slika 3.2: Stopnje v postopku čiščenja DNA iz gela preko silikatnih nosilcev.**

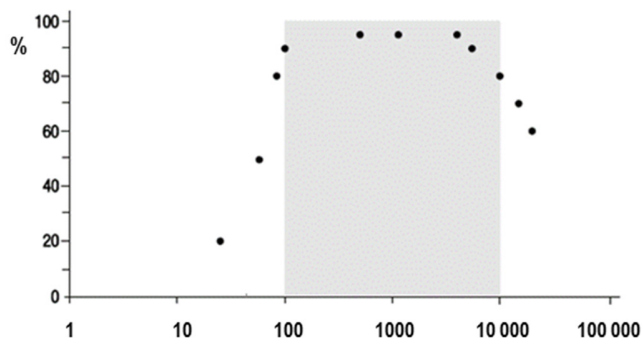
(<https://www.bioke.com/webshop/productpage/66.html?wp=>)

#### Uporaba:

Komplet reagentov uporabljamo za izolacijo DNA iz agaroznih elektroforeznih gelov. Velikost DNA naj bi bila med 100 bp in 30 kbp.

Kapaciteta silikatne membrane pri izbranem proizvajalcu ni definirana (pri konkurenčnem je do 25 µg DNA), postopek pa je primeren za delo z največ 300 mg agaroznega gela (pri konkurenčnem izdelku do 1 g). DNA sprostimo z nosilca z 10–50 µl elucijskega pufra.

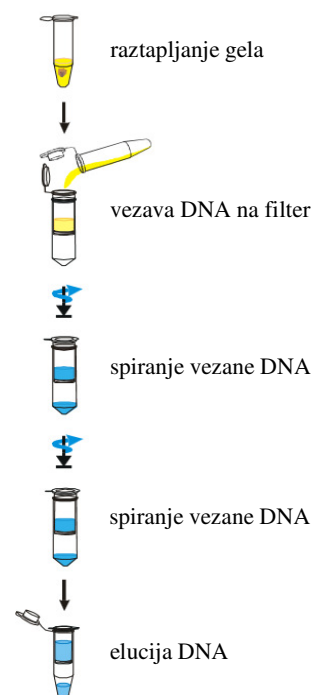
Izkoristek čiščenja je odvisen od velikosti DNA in naj bi bil med 65 % in 90 % (pri konkurenčnem izdelku pri dolžinah DNA med 100 bp in 10 kbp presega 80 % pri optimalni izvedbi poskusa (slika 3.3)).



**Slika 3.3: Odvisnost izkoristka izolacije (os y) od velikosti DNA (v bp; os x).**  
(Thermo Scientific, navodila proizvajalca za GeneJET Gel Extraction Kit, #K0691, #K0692)

#### Postopek dela:

1. Stehtajte prazno označeno mikrocentrifugirko.
2. Ocenite količino DNA v lisi, ki jo nameravate izrezati.
3. Na mizici iz pleksi stekla na transiluminatorju izrežite kos agaroze s fragmentom DNA na tak način, da vsebuje čim manj agaroze, a vso DNA. Rezino prenesite v stehtano mikrocentrifugirko. Masa agaroze naj ne presega 300 mg.
4. Dodajte 650  $\mu$ l raztopine za raztapljanje (Gel Solubilizer).
5. Inkubirajte 10 min s stresanjem pri 50 °C, da se agarozna popolnoma raztopi.
6. Dodajte 50  $\mu$ l vezavne raztopine (Binding Optimizer) in dobro premešajte na vibracijskem mešalniku ali s pipeto.
7. Raztopino prenesite na filtrirni vstavek, ki je v 2-mililitrski epruvetki. Zaprite pokrovček na vstavku in centrifugirajte 1 min pri 10 000 g.
8. Odljite filtrat iz 2-mililitrske epruvetke in postavite filtrirni vstavek nazaj v epruvetko.
9. Odprite pokrovček vstavka, dodajte 700  $\mu$ l raztopine za spiranje (Washing Solution LS), zaprite pokrovček in centrifugirajte 1 min pri 10 000 g. Filtrat nato odljite in filtrirni vstavek postavite nazaj v 2-mililitrsko epruvetko.
10. Ponovite točko 9.
11. Centrifugirajte 2 min pri maksimalni hitrosti, da odstranite vse sledi etanola. Epruvetko zavržite.
12. Filtrirni vstavek postavite v novo, sterilno 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko. Previdno odprite pokrovček in na sredino filtra dodajte 30–50  $\mu$ l elucijskega pufra (Elution Buffer), ki je lahko segret na 50 °C. Inkubirajte 1 min pri sobni temperaturi. Nato centrifugirajte 1 min pri 6000 g. DNA lahko eluirate v manjšem ali večjem volumnu, a bo izkoristek verjetno manjši.
13. Če eluirate z 10–20  $\mu$ l elucijskega pufra (lahko je segret na 50 °C), inkubirajte 2 min pri sobni temperaturi, nato centrifugirajte 1 min pri 8000 g. Po centrifugiranju dobite manjši volumen DNA, kot ste dodali elucijskega pufra na filter (npr. od 10  $\mu$ l elucijskega pufra dobite 9  $\mu$ l raztopine DNA po centrifugiranju).



**Slika 3.4: Prikaz ključnih stopenj izolacije DNA iz gela** (navodila proizvajalca Analytik Jena, 2009).

### 3.3 Ligacija

V ligazni reakciji moramo poleg obeh fragmentov DNA, ki ju želimo povezati, imeti še encim in pufer. Pufer je že pripravljen v 10× končni koncentraciji. Potrebno količino encima lahko izračunate na osnovi definicije ene encimske enote in količine DNA (koncev), ki jih boste imeli v reakciji. Za čim boljši izkoristek naj bo končna koncentracija DNA v reakciji > 25 µg/ml. [Pri ligiranju topih koncev je optimalna koncentracija DNA stokrat nižja kot pri povezovanju lepljivih koncev.] Pufer je sestavljen tako, da že vsebuje ATP (0,5 mM končna koncentracija), tris/HCl, pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> in DTT. Za povezovanje lepljivih koncev je potrebna pribl. 50-krat manjša količina encima kot za tope konce ali konce s samo 1 lepljivo bazo, tako da za standardno reakcijo rabimo manj kot 1 U encima. Za uspešno ligacijo je zelo pomembno, kakšno je molarno razmerje med vektorjem in vključkom. Razmerje je odvisno od velikosti vključka; manjši ko je, večji prebitek moramo uporabiti. Pogost pristop je, da je vključka molarno gledano trikrat več kot vektorja, pri majhnih vključkih pa je lahko ta prebitek tudi 10-kraten.

Ligacijska reakcija:

vektorska DNA	µl	µg	pmol
DNA inserta	µl	µg	pmol
ligazni pufer	µl		
ligaza (1 U/µl)	µl	U	
dH <sub>2</sub> O	µl		
<hr/>			
skupaj	µl	µg	
koncentracija DNA		µg/µl	µM
koncentracija DNA koncev		µM	

Ko boste odpipetirali posamezne komponente (majhne volumne pipetirajte na rob mikrocentrifugirke, nato pa na kratko centrifugirajte in rahlo pretresite), inkubirajte 10–60 minut pri sobni temperaturi.

---

Definicije encimskih enot so različne. Najpogosteje uporabljamo t. i. Weissove enote, vendar nekateri proizvajalci vseeno uporabljajo druge enote. Eden od proizvajalcev ima enote podane kot 'ligacijske enote za kohezivne konce'; 1 NEB U = 0,015 Weissove U (razmerje je 1 : 67).

Potrebno koncentracijo substrata (DNA) v reakciji najbolj pravilno določimo z izračunom prostih 5'-koncev, ki jih želimo ligirati. Upoštevati je treba, da imamo ob povezovanju fragmentov dvakrat več 5'-koncev kot DNA. Optimalna koncentracija 5'-koncev DNA je 0,1 µM do 1 µM.

Poleg DNA-ligaze T4 lahko kupimo tudi več drugih vrst ligaz: RNA-ligazo T4 uporabljamo npr. za označevanje 3'-koncev RNA, DNA-ligazo iz *E. coli* uporabljamo pri postopku vnosa cDNA v vektor po klasični metodi (Okayama in Berg, Mol. Cell Biol., 1982; ta encim uporablja kot vir energije NAD, ne ATP!). DNA-ligaza *E. coli* velja za bolj zanesljivo od fagne, ko med seboj povezujemo lepljive konce. Termostabilno *Taq*-ligazo pa rabimo pri mutagenezi s PCR in tremi začetnimi oligonukleotidi. Zaradi podobnosti imen je treba paziti, da smo vsakič izbrali tisti encim, ki ga za dano reakcijo res potrebujemo.

Uporaben podatek je, da številne DNA-ligaze uspešno katalizirajo nastanek fosfodiesterne vezi tudi v pufrih, ki so optimizirani za aktivnost restriksijskih endonukleaz. To pomeni, da si pri nekaterih postopkih lahko poenostavimo delo in zmanjšamo število stopenj v poskusu, ni pa splošno uporabno, saj je v poskusu, kakršnega izvajamo pri vajah, treba predhodno z elektroforezo ločiti fragmente DNA, za katere nočemo, da se ponovno sestavijo v izhodiščna vektorja.

### 3.4 Priprava kompetentnih celic

Za pripravo kompetentnih celic *E. coli* obstaja več različnih postopkov, že dolgo pa je uveljavljen postopek, ki ga je 1990 opisal Inoue s sodelavci (Gene 96, 23–28), saj je preprost in hiter. Tako kot pri vseh preostalih recepturah je tudi pri tem postopku ključna stopnja spiranje celic v pufru, ki vsebuje CaCl<sub>2</sub>. Od drugih postopkov pa se ta razlikuje po tem, da celice rastejo pri nižji temperaturi in je zato njihova celična stena manj kompleksna ter torej bolj prepustna za molekule krožne DNA. Delajte nežno in na ledu!

Asistent je že prejšnji dan nacepil seva *E. coli* DH5 $\alpha$  in BL21[DE3] v gojišče LB. Kulturo smo stresali pri 250 r/min pri 20 °C, tako da je do začetka vaje A<sub>550</sub> ~ 0,7.

1. V sterilni 15-mililitrski centrifugirki odcentrifugirajte vsak po 5 ml kulture (2000 g, 4 °C, 5 min) – eden od para DH5 $\alpha$ , drugi pa BL21[DE3].
2. Supernatant odlijte v erlenmajerico za odpadke, ostanke pa popivnajte tako, da centrifugirke postavite z odprtino navzdol na 3 sloje vpojnega papirja.
3. Celicam dodajte 1,6 ml ledeno hladnega pufru TB, na hitro resuspendirajte in pustite stati na ledu 10 min.
4. Ponovno centrifugirajte, odlijte pufer, popivnajte in resuspendirajte celice v 0,4 ml TB, nato pa počasi dodajte DMSO do končne 7-odstotne koncentracije.
5. Inkubirajte na ledu 10 min, nato pa celice prenesite v 2 mikrocentrifugirki (2 × 200  $\mu$ l).
6. Oba alikvota shranite pri –80 °C.

Pufer TB vsebuje: 10 mM Pipes, pH 6,7, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl. Pripravljen je vnaprej in je sterilno filtriran. Hraniti ga je treba v hladilniku.

V pravem poskusu bi pripravili seveda več kompetentnih celic, običajno toliko, kot računate, da jih boste porabili v naslednjih 2 mesecih. Kompetentne celice so namreč stabilne pri –70 °C vsaj toliko časa, so pa občutljive za tajanje in ponovno zmrzovanje, tako da jih zamrzujemo v alikvotih za enkratno uporabo. Preden bi kompetentne celice postavili v zmrzovalnik, bi jih hipno zamrznili v tekočem dušiku, da se ne bi posedle na dno mikrocentrifugirke. Laboratoriji, ki pogosto uporabljajo več različnih sevov, imajo na zalogi kompetentne celice vseh takih sevov, saj si s tem prihranijo vsakokratnih nekaj ur dela. V originalnem postopku celice rastejo pri 18 °C, kar pa je pogosto težko doseči, saj zahteva uporabo hladilnega termostata, pa tudi celice rastejo zelo počasi in so običajno v primerni fazi rasti šele po dveh dneh stresanja.

Alternativni način transformacije je tako imenovana elektrotransformacija ali elektroporacija. Pri tem postopku celic ni treba predhodno obdelati s kemikalijami, pač pa jih tik pred elektroporacijo le speremo z destilirano vodo, nato pa hitro, da ne pride do osmornega šoka, dodamo DNA in izvedemo elektroporacijo. Ta postopek je uporaben za številne različne tipe celic, tudi take, za katere kemijski postopki transformacije niso opisani ali pa so zelo nizko učinkoviti.



### 3.5 Transformiranje bakterijskih celic in določanje učinkovitosti transformacije

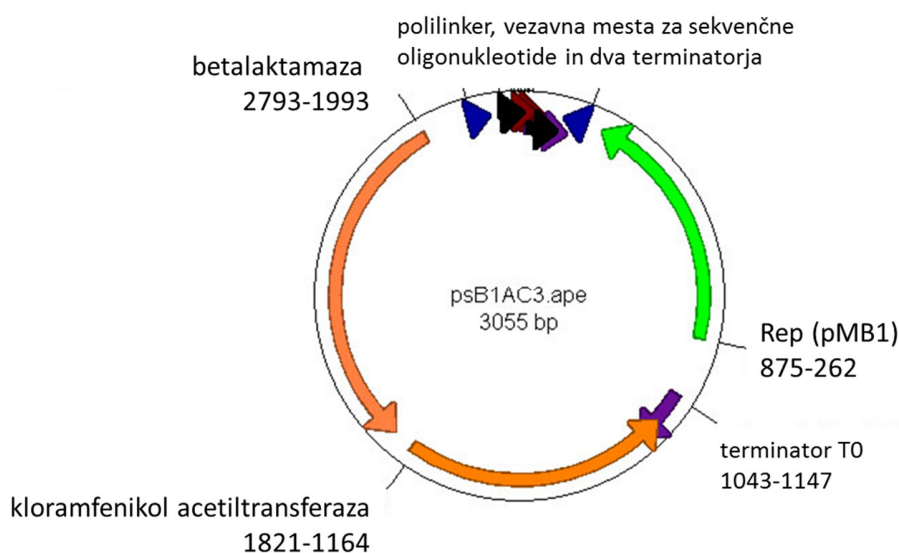
Po tem, ko smo v procesu ligacije pripravili rekombinantni plazmid, bomo v tem poskusu izvedli kloniranje v pravem pomenu besede. Rekombinantne plazmide bomo vstavili v kompetentne bakterijske celice, ki se bodo delile in hkrati namnožile plazmid, ki so ga sprejele vase. Zaradi selekcijskega pritiska (antibiotika v gojišču) bodo preživele in rasle samo tiste celice, ki vsebujejo plazmid.

Transformiranje celic poteka tako, da najprej na ledu inkubiramo kompetentne celice z dodanim čim manjšim volumnom ligacijskega produkta. Po 20 min izvedemo toplotni šok (42 °C). V tej stopnji pride prehodno do znižanja membranskega potenciala, kar olajša prehod plazmida v notranjost bakterijskih celic. Takoj zatem celice ponovno ohladimo, pri čemer se membranski potencial vrne na normalno raven (Panja in sod., J. Biotechnol., 2006).

Vse skupine bodo transformirale sev DH5 $\alpha$  z ligacijskim produktom in oba seva s kontrolnim vektorjem (pSB1AC3) za določanje učinkovitosti transformacije (karta tega vektorja je na sliki 3.4). Rezultat vam bo povedal, kako dobro ste pripravili kompetentne celice.

Standardni postopek za transformacijo celic *E. coli*, pripravljenih po postopku iz vaje 3.4, je:

1. Na ledu odtajamo 200  $\mu$ l kompetentnih celic.
2. Dodamo do 5  $\mu$ l raztopine plazmida (10–100 ng) ali polovico ligacijske mešanice (pri vajah vzemite 10–15  $\mu$ l ligacijske mešanice).
3. Inkubiramo na ledu 20 min in celice občasno rahlo premešamo.
4. Izvedemo toplotni šok: 40 s v vodni kopeli z 42 °C in takoj vrnemo na led.
5. Po 2 min dodamo 800  $\mu$ l gojišča LB in stresamo pri 37 °C in 200 r/min.
6. Po 1 h stresa razmažemo celično suspenzijo na gojišče z antibiotikom (petrijevko predhodno označimo z imenom seva in vektorja, ki smo ga uporabili za transformacijo).
7. Naslednji dan preštejemo transformante in jih nekaj precepimo na svežo ploščo za kasnejšo izolacijo plazmidov.



**Slika 3.4: Vektorska karta pSB1AC3).**

(Povzeto iz Registra standardnih bioloških delov, <http://parts.igem.org/Part:pSB1AC3>)

Uspešnost priprave kompetentnih celic in postopka transformacije podajata dva izraza, frekvenca transformacije in učinkovitost transformacije. Tudi v znanstveni literaturi učinkovitost večkrat poimenujejo kar frekvenca transformacije, kar pa ni upravičeno. Frekvenca transformacije je razmerje med transformiranimi celicami in vsemi celicami, ki smo jih poskusili transformirati. Običajno transformiramo kvečjemu vsako stoto ali vsako tisočo celico. Učinkovitost transformacije pa nam pove, koliko kolonij bi zraslo na selekcijskem gojišču, če bi za transformacijo uporabili neko množino vektorja. Učinkovitost transformacije izrazimo s številom cfu (kolonijskih enot) na pmol vektorja. Nekateri raziskovalci uporabljajo enoto cfu/ $\mu\text{g}$  vektorja, kar pa je manj natančno.

Poskus, v katerem bomo določili učinkovitost transformacije, moramo izvesti z majhno količino vektorja, saj pri večjih količinah (okrog 0,01 pmol) pride do nasičenja in so zato preračunane vrednosti (na pmol) manjše, kot jih dobimo s količino plazmida pod nasičenjem. Vir plazmida za določanje učinkovitosti transformacije naj bi bil zelo čista preparacija nekega standardnega plazmida, pogosto je to pUC19 ali kateri od podobnih majhnih klonirnih vektorjev. Mali vektorji namreč lažje vstopajo v celice kot veliki in so tako učinkovitosti transformacije višje kot pri uporabi velikih vektorjev.

Učinkovitost transformacije je odvisna od postopka za pripravo pa tudi od uporabljenega bakterijskega seva; sevi BL (pogosto jih uporabljamo pri izražanju rekombinantnih zapisov, ker imajo tudi manj endogenih proteinaz, ki bi lahko razgradile rekombinantni protein) imajo nekoliko drugačno sestavo celične stene in jih težje transformiramo kot seve, ki izhajajo iz seva K-12. Tudi če uporabljamo enak postopek in vedno isti sev celic, se nam lahko zgodi, da bodo celice različno kompetentne. Vplivajo namreč temperatura gojenja, faza rasti (fiziološko stanje v trenutku, ko smo celice poželi) in drugi dejavniki.

Visoka učinkovitost transformacije je pomembna predvsem, ko pripravljamo genske knjižnice. Če smo pripravili še tako dobro izvorno DNA in jo še tako uspešno ligirali v plazmid, knjižnica ne bo uporabna, če na koncu zbirke rekombinantnih vektorjev ne bomo uspeli vnesti v bakterijske celice in namnožiti. Kot zelo dobre lahko štejemo kompetentne celice z učinkovitostmi transformacij blizu  $10^{10}$ /pmol plazmida. Take celice je mogoče kupiti, pripraviti v lastnem laboratoriju pa skoraj nemogoče. Za rutinske transformacije so še vedno uporabne tudi celice z učinkovitostjo transformacije okrog  $10^6$ /pmol, dobre 'domače' celice najboljših sevov pa pridejo z učinkovitostmi v red velikosti  $10^8$ /pmol pUC19.

Za poskus, v katerem boste določili učinkovitost transformacije, je pomembno, da razmažete na ploščo tako število celic, da jih bo na plošči mogoče brez težav prešteti, ne pa premalo. Najbolje je, če bi bilo celic na posamezni plošči med 50 in 200. Na osnovi dosedanjih izkušenj vemo, da so celice, ki jih pripravite na vajah, sorazmerno nizko kompetentne, zato boste na selekcijsko gojišče razmazali pol transformacijske mešanice.

Za določanje učinkovitosti transformacije bomo uporabili plazmid pSB1AC3, ki je bil pripravljen s kompletom reagentov za izolacijo plazmidov in je zato bolj čist. Celicam boste dodali 3 fmol vektorja. *Izračunajte, koliko  $\mu\text{l}$  in koliko ng vektorja je to.* Koncentracijo boste izvedeli pri vaji.

Na začetku naslednje vaje preštete kolonije in določite učinkovitost transformacije s pSB1AC3 za svoje kompetentne celice. Izrazite jo v cfu/pmol in cfu/ $\mu\text{g}$ !

---

V raziskovalnem laboratoriju bi s celicami, za katere ne moremo točno predvideti, kako učinkovita bo transformacija, pripravili več razredčin, ki pričakovano učinkovitost zaokrožijo, torej računamo, kot da je v resnici kompetentnih do 10-krat več ali do 100-krat manj celic kot pričakujemo.

---

*Zakaj je učinkovitost transformacije izražena v cfu/ $\mu\text{g}$  manj natančna kot v cfu/pmol?*

*Kakšno je razmerje med cfu/pmol in cfu/ $\mu\text{g}$  pri vektorju pLITMUS 28, ki ima dolžino 2823 bp, in kakšno pri prenašalnem vektorju pHIL-S1 z dolžino 8300 bp?*

### 3.6 Analiza transformant in prenos vektorja v ekspresijski bakterijski sev

Po transformaciji celic z rekombinantnim konstruktom (pET-32a/zapis za kokošji cistatin) bodo na plošči LB z ampicilinom zrasle kolonije. Vsak par si izbere 2 koloniji, ju nacepi v ustrezno gojišče in naslednji dan iz dobljene prekončne kulture izvedemo minipreparacijo plazmidne DNA po postopku, ki je opisan v nadaljevanju. Ko bo vektorska DNA izolirana, jo boste analizirali s tem, da jo boste rezali z restriktazo in dobljene produkte ločili z agarozno gelsko elektroforezo.

*Na vajah bomo izvedli analizo po klasičnem postopku. Raziskovalci bi v laboratoriju pogosto izvedli alternativni način analize, pri katerem bi poskusili s PCR pomnožiti regijo, ki predstavlja vektorski vključek, pri tem pa bi uporabili začetne oligonukleotide, ki se prilegajo na vektorska zaporedja. Kot vir DNA bi uporabili kar celice iz kolonij, ki bi po transformaciji zrasle na selekcijskem gojišču. Pri tem pristopu sicer rezultate dobimo hitreje kot pri klasičnem, je pa večja nevarnost lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov.*

#### 3.6.a Izolacija plazmidne DNA z encimsko lizo

1. Prelijte ali odpipetirajte 1,5 ml prekončne kulture bakterij v mikrocentrifugirko.
2. Centrifugirajte 1 min pri 10 000 g in s pipeto odstranite supernatant.
3. V mikrocentrifugirko dodajte še 1,5 ml kulture in centrifugirajte ter odstranite supernatant kot prej.
4. Dodajte 400  $\mu$ l pufra STET, resuspendirajte celice (s pipeto ali na vibracijskem mešalniku) in dodajte 20  $\mu$ l raztopine lizocima (10 mg/ml). Inkubirajte 5 min.
5. Vzorce prekuhajte (75 s, 100 °C) v vreli vodni kopeli. *(Pri vretju pazite, da se pokrovčki ne odprejo.)*
6. Centrifugirajte 10 min pri 15 000 g.
7. Oborino odstranite s sterilnim zobotrebcom ter določite volumen preostalega supernatanta. Dodajte 1 V izopropanola.
8. Centrifugirajte 10 min pri 15 000 g.
9. Supernatant zavržite. Usedlini dodajte 0,4 ml 70-odstotnega etanola in dobro premešajte (oborina naj se odlepi).
10. Centrifugirajte 5 min pri 15 000 g.
11. Supernatant zavržite in kratko centrifugirajte. Odpipetirajte vso tekočino, usedlino pa posušite na zraku ter resuspendirajte v 40  $\mu$ l 10 mM tris/HCl, pH 9.
12. Koncentracijo plazmidne DNA lahko določite spektrofotometrično z napravo Nanodrop. Zavedati se morate, da lahko v UV-območju absorbirajo svetlobo tudi druge molekule, ne samo DNA.

#### Reagenti:

STET: 8-odstotna saharoza, 5-odstoten Triton X-100, 5 mM EDTA, 50 mM tris/HCl, pH 8,5, 0,1 M NaCl  
10 mM tris/HCl pH 9,0  
lizocim: 10 mg/ml v 10 mM tris/HCl, pH 9,0  
izopropanol, 70-odstotni etanol

Oprema: vibracijski mešalnik, mikrocentrifuga, vodna kopel (100 °C)



*Preden končni vzorec raztopite v 10 mM puffru tris/HCl, mora biti usedlina suha (običajno postane bolj belkasta). Če ni suha (torej še vsebuje etanol), bo DNA slabše topna, raztopina pa vam pri elektroforezi (naslednji poskus) ne bo padla v žepek, pač pa bo splavala iz žepka v pufer. Prisotnost etanola lahko vpliva tudi na encimske reakcije – pojavi se npr. 'star aktivnost'.*

### 3.6.b Restriksijska analiza izoliranih vektorjev

Izolirano vektorsko DNA bomo rezali z encimom *Bam*HI oziroma z encimom *Pst*I (alternativno z *Eco*RI in *Hind*III). Natančno si oglejte plazmidni karti obeh izhodiščnih vektorjev, skicirajte si karto rekombinantnega plazmida in ocenite, kakšen rezultat lahko pričakujete po rezanju z encimi in elektroforezi. Za skico in izračun predvidenih velikosti fragmentov uporabite prostor spodaj na tej strani.

Na osnovi znanja, ki ste si ga pridobili pri vaji 3.1, pripravite shemo za izvedbo restriksijskega rezanja DNA. Z asistentom se posvetujte, ali je vaš preračun pravilen. Upoštevajte, da morate za rezanje vzeti dovolj DNA, da boste produkte (insert!) nedvoumno videli na agaroznem gelu po končanem elektroforeznem ločevanju. Upoštevajte tudi volumen plazmida (40  $\mu$ l – 2  $\mu$ l (spektroskopsko določanje koncentracije z napravo Nanodrop) – 1  $\mu$ l (transformacija) = 37  $\mu$ l za 2 restriksijski reakciji).

Identificirajte plazmide s fragmenti pričakovanih velikosti in z **1  $\mu$ l preostalega nerezanega vektorja** transformirajte celice BL21[DE3] po postopku, opisanem v poglavju 3.5! Transformirajte bakterije tudi s praznim vektorjem pET-32a; te bakterije boste kasneje uporabili za kontrolo pri izražanju cistatina. Celice *E. coli* BL21[DE3] imajo preko profaga v kromosom vnesen zapis za RNA-polimerazo virusa T7. Ta polimeraza edina lahko katalizira sintezo mRNA po zaporedju navzdol od promotorja T7, ki ga imamo na vektorju pET-32a.

Dobljene klone v ekspresijskem sevu boste uporabili skupaj s kontrolami za izvedbo 4. vaje.

SKICA POSKUSA:

REAKCIJSKI SHEMI ZA REZANJE Z RESTRIKCIJSKIMI ENCIMI:

1.

2.

---

*Kako zamrežen agarozni gel je treba pripraviti za ločevanje restrikcijskih fragmentov po rezanju izoliranih plazmidov? Kako to, da po transformaciji lahko dobimo tudi celice z vektorji, ki niso sprejeli inserta?*

## 4 Izražanje zapisa za kokošji cistatin v bakterijah *Escherichia coli*

Vaša naloga je, da v bakterijah *E. coli* seva BL21[DE3] inducirate izražanje zapisa za kokošji cistatin, ki ste ga predhodno vnesli v vektor pET-32a. Hkrati moramo izvesti tudi kontrolni poskus (ena skupina v vsakem turnusu), ki bo vseboval sistem z izhodiščnim vektorjem pET-32a – torej brez zapisa za cistatin.

*Vsaj ena od skupin naj izvaja poskus s celicami, ki vsebujejo vektor pGM1b (namesto pET-32a s cistatinom). S tem sistemom pričakujemo lokalizacijo rekombinantnega proteina v periplazmi, zato je postopek za nadaljnje delo nekoliko drugačen – vsakič upoštevajte opis vaje pod naslovom Alternativni poskus!*

Ko pripravljamo poskus, v katerem želimo prvič ugotoviti, ali se nek zapis v sistemu sploh izraža, moramo paziti, da imamo v paralelnem eksperimentu tudi kontrolni sev, transformiran z vektorjem brez zapisa, ki ga želimo izraziti. Če seva z ekspresijskim vektorjem ni na voljo, si lahko pomagamo z netransformiranim sevom, vendar moramo biti v tem primeru pri interpretaciji rezultatov bolj previdni kot sicer. Prav tako pazimo, da odvzamemo vzorec kulture pred dodatkom induktorja; analiza tega alikvota nam bo povedala, kako učinkovita je bila indukcija oziroma ali nastaja rekombinantni protein tudi brez dodatka induktorja. Sestavine za bogata gojišča namreč pogosto vsebujejo ostanke mikrobnih kultur, ki lahko delujejo kot induktorji operona *lac* – efekt imenujemo 'puščanje promotorja'. Proti temu se lahko borimo na dva načina: da uporabimo sistem z zapisom za *lacI*<sup>q</sup> – varianto represorja, ki se izraža v večjih količinah – ali pa da v gojišče dodajamo glukozo.

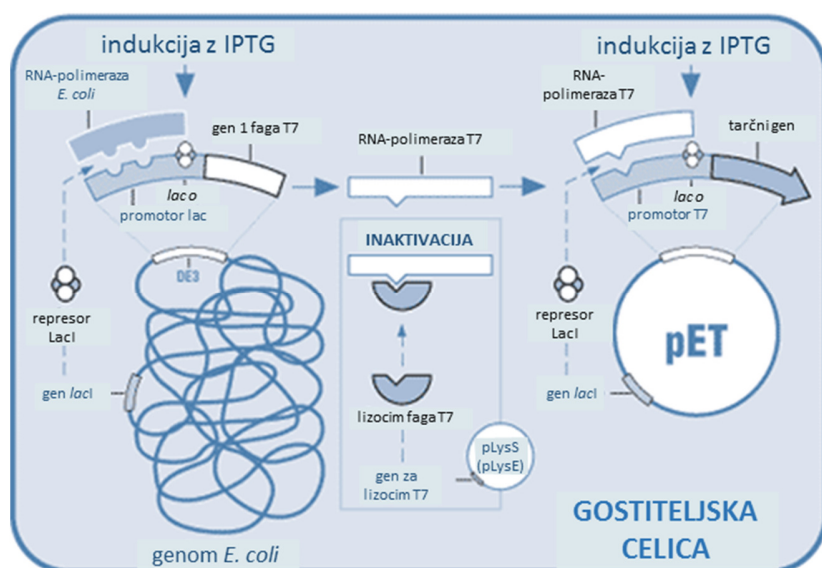
Eksperimente, v katerih želimo pripraviti rekombinantni protein v bakterijah, lahko izvajamo v analitskem merilu, torej z volumni kultur, ki nam omogočajo le nekaj preprostih analiz, ali pa v preparativnem merilu, ko smo s predhodnimi poskusi že pokazali, da je izražanje učinkovito, pa nato želimo pripraviti večje količine rekombinantnih proteinov. Preparativni poskusi lahko potekajo tudi v fermentorjih, medtem ko analitske izvajamo kar v epruvetah ali v stresalnih erlenmajericah z volumni kultur med 5 in 20 ml.

Ko prvič analiziramo transformante z ekspresijskim vektorjem, običajno izvedemo analitsko indukcijo z več kloni, lahko pa tudi testiramo vlogo seva, gojišča, trajanja indukcije in temperature gojenja. Tako bi na primer z ekspresijskim sevom transformirali več sevov *E. coli* z različnimi lastnostmi (npr. okvaro v zapisu za proteaze) in jih gojili v bogatih in definiranih gojiščih, nato pa preverili, ali je po indukciji nastal rekombinantni protein in ali so v nivojih izražanja kakšne razlike. Za preparativni poskus bi potem izbrali kombinacijo, ki je dala najboljše rezultate.

Raven izražanja lahko preverimo na več načinov. Najpogosteje izvedemo analizo celotnih bakterijskih proteinov z NaDS-PAGE. Primerjamo vzorec seva brez zapisa za iskani protein in seva z zapisom, na osnovi pričakovane velikosti identificiramo dodatno liso in iz njene intenzitete sklepamo na nivo ekspresije. Če gre za izražanje proteina z znano biološko aktivnostjo in pričakujemo, da bo rekombinantni protein pravilno zvit, lahko preverimo njegovo aktivnost v lizatu. Pri tem moramo upoštevati možnost, da se je protein vezal na druge bakterijske proteine in se inaktiviral, ter oceniti mejo detekcije. Rekombinantni proteini, ki se odlagajo v obliki netopnih inkluzijskih telesc, niso primerni za analizo aktivnosti, elektroforezna analiza pa je vseeno mogoča, saj je inkluzijska telesca mogoče raztopiti v NaDS in reducentu, ki sta v nanašalnem pufu. Vseeno lahko v celici del rekombinantnega proteina ostane v topni obliki, kar lahko preverimo elektroforezno, če je topni protein tudi pravilno zvit, pa lahko preverimo s testom aktivnosti.

## 4.1 Indukcija izražanja

Ekspresijski sistem T7 je eden bolj zapletenih, saj indukcija izražanja rekombinantnega gena ne poteka neposredno, pač pa preko RNA-polimeraze bakteriofaga T7. Sistem opisuje slika 4.1. Z dodatkom IPTG pride do konformacijske spremembe represorja *lac*, ki se posledično ne more več vezati na operatorsko regijo. Zato bakterijska RNA-polimeraza začne prepisovati RNA-polimerazo faga T7 s kromosoma *E. coli* BL21[DE3]. Ko na ribosomih pride do sinteze polimeraze T7, se ta veže na promotor T7 na vektorju pET-32a in začne prepisovati zapis za kokošji cistatin (oziroma fuzijski protein – glej plazmidno karto pri 2. vaji).



**Slika 4.1: Prikaz ekspresijskega sistema T7 v bakterijah *Escherichia coli*.**  
(<https://www.quora.com/How-does-IPTG-induced-gene-expression-work-at-a-molecular-level>)

Postopek za analitsko indukcijo ekspresije (torej delo z majhnimi volumni kultur) je naslednji:

- Posamezno kolonijo BL21[DE3] (pET-32a/kc) – tudi kontrolni sev! – precepimo v 3 ml gojišča LB z ampicilinom (100 µg/ml) in stresamo preko noči pri 200 r/min in 37 °C.
- Naslednji dan gosto prekončno kulturo redčimo 1 : 20 v sveže gojišče z ampicilinom (8 ml v 20-mililitrskih epruvetah) in stresamo pri 250 r/min in 37 °C, dokler  $A_{550}$  ne doseže 0,4–0,8. Odvzamemo en alikvot celic (1,5–2 ml), ostanku pa dodamo IPTG do končne 1 mM koncentracije.
- Nadaljujemo z gojenjem še 3–4 ure pri 30 °C, nato določimo  $A_{550}$  in odvzamemo celice za analizo (celotnega bakterijskega lizata ter ločeno topne in netopne celične frakcije).

### **Alternativni poskus: Rekombinantni protein v periplazmi**

Vsaj ena od skupin na vajah naj zapis za kokošji cistatin izrazi v *E. coli* s pomočjo vektorja pGM1. Tudi tu lahko izražanje induciramo z dodatkom IPTG, ki je analog substrata in veže represor *lac*, tako da RNA-polimeraza *E. coli* lahko začne s prepisovanjem zapisa, ki se nato prevaja v protein (primerjaj plazmidno karto pGM1b pri 2. vaji).

Izražanje običajno induciramo, ko celice dosežejo logaritemsko fazo rasti, to je (odvisno od seva) med  $A_{550} = 0,4$  in  $A_{550} = 0,8$ . V primeru, ko je rekombinantni produkt citotoksičen, pa se raje odločimo za indukcijo tik preden celice dosežejo stacionarno fazo rasti. Na ta način zaradi več biomase še lahko dosežemo ravni izražanja, ki omogočajo detekcijo in izolacijo rekombinantnega proteina.

Na današnji vaji bomo inducirali izražanje kokošjega cistatina v 7 ml kulture v epruvetah.

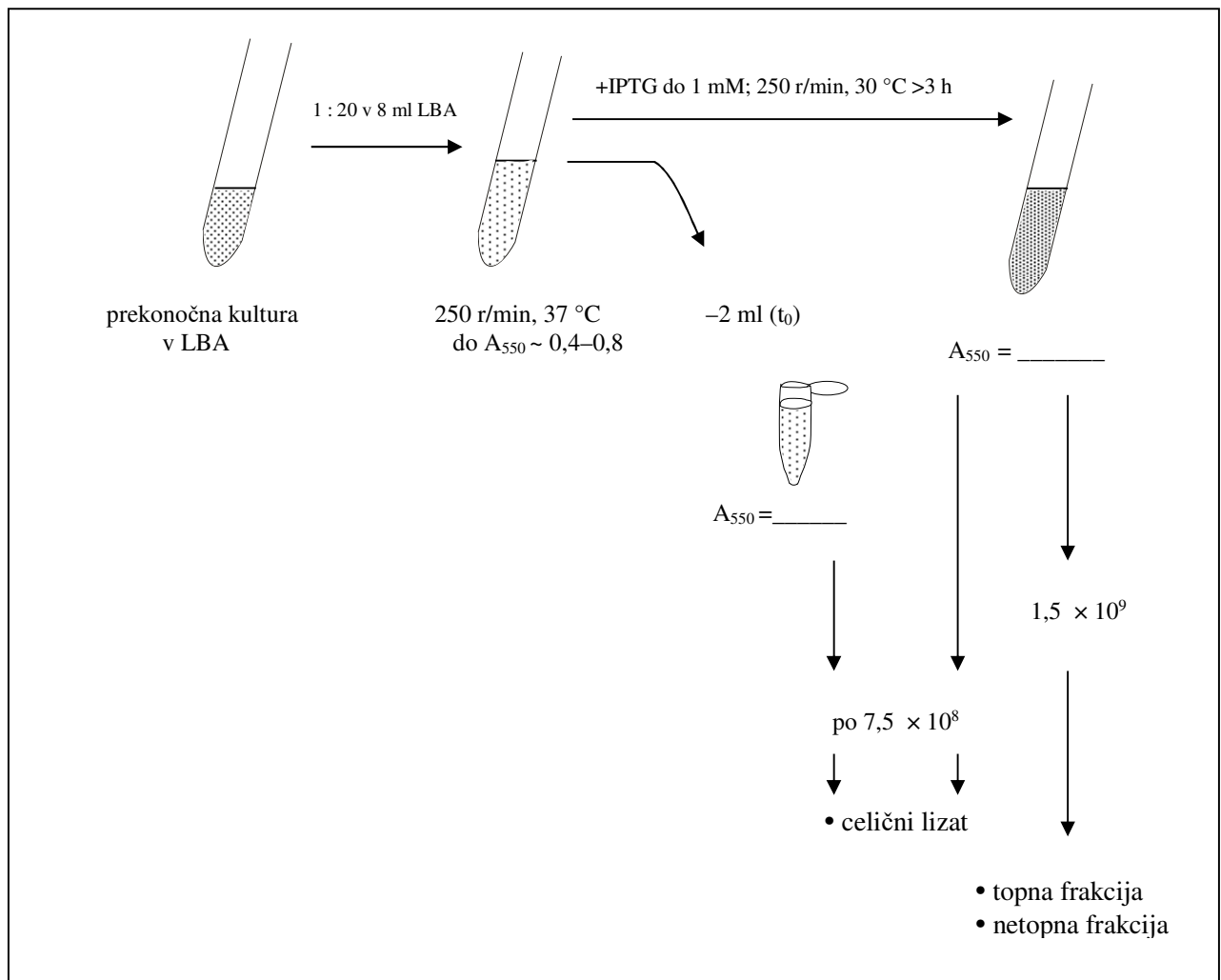
- Posamezno kolonijo ekspresijskega seva precepimo v 5 ml gojišča LB z ampicilinom (100  $\mu\text{g/ml}$ ) in stresamo preko noči pri 200 r/min in 37 °C.
- Naslednji dan [vajo začnemo tu →] prekonočni kulturi izmerimo  $A_{550}$  in prenesemo v sveže gojišče toliko kulture, da bo  $A_{550} \sim 0,15$ , skupni volumen kulture pa bo 8 ml (v 20-mililitrski epruveti). Stresamo pri 250 r/min, dokler  $A_{550}$  ne doseže 0,4–0,8. Odvzamemo en alikvot celic (2 ml), ostanku pa dodamo IPTG do 1 mM končne koncentracije. Kontrolni alikvot predstavlja vzorec pred indukcijo. Celice odcentrifugiramo in zamrznemo do elektroforezne analize celičnih proteinov.
- Nadaljujemo z gojenjem pri 30 °C preko noči, nato določimo  $A_{550}$  in odvzamemo ustrezen volumen kulture (glej tabelo v Dodatku teh navodil) za elektroforezno analizo celotnega bakterijskega lizata, del preostanka pa uporabimo za izolacijo periplazemskih proteinov.



## 4.2 Analiza indukcije

Če nas zanima samo količina proizvedenega rekombinantnega proteina, ne pa tudi lokalizacija, izvedemo NaDS-PAGE celotnih lizatov, pri čemer kot kontrolo nanesemo lizat celic pred indukcijo in lizat celic, ki so bile inducirane, a nosijo samo ekspresijski vektor brez inserta. Na podlagi razlik v proteinski sliki lahko ocenimo, ali je prišlo do proizvodnje rekombinantnega proteina in kakšni so nivoji proizvodnje.

V primeru, ko moramo določiti, ali je rekombinantni protein prisoten v topni obliki ali pa morda v netopni – torej kot inkluzijska telesa, pa moramo ločeno analizirati topno in netopno frakcijo bakterijskega lizata. Za takšno analizo običajno izhajamo iz dvakratne količine celic (pribl.  $2 \times 10^8$ ), kot je sicer običajna, ko analiziramo celotne bakterijske proteine. Z ultrazvokom razbijemo celice in netopni del lizata odcentrifugiramo. Supernatant predstavlja topno frakcijo. Usledini dodamo nekaj pufra in nanašalni puffer, ki vsebuje NaDS. Po prekuhanju vzorcev se bodo raztopili tudi prej netopni proteinski agregati. Na elektroforezni gel nanesemo celotni lizat, netopno in topno frakcijo, in po elektroforezi in obarvanju določimo, koliko proteina pričakovane velikosti je topnega, koliko pa ga je bilo agregiranega.



Slika 4.2: Shema poskusa indukcije in analize v primeru izražanja v citoplazmi (osnovni poskus).

#### Priprava celotnega celičnega lizata za elektroforezo:

Celični lizat pripravite iz celic pred in po indukciji. En par študentov naj izvede poskus s kontrolnim vzorcem!

Na podlagi izmerjene vrednosti  $A_{550}$  iz tabele odčitajte gostoto celic in v svežo centrifugirko odpipetirajte volumen, ki ustreza  $7,5 \times 10^8$  celicam.

1. Odcentrifugirajte celice (1 min pri 12 000 g).
2. Odpipetirajte supernatant in ga zavržite.
3. Usedlini dodajte 50  $\mu$ l pufra TE.
4. Razbijajte z ultrazvokom  $3 \times 10$  s na ledu (to naj naredi asistent – zaradi majhnega volumna lahko hitro pride do pretiranega penjenja in poškodbe mikrosonde).
5. Odvzemite 10  $\mu$ l suspenzije razbitih celic, prenesite jih v novo mikrocentrifugirko in dodajte 2  $\mu$ l (6 $\times$ ) nanašalnega pufra.
6. Pred nanosom kuhajte 3 min in nato centrifugirajte 10 min.
7. Na elektroforezni gel nanesite samo topni del vzorca.

#### Priprava topne in netopne frakcije za elektroforezo:

Najprej pripravite celični lizat iz celic po indukciji, nato pa ločite topni del lizata od netopnega. En par študentov naj izvede poskus s kontrolnim vzorcem!

Na podlagi izmerjene vrednosti  $A_{550}$  iz tabele odčitajte gostoto celic in v svežo centrifugirko odpipetirajte volumen, ki ustreza  $1,5 \times 10^9$  celicam.

1. Odcentrifugirajte celice (1 min pri 12 000 g).
2. Odpipetirajte supernatant in ga zavržite.
3. Usedlini dodajte 50  $\mu$ l pufra TE.
4. Razbijajte z ultrazvokom  $3 \times 10$  s na ledu (to naj naredi asistent – zaradi majhnega volumna lahko hitro pride do pretiranega penjenja in poškodbe mikrosonde).
5. Odvzemite 10  $\mu$ l suspenzije razbitih celic in jih prenesite v novo mikrocentrifugirko.
6. Obe centrifugirki (z 10  $\mu$ l in preostankom) centrifugirajte 2 min pri polnih obratih.
7. Oba supernatanta prenesite v novi mikrocentrifugirki in tistemu supernatantu iz 10  $\mu$ l suspenzije dodajte 2  $\mu$ l (6 $\times$ ) nanašalnega pufra. Ta vzorec predstavlja topno frakcijo. Supernatant z večjim volumnom zamrznite do naslednje vaje in NE dodajajte pufra!
8. Usedlino iz 10  $\mu$ l vzorca po zadnjem centrifugiranju resuspendirajte v 10  $\mu$ l pufra TE in dodajte 2  $\mu$ l (6 $\times$ ) nanašalnega pufra. Ta vzorec predstavlja netopno frakcijo.
9. Pred nanosom kuhajte oba vzorca 3 min in nato centrifugirajte 10 min.
10. Na elektroforezni gel nanesite samo topni del vzorca.

Analizirajte dobljene frakcije z NaDS-PAGE (na 15-odstotnem gelu). V prvi analizi ugotovite, če se da iz celotnega celičnega lizata ugotoviti, ali je prišlo do izražanja kokošjega cistatina in ali je koncentracija kokošjega cistatina po indukciji izražanja kaj narasla. [Na prvi gel nanesite torej vzorec celic pred indukcijo in po njej.] Druga analiza pa bo pokazala, koliko (če sploh) rekombinantnega proteina je prisotnega v topni, koliko pa v netopni obliki. [Na drugi gel torej nanesite zapored topno in netopno frakcijo celic po indukciji.] Na oba gela nanesite tudi **ustrezne kontrole!**

---

*Ali je po indukciji prišlo do sinteze proteina z velikostjo, ki jo pričakujemo za fuzijski protein s kokošjim cistatinom? Ali je do sinteze prišlo že pred dodatkom IPTG? Zakaj bi se lahko cistatin sintetiziral že pred dodatkom induktorja?*

*Ugotovite, ali je rekombinantni protein v celicah po indukciji prisoten pretežno v topni ali netopni obliki! Na osnovi intenzitete proteinske lise poskusite oceniti, koliko proteina je topnega in koliko netopnega!*

*Kakšen bi bil postopek za izolacijo inkluzijskih telesc iz večje količine bakterijskega lizata? Kako bi inkluzijska telesa raztopili in kakšni so postopki za renaturacijo tako raztopljenih proteinov?*

## Alternativni poskus: Izolacija periplazemske frakcije bakterij in analiza izoliranih proteinov

Ekspresijski vektor pGM1 je konstruiran tako, da vsebuje pred zapisom za kokošji cistatin signalno zaporedje *ompA* (angl. outer membrane protein A), kar pomeni, da pričakujemo rekombinantni protein v periplazemskem prostoru. Periplazma je sicer prostorsko majhen celični razdelek, vendar je za pripravo rekombinantnih proteinov primeren vsaj iz dveh razlogov: ker je v periplazmi redoks okolje bolj primerno za ustvarjanje disulfidnih mostičkov in ker je v periplazmi manj proteaz kot v citoplazmi. Kokošji cistatin vsebuje 4 cisteinske ostanke, ki so v naravni molekuli povezani z 2 disulfidnima mostičkoma. Periplazma je zato zelo primerno okolje za izražanje tega proteina v *E. coli*. Nadaljnja prednost periplazme pred citoplazmo je, da je v njej manj proteinov in je zato čiščenje rekombinantnega proteina iz periplazemske frakcije lažje.

Pri izolaciji periplazemske frakcije celice iz kulture najprej odcentrifugiramo, nato pa resuspendiramo v izotoničnem pufri (vsebuje 20–25-odstotno saharozo in soli). Celice nato odcentrifugiramo in resuspendiramo v večji količini pufru brez saharoze in intenzivno stresamo na ledu. Ob tem bodo bolj rigidne zunanje bakterijske stene popokale, notranja membrana pa je bolj fleksibilna in ostane intaktna. Vsebina periplazme se bo tako sprostila v pufer in po odcentrifugiranju sferoplastov ostala v supernatantu.

Dobro pripravljena periplazemska frakcija vsebuje vsaj desetkrat manj proteinov kot citoplazma iz enakega števila celic in razporeditev lis po velikosti na elektroferogramu jasno kaže, da gre pretežno za proteine, ki jih v citoplazmi ni. Če smo pri delu preveč agresivni, nam bodo popokale tudi notranje membrane in periplazemska frakcija bo onesnažena s citoplazemskimi proteini. Če pa delamo preveč nežno, bo preveč celic ostalo intaktnih in periplazme bodo v usedlini po zadnjem centrifugiranju, kar pomeni, da bo 'periplazemska frakcija' vsebovala zelo malo proteinov. Ker je periplazemska frakcija dokaj čista, lahko merimo vsebnost proteinov spektrofotometrično in tako ocenimo, koliko vzorca moramo nanesti na elektroforezni gel.

Zaradi velike količine pufru, ki ga potrebujemo, da dosežemo osmozni šok, je koncentracija proteinov v tej frakciji lahko prenizka za takojšen nanos na elektroforezni gel. V tem primeru je treba vzorce prej skoncentrirati. Najpreprostejša je uporaba vakuumskega koncentratorja, če pa je koncentracija proteinov  $> 0,1$  mg/ml, vzorec lahko skoncentriramo tudi z obarjanjem. Najpogosteje uporabljamo trikloroocetno kislino (TCA), lahko pa tudi aceton.

### Priprava celotnega celičnega lizata za elektroforezo:

Celični lizat pripravite iz celic pred in po indukciji. En par študentov naj izvede poskus s kontrolnim vzorcem!

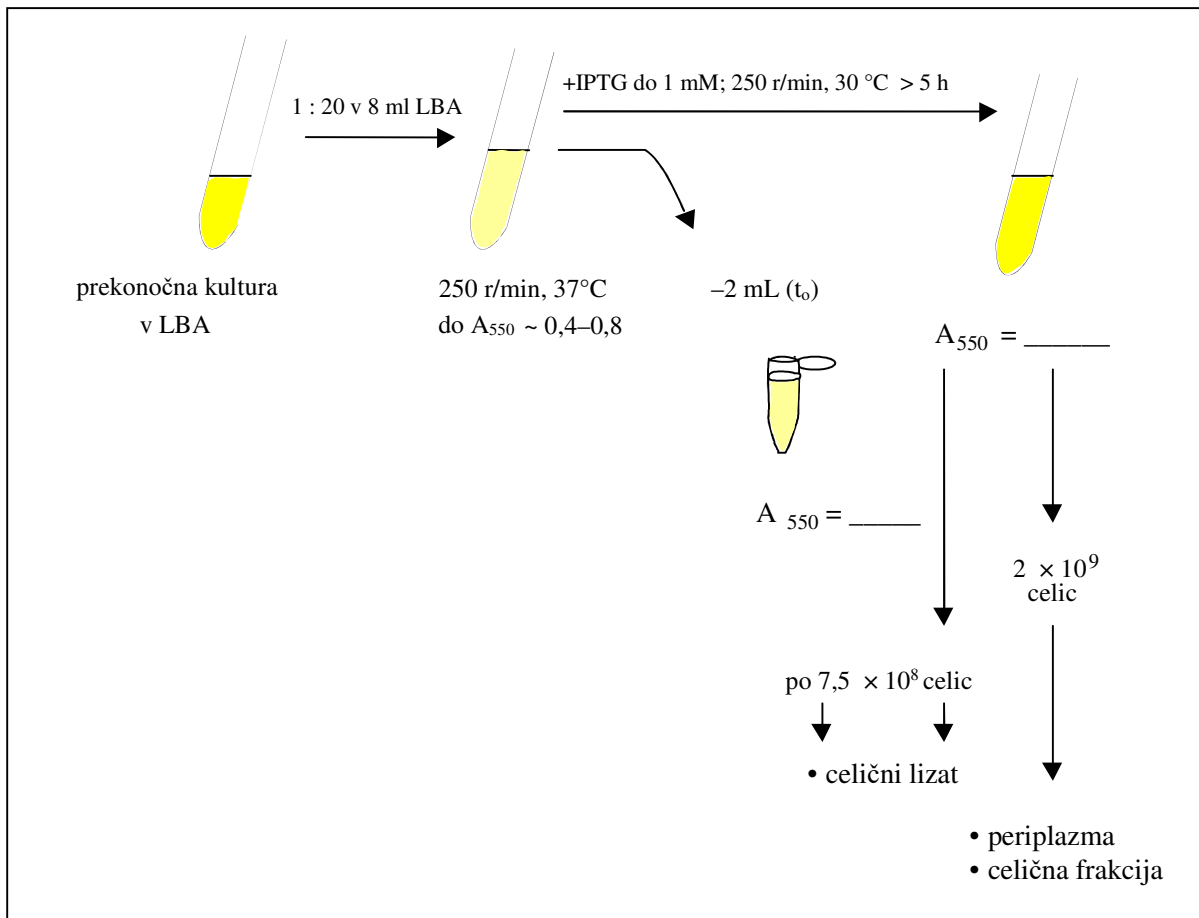
Na podlagi izmerjene vrednosti  $A_{550}$  ocenite ( $A = 1$  ustreza približno  $10^9$  cel./ml) gostoto celic in v svežo centrifugirko odpipetirajte volumen, ki ustreza  $7,5 \times 10^8$  celicam.

1. Odcentrifugirajte celice (1 min pri 12 000 g).
2. Odpipetirajte supernatant in ga zavržite.
3. Usedlini dodajte 50  $\mu$ l pufru TE.
4. Razbijajte z ultrazvokom  $3 \times 10$  s na ledu (to naj naredi asistent – zaradi majhnega volumna lahko hitro pride do pretiranega penjenja in poškodbe mikrosonde).
5. Odvzemite 10  $\mu$ l suspenzije razbitih celic, prenesite jih v novo mikrocentrifugirko in dodajte 2  $\mu$ l (6 $\times$ ) nanašalnega pufru.
6. Pred nanosom kuhajte 3 min in nato centrifugirajte 10 min.
7. Na elektroforezni gel nanesite samo topni del vzorca.

Postopek izolacije periplazemske frakcije:

En par študentov naj izvede poskus s kontrolnim vzorcem!

1. Odcentrifugirajte (3 min pri 5000 g)  $2 \times 10^9$  induciranih celic in jih resuspendirajte v 0,5 ml pufra TES (100 mM tris/HCl, pH 9,0, 0,2 M EDTA, 25 % (w : v) saharoze).
2. Postavite na led za 10 min in pretresite vsako minuto.
3. Celice odcentrifugirajte (kot zgoraj) in ostanek pufra odpivajte.
4. Takoj dodajte 0,75 ml hladnega pufra TE, postavite na led in izmenično intenzivno stresajte (15 s) – ne z vibracijskim mešanikom – in inkubirajte na ledu (45 s), skupaj 10 min.
5. Odcentrifugirajte celični ostanek (za PAGE), supernatant (periplazemsko frakcijo – za PAGE in za določanje aktivnosti) pa shranite ločeno od preostanka celic.



**Slika 4.3: Shema poskusa indukcije in analize v primeru izražanja v periplazmi (alternativni poskus).**

Priprava celične frakcije za elektroforezno analizo:

1. Odcentrifugirane ostanke celic resuspendirajte v 50  $\mu$ l pufra TE.
2. Razbijte celice z ultrazvokom  $3 \times 10$  s na ledu (pri tem nosite zaščitne slušalke).
3. Odvzemite toliko suspenzije, da ustreza  $2,5 \times 10^8$  celicam, prenesite v svežo mikrocentrifugirko, če je treba, dopolnite do 10  $\mu$ l z vodo, in dodajte 2  $\mu$ l (6 $\times$ ) nanašalnega pufra.
4. Pred nanosom kuhajte 3 min in nato centrifugirajte 10 min.
5. Nanesite samo topni del vzorca.

Priprava periplazemske frakcije za elektroforezno analizo:

Določite  $A_{280}$  izolirane frakcije in izračunajte koncentracijo proteinov (ob upoštevanju, da  $A = 1$  ustreza 1 mg/ml).

Za nanos rabite ~ 40  $\mu$ g proteinov; če je za to potrebni volumen >15  $\mu$ l, oborite proteine s TCA.

♣ *Oborite samo toliko proteinov, kolikor jih rabite za PAGE. Preostanek periplazemske frakcije boste rabili za test aktivnosti, kjer boste potrebovali nativne proteinske molekule!*

1. K 1 V periplazemske frakcije dodajte 0,11 V 100-odstotnega TCA (w : v), pretresite in inkubirajte na ledu 15 min.
2. Centrifugirajte 10 min; supernatant zavržite.
3. Usedlino sperite s 100  $\mu$ l mešanice etanol:eter (1 : 1).
4. Centrifugirajte 3 min pri polnih obratih, supernatant odpipetirajte do zadnje kapljice in zavržite (v za to predvideno erlenmajerico).
5. Usedlino posušite v digestoriju.
6. Raztopite v 10  $\mu$ l vode in dodajte 2  $\mu$ l (6 $\times$ ) nanašalnega pufra.
7. Pred nanosom kuhajte 3 min in nato centrifugirajte 5 min.

Analizirajte dobljene frakcije z NaDS-PAGE (na 15-odstotnem gelu). V prvi analizi ugotovite, če se da iz celotnega celičnega lizata ugotoviti, ali je prišlo do izražanja kokošjega cistatina in ali je koncentracija kokošjega cistatina po indukciji izražanja kaj narasla. [Na prvi gel nanesite torej vzorec celic pred indukcijo in po njej.] Druga analiza pa bo pokazala, ali je rekombinantni kokošji cistatin prisoten v periplazmi in koliko približno ga je; hkrati bomo kontrolirali tudi kvaliteto preparacij periplazme. [Na drugi gel torej nanesete vzorec periplazemske frakcije in celičnega ostanka.] Na robu vsakega gela pustite dve mesti prosti za standarde velikosti in za vzorec celic brez rekombinantnega vektorja.

---

*Ali je po indukciji prišlo do sinteze proteina z velikostjo, ki jo pričakujemo za kokošji cistatin? Ali je do sinteze prišlo že pred dodatkom IPTG? Ali bi to sploh bilo mogoče? Zakaj?*

*Na osnovi intenzitete proteinske lise poskusite oceniti, koliko proteina so bakterije proizvedle na liter kulture!*

*Ali bi v primeru, da bi izražanje izvedli v citoplazmi, pričakovali več ali manj produkta? Od česa je to odvisno?*

---

### 4.3 Test aktivnosti na papain s substratom BANA

Če je rekombinantni protein topen, je smiselno preveriti, ali je morda tudi aktiven. Ker smo poskušali proizvesti inhibitor cisteinskih proteinaz, bi lahko izvedli preprost test aktivnosti na encim papain z uporabo kromogenega substrata BANA. (Podoben test poznate že z Biokemijskega praktikuma.) Če ste zaznali inhibitorno aktivnost, v kontrolnem poskusu pa ne, je zelo verjetno, da je aktivnost posledica pravilno zvitega kokošnjega cistatina. Če pa ste zaznali aktivnost tudi v kontrolnem poskusu (sev z vektorjem brez inserta), potem gre za aktivnost endogenega inhibitorja, in ne za aktivnost rekombinantnega proteina.

Testirajte dva različna volumna topne frakcije [v alternativnem poskusu: periplazemske frakcije] na papain s substratom BANA! Primerjaj s kontrolnim vzorcem (brez dodanega inhibitorja – to pomeni brez dodane citoplazemske/periplazemske frakcije) in slepim vzorcem (brez dodanega encima).

Alikvot topne frakcije (> 35 µl) razredčite v razmerju 1 : 10 s pufrom TE in analizirajte aktivnost na papain z dvema količinama v testu po spodnji tabeli. V alternativnem poskusu analizirajte nerazredčeno periplazemsko frakcijo.

Dopolnite shemo pipetiranja in izvedite poskus!

	vzorec 1	vzorec 2	kontrolni vz.	slepi vzorec
Citoplazemska oz. periplazemska frakcija	50 µl	200 µl		
papain (20 µg/ml)	50 µl			
pufer TE	150 µl			
cistein v testnem pufru	250 µl			
<i>inkubirajte 5 min pri 37 °C – občasno pretresite</i>				
BANA	50 µl			
<i>inkubirajte 10 min pri 37 °C – občasno pretresite</i>				
prekinjevalni reagent	550 µl			
<i>inkubirajte 5 min pri sobni T – občasno pretresite izmerite A<sub>520</sub> proti slepemu vzorcu</i>				

Izmerjene vrednosti:

1) Vaš vzorec (celice z vektorjem, ki je vseboval zapis za kokošji cistatin):

kontrolni vzorec:

vzorec 1:

vzorec 2:

2) Celice s praznim vektorjem:

kontrolni vzorec:

vzorec 1:

vzorec 2:

---

*Ali je bilo mogoče določiti inhibitorno aktivnost periplazemskih frakcij?*

*Ali lahko ugotovite iz rezultatov vseh skupin, ali gre za aktivnost endogenega inhibitorja ali za aktivnost rekombinantnega proteina?*

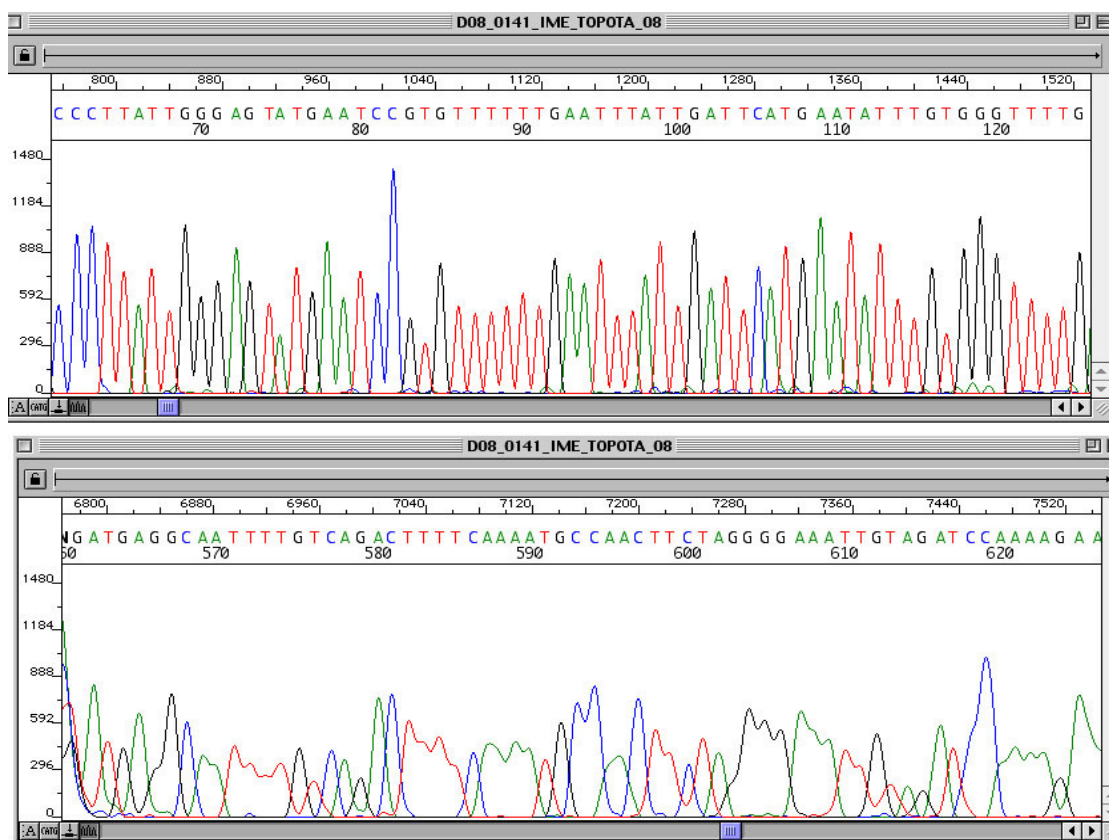
*Kaj bi lahko rekli o testu/vzorcu v primeru, da ne bi uspeli dokazati inhibitorne aktivnosti?*

## 5 Določanje nukleotidnega zaporedja

Za določanje nukleotidnega zaporedja po dideoksi metodi so dolgo uporabljali radioaktivno označevanje produktov DNA-polimeraze T7. Različno dolge produkte so ločevali na tankih dolgih denaturacijskih poliakrilamidnih gelih, ki so bili z ene strani termostatirani. Po sušenju gela, iz katerega je bilo treba predhodno eluirati ureo, so na gel položili občutljiv film in eksponirali nekaj dni, preden so film razvili in prebrali zaporedje v obliki lestvice 4 ločenih nukleotidov.

Napredek v tehnologiji je predstavljal nadomestitev PAGE s kapilarno elektroforezo v kombinaciji s fluorescenčno označenimi vzorci. Fluorescenčne oznake uvedemo v nastajajočo verigo s poenostavljeno (enosmerno) PCR. Očiščen vzorec (znebimo se neuporabljenih reagentov) nato nanese na avtomatizirano napravo za določanje nukleotidnega zaporedja. Ločevanje in analiza potekata nekaj ur, izpis pa je v obliki elucijskega diagrama z barvno označenimi 4 nukleotidi. Običajno lahko preberemo zaporedja, ki so od začetnega oligonukleotida oddaljena > 20 nukleotidov, dolžina ločene regije pa je lahko tudi 800–1000 nukleotidov.

Računalniški program že prevede elucijski diagram v enočrkovno zaporedje (slika 5.1), ki je nadpisano grafu, vendar pa je natančnost avtomatskega branja omejena, predvsem v začetnem delu, na mestih ponovitev iste baze in proti koncu učinkovitega ločevanja.

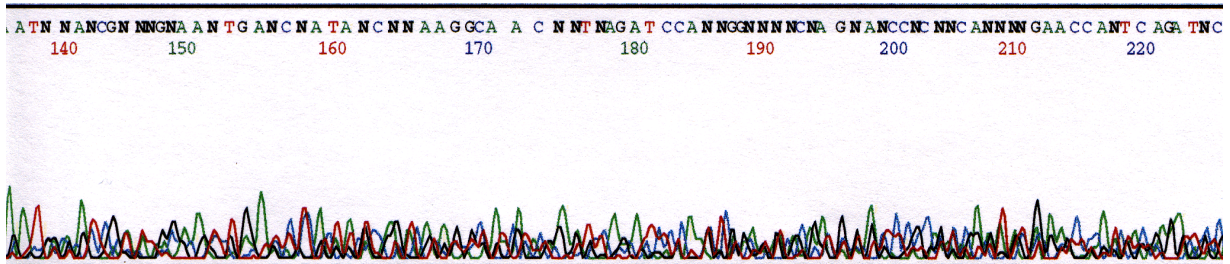


Slika 5.1: Elucijski diagram kapilarne elektroforeze pri določanju nukleotidnega zaporedja z začetnega (zgoraj) in končnega dela območja določanja.



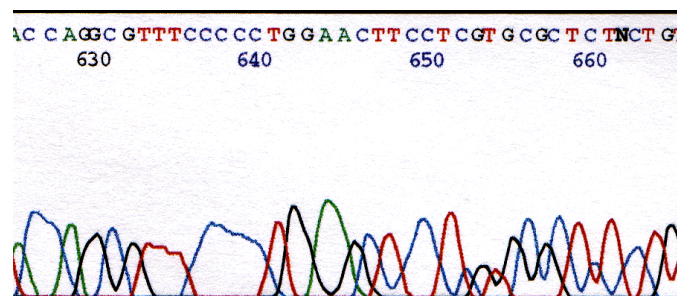
Pri določanju ali preverjanju nukleotidnega zaporedja je ključnega pomena izbor začetnih oligonukleotidov. Vedeti moramo, na katero verigo se bodo vezali, in izbrati primerno razdaljo od regije, ki jo določamo. Pri preverjanju znanih zaporedij si pogosto pomagamo z regijami, kjer se zaporedje istega nukleotida ponovi štirikrat ali večkrat, nato pa beremo zaporedje od tega mesta navzgor ali navzdol.

Pri šibkih signalih se vrhovi lahko izgubijo v ozadju, kar onemogoča avtomatsko branje, pa tudi ročno branje je zelo otežkočeno. Program bo na mesta, kjer ne more določiti prave baze, vpisal N (slika 5.2).



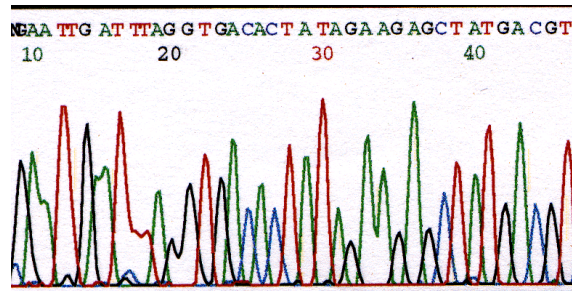
**Slika 5.2: Elucijski diagram kapilarne elektroforeze pri določanju nukleotidnega zaporedja v primeru šibkih signalov.**

Proti koncu regije, ki je berljiva, se lahko pojavi navidezna insercija ene baze. Do tega pride zaradi razširjenih elucijskih vrhov (lis) v območju znižane ločljivosti. Po drugi strani lahko pride tudi do navideznih delecij, ko se vrhovi s šibkim signalom skrijejo pod razširjeni vrh. Na sliki 5.3 je na primer navidezno podvojen A na mestu 645, na tem mestu pa je program spregledal bazo G. Podvojen je tudi T 648.



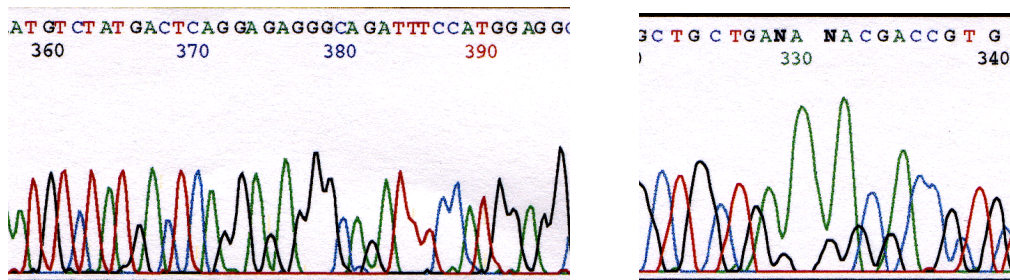
**Slika 5.3: Elucijski diagram kapilarne elektroforeze pri določanju nukleotidnega zaporedja v segmentu z razširjenimi vrhovi.**

Na začetku analizirane regije na izpisih pogosto zasledimo navidezno delecijo ene baze, do česar pride zaradi kompresij vrhov – na sliki 5.4 npr. A za G14. Podobne 'delecije' se včasih pojavljajo tudi v sredini območja, ki ga analiziramo.



Slika 5.4: Elucijski diagram kapilarne elektroforeze pri določanju nukleotidnega zaporedja v začetnem segmentu s kompresijo vrhov.

Naslednja pogosta težava pri branju izpisov zaporedij je sorazmerno šibak signal za G, ki sledi bazi A. Program take nizke vrhove včasih tudi spregleda (diagrama na sliki 5.5).



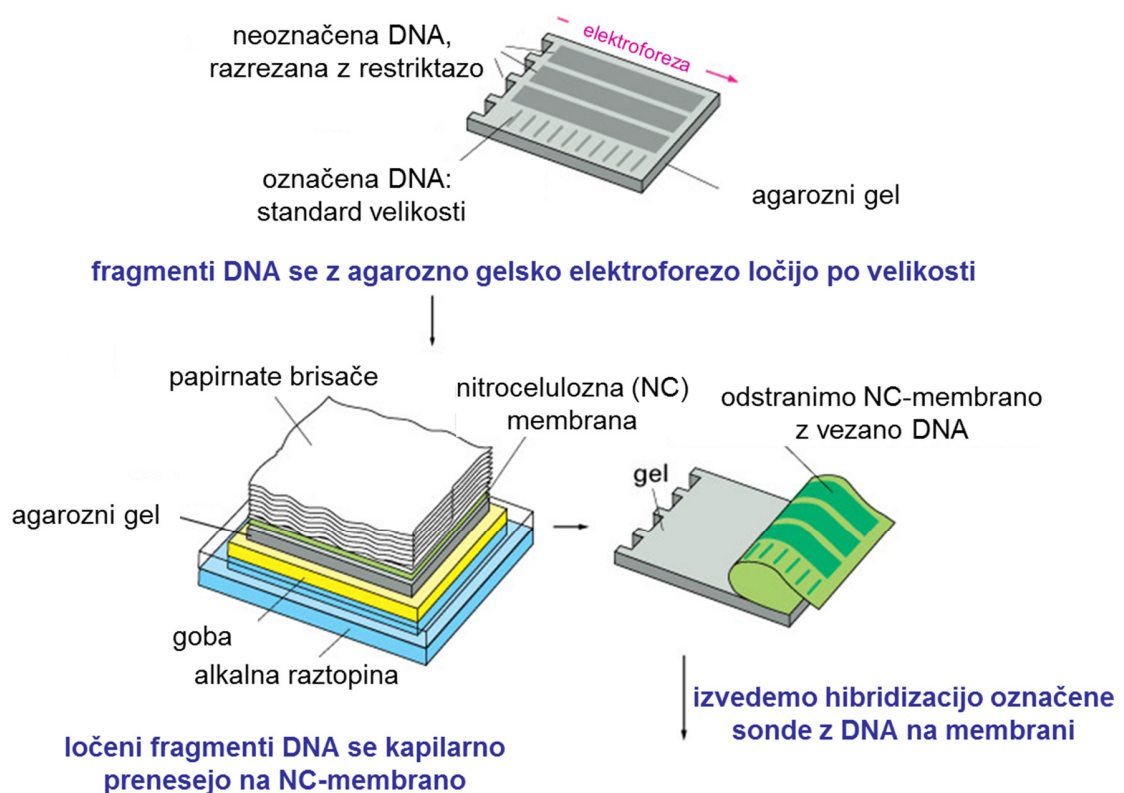
Slika 5.5: Elucijska diagrama kapilarne elektroforeze pri določanju nukleotidnega zaporedja z vidnim znižanjem vrhov za G, ki sledijo A.

Zaradi vseh opisanih težav pri avtomatskem določanju vrhov je smiselno zaporedja, ki jih je določil računalniški program za obdelavo elucijskih diagramov, tudi ročno preveriti in oceniti pravilnost računalniških določitev. Sodobni programi sicer večino pogostih pojavov že upoštevajo, ne pa nujno vedno v celoti.

## 6 Prenos fragmentov DNA z elektroforeznega gela na membrano

To je demonstracijska vaja, kjer si bomo na kratko ogledali, kako je treba pripraviti 'sendvič' za prenos in kako bi potekala kasnejša detekcija specifičnih zaporedij DNA na membrani.

Najenostavnejši način prenosa je s pasivno difuzijo (ki si ga bomo ogledali in ga prikazuje slika 6.1), prenos pa bi lahko izvedli tudi podobno, kot to delamo s proteini. Gel in membrano bi namestili v električno polje in DNA bi potovala z agaroznega gela na membrano, ki bi jo položili na pravo stran. Tak postopek boste izvajali pri vajah iz Celične in molekularne imunologije.



**Slika 6.1: Prikaz prenosa Southern.**

(prirejeno iz *Alberts et al., Essential Cell Biology, 2. izdaja, Garland Publishing, 2004*)

## TEHNIČNI DODATEK

- A) Obarjanje DNA iz etanola ali izopropanola
  - B) Koncentriranje vodnih raztopin nukleinskih kislin z butanolom
  - C) Agarozna gelska elektroforeza
  - D) Poliakrilamidna gelska elektroforeza
  - E) Gojišča za bakterije
  - F) Napotki za uporabo centrifug
  - G) Sterilizacija
  - H) Antibiotiki
  - I) Ocena gostote bakterijskih kultur
  - J) Tabela genetskega koda
  - K) Fizikalnokemične značilnosti nukleinskih kislin
  - L) Nekatere restriktivne endonukleaze in njihova prepoznavna mesta
- 

### A) Obarjanje DNA iz etanola ali izopropanola

DNA iz vodne raztopine oborite z dodatkom Na-acetata in alkohola. V takih pogojih se topnost DNA zmanjša in precipitat, ki nastane, lahko odcentrifugiramo.

Postopek:

- 1 V raztopine DNA (ne manj kot 10 µl, sicer dopolnite z vodo)
- 0,11 V 3 M Na-acetata, pH 5,2
- 2,5 V absolutnega etanola
- premešajte
- centrifugirajte 10 min pri 14 000 g
- odpipetirajte supernatant in ga zavržite
- usedlino sperite z 1 V 70-odstotnega etanola (ne manj kot 50 µl)
- močno stresajte
- centrifugirajte 3 min pri 14 000 g
- odstranite supernatant
- usedlino posušite na zraku (10 min) ali v koncentradorju (1 min)

Enako učinkovit je postopek z izopropanolom: namesto 2,5 V etanola v zgornjem postopku vzamete 0,7 V izopropanola. Pozor: izopropanol ne sme biti mrzel, sicer se obarjajo tudi soli.

Za obarjanje kratkih fragmentov dsDNA (< 100 bp) ali ssDNA uporabite etanol iz zmrzovalnika. Pred centrifugiranjem inkubirajte 10 min (bolje: preko noči) pri -20 °C in centrifugirajte po možnosti v hlajeni centrifugi 20 min.

Postopek deluje dobro za običajne izhodiščne koncentracije DNA. Če je DNA zelo razredčena (nekaj deset ng/ml), obarjajte po postopku za kratke fragmente dsDNA.

Spiranje s 70-odstotnim etanolom lahko izvedemo s poljubno količino etanola; več soli ko pričakujemo v vzorcu, večji volumen 70-odstotnega etanola vzamemo. Stopnjo spiranja lahko tudi ponovimo. Po dodatku etanola stresamo na vibracijskem mešalu; usedlina se včasih loči s stene centrifugirke, včasih pa ne. Tudi če smo obarjali z izopropanolom, spiramo soli na koncu z etanolom.

Postopek obarjanja imamo lahko tudi za tehniko za povečevanje koncentracije DNA v vzorcu, saj lahko oborjeno DNA ponovno raztopimo v ustrezno majhnem volumnu puфра.

---

## B) Koncentriranje vodnih raztopin nukleinskih kislin z butanolom

Butanol, ki ga dodamo vodni raztopini, bo vezal nekaj vode in s tem zmanjšal volumen vodne faze. Koliko vode bo vezal, je odvisno od tega, kako svež je (koliko vode je že vezal iz zraka) in kako intenzivno mešamo vodno in organsko fazo, zato ni mogoče podati natančnih količin butanola, ki jih je treba dodati, da odvezamo določen volumen vode. Ravnati je treba empirično.

Butanol je lažji od vode in bo zato po centrifugiranju (zadošča 1 min pri polnih obratih mikrocentrifuge) nad vodno fazo. Zato ga po centrifugiranju zlahka odpipetiramo, in če je treba, dodamo svež butanol ter ekstrakcijo ponovimo. Ko smo prišli do zelenega volumna raztopine DNA, butanol kvantitativno odstranimo, da ne bo motil naslednjih encimskih reakcij, ki vključujejo DNA ali nanašanja na gel (ker je butanol lažji od vode, bo del vzorca splaval iz žepka, kljub temu da mu dodate nanašalni pufer, ki vzorec obteži).

Pri koncentriranju z butanolom je treba upoštevati, da se hkrati s koncentriranjem DNA koncentrirajo tudi soli in da se vam te lahko oborijo iz raztopine. Če boste dodali preveč butanola, se vam lahko zgodi, da vodne faze ne boste več videli, soli in DNA pa se vam bodo oborile. V tem primeru odstranite butanol in usedlino resuspendirajte v zahtevanem volumnu vode. Upoštevajte, da morda DNA v raztopini, ki ste jo dobili, ne bo dobro topna! Zato je koncentriranje z butanolom primerno predvsem za odzemanje manjših volumnov vode iz raztopine, ki ne vsebuje veliko soli. V vseh drugih primerih je bolje izvesti obarjanje DNA iz etanola ali izopropanola pod pogoji, pri katerih se soli ne obarjajo. Obarjanje je časovno nekoliko bolj dolgotrajno, vendar boste z oborjeno in ponovno raztopljeno DNA imeli manj težav kot z DNA, ki ste jo skoncentrirali z butanolom.

Alternativni postopek za koncentriranje vodnih raztopin je odparevanje topila v koncentradorju pri znižanem tlaku (pri tem epruveto z vzorcem vstavite v rotor, centrifugalna sila pa bo preprečevala, da bi posušen vzorec odlepilo z dna epruvete). Nukleinsko kislino lahko skoncentriramo tudi s tem, da jo oborimo in nato ponovno raztopimo v manjšem volumnu pufru kot je bil začetni.

---

## C) Agarozna gelska elektroforeza

Na vajah uporabljamo dve različni veliki elektroforezni kadički, za kateri rabimo 60 oz. 80 ml gela.

Za pripravo gela zatehtamo toliko agaroze, kot je razvidno iz spodnje tabele.

koncentr. agaroze	60 ml gela	80 ml gela
1,0 %	0,60 g	0,80 g
1,2 %	0,72 g	0,96 g
1,5 %	0,90 g	1,20 g

Agarozo zatehtamo v visoko čašo (vsaj 500 ml), dolijemo pufer (1×) TAE in označimo višino raztopine s flomastrom za primer, da nam pri kuhanju izhlapi preveč tekočine.

Gel prevremo v mikrovalovni pečici ob večkratnem premešanju – toliko, da se razpustijo vsi delčki. Pufer ne sme povreti! Če je treba, dopolnimo z vodo. V model z vstavljenim glavničkom nalijemo gel šele, ko se nekoliko ohladi. Pozorni moramo biti na morebitne zračne mehurčke, ki bi se prijeli na glavniček. Dokler je gel tekoč, mehurčke zlahka odstranimo.

Elektroforeza na malem gelu naj teče pri 90 V, na velikem pa pri 110 V.

**TAE** – končne koncentracije v 1× pufru so: 40 mM tris-acetat, pH 7,6, 1 mM EDTA. Običajno pripravimo 20× založno raztopino (včasih tudi 50×), ki jo pred uporabo redčimo z vodo. Za 500 ml 20× pufru rabimo: 48,4 g tris-baze, 11,4 ml ledocetne kisline, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8).

Spodnja preglednica prikazuje območja optimalnega ločevanja dsDNA in potovanje indikatorskih barvil na agaroznih gelih. Podatki veljajo za standardno agarozo v pufru TAE.

koncentr. agaroze	območje ločevanja	ksilencianol	bromofenolmodro
0,75 %	15 000–1000 bp	~ 10000 bp	~ 1000 bp
1,00 %	10 000–500 bp	~ 6000 bp	~ 500 bp
1,25 %	5000–300 bp	~ 3600 bp	~ 370 bp
1,50 %	4000–200 bp	~ 2800 bp	~ 300 bp
2,00 %	2500–100 bp	~ 300 bp	~ 150 bp

(Podatki: Roche Applied Science, Cambrex)

#### D) Poliakrilamidna gelska elektroforeza

Za **ločevanje proteinov** uporabljamo diskontinuuirni gel (tris/HCl), ki teče v glicinskem pufru. V vzorcu in vseh pufrih je prisoten NaDS, ki izravna razlike v naboju proteinov.

raztopina	ločevalni gel 15 %	nanašalni gel ~3 %
akrilamid : bisakrilamid (37,5 : 1)	4,5 ml	0,5 ml
dest. voda	5,3 ml	3,0 ml
3 M tris, pH 8,8	1,5 ml	---
0,5 M tris, pH 6,8	---	1,25 ml
10-odstotni NaDS	0,12 ml	0,05 ml
1,5-odstotni APS	0,60 ml	0,25 ml
TEMED	0,006 ml	0,004 ml

3 M tris: umerite pH-meter (s standardom pH 9) pred pripravljanjem raztopine. Za 500 ml rabite 181,65 g tris baze; raztopite v 350 ml vode in nastavite pH na 8,8 s HCl. Natančen pH pufriv je bistven za uspešno ločevanje proteinov; raztopina mora biti pred nastavljanjem pH ogreta na sobno temperaturo.

0,5 M tris: Za 500 ml zatehtajte 30,3 g tris-baze; nastavite pH na 6,8. Bodite natančni pri titriranju pufra! pH 6,8 je na spodnji meji pufranja, zato obstaja nevarnost pretitriranja. Zadnje kapljice HCl dodajajte zelo počasi.

10-odstotni NaDS: K 10 g NaDS dodajte dH<sub>2</sub>O do 100 ml. Hranite ga pri sobni temperaturi poljubno dolgo.

*Pozor: NaDS v prahu draži sluznico, zato ga zatehtajte v digestoriju.*

APS (amonijev persulfat): Zatehtajte svežega – pripravite 10 ml (150 mg APS, dH<sub>2</sub>O do 10 ml), ostanek shranite v zmrzovalniku (obstočno ~ 1 mesec).

TEMED: Smrdi, zato stekleničko takoj po odpipetiranju zaprite. *Delajte v digestoriju.*

##### Priprava delovne raztopine:

Odpipetirajte potrebne volumne raztopin (glej tabelo). Premešajte pred in po dodatku TEMED, ki inducira polimerizacijo. Takoj nalijte v vnaprej pripravljen stekleni sendvič in pazite, da v tekočino med nalivanjem ne pridejo mehurčki. Spodnji (ločevalni) del gela, ki ga nalijete kot prvega, prekrijte s plastjo vode ( pribl. 5 × 0,2 ml; pipetirajte previdno, ob robovih). Polimeriziran gel lahko shranite preko noči v hladilniku in nalijete nanašalni del gela naslednje jutro. Seveda lahko z delom nadaljujete tudi takoj potem, ko ste ločevalni gel prekrili s plastjo vode. Do uporabe shranite gel z vstavljenim glavničkom zaviti v vlažno papirnato krpo. Pri vstavljanju glavnička pazite na mehurčke, ki se radi ujamejo pod žepki.

Elektroforezni pufer (10×):

Za 1 l zmešajte 30,3 g tris-baze + 144 g glicina + 10 g NaDS. Ne nastavlajte pH (nekateri protokoli imajo napačen podatek, da mora biti pH 8,3). Pred uporabo razredčite 1 : 10.

Nanašalni pufer (reducirajoč) (5×):

Za 20 ml zmešajte 0,73 g tris-baze, 5 ml glicerola, 5 ml 2-merkaptioetanol in 2 g NaDS. pH naj bo 8,8 (nastavite s HCl). Dodajte za konico spatule bromfenolmodrega.

Raztopina za barvanje:

Za 500 ml zmešajte 1 g barvila Coomassie Brilliant Blue in 200 ml etanola ter dopolnite z vodo do končnega volumna. Tik pred barvanjem dodajte 20-odstotno očetno kislino v razmerju 1:1.

Raztopina za razbarvanje:

Za 1 l rabite 100 ml očetne kisline, 300 ml etanola in 600 ml vode. Raztopino po uporabi regenerirajte preko filtra z ogljem (pazite, da oglje ne prehaja v filtrirano raztopino!).

---

## E) Gojišča za bakterije

**LB:** 1 % triptona (ali kazein-hidrolizata ali podobne mešanice aminokislin), 0,5 % kvasnega ekstrakta, 1 % NaCl. Za 400 ml zatehtajte 4 g triptona, 2 g kvasnega ekstrakta in 4 g NaCl ter raztopite v vodi. pH naj bi bil 7,4 (običajno ga ne nastavljamo, tudi če vrednost pH odstopa, saj so bakterije *E. coli* zelo prilagodljive glede pH). Avtoklavirajte. Hranite pri sobni temperaturi do nekaj tednov.

Podobno gojišče je **YT:** 0,8 % triptona, 0,5 % kvasnega ekstrakta, 0,5 % NaCl. Včasih pripravimo 2YT (dvojne koncentracije vseh sestavin).

Gojišče **TB** vsebuje tudi glicerol: 1,2 % triptona, 2,4 % kvasnega ekstrakta, 0,4 % glicerola; raztopite v 90 % končnega volumna, avtoklavirajte, nato dodajte 0,1 M K-fosfata (0,17 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,72 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), ki ste ga avtoklavirali ločeno.

Gojišče **BY** vsebuje mesni ekstrakt (3 %), kvasni ekstrakt (1,5 %) in  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,5 %).

Za agarne plošče dodajte še agar, in sicer 1,5-2 % (w : v) končne koncentracije.

---

## F) Napotki za uporabo centrifug

V laboratoriju uporabljamo tri tipe centrifug proizvajalca Eppendorf in eno proizvajalca Haereus. Za delo z mikrocentrifugirkami (1,5-mililitrske koničaste plastične epruvete s pokrovčki) uporabljamo hlajeno centrifugo ali malo namizno centrifugo, ki ni hlajena. Za večje volumne bomo uporabljali hlajeno centrifugo 5810R.

Male centrifuge omogočajo centrifugiranje pri do ~ 15 000 g. Če v protokolih ni napisano, pri katerih obratih ali katerih vrednostih g moramo centrifugirati vzorce, je to običajno 14 000 g ali več – to velja vsaj pri delu z DNA v malem merilu. Obe mali centrifugi uporabljamo samo s po enim rotorjem, zato ni nevarnosti, da bi izbrali napačen rotor ali poskušali centrifugirati pri vrednostih, ki bi presegle kapaciteto centrifuge oz. rotorja.

Večja centrifuga ima dva rotorja. Rotor s fiksnim kotom (F-34-6-38) uporabljamo za 50-mililitrske centrifugirke s koničastim dnom. Največja hitrost centrifugiranja, ki jo omogoča rotor, je sicer 12 000 r/min, kar ustreza 18 500 g, vendar pa centrifugirke takšnih vrednosti ne dopuščajo in lahko pri takšnih obremenitvah počijo. S 50-mililitrskimi centrifugirkami ne smemo centrifugirati pri več kot 8000 g. Rotor s spremenljivim nagibom A-4-81 uporabljamo samo za volumne med 50 in 300 ml z ustreznimi adapterji. Tega rotorja sami na vajah ne boste uporabljali.

Pri centrifugiranju je treba predvsem paziti na uravnoveženost vzorcev, ki so v rotorju postavljeni na nasprotnih mestih. Pri mikrocentrifugah tariramo na < 50 µl natančno, in če nimamo ustreznega protivzorca, uporabimo ustreznega izmed vnaprej pripravljenih (so v stojalu nad hlajeno centrifugo). Pri večji centrifugi tariramo na tehtnici na ± 0,5 % mase vzorca s centrifugirko vred. Če je masa 50 g, je lahko razlika med nasproti si postavljenima vzorcema kvečjemu 250 mg.

Hitrost centrifugiranja lahko nastavimo v r/min ali kot končno vrednost g. Za preklop med obema prikazoma navadno obstaja posebna tipka ali kombinacija dveh tipk.

---

## G) Sterilizacija

suho steriliziranje: 200 °C 2 h

- ne steriliziramo plastičnih posod in zamaškov, ne označujemo s papirnim avtoklavirnim trakom
- suho steriliziramo samo prazno steklovino in kovinsko orodje (pincete, škarje)

sterilizacija v pari (avtoklaviranje): 1,2 bar, 121 °C, 20 min

- posode morajo biti priprte, da ima para dostop in so tlaki izenačeni
- primerno za raztopine, ki zdržijo povišane temperature
- alternativni pogoji za avtoklaviranje orodja in steklovine (pa tudi odpadnih reagentov in nepatogenih kultur): 2 bar, 135 °C, 10 min

steriliziranje občutljivih reagentov: sterilno filtriranje skozi filtre s porami 0,2 µm

---

## H) Antibiotiki

Predpisane koncentracije antibiotikov v gojišču so navedene za *E. coli* s srednjim ali visokim številom kopij vektorja na celico. Za vektorje, ki so v celicah prisotni le v majhnem številu kopij, so koncentracije antibiotikov praviloma nižje in jih je treba preveriti v literaturi.

### ampicilin

konc. založne raztopine 100 mg/ml v etanolu

končna konc. v gojišču 50–200 µg/ml

deluje na ravni sinteze bakterijske stene – samo na rastoče celice

mehanizem odpornosti: periplazemska β-laktamaza cepi β-laktamski obroč

### kanamicin

konc. založne raztopine 10 mg/ml v vodi

končna konc. v gojišču 10–30 µg/ml

deluje na ravni translacije

mehanizem odpornosti: aminoglikozid fosfotransferaza inaktivira antibiotik

### kloramfenikol

konc. založne raztopine 25 mg/ml v etanolu

končna konc. v gojišču 25–150 µg/ml

deluje na ravni translacije

mehanizem odpornosti: acetiltransferaza inaktivira antibiotik

### tetraciklin

konc. založne raztopine 12,5 mg/ml v etanolu – hrani na temnem

končna konc. v gojišču 12,5 µg/ml

deluje na ravni translacije

mehanizem odpornosti: modifikacija celične membrane onemogoči transport antibiotika v celice

---



### I) Ocena gostote bakterijskih kultur

Tabela za preračunavanje absorbance pri 550 nm v koncentracijo celic v kulturi *E. coli* K-12 (*vir ni znan; dobljeno posredno preko Bayer AG / Universität München*) je uporabna za oceno gostote celičnih kultur pri vajah iz Molekulskega kloniranja. Razmerje med absorbanco in gostoto je lahko od seva do seva različno, zato tabela ni splošno uporabna.

A <sub>550</sub>	c [ × 10 <sup>8</sup> /ml]
0,90	6,65
0,80	5,90
0,70	5,17
0,60	4,50
0,50	3,78
0,40	3,10
0,30	2,30

Pri spektrofotometričnem ocenjevanju celične gostote nikoli ne merimo absorbance vzorcem z A<sub>550</sub> > 0,9. Če je kultura bolj gosta od te vrednosti, jo redčimo z gojiščem in faktor redčenja upoštevamo pri preračunavanju. Najbolj natančne so meritve v območju med 0,5 in 0,8.

### J) Tabelarni prikaz genetskega koda

		drugi nukleotid					
		U	C	A	G		
prvi nukleotid (5'-konec)	U	UUU } Phe	UCU } UCC } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	
		UUC }		UAC }	UGC }	C	
		UUA } Leu		UCA }	UAA } STOP	UGA } STOP	A
		UUG }		UCG }	UAG }	UGG } Trp	G
	C	CUU } Leu	CCU } CCC } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U	
		CUC }		CAC }	CGC }	C	
		CUA }		CAA }	CGA }	A	
		CUG }		CCG }	CAG }	CGG }	G
	A	AUU } Ile	ACU } ACC } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U	
		AUC }		AAC }	AGC }	C	
		AUA }		ACA }	AAA } Lys	AGA }	A
		AUG } Met		ACG }	AAG }	AGG }	G
	G	GUU } Val	GCU } GCC } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U	
		GUC }		GAC }	GGC }	C	
		GUA }		GAA }	GGA }	A	
		GUG }		GCG }	GAG }	GGG }	G

### **K) Fizikalnokemične značilnosti nukleinskih kislin**

1 pmol fragmenta DNA s 1000 bp = 0,66  $\mu\text{g}$   
1 pmol vektorja pUC18/19 (2686 bp) = 1,77  $\mu\text{g}$   
1 pmol DNA bakteriofaga lambda (48 502 bp) = 32,01  $\mu\text{g}$   
1  $\mu\text{g}$  DNA dolžine 1000 bp = 1,52 pmol  
1  $\mu\text{g}$  vektorja pUC18/19 (2686 bp) = 0,57 pmol  
1  $\mu\text{g}$  DNA bakteriofaga lambda (48 502 bp) = 0,03 pmol

1  $A_{260}$  dsDNA = 50  $\mu\text{g/ml}$   
1  $A_{260}$  ssDNA = 38  $\mu\text{g/ml}$   
1  $A_{260}$  ssRNA = 37  $\mu\text{g/ml}$

povprečna M enega deoksiribonukleotida: 333 Da  
povprečna M enega ribonukleotida: 340 Da  
povprečna M enega baznega para DNA: 650 Da

## L) Nekatere restrikcijske endonukleaze in njihova prepoznavna mesta

Tabela predstavlja izbor restriktaz, ki se sorazmerno pogosto pojavljajo v različnih vektorjih in vam bo v pomoč pri nalogah za preračunavanje potrebnih količin encimov pa tudi pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov.

ime	zaporedje	št. mest na $\lambda$	ime	zaporedje	št. mest na $\lambda$
AatII	GACGT/C	10	BstNI	CC/WGG	71
Acc65I	G/GTACC	2	BstXI	CCANNNNN/NTGG	13
AccI	GT/MKAC	9	BstYI	R/GATCY	21
AclI	AA/CGTT	7	BstZ17I	GTA/TAC	3
AfeI	AGC/GCT	2	Bsu36I	CC/TNAGG	2
AflIII	C/TTAAG	3	BtgI	C/CRYGG	46
AflIII	A/CRYGT	20	Cac8I	GCN/NGC	238
AgeI	A/CCGGT	13	ClaI	AT/CGAT	15
AluI	AG/CT	143	DdeI	C/TNAG	104
AlwNI	CAGNNN/CTG	41	DpnI	GA/TC	116
ApaI	GGGCC/C	1	DpnII	/GATC	116
ApaLI	G/TGCAC	4	DraI	TTT/AAA	13
ApoI	R/AATTY	58	DraIII	CACNNN/GTG	10
AscI	GG/CGCGCC	2	DrdI	GACNNNN/NNGTC	3
AseI	AT/TAAT	17	EaeI	Y/GGCCR	39
AvaI	C/YCGRG	8	EagI	C/GGCCG	2
AvaII	G/GWCC	35	EcoNI	CCTNN/NNNAGG	9
AvrII	C/CTAGG	2	EcoO109I	RG/GNCCY	3
BamHI	G/GATCC	5	EcoRI	G/AATC	5
BanI	G/GYRCC	25	EcoRV	GAT/ATC	21
BanII	GRGCY/C	7	Fnu4HI	GC/NGC	380
BclI	T/GATCA	8	FseI	GGCCGG/CC	0
BfaI	C/TAG	13	FspI	TGC/GCA	15
BfrBI	ATG/CAT	14	HaeII	RGCGC/Y	48
BglI	GCCNNNN/NGGC	29	HaeIII	GG/CC	149
BglIII	A/GATCT	6	HhaI	GCG/C	215
BlpI	GC/TNAGC	6	HincII	GTY/RAC	35
BsaAI	YAC/GTR	14	HindIII	A/AGCTT	6
BsaBI	GATNN/NNATC	21	HinfI	G/ANTC	148
BsaHI	GR/CGYC	40	HinPII	G/CGC	215
BsaJI	C/CNNGG	105	HpaI	GTT/AAC	14
BsaWI	W/CCGGW	81	HpaII	C/CGG	328
BsiEI	CGRY/CG	22	Hpy188I	TCN/GA	170
BsiHKAI	GWGCW/C	28	Hpy188III	TC/NNGA	185
BsiWI	C/GTACG	1	Hpy99I	CGWCG/	102
BslI	CCNNNNN/NGG	176	HpyCH4III	ACN/GT	187
BsoBI	C/YCGRG	8	HpyCH4IV	A/CGT	143
Bsp1286I	GDGCH/C	38	HpyCH4V	TG/CA	273
BspDI	AT/CGAT	15	KasI	G/GCGCC	1
BspEI	T/CCGGA	24	KpnI	GGTAC/C	2
BspHI	T/CATGA	8	MboI	/GATC	116
BsrFI	R/CCGGY	61	MfeI	C/AATTG	8
BssHII	G/CGCGC	6	MluI	A/CGCGT	7
BssKI	/CCNGG	185	MscI	TGG/CCA	18
BstAPI	GCANNNN/NTGC	34	MseI	T/TAA	195
BstBI	TT/CGAA	7	MslI	CAYNN/NNRTG	62
BstEII	G/GTNACC	13	MspAII	CMG/CKG	75

MspI	C/CGG	328	StyI	C/CWWGG	10
MwoI	GCNNNNN/NNGC	347	SwaI	ATTT/AAAT	0
NaeI	GCC/GGC	1	TaqI	T/CGA	121
NarI	GG/CGCC	1	TfiI	G/AWTC	87
NciI	CC/SGG	114	TliI	C/TCGAG	1
NcoI	C/CATGG	4	TseI	G/CWGC	199
NdeI	CA/TATG	7	Tsp45I	/GTSAC	81
NgoMIV	G/CCGGC	1	Tsp509I	/AATT	189
NheI	G/CTAGC	1	TspRI	CASTGNN/	119
NlaIII	CATG/	181	Tth111I	GACN/NNGTC	2
NlaIV	GGN/NCC	82	XbaI	T/CTAGA	1
NotI	GC/GGCCGC	0	XcmI	CCANNNNN/NNNNTGG	12
NruI	TCG/CGA	5	XhoI	C/TCGAG	1
NsiI	ATGCA/T	14	XmaI	C/CCGGG	3
NspI	RCATG/Y	32	XmnI	GAANN/NNTTC	24
PacI	TTAAT/TAA	0			
Paer7I	C/TCGAG	1			
PciI	A/CATGT	2			
PflFI	GACN/NNGTC	2			
PflMI	CCANNNN/NTGG	14			
PmeI	GTTT/AAAC	2			
PmlI	CAC/GTG	3			
PpuMI	RG/GWCCY	3			
PshAI	GACNN/NNGTC	7			
PsiI	TTA/TAA	12			
PspGI	/CCWGG	71			
PspOMI	G/GGCCC	1			
PstI	CTGCA/G	28			
PvuI	CGAT/CG	3			
PvuII	CAG/CTG	15			
RsaI	GT/AC	113			
RsrII	CG/GWCCG	5			
SacI	GAGCT/C	2			
SacII	CCGC/GG	4			
SalI	G/TCGAC	2			
Sau3AI	/GATC	116			
Sau96I	G/GNCC	74			
SbfI	CCTGCA/GG	5			
ScaI	AGT/ACT	5			
ScrFI	CC/NGG	185			
SexAI	A/CCWGGT	5			
SfcI	C/TRYAG	38			
SfiI	GGCCNNNN/NGGCC	0			
SfoI	GGC/GCC	1			
SgrAI	CR/CCGGYG	6			
SmaI	CCC/GGG	3			
SmlI	C/TYRAG	17			
SnaBI	TAC/GTA	1			
SpeI	A/CTAGT	0			
SphI	GCATG/C	6			
SspI	AAT/ATT	20			
StuI	AGG/CCT	6			

prirejeno iz kataloga New England BioLabs

#### Enočrkovne oznake nukleotidov

B = C, G ali T  
D = A, G ali T  
H = A, C ali T  
K = G ali T  
M = A ali C  
N = G, A, T ali C  
R = G ali A  
S = C ali G  
V = A, C ali G  
W = A ali T  
Y = C ali T

*EcoRI*: 1 U razreže v 1 h pri 37 °C 1 µg faga λ na 5 mestih; za rezanje dodatno zvite DNA je potrebna 2,5-krat več encima kot za linearno DNA

*BamHI*: 1 U razreže v 1 h pri 37 °C 1 µg faga λ na 5 mestih; za rezanje dodatno zvite DNA je potrebna 2-krat več encima kot za linearno DNA

*HindIII*: 1 U razreže v 1 h pri 37 °C 1 µg faga λ na 6 mestih; za rezanje dodatno zvite DNA je potrebna 5-krat več encima kot za linearno DNA

# ZBIRKA NALOG IZ MOLEKULSKEGA KLONIRANJA

## 1. NALOGA: NAČRTOVANJE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV

Nukleotidni zapis za fragment proteina človeški kolagen tipa III je:

atggggagaaagaggggctcctggagttgcaggaccccctggagggttctggacctgctgtatag  
**M G E R G A P G V A G P P G G S G P A V stop**

Človeški kolagen tipa III želite izraziti v *E. coli* seva BL21 [DE3] tako, da bo imel zgornji peptid na N-koncu fuzijski protein GST in na C-koncu nič!

Označite izbrane restriktaze in načrtajte začetna oligonukleotida za pomnoževanje s PCR, ki bosta omogočala vnos zapisa za kolagen na primerno mesto in pravilno izražanje! Začetna oligonukleotida morata biti dolga vsaj 20 nt.

RESTRIKTAZA	PREPOZNAVNO ZAPOREDJE
<i>Bam</i> HI	G/GATCC
<i>Xho</i> I	C/TCGAG
<i>Hind</i> III	A/AGCTT
<i>Pst</i> I	CTGCA/G
<i>Nco</i> I	C/CATGG
<i>Nde</i> I	CA/TATG
<i>Spe</i> I	A/CTAGT
<i>Sac</i> II	CCGC/GG

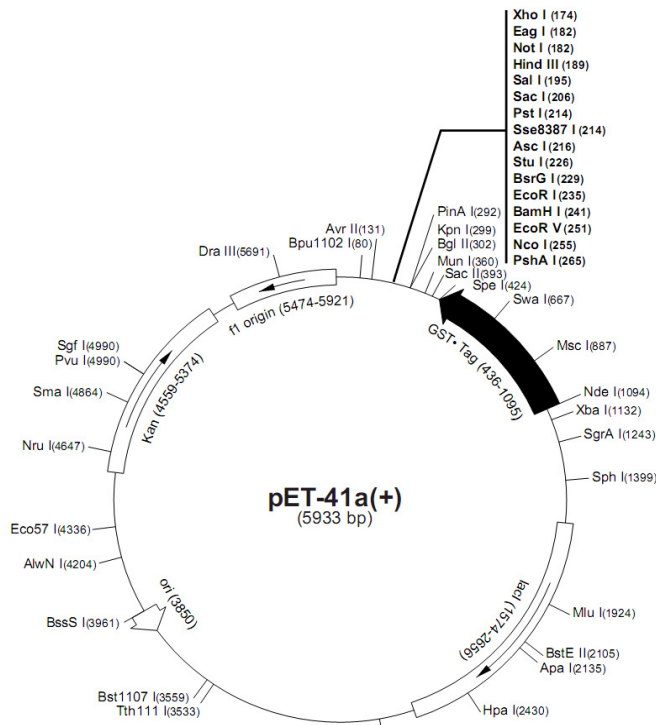
1. Smerni začetni oligonukleotid:

5' - \_\_\_\_\_ -3'

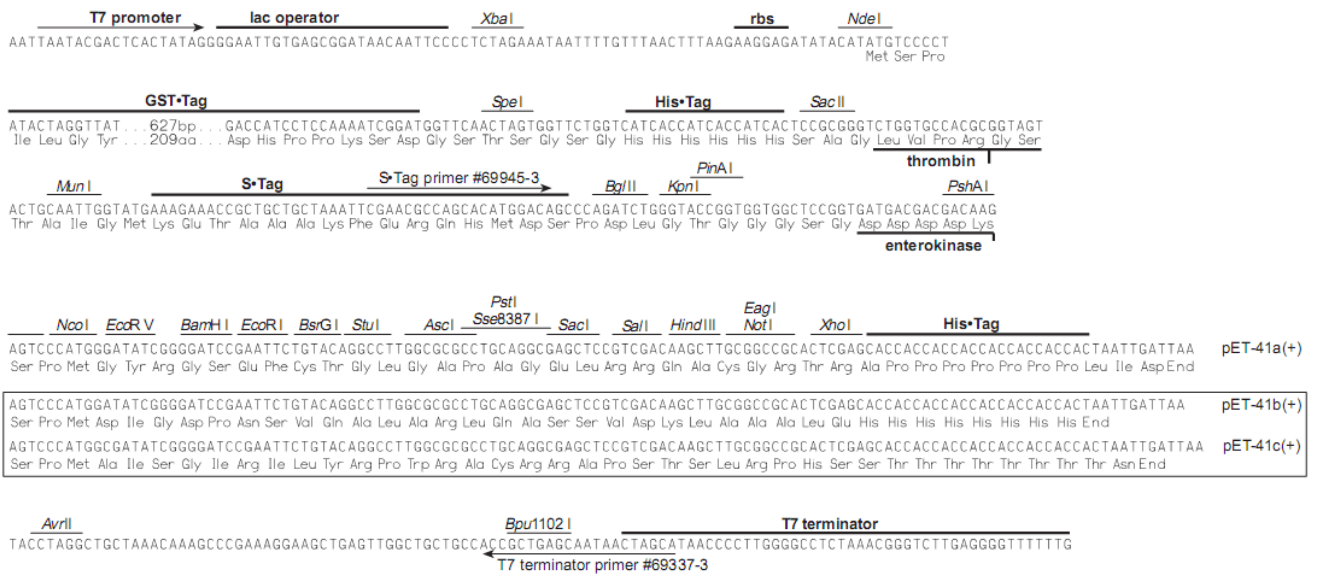
2. Protismerni začetni oligonukleotid:

5' - \_\_\_\_\_ -3'

3. Iz nukleotidnega zaporedja vključka izračunajte pričakovano velikost fuzijskega proteina v kDa, pri čemer upoštevajte tudi del, ki ga prispeva oznaka GST!



**Mesto za kloniranje (MCS):**



Pomagajte si tudi s tabelo genetskega koda v Dodatku teh navodil za vaje!

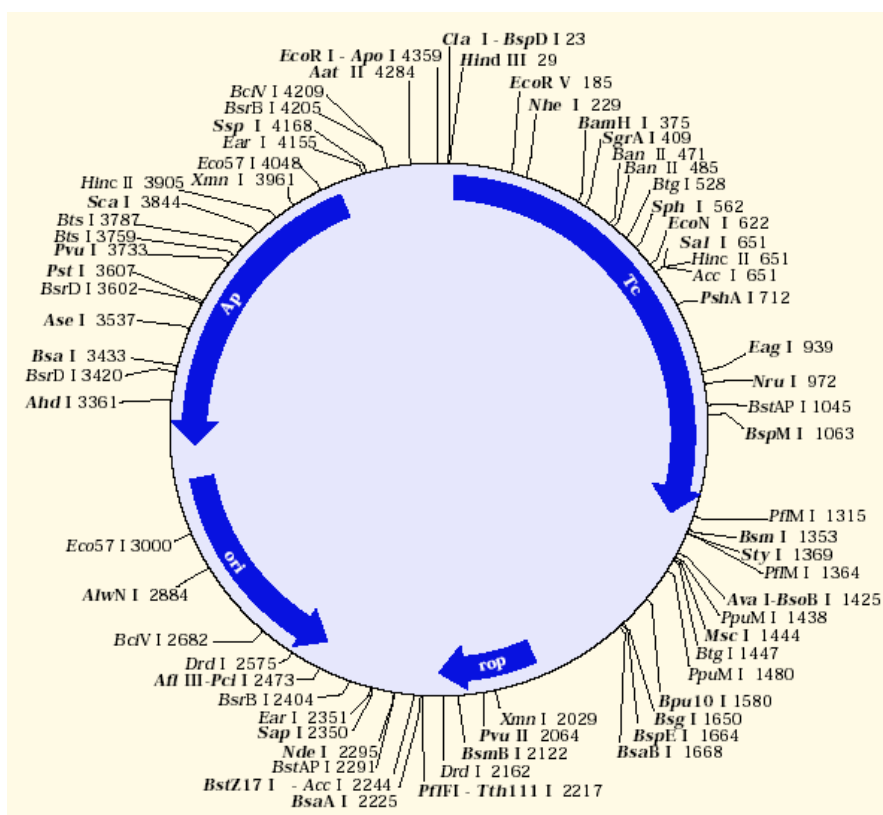
## 2. NALOGA: NAČRTOVANJE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV

V vektor pBR322 želite vstaviti fragment DNA, dolg 360 bp, ki ima interna mesta *Hind*III (mesto 122), *Pvu*I (mesto 176) in *Sal*I (mesto 235). Načrtajte oligonukleotide za pomnoževanje s PCR, ki bodo omogočali vnos produkta v vektor na tak način, da bo rekombinantni sev odporen samo proti ampicilinu oziroma samo proti tetraciklinu (načrtati morate torej dva para ustreznih oligonukleotidov).

Nukleotidno zaporedje fragmenta DNA je:

ATGCCAACCGACGTTTGTAGT.....(*Hind*III)...(*Pvu*I)...(*Sal*I).....CATATAGCACAGTCGCGGTGA

Pomagajte si s plazmidno karto vektorja pBR322 (4.361 bp; iz kataloga New England BioLabs, ZDA):



Izmed množice označenih restrikcijskih mest so uporabna predvsem mesta *Eco*RV, *Bam*HI, *Ava*I, *Pst*I in *Eco*RI, saj so encimi sorazmerno poceni in delujejo zanesljivo.

Glede na izbrana restrikcijska mesta na pomnoževalnih oligonukleotidih določite, kako bi preverili, ali se je fragment res vgradil v vektor. Uporabite lahko tudi interna mesta! Napišite, kakšna bo dolžina fragmentov po rezanju s *Hind*III, *Sal*I, *Pvu*I+*Eco*RI.

*Možnih rešitev je več, odvisno od tega, katera mesta izberete za vnos fragmenta.*

Ker v laboratoriju nimamo dostopa do interneta z več računalnikov hkrati, tokrat ne morete preveriti, ali so oligonukleotidi optimalno konfigurirani glede na njihove fizikalnokemične lastnosti. Paziti morate torej le, da so smiselno izbrani restrikcijska mesta, dolžina oligonukleotida in delež prilegajočega se zaporedja.

Oligonukleotida se morata prilegati na različni verigi, pazite pa tudi, da v neprilegajoči del 5'-oligonukleotida pomotoma ne vstavite stop-kodona, če boste produkt uporabili za vstavljanje v ekspresijske fuzijske vektorje.

*Zakaj se morata oligonukleotida prilegati na različni verigi?*

*Kako bi izvedli selekcijo, ki bi omogočala identifikacijo klonov z vključenim fragmentom v vektorju?*

*Katere so prednosti in slabosti selekcije z ampicilinom oz. tetraciklinom?*

#### **VPIS REŠITEV:**

Zaporedje 5'-oligonukleotida za pripravo vektorja, ki bo imel funkcionalen zapis za odpornost proti ampicilinu:

Zaporedje 3'-oligonukleotida za pripravo vektorja, ki bo imel funkcionalen zapis za odpornost proti ampicilinu:

Zaporedje 5'-oligonukleotida za pripravo vektorja, ki bo imel funkcionalen zapis za odpornost proti tetraciklinu:

Zaporedje 3'-oligonukleotida za pripravo vektorja, ki bo imel funkcionalen zapis za odpornost proti tetraciklinu:

—

Dolžine restrikcijskih fragmentov po delovanju encima *HindIII*:

Dolžine restrikcijskih fragmentov po delovanju encima *SalI*:

Dolžine restrikcijskih fragmentov po hkratnem delovanju encimov *PvuI* in *EcoRI*:



### 3. NALOGA: PRERAČUNAVANJE POTREBNE KOLIČINE ENCIMOV

Plazmid pEFU2 vsebuje zapis za rastni faktor. Vaša naloga je, da izolirate insert iz 5 pmol vektorja. pEFU je dolg 3890 bp, insert pa je vstavljen preko mest *SalI* in *MscI* (mesti se pojavljata na vektorju samo po enkrat). Koliko  $\mu\text{l}$  posameznega encima boste rabili za izvedbo reakcije v 1 h pri  $37^\circ\text{C}$  ob upoštevanju naslednjih podatkov:

*SalI*: koncentracija encima  $5\text{ U}/\mu\text{l}$ ; na fagu  $\lambda$  sta 2 prepoznavni mesti; za rezanje dodatno zvite DNA rabimo 10-krat več encima kot za linearno DNA

*MscI*: konc. encima  $10\text{ U}/\mu\text{l}$ ; na fagu  $\lambda$  je 18 prepoznavnih mest; za rezanje dodatno zvite DNA rabimo 3-krat več encima kot za linearno DNA

Račun:

Kako bi sestavili reakcijsko mešanico, če je koncentracija vektorja  $0,25\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , z obema encimoma pa lahko režemo v enakem pufru?

DNA	$\mu\text{l}$
<i>SalI</i>	$\mu\text{l}$
<i>MscI</i>	$\mu\text{l}$
pufer (10 $\times$ )	$\mu\text{l}$
voda	$\mu\text{l}$
-----	
skupaj	$\mu\text{l}$
konc. DNA:	

Kako bi izvedli preparativno elektroforezo na agaroznem gelu? V žepku je prostora za 20  $\mu\text{l}$  vzorca!

#### 4. NALOGA: PRIPRAVA RESTRIKCIJSKE KARTE

Skicirajte možno razporeditev restrikcijskih mest na linearni molekuli DNA (produktu PCR) na osnovi iz agarozne gelske elektroforeze določenih velikosti fragmentov po rezanju z restrikcijsko endonukleazo!

Po rezanju PCR-produkta ste dobili naslednje dolžine fragmentov (v bp):

*EcoRI*: 120, 760  
*SmaI*: 100, 220, 560  
*BamHI*: 440

*BamHI* + *EcoRI*: 120, 320, 440  
*SmaI* + *EcoRI*: 100, 120, 560

Restrikcijska karta:

Navedite dolžino fragmentov, ki bi jih dobili po rezanju z *BamHI* in *SmaI*!

\_\_\_\_\_

Koliko različno velikih fragmentov bi dobili, če bi rezali z *BamHI*, *EcoRI* in *SmaI*?

\_\_\_\_\_

#### 5. NALOGA: PRIPRAVA RESTRIKCIJSKE KARTE

Določite razporeditev restrikcijskih mest na plazmidu na osnovi iz agarozne gelske elektroforeze določenih velikosti restrikcijskih fragmentov!

Po rezanju plazmida ste dobili naslednje dolžine fragmentov (v bp):

*EcoRI*: 4700  
*PstI*: 1000, 3700  
*HindIII*: 2400, 2300  
*HindIII* + *EcoRI*: 300, 2000, 2400  
*PstI* + *HindIII*: 400, 1000, 2300  
*PstI* + *EcoRI*: 700, 1000, 3000

Skicirajte plazmidno karto  
z vrisanimi restrikcijskimi mesti!

## 6. NALOGA: RAZUMEVANJE POSTOPKOV IN NAČRTOVANJE POSKUSOV

Natančno preberite metodološki del o pripravi vektorja pT7470 in si pripravite skico, s pomočjo katere boste lahko razložili, kako je potekal eksperiment! Gre za članek Y. Dinga in sodel., objavljen v reviji Protein Expression and Purification leta 2004.

Pomagajte si s plazmidno karto vektorja pET-21a in z nukleotidnimi zaporedji začetnih oligonukleotidov, ki so predstavljeni v besedilu in tabeli 1.

### Cloning the *cdb3* coding region into vector pT7470 and pTYB12

The pT7470 expression vector containing both N-terminal and C-terminal hexahistidine tags was constructed from plasmid pET21a. Briefly, a pair of synthesized DNA fragments containing hexahistidine sequence with a *NdeI* end and an *EcoRI* end was ligated into *NdeI*- and *EcoRI*-digested pET21a. For vector

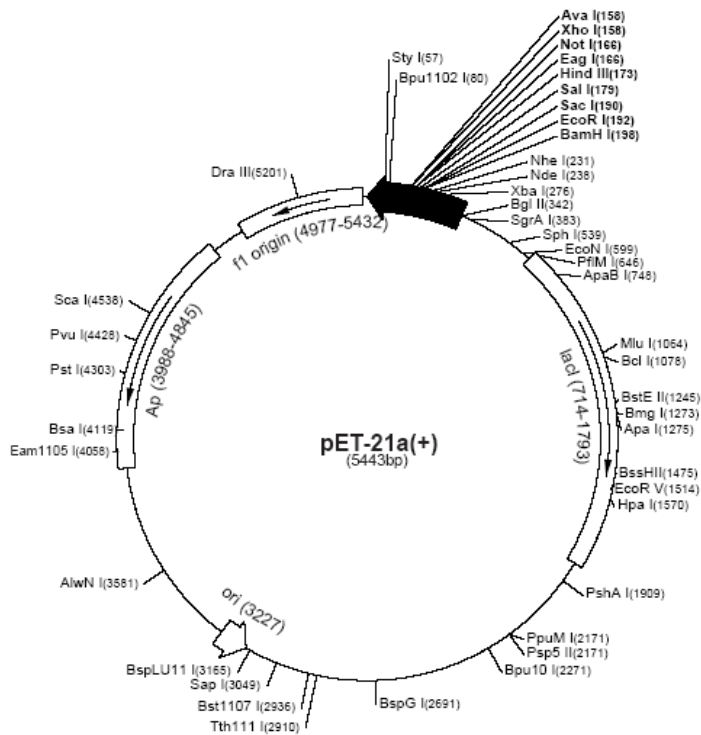


Table 1

Sequences of synthesized oligonucleotide primers used in cloning the *cdb3* into vectors pT7470 and pTYB12

Primer	Sequence <sup>a</sup>
P1	5'-TAGGATCCGAGGAGCTGCAGGATGATTAT-3'
P2	5'-AACTCGAGCTAGAAGAGCTGGCCTGTCTG-3'
P3	5'-ATACATATGGAGGAGCTGCAGGAT-3'
P4	5'-AAACTCGAGGAAGAGCTGGCCTGT-3'
P5	5'-TCTCATATGGAGGAGCTGCAGGAT-3'
P6	5'-ACTCTCGAGTCAGAAGAGCTGGCCTGTCTG-3'

<sup>a</sup> P1 and P2 are for vector pT7470 and encode hexahistidine tag in the N-terminal, P3 and P4 are for vector pT7470 and encode hexahistidine tag in the C-terminal, and P5 and P6 are for vector pTYB12. The sequences cut by respective restriction endonucleases are underlined.

verification and further cloning, a *BamHI* was introduced immediately before *EcoRI*. The synthesized fragments are as follows, where the sequences encoding six consecutive histidine residues are underlined.

+ strand: 5'-TATGCACCACCACCACCACCCGGATCCG-3'

- strand: 3'-ACGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCC TAGGCTTAA-5'

Previously, we had constructed a pRSET-cdb3 plasmid derived from pHB3 plasmid (a gift of Dr. S.E. Lux, The Children's Hospital, Boston) containing full-length human erythrocyte band 3 cDNA [26]. Now we used pRSET-cdb3 plasmid as a template to clone *cdb3* into pT7470 via primers P1 and P2 (hexahistidine in N-terminal), P3 and P4 (hexahistidine in C-terminal) (Table 1). Another vector we used for expression of fusion protein chitin-binding domain (CBD)-*cdb3* via primers P5 and P6 (Table 1) was pTYB12. The conditions used for both PCR amplifications were same: 94 °C for 5 min followed by 30 cycles at 94 °C for 60 s, 58 °C for 60 s, 72 °C for 90 s, and finally 72 °C for 5 min. The PCR product was purified by cutting the desired band from agarose gel and then ligated into the expression vector. For recombinant protein (N)His6-*cdb3*, the *BamHI* and *XhoI* sites were used. Since there was a *BamHI* endonuclease site in *cdb3*, we carried out a partial digestion. The desired long form digested PCR product was separated by gel recovery and then ligated into *BamHI*- and *XhoI*-digested pT7470 vector. For recombinant protein (C)His6-*cdb3*, the *NdeI* and *XhoI* sites were used. For pTYB12, the *NdeI* and *XhoI* sites were used. The ligated vector was then transformed into the host cell (*E. coli* DH5 $\alpha$ ). The insert was sequenced for verification purposes.

