

Univerza v Ljubljani



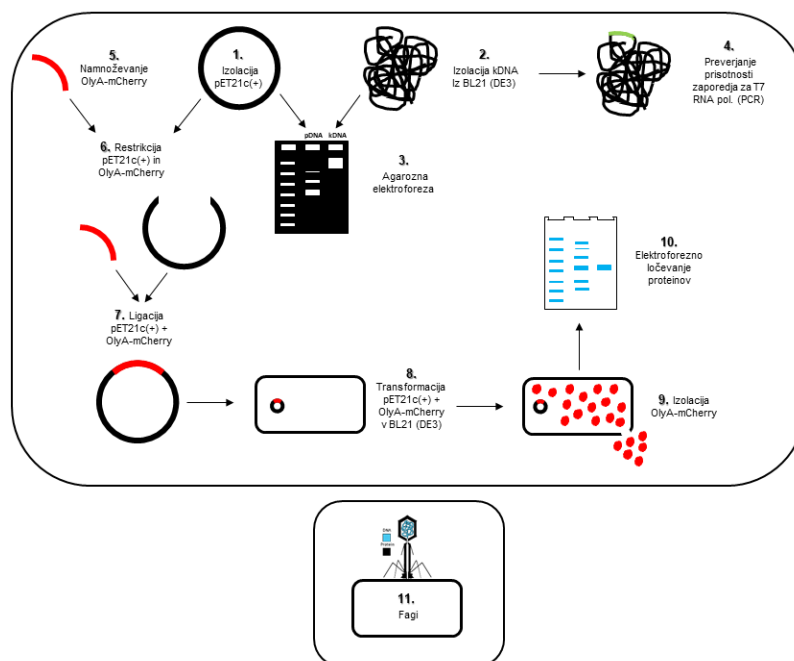
Matej Skočaj

# Molekularna biologija

(gradivo za vaje)

za študente Univerze v Ljubljani, Biotehniške fakultete, Oddelka za biologijo,  
Univerzitetni študijski program 1. stopnje Mikrobiologija

Vodja vaj: dr. Matej Skočaj (matej.skocaj@bf.uni-lj.si)



Avtor: Matej Skočaj

Recenzent: Uroš Petrovič

Založnik: Oddelek za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani

Kraj izida: Ljubljana

Leto izida: 2019

Navedba izdaje: Elektronska izdaja

ISBN: 978-961-6822-55-8 (pdf)

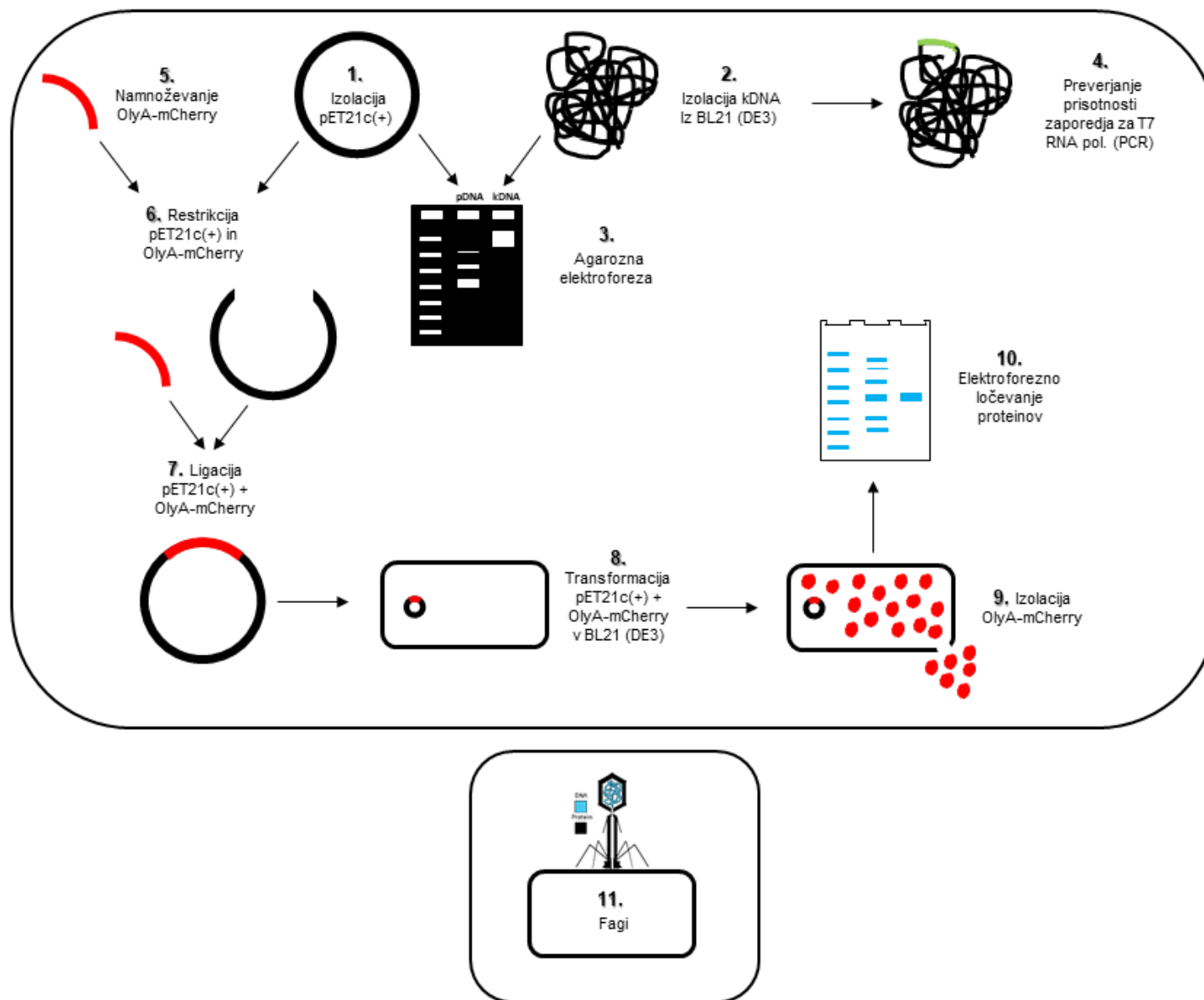
Katalogni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani  
COBISS.SI-ID=298579456  
ISBN 978-961-6822-55-8 (pdf)

## **VARNOST IN RED V LABORATORIJU – PRAVILA**

- ▶ V laboratorij vstopamo v haljah, ki so namenjene samo delu v laboratoriju. Vsa ostala oblačila shranimo v laboratoriju. Nošenje kratkih hlač/ kril in odprte obutve ni dovoljeno. Torbe, nahrbtnike in oblačila ne polagamo na površino delovnih pultov. Na pultu imamo lahko samo gradivo za vaje, pisalo, vžigalnik in flomaster.
- ▶ V laboratoriju je strogo prepovedano vnašanje in uživanje hrane in pijač. Prav tako ni dovoljeno nanašanje dekorativne/ negovalne kozmetike in kajenje. Ob delu se z rokami ne dotikamo obraza.
- ▶ Pri večini vaj je obvezna uporaba zaščitnih rokavic. Z zamazanimi rokavicami se ne dotikamo čistih površin. Po končanem delu si skrbno umijemo ali razkužimo roke.
- ▶ Pri delu z organizmi upoštevamo načela aseptičnega dela, z njimi delamo previdno, ob plamenu plinskega gorilnika ali v laminariju. Pipetiranje z usti je strogo prepovedano. Organizmov ne smemo odnašati z vaj. Kontaminiran material (material, ki je bil v stiku z živimi organizmi) odlagamo v odlagalnike ali na označeno mesto (in ga pozneje avtoklaviramo).
- ▶ Pri delu z gorilnikom pazimo, da nam plamen ne ožge kože, las ali halje. Dolge lase spnemo. Pozorni smo tudi pri uporabi etanola za obžiganje. Po končanem delu se prepričamo, da so gorilniki ugasnjeni.
- ▶ Pri delu z organizmi pazimo, da jih ne razširjamo po mizi, po tleh in po obleki (npr. razlite mikrobne kulture). Z rokami se jih ne dotikamo. Če pride kužnina v stik s kožo ali delovno površino, površino razkužimo in obvestimo asistentko. Kontaminirano delovno površino pokrijemo s papirnato brisačo in jo prelijemo z razkužilom (največkrat uporabimo 70% etanol). Razkužilo pustimo delovati najmanj 20 minut, nato ga pobrišemo in brisačke odložimo na označeno mesto za avtoklaviranje. Kontaminirano mesto na telesu ali obleki razkužimo in nato speremo z vodo.
- ▶ Vse encime in tudi nekatere reagente za molekularno biologijo (začetni oligonukleotidi, pufri...) imamo med uporabo vedno na ledu, takoj ko jih ne potrebujemo več, jih shranimo v zamrzovalnik oziroma hladilnik. Pred uporabo jih vedno premešamo z vibracijskim mešalom in na kratko centrifugiramo.
- ▶ Za delo z nevarnimi snovmi, kot so kisline, baze in organska topila, uporabljamo digestorij. Vse nevarne odpadke odložimo v označene posode. Gele, obarvane z etidijevim bromidom, odložimo v označen odlagalnik (ne v navadne smeti).

- ▶ Vse aparature uporabljamo po navodilih asistenta. Samovoljna uporaba aparatov ni dovoljena.
- ▶ Pri delu pazimo, da čimbolj zmanjšamo nastajanje aerosolov. Pravilno uporabljamo pipete, nikoli jih ne obračamo tako, da je nastavek s tekočino višje kot bat, prav tako na pult ne odlagamo pipet z nataknenimi nastavki. Pred in po opravljenem delu pospravimo za seboj in razkužimo delovne površine.
- ▶ Vse vzorce moramo označiti tako, da jih lahko nedvoumno identificiramo. Na gojiščih kultur organizmov morajo biti navedeni ime organizma, oznaka skupine, datum in pogoji gojenja. Na vzorcih DNA, proteinov in podobnega mora biti oznaka vsebine, oznaka skupine in datum.
- ▶ Študent/-ka se mora seznaniti z mestom in uporabo varnostne opreme (aseptično milo, dezinfekcijsko sredstvo, gasilni aparat...). Obiskovalcem je vstop v laboratorij prepovedan.
- ▶ Na vsakih vajah bosta določena dežurna študenta, ki bosta pomagala pri izvedbi vaje. Poskrbela bosta, da bo ves kontaminiran material predan v avtoklaviranje ter vsi vzorci označeni, vsa nacepljena gojišča dana v inkubacijo in vsi vzorci primerno shranjeni (npr. zamrznjeni). Prav tako bosta nadzirala pospravljanje vajalnice in razkuževanje delovnih pultov po končani vaji ter preverila, če so vsi gorilniki zaprti.
- ▶ Mobilni telefoni morajo biti na vajah izklopljeni in pospravljeni v torbe (ne v žepe)!
- ▶ Študent/-ka mora izkazati poznavanje vaj za nazaj (teorija in praksa) in biti seznanjen/-a z naslednjo vajo. Sprotno preverjanje znanja bo na začetku vsake vaje. Obisk vseh vaj je obvezen.
- ▶ Neupoštevanje pravil in navodil asistenta vodi k takojšnji izključitvi z vaj. Seznanjen/-a sem in razumem zgoraj navedena pravila. Ravnal/-a se bom po njih.

Ime in priimek (tiskane črke): Podpis:



## KAZALO LABORATORIJSKIH VAJ

|                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Izolacija plazmida pET21c(+) + OlyA iz seva DH5 $\alpha$ bakterije <i>Escherichia coli</i> .....                                                                                                                                 | 6  |
| 2. Izolacija kromosomske DNA iz seva BL21 (DE3) bakterije <i>Escherichia coli</i> .....                                                                                                                                             | 11 |
| 3. Elektroforeza plazmidne in kromosomske DNA v agaroznem gelu .....                                                                                                                                                                | 17 |
| 4. Priprava para začetnih oligonukleotidov za preverjanje prisotnosti zaporedja za T7<br>RNA polimerazo na izolirani kromosomski DNA iz seva BL21 (DE3) bakterije<br><i>Escherichia coli</i> in verižna reakcija s polimerazo ..... | 21 |
| 5. Priprava para začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje zaporedja, ki kodira za<br>fluorescenčni protein OlyA-mCherry in verižna reakcija s polimerazo.....                                                                      | 27 |
| 6. Rezanje (i) pomnoženega zaporedja, ki kodira za fluorescenčni protein OlyA-<br>mCherry in (ii) izoliranega plazmida pET21c(+) + OlyA .....                                                                                       | 33 |
| 7. Ligacija odprtega plazmidnega vektorja pET21c(+) in rezanega fragmenta OlyA-<br>mCherry .....                                                                                                                                    | 39 |
| 8. Priprava in transformacija kompetentnih celic BL21 (DE3) bakterije <i>Escherichia coli</i><br>z ligacijsko mešanico pET21c(+) + OlyA-mCherry .....                                                                               | 43 |
| 9. Izolacija rekombinantnega proteina OlyA-mCherry-His <sub>6</sub> .....                                                                                                                                                           | 47 |
| 10. Elektroforezno ločevanje proteinov (NaDS-PAGE) .....                                                                                                                                                                            | 52 |
| 11. Priprava suspenzije in ugotavljanje števila bakteriofagov M13.....                                                                                                                                                              | 55 |
| Priloge: .....                                                                                                                                                                                                                      | 63 |
| Literatura: .....                                                                                                                                                                                                                   | 69 |

## 1. VAJA

### Izolacija plazmida pET21c(+) + OlyA iz seva DH5 $\alpha$ bakterije *Escherichia coli*

#### Teorija:

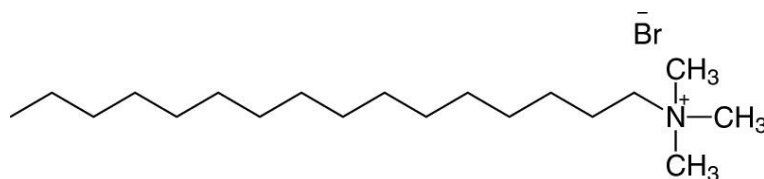
Izolacija plazmidne DNA z detergentom cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) je časovno dokaj kratka metoda, a je v dobljeni raztopini DNA prisotnih še nekaj nečistoč. Kvaliteta pridobljene DNA je še vedno dovolj ustrezna za nadaljnjo uporabo v večini metod molekularne biologije. Celice s pomočjo detergenta Triton in lizocima naluknjamo, tako da se plazmidna DNA (ne pa tudi kromosomska) iz celic sprostijo. Glavna stopnja čiščenja je obarjanje plazmidne DNA z detergentom CTAB. Pri tem postopku večina nečistoč ostane v supernatantu. Nato iz vzorca odstranimo CTAB s pomočjo obarjanja DNA v prisotnosti etanola in soli ter spiranjem DNA z 80% etanolom (1).

Plazmidni vektor pET21c(+) je velik 5541 bp in je izpeljanka plazmidnega vektorja pBR322 ter se v celicah nahaja v približno 40 kopijah. Selekcijo celic, ki so plazmid sprejele, omogoča gen, ki posreduje odpornost proti antibiotiku ampicilinu. pET21c(+) je ekspresijski vektor, kar pomeni, da v njega lahko vključimo izbrano in pomnoženo nukleotidno zaporedje, ki ga želimo izraziti (7. vaja). Izražanje rekombinantnega proteina omogočata promotorsko in terminatorsko zaporedje T7. Rekombinanti protein se izrazi kot protein z C-terminalnim repkom, ki je sestavljen iz šestih histidinov (histidinski rep ali rep His<sub>6</sub>) in ki v nadaljevanju omogoča izolacijo rekombinantnih proteinov z nikelj-afinitetno kromatografijo (9. vaja). Rekombinanti proteini, ki imajo v svoji strukturi rep His<sub>6</sub> imajo namreč visoko afiniteto do niklja, ki je vezan na agarozni nosilec. Na ta način se znebimo vseh proteinov, ki jih ne potrebujemo in izoliramo čiste rekombinantne proteine (2).

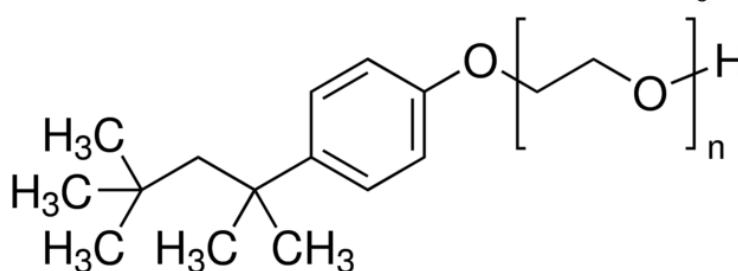
**Bakterijski sev:** DH5 $\alpha$  + pET21c(+) + OlyA6

**Genotip:** F<sup>-</sup> *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>),  $\lambda$ <sup>-</sup>*

A



B



Slika 1: Strukturni formuli detergentov cetiltrimetilamonijev bromid (A) in Triton-X-100 (3,4).

### Postopek:

#### 1. Dan:

1. S cepilno zanko prenesite bakterijsko kulturo iz trajnika (-80 °C) na trdno gojišče LBAp.

#### 2. Dan:

1. S cepilno zanko prenesite 1 bakterijsko kolonijo v 50 ml gojišča LBAp. Inkubirajte preko noči pri 37 °C v rotacijskem stresalniku pri 180 obratov/min.

#### 3. Dan:

### Pričetek vaje

1. Odpipetirajte **1,5 ml bakterijske kulture** v **1,5 ml mikrocentrifugirko** in centrifugirajte 1 min pri maksimalnem številu obratov.
2. Odlijte supernatant in ga naknadno **popolnoma odstranite** z avtomatsko pipeto.
3. Usedlino bakterij resuspendirajte v **200 µl pufra STET**, dodajte **lizocim** (50 mg/ml), tako, da bo njegova končna koncentracija 1 mg/ml in nato dobro premešajte na vibracijskem mešalu. Inkubirajte **5 min** pri **sobni temperaturi**.
4. Suspenzijo v nadaljevanju inkubirajte **45 s v vreli vodi** in vzorce nato **ohladite na ledu**.
5. Centrifugirajte **10 min** pri maksimalnem številu obratov in odstranite usedlino s sterilnim zobotrebcom.
6. Dodajte **8 µl 5% detergenta CTAB** in premešajte.
7. Centrifugirajte **5 min** pri maksimalnem številu obratov.
8. S pipeto previdno odstranite supernatant. Usedlino resuspendirajte v **300 µl 1,2 M NaCl** in dobro premešajte na vibracijskem mešalu.
9. Plazmidno DNA oborite na tak način, da suspenziji dodate **750 µl 96% etanola** (sobna T). Premešajte tako, da mikrocentrifugirko nekajkrat obrnete in inkubirajte še dodatnih **10 min na ledu**.
10. Centrifugirajte **15 min** pri maksimalnem številu obratov in 4 °C.
11. S pipeto previdno odstranite supernatant in pri tem pazite, da ne odstranite tudi oborjene plazmidne DNA, ki je običajno prilepljena na steno, na dnu mikrocentrifugirke.

12. Oborino plazmidne DNA dvakrat sperite in sicer tako, da previdno dodate **1 ml 80% etanola**, ki ga nato s pipeto previdno odstranite. Ko drugič odstranite 80% etanol, centrifugirajte **5 s** in nato **popolnoma odstranite preostali etanol**, ki je s stene spolzel na dno mikrocentrifugirke. Če se po dodajanju 80% etanola oborina DNA odlepi od dna mikrocentrifugirke, centrifugirajte dodatni 2 min pred odstranjevanjem etanola.
13. **Posušite oborino** plazmidne DNA pri 37 °C v topli sobi.
14. Z metodo viseče kaplje resuspendirajte plazmidno DNA v **50 µl pufra TE z dodano RNAzo A** (30 µg/ml).
15. Spektrofotometrično določite koncentracijo plazmidne DNA in sicer tako, da v **1 ml sterilne vode odpipetirate 1 µl vzorca plazmidne DNA**.
16. Vzorce plazmidne **označite** in plazmidno DNA shranite v zmrzovalniku pri -20 °C.

**Vzorce DNA in proteinov, ki jih bomo na vajah iz Molekularne biologije pridobili bomo vedno označili na sledeči način: datum, vsebina, skupina, pult in inicialke posameznika.**

#### **Gojišča, raztopine in pufri:**

1. Gojišče LB: 25 g gojišča Luria-Bertani (Difco) v 1000 ml vode
2. Antibiotiki: Ap – ampicilin (100 mg/ml) v gojišču 100 µg/ml
3. Pufer STET: 8% saharoza (w/v), 0,1% Triton-X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH = 8
4. Raztopina lizocima: 50 mg/ml v pufu TE
5. 5% raztopina detergenta CTAB (w/v)
6. 1,2 M raztopina NaCl
7. 80% in 96% raztopina etanola
8. Sterilna voda
9. Pufer TE: 1 mM Tris-HCl, 0,5 M EDTA, pH =8
10. RNAza A (1 mg/ml)

#### **Material:**

1,5 ml mikrocentrifugirke, namizna centrifuga, pipete in pipetni nastavki, vibracijsko mešalo, ledena kopel, sterilni zobotrebeci, rokavice, plovci, stojala, odlagalniki, kuhalnik, lonec, mešalo, pincete, čaša z alkoholom, parafilm, kvarčne kivete (UV)

**Vprašanja:**

1. Zakaj bakterijsko kulturo vedno pripravimo iz ene same bakterijske kolonije?
2. Zakaj moramo pri postopku izolacije plazmidne DNA paziti na čas inkubacije vzorcev z lizocimom?
3. Kako spektrofotometrično zaznamo proteinske nečistoče?
4. Zakaj nas moti prisotnost proteinov v vzorcu DNA?

6. S pomočjo spleta ugotovite, kaj pomenijo posamezne oznake v genotipu seva DH5 $\alpha$ .

## 2. VAJA

### Izolacija kromosomske DNA iz seva BL21 (DE3) bakterije *Escherichia coli*

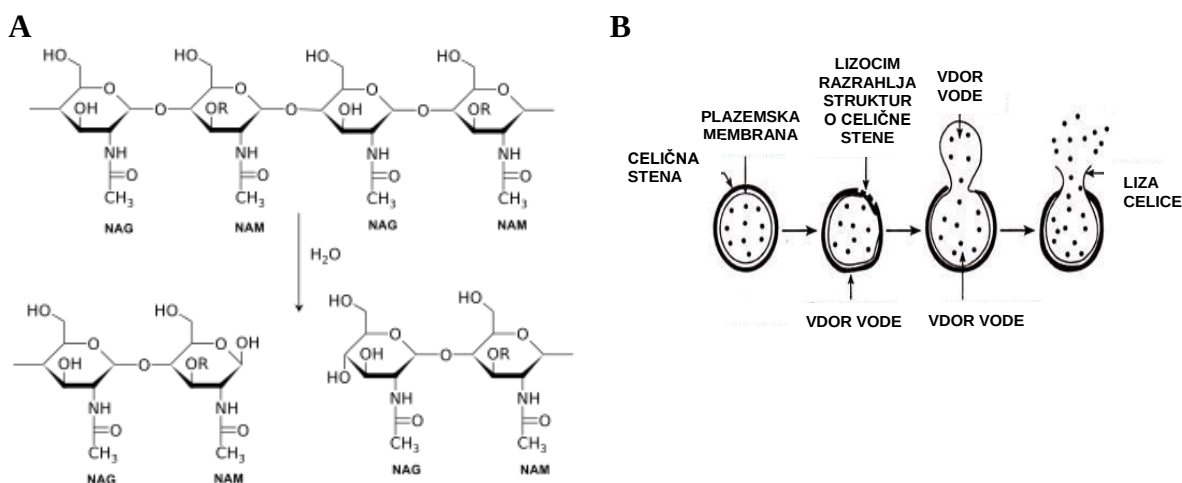
#### Teorija:

Velikost bakterijske kromosomske DNA je med posameznimi vrstami zelo različna. Najmanjši do sedaj opisan bakterijski genom, ki je bil izoliran iz obligatne znotrajcelične bakterije *Carsonella ruddii*, je velik 180 kbp, medtem ko je velikost največjega bakterijskega genoma 13 Mbp in pripada bakteriji *Sorangium cellulosum*, ki jo prištevamo med miksobakterije. Velikost kromosomalne DNA *E. coli* je približno 4,6 Mbp (5).

Kromosomsko DNA iz bakterijskih celic sprostimo tako, da popolnoma razgradimo celično steno in membrano. Pri tem je potrebno med postopkom izolacije ves čas paziti, da na molekule kromosomske DNA deluje čim manj strižnih sil, kar v praksi pomeni, da vzorcev ne bomo mešali z uporabo vibracijskega mešala. Zunajcelični matriks, ki obdaja bakterije, bomo sprali s pufrom TSE, z encimom lizocimom pa bomo razgradili celično steno. V naslednji fazi bomo s pufrom GES povzročili popolno lizo celic, hkrati pa bomo oborili tudi proteine, ki jo bomo na koncu odstranili s fenolno ekstrakcijo (6). Izolirano kromosomsko DNA bomo uporabili na 4. vaji, kjer bomo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in parom specifičnih začetnih oligonukleotidov preverjali uspešnost izolirane kromosomske DNA s pomnoževanjem zaporedja, ki ima zapis za T7 RNA polimerazo.

#### Bakterijski sev: BL21 (DE3)

**Genotip:** B F<sup>-</sup> *ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)* λ(DE3 [*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*]) [*malB*<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(λ<sup>S</sup>)



Slika 2: (A) Mehанизem reakcije, ki jo katalizira lizocim; NAG, N-acetil glukozomain; NAM; N-acetilmuraminska kislina (7) in (B) posledična liza bakterijske celice, povzeto po (8).

**Postopek:****1. Dan:**

1. S cepilno zanko prenesite 1 bakterijsko kolonijo seva BL21 (DE3) v 10 ml gojišča LB. Inkubirajte preko noči pri 37 °C v rotacijskem stresalniku pri 180 obratih/min.

**2. Dan:**

1. Precepitate 500 µl kulture v 50 ml svežega in na 37 °C ogretega gojišča. Bakterijsko kulturo inkubirajte 2,5 – 3 h pri 37 °C v rotacijskem stresalniku pri 180 obratih/min, dokler bakterije ne dosežejo zgodnje eksponentne faze rasti ( $OD_{600} = 0,4 - 0,6$ ).

**Pričetek vaje**

2. Odpipetirajte **1,5 ml bakterijske kulture v 2 ml mikrocentrifugirko** in centrifugirajte 1 min pri maksimalnem številu obratov.
3. Odlijte supernatant in ga naknadno **popolnoma odstranite** z avtomatsko pipeto.
4. Usedlino bakterij resuspendirajte v **1,5 ml pufra TSE** in dobro premešajte na vibracijskem mešalu.
5. Centrifugirajte **1 min** pri maksimalnem številu obratov, odlijte supernatant in ga naknadno popolnoma odstranite z avtomatsko pipeto.
6. Usedlino bakterij resuspendirajte v **35 µl lizocima** (50 mg/ml), ki je pripravljen v pufru TE. Dobro premešajte na vibracijskem mešalu in inkubirajte **30 min** v vodni kopeli pri 37 °C.
7. Dodajte **500 µl raztopine GES**. Močno premešajte, da se suspenzija zbistri in nato inkubirajte še **10 min v ledeni kopeli**.
8. Ob previdnem mešanju dodajte **250 µl ohlajene (4 °C) raztopine amonijevega acetata** in inkubirajte še dodatnih **10 min na ledeni kopeli**.
9. V digestoriju (**obvezna uporaba rokavic!**) dodajte **500 µl mešanice kloroform/izoamilalkohol** in dobro premešajte.
10. Ločite vodno fazo od kloroforma s **3 min** centrifugiranjem pri maksimalnem številu obratov.
11. V digestoriju (**obvezna uporaba rokavic!**) previdno odpipetirajte in **prenesite zgornjo vodno fazo** v svežo 2 ml mikrocentrifugirko. V interfazi je sluzasta oborina proteinov in celične stene, ki jo lahko odstranite s sterilnim zobotrebcem, in nato odpipetirate in prenesete še preostalo vodno raztopino. Vodni raztopini dodajte **500 µl mešanice**

**fenol/kloroform/izoamilalkohol.** Dobro premešajte in centrifugirajte v **3 min** pri maksimalnem številu obratov.

12. V digestoriju (**obvezna uporaba rokavic!**) previdno odpipetirajte in prenesite **zgornjo vodno fazo** v svežo 1,5 ml mikrocentrifugirko in ji dodajte **500 µl mešanice kloroform/izoamilalkohol**. Premešajte in centrifugirajte **3 min** pri maksimalnem številu obratov.
13. V digestoriju (**obvezna uporaba rokavic!**) previdno odpipetirajte in **prenesite zgornjo vodno fazo** v svežo mikrocentrifugirko in **ocenite/zmerite volumen vodne raztopine**.
14. Oborite kromosomsko DNA tako, da dodate vodni raztopini **0,54 volumna hladnega 2-propanola**. Mikrocentrifugirko previdno obračajte, dokler se DNA ne obori.
15. Centrifugirajte 5 s (**short spin**) in z pipeto odstranite ves supernatant. Pri tem pazite, da ne odstranite kromosomske DNA.
16. Oborino kromosomske DNA **sperite trikrat** in sicer tako, da dodate **1 ml 80% etanola**, ki ga nato previdno odstranite s pipeto. Ko tretjič odstranite 80% etanol, centrifugirajte 2 s in nato popolnoma odstranite preostali etanol, ki je spolzel s stene na dno mikrocentrifugirke.
17. Posušite oborino kromosomske DNA **pri 37 °C v topli sobi**. Pri tem bodi pazljivi, da se DNA ne presuši.
18. Resuspendirajte kromosomsko DNA v **30 µl pufra TE z dodano RNAzo A** (50 µg/ml) in inkubirajte 30 min (ali preko noči) v vodni kopeli pri 37 °C.

### 3. Dan (ali še isti dan):

19. Spektrofotometrično določite koncentracijo kromosomske DNA in sicer tako, da **v 1 ml sterilne vode dodate 1 µl izolirane kromosomske DNA**.
17. Vzorce kromosomske DNA primerno **označite** in shrani na -20 °C.

### Gojišča, raztopine in pufri:

1. Gojišče LB: 25 g gojišča Luria-Bertani (Difco) v 1000 ml vode
2. Pufer TSE: 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8)
3. Pufer TE (pH 8): 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)
4. Raztopina lizocima: 50 mg/ml v pufru TE
5. Pufer GES: 5 M gvanidinijev izotiocianat, 100 mM EDTA (pH 8), 0,5% raztopina N-lavrilsarkozin; (60 g gvanidin izotiocianat, 20 ml 0,5 M EDTA, 5 ml 10% raztopine N-lavrilsarkozina, dopolni do 100 ml z vodo).
6. Raztopina amonijevega acetata (10 M): 77 g amonijevega acetata in dopolni do 100 ml, filtriraj; uporablja se 7,5 M raztopina
7. Mešanica kloroform/izoamilalkohol v/v 24:1

8. Mešanica fenol/kloroform/izoamilalkohol v/v/v 25/24/1
9. 2-propanol
10. 80% etanol
11. Sterilna voda
12. RNAza A (1 mg/ml)

**Material:**

1,5 in 2 ml mikrocentrifugirke, namizna centrifuga, pipete in pipetni nastavki, vibracijsko mešalo, vodna kopel (37 °C), ledena kopel, sterilni zobotrebeci, rokavice, plovci, stojala, odlagalniki, mešalo, pincete, čaša z alkoholom, parafilm, 2 ml mikrocentrifugirke z volumni 50 – 500 µl (za določanje volumna vodne faze po fenolni ekstrakciji)

**Vprašanja:**

1. Kaj dosežemo s spiranjem bakterij s pufrom TSE?
2. Zakaj vzorec DNA po obarjanju spiramo z 80% etanolom?
3. Kakšne načine lize celic poznamo?
4. Zakaj moramo pri delu s kromosomsko DNA paziti na strižne sile, pri delu s plazmidno DNA pa ne?

5. S pomočjo spleta ugotovite, kaj pomenijo posamezne oznake v genotipu seva BL21 (DE3).

### 3. VAJA

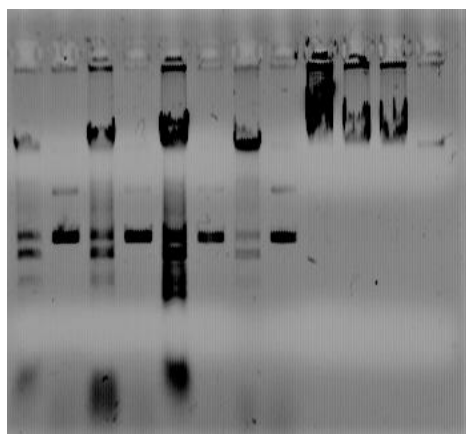
#### Elektroforeza plazmidne in kromosomske DNA v agaroznem gelu

##### Teorija:

S pomočjo agarozne elektroforeze ločujemo molekule DNA, v velikostnem razredu 50 bp – 20.000 bp. Molekule DNA v gelu potajujejo različno hitro, kar je odvisno predvsem od velikosti, pri čemer velja, da se manjše molekule skozi agarozno mrežo pomikajo hitreje. Hitrost potovanja molekul DNA je odvisna tudi od oblike DNA, in ali je v enoverižni ali v dvoverižni obliki. Potek potovanja molekul DNA v agaroznem gelu spremljamo s pomočjo barvil, ki jih dodamo vzorcu DNA tik pred nanosom v jamico agaroznega gela. Ti barvili sta bromfenol modro in ksilen cianol. DNA zaznamo s pomočjo etidijevega bromida. Zaradi strukturne podobnosti z bazami v nukleinskih kislinah ima ta molekula sposobnost vgraditve med bazne pare nukleinskih kislin. Pod UV svetlobo nato zaznamo fluoresciranje DNA zaradi vgrajenega etidijevega bromida.

Agarosa je sicer linearni polisaharid, zgrajen iz disaharida agarobioze in D-galaktoze ter iz monosaharida 3,6 anhidro-L-galaktopiranoze. Agarosa v gelu zavzame vijačno strukturo, ki jo omogočajo vodikove vezi in je posledično supernavita. Ker se nanjo biomolekule ne absorbirajo, se agarozo uporablja tudi pri pripravi kromatografskih nosilcev za ločevanje bioloških molekul (9).

**DNA:** plazmidna DNA pET21c(+) + OlyA (izolirana na 1. vaji) in kromosomska DNA BL21 (DE3) (izolirana na 2. vaji)



Slika 3: Slika agaroznega gela, z ločeno plazmidno in kromosomska DNA (osebni arhiv; Jerneja Ambrožič Avguštin).

##### Postopek:

#### PRIPRAVA AGARozNEGA GELA IN AGARozNA ELEKTROFOREZA

Uspešnost izolacije plazmidne in kromosomske DNA boste preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 0,8% agaroznem gelu s 0,5-kratnim pufrom TBE, ki mu dodamo barvilo etidijev bromid. Pripravili bomo dva agarozna gela, na enem bomo ločevali plazmidno DNA, na drugem pa kromosomsko DNA.

1. **Pri pripravi agaroznih gelov je nujno potrebna uporaba rokavic!** V vsako od dveh erlenmajeric pripravite po **40 ml 0,5-kratnega elektroforeznega pufra TBE**. Dodajte ustrezno količino agaroze za pripravo **0,8% gela**. Raztopite agarozo ob segrevanju v mikrovalovni pečici. Erlenmajerici naj bosta v mikrovalovni pečici toliko časa, da se agaroz popolnoma raztopi.
2. Ohladite raztopini agaroze pod tekočo hladno vodo.
3. Medtem, ko se erlenmajerici z raztopljenima geloma ohlajata, pripravite nosilca za gela s primernima glavničkoma. Nekoliko ohlajeni agaroz dodajte **1 µl etidijevega bromida** (10 mg/ml) v končni koncentraciji 0,5 µg/ml in jo zlijte v nosilec. Dobro premešajte in razlijte agarozo po nosilcih za gela. Po 30 – 45 minutah sta gela strjena. **Obvezno delajte z rokavicami, ki jih po razlitju gela zamenjate.**
4. Po 30 – 45 min prenesite agarozna gela v elektroforezni kadički in vanje nalijte 400 ml 0,5-kratnega elektroforeznega pufra TBE in iz njiju odstranite glavnik. Gela mora biti prekrita s pufrom. Zamenjajte rokavice.
5. Na parafilm nanesite 1 µl 6-kratnega nanašalnega pufra in 5 µl vzorca plazmidne in kromosomske DNA. Mešanico nanašalnega pufra in vzorca vnesite v jamico gela. V agarozni gel. Poleg vzorcev vnesite v eno luknjico še 4 µl standardne DNA. Priključite vir napetosti na 100 V in izvedite elektroforezo (30 – 45 min). Po elektroforezi osvetlite gel z UV transluminatorjem (G-Box Chemi, Syngene) in ga fotografirajte.
6. Preostanek vzorce DNA shranite do nadaljnjega v zmrzovalniku pri -20 °C.

#### **Gojišča, raztopine in pufri:**

1. 0,8% agaroz v 0,5-krantem TBE
2. 5-kratni TBE – Tris-boratni elektroforezni pufer; 0,45 M Tris-borat (54 g Tris, 27,5 g borove kisline), 10 mM EDTA (pH 8)
3. Etidijev bromid – 10 mg/ml
4. 6-kratni nanašalni pufer – 0,25% raztopina bromfenol modro, 0,25% raztopina ksilen cinaol, 40% saharoza (w/v)
5. Sterilna voda
6. DNA lestvici Gene Ruler 1 kb DNA ladder

#### **Material:**

1,5 ml mikrocentrifugirke, erlenmajerice (150 ml), valji (100 in 500 ml), lonec, parafilm, električni napajalnik, elektroforezna banjica, nosilec za gel, glavnik (15 zob), mizica z libelo, vodna kopel, sistem za ulivanje agaroznih gelov, namizna centrifuga, mešalo, odlagalniki, kuhalnik, pipete in pipetni nastavki, rokavice

**Vprašanja:**

1. Od česa je odvisna hitrost potovanja DNA v agaroznem gelu?
2. Katero metodo bi uporabil za ločevanje molekul DNA, ki so manjše od 100 bp?
3. Zakaj smo vzorcem DNA pred nanosom v jamice gela dodali nanašalni pufer?
4. Kaj pričakujemo, da bomo po končni elektroforezi plazmidne DNA videli v agaroznem gelu pod UV svetlobo? Nariši?
5. Katere oblike DNA pričakujemo največ?

6. Kako bi pripravil 100  $\mu$ l raztopine standardne DNA Lambda/*Hind*III v koncentraciji 50 ng/ml iz koncentrirane raztopine 237  $\mu$ g/ml? Pri tem upoštevajmo, da je v končnem volumnu raztopine standardne DNA tudi 1/5 volumna nanašalnega pufra.

7. Kako bi pripravil 250 ml pudra STET (sestava je napisana pri 1. vaji), če imamo na razpolago saharozo v prahu, tekoči 100% Triton-X-100, 1 M EDTA in 2 M Tris-HCl?

8. Kako bi pripravili naslednje pufre:

-Depurinacijska raztopina: 500 ml  
0,2 M HCl

M (Tris) = 121 g/mol  
M (NaCl) = 58,44 g/mol  
M (HCl) = 36,4 g/mol

-Denaturacijska raztopina: 500 ml  
1,5 M NaCl  
0,5 M NaOH

-Nevtralizacijska raztopina: 500 ml  
1 M Tris  
1,5 M NaCl  
S HCl izravnaj pH na 7,4

Koncentrirana raztopina  
HCl je 36,2%  
 $\rho$ (HCl) = 1,18 g/ml  
M (NaOH) = 40 g/mol

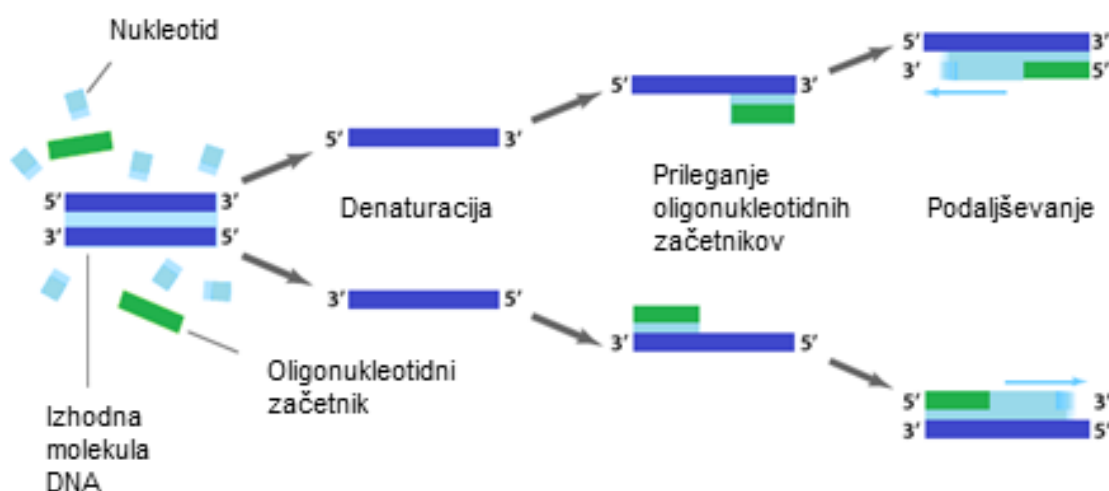
## 4. VAJA

### Priprava para začetnih oligonukleotidov za preverjanje prisotnosti zaporedja za T7 RNA polimerazo na izolirani kromosomski DNA iz seva BL21 (DE3) bakterije *Escherichia coli* in verižna reakcija s polimerazo

#### Teorija:

Verižna reakcija s polimerazo je metoda pomnoževanja fragmenta DNA, ki leži med dvema regijama z znanim nukleotidnim zaporedjem. Za pomnoževanje izbranega zaporedja je potrebno oblikovati začetna oligonukleotida, ki sta komplementarna regiji 5' oz. 3' izbranega zaporedja DNA. Reakcija obsega tri faze: (i) denaturacija dvoverižne DNA, (ii) vezava začetnih oligonukleotidov in (iii) podaljševanje verige DNA s polimerazo. Celoten cikel reakcije nato ponavljamo, tako da iz ene molekule tarčne DNA teoretično dobimo  $2^{\text{število ciklov}}$  molekul. V reakciji uporabljamo posebno polimerazo – *Taq* DNA-polimerazo, ki je termostabilna in se ohrani med fazo denaturacije. Izolirana je bila iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*. Encim ima tudi višji temperaturni optimum od večine encimov, ki jih uporabljamo v molekularni biologiji, zato reakcija podaljševanja poteka pri 72 °C. Faza vezave začetnih oligonukleotidov poteka 5 °C pod temperaturo tališča vezave med začetnim oligonukleotidom in tarčno molekulo DNA. V vzorec DNA, ki vsebuje tarčno zaporedje dodamo začetna oligonukleotida, encim *Taq* DNA-polimerazo, vse štiri deoksiribonukleozid-trifosfate (dNTP-je),  $Mg^{2+}$  ione ter primešamo pufer, ki omogoča optimalno delovanje encima. Metoda je uporabna tako za raziskovalne namene kot tudi v diagnostiki (10).

**DNA:** kromosomska DNA BL21 (DE3) (izolirana na 2. vaji)



Slika 4: Shema poteka verižne reakcije s polimerazo, povzeto po (11).

**Postopek:**

- Glede na priloženo nukleotidno zaporedje dela kromosoma *E. coli*, ki vsebuje zaporedje 16S rRNA in ki ga želimo pomnožiti, izberite zaporedje nukleotidov, po katerem boste oblikovali 5' in 3' začetna oligonukleotida. Pri tem upoštevajte:
  - 3' konca obeh začetnih oligonukleotidov ne smeta biti komplementarna, da ne pride do nastanka oligonukleotidnih dimerov.
  - Preverite, če je znotraj posameznega začetnega oligonukleotida možen nastanek sekundarnih struktur.
  - Začetna oligonukleotida naj vsebujeta približno 50% ( $\pm 10\%$ ) baznih parov GC.
  - Dolžini začetnih oligonukleotidov naj bo nad 17 nukleotidov, optimalna dolžina je 20-24 nukleotidov.
  - Temperaturi tališč obeh začetnih oligonukleotidov se ne smeta razlikovati za več kot 5 °C.
- Preračunajte koliko posamezne komponente potrebujete za reakcijsko mešanico, v kateri bo končni volumen 20  $\mu\text{l}$ .

**Preglednica 1: Reagenti za verižno reakcijo s polimerazo.**

| Reagent                                       | Volumen [ $\mu\text{l}$ ] | Začetna konc.      | Končna konc.              |
|-----------------------------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|
| Pufer <i>Taq</i> $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 2 $\mu\text{l}$           | 10-kratni          | 1-kratni                  |
| $\text{MgCl}_2$                               | 1,6 $\mu\text{l}$         | 25 mM              | 2 mM                      |
| Mešanica dNTP                                 | 1,6 $\mu\text{l}$         | 1,25 mM vsakega    | 100 $\mu\text{M}$ vsakega |
| MQ                                            |                           |                    |                           |
| Smerni začetni oligonukleotid                 |                           | 10 $\mu\text{M}$   | 200 nM                    |
| Protismerni začetni oligonukleotid            |                           | 10 $\mu\text{M}$   | 200 nM                    |
| matrica                                       | 1 $\mu\text{l}$           |                    | 0,5 ng/ $\mu\text{l}$     |
| Polimeraza <i>Taq</i>                         | 0,2                       | 5 U/ $\mu\text{l}$ | 0,05 U/ $\mu\text{L}$     |

- V nadaljevanju **1 posameznik pripravi osnovno zmes (master mix) za PCR za celotno delovno skupino na enem pultu**, kar pomeni, da v 1,5 ml mikrocentrifugirki zamešate reakcijsko mešanico za toliko posameznikov kot jih sedi za vašim pultom, pri tem pa **upoštevajte še dodatni volumen za negativno kontrolo in dodatni volumen za rezervo** (če vas za enim delovnim pultom sedi 5, pripravite osnovno zmes za 7 reakcij). Pri negativni kontroli boste namesto vzorca kromosomske DNA dodali

ustrezen volumen destilirane vode. **Osnovno zmes se vedno pripravlja na ledu. V 1,5 ml mikrocentrifugirko odpipetirajte vse reagente razen matrice (kromosomske DNA).**

4. Ko je osnovna zmes pripravljena si vsak posameznik na ledu **v 0,2 ml mikrocentrifugirko odpipetira 19 µl osnovne mešanice** in šele nato dodate svojo izolirano kromosomsko DNA. Ne pozabite označiti svoje mikrocentrifugirke (na vrhu in na trupu mikrocentrifugirke).
5. Mikrocentrifugirke PCR dajte v aparaturo za PCR in izvedite verižno reakcijo s polimerazo po programu, ki je podan v **preglednici 2**.
6. **Izračunajte čas podaljševanja DNA**, če veste, da je hitrost dodajanja nukleotidov polimeraze *Taq* je 1000 nukleotidov/minuto.

**Preglednica 2: Pogoji za pomnoževanje zaporedja za T7 RNA polimerazo z verižno reakcijo s polimerazo.**

|                   |              |           |
|-------------------|--------------|-----------|
| Denaturacija DNA  | 95 °C 5 min  |           |
| Denaturacija DNA  | 95 °C, 30 s  | 30 ciklov |
| Prileganje        | 55 °C, 30 s  |           |
| Podaljševanje DNA | 72 °C, ___s  |           |
| Podaljševanje DNA | 72 °C, 2 min |           |
| Konec             | 4 °C         |           |

7. Računanje temperature tališča,  $T_m$  (v °C):  $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$

Zaporedje smernega začetnega oligonukleotida:

$T_m$  smernega začetnega oligonukleotida =

Zaporedje protismernega začetnega oligonukleotida:

$T_m$  protismernega začetnega oligonukleotida =

**Nukleotidno zaporedje za T7 RNA polimerazo (2652 nt):**

750421  
 5' - ATGAACACGATTAACATCGCTAAGAACGACTTCTCTGACATCGAACTGGCTGCTATCCCGTTCAACACTC  
 TGGCTGACCATTACGGTGAGCGTTTAGCTCGCGAACAGTTGGCCCTTGAGCATGAGTCTTACGAGATGGG  
 TGAAGCACGCTTCCGCAAGATGTTTGAGCGTCAACTTAAAGCTGGTGAGGTTGCGGATAACGCTGCCGCC  
 AAGCCTCTCATCACTACCTACTCCCTAAGATGATTGCACGCATCAACGACTGGTTTGAGGAAGTGAAAG  
 CTAAGCGCGGCAAGCGCCCGACAGCCTTCCAGTTCTTGCAAGAAATCAAGCCGGAAGCCGTAGCGTACAT  
 CACCATTAAGACCACTCTGGCTTGCCTAACCAGTGCTGACAATACAACCGTTCCAGGCTGTAGCAAGCGCA  
 ATCGGTCGGGCCATTGAGGACGAGGCTCGCTTCGGTCGTATCCGTGACCTTGAAAGTAAGCACTTCAAGA  
 AAAACGTTGAGGAACAACCTCAACAAGCGCTAGGGCACGTCTACAAGAAAGCATTTATGCAAGTTGTCGA  
 GGCTGACATGCTCTCTAAGGGTCTACTCGGTGGCGAGGCGTGGTCTTCGTGGCATAAGGAAGACTCTATT  
 CATGTAGGAGTACGCTGCATCGAGATGCTCATTGAGTCAACCGGAATGGTTAGCTTACACCGCCAAAATG  
 CTGGCGTAGTAGGTCAAGACTCTGAGACTATCGAACTCGCACCTGAATACGCTGAGGCTATCGCAACCCG  
 TGCAGGTGCGCTGGCTGGCATCTCTCCGATGTTCCAACCTTGCGTAGTTTCTCCTAAGCCGTGGACTGGC  
 ATTACTGGTGGTGGCTATTGGGCTAACGGTCGTCTGCTGCTGCGCTGGTGGCTACTCACAGTAAGAAAG  
 CACTGATGCGCTACGAAGACGTTTACATGCCTGAGGTGTACAAAGCGATTAAACATTGCGCAAAACACCGC  
 ATGGAATAATCAACAAGAAAGTCTAGCGGTCGCCAACGTAATCACCAGTGGAAGCATTGTCCGGTCGAG  
 GACATCCCTGCGATTGAGCGTGAAGAACTCCCGATGAAACCGGAAGACATCGACATGAATCCTGAGGCTC  
 TCACCGCGTGGAACGTGCTGCCGCTGCTGTGTACCGCAAGGACAAGGCTCGCAAGTCTCGCCGTATCAG  
 CCTTGAGTTCATGCTTGAGCAAGCCAATAAGTTTGCTAACCATAAGGCCATCTGGTTCCCTTACAACATG  
 GACTGGCGCGGTGCTGTTTACGCTGTGTCAATGTTCAACCCGCAAGGTAACGATATGACCAAAGGACTGC  
 TTACGCTGGCGAAAGGTAAACCAATCGGTAAGGAAGGTTACTACTGGCTGAAAATCCACGGTGCAAACCTG  
 TCGGGGTGTCGATAAGGTTCCGTTCCCTGAGCGCATCAAGTTCATTGAGGAAAACACGAGAATCATCATG  
 GCTTGCGCTAAGTCTCCACTGGAGAACAACCTTGGTGGGCTGAGCAAGATTCTCCGTTCTGCTTCCCTTGCGT  
 TCTGCTTTGAGTACGCTGGGGTACAGCACACGGCCTGAGCTATAACTGCTCCCTTCCGCTGGCGTTTGA  
 CGGGTCTTGCTCTGGCATCCAGCACTTCTCCGCGATGCTCCGAGATGAGGTAGGTGGTCGCGCGGTTAAC  
 TTGCTTCTAGTGAAACCGTTTCCAGGACATCTACGGGATTGTTGCTAAGAAAGTCAACGAGATTCTACAAG  
 CAGACGCAATCAATGGGACCGATAACGAAGTAGTTACCGTGACCGATGAGAACACTGGTGAAATCTCTGA  
 GAAAGTCAAGCTGGGCACTAAGGCACTGGCTGGTCAATGGCTGGCTTACGGTGTTACTCGCAGTGTGACT  
 AAGCGTTTCAAGTACGCTGGCTTACGGGTCAAAGAGTTTCGGCTTCCGTCAACAAGTGTGGAAGATA  
 CCATTACAGCCAGCTATTGATTCCGGCAAGGGTCTGATGTTCACTCAGCCGAATCAGGCTGCTGGATACAT  
 GGCTAAGCTGATTTGGGAATCTGTGAGCGTGACGGTGGTAGCTGCGGTTGAAGCAATGAAGTGGCTTAAG  
 TCTGCTGCTAAGCTGCTGGCTGCTGAGGTCAAAGATAAGAAGACTGGAGAGATTCTTCGCAAGCGTTGCG  
 CTGTGCATTGGGTAACCTCTGATGGTTTTCCCTGTGTGGCAGGAATACAAGAAGCCTATTTCAGACGCGCTT  
 GAACCTGATGTTCTCCGTGAGTTCCGCTTACAGCCTACCATTAACACCAACAAAGATAGCGAGATTGAT  
 GCACACAAACAGGAGTCTGGTATCGCTCCTAACTTTGTACACAGCCAAGACGGTAGCCACCTTCGTAAGA  
 CTGTAGTGTGGGCACACGAGAAGTACGGAATCGAATCTTTTGCATGATTCACGACTCCTTCGGTACCAT  
 TCCGGCTGACGCTGCGAACCTGTTCAAAGCAGTGCGCGAAACTATGGTTGACACATATGAGTCTTGTGAT  
 GTACTGGCTGATTTCTACGACAGTTTCGCTGACAGTGTGCACGAGTCTCAATTGGACAAAATGCCAGCAC  
 TTCCGGCTAAAGTAACTTGAAGTACCTCCGTGACATCTTAGAGTCGGACTTCGCGTTCGCGTAA -3'

753072

**PRIPIRAVA AGARONEGA GELA IN GELSKA ELEKTROFOREZA**

Uspešnost PCR boste preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 0,8% agaroznem gelu z 0,5-kratnim elektroforeznim pufrom TBE, ki mu dodate barvilo etidijev bromid.

1. **Pri pripravi agaronega gela je nujno potrebna uporaba rokavic!** Pripravi 40 ml 0,5-kratnega elektroforeznega pufr TBE. Dodajte ustrezno količino agaroze za pripravo **0,8% gela**. Raztopite agarozo ob segrevanju v mikrovalovni pečici. Erlenmajerica naj bo v mikrovalovni pečici toliko časa, da se agaroz popolnoma raztopi.
2. Ohladite raztopino agaroze pod tekoče hladno vodo.

3. Medtem, ko se erlenmajerica z raztopljenim gelom ohlaja, pripravite nosilec za gel s primernim glavničkom. Nekoliko ohlajeni agarozni dodajte **1 µl etidijevega bromida** (10 mg/ml) v končni koncentraciji 0,5 µg/ml in jo zlijte v nosilec. Dobro premešajte in razlijte agarozo po nosilcih za gela. Po 30 – 45 minutah je gel strjen. **Obvezno delajte z rokavicami, ki jih po razlitju gela zamenjajte.**
4. Po 30 – 45 min, ko je gel strjen, ga prenesite v elektroforezno kadičko, vanjo nalijte 400 ml 0,5-kratnega elektroforeznega pufra TBE in odstranite glavniček. Gel mora biti prekrit s pufrom. **Zamenjajte rokavice.**
5. Na parafilm nanesite **1 µl 6-kratnega nanašalnega pufra in 5 µl pomnožkov.** Mešanico nanašalnega pufra in vzorca vnesite v jamico gela. V agarozni gel poleg vzorcev vnesite še **4 µl standardne DNA.** Priključite na vir napetosti na 100 V in izvedite elektroforezo (30 - 45 min). Po elektroforezi preverite, če je bila verižna reakcija s polimerazo uspešna (lisa na gelu). Gel osvetlite z UV transluminatorjem (G-Box Chemi, Syngene) in ga fotografirajte.
6. Preostanek vzorcev DNA do nadaljnjega shranite v zmrzovalniku pri -20 °C. Ne pozabite vzorcev označiti!

#### Gojišča, raztopine in pufri:

1. Pufer *Taq* (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
2. 25 mM MgCl<sub>2</sub>
3. 1,25 mM Mešanica dNTP
4. Polimeraza *Taq*
5. 0,8% agaroz v 0,5-krantem TBE
6. 5-kratni TBE – Tris-borati elektroforezni pufer; 0,45 M Tris-borat (54 g Tris, 27,5 g borove kisline), 10 mM EDTA (pH 8)
7. Etidijev bromid – 10 mg/ml
8. 6-kratni nanašalni pufer – 0,25% raztopina bromfenol modro, 0,25% raztopina ksilen cinaol, 40% saharoza (w/v)
9. Sterilna voda
10. DNA lestvici Gene Ruler 1 kb DNA ladder
11. Par začetnih oligonukleotidov

#### Material:

1,5 in 0,2 ml mikrocentrifugirke, erlenmajerice (150 ml), valj (100 in 500 ml), led, parafilm, električni napajalnik, elektroforezna banjica, nosilec za gel, glavnik (15 zob), mizica z libelo, centrifuga, mešalo, odlagalniki, pipete in pipetni nastavki, rokavice

**Vprašanja:**

1. Katere molekule/sestavine so nujno potrebne za PCR?
2. Kakšne vrste vezi se tvorijo med začetnimi oligonukleotidi in matričnim zaporedjem DNA?
3. Ali bi lahko PCR potekal s človeško rekombinantno DNA-polimerazo?
4. Naštej nekaj aplikacij PCR?

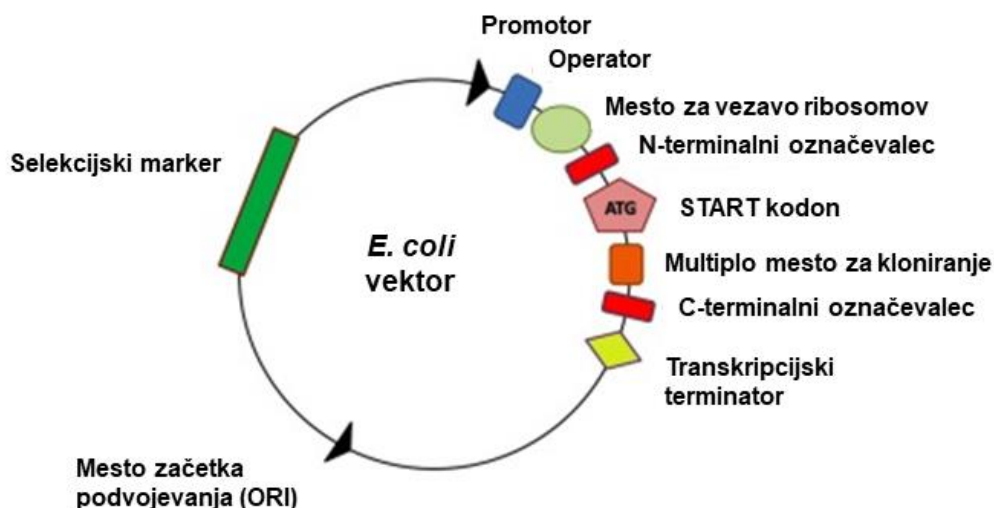
## 5. VAJA

### Priprava para začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje zaporedja, ki kodira za fluorescenčni protein OlyA-mCherry in verižna reakcija s polimerazo

#### Teorija:

Na prejšnjih vajah smo spoznali, kako z reakcijo PCR preverjamo prisotnost določenih zaporedij, kar po koncu reakcije lahko preverimo z uporabo agarozne elektroforeze. Z oblikovanjem specifičnih začetnih oligonukleotidov pa lahko izbrano pomnoženo zaporedje vključimo v odprt plazmidni vektor ali kakšen drugi vektor za kloniranje. Pri tem moramo paziti, da v skrajni del zaporedja, ki ga želimo pomnožiti, vstavimo tudi ustrezna restrikcijska mesta, ki bodo kompatibilna z izbranim plazmidnim vektorjem, hkrati pa moramo tudi zagotoviti, da izbrani restrikcijski encimi ne bodo rezali znotraj tarčnega zaporedja. Pri oblikovanju takšnih začetnih oligonukleotidov je potrebno zagotoviti, da se ohrani genetski kod in da zagotovimo, da se zaporedje, ki ga bomo izražali, prične s kodonom start in konča z zaporedjem stop (12,13). Protein, ki ga bomo izrazili bo imel na svojem C-terminalnem delu repek His<sub>6</sub>, kar bomo po izolaciji proteina izkoristili za njegovo čiščenje z ionsko-izmenjevalno kromatografijo.

**DNA:** zaporedje za protein OlyA-mCherry



Slika 5: Poglavitni elementi ekspresijskega vektorja za *E. coli*. Povzeto po (13).



Slika 6: Elementi DNA, potrebni za sintezo rekombinantnega OlyA-mCherry; TM, trombinsko mesto.

**Postopek:**

1. Zaporedje, ki kodira za OlyA-mCherry (1152 bp) bomo po reakciji z verižno reakcijo s polimerazo vključili v odprt plazmidni vektor pET21c(+) (6. vaja), kar pomeni, da moramo v zaporedje, ki kodira za izbrani protein vključiti zaporedji, ki ju bo prepoznal ustrezen par restrikcijskih encimov. Ti dve restrikcijski mesti morata biti kompatibilni z mestom mestom za kloniranje na izbranem ekspresijskim plazmidu in morata hkrati ustrezati pogoju, da teh zaporedij ni znotraj zaporedja, ki kodira za OlyA-mCherry. Katera restrikcijska mesta imate na voljo, si lahko ogledate na strani 63, kjer je prikazana plazmidna mapa plazmidnega vektorja pET21c(+).
2. Pri oblikovanju ustreznih oligonukleotidnih začetnikov je potrebno tudi preveriti, ali (i) zaporedje, ki ga želimo izraziti ali (ii) plazmidni vektor že vsebujeta kodona start in stop.
3. V končni začetni oligonukleotid bomo dodali še nukleotidno zaporedje CTGGTTCCGCGCGGCAGC, ki kodira za aminokislinsko zaporedje LVPR↓GS, ki ga prepozna proteaza trombin (kjer nakazuje puščica), kar nam omogoča, da repek His<sub>6</sub> po izolaciji rekombinantnih proteinov odrežemo.

**Nukleotidno zaporedje za OlyA-mCherry (1152 nt):**

5' -ATGGCGTACGCCCAATGGGTCATCATTATCATCCACAACGTCGGATCTCAAGACGTGAAGATCAAGAACCTC  
 AAGGCTTCCTGGGGGAAGCTTCACGCTGACGGTGACAAAGACGCTGAAGTCTCAGCAAGCAACTACGAAGGAAAG  
 ATCGTCAAGCCTGACGAGAAGCTCCAGATCAACGCCTGCGGCAGATCAGATGCCGCCGAAGGCACGACCGGAACC  
 TTCGATCTTGTCGACCCTGCCGATGGCGACAAGCAGGTCCGCCACTTCTACTGGGACTGCCCCCTGGGGCAGCAAA  
 ACCAACACTTGGACCGTTAGCGGCTCCAACACCAAGTGGATGATCGAGTACTCTGGGCAGAACTTGGACAGCGGT  
 GCCCTCGGCACCATCACCGTCGACACCTTGAAGAAGGGGAACGGCAGCGAAGGCAAAAGCAGCGGCAGCGGCATG  
 GTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCC  
 GTGAACGGCCACGAGTTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTG  
 AAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCC  
 TACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCCTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTG  
 ATGAACCTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAG  
 GTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCCTCC  
 TCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGC  
 CACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAAC  
 ATCAAGTTGGACATCACCTCCCAACAGGAGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCAC  
 TCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAG -3'

Zaporedje smernega začetnega oligonukleotida:

T<sub>m</sub> smernega začetnega oligonukleotida =

Zaporedje protismernega začetnega oligonukleotida:

T<sub>m</sub> protismernega začetnega oligonukleotida =

1. Preračunajte, koliko posamezne komponente potrebujete za reakcijsko mešanico, v kateri bo končni volumen 20  $\mu$ l.

Preglednici 3: Reagenti za verižno reakcijo s polimerazo.

| Reagent                            | Volumen [ $\mu$ l] | Začetna konc.   | Končna konc.        |
|------------------------------------|--------------------|-----------------|---------------------|
| 10-kratni pufer                    | 2 $\mu$ l          | 10-kratni       | 1-kratni            |
| MgCl <sub>2</sub>                  | 1,6 $\mu$ l        | 25 mM           | 2 mM                |
| Mešanica dNTP                      | 1,6 $\mu$ l        | 1,25 mM vsakega | 100 $\mu$ M vsakega |
| MQ                                 |                    |                 |                     |
| Smerni začetni oligonukleotid      |                    | 10 $\mu$ M      | 200 nM              |
| Protismerni začetni oligonukleotid |                    | 10 $\mu$ M      | 200 nM              |
| matrica                            | 1 $\mu$ l          |                 |                     |
| DNA polimeraza Q5                  | 0,2                | 5 U/ $\mu$ l    | 0,05 U/ $\mu$ L     |

2. V nadaljevanju **1 posameznik pripravi osnovno zmes za PCR za celotno skupino**, kar pomeni, da v 1,5 ml mikrocentrifugirki zamešate reakcijsko mešanico za toliko posameznikov, kot jih sedi za vašim pultom, s tem da upoštevate še dodatni volumen za rezervo. Reakcijo za negativno kontrolo boste zamešali v 0,2 ml mikrocentrifugirki, kjer boste namesto matrične DNA dodali ustrezen volumen destilirane vode. **Osnovno zmes se vedno pripravlja na ledu. V 1,5 ml mikrocentrifugirko odpipetirajte vse sestavine in sicer po vrstnem redu, ki sledi preglednici 3.**
3. Ko je osnovna zmes pripravljena, si **vsak posameznik na ledu v 0,2 ml mikrocentrifugirko odpipetira 20  $\mu$ l mešanice**. Ne pozabite označiti svoje mikrocentrifugirke (na vrhu in na trupu mikrocentrifugirke).
4. Mikrocentrifugirke PCR dajte v aparaturo za PCR in izvedite verižno reakcijo s polimerazo po programu.
5. Izračunajte čas podaljševanja DNA, če veste, da je hitrost dodajanja nukleotidov polimeraze Q5 **1000 nukleotidov/minuto**.

Preglednica 4: Pogoji za pomnoževanje zaporedja za OlyA-mCherry z verižno reakcijo s polimerazo.

|                   |               |           |
|-------------------|---------------|-----------|
| Denaturacija DNA  | 95 °C 5 min   |           |
| Denaturacija DNA  | 95 °C, 30 s   | 30 ciklov |
| Prileganje        | 55 °C, 30 s   |           |
| Podaljševanje DNA | 72 °C, ____ s |           |
| Podaljševanje DNA | 72 °C, 2 min  |           |
| Konec             | 4 °C          |           |

**PRIPRAVA AGARozNEGA GELA IN AGARozNA ELEKTROFOREZA**

Uspešnost PCR boste preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 0,8% agaroznem gelu z 0,5-kratnim pufrom TBE, ki mu dodate barvilo etidijev bromid.

1. **Pri pripravi agaroznega gela je nujno potrebna uporaba rokavic!** Pripravi **40 ml** 0,5-kratnega elektroforeznega pufru TBE. Dodaj ustrezno količino agaroze za pripravo **0,8% gela**. Raztopite agarozo ob segrevanju v mikrovalovni pečici. Erlenmajerica naj bo v mikrovalovni pečici toliko časa, da se agaroz popolnoma raztopi.
2. Ohladite raztopino agaroze pod tekoče hladno vodo.
3. Medtem, ko se erlenmajerica z raztopljenim gelom ohlaja, pripravite nosilec za gel s primernim glavničkom. Nekoliko ohlajeni agaroz dodajte **1 µl etidijevega bromida** (10 mg/ml) v končni koncentraciji 0,5 µg/ml in jo zlijte v nosilec. Dobro premešajte in razlijte agarozo po nosilcih za gela. Po 30 – 45 minutah je gel strjen. Obvezno delajte z rokavicami, ki jih po razlitju gela zamenjajte.
4. Ko je gel po 30 – 45 strjen, ga prenesite v elektroforezno kadičko, vanjo nalijte 400 ml 0,5-kratnega pufru TBE in odstranite glavniček. Gel mora biti prekrit s pufrom. **Zamenjajte rokavice.**
5. Na parafilm nanesite **1 µl 6-kratnega nanašalnega pufru in 5 µl pomnožkov**. Mešanico nanašalnega pufru in vzorca vnesite v jamico gela. V agarozni gel poleg vzorcev vnesite še **4 µl standardne DNA**. Priključite na vir napetosti na 100 V in izvedite elektroforezo (30 - 45 min). Po elektroforezi preverimo, če je bila verižna reakcija s polimerazo uspešna (lisa na gelu). Gel osvetlite z UV transluminatorjem (G-Box Chemi, Syngene) in ga fotografirajte.
6. Preostanek vzorcev DNA do nadaljnjega shranite v zmrzovalniku pri -20 °C. Ne pozabite označiti vzorcev!

**Gojišča, raztopine in pufri:**

12. Pufer *Taq* (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
13. 25 mM MgCl<sub>2</sub>
14. 1,25 mM Mešanica dNTP
15. Polimeraza *Taq*
16. 0,8% agaroz v 0,5-krantem TBE
17. 5-kratni TBE – Tris-boratni elektroforezni pufer; 0,45 M Tris-borat (54 g Tris, 27,5 g borove kisline), 10 mM EDTA (pH 8)
18. Etidijev bromid – 10 mg/ml
19. 6-kratni nanašalni pufer – 0,25% raztopina bromfenol modro, 0,25% raztopina ksilen cinaol, 40% saharoza (w/v)
20. Sterilna voda
21. DNA lestvici Gene Ruler 1 kb DNA ladder
22. Par začetnih oligonukleotidov

**Material:**

1,5 in 0,2 ml mikrocentrifugirke, erlenmajerice (150 ml), valj (100 in 500 ml), led, parafilm, električni napajalnik, elektroforezna banjica, nosilec za gel, glavnik (15 zob), mizica z libelo, centrifuga, mešalo, odlagalniki, pipete in pipetni nastavki, rokavice

**Vprašanja:**

1. Oglejte si sliko 6 in utemeljite, zakaj so v shemi plazmidnega vektorja nakazani posamezni DNA elementi.
2. Kako bi v bakterijske celice vnesli plazmidni vektor, ki je večji od 10.000 bp?
3. Kateri so izvorni organizmi, iz katerih so pridobili zaporedja za fluorescenčne proteine?
4. Kakšne selekcijske markerji bi v teoriji lahko vseboval plazmidni vektor?
5. Zakaj za pripravo DNA konstruktov za izražanje uporabljamo drugačno polimerazo kot pri diagnostičnemu PCR?

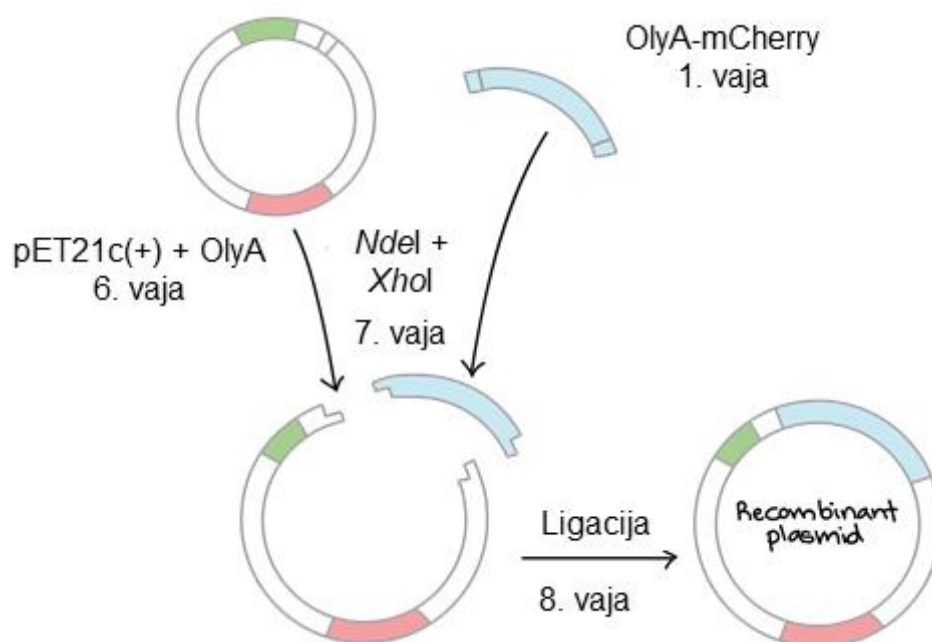
## 6. VAJA

### Rezanje (i) pomnoženega zaporedja, ki kodira za fluorescenčni protein OlyA-mCherry in (ii) izoliranega plazmida pET21c(+) + OlyA

#### Teorija:

Restriksijske endonukleaze (restriktaze) so encimi, ki režejo DNA znotraj prepoznavnega zaporedja ali ob njem. DNA lahko torej z njihovo pomočjo usmerjeno režemo. Kot velja za vse encime, moramo tudi tukaj paziti, da reakcije teče vsaj blizu optimuma encimskega delovanja. Pravilno ionsko koncentracijo, vrednost pH in koncentracijo morebitnih aktivatorjev uravnamo s pomočjo restriksijskega pufra, ki ga dodamo v restriksijsko mešanico. Prav tako je treba paziti na količino dodanega encima in na temperaturo, pri kateri reakcija poteka. Pri določanju koncentracije encima v mešanici in časa inkubacije moramo biti pozorni na to, kako encim prepozna in reže zaporedja ob koncih molekul DNA, ter na število prepoznavnih mest v molekuli DNA (14).

**DNA:** fragment OlyA-mCherry-linker-trombin-His<sub>6</sub> (namnožen na 5. vaji) in izolirana plazmidna DNA pET21c(+) + OlyA (izolirana na 1. vaji).



Slika 7: Potek eksperimentov pri 7. in 8. laboratorijski vaji, povzeto po (15).

#### Restriksijski endonukleazi in njihuni prepoznavni zaporedji:

|             |                    |                                |
|-------------|--------------------|--------------------------------|
| <i>NdeI</i> | CA↓TATG<br>GTAT↑AC | <i>Neisseria denitrificans</i> |
| <i>XhoI</i> | C↓TCGAG<br>GAGCT↑C | <i>Xanthomonas holcicola</i>   |

**Postopek:**

**Delali bomo v parih, eden izmed para bo pripravil (rezal) fragment OlyA-mCherry, drugi pa plazmidni vektor. Najprej bomo pripravili 2 agarozna gela.**

1. V dve 1,5 ml mikrocentrifugirki odpipetirajte toliko vzorca DNA, da bo vsaka raztopina vsebovala **2 µg vektorja pET21c(+) + OlyA** in **1 µg pomnoženega zaporedja OlyA-mCherry**.
2. Ugotovite količino restrikcijske endonukleaze, ki jo boste dodali vzorcema DNA, če **1 µl encima razgradi 2 µg plazmidne DNA in 0,4 µg produkta PCR v 15 min.**
3. **Količina restrikcijske endonukleaze ne sme presegati 1/10 končnega volumna restrikcijske mešanice.**
4. Če je potrebno, vzorcu DNA **dodajte sterilno vodo**, in sicer ga dopolnite do volumna, ki je za količino encima in za 1/10 volumna manjši od končnega volumna restrikcijske mešanice.
5. Dodajte **1/10 končnega volumna 10-kratnega restrikcijskega pufra**, ki ustreza restrikcijski endonukleazi.
6. Dodajte **ustrezno količino restrikcijske endonukleaze, rahlo premešajte** na vibracijskem mešalu in **centrifugirajte 5 s.**

**Preglednica 5: Reagenti za rezanje plazmidnega vektorja pET21c(+) + OlyA in fragmenta OlyA-mCherry.**

|                     | pET21c(+) + OylA | OlyA-mCherry |
|---------------------|------------------|--------------|
| DNA                 |                  |              |
| <i>NdeI</i>         |                  |              |
| <i>XhoI</i>         |                  |              |
| Restrikcijski pufer |                  |              |
| ddH <sub>2</sub> O  |                  |              |
| Skupni V            |                  |              |

7. Restrikcijsko mešanico inkubirajte **10 min v vodni kopeli pri 37 °C.**
8. Pripravite **dva 0,8% agarozna gela.**
9. Če je vzorec DNA popolnoma razrezan, inaktivirajte restrikcijsko endonukleazo s povišano temperaturo in sicer tako, da inkubirate restrikcijsko mešanico 10 min pri 65 °C.

**PRIPRAVA AGARozNEGA GELA IN AGARozNA ELEKTROFOREZA**

Uspešnost rezanje fragmentov DNA boste preverili z agarozno gelsko elektroforezo na dveh 0,8% agaroznih gelih z 0,5-kratnim elektroforeznim pufrom TBE, ki mu dodate barvilo etidijev bromid.

1. **Pri pripravi agaroznega gela je nujno potrebna uporaba rokavic!** Pripravi **40 ml** elektroforeznega pufra 0,5-kratnega TBE. Dodajte ustrezno količino agaroze za pripravo **0,8% gela**. Raztopite agarozo ob segrevanju v mikrovalovni pečici. Erlenmajerico naj bo v mikrovalovno pečico toliko časa, da se agaroz popolnoma raztopi.
2. Ohladite raztopino agaroze pod tekoče hladno vodo.
3. Medtem, ko se erlenmajerica z raztopljenim gelom ohlaja, pripravite nosilec za gel s primernim glavničkom. Nekoliko ohlajeni agarozni dodajte **1 µl etidijevega bromida** (10 mg/ml) v končni koncentraciji 0,5 µg/ml in jo zlijte v nosilec. Dobro premešajte in razlijte agarozo po nosilcih za gela. Po 30 – 45 minutah je gel strjen. **Obvezno delajte z rokavicami, ki jih po razlitju gela zamenjajte.**
4. Po 30 – 45, min ko je gel strjen, ga prenesite v elektroforezno kadičko, vanjo nalijte 400 ml 0,5-kratnega pufer TBE in odstranite glavniček. Gel mora biti prekrit s pufrom. **Zamenjajte rokavice.**
5. Na parafilm nanesite **ves reakcijski volumen rezanega plazmida pET21c(+) + OlyA** in ustrezen volumen 6-kratnega nanašalnega pufra in **ves reakcijski volumen rezanega produkta PCR** (OlyA-mCherry) in ustrezen volumen 6-kratnega nanašalnega pufra. Mešanico nanašalnega pufra in vzorca DNA vnesite v jamico gela. V agarozni gel poleg vzorcev vnesite še 4 µl standardne DNA. Prikluči na vir napetosti na 100 V in izvedite elektroforezo (30 - 45 min). Po elektroforezi osvetlite gel osvetlite z UV transluminatorjem (G-Box Chemi, Syngene) in ga fotografirajte.
6. Po agarozni elektroforezi s skalpelom **izrežite iz gela približno 5500 bp velik fragment odprtega plazmida pET21c(+)** in **1200 bp velik fragment OlyA-mCherry-His<sub>6</sub>** ter ju shranite v mikrocentrifugirkah pri 4 °C v hladilniku. **Mikrocentrifugirki predhodno stehtajte** prav tako pa tudi po dodatku gela v katerem sta fragmenta DNA. Določite maso izrezanih koščkov gela. Vzorce natančno označite, ker jih boste potreboval za ligacijo (8. vaja).

**Gojišča, raztopine in pufri:**

1. *Nde*I, restrikcijska endonukleaza
2. *Xho*I, restrikcijska endonukleaza
3. 10-kratni restrikcijski pufer
4. Sterilna, dva-krat destilirana sterilna voda
5. Agaroz, 0,8% v 0,5-kratnem TBE
6. DNA lestvici Gene Ruler 1 kb DNA ladder

7. 5-kratni pufer TBE - Tris-boratni elektroforezni pufer; 0,45 M Tris-borat (54 g Tris, 27,5 g borove kisline), 10 mM EDTA (pH 8)
8. Etidijev bromid, 10 mg/ml
9. 6-kratni nanašalni pufer – 0,25% raztopina bromfenol modro, 0,25% raztopina ksilen cinaol, 40% saharoza (w/v)

**Material:**

1,5 in 0,2 ml mikrocentrifugirke, erlenmajerice (150 ml), valj (100 in 500 ml), led, parafilm, električni napajalnik, elektroforezna banjica, nosilec za gel, glavnik (15 zob), mizica z libelo, centrifuga, mešalo, odlagalniki, pipete in pipetni nastavki, rokavice

**Vprašanja:**

1. Zakaj je potrebno po rezanju plazmidnega vektorja njegovo čiščenje na agaroznem gelu?
2. Kaj je razlog, da reakcijo restrikcije izvajamo pri 37 °C?
3. Zakaj količina dodanega encima ne sme presegati 10% končnega volumna restrikcijske mešanice?
4. Zakaj so restriktaze občutljive na daljšo inkubacijo pri višjih temperaturah?

5. Kromosomsko DNA *E. coli* boste rezali z *Bam*HI in *Eco*RI. Zatem boste restrikcijsko mešanico vnesli v jamice agaroznega gela, ki sprejmejo do 30 µl vzorca. V gel je potrebno vnesti 10 µg DNA. Koncentracija DNA je 1 µg/µl, restrikcijski pufer je 10-krat koncentriran, za popolno restrikcijo potrebujete 2,5 U *Eco*RI in 3 U *Bam*HI na 1 µg kromosomske DNA. Elektroforezni nanašalni pufer je 6-krat koncentriran. Izračunajte količine posameznih sestavin restrikcijske mešanice.

## 7. VAJA

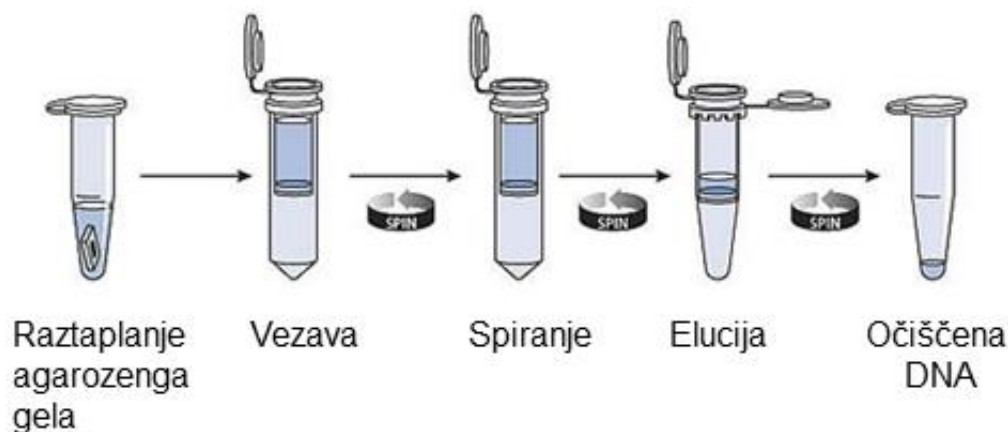
### Ligacija odprtega plazmidnega vektorja pET21c(+) in rezanega fragmenta OlyA-mCherry

#### Teorija:

Kloniranje in subkloniranje predstavljata skupek postopkov, ki jih uporabljamo, da želeno DNA vstavimo v primeren vektor. DNA-ligaza, ki zleplja dve molekuli DNA (vektor in fragment), je zelo občutljiva na prisotnost nečistoč v vzorcu, zato moramo DNA pred ligacijsko reakcijo dodatno očistiti. Ker so odprti plazmidni vektorji (pET21c(+)) in fragmenti OlyA-mCherry v agaroznem gelu, jih moramo najprej ločiti od agaroze. Za ta namen si bomo pomagali s komercialnim kitom »GeneJET Gel Extraction Kit«. Agarozne blokce, v katerih je tudi tarčna DNA, bomo najprej raztopili, nato pa raztopino nanесли v komercialno kolono. V prisotnosti visokih koncentracij soli se DNA veže v koloni na membrano iz silikatnega gela, nečistoče pa se sperejo iz kolone. Absorbirano DNA na silikatni membrani dodatno speremo in sprostimo iz kolone s pufrom ali z vodo (16).

Pri ligacijski reakciji moramo, podobno kot pri rezanju DNA, paziti na pogoje, v katerih je encim aktiven. Ligacijo izvajamo pri nižjih temperaturah od temperaturnega optimuma, saj s tem omogočimo lažji nastanek vodikovih vezi med lepljivimi konci vektorja in inserta ter zmanjšamo verjetnost nastanka povezav med večjim številom molekul DNA. Po transformaciji bakterijskih celic z ligacijsko mešanico sledi še selekcija oziroma identifikacija tistih kolonij, ki vsebujejo plazmid z rekombinantno DNA. Uporabili bomo direktno selekcijo.

**DNA:** OlyA-mCherry (1200 bp) in pET21c(+) (5500 bp), pridobljeni na 7. vaji



Slika 8: Shematski prikaz izolacije DNA iz agaroznih blokcev s komercialnim kompletom »GeneJET Gel Extraction Kit«, povzeto po (17).

**Postopek:****PRIPRAVA VEKTORJA IN FRAGMENTA DNA ZA KLONIRANJE**

1. Vzorcem fragmentov DNA, izrezanih iz agaroznega gela, dodajte 1 volumne pufru za vezavo (**Binding Buffer**) in premešajte. Pri tem upoštevajte, da **100 mg gela zavzema 100 µl**.
2. Vzorce, izrezane iz gela, inkubirajte **10 min pri 50 - 60 °C**, da se agaroz popolnoma raztopi. Vmes **nekajkrat premešajte** na način, da mikrocentrifugirko pretresete, kar bo pospešilo raztapljanje agaroze. Po končanem raztapljanju premešajte vsebino mikrocentrifugirke na vibracijskem mešalu. Po inkubaciji preverite barvo raztopine. Vezava DNA na silikatno membrano v koloni je odvisna od vrednosti pH. Pri  $\text{pH} \geq 7,5$  se adsorpcija močno zmanjša. Povišano vrednost pH zaznamo s spremembo barve vzorca iz rumeno v vijoličasto. Če barva vzorca ni rumena, dodajte 10 µl 3 M Na-acetat (pH 5).
3. V kolono prenesite **do 800 µl raztopljenega gela** in **centrifugirajte 1 min** pri maksimalnem številu obratov. Spraznite zbiralno epruveto in jo vstavite nazaj v kolono. Če je v mikrocentrifugirki ostalo še raztopljenega gela postopek ponovite.
4. V kolono dodajte **700 µl pufru za spiranje (Wash Buffer)**, v katerega se je že predhodno dodalo etanol. **Centrifugirajte 1 min** pri maksimalnem številu obratov. Spraznite zbiralno epruveto in jo vstavite nazaj v kolono.
5. **Centrifugirajte 1 min pri maksimalnem številu obratov**, da se popolnoma znebite pufru za spiranje.
6. Kolono prenesite v čisto mikrocentrifugirko. Natančno v sredino silikatne membrane v koloni nanesite **30 µl pufru za elucijo DNA (Elution Buffer)** ali sterilne vode in **inkubirajte 1 minuto** pri sobni temperaturi, nato centrifugirajte 1 minuto. Odstranite kolono in zaprite mikrocentrifugirko z izprano DNA.
7. Mikrocentrifugirko s čisto DNA ustrezno označite in spektrofotometrično določite koncentracijo DNA.

**LIGACIJA LINEARIZIRANE DNA VEKTORJA IN FRAGMENTA DNA**

1. Pripravili boste **20 µl ligacijske mešanice** v mikrocentrifugirki. Tipično se za ligacijo uporablja **25 ng DNA prečiščenega vektorja in ustrezno količino fragmenta v molskem razmerju 1:3**.
2. Količino fragmenta se izračuna po naslednji formuli:

$$\text{Količina fragmenta} = \frac{25 \text{ ng} * (\text{velikost inserta v bp}) * 3}{\text{velikost vektorja v bp}}$$

3. Mešanici DNA vektorja in fragmenta **dodajte sterilno vodo**. Količino sterilne vode dodamo toliko, da volumen ligaze ne presega 1/10 končnega volumna ligacijske mešanice.
4. Dodajte 1/10 končnega volumna 10-krantega koncentriranega pufra za T4 DNA-ligazo.

**Preglednica 6: Reagenti za ligacijo plazmidnega vektorja pET21c(+) in fragmenta OlyA-mCherry.**

|                    | Vzorec | Kontrola |
|--------------------|--------|----------|
| Vektor             |        |          |
| Fragment DNA       |        |          |
| Ligacijski pufer   |        |          |
| ddH <sub>2</sub> O |        |          |
| T4 DNA ligaza      |        |          |
| Končni V           |        |          |

5. Ligacijsko mešanico **premešajte in centrifugirajte v centrifugi 1-2 s**. Inkubirajte **preko noči v vodni kopeli pri 16 °C**.
6. Vzoredno vsaka delovna skupina pripravi tudi **10 µl kontrolne ligacijske mešanice**. Postopek je enak zgoraj opisanemu postopku, le da namesto fragmenta dodate sterilno vodo in **uporabite polovični volumen** vzorca DNA vektorja, pufra z ATP za T4 DNA-ligazo in T4 DNA-ligaze.

**Gojišča, raztopine in pufri:**

1. *Kit »GeneJET Gel Extraction Kit«* - pufri za vezavo, spiranje in elucijo; kolone
2. 3 M Na-acetat (pH 5)
3. 10-kratni pufer z ATP za T4 DNA-ligazo
4. T4 DNA-ligaza
5. Sterilna, 2-krat destiliran voda

**Material:**

Pipete in pipetni nastavki, 1,5 ml mikrocentrifugirke, čaša z alkoholom, pinceta, odlagalniki, mešalo, centrifuga, plovci, ledena kopel, vodna kopel 16 °C, vodna kopel 50-60 °C, kuhalnik, lonec, termoblok ali vodna kopel

**Vprašanja:**

1. Kaj bi naredili, če bi volumen mešanice fragmenta DNA in vektorja presegel 17  $\mu$ l in če njuna koncentracija v ligacijski mešanici ne bi bila dovolj visoka?
2. Zakaj je potrebno paziti, da volumen T4 DNA ligaze ne presega 1/10 volumna končne ligacijske mešanice?
3. Kaj nam bo povedal rezultat negativne kontrole?
4. Zakaj reakcijo ligacije izvajamo pri 16 °C?

## 8. VAJA

### Priprava in transformacija kompetentnih celic BL21 (DE3) z ligacijsko mešanico pET21c(+) + OlyA-mCherry

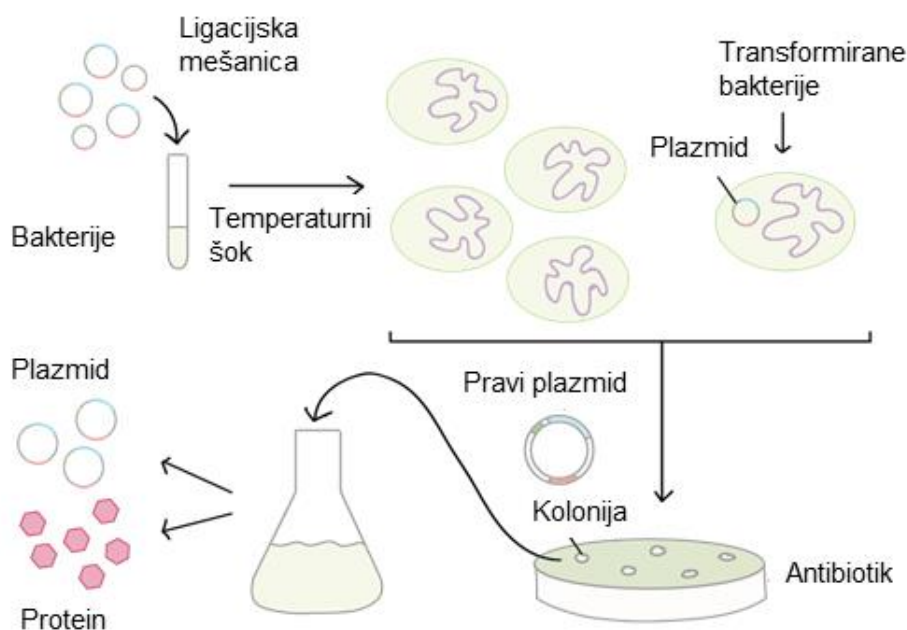
#### Teorija:

Transformacija kompetentnih celic je eden izmed načinov vnosa DNA v bakterijske celice. DNA vstopi v celice direktno iz raztopine, kar je razlika od konjugacije ali transdukcije, kjer je DNA del bakterije oz. virusa. Da je transformacija celic čim bolj uspešna, je celice potrebno pripraviti na poseben način, kar poveča učinkovitost vnosa DNA v celice. Za pripravo kompetentnih celic – to je celic, ki so v takem fiziološkem stanju, da so sposobne sprejemati tujo DNA z učinkovitostjo  $10^7$  do  $10^9$  celic na  $\mu\text{g}$  DNA v raztopini – je pomembno tudi, da je bakterijska kultura v zgodnji logaritemski fazi rasti. Postopek, ki ga bomo uporabili pri 8. vaji temelji na inkubaciji celic v  $\text{CaCl}_2$  in hitrem zamrzovanju. Oba koraka v postopku povečata prepustnost bakterijske celične stene in membrane. Med samim postopkom transformacije še enkrat izpostavimo bakterijske celice temperaturnemu šoku v prisotnosti plazmidne DNA (18–20).

#### Bakterijski sev: BL21 (DE3)

**Genotip:** B  $F^-$  *ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)*  $\lambda$ (DE3 [*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*]) [*malB*<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>( $\lambda$ <sup>S</sup>)

**DNA:** ligacijska mešanica pET21c(+) + OlyA-mCherry



Slika 9: Shema transformacije in selekcije bakterijskih celic povzeto po (21).

## PRIPRAVA KOMPETENTNIH CELIC

### 1. Dan:

1. S cepilno zanko prenesite bakterijsko kulturo BL21 (DE3) iz trajnika (-80 °C) na trdno gojišče LB.

### 2. Dan:

1. S cepilno zanko prenesite 1 bakterijsko kolonijo v 10 ml gojišča LB. Inkubirajte preko noči pri 37 °C v rotacijskem stresalniku pri 180 obratih/min.

### 3. Dan:

1. Precepitate 2 ml prekonočne kulture v 3-krat 100 ml svežega, na 37 °C ogretega LB (za vsak pult ena kultura). Inkubirajte precepljene kulture pri 37 °C v rotacijskem stresalniku pri 180 obratih/min da zrastejo do optične gostote pri 600 nm  $A_{600}=0,375$  (približno 2 uri, kar ustreza koncentraciji  $10^8$  bakterij/ml).

## Pričetek vaje

2. 100 ml kulture prelijte v **dve 50 ml centrifugirki** in inkubirajte v **ledeni kopeli 10 min**.
3. Ohlajeni kulturi **centrifugirajte 10 min pri 4 °C in 8000 obratih/min**.
4. Popolnoma **odstranite supernatant** in usedlino celic resuspendirajte v **6 ml ohlajenega (0 °C) CaCl<sub>2</sub>**. Inkubirajte v **30 min v ledeni kopeli**.
5. Ponovite postopek 3.
6. Popolnoma odstranite supernatant in v vsaki centrifugirki resuspendirajte usedlino celic v **300 µl ohlajenega (0 °C) CaCl<sub>2</sub> z 20% glicerolom** in shranite v ledeni kopeli.
7. Odpipetirajte **3-krat po 100 µl kompetentnih celic v 3 mikrocentrifugirke** in inkubirajte v ledeni kopeli.

## TRANSFORMACIJA KOMPETENTNIH CELIC

1. Pripravite transformacijsko mešanico v mikrocentrifugirki in sicer zamešajte **10 µl ligacijske mešanice** (20-250 ng DNA) in **100 µl pripravljenih kompetentnih celic**. Vsaka delovna skupina pripravi tudi **dve kontroli** in sicer k 100 µl kompetentnih celic dodajte (i) vso kontrolno ligacijsko mešanico, kar je kontrola ligacije in (ii) 10 µl sterilne vode, kar je kontrola transformacije. **Transformacijsko mešanico inkubirajte v ledeni kopeli 20 minut, nato v vodni kopeli pri 42 °C natančno 90 s**.

2. Transformacijski mešanici **dodajte 200 µl gojišča LB** in tako transformirane bakterije inkubirajte **45 min pri 37 °C** na rotacijskem stresalniku pri 180 obratih/minuto.
3. Razmažite po 110 µl transformacijske mešanic na plošče LBAp.
4. Kontrola: na ploščo LBAp razmažite 10 µl kompetentnih celic.
5. Vse agrske plošče inkubirajte 24 h pri 37 °C.

**Gojišča, raztopine in pufri:**

1. Gojišče LB: 25 g gojišča Luria-Bertani (Difco) v 1000 ml vode
2. Agarske plošče LB in LBAp
3. 0,1 M raztopina  $\text{CaCl}_2$
4. 0,1 M raztopina  $\text{CaCl}_2$  z dodatkom 20% glicerola
5. etanol

**Material:**

Pipete (10 ml), 50 ml centrifugirke (6-krat), 4-krat ledena kopel s soljo, mešalo, 1,5 ml mikrocentrifugirke, čaše z etanolom, pipete in pipetni nastavki, odlagalniki, pincete, kopel 42 °C

**Vprašanja:**

1. Zakaj je potrebno za pripravo kompetentnih celic paziti na fazo rasti bakterijske kulture?
2. Kakšne kontrole transformacije bi še lahko naredili?
3. Kaj vpliva na učinkovitost transformacije?
4. Kako bi pripravil 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  z 20% glicerolom in koncentriranega 87% glicerola?
5. Razložite pojme direktna selekcija, inercijska inaktivacija in  $\alpha$ -komplementacija.

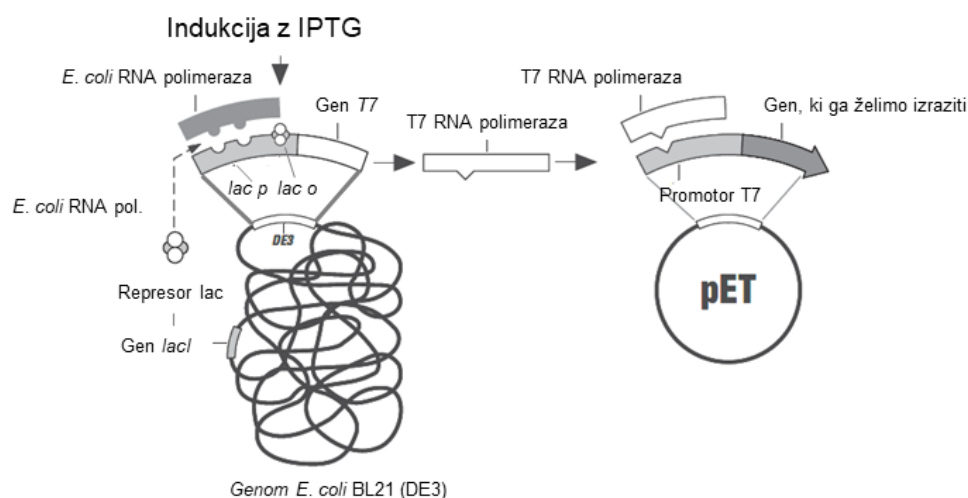
## 9. VAJA

### Izolacija rekombinantnega proteina OlyA-mCherry-His<sub>6</sub>

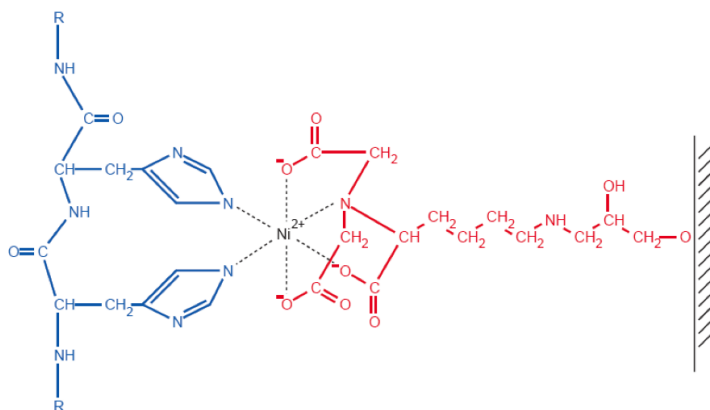
#### Teorija:

Ker vsebuje tipična celica *E. coli* več kot 4000 različnih proteinov, je potrebno rekombinantni protein, ki ga izražamo, učinkovito ločiti od preostalih proteinov in komponent celice. Rekombinantni proteini se tipično proizvajajo kot proteini z N- ali C-terminalnim histidinskim repkom, ki omogoča vezavo rekombinantnih proteinov na Ni<sup>2+</sup> ali Co<sup>2+</sup> ione, ki so vezani na komercialne agarozne kroglice, na katera sta kationa vezana v obliki kompleksa Ni<sup>2+</sup> - ali Co<sup>2+</sup> - NTA. Ko inkubiramo celični lizat s tako pripravljenimi kroglicami, se na kroglice vežejo le rekombinantni proteini, ostali ostanejo prosti v raztopini. Po centrifugiranju v mikrocentrifugirki (mogoča je tudi kolonska izvedba), se kroglice z vezanimi proteini posedejo. Supernatant odpipetiramo in nato dodamo raztopino z imidazolom, ki se kompetitivno veže na Ni<sup>2+</sup> - ali Co<sup>2+</sup> ione, rekombinantni proteini pa posledično izpadejo v raztopino. Po centrifugiranju jih dobimo v topni frakciji, ki jih iz mikrocentrifugirke preprosto odpipetiramo.

**Bakterijski sev:** BL21 (DE3) + pET21c(+) + OlyA-mCherry-His<sub>6</sub>



Slika 10: Indukcija ekspresije rekombinantnih proteinov z IPTG, povzeto po (22).



Slika 11: Interakcija med Ni-NTA-agarozo in histidinskim repkom rekombinantnega proteina (23).

Na delovnih pultih vas čakajo preinducirane kulture, v katerih so rekombinantni proteini že namnoženi.

**1. Dan:**

2. S cepilno zanko prenesite 1 kolonijo BL21 (DE3) + pET21c(+) + OlyA-mCherry v 10 ml LBAp in inkubirajte preko noči na 37 °C s stresanjem na rotacijskem stresalniku pri 180 obratih/minuto.

**2. Dan:**

1. Precepitate 500 µl kulture v 50 ml svežega in na 37 °C ogretega gojišča. Bakterijsko kulturo inkubirajte pri 37 °C v rotacijskem stresalniku pri 180 obratih/min, dokler optična gostota bakterij pri 600 nm ne doseže 0,5 (2-3 h).
2. Ko je ustrezna optična gostota dosežena dodajte 1 M IPTG, da bo njegova končno koncentracija 1 mM in inkubirajte še 4 h na 37 °C s stresanjem na rotacijskem stresalniku pri 180 obratih/minuto.

**Pričetek vaje**

3. Vsak študent si v 1,5 ml mikrocentrifugirke odpipetira **1,5 ml inducirane kulture**. Kulturo centrifugirajte 1 min pri maksimalnem številu obratov.
4. Supernatant popolnoma **odstranite z avtomatsko pipeto**.
5. Usedlino bakterij **resuspendirajte v 1 ml pufra za lizo in inkubiraj na ledu 30 min**.
6. **Centrifugirajte 10 min** pri maksimalnem številu obratov in **supernatant prenesite z avtomatsko pipeto v svežo mikrocentrifugirko**.
7. V naslednjem koraku supernatantu **dodajte 20 µl kroglic NI-NTA**, ki jih je predhodno potrebno ustrezno pripraviti.
8. Na delovnem pultu vas čaka **120 µl kroglic Ni-NTA**, ki so resuspendirane v etanolu. **Kroglice posedite s kratkim centrifugiranjem (2000 obratov/min) in previdno odstranite ves supernatant**.
9. Kroglicam dodajte **1 ml pufra A**, dobro resuspendirajte in jih posedite s kratkim centrifugiranjem.
10. Odstranite supernatant in ponovi korak 9.
11. Odstranite supernatant in kroglice **resuspendirajte v začetnem volumnu (150 µl) pufra A**.

12. Po 30 minutah inkubacije celic na ledu, vsak posameznik v lizirane celice odpipetira **20 µl kroglic Ni-NTA**.
13. Inkubirajte z občasnim obračanjem **10 min pri sobni T**.
14. **Centrifugirajte** (2000 obratov/min) 1 min pri maksimalnem številu obratov.
15. Odstranite supernatant in ponovno dodajte **1 ml pufra A** ter inkubirajte **10 min pri sobni temperaturi** z občasnim obračanjem.
16. Centrifugirajte 1 min pri 2000 obratov/min.
17. Odstranite supernatant in **dodajte 1 ml pufra B**. Inkubirajte **10 min z občasn timer obračanjem**.
18. **Centrifugirajte 1 min pri 2000 obratov/min**.
19. Odstranite supernatant in dodajte **100 µl pufra C**. Inkubirajte **10 min z občasn timer obračanjem**.
20. **Centrifugirajte 1 min pri 2000 obratov/min** in supernatant s čistimi rekombinantnimi proteini **prenesite v svežo mikrocentrifugirko**.
21. Vsi člani enega pulta **združijo svoje izolate v eno 1,5 ml mikrocentrifugirko** in celotno vsebino prenesejo v dializno črevo.
22. Dializno črevo z rekombinantni proteini postavite v dializno raztopino in ob stalnem mešanju inkubirajte 24 ur, z mešanjem v hladni sobi.

### 3. Dan:

1. Iz dializne raztopine odstranite dializno vrečko in iz nje odpipetirajte rekombinantne proteine.
2. Rekombinantne proteine **centrifugirajte 10 min** pri maksimalnem številu obratov.
3. Supernatant prenesite v svežo 1,5 ml mikrocentrifugirko in zamrznite pri -20 °C.

### Gojišča, raztopine in pufri:

1. LBAp: 10 ml in 50 ml
2. 1M IPTG
3. Kroglice Ni-NTA
4. Pufer za lizo = pufer A + 10 µg/ml DNAza (10 mg/ml) + 20 µg/ml RNAza (10 mg/ml) + proteazni inhibitorji cOmplete + 0,5 mg/ml lizocima (100 mg/ml)
5. Pufer A = 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH =8
6. Pufer B = 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH =8

7. Pufer C = 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 300 mM imidazol , pH =8
8. Dializni pufer = 20 mM Tris, pH 8

**Material:**

Led, 1,5 ml mikrocentrifugirke, čaše z etanolom, pipete in pipetni nastavki, odlagalniki, pincete, dializno črevo

**Vprašanja:**

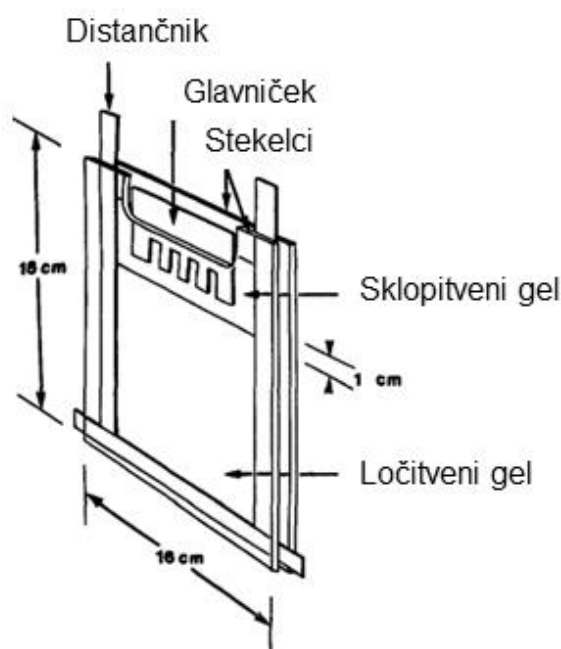
1. Zakaj je potrebno v pufer za lizo dodati proteazne inhibitorje?
2. Ali je za indukcijo sinteze proteine potrebno dodati IPTG? Analog česa je IPTG in kako deluje?
3. V katerem primeru bi bakterije, ki producirajo rekombinantne proteine, gojili pri 30 °C?
4. Ali bi lahko bakterije, ki producirajo rekombinantni protein, lahko gojili v gojišči brez ampicilina?

## 10.VAJA

### Elektroforezno ločevanje proteinov (NaDS-PAGE)

#### Teorija:

Za elektroforezno ločevanje proteinov se uporablja poliakrilamidne gele (poliakrilamidna gelska elektroforeza – PAGE). V električnem polju proteini potujejo v odvisnosti od velikosti, oblike in lastnega naboja. Če jih želimo ločiti po molekularni masi, jih denaturiramo s kuhanjem v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS). V povprečju se ena molekula NaDS veže na dva aminokislinska ostanka. S tem dobijo vsi proteini enotno število negativnih nabojev glede na število aminokislinskih ostankov in hkrati enotno linearno obliko. Metoda po Laemmliju vključuje pripravo dveh plasti gelov. Zbirali gel je namenjen združevanju vseh proteinov v vzorcu, ki smo ga vnesli v žepek gela, v ozek pas. V ločitvenem gelu pa pride do ločitve proteinov v vzorcu glede na molekularno maso. Proteine po končani elektroforezi obarvamo z barvilom Comassie modro (24).



Slika 12: Shema izdelave sistema za ulivanje poliakrilamidnih gelov.

#### Material:

Izoliran OlyA-mCherry-His<sub>6</sub>

#### Postopek:

Uspešnost izolacije bomo preverili s **poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata** (NaDS-PAGE), s katero bomo preverili, ali je izoliran OlyA-mCherry prave velikosti (54 kDa). Pripravili bomo 12,5 %-na poliakrilamidni gel za ločevanje proteinov, na katerega bomo nanесли svoje vzorce. V mikrocentrifugirki bomo zamešali 5  $\mu$ l izoliranih proteinov in 1  $\mu$ l 6-kratnega nanašalnega pufra ter kuhali 2 min ter nanесли na gel. Reagenti za pripravo poliakrilamidnih gelov so navedeni v **Preglednici 7**.

**Preglednica 7: Reagenti za pripravo dveh poliakrilamidnih gelov.**

|                    | Ločevalni gel | Nanašalni gel |
|--------------------|---------------|---------------|
| % poliakrilamida   | 12%           | 4%            |
| dH <sub>2</sub> O  | 3,88 ml       | 2,65 ml       |
| 3 M Tris, pH 8,8   | 0,94 ml       | /             |
| 0,5 M Tris, pH 6,8 | /             | 1,13 ml       |
| 40% akrilamid      | 2,25 ml       | 0,45 ml       |
| 10% NaDS           | 0,05 ml       | 0,045 ml      |
| 10% APS            | 0,375 ml      | 0,225 ml      |
| TEMED              | 0,0075 ml     | 0,0045 ml     |

1. Pri delu s poliakrilamidnimi geli je **obvezna uporaba rokavic**. Obe elektroforezni stekelci in glavniček je potrebno predhodno očistiti z destilirano vodo in etanolom in nato sestaviti elektroforezni sistem.
2. V mikrocentrifugirko odpipetirajte **5 µl rekombinantnega OlyA-mCherry-His<sub>6</sub> in 1 µl 6-kratnega nanašalnega pufra za Na-DS elektroforezo**.
3. **Kuhajte 5 min** in centrifugirajte 1 min pri maksimalnem številu obratov.
4. Na gel **nanosite 5 µl vzorca**, na gel je potrebno nanesti tudi 5 µl proteinskega standarda.
5. Priključite napetost na **180 mA** (elektroforeza traja 45 min).
6. Po končani elektroforezi razstavite elektroforezni sistem in poliakrilamidni gel inkubirajte **5 min v topli destilirani vodi**.
7. Poliakrilamidni gel prestavite v **barvilo Comassie modro in barvajte 30 min**.
8. Po 30 min prestavite poliakrilamidni gel v **razbarvalno raztopino** in preglejte proteinske lise.

**Gojišča, raztopine in pufri:**

1. 40% suspenzija poliakrilamida
2. 3 M Tris, pH = 8
3. 0,5 M Tris, pH = 6,8
4. 10% Na-DS
5. 10% APS
6. TEMED
7. 6-kratni nanašali pufer za poliakrilamidno elektroforezo
8. Comassie modro
9. Razbarvalna raztopina
10. Proteinska lestvica PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Fisher

**Material:**

1,5 mikrocentrifugirke, 4-krat 20 ml čaše, pipete in pipetni nastavki, odlagalniki, 2-posodi za barvanje in razbarvanje gelov, kuhalnik, posoda

**Vprašanja:**

1. Razložite, zakaj potrebujete posamezne komponente, ki so potrebne za pripravo poliakrilamidnih gelov.
2. Kako bi potovali proteini, če v gelih ne bi bilo prisotnega detergenta Na-DS?
3. Kaj je dvo-dimenzionalna gelska elektroforeza?

## 11.VAJA

### Priprava suspenzije in ugotavljanje števila bakteriofagov M13

#### Teorija:

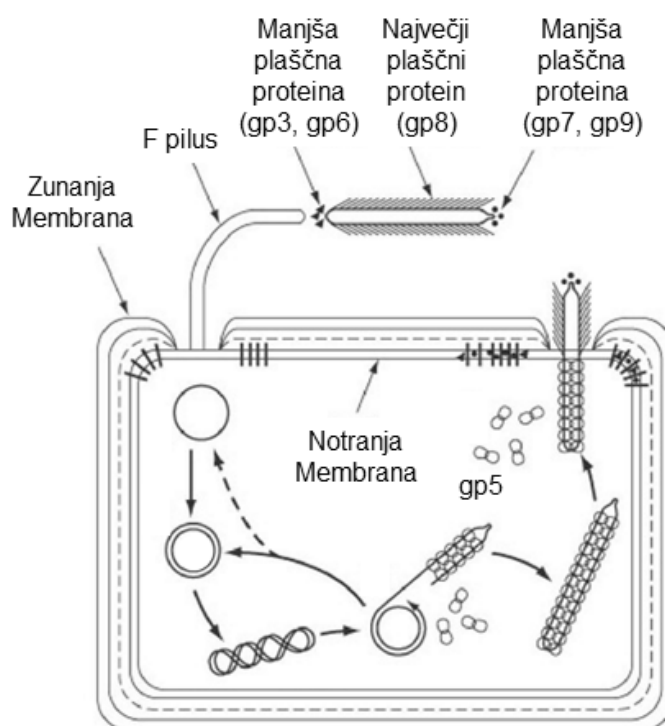
Bakteriofag M13 je modelni filamentozni bakteriofag, za katerega je značilno, da celice *E. coli* okuži preko F konjugativnega pilusa na površini bakterij. Ena izmed njihovih ključnih lastnosti je tudi ta, da virioni ob sproščanju iz gostiteljskih celic, le teh ne lizirajo. Namen vaje je spoznati (i) osnovne značilnosti pri delu z bakteriofagi in (ii) postopke za uporabo bakteriofagnih vektorjev v molekularni biologiji. Prednost bakteriofaga M13 pred ostalimi vektorji je predvsem v tem, da lahko izoliramo njegovo DNA v obliki (i) enoverižne molekule DNA (ssDNA), ki se jo lahko uporabi za določevanje nukleotidnega zaporedja (metoda po Sangerju) ali dvoverižni obliki (dsDNA), ko se virus nahaja v replikativni obliki in ki se v bakterijskih celicah obnaša podobno kot plazmidna DNA. V praksi to pomeni, da lahko dvoverižno obliko njegove molekule DNA lahko uporabimo kot vektor za kloniranje (25).

Število bakteriofagov določamo na tak način, da bakteriofage redčimo in tako izoliramo posamezne plake fagov. S posamičnim plakom v nadaljevanju lahko okužimo bakterijsko kulturo in pripravimo čisto kulturo posameznega faga.

**Bakterijski sev:** *E. coli* TG1 in TG1/M13

**Genotip:** *supE hsdΔ5 thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rK-mK-)/F' traD36 proAB lacI lacZ ΔM15* (za bakteriofag M13 – α-komplementacija)

**Bakteriofag:** 7,25 kb enoverižna krožna DNA (α-komplementacija)



Slika 13: Življenjski cikel bakteriofaga M13. Povzeto po (26).

**Postopek:**

Vaja bo razdeljena v 4 termine. V prvem terminu (ponedeljek) bo vsaka od štirih skupin inficirala kulturo TG1 in pripravila indikatorsko kulturo.

V drugem terminu (torek) bo vsaka od štirih skupin iz inficirane in indikatorske kulture pripravila plošče mehkega agarja za ugotavljanje števila fagov/ml, kar bomo določali v sredo, hkrati pa bomo izolirali tudi enoverižno DNA bakteriofaga M13.

V tretjem terminu (sreda) bo vsaka od skupin preračunala število bakteriofagov/ml iz torkove kulture. Hkrati bomo v prvi sredini skupini ponovno inficirali indikatorsko kulturo TG1 in preko celotnega sredinega termina spremljali rast neinficirane in inficirane kulture ter določili njun generacijski čas.

**1. Dan:**

1. S cepilno zanko prenesite bakterijski kulturi TG1 in TG1/M13 iz trajnika (-80 °C) na minimalno trdno gojišče M9 s tiaminom.

**2. Dan:**

1. Precepitate (i) eno kolonijo bakterije TG1 in (ii) eno kolonijo bakterije TG1 inficirane z M13 (TG1/M13) v erlenmajerici s 50 ml gojišča LB. Inkubirajte 5 – 8 ur pri 37 °C v rotacijskem stresalniku pri 180 obratih/min.
2. Po 5 – 8 urah razmnoževanja fagov (iz kulture TG1/M13) suspenzija fagov vsebuje do  $10^{12}$  delcev/ml. Razredčite kulturo TG1/M13 in pripravite redčine  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ .
3. V 3 epruvete po 3 ml odpipetirajte po 3 ml raztopljenega in do 48 °C ohlajenega mehkega agarja LB. V vsako epruveto dodajte po 200 µl indikatorske kulture TG1 in po 100 µl posamezne razredčine kulture TG1/M13.
4. Premešajte in razlijte po celi površini predgrete (37 °C) plošče hranilnega agarja LB. Ko se mehki agar strdi, obrnite plošče in jih preko noči inkubirajte na 37 °C.
5. Asistent ponovno precepi eno kolonijo bakterije TG1 iz gojišča M9 s tiaminom v erlenmajerico s 50 ml gojišča LB. Inkubirajte preko noči pri 37 °C v rotacijskem stresalniku pri 180 obratih/min.

**3. Dan:****Pričetek vaje****PRIPRAVA SUSPENZIJE BAKTERIOFAGA M13**

1. Člani vsakega delovnega pulta **precepijo 0,1 ml kulture TG1 v 10 ml svežega**, na 37 °C ogretega gojišča LB. Premešajte in **odpipetirajte 5 ml precepljene kulture v novo sterilno epruveto**. V epruveto s precepljeno kulturo **resuspendirajte 1 plak**

**bakteriofaga M13** – z nastavkom avtomatske pipete posrkajte plak in ga prenesite v epruveto s kulturo TG1 (1 plak vsebuje  $10^6 - 10^8$  fagov). Pripravite suspenzijo izbranih fagov, tako da inkubirate kulturo s plaki pri 37 °C v rotacijskem stresalniku pri 180 obratih/min, približno 5 ur.

- Po 5 urah bo asistent odpipetiral 1,5 ml inficirane kulture in jo centrifugiral 5 min pri maksimalnem številu obratov. Asistent bo odpipetiral **1 ml suspenzije fagov**, ki bodo počakali na ledu do naslednjega dne.
- Asistent ponovno precepi eno kolonijo bakterije TG1 iz gojišča M9 s tiaminom v erlenmajerico s 50 ml gojišča LB. Inkubiraj preko noči pri 37 °C v rotacijskem stresalniku pri 250 obratih/min.
- Vsak študent si zato pripravi in označi po dve 1,5 ml mikrocentrifugirki.**

#### 4. Dan:

#### UGOTAVLJANJE ŠTEVILA BAKTERIOFAGOV M13 V SUSPENZIJI

- Člane vsakega delovnega pulta čaka na ledu 1 ml suspenzije fagov M13, ki ste jih namnoževali v prejšnji dan.
- Vsak član delovnega pulta si odpipetira **20 µl supernatanta** in ga prenese v svežo 1,5 ml mikrocentrifugirko iz katere boste naslednji dan izolirali enoverižno DNA.
- Za določanje števila bakteriofagov M13 v 1 ml suspenzije je potrebno **raztopiti mehki agar** in ga prestaviti v vodno kopel s temperaturo 48-50 °C. Za vsakega študenta bodo na voljo 1 epruveta z mehkim agarjem.
- Število bakteriofagov v suspenziji je od  $10^{10} - 10^{12}$  fagov/ml. Vsak delovni pult pripravi **redčine  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  in  $10^{-10}$** , suspenzije bakteriofaga M13. Če vas je za delovnim pultom več, pripravite še 1 nižjo in eno višjo redčitev od predvidenih treh.
- V vsako od epruvet raztopljenega in do 48 °C ohlajenega mehkega agarja LB dodajte po **200 µl indikatorske kulture TG1** in po **100 µl posamezne razredčine kulture TG1/M13**.
- Premešajte in razlijte po celi površini predgrete (37 °C) plošče hranilnega agarja LB. Ko se mehki agar strdi, obrnite plošče in jih preko noči inkubirajte na 37 °C.
- Asistent ponovno precepi eno kolonijo bakterije TG1 iz gojišča M9 s tiaminom v erlenmajerico s 50 ml gojišča LB. Inkubirajte preko noči pri 37 °C v rotacijskem stresalniku pri 180 obratih/min.

**5. Dan:****PRIPRAVA AGARozNEGA GELA IN AGARozNA ELEKTROFOREZA**

Uspešnost izolacije enoverižne DNA faga M13 boste preverili z agarozno gelsko elektroforezo na 0,8% agaroznem gelu z 0,5-kratnim pufrom TBE, ki mu dodate barvilo etidijev bromid. **En študent iz skupine pripravi 0,8% agarozni gel.**

1. **Pri pripravi agaroznih gelov je nujno potrebna uporaba rokavic!** V erlenmajerici pripravite **40 ml 0,5-kratni elektroforeznega pufra TBE**. Dodajte ustrezno količino agaroze za pripravo **0,8% gela**. Raztopite agarozo ob segrevanju v mikrovalovni pečici. Erlenmajerica naj bo v mikrovalovni pečici toliko časa, da se agaroz popolnoma raztopi.
2. Ohladite raztopino agaroze pod tekoče hladno vodo.
3. Medtem, ko se erlenmajerica z raztopljenim gelom ohlaja, pripravite nosilec za gel s primernima glavničkoma. Nekoliko ohlajeni agarozni dodajte **1 µl etidijevega bromida** (10 mg/ml) v končni koncentraciji 0,5 µg/ml in jo zlijte v nosilec. Dobro premešajte in razlijte agarozo po nosilcu za gel. Po 30 – 45 minutah je gel strjen. **Obvezno delajte z rokavicami, ki jih po razlitju gela zamenjajte.**
4. Po 30 – 45 min prenesite agarozni gel v elektroforezno kadičko in vanje nalijte 400 ml 0,5-kratnega pufra TBE in iz njega odstranite glavnik. Gel mora biti prekrit s pufrom. Zamenjajte rokavice.
5. Ostali študenti 20 µl suspenzije fagov M13, ki vsebujejo enoverižno DNA dodajo 1 µl 2% NaDS, premešajo na mešalu in inkubirajo v vodni kopeli pri 65 °C 5 min.
6. Po inkubaciji dodajte vzorcu 5 µl 6-kratnega elektroforeznega nanašalnega pufra, premešajte in 5 µl vzorca vnesite v jamico 0,8% agaroznega gela. Poleg vzorcev vnesite tudi 4 µl standardne DNA.
7. Priključite na vir napetosti na 100 V in izvedite elektroforezo (30 - 45 min). Po elektroforezi osvetlite gel osvetlite z UV transiluminatorjem (G-Box Chemi, Syngene) in ga fotografirajte.

**UGOTAVLJANJE ŠTEVILA BAKTERIOFAGOV M13 V SUSPENZIJI (NADALJEVANJE)**

1. Člani vsakega delovnega pulta preštejejo plake na posameznih ploščah in ugotovijo število fagov/ml, ki so jih pripravili v 1. dnevu vaje, pri čemer upoštevajo faktor redčenja in dejstvo, da so števne plošče tiste, ki vsebujejo 30 – 300 plakov.

## DOLOČEVANJE GENERACIJSKEGA ČASA KULTURE TG1 IN KULTURE TG1, OKUŽENE S FAGOM M13

1. Prva skupina precepi 0,5 ml kulture TG1 v dve erlenmajerici, v katerih je 50 ml gojišča LB. Bakterijski kulturi gojimo pri 37 °C v rotacijskem stresalniku 180 obratih/min in vsako uro pomerimo optično gostoto OD<sub>600</sub> pri 600 nm.
2. Ko optična gostota OD<sub>600</sub> doseže vrednost 0,5, v eno izmed erlenmajeric resuspendiramo 1 plak in nato optično gostoto spremljamo do konca vaj. Študentje si boste po koncu vaj izmenjajo meritve in iz podatkov optične gostote izračunali generacijski čas v eksponentni fazi rasti celic inficirane in neinficirane kulture. V tabeli označi tudi čas, ob katerem bomo eni izmed kultur dodali plak.

**Tabela 8: Čas gojenja in optična gostote inficirane in neinficirane kulture TG1.**

| Čas | Optična gostota OD <sub>600</sub><br>neinficirane kulture TG1 | Optična gostota OD <sub>600</sub><br>neinficirane kulture TG1 |
|-----|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
|     |                                                               |                                                               |
|     |                                                               |                                                               |
|     |                                                               |                                                               |
|     |                                                               |                                                               |
|     |                                                               |                                                               |
|     |                                                               |                                                               |
|     |                                                               |                                                               |
|     |                                                               |                                                               |
|     |                                                               |                                                               |

### Gojišča, raztopine in pufri:

1. Minimalne agarske plošče M9 – za 1000 ml: 6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g NaCl, 10 ml 0,01 M CaCl<sub>2</sub>, 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, 20 ml 20% glukoze, 15 g agarja  
Tiamin – (50 mM) v gojišču 0,1 mM
2. Gojišče LB: 25 g gojišča Luria-Bertani (Difco) do 1000 ml vode
3. Mehki agar LB (LB top – soft agar): 25 g gojišča Luria Bertani (Difco), 7 g agarja do 1000 ml vode
4. Agarske plošče LB: 25 g gojišča Luria-Bertani (Difco), 15 g agarja do 1000 ml vode
5. 2% NaDS
6. 0,8% agaroza v 0,5-krantem TBE

7. 5-kratni TBE – Tris-boratni elektroforezni pufer; 0,45 M Tris-borat (54 g Tris, 27,5 g borove kisline), 10 mM EDTA (pH 8)
8. Etidijev bromid – 10 mg/ml
9. 6-kratni nanašalni pufer – 0,25% raztopina bromfenol modro, 0,25% raztopina ksilen cinaol, 40% saharoza (w/v)
10. DNA lestvici Gene Ruler 1 kb DNA ladder

**Material:**

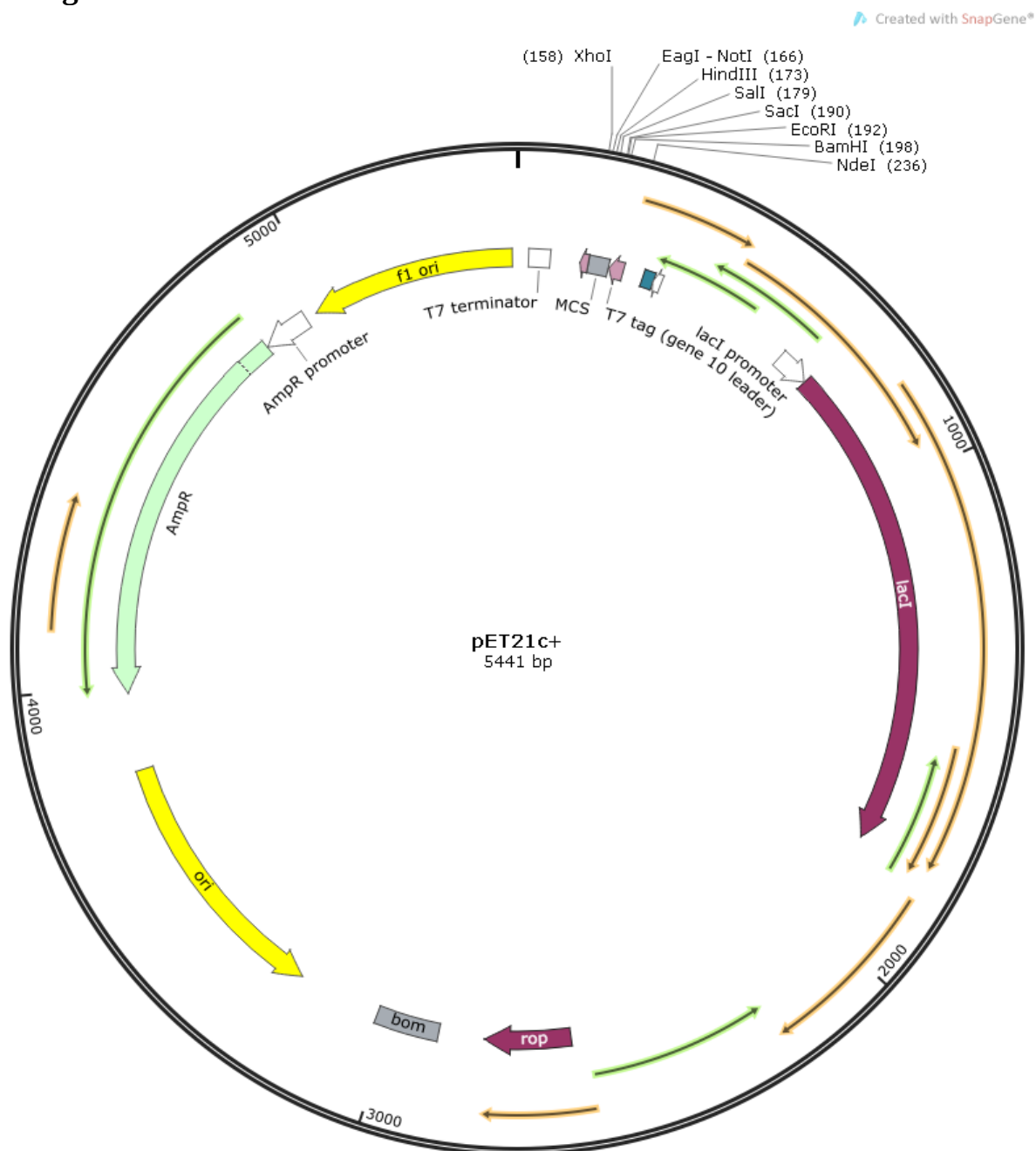
Pipete (10 ml), termo blok (48 °C), steklene epruvete s kovinskim zamaškom, 1,5 ml mikrocentrifugirke, pipete in pipetni nastavki, erlenmajerice (150 ml in 500 ml), valj (100 in 500 ml), led, parafilm, električni napajalnik, elektroforezna banjica, nosilec za gel, glavnik (15 zob), mizica z libelo, centrifuga, odlagalniki, rokavice

**Vprašanja:**

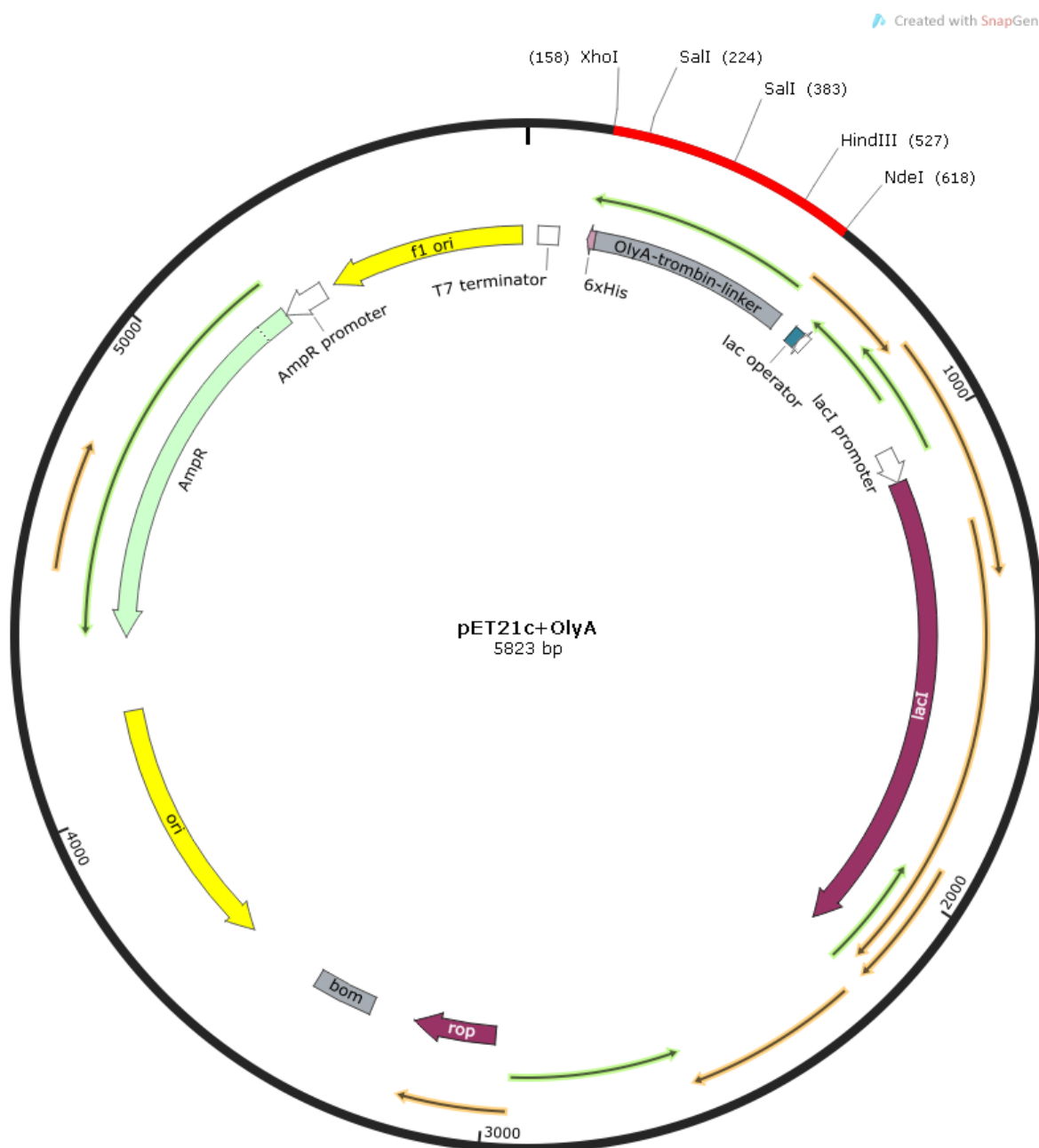
1. Zakaj moramo pri večini bakteriofagov (npr. pri  $\lambda$ , a ne pri M13) paziti na čas inkubacije fagov z bakterijami pred razlitjem na plošče?
2. Zakaj uporabljamo za infekcijo z M13 bakterije TG1, ki so zrasle na ploščah z minimalnim gojiščem M9 s tiaminom?
3. Zakaj uporabljamo pri delu z bakteriofagi preliv z mehkim agarjem?
4. Ali lahko pri nasičeni bakterijski kulturi TG1 opazimo okužbo s fagom M13? Razložite!

5. Kaj pričakujete, če bi primerjali potovanje enoverižne in dvoverižne DNA faga M13? Razloži!
6. Zakaj dodamo, če želimo izolirati dvoverižno obliko DNA faga M13, v kulturo TG1/M13 antibiotik kloramfenikol?

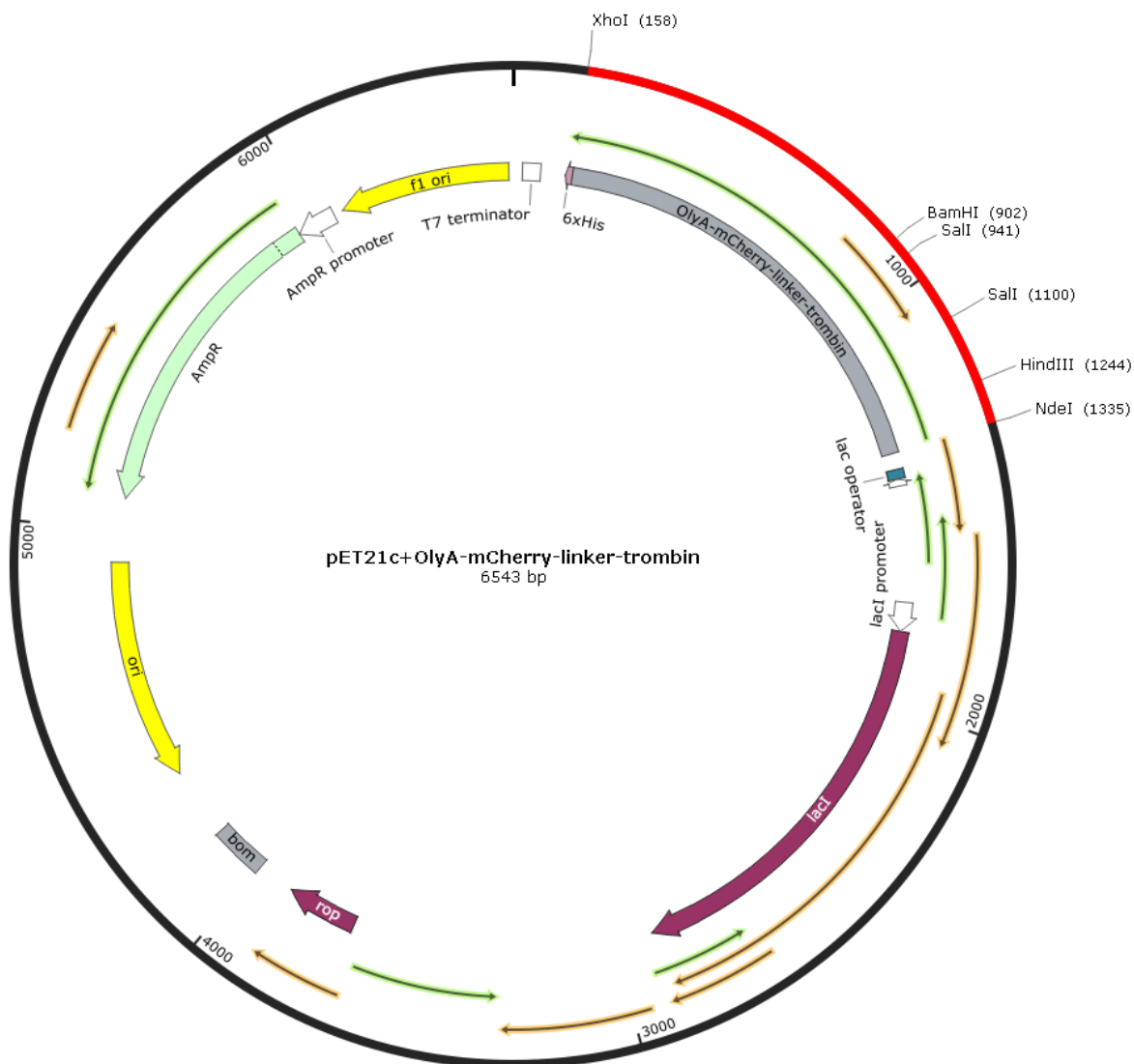
**Priloge:**



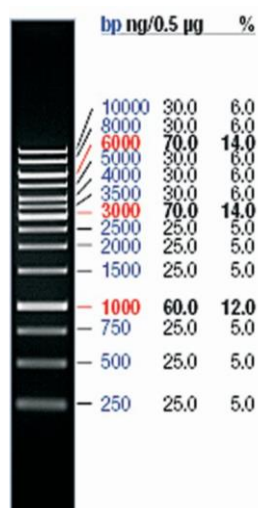
**Slika 14: Ekspresijski vektor pET21c(+).**



Slika 15: Ekspresijski vektor pET21c(+) z vstavljenim zaporedjem za OlyA.



Slika 16: Ekspresijski vektor pET21c(+) z vstavljenim zaporedjem za OlyA-mCherry.



Slika 17: Standardna DNA lestvica: Gene Ruler 1 kb DNA ladder.

## FastDigest restriction enzymes

### Protocol for rapid digestion of DNA using Thermo Scientific™ FastDigest™ restriction enzymes

Prepare the reaction mixture at room temperature in the order indicated:

| Component                                              | Volume               |                    |                       |
|--------------------------------------------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|
|                                                        | Plasmid DNA          | PCR product**      | Genomic DNA           |
| Water,* nuclease-free (Cat. No. H2981)                 | 15 µL                | 16 µL              | 30 µL                 |
| 10X FastDigest™ Green Buffer or 10X FastDigest™ Buffer | 2 µL                 | 3 µL               | 5 µL                  |
| DNA*                                                   | 2 µL<br>(up to 1 µg) | 10 µL<br>(~0.2 µg) | 10 µL<br>(up to 5 µg) |
| FastDigest enzyme                                      | 1 µL                 | 1 µL               | 5 µL                  |
| <b>Total volume</b>                                    | <b>20 µL</b>         | <b>30 µL</b>       | <b>50 µL</b>          |

1. Mix gently and spin down.
2. Incubate at 37°C in a heat block or water bath for 5 min.†
3. (Optional) Inactivate the enzyme.‡
4. If FastDigest Green Buffer was used, load a portion of the reaction mixture directly onto a gel.

#### Scaling up DNA digestion reactions

| DNA                                                  | 1 µg         | 2 µg         | 3 µg         | 4 µg         | 5 µg         |
|------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| FastDigest enzyme                                    | 1 µL         | 2 µL         | 3 µL         | 4 µL         | 5 µL         |
| 10X FastDigest Green Buffer or 10X FastDigest Buffer | 2 µL         | 2 µL         | 3 µL         | 4 µL         | 5 µL         |
| <b>Total volume</b>                                  | <b>20 µL</b> | <b>20 µL</b> | <b>30 µL</b> | <b>40 µL</b> | <b>50 µL</b> |

### Digestion of DNA with multiple enzymes

FastDigest enzymes allow for simultaneous digestion of DNA with two or more enzymes in one reaction.

- Use 1 µL of each enzyme and scale up the reaction conditions appropriately.
- The combined volume of all added enzymes should not exceed one-tenth of the total reaction volume.

### Reaction setup for digestion of multiple DNA samples

1. Pipette 2 µL of DNA\* into each tube.
2. Prepare a master mix for n + 1 samples.
3. Example of master mix for 10 samples:

|                                                      |                           |
|------------------------------------------------------|---------------------------|
| Water,* nuclease-free (Cat. No. H2981)               | (10 + 1) × 15 µL = 165 µL |
| 10X FastDigest Green Buffer or 10X FastDigest Buffer | (10 + 1) × 2 µL = 22 µL   |
| FastDigest enzyme                                    | (10 + 1) × 1 µL = 11 µL   |

4. Add 18 µL of master mix\* to tubes containing DNA.

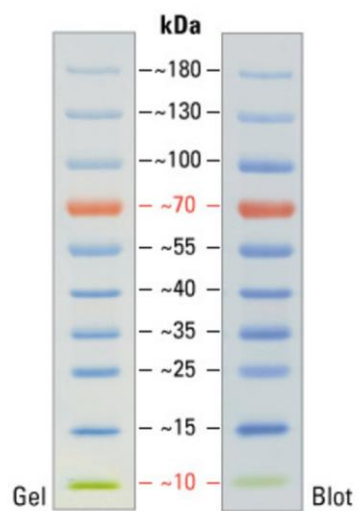
\* The volume of DNA can be adjusted depending on the DNA concentration. The volume of water and master mix should be adjusted to keep the indicated total reaction volume.

\*\* Water and buffer volumes are for unpurified PCR products.

† See the product information sheet for enzyme- and substrate-specific incubation times and enzyme inactivation conditions.

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

Slika 18: Navodila proizvajalca za uporabo restrikcijskih encimov.



**Slika 19: Standardna proteinska lestvica: PageRuler Prestained Protein Ladder.**

**Literatura:**

1. Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C. A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res.* 1988 Oct 25;16(20):9878.
2. Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* 2013 Aug;32(6):419–25.
3. [https://www.google.com/search?q=ctab&rlz=1C1GCEU\\_enSI822SI822&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiyr4SQsfffAhWbDmMBHcGGAnsQ\\_AUIDigB&biw=1920&bih=969#imgsrc=-skodchwc8toBM:](https://www.google.com/search?q=ctab&rlz=1C1GCEU_enSI822SI822&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiyr4SQsfffAhWbDmMBHcGGAnsQ_AUIDigB&biw=1920&bih=969#imgsrc=-skodchwc8toBM:)
4. [https://www.google.com/search?q=triton+x+100&rlz=1C1GCEU\\_enSI822SI822&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjD8farsfffAhUJkhQKHUj4DwQQ\\_AUIDigB&biw=1920&bih=969#imgsrc=rV\\_9L0Y8D1cYGM:](https://www.google.com/search?q=triton+x+100&rlz=1C1GCEU_enSI822SI822&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjD8farsfffAhUJkhQKHUj4DwQQ_AUIDigB&biw=1920&bih=969#imgsrc=rV_9L0Y8D1cYGM:)
5. Koonin EV, Wolf YI. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res.* 2008 Dec;36(21):6688–719.
6. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *J Biomed Biotechnol* 2009.
7. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Lysozyme&oldid=872356584>
8. Defence Mechanisms and Innate Immunity. *Biology Discussion.* 2016.
9. Stellwagen NC. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis.* 2009 Jun;30(Suppl 1):S188–95.
10. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol.* 2013 Mar;133(3):e6.
11. Coney R. Polymerase Chain Reaction: The Past, Present and Future [Internet]. *xxpresspcr.* 2017.
12. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 2014.
13. Kaur J, Kumar A, Kaur J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *Int J Biol Macromol.* 2018 Jan 1;106:803–22.
14. Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, Wende W. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Mar;62(6):685–707.
15. <https://socratic.org/questions/how-are-restriction-and-dna-ligase-enzymes-used-to-insert-a-foreign-gene-into-a->
16. [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012657\\_Silica\\_Bead\\_DNA\\_Gel\\_Extraction\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012657_Silica_Bead_DNA_Gel_Extraction_UG.pdf)

17. Different types of commercially available DNA gel extraction kit
18. Yoshida N, Sato M. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009 May 27;83(5):791.
19. Asif A, Mohsin H, Tanvir R, Rehman Y. Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation. *Front Microbiol* 2017.
20. Chan W-T, Verma CS, Lane DP, Gan SK-E. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Biosci Rep*
21. from: <https://da.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/bacterial-transformation-selection>
22. [https://www.google.com/search?rlz=1C1GCEU\\_enSI822SI822&biw=1920&bih=920&tbm=isch&sa=1&ei=W95BXMvzJ7CRrgTo46qADw&q=pET+expression+system&oq=pET+expression+system&gs\\_l=img.3..0i19j0i8i30i19.70697.75101..75372...0.0..0.92.1551.21.....1....1..gws-wiz-img.....35i39j0i67j0j0i30j0i30i19.Z9Oi6XVOVzs#imgsrc=9uLdyoUoSM3nzM:](https://www.google.com/search?rlz=1C1GCEU_enSI822SI822&biw=1920&bih=920&tbm=isch&sa=1&ei=W95BXMvzJ7CRrgTo46qADw&q=pET+expression+system&oq=pET+expression+system&gs_l=img.3..0i19j0i8i30i19.70697.75101..75372...0.0..0.92.1551.21.....1....1..gws-wiz-img.....35i39j0i67j0j0i30j0i30i19.Z9Oi6XVOVzs#imgsrc=9uLdyoUoSM3nzM:)
23. <http://ouopentextbooks.org/biochemical-methods/lab-8/>
24. Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: Walker JM, editor. *Basic Protein and Peptide Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 1994. p. 23–34. (Methods in Molecular Biology™).
25. Endō I, Nagamune T, Akita H, editors. *Nano/micro biotechnology*. Berlin ; New York: Springer; 2010. 270 p. (Advances in biochemical engineering/biotechnology).
26. <http://what-when-how.com/molecular-biology/m13-phage-molecular-biology/>