

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Dario Zrnec

Heterologna ekspresija gena koji kodira za protein SSB-L iz bakterije  
*Streptomyces coelicolor*

Zagreb, 2010.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za molekularnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Dušice Vujaklije, izv. prof. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2009./2010.

## Popis kratica

APS	amonijev peroksodisulfat
DMSO	dimetilsulfoksid
DTT	ditiotreitrol
EDTA	etildiamintetraoctena kiselina
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani broth
SDS	natrijev dodecilsulfat
TAE	Tris Acetate EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TBS	Tris Borate EDTA
TE	Tris EDTA

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Rod <i>Streptomyces</i></b>	<b>1</b>
1.1.1. Općenito o streptomicetima	1
1.1.2. <i>Streptomyces coelicolor</i>	3
<b>1.2. Protein SSB</b>	<b>4</b>
1.2.1. Općenito o proteinu SSB	4
1.2.2. Uloga proteina SSB u replikaciji DNA	5
1.2.3. Organizacija gena za protein SSB u prokariota	6
1.2.4. Fosforilacija proteina SSB	7
1.2.5. Kristalna struktura proteina SSB iz bakterije <i>S. coelicolor</i>	7
<b>2. Cilj rada</b>	<b>9</b>
<b>3. Materijali i metode</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Materijali</b>	<b>10</b>
3.1.1. Kemikalije	10
3.1.2. Mikroorganizam	11
3.1.3. Plazmidni vektor	11
3.1.4. Oligonukleotidne početnice	12
3.1.5. Hranjive podloge	13
3.1.6. Kompleti	13
3.1.7. Pufferi	13
3.1.8. Enzimi	14
3.1.9. Biljezi	14
3.1.10. Antibiotik	14
3.1.11. Protutijela	14
3.1.12. Boje	15
<b>3.2. Metode</b>	<b>16</b>
3.2.1. Lančana reakcija polimerazom	16
3.2.2. Elektroforeza molekula DNA u agaroznom gelu	17
3.2.3. Razgradnja molekula DNA pomoću restrikcijskih endonukleaza	18
3.2.4. Pročišćavanje molekula DNA	18
3.2.4.1. Pročišćavanje molekula DNA iz agaroznog gela	18
3.2.4.2. Pročišćavanje produkta PCR reakcije	18
3.2.4.3. Pročišćavanje plazmida iz prekončne kulture bakterijskih stanica <i>E. coli</i>	19
3.2.5. Ligacija fragmenata DNA	19
3.2.6. Koncentriranje otopine DNA	19
3.2.7. Priprema kompetentnih stanica bakterije <i>E. coli</i> za elektroporaciju	19
3.2.8. Transformacija bakterija <i>E. coli</i> metodom elektroporacije	20
3.2.9. Određivanje primarne strukture DNA	20

3.2.10. Bioinformatička analiza nukleotidnih slijedova molekula DNA	21
3.2.11. Indukcija gena <i>ssb-l</i> u bakteriji <i>E. coli</i>	21
3.2.12. SDS-PAGE	21
3.2.13. Detekcija proteina u poliakrilamidnom gelu	22
3.2.14. Western analiza	22
3.2.15. Detekcija kemoluminiscentnog signala na membrani	23
3.2.16. Obrada fotografija	23
<b>4. Rezultati</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Kloniranje gena <i>ssb-l</i> u vektor pET-15b</b>	<b>24</b>
4.1.1. Umnažanje gena <i>ssb-l</i> i dodavanje restrikcijskih mjesta pomoću PCR-a	24
4.1.2. Razgradnja vektora i PCR produkta restrikcijskim endonukleaza	25
4.1.3. Ligacijska smjesa	26
<b>4.2. Priprema i transformacija kompetentnih stanica bakterije <i>E. coli</i></b>	<b>27</b>
<b>4.3. Analiza transformanata</b>	<b>27</b>
4.3.1. Probiranje transformanata metodom PCR-a	27
4.3.2. Izolacija plazmida iz odabranih transformanata	28
4.3.3. Razgradnja odabranih plazmida restrikcijskim endonukleazama	29
4.3.4. Određivanje i analiza primarne strukture kloniranog gena <i>ssb-l</i>	30
<b>4.4. Ekspresija gena <i>ssb-l</i></b>	<b>32</b>
4.4.1. Ekspresija gena <i>ssb-l</i> u različitim sojevima bakterije <i>E. coli</i>	32
4.4.2. SDS-PAGE elektroforeza	32
4.4.3. Western analiza	33
<b>4.5. Rekloniranje gena <i>ssb-l</i> u novi plazmidni vektor pET-15b</b>	<b>34</b>
4.5.1. Izolacija plazmida pET-15b- <i>ssb-l</i> i pET-15b- <i>recA</i>	35
4.5.2. Restrikcijska razgradnja plazmida pET-15b- <i>recA</i> i pET-15b- <i>ssb-l</i>	35
4.5.3. Ligacija novog pET-15b i gena <i>ssb-l</i>	36
<b>4.6. Transformacija soja bakterije <i>E. coli</i></b>	<b>37</b>
<b>4.7. Analiza novih transformanata</b>	<b>37</b>
4.7.1. Izolacija plazmida iz odabranih transformanata	37
4.7.2. Restrikcijska analiza odabranih plazmida	38
<b>4.8. Ekspresija gena <i>ssb-l</i> kloniranog u novi vektor pET-15b</b>	<b>39</b>
4.8.1. Transformacija ekspresijskog soja bakterije <i>E. coli</i> i ekspresija gena <i>ssb-l</i>	39
4.8.2. Detekcija biosinteze proteina SSB-L pomoću SDS-PAGE elektroforeze	40
<b>5. Rasprava</b>	<b>41</b>
<b>6. Zaključci</b>	<b>44</b>
<b>7. Zahvale</b>	<b>45</b>
<b>8. Literatura</b>	<b>46</b>

**Sažetak**

**49**

**Summary**

**50**

## 1. Uvod

### 1.1. Rod *Streptomyces*

#### 1.1.1. Općenito o streptomicetima

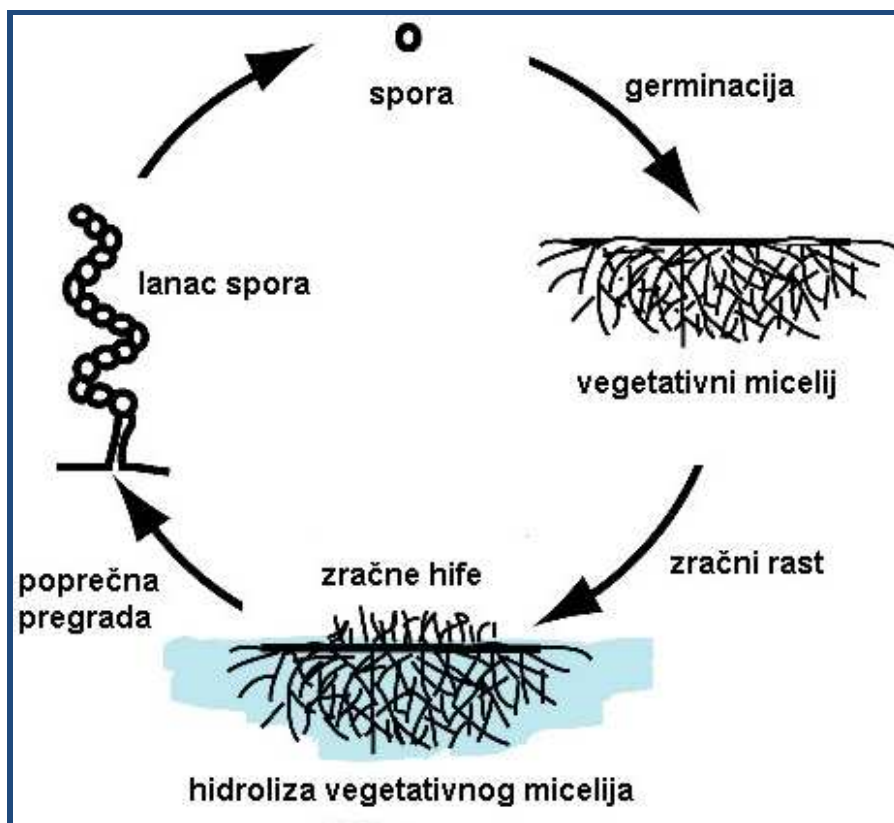
Streptomiceti su aerobne, gram-pozitivne, filamentozne bakterije tla s velikim biotehnološkim potencijalom (Birch i sur., 1990). Njihova klasifikacija prema tradicionalnoj taksonomiji prikazana je u tablici 1. Unutar roda *Streptomyces*, vrste se klasificiraju po različitim kriterijima: fiziološkim (proizvodnja primarnih i sekundarnih metabolita, korištenje različitih izvora ugljika i dušika), morfološkim (boja i oblik micelija i spore te građa stanične stijenke) i genetičkim (Williams i sur., 1983). Rod *Streptomyces* razvio se prije 450 milijuna godina kao jedan od prvih saprofitskih rodova bakterija. Genom streptomiceta čini linearna DNA (Wang i sur., 1999) karakterizirana visokim G-C udjelom nukleotidnih baza (~73 mol%).

**Tablica 1.** Klasifikacija bakterija roda *Streptomyces* (izvor: NCBI, 2010)

Carstvo	<i>Bacteria</i>
Koljeno	<i>Actinobacteria</i>
Razred	<i>Actinobacteria</i>
Red	<i>Actinomycetales</i>
Porodica	<i>Streptomycetaceae</i>
Rod	<i>Streptomyces</i>

Metabolizam streptomiceta podijeljen je u primarni i sekundarni. Primarni metabolizam predstavlja procese u stanici odgovorne za rast, preživljavanje i pribavljanje energije za izgradnju bakterije. Sinteza produkata primarnog metabolizma odvija se tijekom rasta stanica. Sekundarni metabolizam je, s druge strane, odgovaran za proizvodnju raznih ne esencijalnih organskih molekula koje se sintetiziraju u stacionarnoj fazi rasta (Bérdy, 2005). Najvažniji sekundarni metaboliti streptomiceta su antibiotici. Oko 50% komercijalno važnih prirodnih antibiotika s primjenom u humanoj medicini, agrikulturi i veterini potječe od streptomiceta (Hopwood i sur., 1995).

Životni ciklus streptomiceta započinje germinacijom/klijanjem jedne spore (Hardisson i sur., 1978). Germinacija se događa u povoljnim životnim uvjetima (Chater, 2006). Iz spore se počinje razvijati hifa (promjer 0,5-1  $\mu\text{m}$ ) koja pri vrhu raste i grana se tvoreći vegetativni micelij (Anderson i Wellington, 2001). Kada ponestane nutrijenata u mediju, stvaraju se zračne hife (sporofore) koje za rast koriste hranjive tvari dobivene hidrolizom vegetativnog micelija. Tijekom morfološke diferencijacije, bakterije sintetiziraju antibiotike kao obranu od drugih kompetitivnih mikroorganizama i razne pigmente (Chater, 2006). Nakon rasta, zračne hife se smatraju u spiralu i potom pri vrhu poprečno pregrade dajući lance jednokromosomskih spora koje sazrijevaju i raspršuju se. Nastale spore proklijat će u povoljnim uvjetima ponovno dajući vegetativni micelij (Anderson i Wellington, 2001). Opisani ciklus prikazan je na slici 1.

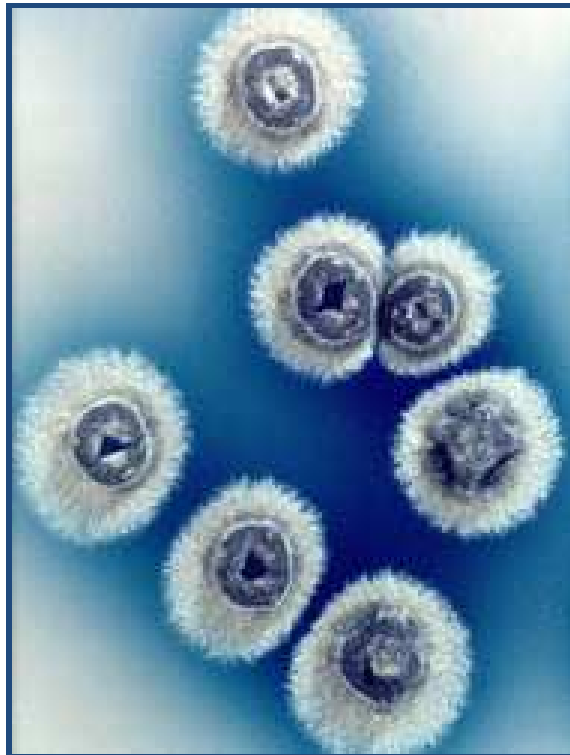


Slika 1. Životni ciklus streptomiceta (izvor: Kenyon College, 2010).



### 1.1.2. *Streptomyces coelicolor*

Modelni mikroorganizam iz roda *Streptomyces* je bakterija *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Slika 2). Njezin genom pripada skupini izrazito velikih sekvenciranih bakterijskih genoma. Sadrži 8 667 507 parova baza, 7825 gena, te 72,1% udio G-C parova baza (GNN, 2010; Wellcome Trust Sanger Institute, 2010). Bakterija *S. coelicolor* ime je dobila po antibiotiku aktinorodinu koji poprima karakterističnu plavu boju u neutralnom i bazičnom pH medija. (Hopwood, 1999).



**Slika 2.** Kolonije bakterije *Streptomyces coelicolor* s karakterističnim zračnim micelijem i sporama. Za plave prstene, koji okružuju kolonije, odgovoran je antibiotik aktinorodin koji se izlučuje tijekom stacionarne faze rasta bakterije (izvor: GNN, 2010).

## 1.2. Protein SSB

### 1.2.1. Općenito o proteinu SSB

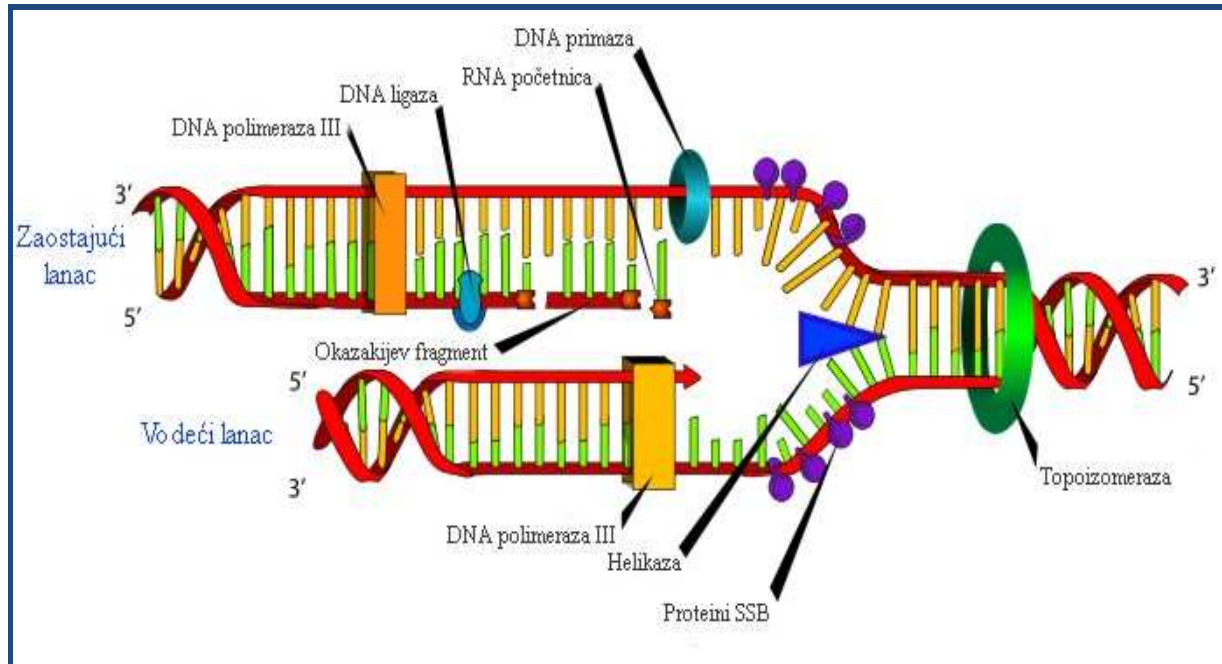
Proteini SSB (engl. *Single-Stranded DNA-Binding proteins*) sudjeluju u replikaciji, popravku i rekombinaciji DNA u svim organizmima (Lindner i sur., 2004). Istraživanja na DNA vezujućim proteinima započela su kasnih 60-tih godina, a 1979. godine identificiran je gen u bakteriji *E. coli* koji kodira za protein SSB, što je pokrenulo lavinu istraživanja u tom području (Meyer i Laine, 1990). Proteini SSB pronađeni su u raznih organizmima, ali unatoč i maloj homologiji u slijedu nukleotida, dokazano je da imaju slične uloge (Štefanić i sur., 2007). Proteine karakterizira iznimna stabilnost i otpornost na visoke temperature (Meyer i Laine, 1990), a zbog velike važnosti u očuvanju DNA integriteta, funkcionalni proteini SSB esencijalni su za život svake stanice (Štefanić i sur., 2007).

Protein SSB najbolje je istražen kod bakterije *E. coli* i služi kao modelni protein za proučavanje ostalih bakterijskih proteina SSB. U većini organizama poprima oblik homotetramera (Štefanić i sur., 2007). Jedan monomer proteina SSB iz bakterije *E. coli* sadrži 178 aminokiselinskih ostataka, te ima molekulsku masu 18,9 kDa (Meyer i Laine, 1990). Za usporedbu, protein SSB-L iz bakterije *S. coelicolor* ima molekulsku masu 19,9 kDa, a sadrži 199 aminokiselinskih ostataka (Štefanić i sur., 2007). U strukturi monomera razlikuju se 2 domene: DNA vezujuća domena na N-kraju proteina i slabo strukturirana domena na C-kraju preko koje protein ulazi u interakcije s enzimima važnim u metabolizmu DNA. DNA vezujuća domena nazvana je OB (oligonukleotid/oligosaharid/oligopeptid) domena i sadrži oko 100 aminokiselinskih ostataka. Struktura OB domene jako je očuvana u svih bakterija, dok je domena na C-kraju varijabilna (Štefanić i sur., 2009).

Kod eukariota otkriveno je da protein RPA (replikacijski protein) ima istu ulogu kao i bakterijski protein SSB. Protein RPA združuje se u stanici u heterotrimere koji sadrže šest OB domena, od kojih četiri vežu jednolančanu DNA. Ljudski RPA (hsRPA) identificiran je kao prvi eukariotski replikacijski protein A. (Wold i sur., 1997)

### 1.2.2. Uloga proteina SSB u replikaciji DNA

Replikacija molekule DNA u streptomiceta započinje vezanjem inicijacijskog proteina DnaA na izvorište replikacije linearnog kromosoma. Vezanje proteina DnaA omogućava vezanje DNA helikaze zvane DnaB koja koristi energiju ATP-a za dvostrano "odmotavanje" DNA lanaca i uspostavljanje takozvane replikacijske vilice (Meyer i Laine, 1990). Helikaznom aktivnošću proteina DnaB pucaju vodikove veze između antiparalelnih DNA lanaca, te nastaju jednolančane regije na koje se nespecifično i kooperativno vežu proteini SSB stabilizirajući jednolančane konformacije ne prikrivajući pritom nukleotidne baze (Berg i sur., 2002). Vezani proteini SSB štite jednolančanu DNA od razgradnje nukleazama, te potiču vezanje enzima primaze koji ulazi u interakcije s DnaB i drugim inicijacijskim proteinima tvoreći primosom. Djelovanjem enzima primaze, primosom sintetizira RNA početnicu na koju se veže holoenzim DNA polimeraza III elongirajući prethodno sintetiziranu početnicu. Proteini SSB sprječavaju tvorbu sekundarnih struktura koje bi smetale procesivnosti DNA polimeraze III, no netom prije prolaska polimeraze disociraju (Meyer i Laine, 1990). Jedan lanac DNA se sintetizira kontinuirano, a drugi diskontinuirano zbog svojstva DNA polimeraze da može sintetizirati novi lanac samo u 5'-3' smjeru. Nakon završetka sinteze određenog fragmenta na molekuli DNA, enzim topoizomeraza II uvodi negative superzavoje, što kao krajnji rezultat daje dvije identične molekule DNA (Berg i sur., 2002) (Slika 3). Uz opisane uloge proteina SSB u replikaciji DNA, predloženo je i da povećava točnost DNA polimeraze III, te da sudjeluju u njenom vezanju za jednolančanu DNA (Meyer i Laine, 1990).



**Slika 3.** Prikaz replikacije DNA u prokariota. Enzimi helikaza i topoizomeraza I "odmotavaju" DNA uzvojniju stvarajući replikacijsku vilicu. Proteini SSB se vežu na jednolančane regije DNA stabilizirajući nastalu strukturu. DNA polimeraza III sintetizira nove lance DNA u 5'-3' smjeru, a Okazakijski fragmenti nastali sintezom zaostajućeg lanca spajaju se pomoću DNA ligaze. (izvor: Cell Biology Wiki, 2010)

### 1.2.3. Organizacija gena za protein SSB u prokariota

2003. godine otkriveno je da bakterija *Bacillus subtilis* sadrži dva paralogna proteina koji se vežu za jednolančanu DNA: SSB i YwpH. Protein SSB jako je eksprimiran tijekom eksponencijalnog rasta bakterija. Njegova prisutnost esencijalna je za stanicu, a ekspresija je koregulirana s ekspresijama gena *rpsF* i *rpsR* koji kodiraju za ribosomalne proteine S6 i S18. S druge strane, protein YwpH nije esencijalan za stanicu i eksprimiran je samo u minimalnoj hranjivoj podlozi tijekom stacionarne faze rasta. S obzirom na ovo otkriće, bakterije se mogu podijeliti u četiri grupe ovisno o organizaciji gena *ssb* i broju njegovih paraloga. Prvoj grupi pripadaju bakterije s više paraloga proteina SSB i istom organizacijom položaja gena *ssb* kao kod bakterije *B. subtilis* (*rpsF-ssb-rpsR*). Druga grupa bakterija ima istu organizaciju gena *ssb* kao i prva, ali bakterije ne sadrže više od jednog proteina koji se veže za jednolančanu DNA. U treću grupu spadaju bakterije slične *E. coli* koje imaju samo jedan protein SSB, a gen *ssb*

smješten je pokraj gena *uvrA*. U četvrtu grupu ulaze sve ostale bakterije koje posjeduju gen *ssb* u drugim položajima na kromosomu. Iz ove podjele, može se zaključiti da bakterija *S. coelicolor* pripada prvoj grupi bakterija, te da ima više, točnije dva, paralogna proteina SSB. (Lindner i sur., 2004)

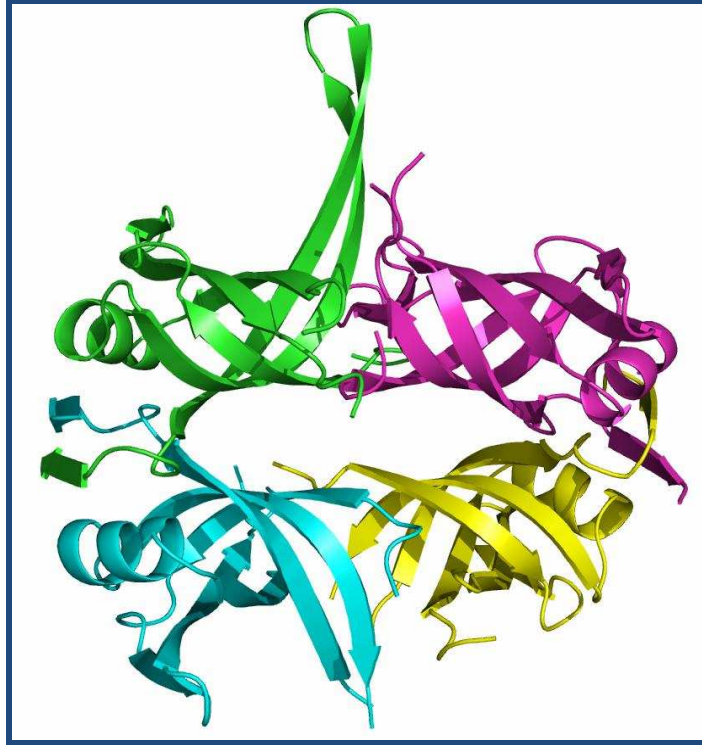
#### 1.2.4. Fosforilacija proteina SSB

Imunoafinitetnom kromatografijom izoliran je protein SSB iz bakterije *Streptomyces griseus* s fosforiliranim tirozinskim aminokiselinskim ostatkom. Od prije je poznato da su proteini SSB u eukariota regulirani fosforilacijom aminokiselinskih ostataka na Ser i Thr, no ovo je bio prvi dokaz fosforilacije proteina SSB u prokariotskim organizmima. Dok u streptomiceta još nije otkriven gen koji kodira za protein-tirozin-kinazu, kod bakterije *Bacillus subtilis* identificirana je protein-tirozin-kinaza YwqD. Pomoću te kinaze, u *in vitro* uvjetima, fosforilirana su dva paralogna proteina iz bakterije *B. subtilis* (SSB i YwpH). Tirozinski ostatak na položaju 82 identificiran je kao mjesto fosforilacije koja je odgovorna za porast afiniteta za jednolančanu DNA od čak 200 puta. Fosforilacija na tirozinskom ostatku proteina SSB također je uočena u bakterija *E. coli*, *S. coelicolor* i *B. subtilis* pri heterolognoj biosintezi proteina u bakteriji *E. coli*. Iz toga se zaključilo da je fosforilacija proteina SSB očuvana post-translacijska modifikacija kod gram-pozitivnih, ali i gram-negativnih bakterija. (Mijaković i sur., 2006)

#### 1.2.5. Kristalna struktura proteina SSB iz bakterije *S. coelicolor*

Kristalna struktura proteina SSB iz bakterije *E. coli* riješena je 1997. godine. To je ujedno bila i prva riješena kristalna struktura nekog proteina SSB, nakon koje su opisane i druge SSB strukture, uključujući od nedavno i bakterije *S. coelicolor* (Slika 4). Trodimenzionalna struktura otkriva konzerviranu OB domenu nađenu i u svim prethodno opisanim proteinima SSB, ali i varijacije u kvartarnoj strukturi slične kao i u bakteriji *Mycobacterium tuberculosis*. *Streptomyces* sp. i *Mycobacterium* sp. pripadaju koljenu *Actinobacteria*, te se može reći da su u dalekom srodstvu. No, uspoređujući strukture i aminokiselinske sljedove njihovih proteina

SSB uočena je velika sličnost, te se pretpostavlja da protein SSB ima sličnu konformaciju u svim G-C bogatim, gram-pozitivnim bakterija. (Štefanić i sur., 2009; Štefanić i sur., 2007)



**Slika 4.** Prikaz trodimenzionalne strukture proteina SSB-L iz bakterije *S. coelicolor* A3(2) (izvor: Štefanić i sur., 2009).

## 2. Cilj rada

Proteini SSB esencijalni su za život stanice i izučavaju se u mnogobrojnim laboratorijima diljem svijeta. Posebno su važne nove spoznaje o proteinima SSB patogenih organizama jer predstavljaju potencijal za razvoj novih anti-bakterijskih lijekova. Također bi bolje razumijevanje uloge bakterijskog proteina SSB u staničnoj DNA replikaciji i diobi moglo pomoći i boljem kontroliranju rasta bakterija tijekom biotehnoloških procesa

U Laboratoriju za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu kloniran je gen iz bakterije *Streptomyces coelicolor* A3(2) koji kodira za esencijalni protein SSB-L. Dokazana je fosforilacija proteina SSB-L, a nedavno je riješena i kristalna struktura istog proteina.

Za potrebe dosadašnjih istraživanja i izolacije metodom imunoafinitetne kromatografije, proteinu SSB-L dodano je na N-kraju šest histidina ("His-tag"). Cilj ovog rada bio je (i) reklonirati streptomicetni gen *ssb-l* u vektor pET-15b bez kodona za "His-tag", (ii) dokazati njegovu ekspresiju i (iii) detektirati biosintezu proteina SSB-L u bakteriji *E. coli*.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

- agaroz (Sigma)
- akrilamid (Serva)
- amonijev persulfat (Pharmacia Biotech)
- *Bacto Agar* (Difco)
- *Bacto Tryptone* (Difco)
- *Bacto Yeast Extract* (Difco)
- bisakrilamid (Serva)
- dimetilsulfoksid (Finnzymes)
- ditiotreitol (New England Biolabs)
- etanol (Kemika)
- glicerol (Kemika)
- izopropanol (Kemika)
- izopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid (Ambion)
- magnezijev klorid (Kemika)
- natrij-dodecil sulfat (Serva)
- natrijev acetat
- natrijev hidroksid (Kemika)
- natrijev klorid (Kemika)
- octena kiselina (Kemika)
- redestilirana voda
- saharoza (Kemika)
- tetrametiletilendiamin (Pharmacia Biotech)
- *Tween 20* (Sigma)



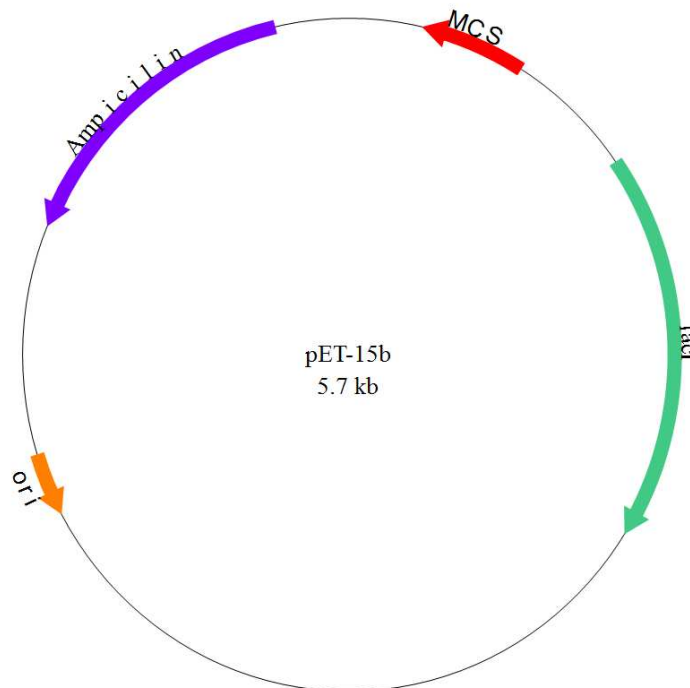
### 3.1.2. Mikroorganizam

U ovom radu korištena su tri soja bakterije *E. coli*:

- XL1-Blue genotipa: *endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 recA1 relA1 lac* [F' *proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)]
- BL21–Gold (DE3) genotipa: F<sup>-</sup> *ompT hsdS* (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup> *Tet*<sup>r</sup> *gal* λ(DE3) *endA Hte*
- NM522 genotipa: *supE thi-1* Δ(*lac-proAB*) Δ(*mcrB-hsdSM*)5 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) [F' *proAB* *lacI*<sup>q</sup>ZΔM15]

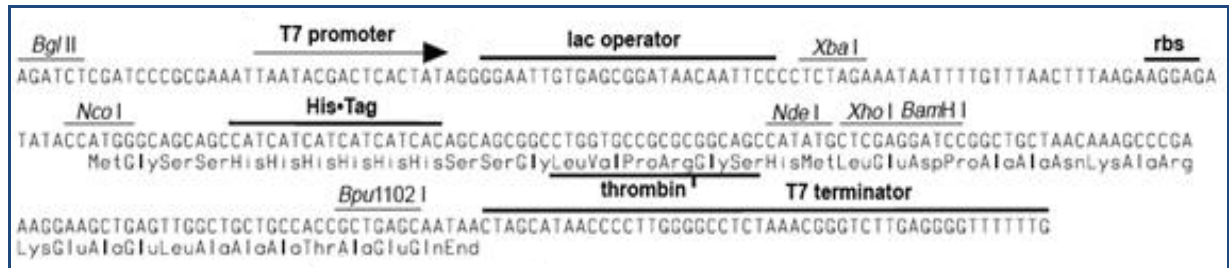
### 3.1.3. Plazmidni vektor

Plazmid pET–15b (Novagen) je velik 5708 pb. Sadrži gen za otpornost na ampicilin, gen *lacI* koji kodira za LacI represor, vlastito izvorište replikacije *ori*, te višestruko mjesto za kloniranje MCS (Slika 5)



Slika 5. Prikaz plazmidnog vektora pET-15b

Višestruko mjesto za kloniranje (Slika 6) sadrži promotor za vezanje T7 RNA polimeraze, *lac* operator na koji se može vezati produkt gena *lacI*, nukleotidni slijed na koji se veže ribosom pri translaciji transkripta (rbs, engl. *ribosom binding site*), "His-tag" (nukleotidni slijed koji kodira za šest aminokiselinskih ostataka histidina pomoću kojih se rekombinantni protein, nakon biosinteze, može lako pročistiti afinitetnom kromatografijom na nosaču s imobiliziranim metalom nikla), nukleotidni slijed koji kodira za mjesto vezanja proteina trombina, T7 terminatorski nukleotidni slijed odgovoran za završetak transkripcije, te sedam palindromskih nukleotidnih sljedova koje prepoznaju specifične restriksijske endonukleaze. U ovom radu su pri kloniranju korištene restriksijske endonukleaze *NcoI* i *BamHI*.



**Slika 6.** Prikaz višestrukog mjesta za kloniranje u plazmidnom vektoru pET-15b (Novagen)

### 3.1.4. Oligonukleotidne početnice

Oligonukleotidne početnice (Sigma), njihova namjena u eksperimentu, kao i slijed nukleotida navedeni su u tablici 2.

**Tablica 2.** Oligonukleotidne početnice

Ime početnice	Namjena	Nukleotidni slijed početnice
SSBLΔHisR	umnožavanje	5' GCCGGATCCTCAGAAGGGGGGCTCGTCCG 3'
SSBLΔHisF	umnožavanje	5' GCACCATGGCAGGCGAGACCGTCATCACGG 3'
T7R	sekvenciranje	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3'
pF-pET	sekvenciranje	5' CTATAGGGGAATTGTGAGCGG 3'

### 3.1.5. Hranjive podloge

Za uzgoj bakterije *E. coli* korištena je tekuća i kruta hranjiva podloga LB. Tekuća hranjiva podloga bila je sljedećeg sastava: 10 g/L *Bacto Tryptone*, 5 g/L *Bacto Yeast Extract* i 5 g/L natrijev klorid, dok je za krutu hranjivu podlogu dodano 15 g/L *Bacto Agar*. Obje podloge sterilizirane su u autoklavu pri temperaturi od 121 °C.

### 3.1.6. Kompleti

- *ECL Plus Western Blotting Detection System* (Amersham Biosciences)
- *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN)
- *QIAquick Gel Purification Kit* (QIAGEN)
- *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN)

### 3.1.7. Pufferi

- Puffer za prijenos na membranu (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glicin, 20% metanol)
- SDS-PAGE puffer (10 puta koncentrirana matična otopina: 30,3 g/L Tris-HCl, 144 g/L glicin, 10 g/L SDS)
- SDS-PAGE puffer za denaturaciju proteina (4 puta koncentrirana matična otopina: 8% SDS, 400 mM DTT, 200 mM Tris-HCl pH 6,8 i 40% glicerol)
- TAE puffer za elektroforezu DNA (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA)
- TBS puffer za Western analizu (0,15 M NaCl, 0,02 M Tris-HCl pH 7,5)
- TE puffer za resuspenziju plazmidne DNA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)

### 3.1.8. Enzimi

- *Taq* polimeraza (Fermentas) s pripadajućim puferom i magnezijevim sulfatom
- restrikcijske endonukleaze *NcoI* i *BamHI* (Fermentas) s pripadajućim puferima
- T4 DNA ligaza (Fermentas) s pripadajućim puferom
- ribonukleaza A (Sigma)

### 3.1.9. Biljezi

- *Mass Ruler DNA Ladder Mix* (Fermentas)
- *Precision Plus Protein Standard Unstained* (Fermentas)
- *Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope* (Fermentas)

### 3.1.10. Antibiotik

- ampicilin

### 3.1.11. Protutijela

- *anti-SSB* protutijela iz zeca (Amersham Biosciences)
- *anti-rabbit* protutijela (Amersham Biosciences)

### 3.1.12. Boje

- boja za praćenje elektroforeze DNA (6 puta koncentrirana matična otopina *MassRuler Loading Dye*, Fermentas), sastav: 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,03% bromfenol plavo, 60% glicerol, 60 mM EDTA
- Coomassie brilijant plavo (matična otopina 0,5 g/L *Coomassie Brilliant Blue R-250*, Sigma), sastav: 40% metanol, 10% octena kiselina, 0,025% boje brilijant plavo
- etidij bromid (koncentracija matične otopine 10 mg/mL, Boehringer Mannheim)

## 3.2. Metode

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

Lančana reakcija polimerazom (u daljnjem tekstu engleski akronim PCR) služi za umnažanje specifične regije molekule DNA u *in vitro* uvjetima. Pri umnažanju fragmenta DNA koriste se dvije početnice komplementarne s krajevima ciljne regije DNA. Reakcija se odvija u više ponavljajućih ciklusa: denaturacija kalupa DNA, specifično vezanje oligonukleotidnih početnica na kalup i sinteza komplementarnog lanca DNA. Standardna reakcijska smjesa volumena 25  $\mu\text{L}$  sadržavala je u konačnim koncentracijama 0,4 ng/ $\mu\text{L}$  plazmidne DNA koja je služila kao kalup u reakciji,  $0,8 \times 10^{-3}$   $\mu\text{M}$  svake od dviju oligonukleotidnih početnica, 200  $\mu\text{M}$  smjese deoksiribonukleotida, 0,0004 U/ $\mu\text{L}$  *Taq* polimeraze, PCR pufer, DMSO, 200  $\mu\text{M}$  magnezijevog klorida i redestiliranu vodu. Za provedbu reakcije korišten je uređaj *Progene* (Techne).

Metoda PCR-a na bakterijskim staničnim lizatima omogućava provjeru uspješnosti kloniranja gena bez prethodne izolacije plazmida iz prekonočne kulture transformiranih stanica bakterije *E. coli*. Kompetentne stanice bakterije *E. coli* transformirane su ligacijskom smjesom, te nacijepljene na krutu selektivnu hranjivu podlogu LB s antibiotikom ampicilinom. Nakon prekonočne inkubacije na 37°C, odabrani porasli transformanti sterilnom su čačalicom resuspendirani u 50  $\mu\text{L}$  redestilirane vode. Suspenzija je zatim inkubirana 10 minuta pri 95°C, te centrifugirana pri 13000 rpm (engl. *revolutions per minute*) u trajanju od jedne minute. Dobiveni supernatant korišten je kao kalup u PCR-u.

U ovom radu, PCR je korišten pri umnažanju željenog gena i prilikom provjeravanja uspješnosti kloniranja. Dijelovi i uvjeti oba PCR-a prikazani su u tablici 3.

**Tablica 3.** Dijelovi i uvjeti PCR reakcija

dijelovi PCR reakcije	umnažanje fragmenta DNA		PCR na staničnom lizatu	
	temperatura/°C	trajanje	temperatura/°C	trajanje
početna denaturacija	94	2 min	95	4 min
28 ciklusa:				
denaturacija lanaca	94	30 sek	94	1 min
vezanje početnica na kalup	62	30 sek	62	45 sek
sinteza komplementarnih lanaca	72	70 sek	72	1 min
završno produživanje lanaca	72	4 min	72	5 min

### 3.2.2. Elektroforeza molekula DNA u agaroznom gelu

Elektroforeza je metoda razdvajanja fragmenata DNA koja se zasniva na različitoj pokretljivosti fragmenata u električnom polju ovisno o njihovoj molekularnoj masi. Na pokretljivost DNA, osim veličine, utječe i koncentracija agaroze u gelu, sastav pufera za elektroforezu, jačina napona, te konformacija molekule. Put koji molekula DNA prijeđe u električnom polju obrnuto je proporcionalan logaritmu njene mase. U ovom radu korišten je 1% agarozni gel pripremljen s puferom TAE kojemu je dodano 0,5 µg/mL etidij bromida. Uzorci DNA pomiješani su s bojom za praćenje elektroforeze, te nanoseni u jažice pripremljenog gela. Elektroforeza je provedena pri naponu od 60 V. (izvor istosmjerne struje: ELPHO *Power Supply*, HVD Life Sciences). Položaj molekula DNA u gelu bio je vidljiv zahvaljujući interkalaciji etidij bromida, između baza molekula DNA, koji pod UV svjetlom valne duljine 312 nm fluorescira. Fluoresciranje etidij bromida omogućilo je fotografiranje gela pomoću uređaja *Imagemaster VDS* (Amersham Pharmacia Biotech). Elektroforeza molekula DNA korištena je za provjeru veličina plazmida, određivanje koncentracije molekula DNA u otopini, analize restrikcijskih i ligacijskih smjesa, provjeru uspješnosti PCR reakcija, te pročišćavanje fragmenata DNA dobivenih razgradnjom s restrikcijskim endonukleazama. Kao biljeg pri elektroforezi korišten je *Mass Ruler DNA Ladder Mix* (Fermentas).

### 3.2.3. Razgradnja molekula DNA pomoću restrikcijskih endonukleaza

Restrikcijske endonukleaze su bakterijski enzimi koji cijepaju dvolančanu DNA unutar specifičnih palindromskih sekvenci, ostavljajući tupe ili ljepljive 5' ili 3' krajeve. U ovom radu, prilikom razgradnje plazmida i PCR produkta, korištene su *NcoI* i *BamHI* restrikcijske endonukleaze (Fermentas):

*BamHI* 5' G↓GATCC 3'

*NcoI* 5' C↓CATGG 3'

Reakcije razgradnje provedene su u otopini pufera za restrikciju u uvjetima koje preporuča proizvođač.

### 3.2.4. Pročišćavanje molekula DNA

#### 3.2.4.1. Pročišćavanje molekula DNA iz agaroznog gela

Molekule DNA izrezane su u komadiću agaroznog gela nakon elektroforetskog razdvajanja molekula i pročišćene pomoću kompleta *QIAquick Gel Purification Kit* (QIAGEN) prema uputama proizvođača. Metoda je korištena pri pripremi fragmenata DNA za ligacijsku smjesu.

#### 3.2.4.2. Pročišćavanje produkta PCR reakcije

Fragmenti dobiveni PCR reakcijom pročišćeni su pomoću kompleta *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) prema uputama proizvođača.



### 3.2.4.3. Pročišćavanje plazmida iz prekonoćne kulture bakterijskih stanica *E. coli*

Umnoženi plazmidi iz prekonoćnih kultura bakterijskih stanica *E. coli* pročišćeni su pomoću kompleta *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) i metodom opisanom u sveučilišnom priručniku "Metode u molekularnoj biologiji" (Ambriović-Ristov i sur., 2007).

### 3.2.5. Ligacija fragmenata DNA

Ligacija fragmenata DNA je postupak u kojem se, pomoću enzima DNA ligaze, povezuju krajevi molekula DNA nastali prethodnom razgradnjom restriksijskim endonukleazama. Ligacijska smjesa sadržavala je fragment DNA s genom *ssb-l* i linearizirani plazmidni vektor pET-15b (u molarnom omjeru 3,5:1), T4 DNA ligazu (0,3 jedinice/ $\mu$ L ligacijske smjese) i pripadajući pufer. Smjesa je inkubirana preko noći pri temperaturi od 16°C.

### 3.2.6. Koncentriranje otopine DNA

Metoda je korištena po potrebi u slučaju male koncentracije DNA u otopini, s ciljem povećavanja koncentracije. Otopine su koncentrirane u uređaju DNA 120 *SpeedVac Concentrator* (Thermo). Postupak koncentriranja korišten je pri pripremi lineariziranog plazmidnog vektora i fragmenta s genom *ssb-l* za ligacijsku smjesu, te pri izolaciji plazmidnih vektora iz prekonoćnih kultura stanica bakterije *E. coli* metodom iz sveučilišnog priručnika "Metode u molekularnoj biologiji" (Ambriović-Ristov i sur., 2007).

### 3.2.7. Priprema kompetentnih stanica bakterije *E. coli* za elektroporaciju

Priprema kompetentnih stanica započela je prekonoćnim uzgojem bakterijskih stanica *E. coli* u tekućoj hranjivoj podlozi LB. Prekonoćna kultura razrijeđena je 100 puta i uzgajana pri temperaturi od 37°C i potresanju od 250 rpm. Tijekom uzgoja provedena su kontinuirana spektrofotometrijska mjerenja optičke gustoće pri valnoj duljini od 600 nm. Kada je iznos apsorbancije dosegao vrijednost od 0,5 (stanice u ranoj ekspanzionalnoj fazi rasta), uzgoj je prekinut i stanice su bile hladene na ledu 15 minuta uz potresanje. Ohlađene stanice

centrifugirane su 15 minuta, pri 4000 g i 4°C. Dobiveni talog dva puta je ispran sterilnom hladnom redestiliranom vodom (prvo s jednim početnim volumenom kulture, pa kasnije s pola početnog volumena), te jedanput u ledenom 10% glicerolu (petina početnog volumena kulture) u istim uvjetima centrifugiranja. Prije posljednjeg centrifugiranja stanice su ostavljene da odstoje na ledu 20 minuta. Bakterijske stanice su zatim resuspendirane u minimalnom volumenu sterilnog 10% glicerola. Dobivena kultura razdijeljena je u alikvot od 40 µL, naglo smrznuta u tekućem dušiku i pohranjena na -80°C.

### 3.2.8. Transformacija bakterija *E. coli* metodom elektroporacije

Elektroporacija je metoda koja koristi kratki visokovoltazni puls koji stvara pore u bakterijskoj staničnoj stijenci. Nastanak kratkotrajnih pora omogućava ulazak strane DNA u bakterijsku stanicu. U prethodno pripremljeni alikvot kompetentnih stanica bakterije *E. coli* u volumenu od 40 µL, dodan je 1 µL suspenzije plazmida ili ligacijske smjese. Dobivena smjesa stavljena je u ohlađenu kivetu za elektroporaciju, te podvrgnuta električnom pulsu od 2500 V, otporu od 400 Ω i kapacitetu od 25 µF. Za elektroporaciju korišten je uređaj *Electroporator* 2510 (Eppendorf). Nakon elektroporacije, stanice su regenerirane jedan sat u tekućoj hranjivoj podlozi LB (37°C, 250 rpm), te nacijepljene na krutu selektivnu hranjivu podlogu LB s antibiotikom ampicilinom.

### 3.2.9. Određivanje primarne strukture DNA

Određivanje primarne strukture gena *ssb-l*, kloniranog u plazmidni vektor pET-15b, provedeno je u DNA servisu na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Analiza je izvršena na uređaju ABI PRISM 3100-*Avant* DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems) uz softver za analizu sekvenci, te komplet ABI PRISM *BigDye Terminator v3.1 Ready reaction Cycle Sequencing Kit*. Smjesa za određivanje primarne strukture gena *ssb-l*, konačnog volumena 13 µL, sadržavala je: 1 µL T7R ili pF-pET početnice (koncentracija matične otopine 3,2 pmol/µL), 10 µL plazmidnog vektora s kloniranim genom *ssb-l* i 2 µL redestilirane vode.

### 3.2.10. Bioinformatička analiza nukleotidnih slijedova molekula DNA

Za sravnjavanje nukleotidnih slijedova fragmenata DNA, korišten je program *ClustalW* na EMBL (EMBL-EBI, 2010) elektroničkoj bazi podataka.

### 3.2.11. Indukcija gena *ssb-l* u bakteriji *E. coli*

Gen *ssb-l* se u plazmidnom vektoru pET-15b nalazi pod kontrolom jakog T7 promotora. Plazmid sadrži gen koji kodira za LacI represor koji se u mediju bez laktoze veže na *lac* operator sprječavajući pritom transkripciju gena *ssb-l*. Stanice su uzgajane u 30 mL tekuće hranjive podloge LB u koju je dodano 30  $\mu$ L antibiotika ampicilina koncentracije 1M i 600  $\mu$ L prekonoćne kulture bakterijskih stanica *E. coli* transformiranih plazmidom s ugrađenim genom *ssb-l* ispravnog slijeda. Uzgoj je vršen pri 30°C uz potresanje od 250 rpm. Svakih pola sata mjerena je optička gustoća kulture stanica na spektrofotometru pri valnoj duljini od 600 nm. Kada je optička gustoća dosegla vrijednost od 0,4, kultura stanica bila je u ranoj eksponencijalnoj fazi rasta. U tom trenutku u kulturu je dodan induktor IPTG (konačna koncentracija 1 mM) koji se vezao na LacI represor mijenjajući mu konformaciju. LacI represor je u tom trenutku disocirao s *lac* operona, čime je omogućena transkripcija gena *ssb-l*. Nakon dodavanja IPTG-a kultura stanica uzgajana je tri sata, a uzorci su uzimani svakih sat vremena uključujući i uzorak neposredno prije dodavanja IPTG-a. Učinkovitost indukcije gena *ssb-l* provjerena je pomoću SDS-PAGE elektroforeze.

### 3.2.12. SDS-PAGE

Jednodimenzionalnom diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS PAGE) razdvajaju se prethodno denaturirani proteini na osnovi razlike u njihovim molekularnim masama. Denaturacija je provedena tretmanom s puferom za denaturaciju proteina kroz 10 minuta pri temperaturi od 95°C. U SDS-PAGE elektroforezi korištena su dva gela: gel za sabijanje i gel za razdvajanje. Gel za sabijanje sastojao se od 5% otopine akrilamida i bisakrilamida (maseni omjer 29:1), 0,125M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS i 0,1% TEMED, dok se gel za razdvajanje sastojao od 12% otopine akrilamida i

bisakrilamida (maseni omjer 29:1), 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% APS i 0,1% TEMED. Gel s nanesenim uzorcima stavljen je u kadicu za elektroforezu (*Mini-PROTEAN II*, Bio Rad) i uronjen u SDS-PAGE pufer. Na gel je primijenjen napon od 150 V, koji je nakon sabijanja uzoraka povećan na 180 V. U elektroforezi je korišten biljeg *Precision Plus Protein Standard Unstained* (Fermentas).

### 3.2.13. Detekcija proteina u poliakrilamidnom gelu

Nakon provedene SDS-PAGE elektroforeze proteini su detektirani otopinom koja je sadržavala boju Coomassie briljant plavo, octenu kiselinu i metanol. Coomassie briljant plavo je anionska boja koja se, uz pomoć octene kiseline, nespecifično veže za proteine u gelu. Gel je nakon bojanja podvrgnut odbojavanju s otopinom 10% octene kiseline i 10% izopropanola s ciljem micanja viška boje iz gela. Proteini na gelu prepoznati su po plavim vrpčama na bistroj površini.

### 3.2.14. Western analiza

Western analiza je metoda koja služi za detekciju specifičnih proteina u uzorku. Proteini su prvo separirani pomoću SDS-PAGE elektroforeze, nakon koje su vrpce proteina elektrotransferom (*Mini Trans-Blot*, Bio-Rad), pri naponu od 100 V, tijekom jednog sata, prenesene na *Hybond-P* PVDF membranu (Amersham Biosciences). Za transfer je korišten pufer sastava: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin i 20% metanol, a cijeli postupak opisan je u podpoglavlju 11.3.2.1. sveučilišnog priručnika "Metode u molekularnoj biologiji" (Ambriović-Ristov i sur., 2007). Nakon prijenosa proteina, membrana je na sat vremena uronjena u otopinu pufera TBS s 0,1% detergentom *Tween 20* i 3% albuminom govedeg seruma (*Albumine Bovine Fraction V*, Serva). Membrana je zatim isprana tri puta u trajanju od jedne minute s puferom TBS koji je sadržavao 0,1% *Tween 20*. Nakon ispiranja membrana je inkubirana s primarnim *anti-SSB* zečjim protutijelima kroz jedan i pol sat u puferu TBS koji je sadržavao 0,1% *Tween 20* i albumin govedeg seruma. Primarna protutijela razrijeđena su 10000 puta s obzirom na matičnu otopinu. Nakon inkubacije s primarnim protutijelima,

membrana je ispirana tri puta u trajanju od 5 minuta s puferom TBS koji je sadržavao 0,1% *Tween* 20, te inkubirana jedan sat u istoj otopini s 10000 puta razrijeđenim sekundarnim zečjim protutijelima (*anti-rabbit*). Sekundarna protutijela vezala su se na primarna preko konstantnih Fc regija, a sekundarno protutijelo sadržavalo je konjugirani enzim peroksidazu iz hrena. Prije detekcije, membrana je isprana tri puta u trajanju od 10 minuta u puferu TBS s 0,1% *Tween* 20.

### 3.2.15. Detekcija kemoluminiscentnog signala na membrani

Kemoluminiscentnost je emisija svjetla čiju pojavu rezultira neka kemijska reakcija. Kao supstrat za enzim peroksidazu iz hrena, vezanu na sekundarno protutijelo, korištena je otopina dobivena miješanjem 500  $\mu$ L otopine A i 12,5  $\mu$ L otopine B (*ECL Plus Western Blotting Detection System*). Otopina sadrži luminol i vodikov peroksid koji djelovanjem enzima peroksidaze daje produkt koji luminiscira. Dobivena otopina nanescena je na membranu koja je bila zatvorena u kazeti koja nije propuštala danju svjetlost. Supstrat je inkubiran na membrani u trajanju od 5 minuta nakon čega je membrana, u potpunom mraku, izložena filmu za autoradiografiju (*Hyperfilm ECL*, Amersham Biosciences) u trajanju od dvije minute. Nakon toga, membrana je stavljena u otopinu razvijaača (*Kodak processing chemicals for autoradiography films*, *GBX developer/replenisher*, Sigma) do pojave signala na filmu, te isprana destiliranom vodom i fiksirana u fiksiru *XAF3* (3M).

### 3.2.16. Obrada fotografija

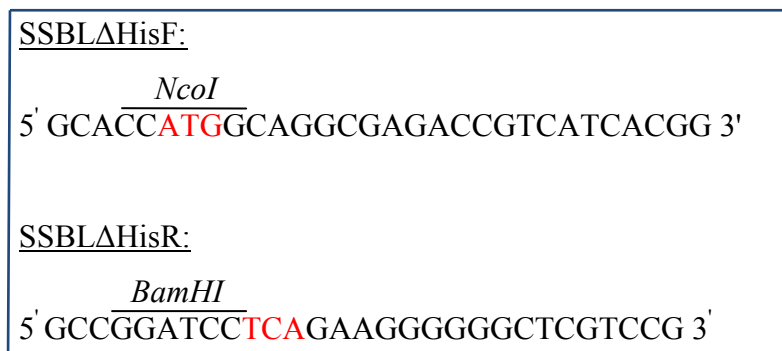
Za obradu fotografija korišteni su programi *ACDSee 10 Photo Manager* i *Corel PHOTO-PAINT X3*.

## 4. Rezultati

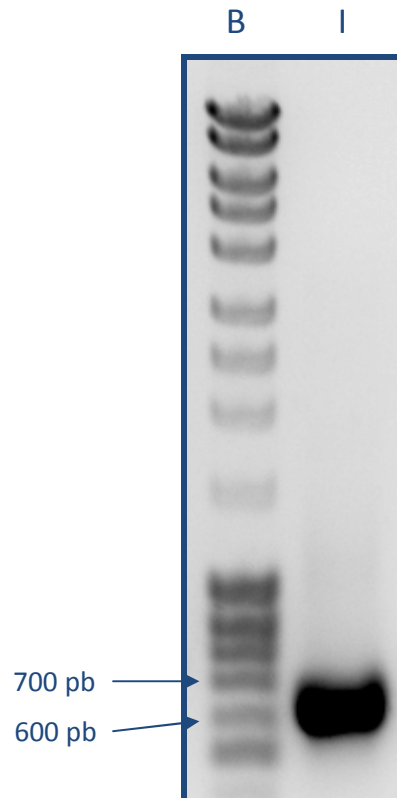
### 4.1. Kloniranje gena *ssb-l* u vektor pET-15b

#### 4.1.1. Umnažanje gena *ssb-l* i dodavanje restrikcijskih mjesta pomoću PCR-a

Prilikom umnožavanja gena *ssb-l*, kao kalup korišten je konstrukt pQE-30-*ssb-l* priređen u prethodnim istraživanjima Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. U PCR reakciji korištene su početnice SSBLΔHisF i SSBLΔHisR. Početnica SSBLΔHisF sintetizirana je da na početku gena *ssb-l* doda restrikcijsko mjesto za restrikcijsku endonukleazu *NcoI*, dok početnica SSBLΔHisR nizvodno od nukleotidnog slijeda TGA (stop kodon) dodaje restrikcijsko mjesto za *BamHI* (Slika 7). Uvjeti i dijelovi PCR-a opisani su u poglavlju 3.2.1., a uspješnost PCR reakcije, te veličina umnoženog fragmenta provjereni su elektroforezom (poglavlje 3.2.2.) na 1% agaroznom gelu (Slika 8). Veličina PCR produkta trebala je biti 614 pb.



**Slika 7.** Nukleotidni slijedovi početnica SSBLΔHisF i SSBLΔHisR s označenim mjestima za vezanje restrikcijskih endonukleaza *NcoI* i *BamHI*. Start (ATG) i stop (TCA) kodon označeni su crvenom bojom.

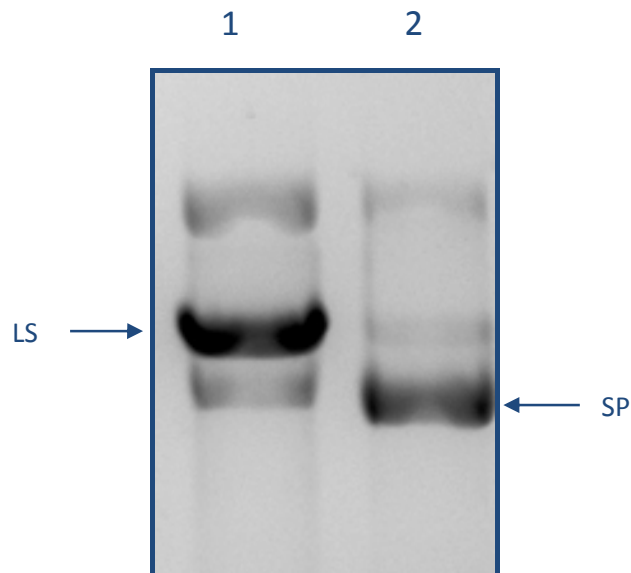


**Slika 8.** Produkt PCR reakcije. Biljeg *Mass Ruler DNA Ladder Mix* označen je slovom "B", a PCR produkt slovom "I". Veličine fragmenata biljega kreću se od 500 do 10000 pb, a posebno su označeni fragmenti veličina 600 i 700 pb.

#### 4.1.2. Razgradnja vektora i PCR produkta restrikcijskim endonukleaza

Za razgradnju vektora pripremljena je restrikcijska smjesa konačnog volumena 25  $\mu$ L koja je sadržavala plazmid pET-15b (Slika 5), restrikcijske endonukleaze *NcoI* i *BamHI* (20 jedinica/ $\mu$ L) s pripadajućim puferom, te redestiliranu vodu. Restrikcijska smjesa za razgradnju PCR produkta konačnog volumena 55  $\mu$ L sadržavala je fragment DNA s genom *ssb-l*, restrikcijske endonukleaze s pripadajućim puferom i redestiliranu vodu. Reakcije razgradnje provedene su pri 37°C, a uspješnost je provjerena elektroforezom na agaroznom gelu (Slika 9). Uspješnost razgradnje PCR produkta nije bilo moguće provjeriti elektroforezom zbog premale razlike u parovima baza između nerazgrađenog i razgrađenog fragmenta, a pročišćen je metodom opisanom u poglavlju 3.2.4.2. Nakon provjere uspješnosti

razgradnje, pripremljen je preparativni agarozni gel iz kojega je izoliran željeni linearizirani vektor metodom opisanom u poglavlju 3.2.4.1.



**Slika 9.** Razgradnja vektora pET-15b restrikcijским endonukleazama *NcoI* i *BamHI*. Uzorak 1 predstavlja vektor pET-15b nakon razgradnje restrikcijским endonukleazama, a uzorak 2 nativni nerazgrađeni vektor pET-15b. (LS-linearizirani vektor, SP-superzavijena forma vektora)

#### 4.1.3. Ligacijska smjesa

Nakon razgradnje restrikcijским endonukleazama, pripravljena je ligacijska smjesa s ciljem spajanja nastalih krajeva vektora pET-15b s krajevima fragmenta DNA koji je sadržavao gen *ssb-l*. Ligacijska smjesa konačnog volumena 15  $\mu$ L sadržavala je oko 60 ng lineariziranog vektora, približno 30 ng fragmenta DNA i T4 DNA ligazu s pripadajućim puferom.



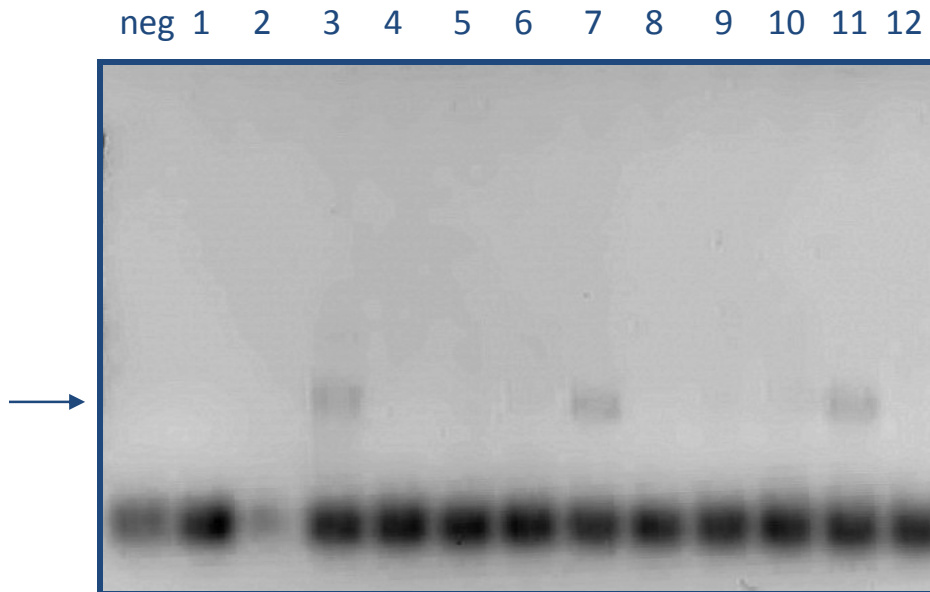
## 4.2. Priprema i transformacija kompetentnih stanica bakterije *E. coli*

Kompetentne stanice bakterije *E. coli* soja XL1-Blue pripremljene su metodom opisanom u poglavlju 3.2.7. Bakterijske stanice transformirane su s 1  $\mu$ L ligacijske smjese metodom elektroporacije (poglavlje 3.2.8.), te nacijepljene na krutu selektivnu hranjivu podlogu LB s dodatkom ampicilina. Na takvoj selektivnoj podlozi mogu rasti samo one bakterijske stanice u koje je ušao plazmid pET-15b koji nosu gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin. Na hranjivoj podlozi je nakon prekonocnog uzgoja izbrojano 12 transformanata. Učinkovitost transformacije bila je  $1,5 \times 10^3$  transformanata/ $\mu$ g linearizirane plazmidne DNA.

## 4.3. Analiza transformanata

### 4.3.1. Probiranje transformanata metodom PCR-a

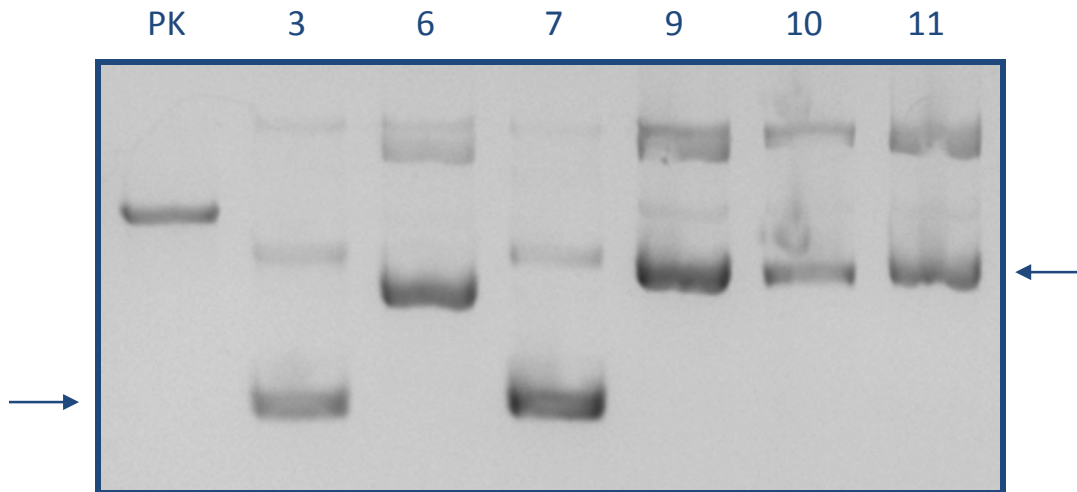
PCR reakcija na lizatu kolonija korištena je u svrhu provjere prisutnosti gena *ssb-l* u 12 poraslih transformanata. Metoda je opisana u poglavlju 3.2.1., a za reakciju korištene su početnice SSBL $\Delta$ HisF i SSBL $\Delta$ HisR. Rezultati PCR-a provjereni su elektroforezom na agaroznom gelu, a pozitivna PCR-a reakcija dobivena je samo u transformantima 3, 7 i 11 (Slika 10).



**Slika 10.** PCR reakcija na lizatu kolonija. Uzorci su označeni brojem transformanta, a negativna proba označena je s "neg". Strelica označava fragmente DNA željene veličine.

#### 4.3.2. Izolacija plazmida iz probranih transformanata

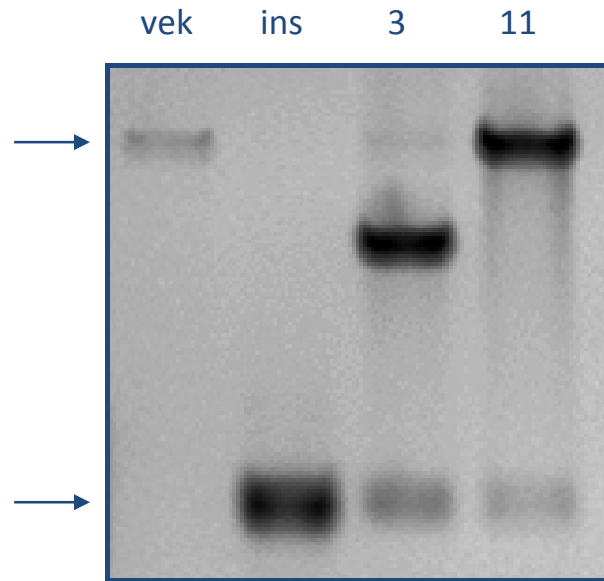
Plazmidi su izolirani iz prekonocnih kultura transformanata 3, 6, 7, 9, 10 i 11 pomoću metode opisane u poglavlju 3.2.4.3. Veličine plazmida provjerene su elektroforezom na agaroznom gelu, a plazmid pET-15b, razgrađen restriksijskim endonukleazama *NcoI* i *BamHI*, korišten je kao pozitivna kontrola. Linearizirani plazmid s insertom treba biti veći od razgrađenog plazmida pET-15b iz razloga što bi trebao sadržavati gen *ssb-I*. U plazmidnim izolatima probranih transformanata takav plazmid nije primijećen, kao što prikazuje slika 11. Plazmidi 3 i 11 bili su različitih veličina pa su uzeti za daljnju analizu.



**Slika 11.** Analiza plazmida izoliranih iz probranih transformanata. Uzorci plazmida označeni su brojem transformanta iz kojeg su izolirani, a plazmid pET-15b razgrađen restrikcijским endonukleazama *NcoI* i *BamHI* označen je s "PK". Strelice označavaju veličine plazmida uzetih za daljnju analizu.

#### 4.3.3. Razgradnja odabranih plazmida restrikcijским endonukleazama

Provedena je restrikcijška analiza plazmida izoliranih iz transformanata 3 i 11. Plazmidi su razgrađeni restrikcijским endonukleazama *NcoI* i *BamHI*, a za provjeru veličina nastalih fragmenata korišteni su razgrađeni vektor pET-15b i fragment DNA s genom *ssb-l*. Rezultati elektroforeze na agaroznom gelu prikazani su na slici 12. Usporedbom veličina fragmenata, zaključeno je da plazmid izoliran iz transformanta 11 sadrži fragmente odgovarajućih veličina. Plazmidu 11 je radi provjere rezultata određen slijed nukleotida kloniranog gena *ssb-l*.



**Slika 12.** Restriksijska analiza plazmida izoliranih iz transformanata 3 i 11. Plazmid pET-15b razgrađen restriksijskim endonukleazama *NcoI* i *BamHI* označen je oznakom "vek", fragment DNA s genom *ssb-l* označen je s "ins", a uzorci plazmida razgrađenih restriksijskim endonukleazama označeni su brojem transformanta iz kojeg su izolirani. Strelice označavaju željene veličine fragmenata.

#### 4.3.4. Određivanje i analiza primarne strukture kloniranog gena *ssb-l*

Primarna struktura gena *ssb-l* u plazmidu 11 određena je prema opisu u poglavlju 3.2.9. Dobiveni nukleotidni slijed sravnjen je sa slijedom nukleotida gena *ssb-l* iz bakterije *S. coelicolor* nađenom u NCBI (NCBI, 2010) elektroničkoj bazi podataka. Za sravnjavanje slijedova korišten je program *ClustalW* na EMBL (EMBL, 2010) elektroničkoj bazi podataka. Rezultat sravnjavanja prikazan je na slici 13, a određena primarna struktura gena *ssb-l* u plazmidu 11 u potpunosti je identična slijedu nukleotida nađenom u NCBI bazi podataka.

	<u><b>NcoI</b></u>	
<i>ssb-l</i>	CC <b>ATG</b> GCGAGACCGTCATCACGGTCGTCGGCAATCTTGTGCGACACCCCGAGTGC	60
plazmid11	CC <b>ATG</b> GCGAGACCGTCATCACGGTCGTCGGCAATCTTGTGCGACACCCCGAGTGC	60
	*****	
<i>ssb-l</i>	GCTTACCCCGTCCGGTGC GGCCGTCGCGAAGTTCCGCGTCGCGTCGACTCCCCGCACCT	120
plazmid11	GCTTACCCCGTCCGGTGC GGCCGTCGCGAAGTTCCGCGTCGCGTCGACTCCCCGCACCT	120
	*****	
<i>ssb-l</i>	TGCACCGCCAGACGAACGAGTGAAGGACGGCGAAAGCCTCTTCCTGACCTGCTCGGTCT	180
plazmid11	TGCACCGCCAGACGAACGAGTGAAGGACGGCGAAAGCCTCTTCCTGACCTGCTCGGTCT	180
	*****	
<i>ssb-l</i>	GGCGTCAGGCGGCGGAGAACGTCGCCGAGTCGCTTCAGCGAGGCATGCGCGTCATCGTGC	240
plazmid11	GGCGTCAGGCGGCGGAGAACGTCGCCGAGTCGCTTCAGCGAGGCATGCGCGTCATCGTGC	240
	*****	
<i>ssb-l</i>	AGGGCCGGCTGAAGCAGCGGTCTTACGAGGACCGTGAGGGCGTCAAGCGCACGGTCTACG	300
plazmid11	AGGGCCGGCTGAAGCAGCGGTCTTACGAGGACCGTGAGGGCGTCAAGCGCACGGTCTACG	300
	*****	
<i>ssb-l</i>	AGCTGGACGTCGACGAGGTCGGCGCCAGCCTGCGCAGCGCCACGGCCAAGGTACCAAGA	360
plazmid11	AGCTGGACGTCGACGAGGTCGGCGCCAGCCTGCGCAGCGCCACGGCCAAGGTACCAAGA	360
	*****	
<i>ssb-l</i>	CCTCGGGCCAGGGCCGCGGCGCCAGGGCGGTTACGGCGGCGGTGGCGGCGCCAGGGTG	420
plazmid11	CCTCGGGCCAGGGCCGCGGCGCCAGGGCGGTTACGGCGGCGGTGGCGGCGCCAGGGTG	420
	*****	
<i>ssb-l</i>	GCGGCGGCTGGGGCGGCGGCCCGGTGGCGGCCAGCAGGGCGGCGGCGCTCCGGCCGACG	480
plazmid11	GCGGCGGCTGGGGCGGCGGCCCGGTGGCGGCCAGCAGGGCGGCGGCGCTCCGGCCGACG	480
	*****	
<i>ssb-l</i>	ACCCCTGGGCGACTGGCGGGGCTCCCGCCGGTGGCCAGCAGGGTGGCGGCGGCCAGGGTG	540
plazmid11	ACCCCTGGGCGACTGGCGGGGCTCCCGCCGGTGGCCAGCAGGGTGGCGGCGGCCAGGGTG	540
	*****	
<i>ssb-l</i>	GCGGCGGCTGGGGCGGTTGGCTCCGGCGGCGGTGGCGGCTACTCGGACGAGCCCCCTT	598
plazmid11	GCGGCGGCTGGGGCGGTTGGCTCCGGCGGCGGTGGCGGCTACTCGGACGAGCCCCCTT	598
	*****	
	<u><b>BamHI</b></u>	
<i>ssb-l</i>	CT <b>GAGGATCC</b> 608	
plazmid11	CT <b>GAGGATCC</b> 608	
	*****	

**Slika 13.** Svrnjavanje slijeda nukleotida gena *ssb-l* iz bakterije *S. coelicolor* (oznaka "*ssb-l*") s primarnom strukturom gena *ssb-l* iz plazmida 11 (oznaka "plazmid11"). Crvenom bojom označeni su start (ATG) i stop (TGA) kodon, a zelenom restrikcijska mjesta za restrikcijske endonukleaze *NcoI* i *BamHI*.

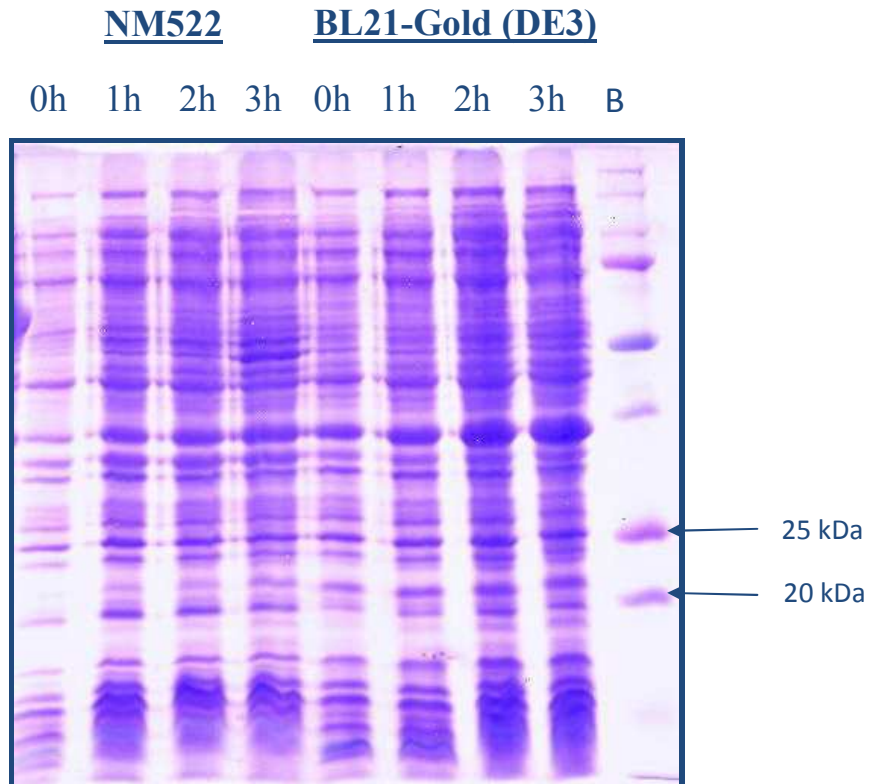
#### **4.4. Ekspresija gena *ssb-l***

##### 4.4.1. Ekspresija gena *ssb-l* u različitim sojevima bakterije *E. coli*

Za ekspresiju gena koji kodira za protein SSB-L korištena su dva ekspresijska soja bakterije *E. coli*: NM522 i BL21–Gold (DE3). Svaki soj transformiran je s plazmidom 11 (poglavlje 3.2.8.). Odabran je po jedan porasli transformant za svaki soj, te su uzgojene prekonoćne kulture stanica. Indukcije gena *ssb-l* opisana je u poglavlju 3.2.11.

##### 4.4.2. SDS-PAGE elektroforeza

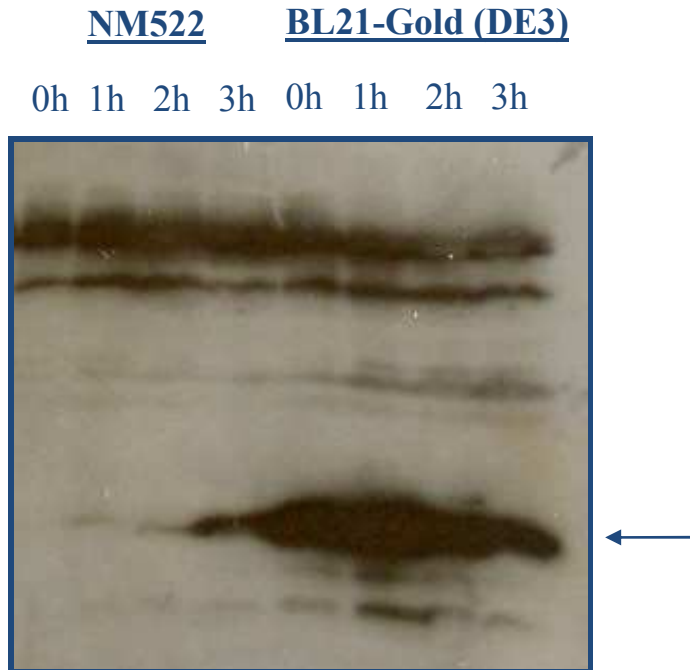
Učinkovitost biosinteze proteina SSB-L provjerena je SDS-PAGE elektroforezom opisanom u poglavlju 3.2.12. Molekulska težina proteina SSB-L je 19,9 kDa. Tijekom ovog eksperimenta, kao što je vidljivo iz slike 14, nije bilo moguće odrediti da li je došlo do biosinteze rekombinantnog proteina SSB-L, pa je za provjeru korištena Western analiza.



**Slika 14.** SDS-PAGE elektroforeza. Biljeg *Precision Plus Protein Standard Unstained* označen je slovom "B". Veličine njegovih fragmenata kreću se od 10 do 250 kDa, a posebno su označeni fragmenti veličina 20 i 25 kDa. Za ekspresiju gena *ssb-l* korištena su dva ekspresijska soja bakterije *E. coli*. Uzorci su nakon indukcije gena *ssb-l* uzimani svakih sat vremena, uključujući i uzorak neposredno prije dodavanja IPTG-a.

#### 4.4.3. Western analiza

Svrha Western analize, opisane u poglavlju 3.2.14., bila je provjera biosinteze rekombinantnog proteina SSB-L u dva ekspresijska soja bakterije *E. coli*. Rezultat kemoluminiscencije (poglavlje 3.2.15.) prikazan je na slici 15. Signal je detektiran u svim uzorcima soja BL21–Gold (DE3), pa se može zaključiti da je došlo do biosinteze željenog proteina, ali u manjim razmjerima od očekivanih.



**Slika 15.** Western analiza rekombinantnog proteina SSB-L. Na slici su označena imena sojeva korištenih za ekspresiju gena *ssb-l*, te vremena uzoraka. Strelica označava pozitivan signal (protein SSB-L).

#### **4.5. Rekloniranje gena *ssb-l* u novi plazmidni vektor pET-15b**

Zbog male biosinteze proteina SSB-L, odlučeno je reklonirati gen *ssb-l* u isti ekspresijski vektor pET-15b iz drugog izvora. Gen *ssb-l* rekloniran je zbog sumnje da je došlo do neke mutacije u prvotnom vektoru koja je sprječavala veću biosintezu proteina. Genu *ssb-l* je u prethodnim eksperimentima detektiran pravilan slijed nukleotida, a za novi ekspresijski vektor pET-15b bilo je poznato da je dao visoke prinose proteina RecA u prijašnjim istraživanjima Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković.

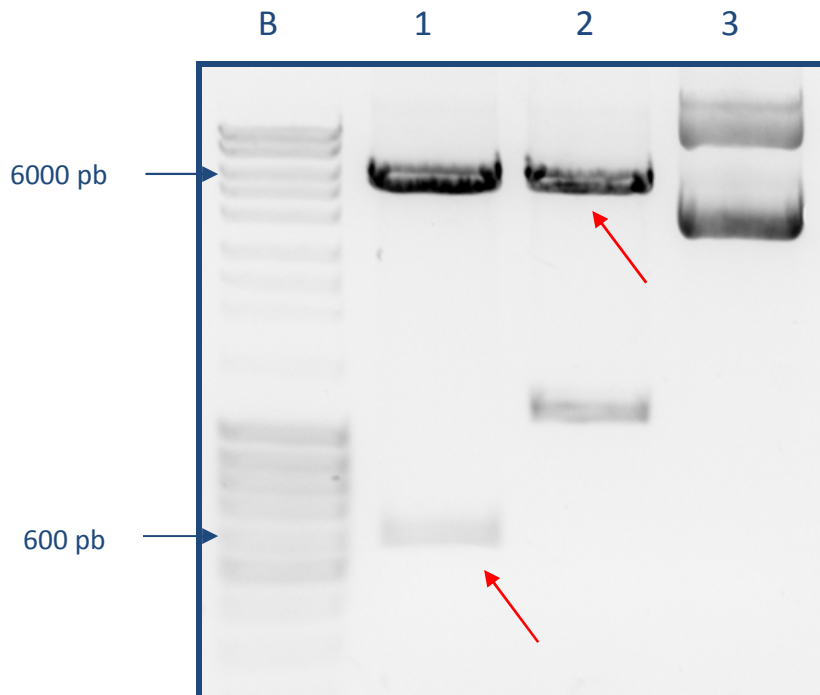


#### 4.5.1. Izolacija plazmida pET-15b-*ssb-l* i pET-15b-*recA*

S novim ekspresijskim vektorom pET-15b koji je sadržavao klonirani gen *recA*, te plazmidom 11 (izoliranim iz klona 11) s kojim je dobivena mala biosinteza proteina SSB-L u prethodnom eksperimentu, transformirane su metodom elektroporacije (poglavlje 3.2.8.) kompetentne stanice (poglavlje 3.2.7.) soja XL1-Blue bakterije *E. coli*. Za izolaciju oba plazmida, odabran je po jedan porasli transformant s krute selektivne podloge LB s ampicilinom. Odabrane kolonije nacijepnjene su u 50 mL tekuće selektivne hranjive podloge LB s ampicilinom, a plazmidi su izolirani metodom opisanom u poglavlju 3.2.4.3.

#### 4.5.2. Restriksijska razgradnja plazmida pET-15b-*recA* i pET-15b-*ssb-l*

Smjesa za restriksijsku razgradnju plazmida pET-15b-*recA* konačnog volumena 40  $\mu$ L sadržavala je: 20  $\mu$ L prethodno izoliranog plazmida, restriksijske endonukleaze *NcoI* i *BamHI* s pripadajućim puferom, te redestiliranu vodu. Restriksijska smjesa za razgradnju plazmida pET-15b-*ssb-l* istog konačnog volumena sadržavala je: 25  $\mu$ L plazmida izoliranog iz klona 11, iste restriksijske endonukleaze s pripadajućim puferom, te redestiliranu vodu. Uspješnost restriksijske razgradnje provjerena je elektroforezom na agarozom gelu (Slika 16), nakon čega je pripremljen preparativni agarozni gel iz kojega su, metodom opisanom u poglavlju 3.2.4.1., izolirani linearizirani novi vektor i fragment s genom *ssb-l*.



**Slika 16.** Razgradnja plazmida pET-15b-*recA* i pET-15b-*ssb-l* pomoću restrikcijskih endonukleaza *NcoI* i *BamHI*. Biljeg *Mass Ruler DNA Ladder Mix* označen je slovom "B", a posebno su označeni fragmenti veličina 6000 pb i 600 pb. Razgrađeni plazmid pET-15b-*ssb-l* označen je s "1", razgrađeni plazmid pET-15b-*recA* s "2", a ne razgrađeni plazmid pET-15b-*ssb-l* s "3". Crvene strelice označavaju izolirane fragmente.

#### 4.5.3. Ligacija novog pET-15b i gena *ssb-l*

Radi spajanja krajeva željenih fragmenata pripravljena je ligacijska smjesa konačnog volumena 13  $\mu\text{L}$  koja je sadržavala: linearizirani novi vektor pET-15b u koncentraciji od oko 4,6  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , gen *ssb-l* u koncentraciji od oko 2  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , te T4 DNA ligazu s pripadajućim puferom. Ligacija je provedena pri 16 °C u trajanju od 4 sata.

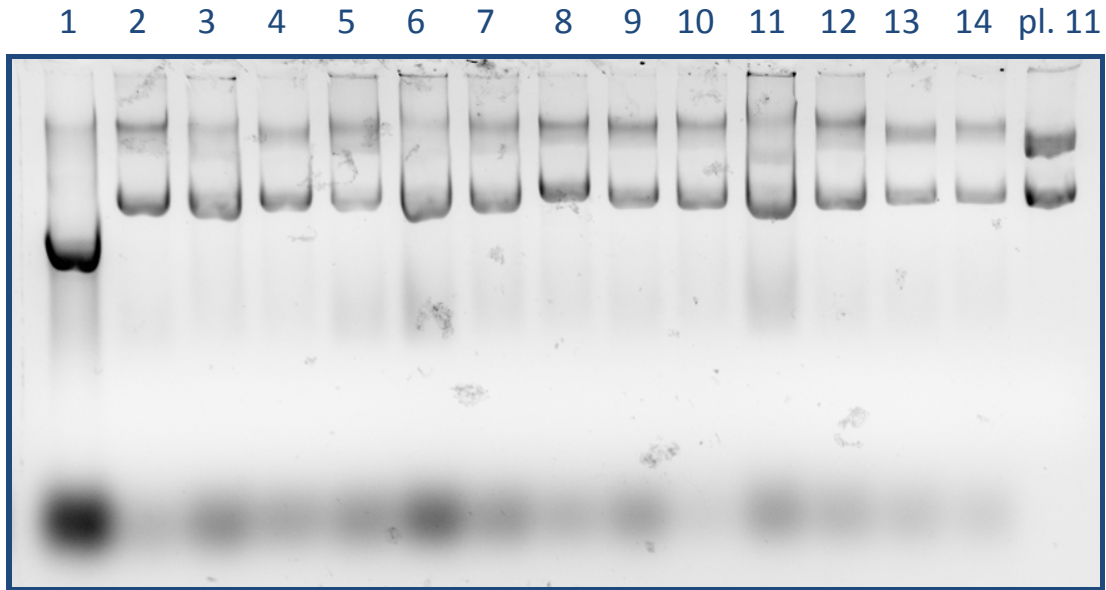
#### **4.6. Transformacija soja bakterije *E. coli***

S prethodno pripremljenom ligacijskom smjesom transformirane su, metodom elektroporacije (poglavlje 3.2.8.), kompetentne stanice (poglavlje 3.2.7.) soja XL1-Blue bakterije *E. coli*. Nakon elektroporacije, transformirane stanice nacijepljene su na krutu selektivnu podlogu LB s ampicilinom.

#### **4.7. Analiza novih transformanata**

##### 4.7.1. Izolacija plazmida iz odabranih transformanata

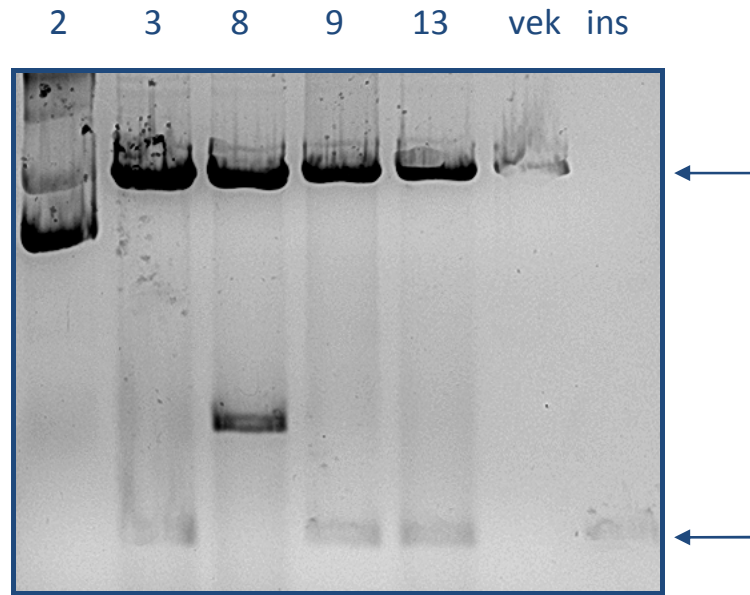
Odabrano je 14 transformanata, naraslih na krutoj selektivnoj podlozi LB s ampicilinom, iz kojih su izolirani plazmidi metodom opisanom u poglavlju 3.2.4.3. Veličine izoliranih plazmida uspoređene su sa plazmidom 11 (izoliranim iz klona 11), a analiza je izvršena elektroforezom na agaroznom gelu prikazanom na slici 17. Plazmidi su zbog razlika u veličini podijeljeni u grupe, a po jedan predstavnik svake grupe uzet je za daljnju analizu. Za daljnju analizu uzeti su plazmidi izolirani iz transformanata 2, 3, 8, 9 i 13.



**Slika 17.** Usporedba veličina plazmida izoliranih iz odabranih transformanata poraslih na selektivnoj krutoj podlozi LB s ampicilinom. Plazmidi su označeni brojem transformanta iz kojeg su izolirani, a veličine plazmida uspoređene su sa plazmidom izoliranim iz klona 11 (oznaka "pl. 11")

#### 4.7.2. Restriksijska analiza odabranih plazmida

Odabranih pet plazmida razgrađeni su restriksijskim endonukleazama *NcoI* i *BamHI* (Slika 18). Dobiveni fragmenti uspoređeni su s odgovarajućim veličinama lineariziranog vektora pET-15b i fragmenta s genom *ssb-l*. Zaključeno je da plazmidi 3, 9 i 13 sadrže fragmente odgovarajućih veličina.



**Slika 18.** Restrikcijaska analiza pet odabranih plazmida. Plazmidi su označeni brojem transformanta iz kojeg su izolirani. Linearizirani vektor pET-15b označen je s "vek", a fragment s genom *ssb-l* s "ins". Strelice označavaju željene veličine fragmenata.

#### 4.8. Ekspresija gena *ssb-l* kloniranog u novi vektor pET-15b

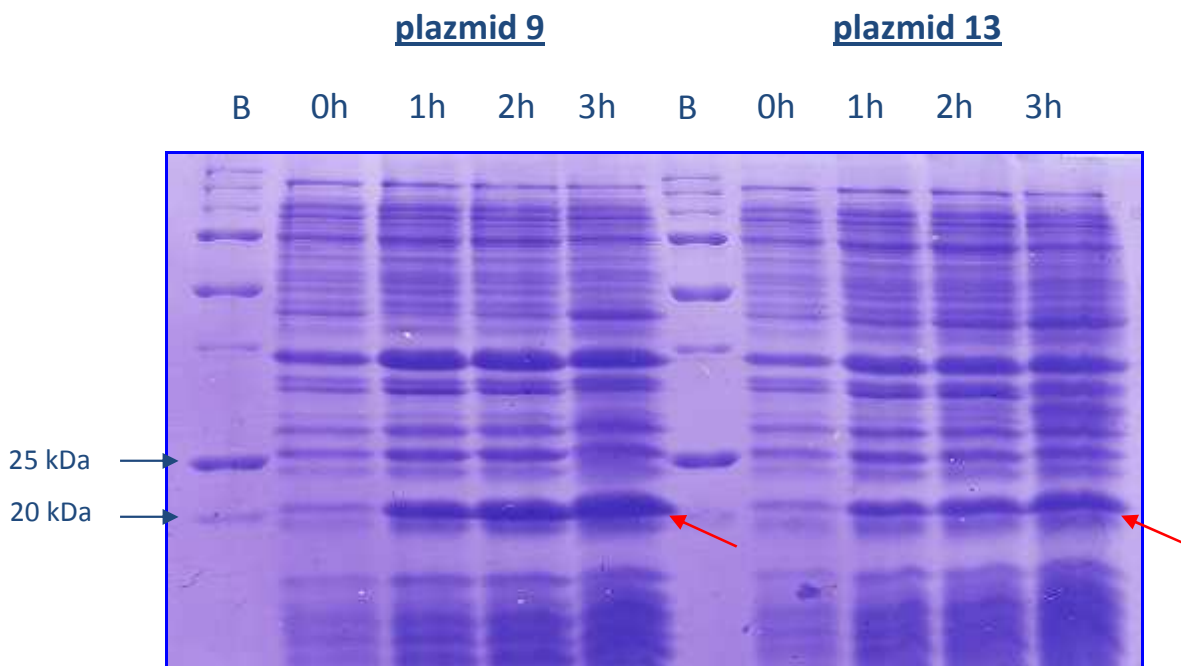
##### 4.8.1. Transformacija ekspresijskog soja bakterije *E. coli* i ekspresija gena *ssb-l*

Kompetentne stanice ekspresijskog soja BL21-Gold (DE3) bakterije *E. coli* transformirane su, metodom elektroporacije (poglavlje 3.2.8.), s plazmidima 9 i 13. Transformirane stanice nacijepljene su na krutu selektivnu podlogu LB s ampicilinom, te je odabran po jedan porasli transformant za svaki korišteni plazmid. Odabrani transformanti nacijepljeni su u tekuću selektivnu podlogu LB s ampicilinom, a indukcija ekspresije gena *ssb-l* provedena je postupkom opisanim u poglavlju 3.2.11.

## 4.8.2. Detekcija biosinteze proteina SSB-L pomoću SDS-PAGE elektroforeze

Učinkovitost biosinteze proteina SSB-L provjerena je SDS-PAGE elektroforezom opisanom u poglavlju 3.2.12. Primijećena je biosinteza proteina SSB-L u obje kulture stanica, ekspresijskog soja BL21-Gold (DE3) bakterije *E. coli*, transformiranih različitim plazmidima (Slika 19). U usporedbi s biosintezom proteina SSB-L u prethodnom eksperimentu s plazmidom 11 (Slika 14), biosinteza je znatno veća s novim plazmidima. Vidljivo je da se količina proteina SSB-L, prema očekivanjima, povećava ovisno o proteklom vremenu nakon dodavanja induktora IPTG-a u kulturu transformiranih stanica bakterije *E. coli*.

Ovim je dokazana pretpostavka da je došlo do neke mutacije u plazmidu 11 (izoliranom iz klona 11) koja je spriječila veću biosintezu proteina SSB-L. Znatno veća biosinteza proteina SSB-L dobivena je s novim plazmidima konstruiranim rekloniranjem gena *ssb-l* u plazmidni vektor pET-15b iz drugog izvora.



**Slika 19.** SDS-PAGE elektroforeza. Biljeg *Precision Plus Protein Standard Unstained* označen je slovom "B", a posebno su označeni fragmenti veličina 20 i 25 kDa. Biosinteza proteina SSB-L provedena je u ekspresijskom soju BL21-Gold bakterije *E. coli* s plazmidima 9 i 13 izoliranim iz transformanata istih oznaka. Tijekom ekspresije gena *ssb-l* uzeta su četiri uzorka u vremenima 0h, 1h, 2h i 3h. Crvene strelice označavaju protein SSB-L.

## 5. Rasprava

Streptomiceti su bakterije kompleksne morfologije i životnog ciklusa, a njihova velika važnost u biotehnologiji potječe iz činjenice da imaju izuzetno veliki genetički kapacitet za proizvodnju antibiotika. Uz antibiotike, bakterije roda *Streptomyces* su i veliki izvor anti-tumorskih agenasa, komercijalno važnih enzima i bioaktivnih molekula, što ih čini vrlo bitnim organizmima u temeljnim i primijenjenim istraživanjima (Kumari i sur., 2006). Modelni organizam roda *Streptomyces* je bakterija *Streptomyces coelicolor* A3(2).

Funkcija i strukturne karakteristike bakterijskog proteina SSB najbolje su istražene na modelnom proteinu SSB izoliranom iz bakterije *E. coli* (Meyer i Laine, 1990). Mnogo godina se zna da je ovaj protein esencijalan za život stanice i da tijekom različitih procesa veže, i time štiti, jednolančanu DNA. Novijim istraživanjima dokazano je da proteini SSB ulaze i u niz interakcija s enzimima važnim u metabolizmu DNA, mijenjajući im pritom aktivnosti. Tako se pokazalo da je uloga proteina SSB puno kompleksnija nego što se prije mislilo (Shereda i sur., 2008). Ove nove spoznaje još više su potaknule istraživanja na proteinima SSB iz različitih bakterija, na njihovim post-translacijskim modifikacijama, strukturama i interakcijama. Očekuje se da će rezultati ovih istraživanja biti važni za razumijevanje temeljnih staničnih procesa, ali isto tako da će dovesti do primjene. Kako je protein SSB ključan za replikaciju DNA, odnosno staničnu diobu, pretpostavljeno je da bi detaljno razumijevanje post-translacijskih modifikacija (Mijaković i sur, 2006) i interakcija proteina SSB s proteinima replikacijske vilice moglo dovesti do otkrića koja bi nam omogućila bolju kontrolu ili inhibiciju bakterijskog rasta. Tako bi ove spoznaje mogle imati veliku primjenu u inhibiciji rasta patogenih bakterija, odnosno u medicini.

U prethodnim istraživanjima Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, izoliran je protein SSB-L, dokazana je njegova post-translacijska modifikacija, kloniran je gen, a nedavno je proteinu određena i kristalna struktura. Izučavanje proteina SSB iz streptomiceta mogu biti interesantna iz nekoliko razloga. Kao što je prije napomenuto streptomiceti su biotehnoški važni proizvođači anti-mikrobnih supstanci, te je stoga i važno

izučavanje njihovih staničnih procesa. Drugo, kristalna struktura proteina SSB-L iz bakterije *S. coelicolor* A3(2) (Štefanić i sur., 2009) pokazala je izrazito veliku sličnost sa strukturom proteina SSB iz patogenih bakterija roda *Mycobacterium*, pa ovaj protein može biti dobar model za istraživanja koja bi u konačnici mogla imati i medicinsku primjenu.

Za potrebe dosadašnjih istraživanja i brzog pročišćavanja proteina SSB-L afinitetnom kromatografijom, na protein je tehnikama genetičkog inženjerstva dodano 6 aminokiselinskih ostataka histidina. Prije obavljene rezultati pokazali su da ovi histidini ne sprječavaju stvaranje homotetramera u bakterijskoj stanici, ni post-translacijsku modifikaciju (Mijaković i sur., 2006; neobjavljeni rezultati Laboratorija za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković). Kako bi se usporedili afiniteti vezanja proteina SSB-L, sa i bez "His-tag-a", za jednolančanu DNA, bilo je potrebno reklonirati gen *ssb-l* bez purifikacijskog biljega. Razumijevanje procesa vezanja proteina SSB-L za jednolančanu DNA jedan je od koraka u studiji funkcionalnosti ovog proteina.

Metodama opisanim u poglavlju rezultati, dobiven je plazmid pET-15b s pravilno kloniranim genom *ssb-l*. Tim plazmidom transformirani su ekspresijski sojevi NM522 i BL21-Gold (DE3) bakterije *E. coli*, te je u njima provedena ekspresija gena *ssb-l*. Uspješnost biosinteze proteina SSB-L u ekspresijskim sojevima provjerena je SDS-PAGE elektroforezom. Iz rezultata elektroforeze, vidljivih na slici 14, nije bilo moguće odrediti da li je došlo do biosinteze željenog proteina, te je iz tog razloga napravljena Western analiza. Western analiza korištena je iz razloga jer je jako osjetljiva metoda koja omogućava detekciju malih količina proteina u staničnom lizatu. Rezultat analize, vidljiv na slici 15, jasno prikazuje prisutnost proteina SSB-L, ali samo u soju BL21-Gold (DE3) bakterije *E. coli*, te u puno manjoj količini nego što je pri planiranju eksperimenta bilo očekivano. Razlog zašto je biosinteza primijećena samo u ovom bakterijskom soju vjerojatno leži u tome što ovaj soj nema Lon ni OmpT proteaze. Kloniranje je ponovljeno, te pošto je dobiven identični rezultat isključene su pogreške u metodama. Pretpostavljeno je da vektor pET-15b sadrži mutaciju u promotorskoj regiji koja onemogućava veću biosintezu proteina SSB-L u heterolognom sustavu. Mutacije u samom genu *ssb-l* su isključene iz razloga što je tome genu prethodno određen pravilan slijed nukleotida. Također je isključena mogućnost mutacije u slijedu nukleotida za koji se veže



ribosom pri translaciji transkripta, pošto je prilikom sravnjivanja slijedova (poglavlje 4.3.4.) ustanovljeno da je Shine-Dalgrano slijed nukleotida bio ispravan. S obzirom da je izolacija pokazala kako prinos plazmida ne odstupa od uobičajenog, zaključeno je da izvorište replikacije (*ori*) nije mutirano, te da je najvjerojatnije došlo do mutacije u samoj promotorskoj regiji. Radi provjere te pretpostavke, gen *ssb-l* rekloniran je u isti vektor pET-15b, ali iz drugog izvora. Za ovaj vektor znalo se da je u prijašnjim eksperimentima dao visoke prinose proteina RecA, te se sa sigurnošću moglo reći da je imao pravilni slijed nukleotida u promotorskoj regiji. Iz dva izabrana transformanta s rekloniranim genom *ssb-l*, izolirani su plazmidi i transformiran je ekspresijski soj BL21-Gold (DE3) bakterije *E. coli*. Biosinteza proteina SSB-L provjerena je SDS-PAGE elektroforezom, a na slici 19 se jasno vidi da je došlo do znatne ekspresije. Količina proteina SSB-L očekivano je rasla svakim satom nakon indukcije gena *ssb-l* s IPTG-om. Dobiveni rezultat potvrdio je pretpostavku o mutaciji promotorske regije prvotnog plazmida. Zbog nedostupnosti odgovarajućih početnica, ta tvrdnja nije mogla biti provjerena. S obzirom da je ipak i u prvom eksperimentu došlo do biosinteze proteina SSB-L, ali u malim razmjerima, može se nagađati da je došlo do točkaste mutacije u promotorskoj regiji kojom je povećana konstanta disocijacije RNA polimeraze. Enzim RNA polimeraze mora se čvrsto vezati za promotor kako bi došlo do transkripcije željenog gena. Točkasta mutacija u sačuvanom slijedu promotorske regije možda smanjuje afinitet vezanja RNA polimeraze, te s time i količinu transkripta, pa je iz tog razloga biosinteza proteina SSB-L bila gotovo u tragovima. Spomenuta mutacija mogla je nastati predugim izlaganjem plazmidne DNA UV zračenju tijekom izrezivanja fragmenata DNA za ligacijsku smjesu ili pogreškama u replikaciji plazmida tijekom uzgoja stanica za izolaciju.

Tijekom ovog rada postignut je krajnji cilj. Metodama genetičkog inženjerstva konstruiran je rekombinantni plazmid koji se stabilno replicira i eksprimira u bakteriji *E. coli*. U nastavku istraživanja, iz odabranog klona dobivenog tijekom ovog rada izolirat će se protein SSB-L, te će se usporediti njegov afinitet vezanja za jednolančanu DNA s prethodno izoliranim proteinom koji sadržava "His-tag".

## 6. Zaključci

- PCR reakcijom umnožen je fragment DNA s genom *ssb-l*.
- Gen *ssb-l* uspješno je kloniran u ekspresijski vektor pET-15b.
- Genu *ssb-l* određen je slijed nukleotida, a točnost je provjerena sravnjivanjem sa slijedom nukleotida gena koji se nalazi na kromosomu bakterije *Streptomyces coelicolor* A3(2).
- S rekombinantnim plazmidom pET-15b transformirani su ekspresijski sojevi bakterije *E. coli*.
- Biosinteza proteina SSB-L dobivena je u ekspresijskom soju BL21-Gold (DE3) bakterije *E. coli* i potvrđena je SDS-PAGE elektroforezom.

## 7. Zahvale

Zahvaljujem se iz srca mentorici dr. sc. Dušici Vujakliji na pruženoj prilici, neprocjenjivim savjetima, strpljenju, dobroj volji, te svim diskusijama koje su u meni probudile istraživački duh i veliku želju za radom i znanjem.

Veliko hvala dipl. ing. Mariji Marić, dipl. ing. Tini Paradžik i dipl. ing. Ani Bielen na svemu što su me naučile, na svim odgovorima na moja pitanja, na prijateljskom raspoloženju i neprekidnoj podršci.

Hvala mojoj obitelji, tati Mariu, mami Ružici i sestri Anji na strpljenju, razumijevanju i velikoj ljubavi koju mi pružaju tijekom cijelog mog života.

Djevojci Silviji zahvaljujem na vjeri u mene i ljubavi koja mi je pomogla u pisanju ovog rada.

## 8. Literatura

Ambriović-Ristov, A., Brozović, A., Bruvo-Mađarić, B., Četković, H., Herak-Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić-Hećimović, S., Meštrović-Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. (2007) *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

Anderson, A. S., Wellington, E. M. H. (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 797-814.

Berdy, J. (2005) Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot.* **58**, 1-26.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2002) *Biochemistry*, 5. izd., W. H. Freeman and company, New York.

Birch, A., Häusler, A., Hütter, R. (1990) Genome Rearrangement and Genetic Instability in *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.* **172**, 4138-4142.

Cell Biology Wiki (2010, 1. travanj). <<http://en.wikipedia.org/wiki/>>. Pristupljeno 1. travnja 2010.

Chater, K. F. (2006) *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **361**, 761-768.

EMBL-EBI (2010, 24. travanj) ClustalW. EMBL-EBI-European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute, <<http://www.ebi.ac.uk/>>. Pristupljeno 24. travnja 2010.

GNN (2010, 25. ožujak). GNN-Genome News Network, <<http://www.genomenetwork.org/>>. Pristupljeno 25. ožujka 2010.

Hardisson, C., Manzanal, M. B., Salas, J. A., Suárez, J. E. (1978) Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.* **105**, 203-214.

Hopwood, D. A. (1999) Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiology* **145**, 2183-2202.

Hopwood, D. A., Chater, K. F., Bibb, M. J. (1995) Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2), a model streptomycete. *Biotechnology* **28**, 65-102.

Kenyon College (2010, 21. ožujak), <<http://www.kenyon.edu/>>. Pristupljeno 21. ožujka 2010.

Kumari, K. K., Ponmurugan, P., Kannan, N. (2006) Isolation and Characterization of *Streptomyces* sp. From Soil Samples for Secondary Metabolite Production. *Biotechnology* **5**, 478-480.

Lindner, C., Nijland, R., van Hartskamp, M., Bron, S., Hamoen, L. W., Kuipers, O. P. (2004) Differential Expression of Two Paralogous Genes of *Bacillus subtilis* Encoding Single-Stranded DNA Binding Protein. *J. Bacteriol.* **186**, 1097-1105.

Meyer, R. R., Laine, P. S. (1990) The Single-Stranded DNA-Binding Protein of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **54**, 342-380.

Mijaković, I., Petranović, D., Maček, B., Cepo, T., Mann, M., Davies, J., Jensen, P. R., Vujaklija, D. (2006) Bacterial single-stranded DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine. *Nucleic Acids Res.* **34**, 1588-1596.

NCBI (2010, 24. travanj) Entrez. NCBI–National Center for Biotechnology Information, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Pristupljeno 24. travnja 2010.

Shereda, R. D., Kozlov, A. G., Lohman, T. M., Cox, M. M., Keck, J. L. (2008) SSB as an Organizer/Mobilizer of Genome Maintenance Complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **43**, 289-318.

Štefanić, Z., Vujaklija, D., Andrišić, L., Mikleušević, G., Andrejašič, M., Turk, D., Luić, M. (2007) Preliminary Crystallographic Study of *Streptomyces coelicolor* Single-stranded DNA-binding Protein. *Croat. Chem. Acta* **80**, 35-39.

Štefanić, Z., Vujaklija, D., Luić, M. (2009) Structure of the single-stranded DNA-binding protein from *Streptomyces coelicolor*. *Acta Cryst.* **65**, 974-979.

Wang, S. J., Chang, H. M., Lin, Y. S., Huang, C. H., Chen, C. W. (1999) *Streptomyces* genomes: circular genetic maps from the linear chromosomes. *Microbiology* **145**, 2209-2220.

Wellcome Trust Sanger Institute (2010, 25. ožujak), <<http://www.sanger.ac.uk/>>. Pristupljeno 25. ožujka 2010.

Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A., Sackin, M. J. (1983) Numerical Classification of *Streptomyces* and Related Genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1743-1813.

Wold, L. F. (1997) Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 61-92.

## Sažetak

Dario Zrnec

### Heterologna ekspresija gena koji kodira za protein SSB-L iz bakterije *Streptomyces coelicolor*

Proteini SSB (engl. *Single-Stranded DNA-Binding proteins*) esencijalni su u replikaciji, popravku i rekombinaciji DNA u svim organizmima. Nespecifičnim i kooperativnim vezanjem jednolančane DNA proteini SSB sprječavaju stvaranje sekundarnih struktura koje narušavaju procese DNA metabolizma, a ujedno i štite jednolančanu DNA od nukleolitičke razgradnje. Istraživanja na proteinima SSB iz streptomiceta provode se već dugi niz godina u Laboratoriju za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Za potrebe dosadašnjeg istraživanja koristili su se rekombinantni proteini SSB koji su na N-kraju imali dodane aminokiselinske slijedove ("His-tag" i "TAP-tag") za lakše pročišćavanje na afinitetnim kromatografskim kolonama.

Cilj ovog rada bio je klonirati "His-tag-om" neobilježeni gen *ssb-l* iz bakterije *S. coelicolor* u ekspresijski vektor pET-15b, te biosintetizirati željeni protein u heterolognom domaćinu, bakteriji *E. coli*. Rezultati ovog rada omogućit će ispitivanje utjecaja "His-tag-a" na učinkovitost vezanja proteina SSB-L za jednolančanu DNA.

Gen *ssb-l* umnožen je metodom lančane reakcije polimerazom, kloniran pomoću restriksijskih endonukleaza *NcoI* i *BamHI* u plazmid pET-15b te mu je određen slijed nukleotida. Indukcija gena provedena je u ekspresijskim sojevima bakterije *E. coli*. Biosinteza proteina SSB-L provjerena je elektroforezom ukupnog staničnog lizata u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE) te Western analizom.

**Ključne riječi:** bakterija *Streptomyces coelicolor*, bakterija *E. coli*, gen *ssb-l*, protein SSB-L, ekspresija

## Summary

Dario Zrnec

### **Heterologous expression of the gene coding for SSB-L protein from *Streptomyces coelicolor***

Single-Stranded DNA-Binding proteins (SSB proteins) are essential in DNA replication, recombination and repair. Their non-specific and co-operative binding to single-stranded DNA prevents formation of secondary structure and DNA degradation. Experiments on *Streptomyces* bacteria have been conducted for many years in the Laboratory for Molecular Genetics at Ruđer Bošković Institute in Zagreb. For the purpose of previous research, the SSB-L has been His- or TAP-tagged to facilitate protein purification applying affinity columns.

The main aim of this work was to clone non-tagged *ssb-l* gene from *S. coelicolor* on to expression vector pET-15b in order to produce SSB-L in heterologous host *E. coli*. The results of this work will allow us to compare the efficiency of binding of SSB-L and SSB-L His-tagged protein towards single-stranded DNA.

PCR reaction was used to amplify the *ssb-l*, gene was cloned using restriction enzymes *NcoI* i *BamHI* into plasmid pET-15b and the sequence was determined. Heterologous expression was performed in *E. coli* and the production of the SSB-L protein was examined with SDS-PAGE and Western analysis.

**Key words:** *Streptomyces coelicolor*, *E. coli*, *ssb-l* gene, SSB-L protein, expression



## Životopis

Rođen sam u Zagrebu 12. svibnja 1987. godine gdje sam završio osnovnu i srednju školu (XV. gimnazija). Prehrambeno-biotehnološki fakultet upisao sam 2006. godine, te u roku završio preddiplomski studij "Biotehnologija" s prosjekom ocjena 4,189. Trenutno sam student prve godine diplomskog studija "Molekularna biotehnologija". Tijekom dosadašnjeg studija sudjelovao sam na pet međunarodnih seminara, uključujući "Applications of micro and nanotechnology" (Eindhoven, Nizozemska) i "What goes around comes around–Put your self in the recycling tray: the waste point of view" (Almada, Portugal). Sudjelovao sam i na volonterskom kampu u Španjolskoj, te sam na drugoj godini preddiplomskog studija bio demonstrator na fakultetu iz biologije i tjelesno zdravstvene kulture. Aktivno se služim engleskim jezikom i redovni sam član studentske udruge IAESTE.