

Priprava na kolokvij

1. Restriksijske endonukleaze (restriktaze) – kaj so? Kje cepijo? Zakaj so pomembne?

Katere tipe poznamo? kateri se najpogosteje uporablja?

To je skupina encimov, ki katalizirajo hidrolizo fosfoestrskih vezi v sladkorno-fosfatnem ogrodju verige DNA.

Prepoznajo specifična nukleotidna zaporedja (pogosto palindromske narave, znotraj ali ob katerih pride do cepitve. Dobimo bodisi lepljive ali tope konce.

Pomen:

- pomembne so pri bakterijah, kjer cepijo virusno DNA in na ta način omogočajo obrambo pred virusi
- pomembne pri popravljanju napak
- uporabne v tehnologiji rekombinantne DNA

3 tipi:

- Tip I: prepoznajo specifično nukleotidno zaporedje, a je mesto cepitve znotraj tega zaporedja naključno
- Tip II: prepoznajo specifično nukleotidno zaporedje in cepijo DNA na točno določenem mestu
- Tip III: prepoznajo dve nasprotno orientirani nepalindromski prepoznavni zaporedji in DNA cepijo izven teh dveh mest.

2. Katere so osnovne značilnosti vektorja in kaj mora imeti, da je uporaben?

- sposobnost podvojevanja (ORI-mesto začetka podvojevanja): je vezavno mesto za DNA polimerazo, ki omogoča replikacijo (podvajanje) vektorja v gostiteljski celici. (ni dosti da vektor samo spravimo v gostiteljsko celico, tam se mora tudi podvojevati, da ga z delitvijo ne izgubimo)
- omogočajo selekcijo med gostiteljskimi organizmi z nerekombinantnimi oz. rekombinantnimi vektorji (seleksijski označevalci/markerji)
(ločimo med tistimi, ki so prejele vektor in tistimi ki ga niso, oz. tudi med tistimi, ki so prejele prazen vektor ali vektor, ki je vseboval insert)
- vsebujejo restriksijska mesta (poliklonsko mesto), kamor se vključi fragment tuje DNA/insert (**MCS**)
- ekspresijski vektorji omogočajo tudi sintezo rekombinantnih proteinov (promotorska zaporedja...)

3. Seleksijski označevalci za razlikovanje gostiteljskih celic po transformaciji – katera dva tipa poznamo in na podlagi česa ločujejo?

Pozitivni: omogočajo razlikovanje med gostiteljskimi celicami, ki so vektor sprejele in tistimi, ki ga niso. V vektor je običajno vključen gen, ki transformiranim celicam zagotavlja odpornost proti določenemu antibiotiku (npr. ampicilinu). V selekcijskem gojišču z antibiotikom tako preživijo le celice, ki so sprejele vektor.

Negativni: so namenjeni razlikovanju gostiteljskih celic, ki so sprejele vektor z vstavljenim insertom, od tistih, ki so sprejele prazen vektor (uspešnost ligacije nikoli ni 100%). Pri bakterijah najpogosteje izkoriščamo alfa-komplementacijo (belo-modri test).

4. Vnos vektorja v gostiteljsko celico – katere načine prenosa poznamo? Opiši.

• **Transformacija:**

- proces privzema gole DNA v gostiteljske celice
- naravni proces pri številnih bakterijskih vrstah (KONJUGACIJA-horizontalni (na ta način se širi rezistenca) in vertikalni prenos gena (generacijsko z razmnoževanjem))
- sposobnost celice, da privzame DNA se imenuje **kompetenca** (običajno je umetno inducirana)

• **Transfekcija:**

- proces vnosa DNA v evkariontske celice z nevirusnimi metodami (elektroporacija, kationski lipidi, mikroinjuciranje...)

• **Transdukcija:**

- vnos DNA enkapsulirane v virusne/bakteriofagne delce v gostiteljske celice

5. Encimi:

- **restriksijske endonukleaze**

- **reverzna transkriptaza:** prepíše mRNA v dvovertižno (ds) cDNA

- **DNA-ligaza:** katalizira tvorbo kovalentnih fosfodiestrskih vezi med 5' fosfatom ene verige in 3' OH (hidroksilno skupino) druge verige (zlepijo to vez).

Uporabljamo jih za povezovanje kompatibilnih koncev fragmentov DNA (zapolni zarezo pri kasetnem kloniranju) in za ligacijo insertov v vektorje. Sicer pa so to od ATP odvisni encimi, ki sodelujejo pri procesih podvojevanja in popravljanja napak DNA.

- **terminalna transferaza:** z njo dodamo timidin na tope konce, po tem ko plazmid lineariziramo z restriktazo

6. Kakšne so strukturne lastnosti vektorjev?

Navedi razlike med ekspresijskim (EV) in klonirnim (KV) vektorjem.

- vsak vektor mora imeti ORI mesto (origin of replication), ki mu daje sposobnost podvojevanja (vsakič, ko se celica deli, omogoči prenos gena, ki smo ga vstavili).

- seleksijski označevalci omogočajo razlikovanje med celicami, ki so vektor sprejele in tistimi, ki ga niso. Omogoči tudi razlikovanje med celicami, ki so prejele vektor z insertom in tistimi, ki so prejele prazen vektor.

- MCS oz. poliklonsko mesto je restriksijsko mesto, v katerega se vključi fragment tuje DNA.

Promotorska zaporedja in zaključevalna zaporedja omogočajo sintezo rekombinantnih proteinov (v primeru ekspresijskih vektorjev).

Razlike:

- **namen:**

KV je namenjen pomnoževanju inserta v gostiteljskem bakterijskem sevu,

EV pa izražanju rekombinantnih proteinov v gostiteljskem sevu.

- **struktura:**

KV je bolj enostaven po strukturi (ima vse osnovne strukturne lastnosti),

EV pa ima poleg vstavljenega gena prisotne še dodatne informacije (zaporedja, zanke ...), da bo lahko celica izražala vstavljen gen. Najosnovnejša struktura, ki jo EV potrebuje, je promotor, brez njega se gen ne more izraziti. Sestavljen je še iz RBS (ribosome binding site), oznak na N-koncu, cepitvenih

mest za proteaze, MCS, oznak na C-koncu, terminatorja in represorja.

7. Kakšne so prednosti in slabosti prokariotskih ekspresijskih sistemov (ES)?

Naštetj 2, ki se najpogosteje uporabljata.

Escherichia coli, G -

- + : enostavno rokovanje, kratek generacijski čas, visoka gostota celic, poceni in enostavna gojišča, visok delež rekombinantnega produkta, dobro okarakterizirana genetika, uveljavljenost, velik nabor komercialno dostopnih rekombinantnih sevov
- : ni posttranslacijskih modifikacij, prisotnost endotoksinov, razlike v rabi kodonov, tvorba inkluzijskih telesc, razgradnja s proteazami, neučinkovito izločanje produkta v periplazmo in v gojišče

Bacillus subtilis, G +

- + : primernejši sistemi za izločanje rekombinantnih proteinov v gojišče, odsotnost endotoksinov
- : razgradnja s proteazami, slabše poznavanje genetike in fiziologije, potencialni pomisleki regulatornih inštitucij

8. Načini vnosa DNA v sesalsko celico:

- **FIZIKALNE METODE:** elektroporacija (celico izpostavimo izmenjujočim električnim impulzom → depolarizacija membran in tvorba por skozi katere vstopa DNA), mikrodermabrazija (DNA vnesemo v celico s pomočjo majhnih delcev zlata/wolframa), mikroinjiciranje (neposreden vnos v jedro celice)
- **KEMIJSKE METODE:** transfekcija s pozitivno nabitimi ioni (DNA obdelamo s polimeri npr. DEAE dekstran), transfekcija s kationskimi lipidi (DNA se združi z liposomom = lipopleks, ki prehaja celično membrano z endocitozo; DNA dostopa do celice po fuziji z membrano ali preko endocitoznih poti), transfekcija s $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (ioni tvorijo precipitat z rekombinantno DNA, ki s fagocitozo vstopa v sesalske celice)
- **BIOLOŠKE METODE:** transdukcija z lentivirusi

9. Načini vnosa DNA v prokarionte:

- transformacija (vnos gole DNA; kompetentne celice ali električno/kemijsko inducirana kompetenca)
- transdukcija (bakteriofagi, fagmidi)
- konjugacija (plazmidi)

10. Na kakšne načine lahko transformiramo kompetentne bakterije?

- toplotni šok
- elektroporacija

11. Kako identificiramo gramicidin?

S TLC – tankoplastno tekočinsko kromatografijo. Na silikagelno ploščico (SF) nanesemo standarde (gramicidin in tirotricin) in naš eluat z najvišjo konc. ter neprečiščen lizat. Nato ploščico potopimo v MF, posušimo, dodamo Ehrlichov reagent ("barvilo") in ponovno posušimo – dobimo lise.

Če so lise iz našega eluata na enaki višini kakor lisa standarda gramicidina, nam to pove, da se v našem eluatu res nahaja gramicidin.

12. Kako smo testirali antibiotično aktivnost gramicidina?

Opazovali smo inhibicijo rasti bakterije *Lactococcus lactis* na agar plošči s strani standarda gramicidina, našega eluata z najvišjo konc. gramicidina in PBS (slepa proba, kontrola). Okoli nanosa

gramicidna (S in E) je bilo vidno območje inhibicije – bakterije niso zrastle, kar kaže na učinkovitost gramicidina kot antibiotika.

13. Pri kakšnih pogojih steriliziramo steklovino in tekočine v avtoklavu?

Z nadtlakom in pri povišani temperaturi. Avtoklaviranje je primerno samo za termostabilne snovi.

Pogoji: 1,3 kPa(2bar), 121°C, 15min

14. Ali z mikrobiološko filtracijo odstranimo vse mikroorganizme?

Ne, odstranimo samo bakterije, ki so večje od 0,2 mikrometrov. Virusov, mikoplazem in mikobakterij pa ne odstranimo - lahko uidejo skozi filter (tisti, ki so manjši od por).

15. Od kod izvira očetna kislina, ki se v anaerobnih pogojih pojavi v gojišču z E. coli?

Proizvajajo jo same bakterije v anaerobnih pogojih, iz sladkorjev (pentoz).

Očetna kislina spremeni pH gojišča, kar je neugodno za rast bakterij. Negativno vpliva tudi na izražene rekombinantne proteine.

16. Kateri dejavniki vplivajo na rast bakterij?

Vrsta gojišča in pogoji (prisotnost kisika, hranil, T°, pH, osmolarnost, mešanje, stresanje, velikost posode, v kateri so bakterije ...), vrsta oz sev bakterij.

17. Ali je generacijski čas bakterij (v eksponentni fazi) odvisen od števila bakterij, ki jih na začetku vcepimo v gojišče? Ali je ves čas enak? Kaj pa hitrost rasti?

Generacijski čas ni odvisen od števila bakterij in se med eksponentno fazo ne spreminja. Razlikuje pa se med vrstami, sevi bakterij, pri različnih pogojih in gojiščih.

Hitrost rasti pa se med eksponentno fazo spreminja, saj nanjo vpliva število bakterij (to se ves čas spreminja, narašča), količina oz. dostopnost hranil, kisika, pH ...

18. Zakaj uporabljamo erlenmajerico z utori?

Ker omogočajo dobro mešanje, povečajo površino v stiku z zrakom in privzem kisika. Na ta način imajo bakterije boljši dostop do kisika, kar pospeši njihovo rast.

19. Kako na obliko rastne krivulje vplivajo:

a) Antibiotik, ki ga dodamo v gojišče?

Tiste, ki so odporne, bi preživele, ostale pa ne – **baktericidni** atb ubijejo bakterije (prej nastopi stacionarna faza in faza odmiranja – nižji graf, večji naklon krivulje v fazi odmiranja bakterij), **bakteriostatični** atb pa upočasnijo ali zaustavijo rast bakterij (zmanjša se naklon krivulje v eksponentni fazi, zniža se graf ...).

Tudi, če je bakterija rezistentna, se del njenega metabolizma lahko preusmeri v izdelavo proteinov za obrambo (encimi) in se zato rast upočasni.

b) Indukcija izražanja rekombinantnega proteina?

Počasnejša rast bakterij - E začnejo uporabljati za sintezo rekombinantnega proteina (RP).

c) Indukcija izražanja RP, ki je toksičen za E. coli?

Rast se najprej upočasni zaradi usmeritve biosinteze v izražanje RP, nato pa se po določenem času ustavi, bakterije začnejo odmirati zaradi dosega zadostne konc. toksičnega RP.

20. Navedite in opišite še druge načine za lizo bakterijskih celic!

Fizikalni princip:

mehanske metode (koloidni mlin, kroglični mlin, homogenizatorji, stiskalnice – francoska preša ...)
nemehansko (osmozni šok, toplotni šok, sušenje, ultrasonikacija, mikrovalovna pečica ...)

Kemijski princip: PAS, kelirajoča sredstva (EDTA), alkalna liza, organska topila (etanol), kaotropne spojine, encimi (dragi, zelo učinkoviti)

21. Kakšna je vloga posameznih reagentov pri izolaciji plazmidne DNA z alkalno lizo?

Raztopina I:

glukoza - medij
tris -HCl - pufer
EDTA - kelator, veže Ca in Mg ione, ki stabilizirajo zunanjo membrano G-bakterij

→ celice dispergiramo, jim zagotovimo hrano in okolje, zmanjšamo presnovo in oslabimo plazmalemo (keliranje Ca in Mg)

Raztopina II:

NaOH - alkalna denaturacija NK (reverzibilno, DNA se razvije), proteinov (ireverzibilno)
SDS - emulgacija komponent membrane - membrana izgubi funkcijo, razpade

→ liza celic (membrane se odprejo, izstopijo plazmidi ..), denaturacija NK in proteinov

Raztopina III:

kalcijev acetat - velike DNA nepravilno zvije in obori (to odstranimo s centrifugiranjem)
brezvodna očetna k. - spremeni pH

→ nevtralizacija baze, obori proteine, renaturira DNA (dolge verige nepravilno, se oborijo; kratke pa v celoti in pravilno – plazmidna DNA)

etanol - obori plazmide, ker je DNA v etanolu slabo topna – jih loči od drugih
- inaktivira encime, zato ga moramo pred naslednjim korakom odstraniti

pufer TE:

Tris-Hcl - redispergiranje plazmidne DNA
EDTA - kelator
RNaza - razgradi molekule RNA (da se znebimo nečistoč)

22. Kako lahko v gen uvedemo restrikcijska mesta z verižno reakcijo s polimerazo?

Z uporabo začetnih oligonukleotidov (R-XhoI, F-NcoII), ki so načrtovani tako, da na enem delu nista komplementarna matrični DNA in ta del 'štrli stran' - v teh delih nosita zapis oz. prepoznavno mesto za RE (NcoI, XhoI).

23. Kakšna je razlika med a-komplementacijo in belo-modrim testom?

a-komplementacija je proces, ki je potreben, ko je za delovanje (funkcionalnost) encima potrebna združitev 2/več podenot (npr. pri b-galaktozidazi).

Z belo modrim testom preverimo ali pride do a-komplementacije ali ne in s tem ugotovimo ali je bila transformacija uspešna (bele kolonije, nefunkcionalen encim) ali ne (modre kolonije, a-komplementacija poteče, ker se insert ni vstavil in ne moti izražanja gena za b-galaktozidazo - nastane aktiven encim, ki cepi alternativni substrat X-gal do produkta, ki oksidira do nastanka modrega pigmenta).

Na kratko: belo modri test je metoda, ki za ločevanje med uspešno in neuspešno transformiranimi bakterijami izkorišča pojav alfa komplementacije.

Belo modri test je možen, ker uporabljamo bakterijski sev E.coli DH5 α , ki nima celotnega genskega zapisa za b-galaktozidazo (delecija), ampak samo za omega peptid encima, ki se more združiti z α peptidom, da deluje. α peptid pa se nahaja na plazmidu, ki ga vnesemo in ki je ob uspešni transformaciji prekinjen zaradi inserta in se ne more izraziti).

Če je B. prejela plazmid z vstavljenim genom, bo na gojišču (ki vsebuje ATB in X-gal) bela, če prejme plazmid brez vstavljenega gena, bo modra, če pa plazmida ne sprejme, na gojišču sploh ne bo zrasla (ker nima odpornosti na ATB).

24. Zakaj je na N-končni strani rekombinantnega proteina prisoten metionin?

Ker START kodon kodira metionin – zato to je običajno začetna AK proteinov, lahko pa ga encimi po sintezi proteina odcepijo ... (ne velja npr. za proteine, ki nastanejo z NRPS).

25. Kaj so endospore?

Oblike bakterij, ki preživijo v neugodnem okolju – pred negativnimi kemičnimi/fizikalnimi vplivi okolja jih varuje debela celična stena ...

26. Zakaj ste bakterije/endospore B. parabrevis prekuhali v etanolu in ne vodni raztopini?

Da razbijemo celično steno - ekstrakcija. V vodi se gramicidin, zaradi hidrofobnih AK ne bi raztapljal.

27. Gramicidin ste izolirali z adsorpcijsko kromatografijo. Pojasnite princip ločevanja.

Ali preprosta metoda, ki ste jo uporabili na vaji, dovoljuje ločitev gramicina od tirocidina? Zakaj? Predlagajte ustrežnejšo alternativno metodo.

Adsorpcijska kromatografija ločuje snovi glede na moč adsorpcije (hidrofobne vezi) na SF.

Uporabili smo Al₂O₃ (anorganski adsorbent), na katerega se bolje vežejo bolj hidrofobne snovi (AK).

Ločba ni učinkovita, ker adsorpcijska kromatografija temelji na jakosti hidrofobnih interakcij (in ne na velikosti, obliki, naboju) in ker imata oba antibiotika hidrofobne verige, je ločba nemogoča.

Lahko bi uporabili ionski izmenjevalec (ionsko izmenjevalno kromatografijo), ker bi se molekuli različno elektrostatsko (ionsko) vezali na nasprotno nabito SF in bi ju lahko ločili zaradi različnega naboja. Ena bi se eluirala prej kot druga.

Lastnosti, ki jih lahko izkoristimo: različen naboj (jakost, neto naboj), oblika (linearna, ciklična), velikost?

28. Pojasnite hemolitično aktivnost gramicina in komentirajte rezultate, ki jih prikazuje slika.

Hemoliza je nespecifična, zato je toksičen in neprimeren za sistemsko aplikacijo. Gramicidin neselektivno poškoduje celične membrane (tako tarčne, kot tudi človeške) – poškoduje membrano eritrocitov, poruši se ionski gradient (ker so nastali ionski kanalčki nespecifično prepustni za monovalentne katione), pride do lize eritrocitov, izhajanje hemoglobina, ki supernatant obarva rdeče. Hemolitična aktivnost gramicidina je večja kakor pri etanolu in nekoliko manjša kot pri SDS.

29. Skicirajte domensko strukturo teoretične neribosomske peptidne sintetaze, ki bi katalizirala sintezo tetrapeptida L-Ala-D-Gln-L-Lys-D-Ala.

30. Kakšni so mehanizmi delovanja β-laktaminskih atb, bacitracina, vankomicina in gramicina D?

- **Betalakaminski atb** so baktericidi, kar pomeni, da ubijejo bakterijo. Zavrejo sintezo peptidoglikanskega ogrodja celične stene B. Vežejo se na encim transpeptidazo in ga inaktivirajo. Učinkujejo proti G⁺ in G⁻.

- **Bacitracin** je baktericid, ki zavira defosforilacijo C55-izoprenil pirofosfata, ki prenaša gradnike peptidoglikanov B. celične stene na zunanjo plast cel. membrane. Učinkujejo proti G⁺ in G⁻.

- **Vankomicin** deluje tako, da zavre sintezo celične stene pri G+ bakterijah. Prepreči vgrajevanje NAM (N-acetilmuraminske kisline) in NAG (N-acetilglukozamina) v peptidoglikansko verigo, ki je glavni gradnik celične stene G+ B. Je ozkospektralni atb.

- **Gramicidin D** se vgrajuje v plazmalemo G+ B. (jo deformira – kompresija, zvijanje), v njej tvori ionske kanalčke, neselektivno prepustne za monovalentne katione. S tem poruši ionski gradient med citoplazmo in zunanostjo B. – pride propada B.

31. Kaj nam o izoliranem plazmidu pove razmerje absorbanc pri 280 in 260nm?

Iz razmerja absorbanc lahko določimo čistost (izolirane plazmidne) DNA.

Raztopina čiste dsDNA ima razmerje absorbanc A_{260}/A_{280} približno 1,8.

Prisotnost RNA to razmerje poviša, prisotnost proteinov/fenolov pa ga zniža.

(proteini imajo 2 absorpcijska maksimuma – pri 225nm in pri 280nm).

32. Zakaj smo pri adsorpcijski kromatografiji naš supernatant redčili s 130 mikrolitri vode?

Ker smo za uporabili absolutni etanol, pri kromatografiji pa je MF 85% etanol in smo z redčenjem tako zagotovili, da smo pri obeh dobili enako ozadje (medij).

33. V kateri fazi rasti so celice primerne za transformacijo?

V zgodnji eksponentni (logaritmski) fazi. Kasneje je transformacija manj uspešna, v stacionarni fazi pa celo nemogoča.

34. V kateri fazi induciramo izražanje proteina?

V zgodnji eksponentni fazi. Če to naredimo kasneje, bomo imeli manjše donose RP.

35. V kateri fazi rasti se splača izolirati RP?

V srednji oziroma pozni eksponentni fazi (glede na izraženost RP).

Kasneje (stacionarna faza) lahko pride do proteolitične razgradnje našega produkta.

36. Za kaj so primerne bakterije v stacionarni fazi rasti?

Primerne so za izolacijo plazmidne DNA, ki se nakopiči po daljši rasti bakterij.

37. Zakaj smo pri spektrofotometričnem določanju koncentracije gramicidina uporabili Ehrlichov reagent in NaNO_3 (KNO_3)?

Ehrlichov reagent smo dodali zato, ker sam gramicidin ni obarvan, ne absorbira vidne/UV svetlobe, ob dodatku reagenta pa pride do nastanka obarvanega produkta (vsebuje kondenzirane dvojne vezi) – večja kot je koncentracija gramicidina, bolj bo barva intenzivna – to pa omogoča kvantitativno analizo.

Nitrat dodamo, da nam stabilizira produkt, ki nastane pri reakciji z Ehrlichovim reagentom.

Po dodatku se rožnato vijoličen produkt spremeni v temno modrega.

38. Kakšen je genom E.coli?

Vsebuje en krožen kromosom, prisotni pa so lahko tudi izvenkromosomski plazmidi.

39. Kakšna je razlika med diferencialnimi in selektivnimi gojišči?

Selektivna gojišča omogočajo izolacijo vrste/seva MO, npr. glede na to ali so odporne na atb ali ne (primerna so za selekcijo po transformaciji – pozitivni selekcijski marker). Diferencialna gojišča pa omogočajo ločevanje med različnimi vrstami/sevi MO, ki rastejo hkrati na gojišču (npr. z uporabo indikatorjev – kromogeni substrat X-gal; modro beli test; negativni selekcijski marker?).

40. V čem se obogatena gojišča razlikujejo od gojišča LB?

Vsebujejo več peptona/triptona, kvasnega ekstrakta, vsebujejo dodatne Mg ione, ki omogočajo rast do večjih gostot in lahko tudi fosfatni pufer, ki nevtralizira kisle produkte bakterijskega metabolizma.

41. Kako se koeficient hitrosti spreminja glede na hitrost rasti?

Ob hitrejši rasti je koeficient manjši, ob počasnejši pa večji.

42. Kako merimo optično gostoto in kaj nam ta pove?

Turbidimetrično z merjenjem transmittance (oz. absorbance) in pri valovni dolžini 600nm.

Optična gostota je merilo za število bakterij na volumen gojišča.

43. Kakšna je sestava in vloga sestavin gojišča LB?

- pepton/tripton (vir AK, E)
- kvasni ekstrakt (vir mineralov, vitamina B, AK, peptidov, lipidov ...)
- NaCl (zagotavlja ustrezno osmolarnost gojišča, ki je pomembna za optimalno rast)

44. Kaj pa vsebuje minimalno gojišče in zakaj ni najbolj primerno za gojenje?

- anorganske snovi (vir biogenih elementov - P, N, S)
- glukoza, glicerol (vir ogljika)
- Mg in Ca ioni (kofaktorji encimov)

Slabost je, da na njem bakterije rastejo zelo počasi in dosežajo nizke gostote (OD₆₀₀ do 2).

45. Kakšno vlogo ima protein A za S.aureus?

Omogoči mu, da se izogne IS gostitelja - opsonizaciji in fagocitozi, saj se veže na Fc IgG in s tem onemogoči vezavo na receptor.

46. Zakaj so pomembne oznake na N- in C- koncu proteina?

Za lažje čiščenje, detekcijo ... (omogočajo vezavo)

47. Katera je nujna komponenta MCS, da se lahko gen izrazi?

Start in stop kodon na vstavljeni cDNA.

48. Zakaj se uvajajo cepitvena mesta za proteaze?

Zato, da lahko odstranimo C- in N-končne oznake po izolaciji in čiščenju gena.

49. Katere so skupne značilnosti vseh vektorjev?

- ORI mesto
- MCS
- selekcijski označevalci (+, -)
- promotor

50. Slabosti in prednosti TA-kloniranja:

- +: enostavno, hitro, brez uporabe RE, obstajajo komercialno dostopni plazmidi z dodanimi timidini, primerno tudi ko ustrezen restriksijski encim ni na voljo
- : obstaja 50% možnost, da se vstavek ne vgradi v pravi smeri

51. Za kaj smo na vajah uporabili TA-kloniranje?

Za ligacijo PCR produkta (inserta) v klonirni plazmid (pGEM-T Easy).

52. Kako izvedemo toplotni šok in kakšen je namen?

Namen je induciranje kompetence celic, da lahko transformiramo plazmidno DNA.

Toplotni šok je kemijska metoda za induciranje kompetence bakterij. Celicam dodamo CaCl (Ca²⁺ ione), da se DNA lahko približa membrani B (zmanjša se elektrostatski odboj med – plazmidno DNA

(fosfatne skupine) in – površino celice oz. fosfolipidnim dvoslojem). Najprej zmes ohladimo na 0-5°C, nato za kratek čas segrejemo na 37-45°C in ponovno ohladimo. Natančen mehanizem privzema ni poznan.

53. Glede na katere kriterije razdelimo restriksijske endonukleaze v 3 tipe?

- strukturne domene
- kofaktorji
- cepitvena mesta
- način rezanja DNA

54. Kakšna je elektroforezna mobilnost različnih oblik molekul DNA?

- supercoiled form (dodatno zviti plazmidi) – potuje najhitreje
- linearizirane oblike (poškodbe ob izolaciji)
- relaxed form (sproščena oblika)
- nicked circles (plazmidi s hidrolizirano fosfodiestersko vezjo v eni komplementarni verigi)

55. Katere sekundarne metabolite bakterij poznamo?

Atb, pigmenti, toksini, ekološki efektorji, feromoni, encimski inhibitorji, pesticidi, protitumorske ZU.

56. Kakšna je funkcija gramicidina v bakterijah?

Uravnava proces sporulacije.

57. Glede na strukturo poznamo različne skupine atb. Katere?

- beta laktamski atb
- tetraciklini
- makrolidi
- aminoglikozidi
- kinoloni

58. Katera sta dva osnovna principa delovanja atb in katere so glavne tarče atb?

- baktericidno
- bakteriostatično delovanje

- sinteza celične stene
- biosinteza proteinov
- podvojevanje in popravljanje DNA
- ostalo (npr. tvorba por – nisin, gramicidin ...)

58. Kako pride do povečanega izražanja gramicidina v bakterijah?

Še nepoznane proteaze razgradijo kazein iz mleka (mleko je v gojišču) do produktov, ki pospešijo nastajanje gramicidina (zmanjšajo razmerje med gramicidinom in tirocidinom v tirotrcinu).

59. Za kakšne namene se še uporablja gramicidin?

- strukturna biologija: kot modelni membranski kanalček
- elektrofiziologija: za naluknjanje membrane pri preučevanju sprememb v el. potencialu celic (metoda vpete napetosti perforirane membrane)

60. Kako nastaja gramicidin?

Nastaja na NRPS (neribosomskih peptidnih sintetazah) – to so ogromni, multifunkcionalni encimi, sestavljeni iz ene polipeptidne verige ali več podenot.

Modul je enota, ki izvede pripojitev posamezne AK na nastajajočo polipeptidno verigo. Minimalno je sestavljen iz 3 domen (A, PCP(T), C), lahko pa ima še dodatno epimerizacijsko domeno E ipd. Vsaka

domena katalizira posamezen korak:

A – adenilacija AK (aktivacija)

T – kovalentna vezava na tiolno skupino prostetične sk. (4-fosfopenteteinske k.), prenos do C

E – epimerizacija iz L- v D- AK

C – kondenzacija s peptidno verigo sosednjega modula

TE – tioesterazna domena, ki zaključi verigo in sprosti nastali peptid

61. Kdaj smo uporabili kasetno kloniranje?

Ob prenosu gena za rBd v ekspresijski plazmid (pET-28a) – samo teoretično, nismo zares izvedli.