

Molekularna biologija

Navodila za vaje

za 2. letnik študijskega programa Biokemija

študijsko leto 2013/14

prof. dr. Marko Dolinar

ver. 2.0, marec 2014

Predgovor

Vaje iz Molekularne biologije letos potekajo prvič. Zasnovane so tako, da v treh terminih po tri ure pokrijejo nekatere od tem, o katerih ste že slišali med predavanji, ob tem pa vam dajo osnovni občutek o tem, kako teče praktično delo v molekularnobiološkem laboratoriju.

Vaš asistent letos bo Aljaž Gaber, univ. dipl. biokem. (aljaz.gaber@fkkt.uni-lj.si). Dajal vam bo potrebne napotke za delo in odgovarjal na vaša vprašanja povezana z vajami. Tehnik na vajah bo Matjaž Malavašič. Obema se že vnaprej zahvaljujem za pomoč, hvala pa tudi dr. Petri Prijatelj Žnidaršič za sodelovanje pri izvedbi predposkusov.

Na vaje morate priti pripravljeni – to pomeni, da morate prebrati in razumeti teoretični del vsake vaje. Če kaj ni jasno, si morate to razjasniti pred začetkom dela.

Ker boste pri vajah uporabili gensko spremenjene organizme (GSO) oziroma jih pri transformaciji celic sami generirali, je treba upoštevati pravila dela v zaprtem sistemu za delo z GSO. Vse tekočine, ki so bile v stiku z GSO ali ki vsebujejo GSO, na koncu poskusa avtoklaviramo. Enako velja za ves potrošni material (npr. mikrocentrifugirke, nastavke za pipetiranje). Če je prišlo do razlitja kulture, celično suspenzijo popivnemo s papirnato brisačo, ki jo nato avtoklaviramo, površine pa obrišemo s 70-odstotnim etanolom, ki je v puhalkah na pultih. O vsakem nepredvidenem dogodku pri delu z GSO takoj obvestite asistenta.

Praktični del vaj zajema več različnih postopkov, ki (razen transformacije bakterijskih celic) niso opisani kot samostojna vaja. Agarozno gelsko elektroforezo že poznate, tako kot tudi ostale osnovne biokemijske laboratorijske tehnike ter delo z mikroorganizmi. Vaje se v veliki meri med seboj prepletajo in sestavljajo celoto, ki jo je treba tako tudi razumeti.

Navodila za vaje so zasnovana tako, da ima vsaka vaja teoretični uvod, ki mu sledijo napotki za izvedbo. Na ločenem listu je prostor za vpisovanje rezultatov, temu pa sledijo vprašanja, na katera boste morali odgovoriti takoj po končani vaji in liste z rezultati in odgovori na vprašanja pustiti asistentu, da jih pregleda in oceni. Poročila z vaj namreč predstavljajo 10 % skupne ocene predmeta, pri tem pa se upošteva tudi vaša pripravljenost in zavzetost pri opravljanju vaj. Nadaljnjih 10 % ocene boste dobili za odgovore na vprašanja iz tem, ki jih boste obdelali na vajah. Ta vprašanja bodo na izpitu dodana na posebnem listu in jih ocenjuje asistent.

Želim vam veliko uspeha pri delu v laboratoriju in pri interpretaciji rezultatov.

Marko Dolinar

KAZALO

1	Plazmidi in transformacija bakterijskih celic	5
2	Laktozni operon in alfa komplementacija	19
3	Utišanje genov s kratko interferenčno RNA	27

1 Plazmidi in transformacija bakterijskih celic

Transformacija je v molekularnobiološkem laboratoriju najpogostejša tehnika za vnos tuje DNA v bakterijske celice. Nekateri bakterijski vrste oz. sevi so naravno kompetentni – to pomeni, da so sposobni sprejeti tujo DNA, ne da bi celice predhodno kakorkoli obdelali. Take bakterije pa so dokaj redke. Bakterije *Escherichia coli*, ki jih v laboratoriju najpogosteje uporabljamo, ne morejo spontano sprejeti tuje DNA. V 70-tih letih prejšnjega stoletja so razvili nezahteven postopek kemijske modifikacije bakterijskih ovojnic, s katerim je mogoče pripraviti kompetentne celice *E. coli*. Ključna stopnja priprave kompetentnih celic je spiranje celic s pufrsko raztopino, ki vsebuje CaCl_2 . Ta postopek bomo uporabili tudi na vajah, s tem da bomo kot izhodišče vzeli modificirano verzijo, ki je bolj učinkovita, temelji pa na tem, da bakterije rastejo dalj časa pri suboptimalni temperaturi in zato verjetno ne sintetizirajo enako rigidne celične stene kot če bi rasle pri 37°C .

Razen s transformacijo je vnos tuje DNA mogoč tudi s konjugacijo (dve bakteriji se povežeta z mostičkom, preko katerega iz ene celice preide kopija genoma ali samo en del v drugo celico) ali s transdukcijo (bakterijski virus – bakteriofag – okuži napadeno celico in vanjo prenese svojo DNA).

Transformacijo, redkeje pa tudi katerega od obeh alternativnih postopkov, uporabljamo v laboratoriju običajno zato, da v gostiteljske bakterijske celice vnesemo tujo DNA, ki zapisuje za določene lastnosti oz. za določene proteine, ki jih raziskujemo. Pri tem uporabimo kot vektor najpogosteje plazmid.

Plazmidi, prirejeni za delo v laboratoriju, so krožne dvoverižne molekule DNA, ki v svojem nukleotidnem zaporedju nosijo zapise za selekcijske označevalce, vključujejo pa tudi regijo *ori* (mesto začetka podvojevanja), klonirno mesto (za vstavljanje tuje DNA) in pogosto še dodatna zaporedja, kot so na primer promotor, operator, terminator itd. Vlogo teh zaporedij ponovite po zapiskih s predavanj ali iz drugih virov.

Lastnosti plazmida najbolj nazorno predstavlja plazmidna karta, to je grafični prikaz razporeda genetskih elementov na vektorju. Primer take plazmidne karte je predstavljen na sliki 1. Gre za vektor pUC18, ki je komercialno dostopen. Njegove glavne lastnosti so opisane v besedilu pod sliko.

Gramnegativne bakterije vrste *Escherichia coli* so najbolj razširjene bakterije za kloniranje genov in njihovo izražanje. Obstaja stotine sevov. Nekateri so patogeni in jih zato seveda v laboratoriju ne uporabljamo. Znanih je več deset sevov, ki so nepatogeni: ne izločajo toksinov in so praktično nezmožni naseliti človeška prebavila. Razen tega imajo okvare številnih genov, kar jim onemogoča preživetje zunaj kontroliranih laboratorijskih pogojev. Opis bakterijskih lastnosti ponazarja genotip, v katerem so navedene posebnosti, pomembne za laboratorijsko delo. Našteti so predvsem geni, ki so okvarjeni, manjkajo ali so spremenjeni, včasih pa tudi tisti geni, ki so bili predhodno vstavljeni v genom bakterijske celice.

Oglejmo si dva primera genotipov laboratorijskih sevov *E. coli* !

MG1655: $F^- \lambda^- ilvG^- rfb-50 rph-1$

Ta sev je prototip *E. coli* iz skupine K-12 in predstavlja osnovo za številne mutante, ki jih uporabljamo v laboratoriju. Nima F-faktorja (plazmida, ki omogoča izmenjavo DNA preko pilusov), nima vključenega faga lambda, ima zaradi premika bralnega okvira neaktiven gen *ilvG* za veliko podenoto acetolaktat-sintaze II (potrebna za biosintezo valina in izolevcina iz piruvata) ter okvaro v genu za biosintezo določenih lipopolisaharidov (*rfb-50*). Delecija enega nukleotida v genu *rph* povzroči premik bralnega okvira za zadnjih 15 kodonov ribonukleaze PH, kar zniža izražanje gena *pyrE*, posledično pa je koncentracija pirimidinov, če celice rastejo na minimalnem gojišču, zmanjšana.

DH5 α : F⁻ λ -*endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG* Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*($r_K^- m_K^+$)

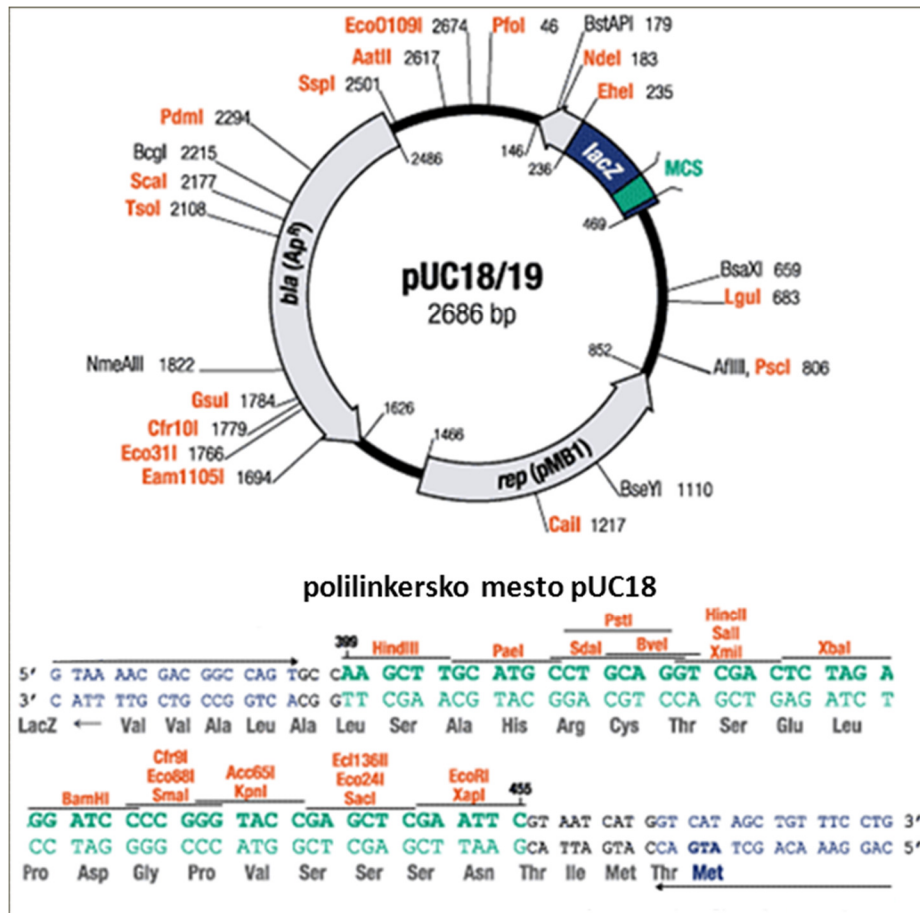
V izhodiščni sev DH1 so vnesli več dodatnih mutacij, med katerimi je ključna delecija laktoznega operona do gena *argF* in vnos delecijske mutacije Φ 80*dlacZ* Δ M15 iz seva TB1. Ta gen zapisuje za betagalaktozidazo, skrajšano za N-končni alfa peptid. Preostanek verige imenujemo fragment omega. Funkcionalna betagalaktozidaza nastane samo, če se peptid alfa sintetizira z DNA, ki smo jo naknadno vnesli v take celice. Sev DH5 α zelo pogosto uporabljamo v laboratoriju, saj nam torej omogoča izvedbo alfa komplementacije, fenotipskega razlikovanja med bakterijami s plazmidi, ki vsebujejo tujo DNA (vključek) in tistimi, ki vsebujejo vektorje brez vključka. Alfa komplementacija je sicer tema 2. vaje, zato si več o tem preberite v uvodu v naslednjo vajo.

V divjih tipih bakterij obstajajo številni plazmidi, ki pa za prenašanje DNA v laboratorijskih poskusih niso uporabni. Večinoma so zelo veliki, kar jih dela manj primerne za vnos v bakterijske celice (veliki plazmidi se težje prebijejo v celico kot manjši), lahko so brez selekcijskega označevalca (gena, ki bi omogočal razlikovanje med celicami, ki so sprejele plazmid in tistimi, ki ga niso), zelo redko pa tudi vsebujejo primerna klonirna mesta, ali pa mesta, kjer režejo encimi, niso v celoti znana, ker še niso določili nukleotidnega zaporedja plazmidne DNA. Predvsem v DNA-tehnologiji uporabljamo kot vektorje plazmide, ki niso večji kot ~10 kbp in imajo znano nukleotidno zaporedje. Izbor takih vektorjev za delo z *E. coli* je zelo širok in številne vektorje je mogoče kupiti, lahko pa jih tudi dobimo od avtorjev, ki so jih konstruirali in opisali.

Ena od pomembnih značilnosti plazmidov je, da vsebujejo klonirno mesto. To je zaporedje, kjer je običajno nanizanih več prepoznavnih mest za restriksijske endonukleaze (restriktaze). Pred vstavljanjem tuje DNA v vektor moramo namreč krožni vektor razrezati z enim ali dvema encimoma, nato pa z DNA-ligazo vanj vstaviti (ligirati) tujo DNA s komplementarnimi konci. Prepoznavna mesta nekaterih restriktaz so prikazana na sliki 2. Kot vidite, nekateri encimi po rezanju pustijo za sabo lepljive konce, drugi pa tope konce. Bolj uporabni so encimi z daljšim prepoznavnim zaporedjem (npr. 6 bp) kot s krajšim (npr. 4 bp), saj je statistično manj verjetno, da režejo znotraj nekega zaporedja, ki nas zanima. Če namreč reže znotraj zaporedja, zelo težko pripravimo konce, kompatibilne z vektorjem, ne da bi pri tem 'naše' zaporedje razpadlo na dva ali več delov.

Oznako plazmida prepoznate po mali črki p, ki ji sledi kratko poimenovanje vektorja. Izbira imena je prepuščena avtorjem, ki so plazmid odkrili ali sestavili v laboratoriju. Razen pravih plazmidnih vektorjev v laboratoriju uporabljamo še nekatere druge, ki vključujejo zaporedja

iz bakteriofagov (fagmidi, kozmidi, fozmidi) in kromosomov (umetni kromosomi). Več o tem boste zvedeli pri predmetu Molekulsko kloniranje v 3. letniku.



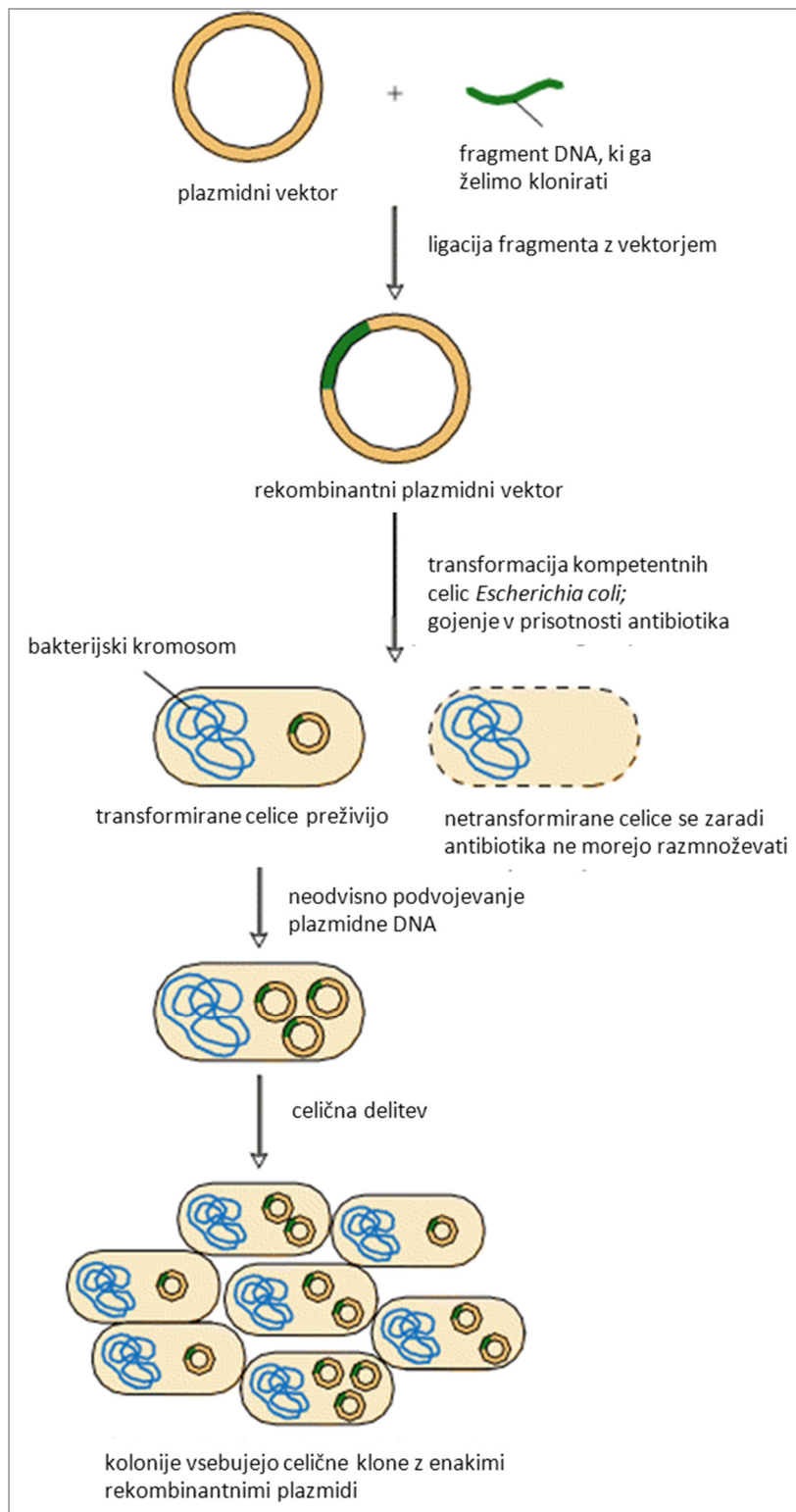
Slika 1: plazmidna karta vektorja pUC18. Vektorja pUC 18 in pUC19 se razlikujeta le v orientaciji zaporedja klonirne regije (MCS). Pod plazmidno karto je navedeno nukleotidno zaporedje MCS in robnih regij. Oznake na vektorju: *bla* – gen za betalaktamazo (odpornost proti antibiotiku ampicilinu), *lacZ'* – zapis za N-konec betagalaktozidaze (alfa peptid), *rep* – replikatorska regija (regulacija podvojevanja DNA). Alfa komplementacija je mogoča v kombinaciji s sevi, ki nosijo mutacijo $\Delta lacZM15$. Aminokislinsko zaporedje N-konca betagalaktozidaze je podpisano nukleotidnemu; zaradi orientacije promotorja (ni prikazan) je kodirajoča spodnja veriga DNA, zato zaporedje na videz teče od 3'- proti 5'-koncu. Zaporedje MCS je prikazano z zeleno, robna zaporedja pa z modro. V resnici zapis za alfa peptid nima enakega nukleotidnega zaporedja kot je v MCS, je pa uporabljeno zaporedje kompatibilno s strukturo galaktozidaze. Puščici nad oz. pod zaporedjem označujeta mesto vezave začetnih oligonukleotidov, ki jih rabimo za določanje nukleotidnega zaporedja vključkov v MCS. Kratke oznake na obodu plazmidne karte in v prikazu regije MCS pomenijo prepoznavna mesta za restriktaze. Prikazane so samo tiste, ki vektor režejo enkrat samkrat. Razen teh obstaja še na stotine prepoznavnih mest za druge restrikcijske endonukleaze, ki režejo vektor dvakrat ali večkrat.

encim	izvirni organizem	prepoznavno zaporedje	produkta po rezanju DNA
(a) <i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>		
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>		
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>		
(b) <i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>		
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		

Slika 2: primeri nekaterih restrikcijskih endonukleaz, mikroorganizmi, iz katerih so jih izolirali, prepoznavna zaporedja in narava koncev, ki nastanejo po rezanju DNA (lepljivi konci s 5'- ali 3'-previsi ali topi konci). Restriktaze, ki prepoznajo 6 bp (a) ali 4 bp (b). Imena restriktaz so sestavljena iz prve črke rodovnega imena, prvih dveh črk vrstnega imena bakterije v latinščini (zato prve tri črke pišemo poševno), oznake seva (ni nujno) in rimske številke. Črne pike prikazujejo os simetrije. Zaporedja so namreč v večini primerov palindromna, struktura encimov, ki se na ta zaporedja vežejo, pa iz dveh enakih podenot, pri čemer se vsaka podenota veže na eno verigo. Puščice nad zaporedjem kažejo mesto cepitve.

Najpreprostejši poskus vstavitve neke tuje DNA v plazmidni vektor so izvedli pred slabimi 40 leti. V splošnem tak eksperiment poteka tako, kot je prikazano na sliki 3. Vektor in vključek morata imeti konce, dobljene po rezanju z enako restriktazo, nato pa ju povežemo z encimom DNA-ligazo. Učinkovitost ligacije je običajno relativno nizka, saj encim lahko generira konkatemere vektorja in konkatemere vključka, razen tega pa je ligaza precej občutljiv encim. Zato običajno pričakujemo, da smo povezali vektor in vključek v manj kot 1 % primerov.

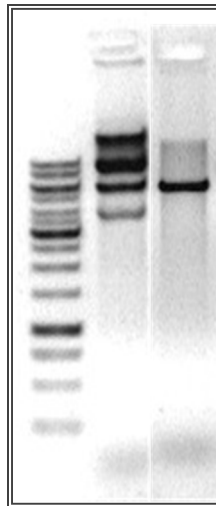
Ligaciji logično sledi transformacija bakterijskih celic. Za izvedbo transformacije *E. coli*, ki je sicer zelo enostaven postopek, moramo predhodno pripraviti kompetentne celice. Pri tem je pomembno, da celice niso prešle preko zgodnje eksponentne faze rasti, da vse delo opravljamo na ledu in z občutkom.



Slika 3: shema priprave rekombinantnega vektorja in kloniranja. Osnova kloniranja (priprave identičnih kopij) je vnos v vektor vstavljene DNA v bakterijske celice, ki se delijo in s tem eksponentno večajo število kopij tuje DNA. Iz transformiranih bakterij je mogoče enostavno izolirati plazmidno DNA in jo analizirati, na primer z restrikcijskimi endonukleazami, čemur sledi agarozna gelska elektroforeza.

Analiza transformant (bakterij, ki vsebujejo tujo DNA) poteka običajno tako, da iz bakterij izoliramo plazmidno DNA, en alikvot razrežemo z restrikcijsko endonukleazo, enega pa ne, nato pa z agarozno gelsko elektroforezo primerjamo potovanje nerazrezanega plazmida, razrezanega plazmida in označevalcev velikosti. Kot označevalce uporabimo komercialne standarde linearnih fragmentov DNA z znanimi velikostmi.

Plazmidna DNA zaradi krožne in dodatno zvite strukture v električnem polju potuje hitreje kot linearni fragment DNA enake dolžine, saj se lažje prebija skozi pore agaroznega polimera. Razen tega ne moremo pričakovati, da po izolaciji dobimo izključno dodatno zvito obliko plazmidov, saj so metode za razbijanje celic in izolacijo plazmidne DNA sorazmerno agresivne, zato se del plazmidne DNA konformacijsko spremeni. Lahko se pretrga ena od verig, lahko se obe, včasih pa najdemo tudi po dve krožni plazmidni molekuli ujete eno v drugo (konkatemere). Slika 4 ponazarja pričakovane elektroforezne mobilnosti plazmidne DNA v agaroznem gelu.

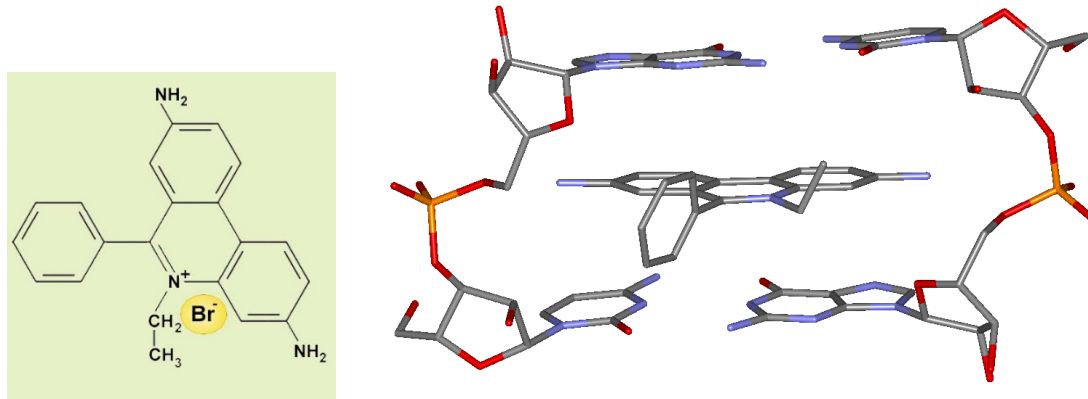


Slika 4: potovanje plazmidne DNA pred rezanjem in po rezanju z restriktazo. Restriktaza, ki prereže plazmidno DNA na enem mestu, pretvori vse krožne konformacije plazmida v eno samo, linearno. Leva steza predstavlja standarde velikosti (najnižja lisa predstavlja linearno DNA dolžine 250 bp, sledijo 500 bp, 750 bp, 1000 bp, 1500 bp in tako naprej do 10.000 bp), srednja nerazrezan plazmidni vektor pET32a in desna steza enak vektor po rezanju z encimom EcoRI.

DNA potuje v električnem polju proti pozitivni elektrodi, ker je zaradi fosfatnih skupin v ogrodju negativno nabita molekula. Gostota naboja je vedno enaka, ne glede na dolžino, zato ni potrebna predhodna obdelava DNA pred analizo (kot je to potrebno z natrijevim dodecilsulfatom pri elektroforezi proteinov). Vendar pa je mobilnost odvisna zgolj od dolžine le pri linearni DNA, krožna DNA pa potuje drugače. Najhitreje potuje dodatno zvita krožna DNA, počasneje sproščena krožna, linearna pa še počasneje.

Ker DNA ni obarvana molekula, je med ali po elektroforezi potrebno barvanje z barvili. Barvila za DNA so pogosto interkalatorji (vrivajo se med bazne pare v dvojni vijačnici) in so po strukturi podobni povezanemu purinu in pirimidinu. Zaradi načina vezave so barvila z redkimi izjemami genotoksična sredstva – povzročajo lahko mutacije v celicah, v katere se

prebijejo. Na vaji bomo uporabili kot barvilo etidijev bromid (slika 5). Gre za fluorogeno barvilo, ki po obsevanju s svetlobo valovne dolžine 302 nm izseva večino fotonov valovne dolžine 600 nm.



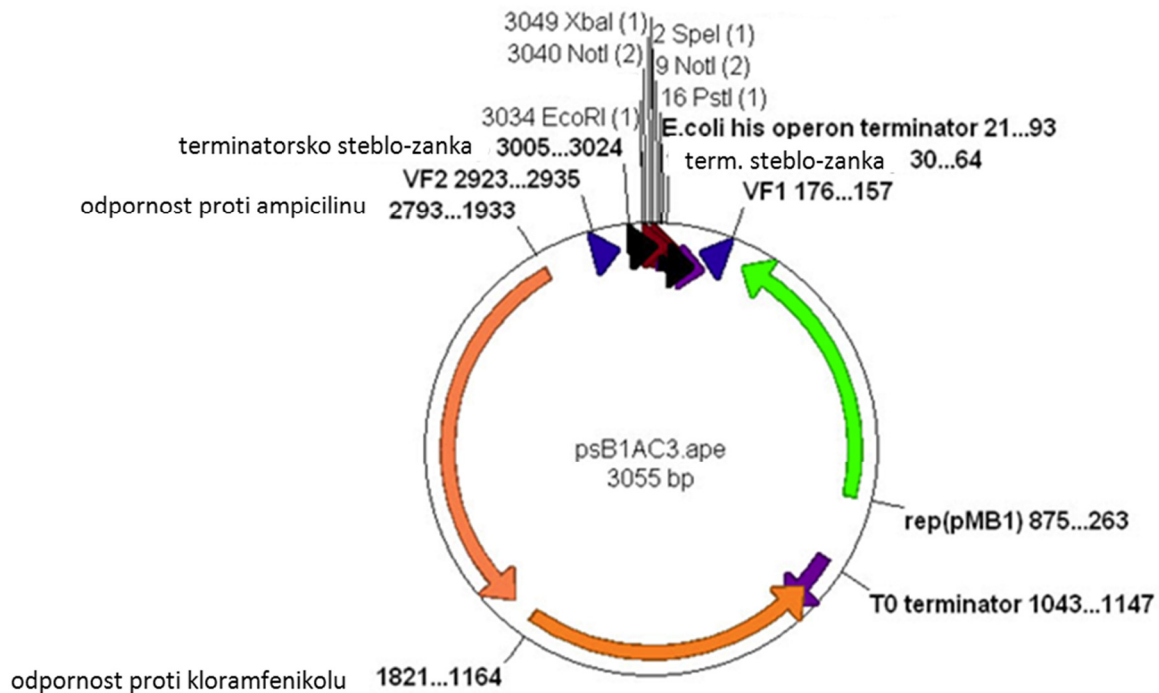
Slika 5: strukturalna formula etidijevega bromida (levo) in prikaz interkalacije med dva bazna para v dsDNA (desno).

Vaja, ki jo boste praktično izvajali, ima dva dela. Z restrikcijsko endonukleazo boste razrezali plazmidni vektor in analizirali elektroforezno potovanje nerazrezanega in razrezanega vektorja v agaroznem gelu. V vzporednem poskusu pa boste vnaprej pripravljene kompetentne celice *E. coli* DH5 α transformirali z enakim plazmidnim vektorjem in izračunali frekvenco transformacije.

Uporabili boste klonirni vektor pSB1AC3, ki je bil dolgo eden od standardnih vektorjev v sintezni biologiji. Njegova karta je predstavljena na sliki 6, iz nje pa lahko razberete velikost in osnovne značilnosti tega vektorja.

Plazmidni vektor boste dobili že izoliran (izolacija je tema ene od vaj pri Molekulskem kloniranju naslednje leto), restrikcijske endonukleaze pa smo kupili pri enem od velikih proizvajalcev reagentov za molekularno biologijo. Asistent bo določil, katerega od encimov bo uporabila vaša skupina: *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *XbaI*, *XhoI* ali *SacI*. Za nekatere od navedenih encimov lahko iz vektorske karte ugotovite, kje in kolikokrat režejo DNA, za vse pa ne. Ugotoviti boste morali, ali je do rezanja prišlo, na koliko mestih in kakšne so velikosti dobljene DNA. [Za asistenta: *XhoI* reže dvakrat – pri 1035 in 1927, *HindIII* ne reže in *SacI* reže enkrat, pri 1115]

Za rezanje boste uporabili 500 ng – 1 μ g vektorske DNA, ki jo boste rezali z 10 U vsakega od encimov. Ta količina encima zadošča za kvantitativno rezanje substratne DNA v 30 minutah in v optimalnih pufrskih pogojih, če je izolirana DNA čista. Reakcija poteka pri temperaturi 37 °C, ki je optimalna za večino restriktaz. Več o parametrih restrikcijske reakcije boste zvedeli naslednje leto.



Slika 6: plazmidna karta vektorja pSB1AC3. Z oranžno sta prikazana dva odprta bralna okvira, ki zapisujeta za encima, potrebna za zagotavljanje odpornosti proti antibiotikom, z zeleno pa replikacijska regija. Klonirno mesto je med nukleotidi 3034 in 16. Regiji VF1 in VF2 sta mesti za vezavo začetnih oligonukleotidov pri določanju nukleotidnega zaporedja vključkov.

Analiza dobljenih produktov rezanja bo potekala na 1-odstotnem agaroznem gelu v pufru TAE (tris-acetat-EDTA) pri pH 8. Pri tej vrednosti pH je DNA negativno nabita, EDTA pa kompleksira dvovalentne kovinske ione, kofaktorje encimov, ki modificirajo DNA. Med temi so za analizo najbolj nevarne nespecifične nukleaze, ki bi lahko razgradile DNA. Etidijev bromid bo vključen v gel. Dodamo ga preden agarozna polimerizira. Zaradi vsebnosti mutagenega sredstva gel prijemamo samo z rokavicami!

Izbor zamreženosti gela, ki ga uporabimo, je odvisen od velikosti DNA, ki jo ločujemo. Za optimalno ločevanje kratkih segmentov DNA (do nekaj sto bp) bi bilo bolj smiselno uporabiti bolj zamrežen gel, na primer 1,5-odstotnega za fragmente dolžine 0,5 kbp do 8 kbp. Samo izjemoma uporabljamo gele, ki vsebujejo >2-odstotno agarozo. Geli z manj kot 0,8 % agaroze so manj primerni za delo, ker so premalo kompaktni. Elektroforeza poteka pri napetosti ~8 V/cm.

Vzorcu DNA pred nanosom na gel dodamo 1/6 končnega volumna nanašalnega pufru, ki je pripravljen kot založna raztopina s 6-kratno končno koncentracijo. Nanašalni pufer vsebuje dve barvili, ksilencianol in bromfenolmodro, ki nam pomagata pri oceni prepotovane dolžine DNA. Razen obeh barvil raztopina vsebuje tudi enako pufrsko snov kot elektroforezni pufer (Tris-acetat) in EDTA, za povečanje gostote, da se vzorec lažje potopi na dno žepka v agaroznem gelu, pa je dodan glicerol. Med elektroforezo v 1-odstotnem agaroznem gelu potuje ksilencianol (svetlomodro barvilo) podobno hitro kot linearna DNA

dolžine ~3500 bp, bromfenolmodro (vijoličnomodro barvilo) pa kot linearna DNA dolžine ~350 bp. Ker je lineariziran vektor pSB1AC3 velik 3 kbp, bo potoval podobno hitro kot počasnejše od obeh barvil.

Dolžino analiziranih linearnih molekul DNA ocenimo s primerjavo s standardi velikosti. Tiste, ki jih boste uporabili pri vaji, smo kupili že pripravljene, lahko pa bi jih pripravili sami, na primer tako, da bi neko daljšo molekulo DNA (pogosto je to bakteriofag lambda) razrezali z enim ali več encimi, ki dajo po rezanju DNA produkte, velike približno toliko kot so veliki fragmenti, ki jih pričakujemo.

Z analizo velikosti produktov rezanja boste posredno (predvidoma) potrdili identiteto uporabljenega vektorja, hkrati pa boste lahko ocenili morebitno prisotnost drugih nukleinskih kislin in delež dodatno zvite DNA v nerazrezanem vzorcu.

Transformacijo izvedemo tako, da počasi odtajamo zamrznjene kompetentne celice (shranjene so bile pri -80 °C), nato pa jim dodamo DNA v čim manjšem volumnu, premešamo in inkubiramo 30 min na ledu z občasnim premešanjem, ki naj ne bo agresivno, saj so celice v tem stanju zelo labilne. Plazmidna DNA lahko vstopi v citoplazmo kompetentnih celic; manjša in bolj kompaktna ko je, lažje bo stopila. Pri isti množini plazmida in enakih kompetentnih celicah bi pričakovali, da bo učinkovitost vstopa predvsem odvisna od dolžine plazmidne DNA in od deleža dodatne zvite DNA. Pri transformaciji dokaj hitro dosežemo stopnjo nasičenja, ko kljub povečanju množine DNA ne dobimo več transformant. Zato običajno za transformacijo uporabljamo femtomolarne množine vektorja (1000 femto = piko, 1000 piko = nano).

Po polurnem inkubiranju izvedemo takoimenovani toplotni šok. To pomeni, da celice na kratko segrejemo na 37 °C do 42 °C. Ta stopnja je izredno pomembna za končni uspeh, čas in temperatura pa sta odvisna predvsem od prevodnosti plastike in volumna celic. Običajno zadošča 75 s v vodni kopeli pri 37 °C (pri uporabi termobloka ta kombinacija ni optimalna zaradi počasnejšega segrevanja tekočine), če uporabite standardne mikrocentrifugirke.

Toplotnemu šoku sledi kratka inkubacija na ledu (~2 min), nato pa celicam dodate gojišče brez antibiotika in jih gojite eno uro pri 37 °C. V tem času se celice še ne delijo, pač pa ponovno vzpostavijo metabolične procese. Po tej regeneracijski stopnji alikvot celic razmažete na selekcijsko trdno gojišče, ki vsebuje antibiotik, na katerega bodo transformirane celice odporne.

Frekvenca transformacije je izraz, s katerim opredelimo, kako dobre so bile kompetentne celice in kako uspešno smo izvedli transformacijo. Pri tem vedno izhajamo iz predpostavke, da smo uporabili majhno množino vektorja (bistveno pod točko nasičenja). Frekvenca ima enoto pmol^{-1} ali μg^{-1} , torej število kolonij, ki bi jih teoretično dobili, če bi frekvenco izvedli z 1 pmol (ali 1 μg) vektorske DNA – jasno je, da smo uporabili bistveno manjšo množino od te.

Ker bo treba po izvedeni transformaciji prešteti kolonije, ki bodo po prekonočni inkubaciji zrasle na selekcijskih gojiščih, je smiselno, da že pred razmazom transformacijske mešanice na gojišče izberemo tak volumen celic, da bo na eni plošči zraslo med 50 in 200 kolonij.

Seveda pa vedno ni mogoče dovolj natančno oceniti pričakovane frekvence transformacije, zato v takih primerih platiramo celice na dve plošči, na eno desetkrat manj kot na drugo. Tako vsaj pri eni pridemo do števnega števila kolonij na plošči. Če ne porabimo celotne transformacijske mešanice, ostanke shranimo pri 4 °C do takrat, ko so zrasle kolonije. Če niso zrasle, imamo še vedno možnost, da iz preostale transformacijske mešanice odcentrifugiramo celice in jih vse razmažemo na eno ploščo. Če smo bili uspešni že prvič, preostale celice avtoklaviramo.

Za delo v molekularnobiološkem laboratoriju je pomembno, da dobite občutek glede količin, ki jih uporabljamo oziroma ki so potrebne za izvedbo nekega poskusa. Množine so zaradi občutljivih detekcijskih metod, zaradi fenomena kloniranja / namnožitve in zaradi velikosti DNA pogosto precej manjše kot v kemiji ali proteinski biokemiji. En bazni par ima povprečno molekularno maso 650 Da, majhna vektorska molekula pa ~1,5 MDa. En pmol takega vektorja ima torej maso 1,5 µg (15.000 kg/mol).

EKSPERIMENTALNO DELO

1.1 Rezanje vektorja z restrikcijskimi endonukleazami

Materiali:

- pSB1AC3, koncentracija _____ ng/µl
- restriktaze *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *XbaI*, *XhoI* in *SacI*
- 10-kratne založne raztopine reakcijskih pufrov
- avtoklavirana deionizirana voda
- inkubator ali termoblok (37 °C)

Postopek:

- Pripravite si dve mikrocentrifugirki in ju primerno označite.
- V prvo dajte 500 ng pSB1AC3 in dopolnite volumen do 10 µl z vodo.
- V drugo dajte 750 ng istega vektorja, 1 µl (10x) pufra in 1 µl encima, dopolnite do 10 µl z vodo in premešajte.
- Inkubirajte 30 – 60 min pri 37 °C. (Medtem se lotite transformacije – točka 1.3.)
- Dodajte 1/6 V nanašalnega pufra in premešajte.
- Uporabite za agarozno gelsko elektroforezo.

1.2 Agarozna gelska elektroforeza

Materiali:

- 1-odstotni agarozni gel v pufru TAE z vključenim etidijevim bromidom
- elektroforezni pufer TAE
- označevalec velikosti (lestvica 1 kb)
- elektroforezna kadička in napajalnik

Postopek:

- Nanesite v žepke v agaroznem gelu vnaprej pripravljeni označevalec velikosti (1. žepček), nato pa vsaka skupina svoj nerazrezani in razrezani vektor. (Zapišite si, v kakšnem vrstnem redu ste nanašali razrezane vzorce, da boste lahko interpretirali skupno sliko po elektroforezi.)
- Priključite električno napetost (90 V, konst.) in pustite, da elektroforeza teče dokler hitreje od dveh barvil ne prepotuje vsaj 3 cm poti.
- Prenesite gel iz kadičke na transiluminator. Asistent bo naredil fotografijo in jo objavil v spletni učilnici.

1.3 Transformacija bakterijskih celic

Materiali:

- pSB1AC3 (kot v 1. točki), razredčen na 5 ng/ μ l
- pGEM-5Zf, razredčen na 5 ng/ μ l (ta vektor boste rabili pri 2. vaji)
- kompetentne celice, zamrznjene pri -80 °C
- bogato gojišče LB
- selekcijsko trdno gojišče LB + ampicilin (LBA)
- izolacijska posoda z ledom
- vodna kopel (37 °C)
- stekleni triangel, 70-odstotni etanol, plinski gorilnik

Postopek:

- Alikvot (400 μ l) kompetentnih celic počasi odtajajte.
- Razdelite ga na dva alikvota v mikrocentrifugirkah, ki ju označite z imenom plazmidov, ki ju boste uporabili in z oznako skupine.
- Vsakemu alikvotu dodajte 5 μ l pSB1AC3 oziroma 5 μ l pGEM-5Zf.
- Inkubirajte na ledu 30 min. in vsakih 5 min. narahlo premešajte.
- Mikrocentrifugirki prestavite v plošček in inkubirajte 75 s v vodni kopeli pri 37 °C.
- Mikrocentrifugirki prestavite na led in inkubirajte 2 min.
- Ob plamenu sterilno dodajte po 800 μ l gojišča LB.
- Inkubirajte pri 37 °C do 1 h.
- Na ploščo LBA odpipetirajte po 50 μ l celične suspenzije in takoj razmažite s triangelom po celotni površini plošče.
- Ko se celice vpijejo v gojišče, ploščo obrnite in inkubirajte čez noč pri 37 °C.
- Pri naslednji vaji preštejte kolonije na plošči in izračunajte frekvenco transformacije (št. kolonij/ μ mol vektorske DNA).

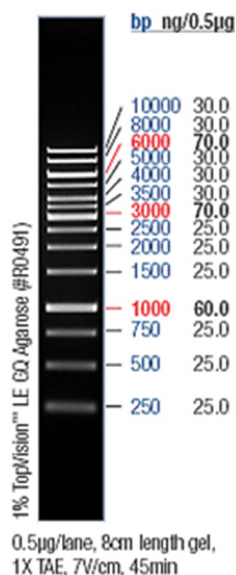
Ime in priimek:

vp. št.:

skupina (dan/ura):

Poročilo 1. vaje

Desno od slike, ki prikazuje pričakovano ločbo označevalcev velikosti, skicirajte ali nalepite fotografijo agaroznega gela z analiziranimi vzorci. Označite proge in obkrožite vaš vzorec.



Opišite rezultat vaše in ostalih skupin v spodnji tabeli!

proga	opis vzorca oz. načina rezanja	število cepitvenih mest	velikosti produktov
1	označevalec velikosti	---	(gl. sliko)
2	pSB1AC3, nerazrezan	---	---
3			
4			
5			
6			
7			

Morebitna opažanja ob delu in komentar rezultatov:

Frekvence transformacij:

skupina \ vektor	pSB1AC3	pGEM-5Zf

Opažanja in komentar glede transformacije *E. coli*:

Odgovorite tudi na naslednja vprašanja:

- 1.) Kako deluje ampicilin? Navedite še dva druga antibiotika in razložite, kako delujeta!
- 2.) kateri encimi uvajajo in kateri odvezajo dodatno zvitje v molekuli DNA?
- 3.) Na osnovi plazmidne karte pSB1AC3 ugotovite, na kakšnem gojišču so najverjetneje rasle bakterije, iz katerih je bil vektor izoliran!
- 4.) Kako dolgi bi bili produkti hkratnega rezanja vektorja pSB1AC3 z encimoma *PstI* in *EcoRI*?
- 5.) Plazmid pBR322 (4361 bp) režemo z encimom *NarI* (reže za nukleotidi 413, 434, 548 in 1205). Kakšne bodo velikosti produktov in ali bi te produkte lahko uporabili kot dober označevalec velikosti pri opravljeni analizi pSB1AC3?
- 6.) Izračunajte frekvenco transformacije (na pmol), če ste s 15 ng vektorja pIKS (3800 bp) dobili 1500 kolonij!

2. Laktozni operon in alfa komplementacija

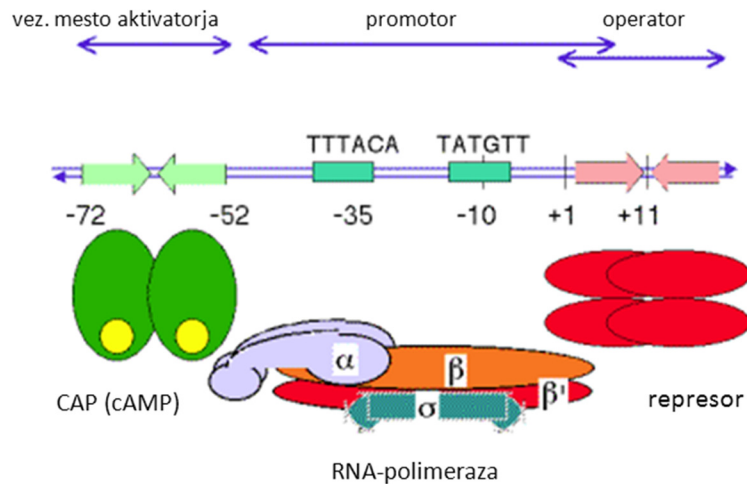
Obstaja več definicij operona. V ožjem pomenu besede operon predstavlja skupina strukturnih genov z usklajenim izražanjem (skupnim promotorjem in operatorjem), v širšem pa so razen strukturnih genov in regulatornih zaporedij vključeni tudi geni za regulatorje izražanja z lastnimi regulatornimi regijami.

Bakterije *E. coli* imajo na svojem krožnem kromosomu eno kopijo laktoznega operona. Uravnava ga produkt gena *lacI*, ki zapisuje za represorski protein. Operon sestavljajo trije strukturni geni, ki zapisujejo za proteine, potrebne za presnovo disaharida laktoze v dva monosaharida, glukozo in galaktozo. Med regulatornim in strukturnimi geni je regija, ki uravnava izražanje strukturnih genov. Sestavlja jo zaporedje, na katerega se veže pozitiven regulator CAP (kataboliti aktivatorski protein), promotorsko zaporedje (vezavna regija za RNA-polimerazo) in operatorsko zaporedje, kamor se veže represorski protein LacZ. Splošno shemo laktoznega operona predstavlja slika 7, natančnejši vpogled v regulatorno regijo pa daje slika 8.



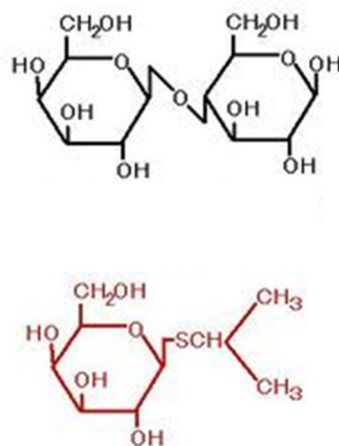
Slika 7: shematski prikaz laktoznega operona. En regulatorni gen (*lacI*) uravnava izražanje treh strukturnih genov (*lacZ*, *lacY* in *lacA*). Regulatorni protein je represor laktoznega operona (LacI), ki se lahko veže na operatorski mesti na začetku zapisa za protein LacZ. Regulatorni gen ima svoj promotor in svoj terminator, zato nastane mRNA po tem delu operona neodvisno od ostalih genov. Strukturni geni imajo svoj skupni promotor in en terminator, tako da nastane prekursorška mRNA, na osnovi katere se sintetizirajo tri polipeptidne verige, ker ima vsak gen svoj stop-kodon in svoje vezavno mesto za ribosom.

Čeprav je naravni induktor derivat laktoze, alolaktoza, je ta za eksperimentalno delo neprimerna, ker je hkrati substrat betagalaktozidaze (LacZ), zato se njena koncentracija v sistemu stalno spreminja. V laboratoriju zato kot induktor uporabljamo izopropiltiogalaktozid (IPTG). Podobnost z naravnim substratom je razvidna s slike 9.



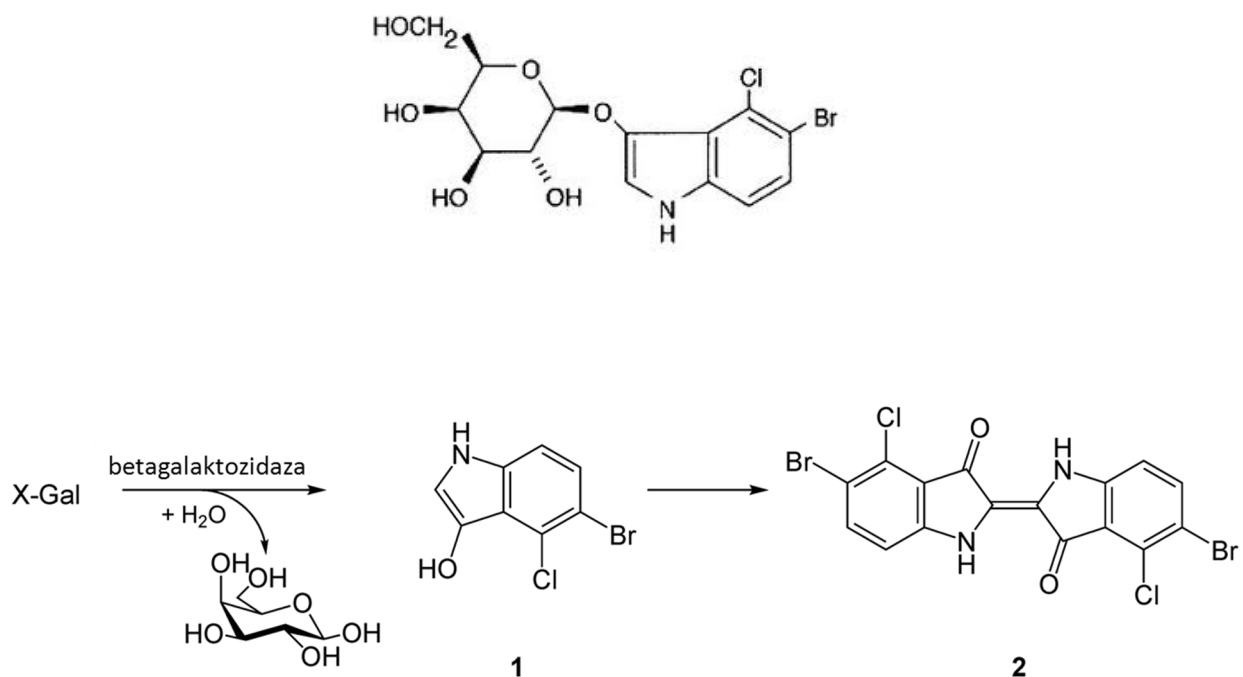
Slika 8: podrobnejši prikaz regulatorne regije laktoznega operona. Promotor, ki je vezavno mesto za RNA-polimerazo, sestavljata elementa -10 (Pribnowova škatla) in -35. Navzgor od promotorja je vezavno mesto za aktivator CAP, ki se lahko veže kot homodimer na regijo -52 do -72 pod pogojem, da je v strukturo CAP vezan cAMP. Navzdol od promotorja je operator, na katerega se preko dveh regij veže tetramer represorskega proteina LacI. RNA-polimeraza se na DNA veže preko podenote sigma, ki ima svojo vlogo pri prepoznavanju promotorskega zaporedja. Ko se sinteza mRNA začne, se ta podenota loči od ostalih (osrednji encim).

Induktor deluje tako, da se veže v vezavni žep represorja LacI, s tem pa se bistveno zmanjša afiniteta represorja do operatorske regije na DNA. Kompleks LacI-IPTG se sprostí z operatorja, kar RNA-polimerazi omogoči transkripcijo strukturnih genov laktoznega operona. Posledično se povečata koncentracija in aktivnost betagalaktozidaze.



Slika 9: strukturni formuli laktoze (zgoraj) in IPTG (spodaj). Laktoza je sestavljena iz galaktoze, povezane z β 1-4 glikozidno vezjo z glukozo. To vez cepi betagalaktozidaza, ki je produkt gena *lacZ*. Laktoza (oziroma njena pretvorbena oblika alolaktoza) deluje kot induktor laktoznega operona, vendar v eksperimentalnih pogojih kot induktor običajno uporabljamo IPTG, ki se stabilno veže v strukturo represorske molekule.

Aktivnost betagalaktozidaze določamo kvalitativno ali kvantitativno. V obeh primerih je smiselno namesto naravnega substrata (laktoze) uporabiti kromogen substrat, ki bi omogočil optično ali spektrofotometrično ugotavljanje encimske aktivnosti. Najpogosteje uporabljamo substrat X-gal (slika 10), ki se pretvarja v modro obarvan produkt. Ta substrat lahko vključimo v gojišče za bakterije, od koder bo prehajal v celično citoplazmo. Če bo tam prisotna betagalaktozidaza, bo prišlo do hidrolitičnega odcepa saharidne enote (galaktoze), preostali 5-bromo-4-klorohidroksindol (produkt 1 na sliki 10 spodaj) pa se oksidira v netopni modro obarvani 5,5'-dibromo-4,4'-dikloroindigo (produkt 2). Zaradi kopičenja tega produkta se celice obarvajo modro, kar je vidno s prostim očesom, lahko pa test izvedemo tudi fotometrično. Pri testu z živimi bakterijami je treba paziti na to, da do izražanja gena *lacZ* ne pride v odsotnosti induktorja, zato modrih kolonij ne pričakujemo, če v gojišču ni bilo prisotnega IPTG (ali laktoze).

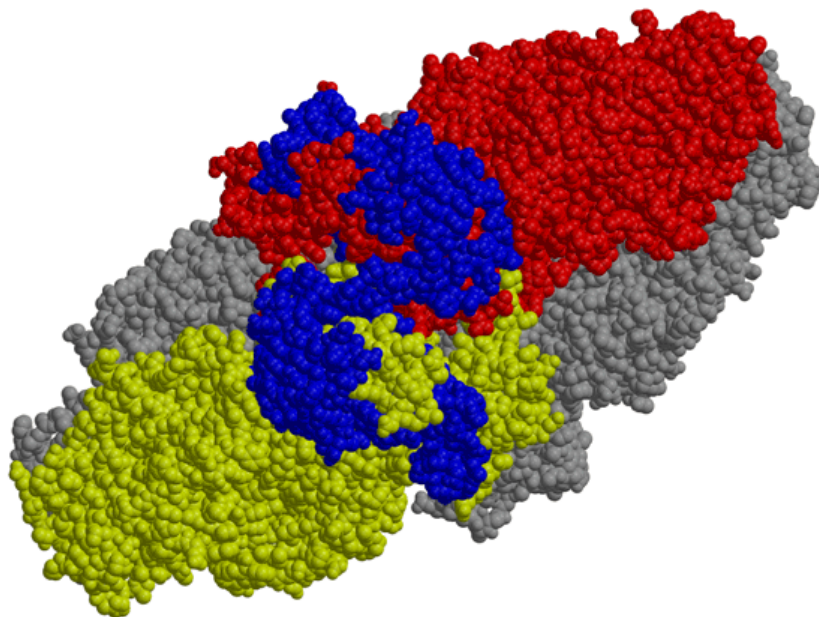


Slika 10: strukturna formula substrata X-gal (bromo-kloroindolil-galaktopiranozid; zgoraj) za določanje aktivnosti betagalaktozidaze ter reakcijska shema (spodaj). Produkt 1 v citoplazmi spontano oksidira v modro obarvani produkt 2.

V praktičnem delu vaje boste dokazovali nekatere značilnosti laktoznega operona, predvsem indukcijske pogoje ter pojav alfa komplementacije. Gre za postopek, pri katerem se sestavi aktivni tetramer betagalaktozidaze iz dveh fragmentov, alfa in omega. Fragment alfa je zapisan na plazmidu in običajno sovpada s klonirnim mestom, fragment omega pa je zapisan na bakterijskem kromosomu. Ker ima divji tip (wt) bakterij *E. coli* v genomu celotno zaporedje gena *lacZ*, je alfa komplementacijo mogoče izvajati samo s sevi, pri katerih so 5'-del kodirajoče regije tega gena deletirali. Taki sevi so večinoma prepoznavni že po imenu, saj vključuje črko α (npr. DH5 α).

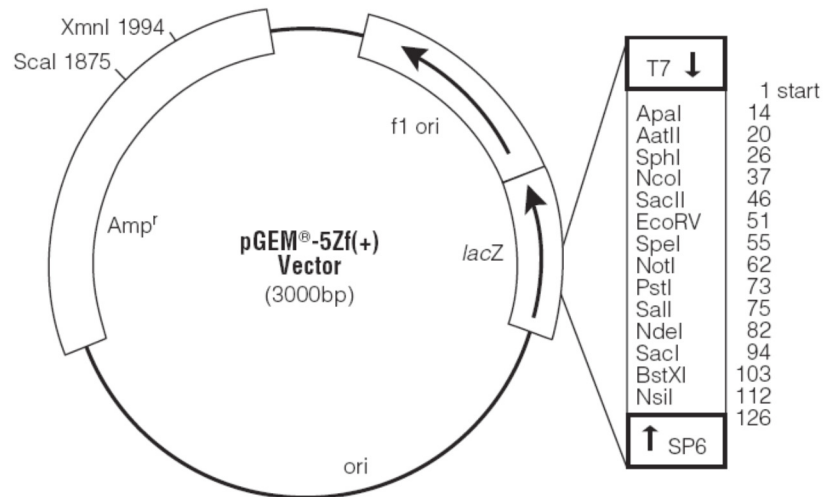
Fragment alfa je pri proteinu LacZ tisti, ki omogoča sestavljanje štirih podenot v homotetramer. Monomerna oblika encima namreč ni aktivna. Strukturni pomen fragmenta alfa za sestavljanje aktivnega encima prikazuje slika 11.

Za izvedbo alfa komplementacije (drugo ime je belo-modri test) torej potrebujete ustrezen bakterijski sev (samo z zapisom za segment omega), ustrezen plazmid (z zapisom za segment alfa) – seveda obakrat s promotorjem, ki omogoča transkripcijo –, ter induktor in kromogeni substrat. Seveda bodo bakterije rasle na selekcijskem gojišču, ki bo omogočal preživetje samo tistih bakterij, ki vsebujejo plazmid. Pri vaji boste uporabili vrsto različnih kombinacij pogojev, ugotoviti in argumentirati pa boste morali, kdaj bo neka kombinacija produktivna in kdaj ne.



Slika 11: prostorsko zapolnjena struktura homotetramera betagalaktozidaze. Dve podenoti fragmenta omega ste prikazani s sivo barvo, ena z rumeno in ena z rdečo. Dva fragmenta alfa sta prikazani z modro (druga dva nista vidna, ker sta na drugi strani molekule). Fragment alfa predstavlja tisti del molekule, ki je odgovoren za tetramerizacijo, aktivno mesto pa je znotraj fragmenta omega. Vseeno aktivnosti ne zaznamo, dokler ne pride do povezave štirih podenot v kvartarno strukturo.

Uporabili boste dva različna vektorja. Vektor pSB1AC3 ste spoznali že pri 1. vaji (njegova karta je na sliki 6), drugi vektor pa je pGEM-5Zf, predstavljen na sliki 12. Kot vidite, vključuje regijo lacZ' z zapisom za alfa peptid.



Slika 12: vektorska karta pGEM-5Zf1(+). V plazmidno ogrodje je vstavljeno dodatno mesto ori iz nitastega faga f1, zato vektor prištevamo v skupino fagmidov. Oznaki T7 in SP6 predstavljata promotorja iz dveh različnih bakteriofagov. Oba sta funkcionalna samo v povezavi z RNA-polimerazo teh dveh fagov. Regija lacZ vsebuje tudi laktozni promotor in operator.

EKSPERIMENTALNO DELO

Vnaprej smo pripravili nekatere seve bakterij *E. coli* in jih transformirali z različnimi vektorji. Osnova za razumevanje rezultatov je poznavanje lastnosti bakterijskih sevov in vektorjev. Vaša naloga bo, da pripravite bakterijska gojišča z vključenim induktorjem in substratom in nato nacepite seve pri pogojih, določenih s tabelo (spodaj). Razumeti morate rezultate vseh skupin, ne samo vaše.

Skupini 1 in 2 delata s sevom BL21[DE3], skupini 3 in 4 s sevom DH5 α in skupina 5 s sevom XL1-Blue.

Značilnosti genotipa seva BL21[DE3]: *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ nin5*

XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r)]*

Na začetku vaje analizirajte dobljene rezultate 1. vaje (štetje kolonij, računanje frekvence transformacije). Po kratkem praktičnem delu 2. vaje pripravite gojišča za naslednje skupine oz. za naslednjo vajo. Manjkajoče podatke vam bo posredoval asistent.

Materiali:

- bakterijski sevi: BL21[DE3], DH5 α , XL1-Blue
- gojišče LBamp (1 l vsebuje 10 g proteinskega hidrolizata, 5 g kvasnega ekstrakta, 10 g NaCl in 30 g agarja, po avtoklaviranju dodano 100 mg ampicilina)
- X-gal: 20 mg/ml v dimetilformamidu
- IPTG: 20 % vodna raztopina (0,8 M)

Postopek:

- Pripravite si 6 plošč LBamp in jih oštevilčite (1-6) ter označite skupino in termin vaj.
- Na plošče sterilno nanesite raztopine in suspenzije po spodnji tabeli oz. kot je opisano spodaj:

pogoji \ plošča	1	2	3	4	5	6
IPTG	x	x			x	x
X-gal			x	x	x	x
pSB1AC3	x		x		x	
pGEM		x		x		x

- Na plošče 1, 2, 5 in 6 razmažite po ___ μ l IPTG.
 - Na plošče 3-6 razmažite po ___ μ l X-gal.
 - Ko se prejšnji dve raztopini vpijeta v gojišče, na plošče 1, 3 in 5 razmažite po 50 μ l kulture celic, transformiranih s pSB1AC3 (vsaka skupina dela z enim sevom – glej zgoraj pred navedbo materialov).
 - Na plošče 2, 4 in 6 razmažite po 50 μ l kulture celic, transformiranih s pGEM-5Zf.
- Inkubirajte čez noč pri 37 °C.
- Vsaka skupina zatehta potrebne sestavine za 400 ml gojišča LB, doda dH₂O in postavi raztopine v avtoklav, ki ga je treba zagnati še isti dan (sicer začnejo v gojišču rasti mikroorganizmi). Osnovni recept za pripravo gojišča je naveden na začetku opisa izvedbe vaje, pod Materiali. Preračun za 400 ml napišite tu spodaj:

Poročilo 2. vaje

Preštejte kolonije, ki so zrasle na ploščah 1-6 in v tabelo vpišite, koliko je bilo belih in koliko modrih ter preračunajte, kakšen delež (v %) predstavljajo modre kolonije. (Zgornja tabela je samo za pomoč pri kasnejši interpretaciji rezultatov.)

pogoji \ plošča	1	2	3	4	5	6
IPTG	x	x			x	x
X-gal			x	x	x	x
pSB1AC3	x		x		x	
pGEM		x		x		x

plošča	število belih kolonij	število modrih kolonij	delež modrih kolonij (%)
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Opišite rezultat vaše in ostalih skupin v spodnjih tabelah tako, da šrafirate tista polja, pri katerih so zrasle modre kolonije. Če je bil rezultat dvoumen (zelo svetlo modre kolonije ali pri eni skupini pretežno modre, pri drugi bele), vpišite '?!'.

Rezultati za sev DH5 α :

pogoji \ plošča	1	2	3	4	5	6
IPTG	x	x			x	x
X-gal			x	x	x	x
pSB1AC3	x		x		x	
pGEM		x		x		x

Rezultati za sev BL21[DE3]:

pogoji \ plošča	1	2	3	4	5	6
IPTG	x	x			x	x
X-gal			x	x	x	x
pSB1AC3	x		x		x	
pGEM		x		x		x

Rezultati za sev XL1-Blue:

pogoji \ plošča	1	2	3	4	5	6
IPTG	x	x			x	x
X-gal			x	x	x	x
pSB1AC3	x		x		x	
pGEM		x		x		x

Morebitna opažanja ob delu in komentar rezultatov:

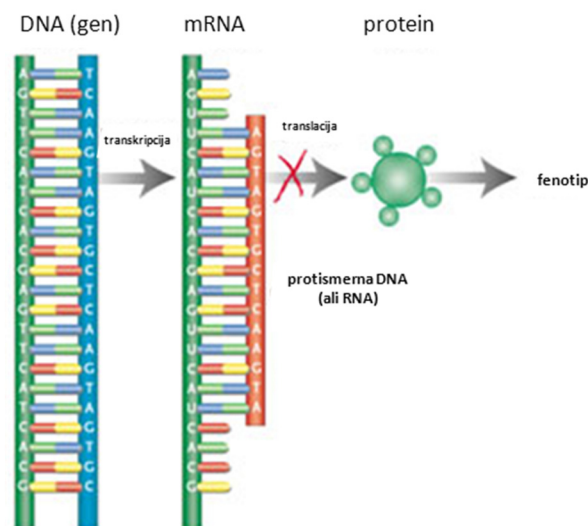
Odgovorite tudi na naslednja vprašanja:

- 1.) V čem je glede laktoznega operona bistvena razlika med sevoma DH5 α in XL1-Blue?
- 2.) Kakšen bi bil pričakovani rezultat podobnega poskusa, pri katerem bi v kombinaciji s sevom DH5 α uporabili plazmidni vektor, ki bi nosil zapis za celoten gen lacZ?
- 3.) Kakšna je vloga glukoze pri uravnavanju izražanja strukturnih genov laktoznega operona? Razložite!
- 4.) Ali bi pri paralelkah 1, 3 in 5 lahko uporabili gojišče, ki bi namesto ampicilina vsebovalo kloramfenikol? Kaj pa tako ampicilin kot tudi kloramfenikol? Na kratko utemeljite!
- 5.) Ali lahko to, da je frekvenca transformacije s sevom BL21[DE3] običajno za en red velikosti nižja kot pri ostalih dveh sevih, vpliva na interpretacijo rezultatov 2. vaje? Na kratko utemeljite!

3. Utišanje genov s protismerno RNA

Uravnavanje izražanja genov v celicah poteka na različnih ravneh. Pri prokariontih in evkariontih je najpogostejše uravnavanje na ravni transkripcije. Čeprav pri prokariontih večinoma govorimo o negativni regulaciji, ki jo posredujejo represorji, obstaja tudi pozitivna regulacija s posredovanjem aktivatorjev. Na primeru laktoznega operona sta klasična predstavnika teh regulatorjev represor LacI in protein CAP (kataboliti aktivatorski protein). Na predavanjih smo omenjali tudi posebne načine regulacije, kot je na primer delovanje kratke interferenčne RNA.

V pogojih *in vitro* lahko vplivamo na raven izražanja na več načinov, ki v naravi morda niso tako pogosti, so pa izvedbeno enostavni. Eden od teh načinov je uporaba protismerne RNA. Gre za nukleotidno zaporedje (enoverižno RNA), ki je komplementarno nekemu transkriptu (prav tako ssRNA), tako da lahko pride do parjenja baz. Posledica je nesposobnost vezave ribosomov, pa tudi razgradnja dsRNA v citoplazmi ob katalitičnem delovanju endogene RNaze H. Splošni princip delovanja protismernih zaporedij je razložen na sliki 13.



Slika 13: princip utišanja izražanja s protismernimi zaporedji. Ko RNA-polimeraza katalizira nastanek enoverižne mRNA, se nanjo veže komplementarno nukleotidno zaporedje, tako da nastane dvoverižna struktura. Taka ne more služiti kot matrica za ribosomsko sintezo proteina, zato kljub temu, da transkripcija poteka, koncentracija proteina ne naraste, neaktivnost proteina pa povzroči razvoj drugačnega fenotipa kot bi ga pričakovali v odsotnosti utišanja.

Pri evkariontih je protismerna tehnologija znana po prvi gensko spremenjeni rastlini, odobreni za prehrano. Paradižnik, ki so ga v ZDA prodajali v letih 1994 – 1997, je imel preko plazmidne DNA vključeno obrnjeno zaporedje tistemu, ki zapisuje za encim aminoglikozid fosfotransferazo. Ta encim je namreč odgovoren za hitro mehčanje plodov, kar je onemogočalo transport paradižnikov s tovornjaki iz Kalifornije na Vzhodno obalo, kjer so številna velika ameriška mesta. Da bi se izognili mehčanju, so prej obirali še nedozorele plodove, taki pa niso imeli dobrega okusa. Z uvedbo protismerne DNA (ta je nato privedla

do sinteze protismerne RNA) pod ustreznim promotorjem so dosegli, da je bilo mogoče plodove obrati, ko so bili že rdeči, zaradi zmanjšane koncentracije encima, ki povzroča mehčanje, pa so plodovi prišli v trgovine še čvrsti.

Enake pristope preizkušajo pri genskem zdravljenju, ko je treba zaustaviti prekomerno izražanje nekega gena, ki je povezan z razvojem bolezni. Razen tega je fenomen dvoverižne RNA tesno povezan z zanimivim področjem utišanja s posredovanjem interferenčne RNA.

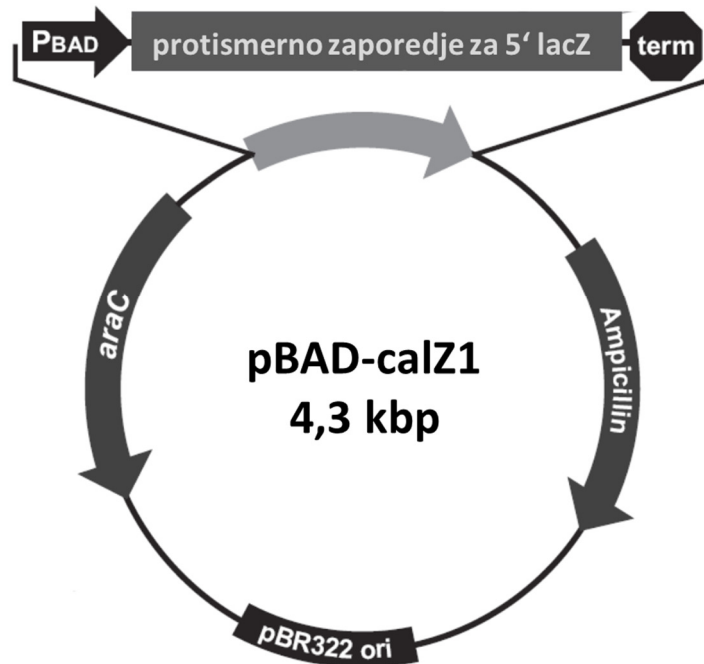
V prokariotskem svetu uporaba protismerne RNA ni običajna, saj obstajajo enostavnejši načini uravnavanja množine nekega proteina v celici. Ker pa je izvedba eksperimenta z bakterijami in na proteinskem modelu, ki ga zdaj že dobro poznate, dokaj nezahtevna, smo poskus vključili v laboratorijske vaje v 2. letniku.

Da bi prišlo do utišanja, ni potrebno, da pride do povezave komplementarnih verig v celotni dolžini zapisa za protein. Tudi pri paradižniku so uporabili samo del zapisa, ki jim je zaradi prisotnosti prepoznavnega mesta v genu prišel prav za prenos v vektor v obratni orientaciji. V našem poskusu utišanja gena *lacZ* je pristop podoben. Avtorji raziskave, na kateri temelji ta vaja, so ugotovili, da je bil najučinkovitejši protismerni konstrukt, ki se je ujema le s 5'-koncem zaporedja mRNA za protein LacZ.

Protismerno zaporedje v celice lahko uvedemo na različne načine. Najpreprostejši za razumevanje je verjetno vnos sintetičnih oligo- ali polinukleotidov, pri čemer si lahko pomagamo z elektroporacijo ali uporabo liposomov in podobnih lipidnih struktur. Vendar pa sinteza večjih količin nukleinskih kislin ni poceni, zato je smiselno protismerna zaporedja vnesti v celice s transformacijo. Uporabimo vektor, ki ima tarčnim celicam prilagojen promotor, vanj pa z ligazo vstavimo segment DNA, ki ima glede na promotor obrnjeno zaporedje v primerjavi z orientacijo gena na kromosomu.

V poskusu bomo preverili učinkovitost protismerne zaporedja na ravni mRNA. Sintezo protismerne RNA bo omogočal arabinozni promotor p_{BAD} – princip regulacije arabinoznega operona je predstavljen na sliki 14, obravnavali pa ga bomo tudi na predavanjih. RNA-polimeraza bo lahko katalizirala sintezo protismerne RNA samo, če bomo z arabinozo blokirali represor oziroma ga ob vezavi tega induktorja pretvorili v aktivator. V celicah bo vektorski konstrukt, ki temelji na vektorju p_{BAD} (slika 15). Zaporedje za protismerno RNA je torej vključeno pod kontrolo arabinoznega promotorja.

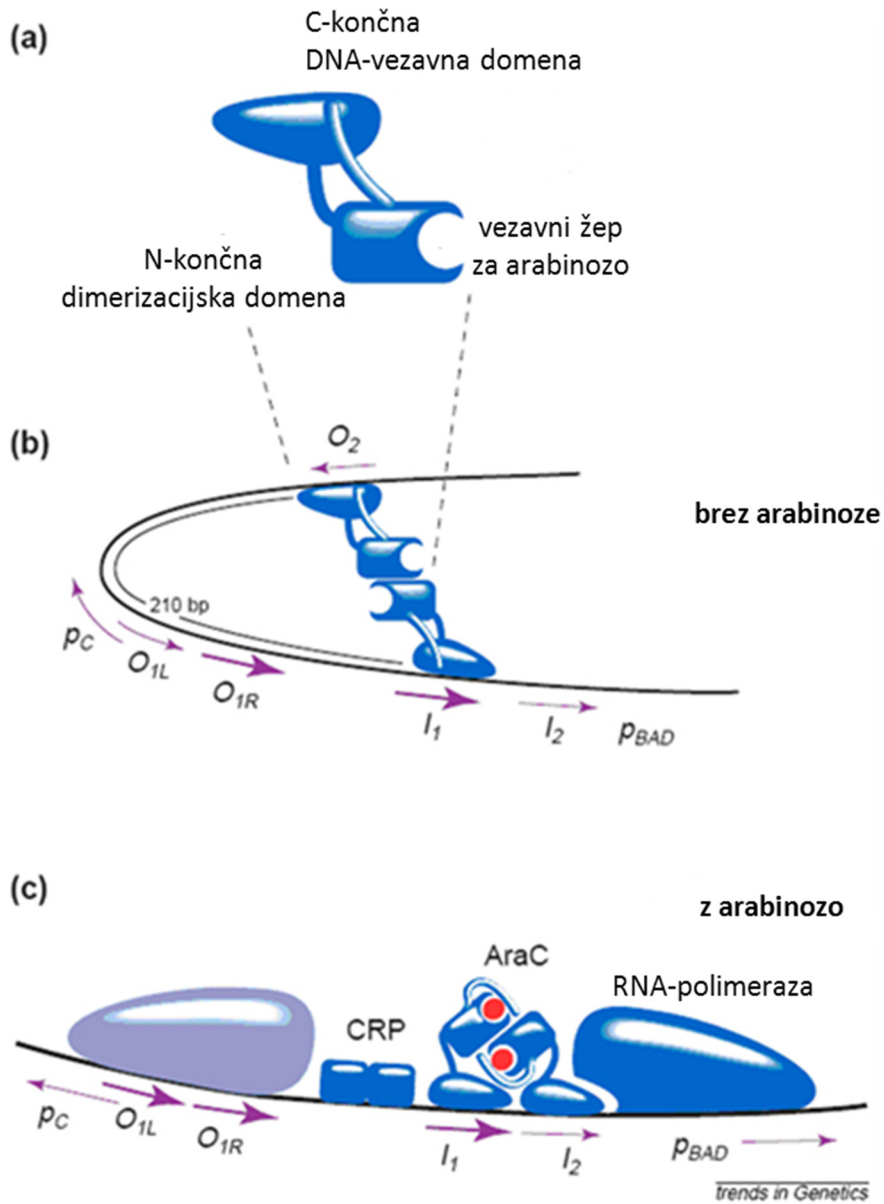
Za plazmidni vektor $p_{BAD-Zca1}$ je značilen arabinozni promotor in poseben način uravnavanja izražanja z arabinozo (regulatorni protein AraC deluje v odsotnosti arabinoze kot represor in v prisotnosti kot aktivator). Oznaka $Zca1$ pomeni, da je v vektor vključeno zaporedje, ki je obratno kot 5'-končni del zaporedja gena *lacZ* (zrcalno od *lacZ* → $Zca1$). Obrnjeno je zaporedje, ki se prekriva z vezavnim mestom za ribosom (Shine-Dalgarnovim zaporedjem) in še 307 nukleotidi kodirajočega zaporedja. Arabinoza deluje kot induktor izražanja tega protismerne zaporedja. Hkrati je treba inducirati tudi transkripcijo gena *lacZ*, kar naredimo z IPTG.



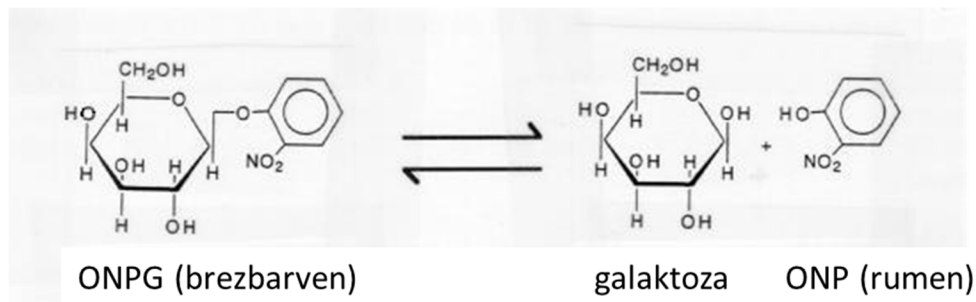
Slika 14: vektorska karta pBAD-calZ1. Promotorska regija p_{BAD} vključuje tudi vezavna mesta za regulatorni protein (prim. sliko 15) in vezavno meso za ribosom. Temu sledi zaporedje calZ1 (345 bp), ki vključuje 38 nt neprevajajočega se zaporedja na 5'-koncu in 102 kodona lacZ. Temu sledi terminatorska regija. Celice, transformirane z vektorjem pBAD-calZ1, bodo odporne proti ampicilinu. Mesto ori izhaja iz plazmida pBR322, na vektorju pa je tudi zapis za regulator arabinoznega operona, AraC.

V kontrolnem poskusu ne boste aktivirali izražanja protismernega zaporedja, sicer pa bo poskus potekal enako. Ali je do utišanja prišlo, v kakšni meri oz. s kakšno kinetiko, boste ugotavljali posredno preko preostale aktivnosti encima betagalaktozidaze (LacZ). Uporabili boste substrat o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG), ki ga encim razcepi v galaktozo in o-nitrofenol (slika 16). Koncentracijo tega produkta boste spremljali spektrofotometrično pri 420 nm, kjer je absorpcijski maksimum te spojine.

Ker je β -galaktozidaza citoplazemski encim, je potrebno celice pred izvedbo encimskega testa lizirati. Uporabili boste detergent CTAB, Na-deoksiholat in reducent β -merkaptetoanol. Če bi test aktivnosti želeli izvesti *in vivo*, bi lahko uporabili fluorogeni substrat 4-metilumbeliferil- β -D-galaktopiranozid, ki prehaja v celico. Encim za svoje delovanje potrebuje K^+ in Mg^{2+} ione. Reakcijo prekinemo z dodatkom Na_2CO_3 .



Slika 15: mehanizem regulacije arabinoznega operona. Operon *ara* sestavljajo strukturni geni *araB*, *araA* in *araD* pod kontrolo skupnega promotorja. Regulator je protein AraC, ki je zapisan navzgor od strukturnih genov in ima lasten promotor (p_C). AraC ima dve domeni: DNA-vezavno domeno in domeno, ki veže arabinozo (slika a). V celici deluje kot dimer. Če v celici ni arabinoze (slika b), je dimer AraC vezan na DNA na regijah O_2 in I_2 , kar predstavlja represorsko konfiguracijo. Ko se koncentracija arabinoze poveča (slika c), se ta veže v strukturo AraC, s tem pa pride do strukturne spremembe v proteinu in afiniteta do regije O_2 se zmanjša, poveča pa se afiniteta do regije I_2 . Dimer AraC z vezano arabinozo in v tej razporeditvi na DNA predstavlja aktivator in olajša vezavo RNA-polimeraze na p_{BAD} .



Slika 16: shema encimske razgradnje kromogenega substrata ONPG (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid). Betagalaktozidaza ga pretvori v galaktozo in ONP (o-nitrofenol), katerega koncentracijo lahko določamo spektrofotometrično v rumenem delu spektra (420 nm).

Vaja je pripravljena na osnovi vektorjev, ki smo jih dobili v uporabo od prof. dr. Alejandra Hochkoeplerja z Oddelka za industrijsko kemijo Univerze v Bologni (Italija). Vektorji in sistem so opisani v dveh člankih njegove skupine: Artificial antisense RNAs silence *lacZ* in *E. coli* by decreasing target mRNA concentration (BMB Reports, 2008) in Shine-Dalgarno sequence enhances the efficiency of *lacZ* repression by artificial anti-*lac* antisense RNAs in *Escherichia coli* (J. Bioscience Bioengng., 2010).

EKSPERIMENTALNO DELO

Izvedbeni postopek:

1. Asistent bo pripravil prekončno kulturo bakterijskih celic *Escherichia coli* BW25993 s plazmidom pBAD-Zca1.
2. V visokih epruveh pripravite dva alikvota po 8 ml kulture v gojišču LBamp in sicer tako, da prekončno kulturo redčite 1:10.
3. Stresajte pri 37 °C dokler gostota celic ne doseže $A_{600} = 1 - 1,5$.
4. Medtem v devet oštevilčenih mikrocentrifugirk (1-9) odpipetirajte po 80 μ l raztopine za razbijanje celic in jih zaprite.
5. V prvo mikrocentrifugirko (slepi vzorec) dodajte 20 μ l gojišča z ampicilinom.
6. Ko je celična kultura dosegla želeno koncentracijo (točka 3), enemu alikvotu bakterijskih celic dodajte IPTG do končne koncentracije 1 mM, drugemu pa poleg IPTG (končna konc. 1 mM) še arabinozo do končne koncentracije 13 mM.
7. Od obeh vzorcev iz prejšnje točke takoj odzemite po 20 μ l kulture in jih razredčite do teoretične $A_{550} = 1$. Po 20 μ l tako razredčenih kultur prenesite v raztopino za razbijanje celic.
8. Alikvota bakterijskih kultur pustite stresati pri enakih pogojih in vzemite vzorca kontrolnega in testnega alikvota po 10, 20 in 30 min. Vsakič liziranje celic opravite tako, kot je opisano v 7. točki.
9. Na koncu poskusa razbitim celicam v 15-sekundnih razmahih dodajte po 600 μ l raztopine substrata.
10. Po 10 min v istem vrstnem redu dodajte po 700 μ l 1 M Na_2CO_3 in dobro premešajte.
11. Izmerite absorbanco pri 420 nm in podatke vpišite v tabelo ter vrišite v graf odvisnosti utišanja gena od časa indukcije izražanja protismernega zaporedja.

Poročilo 3. vaje

Gostota celične kulture ob začetku poskusa (izražena turbidimetrično) je bila $A_{550} =$ _____. Redčenje do $A_{550}=1,0$ smo opravili tako, da smo k 20 μl bakterijske kulture dodali ____ μl gojišča.

Po 10 min nadaljevanja gojenja je bila $A_{550} =$ _____. Redčenje do $A_{550}=1,0$ smo opravili tako, da smo k 20 μl bakterijske kulture dodali ____ μl gojišča.

Po 20 min gojenja je bila $A_{550} =$ _____. Redčenje do $A_{550}=1,0$ smo opravili tako, da smo k 20 μl bakterijske kulture dodali ____ μl gojišča.

Po 30 min gojenja je bila $A_{550} =$ _____. Redčenje do $A_{550}=1,0$ smo opravili tako, da smo k 20 μl bakterijske kulture dodali ____ μl gojišča.

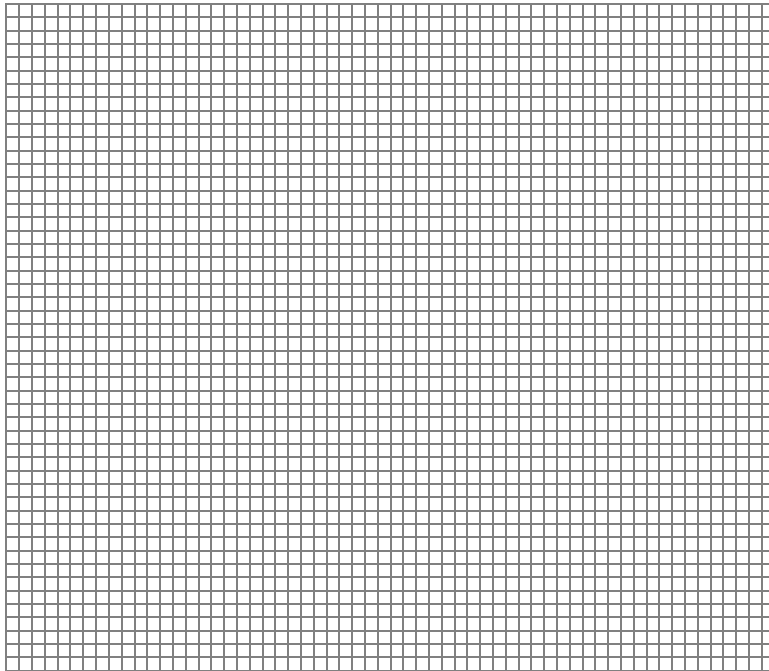
Meritve encimske aktivnosti na substrat ONPG

V tabeli so izmerjene vrednosti A_{420} za kontrolne vzorce (IPTG⁺) in vzorce utišanja gena (IPTG⁺/ara⁺). Vrednost za slepi vzorec (1), ki kaže vrednost v odsotnosti celic, je bila _____.

vzorec	IPTG ⁺	IPTG ⁺ /ara ⁺
0 min (2, 3)		
10 min (4, 5)		
20 min (6, 7)		
30 min (8, 9)		

Na naslednji strani je graf kinetike izražanja betagalaktozidaze za kontrolni vzorec in vzorec z izraženim protismernim zaporedjem (dve krivulji). Vrednosti iz tabele so zmanjšane za vrednost slepega vzorca.

Graf časovne odvisnosti aktivnosti betagalaktozidaze v celicah z izraženim protismernim zaporedjem (□) in brez protismernega zaporedja (○).



Morebitna opažanja ob delu in komentar rezultatov:

Vprašanja za poročilo:

1. Na osnovi slike 15c in znanja s predavanj razložite, kaj bi se zgodilo, če bi v gojišče razen IPTG dodali še glukozo! Bi se izražanje betagalaktozidaze povečalo ali zmanjšalo? Zakaj?
2. Zakaj slepi vzorec pri A420 nima vrednosti 0,000, saj vendar ne vsebuje aktivnega encima?
3. Ali bi lahko namesto substrata ONPG uporabili laktozo, ki je naravni substrat betagalaktozidaze? Utemeljite!