

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Alenka SEDLAR

**PRIMERJAVA DVEH BREZCELIČNIH SISTEMOV
ZA IZRAŽANJE PROTEINOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Alenka SEDLAR

**PRIMERJAVA DVEH BREZCELIČNIH SISTEMOV ZA IZRAŽANJE
PROTEINOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF TWO CELL-FREE SYSTEMS FOR PROTEIN
EXPRESSION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Alenka SEDLAR

**PRIMERJAVA DVEH BREZCELIČNIH SISTEMOV
ZA IZRAŽANJE PROTEINOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Alenka SEDLAR

**PRIMERJAVA DVEH BREZCELIČNIH SISTEMOV ZA IZRAŽANJE
PROTEINOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF TWO CELL-FREE SYSTEMS FOR PROTEIN
EXPRESSION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Odseku za biokemijo in molekularno biologijo Instituta "Jožef Štefan" v Ljubljani ter na Katedri za biotehnologijo, na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja, za somentorja prof. dr. Borisa Turka in za recenzentko prof. dr. Ines Mandić-Mulec.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor
Somentor: prof. dr. Boris Turk
Recenzentka: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Član: prof. dr. Peter Raspor
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Član: prof. dr. Boris Turk
Institut "Jožef Stefan", Ljubljana, Odsek za biokemijo
in molekularno biologijo
Članica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Alenka Sedlar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.66:547.96:577.2.08(043)=863
CX	proteins/synthesis of proteins/green fluorescent protein/enzymes/recombinant gene expression/expression vectors/ <i>in vitro</i> transcription/ <i>in vitro</i> translation/ <i>Escherichia coli/ Saccharomyces cerevisiae</i> /cell-free expresion system
AU	SEDLAR, Alenka
AA	RASPOR, Peter (supervisor)/TURK, Boris (co-advisor)/MANDIĆ-MULEC, Ines (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2007
TI	COMPARISON OF TWO CELL-FREE SYSTEMS FOR PROTEIN EXPRESSION
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XIII, 67 p., 17 tab., 12 fig., 6 ann., 77 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Two cell-free systems for protein expression, based on cell extracts from bacterium <i>Escherichia coli</i> and yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> were prepared and also compared. To observe the <i>in vitro</i> translation, mRNA encoding the green fluorescent protein (mRNA-GFP) was prepared. A gene for the green fluorescent protein, was inserted into expression vectors pET22b(+) and pIVEX 1.3 WG, and multiplied, using bacterial cells DH5α. <i>In vitro</i> transcription, yielding mRNA-GFP, was performed and obtained mRNA was translated in to cell-free systems, bacterial and eukaryotic, which differed only in few components. The presence of active GFP molecules was confirmed in both systems by measuring fluorescence emitted by GFP. Analysis of green fluorescent protein, using SDS electrophoresis, was not possible due to low GFP yield in comparison to other expressed proteins of similar size.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XII
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA.....	1
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV.....	2
2.1 ZGODOVINA RAZVOJA BREZCELIČNIH SISTEMOV	2
2.1.1 Tipi brezceličnih sistemov in njihova produktivnost	2
2.2 PRIPRAVA BREZCELIČNIH SISTEMOV	3
2.2.1 Celični lizati.....	3
2.2.1.1 Prokariontski ekstrakti	4
2.2.1.2 Evkariontski ekstrakti	5
2.2.2 Priprava eksogene mRNA.....	6
2.2.2.1 Vektor pEGFP-N2	7
2.2.2.2 Vektor pGEM-T Easy	8
2.2.2.3 Vektor pIVEX 1.3 WG	8
2.2.2.4 Vektor pET22b(+)	9
2.2.2.5 Transkripcija DNK v mRNA	9
2.2.3 Transkripcijska mešanica kot dodatek k donosnejšemu brezceličnemu sistemu	10
2.2.4 Postmodifikacije beljakovin v brezceličnemu sistemu.....	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 SHEMA DELA.....	12
3.2 MATERIAL.....	12
3.2.1 Kemikalije	12
3.2.2 Komercialni kiti	12
3.2.3 Organizmi.....	12
3.2.4 Začetna oligonukleotida.....	12
3.2.5 Pufri in gojišča.....	12
3.2.6 Laboratorijska oprema.....	14
3.3 METODE MOLEKULARNEGA KLONIRANJA	16
3.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) za pomnožitev cDNA zeleno fluorescentne beljakovine	16
3.3.2 Vstavitev cDNA GFP v vektor za kloniranje pGEM-T Easy	17
3.3.2.1 Proces modificiranja 3'-koncev cDNA zeleno fluorescentne beljakovine	17
3.3.2.2 Vstavitev fragmenta cDNA GFP v vektor za kloniranje pGEM-T Easy	18

3.3.3 Prekloniranje cDNK GFP iz klonirnega vektorja pGEM-T-GFP v vektor za ekspresijo pIVEX 1.3 WG ter pET22b(+)	19
3.3.3.1 Vstavitev fragmента cDNK GFP v vektor za ekspresijo pIVEX1.3 WG...	19
3.3.3.2 Vstavitev fragmента cDNK GFP v vektor za ekspresijo pET22b(+)...	20
3.3.6 Transformacija kompetentnih celic s temperaturnim šokom.	20
3.3.6.1 Transformacija kompetentnih celic DH5 α s temperaturnim šokom.	21
3.3.6.2 Transformacija kompetentnih celic BL21(DE3) s temperaturnim šokom	21
3.3.7 Namnoževanje in preverjanje kolonij.	21
3.3.8 Določevanje koncentracije in količine izolirane DNK v vzorcu.	22
3.3.8.1 Določanje koncentracije in čistosti DNK z agarozno gelsko elektroforezo	22
3.3.8.2 Določanje koncentracije in čistosti DNK z UV-spektrofotometrom.....	23
3.3.9 In vitro sinteza mRNK iz pripadajoče DNK.	24
3.3.9.1 Transkripcija lineariziranega plazmida pIVEX 1.3-GFP v mRNA-GFP1.....	24
3.3.9.2 Transkripcija lineariziranega plazmida pET22-GFP v mRNA-GFP2.	24
3.3.10 Čiščenje eksogene mRNA	25
3.4 METODE ZA PRIPRAVO CELIČNEGA EKSTRAKTA	26
3.4.1 Namnožitev bakterijskega seva <i>E. coli</i> Bl21-CodonPlus-RIL ter celično razbijanje z lizocimom v TE pufru.	26
3.4.1.1 Kultivacija bakterije <i>E. coli</i> v tekočem LB gojišču.	26
3.4.1.2 Encimsko razbijanje celične membrane s pomočjo lizocima.	26
3.4.2 Namnožitev kvasovk <i>S. cerevisiae</i> S228c ter celično razbijanje s steklenimi kroglicami.	27
3.4.2.1 Kultivacija kvasovk <i>S. cerevisiae</i> v tekočem YEPD gojišču.	27
3.4.2.1 Mehansko razbijanje celične stene s steklenimi kroglicami.	28
3.4.3 Dializa celičnih ekstraktov.	28
3.4.4 Umerjanje absorbance ekstraktov S30.	29
3.5 METODE ZA VZPOSTAVITEV BREZCELIČNIH SISTEMOV IN DOLOČITEV NJIHOVIH DONOSOV	30
3.5.1 Priprava translacijske mešanice reagentov za brezcelični sistem	30
3.5.2 Vzpostavitev brezceličnega sistema.	31
3.5.3 Preverjanje uspešnosti translacije v brezceličnemu sistemu.	32
3.5.3.1 Merjenje fluorescence GFP proteina s spektrofotometrom.....	32
3.5.3.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS PAGE)	32
4 REZULTATI	34
4.1 MOLEKULSKO KLONIRANJE TER IN VITRO SINTEZA mRNA-GFP	34

4.1.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR) za pomnožitev cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine (GFP).....	34
4.1.2	Vstavitev cDNK GFP v vektor za kloniranje pGEM-T Easy.....	35
4.1.3	Vstavitev cDNK GFP v vektor za ekspresijo pIVEX 1.3 WG.....	36
4.1.4	Vstavitev cDNK GFP v vektor za ekspresijo pET22b(+)	37
4.1.5	Restriktionska analiza plazmidov pGEM-T-GFP, pIVEX 1.3-GFP in pET22-GFP	38
4.1.6	In vivo izražanje zeleno fluorescenčne beljakovine v <i>E. coli</i>	38
4.1.7	Določanje koncentracije in čistosti DNK z UV-spektrofotometrom.....	39
4.1.8	Transkripcija cDNK-GFP v mRNK-GFP	39
4.2	GOJENJE CELIC IN PRIPRAVA CELIČNEGA EKSTRAKTA.....	40
4.2.1	Priprava <i>E. coli</i> ekstrakta z lizocimom	40
4.2.2	Priprava <i>S. cerevisiae</i> ekstrakta s steklenimi kroglicami	40
4.3	SINTEZA ZELENO FLUORESCENČNE BELJAKOVINE V BREZCELIČNEM SISTEMU.....	41
4.3.1	Določanje izražanja beljakovin z merjenjem fluorescence	41
4.3.2	NaDS poliakrilamidna gelska elektroforeza	43
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	46
5.1	RAZPRAVA.....	46
5.1.1	Priprava in sinteza mRNK molekule	46
5.1.2	Priprava ekstrakta S30	48
5.1.3	Priprava translacijske mešanice	50
5.1.4	Vzpostavitev, delovanje in primerjava brezceličnih sistemov.....	51
5.2	SKLEPI	54
6	POVZETEK.....	55
7	VIRI.....	56
	ZAHVALA	63

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2.1: Razlike in podobnosti med prokariotskim in evkariotskim celičnim ekstraktom (Lenhninger in sod., 1993; Roche, 2002-2003).....	3
Preglednica 2.2: Razlike in podobnosti evkariotske in prokariotske mRNA (Shine in Dalgarno, 1975; Kozak, 1986 in 1987; Lehninger in sod., 1993; Lodish in sod., 2003)	9
Preglednica 3.1: Reakcijska mešanica za PCR reakcijo (pomnoževanje gena za GFP) (Mullis, 1985).	17
Preglednica 3.2: Program za reakcijo PCR, ki omogoča denaturacijo, vezavo oligonukleotidov in podaljševanje verige cDNA GFP (Cheng in sod., 1994).....	17
Preglednica 3.3: Reakcijska mešanica za proces modificiranja 3'-koncov cDNA GFP (Promega, 1999).	18
Preglednica 3.4: Ligacija fragmenta cDNA GFP in plazmida pGEM-T Easy (Hayashi in sod., 1986).....	18
Preglednica 3.5: Restriktijska analiza plazmida pGEM-T-GFP z restriktijskima endonukleazama <i>Xba</i> I in <i>Nde</i> I (Promega, 1999).....	19
Preglednica 3.6: Ligacija fragmenta cDNA GFP in vektorja pIVEX 1.3 WG (Hayashi in sod., 1986).....	19
Preglednica 3.7: Ligacija fragmenta cDNA GFP in vektorja pET22b(+) (Hayashi in sod., 1986).....	20
Preglednica 3.8: Restriktijska analiza plazmidne DNA vzorcev A, pIVEX 1.3-GFP, z restriktijsko endonukleazo <i>Pvu</i> I (Promega, 1999; Clontech, ZDA).....	22
Preglednica 3.9: Restriktijska analiza plazmidne DNA vzorcev B, pET22-GFP, z restriktijsko endonukleazo <i>Eco</i> V (Promega, 1999; Clontech, ZDA).....	22
Preglednica 3.10: Restriktijska mešanica za proizvodnjo 3'-topi konec s pomočjo Klenowga fragmenta (Promega, 2006).....	24
Preglednica 3.11: Restriktijska mešanica za proizvodnjo mRNA-GFP2 iz lineariziranega pET22-GFP vektorja (Promega, 2006).....	25
Preglednica 3.12: Encimsko razbijanje celične membrane bakterije <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus-RIL v pufru A s pomočjo lizocima v TE pufru.....	27
Preglednica 3.13: Razbijanje celičnih komponent kvasovke <i>S. cerevisiae</i> S288c s steklenimi kroglicami velikosti od 425 do 600 mikronov v pufru A (Scopes, 1987).....	28
Preglednica 3.14: Pregled dodanih reagentov za translacijsko mešanico: potrebna molarna količina reagenta, ime reagenta in molekulska masa nekaterih reagentov (Madin in sod., 1999; Kigawa in sod., 1999).....	30
Preglednica 3.15: Vzpostavitev brezceličnega sistema s pomočjo dodanih komponent: translacijska mešanica, ekstrakt S30 bakterije <i>E. coli</i> , mRNA-GFP ter DEPC voda.....	31

Preglednica 3.16:Vzpostavitev prokariotskega brezceličnega sistema s pomočjo dodanih komponent: translacijska mešanica, ekstrakt S30 kvasovke <i>S. cerevisiae</i> , mRNK-GFP ter DEPC voda.....	32
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

KAZALO SLIK

Slika 3.1: Shema eksperimentalnega dela: priprava brezceličnega sistema in sinteza GFP beljakovine	11
Slika 4.1: Elektroforeza na 0,8 % agaroznem gelu s PCR pomnožene cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine.....	34
Slika 4.2: Restrikcijska analiza, z restriktazama <i>XhoI</i> in <i>NdeI</i> , plazmida pIVEX 1.3 z vstavljeno cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine na 0,8 % agaroznem gelu.....	36
Slika 4.3: Restrikcijska analiza, z restriktazo <i>EcoRV</i> , plazmida pET22 z vstavljeno cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine na 0,8 % agaroznem gelu.....	37
Slika 4.4: Primerjava celic bakterijskega seva <i>E. coli</i> BL21(DE3) z in brez vektorjema pET22-GFP.....	38
Slika 4.5: Bakterijske celice <i>E.coli</i> BL21(DE3) z vektorjem pET22-GFP pod mikroskopom.....	39
Slika 4.6: Grafični prikaz emisijskega spektra (od 400 do 540 nm) posnetega za brezcelični sistem narejen iz bakterijskega ekstrakta <i>E. coli</i> (logaritemska faza rasti celic) na merilecu fluorescence pri konstantnem ekscitacijskem spektru Eex = 375 nm.....	41
Slika 4.7: Grafični prikaz emisijskega spektra (od 400 do 540 nm) posnetega za brezcelični sistem narejen iz bakterijskega ekstrakta <i>E. coli</i> (stacionarna faza rasti celic) na merilecu fluorescence pri konstantnem ekscitacijskem spektru Eex = 375 nm.....	42
Slika 4.8: Grafični prikaz emisijskega spektra (od 400 do 540 nm) posnetega za brezcelični sistem narejen iz kvasnega ekstrakta <i>S. cerevisiae</i> (logaritemska faza rasti celic) na merilecu fluorescence pri konstantnem ekscitacijskem spektru Eex = 375 nm.....	42
Slika 4.9: Grafični prikaz emisijskega spektra (od 400 do 540 nm) posnetega za brezcelični sistem narejen iz kvasnega ekstrakta <i>S. cerevisiae</i> (stacionarna faza rasti celic) na merilecu fluorescence pri konstantnem ekscitacijskem spektru Eex = 375 nm.....	43
Slika 4.10: NaDS poliakrilamidna gelska elektroforeza prokariontskega brezceličnega sistema po končanem spremljanju nastajajoče aktivne oblike beljakovine GFP.	44
Slika 4.11: NaDS poliakrilamidna gelska elektroforeza evkariontskega brezceličnega sistema po končanem spremljanju nastajajoče aktivne oblike beljakovine GFP..	45

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vektor pEGFP-N2 (BD Biosciences, ZDA)

Priloga B: Nukleotidno in beljakovinsko zaporedje zeleno fluorescenčne beljakovine (BD Biosciences, ZDA).

Priloga C: Klonirni vektor pGEM-T Easy (Promega, ZDA)

Priloga D: Ekspresijski vektor pET22b(+) (Novagen, ZDA)

Priloga E: Ekspresijski vektor pIVEX 1.3 WG (Roche, Švica)

Priloga F: Rastna krivulja za kvasni sev *S. cerevisiae* S228c v tekočem YEPD gojišču

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AcK	kreatin acetat
AcP	acetil fosfat
AK	aminokislina
AMP	adenozin nukleozid monofosfat
ATP	adenozin nukleozid trifosfat
bp	bazni par
BSA	angl. <i>bovine serum albumine</i> (goveji serumski albumin)
°C	stopinj celzija
CAT	angl. <i>chloramphenicol acetyltransferase</i> (kloramfenikol acetiltransferaza)
cDNA	angl. <i>complementary DNA</i> (komplementarna DNK)
CECF	angl. <i>continuous exchange cell-free</i> (kontunuiran brezcelični sistem)
CFCF	angl. <i>continuous flow cell-free</i> (kontinuiran odprti brezcelični sistem)
CK	angl. <i>creatine kinase</i> (kreatin kinaza)
CP	angl. <i>creatine phosphate</i> (kreatin fosfat)
CTAB	heksadeciltrimetil amonijev bromid
CTP	citozin nukleozid trifosfat
dATP	2'-deoksiadenozin-5'trifosfat
dH2O	destilirana voda
DEPC	dietil pirokarbonat
DNaza	deoksiribonukleaza
dGTP	2'-deoksigvanozin-5'trifosfat
dH2O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	2'-deoksinukleozid-5'-trifosfat
dsDNA	angl. <i>double stranded DNA</i> (dvoverižna DNK)
DTT	ditiotreitol (treo-1,4-dimerkapto-2,3-butandiol)
EF	prokariotski elongacijski faktor translacije
eEF	evkarijotski elongatorski faktor translacije
EIF	evkarijotski iniciatorski faktor translacije
eRF	evkarijotski terminacijski faktor translacije
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamino-N,N,N',N'-tetraocetna kislina
E-64	1-L-trans-epoksisukcinil-levcilamido-3-(4-gvanidino)butan
GFP	angl. <i>green fluorescent protein</i> (beljakovina, ki oddaja fluorescenco zelene svetlobe)
GMP	gvanozin nukleozid monofosfat
GSH	reducirana oblika glutationa
GTP	gvanozin nukleozid trifosfat
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HEPES	N-(2-hidroksietyl)piperazin-N'-2-etansulfonska kislina
His ₆	heksahistidin
HTN	raztopina HEPES, tirozina in NaN ₃
IF	prokarijotski iniciatorski faktor translacije
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranoid
kDa	kilodalton, enota za molekulsko maso

KOAc	kalijev acetat
KOH	kalijev hidroksid
LB	gojišče po Lurii in Bertaniju
LBA	gojišče LB, ampicilin 100 µg/ml
LBK	gojišče LB, kanamicin 10 µg/ml
M	enota za molarnost, mol/l
MCS	angl. <i>multi clone site</i> (poliklonsko mesto)
ME	β-merkaptoetanol
mg	miligram, enota za maso
µg	mikrogram, enota za maso
Mg(OAc) ₂	magnezijev acetat
Mr	molekulska masa
mRNK	angl. <i>messenger RNA</i> (informacijska ribonukleinska kislina)
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaN ₃	natrijev nitrid
P40	polioksietilen p-t-oktil-fenol (Nonidet-P40)
P(OAc)	fosforjev acetat
PCR	angl. <i>polymerase chain reaction</i> (verižna reakcija s polimerazo)
PEP	angl. <i>phosphoenol pyruvat</i> (fosfoenol piruvat)
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PK	piruvat kinaza
RF	prokariontski terminacijski faktor translacije
RNK	ribonukleinska kislina
Rnaza	ribonukleaza
RTS	angl. <i>rapid translation system</i> (hitri translacijski sistem)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	natrijev dodecil sulfat
ssDNA	angl. <i>single stranded DNA</i> (enoverižna DNK)
TE	raztopina Tris-a in EDTA
TAE	raztopina Tris-a, ocetne kisline in EDTA
TBE	tris – boratni elektroforezni pufer
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
Tris	2-amio-2-hiroksimetil-1,3-propandiol
tRNK	prenašalna ribonukleinska kislina
U	angl. <i>unit</i> (enota)
UTP	uracil nukleozid trifosfat
x g	težni pospešek (9,81 m/s ²)
YEPD	kvasni ekstrakt, pepton, dekstroza
UTR	angl. <i>untranslated regions</i> (nekodirajoča regija na mRNK molekuli)
UV	ultravijolično

Standardne kratice za nukleotide

Enočrkovna oznaka	Nukleotid
A	adenin
C	citozin
G	gvanin
T	timin
U	uracil

Okrajšave imen aminokislín

Enočrkovna oznaka	Tričrkovna oznaka	Aminokislina
A	Ala	alanin
C	Cys	cistein
D	Asp	aspartat ali asparaginska kislina
E	Glu	glutamat ali glutaminska kislina
F	Phe	fenilalanin
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
K	Lys	lizin
L	Leu	levcin
M	Met	metionin
N	Asn	asparagin
P	Pro	prolin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
V	Val	valin
W	Trp	tryptofan
Y	Tyr	tirozin

1 UVOD

OPREDELITEV PROBLEMA

Mikroorganizme je človek začel izkoriščati za svoje potrebe že v daljni zgodovini. Novejše metode uporabljajo mikroorganizme za proizvodnjo različnih spojin, tudi beljakovin. Pri tem včasih naletimo na problem preživetja mikroorganizma zaradi mikroorganizmu toksičnega produkta. Problem so znanstveniki rešili z odkritjem brezceličnih sistemov. Osnovna ideja je namnožiti mikroorganizem do določene stopnje in količine, nato pa po razbitju celic uporabiti molekularno orodje organizma za sintezo beljakovin. Za uspešno pripravo rekombinantnih beljakovin je včasih potrebno preizkusiti več sistemov v krajšem času. V našem eksperimentu bomo zato uporabili dva različna brezcelična sistema pripravljenega iz prokariontskega in evkariontskega ekstrakta z minimalnimi razlikami med sistemi, ki nam bodo omogočila hitro zamenjavo in s tem hitrejši uspeh.

CILJ RAZISKOVANJA

Namen diplomskega dela je primerjava brezceličnih sistemov z biosintetskim ekstraktom iz bakterije *E. coli* ter iz kvasovke *S. cerevisiae*. Priprava sistema bo temeljila na veliki podobnosti sestave komponent, kar bo omogočilo hitro prilagajanje dela. Razlike bodo le v nujnih komponentah. Optimalen izbor vektorja za izražanje in njegovo procesiranje, z metodami molekularne biologije, bo omogočilo pravilno zvitje in izražanje modelne beljakovine: zeleno fluorescenčna beljakovina (angl. "green fluorescent protein" – GFP). Z metodami fluorospektrometrije bomo sledili nastanku zeleno fluorescenčne beljakovine.

DELOVNA HIPOTEZA

Hipoteza diplomske naloge je, sposobnost dveh sistemov, tako bakterije *Escherichia coli*, kot tudi kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, da sta z minimalnimi razlikami v sestavi sposobna proizvajati zeleno fluorescenčno beljakovino v aktivni obliki.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA RAZVOJA BREZCELIČNIH SISTEMOV

Na začetku pedesetih let prejšnjega stoletja so prvič spoznali, da celična integriteta ni nujno potrebna za sintezo beljakovine ter da lahko sinteza poteka tudi po razbitju celic (Spirin, 2002). Littlefield in sod. (1955) so prvi pripravili pravi brezcelični ribosomalni sistem za beljakovinsko sintezo (translacija) iz živalskega (iz podganjih celic) celičnega ekstrakta. Temu delu sta sledili nemški in ameriški skupini (Schachtschabel in Zillig, 1959; Lamborg in Zamecnik, 1960), ki sta pripravili sistem temeljoč na bakterijskem (*E. coli*) ekstraktu. Zanimivo je to, da so se pri tem uporabljali endogene mRNA molekule.

Spirin (2002) je mnenja, da sta revolucionarno spremembo, z uporabo eksogene mRNA molekule v brezceličnemu – translacijskemu sistemu, uvedla Nirenberg in Matthaei (1961, cit. po Spirin, 2002). Na bakterijskemu sistemu iz *E. coli*, sta v predinkubaciji celičnega ekstrakta na povišani temperaturi spodbudila ločitev endogene mRNA od ribosomov. Tako je bil prazen ribosom sposoben sprejeti eksogene mRNA oziroma sintetične poliribonukleotide za polipeptidno sintezo. Kasneje so znanje prenesli na brezcelični sistem narejen iz zajčjih retikulocitov, ki je bil brez endogene mRNA s pomočjo mikrokokne od Ca^{2+} odvisne RNazne obdelave (Pelham in Jackson, 1976). Še en zelo uporaben brezcelični sistem izhaja iz ekstrakta iz pšeničnih kalčkov, kjer ni potrebna obdelava endogene mRNA zaradi njene nizke koncentracije (Roberts in Jackson, 1973).

2.1.1 Tipi brezceličnih sistemov in njihova produktivnost

Prvo generacijo brezceličnih sistemov so sestavili Littlefield in sod. (1955) in je imela zelo kratko inkubacijsko dobo (pod eno uro) ter posledično manjše koncentracije končnega produkta. Tak sistem je zelo hitro izčrpal visoko energetske fosfatne ekstrakte, ki so povezani z nastankom magnezijevih kompleksov in z inhibicijo beljakovinske sinteze. Ta problem so delno rešili Spirin in sod. (1988) z uvedbo kontinuiranega translacijskega sistema (angl. "continuous flow cell free" - CFCF), kjer se nepretrgano dodajata energija in substrat ter konstantno odvzema različne produkte. Tak sistem deluje do dvajset ur in ima povečan donos za dva kratno vrednost enostavnega sistema. Sledil je čas, ko se je veliko laboratorijev usmerilo v raziskave lažjega in bolj prijaznejšega sistema, ki ima polprepustno membrano. Tako je tehnologija s časoma ta sistem poenostavila s semi-kontinuiranim sistemom (angl. "continuous exchange cell free" - CECF) (Kim in sod., 1996). Reakcijska doba takega brezceličnega sistema se podaljša na račun subsistema, ki regenerira energijske zaloge znotraj brezceličnega sistema. Za pripravo takšnega sistema je potrebno znanje miniaturizacije in avtomatizacije.

Zelo pomembno vlogo pri sestavljanju najbolj učinkovitega brezceličnega sistema sta odigrala Kim in Swartz (Kim in Swartz, 1999; Kim in Swartz, 2000; Kim in Swartz, 2001), saj sta pripravila efektivnejšo in cenovno ugodnejšo metodo, pri kateri ima ATP oziroma GTP napajalni subsistem integriran v brezcelični sistem.

2.2 PRIPRAVA BREZCELIČNIH SISTEMOV

2.2.1 Celični lizati

Tako Spirin (2002) kakor tudi Katzen in sod. (2005) ugotavljajo, da je lahko katerikoli organizem potencialni vir za brezcelični ekspresijski sistem, seveda pa so najbolj popularni lizati iz bakterije *E. coli*, iz pšeničnih kalčkov in iz zajčjih retikulocitov. Sam izbor sistema je deternimiran z izvorom in biokemijsko naravo željene sintetizirajoče beljakovine. Prvotna uporaba je bila namenjena za razumevanje prepisa mRNK molekule v funkcionalni polipeptid, za odkrivanje antibiotikov ter za ekspresijo toksičnih produktov. Veliko poizkusov je bilo potrebnih, da so prišli do prave mešanice, ki jim je omogočila *in vitro* sintezo beljakovin (sledilo je *in vitro* evolucija, avtomatizacija, miniaturizacija...).

Poglavitne razlike sistemov se opazijo predvsem med sistemih narejenih iz prokarionskih in evkarionskih lizatov, kar sem prikazala v spodnji tabeli Preglednica 2.1. Katerega bomo uporabili je odvisno od narave beljakovine, katero želimo proizvestil.

Preglednica 2.1: Razlike in podobnosti med prokarionskim in evkarionskim brezceličnim sistemom (Lehninger in sod., 1993; Roche, 2002-2003).

Komponente	Prokariontski sistemi	Evkariontski sistemi
Ribosomi	70S	80S
Mala podenota	30S	40S
Št. Beljakovin	~ 21	~ 30
Velikost RNK molekule (št. baz)	16S (1500)	18S (2300)
Velika podenota	50S	60S
Št. Beljakovin	~ 34	~ 50
Velikost RNK molekule (št. baz)	23S (2900), 5S (120)	28S (4200), 5,8S (160), 5S (120)
mRNK*	Brez postmodifikacij	Postmodifikacija prekurzne mRNK v zrelo mRNK s 5'- "cap" repom in 3'- poliA repom
Elongator tRNK-jev	Prokariontski	Evkariontski
Iniciatorska molekula tRNK	tRNK ^{Met} **	tRNKi ^{Met}
Iniciacijski faktorji	eIF-ji:1, 2, 3	eIF-ji:1, 1A, 2, 2A, 2B, 3, 4A, 4B, 4F (4A+4E+4G), 5, 5A, 6, SUI1
Elongacijski faktorji	EF-ji: Tu, Ts, G, P	eEF-ji: 1A, 1B, 1G, 2, 3
Terminacijski faktorji	RF-ji: 1, 2, 3, 4, H	eRF-ji: 1, 2, 3
Aminokisline	Vseh 20	Vseh 20
ATP in GTP***	+	+
Magnezij	8–15 mM	1–4 mM

"se nadaljuje"

"nadaljevanje"

Preglednica 2.1: Razlike in podobnosti med prokarionskim in evkarionskim brezceličnim sistemom (Lehninger in sod., 1993; Roche, 2002-2003).

Komponente	Prokariontski sistemi	Evkariontski sistemi
K+ in/ali NH₄+	100–250 mM	okoli 100 mM
Ostale komponente	ME, ali DTT, ali GSH, inhibitor proteaz, inhibitor RNaz (npr. RNAzin) in antiseptiki (npr. NaN3).	
Puffer	pH 7.4 – 8	

Legenda: seznam komponent za brezcelični translacijski sistem

* - vsi brezcelični sistemi so sestavljeni iz sintetizirajočega mRNK subsistema, kateri je lahko znotraj ali zunaj sistema ter temelji na plazmidu ali fragmentu DNK (genu) in DNK-odvisne RNK polimeraze (v tak subsistem je potrebno dodati vse štiri NTP-je (ATP, GTP, CTP in UTP)), ** - Prokariontski (bakterijski) sistem potrebuje dodaten subsistem za tvorbo Met-tRNKf, sestavljen iz Met-tRNKf transformilaze in formiltetrahidrofolata, *** - Priporočljivo je imeti ATP/GTP-regeneracijske subsisteme (PEP in PK, ali CP in CK, ali AcP in AcK) (Kim in Swartz, 1999; Kim in Swartz, 2001; Kim in Swartz, 2002).

Opomba: reakcijska mešanica mora biti inkubirana pri temperaturi med 26 °C in 37 °C.

Za delajoč brezcelični translacijski ali transkripcijsko-translacijski sistem je potrebno dodati celični ekstrakt (predhodnja namnožitev čiste kulture, sledi kemična, mehanska ali biološka razgradnja plazmaleme in/ali celične stene), saj le ta vsebuje potrebne makro- in mikroelemente, molekularna orodja za sintezo beljakovin... Zraven koristnih komponent pa se nahajajo tudi inhibitorne substance (AMP, GMP, izrabljene snovi...), katere je priporočljivo pred uporabo vsaj delno odstraniti z dializo. Dializa pa ne odstrani le inhibitorje, temveč tudi vse tiste nujno potrebne nizkomolekularne reaktante, katere je naknadno potrebno dodajati (AK, ATP, GTP, ... Več o tem v poglavju 2.2.3)

2.2.1.1 Prokariontski ekstrakti

Bakterija *E.coli* je sistem, ki se najdlje uporablja za produkcijo heterolognih beljakovin. Še pred razvojem molekulskega kloniranja so se genetsko modificirani sevi te bakterije uporabljali za proizvodnjo večjih količin določenih beljakovin. Osnovne lastnosti bakterije, zaradi katerih je primerna za proizvodnjo heterolognih beljakovin, so enostavna genetska manipulacija, hitra rast in enostavno gojenje. Proizvodnja v bakteriji lahko za določeno beljakovino, ki jo želimo v njej pridobiti, pripelje do nerešljivih problemov. Problemi so pogosteji, kadar želimo izraziti evkariontski gen. Pogosto se beljakovina v takšnem sistemu nepravilno zvije, problem predstavlja tudi nepravilno vzpostavljanje disulfidne vezi in nezmožnost bakterij za posttranskripcijske modifikacije beljakovin, toksičnost produkta za celice, pojav inkluzijskih teles, problem z izolacijo beljakovin (Herzog-Velikonja in Gruden, 2000).

Z brezceličnim sistemom lahko del teh problemov rešimo, naprimer beljakovinske toksičnost ni več, saj nimamo več živih organizmov, prav tako ne nastajajo inkluzijska telesca, iz sistema lahko odvzamemo produkte in mu dodajamo reagente. Na splošno na

bakteriji *E. coli* temeljoč sistem deluje v velikih primerih homogeno (primerno za strukturno proučevanje beljakovin).

Do sedaj se je izkazalo, da je celični ekstrakt iz bakterije *E. coli* najbolj praktičen in učinkovit za brezcelični translacijski in transkripcijsko-translacijski sistem pri sintezi beljakovine *in vitro*. V prejšnjih letih so znanstveniki dodobra proučili mehanizem beljakovinske sinteze v celicah *E. coli* (vključno s strukturo, geni, metabolizmom ter regulacijo reakcij) ter v brezceličnemu bakteriskemu (*E. coli*) sistemu. Teoretično gledano, lahko v bakterijskem brezceličnem sistemu katerokoli gensko informacijo prepišemo v polipeptid. Produktivnost je odvisna od samega uporabljenega sistema, največji donos ima semi-kontinuirana reakcija. Kvaliteta pa je odvisna od kompleksnosti beljakovine (multidomene, disulfidni mostički evkariontskih beljakovin zmanjšujejo kvaliteto). *E. coli* ekstraktarni sistem je dokaj toleranten na razne dodatke, vključno s kofaktorji, metaboliti, neobičajnimi aminokislinami ter na nizke koncentracije detergentov. Presežek enega od naštetih pa lahko zmanjša donos, modificira sintezo, spremeni funkcionalno aktivnost belakovine. V podjetju Roche so dognali, da kotranslacija in postmodifikacija z glikozilacijo ter tudi druge kompleksne modifikacije evkariontskih beljakovin niso izvedljive v *E. coli* ekstraktarnem brezceličnemu sistemu (Roche, 2002-2003).

2.2.1.2 Evkariontski ekstrakti

Evkariontski ekstrakt pripravimo iz citoplazemske frakcije, v kateri ni zaznat endogene RNK polimerazne aktivnosti. Ta limitni faktor lahko rešimo z dodatkom eksogene RNK polimeraze iz bakteriofagov ali pa s presežkom eksogene mRNK. V transkircijsko-translacijskem evkariontskem brezceličnemu sistemu z dodanim fragmentom DNK molekule z željeno gensko informacijo uporabimo T7 ali SP6 RNK polimerazo, saj sta se izkazali kot najbolj učinkoviti. Različni avtorji so prišli do enakih zaključkov (Spirin, 1991; povzeto po Spirin, 2002), da je v transkripcijsko-translacijskem sistemu sinteza mRNK hitrejša od sinteze beljakovin, kar vodi v učinkovit ter pozitiven donos.

Sistem iz zajčjih retikulocitov je manj produktiven od bakterijskega sistema, vendar je odličen za funkcionalne študije posttranslacijskih modifikacij beljakovin. Uporablja ga predvsem za sintezo globina. Sintesa ostalih beljakovin daje nizko razmerje med sintezo aktivne in totalne beljakovine, hkrati pa zahteva manipulacijo živali, zato je bolj uporaben brezcelični sistem narejen iz pšeničnih kalčkov. Ta sistem ima širok spekter delovanja, saj lahko uporabimo tako krožno kot lineano DNK, cap oz. ne cap mRNK...

Kvasovke so enocelični evkariontski organizmi, ki za produkcijo heterolognih beljakovin združujejo določene prednosti pred bakterijskim sistemom in določene prednosti produkcije beljakovin pred višjimi evkarionti. Gojenje je relativno enostavno, sposobne pa so tudi enostavnejših posttransformacijskih modifikacij. Za produkcijo heterolognih beljakovin lahko uporabljamo več vrst kvasovk, kot so *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* ali *Schizosaccharomyces pombe*. Vsaka vrsta ima svoje prednosti kot na primer povečana učinkovitost transporta beljakovin iz celice, pripravljeni vektorji z močnimi promotorji ali enostavno gojenje. Najpogosteje se uporablja prvi dve omenjeni vrsti kvasovk. Pogosto se beljakovina v gojišču razgradi zaradi aktivnosti zunajceličnih proteaz ali pa je beljakovina za celico

toksična. Pogosti so tudi problemi z nizkim donosom, hiperglikozilacijo ali napačno glikozilacijo beljakovin (Herzog-Velikonja in Gruden, 2000). Z uporabo brezceličnega sistema iz kvasnega ekstrakta se deloma izognemo tem nevšečnostim: beljakovina ni toksična za brezcelični sistem ter proteazna aktivnosti ni prisotna .

Gasior in sod. (1979a, b) so prvi objavili natančen opis priprave in lastnosti brezceličnega sistema za sintezo beljakovin narejenega iz kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, kjer so uporabili eksogeno mRNK molekulo. Kasneje so se še redki avtorji poslužili brezceličnega sistema narejenega iz tovrsnega kvasnega ekstrakta (Gallisi in Young, 1975; Moldave in Gasior, 1983; Edelmann in sod., 2000). Študije delane na drugih evkariontskih brezceličnih sistemih pa so dognale, da so posttransformacije beljakovin možne le z dodanimi subsistemi (Roche, 2002-2003). Tako je potrebno dodati mikrosom (pasji mikrosom iz trebušne slinavke) za glikozilatno aktivnost, za tvorbo disulfidnih mostičkov potrebuje mešanico reducirajočih molekul glutationa GSH/GSSG za vzdrževanje pravilnega redoks potenciala.

2.2.2 Priprava eksogene mRNA

Spirin (2002) je mnenja, da se je po letu 1961 dogajala prava revolucija na področju razvoja brezceličnih sistemov, ko je uspela uporaba eksogene mRNA v bakterijskemu (*E. coli*) ekstraktu po osvoboditvi ribosomov od endogene mRNA (Nirenberg in Matthaei, 1961; Lederman in Zubay, 1967; DeVries in Zubay, 1967; Gold in Schweiger, 1969; vse cit. Spirin, 2002). Košček DNK molekule, ki je lahko plazmid, izolirani gen ali sintetični fragment DNK molekule, so dodali v transkripcijsko mešanico in tako so proizvedli pripadajočo mRNA molekulo, ki so jo nato uporabili v translacijskem brezceličnem sistemu. Pri tem so izkoristili delovanje RNK polimeraze iz bakterijskega ekstrakta oziroma supernatantne frakcije.

Pravilen izbor vektorjev za pripravo eksogene mRNA veliko pripomore k boljši učinkovitosti translacijskega oziroma transkripcijsko-translacijskega brezceličnega sistema in prispeva k večjemu donosu. Vektorji za izražanje rekombinantnih genov v svojem zapisu vsebujejo restrikcijska mesta za kloniranje in regulatorna zaporedja. Ta zaporedja nadzirajo izražanje vnesenega gena. Pri izbiri moramo paziti tudi na številne dejavnike, ki vplivajo na nivo izražanja gena v gostiteljskih celicah. Na primer, če želimo doseči visok nivo izražanja gena, uporabimo vektorje s sproščenim ("relaxed") načinom podvajanja. Tak primer vektorja so različice vektorjev pUC in pBR322. Na količino produkta vpliva tudi število kopij gena na celico in sicer, večje kot je število kopij, večja je količina produkta.

Vrsta promotorja je naslednji ključni dejavnik, ki omogoča pravočasen začetek prepisovanja in nivo izražanja gena. Najbolj pogosto se uporablja *lac* promotor, ki po dodatku laktoznega analoga izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG) omogoči začetek prepisovanja gena in končno izražanje želenega gena. Na precej podoben način delujejo še *tac*, *trc* in *trp* promotorji. Danes imamo na voljo še promotorje, ki so pod nadzorom dodatka kakšnega drugega hranila in promotorje, ki so regulirani z različnimi signali (pH, sprememba temperature, koncentracija raztopljenega kisika,...). V zadnjih letih se vse bolj uporablja pozni promotor bakteriofaga T7. Z RNK polimerazo bakteriofaga T7, ki pa je ponavadi pod kontrolo *lac* promotorja, se prepišejo le tisti geni, ki so pod kontrolo pozneg

promotorja. Zato je potrebno pri izražanju takih genov v vektor vstaviti oziroma mu zagotoviti zapis za T7 RNK polimerazo. Za začetek izražanja želenega gena je potreben dodatek induktorja, laktognega analoga IPTG, ki prepreči vezavo *lac* represorja na *lac* operator. To vodi do sprožitve prepisovanja in izražanja T7 RNK polimeraze. Ker T7 RNK polimeraza prepozna le T7 promotorje, začne prepisovati samo tiste gene, ki so pod njegovo kontrolo. Takšen model najdemo na novejših komercialnih vektorjih za izražanje, kot sta naprimer pET in pIVEX 1.3 WG vektorja in klonirni vektor pGEM-T Easy.

Kadar želimo v vektor za izražanje vstaviti želen gen, moramo paziti, da vstavljen gen na 5'- koncu vsebuje start kodon in vezavno mesto za ribosome ter na 3'- koncu terminator prepisovanja (transkripcije). Ni pa nujno, da so vsa ta mesta prisotna na vstavljenem genu. Lahko so prisotna tudi na vektorju za izražanje, takšen primer je vektor pIVEX. Vezavno mesto za ribosome na 5'- koncu se pri prokariontih imenuje Shine-Dalgarnovo zaporedje, ki ustreza (je komplementarno) 3'- koncu 16S rRNK v ribosomu. Šele, ko so prisotna vsa ta mesta, lahko pride po prepisovanju gena v mRNA (sporočilna RNK) do prevajanja mRNA v beljakovino. Za uspešnost prevajanja mRNA v beljakovino so odgovorni tudi prvi nukleotidi, ki se nahajajo na 5'- koncu kodirajočega zaporedja. Pri vstavljanju gena, kateri ne vsebuje zapisa za start kodon, v ekspresijski vektor z zapisom za start in stop kodon moramo biti pozorni na bralni okvir, ki nastane pri tovrstni fuziji. Namreč le en bralni okvir omogoča nastanek funkcionalne beljakovine. Znanost nam je omogočila, da z različnimi vektorji manipuliramo bralne okvirje.

2.2.2.1 Vektor pEGFP-N2

Vektor za izražanje pEGFP-N2 (priloga A) je sintetično pripravljen komercialni vektor (BD Biosciences Clontech, ZDA). Gen za beljakovino GFP (beljakovina, ki oddaja fluorescenco zelene svetlobe; angl. "green fluorescent protein") je pridobljen iz meduze *Aequorea victoria*. Fuzija željene beljakovine na N-terminalni del beljakovine GFP omogoča lokalizacijo fuzijske beljakovine *in vivo* ter *in vitro* in ohranitev fluorescenčnih lastnosti beljakovine GFP. Vektor pEGFP-N2 lahko uporabimo za izražanje same beljakovine GFP pri preiskovanih celičnih linijah kot transfekcijski marker ter pri študijah izražanja gena kot reportersko beljakovino.

Vektor pEGFP-N2, ki vsebuje različico divjega tipa GFP, je bil optimiziran tako, da oddaja svetlejšo fluorescenco in da je uporaben za prekomerno izražanje v različnih sistemih (ekscitacijski maksimum = 488 nm in emisijski maksimum = 507 nm). Geni, ki sledijo genom za beljakovino GFP, so spremenjeni v Kozakovo iniciacijsko translacijsko mesto, ki poveča učinkovitost translacije predvsem v evkariontskih celicah. Klonirno mesto MCS, v vektorju pEGFP-N2, se nahaja med promotorjem človeškega citomegalovirusa CMV ("Human cytomegalovirus") ($P_{CMV} IE$) in zaporedjem, ki nosi zapis za beljakovino GFP. Poliadenilacijsko signalno mesto SV40 je takoj za nukleotidnim mestom GFP in narekuje pravilno procesiranje 3'- konca gena GFP mRNA. Vektor vsebuje tudi SV40 mesto začetka replikacije v sesalskih celicah, ki izražajo SV40 T-antigen. Za replikacijo SV40 DNK je potrebna le ena virusna beljakovina, T-antigen, ostale faktorje, potrebne za replikacijo, pa priskrbi plazmid-vsebujoča celica. Neomicinska rezistenčna kaseta je naprej od SV40 mesta in omogoča selekcijo stabilno transfeiranih evkariontskih celic. Promotor P_{SV40} , ki leži pred to kaseto, omogoča začetek prepisovanja le-te in

kanamicinsko rezistenco v *E. coli*. Vektor pEGFP-N2 vsebuje še pUC (plazmidni vektor *E. coli*) mesto začetka replikacije v *E. coli* in f1 (filamentozni fag) mesto začetka za nastanek enoverižne DNK (Gorman, 1985; Inouye in Tsuji, 1994).

2.2.2.2 Vektor pGEM-T Easy

Vektor za kloniranje pGEM-T Easy (priloga C) je primeren sistem za kloniranje produktov PCR. Vektor so pripravili z uporabo restriktivnega encima *EcoRV* (ta reže na 60. mestu bp) in dodatkom dveh timidinov na vsak 3'- konec rezane DNK. Ti posamezni 3'- T podaljšani konci v insercijski regiji močno izboljšajo uspešnost ligacije produkta PCR v plazmid. S tem preprečijo ponovno zaprtje vektorja in omogočijo dobro prileganje s konci produkta PCR, ki je namnožen z eno od termostabilnih polimeraz. Take polimeraze pogosto dodajo deoksiadenozin na 3'- konec namnoženega fragmenta. Vektor v velikem številu kopij ("high copy number") pGEM-T Easy vsebuje T7 in SP6 RNK polimerazna promotorja, ki ležita na vsaki strani klonirnega mesta MCS ("multiple cloning site"), katerega loči gen *lacZ*, ki nosi zapis za encim β-galaktozidazo. Ko insert vstavimo v klonirno mesto, prekinemo gen *lacZ* in tako lahko "prave" rekombinantne klone direktno identificiramo na indikatorskih ploščah. Kolonije rekombinantnih klonov so bele barve. Če vektor ne vsebuje fragmenta, gen *lacZ* ostane neprekinjen in lahko proizvaja β-galaktozidazo (reporterska beljakovina). β-galaktozidaza cepi barvni substrat X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-galaktopiranozid) na galaktozo in netopni produkt modre barve, zaradi česar se kolonije obarvajo modro. Vektor vsebuje znotraj klonirne regije tudi več, za restriktivne encime prepoznavnih, restriktivnih mest. Ta restriktivna mesta omogočajo izrez inserta iz vektorja in to z enim samim restriktivnim encimom. Tak primer restriktivnih encimov so encimi *EcoRI*, *BstZI* in *NotI*. Vektor v svojem zapisu vsebuje tudi mesto začetka za replikacijo filamentoznega faga f1, pri čemer nastane enoverižna molekula DNK (Promega, 1999).

2.2.2.3 Vektor pIVEX 1.3 WG

Vektor pIVEX 1.3 WG je skonstruiralo podjetje Roche (Švica) za visok nivo ekspresije beljakovin v evkariotskih brezceličnih sistemih, optimiziran za sistem iz pšeničnih kalčkov. Vektor namreč vsebuje vse potrebne regulatorne elemente za *in vitro* ekspresijo bazirano na T7 RNK polimerazni aktivnosti in na lizatu iz embrionalnih kalčkov. Njegovo ime je sestavljeno iz angleških kratic "In Vitro EXpression" in njegova posebnost je t.i. His₆-tag regija. Ta regija vsebuje zapis za šest zaporednih histidinov na C-terminalnem koncu oziroma za klonirnim mestom. To je pomembno pri preverjanju vstavljenega fragmenta v vektor s pomočjo PCR reakcije, uporabimo pa lahko lastnost tudi pri izolaciji beljakovin iz brezceličnih sistemov s pomočjo kolon. V primeru, ko ne želimo izkoristiti te lastnosti vektorja pIVEX 1.3 WG, pa na konec našega gena dodamo TAA stop kodon.

Klonirno mesto plazmida pIVEX 1.3 WG leži znotraj regije vzpodbujevalcev (angleško "enhancer"). Prav tako ima start in stop kodone ob klonirnem mestu. Vektor v svojem zapisu vsebuje zapis za ampicilinsko rezistenco in mesto začetka za replikacijo filamentoznega faga f1, pri čemer nastane enoverižna molekula DNK (priloga E).

Po ligaciji vektorja pIVEX 1.3 WG in želenega fragmenta DNK predlaga podjetje Roche (Švica) transformacijo tako nastalega plazmida v bakterijo *E. coli*. Po amplifikaciji in izolaciji vektorja pIVEX 1.3 - fragment DNK, lahko takoj uporabimo v transkripcijsko-translacijskem ekvariontskem brezceličnem sistemu, ali pa *in vitro* pripravimo eksogeno mRNA ter nato prenesemo v translacijski brezcelični sistem (Roche, 2007).

2.2.2.4 Vektor pET22b(+)

Ekspresija vstavljenega inserta v pET sistemu poteka pod kontrolo močnega T7 promotorja. Plazmid lahko deluje le v tistih bakterijskih sevih, ki imajo v kromosому zapis za T7 RNK polimerazo. Kodirajoči del gena za T7 RNK polimerazo je pod kontrolo *lacI* promotorja, ki se po indukciji z IPTG aktivira. S tem nastanejo večje količine T7 RNK polimeraze, ki se veže na T7 promotor in prepiše primarni transkript. pET plazmidi vsebujejo tudi gen za β-laktamazo, kar omogoča selekcijo v gojišču z ampicilinom. F1 origin pa omogoča pri infekciji z filamentoznim fagom f1, da ta proizvede virion (enoverižna molekula DNK).

V diplomski nalogi smo uporabili plazmid pET22b(+) (priloga D), njegova posebnost je ta, da ima His-tag kodirajočo sekvenco na mestu 140-157 ter T7 terminatorski primer na mestu 26-72 (Merck KgaA, 2003).

2.2.2.5 Transkripcija DNK v mRNA

Po končani amplifikaciji plazmida z želenim genom za zeleno fluorescenčno beljakovino v izbranih celicah bakterije *E. coli* lahko sintetiziramo mRNA ali direktno v transkripcijsko-translacijskem brezceličnemu sistemu (Iskakova in sod., 2006) ali pa *in vitro* zunaj translacijskega brezceličnega sistema (Spirin in sod., 1988). V našem primeru smo se odločili za drugo varianto.

Preglednica 2.2: Razlike in podobnosti evkariontske in prokariontske mRNA molekul (Shine in Dalgarno, 1975; Kozak, 1986; Kozak, 1987; Lehninger in sod., 1994; Lodish in sod., 2003)

Lastnosti:	Prokariontska mRNA	Evkariontska mRNA
3'- konec	Katerikoli nukleotid	PoliA rep
5'- konec	Katerikoli nukleotid	7-metil gvanin in 2' O-metil purin
Poligenska	Možnost policistrone verige	Monocistrone veriga
UTR regije	+	+
Prekurzna mRNA in procesiranje	-	+
Ribosomalno mesto vezave	Shine-Dalgarna sekvenca	Kozakova sekvenca
Stabilnost mRNA	Majhna	Večja

Legenda: UTR - iz ang. "untranskription region" (nekodirajoče regije)

Molekule mRNA za evkariontski in prokariontski sistem imajo nekaj različnih detajlov, katere je nujno potrebno upoštevati tudi pri sestavljanju brezceličnega sistema, če želimo, da bo sistem deloval. V tabeli Preglednica 2.2 so prikazane vse razlike evkariontskih in prokariontskih molekul mRNA.

2.2.3 Transkripcijska mešanica kot dodatek k donosnejšemu brezceličnemu sistemu

Aktivnost brezceličnega translacijskega in pa transkripcijsko-translacijskega sistema je odvisna od proste energije v obliki NTP-jev. ATP je potreben za aktivacijo aminokislinskih substanc ter GTP uporablja ribosomska aktivnost. V celicah se ti dve substanci neprestano sintetizirata, v brezceličnemu ekstraktu pa sta limitirajoči faktor, saj sta podvrženi močni degradaciji zaradi NTP-odvisnih metabolnih reakcij ter NTPaz, ki so prisotne v brezceličnem ekstraktu. Kim in Swartz (1999) sta pred kratkim predlagala in uporabila piruvat oksidacijski subsistem, kjer sta pridobivala acetil fosfat *in situ*. S tem sta izboljšala in povečala nivo koncentracije ATP-ja v translacijski brezcelični mešanici narejeni iz bakterijskega ekstrakta *E. coli*.

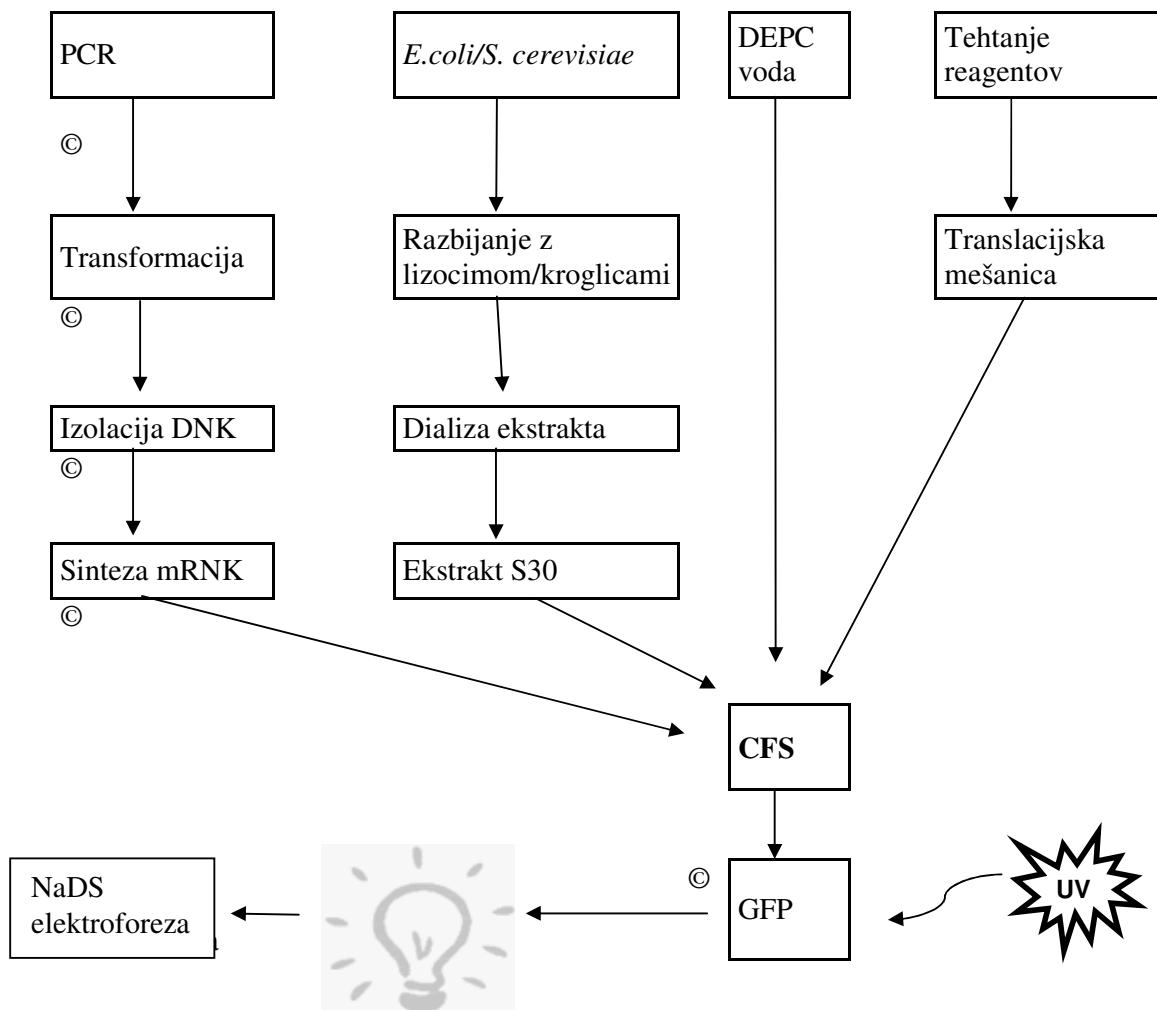
Že Reiness s sod. (1974) so v svojih študijah o brezceličnih sistemih dognali, da je za podaljšano beljakovinsko sintezo potrebno dodati dvovalentne katione (Mn^{2+} , Ca^{2+} ali $Mg(OAc)_2$), glicerol in KCl, saj so bili mnenja, da olajšajo iniciacijo transkripcije. Uporabili so tudi fosfoenol piruvat in kreatin fosfat skupaj s kreatin fosfatazo za povečanje energijske vrednosti sistema. Reiness in sod. (1974) so tudi mnenja, da ni potrebno dodajati tRNA molekul, saj se le te nahajajo v zadostni koncentraciji v celičnih ekstraktih. Ker pa so v tistih časih z brezceličnimi sistemi proizvedli bistveno nižjo koncentracijo beljakovin v primerjavi z današnjimi časi ter inkubacijska doba reakcije je bila prav tako krajša od današnje, prejšnja trditev o tRNA molekulah ne drži več. Kaj kmalu so znanstveniki dognali, da je porebno dodati še bistveno več reagentov, če želijo miniaturizirat, avtomatizirat in optimizirat brezceličen sistem. Za brezhibno delovanje je bilo nujno potrebno dodati aminokisline, fosfatni acetat, spermidin, ditiotreitol (DDT) in N-(2-hidroksietyl)piperazin-N'-2-etansulfonsko kislino (HEPES), neglede na vrsto brezceličnega sistema. Tako znamo danes sintetizirati tako strukturne kakor tudi funkcionalne beljakovine (Katzen in sod., 2005).

2.2.4 Postmodifikacije beljakovin v brezceličnemu sistemu

Glavni ključ brezceličnega sistema je sinteza biološko aktivne beljakovine. Nekatere beljakovine pa za svojo aktivnost potrebujejo posttranskripcijsko procesiranje, kar brezcelični sistem zagotovi z dodatkom potrebnih surovin. Tako lahko v sistem dodajamo različne šaperone (DnaKJ, GroEL-ES...) za zvijanje, S-S mostičke dobimo z glutation redoks pufrom in z disulfid tvorno izomerazo, glikozilacijo izvedemo z glikozilacijskimi encimi brez vezikularne membrane (Katzen in sod., 2005).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SHEMA DELA



Slika 3.1: Shema eksperimentalnega dela: priprava brezceličnega sistema in sinteza GFP beljakovine
 PCR – verižna reakcija s polimerazo, mRNA – informacijska ribonukleinska kislina, S30 – celični ekstrakt, ki ostane v supernatantu po 30 minutnem centrifugirjanju pri 30000 x g in dializi, CFS – iz angl. "cell-free system" (brezcelični sistem), GFP – beljakovina, ki oddaja fluorescenčno svetlobo pod UV svetlobo, UV – ultravijolično, © - kontrola vzorcev z gelsko oziroma z NaSD elektroforezo, NaDS elektroforeza – poliakrilamidna gelska elektroforeza.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Kemikalije

BSA (goveji serumski albumin) (Bio-Rad, ZDA)
 DTT (ditiotreitol) (Sigma, ZDA)
 EDTA (etilendiamino-N,N,N',N'-tetraacetna kislina) (Sigma, ZDA)
 Encimi za molekulsko kloniranje (MBI Fermentas, Litvija; New England BioLabs, Velika Britanija; Promega, ZDA; Roche, Švica)
 Reagent za merjenje absorbance (Protein Assay Dye Reagent Concentrate) (Bio-Rad, ZDA)
 TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin) (Merck, ZDA)
 DEPC (dietyl pirokarbonat) (Sigma, ZDA)

3.2.2 Komercialni kiti

Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed GmbH, Nemčija)
 WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA)
 RiboMAX™ Large Scale – RNA Production System – T7 (Promega, ZDA)

3.2.3 Organizmi

Bakterijski sevi:	- <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) Stratagen, ZDA
	- <i>Escherichia coli</i> DH5 α zbirka kultur iz inštituta Jožeta Štefana, Slovenija
	- <i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus-RIL Stratagen, ZDA
Evkariontski organizem:	- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sev ZIM2155 S288c iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov Biotehniške fakultete, Slovenija

3.2.4 Začetna oligonukleotida

GFPWG-N1 5' –TGACATCATATGGTGAGCAAGGGCGAGG–3'
 GFPWG-C1 5' –TGTACTCGAGCTACTTGTACAGCTCGTCC–3'

Oba nukleotida smo sami skonstruirali na podlagi nukleotidne karte plazmida pEGFP-N2.

3.2.5 Pufri in gojišča

TAE pufer: - 40 mM Tris/acetat, pH 8,0
 - 1 mM EDTA

TE pufer 10X: - 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 (121 g/l)
 - 1 mM EDTA (37 g/l)
 - v DEPC vodi

TE pufer 1X:	- pufer TE 10X 10 ml - DEPC voda do 100 ml
Tekoče gojišče LB (Luria Bertani):	- kazeinski hidrolizat, 10 g/l - kvasni ekstrakt, 5 g/l - NaCl, 10 g/l - pH 7,0 z NaOH - v dH ₂ O
Tekoče gijošče LBA:	- v sterilno gojišče LB dodamo ampicilin do končne koncentracije 100 µg/l
Trdo gojišče LB, LBA:	- pred avtoklaviranjem dodamo 15 g agarja na liter gojišča LB, avtoklaviramo in ko se ohladi na 60 °C, vlijemo v sterilne petrijevke. Za trdno gojišče LBA dodamo pred vlivanjem ampicilin do končne koncentracije 100 mg/l
Tekoče gojišče YEPD:	- kvasni ekstrakt 5 g/l - pepton 5 g/l - glukoza 10 g/l - pH = 6,987 - v dH ₂ O - avtoklaviranje: 20 minut pri 121 °C in 1,2 bar
DEPC voda	- 1 ml dietil pirokarbonata (DEPC, Sigma) - dopolnimo do 1 l destilirane vode - mešamo preko noči - avtoklaviramo: 20 minut pri 121 °C in 1,2 bar
pufer A:	- 10 mM Tris/ acetat, pH 8,2 - 14 mM magnezijev oksalacetat - 60 mM kalijev oksalacetat - 1 mM DTT - v DEPC vodi
5x TBA:	- 10 mM Tris - borat - 10 mM EDTA (pH 8)
Elektroforezni pufer:	- Tris/HCl 30,3 g/l - glicina 144 g/l - NaDS 10 g/l - v dH ₂ O
15 % ločevalni poliakrilamidni gel:	- 3,75 ml 40 % akrilamida - 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 - 3,65 ml dH ₂ O - 0,1 ml 10 % NaDS

- 0,03 ml 10 % APS (amonijev persulfat)
- 15 µl TEMED-a (N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin)

5 % nanašalni (koncentrirni) poliakrilamidni gel:	- 1,25 ml 40 % akrilamida - 2,5 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 - 0,1 ml 10 % NaDS - 0,03 ml 10 % APS - 15 µl TEMED-a - 6,15 ml dH ₂ O
---------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3.2.6 Laboratorijska oprema

Aparat za PCR, GeneAmp2400 PCR System (Perkin Elmer, ZDA);
Avtomatske pipete P-10, P-20, P-200, P-1000 (Eppendorf, Nemčija);
Avtoklav (Sutjeska, Jugoslavija);
Brezprašna komora PIO SMBC 122 (Iskra, Slovenija);
Centrifuga Eppendorf Concentrator 5417R (Eppendorf, Nemčija);
Centrifuga Eppendorf Concentrator 5410 (Eppendorf, Nemčija);
Centrifuga Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf, Nemčija);
Centrifuga Sorvall® RC5C Plus (Sorvall, ZDA);
Cepilne zanke;
Dializno črevo (Serva – Servapor® 44145, Nemčija)
Erlenmajerica s stransko kiveto 1 l;
Erlenmajerice 500 ml, 1 l, 2 l;
Fotoaparat Nikon COOLPIX 3200 (Nikon, Japonska)
Fluorescenčni mikroskop s CCD kamero (Olympus, ZDA);
Inkubator (Sutjeska, Jugoslavija);
Inkubator Binder BD (Binder, Nemčija);
Kadička za agarozno gelsko elektroforezo Easy Cast (Owl Separations, ZDA);
Kadička za poliakrilamidno NaDS gelsko elektroforezo Miniprotean II (Bio-Rad, ZDA);
Magnetno mešalo 550 M (Tehtnica);
Magneti za mešanje;
Merilec fluorescence Safire^{2TM} (Tecan, Nemčija);
Merilec UVI-tec (Velika Britanija);
Merilni valji 10 ml, 50 ml, 2 l;
Mikrocentrifugirke 2 ml (Eppendorf, Nemčija);
Mikrovalovna pečica;
Petrijevke (Golias, Slovenija);
pH meter Seven Easy pH S20 (Mettler Toledo, ZDA);
pH meter Seven Multi pH S40 (Mettler Toledo, ZDA);
Plastične epruvete z navojnim pokrovom;
Plinski gorilnik;
Spektrofotometer ND-1000 Full spectrum UV/VIS (Nano Drop, ZDA);
Spektrofotometer Ultrospec 1000E (Pharmacia Biotech, ZDA);
Spektrofotometer Cole-Parmer Scanning UV / Visible Spectrophotometers (Cole Parmer, ZDA);
Steklene kroglice (premer ...mm) (Sigma, ZDA);

Stresalnik Certomat HK (B. Braun Biotech International, Nemčija);
Tehnici AG245 in PC2000 (Mettler Toledo, ZDA);
Tehnici Sartorius-excellence in Sartorius-analytic (Sartorius, ZDA);
Žlice različnih velikosti;

3.3 METODE MOLEKULARNEGA KLONIRANJA

3.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) za pomnožitev cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine

Na osnovi poznanega nukleotidnega zaporedja cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine smo načrtovali dva začetna oligonukleotida za pomnožitev cDNK. Načrtovana sta bila tako, da se je z verižno reakcijo s polimerazo pomnožila cDNK, ki kodira zeleno fluorescenčno beljakovino – GFP (zaporedje naj bi bilo dolgo okoli 720 baznih parov, sintetizirana beljakovina pa naj bi imela 254 aminokislin). Zaporedji začetnih oligonukleotidov, ki se prilegata N-terminalnemu in C-terminalnemu delu GFP, sta:

N-terminalni oligonukleotid

5' – TGACATCATatggtgagcaaggcgaggatggtgagcaaggcg – 3'

- označeno je mesto restrikcije z encimom *NdeI*
- uporabili smo 5'- primer GFPWG-N1, ki smo ga sami načrtovali

GFPWG-N1 TGACATCATATGGTGAGCAAGGGCGAGG (28 baz)

C-terminalni oligonukleotid

5' – ggacgagctgtacaagtagCTCGAGtaca – 3'

- označeno je mesto restrikcije z encimom *XhoI*
- uporabili smo 3'- primer GFPWG-C1, ki smo ga sami načrtovali

GFPWG-C1 TGTACTCGAGCTACTTGTACAGCTCGTCC (29 baz)

Oligonukleotida vsebujeta zaporedji, ki ju prepoznata restriktivna encima. Oligonukleotid, ki se prilega 5'- koncu gena za GFP, vsebuje restriktivno mesto za restriktazo *NdeI* (New England BioLabs, Velika Britanija). 3'- oligonukleotid vsebuje restriktivno mesto za restriktazo *XhoI* (New England BioLabs, Velika Britanija) s stop kodonom. Teoretična dolžina namnoženega fragmenta z uporabo teh dveh oligonukleotidov je bila 720 nukleotidov (priloga B).

DNK smo pomnožili z uporabo sistema GeneAmp2400 PCR System (Perkin Elmer, ZDA). Kot vir cDNK zelene fluorescenčne beljakovine smo uporabili plazmid pEGFP-N2 (BD Biosciences, 2002). Za pomnožitev DNK smo uporabili Pfu DNK polimerazo, ki zaradi preverjanja svojega delovanja dela manj napak kot druge znane visokotemperaturno stabilne polimeraze, npr. Taq polimeraza, hkrati pa proizvaja tope konce. Reakcijo smo izvedli po patentiranemu protokolu avtorja Mullis (1985) in v mikrocentrifugirki (proizvajalca Eppendorf, Nemčija) pripravili naslednjo reakcijsko mešanico:

Preglednica 3.1: Reakcijska mešanica za PCR reakcijo (pomnoževanje gena za GFP) (Mullis, 1985).

cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine (50 pg/µl)	1,0 µl
5'- oligonukleotid (10 µM)	1,0 µl
3'- oligonukleotid (10 µM)	1,0 µl
dNTP (2,5 mM)	1,0 µl
reakcijski pufer, 10x (Promega, ZDA)	2,5 µl
Pfu DNK polimeraza (2,5 U/µl) (Promega, ZDA)	0,6 µl
dH ₂ O	17,9 µl
Skupaj	25,0 µl

Pfu DNK polimeraza in reakcijski pufer za to polimerazo sta bila kupljena pri Promega, ZDA. Sestava 10 kratnega koncentriranega reakcijskega pufra je naslednja: 100mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris/HCl, pH 8,8, 20 mM MgSO₄, 100 mM KCl, 1 % Triton X-100 in 1 mg/ml govejega serumskega albumina. Koncentrirana raztopina dNTP je vsebovala 2,5 mM vsakega od deoksinukleotidov.

Reakcijsko zmes smo pripravili v mikrocentrifugirki, jo vstavili v aparaturo za PCR in pognali program z naslednjimi parametri:

Preglednica 3.2: Program za reakcijo PCR, ki omogoča denaturacijo, vezavo oligonukleotidov in podaljševanje verige cDNK GFP (Cheng in sod., 1994).

	T (°C)	čas (min)	št. ciklov
Denaturacija dvoverižne DNK	95	4	1
Denaturacija dvoverižne DNK Prileganje začetnih oligonukleotidov Podaljševanje verige	95	1	30
	53	1	
	72	3	
Podaljševanje verige	72	10	1
	4	∞	

3.3.2 Vstavitev cDNK GFP v vektor za kloniranje pGEM-T Easy

Za uspešno pomnožitev gena za zeleno fluorescenčno beljakovino (GFP) je potrebno predhodno vstaviti gen za GFP v klonirni vektor, nakar pa izvedemo postopek transformacije v klonirne celice *E. coli* DH5α. Na ta način si zagotovimo zadostno količino plazmida pGEM-T-GFP, ki izhaja iz istega klena.

3.3.2.1 Proces modificiranja 3'- koncov cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine

Fragment cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine, dobljen z reakcijo PCR, smo očistili s kompletom reagentov "WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega, ZDA) po priporočenem postopku proizvajalca (Promega, 2003). Očiščen proizvod smo raztopili v 50 µl destilirane vode. Prisotnost cDNK GFP smo preverili na 0,8 % agarozni gelski elektroforezi. Pfu DNK polimeraza pri pomnoževanju z reakcijo PCR tvori tope konce. Za vezavo PCR produkta v pGEM-T Easy vektor je potrebno produkt modificirati na 3'-

koncu cDNK. Topi konci se modificirajo tako, da se na vsako stran 3'- konca veže po en adenin. Proces modificiranja 3'- koncev cDNK smo izvedli po protokolu, ki so jih v svojih navodilih predlagali Promega (1999). V mikrocentrifugirko smo odpipetirali naslednje sestavine reakcijske zmesi:

Preglednica 3.3: Reakcijska mešanica za proces modificiranja 3'- koncev cDNK GFP (Promega, 1999).

PCR produkt (cDNK GFP)	7,2 µl
dATP (100 mM)	0,2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 µl
Reakcijski pufer, 10x (Promega, ZDA)	1,0 µl
Taq polimeraza (Promega, ZDA)	0,8 µl
Skupaj	10,2 µl

Taq polimeraza in 10 kratni reakcijski pufer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl, pH 9,0 in 1 % Triton X-100) sta bila kupljena pri Promega (ZDA). Reakcijsko zmes smo inkubirali 30 minut pri 70 °C.

3.3.2.2 Vstavitev fragmenta cDNK GFP v vektor za kloniranje pGEM-T Easy

Modificiran fragment cDNK GFP, ki nosi zapis za zeleno fluorescenčno beljakovino, smo z ligacijo vstavili v klonirni plazmid. Klonirni plazmid pGEM-T Easy smo naročili pri podjetju Promega (ZDA). Pred ligacijo smo cepili plazmid z restriktijskima encimoma *Xba*I in *Nde*I (New England BioLabs, Velika Britanija), ki cepita tudi v restriktijskem mestu pomnožene cDNK GFP. Modificiran odprt fragment produkta PCR in odprt vektor pGEM-T Easy smo zmešali v razmerju 3:1. V to mešanico smo dodali tudi T4 DNK ligazo (Roche, Švica) in 10 kratni reakcijski pufer (Promega, ZDA). Oba fragmenta smo ligirali z ligazo DNK po zgledu Hayashi in sod. (1986) v naslednjih količinah:

Preglednica 3.4: Ligacija fragmenta cDNK GFP in plazmida pGEM-T Easy (Hayashi in sod., 1986).

Fragment-cepljen produkt PCR (cDNK GFP)	4 µl
Cepljen vektor pGEM-T Easy (Promega, ZDA)	0,5 µl
T4 DNK ligaza (3 U/µl) (Roche, Švica)	1 µl
Ligacijski pufer, 2x (Promega, ZDA)	4,5 µl
Skupaj	10 µl

2 kratni reakcijski ligacijski pufer (60mM Tris-HCl (pH 7.8), 20mM MgCl₂, 20mM DTT, 2mM ATP, 10% polietilen glikol) je bil kupljen pri podjetju Promega (ZDA), T4 DNK ligaza pa pri Roche, Švica. Ligacija je potekala 1 uro pri sobni temperaturi in nato še preko noči pri 4 °C. Dobljeno rekombinantno DNK smo s transformacijo s temperaturnim šokom (poglavje 3.3.6.1) prenesli v bakterijski sev *E. coli* DH5α.

3.3.3 Prekloniranje cDNK GFP iz klonirnega vektorja pGEM-T-GFP v vektorja za ekspresijo pIVEX 1.3 WG ter pET22b(+)

Po amplifikaciji plazmida pGEM-T-GFP v bakterijskem sevu *E. coli* DH5 α (opisan v poglavju 3.3.6.1) smo z alkalno lizo razbili celice ter izolirali in očistili plazmid pGEM-T-GFP s "Plasmid miniprep spin" kitom (Genomed GmbH, Nemčija) po proizvajalčevih navodilih. Očiščen plazmid pGEM-T-GFP smo rezali z restriktijskima encimoma *NdeI* in *XhoI* (obe New England BioLabs, Velika Britanija), ki hkrati optimalno delujeta v NEB-pufru 4 (New England BioLabs, Velika Britanija), v naslednjih količinah:

Preglednica 3.5: Restriktija plazmida pGEM-T-GFP z restriktijskima encimoma *NdeI* in *XhoI* v pufru 4 (Promega, 1999).

Plazmid pGEM-T-GFP	30 µl
Restriktaza <i>XhoI</i> (New England BioLabs, Velika Britanija)	1 µl
Resriktaza <i>NdeI</i> (New England BioLabs, Velika Britanija)	1 µl
NEB pufer 4 (New England BioLabs, Velika Britanija)	3,6 µl
Skupaj	35,6 µl

Reakcijsko mešanico smo inkubirali na 37 °C preko noči. Sledilo je ločevanje gena za zeleno fluorescenčno beljakovino od ostalih komponent (rezan plazmid pGEM-T, encima *XhoI* in *NdeI*) z agarozno gelsko elektroforezo na 0,8% gelu. Po končani elektroforezi smo iz gela ekstrahirali fragment DNK, kateri kodira zeleno fluorescenčno beljakovino (cDNK GFP). S pomočjo UV-transluminatorja (Cole Parmer, ZDA) smo fragment ustrezne velikosti izrezali iz gela. Nato smo ga očistili s kompletem reagentov "WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega, ZDA) po postopku, ki ga je predlagal proizvajalec (Promega, 2003).

3.3.3.1 Vstavitev fragmenta cDNK GFP v vektor za ekspresijo pIVEX 1.3 WG

Očiščen fragment cDNK GFP rezan z restriktijskima encimoma *XhoI* in *NdeI* iz plazmida pGEM-T-GFP, nosi zapis za zeleno fluorescenčno beljakovino. Z ligazo smo vstavili cDNK GFP v ekspresijski vektor pIVEX 1.3 WG, ki smo ga naročili pri podjetju Roche (Švica). Pred ligacijo smo cepili vektor z restriktijskima encimoma *XhoI* in *NdeI* (New England BioLabs, Velika Britanija), ki cepita tudi v restriktijskem mestu pomnožene cDNK GFP. Odprt fragment cDNK GFP in odprt vektor pIVEX 1.3 WG smo zmešali skupaj z DNK ligacijskim kitom podjetja Takara (Japonska) v količinah opisanih v tabeli Preglednica 3.6.

Ligacijska mešanica vsebuje T4 DNK ligazo (3 U/µl) in 2 kratni reakcijski ligacijski pufer (60mM Tris-HCl (pH 7.8), 20mM MgCl₂, 20mM DTT, 2mM ATP, 10% polietilen glikol) kupljena pri podjetju Takara, Japonska. Ligacija je potekala pol ure na temperaturi 20 °C in nato še pol ure v ledeni kopeli. Dobljeno rekombinantno DNK smo s transformacijo s temperaturnim šokom (poglavlje 3.3.6.1) prenesli v bakterijski sev *E. coli* DH5 α .

Preglednica 3.6: Ligacija fragmenta cDNK GFP in vektorja pIVEX 1.3 WG (Hayashi in sod., 1986).

Fragment-cepljen produkt iz pGEM-T-GFP (cDNK GFP)	4,0 µl
Cepljen vektor pIVEX 1.3 WG (Roche, Švica)	0,5 µl
Ligacijske mešanice (Takara, Japonska)	5,0 µl
dH ₂ O	0,5 µl
Skupaj	10,0 µl

3.3.3.2 Vstavitev fragmenta cDNK GFP v vektor za ekspresijo pET22b(+)

Fragment cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine rezan z restriktijskima encimoma *XhoI* in *NdeI* iz plazmida pGEM-T-GFP smo z ligacijo vstavili v ekspresijski vektor pET22b(+), da bi pripravili mRNK molekulo za prokariotski brezcelični sistem ter da bi preverili ekspresijo gena za zeleno fluorescenčno beljakovino (GFP) v živih celicah bakterijskega seva *E. coli* BL21(DE3). S tem smo se žeeli prepričali, da gen še vedno kodira aktivno obliko zeleno fluorescenčne beljakovine kljub temu, da je bil gen podvržen večkratni restrikciji in ligaciji. Ekspresijski vektor pET22b(+) smo naročili pri podjetju Novagen (ZDA). Pred ligacijo smo cepili vektor z restriktijskima encimoma *XhoI* in *NdeI* (New England BioLabs, Velika Britanija), ki cepita tudi v restriktijskem mestu pomnožene cDNK GFP. Tako rezana fragment cDNK GFP in odprt vektor smo zmešali skupaj z DNK ligacijskim kitom podjetja Takara (Japonska) v naslednjih količinah:

Preglednica 3.7: Ligacija fragmenta cDNK GFP in vektorja pET22b(+) (Hayashi in sod., 1986).

Fragment-cepljen produkt iz pGEM-GFP (cDNK GFP)	4,0 µl
Cepljen vektor pET22b(+) (Novagen, ZDA)	0,5 µl
Ligacijske mešanice (Takara, Japonska)	5,0 µl
dH ₂ O	0,5 µl
Skupaj	10,0 µl

Ligacija je potekala pol ure na temperaturi 20 °C in nato še pol ure v ledeni kopeli. Dobljeno rekombinantno DNK smo s transformacijo s temperaturnim šokom (poglavlje 3.3.6.2) prenesli v bakterijski sev *E. coli* BL21(DE3) ter v sev *E. coli* DH5α (poglavlje 3.3.6.1).

3.3.6 Transformacija kompetentnih celic s temperaturnim šokom

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) proizvaja veliko napak pri pomnoževanju DNK, napake nastajajo tudi pri pomnoževanju DNK znotraj živih celic, vendar v tem primeru ima celica popravljalne mehanizme, katerih ni v PCR reakciji. To je tudi poglaviti vzrok za uporabo namnoževanja DNK materiala v kompetentnih celicah.

3.3.6.1 Transformacija kompetentnih celic DH5 α s temperaturnim šokom

Zamrznjene kompetentne celice DH5 α iz mikrobiološke zbirke inštituta "Jožef Štefan" (Slovenija) smo odtalili na ledu in po 60 μ l kulture prenesli v ohlajene mikrocentrifugirke. Nato smo h kulturi celic DH5 α dodali 5 μ l ligacijske zmesi in transformacijsko mešanico inkubirali 10 minut na ledu. Sledil je temperaturni šok (42 °C, 60 sekund) transformacijske mešanice in ponovna inkubacija mešanice za 2 minuti na ledu. Ko smo dodali 500 μ l gojišča LB (tekoče gojišče po Luria-Bertaniju, sestavljeno iz kazeinskega hidrolizata, kvasnega ekstrakta in NaCl), smo zmes prenesli v sterilno 15-mililitrsko polipropilensko epruveto ter inkubirali ob stresanju 1 uro pri 37 °C. Nato smo bakterije razmazali na LBA plošče (trdo gojišče LB z dodanim ampicilinom koncentracije 100 μ g/ml). Plošče smo inkubirali preko noči (16 ur) pri 37 °C. Zrasle so bele kolonije. Transformacijo kompetentnih celic DH5 α smo izvedli po protokolu avtorjev Maniatis in sod. (1989).

3.3.6.2 Transformacija kompetentnih celic BL21(DE3) s temperaturnim šokom

Transformacijo kompetentnih celic BL21(DE3), katere so bile od podjetja Stratagene (ZDA), smo izvedli po protokolu avtorjev Maniatis in sod. (1989). V mikrocentrifugirke smo prenesli 2 μ l ligacijske mešanice in postavili na led. Zamrznjene celice *E. coli* BL21(DE3) smo rahlo odtalili in postavili v ledeno kopel. Prenesli smo 400 μ l celične kulture v mikrocentrifugirko z liacijsko mešanico, rahlo pretresli ter inkubirali 10 minut v ledeni kopeli. Sledil je temperaturni šok (42 °C, 60 sekund) transformacijske mešanice in ponovna inkubacija mešanice za 2 minuti na ledu. Po dodatku 400 μ l gojišča LB (tekoče gojišče po Luria-Bertaniju, sestavljeno iz kazeinskega hidrolizata, kvasnega ekstrakta in NaCl), smo zmes prenesli v sterilno 15-mililitrsko polipropilensko epruveto ter inkubirali ob stresanju 1 uro pri 37 °C. Nato smo bakterije razmazali na LBA ploščo (trdo gojišče LB z dodanim ampicilinom koncentracije 100 μ g/ml) in na LBA ploščo z IPTG-jem (trdo gojišče LBA z dodanim 100 μ l 0,02 M IPTG-jem). Plošči smo inkubirali preko noči (16 ur) pri 37 °C.

3.3.7 Namnoževanje in preverjanje kolonij

V steklene epruvete s po 4 ml gojišča LBA smo nacepili po eno kolonijo DH5 α , prav tako smo v nove steklene epruvetke po 4 ml gojišča LBA nacepili po eno kolonijo BL21(DE3) in inkubirali preko noči ob stresanju pri 37 °C. Naslednji dan smo iz prekonočnih kultur osamili plazmidno DNK z uporabo kompletov reagentov "Plasmid Miniprep Spin Kit" (Genomed GmbH, Nemčija) po navodilih Maniatis in sod. (1989). Očiščen proizvod plazmidne DNK smo na koncu raztopili v 20 μ l pufru TE (10 mM Tris/HCl, pH 8,0 in 1 mM EDTA). Po izolaciji plazmidnih DNK (pGEM-T-GFP, pIVEX 1.3-GFP in pET22-GFP) smo na 0,8 % agarozni gelski elektroforezi preverili prisotnost izolirane plazmidne DNK pri posameznih kolonijah.

Vzorce pIVEX 1.3-GFP smo cepili z restriktijskim encimom *Pvu*I (New England BioLabs, Velika Britanija), ki optimalno deluje v NEB pufru R (New England BioLabs, Velika Britanija). Vzorce s plazmidom pET22-GFP smo cepili z restriktijsko endonukleazo *Eco*RV (New England BioLabs, Velika Britanija), ki optimalno deluje v NEB pufru 2 (New England BioLabs, Velika Britanija). K mešanici smo dodali goveji serumski albumin

(BSA - "Bovine Serum Albumine") s koncentracijo 100 µg/ml, da stabilizira restriktivno endonukleazo. Cepitev plazmidov pIVEX 1.3-GFP in pET22-GFP je potekala dve uri pri 37 °C. Restriktivno analizo smo izvedli, kot je navedeno v tabeli:

Preglednica 3.8: Restriktivna analiza plazmidne DNK, pIVEX 1.3-GFP, z restriktivno endonukleazo *PvuI* (Promega, 1999; Clontech, ZDA).

Plazmid pIVEX 1.3-GFP	4,0 µl
Restriktaza <i>PvuI</i> (2 U/ml) (New England BioLabs, Velika Britanija)	0,2 µl
NEB pufer R, 10x (New England BioLabs, Velika Britanija)	1,0 µl
dH ₂ O	4,5 µl
Skupaj	10,0 µl

Preglednica 3.9: Restriktivna analiza plazmidne DNK, pET22-GFP, z restriktivno endonukleazo *EcoRV* (Promega, 1999; Clontech, ZDA).

Plazmid pET22-GFP	4,0 µl
Restriktaza <i>EcoRV</i> (2 U/ml) (New England BioLabs, Velika Britanija)	0,2 µl
NEB pufer 2, 10x (New England BioLabs, Velika Britanija)	1,0 µl
BSA (100 µg/ml) (Bio-Rad, ZDA)	0,1 µl
dH ₂ O	4,7 µl
Skupaj	10 µl

Sledila je agarozna gelska elektroforeza na 0,8 % gelu, s katero smo skušali preveriti, katera kolonija ima pravilen restriktivni vzorec ekspresijskega plazmida pIVEX 1.3-GFP in katera ima pET22-GFP. Preostale celice iz iste kolonije, katere so vsebovale plazmid z vključkom pravilne dolžine, smo namnožili, iz njih izolirali in cepili plazmid v večji količini na zgoraj opisan način. Po ločbi na 0,8 % gelu agarozne gelske elektroforeze smo naš fragment očistili s kompletom reagentov "WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega, ZDA) po postopku, ki ga je predlagal proizvajalec (Promega, 2003).

3.3.8 Določevanje koncentracije in količine izolirane DNK v vzorcu

Poznamo več načinov za določanje koncentracije in količine izolirane DNK v vzorcu, v našem eksperimentalnem delu pa smo se poslužili določanja z agarozno gelsko elektroforezo in z UV-spektrofotometrom.

3.3.8.1 Določanje koncentracije in čistosti DNK z agarozno gelsko elektroforezo

Koncentracijo izolirane plazmidne DNK pGEM-T-GFP, pIVEX 1.3-GFP in pET22-GFP smo določili s primerjavo intenzitete (jakosti) lise vzorca in zmesi fragmentov DNK znanih

velikosti in koncentracij λ DNK/*Eco*91I(*Bst*EII). Ta zmes fragmentov DNK se uporablja za določevanje velikosti fragmentov DNK pri agarozni gelski elektroforezi.

Pred delom smo kadičko za gel, nosilec in glavniček sprali z destilirano vodo. Pripravili smo 0,8-odstotni gel, tako da smo agarozo (0,4 g) (polimer D-galaktoze in 3,6-anhidro-L-galaktoze, proizvajalec SERVA Electrophoresis GmbH, Nemčija) segrevali v TAE pufru (50 ml) (40 mM Tris/acetat, pH 8,0 in 1 mM EDTA). Ko se je agariza popolnoma raztopila, smo raztopino nekoliko ohladili in jo razlili na nosilec za gel ter pustili 30 minut, da se je gel strdil.

Vzorce smo pred nanosom na gel zmešali s 6 kratno nanašalno raztopino (0,25 % bromfenol modro, 0,25 % ksilen cianol, 15 % Ficoll, 0,04 M Tris/acetat in 1 mM EDTA) v razmerju 2-10 μ l vzorca, 2 μ l nanašalne raztopine in 0-8 μ l dH₂O. 12 μ l tako pripravljenih mešanic smo nanesli v vdolbinice gela. Kot kontrolo smo v eno progo na gelu nanesli 2 μ l DNK standarda zmešanega z 2 μ l nanašalne raztopine in 8 μ l destilirane vode.

Vzorce smo ločevali 45 minut pri konstantni napetosti 100V. Uporabljali smo napajalnik POWER / PAC 300 (BIO-RAD, ZDA). Po koncu elektroforeze smo gel potopili v etidijev bromid (0,5 μ g/ml) za 15 minut, nato smo gel tri krat sprali z vodo in ga slikali s kamero UVItec (Velika Britanija).

Relativno koncentracijo vzorcev smo ocenili na osnovi primerjave fluorescence, ki jo v svetlobi UV oddaja kompleks etidijev bromid – DNK oziroma etidijev bromid – RNK. Hkrati nam je ta metoda tudi potrdila prisotnost oziroma odsotnost željenih vzorcev (Herzog-Velikonja in Gruden, 2000).

3.3.8.2 Določanje koncentracije in čistosti DNK z UV-spektrofotometrom

S spektrofotometrom Perkin Elmer Lambda 11 (Velika Britanija) smo določili koncentracijo DNK in koncentracijo beljakovin, z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 260 nm (za DNK) in 280 nm (za beljakovine). Aromatske aminokisline absorbirajo pri 280 nm, nukleotidi pa pri 260 nm. Z merjenjem absorbancije pri 260 nm smo izmerili koncentracijo plazmidnim DNK: pGEM-T-GFP, pIVEX 1.3-GFP in pET22-GFP. Z merjenjem pri valovni dolžini 280 nm pa smo želeli določiti koncentracijo beljakovin, oziroma koncentracijo nečistoč v vzorcu. Če se v vzorcu nahaja preveč nečistoč to pomeni, da izolirana plazmidna DNA ni povsem čista, kar bi kasneje lahko pokvarilo rezultate transfekcije in transkripcije. Čistost DNA v vzorcu smo izračunali iz preprostega matematičnega razmerja:

$$A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0 \quad \dots(1)$$

Bolj, kot se vrednost razmerja bliža 2,0, bolj je DNA čista.

3.3.9 *In vitro* sinteza mRNK iz pripadajoče DNK

In vitro transkripcija v današnjem času ni več tako zahtevna, saj imamo znanje in vse potrebne reagente, da jo lahko izvedemo brez pomoči živih celic. Podjetje Promega (2006) prodaja komplet reagentov, kjer izkoriščajo delovanje RNK polimeraze odvisne od T7 RNK polimeraznega promotorja. Ta produkt smo uporabili tudi mi po principu, ki so ga opisali Gurevich in sod. (1991).

Pred nadaljnjam delom mora biti DNK očiščena s kompletom reagentov "WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega, ZDA) po postopku, ki ga je predlagal proizvajalec ter skoncentrirana s koncentratorjem Eppendorf Concentrator 5301 (Nemčija) na vsaj 50 µl (iz 150 µl vzorca).

3.3.9.1 Transkripcija lineariziranega plazmida pIVEX 1.3-GFP v mRNK-GFP1

Lineariziranemu plazmidu pIVEX 1.3-GFP z restriktazo *Pvu*I (New England BioLabs, Velika Britanija) smo najprej pretvorili 3'- štrleči konec v topi konec s pomočjo Klenowga fragmenta, saj se s tem izognemo ponovnemu cikliziranju. Način in potek tvorbe topih koncev je opisan v spodnji tabeli:

Preglednica 3.10: Restriktijska mešanica za proizvodnjo 3'- topi konec s pomočjo Klenowga fragmenta (Promega, 2006).

Lin. vektor pIVEX 1.3-GFP z restriktazo <i>Pvu</i> I	35,0 µl
Klenow fragment (Promega, ZDA)	2,0 µl
T7 transkripcijski pufer (Promega, ZDA)	20,0 µl
Voda brez nukleaz	3,0 µl
Skupaj	60,0 µl

Klenow fragment in pet kratni T7 transkripcijski pufer (400 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 120 mM MgCl₂, 10 mM spermidin in 200 mM DTT) sta bila kupljena pri podjetju Promega (ZDA). Zgoraj pripravljeno reakcijsko mešanico smo inkubirali eno uro na 37 °C. Nakar smo ji dodali 30 µl rNTP-jev (20 µl vsakega 100 mM rNTP-ja (ATP, GTP, CTP, UTP) smo zmešali v eni mikrocentrifugirki in 10 µl encimske mešanice (T7) (produkt Promega, ZDA) ter inkubirali nadalne tri ure na 37 °C. DNK vektorja pIVEX 1.3-GFP smo odstranili z 8,0 µl RQ1 DNazo (dodata se jo 1U/ µg DNK) po 20-minuti inkubaciji na 37 °C. Sledilo je čiščenje mRNK-GFP1, katero je opisano v poglavju 3.3.10.

3.3.9.2 Transkripcija lineariziranega plazmida pET22-GFP v mRNK-GFP2

Na DNK lineariziranega vektorja pET22-GFP cepljenega z endonukleazo *Eco*RV smo izvedli transkripcijo v mRNK-GFP2 s pomočjo pripravljene encimske mešanice pri podjetju Promega (ZDA). Dodali smo rNTP-je in T7 transkripcijski pufer na način podan v sledeči tabeli Preglednica 3.11:

Preglednica 3.11: Restriktijska mešanica za proizvodnjo mRNK-GFP2 iz lianiziranega pET22-GFP vektorja (Promega, 2006).

Lin. vektor pET22-GFP rezan z encimom <i>EcoRV</i>	25,0 µl
25mM rNTP	30,0 µl
T7 transkripcijski pufer (Promega, ZDA)	20,0 µl
Encimska mešanica (T7) (Promega, ZDA)	10,0 µl
Skupaj	60,0 µl

Pet kratni T7 transkripcijski pufer (400 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 120 mM MgCl₂, 10 mM spermidina in 200 mM DTT) je bil kupljen pri podjetju Promega (ZDA). Translacijsko mešanico smo pustili inkubirat tri ure in pol na 37 °C, nakar smo ji dodali 10 µl DNaze brez Rnaz (po protokolu se doda 1U/ µg DNK) in nadaljevali z inkubacijo še za 20 minut na 37 °C. Sledilo je čiščenje sintetizirane mRNK-GFP2 po protokolu opisanega v sledečem poglavju 3.3.10.

3.3.10 Čiščenje eksogene mRNA

Da bi iz vzorca mRNA odstranili encime, pufre in nerazgrajene DNA molekule, smo po tretiranju z DNazo brez RNaze, nadaljevali s fenol/kloroform/izoamil alkoholno precipitacijo (Ausubel in sod., 1988).

V 48µl vzorca mRNA s primesi smo najprej dodali enak volumen z DEPC vodo saturiran fenol (pH 4,7), kloroform in izoamil alkohol v razmerju 125:24:1 ter po eno minutnem mešanju na vrtinčniku, je sledilo dvo minutno centrifugiranje pri 14000 x g. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, kjer smo dodali enak volumen kloroforma in izoamil alkohola v razmerju 25:1 ter po eni minutni vrtinčenja, smo dve minute centrifugirali. Ponovno smo prenesli zgornjo fazo v novo mikrocentrifugirko ter dodali 0,3 volumna vzorca natrijevega acetata ter en volumen vzorca izopropanola. Sledilo je nežno prevračanje in po pet minutni inkubaciji na ledu smo centrifugirali deset minut. Supernatant smo odlili, usedlino sprali z 1 ml 70% etanolom, v končni fazi pa smo usedlino resuspendirali v 100 µl destilirane vode, katera ni vsebovala nulkeaz.

3.4 METODE ZA PRIPRAVO CELIČNEGA EKSTRAKTA

Priprava brezceličnega sistema je zahtevna in dolgotrajna, saj je nešteto drobnih elementov, kateri sodelujejo pri uravnavanju sinteze beljakovin. Sintetična proizvodnja teh substanc je nemogoča, tudi zaradi tega, ker bi bila potrebna optimizacija vsake sleherne komponente. Zatorej se pri pripravi brezceličnega sistema posložujemo celičnega ekstrakta.

3.4.1 Namnožitev bakterijskega seva *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL ter celično razbijanje z lizocimom v TE pufru

Za namnožitev *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL smo uporabili aerobno metodo kultivacije v tekočem gojišču LB (10 g/l kazeinski hidrolizat, 5 g/l kvasni ekstrakt, 10 g/l NaCl, pH 7.0 z NaOH). Celice smo naročili pri podjetju Stratagene (ZDA), katere smo jih najprej odtalili in gojili na trdem LB gojišču, nato pa smo si pripravili 600 ml gojišča LB, ki smo ga prelimili dva krat po 100 ml v 500 ml elenmajerici ter dva krat po 200 ml gojišča v 500 ml elenmajerici. Elenmajerice smo zaprli z zamaškom iz vate ter avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar.

3.4.1.1 Kultivacija bakterije *E. coli* v tekočem LB gojišču

Celice *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL smo najprej namnožili preko noči v dveh paralelkah v 100 ml gojišču LB z antibiotikom kloranfenikolom (81 µl / 100 ml LB gojišča) na 37 °C. Naslednji dan smo kulturi razredčili z 200 ml gojiščem, razdelili inokulirano gojišče v štiri paralelke in izmerili začetno optično gostoto, ki je znašala pri OD₆₀₀ okoli 0,4. Inokulirana gojišča smo inkubirali na stresalniku pri 37 °C, dve do eksponentne faze rasti (optična gostota je znašala okoli 0,8), drugi dve pa do pozne stacionarne faze rasti (16 ur inkubacije).

3.4.1.2 Encimsko razbijanje celične membrane s pomočjo lizocima v TE pufru

Encimska metoda razbijanja celične membrane pri bakterijah je najboj uporabljena metoda pri tovrstnih opravilih. Mi smo v ta namen uporabili založno raztopino lizocima (10 mg/ml) resuspendiranega v TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0). Uporaba lizocima je zelo preprosta, potrebna je mešanica gram negativnih celic in encima v TE pufru v razmerju 100:1 ter inkubacija na 37 °C za 30 minut.

Po končani kultivaciji smo inokume iz elermajeric prelimili v plastične epruvete z navojnim pokrovom in jih centrifugirali dve minuti na 10000 x g. Supernatant (gojišče) smo odlili ter tri krat sprali celice s pufrom A (10 mM Tris/ acetat, pH 8,2, 14 mM Mg(OAc)₂, 60 mM KOAc, 1 mM DTT), ki smo ga pripravili po članku avtorjev *Kigawa* in sod. (2004). Tako smo pridobili 0,3 g mokre biomase iz logaritemske faze rasti bakterije *E. coli* ter 1,0 g mokre biomase iz stacionarne faze rasti, te pa smo resuspendirali v odgovarjajočem volumnu pufra A ter jima dodali lizocimi v TE pufru, toliko kolikor je prikazano v tabeli Preglednica 3.12.

Preglednica 3.12: Encimsko razbijanje celične membrane bakterijskega seva *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL v pufru A s pomočjo lizocima v TE pufru.

Sestava	Log faza celic	Stac. faza celic
Mokra teža celic <i>E. coli</i>	0,3 g	1,0 g
Volumen pufra A	3,0 ml	10,0 ml
Volumen lizocima v TE pufru	30 µl	300 µl

Po končani 30 minutni inkubaciji na 37 °C smo pričeli z dializo celičnih ekstraktov (poglavlje 3.4.3).

3.4.2 Namnožitev kvasovk *S. cerevisiae* S228c ter celično razbijanje s steklenimi kroglicami

Kot metodo za pripravo biomase smo uporabili aerobno submerzno kultivacijo na stresalniku. Za kultivacijo smo uporabili delovno prostornino 400 ml. Sev *S. cerevisiae* S228c smo dobili iz mikrobiološke zbirke Biotehniške fakultete (Slovenija). Celice smo morali najprej odmrzniti in jih kultivirati na trdem YEPD gojišču (tri kratni prenos celic na novo trdo YEPD gojišče po vsaki dvo dnevni inkubaciji), kasneje pa smo jih prenesli v tekoče YEPD gojišče.

Pripravili smo 2,2 l tekočega YEPD gojišča (11 g kvasnega ekstrakta, 11 g peptona, 22 g glukoze, dH₂O do 2200 ml in pH = 6,987) in ga prelimili v štiri dvo litrške elenmajerice tako, da je vsaka vsebovala 400 ml gojišča. Ostanki tekočega gojišča (200 ml) smo prelimili v eno litrsko elenmajerico s stransko kiveto (služila je za umerjanje spektrofotometra). Elenmajerice smo zaprli z zamaškom iz vate ter avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar.

Predhodno smo naredili umeritveno krivuljo za kvasovko *S. cerevisiae* S228c, da smo pridobili orientacijo, kdaj preidejo kvasovke v stacionarno fazo, ko jih gojimo v tekočem YEPD gojišču pri 38 °C in na stresalniku z 210 RPM. Začetna optična gostota je znašala okoli 0,2 ter končna 2,0.

3.4.2.1 Kultivacija kvasovk *S. cerevisiae* v tekočem YEPD gojišču

Koncentracijo celic v gojišču smo ocenili s pomočjo optične gostote gojišča, ki smo jo izmerili na spektrofotometru UltraSpec® 2000 podjetja Pharmacia Biotech (ZDA). S sterilno cepilno zanko smo s plošče (trdo YEPD gojišče) vedno prenesli toliko celic, da je bila optična gostota na začetku približno 0,2. Inokulirana 400 ml gojišča smo namestili na stresalnik, ki se je vrtel z 210 RPM. Kultivacija za prva dva vzorca je potekala pri temperaturi 38 °C 6 ur (sredina eksponentne faze rasti), pri drugih dveh vzorcih pa 24 ur (pozna stacionarna faza rasti).

3.4.2.2 Mehansko razbijanje celične stene s steklenimi kroglicami

Razbijanje celične stene s steklenimi kroglicami (Scopes, 1987) deluje na principu trenja med kroglicami ter med kroglicami in steno posode. Zmes steklenih kroglic, pufra A in biomase je potrebno intenzivno stresati.

Po končani kultivaciji smo bioprosesno brozgo iz elermajeric prelili v plastične epruvete z navojnim pokrovom in jih centrifugirali pet minut na 14000 obr./min pri sobni temperaturi s centrifugo SIGMA 3K30 in rotorjem NR 12159. Supernatant (odvečno gojišče) smo odlili, celice smo spirali z dH₂O ter jih resuspendirali v nekaj mililitrih pufra A, združili vzorca 1 in 2 (celice iz eksponentne faze rasti) ter vzorca 3 in 4 (celice iz stacionarne faze rasti) za lažje nadaljevanje. Po pet minutnem centrifugiranjem smo odlili supernatant. S takšnim postopkom kultivacije in čiščenja smo pridobili približno 1 g biomase iz logaritemsko faze rasti in 7 g biomase iz stacionarne faze rasti (mokra biomasa) (zaradi prevelike količine celic, smo za nadalno delo uporabili le 3 grame celic iz stacionarne faze rasti). Po modificiranemu protokolu za pripravo celičnega ekstrakta (Scopes, 1987) smo na en gram celic dodali 5 g sterilnih steklenih kroglic (Sigma, ZDA, velikost 425 – 600 mikronov) in 5 ml pufra A (razmerje sestavin je 1:5:5), kar je prikazano v tabeli Preglednica 3.13:

Preglednica 3.13: Razbijanje celičnih komponent kvasovke *S. cerevisiae* S288c s steklenimi kroglicami velikosti od 425 do 600 mikronov v pufru A (Scopes, 1987).

Sestava	Log faza celic	Stac. faza celic
Mokra teža celic <i>S. cerevisiae</i>	1,0 g	3,0 g
Teža steklenih kroglic (Sigma)	5,0 g	15,0 g
Volumen pufra A	5,0 ml	15,0 ml

Razbijanje celic je potekalo na vrtinčniku štiri krat po eno minuto z vmesnim hlajenjem na ledu. Po centrifugiranjem (Sorvall RC 5C PLUS, rotor SS34) na 4 °C pri 30000 x g za 30 minut je sledila dializa, ki je opisana v sledečem poglavju (3.4.3).

3.4.3 Dializa celičnih ekstraktov

V celičnemu lizatu je veliko inhibitornih molekul (AMP, GMP,...), ki ovirajo pri brezcelični translacji, zato je potrebna dializa. Postopek za dializo celičnega lizata bakterijskega seva *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL in celičnega lizata iz kvasovk *S. cerevisiae* S228c je enak (Kigawa in sod., 1999).

Po razbijanju celic smo 30 minut centrifugirali pri obratih 30000 x g, nakar smo supernatant prenesli v dializno črevo (Serva- Servapor, Nemčija), to pa smo potopili v 100 ml pufer A, ki se je nahajal v čaši z mešalom. Delo je potekalo v hladni komori pri 4°C, kjer smo na vsake dve do tri ure zamenjali pufer A (tri krat). Tako smo dobili razredčen ekstrakt S30, katerega smo iz dializnega črevesa prenesli v mikrocentrifugirke ter shranili na -80 °C do uporabe.

3.4.4 Umerjanje absorbance ekstraktov S30

Celice v različni fazи rasti imajo različno razmerje celičnih komponent. Zaradi lažje in bolj realne primerjave sistemov narejenih iz različnih ekstraktov S30 smo izmerili ekstinkcijo pri 260 nm ter ekstraktne S30 sisteme redčiti s pufom A do podobnih vrednosti. Meritve smo opravili na spektrofotometru NanoDrop (ZDA), kjer smo za analizo vzorcev porabili 2 μ l ekstrakta S30.

3.5 METODE ZA VZPOSTAVITEV BREZCELIČNIH SISTEMOV IN DOLOČITEV NJIHOVIH DONOSOV

Za vzpostavitev brezceličnih sistemov je potrebna zelo natančno in skrbno delo, saj že en sam primankajaj sestavin lahko vodi v nižji donos oziroma v neuspešno beljakovinsko sintezo.

3.5.1 Priprava translacijske mešanice reagentov za brezceličen sistem

Surovi celični lizat je vir encimskih orodij, vendar pa je translacija zahtevna operacija, ki potrebuje bistveno več kot zgolj lizat, ker svoje surovine kaj kmalu iztroši. Po modificiranemu predlogu avtorjev Madin in sod. (2000) smo v naše brezcelične sisteme dodali nekaj esencialnih sestavin.

Za lažjo pripravo teh sestavin smo vsako sestavino posebej zatehtali in raztopili v topilu. Tako smo se izognili problemu netopnosti oziroma slabe topnosti, obarjanju...V tabeli Preglednica 3.14 smo prikazali reagente, njihove molekulske mase in zahtevano koncentracijo reagentov v brezceličnemu sistemu.

Preglednica 3.14: Pregled dodanih reagentov za translacijsko mešanico: potrebna molarna količina reagenta, ime reagenta in molekulska masa nekaterih reagentov (Madin in sod., 2000; Kigawa in sod., 1999)

Potrebujemo (mM)	Reagenti	Mr (g/mol)	Potrebujemo (mM)	Reagenti	Mr (g/mol)
0,35	Thr ^b	119,12	0,35	Leu ^b	131,18
0,35	Phe ^b	164,16	0,35	Pro ^b	115,13
0,35	Met ^b	149,21	0,35	Glu ^b	147,13
0,35	Trp ^b	204,23	1,2	ATP ^b	551,10
0,35	Cys-HCl ^b	157,61	0,25	GTP ^b	603,00
0,35	Asn ^b	132,12	16	kreatin-fosfat ¹	327,14
0,35	Gly ^b	75,07	2	DTT	154,30
0,35	Lys ^b	182,65	0,35	spermidin ^c	145,25
0,35	Ser ^b	105,09	100	fosfo-acetat ^{**1}	98,14
0,35	Arg ^b	210,67	50 µg/ml	t-RNK	
0,35	Asp ^b	133,10	0,01-%	NaN ₃ *	65,00
0,35	Ala ^b	89,09	1 µM	E64***	
0,35	Gln ^b	146,15	0,05-%	Nonidet-P40***	
0,35	Tyr* ^b	181,19	2,5	Mg(OAc) ₂ ^b	214,46
0,35	His ^b	209,63	27	fosfoenolpiruvat ²	
0,35	Val ^b	117,15	80	piruvat-kinaza ²	
0,35	Ile ^b	131,18	0,45 mg/ml	kreatin-fosfokinaza	
			24	HEPES/KOH (pH 7,8)* ^a	238,30

Legenda: sestava translacijske mešanice:

*- zaradi slabe topnosti aminokislina tirozin, smo skupaj zamešali reagente HEPES/KOH (pH 7,8), NaN₃ in tirozin, ** - Pripravili smo 66 kratno mešanico fosforjevega acetata, *** - reagenta E64 in P40 se nahajata v tekoči fazi, zato smo ju raztopili do 100 kratne potrebne mešanice, a - komponenta je iz podjetja Serva, Nemčija, b - komponenta je iz podjetja Sigma, ZDA, c - komponenta je iz podjetja Fluka, Švica, 1 – reagent se je uporabil le pri evkariontskem brezceličnem sistemu, 2 – reagent se je uporabil le pri prokariotskem brezceličnem sistemu.

Zaradi problema topnosti, smo vsako komponento posebej raztopili v topilu tako, da smo si pripravili 100 kratne koncentracije potrebnih sestavin, izjema so aminokislina tirozin, ki je najslabše topna, fosforjev acetat, ki je pripravljen v 66 kratni mešanici ter spermidin, kupljen pri podjetju Fluka (Švica) v koncentraciji 1 g/ml.

31,7 g tirozina smo raztopili v 85 ml DEPC vodi, 2,86 g HEPES in 10 mg NaN₃, premešali ter dodali KOH do pH 7,8. Dolili smo še DEPC vode do končnega volumena 100 ml. Tako pripravljeno mešanico smo označili s HTN mešanico (HEPES, tirozin, NaN₃)

Priprava translacijske mešanice je potekala tik pred vzpostavitvijo brezceličnega sistema na sledeči način: v mikrocentrifugirko smo dodajali 200 µl HTN mešanice, 10 µl vsake od 100 kratne raztopljene komponente, 15,5 µl spermidina in 15 µl fosforjevega acetata ter sestavine na rahlo premešali.

3.5.2 Vzpostavitev brezceličnega sistema

Za nemoteno delovanje brezceličnega sistema je potrebno pravilno nastaviti tovrstni sistem. V tabeli Preglednica 3.15 je prikaz dodanih sestavin za pravilno delovanje prokariotskega brezceličnega sistema ter v tabeli Preglednica 3.16 za pripravo evkariontskega brezceličnega sistema.

Preglednica 3.15: Vzpostavitev prokariotskega brezceličnega sistema s pomočjo dodanih komponent: translacijska mešanica, ekstrakt S30 bakterije *E. coli*, mRNK-GFP ter DEPC voda.

Mešanice	K1	Vzorec CF 1	Vzorec CF 2
Translacijska mešanica	50 µl	50 µl	50 µl
Ekstrakt S30	40 µl	40 µl	40 µl
mRNK (GFP-6,6 mg/ml)	0 µl	1 µl	1 µl
DEPC voda	10 µl	9 µl	9 µl
Skupaj	100 µl	100 µl	100 µl

Legenda: sestava brezceličnih sistemov:

vzorec CF1 in K1 – brezcelični sistem narejen iz ekstrakta S30 logaritemske faze rasti bakterije *E. coli* in njegova kontrola (enak sistem brez mRNK-GFP) , vzorec CF2 – brezcelični sistem narejen iz ekstrakta S30 stacionarne faze rasti bakterije *E. coli*.

Preglednica 3.16: Vzpostavitev prokariontskega brezceličnega sistema s pomočjo dodanih komponent: translacijska mešanica, ekstrakt S30 kvasovke *S. cerevisiae*, mRNK-GFP ter DEPC voda.

Mešanice	K3	Vzorec CF 3	Vzorec CF 4	K4	Vzorec CF5	Vzorec CF 6
Translacijska mešanica	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Ekstrakt S30	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl
mRNK (GFP-6,6 mg/ml)	0 µl	1 µl	1 µl	0 µl	1 µl	1 µl
DEPC voda	10 µl	9 µl	9 µl	10 µl	9 µl	9 µl
Skupaj	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Legenda: sestava brezceličnih sistemov:

vzorec CF3, vzorec CF4 in K3 – brezcelična sistema narejena iz ekstrakta S30 logaritemske faze rasti kvasovke *S. cerevisiae* in njuna kontrola, vzorec CF5, vzorec CF6 in K4 – brezcelična sistema narejena iz ekstrakta S30 stacionarne faze rasti kvasovk *S. cerevisiae* in njuna kontrola.

3.5.3 Preverjanje uspešnosti translacije v brezceličnemu sistemu

Za ugotavljanje uspešnosti sinteze zeleno fluorescenčne beljakovine (GFP) v brezceličnemu sistemu smo uporabili dve metodi: merjenje fluorescence s spektrofotometrom ter poliakrilamidno gelsko elektroforez v prisotnosti NaDS.

3.5.3.1 Merjenje fluorescence GFP beljakovine s spektrofluorimetrom

Najhitrejša metoda merjenja nastajajoče beljakovine GFP je spektrofotometerija, saj nam omogoča večkratne meritve ne da bi sistem zaustavili, kontaminirali, ali spremenili. V ta namen smo uporabili dva aparata: Microplate reader – Tecan (Nemčija), meri 100 µl vzorce v titerski plošči; fluorimeter PTI, za meritev so potrebni večji volumni vzorcev (400µl). Oba aparata delujeta na podoben princip.

3.5.3.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS PAGE)

Poliakrilamidno NaDS gelsko elektroforezo smo izvedli po navodilih, ki so jih zbrali Gallagher in sod. (1999). Za analizo velikosti in čistosti beljakovinskih vzorcev z NaDS PAGE smo uporabljali 15 % ločevalni poliakrilamidni gel (3,75 ml 40 % akrilamida, 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 3,65 ml dH₂O, 0,1 ml 10 % NaDS, 0,03 ml 10 % APS (amonijev persulfat) in 15 µl TEMED-a (N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin)) in aparaturo Miniprotean II (Bio-Rad, ZDA). Zmes ločevalnega gela smo vlili med dve stekleni plošči, ki sta bili razmaknjeni z distančnikoma debeline 0,75 mm. Nato smo gel prelili z butanolom, da se je gladina gela zravnala. Ko je gel polimeriziral, smo butanol odlili in na ločevalni gel nalili 5 % nanašalni (koncentrirni) gel (1,25 ml 40 % akrilamida, 2,5 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 6,15 ml dH₂O, 0,1 ml 10 % NaDS, 0,03 ml 10 % APS in 15 µl TEMED-a). V nanašalni gel smo vstavili glavniček in počakali, da je nanašalni gel polimeriziral. Nato smo glavniček odstranili ter plošči z gelom vstavili v elektroforezno

aparaturo in v kadičko nalili 1x elektroforezni pufer. Elektroforezni pufer smo pripravili iz 10x koncentrirane raztopine (30,3 g Tris/HCl, 144 g glicina, 10 g NaDS na liter dH₂O). V žepki elektroforeznega gela smo najprej nanesli 7,5 µl 5x nanašalnega pufra (MBI Fermentas, Litva) s standardom velikosti do 118 kDa in koncentracijo 0,5 µg/µl (250 mM Tris/HCl, pH 6,8, 50 % glicerol, 10 % NaDS, 0,5 % bromfenol modro in 400 mM DTT (ditiotreitol)). V ostale žepke pa smo nanesli še 25 µl vzorcev, raztopljene v ustreznem volumnu 1x nanašalnega pufra. Vzorce smo pred nanosom na gel inkubirali 5 min v vodni kopeli pri 100 °C. Elektroforeza je potekala pri toku 35 mA, dokler barvilo ni pripravovalo do spodnjega roba steklenih plošč. Po končani elektroforezi smo gel barvali v barvalni raztopini "Coomassie modro" (0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 7 % ocetne kisline in 40 % etanola) približno 1 uro. Nato smo barvo odlili in gel spirali 1 do 2 ure z razbarvalno raztopino (30 % etanola in 10 % ocetne kisline v destilirani vodi). Na koncu smo gel prelili z manj koncentrirano razbarvalno raztopino, dokler niso zaradi razbarvanja ozadja postale vidne beljakovinske lise.

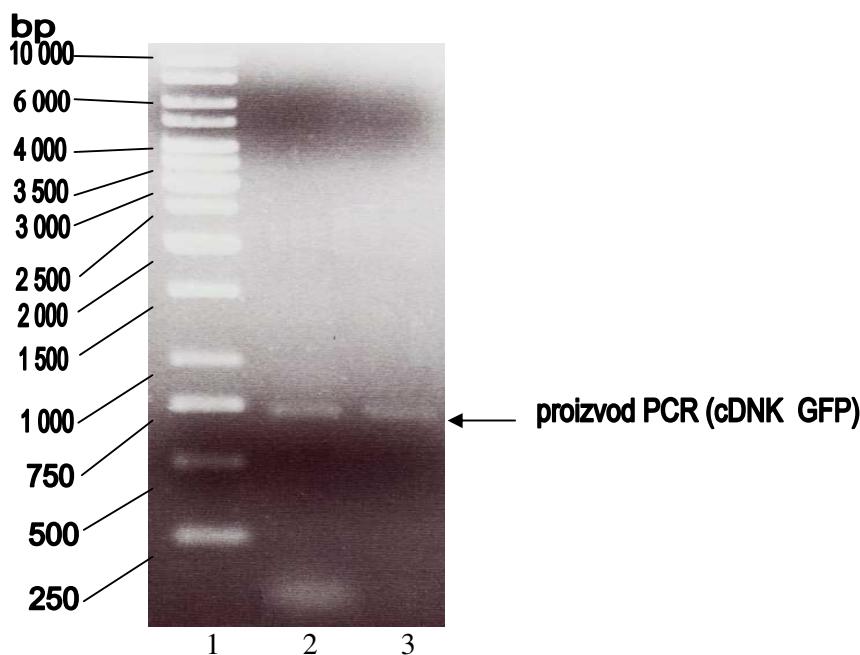
4 REZULTATI

Na podlagi delovne hipoteze smo razvili dva sistema za brezcelično izražanje beljakovin, narejenega iz bakterijskega ekstrakta *Echerichia coli*, kot tudi iz kvasnega ekstrakta *Saccharomyces cerevisiae*, z minimalnimi razlikami v sestavi. Pri tem smo opravili naslednje postopke. Preklonirali smo gen za zeleno fluorescenčno beljakovino (GFP) v klonirni vektor pGEM-T-Easy, in tudi v dva izrazna vektorja, pIVEX 1.3 WB ter pET22b(+); pripravili smo izražanje beljakovine GFP v bakteriji; pripravili smo mRNK za prokariotski in evkarionski brezcelični sistem, pripravili smo celične ekstrakte iz bakterije *E. coli* in kvasovke *S. cerevisiae*, oboje v logaritemski fazи in stacionarni fazи rasti, na koncu pa smo pripravili translacijske mešanice, ki smo jih uporabili kot dodatek za večji donos pri izražanju beljakovine. Delo je potekalo v času od februarja 2006 do maja 2007 z vmesnimi prekinittvami dela. V tem obdobju smo vzpostavili 29 krat brezcelične sisteme. Največ poizkusov smo naredili na brezceličnih sistemih narejenih iz bakterijskega ekstrakta (celice smo pobrali v logaritemski fazи rasti zaradi hitrejšega poteka dela), saj smo želeli nekoliko izboljšati donos *in vitro* sinteze beljakovine. Ostale sisteme smo naredili v petih paralelkah, kot rezultat pa smo podali vrednosti devetih brezceličnih sistemov.

4.1 MOLEKULSKO KLONIRANJE TER *IN VITRO* SINTEZA mRNK-GFP

4.1.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) za pomnožitev cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine (GFP)

Z namenom uporabe zelene fluorescenčne beljakovine za nadaljne študije o brezceličnih sistemih smo s postopki kloniranja pripravili ustrezne konstrukte. Z metodo PCR smo pomnožili gen za GFP, hkrati pa smo spremenili 5'- in 3'- konca, saj smo vanju vključili nova restriktijska mesta. Uspešnost PCR smo potrdili z nanosom vzorca po pomnožitveni reakciji na agarozno gelsko elektroforezo. Velikost pomnoženega fragmenta smo primerjali z zmesjo fragmentov DNK znanih velikosti (Slika 4.1). Produkt je imel pričakovano dolžino 720 nukleotidov in je ustrezala dolžini zapisa za zeleno fluorescenčno beljakovino (Slika 4.1).



Slika 4.1: Elektroforeza na 0,8 % agaroznem gelu s PCR pomnožene cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine.

Na levi strani je nanešena zmes fragmentov DNK znanih velikosti (stolpec 1), na sredini je pomnožena cDNK GFP – neočiščen (stolpec 2), na desni strani pa je očiščen pomnožek cDNK GFP (stolpec 3). Iz primerjave lis zmesi fragmentov DNK znanih velikosti in cDNK smo ugotovili, da velikost namnožene cDNK ustreza pričakovani dolžini.

Namnoženi fragment cDNK zelene fluorescenčne beljakovine, ki je bil brez primesi produktov in pravilne velikosti, smo očistili s kompletom reagentov "WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega, 2003).

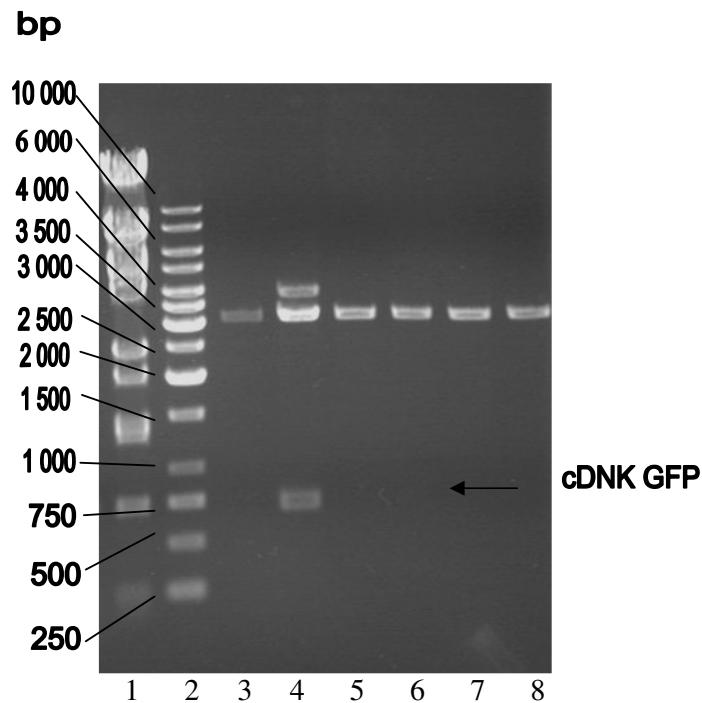
4.1.2 Vstavitev cDNA GFP v vektor za kloniranje pGEM-T Easy

Pfu DNK polimeraza pri pomnoževanju s PCR tvori tope konce. Zato smo namnoženemu in očiščenemu fragmentu dodatno modificirali 3'- konce z vezavo adenina. Pri tem smo uporabili Taq DNK polimerazo. Nastali produkt smo brez dodatnega čiščenja s pomočjo T4 DNK ligaze ligirali v vektor za kloniranje pGEM-T Easy. Celice seva DH5 α smo transformirali z dobljenim konstruktom rekombinantnega plazmida. Bakterijske kolonije z rekombinantnim plazmidom so zrasle na indikatorskih ploščah s trdim gojiščem LBA, ki smo jim predhodno dodali zmes X-Gal/IPTG. Na ploščah smo ločili bele kolonije, t.j. kolonije z rekombinantnim plazmidom, od modrih kolonij in jih nato precepili v tekoče gojišče LBA. Iz pripravljenih prekonočnih kultur smo izolirali plazmidno DNK (pGEM-T-GFP) s pomočjo kompleta reagentov "Plasmid Miniprep Spin Kit". Posameznim klonom smo po izolaciji plazmida pGEM-T-GFP z elektroforezo na 0,8 % agaroznem gelu preverili prisotnost gena za GFP ter določili njihovo koncentracijo. Koncentracijo izolirane plazmidne DNK smo določili s primerjavo intenzitete lise vzorca in zmesi fragmentov DNK znanih velikosti ter koncentracij λ DNK/Eco91I(BstEII) in dognali, da imamo pravilno in zadostno količino za nadaljo delo (4 ng/ μ l cDNA GFP).

Izoliran vektor pGEM-T-GFP smo rezali z restriktijskima encimoma *Xho*I in *Nde*I tako, da smo pridobili namnožen gen za zeleno fluorescenčno beljakovino (cDNK GFP). Gen za GFP smo ločili od ostalih komponent z agarozno gelsko elektroforezo na 0.8% gelu. Po končani elektroforezi smo naredili ekstrakcijo cDNK GFP iz gela s kompletom reagentov "WINZARD SV Gel and PCR Clear-Up System" (Promega, 2003).

4.1.3 Vstavitev cDNK GFP v vektor za ekspresijo pIVEX 1.3 WG

Očiščen fragment cDNK GFP, rezan z restriktijskima encimoma *Xho*I in *Nde*I, smo ligirali v odprt ekspresijski vektor pIVEX 1.3, kateri je bil prav tako rezan z enakimi encimi. Po transformaciji v bakterijske celice DH5 α , smo celice nacepili na trdo gojišče LBA. Zrasle so drobne kolonije premera 2-3 mm in iz med njih smo naključno izbrali 6 kolonij, katere smo precepili v tekoče gojišče LBA. Iz tako namnoženih bakterijskih kultur smo izolirali plazmidno DNK (pIVEX 1.3-GFP) s kompletem reagentov "Plasmid Miniprep Spin Kit" ter nanesli na 0.8 % agarozni gel in preverili prisotnost ter količino izoliranih DNK. Od šestih naključno izbranih kolonij, je le ena vsebovala vektor pIVEX 1.3-GFP. To kolonijo smo precepili v 30 ml gojišča LBA, da bi pridobili večje količine celic in s tem večje količine plazmidne DNK. Iz namnoženih kolonij smo izolirali DNK s kompletem reagentov "JETStar, The novel plasmid purification system".



Slika 4.2: Restriktijska analiza, z restrikta zama *Xho*I in *Nde*I, plazmida pIVEX 1.3 z vstavljenim cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine na 0,8 % agaroznem gelu.

Iz leve proti desni strani so nanešene: zmes fragmentov DNK znanih velikosti in koncentracij λ -DNK/Eco91I(BstEII), v stolpcu 2 je nanešena zmes fragmentov DNK znanih velikosti in ter v stolpcu 3, 4, 5, 6, 7 in 8 je nanešena količina 2 μ l rezanih vzorcev (pravilen le vzorec v stolpcu 4). V stolpcu 4 vidimo tri

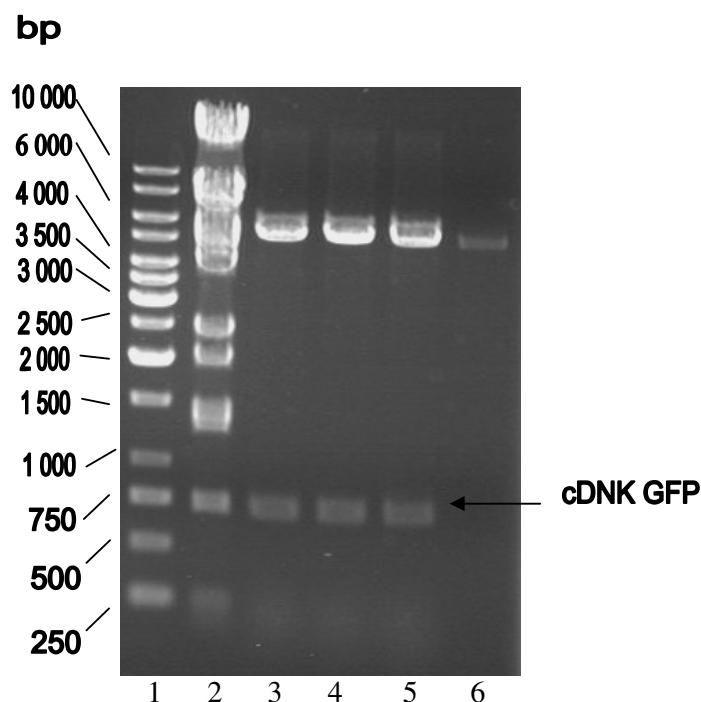
lise, zgornja predstavlja preostanek rezanega plazmida, srednja lisa je nerezan plazmid pIVEX 1.3-GFP, spodnja lisa pa ustreza velikosti gena za GFP.

Po izolaciji in čiščenju plazmida pIVEX 1.3-GFP smo izvedli postopek restrikcije z restriktazo *PvuI* zato, da smo pridobili lianiziran produkt, ki je primernejši za pripravo mRNA. Ker pa restriktaza *PvuI* proizvaja štrelče konce, smo morali s pomočjo Klenowega fragmenta pretvoriti 3' štrelče konce v tope konce. Tako

4.1.4 Vstavitev cDNK GFP v vektor za ekspresijo pET22b(+)

Uporabili smo še en izrazni vektor: pET22b(+), da bi preverili ekspresijo v *in vivo* in *in vitro* sistemih. Vektor smo rezali z restriktijskima encimoma *XhoI* in *NdeI* ter vanj ligirali gen za zeleno fluorescenčno beljakovino pridobljeno s pomnožkom pGEM-T-GFP po restrikciji z enakima encimoma. Sledila je transfekcija z dobljenim konstruktom v bakterijska seva *E. coli* DH5 α ter BL21(DE3).

Celice *E. coli* DH5 α so služile za pomnoževanje konstrukta pET22-GFP. Iz trdega gojišča LBA smo naključno prenesli 10 kolonij v 2 ml tekočega gojišča LB, od tega nam ena ni zrasla. Plazmidne DNK od štirih naključno izbranih kolonij smo nanesli na 0,8 % agarozni gel po restrikciji z restriktazo *EcoRV* in preverili prisotnost ter količino izoliranih DNK. Agarozna gelska elektroforeza je potrdila prisotnost fragmentov cDNK GFP, s pričakovanimi velikostmi.



Slika 4.3: Restriktijska analiza, z restriktazo *EcoRV*, plazmida pET22 z vstavljenim cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine na 0,8 % agaroznem gelu.

Na levi strani je nanešena zmes fragmentov DNA znanih velikosti (stolpec 1), v stolcu 2 je nanešena zmes fragmentov DNA znanih velikosti in koncentracij λDNA/Eco91I(BstEII) ter v stolcu 3, 4, 5 in 6 je nanešena

količina 2 µl rezanih vzorcev (vsi pravilni). V stolpcih z vzorci sta vidni dve lisi, zgornja je ostanek rezanega plazmida, spodnja lisa pa ustreza velikosti gena za GFP. Koncentracija izoliranih plazmidov (stolpci 3, 4 in 5) je zadostna za nadaljni potek dela.

4.1.5 Restriktijska analiza plazmidov pGEM-T-GFP, pIVEX 1.3-GFP in pET22-GFP

Z restriktijsko analizo smo preverili prisotnost fragmenta cDNK za zeleno fluorescenčno beljakovino v plazmidih pGEM-T, pIVEX 1.3 in pET22. Na 0,8 % agarozni gel smo nanesli restriktijske mešanice. Po pričakovanju smo dobili dva fragmenta (Slika 4.2 in Slika 4.3), eden izmed njih je v velikosti približno 720 bp, kar ustreza velikosti cDNK GFP, drugi fragment pa je preostanek rezanega vektorja. Agarozna gelska elektroforeza je potrdila prisotnost gena za GFP v plazmidih. Produkt cepitve smo po agarozni gelski elektroforezi z ekstrakcijo iz gela tudi očistili s kompletom reagentov "WIZARD® SV Gel and PCR Clean-Up System".

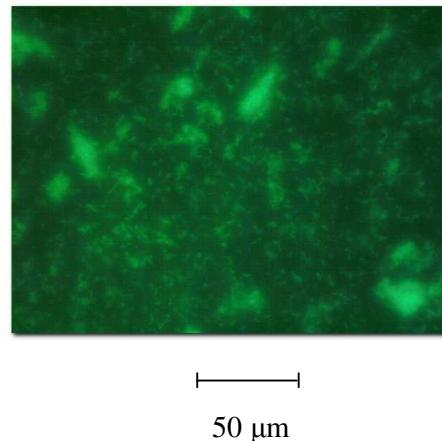
4.1.6 In vivo izražanje zeleno fluorescenčne beljakovine v *E. coli*

Celice *E. coli* BL21(DE3) smo uporabili za kontrolo ekspresije v *in vivo* sistemu. Po transformaciji s pET22-GFP smo celice prenesli na trdo gojišče LBA, nekaj pa na LBA z dodanim IPTG-jem. Na prvem gojišču je zraslo bistveno več kolonij, kakor na LBA z IPTG-jem. Kasneje smo naključno izbrane kolonije prenesli v tekoče gojišče LBA, kjer smo po preko nočni inkubaciji skoncentrirali v mikrocentrifugirki s centrifugiranjem, odlini gojišče ter preverili prisotnost zeleno fluorescenčne svetlobe na aparaturi UVI-tec (Velika Britanija) (Slika 4.4). Celice smo si ogledali tudi pod fluorescenčnim mikroskopom s CCD kamero (Slika 4.5). Želeli smo si ogledati tudi *in vivo* ekspresijo GFP beljakovine v celicah transformirane s pIVEX 1.3-GFP. Kot rezultat smo dobili drobcene kolonije (1 mm premera), katere niso fluorescirale pod UV svetlogo.



Slika 4.4: Primerjava celic bakterijskega seva *E. coli* BL21(DE3) z in brez vektorjem pET22-GFP. Celice bakterijskega seva *E. coli* BL21(DE3) (oznaka A) in transfekcirane celice BL21(DE3) z ekspresijskim vektorjem pET22-GFP, ki izražajo aktivno obliko zeleno fluorescenčne beljakovine GFP (oznaka B),

skoncentrirane na dnu mikrocentrifugirke brez tekočega gojišča LBA ter po dvo minutni UV osvetlitvi. Celice smo slikali s fotoaparatom.



Slika 4.5: Bakterijske celice *E.coli* BL21(DE3) z vektorjem pET22-GFP pod mikroskopom.

Transfekcija celic *E.coli* BL21(DE3), ki izenačajo aktivno obliko zeleno fluorescenčne beljakovine (GFP), po 48-ih urah rasti na gojišču LBA z IPTG-jem pri 37 °C. Celice smo opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom in sliko slikali s CCD kamero.

4.1.7 Določanje koncentracije in čistost DNK z UV-spektrofotometrom

Izolirani plazmidni DNK, pIVEX 1.3-GFP in pET22-GFP, smo določili koncentracije DNK z merjenjem absorbance pri 260 nm: pIVEX 1.3-GFP s koncentracijo 100 ng/μl in pET22-GFP s koncentracijo 315 ng/μl. Na podlagi izračunanih koncentracij smo izračunali volumen plazmidne DNK, ki je potreben za pripravo mRNK. Poleg merjenja pri 260 nm smo merili tudi absorbancijo pri 280 nm (določanje koncentracije beljakovinskih nečistoč v vzorcu), da smo potrdili čistost plazmidnih DNK.

4.1.8 Transkripcija cDNK GFP v mRNK-GFP

Lianiziranemu plazmidu pIVEX 1.3-GFP rezanega z restriktazo *Pvu*I smo najprej pretvorili 3'- štrleči konec v topi konec s pomočjo Klenowega fragmenta, nato pa smo s pomočjo od DNK odvisne RNK polimeraze *in vitro* sintetizirali mRNK zeleno fluorescenčne beljakovine. Sledilo je rezanje DNK molekul z RQ1 DNazo in čiščenje reakcijske mešanice s fenolno/kloroform/izoamil alkoholno precipitacijo. Koncentracijo očiščene mRNK-GFP1 smo izmerili s spektrofotometerom ND-1000 Full spectrum UV/VIS (NanoDrop, ZDA) (660 ng/μl).

Tudi na lineariziranemu plazmidu pET22-GFP rezanega z restriktijskim encimom EcoRV smo izvedli transkripcijo v mRNK-GFP2, razgradili DNK molekule z RQ1 DNazo in očistili reakcijsko mešanico s fenolno ekstrakcijo. Spektrofotometer je pokazal koncentracijo 4,2 μg/ μl.

Čistost in koncentracijo RNK molekul smo skušali preveriti tudi z gelsko elektroforezo, vendar pa po barvanjem z etidijevim bromidom nismo videli ničesar pod UV svetlogo.

4.2 GOJENJE CELIC IN PRIPRAVA CELIČNEGA EKSTRAKTA

Za pripravo celičnega ekstrakta je potrebno najprej namnožiti celice, jim odstraniti gojišča ter jih razbiti kemično, fizično, ali biološko. Pred uporabo v brezceličnem sistemu pa je potrebno ekstrakt še dializirati tako, da se znebimo čim več inhibitornih substanc. Mi smo pripravili dva različna ekstrakta: prokariontskega iz bakterijskega seva *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL in evkarijontskega iz kvasnega seva *S. cerevisiae* S228c. Ker pa se ekstrakta ločujeta po sestavi in koncentriranosti znotraj celičnih komponent, smo po dializi izmerili optično gostoto ter jih redčili do podobnih vrednosti. Pogledali smo si tudi do kolikšne mere vpliva endogena mRNK v naših brezceličnih sistemih tako, da smo po dializi ekstrakta dodali mikrokokno nukleazo. Ta je razgradila mRNK molekule, nato pa smo jo zaustavili z etilendiamino tetraacetno kislino (EDTA). Donos tako pripravljenega brezceličnega sistema ni bil bistveno večji od donosa ostalih sistemov, zato tega postopka nismo opisali.

4.2.1 Priprava *E. coli* ekstrakta z lizocimom

Bakterijske celice *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL smo namnožili v tekočem gojišču LB do sredine logaritemsko faze, ki smo jo določili z merjenjem optične gostote OD₆₀₀ in je znašalo okrog 0,8 ter do stacionarne faze, ki je obsegala 16 urno kultivacijo. Začetna optična gostota je znašala 0,4. Ko smo odstranili gojišče, smo dobili pri celicah iz logaritemsko faze rasti 0,3 g mokre biomase ter 1,0 g pri celicah iz stacionarne faze rasti. Proporcionalno teži celic smo dodali lizocim v pufru TE za razbijanje celične membrane, nakar je sledilo centrifugiranje ter dializa v pufru A.

Po dializi celičnih ekstraktov smo izmerili absorbanco pri A260 s spektrofotometrom ND1000 (NanoDrop, ZDA) in namerili 3,2 za celični ekstrakt iz logaritemsko faze rasti ter 10,9 za ekstrakt iz stacionarne faze rasti.

4.2.2 Priprava *S. cerevisiae* ekstrakta s steklenimi kroglicami

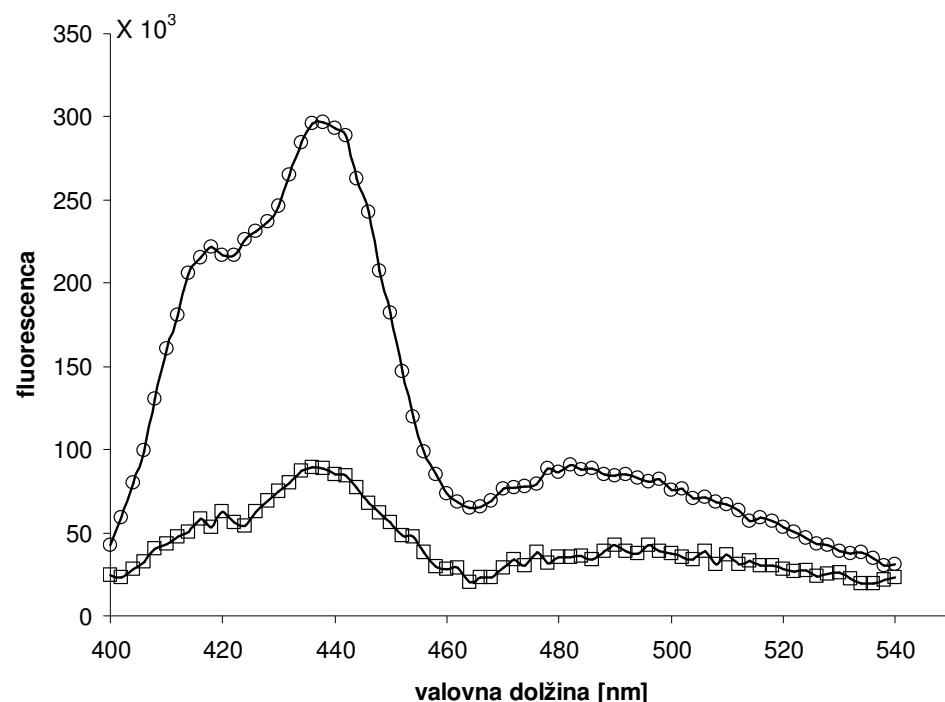
Za orientacijo, kako hitro rastejo kvasne celice v YEPD tekočem gojišču, smo za sev *S. cerevisiae* S228c naredili rastno krivuljo, ki je podana z grafom prikazanim v prilogi (Priloga F). Na podlagi rastne krivulje za kvasne celice smo se odločili zaustavitev bioprosesniške brozge po 6. urah (sredina logaritemsko faze rasti) in 24. urah (stacionarna faza rasti). Tako smo pridobili 1 g mokre biomase za celice v logaritemski fazo rasti ter 7 g celic iz stacionarne faze. Na podlagi dobljenih mas smo dodali steklene kroglice in pufer A ter jih mehansko razbili na vrtinčniku. Sledilo je centrifugiranje ter dializa. S spektrofotometrom ND1000 (NanoDrop, ZDA) smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 260 nm in namerili 4,8 za logaritemsko celice ter 2,4 za stacionarne celice. Na podlagi danih rezultatov absorbance pri 260 nm smo ekstrakt celic iz logaritemsko faze rasti redčili 24 krat s pufrom A in ekstrakt celic iz stacionarne faze rasti 12 krat.

4.3 SINTEZA ZELENO FLUORESCENČNE BELJAKOVINE V BREZCELIČNEMU SISTEMU

Vspostavili smo štiri različne brezcelične sisteme: dva prokariotska sistema iz bakterijskih ekstraktov *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL (celice iz logaritemsko in stacionarne faze rasti) ter dva eukariotska sistema iz kvasnega ekstrakta *S. cerevisiae* S228c (celice iz logaritemsko in stacionarne faze rasti). Sintezo nastajajoče zeleno fluorescenčne beljakovine smo spremljali s fluorimetrom. Po končani reakciji smo tudi naredili NaDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo.

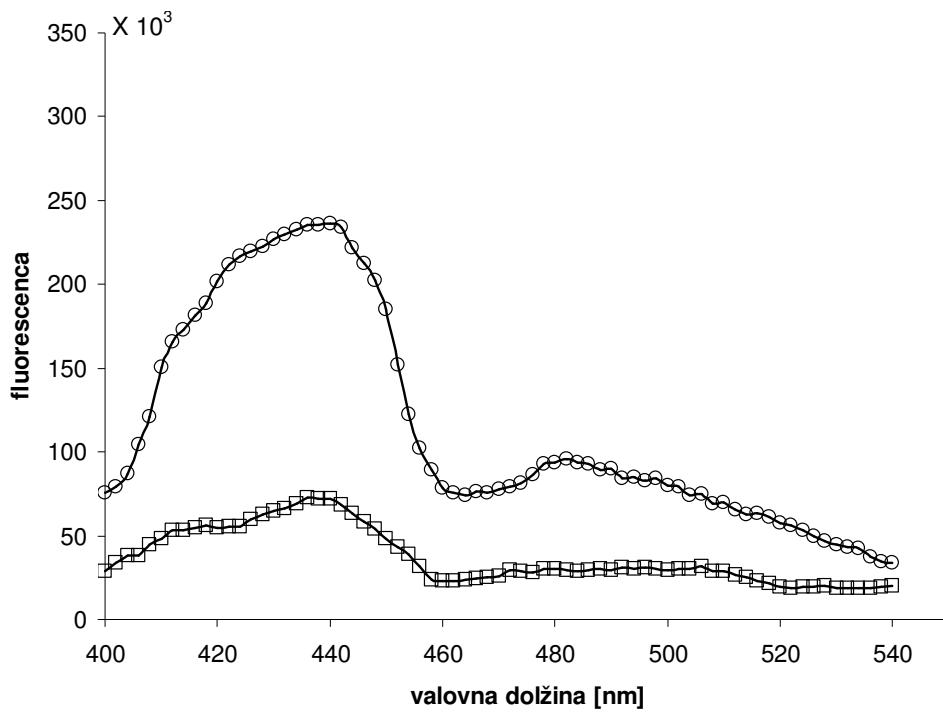
4.3.1 Določanje izražanja beljakovin z merjenjem fluorescence

Brezcelične sisteme smo pripravili v mikrotitrski plošči in jih v paralelkah merili z merilcem fluorescence Safire^{2TM} (Tecan, Nemčija). Aparatura je v sekundnih presledkih večkratno izmerila fluorescenco posameznih paralelek in jih tabelarno podala, mi pa smo jih grafično obdelali (Slika 4.6, Slika 4.7, Slika 4.8 in Slika 4.9).



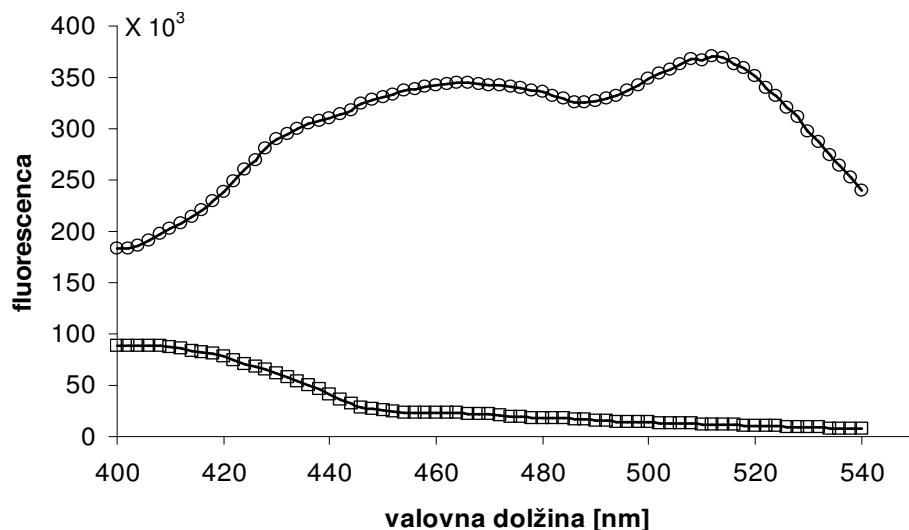
Slika 4.6: Grafični prikaz emisijskega spektra (od 400 do 540 nm) posnetega za brezcelični sistem narejen iz bakterijskega ekstrakta *E. coli* (logaritemsko faza rasti celic) na merilecu fluorescence Safire^{2TM} (Tecan, Nemčija) pri konstantnem eksitacijskem spektru $E_{ex} = 375$ nm.

Kvadratki (□) predstavljajo kontrolni vzorec, krogci (○) pa vzorec.



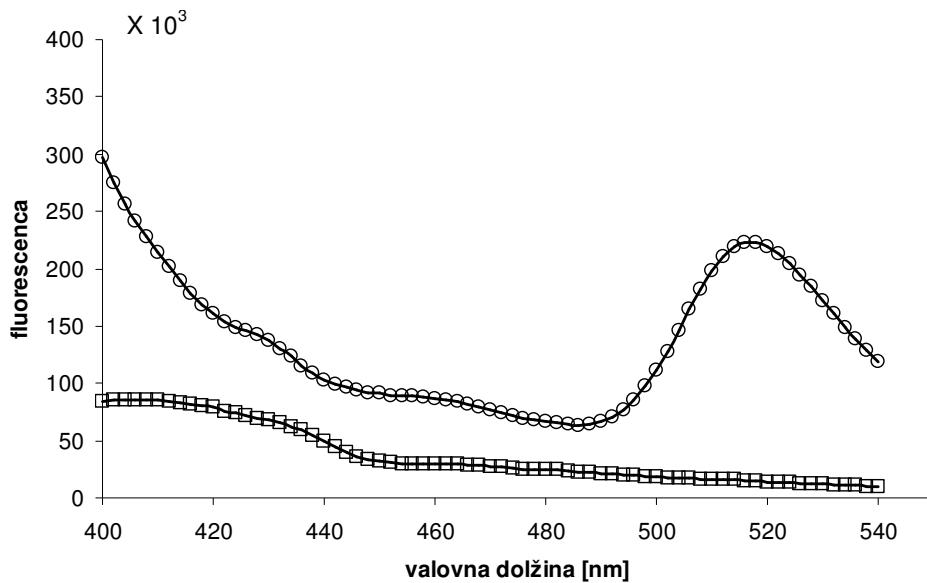
Slika 4.7: Grafični prikaz emisijskega spektra (od 400 do 540 nm) posnetega za brezcelični sistem narejen iz bakterijskega ekstrakta *E. coli* (stacionarna faza rasti celic) na merilecu fluorescence pri konstantnem ekscitacijskem spektru $E_{ex} = 375$ nm.

Kvadratki (□) predstavljajo kontrolni vzorec, krogci (○) pa vzorec.



Slika 4.8: Grafični prikaz emisijskega spektra (od 400 do 540 nm) posnetega za brezcelični sistem narejen iz kvasnega ekstrakta *S. cerevisiae* (logaritemski faza rasti celic) na merilecu fluorescence pri konstantnem ekscitacijskem spektru $E_{ex} = 375$ nm.

Kvadratki (□) predstavljajo kontrolni vzorec, krogci (○) pa vzorec.



Slika 4.9: Grafični prikaz emisijskega spektra (od 400 do 540 nm) posnetega za brezcelični sistem narejen iz kvasnega ekstrakta *S. cerevisiae* (stacionarna faza rasti celič) na merilecu fluorescence pri konstantnem eksitacijskem spektru $E_{ex} = 375$ nm.

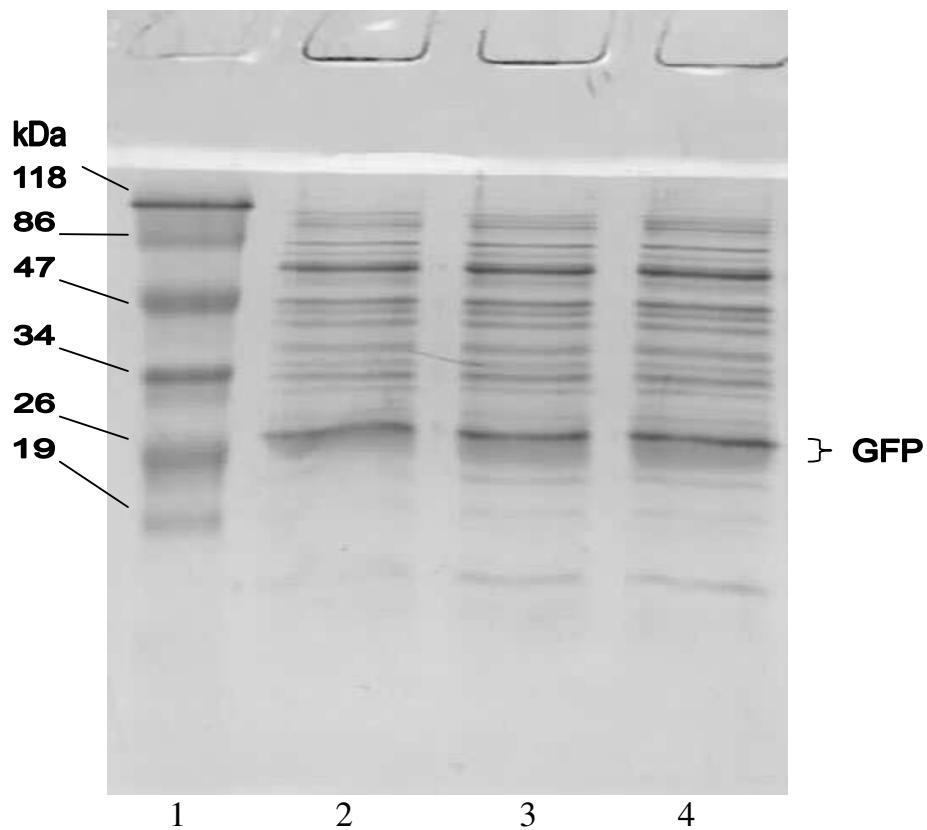
Kvadratki (□) predstavljajo kontrolni vzorec, krogci (○) pa vzorec.

Iz rezultatov je razvidna razlika med sistemi narejenih s celičnimi ekstrakti iz logaritemsko faze rasti in stacionarne faze rasti kvasovk. Slednji dajejo nižji donos aktivne oblike zeleno fluorescenčne beljakovine. Razlike so opazne tudi med prokarionskim in evkarionskim brezceličnim sistemom, verjetno zaradi drugačne priprave in sestave celičnega ekstrakta S30. Prav tako je razvidno, da tudi kontrole vzorcev oddajajo fluorescenco, ta pa ne presega vrednosti 90.000.

Zanimalo nas je tudi, kako deluje evkarionski brezcelični sistem z energetskim napajalnim subsistrem narejenim iz fosfoenol piruvata in piruvat kinaze, s čemer bi bila translacijska mešanica bolj podobna translacijski mešanici za prokarionski brezcelični sistem. Ugotovili smo, da se je sinteza GFP beljakovine zelo zmanjšala, zato smo to idejo opustili (rezultatov nismo prikazali).

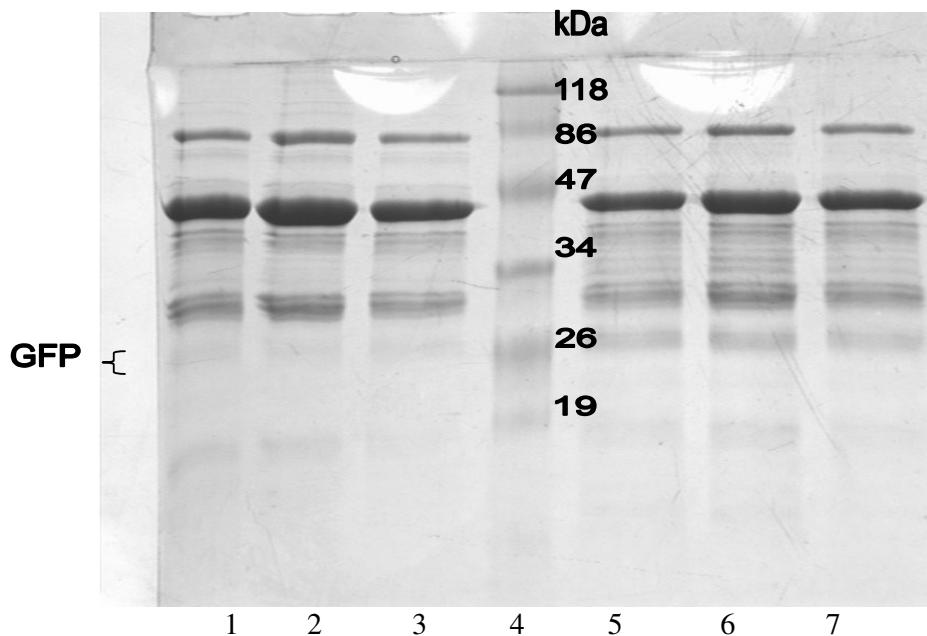
4.3.2 NaDS poliakrilamidna gelska elektroforeza

S pomočjo analitske metode, NaDS elektroforeze, smo vzorce zeleno fluorescirajoče beljakovine GFP očistili na 15 % ločevalnem poliakrilamidnem gelu. Pred nanosom vzorcev na NaDS elektroforezo smo vzorce, s kuhanjem pri 100 °C, denaturirali in ločili od morebitnih povezav z ostalimi beljakovinami. Med NaDS elektroforezo so v električnem polju vse beljakovine v vzorcih potovale oziroma se ločile glede na velikost naboja. Pričakovali smo, da bomo imeli zadostno količino sintetizirane GFP beljakovine, vendar iz slike Slika 4.10 in Slika 4.11 je razvidno, da je bil donos brezceličnih sistemov prenizek za detekcijo s to metodo, saj se ne vidijo razlike med kontrolo in vzorci, hkrati pa vidimo, da je v brezceličnemu ekstraktu veliko beljakovin podobnih velikosti v območju med 19 in 26 kDa (zeleno fluorescenčna beljakovina ima velikost okoli 23 kDa).



Slika 4.10: NaDS poliakrilamidna gelska elektroforeza prokariontskega brezceličnega sistema po končanem spremljanju nastajajoče aktivne oblike beljakovine GFP.

Iz leve strani je nanošena standerdna lestvica z znanimi velikostmi, stolpec 2 predstavlja brezcelični sistem pripravljen iz bakterijskega ekstrakta (logaritemska faza rasti celic), stolpec 3 predstavlja bakterijski brezcelični sistem narejen iz celic stacionarnih faz rasti ter v vzorcu 4 se prikazuje slepo kontrola brezceličnega sistema (brez mRNK-GFP). Zeleno fluorescenčna beljakovina ima velikost okoli 23 kDa.



Slika 4.11: NaDS poliakrilamidna gelska elektroforeza evkariontskega brezceličnega sistema po končanem spremljanju nastajajoče aktivne oblike beljakovine GFP.

V stolpecih 1 in 2 se prikazuje brezcelični sistem narejen iz kvasnih celic *S. cerevisiae* iz logaritemske faze rasti ob prisotnosti mRNK-GFP, v stolpcu 3 je enak brezceličen sistem brez mRNK-GFP (kontrola), v stolcu 4 je standardna lestvica z znano velikostjo, v stolcih 5 in 6 se prikazuje brezcelični sistem narejen iz kvasnih celic *S. cerevisiae* iz stacionarne faze rasti ter v stolcu 7 se nahaja kontrola brezceličnega sistema pripravljenega iz celic iz stacionarne faze rasti brez mRNK-GFP. Zeleno fluorescenčna beljakovina ima velikost okoli 23 kDa.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Začentna hipoteza je temeljila na sposobnosti priprave dveh brezceličnih sistemov, na takšen način, da bosta sposobna sintetizirati aktivno obliko zelene fluorescenčne beljakovine. V ta namen smo vzpostavili prokariotski (iz bakterijskega seva *Escherichia coli* BL21-CodonPlus-RIL) in evkariotski (iz kvasnih celic *Saccharomyces cerevisiae* S228c) brezcelični sistem z dodano eksogeno mRNK molekulo, katera vsebuje zapis za zeleno fluorescenčno beljakovino. Pri tem smo uporabili različne protokole, ki so jih različni avtorji uporabili pri sintezi beljakovin v brezceličnih sistemih. Na podlagi opravljenih poskusov smo v naš končni protokol umestili korake, s katerimi smo uspešno pridobili aktivno beljakovino GFP. Za večji rezultat brezceličnih sistemov bi morali še dodatno optimizirati pogoje za vsak sistem posebej.

5.1 RAZPRAVA

Z delom smo hoteli pokazati *in vitro* sintezo zeleno fluorescenčne beljakovine GFP v dveh različnih brezceličnih sistemih. Takšen izbor je pogojen z lahko detekcijo nastale beljakovine s spektrofotometrom. Mnogi avtorji uporabljajo gen za GFP kot fizijski markerski gen (Xu in sod., 2005), nekateri pa se raje poslužujejo radioaktivnih amino kislin (Kigawa in sod., 1999), spet tretji raje zasledujejo vgrajevanje stabilnih izotopov z nuklearno magnetno resonanco (NMR analize) (Kigawa in sod., 1995; Kigawa in sod., 2004; Ozawa in sod., 2004; Matsuda in sod., 2007).

5.1.1 Priprava in sinteza mRNK molekule

Da bi zeleno fluorescenčno beljakovino lahko izrazili, smo morali gen za zeleno fluorescenčno beljakovino najprej namnožiti. Z metodo verižne reakcije s polimerazo smo tako v večjih količinah pomnožili cDNK zeleno fluorescenčne beljakovine (GFP) (Slika 4.1). Po reakciji PCR smo fragment gena za GFP modificirali tako, da smo gen lahko vstavili v vektor za kloniranje. Uporabljeni Pfu DNK polimeraza pri pomnoževanju z reakcijo PCR tvori tope konce hkrati pa polimeraza dela zelo malo napak v primerjavi z ostalimi termostabilnimi DNK polimerazami, saj izkorišča svojo ekszonukleazno aktivnost (3' → 5') za popravilo (Mullis, 1985). Za lažjo vstavitev fragmenta v vektor smo morali modificirati 3'- konec namnoženega gena s pomočjo Taq DNK polimerazo. Tako se je na 3'- in 5'- konec gena vezal po en adenin, ki je bil ob vstavitvi v vektor za kloniranje komplementaren timidinu na pGEM-T Easy vektorju.

Vektor pGEM-T Easy je vektor za kloniranje in je zelo primeren sistem za kloniranje produktov PCR oziroma za kloniranje genov za beljakovine v bakteriji *E. coli*. (Promega, 1999) Obstaja še mnogo drugih vektorjev za kloniranje, kot je na primer vektor pCR-Skript SK(+) (Stratagene, ZDA). V primerjavi z vektorjem pGEM-T Easy ima vektor pCR-Skript SK(+) tope konce, zato fragmenta po pomnoževanju s Pfu DNK polimerazo z metodo PCR ni potrebno modificirati, hkrati pa je to tudi njegova slabost, saj 3'- T podaljšani konci v insercijski regiji močno izboljšajo uspešnost ligacije v pGEM-T Easy vektor. Po transformaciji plazmida v bakterijski sev DH5 α smo preverili uspešnosti vstavitve fragmenta v vektor za kloniranje. Pri namnoževanju genov za zeleno fluorescenčno beljakovino smo izbrali bakterijo *Escherichia coli* zato, ker raste hitro in doseže visoke

konzentracije na sorazmerno enostavnih in poceni gojiščih. Poleg tega jo je zelo enostavno transformirati (Madigan in sod., 1997).

Ob vstavitvi rekombinantnega plazmida v celice DH5 α smo na ploščah, ob dodatku mešanice X-Gal/IPTG, omogočili selekcijo modro-belih kolonij. Agarozna gelska elektroforeza je po izolaciji rekombinantnih plazmidov potrdila pravilno izbiro belih kolonij.

Gen za zeleno fluorescenčno beljakovino smo iz klonirnega vektorja pGEM-T-GFP prenesli v dva različna ekspresijska vektorja, pET22b(+) in pIVEX 1.3 WG, ki smo ju uporabili za izražanje gena v bakteriji ter kasneje za pripravo mRNK. Za izražanje beljakovin v bakteriji so zelo primerni ekspresijski pET vektorji (Merck KgaA, 2003). Izbrani vektor pET22b(+) omogoča visok nivo stabilnega izražanja genov v bakterijskih celicah, pIVEX 1.3 WG pa je ekspresijski vektor prirejen za izražanje v evkariontskih sistemih (Rogé and Betton, 2005).

Najprej smo zeleno fluorescenčno beljakovino izrazili v bakteriji *E. coli*. V ta namen smo plazmid pET22-GFP transformirali v bakterijski sev *E. coli* BL21(DE3), nato pa ob pomoči induktorja IPTG vzpodbudili sintezo aktivne oblike zeleno fluorescenčne beljakovine (Slika 4.4 in Slika 4.5). Enak postopek smo uporabili pri izražanju beljakovine s pomočjo vektorja pIVEX 1.3-GFP, vendar po pričakovanju nismo zasledili izražanja željene beljakovine, vsaj ne do te mere, da bi jo lahko zaznali pod UV svetlobo. Če bi hoteli doseči izražanje beljakovine s to skupino vektorjev v bakteriji, bi morali uporabiti druge vektorje, kot naprimer pIVEX 2.4 (Rogé and Betton, 2005).

Za izražanje genov za zeleno fluorescenčno beljakovino v brezceličnih sistemih smo plazmida za izražanje pET22-GFP in pIVEX 1.3-GFP po transformaciji v klonirne DH5 α celice namnožili v količinah, ki so potrebne za pripravo mRNK (Materiali in metode, poglavje 3.3.6.1). To nam je kasneje omogočilo medsebojno primerjavo transkripcije različnih mRNK-GFP molekul v brezceličnih sistemih. Po transformaciji z vektorjem, smo opazili razliko pri rasti bakterijskih celic, saj je bila na trdem gojišču rast celic z plazmidom pET22-GFP hitrejša pa tudi kolonije so bile večje kot pri celicah, ki so vsebovale pIVEX 1.3-GFP. Domnevamo, da je vzrok za ta pojav v tem, da so bakterijske celice potrebovale bistveno več energije za vzdrževanje in repliciranje evkariantskega ekspresijskega vektorja (Rogé in Betton, 2005). S kompletom kemikalij za izolacijo DNK, ki bazira na alkalni lizi celic in vezavi plazmidne DNK na ionski izmenjevalec, smo izolirali večje količine čiste rekombinantne plazmidne DNK (Slika 4.2 in Slika 4.3). Tako smo lahko dosegli visoke koncentracije plazmidov, ki so bile ključne za pripravo ustrezne mRNK. Kigawa in sod. (2004) omenjajo še druge načine čiščenja: etanolna precipitacija, fenol-kloroformna precipitacija, za katere pa se nismo odločili zaradi njihove zahtevnosti. Med potekom čiščenja plazmidov pET22-GFP in pIVEX 1.3-GFP smo ugotovili, da se je vektor namenjen evkariontski ekspresiji namnožil v nižjih koncentracijah kot vektor namenjen bakterijski ekspresiji, kar je vplivalo tudi na koncentracijo nastale mRNK molekul iz odgovarjajočih vektorjev.

V našem primeru smo uporabili komplet kemikalij za sintezo mRNK podjetja Promega (ZDA). Za sintezo mRNK iz plazmidne DNK je priporočljivo plazmid linearizirati

(Promega, 2005). Tako smo iz lianiziranega in očiščenega vektorja pET22-GFP, rezanega z restriktionskim encimom *EcoRV*, *in vitro* sintetizirali mRNK, ki smo jo poimenovali mRNK-GFP1. Pri vektorju pIVEX 1.3-GFP rezan z restriktionskim encimom *PvuI* je bilo potrebno najprej pretvoriti lepljive konce v tope s pomočjo Klenowega fragmenta. Na ta način smo se izognili ponovnemu zlepljenju štrlečih koncev, nato pa je sledila transkripcija v mRNK-GFP2.

V naši diplomski nalogi smo uporabili T7 RNK polimerazo iz kita, ki nam ga je ponudilo podjetje Promega, nekateri avtorji pa (Grodberg in Dunn, 1988; Zawadzki in Gross, 1991) rajši sami izolirajo in očistijo T7 RNK polimerazo, ker so mnenja, da je v komercialnih kompletih nižja koncentracija encima.

Za visok donos beljakovin v evkariontskem translacijskem brezceličnem sistemu je potrebno optimizirati več pogojev. Tako so Sawasaki in sod. (2002) mnenja, da je porebno optimizirati 5'- in 3'- RNK nekodirajoča regija, saj odigra pomembno vlogo pri ekspresiji gena. Ni potrebno dodajati 5'- m7GpppG (cap) in poliA rep, saj predstavlja problem, ker je plazmid s poli dT/dA nestabilen v gostiteljski celici ter se na 5'- koncu lahko pojavijo modificirani dinukleotidi (7-mG-5'ppp-5'G). Tudi dober ekspresijski vektor pripomore k večjemu donosu. Altmann in sod. (1989) ter Merrick (2004) pa so mnenja, da v evkariontskih sistemih potrebuje ribosom za iniciacijo transkripcije 5'- cap strukturo na mRNK. V našem poskusu smo uporabili dobra ekspresijska vektorja. Pri transkripciji iz vektorja pIVEX 1.3-GFP smo dobili mRNK molekulo, ki je odgovarjala gornjim zahtevam in je vsebovala zapis za zeleno fluorescenčno beljakovino in tudi t.i. UTR regije ("Untranslated regulatory regions containing translational enhancer elements"- netranslacijske regulatorne regije z vzpodbujevalci transkripcije). Pri prepisovanju iz vektorja pET22-GFP, pa smo dobili mRNK z zapisom zeleno fluorescenčne beljakovine in nekaj začetnih in končnih nukleotidov.

Po čiščenju mRNK s fenol/kloroform/izoamil alkoholno precipitacijo (Ausubel in sod., 1988) ob predhodni obdelavi z RQ Dnazi smo vzorce kvantificirali s spektrofotometrom, ki je pokazal zadostno količino vzorcev za nadaljnje delo. Pri gelski elektroforezi pa nismo ničesar videli na UV translaminatorju, saj se etidijev bromid ni vezal na mRNK vijačnico. Značilna lastnost tega barvila je ta, da se veže le na dvojno vijačnico DNK oziroma RNK molekul. Zato lahko sklepamo, da se naša molekula ni zvila v sekundarno strukturo do teme, da bi jo lahko zaznali (Sepčić in sod., 2000).

5.1.2 Priprava celičnega ekstrakta S30

Po priporočilu Kigawa in sod. (2004) smo za pripravo bakterijskega ekstrakta uporabili bakterijski sev *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL, saj je sev obogaten z redkimi kodoni: *argU*, *ileY*, *leuW* tRNK geni ter ima AT bogat genom, kar nam zagotavlja tudi podjetje Strategen (ZDA), pri katerem je bil kupljen sev. Dodatni geni za redke kodone pripomorejo k boljši ekspresiji genov tako *in vivo* kakor tudi *in vitro* sistemih.

Za namnožitev biomase bakterijskih celic *E. coli* smo uporabili LB tekoče gojišče, ki smo ga po končani inkubaciji sprali s pufrom A (mešanica Tris/acetata, magnezijevega oksalacetata, kalijevega oksalacetata in DDT-ja s pH 8,2 (Madin in sod., 2000)). Nekateri

avtorji (Kigawa in sod., 2004; Kim in sod., 1996; Lesley in sod., 1991) navajajo spiranje celic z nekoliko drugačnim pufrom A. Ta vsebuje sestavine našega pufra A, hkrati pa ima še β -merkaptetoetanol. Po lizi celic s pomočjo encima lizocim v TE pufru, smo celični ekstrakt scentrifugirali na 30000 x g ter dializirali. Nekateri avtorji navajajo predhodno inkupacijo v predinkubacijskem pufru, ki vsebuje Tris-acetat, magnezijev acetat, ATP, PEP, DTT in amino kislino (Kigawa in sod., 2004; Mannheim cit. po Lesley in sod., 1991), potem šele izvedejo dializo. Mi smo ta korak preskočili zaradi hitrejše pridobitve očiščenega ekstrakta S30.

Kvasovka *S. cerevisiae* je pogosto uporabljena kot modelni organizem za raziskave organizacije in lastnosti evkariontskih celičnih procesov, tako kot je bakterija *E. coli* pogosto uporabljena kot modelni organizem za prokariotske procese in za voljo tega, smo se odločili vzpostaviti brezcelične sisteme na podlagi njunih celičnih ekstraktih.

Čisto kulturo kvasovk *S. cerevisiae* (S288C) smo namnožili v YEPD gojišču. Bioprosesniško brozgo smo dva krat pobrali, prvič v logaritemski fazi rasti celic in drugič v stacionarni fazi rasti. S tem smo zagotovili zadostno količino celic za začetek dela. Oba kvasna inokuluma smo scentrifugirali in z destilirano vodo sprali gojišče iz celic. Po tehtanju je sledilo razbijanje celic s steklenimi kroglicami v purfu A. To metodo priprave celičnega ekstrakta smo naredili po zgledu Scopes (1987) z manjšo modifikacijo. V članku uporablja fosfatni pufer z inhibitorjem proteaz (pH 7,0), mi pa smo uporabili pufer A, ki je mešanica Tris/acetata, magnezijevega oksalacetata, kalijevega oksalacetata in DDT-ja s pH 8,2 (Madin in sod., 2000). Sledilo je centrifugiranje na 30000 x g obratih, kjer smo odstranili nelizirajoče celice, celična jedra, mitohondrije, polisome...

Za razbijanje celične stene pri kvasovkah se uporablja tudi encim litikaza (Nguyen in Lepingle, 2000). Pri našem poskušu ga nismo uporabili, saj smo imeli veliko količino celic (skupna mokra masa celic je bila okoli 4 g), za kar bi potrebovali veliko količino encima (dražja metoda pridobivanja ekstrakta).

Več avtorjev se je odločilo odstraniti endogene mRNA molekul iz transkripcijkega brezceličnega sistema, saj ovirajo sintezo željene beljakovine. Tako Nuss in Peterson (1980) uporabljata etanolno precipitacijo, Erickson in Blobel (1983), Gasior in sod. (1979a, b) ter Pelham in Jackson (1976) uporabljajo od Ca^{2+} odvisno mikrokokno nukleazo, skupaj s Ca^{2+} kot kofaktor (po končani inkubaciji dodajo EGTA kelator, ki inaktivira nukleazo, hkrati pa signifikantno ne vpliva na koncentracijo magnezijevih ionov (kompleksira do 10%)). Klammt in sod. (2004) pa opisujejo odstranitev endogene mRNA z inkubacijo v 400mM NaCl pri 42 °C za 45 min. Mi smo v enem iz med poskusov uporabili mikrokokno nukleazo s Ca^{2+} . Brezcelična sinteza zeleno fluorescenčne beljakovine v tako pripravljenem bakterijskemu ekstraktu S30 ni dala boljših rezultatov od postopka brez uporabe mikrokokne nukleaze, zato postopka nismo opisali v rubriki Metode in materiali.

5.1.3 Priprava translacijske mešanice

Translacijska mešanica je pomemben ključ do uspešnosti brezceličnega sistema, saj vsebuje vse tiste esencialne elemente, katere smo z dializo celičnega ekstrakta odstranili in so nujno potrebni za delovanje tovrstnih sistemov, hkrati pa zagotavlja vsebnost hitro potrošnih elementov.

Med pripravo 100 kratnih koncentriranih raztopin reaktantov so nam največ preglavic povzročile nekatere amino kisline, saj se niso hotele raztopiti v DEPC vodi, druge pa so se kasneje obarjale, kar je prispevalo k nižjemu donosu pri *in vitro* sintezi zeleno fluorescenčne beljakovine. Dunn in sod. so že leta 1933 opisali problem topnosti amino kislin v vodi, njihova dognanja pa smo uporabili v diplomski nalogi. Večina amino kislin je topnih pri sobni temperaturi, za Glu, Cys, Pro in Leu pa smo morali nekoliko dvigniti temperaturo vode. Topnost amino kislin se eksponentno dvigne z dvigovanjem temperature. Vendar pa višanje temperature topila za topnost tirozina v željenih koncentracijah ni smotrna. Tako smo tirozin pripravili v nekoliko bolj razrečeni raztopini skupaj s HEPES in NaN₃ substanco. Ostale amino kisline pa smo pripravili v sto kratno večji koncentraciji kot je bila končna koncentracija.

Podjetje Roche (Švica) se že vrsto let ukvarja z brezceličnimi sistemi, proizvedla je celo lastne kite brezceličnih sistemov. Med drugim omenja tudi problem amino kislin in svoj način reševanja problemov topnosti in obarjanja (protokol "RTS Amino Acid Sampler..."). Za amino kislini Met in Cys predlaga raztopljanje v vodi z dodanim ditiotreitol (DDT), Tyr naj bi raztopili v 60 mM HEPES-u in 0,7 M KOH, Trp pa v 60 mM HEPES-u in 0,7 M HCl, tako bi skupaj tvorila nevtralno mešanico, Phe pa po protokolu " RTS Amino Acid Sampler " (Roche, 2005) naj bi se raztopil v 60 mM HEPES-u s pH 7,45. Tako pripravljene raztopine imajo visoko stabilnost pri temperaturi -15 do -25 °C, le mešanice z DTT-jem so zanesljive le za dva kratno odtaljevanje.

Pomembne sestavine translacijske mešanice so tudi molekule tRNK, ki morajo imeti veliko pestrost. Delež vnesenih tRNK molekul je odvisen od titra (50–500 µg tRNK / ml celotne translacijske mešanice). Prevelika koncentracija prispeva k težjemu vnosu radioaktivnih aminokislín v beljakovinsko sintezo, prenizka koncentracija pa k nižjemu donosu translacije (Erickson in Blobel, 1983). V našem primeru nismo uporabili radioaktivnih aminokislín, saj smo sintetizirali zeleno fluorescenčno beljakovino, ki se jo zlahka zazna pod UV svetlobo, zato smo morali zagotoviti le dovolj veliko raznolikost tRNK molekul.

Temperaturna stabilnost posameznih komponent predstavlja velik faktor pri izkoristkih beljakovinske sinteze. Avtorja Erickson in Blobel (1983) navajata, da je zelo pomembno imeti nekatere komponente translacijske mešanice neprestano na ledu : aminokisline, ATP, GTP, kreatinfosfat in kreatin fosfokinaza, za preprečevanje strukturne deformacije.

Sinteza beljakovin je zelo zahteven proces, saj se na eno amino kislino cepijo štiri anhidridne vezi. Zato je pomembno da dodamo zadostno količino energetskih molekul (ATP, GTP) ali/in poskrbimo za delovanje napajjalnega subsistema v brezceličnemu sistemu (Kim in Swartz, 1999) – npr. piruvat oksidacijski subsistem za bakterijski

brezcelični sistem. V našem primeru smo se odločili uporabo fosfoenolpiruvata in fosfokinaze za bakterijski brezcelični sistem ter kreatin-fosfata in kreatin-fosfokinaze za evkariontski brezcelični sistem.

Kim in sod. (2006) navajajo v svojem povzetku članka "Rapid production...", da so omogočili povečanje donosa brezceličnega sistema z nekaterimi spremembami v translacijski mešanici. S povečano koncentracijo amino kislin (3 mM) in kreatin fosfata (100 mM), slednji napaja energijski sistem, so dosegli donos 1,2 mg/ml aktivnih CAT oziroma GFP beljakovin v dvo urni inkubaciji. Pišejo tudi o tem, da akumulacija anionskih fosfatov vpivajo na koncentracijo magnezijevih ionov, ti pa so zelo pomembni pri brezhibnem delovanju brezceličnega sistema. V našem primeru nismo določili količine nastale GFP beljakovine, saj smo energijo in znanje usmerili le v to, da bi usposobili delovanje preprostih brezceličnih sistemov. Med delom sta dve točki, kjer bi lahko določili koncentracijo aktivne oblike GFP. Prva je pri merjenu fluorescence pod UV svetlobo. Potrebno bi bilo pripraviti brezcelični sistem brez mRNK in z GFP beljakovino znane koncentracije. Druga točka pa je pri NaDS poliakrilamidni elektroforezi, kjer nismo zaznali razlike med kontrolo in vzorci, zato tudi ni bilo smiselnega določevati koncentracije GFP beljakovine na elektroforezi.

5.1.4 Vzpostavitev, delovanje in primerjava brezceličnih sistemov

Študije brezceličnih sistemov so pripeljale do spoznanja, da je kar nekaj kritičnih momentov pri vzpostavitvi tovrstnih sistemov. Anderson in sod. (1983) menijo, da obstaja več šibkih točk pri pripravi brezceličnih sistemov: priprava sferoblastov, odstranitev polisomov, razgradnja endogene mRNK ter inkubacijska temperatura. Gallie in Walbot (1992) sta mnenja, da je sinteza odvisna od vira ribosomov in njihove koncentracije. Klammt in sod. (2004) pa pravijo, da so kritični moment: koncentracija kalijevih in magnezijevih ionov, koncentracija amino kislin, kvaliteta ekstraktov S30 in energijsko reakcijski sistem. Tudi v naši diplomske nalogi smo opazili, da ekstrakt S30 vpliva na donos translacije, saj smo pri prvi vzpostavitvi evkariotskega brezceličnega sistema videli bistveno večjo količino sintetizirane zeleno fluorescenče beljakovine, kakor pa v poznejših večkratnih vzpostavitvah sistemov iz enakega ekstrakta S30 (po dializi smo celični ekstrakt razparcelirali v manjše kvote in jih posamezno zamrznili). Razlika je bila le v tem, da so bili celični ekstrakti dlje časa zamrznjeni na -80 °C.

Erickson in Blobel (1983) dajata velik pomen na vrstni red dodanih komponent v brezcelični sistem. Pravita, da je potrebno najprej skupaj zmešati aminokisline, energetnske molekule (ATP in GTP), kreatinfosfat in kreatin fosfokinazo. Nakar naj bi se dodalo še kompenzacijski pufer, destilirano vodo, tRNK in RNazni inhibitor (le v primeru RNazne prisotnosti). Sestavini, karerima priprada zadnje mesto pri sestavi brezceličnega sistema, pa sta ekstrakt S30 in eksogena mRNK molekula. Avtorja sta tudi zagovornika nežnega rokovanja, saj so komponente zelo krhke. V naši diplomske nalogi smo vedno najprej pripravili translacijsko mešanico v katero smo nežno vmešali ekstrakt S30 in DEPC vodo. Kot zadnjo komponento pa smo previdno dodali mRNK molekulo in narahlo premešali s pipeto.

Po dodatku vseh potrebnih sestavin (mRNK, translacijska mešanica, ekstrakt S30, DEPC voda) smo pričeli z merjenjem nastajajoče zeleno fluorescenčne beljakovine. Podjetje BD Biosciences (2002) je podalo podatke o absorbciji in fluorescenci GFP beljakovine (ekscitacijski maksimum je pri 488 nm, emisijski maksimum pa pri 507 nm). Mi smo za bakterijski in evkarionski brezcelični sistem posneli emisijske spektre pri konstantnem ekscitacijskem spektru $E_{ex} = 375$ nm (Slika 4.6, Slika 4.7, Slika 4.8 in Slika 4.9) to pa zato, ker po posnetem ekscitacijskemu spektru pri konstantnem emisijskem spektru $E_{em} = 480$ smo videli najvišji vrh pri $E_{ex} = 375$ nm. Razlike v spektrih brezceličnih sistemov pripisujemo razlikam v nespecifični sintezi beljakovin, kar posledično privede do različne absorbcijske svetlobe.

Kigawa in sod. (1999) opisujejo uporabo kreatin fosfata in kreatin kinaze kot energijskih napajalnih subsistov. Z njimi naj bi dosegli povečanje produktivnosti brezceličnega sistema za 2,5 krat, kot pri napajальнem sistemu skonstruiranega iz fosfoenol piruvata in fosfokinaze. Mi smo uporabili kreatin fosfat – kreatin kinazni napajalni subsystem za regeneracijo energije v primeru sistema, ki izhaja iz evkariotskega organizma. Pri prokariotskem pa smo uporabili fosfoenolpiruvat in piruvat kinazo.

Za začasno zaustavitev reakcije v brezceličnem sistemu se Erickson in Blobel (1983) poslužujeta inkubacije na ledu, za permanentno zaustavitev pa uporabljata detergente (3 kloro-acetilna precipitacija). Mi smo v našem primeru spremljali sintezo beljakovin s spektrofotometrom dokler je reakcija potekala, potem pa smo vzorce pripravili za elektroforezo na poliakrilamidnem gelu. Kot rezultat elektroforeze smo dobili po velikosti razporejene beljakovine, te pa jih je bilo v precejšnjem številu tako, da nismo mogli z gotovostjo reči, katera iz med njih predstavlja zeleno fluorescenčno beljakovino (Slika 4.10 in Slika 4.11).

Zanimivo študijo so naredili Iskakova in sod. (2006), kjer so testirali tri različne brezcelične sisteme (kontinuiran, semi-kontinuiran brezcelični sistem in komercializiran kit podjetja Roche) z zeleno fluorescenčno beljakovino. Na podlagi primerjav fluorescence in NaDS poliakrilamidne gelske elektroforeze so prišli do zaključka, da noben sistem ni dal 100 % aktivnosti beljakovine, temveč da so se vsi vrteli okoli (50 ± 20) % aktivnosti od celotne količine GFP beljakovine. Če je nastala podobna situacija tudi pri naši diplomski nalogi ne vemo, saj rezultati z NaDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo niso dovolj jasni za kvantifikacijo produkta.

Kolb in sod. (2000) so naredili primerjavo med različnimi brezceličnimi sistemi prav tako kot mi. Uporabili so celične ekstrakte narejene iz bakterije *E. coli*, zajčjih retikulocitov in pšeničnih kalčkov. Dognali so, da se prokariotski brezcelični sistem hitreje pripravi zaradi hitre rasti celic, lažjega in enostavnnejšega gojenja, nezahtevnosti tovrstnega sistema. Donosi različnih sistemov pa se bistveno ne razlikujejo, večkratna količina mRNK ne pomeni še večkratni donos (če dodamo tri kratno količino mRNK v brezcelični sistem, produkt ne naraste za tri kratno vrednost sistema z en kratno količino mRNK). Enako mnenje smo si tudi sami vstvarili, saj nismo opazili bistvene razlike pri sintezi beljakovin pri različnih brezceličnih sistemih. Prav tako smo primerjali donos translacije med dodanim 1 μl mRNK in 2 μl mRNK (dvo kratna razlika v koncentraciji mRNK), kot rezultat pa nismo dobili 2 kratne razlike v koncentraciji GFP beljakovine, ta vrednost je

bila nižja (približno 1,3 krat). To smo storili predvsem zato, da smo ugotovili, katera koncentracija mRNK bi bila najbolj primerna za brezcelični sistem (optimizacija) in hkrati nebi predstavljala prevelik strošek, zato teh ugotovitev nismo uvrstili med rezultate.

5.2 SKLEPI

Na podlagi eksperimentalnih poskusov ugotavljamo, da s preizkušenimi protokoli lahko pridobimo željeno beljakovino iz eksogenih mRNK molekul. Za večji donos pa je potrebna optimizacija pogojev za vsak sistem posebej.

Ugotovili smo, da topnost in prisotnost vseh komponent v translacijski mešanici pripomorejo k boljši translaciji v brezceličnem sistemu.

Pri vzpostavitvi brezceličnega sistema smo uporabili vektor pET22b(+) za prokariontski brezcelični sistem ter pIVEX 1.3 WG za evkariontski brezcelični sistem in izkazali so se kot primerni. Uporaba dobrih ekspresijskih vektorjev je smotrna, saj so prilagojeni na določen sistem in prispevajo k sintezi stabilnejše mRNK molekule.

Donosi prokariontskih (iz bakterijskega ekstrakta *E. coli*) in evkariontskih (iz kvasnega ekstrakta *S.cerevisiae*) brezceličnih sistemov se bistveno ne razlikujejo med seboj, se pa prokariontski brezcelični sistem hitreje pripravi zaradi hitre rasti bakterijskih celic in enostavnejše gojitvene tehnike.

6 POVZETEK

V moderni mikrobiologiji se je pojavil nov način sinteze beljakovine, sinteza v brezceličnih sistemih. Metoda se je uveljavila za sistematični študij beljakovin, za proučevanje strukturno-funkcionalnih odnosov, preučevanje interakcij beljakovina - beljakovina... Njena uporabnost se je s časoma razširila še na druge aplikacije, katere so pomembne pri moderni proteomiki, encimskih testih. V današnjih časih je veliko število genskih ekspresij v brezceličnih sistemih za identifikacijo beljakovinskih struktur in za hitri vpogled v evolucijsko risbo beljakovin. *In vivo* lahko sintetiziramo le tiste beljakovine, ki ne vplivajo na celično fiziologijo, v brezceličnih sistemih pa lahko pridobimo skoraj vsako beljakovino, le da nima predolg genski zapis. Sodobna znanost je tako omogočila miniaturizacijo in avtomatizacijo ekspresijskega sistema do te mere, da je sistem postal že nekakšna mikrobiološka tovarna za proizvodnjo beljakovin. Gre za sistem, ki je nekoliko dražji od običajnega (*in vivo* sinteza beljakovine), nam pa omogoča večjo fleksibilnost, lažjo izolacijo produkta, kontinuirano sintezo... V diplomski nalogi smo uporabili sev bakterije *Escherichia coli* DH5 α , ki je pogosto uporabljen kot sistem za proizvodnjo večjih količin rekombinantnih plazmidov. Obstaja veliko število različnih vektorjev, ki omogočajo pripravo večjih količin plazmidne DNK ali pa se uporabljajo za izražanje rekombinantnih genov. Sistema vektorjev pGEM-T-Easy in pET sta le dva izmed najbolj izpopolnjenih sistemov za kloniranje in izražanje genov. Z uporabo vektorjev pGEM-T Easy, pET22 in pIVEX 1.3 smo uspeli sklonirati in izraziti gen za zeleno fluorescenčno beljakovino v živih bakterijskih celicah ter v prokariontskem in evkariontskem brezceličnem sistemu. Pred vzpostavitvijo brezceličnega sistema smo imeli veliko dela s pripravo komponent za tovrstne sisteme. Največ dela je bilo s pripravo mRNA molekule, ki je vsebovala zapis za zeleno fluorescenčno beljakovino. Po PCR pomnoževanju GFP gena in modificirjanju 3'- konca, smo uspešno vstavili gen v klonirni vektor pGEM-T-Easy ter sklonirali v DH5 α . Po izolačiji in čiščenju smo gen za GFP prenesli še v ekspresijska vektorja pET22 in pIVEX 1.3, da bi preverili ekspresijo v *in vivo* bakterijskih sistemih in hkrati bi omogočili pripravo mRNA. Transkripcija je potekala po linearizaciji ekspresijskih vektorjev. Tako smo pridobili dve različni mRNA molekuli, ki sta nosili enak zapis za zeleno fluorescenčno beljakovino. Druga pomembna komponenta brezceličnega sistema je ekstrakt S30, ki smo ga pripravili iz bakterije *E. coli* z encimsko razgradnjo (lizocim v TE pufru) in kvasovke *S. cerevisiae* z razbijanjem s steklenimi kroglicami v pufru A. Po centrifugiraju na 30000 x g je sledila dializa celičnih ekstraktov. Tretja komponenta pa je translacijska mešanica, v kateri smo raztopili vse potrebne kemikalije za brezhibno delovanje brezceličnih sistemov. S preiskušanjem različnih translacijskih mešanic (razlike so bile v koncentraciji in sestavi nekaterih komponent), ki so bazirala na čim bolj podobni sestavi za oba sistema, smo dobili aktivno obliko zelene fluorescenčne beljakovine. Koncentracija produkta je bila dovolj velika za zaznavo s spektrofluorimetrom, ne pa za prepoznavo na poliakrilamidni gelski elektroforezi. Razlik v proizvodni produkta med različnimi brezceličnimi sistemi nismo zaznali. Lastnost translacijskega brezceličnega sistema je prevajanje genske informacije v ustrezno beljakovino. V kombinaciji z gensko sekvenčno analizo lahko skonstruiramo nov sistem za medicinske in biokemične potrebe v beljakovinskih raziskavah, saj nam je mikrobiologija omogočila miniaturizacijo ekspresijskega sistema v obliki mikrobiološke industrije.

7 VIRI

Altman M., Sonenberg N., Trachsel H. 1989. Translation in *Saccharomyces cerevisiae*: Initiation factor 4E-dependent cell-free system. Molecular and Cellular Biology, 9, 10: 4467-4472.

Anderson C.W., Straus J.W., Dudock B.S. 1983. Preparation of cell-free protein-synthesizing system from wheat germ. Methods in Enzymology, 101: 635-644.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 1988. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York.

Becton, Dickinson and Company. 2002. pEGFP-N2 vector information. V: Protocol PT3053-5, Version PR29968, Catalog 6081-1. Terra Bella Avenue Mountain View, Biosciences Clontech (3. okt. 2002).

https://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3053-5.pdf (15. feb. 2006): 1-3.

Cheng S., Focker C., Barnes W.M., Higuchi R. (1994). Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91: 5695-5699.

Dunn M.S., Ross F.J., Read L.S. 1933. The solubility of amino acid in water. Los Angeles, Chemical Laboratory, University of California at Los Angeles. <http://www.jbc.org/cgi/reprint/103/2/579.pdf> (17. maj 2007): 1-17

Edelmann A., Kirchberger J., Naumann M., Kopperschlager G. 2000. Generation of catalytically active 6-phosphofructokinase from *Saccharomyces cerevisiae* in a cell-free system. European Journal of Biochemistry, 267: 4825-4830.

Erickson A.H., Blobel G. 1983. Cell-free translation of messenger RNA in a wheat germ system. Methods in Enzymology, 96: 38-50.

Gallagher S.R. 1999. Electrophoretic separation of proteins. V: Current protocols in molecular biology. Volume 2. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (eds.). New York, John Wiley & Sons: 10.2.1-10.2A.34.

Gallie D.R., Walbot V. 1992. Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. Nucleic Acids Research, 20, 17: 4631-4638.

Gallisi B.M., Young E.T. 1975. Endogenous messenger ribonucleic acid-directed polypeptide chain elongation in a cell-free system from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, 122, 2: 719-726.

Gasior E., Herrera F., Sadnik I., McLaughlin C.S., Moldave K. 1979a. The preparation and characterization of a cell-free system from *Saccharomyces cerevisiae* that translates natural messenger ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 10: 3965–3969.

Gasior E., Herrera F., McLaughlin C.S., Moldave K. 1979b. The analysis of intermediary reactions involved in protein synthesis, in a cell-free extract of *Saccharomyces cerevisiae* that translates natural messenger ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 10: 3970–3976.

Gorman C. 1985. In DNA cloning: A practical approach. Vol. 2. Glover E. (ed.). Oxford, IRL Press: 134-190.

Groberg J., Dunn J.J. 1988. *OmpT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *Journal of Bacteriology*, 170, 3: 1245-1253.

Gurevich V.V, Pokrovskaya I.D., Obukhova T.A., Zozulya S.A. 1991. Preparative *in vitro* mRNA synthesis using SP6 and T7 RNA polymerases. *Analytical Biochemistry*, 195: 207-213.

Hayashi K., Nakazawa M., Ishizaki Y., Hiraoka N., Obayashi A. 1986. DNA ligation kit. V: Catalog number 6023. Shiga, Takara BIO INC. http://bio.takara.co.jp/bio_en/catalog_d.asp?C_ID=C1303 (15. feb. 2006): 2 str.

Herzog-Velikonja B., Gruden K. 2000. Praktikum iz molekularne biologije - Teoretični del. Ljubljana, Študentska založba: 23-100.

Inouye S., Tsuji F.I. 1994. *Aequorea* green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescent characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters*, 341: 277-280.

Invitrogen Corporation. 2001. Subcloning efficiency™ DH5α™: Chemically competent *Escherichia coli*. Carlsbad, California, Invitrogen Corporation: 1-7

Iskakova M.B., Szaflarski W., Dreyfus M., Remme J., Nierhaus K.H. 2006. Troubleshooting coupled *in vitro* transcription–translation system derived from *Escherichia coli* cells: synthesis of high-yield fully active proteins. *Nucleic Acids Research*, 34, 19: 1-9

JETquick, Spin column technique. Genomed GmbH plasmid miniprep spin kit/250. 2003. Löhne, Germany, Genomed GmbH: 1-18.

JETStar. 2003. The novel plasmid purification system. Genomed GmbH plasmid purification MIDI kit/25. Löhne, Germany, Genomed GmbH: 1-10.

Katzen F., Chang G., Kudlicki W. 2005. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends in Biotechnology*, 23, 3: 150-156.

KEGG PATHWAY Database. 2006. Genetic information processing. Tokyo, Kanehisa Laboratories (25. okt. 2006).

<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> (2. maj 2007): 6 str.

Keith D.H. 1990. Restriction/ligation labeling for primer initiated multiple copying of DNA sequences. United States Patent 5366877: 14 str.

Kigawa T., Muto Y., Yokoyama S. 1995. Cell-free synthesis and amino acid-selective stable isotope labeling of proteins for NMR analysis. Journal of Biomolecular NMR, 6, 2: 129-134.

Kigawa T., Yabuki T., Yoshida Y., Tsutsui M., Ito Y., Shibata T., Yokoyama S. 1999. Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of protein. FEBS Letters 442: 15-19.

Kigawa T., Yabuki T., Matsuda N., Matsuda T., Nakajima R., Tanaka A., Yokoyama S. 2004. Preparation of *E. coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression. Journal of Structural and Functional Genomic, 4: 1-6.

Kim D.M., Ktgawa T., Choi C.Y., Yokoyama S., 1996. A highly efficient cell-free protein synthesis system from *E. coli*. European Journal of Biochemistry, 239: 881-886.

Kim D.M., Swartz J.R. 1999. Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. Biotechnology and Bioengineering, 66: 180-188.

Kim D.M., Swartz J.R. 2000. Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent addions. Biotechnology Progress, 16: 385-390.

Kim D.M., Swartz J.R. 2001. Regeneration of adenosine triphosphate from glycolitic intermediates for cell-free synthesis. Biotechnology and Bioengineering, 74: 309-316.

Kim T.W., Kim D.M., Choi C.Y. 2006. Rapid production of milligram quantities of proteins in a batch cell-free protein synthesis system. Journal of Biotechnology, 124, 2: 373-80.

Klammt C., Löhr F., Schäfer B., Haase W., Dötsch V., Rüterjans H., Glaubitz C.I., Bernhard F. 2004. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. European Journal of Biochemistry, 271: 568-580.

Kolb V.A., Makeyev E.V., Spirin A.S. 2000. Co-translational folding of an eukaryotic multidomain protein in a prokaryotic translation system. Journal of Biological Chemistry, 275, 22: 16597-16601.

Kolb V., Makeyev E., Ward W., Spirin A.S. 2004. Synthesis and maturation of green fluorescent protein in a cell-free translation system. Journal Biotechnology Letters, 18, 12: 1444-1452.

Kozak M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44, 2: 283-92.

Kozak M. 1987. An analysis of 5'- noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research*, 15, 20: 8125-48.

Lamborg H., Zamecnik P.C. 1960. Amino acid incorporation into protein by extracts of *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 42: 206-211.

Lehnninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. 1993. Principles of biochemistry. 2nd ed. New York, Worth Publishers, Inc: 855-1099.

Lesley A.S., Brow M.A., Burgess R.R. 1991. Use of *in vitro* protein synthesis from polymerase chain reaction-generated templates to study interaction of *E. coli* transcription factor with core RNA polymerase and for epitope mapping of monoclonal antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 2: 2632-2638.

Littlefield J.W., Keller E.B., Gross J., Zamecnik P.C. 1955. Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 217: 111-123.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky L.S., Darnell J. 2003. Molecular cell biology. 5th ed. New York, W.H. Freeman and Company: 59-195.

Madigan T.M., Martinko J.M., Parker J. 1997. Brock biology of microorganisms. 8th ed.. New Jersey, Prentice Hall: 986 str.

Madin K., Sawasaki T., Ogawaware T., Yaeto E. 2000. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 559-564.

Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E.F. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press p.1.74-1.75.

Matsuda T., Koshiba S., Tochio N., Seki E., Iwasaki N., Yabuki T., Inoue M., Yokoyama S., Kigawa T. 2007. Improving cell-free protein synthesis for stable-isotope labeling. *Journal of Biomolecular NMR*. 37, 3: 225-229.

Merck KgaA. 2003. pET *E. coli* T7 expression vectors. Darmstadt, Merck (25. sep. 2003). <http://www.merckbiosciences.com/g.asp?f=NVG/pETtable.html>. feb. 2006).

Merrick W.C. 2004. Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene*, 332: 1-11.

Moldave K., Gasior E. 1983. Preparation of a cell-free system from *Saccharomyces cerevisiae* that translates exogenous messenger ribonucleic acids. Methods un Enzymology, 101: 644-650.

Mullis K.B. 1985. Process for amplifying nucleic acid sequence. United States Patent 4683202: 28 str.

Nguyen H., Lepingle A. 2000. Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. Systematic and Applied Microbiology, 23: 71-85.

Nuss D.L., Peterson A.J. 1980. Expression of wound tumor virus gene products *in vivo* and *in vitro*. Juornal of Virology, 34, 2: 532-541.

Ozawa K., Headlam M.J., Schaeffer P.M., Henderson B.R., Dixon N.E. 2004. Optimization of an *Escherichia coli* system for cell-free synthesis of selectively 15N-labelled proteins for rapid analysis by NMR spectroscopy and Gottfried Otting. European Journal of Biochemistry, 271: 4084–4093.

Parrish J., Limjindaporn T. 2004. Recombination cloning in bacteria. Detroit, Center for Molecular Medicine and Genetics Wayne State University School of Medicine.
<http://proteome.wayne.edu/RecombCloning2.pdf> (15. feb. 2006): 4 str.

Pelham, H.R., Jackson R.J. 1976. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. European Journal of Biochemistry, 67, 247-256.

Promega. 1999. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. V: Technical manual No. 024: Instructions for use of products A1360, A1380, A3600 and A3610. Madison, Promega: 1-30.

Promega. 2003. WIZARD® SV gel and PCR Clean-Up system. V: Technical bulletin: Instructions for use of products A9280, A9281 and A9282. Madison, Promega: 1-11.

Promega. 2004. Pfu DNK polimeraza. Madison, Promega (dec. 2004).
<http://www.promega.com/tbs/9pim774/9pim774.pdf> (15.2.2006): 2 str.

Promega. 2006. RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems – SP6 and T7. Catalog number P1300. Madison, Promega (junij 2006).
<http://www.promega.com/tbs/tb166/tb166.pdf> (20. maj 2006): 13 str.

Reiness G., Yang H.L., Zubay G., Cashel M. 1974. Effects of guanosine tetraphosphate on cell-free synthesis of *Escherichia coli* ribosomal RNA and other gene products. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 72, 8: 2881–2885.

Roberts B.E., Jackson B.M. 1973. Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 70: 2330-2334.

Roche. 2005. RTS Amino Acid Sampler Amino acid solutions for use in RTS expression kits. Instruction manual: Catalog 03 262 154 001. Mannheim, Roche Applied Science (jun. 2005).

www.proteinexpression.com (15. feb. 2006): 28 str.

Roche. 2002-2003. RTS Application Manual for Cell-Free Protein Expression. Mannheim, Roche Applied Science (2002-2003).

http://www.roche-applied-science.com/sis/proteinexpression/literature/manual/cell_free.htm (1. maj 2007): 7 str.

Roche. 2007. RTS pIVEX Wheat Germ His6-tag Vector Set. Instruction manual: Catalog 03 728 803 001. Mannheim, Roche Applied Science.

<http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/3728803a.pdf> (1.6.2007): 1-7.

Rogé J., Betton J.M. 2005. Use of pIVEX plasmids for protein overproduction in *Escherichia coli*. Microbial Cell Factories, 4, 18: 1-5.

Sawasaki T., Ogasawara T., Morishita R., Endo Y. 2002. A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 99, 23: 14652-14657.

Schachtschabel, D., Zilling, W. 1959. Untersuchungen zur Biosynthese der Proteine. I. Über den Einbau C14-markierter Aminosäuren ins Protein zellfreier Nucleoproteid-Enzyme-Systeme aus *E. coli* B. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, 314: 262-275.

Scopes R.K. 1987. Protein purification: principles and practice. 2nd ed. New York, Springer Verlag: 328 str.

Sepčić K., Anderluh G., Turk T., Maček P. 2000. Biokemiski praktikum. Teoretični del. Ljubljana, Študentska založba, 2000: 19-83.

Shine J., Dalgarno L. 1975. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. Nature, 6, 254-5495: 34-38.

Spirin A.S. 1991. Cell-free protein synthesis bioreactor. V: Frontiers in bioprocessing II. Washington, American Chemical Society, DC: 31-43.

Spirin A.S. 2002. Cell-free translation systems. Berlin – Heidelberg – New York, Springer Verlag: 197-202, 219-225, 227-233, 235-246.

Spirin A.S., Baranov V.I., Ryabova L.A., Ovodov S.Y., Alakhov Y.B. 1988. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high

yield. *Science*, 242: 1162-1164.

Stratagene. 2004. BL21(DE3) competent cells. V: Instruction manual: catalog #200131. Stratagene, United States of America.

<http://www.stratagene.com/MSDS> (15. maj 2006): 1-15.

Xu Z., Chen H., Yin X., Xu N., Cen P. 2005. High-level expression of soluble human beta-defensin-2 fused with green fluorescent protein in *Escherichia coli* cell-free system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 127, 1: 53-62

Zawadzki V., Gross H.J. 1991. Rapid and simple purification of T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, 19, 8: 1948.

ZAHVALA

Diplomsko delo sem opravila na Institutu "Jožef Stefan", na Odseku za biokemijo in molekularno biologijo ter na katedri za biotehnologijo, na oddelku za živiljstvo, Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Petru Rasporju za prevzem mentorstva pričujoče diplomske naloge ter strokovni pregled diplomskega dela.

Somentorju prof. dr. Borisu Turku se iskreno zahvaljujem za prevzem somentorsva diplomske naloge.

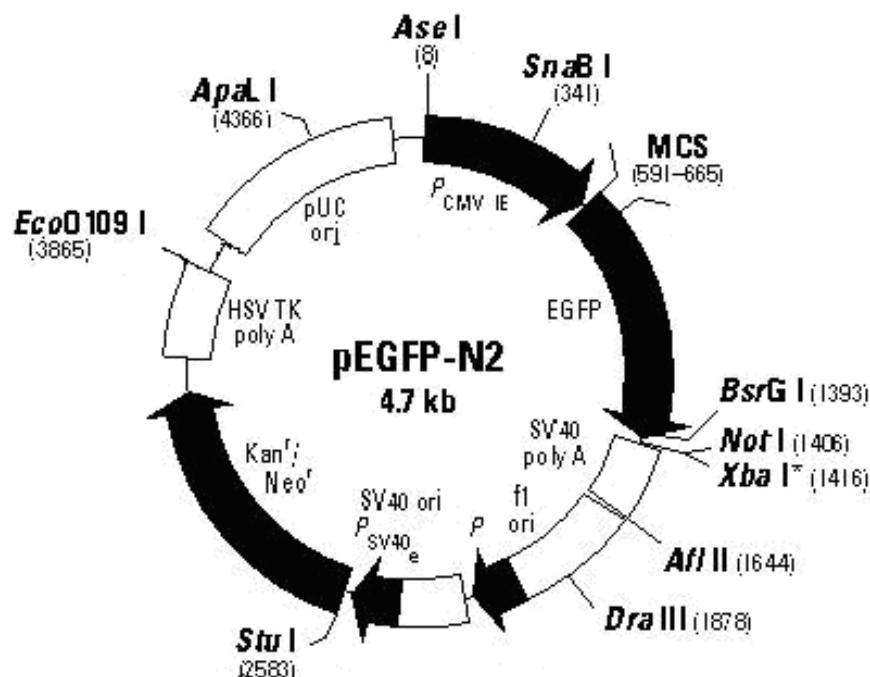
Prof. dr. Ines Mandić-Mulec se zahvaljujem za strokovni pregled diplomskega dela.

Posebna zahvala gre dr. Iztoku Dolencu za vso potrpežljivost, prijaznost, pomoč in strokovne nasvete pri uvajanju v laboratorijsko delo in nastajanju pričujočega diplomskega dela ter za dosleden in kritičen pregled diplomskega dela.

Neži Čadež, Štefanu Fujsu in Mateju Šergantu se zahvaljujem za pomoč in neizčrpne nasvete pri pripravi ekstrakta iz *Saccharomyces cerevisiae*, ki sem ga potrebovala pri svojem delu.

Vsem sodelavcem v laboratorijih odseka za Biokemijo in molekularno biologijo Instituta "Jožef Stefan" sem hvaležna za prijetno vzdušje.

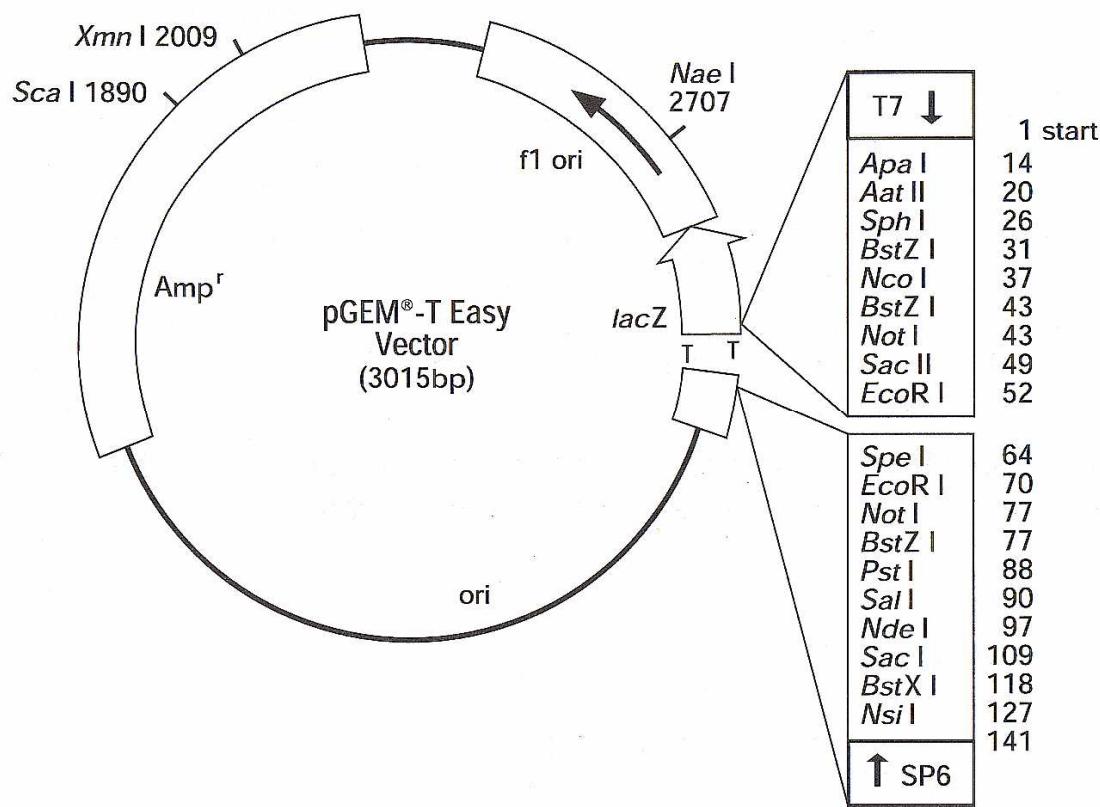
Na koncu se zahvaljujem vsem domačim za podporo in vzpodbudo v trenutkih, ko "mi rezultati niso bili ravno naklonjeni", posebna mislel pa gre hčerki Mojci, ki mi je dajala vsakodnevni zagon.

PRILOGE

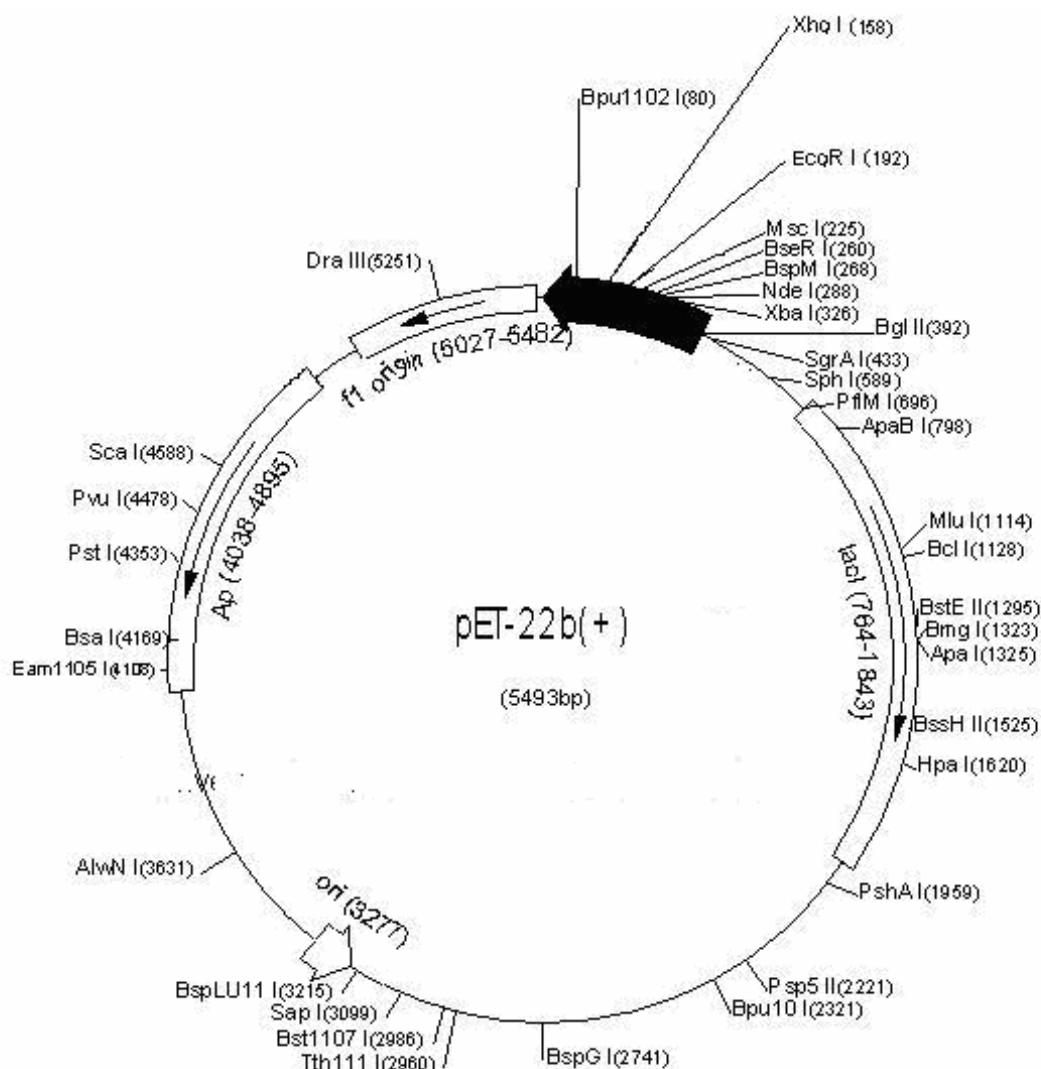
Priloga A: Vektor pEGFP-N2 (BD Biosciences, ZDA).

1 atggtagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatc
 M V S K G E E L F T G V V P I
 46 ctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtg
 L V E L D G D V N G H K F S V
 91 tccggcgagggcgagggcgatgccacacctacggcaagctgaccctg
 S G E G E G D A T Y G K L T L
 136 aagttcatctgcaccacggcaagctgcccgtgccctggcccacc
 K F I C T T G K L P V P W P T
 181 ctcgtgaccaccctgacctaaggcgtgcagtgcattcagccgctac
 L V T T L T Y G V Q C F S R Y
 226 cccgaccacatgaagcagcacgacttcaagtccgcattgccc
 P D H M K Q H D F F K S A M P
 271 gaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcaaggacgacggc
 E G Y V Q E R T I F F K D D G
 316 aactacaagacccgcgcgaggtaagttcgagggcgacaccctg
 N Y K T R A E V K F E G D T L
 361 gtgaaccgcatacgagctgaaggcatcgacttcaaggaggacggc
 V N R I E L K G I D F K E D G
 406 aacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaac
 N I L G H K L E Y N Y N S H N
 451 gtctatatcatggccgacaaggcagaagaacggcatcaaggtaac
 V Y I M A D K Q K N G I K V N
 496 ttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgcc
 F K I R H N I E D G S V Q L A
 541 gaccactaccagcagaacacccccatcgccgacggcccgctgctg
 D H Y Q Q N T P I G D G P V L
 586 ctgcccgcacaaccactacactggagcacccagtcgcctgagcaaa
 L P D N H Y L S T Q S A L S K
 631 gaccccaacgagaagcgcgatcacatggcctgctggagttcgtg
 D P N E K R D H M V L L E F V
 676 accggccggccggatcactctcgcatggacgagctgtacaagtaa 720
 T A A G I T L G M D E L Y K *

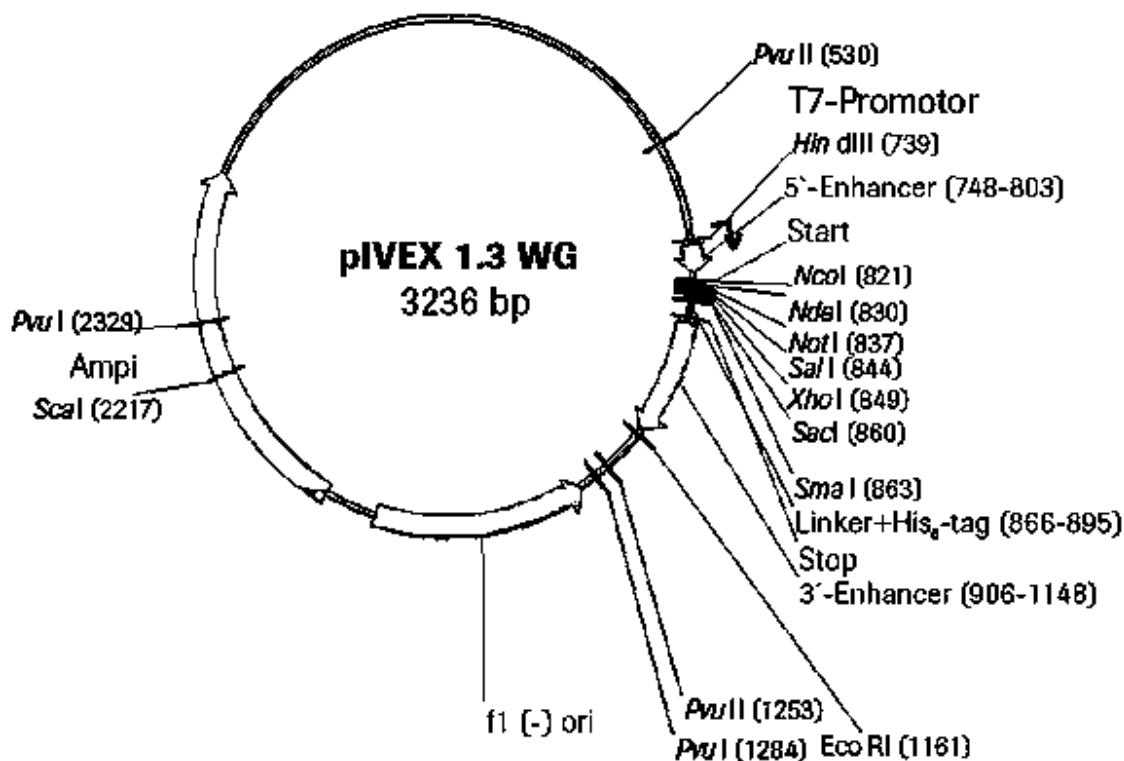
Priloga B: Nukleotidno in beljakovinsko zaporedje zeleno fluorescenčne beljakovine (BD Biosciences, ZDA).



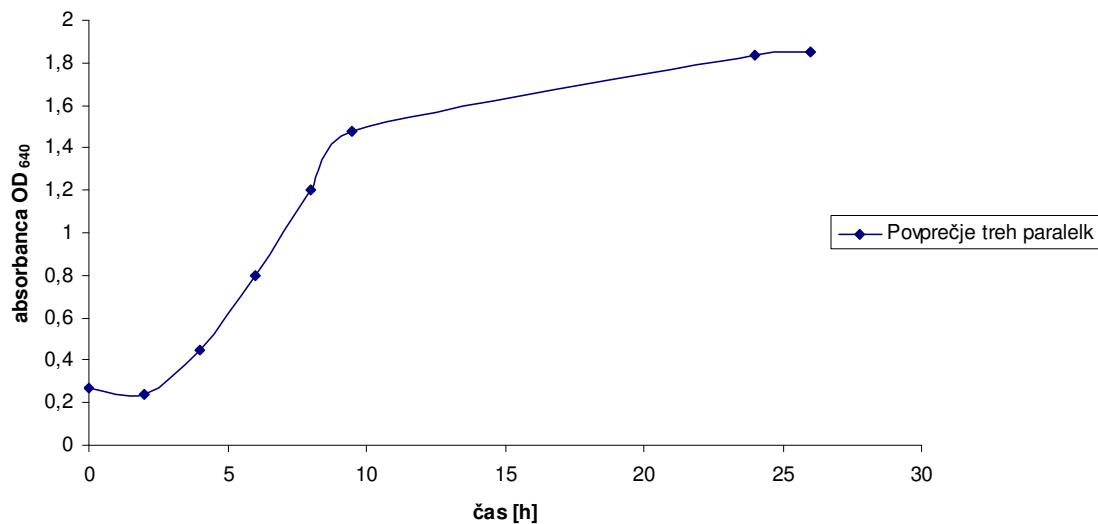
Priloga C: Klonirni vektor pGEM-T Easy (Promega, ZDA).



Priloga D: Ekspresijski vektor pET22b(+) (Novagen, ZDA).



Priloga E: Ekspresijski vektor pIVEX 1.3 WG (Roche, Švica).



Priloga F: Rastna krivulja za kvasni sev *S. cerevisiae* S228c v tekočem YEPD gojišču. Rastna krivulja je bila narejena na podlagi povprečja treh paralelk, ki so imele začetno optično gostoto okoli 0,2 in so bile inkubirane na stresalniku z 210 RPM pri 37 °C.

ŽIVLJENJEPIS

OSEBNI PODATKI

Ime in priimek: Alenka Sedlar
Datum rojstva: 15. 7. 1980
Naslov: Malija 31 I, 6310 Izola
GSM: 041/ 925-363
E-naslov: arzen@email.si

IZOBRAZBA

Univ. dipl. mikrobiol.
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
Smer: mikrobiologija
Diplomsko delo: xxxxxxxxxxxx
Diplomirala leta 2007

Zaključek 1999
Gimnazija Piran, Piran
gimnazijski maturant

DELOVNE IZKUŠNJE

- tekom študija pri vajah
- inštitut Jožef Stefan

DODATNA IZOBRAŽEVANJA

- inštitut
- Učenje tujih jezikov

ZNANJA

- tudi jeziki
- računalništvo
- vozniški izpit B kategorije

INTERESNE DEJAVNOSTI

- klavir
- tudi jeziki
- šport: tek na dolge proge

HOBIJI

Tek, sprehodi v naravi, potovanja, kolesarjenje.....

REFERENCE