

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Daša MEDVEŠČEK

**VNOS TERAPEVTSKEGA PLAZMIDA pORF-hIL-12
V IZBRANE VRSTE ENTEROBAKTERIJ**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Daša MEDVEŠČEK

**VNOS TERAPEVTSKEGA PLAZMIDA pORF-hIL-12 V IZBRANE
VRSTE ENTEROBAKTERIJ**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**INTRODUCTION OF THERAPEUTIC PLASMID pORF-hIL-12 INTO
SELECTED SPECIES OF THE FAMILY *Enterobacteriaceae***

M. Sc. THESIS

Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, kjer so bili izvedeni vsi poskusi in kemijske analize.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorija magistrskega dela imenovala prof. dr. Gorazda Avguština, za somentorico prof. dr. Majo Čemažar, za recenzentko pa doc. dr. Blagajano Herzog Velikonja.

Mentor: prof. dr. Gorazd Avguštin

Somentorica: prof. dr. Maja Čemažar

Recenzentka: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Maja ČEMAŽAR

Onkološki inštitut v Ljubljani

Članica: doc. dr. BLAGAJANA HERZOG VELIKONJA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Daša MEDVEŠČEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 579.254.2: 602.6: 577.2.083(043) = 163.6
KG horizontalni genski prenosi/ transformacija /elektroporacija /naravna kompetenca /osmotski stres/ odpornost proti ampicilinu /gostiteljsko območje/ enterobakterije/ plazmidi
AV MEDVEŠČEK, Daša, dipl. mikrobiol. (UN)
SA AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)/ČEMAŽAR, Maja (somentorica)/ HERZOG VELIKONJA, Blagajana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2016
IN VNOS TERAPEVTSKEGA PLAZMIDA pORF-hIL-12 V IZBRANE VRSTE ENTEROBAKTERIJ
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XI, 58 str., 14 pregl., 6 sl., 4 pril., 97 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI S horizontalnimi genskimi prenosi, med katere spada tudi transformacija, bakterijske celice pridobivajo nove genske zapise, ki imajo lahko negativen vpliv na okolje. V magistrskem delu smo ugotavljali učinkovitost naravne transformacije kot posledice odziva bakterije na osmotski stres in jo primerjali z učinkovitostjo elektroporacije, ki je najpogosteje uporabljen način vnosa molekul DNA v celice. Slednja se uporablja tudi pri genski terapiji raka, pri čemer uporabljajo terapevtske plazmide, ki poleg terapevtskega gena vsebujejo še zapis za seleksijski označevalec, v našem primeru gen za odpornost proti ampicilinu. Ta bi lahko predstavljal omejitveni dejavnik pri uporabi preiskovanega plazmida pORF-hIL-12, ki se uporablja pri zdravljenju raka kože psov in mačk. Hkrati smo ugotavljali tudi učinkovitost elektroporacije in transformacije ter širino gostiteljskega območja pogosto uporabljanega plazmidnega vektorja pUC-19. Uspešnost vnosa obeh plazmidov smo preverili pri petih različnih taksonomskih skupinah bakterij. Ugotovili smo, da je elektroporacija učinkovitejša od naravne transformacije bakterij in da tako frekvenca kot tudi učinkovitost transformacije z obema plazmidoma s filogentsko oddaljenostjo bakterij upadata. Z ozirom na bakterijsko mikrobioto kože psov ter mačk in na podlagi naših rezultatov lahko doumnevamo, da bi se terapevtski plazmid lahko prenesel samo, če bi bili izpolnjeni vsi pogoji, ki omogočajo vzpostavitev stanja kompetence. Glede na rezultate študije gostiteljskega območja plazmida pUC-19, ki vsebuje minimalno mesto *ori* plazmida *E. coli* pMB1, pa lahko zaključimo, da je verjetnost prenosa plazmida v analiziranih laboratorijskih pogojih v filogenetsko bolj oddaljene vrste, majhna. Poleg tega ostaja odprt vprašanje, ali bi do prenosa plazmida v *in vivo* razmerah sploh prišlo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 579.254.2: 602.6: 577.2.083(043) = 163.6
CX horizontal gene transfer/ transformation/ electroporation/natural competence/
osmotic stress/ ampicillin resistance/ hoste range/ *Enterobacteriaceae*/ plasmids
AU MEDVEŠČEK, Daša
AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)/ČEMAŽAR, Maja (co-advisor)/ HERZOG
VELIKONJA, Blagajana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2016
TI INTRODUCTION OF THERAPEUTIC PLASMID pORF-hIL-12 INTO
SELECTED SPECIES OF THE FAMILY *Enterobacteriaceae*
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XI, 58 p., 14 tab., 6 fig., 4 ann., 97 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Bacterial cells acquire new genetic information through horizontal gene transfer, among others through transformation, and this may have a negative impact on the environment. This master's thesis therefore deals with the effectiveness of natural transformation resulting from the response of bacteria to osmotic stress, in comparison with the effectiveness of electroporation, which is a common way of introducing DNA molecules into cells. This technique has been often used in gene therapies including cancer treatments with therapeutic plasmids, which contain both the therapeutic gene and the code for the selective markers. In this case, the marker marker was the gene for ampicillin resistance. This could also be the limiting factor in using the pORF-hIL-12 plasmid for treating skin cancer in dogs and cats. At the same time, we explored effectiveness of the DNA transfer via transformation, electroporation, and the host range of the commonly used vector pUC-19. We assessed the success rate of plasmid introduction on five different taxonomic groups of bacteria. Our findings indicate that electroporation is more effective than natural transformation. The frequency as well as effectiveness of transformation in both plasmids decline with increasing phylogenetic distance. Taking into account the bacterial microbiota of dog and cat skin and the possibility of the transfer of the therapeutic plasmid, we conclude that transfer is possible only when all conditions for induction of competence are present. Having studied the host range of plasmid pUC-19, we can conclude that there is a small probability that plasmids, containing minimal *E. coli* origin of replication, could be transferred in phylogenetically more distant species.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN	2
1.2 HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 SPLOŠNO O HORIZONTALNIH GENSKIH PRENOSIH (HGP)	3
2.2 TRANSDUKCIJA	4
2.3 KONJUGACIJA	4
2.4 TRANSFORMACIJA	4
2.4.1 Indukcija kompetence.....	5
2.4.2 Filogenetska razširjenost naravne transformacije.....	8
2.5 UMETNI VNOS DNA V BAKTERIJSKO CELICO	9
2.5.1 Elektroporacija.....	10
2.6 MOLEKULSKO KLONIRANJE	12
2.6.1 Plazmid pUC-19	14
2.7 GENSKA TERAPIJA RAKA.....	14
2.7.1 Osnovni principi genske terapije raka	14
2.7.2 Interlevkin 12.....	15
3 MATERIAL IN METODE	17
3.1 MATERIAL	17
3.1.1 Laboratorijski sevi	17
3.1.2 Plazmidi.....	17
3.1.3 Gojišča.....	17

3.1.3.1	Tekoča gojišča.....	17
3.1.3.2	Trdna gojišča.....	19
3.1.4	Kemikalije.....	20
3.1.5	Komercialni kompleti	20
3.1.6	Pufri, raztopine in reagenti	21
3.1.7	Encimi	21
3.1.8	Pribor in oprema	22
3.2	METODE DELA	23
3.2.1	Transformacija	23
3.2.1.1	Transformacija izbranih sevov z metodo elektroporacije	23
3.2.1.2	Transformacija seva iz rodu <i>Staphylococcus</i> z elektroporacijo.....	24
3.2.1.3	Transformacija neobdelanih celic seva DH5 α s plazmidnima vektorjem pORF-hIL-12 G2 in pUC-19.....	24
3.2.1.4	Transformacija neobdelanih celic, izvedena po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012)	25
3.2.1.5	Preverjanje prevzema plazmida pri predhodno neobdelanih baterijskih celicah v mikrotitrski plošči	25
3.2.1.6	Preverjanje prevzema plazmida pri predhodno neobdelanih bakterijskih celicah na različnih trdnih gojiščih.....	26
3.2.2	Potrditveni testi	26
3.2.2.1	Izolacija plazmidne DNA z detergentoma CTAB in tritonom X-100	26
3.2.2.2	Izolacija plazmidne DNA z alkalno hidrolizo.....	27
3.2.2.3	Izolacija plazmidne DNA s komercialnim kompletom »QIAprep® Spin Miniprep Kit«.....	27
3.2.2.4	Restrikcija izolirane plazmidne DNA	28
3.2.2.5	Agarozna gelska elektroforeza	28
4	REZULTATI	29
4.1	UGOTAVLJANJE FREKVENCE IN UČINKOVITOSTI ELEKTROTRANSFORMACIJE S TERAPEVTSKIM PLAZMIDOM PORF-hIL-12 G2 IN KONTROLNIM PLAZMIDOM pUC-19, IZVEDENE PO PROTOKOLU ZA SEV <i>E. coli</i> DH5 α	29

4.2	UGOTAVLJANJE FREKVENCE IN UČINKOVITOSTI ELEKTROTRANSFORMACIJE S TERAPEVTSKIM IN KONTROLNIM PLAZMIDOM, IZVEDENE PO PROTOKOLU ZA VRSTE RODU <i>Staphylococcus</i>	31
4.3	UGOTAVLJANJE FREKVENCE IN UČINKOVITOSTI TRANSFORMACIJE IZVEDENE S TERAPEVTSKIM PLAZMIDOM pORF-hIL-12 G2 IN KONTROLNIM PLAZMIDOM pUC-19 PO PROTOKOLU, KI SO GA OPISALI ZHANG IN SOD. (2012)	31
5	RAZPRAVA	39
5.1	ELEKTROPORACIJA	39
5.2	NARAVNA TRANSFORMACIJA.....	42
5.3	PRIMERJAVA FREKVENCE IN UČINKOVITOSTI TRANFORMACIJE Z ELEKTROPORACIJO, IZVEDENO PO PROTOKOLU, KI SO GA OPISALI ZHANG IN SOD. (2012).....	44
5.4	POTRDITEV PRISOTNOSTI PLAZMIDNE DNA V DOMNEVNIH TRANSFORMANTAH	44
5.5	VARNOSTNI VIDIK UPORABE TERAPEVTSKEGA PLAZMIDA pORF-hIL-12 G2...	45
6	SKLEPI	47
7	POVZETEK	48
8	VIRI	50
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Primerjava učinkovitosti in razširjenosti različnih metod umetne transformacije (Aune in Aachmann, 2010)	9
Preglednica 2:	Sestava gojišča SMMP50.....	18
Preglednica 3:	Založna raztopina 10×A	19
Preglednica 4:	Seznam uporabljenih kemikalij	20
Preglednica 5:	Uporabljena laboratorijska oprema in pribor.....	22
Preglednica 6:	Sestava raztopin I, II, III.....	27
Preglednica 7:	Frekvence in učinkovitosti elektroporacije pri izbranih sevih.....	29
Preglednica 8:	Pojasnitev oznak, uporabljenih po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012).....	31
Preglednica 9:	Frekvenca in učinkovitost transformacije seva iz vrste <i>E. coli</i> DH5α po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012), s plazmidom pUC-19...	32
Preglednica 10:	Frekvenca in učinkovitost transformacije seva iz vrste <i>E. coli</i> DH5α po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012), s plazmidom pORF-hIL-12 G2 ..	32
Preglednica 11:	Opažena frekvenca in učinkovitost transformacije terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 G2 po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012).....	33
Preglednica 12:	Opažena frekvenca in učinkovitost transformacije kontrolnega plazmida pUC-19 po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012).....	34
Preglednica 13:	Transformacija neobdelanih celic seva vrste <i>E. coli</i> DH5α s terapevtskim in kontrolnim plazmidom z nizko (3 ng/µl) in visoko koncentracijo (30 ng/µl).....	35
Preglednica 14:	Rast transformant na izbranih gojiščih po dodatku plazmidne DNA.....	36

KAZALO SLIK

Slika 1:	Mehanizem prevzema zunajcelične DNA pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijskih vrstah (prirejeno po Johnston in sod., 2014: 5).	7
Slika 2:	Lestvica DNA »O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder« (Fischer Scientific, 2015).....	28
Slika 3:	Slika gelske elektroforeze izolirane plazmidne DNA (pORF-hIL-12 G2) po restrikciji z <i>EcoRI</i>	36
Slika 4:	Slika gelske elektroforeze izolirane plazmidne DNA (pUC-19) po restrikciji z <i>EcoRI</i>	36
Slika 5:	Slika gelske elektroforeze izolirane DNA (plazmid pUC-19 in plazmid pORF-hIL-12 G2) iz kolonij, ki so zrasle po transformaciji po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sodelavci (2012), po restrikciji z <i>EcoRI</i>	37
Slika 6:	Slika gelske elektroforeze izolirane DNA (plazmida pUC-19 in plazmida pORF-hIL-12 G2), po restrikciji z <i>EcoRI</i> , uporabljena je 1kb lestvica	38

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

amp	gen za odpornost proti ampicilinu
ATP	adenozin tri fosfat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BHI	gojišče "Brain heart infusion broth"
BM	gojišče "Basic medium"
bp	bazni pari v dvostranski vijačnici nukleinske kislina
BSA	goveji serumski albumin (<i>ang. bovine serum albumin</i>)
CFU	število kolonijskih enot (<i>ang. colony-forming unit</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. amnigenus</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. hermannii</i>	<i>Escherichia hermannii</i>
<i>E. chrysanthemi</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
EDTA	etilendiaminetetraocetna kislina
EGT	elektrogenska terapija
GMO	gensko modificirani organizmi
GSO	gensko spremenjeni organizmi
<i>H. frisingense</i>	<i>Herbaspirillum frisingense</i>
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HGP	horizontalni genski prenos
IFN- γ	interferon gama
IL-12	interlevkin 12
kb	kilobazni pari, 1000 baznih parov v dvostranski vijačnici DNA
lacZ	struktturni gen v operonu <i>lac</i> , ki nosi zapis za sintezo encima beta-galaktozidaze
LB	gojišče Luria-Bertani
MG	MG-minimalno gojišče
MGE	mobilni genetski elementi
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>P. rettgeri</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije ionov H_3O^+
QACs	kvarterne amonijeve spojine (<i>ang. quaternary ammonium compounds</i>)
RMP	rekombinacijske mediatorske beljakovine
RNA	ribonukleinska kislina
<i>S. boydii</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>

<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. sonnei</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>S. typhymurium</i>	<i>Salmonella typhymurium</i>
<i>S. enteritidis</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
SMMP50	gojišče za gojenje sevov iz rodu <i>Staphylococcus</i>
SOB	gojišče "Super optimal broth"
SOC	gojišče "Super optimal broth z dodatkom glukoze"
ssDNA	enoverižna DNA (ang. <i>single stranded</i>)
TBE	pufer tris-borat-EDTA
UV	ultravijolična svetloba
vrt.	vrtljaj

1 UVOD

Velika prednost bakterij v primerjavi z drugimi organizmi je sposobnost prilagoditve na okoljske razmere z mutacijami, kratek generacijski čas in sposobnost pridobivanja dodatnih genskih informacij preko horizontalnih genskih prenosov (HGP). Horizontalni genski prenosi (HGP) so naravni pojav vnosa novih zapisov v celico, ki jih s pridom izkoriščamo tudi v biotehnologiji.

Transformacija vključuje vstop gole DNA v celico. Po vstopu DNA v celico lahko pride do razgradnje ali do vključitve le-te v bakterijski kromosom, kar je odvisno od podobnosti tuje DNA s kromosomalno DNA gostitelja. Če gre za prenos preko plazmida s širokim gostiteljskim območjem, lahko pride do hitrega širjenja informacij med bakterijskimi vrstami. Kompetenca, zmožnost sprejema tuje DNA, tako predstavlja sposobnost prilagoditve bakterij na spremembe v okolju (Thomas in Nielsen, 2005).

Elektroporacija je način vnosa tuje DNA z izpostavitvijo celic električnem pulzu, ki povzroči povečanje prepustnosti celične membrane. Zaradi enostavnosti in velike učinkovitosti je pogosto uporabljen način vnosa genskih zapisov v gostitelja. Reverzibilen pojav prepustnosti membrane uporabljajo tudi pri genski terapiji raka. *In vitro* metodo uporabljajo rutinsko za vnos različnih molekul, na primer RNA, DNA, kemoterapevtikov in drugih. Metoda ima velik potencial na področju onkologije, saj sta elektrokemoterapija in elektrogenska terapija zelo učinkoviti metodi zdravljenja, tako v humani kot tudi v veterinarski medicini. Elektrogenska terapija, s katero v celice kožnih in podkožnih nodulov različnih histoloških tipov tumorjev psov vnesejo terapevtski plazmid pORF-hIL-12 G2 je bila testirana v klinični študiji za zdravljenja raka v veterinarski onkologiji. V plazmidu je poleg terapevtskega gena za humani interlevkin-12 in ustreznih evkariontskih nukleotidnih zaporedij, ki so povezane z njegovim izražanjem, tudi seleksijski označevalec (gen z zapisom za odpornost proti ampicilinu) ter replikacijska regija pMB1-Ori iz bakterije *Escherichia coli*. Slednja omogoča pomnoževanje plazmida v sevu iz vrste *E. coli* med postopkom priprave rekombinantnega terapevtskega plazmida in pridobivanja zadostne količine plazmida za aplikacijo terapije. Interlevkin 12 (IL-12) je eden izmed najbolj obetavnih citokinov pri imunskemu zdravljenju malignih obolenj (Aune in Aachmann, 2010; Čemažar in sod., 2010; Čemažar in Serša, 2007).

Vektorji so molekule DNA, s pomočjo katerih lahko umetno vnesemo tujo DNA v gostiteljsko celico. Plazmidi so najpogosteje uporabljeni vektorji pri molekulskem kloniranju. Eden izmed korakov pri optimizaciji uporabe plazmidnih vektorjev je tudi poznavanje gostiteljskega območja vektorja, saj si tako lahko razširimo nabor potencialno uporabnih organizmov.

1.1 NAMEN

Pri genski terapiji raka je pomemben tudi varnostni vidik uporabe izbrane tehnologije. Za pripravo terapevtskega plazmida in njegovo namnožitev je potreben v plazmidu potreben selekcijski označevalcev. V primeru pORF-hIL-12 G2 gre za zapis za odpornost proti ampicilinu. Ker število proti antibiotikom odpornih sevov v okolju narašča, je uporaba rezistenčnih genov kot selekcijskih označevalcev nezaželena, ravno zaradi možnosti horizontalnega prenosa genov. V magistrski nalogi smo želeli preveriti možnost vnosa DNA plazmida pORF-hIL-12 G2 v inducirano kompetentne celice različnih enterobakterijskih vrst z elektroporacijo. Hkrati smo poskušali ugotoviti ali so med enterobakterijami tudi naravno kompetentne vrste. Vzporedno smo kot kontrolo preverjali gostiteljsko območje pogosto uporabljenega vektorja v molekulskem kloniranju, pUC-19.

1.2 HIPOTEZE

Pred pričetkom dela smo postavili naslednji glavni hipotezi:

- Vnos terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 G2 s transformacijo bo uspešen samo v primerih sevov iz vrste *Escherichia coli* in njej zelo sorodnih vrst.
- Vnos terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 G2 bo uspešen samo po predhodno inducirani kompetenci recipientskih celic.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNO O HORIZONTALNIH GENSKIH PRENOSIH (HGP)

Izraz horizontalni genski prenosi (ang. *horizontal gene transfer*, HGT) povezujemo s prenosom genskih zapisov med organizmi iste ali različnih vrst. Pri bakterijah poznamo tri glavne vrste HGP: (a) transformacija (prevzem proste DNA), (b) transdukcija (prenos genskega zapisa s pomočjo bakteriofagov) in (c) konjugacija (horizontalni genski prenos, pri katerem se konjugativni plazmid enosmerno prenese iz donorske v recipientsko celico). Mobilni genetski elementi udeleženi v HGP so lahko plazmidi, bakteriofagi, integrativni konjugativni elementi, transpozoni, insercijska zaporedja, integroni, genske kasete ali genomski otoki (Heuer in Smalla, 2007).

Watanabe (1963) je prvi opisal HGP in sicer pri večkratno odpornih patogenih bakterijah, in pri tem uporabil izraz »nalezljiva dedičina« (ang. *infectious heredity*). Od takrat so HGP pripisali že več razlag in pomenov. Z vse večjim številom v celoti sekvenciranih bakterijskih genomov raziskovalci ugotavljajo, da so HGP eno od pomembnejših gonil bakterijske evolucije preko genomske sprememb (Johnsborg in sod., 2007). Engelstädter in Moradigaravand (2013) sta z matematičnim modelom poskušala dokazati predpostavko, da transformacija preko procesa »genetskega potovanja v času« omogoči bakterijski celici hitrejše prilaganje na spremembe v okolju. Bakterije na tak način poleg razvoja z mutacijami in hitrim razmnoževanjem pridobivajo pomembne informacije in s tem selektivno prednost tudi od drugih, ne le starševskih celic (Thomas in Nielsen, 2005). V okolju lahko pride do prenosa genov, ki imajo različen vpliv na fenotip, kot so na primer toksičnost, patogenost, povečana virulenta, odpornost proti antibiotikom, kompetitivna prednost, presnova alternativnih substratov ali razširjen nabor gostiteljev. Zato ima pojavnost HGP velik vpliv na oceno tveganja pri uporabi gensko spremenjenih bakterij, ki jih spuščamo v okolje. Geni, ki jih z gensko spremenjenimi organizmi (GMO) vnašamo v okolje, lahko namreč spremenijo genome v okolju naravno pristotnih mikroorganizmov in posledično njihove lastnosti. Zgodi se lahko tudi, da GMO prevzamejo mobilne genske elemente (ang. *mobile gene element*, MGE) od v okolju prisotnih organizmov, kar lahko poveča njihov ekološki potencial (Heuer in Smalla, 2007).

2.2 TRANSDUKCIJA

Transdukacija je vstop tuje DNA v celico s pomočjo virusov. Mehanizem vstopa v celico se razlikuje glede na virus. V *in vitro* razmerah pri kloniranju najbolj pogosto uporablja bakteriofag λ , pri katerem lahko sestavimo DNA primerne dolžine in proteine virusnega plašča v infektivni delec. Učinkovitost vnosa rekombinantne fagne DNA s transdukциjo je manjša kot transformacija bakterij z rekombinantno plazmidno DNA, vendar je transdukacija manj odvisna od velikosti vnesene DNA kot transformacija. Transdukacija pri bakterijah poteka v treh fazah: (a) vstop bakteriofaga v donorsko celico, nato (b) izstop iz donorske celice z delom njene DNA, (c) vnos donorske DNA v tarčno celico (Madigan in sod., 2006).

2.3 KONJUGACIJA

Bakterijska konjugacija je proces pri katerem prenos DNA iz donorske v recipientsko celico poteče ob vzpostavitvi fizičnega stika med njima. Donor je bakterija, ki vsebuje konjugativni plazmid. Proses v splošnem poteka tako, da donorska celica sintetizira konjugativni pil s katerim se pritrdi na recipientsko celico. S skrajšanjem pila se celici približata in nato preko novonastale konjugativne pore ena veriga plazmidne DNA preide iz donorske v tarčno celico. Po prenosu DNA pride do sinteze komplementarne verige DNA. Tarčno celico, ki plazmidno DNA sprejme, imenujemo transkonjuganta (Snyder in Champness, 2003; Madigan in sod., 2006).

2.4 TRANSFORMACIJA

Naravna transformacija je stabilen prevzem, vključitev in funkcionalno izražanje »tujerodne« DNA. Je tudi edini mehanizem, s katerim lahko pojasnimo, kako bakterijska celica pridobi DNA tuje vrste izven gostiteljskega območja MGE ali bakteriofaga. Pri transformaciji gre za sklopitev pridobljene enoverižne DNA in gostiteljevega genoma. Vključitev novo pridobljene DNA v genom bakterije prejemnika omogoča proces homologne rekombinacije (Johnston in sod., 2014). Prvič so pojav opisali pri po Gramu pozitivni bakteriji *Streptococcus pneumoniae* (Griffith, 1928). Do sedaj je bil pojav naravne transformacije opisan pri približno 80 vrstah. Zadnje raziskave kažejo, da imajo sicer filogenetsko oddaljene vrste ohranjen mehanizem prevzema DNA, medtem ko so načini iniciacije in nadaljnji regulatorni mehanizmi različni. Za razliko od transdukcijske in konjugacijske je proces transformacije popolnoma uravnalan s strani tarčne celice in tudi vse potrebne beljakovine so zapisane v delu genoma (ang. *core genome*), ki je prisoten pri vseh sevih določenih vrstah. Pri večini bakterij proteini, ki so potrebni za

prevzem zunajcelične DNA, niso stalno prisotni, temveč se kompetenca pojavi le v določenih razmerah. Kompetenca je sposobnost sprejemanja zunajcelične DNA (Thomas in Nielsen, 2005; Johnston in sod., 2014).

2.4.1 Indukcija kompetence

Najpogosteje opisani sprožilci, vpleteni v razvoj kompetence, so: (a) genotoksičen stres, ki povzroči poškodbe DNA, (b) bakterijsko medcelično komuniciranje (zaznavanje kvoruma, ang. *quorum sensing*), (c) pomanjkanje glavnega vira ogljika ali (d) prisotnost oziroma odsotnost določenega vira ogljika (Seitz in Blokesch, 2012). Pri bakterijah *S. pneumoniae* in *Legionella pneumophila* lahko stanje kompetence inducirata subletalna koncentracija aminoglikozidnih in florokinolonskih antibiotikov ter genotoksični agensi, kot sta sevanje UV ali mitomicin C (Prudhomme in sod., 2006; Charpentier in sod., 2011).

Poleg zaznavanja kvoruma raziskovalci opisujejo še bakterijsko komunikacijo s signaliziranjem (ang. »cell-cell signaling). Celice lahko komunicirajo preko alarmonov ali avtoinduktorjev, ki jih bakterije proizvajajo kot odgovor na stres. Alarmoni so signalne molekule, ki povečajo izražanje genov, ki so povezani z celičnim odzivom na stres. Avtoinduktorji so signalne molekule, ki so vpletene v zaznavanje kvoruma kot tudi v celično signaliziranje. Glede na raznolikost molekul, ki so vpletene v indukcijo kompetence, lahko zaključimo, da so regulatorne poti kompetence pri različnih mikrobnih vrstah različne (Claverys in sod., 2006). Mnogi avtorji opisujejo pojav naravne transformacije kot proces, ki omogoča prevzem tuje DNA za popravila poškodb DNA, vira hranil ali pridobitve novih funkcij, ki omogočajo lažje prilagajanje na spremembe v okolju (Michod, 2008).

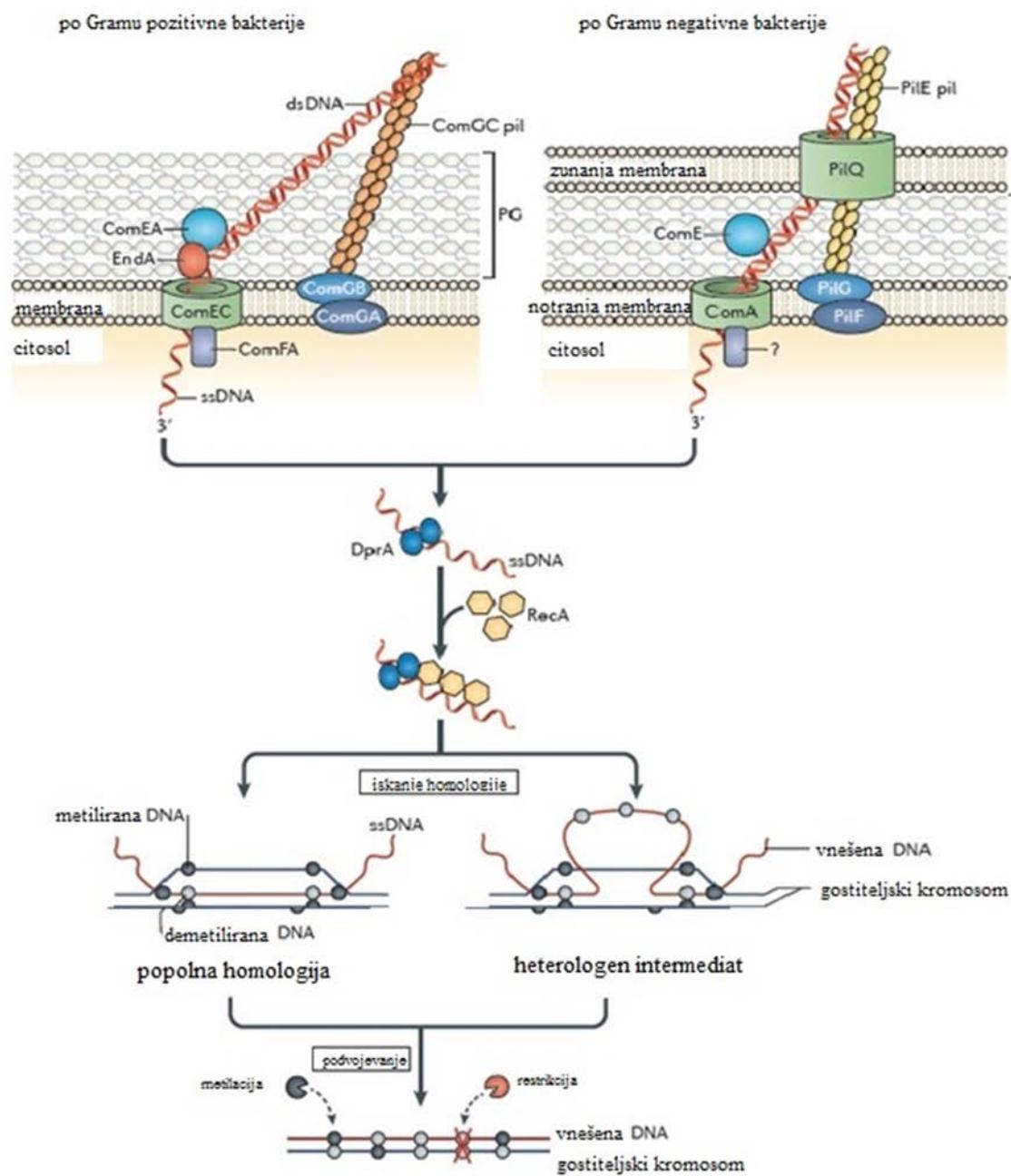
2.4.2 Mehanizem naravne transformacije

Sistemi prevzema DNA pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijah so si precej podobni, le da je pri po Gramu negativnih potreben še prehod DNA preko zunanje membrane. Domnevajo, da imajo po Gramu negativne bakterije beljakovine, ki so podobne sistemu izločanja tipa II in pilom tipa IV (Hobbs in Mattick, 1993; Dubnau, 1999). Pseudopili imajo vlogo pri prevzemu zunajcelične DNA tudi pri po Gramu pozitivnih vrstah (Chen in Dubnau, 2004). V znanstveni literaturi poročajo o povezavi pilov tipa IV in prevzemom DNA. Gre za pil tipa IV, ki je dolg dva do tri mikrometre in neposredno veže zunajcelično DNA. Ker je vpletен v proces transformacije, so ga poimenovali transformacijski pil

(Laurenceau in sod., 2013). Izjema v načinu prevzema zunajcelične DNA je bakterijska vrsta *Helicobacter pylori*, ki uporablja sistem izločanja tipa IV (Hofreuter in sod., 2001).

Na **Sliki 1** so prikazani ključni dogodki prevzema DNA pri po Gramu negativnih in pri po Gramu pozitivnih baterijskih vrstah. Za prevzem DNA je pri po Gramu pozitivnih bakterijskih vrstah ključen pil, ki je sestavljen večinoma iz podenot beljakovine ComGC (ujame dvoverižno DNA), DNA-receptorja ComEA in transmembranske pore ComEC. Ena stran dvojne vijačnice razgradijo nukleaze ali DNA-ločevalne beljakovine. Pri bakterijah iz debla *Firmicutes* prenos skozi ComEC omogoča od ATP odvisna translokaza ComFA. Pri po Gramu negativnih bakterijskih vrstah kanal za izločanje PilQ omogoči prehod skozi zunano membrano. Domnevajo, da je pri po Gramu negativnih bakterijskih vrstah prisoten homolog translokaze ComFA, vendar to še ni potrjeno. Enoverižna DNA, vezana na beljakovino DrpA (ang. *DNA processing protein A*) je signal za aktivacijo RecA, ki omogoča prepoznavo homolognih mest vzdolž kromosomske DNA (Mortier-Barrière in sod., 2007; Johnston in sod., 2014).

Homologno rekombinacijo v vseh organizmih sproži prisotnost enoverižne ali ssDNA (ang. *single stranded*). Proces vršijo rekombinaze (RecA pri prokariontih, Rad51 pri evkariontih) s kofaktorji, ki jih imenujemo rekombinacijske mediatorske beljakovine (RMP). Protein DprA, izoliran iz *S. pneumoniae*, je RMP vpleten pri transformaciji. Analize genskih zaporedij naravno kompetentnih bakterijskih vrst kažejo, da je DprA ohranjen pri vseh vrstah. Primerjava zaporedij naravno kompetentnih vrst je pokazala, da je gen *dprA* ohranjen pri vseh naravno kompetentnih vrstah. Četudi gen *dprA* najdemo tudi pri vrstah, ki ne izkazujejo naravne kompetence, je edina znana funkcija DrpA povezana s transformacijo (Beernink in Morrical, 1999; Mortier-Barrière in sod., 2007; Johnston in sod., 2014).



Slika 1: Mehanizem prevzema zunajcelične DNA pri po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijskih vrstah (prirejeno po Johnston in sod., 2014: 5).

2.4.2 Filogenetska razširjenost naravne transformacije

Horizontalno pridobljena kromosomska DNA lahko gostiteljskemu sevu v okolju omogoči selektvino prednost. Verjetnost, da se bo specifična genska informacija uspešno prenesla v gostitelja je odvisna od procesa prenosa, oblike nukleinske kisline, ki je prenešena in od integratz (retrovirusni encim, ki omogoča vgradnjo genetskega materiala virusa v DNA okužene celice) v organizmih. Pokazano je bilo, da ob pojavu HGP med nesorodnimi organizmi, ponavadi pride do prenosa vzdrževalnih genov (ang. *housekeeping genes*). Informacijski geni, med katere uvrščamo tiste gene, ki so vpleteni v proces translacije, transkripcije in podobnih procesov ter tudi geni za odpornost proti antibiotikom, imajo med organizmi manjšo verjetnost prenosa s HGP. Jain in sod. (1999) s kompleksnostno teorijo pokažejo, da so informacijski geni ponavadi del kompleksnejšega sistema, v nasprotju z vzdrževalnimi geni, ki so del manjšega sistema, ki predstavlja le nekaj genskih produktov. Predpostavljam, da je ravno kompleksnost interakcij informacijskih genov tisti faktor, ki vpliva na pogostotstvo pojava HGP.

Filogenetska analiza naravno kompetentnih bakterijskih vrst kaže, da je ta lastnost razširjena tako med po Gramu pozitivnimi kot tudi med po Gramu negativnimi bakterijskimi vrstami. Približno en odstotek do sedaj opisanih bakterijskih vrst je naravno kompetentnih. Zmožnost prevzema gole DNA so do sedaj zaznali pri arhejah in različnih bakterijskih skupinah, ki vključujejo predstavnike po Gramu pozitivnih bakterij, cianobakterije, vrste iz debla *Deinococcus–Thermus*, zelene žveplove bakterije in mnoge po Gramu negativne bakterije. Med proteobakterijami najdemo naravno kompetentne vrste v razredih alfa, beta, gama in epsilon. Mnogi človeški patogeni so naravno kompetentni, mednje uvrščamo predstavnike rodov *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* in *Streptococcus*. V deblu Firmicutes sta modelna organizma za preučevanje naravne transformacije vrsti *S. pneumoniae* in *Bacillus subtilis*. Med proteobakterijami so najbolj preučene naravno kompetentne bakterijske vrste *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* in *Neisseria meningitidis*. Do sedaj je *Mycobacterium smegmatis* edina opisana aktinobakterija, ki je naravno kompetentna. Analize genomskega podatkov vrst iz debla aktinobakterij kažejo, da imajo zapise za homologe genov *com*, ki kodirata ComEA in ComEC. Glede na to, da sta ti dve beljakovini vpleteni v prenos DNA preko membrane kompetentnih bakterijskih vrst, njuna prisotnost nakazuje na veliko večjo razširjenost naravne

kompetence aktinobakterij, kot je do sedaj opisana v literaturi (Jonas in sod., 2001; Johnsborg in sod., 2007; Bhatt in sod., 2002).

2.5 UMETNI VNOS DNA V BAKTERIJSKO CELICO

Poznamo različne metode umetnega vnosa DNA v bakterijsko celico (**Preglednica 1**). Za elektroporacijo velja, da je uporabna za širok spekter prokariontskih (bakterijskih in arhejskih) vrst. Transformacija v laboratorijskih razmerah ni odvisna od velikosti inokuluma in časa inkubacije bakterijske kulture, temveč od koncentracije celic in faze rasti. Prevzem plazmidne DNA poteče v zelo kratkem času (Zhang in sod., 2012).

Preglednica 1: Primerjava učinkovitosti in razširjenosti različnih metod umetne transformacije (Aune in Aachmann, 2010).

Metoda	Učinkovitost transformacije (CFU/µg DNA)	Filogenetski obseg uporabnosti metode	Vir
kemotransformacija	10^5 – 2×10^9	zlasti <i>Proteobacteria</i> in <i>Euryarcheota</i>	Hanahan, 1983; Hanahan in Bloom, 1996
elektroporacija	$0,5$ – 5×10^{10}	zelo širok obseg (vrste iz domen <i>Bacteria</i> in <i>Archaea</i>)	Aune in Aachmann, 2010
zamrzovanje in odtajanje (ang. <i>freeze and thaw</i>)	$\sim 10^3$	možen širok obseg	Dityatkin in Ilyashenko, 1979
sonoporacija	$\sim 10^7$	možen širok obseg	Song in sod., 2007
liposom	$\sim 2 \times 10^8$	možen širok obseg	Fraley in sod., 1979
citosan	/	možen širok obseg	Mumper in sod., 1995
biolistična	2×10^2 – 8×10^8	možen širok obseg	Shark in sod., 1991
tribos	10^4 – 10^6	možen širok obseg	Yoshida in Ide, 2008

Prvi zapisi o umetni transformaciji segajo v leto 1970, ko sta Mandel in Higa dokazala, da postanejo bakterije iz vrste *E. coli* ob tretiranju s CaCl_2 sposobne prevzema fagne DNA brez uporabe fagnih delcev (Mandel in Higa, 1970). Pri kemijski transformaciji so kationi ključen elementi, ki omogočajo celoten proces (Hanahan, 1983; Hanahan in Bloom, 1996). Kationi s povezavo z negativnimi fosfatnimi skupinami, prisotnimi v goli DNA, omogočijo kondenzacijo DNA. Tako je olajšan prevzem DNA, saj je zmanjšan volumen snovi, ki vstopa v celico. Kationi lahko hkrati izničijo odbijajoče elektrostatske sile, ki so prisotne med DNA in zunanjostjo celične membrane in tako olajšajo kontakt med DNA in membrano (Weston in sod., 1981).

Veliko manjšo učinkovitost transformacije izkazuje tehnika zamrzovanja in odtajanja (ang. *freeze and thaw*), pri kateri bakterijske celice transformiramo tako, da jih zmrznemo pri -70°C (ali -196°C) in jih nato odtalimo pri 42°C , kot je bilo pokazano pri bakterijski vrsti *E. coli* (Dityatkin in Ilyashenko, 1979).

Ultrazvok v vodnih raztopinah tvori mikromehučke, ki povzročijo nastanke prehodnih por v celični steni, kar omogoči prehod molekul v notranjost celice. Ta način imenujemo sonoporacija (Liu in sod., 2006), in je bil prvič uspešno preizkušen pri bakterijskih vrstah *E. coli*, *Pseudomonas putida* in *Pseudomonas fluorescens*. Sonoporacija je uporabljena pri različnih bakterijskih vrstah in je v primerjavi z elektroporacijo manj odvisna od ionske moči in jakosti napetosti (Song in sod., 2007).

Za vnos tuje DNA lahko uporabimo tudi polisaharidne in lipidne dostavljalne sisteme. Polisaharid hitozan vsebuje aminokislino, ki je pri kisli vrednosti pH pozitivno nabita, kar omogoči nastanek polimera. Ta v prisotnosti anionskih molekul, kot je tudi DNA, tvori kompleks, ki ga potencialno lahko uporabljamo kot dostavni sistem DNA (Mumper in sod., 1995). Podobno delujejo lipidni dostavljalni sistemi (liposomi), ki ujeti DNA preko fuzije z membrano omogočijo prehod v bakterijsko celico (Fraley in sod., 1979). Manj znani in uporabljeni sta tudi biolistična metoda in metoda tribos. Pri prvi gre za obstreljevanje rastlinskih celic z delci volframa, ki so prevlečeni z DNA. Transformacija tribos pa temelji na povečanju prepustnosti bakterijske celice z drgnjenjem s polistirensko paličico po površini agarske plošče, ki vsebuje koloidno raztopino *E. coli*, krizolit in plazmidno DNA (Yoshida in Ide, 2008). Maksimalno učinkovitost transformacije dosežemo z elektroporacijo ($0,5\text{--}5 \times 10^{10}$ CFU/ μg DNA) (Aune in Aachmann, 2010).

2.5.1 Elektroporacija

Zgodovinsko gledano je bila transformacija kot način vnosa tuje DNA v bakterijsko celico opisana predvsem pri proteobakterijah, firmikutih in aktinomicetah. Slednje velja tudi zato, ker so to v splošnem najbolje preučena bakterijska debla (Kyriides, 2009). Z razvojem novih in optimizacijo že poznanih metod so le-te doble večji obseg uporabe tako pri uporabi v osnovni mikrobiologiji kot tudi v aplikativni biotehnologiji (Aune in Aachmann, 2010).

Elektroporacija je sicer fizikalna metoda, pri kateri z izpostavitvijo celic električnim pulzom ustreznih parametrov dosežemo prepustnost celičnih membran. Prehodno povečano prepustnost membran dosežemo z vsiljenim transmembranskim potencialom, ki nastane pod vplivom zunanjega električnega polja. Ko doseže kritično vrednost in preseže določen prag, pride do prehodno povečane prepustnosti membran bakterijskih celic in zato lahko v celično notranjost vstopijo molekule, za katere je celična membrana sicer neprepustna. Pri določenih električnih pulzih je strukturalna sprememba celične membrane lahko začasna in reverzibilna. (Čemažar in sod., 2010). S tem olajšamo prehod eksogenih molekul, kot so DNA, RNA, beljakovine in drugih molekul, ki drugače ne morejo preiti pregrade (Prasanna in Panda, 1997).

Postopek v splošnem sestoji iz treh korakov, in sicer:

- priprava kompetentnih celic (z modifikacijo celičnih membran in povečanjem prepustnosti celične stene),
- šok celic (električni),
- okrevanje celic (Aune in Aachmann, 2010).

V splošnem velja, da je učinkovitost transformacije obratno sorazmerna z velikostjo in obliko plazmidne DNA, medtem ko je v primeru elektroporacije učinkovitost transformacije direktno proporcionalna koncentraciji vnešene molekule DNA in je neodvisna od velikosti in oblike DNA (Eynrd in sod., 1992). Za optimiziranje procesa je potrebno zadostiti nekaterim pogojem, ki jih lahko razdelimo v tri večje sklope: celični faktorji, fiziološko-kemijski dejavniki in parametri, ki so povezani z elektrokemijskimi lastnostmi. Med prve spadajo faza rasti, število celic v kulturi, premer celic, rigidnost celične stene in dovzetnost bakterijske celice za elektroporacijo. Med fiziološko-kemijske parametre štejemo temperaturo, vrednost pH, osmolarnost, koncentracijo ionov v elektroporacijskem pufru, koncentracijo DNA in razmere inkubacije pri elektroporaciji. Najpomebniji elektrokemijski parametri so optimalna moč električnega polja, kritična napetost, dolžina in število ponavljenih električnih pulzov (Prasanna in Panda, 1997).

Elektroporacija je hiter in tehnično nezahteven postopek, ki omogoča doseganje višje učinkovitosti transformacije v primerjavi z drugimi opisanimi kemijskimi metodami transformacije. Za bakterijsko vrsto *E. coli* velja, da učinkovitost transformacije doseže 10^8 –

10^9 transformant / μg , medtem ko z kemijskimi metodami doseže le od 10^5 – 10^6 transformant / μg plazmidne DNA. Postopek omogoča natančno določitev in uravnavanje električnih parametrov in hkrati izogib toksičnim učinkom kemikalij, ki pri nekaterih kemijskih metodah vnosa DNA ni mogoč. Ker je vstop DNA sočasen z električnim pulzom predinkubacija bakterijskih celic ni potrebna (Prasanna in Panda, 1997).

2.6 MOLEKULSKO KLONIRANJE

Leta 1952 je Joshua Lederberg prvič uporabil izraz "plazmid" za opis katerega koli bakterijskega genskega elementa, ki obstaja v zunajkromosomskem stanju vsaj v enemu delu svojega replikacijskega cikla. V ta opis so bili vključeni tudi bakterijski virusi, kar je bil tudi primarni razlog za potrebo po izpopolnjevanju prvotne definicije plazmida. Danes izraz "plazmid" opisuje izključno ali pretežno zunajkromosomske genske elemente, ki se avtonomno podvojujejo. Naravni plazmidi se zelo razlikujejo po fizikalnih značilnostih kot so velikost, geometrija (krožni ali linearji) ali število kopij v celici. Plazmidi so večinoma dvoverižne krožne molekule DNA, obstajajo pa tudi linearni plazmidi. Plazmidi kodirajo encime in druge proteine, ki v določenih razmerah celicam, ki jih imajo, omogočajo selektivno prednost v primerjavi s celicami, ki teh elementov nimajo. Pogosto so to zapisi za rezistenco proti antibiotikom, težkim kovinam, zapisi za sintezo antibiotikov, toksinov, virulenčnih dejavnikov ali zapisi za določene metabolne poti, ki omogočajo razgradnjo specifičnih substratov ali molekul. Številni plazmidi nosijo zapise za protirestričijske sisteme, ki ščitijo plazmidno DNA pri prvemu vstopu v bakterijsko celico. Majhna molekulska masa plazmida omogoča lažjo transformacijo kompetentnih celic in lažjo izolacijo le tega v večjih količinah. Poleg tega so manjši plazmidi manj dovetni za poškodbe in se v celicah nahajajo v večjem številu kopij (Woodall, 2003).

Plazmidna DNA predstavlja pomemben del razvoja na področju biotehnologije, prav tako pa predstavlja plazmidi grožnjo za okolje, saj so jih v nekaterih primerih povezali s širjenjem bolezni (Jain in Srivastava, 2013). Plazmidi so najpogosteje uporabljeni vektorji pri kloniranju. Vektorji so molekule DNA, s pomočjo katerih lahko umetno vnesemo tujo DNA v gostiteljsko celico, kjer se ta lahko podvojuje in/ali izraža. Metodo oblikovanja in vnosa rekombinantnih molekul DNA v molekularni biologiji imenujemo molekulsко kloniranje. Poleg plazmidov lahko opišemo še tri skupine vektorjev, virusni vektorji oz. bakteriofagi, kozmidi in umetni bakterijski kromosomi.

Osnovne značilnosti molekularnih vektorjev so:

- imajo sposobnost podvojevanja v gostiteljski celici (mesto ori),
- vsebuje selekcijski označevalec (npr. *amp* pri pUC-19),
- vsebujejo restriktivna mesta (poliklonsko mesto), v katerega se vključi fragment tujih DNA.

Z izrazom gostiteljsko območje plazmida pojmujemo skupino različnih mikroorganizmov, v katerih se plazmid lahko podvojuje in vzdržuje. Glede na velikost gostiteljskega območja delimo plazmide v dve skupini: na plazmide z ozkim in širokim gostiteljskim območjem (Datta in Hedges, 1972). Danes v skupino plazmidov s širokim gostiteljskim območjem uvrščamo tiste, ki se prenašajo in obdržijo v bakterijah iz različnih filogenetskih skupin (Top in sod., 1998). Plazmidi s širokim gostiteljskim območjem predstavljajo pomembno vlogo pri HGP in so vir genske informacije za izdelavo novih vektorjev. Omejitve pri prenosu plazmidov v nesorodne bakterije so: (a) interakcije na celični površini, ki lahko preprečijo učinkovit kontakt, ki je potreben za prenos plazmida, (b) restriktivni sistemi gostiteljske celice, ki lahko sprožijo razgradnjo tujih DNA, ali (c) plazmidi, ki se v gostiteljski celice ne podvojujejo. Mobilni plazmidi s širokim gostiteljskim območjem imajo velik pomen pri prenosu koristne genske informacije med populacijami določene bakterijske vrste in tudi izven same vrste. V takih primerih gre npr. za zapise za odpornost proti antibiotikom in kovinam, kvarterne amonijeve spojine (QACs), razgradnjo herbicidov (Smalla in sod., 2006; Schluter in sod., 2007; Don in Pemberton, 1981; Jain in Srivastava, 2013).

Dobro preučeni plazmidi bakterije *E. coli* – ColE1, p15A, pSC101 – pri katerih so bile za uporabo na področju molekulskega kloniranja potrebne le manjše spremembe, imajo pomankljivost in sicer ozko gostiteljsko območje. Trenutno je podatkovna zbirka o plazmidih s širokim gostiteljskim območjem majhna. Najbolj uporabljen plazmida s širokim gostiteljskim območjem, ki se lahko podvojujeta v različnih po Gramu negativnih in pozitivnih bakterijskih vrstah, sta plazmida pBBR1 in pWVO1 (Davison, 2002; Jain in Srivastava, 2013).

2.6.1 Plazmid pUC-19

Plazmid pUC-19 je 2.686 bp velik plazmidni vektor. Vsebuje gen *amp* z zapisom za odpornost proti ampicilinu in gen *lacZ* z zapisom za α -peptid β -galaktozidaze. Poliklonsko mesto se nahaja znotraj gena *lacZ* in omogoča α -komplementacijo (modro-beli test). Prepoznavna mesta za restriktivne endonukleaze izhajajo iz vektorja M13mp19. Mesto začetka podvojevanja *ori* izhaja iz vektorja pMB1 (minimalno mesto začetka podvojevanja *E. coli*). Vektor pUC-19 je v celicah v velikem številu kopij, kar je posledica odsotnosti gena *rop* in točkovne mutacije v genu *rep* znotraj mesta *ori*.

2.7 GENSKA TERAPIJA RAKA

2.7.1 Osnovni principi genske terapije raka

Rak je bolezen, ki nastane zaradi nepopravljive spremembe v celičnem jedru, mutacije genov, bodisi v telesnih ali v spolnih celicah. Spremenjene gene (mutacije) lahko podedujemo ali pa se pojavijo po rojstvu.

V zadnjih letih število raziskav na področju genske terapije raka narašča. Izraz genska terapija raka se nanaša na katerikoli postopek zdravljenja bolezni z gensko modifikacijo celic bolnika. Genski material, ki ga vnesemo v celice bolnika, so lahko geni, odseki gena ali oligonukleotidi. Terapijo lahko izvedemo *in vivo*, kjer gre za neposredno tretiranje tarčnih celic, ali s pristopom *ex vivo*. Pri slednjem celice gojimo in gensko spremenimo v nadzorovanem okolju, nato pa transgen ponovno vstavimo v gostitelja (pacienta). Transgen je gen ali genski material, ki ima potencial spremeniti fenotip gostiteljske celice. Po vstavitvi novega gena ali zapisa za beljakovine (transgen) v celični genom, take celice ponovno vstavimo v gostitelja. Tak pristop je enostavnejši, saj je manipulacija tarčnih celic tako lažja. Tarčne celice so zdrave ali rakave in bodisi celice imunskega odziva bodisi pluripotentne zarodne celice. Ko pride do vstopa transgena v obolelo celico, lahko le-ta povzroči njen propad ali obnovi normalno celično delovanje. Transgen lahko po vstopu v zdravo celico ščiti pred zastrupitvijo celic, povzročeno s strani zdravil, ali aktivira celični imunski odziv, kar ima za posledico uničenje rakave celice. Genska terapija raka torej vključuje modifikacijo rakavih, zdravih in/ali celic tumorskega mikrookolja. Raziskovalci pričakujejo, da bi v prihodnosti z gensko analizo tumorjev pripomogli k boljšem razumevanju in učinkovitejšem zdravljenju raka z uporabo genske terapije (Weigel-Van Aken, 2010; Niidome in Huang, 2002).

Pri genski terapiji raka gre za vnos genske informacije v celico z namenom zamenjave, popravila ali utišanja okvarjenega gena. Pogoste strategije, ki jih uporabljamo pri genski terapiji raka, so:

- utišanje izražanja onkogena ali prenos tumor-supresorskega gena,
- imunopotenciacija: povečanje imunskega odziva z vnosom genskih zapisov za citokine, kostimularne molekule in antigene,
- vnos samomorilskih genov (Weigel-Van Aken, 2010).

Tehnike vnosa DNA lahko delimo na virusne in nevirusne. Nevirusne tehnike vnosa lahko razdelimo v dve skupini:

- vnos gole DNA s fizikalnimi metodami, kot sta elektroporacija in biobalistična metoda,
- vnos DNA s pomočjo kemičnega nosilca, kot je na primer kationski polimer ali lipidna molekula (Niidome in Huang, 2002).

Najenostavnnejši in varen način vnosa gole plazmidne DNA je neposredno injiciranje. Do sedaj so tehniko neposrednega injiciranja uporabili na skeletni mišici, jetrih celicah, ščitnici, srčni mišici, uroloških organih ter koži in pri zdravljenju tumorjev (Nishikawa in Huang, 2001).

Povečanje učinkovitosti vnosa tuje DNA lahko dosežemo z uporabo različnih fizikalnih metod. Med te štejemo elektroporacijo, biobalistiko, ultrazvok, hidrodinamsko injiciranje in druge (Li in Ma, 2001). Vnos terapevtskega gena z elektroporacijo imenujemo elektrogenska terapija (EGT). Ta metoda združuje vnos/nanos plazmidne DNA v/na tkivo in lokalno uporabo električnih pulzov. EGT se lahko uporablja kot samostojna terapija ali v kombinacijah z drugimi načini zdravljenja raka (Čemažar in sod., 2010).

2.7.2 Interlevkin 12

Ena od metod za dostavo terapevtskih genov je EGT z IL-12, ki so jo do sedaj testirali na mnogih različnih tumorskih modelih. Z uporabo elektroporacije terapevtski gen dostavimo v tumorsko tkivo ali skeletno mišico (Čemažar in sod., 2010). Rezultati študije pri psih z rakom kažejo, da je intramuskularna EGT z IL-12 varna oblika zdravljenja in vodi v daljše obdobje brez bolezni (Čemažar, 2011; Pavlin in sod., 2011). Pred kratkim so Čemažar in sodelavci

(2015) objavili rezultate študije o učinkovitosti in varnosti uporabe elektrokemoterapije v kombinaciji z EGT s genom z IL-12. Rezultati so pokazali, da en mesec po terapiji ni stranskih učinkov, prav tako en teden po terapiji, v brisih odvzetih na različnih predelih psa in tudi na predelu nanosa terapevtskega plazmida, ni več zaznati prisotnosti plazmidne DNA.

Interlevkin 12 je heterodimerni protein iz dveh kovalentno povezanih podenot, 35 kDa velike lahke verige (p35 / IL-12 α) in 40 kDa velike težke verige (p40 / IL-12 β) (Kobayashi in sod., 1989). IL-12 je citokin, ki ima veliko vlogo pri povezovanju prirojenega in pridobljenega imunskega odziva (Trinchieri, 1995). Tvorijo ga fagociti, celice B, dendritične celice in domnevno tudi druge celice, ki pridejo v stik z infektivnimi agensi. IL-12 deluje na celice T in celice NK tako, da poveča produkcijo in aktivnost citotoksičnih limfocitov in inducira produkcijo citokinov, še posebej INF- γ (Ma in sod., 1996). INF- γ deluje neposredno na tumorske celice (in druge komponente tumorskih celic) s tem, da celicam T omogoči povečano prepoznavanje tumorskih celic preko molekul predstavitevnega kompleksa 1 (MHC 1) in s spremjanjem zunajceličnega matriksa. Posledica tega je zmanjšana stopnja angiogeneze in zavirana rast tumorja (Brunda in sod., 1993).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Laboratorijski sevi

Večina sevov (**Priloga C**), ki smo jih uporabili pri raziskavi, je trajno shranjenih in vključenih v zbirko EX-, ki je del Mreže infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani (MRICUL) in deluje v okviru IC Mycosmo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete v Ljubljani. Laboratorijske seve v **Prilogi C**, vir 2, smo pridobili iz DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Bakterije iz rodu *Sphingomonas* smo dobili iz vzorca jamskega srebra iz Pajšarjeve Jame pri Vrhniku.

3.1.2 Plazmidi

- pUC – 19 (genska karta v **Prilogi D**),
- pORF-hIL-12 G2 (genska karta v **Prilogi E**).

3.1.3 Gojišča

3.1.3.1 Tekoča gojišča

- Gojišče Luria-Broth (LB)

Tekočo gojišče LB smo pripravili tako, da smo 25 g gojišča LB raztopili v 1 l dH₂O in porazdelili v erlenmajerice. Gojišče smo sterilizirali s 15-minutnim avtoklaviranjem pri 121 °C in tlaku 1,23 bara.

- Gojišče 1,5 × LB

Tekočo gojišče 1,5 × LB smo pripravili tako, da smo 37,5 g LB raztopili v 1 l dH₂O in porazdelili v erlenmajerice. Gojišče smo sterilizirali s 15-minutnim avtoklaviranjem pri 121 °C in tlaku 1,23 bara.

➤ Gojišče "Brain-heart infusion" (BHI)

Tekče gojišče BHI smo pripravili tako, da smo 37 g gojišča BHI raztopili v 1 l dH₂O in porazdelili v erlenmajerice. Gojišče smo sterilizirali s 15-minutnim avtoklaviranjem pri 121 °C in tlaku 1,23 bara.

➤ Gojišče BM

Tekče gojišče BM sestoji iz 1 % peptona, 0,5% kvasnega ekstrakta, 0,1 % glukoze, 0,5 % NaCl in 0,1 % K₂HPO₄. Gojišče smo sterilizirali s 15-minutnim avtoklaviranjem pri 121 °C in tlaku 1,23 bara.

➤ Gojišče SOC

Obogatitveno gojišče SOC pripravimo tako, da v 1000 ml dH₂O raztopimo 30,7 g gojišča SOB. Raztopino steriliziramo s 15-minutnim avtoklaviranjem pri 121 °C in tlaku 1,23 bara in tik pred uporabo dodamo 40-odstotno glukozo (9,1 ml/l).

➤ Gojišče SMMP50

Gojišče sestoji iz pufra SMM, sestavine "Pannasy broth" in BSA (goveji serumski albumin). Vse tri raztopine smo redčili z dH₂O, ločeno avtoklavirali, in nato v laminariju sterilno pripravili končno gojišče v razmerju predstavljenem v **Preglednici 2**, kjer so prikazane tudi končne koncentracije sestavin gojišča.

Preglednica 2: Sestava gojišča SMMP50

delež (%)	raztopina	končna koncentracija in sestava
55	pufer SMM (pH 6,5)	1M saharoza, 0,04 M maleinska kislina, 0,04 M MgCl ₂
40	tekoče gojišče »Panassy broth«	7 g/l
5	goveji serumski albumin (BSA)	10 g/l

3.1.3.2 Trdna gojišča

➤ Minimalno gojišče

Za pripravo 10-kratne založne raztopine soli A, smo soli raztopili (**Preglednica 3**) v 1 l dH₂O. Sto ml založne raztopine soli A smo redčili v 200 ml dH₂O in 15 minut avtoklavirali pri 121 °C in tlaku 1,23 bara. Posebej smo raztopili 12 g agarja v 700 ml dH₂O in raztopino sterilizirali z avtoklaviranjem. Tako pripravljeni in ohlajeni raztopini smo združili in sterilno dodali 5 ml raztopine 40-odstotne glukoze in nato minimalno gojišče razlili v petrijevke.

Preglednica 3: Založna raztopina 10×A

sol	količina (g)
(NH ₄) ₂ SO ₄	10
K ₂ HPO ₄	105
KH ₂ PO ₄	45
Na-citrat × 5 H ₂ O	5
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	1

➤ Gojišče LB

Pri pripravi trdnih gojišč smo osnovnim sestavinam pred avtoklaviranjem dodali še 15g/l agarja. Gojišče, ohlajeno v kopeli do 55 °C smo razlili v sterilne petrijevke. Uporabljali smo tudi trdna gojišča z dodatkom ampicilina s končno koncentracijo 110 µl/ml (180 µl/ml pri določanju transformant *E. hermannii*).

➤ Gojišče BHI

Pri pripravi trdnih gojišč smo osnovnim sestavinam pred avtoklaviranjem dodali še 15 g/l agarja. Gojišče, ohlajeno v kopeli do 55 °C smo razlili v sterilne petrijevke. Uporabljali smo tudi trdna gojišča z dodatkom ampicilina v končni koncentracijo 110 µl/ml.

➤ Gojišče BM

Pri pripravi trdnih gojišč smo osnovnim sestavinam pred avtoklaviranjem dodali še 15 g/l agarja. Gojišče, ohlajeno v kopeli do 55 °C, smo razlili v sterilne petrijevke. Uporabljali smo tudi trdna gojišča z dodatkom ampicilina s končno koncentracijo 110 µl/ml.

3.1.4 Kemikalije

Preglednica 4: Seznam uporabljenih kemikalij

<u>proizvajalec</u>	<u>kemikalije</u>
Acros organic, ZDA	saharoza
Biolife, Italija	Gojišče BHI
Difco laboratories, ZDA	Gojišče "Pannasy broth"
Fermentas, Kanada	standardna lestvica fragmentov DNA: "1kb DNA Ladder" (GeneRuler™) nanšalni pufer 6× DNA "Loading Dye"
Fluka ag., Švica	lizocim
Honeywell Riedel-de Haen®, Nemčija	borova kislina
InvivoGen, Francija	plazmid pORF-hIL-12 G2
Kemika, Hrvaška	EDTA
Merck, Nemčija	glukoza 96-odstotni etanol kalijev hidrogen fosfat (K2HPO4) magnezijev sulfat heptahidrat ($MgSO_4 \times 7H_2O$) natrijev klorid (NaCl) $MgCl_2 \times 6 H_2O$
Milipor, Policlinica s.r.l., Italija	miliQ 100-odstotni glicerol agar agaroza
Roth, Nemčija	borova kislina gojišče SOB tris baza ampicilin etidijev bromid gojišče LB ("Luria broth medium") BSA maleinska kislina
SIGMA Life Scinece, ZDA	

3.1.5 Komercialni kompleti

- "EndoFree® Plasmid Maxi, Mega, Giga Kits"
- "Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit" – Fermentas LIFE Sciences, Kanada

3.1.6 Pufri, raztopine in reagenti

- 5-kratni pufer TBE

Za pripravo založne raztopine pufra $5\times$ TBE smo v 800 ml destilirane vode dodali 54 g baze Tris, 27,5 g borove kisline in 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8) in dopolnili volumen pufra z destilirano vodo do 1 l.

- 0,5 M EDTA (pH 8,0)

0,5 M EDTA z vrednostjo pH 8 smo pripravili tako, da smo 93,6 mg EDTA raztopili v 500 ml vode in umerili vrednost pH z 10 mM NaOH.

- Nanašalni elektroforezni pufer (0,25-odstotno bromofenol modro, 0,25-odstotni ksilencianol, 40-odstotna saharoza)
- Etidijev bromid (10 mg/ml).

3.1.7 Encimi

- EcoRI (Fermentas)

3.1.8 Pribor in oprema

Preglednica 5: Uporabljena laboratorijska oprema in pribor

proizvajalec	laboratorijska oprema in pribor
Kambič, Slovenija	avtoklav
Eppendorf , Nemčija	avtomatske pipete
Hettich, Anglija	centrifuga ROTANTA 460R
Biostea, Golias labortechnika, Slovenija	cepilne zanke za enkratno uporabo (1 µl, 10 µl)
Consort, Belgija	aparatura "Electrophoresis power supply consort" (300 V - 500 mA) E835
Amersham Biosciences, Velika Britanija	kadičke za elektroforezo Hoefer™-HE33 (mini horizontal submarine unit)
Eppendorf, Nemčija	elektroporacijske kivete 1 mm
Eppendorf, Nemčija	elektroporator 2510
Sartorius AG, Nemčija	filter za sterilizacijo CA-MEMBRANE 0,20µm
Brand, Nemčija in ratiolab®, Nemčija	hladilnike (4 °C) in zamrzovalnike (-20 °C in -75 °C); kivete (1,5 ml PS)
IKA, Kitajska	kuhalo CL4 TRONIC®;
Gorenje, Slovenija	laboratorijska steklovina - erlenmajerice, merilni valji, čaše;
Eppendorf, Nemčija	laboratorijske rokavice za enkratno uporabo;
Eppendorf, Nemčija	magnetno mešalo IKA® RCT Standard
Biostea, Golias labortechnika, Slovenija	mikrovalovna pečica
Tlos, Hrvaška	namizna centrifuga Eppendorf 29571 MiniSpin Plus
Thermo Scientific, Velika Britanija	namizna centrifuga Eppendorf 5417C
New brunswick scientific, ZDA	nosilca za vlivanje agaroznega gela in glavnike za jamice
KernPFB, Nemčija;	plastične petrijevke
KernPFB, Nemčija;	plinski gorilnik
Sutjeska, Srbija	NanoDrop ND - 1000
Biostep, Nemčija	stresalnik Platform shaker innova™ 2300
St John's innovation centre, Anglija	Tehtnica
Perkin Elmer, ZDA	Tehtnica
Sarstedt, Nemčija	termostatska komora (30 °C)
Golias labortechnika, Slovenija	transiluminator BIOView UV light UXDT-20ML-15R
	transiluminator UVItec Limited 230V – 50/60 Hz UV radiation
	spektrofotometer UV/VIS (Lambda Bio)
	mikrocentrifugirke 2 ml
	mikrocentrifugirke 1,5 ml

3.2 METODE DELA

3.2.1 Transformacija

3.2.1.1 Transformacija izbranih sevov z metodo elektroporacije

V 10 ml tekočega gojišča LB smo vcepili polno cepilno zanko bakterijske kulture in sicer iz trdnega gojišča LB. Kulturo smo inkubirali preko noči na rotacijskem stresalniku pri 180 vrt./minuto in temperaturi 37 °C (pri sevih z nižjo optimalno temperaturo rasti pa pri 30 °C). Naslednji dan smo razredčili 0,5 ml prekonočne kulture v 150 ml tekočega gojišča LB in ponovno inkubirali na rotacijskem stresalniku pri 37 °C (pri sevih z nižjo optimalno temperaturo rasti pa pri 30 °C). Ko je optična gostota kulture pri OD₆₀₀ dosegla vrednost 0,5–0,6, smo kulturo za 15 minut postavili v ledeno kopel. Za bakterijsko vrsto *Erwinia chrysanthemi* smo uporabili tekoče gojišče BHI. Kulturo smo v predhodno ohlajenih centrifugirkah centrifugirali 20 min pri 5000 x g (Hettich, Anglija centrifuga ROTANTA 460R) in temperaturi 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo gojišče odlili in usedlino resuspendirali v 250 µl hladne vode MilliQ. Vsako centrifugirko smo spirali s 25 ml ohlajene vode MilliQ. Spiranje smo ponovili dvakrat. Po zadnjem spiranju smo MilliQ vodo odlili in usedlino resuspendirali v preostanku MilliQ vode. Iz vsake centrifugirke smo bakterijske celice prenesli v ohlajeno mikrocentrifugirko in centrifugirali 10 min pri 10000 vrt./minuto (namizna centrifuga Eppendorf 29571 MiniSpin Plus) pri temperaturi 4 °C. Usedline smo združili v skupen končni volumen 100 µl. Kulture smo razmazali na trdna gojišča LB (pri bakterijski vrsti *E. chrysanthemi* trdno gojišče BHI) za določitev števila kompetentnih celic.

Elektroporacijo celic smo naredili tako, da smo k 40 µl kompetentnih celic dodali 15.92 ng/µl plazmidne DNA. Transformacijsko mešanico smo premešali s konico nastavka za avtomatsko pipeto in jo odpipetirali v predhodno ohlajeno kiveto, ki smo jo vstavili v elektroporator, kjer smo celice izpostavili električnemu pulzu (1700 V). Po elektroporaciji smo takoj dodali 1 ml gojišča SOC in inkubirali s stresanjem 30–60 minut pri temperaturi 37 °C. Nato smo bakterijske kulture razmazali na trdna gojišča LB z dodanim ampicilinom (za ugotavljanje števila/deleža transformiranih celic). Vse nacepljene plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C (pri sevih z nižjo optimalno temperaturo rasti pa pri 30 °C).

Frekvenco in učinkovitost transformacije smo določili s štetjem dobljenih kolonij po enačbah:

- frekvenca transformacije = število transformant (LB_{Ap110}) / število vseh celic (LB),
- učinkovitost transformacije = število transformant (LB_{Ap110}) / koncentracija plazmidne DNA [ng/ μ l].

3.2.1.2 Transformacija seva iz rodu *Staphylococcus* z elektroporacijo

En mililiter prekonočne kulture smo razredčili v 100 ml tekočega gojišča BM in inkubirali pri 30 °C dokler optična gostota kulture pri OD₅₇₈ ni dosegla vrednosti med 0,5 in 0,65. Sledilo je spiranje celic z 10-odstotnim glicerolom, in sicer najprej z enkratim volumnom, nato še s polovičnim, z eno dvajestino volumna in na koncu z eno petdesetino volumna celic. Spiranje je potekalo pri sobni temperaturi, z vmesnim centrifugiranjem in odstranjevanjem supernatanta. Na koncu smo centrifugirali 3 minute pri 10000 obr./min in odstranili superntant. Vse celice smo združili v 100 μ l 10-odstotnega glicerola. Deset μ l smo odvzeli za pripravo redčitvene vrste za štetje kompetentnih celic. Po 40 μ l celic smo tretirali s terapevtskim plazmidom in 40 μ l s kontrolnim plazmidom (koncentracija obeh plazmidov je bila 15,92 ng/ μ l). Celice smo izpostavili električnemu pulzu 1800 V. Po elektroporaciji smo celicam dodali 1 ml SMMP50 in jih 90 minut inkubirali na stresalniku pri 37 °C. Redčitveno vrsto smo nanesli na trdna gojišča BM z ampicilinom (110 μ g/ml) in plošče inkubirali 20 ur pri 37 °C.

3.2.1.3 Transformacija neobdelanih celic seva DH5 α s plazmidnima vektorjema pORF-hIL-12 G2 in pUC-19

V 10 ml tekočega gojišča LB smo vcepili polno cepilno zanko kulture iz trdnega gojišča LB. Kulturo smo inkubirali preko noči na rotacijskem stresalniku pri 150 vrt./minuto in temperaturi 37 °C (pri sevih z nižjo optimalno temperaturo rasti pa pri 30 °C). Naslednji dan smo 1 ml prekonočne kulture razredčili v 100 ml 1,5-kratnega tekočega gojišča LB in ponovno inkubirali na rotacijskem stresalniku pri 30 °C. Ko je optična gostota kulture pri OD₆₀₀ dosegla vrednost 1,5, smo porazdelili po 500 μ l v mikrocentrifugirke in bakterijske celice posedli s 5-minutnim centrifugiranjem pri 14.000 vrt./min (namizna centrifuga Eppendorf 5417C). Štiristopedeset μ l supernatanta smo zavrgli in celično usedlino resuspendirali v preostalem volumnu. Tako pripravljenim celicam smo dodali plazmid v nizki (3 ng/ μ l), ali visoki (30 ng/ μ l) koncentraciji. Za določanje transformant smo kulture razmazali na trdna gojišča LB z dodanim ampicilinom (110 μ g/ml). Vse nacepljene plošče smo

inkubirali dva dni pri 30 °C. Vzporedno smo določali število kompetentnih celic na trdnem gojišču LB brez dodanega antibiotika.

3.2.1.4 Transformacija neobdelanih celic, izvedena po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012)

V 10 ml tekočega gojišča LB smo vcepili polno cepilno zanko kulture iz trdnega gojišča LB. Kulturo smo inkubirali preko noči na rotacijskem stresalniku pri 150 vrt./minuto in temperaturi 37 °C ali 30 °C, odvisno od temperaturnega optimuma rasti bakterijske vrste. Naslednji dan smo 1 ml prekonočne kulture razredčili v 100 ml 1,5-kratnega tekočega gojišča LB in ponovno inkubirali na rotacijskem stresalniku pri 30 °C. Ko je optična gostota kulture dosegla vrednost 1,5 pri OD₆₀₀, smo v intervalih po 500 µl kulture oborili. Štiristopedeset µl supernatanta smo zavrgli in celično usedlino resuspendirali v preostalem volumnu (50µl). Tako pripravljenim celicam smo dodali 30-70 ng/µl (začetne ponovitve protokola z bakterijo *E.coli* DH5α), kasneje pa 3-7 ng/µl plazmidne DNA. Nato smo kulture razmazali na trdna gojišča LB z 5-odstotnim agarjem z dodanim ampicilinom (200 µg/ml, za določitev transformiranih celic). Vse nacepljene plošče smo inkubirali dva dni pri 30 °C. Vzporedno smo določali število kompetentnih celic na trdnem gojišču LB brez dodanega antibiotika.

Frekvenco transformacije smo izračunali po sledeči formuli:

- frekvenca = št.transformant ($LB5\%_{agarAp} \times 20$) / CFU/ml(LB) × 10,
medtem, ko smo učinkovitost transformacije izračunali na naslednji način
- učinkovitost = št. transformant ($LB5\%_{agarAp} \times 20$) / konc. plazmida (ng/µl).

3.2.1.5 Preverjanje prevzema plazmida pri predhodno neobdelanih baterijskih celicah v mikrotitrski plošči

V mikrotitrsko ploščo smo brez gojišča vnesli kulture testnih sevov in jim dodali 0,7 µl terapevtskega plazmida in 0,5 µl kontrolnega plazmida, oba redčena tako, da je bila delovna koncentracija plazmidne DNA 16 ng/µl. Mikrotitrsko ploščo smo preko noči inkubirali pri 30 °C. Tako inkubiranim celicam smo naslednji dan dodali 50 µl 0,8-odstotne raztopine NaCl in s cepilno zanko razmazali na selekcijska gojišča. Plošče smo inkubirali preko noči pri optimalni temperaturi rasti seva (**priloga C**). Sev, pri katerem se je pri razmazu do posamezne kolonije pojavila rast, smo nacepili v tekoče gojišče z antibiotikom za potrditveni test (izolacija plazmidne DNA).

3.2.1.6 Preverjanje prevzema plazmida pri predhodno neobdelanih bakterijskih celicah na različnih trdnih gojiščih

Ploščo s trdim gojiščem smo na zunanji strani s flomastrom razdelili na šest delov. Na vsak del gojišča smo nacepili bakterijsko kultruro pri čemer je en del predstavljal kontrolo, kamor nismo dodali plazmidne DNA. Ostalim petim nacepljenim bakterijskim kulturam pa smo v časovnih zamikih dodajali plazmidno DNA. Slednjo smo celicam dodali takoj, po sedemnajstih, petindvajsetih, dvainštiridesetih in petdesetih urah. Koncentracija plazmidne DNA, s katero smo tretirali celice, je bila 16ng/µl. Po dodatku plazmida smo polovico kolonije razmazali na selekcijsko gojišče (LB z dodanim ampicilinom) in inkubirali pri optimalni temperaturi rasti (**Priloga C**). Prevzem plazmidne DNA na trdem gojišču smo testirali na štirih gojiščih z različno sestavo: LB, MG, MG z dodanim 2,5g/l LB in LB s 5-odstotnim agarjem.

3.2.2 Potrditveni testi

3.2.2.1 Izolacija plazmidne DNA z detergentoma CTAB in tritonom X-100

Pri tej metodi smo plazmidno DNA izolirali iz tekočega gojišča. V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 1,3 ml prekonočne kulture (gojišču je bila dodana ustrezna koncentracija antibiotika za vzdrževanje selekcijskega pritiska) in centrifugirali 3 minute pri 14.000 vrt./minuto (namizna centrifuga Eppendorf 5417C). Nato smo odstranili supernant in preostanku dodali 200 µl pufra STET. Tako resuspendiranim bakterijskim celicam smo dodali 4 µl lizocima, inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi in jih nato 45 sekund inkubirali še pri 100 °C. Sledilo je 10 minutno centrifugiranje pri 14.000 vrt./minuto (namizna centrifuga Eppendorf 5417C). Oborino v mikrocentrifugirki smo nato resuspendirali v 300 µl 1,2 M NaCl in dodali 750 µl 96-odstotnega etanola. Sledilo je centrifugiranje v namizni centrifugi, 10 minut pri 14.000 vrt./minuto (namizna centrifuga Eppendorf 5417C). Nato smo supernatant zavrgli in nadaljevali obarjanje DNA še z 80-odstotnim etanolom. Po centrifugiranju smo previdno odstranili vse ostanke etanola in odprto mikrocentrifugirko posušili pri 37 °C. Tako izolirano plazmidno DNA smo raztopili v 20 µl pufra TE z RNazo A (20 µg/ml) in do nadaljne uporabe plazmidno DNA hranili pri -20 °C.

3.2.2.2 Izolacija plazmidne DNA z alkalno hidrolizo

V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 1,3 ml prekonočne kulture (gojišču je bila dodana ustrezna koncentracija antibiotika za vzdrževanje seleksijskega pritiska) in centrifugirali 1 minuto pri 12.0000 vrt./minuto (namizna centrifuga Eppendorf 5417C). Previdno smo odstranili ves supernatant in bakterijski usedlini dodali 100 µl ledeno hladne raztopine I (**Preglednica 6**). Tako resuspendirano bakterijsko kulturo smo nato v ledeni kopeli inkubirali 5 minut. Po inkubaciji smo dodali 200 µl raztopine II (**Preglednica 6**), premešali in mikrocentrifugirko inkubirali nadaljnih 5 do 10 minut v ledeni kopeli. Nato smo dodali 150 µl ledeno hladne raztopine III (**Preglednica 6**) in ponovno inkubirali v ledeni kopeli 3 do 5 minut. Sledilo je centrifugiranje pri 12.000 vrt./minuto (namizna centrifuga Eppendorf 29571 MiniSpin Plus) in sicer 15 minut pri 4 °C. Od pipetiranem volumnu dobljenega supernatanta smo dodali enak volumen mešanice fenol/kloroform/izoamilalkohol (v razmerju 25 : 24 : 1). Ponovno je sledilo 5 minutno centrifugiranje pri sobni temperaturi. Zgornjo vodno plast smo odpipetirali v sterilno mikrocentrifugirko in dodali enak volumen mešanice kloroform/izoamilalkohol (v razmerju 24 : 1). Ponovno je sledilo centrifugiranje v namizni centrifugi. Dobljeno zgornjo vodno plast smo nato ponovno odpipetirali v sterilno mikrocentrifugirko in dodali dva-kratni volumen 96-odstotnega etanola. Usedlino smo nato splagnili s 500 µl 80-odstotnega etanola, centrifugirali 5 minut pri 10.000 vrt./minuto (namizna centrifuga Eppendorf 5417C) in popolnoma odstranili ves ostanek etanola. Tako izolirano plazmidno DNA smo raztopili v 20 µl pufra TE z RNazo A (20 µg/ml) in do nadaljnje uporabe plazmidno DNA hrаниli pri –20 °C.

Preglednica 6: Sestava raztopin I, II, III

Raztopina	Sestava
Raztopina I	50 mM glukoza, 25 mM Tris-Cl (pH 8), 10mM EDTA (pH 8)
Raztopina II	0,2 M NaOH, 1% SDS
Raztopina III	5 M kalijev acetat, ledocetna kislina, destilirana voda

3.2.2.3 Izolacija plazmidne DNA s komercialnim kompletom »QIAprep® Spin Miniprep Kit«

Za izolacijo plazmidne DNA iz pridobljenih transformant smo uporabili kompletni »QIAprep® Spin Miniprep Kit« (Fermentas) po navodilih proizvajalca. Do nadaljnje uporabe smo plazmidno DNA shranili pri –20 °C. Koncentracijo plazmidne DNA smo izmerili z aparaturom NanoDrop.

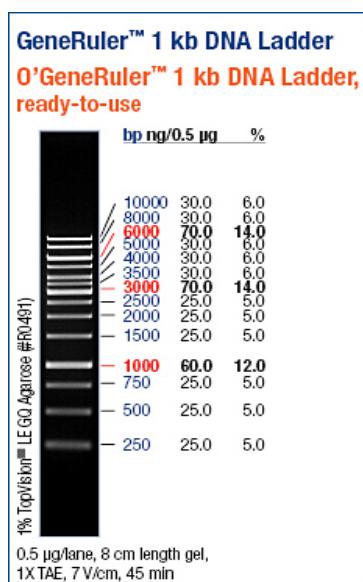
3.2.2.4 Restrikcija izolirane plazmidne DNA

Uspešnost izolacije plazmidne DNA smo potrdili z analizo restriktivnega profila. Uporabili smo encim *EcoRI*, ki ima v primeru terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 G2 dve restriktivni mesti, kontrolni plazmid pUC-19 pa vsebuje le eno restriktivno mesto. V 1,5-ml mikrocentrifugirki smo pripravili po 10 µl restriktivne mešanice (1 µl pufra, 1 µl encima in 8 µl DNA). Restriktivno mešanico smo inkubirali 1–1,5 ure v vodni kopeli, segreti na 37 °C. Po končani restriktiji smo restriktivni profil nanesli na 1-odstotni agarozni gel in izvedli gelsko elektroforezo.

3.2.2.5 Agarozna gelska elektroforeza

Restriktivno mešanico smo nanašali v jamice 1-odstotnega gela, ki smo ga pripravili tako, da smo zatehtali 0,3 g agaroze in jo raztopili v 30 ml 1x pufra TBE. Ko se je gel ustrezno ohladil, smo dodali etidijev bromid v končni koncentraciji 0,5 µl/ml ter gel vlili v nosilec. Vsi postopki gelske elektroforeze so tekli pri 10 V/cm. Vedno smo v prvo jamico vnesli velikostni standard (lestvico DNA »GeneRuler 1 kb DNA Ladder«), sledila je pozitivna kontrola in nato vzorci.

Spodnja slika prikazuje velikostni standard DNA (lestvico DNA »GeneRuler 1 kb DNA Ladder«), ki vsebuje fragmente sledeče velikosti (v baznih parih): 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250.



1. Slika 2: Lestvica DNA »O'GeneRuler 1kb DNA Ladder - 250-10,000 bp« (Fischer Scientific, 2015).

4 REZULTATI

4.1 UGOTAVLJANJE FREKVENCE IN UČINKOVITOSTI ELEKTROTRANSFORMACIJE S TERAPEVTSKIM PLAZMIDOM pORF-hIL-12 G2 IN KONTROLNIM PLAZMIDOM pUC-19, IZVEDENE PO PROTOKOLU ZA SEV *E. coli* DH5 α

Pri osemnajstih preučenih sevih smo opredelili frekvenco in učinkovitost prenosa plazmidne DNA z elektroporacijo. Pri tem smo uporabili koncentracijo plazmidne DNA 16 ng/ μ l. Rezultati so podani v **Preglednici 7**.

Preglednica 7: Frekvanca in učinkovitost elektroporacije pri izbranih sevih

Bakterijski sevi	Frekvence pORF-hIL-12 G2	Učinkovitost pORF-hIL-12 G2	Frekvence pUC-19	Učinkovitost pUC-19
<i>E. coli</i> DH5 α	$2,02 \times 10^{-6}$	$9,57 \times 10^2$	$1,32 \times 10^{-5}$	$6,24 \times 10^3$
	$5,43 \times 10^{-7}$	$2,36 \times 10^2$	$1,70 \times 10^{-6}$	$7,35 \times 10^2$
<i>Escherichia hermannii</i>	$4,47 \times 10^{-6}$	$6,40 \times 10^3$	$1,81 \times 10^{-3}$	$2,59 \times 10^6$
	$1,44 \times 10^{-7}$	$6,28 \times 10^2$	$5,21 \times 10^{-4}$	$2,27 \times 10^6$
<i>Buttiauxella</i> sp.	$9,92 \times 10^{-6}$	$7,54 \times 10^3$	$2,11 \times 10^{-5}$	$1,60 \times 10^4$
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	$1,31 \times 10^{-5}$	$6,53 \times 10^3$	$4,16 \times 10^{-4}$	$2,08 \times 10^5$
<i>Salmonella typhimurium</i>	$8,16 \times 10^{-5}$	$1,16 \times 10^5$	neštevno	neštevno
	$4,97 \times 10^{-6}$	$1,98 \times 10^4$	$2,21 \times 10^{-5}$	$1,41 \times 10^6$
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizona</i>	$1,38 \times 10^{-8}$	$1,10 \times 10^1$	$1,60 \times 10^{-3}$	$1,28 \times 10^6$
<i>Salmonella enteritidis</i>	$8,52 \times 10^{-6}$	$7,41 \times 10^3$	$2,77 \times 10^{-4}$	$2,41 \times 10^5$
<i>Proteus vulgaris</i>	$4,01 \times 10^{-6}$	$1,68 \times 10^3$	$4,92 \times 10^{-4}$	$2,06 \times 10^5$
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	$3,64 \times 10^{-9}$	2,51	$8,18 \times 10^{-9}$	5,65
<i>Yersinia</i> sp.	$1,62 \times 10^{-4}$	$1,92 \times 10^5$	$2,07 \times 10^{-4}$	$2,45 \times 10^5$
<i>Providencia</i> sp.	$3,89 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^4$	$4,34 \times 10^{-3}$	$1,12 \times 10^6$
<i>Providencia rettgeri</i>	$4,50 \times 10^{-7}$	$1,70 \times 10^1$	$9,83 \times 10^{-5}$	$3,71 \times 10^3$
<i>Enterobacter amnigenus</i> biogroup2	$2,62 \times 10^{-7}$	$7,64 \times 10^2$	$2,17 \times 10^{-4}$	$6,35 \times 10^5$
<i>Shigella boydii</i>	$7,51 \times 10^{-4}$	$4,84 \times 10^4$	$1,56 \times 10^{-3}$	$1,01 \times 10^5$
<i>Shigella sonnei</i>	$4,53 \times 10^{-4}$	$1,02 \times 10^5$	$2,88 \times 10^{-3}$	$6,47 \times 10^5$
<i>Herbaspirillum frisingense</i>	$8,82 \times 10^{-6}$	$1,39 \times 10^1$	$6,86 \times 10^{-6}$	$1,08 \times 10^1$
<i>Sphingomonas</i> sp.	$5,26 \times 10^{-10}$	1,26	$5,26 \times 10^{-10}$	1,26
<i>Staphylococcus</i> sp.	NT		NT	
<i>Mycobacterium</i> sp.	NT		NT	

NT - ni transformant

Kot je razvidno iz **Preglednice 7**, pri sevih iz rodov *Staphylococcus* in *Mycobacterium* transformante po elektroporaciji s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 G2 niso zrasle. Kot referenčni sev smo uporabili laboratorijski sev *E. coli* DH5 α . Frekvanca transformacije je bila v tem primeru v razponu med 10^{-6} do 10^{-7} transformant/ml, povprečna učinkovitost transformacije pri sevu iz vrste *E. coli* DH5 α pa $6,09 \times 10^2$ transformant/ μ g plazmidne DNA. Najvišjo frekvenco transformacije, v razponu med 10^{-4} – 10^{-5} transformant/ml smo dobili pri

sevih iz vrst in rodov *S. boydii*, *S. sonnei*, *Yersinia*, *Providencia*, *S. enterica* subsp. *enterica*. V padajočem vrstnem redu sledijo sevi iz vrst oz. rodov *Buttiauxella*, *H. frisingense*, *S. enteritidis*, *S. typhymurium*, *E. hermannii*, *P. vulgaris*, *P. rettgeri* in *E. amnigenus*. Najnižjo frekvenco transformacije smo ugotovili pri sevih *S. enterica* subsp. *arizona* $1,38 \times 10^{-8}$ transformant/ml, pri bakteriji *E. chrysanthemi* $3,64 \times 10^{-9}$ transformant/ml in pri sevu iz rodu *Sphingomonas*, $5,26 \times 10^{-10}$ transformant/ml.

Pri elektroporaciji bakterijskih celic s kontrolnim plazmidom pUC-19 prav tako niso zrasle transformante sevov iz rodov *Staphylococcus* in *Mycobacterium*. Pri bakteriji *E.coli* DH5α je ugotovljena frekvenca transformacije s pUC-19 $1,32 \times 10^{-5}$ in $1,70 \times 10^{-6}$ transformant/ml. Ugotovljena učinkovitost transformacije pa $6,24 \times 10^3$ in $7,35 \times 10^2$ transformant/ μg pUC-19. Najvišjo frekvenco transformacije, v velikostnem razredu 10^{-3} transformant/ml, smo ugotovili pri bakterijah iz vrst in rodov *E. hermannii*, *S. enterica* subsp. *arizona*, *Providencia*, *S. boydii* in *S. sonnei*. Sledijo *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enteritidis*, *P. vulgaris*, *Yersinia*, *E. amnigenus* s frekvenco transformacije v velikostnem razredu 10^{-4} transformant/ml. V razponu med 10^{-5} in 10^{-6} transformant/ml padajoče sledijo bakterijski sevi iz vrst in rodov *S. typhymurium*, *Buttiauxella*, *P. rettgeri* in *H. frisingense*. Najnižjo frekvenco transformacije smo ugotovili pri pri bakterijah *E. chrysanthemi*, $8,18 \times 10^{-9}$ transformant/ml ter pri bakteriji iz rodu *Sphingomonas*, $5,26 \times 10^{-10}$ transformant/ml.

Kot je razvidno iz **Preglednice 7**, smo najnižjo učinkovitost transformacije s pORF-hIL-12 G2 ugotovili pri sevu iz rodu *Sphingomonas* in *E. chrysanthemi*. Velikostni razred med 10^1 in 10^3 transformant/ μg pORF-hIL-12 G2 smo ugotovili pri bakterijah iz vrst in rodov *S. enterica* subsp. *arizona*, *P. rettgeri*, *H. frisingense*, *E. amnigenus*, *E. hermannii*, *Buttiauxella*, *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enteritidis* in *P. vulgaris*. V velikostnem razponu med 10^4 in 10^5 transformant/ μg pORF-hIL-12 G2 si po učinovitosti transformacije od manjše do večje sledijo bakterijske vrste: *Providencia*, *S. boydii*, *S. typhymurium*, *S. sonnei* in bakterija iz rodu *Yersinia* z najvišjo učinkovitostjo transformacije $1,92 \times 10^5$ transformant/ μg pORF-hIL-12 G2.

Pri kontrolnem plazmidu smo prav tako ugotovili najnižjo učinkovitost transformacije bakterij iz rodu *Sphingomonas* in vrste *E. chrysanthemi*. Sledita bakterijski vrsti *H. frisingense* ($1,08 \times 10^1$ transformant/ μg pUC-19) in *P. rettgeri* ($3,71 \times 10^3$ transformant/ μg pUC-19). Učinkovitost transformacije sevov iz rodu *Buttiauxella* je bila $1,60 \times 10^4$ transformant/ μg

pUC-19. V razponu učinkovitosti transformacije med 10^5 in 10^6 transformant/ μg pUC-19 sledijo bakterije iz vrst in rodov *S. boydii*, *S. sonnei*, *E. amnigenus*, *Yersinia*, *P. vulgaris*, *S. enteritidis*, *S. enterica* subsp. *enterica*, *E. hermannii*, *S. typhymurium*, *S. enterica* subsp. *arizonae* in *Providencia*.

4.2 UGOTAVLJANJE FREKVENCE IN UČINKOVITOSTI ELEKTROTRANSFORMACIJE S TERAPEVTSKIM IN KONTROLNIM PLAZMIDOM, IZVEDENE PO PROTOKOLU ZA VRSTE RODU *Staphylococcus*

Elektroporacija seva iz rodu *Staphylococcus* po protokolu za vrste rodu *Staphylococcus* s plazmidoma pORF-hIL-12 G2 in pUC-19 ni bila uspešna.

4.3 UGOTAVLJANJE FREKVENCE IN UČINKOVITOSTI TRANSFORMACIJE IZVEDENE S TERAPEVTSKIM PLAZMIDOM pORF-hIL-12 G2 IN KONTROLNIM PLAZMIDOM pUC-19 PO PROTOKOLU, KI SO GA OPISALI ZHANG IN SOD. (2012)

Laboratorijskemu sevu *E. coli* DH5 α in izbranim dvajsetim sevom (**Priloga C**) smo opredelili frekvenco in učinkovitost prenosa plazmidne DNA izvedebem po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012). Rezultati so podani v **Preglednicah 11 in 12**. Pri tem sta bili uporabljeni dve različni koncentraciji plazmidne DNA in različno sušeni gojišči (glej **Preglednico 8**).

Preglednica 8: Pojasnitev oznak, uporabljenih po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012)

oznaka	opis
VI	Plošča, posušena v laminariju, dodana visoka koncentracija plazmida (30 ng/ μl)
VII	Plošča, sušena 24 ur pri 37 °C, dodana visoka koncentracija plazmida (30ng/ μl)
NI	Plošča, posušena v laminariju, dodana nizka koncentracija plazmida (3 ng/ μl)
NII	Plošča, sušena 24 ur pri 37 °C, dodana nizka koncentracija plazmida (3 ng/ μl)

Najprej smo po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012), transformirali laboratorijski sev *E. coli* DH5 α v štirih ponovitvah (**Preglednici 9 in 10**). Najnižjo frekvenco transformacije *E. coli* DH5 α s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 G2, $9,23 \times 10^{-9}$ transformant/ml, smo ugotovili za bakterije, ki so zrasle na ploščah, sušenih pri 37 °C ob dodatku nižje koncentracije plazmida (3 ng/ μl) v transformacijsko mešanico. Najvišjo frekvenco transformacije *E. coli* DH5 α , $1,16 \times 10^{-7}$ transformant/ml, pa smo ugotovili za bakterije, ki so

zrasle na ploščah, sušenih pri 37 °C, ob dodatku višje koncentracije plazmida (30 ng/µl) v transformacijsko mešanico. Ugotovljena učinkovitost transformacije s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 G2 so je gibala med 3,33 in $1,53 \times 10^2$ transformant/µg plazmidne DNA. Najvišjo učinkovitost transformacije *E. coli* DH5α s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 G2, smo ugotovili na ploščah, sušenih pri 37 °C, ob dodatku nižje koncentracije plazmida (3 ng/µl) v transformacijsko mešanico.

Pri transformaciji seva iz vrste *E. coli* DH5α s kontrolnim plazmidom pUC-19 izvedeni po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2010), transformante v dveh ponovitvah niso zrasle. Najnižjo frekvenco transformacije s pUC-19, $9,70 \times 10^{-9}$ transformant/ml, smo ugotovili na ploščah, sušenih v laminariju ob dodatku nižje koncentracije plazmida (3 ng/µl). Najvišjo frekvenco transformacije s pUC-19, $1,39 \times 10^{-8}$ transformant/ml, pa smo ugotovili na ploščah, sušenih v laminariju ob dodatku višje koncentracije plazmida (30 ng/µl). Učinkovitost transformacije *E. coli* DH5α s kontrolnim plazmidom pUC-19, se je gibala med 0,67 in $1,33 \times 10^2$ transformant/µg plazmidne DNA. Najvišjo učinkovitost transformacije *E. coli* DH5α smo ugotovili na ploščah sušenih v laminariju ob dodatku nižje koncentracije plazmida (3 ng/µl).

Preglednica 9: Frekvenca in učinkovitost transformacije seva iz vrste *E. coli* DH5α izvedena s plazmidom pUC-19 po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012)

pUC-19	Frekvenca VI	Frekvenca VII	Frekvenca NI	Frekvenca NII	Učinkov. VI	Učinkov. VII	Učinkov. NI	Učinkov. NII
1.	$2,18 \times 10^{-8}$	$1,46 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-8}$	$3,64 \times 10^{-8}$	6,00	4,00	$1,33 \times 10^2$	$1,00 \times 10^2$
2.	$1,94 \times 10^{-8}$	NT	$9,70 \times 10^{-9}$	$1,70 \times 10^{-8}$	5,33	NT	$2,67 \times 10^1$	$4,67 \times 10^1$
3.	$7,38 \times 10^{-8}$	$6,15 \times 10^{-8}$	NT	$3,08 \times 10^{-9}$	$1,60 \times 10^1$	0,67	NT	6,67
4.	$1,39 \times 10^{-8}$	$3,83 \times 10^{-8}$	$6,61 \times 10^{-8}$	NT	2,67	7,33	$1,27 \times 10^2$	NT
X	$3,46 \times 10^{-8}$		$2,41 \times 10^{-9}$		6,00		$7,33 \times 10^1$	

NT - ni transformant.

Preglednica 10: Frekvenca in učinkovitost transformacije seva iz vrste *E. coli* DH5α izvedena s plazmidom pORF-hIL-12 G2 po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012)

pORF-hIL-12	Frekvenca VI	Frekvenca VII	Frekvenca NI	Frekvenca NII	Učinkov. VI	Učinkov. VII	Učinkov. NI	Učinkov. NII
1.	$3,88 \times 10^{-8}$	$1,16 \times 10^{-7}$	$1,70 \times 10^{-8}$	$2,42 \times 10^{-8}$	$1,07 \times 10^1$	$3,20 \times 10^1$	$4,67 \times 10^1$	$6,67 \times 10^1$
2.	$1,70 \times 10^{-8}$	$1,21 \times 10^{-8}$	$1,67 \times 10^{-7}$	$5,58 \times 10^{-8}$	4,67	3,33	$4,60 \times 10^2$	$1,53 \times 10^2$
3.	$2,77 \times 10^{-8}$	$9,54 \times 10^{-8}$	$4,00 \times 10^{-8}$	$9,23 \times 10^{-9}$	6,00	$2,07 \times 10^1$	$8,67 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$
4.	$1,60 \times 10^{-7}$	$5,91 \times 10^{-8}$	$6,96 \times 10^{-9}$	$6,96 \times 10^{-9}$	$3,07 \times 10^1$	$1,13 \times 10^1$	$1,33 \times 10^1$	$1,33 \times 10^1$
X	$3,16 \times 10^{-8}$		$3,07 \times 10^{-9}$		$1,50 \times 10^1$		$1,07 \times 10^2$	

Transformante, ki so prevzele tako pORF-hIL-12 G2 kot tudi pUC-19, so zrasle pri sevih iz rodov in vrst: *E. hermannii*, *Buttiauxella*, *S. enterica* subsp. *arizona*, *S. boydii*, *S. sonnei* in *Yersinia*. Transformante, ki so zrasle po transformaciji s plazmidom pORF-hIL-12 G2 pripadajo bakterijski vrsti *S. typhymurium*. Transformante seva vrste *S. typhymurium*, ki bi sprejele pUC-19, niso zrasle. Transformante, ki so prevzele kontrolni plazmid pUC-19, so zrasle še v primeru sevov iz rodov in vrst *S. enterica* subsp. *enterica*, *P. vulgaris*, *Providencia*. Pri slednjih transformante ob dodatku terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 G2 v transformacijsko mešanico, niso zrasle. Pri ostalih od osemnajst izbranih sevov transformante niso zrasle.

Preglednica 11: Opažena frekvenca in učinkovitost transformacije s terapevtskim plazmidom pORF-hIL-12 G2 izvedene po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012)

	frekvenca transformacije pORF-hIL-12 G2				učinkovitost transformacije pORF-hIL-12 G2			
	VI	VII	NI	NII	VI	VII	NI	NII
<i>Buttiauxella</i>	$2,03 \times 10^{-7}$	$2,03 \times 10^{-7}$	$6,90 \times 10^{-8}$	$3,45 \times 10^{-8}$	$5,13 \times 10^1$	$7,47 \times 10^1$	$5,47 \times 10^2$	$3,27 \times 10^2$
<i>S.typhymurium</i>	NT	NT	$1,96 \times 10^{-9}$	NT	NT	NT	6,67	NT
<i>S.enterica</i> subsp. <i>arizona</i>	NT	$1,55 \times 10^{-8}$	NT	$2,73 \times 10^{-9}$	NT	0,57	NT	1
<i>Yersinia</i> sp.	$9,57 \times 10^{-4}$	NT	$3,10 \times 10^{-4}$	$2,14 \times 10^{-3}$	$3,49 \times 10^4$	NT	$1,13 \times 10^4$	$7,79 \times 10^4$
<i>Shigella boydii</i>	$1,24 \times 10^{-7}$	$1,80 \times 10^{-7}$	$1,32 \times 10^{-7}$	$7,87 \times 10^{-8}$	$5,13 \times 10^1$	$7,47 \times 10^1$	$5,47 \times 10^2$	$3,27 \times 10^2$
<i>Shigella sonnei</i>	$3,56 \times 10^{-8}$	$5,04 \times 10^{-8}$	$1,48 \times 10^{-8}$	$4,44 \times 10^{-9}$	$1,60 \times 10^1$	$2,27 \times 10^1$	$6,67 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$

Preglednica 12: Opažena frekvenca in učinkovitost transformacije s kontrolnim plazmidom pUC-19, izvedene po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012)

	frekvenca transformacije pUC-19				učinkovitost transformacije pUC-19			
	VI	VII	NI	NII	VI	VII	NI	NII
<i>E.hermannii</i>	NT	NT	NT	$1,76 \times 10^{-5}$	NT	NT	NT	$1,88 \times 10^3$
<i>Buttiauxella</i>	$1,70 \times 10^{-7}$	$6,25 \times 10^{-7}$	$3,02 \times 10^{-8}$	$1,94 \times 10^{-8}$	$1,33 \times 10^2$	$4,93 \times 10^1$	$2,20 \times 10^2$	$1,93 \times 10^2$
<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	$3,23 \times 10^{-9}$	NT	NT	NT	0,67	NT	NT	NT
<i>S.enterica</i> subsp. <i>arizona</i>	NT	$2,73 \times 10^{-9}$	NT	$1,82 \times 10^{-9}$	NT	2,00	NT	$1,33 \times 10^1$
<i>P.vulgaris</i>	NT	$2,30 \times 10^{-9}$	NT	$2,30 \times 10^{-9}$	NT	0,67	NT	6,67
<i>Providencia</i> sp.	NT	NT	NT	$2,76 \times 10^{-8}$	NT	NT	NT	66,67
<i>Yersinia</i> sp.	$8,97 \times 10^{-4}$	NT	$4,48 \times 10^{-4}$	NT	$3,27 \times 10^4$	NT	$1,63 \times 10^4$	NT
<i>Shigella boydii</i>	$3,20 \times 10^{-7}$	$1,19 \times 10^{-7}$	$5,30 \times 10^{-8}$	$4,66 \times 10^{-8}$	$1,33 \times 10^2$	$4,93 \times 10^1$	$2,20 \times 10^2$	$1,93 \times 10^2$
<i>Shigella sonnei</i>	NP	$1,23 \times 10^{-7}$	$7,41 \times 10^{-9}$	$4,44 \times 10^{-9}$	NP	$5,53 \times 10^1$	$3,33 \times 10^1$	$2,00 \times 10^1$

NT - ni transformant, NP - ni podatka

4.4 UGOTAVLJANJE FREKVENCE IN UČINKOVITOSTI TRANSFORMACIJE SEVA IZ VRSTE *E. coli* DH5 α , IZVEDENE PO PROTOKOLU, KI SO GA OPISALI ZHANG IN SODELAVCI (2012), S TERAPEVTSKIM PLAZMIDOM pORF-hIL-12 G2 IN KONTROLNIM PLAZMIDOM pUC-19 Z UPORABO KLASIČNIH TRDIH GOJIŠČ LB

Za ovrednotenje vpliva koncentracije agarja smo transformacijsko mešanico pripravljeno po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012) namesto na trdna gojišča s koncentracijo agarja 25 g/l, nanesli na običajna trdna gojišča LB, s koncentracijo agarja 15 g/l.

Preglednica 13: Transformacija neobdelanih celic seva vrste *E. coli* DH5 α s terapevtskim in kontrolnim plazmidom v nizki (3 ng/ μ l) in visoki koncentraciji (30 ng/ μ l)

št. ponovitev \ plazmid (konc.)	pUC-19 30 ng/ μ l	pUC-19 3 ng/ μ l	pORF-hIL-12 G2 30 ng/ μ l	pORF-hIL-12 G2 3 ng/ μ l
1.	NT	frekvenca: $3,08 \times 10^{-9}$ učinkovitost: 6,67	NT	NT
2.	NT	NT	frekvenca: $3,48 \times 10^{-9}$ učinkovitost: 0,67	NT

NT - ni transformant

Transformante so zrasle le v primeru seva iz vrste *E. coli* DH5 α ob dodatku nižje koncentracije kontrolnega plazmida pUC-19. Ugotovljena frekvenca transformacije je bila $3,08 \times 10^{-9}$ transformant/ml, učinkovitost transformacije s pUC-19 pa 6,67 transformant/ μ g plazmidne DNA. Ob dodatku višje koncentracije terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 G2 v transformacijsko mešanico smo ugotovili frekvenco transformacije $3,48 \times 10^{-9}$ transformant/ml, ugotovljena učinkovitost transformacije s pORF-hIL-12 G2 pa 0,67 transformant/ μ g plazmidne DNA. V ostalih primerih transformante seva iz vrste *E. coli* DH5 α niso zrasle (glej **Preglednico 13**).

4.5 USPEŠNOST PREVZEMA PLAZMIDNE DNA PRI PREDHODNO NEOBDELANIH BAKTERIJSKIH CELICAH NA IZBRANIH GOJIŠČIH IN V MIKROTITRSKI PLOŠČI

V **Preglednici 14** je prikazana rast posameznih bakterijskih sevov, ki so zrasli na selekcijskem gojišču vsaj na enem izmed izbranih gojiščih ali v mikrotiterski plošči po dodatku plazmidne DNA. Vsi bakterijski sevi navedeni v **Preglednici 14** so zrasli na

selektivnem gojišču po takojšnjem dodatku plazmida. Pri ostalih do rasti na selekcijskem gojišču ni prišlo v nobenem izbranem časovnem intervalu.

Preglednica 14: Rast transformant na izbranih gojiščih po dodatku plazmidne DNA

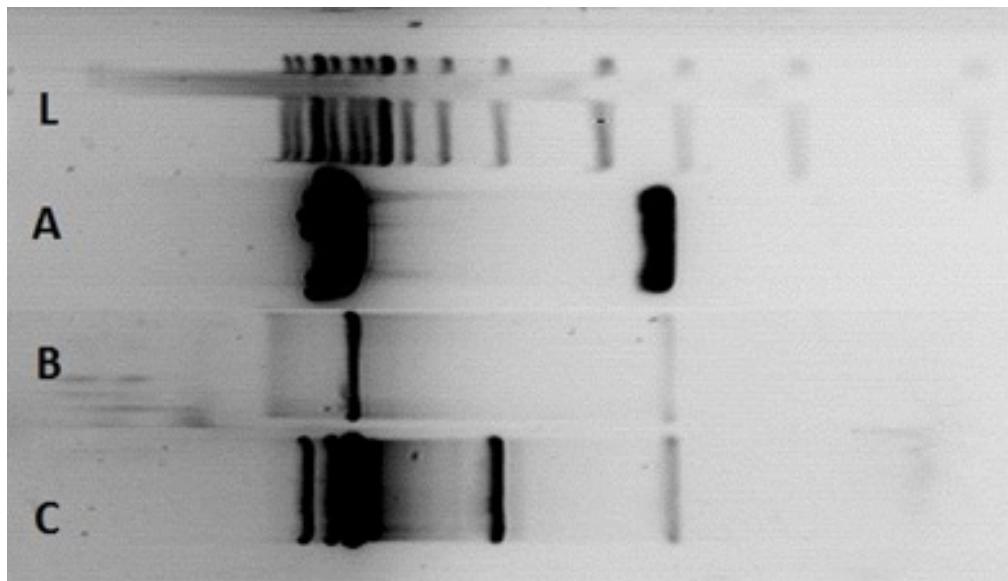
Bakterijski sev + dodani plazmid	LB	MG	MG z 2,5% LB	LB 5% agar	MT
<i>E. hermannii</i> +pORF-hIL-12 G2	+	+	+	+	+
<i>E. hermannii</i> + pUC-19	+	+	+	+	+
<i>Yersinia</i> sp+ pORF-hIL-12 G2	+	+	+	+	+
<i>Yersinia</i> sp+ pUC-19	+	+	+	+	+
<i>I. fluvitalis</i> + pORF-hIL-12 G2	+	-	-	-	-
<i>I. fluvitalis</i> + pUC-19	+	-	-	-	-
<i>H. frisingense</i> + pORF-hIL-12 G2	-	-	+	-	-
<i>H. frisingense</i> + pUC-19	-	-	+	-	-

LB, gojišče LB; MG, minimalno gojišče; MG z 2,5 % LB, minimalno gojišče z dodanim LB gojiščem; LB 5 % agar, gojišče LB z dodanim 5% agarjem; MT, mikrotitrtska plošča; +, opazili smo rast; -, nismo opazili rasti.

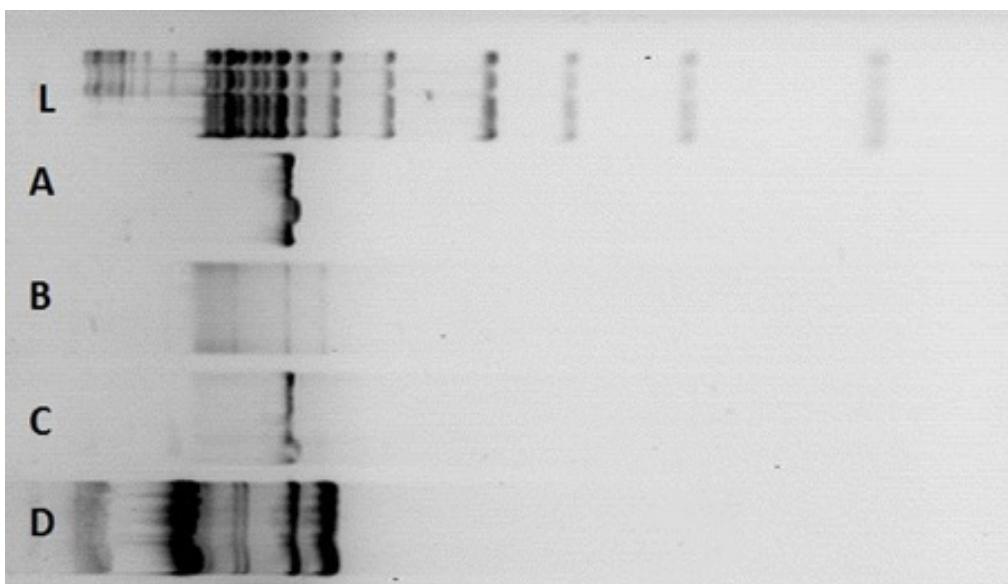
4.6 POTRДITVENI TESTI

4.6.1 Izolacija in analiza plazmidne DNA iz transformant, ki so zrasle po elektroporaciji

V poskusu transformacije z elektroporacijo so bili vključeni vsi sevi navedeni v **Prilogi C** razen sevov iz vrst *P. mephitica* in *I. fluvitalis*. Rezultati so prikazani na **Sliki 3** in **Sliki 4**. Pri vseh izbranih sevih razen pri bakterijah iz rodov *Staphylococcus* in *Mycobacterium* so po elektroporaciji zrasle transformante. Kot potrditveni test smo izbrali izolacijo plazmida z metodo STET/CTAB. Pri tistih, kjer plazmida nismo uspeli izolirati, smo uporabili še metodo izolacije plazmidne DNA z alkalno hidrolizo. Pri sevih iz vrste *H. frisingense* in rodu *Sphingomonas* sta bili obe metodi neuspešni, zato smo za izolacijo plazmidne DNA uporabili še komercialni komplet »Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit«. Izolacija plazmidne DNA ni bila uspešna pri bakterijah iz vrst rodov *H. frisingense*, *S. enteritidis*, *S. enterica* subsp. *enterica* in *Sphingomonas*.



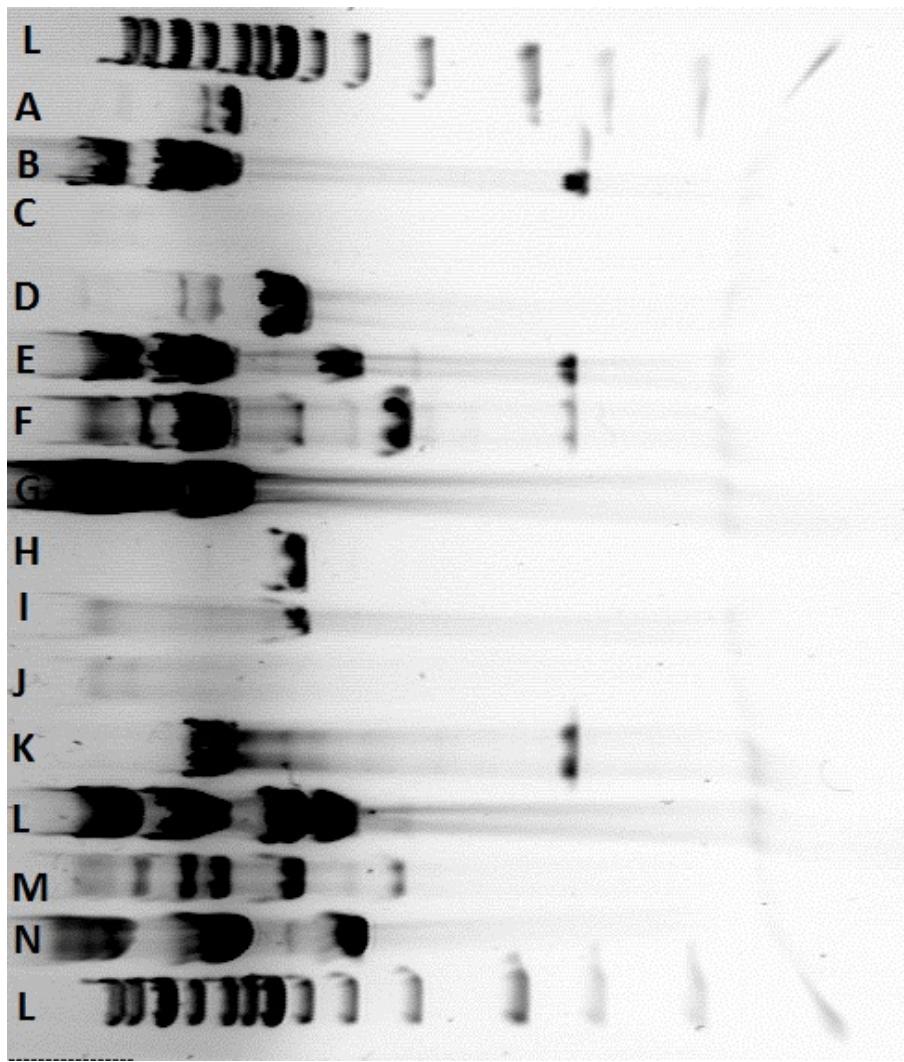
Slika 3: Slika gelske elektroforeze izolirane plazmidne DNA (pORF-hIL-12 G2) po restrikciji z *EcoRI*. (L) 1kb DNA lestvica; (A) kontrolni plazmid pORF-hIL-12 G2 ; (B) plazmid, izoliran iz transformant seva iz vrste *P. rettgeri*; (C) plazmid, izoliran iz transformant seva iz vrste *S. boydii*.



Slika 4: Slika gelske elektroforeze izolirane plazmidne DNA (pUC-19) po restrikciji z *EcoRI*. (L) 1kb DNA lestvica; (A) kontrolni plazmid pUC-19; (B) plazmid, izoliran iz transformant seva iz vrste *S. sonnei*; (C) plazmid izoliran iz transformant seva iz vrste *P. rettgeri*; (D) plazmid, izoliran iz transformant seva iz vrste *E. hermannii*.

4.6.2 Izolacija in analiza plazmidne DNA iz transformant, ki so zrasle po transformaciji, izvedeni po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012)

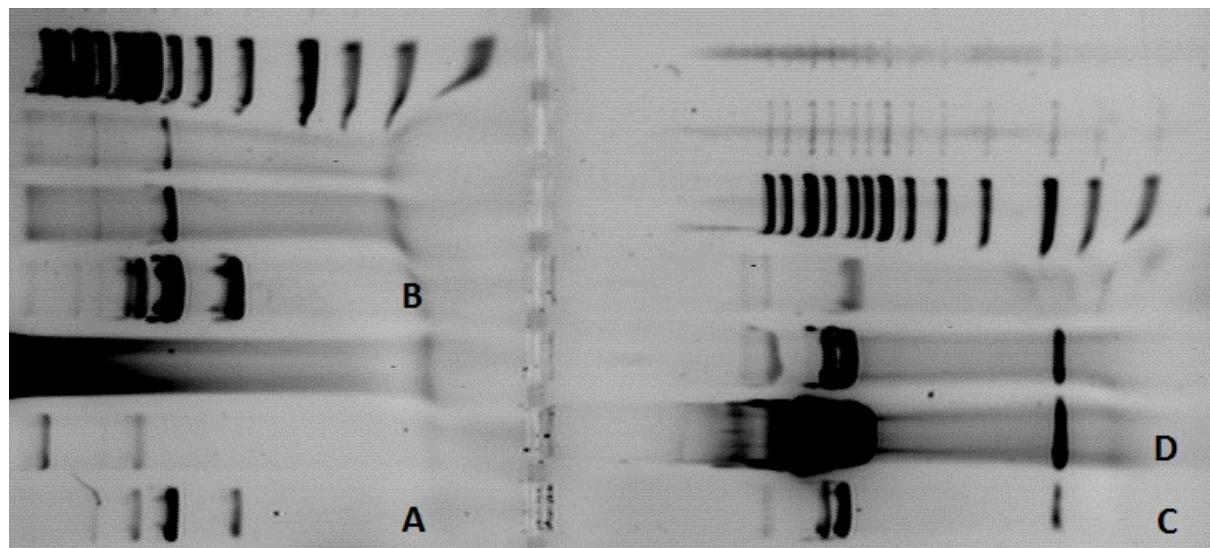
Rezultati gelske elektroforeze po restrikciji plazmida pUC-19 so prikazani na **Sliki 5**. Kot kontrolo smo uporabili restriktijski profil plazmida pUC-19. Le v primeru seva iz rodu *Yersinia* plazmidne DNA nismo uspeli izolirati.



Slika 5: Slika gelske elektroforeze izolirane DNA (plazmid pUC-19 in plazmid pORF-hIL-12 G2) iz kolonij, ki so zrasle po transformaciji po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sodelavci (2012), po restrikciji z EcoRI. (L) 1kb DNA lestvica; (A) kontrolni plazmid pORF-hIL-12; (B) pORF-hIL-12 G2, izoliran iz transformant seva iz vrste *E. coli* DH5; (C) pORF-hIL-12 G2, izoliran iz transformant seva iz rodu *Yersinia*; (D) pUC-19 izoliran iz transformant seva iz vrste *S. enterica* subsp. *arizona*; (E) pORF-hIL-12 G2 izoliran iz transformant seva iz vrste *S. sonnei*; (F) pORF-hIL-12 G2, izoliran iz transformant seva iz vrste *S. boydii*; (G) pORF-hIL-12 G2 izoliran iz transformant seva iz rodu *Buttiauxella*; (H) kontrolni plazmid pUC-19; (I) pUC-19 izoliran iz transformant seva iz vrste *E. coli* DH5 α ; (J) pUC-19, izoliran iz transformant seva iz rodu *Yersinia*; (K) pORF-hIL-12 G2 izoliran iz transformant seva iz vrste *S. enterica* subsp. *arizona*; (L) pUC-19, izoliran iz transformant seva iz vrste *S. sonnei*; (M) pUC-19, izoliran iz transformant seva iz vrste *S. boydii*; (N) pUC-19, izoliran iz transformant seva iz rodu *Buttiauxella*.

4.6.3 Izolacija in analiza plazmidne DNA iz transformant seva iz vrste *E. coli* DH5 α , ki so zrasle na trdnem gojišču LB z običajno koncentracijo agarja, po transformaciji, izvedeni po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012)

Na **Sliki 6** so prikazani rezultati gelske elektroforeze izolirane plazmidne DNA, ki smo jo izolirali iz kolonij *E. coli* DH5 α , ki so zrasle na trdnih gojiščih LB z običajno koncentracijo agarja po transformaciji, izvedeni po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012).



Slika 6: Slika gelske elektroforeze izolirane DNA (plazmida pUC-19 in plazmida pORF-hIL-12 G2), po restrikciji z EcoRI, uporabljen je 1kb lestvica. (A) kontrolni plazmid pUC-19; (B) pUC-19, izoliran iz transformant seva iz vrste *E. coli* DH5 α , ki so zrasle na ploščah z običajno koncentracijo agarja (15 g/l); (C) kontrolni plazmid pORF-hIL-12 G2 ; (D) pORF-hIL-12 G2 , izoliran iz transformant seva iz vrste *E. coli* DH5 α , ki so zrasle na ploščah z običajno koncentracijo agarja (15 g/l).

4.6.4 Izolacija plazmidne DNA iz transformant, ki so zrasle na izbranem gojišču/mikrotitrski plošči po dodatku plazmida v različnih časovnih intervalih

Izolacija plazmida pORF-hIL-12 G2 ni bila uspešna na nobenem od izbranih gojišč ali mikrotitrski plošči. Prav tako v primeru transformacije s plazmidom pUC-19 plazmidne DNA nismo uspeli izolirati iz nobene od domnevnih transformant, ki so zrasle na selektivnem gojišču (glej **Preglednico 14**).

5 RAZPRAVA

5.1 ELEKTROPORACIJA

V magistrskem delu smo želeli preveriti, kakšno je tveganje prenosa determinante za ampicilinsko rezistenco iz plazmidne DNA v bakterije, ki živijo v okolju in kakšno je gostiteljsko območje vektorja pUC19, ki ga pogosto uporabljam pri molekulskega kloniranju. Da bi preverili kakšno je gostiteljsko območje smo izbrali bakterijske vrste ki so sorodne bakteriji *E. coli*, saj plazmidni vektor pUC-19 vsebuje minimalno mesto *ori* *E. coli* pBM1 (naštete so v **Prilogi C**, razen *I. fluvitalis* in *P. mephitica*). Uporabili smo protokol, ki je bil pripravljen za elektroporacijo bakterije *E. coli* DH5 α , ne pa tudi za druge bakterijske seve. Učinkovitost transformacije pri bakteriji *E. coli* DH5 α je bila za šest velikostnih razredov manjša od pričakovane. Po protokolu, ki je pripravljen za bakterijo *E. coli* DH5 α smo dobili pri sevih iz rodov *Salmonella*, *Erwinia* in *Sphingomonas* nižjo učinkovitost transformacije, pri sevih iz rodov *Proteus* in *Yersinia* enako ali večjo (odvisno od uporabljenega plazmida) ter pri sevu iz rodu *Enterobacter* višjo učinkovitost transformacije, kot poročajo v literaturi (glej **Prilog A**). Sicer za posamezne bakterijske vrste obstajajo specifični protokoli, vendar smo zavoljo možnosti primerjave rezultatov, poskušali vse postopke transformacije opraviti po istem protokolu. Uporabili smo tudi protokol pripravljen za elektroporacijo sevov iz rodu *Staphylococcus*, vendar transformante nismo dobili.

Razlogov za velike razlike v učinkovitosti prenosa DNA z elektroporacijo je več. V splošnem velja, da po Gramu negativne bakterijske vrste lažje transformiramo že zaradi same strukture celične stene. Na povečanje uspešnosti prenosa DNA lahko vplivamo že na samem začetku z izbiro primernega gojišča, ki vpliva na številne fiziološke parametre. Dodajanje različnih agensov, kot je na primer glicin, ki inhibira sintezo celične stene pri streptokokih in drugih organizmih, je še posebej ključno pri po Gramu pozitivnih bakterijskih vrstah (Chassy, 1976). V naši studiji tovrstnih agensov nismo uporabili, saj smo v večjem deležu preiskovali po Gramu negativne bakterijske vrste. Protokolu za elektroporacijo smo z namenom čim boljše odstranitve ionov iz gojišča dodali še dodatno spiranje celic, saj ti negativno vplivajo na elektroporacijo.

Za učinkovito transformacijo je pomembna tudi izvedba poskusa v najbolj primerni fazi rasti bakterijskih celic, pri katerih želimo vzbuditi kompetentno stanje. EkspONENTNA faza rasti je

tista kritična faza rasti bakterijskih celic, ki jo kot je navedeno v literaturi potrebna, da bi dosegli maksimalni prevzem DNA. Učinkovitost prevzema DNA je odvisna od bakterijskega seva, nukleinske kisline, ki jo želimo vstaviti, kemijske sestave gojišča in pogojev rasti (Dower in sod., 1988; Tu in sod., 2005). Wu in sodelavci (2010) so primerjali učinkovitost transformacije v zgodnji ($OD_{600} = 0,15$), srednji ($OD_{600} = 0,25$) in pozni ($OD_{600} = 0,45$) eksponentni fazni rasti bakterije *E. coli* GB101. V zgodnji eksponentni fazi rasti je prišlo do najvišje frekvence in največje učinkovitosti transformacije. V naši študiji smo izbrane baterijske seve gojili do optične gostote $OD_{600} = 0,5\text{--}0,6$ po protokolu, ki je bil pripravljen za elektroporacijo bakterije *E. coli* DH5 α , kar pa ni nujno primerno za ostale bakterijske vrste, za katere smo ugotavljali frekvenco in učinkovitost transformacije.

Optimalno število celic je tudi eden izmed parametrov, ki je ključen za povečanje učinkovitosti transformacije. Pokazano je bilo namreč, da obstaja neposredna povezava med številom celic, podvrženih transformaciji, in učinkovitostjo transformacije. Chung in sod. (1989) so pokazali, da učinkovitost transformacije drastično pada, ko doseže koncentracija bakterij kritično točko, ki je verjetno za različne bakterijske vrste različna. Do podobnega zaključka so prišli tudi Wu in sod. (2010), saj je bila pri bakteriji *E. coli* HB101 najvišja učinkovitost transformacije pri celični gostoti 10^{10} bakterijskih celic/ml, pri večjem številu celic pa je prišlo do upada učinkovitosti transformacije. Avtorji domnevajo, da je ta fenomen posledica neoptimalnega razmerja med molekulami DNA in bakterijskimi celicami. Za razliko od raziskave, ki so jo opravili Wu in sodelavci (2010), je bila delovna koncentracija bakterij v naših poskusih v povprečju 10^9 celic/ml. Slednjo smo določili na gojišču LB brez seleksijskega označevalca. Vendar je potrebno upoštevati še izgubo celic, ki jih poškodujejo električni pulzi. Pri elektroporaciji bakterije *E. coli* pride v večini primerov do poškodb membrane in sicer pri 50 do 70 odstotkih bakterij (Woodal, 2003).

Priprava elektrokompetentnih celic je prav tako ena izmed stopenj, ki lahko vpliva na končno učinkovitost transformacije. Na njihovo število lahko vpliva tudi število centrifugiranj in spiranj usedline, saj lahko pri tem pride do izgube bakterijskih celic. To je običajen način odstranjevanja komponent gojišča, ki motijo proces elektroporacije, obsežno spiranje in resuspendiranje bakterijskih celic pa lahko poleg izgube celic privede do okužbe elektroporacijske raztopine oz. mešanice in posledično do nižje učinkovitosti elektroporacije

(Enderle in Farwell, 1998; Papagianni in sod., 2007; Sheng in sod., 1995; Sharma in Schimke, 1996; Dower in sod., 1988).

Velikost plazmidne DNA pri elektroporaciji bakterije *E. coli* nima večjega vpliva na učinkovitost transformacije, ko gre za plazmide manjše od 100 kb. Večji vpliv na učinkovitost transformacije je opazen pri po Gramu pozitivnih bakterijah, pri katerih so opazili upad frekvence in učinkovitosti prenosa pri vnosu vektorjev, ki so bili večji od 25 kb (Leonard in Sedivy, 1990). Ugotovljenih razlik med frekvencami in učinkovitostjo transformacije pri elektroporaciji z uporabljenima plazmidoma (pUC-19 velikosti 2.864 bp in pORF-hIL-12 G2 (4912 bp) z zgoraj omenjenimi opažanji ne moremo razložiti.

Vpliv uporabljene koncentracije DNA lahko zanemarimo, ker je bila delovna koncentracija plazmidov enaka. V večini primerov vidimo, da je bila frekvenca prenosa terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 G2 pri izbranih sevih za vsaj en razred manjša od frekvence transformacije bakterij s plazmidom pUC-19. Za dva velikostna razreda se razlikujeta frekvenci prenosa pri sevih iz vrst *S. enteritidis*, *P. vulgaris*, in *P. rettgeri*. Pri bakterijskih vrstah *E. hermannii* in *E. amnigenus* je bila frekvenca prenosa plazmida pUC-19 za tri velikostne razrede večja. Največje razlike opazimo pri bakterijski vrsti *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, kjer je bila frekvenca transformacije plazmida pUC-19 $1,60 \times 10^{-3}$ transformant/ml, medtem ko je frekvenca transformacije plazmida pORF-hIL-12 G2 za pet razredov manjša, $1,38 \times 10^{-8}$ transformant/ml.

Glede na sorodnost izbranih bakterijskih vrst vidimo, da sta frekvenca in učinkovitost transformacije pri gamaproteobakterijah večinoma podobni, z večjo oddaljenostjo v filogenetskem drevesu pa padata. Pri najbolj oddaljenih bakterijskih deblih, aktinobakterijah in firmikutih, transformant nismo dobili. Možen razlog je, da zaradi filogenetske oddaljenosti bakterijske vrste nimajo sposobnosti podvojevanja, saj plazmida vsebuju minimalno mesto *ori* *E. coli* pMB1. Glede na rezultate te študije lahko zaključimo, da je malo verjetno, da bi se plazmidi, ki so vsebujejo minimalno mesto *ori* plazmida *E. coli* pMB1, prenesli v filogenetsko bolj oddaljene vrste, kar je z okoljskega stališča zaželeno.

5.2 NARAVNA TRANSFORMACIJA

V literaturi se pojavljajo domneve, da je bakterija *E. coli* pri določenih rastnih razmerah naravno kompetentna, zato smo po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012) preverili vpliv stresnega dejavnika na sposobnost bakterije, da prevzame prosto plazmidno DNA.

Pri bakterijski vrsti *E. coli* je namreč opisana izmenjava genskih zapisov le s procesom konjugacije. Transformacija bakterijske vrste *E. coli* s plazmidno DNA naj bi bila mogoča le ob uporabi elektrošoka ali s stimulacijo kompetence z Ca^{2+} ioni in toplotnim šokom (Solomon in Grossman, 1996). Baur in sod. (1996) so ugotovili, da lahko pri po Gramu negativnih bakterijskih vrstah ob spremembi rastnih razmer (npr. pomanjkanje hranil) pride do vzpostavitve stanja kompetence. V zgodnji stacionarni fazi rasti lahko *E. coli* ob prisotnosti ionov Ca^{2+} in M^+ , brez predhodne obdelave celic, prevzame plazmidno DNA, vendar to velja le kadar bakterija raste na trdnem gojišču. Tsen in sodelavci (2002) so ugotovili, da do tega fenomena ne pride pri gojenju v tekoči kulturi. V sledečih raziskavah so nato pokazali, da je *E. coli* sposobna prevzeti plazmidno DNA tudi brez dodatka ionov Ca^{2+} in toplotne obdelave (Tsen in sod., 2002; Sun in sod., 2006). Na učinkovitost transformacije lahko vpliva tudi temperatura rasti bakterij. Chuang in sodelavci (1995) so pokazali, da je učinkovitost transformacije bakterijske kulture *E. coli* XL-1 Blue večja pri $18\text{ }^\circ\text{C}$, kar ni optimalna temperatura rasti bakterij *E. coli*. V študiji, ki so jo izvedli Zhang in sod. (2012) so *E. coli* gojili pri $30\text{ }^\circ\text{C}$, zaradi prepričanja, da je to najbolj običajna okoljska temperatura, pri kateri te bakterije rastejo in so nanjo najbolj prilagojene. Pri gojenju bakterij niso dodajali ionov Ca^{2+} ali tretirali bakterijskih celic s toplotnim šokom, nakar so transformante izolirali na selektivnem gojišču, ki je vsebovalo 5-odstotni agar in antibiotik. Ugotovili so, da agar oz. agaroza pozitivno vpliva na prevzem DNA in da v danih razmerah bakterijska kultura v zgodnji stacionarni fazi ($\text{OD}_{600} \sim 1,5$) doseže najvišjo frekvenco transformacije ($1 \sim 2 \times 10^{-7}/\text{ml}$) (Zhang in sod., 2012). Poleg tega, da lahko *E. coli* v spremenjenih rastnih razmerah inducira stanje kompetence, je znano, da vsebuje v funkcionalnem regulonu set inducibilnih genov, homolognih genom kompetence (Sinha in sod., 2009). Ker je malo znanega o regulaciji transformacije, so preverili vpliv alternativnega faktorja sigma RpoS, ki v stacionarni fazi vpliva na aktivacijo transkripcije več genov, povezanih s stresom. Znano je, da nekateri geni odgovorni za prevzem DNA, oziroma njihovi ortologi, na transformacijo ne vplivajo. Zhang in sod. (2012) so predpostavili, da RpoS regulira drug set genov, ki kodirajo membranske ali periplazemske proteine in tako omogočajo prevzem DNA in/ali genov za

vključitev plazmidne DNA pri bakteriji *E. coli*. Natančna vpletenost genov regulona *rpoS* v regulaciji transformacije še ni znana (Zhang in sod., 2012).

V naši študiji so pri transformaciji, izvedeni po protokolu Zhang in sod. (2012) zrasle transformante devet od devetnajst preiskovanih bakterijskih vrst. Vse transformante bakterijskih vrst, ki so po transformaciji zrasle na selektivnem gojišču uvrščamo med gammaproteobakterije. Pred začetkom tega dela študije smo preverili, ali na frekvenco in učinkovitost transformacije bakterije *E. coli* DH5 α vpliva načina sušenja trdnih gojišč. Eno serijo trdnih gojišč smo sušili v laminariju, eno serijo pa smo šušili 24 ur pri 37 °C, kar je še dodatno zmanjšalo vodni potencial (vrednost a_w) in v obeh primerih so trdna gojišča vsebovala 5-odstotni agar. S tem parametrom (vrednost a_w) ovrednotimo dostopnost vode v okolju, ki predstavlja za rast mikroorganizmov omejujoč dejavnik. Način sušenja trdnih gojišč v naši študiji ni pokazal razlik na nivoju frekvenca in učinkovitosti transformacije s plazmidoma pUC-19 in pORF-hIL-12 G2.

Pri vseh sevih smo pri transformaciji, izvedeni po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012) preverili vpliv koncentracije plazmidne DNA na frekvenco in učinkovitost transformacije. Frekvenca transformacije je bila pri inkubaciji z nižjo koncentracijo plazmidne DNA, tako s pUC-19 kot s pORF-hIL-12 G2, za en velikostni razred večja, kot pri inkubaciji z desetkrat višjo koncentracijo plazmidne DNA. Prav tako je bila za en velikostni razred večja učinkovitost transformacije, kadar smo inkubirali bakterijske celice z nižjo koncentracijo plazmida. Kot že omenjeno, bi razlog lahko iskali v razmerju med količino DNA in številom bakterijskih celic, prisotnih v transformacijski mešanici.

Vpliv osmotskega tlaka na frekvenco in učinkovitost transformacije, izvedene po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sodelavci (2012), smo preverili tako, da smo bakterije sočasno gojili na trdnem gojišču z običajno koncentracijo agarja (15 g/l) in povišano koncentracijo agarja (50 g/l). Kadar smo enako pripravljene bakterije gojili na običajnem gojišču LB, je zraslo manj transformant, s čimer smo potrdili, da povišana koncentracija agarja dejansko vpliva na proces bakterijske transformacije.

Da bi preverili vpliv različno bogatih gojišč in vpliv faze rasti bakterij na frekvenco in učinkovitost transformacije, smo bakterijskim kolonijam na trdnem gojišču dodajali plazmid v časovnih zamikih. Starost samih kolonij ni vplivala na sprejem DNA in pojav kompetence. Po

koncu inkubacije smo kolonije bakterij, katerim smo dodali plazmidno DNA, nacepili na selektivna gojišča z dodanim antibiotikom. Rast smo opazili pri bakteriji *E. hermanii* in bakterijah iz rodu *Yersinia* na vseh gojiščih (**Preglednica 14**) in tudi v mikrotitrski plošči, medtem ko je vrsta *I. fluvitalis* zrasla le na gojišču LB z dodanim antibiotikom, vrsta *H. frisingense* pa na minimalnem gojišču z 2,5-odstotnim LB in ampicilinom. Rast ni bila pogojena z vrsto dodanega plazmida. Pri nobeni od tako dobljenih transformant plazmidne DNA nismo uspeli izolirati. Opažena rast na gojiščih z antibiotikom je lahko posledica visoke celične gostote, ki lahko predstavlja oviro pri difuziji antibiotika do posamezne bakterijske celice.

5.3 PRIMERJAVA FREKVENCE IN UČINKOVITOSTI TRANFORMACIJE Z ELEKTROPORACIJO, IZVEDENO PO PROTOKOLU, KI SO GA OPISALI ZHANG IN SOD. (2012)

Ob predpostavki, da predstavlja frekvenca in učinkovitost transformacije posamezne bakterijske vrste z elektroporacijo pozitivno koto ro oziroma maksimalen možen vnos plazmida, lahko domnevo, da je elektroporacija učinkovitejša metoda od transformacije neobdelanih celic, potrdimo. Podobno frekvenco in učinkovitost transformacije smo ugotovili le v primeru bakterije iz rodu *Yersinia* (glej prilogo B). Razlog za to bi lahko bila tudi že naravno prisotna rezistenca, katere zapis se nahaja v bakterijskem kromosому. Pred samim začetkom dela smo to možnost sicer preverili tako, da smo sveže kulture razmazali na gojišče z antibiotikom. Ker je *Yersinia* zrasla v manjšem obsegu, smo se vseeno odločili, da je primerna za našo študijo. Domnevamo, da gre za zmanjšano občutljivost za antibiotik, ki bakteriji sicer omogoča rast, a v manjšem obsegu kot pri transformantah, ki so po prekonočni inkubaciji prerasle trdno gojišče. Slednje je posledica prevzema plazmida, ki vsebuje zapis za odpornost proti uporabljenem antibiotiku.

5.4 POTRDITEV PRISOTNOSTI PLAZMIDNE DNA V DOMNEVNIH TRANSFORMANTAH

Kot potrditveni test smo uporabili izolacijo plazmidne DNA iz transformant. V večini primerov smo plazmidno DNA izolirali z metodo STET/CTAB (glej **Prilogo C**), kadar pa plazmida s to metodo nismo uspeli izolirati, smo uporabili še metodo izolacije plazmidne DNA z alkalno hidrolizo ali s komercialnim kompletom. Plazmid smo uspešno izolirali pri trinajstih od devetnajstih bakterijskih sevih. Neuspešna izloacija plazmida je mogoče tudi

posledica dejstva, da nismo uporabili prave metode za izolacijo plazmidne DNA. Neuspešno izolacijo plazmida bi lahko pojasnili tudi z vključitvijo le tega v genom s homologno rekombinacijo. Ta se pojavi med dvema regijama, ki vsebujejo homologni ali skoraj homologni zaporedji. Frekvenca homologne rekombinacije pri najbolj preučeni bakterijski vrsti *E. coli* je sicer nizka, 5×10^{-12} prenosov na nukleotid na generacijo (Milkman in Bridges, 1990), ni pa izključujoča.

5.5 VARNOSTNI VIDIK UPORABE TERAPEVTSKEGA PLAZMIDA pORF-hIL-12 G2

Danes sodi elektroporacija med zelo uporabne metode, predvsem kot način vnosa izbranih genov v človeške celice za zdravljenja raka. Bolniki, zdravljeni s terapevtskim plazmidom, so le začasni nosilci transfeciranega tkiva, in sicer le do dva tedna po genski terapiji tumorja. Širjenje plazmida je omejeno tudi zato, ker je sprostitev plazmida omejena na sam tumor in nima možnosti razmnoževanja v drugih celicah. Gre za golo DNA brez dodanih elementov, ki bi lahko omogočili njegov obstoj in zaradi vseh teh elementov je možnost širjenja plazmida zanemarljiva. Potencialno problematična bi lahko bila uporaba gena za odpornost proti ampicilinu, saj lahko terapevtski plazmid pride v stik z bakterijami. Da bi prišlo do prevzema, pa morata biti izpolnjena vsaj dva pogoja, in sicer, da so bakterije kompetentne in da je bakterijska vrsta *E. coli* (Ocena tveganja GSO..., 2009). V doslej opravljenih študijah so z gojenjem bakterij s površine kože psov dokazali naslednje komenzale: *Micrococcus* spp., koagulaza negativne stafilocoke, α -hemolitične streptokoke, *Clostridium* spp., *Propionibacterium acnes*, *Acinetobacter* spp. in različne po Gramu negativne bakterijske vrste. *E. coli*, *P. mirabilis*, *Corynebacterium*, *Bacillus* spp. in *Pseudomonas* spp. so veljali za prehodno mikrobioto kože psov (Harvey in Lloyd, 1995; Sajjonma Koulumies in Lloyd, 1996; Miller in sod., 2012). Hoffmann in sod. (2014) so s sekvenciranjem zapisa za 16S rRNA vzorcev z različnih delov kože psov pokazali, da je prevladajoče bakterijsko deblo *Proteobacteria*, sledijo, firmikuti, aktinobakterije, bakteriodete in cianobakterije. Prevladajoči mikroorganizmi kože mačk pa so *Micrococcus* sp., *Acinetobacter* spp., streptokoki in stafilocoki (Weese, 2013). Čemažar in sodelavci (2015) so v študiji varnostnega vidika uporabe terapevtskega plazmida izolirali gojljive aerobne bakterije prisotne na koži psov pred in po terapiji tumorja. Pred terapijo so izolirali 69 bakterijskih sevov, ki so pripadali 17 različnim bakterijskim skupinam. Prevladovale so vrste iz rodov *Bacillus*, *Microbacterium*, *Macrococcus* in *Staphylococcus*, med izolati pa so identificirali še seve ki jih uvrščamo v

rodove *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Enterococcus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rothia*, *Sporosarcina* in *Streptomyces*. Po terapiji so na koži psov izolirali naslednje rodove: *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Agromyces*, *Brachybacterium*, *Escherichia*, *Janibacter*, *Kocuria*, *Macroccoccus*, *Mycobacterium*, *Oceanobacillus*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* in bakterije iz rodu *Rothia*. Pri vseh izoliranih sevih so preverjali tudi potencialen pojav HGP in določali koncentracijo plazmidne DNA na mestu nanosa do štiri tedne po terapiji. Rezultati kažejo, da je koncentracija plazmidne DNA takoj po nanosu 40 ng/ml (po enem tednu ta pada na 0,13 ng/ml), kar je znantno manj v primerjavi s koncentracijo plazmidne DNA, ki smo jo v naši študiji uporabili za dokazovanje procesa transformacije, izvedene po protokolu ki so ga opisali Zhang in sodelavci (2012). Pri slednjem smo bakterijske celice tretirali s 3/30 ng/µl plazmidne DNA. Prav tako je potrebno tu upoštevati dejstvo da smo uporabili laboratorijske seve, ne izolatov, ki se nahajajo na koži psov ter tudi, da smo z uporabljenim protokolom z znižanjem a_w vrednosti inducirali stanje kompetence. Proteini, ki so potrebni za prevzem zunajcelične DNA, niso stalno prisotni, temveč se kompetenca pojavi le v določenih razmerah. Odsotnost plazmidne DNA na območju tretiranja in odsotnost plazmidne DNA v izoliranih bakterijskih sevih, ter tudi nezmožnost in vitro transformacije izoliranih sevov potrjuje dejstvo, da gre za varno terapijo, brez potenciala za širjenje determinante za odpornost. Le v enem primeru so v in vitro pogoji dokazali možnost prenosa s HGP, in sicer pri sevu *E. coli*. Slednje ne preseneča, saj je ravno ta sev uporabljen za manipulacijo in namonoževanje terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 G2. Z ozirom na bakterijsko mikrofloro kože psov lahko dopuščamo minimalno možnost, da bi do prenosa terapevtskega plazmida lahko prišlo, le če bi bili izpoljeni vsi pogoji, ki bakterijski celici omogočijo vzpostavitev kompetenčnega stanja.

6 SKLEPI

V nalogi smo si zastavili hipotezi, da bo vnos terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 G2 s transformacijo uspešen samo v primerih sevov iz vrste *E. coli* in njej zelo sorodnih vrst in, da bo vnos terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 G2 bo uspešen samo po predhodno inducirani kompetenci recipientskih celic. Obe hipotezi smo potrdili. Zaključimo lahko sledeče:

- Za večjo učinkovitost in frekvenco transformacije bakterij bi morali uporabljati protokole, ki so optimizirani za posamezne bakterijske vrste.
- Elektroporacija je učinkovitejši vnos terapevtskega plazmida od naravne transformacije.
- Osmotski stres lahko inducira kompetenco.
- Z ozirom na bakterijsko mikrofloro kože psov in mačk lahko dopuščamo minimalno možnost, da bi do prenosa terapevtskega plazmida lahko prišlo, vendar le če bi bili izpoljeni vsi pogoji, ki bakterijski celici omogočijo vzpostavitev kompetenčnega stanja.

7 POVZETEK

Transformacija je eden izmed načinov HGP, s katerim si bakterijske celice pridobijo nove genske zapise, ki jim lahko omogočajo selektivno prednost v ekološki niši. Pogosto uporabljeni laboratorijski metoda vnosa genskih informacij v celico je elektroporacija. Ta je vse bolj razširjena tudi pri genski terapiji tumorjev, pri kateri se uporablja terapevtski plazmidi. Na teh se poleg terapevtskega gena, kot selekcijski označevalec uporablja tudi gen za odpornost proti antibiotiku. V oviru magisterskega dela smo preverjali kako učinkovit je prenos gena odpornosti proti ampicilinu, katerega zapis je del terapevtskega plazmida pORF-hIL-12 G2. Hkrati pa smo kot kontrolo preverjali gostiteljsko območje pogosto uporabljenega vektorja pri molekulskem kloniranju, pUC-19.

Uspešnost vnosa terapevtskega plazmida smo preverili pri petih različnih taksonomskih skupinah bakterij. Pri vseh smo uporabili protokol, ki je namenjen pripravi kompetentnih celic in elektroporaciji bakterijskega seva *E. coli* DH5α. Največji delež preiskovanih bakterijskih vrst so predstavljale gamaproteobakterije, pri katerih smo ugotovili tako navečjo učinkovitost, kot tudi frekvenco transformacije. Pri evolucijsko bolj oddaljenih alfa- in betaproteobakterijah so te že znatno nižje. Pri še bolj oddaljenih bakterijskih deblih, aktinobakterijah in firmikutih, do prenosa plazmida ni prišlo.

Približno en odstotek do sedaj opisanih bakterijskih vrst je naravno kompetentnih, do česar navadno pride zaradi vsaj enega izmed stresnih dejavnikov, ki se pojavljajo v okolju. V magistrski nalogi smo po protokolu, ki so ga opisali Zhang in sod. (2012), preverjali vpliv osmotskega pritiska na transformacijo. Povišana koncentracija agarja v gojišču dejansko vpliva na proces bakterijske transformacije, vendar je do prenosa plazmida prišlo le pri polovici od preiskovanih gamaproteobakterij. Pri ostalih taksonomskih skupinah do prenosa plazmida ni prišlo. Učinkovitost in frekvenco transformacije pa sta bili znantno nižji od tistih, ki smo jih dobili z uporabo elektroporacije.

Tako kot terapevtski plazmid vsebuje tudi vektor pUC-19 minimalno mesto *ori E. coli* pMB1, kar lahko predstavlja enega izmed omejitvenih dejavnikov za širjenje gostiteljskega območja, saj se s filogenetsko oddaljenostjo bakterij zmanjšuje možnost podvojevanja plazmida v recipientski celici. Glede na dobljene rezultate lahko trdimo, da možnost transformacije z molekularnim vektorjem pUC-19 s filogenetsko oddaljenostjo bakterijskih skupin pada.

Da bi lahko rezultate še natančneje opredelili, bi bile potrebne še nadaljne raziskave pri katerih bi morali optimizirati protokole glede na posamezno bakterijsko vrsto in razširiti nabor izbranih bakterijskih vrst. Tako bi lahko še z večjo gotovostjo trdili, da ne prihaja do širjenja ampicilinske rezistence v okolje. Prav tako bi na ta način bolj natančno določili gostiteljsko obmojče molekularnega vektorja pUC-19.

8 VIRI

- Aune T.E.V., Aachmann F.L. 2010. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 1301-1313
- Baur B., Hanselmann K., Schlimme W., Jenni B. 1996. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 10: 3673–3678
- Beernink H.T., Morrical S.W. 1999. RMPs: recombination/replication mediator proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24: 385–389
- Berg O.G., Kurland C.G. 2002. Evolution of microbial genomes: sequence acquisition and loss. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 12: 2265-2276
- Bhatt A., Melton R.E., Kieser, T. 2002. Plasmid transfer from *Streptomyces* to *Mycobacterium smegmatis* by spontaneous transformation. *Molecular Microbiology*, 43: 135-146
- Brunda M.J., Luistro L., Warrier R.R., Wright R.B., Hubbard B.R., Murphy M., Wolf S.F., Gately M.K. 1993. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *Journal of Experimental Medicine*, 178: 1223-1230
- Cameron A.D.S., Redfield R.J. 2006. Non-canonical CRP sites control competence regulons in *Escherichia coli* and many other γ -proteobacteria. *Nucleic Acids Research*, 34, 20: 6001-6014
- Charpentier X., Kay E., Schneider D., Shuman H. 2011. Antibiotics and UV radiation induce competence for natural transformation in *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology*, 193: 1114–1121
- Chassy B. M. 1976. A gentle method for the lysis of oral streptococci. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 68: 603-608
- Chassy B.M., Flickinger J.L. 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiology Letters*, 44: 173–177
- Chen I., Dubnau D. 2004. DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 241–249

- Chuang S. E., Chen A. L., Chao C. C. 1995. Growth of *E. coli* at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. Nucleic Acids Research, 23: 1641- 1641
- Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86, 7: 2172-2175
- Claverys J. P., Prudhomme M., Martin B. 2006. Induction of competence regulons as general stress responses in Gram-positive bacteria. Annual Review of Microbiology, 60: 451–475
- Conchas R.F., Carniel E. 1990. A highly efficient electroporation system for transformation of *Yersinia*. Gene, 87: 133-137
- Cutrín J.M., Conchas R.F., Barja J.L., Toranzo A.E. 1994. Electrotransformation of *Yersinia ruckeri* by plasmid DNA. Microbiologia, 10, 1-2: 69-82
- Čemažar M., Jarm T., Serša G. 2010. Cancer electrogene therapy with interleukin-12. Current Gene Therapy, 10: 300-311
- Čemažar M., Serša G. 2007. Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues. Current Opinion in Molecular Therapeutics, 9: 554-562
- Čemažar M., Ambrožič Avguštin J., Pavlin D., Serša G., Poli A., Krhač Levačič A., Tešić N., Lamprecht Tratar U., Rak M., Tozon N. 2015. Efficacy and safety of electrochemotherapy combined with peritumoral IL-12 gene electrotransfer of canine mast cell tumors. Veterinary and Comparative Oncology, doi: 10.1111/vco12208: 15 str. (v tisku)
- Datta N., Hedges R.W. 1972. Host ranges of R factors. Journal of General Microbiology, 70: 453–460
- Davison J. 2002. Genetic tools for *Pseudomonads*, *Rhizobia*, and other gram-negative bacteria. Biotechniques. 32: 386-401
- Dityatkin S.Y.A., Iliyashenko B.N. 1979. Plasmid transformation of frozen-thawed bacteria. Genetika, 15: 220–225
- Don R.H., Pemberton J.M. 1981. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. Journal of Bacteriology, 145: 681–686

- Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W.. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Research, 16: 6127–6145
- Dubnau D. 1999. DNA uptake in bacteria. Annual Review of Microbiology, 53: 217–244
- Enderle P. J., Faewell M. A. 1998. Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. Biotechniques, 25, 6: 954-958
- Engelstädter J., Moradigaravand D. 2013. Adaptation through genetic time travel? Fluctuating selection can drive the evolution of bacterial transformation. Proceedings of the Royal Society B, 281: 20132609, doi: 10.1098/rspb.2013.2609: 7 str.
- Eynard N., Sixon S., Duran N., Teissie J. 1992. Fast kinetic studies of *Escherichia coli* electrotransformation. European Journal of Biochemistry, 209: 431–436
- Fernandes B.L., da Costa S.O. 1996. High efficiency of tranformation of *Proteus mirabilis* with a pUC19 derivate vector directs the eypression and secretion of the *Bacillus subtilis* α -amylase gene. Journal of Microbiological Methods, 26: 147-150
- Fischer Scientific. 2015. O'GeneRuler 1kb DNA Ladder - 250-10,000 bp. Carlsbad, Invitrogen Corporation: 1 str. (september, 2015)
<https://www.fishersci.com/shop/products/thermo-scientific-o-generuler-1-kb-dna-ladder-ready-to-use-250-10-000-bp-250-10000bp-0-1-g-l/fersm1163>
- Fraley R.T., Fornari C.S., Kaplan S. 1979. Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid-vesicles—potential for gene-transfer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76: 3348–3352
- Griffith F. 1928. The significance od pneumococcal types. Journal of Hygiene, 27: 113-159
- Hanahan D., Bloom F.R. 1996. Mehanisms of DNA transformation. V: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Neidhardt F.C., Curtiss R. III, Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umbarger H.E. (eds.). Washington, D.C., American Society for Microbiology: 2449–2459
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal of Molecular Biology, 166: 557–580
- Harlander S.K. 1987. Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation. V: Streptococcal genetics. Ferretti J.J., Curtiss III R. (eds.). Washington D.C., American Society for Microbiology: 229-233

- Harvey R.G., Lloyd D.H. 1995. The distribution of bacteria (other than *Staphylococci* and *Propionibacterium-acnes*) on the hair, at the skin surface and within the hair-follicles of dogs. *Veterinary Dermatology*, 6: 79–84
- Heuer H., Smalla K. 2007. Horizontal gen transfer between bacteria. *Environmental Biosafety Research*, 6: 3-13
- Hobbs M., Mattick J. S. 1993. Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Molecular Microbiology*, 10: 233–243
- Hoffmann A.R., Patterson A.P., Diesel A., Lawhon S.D., Ly H.J., Stephenson C.E., Mansell J., Steiner J.M., Dowd S.E., Olivry T., Suchodolski J.S. 2014. The skin microbiome of healthy and allergic dogs. *PLoS ONE*, 9, 1: e83197, doi:10.1371/journal.pone.003197: 12 str.
- Hofreuter D., Odenbreit S., Haas R. 2001. Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Molecular Microbiology*, 41: 379–391
- Jain A., Srivastava P. 2013. Broad host range plasmid. *FEMS Microbiology Letters*, 348: 87-96
- Jain R., Rivera M.C., Lake J.A. 1999. Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 3801-3806
- Javornik B. 2009. Strokovno mnenje - Intratumoralno injiciranje gole DNA, ki kodira gen za interlevkin 12 in električno posredovani vnos tega odmerka DNA v celice psov. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, Znanstveni odbor za namerno sproščanje GSO v okolje in dajanje izdelkov na trg: 5 str. http://www.arhiv.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/dokumenti/gso_strokovno_mnenje.pdf (junij 2014)
- Johnsborg O., Eldholm V., Havarstein L.S. 2007. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in Microbiology*, 158: 767-778
- Johnston C., Martin B., Fichant G., Polard P., Claverys J.P. 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews*, 12: 181-196

- Jonas D.A., Elmada I., Engel K.H., Heller K.J., Kozianowski G., König A., Müller D., Narbonne J.F., Wackernagel W., Kleiner J. 2001. Safety considerations of DNA in food. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 45, 6: 235-254
- Kobayashi M., Fitz L., Ryan M., Hewick R.M., Clark S.C., Chan S., Loudon R., Sherman F., Perussia B., Trinchieri G. 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 170, 3: 827-845
- Kyrides N.C. 2009. Fifteen years of microbial genomics: meeting the challenges and fulfilling the dream. *Nature Biotechnology*, 27: 627–632
- Laurenceau R., Péhau-Arnaudet G., Baconnais S., Gault J., Malosse C., Dujeancourt A., Campo N., Chamot-Rooke J., Le Cam E., Clavérys J.P., Fronzes R. 2013. A Type IV pilus mediates DNA binding during natural transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathogens*, 9: e1003473, doi: 10.1371/journal.ppat.1003473: 11 str.
- Leonard J.A., Sedivy J.M. 1990. A new vector for cloning large eukaryotic DNA segments in *Escherichia coli*. *Bio/Technology*, 8: 841-844
- Li S., Ma Z. 2001. Nonviral gene therapy. *Current Gene Therapy*, 1: 201–226
- Liu Y., Yang H., Sakanishi A. 2006. Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. *Biotechnology Advances*, 24:1–16
- Ma X., Chow J.M., Gri G., Carra G., Gerosa F., Wolf S.F., Dzialo R., Trinchieri G. 1996. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 183: 147–157
- Madigan M.T., Martinko J.M., Brock T.D. 2006. *Brock biology of microorganisms*. 11th ed. Upper Saddle River, N.J., Pearson Prentice Hall: 1056 str.
- Mandel M., Higa A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*, 53, 1: 159-162
- Martin B., Fichant G., Polard P., Clavérys J.P. 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews*, 12: 181-196
- Michod R.E., Bernstein H., Nedelcu A.M. 2008. Adaptive value of sex in microbial pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, 8: 267-285
- Milkman R., Bridges M.M. 1990. Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome. III. Clonal frames. *Genetics*, 126, 3: 505-517

- Miller W.H., Griffin C.E., Campbell K. 2012. Muller and Kirk's small animal dermatology. 7th ed. St. Louis, Missouri, Elsevier: 184–222
- Monteiro G.A., Fialho A.M., Ripley S.J., Sa-Correia I. 1992. Electroporation of gellan gum-producing and non-producing *Pseudomonas elodea* strains. Journal of Applied Bacteriology, 72: 423-428
- Mortier-Barrière I., Velten M., Dupaigne P., Mirouze N., Piétrement O., McGovern S., Fichant G., Martin B., Noirot P., Le Cam E., Polard E., Claverys J.P. 2007. A key presynaptic role intransformation for a widespread bacterial protein: DprA conveys incoming ssDNA to RecA. Cell, 130: 824–836
- Mumper R.J., Wang J.J., Claspell J.M., Rolland A.P. 1995. Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. Proceedings of the International Symposium on Controlled Release Bioactive Materials, 22: 178–179
- Niidome T., Huang L. 2002. Gene therapy progress and prospects: Nonviral vectors. Gene Therapy, 9: 1647-1652
- Nishikawa M., Huang L. 2001. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. Human Gene Therapy, 12: 861–870
- O'Callaghan D., Charbit A. 1990. High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation. Molecular and General Genetics, 223: 156-158
- Pavlin D. 2009. Ocena tveganja za sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje - elektrogenska terapija spontanih tumorjev psov s plazmidom pORF-hIL12. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor: 8 str. http://www.arhiv.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/dokumenti/gso_ocena_tveganja.pdf (maj, 2014).
- Papagianni M., Avramidis N., Filioussis G. 2007. High efficiency electrotransformation of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* cells pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. BMC Biotechnology, 7: 15, doi: 10.1186/1472-6750-7-15: 6 str.
- Pavlin D., Čemažar M., Serša G., Tozon N. 2011. Elektrogenska terapija pri zdravljenju tumorjev psov. V: Slovenski veterinarski zbornik. 4. Slovenski veterinarski kongres 2011, Portorož, 18.-19. november 2011. Majdič G. (ur.). Ljubljana, Veterinarska fakulteta: 48-51

- Prasanna G.L., Panda T. 1997. Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology. *Bioprocess Engineering*, 16: 261-264
- Prudhomme M., Attaiech L., Sanchez G., Martin B., Claverys J.P. 2006. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science*, 313: 89–92
- Saijonmaa-Koulumies L.E., Lloyd D.H. 1996. Colonization of the canine skin with bacteria. *Veterinary Dermatology*, 7: 153–162
- Schluter A., Szczepanowski R., Puhler A., Top E.M. 2007. Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiology Reviews*, 31: 449–477
- Seitz P., Blokesch M. 2012. Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 37: 336-363
- Sheng Y., Mancino V., Birren B. 1995. Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Research*, 23, 11: 1990-1996
- Shark K.B., Smith F.D., Harpending P.R., Rasmussen J.L., Sanford J.C. 1991. Biolistic transformation of a prokaryote, *Bacillus megaterium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 480–485
- Sinha S., Cameron A.D.S., Redfield R.J. 2009. Sxy induces a CRP-S regulon in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 191, 16: 5180-5195
- Smalla K., Haines A.S., Jones K., Krogerrecklenfort E., Heuer H., Schloter M., Thomas C.M. 2006. Increased abundance of IncP-1 beta plasmids and mercury resistance genes in mercury-polluted river sediments: first discovery of IncP-1beta plasmids with a complex mer transposon as the sole accessory element. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7253–7259
- SnyderL., Champness W. 2003. Molecular genetics of bacteria. 2nd ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology Press: 566 str.
- Solomon J.M., Grossman A.D. 1996. Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends in Genetics*, 12: 150–155

- Song Y.Z., Hahn T., Thompson I.P., Mason T.J., Preston G.M., Li G.H., Paniwnyk L., Huang W.E. 2007. Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria. *Nucleic Acids Research*, 35: e129, doi: 10.1093/nar/gkm710: 9 str.
- Sun D., Zhang Y., Mei Y., Jiang H., Xie Z., Liu H., Chen X., Shen P. 2006. *Escherichia coli* is naturally transformable in a novel transformation system. *FEMS Microbiology Letters*, 265: 249-255
- Thomas C.M., Nielsen K.M. 2005. Mechanisms of, and barriers to horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews*, 3: 711-721
- Top E.M., Van Daele P., De Saeyer N., Forney L.J. 1998. Enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmids. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73: 87–94
- Trinchieri G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigenspecific adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*, 13: 251–276
- Tsen S., Fang S., Chen M., Chien J., Lee C., Tsen D. 2002. Natural plasmid transformation in *Escherichia coli*. *Journal of Biomedical Science*, 9: 246-252
- Tu Z., He G., Li K.X., Chen M.J., Chang J., Chen L., Yao Q., Liu D., Ye H., Shi J., Wu X. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8, 1, doi: 10.2225/vol8-issue1-fulltext-8: 7 str.
- Wang Y., Ma Y., Ren H., Wang X., Xiao C., Ma J. 2013. The study on the factors affecting the natural transformation of E.coli DH5 α . *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5, 12: 450-453
- Wards B.J., Collins D.M. 199. Electroporation at elevated temperatures substantially improves transformation efficiency of slow-growing mycobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 145:101-105
- Watanabe T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriological Reviews*, 27: 87–115
- Wesse Scott J. 2013. The canine and feline skin microbiome in health and disease. *Veterinary Dermatology*, 24: 137-e31, doi: 10.1111/j.1365-3164.2012.01076.x: 10 str.

- Weston A., Brown M.G.M., Perkins H.R., Saunders J.R., Humphreys G.O. 1981. Transformation of *Escherichia coli* with plasmid deoxyribonucleic acid-calcium induced binding of deoxyribonucleic acid to whole cells and to isolated membrane fractions. *Journal of Biotechnology*, 145: 780–787
- Wiegel-Van Aken K.A.K. 2010. Cancer gene therapy. V: A guide to human gene therapy. Herzog W.R., Zolotukhin S. (eds.). Singapore, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd: 279-294
- Wirth R., Friesenegger A., Fiedler S. 1989. Transformation of various species of Gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Molecular and General Genetics*, 216:175–177
- Woodall C.A. 2003. Electroporation of *E. coli*. V: *E. coli* plasmid vectors: Methods and applications (Methods in Molecular Biology). Casali N., Preston A. (eds.). Totowa, Humana Press: 55-59
- Wu N., Matand K., Kebede B., Acquaah G., Williams S. 2010. Enhancing DNA electrotransformation efficiency in *Escherichia coli* DH10B electrocompetent cells. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13, 5, doi.org/10.2225/vol13-issue5-fulltext-11: 5 str.
- Yoshida N., Ide K. 2008. Plasmid DNA is released from nanosized acicular material surface by low molecular weight oligonucleotides:exogenous plasmid acquisition mechanism for penetration intermediates based on the Yoshida effect. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 813–821
- Zhang Y., Shi C., Yu J., Ren J., Sun D. 2012. RpoS regulates a novel type of plasmid DNA transfer in *Escherichia coli*. *PloS ONE* 7, 3: e33514, doi:10.1371/journal.pone.0033514: 11 str.

ZAHVALA

PRILOGE

Priloga A: Primerjava učinkovitosti elektroporacije, za katere so podatki na voljo v literaturi.

bakterijski rod	št.transformant/ μg plazmidne DNA	vir
<i>Escherichia</i>	$1,6 \times 10^5$ $3,5 \times 10^9$	Wirth in sod., 1989, protokol ependorf
<i>Salmonella</i>	NT $10^9 - 10^{10}$	Wirth in sod., 1989, O'Callaghan in Charbit, 1990
<i>Enterobacter</i>	5×10^1	Wirth in sod., 1989
<i>Erwinia</i>	$4,1 \times 10^4 - 4 \times 10^5$	Wirth in sod., 1989
<i>Proteus</i>	$4,2 \times 10^2 - 6 \times 10^3$	Wirth in sod., 1989
<i>Yersinia</i>	$10^2 - 10^7$ $6,0 \times 10^5$	Conchas in Carniel, 1990 Cutrin in sod., 1994
<i>Sphingomonas</i>	$8 \times 10^7, 8 \times 10^7$	Montiero in sod., 1992
<i>Mycobacterium</i>	$>10^5, 1,8 \times 10^6$	Wards in Collins, 1996

NT - ni transformant

Priloga B: Primerjava v študiji pridobljenih frekvenc in učinkovitosti transformacije po obeh uporabljenih protokolih.

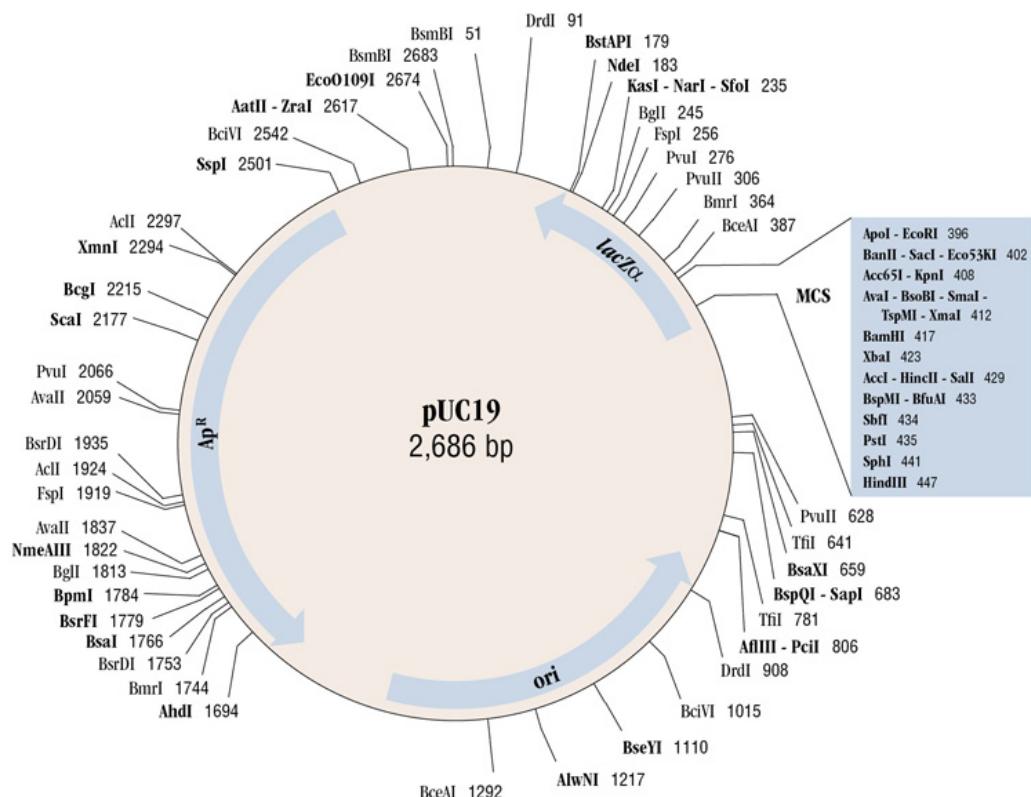
bakterijski sev	pUC-19 (elektroporacija)		pUC – 19 (Zhang in sod., 2012)	
	frekvenca	učinkovitost	frekvenca	učinkovitost
<i>E.hermanii</i>	$2,70 \times 10^{-4}$	$2,43 \times 10^6$	$1,76 \times 10^{-5}$	$1,88 \times 10^3$
<i>Buttiauxella</i>	$2,11 \times 10^{-5}$	$1,60 \times 10^4$	$1,44 \times 10^{-8}$	$1,49 \times 10^2$
<i>S.enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	$4,16 \times 10^{-4}$	$2,08 \times 10^5$	$3,23 \times 10^{-9}$	0,67
<i>S.enterica</i> subsp. <i>arizonaee</i>	$1,60 \times 10^{-3}$	$1,28 \times 10^6$	$2,28 \times 10^{-9}$	7,65
<i>P.vulgaris</i>	$4,92 \times 10^{-4}$	$2,06 \times 10^5$	$2,30 \times 10^{-9}$	3,67
<i>Providencia</i> sp	$4,34 \times 10^{-3}$	$1,12 \times 10^6$	$2,76 \times 10^{-8}$	$6,67 \times 10^1$
<i>Yersinia</i> sp.	$2,07 \times 10^{-4}$	$2,45 \times 10^5$	$6,73 \times 10^{-4}$	$2,45 \times 10^4$
<i>Shigella boydii</i>	$1,56 \times 10^{-3}$	$1,01 \times 10^5$	$2,60 \times 10^{-8}$	$1,49 \times 10^2$
<i>Shigella sonnei</i>	$2,88 \times 10^{-3}$	$6,47 \times 10^5$	$3,95 \times 10^{-9}$	$3,62 \times 10^1$
bakterijski sev	pORF-hIL-12 G2 (elektroporacija)		pORF-hIL-12 G2 (Zhang in sod., 2012)	
	frekvenca	učinkovitost	frekvenca	učinkovitost
<i>Buttiauxella</i>	$9,92 \times 10^{-6}$	$7,54 \times 10^3$	$2,69 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^2$
<i>S.typhimurium</i>	$4,97 \times 10^{-6}$	$1,98 \times 10^4$	$1,96 \times 10^{-9}$	6,67
<i>S.enterica</i> subsp. <i>arizonaee</i>	$1,38 \times 10^{-8}$	$1,10 \times 10^1$	$1,44 \times 10^{-9}$	0,79
<i>Yersinia</i> sp.	$1,62 \times 10^{-4}$	$1,92 \times 10^5$	$4,29 \times 10^{-4}$	$8,09 \times 10^4$
<i>Shigella boydii</i>	$7,51 \times 10^{-4}$	$4,84 \times 10^4$	$2,08 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^2$
<i>Shigella sonnei</i>	$4,53 \times 10^{-4}$	$1,02 \times 10^5$	$1,36 \times 10^{-9}$	$3,14 \times 10^1$

Priloga C: Pregled uporabljenih sevov, njihova filogenetska uvrstitev, temperaturni optimum rasti, vir pridobitve seva

organizem	filogenska uvrstitev v kraljestvo bakterij (deblo; razred;(podrazred);red;(podred); družina; rod)	metoda izolacije plazmidne DNA	T _{opt}	izvor
<i>E. coli</i> DH5α	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia	K:+	37	2
<i>E. hermannii</i>	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia	C: + K: +	37	2
<i>Buttiauxella</i> sp.	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae	C: + K: +	37	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Salmonella	C: - AH: - K: -	37	1
<i>S. typhimurium</i>	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Salmonella	C: +	37	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Salmonella	C: +	37	1
<i>S. enteritidis</i>	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Salmonella	C: -	37	1
<i>P. vulgaris</i>	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Proteus	C: +	37	1
<i>E. chrysanthemi</i>	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Dickeya	C: +	37	1
<i>Yersinia</i> sp.	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Yersinia	C: +	37	1
<i>Providencia</i> sp.	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Providencia	C: +	37	1
<i>P. rettgeri</i>	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Providencia	C: +	37	1
<i>E. amnigenus</i>	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Lelliottia	C: +	37	1
<i>S. boydii</i>	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Shigella	C: +	37	1
<i>S. sonnei</i>	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Shigella	C: +	37	1
<i>P. mephitica</i>	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas	C: - AH: -	30	2
<i>I. fluviatilis</i>	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Neisseriales; Chromobacteriaceae; Chromobacterium group; Iodobacter	C: - AH: -	30	2
<i>H. frisingense</i>	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae; Herbaspirillum	C: - K: -	30	2
<i>Sphingomonas</i> sp.	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae	C: - AH: - K: -	30	3
<i>Staphylococcus</i> sp.	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae	NT	30	2
<i>Mycobacterium</i> sp.	Actinobacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Mycobacteriaceae	NT	30	2

NT, ni transformant; +/-, uspešna/neuspešna izolacija plazmidne DNA; C, Izolacija plazmidne DNA z metodo izolacije s CTAB in tritonom X-100; AH – izolacija plazmidne DNA z alkalno hidrolizo; K, Izolacija plazmidne DNA s komercialnim kompletom »QIAprep® Spin Miniprep Kit«

Priloga D: Restriktijska karta plazmida pUC-19



pUC19 MCS

SacI	SmaI	XbaI	SbfI					
EcoRI	KpnI	BamHI	SalI	PstI	SphI	HindIII		

```
agtgAATTGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGcgtaatcatggtcat
```

400 410 420 430 440 450 460

...S N S S P V R P D E L T S R C A H L S P T I M T M

← *lacZα* translational start →

pNEB193 MCS

SacI	SmaI	BssHII	PacI						
EcoRI	KpnI	AscI	BamHI	XbaI	SalI	PmeI	PstI	SphI	HindIII

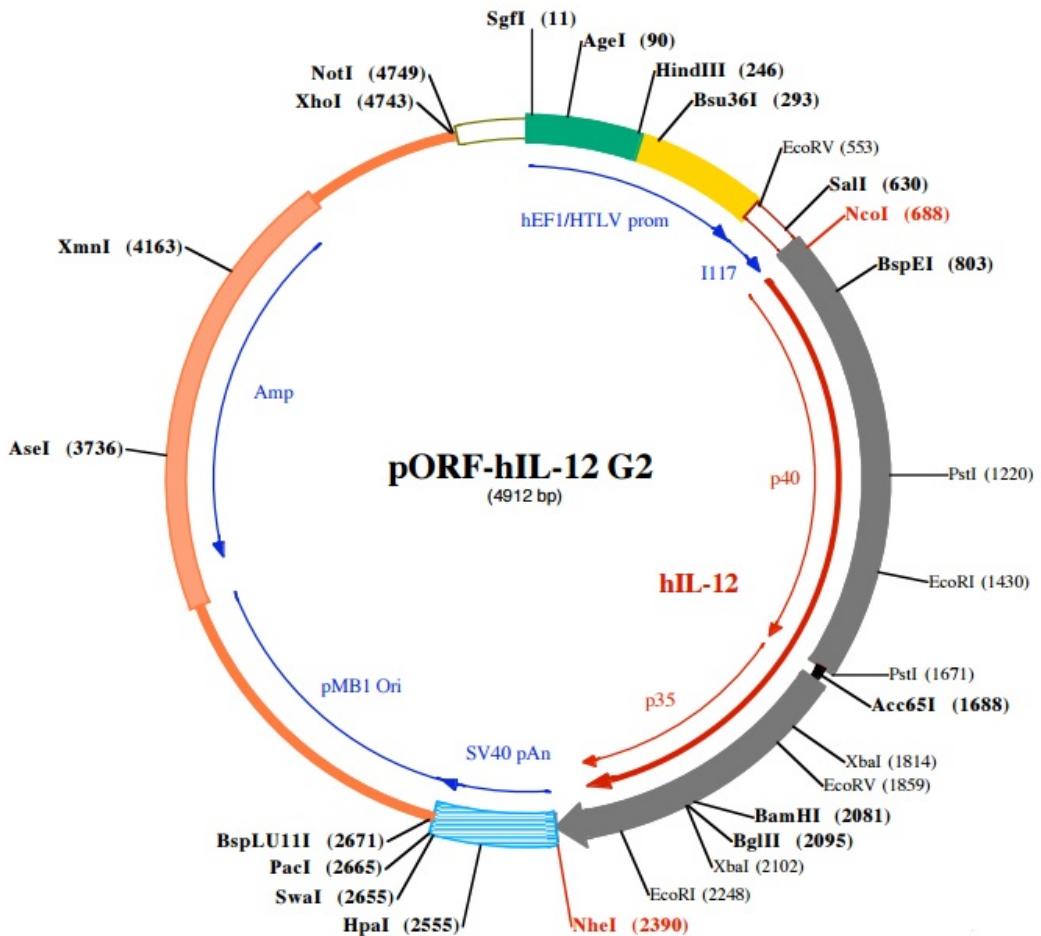
```
agtgAATTGAGCTCGGTACCCGGGGCGCGCGGATCTTAATTAAAGTCTAGAGTCGACTGTTAACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGcgtaatcatggtcat
```

400 410 420 430 440 450 460 470 480 490

...S N S S P V R P R A P D K I L D L T S Q K F R C A H L S P T I M T M

← *lacZα* translational start →

Priloga E: Restriktijska karta plazmida pORF-hIL-12 G2



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Daša MEDVEŠČEK

**VNOS TERAPEVTSKEGA PLAZMIDA PORF-HIL-12
V IZBRANE VRSTE ENTEROBAKTERIJ**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016