

# TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNA

skripta za vaje

magistrski študijski program druge stopnje Laboratorijska biomedicina

Marija Nika Lovšin



Ljubljana, 2025

**Naslov: TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNA - skripta za vaje magistrski študijski program druge stopnje Laboratorijska biomedicina**

**Avtor: doc. dr. Marija Nika Lovšin**

**Recenzent: prof. dr. Tomaž Bratkovič**

**Slike so ustvarjene s pomočjo programa Biorender. Slika na naslovnici ustvarjena s programom ChatGPT.**

**Izdala: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo**

**Kraj in leto izida: Ljubljana, 2025**

**Katalogni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani**

**[COBISS.SI](https://cobiss.si/)-ID [283097347](https://cobiss.si/283097347)**

**ISBN 978-961-7231-09-0 (PDF)**

## Vsebina

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Teoretične osnove tehnologije rekombinantne DNA .....                                                       | 1  |
| Navodila za vaje pri predmetu Tehnologija rekombinantne DNA .....                                           | 9  |
| 1. Korak: Načrtovanje molekulskega kloniranja in oblikovanje začetnih oligonukleotidov. ....                | 10 |
| 2. Korak: Pomnoževanje fragmenta promotorske regije s PCR in restrikcija plazmidnega vektorja.....          | 11 |
| 3. Korak: Agarozna elektroforeza pomnožkov PCR in lineariziranega vektorja, restrikcija produktov PCR ..... | 13 |
| 4. Korak: Čiščenje produktov PCR in ligacija.....                                                           | 14 |
| 5. Korak: Transformacija.....                                                                               | 15 |
| 6. Korak: Nacepljanje bakterijskih kolonij v tekoče gojišče in kolonijski PCR .....                         | 15 |
| 7. Korak: Izolacija plazmidne DNA in transfekcija .....                                                     | 17 |
| 8. Korak: Merjenje luciferazne aktivnosti.....                                                              | 18 |

# Teoretične osnove tehnologije rekombinantne DNA

## Tehnologija rekombinantne DNA

Produkti, pridobljeni s tehnologijo rekombinantne DNA, imajo osrednjo vlogo v sodobni biokemiji, biotehnologiji in laboratorijski biomedicini. Rekombinantne proteine uporabljamo kot ključne reagente v imunokemijskih analizah, pri specifični detekciji in kvantifikaciji tarčnih molekul, v encimskih testih ter pri obdelavi in analizi nukleinskih kislin. Tehnike rekombinantne DNA omogočajo tudi razvoj gensko spremenjenih organizmov, ki predstavljajo modelne sisteme za preučevanje molekularnih in celičnih mehanizmov ter za odkrivanje in vrednotenje zdravilnih učinkovin. Poleg tega gensko spremenjene celice ali celo organizmi omogočajo učinkovito proizvodnjo bioloških učinkovin.

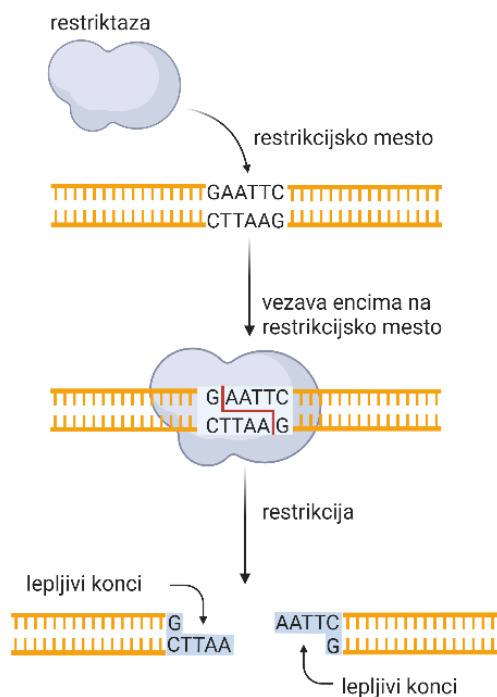
**Tehnologija rekombinantne DNA** zajema nabor metod in tehnik, s katerimi izoliramo, pomnožujemo, spreminjamo in prenašamo gensko informacijo med organizmi. V prejemnem organizmu gene lahko tudi »shranjujemo« ali izražamo. Povedano drugače: s tehnologijo rekombinantne DNA lahko ustvarjamo nove kombinacije genov, ki v naravi niso prisotne, in dosežemo, da celice s spremenjeno dedno zasnovo sintetizirajo končne produkte takšnih genov (tj. RNA ali proteine). Kot sinonim za tehnologijo rekombinantne DNA pogosto uporabljamo tudi izraz **gensko inženirstvo**.

Gensko inženirstvo nam torej omogoča zlasti preučevanje in spreminjanje lastnosti ter funkcije proteinov ali organizmov na ravni nukleinskih kislin. Fragment DNA iz ene vrste celic ali organizma prenesemo v **prejemno celico**. Prejemna celica je sposobna obdržati, prepoznati in uporabiti vanjo vnesen tuj gen le, če je vstavljen v **vektor**. Vektor definiramo kot molekulo DNA, ki služi kot prenašalni sistem za vnos tuje DNA v prejemno celico. Osrednji nalogi vektorja sta avtonomno podvojevanje (tj. neodvisno od replikacije genomske DNA prejemne celice) in zagotavljanje primerne konteksta za izražanje vanj vstavljenega gena (tj. prisotnost ustreznih regulatornih genskih elementov, kot so promotor, ojačevalno zaporedje in transkripcijski terminator/poliadenilacijsko mesto). Končni produkt izražanja gena je lahko protein ali pa nekodirajoča RNA. Z vstavitvijo tujega gena (t.i. genskega **inserta** ali **vklučka**) v vektor dobimo nekakšno »hibridno« DNA, nastalo s kombinacijo dveh ali več molekul DNA, zato govorimo o rekombinantni DNA; genskim produktom pravimo rekombinantne RNA oz. rekombinantni proteini.

Prejemna celica ustvarja kopije vektorja in vanj vstavljenega tujega genskega zapisa, z delitvijo pa tudi prenaša to gensko informacijo na hčerinske celice. Ker so hčerinske celice kloni – nosijo enak genski zapis, vključno z vektorsko DNA – tak proces pomnoževanja genske informacije (temelječ na uporabi živih organizmov) imenujemo **molekulsko kloniranje**. Poznamo več metod molekulskega kloniranja, npr. klasično kloniranje z restrikcijo in ligacijo, sestavljanje po Gibsonu, kloniranje Gateway, kloniranje TOPO in metodo BioBrick.

## Molekulsko kloniranje z restrikcijo in ligacijo

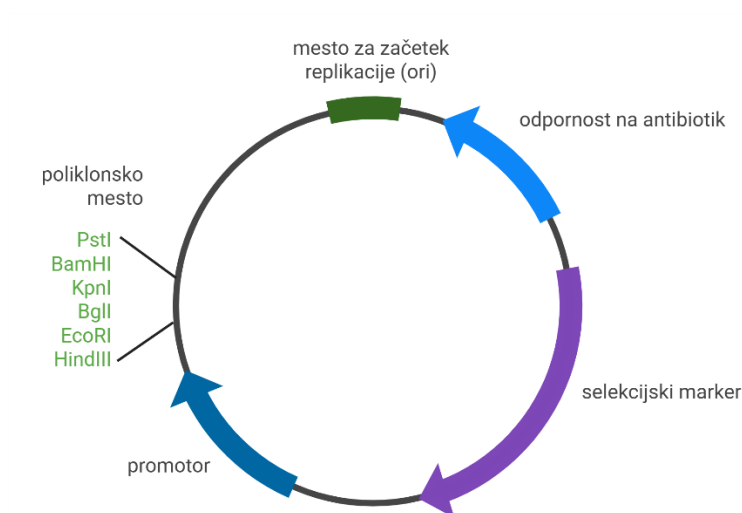
Metode molekulskega kloniranja so se razvile po odkritju **restrikcijskih encimov** (ali **restriktaz**), ki prepoznajo kratka nukleotidna zaporedja (t.i. restrikcijska mesta; Slika 1) in katalizirajo hidrolizo fosfodiesterne vezi na točno določenem položaju DNA znotraj ali ob prepoznavnem zaporedju. Restrikcijsko mesto je praviloma palindromne narave. Po cepitvi z restriktazo nastane fragmenta DNA, ki imata bodisi topa ali lepljiva konca. Lepljivi konci (angl. *sticky ends*) nosijo za razliko od topih (angl. *blunt ends*) kratke, nekaj nukleotidov dolge komplementarne enoverižne segmente (t.i. previse, angl. *single-stranded overhangs*). Prvotno so restriktaze izolirali iz bakterij, kjer služijo kot obrambni mehanizem proti tuji DNA. Restriktaze namreč cepijo virusno DNA, ki vstopi v bakterijo. Danes v laboratoriju uporabljamo rekombinantne restriktaze, s katerimi lahko nadzorovano cepimo vektorsko DNA in vključek, ki ju naknadno prek lepljivih koncev povežemo v rekombinantno DNA.



**Slika 1: Delovanje restrikcijskih encimov.** Restrikcijska endonukleaza prepozna specifično restrikcijsko mesto in ga cepi. Na sliki je prikazano prepoznavno mesto restriktaze *EcoRI*. Po cepitvi DNA nastanejo lepljivi konci s 5'- ali 3'-previsi. Z rdečo je označeno mesto cepitve.

Pomembno orodje pri molekulskega kloniranju so klonirni vektorji. Klonirni vektorji omogočajo prenos fragmentov DNA med celicami. Najpogosteje za kloniranje uporabljamo plazmide. Plazmidi so bakterijska krožna, dvovertižna, izvenkromosomska DNA, ki se lahko samostojno podvaja. Običajno so veliki nekaj tisoč baznih parov. Neodvisno podvajanje od kromosomske DNA jim omogoča mesto *ori* (angl. *origin of replication*), ki ga prepozna bakterijska DNA-polimeraza in plazmid podvojuje. Plazmidi se v bakterijski celici lahko namnožijo do velikega števila kopij. Plazmidi, ki jih uporabljamo kot orodja za molekulskega kloniranje, vsebujejo tudi

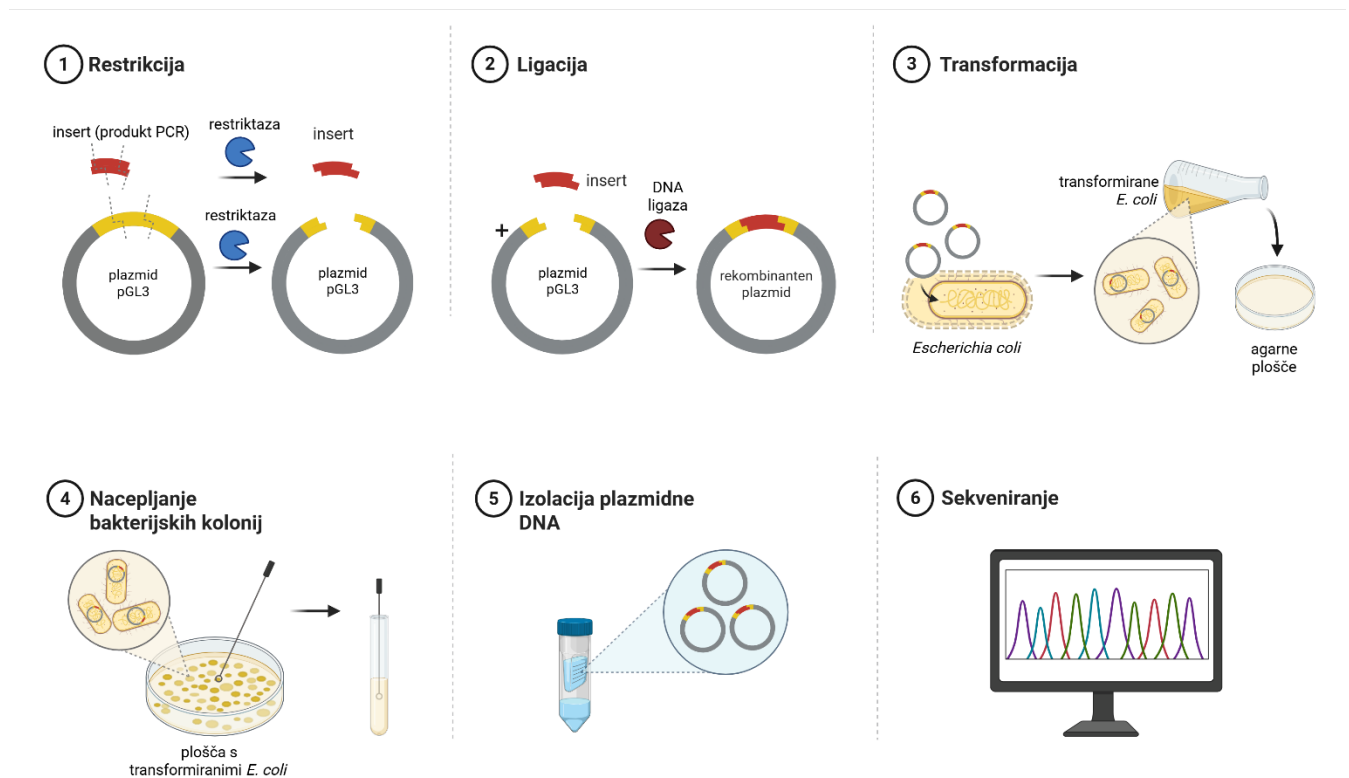
poliklonsko mesto. To vključuje cepitvena mesta za različne restriktaze (Slika 2). V poliklonskem mestu se nahaja le po eno mesto, ki ga prepozna posamezna restriktaza. Plazmidi vsebujejo tudi selekcijske označevalce, ki celicam dajejo specifične lastnosti. Pogosto selekcijski označevalci nosijo zapis za odpornost proti antibiotikom. Celice, ki privzamejo plazmid, postanejo odporne proti antibiotiku. Na ta način ločimo bakterije, ki so privzele plazmid, od tistih, ki ga nimajo.



**Slika 2. Shema plazmidnega vektorja.** Plazmidni vektor vsebuje poliklonsko mesto s prepoznavnimi mesti za restrikcijske encime, mesto *ori* za začetek replikacije, selekcijski označevalec, promotorska zaporedja.

Pri klasičnem molekularnem kloniranju fragment DNA in klonirni vektor, v katerega vstavljamo fragment, najprej cepimo z restrikcijskimi encimi (Slika 3). Fragment DNA, ki ga kloniramo, lahko pridobimo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) iz genomske DNA, cDNA ali s kemijsko sintezo. Pomembno je, da fragment DNA in klonirni vektor cepimo z istim parom restriktaz. Po **restrikciji** fragmente DNA (fragment in vektor) očistimo, da ne vsebujejo več nerazrezanih produktov ali restriktaz. Sledi **ligacija** z uporabo DNA-ligaze, ki katalizira tvorbo fosfodiesterne vezi med zaporednima polinukleotidoma (tj. obema fragmentoma DNA, povezanima prek previsov z vodikovimi vezmi med komplementarnimi bazami). Pri ligaciji je pomembno molsko razmerje med insertom in vektorjem. Običajno sprva poskusimo z razmerjem 3 : 1, a ga je pogosto potrebno empirično optimizirati, da dobimo želeno rekombinantno DNA. Izkoristek ligacije je zelo nizek, nastane lahko le nekaj tisoč molekul. Za pomnožitev rekombinantnih molekul uporabimo prejemne celice, zlasti seve bakterije *Escherichia coli*. S postopkom **transformacije** vnesemo rekombinantno DNA v gostiteljske celice. Bakterijske celice, ki lahko privzamejo rekombinantno DNA, imenujemo **kompetentne celice**. Najpogosteje v laboratoriju uporabljamo seve bakterije *E. coli* DH5α ali TOP10.

Bakterijske kolonije, ki zrastejo na selekcijskem gojišču, imenujemo transformanti. Uspešnost kloniranja običajno analiziramo tako, da iz kolonij izoliramo plazmidno DNA in izvedemo restrikcijsko analizo. Plazmid cepimo z restriktazama ter z agarozno gelsko elektroforezo preverimo velikost fragmentov (plazmida in inserta). Velikost fragmentov pri agarozni elektroforezi primerjamo s standardom velikosti. Za dokončno potrditev uspešnosti kloniranja določimo nukleotidno zaporedje konstrukta (t.i. sekvenciranje).



**Slika 3. Shematski prikaz molekulskega kloniranja.** (1) V prvem koraku fragment DNA, ki ga kloniramo, in klonirni vektor cepimo z istim parom restrikcijskih encimov. (2) Insert DNA in vektor ligiramo, da nastane rekombinanten plazmid. (3) Z rekombinantnim plazmidom transformiramo kompetentne bakterijske celice. (4) Bakterijske kolonije iz agarne gojišča nacepimo v tekoče gojišče in (5) izoliramo plazmidno DNA. (6) Nukleotidno zaporedje konstrukta analiziramo s sekvenciranjem.

## **Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za kloniranje**

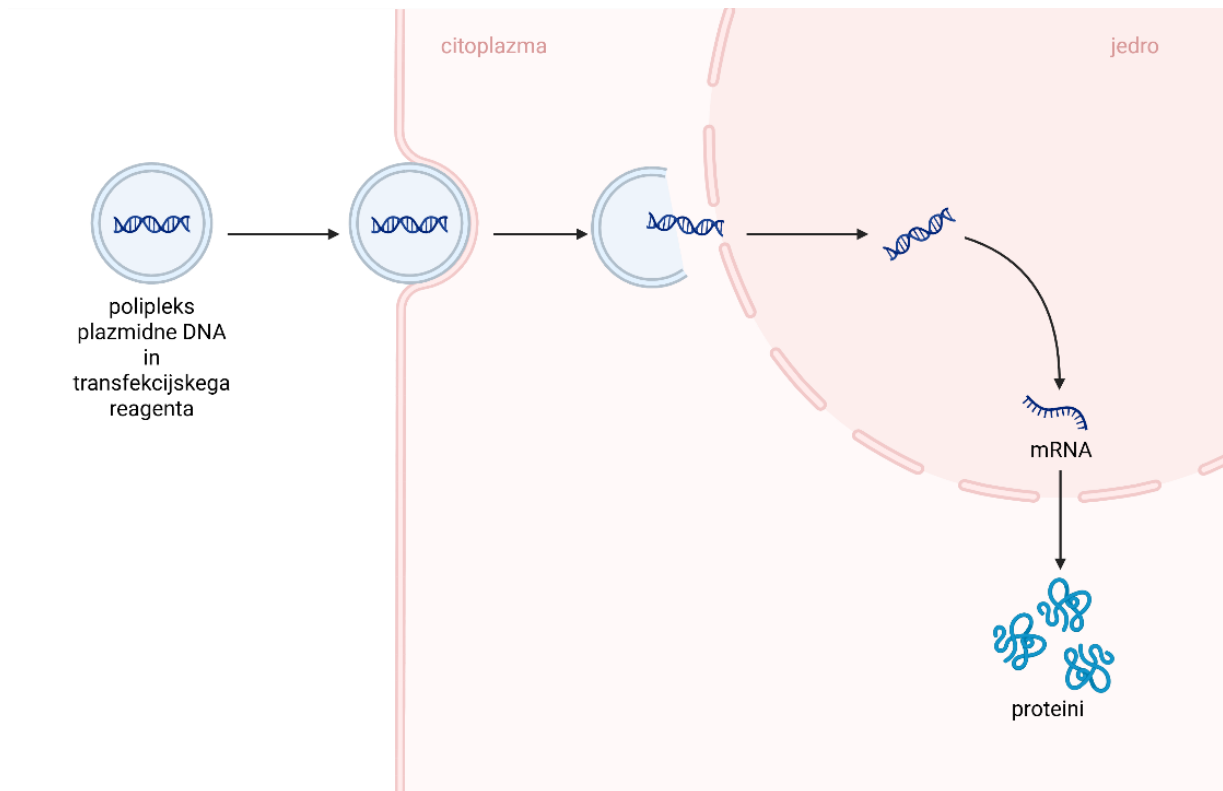
Začetni oligonukleotidi so enoverižna DNA, dolžine 15-30 nt, s katerimi definiramo dolžino in specifičnost produkta PCR (amplikona). Pravila za načrtovanje začetnih oligonukleotidov:

1. Delež G/C 40-60% (delež GC vpliva na talilno temperaturo ( $T_m$ ))
2.  $T_m$  obeh oligonukleotidov naj bosta čimbolj podobni, razlika naj ne presega 5 °C.
3.  $T_m$  naj bo med 55 – 65 °C
4. Na 3'- koncu naj bo G ali C, kar omogoča boljše prileganje oligonukleotida
5. Znotraj zaporedja naj ne bo območij, ki bi se lahko hibridizirala (naj ne bo intra, inter-komplementarnosti, ki vodijo do sekundarnih struktur ali dimerov)
6. Oligonukleotid naj ne vsebuje regij, ki so homologne (>70 % ) z matrično DNA izven območja, ki ga pomnožujemo (specifičnost)
7. Dolžina produkta PCR je običajno od 100 – 1000 bp (odvisno kaj pomnožujemo)
8. Oligonukleotidna zaporedja analiziramo s programom BLAST, preverimo ali obstajajo podobna zaporedja izven načrtovanih mest hibridizacije

Pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov za molekularno kloniranje vanje na 5'-konec vnesemo tudi restrikcijska mesta in (neposredno prednje) še nekaj dodatnih baz, ki omogočijo vezavo restriktaze.

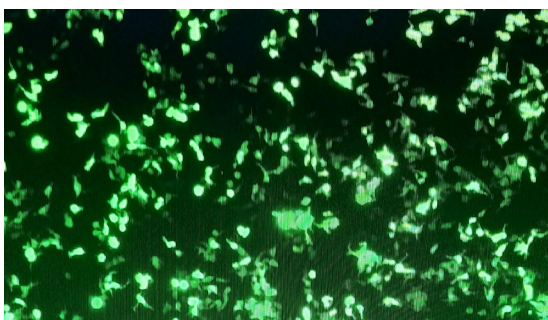
## **Transfekcija sesalskih celic**

Transfekcija je postopek vnosa nukleinskih kislin v sesalske celice. Transficiramo lahko plazmidno DNA, siRNA, mikro RNA, mRNA, komplekse gRNA/Cas9 in druge nukleinske kisline. Kadar nukleinske kisline ostanejo v celici omejen čas, gre za prehodno transfekcijo (nekaj dni po transfekciji). Če se DNA vgradi v genom gostiteljske celice, je transfekcija stabilna. Najpogosteje za transfekcijo celičnih linij uporabljamo transfekcijske reagente, ki so kationski lipidi ali polimeri (npr. Lipofectamine, Polyjet). Med plazmidno DNA in kationskimi lipidi/polimeri nastanejo lipopleksi/polipleksi, ki vstopijo v celice z endocitozo. V citoplazmi polipleksi razpadejo, med celično delitvijo ob razpadu jedrne ovojnice pa pride do transkripcije plazmidne DNA (Slika 4).



**Slika 4. Shematski prikaz transfekcije.** Nukleinske kisline s kationskim polimerom tvorijo polipeks, ki se z endocitozo prenese v celico. Med celično delitvijo pride do transkripcije in sinteze proteinov.

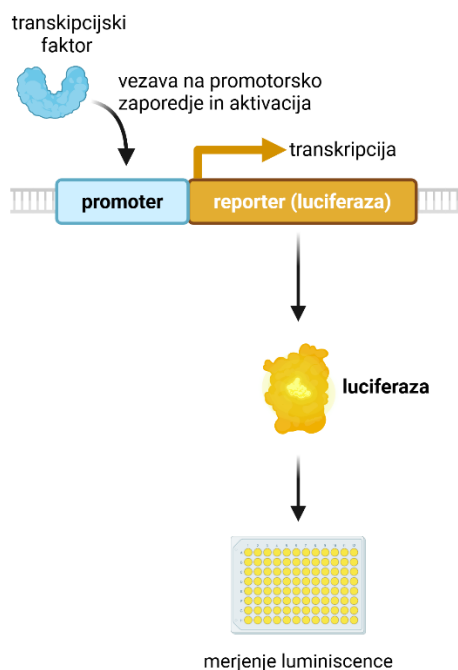
Za kontrolo uspešnosti transfekcije, celice pogosto transficiramo z genom za zeleni fluorescenčni protein (angl. *green fluorescent protein*, GFP) (Slika 5).



**Slika 5. Celice HEK293T, transficirane s proteinom GFP** pod fluorescenčnim mikroskopom pri 20x povečavi. Slika je posneta na Fakulteti za farmacijo.

## Luciferazni test za določanje aktivnosti promotorja

Za analizo aktivnosti promotorja uporabljamo različne reporterske sisteme. Promotorsko regijo vstavimo v reporterske vektorje in po vnosu v sesalske celice spremljamo aktivnost promotorja (posredno – z merjenjem aktivnosti reporterskega gena oz. njegovega proteinskega produkta). Aktivnost promotorja lahko spremljamo ob prisotnosti različnih transkripcijskih dejavnikov ali učinkovin, ki vplivajo na aktivnost določenega promotorja. Kot reporterske vektorje pogosto uporabljamo vektorje, ki poleg poliklonskega mesta za vstavljanje promotorske regije vsebujejo zapis za luciferazo. To je encim, ki katalizira oksidacijo substrata, ob čemer pride do sproščanja svetlobe, t.i. bioluminiscence, kar zaznamo z optičnim čitalcem. Če se na promotor vežejo aktivatorji in pride do transkripcije, torej je promotor aktiven, se gen za luciferazo izrazi (prepiše in prevede v protein) in njegovo aktivnost lahko spremljamo z merjenjem intenzitete luminiscenčnega signala (slika 6).



**Slika 6. Reporterski sistem za določanje aktivnosti promotorja z uporabo luciferaze.** Promotorsko regijo vstavimo v plazmidni vektor, ki vsebuje zapis za luciferazo. Če pride do aktivacije promotorja, se zapis za luciferazo prepiše, sledi sinteza luciferaze, ki katalizira oksidacijo substrata in pride do luminiscence.

## Delo z gensko spremenjenimi organizmi

Pri delu z gensko spremenjenimi organizmi (GSO) upoštevamo pravila dela v zaprtem sistemu za GSO. Ves potrošni material (nastavki, (mikro)centrifugirke) in odpadne tekočine (bakterijsko gojišče) po končanem poskusu inaktiviramo. Tekočine zavržemo v posodo, namenjeno zbiranju tekočih gojišč, potrošni material pa v posebne koše za kontaminirane odpadke, ki so na vsakem pultu. Če bakterijsko kulturo razlijemo, jo pobrišemo, brisačke

odvržemo v biološki odpad, površino pa obrišemo s 70% etanolom. O vsakem nepredvidenem dogodku pri delu z GSO takoj obvestimo asistenta.

## Navodila za vaje pri predmetu Tehnologija rekombinantne DNA

### Naslov projektnega dela: Molekularno kloniranje promotorske regije in merjenje aktivnosti promotorja v sesalskih celicah

#### Namen projektnega dela

Namen projektnega dela je seznaniti se z osnovnimi tehnikami genskega inženirstva. Osnovna metoda je molekularno kloniranje. Študent bo v okviru projektnega dela najprej pripravil načrt kloniranja promotorske regije v primeren reporterski vektor (načrtovanje začetnih oligonukleotidov). Sledilo bo kloniranje promotorske regije v reporterski vektor (PCR, restrikcija in ligacija ali kloniranje po Gibsonu, transformacija). Po izolaciji plazmidne DNA in potrditvi nukleotidnega zaporedja reporterskega vektorja bodo študentje preverili aktivnost promotorja v sesalskih celicah. V ta namen bodo sesalske celice transficirali s plazmidnim vektorjem, jih po enem dnevu lizirali in izmerili luminiscenco na avtomatskem čitalcu.

#### Izvedba vaj in ocenjevanje

Vaje bodo potekale v skupinah po 5-8 študentov v obliki samostojnega projektnega dela. Na koncu vaj je potrebno oddati poročilo, za katerega boste dobili oceno. Ocena vaj prispeva 50 % h končni oceni predmeta. Vaje se bodo terminsko izvajale predvidoma v mesecu novembru in sicer v sklopu in po dogovoru z vodjo vaje. Pred pričetkom vaj bomo predstavili teoretične osnove v obliki seminarja (v okviru terminov za predavanja).

#### Poročilo:

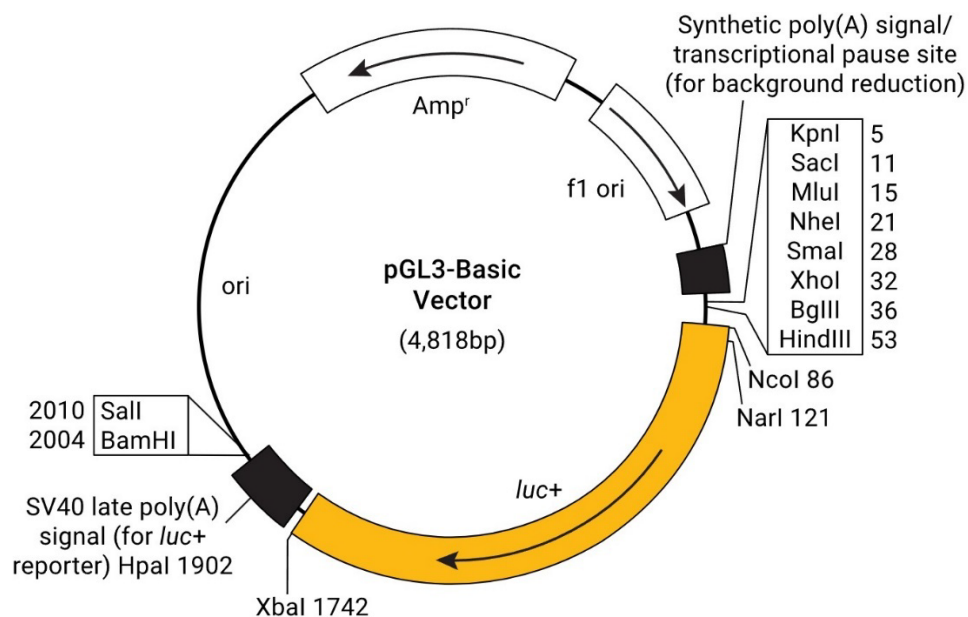
Vsak študent odda svoje poročilo na koncu izvedenega projekta. Poročilo naj bo v obliki znanstvenega članka in naj vsebuje sledeča poglavja:

1. **Namen** – V nekaj stavkih napišite, kaj je cilj vašega projekta.
2. **Metode** – Na kratko opišite vse metode, ki ste jih uporabljali pri delu.
3. **Rezultati** – Predstavite rezultate, oblikujte podpoglavja glede na navodila. Rezultate kritično ovrednotite in dodajte relevantne slike. Ob slikah naj bodo naslov slike in kratek opis, kaj je na sliki. V tem poglavju rezultate tudi komentirate.
4. **Zaključek** – Podajte komentar k celotnemu projektному delu, komentirajte potencialne težave in na kratko povzemite, kaj so zaključki projektnega dela.
5. **Literatura** – Navedite literaturo, ki ste jo uporabili pri pisanju poročila. V besedilu uporabite številke v oklepaju, na koncu naredite seznam referenc, ki naj vsebujejo seznam avtorjev, leto, naslov, revija, strani. Pomagajte si lahko z orodji za citiranje kot so Zotero ali Mendeley.

## 1. Korak: Načrtovanje molekulskega kloniranja in oblikovanje začetnih oligonukleotidov

### Uvod

Pri patoloških stanjih je izražanje genov pogosto spremenjeno. Za razumevanje procesov, ki vodijo do spremenjenega izražanja genov, je ključno poznavanje aktivnosti promotorjev. Za študij aktivnosti promotorja promotorsko regijo vstavimo v reporterske vektorje in po vnosu v sesalske celice spremljamo aktivnost promotorja. Aktivnost promotorja se lahko spremlja ob prisotnosti različnih transkripcijskih dejavnikov ali učinkovin, ki vplivajo na njegovo aktivnost. Kot reporterske vektorje pogosto uporabljamo vektorje, ki poleg poliklonskega mesta, kamor vstavimo promotorsko regijo, nosijo zapis za luciferazo. To je encim, ki katalizira oksidacijo substrata, pri čemer pride do sproščanja svetlobe, tj. pojava bioluminiscence, kar lahko zaznamo z optičnim čitalcem. Če se na promotor vežejo aktivatorji in pride do transkripcije, torej je promotor aktiven, se bo luciferaza izrazila in izmerili bomo encimsko aktivnost. Pri vaji bomo uporabili reporterski vektor pGL3 (Promega; Slika 7). V poliklonsko mesto bomo prek restrikcijskih mest vstavili promotorsko regijo za promotor SV40 (virusni promotor - simian virus 40) oziroma CMV (citomegalovirusni promotor).



**Slika 7: Osnovni plazmidni vektor pGL3-Basic (Promega)** – v strukturi najdemo mesto pričetka replikacije (ori) , gen za odpornost proti ampicilinu (Amp<sup>r</sup>) in zapis za kresničkino luciferazo. (Vir: <http://www.promega.com/vectors>)

### Naloge:

1. Poiščite promotorsko regijo za a) promotor SV40, b) promotor CMV in naredite restrikcijsko analizo s pomočjo programa [NEBCutter](#). Za iskanje nukleotidnih zaporedij lahko uporabite [NCBI](#), [SnapGene](#).

2. Izberite restrikcijska encima, s pomočjo katerih boste vstavili promotorsko regijo v plazmid. Fragment DNA (tj. izbrana promotorska regija), ki ga klonirate ne sme vsebovati teh restrikcijskih mest.
3. Najdite nukleotidna zaporedja restrikcijskih mest in jih dodajte nukleotidnemu zaporedju promotorske regije.
4. Načrtajte začetne oligonukleotide; bodite pazljivi, da nukleotidna zaporedja vedno pišemo v smeri 5' -> 3'.
5. Preverite naleganje začetnih oligonukleotidov in naročite sintezne oligonukleotide.

5' (forward/istosmerni) začetni oligonukleotid

---

3' (reverse/protismerni) začetni oligonukleotid

---

## **2. Korak: Pomnoževanje fragmenta promotorske regije s PCR in restrikcija plazmidnega vektorja**

**Naloge:**

### **1. PCR reakcija:**

Z začetnimi oligonukleotidi in matrično DNA, ki vsebuje zaporedje promotorja, izvedite reakcijo PCR. Začetne oligonukleotide, ki ste jih načrtali, proizvajalec pošlje v liofilizirani obliki. Zato jih najprej raztopite skladno z navodili proizvajalca (običajno v 250 µL) H<sub>2</sub>O, da dobite koncentracijo 100 µM. Nato oligonukleotide redčite do koncentracije 10 µM. Za pomnoževanje uporabite DNA-polimerazo Q5 (Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, NEB). Sestava reakcijske mešanice je podana v Tabeli 1. Za matrično DNA bomo uporabili plazmidni vektor, ki vsebuje zaporedje promotorja SV40 oziroma CMV. Pogoji reakcije PCR so navedeni v Tabeli 2. Po koncu reakcije PCR vzorce lahko zamrznete pri -20 °C do nadaljnje obdelave.

**Tabela 1. Predlog za pripravo reakcijske mešanice za PCR.**

| Reagent                                          | Volumen  |
|--------------------------------------------------|----------|
| H <sub>2</sub> O                                 | 10,5 µL  |
| 5x Q5 reakcijski pufer (NEB)                     | 5,00 µL  |
| 5x Q5 High GC Enhancer (NEB)                     | 5,00 µL  |
| 10 µM istosmerni začetni oligonukleotid          | 1,25 µL  |
| 10 µM protismerni začetni oligonukleotid         | 1,25 µL  |
| 10 µM zmes vseh štirih deoksinukleotidov (dNTPs) | 0,500 µL |

|                   |          |
|-------------------|----------|
| pDNA (c=50 ng/μL) | 1,00 μL  |
| DNA-polimeraza Q5 | 0,500 μL |
| Celokupni volumen | 25,0 μL  |

**Tabela 2. Temperaturni program reakcije PCR.**

|                                         |       |        |
|-----------------------------------------|-------|--------|
| Začetna denaturacija                    | 95 °C | 4 min  |
| Prileganje in podaljševanje (30 ciklov) | 95 °C | 15 s   |
|                                         | 55 °C | 15 s   |
|                                         | 72 °C | 1 min  |
|                                         | 72 °C | 10 min |
| Zaključno podaljševanje                 | 72 °C | 10 min |
| Ohlajanje                               | 4 °C  | ∞      |

## **2. Restrikcija plazmidnega vektorja pGL3**

Plazmidni vektor pGL3 in produkte PCR cepite po predlaganem protokolu v Tabeli 3.

**Tabela 3. Restriksijska reakcija**

| Reagent                  | Volumen |
|--------------------------|---------|
| pGL3 (c=50 ng/μL)        | 10 μL   |
| H <sub>2</sub> O         | 1,5 μL  |
| Pufer CutSmart 10x (NEB) | 1,5 μL  |
| Encim 1 (NEB)            | 1,0 μL  |
| Encim 2 (NEB)            | 1,0 μL  |
| Celokupni volumen        | 15 μL   |

Tako pripravljeno zmes 3 ure inkubirajte v termobloku na 37 °C. Po končani inkubaciji vzorce shranite pri -20 °C do analize na agaroznem gelu. Med inkubacijo pripravite 1% agarozni gel, na katerem boste analizirali rezultate PCR in uspešnost restrikcije.

## **3. Priprava 1% agaroznega gela, 100 mL**

100 mL pufru 1xTAE

1 g agaroze

Agarozo v pufru 1xTAE raztopite z uporabo mikrovalovke. Ko se gel ohladi na 70 °C, dodajte 2 μL DNA-barvila MidoriGreen in vlijte gel v elektroforezno kadičko. Ko se gel strdi, ga shranite v hladilniku v pufru 1xTAE do naslednjega koraka, ko boste izvedli elektroforezo.

### **3. Korak: Agarozna elektroforeza pomnožkov PCR in lineariziranega vektorja, restrikcija produktov PCR**

V elektroforezno kadičko vlijte toliko pufru 1x TAE (zagotavlja ustrezen pH in nabite delce, ki omogočajo električno prevodnost medija), da je gel popolnoma potopljen. V vdolbinice v gelu (žepke) previdno nanesite 4 µL standarda velikosti DNA (uporabljen DNA Ladder Nippon Genetics MWD01) in vaše vzorcev, ki jim predhodno dodajte 6-kratni nanašalni pufer. Glicerol v nanašalnem pufru poveča viskoznost vzorca in olajša njegovo nanašanje v žepke, barvna indikatorja ksilen cianol in bromfenol modro pa obarvata vzorec in omogočita spremljanje elektroforeze. Elektroforeza, ki poteka horizontalno, naj teče pri konstantni napetosti 80 V dokler pas modrega barvila ne doseže  $\frac{3}{4}$  dolžine gela. Po končani elektroforezi gel pogledajte pod UV-svetlobo v aparaturi G-Box (SYNGENE).

#### **Nanos vzorcev in pričakovane velikosti DNA fragmentov**

Standard velikosti \_\_\_\_\_

Negativna kontrola PCR \_\_\_\_\_

PCR produkti \_\_\_\_\_

Nerazrezan vektor (plazmid) \_\_\_\_\_

Razrezani vektor (plazmid) \_\_\_\_\_

#### **Slika agaroznega gela**

### Izolacija produktov PCR in razrezanega vektorja

Po končani elektroforezi iz gela izrežite koščke s produkti PCR in ogrodjem plazmidnega vektorja. Z uporabo kompleta QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) izolirajte DNA iz agaroznega gela. DNA eluirajte v 30 µL elucijskega pufra. Izmerite koncentracijo DNA s spektrofotometrom NanoDrop.

Koncentracija produkta PCR (ng/µL) \_\_\_\_\_

Koncentracija ogrodja vektorja (ng/µL) \_\_\_\_\_

### Restrikcija produkta PCR

Produkt reakcije PCR pred ligacijo cepite z istima restriktazama kot plazmid (Tabela 4).

**Tabela 4. Restriksijska reakcija**

| Reagent                    | Volumen            |
|----------------------------|--------------------|
| produkt PCR (c=____ ng/µL) | µL                 |
| H <sub>2</sub> O           | dopolnimo do 15 µL |
| Pufer CutSmart 10x (NEB)   | 1,5 µL             |
| Encim 1(NEB)               | 1,0 µL             |
| Encim 2 (NEB)              | 1,0 µL             |
| Celokupni volumen          | 15 µL              |

## 4. Korak: Čiščenje produktov PCR in ligacija

### 1. Čiščenje produkta PCR po restrikciji

Po restrikciji produkta PCR ga ponovno očistite z uporabo kompleta QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) in izmerite koncentracijo DNA s spektrofotometrom NanoDrop.

Koncentracija produkta PCR (ng/µL) \_\_\_\_\_

### 2. Ligacija

Po predlaganem protokolu pripravite ligacijsko mešanico z uporabo DNA-ligaze T4 (NEB) in jo inkubirajte čez noč pri 16 °C (Tabela 5). Molarno razmerje med insertom in vektorjem naj bo 3:1. Za izračun količine plazmidne DNA si lahko pomagate z [NEBioCalculator](#)-jem.

**Tabela 5. Sestava ligacijske mešanice.**

| Reagent                      | Volumen      |
|------------------------------|--------------|
| pGL3 (c= ____ ng/ $\mu$ L)   | $\mu$ L      |
| Insert (c= ____ ng/ $\mu$ L) | $\mu$ L      |
| H <sub>2</sub> O             | $\mu$ L      |
| 10x ligazni pufer (NEB)      | 2,50 $\mu$ L |
| DNA-ligaza T4 (NEB)          | 1,00 $\mu$ L |
| Celokupni volumen            | 25,0 $\mu$ L |

Kontrole ligacije so \_\_\_\_\_.

### **5. Korak: Transformacija**

Na ledu počasi odtalite 50- $\mu$ L alikvot kompetentnih celic, shranjen pri  $-80^{\circ}\text{C}$ ; vanj takoj po odtajanju odpipetirajte 10  $\mu$ L ligacijske zmesi vzorca in kontrole ter narahlo premešajte. Transformacijsko zmes inkubirajte 30 min na ledu, nato jo 45 s inkubirajte pri  $42^{\circ}\text{C}$  v vodni kopeli in takoj zatem zmes ponovno nekaj minut inkubirajte na ledu. Celicam dodajte 250  $\mu$ L segretega gojišča LB brez ampicilina in jih 1 uro inkubirajte pri  $37^{\circ}\text{C}$  s stresanjem pri 225 vrt./min. S tem omogočite bakterijam, ki so sprejele plazmid, da razvijejo odpornost proti ampicilinu, kar bo na selektivnem agar gojišču kasneje omogočilo identifikacijo kolonij, ki so sprejele plazmid. Po 1 uri nanosite 100  $\mu$ L transformacijske zmesi na predhodno ogreto petrijevko z gojiščem LBA (LB-agar, 100  $\mu\text{g/mL}$  ampicilina); preostanek 5 min centrifugirajte v namizni centrifugi pri 3.000 vrt./min. Po centrifugiranju odstranite večino supernatanta in v preostanku suspendirajte posedle celice. Tako pridobljene skoncentrirane celice po enakem postopku nanosite na predhodno ogreto selekcijsko trdno gojišče. Ko sta gojišči suhi, ju inkubirajte obrnjeni navzdol čez noč pri  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **6. Korak: Nacepljanje bakterijskih kolonij v tekoče gojišče in kolonijski PCR**

Za analizo uspešnosti ligacije bomo uporabili metodo PCR na osnovi kolonije, pri kateri za vhodni material uporabimo bakterijsko kolonijo. V 200- $\mu$ L mikrocentrifugirke odpipetirajte po 20  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. V 10-mL centrifugirke odpipetirajte 3 mL gojišča LBA. S sterilnim nastavkom se dodaknite bakterijske kolonije na agarni plošči in prenesite kolonijo v 20  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, preostanek bakterij na nastavku prenesite v 3 mL LBA gojišča. Vodno suspenzijo bakterij segrejte za 5 minut na  $95^{\circ}\text{C}$ , nastala suspenzija služi kot matrica za kolonijski PCR (Tabeli 6 in 7). Bakterijske kolonije (nacepljene v 3 mL tekočega gojišča LBA) ob stresanju pri 120 vrt./min inkubirajte pri  $37^{\circ}\text{C}$  čez noč.

**Tabela 6. Reakcijska mešanica za PCR na osnovi kolonije**

| Reagent                                    | Volumen |
|--------------------------------------------|---------|
| H <sub>2</sub> O                           | 5 µL    |
| RVprimer3 (10 µM)                          | 1 µL    |
| GIprimer2 (10 µM)                          | 1 µL    |
| LongAmp Hot Start <i>Taq</i> 2X Master Mix | 10 µL   |
| Vzorec                                     | 3 µL    |
| Celokupni volumen                          | 20 µL   |

**Tabela 7: Temperaturni program reakcije PCR:**

|                                                |       |        |
|------------------------------------------------|-------|--------|
| <b>Začetna denaturacija</b>                    | 94 °C | 30 s   |
| <b>Prileganje in podaljševanje (25 ciklov)</b> | 94 °C | 15 s   |
|                                                | 55 °C | 15 s   |
|                                                | 65 °C | 20 s   |
| <b>Zaključno podaljševanje</b>                 | 65 °C | 10 min |
| <b>Ohlajanje</b>                               | 4 °C  | ∞      |

Produkte PCR analizirajte z gelsko elektroforezo v 1% agaroznem gelu.

**Slika agaroznega gela**

Pozitivni plazmidi: \_\_\_\_\_

## **7. Korak: Izolacija plazmidne DNA in transfekcija**

### **1. Izolacija plazmidne DNA**

Iz prekonočne kulture izolirajte plazmidno DNA po protokolu Monarch® Plasmid Miniprep Kit (NEB). Plazmidni DNA izmerite koncentracijo.

Koncentracija pDNA (ng/μL) \_\_\_\_\_

### **Restriksijska analiza (opsijsko)**

Plazmide cepite po istem protokolu, kot ste izvedli kloniranje, in naredite agarozno elektroforezo. Plazmidno DNA pošljite na analizo s sekvenciranjem, da preverite ustreznost plazmidnih vektorjev. Nukleotidna zaporedja analizirajte z uporabo programa [BLAST](#).

### **2. Transfekcija plazmidne DNA**

Aktivnost promotorja bomo določali v sesalski celični liniji HEK293T. Celice bomo dan pred transfekcijo nasadili v ploščice s 96 vdolbinicami (pripravi asistent). Transfekcijo bomo izvedli z reagentom PolyJet™ po priporočenem protokolu proizvajalca (Tabela 8) in v sterilni biološki komori (laminarju).

**Tabela 8. Transfekcijska mešanica.**

| Reagent          | Celokupna količina na vdolbinico za ploščo z 96 vdolbinicami |
|------------------|--------------------------------------------------------------|
| Optimem          | 20 μL                                                        |
| pDNA             | 0,2 μg                                                       |
| PolyJet™ reagent | 0,8 μL                                                       |

V laminarju v 10 μL gojišča Optimem razredčite 200 ng pDNA. V drugi mikrocetrifugirki ravno tako v 10 μL gojišča Optimem razredčite 0,8 μL transfekcijskega reagenta. Vsebinsko obeh be mikrocetrifugirk kratko premešajte z vibracijskim mešalnikom in prenesite celotno količino razredčena transfekcijskega reagenta v raztopino razredčene DNA. Kratko premešajte na vibracijskem mešalniku in inkubirajte na sobni temperaturi 10 do 15 minut. Nato transfekcijsko mešanico po kapljicah nanesite na celice in jih inkubirajte 24 ur v inkubatorju za celične kulture pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>.

Pozitivna kontrola \_\_\_\_\_

Negativna kontrola \_\_\_\_\_

Vzorci \_\_\_\_\_

## **8. Korak: Merjenje luciferazne aktivnosti**

Luciferazno aktivnost v celicah izmerite s pomočjo kompleta BrightGlo (Promega), ki omogoča lizo in dodajanje substrata kar v ploščici za gojenje celic (Tabela9). Luminiscenco izmerite na čitalcu ploščic Tecan Spark. Izmerite tudi luciferazno aktivnost netransficiranih celic.

**Tabela 9. Postopek merjenja luciferazne aktivnosti.**

|                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Odstranite gojišče sesalskim celicam. (Opcijsko, odvisno od gojišča)        |
| 2. Dodajte 50 µL reagenta Stop&Glo. Inkubirajte 5 minut pri sobni temperaturi. |
| 3. Izmerite luminiscenco na optičnem čitalcu Tecan Spark.                      |

### **Rezultati merjenja luciferazne aktivnosti**

Pozitivna kontrola \_\_\_\_\_

Negativna kontrola \_\_\_\_\_

Netransficirane celice \_\_\_\_\_

Vzorci \_\_\_\_\_

## Priloga 1 . Nukleotidna zaporedja promotorjev SV40 in CMV ter vektorja pGL3

### > promotor CMV; 508 bp

CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAA  
TAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTA  
CGGTAAACTGCCCACCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAA  
TGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGT  
ACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGA  
TAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCA  
CCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGC  
GTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT

### > promotor SV40; 317 bp

GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCA  
ACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC  
AGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCCAGTTCCGCCCCATTCTC  
CGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTTATTTATGAGAGGCGGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTC  
CAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTTGCAA

### > vektor pGL3; 4818 bp

GGTACCGAGCTCTTACGCGTGCTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGG  
TACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAAGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCGC  
TGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCTTGGGAACA  
ATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTTCG  
GTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAAC  
CTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGAC  
ATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAA  
AAAGGGGTGCAAAAAATTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCCAAAAAATTATTATCATGG  
ATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGT  
TTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTC  
CTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTGCTCTGCCTCATAGAAGTGCCTGCGTGAGATTCTCGC  
ATGCCAGAGATCCTATTTTTTGGCAATCAAATCATTCGCGTACTGCGATTTTAAGTGTGTTCCATTTC  
CATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTA  
TAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTGC  
CAACCTTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAA  
ATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCC  
AGGTATCAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATG  
ATAAACCGGGCGCGGTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGG  
AAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGT  
AAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTT  
ACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTAT  
CAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGC  
AGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCGGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGA  
TGACGGAAAAAGAGATCGTGATTACGTGCGCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGA  
GTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGAT  
CCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAATTCTAGAGTCGGGGCGGCCGCGCTTC  
GAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGC  
TTTATTTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAA  
CAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTTAAAGCAAGT

AAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGGATCCGTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCC  
AGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATCA  
TGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGT  
CGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGG  
ATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTG  
CTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG  
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG  
TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAA  
TGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACC  
CCCCGTTTCCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACG  
ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA  
GAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT  
GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCG  
GTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC  
TTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATC  
AAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG  
AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTT  
CGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGG  
CCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGC  
CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGT  
TGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGG  
CATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAG  
TTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGT  
AAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATC  
CGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGAC  
CGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTC  
ATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGAT  
GTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA  
AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTC  
TTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATG  
TATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCGCCCT  
GTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCC  
CTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGC  
TCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCCAAAAAAGTTG  
ATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAG  
TCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTC  
TTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT  
TTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCCCATTTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGT  
TGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCCCAAGCTACCATGATAAGTAAGTAA  
TATTAAGGTACGGGAGGTACTTGGAGCGGCCGCAATAAAATATCTTTATTTTATTACATCTGTGTGT  
TGGTTTTTTGTGTGAATCGATAGTACTAACATACGCTCTCCATCAAAACAAAACGAAACAAAACAAAC  
TAGCAAAATAGGCTGTCCCCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCTATCGATA