

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA ZUPANČIČ

**PRIPRAVA IN UPORABA GENSKEGA KONSTRUKTA ZA  
IZRAŽANJE HETEROLOGNIH PROTEINOV NA POVRŠINI  
MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ**

**DEVELOPMENT AND USAGE OF GENE CONSTRUCT FOR  
EXPRESSION OF HETEROLOGOUS PROTEINS BY USING  
LACTIC BACTERIA**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu Jožef Stefan pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja in somentorstvom Aleša Berleca, mag.farm.

Analizo nukleotidnega zaporedja DNA je opravilo podjetje MWG Biotech AG-Sequencing Service, Ebersberg, Nemčija.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Borutu Štruklju za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Posebna zahvala gre somentorju Alešu Berlecu za laboratorijsko vodenje, sodelovanje in svetovanje.

Zahvaljujem se tudi Nataši Obermajer, Matjažu Ravnikarju in Tomažu Bratkoviču, ki so pripomogli k nastanku tega diplomskega dela.

Najlepše se zahvaljujem tudi prijateljem za sproščene trenutke ob študiju ter seveda svojim staršem, ki so vedno verjeli vame in mi nudili vso podporo.

Diplomsko delo posvečam mami Danici.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja in somentorstvom Aleša Berleca, mag.farm.

Ljubljana, maj 2008

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Krbavčič

Članica diplomske komisije: izr. prof. dr. Janja Marc

## Povzetek

Mlečnokislinska bakterija *Lactococcus lactis* bi se lahko uporabila kot potencialni vektor za dostavo različnih, na površini izraženih peptidov in proteinov, v prebavila in na telesne sluznice. Odlikujejo jo tako prednosti Gram-pozitivnih bakterij (med katerimi prevladuje njihova rigidnost zaradi debelejšje celične stene) kot tudi status GRAS (vrsta je splošno priznana kot varna). Pripisujejo ji tudi probiotične lastnosti. V prebavnem traktu premika ravnotežje v smer koristnih bakterij.

Uspešno smo pripravili genski konstrukt za fuzijski protein, ki je bil sestavljen iz signalnih zaporedij za izločanje v gojišče (*usp-45*) ter pripetje na površino (*acmA*) ter vstavili med njiju zapis za modelni peptid s sposobnostjo vezave na streptavidin. Ta konstrukt smo kasneje vstavili v plazmidni vektor pNZ8148 ter ga z elektroporacijo vnesli v bakterijo *L. lactis* sev NZ9000. Ta sev omogoča odzivnost na prisotnost bakteriocina nizina v okolju (gojišču), aktivacijo nizinskega promotorja, če je le-ta prisoten v organizmu (npr. na plazmidu) in izražanje gena, ki je pod nadzorom promotorja.

Z dodatkom nizina smo sprožili izražanje fuzijskega proteina. Uspešnost izražanja na površini smo ugotavljali z vezavo na fluorescenčno označen streptavidin. Uporabili smo metodo fluorescenčno aktiviranega celičnega sortiranja, metodo merjenja fluorescence na mikrotitrski ploščici ter prenos Western. Načrtovanega fuzijskega proteina na površini laktokoka nismo uspeli detektirati, zato smo testirali tudi bakterijski lizat.

Metode detekcije so pri bakterijskem lizatu pokazale delno pozitiven rezultat, hkrati pa je bilo zaznati močno nespecifično vezavo na ostale proteine v lizatu. Uporabnost konstrukta je kljub uspešni pripravi postala vprašljiva. Nadaljnje bi bilo potrebno uporabiti drugačen sistem za detekcijo, ki bi omogočil spremljanje izražanja, izločanja v gojišče in pritrjevanja na površino.

## Abstract

The lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* can be potentially used as a live vehicle for the delivery of heterologous proteins, anchored onto the outer surface of the bacteria, to gastrointestinal tract. Lactic acid bacteria have recently received much attention due to their »generally recognized as safe« (GRAS) status and to their potential health-promoting effects as probiotics. For this reason they represent attractive host cells for recombinant protein expression.

We successfully developed a gene construct for fusion protein that harbors a signal sequence for secretion into medium (*usp-45*), a signal sequence for cell wall-binding (*acmA*) and combined these two sequences with a genetic code for model peptide with a tendency to bind streptavidin. The construct was cloned in plasmide vector pNZ8148 and transferred in *L. lactis* NZ9000 with electroporation. Gene expression in the strain NZ9000 is activated by bacteriocin nisin if the nisin promotor exists in the organism.

Expression of gene was induced by the addition of nisin. The cell surface display was evaluated with a protein-binding ability to fluorescence marked streptavidin. We used three methods: fluorescence activated cell sorting, fluorescence measuring with micro titre strip and Western blot. Because the fusion protein was not detected on a surface of lactic acid bacteria, bacterial lysate was tested.

A positive result was detected with bacterial lysate but also high non-specific binding to other proteins in lysate. However the usage of gene construct is in spite of successful development questionable. A different detection system which would enable visual detection of protein expression, secretion and binding on a surface represents subjects for further investigations.

## Abecedni seznam okrajšav

|                   |                                                                                           |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| A                 | absorbanca                                                                                |
| AcmA              | N-acetilmuraminidaza (ang. N-acetylmuraminidase)                                          |
| BSA               | goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)                                       |
| bp                | število baznih parov                                                                      |
| dATP              | 2`-deoksiadenozin trifosfat                                                               |
| dCTP              | 2`-deoksicitozin trifosfat                                                                |
| dGTP              | 2`-deoksigvanozin trifosfat                                                               |
| dH <sub>2</sub> O | destilirana voda                                                                          |
| DNA               | deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)                                 |
| dNTP              | 2`-deoksinukleotid trifosfat                                                              |
| DTT               | ditiotreitol                                                                              |
| dTTP              | 2`-deoksitimidin trifosfat                                                                |
| E                 | ekstinkcija                                                                               |
| <i>E. coli</i>    | <i>Escherichia coli</i>                                                                   |
| EDTA              | etilendiamintetraocetna kislina                                                           |
| FACS              | fluorescenčno aktivirano celično sortiranje<br>(ang. fluorescence-activated cell sorting) |
| g                 | enota pospeška relativne centrifugalne sile pri centrifugiranju                           |
| HRP               | hrenova peroksidaza (ang. horseradish peroxidase)                                         |
| IPTG              | izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid                                                 |
| LB gojišče        | Luria-Bertani gojišče                                                                     |
| <i>L. lactis</i>  | <i>Lactococcus lactis</i>                                                                 |
| MCS               | multiple mesto za kloniranje (ang. multiple cloning site)                                 |
| MP                | modelni peptid                                                                            |
| NICE              | od nizina odvisno gensko izražanje (ang. nisin-controlled gene expression)                |
| PAGE              | poliakrilamidna gelska elektroforeza                                                      |
| PBS               | fosfatni pufer s soljo (NaCl)                                                             |
| PCR               | verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)                            |
| pGEM              | plazmid pGEM <sup>®</sup> -T Easy                                                         |
| pol.              | polimeraza                                                                                |
| SDS (NaDS)        | natrijev dodecil sulfat (ang. sodium dodecyl sulphate)                                    |
| TAE               | tris-acetat-EDTA pufer                                                                    |
| TBS               | tris pufer s soljo (NaCl)                                                                 |
| TEMED             | N,N,N',N'-tetrametiletildiamin                                                            |
| Tm                | temperatura tališča                                                                       |
| Tris              | tris (hidroksimetil)-aminometan                                                           |
| Tween 20          | polioksietilen sorbitan monolavrat                                                        |
| U                 | enota encimske aktivnosti                                                                 |
| Usp-45            | neznani izločani protein (ang. unidentified secreted protein)                             |
| X-gal             | 5-bromo-4-kloro-3-indolil- beta-D-galaktopiranozid                                        |

## Abecedni seznam okrajšav aminokislin in njihovi kodoni

|     |   |                      |                              |
|-----|---|----------------------|------------------------------|
| Ala | A | alanin               | GCT, GCC, GCA, GCG           |
| Arg | R | arginin              | CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG |
| Asn | N | asparagin            | AAT, AAC                     |
| Asp | D | asparaginska kislina | GAT, GAC                     |
| Cys | C | cistein              | TGT, TGC                     |
| Phe | F | fenilalanin          | TTT, TTC                     |
| Gly | G | glicin               | GGT, GGC, GGA, GGG           |
| Gln | Q | glutamin             | CAA, CAG                     |
| Glu | E | glutaminska kislina  | GAA, GAG                     |
| His | H | histidin             | CAT, CAC                     |
| Ile | I | izolevcin            | ATT, ATC, ATA                |
| Leu | L | levcin               | CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG |
| Lys | K | lizin                | AAA, AAG                     |
| Met | M | metionin             | ATG                          |
| Pro | P | prolin               | CCT, CCC, CCA, CCG           |
| Ser | S | serin                | TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC |
| Tyr | Y | tirozin              | TAT, TAC                     |
| Thr | T | treonin              | ACT, ACC, ACA, ACG           |
| Trp | W | triptofan            | TGG                          |
| Val | V | valin                | GTT, GTC, GTA, GTG           |

## Abecedni seznam okrajšav baz pri nukleotidih

|   |         |
|---|---------|
| A | adenin  |
| C | citozin |
| G | gvanin  |
| T | timin   |

## Vsebina

|            |                                                                                                                   |           |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I</b>   | <b>UVOD .....</b>                                                                                                 | <b>1</b>  |
| <b>1</b>   | <b>Mlečnokislinske bakterije .....</b>                                                                            | <b>3</b>  |
| 1.1        | <i>Lactococcus lactis</i> .....                                                                                   | 3         |
| 1.1.1      | NICE sistem.....                                                                                                  | 4         |
| <b>2</b>   | <b>Izražanje heterolognih proteinov .....</b>                                                                     | <b>7</b>  |
| 2.1        | Izražanje na površini celic .....                                                                                 | 7         |
| 2.1.1      | Izražanje na površini mlečnokislinskih bakterij .....                                                             | 11        |
| <b>II</b>  | <b>NAČRT DELA.....</b>                                                                                            | <b>14</b> |
| <b>III</b> | <b>MATERIALI IN METODE .....</b>                                                                                  | <b>15</b> |
| <b>1</b>   | <b>MATERIALI.....</b>                                                                                             | <b>15</b> |
| 1.1        | Voda .....                                                                                                        | 15        |
| 1.2        | Pufri in raztopine .....                                                                                          | 15        |
| 1.3        | Kemikalije .....                                                                                                  | 17        |
| 1.4        | Oligonukleotidni začetniki .....                                                                                  | 18        |
| 1.5        | Encimi.....                                                                                                       | 18        |
| 1.6        | Gojišča .....                                                                                                     | 19        |
| 1.7        | Geli, označevalci velikosti, barvila, nanašalni pufri.....                                                        | 20        |
| 1.8        | Bakterijski sevi, antibiotiki.....                                                                                | 20        |
| 1.9        | Laboratorijska oprema .....                                                                                       | 21        |
| 1.10       | Kompleti .....                                                                                                    | 22        |
| <b>2</b>   | <b>METODE .....</b>                                                                                               | <b>24</b> |
| 2.1        | Splošno o metodah .....                                                                                           | 24        |
| 2.1.1      | Verižna reakcija s polimerazo .....                                                                               | 24        |
| 2.1.2      | Obarjanje DNA.....                                                                                                | 25        |
| 2.1.3      | Prenos genske informacije.....                                                                                    | 26        |
| 2.1.4      | Določitev nukleotidnega zaporedja .....                                                                           | 28        |
| 2.1.5      | Agarozna gelska elektroforeza .....                                                                               | 29        |
| 2.1.6      | Poliakrilamidna gelska elektroforeza .....                                                                        | 29        |
| 2.1.7      | Prenos Western .....                                                                                              | 30        |
| 2.1.8      | Fluorescenčno aktivirano celično sortiranje .....                                                                 | 30        |
| 2.2        | Shema laboratorijskega dela.....                                                                                  | 31        |
| 2.3        | Postopki .....                                                                                                    | 32        |
| 2.3.1      | Priprava elektrokompetentnih bakterij <i>L. lactis</i> NZ9000 in vstavljanje plazmidov pNZ8148 .....              | 32        |
| 2.3.2      | Načrt za PCR začetnike za pripravo želenega konstrukta .....                                                      | 34        |
| 2.3.3      | Priprava posameznih fragmentov konstrukta .....                                                                   | 37        |
| 2.3.4      | Sestavljanje fragmentov v konstrukt .....                                                                         | 40        |
| 2.3.5      | Ligacija konstrukta v pNZ8148 in transformacija plazmida z vstavljenim konstruktom v <i>L. lactis</i> NZ9000..... | 44        |
| 2.3.6      | Izražanje celotnega konstrukta v <i>L. lactis</i> NZ9000 .....                                                    | 47        |

|           |                                                                                                                           |           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.7     | Detekcija izražanja na površini .....                                                                                     | 47        |
| <b>IV</b> | <b>REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>                                                                                         | <b>51</b> |
| <b>1</b>  | <b>Priprava posameznih fragmentov konstrukta.....</b>                                                                     | <b>51</b> |
| <b>2</b>  | <b>Sestavljanje fragmentov v konstrukt.....</b>                                                                           | <b>53</b> |
| <b>3</b>  | <b>Ligacija konstrukta v pNZ8148 in transformacija plazmida z vstavljenim konstruktom v <i>L. lactis</i> NZ9000 .....</b> | <b>56</b> |
| <b>4</b>  | <b>Detekcija izražanja na površini.....</b>                                                                               | <b>60</b> |
| 4.1       | FACS .....                                                                                                                | 60        |
| 4.2       | Mikrotitrna ploščica .....                                                                                                | 62        |
| 4.3       | Prenos Western .....                                                                                                      | 64        |
| <b>V</b>  | <b>SKLEP .....</b>                                                                                                        | <b>65</b> |
| <b>VI</b> | <b>REFERENCE .....</b>                                                                                                    | <b>66</b> |

# I UVOD

Mlečnokislinske bakterije so že tisočletja spremljevalke človeka, predstavljajo sestavni del naše prehrane in so industrijsko eden od najpomembnejših mikroorganizmov. Znana so številna poročila o njihovem pozitivnem vplivu na zdravje, saj predstavljajo sestavni del koristne človeške flore in sodelujejo pri tvorbi pomembnih hranil. Zato se pogosto dodajajo prehrani kot probiotiki. Ker imajo splošno priznan varen status («generally recognised as safe» - GRAS), postajajo pomembne tudi kot gostitelji v biotehnologiji in kot potencialni vektor za dostavo biološko aktivnih učinkovin v človeški organizem. V novejšem času so se visoko razvile tehnike, ki omogočajo rekombinantno izražanje proteinov tudi pri mlečnokislinskih bakterijah (1). V nekaterih primerih je cilj izražanje zelenega proteina v gostiteljski citoplazmi in izločanje v gojišče, ponekod pa je tarča raziskav površina mlečnokislinskih bakterij, na katero želimo ta poljuben protein pripeti.

Prikaz proteinov na površini mikroorganizmov je postal zelo uporabljan v mikrobiologiji, biotehnologiji ter proizvodnji cepiv in je povzročil povečanje potrebe po učinkovitih sistemih za izražanje. Pot do uporabe takšnih rekombinantnih proteinov v terapevtske namene pa je v zadnjih desetletjih odprlo gensko inženirstvo.

Rekombinantna DNA tehnologija, DNA kloniranje, molekularno kloniranje ali pa gensko kloniranje so sinonimi, ki zajemajo tehnike, s pomočjo katerih prenesemo zeleni segment DNA iz danega organizma v drug organizem, celico. Tehnike rekombinantne DNA tehnologije predstavljajo molekulska orodja, brez katerih si danes ne predstavljamo rutinskega dela vsakega molekularno-biološkega laboratorija. Rekombinantna DNA tehnologija omogoča študije genov, proteinov in tudi drugih tehnologij, kot so gensko zdravljenje, gensko inženirstvo organizmov, določanje nukleotidnega zaporedja genomov in nenazadnje tudi pridobivanje rekombinantnih zdravilnih učinkovin (2).

Virusne in bakterijske sisteme za izražanje kot vektorje za dostavo in izražanje proteinov pri človeku so že uspešno razvili. V splošnem živi vektorji omogočajo dostavo rekombinantnih proteinov, ki se izražajo v samem vektorju, genetska informacija pa se

integrira v genom ali obdrži kot plazmidna DNA. Idealni živi vektor opredeljujejo naslednje značilnosti (2):

- nepatogenost za gostitelja in okolje,
- enostavnost za rokovanje,
- enostavna in ekonomična proizvodnja,
- stabilen genom,
- dobro definirana mesta za vstavitev tujih genov,
- enostavna dostava,
- genska informacija se ne integrira v gostiteljev genom.

Trenutno se proučujejo številni bakterijski vektorji za dostavo proteinov, prednost bakterijske celice pa je tudi v visoki kapaciteti ter številnih načinih izražanja: v citosolu, periplazmi ter tudi na bakterijski površini. Med take bakterije sodijo atenuirani patogeni kot so *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Yersinia spp.*, *Vibrio spp.*, *Erysipelothrix spp.* in *Bordetella spp.* ter komenzalni mikroorganizmi, kot so *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp* (2).

# 1 Mlečnokislinske bakterije

Mlečnokislinske bakterije so Gram-pozitivne, mikroaerofilne bakterije (potrebujejo manjši odstotek kisika kot se nahaja v atmosferi). Ne tvorijo spor in niso zmožne premikanja. Ker zasedajo isto ekološko nišo, so razvile nekatere skupne metabolne in fiziološke značilnosti (1). Proizvajajo mlečno kislino iz glukoze in ostalih heksoz. Nekateri sevi proizvajajo bakteriocine, ki preprečujejo razvoj patogenih mikroorganizmov. V človeškem prebavnem traktu so zaželeni, saj premikajo ravnotežje v smer koristnih bakterij. Mlečnokislinske bakterije se že dolgo uporabljajo pri izdelavi mlečnih izdelkov in kot dopolnilo k prehrani. Uporabljajo se tudi v mikrobiologiji, ekologiji in biotehnologiji, zlasti v genskem inženiringu so v zadnjih 25-letih doživeli bliskovit razvoj. Pomembni so predstavniki iz vrst *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* in tudi *Streptococcus*. Modelno mlečnokislinsko bakterijo z dobro znanim in koristnim delovanjem v prebavnem traktu (probiotiki) pa predstavlja *Lactococcus lactis* (1,3).

## 1.1 *Lactococcus lactis*

Ta vrsta je prehransko zelo zahtevna, za rast potrebuje številne aminokisline in vitamine, ki jih sama ni sposobna tvoriti. Optimalna temperatura rasti je 30°C, pri temperaturi višji od 45°C pa ne raste. V rahlo kislem gojišču (primer je gojišče M17, ki vsebuje pepton, kvasni in mesni ekstrakt, askorbinsko kislino, laktozo, magnezijev sulfat in glicerofosfat) zrastejo do gostote 1 g/l. Rast se ustavi, ko pH pade pod 5,0. Z nevtralizacijo, pri kateri uporabimo NaOH ali NH<sub>4</sub>OH lahko gostota celic naraste do 5 g/l. Glavni razlog za omejitev rasti je kopičenje produktov (mlečne kisline) v bakterijah (3).

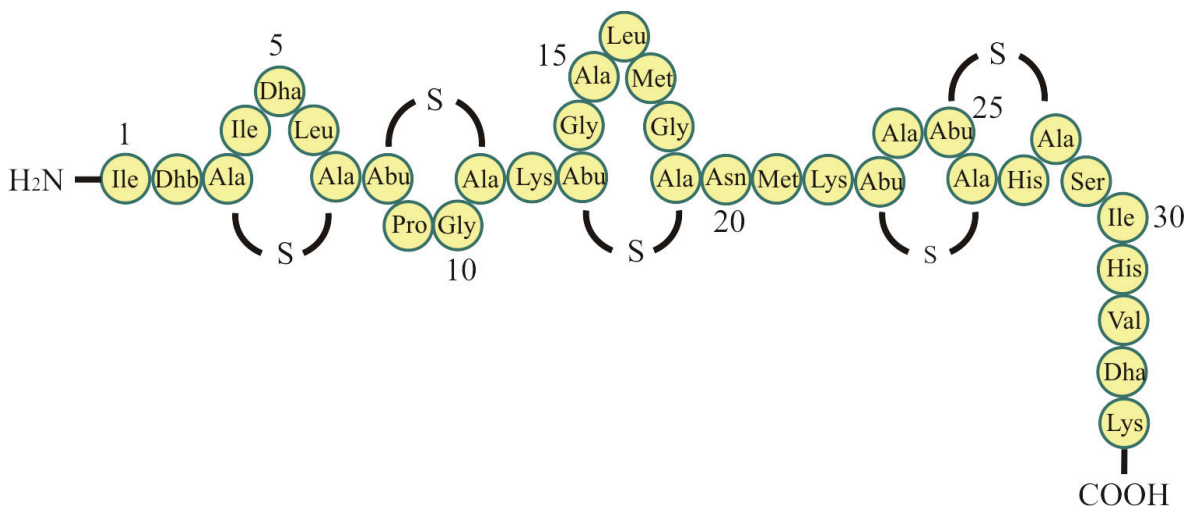
Bakterije *L. lactis* so v novejšem času doživele velik napredek v razvoju tehnik molekularne biologije. Razviti so bili učinkoviti protokoli za transformacijo in izolacijo plazmidov. Za rekombinantno izražanje proteinov se uporabljajo različni sistemi. Heterologni geni se nahajajo bodisi na plazmidih bodisi so vstavljeni v bakterijski kromosom in so pod nadzorom konstitutivnih ali inducibilnih promotorjev. Konstitutivni promotorji zagotavljajo enakomerno izražanje daljši čas, a običajno v manjših količinah. Pri inducibilnih promotorjih lahko izražanje nadzorujemo in je običajno močnejše.

Izražanje lahko sprožimo z ogljikovimi hidrati, fagno infekcijo, bakteriocini, toplotno ali pH spremembo (1). Najpogosteje se uporablja sistem NICE - od nizina odvisno gensko izražanje (ang. nisin - controlled gene expression) (3).

### 1.1.1 NICE sistem

Nekateri sevi laktokokov (NZ9700, NZ9800, NZ9000, NZ3900) imajo vstavljene gene *nisR* (regulator odziva) in *nisK* (tirozin kinazo), ki predstavljata dvokomponentni regulatorni sistem in omogočata odzivnost na prisotnost bakteriocina nizina v okolju (gojišču) in aktivacijo nizinskega promotorja, če je le-ta prisoten v organizmu (npr. na plazmidu). Nizin se zato lahko uporablja za indukcijo izražanja (3).

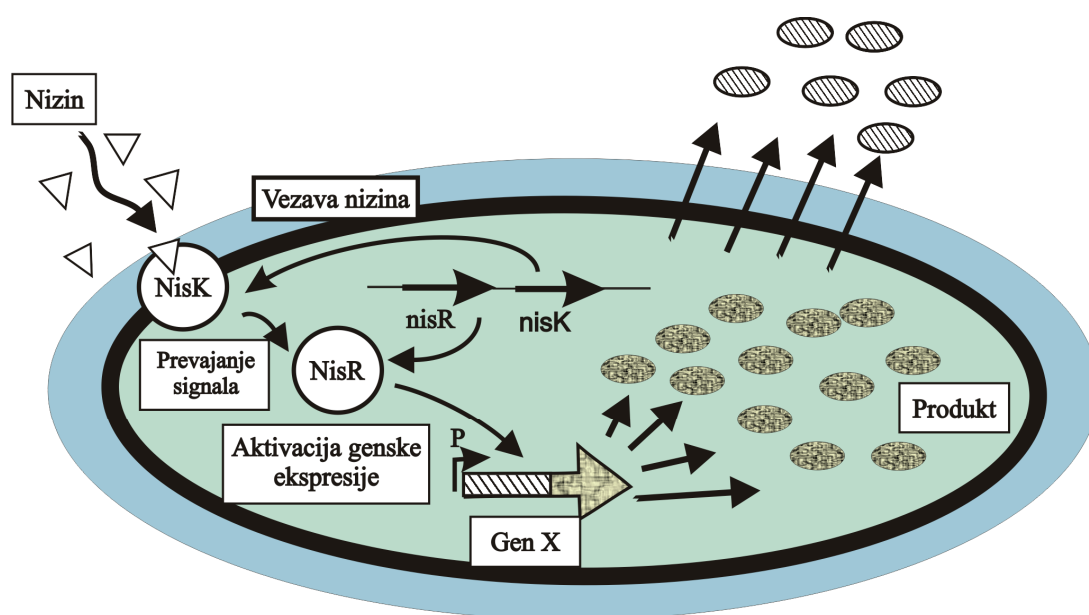
Nizin (slika 1) je antimikrobni peptid (lantibiotik), sestavljen iz 34 aminokislin, katerega značilnost so spremenjene aminokisline ter petciklični obroči. Deluje tako, da tvori pore v citoplazemski membrani, kar vodi v prehajanje majhnih molekul skozi membrano, vključno z adenozin trifosfatom (ATP) in posledično v celično smrt. Zaradi širokega spektra se pogosto uporablja kot konzervans v prehrambeni industriji (3).



*Slika 1: Prikaz strukture nizina, pri katerem kratica Dhb označuje dehidrobutirin, Dha dehidroalanin, Ala-S-Ala lantionin in Abu-S-Ala  $\beta$ -metillantionin (3)*

Nizin se sintetizira na ribosomih kot prekurzor. Z nadaljnjimi encimskimi modifikacijami dozori v končno, zrelo obliko, ki se s translokacijo prenese preko citoplazemske

membrane. Zapis za nizin se nahaja na skupini genov, od katerih prvi gen *nisA* kodira prekurzor nizina. Ostali geni vplivajo na sintezo proteinov, ki so udeleženi v modifikaciji, translokaciji in procesiranju nizina (*nisB*, *nisC*, *nisP* in *nisT*) ter regulaciji izražanja nizinskih genov (*nisR* in *nisK*). *NisR* in *NisK* sta tako sestavni člen bakterijskega dvokomponentnega transdukcijskega sistema. *NisK* je histidinska protein kinaza, ki se nahaja v citoplazemski membrani in nosi vlogo receptorja zrele nizinske molekule. Ob vezavi nizina na *NisK*, se kinaza avtofosforilira. Fosfatna skupina se prenese na *NisR*, njegova aktivacija pa inducira transkripcijo promotorja na tarčnem genu in tako vodi v celični odgovor ter sintezo produktov.



Slika 2: Nizinsko pogojeno gensko izražanje (3)

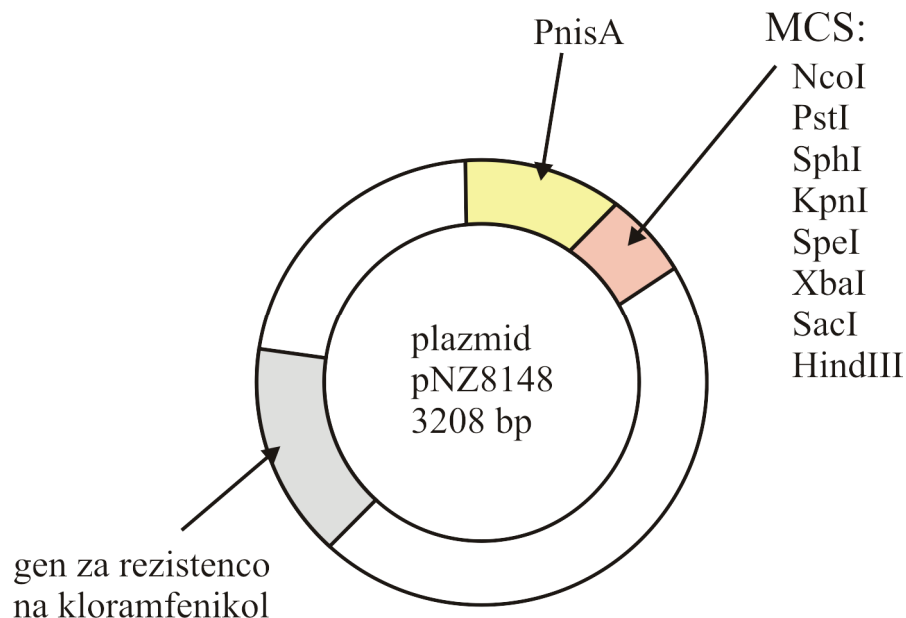
Inducibilni nizinski promotor so izkoristili za pripravo sistema za izražanje NICE. Geni za *nisR* in *nisK* so bili izolirani iz nizinskega genskega zapisa in vstavljeni v kromosom *L. lactis* (slika 2), podvrste *cremoris* MG1363. Tako je nastal nov sev NZ9000. Kadar želeni gen vstavimo za zapis za nizinski promotor, lahko tako z dodatkom nizina (0,1-5 ng/ml) sprožimo njegovo izražanje.

Za intracelularno proizvodnjo in izločanje raznih genskih produktov iz *L. lactis* so bili konstruirani različni plazmidi. Tipičen predstavnik je vektor pNZ8148 (slika 3), ki je velik 3208 bp. Želeni gen lahko s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov s PCR reakcijo

pomnožimo in vstavimo prek restrikcijskih mest v multiplo mesto za kloniranje na plazmidu. Z uporabo restrikcijskega mesta NcoI lahko dosežemo, da se translacija začne z začetnim Met in da na N-končnem delu proteina ni dodatnih aminokislin.

Značilnosti vektorja pNZ8148 (3):

- plazmid sestavlja DNA, ki izvira iz *L. lactis*,
- na plazmidu se nahaja nizinski promotor (PnisA), ki omogoča inducibilno izražanje genov,
- promotor se nahaja pred MCS,
- kot selekcijski marker služi gen za rezistenco na kloramfenikol,
- MCS: NcoI, PstI, SphI, KpnI, SpeI, XbaI, SacI, HindIII.



Slika 3: Prikaz vektorja pNZ8148 (3)

Poleg NICE sistema so razviti tudi drugi, ki omogočajo usmerjanje proteinov v bakterijah (ciljanje). Za izločanje proteinov v gojišče se pri *L. lactis* najpogosteje uporablja zaporedje Usp-45, za pritrditev proteinov na površino bakterij (celično steno) pa C-terminalno zaporedje avtolizina AcmA (1).

## **2 Izražanje heterolognih proteinov**

Pri nekaterih mikroorganizmih lahko sprožimo izražanje in izločanje proteinov, ki se normalno izražajo v drugih organizmih. To pomeni, da so ti proteini svojemu gostitelju heterologni oziroma tuji. Takšen način izražanja lahko dosežemo, kadar gensko zaporedje za heterologni protein vnesemo v gostiteljev organizem in v njem sprožimo njegovo izražanje. Pod definicijo "izločani" proteini so mišljeni gostiteljevi proteini s signalnim zaporedjem, ki usmerja izločanje v gojišče. Temu zaporedju je lahko dodano drugo, ki narekuje vezavo na površino, s čimer pa heterologni protein dobi lastnosti obeh procesov, izločanja v gojišče ter pritrdjevanja na površino (4).

### **2.1 Izražanje na površini celic**

Prvo površinsko predstavitev heterolognih proteinov je izvedel George P. Smith (1980), ki je za prikaz peptidov in majhnih proteinov uporabil bakteriofage (5). Od takrat najprej pa so se razvili sistemi z možnostjo izražanja na površini, vključno s prikazom na površini bakterijskih celic. Površinsko lokalizirane molekule so mnogokrat udeležene v življenjsko pomembnih procesih. Mednje štejemo celično prepoznavo, prevajanje signalov, vezavo na površino, kolonizacijo, imunske reakcije ter številne druge, njihovo pravilno delovanje pa omogočajo prav medproteinske interakcije. Normalno prisotne površinske proteine se lahko izkorišča tudi kot nosilce za vezavo nekaterih tujih molekul (heterolognih proteinov), ki jih želimo predstaviti na površini bakterijskih celic.

Izražanje na bakterijski površini se lahko uporablja za številne namene v biotehnologiji ter tudi na industrijskem nivoju. Moderni načini vključujejo med drugim pripravo cepiv, peptidne knjižnice, produkcijo protiteles z izpostavitvijo antigena na površini bakterij, pripravo bioadsorbentov za vezavo težkih kemikalij ter težkih kovin, imobilizacijo encimov na površino in njihovo biokatalitično delovanje. Sam efekt, ki ga želimo doseči, je odvisen od načina delovanja tarčnega proteina, ki ga izrazimo na površini.

Protein, ki ga želimo izraziti na površini, lahko pripnemo na nosilni protein z N-terminalno fuzijo, C-terminalno fuzijo ali pa ga pripnemo na sredino (»sendvič način«). Na samo

izražanje tako vplivajo tako lastnosti samega nosilnega ter tarčnega proteina kot tudi značilnosti gostitelja (5).

**Uspešen nosilni protein** naj bi imel štiri pomembne lastnosti (5):

- signalno zaporedje, ki omogoča zrelemu fuzijskemu proteinu prehod skozi zunanjo membrano,
- močno kapaciteto vezave na površino ter stabilnost fuzijskega proteina na površini,
- kompatibilnost s tarčnim proteinom,
- rezistenco na proteaze.

Tudi mesto vstavitve tarčnega proteina v nosilnega je zelo pomembno, saj vpliva na način vezave, stabilnost, specifično aktivnost ter tudi post-translacijske modifikacije. Ker so nekateri deli površinsko izraženega nosilnega proteina v neposrednem stiku z okoljem, je pomembno poznati regije, ki so zunanjim vplivom izpostavljene.

**Tarčni protein** se izbere glede na namen, ki ga želimo doseči. Tudi ta protein lahko vpliva na proces translokacije ter na končni površinski prikaz. Vstavljen protein ima ponavadi močan vpliv na prehod skozi membrane. Večji delež hidrofobnih aminokislin ima lahko za posledico nezadostno izločanje proteina v gojišče.

Pomembna je tudi **izbira gostitelja**. Ustrezen gostitelj mora biti kompatibilen s fuzijskim proteinom ter imeti majhno količino ekstracelularnih proteaz. Celična liza pri njegovem gojenju ni sprejemljiva. Pri Gram-negativnih bakterijah se pojavlja problem krhkosti zunanje membrane pri površinskem prikazu. Kljub temu je bakterija *E. coli* ena najpogostejše uporabljenih bakterij v namene reševanja velikih peptidov ter priprave proteinskih knjižnic za prikaz na površini. Gram-pozitivne bakterije imajo rigidno strukturo ter so zato bolj primerne za delovanje kot katalizatorji ali adsorbenti, kot proteinske knjižnice pa zaenkrat še niso v uporabi. Največ se uporabljajo vrste *Bacillus* ter *Staphylococcus*.

**Gram-negativne bakterije** imajo zunanjo in notranjo membrano, med njima pa peptidoglikansko strukturo. Notranja membrana je tipičen fosfolipidni dvosloj, medtem ko je zunanja membrana sestavljena pretežno iz lipopolisaharidov. Proteini, ki jih želimo

izločiti v gojišče ali pripeti na zunanjo površino, morajo preiti obe membrani. Zato se tu kot nosilce želenega proteina najraje izkorišča naravno izločene proteine. V tem primeru so kritične samo lastnosti tarčnega proteina, ki lahko ta proces omejijo (6).

*Tabela I: Prikaz nekaterih nosilnih proteinov za izražanje na površini pri Gram-negativnih bakterijah (6)*

*Omp, Opr* kratlici označujeta zunanje membranske proteine, *Pho* fosfatazo, *PAL* je s peptidoglikanom povezan lipoprotein, *AIDA-I*, *TraT* in *LamB* so proteini z adhezivnimi lastnostimi  $IgA_{\beta}$ ,  $VirG_{\beta}$  vrsti proteaz, *INP* kratica označuje »protein ledenih jeder« (ang. ice nucleation protein), *RsaA* kratica protein parakristalinične površinske plasti.

| <b><i>nosilec</i></b>                                                                                                                            | <b><i>uporaba</i></b>                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Proteini zunanje membrane (nekajkrat prebadajo membrano, večinoma antiparalelno)</i></b>                                                   |                                                                                |
| OmpA                                                                                                                                             | cepiva                                                                         |
| OprF                                                                                                                                             | cepiva                                                                         |
| LamB                                                                                                                                             | cepiva, celični adsorbenti, peptidne knjižnice                                 |
| OmpS                                                                                                                                             | mapiranje epitopov, proteinske študije, vezava bakterij                        |
| OmpC                                                                                                                                             | vezava nečistoč                                                                |
| PhoE                                                                                                                                             | cepiva                                                                         |
| Invazin                                                                                                                                          | peptidne knjižnice                                                             |
| Lpp OmpA                                                                                                                                         | biokataliza, knjižnice protiteles, imobilizacija, vezava nečistoč, biosenzorji |
| <b><i>Lipoproteini (skupina bakterijskih proteinov, ki so kovalentno pripeti na lipidni del zunanje membrane)</i></b>                            |                                                                                |
| TraT                                                                                                                                             | cepiva                                                                         |
| PAL                                                                                                                                              | protitelesa, vezava nečistoč                                                   |
| OprI                                                                                                                                             | cepiva                                                                         |
| INP                                                                                                                                              | biokataliza, cepiva                                                            |
| <b><i>Avtotransporterji (neodvisno od drugih proteinov sodelujejo pri lastnem izločanju preko zunanje membrane Gram-negativnih bakterij)</i></b> |                                                                                |
| $IgA_{\beta}$                                                                                                                                    | cepiva, vezava nečistoč                                                        |
| $VirG_{\beta}$                                                                                                                                   | biokataliza                                                                    |
| AIDA-I                                                                                                                                           | cepiva, biokataliza                                                            |
| <b><i>Proteini, izločani v gojišče (ta proces je odvisen od drugih dejavnikov oz. promotorjev)</i></b>                                           |                                                                                |
| pululanaza (indukcija odvisna od maltoze)                                                                                                        | biokataliza                                                                    |
| <b><i>Površinski deli</i></b>                                                                                                                    |                                                                                |
| bički (zunanje filamentne strukture, ki omogočajo gibanje bakterije)                                                                             | cepiva, vezava bakterij, peptidne knjižnice, študije proteinskih interakcij    |
| fimbriji (dolge filamentne bakterijske adhezivne strukture, ki omogočajo kolonizacijo oz. vezavo na tarčna tkiva)                                | cepiva, peptidne knjižnice, vezava nečistoč                                    |
| <b><i>Površinski proteini</i></b>                                                                                                                |                                                                                |
| RsaA                                                                                                                                             | ni znane uporabe                                                               |

**Gram-pozitivne bakterije** imajo debelo celično steno, ki je vzrok njihove rigidnosti. Nimajo zunanje celične ovojnice, kar poenostavi njihovo izločanje proteinov v gojišče v primerjavi z Gram-negativnimi bakterijami (6).

*Tabela II: Prikaz nekaterih nosilnih proteinov za izražanje na površini pri Gram-pozitivnih bakterijah (6)*

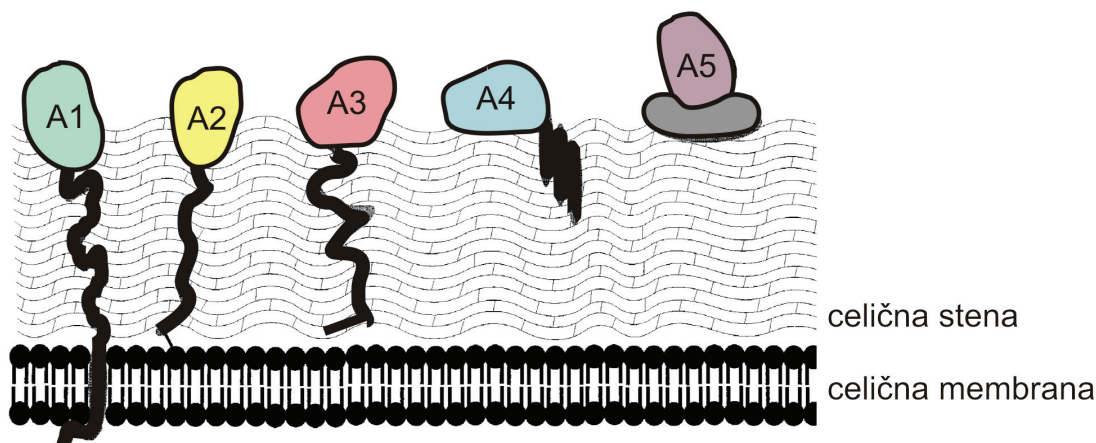
*SPA je kratica za stafilokokni protein A, FnBPA in FnBPB sta fibronektin vezavna proteina, Spa površinski proteinski antigen, CwbA, DppE in Mtb19 so različne vrste lipoproteinov, Ftf $\beta$ -D fruktoziltransferaza, SLH kratica označuje homologni motiv S-površinskega proteina. Razlaga proteinov M6 ter PrtP sledi v nadaljevanju.*

| <b><i>nosilec</i></b>                                                                                         | <b><i>uporaba</i></b>                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <b><i>Proteini celične stene (proteini na površini)</i></b>                                                   |                                                             |
| SPA                                                                                                           | cepiva, diagnostika, adsorbenti, biokataliza, imobilizacija |
| M6                                                                                                            | cepiva                                                      |
| FnBPA, FnBPB                                                                                                  | biokataliza                                                 |
| SpaP1                                                                                                         | cepiva                                                      |
| PrtP                                                                                                          | cepiva                                                      |
| <b><i>Proteini, pripeti na celično membrano (lipoproteini)</i></b>                                            |                                                             |
| DppE                                                                                                          | cepiva                                                      |
| CwbA                                                                                                          | cepiva                                                      |
| Mtb19                                                                                                         | cepiva                                                      |
| <b><i>Proteini s težnjo po interakciji s celično površino (ti proteini se navadno izločajo v gojišče)</i></b> |                                                             |
| Ftf $\beta$                                                                                                   | ni znane uporabe                                            |
| SLH                                                                                                           | cepiva, biokataliza                                         |

### 2.1.1 Izražanje na površini mlečnokislinskih bakterij

Nekatere proteine so že uspeli izraziti na površini mlečnokislinskih bakterij, številne raziskave pa še vedno potekajo. Te bakterije imajo že omenjene prednosti v primerjavi z Gram-negativnimi bakterijami in status GRAS, kar jih postavlja v ospredje med vrstami bakterij za površinski prikaz. Takšne bakterije bi teoretično lahko uporabili v prehrabnih dodatkih, kjer bi proizvajale heterologe proteine in vzpostavile interakcije med izraženimi proteini (npr. encimom ali antigenom) ter okoljem (hrana ali pa prebavni trakt človeka).

Če želimo protein pritrditi na površino mlečnokislinske bakterije, ga moramo najprej usmeriti v gojišče. *L. lactis* intenzivno izloča le en protein in to je Usp-45 (ang. Unidentified Secreted Protein), velikosti 45kDa, a njegova funkcija ni povsem jasna. Ta protein se tudi edini pri tej vrsti izloča v količinah, ki jih je po elektroforezi moč detektirati z barvilom Coomassie Brilliant Blue. Hkrati pa laboratorijski sevi *L. lactis* ne vsebujejo velikih količin ekstracelularnih proteaz, kar uvršča to bakterijo med glavne kandidate za heterologno proteinsko izražanje (7).



Slika 4: Načini izražanja heterolognih proteinov pri laktokokih (8)

Proteine na površini laktokov lahko predstavimo na več načinov (slika 4). V primeru A1 se fuzijski protein preko nosilca (transmembranski protein) kovalentno veže na membrano. A2 način prikazuje vezavo na lipidni dvosloj (v tem primeru so nosilci lipoproteini). A3 način vključuje uporabo zaporedja LPXTG (X predstavlja katerokoli aminokislino) kot nosilca, ki ga prepozna encim sortaza na površini bakterije in katalizira tvorbo kovalentne

vezi s celično steno. Pri A4 načinu se protein izrazi s pomočjo bakterijske celične hidrolaze, npr. AcmA, ki je na površino celične stene pritrjena prek treh sidrnih podenot. Ta vezava je šibkejša kot pri LPXTG tipu in je po vsej verjetnosti nekovalentne narave. Med A5 pa prištevamo proteine, katerih nosilec se izraža na površini (8).

*Tabela III: Prikaz nekaterih uporabljenih nosilnih proteinov pri mlečnokislinskih bakterijah*

*ProtA* je kratica za protein A, *LcnD* je protein, udeležen v transportu bakteriocinov *L. lactis*, *Tmp* transmembranski protein, *Nlp* je novi laktokokni protein, *Opp* oligopeptidni vezavni protein, *SLP* protein površinske plasti. Najpogostejši so krepko označeni.

| <b>gostitelj</b>                          | <b>nosilni protein</b> |
|-------------------------------------------|------------------------|
| <i>Staphylococcus carnosus in xylosus</i> | ProtA (A3)             |
|                                           | <b>FnBPB (A3)</b>      |
| <i>Streptococcus gordonii</i>             | <b>M6 (A3)</b>         |
| <i>Lactococcus lactis</i>                 | ProtA (A3)             |
|                                           | <b>M6 (A3)</b>         |
|                                           | Holin (A1)             |
|                                           | LcnD (A1)              |
|                                           | Tmp1-7 (A1)            |
|                                           | Nlp1-4 (A2)            |
|                                           | OppA (A2)              |
|                                           | <b>PrtP (A3)</b>       |
|                                           | <b>AcmaA (A4)</b>      |
| <i>Lactobacillus subspecies</i>           | M6 (A3)                |
|                                           | AcmaA (A4)             |
|                                           | PrtP (A3)              |
|                                           | SLP (A5)               |

*Tabela IV: Najpogostejše uporabljeni nosilni proteini pri vrsti *L. lactis* (9, 10, 11)*

|       |                                                                                                                                                                                                                      |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| M6    | M6 protein je pridobljen iz vrste <i>Streptococcus pyrogenes</i> . Gen za M6 so klonirali in izrazili v različnih mlečnokislinskih bakterijah, tudi v <i>L. lactis</i> .                                             |
| PrtP  | Nekatere proteine (primer je MSA2, zaščitni protein <i>Plasmodium falciparum</i> ) so uspešno izrazili v <i>L. lactis</i> . Proteini so izraženi v fuziji s PrtP, ki se kovalentno veže prek LPXTG na celično steno. |
| AcmaA | S plazmidnim vektorjem so v <i>L. lactis</i> vstavili 255bp dolgo zaporedje AcmaA, ki se je nekovalentno pripelo na zunanjo površino bakterije.                                                                      |

AcmaA protein je v zadnjem času zelo uporabljan nosilec pri vrsti *L. lactis*, zato ga v nadaljevanju tudi podrobneje predstavljamo.

### N-acetilmuraminidaza

N-acetil muraminidaza (AcmA) je glavna peptidoglikanska hidrolaza pri *L. lactis*. Deluje kot avtolizin in je odgovorna za celično lizo med stacionarno fazo. Hidrolizira 1,4- $\beta$  vezi med N-acetilmuraminsko kislino in N-acetil-D-glukozaminom (10,12).

Sestavljena je iz treh domen (tabela V):

- N terminalno signalno zaporedje
- aktivna domena  $\rightarrow$  N-acetilmuraminidaza
- C-terminalni površinski pripenjevalec (3 homologne domene)

Tabela V: Prikaz domen AcmA

| domena                 | od<br>(aminokislina) | do<br>(aminokislina) | dolžina | funkcija                                 |
|------------------------|----------------------|----------------------|---------|------------------------------------------|
| N-terminalna<br>domena | 1                    | 57                   | 57      | signalno<br>zaporedje                    |
| aktivna domena         | 58                   | 437                  | 380     | hidrolizna<br>aktivnost                  |
| C-terminalna<br>domena | 245                  | 287                  | 43      | pripetje na<br>površino <i>L. lactis</i> |
|                        | 321                  | 320                  | 43      |                                          |
|                        | 395                  | 437                  | 43      |                                          |

AcmA gen kodira za protein, ki je sestavljen iz 437 aminokislin z molekularno maso 46 kDa. V C-terminalnem delu se pojavljajo 3 homologne regije, velikosti 43 aminokislin. Ta ponavljajoča se zaporedja so odgovorna za vezavo na bakterijsko površino in so med seboj ločena z zaporedji, bogatimi s Ser, Thr in Asp preostanki. Za vezavo zadošča že ena sama regija, zato z uporabo genskega zapisa zanjo usmerimo protein na površino.

Ker je bakterija *L. lactis* primerna za manipulacijo in heterologno izražanje proteinov in njihov prikaz na površini, obstaja možnost njene uporabe v prihodnosti tudi v terapevtske namene. Uspešno razvite rekombinantne mlečnokislinske bakterije bi lahko predstavljale alternativni pristop preprečevanja ali zdravljenja okužb, zlasti takšnih, ki so povezane s prebavnim traktom človeka.

## II NAČRT DELA

Izbrani modelni peptid z visoko afiniteto do streptavidina (13) želimo vezati na površino bakterije *L. lactis*. Zato ga bomo kombinirali z zaporedjem, ki omogoča izločanje proteina v gojišče (signalno zaporedje *usp-45*) ter z zaporedjem, ki omogoča pripetje na površino (signalno zaporedje *acmA*). Gene, ki kodirajo za posamezne dele, bomo tvorili s PCR reakcijo na novo, na podlagi obstoječih matric ali na podlagi genomske DNA *L. lactis*. Posameznim genom bomo na koncu dodali ustrezna restrikcijska mesta in jih nato združili v konstrukt (slika 5), ki bo vseboval vse tri segmente. Nato bomo ta konstrukt vstavili v MCS vektorja pNZ8148 med mesti NcoI ter XbaI.

| Usp-45 |       | MP    |       | AcmA  |      |
|--------|-------|-------|-------|-------|------|
| NcoI   | BamHI | BamHI | EcoRI | EcoRI | XbaI |

Slika 5: Prikaz želenega konstrukta z restrikcijskimi mesti

Plazmide bomo v *L. lactis* sev NZ9000 vnesli z elektroporacijo. Izražanje bomo sprožili z dodatkom nizina. Uspešnost vezave modelnega peptida na površino bomo preverjali z vezavo fluorescenčno označenega streptavidina na modelni peptid. Pri tem bomo uporabili metodo FACS, prenos Western in metodo merjenja fluorescence na mikrotitrski ploščici.

### III MATERIALI IN METODE

#### 1 MATERIALI

Vse materiale, pri katerih je bilo to možno, smo predhodno avtoklavirali (pri pogojih 121°C, 20 minut, 1 bar). Za sterilno filtracijo smo uporabili 500 ml Bottle Top Filter (velikost por 0,22 µm, polietersulfon), proizvajalca Corning ali Minisart. Filtrirali smo predvsem raztopine z vsebnostjo ogljikovih hidratov (glukoza, saharoza), ki pri avtoklaviranju karamelizirajo.

##### 1.1 Voda

Demineralizirano vodo pridobivamo z reverzno osmozo in ionsko izmenjavo (v nadaljevanju dH<sub>2</sub>O). Ultračisto prečiščeno vodo pridobivamo z napravo Millipore, model Milli-Q R6 (voda je še dodatno filtrirana in ima nižjo prevodnost). Za delo smo uporabljali dH<sub>2</sub>O, ki je bila avtoklavirana, za pripravo nekaterih pufrov in raztopin pa smo uporabili vodo Milli-Q.

##### 1.2 Pufri in raztopine

|                    |                                                                                                                                        |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PBS pufer, pH=7,2: | 8,57g NaCl<br>6,244 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>1,926 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>Z vodo MilliQ smo dopolnili do 1L. |
| PBS-Tween (0,05%)  | 250 µl Tweena smo razredčili z 0,5L PBS.                                                                                               |
| PBS-Tween-BSA (2%) | 2 g BSA raztopimo v volumnu 100 ml PBS-Tweena.                                                                                         |
| dNTP zmes          | 25 µl dATP (10mM)<br>25 µl dCTP (10mM)<br>25 µl dGTP (10mM)<br>25 µl dTTP (10mM)<br>100 µl dH <sub>2</sub> O                           |

|                                                     |                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TAE pufer (10×)                                     | 48,4 g Tris<br>11,4 ml ledocetna kislina<br>40 ml EDTA (0,5M)<br>Dopolnimo z vodo do 1000 ml.                                                   |
| SGM17                                               | 250 ml <i>raztopina A</i> (15g glicin, 2,5 g glukoza, 21,25g M17)<br>250 ml <i>raztopina B</i> (1M saharoza)                                    |
| Raztopina C (10% glicerol v 0,5M saharozi)          | 50 ml 1M saharoza<br>50 ml 20% glicerol                                                                                                         |
| Raztopina SGM17 brez glicina                        | 0,5% glukoza<br>1,7 g M17<br>0,5 M saharoza<br>Dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 40 ml.                                                          |
| Tris-glicin elektroforezni pufer                    | 29 g Tris<br>144 g glicin<br>10g NaDS<br>Dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 1L.                                                                   |
| Nanašalni pufer za NaDS-PAGE                        | 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH=6,8<br>2,0 ml glicerol<br>4,0 ml 10% NaDS<br>0,5 ml 0,1% bromfenol modro<br>Dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 10,0 ml. |
| Pufer za prenos                                     | 2,93 g Tris<br>5,81 g glicin<br>3,75 ml 10% NaDS<br>200 ml metanol<br>Dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 1L.                                      |
| 1% blokirna raztopina                               | 5 ml Western blocking reagent 10x<br>50 ml TBS-T                                                                                                |
| Raztopina za detekcijo proteinov po prenosu Western | 5 ml 1% blokirna raztopina<br>5 ml TBS-T<br>2 µl streptavidin-HRP                                                                               |

|             |                                                                                                                                  |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TBS, pH=7,5 | 6,05 g Tris<br>8,76 g NaCl<br>800 ml dH <sub>2</sub> O<br>Uravnavamo pH na 7,5 z 1M HCl,<br>dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 1L. |
| TBS-T       | 1 ml Tween 20<br>Dopolnimo s TBS do 1L.                                                                                          |

### 1.3 Kemikalije

| kemikalija                                        | proizvajalec            |
|---------------------------------------------------|-------------------------|
| EtOH (95%, 70%)                                   | Carlo Erba, Italija     |
| HCl (1M)                                          | Sigma, ZDA              |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                   | Fluka, Švica            |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                   | Riedel-de Haën, Nemčija |
| NaCl                                              | Merck, Nemčija          |
| NaOAc (3M)                                        | Kemika, Hrvaška         |
| agaroz                                            | Sigma, ZDA              |
| akrilamid                                         | Merck, Nemčija          |
| amonijev persulfat (10%)                          | Sigma, ZDA              |
| BSA (Albumin Bovine Serum, FractionV),<br>10mg/ml | Sigma, ZDA              |
| butanol                                           | Carlo Erba, Italija     |
| D(+) - glukoza monohidrat                         | Fluka, Švica            |
| dATP, dCTP, dGTP, dTTP (10mM)                     | Promega, ZDA            |
| DTT                                               | Fermentas, Kanada       |
| glicerol                                          | Carlo Erba, Italija     |
| glicin                                            | Serva, Nemčija          |
| IPTG (0,1M)                                       | Sigma, ZDA              |
| kazeinski hidrolizat                              | Sigma, ZDA              |
| kvasni ekstrakt                                   | Sigma, ZDA              |

|                          |                     |
|--------------------------|---------------------|
| metanol                  | Carlo Erba, Italija |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM) | Fermentas, Kanada   |
| nizin (25 µl/ml)         | Fluka, Švica        |
| ocetna kislina           | Carlo Erba, Italija |
| saharoza                 | Fluka, Švica        |
| TEMED                    | Merck, Nemčija      |
| Tris                     | Serva, Nemčija      |
| Tween <sup>®</sup> 20    | Fluka, Švica        |
| X-gal (20 mg/ml)         | Fermentas, Kanada   |

## 1.4 Oligonukleotidni začetniki

| oligonukleotidni začetniki                                                                                                           | proizvajalec         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| PCR začetniki fragmentov (100,20,5 µM):<br>Usp1-NcoI, UspR-BamHI, Mod-BamHI,<br>Mod-EcoRI, AcmA-F, AcmA-R, AcmA-<br>EcoRI, AcmA-XbaI | Operon, ZDA          |
| pNZ-p (začetnik pNZ8148) 5 µM                                                                                                        | Thermo Electron, ZDA |

## 1.5 Encimi

Enota za aktivnost encimov U je definirana kot količina encima, ki katalizira transformacijo enega µmol substrata v eni minuti pri standardnih pogojih.

| polimeraze                                         | proizvajalec      |
|----------------------------------------------------|-------------------|
| Pfu (10×Pfu pufer)                                 | Promega, ZDA      |
| Taq (10× PCR pufer)                                | Fermentas, Kanada |
| ligaza                                             |                   |
| T4 DNA ligaza (+ T4 ligacijski pufer )<br>400 U/µl | Fermentas, Kanada |
| restriksijski encimi                               |                   |
| BamHI (Tango pufer) 10 U/µl                        | Fermentas, Kanada |
| EcoRI (Tango pufer) 10 U/µl                        | Fermentas, Kanada |

|                        |                          |
|------------------------|--------------------------|
| XbaI (20 U/ $\mu$ l)   | New England Biolabs, ZDA |
| NcoI (20 U/ $\mu$ l)   | New England Biolabs, ZDA |
| SacI (20 U/ $\mu$ l)   | New England Biolabs, ZDA |
| 10 $\times$ NEBuffer 1 | New England Biolabs, ZDA |
| 10 $\times$ NEBuffer 2 | New England Biolabs, ZDA |
| <b>ostali encimi:</b>  |                          |
| lizocim (50 mg/ml)     | Sigma, ZDA               |

## 1.6 Gojišča

| gojišče                            | priprava                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LB tekoče gojišče                  | 5g/l kvasni ekstrakt<br>10 g/l kazeinski hidrolizat<br>10 g/l NaCl<br>Z 0,1 M NaOH uravnavamo do pH=7,5.                                                                                                     |
| LBA tekoče gojišče                 | V sterilno LB gojišče dodamo ampicilin do končne koncentracije 100 $\mu$ g/ml.                                                                                                                               |
| LB, LBA plošče                     | V liter tekočega LB gojišča dodamo 15g agarja, steriliziramo z avtoklaviranjem, ohladimo do 45°C in vlijemo v sterilne petrijevke. V primeru LBA dodamo še ampicilin do končne koncentracije 100 $\mu$ g/ml. |
| GM17 tekoče gojišče (0,5l)         | 21,25 g M17 (Merck, Nemčija)<br>0,5% glukoza (2,5g)                                                                                                                                                          |
| GM17 plošče (100 ml)               | 4,25g M17<br>0,5% glukoza (0,5g)<br>1,5g agar                                                                                                                                                                |
| GM17 C <sub>10</sub> plošče (0,5l) | 21,25 g M17<br>0,5% glukoza (0,5g)<br>7,5g agar<br>kloramfenikol 10 $\mu$ g/ml                                                                                                                               |

## 1.7 Geli, označevalci velikosti, barvila, nanašalni pufri

| geli za agarozno elektroforezo                                                                                                                                                                                              | sestava                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1,5% agarozni gel                                                                                                                                                                                                           | 0,75 g agaroz<br>50 ml TAE pufer<br>5 µl barvilo                                                                       |
| 3% agarozni gel                                                                                                                                                                                                             | 1,5 g agaroz<br>50 ml TAE pufer<br>5 µl barvilo                                                                        |
|                                                                                                                                                                                                                             | proizvajalec                                                                                                           |
| <b>označevalec velikosti</b><br>GeneRuler™ 100bp DNA Ladder<br>GeneRuler™ 1kb DNA Ladder<br>za SDS PAGE                                                                                                                     | Fermentas, Kanada<br>Fermentas, Kanada<br>Bio-Rad, ZDA                                                                 |
| <b>barvilo</b><br>SYBR® Safe DNA Gel Stain<br>Streptavidin-Alexa Fluor® 488<br>Streptavidin-HRP<br>Substrat za HRP, Lumi Light (Enhancer<br>Solution, Stable Peroxide Solution)<br>Bio-Rad Protein Assay<br>Bromfenol modro | Invitrogen, ZDA<br>Invitrogen, ZDA<br>Invitrogen, ZDA<br>Roche Diagnostics, Nemčija<br>Bio-Rad, ZDA<br>Bromma, Švedska |
| <b>nanašalni pufer</b><br>6× Loading Dye Solution                                                                                                                                                                           | Fermentas, Kanada                                                                                                      |

## 1.8 Bakterijski sevi, antibiotiki

| antibiotiki              | proizvajalec       |
|--------------------------|--------------------|
| kloramfenikol (25 mg/ml) | Sigma, ZDA         |
| ampicilin (100mg/ml)     | Sigma, ZDA         |
| <b>bakterijski sevi</b>  | <b>vir</b>         |
| <i>L. lactis</i> NZ9000  | NIZO Food Research |
| <i>E. coli</i> DH5α      | Invitrogen, ZDA    |

**Genotip DH5a:**

*F<sup>-</sup> endAI glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, mit<sub>k</sub><sup>+</sup>) λ-*

**Genotip NZ9000:**

*L. lactis* MG1363 *nisRK pepN*

**1.9 Laboratorijska oprema**

| oprema                                                                      | proizvajalec                                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| analitska tehnica<br>P1200<br>200A                                          | Mettler, Nemčija<br>Tehtnica, Slovenija                                                                        |
| centrifuge:<br>5415R<br>universal 320R<br>RC5C PLUS<br>short spin<br>5702R  | Eppendorf, Nemčija<br>Hettich zentrifugen, Nemčija<br>Sorvall, ZDA<br>Eppendorf, Nemčija<br>Eppendorf, Nemčija |
| ciklični termostat (PCR naprava)<br>2720 Thermal Cycler                     | Applied Biosystems, ZDA                                                                                        |
| čitalnik mikrotitrskih plošč Safire                                         | Tecan, Švica                                                                                                   |
| elektroforezna kadička                                                      | Pharmacia, Švedska                                                                                             |
| inkubator Certomat <sup>®</sup> HK                                          | BioTech, ZDA                                                                                                   |
| koncentrator Concentrator 5301                                              | Eppendorf, Nemčija                                                                                             |
| Membrana Immobilon <sup>™</sup> Transfer                                    | Millipore, ZDA                                                                                                 |
| mikrotitrške ploščice<br>NUN96fbt, MaxiSorp, Starvell<br>StreptaWell, 96fbt | Nunclon-Nunc, Danska<br>Roche Applied Science, ZDA                                                             |
| naprave:<br>SDS PAGE<br>Prenos Western                                      | Bio-Rad, ZDA<br>Bio-Rad, ZDA                                                                                   |
| pH meter PHM220                                                             | MettlerLab, Nemčija                                                                                            |
| pipete<br>(0,5-10; 10-100; 100-1000, 1000-5000) µl                          | Eppendorf, Nemčija                                                                                             |

|                                                                                             |                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| sonifikator Sonifier W450-D                                                                 | Branson Digital Sonifier, ZDA                  |
| spektrofotometri:<br>spektrofotometer Nanodrop ND-1000<br>spektrofotometer Lambda 20 UV-VIS | NanoDrop Technologies, ZDA<br>PerkinElmer, ZDA |
| vir napetosti za elektroforezne kadičke<br>Power Pac 300                                    | Bio-Rad, ZDA                                   |
| UV svetilka                                                                                 | Universal UV, Camag, Švica                     |
| UV transiluminator                                                                          | Cole-Parmer, ZDA                               |
| UVItec arhivirni sistem                                                                     | UVItec Limited, VB                             |

## 1.10 Kompleti

- **Komplet za minipreparacijo plazmidov - JET Quick Spin Column Techinque: Plasmid Miniprep, Gel Extraction, PCR Purification (Genomed, Nemčija)**

Vsebuje raztopine za celično lizo, vezavo sproščene DNA (plazmidov) na kolono in njeno elucijo (14). Postopek je namenjen Gram negativnim bakterijam, zato smo ga v prvi stopnji spremenili. K 210 µl raztopine G1 (Tris HCl, EDTA, RNaza A) smo dodali 40 µl lizocima, ki naluknja celično steno Gram negativnih bakterij (*L. lactis*) in inkubirali 25 min pri 37°C.

- **Komplet za čiščenje DNA iz agaroznega gela - Wizard<sup>R</sup> SV gel and PCR Clean Up System (Promega, ZDA)**

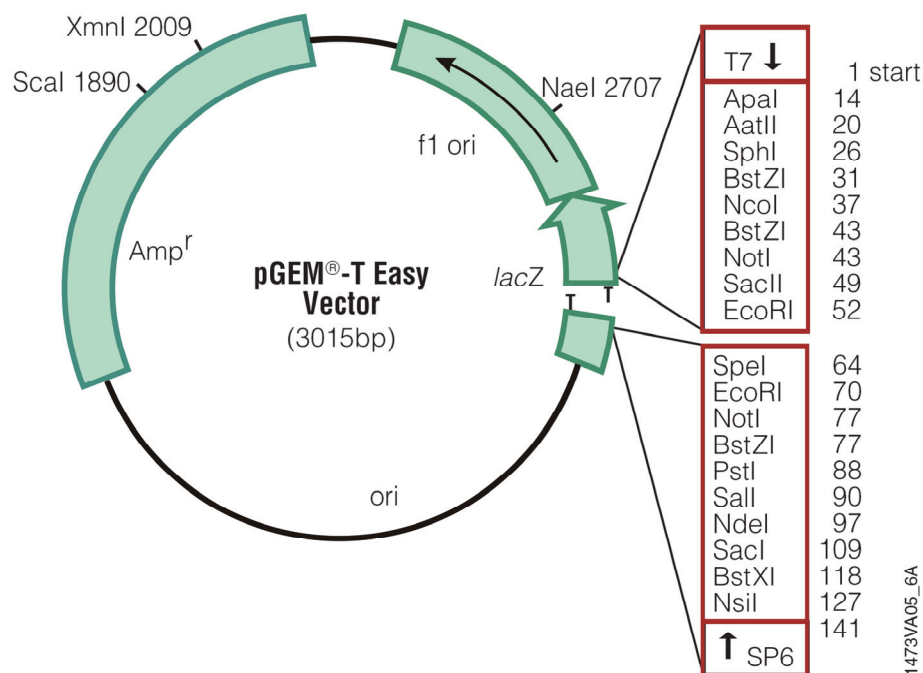
To je postopek, pri katerem ekstrahiramo in očistimo DNA segmente od 100 bp do 10 kbp iz agaroznega gela, pripravljenega bodisi v tris acetatu (TAE) ali tris boratu (TBE). Postopek lahko zajema tudi čiščenje PCR produktov direktno iz PCR reakcije (15). Metoda temelji na raztapljanju in depolimerizaciji agaroze in na vezavi DNA na kolono, ki je priložena kompletu (17). Dodani volumen NFW (nuclease free water; voda brez nukleaz) smo spremenili v 30 µl, ker smo želeli bolj koncentriran eluat.

- **Komplet za ligacijo v pGEM<sup>®</sup>-T Easy - pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems Quick Protocol (Promega, ZDA)**

Komplet vsebuje PCR primerje pGEM (2,5 mM): UniV/GemR, pGEM-T Easy plazmid, T4 DNA ligazo, 2x ligacijski pufer (16).

Plazmid pGEM<sup>®</sup>-T Easy smo uporabili kot splošen vektor za kloniranje in določanje nukleotidnega zaporedja. Plazmid je odprt in ima na 3'-koncih dodan timidin. To preprečuje zapiranje plazmida samega vase in predstavlja komplement kohezivnim koncem PCR produktov. Nekatere vrste polimeraz (tudi Taq polimeraza) namreč na 5'-koncu dodajo adenin, kar omogoča enostavno ligacijo želenega fragmenta v ta plazmid. Plazmid vsebuje (slika 6):

- *lacZ*: gen za  $\beta$ -galaktozidazo z vsebujočim multiplim restrikcijskim mestom, kar omogoča uporabo modro-belega testa,
- *Amp<sup>r</sup>*: gen za  $\beta$ -laktamazo, ki omogoča selekcijo uspešno transformiranih bakterij na podlagi rezistence na ampicilin,
- T7: iniciacijsko mesto za T7 RNA polimerazo,
- SP6: iniciacijsko mesto za SP6 RNA polimerazo (16).



Slika 6: Plazmid pGEM<sup>®</sup>-T Easy (16)

Med celicami, ki so sprejele plazmid z vstavljenim fragmentom, in tistimi, ki so sprejele plazmid brez fragmenta lahko razlikujemo z uporabo modro-belega testa. Plazmid pGEM<sup>®</sup>-T Easy namreč vsebuje klonirno mesto za vstavitev fragmenta znotraj gena za  $\beta$ -galaktozidazo. V gojišče pri uporabi testa dodamo zmes IPTG in X-gal. IPTG je induktor gena *lacZ*, ki kodira za  $\beta$ -galaktozidazo in spodbuja izražanje tega encima. X gal je

substrat za  $\beta$ -galaktozidazo. Encim ga razgradi do produkta, ki na zraku dimerizira v modro barvilo (indigo), ta pa obarva kolonijo celic iz sicer bele v modro. Celice, ki vsebujejo plazmid z vstavljenim fragmentom, ne tvorijo  $\beta$ -galaktozidaze in ostanejo bele (2,16).

## **2 METODE**

### **2.1 Splošno o metodah**

#### **2.1.1 Verižna reakcija s polimerazo**

Verižno reakcijo s polimerazo (PCR) je leta 1983 odkril Kary Banks Mullis, ki je zanjo prejel Nobelovo nagrado za kemijo. PCR predstavlja in vitro metodo sinteze nukleinskih kislin, s katero lahko pomnožimo tarčni odsek DNA. Reakcijsko zmes sestavljajo vzorec DNA, ki služi kot matrica, dva začetna oligonukleotida, deoksinukleozid – trifosfati, ki predstavljajo gradnike nove verige DNA,  $Mg^{2+}$  ioni, reakcijski pufer in termostabilna DNA polimeraza. Reakcija poteka ciklično, vsak cikel pa sestavljajo tri stopnje: denaturacija DNA, nalaganje začetnikov in izgrajevanje komplementarne verige (2).

Začetni oligonukleotidi (PCR primerji) so kratki enovijačni, umetno načrtovani oligonukleotidi, katerih velikost ne presega 50 nukleotidov (običajno med 15 in 20). Pomembno je, da so komplementarni z začetnim in končnim delom DNA segmenta, ki ga želimo pomnožiti. Med PCR reakcijo se pripnejo na komplementarne dele DNA verige.

Pomembni faktorji, ki jih moramo upoštevati pri izbiri začetnih oligonukleotidov (18):

- optimalna  $T_m$  (temperatura pripajanja): 50-60°C,
- GC (gvanin, citozin) vsebnost med 40-60% ,
- $T_m$  obeh oligonukleotidov naj se ne razlikuje >5°C,
- številu notranjih lasničnih zank >4 in številu dimerov >8 se poskusimo izogniti,
- začetniki naj se ne začnejo in končajo z 1-2 G ali C ostanki,
- 3' konec ne sme biti komplementaren s katerokoli regijo drugega začetnika,
- začetniki naj ne tvorijo obsežnejših sekundarnih struktur ali lastne komplementarnosti, kar lahko tvori v tvorbo lasničnih zank ter dimerov.

Pri delu smo si za oceno teh faktorjev pomagali s programom OligoAnalyzer (19).

Uporabljali smo dve vrsti PCR reakcij (tabela VI), navadno PCR reakcijo s Pfu polimerazo ter colony PCR s Taq polimerazo. Pfu polimeraza je natančnejša, zato smo jo uporabili, kadar smo gen tvorili s PCR reakcijo na novo (tu je natančnost bistvenega pomena).

*Tabela VI: Prikaz pogojev PCR reakcije*

| Navadni PCR                                                                                                                                                                  | Colony PCR                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| uporaba Pfu polimeraze<br>volumen: 25 µl<br><u>94°C 3 min</u><br><br><u>94°C 30 s / 50°C 1 min / 72°C 1 min</u> (št.<br>ciklov: 30)<br><u>72°C 1 min</u><br>ohladitev na 4°C | uporaba Taq polimeraze<br>volumen: 30 µl<br><u>99°C 10 min / 50°C 2 min</u> (vmes dodamo<br>Taq polimerazo)<br><u>94°C 30 s / 50°C 1 min / 72°C 1 min</u> (št.<br>ciklov: 30)<br><u>72°C 5 min</u><br>ohladitev na 4°C |

Taq polimerazo smo uporabili pri colony PCR. To metodo uporabimo, kadar želimo na enostaven način dokaj zanesljivo ugotoviti, če bakterije v koloniji vsebujejo plazmid z vstavljenim fragmentom. Izvedemo jo tako, da del bakterij prenesemo v PCR mešanico, tako da se z vrhom nastavka za pipete dotaknemo izbrane kolonije. PCR začnemo z 10 min inkubacijo na 99°C, ki povzroči porušitev integritete celične stene in membrane. Plazmid se pri tem sprosti in služi kot matrica v PCR reakciji, seveda ob uporabi ustreznih začetnih oligonukleotidov. Nastanek fragmenta ustrezne dolžine ugotavljamo z elektroforezo (17). Taq polimeraza je na visoke temperature občutljiva, zato jo dodamo med samo PCR reakcijo, takoj po znižanju temperature. V našem primeru smo colony PCR uporabili tudi za pomnožitev dela gena *acmA* iz bakterijskega genoma *L. lactis* NZ9000.

### 2.1.2 Obarjanje DNA

Obarjanje DNA je ena od osnovnih metod čiščenja in koncentriranja DNA. DNA iz vodne raztopine oborimo z dodatkom absolutnega etanola, s čimer zmanjšamo polarnost topila in s tem topnost DNA, ki je velika, nabita molekula. Po centrifugiranju se DNA nabere na dnu epruvete v obliki oborine (pelet), ki jo speremo z 70% etanolom, s čimer odstranimo

soli in majhne organske molekule. Pred resuspendiranjem v vodi ali pufru je potrebno etanol povsem odstraniti, drugače se DNA ne raztopi (17). Pri obarjanju lahko pričakujemo tudi precejšnje izgube DNA.

Vzorci smo oborili po splošnem protokolu obarjanja:

- + 0,1 V 3M NaOAc (pH 4,8), nežno premešamo,
- +2,5 V 95% EtOH, kratko vorteksiramo,
- inkubiramo pri -20°C, najmanj 20 min,
- centrifugiramo 20 min pri 14000 obratov/min, 4°C,
- odpipetiramo supernatant, + 500 µl 70% EtOH, vorteksiramo,
- centrifugiramo 20 min pri 14000 obratov/min, 4°C,
- odpipetiramo supernatant in posušimo DNA pri 37°C, 30 min.

### 2.1.3 Prenos genske informacije

#### Rekombinacija DNA (restrikcija, ligacija)

Nastanek rekombinantne DNA si lahko predstavljamo kot rezanje (restrikcija) in ponovno lepljenje (ligacija) DNA molekule. Za rezanje in lepljenje potrebujemo orodje, katero nam na molekularnem nivoju predstavljajo encimi:

- **restriksijske endonukleaze (RE):** za te encime je značilno, da DNA vedno cepijo na specifičnem mestu oz. določenem nukleotidnem zaporedju. Tip I prepozna specifično zaporedje, a cepi znotraj zaporedja naključno, tip II cepi na točno določenem mestu, pod tip III pa sodijo encimi, ki imajo vmesno aktivnost med tipoma I in II. Za tvorbo rekombinantne DNA je največkrat uporabljen tip II.
- **ligaze:** katalizirajo tvorbo fosfodiesterne vezi med 5' fosfatom ene verige in 3' hidroksilno skupino druge verige, pri tem pa nastane kovalentna vez. Predstavljajo lepilo in so od ATP odvisni encimi, ki se vključujejo v procese podvojevanja, popravljanja in rekombinacije DNA.
- **PCR produkti:** Če želimo vstaviti produkt verižne reakcije s polimerazo v vektor, imamo na razpolago dve možnosti. Prva možnost je posledica aktivnosti same Taq polimeraze, ki pri pomnoževanju DNA segmenta na 5' koncu po vsaki pomnožitvi

dodaja adenin, tak segment je možno vstaviti v vektor, ki ima na svojem 3' koncu timin. Druga možnost pa je načrtovanje takšnih začetnih oligonukleotidov, ki imajo na 5' koncih izbrano restrikcijsko mesto (2).

### **Vnos vektorja v gostiteljsko celico**

Po pripravi rekombinantne DNA sledi postopek, s katerim dani konstrukt vnesemo v gostiteljsko celico. Možnosti načina vnosa je več. Poznamo tako kemijske kot fizikalne načine vnosa. Med kemijske sodi klasična transformacija, med fizikalnimi pa naletimo na metode mikroinjiciranja, koprecipitacije, elektroporacije, biolistike in druge. Najbolj uporabljana možnost je transformacija, ki zavzema proces privzema gole DNA v gostiteljsko celico. Lastnost oziroma zmožnost, da bakterija privzame DNA imenujemo kompetenca. Kompetenca se pojavi v točno določeni fazi rasti bakterij imenovani tudi stacionarna faza, ki jo povezujemo s sintezo in pojavom t.i. kompetitivnih proteinov. Stopnjo kompetence lahko izvedemo z ustreznimi kemikalijami ali pa z električnim tokom. Pri **kemijsko inducirani kompetenci** je poleg prisotnosti dvovalentnih ionov pomembna tudi temperatura. Uspešnost privzema se poveča pri nizki temperaturi (0-5°C) in naknadnem temperaturnem šoku (37- 45°C) in ponovni ohladitvi. **Kompetenco, izzvano z električnim tokom**, imenujemo tudi elektroporacija. Pulz visoke napetosti povzroči depolarizacijo celične membrane in tvorbo por, preko katerih se prenese DNA in tudi druge makromolekule (2).

### **Selekcija**

Po prenosu vektorja v gostiteljsko celico je potrebno izvesti selekcijo, saj vse gostiteljske celice ne sprejmejo vektorja, kot tudi vsi vektorji ne vsebujejo DNA segmenta. V ta namen pripravimo selekcijska gojišča. Primer gojišča je LBA/IPTG/X-gal gojišče, postopek pa se imenuje **modro-beli test**. Po transformaciji celice razmažemo na selekcijsko gojišče. Zaradi prisotnosti antibiotika se na gojišču razmnožijo le tiste bakterije, ki so sprejele plazmid. Kajti le-te so s sprejemom plazmida privzele tudi gensko informacijo za razvoj rezistence na antibiotik. Govorimo o pozitivni selekciji.

Na gojišču se tvorijo tako bele kot tudi modre kolonije. Modra obarvanost kolonij je posledica barvila, ki se tvori zaradi nastanka funkcionalne  $\beta$ -galaktozidaze, ki je zmožna cepiti substrat, ki je prisoten na gojišču. Zaradi prisotnosti induktorja za izražanje gena za

$\beta$ -galaktozidaze (IPTG), je vzpodbujena tvorba le-te v vseh celicah, ki so sprejele plazmid, vendar pa se v določenih celicah tvori funkcionalna  $\beta$ -galaktozidaza, v nekaterih pa fuzijski protein z vključenim delom za katerega kodira vstavljeni DNA segment. Zaradi premaknjenega bralnega okvirja, fuzijski protein nima sposobnosti cepitve substrata, kar ima za posledico tvorbo belih kolonij (2).

### **Izolacija plazmidov (minipreparacija)**

Po uspešni selekciji, kolonijo iz trdnega gojišča nacepimo in pripravimo tekočo kulturo celic izbrane kolonije. Izolacija plazmida iz bakterijske celice temelji na odprtju celice s temperaturo, organskimi topili, encimsko, z alkalijami ali mehanskim razbitjem. Po odprtju celic in sprostitve plazmida v raztopino, lahko vežemo sproščene nukleinske kisline s kationskim detergentom in na koncu DNA oborimo z dodatkom soli ali etanola. Lahko se tudi uporabi številne reagenčne komplete, ki temeljijo na vezavi nukleinskih kislin na membrane, v končni fazi pa se DNA eluira iz kolone z vodo ali pufrom (2).

### **2.1.4 Določitev nukleotidnega zaporedja**

Določevanje zaporedja nukleotidov je proces, s katerim določimo natančno zaporedje nukleotidov v danem fragmentu DNA. Danes največkrat uporabljana metoda določevanja zaporedja DNA je dideoksi metoda, ki jo je razvil Frederik Sanger, v bistvu pa gre za posebno obliko verižne reakcije s polimerazo. Dideoksi metoda je dobila ime po vlogi sinteznih nukleotidov (ddNTP), ki imajo na mestu 3' na ogljik pripet le vodikov atom (in ne OH skupine).

DNA, ki ji želimo določiti nukleotidno zaporedje, lahko pripravimo v enoverižni obliki – matrična DNA. Dodamo zmes štirih deoksinukleotidov v zadostni količini (dATP, dGTP, dCTP in dTTP) in zmes štirih z različnimi fluorescenčnimi barvili označenih dideoksinukleotidov (ddATP, ddGTP, ddCTP in ddTTP) v omejenih količinah. Dokler DNA polimeraza ne vgradi dideoksinukleotida, elongacija normalno poteka. Produkta PCR z gelsko kapilarno elektroforezo razporedimo glede na dolžino. Če jih osvetlimo z laserskim žarkom, vsak od štirih dideoksinukleotidov fluorescira drugačno barvo in tako razberemo zaporedje (20). Vzorce smo na določitev nukleotidnega zaporedja pošiljali družbi MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Nemčija).

### **2.1.5 Agarozna gelska elektroforeza**

Agarozna gelska elektroforeza je enostavna in učinkovita metoda ločevanja molekul DNA različnih velikosti (100 bp do 25000 bp). Agaroz je linearni polisaharid, ki je topen v vroči vodi, pri ohlajanju pa polimerizira in tvori gel. Velikost por v nastalem gelu je odvisna od koncentracije agaroze. Elektroforeza pomeni ločevanje nabitih molekul v električnem polju. Molekula DNA je negativno nabita in v električnem polju potuje proti pozitivno nabiti elektrodi, anodi. Hitrost potovanja je odvisna od velikosti oz. oblike DNA molekule, od zamreženosti gela in od jakosti električnega polja. Za ustrezen prikaz rezultatov ločevanja uporabimo označevalce velikosti in sledilna barvila z različno elektroforetično mobilnostjo. Dvoverižno DNA lahko v gelu zaznamo z barvilom, ki se vrine med nukleotide v dvojni DNA verigi (17). Velikokrat agarozno gelsko elektroforezo uporabimo po PCR reakciji, kjer ločimo želene fragmente od ostale PCR mešanice. Nato očistimo izrezan del gela, ki vsebuje fragment.

### **2.1.6 Poliakrilamidna gelska elektroforeza**

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE) uporabljamo predvsem za ločevanje proteinov. Osnovni gradnik poliakrilamidnih gelov je akrilamid. Polimerizacija akrilamida steče v prisotnosti prostih radikalov. Vir prostih radikalov je običajno amonijev persulfat, stabilizira pa jih TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin). Prosti radikali sprožijo verižno reakcijo, ki vodi v nastanek linearnih verig. Če v polimerizacijsko reakcijo vključimo bifunkcionalni reagent N,N'-metilenbisakrilamid, se verige prečno povežejo in tvorijo gel. Poroznost gela je odvisna od dolžine verig in deleža prečnih povezav. Večja zamreženost daje manjšo velikost por in bolj ovira potovanje molekul, za manjšo zamreženost pa velja ravno obratno. Ločevanje lahko poteka ob prisotnosti NaDS, ki je negativno nabita amfifilna molekula in se nespecifično veže na denaturirane molekule proteinov. Naboj kompleksa NaDS/protein je sorazmeren z velikostjo proteina, saj se na večji protein veže več molekul NaDS. Zato poteka ločevanje izključno na podlagi velikosti (2,20).

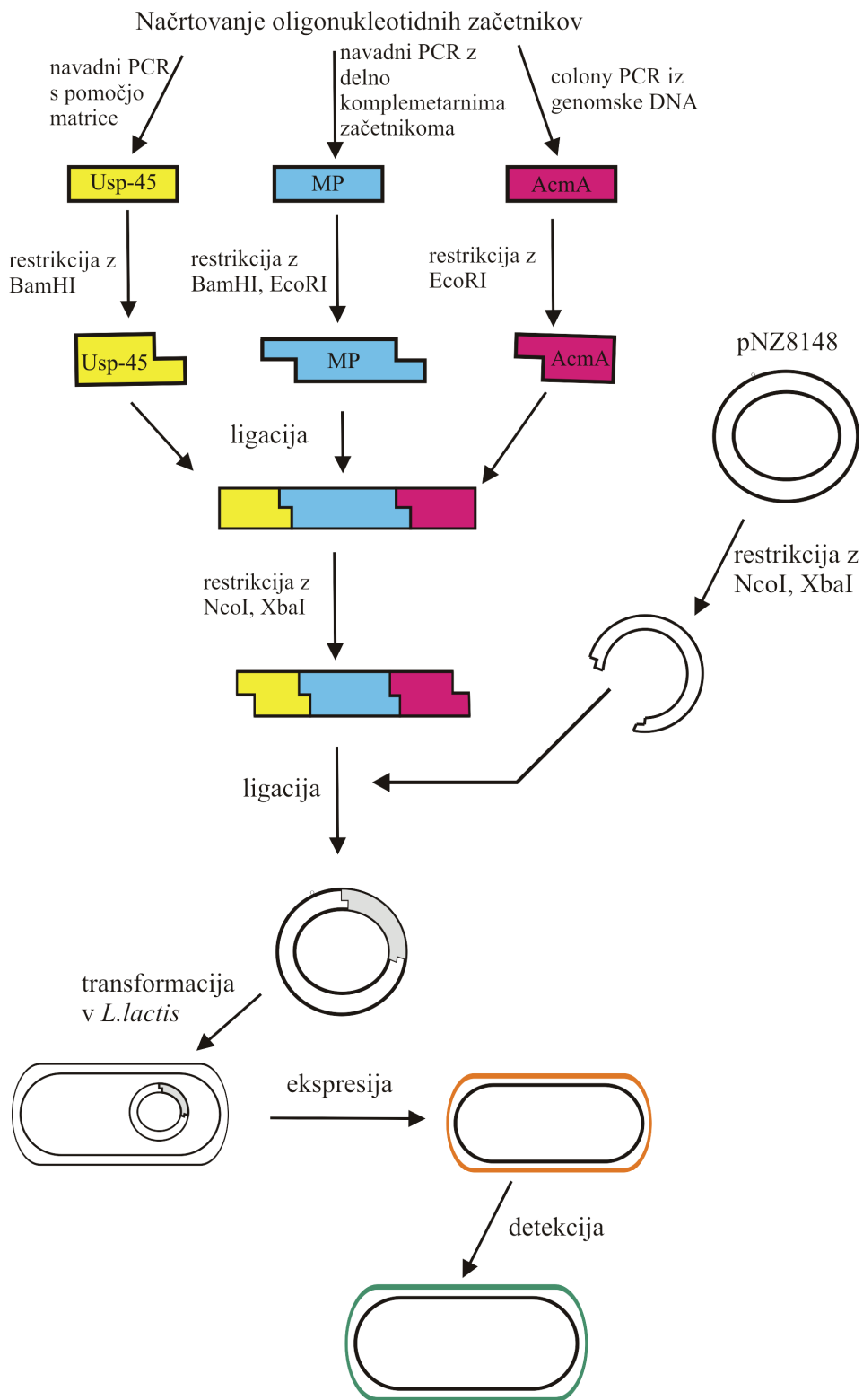
### **2.1.7 Prenos Western**

Proteine po NaDS PAGE najbolj specifično detektiramo z uporabo monoklonskih protiteles, ki so usmerjena proti tem proteinom. Ker so protitelesa velike molekule in težko difundirajo skozi poliakrilamidni gel, gela ne moremo neposredno inkubirati v raztopini protiteles. Proteine moramo zato prenesti na nitrocelulozno ali najlonsko membrano, kar lahko storimo s pomočjo elektroforeznega prenosa. Ta prenos imenujemo prenos Western. Membrano nato inkubiramo v raztopini govejega albumina ali kazeina, s čimer blokiramo nezasedena mesta na membrani in preprečimo nespecifično vezavo protiteles. Sledi inkubacija v raztopini protiteles. Običajno uporabljamo dve vrsti protiteles. Primarna protitelesa so specifično usmerjena proti proteinu, ki ga želimo detektirati. Sekundarna protitelesa so usmerjena proti primarnim in so označena bodisi radioaktivno ali pa z encimom, ki ob inkubaciji s določenim substratom tvori produkt, ki ga lahko detektiramo (17).

### **2.1.8 Fluorescenčno aktivirano celično sortiranje**

Fluorescenčno aktivirano celično sortiranje (FACS) omogoča fenotipsko razlikovanje celic. Modelni peptid ima sposobnost vezave streptavidina, ta pa je fluorescenčno označen. S FACS tako lahko ločimo celice, na katere se veže streptavidin, od tistih na katere se ne veže in tako izvedemo selekcijo. Laserski žarek osvetljuje posamezno celico, ki potuje v ozkem toku tekočine. Če celica vsebuje fluorokrom, se le-ta stimulira in emitira svetlobo specifične valovne dolžine, kar detektira detektor. Hkrati se začetni žarek zaradi prisotnosti celice odkloni in dobimo tudi informacijo o velikosti celice, njeni granuliranosti oziroma notranji kompleksnosti. Podatke navadno predstavimo v dveh oblikah: kot frekvenčni diagram ali kot dvodimenzionalni grafični prikaz. Frekvenčni diagram prikaže profil merjenega dejavnika v celični populaciji. Tudi dvodimenzionalni grafični prikaz prikaže profil dejavnikov, vendar meri dva parametra za vsako celico hkrati in je zato prikaz podatkov dvodimenzionalen (2).

## 2.2 Shema laboratorijskega dela



## 2.3 Postopki

### 2.3.1 Priprava elektrokompetentnih bakterij *L. lactis* NZ9000 in vstavljanje plazmidov pNZ8148

Nacepili smo *L. lactis* seva NZ9000 iz trajne kulture na plošče GM17 ter preko noči inkubirali pri 30°C. Nato smo precepljali bakterijske kolonije v tekoče gojišče GM17 (v epruvete po 5 ml) v različnih časovnih intervalih (ob 10<sup>h</sup>, 12<sup>h</sup>, 14<sup>h</sup>, 16<sup>h</sup>) ter ob 21<sup>h</sup> pomerili absorbance ( $A_{600}$ ) vseh štirih vzorcev napram gojišču GM17 (tabela VII). Želena absorbanca v maksimumu rasti (eksponentni fazi) naj bi bila med 0,5-0,8 (21).

Tabela VII: Prikaz absorbanc v odvisnosti od časa

| ura | $A_{600}$ |
|-----|-----------|
| 10  | 2,552     |
| 12  | 0,380     |
| 14  | 0,054     |
| 16  | 0,052     |

Vrednost kulture, ki je bila precepljena ob 12<sup>h</sup> smo tretirali kot sprejemljivo ter redčili celice *L. lactis* (5 ml) z 0,5 L gojišča SGM17. Bakterije so v inkubatorju do jutra zrasle do absorbance 0,309. Ta vrednost ustreza zahtevam (med 0,2 in 0,7) (21), zato smo nadaljevali s pripravo. Kulturo smo centrifugirali, pri čemer so se celice usedle na dno. Oborjeni del smo resuspendirali v raztopini C (20ml) in centrifugiranje ter resuspendiranje v raztopini C (spiranje) ponovili še enkrat (pogoji centrifugiranja so prikazani v tabeli VIII). S tem smo zmanjšali ionsko moč bakterijske suspenzije. Prevelika ionska moč lahko moti elektroporacijo, saj se raztopini poveča prevodnost.

Tabela VIII: Prikaz pogojev centrifugiranja

| oznaka rotorja | GS3                       | SS-34                    |
|----------------|---------------------------|--------------------------|
| pogoji         | 20 min, 5500 obr/min, 4°C | 20min, 6500 obr/min, 4°C |

V vsako centrifugirko smo po odlitju supernatanta dodali 500  $\mu$ l raztopine C. Alikvote po 110  $\mu$ l smo zamrznili v tekočem dušiku. Tako pripravljeni laktokoki so elektrokompetentni in primerni za elektroporacijo. Po odtalitvi smo zmešali 45  $\mu$ l bakterij *L. lactis* in 2  $\mu$ l plazmida pNZ8148. **Elektroporacijo smo izvajali pri naslednjih pogojih: upornost: 200 $\Omega$ , napetost: 2kV, kapacitanca: 25  $\mu$ F.** Po dodatku 1 ml gojišča SGM17 brez glicina smo inkubirali pri 30°C 2 uri. Bakterije smo razmazali na plošče GM17 C<sub>10</sub> v različnih volumnih (20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l) in inkubirali 2 dni pri 30°C.

Pripravili smo prekonočne kulture. Izbrane kolonije smo prenesli v epruveto s 5 ml tekočega gojišča GM17 in kloramfenikola s koncentracijo 10  $\mu$ g/ml (osnovna koncentracija kloramfenikola je bila 25 mg/ml, zato smo odpipetirali 2  $\mu$ l antibiotika v gojišče). Nato smo iz bakterij izolirali plazmide po protokolu *JET Quick Spin Column Techinque: Plasmid Miniprep, Gel Extraction, PCR Purification*.

#### **Izvedba agarozne gelske elektroforeze:**

Metodo smo uporabljali za ocenjevanje uspešnosti posameznih reakcij in za izolacijo zelenih fragmentov. Uporabljali smo od 1% do 3% agarozne gele. Pripravili smo jih z raztapljanjem ustrezne količine agaroze v 50 ali 150 ml TAE pufra. Nanašalna raztopina vsebuje glicerol, ki vzorcem zveča gostoto in omogoča lepše usedanje v žepke, ter barvili bromfenol modro in ksilencianol zeleno, ki v 1% gelu potujeta s fragmenti velikosti 300 bp oz. 4000 bp in omogočata vizualno spremljanje elektroforeze. Za spremljanje velikosti smo v enega od žepkov nanesti 1  $\mu$ l ustreznega označevalca velikosti. Nanašali smo ga v kombinaciji z 14  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O in 3  $\mu$ l nanašalnega pufra. Vzorec se nanaša na gel v takšnem volumnu, da je nanašalni pufer 6x redčen. Elektrode smo priklopili na vir napetosti, običajno smo elektroforezo izvajali pri 100 V. Gele smo opazovali na UV transiluminatorju. Za potrebe arhiviranja smo jih posneli s pomočjo UVItec arhivirnega sistema, kjer pod UV svetilko z video kamero posnamemo gel, ga shranimo v računalniškem zapisu in natisnemo na termičnem tiskalniku.

### 2.3.2 Načrt za PCR začetnike za pripravo želenega konstrukta

Pripravili smo načrt za istosmerne ter obratnosmerne oligonukleotidne začetnike želenih fragmentov (Usp-45, MP, AcmA), skupaj z restrikcijskimi mesti. Na 5' konec smo dodali 4 baze za restrikcijskim mestom, s tem smo omogočili restrikcijskemu encimu rezanje. G,C pari prispevajo k višjemu tališču, zato se jim izogibamo.

**Usp-45 signalni peptid: Unidentified secreted protein, glavni ekstracelularni protein *L. lactis*, omogoča izločanje v gojišče, vzeli smo samo signalno zaporedje za izločitev v gojišče**

Zapis za peptid (nukleotidno zaporedje):

ATGAAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATGTCTACAGTGATACTTTCTGCT  
GCAGCCCCGTTGTCAGGTGTTTACGCT

Usp1 (istosmerni začetnik): 5'-ATGAAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATG-3'

UspR (obratnosmerni začetnik): 5'-AGCGTAAACACCTGACAACGGGGCTG-3'

- **Usp1-NcoI:**  
ATAACCATGGCTAAAAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATG  
dolžina: 42  
GC vsebnost: 26.2 %  
Tm: 58.2 °C  
CCATGG – restrikcijsko mesto za NcoI (mesto na plazmidu pNZ8148)
- **UspR-BamHI:**  
ATAAGGATCCAGCGTAAACACCTGACAACGGGGC  
dolžina: 34  
GC vsebnost: 52.9 %  
Tm: 66.5 °C  
GGATCC – restrikcijsko mesto za BamHI (vmesno mesto za ligacijo v želeni konstrukt, plazmid pNZ8148 ga ne vsebuje)

### Modelni peptid: Nano-tag, streptavidin vezavni peptid (13)

Zapis za peptid:

GATGTTGAAGCTTGGCTTGGTGCTCGTGTTCCACTTGTTGAAACT

Mod-BamHI: 5'-GATGTTGAAGCTTGGCTTGGTGCTCGTGTTTC-3'

Mod-EcoRI: 5'-AGTTTCAACAAGTGGAACACGAGCACCAAGCC-3'

Začetnika sta delno komplementarna.

- **Mod-BamHI:**  
TTAGGATCCGATGTTGAAGCTTGGCTTGGTGCTCGTGTTCC  
dolžina: 41

GC vsebnost: 51.2 %

Tm: 68.3 °C

*GGATCC* – restrikcijsko mesto za BamHI (vmesno mesto za ligacijo v želeni konstrukt, plazmid pNZ8148 ga ne vsebuje)

- Mod-EcoRI:

**TTAGAAATTC**AGTTTCAACAAGTGGAACACGAGCACCAAGCC

dolžina: 41

GC vsebnost: 43.9 %

Tm: 65.5 °C

*GAATTC* – restrikcijsko mesto za EcoRI (vmesno mesto za ligacijo v želeni konstrukt, plazmid pNZ8148 ga ne vsebuje)

**AcmA: protein, katerega regija med 904 in 1038 baz omogoča pritrjevanje na površino laktokoka (10,12)**

Zapis za celoten protein AcmA( okrepljeni tisk prikazuje regije proteina, ki omogočajo pritrjevanje na površino):

```
atttttgttttaaatcagatttttttagattaaaggcaaaaagtttttacaaatatgaatccttaacggaaa
aacgtttacaaaccgccaccaaattgacatcttttttagcttgaggcgtggtagaataaagatagtactt
attatattttgtaatcttttagaaaggttaatttttatgccagtatcacgtgttaaagttaaaaatagacat
ttaaaaaagaaaactaaaaaaccactcgctttttataaaccagccacaaaatttgctggcgctgttcttat
tgccggaacattgacaaccacacatgaacttcttcttcaacagacaagtccaatgggttcaagcagcgacta
actcatcagaggttttttattgaaagtattgcccgcacagcaaaacctgtggcagatgctaattggcttatat
ccttcggtcatgattgcccgaagctatttttgaaaagcaactggggctcaagtcagctttcacgagctcccta
ttataattttatttggtattcaaggtacttatcaaggaaagagcgtcgtattttaaaactcaagagtatctca
atggtaaatgggtgactaaagatatgccctttagggtctatccttcccttaatacaagttttcaagacaat
gcttatgttctaaaaacaacaaactttgggaatgggtccctattacgctaaggcgttgggggccaatgctgc
cacctatcaagacgctactgctgctttgacgggcagatatgctaccgaccaagttatggcgcttcaactga
atcgcatattttctcaatataatttgactcgttttgacggagcttcttcagctggaaatactaattctgggt
ggctcgacaaccacaattacgaataataattctggaaccaatagcagttcaactacttataaccgtcaaatc
tggtgatactcctttggggaatctcacaagatatggaattagtgtcgctcaaatccaagtgcgaaataatc
ttaaaagtaccattatctacattgggtcaaaaacttgactgacaggttcagcttcttctacaaattcaggt
ggttcaaaacaattccgcaagcactactccaaccacttctgtgacacctgcaaaaccaacttcacaaacaac
tgttaaaggttaaatccggagataccctttgggcgctatcagtaaaatataaaaactagtattgctcaattga
aaagttggaatcatttaagttcagataccatttatattgggtcaaaatcttattgtttcacaaatctgctgct
gcttcaaatccttcgacaggttcaggtcactgctaccaataactcaaaactcgacttcttctaactcaaa
tgcctcaattcataaaggtcggttaaaggagatactctctggtgggactttcgcaaaaatctggcagcccaattg
cttcaatcaaggttggaatcatttatctagcgatactattttaattgggtcagtatctacgaataaaaataa
attattattaatgaacttttagttaataaaaaaagaatgaaattcaattcattcttttttaattcttgta
aaaccgcttgaagatggatagaacgggtcggttctgacattccaacagtcatttcccaaggagttggttct
ttttcaagagccaattcaagaaaaacacggttgaaatgaagttaattcttcacagttcggttaaatagtcaat
ctcttttttagagagcaaaattttgtcacgttgaaatcactttgttttaggtagcgaacccaaagttctaaat
tccatttggtatttttgggcagcctgcaagagatattcaatccacgtcattgtaataacctcagtatttttg
gattttttcgtaaataatttttttaagcttcttcaccataagccaaactataagcttctaaaataaccgct
ggg
```

Uporabili smo začetnike za direktno pomnožitev iz genomske DNA *L. lactis*, začetnike brez restrikcijskih mest smo izbrali glede na literaturne podatke (senčeni tisk) (10):

- AcmA-F: 5'-TTTGACGGAGCTTCTTCAGC-3'

dolžina: 20 bp

GC vsebnost: 50.0 %

Tm: 55.4 °C

- AcmA-R: 5'-TTGAACCACTGAATTTGTAGAAG-3'  
dolžina: 24 bp  
GC vsebnost: 37.5 %  
Tm: 53.3 °C
- AcmA-EcoRI: 5'-TTATGAATTCTTTGACGGAGCTTCTTCAGC-3'  
dolžina: 30  
GC vsebnost: 40.0 %  
Tm: 58.9 °C  
*GAATTC* – restrikcijsko mesto za EcoRI (vmesno mesto za ligacijo v želeni konstrukt, plazmid pNZ8148 ga ne vsebuje)
- AcmA-XbaI: 5'-TTATTCTAGATTATGAACCACTGAATTTGTAGAAG-3'  
dolžina: 36  
GC vsebnost: 30.6 %  
Tm: 56.7 °C  
*TCTAGA* – restrikcijsko mesto za XbaI (mesto na plazmidu pNZ8148)

Celoten zapis za načrtovani insert (restrikcijska mesta so podčrtana, *ATG* – *start kodon*, *TAA* – *stop kodon*):

ATAACCATGGCTAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATGTCTACAGTGAT  
ACTTTCTGCTGCAGCCCCGTTGTCAGGTGTTTACGCTGGATCCGATGTTGAAG  
CTTGGCTTGGTGCTCGTGTTCCACTTGTTGAAACTGAATTCCTTGACGGAGCT  
TCTTCAGCTGGAAATACTAATTCTGGTGGCTCGACAACCACAATTACGAATA  
ATAATTCTGGAACCAATAGCAGTTCAACTACTTATAACCGTCAAATCTGGTGAT  
ACTCTTTGGGGAATCTCACAAAGATATGGAATTAGTGTCGCTCAAATTCAA  
GTGCGAATAATCTTAAAAGTACCATTATCTACATTGGTCAAAAACCTTGACTG  
ACAGGTTCTCAGCTTCTTCTACAAATTCAGGTGGTTCATAATCTAGATAA

### 2.3.3 Priprava posameznih fragmentov konstrukta

Sprva smo fragmente pridobili s PCR reakcijo (tabela IX), uporabili smo tri dokaj različne PCR reakcije:

*Tabela IX: Prikaz dodanih snovi v PCR reakciji*

| fragment, ki ga želimo pomnožiti                                                                                                             | mešanica za PCR reakcijo                                                                                                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Usp-45 (navadni PCR)<br>pomnoževanje s pomočjo matrice<br>(pGEM::Usp-45) (22)                                                                | 1 µl matrice<br>2 µl Usp1- NcoI (5 µM)<br>2 µl UspR-BamHI (5 µM)<br>2 µl dNTP<br>2,5 µl 10× Pfu pufer<br>12,5 µl dH <sub>2</sub> O<br>0,6 µl Pfu pol. + 2,4 µl dH <sub>2</sub> O |
| Modelni peptid (navadni PCR)<br>ne potrebuje matrice, ker med samima<br>oligonukleotidoma pride do prekrivanja<br>(sta delno komplementarna) | 2 µl Mod-BamHI (5 µM)<br>2 µl Mod-EcoRI (5 µM)<br>2 µl dNTP<br>2,5 µl 10× Pfu pufer<br>13,5 µl dH <sub>2</sub> O<br>0,6 µl Pfu pol. + 2,4 µl dH <sub>2</sub> O                   |
| AcmaA (colony PCR)<br>pomnoževanje iz genomske DNA <i>L. lactis</i> ,<br>sprva pomnožujemo brez restrikcijskih mest                          | 2 µl AcmaA-F (5 µM)<br>2 µl AcmaA-R (5 µM)<br>4 µl MgCl <sub>2</sub><br>3 µl dNTP<br>5 µl 10× PCR pufer<br>29 µl dH <sub>2</sub> O<br>0,2 µl Taq pol. + 4,8 µl dH <sub>2</sub> O |

Fragmente smo po PCR reakciji ločili od zmesi z agarozno gelsko elektroforezo, ki smo jo izvedli pri napetosti 93V. Za Usp-45 ter modelni peptid smo pripravili 3% gel, za AcmaA pa 1,5% (ta fragment je večji). Fragmente smo izrezali ter očistili iz gela ter vstavili v plazmid pGEM. Priredili smo protokol *p-GEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>R</sup>-T Easy Vector Systems*

*Quick Protocol* (tabela X). Taq polimeraza na 5'-koncu DNA verige, ki jo sintetizira, spontano doda adenin. Ta lastnost se izkorišča za enostavno ligacijo v plazmid pGEM®-T Easy, ki je odprt in na 3'-koncih vsebuje komplementaren timidin.

*Tabela X: Prikaz izvedbe A-tailinga in ligacije v pGEM*

| fragment                 | A-tailing                                                                                                                                                 | ligacija                                                                                                                 |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| USP-45<br>Modelni peptid | 7 µl PCR produkta (iz gela)<br>1 µl Taq pol. 10× PCR pufer<br>1 µl MgCl <sub>2</sub><br>0,5 µl dATP (10mM)<br>0,5 µl Taq polimeraze<br><b>30 min 70°C</b> | 6 µl zmesi A-tailing<br>1 µl pGEM (3× redčen)<br>7,5 µl ligacijskega pufr<br>0,5 µl T4 DNA ligaze<br><b>16°C čez noč</b> |
| AcmA                     | te faze ne izvajamo, ker smo že v postopku colony PCR uporabili Taq polimerazo                                                                            | 6 µl zmesi A-tailing<br>1 µl pGEM (3× redčen)<br>7,5 µl ligacijskega pufr<br>0,5 µl T4 DNA ligaze<br><b>16°C čez noč</b> |

Nato smo ligate transformirali v komercialne DH5α kompetentne *E.coli*, kjer smo sledili protokolu *Subcloning Efficiency<sup>TM</sup> DH5α<sup>TM</sup> Competent Cells* (23). 5 µl vzorce ligacijske mešanice smo dodali k 40 µl celic in inkubirali na ledu 30 minut. Transformacijo smo izvedli s toplotnim šokom 45 s pri 37°C v vodni kopeli ter celice znova postavili na led za 2 minuti. Dodali smo 950 µl Luria-Bertani gojišča ter inkubirali 1 uro pri 37°C, 225 obratov/min. Transformirane celice smo v dveh različnih volumnih (100 in 900 µl) razmazali na že pripravljene LBA/IPTG/X-gal plošče, ki vsebujejo antibiotik ampicilin v koncentraciji 100 µg/ml.

**Razmaz IPTG/X-gal na LBA plošče:**

10 µl IPTG (0,1M), 40 µl X-gal, 50 µl dH<sub>2</sub>O

Volumen 900 µl se na plošče težko razmaže, zato smo celice centrifugirali, odpipetirali približno 600 µl gojišča ter v preostanku gojišča oborino resuspendirali. Plošče smo inkubirali čez noč pri 37°C.

Zrasle so modre in bele kolonije (modro-beli test). Vsebnost plazmida z insertom (bele kolonije) smo preverili s colony PCR. Pripravili smo zmes za PCR reakcijo (1 µl UniV, 1 µl GemR, 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl dNTP, 3 µl 10× PCR pufer, 14,5 µl dH<sub>2</sub>O ter zmes 0,1 µl Taq pol. + 4,9 µl dH<sub>2</sub>O), izvedli colony PCR ter ligate od PCR zmesi ločili z agarozno gelsko elektroforezo. Pripravili smo 1,5% gel, saj je med fragmenti prisoten tudi AcmA, ki vsebuje večje število baznih parov. Napetost je bila 115V.

Precepili smo izbrane kolonije, ki so uspešno sprejele plazmide z insertom (bele kolonije), v že pripravljeno tekoče LBA gojišče v epruvetah (5 ml, ampicilin 100 µg/ml, osnovna koncentracija ampicilina je bila 100mg/ml, zato smo odpipetirali 5 µl antibiotika). Inkubirali smo pri 37°C, 225 obratov/min preko noči (prekonočne kulture). Po minipreparaciji smo izmerili koncentracijo plazmidov z insertom (tabela XI) z Nanodrop spektrofotometrom ND-1000. Ta način merjenja omogoča določanje koncentracije zelo

*Tabela XI: Izmerjene koncentracije fragmentov*

| vzorec              | izmerjena koncentracija<br>(ng/µl) | E <sub>260</sub> /E <sub>280</sub> | volumen za obarjanje *<br>(µl) |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Usp-45 <sub>1</sub> | 312,6                              | 1,90                               | 6,4                            |
| Usp-45 <sub>2</sub> | 378,4                              | 1,91                               | 5,3                            |
| Usp-45 <sub>3</sub> | 209,5                              | 1,93                               | 9,6                            |
| Usp-45 <sub>4</sub> | 233,5                              | 1,91                               | 8,6                            |
| M.pep <sub>1</sub>  | 155,0                              | 1,93                               | 12,9                           |
| M.pep <sub>2</sub>  | 148,0                              | 1,93                               | 13,5                           |
| AcmA <sub>1</sub>   | 250,2                              | 1,92                               | 8,0                            |
| AcmA <sub>2</sub>   | 377,3                              | 1,91                               | 5,3                            |
| AcmA <sub>3</sub>   | 421,0                              | 1,91                               | 4,8                            |

\* na določitev nukleotidnega zaporedja se pošlje vzorec z maso 2 µg

majhnim volumnom vzorca (nanesli smo 2 $\mu$ l). Meri se  $E_{260}$  in  $E_{280}$  z upoštevanjem, da  $E_{260}=1$  ustreza koncentraciji 50  $\mu$ g/ml za dvoverižno DNA. Čisti vzorci DNA vsebujejo razmerje  $E_{260}/E_{280}$  okoli 1,8. Pri  $\lambda_{280}$  absorbirajo proteini, za katere pa želimo, da v vzorcu niso prisotni.

Vzorci smo oborili po splošnem protokolu obarjanja in jih poslali na določitev nukleotidnega zaporedja.

### 2.3.4 Sestavljanje fragmentov v konstrukt

Posamezne fragmente (pGEM::Usp-45, pGEM::MP, pGEM::AcmA) smo pomnožili direktno iz ustreznega pGEM vektorja (tabela XII), ki je te fragmente tudi vseboval. Fragmentov Usp-45 in AcmA nismo direktno izrezali, saj smo želeli ohraniti nedotaknjene konce. Pri ligaciji v konstrukt smo namreč pri Usp-45 in AcmA rezali z restriktazami samo na enem koncu. Izjema je modelni peptid, ki je imel na obeh koncih restrikcijski mesti, zato smo le-tega lahko direktno izrezali iz pGEM in ga predhodno ni bilo potrebno pomnoževati.

*Tabela XII: Prikaz dodanih volumnov pri PCR pomnoževanju iz pGEM*

| <b>Usp-45 (navadni PCR):</b>                         | <b>AcmA (navadni PCR):</b>                           |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 1 $\mu$ l pGEM::Usp-45                               | 1 $\mu$ l pGEM::AcmA                                 |
| 2 $\mu$ l Usp1- NcoI (5 $\mu$ M)                     | 2 $\mu$ l AcmA-EcoRI (5 $\mu$ M)                     |
| 2 $\mu$ l UspR-BamHI (5 $\mu$ M)                     | 2 $\mu$ l AcmA-XbaI (5 $\mu$ M)                      |
| 2 $\mu$ l dNTP                                       | 2 $\mu$ l dNTP                                       |
| 2,5 $\mu$ l 10 $\times$ Pfu pufer                    | 2,5 $\mu$ l 10 $\times$ Pfu pufer                    |
| 12,5 $\mu$ l dH <sub>2</sub> O                       | 12,5 $\mu$ l dH <sub>2</sub> O                       |
| 0,6 $\mu$ l Pfu pol. + 2,4 $\mu$ l dH <sub>2</sub> O | 0,6 $\mu$ l Pfu pol. + 2,4 $\mu$ l dH <sub>2</sub> O |

Fragmente smo od PCR mešanice ločili z agarozno gelsko elektroforezo (1,5%) ter očistili. Fragmentom smo dodali izbrane restriktaze (tabela XIII).

*Tabela XIII: Prikaz dodanih volumnov pri restrikciji*

| <b>Usp-45</b>                                                         | <b>Modelni peptid</b>                                                                                            | <b>AcmA</b>                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 25 µl PCR produkta<br>2 µl BamHI restriktaze<br>3 µl Tango pufra (24) | 10 µl pGEM::MP<br>4 µl Tango pufra<br>2 µl BamHI restriktaze<br>1 µl EcoRI restriktaze<br>3 µl dH <sub>2</sub> O | 10 µl PCR produkta<br>2 µl EcoRI restriktaze<br>6 µl Tango pufra<br>12 µl dH <sub>2</sub> O |

Vzorci smo inkubirali 3 ure pri 37°C.

Nato smo izmerili koncentracije dobljenih rezanih fragmentov z Nanodrop spektrofotometrom ND-1000 (tabela XIV). Za ligacijo želimo fragmente v približnem množinskem razmerju 1:1:1. AcmA fragment je večji, nahaja se tudi v večji masni koncentraciji. Usp-45 in modelni peptid sta približno v enakem množinskem razmerju. Odločili smo se za ligacijo v volumskem razmerju 5:5:7, kar približno ustreza množinskemu razmerju 1:1:1.

*Tabela XIV: Izmerjene koncentracije rezanih fragmentov*

| fragment                    | Usp-45 | Modelni peptid | AcmA |
|-----------------------------|--------|----------------|------|
| koncentracija *<br>(ng/ µl) | 2,9    | 3,0            | 4,0  |

\* masna koncentracija

Za ligacijo smo zmešali naslednje: 1 µl T4 DNA ligaze, 2 µl T4 ligacijskega pufra, 5 µl Usp-45, 5 µl modelnega peptida, 7 µl AcmA; in jo izvedli preko noči pri 16°C.

Z navadno PCR reakcijo smo testirali ligacijsko zmes na vse možne produkte (tabela XV):

**Usp-45 + modelni peptid + AcmA:** uporabili smo začetnike Usp1-NcoI, AcmA-XbaI

**Usp-45 + modelni peptid:** Usp1-NcoI, Mod-EcoRI

**Modelni peptid + AcmA:** Mod-BamHI, AcmA-XbaI

*Tabela XV: Prikaz dodanih volumnov pri PCR pomnoževanju ligacijske zmesi*

| <b>Usp-45 + MP + AcmA</b>                  | <b>Usp-45 + Modelni peptid</b>             | <b>Modelni peptid + AcmA</b>               |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1 µl produkta ligacije                     | 1 µl produkta ligacije                     | 1 µl produkta ligacije                     |
| 2 µl Usp1-NcoI (5 µM)                      | 2 µl Usp1-NcoI (5 µM)                      | 2 µl Mod-BamHI (5 µM)                      |
| 2 µl AcmA-XbaI (5 µM)                      | 2 µl Mod-EcoRI (5 µM)                      | 2 µl AcmA-XbaI (5 µM)                      |
| 2 µl dNTP                                  | 2 µl dNTP                                  | 2 µl dNTP                                  |
| 2,5 µl 10× Pfu pufer                       | 2,5 µl 10× Pfu pufer                       | 2,5 µl 10× Pfu pufer                       |
| 12,5 µl dH <sub>2</sub> O                  | 12,5 µl dH <sub>2</sub> O                  | 12,5 µl dH <sub>2</sub> O                  |
| 0,6 µl pfu pol. + 2,4 µl dH <sub>2</sub> O | 0,6 µl pfu pol. + 2,4 µl dH <sub>2</sub> O | 0,6 µl pfu pol. + 2,4 µl dH <sub>2</sub> O |

V p-GEM smo z metodo A-tailinga in sledeče ligacije (tabela XVI) vstavili samo celoten konstrukt.

*Tabela XVI: Pogoji A-tailinga in ligacije konstrukta v pGEM*

| <b>Fragment</b>    | <b>A-tailing</b>                                                                                                                                          | <b>ligacija</b>                                                                                                            |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Usp-45 + MP + AcmA | 7 µl PCR produkta (iz gela)<br>1 µl Taq pol. 10× PCR pufer<br>1 µl MgCl <sub>2</sub><br>0,5 µl dATP (10mM)<br>0,5 µl Taq polimeraze<br><b>30 min 70°C</b> | 6 µl zmesi A-tailing<br>1 µl pGEM (neredčen!)*<br>7,5 µl ligacijskega pufra<br>0,5 µl T4 DNA ligaze<br><b>16°C čez noč</b> |

\* prejšnja transformacija je uspela zelo slabo, zato smo uporabili bolj koncentriran pGEM

Ligacijsko zmes smo transformirali v komercialne DH5α kompetentne *E. coli*. 10 µl pGEM ligata smo dodali k 40 µl celic ter postopali po protokolu. V dveh različnih volumnih (100 in 900 µl) smo transformirane celice razmazali že na pripravljene LBA/IPTG/X-gal plošče, ki vsebujejo antibiotik ampicilin v koncentraciji 100 µg/ml.

|                                                         |
|---------------------------------------------------------|
| <b>Razmaz IPTG/X-gal na LBA plošče:</b>                 |
| 10 µl IPTG (0,1M), 40 µl X-gal, 50 µl dH <sub>2</sub> O |

Plošče smo inkubirali čez noč pri 37°C.

Bele kolonije, ki so vsebovale plazmid z vstavljenim konstruktom, smo določili s colony PCR. Pripravili smo mešanico za PCR reakcijo (1 µl UniV, 1 µl GemR, 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl dNTP, 3 µl 10× PCR pufer, 14,5 µl dH<sub>2</sub>O ter zmes 0,1 µl Taq pol. + 4,9 µl dH<sub>2</sub>O), izvedli colony PCR ter konstrukt od PCR mešanice ločili z agarozno gelsko elektroforezo. Precepili smo izbrane kolonije, ki so uspešno sprejele plazmide z vstavljenim konstruktom, v tekoči LBA gojišče v epruvetah (5 ml). Inkubirali smo pri 37°C, 225 obratov/minuto preko noči.

Po minipreparaciji smo izmerili koncentracijo pGEM z vstavljenim konstruktom (tabela XVII) z Nanodrop spektrofotometrom ND-1000.

*Tabela XVII: Izmerjene koncentracije pGEM z vstavljenim konstruktom*

| vzorec<br>(št.konstrukta) | izmerjena<br>koncentracija<br>(ng/µl) | E <sub>260</sub> /E <sub>280</sub> | E <sub>260</sub> /E <sub>230</sub> | volumen za<br>obarjanje *<br>(µl) |
|---------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 1                         | 62,2                                  | 1,85                               | 2,15                               | 32,15                             |
| 3                         | 423,3                                 | 1,89                               | 2,28                               | 4,72                              |
| 4                         | 371,9                                 | 1,91                               | 2,21                               | 5,38                              |
| 5                         | 296,8                                 | 1,91                               | 2,23                               | 6,74                              |
| 6                         | 280,0                                 | 1,92                               | 2,22                               | 7,14                              |
| 7                         | 435,8                                 | 1,90                               | 2,20                               | 4,59                              |

\* na določitev nukleotidnega zaporedja se pošlje vzorec z maso 2 µg

Vzorci smo oborili po splošnem protokolu obarjanja in jih poslali na določitev nukleotidnega zaporedja.

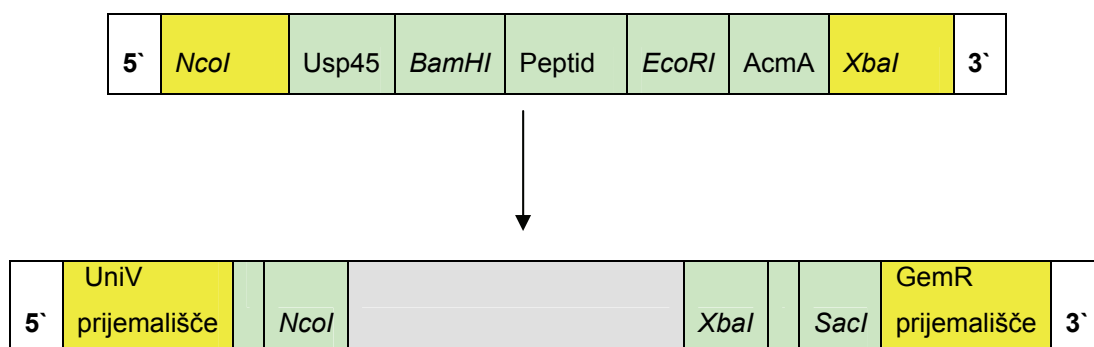
### 2.3.5 Ligacija konstrukta v pNZ8148 in transformacija plazmida z vstavljenim konstruktom v *L. lactis* NZ9000

Konstrukt je vseboval pravi genski zapis, mutacija je bila le na restrikcijskem mestu XbaI. To mutacijo je možno popraviti s ponovnim PCR pomnoževanjem ali pa korigirati z izbiro drugega restrikcijskega mesta, mesta SacI na pGEM (slika 7), pri čemer izrežemo celotni

*Tabela XVIII: Prikaz vseh možnih načinov restrikcije konstrukta iz vektorja pGEM*

| Navadni PCR konstrukta z začetniki konstrukta in nadaljnja restrikcija z NcoI ter XbaI restriktazami                                                                                                                                                           | Navadni PCR konstrukta z univerzalnimi začetniki pGEM in nadaljnja restrikcija z NcoI in SacI restriktazami                                                                                                                                               | Direktna restrikcija konstrukta iz pGEM z NcoI ter SacI restriktazami                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PCR:</b><br>1 µl pGEM::konstrukt 3<br>2 µl Usp1-NcoI (5 µM)<br>2 µl AcmA-XbaI (5 µM)<br>2 µl dNTP<br>2,5 µl 10× Pfu pufer<br>12,5 µl dH <sub>2</sub> O<br>0,6 µl pfu pol. + 2,4 µl dH <sub>2</sub> O                                                        | <b>PCR:</b><br>1 µl pGEM::konstrukt 3<br>2 µl UniV(5 µM)<br>2 µl GemR (5 µM)<br>2 µl dNTP<br>2,5 µl 10× Pfu pufer<br>12,5 µl dH <sub>2</sub> O<br>0,6 µl pfu pol. + 2,4 µl dH <sub>2</sub> O                                                              | <b>Restrikcija pGEM:</b><br>15 µl pGEM::konstrukt 3<br>3 µl 10× pufer 1 (25)<br>1 µl SacI<br>2 µl NcoI<br>9 µl dH <sub>2</sub> O |
| <b>Restrikcija PCR produkta:</b><br>30 µl PCR produkta<br>5 µl 10× pufer 2 (25)<br>2 µl XbaI<br>2 µl NcoI<br>11 µl dH <sub>2</sub> O<br><b>Restrikcija pNZ8148:</b><br>10 µl plazmida<br>3 µl 10× pufer 2<br>1 µl XbaI<br>2 µl NcoI<br>14 µl dH <sub>2</sub> O | <b>Restrikcija PCR produkta:</b><br>30 µl PCR produkta<br>5 µl 10× pufer 1<br>2 µl SacI<br>2 µl NcoI<br>11 µl dH <sub>2</sub> O<br><b>Restrikcija pNZ8148:</b><br>10 µl plazmida<br>3 µl 10× pufer 1<br>1 µl SacI<br>2 µl NcoI<br>14 µl dH <sub>2</sub> O | <b>Restrikcija pNZ8148:</b><br>10 µl plazmida<br>3 µl 10× pufer 1<br>1 µl SacI<br>2 µl NcoI<br>14 µl dH <sub>2</sub> O           |

konstrukt. Mesto *SacI* vsebuje tudi plazmid pNZ8148. Konstrukt smo iz pGEM vektorja pridobili na tri načine (tabela XVIII). PCR reakcijam je sledila restrikcija z izbranimi restriktazami. Restrikcija je potekala 3 ure pri 37°C.



Slika 7: Prikaz celotnega konstrukta z restrikcijskimi mesti (zgoraj), prikaz vstavljenega konstrukta v vektorju pGEM (spodaj)

Za ligacijo konstrukta v pNZ8148 smo zmešali: 10 µl rezanega plazmida pNZ8148, 7 µl rezanega PCR produkta (ali produkta pri direktni restrikciji), 2 µl 10× ligacijskega pufra, 1 µl T4 DNA ligaze in jo izvedli preko noči pri 16°C. Ligat smo oborili in sprali, s čimer smo odstranili soli. Nato smo ligat resuspendirali v 10 µl dH<sub>2</sub>O ter v vakumskem koncentradorju skoncentrirali do približnega volumna 5 µl. Pri direktni restrikciji ligata nismo oborili, ampak smo ga samo skoncentrirali.

Subkloniran konstrukt smo z elektroporacijo vnesli v *L. lactis* sev NZ9000. Elektroporacijo smo izvedli pri enakih pogojih kot pri transformaciji plazmidov brez konstrukta. Transformirane celice smo razmazali na plošče GM17 C<sub>10</sub> v dveh različnih volumnih (100 µl in 900 µl).

Kolonije, ki so zrasle na ploščah smo preverili s colony PCR. Pripravili smo zmes za PCR reakcijo: 1 µl pNZ-p, 1 µl AcmA-XbaI, 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl dNTP, 3 µl 10× PCR pufer, 14,5 µl dH<sub>2</sub>O, ter zmes 0,1 µl Taq pol. + 4,9 µl dH<sub>2</sub>O in izvedli colony PCR. Izbrane kolonije smo prenesli v epruveto s 5 ml tekočega gojišča GM17 in kloramfenikola s koncentracijo 10 µg/ml v gojišču. V gojišče smo odpipetirali 2 µl antibiotika z osnovno koncentracijo 25 mg/ml. Inkubirali smo 2 dni pri 30°C.

Po minipreparaciji smo vzorcem (tabela XIX) izmerili koncentracijo z Nanodrop spektrofotometrom ND-1000.

*Tabela XIX: Izmerjene koncentracije plazmidov pNZ8148 z vstavljenim konstruktom*

| vzorec<br>(št.plazmida<br>pNZ8148) | izmerjena<br>koncentracija<br>(ng/μl) | E <sub>260</sub> /E <sub>280</sub> | E <sub>260</sub> /E <sub>230</sub> | volumen za<br>obarjanje *<br>(μl) |
|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 1                                  | 74,6                                  | 2,10                               | 2,04                               | 26,8                              |
| 2                                  | 67,4                                  | 2,18                               | 2,04                               | 29,7                              |
| 3                                  | 81,6                                  | 1,99                               | 1,93                               | 24,5                              |
| 4                                  | 55,9                                  | 2,11                               | 1,80                               |                                   |
| 5                                  | 63,3                                  | 2,08                               | 1,90                               |                                   |
| 6                                  | 71,6                                  | 2,13                               | 2,04                               | 28,0                              |
| 10                                 | 66,2                                  | 2,08                               | 1,85                               | 30,2                              |
| 12                                 | 53,7                                  | 2,15                               | 2,00                               |                                   |
| 18                                 | 53,2                                  | 2,13                               | 1,93                               |                                   |
| 19                                 | 54,7                                  | 2,11                               | 1,94                               | 36,6                              |

\* na določitev nukleotidnega zaporedja se pošlje vzorec z maso 2 μg, poslali smo izbrane vzorce 1,2,3,6,10,19 (višja koncentracija)

Vzorci smo oborili po splošnem protokolu obarjanja in jih poslali na določitev nukleotidnega zaporedja.

Sama transformacija v *L. lactis* se je izkazala za problematično. Pri elektroporaciji je namreč vsakič prišlo do električnega stika, kar je zmanjšalo možnost preživetja elektrokompetentnih laktokokov ter sprejema plazmida. Transformacija je sicer uspela, toda z nobenim poskusom optimizacije elektroporacije (uporaba Milli-Q vode namesto dH<sub>2</sub>O, uporaba drugega seva laktokokov) težave nismo uspeli odpraviti. Verjetno je največja težava sama prevodnost suspenzije laktokokov.

### 2.3.6 Izražanje celotnega konstrukta v *L. lactis* NZ9000

Plazmid pNZ8148 s konstruktom in plazmid pNZ8148 brez konstrukta (kontrola) smo transformirali v *L. lactis* NZ9000. Po razmazu na plošče in dvodnevni inkubaciji pri 30°C smo pripravili še prekonočne kulture. 250 µl bakterijske prekonočne kulture smo odpipetirali v 25 ml gojišča GM17 s kloramfenikolom\* (10 µg/ml), inkubirali na 30°C dokler nismo dosegli  $A = 0,5$  pri  $\lambda = 600$  nm. Za merjenje absorbance smo iz erlenmajerice odpipetirali 100 µl kulture in jo z gojiščem GM17 10× redčili. Izražanje smo inducirali z nizinom\*\* (25ng/ml) ter inkubirali 3 ure pri 30°C.

\* Osnovna koncentracija je bila 25 mg/ml, zato smo odpipetirali 10 µl antibiotika v gojišče.

\*\* Osnovna koncentracija je bila 25 µl/ml, zato smo odpipetirali 25 µl nizina.

**Izražanje smo izvedli v dveh ponovitvah.**

### 2.3.7 Detekcija izražanja na površini

Testirali smo bakterijske celice in lizate bakterijske kulture. Bakterijske lizate smo pripravili tako, da smo po inkubaciji ostalo bakterijsko kulturo prelili v centrifugirke in centrifugirali 10 minut pri 5000 g. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant in pelet resuspendirali v PBS pufru (10 ml kulture v 1 ml PBS pri prvem izražanju in v 0,7 ml pri drugem izražanju). Bakterijsko kulturo smo zmrznili na -20°C, odtalili na ledu in sonificirali pri 30%-ni amplitudi 6x po 3 sekunde (razbitje). Na koncu smo 5 min centrifugirali pri maksimalnih obratih v hladni centrifugi (4°C) ter za nadaljnjo detekcijo uporabili supernatant, v katerem je bil topen del lizata (tudi izraženi proteini).

Detekcijo smo preverjali z vezavo streptavidina na modelni peptid. Streptavidin je bil označen s fluorescenčnim barvilom Alexa Fluor ali pa konjugiran z encimom HRP (hrenova peroksidaza). Za detekcijo smo uporabili tri načine:

- **FACS**

Barvanje s Streptavidin, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488:

**Bakterijske celice:**

400 µl 80× redčeni bakterijski kulturi smo dodali 2 µl barvila (1mg/ml), inkubirali pri sobni temperaturi 5 min. Nato smo centrifugirali (5000g, 20°C) 5 min ter sprali s 400 µl PBS pufra. Ta zadnji postopek smo ponovili dvakrat. Merili smo fluorescenco (ekscitacija pri  $\lambda = 495$  nm in emisija pri  $\lambda = 519$  nm).

**Bakterijski lizat:**

Zmešali smo 100 µl bakterijske kulture s praznim plazmidom z :

- 530 µl lizata bakterij s konstruktom (c(proteinov) = 231 µg/ml)
- 800 µl lizata bakterij s praznimi plazmidi - kontrola ( c(proteinov) = 153 µg/ml)

Nato smo centrifugirali (5000g, 20°C) 5 min ter resuspendirali s 400 µl PBS pufra. Dodali smo 5 µl barvila (1mg/ml), inkubirali pri 30°C 10 min. Znova smo centrifugirali (5000g, 20°C) 5 min ter sprali z 400 µl PBS pufra. Merili smo fluorescenco (ekscitacija pri  $\lambda = 495$  nm in emisija pri  $\lambda = 519$  nm).

- **mikrotitrne ploščice**

Volumen nanosa lizata smo izračunali glede na koncentracijo proteinov, ki smo jo določili po Bradfordovi metodi (za izračun glej poglavje Rezultati in razprava). Za Bradfordovo metodo smo lizat redčili 1/25 ter 1/100. K 160 µl vzorca smo nanесли 40 µl barvila Bio-Rad Protein Assay.

Bradfordova metoda:

Barvilo Bio-Rad Protein Assay vsebuje barvilo Coomassie Brilliant Blue, ki se preko hidrofobnih in Van der Waalsovih interakcij veže na proteine z bazičnimi in hidrofobnimi skupinami (nastanek modre barve). Kompleks ima maksimum absorbance pri 595 nm. Absorbanco smo izmerili po kratki inkubaciji na sobni temperaturi.

Po nanosu lizata na mikrotitrsko ploščico za merjenje fluorescence in prekonočni inkubaciji v hladilniku, smo ploščico spirali s PBS-Tweenom ter nezasedena mesta

zapolnili s PBS-Tween-BSA (200  $\mu$ l). Inkubirali smo 1 uro pri sobni temperaturi. Streptavidin-Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 smo nanесли na mikrotitrne ploščice v volumnu 100  $\mu$ l z naslednjimi redčitvami v PBS pufru: 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi in ploščico ponovno sprali s PBS-Tweenom. Vezanim kompleksom na mikrotitrski ploščici smo pred meritvijo dodali 100  $\mu$ l PBS. Merili smo fluorescenco (ekscitacija pri  $\lambda$ = 495 nm in emisija pri  $\lambda$ = 519 nm).

- **NaDS PAGE in prenos Western**

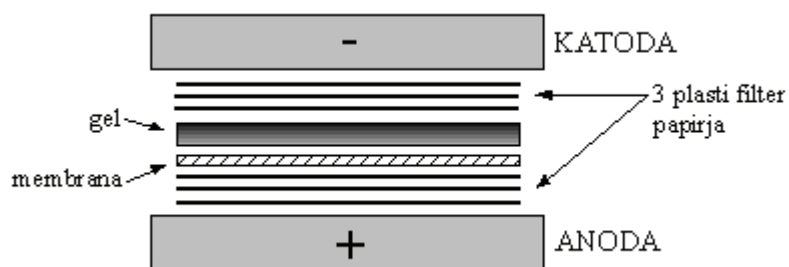
Sprva smo pripravili oba gela za NaDS PAGE (tabela XX). Gela smo vlili takoj po dodatku TEMED-a, ki sproži polimerizacijo. Gladino separacijskega gela smo izravnali z butanolom, ki je izravnal gladino gela. Vzorcem (volumne smo znova preračunali glede na dobljeno koncentracijo proteinov po Bradfordovi metodi, glej tabelo XXI) smo dodali nanašalni pufer v takšnem volumnu, da je bil le-ta 4 $\times$  redčen in 1 $\mu$ l DTT ter jih za 5 minut inkubirali na 100°C, da je prišlo do denaturacije proteinov. Elektroforezo smo izvajali v Tris-glicin elektroforeznem pufru pri toku 30 mA.

*Tabela XX: Priprava gelov pri SDS PAGE*

| 12% separacijski gel              | 4% koncentracijski gel           |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| 3,0 ml akrilamid (40%)            | 0,5 ml akrilamid (40%)           |
| 2,50 ml 1,5 M Tris-HCl (pH=6,8)   | 1,25 ml 0.5 M Tris-HCl (pH=6,8)  |
| 4,34 ml dH <sub>2</sub> O         | 3,175 ml dH <sub>2</sub> O       |
| 100 $\mu$ l NaDS (10%)            | 50 $\mu$ l NaDS (10%)            |
| 50 $\mu$ l amonijev persulfat     | 25 $\mu$ l amonijev persulfat    |
| <u>10 <math>\mu</math>l TEMED</u> | <u>5 <math>\mu</math>l TEMED</u> |
| $\Sigma$ = 10 ml                  | $\Sigma$ = 5 ml                  |

Prenos Western smo izvajali na posebni aparaturi med dvema elektrodama. Membrano smo aktivirali v metanolu ter jo skupaj s filter papirji namočili v pufru za prenos. Filter papirje, gel in membrano smo prenesli na anodo in jih previdno zložili eden na drugega, tako da vmes ni bilo zračnih mehurčkov. Tako smo oblikovali »sendvič«, ki je prikazan na sliki 8. Zatem smo aparaturo priključili na napetost 100 V. Prenos je potekal eno uro in pol. Membrani smo nato dodali blokirno raztopino ter pustili stresati eno uro. Blokirno

raztopino smo nato odlili in dodali raztopino streptavidina, konjugiranega z encimom HRP in pustili stresati še eno uro. Sledilo je spiranje membrane z raztopino TBS-T in sicer 4× po 20 minut. Preden smo membrano prenesli med dve plasti folije, smo jo narahlo popivnali s papirnato brisačo. Na membrano smo nanесли 375 μl obeh raztopin substrata Lumi-Light in inkubirali 2 minuti. Po inkubaciji smo membrano prenesli med novi dve plasti folije in pazljivo fiksirali v kaseto za ekspozicijo. V temnici smo v kaseto namestili še film, eksponirali približno 1 minuto in film takoj razvili.

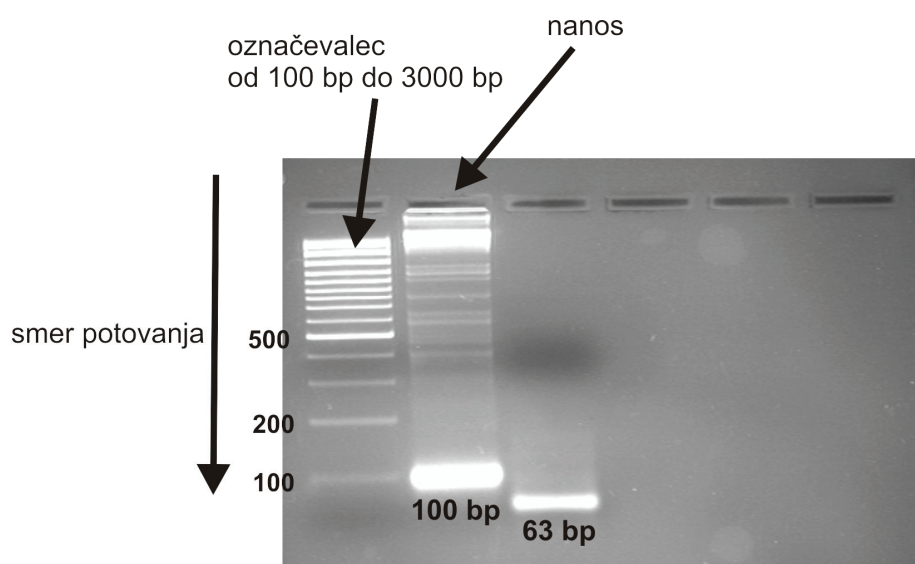


*Slika 8: Shema prenosa Western (17)*

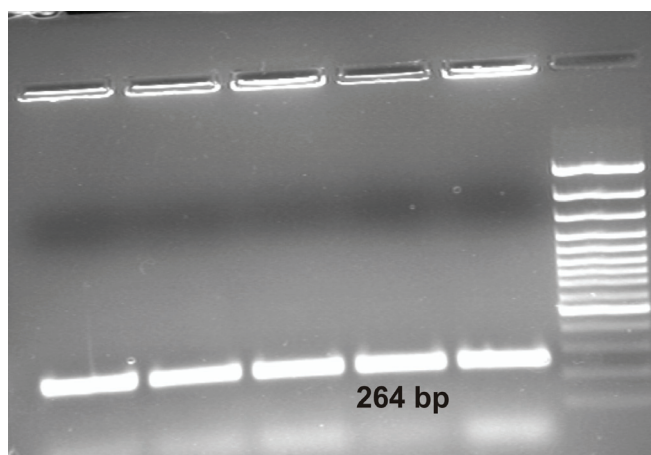
## IV REZULTATI in RAZPRAVA

### 1 Priprava posameznih fragmentov konstrukta

Po pomnoževanju z navadno PCR reakcijo in začetniki z restrikcijskimi mesti sta bila na gelu vidna oba fragmenta, Usp-45 pri 100 bp, ter modelni peptid pri manj kot 100 bp (velikost 63 bp), slika 9. Tudi pomnoževanje fragmenta AcmA s colony PCR z začetniki brez restrikcijskih mest je potrdilo njegovo prisotnost v PCR produktu (velikost 264 bp, slika 10). Taq polimeraza je v primerjavi s Pfu polimerazo manj natančna, zato smo pri fragmentu AcmA naredili več vzporednih reakcij.

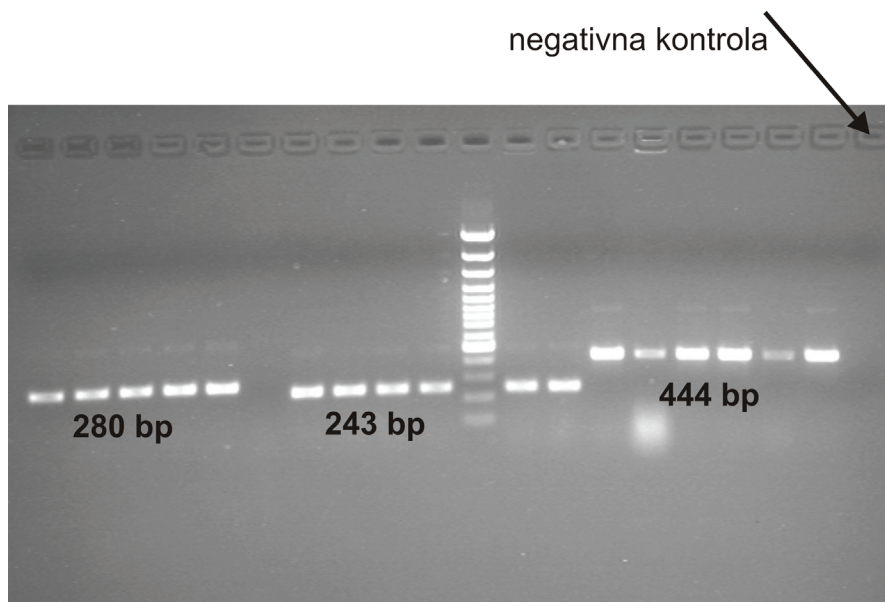


*Slika 9: Agarozna gelska elektroforeza Usp-45 in modelnega peptida po navadnem PCR*



*Slika 10: Agarozna gelska elektroforeza AcmA po colony PCR*

Uspešno pomnožene fragmente smo vstavili v pGEM in transformirali v bakterije *E. coli*. Kolonije smo preverili s colony PCR. Želeli smo dokazati, da izbrane bele kolonije vsebujejo fragmente. Začetnika UniV in GemR pomnožita tudi del vektorja pGEM in k produktu PCR prispevata dodatnih 180 bp. Pri pomnoževanju iz plazmida pGEM z uporabo pGEM univerzalnih začetnikov so pričakovane velikosti fragmentov po agarozni gelski elektroforezi (slika 11): Usp-45 280 bp, modelni peptid 243 bp in AcmA 444 bp.



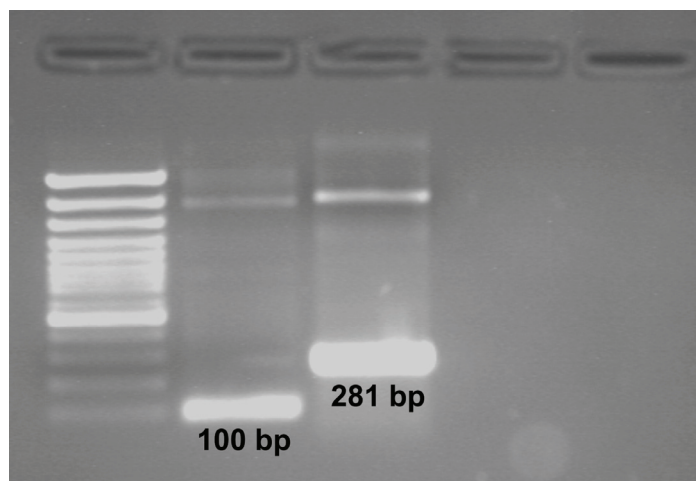
Slika 11: Agarozna gelska elektroforeza Usp-45, modelnega peptida in AcmA po transformaciji v *E. coli* ter colony PCR

Po preučitvi genskega zaporedja DNA fragmentov, ki smo jih poslali na določitev nukleotidnega zaporedja, smo ugotovili, da izmed vzorcev ustrezajo Usp-45<sub>3</sub>, Usp-45<sub>4</sub>, M.pep<sub>1</sub>, M.pep<sub>2</sub> ter AcmA<sub>1</sub>, AcmA<sub>2</sub> in AcmA<sub>3</sub>. AcmA segmenti restrikcijskih mest v tej stopnji še ne vsebujejo.

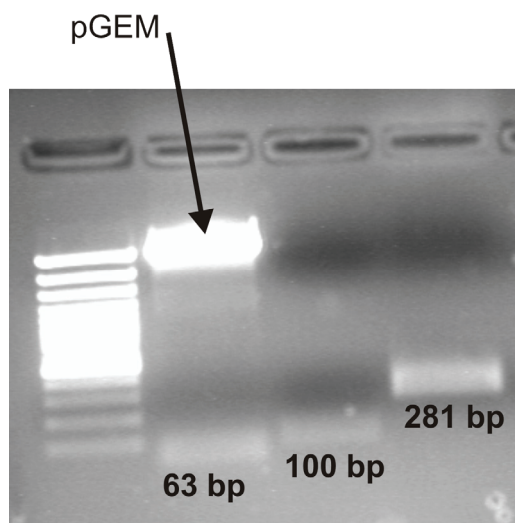
Načrtovanje začetnih oligonukleotidov ter pomnoževanje s PCR reakcijo je torej uspelo v celoti. Uporabili smo tri zahtevne, a med seboj popolnoma različne reakcije: pomnoževanje s pomočjo matrice (Usp-45), s pomočjo delno komplementarnih oligonukleotidnih začetnikov (MP) ter pomnoževanje iz genomske DNA *L. lactis* (AcmA). Določenje nukleotidnega zaporedja je potrdilo, da smo vse tri fragmente s polimerazama Pfu in Taq uspešno pomnožili, pravilna je bila izbira oligonukleotidnih začetnikov in tudi vrste PCR reakcije. Prav tako je bila uspešna reakcija A-tailinga in nadaljnja ligacija v pGEM ter transformacija (s pomočjo toplotnega šoka) plazmida v bakterije *E. coli*.

## 2 Sestavljanje fragmentov v konstrukt

Fragmente smo iz pGEM vektorja pridobili s PCR reakcijo (Usp-45 pri 100bp, AcmA pri 281 bp, slika 12) in nadaljnjo restrikcijo (slika 13) ali pa z direktno restrikcijo (MP pri 63 bp, slika 13, drugi stolpec). Tak način reakcij smo izbrali zato, ker smo želeli Usp-45 in AcmA pomnožiti v celoti, potem pa rezati z izbranimi restriktazama (BamHI v primeru Usp-45 in EcoRI v primeru AcmA) samo na tistem koncu, kjer smo potem fragmente lepili v konstrukt. Fragment MP zavzema središčno lego, zato smo ga iz vektorja pGEM::MP lahko direktno izrezali z restriktazama BamHI in EcoRI. Fragment AcmA po tem pomnoževanju zavzema večjo velikost (prej 264, sedaj 281 bp), saj smo ga pomnožili z začetniki z restrikcijskimi mesti.



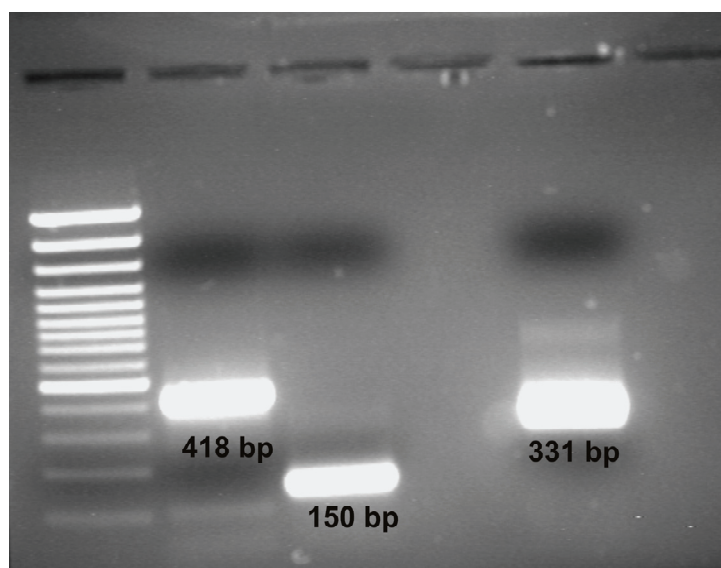
Slika 12: Agarozna gelska elektroforeza Usp-45 ter AcmA po PCR iz p-GEM



Slika 13: Agarozna gelska elektroforeza MP, Usp-45 ter AcmA po restrikciji

Iz slike 12 je razvidno, da smo uspešno pomnožili fragmenta Usp-45 ter AcmA. Fragmentu AcmA smo dodali tudi restrikcijska mesta. Slika 13 kaže na uspešnost restrikcije vseh treh fragmentov. Velik fragment, viden pri 3000 bp pri drugem nanosu je pGEM po restrikciji, saj smo modelni peptid direktno izrezali iz pGEM. Izbira BamHI in EcoRI restrikcijskih mest je bila torej uspešna, saj so restriktaze izrezale modelni peptid iz pGEM. V resnici so vrednosti fragmentov manjše za par baz, ki smo jih z restrikcijo izrezali.

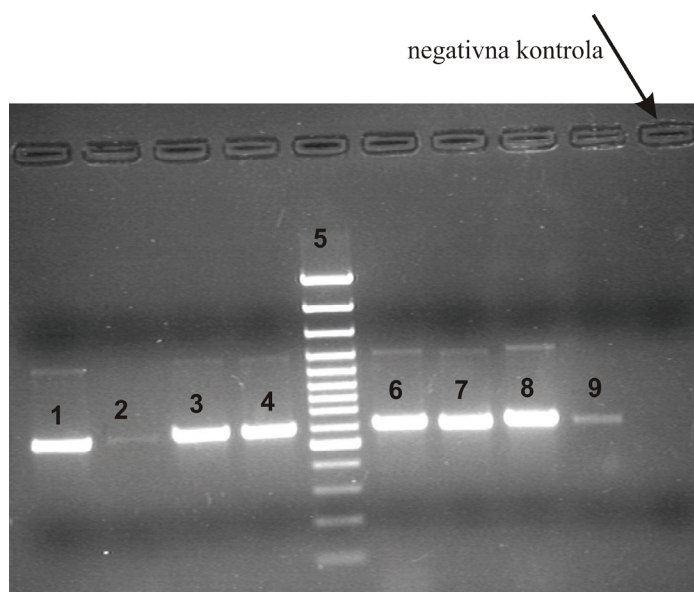
Po restrikciji smo izvedli ligacijo preko izbranih restrikcijskih mest z zmesjo vseh treh fragmentov, produkt ligacijske zmesi pa s PCR reakcijo testirali na prisotnost vseh treh možnih ligatov (slika 14). V zmesi se lahko pojavi celoten načrtovan konstrukt (torej ligacija vseh treh fragmentov med seboj) ali pa nepopoln ligat (ligacija dveh fragmentov med seboj). S PCR reakcijo smo želeli potrditi samo prisotnost konstrukta v ligacijski zmesi, ostali dve reakciji pa sta imeli vlogo kontrole. V primeru odsotnosti konstrukta bi z njima lahko hitro ugotovili kje je nastopila težava pri ligaciji.



*Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza ligatov*

Pri drugem nanosu smo dobili liso okrog 418 bp, kar ustreza ligatu Usp-45 + modelni peptid + AcmA. Ustrezala sta tudi oba druga ligata in sicer smo dobili lise okrog 150 bp (Usp-45 + modelni peptid) ter 331 bp (modelni peptid + AcmA). V ligacijski zmesi smo tako dobili vse možne ligacijske produkte, v pGEM pa smo vstavili samo celoten konstrukt.

Pred colony PCR (slika 15) je skupaj s začetniki pGEM vektorja, UniV in GemR (180 bp), sedaj pričakovana velikost produkta colony PCR reakcije (Usp-45 + modelni peptid + AcmA) 598 bp.



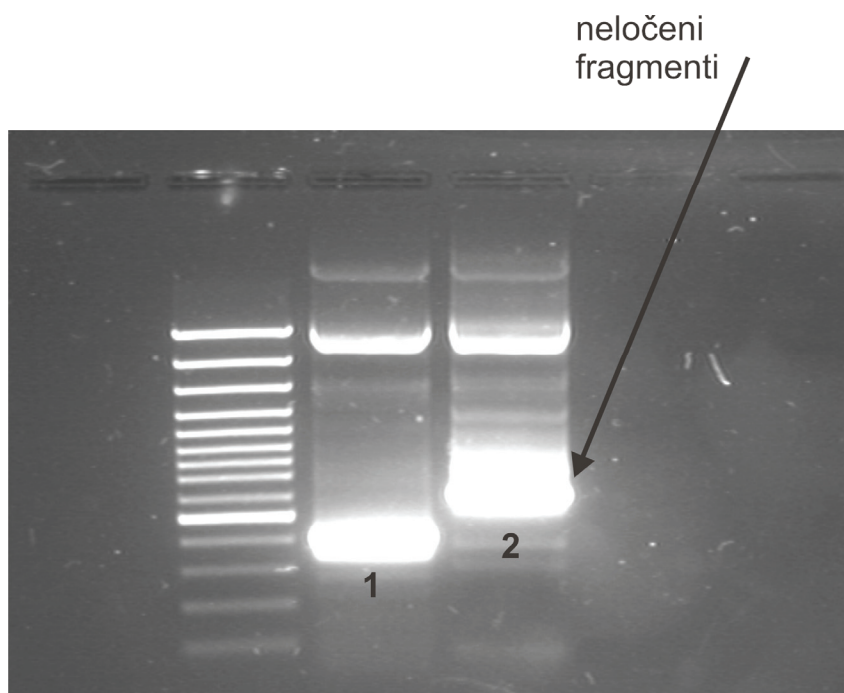
*Slika 15: Agarozna gelska elektroforeza po colony PCR*

Vidne so lise okrog 600 bp, toda sklepali smo, da je prišlo do mutacije, ker vse lise niso bile v isti dolžini. Nanos 5 je označevalec, 10 negativna kontrola, 2 in 9 pa ne izkazujeta pozitivne reakcije. Vse druge vzorce smo poslali na določitev nukleotidnega zaporedja.

Samo en konstrukt se je izkazal za uporabnega v nadaljnjem delu. Ta konstrukt je bil v celoti pravilen, genski zapis za vse tri peptide je ustrežal, prav tako notranji restrikcijski mesti, napaka je bila samo na zadnjem, zunanjem restrikcijskem mestu XbaI (*TCTAGA*). Primerjali smo restrikcijska mesta na pGEM z mesti na plazmidu pNZ8148 in smo ugotovili, da je obema skupno restrikcijsko mesto SacI. Mutacijo smo tako lahko popravili z vnovičnim pomnoževanjem iz pGEM, ki je vseboval ta konstrukt, in sicer z začetniki konstrukta in nadaljnjo restrikcijo z NcoI ter XbaI restriktazama ali pa s PCR reakcijo z univerzalnimi začetniki pGEM in nadaljnjo restrikcijo z NcoI ter SacI restriktazama. NcoI mesto ustreza prvemu restrikcijskemu mestu na konstrukt, ima ga tudi plazmid pNZ8148. SacI restrikcijsko mesto pa ustreza restrikcijskemu mestu na pGEM (od XbaI mesta ga loči 49 baz) ter na plazmidu pNZ8148. V nadaljnje je tako omogočena ligacija konstrukta v plazmid pNZ8148 preko NcoI ter XbaI ali pa preko NcoI ter SacI restrikcijskih mest.

### 3 Ligacija konstrukta v pNZ8148 in transformacija plazmida z vstavljenim konstruktom v *L. lactis* NZ9000

Konstrukt smo pridobili iz pGEM, ki je vseboval konstrukt, na tri načine: s PCR reakcijo z začetniki konstrukta (slika 16,1) oz. z univerzalnimi začetniki pGEM (slika 16, 2) ter sledečo restrikcijo (slika 17) ali pa z direktno restrikcijo (slika 18). Prednost pomnoževanja s PCR reakcijo pred direktno restrikcijo je v večji količini produkta (v našem primeru konstrukta). Za oba načina pomnoževanja pa smo se odločili zato, ker univerzalna začetnika pGEM pomnožita tudi del vektorja pGEM na obeh koncih in s tem omogočita tudi vizualno spremljanje restrikcije, saj se oba dela pGEM pri restrikciji tudi izrežeta. Pri pomnoževanju z začetniki konstrukta takšno vizualno spremljanje v primeru težav ni mogoče, saj restriktaze odrežejo le tistih par baz na obeh koncih konstrukta.



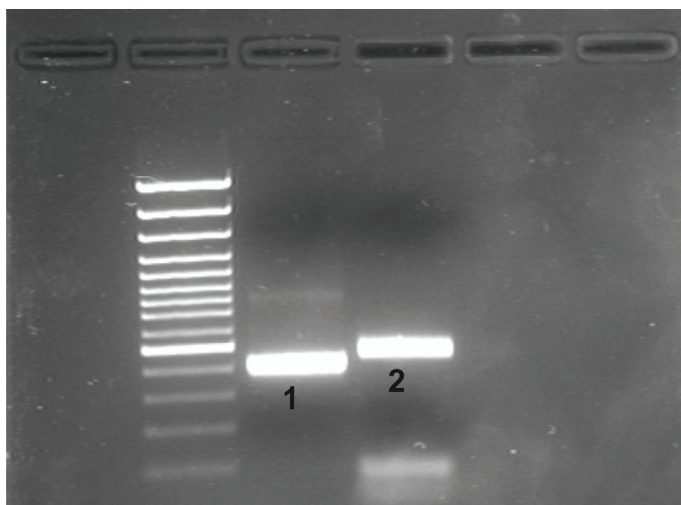
Slika 16: Agarozna gelska elektroforeza po pomnoževanju konstrukta z začetniki konstrukta (1) ter z univerzalnimi začetniki (2)

Pri drugem nanosu smo dobili liso okrog 418 bp, kar ustreza konstruktUsp-45 + modelni peptid + AcmA. Vprašljiva pa je postala metoda, pri kateri smo konstrukt pomnoževali z začetniki pGEM, saj je pri PCR reakciji nastalo več produktov. Tudi pri ponovitvi PCR reakcije je bil enak rezultat. Pri nadaljnji elektroforezi se je lisa ločila v dva produkta.

Izrezali smo fragment pri 600 bp, ki je ustrezal pričakovani velikosti in ga uporabili za nadaljnjo delo.

Prvo restrikcijo (slika 17, 1) smo izvedli z NcoI ter XbaI restriktazama. Konstrukt je ostal na istem mestu v primerjavi s prejšnjo elektroforezo, saj smo izrezali le par baz. Tako izrezan konstrukt je bil pripravljen za ligacijo v pNZ8148, pri katerem smo predhodno uporabili isti restriktazi.

Drugo restrikcijo (slika 17, 2) smo izvedli z NcoI ter SacI restriktazama. Fragment je bil velik okrog 500 bp (slika 16, 2), predvidevana velikost fragmenta pa je 463 bp (pri tem izračunu je upoštevan konstrukt ter število baznih parov od mesta XbaI do SacI). Glede na dobljeno velikost smo sklepali, da je prišlo do nepopolne restrikcije, pri čemer je bil vprašljiv encim SacI (brez delovanja tega encima bi fragment po PCR pomnožitvi ter nepopolni restrikciji glede na izračun zavzel vrednost 492 bp). Pri ponavljanju restrikcije smo ponovno dobili isti rezultat.



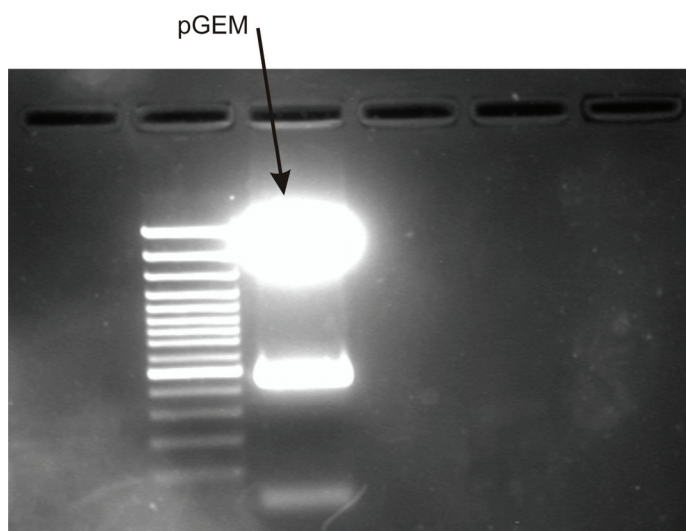
*Slika 17: Agarozna gelska elektroforeza po restrikciji konstrukta*

Vzporedno smo preverjali delovanje restriksijskega encima SacI na plazmidu pNZ8148, ki ga je encim uspešno razrezal, kar kaže na pravilno delovanje encima. Tako smo sklepali, da je v primeru 2 (slika 17) prisotna mešanica popolno rezanega konstrukta z nepopolno rezanim konstruktom ter ga uporabili za ligacijo v plazmid pNZ8148, ki smo ga predhodno rezali z obema restriktazama, NcoI in SacI.

V primeru direktne restrikcije brez predhodne PCR reakcije smo konstrukt direktno izrezali iz pGEM (slika 18) z restriktazama NcoI in SacI. Fragment je zavzel pričakovano vrednost (463 bp), zato smo predvidevali, da fragment po direktni restrikciji iz pGEM predstavlja najboljšega kandidata za ligacijo v pNZ8148 ter nadaljnjo transformacijo v *L. lactis*.

Za transformacijo v *L. lactis* smo izbrali elektroporacijo. Te bakterije vsebujejo celično steno, zato gena v bakterijo samo s toplotnim šokom (kot v primeru uporabe *E. coli*) ne moremo vnesti. Potrebujemo bolj grobo metodo. Z elektroporacijo sprožimo depolarizacijo celične membrane, pri čemer se tvorijo pore, preko katerih lahko vnesemo DNA segment.

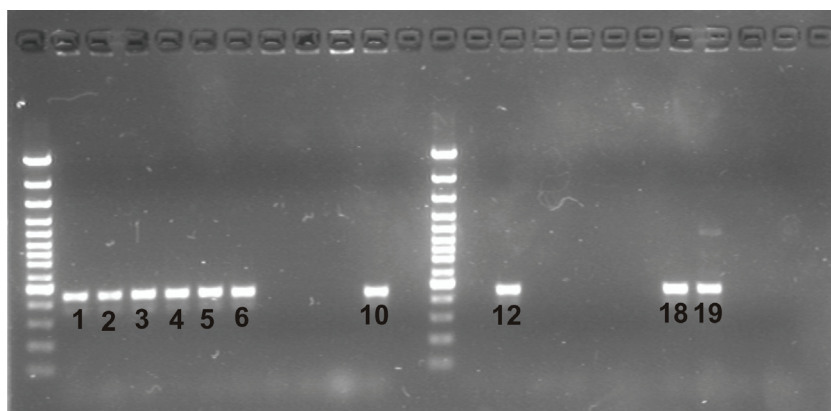
Transformacija je bila uspešna le v primeru uporabe konstrukta, dobljenega z direktno restrikcijo. Vsak dodaten vmesni postopek (npr. obarjanje) skupaj z neuspelo transformacijo kaže na to, da so izgube v tem primeru verjetno prevelike. Obarjanje namreč zmanjša koncentracijo plazmidov. Uspeh transformacije pa je odvisen od stopnje kompetitivnosti bakterij ter tudi od koncentracije plazmidne DNA. V primeru direktne restrikcije smo postopek obarjanja ligata (pNZ8148::konstrukt) spustili.



Slika 18: Agarozna gelska elektroforeza po direktni restrikciji

Po transformaciji pNZ8148 s konstruktom v *L. lactis* smo testirali bakterijske kolonije, ki so sprejele plazmid s konstruktom (slika 19). Pozitivne kolonije smo poslali na določitev

nukleotidnega zaporedja. Poslali smo vzorce 1, 2, 3, 6, 10, 19, ker so imeli večjo koncentracijo.



*Slika 19: Agarozna gelska elektroforeza po colony PCR, pozitivne kolonije vsebujejo plazmide pNZ8148 z vstavljenim konstruktom*

Vsi plazmidi pNZ8148 z vstavljenim konstruktom razen vzorca 10 so imeli pravi genski zapis za konstrukt. Plazmid s konstruktom (izbrali smo vzorec 3, ker je imel največjo koncentracijo) smo tako transformirali v *L. lactis* NZ9000 in ga uporabili v nadaljnjih poskusih izražanja.

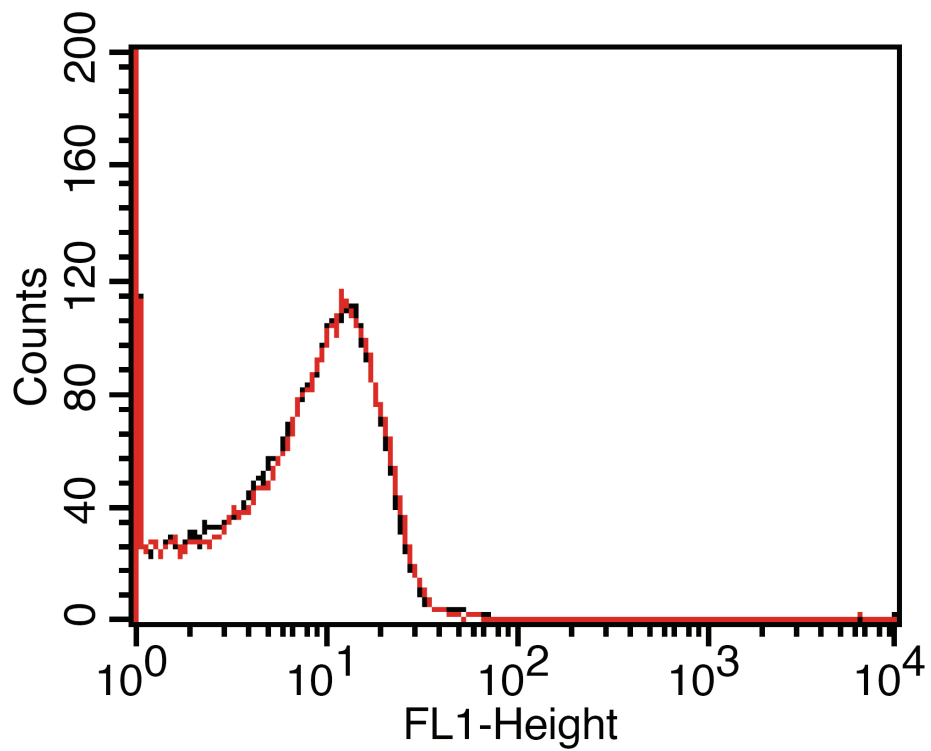
## 4 Detekcija izražanja na površini

V *L. lactis* NZ9000 smo vnesli plazmid pNZ8148 s konstruktom in sam plazmid pNZ8148 (kontrola). Izražanje smo v dveh vzporednih poskusih sprožili z dodatkom nizina. Funkcionalen protein bi se moral izločiti v gojišče, vezati na površino ter v končni fazi vezati na streptavidin, težava pa se lahko pojavi prav na vsaki izmed teh treh stopenj. Uspešnost vezave na streptavidin smo najprej preverjali pri intaktnih bakterijskih celicah z metodo FACS. V primeru pozitivnega rezultata bi to pomenilo, da vsi trije procesi delujejo.

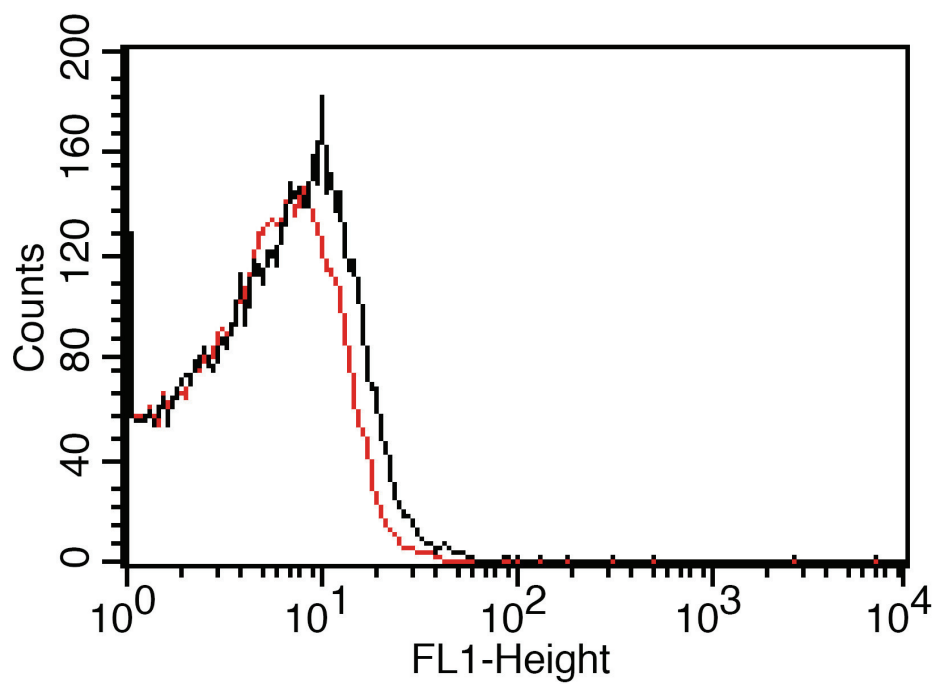
### 4.1 FACS

Ta metoda ni pokazala nobenih odstopanj med kulturo celic, ki je sprejela plazmid s konstruktom glede na tisto, ki je sprejela samo plazmid (graf 1). Za nadaljnje poskuse detekcije smo pripravili lizat bakterijske kulture, ki smo ga inkubirali z intaktnimi bakterijami. Izražen protein, ki mu težavo predstavlja izločanje v gojišče, bi se moral nahajati v lizatu, pripeti na površino bakterij ter vezati s streptavidinom. Lizat bakterijske kulture, ki je sprejela plazmid s konstruktom, je pokazal rahla pozitivna odstopanja (to kaže na dve različni populaciji) napram lizatu kulture, ki je sprejela samo plazmid (graf 2). Ker to odstopanje ni bilo tako veliko, da bi padlo v območje signifikantnosti FACS metode, smo lizate preverjali še po dveh metodah, metodi merjenja fluorescence na mikrotitrski ploščici ter prenosu Western.

Pri meritvah s FACS vsak posamezni delec ali celica predstavlja svojo točko na grafu velikosti in granuliranosti. Posamezno populacijo nato lahko analiziramo ter jo statistično ovrednotimo (2). V našem primeru x os predstavlja vrednost fluorescence, y os pa delež populacije, torej graf prikazuje delež populacije z določeno vrednostjo fluorescence. O signifikantni razliki lahko govorimo, kadar se grafa med seboj ne prekrivata.



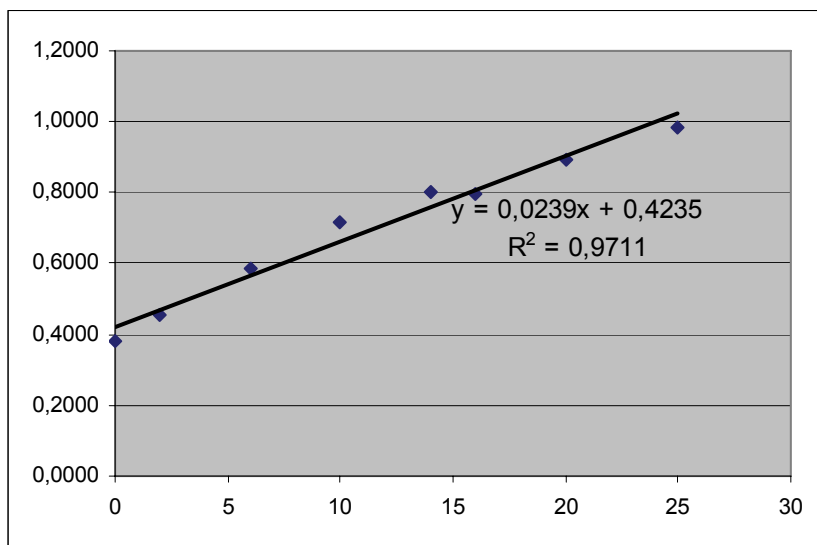
Graf 1: FACS bakterijske kulture *L. lactis* (rdeče kontrola, črno testirana kultura)



Graf 2: FACS lizatov bakterijske kulture *L. lactis* (rdeče kontrola, črno testirani lizat)

## 4.2 Mikrotitrna ploščica

Najprej smo na mikrotitrski ploščici za merjenje absorbance izmerili koncentracije izraženih proteinov v lizatu z Bradfordovo metodo. Koncentracije smo izračunali s pomočjo umeritvene premice (graf 1, tabela XXI) in izračunali volumne nanosa lizata na mikrotitrsko ploščico za merjenje fluorescence (tabela XXI), tako da so vsebovali enako količino proteinov.



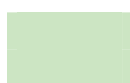
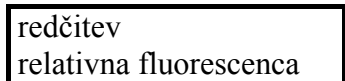
Graf 3: Odvisnost absorbance od koncentracije proteina (koncentracija v µg/ml)

Tabela XXI: Izračun koncentracije proteinov iz umeritvene premice

| vzorec             | A      | c(µg/ml) | c*25     | V (µl) - MTP | V (µl) - PAGE |
|--------------------|--------|----------|----------|--------------|---------------|
| <b>1.izražanje</b> |        |          |          |              |               |
| P 1/25             | 0,6449 | 9,263598 | 231,59   | 100          | 10            |
| K 1/25             | 0,5693 | 6,100418 | 152,5105 | 152          | 15            |
| P 1/100            | 0,4573 | 1,414226 |          |              |               |
| K 1/100            | 0,4348 | 0,472803 |          |              |               |
| <b>2.izražanje</b> |        |          |          |              |               |
| P 1/25             | 0,7429 | 13,36402 | 334,1004 | 72,5         | 7,3           |
| K 1/25             | 0,6557 | 9,715481 | 242,887  | 100          | 10            |
| P 1/100            | 0,4927 | 2,895397 |          |              |               |
| K 1/100            | 0,4506 | 1,133891 |          |              |               |

Na mikrotitrskih ploščicah za merjenje fluorescence (slika 20) smo preverjali vezavo streptavidina v različnih koncentracijah na fuzijski protein v lizatu. Metoda glede na kontrolo ni odkrila razlik pri višjih koncentracijah dodanega streptavidina (ponekod so vrednosti kontrole celo višje). Ugotovili smo visoko nespecifično vezavo na mestih od A3 do D3, kjer smo pore zapolnili samo z BSA. Pri najvišji redčitvi (1/200) pa smo zaznali povečanje v vrednostih pri merjenju relativne fluorescence glede na kontrolo (okrepljeni tisk na sliki 20, E2-H2). To kaže na sposobnost vezave, a zaradi suma na nespecifičnost, takšnih rezultatov žal ne moremo opredeliti kot zanesljive. Možne vzroke takšnih rezultatov lahko iščemo tudi v preslabem spiranju mikrotitrške ploščice ter tudi v previsoki

|   | 1              | 2                     | 3              |
|---|----------------|-----------------------|----------------|
| A | 1/25<br>1,146  | 1/50<br>1,168         | 1/25<br>1,150  |
| B | 1/25<br>1,148  | 1/50<br>1,118         | 1/50<br>1,000  |
| C | 1/25<br>1,163  | 1/50<br>1,145         | 1/100<br>1,046 |
| D | 1/25<br>1,155  | 1/50<br>1,141         | 1/200<br>1,064 |
| E | 1/100<br>1,085 | 1/200<br><b>1,097</b> |                |
| F | 1/100<br>1,087 | 1/200<br><b>1,147</b> |                |
| G | 1/100<br>1,122 | 1/200<br><b>1,019</b> |                |
| H | 1/100<br>1,062 | 1/200<br><b>1,176</b> |                |

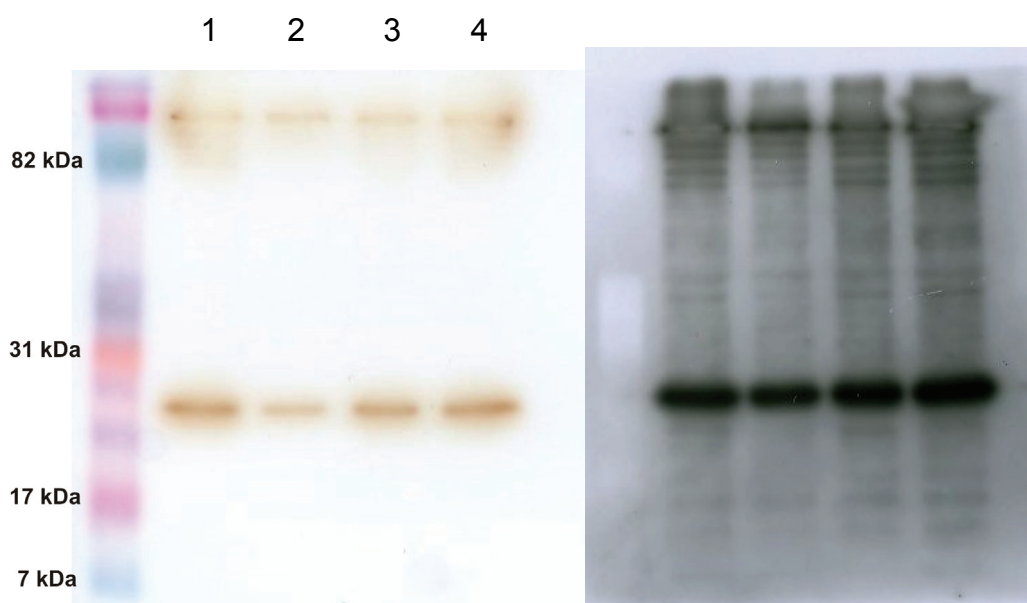
|                                                                                     |                                 |                                                                                     |                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
|  | 1.izražanje plazmid             |  | 1.izražanje plazmid s konstruktom |
|  | 2.izražanje plazmid             |  | 2.izražanje plazmid s konstruktom |
|  | redčitev relativna fluorescenca |  | kontrola z BSA                    |

*Slika 20: Prikaz rezultatov na mikrotitrski ploščici*

koncentraciji streptavidina. Metodo bi bilo potrebno večkrat ponoviti in optimizirati, morda z nižjimi koncentracijami streptavidina. Nespecifičnost bi lahko dokončno potrdili z metodo prenosa Western, zato smo uporabili še to metodo detekcije.

### 4.3 Prenos Western

Z NaDS PAGE smo najprej ločili proteine v lizatu ter jih nato s prenosom Western prenesli na membrano (slika 21, vzorci 1-4). Vzorce smo nanegli v naslednjem zaporedju: plazmid s konstruktom/1. izražanje (1), plazmid/1. izražanje (2), plazmid s konstruktom/2. izražanje (3), plazmid/2. izražanje (4). Opazili smo močno nespecifično vezavo na protein pri približno 20 kDa (izražen protein zavzema velikost okoli 13 kDa) in več drugih nespecifičnih vezav (glej sliko 21, razvit film), s čimer smo potrdili vprašljivost izbranega sistema za detekcijo. To prisotnost konstrukta ne izključuje, saj je vezava streptavidina na konstrukt lahko šibkejša in jo vezava na protein pri 20 kDa popolnoma zasenči.



*Slika 21: Slika membrane(levo) in razvit film (desno) po prenosu Western*

Zaradi nespecifičnih vezav se izbrani detekcijski sistem ni izkazal za ustreznega. Rezultati, ki smo jih dobili pri prenosu Western po vsej verjetnosti spremenijo rezultate prvih dveh metod v lažno pozitivne. V nadaljnjem razvoju konstrukta bi se morali posvetiti večji specifičnosti pri metodah detekcije.

## V Sklep

Na podlagi dela lahko povzamemo naslednje:

- S PCR reakcijo smo uspešno pomnožili fragmente konstrukta: Usp-45 na osnovi plazmidne matrice, MP z delno komplementarnima začetnikoma in AcmA iz genomske DNA.
- Fragmente smo uspešno sestavili v konstrukt, ki je imel pravilno nukleotidno zaporedje. Konstrukt smo vstavili v plazmid za izražanje v *L. lactis*, pNZ8148.
- Metode detekcije so po indukciji izražanja fuzijskega proteina z nizinom pokazale negativen rezultat v primeru testiranja intaktne bakterijske kulture. Pri testiranju lizata bakterijske kulture glede na kontrolo smo z metodo FACS zaznali rahla odstopanja. Sklepali smo, da se protein verjetno izrazi, a mu problem predstavlja dejavnik izločanja v gojišče.
- Pri bakterijskem lizatu smo odkrili nespecifično vezavo streptavidina na proteine v lizatu, kar je bilo potrjeno z metodo merjenja fluorescence na mikrotitrski ploščici ter predvsem z metodo prenosa Western.

V nadaljnjem razvoju uporabe uspešno načrtovanega in pripravljenega konstrukta za heterologno izražanje proteinov na površini laktokokov bi lahko na mesto izbranega modelnega peptida vstavili genski zapis za nek drug protein, ki bi ga lahko bolj specifično detektirali ali pa izbrali drugo vrsto detekcije, na primer specifična protitelesa proti AcmA ali pa modelnemu peptidu. S tako povečano specifičnostjo bi lahko tudi potrdili, če se je protein izrazil na površini, saj ga z izbranim detekcijskim sistemom sploh nismo mogli zaznati.

## VI Reference

1. Berlec A, Štrukelj B: Gensko spremenjene mlečno kislinke bakterije kot dostavni sistemi za biološka zdravila. Farmacevtski vestnik, »sprejeto v objavo, 2008«.
2. Borut Štrukelj, Janko Kos: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, 2007.
3. Mierau I, Kleerebezem M: 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 68(6):705-17.
4. Le Loir Y, Azevedo V, Oliveira SC, Freitas DA, Miyoshi A, Bermúdez-Humarán LG, Nouaille S, Ribeiro LA, Leclercq S, Gabriel JE, Guimaraes VD, Oliveira MN, Charlier C, Gautier M, Langella P: Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. Microb Cell Fact 2005; 4(1):2.
5. Lee SY, Choi JH, Xu Z: Microbial cell-surface display. Trends Biotechnol 2003; 21(1):45-52.
6. Samuelson P, Gunneriusson E, Nygren PA, Ståhl S: Display of proteins on bacteria. J Biotechnol 2002; 96(2):129-54.
7. <http://www.patentstorm.us/patents/4775622-description.html> (april 2008)
8. Leenhouts K, Buist G, Kok J: Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 1999; 76(1-4):367-76.
9. Ramasamy R, Yasawardena S, Zomer A, Venema G, Kok J, Leenhouts K: Immunogenicity of a malaria parasite antigen displayed by *Lactococcus lactis* in oral immunizations. Vaccine 2006; 24(18):3900-8.

10. Raha AR, Varma NR, Yusoff K, Ross E, Foo HL: Cell surface display system for *Lactococcus lactis*: a novel development for oral vaccine. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 68(1):75-81.
11. Piard JC, Hautefort I, Fischetti VA, Ehrlich SD, Fons M, Gruss A: Cell wall anchoring of the Streptococcus pyogenes M6 protein in various lactic acid bacteria. J Bacteriol 1997; 179(9):3068-72.
12. <http://www.expasy.org/uniprot/A2RHZ5> (april 2008)
13. Lamla T, Erdmann VA: The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins. Protein Expr Purif 2004; 33(1):39-47.
14. [http://www.genycell.com/images/productos/protocolos/400050\\_.pdf](http://www.genycell.com/images/productos/protocolos/400050_.pdf) (april 2008)
15. <http://www.promega.com/tbs/tb308/tb308.pdf> (april 2008)
16. <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf> (april 2008)
17. Berlec A: Izražanje gena za brazein v "In vitro" pogojih z uporabo naprave RTS 500. Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2003.
18. <http://www.pcrstation.com/> (april 2008)
19. <http://eu.idtdna.com/home/welcome.aspx> (april 2008)
20. Zgrablić M: Izbor peptidnega liganda za streptavidin iz peptidnopredstavitvene knjižnice na bakteriofagu T7. Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008.

21. Holo H, Nes IF: Transformation of *Lactococcus* by electroporation. In: Nickoloff JA (ed) Electroporation protocols for microorganisms. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1995.
22. Berlec A, Jevnikar Z, Majhenic AC, Rogelj I, Strukelj B: Expression of the sweet-tasting plant protein brazzein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*: a path toward sweet lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 73(1):158-65.
23. <http://www.invitrogen.com> (april 2008)
24. <http://www.fermentas.com/> (april 2008)
25. <http://www.neb.com> (april 2008)