

Kloniranje i ekspresija gena za SGNH-hidrolazu iz bakterije *Streptomyces coelicolor* u heterolognom sustavu

Marić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:936343>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marija Marić

**Kloniranje i ekspresija gena za SGNH-hidrolazu iz
bakterije *Streptomyces coelicolor* u heterolognom
sustavu**

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Dušice Vujaklija, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Zahvala

Veliko hvala mojoj mentorici dr. sc. Dušici Vujaklija na njezinom vodstvu, na svim pruženim prilikama i velikom povjerenju, na svim njezinim stručnim savjetima, na svim diskusijama i trudu da odgovori na moja pitanja, na svim riječima ohrabrenja.

Dipl. ing. Ani Bielen zahvaljujem na svakom eksperimentu kojeg me naučila, na njezinoj velikoj pomoći i bezbrojnim savjetima i njezinoj velikoj podršci.

Dipl. ing. Tini Šimunov zahvaljujem što me svaki put sa zanimanjem saslušala i ponudila savjet, na svakoj njezinoj pomoći i potpori.

Hvala dr. sc. Jasenki Pigac na njezinim dragocjenim i uvijek dobrodošlim savjetima.

Svim članovima Laboratorija za molekularnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju na Institutu "Ruđer Bošković" zahvaljujem na njihovoj susretljivosti i pomoći.

Hvala mojoj obitelji koja je uvijek uz mene, što sam uvijek imala njihovu bezgraničnu ljubav i podršku.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Kloniranje i ekspresija gena za SGNH-hidrolazu iz bakterije *Streptomyces coelicolor* u heterolognom sustavu

Marija Marić

Laboratorij za molekularnu genetiku, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Bijenička 54, 10000 Zagreb

Bakterijske SGNH-hidrolaze su značajna grupa enzima koja još uvijek nije dobro istražena, ni strukturalno ni biokemijski. Izvanstanična lipaza iz obitelji SGNH-hidrolaza iz bakterije *Streptomyces coelicolor* soja A3(2) (Q93J06, SCO7513) je djelomično biokemijski okarakterizirana. Cilj ovog istraživanja bio je izrada konstrukta gena s dodatkom kodona za 6 histidina na 3' kraju gena te kloniranje i ekspresija gena u bakteriji *Streptomyces lividans* soja TK23 sa svrhom uspostavljanja učinkovite i brze metode za pročišćavanje proteina. Nakon ekspresije rekombinantnog gena u heterolognom sustavu protein je pročišćen taloženjem s amonijevim sulfatom i afinitetnom kromatografijom na nosaču s imobiliziranim metalom. Prisustvo pročišćenog proteina je dokazano Western analizom, a uočeno je da tijekom pročišćavanja dolazi do gubitka specifične aktivnosti. Iako je prema literaturi ovaj protein označen kao izvanstanični, analiza softverom SignalP 3.0 za predviđanje signalnog slijeda proteina nije prepoznala signalni slijed u SGNH-hidrolazi, što upućuje na mogućnost zadržavanja proteina unutar stanica.

(49 stranica, 18 slika, 2 tablice, 22 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Streptomyces coelicolor*, GDSL/SGNH obitelj, lipaza

Voditelj: dr. sc. Dušica Vujaklija, izv. prof.

Suvoditelj: dr. sc. Ivana Ivančić-Baće, doc.

Ocjenitelji: dr. sc. Dijana Škorić, izv. prof.

dr. sc. Dubravka Hranilović, doc.

dr. sc. Nataša Bauer, doc. (zamjena)

Rad prihvaćen: 03.lipnja 2009.

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

Cloning and expression of SGNH-hydrolase of *Streptomyces coelicolor* in heterologous host

Marija Marić

Laboratory of Molecular Genetics, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute,
Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia

Bacterial SGNH-hydrolases are an important group of enzymes which are still not well characterised structurally or biochemically. Extracellular SGNH-hydrolase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Q93J06, SCO7513) was earlier partially biochemically described. Aim of this investigation was to construct a gene with an additional codons for 6 histidines on 3' end of the gene. Cloning and expression of the gene *Streptomyces lividans* TK23 was performed with a purpose of establishing an efficient and quick protein purification method. After the expression of the recombinant gene in heterologous system protein was purified applying ammonium sulfate precipitation and immobilized-metal affinity chromatography. Presence of the purified protein was confirmed with Western analysis. The protein lost specific activity during the purification. Although according to the literature this protein was annotated as extracellular, software SignalP 3.0 failed to recognize a signal sequence in SGNH-hydrolase which implicates a possibility that the protein retains inside the cell.

(49 pages, 18 figures, 2 tables, 22 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: *Streptomyces coelicolor*, GDSL/SGNH family, Lipase

Supervisor: dr. Dušica Vujaklija, Assoc. Prof.

Cosupervisor: dr. Ivana Ivančić-Baće, Asst. Prof.

Reviewers: dr. Dijana Škorić, Assoc. Prof.

dr. Dubravka Hranilović, Asst. Prof.

dr. Nataša Bauer, Asst. Prof. (replacement)

Thesis accepted: June 3rd, 2009

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Streptomiceti	1
1.2	Genom streptomiceta	2
1.3	Bakterijski lipolitički enzimi	3
1.4	Svojstva bakterijskih lipaza i njihova primjena u biotehnologiji	3
1.5	GDS(L)/SGNH-lipaza iz bakterije <i>Streptomyces rimosus</i> i homologan protein iz bakterije <i>Streptomyces coelicolor</i>	4
1.6	Cilj istraživanja	6
2	Materijali i metode	7
2.1	Materijali	7
2.1.1	Osnovne kemikalije	7
2.1.2	Kompleti	8
2.1.3	Enzimi	8
2.1.4	Antibiotici	9
2.1.5	Protutijela	9
2.1.6	Biljezi i boje	9
2.1.7	Otopine i puferi	10
2.1.8	Oligonukleotidne početnice	10
2.1.9	Bakterijski sojevi	11
2.1.10	Plazmidni vektori	11
2.1.11	Hranjive podloge	13
2.2	Metode	14
2.2.1	Lančana reakcija polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction – PCR)	14
2.2.2	Elektroforeza DNA	15
2.2.3	Pročišćavanje DNA	15
2.2.4	Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNA	16

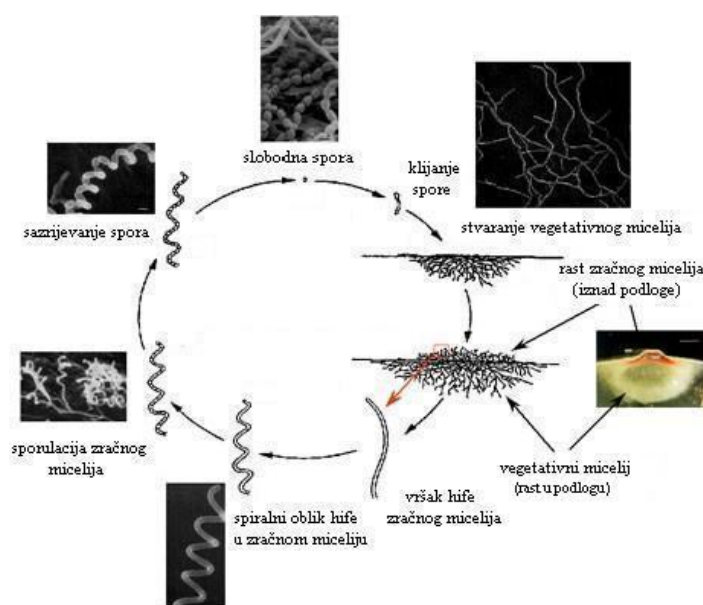
2.2.5	Ugušćivanje DNA.....	16
2.2.6	Enzimska razgradnja DNA.....	16
2.2.7	Sustav za direktno kloniranje PCR produkta (TA kloniranje).....	17
2.2.8	Ligacija fragmenata DNA.....	17
2.2.9	Priprema kompetentnih stanica bakterije <i>E. coli</i> za elektroporaciju.....	18
2.2.10	Priprema protoplasta vrste <i>S. lividans</i> (soj TK23).....	18
2.2.11	Transformacija bakterijskih stanica <i>E. coli</i> elektroporacijom.....	19
2.2.12	Transformacija protoplasta vrste <i>S. lividans</i> (soj TK23).....	19
2.2.13	Probiranje bakterijskih kolonija <i>E. coli</i> α -komplementacijom (plavo – bijela selekcija).....	19
2.2.14	Izolacija plazmidne DNA iz bakterije <i>E. coli</i>	20
2.2.15	Izolacija plazmidne DNA iz bakterije <i>S. lividans</i>	20
2.2.16	Određivanje primarne strukture DNA.....	21
2.2.17	Bioinformatička analiza nukleotidnih slijedova DNA molekula i transliranih slijedova aminokiselina.....	21
2.2.18	Uzgoj transformanata bakterije <i>S. lividans</i> na krutoj hranjivoj podlozi CRM.....	21
2.2.19	Uzgoj transformanata bakterije <i>S. lividans</i> u tekućoj hranjivoj podlozi CRM.....	22
2.2.20	Čuvanje bakterijskih kultura streptomiceta.....	22
2.2.21	Optimizacija uzgoja transformanata bakterije <i>S. lividans</i>	22
2.2.22	Spektrofotometrijsko mjerenje lipolitičke aktivnosti prema 4-nitrofenil palmitatu.....	23
2.2.23	Uzgoj transformanata bakterije <i>S. lividans</i> za izolaciju proteina.....	23
2.2.24	Izolacija topljivih izvanstaničnih proteina iz kulture streptomiceta.....	24
2.2.25	Dijaliza proteina.....	24
2.2.26	Metoda detekcije proteina po Bradfordu.....	25
2.2.27	Afinitetna kromatografija na nosaču s imobiliziranim metalom.....	25
2.2.28	Jednodimenzionalna diskontinuirana elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE).....	26
2.2.29	Detekcija proteina u poliakrilamidnom gelu.....	26
2.2.30	Western analiza.....	27

2.2.31	Detekcija kemoluminiscentnog signala na membrani	27
3	Rezultati	29
3.1	Uspoređivanje aminokiselinskog slijeda SGNH-hidrolaze s aminokiselinskim slijedovima iz baze	29
3.2	Umnožavanje gena za SGNH-hidrolazu iz bakterije <i>S. coelicolor</i> s <i>Pfu</i> DNA polimerazom....	30
3.3	Direktno kloniranje PCR produkta (TA kloniranje) s genom <i>sc2</i>	31
3.4	Određivanje primarne strukture plazmida s genom <i>sc2</i>	32
3.5	Enzimski razgradnja plazmida iz bakterijskih stanica <i>E. coli</i> transformiranih ligacijskom smjesom vektora i fragmenta s genom <i>sc2</i>	33
3.6	Prisutnost gena <i>sc2</i> u kolonijama <i>E. coli</i> soja XL-1 Blue.....	35
3.7	Određivanje primarne strukture rekombinantnog plazmida.....	36
3.8	<i>In vivo</i> sinteza nemetiliranog fragmenta DNA s genom <i>sc2</i>	38
3.9	Ligacija nemetiliranog fragmenta DNA s genom <i>sc2</i> i vektora pANT849	40
3.10	Optimizacija uzgoja transformiranih bakterija <i>S. lividans</i> soja TK23	41
3.11	Pročišćavanje proteina Sc2 iz supernatanta kultura transformiranih bakterijskih stanica <i>S. lividans</i> soja TK23	41
3.12	Western analiza.....	42
4	Rasprava.....	29
5	Zaključak	46
6	Literatura.....	47

1 Uvod

1.1 Streptomiceti

Streptomiceti su filamentozne Gram-pozitivne bakterije tla te za prokariote izuzetno složenog životnog ciklusa i velikog genoma koji upućuje na mogućnost prilagodbe različitim uvjetima života. Prema današnjoj klasifikaciji bakterije roda *Streptomyces* pripadaju redu *Actinomycetales* te porodici *Streptomycetaceae*. Naziv roda *Streptomyces* ukazuje na morfološku sličnost ovih bakterija s gljivama jer streptomicetnu koloniju tvori razgranata nitasta struktura koja se naziva micelij. U životnom ciklusu streptomiceta, koji je prikazan na Slici 1-1, izmjenjuju se različiti morfološki i funkcionalni oblici streptomiceta (Kieser i suradnici, 2000). Spora je mirujući oblik s jednom kopijom kromosoma u kojem streptomiceti mogu preživjeti dulji period vremena u nepovoljnim uvjetima. Nastupanjem povoljnih uvjeta spora može proklijati te se iz nje razvija vegetativni ili supstratni micelij koji formira koloniju. Zbog manjka hranjivih tvari u podlozi dolazi do određenih morfoloških i fizioloških promjena u koloniji streptomiceta te se počinje stvarati zračni micelij koji koristi vegetativni micelij kao izvor hranjivih tvari. Zračni micelij isprva ima neseptirane hife s mnogo kopija kromosoma. Hife se počinju uvijati te nakon spiralizacije dolazi do odjeljivanja pojedinačnih kromosoma prilikom septiranja vršnih dijelova hifa. Septirani odjeljci hifa sporuliraju te se spore mogu raspršiti. U povoljnim uvjetima spore opet mogu započeti životni ciklus.



Slika 1-1. Životni ciklus streptomiceta (preuzeto sa: http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto-E.html).

Streptomiceti su značajni zbog svojeg sekundarnog metabolizma koji obuhvaća, uz sintezu ostalih klasa sekundarnih metabolita poput pigmenata, i sintezu mnogih farmakološki aktivnih supstanci (Schrempf, 2006). Takve supstance primjenjive su kao antibiotici, fungicidi, regulatori imunološkog odgovora, citostatici i inhibitori mnogih eukariotskih staničnih procesa. U kulturama koje rastu na agaru uočeno je da sinteza antibiotika započinje istovremeno s formiranjem zračnih hifa (Kieser i suradnici, 2000). Antibiotici streptomiceta čine približno 53% svih danas poznatih antibiotika koji se primjenjuju u medicini, veterini i agronomiji (Kieser i suradnici, 2000). Tijekom svog rasta streptomiceti aktiviraju i različite gene koji kodiraju za hidrolitičke enzime. Te enzime streptomiceti također otpuštaju u tlo čime ostvaruju svoju saprofitnu ulogu u hranidbenom lancu i doprinose kruženju elemenata u prirodi (Kieser i suradnici, 2000).

1.2 Genom streptomiceta

Modelni organizam streptomiceta je bakterija *Streptomyces coelicolor*. Ova je bakterija najbolje genetički istražena od svih streptomiceta zbog čega je genom ove vrste prvi među streptomicetnim genomima odabran za određivanje primarne strukture DNA (Bentley i suradnici, 2002). Genom bakterije *S. coelicolor* sastoji se od jednog linearnog kromosoma veličine 8,67 Mb s visokim udjelom gvanina i citozina u sastavu baza (72,1%), što je karakteristika cijelog reda. U središnjem dijelu kromosoma nalaze se esencijalni geni, dok su prema rubovima kromosoma smješteni neesencijalni geni, poput onih koji kodiraju za sekundarne metabolite. Rubovi kromosoma podložni su genetičkoj rekombinaciji i delecijama kao čestim događajima u genomu bakterija roda *Streptomyces*. Prema Bentleyu i suradnicima (2002) bakterija *S. coelicolor* kodira za 7825 gena. Takav veliki broj gena za jednu bakteriju odražava raznovrsnost genetičkog materijala potrebnog za prilagodbu različitim uvjetima života. Visoki udio gena za regulatorne proteine u genomu (12,3%) upućuje na složeni mehanizam regulacije ovog velikog i kompleksnog bakterijskog genoma. Dvadeset genskih klastera pripisuje se poznatim ili predviđenim genima koji kodiraju za sekundarne metabolite (Bentley i suradnici, 2002).

1.3 Bakterijski lipolitički enzimi

Prema klasifikaciji Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) enzimi su svrstani u 6 osnovnih klasa. Hidrolitički enzimi, koji pripadaju 3. klasi enzima (oznaka EC 3), kataliziraju hidrolitičko cijepanje različitih veza organskih spojeva. Klasu EC 3.1 čine hidrolitički enzimi koji cijepaju estersku vezu. Cijepanje esterske veze u triacilglicerolima svojstvo je triacilglicerol lipaza (EC 3.1.1.3). Bakterije proizvode različite klase lipolitičkih enzima koji su klasificirani u 8 obitelji prema aminokiselinskom sastavu i svojstvima (Arpigny i Jaeger, 1999). Prema toj klasifikaciji drugoj obitelji pripadaju enzimi iz GDS(L) obitelji. GDS(L) obitelj serinskih esteraza/lipaza karakteristična je po konzerviranom motivu Gly-Asp-Ser-(Leu) [GDS(L)] s aktivnim serinskim mjestom, vrlo različitim od motiva G-X-S-X-G pronađenog u brojnim lipazama (Upton i Buckley, 1995). Za ovu porodicu je također značajno i da se aktivno mjesto nalazi mnogo bliže N-kraju polipeptidnog lanca nego što je to slučaj kod ostalih lipolitičkih enzima gdje se aktivno mjesto nalazi u sredini polipeptidnog lanca (Brenner, 1988). Određene studije su pokazale fleksibilnost aktivnog serinskog mjesta u trodimenzionalnoj strukturi enzima iz GDS(L) obitelji koje mijenja konformaciju prilikom vezanja različitih supstrata (Akoh i suradnici, 2004). Uz opisano, ova obitelj ima sačuvana još 4 konzervirana motiva. Zbog prisutnosti 4 konzervirana i katalitički važna aminokiselinska ostatka Ser (S), Gly (G), Asn (N) i His (H) prisutna u konzerviranim motivima I, II, III i V GDS(L) obitelji, enzimi ove skupine svrstavaju se i u obitelj SGNH-hidrolaza (Akoh i suradnici, 2004).

1.4 Svojstva bakterijskih lipaza i njihova primjena u biotehnologiji

Lipaze kataliziraju hidrolizu karboksiesterske veze (kao i njezinu sintezu) u triacilglicerolima pri čemu dolazi do oslobađanja masnih kiselina i glicerola. Prirodni supstrati lipaza su triacilgliceroli s dugim lancima masnih kiselina koji imaju slabu topljivost u vodi, pa se reakcija odvija na dodiru topljivog i netopljivog. Gupta i suradnici (2004) su na temelju detaljnih biokemijskih analiza dotad opisanih bakterijskih lipaza ustvrdili da mnoge od njih posjeduju sljedeća svojstva: aktivnost i stabilnost u širokom temperaturnom i pH rasponu, specifičnost supstrata kojeg koriste, enantioselektivnost, stabilnost u organskim otapalima,

neovisnost o kofaktorima (metalnim ionima). Zbog dobrih biotehnoloških svojstava i brzog uzgoja bakterijskih stanica s visokim prinosima, bakterijske lipaze su pronašle svoju primjenu u biotehnologiji kao značajni biokatalizatori te u prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji u kojima se koriste već dugi niz godina.

Velik biotehnološki potencijal ovih enzima razlog je kontinuirane potrage za novim enzimima sličnih svojstava. Određivanjem primarnih struktura DNA (sekvenciranjem) genoma različitih mikroorganizama otkriveni su brojni novi hidrolitički enzimi. Jedan od trenutno progresivnijih pristupa traženja novih enzima je sekvenciranje genoma zajednice mikroorganizama iz različitih okoliša (metagenomički pristup). Za biotehnološke potrebe razvijeni su i postupci u svrhu poboljšanja svojstava već opisanih enzima. Neka od svojstava lipaza, poput enantioselektivnosti, moguće je poboljšati postupkom usmjerene evolucije (Jaeger i suradnici, 2001).

1.5 GDS(L)/SGNH-lipaza iz bakterije *Streptomyces rimosus* i homologan protein iz bakterije *Streptomyces coelicolor*

Izvanstanična lipaza izolirana je iz kulture bakterije *Streptomyces rimosus* soja R6-554W (Abramić i suradnici, 1999). Autori su pokazali da su za ovaj monomer najbolji supstrati srednje dugački lanci masnih kiselina (C_8 - C_{12}) te da je aktivnost lipaze najviša u temperaturnom rasponu od 50-60°C pri pH 9-10. Lipaza se pokazala vrlo stabilnom u širokom pH rasponu od 4-10, kao i vrlo termostabilnim enzimom, što ovaj enzim čini potencijalno biotehnološki iskoristivim. Određen je aminokiselinski slijed native lipaze iz *S. rimosus* i upotrebom bioinformatičkih metoda (korištenje alata BLAST) su s tim slijedom uspoređeni slijedovi aminokiselina svih dotad poznatih lipaza u bazi (Vujaklija i suradnici, 2002). Prema sačuvanim motivima utvrđeno je da ova lipaza prema klasifikaciji bakterijskih lipolitičkih enzima pripada obitelji II, GDS(L)-lipazama. Najveća homologija dobivena je sa slijedovima aminokiselina dva, tada hipotetička, proteina iz genoma bakterije *S. coelicolor* soja A3(2) (Redenbach i suradnici, 1996). Ovi proteini (pristupni brojevi u bazi UniProtKB/Swiss-Prot: Q9S2A5 i Q93J06) bili su označeni kao moguće izvanstanične hidrolaze, a pokazali su identičnost od 66% odnosno 33% s aminokiselinskim slijedom lipaze iz bakterije *S. rimosus*. Osim ovih mogućih hidrolaza utvrđena je i određena homologija s esterazom iz bakterije

Streptomyces diastatochromogenes (Q59837) (25% identičnosti sa cijelim slijedom i 58% identičnosti prvih 17 aminokiselinskih ostataka zrelog enzima) i esterazom iz plijesni *Aspergillus terreus* (Q9Y7C6) (34% identičnosti) (Vujaklija i suradnici, 2002). Svrnjenje aminokiselinskih slijedova lipaze iz bakterije *S. rimosus* sa slijedovima ostalih navedenih enzima prikazana je na Slici 1-2.

```
Srimo      : MRLSRRAATASALLLTPALALFG----ASA AVSAPRIQATDYVALGDSYSSCVGAGS--- : 53
Scoel-1   : MRRFRLVGFSLVLAAGAALTG----AATAQAAQPAAADGYVALGDSYSSCVGAGS--- : 53
Scoel-2   : MPKPALRRVMTATVAAVGTLALGLTDATAHAAPAQATPTLDYVALGDSYSAGSGVLP--- : 57
Sdias     : MARFRTRLALLGSAAALAAGAVVP-AQLAGAQPAAAAADLQWVALGDSYTACVIRAAGDA : 59
Aterr     : -----ASSADDSSCPAYD---DSSYDADTVYGVNDYVHF GDSYAACMGTGT--- : 43
```

```
Srimo      : YDSSSGSCKRSTKSYPALWA--ASHTGTRFNFTACSGARTGDV----- : 94
Scoel-1   : YISSSGDCKRSTKAHPYLWA--AAHSPSTFDFTACSGARTGDV----- : 94
Scoel-2   : VDPANLLCLRSTANYPHVIA--DTTG-ARLTDVTCGAAQTADFTRA----- : 100
Sdias     : IDYPRDGCERTDRSYPQVIER-DLYGLFDLTVNSCGAATIENVSDTPQYPIGRHMPFFSE : 118
Aterr     : --TTGDSCKRVGSNSYGKLVQEWFDTEFTYTNYACSGDITVGLN----- : 85
```

```
Srimo      : -----LAKQLTPVNSGTDLVSITIGGND-AGFADTMTTCNLQ----- : 130
Scoel-1   : -----LSGQLGPLSSGTGLVSIISIGGND-AGFADTMTTCVLQ----- : 130
Scoel-2   : ----QYPGVAPQLDALGTGTDLVTLTIGGNDNSTFINAITACGTAGVLS-----GG : 147
Sdias     : DPDHPFPVPPQSEAVGPGTDVITVGVGGNT-LGFADILTKQELGGES-----GG : 168
Aterr     : -----KKIDQWLGQDPTGTTMATLTIGGND-VFESDLVSNQVLTMWWSLEQYRQWCLE : 138
```

```
Srimo      : GESACLARIAK-ARAYIQOTLPAQLDQVYDAIDSRAPAAQVVVLGYPRFY--KLGGSQAV : 187
Scoel-1   : SESSCLSRAT-AEAYVDSTLPGKLDGVYSAISDKAPNAHVVVIGYPRFY--KLG-TTCI : 186
Scoel-2   : KGSFCKDRHGTSFDDEIEANTYPALKEALLGVRARAPHARVAALGYPWITPATADPSCFL : 207
Sdias     : EGTPEKALGSGIKARLDKVS-QGYDRMLTVLHERGPKAKILTVGYPTVIPENTADCGYQ : 227
Aterr     : TEEKARNLMQDGTGSDGLGSKLRAAYEKILDRSGSSVYLPVILIYSCRAVLRRAADFTLVVQ : 198
```

```
Srimo      : GLS-----EKS--RAAIN-AAADDINAVTAK-----RAADHGFAFGDVNTT : 225
Scoel-1   : GLS-----ETK--RTAIN-KASDHLNIVLAQ-----RAAHGFTEFGDVRTT : 224
Scoel-2   : KLP-----LAAGDVPYLR-AIQAHLNDAVRR-----AAEETGATVYVDFSGV : 247
Sdias     : DLTKFGT-ITQGDRAWLRQDVLEPLNKTIEDS-----AATQEAADFNLYAP : 273
Aterr     : PLRPWLCHLLQRRHRLRLNHLLELNDLVRMLNSLIQSTISDINTARNTAQIHYIDMDAR : 258
```

```
Srimo      : FAGEHLCSE-----GAPWLHSVT-LPVENS-----YHPTANGQ : 256
Scoel-1   : FTGHEHLCSE-----GSPWLHSVNWLNIGES-----YHPTAAGQ : 256
Scoel-2   : SDGHDAACEA-----PGTRWIEPLLFHGSVLP-----VHPNALGE : 281
Sdias     : SQGHSVCD-----ADKQWVEGILTVPSPNQDPQ-----LSFVHPNASGH : 310
Aterr     : FDGHRWCEFGTQEPDPDPNPNTYFFLSAWPDIAIVGDTTAESTNATETDEITALMNSGSIQ : 318
```

```
Srimo      : SKGYLPVLNSAT----- : 268
Scoel-1   : SGGYLPVLNGAA----- : 268
Scoel-2   : RRMAEHTMDVLGLD----- : 295
Sdias     : RNAADHVEEAMLNALS----- : 326
Aterr     : LPDADTCQDALGSDPDYAVFMCDVAHVKANSSS : 353
```

Slika 1-2. Svrnjenje aminokiselinskih slijedova lipaze iz bakterije *S. rimosus* (Srimo, Q93MW7) sa slijedovima lipaza iz bakterije *S. coelicolor* (Scoel-1, Q9S2A5; Scoel-2, Q93J06) te esterazama iz bakterije *S. diastatochromogenes* (Sdias, Q59837) i plijesni *A. terreus* (Aterr, Q9Y7C6) (preuzeto iz: Vujaklija i suradnici, 2002).

1.6 Cilj istraživanja

Iz skupine SGNH-hidrolaza iz roda *Streptomyces* prva je biokemijski analizirana lipaza iz bakterije *S. rimosus* soja R6-554W (UniProtKB/TrEMBL pristupna oznaka Q93MW7, u daljnjem tekstu Srl) (Vujaklija i suradnici, 2002). Tijekom ovog istraživanja objavljeni su podaci o kloniranju i ekspresiji dvije lipaze iz obitelji SGNH-hidrolaza iz bakterije *S. coelicolor* soja A3(2) (UniProtKB/TrEMBL pristupna oznaka Q9S2A5, oznaka lokusa SCO1725 i UniProtKB/TrEMBL pristupna oznaka Q93J06, oznaka lokusa SCO7513) te njihova osnovna biokemijska karakterizacija (Côté i Shareck, 2008). Lipaza iz bakterije *S. coelicolor* soja A3(2) (Q9S2A5, u daljnjem tekstu Sc1) koja je obilježena sa 6 histidina na C-kraju proteina je detaljno biokemijski opisana (Bielen i suradnici, 2009). Cilj ovog istraživanja bio je kloniranje i ekspresija gena za SGNH-hidrolazu (Q93J06, u daljnjem tekstu Sc2) obilježenu sa 6 histidina na C-kraju proteina iz bakterije *S. coelicolor* soja A3(2) u heterolognom sustavu sa svrhom uspostavljanja učinkovite i brze metode za pročišćavanje proteina.

2 Materijali i metode

2.1 Materijali

2.1.1 Osnovne kemikalije

- agaroz *NEEO* (Roth)
- amonijev acetat (Kemika)
- amonijev peroksodisulfat (Pharmacia Biotech)
- amonijev sulfat (Kemika)
- dimetilsulfoksid (Sigma)
- dioksan (Sigma)
- ditiotritol (New England Biolabs)
- EDTA (Fluka)
- etanol (Kemika)
- fenol (Kemika)
- glicerol (Kemika)
- glicin (Kemika)
- glukoza (Kemika)
- izoamilni alkohol (Kemika)
- izopropanol (Kemika)
- kalcijev karbonat (Kemika)
- kalcijev klorid (Kemika)
- kalcijev klorid dihidrat (Kemika)
- kalijev acetat (Kemika)
- kalijev dihidrogenfosfat (Kemika)
- kalijev klorid (Kemika)
- kalijev sulfat (Kemika)
- kloroform (Kemika)
- magnezijev klorid heksahidrat (Kemika)
- magnezijev sulfat heptahidrat (Kemika)
- maleinska kiselina (Kemika)

- MES hidrat (Sigma)
- metanol (Kemika)
- mliječna kiselina (Kemika)
- natrijev dihidrogenfosfat hidrat (Kemika)
- natrijev hidrogenfosfat (Kemika)
- natrijev hidroksid (Kemika)
- natrijev klorid (Kemika)
- 4-nitrofenil palmitat (Sigma)
- octena kiselina (Kemika)
- PEG 1500 (Merck)
- saharoza (Kemika)
- SDS (Serva)
- TEMED (Pharmacia Biotech)
- *Trizma base* (Sigma)
- *Tween 20* (Sigma)

2.1.2 Kompleti

- *ECL Plus Western Blotting Detection System* (Amersham Biosciences)
- *Perfectprep Gel Cleanup Kit* (Eppendorf)
- *pGEM-T Vector System I* (Promega)
- *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen)
- *QIAquick Gel Purification Kit* (Qiagen)
- *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen)

2.1.3 Enzimi

- *Pfu* DNA polimeraza (Fermentas) s pripadajućim puferom i magnezijevim sulfatom
- *Taq* DNA polimeraza (Fermentas) s pripadajućim puferom i magnezijevim sulfatom
- restriksijske endonukleaze *EcoRI*, *HindIII* i *SmaI* (Fermentas) s pripadajućim puferima
- T4 DNA ligaza (Fermentas) s pripadajućim puferom

- lizozim (Serva) (matična otopina u P-puferu)
- ribonukleaza A (Sigma)

2.1.4 Antibiotici

- ampicilin (Sigma)
- tiostrepton iz bakterije *Streptomyces azureus* (Sigma)
- tetraciklin (Sigma)

2.1.5 Protutijela

- *anti-His* iz miša (Amersham Biosciences)
- *anti-mouse* iz *ECL Plus Western Blotting Reagent Pack* (Amersham Biosciences)

2.1.6 Biljezi i boje

Biljezi:

- *Mass Ruler DNA Ladder Mix* (Fermentas)
- *Lambda-pUC Mix Marker* (Fermentas)
- *Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope* (Bio-Rad)

Boje:

- boja za praćenje elektroforeze DNA (0,25% bromfenol plavo, 0,25% ksilencijanól FF i 30% glicerol)
- boja za praćenje SDS-PAGE (4 puta koncentrirana matična otopina 8% SDS, 400 mM DTT, 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glicerol)
- Coomassie briljant plavo (matična otopina 0,5 g/L *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Sigma), 40% metanol, 10% octena kiselina)
- etidij-bromid (Boehringer) (koncentracija matične otopine 10 mg/ml)

2.1.7 Otopine i puferi

- otopina elemenata u tragovima (0,04 g/L cinkov klorid, 0,2 g/L željezov (III) klorid heksahidrat, 0,01 g/L bakrov (II) klorid dihidrat, 0,01 g/L manganov (II) klorid, 0,01 g/L natrijev borat dekahidrat, 0,01 g/L amonijev molibdat tetrahidrat)
- 1 M fosfatni pufer pH 6,5 (1 M natrijev dihidrogenfosfat i 1 M natrijev hidrogenfosfat u omjeru 68,5:31,5)
- P (protoplast) pufer (103 g/L saharoza, 0,25 g/L kalijev sulfat, 2,02 g/L magnezijev klorid heksahidrat, 0,2% otopina elemenata u tragovima, 0,005% kalijev dihidrogenfosfat, 0,368% kalcijev klorid dihidrat, 0,573% TES pufer pH 7,2)
- pufer za prijenos na membranu (0,025 M Tris baza, 0,192 M glicin, 20% metanol)
- SDS-PAGE pufer (10 puta koncentrirana otopina: 30,3 g/L Tris baza, 144 g/L glicin, 10 g/L SDS)
- TAE pufer za elektroforezu DNA (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA)
- TBS pufer (0,15 M natrijev klorid, 0,02 M Tris-HCl pH 7,5)
- TES pufer za izolaciju plazmidne DNA iz streptomiceta (25 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 0,3 M saharoza)
- TES pufer (0,01 M TES (Sigma))
- T (Transformation) pufer (1,3% saharoza, 0,186% otopina elemenata u tragovima, 0,02325% kalijev sulfat, 0,1 M kalcijev klorid, 5% Tris-maleinska kiselina)
- TE pufer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)

2.1.8 Oligonukleotidne početnice

Oligonukleotidne početnice, njihova namjena u eksperimentu, kao i slijed nukleotida navedeni su u Tablici 2-1.

Tablica 2-1. Oligonukleotidne početnice i njihova namjena.

ime početnice	namjena početnice	slijed nukleotida početnice
Eco-Sc2	umnožavanje	5' - CGGAATTCGGAGGTTCCATGCCGAAGCCTGCCCTTCGCCGTGCATGA - 3'
Hind-Sc1N	umnožavanje	5' - CCCCAAGCTTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTG - 3'
pUC/M13 rev	sekvenciranje	5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3'
T7f	sekvenciranje	5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'
Sc2-F-inseq	sekvenciranje	5' - CCTGGTCACGCTCACCATCGGC - 3'
FANT	umnožavanje	5' - CGGTTGCCATCATCACAACGGCCG - 3'
RANT	umnožavanje	5' - CGTCGGAGCCGCTGTTCCAGGGC - 3'

2.1.9 Bakterijski sojevi

Escherichia coli

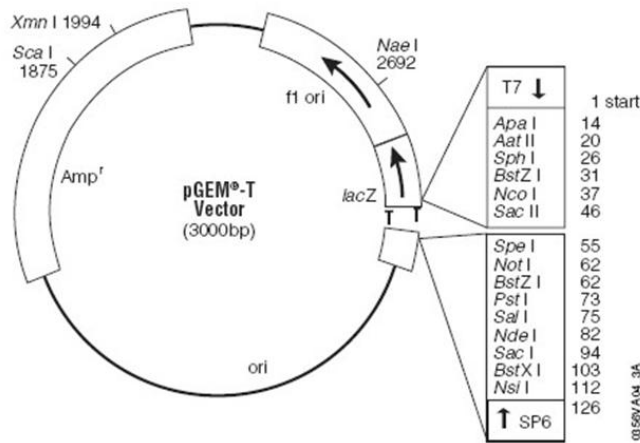
- XL1–Blue genotipa: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lac^fzΔM15 Tn10* (Tet^r)]
- ER2925 genotipa: *ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galk2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2*

Streptomyces lividans

- TK23: Spc^R

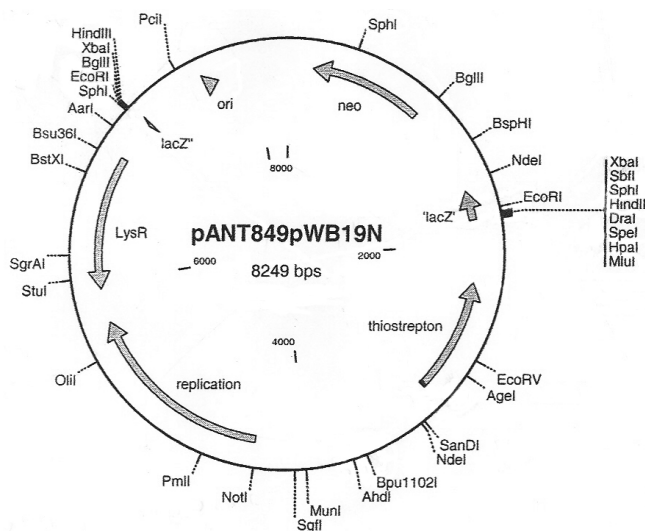
2.1.10 Plazmidni vektori

Plazmid pGEM-T (Promega) je velik 3000 pb (Slika 2-1). Sadrži gen za otpornost na ampicilin, dio *lacZ* gena koji je odgovoran za selekciju α -komplementacijom te višestruko mjesto za kloniranje između promotora za T7 RNA polimerazu i SP6 RNA polimerazu. Ima vlastito izvorište replikacije, kao i izvorište replikacije bakteriofaga f1. Vektor sadrži 3' stršeće deoksitimidozine zbog kojih nije zatvorena kružna molekula te se može učinkovito povezati s fragmentom DNA koji sadrži deoksiadenozine na 3' kraju fragmenta.



Slika 2-1. Mapa plazmida pGEM-T (preuzeto iz: pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems - Technical Manual, Promega).

Plazmid pANT849pWB19N (veličine 8249 pb, Slika 2-2) je ekspresijski vektor za streptomicete s dijelovima lokusa *snp* iz *Streptomyces sp.* soja C5 (Desanti i Strohl, 2003). Lokus *snp* sastoji se od gena *snpA*, koji kodira za metaloproteinazu, i *snpR*, koji kodira za aktivator transkripcije gena *snpA* sličan aktivatoru transkripcije LysR. U plazmidu pANT849pWB19N je korišten gen *snpR* i promotorska regija gena *snpA* iza koje je umetnut slijed od 39 pb koji čini višestruka mjesta za kloniranje. Plazmid pANT849pWB19N sadrži i gen za otpornost na tiostrepton. Za potrebe ovog eksperimenta plazmid pANT849pWB19N (u daljnjem tekstu plazmid pANT849) je bio razgrađen s restriksijskim endonukleazama *EcoRI* i *HindIII* (konačna veličina 5343 pb).



Slika 2-2. Mapa plazmida pANT849pWB19N.

2.1.11 Hranjive podloge

Za uzgoj bakterije *E. coli* korištena je tekuća hranjiva podloga LB (10 g/L *Bacto Tryptone* (Difco Laboratories), 5 g/L *Bacto Yeast Extract* (Difco Laboratories), 5 g/L natrijev klorid), dok je za krutu hranjivu podlogu dodano 15 g/L *Bacto Agar* (Difco Laboratories). U selektivne hranjive podloge LB bio je dodan antibiotik ampicilin (u konačnoj koncentraciji 100 µg/ml), a u krute hranjive podloge LB za probiranje rekombinantnih bakterijskih kolonija α -komplementacijom (plavo – bijela selekcija) uz ampicilin je dodan IPTG (0,5 mM) i X-Gal (80 µg/ml). Za regeneraciju bakterije *E. coli* nakon transformacije elektroporacijom korištena je tekuća hranjiva podloga SOC (20 g/L *Bacto Tryptone*, 5 g/L *Bacto Yeast Extract*, 10 mM natrijev klorid, 2,5 mM kalijev klorid, 10 mM magnezijev klorid heksahidrat, 10 mM magnezijev sulfat heptahidrat, 20 mM glukoza). Za regeneraciju transformiranih protoplasta *S. lividans* korištena je kruta hranjiva podloga R5 (103 g/L saharoza, 0,25 g/L kalijev sulfat, 10,12 g/L magnezijev klorid heksahidrat, 0,1 g/L *Casaminoacids* (Difco Laboratoires), 0,2% otopina elemenata u tragovima, 5 g/L *Bacto Yeast Extract*, 5,73 g/L TES pufer, 15 g/L *Bacto Agar*). Za uzgoj bakterija *S. lividans* korištena je tekuća hranjiva podloga CRM (103 g/L saharoza, 10,12 g/L magnezijev klorid heksahidrat, 15 g/L *Tryptic Soya Broth* (Difco Laboratories), 5 g/L *Bacto Yeast Extract*, 0,75 mM natrijev hidroksid) uz dodatak tiostreptona (25 µg/ml), dok je za krutu hranjivu podlogu CRM dodano 15 g/L *Bacto Agar*. Za uzgoj bakterija *S. lividans* u svrhu izolacije proteina korištena je tekuća hranjiva podloga GR₂d (7 g/L kalcijev karbonat, 40 g/L *Dekstrin 15* (Fluka), 8 g/L *Corn-steep solids* (Sigma), 2 g/L amonijev sulfat, 0,14% mliječna kiselina, 19,5 mM natrijev hidroksid) uz dodatak tiostreptona (25 µg/ml). U tekuću hranjivu podlogu GR₂d može biti dodano 2% sterilnog pufera 1M Tris-HCl pH 8 ili 1M MES pH 6.

2.2 Metode

2.2.1 Lančana reakcija polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction – PCR)

Lančana reakcija polimerazom (u daljnjem tekstu engleski akronim PCR) je metoda eksponencijalnog umnožavanja fragmenta DNA *in vitro*. Reakcija se odvija u ciklusima sa sljedećim fazama: denaturacija kalupa DNA, specifično vezanje oligonukleotidnih početnica na kalup i sinteza komplementarnih lanaca DNA.

Standardna reakcijska smjesa volumena 25 μl sadržavala je u konačnim koncentracijama 0,4 ng/ μl plazmidne DNA koja služi kao kalup u reakciji, 0,8 μM svake od dviju oligonukleotidnih početnica, 0,16 mM smjese deoksiribonukleotida, 0,025 U/ μl *Pfu* DNA polimeraze ili 0,02 U/ μl *Taq* DNA polimeraze, pufer bez dodatka magnezijeva sulfata, 4 mM magnezijeva sulfata, dodatke za olakšanu polimerizaciju kalupa visokog GC sastava (DMSO u rasponu od 2,5% do 4% te, u reakciji s *Pfu* DNA polimerazom, protein koji se veže na jednolančanu DNA iz bakterije *S. coelicolor* (u daljnjem tekstu SSB) u rasponu od 2 ng/ μl do 20 ng/ μl) i redistiriranu vodu. Korišten je PCR uređaj *Progene* (Techne) s programima navedenima u Tablici 2-2.

Tablica 2-2. Dijelovi lančane reakcije polimerazom.

dijelovi PCR reakcije	reakcija s <i>Taq</i> DNA polimerazom		reakcija s <i>Pfu</i> DNA polimerazom	
	temperatura/ $^{\circ}\text{C}$	trajanje	temperatura/ $^{\circ}\text{C}$	trajanje
početna denaturacija	95	4 min	95	3 min
28 ciklusa:				
denaturacija lanaca	94	1 min	95	50 sec
vezanje početnica na kalup	60	45 sec	62	50 sec
sinteza komplementarnih lanaca	72	1 min	72	2 min
završno produživanje lanaca	72	5 min	72	5 min

Reakcija umnožavanja *sc2* optimizirana je dodacima za olakšanu polimerizaciju kalupa visokog GC sastava. Napravljene su četiri različite reakcijske smjese s dodacima za olakšanu polimerizaciju DMSO i SSB. Prva je sadržavala 2,5% DMSO, druga 2,5% DMSO i 2 ng/ μl SSB, treća 2,5% DMSO i 20 ng/ μl SSB, dok je četvrta sadržavala samo 20 ng/ μl SSB.

PCR se koristio i za dokazivanje prisutnosti određenog fragmenta DNA u plazmidu u bakterijskoj stanici. Pri tome su kao kalup korišteni potpuno pročišćeni plazmidi (postupak pročišćavanja je opisan u odjeljcima **2.2.14** i **2.2.15**) ili bakterijski stanični lizati. Lizati su dobiveni resuspenzijom dijela bakterijske kolonije u 50 µl vode te zagrijavanjem suspenzije pri temperaturi od 95°C u trajanju od 10 minuta. Nakon toga je slijedilo centrifugiranje pri 15700 x g u trajanju od 5 minuta te je kao kalup za PCR uzet 1 µl ovako pripremljenog supernatanta.

2.2.2 Elektroforeza DNA

Elektroforeza je metoda koja se temelji na mogućnosti odjeljivanja fragmenata DNA koji pod utjecajem istosmjernog električnog polja putuju različitom brzinom ovisno o svojoj veličini. Na brzinu kojom fragmenti putuju osim veličine utječe i koncentracija agaroze u gelu, primijenjena voltaža, kao i sastav pufera za elektroforezu. U ovom radu je elektroforeza korištena za provjeru uspješnosti PCR-a, provjeru veličine rekombinantnih plazmida iz bakterijskih stanica *E. coli* i *S. lividans* i pročišćavanje fragmenata DNA dobivenih razgradnjom s restriksijskim endonukleazama. Za određivanje koncentracije i veličine fragmenata DNA korišteni su biljezi *Lambda-pUC Mix Marker* i *Mass Ruler DNA Ladder Mix*. Za elektroforezu su korišteni gelovi s 0,7-1% udjela agaroze. Za izradu gela i kao pufer za elektroforezu korišten je TAE pufer (u pufer za izradu gela dodana je boja etidij-bromid do konačne koncentracije 0,5 µg/ml). Aparaturu za elektroforezu čine kadice *Sub-Cell GT* (za veće gelove (150 ml) pri naponu od 85 V) i *Mini-Sub Cell GT* (za manje gelove (50 ml) pri naponu od 55 V) (obje Bio-Rad) te izvori istosmjerne struje proizvođača Hoefer te ELPHO Power Supply.

2.2.3 Pročišćavanje DNA

Komplet *QIAquick PCR Purification Kit* korišten je prema uputama proizvođača za pročišćavanje fragmenata DNA iz PCR smjese, za pročišćavanje fragmenata DNA nakon dodavanja deoksiadenozina na 3' kraj molekule DNA, kao i nakon djelovanja restriksijskih

endonukleaza *EcoRI*, *SmaI* i *HindIII* na plazmidnu DNA. Komplet *QIAquick Gel Extraction Kit* korišten je prema uputama proizvođača za pročišćavanje fragmenata DNA dobivenih djelovanjem restrikcijskih endonukleaza nakon izrezivanja iz agaroznog gela.

2.2.4 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNA

Koncentracija DNA nakon pročišćavanja PCR produkta određena je spektrofotometrijski u kvarcnoj kiveti na valnoj duljini od 260 nm. Mjerenje je izvršeno na uređaju *M501 Single Beam Scanning UV/Visible Spectrophotometer* (Camspec).

2.2.5 Ugušćivanje DNA

Otopine DNA male koncentracije po potrebi su ugušćene u uređaju *DNA 120 SpeedVac Concentrator* (Thermo). Ugušćivanju je podvrgnuta otopina fragmenta DNA prije ligacije u pGEM-T vektor, otopine lineariziranih plazmidnih DNA molekula nakon enzimske razgradnje restrikcijskim endonukleazama *EcoRI* i *HindIII*, otopine fragmenata DNA nakon pročišćavanja restrikcijskih smjesa s restrikcijskom endonukleazom *SmaI*, otopina pročišćenog fragmenta DNA nakon razgradnje s restrikcijskim endonukleazama *EcoRI* i *HindIII* i otopina plazmidne DNA iz streptomyceta na kraju pročišćavanja.

2.2.6 Enzimska razgradnja DNA

Restrikcijske endonukleaze su bakterijski enzimi koji cijepaju fosfodiesterske veze u okosnici DNA molekule na određenom slijedu nukleotida. Pri tome enzimi mogu ostaviti tupe krajeve odnosno 5' ili 3' stršeće krajeve DNA molekule. Stršeći krajevi jedne DNA molekule se mogu naknadno slijepiti s komplementarnim stršećim krajevima druge DNA molekule, dok se tupi krajevi mogu slijepiti s tupim krajevima DNA molekula. Rekombinantni plazmidi pGEM-T pročišćeni iz bakterija *E. coli* podvrgnuti su djelovanju restrikcijskih endonukleaza *EcoRI*, *SmaI*

i *Hind*III. Reakcije razgradnje plazmidne DNA izvođene su u otopinama pufera i uvjetima reakcije predloženim od strane proizvođača.

2.2.7 Sustav za direktno kloniranje PCR produkta (TA kloniranje)

TA kloniranje PCR produkta izvršeno je uz pomoć *pGEM-T Vector System I* kompleta. Za TA kloniranje nužno je da fragment DNA na svojim 3' krajevima sadrži po jedan nesporeni deoksiadenozin kako bi se fragment mogao komplementarno spariti s vektorom koji ima na svojim 3' krajevima pojedinačne deoksitimidozine. *Taq* DNA polimeraza ima svojstvo terminalne transferazne aktivnosti neovisne o kalupu koje se koristi za reakciju dodavanja deoksiadenozina na 3' krajeve molekule (Clark, 1988). S obzirom da su u ovom radu DNA fragmenti umnoženi uz pomoć *Pfu* DNA polimeraze koja ostavlja tupe krajeve, naknadno vezanje deoksiadenozina na 3' krajeve već polimeriziranog fragmenta DNA postignuto je dodavanjem: *Taq* DNA polimeraze u konačnoj koncentraciji 0,03 U/ μ l, pufera za *Taq* DNA polimerazu, magnezijeva sulfata (konačna koncentracija 4 mM) i deoksiadenozin-trifosfata (konačna koncentracija 0,08 mM) s pročišćenim fragmentima DNA do konačnog volumena od 10 μ l. Smjesa je inkubirana 30 minuta pri temperaturi od 72°C te je pročišćena kompletom (opisano u odjeljku 2.2.3). Fragmenti DNA su nakon pročišćavanja ligirani u vektor pGEM-T iz *pGEM-T Vector System I* kompleta prema uputama proizvođača. Molarni omjer vektora i fragmenta bio je 1:4. Smjesa je inkubirana preko noći pri temperaturi od 16°C. Ligacijska smjesa je korištena za transformaciju bakterijskih stanica *E. coli* soja XL-1 Blue.

2.2.8 Ligacija fragmenata DNA

Za sljepljivanje fragmenata razgrađenih restrikcijskim endonukleazama korištena je T4 DNA ligaza s pripadajućim puferima prema uputama proizvođača. Reakcijska smjesa ligacije fragmenata dobivenih djelovanjem restrikcijskih endonukleaza *Eco*RI i *Sma*I inkubirana je pri temperaturi od 8°C preko noći (molarni omjer velikog i malog fragmenta 1:5), dok je reakcijska smjesa ligacije fragmenta i vektora pANT849 (molarni omjer 1:4,5) dobivenih

djelovanjem restrikcijskih endonukleaza *EcoRI* i *HindIII* inkubirana pri temperaturi od 16°C preko noći.

2.2.9 Priprema kompetentnih stanica bakterije *E. coli* za elektroporaciju

Za pripremu kompetentnih stanica bakterije *E. coli* uzgojena je svježa prekonoćna kultura u tekućoj hranjivoj podlozi LB. Pri uzgoju soja XL-1 Blue u tekuću hranjivu podlogu je dodan antibiotik tetraciklin kako bakterije ne bi odbacile F' episom koji sadrži kodirajući slijed za ω podjedinicu enzima β -galaktozidaze te gen za otpornost na tetraciklin. Prekonoćna kultura soja ER2925 uzgajana je bez dodatka antibiotika. Prekonoćna kultura bakterije *E. coli* razrijeđena je 100 puta i zatim uzgajana pri temperaturi od 37°C uz potresanje pri 250 rpm. Spektrofotometrijski je mjerena apsorbancija kulture pri 600 nm do vrijednosti apsorbancije od 0,5 koja odgovara sredini logaritamske faze rasta bakterijske kulture. Stanice su stavljene 15 minuta na led uz potresanje i nakon toga centrifugirane pri 4000 x g u trajanju od 15 minuta pri temperaturi od 4°C. Talog je dva puta ispran s hladnom sterilnom redestiliranom vodom (s jednim početnim volumenom kulture, pa s pola početnog volumena kulture) i jednom s hladnim sterilnim 10%-tnim glicerolom (petina početnog volumena kulture) uz centrifugiranje u prethodno navedenim uvjetima. Prije posljednjeg centrifugiranja stanice su ostavljene u hladnom sterilnom 10%-tnom glicerolu da odstoje 30 minuta. Bakterijske stanice su zatim resuspendirane u hladnom sterilnom 10%-tnom glicerolu, raspodijeljene u alikvote od 40 μ l, naglo smrznute u tekućem dušiku i pohranjene na temperaturi od -80°C.

2.2.10 Priprema protoplasta vrste *S. lividans* (soj TK23)

Protoplasti su hife micelija kojima je enzimski uklonjena stanična stijenka u svrhu olakšane transformacije bakterijske stanice. Morfološki gledano, protoplasti su manji od ishodišnih streptomycetnih hifa, okruglog su oblika te su omeđeni samo staničnom membranom. Protoplasti vrste *Streptomyces lividans* (soj TK23) pripremljeni su prema protokolu opisanom u potpoglavlju 16.2.1.1. sveučilišnog priručnika Metode u molekularnoj biologiji (Ambriović Ristov i suradnici, 2007).

2.2.11 Transformacija bakterijskih stanica *E. coli* elektroporacijom

Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom metoda je u kojoj primjenom kratkotrajnog visokovoltaznog pulsa nastaju pore u bakterijskoj stijenci, što omogućava ulazak DNA u stanicu. Prethodno pripremljenom alikvotu kompetentnih bakterijskih stanica volumena 40 μ l dodana je ligacijska smjesa te je ukupna smjesa prebačena u ohlađenu kivetu za elektroporaciju (razmak između elektroda 2 mm). Kiveta je stavljena u uređaj za elektroporaciju *Electroporator 2510* (Eppendorf) te je smjesa podvrgnuta električnom puls u pri naponu od 2500 V, otporu od 400 Ω i kapacitetu od 25 μ F. Bakterijske stanice su nakon elektrotransformacije regenerirane u tekućoj hranjivoj podlozi SOC sat vremena pri temperaturi 37°C uz potresanje pri 250 rpm te je tekuća hranjiva podloga s bakterijskim stanicama razmazana na krute hranjive podloge LB s dodatkom ampicilina. U krute hranjive podloge LB za rast bakterijskih stanica u koje je transformirana ligacijska smjesa pGEM-T vektora i fragmenta DNA s genom dodani su, uz ampicilin, IPTG i X-Gal.

2.2.12 Transformacija protoplasta vrste *S. lividans* (soj TK23)

Transformacija protoplasta vrste *S. lividans* soja TK23 izvršena je prema postupku opisanom u potpoglavlju 16.2.1.2. sveučilišnog priručnika Metode u molekularnoj biologiji (Ambriović Ristov i suradnici, 2007). Za transformaciju protoplasta korištena je otopina T pufera s PEG 1500.

2.2.13 Probiranje bakterijskih kolonija *E. coli* α -komplementacijom (plavo – bijela selekcija)

Nakon elektrotransformacije, selektivne krute hranjive podloge LB su inkubirane 2 dana pri temperaturi od 30°C, dok bakterijske kolonije *E. coli* nisu bile dovoljno vidljive. Na podlozi rastu samo bakterijske kolonije koje sadrže plazmid zbog kojeg su otporne na ampicilin. One bakterijske kolonije koje sadrže plazmid s ugrađenim fragmentom DNA bijele su boje zbog toga što je prekinut nukleotidni slijed koji kodira za α podjedinicu enzima β -galaktozidaze. Enzim β -galaktozidaza u prisutnosti induktora (IPTG) razgrađuje analog galaktoze u podlozi

(X-Gal). U bakterijskim stanicama koje sadrže plazmid bez ugrađenog fragmenta, enzim je prisutan i aktivan, što se očituje u pojavi plave boje kolonija (plava boja potječe od razgradnje X-Gal).

2.2.14 Izolacija plazmidne DNA iz bakterije *E. coli*

Plazmidna DNA je izolirana iz svježe prekonocne bakterijske kulture. Korišten je komplet *QIAprep Spin Miniprep Kit* koji se temelji na metodi alkalne lize.

2.2.15 Izolacija plazmidne DNA iz bakterije *S. lividans*

Plazmidna DNA iz vrste *S. lividans* može se izolirati metodom alkalne lize koja je prilagođena za streptomicete. Ova je metoda izvedena prema modificiranom protokolu opisanom u 8. poglavlju priručnika *Practical Streptomyces Genetics* (Kieser i suradnici, 2000). Nakon dvodnevnog uzgoja bakterijskih kultura transformiranih streptomiceta, odvojen je 1 ml bakterijske kulture i centrifugiran pri 15700 x g u trajanju 15 minuta. Optimalna količina biomase za postupak izolacije plazmidne DNA iz streptomiceta je volumen od 50 do 100 µl taloga nakon centrifugiranja. Na talog je dodan TES pufer do ukupnog volumena od 500 µl. U tu je otopinu dodana ribonukleaza A do konačne koncentracije od 10 µg/ml i lizozim do konačne koncentracije od 5 mg/ml. Ribonukleaza A se dodaje kako bi do razgradnje RNA došlo odmah nakon lize stanice. Lizozim se dodaje za razgradnju stanične stijenke streptomiceta. Suspenzija je inkubirana na temperaturi od 37°C u trajanju od 30 minuta uz povremeno lagano potresanje taloga. Nakon inkubacije u suspenziju je dodano 250 µl 0,3 M otopine natrijeva hidroksida s 2% SDS te je otopina naglo protresena, pri čemu je došlo do lize stanica. Otopina je inkubirana pri temperaturi od 70°C u trajanju od 15 minuta. Nakon hlađenja epruveta na temperaturu od 37°C u otopinu je dodano 80 µl kiselog fenol-kloroforma. Epruvete su kratko vorteksirane te je otopina centrifugirana pri 15700 x g u trajanju od 10 minuta (u ostatku protokola ponavlja se jednaki režim centrifugiranja). Gornja vodena faza je nakon toga prebačena u nove epruvete te joj je dodano 80 µl kloroform-izoamilnog alkohola koji uklanja ostatke fenola iz otopine. Otopina je kratko vorteksirana te

centrifugirana. U nove epruvete s 50 µl nepuferiranog 3M kalijeva acetata dodano je oko 700 µl gornje faze te 450 µl izopropanola. Otopina je pažljivo promiješana i centrifugirana. Supernatant je odsisan vakuum sisaljkom te je talog otopljen u 150 µl TE pufera pH 8 i 150 µl 5M amonijevog acetata. Nakon centrifugiranja supernatant je prebačen u nove epruvete te mu je dodano 660 µl apsolutnog etanola. Otopina je centrifugirana te je supernatant odsisan, a talog opran s 1 ml hladnog 70%-tnog etanola. Nakon centrifugiranja i odsisavanja supernatanta, talog je do kraja posušen (opisano u odjeljku **2.2.5**) te konačno otopljen u 50 µl pufera 5 mM Tris-HCl pH 8,5.

2.2.16 Određivanje primarne strukture DNA

Određivanje primarne strukture DNA (sekvenciranje DNA) plazmida izoliranih iz bakterije *E. coli* soja XL-1 Blue izvršeno je u DNA servisu Instituta Ruđer Bošković. Korišten je uređaj *ABI PRISM 3100 – Avant DNA Genetic Analyser* (Applied Biosystems) uz softver za analizu sekvenci te komplet *ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit*.

2.2.17 Bioinformatička analiza nukleotidnih slijedova DNA molekula i translatiranih slijedova aminokiselina

Nukleotidni slijedovi i translatirani slijedovi aminokiselina analizirani su pomoću programa ClustalW (EMBL-EBI). Nukleotidni slijedovi translatirani su u slijedove aminokiselina pomoću alata Six Frame Translation of Sequence (BCM search launcher, HGSC). Pretraživanje baza proteina u NCBI izvršena je pomoću alata BLAST (NCBI) s programom BLASTP (verzija 2.2.20.).

2.2.18 Uzgoj transformanata bakterije *S. lividans* na krutoj hranjivoj podlozi CRM

Nakon pojavljivanja vidljivih kolonija transformanata na krutim hranjivim podlogama R5, a prije uzgoja u tekućoj hranjivoj podlozi u svrhu izolacije izvanstaničnih proteina, potrebno je napraviti precjepljivanje transformanata na bogatu hranjivu podlogu na veću površinu kako

bi se dobilo više biološkog materijala za inokulum. Stoga su kolonije precijepljene na krutu hranjivu podlogu CRM s tiostreptonom. Kolonije su razmazane u površine krute hranjive podloge veličine 2 cm × 2 cm. Ploče su inkubirane pri temperaturi od 30°C 2 dana.

2.2.19 Uzgoj transformanata bakterije *S. lividans* u tekućoj hranjivoj podlozi CRM

Za izolaciju plazmidne DNA iz transformiranih kolonija potrebno je uzgojiti transformante u manjem volumenu tekuće hranjive podloge CRM. Zračni micelij pojedinog transformanta je sastrugan s površine krute hranjive podloge CRM i prebačen u 200 µl tekuće hranjive podloge CRM s tiostreptonom. U tom su volumenu transformanti sterilno mehanički usitnjeni (postupak tzv. poteriranja) i nakon toga prebačeni u 3 ml tekuće hranjive podloge CRM s tiostreptonom. Bakterijske kulture su inkubirane pri temperaturi od 30°C uz potresanje pri 250 rpm do eksponencijalne faze rasta (najčešće dvodnevni uzgoj).

2.2.20 Čuvanje bakterijskih kultura streptomiceta

Bakterijsku kulturu streptomiceta moguće je sačuvati u 20%-tnom glicerolu, pri čemu bakterijske stanice ostaju vijabilne kroz nekoliko mjeseci. Bakterijska kultura u volumenu od 1 ml je centrifugirana pri 1500 x g u trajanju od 15 minuta te je talogu dodano 1,5 ml sterilnog 20%-tnog glicerola. Glicerolska kultura smrznuta je na temperaturu od -20°C.

2.2.21 Optimizacija uzgoja transformanata bakterije *S. lividans*

Transformant iz glicerolske kulture (opisano u odjeljku **2.2.20**) je naciyepljen u 20 ml tekuće hranjive podloge GR₂d bez pufera, GR₂d s puferom MES pH 6 i GR₂d s puferom Tris pH 8. U tekuće hranjive podloge dodan je tiostrepton. Transformant je uzgajan pri temperaturi od 30°C uz potresanje pri 250 rpm. Tijekom 10 dana uzgoja uzimani su uzorci bakterijske kulture (300 µl) te je mjerena lipolitička aktivnost supernatanta kulture (opisano u odjeljku **2.2.22**), kao i pH supernatanta kulture.

2.2.22 Spektrofotometrijsko mjerenje lipolitičke aktivnosti prema 4-nitrofenil palmitatu

Lipolitička aktivnost uzorka prema supstratu 4-nitrofenil palmitatu može se odrediti spektrofotometrijski. Tijekom reakcije lipolitički enzim iz uzorka razgrađuje supstrat na žuto obojeni 4-nitrofenol, koji apsorbira pri 410 nm, i palmitinsku kiselinu (Bielen i suradnici, 2009). Matična otopina 0,0132 M 4-nitrofenil palmitata je priređena dodavanjem 0,01 g 4-nitrofenil palmitata u prahu s 2 ml organskog otapala dioksana. U 2 ml pufera 50 mM Tris-HCl pH 8 dodano je 50 µl matične otopine neposredno prije početka mjerenja reakcije razgradnje. U 1 ml tako pripremljene otopine dodano je 10-20 µl supernatanta. Kinetika reakcije raspada supstrata praćena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 410 nm pri čemu je svakih 30 sekundi reakcije očitana vrijednost apsorbancije. Mjerenja su izvršena na uređaju *M501 Single Beam Scanning UV/Visible Spectrophotometer* (Camspec).

2.2.23 Uzgoj transformanata bakterije *S. lividans* za izolaciju proteina

Za uzgoj transformanata u većem volumenu (400 ml po kulturi) prvo je potrebno uzgojiti transformante u manjem volumenu (1% većeg volumena). Transformanti iz glicerolske kulture (opisano u odjeljku **2.2.20**) nacijepljeni su u 30 ml hranjive tekuće podloge CRM s tiostreptomom. Kultura je uzgajana na temperaturi od 30°C uz potresanje pri 250 rpm tijekom 2 dana. U 5 Erlenmayer tikvi volumena 2 litre s 400 ml tekuće hranjive podloge GR₂d s dodatkom tiostreptona inokulirano je po 4 ml uzgojene bakterijske kulture. Kulture su inkubirane pri temperaturi od 30°C uz potresanje pri 250 rpm. Tijekom 2 dana praćena je lipolitička aktivnost u supernatantu svake kulture (opisano u odjeljku **2.2.22**), a rast je zaustavljan kada su vrijednosti aktivnosti dosegnule svoj maksimum prema rezultatu iz optimizacije (opisana u odjeljku **2.2.21**). Kulture su centrifugirane pri 4000 x g u trajanju od 25 minuta pri temperaturi od 4°C. Dobiveni supernatant je smrznut na temperaturu od -20°C.

2.2.24 Izolacija topljivih izvanstaničnih proteina iz kulture streptomiceta

Za taloženje svih proteina iz supernatanta kulture koristi se taloženje amonijevim sulfatom u masenoj koncentraciji od 516 g/l. Takvo 80%-tno zasićenje otopine će, osim taloženja svih proteina, i razdvojiti proteine od ostalih produkata staničnog metabolizma te smanjiti ukupni volumen uzorka. Supernatant kultura je uz miješanje otopine pri temperaturi od 4°C postupno zasićen usitnjenim prahom amonijeva sulfata. Otopina je centrifugirana pri 4400 x g u trajanju od 30 minuta na temperaturi od 4°C. Talog je resuspendiran u minimalnom volumenu pufera 10 mM Tris-HCl pH 8.

2.2.25 Dijaliza proteina

Dijaliza proteina je metoda odvajanja proteina od malih molekula. Otopina proteina i male molekule dijalizira se preko polupropusne membrane čije su pore veće od otopljenih male molekule, a manje od otopljenog proteina. Na temelju razlike u koncentraciji male molekule unutar crijeva za dijalizu i izvan nje, male molekule difundiraju kroz polupropusnu membranu u smjeru svoje manje koncentracije, dok protein zbog veličine pora ne može prijeći membranu i on ostaje u crijevu za dijalizu. Istovremeno, zbog koncentracijskog gradijenta u crijevo za dijalizu ulaze male molekule iz okolne otopine.

Prokuhano crijevo za dijalizu (Sigma) koje propušta molekule manje od 12 kDa napunjeno je otopinom proteina istaloženih s amonijevim sulfatom te je na temperaturi od 4°C stavljeno u posudu većeg volumena napunjenu s puferom 10 mM Tris-HCl pH 8 koji se konstantno miješa. Pufer je redovito i često mijenjan tijekom nekoliko sati kako bi sav amonijev sulfat izašao iz otopine unutar crijeva za dijalizu u otopinu izvan crijeva za dijalizu. Posljednja otopina pufera u kojoj se otopina proteina u crijevu dijalizirala preko noći je bio pufer sastava 50 mM Tris-HCl pH 8 i 300 mM natrijev klorid.

2.2.26 Metoda detekcije proteina po Bradfordu

Boja Coomasie briljant plavo u kiseloj otopini se veže za proteine pri čemu nastaje plavo obojenje. Ova se metoda može koristiti za brzo detektiranje proteina u uzorku. Tijekom afinitetne kromatografije na Ni-NTA agarozu prisutnost proteina u pojedinoj frakciji je detektirana tako da je manji alikvot uzorka (5 μ l) pomiješan s alikvotom Bradfordovog reagensa (20 μ l) (*Quick Start Bradford Dye Reagent*, Bio-Rad). Ukoliko je u uzorku bilo proteina, boja Bradfordovog reagensa iz crveno-smeđe boje prešla je u plavu, a ukoliko proteina nije bilo, Bradfordov reagens ostao je crveno-smeđe boje.

2.2.27 Afinitetna kromatografija na nosaču s imobiliziranim metalom

Afinitetna kromatografija na nosaču s imobiliziranim metalom je metoda odvajanja proteina na temelju afiniteta određenog proteina za neki metal. Stoga se željeni protein specifično veže na metal na nosaču, dok preostali proteini iz smjese prolaze kroz kolonu. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu (Qiagen) koristi se za pročišćavanje proteina koji na N-kraju ili C-kraju imaju segment od 6 histidina. Atom nikla koji se nalazi vezan za NTA molekulu na agarozu iznad pH 6 veže bočne ogranke histidina te se protein sa segmentom bogatim aminokiselinskim ostacima histidina zadržava vezan na nosač. Dodatkom imidazola koji se natječe s bočnim ograncima histidina za vezu s atomom nikla, vezani protein će na Ni-NTA agarozu biti zamijenjen tom molekulom te će se protein eluirati s kolone. Afinitetna kromatografija s Ni-NTA agarozom izvedena je prema modificiranom protokolu predloženom od strane proizvođača. Dijalizirani uzorak nanesen je na manji volumen Ni-NTA agaroze (oko 250 μ l) koji je dovoljan za vezanje miligramskih količina specifičnog proteina u kromatografskoj koloni manjeg volumena. Okomito postavljena kolona je priključena na protočnu pumpu koja omogućuje kruženje uzorka kroz kolonu brzinom od 0,5 ml/min. Nakon što je uzorak 4 puta prošao kroz kolonu, kolona je isprana puferom sastava 50 mM fosfatni pufer pH 8 i 300 mM natrijev klorid. Uzorak s proteinima koji su prošli kroz kolonu je pohranjen na temperaturi od 4°C. Nakon toga je kolona isprana, kako bi se svi proteini koji su eventualno zaostali na nosaču odstranili s nje. Ispiranje kolone praćeno je metodom detekcije proteina po Bradfordu (opisano u odjeljku **2.2.26**). Vezani protein je eluiran s

kolone pomoću pufera za eluciju sastava 50 mM fosfatni pufer pH 8, 300 mM natrijev klorid i 250 mM imidazol. Pri eluciji proteina kolona je privremeno zatvorena na oba kraja s dodanim volumenom pufera za eluciju od 800 µl i potresana u vodoravnom položaju na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Dobiveni eluat proteina je smrznut na temperaturu od -20°C.

2.2.28 Jednodimenzionalna diskontinuirana elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE)

Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE) je analitička metoda razdvajanja proteina. Tijekom postupka se anionski detergent SDS dodaje u poliakrilamidni gel i u otopinu s bojom za proteine. Vezanje SDS-a na proteine u uzorku uzrokuje njihovu denaturaciju i daje im negativni naboj koji je proporcionalan njihovoj veličini te je njihovo razdvajanje u poliakrilamidnom gelu posljedica razlike u molekularnoj masi. U SDS-PAGE korišteni su gel za razdvajanje i gel za sabijanje. Gel za razdvajanje je 12% otopina akrilamida i bisakrilamida masenog omjera 29:1 u puferu sastava 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% APS i 0,1% TEMED. Gel za sabijanje je 5% otopina akrilamida i bisakrilamida masenog omjera 29:1 u puferu sastava 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS i 0,1% TEMED. Za pripremu uzoraka za elektroforezu u 12 µl uzorka dodana je 4 puta koncentrirana boja za proteine (4 µl). Uzorci su nanješeni na poliakrilamidni gel u kadici za elektroforezu *Mini-PROTEAN II* (Bio Rad) uronjenom u pufer za SDS-PAGE. U elektroforezi je korišten biljeg *Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope*. Na poliakrilamidni gel primijenjena je voltaža od 150 V do sabijanja uzoraka u gelu za sabijanje, a zatim je voltaža povišena na 180 V.

2.2.29 Detekcija proteina u poliakrilamidnom gelu

Proteini u poliakrilamidnom gelu mogu se detektirati bojom Coomassie briljant plavo koja se u kiseloj otopini veže za proteine u gelu. Bojanje proteina u poliakrilamidnom gelu izvršeno je prema protokolu opisanom u potpoglavlju 11.3.1.1. sveučilišnog priručnika *Metode u molekularnoj biologiji* (Ambriović Ristov i suradnici, 2007).

2.2.30 Western analiza

Western analiza je metoda detekcije proteina i njegove identifikacije u kojoj se određeni aminokiselinski slijed u proteinu kao antigenska determinanta prepoznaje specifičnim protutijelom. Na specifično protutijelo (primarno protutijelo) se zatim veže protutijelo koje prepoznaje određenu antigensku determinantu primarnog protutijela (sekundarno protutijelo) koje ima konjugiran enzim peroksidaze iz hrena. Peroksidaza zatim razgrađuje kemoluminiscencijski supstrat te se ta reakcija može detektirati na filmu za autoradiografiju. Nakon razdvajanja smjese proteina denaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu uz biljeg *Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard*, proteini su elektrotransferom na uređaju *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad) pri 100 V u trajanju 1 sata preneseni na *Hybond-P* PVDF membranu (Amersham Biosciences) prema opisanom protokolu u potpoglavlju 11.3.2.1. sveučilišnog priručnika *Metode u molekularnoj biologiji* (Ambriović Ristov i suradnici, 2007). Nakon prijenosa proteina na membranu, membrana je inkubirana u otopini TBS s 0,1% detergenta *Tween 20* s 3% albumina govedjeg seruma (*Albumine Bovine Fraction V* (Serva)) u volumenu od 25 ml na temperaturi od 4°C preko noći. Membrana je zatim isprana 3 puta u trajanju od 1 minute u otopini TBS s 0,1% detergenta *Tween 20*. Nakon toga je membrana inkubirana s otopinom primarnog protutijela *anti-His* iz miša razrjeđenja 1:5000 (2 µl protutijela u 10 ml otopine TBS s 0,1% detergenta *Tween 20*) na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 sata. Membrana je nakon inkubacije s primarnim protutijelima isprana 3 puta u trajanju od 5 minuta u otopini TBS s 0,1% detergenta *Tween 20*. Inkubacija membrane s otopinom sekundarnih protutijela *anti-mouse* u razrjeđenju 1:10000 (1 µl u 10 ml otopine TBS s 0,1% detergenta *Tween 20*) trajala je 1 sat na sobnoj temperaturi. Membrana je nakon toga isprana 3 puta u trajanju od 10 minuta u otopini TBS s 0,1% detergenta *Tween 20*.

2.2.31 Detekcija kemoluminiscenog signala na membrani

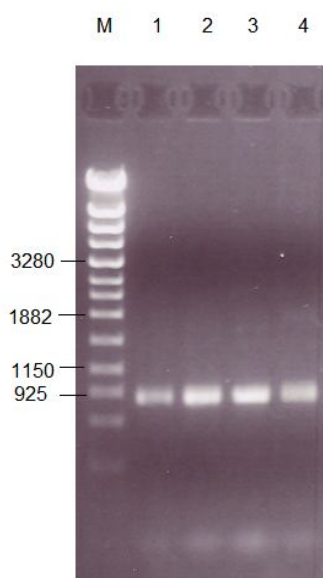
Kemoluminiscencija je emisija svjetla kao posljedica neke kemijske reakcije razgradnje. Enzimskim djelovanjem peroksidaze iz hrena na smjesu vodikovog peroksida i kemikalije luminol nastaje kemoluminiscencijski signal na membrani na mjestu vezanja sekundarnog protutijela. Kao supstrat za konjugiranu peroksidazu na sekundarnom protutijelu korištena je

otopina dobivena miješanjem 500 μ l otopine A i 12,5 μ l otopine B iz *ECL Plus Western Blotting Detection System*. Otopina je neposredno prije nanošenja na membranu pomiješana te pažljivo nanosena na membranu koja je odmah zatvorena u kazetu koja ne propušta danju svjetlost. Nakon inkubacije supstrata na membrani u trajanju od 5 minuta membrana je u potpunom mraku izložena filmu za autoradiografiju *Hyperfilm ECL* (Amersham Biosciences) u trajanju od 2 minute. Membrana je zatim stavljena u otopinu razvijачa *Kodak processing chemicals for autoradiography films, GBX developer/replenisher* (Sigma) do pojave signala na filmu, isprana u destiliranoj vodi i konačno fiksirana u fiksiru *XAF3* (3M).

3 Rezultati

3.2 Umnožavanje gena za SGNH-hidrolazu iz bakterije *S. coelicolor* s *Pfu* DNA polimerazom

Za umnožavanje gena za SGNH-hidrolazu (u daljnjem tekstu *sc2*) korištena je *Pfu* DNA polimeraza i oligonukleotidne početnice Eco-Sc2 i Hind-Sc1N (opisane u odjeljku 2.1.8) koje imaju slijedove za razgradnju restrikcijским endonukleazama *EcoRI* i *HindIII*. Uvođenjem tih mjesta za razgradnju fragment DNA s genom *sc2* dobiven umnožavanjem moguće je ligirati u streptomicetni ekspresijski plazmid pANT849 (opisan u odjeljku 2.1.10). Također, početnica Hind-Sc1N ispred stop kodona sadrži 18 nukleotida koji kodiraju za 6 histidina na C-kraju proteina. Izvršena je reakcija opisana u odjeljku 2.2.1 s 10% DMSO. Produkt reakcije kloniran je u vektor pGEM-T u bakterijskoj stanici *E. coli* soja XL1-Blue. Na plazmidima pročišćenim iz 15 probranih transformanata je određena primarna struktura kloniranog gena (korištene su oligonukleotidne početnice pUC/M13 rev i T7f opisane u odjeljku 2.1.8, postupak opisan u odjeljku 2.2.15) (rezultati nisu prikazani). Niti jedan istražen klon nije sadržavao ispravan slijed gena. Provedena je optimizacija sinteze gena *sc2* dodatkom DMSO i SSB prema opisu navedenom u odjeljku 2.2.1. Gen *sc2* je veličine 888 pb i, uz veličinu početnica za umnožavanje, bilo je predviđeno da će veličina umnoženog fragmenta biti 933 pb. Rezultat reakcije umnožavanja prikazan je na Slici 3-2.

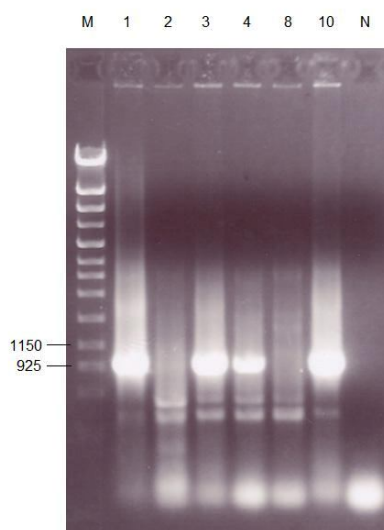


Slika 3-2. Elektroforeza produkata PCR-a s *Pfu* DNA polimerazom na 1% agaroznom gelu. U liniji označenoj s M nalazi se biljeg *Lambda-pUC Mix Marker*, u ostalim linijama PCR produkti (1 - 2,5% DMSO, 2 - 2,5% DMSO i 2 ng/ μ l SSB, 3 - 2,5% DMSO i 20 ng/ μ l SSB, 4 - 20 ng/ μ l SSB).

Reakcijska smjesa pod brojem 3 je pročišćena kompletno (opisano u odjeljku **2.2.3**). Koncentracija pročišćenog PCR produkta određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 260 nm i iznosila je 106 ng/μl (opisano u odjeljku **2.2.4**).

3.3 Direktno kloniranje PCR produkta (TA kloniranje) s genom *sc2*

Alikvot pročišćenog fragmenta s genom *sc2* ligiran je u vektor pGEM-T prema postupku opisanom u odjeljku **2.2.7**. Kompetentne bakterijske stanice *E. coli* soja XL1-Blue pripremljene su prema postupku opisanom u odjeljku **2.2.9** i transformirane su ligacijskom smjesom prema postupku opisanom u odjeljku **2.2.11**. Transformirane kolonije su probrane prema opisu u odjeljku **2.2.13**. Iz transformanata uzgojenih u tekućoj hranjivoj podlozi LB s ampicilinom izolirani su plazmidi prema postupku opisanom u odjeljku **2.2.14**. Metodom PCR-a na plazmidima izoliranim iz bakterije *E. coli* provjerena je ugradnja fragmenta u vektor pGEM-T (opisano u odjeljku **2.2.1**). Korištena je *Taq* DNA polimeraza u reakcijskoj smjesi opisanoj u odjeljku **2.2.1**, dok je kao kalup za svaku reakciju korišten pročišćeni plazmid. U reakcijama su korištene oligonukleotidne početnice Eco-Sc2 i Hind-Sc1N (opisane u odjeljku **2.1.8**). Rezultati su prikazani na Slici 3-3.

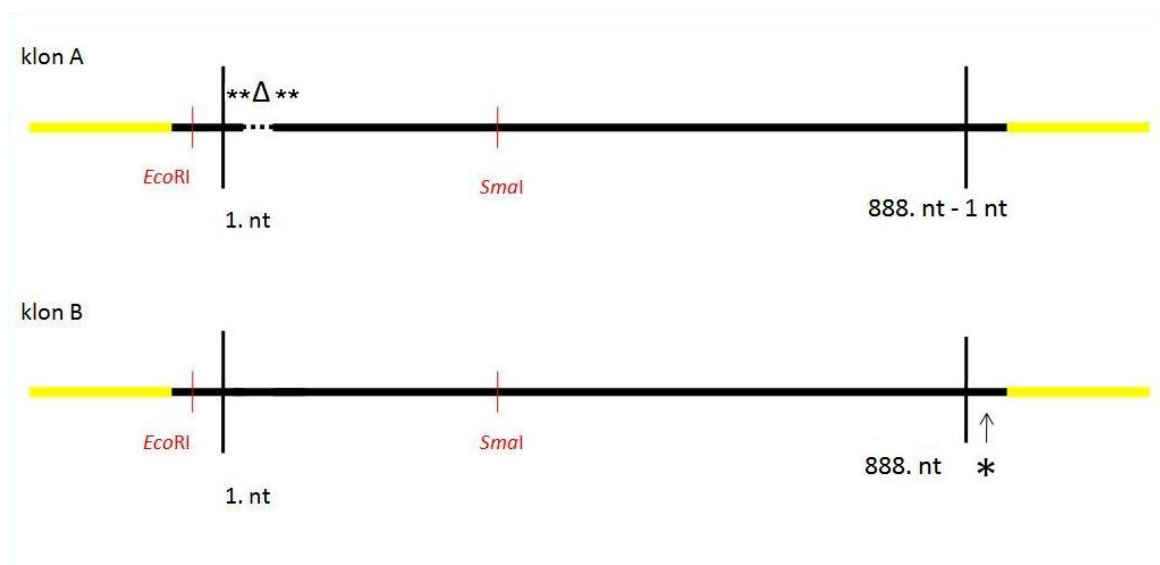


Slika 3-3. Elektroforeza produkata PCR-a na plazmidima s *Taq* DNA polimerazom iz transformiranih bakterijskih stanica *E. coli* soja XL1-Blue ligacijskom smjesom vektora pGEM-T i fragmenta s genom *sc2* na 1% agaroznom gelu. U liniji M nalazi se biljeg *Lambda-pUC Mix Marker*. U linijama 1, 2, 3, 4, 8, 10 nalaze se PCR produkti. U liniji N nalazi se negativna kontrola metode PCR.

Reakcija umnožavanja na plazmidima iz kolonija 1, 3, 4 i 10 bila je pozitivna te su fragmenti odgovarali predviđenoj veličini od 933 pb. U reakcijama umnožavanja na tim plazmidima je došlo i do nespecifičnog umnožavanja. U reakcijama umnožavanja na plazmidima iz kolonija 2 i 8 došlo je do nespecifičnog umnožavanja, no nije detektiran fragment veličine 933 pb.

3.4 Određivanje primarne strukture plazmida s genom *sc2*

Primarna struktura plazmida izoliranih iz kolonija 1, 3 i 10 s ugrađenim fragmentom s genom *sc2* određena je prema opisu u odjeljku **2.2.16**. Za reakcije su korištene oligonukleotidne početnice pUC/M13 rev i T7f (opisane u odjeljku **2.1.8**). Slijedovi nukleotida analizirani su bioinformatičkim alatima navedenima u odjeljku **2.2.17**. Analizom je utvrđeno da niti jedan od odabranih klonova nema ispravan slijed nukleotida. Za daljnji postupak odabrana su dva klona čije su značajke prikazane na shemi (Slika 3-4). Klon 1 (dalje u tekstu klon A) sadržavao je deleciju od 1 nukleotida na početku gena (u području oligonukleotidne početnice Eco-Sc2, opisana u odjeljku **2.1.8**) i višestruke supstitucije nukleotida oko mjesta delecije, dok je ostatak slijeda gena bio ispravan, kao i mjesto razgradnje restriksijskom endonukleazom *HindIII* uvedeno oligonukleotidnom početnicom Hind-Sc1N (opisana u odjeljku **2.1.8**). Drugi odabrani klon, porijeklom iz laboratorijske kolekcije klonova gena *sc2*, (dalje u tekstu klon B) imao je potpuno ispravan slijed cijelog gena, no mjesto razgradnje restriksijskom endonukleazom *HindIII* bilo je mutirano.

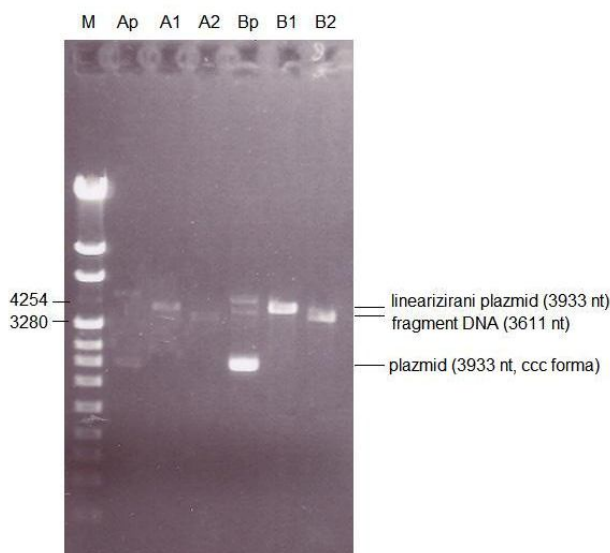


Slika 3-4. Shema klonova A i B. Žutom bojom označeni su dijelovi pojedinog klona koji pripadaju vektoru u koji su fragmenti s genom *sc2* ugrađeni. Veličina gena označena je većim crnim vertikalnim linijama uz oznake, dok su malim crvenim vertikalnim linijama označena mjesta razgradnje s restriksijskim endonukleazama *EcoRI* i *SmaI*. Malim grčkim slovom delta označen je položaj delecije u A te su manjim zvjezdicama označene supstitucije u A, dok je većom zvjezdicom označena supstitucija u B.

3.5 Enzimska razgradnja plazmida iz bakterijskih stanica *E. coli* transformiranih ligacijskom smjesom vektora i fragmenta s genom *sc2*

Zasebni alikvoti kompetentnih bakterijskih stanica *E. coli* soja XL1-Blue transformirani su plazmidima A i B prema postupku opisanom u odjeljku 2.2.11. Odabrana je po jedna kolonija sa selekcijske krute hranjive podloge LB i umnožena u tekućoj hranjivoj podlozi LB s ampicilinom za izolaciju plazmidne DNA. Plazmidi su izolirani prema postupku opisanom u odjeljku 2.2.14.

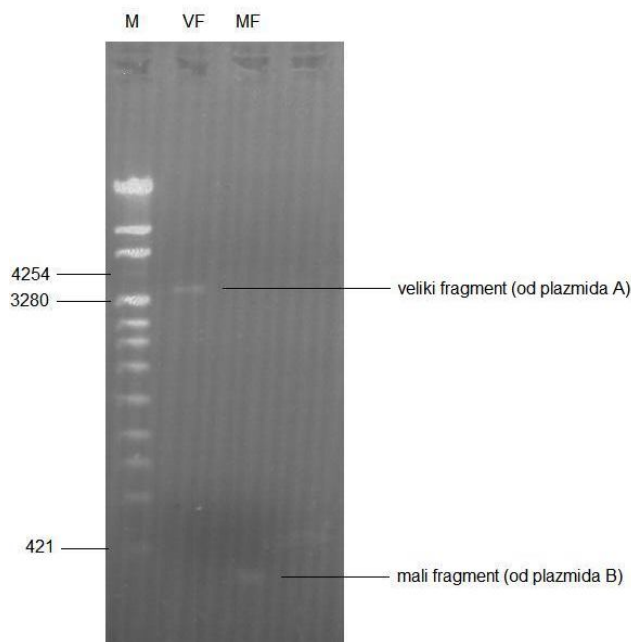
Oba plazmida podvrgnuta su enzimskoj razgradnji s restriksijskom endonukleazom *EcoRI* (opisano u odjeljku 2.2.6) i nakon toga su reakcijske smjese pročišćene kompletom (opisano u odjeljku 2.2.3). Linearizirane plazmidne molekule DNA su zatim razgrađene restriksijskom endonukleazom *SmaI*, koja razgrađuje obje plazmidne molekule na 308. nukleotidu gena (opisano u odjeljku 2.2.6). Rezultati enzimske razgradnje restriksijskim endonukleazama *EcoRI* i *SmaI* prikazani su na Slici 3-5.



Slika 3-5. Elektroforeza enzimske razgradnje lineariziranih plazmida A i B s restriksijskom endonukleazom *Sma*I na 1% agaroznom gelu. U liniji M nalazi se biljeg *Lambda-pUC Mix Marker*. U linijama Ap i Bp nalaze se nerazgrađeni plazmidi A, odnosno B. U linijama A1 i B1 nalaze se razgrađeni plazmidi A, odnosno B s restriksijskom endonukleazom *Eco*RI. U linijama A2 i B2 nalaze se produkti enzimske razgradnje restriksijskim endonukleazama *Eco*RI i *Sma*I.

U linijama A2 i B2 vidljivi su fragmenti DNA koji odgovaraju veličini od 3611 nukleotida, dok su u linijama A1 i B1 vidljivi fragmenti DNA koji odgovaraju veličini od 3933 nukleotida. U obje reakcijske smjese linearizirane plazmidne molekule DNA su razgrađene restriksijskom endonukleazom *Sma*I na dva fragmenta veličine 322 nukleotida i 3611 nukleotida.

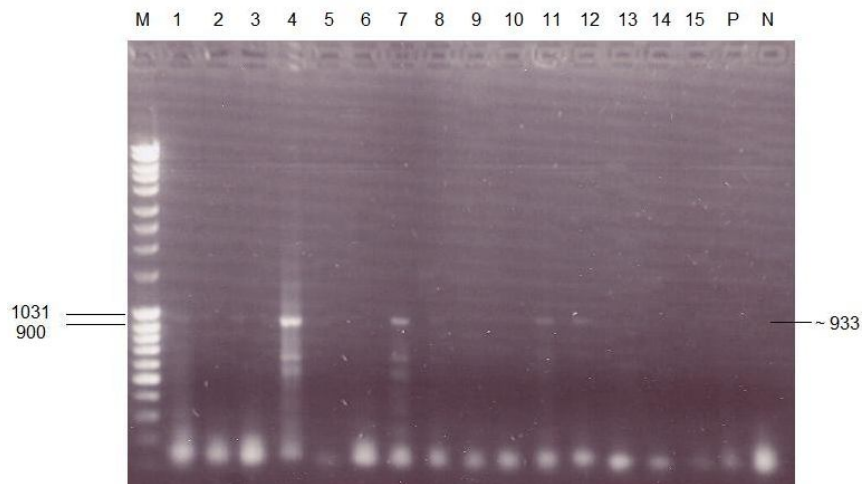
Obje reakcijske smjese su u potpunom volumenu nanosene na agarozni gel koncentracije 0,7% i nakon elektroforeze pojedini fragmenti su izrezani iz gela (opisano u odjeljku 2.2.2). Iz smjese razgrađenih molekula plazmida A izrezan je veći fragment (3611 nukleotida), dok je iz smjese razgrađenih molekula plazmida B izrezan manji fragment (322 nukleotida). Izrezani fragmenti DNA iz agaroznog gela pročišćeni su kompletno (opisano u odjeljku 2.2.3). Rezultati pročišćavanja fragmenata prikazani su na Slici 3-6.



Slika 3-6. Elektroforeza pročišćenih fragmenata nakon enzimske razgradnje restriksijskim endonukleazama *EcoRI* i *SmaI* (1% agarozni gel). U liniji M nalazi se biljeg *Lambda-pUC Mix Marker*. U liniji VF nalazi se pročišćen fragment iz smjese razgrađenog plazmida A veličine 3611 nukleotida. U liniji MF nalazi se pročišćen fragment iz smjese razgrađenog plazmida B veličine 322 nukleotida.

3.6 Prisutnost gena *sc2* u kolonijama *E. coli* soja XL-1 Blue

Pročišćeni fragmenti DNA ligirani su prema postupku opisanom u odjeljku **2.2.8**. Bakterijske stanice *E. coli* soja XL-1 Blue transformirane su ligacijskom smjesom (postupak opisan u odjeljku **2.2.11**). Transformanti su odabrani sa selekcijskih krutih hranjivih podloga LB. Nasumično je odabrano 15 kolonija te je u njima provjerena prisutnost pravilno ligiranog plazmida metodom PCR na bakterijskom staničnom lizatu (postupak opisan u odjeljku **2.2.1**). U PCR smjesi korištene su oligonukleotidne početnice Eco-Sc2 i Hind-Sc1N (opisane u odjeljku **2.1.8**). Rezultati su prikazani na Slici 3-7.



Slika 3-7. Elektroforeza produkata PCR-a s *Taq* DNA polimerazom na bakterijskom staničnom lizatu transformiranih bakterijskih stanica *E. coli* soja XL1-Blue ligacijskom smjesom fragmenata DNA na 1% agaroznom gelu. U liniji M nalazi se biljeg *Lambda-pUC Mix Marker*. U linijama 1-15 nalaze se PCR produkti na nasumično odabranim kolonijama koje su obilježene brojevima 1-15. U liniji P se nalazi PCR produkt na koloniji pozitivnoj na fragment. U liniji N nalazi se negativna kontrola metode PCR.

Fragment DNA odgovarajuće veličine (933 pb) uočen je u reakcijama na bakterijskom staničnom lizatu dobivenom iz kolonija 4, 7, 11 i 12. Među njima je odabrana kolonija 11 koja je nacijepljena u tekuću hranjivu podlogu LB s ampicilinom. Iz bakterijske kulture je izoliran rekombinantni plazmid (opisano u odjeljku **2.2.14**).

3.7 Određivanje primarne strukture rekombinantnog plazmida

Izoliranom rekombinantnom plazmidu određena je primarna struktura (opisano u odjeljku **2.2.16**). Korištene su početnice pUC/M13 rev, T7f i Sc2-F-inseq (opisane u odjeljku **2.1.8**). Analizom s bioinformatičkim alatima (opisano u odjeljku **2.2.17**) je utvrđeno da je gen *sc2* ispravnog slijeda. Srađivanje je prikazano na Slici 3-8.

sc2	-----	
klon11	AGTCTCACACAAGCTTATTTTAAGGTTGACCTATAGAAATACTCAAGCTATGCATCCAAC	60
sc2	-----	
klon11	GCGTTGGGAGCTTTCCTCTATATGGTCGACCTGCAAGCGGCCACTAGTGATTGCAA	120
sc2	-----ATGCCGAAGCCTGCCCTTCGCCGTGTCATGACCGCGACAGTCGCCGCCG	49
klon11	CGGAGGTTCCATGCCGAAGCCTGCCCTTCGCCGTGTCATGACCGCGACAGTCGCCGCCG	180

sc2	TCGGCACGCTCGCCCTCGGCCTCACCAGCGCCACCGCCACGCCGCGCCCGCCAGGCCA	109
klon11	TCGGCACGCTCGCCCTCGGCCTCACCAGCGCCACCGCCACGCCGCGCCCGCCAGGCCA	240

sc2	CTCCGACCTGGACTACGTCGCCCTCGGCGACAGCTACAGCGCCGGCTCCGGCGTCTGTC	169
klon11	CTCCGACCTGGACTACGTCGCCCTCGGCGACAGCTACAGCGCCGGCTCCGGCGTCTGTC	300

sc2	CCGTCGACCCCGCCAACTGCTCTGTCTGCGCTCGACGGCCAACTACCCACAGTCATCG	229
klon11	CCGTCGACCCCGCCAACTGCTCTGTCTGCGCTCGACGGCCAACTACCCACAGTCATCG	360

sc2	CGGACACGACGGGCGCCCGCTCACGGACGTACCTGCGGCGCCGCGCAGACCCGGACT	289
klon11	CGGACACGACGGGCGCCCGCTCACGGACGTACCTGCGGCGCCGCGCAGACCCGGACT	420

sc2	TCACGCGGGCCAGTAACCGGCGTTCGCGACCCAGTTGGACGCGCTCGGCACCGGCACGG	349
klon11	TCACGCGGGCCAGTAACCGGCGTTCGCGACCCAGTTGGACGCGCTCGGCACCGGCACGG	480

sc2	ACCTGGTCAGGCTCACCATCGGCGGCAACGACAACAGCACCTTCATCAACGCCATCACGG	409
klon11	ACCTGGTCAGGCTCACCATCGGCGGCAACGACAACAGCACCTTCATCAACGCCATCACGG	540

sc2	CCTGCGGCACGGCGGGTGTCTCAGCGGCGGCAAGGGCAGCCCTGCAAGGACAGGCACG	469
klon11	CCTGCGGCACGGCGGGTGTCTCAGCGGCGGCAAGGGCAGCCCTGCAAGGACAGGCACG	600

sc2	GCACCTCCTTCGACGACGAGATCGAGGCCAACACGTACCCCGCGCTCAAGGAGGCGCTGC	529
klon11	GCACCTCCTTCGACGACGAGATCGAGGCCAACACGTACCCCGCGCTCAAGGAGGCGCTGC	660

sc2	TCGGCGTCCGCGCCAGGGCTCCCCACGCCAGGGTGGCGGCTCTCGGCTACCCGTGGATCA	589
klon11	TCGGCGTCCGCGCCAGGGCTCCCCACGCCAGGGTGGCGGCTCTCGGCTACCCGTGGATCA	720

sc2	CCCCGGCCACCGCCGACCCGTCCTGCTTCTGAAAGCTCCCCCTCGCCGCGGTGACGTGC	649
klon11	CCCCGGCCACCGCCGACCCGTCCTGCTTCTGAAAGCTCCCCCTCGCCGCGGTGACGTGC	780

sc2	CCTACCTGCGGGCCATCCAGGCACACCTCAACGACGCGGTCCGGCGGGCCGCCGAGGAGA	709
klon11	CCTACCTGCGGGCCATCCAGGCACACCTCAACGACGCGGTCCGGCGGGCCGCCGAGGAGA	840

sc2	CCGGAGCCACTACGTGGACTTCTCCGGGGTGTCCGACGGCCACGACGCTGCGAGGCC	769
klon11	CCGGAGCCACTACGTGGACTTCTCCGGGGTGTCCGACGGCCACGACGCTGCGAGGCC	900

sc2	CCGGCACCCGCTGGATCGAACCGCTGCTTTCGGGCACAGCCTCGTCCCGTCCACCCCA	829
klon11	CCGGCACCCGCTGGATCGAACCGCTGCTTTCGGGCACAGCCTCGTCCCGTCCACCCCA	960

sc2	ACGCCCTGGGCGAGCGCGCATGGCCGAGCACACGATGGACGTCCTCGGCCTGGAC	888
klon11	ACGCCCTGGGCGAGCGCGCATGGCCGAGCACACGATGGACGTCCTCGGCCTGGAC	1020

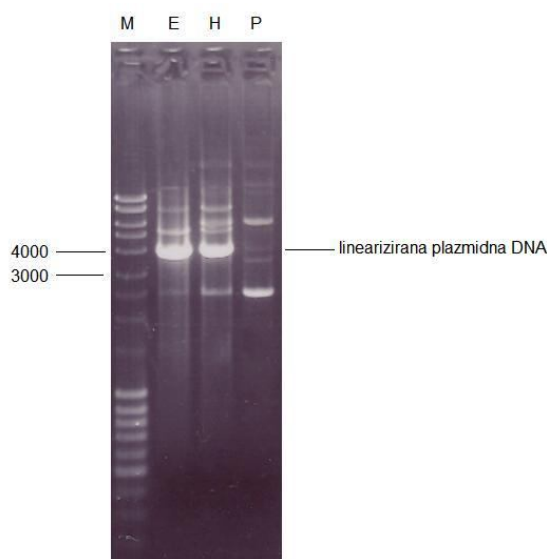
sc2	-----	
klon11	ACCACCACCACCTGAAAGCTGGGGAATCCCAGCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCCA	1080
sc2	-----	
klon11	CGTTCGGGCCCTAATG	1098

Slika 3-8. Svrnjenje nukleotidnih slijedova gena *sc2* i fragmenta DNA s genom *sc2* dobivenog rekombinacijom. Crvenom bojom naznačena su mjesta razgradnje restrikcijskih endonukleaza (*EcoRI* ispred gena, *SmaI* unutar gena *HindIII* mjesto iza gena). Žutom bojom je naznačen start kodon, a zelenom stop kodon. U plavoj boji je obilježen nukleotidni niz koji kodira za 6 histidina na C-kraju proteina.

3.8 *In vivo* sinteza nemetiliranog fragmenta DNA s genom *sc2*

Bakterijske stanice *E. coli* soja ER2925 koje ne metiliraju DNA transformirane su rekombinantnim plazmidom. Stanice su pripremljene prema postupku opisanom u odjeljku 2.2.9. Transformacija stanica izvršena je prema postupku opisanom u odjeljku 2.2.11. Nasumično je odabrana jedna kolonija sa selektivne krute hranjive podloge LB i nacijepljena u tekuću hranjivu podlogu LB s ampicilinom. Iz prekonoćne bakterijske kulture izolirana je plazmidna DNA (postupak opisan u odjeljku 2.2.14) koja nije metilirana.

Pročišćeni rekombinantni plazmid iz transformiranih bakterijskih stanica *E. coli* soja ER2925 podvrgnut je enzimskoj razgradnji s restriksijskim endonukleazama *EcoRI* i *HindIII* u odvojenim reakcijskim smjesama (opisano u odjeljku 2.2.6). Enzimska razgradnja plazmidne DNA prikazana je na Slici 3-9.



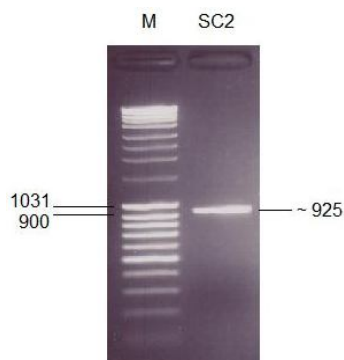
Slika 3-9. Elektroforeza rekombinantnog plazmida iz transformiranih bakterija *E. coli* soja ER2925 razgrađenog s restriksijskom endonukleazom *EcoRI*, odnosno *HindIII* (1% agarozni gel). U liniji M nalazi se biljeg *Mass Ruler DNA Ladder Mix*. U linijama E i H nalaze se produkti razgradnje plazmidne DNA s restriksijskom endonukleazom *EcoRI* (E), odnosno *HindIII* (H). U liniji P nalazi se nerazgrađena plazmidna DNA izolirana iz transformiranih bakterija *E. coli* soja ER2925.

Ukupne reakcijske smjese pročišćene su kompletom (opisano u odjeljku 2.2.3) i linearne molekule DNA su zatim podvrgnute enzimskoj razgradnji s restriksijskim endonukleazama *EcoRI* i *HindIII*, ovisno o razgradnji u prethodnom koraku. Rezultati enzimske razgradnje prikazani su na Slici 3-10.



Slika 3-10. Elektroforeza linearizirane rekombinantne plazmidne DNA iz transformiranih bakterija *E. coli* soja ER2925 razgrađene s restriksijskom endonukleazom *EcoRI*, odnosno *HindIII* (1% agarozni gel). U liniji M nalazi se biljeg *Mass Ruler DNA Ladder Mix*. U linijama E/H i H/E nalaze se produkti razgradnje linearizirane rekombinantne plazmidne DNA s restriksijskom endonukleazom *HindIII*, odnosno *EcoRI*. U liniji P nalazi se nerazgrađena plazmidna DNA izolirana iz transformiranih bakterija *E. coli* soja ER2925.

Dobiven je fragment DNA koji odgovara veličini od 925 nukleotida. Reakcijske smjese su spojene i pročišćene elektroforezom na 1% agaroznom gelu (opisano u odjeljku 2.2.2). Fragment DNA od 925 nukleotida izrezan je iz agaroznog gela i pročišćen kompletom (opisano u odjeljku 2.2.3). Rezultat pročišćavanja prikazan je na Slici 3-11.

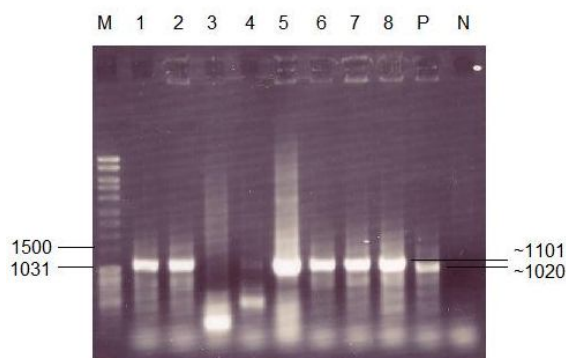


Slika 3-11. Elektroforeza pročišćenog fragmenta DNA dobivenog enzimskom razgradnjom rekombinantnog plazmida iz transformirane bakterije *E. coli* soja ER2925 (1% agarozni gel). U liniji M nalazi se biljeg *Mass Ruler DNA Ladder Mix*. U liniji SC2 nalazi se pročišćeni fragment DNA s genom *sc2*.

3.9 Ligacija nemetiliranog fragmenta DNA s genom *sc2* i vektora pANT849

Pročišćeni fragment (925 nukleotida) koji sadrži gen za *sc2* ligiran je sa streptomycinom ekspresijskim vektorom pANT849 (vektor opisan u odjeljku 2.1.10, postupak opisan u odjeljku 2.2.8). Protoplasti bakterijskih stanica *S. lividans* soja TK23, koji su pripremljeni prema postupku opisanom u odjeljku 2.2.10, transformirani su ligacijskom smjesom (opisano u odjeljku 2.2.12). Transformanti su nacijepljeni na krutu, pa u tekuću hranjivu podlogu CRM s tiostreptomom (opisano u odjeljku 2.2.18 i odjeljku 2.2.19). Nasumično je odabrano 8 transformanata za izolaciju plazmidne DNA (postupak opisan u odjeljku 2.2.15).

Pročišćeni plazmidi iz probranih bakterija *S. lividans* soja TK23 korišteni su kao kalup za provjeru ugradnje fragmenta sa *sc2* u vektor pANT849 metodom PCR-a na plazmidima opisanom u odjeljku 2.2.1 s oligonukleotidnim početnicama FANT i RANT (opisane u odjeljku 2.2.8). Rezultati provjere prikazani su na Slici 3-12.



Slika 3-12. Elektroforeza produkata PCR-a s *Taq* DNA polimerazom na plazmidima pročišćenim iz transformiranih bakterijskih stanica *S. lividans* soja TK23 ligacijskom smjesom vektora pANT849 i fragmenta s genom *sc2* na 1% agaroznom gelu. U liniji M nalazi se biljeg *Mass Ruler DNA Ladder Mix*. U linijama 1-8 nalaze se PCR produkti na plazmidima obilježenima brojevima 1-8. U liniji P se nalazi PCR produkt na vektoru pANT849 s ugrađenim fragmentom manje veličine kao pozitivna kontrola PCR-a. U liniji N nalazi se negativna kontrola metode PCR.

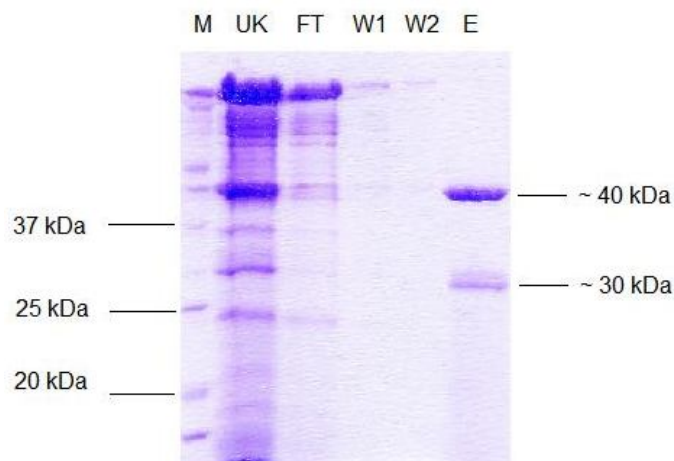
U reakcijskim smjesama s plazmidima iz kolonija 1, 2, 5, 6, 7 i 8 vidljivi su fragmenti koji odgovaraju veličini od 1101 pb, čime je potvrđena ugradnja fragmenta u vektor pANT849 u kolonijama. U pozitivnoj kontroli PCR-a vidljiv je fragment koji odgovara veličini od 1020 pb, što je bilo i predviđeno.

3.10 Optimizacija uzgoja transformiranih bakterija *S. lividans* soja TK23

Kolonija 7 odabrana je za daljnji uzgoj za konačnu izolaciju proteina. Optimizacija uzgoja opisana je u odjeljku 2.2.21. Rezultat ovih istraživanja je ukazao da je najveća lipolitička aktivnost supernatanta kultura transformiranih bakterijskih stanica *S. lividans* soja TK23 u drugom danu uzgoja u tekućoj hranjivoj podlozi GR₂d bez pufera uz dodatak tiostreptona.

3.11 Pročišćavanje proteina Sc2 iz supernatanta kultura transformiranih bakterijskih stanica *S. lividans* soja TK23

Kolonija 7 uzgojena je u tekućoj hranjivoj podlozi GR₂d bez pufera uz dodatak tiostreptona ukupnog volumena 2 litre prema postupku opisanom u odjeljku 2.2.23. Iz supernatanta kulture istaloženi su izvanstanični proteini dodavanjem amonijeva sulfata do konačnog udjela 80% prema postupku opisanom u odjeljku 2.2.24. Proteini su dijalizirani (opisano u odjeljku 2.2.25) i pročišćeni afinitetnom metalnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu (opisano u odjeljku 2.2.27). Prikupljene frakcije analizirane su metodom SDS-PAGE (opisana u odjeljku 2.2.28) što je prikazano na Slici 3-13.



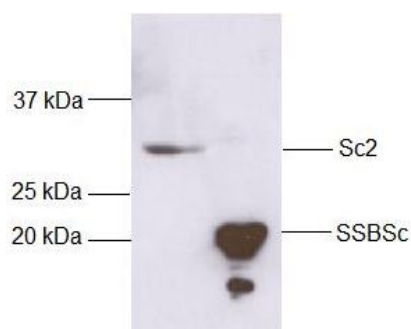
Slika 3-13. SDS-PAGE frakcija nakon afinitetne metalne kromatografije na Ni-NTA agarozu. U liniji M nalazi se biljeg *Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope*. U liniji UK nalazi se ukupni uzorak proteina prije afinitetne metalne kromatografije na Ni-NTA. U liniji FT nalazi se preostali uzorak proteina nakon prolaska kroz kolonu. U linijama W1 i W2 nalaze se frakcije ispiranja kolone. U liniji E nalazi se frakcija u kojoj je eluiran protein.

Molekulska masa proteina eluiranih s kolone (linija E na Slici 3-13) određena je prema biljegu *Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope* i iznosi ~40 i ~30 kDa. Manja vrpca približno odgovara molekulknoj masi SGNH-hidrolaze (Sc2) iz bakterije *S. coelicolor* soja A3(2) (Q93J06). Iz slike je vidljivo da se na Ni-NTA agarozu jako veže protein koji odgovara molekulknoj masi ~40 kDa.

Tijekom pročišćavanja praćena je aktivnost uzorka prema supstratu 4-nitrofenil palmitatu (opisano u odjeljku **2.2.22**) kao provjera vezanja proteina na kolonu i njegove elucije s kolone. Aktivnost je uočena u uzorku prije pročišćavanja i u eluatu, dok aktivnosti nije bilo među nevezanim proteinima.

3.12 Western analiza

Western analiza izvršena je prema postupku opisanom u odjeljcima **2.2.30** i **2.2.31**. Svrha ovog postupka bila je provjera uspješne izolacije proteina Sc2 sa 6 histidina na C-kraju proteina. Pozitivna kontrola Western analize proteina bio je protein koji se veže na jednolančanu DNA iz bakterije *S. coelicolor* soja A3(2) obilježen sa 6 histidina na N-kraju proteina, veličine 21,3 kDa. Rezultat kemoluminiscencije prikazan je na Slici 3-14.



Slika 3-14. Western analiza uzorka sa Sc2. Horizontalnim crtama naznaćena je SGNH-hidrolaza (Sc2) i pozitivna kontrola (protein koji se veže za jednolančanu DNA iz bakterije *S. coelicolor* obilježen sa 6 histidina na N-kraju proteina, SSBSc), kao i veličine biljega *Precision Plus Protein Standard Kaleidoscope*.

Signal je detektiran samo na vrpci proteina koja odgovara SGNH-hidrolazi. Pozitivna kontrola također je dala signal, dok vrpca s proteinom veličine ~40 kDa nije dala signal.

4 Rasprava

Bakterijske SGNH-hidrolaze su značajna grupa enzima koja još uvijek nije dobro istražena, ni strukturalno ni biokemijski. Dosad su klonirana tri gena iz roda *Streptomyces* koja pripadaju ovoj grupi enzima, a po svojim biokemijskim svojstvima svrstani su u lipaze. To su rijetki primjeri bakterijskih lipaza iz SGNH obitelji. Prema dostupnim literaturnim podacima poznata je još samo jedna bakterijska lipaza ovog tipa iz bakterije *Xenorhabdus luminescens* (Wang i Dowds, 1993). Najbolje je biokemijski istražena SGNH-lipaza iz bakterije *S. rimosus* soja R6-554W (Q93MW7) (Vujaklija i suradnici, 2002). Dvije lipaze iz bakterije *S. coelicolor* soja A3(2) su nedavno klonirane i djelomično biokemijski istražene (Q9S2A5 i Q93J06) (Côté i Shareck, 2008). Jedna od lipaza iz bakterije *S. coelicolor* soja A3(2) (Q9S2A5) s dodatkom od 6 histidina na C-kraju proteina je dobro biokemijski istražena (Bielen i suradnici, 2009). Cilj ovog rada bio je kloniranje i ekspresija SGNH-hidrolaze iz bakterije *S. coelicolor* soja A3(2) (Q93J06) s dodanih 6 histidina na C-kraj proteina u svrhu uspostavljanja učinkovite i brze metode za pročišćavanje proteina kako bi se nakon toga provela detaljnija biokemijska karakterizacija.

Kao što je prikazano u poglavlju Rezultati, za umnožavanje gena *sc2* korištena je *Pfu* DNA polimeraza koja ima 3' – 5' egz nukleaznu aktivnost što ju čini polimerazom s vrlo malom mogućnošću pogreške umetanja nekomplementarne baze u rastući lanac DNA („high fidelity polymerase“). Frekvencija pogreške ove polimeraze je $2,6 \cdot 10^{-6}$ nukleotida po ciklusu PCR-a te je bilo očekivano da će se kloniranjem produkta *Pfu* DNA polimeraze u vektor brzo pronaći klon ispravnog slijeda. Reakcija PCR izvođena je uz dodatak DMSO (koncentracije 10%) koji se koristi za umnožavanje molekula DNA visokog GC sastava u kojima je moguće stvaranje izuzetno stabilnih sekundarnih struktura (strukture ukosnica) na jednolančanoj DNA. Ovakve strukture otežavaju ili blokiraju replikaciju DNA tijekom PCR reakcije. Iako se DMSO dodaje zbog bolje učinkovitosti reakcije umnožavanja DNA fragmenata visokog udjela gvanina i citozina, dosadašnje iskustvo u Laboratoriju za molekularnu genetiku pokazalo je da povećane koncentracije DMSO mogu također uzrokovati krivo sparane baze i povećanje mutacija u umnoženim fragmentima. Kako niti jedan istražen klon od 15 istraženih nije imao ispravan slijed nukleotida, uočena visoka stopa mutacija pripisana je korištenoj koncentraciji DMSO. Zbog toga je reakcija umnožavanja modificirana, istražene su smanjene koncentracije DMSO, a u reakciju je uveden SSB protein iz *S. coelicolor* soja A3(2) u različitim koncentracijama. Za proteine koji se vežu na jednolančanu DNA je poznato da uspješno uklanjaju stabilne sekundarne strukture DNA molekula tijekom polimerizacije (Myers i

Romano, 1997). Nakon ovih modifikacija rezultati su pokazali smanjenje broja mutacija tijekom PCR reakcije. Unatoč tome treba istaknuti da nije dobiven fragment DNA s genom *sc2* ispravnog slijeda. Kako je opisano u Rezultatima, rekombinacijom fragmenata DNA iz dva različita klona dobiven je ispravan slijed gena *sc2*.

Gen *sc2* nije direktno kloniran u ekspresijski vektor za streptomicete. Razlog tome je što je nemetiliranost DNA važna za uspješnost transformacije streptomiceta. Za *in vivo* sintezu nemetiliranog fragmenta DNA s genom *sc2* koristila se bakterija *E. coli* ER2925 (genotipa *dam⁻ dcm⁻*) Dam metilaza kodirana genom *dam* metilira bazu A na N⁶ položaju u slijedu GATC, dok Dcm metilaza kodirana genom *dcm* metilira drugu bazu C u slijedovima CCAGG ili CCTGG na C⁵ položaju. Kompleksniji pristup, s jednim međukloniranjem, primijenjen je zato što ova bakterija ima nisku transformabilnost. Kako je pokazano u Rezultatima, nakon dobivanja nemetiliranog fragmenta DNA, gen *sc2* uspješno je ligiran u vektor pANT849 i takvim su konstruktom transformirane bakterije *S. lividans* soja TK23 za koji je utvrđeno da nema nikakve izvanstanične lipazne aktivnosti (Vujaklija i suradnici, 2003).

Prije uzgoja transformanta s ispravnim slijedom gena *sc2* bilo je potrebno istražiti rast i tijek sinteze proteina kod izabranog klona u različitim hranjivim podlogama. Kao što je prikazano u Rezultatima, uočeno je da je aktivnost proteina Sc2 prema supstratu 4-nitrofenil palmitatu najveća u 2. danu uzgoja. Ovaj rezultat je bio drugačiji u odnosu na prije istraženu sintezu proteina Sc1 (Bielen i suradnici, 2009) i proteina SrL (usmeno priopćenje, A. Bielen). Kod ovih proteina najveća sinteza je bila u kasnijoj stacionarnoj fazi rasta bakterije *S. lividans* (najčešće 6. do 7. dan). Također treba napomenuti da je uspoređivanjem maksimalnih izmjerenih aktivnosti prema istom supstratu (4-nitrofenil palmitat) aktivnost proteina Sc2 bila približno 7 puta manja od aktivnosti proteina Sc1 (usmeno priopćenje, A. Bielen). Autori Côté i Shareck (2008) koji su klonirali i eksprimirali gen *sc2* nisu izvijestili o dobivenim aktivnostima proteina Sc2 u apsolutnim mjernim jedinicama, stoga nije moguća usporedba prinosa. Uz to, rezultati nisu usporedivi zbog drugačijeg sustava za ekspresiju. Jedan od mogućih uzroka slabe aktivnosti proteina Sc2 može biti slaba sinteza, no kako se radi o istom promotoru s kojeg se prepisuje i gen za protein Sc1, slaba sinteza možda se može pripisati lošijoj translaciji gena *sc2* u heterolognom sustavu, a ne transkripciji. Također, u obzir treba uzeti moguće neispravno smatanje proteina u bakteriji *S. lividans*. Uz to, dodatak 6 histidina na C-kraju proteina, koji se često koristi za olakšano pročišćavanje proteina, možda narušava

strukturu proteina i tako uzrokuje smanjenu aktivnost. U sljedećim eksperimentima potrebno je istražiti kakav je utjecaj dodatka 6 histidina na C-kraj proteina, no treba napomenuti da je to istraženo za drugu SGNH-lipazu iz bakterije *S. coelicolor* (Sc1) te da nije uočena razlika u aktivnosti i stabilnosti ovog enzima (Bielen i suradnici, 2009). Kao primjeri se još mogu navesti podaci o utjecaju 6 histidina na C-kraju proteina kod dva GDS(L) enzima: tioesteraze iz bakterije *E. coli* (Lee i suradnici, 1999) i arilesteraze iz bakterije *Vibrio mimicus* (Lee i suradnici, 1997). Podaci iz tih radova također ukazuju na to da aktivnost niti jednog enzima nije bila narušena dodatkom 6 histidina na C-kraj proteina.

Nakon pročišćavanja s Ni-NTA agarozom u proteinskom uzorku je, kao što je prikazano u Rezultatima, bio je samo jedan dodatni protein. Potpuno izdvajanje proteina Sc2 iz ove proteinske smjese pokušano je s gel-filtracijom (podaci nisu prikazani). Pristup nije bio učinkovit jer je tijekom pročišćavanja izgubljeno više od 99% početne aktivnosti proteina. Mogući uzrok gubitka aktivnosti je pH vrijednost u kojoj se protein tijekom pročišćavanja nalazio. Autori Côté i Shareck (2008) navode da se stabilnost proteina Sc2 gubi nakon inkubacije u pH rasponu 6,5-11. Unatoč modifikacijama postupka pročišćavanja s obzirom na pH vrijednost, u postupku pročišćavanje postoje još dodatni koraci koji bi se u budućim eksperimentima mogli optimizirati.

Analiza aminokiselinskog slijeda proteina Sc2 alatom SignalP 3.0 za predviđanje signalnog slijeda proteina Gram-pozitivnih bakterija ukazala je na nepostojanje signalnog slijeda u ovoj SGNH-hidrolazi (rezultati nisu prikazani), iako je ovaj protein anotiran kao izvanstanični. U odnosu na Sc1 i SrL, Sc2 nema sačuvan klasični signalni slijed (Vujaklija i suradnici, 2002 i Bielen i suradnici, 2009). Ovaj podatak upućuje na mogućnost da je Sc2 unutarstanični protein, što inicira budući slijed istraživanja. Masenom spektrometrijom bit će potrebno istražiti N-kraj proteina iz supernatanta te će se istražiti zaostaje li enzim unutar stanice i postoji li aktivnost enzima unutar stanice.

5 Zaključak

- Gen koji kodira za SGNH-hidrolazu iz bakterije *S. coelicolor* soja A3(2) s dodanih 6 histidina na C-kraj proteina uspješno je kloniran i eksprimiran u heterolognom sustavu.
- Uspostavljena je metoda pročišćavanja proteina taloženjem s amonijevim sulfatom i afinitetnom kromatografijom na nosaču s imobiliziranim metalom. Gotovo svi proteini osim jednog (~40 kDa) su učinkovito uklonjeni na koloni s Ni-NTA agarozom. Nakon primjene gel-filtracije Sc2 protein je gotovo potpuno izgubio aktivnost.
- Potrebne su modifikacije metode pročišćavanja proteina u svrhu očuvanja aktivnosti.
- Analiza softverom SignalP 3.0 za predviđanje signalnog slijeda proteina (za Gram-pozitivne bakterije) nije prepoznala signalni slijed u SGNH-hidrolazi (Q93J06), što upućuje na mogućnost da je ovaj protein unutarstaničan. U istraživanjima koja slijede potrebno je provjeriti N-kraj proteina iz supernatanta i istražiti prisustvo i aktivnost proteina unutar stanice.

6 Literatura

Abramić M., Leščić I., Korica T., Vitale Lj., Saenger W., Pigac J. (1999): Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme Microbiol Technol* 25:522-529

Akoh C.C., Lee G.-C., Liaw Y.-C., Huang T.-H., Shaw J.-F. (2004): GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res.* 43: 534-552

Ambriović Ristov A., Brozović A., Bruvo Mađarić B., Četković H., Herak Bosnar M., Hranilović D., Katušić Hećimović S., Meštović Radan N., Mihaljević S., Slade N., Vujaklija D. (2007): *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Arpigny J.L., Jaeger K.-E. (1999): Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343: 177-183

Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeño-Tárraga A.-M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C.W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.-H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M.-A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell D.G., Parkhill J., Hopwood D.A. (2002): Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417:141-147

Bielen A., Četković H., Long P.F., Schwab H., Abramić M., Vujaklija D. (2009): The SGNH-hydrolase of *Streptomyces coelicolor* has (ar)lyesterase and a true lipase activity. *Biochimie* 91:390-400

Brenner S. (1988): The molecular evolution of genes and proteins: A tale of two serines. *Nature* 334:528-530

Clark J. M. (1988): Novel non – templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 16:9677-9686

Côté A., Shareck F. (2008): Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Enzyme Microb Technol* 42:381–388

DeSanti C.L., Strohl W.R. (2003): Characterization of the *Streptomyces* sp. strain C5 *snp* Locus and development of *snp*-derived expression vectors. *Appl Environ Microbiol* 69:1647-1654

Gupta R., Gupta N., Rathi P. (2004): Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:763-781

Jaeger K.-E., Eggert T., Eipper A., Reetz M.T. (2001): Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:519–530

Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. (2000): Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich.

Lee Y.L., Chang R.C., Shaw J.F. (1997): Facile purification of a C-terminal extended His-tagged *Vibrio mimicus* arylesterase and characterization of the purified enzyme. *J Am Oil Chem Soc* 74:1371-1376

Lee Y.L., Su M.S., Huang T.H., Shaw J.F. (1999): C-terminal His-tagging results in substrate specificity changes of the thioesterase I from *Escherichia coli*. *J Am Oil Chem Soc* 76:1113-1118

Myers T.W., Romano L.J. (1997): Mechanism of stimulation of T7 DNA polymerase by *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein (SSB). *J Biol Chem* 263: 17006-17015

Redenbach M., Kieser H.M., Denapaite D., Eichner A., Cullum J., Kinashi H., Hopwood D.A. (1996): A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol Microbiol* 21:77-96

Schrempf H. (2006): The Family Streptomycetaceae, Part II: Molecular Biology. Prokaryotes 3:605-622

Upton C., Buckley J.T. (1995): A new family of lipolytic enzymes? Trends Biochem Sci 20:178-179

Vujaklija D., Abramić M., Lešćić I., Maršić T., Pigac J. (2003): *Streptomyces rimosus* GDS(L) lipase: production, heterologous overexpression and structure – stability relationship. Food Technol Biotechnol 41:89-93

Vujaklija D., Schröder W., Abramić M., Zou P., Lešćić I., Franke P., Pigac J. (2002): A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. Arch Microbiol 178:124-130

Wang H., Dowds B.C.A. (1993): Phase variation in *Xenorhabdus luminescens*: Cloning and sequencing of the lipase gene and analysis of its expression in primary and secondary phases of the bacterium. J Bacteriol 175:1665-1673

Popis kratica

APS	amonijev peroksodisulfat
DMSO	dimetilsulfoksid
DTT	ditiotreitol
EDTA	etildiamintetraoctena kiselina
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani broth
MES	2-(N-morfolino)etan sulfonska kiselina
NTA	nitriloctena kiselina
PEG	polietilen glikol
SDS	natrijev dodecilsulfat
SOC	Super Optimal Catabolite repression
TAE	Tris Acetate EDTA
TBS	Tris Borate EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TES	N-Tris-(hidroksimetil)-metil-2-aminoetan sulfonska kiselina
X-Gal	5-brom-4-klor-3-indolil-beta-D-galaktopiranozid