



Univerza v Mariboru

Fakulteta za naravoslovje
in matematiko

MIKROBNA BIOTEHNOLOGIJA

Skripta z navodili za vaje za študijski program Biologija

Janja Trček

Maribor, 2018



MIKROBNA BIOTEHNOLOGIJA

Skripta z navodili za vaje za študijski program Biologija

Avtorica:
dr. Janja Trček

Marec 2018

- Naslov:** Mikrobna biotehnologija
- Podnaslov:** Skripta z navodili za vaje za študijski program Biologija
- Avtorica:** izr. prof. dr. Janja Trček (Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko)
- Strokovna recenzija:** red. prof. dr. Hrvoje Petković (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta),
doc. dr. Tomaž Accetto (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta).
- Jezikovna recenzija:** Mojca Garantini, univ. prof. slov. j. in knjiž.
- Tehnična urednika:** izr. prof. dr. Janja Trček (Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko),
Jan Perša (Univerzitetna založba Univerze v Mariboru).
- Oblikovanje ovitka:** Jan Perša (Univerzitetna založba Univerze v Mariboru)
- Grafične priloge:** Avtorica.

Izdajateljica:

Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko
Koroška cesta 160, 2000 Maribor, Slovenija
tel. +386 2 229 38 44, faks +386 2 251 81 80
<http://www.fnm.um.si>, dekanat.fnm@um.si

Založnik:

Univerzitetna založba Univerze v Mariboru
Slomškov trg 15, 2000 Maribor, Slovenija
tel. +386 2 235 52 76, faks +386 2 252 32 45
<http://press.um.si>, zalozba@um.si

Izdaja: Prva izdaja

Vrsta publikacije: Elektronska knjiga

Dostopno na: <http://press.um.si/index.php/ump/catalog/book/318>

Izid: Maribor, marec 2018

© Univerzitetna založba Univerze v Mariboru

Vse pravice pridržane. Brez pisnega dovoljenja založnika je prepovedano reproduciranje, distribuiranje, predelava ali druga uporaba tega dela ali njegovih delov v kakršnemkoli obsegu ali postopku, vključno s fotokopiranjem, tiskanjem ali shranjevanjem v elektronski obliki.

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Univerzitetna knjižnica Maribor

579:60(075.8)(076)(0.034.2)

TRČEK, Janja

Mikrobna biotehnologija [Elektronski vir] : skripta z navodili za vaje za študijski program Biologija / avtorica Janja Trček. - 1. izd. - El. knjiga. - Maribor : Univerzitetna založba Univerze, 2018

Način dostopa (URL): <http://press.um.si/index.php/ump/catalog/book/318>

ISBN 978-961-286-143-8 (pdf)

COBISS.SI-ID [94145025](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:si:coibis-94145025)

ISBN: 978-961-286-143-8 (PDF)

DOI: <https://doi.org/10.18690/978-961-286-143-8>

Cena: Brezplačen izvod

Odgovorna oseba založnika: red. prof. dr. Žan Jan Oplotnik, prorektor Univerze v Mariboru.

Mikrobna biotehnologija

Skripta z navodili za vaje za študijski program Biologija

JANJA TRČEK

Povzetek Mikrobna biotehnologija – skripta z navodili za vaje je namenjena študentom 1. stopnje študijskega programa Biologija. Skripta je sestavljena iz teoretičnih osnov z opisom osnovnih orodij in metod dela na področju mikrobne biotehnologije in osmih praktičnih vaj. Vaje so sestavljene iz dveh delov: v prvem delu so primeri laboratorijskih procesov, pri katerih se študenti spoznajo z različnimi mikroorganizmi za produkcijo uporabnih produktov, v drugem delu pa so vaje s področja genskega inženiringa, pri katerih se študenti naučijo osnov bioinformatike in nekaterih metod dela v procesu kloniranja genov pri bakterijah. Študenti si z razumevanjem teh vaj pridobijo osnovna teoretična in praktična znanja s področja mikrobna biotehnologija.

Ključne besede: • mikrobna biotehnologija • skripta za vaje • mikrobni bioproces • bioinformatika • kloniranje •

NASLOV AVTORICE: dr. Janja Trček, izredna profesorica, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo, Koroška cesta 160, 2000 Maribor, Slovenija, e-pošta: janja.trcek@um.si.

DOI <https://doi.org/10.18690/978-961-286-143-8>
© 2018 Univerzitetna založba Univerze v Mariboru
Dostopno na: <http://press.um.si>

ISBN 978-961-286-143-8

Kazalo vsebine

Kazalo slik in prilog	ii
Okrajšave	iii
Predgovor	1
SPLOŠNE TEORETIČNE OSNOVE	2
Delovni mikroorganizmi	2
Primarni in sekundarni metaboliti.....	5
Pogoste metode dela v genskem inženirstvu.....	5
Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	5
Elektroforeza v agaroznem gelu.....	7
Molekulsko kloniranje	8
NAVODILA ZA VAJE	10
Vaja 1: Mikrobna oksidacija etanola v očetno kislino	10
Vaja 2: Optimizacija namnoževanja bakterije <i>Janthinobacterium lividum</i> za pridobivanje violaceina...	13
Vaja 3: Laboratorijska proizvodnja zunajceličnih polisaharidov	16
Vaja 4: Določevanje sestave peptidoglikana pri po Gramu pozitivnih bakterijah.....	18
Vaja 5: Osnove bioinformatike v mikrobni biotehnologiji	22
Vaja 6: Izolacija plazmidne DNA iz bakterijske celice	25
Vaja 7: Restriksijska analiza rekombinantne plazmidne DNA	29
Vaja 8: Primerjava nukleotidnega zaporedja z zaporedji v prosto dostopnih bazah	31
PRILOGE.....	36
LITERATURA.....	38

Kazalo slik in prilog

Slika 1: Kvasovke v fazi brstenja	2
Slika 2: Ocetnokislinske bakterije vrste <i>Komagataeibacter europaeus</i>	3
Slika 3: Kolonija plesni iz rodu <i>Penicillium</i> na trdem gojišču.....	3
Slika 4: Shema poteka priprave starter kulture.....	4
Slika 5: Skica bioreaktorja z mešalom.	4
Slika 6: Grafični prikaz nastajanja primarnega in sekundarnega metabolita	5
Slika 7: Shema procesa pomnoževanja DNA z metodo PCR.....	7
Slika 8: Shema ločevanja DNA z elektroforezo v agaroznem gelu.	8
Slika 9: Biokemijski potek oksidacije etanola v očetno kislino pri očetnokislinskih bakterijah.....	10
Slika 10: Skica industrijskega acetatorja.....	10
Slika 11: Priraščanje kisline in biomase ter poraba etanola med oksidacijo etanola v očetno kislino....	11
Slika 12: Struktura violaceina.	14
Slika 13: Rast bakterije <i>Janthinobacterium lividum</i> na hranilnem agarju	14
Slika 14: Shema peptidoglikana iz skupine A.....	19
Slika 15: Shema peptidoglikana iz skupine B.....	19
Slika 16: Skica ccc, oc in linearne oblike plazmidne DNA.	25
Priloga A: Identifikacija aminokislin po separaciji vzorca s tankoplastno kromatografijo	36
Priloga B: Genetska karta plazmidnega vektorja pJT2.	37

Okrajšave

ADH	alkohol dehidrogenaza
ALDH	aldehid dehidrogenaza
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dCTP	deoksicitidin trifosfat
dGTP	deoksigvanozin trifosfat
Divji sevi	so sevi, ki smo jih osamili iz različnih okoljskih vzorcev (angl.: wild-type)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleozid trifosfat
dTTP	deoksitimidin trifosfat
<i>in vitro</i>	biološki procesi, ki jih vodimo izven žive celice, v laboratorijskih razmerah
<i>in vivo</i>	biološki procesi, ki potekajo v živem organizmu
Moco	molibdopterin (angl.: molybdopterin cofactor)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl.: polymerase chain reaction)
PQQ	pirolokinolin kinon (angl.: pyrroloquinoline quinone)
SDS-PAGE	elektroforeza v poliakrilamidnem gelu (angl.: polyacrylamide gel electrophoresis) v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (angl.: sodium dodecyl sulfate)
Starter kultura	namnoženi sev, ki ga uporabimo kot inokulum za industrijski bioproces

Predgovor

Mikrobna biotehnologija je znanstveno področje, ki uporablja mikroorganizme za pridobivanje različnih uporabnih produktov. Za mikroorganizme je značilen kratek generacijski čas in veliko različnih presnovnih poti, zato imajo velik uporabni potencial v živilski, kemijski, farmacevtski in drugih vrstah industrije. Biokemijske poti nastanka nekaterih izmed njihovih uporabnih presnovnih produktov so enostavne (npr. očetne kisline), druge pa zelo kompleksne (npr. antibiotikov).

Začetki industrijske uporabe mikroorganizmov segajo v leto 1912, ko je Chaim Weizmann uporabil bakterijo *Clostridium acetobutylicum* za fermentacijo škroba v butanol in aceton; slednji produkt je bil pomembna sestavina eksplozivov v 1. svetovni vojni. Naslednji zelo znan industrijski proizvod je penicilin, katerega sposobnost sinteze pri glivi *Penicillium notatum* je odkril Aleksander Fleming leta 1929. Industrijska proizvodnja penicilina je bila zaradi velikih potreb po antibiotikih postavljena med 2. svetovno vojno. V tem obdobju je industrijska mikrobiologija izkoriščala lastnosti mikroorganizmov, ki so bile že naravno zapisane v njihovem genomu. Takšni, t. i. divji sevi so bili s presejalnimi metodami selekcionirani v laboratorijskih pogojih, proces pa je bil nato prenesen in optimiziran na industrijskem nivoju. V tem primeru je bila ključnega pomena zagotovitev optimalnih zunanjih (temperatura, vlažnost, sestava zraka) in notranjih (optimalna sestava gojišča) razmer za sintezo želenega metabolita.

Velika prelomnica v razvoju mikrobne biotehnologije je bilo odkritje restrikcijskih encimov. Ti encimi prepoznajo specifično zaporedje nukleotidov v dvovertični DNA in le-to na specifičnem mestu razrežejo. To orodje (skupaj s še drugimi encimi za manipulacijo DNA) je omogočilo proučevanje DNA molekul in začetke kloniranja. Naslednje pomembno odkritje je bil opis metode za *in vitro* pomnoževanje DNA, tj. verižna reakcija s polimerazo (PCR). Ti in številna druga orodja genskega inženiringa so omogočila konstrukcijo rekombinantnih sevov bakterij z izboljšanimi produkcijskimi lastnostmi. Prvi rekombinantni organizem za proizvodnjo v industrijskem obsegu je bila bakterija *Escherichia coli* za pridobivanje inzulina. Uporaba genetsko spremenjenih mikroorganizmov z izboljšanimi lastnostmi za produkcijo želenega produkta ali pa tudi za pridobivanje novega produkta je danes zelo razširjena.

Mikrobna biotehnologija je interdisciplinarno področje, zato se od študenta pričakuje, da že ima osnovna znanja s področij kemija, biokemija in mikrobiologija. Vaje so oblikovane tako, da se bo študent spoznal z različnimi orodji in metodami, ki jih mikrobni biotehnolog uporablja pri svojem delu. Upam, da vam bodo te praktične izkušnje v pomoč pri vaši poklicni poti.

Maribor, 15. januar 2018.

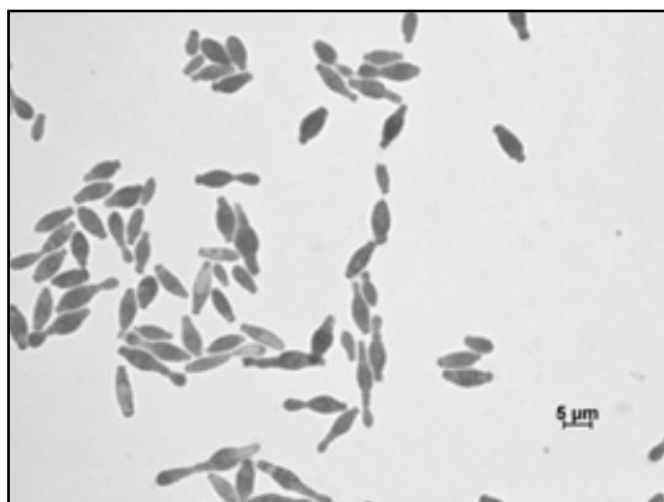
Janja Trček

SPLOŠNE TEORETIČNE OSNOVE

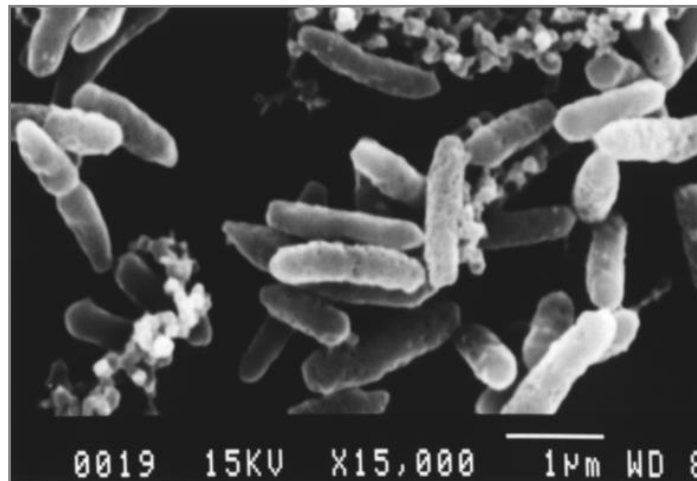
Delovni mikroorganizmi

Kot delovni organizmi v industrijskih procesih za proizvodnjo različnih uporabnih produktov se najpogosteje uporabljajo kvasovke (slika 1), bakterije (slika 2) in nitaste glive (slika 3) (Thieman & Palladino, 2012). Zaželenosti teh organizmov so naslednje:

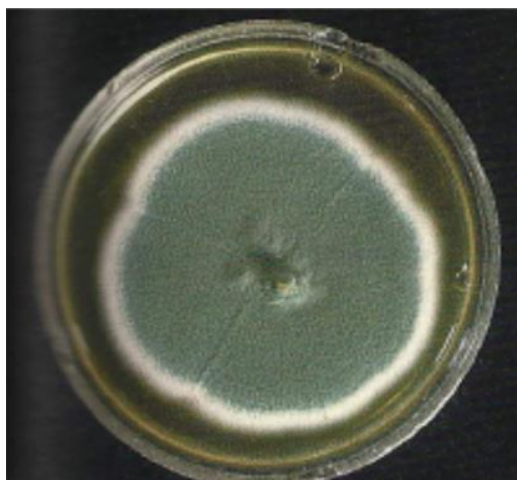
- a) sposobnost rasti v tekočem gojišču, ki je na razpolago v velikih količinah in je poceni (npr. uporaba odpadnega materiala iz drugih industrijskih procesov);
- b) hitra rast;
- c) tvorba produkta v kratkem času;
- d) rast in tvorba produkta v industrijskem merilu;
- e) ne sme biti patogen za ljudi in ekonomsko pomembne živali in rastline ter
- f) genetska stabilnost.



Slika 1: Kvasovke v fazi brstenja. Mikrografija je bila narejena s svetlobnim mikroskopom (foto: Janja Trček). Daljica prikazuje merilo za 5 μm .

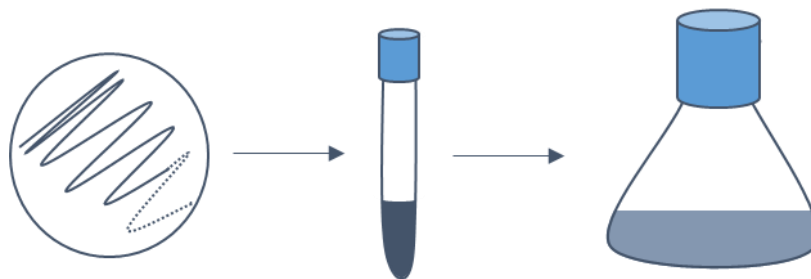


Slika 2: Ocetnokislinske bakterije vrste *Komagataeibacter europaeus* po namnoževanju v gojišču RAE v prisotnosti 3 % etanola in 3 % očetne kisline. Mikrografija je bila narejena z vrstičnim elektronskim mikroskopom (foto: Janja Trček). Daljica prikazuje merilo za 1 μm .



Slika 3: Kolonija plesni iz rodu *Penicillium* na trdem gojišču Sabouraud (foto: Janja Trček).

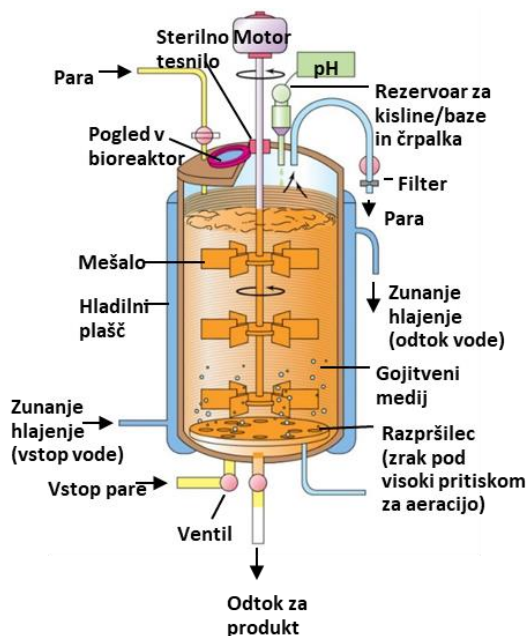
Delovni mikroorganizem iz trdega gojišča nacepimo v tekoče gojišče in v njem namnožimo starter kulturo (slika 4) za inokulacijo gojišča v industrijskem bioreaktorju (npr. v obsegu 1/100 volumna gojišča v bioreaktorju).



Slika 4: Shema poteka priprave starter kulture.

Industrijski procesi potekajo v bioreaktorjih (slika 5). Njihova velikost je odvisna predvsem od cene produkta, ki ga mikroorganizem producira. Tako je za proizvodnjo encimov, ki se uporabljajo v molekularni biologiji in v diagnostične namene značilna manjša velikost bioreaktorjev, t. j. 1–20.000 L, za proizvodnjo živilskih proizvodov, kot je vino in pivo, pa se uporabljajo veliki bioreaktorji, t. j. 200.000–500.000 L.

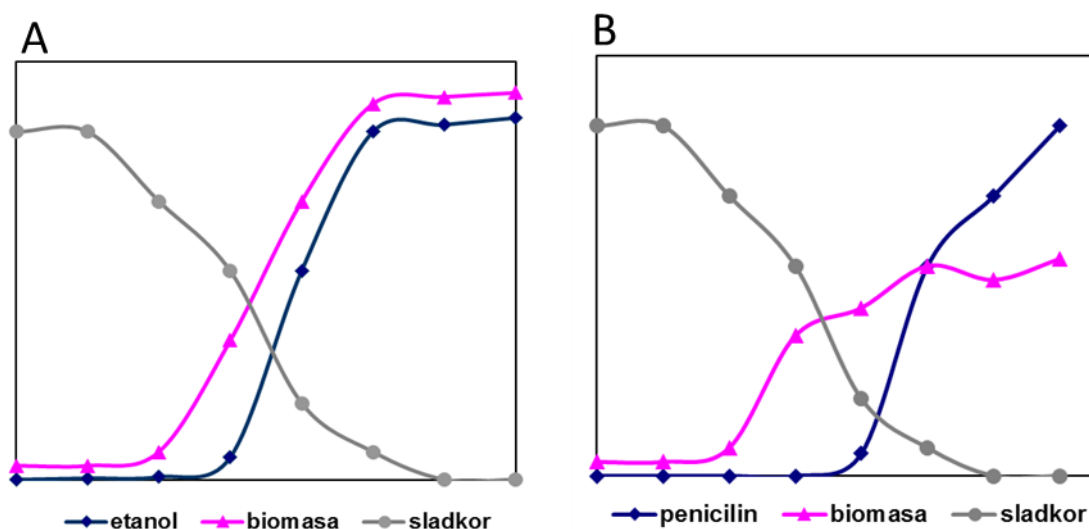
Optimizacija bioprocasa za proizvodnjo zelenega produkta poteka najprej v manjših volumnih, lahko v laboratorijskih bioreaktorjih ali tudi v erlenmajericah. Pri tem optimiziramo notranje (sestava gojišča) in zunanje razmere (temperatura, vnos zraka itd.) za optimalno namnoževanje mikroorganizma in produkcijo zelenega produkta. Pri prenosu procesa iz laboratorijskega na industrijski nivo sodeluje inženir, ki pozna zakonitosti prenosa zraka in toplote v bioreaktorju ter dinamiko tekočin v različnih vrstah bioreaktorjev.



Slika 5: Skica bioreaktorja z mešalom (Madigan, Martinko, Bender, Buckley in Stahl, 2015).

Primarni in sekundarni metaboliti

Kadar metabolit nastaja med eksponentno fazo rasti mikroorganizma, imenujemo takšen produkt primarni metabolit. Metabolit, ki nastaja v fazi, ko je rast mikroorganizma že skoraj ustavljena, je sekundarni metabolit (slika 6). Značilen produkt primarnega metabolizma je etanol, ki nastaja kot eden izmed produktov razgradnje sladkorjev pri kvasovkah in nekaterih bakterijah. Pri tem nastaja energija, ki jo mikroorganizmi potrebujejo za rast in razmnoževanje, zato primarni metaboliti nastajajo sočasno z rastjo mikroorganizmov. Sekundarni metaboliti nastajajo med stacionarno fazo rasti in tako pogosto med sporulacijo plesni in prokariotov. Značilni produkti sekundarnega metabolizma so antibiotiki. Sekundarni metaboliti niso potrebni za rast in razmnoževanje mikroorganizmov, njihova tvorba pa je močno odvisna od razmer, pri katerih mikroorganizem raste (velik vpliv sestave gojišča); neustrezne razmere lahko tudi zavrejo tvorbo sekundarnih metabolitov. Sekundarni metaboliti so skupina med seboj podobnih substanc, npr. sevi iz rodu *Streptomyces* proizvajajo 30 podobnih, a kemijsko različnih antibiotikov. Sekundarni metaboliti pogosto nastajajo v čezmernih količinah, za razliko od primarnih metabolitov, katerih donos se običajno ne more bistveno povečati zaradi neposredne povezave s hitrostjo rasti mikroorganizma, katerega povečanje je omejeno z metabolizmom mikrobnih celic za pridobivanje energije.



Slika 6: Grafični prikaz nastajanja primarnega (A) in sekundarnega metabolita (B).

Pogoste metode dela v genskem inženirstvu

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

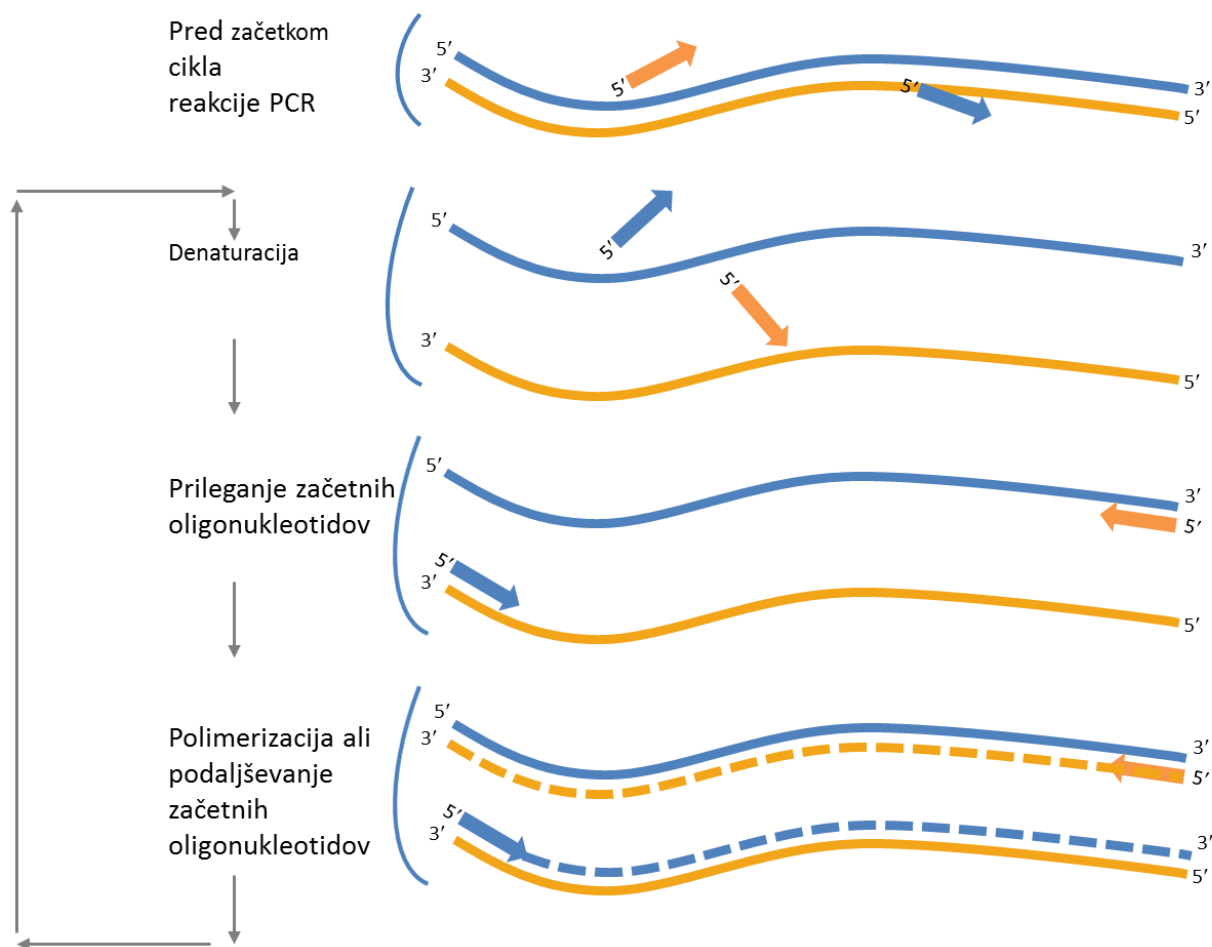
Metoda PCR omogoča *in vitro* pomnoževanje specifičnih odsekov DNA z encimom DNA-polimeraza. Metodo je leta 1983 koncipiral in s sodelavci dokazal njeno praktično uporabnost Kary B. Mullis. Za ta izum je bil leta 1993 nagrajen z Nobelovo nagrado za kemijo. H kasnejši poenostavitvi te metode je prispeval razvoj aparata PCR in zamenjava termolabilne s termostabilno DNA-polimerazo. V aparatih PCR poteka pomnoževanje DNA v PCR-mikrocentrifugirkah v ponavljajočih se ciklih, sestavljenih iz treh zaporednih procesov: denaturacije, prileganja začetnih oligonukleotidov in podaljševanja začetnih oligonukleotidov oz. polimerizacije (slika 7). V aparatu so omogočene hitre spremembe temperatur med

posameznimi stopnjami cikla. Visoka temperatura med denaturacijo ne inaktivira termostabilne polimeraze DNA, zato je v primerjavi s termolabilno polimerazo DNA ni potrebno dodajati v reakcijsko mešanico v vsakem ciklu.

Termostabilna DNA-polimeraza je bila izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*, ki jo je prvi osamil Thomas Brock iz gezirja v nacionalnem parku Yellowstone v državi Wyoming v ZDA. Po imenu bakterijske vrste je ta polimeraza poimenovana DNA-polimeraza *Taq*. V kasnejših letih so se na trgu pojavile izboljšane DNA-polimeraze, izolirane tudi iz termofilnih arhej, s hitrejšim dodajanjem nukleotidov (dNTP) na začetni oligonukleotid in tudi takšne s popravljalno aktivnostjo, kar zmanjša verjetnost priključitve napačnega nukleotida na že nastalo polinukleotidno verigo. Primer takšne DNA-polimeraze je DNA-polimeraza *Pfu*, ki je bila izolirana iz arheje *Pyrococcus furiosus*. Njena napaka pomnoževanja DNA je $1,3 \cdot 10^{-6}$ nukleotidov, pri DNA-polimerazi *Taq* pa je ta vrednost v povprečju $8 \cdot 10^{-6}$ nukleotidov. DNA-polimeraze se med seboj razlikujejo tudi po tem, kako velik fragment lahko pomnožijo. Včasih je bila ta velikost omejena na nekaj 100 bp (ca. 2500 bp), danes pa je mogoče kupiti tudi DNA-polimeraze, ki lahko namnožijo DNA-pomnožke velikosti nekaj 1000 bp (ca. 30 kbp).

Reakcijska mešanica PCR je sestavljena iz tarčne DNA, deoksiribonukleozid trifosfatov (dNTP), smernega (angl.: forward) in protismernega (angl. reverse) začetnega oligonukleotida (angl.: primer), DNA-polimeraze in reakcijskega pufra z optimalno vrednostjo pH, ustrezno koncentracijo Mg^{2+} ionov, potrebnih za aktivnost DNA-polimeraze, in ustrezne koncentracije soli (KCl ali $(NH_4)_2SO_4$) za izboljšanje učinkovitosti pomnoževanja DNA.

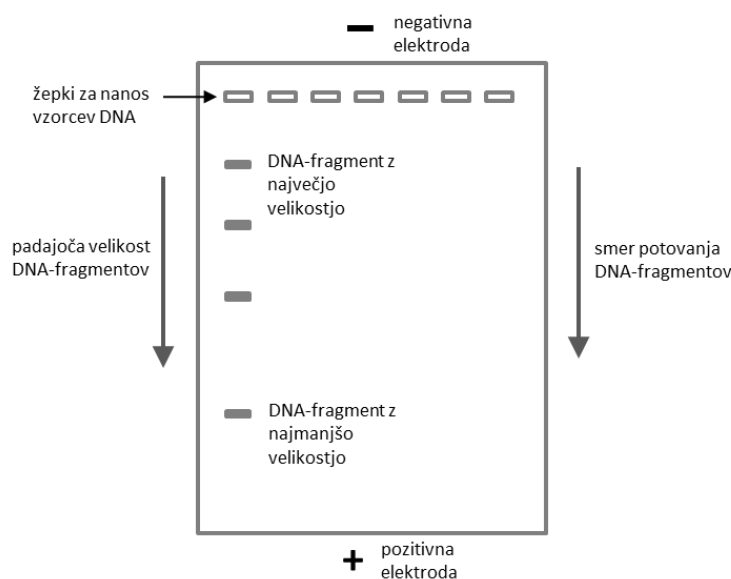
Potek reakcije PCR je shematično prikazan na sliki 7. Reakcija poteka v 25–35 ponavljajočih se ciklih, sestavljenih iz zaporednih reakcij denaturacije, prileganja začetnih oligonukleotidov in polimerizacije. Med denaturacijo se zaradi visoke temperature (95 °C, 1 min) obe verigi tarčne DNA razkleneta in razideta. Temu sledi prileganje začetnih oligonukleotidov na komplementarno DNA. Uporabljena temperatura za doseg specifičnega prileganja začetnih oligonukleotidov je odvisna od nukleotidne sestave začetnih oligonukleotidov. Večji kot je delež gvanina in citozina v primerjavi z adeninom in timinom v 18–25 baz dolgem začetnem oligonukleotidu, višja temperatura je potrebna za specifično prileganje na komplementarno DNA. Ker so v reakcijski mešanici začetni oligonukleotidi prisotni v visoki koncentraciji in jih je bistveno več, kot se jih lahko veže na enoverižno DNA, ima vezava začetnih oligonukleotidov prednost pred ponovno združitvijo obeh enoverižnih tarčnih DNA v dvoverižno DNA. Po vezavi začetnih oligonukleotidov na specifično komplementarno mesto enoverižnih DNA, se oligonukleotidi začnejo podaljševati tako, da DNA-polimeraza dodaja komplementarne nukleotide na začetna oligonukleotida. Čas, ki je namenjen polimerizaciji, je odvisen od dolžine DNA-fragmenta, ki ga pomnožujemo in hitrosti dodajanja nukleotidov na že nastalo verigo oligonukleotidov.



Slika 7: Shema procesa pomnoževanja DNA z metodo PCR.

Elektroforeza v agaroznem gelu

Elektroforeza v agaroznem gelu (slika 8) je metoda, s katero preiskujemo kakovost in velikost DNA, lahko pa ocenimo tudi njeno koncentracijo. Vzorce DNA po dodatku DNA-nanašalnega pufra, ki DNA zviša gostoto (jo obteži) in obarva, vnesemo v žepke gela, od koder po vzpostavitvi električnega toka v elektroforezni kadički potujejo proti pozitivni elektrodi (anodi) zaradi negativnega naboja fosfatnih skupin ($-PO_4^{3-}$) v DNA. Hitrost potovanja je pri linearni DNA odvisna od velikosti, pri plazmidni DNA pa tudi od oblike DNA. Čim bolj kompaktna (npr. ccc oblika plazmida je bolj kompaktna od oc) in čim krajša je DNA, tem hitreje bo potovala skozi pore agaroznega gela, ki sicer njeno potovanje ovirajo. Pripravimo lahko gele z različnimi koncentracijami agaroze (0,7—2,0 %); višja koncentracija omogoča boljše ločevanje manjših fragmentov. Ob vzorcih DNA nanese v žepok vsakega gela tudi DNA-standard z znanimi velikostmi fragmentov, s katerimi po ločitvi DNA primerjamo položaj DNA-fragmentov vzorca v gelu. Za ločevanje zelo kratkih DNA-fragmentov (ca. < 300 bp) uporabljamo poliakrilamidne gele.



Slika 8: Shema ločevanja DNA z elektroforezo v agaroznem gelu.

Molekulsko kloniranje

Molekulsko kloniranje je proces, s katerim konstruiramo rekombinantne organizme z namenom izboljšanja divjega seva za sintezo določenega produkta, za sintezo novega produkta ali za produkcijo produkta v gostiteljski celici, ki je primernejša od celice, v kateri je gen naravno prisoten. V okviru tega postopka uporabljamo številne metode, npr. metodo PCR za namnoževanje genov, restrikcijo DNA, pripravo vektorjev kot orodja za prenašanje genov med različnimi organizmi, elektroporacijo in konjugacijo za vnos rekombinantnih vektorjev v gostiteljsko celico, sekvenciranje DNA, analizo rekombinantnih proteinov (produktov) z metodo SDS-PAGE in druge. Rekombinantni mikroorganizmi imajo vstavljene dodatne gene, spremenjeno nukleotidno zaporedje že prisotnih naravnih genov ali pa tudi regulatornih regij, ki vplivajo na izražanje posameznih genov.

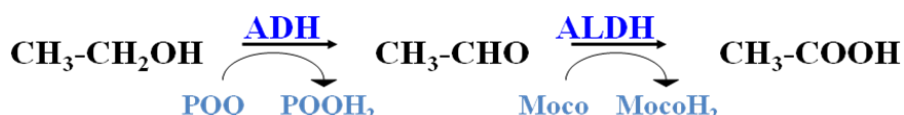
Prvi komercialen proizvod, ki je bil pripravljen z molekulskim kloniranjem, je bil inzulin. Inzulin, pripravljen z ekstrakcijo iz želodčne slinavke krav ali prašičev, v večini primerov dobro regulira koncentracijo sladkorja v krvi pri ljudeh, obstajajo pa tudi posamezniki, ki tujega inzulina ne prenašajo dobro, na kar se odzove njihov imunski sistem. Prav za te je pridobivanje človeškega inzulina z rekombinantnimi sevi zelo pomembno. V tem primeru so bili s postopki molekulskega kloniranja geni za izražanje človeškega inzulina iz genoma človeka klonirani in izraženi v bakterijski in kvasni celici.

Uspešnost molekulskega kloniranja je odvisna od natančnega načrtovanja in upoštevanja vseh procesov in razlik, ki obstajajo med organizmom, iz katerega geni izvirajo, in tistim, v katerega jih vnašamo. Razlik je več v primeru, če prenašamo gene iz evkariontske v prokariontsko celico. V tem primeru morajo biti iz genov pred vnosom v prokariontsko celico odstranjeni introni, težava pa se lahko pojavi zaradi različne pogostnosti uporabe kodonov za kodiranje določene aminokislina med različnimi organizmi, kar vpliva na učinkovitost translacije. Naslednji problem je lahko potreba po modifikaciji proteinov po njihovi sintezi, ki poteka v evkariontski celici, ne pa tudi v prokariontski celici. Po uspešno pridobljenem rekombinantnem organizmu moramo rekombinantni produkt iz celice izolirati in očistiti vseh spremljajočih sestavin celice, saj so nekatere med njimi že v minimalnih količinah toksične (npr. lipopolisaharidi pri po Gramu negativnih bakterijah).

NAVODILA ZA VAJE

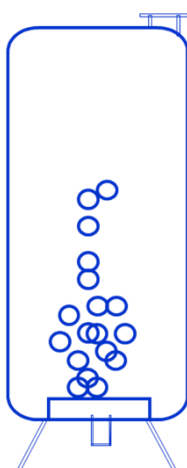
Vaja 1: Mikrobna oksidacija etanola v očetno kislino

Kis je proizvod dvostopenjskega mikrobiološkega procesa, katerega glavni končni produkt je očetna kislina (slika 9). Osnovni substrat za proizvodnjo kisa predstavljajo sladkorji, ki lahko izvirajo iz različnih rastlinskih plodov. V prvi stopnji kvasovke fermentirajo sladkorje v etanol, tega pa nato očetnokislinske bakterije oksidirajo v očetno kislino. Oksidacija etanola v očetno kislino poteka v zaporedju dveh biokemijskih reakcij s pomočjo encimov, ki so vpeti na zunanjo stran citoplazemske membrane.

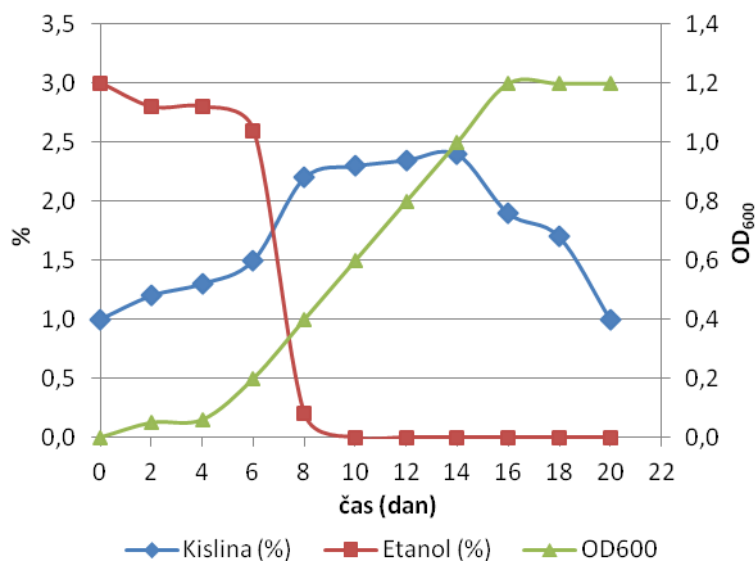


Slika 9: Biokemijski potek oksidacije etanola v očetno kislino pri očetnokislinskih bakterijah. Okrajšave: ADH, alkohol dehidrogenaza; ALDH, aldehyd dehidrogenaza; PQQ, pirolokinolin; Moco, molibdopterin.

Očetnokislinske bakterije so po Gramu negativne, elipsoidne ali paličaste bakterije. Njihova najbolj značilna lastnost je oksidacija etanola v očetno kislino. To njihovo lastnost človek že tisočletja izkorišča za izdelovanje različnih vrst kisa (vinski, jabolčni, alkoholni, rižev, sladni kis in drugi). Prvotni domači acetifikaciji vin je sledil razvoj prve industrijske proizvodnje kisa ob koncu 14. stoletja v Franciji. V tem, t. i. Orleanskem postopku, je oksidacija etanola v očetno kislino potekala v manjših sodih. Vino v njih je bilo inokulirano s kisom ali debelim slojem mikrobne biomase, ki se je zbirala na površini soda. V prvi polovici 19. stoletja so bili v kisarne postavljeni cilindrični generatorji, napolnjeni z oblanci, na katerih je bila imobilizirana kultura očetnokislinskih bakterij. Danes so najbolj razširjeni submerzni bioreaktorji, tako imenovani acetatorji. Bakterije v njih so enakomerno razpršene po celotnem volumnu in podvržene neprestanemu mešanju z etanolnim substratom in drobnimi zračnimi mehurčki (slika 10).



Slika 10: Skica industrijskega acetatorja.



Slika 11: Priraščanje kisline in biomase ter poraba etanola med oksidacijo etanola v očetno kislino.

Pri zagonu bioprocasa bioreaktor najprej napolnimo z ustreznim rastnim gojiščem in ga avtoklaviramo. Nato gojišče inokuliramo s starter kulturo za industrijsko proizvodnjo kisa in proces vodimo pri optimalnih pogojih (temperatura in količina raztopljenega O₂) za rast bakterijske kulture in produktivnost bioprocasa. Zaradi rasti bakterij in njihovega metabolizma, se lastnosti gojišča neprestano spreminjajo (vsebnost C, N, koncentracija biomase, koncentracija metabolitov itd.). V teku procesa se razvijejo značilne faze rasti: faza lag, logaritemska faza, stacionarna faza in faza odmiranja.

Laboratorijska proizvodnja očetne kisline

Pri današnji vaji boste simulirali submerzno proizvodnjo kisa v laboratorijskih steklenicah. Bioprocas vodite v 80 mL gojišča RAE (glukoza 40 g/L, pepton 10 g/L, kvasni ekstrakt 10 g/L, citronska kislina 1,37 g/L, Na₂HPO₄ × 2H₂O 3,38 g/L) v prisotnosti 3 % etanola in 1 % očetne kisline v 250 mL erlenmajericah na stresalniku (200 obr/min) pri 28°C. Inokulum za zagon bioprocasa pridobite z namnožitvijo izbranih vrst očetnokislinskih bakterij (*Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Komagataeibacter hansenii*, *Komagataeibacter kakiaceti*, *Komagataeibacter maltaceti*) v gojišču RAE ob prisotnosti 1 % etanola in 1 % očetne kisline v epruveh na stresalniku. 800 µL tako namnoženega inokuluma uporabite za zagon bioprocasa.

Med bioprocasom spremljajte koncentracijo očetne kisline, pH-vrednost in biomaso. Omenjene analize naredite vsak dan tekom enega tedna.

Določanje koncentracije očetne kisline

Koncentracijo skupnih kislin določite s titracijo vzorca z 0,1 M NaOH ob prisotnosti indikatorja fenolftaleina. Očetna kislina predstavlja v povprečju 98 % vseh kislin v kisu, zato je izračunana vrednost enačena s koncentracijo očetne kisline v vzorcu.

Titracijska enačba: $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{NaOH} \rightarrow \text{CH}_3\text{COONa} + \text{H}_2\text{O}$

Konc. očetne kisline (g/L) = $(c_{(\text{NaOH})} (\text{mol/L}) V_{(\text{NaOH})} (\text{mL}) 60 (\text{g/mol})) / V_{(\text{vzorca})} (\text{mL})$

Spremljanje priraščanja bakterijske biomase v tekočem gojišču

Priraščanje bakterijske biomase spremljajte spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 600 nm.

Merjenje pH

Med bioprocesom spremljajte vrednost pH s pH-indikatorskimi lističi.

Naloga 1

Prikažite bioproces grafično (priraščanje očetne kisline, biomase in spremembe pH-vrednosti v odvisnosti od časa).

Iz grafa določite fazo lag, logaritemsko fazo in stacionarno fazo rasti. Označite na grafu.

Izračunajte produktivnost bioprocesa (nastajanje očetne kisline v $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Naloga 2

Prikažite priraščanje biomase v semilogaritemskem grafu tako, da na ordinati prikažete logaritemske vrednosti izmerjenih absorbanc v odvisnosti od časa in izračunajte specifično hitrost rasti (h^{-1}) in generacijski čas za vašo starter kulturo.

Vaja 2: Optimizacija namnoževanja bakterije *Janthinobacterium lividum* za pridobivanje violaceina

Naravni pigmenti zaradi okoljskih in zdravstvenih razlogov vse pogosteje nadomeščajo sintetične pigmente v živilski, farmacevtski in kozmetični industriji. Vir naravnih pigmentov so žuželke, rastline in mikroorganizmi. Zaradi možnosti hitrega pomnoževanja mikroorganizmov v industrijskih bioprocseh je produkcija pigmentov s pomočjo mikroorganizmov primerna za pridobivanje večjih količin pigmentov. Najbolj pogosti pigmenti, ki jih proizvajajo mikroorganizmi, so rumene in rdeče barve, kot so npr. karotenoidi iz bakterij *Micrococcus roseus*, *Brevibacterium linens*, monakolin iz glive *Monascus* sp. in ksantomonadin iz bakterije *Xanthomonas campestris*. Med modrimi pigmenti, ki sicer med mikroorganizmi niso tako pogosti, je najbolj znan violacein, ki ga proizvaja bakterija *Chromobacterium violaceum* in *Janthinobacterium lividum*.

Ob uporabi violaceina v tekstilni industriji je le-ta zanimiv tudi za farmacevtsko industrijo, zaradi njegove dokazane citotoksičnosti proti rakavim celicam debelega črevesa, protivirusnih in protibakterijskih aktivnosti. Violacein nastaja v bakterijski celici iz triptofana, njegovo sintezo pa uravnava signalna molekula N-acetil-homoserin lakton. Sinteza violaceina je odvisna tudi od metabolizma ogljikovih hidratov v bakterijski celici, temperature namnoževanja bakterije in faze rasti bakterije.

V današnji vaji boste naredili prve korake k optimizaciji procesa za pridobivanje violaceina s psihotropno bakterijo *Janthinobacterium lividum*.

Namnožitev bakterijske biomase

Po 5 μL prekončno namnožene kulture *Janthinobacterium lividum* razmažite po hranilnem agarju (9 plošč) in po tri plošče inkubirajte pri temperaturi 4 °C (hladilnik), 25 °C (inkubator) in 30 °C (inkubator). Po dveh, štirih in šestih dneh postrgajte biomaso iz celotne površine ene plošče, inkubirane pri vsaki izmed temperatur in jo suspendirajte v 2 mL fiziološke raztopine (0,9 % NaCl). Z merjenjem optične gostote pri 600 nm primerjajte količino biomase med vzorci (po potrebi vzorce predhodno redčite).

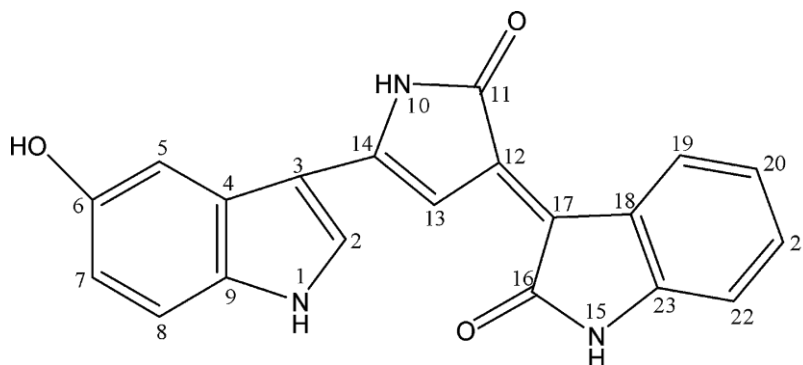
Določitev koncentracije proteinov z metodo po Bradfordu

V vzorcih, v katerih boste določili violacein, določite tudi koncentracijo proteinov z metodo po Bradfordu s komercialnim kompletom proizvajalca Bio-Rad. Metoda temelji na specifični vezavi kislega barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 (barvilo vsebuje 8,5 % fosforne kisline) na bazične in aromatske aminokisliline (posebej Arg), kar povzroči spremembo barve reakcijske mešanice v odvisnosti od koncentracije proteinov. Ob vezavi barvila na protein se absorpcijski maksimum barvila premakne iz 465 nm na 595 nm. Analizo izvedete tako, da 800 μL vzorca dodate 200 μL barvila, dobro premešate in inkubirate pri sobni temperaturi vsaj 5 min in ne več kot 1 uro (absorbanca s časom narašča). Nato izmerite absorbanco pri 595 nm. Za izdelavo standardne krivulje pripravite raztopine govejega serumskega albumina s koncentracijami 0,2–0,9 mg/mL. V tem območju je povezava med koncentracijo govejega serumskega albumina in absorbanco linearna. Pripravite različne koncentracije vzorca, kot tudi več paralelk za natančno določitev koncentracije proteina.

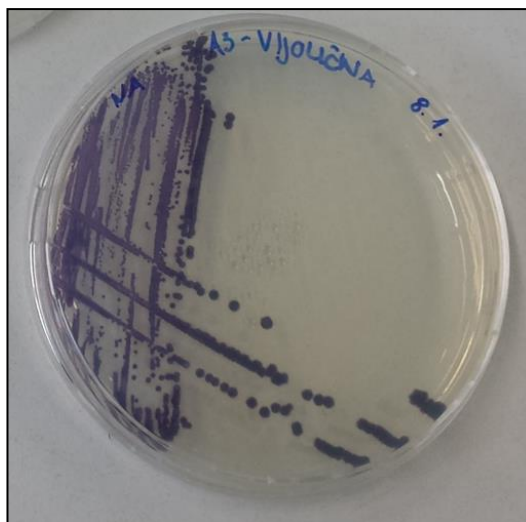
Ocena količine nastalega violaceina

Iz namnožene bakterijske biomase izolirajte violacein po naslednjem postopku:

- centrifugirajte 1 mL suspendirane biomase, ki ste jo na začetku postrgali iz gojišča, 5 min pri 14000 obr/min;
- supernatant odstranite, biomaso pa suspendirajte v 1 mL etanola (99,8 %);
- pustite stati 5 minut, nato centrifugirajte 1 min pri 14000 obr/min in supernatantu določite absorbanco pri 576 nm (Mojib, Farhoomand, Andersen in Bej, 2013).



Slika 12: Struktura violaceina (M_R : 344,24) (Lu s sod., 2009).



Slika 13: Rast bakterije *Janthinobacterium lividum* na hranilnem agarju (foto: Lučka Simon).

Naloga 1

Grafično prikažite relativni delež nastalega violaceina na enoto proteinov ($A_{576\text{nm}}/\mu\text{g proteinov}$) v biomasi *Janthinobacterium lividum*, namnoženi pri 4 °C, 25 °C in 30 °C na trdem gojišču NA po 48, 96 in 144 h.

Naloga 2

Kateri izmed preiskanih pogojev namnoževanja biomase *J. lividum* je najprimernejši za pridobivanje violaceina?

Naloga 3

Kako bi še naprej optimizirali pogoje namnoževanja bakterije *J. lividum* za pridobivanje violaceina?

Vaja 3: Laboratorijska proizvodnja zunajceličnih polisaharidov

Mnoge bakterije imajo sposobnost sekrecije proizvedenih polisaharidov iz celice, zaradi česar te bakterijske produkte imenujemo zunajcelični (ekstracelularni) biopolimeri. Če ti biopolimeri po sekreciji iz celice ostanejo povezani s površino celice v obliki sluzastega ovoja, jih imenujemo kapsularni polisaharidi. Razlikovanje med ekstracelularnimi in kapsularnimi polisaharidi je včasih težko, saj se v primeru prekinitev fosfodieterske vezi med kapsularnim polisaharidom in fosfolipidi v membrani celice tudi kapsularni polisaharidi lahko izločijo v gojišče.

Značilna lastnost bakterij, ki tvorijo ekstracelularne polisaharide, je sposobnost tvorbe biofilmov. Ti omogočajo pričvrščevanje bakterij na določeno površino, predstavljajo pa tudi zaščito za bakterije pred izsušitvijo. Stik, ki ga vzpostavijo biofilmi z živo površino (npr. epitelnimi celicami) ali neživo površino (minerali, medicinski vsadki itd.), omogoči adhezijo celic na stično površino ob tvorbi kovalentnih, ionskih ali hidrofobnih vezi. Biofilmi se lahko razvijejo tudi na površini statičnih gojišč, npr. na površini jabolčnika ali vina, kjer se razvije t. i. klobuk, sestavljen iz oacetnokislinskih bakterij, ujetih v bakterijski ekstracelularni matriks.

Glavna komponenta bakterijskih ekstracelularnih polisaharidov so ogljikovi hidrati, med katerimi prevladujejo glukoza, galaktoza in manosa kot monomerne enote. Različna sestava ogljikovih hidratov vpliva na zelo različne molekulske strukture, ki jih posamezni polisaharidi lahko zavzamejo. Variabilnost v številu in položaju glikozidnih vezi vpliva dodatno na spremembe v molekularni strukturi polisaharidov. Različni bakterijski ekstracelularni polisaharidi imajo zaradi tega specifične karakteristike, ki so vidne v kemijski sestavi, strukturi, povprečni molekularni masi in njihovih lastnostih v raztopini. Na sestavo in strukturo bakterijskih ekstracelularnih polisaharidov vpliva tudi sestava gojišča za namnoževanje bakterij in razmere, pri katerih bakterije namnožujemo. Glede na številne uporabne vrednosti biopolimerov, s spreminjanjem omenjenih razmer namnoževanja bakterij lahko pridobivamo biopolimere različnih lastnosti.

Bakterija *Komagataeibacter xylinus* (prejšnje poimenovanje *Gluconacetobacter xylinus* oz. *Acetobacter xylinus*) iz skupine oacetnokislinskih bakterij je ena izmed najbolj znanih in učinkovitih proizvajalk celuloze, enega izmed značilnih zunajceličnih polisaharidov z lastnostmi, ki so uporabne v živilski industriji (emulgatorji, proizvodnja nate in kombuče) in biomedicini (obliži za rane, umetna koža itd.). Zaradi tega predstavlja ta vrsta bakterije modelni organizem pri raziskavah sinteze, strukture in lastnosti celuloze. Ob tej bakteriji proizvajajo celulozo tudi nekatere druge vrste oacetnokislinskih bakterij, nekatere med njimi tudi vodotopni zunajcelični polisaharid, imenovan acetan.

V današnji vaji boste namnoževali različne vrste oacetnokislinskih bakterij, v različnih gojiščih in pri različnih temperaturah pri statičnih razmerah. Po dveh tednih boste med sevi primerjali sposobnost za oblikovanje zunajceličnih polisaharidov in njihove fenotipske lastnosti. Rezultate vnesite v spodnjo razpredelnico.

Hiter test, s katerim ocenimo, ali pretežni del biofilma predstavlja celuloza, temelji na kuhanju (30 min) namnoženega peleta v 5 % NaOH. Celuloza po takšni obdelavi ne razpade. Opozorilo: NaOH je močna baza, zato bodite pri njeni uporabi zelo pazljivi. Pripravite si manjši volumen raztopine NaOH v visoki čaši (npr. 50 mL NaOH v 500 mL čašo), segrevajte, vendar ne do vrenja, pri opazovanju uporabljajte zaščitna očala, za mešanje raztopine pa stekleno palčko.

	Sev A	Sev B	Sev C	Sev D
Tvori zunajcelične polisaharide ¹				
Barva peleta				
Trdnost peleta ²				
Prevladuje celuloza				

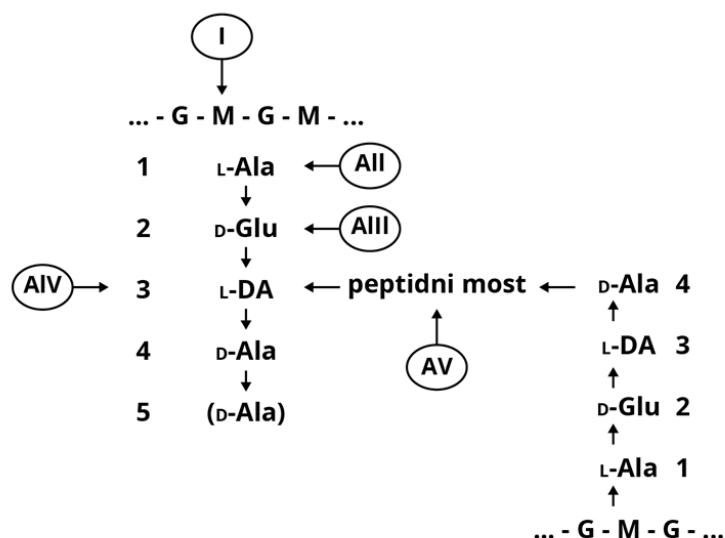
¹, Ocenite sposobnost za tvorbo zunajceličnih polisaharidov z vrednostmi od 1 do 5, pri čemer je vrednost 1 najmanjša količina nastalih polisaharido.

², Trdnost peleta ocenite po spiranju z vodo z dotikom med prsti.

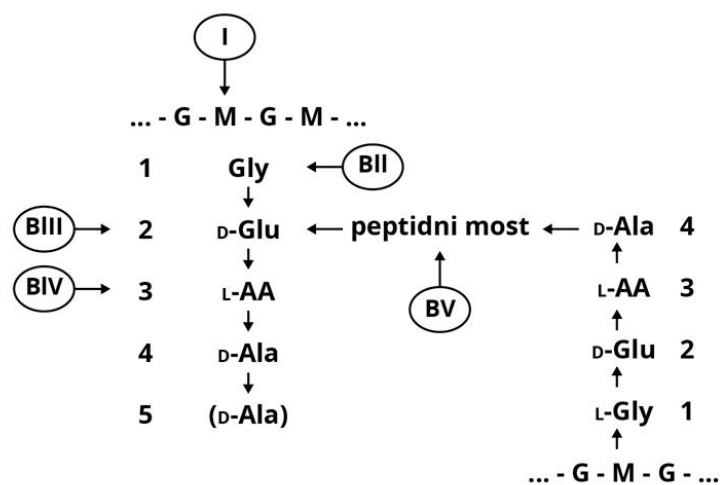
Vaja 4: Določevanje sestave peptidoglikana pri po Gramu pozitivnih bakterijah

Peptidoglikan je ena izmed pomembnih sestavin bakterijskih celic. Obdaja citoplazemsko membrano in daje celici trdnost in obliko ter jo varuje pred razpadom kot posledica visokega znotrajceličnega tlaka. Nahaja se v skoraj vseh bakterijskih celicah, tako po Gramu pozitivnih kot po Gramu negativnih, z redkimi izjemami, kot so bakterije iz razreda *Mollicutes* (npr. mikoplazme), katerim evkariontska gostiteljska celica zagotavlja osmotsko stabilno življenjsko okolje. Dolgo veljavno mnenje o odsotnosti peptidoglikana pri bakterijah iz debel *Planctomycetes* (prostoživeče bakterije) in *Chlamydiae* (striktno intracelularne bakterije) je bilo pred kratkim z eksperimentalnimi dokazi ovrženo (Jeske s sod., 2015). Tudi pri nobeni izmed znanih arhej (mikroorganizmih iz domene *Archaea*) ne najdemo peptidoglikana.

Pri po Gramu pozitivnih bakterijah peptidoglikan pokriva citoplazemsko membrano v več plasteh in predstavlja približno 30–70 % celične stene, ob drugih polisaharidih (teihonske kisline) in proteinih. Pri po Gramu negativnih bakterijah se peptidoglikan nahaja v periplazmi, t. j. v prostoru med citoplazemsko in zunanjo membrano, njegova vsebnost pa je bistveno manjša (< 10 %) kot pri po Gramu pozitivnih bakterijah. Po Gramu negativne bakterije imajo enotno sestavo peptidoglikana, medtem ko je raznolikost strukture peptidoglikana pri po Gramu pozitivnih bakterijah velika. Pri opisu taksonomsko nove vrste bakterije iz skupine po Gramu pozitivnih bakterij je zato priporočeno navesti tudi sestavo peptidoglikana. Peptidoglikan je heteropolimer, sestavljen iz verig glikana, ki so med seboj prečno povezane s peptidno vezjo s peptidi. Verige glikana sestavlja izmenjujoče zaporedje enot *N*-acetilglukozamina (G) in *N*-acetilmuraminske kisline (M), ki so med seboj povezane z β -1,4-glikozidno vezjo (sliki 14 in 15). Na muraminsko kislino je vezano zaporedje štirih L- in D-aminokislin, v nekaterih primerih pa je dodana še peta aminokislina. Pri večini bakterij je druga aminokislina peptida D-glutaminska kislina, tretja pa L-diaminokislina, s katero je običajno vzpostavljena povezava s peptidno podenoto sosednje verige glikana. Glede na prečne povezave v peptidoglikanu, je le-ta razdeljen na dve glavni skupini: A in B (sliki 14 in 15). V skupini peptidoglikana A je prečna peptidna vez med peptidoma dveh sosednjih verig peptidoglikana vzpostavljena med aminoskupino diaminokisline in karboksilno skupino D-alanina, kot četrte aminokisline v nasproti ležečem peptidu. Ta povezava je neposredna ali poteka po peptidnega mostu, ki ga sestavlja 1–7 aminokislinskih ostankov. V primeru peptidoglikana iz skupine B je v prečno povezavo vključena karboksilna skupina D-glutaminske skupine, ki se nahaja na drugem mestu peptida. V to prečno povezavo je vedno vključena diaminokislina, ki zagotovi prosto aminoskupino za povezavo na karboksilno skupino peptida sosednje verige peptidoglikana. Peptidoglikan iz skupine A imajo npr. bakterije iz rodu *Aeromicrobium*, *Nocardioides* in *Dermabacter*, iz skupine B pa iz rodov *Microbacterium*, *Agromyces* in *Plantibacter*.



Slika 14: Shema peptidoglikana iz skupine A. Oznake I in All do AV označujejo mesta strukturnih razlik. I: delna zamenjava N-acetilnih z N-glikolilnimi skupinami pri ostankih muraminske kisline; All: zamenjava L-Ala z Gly; Alll: α -karboksilna skupina D-Glu je prosta ali vezana na Gly, glicinamid, D-alaninamid, kadaverin ali putrescin; AIV: povezava med peptidoma dveh sosednjih verig je vzpostavljena po L-diaminokislini (L-DA), npr. mezo-2,6-diaminopimelični kislini, LL-2,6-diaminopimelični kislini, L-Lys, L-Orn, lantioninu, 2,6-diamino-3-hidroksipimelični kislini, hidroksilizinu ali treo- β -hidroksiornitinu; AV: 1–7 aminokislinskih ostankov (Schumann, 2011).



Slika 15: Shema peptidoglikana iz skupine B. Oznake I in BII do BV označujejo mesta strukturnih razlik. I: delna zamenjava N-acetilnih z N-glikolilnimi skupinami pri ostankih muraminske kisline; BII: zamenjava Gly z L-Ser; BIII: zamenjava D-Glu s treo-3-hidroksiglutaminsko kislino; BIV: na mesto 3 se lahko vežejo L-aminokislina (L-AA), npr. L-homoserin, L-Ala, L-Glu, L-Orn, L-Lys ali L-2,4-diaminomaslena kislina; BV: tip B1, ki vsebuje L-diamino kislino (L-Lys ali L-2,4-diaminobutirično kislino); tip B2, ki vsebuje D-diamino kislino (D-Orn, D-Lys ali D-2,4-diaminomasleno kislino); ob tem se lahko pojavijo še naslednje aminokislino: Gly, L-Thr ali L-Asp (Schumann, 2011).

Preiskovanje strukture peptidoglikana je z biotehnološkega vidika zanimivo zaradi iskanja potencialnih tarčnih molekul za delovanje antibiotikov, razumevanja odpornosti bakterij proti antibiotikom, razumevanja mehanizmov delovanja bakteriofagov in tudi zaradi dejstva, da nekatere sestavine celične stene po vzpostavitvi stika z evkariontsko celico inducirajo reakcije, ki vodijo do bolezni (npr. kronična vnetna črevesna bolezen).

Kljub temu da so postopki za natančno preiskovanje sestave peptidoglikana dolgotrajni, saj temeljijo na preiskovanju izoliranega in očiščenega peptidoglikana, lahko nekatere osnovne informacije, npr. prisotnost 2,6-diaminopimelične kisline (Dpm), 2,6-diamino-4-hidroksipimelične kisline (OH-Dpm), pojavljanje glikolilnih ostankov v verigi glikana in sestavo sladkorjev v peptidoglikanu, pridobimo že s preiskovanjem bakterijskega lizata.

V današnji vaji boste ugotavljali prisotnost LL-diaminopimelične kisline v peptidoglikanu bakterij *Aeromicrobium choanae* LMG 29165^T, *Aeromicrobium flavum* DSM 19355^T, *Bacillus subtilis* DSM10^T in *Paenibacillus aquistagni* CCM 8679^T. Diaminopimelična kislina se nahaja le v peptidoglikanu, lahko pa jo enostavno ločimo od vseh proteinogenih aminokislin in drugih produktov hidrolize bakterijskih celic s tankoplastno kromatografijo (TLC). Diaminopimelična kislina se pojavlja v peptidoglikanu v dveh enantiomerah: LL-Dpm in *mezo*-Dpm. Za obe enantiomeri je značilen nizek retencijski čas (vrednost R_f); za razliko od signala za druge aminokisliline je signal diaminopimelične kisline stabilen.

Priprava biomase in kislinska hidroliza bakterijske biomase

Biomaso preiskovanih sevov namnožite na trdem gojišču do pozne eksponentne faze rasti. Iz gojišča postrgajte približno dve cepilni zanki biomase in jo suspendirajte v 200 µL 4 M HCl. Biomaso prenesite v 2 mL stekleno vijalo, ki jo ob ognju zavarite in nato inkubirajte v sušilniku pri temperaturi 100 °C, 16 h. Ohlajeno vijalo odprite in vsebino posušite v digestoriju. Hidrolizat raztopite v 200 µL destilirane H₂O in ponovno sušite. Postopek ponovite dvakrat, tako da odstranite vse sledove HCl. Na koncu hidrolizat raztopite v 100 µL destilirane H₂O.

Priprava hidrolizata za nanos na kromatografske plošče

Hidrolizat filtrirajte skozi majhno količino oglja, da odstranite stranske produkte. V kadički za TLC pripravite mobilno fazo za ločevanje vzorcev (32 mL metanola, 4 mL piridina, 7 mL dest. H₂O in 1 mL 12 M HCl) in v njej najprej inkubirajte filtrirni papir (1–3 ure) za vzpostavitev ravnotežja sestave atmosfere. Za analizo TLC uporabite plošče z nanešeno celulozo (0,1 mm) na poliesterskem nosilcu. Centimeter od spodnjega roba plošče narišite bazno linijo in nanjo nanesite 2 µL posameznega vzorca. Ploščo postavite v kadičko z mobilno fazo. Ko mobilna faza doseže vrh kromatografske plošče, ločevanje ustavite (približno po 1,5 uri).

Detekcija aminokislin

Kromatografsko ploščo posušite v digestoriju (1 h pri sobni temperaturi), jo nato orosite z reagentom ninhidrin in sušite pri temperaturi 100 °C, 5 min. Položaj signalov preiskovanih sevov primerjajte s položajem referenčnih signalov (priloga A).

Naloga 1

V prilogi A je prikazana kromatografska ločitev hidrolizatov referenčnih sevov in identiteta posameznih signalov, dobljena po zgoraj opisanem postopku. Iz rezultatov, ki ste jih dobili pri preiskovanju hidrolizatov preiskovanih sevov, ugotovite, ali je LL-diaminopimelična kislina sestavina njihovega peptidoglikana.

Naloga 2

Izračunajte vrednosti R_f za LL-diaminopimelično kislino in *mezo*-diaminopimelično kislino. Katera od njiju potuje po celulozni stacionarni fazi hitreje?

Vaja 5: Osnove bioinformatike v mikrobni biotehnologiji

Preden začnemo s praktičnim delom na področju genskega inženiringa, moramo opraviti analize DNA z ustreznimi orodji bioinformatike. To pomeni, da poiščemo DNA-zaporedja genov, ki jih bomo pomnoževali in klonirali, kot tudi DNA-zaporedja vektorjev, v katere bomo pomnožene regije vnašali (klonirali). Prosto dostopna baza podatkov, v katere je praviloma pred objavo znanstvenih člankov potrebno deponirati nove DNA-sekvence, se imenuje GenBank/EMBL/DDBJ. Vanjo lahko vstopimo preko baze Nucleotide, vključene v NCBI (National Center for Biotechnology Information) na spletni strani:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Z vnosom ključnih besed lahko v omenjeni bazi najdemo DNA-zaporedja in jih prenesemo v druge programe, lahko tudi v wordovo datoteko. V nadaljevanju moramo ugotoviti, v katera restrikcijska mesta plazmida bomo DNA-fragment vključili, zato sekvence analiziramo. Primerno mesto za kloniranje DNA-fragmenta v plazmidni vektor običajno ugotovimo že iz njegove plazmidne karte, ki je objavljena v članku. Članek lahko poiščemo v različnih bazah, npr. v bazi PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Najbolj primerno mesto za kloniranje se nahaja v polilinkerski regiji. Kloniramo lahko s topim ali lepljivim koncem. Izbrano(a) restrikcijska mesta moramo vključiti tudi v DNA-fragment, ki ga kloniramo. Paziti moramo, da se izbrana restrikcijska mesta ne nahajajo znotraj DNA-fragmenta, ki ga kloniramo. Pri tem si pomagamo s programi, ki opravijo *in silico* restrikcijsko analizo DNA-sekvence. Primer takšnega na spletu prosto dostopnega programa sta Webcutter in NEBcutter:

<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>

<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>

V naslednjem koraku konstruiramo začetne oligonukleotide. V standardnih reakcijah PCR uporabimo 18–24 nukleotidov dolge začetne oligonukleotide, s G ali C na 3'-koncu, 45–55 % G+C in temperaturo prileganja (T_a) 55–65 °C. Temperaturo prileganja (T_a) izračunamo iz temperature taljenja (T_m) oligonukleotida. Paziti moramo, da se temperatura prileganja obeh oligonukleotidov med seboj ne razlikuje preveč. Pred naročilom oligonukleotidov preverimo, kakšna je verjetnost, da oligonukleotidi tvorijo zanke in dimere, ter jih po potrebi še spremenimo. Na spletu najdemo več programov za preverjanje lastnosti oligonukleotidov, kot npr. OligoAnalyzer:

<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

Začetna oligonukleotida se prilegata na konce DNA-regije, ki jo bomo pomnožili, imeti pa morata tudi ustrezna restrikcijska mesta, ki omogočijo vključitev (ligacijo) fragmenta v vektor. Restrikcijsko mesto dodamo na 5'-koncu začetnih oligonukleotidov. Nekatere restriktaze potrebujejo za učinkovit razrez dodatek ene ali več baz. Ta podatek lahko najdemo v katalogu firme NewEngland BioLabs na spletni strani:

<http://www.neb.com/>

Naloga 1: Poiščite DNA-sekvenco vektorja pJT2.

Kakšna je velikost tega plazmidnega vektorja?

V katerih bakterijah je ta vektor za kloniranje primeren?

Poiščite članek, kjer je bila objavljena njegova restrikcijska karta.

Kaj je selekcijski marker tega plazmidnega vektorja?

Katera mesta v vektorju so primerna za kloniranje in katera ne?

Kje se nahaja polilinkerska regija?

Kaj je prednost kloniranja gena v polilinkersko regijo pred kloniranjem v nekodirajoče DNA-regije?

Naloga 2

Vektor pJT2 želimo uporabiti za kloniranje in izražanje genov za PQQ-odvisno alkohol dehidrogenazo (ADH) bakterije *Acetobacter* (preimenovana v *Komagataeibacter*) *europaeus*, ki jo sestavljata dve enoti: ADH in citokrom c. Poiščite sekvenci za obe enoti in pripravite načrt za kloniranje obeh genov v plazmid pJT2.

Od kje do kje boste pomnožili DNA-regijo?

Napišite sekvenci začetnih oligonukleotidov, ki jih boste uporabili za pomnoževanje te DNA-regije v reakciji PCR.

Kolikšno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov boste uporabili v reakciji PCR in koliko časa pomnoževanja?

Naloga 3

Kako boste zlepili PCR-produkt in vektor?

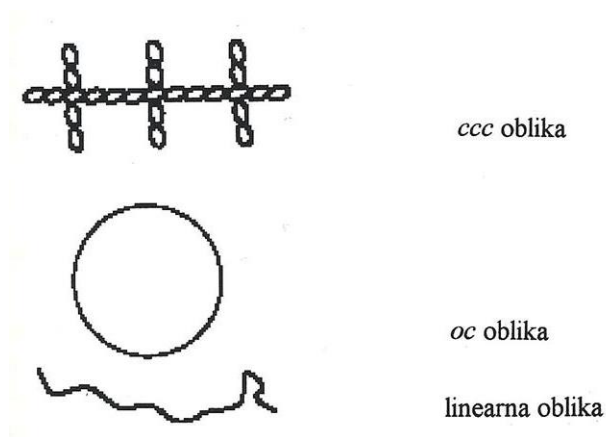
Kako boste pravilne konstrukte selekcionirali v bakteriji *E. coli* in kako v *Acetobacter* spp.?

Vaja 6: Izolacija plazmidne DNA iz bakterijske celice

Plazmidi so ekstrakromosomalne dvoverižne molekule DNA in so prisotni v mnogih bakterijskih celicah. Predstavljajo od < 0,1 % do 4 % bakterijskega genoma, v redkih primerih pa 20 % ali več. Njihove dolžine se gibljejo od 1 kbp do 700 kbp, najbolj pogoste so dolžine od 1,5 kbp do 100 kbp. Na plazmidih so zapisi za različne fenotipske lastnosti mikroorganizma, npr. za sintezo bakteriocinov, odpornost na antibiotike, transport in metabolizem sladkorjev, odpornost na fage itd.

Celica lahko izgubi plazmid kot posledico izločitve le-tega iz celice zaradi naravnih selekcijskih vzrokov (celica izloči plazmide, ki niso nujno potrebni za njeno preživetje in le obremenjujejo energijsko preskrbo) ali pa kot posledico integriranja v kromosomsko DNA. Plazmidi lahko vsebujejo tudi transpozicijska nukleotidna zaporedja, ki lahko potujejo iz plazmida na plazmid ali tudi na kromosom, do izmenjave plazmidov pa lahko pride tudi med konjugacijo. Do naštetih procesov v naravi pogosto prihaja, zato med plazmidi ene bakterije načeloma pogosto prihaja do sprememb.

Plazmidne molekule v bakterijski celici so običajno v obliki *ccc* (angl.: covalently closed circular). Če se ena od obeh polinukleotidnih verig *ccc* oblike plazmida prekine, dobimo sproščeno *oc* (angl.: open circular) strukturo. Do tega pride lahko med ali po izolaciji plazmidov iz celice. Linearno obliko plazmida dobimo, če se pretrgata obe polinukleotidni verigi (slika 16).



Slika 16: Skica *ccc*, *oc* in linearne oblike plazmidne DNA.

Natančna, a draga in za hitro laboratorijsko analizo neprimerna je tehnika izolacije plazmidov s centrifugiranjem v gradientu cezijevega klorida. Hitrejša in cenejša metoda, za katero tudi ni potrebna uporaba ultracentrifuge, temelji na alkalni denaturaciji celotne DNA. Kromosomska DNA se pri tem ireverzibilno denaturira in precipitira, plazmidna DNA pa po nevtralizaciji vzorca renaturira. Kromosomska DNA ločimo od plazmidov v raztopini s centrifugiranjem. Zaradi hitrejše renaturacije ccc oblike od oc oblike plazmida so praviloma v tako dobljenem plazmidnem profilu, ki je viden po elektroforezi na agaroznem gelu, zastopane le ccc oblike plazmidov. Kljub temu je dobljene plazmidne profile včasih težko interpretirati. Tako npr. dobimo zelo kompleksne profile, kadar ima proučevani sev več plazmidov podobnih velikosti ali če med postopkom izolacije prihaja do modifikacij oblik plazmida. Takšen problem lahko rešimo z restrikcijsko analizo celotne plazmidne DNA.

Na zgoraj opisanem principu temeljijo številni postopki izolacije in identifikacije plazmidov iz bakterij. Zaradi posebnosti posameznih mikroorganizmov moramo običajno vsaki vrsti mikroorganizma prilagoditi postopek izolacije plazmidov. Običajni plazmidi so veliki do 100 kbp in jih je po uporabi ustrezne izolacijske tehnike mogoče ločiti z elektroforezo v agaroznem gelu. Za elektroforetsko ločitev večjih plazmidov moramo uporabiti tehniko PFGE (angl. pulsed-field gel electrophoresis).

Plazmidi so v genskem inženirstvu tudi najbolj pogosto uporabljena orodja v postopkih kloniranja genov v bakterijah. Po ligaciji in transformaciji ligacijskih produktov v pogosto uporabljen sev *Escherichia coli* DH5 α , moramo pozitivne klone izbrati na selektivnih agar gojiščih. Iz izbranih pozitivnih klonov nato izoliramo rekombinantne plazmide in z restrikcijsko analizo ter nadaljnjo analizo nukleotidne sekvence potrdimo ali ovržemo pravilnost nukleotidnega zaporedja v rekombinantnem plazmidu.

V današnji vaji boste:

- a) izvedli izolacijo rekombinantnega plazmida (pGEM z vnešenim PCR-produktom);
- b) izolirane plazmide preiskali z elektroforezo v agaroznem gelu.

Za izolacijo plazmidne DNA uporabite alkalno lizo:

- Iz 5 mL prekonočne kulture pripravite bakterijsko biomaso v 1,5 mL mikrocentrifugirki s centrifugiranjem pri 10.000 obr/min, 2 min.
- K sedimentu dodajte 250 μ L raztopine P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 μ g/mL RNaze) in v njej biomaso dobro suspendirajte.
- Dodajte 250 μ L raztopine P2 (0,2 M NaOH, 1 % NaDS) in mikrocentrifugirko previdno 10-krat obrnite. Nato inkubirajte 5 min pri sobni temperaturi.
- Dodajte 350 μ L raztopine P3 (3M K-acetat pH 5,5), mikrocentrifugirko nekajkrat obrnite in inkubirajte 5 min na ledu.
- Centrifugirajte 10 min pri maksimalni hitrosti v mikrocentrifugi.
- Prenesite supernatant v novo mikrocentrifugirko.
- Dodajte 1-kratni volumen izopropanola, mikrocentrifugirko 10-krat obrnite in inkubirajte 5 min na ledu.
- Centrifugirajte 10 min pri 4 °C in maksimalni hitrosti v mikrocentrifugi.
- Supernatant zavržite, usedlini pa dodajte 500 μ L 70 % etanola.
- Ponovno centrifugirajte 10 min pri 4 °C in maksimalni hitrosti v mikrocentrifugi.
- Supernatant zavržite, usedlino pa posušite na zraku in jo nato suspendirajte v 25 μ L raztopine TE (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA).

Izolirane plazmide ločite v 0,65 % agaroznem gelu, pripravljenem v pufru TAE (50-kratni pufer TAE: 242 g/L Tris, 57,1 mL/L očetna kislina, 100 mL/L 0,5 M EDTA pH 8,0). Pripravite 100 mL agaroznega gela in ga razlijte v plastični okvir velikosti M (Biometra). V žepke gela, potopljenega v raztopino pufru TAE, nanesi 10 μ L suspendiranega vzorca plazmida z dodano raztopino za nanos DNA. Elektroforezo vodite pri 8 V/cm (ca. 80 V), dokler barvni indikator ne pripotuje do konca gela. Gel pogledajte nad transiluminatorjem ($\lambda=302$ nm).

Naloga 1

Opišite princip izolacije plazmidne DNA z alkalno lizo. Zakaj s to metodo lahko ločimo plazmidno DNA od kromosomalne DNA?

Naloga 2

Od česa je odvisna hitrost potovanja DNA v agaroznem gelu pri linearni DNA in od česa pri plazmidni DNA?

Naloga 3

K sliki elektroforetske ločitve plazmidov napišite, kaj predstavljajo posamezne proge.

Naloga 4

Kako bi ocenili velikost izoliranega plazmida?

Vaja 7: Restriksijska analiza rekombinantne plazmidne DNA

Po zaključenem kloniranju dobimo rekombinantne bakterije, v katerih se nahajajo rekombinantni plazmidi. Bakterije, ki jih najpogosteje uporabljamo za kloniranje in s pomočjo katerih lahko že fenotipsko selekcioniramo rekombinantne plazmide so *Escherichia coli* DH5 α in *Escherichia coli* XL-1 Blue. Kljub temu da smo na začetku natančno načrtovali velikost in mesto vnosa inserta (PCR-pomnožka) v plazmidni vektor, pa ima DNA-konstrukt zaradi različnih genetskih mehanizmov, ki potekajo v bakterijah, na koncu lahko drugačno velikost in nukleotidno zaporedje od pričakovanega. Zato moramo rekombinantne plazmide pred vnosom v končno gostiteljsko celico preiskati z restriksijsko analizo in sekvenciranjem. Za restriksijsko analizo lahko uporabimo različne restriksijske encime, ki specifično režejo DNA ob razpoznavnem zaporedju nukleotidov. Razpoznavna zaporedja nukleotidov posameznih restriksijskih encimov lahko preberemo tudi v katalogih proizvajalcev teh encimov (npr. New England Biolabs, Thermo Fisher Scientific itd.). Restriksijski encimi izvirajo iz različnih vrst bakterij, zato prve črke imena encima v poševni pisavi označujejo okrajšavo bakterije, iz katere je bil dotični encim izoliran (npr. *EcoRV* iz bakterije *Escherichia coli*, *SmaI* iz bakterije *Serratia marcescens* itd.). Restriksijsko analizo izvedemo po navodilih proizvajalca encima, pri čemer zagotovimo encimu optimalne razmere za delovanje (pufer, temperaturo in čas delovanja). Nekateri proizvajalci encimov imajo v ta namen spletne aplikacije, ki nam svetujejo najbolj primeren restriksijski pufer v primeru, da sočasno režemo z dvema encimoma.

V današnji vaji boste:

- izvedli restriksijsko analizo rekombinantnega plazmida (pGEM z vnešenim PCR-produktom);
- restriksijske produkte preiskali z elektroforezo v agaroznem gelu;
- ocenili velikost restriksijskih produktov.

Za restrikcijo pripravite reakcijsko mešanico v 1,5 mL mikrocentrifugirki z naslednjimi sestavinami:

- 5 μ L plazmidne DNA (\cong 500 μ g DNA),
- 11 μ L H₂O,
- 2 μ L pufra pufra R (Thermo Fischer Scientific),
- 1 μ L restriksijskega encima *HindIII* (10 U/ μ L) (Thermo Fischer Scientific),
- 1 μ L restriksijskega encima *BglII* (10 U/ μ L) (Thermo Fischer Scientific).

Reakcijsko mešanico inkubirajte 1,5 h pri 37 °C.

Po končani restrikciji raztopini dodajte DNA-nanašalni pufer, premešajte ter 10 μ L nanesite v žepke 1 % agaroznega gela. V en žepok gela nanesite DNA-velikostni standard 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific). Po končani agarozni elektroforezi gel obarvajte v raztopini etidijevega bromida ter po razbarvanju presvetlite z UV-svetlobo nad transiluminatorjem. Položaj restriksijskih produktov primerjajte s položajem posameznih fragmentov DNA-velikostnega standarda.

Naloga 1

Ocenite velikost PCR-inserta, ki je bil kloniran v plazmidni vektor, in velikost celotnega rekombinantnega plazmida. Izpolnite spodnjo razpredelnico.

Velikost DNA-inserta <i>HindIII-BglII</i> (bp)	Velikost uporabljenega plazmidnega vektorja za kloniranje (bp)	Velikost celotnega plazmidnega vektorja pred restrikcijo (bp)

Vaja 8: Primerjava nukleotidnega zaporedja z zaporedji v prosto dostopnih bazah

Analiza nukleotidnih in proteinskih zaporedij iz mednarodnih, prosto dostopnih baz, njihova primerjava z novimi zaporedji ter sposobnost interpretacije poravnanih zaporedij so potrebna znanja, ki jih pri svojem delu uporablja mikrobni biotehnolog. Kritična ocena poravnanih sekvenc je toliko bolj pomembna, ker količina sekvenc v prosto dostopnih bazah v zadnjih letih zelo hitro narašča. Ključno orodje za primerjavo sekvenc in iskanje informacij v genomskih bazah je BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), ki ga lahko uporabljamo neposredno preko spletne povezave <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. S pomočjo orodja BLAST identificiramo v bazah tiste sekvence, ki so podobne sekvenci, ki jo preiskujemo. Zadetki so razvrščeni na osnovi dolžine in kakovosti ujemanja s sekvencami v bazah podatkov. Kakovost ujemanja razberemo iz vrednosti E, deleža ujemanja s tarčno sekvenco in deleža maksimalne podobnosti.

V današnji vaji se boste seznanili z osnovnimi funkcijami orodja BLAST, se naučili napovedati potencialno funkcijo proteinske sekvence in se naučili oceniti podobnost sekvence s sekvencami naloženimi v prosto dostopnih bazah, na osnovi vrednosti E, maksimalne podobnosti in deleža ujemanja dolžin (Newell, Fricker, Roco, Chandrangu in Merkel, 2013).

Orodje BLAST je torej namenjeno primerjavi sekvenc. Rezultat takšne analize je prikazan kot poravnava enakih ali podobnih nukleotidov oz. aminokislinskih ostankov dveh ali več sekvenc, in to tako, da je doseženo najboljše ujemanje. Tako orodje BLAST identificira sekvence v bazi NCBI (National Center for Biotechnology Information), ki so preiskovani sekvenci najbolj podobne.

Spodaj je aminokislinsko zaporedje proteina (v nadaljevanju preiskovana sekvenca), ki se nahaja v ovojnici nekaterih bakterij. S pomočjo programa BLAST za analizo proteinskih zaporedij (BLASTP) pridobite osnovne podatke o tem proteinu in odgovorite na spodnja vprašanja.

```
MKSKLVILSL LLAGATAATA QTKETFYSES FKDNIFVSVG VGAQGCVPND NFDYGFGKAI
TPLINVSVGK LFNPVWGIRG QVAGAWTTLY SNYGQPADTY IKS KNKHYFT MRADGMFNLS
NAIGGYNPDR LFTVSVFAGP GLTFAYKAYGD QDKVNALING SVGLAGQFNI NKYLDINIEA
RGEVSPSPFG NISSAHTDGA VSLTAGVITYT FGGKRFVSCG SQVDQNAINE ELNRYRSELA
KAQSDLADAK NALANVKPVT KEVVKEIEVA GPRAIFFQIG KSKIDDYGMV NIQLAAKILK
ANPDKKYKVA GYADKATGSA KWNQKLSEAR AQAVYDALIK EGVSKDQLEL VGFGGTANMF
GKNFLNRVVI LE
```

Naloga 1

Kakšno vrsto proteina oblikuje to aminokislinsko zaporedje glede na poimenovanje (označitev) proteina v mednarodni bazi? Iz katerega organizma izvira? Kakšen je delež ujemanja dolžine tega proteina in njegova maksimalna identičnost s proteini v mednarodni bazi? Izpolnite spodnjo razpredelnico.

Protein	Organizem	Ujemanje dolžin (%) (angl.: % query cover)	Vrednost E (angl.: E-value)	Maksimalna podobnost (%) (angl.: % max. identity)

Naloga 2

Glede na to, kje v organizmu se ta protein nahaja, menite, da je ta organizem po Gramu negativna ali po Gramu pozitivna bakterija? Utemeljite.

Naloga 3

Preberite definicije parametrov, ki so vključeni v rezultat analize BLAST na spletni strani https://www.youtube.com/watch?v=x_dAyY5-VNc ali <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62051/> in vpišite spodaj razlage za:

Vrednost E:

Maksimalna podobnost (%):

Naloga 4

Kot rezultat analize BLAST se pogosto prikažejo sekvence takšnih dolžin, ki predstavljajo le del dolžine preiskovane sekvence. NCBI definira parameter ujemanja dolžin kot delež dolžine preiskovane sekvence, ki je vključena v poravnavo. Ta številka je zelo pomembna, saj vpliva na vrednost E; večje kot je ujemanje dolžin obeh sekvenc, ki sta primerjani, nižja bo vrednost E in boljši bo zadenek. Spodaj sta dva primera rezultata analize BLAST, v obeh primerih je preiskovana sekvenca enaka. Ugotovite, v katerem primeru se preiskovana sekvenca glede na dolžino bolje ujema z zadetkom.

A)

membrane protein [Bacteroides fragilis]

Sequence ID: [WP_032567649.1](#) Length: 372 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 372

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
755 bits(1949) 0.0() Compositional matrix adjust. 371/372 (99%) 371/372 (99%) 0/372 (0%)					
Query	1	MKSKLVILSLLLAGATAATAQTKETFYSESEFKDNIFVSVGVAQGCVNPDNFDYGF GKAI			60
		MKSKLVILSLLLAGAT ATAQTKETFYSESEFKDNIFVSVGVAQGCVNPDNFDYGF GKAI			
Sbjct	1	MKSKLVILSLLLAGATVATAQTKETFYSESEFKDNIFVSVGVAQGCVNPDNFDYGF GKAI			60
Query	61	TPLINVSVGKLFNPVWGIRGQVAGAWTTLYSNYGQPADTYIKSKNKHYFTMRADGMFNLS			120
		TPLINVSVGKLFNPVWGIRGQVAGAWTTLYSNYGQPADTYIKSKNKHYFTMRADGMFNLS			
Sbjct	61	TPLINVSVGKLFNPVWGIRGQVAGAWTTLYSNYGQPADTYIKSKNKHYFTMRADGMFNLS			120
Query	121	NAIGGYNPDRFLT VSVFAGPGLTFAKAYGDQDKVNALINGSVGLAGQFNINKYLDINIEA			180
		NAIGGYNPDRFLT VSVFAGPGLTFAKAYGDQDKVNALINGSVGLAGQFNINKYLDINIEA			
Sbjct	121	NAIGGYNPDRFLT VSVFAGPGLTFAKAYGDQDKVNALINGSVGLAGQFNINKYLDINIEA			180
Query	181	RGEVSPSPFGNISSAHTDGAVSLTAGVTTYTFGGKRFVSCGSQVDQNAINEELNRYRSELA			240
		RGEVSPSPFGNISSAHTDGAVSLTAGVTTYTFGGKRFVSCGSQVDQNAINEELNRYRSELA			
Sbjct	181	RGEVSPSPFGNISSAHTDGAVSLTAGVTTYTFGGKRFVSCGSQVDQNAINEELNRYRSELA			240
Query	241	KAQSDLADAKNALANVKPVTKEVVKEIEVAGPRAIFFQIGKSKIDYGMVNIQLAAKILK			300
		KAQSDLADAKNALANVKPVTKEVVKEIEVAGPRAIFFQIGKSKIDYGMVNIQLAAKILK			
Sbjct	241	KAQSDLADAKNALANVKPVTKEVVKEIEVAGPRAIFFQIGKSKIDYGMVNIQLAAKILK			300
Query	301	ANPDKKYKVAGYADKATGSAKWNQKLSEARAQAVYDALIKEGVSKDQLELVGFGGTANMF			360
		ANPDKKYKVAGYADKATGSAKWNQKLSEARAQAVYDALIKEGVSKDQLELVGFGGTANMF			
Sbjct	301	ANPDKKYKVAGYADKATGSAKWNQKLSEARAQAVYDALIKEGVSKDQLELVGFGGTANMF			360
Query	361	GKNFLNRVILE 372			
		GKNFLNRVILE			
Sbjct	361	GKNFLNRVILE 372			

B)

membrane protein [Pseudomonas stutzeri]

Sequence ID: [WP_019341002.1](#) Length: 267 Number of Matches: 1

Range 1: 151 to 229

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
74.3 bits(181) 4e-13 () Compositional matrix adjust. 36/80 (45%) 52/80 (65%) 1/80 (1%)					
Query 275	IFFQIGKSKIDDYGMVNIQLAAKILKANPDKKYKVAGYADKATGSAKWNQKLSEARAQAV				334
	+ F + K+ + GM ++Q A LK NPD+K + GY D +TGS +NQ+LSE RA+AV				
Sbjct 151	VLFDLKADLKPAGMRDVQKLADFLKENPDRKLVIEGYTD-STGSDSYNQQLSERRAEAV				209
Query 335	YDALIKEGVSKDQLELVGFG				354
	Y ALI GV +++ VG+G				
Sbjct 210	YRALIHAGVDAQRIQTVGYG				229

Naloga 5

Kot rezultat analize BLAST ste dobili razvrščene zadetke glede na podobnost preiskovanega proteina s proteini v mednarodnih bazah. Zanima vas, ali je ta protein prisoten v dveh dobro proučenih bakterijah: *Bacillus subtilis* (predstavnik po Gramu pozitivne bakterije) in *Escherichia coli* (predstavnik po Gramu negativne bakterije). V tem primeru prav tako uporabite program BLASTP, v katerega vnesete preiskovano sekvenco, ob tem spodaj na isti spletni strani vpišete ime organizma, s katerim boste primerjali vašo sekvenco ("Bacillus subtilis (taxid: 1423)" oz. "Escherichia coli (taxid: 562)"). Po opravljeni analizi izpolnite spodnjo preglednico.

Organizem	Ime proteina	Ujemanje dolžin (%) (angl.: % query cover)	Vrednost E (angl.: E-value)	Maksimalna podobnost (%) (angl.: % max. identity)
<i>Bacteroides fragilis</i>				
<i>Bacillus subtilis</i>				
<i>Escherichia coli</i>				

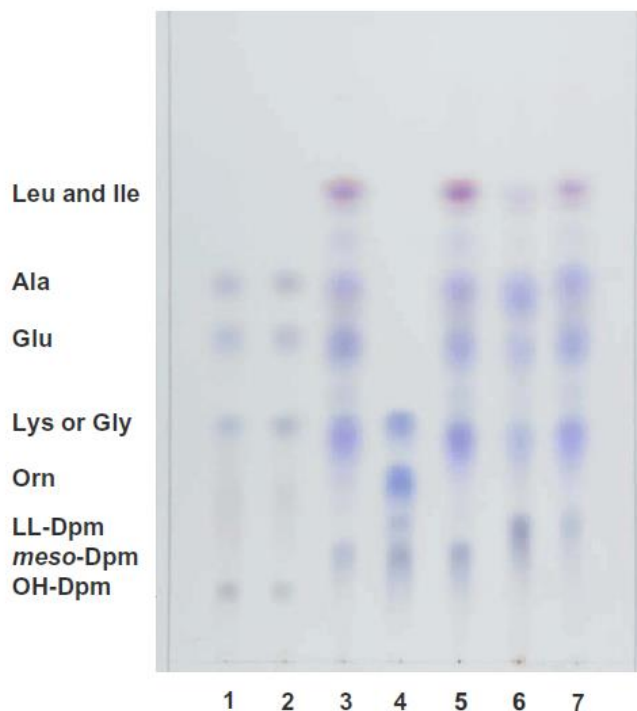
Na osnovi vrednosti E ocenite, ali se gen za ta protein nahaja v *E. coli* oz. *B. subtilis*. Utemeljite.

Ali so ti rezultati v skladu s teoretičnimi vedenjem o zgradbi bakterije *E. coli* in *B. subtilis*? Utemeljite.

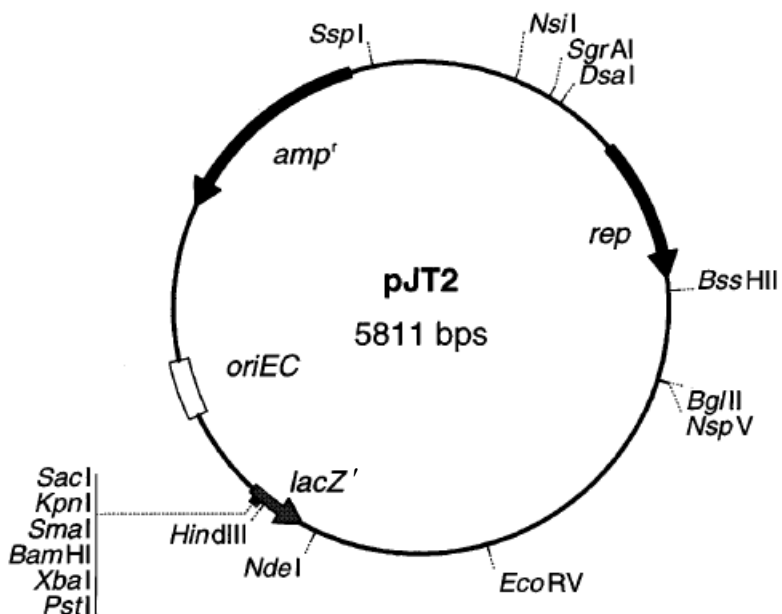
Kako je mogoče, da ima protein bakterije *B. subtilis* večjo maksimalna podobnost (%) s preiskovanim proteinom kot v primeru *E. coli*, ampak manjšo ujemanje dolžin (%)? Razložite.

Priloge

Priloga A: Identifikacija aminokislin po separaciji vzorca s tankoplastno kromatografijo (Vir: Schumann, 2011). Progi 1 in 2: hidrolizat peptidoglikana, progi 3, 5–7: celični lizat, proga 4: standard, sestavljen iz *mezo*-Dpm, LL-Dpm, Orn in Lys. Proge: 1, *Rugosimonospora acidiphila* DSM 45227^T; 2, *Rugosimonospora africana* DSM 45227^T; 3, *Brevibacterium frigoritolerans* DSM 8801^T; 5, *Bacillus subtilis* DSM 10^T; 6, *Kribbella antibiotica* DSM 15501^T; 7, *Kribbella flavida* DSM 17836^T. Okrajšave: OH-Dpm, 2,6-diamino-3-hidroksipimelična kislina; Dpm, 2,6-diaminopimelična kislina.



Priloga B: Genetska karta plazmidnega vektorja pJT2. Okrajšave: *lacZ'*, gen za α -peptid β -galaktozidaze; *oriEC*, začetek replikacije plazmida pUC18; *rep*, gene za replikacijo plazmida pK2-1 (Trček, Raspor in Teuber, 2000); *amp^r*, gen za odpornost proti ampicilinu. Puščice predstavljajo smer transkripcije, označena so samo restrikcijska mesta, ki režejo plazmidno DNA na enem samem mestu. Nukleotidno zaporedje plazmida pJT2 je shranjeno v bazi EMBL/DBJ/GenBank pod oznako AJ009780.



Literatura

- Jeske, O., Schüler, M., Schumann, P., Schneider, A., Boedeker, C., Jogler, M., . . . Jogler, C. (2015). Planctomycetes do possess a peptidoglycan cell wall. *Nature Communications*, 6, 7116.
- Lu, Y., Wang, L., Xue, Y., Zhang, C., Xing, X.-H., Lou, K., . . . Su, Z. (2009). Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), 135–141.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. in Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (14. izd.). Boston: Pearson.
- Mojib, N., Farhoomand, A., Andersen, D. T. in Bej, A. K. (2013). UV and cold tolerance of a pigment-producing Antarctic *Janthinobacterium* sp. Ant5-2. *Extremophiles*, 17(3), 367–378.
- Newell, P. D., Fricker, A. D., Roco, C. A., Chandrangsu, P. in Merkel, S. M. (2013). A small-group activity introducing the use and interpretation of BLAST. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 14(2), 238–243.
- Schumann, P. (2011). Peptidoglycan structure. V F. Rainey in A. Oren (ur.), *Taxonomy of Prokaryotes* (str. 101–129). Chennai: Academic Press.
- Thieman, W. J. in Palladino, M. A. 2012. *Introduction to Biotechnology* (3. izd.). Boston: Pearson.
- Trček, J., Raspor, P. in Teuber, M. (2000). Molecular identification of *Acetobacter* isolates from submerged vinegar production, sequence analysis of plasmid pJK2-1 and application in development of a cloning vector. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(3), 289–295.



Univerza v Mariboru

Fakulteta za naravoslovje
in matematiko