

Digestija genomske DNA restrikcijskim endonukleazama

Kovač, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:726622>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-02**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Jelena Kovač

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

Digestija genomske DNA restrikcijskim endonukleazama

Završni rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Jelena Kovač

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

Digestija genomske DNA restrikcijskim endonukleazama

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. prof.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
2. prof.dr.sc. Sonja Vila
3. doc.dr.sc. Sunčica Kujundžić

Osijek, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij, smjer Hortikultura
Jelena Kovač

Završni rad

Digestija genomske DNA restriksijskim endonukleaza

Sažetak: Restriksijska endonukleaza je naziv za enzim pronađen u bakterijskim stanicama kao dio njihova restriksijsko modifikacijskog sustava koji im služi u obrani i razgradnji virusne DNA. Cilj ovog istraživanja je bio izolirati genomsku DNA iz tri biljne vrste s različitim veličinom genoma te provesti uspješnu digestiju genomske DNA restriksijskim endonukleazama. U radu su korištene vrste *Brachypodium distachyon* L. i kukruz (*Zea mays* L.) i šest restriksijskih endonukleaza. Genomska DNA izolirana je koristeći CTAB metodu, a digestija izolirane DNA je optimizirana te su rezultati cijepanja provjereni elektroforezom. Utvrđeno je da su najpogodniji enzimi za cijepanje genomske DNA *Brachypodium distachyon* L., *EcoRI* i *BamHI*, a za *Zea mays* L. to su enzimi *HindIII*, *RspRSII*, *EcoRI*, pri uvjetima inkubacije i volumenu sastavnica restriksijskih smjesa propisanih od strane proizvođača.

Ključne riječi: izolacija DNA, restriksijske endonukleaze, digestija, *Brachypodium distachyon* L., *Zea mays* L.

22 stranice, 4 tablice, 28 slika, 10 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju diplomskih i završnih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

BASIC DOCUMENT CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Horticulture
Jelena Kovač

BSc Thesis

Restriction endonuclease digestion of genomic DNA

Summary: Restriction endonuclease is the name for an enzyme found in bacterial cells as part of their restriction modification system that are used in defense and degradation of foreign DNA. The aim of the study was to isolate genomic DNA from three plant species with different genome sizes and to perform successful digestion of genomic DNA with restriction endonucleases. The species *Brachypodium distachyon* L. and maize (*Zea mays* L.) and six restriction endonucleases were used in the work. Genomic DNA was isolated using the CTAB method, digestion of the isolated DNA was optimized and the cleavage results were verified by electrophoresis. It was determined that the most suitable enzymes for genomic DNA of *Brachypodium distachyon* L. are *EcoRI* and *BamHI*, and for *Zea mays* L. to su enzimi *HindIII*, *RspRSII*, *EcoRI*, under the conditions of incubation and the volume of components of the restriction mixtures prescribed by the manufacturer.

Key words: DNA isolation, restriction enzyme, digestion, *Brachypodium distachyon* L., *Zea mays* L.

22 pages, 4 tables, 28 figures, 10 references

BSc Thesis is archived: in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. MATERIJAL I METODE	2
2.1. Biljni materijal	2
2.1.2 Enzimi	3
2.2 Metode	5
2.2.1 Uzgoj klijanaca	5
2.2.2 Izolacija genomske DNA	7
2.2.3 Mjerenje koncentracije i čistoće izolirane DNA	12
2.2.4 Razgradnja biljne DNA restrikcijskim endonukleazama	13
2.2.5 Metoda elektroforeze	15
3. REZULTATI I RASPRAVA	17
4. ZAKLJUČAK	21
5. LITERATURA	22

1.UVOD

Tehnologija rekombinantne DNA kojoj je drugi naziv genetičko inženjerstvo u današnjici je pronašla široku primjenu u granama kao što su biotehnologija, medicina, farmacija i poljoprivreda. U okviru biotehnologije služi za proizvodnju bioloških lijekova čija je djelatna tvar biološkog podrijetla iz ljudskog, životinjskog ili mikrobiološkog izvora, poboljšanja kakvoće hrane i drugih industrijskih proizvoda. U medicini se koristi u proizvodnji cjepiva, hormona, novih vrsta lijekova te u determinaciji gena za određene bolesti. S druge strane, dok je u ove dvije grane genetičko inženjerstvo uvriježeno i prihvaćeno u poljoprivredi i dalje postoji stigma prilikom spomena GMO hrana i biljka. Genetičko inženjerstvo u poljoprivredi ima važnu ulogu u razvoju poboljšanja biljnih otpornosti prema visokim temperaturama, suši, hladnoći i drugim abiotičkim čimbenicima, kao i poboljšanju prehrambene vrijednosti biljaka. Razvoj genetičkog inženjerstva usko je povezan s istraživanjem i otkrićem restrikcijskih endonukleaza koje je započelo 1952. godine. Restrikcijska endonukleaza je naziv za enzim pronađen u bakterijskim stanicama kao dio njihova restrikcijsko modifikacijskog sustava koji im služi u obrani i razgradnji virusne DNA, odnosno bakteriofaga, vrste virusa koji napadaju bakterijske stanice. Za njihovo otkriće zaslužni su znanstvenici Werner Arber, Daniel Nathans i Hamilton Smith kojima je dodijeljena Nobelova nagrada 1978. godine (Godinić Mikulčić, 2020.). Značaj restrikcijskih endonukleaza je u njihovoj sposobnosti prepoznavanja određene nukleotidne sekvencije, odnosno restrikcijskog mjesta i potom presijecanja molekule DNA na točno određenim redosljedima od 4 do 8 nukleotidnih parova baza. Smatramo ih “molekularnim škarama za DNA”. Svaka izolirana restrikcijska endonukleaza ima individualni naziv prema vrsti, rodu i soju bakterije iz koje su izolirane, prema principu prvo slovo označava rod, druga dva slova su prva dva slova vrste, a potom slijedi slovo koje označava soj te rimski broj. Tehnologija rekombinantne DNA temelji se na ugradnji stranog gena u genom eukariotskih ili prokariotskih stanica, uz pomoć bakterijskih virusa koje nazivamo vektori. Postupak se provodi izolacijom i izrezivanjem određenih sekvenci gena strane i vektorske DNA uz pomoć restrikcijskih endonukleaza, a potom ugradnje strane DNA u vektorsku. Ovim procesom dobiven je lijek inzulin koji se primjenjuje za liječenje šećerne bolesti, on ujedno i prvi lijek proizveden tehnologijom rekombinantne DNA 1982. godine (Pavlica M., 2022.). Cilj završnog rada je provesti uspješnu digestiju biljne genomske DNA restrikcijskim endonukleazama.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Biljni materijal

U radu su korištene vrste *Brachypodium distachyon* L. Bd-21 i B-21, kukruz (*Zea mays* L.) koje pripadaju biljnoj porodice trava (*Poaceae*) te soja (*Glycine max* L.)

Brachypodium distachyon L. je samooplodna, jednogodišnja biljka, niskog rasta (do 20 centimetara u punoj fazi zrelosti) s niskim zahtjevima za uzgoj i životnim ciklusom kraćim od četiri mjeseca. Veličina genoma mu iznosi 0,36-0,4 pg što je ujedno jedan od najjednostavnijih genoma u trava. Diploid je koji sadrži pet kromosoma u haploidnom obliku, odnosno $2n=10$ (Draper i sur., 2001.)

Zea mays L. je stranooplodna, jednogodišnja biljna vrsta. Veličina genoma mu iznosi 2,4 Gb te je diploid, a u haploidnom obliku sadrži 10 kromosoma (Ensembl Genomes, 2022.). Područje uzgoja mu je vrlo široko, uzgaja se u cijelome svijetu te je po zasijanim površinama treća kultura u svijetu nakon pšenice i riže, od velikog je značaja kako za ljudsku, tako i za životinjsku ishranu, u obliku zrna i silaže.

Soja (*Glycine max* (L.) Merr.) je jednogodišnja biljka iz porodice *Fabaceae* ili *Leguminosae* (mahunarke ili lepirnjače). Glavni je izvor bjelančevina visokih hranidbenih vrijednosti te značajna uljna kultura (Vratarić i Sudarić, 2010.). Izrazito je samooplodna, diploidni tetraploid ($2n = 40$), veličine genoma približno 1,1 Gb (Schmutz i sur., 2010.).

U porodici *Poaceae* pripadaju i biljne vrste strnih žitarica kao što su pšenica, raž, ječam, zob i prosolikih žitarica, riža. Navedeni usjevi posjeduju važnu ulogu u prehrani čovječanstva u vidu ishrane ljudi i životinja, u proizvodnji obnovljivih izvora energije te u industrijskoj preradi (Kovačević i Rastija, 2014.). Biljne vrste korištene u ovom radu posjeduju uzgojne i genetičke karakteristike koje omogućavaju i pojednostavljuju procese eksperimentalnog sustava u poboljšanju otpornosti i prehrambene vrijednosti žitarica (The International Brachypodium Initiative, 2010.). Upravo tim uvidom njihove važnosti i značaja, odabrane su za biljne materijale i u ovom procesu istraživanja i digestije genomske DNA.

2.1.2 Enzimi

Restriksijski enzimi ili restriksijske endonukleaze su katalitički proteini pronađeni su u bakterijskim stanicama u kojima obavljaju funkciju razgradnje virusne DNA. Ovu ulogu vrše cijepanjem fosfolipidnih veza katalizom hidrolize unutar DNA lanca na specifičnom mjestu koje nazivamo restriksijsko mjesto. Restriksijsko mjesto je jedinstveno za svaku endonukleazu, a sastoji se od 4 do 8 nukleotidnih parova baza, nukleotidne baze predstavljaju osnovnu kemijsku podjedinicu građe molekule DNA, razlikujemo četiri vrste adenin, gvanin, timin i citozin. Prema podacima dosadašnjeg istraživanja poznata su i opisana četiri tipa endonukleaza, koji se međusobno razlikuju prema strukturi, specifičnosti cijepanja i kofaktorima (<https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/restriction-enzymes>). U ovom radu je korišteno nekoliko vrsta restriksijskih enzima Tipa II: BamHI, EcoRI, PstI, HindIII, Tru9 I, RspRSII.

BamHI je restriksijska endonukleaza koja je naziv dobila prema vrsti bakterije iz koje je izolirana *Bacillus amyloliquefaciens* soj H1. Prepoznaje i cijepa sekvencu DNA na restriksijskom mjestu 5'GGATCC 3'- 3'CCTAGG 5'. Za restriksijsku digestiju s enzimom BamHI korišten je pripadajući pufer MULTI-CORE.



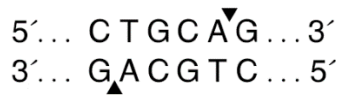
Slika 3. Obrnuto ponavljajuća sekvencija (palindrom) koji prepoznaje i cijepa enzim BamHI (Izvor: <https://international.neb.com/products/r0136-bamhi#Product%20Information>)

EcoRI je restriksijska endonukleaza koja je naziv dobila prema vrsti bakterije iz koje je izolirana *Escherichia coli*. Prepoznaje i cijepa sekvencu DNA na restriksijskom mjestu 5'GAATTC 3'- 3'CTTAAG 5'. Za restriksijsku digestiju s enzimom EcoRI korišten je pripadajući pufer H.



Slika 4. Obrnuto ponavljajuća sekvencija (palindrom) koji prepoznaje i cijepa enzim EcoRI (Izvor: <https://international.neb.com/products/r0136-bamhi#Product%20Information>)

PstI je restriksijska endonukleaza koja je naziv dobila prema vrsti bakterije iz koje je izolirana *Providencia stuartii*. Prepoznaje i cijepa sekvencu DNA na restriksijskom mjestu 5'CTGCAG 3'- 3'GACGTC 5'. Za restriksijsku digestiju s enzimom PstI korišten je pripadajući pufer MULTI-CORE.



Slika 5. Obrnuto ponavljajuća sekvencija (palindrom) koji prepoznaje i cijepa enzim PstI (Izvor: <https://international.neb.com/products/r0136-bamhi#Product%20Information>)

HindIII je restriksijska endonukleaza koja je naziv dobila prema vrsti bakterije iz koje je izolirana *Haemophilus influenzae*. Prepoznaje i cijepa sekvencu DNA na restriksijskom mjestu 5'AAGCTT 3'- 3'TTCGAA 5'. Za restriksijsku digestiju s enzimom HindIII korišten je pripadajući pufer MULTI-CORE.



Slika 6. Obrnuto ponavljajuća sekvencija (palindrom) koji prepoznaje i cijepa enzim HindIII (Izvor: <https://international.neb.com/products/r0136-bamhi#Product%20Information>)

Tru9I je restriksijska endonukleaza koja prepoznaje i cijepa sekvencu DNA na restriksijskom mjestu 5'TTAA 3'- 3'AATT 5'. Za restriksijsku digestiju s enzimom Tru9I korišten je pripadajući pufer SuRE/Cut buffer M.



Slika 7. Obrnuto ponavljajuća sekvencija (palindrom) koji prepoznaje i cijepa enzim Tru9 I (Izvor: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/315/872/11464825001bu1.pdf>)

RspRSII je restriksijska endonukleaza koja prepoznaje i cijepa sekvencu DNA na restriksijskom mjestu 5'TTAA 3'- 3'AATT 5'. Za restriksijsku digestiju s enzimom RspRSII korišten je pripadajući pufer T.

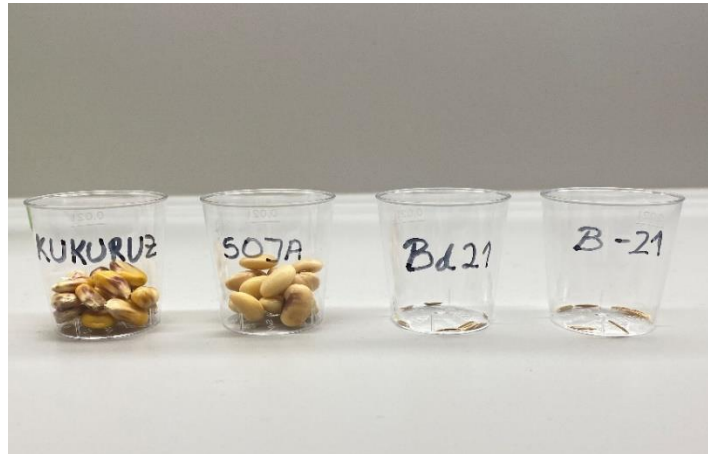


Slika 8. Obrnuto ponavljajuća sekvencija (palindrom) koji prepoznaje i cijepa enzim RspRSII (Izvor: [https://www.takarabio.com/products/cloning/restriction-enzymes/msei-\(rsprsii\)](https://www.takarabio.com/products/cloning/restriction-enzymes/msei-(rsprsii)))

2.2 Metode

2.2.1 Uzgoj klijanaca

U ovom istraživanju korištene su biljne vrste *Brachypodium distachyon*, *Zea mays* i *Glycine max*. Sjeme odabranih biljnih linija najprije je očišćeno, a zatim odloženo u zasebne čašice koje su prethodno obilježene.



Slika 9. Sjeme kukuruza, soje i *Brachypodium* (foto original: J. Kovač)

Potom su pripremljeni čisti plastični kontejneri za klijanje koji su zatim napunjeni supstratom za uzgoj biljaka. Nakon toga zasijane su po četiri sjemenke od svake linije u zasebne kućice u dva ponavljanja te je svaka zasebna kućica označena nazivom sjemena određene biljne linije.



Slika 10. Posijan i označen biljni materijal (foto original: J. Kovač)

Zasijano sjeme stavljeno je u komoru za uzgoj biljnog materijala u uvjetima dugog dana (16/8), dnevne temperature 24°C, a noćne 18°C uz svakodnevno zalijevanje destiliranom vodom te nadziranje razvitka procesa njihova rasta i razvoja.



Slika 1. Klijanci *Brachypodium distachyon* L. (foto original: J. Kovač)



Slika 2. Klijanci kukuruza (foto original: J. Kovač)

2.2.2 Izolacija genomske DNA

Nakon 14 dana, kada su klijanci izrasli na optimalnu veličinu uslijedio je postupak izolacije genomske DNA. Uzgoj klijanaca u komori rezultirao je nicanjem i uspješnim razvojem biljnih linija *Brachypodium distachyon* i *Zea mays*. Sjeme *Glycine max* nije niknulo te se ova linija iz toga razloga nije koristila u daljnjim procesima izolacije i digestije biljne DNA. U istraživanju korištena je CTAB metoda koja ima široku primjenu u izdvajanju DNA iz različitih vrsta biljnog tkiva. CTAB je kationski deterdžent topiv u vodi i lako topiv u alkoholu. Tijekom ekstrakcije DNA iz biljnog tkiva dolazi u doticaj s biološkim membranama te oslobađa jezgru obavijanjem lipide i razaranjem membrane. Za sposobnost razaranja membrane zaslužna je amfipatska priroda CTAB-a, sačinjen je od dugog lanac ugljikovodika (hidrofobni rep) i pozitivno nabijenu trimetil amonijevu skupinu (hidrofilna glava). CTAB pufer sastoji se od cetil trimetil amonijev bromid ($C_{19}H_{42}NBr$), NaCl-a, Na_2EDTA (Ethilenediamintetraacetatna kisleina dinatrijeva sol dihidrat), TRIS-a (hidroksimetil)aminometan) i PVP-a (polivinilpirolidon). Uloga NaCl-a je u odstranjivanju proteina vezanih za DNA i njihovo održavanje u otopljenom obliku, a TRIS ima ulogu pufera prilikom oslobađanje citoplazme uslijed razgradnje stanične stijenke i membrane, održavajući povoljnu pH otopine za stabilnost biomolekula (Heikrujam i sur., 2020.).

Prije samog početka izolacije provedeno je nekoliko koraka, izolacijski pufer zagrijan je u vodenoj kupelji na temperaturu od $65^{\circ}C$ te je priređen prethodno rashlađeni izopropanol i čist i sterilizirana pribor za homogenizaciju tkiva, tučak i tarionik.



Slika 11. Sterilizirani tučci i tarionici za homogenizaciju tkiva (foto original J. Kovač)

Nedugo zatim iz uzgojenih klijanaca sa sterilnim škarama je odrezano i odvagano 20 mg lisnog tkiva za svaku pojedinu biljnu vrstu.



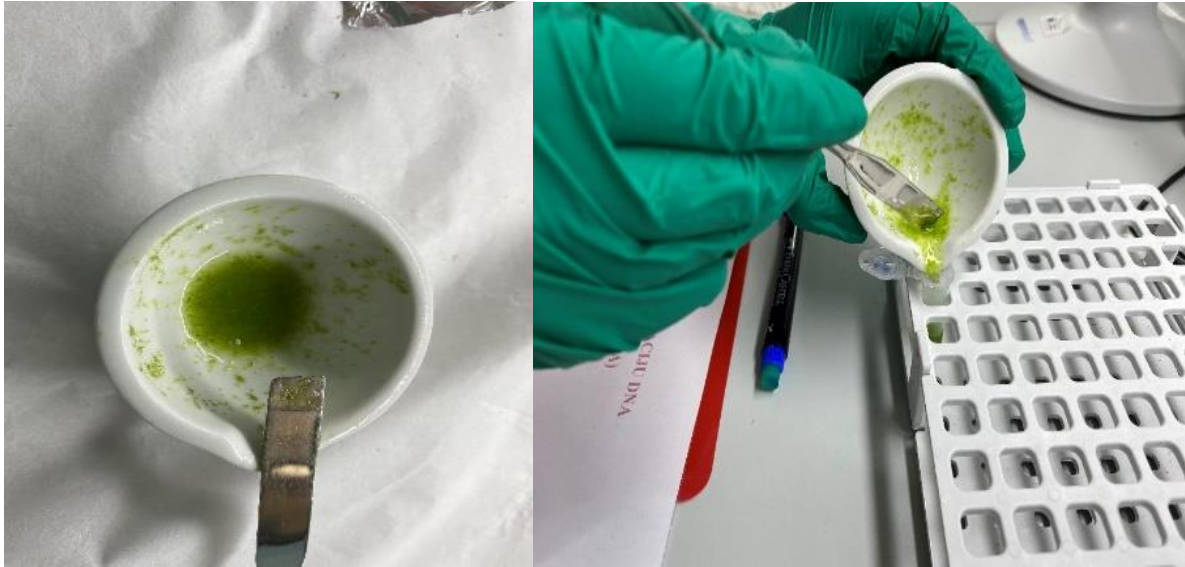
Slika 12. Rezanje i vaganje lisnog tkiva uzgojenih biljnih vrsta (foto original: J. Kovač)

Odvagana lisna tkiva potom su pažljivo premještena u zasebne tarionike te je u svaki pojedinačno dodan tekući dušik, čija je uloga biljno tkivo učiniti dodatno lomljivim. Uz pomoć tučca, kružnim i energičnim pokretima lisno tkivo je dobro usitnjeno do fine praškaste strukture.



Slika 13. i 14. Proces mljevenja lisnog tkiva (foto original: J. Kovač)

U svaki uzorak zatim je dodano pipetom 1000 μ l zagrijanog izolacijskog 2% CTAB pufera (1M Tris-HCl pH 8.0; 0,5 Na₂EDTA pH 8.0; 5 M NaCl; 10% SDS) i uz pomoć laboratorijskog štapića, prah i pufer su promiješani do homogene konzistencije (slika 15), a zatim je sadržaj izliven u prethodno numerirane tubice od 2 ml (slika 16) koje su kratko promiješane na vrtložnoj miješalici (vorteksu).



Slika 15. Otopina biljnog tkiva i pufera; Slika 16. Ulijevanje otopine biljnog tkiva u numerirane tubice (foto original: J. Kovač)

Tubice su ubrzo nakon toga odložene u vodenu kupelj prethodno zagrijanu na 65°C i inkubirane na 45 minuta uz pažljivo okretanje svakih 15 minuta (slika 17).



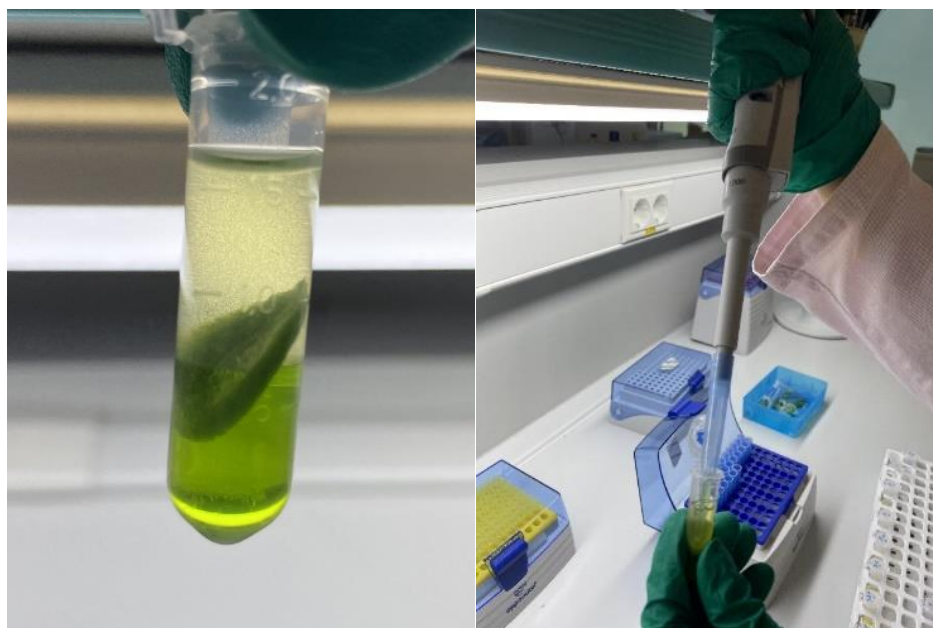
Slika 17. Inkubacija uzoraka u vodenoj kupelji (foto original: J. Kovač)

Nakon inkubacije, tubice su postavljene na led i u svaku tubicu pipetom je dodano 670 μ l kloroform izoamilnog alkohola (SEVAG-a) u omjeru 24:1 (slika 18) i pažljivo su okrenute nekoliko puta kako bi se sadržaj promiješao, a potom su stavljene na stalak za mućkanje u vremenskom periodu od 30 minuta.



Slika 18. Dodavanje kloroform izomilnog alkohola u tubice (foto original: J. Kovač)

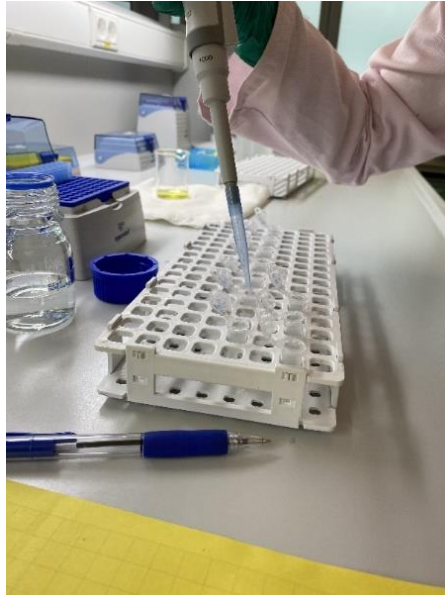
Zatim su tubice postavljene u laboratorijsku centrifugu i centrifugirane su na maksimalnoj brzini u trajanju od 8 minuta. Nakon centrifugiranja tubice su pažljivo izvađene, kako se nastali disk koji odvaja vodenu fazu od organske faze ne bi razbio (slika 19).



Slika 19. Odvajanje tekuće i krute faze nakon centrifugiranja; Slika 20. Izdvajanje vodene faze (foto original: J. Kovač)

Gornja vodena faza iznad diska zatim je oprezno izdvojena uz pomoć pipete (slika 20), pazeći da se pritom ne probije disk. U nove numerirane tubice izdvojeno je do 750 μ l vodene faze u kojoj se nalazi DNA. U svaku novu tubicu nedugo zatim je dodano 16 μ l RNAze (enzima koji

razgrađuje RNA) (slika 21) i tubice su ponovno postavljene na stalak za mućkanje na 30 minuta, nakon čega se u svaku tubicu dodalo 650 μ l hladnog izopropanola. Tubice su zatim pažljivo invertirane nekoliko puta dok DNA u obliku tanke, bjeličaste niti nije postala vidljiva.



Slika 21. Dodavanje enzima RNAze u tubice (foto original: J. Kovač)

Tubice su potom ostavljene na sat vremena unutar kojih su svakih 15 minuta lagano okrenute nekoliko puta. Nakon toga tubice su ponovno centrifugirane na maksimalnoj brzini 1 minutu nakon koje su pažljivo izvađene kako se ne bi oštetile pelete koje su se formirale na dnu tubica. Nedugo zatim iz svih tubica je oprezno izlivena tekućina pri tome pazeći da se peleta nije odvojila od stjenke tubice.

U tubice je zatim dodano 500 μ l 0,2 mM natrij acetata u 76% etanolu (slika 22) i potom se peleta “prala” 30 minuta lagano tresući tubice prstima. Potom je iznova uslijedilo centrifugiranje na maksimalnoj brzini 2 minute te nakon toga je opet slijedilo izlivanje tekućine pazeći pri tome na pelete.



Slika 22. Pipetiranje 0,2 mM natrij acetata u 76% etanolu (foto original: J. Kovač)

Potom je u tubice dodano 500 μ l 10 mM amonij acetata u 76% etanolu i peleta se ponovno “prala” 10 minuta istom tehnikom kao prethodno opisano te nakon toga su iznova postavljene na maksimalnoj brzini 2 minute na centrifugiranje. Naposljetku je iz tubica izlivena preostala tekuća faza, zatim se pipetom uklonio sav zaostao etanol.

Otvorene tubice su položene vodoravno na papir te ostavljene otprilike 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se pelete osušile. U konačnici u tubice s osušenim peletama je dodano 100 μ l TE pufera nakon čega su uzorci izolirane DNA pohranjeni u hladnjak na +4°C.

2.2.3 Mjerenje koncentracije i čistoće izolirane DNA

Uz pomoć spektrofometra utvrđena je koncentracija i čistoća iz uzoraka izolirane DNA. Spektrofometar je uređaj koji utvrđuje fotometričko mjerenje zračenja adsorbirano od pojedine supstance na točno određenoj valnoj duljini. Prilikom ove analize korištene su valne duljine 260 i 280 nm. Prvi korak je provođenje testa sa slijepom probom s TE puferom, a nakon utvrđene 0 valne duljine, započeto je s analizom uzoraka. Pipetom je uzeto i nanoseno 2 μ l od svakog pojedinog uzorka i od svakog je zasebno ispitana koncentracija u ng/ μ l i utvrđena čistoća iz omjera absorbancije A₂₆₀/A₂₈₀. Rezultati omjera absorbancije koji su u rasponu od 1,8 do 2 su indikatori da je DNA čista. Ukoliko je rezultat omjera absorbancije čistoće manji

od 1,8 to ukazuje da su u uzorku izolirane DNA prisutni tragovi ugljikohidrata i proteina, a ukoliko je omjer veći od 2 to ukazuje na tragove preostalog etanola.

2.2.4 Razgradnja biljne DNA restrikcijskim endonukleazama

Proces restrikcijske digestije proveden je u nekoliko koraka. Optimizacija procesa digestije provedena je 28.6., 29.6. i 18.7. prilikom kojih su korišteni različiti volumeni sastavnica reakcijskih smjesa, genomske DNA te period i temperature inkubacije.

Prilikom restrikcijske digestije provedene 28.6. korišteno je 2 μ l izolirane DNA uzoraka Bd-21 (2.) i K 6, koji su prema preporuci za digestiju prethodno razrijeđeni. U svakom uzorku korišteno je 0,2 μ l BSA i 16,3 μ l H₂O, ukupni volumen reakcije bio je 25,5 μ l (tablica 2).

Tablica 2. Prvi korak optimizacija reakcijske smjese i volumen sastavnica reakcijskih smjesa za restrikcijsku digestiju provedenu 28.6.

Enzim i pufer	Bd-21 (2.)	K 6
<i>EcoRI</i> 5 μ l Pufer H 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA
<i>PstI</i> 5 μ l Pufer MULTI-CORE 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA
<i>BamHI</i> 5 μ l Pufer MULTI-CORE 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA
<i>HindIII</i> 5 μ l Pufer MULTI-CORE 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA

Potom je provedena inkubacija preko noći u trajanju od 18 sati na temperaturi od 37°C u vodenoj kupelji. Vrijeme inkubacije, temperatura i koncentracije sastavnica reakcijske smjese određena su i praćena prema preporuci za digestiju uz pomoć navedenih restrikcijskih enzima.

Prilikom restrikcijske digestije provedene 29.6. korišteno je 2 μ l izolirane DNA uzoraka Bd-21 (2.) i 4 μ l izolirane DNA uzoraka K 1, K 5 i K 6 te 2 μ l λ DNA, a ukupni volumen reakcije bio je 25 μ l. U svakom uzorku korišteno je 0,5 μ l BSA i 15,5 μ l H₂O (tablica 3).

Tablica 3. Drugi korak reakcijske smjese i volumen sastavnica reakcijskih smjesa za restriksijsku digestiju provedenu 29.6.

Enzim i pufer	Bd-21 (2.)	λ DNA	Kukuruz
<i>EcoRI</i> 5 μ l Pufer H 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA	4 μ l DNA K 1
<i>HindIII</i> 5 μ l Pufer H 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA	4 μ l DNA K 5
<i>Tru9I</i> 5 μ l Pufer M 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA	4 μ l DNA K 6
<i>BamHI</i> 5 μ l Pufer H 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA	4 μ l DNA K 1
<i>PstI</i> 5 μ l Pufer H 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA	4 μ l DNA K 5
<i>RspRSII</i> 5 μ l Pufer T 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA	4 μ l DNA K 6

Potom je uslijedila inkubacija u trajanju od četiri sata u vodenoj kupelji pri temperaturi 37°C, nakon čega su uzorci stavljeni na led. U procesu digestije korištena je čista, nerazrijeđena izolirana DNA. Dok su vrijeme inkubacije, temperatura i koncentracije sastavnica reakcijske smjese određeni i praćeni prema preporuci proizvođača navedenih restriksijskih enzima.

Tablica 4. Treći korak reakcijske smjese i volumen sastavnica reakcijskih smjesa za restriksijsku digestiju provedenu 18.7.

Enzim i pufer	Bd-21 (2.)	K 6	λ DNA
<i>EcoRI</i> 5 μ l Pufer H 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA	2 μ l DNA
<i>PstI</i> 5 μ l Pufer H 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA	2 μ l DNA
<i>BamHI</i> 5 μ l Pufer H 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA	2 μ l DNA
<i>HindIII</i> 5 μ l Pufer H 2 μ l	2 μ l DNA	2 μ l DNA	2 μ l DNA

Prilikom restriksijske digestije provedene 18.7. korišteno je 2 μ l izolirane DNA uzoraka Bd-21 (2.) i K 6 te 2 μ l λ DNA, a ukupni volumen reakcije bio je 25 μ l. U svakom uzorku korišteno je 0,5 μ l BSA i 15,5 μ l H₂O (tablica 4).

Potom je uslijedila inkubacija u trajanju od četiri sata u vodenoj kupelji pri temperaturi 37°C, nakon čega su uzorci stavljeni na led. U procesu digestije korištena je čista, nerazrijeđena izolirana DNA. Dok su vrijeme inkubacije, temperatura i koncentracije sastavnica reakcijske smjese određeni i praćeni prema preporuci proizvođača navedenih restriksijskih enzima.

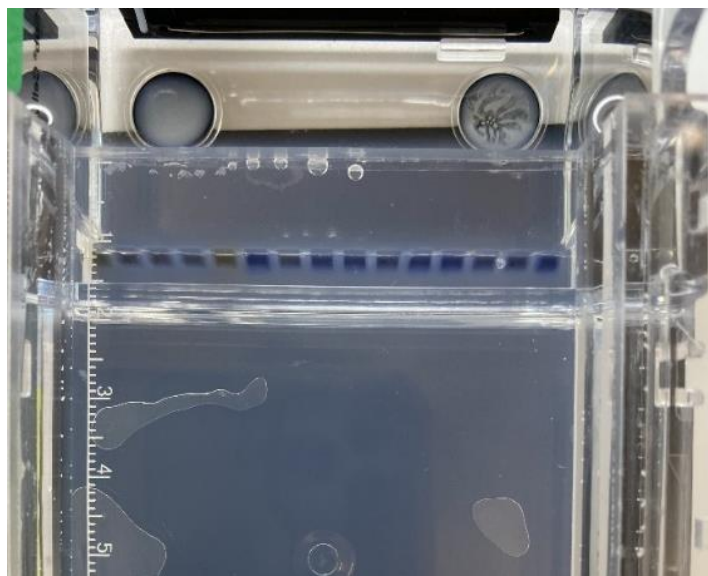
2.2.5 Metoda elektroforeze

Za pripremu jednog agaroznog gela najprije je izvagano 0,6 g agaroze u Erlemayer tikvici, a potom se u nju ulilo 60 ml 1x TBE. Otopina je zatim zagrijana u mikrovalnom aparatu na 2 minute uz povremeno miješanje sadržaja. Nakon što se agarozna otopina rashladila laganim miješanjem pod mlazom vode pri tome pazeći da voda ne dospije u sadržaj unutar Erlemayer tikvice. Zatim je u otopinu dodano 2 kapljice Olerup SSP® GelRed boje koja se interkalira između baza te tako DNA postaje vidljiva pod UV svjetlom. Naposljetku se otopina navedenog sastava ulila u prethodno pripremljenu kadnicu



Slika 23. Laboratorijski pribor za pripremu elektroforeze (foto original J. Kovač)

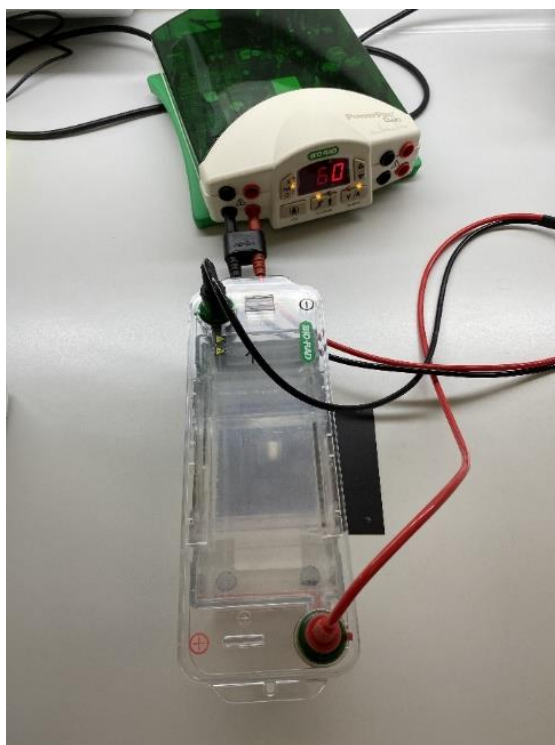
Nakon 15 minuta agarozni gel se polimerizirao do željene čvrstoće (slika 23). te je položen u uređaj Bio-Rad Mini-Sub® Cell GT za elektroforezu. U navedeni uređaj je uliveno 1xTBE pufera do označene granice za maksimum. Potom su prethodno pripremljeni uzorci obojeni s 2 μ l stop mix-a (5x SGB; 1M Tris-HCl pH 8,0, 0,5M Na₂EDTA, Bromfenolblue boja, 87% glicerol, SDS (natrijev dodecil sulfat)). Slijedila je priprema DNA standarda (ljestvi) za utvrđivanje veličine fragmenata u omjeru 1 (Promega® 1kbp DNA Ladder) : 1 (pripadajuća boja 6x Blue/Orange Loading Dye) : 4 (TE pufer). U svaku jažicu agaroznog gela je uz pomoć pipete stavljeno 5 μ l uzorka ili ljestvi (slika 24).



Slika 24. Jažice agaroznog gela ispunjene sa uzorkom i ljestvama

(foto original J. Kovač)

Naposljetku je uređaj za elektroforezu postavljen na sljedeće uvjete: 60 A, 50 mA i 40W u vremenskom periodu od sat i trideset minuta (slika 25). Slijedilo je očitavanje produkata digestije pomoću G:BOX F3 uređaja za snimanje gela.



Slika 25. Elektroforeza agaroznog gela s uzorcima digestirane genomske DNA

(foto original: J. Kovač)

3. REZULTATI I RASPRAVA

Izolacija kvalitetne DNA prvi je korak i preduvjet za genetičko inženjerstvo. Biljna tkiva *Brachypodium distachyon* i *Zea mays*, kao i ostalih biljnih vrsta sačinjena su od raznih kemijskih komponenti kao što su polisaharidi, polifenoli, proteini i lipidi, čija koncentracija varira ovisno o biljnim vrstama i djeluju kao kontaminanti tijekom izolacije DNA. Za izolaciju kao biljni materijal najpogodnije je svježije, mlado lisno tkivo staro do 20 dana (Heikrujam i sur.,2020.). Osnovna uloga izolacije DNA iz biljnog tkiva prema CTAB metodi opisanoj u poglavlju 2.2.2. je razgradnja biomembrana za oslobađanje i taloženje DNA u otopini te uklanjanje kontaminirajućih komponenta iz otopine. Izolirana DNA potom se podvrgne testu provjere koncentracije i čistoće opisane u poglavlju 2.2.3.. Rezultati koncentracije i čistoće 10 uzoraka izolirane biljne DNA prikazani su u Tablici 1.

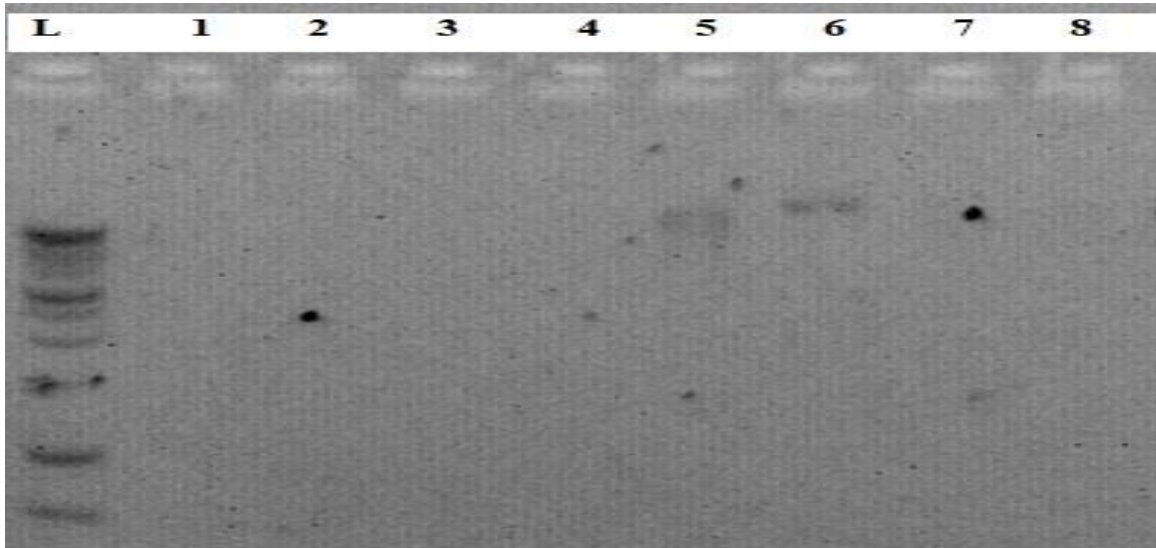
Tablica 1. Rezultati mjerenja koncentracije i čistoće izolirane DNA

Broj uzorka	Koncentracija u ng/μl	A 260/280
Bd – 21 (1.)	251, 54	1, 86
Bd – 21 (2.)	438, 9	1, 87
B-21 (1.)	150,49	1,75
B-21 (2.)	132,81	1,83
K 1.	309, 31	1, 86
K 2.	282, 86	1, 91
K 3.	39, 52	1, 8
K 4.	121, 58	1, 8
K 5.	245, 37	1, 85
K 6.	212, 25	1, 81

Koncentracija izolirane DNA je pokazatelj koliko nanograma DNA se nalazi u jednoj μl uzorka. Vrijednosti koncentracija izolirane DNA su se kretale između 39,52 i 438,9 ng/μl. Vrijednosti omjera absorpcija A260/280 kretali su se između 1,7 do 1,9, a njihovi iznosi sugeriraju nam na uspješnost izolacije u vidu čistoće. Omjer manji od 1,8 ukazuje na veći sadržaj zaostalih ugljikohidrata u uzorku, dok omjer veći od 2,0 ukazuje na višak etanola zaostao u uzorku zbog loše izvedenog pipetiranja ili nedovoljnog sušenja pelete. Sukladno dobivenim rezultatima izabrali smo uzorke s najvećim koncentracijama te omjerom apsorbancija A260/280 između 1,81 do 1,86 koji potvrđuju da je izolirana DNA čista, odnosno da ne posjeduje zaostatke ugljikohidrata ili etanola. Ti najpogodniji uzorci su Bd-21 (2.), K 1., K 5., K 6., s kojima se potom nadalje nastavlja proces digestije restrikcijским enzimima *BamHI*, *EcoRI*, *PstI*, *HindIII*, *Tru9I*, *RspRSII*. Završetkom digestije uslijedilo je elektroforeza odabranih uzoraka podvrgnutih

restriksijskoj digestiji opisane u poglavlju 2.2.5., a zatim očitavanje produkata digestije pomoću G:BOX F3 uređaja za snimanje

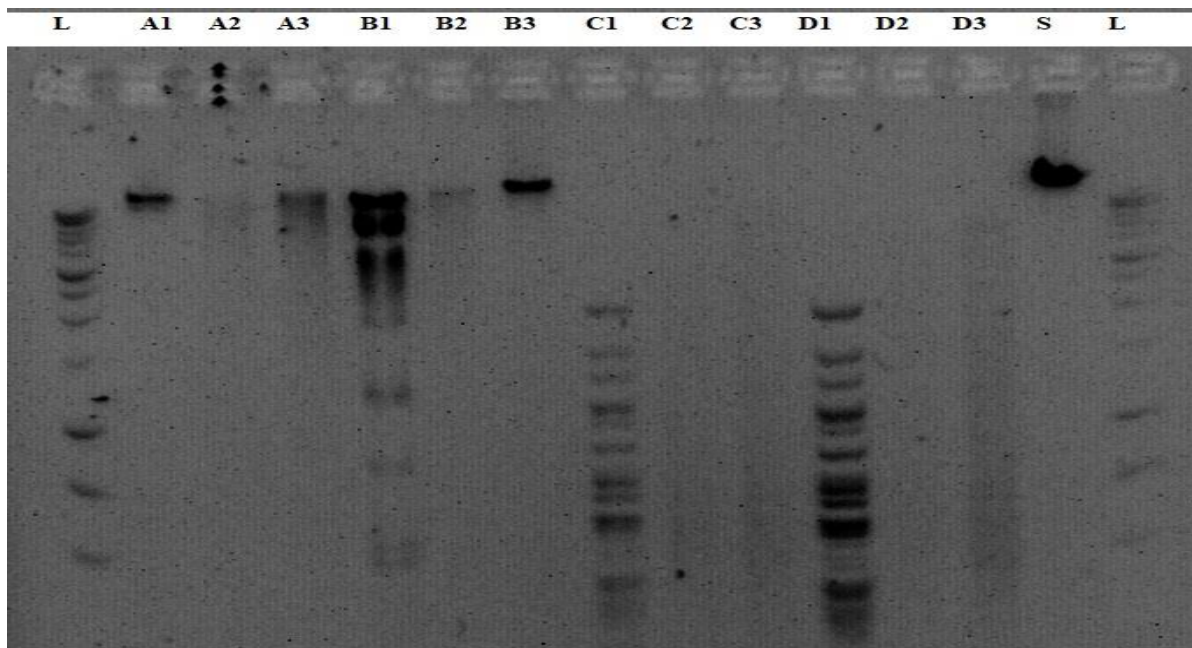
Rezultati i uspješnost digestije provedene provjereni su procesom elektroforeze 29.6., a rezultati provjere prikazani su na slici 26 .



Slika 26. Rezultati digestije genomske DNA restriksijskim endonukleazama 28.6. L- ljestve, 1.- Bd-21 s *EcoRI*, 2.- Bd-21 s *PstI*, 3.- Bd-21 s *BamHI*, 4.- Bd-21 s *HindIII*, 5.- K 6 s *EcoRI*, 6.- K 6 s *PstI*, 7.- K 6 s *BamHI*, 8.- K 6 s *HindIII* (foto original: J. Kovač)

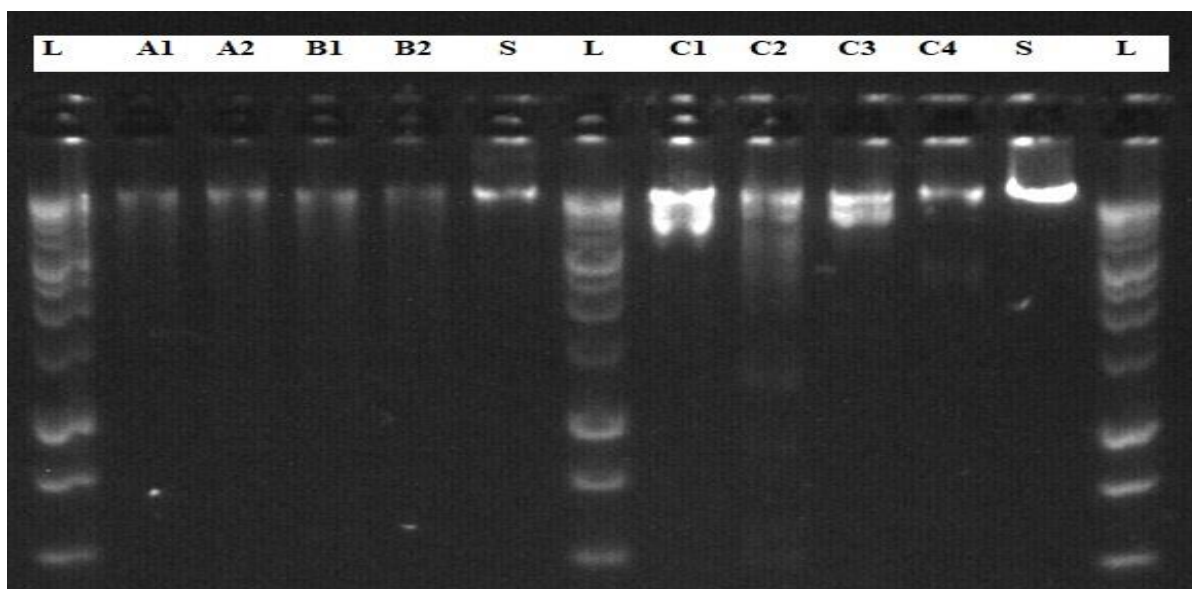
Prvi korak u optimizaciji digestije restriksijskim endonukleazama (28.6.) uočava se odsustvo uzoraka 1.,2.,3.,4.,7. i 8. Dok su uzorak 5. i 6. jedva zamjetni na agaroznom gelu. Time se dolazi do zaključka kako digestija nije uspješno provedena, odnosno nije došlo do cijepanja sekvenci DNA. Uzrok tomu je prema preporuci prilikom optimizacije korištenje razrijeđenih uzoraka DNA i inkubacija u trajanju od 18 sati, što je prouzrokovalo prestanak rada enzima. Rezultat toga je neuspješna digestija Bd-21 i slabe vrijednosti digestije K 6 sa enzimima *EcoRI* i *PstI*. Uzevši u obzir dobivene rezultate, u narednim koracima procesa optimizacije digestijama korak 2 i korak 3, korišteni su uzorci čiste i nerazrijeđene izolirane DNA te inkubacija prema uputama i protokolu proizvođača korištenih restriksijskih enzima. Uz potvrdu ispravnosti digestije korištenjem kontrolnog ili slijepog uzorka koji označava uzorak bez izolirane DNA.

Rezultati i uspješnost drugog koraka optimizacije digestije provedene 29.6. provjereni su procesom elektroforeze, a rezultati provjere prikazani su na slici 27.



Slika 27. Rezultati genomske digestije restriktivnim endonukleazama 28.6. L- ljestve, A1- λ DNA s *HindIII*, A2- Bd-21 s *HindIII*, A3- K 5 s *HindIII*, B1- λ DNA s *PstI*, B2- Bd-21 s *PstI*, B3- K 5 s *PstI*, C1- λ DNA s *Tru9I*, C2- Bd-21 s *Tru9I*, C3- K6 s *Tru9I*, D1- λ DNA s *RspRSII*, D2- Bd-21 s *RspRSII*, D3- K6 s *RspRSII*, S- slijepa proba (foto original J. Kovač)

Rezultati i uspješnost trećeg i posljednjeg koraka optimizacije digestije provedene 18.7. provjereni su procesom elektroforeze 19.7., a rezultati provjere prikazani su na slici 28.



Slika 28. Rezultati genomske digestije restriktivnim endonukleazama 18.7. L- ljestve, A1- Bd-21 s *EcoRI*, A2- Bd-21 s *BamHI*, B1- K6 s *EcoRI*, B2- K6 s *HindIII*, C1- λ DNA s *BamHI*, C2- λ DNA s *PstI*, C3- λ DNA s *EcoRI*, C4- λ DNA s *HindIII*, S- slijepa proba (foto original J. Kovač)

Drugi i treći korak digestije genomske DNA provedene 29.6 i 18.7. s čistom izoliranom DNA, volumenom sastavnica restrikcijskih smjesa i vremenom inkubacije preporučenim od proizvođača enzima, rezultirali su uspješnom digestijom sa sličnim dobivenim rezultatima cijepanja molekule DNA. Usporedbom rezultata digestije prikazanima na slikama 27. i 28. uočava se kako su najbolji rezultati digestije sorte *Brachypodium distachyon* L. provedeni uz pomoć enzima *EcoRI* i *BamHI*, dok su slabiji rezultati digestije dobiveni primjenom enzima *HindIII*, *PstI*, *Tru9 I* i *RspRSII*. S druge strane enzimi *HindIII*, *RspRSII*, *EcoRI* pokazuju uspješnost kod digestije *Zea mays* L. u odabranim uzorcima K 5 i K 6, dok enzimi *PstI* i *Tru9I* ne pokazuju u tolikoj mjeri učinkovitost. Prilikom digestije λ DNA s enzimima *HindIII*, *PstI*, *Tru9I*, *RspRSII*, *BamHI* i *EcoRI*, dobiveni su najbolji rezultati u kojima se jasno uočava mjesto i broj presijecanje DNA uz pomoć enzimima.

Nakon uspješno provedenog procesa digestije uz pomoć restrikcijskih enzima, izrezane sekvencije gena nadalje se upotrebljavaju u procesu tehnologije rekombinantne DNA. Proces se naziva molekularnim kloniranjem pri kojem uz pomoć istog restrikcijskog enzima izrezujem fragment strane i vektorske DNA, a potom željenu sekvenciju gena strane DNA ugrađujemo u vektorsku DNA i time dobivamo rekombinantni vektor koji se potom ugrađuje u stanicu domaćina. Najčešća stanica domaćina koja se koristi u ovom procesu je bakterija *Escherichia coli* u kojoj potom dolazi do umnožavanja i stvaranja velikog broja kopija sekvencija gena strane DNA. Postoje različite vrste vektora, a jedan od njih je BAC - bacterial artificial chromosomes (Pavlica M., 2022.). Upravo upotrebom ovog vektora proveden je istraživački rad Farrar i sur. (2007.), pri kojem je prvo proveden proces digestije izolirana DNA *Brachypodium distachyon* uz pomoć restrikcijskih enzima. U istraživanju je korištena izolirana DNA *Brachypodium distachyon*, a digestiju 0,5 μ g izolirane DNA su proveli upotrebom enzima *HindIII*. U razgradnji biljne DNA koristili su različite koncentracije *HindIII* enzima od 0 do 10 U/ μ l, uzorci s enzimom i puferom inkubirali su se 4 sata na ledu, kako bi došlo do razgradnje potom je uslijedila inkubacija uzoraka u trajanju od jednog sata pri temperaturi 37°C. Potom su procesom elektroforeze provjerili rezultate digestije.

Farrar i sur. (2007.) su u istraživanju dobili duže i jasnije izražene odsječke digestije. Rezultat tomu mogu biti različiti čimbenici, na primjer drugačiji uvjeti inkubacije ili veća koncentracija uz upotrebu većeg volumena izolirane DNA. Naposljetku se može zaključiti kako su obje digestije uspješne provedene, iako se razlikuju u određenim segmentima procesa. Time su rezultati obiju digestija prikladni za daljnji proces molekularnog kloniranja.

4. ZAKLJUČAK

Restriksijske endonukleaze ili restriksijski enzimi pronađeni su u bakterijskim stanicama i imaju sposobnosti prepoznavanja određene nukleotidne sekvencije i potom presijecanja molekule DNA na točno određenim redosljedima nukleotidnih parova baza. Restriksijski enzimi opisani su i podijeljeni u četiri tipa, a prilikom digestije genomske DNA u ovom radu korišteni su enzimi Tipa II u kojih spadaju *BamHI*, *EcoRI*, *PstI*, *HindIII*, *Tru9 I*, *RspRSII*. Prilikom ispitivanja rezultata digestije utvrđeno je da su najpogodniji enzimi za cijepanje genomske DNA *Brachypodium distachyon* L., *EcoRI* i *BamHI*, a za *Zea mays* L. to su enzimi *HindIII*, *RspRSII*, *EcoRI*, pri uvjetima inkubacije i volumenu sastavnica restriksijskih smjesa propisanih od strane proizvođača. Uz to za uspješnu digestiju neizostavna je visoka koncentracija i čistoća izolirane DNA. Ukoliko se uspješno obave sve tražene komponente i prate sve regulative, po završetku procesa digestije dobivaju se odsječci koji se dalje sekvenciraju.

5. LITERATURA

1. Godinić Mikulčić, V. (2020.): Povijesni i tehnološki razvoj genetičkoga inženjerstva u Hrvatskoj. *Studia lexicographica: časopis za leksikografiju i enciklopedistiku*, Vol. 14 No. 26, 91-102. Povijesni i tehnološki razvoj genetičkoga inženjerstva u Hrvatskoj (srce.hr)
2. Pavlica M. (2022.): Mrežni udžbenik iz genetike Tehnologija rekombinantne DNA ili genetičko inženjerstvo - Mrežni udžbenik iz genetike (pmf.hr)
3. Draper, J., Luis A.J. Mur, Jenkins, G. Gadab C. Ghosh-Biswas, Bablak, P., Hasterok, R., P.M. Routledge, A. (2001.): *Brachypodium distachyon*. A New Model System for Functional Genomics in Grasses. *Plant Physiol* 127(4): 1539-1555
4. Farrar, K., Donnison, I.S. (2007.): Construction and screening of BAC libraries made from *Brachypodium* genomic DNA. *Nature protocols* Vol. 2 No. 7, 1661-1674.
5. Ensembl Genomes (2022.): *Zea mays* Assembly and Gene Annotation. Details - *Zea_mays* - Ensembl Genomes 54
6. Kovačević, V., Rastija, M. (2014.): *Žitarice*. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek 8-9 ZITARICE udžbenik.pdf (unios.hr)
7. The International Brachypodium Initiative (2010.): Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463, 763–768
8. Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G.D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M.K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X., Shinozaki, K., Nguyen, H.T., Wing, R.A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R.C., Jackson, S.A. (2010.): Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463, 178-183
9. Heikrujam, J., R. Kishor., P. B. Mazumder (2020): *The Chemistry Behind Plant Dnk Isolation Protocols, Biochemical Analysis Tools – Methods For Bio-Molecules Studies*, 8. poglavlje.
10. <https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/restriction-enzymes>