

## Opravljanje diplomskih nalog s področja tehnologije rekombinantne DNA

doc. dr. Marko Dolinar

(študijsko leto 2009/10)

*Če vas tehnologija rekombinantne DNA zanima in želite opravljati diplomsko nalogo v zvezi s tem, se mi najprej javite, mesec ali dva pred začetkom dela pa si boste izbrali eno od tem, ki bodo takrat na voljo. Na naslednji strani so opisane teme za tekoče študijsko leto, postopek prijave pa je predstavljen na tej strani.*

Laboratorijsko delo bo potekalo na Katedri za biokemijo FKKT, ki ima laboratorij v prostorih Instituta »Jožef Stefan« na Jamovi 39. Najprimernejši čas za pripravo diplomske naloge je med junijem in februarjem, saj v poletnem semestru v laboratoriju potekajo nekatere vaje za dodiplomske študente.

Vsako leto lahko diplomsko nalogo pod mojim mentorstvom opravljata največ dva diplomanta. Če želite opravljati diplomsko nalogo pod mojim mentorstvom, se mi čim prej oglasite. Z delom lahko začnete, ko imate do konca študija še največ 2 izpita ali kolokvija.

Javite se lahko tudi zainteresirani za opravljanje raziskovalne ali diplomske naloge med študijem. Takšno delo je smiselno opravljati samo v primeru, da si za eksperimentalno delo lahko rezervirate vsaj 4 x pol dneva tedensko (ali 1 dan + 2-krat pol dneva) skozi 2 semestra. Eksperimentalni del bo seveda trajal dalj, pač odvisno od tega, koliko časa boste laboratorijskemu delu lahko namenili. Raziskovalno/diplomsko delo med študijem lahko pod mojim mentorstvom opravljajo samo študenti s povprečno oceno vsaj 8,5 in z opravljenimi izpiti iz biokemije, mikrobiologije in molekularne genetike.

Pričakovano trajanje diplomskega dela je 3 mesece (brez morebitnih prekinitev zaradi dokončanja študijskih obveznosti in drugih odsotnosti) ob obremenitvi 40 ur tedensko.

Pred začetkom laboratorijskega dela je treba predelati več člankov iz revij, ki se tičejo posameznih proteinov in laboratorijskih postopkov, zato svetujem, da računate na 1-2 tedna študija še pred začetkom dela v laboratoriju.

Teme bodo z naslednjih področij:

1. Priprava evkariontskega modularnega ekspresijskega vektorja
2. Raziskave funkcionalnih lastnosti povezovalnih zaporedij v fuzijskih proteinih
3. Analiza topnosti rekombinantnih proteinov v bakterijski citoplazmi v odvisnosti od N-končnega aminokislinskega zaporedja
4. Priprava sistema za usmerjeno mutagenezo na osnovi sinteznobiološkega vektorja pSB1AC3

*kje boste opravljali delo*

*prijava*

*začetek dela*

*delo med študijem –  
izjemoma*

*trajanje*

*pred začetkom*

*teme*

## 1. Priprava evkariontskega modularnega ekspresijskega vektorja

V preteklem letu smo pripravili prve lastne ekspresijske vektorje na osnovi sinteznobioloških klonirnih plazmidov in razvili novo metodo za ugotavljanje moči promotorjev. Kot naslednji korak načrtujemo pripravo evkariontskega prenosljivega vektorja, ki bi ga uporabili za izražanje rekombinantnih protiteles. Vektor bo racionalno načrtan in bo sestavljen iz številnih DNA-kaset, ki jih bo treba sestaviti po stopnjah, nato pa na primeru dokazati, da je uporaben za izražanje v sesalskih celičnih linijah.

### Metode:

Med delom bomo uporabili postopke kasetne mutageneze, PCR, kloniranja zapisov v bakterijah, transfekcijo celic in določanje ravni izražanja. Praktično delo naj bi trajalo (vsaj) 3 mesece, v primeru nepričakovanih težav pri delu tudi dlje.

## 2. Raziskave funkcionalnih lastnosti povezovalnih zaporedij v fuzijskih proteinih

Pri pripravi fuzijskih proteinov ne obstajajo natančna pravila glede načina povezovanja dveh fuzijskih partnerjev. V nekaterih primerih zadošča, da spojimo C-konec enega proteina z N-koncem drugega in proteina se zvijeta neodvisno, drugič pa neodvisnost dosežemo šele po vstavitvi povezovalnega zaporedja. Zanima nas, ali je mogoče postaviti pravila glede dolžine in sestave povezovalnih zaporedij v odvisnosti od velikosti globularnih fuzijskih partnerjev. V predhodnih raziskavah smo klonirali zapise za nekatere fuzijske partnerje, zdaj pa bo bilo treba zanimive pare vstaviti v ekspresijski vektor in jih povezati z likerji različne sestave in dolžin. Po indukciji izražanja bomo analizirali topnost, lokalizacijo in aktivnost rekombinantnih proteinov.

### Metode:

Med delom bomo uporabili postopke kloniranja v bakterijskih celicah, indukcijo izražanja genov, izolacijo rekombinantnih proteinov in določitev lastnosti fuzijskih partnerjev. Praktično delo naj bi trajalo 3 mesece, v primeru nepričakovanih težav pri delu tudi dlje.

## 3. Analiza topnosti rekombinantnih proteinov v bakterijski citoplazmi v odvisnosti od N-končnega aminokislinskega zaporedja

Ob pripravi novega ekspresijskega sistema smo ugotovili, da sta raven proizvodnje v citoplazmi in topnost zelo odvisna od N-končnega zaporedja proteina. Zato bi bilo treba natančneje raziskati, katere lastnosti so tiste, ki odločajo o topnosti. Zdi se, da je pomembnih več (nekateri so že znani, morda pa ne vsi), tako da je naloga povezana najprej z natančnim pregledom literature, nato pa bi se bilo treba odločiti za 3-5 smiselnih N-končnih mutant modelnega proteina (kokošjega cistatina), s katerimi bi lahko ugotovili, kaj vse vpliva na izražanje. Ta naloga je morda najbolj inventivna od vseh razpisanih, saj se da odkriti morda kaj povsem novega, hkrati pa ni lahka...

### Metode:

Zapis za kokošji cistatin bomo na 5'-koncu spremenili tako, da bomo po izražanju v *E. coli* dobili proteine z verjetno različnimi ravnmi izražanja in z različno topnostjo. Mutagenezo bomo izvajali bodisi z zamenjavo sintetičnih kaset ali s PCR, dobljene zapise pa bomo izrazili v citoplazmi. Ocenili bomo raven izražanja, določili topnost in morebitno aktivnost, iz rezultatov pa sklepali na potrebne lastnosti N-konca. Praktično delo naj bi trajalo vsaj 3 mesece, odvisno tudi od spoti dobljenih rezultatov.

## 4. Priprava sistema za usmerjeno mutagenezo na osnovi sinteznobiološkega vektorja pSB1AC3

Komercialni sistem za uvedbo mutacij na plazmidu ('metoda s tremi oligonukleotidi') je povezana z nakupom dragega vektorja. Podoben sistem bi lahko razvili v lastnem laboratoriju s preprostejšim vektorjem, ki bi hkrati bil kompatibilen s priporočenim načinom kloniranja v sintezni biologiji.

### Metode:

Izhodiščni vektor bomo mutirali v dveh regijah, nato pa na primeru preverili, ali je uporaben na enak način kot komercialni sistem. Med delom bomo uporabili postopke usmerjene mutageneze s PCR in kloniranja v bakterijskih celicah, nato pa bomo izvedli mutagenezo na plazmidu z lastnim vektorjem in preverili, kako uspešna je. Praktično delo naj bi trajalo 3 mesece.