

GENMODIFISERING AF BAKTERIER

GENSPLEJSNING AF E. COLI
BAKTERIER MED FARVEPROTEIN.

Anna Sofie Kjerkegaard Outzen, Johan Jensen & Nick Nissen.

Indledning

Gensplejsning af bakterier kan benyttes til at modificere egenskaber af en celle, såsom f.eks. at få en bakterie til at producere termofile-enzym, der gør det muligt for den at arbejde under høje temperaturer, som de naturligt ikke vil kunne overleve i, hvis deres enzymer ikke var egnet til det. Dette er brugbart i et hverdags sammenhæng ved f.eks. enzymer i vaskepulver der er blevet produceret fra genmodificeret bakterier, der er blevet ændret genetisk således at de kan producere skidt-nedbrydelse enzymer der er tilpasset 45°C som er den typiske temperatur for en normal tøjvask. Denne teknologi kan hermed bruges til at tilpasse mikroorganismer, så de bedre kan bruges effektivt i industrielle sammenhæng, hvilket kan være med til at øge kvaliteten af produkter såsom vaskepulver, så produktet ultimativt bliver billigere, og i nogle tilfælde mere miljøvenligt. Denne rapport vil omhandle et forsøg, hvor muligheden for at gensplejse E. coli bakterien (en bakterie ofte brugt i industrien) udforskes med henblik på at udtrykke et protein (eforRed farveprotein), som under naturlige forhold ikke kan dannes af bakterien.

Hypotese

Når en vektor transformeres ind i prokaryote celler, vil de transgene-celler kunne udvise egenskaber af det indsplejsede protein ved brug af cellens eget centrale dogme.

Teori

I de nedenstående afsnit vil teorien bag gensplejsning uddybes og forklares.

Responsgen (Vektor)

Responsgenet, er et udtryk for det gen som benyttes som vektor. En vektor har til formål at kunne optage donergenet (Forklares i afsnittet nedenfor), kunne indtrænge cellen gennem endocytose, og indsætte sig selv og donergenet ind i cellens genetiske kode.

Da et responsgen skal kunne optages af cellen der skal gensplejse, benyttes der oftest en plasmid, da bakterieceller har en naturlig egenskab til at kunne optage plasmider, og indsætte deres genetiske kode i deres egen genetiske kode (Bruun, 2011), og på denne måde kan cellen udtrykke donergenet. Udover at responsgenet skal kunne virke som transport-mediet, for at donergenet skal kunne optages i cellen, skal responsgenet også indeholde et antibiotikum-resistensgen (chloramphenicol-resistens), for at de transgene bakterier (bakterier der har optaget plasmidet) kan selekteres senere i processen.

Donergen

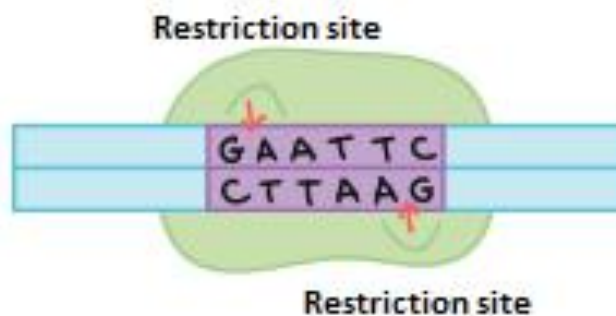
Donergenet, er et udtryk som bruges til at beskrive det gen som ønskes gensplejset ind i den prokaryote celle. Hertil er det det gen - som forklaret i det ovenstående afsnit - der indsættes i responsgenet (vektoren), og derigennem bliver indsat i bakteriecellens genetiske kode.

Restriction

For at donergen kan indsættes i responsgenet (plasmid), skal responsgenets DNA-sekvens åbnes, så der kan indsættes donergen - til dette benyttes restriktionszymer.

Restriktionszymer er enzymer der genkender palindrome (spejl lignet) nukleotidsekvenser i et gen, og kan klippe et bestemt sted i sekvensen, så enden af det restricted gen, har et stykke (ca. 4 nukleotider) af dens lagging-strand fri som single-strain DNA. Disse frie single-strain DNA ender af genet kaldes sticky-ends, da de har egenskaben til let at sætte sig sammen med en anden sticky-end, hvis stykke med single-strain DNA er komplementær til den første sticky end. Da sticky-ends har denne egenskab, benyttes restriktionszymer til at klippe både donergenets ender, og responsgenets ender for at donergen på denne måde kan indsættes i responsgenets restrictions sites.

Et eksempel på en palindrome sekvens, og et restriction site (klippe stedet) ses nedenfor:



(Wilkin, 2018)

For at klippe det korrekte sted på hhv. responsgenet og donergen, benyttes forskellige restriktionszymer som hver genkender forskellige palindrome sekvenser. Der benyttes desuden også 2 forskellige restriktionszymer til at klippe hver ende af donergen, for at donergen bliver indsat i responsgenet korrekt, og der ikke forekommer nogen inversion af gen-stykket når det indsættes i responsgenet. Nedenfor er en tabeloversigt over de forskellige restriktionszymer der benyttes til at klippe responsgenet og donergen, samt den restriction site i nukleotidsekvensen de genkender og klipper (Bruun, 2011).

	Restriktionszymer	Restriction site 1	Restriction site 2
Responsgenet	Xbal (1) + PstI (2)	5'... T [▽] CTAGA...3' 3'... AGATC [▲] T...5'	5'... CTGCAG [▽] ...3' 3'... G [▲] ACGTC...5'
Donergen	SpeI (1) + PstI (2)	5'... A [▽] CTAGT...3' 3'... TGATC [▲] A...5'	5'... CTGCAG [▽] ...3' 3'... G [▲] ACGTC...5'

Restriktionszymer fundet fra øvelsesvejledningen. Restriction sites fundet på (se kilde NEB).

Ligation

Når både responsgenet og donergenet er blevet klippet med restrictionenzymmer, kan responsgenet og donergenet potentielt sætte sig sammen da de begge har frie "sticky ends" hvis nukleotidsekvenser - pga. hvordan de hver er klippet af restriktionsenzymmerne - er komplementær til hinanden. Dog opstår der ofte fejl hvis de sticky ends i opløsningen skal sætte sig sammen naturligt, da responsgenet kan sætte sig sammen med det afklippet stykke DNA, og samle det fulde responsgen igen i stedet for at indsætte donergenet.

For at løse dette problem kan ligationsenzymmer benyttes til at specifikt samle responsgenet med donergenet. Ligationenzymmer virker ved at genkende specifikke nukleotidsekvenser, og samle hydrogenbindingen mellem nukleotidernes phosphat-grupper (Kahn, 2003).

Transformation

Når donergenet er indsat i responsgenet, kan plasmid-komplekset tilføjes til en opløsningen der indeholder bakterieceller der er klargjort til at optage plasmider (gjort kompetente), herefter vil bakterierne naturligt optage plasmid-komplekset gennem endocytose, og indsætte det i bakteriens arvemateriale. For at få bakterierne til at optage plasmid-komplekset hurtigere, kan man benytte *heat-shock* metoden, hvor bakterie-plasmid opløsningen opvarmes til 42°C over en meget kort periode (ca. 30 sekunder), længere opvarmning af opløsningen vil dræbe bakterierne og dermed have den uønsket effekt af heat-shock metoden (Bruun, 2011).

Selektion

Bagefter bakterier i bakterie kolonien har optaget plasmid-komplekset (plasmidet), skal de *transgene bakterier* (bakterierne der har optaget plasmidet) selekteres fra bakterierne der ikke har optaget plasmidet, hvis man ønsker at isolere produktet af gensplejsningen (de transgene bakterier). Til dette benyttes den antibiotika som responsgenet indeholder resistens over for, på denne måde indeholder de transgene bakterier også resistens over for antibiotikummet, og på denne måde selekteres kun de bakterier som har optaget plasmidet når antibiotikummet tilsættes en agarplade som indeholder bakterie kolonien der er tilsat plasmidet (Bruun, 2011).

Sikkerhed

I dette afsnit beskrives de sikkerhedsforanstaltninger, der skal tages hensyn til under forsøget.

Regler for GMO-lab

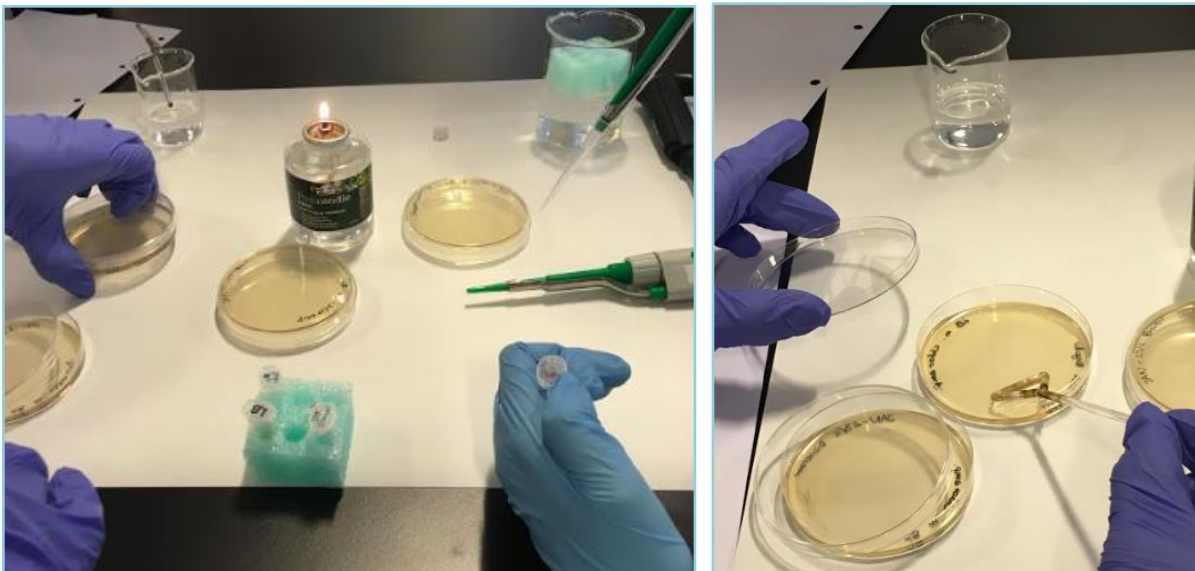
Når der arbejdes med genmodificerede organismer i laboratoriet, skal laboratoriet mærkes som GMO-lab. På den måde ved alle som befinder sig i laboratoriet såvel som udenfor, hvilke sikkerhedsmæssige forholdsregler de skal følge.

Kitlerne som anvendes i forbindelse med GMO-forsøg, må ikke forlade laboratoriet, da der er risiko for, at nogle af de genmodificerede organismer sidder på kitterne. Ligesom der i laboratoriet bæres kitlel, bæres der også handsker, således dem som udfører forsøget ikke er i direkte kontakt med GMO-bakterierne. Opstår der et behov for at skifte handsker undervejs i forsøget, vaskes der hænder så de nye handsker bliver påsat med rene hænder. Under forsøget foregår alt arbejde med papir på bordet, således bakterierne ikke slipper ud på bordet der arbejdes på. Dette autoklavres efter forsøget, på samme måde som alt det udstyr, der er blevet brugt under forsøget.

Forsøgsbeskrivelse

Forsøgsopstilling

På billederne herunder ses forsøgsopstillingen af forsøget:



Fremgangsmåde

Fremgangsmåden for øvelse 2.a og 2.b fremgår herunder som billeder fra Biosensor kittet fra Biotech Academy:

Fremgangsmåde:

1. Angiv hvilke koordinat du skal bruge:

Detektorgen: (I niveau 1 biosensor kittet findes kun ét detektorgen)

Responsgen:

2. Fyld en bøtte med is. Optø NEB Buffer 2.1 og tuben med dit valgte detektor- og responsgen på is. Det tager cirka 30 minutter.
3. Imens du venter, udregn hvor meget der skal tilsættes af hvert reagens til mastermixet. Husk at lave til én ekstra. Det skal i alt laves to mastermixes – et til responsgenet og et til detektorgenet. Vælg to grupper til at lave mastermix – én til hver mastermix. Udregn i tabellen herunder mængden af de forskellige reagenser i skal bruge i jeres mastermix.
4. **Grupper, som laver mastermix:** Markér et eppendorfrør så du ved at det er et mastermix – f.eks. med "Res MM" (for **Responsgen mastermix**) eller "Det MM". Tilsæt først vand og buffer til et eppendorfrør. Sæt låg på tuben og slå let på den for at blande. Man kan også blande ved at pipettere op og ned, men så risikerer man at danne en masse luftbobler. Stil restriktionsenzymene på is. Pipetter enzymet. Enzymet er opløst i glycerol, så der sidder ofte også enzym på siden af pipettespidsen. (Husk at skifte pipettespids før du pipetterer det næste enzym!) Bland forsigtigt mastermixet ved at slå på tuben. Slut af med at centrifugere begge rør med mastermix ved 5000 RPM i 1 min **VIGTIGT** husk at rørene skal stå overfor hinanden.

Responsgen mastermix

Reagens	Volumen	Master-mix
ddH ₂ O	2.8 µL	
10x Buffer 2.1	0.8 µL	
PstI	0.2 µL	
XbaI	0.2 µL	
Total	4.0 µL	
volumen		

Detektorgen mastermix

Reagens	Volumen	Master-mix
ddH ₂ O	2.8 µL	
10x Buffer 2.1	0.8 µL	
PstI	0.2 µL	
SpeI	0.2 µL	
Total	4.0 µL	
volumen		

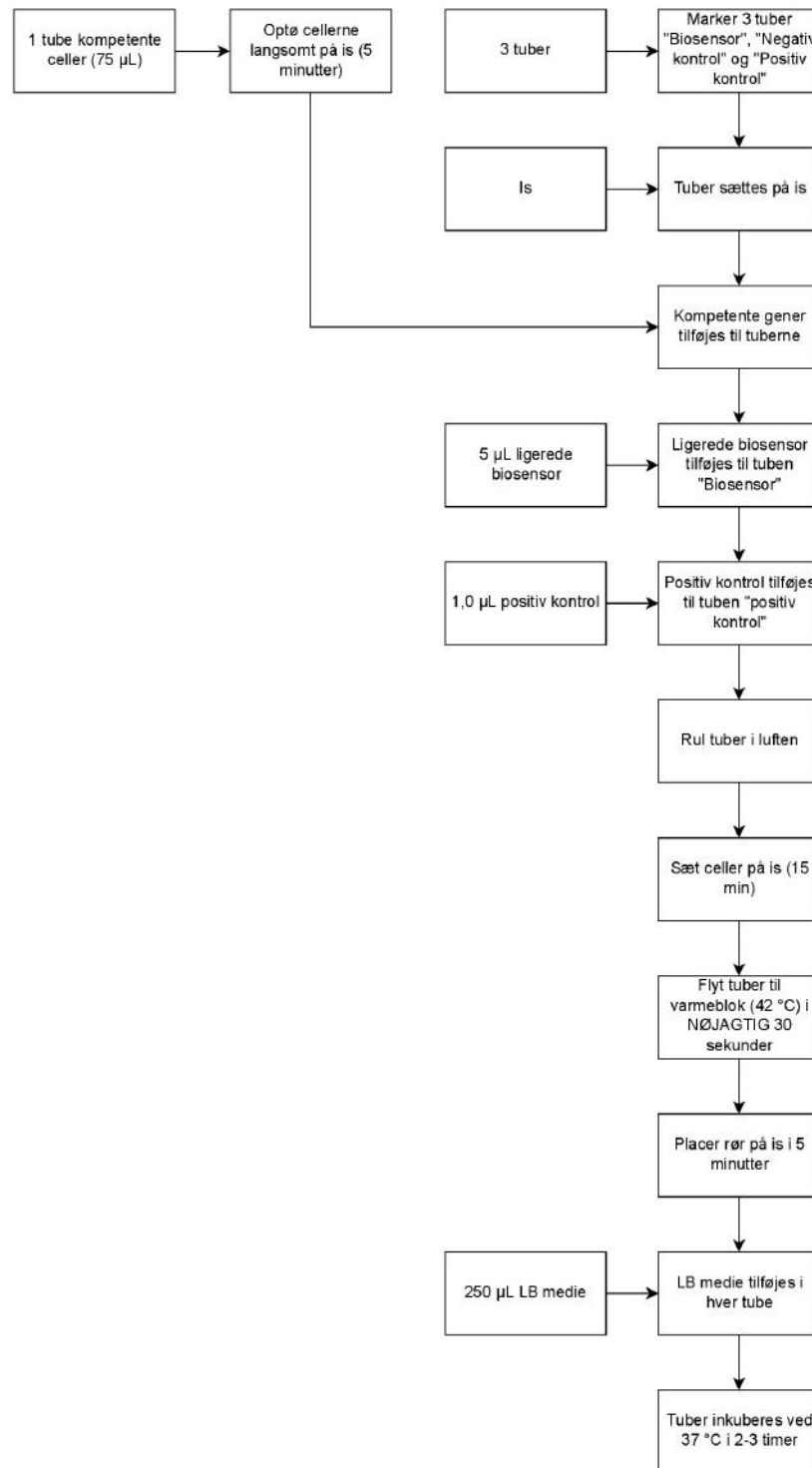
5. **Grupperne som laver mastermix:** Giv mastermixen til jeres lærer når I er færdige med dem, så kan de andre grupper hente det hos ham eller hende.
6. Hver gruppe pipetterer 4 μ L master-mix ud i en tube. Markér tuben med "R Gen" samt gruppenummer, så du kan genkende din tube fra de andre grupper.
7. Dernæst pipetterer hver gruppe 4 μ L detektionsgen mastermix ud i en tube. Markér tuben med "D gen", samt gruppenummer, så du kan genkende din tube fra de andre grupper.
8. Tilsæt 4 μ L af dit valgte responsgen fra biosensor kittet til tuben markeret med ResGen"
9. Tilsæt 4 μ L af detektionsgenet 1A fra biosensor kittet til tuben markeret med "D Gen"
10. Centrifuger begge tuber ved 5000 RPM i 1 min, HUSK at rørene skal stå overfor hinanden
11. **Klip generne** ved at inkubere eppendorfrørerne ved 37°C i en time.
12. **Inaktiver restriktionsenzymene** ved 80 °C i 20 minutter. Hvis I bruger en PCR-maskine, kan I derfor indstille et program. Hvis I ikke bruger en PCR-maskine kan I i stedet bruge et varmeskab eller en varmeblok. Sørg for at **låget** på tuben er **ordentligt lukket** ellers fordamper jeres reaktioner.
 - a. Efter inaktivering kan det se ud som om at det ikke er noget i jeres rør, men forsæt til næste step om se om er kommer noget.
13. Centrifuger begge tuber ved 5000 RPM i 1 min, HUSK at rørene skal stå overfor hinanden
14. Sæt eventuelle tuber fra biosensor kittet tilbage i kittet.

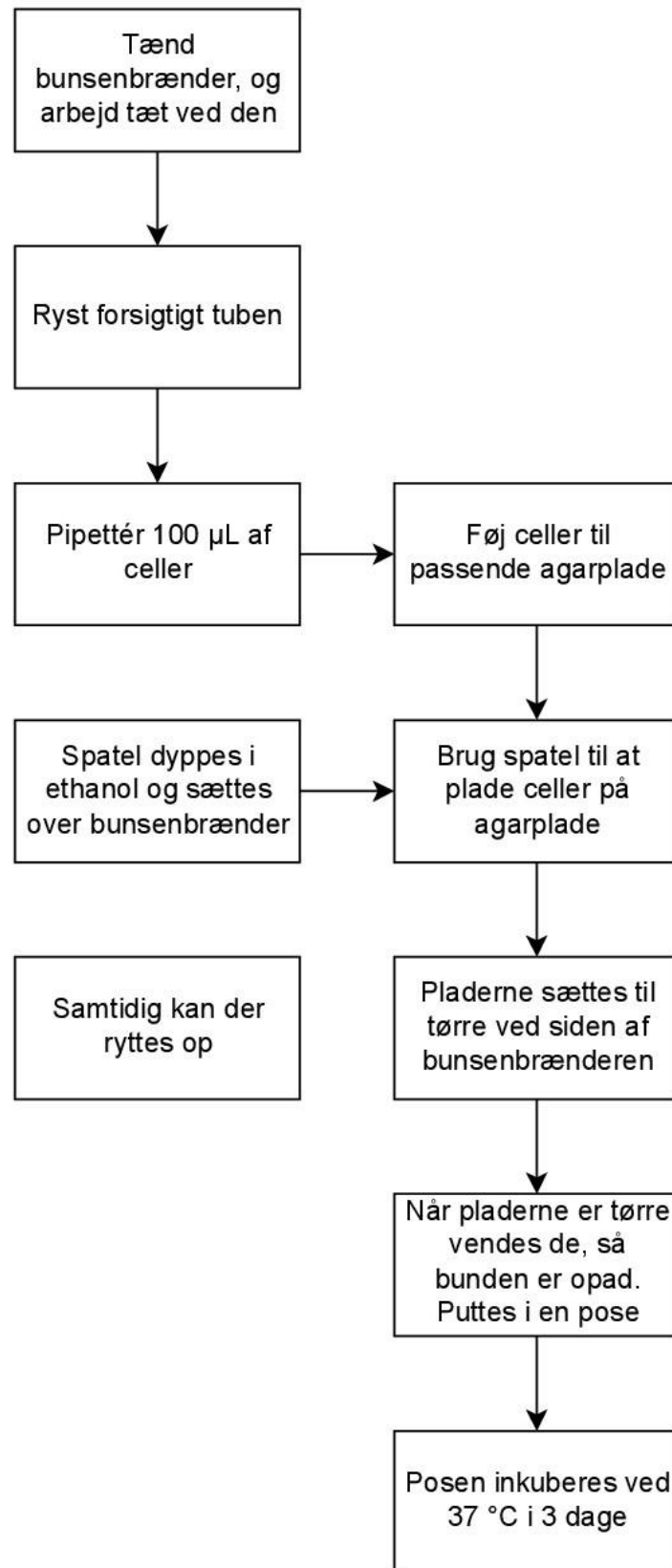
1. Fyld en bøtte med is og tøm T4 DNA-ligase bufferen på is. Det tager cirka 30 minutter. Der er kun én tube buffer, så alle grupper skal deles om tuben. Når I giver tuben til en ny gruppe, så skal gruppen medbringe deres isboks, så tuben er på is hele tiden.
2. Bland følgende reagenser sammen i den rækkefølge, som de er angivet; i skemaet under. Tag T4 DNA-ligasen ud af fryseren lige før du skal bruge den. Transportér den i den lille fryseboks eller på is og stil den tilbage, så snart du er færdig med den.

Reagens	Reaktion
ddH ₂ O	5.5 µL
T4 DNA-ligase buffer	2.0 µL
Klippet detektorgen	4.0 µL
Klippet responsgen	8.0 µL
T4 DNA-ligase	0.5 µL
Total volumen	20.0 µL

3. Centrifuger begge tuber ved 5000 RPM i 1 min, HUSK at rørene skal stå overfor hinanden
4. **Lim genet ind i plasmidet** ved at lade reaktionen stå ved stuetemperatur på bordet i 30 minutter. Enzymet er aktivt ved stuetemperatur, men den optimale aktivitet er ved 16°C. Reaktionen kan evt. sættes i en PCR-maskine.
5. I mellem tiden kan I smide jeres to rør med det klippende respons- og detektionsgen ud i laboratorie affald.
6. Fortsæt derefter direkte til transformationen (del 2.c) eller opbevar ligationen i fryseren ved -20°C indtil næste øvelsesdag.

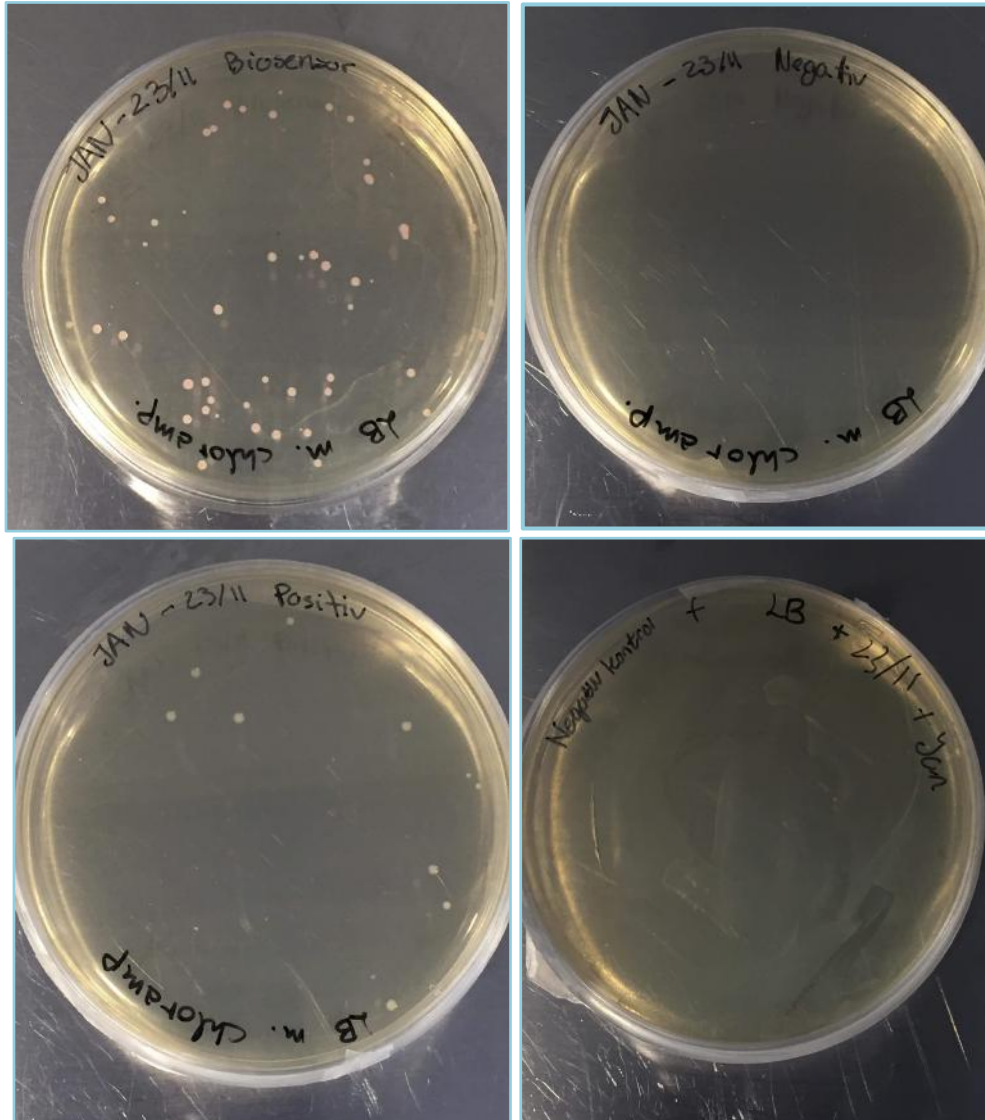
Herunder fremgår gruppens flowdiagrammer over de resterende dele af forsøget. Disse er konstrueret for at holde overblik over forsøget samt skabe overskuelighed over forsøgets trin under laboratoriearbejdet.





Resultater

Herunder ses billeder af gruppens agarplader, efter bakteriekolonierne har haft mulighed for at vokse.



De to billeder til højre viser gruppens negative kontroller, hvor der som forventet ikke er vokset bakteriekolonier. Dog ses der stadig bakterievækst på den negative kontrol uden chlorampicillin, dette uddybes i afsnittet *Resultatbehandling*.

Billedet nederst i venstre hjørne viser gruppens positive kontrol, hvor der tydeligt kan ses kolonier af *E. coli* bakterier. Billedet ovenover (øverst venstre hjørne) viser de bakterier som gruppen har genmodificeret. Disse bakterier er synligt røde, hvilket skyldes det indsatte røde farveprotein (eForRed).

Resultatbehandling

Der tælles antal kolonier for agarpladen med Biosensor + LB Cam samt agarpladen med Positiv kontrol + LB Cam. Desuden vurderes det også om der har været vækst på agarpladen med Negativ kontrol + LB cam, samt agarpladen med Negativ kontrol + LB.

Plade	Antal kolonier
Biosensor + LB Cam	48
Positiv kontrol + LB Cam	10
	Vækst (Ja/Nej)
Negativ kontrol + LB Cam	Nej
Negativ kontrol + LB	Ja

Det ses at der er flest kolonier på pladen med biosensor + LB Cam. På pladen med positiv kontrol + LB Cam blev der også fundet kolonier, dog en del færre end pladen med biosensor + LB Cam. Det forventes, at der ville være kolonier på pladen med biosensor og positiv kontrol, da begge plader har bakterier med responsgenet. Der ses 48 kolonier på biosensor + LB Cam pladen og 10 kolonier på pladen med positiv kontrol + LB Cam. Der er et forhold på 4,8:1. Det virker sandsynligt, eftersom at der blev brugt 5 µL ligerede biosensor og 1 µL positiv kontrol, hvilket har et forhold på 5:1, hvilket er meget tæt på forholdet mellem kolonierne på de to plader.

På pladen med negativ kontrol + LB Cam ses der ingen vækst, mens at der ses vækst på pladen med negativ kontrol + LB. Pladen med negativ kontrol + LB Cam forventes der ikke at være vækst, da bakterierne ikke har optaget et responsgen, og der vil heller ikke være vækst da antibiotikaen vil dræbe størstedelen af bakterierne. På pladen med negativ kontrol + LB, sås der vækst, hvilket sandsynligt skyldes at der ikke var chloramphenicol antibiotikummet tilstede.

Diskussion

Ud fra forsøgets resultater kan der argumenteres for at gensplejsningen af bakterier i E. coli kolonien har været succesfuld, da koden for eforRed-proteinet (donergenet) er blevet sat korrekt ind plasmidet (responsgenet), og at plasmid-komplekset bagefter er blevet optaget i nogle bakterier i E. coli kolonien og indsat i deres genetiske kode samt udtrykt som proteiner; dette kan ses ud fra at bakteriekolonierne på agarpladen med biosensor + LB Cam udviser en rødlig farve, hvilket tyder på at bakterierne korrekt har udtrykt eforRed-proteinet.

Ud fra forsøgene som helhed kan det stærkt antages at chlorampicillin har virket som antibiotika da den har forhindret bakterievækst på agarpladen negativ kontrol + LB Cam, og samtidigt har agarpladerne hvor der var bakterier med antibiotikaresistens vist bakterievækst jævnt fordelt over hele agarpladen, udover dette kan der også tydes uklare spor på agarpladen negativ kontrol + LB, hvilket tyder på at udefra bakterier har kunne indtrænge agarpladen, og at det er

tilstedeværelsen af chlorampicillin og chlorampicillin resistens i bakterierne, der styrer bakterievæksten på agarpladerne i forsøget frem for om bakterier er tilsat til agarpladerne eller ikke.

Forholdet mellem antal bakteriekolonier på agarpladerne biosensor LB Cam og positiv kontrol + LB Cam er 4,8:1, hvilket kan sammenlignes med forholdet mellem mængden af gensplejset bakterieholdigt væske tilsat til hhv. biosensor LB Cam og positiv kontrol + LB Cam, hvilket er 5:1 μ L. Dette tyder på de gensplejset bakterier lavet i biosensor forsøget har en ligeså god overlevelsessevne som bakterierne fra positiv kontrol + LB Cam, og dermed er kvaliteten af gensplejsningen - altså mængden af bakterier der er blevet transformeret - sammenlignelig med mængden af bakterier i den positive kontrol der indeholder det modificeret plasmid (som indeholder donergen samt responsgenet). Ud fra dette kan der også argumenteres for at indsættelsen af donergen et forRed ikke ændre E. coli bakteriernes overlevelsessevne på agarplader (da bakterier i den positive kontrol ikke indeholder donergen et forRed, kun responsgenet der indeholder antibiotika resistensen for chlorampicillin).

Konklusion

Forsøget har bevist at den genetiske kode for farveproteinet eforRed har kunne udtrykkes i E. Coli bakterier som protein, ved at den genetiske kode for eforRed indsættes i bakterien som donergen, og herefter kan de transgene bakterier isoleres og placeres i et vækstmedie hvor farveproteinet kan udtrykkes.

Litteraturliste

Bruun, K. & B. Geertsen, P. & Helmig, K. (2011) Grundbog i Bioteknologi 2. : Gyldendal (Bruun, 2011).

Kahn, J. "DNA Ligase." University of Maryland Department of Biochemistry. Visited on 13 Feb. 2003. <http://adnadrn.umd.edu/biochem/kahn/molmachines/replication/DNA%20Ligase.htm> (Kahn, 2003).

NEB. Restriction Endonucleases. *NEW ENGLAND BioLabs Inc.*. Fundet [11/30/2018]. På <https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases/restriction-endonucleases>. (NEB).

Wilkin, Douglas . (06/29/18). Restriction enzymes & DNA ligase. *Khan Academy*. Fundet [11/30/2018]. På <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/restriction-enzymes-dna-ligase>. (Wilkin, 2018).