

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Magistrski študijski program Biokemija

Molekularna biotehnologija

– vaje –

študijsko leto 2013/2014

Ver. 1.0 (marec 2014).

Za optimiziran postopek izolacije DNA iz sojinega mleka in pomnoževanja ključnih regij se zahvaljujem prof. dr. Kristini Gruden z Nacionalnega inštituta za biologijo.

Navodila za vajo "Preverjanje vrstne sestave mesnih izdelkov" je pripravila dr. Vera Župunski, ki je tudi optimizirala postopek.

Postopek za elektroporacijo cianobakterij je posredovala Josefina Anfelt s Kraljeve tehniške visoke šole v Stockholmu. Zahvaljujem se tudi dr. Heleni Čelešnik za pripombe glede praktične izvedbe poskusa.

Molekularno biotehnologijo je težko razmejiti od številnih sorodnih področij. Vsekakor pa je za to vedo značilno, da poskuša tehnološko izrabljati lastnosti bioloških molekul. Razen proizvodnje lahko v spekter tem, ki jih obravnava molekularna biotehnologija, uvrstimo tudi analizne postopke.

Vaje pri predmetu Molekularna biotehnologija so sorazmerno kratke, saj je težko pripraviti poskuse, ki bi na zanimiv način in v kratkem času terminov za vaje prikazali kompleksne molekularnobiotehnoške procese. Zato sem izbral tri teme: dva analizna postopka, kjer je za izvedbo potrebno poznavanje bioloških molekul in molekularnobioloških postopkov, in postopek elektrotransformacije cianobakterij, ki imajo velik potencial za biotehnoško proizvodnjo biogoriv in tržno zanimivih molekul.

Analizna postopka temeljita na analizi živil. Prav živila so za Slovenijo pomembna tema, saj živilska industrija ni delila usode številnih drugih panog, ki so v zadnjih desetletjih izrazito nazadovale. Razen tega je varnost živil za potrošnike vse bolj aktualna tema, pri kateri biokemiki lahko koristno uveljavite svoje znanje.

Gensko spreminjanje cianobakterij je s stališča biološke varnosti lahko problematično, a njihovo gojenje v zaprtih sistemih (fotobioreaktorjih) tveganja precej zmanjša. Naš laboratorij sodeluje v mednarodnem projektu, katerega osnovni cilj je priprava gensko spremenjenih cianobakterij za proizvodnjo vodika, pomemben del pa predstavlja naša naloga priprave sinteznobiološkega vezja za povečano biološko varnost. V zadnjih letih smo si nabrali precej znanja s tega področja, zato se mi je zdelo smiselno, da med študijem spoznate cianobakterije, ki so precej drugačne od ostalih skupin bakterij.

Prvi dve vaji smo v podobni obliki izvajali v okviru predmeta Kemija in biokemija živil v predbolonjskem študijskem programu. Dodal sem samo alternativni postopek izolacije DNA za analizo sojine omake. Zato predvidevam, da pri izvedbi teh dveh vaj ne bo prišlo do zapletov. Nova je tretja vaja, ki pa je zastavljena zelo preprosto in ne zahteva veliko časa v laboratoriju, nekaj več pa morda kasneje, pri analizi rezultatov. Zaradi počasne rasti cianobakterij bo uvodni del vaje opravil asistent, prav tako pa precep na selektivno gojišče.

Tako kot pri vsakih vajah, pri delu z biološkimi molekulami pa morda še bolj, je za uspeh postopka nujno, da natančno sledite opisanim protokolom, precizno pipetirate in upoštevate navedene inkubacijske čase.

Želim vam uspešno delo na vajah!

Marko Dolinar

Kazalo

1. vaja: Preverjanje vrstne sestave mesnih izdelkov	str. 19
2. vaja: Določanje prisotnosti gensko spremenjenih organizmov v hrani	str. 22
3. vaja: Transformacija cianobakterij	str. 27

Kontaktne naslovi:

Slike analiz bodo v spletni učilnici na naslovu

<http://ucilnica.fkkt.uni-lj.si/course/view.php?id=27>

asistentov e-naslov: Matevz.Korenc@fkkt.uni-lj.si

tehnikov e-naslov: Matjaz.Malavasic@fkkt.uni-lj.si

1. vaja: Preverjanje vrstne sestave mesnih izdelkov

(izvedbeni protokol je pripravila dr. Vera Župunski)

Slovenija mora svojo gospodarsko priložnost iskati v izvozu lastnih izdelkov, ki po kvaliteti presegajo druge. Ena takih ekonomskih priložnosti je izvažanje hrane v arabske države, ki imajo sicer veliko nafte a malo drugih naravnih virov. Ta trg obsega poldrugo milijardo ljudi in predstavlja odlično ekonomsko nišo. Njihova živilsko-predelovalna industrija je slabše razvita, hkrati pa imajo posebne standarde ali zahteve pri sestavi in pridelavi hrane. Izdelki iz mesa morajo imeti certifikat »halal«, ki potrjuje, da je hrana pripravljena po islamskih predpisih.

Tako bi lahko v muslimanske države izvažali mesne izdelke, ki pa ne smejo vsebovati svinjine. Zato smo razvili test, s pomočjo katerega lahko ugotovimo, ali je v vzorcu svinjsko meso. Z metodo hkratne PCR (verižna reakcija s polimerazo) lahko z eno reakcijo določimo vrstno sestavo mesnega izdelka. Prednost te metode je sočasna detekcija več vrst mesa v vzorcu, torej ne določamo samo prisotnosti svinjskega mesa, ampak nam rezultati metode lahko služijo za izdelavo deklaracije prehranskega izdelka ne glede na trg, kamor je namenjen.

Izvedba vaje:

Ugotoviti moramo, iz katerih vrst mesa so pripravili mletu meso. Iz vzorcev mletega mesa boste izolirali genomsko DNA in jo analizirali z verižno reakcijo s polimerazo (metoda PCR). S to metodo boste na osnovi začetnih oligonukleotidov specifično pomnožili različno dolge fragmente DNA, ki bodo pokazali, iz katerih vrst mesa je pripravljeno mletu meso. Z eno reakcijo PCR boste lahko pomnožili fragmente DNA iz 3 različnih vrst mesa: fragment piščančje DNA je dolg 227 bp, goveje DNA 274 bp in prašičje DNA 398 bp.

Genomsko DNA lahko izolirate s pomočjo standardnih protokolov, ki so zapisani v laboratorijskih priročnikih ali s prirejenimi oz. izboljšanimi protokoli, ki so jih opisali znanstveniki v raziskovalnih člankih. Večina teh metod temelji na uporabi reagentov, ki jih lahko vsak pripravi v laboratoriju. Na voljo pa imamo tudi komplete reagentov (»kite«), ki vsebujejo optimiziran protokol in reagente z večinoma neznan sestavo kemikalij, ki jih kupimo pri različnih proizvajalcih. Za izolacijo DNA iz mletega mesa bomo v našem protokolu uporabili komplet »Wizard Genomic DNA Purification Kit« proizvajalca Promega.

a) Izolacija genske DNA

(točke 1-3 izvede tehnik en dan pred vajo)

1. V 1,5 ml mikrocentrifugirko odpipetirajte 120 µl 0,5 M EDTA in 500 µl pufru za liziranje jeder (*Nuclei Lysis Solution*) in ohladite na ledu.
2. V novo mikrocentrifugirko dajte manjši košček mletega mesa (0,5 cm³) in dodajte 600 µl zgornje mešanice.
3. Dodajte še 17,5 µl proteinaze K s koncentracijo 20 mg/ml in inkubirajte preko noči pri 55 °C. Med tem večkrat dobro premešajte.
-
4. Dodajte 3 µl raztopine RNaze (konc. 4 mg/ml) in premešajte z 2-5x obračanjem mikrocentrifugirke. Raztopino inkubirajte 15 min pri 37 °C, nato vzorec še 5 min inkubirajte pri sobni temperaturi.
5. Vzorcju dodajte 200 µl pufru za obarjanje proteinov (*Protein Precipitation Solution*) in dobro premešajte z vibracijskim mešalnikom (20 s). Vzorec dajte na led za 5 min.
6. Nato centrifugirajte 4 min pri 13,000 g – 16,000 g. Oborjeni proteini tvorijo belo oborino na dnu mikrocentrifugirke.
7. Previdno prenesite supernatant, ki vsebuje DNA, v mikrocentrifugirko, v katero ste predhodno odpipetirali 600 µl izopropanola (sobna T).

8. Z obračanjem mikrocentrifugirke nežno premešajte raztopino, da nastane nitasta oborina DNA.
9. Centrifugirajte 1 min pri sobni T pri enaki hitrosti kot prej. DNA vidimo kot belo oborino, supernatant pa previdno odlijte ali odstranite s pipeto.
10. Dodajte 600 μl 70-odstotnega etanola (sobna T) in zopet nežno premešajte z obračanjem. S tem oborjeno DNA sperete, nato pa vzorec centrifugirajte 1 min.
11. Previdno s pipeto odstranite raztopino, ker je usedlina le rahlo pritrjena na dno mikrocentrifugirke.
12. Mikrocentrifugirko obrnjeno postavite za 3 min na papirnate brisače, nato pa v termoblok na 37 $^{\circ}\text{C}$, da se usedlina posuši.
13. Dodajte 100 μl rehidracijske raztopine in inkubirajte 1 h pri 65 $^{\circ}\text{C}$, da se DNA rehidrira. DNA lahko pustite tudi čez noč pri 4 $^{\circ}\text{C}$.
14. Izolirano genomsko DNA hranite pri 2 $^{\circ}\text{C}$ – 8 $^{\circ}\text{C}$ ali pa jo takoj uporabite za PCR.

b) Določanje sestave mletega mesa z metodo PCR

S PCR bomo določili vsebnost različnih sestavin v mesnem izdelku, ki lahko vsebuje piščančje, goveje in svinjsko meso. Uporabili bomo 4 različne začetne oligonukleotide. Smerni oligonukleotid je enak za vse vrste mesa, protismerni oligonukleotidi pa so specifični za posamezno vrsto DNA in so narejeni na osnovi gena za citokrom b ustrezne živalske vrste:

- smerni oligonukleotid:
FOR: 5'-GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA
- protismerni oligonukleotidi za piščančje (PI), goveje (GO) in svinjsko (SV) meso:
PI: 5'-AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG
GO: 5'-CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG
SV: 5'-GCTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTA

Produkte PCR bomo med seboj ločili z agarozno elektroforezo.

1. V 0,2 ml mikrocentrifugirko odpipetirajte naslednje reagente v naštetem vrstnem redu:

5 μl dNTP (končna konc. 0,2 mM)
 5 μl 10x pufer za PCR
 3 μl MgCl_2 (končna konc. 1,5 mM)
 5 μl oligonukleotida FOR (konc. 4 pmol/ μl = 4 μM)
 15 μl oligonukleotida PI (konc. 4 pmol/ μl)
 3 μl oligonukleotida GO (konc. 4 pmol/ μl)
 3 μl oligonukleotida SV (konc. 4 pmol/ μl)
 5 μl genomske DNA
dopolnite z dH_2O do 47 μl

Po prvi stopnji denaturacije DNA dodajte 3 μl DNA-polimeraze *Taq* (konc. 0,5 U/ μl).

Eden izmed študentov naj pripravi pozitivno kontrolo, drug študent pa negativno kontrolo PCR!

2. Na PCR-aparaturi nastavite program z naslednjimi koraki:
 - denaturacija pri 97 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
 - sledi 34 ciklov:
 - denaturacija pri 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min
 - prileganje oligonukleotidov pri 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min
 - sinteza verige pri 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s
 - inkubacija pri 15 $^{\circ}\text{C}$

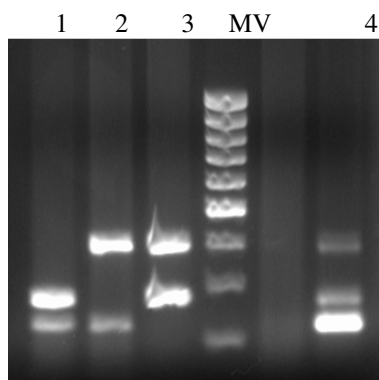
3. Pripravite 1,8-odstoten agarozni gel z etidijevim bromidom (3 μ l / 100 mL gela) in po končani reakciji PCR odpipetirajte v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko 20 μ l vzorca, dodajte 2 μ l nanašalnega pufru za agarozno elektroforezo ter vse skupaj nanesite v žepek na agaroznem gelu. Na gel poleg vzorcev nanesite še pozitivno in negativno kontrolo ter označevalec velikosti (lestvica 100 bp). Elektroforeza naj poteka pri 100 mA, dokler prvo barvilo ne pripotuje do 2/3 gela. Gel si oglejte na transiluminatorju pri 310 nm.

c) Rezultati:

Nalepite sliko elektroforeznega gela z obarvano DNA (bo v spletni učilnici) in jo opišite! Koliko so veliki fragmenti DNA, ki ste jih pomnožili na osnovi izolirane genomske DNA mletega mesa? Katere vrste mesa so v vašem vzorcu in v vzorcih, ki so jih analizirali kolegi?

d) Vprašanja za ponavljanje:

1. Zakaj uporabljamo za pomnoževanje 3 fragmentov 4 začetne oligonukleotide, če vemo, da pri vsaki PCR-reakciji rabimo dva (en začetni in en končni oligonukleotid)?
2. Na priloženi sliki so rezultati PCR na osnovi izolirane DNA iz 4 različnih vzorcev polpet. Določite, katere vrste mesa so bile v testiranih vzorcih 1-4! Na sliki je označevalec velikosti z zgornjo liso pri 1000 bp, ostale lise pa predstavljajo po 100 bp krajše molekule.



3. Ali izdelek, katerega vzorec ste testirali, lahko prodamo na islamska tržišča?
4. Iz katerega organizma so izolirali encim, ki ga uporabimo pri PCR? Zakaj?
5. Kaj sta pozitivna in negativna kontrola pri PCR?
6. S katero metodo bi še lahko določili, katere vrste mesa so v vzorcu?
7. Ali lahko na osnovi elektroforezne analize ugotovimo, koliko je bilo v vzorcu posamezne vrste mesa?
8. Primerjajte metode za izolacijo DNA, ki jih poznate!

2. vaja: Določanje prisotnosti gensko spremenjenih organizmov v hrani

Nekatere poljščine v tujini, predvsem v ZDA, so gensko spremenjene, kar pomeni, da razen genov, ki jih nosi posamezna sorta, vsebujejo še dodatne gene, ki predstavljajo določeno prednost pri pridelavi, skladiščenju pridelka ali uživanju hrane. Gensko spremenjenih rastlin ne smemo sejati brez dovoljenja pristojnih uradov, ki v postopku med drugim določijo, za kakšne namene bo pridelek uporaben. Uporabo lahko omejijo in določijo, da je gensko spremenjena rastlina lahko samo sestavina živinske krme, lahko pa dovoli tudi uporabo v prehrani ljudi.

Gensko spreminjanje je v naravi vsakdanji pojav. Tudi pri križanju rastlinskih sort (ali živalskih pasem) prihaja do spreminjanja genske zasnove. Ker pa na gensko spreminjanje, ki je opravljeno usmerjeno, v laboratoriju, mnogo ljudi gleda skeptično, ali ima do gensko spremenjenih organizmov odklonilno stališče, je v Evropi prevladalo mnenje, da imajo potrošniki pravico vedeti, ali je hrana, ki jo kupujejo in uživajo, pripravljena iz gensko spremenjenih organizmov (GSO).

Največje pridelovalke gensko spremenjene hrane na svetu so ZDA, Brazilija, Argentina in Kanada. Po nekaterih podatkih naj bi bilo z GS rastlinami v svetovnem merilu posejanih dobrih 10 % kmetijskih površin. Med rastlinami, ki so najpogosteje gensko spremenjene, so koruza, soja, bombaž in ogrščica (oljna repica). V ZDA je že okrog 95 % vse soje gensko spremenjene, koruze pa blizu 90 %. Večina gensko spremenjene koruze spada v skupino (Bt). Vstavljen ima gen za bakterijski toksin, ki deluje proti ličinkam žuželk. Na primer ličinke koruzne večče vrtajo rove v stebela, tako da koruza zastaja v razvoju, stebela pa polegajo. Vse več je tudi koruze, ki je odporna proti herbicidoma glifozat in glifozinat. Taka koruza raste na poljih, ki so bila predhodno obdelana s herbicidom, tako da na njih ne morejo rasti pleveli. Pogoste so tudi sorte koruze z obema lastnostma, odpornostjo proti žuželkam in proti herbicidom. Tudi gensko spremenjena soja vsebuje DNA, ki ji omogoča rast v zemlji.

Nasprotniki GSO menijo, da gensko spremenjena hrana pomeni grožnjo za okolje in za zdravje ljudi. Razen tega nekatere moti, da večino svetovnega trga z gensko spremenjenimi semeni obvladuje le nekaj podjetij. Grožnjo za okolje naj bi predstavljalo siromašenje rastlinskih vrst (manj plevelov), kar posledično lahko vpliva na ožjenje spektra žuželk, ki so navezane na te plevelce. Po drugi strani pa bi bakterijski toksin lahko deloval tudi na druge žuželke, ne samo na tiste, proti katerim je v prvi vrsti usmerjen. Gensko spremenjena hrana vsebuje nove antigene, proti katerim bi lahko ljudje razvili imunski odziv. Tudi zaužitje DNA, ki po svojem izvoru ni rastlinska, se zdi nekaterim problematično. Površina kmetijskih zemljišč, ki so posejana z GS poljščinami, še vedno narašča. Nekateri menijo, da se potrošniki vse bolj negativno odzivajo na GSO, kar bo privedlo do usihanja pridelave gensko spremenjenih rastlin, trenutni trendi pa tega še ne kažejo.

Direktnih kratkoročnih zdravstvenih učinkov uživanja GSO ni uspel prepričljivo dokazati še nihče. Nasprotniki GS hrane menijo, da je za oceno dolgoročnih posledic uživanja GS hrane minilo še premalo časa (prve gensko spremenjene poljščine so začeli gojiti šele leta 1996 oziroma gensko spremenjeni paradižnik že dve leti pred tem, vendar ta ni imel vključenih tujih genov v pravem pomenu besede, saj je vseboval le protismerno DNA zapisa za poligalakturonidazo).

Evropski parlament in Evropski svet sta septembra 2003 sprejela uredbo 1829/2003, ki med drugim določa, da je treba ustrezno označiti vse izdelke, ki vsebujejo več kot 0,9 % GSO (predpis je treba izvajati od 18. aprila 2004 naprej). Za izdelke, ki vsebujejo več kot 0,9 % gensko spremenjenih sestavin, je treba pridobiti dovoljenje za dajanje na trg in take izdelke ustrezno označiti. Vendar do danes na slovenskem trgu še ni nobenega izdelka, ki bi imel tako oznako. Občasna testiranja so pokazala, da tudi v resnici GSO le v zelo redkih primerih najdemo v izdelkih na naših tržnih policah. Proizvajalci prehranskih izdelkov zahtevajo od dobaviteljev surovin certifikat o ustreznosti, uvozniki hrane pa v glavnem skrbijo, da hrano, za katero ne morejo pridobiti ustreznega potrdila, predhodno testirajo. V Sloveniji sta dve akreditirani ustanovi, ki opravljata tovrstne analize, to sta Nacionalni inštitut za biologijo (NIB) in Kmetijski inštitut Slovenije (KIS).

Vsebnost GSO lahko preverjamo na več načinov. Specifične antigene lahko določamo s pomočjo imunoloških testov. Zaradi visoke občutljivosti metode pa večina postopkov temelji na PCR. Na ta način lahko preverjamo prisotnost zapisov za posamezne značilne komponente rastlinskih ekspresijskih sistemov. Med temi je na primer močni promotor CaMV35S (CaMV = virus mozaika cvetače, *cauliflower mosaic virus*) ali pa deli zapisa za insekticid iz talne bakterije *Bacillus thuringiensis* (Bt). Običajno hkrati z reakcijo, s katero dokazujemo prisotnost zaporedja DNA, ki je značilno za transgenske organizme, pomnožujemo tudi del genomske DNA, ki vsebuje vrstno-specifična zaporedja. Tako bi na primer pri testiranju koruznih kosmičev pomnoževali segment, ki nosi zapis za Bt, hkrati pa del gena za zein, ki je značilen samo za koruzo. S tem bi preverili, ali je reakcija PCR sploh potekla, kar je še posebej pomembno v primerih, ko ne moremo dokazati prisotnosti produkta, ki bi kazal na gensko spreminjanje. Pomembno je, da sta produkta pri takem hkratnem pomnoževanju različno dolga, da lahko po elektroforezni ločitvi produktov ugotovimo, katera območja genoma so se v resnici pomnožila.

Postopek preverjanja vsebnosti GS-sestavin se začne z izolacijo DNA. Postopki za izolacijo so za različne vrste živil različni (drugačni za trdno in za tekoče živilo), prilagojeni pa so tudi lastnostim živila, povezanim s predpripravo (npr. kislost, prisotnost primesi,...). Brez kvalitetne izolirane DNA je težko pričakovati uspešno pomnoževanje genomskih segmentov s PCR. Osnovni cilj naloge je ugotoviti, ali je mogoče z opisanimi postopkoma izolirati dovolj in ustrezno kakovostno DNA, da je na njej možno izvesti PCR. To pa boste preverjali s pomnoževanjem dveh različno dolgih genomskih segmentov, od katerih je eden značilen za promotor CaMV 35 S.

Eksperimentalno bomo določali vsebnost gensko spremenjene soje v dveh sojinih izdelkih: sojinem mleku in sojini omaki. Sojino mleko velja za neproblematičen vzorec, ker v njem DNA načeloma ni močno fragmentirana, vodna raztopina pa ne vsebuje izrazitih inhibitorjev PCR. Drugače je s sojino omako. Za njeno pripravo sojo skuhamo, pasiramo, dodamo pražena žita in nato fermentiramo (prevladujejo glive iz rodu *Aspergillus*), pasteriziramo in filtriramo. V postopku priprave med drugim pride do fragmentacije DNA. Razen tega je pH sojine omake kisel, omaka pa lahko vsebuje tudi fenolne snovi in barvila. Razen klasičnega postopka obstaja tudi hitrejši postopek s kislinsko hidrolizo proteinov.

Pri sojinem mleku bomo preverjali dva vzorca: prvi je iz ZDA, kjer je verjetnost, da v trgovini kupite gensko spremenjeno hrano, največja (vzorec mA). Vendar pa na izdelku ni pisalo, da je pripravljen iz gensko spremenjenih rastlin. Drugi vzorec je bil kupljen v eni od ljubljanskih veleblagovnic, na njem pa je pisalo, da je bila soja 'ekološko pridelana' (vzorec mE).

Vzorcev sojine omake je več: prvi (oznaka oN) predstavlja omako največjega svetovnega proizvajalca sojinih omak. Pridobljena je po klasičnem postopku, a je najcenejša omaka tega podjetja, pri njej pa ni oznake 'organic'. Za omake tega proizvajalca in tipa na ameriškem tržišču je mogoče prebrati, da so narejene iz GS soje, naš vzorec pa je bil narejen v tovarni na Nizozemskem. Drugi vzorec je svetla sojina omaka kitajske proizvodnje (vzorec oK), kupljena v trgovini v Sloveniji. Kitajska zmanjšuje svojo pridelavo soje, saj cenovno ni konkurenčna uvoženi GS soji, večinoma iz ZDA. Velja prepričanje, da tudi sojini izdelki v zadnjem času vsebujejo GS sestavine, saj s tem živilska industrija ohranja nižje vstopne stroške surovin. Tretja sojina omaka (vzorec oZ) pa je izdelana v ZDA in kupljena v trgovini z azijskimi prehrabnimi izdelki v Ljubljani. Kot rečeno, v ZDA skoraj ne pridelujejo več soje, ki ne bi bila gensko spremenjena. Kaže, da je postopek priprave tak, kot je značilen za japonske sojine omake. Te so fermentirane po daljšem postopku in so pogosto slajše zaradi večje vsebnosti žit v primerjavi s kitajskimi sojinimi omakami.

S PCR bomo pomnoževali dve genomski območji: vstavljeni promotor E35S s sosednjim delom rastlinske DNA (pričakovana dolžina pomnoženega segmenta je 193 bp) ter kot kontrolo del zapisa za sojin lektin (414 bp). Promotor E35S je izboljšana varianta CaMVE35S, ki ima podvojeno ojačevalno zaporedje in zato zagotavlja višjo raven konstitutivnega izražanja. Da pa bi lahko izvedli PCR, bomo najprej morali izolirati DNA.

Izolacija DNA bo potekala po dveh postopkih: za izolacijo iz sojinega mleka smo izbrali metodo s kationskim detergentom CTAB, za izolacijo iz sojine omake pa metodo z 'alkalno lizo' (v resnici liziranje v primeru sojine omake ni potrebno, saj najverjetneje ne vsebuje več intaktnih celic).

Izvedba vaje:

Izhodiščni postopek za sojino mleko je posredovala prof. dr. Kristina Gruden z Nacionalnega inštituta za biologijo. Postopek za izolacijo DNA iz sojine omake temelji na članku Kakahara *et al.*, 2006.

a) Izolacija genomske DNA iz sojinega mleka

Aparati in pribor

- 1) vodna kopel 65 °C;
- 2) mikrocentrifuga;
- 3) mikrocentrifugirke, 1,5 ml;
- 4) nastavljiva avtomatska pipeta, 200 µl - 1000 µl.

Reagenti in sredstva

- 1) absolutni etanol;
- 2) 70-odstotni etanol;
- 3) kloroform;
- 4) izopropanol;
- 5) pufer s CTAB (2 % heksadeciltrimetilamonijev bromid (CTAB), 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA): za 100 ml rabite 2 g CTAB, 8,2 g NaCl, 1,58 g Tris/HCl in 0,75 g Na₂EDTA, dodajte 70 ml deionizirane vode, nastavite pH z 1 M NaOH in dopolnite do 100 ml z vodo. Avtoklavirajte.
- 6) obarjalna raztopina (0,5 % CTAB, 40 mM NaCl): za 100 ml v vodi raztopite 0,5 g CTAB in 0,25 g NaCl in nastavite pH na 8,0 z 1 M NaOH. Avtoklavirajte.
- 7) 1,2 M NaCl (7 g NaCl v 100 ml deionizirane vode; avtoklavirajte);
- 8) 3 M Na-acetat, pH 4,8;
- 9) reagenti za PCR in polimeraza *Taq*;
- 10) avtoklavirana deionizirana voda.

Postopek

1. V mikrocentrifugirko odpipetirajte 100 µl sojinega mleka (zapišite si oznako vzorca za kasnejšo interpretacijo rezultatov).
2. Dodajte 500 µl pufera s CTAB in premešajte.
3. Inkubirajte 30 min v vodni kopeli pri 65 °C.
4. Centrifugirajte 8 min pri 15 000 g.
5. V svežo mikrocentrifugirko odpipetirajte 500 µl kloroforma in mu dodajte supernatant po centrifugiranju. *Pazite na kompakten flotant!*
6. Stresajte 30 s.
7. Centrifugirajte 5 min pri 15 000 g.
8. Zgornji (vodni) sloj prenesite v svežo centrifugirko in dodajte 2 V obarjalne raztopine. Premešajte s pipetiranjem.
9. Inkubirajte vsaj 60 min pri sobni T (ali več dni pri 4 °C).
10. Centrifugirajte 5 min pri 15 000 g.
11. Supernatant zavržite, usedlino pa raztopite v po 175 µl raztopine NaCl (1,2 M) in združite raztopini iz obeh mikrocentrifugirk v eni sami.
12. Dodajte 350 µl kloroforma in stresajte 30 s.
13. Centrifugirajte 8 min pri 15 000 g.
14. Zgornji (vodni) sloj prenesite v svežo mikrocentrifugirko.
15. Dodajte 0,6 V izopropanola in dobro pretresite.
16. Centrifugirajte 8 min pri 15 000 g.

17. Odstranite supernatant (organsko fazo), usedlini pa dodajte 500 μ l 70 %-nega etanola.
18. Previdno stresajte, nato pa centrifugirajte 8 min pri 15 000 g.
19. Supernatant zavržite (odpipetirajte do zadnjega μ l), usedlino pa posušite v vakuumskem koncentradorju (2 min pri 20 °C).
20. DNA raztopite v 35 μ l sterilne deionizirane vode.

b) Izolacija genomske DNA iz sojine omake

Aparati in pribor

- 1) termoblok 95 °C;
- 2) mikrocentrifuga;
- 3) mikrocentrifugirke, 1,5 ml;
- 4) nastavljiva avtomatska pipeta, 200 μ l - 1000 μ l;
- 5) spektrofotometer z možnostjo analize UV-spektrov.

Reagenti

- 1) absolutni etanol;
- 2) 70-odstotni etanol;
- 3) kloroform : izoamilalkohol (24:1);
- 4) izopropanol;
- 5) 25 mM NaOH;
- 6) 1 M Tris/HCl pH 7,0 (avtoklavirajte);
- 7) avtoklavirana deionizirana voda.

Postopek

1. V mikrocentrifugirko odpipetirajte 200 μ l sojine omake (zapišite si oznako vzorca za kasnejšo interpretacijo rezultatov).
2. V vzorec dodajte 600 μ l 25 mM NaOH in mešajte na vibracijskem mešalniku 1 min.
3. Inkubirajte 10 min pri 95 °C in ohladite na ledu.
4. Dodajte 80 μ l 1 M Tris/HCl pH 7 in premešajte.
5. Dodajte 500 μ l mešanice kloroform : izoamilalkohol (24:1) in mikrocentrifugirko večkrat obrnite.
6. Centrifugirajte 10 min pri 12 500 g.
7. Prenesite vodno fazo v svežo mikrocentrifugirko in dodajte 1 V izopropanola ter mikrocentrifugirko večkrat obrnite.
8. Centrifugirajte 6 min pri 12 500 g.
9. Supernatant previdno odpipetirajte in usedlino sperite z 200 μ l 70-odstotnega etanola.
10. Intenzivno mešajte na vibracijskem mešalniku, nato na kratko centrifugirajte (2 min pri 10 000 g).
11. Supernatant previdno, a v celoti odpipetirajte in posušite (po možnosti na zraku).
12. Usedlino raztopite v 50 μ l sterilne vode.
13. Preverite spekter izolirane DNA in določite razmerje A_{260}/A_{280} . (Za eno reakcijo PCR naj bi zadoščalo 3 μ l tako dobljene genomske DNA.)

c) Določanje vsebnosti DNA v preparatu

Ker se v industrijskem procesu priprave sojinega mleka (homogenizacija v vodi) iz celic sprosti DNA, bo ta prisotna v mleku v taki množini, da je lahko iz 200 μ l izoliramo po zgornjem postopku tudi več kot 1 μ g. Pričakovana koncentracija rastlinske DNA bo torej ~10 ng/ μ l. Vendar pa se včasih zgodi, da izhodna surovina vsebuje nekoliko manj DNA, pa tudi v postopku izolacije lahko pride do napak, ki privedejo do nizkih izplenov. Zato je smiselno, da pred izvedbo PCR ugotovimo, koliko DNA smo izolirali. Pri DNA iz sojine omake pričakujemo manjše izplene, tudi na račun hidrolize makromolekul v postopku fermentacije.

Zaradi majhnega volumna vzorca spektrofotometrično določanje koncentracije ni izvedljivo, zato bomo določili koncentracijo semikvantitativno preko fluorescence vzorca na agarozni plošči z etidijevim bromidom. Na ploščo bomo na rob nanesti po 2 μl standardnih raztopin (2 μl naj vsebujeta 2 ng, 4 ng, 8 ng, 16 ng, 32 ng, 64 ng in 128 ng DNA), v sredo pa 2 μl DNA, izolirane iz sojinih izdelkov. Po 20 min na transiluminatorju pri 312 nm primerjamo intenziteto lis in ocenimo, koliko DNA vsebuje naš vzorec.

d) Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za PCR potrebujemo 50 ng – 100 ng DNA iz sojinih izdelkov (pričakujemo, da boste to količino imeli v največ 10 μl vzorca). Pripravimo reakcijo v skupnem volumnu 50 μl :

snov	PCR-L [μl]	PCR-P [μl]
vzorec	x	x
puffer, ki že vsebuje Mg^{2+} (10x)	5 μl	5 μl
mešanica dNTP (vsak dNTP 2,5 mM)	4 μl	4 μl
začetni oligonukleotid GM01 (lektin), 0,2 μM	3 μl	--
začetni oligonukl. GM02 (lektin/reverzni), 0,2 μM	3 μl	--
začetni oligonukleotid GM05 (promotor), 0,2 μM	--	3 μl
začetni oligonukl. GM06 (promotor/reverzni), 0,2 μM	--	3 μl
deionizirana voda (do 49 μl skupnega volumna)		

PCR bo treba izvesti v dveh ločenih reakcijah po spodnji shemi. Vse vzorce najprej inkubirajte 10 min pri 95 °C, nato dodajte 1,5 U DNA-polimeraze *Taq* (0,5 U/ μl) in začnite s pomnoževanjem:

	PCR-L	PCR-P
denaturacija	95 °C, 30 s	95 °C, 30 s
prileganje	57 °C, 30 s	62 °C, 30 s
polimerizacija	72 °C, 30 s	72 °C, 30 s
število ciklov	40	40

Po 40 ciklih izvedemo še dokončanje reakcij (7 min, 72 °C), nato pa vzorce ohladimo na 15 °C in jih do uporabe hranimo v hladilniku (lahko tudi več dni).

e) Elektroforezna analiza produktov PCR

Pripravimo 2,2-odstotni agarozni gel z etidijevim bromidom v pufri TAE. Po končanem pomnoževanju reakcijsko zmes oborite z dodatkom 0,1 V 3 M Na-acetata in 2,5 V etanola. Premešajte in centrifugirajte 10 min pri polnih obratih. Supernatant zavržite, oborino pa sperite s 50 μl 70-odstotnega etanola. Centrifugirajte 3 min pri polnih obratih. Kvantitativno odstranite supernatant, oborino pa posušite v vakuumskem koncentradorju.

Posušeni oborini dodajte 10 μl pufru TE in 1,5 μl nanašalnega pufru ter nanesite na agarozni gel. Elektroforeza naj teče pri 80 V dokler bromfenolmodro ne pripotuje do 2/3 dolžine gela. Na transiluminatorju detektirajte produkte PCR; če je potrebno, še enkrat pobarvajte DNA z etidijevim bromidom.

Rezultati:

Vzorec naše skupine je bil označen s črko ____.

Iz 100 μ l sojinega izdelka smo izolirali ____ ng genomske DNA. Koncentracija je torej _____ ng/ μ l.

Elektroforezno ločitev pomnoženih produktov predstavite s kopijo elektroferograma.

Kaj lahko na osnovi rezultatov PCR poveste o sojinem mleku, ki ste ga analizirali? Opišite tudi rezultate drugih skupin!

Če ste določili absorpcijski spekter, priložite kopijo izpisa!

Vprašanja za ponavljanje in razmišljanje:

- Katere poljščine najpogosteje gensko spreminjajo? Zakaj ravno te?
- Kateri dve lastnosti najpogosteje najdemo v gensko spremenjenih kmetijskih pridelkih?
- Kaj pomeni oznaka Bt pri gensko spremenjeni koruzi?
- Kako vnesejo nove gene v rastline?
- Kako pride DNA v sojino mleko?
- Kako verjetno je, da bodo v naslednjih letih množično pridelovali Bt-sojo tudi pri nas?
- Katero novo lastnost so vključili v edino gensko spremenjeno koruzo, odobreno za sajenje v Evropski uniji?
- Ali bi bilo smiselno v Sloveniji pridelovati gensko spremenjeno koruzo? Zakaj?
- Izolacija genomske DNA je zapleten proces. Poskusite ga opisati z največ 5 ključnimi stopnjami!
- Zakaj smo izvajali kontrolno pomnoževanje dela zapisa za sojin lektin, saj smo vedeli, kaj smo vzeli kot vzorec?
- Kaj nam pove razmerje A_{260}/A_{280} in ali ocenjujete, da je bilo za vaš vzorec ustrezno?
- Če pričakovanega produkta niste dobili, napišite možne razlage! Ali je možno, da se začetni oligonukleotidi niso vezali na matrično DNA? Ali je mogoče reči, da v vzorcih DNA ni bilo inhibitorjev polimeraze?
- Za katero hrano je verjetnost, da vsebuje gensko spremenjene surovine, največja?
- Ali bi lahko določili vsebnost gensko spremenjene ogrščice v jedilnem olju? Utemeljite!

Viri:

Meyer R. in Jaccaud E., Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant soybeans. *Proceedings of Euro Food Chem IX*, September 24-26, 1997, Interlaken, Švica, Vol. 1, Swiss Society of Food and Environmental Chemistry.

Y. Kakiyama *et al.*, Extraction and detection of endogenous soybean DNA from fermented foods, *Food Control* 17, 808–813 (2006)

Lipp M. *et al.*, Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *Eur. Food Res. Technol.* 212, 497-504 (2001)

3. vaja: Transformacija cianobakterij

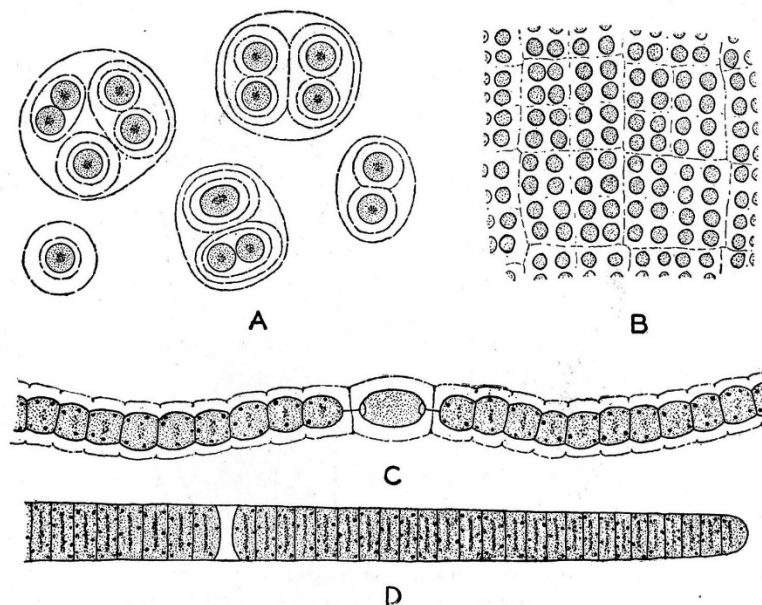
Cianobakterije so edini prokarionti, ki lahko sintetizirajo organsko snov s fotosintezo. To pomeni, da za svojo rast kot (običajno edini) vir ogljika uporabljajo CO₂, ki tako ali tako predstavlja okoljski problem; edini pogoj je, da so celice izpostavljene sončni svetlobi in da sestava gojišča omogoča njihovo nemoteno rast. Kot prokarionti so cianobakterije zanimive zaradi enostavnega genskega spreminjanja, nekatere vrste pa tudi dokaj hitro rastejo. Različni sevi cianobakterij, ki so jih izolirali iz narave in pogosto še dodatno izselekcionalirali s konvencionalnimi tehnikami, so sposobni sintetizirati tržno zanimive snovi, na primer lipide, vitamine itd. Spekter zanimivih produktov pa bi z gensko tehnologijo lahko še bistveno razširili.

Med najbolj obetavnimi produkti, ki bi jih cianobakterije lahko proizvajale, prištevamo biogoriva. V raziskovalnih laboratorijih so že pripravili cianobakterije, ki proizvajajo etanol, butanol, alkane in vodik, možnosti pa so praktično neomejene. V celice je mogoče vnesti nove biosintezne poti in z metabolnim inženirstvom izvesti postopke, ki so učinkoviti in na meji tržne upravičenosti (kar je povezano tako s ceno konvencionalnih goriv kot z zagotovitvijo optimalnih pogojev za rast).

V razvoju planeta so cianobakterije imele pomembno vlogo, saj so v zemeljski zgodovini verjetno prav cianobakterije zagotovile kisik, ki je omogočil razvoj aerobnih organizmov. Še danes predstavljajo pomemben vir kisika, čeprav je delež, ki ga prispevajo evkariontski fototrofi, večji.

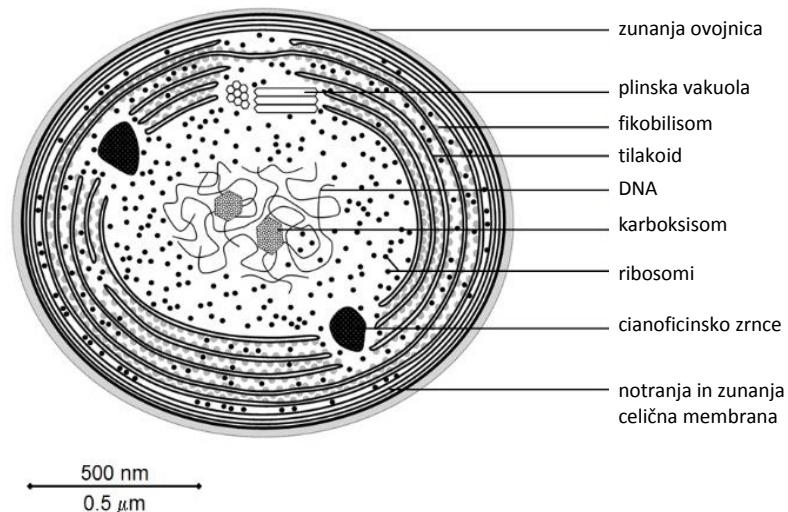
Življenjski prostor cianobakterij so predvsem sladke in slane vode, najdemo pa jih tudi na kopnem in v zgornji plasti zemlje. Zasedajo torej zelo raznolike ekološke niše. Znani okoljski pojav 'cvetenja' je najpogosteje posledica prekomerne rasti cianobakterij, ki lahko prekrijejo površino celih jezer, s tem pa vplivajo na druga živa bitja v istem okolju. Poleg tega nekatere cianobakterije izločajo toksine (na primer pri cianobakterijah iz rodu *Microcystis* toksin mikrocistin), ki so lahko nevarni domačim živalim, pa tudi človeku.

Morfološko razlikujemo enocelične in večcelične (večinoma nitaste ali prekrivne) cianobakterije. Nitaste cianobakterije imajo lahko nekatere celice po obliki in delovanju drugačne od ostalih (npr. heterociste), kar otežuje delo z njimi. Nekaj tipov cianobakterij prikazuje slika 3.1, prerez skozi značilno enocelično cianobakterijo pa na sliki 3.2.



Slika 3.1: Nekateri tipi rasti cianobakterij. A in B: celice v skupnih ovojih; C in D: nitasta oblika. Na sliki ni prikazane klasične enocelične oblike, ki si jo lahko predstavljate kot celico levo spodaj na A. Vir: Haupt, Plant Morphology, McGraw-Hill, 1953.

Nekatere cianobakterije so sposobne spontane transformacije. To pomeni, da lahko brez predhodne obdelave (kakršna je na primer potrebna pri delu z *E. coli*) celice sprejmejo tujo DNA v citoplazmo. Tam jo največkrat razgradijo, lahko pa jo tudi vključijo v svoj genom. Raziskovalci poročajo o zelo različnih učinkovitostih tega postopka, zato ga pri svojem delu uporabljajo redko. Pogostejša metoda za transformacijo je elektroporacija.



Slika 3.2: Prerez skozi tipično enocelično cianobakterijo (vir slike: <http://cronodon.com/BioTech/Cyanobacteria.html>). Fikobilisomi, ki so nameščeni na tilakoidnih membranah, vsebujejo klorofil a in pomožna fotosintezna barvila. Plinske vakuole določajo plovnost vodnih cianobakterij. Karboksisomi vsebujejo večinoma encim rubisco (ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilazo). Cianoficin je neribosomsko sintetiziran polipeptid, ki sodeluje v metabolizmu dušika.

Ekologi, limnologi (raziskovalci notranjih voda), oceanologi in fikologi (raziskovalci alg) iz okoljskih vzorcev izolirajo čiste kulture. Za te pravijo, da so 'aksenične', da torej ne vsebujejo drugih sevov ali vrst in torej omogočajo preučevanje samo tega organizma. Aksenične kulture vzdržujejo v svojih laboratorijih, ali pa jih predajo v hrambo mikrobiološkim zbirkam. Ena od teh, ki je specializirana za hrambo cianobakterij, je na Pasteurjevem inštitutu v Parizu. Vsi sevi, ki jih tam hranijo, imajo kataloško oznako, ki se začne s kratico PCC (Pasteur Collection of Cyanobacteria). Sledijo številke, pri čemer prvi dve pomenijo leto, ko je nek sev prispel v zbirko. Enak sev v drugi zbirki ima lahko drugačno oznako.

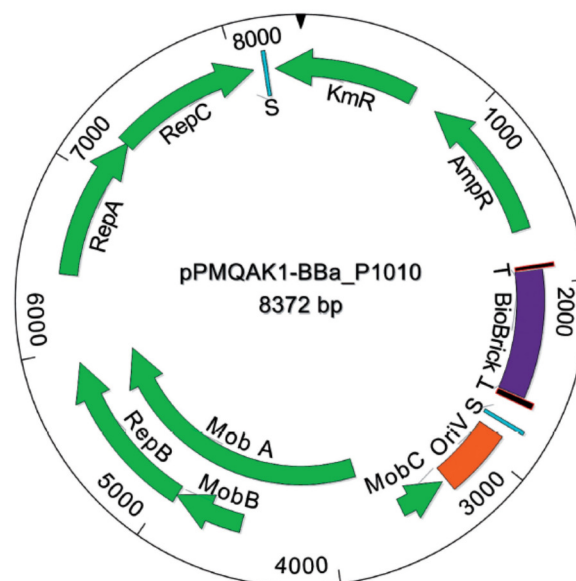
Sev, s katerim boste delali na vajah, ima oznako *Synechocystis sp.* PCC 6803. Kot je razvidno iz imena, vrsta sinehocistisa ni bila natančno določena. Sistematika cianobakterij je težavna, saj so si celice predstavnikov različnih rodov med seboj zelo podobne. To je tudi razlog, zakaj sev nima vrstnega imena. Številčna oznaka pomeni, da sev hranijo že od leta 1968. V letih hrambe so celo opazili, da je sev mutiral, kar so potrdile genomske analize starih in novih sevov.

Cianobakterija PCC 6803 je modelna enocelična gramnegativna cianobakterija, ker je dokaj robustna (neobčutljiva za zmerna nihanja v pogojih gojenja) in ker je naravno kompetentna za transformacijo. Bila je prvi fototrofni organizem, ki so mu določili genomsko zaporedje (1996). Njen krožni kromosom obsega 3.573.470 bp in je v celici prisoten v približno 20 identičnih kopijah. Razen tega celice vsebujejo še 7 različnih plazmidov, velikih od 2,4 kb do 106 kb, vsakega v približno 10 – 20 kopijah. Genoma zapisuje za okrog 3200 proteinov, od tega jih za skoraj tretjino ne vemo, kakšna bi lahko bila njihova funkcija. Kljub temu, da je to eden najbolje preiskanih mikroorganizmov, o njem še vedno veliko ne vemo.

Gojenje cianobakterij je dokaj zamuden proces, delo s cianobakterijami pa zahteva natančnost, saj ne sme priti do okužb. Te bi se zelo hitro pokazale, saj cianobakterije rastejo počasneje od drugih bakterij, pa tudi številnih alg in gliv. PCC 6803 raste optimalno pri temperaturi 30 °C in pri visoki osvetljenosti. V našem laboratoriju uporabljamo 24-urno osvetljenost, v nekaterih drugih laboratorijih pa opažajo primerljivo rast tudi v pogojih, ko simulirajo dnevno-nočni cikel (običajno je obdobje teme 8 ur). Gojišče je raztopina različnih soli v zelo natančno določenih koncentracijah. Za hitrejše delo lahko kupimo koncentrat, ki ga pred uporabo redčimo 50-krat. Za pripravo plošč avtoklaviramo agar v vodi in dodamo ustrezen volumen koncentriranega BG-11. Dodatno uporabimo Na-tiosulfat, ki veže inhibitorne snovi v agarju, in HEPES (4-(2-hidriksietil)piperazin-1-etansulfonska kislina) kot pufer. Če rabimo plošče z antibiotikom, tega dodamo, ko se gojišče ohladi pod 60 °C.

Za biotehnološko izrabo je PCC 6803 zanimiva bakterija prav zato, ker poznamo njen genom in ker obstajajo metode za vnos DNA na točno določena mesta v genomu. Ugotovili so tudi, katera mesta so primerna za vnos heterolognih genov (ne sme namreč priti do prekinitve transkripcijskih enot, niti vezavnih mest za regulatorne proteine ali RNA). Po drugi strani pa PCC 6803 raste dokaj počasi, saj se celice delijo le ~2x na dan (za primerjavo z *E. coli*, ki se deli 2x na uro). Vektorji, ki so primerni za delo z *E. coli*, niso kar brez nadaljnega primerni za delo s cianobakterijami. Kompatibilni so samo redki vektorji z replikatorji širokega spektra, ti pa običajno obsegajo dokaj dolge regije, zato so vektorji običajno precej večji kot za delo z *E. coli*.

Vektor pPMQAK1 (slika 3.3), ki ga boste uporabili za transformacijo cianobakterij, smo dobili iz laboratorija prof. Linblada z Univerze v Uppsali na Švedskem. Pripravili so ga po sinteznobioloških standardih kot potencialni ekspresijski vektor, a v izvedbi, ki jo boste dobili, ne vsebuje promotorja. V *E. coli*, kjer vektor namnožimo, je prisoten v majhnem številu kopij.



Slika 3.3: vektorska karta pPMQAK1. Vektor vsebuje dva gena za odpornost proti antibiotikoma ampicilinu in kanamicinu, mesto *oriV* ter več genov *rep* in *mob*, ki so potrebni za konjugacijski prenos vektorja v cianobakterije, imenovan 'tristarševsko parjenje' (*triparental mating*). Z vijolično (napis BioBrick) je označen vključek, ki je gen za rumeni fluorescirajoči protein (YFP). Vir: H-H. Huang *et al.*, 2010.

Elektroporacija je fizikalni način vnosa DNA v celice. Uporaben je z različnimi tipi celic, pogoji za izvedbo pa se razlikujejo glede na lastnosti celic in njihovih membran. Proizvajalci elektroporatorjev so nekatere protokole že zbrali v navodilih za uporabo, lahko pa jih prevzamemo tudi iz znanstvene literature. Tehnika temelji na permeabilizaciji celičnih membran pod vplivom visokonapetostnih električnih impulzov, ki povzročijo prehodni nastanek lukenj v celični ovojnici. DNA, ki je negativno

nabita, pri tem potuje iz raztopine v smeri proti pozitivni elektrodi, zaradi velike gostote celic pa se lahko znajde znotraj njih. Za elektroporacijo je ključno, da so celice dobro sprane s tekočino, ki ne vsebuje elektrolitov. Običajno uporabimo sorbitol, pri cianobakterijah pa je to lahko sterilna deionizirana voda. Po elektroporaciji cianobakterije najprej regeneriramo v tekočem gojišču brez selekcijskega pritiska, kasneje pa jih prenesemo na trdno selekcijsko gojišče.

V primerjavi z bakterijo *E. coli*, pri kateri lahko dosežemo z malimi vektorji frekvence transformacij, ki so v območju okrog 10^9 transformant na μg uporabljenega vektorja, je cianobakterija bistveno manj učinkovita pri sprejemu tuje DNA. Eden od možnih razlogov je več tilakoidnih membranskih ovojníc, ki praktično obdajajo celico. Zato lahko pri PCC 6803 pričakujemo tudi milijonkrat nižje frekvence transformacij kot pri *E. coli*. Upoštevati je tudi treba, da bomo uporabili sorazmerno velik vektor, učinkovitost pa z velikostjo vektorja upada.

Za uspešnost transformacije je pomembno, da so celice v eksponentni fazi rasti. Pri fotosinteznih enoceličarjih lahko gostoto spremljamo s spektrofotometrom, pri čemer uporabimo valovno dolžino 730 nm, pri kateri absorbira klorofil.

Izvedba eksperimenta:

Za en poskus potrebujete približno 5×10^7 celic. Vse faze opravljajte na ledu, če ni drugače navedeno. Centrifugirajte vsakič 10 min pri $4\text{ }^\circ\text{C}$ in 4500 g. Protokol za elektroporacijo je prevzet iz Laboratorija za proteomiko in nanobiotehnoljijo Kraljeve tehniške visoke šole v Stockholmu. Protokol za spontano transformacijo je iz članka JFG Williamsa (1988).

a) Priprava gojišč

Pripravite po 200 ml gojišča BG-11.

b) Predpriprava cianobakterij za elektroporacijo in spontano transformacijo

(izvede tehnik ali asistent)

Z gojenjem cianobakterij v tekočem gojišču BG-11 začnite vsaj 2 tedna pred poskusom in spremljajte celično rast z merjenjem absorbance pri 730 nm proti vodi (BG-11 ne absorbira v tem območju). Če je treba, celice precepljajte tako, da bo na dan poskusa njihova $A_{730} = 0,3-0,5$.

c) Spiranje celic in elektroporacija

- Če je $A_{730}=0,5$, odcentrifugirajte celice iz 1 ml kulture, če je $A=0,3$, pa iz 2 ml.
- Sperite celice z $\frac{1}{2}$ volumna (to se nanaša na odvzeti volumen kulture) ledenomrzle sterilne deionizirane vode.
- Odcentrifugirajte celice in jih sperite z $\frac{1}{4}$ volumna ledenomrzle sterilne deionizirane vode.
- Odcentrifugirajte celice in jih resuspendirajte v 40 μl ledenomrzle sterilne deionizirane vode (s tem bi naj bila gostota celic 10^9 /ml), v katero ste predhodno dodali 1 μg .
- Postavite na led za 3 min.
- Prenesite v elektroporacijsko napravo in izvedite elektrošok pri naslednjih pogojih (nastavi asistent):

$$V = 2,5 \text{ kV}$$

$$C = 25 \text{ } \mu\text{F}$$

$$R = 200 \text{ } \Omega$$

- Takoj po elektroporaciji (v roku 10 s) v kiveto previdno dodajte 1 ml gojišča BG-11.
- Prenesite celoten volumen v erlenmajerico, ki vsebuje 4 ml BG-11 (pipetirajte počasi!).

- Inkubirajte 24 h pri običajnih ravninskih pogojih.

d) Nacep na selekcijsko gojišče

- Celice odcentrifugirajte in jih resuspendirajte v 150 μ l gojišča BG-11.
- S sterilnim trianglom jih razmažite na trdno gojišče BG-11, ki vsebuje nizko koncentracijo kanamicina (12,5 μ g/ml).
- Ko zrastejo kolonije do ustrezne velikosti, jih precepate na trdno gojišče BG-11 s povečano koncentracijo antibiotika (25 μ g/ml).

e) Spontana transformacija

- Optimalna začetna absorbanca kulture je $A_{730}=0,5 - 1$.
- Če je $A_{730}=0,5$, odcentrifugirajte celice iz 2 ml kulture, če je $A=1$, pa iz 1 ml.
- Resuspendirajte celice v 200 μ l gojišča BG-11.
- K 100 μ l celic na ledu takoj dodajte 2 μ g vektorja, ki naj vsebuje toliko DNA, da bo končna koncentracija 10 μ g/ml.
- Inkubirajte 4 h pri standardnih ravninskih pogojih za PCC 6803.
- Dodajte 900 μ l gojišča BG-11 in vse skupaj prenesite v erlenmajerico, ki vsebuje 4 ml BG-11 (pipetirajte počasi!).
- Inkubirajte 24 h pri običajnih ravninskih pogojih.
- Nadaljujte kot po elektroporaciji s točko d).

Rezultati:

Zrasle kolonije na selekcijskih ploščah po elektroporaciji (označite z zvezdico, katera skupina je vaša!):

skupina	število kolonij	frekvenca transformacije (/pmol)
1		
2		
3		
4		
5		
kontrola		

Zrasle kolonije na selekcijskih ploščah po spontani transformaciji (označite z zvezdico, katera skupina je vaša!):

skupina	število kolonij	frekvenca transformacije (/pmol)
1		
2		
3		
4		
5		
kontrola		

Vprašanja za ponavljanje:

- Cianobakterije so včasih imenovali modrozeleni alge. Zakaj to ime ni upravičeno?
- Izračunajte, koliko celic nastane v 24 urah iz 1 celice *E. coli* in koliko iz 1 celice PCC 6803!
- Kako bi določili, kakšna je koncentracija celic (število/ml) pri določeni vrednosti A_{730} ?
- Koliko kolonij bi pričakovali na plošči, če bi enak eksperiment izvedli z *E. coli*? (Kako bi rešili problem?)
- Kje bi bilo smiselno postaviti obrat za proizvodnjo biogoriv s cianobakterijami, da bi bila taka proizvodnja ekonomsko čimbolj upravičena (dostopnost virov, klimatski pogoji)?

Vira:

Hsin-Ho Huang, Daniel Camsund, Peter Lindblad, Thorsten Heidorn: Design and characterization of molecular tools for a Synthetic Biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Research* 38(8), 2577–2593, 2010.

John G.K. Williams: Construction of specific mutants in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol* 167:766–778, 1988.