Chalmers University of Technology

Institutionen för Biologi och Bioteknik

Projektrapport

BBTX01-17-01

Utveckling av n-alkaninducerad biosensor i *Saccharomyces cerevisiae*: Undersökning av *Yarrowia lipolyticas* promotor *ALK1* och dess tillhörande transkriptionsfaktorer.

Författare:
Baaz Marcus
Hedin Alex
Johansson Elin
Olofsgård Moltas
Stenbom Malin
Tabell Martin

Handledare:
Siewers Verena
Dabirian Yasaman
David Florian

Examinator:
Albers Eva

12 maj 2017



CHALMERS
UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Abstract

Combustion of fossil fuels has raised the average temperature on Earth. To counter this, there is a demand for biofuels as a replacement for fossil fuels. In this project, the focus was on n-alkanes. There are already strains of *Saccharomyces cerevisiae*, which can produce n-alkanes, but the efficiency is not yet high enough for industrial scale. The possibility to create a biosensor for detecting n-alkanes was investigated, this to further the development of n-alkane producing yeast. This project investigated if the n-alkane induced transcription system from *Yarrowia lipolytica* could work in *S. cerevisiae*. This is because *S. cerevisiae* does not have a naturally occurring n-alkane induced system.

The biosensor system consist of the n-alkane induced promotor *ALK1* and the genes encoding for the transcription factors Yas1, Yas2, Yas3 and the protein GFP (Green Fluorescent Protein). Yas1 and Yas2 work as activators for P_{ALK1} and Yas3 represses the promotor by binding to Yas2 in abscence of n-alkane The system was constructed by connecting GFP to *Y. lipolytica's* n-alkane induced P_{ALK1} along with various combinations of the other genes. The activity of P_{ALK1} was then quantified by measuring the fluorescence with a flow cytometer. The test showed an increased fluorescence with Yas1 and Yas2 included. The fluorescence was increased further with the combination Yas1, Yas2 and Yas3, even though Yas3 was thought to code for a protein which represses P_{ALK1}. If Yas3 increases the expression it might be that there are unknown components in *Y. lipolyticas* alkane induced system. The system seems to work differently in *Y. lipolytica* and *S. cerevisiae*. Further studies are needed to determine if it can be used as an n-alkane sensor in *S. cerevisiae*.

Sammanfattning

Förbränning av fossila bränslen har höjt medeltemperaturen på jorden. För att motverka detta finns det en ökad vilja att tillverka biobränslen som kan ersätta fossila bränslen. I detta projektet låg fokus på n-alkaner. Det finns redan stammar av *Saccharomyces cerevisiae* som producerar n-alkaner, men de är inte effektiva nog för produktion på industriell skala. För att underlätta utveckling av dem undersöks möjligheten att tillverka en biosensor som kan detektera n-alkaner. Under detta projekt undersöktes det om det n-alkaninducerade transkriptionssystemet från *Yarrowia lipolytica* kan fungera i *S. cerevisiae*. Detta görs för att *S. cerevisiae* inte har ett naturligt n-alkaninducerat system.

Biosensorsystemet består av den n-alkaninducerade promotorn *ALK1* och generna som kodar for transkriptionsfaktorerna Yas1, Yas2, Yas3 och proteinet GFP (Grön Fluorescerande Protein). Yas1 och Yas2 fungerar som aktivatorer för P_{ALK1} och Yas3 fungerar som en repressor för promotorn genom att binda till Yas2 i frånvaro av n-alkaner. Systemet konstruerades genom att koppla GFP till P_{ALK1} tillsammans med olika kombinationer av generna. Aktiviteten hos P_{ALK1} mättes med hjälp av fluorescens i en flödescytometer. Testerna visade att fluorescensen blev starkare med Yas1 och Yas2 närvarande. Det visade även att kombinationen med Yas1, Yas2 och Yas3 tillsammans gav en förstärkt uttryck, trots att Yas3 uttrycker ett protein som ska inhiberar P_{ALK1}. Att Yas3 gav ett starkare uttryck kan betyda att det finns okända komponenter som är kopplade till *Y. lipolyticas* n-alkaninducerade system. Systemet verkar fungera annorlunda i *Y. lipolytica* gentemot *S. cerevisiae*. Ytterligare studier är nödvändiga för att fastställa om det går att använda den som en biosensor för n-alkaner i *S. cerevisiae*.

Innehåll

1 Inledning **5**
- 1.1 Bakgrund . . . 5
- 1.2 Syfte . . . 5
- 1.3 Avgränsningar . . . 6

2 Teori **7**
- 2.1 *Y. lipolyticas* n-alkaninducerade system . . . 7

3 Metod och material **9**
- 3.1 Konstruktion av plasmider . . . 9
  - 3.1.1 Biosensorkonstruktion . . . 9
  - 3.1.2 PCR . . . 12
  - 3.1.3 Gibsonkloning . . . 13
- 3.2 *E. coli* . . . 13
  - 3.2.1 Transformation av *E. coli* . . . 13
  - 3.2.2 Verifikation i *E. coli* . . . 14
- 3.3 *S. cerevisiae* . . . 14
  - 3.3.1 Transformation av *S. cerevisiae* . . . 14
  - 3.3.2 Verifikation i *S. cerevisiae* . . . 14
- 3.4 Flödescytometri . . . 14

4 Resultat och diskussion **15**
- 4.1 PCR . . . 15
- 4.2 Plasmidkloning och verifikation . . . 17
  - 4.2.1 Transformation av *E. coli*. . . . 17
  - 4.2.2 Restriktionsanalys . . . 17
  - 4.2.3 Sekvensering . . . 19
- 4.3 Transformation och verifikation i *S. cerevisiae* . . . 21
  - 4.3.1 Transformation av *S. cerevisiae* . . . 21
  - 4.3.2 Koloni-PCR . . . 22
- 4.4 Flödescytometri . . . 23

5 Slutsatser **30**

6 Framtida Studier **31**

7 Referenser **32**

8 Bilaga A **33**
- 8.1 Konstruktion av plasmider . . . 33
  - 8.1.1 Omfattande information om primrar och PCR:erna . . . 33
  - 8.1.2 Gelextraktion-protokoll . . . 34
  - 8.1.3 PCR-protokoll . . . 34
  - 8.1.4 Gibsonkloning . . . 35
- 8.2 *E. coli* . . . 36
  - 8.2.1 Komposition LB-Amp medium . . . 36
  - 8.2.2 Transformation av *E. coli* . . . 36
  - 8.2.3 Plasmidrening . . . 36
  - 8.2.4 Verifikation av *E. coli* . . . 37
  - 8.2.5 Thermo Scientific^{TM} FastDigest^{TM} Restriktions protokoll . . . 37
  - 8.2.6 Sekvensering . . . 38
- 8.3 *S. cerevisiae* . . . 38
  - 8.3.1 Transformation av *S. cerevisiae* . . . 38
  - 8.3.2 Verifikation i *S. cerevisiae* . . . 39
- 8.4 Flödescytometri . . . 39
  - 8.4.1 Medium till övernattskulturen . . . 39
  - 8.4.2 Optisk Densitetsmätningar innan flödescytometrin . . . 40

9 Bilaga B **41**
9.1 PCR . . . 41
9.2 Restriktionsanalys . . . 41
9.2.1 Plasmidernas koncentration . . . 41
9.2.2 Gelelektroforesbilderna för alla plasmiderna . . . 42
9.2.3 Gelelektroforesbild av felklyvningen . . . 43
9.2.4 Gelbilder över alla tester för koloni-PCR:en . . . 43
9.3 Flödescytometri . . . 44

1 Inledning

1.1 Bakgrund

Under de senaste decennierna har vi människor blivit mer och mer medvetna om hur vår livsstil påverkar omvärlden och ett av de största klimathoten som vi står inför är uppvärmningen av jorden. Klimatforskare är säkra på att medeltemperaturen på jorden har stigit med en halv grad Celsius under de senaste 100 åren och att vi människor delvis är ansvariga för det[1]. En av de huvudsakliga mänskliga aktiviteter som ligger bakom detta är förbränningen av fossila bränslen för att till exempel driva fordon eller generera elektricitet i kraftverk. Det är därför av intresse att skapa förnybara bränslen som inte påverkar miljön på samma sätt och använda dessa som substitut för de fossila bränslena.

Det mest använda förnybara bränslet idag är bioetanol och används som substitut för bensin. En av de negativa aspekterna av bioetanol är att den bara har runt 2/3 av den energidensitet som finns i bensin[2]. Dessutom finns det restriktioner på hur etanol och bensin kan blandas, vilket ytterligare framhäver behovet av att kunna framställa andra typer av förnybara bränslen[3].

En typ av förnybara bränslen som är av intresse är n-alkaner, då de kan användas som substitut för diesel och fotogen. Genom att påverka jästarten *Saccharomyces cerevisiaes* metaboliska vägar genom rationell design, har det visats att produktion av n-alkan i denna mikroorganism är möjlig[3]. Produktionen är dock alldeles för låg för att effektivt kunna användas på industriell skala ännu. Därför behövs det en stam av *S. cerevisiae* som är optimerad för n-alkanproduktion och en möjlighet att uppnå detta är att införa slumpmässiga mutationer till jästens genom[4]. Denna process återupprepas för att skapa ett stort bibliotek av *S. cerevisiae*-stammar med olika mutationer. Detta leder förhoppningsvis till att en jäststam med tillräckligt hög produktivitet för att lönsamt kunna användas på industriell skala hittas.

De metoder som vanligen används för att kvantifiera n-alkankoncentration, till exempel gaskromatografi-masspektrometer, är långsamma och kräver oftast bearbetning av provet. Dessa metoder lämpar sig inte i det här fallet, då det är alltför många olika mutationer som ska undersökas. Därför finns det intresse av att skapa en biosensor som snabbt och effektivt kan kvantifiera mängden n-alkan som de olika stammarna har producerat[5]. Forskare har tidigare utvecklat biosensorer på ett liknande sätt, exempelvis har en biosensor som kvantifierar aminosyran treonin skapats[6]. Vid skapandet av en biosensor kan en organism användas med förmågan att metabolisera den molekyl vilket det finns intresse av att kvantifiera. I det fallet då målet är att kvantifiera n-alkaner finns det flera olika organismer som är intressanta, däribland jästarten *Yarrowia lipolytica*, vars metabolism av n-alkaner har studerats. Forskare har identifierat ett system av proteiner i *Y. lipolytica* som reglerar uttrycket av det enzym som är involverad i det första steget av metabolismen av n-alkaner. Detta system induceras av n-alkaner, dvs. enzymet uttrycks endast då n-alkaner är närvarande, och har således potential att fungera som en biosensor då vissa modifikationer av systemet har gjorts[7].

Ett tidigare kandidatarbete har försökt att skapa en biosensor genom att modifiera *Y. lipolyticas* n-alkaninducerade system och sedan introducera det till *S. cerevisiaes*[8]. Två modifikationer gjordes av originalsystemet, den första var att originalpromotorn inte användes, då det inte var säkert om den skulle fungera i *S. cerevisiaes*. Den andra modifikationen som gjordes var att genen som systemet reglerar byttes ut mot en gen som kodar för ett GFP (Grönt Fluorescerande Protein). De lyckades med att konstruera ett antal plasmider, vilka innehöll de väsentliga generna för det modifierade n-alkaninducerade systemet, men det uppstod ett flertal mutationer i viktiga proteinkodande regioner. Då en oönskad mutation införts i en viktig del av ett protein, kan det inte längre garanteras att proteinet fungerar som det skall och alla resultat som bygger på användandet av ett sådant protein bör ifrågasättas. Därför finns det intresse av att skapa dessa plasmider igen med förhoppningen om att inga mutationer uppstår i några av de viktiga proteinkodande regionerna.

1.2 Syfte

Syftet med projektet är att med hjälp av *Y. lipolyticas* n-alkaninducerade system skapa en biosensor och transformera in den i *S. cerevisiae*. Målet är att då organismen producerar n-alkan ska ett GFP uttryckas och med hjälp av en flödescytometer ska mängden n-alkan som produceras kunna kvantifieras. Då detta projekt är en fortsättning av ett äldre kandidatarbete är det specifika syftet för det här projektet

att använda *Y. lipolyticas* originalpromotor, *ALK1* samt att lyckas konstruera alla plasmider utan att oönskade mutationer uppstår[8].

1.3 Avgränsningar

I tidigare forskning finns flera potentiella förbättrings- och utvecklingsmöjligheter [8], men på grund av begränsad tid och begränsade resurser har vissa avgränsningar valts att göras.

Det finns olika typer av n-alkaninducerade system men som tidigaret nämnts har systemet från *Y. lipolytica* valts för att skapa en biosensor i detta projekt. Detta på grund av att *Y. lipolytica* är en eukaryot precis som *S. cerevisiae* och delar grundläggande mekanismer. Ännu en anledning till att använda systemet från *Y. lipolytica* är för att detta system är välstuderat och har använts i tidigare försök till att skapa en biosensor. Projektet kommer även att avgränsas till att testa en specifik promotor, även om flera olika alternativ finns. Promotorn som kommer att användas är orginalpromotorn från *Y. lipolytica*, *ALK1*.

För inkorporering av gener i *S. cerevisiae* i projektet kommer två olika metoder användas, två-vektorsystemet och homolog rekombination. Andra metoder som skulle kunna användas är bland annat CRISPR/Cas9-systemet, som eventuellt skulle kunna öka chansen för bättre inkorporering till genomet. CRISPR/Cas9 bedöms dock i detta projekt vara för tidskrävande och har därför valts bort.

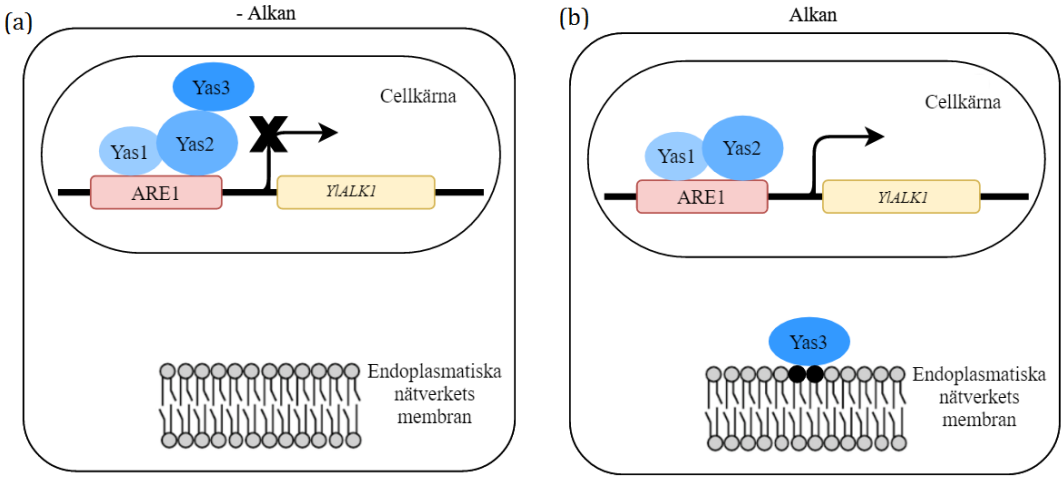
2 Teori

2.1 *Y. lipolyticas* n-alkaninducerade system

Det har visats att flera olika jästarter kan bryta ned n-alkaner, däribland *Y. lipolytica*. Hur nedbrytandet av n-alkaner sker i *Y. lipolytica* har studerats och en omfattande bild om vilka protein som är involverade i regleringen av *YlALK1* har skapats. Genen *YlALK1* kodar för proteinet P450ALK1 och uttrycks i närvaro av n-alkan.[7][9][10][11].

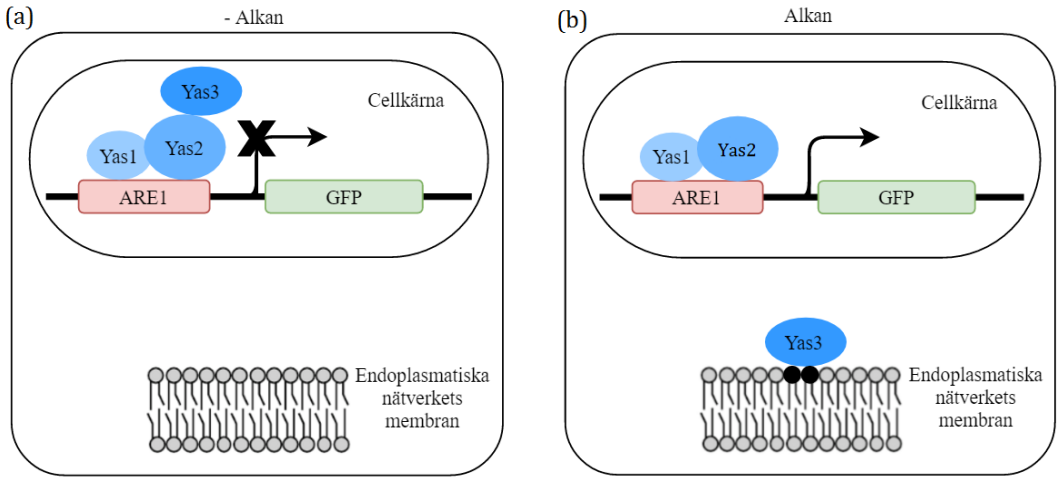
P450ALK1 är ett cytokrom P450 som katalyserar det första steget i nedbrytningen av n-alkaner, dvs. oxidationen av n-alkaner till långa kedjor av fettalkoholer[12]. Genom att skapa ofullständiga fragment av *YlALK1*s promotorregion, *ALK1*, och sedan inkorporera dessa i plasmider som i sin tur introducerats till stammen CXAU1 av *Y. lipolytica*, har en region av promotorn, som är nödvändig för att genen ska transkriberas, lokaliserats. Denna region döptes till ARR1 (alkane-responsive region). En närmare undersökning av denna region gjordes där två viktiga element, ARE1 och ARE2 (alkane-responsive element 1 och 2), hittades[7].

Fortsatta undersökningar av ARE1s funktion har visat att tre protein är väsentliga för regleringen av promotorn. Två av dessa proteiner är bHLH(basic helix-loop-helix)-proteiner och fungerar som aktivatorer, de har döpts till Yas1 och Yas2[13]. De två proteinerna binder till varandra i cellkärnan och bildar en heterodimer som sedan binder in till ARE1, vilket aktiverar ALK1. Detta resulterar i att *YlALK1* transkriberas[9]. Det tredje viktiga proteinet är Yas3 vilket är en Opi1-liknande transkriptionsfaktor och i frånvaro av n-alkan fungerar den som en repressor. Då Yas3 binder in till Yas2, förlorar heterodimeren sin förmåga att aktivera ALK1, vilket leder till att genen inte transkriberas[10]. I närvaro av n-alkan förflyttas Yas3 från cellkärnan till det endoplasmatiska nätverket, vilket resulterar i att heterodimern återigen kan aktivera *ALK1*[11]. De bakomliggande mekanismerna för förflyttningen är inte fastställda, men en teori som föreslagits förklarar fenomenet med att Yas3 binder till det endoplasmatiska nätverkets membran genom interaktioner mellan fosfatidinsyror och fosfatidylinositoler[10]. En schematisk bild över det regulativa systemet visas i Figur 1.



Figur 1: Schematisk representation av *Y. lipolyticas* n-alkaninducerade system i frånvaro samt närvaro av n-alkan. (a) Bilden visar systemet i frånvaro av n-alkan. Yas3 binder in till Yas2, vilket resulterar i att heterodimeren av Yas1 och Yas2 inte kan aktivera ARE1. Detta leder till att transkriptionen av *YlALK1* inte aktiveras. (b) Bilden visar systemet i närvaro av n-alkan. Yas3 förflyttas till det endoplasmatiska nätverket, vilket leder till att heterodimeren av Yas1 och Yas2 kan aktivera ARE1 som i sin tur aktiverar transkriptionen av *YlALK1*.

Tidigare forskning stödjer teorin om att det är möjligt att implementera *Y. lipolyticas* n-alkaninducerande transkriptionsystem i *S. cerevisiae*. Genom att byta ut *YlALK1* mot en gen som uttrycker GFP är det förhoppningsvis möjligt att skapa en biosensor[8]. Det blir då detta projekts uppgift att konstruera en sådan biosensor som tillämpar *Y. lipolyticas* system och som på optisk väg ska kunna identifiera och kvantifiera en enskild jäststams n-alkanproduktion. Detta illustreras i Figur 2.



Figur 2: Schematisk representation av *Y. lipolyticas* n-alkaninducerade system i *S.cerevisiae*, där *YlALK1* är utbytt mot en gen som uttrycker GFP.

Att använda sig av *Y. lipolyticas* originalpromotor *ALK1* för uttryck av GFP i *S. cerevisiae* kan anses vara fördelaktigt då denna naturligt i sin sekvens har de ARE-sekvenser på vilka transkriptionsfaktorerna Yas1 och Yas2 binder in till. Det behövs således inte designas en syntetisk promotor där dessa ARE-sekvenser ska finnas integrerade. Positionen av ARE1 och ARE2 i promotorn är av betydelse i dess aktivitet, vilket innebär att genuttrycket riskerar att minskas vid konstruktion av syntetisk promotor gentemot P_{ALK1}. Anledningen till att en syntetisk promotor kan vara fördelaktig är att den kan designas för anpassning i *S. cerevisiae*, till skillnad från P_{ALK1} som är helt anpassad för *Y. lipolytica*. Huruvida P_{ALK1} fungerar i *S. cerevisiae* eller inte har inte blivit forskningsmässigt fastslaget, så det är av stort intresse att undersöka detta.

Det finns alltså flera aspekter av *Y. lipolyticas* n-alkaninducerade system som är av intresse att undersöka. I detta projekt undersöks huruvida promotorn *ALK1* har förmågan att ge ett basuttryck eller ej då det introduceras i *S. cerevisiae*, samt om transkriptionsfaktorerna Yas1 och Yas2 ytterligare kan förstärka aktiviteten av P_{ALK1}. Då repressorn Yas3 introduceras till systemet är det av intresse att studera om uttrycket minskar i *S. cerevisiae* som teorin föreslår, och dessutom om n-alkaner kan göra denna repression reversibel.

3 Metod och material

Metoden har delats in i avsnitt som följer kronologisk ordning enligt utförandet av projektet. Det första avsnittet täcker plasmidkonstruktion, hur de har designats och hur de har konstruerats. Detta har gjorts i flera steg men kan huvudsakligen delas upp i PCR och Gibsonkloning. Det andra avsnittet täcker det konstruktions- och verifikationsarbetet som gjordes med *Escherichia coli*. I tredje avsnittet så beskrivs metoden för de skapade plasmidernas transformation in i *S. cerevisiae*. Det fjärde avsnittet beskriver metoden flödescytometri som användes för att ge det avslutande resultatet genom fluorescensmätning.

3.1 Konstruktion av plasmider

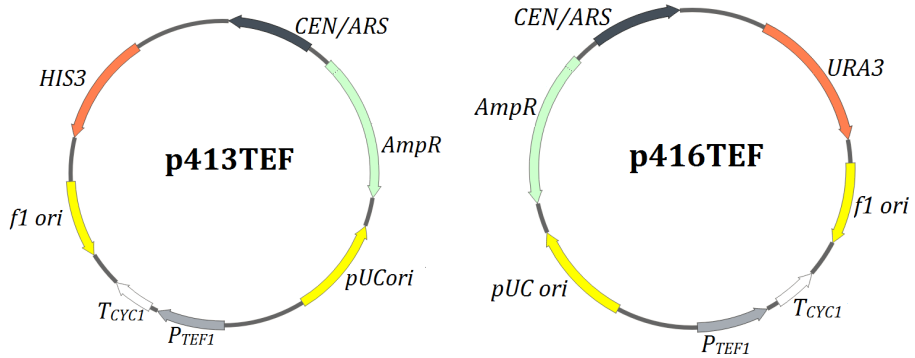
3.1.1 Biosensorkonstruktion

För tillämpning av *Y. lipolyticas* system med avsikt att detektera n-alkaner i *S. cerevisiae* valdes skyttelplasmider med förmågan att uttrycka de nödvändiga delarna av systemet. Två ryggradsplasmider, p413TEF och p416TEF, se Figur 3, användes som utgångspunkt för att konstruera alla slutgiltiga komponenter av mekanismen tillsammans med positiva och negativa kontroller.

Ryggradsplasmiderna innehöll båda replikationsstart för *E. coli* (*pUCori*) och *S. cerevisiae* (*f1 ori*), då det först var nödvändigt för plasmiderna att effektivt odlas upp och kopieras i *E. coli* innan de transformerades in i *S.cerevisiae*. Två sorters markörer var nödvändiga för selektion då de transformerades in i *E. coli* respektive *S. cerevisiae*. För *E. coli* fanns en *AmpR*-markör, som gjorde det möjligt för de celler som tagit upp plasmiden att växa i ampicillinrik miljö, och därmed säkerhetsställa att de överlevande cellerna tagit upp plasmiden. För selektion av *S. cerevisiae* användes ett system med två markörgener. p413TEF innehöll genen *HIS3* som är nödvändig för histidinsyntes och p416TEF innehöll *URA3* som är nödvändig för att syntetisera RNA utan tillsatt uracil. Då den *S. cerevisiae*-stammen som användes, CEN.PK113-11C (-*URA3*-*HIS3*), saknar *HIS3* och *URA3* kan den inte växa i ett histidin- och uracilfattigt medium. Växer de på selektionsmediet betyder det att de har tagit upp plasmiderna.

En promotor- och terminatorregion, *TEF1* och *CYC1*, fanns i båda plasmider för integrering av alla nödvändiga fragment. Denna specifika promotor har visat sig vara en stark promotor och fungerat väl vid uttryck av bland annat GFP [8].

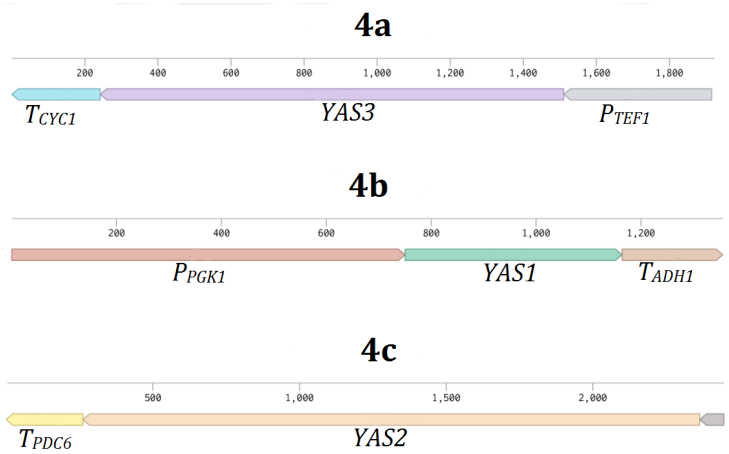
Slutligen innehöll plasmiderna regionen *CEN6*, vilken fungerade som en centromer vid celldelning av *S. cerevisiae*. Denna gen kunde då bidra till stabilisering och därmed öka chanserna till att det genetiska materialet inte fördelades ojämnt mellan moder- och dottercell.



Figur 3: Illustration över de två ryggradsplasmiderna, p413TEF och p416TEF, med dess element som användes som grund för att konstruera de nödvändiga komponenterna i *Y.lipolyticas* n-alkaninducerade system.

Fragment innehållande de nödvändiga delarna av *Y. lipolyticas* system integrerades till p413TEF respektive p416TEF. Tidigare projekt och forskningsarbete som undersökt detta område hade tagit fram lyckade fragment[8]. Även nya strategier användes för att få systemet att fungera optimalt. De redan framtagna fragmenten bestod av Yas1, Yas2 respektive Yas3 med promotor och terminator, vilka benämndes som 4a, 4b och 4c. Dessa fragment illustreras i Figur 4. Förutom dessa användes även en GFP-gen för integrering.

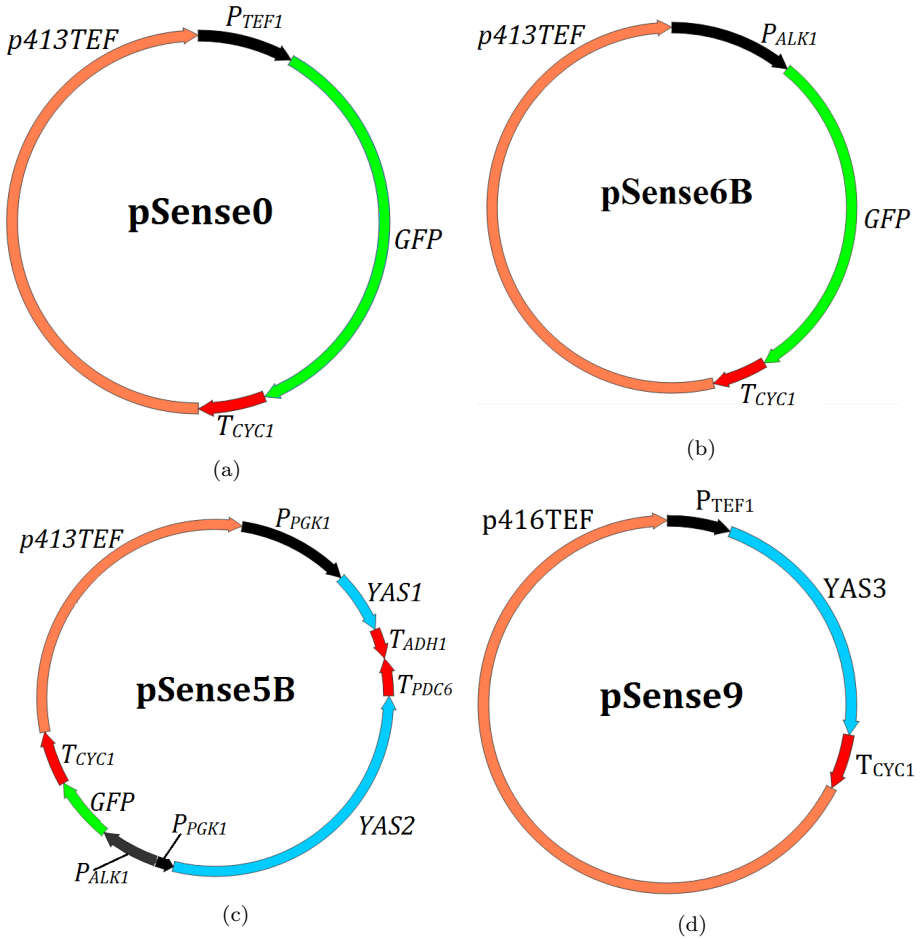
Det var denna gen som slutligen förväntades att ge det visuella resultatet på n-alkanernas verkan i systemet hos *S. cerevisiae*. En ny strategi grundade sig i att använda sig av *Y. lipolyticas* originalpromotor *ALK1*, vilken fanns naturligt i *Y. lipolytica*. Förhoppningen var att Yas1,Yas2 och Yas3 skulle integreras bättre och efterlikna systemet till så hög grad som möjligt. Osäkerhet fanns i om P_{ALK1} skulle fungera på samma sätt i *S. cerevisiae*, då denna tillhörde en annan art. Denna osäkerhet var en stor anledning till att en konstgjord promotor användes vid tidigare försök[8].



Figur 4: Illustration över fragment 4a, 4b och 4c. Fragmenten består av *YAS1*, *YAS2* respektive *YAS3*, som tillsammans utgör delar av *Y. lipolyticas* n-alkaninducerade system.

Fragmenten integrerades till de två ryggradsplasmiderna p413TEF och p416TEF vilket resulterade i fem nya plasmider, som illustreras i Figur 5. Plasmiderna namngavs till *pSense* (*plasmid Sense*), tillsammans med en siffra och/eller bokstav.

- pSense0 innehöll p413TEF tillsammans med en GFP-gen, och kom således att fungera som en positiv kontroll och förväntades ge fullt flourescerande uttryck oavsett om n-alkaner var närvarande eller ej.
- pSense6B skilde sig från pSense0 endast i den aspekt att promotorn *TEF1* var utbytt mot *Y. lipolyticas* originalpromotor *ALK1*. Plasmiden förväntades ge lågt eller inget uttryck eftersom den var beroende av att Yas1 och Yas2 skulle binda till P_{ALK1} för att påbörja transkriptionen av GFP.
- pSense5B var en påbyggnad av pSense6B, men innehöll dessutom *YAS1* och *YAS2* (fragment 4b och 4c). Eftersom denna plasmid innehöll de båda transkriptionsfaktorerna som kunde binda till P_{ALK1}, så förväntades flourescensuttrycket bli högre än pSense6B.
- pSense9 innehöll ryggradsplasmiden p416TEF tillsammans med *YAS3* (fragment 4a). Då denna plasmid transformerades tillsammans med pSense5B var *Y. lipolyticas* n-alkaninducerade system fullständigt. I n-alkanfri miljö förväntades då uttrycket bli mycket lågt eller noll, då Yas3 förväntades inhibera genen från att transkriberas. När systemet exponerades av n-alkaner förväntades uttrycket däremot öka.



Figur 5: De designade plasmiderna som testas i projektet. Blått representerar genen av intresse, grönt den gen som kodar det fluorescerande proteinet, beigt plasmidryggraden, rött terminatorn samt svart den promotor som används.

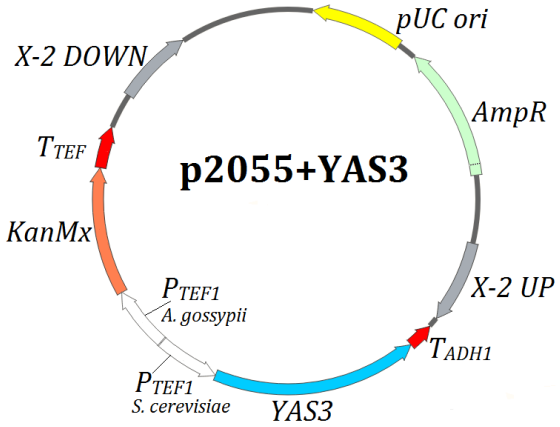
Då alla plasmider var konstruerade och transformerade in i *S. cerevisiae* skulle de fluorescerande uttrycken testas med hjälp av en flödescytometer. Förväntade fluorescensuttryck av samtliga plasmidkombinationer visas i Tabell 1.

Tabell 1: Lätt illustrativt hur *S. cerevisiae*-stammarna skapades genom kombinationer av plasmider som integreras och vad kombinationen innebär samt vilket flourescensuttryck som förväntas av kombinationen.

***S. cerevisiae* -stam**	**Plasmidkombination**	**Typ av test**	**Förväntat Fluorescensuttryck**
Negativ kontroll	p413TEF+p416TEF	Negativ Kontroll	Inget
Sense0	pSense0+p416TEF	Positiv Kontroll	Mycket starkt
Sense6B	pSense6B+p416TEF	Uttryck av P_{ALK1}	Svagt
Sense5B	pSense5B+p416TEF	Uttryck av system utan Yas3	Starkt
Sense(5B+9)	pSense5B+pSense9	Uttryck av system med Yas3	Svagt i frånvaro av alkan Starkt i närvaro av alkan

Samtliga transformationer av dessa fem plasmider skedde i en *S. cerevisiae*-stam som ej på egen väg kunde producera n-alkaner. Utöver dessa, så konstruerades parallellt en sjätte plasmid bestående av en annan ryggradsplasmid, p2055, tillsammans med *YAS3*, som användes till den n-alkanproducerande *S. cerevisiae*-stammen. Denna plasmid innehöll förutom *YAS3*, markörer för *E. coli* (*AmpR*) och *S. cerevisiae* (*KanMX*), sekvenser för homolog rekombination (*X-2 UP/DOWN*) samt replikationsstart för *E. coli* (*pUC ori*). Strategin för denna plasmid var att via homolog rekombination integrera *YAS3* med *kanMX* direkt in i genomet till en ny *S. cerevisiae*-stam, då plasmiden för n-alkanproduktion innehöll

URA3-markör. Då integrering skett var strategin att även transformera in pSense5B i *S.cerevisiae*-cellen för att testa det n-alkaninducerade systemet i sin helhet. Illustration av p2055+ *YAS3* illustreras i Figur 6, samt förväntade flourescensuttryck visas i Tabell 2.



Figur 6: Illustration över plasmiden p2055+ *YAS3* vars genom innehåller *YAS3* med promotor och terminator, markörer för *S.cerevisiae* och *E. coli* (*KanMX* respektive *AmpR*), replikationsstart för *E. coli* (*pUC ori*) samt sekvenser för homolog rekombination (*X-2 up/down*).

Tabell 2: Lätt illustativt hur *S. cerevisiae*-stammen, Sense(5B+Alkan) skulle skapas genom att *YAS3* via homolog rekombination introducerats i den n-alkanproducerande *S.cerevisiae*-stammen, tillsammans med den transformerade pSense5B. Det förväntade fluorescensuttrycket som kombinationen har samt vad de innebär.

***S. cerevisiae* -stam**	**Plasmidkombination**	**Typ av test**	**Förväntad Fluorescens**
Sense(5B+Alkan)	*YAS3* (n-alkanproducerande stam)	Uttryck av system med n-alkanproducerande jäststam	Starkt om hög n-alkanproduktion Svagt om låg n-alkanproduktion

3.1.2 PCR

Först designades primrar vars funktion var att under PCR (Polymeraskedjereaktion) skapa linjära fragment av plasmiderna samt lägga till en region som var homolog med kanterna av det fragmentet som skulle inkorporeras in i plasmiden. En förklarande bild över detta visas i Figur 7. För primersekvenser se Tabell 6 i Bilaga A 8.1.1.

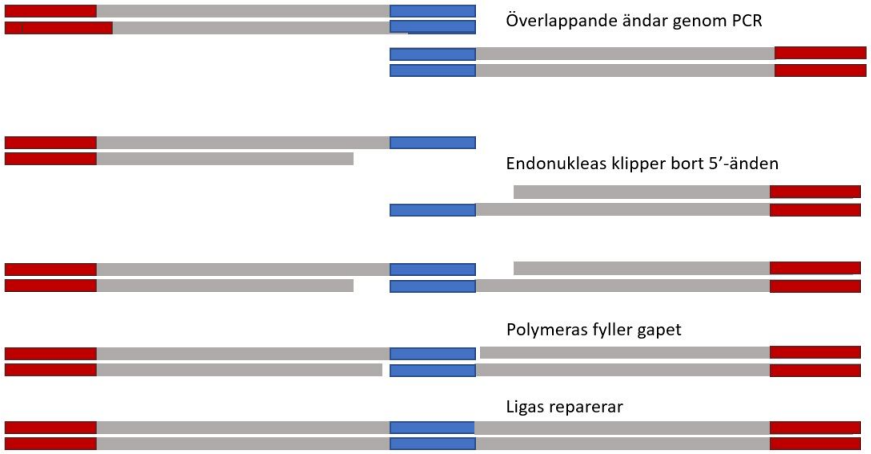


Figur 7: Illustrerande bild av produkt efter PCR.

Beroende på fragmentens längder användes två olika polymeras i PCR:erna, dessa var TaKaRa PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (härefter benämnd som PrimeSTAR) samt ThermoScientic™ Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (härefter benämnd som Phusion). Både Phusion och PrimeSTAR har en hög korrekturläsningsförmåga och noggrannhet, däremot så skiljer de sig åt när det kommer till effektiviteten för olika längder på fragmentet som amplifieras. PrimeSTAR är effektivare för längre fragment där förlängningstiden i PCR uppskattas till 5 s/kb och för Phusion 15 s/kb [14]. Då PrimeSTAR är dyrare än Phusion så valdes Phusion till de kortare fragmenten och PrimeSTAR till de längre för att göra det så kostnads- och tidseffektivt som möjligt. Kontroll att fragmenten var korrekta gjordes med gelelektrofores. Stegen som användes var en ThermoScientic™ GeneRuler 1 kb DNA Ladder och proven laddades på en 1% agarosgel med 4̃% GelGreen. Vid lyckat resultat gjordes en gelextraktion, enligt protokoll i Bilaga A 8.1.2, för att rena fram fragmentet. Temperaturer och cykeltider för PCR av vardera fragment redovisas i Tabell 7 i Bilaga 8.1.1. Koncentrationerna som använts i PCR:erna med PrimeSTAR och Phusion återfinns i Tabell 8 respektive Tabell 9 i Bilaga A 8.1.3. För PCR-cykelns parametrar se Tabell 10 i samma Bilaga.

3.1.3 Gibsonkloning

Gibsonkloning användes vid plasmidkonstruktionen för att sammankoppla DNA-fragment som tidigare skapats med PCR. Fragmenten med överlappande ändar (cirka 20 baspar) sammankopplades i en isotermisk reaktion. De överlappande ändarna skapades med primrar i den föregående PCR:en. Koncentrationen av fragmenten mättes med spektrofotometer för att sedan kunna beräkna volymen prov som skulle blandas med Gibson mastermix. Molkvoten mellan ryggradsplasmiden och fragmentet var 1:4, vilket redovisas i Bilaga A 8.1.4. Gibson mastermix innehåller tre olika enzymer; endonukleas, polymeras och ligas. Endonukleas klipper bort nukleotider på 5'-ändarna, vilket ger klistriga ändar som sedan komplementärt binder ihop fragmenten. Polymeras fyller gapet med nukleotider och ligas reparerar därefter DNA-ryggraden. Slutresultatet är en sammanfogad plasmid med fragmentet infogat i ryggraden [15], se Figur 8.



Figur 8: Gibsonkloning och dess tre olika enzymers funktion. Samma process sker för de röda primerparet för att skapa en cirkulär plasmid.

I den första Gibsonkloningen så skapades pSense0 och pSense9. pSense0 användes sedan i PCR som fragment för att få komplementära ändar så att den därefter kunde användas som templat i skapandet av pSense6B. pSense5B skapades genom att föra samman tre fragment i en Gibsonkloning, se Tabell 3. För fullständigt protokoll se Tabell 11 Bilaga A 8.1.4.

Tabell 3: Fragmenten som användes i Gibsonkloning för att skapa plasmiderna.

Plasmidkonstruktion	**Fragment**
pSense0	p413TEF
	GFP
pSense9	p416TEF
	4a (*YAS3*)
pSense6B	pSense0 utan P_{TEF1}
	P_{ALK1}
pSense5B	P_{PGK1}
	4b (YAS1)
	4c (*YAS2*)
p2055+*YAS3*	p2055
	4a (*YAS3*)

3.2 *E. coli*

3.2.1 Transformation av *E. coli*

Efter att fragmenten sammanfogats genom Gibsonkloning transformerades plasmiderna in i *E. coli* med hjälp av värmechock. Transformation in i *E. coli* gjordes för att enkelt kunna förvara plasmiderna samt

för att amplifiera dem. När plasmiderna tagits upp av cellerna så fick de först återhämta sig i LB-medium innan de spreds ut på en platta innehållande LB-Amp (LB-Ampicillin) medium, mediet förberedes enligt Bilaga A 8.2.1. Transformationen gjordes enligt protokoll i Bilaga A 8.2.2.

3.2.2 Verifikation i *E. coli*

Verifikation av plasmiderna efter transformation gjordes med tre metoder. I den första metoden användes selektionplattor med ampicillin för att verifiera att plasmiden tagits upp och inkorporerats av *E. coli*. Endast de celler som tagit upp den cirkulära plasmiden erhöll ampicillinresistens och kunde därmed växa på en ampicillinplatta. I den andra verifikationsmetoden plockades kolonier från selektionsplattorna och fördes över till falcontuber innehållandes LB-Amp, de inkuberades sedan i en 37°C skakinkubator med en skakhastighet på 200 rpm över en dag. Plasmiderna renades sedan fram med hjälp av ThermoScientic™ GeneJET Plasmid Miniprep Kit, för protokoll se Bilaga A 8.2.3. De renade plasmiderna användes i en restriktionsanalys, vilka restriktionsenzym som användes till vilka plasmider ses i Tabell 12 i Bilaga A 8.2.4. För fullständigt protokoll över restriktionsanalysen se Tabell 13 i Bilaga A 8.2.5. För att bekräfta längden så användes gelelektrofores, som beroende på restriktionsenzym visar band av olika karaktär. Ryggradsplasmiden användes som kontroll, för att se till så att fragmentet förts in på rätt plats. I den tredje verifikationsmetoden skickades de konstruerade plasmiderna in till Eurofins för Sangersekvensering för att kontrollera om några mutationer hade uppstått. För sekvensering med hög säkerhet bör inte mer än 800 baspar sekvenseras i rad, därför delades fragmentet som önskades sekvenseras upp i stycken. Beskrivning av sekvenseringsstart och slut för vardera plasmid kan ses i Bilaga A 8.2.6. Tillbaka från sekvenseringen erhölls en analys som kunde jämföras i datahanteringsprogrammet Benchling med de designade plasmiderna som templat.

3.3 *S. cerevisiae*

3.3.1 Transformation av *S. cerevisiae*

Innan transformationen odlades cellerna upp i YPD-medium. *S. cerevisiae* transformerades med LiAc (Litiumacetat)-metoden. Den använder LiAC, PEG (polyetylenglykol), SS(enkelsträngat)-carrier DNA och en värmechock. PEG gör lösningen hydrofob, vilket luckrar upp lipidlagret i cellmembranet. LiAC neutraliserar DNA:ts negativa laddning, för att det inte ska stötas bort av cellmembranet. SS-carrier DNA binder in i cellmembranet istället för plasmiden, vilket ökar sannolikheten att plasmiden kommer in i cellen, se protokoll och Tabell 14 för komponenter i Bilaga A 8.3.1. När plasmiden har förts in spreds cellerna ut på en platta med selektionsmedium, SD(-HIS)(-URA). I Tabell 1 står de transformer som gjordes och som sedan användes för verifikation och fluorescensmätning.

3.3.2 Verifikation i *S. cerevisiae*

För att verifiera att transformationen in i *S.cerevisiae* lyckats genomfördes en koloni-PCR. För att säkerställa att enbart en koloni undersöktes gjordes två utstrykningar på selektionsplattor. Fyra kolonier plockades från plattan efter transformationen och odlades på en ny selektionsplatta. Detta upprepades, fast med kolonier från den första utstrykningen. Efteråt plockades två kolonier från den andra utstrykningen och förberedes för koloni-PCR, se Bilaga A 8.3.2. I förberedelserna inför koloni-PCR tvättades lösningen med LiAc och etanol för att få ut plasmiderna. Tills sist användes supernatanten som templat i koloni-PCR. Därefter följer koloni-PCR protokollet för Phusion i Tabell 9 i Bilaga A 8.1.3. PCR cykeln följde Tabell 15 i Bilaga A 8.3.2.

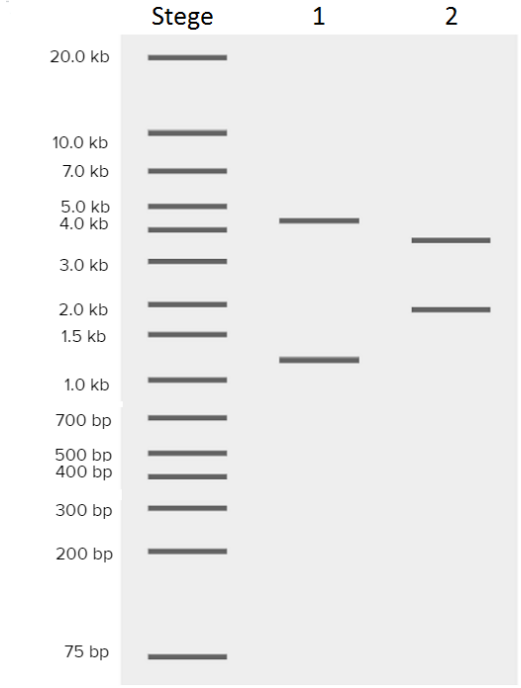
3.4 Flödescytometri

Ett SD(-HIS)(-URA)-medium förberedes, se protokoll och komponenterna i Tabell 16-17 i Bilaga A 8.4.1. Kolonier plockades och förberedes för flödescytometern enligt Bilaga A 8.4.2. Därefter laddades proverna på en platta med brunnar och dess fluorescens mättes genom att använda en Guava® easyCyte flödescytometer. Två mätningar vid olika tidpunkter gjordes för att cellens metabolism, och därmed dess fluorescens, kan skilja sig åt i de olika växtfaserna. Den första mätningen gjordes när cellerna var i glukosfasen och den andra i etanolfasen.

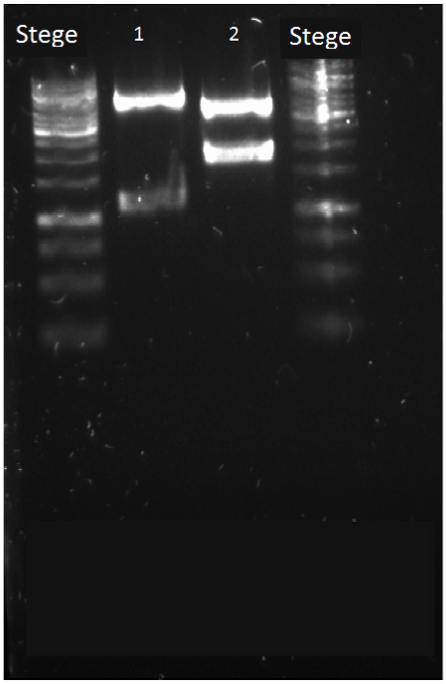
4 Resultat och diskussion

Utifrån syftet att designa en biosensor genom att introducera *Y. lipolyticas* n-alkaninducerade system, kopplat till ett GFP-uttryck i *S. cerevisiae* presenteras först en kort återkoppling till metoden, sedan resultaten och avslutningsvis diskussioner kring resultaten.

Det första som gjordes i labbet var en restriktionsanalys för ryggradsplasmiderna p413TEF och p416TEF. Detta gjordes för att säkerställa att de var korrekta innan de användes som grund i skapandet av projektets plasmider. Ryggradsplasmiderna klipptes med restriktionsenzymet PstI och de förväntade storlekarna på fragmenten var 4400 bp och 1100 bp respektive 3600 bp och 1900 bp, vilket visas i Figur 9 (a). I Figur 9 (b) visas att det erhållna resultatet, från en gelelektrofores, matchar in med det förväntade. För att verifiera att inga mutationer hade uppstått skickades ryggradsplasmiderna in för sekvensering. Sekvenseringen visade att inga mutationer fanns vilket innebar att ryggradsplasmidera var korrekta och kunde användas.



(a) Förväntat resultat.



(b) Erhållit resultat.

Figur 9: Gelelektroforesresultatet för verifikation av ryggradsplasmiderna. Stegen som användes var GeneRuler™ 1kb. I brunn 1 är ryggradsplasmiden p413TEF och i brunn 2 är p416TEF. I (a) visas det förväntade resultatet och i (b) syns resultatet från restriktionsanalysen.

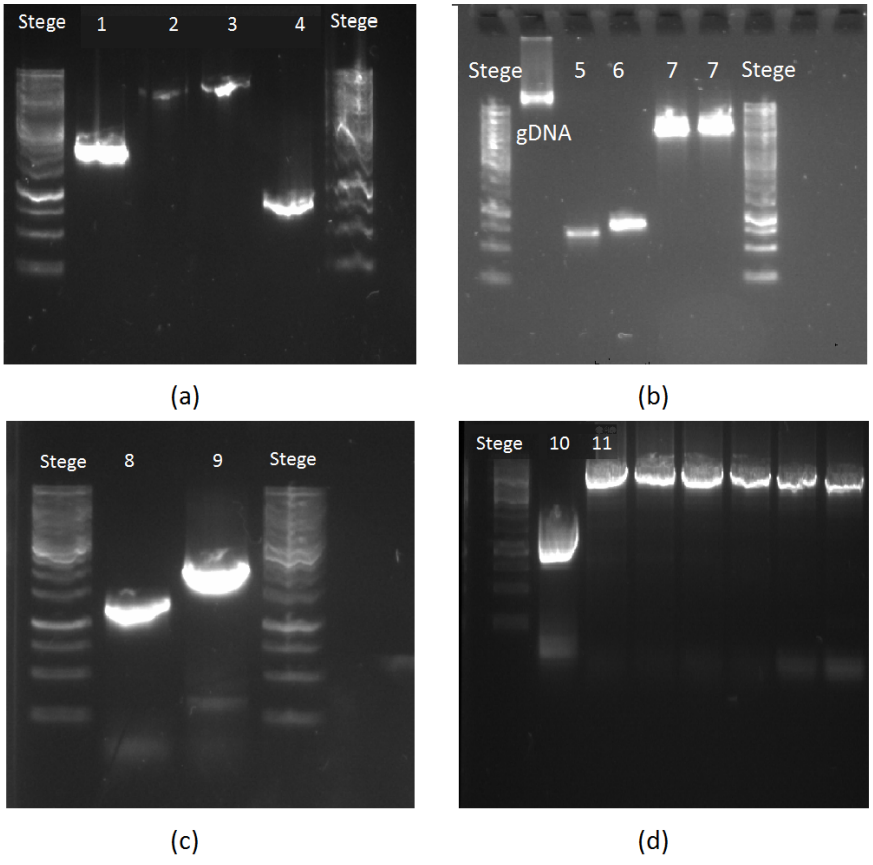
4.1 PCR

Elva stycken PCR:er kördes för att amplifiera fragmenten som sedan skulle sammanfogas med Gibsonkloning för att konstruera respektive plasmid. Två stycken PCR:er för 4a gjordes där olika primrar användes. Detta på grund av att dess respektive klistriga ändar skulle vara anpassade för överlappa till p416TEF respektive p2055. De förväntade storlekarna på fragmenten efter varje PCR presenteras i Tabell 4. För de längre fragmenten användes polymeraset PrimeSTAR samt en temperaturgradient (> 5000 bp), och för de kortare användes polymeraset Phusion.

Tabell 4: Förväntade fragmentstorlekarna för varje PCR.

PCR	**Konstruktion**	**Fragmentstorlek [bp]**
1	4a (*YAS3*)	1923
2	p416TEF	5528
3	p413TEF	5591
4	GFP	738
5	P_{ALK1}	600
6	P_{PGK1}	750
7	pSense0 (utan P_{TEF1})	5855
8	4b (*YAS1*)	1356
9	4c (*YAS2*)	2447
10	4a (*YAS3*)	1923
11	p2055	6071

Resultatet som erhölls från varje PCR presenteras i Figur 10. I (a) visas en sammanställd figur över PCR-produkterna för konstruktion 4a, p416TEF, p413TEF samt GFP. Både p416TEF och p413TEF är något otydliga, vilket förmodligen beror på felladdning i gelen. Tydligare band för dessa finns i Figur 26 i Bilaga B 9.1. I (b) visas gDNA samt PCR-produkten för P_{ALK1}, P_{PGK1} och pSense0 utan P_{TEF1}. För pSense0 utan P_{TEF1} visas resultatet i två brunnar, då den testades att köra över en temperaturgradient så visas produkten vid två olika temperaturen i (b). Se Figur 26 i Bilaga B 9.1 för resultatet från hela temperaturgradienten för pSense0. gDNA är det genomiska DNA:t som användes för att amplifera upp P_{ALK1}, och därmed inte en produkt från PCR:en. I Figur (c) och (d) visas PCR-produkten för 4b och 4c samt 4a och produkten från temperaturgradienten för p2055 som kördes. Resultatet från varje PCR stämmer överens med de förväntade fragmentstorlekarna i Tabell 4.



Figur 10: Gelelektroforesresultatet efter alla PCR-amplifieringar av fragmenten som användes. Stegen som användes var GeneRuler^{TM} 1 kb. Numret över varje brunn svarar mot PCR-numret i Tabell 4.

Anledningen till att polymeraset Phusion valdes istället för PrimeSTAR till vissa PCR:er var för att den var billigare. ThermoScientic ™ DreamTaq™ som också är ett tillgängligt polymeras och som är mycket billigare än Phusion användes dock inte, på grund av dess mycket högre felsekvens och därmed större risk för mutationer. Enligt Thermofisher™ [16] så har Phusion en 52 gånger större korrekturläsningsförmåga än DreamTaq™. För att säkerställa att inte några felsekvenseringar skulle ske så valdes de mer precisa polymerasen.

4.2 Plasmidkloning och verifikation

De lyckade amplifieringarna av fragmenten sammanfogades med Gibsonkloning för att konstruera de önskade plasmiderna. Plasmiderna amplifierades därefter genom att transformeras in i *E. coli* och renades fram med ett Miniprep Kit. Verifiering av att rätt plasmid hade amplifierats skedde med tre metoder, selektionsmedium, restriktionsanalys samt sekvensering som alla redovisas under det här stycket.

4.2.1 Transformation av *E. coli.*

Gibsonprodukten för vardera plasmidkonstruktion transformerades in i *E. coli*, som fick växa på ett ampicillinrikt selektionsmedium för att verifiera att plasmiden hade transformerats. En negativ kontroll gjordes genom att transformera den linjäriserade ryggradsplasmiden till vardera plasmidkonstruktion, se Tabell 12 i Bilaga A 8.2.4 för respektive plasmids kontroll. En liknande tillväxt förväntades för alla transformationer och för de negativa kontrollerna förväntades ingen tillväxt alls.

Alla transformationer av respektive plasmidkonstruktion fick en förväntad tillväxt, dock så visades en tillväxt även för de negativa kontrollerna. Det tros bero på självligering av de linjäriserade ryggradsplamiderna, då ampicillinresistensen sitter i ryggradsplamiderna. Därför valdes ett flertal kolonier som plasmiderna skulle renas fram ifrån, då det fanns en risk att transformationerna endast innehöll ryggradsplasmiden istället för den önskade plasmidkonstruktionen.

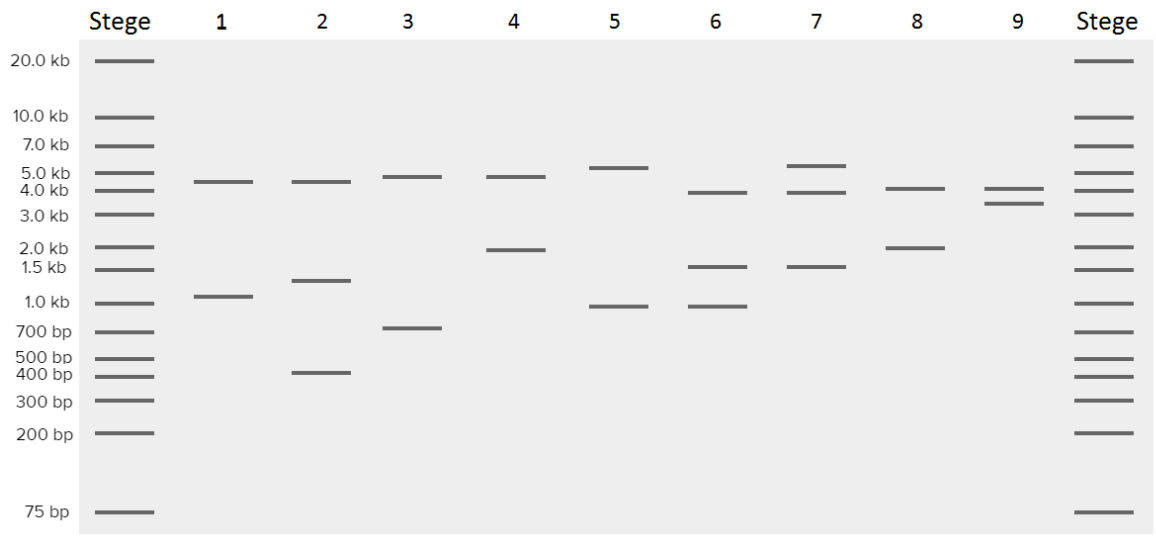
4.2.2 Restriktionsanalys

Efter att en tillväxt av *E. coli* på agarplattorna konfirmerats, plockades ett flertal kolonier från respektive platta. Plasmiderna renades fram och koncentrationen mättes, se Tabell 18 i Bilaga B 9.2.1. En restriktionsanalys gjordes enligt Tabell 12 i Bilaga A 8.2.4 för att konfirmera att rätt plasmid hade transformerats. En kontrollklyvning gjordes som referens för att bekräfta att det var rätt plasmid som hade erhållits. Kontrollen bestod av ryggradsplasmiden som tidigare hade använts för att konstruera plasmiden som transformerades. Samtliga resultat presenteras i Figur 11.

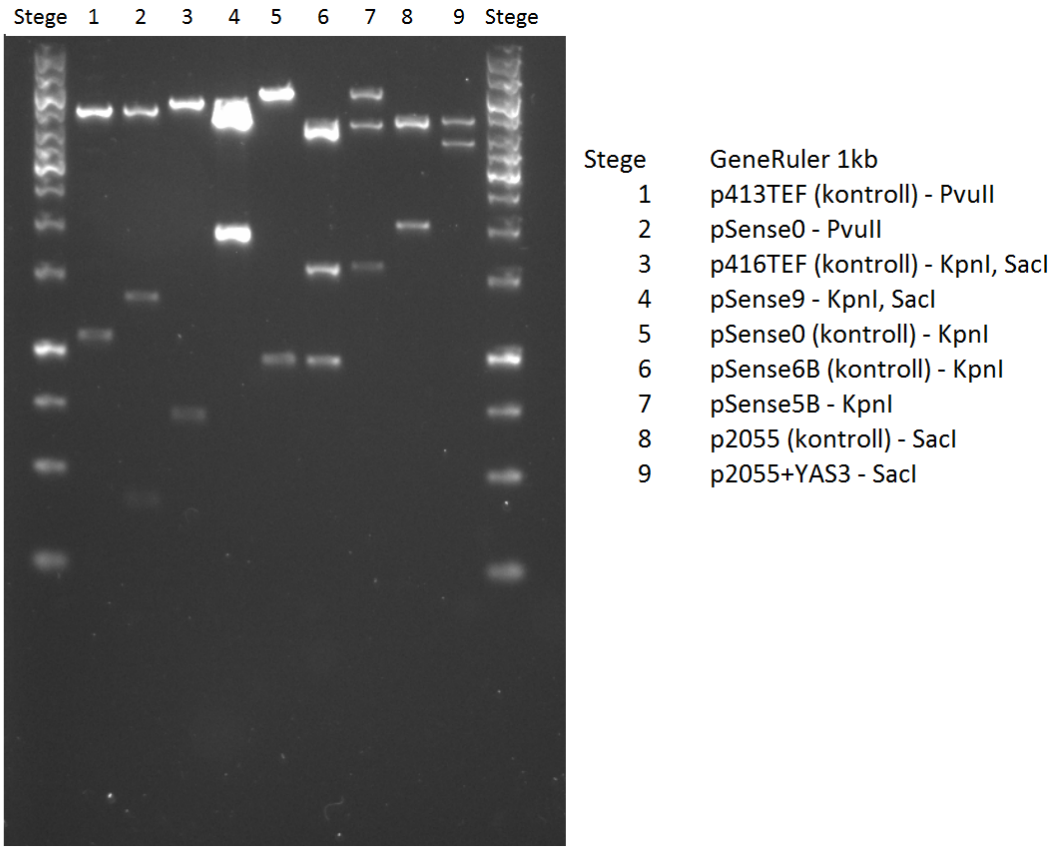
I Figur 11(a) visas de förväntade storlekarna för vardera band efter att plasmiderna kluvits. Gelelektroforesresultatet som visas i Figur 11(b) är plasmiderna som skickades vidare för sekvensering, ihop med en kontroll, samt innehållet av varje brunn. De band som passade in enligt det förväntade resultatet bekräftades som lyckade transformationer. En lyckad transformation och amplifiering erhölls för varje plasmid. pSense6B är i det här fallet både en kontroll av pSense5B samt den slutgiltiga plasmiden. Resultatet från alla de plockade kolonierna visas i Figur 27 i Bilaga B 9.2.2. Storleken för respektive erhållet band från plasmiderna presenteras i Tabell 5. Av dessa valdes två, om möjligt, som hade tydliga band samt en hög koncentration att skickas in på sekvensering, se Tabell 18 i Bilaga 9.2.1 för koncentrationen samt vilka som skickades in på sekvensering. Anledningen till att plasmider med en högre koncentration valdes var för att sannolikheten att *S. cerevisiae* transformationerna skulle lyckas är större med högre plasmidkoncentrationer.

Tabell 5: Den erhållna storleken på respektive band från plasmiderna som amplfierades.

Plasmid	**Förväntad storlek [bp]**		
pSense0	∼4500	∼400	∼400
pSense9	∼3300	∼2000	∼1300
pSense6B	∼4000	∼1600	∼1000
pSense5B	∼4500	∼1300	∼400
p2055+*YAS3*	∼4100	∼3400	



(a) Förväntat resultat.



(b) Erhållit resultat.

Figur 11: En restriktionsanalys över alla designade plasmiderna. I (a) visas det förväntade resultaten tillsammans med kontrollerna. I (b) visas vilka plasmider som lyckades transformeras in, tillsammans med respektive kontroll, samt vad varje brunn innehöll och vad de klyvdes med. Kontrollerna ligger till vänster om den sökta plasmiden pSense0, pSense9, pSense6B, pSense5B och p2055+*YAS3*. Där pSense6B är både en kontroll till pSense5B samt en slutgiltig plasmid.

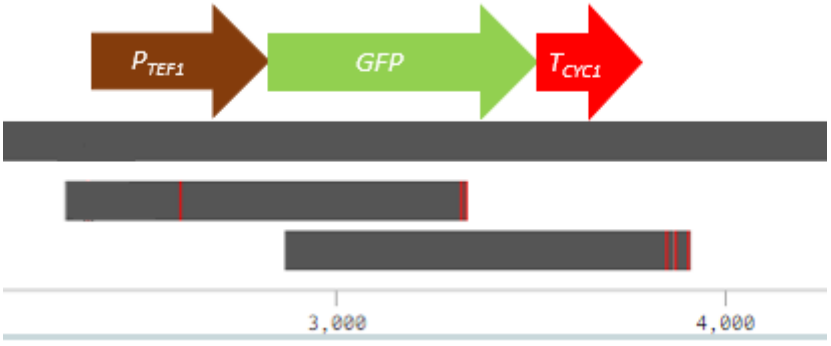
I Figur 27 Bilaga B 9.2.2 syns att flertal band från kolonierna, med den transformerade plasmiden, som är identiska med kontrollen. Den linjäriserade ryggradsplasmiden kan självligeras och därmed återgå till sin ursprungsstruktur, vilket skulle kunna förklarar varför en del är transformationer innehåller samma plasmid som kontrollen.

Två olika restriktionsenzym var tvungna att användas för p413TEF-serien, då skillnaden mellan pSense0 (kontroll) och pSense6B inte kunde klargöras med PvuII. För att visualisera alla lyckade transformationer på samma bild gjordes en ny gel, se Figur 11. Efter gelelektroforesen med alla plasmiderna på samma gel visades några oväntade band för klyvningen av p416TEF och pSense9, se Figur 28 i Bilaga B 9.2.3. Banden beror troligtvis på att klyvningen inte har skett fullständigt och lämnat några klyvningsställen. Det som tyder på en ofullständig klyvning och inte att en felaktig plasmid är närvarande är att bandet som dykt upp mellan de förväntade banden är mycket svagare. Då en gelelektrofores körs där koncentration av de laddade fragmenten är samma, så minskar ljusstyrkan på banden ju längre ner fragmenten har vandrat. Detta på grund av att hos ett kortare fragment så binder en mindre mängd av loading-dye in. Det här gjorde att restriktionenzymen fick bytas ut från SspI till KpnI och SacI. I samma figur så är banden för p2055+*YAS3* lika stora. Det förklaras med att fel plasmid användes vid klyvningen.

4.2.3 Sekvensering

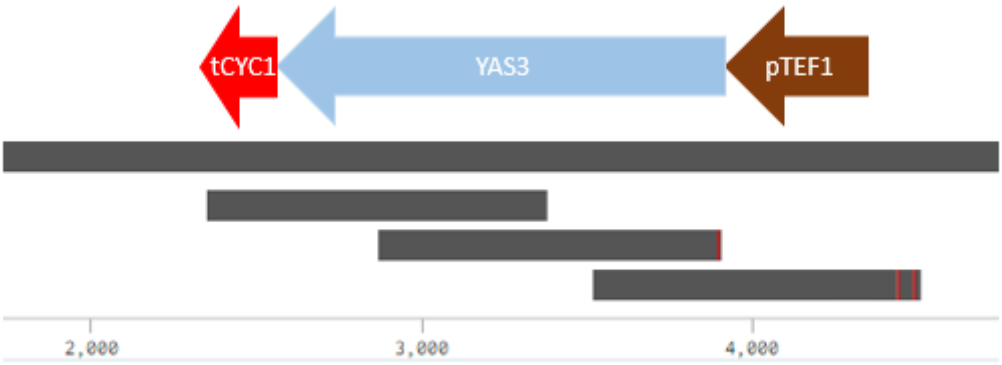
De plasmider som visades vara korrekta i restriktionsanalysen skickades in på Sangersekvensering innan de transformerades in i *S. cerevisiae*. Detta gjordes för att återigen verifiera att genen inkorporerats på rätt ställe, samt så att inga mutationer uppstått i generna under PCR:en. De plasmider vars sekvensering var korrekta användes sedan för transformation i *S.cerevisiae*. Resultaten presenteras nedan i figurer innehållande den delen av plasmiden som sekvenserats. De delarna av plasmiden som sekvenserats ses överst i figuren, under dem finns ett grått streck som respresenterar templatet som sekvenseringen jämförts med. De kortare sekvenserna under templatet är resultatet från sekvenseringen, där röda markeringar visar var sekvenseringen avviker från templatet, vilket skulle kunna vara eventuella mutationer. Varje sekvens täcker ungefär 800 bp, för sekvensernas positioner se Bilaga A 8.2.6. På slutet av de sekvenserade delarna minskar sekvenseringskvalitén, vilket medför att frekvensen av avvikelser är högre där, även om det inte skett några mutationer. Om avvikelser avläses på båda sekvenserna i en överlappande region så är det med största sannolikhet en mutation. Om det bara finns en avvikelse på en av sekvenserna i en överlappande region är det med största sannolikhet sekvenseringsfel. Samtliga sekvenser är sekvenserade från vänster till höger.

Resultatet av sekvenseringen för pSense0 presenteras i Figur 12 och bekräftar att inkorporeringen av *GFP* var korrekt. Det finns några få avvikelser i slutet av sekvenseringen samt en i mitten av promotorn P_{TEF1}. Avvikelserna i slutet av sekvenseringen kan bero på försämrad sekvenseringskvalité. Avvikelsen som finns i mitten av promotorn P_{TEF1} kan bero på att många T ligger på rad i den regionen vilket försämrar kvalitén på sekvenseringen. Då inga andra avvikelser observerades valdes plasmiden att användas för transformation till *S. cerevisiae*.



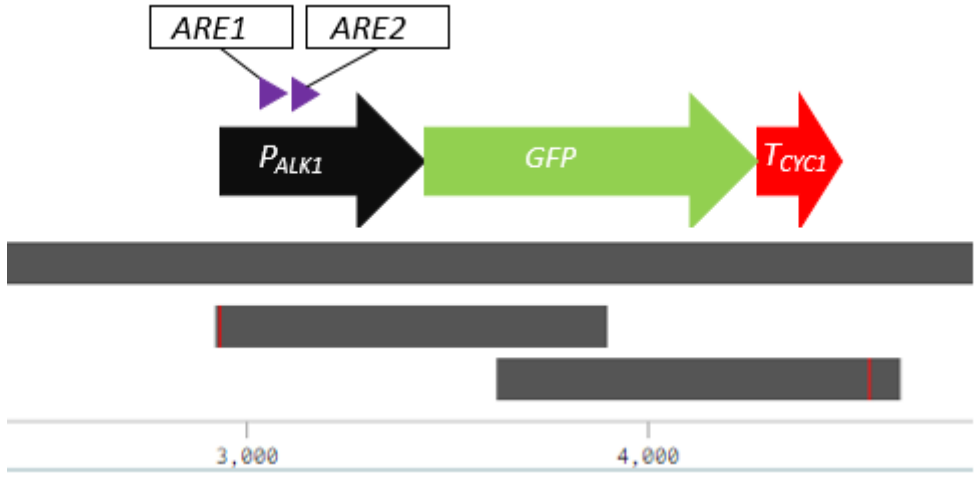
Figur 12: Sekvensering av pSense0. Sekvenseringen täcker promotorn P_{TEF1}, GFP samt terminatorn T_{CYC1}

Resultatet från sekvenseringen av pSense9 visas i Figur 13 och bekräftar att *YAS3* inkorporerats korrekt. De få avvikelser som syns befinner sig i slutet av sekvenseringarna, samt efter promotorn P_{TEF1}. De eventuella mutationerna som ligger efter promotorn har inte lika stor betydelse som om de hade befunnit sig i promotorn, därför valdes plasmiden att användas för transformation till *S. cerevisiae*.



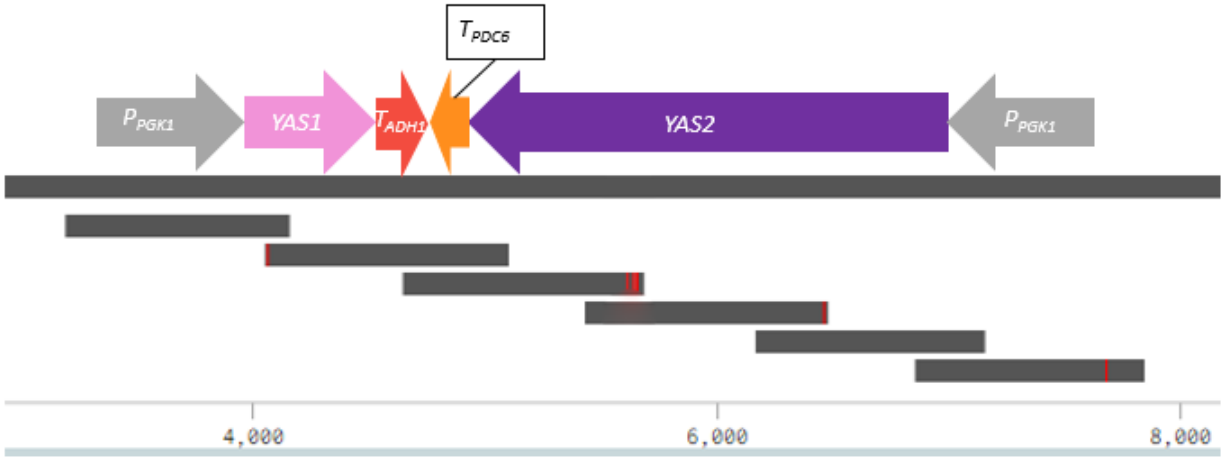
Figur 13: Sekvensering av pSense9. Sekvenseringen täcker promotorn P_{TEF1}, *YAS3* samt terminatorn T_{CYC1}

Resultatet av sekvenseringen av pSense6B presenteras i Figur 14 vilket bekräftar att P_{ALK1} samt *ARE1* och *ARE2* regionerna inkorporerats korrekt i plasmiden. Endast två avvikelser visas i figuren och dessa befinner sig i slutet av en sekvens, samt innan promotorn och efter T_{CYC1}. Då ingen avvikelser observerades i viktiga delar av plasmiden, så valdes plasmiden att använda för transformation till *S. cerevisiae*.



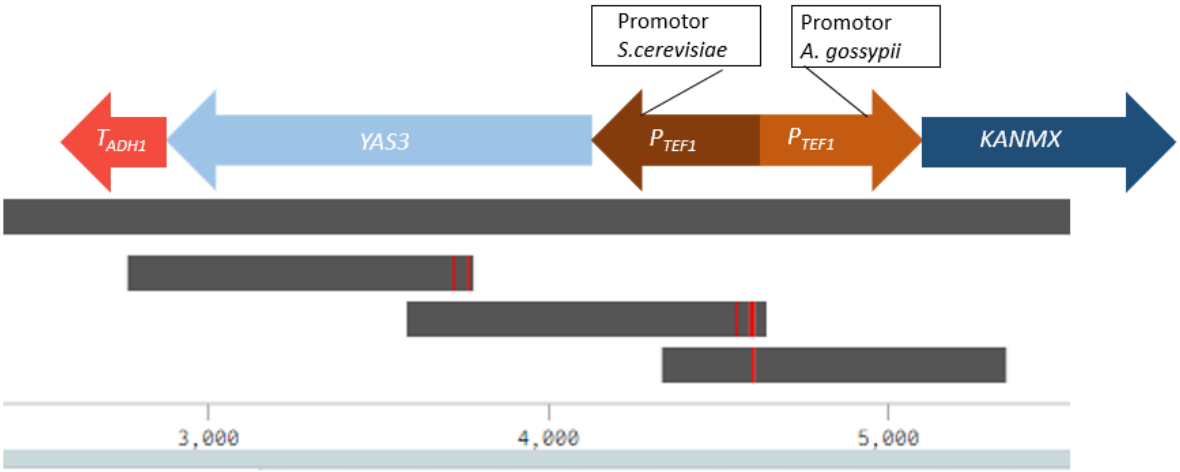
Figur 14: Sekvensering av pSense6B. Sekvenseringen täcker promotorn P_{ALK1}, *ARE1*, *ARE2*, GFP samt terminatorn T_{CYC1}

I Figur 15 redovisas resultatet av sekvenseringen för pSense5B. Den bekräftar att *YAS1* och *YAS2* har inkorporerats korrekt. Alla avvikelsers som syns, förutom en som befinner sig i början av *YAS1*, befinner sig i i slutet av sekvensen. Då avvikelsen i *YAS1* bara visas på en av de två sekvenserna i den överlappande regionen beror det antagligen på sekvenseringsfel. Avvikelsen som syns vid ∼bp 7700 befinner sig i början av *YAS2* promotor P_{PGK1}, vilket skulle kunna vara ett problem. Sekvenseringen visade dock på låg kvalité vid den regionen vilket kan förklara varför den visar en mutation även om den kanske inte existerar och därför valdes plasmiden för transformation till *S. cerevisiae*.



Figur 15: Sekvensering av pSense5B. Sekvenseringen täcker promotorn P_{PGK1} åt båda hållen, *YAS1*, terminatorn T_{ADH1}, *YAS2* och terminatorn T_{PDC6}

Resultatet för sekvenseringen av p2055+*YAS3* presenteras i Figur 16 och verifierar att *YAS3* inkorporerats korrekt. Några få avvikelser finns i slutet av de olika sekvenserna samt en mutation som befinner sig emellan de två P_{TEF1}-promotorerna. Då ingen annan mutation befann sig i någon viktig gen användes plasmiden för transformation till *S. cerevisiae*.



Figur 16: Sekvensering av p2055+*YAS3*. Sekvenseringen täcker promotorn P_{TEF1}, för både *S. cerevisiae* och *A. gossypii*, *YAS3*, terminatorn T_{ADH1}, samt större delen av *KanMX*

4.3 Transformation och verifikation i *S. cerevisiae*

Plasmiderna med minst avvikelser i sekvenseringen valdes att transformeras in i *S. cerevisiae*. Sedan gjordes mätningar av fluorescensen hos de nyskapade *S. cerevisiae*-stammarna: negativ kontroll, Sense0, Sense6B, Sense5B och Sense(5B+9). För att verifiera att plasmiden hade tagits upp användes två metoder, selektionsmedium och koloni-PCR.

4.3.1 Transformation av *S. cerevisiae*

Den första bekräftelsen att transformationen av *S. cerevisiae* lyckades gjordes genom att se ifall en tillväxt hade erhållits på ett uracil- och histidinfattigt medium. En tillväxt är förväntad om transformationen lyckats, då plasmiderna ger cellen förmåga att överleva utan tillsatt histidin och uracil. Resultatet visade att alla plasmidtransformationer lyckades. Alla stammar gav ungefär en liknande tillväxt i antal kolonier (∼100) förutom Sense(5B+9), där ett färre antal kolonier syntes (∼20). Det här indikerar att båda

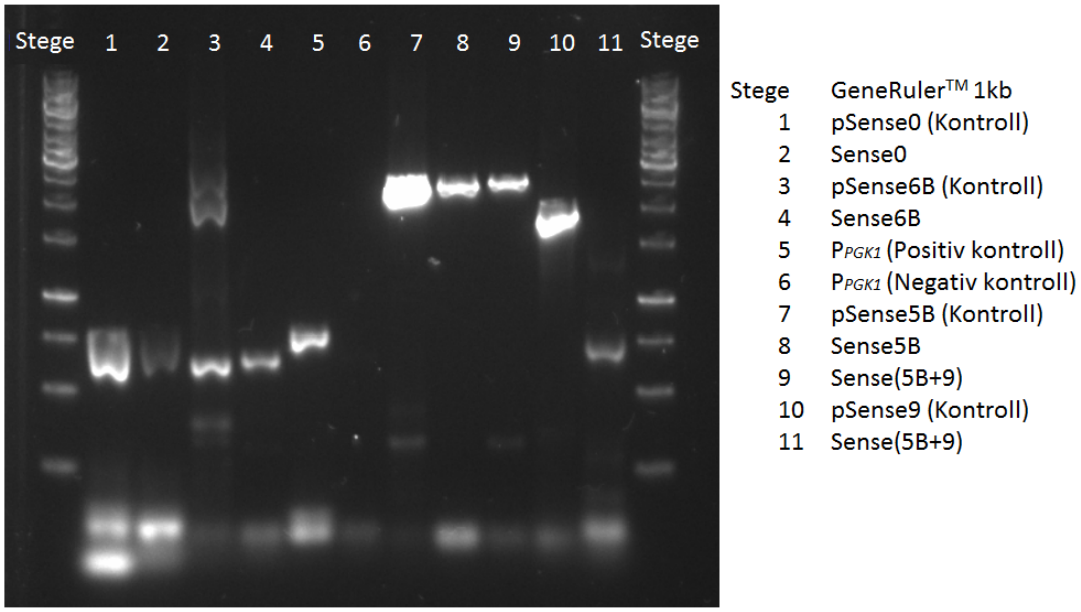
plasmiderna tagits upp under transformationen, då transformationen med endast pSense5B gav en mycket tydligare tillväxt. Något hade rubbat tillväxten i den gemensamma transformationen, troligtvis pSense9. Något annat som tyder på att båda plasmiderna tagits upp var att cellerna överlevde på selektions-mediet. Utan båda plasmiderna hade inte cellerna inte överlevt. För att vara säker på om alla plasmider tagits upp korrekt gjordes en koloni-PCR.

4.3.2 Koloni-PCR

För att verifiera att rätt plasmid tagits upp gjordes en koloni-PCR. Plasmiderna från *S. cerevisiae*-transformationen renades fram och specifika primrar valdes för att kunna amplifiera upp en del och säkerställa att rätt plasmid var närvarande.

Resultatet från koloni-PCR:en presenteras i Figur 17. Kontrollen fungerade som en positiv kontroll, vilket innebar att om koloni-PCR:en visade samma som kontrollen så var rätt plasmid närvarande i *S. cerevisiae*-stammen. Ett test av en transformation med P_{PGK1} utfördes också med en positiv och negativ kontroll. Till den positiva kontrollen användes primrar som borde binda in till plasmiden. Till den negativa kontrollen användes primrar som inte borde binda in till plamsiden. I resultatet för den positiva kontrollen förväntades ett band synas medan inga band förväntades synas för den negativa kontrollen. Anledningen till att testet utfördes var för att fastställa att potentiella fel som kunde uppstå berodde på koloni-PCR:en och inte andra faktorer såsom rening, ineffektivt polymeras eller för låga/höga koncentrationer.

Alla kontroller visade ett band vid den förväntade längden, vilket innebar att koloni-PCR:en lyckades för dessa. Alla plasmider från de olika stammarna visade också band vid förväntad längd, förutom pSense9 i Sense(5B+9), där endast ett något svagare oväntat band syntes vid 750 bp. På grund av det fanns det en möjlighet att transformationen av pSense9 inte lyckades. Samtidigt borde ingen tillväxt ha skett i detta fall, då den stammen skulle sakna förmågan att överleva utan tillsatt uracil. Andledningen till att resultatet inte blev som förväntat kan bero på att ena primern, F, som användes och skulle binda in till pSense9 även kunde binda in till pSense5B, som var närvarande då de transformerades ihop. Detta skulle kunna ha stört PCR:en och därmed även förklara bandet som syns vid 750 bp. För att kunna verifiera att pSense9 var närvarande hade två nya primrar behövs beställas som endast binder in till pSense9. Bandet som syns för Sense0 är något svagare än dess kontroll vilket troligtvis beror på en något lägre koncentrationen. Kontrollen för Sense6B (pSense6B) visar ett tydligt band vid 600 bp vilket förväntas. Den visar även några oväntade band vid 2000-3000 bp vilket kan beror på att annat överblivet cellmaterial från plasmidreningen finns med.



Figur 17: Resultatet från koloni-PCR för alla transformationer tillsammans med en kontroll. Stegen som användes var GeneRuler 1 kb och vad varje brunn innehöll presenteras höger om gelelktroforesbilden.

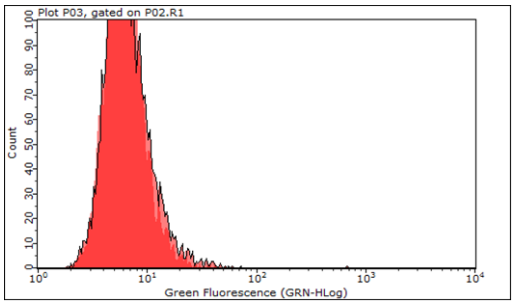
I Figur 29 i Bilaga B 9.2.4 syns det första resultatet, och utifrån det valdes de PCR:er som misslyckades, Sense0 och Sense9, att göras om. Figur 17 visar en sammanställd gelelektroforesbild över de transformationerna som lyckades, då två tester kördes för varje transformation. Transformationen i den alkanproducerande stammen med p2055+*YAS3* valdes att inte fortsättas med efter jästtransformationen, då fel fragment blev transformerad. Detta upptäcktes under restriktionsanlysen, se Figur 28 Bilaga B 9.2.3, då banden på p2055 och p2055+*YAS3* var identiska. Det som transformerades till *S. cerevisiae* var p2055 utan *YAS3*. Vid gelextraktionen började misstankarna uppstå då banden ansågs vara för nära varandra vilket de inte förväntades vara men transformationen genomfördes och en tillväxt erhölls även för dessa. Detta beror antagligen på att p2055 utan *YAS3* också innehöll en *KanMX*-markör, vilket gjorde att den kunde växa på selektionsplattan. Några vidare studier för den alkanproducerande stammens fluorescens, samt en verifikation med koloni-PCR gjordes inte på grund av tidsbrist.

4.4 Flödescytometri

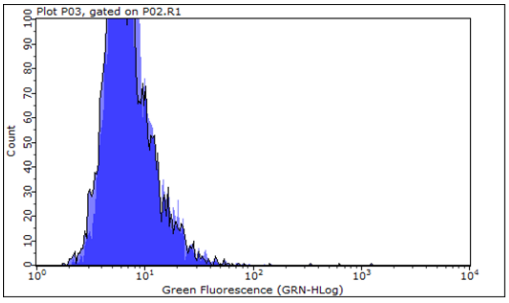
En flödescytometer användes för mäta fluorescensen hos de fem olika *S. cerevisiae*-transformationerna: Negativ kontroll, Positiv kontroll (tidigare benämnt som Sense0), Sense6B (test av P_{ALK1}), Sense5B (kontroll av systemet utan Yas3) och Sense(5B+9) (kontroll av systemet med Yas3). Först förbereddes en övernattskultur för respektive kultur, och två kolonier plockades för att se om det fanns någon signifikant skillnad mellan varje kultur. Därefter gjordes två fluorescensmätningar, en under glukosstadiet och en under etanolstadiet, för att jämföra dess metabolita påverkan för P_{ALK1} och systemet med Yas1, Yas2 och Yas3. Det förväntade uttrycken redovisas i Tabell 1 i Metod och material 3.1.1.

Den första absorbansmätningen av övernattningskulturerna gav ingen tillväxt för kulturen Sense(5B+9). Den visade tidigare sämre tillväxt jämfört med de andra transformationerna, vilket pSense9 skulle kunna vara anledningen till. Detta diskuteras i det tidigare avsnittet i Resultat och diskussion 4.3. Kulturen Sense(5B+9) fick fortsätta sin tillväxt och visade en märkbar tillväxt först efter 4 dagar. I Figur 18 visas resultatet från den första mätningen under glukosstadiet för alla transformationer, förutom Sense(5B+9). X-axeln visar fluorescenensen i logaritmisk skala. Ju längre åt höger på axeln, desto mer fluorescens har cellerna. Y-axeln motsvarar antalet celler som uttrycks vid just den fluorescensen, alltså ju högre amplitud desto fler celler med den fluorescensen är närvarande. Då proverna förbereddes späddes de till samma totala cellantal i varje prov, vilket arean indikerar, då den uppskattningsvis är samma för alla mätningar. Den negativa kontrollen har ett uttryck vid 10^1, vilket inte innebär att den har ett fluorescensuttryck, utan antas vara bakgrundsbrus och sätts som nollpunkt. Resultatet bör betraktas med relativa värden med avseende på den negativa kontrollen snarare än med absoluta värden. Intresset låg i att se om Sense6B och Sense5B ger ett högre uttryck än den negativa kontrollen.

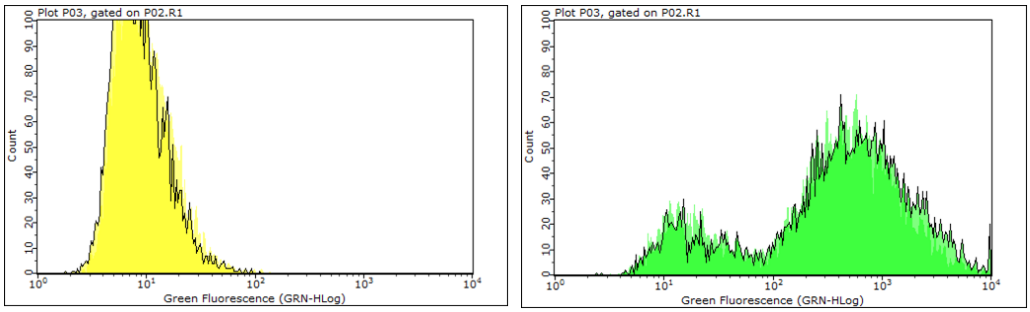
Både den negativa kontrollen (a), Sense6B (b) och Sense5B (c) visar smalare pikar vilket indikerar att många av cellerna i de proverna gav ett liknande fluorescensuttryck. Den positiva kontrollen (d) gav inte en lika hög pik som de andra, utan dess celler har en mycket högre varians. I ett optimalt fall borde den positiva kontrollen gett en liknande pik, dock vid en högre fluorescens. Den tidigare toppen kan dels bero på döda celler, samt att alla cellerna kanske inte ger ett uttryck på grund av mediet eller andra omgivningsfaktorer. Därmed kan det lägre uttryck troligtvis försummas och antas som bakgrundsbrus.



(a) Negativ kontroll

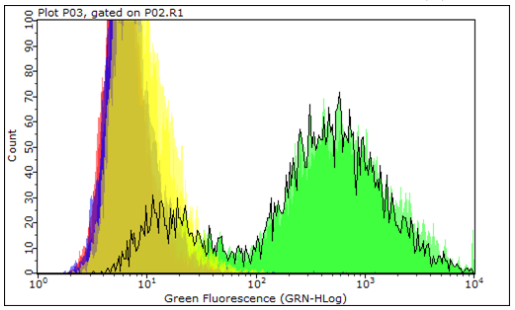


(b) Sense6B



(c) Sense5B

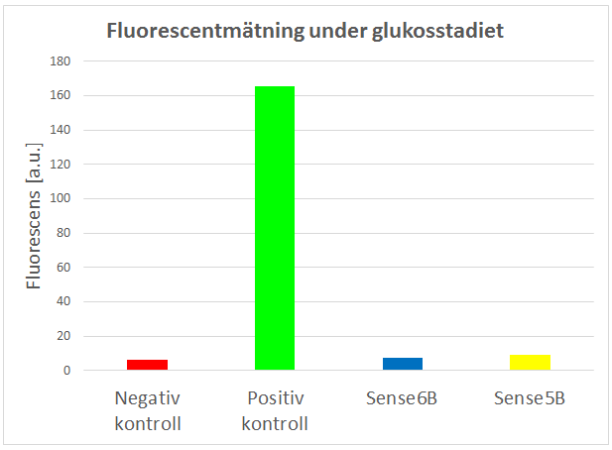
(d) Positiv kontroll.



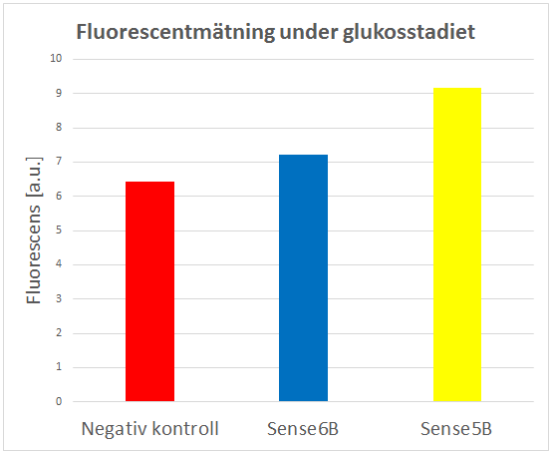
(e) Alla mätningarna överlappande

Figur 18: Första fluorescensmätningarna under glukosstadiet illusterad i 5 olika bilder för respektive plasmid transformation. Kulturen Sense(5B+9) saknas i den här mätningen.

En skillnad i fluorescens är noterbar mellan negativa kontrollen och Sense6B (test av P_{ALK1}) och Sense5B (kontroll av systemet). I (e) syns överlappningen där det går att se att fluorescensen ökar med Sense6B och ytterligare med Sense5B. I Figur 19 visas ett medelvärde över fluorescensuttrycken från resultatet från Figur 18 presenterat i stapeldiagram. I (a) så syns alla mätresultaten, och visar en klar skillnad mellan positiva kontrollen och de resterande. I (b) visas resultat utan den positiva kontrollen, för att tydligare se skillnaden mellan de olika mätningarna. Precis som i Figur 18 (e) syns en mycket klarar bild av att fluorescensen ökar med stammarna Sense6B och Sense5B. Dock i jämförelse med positiva kontrollen så är det med inte någon markant skillnad.



(a)

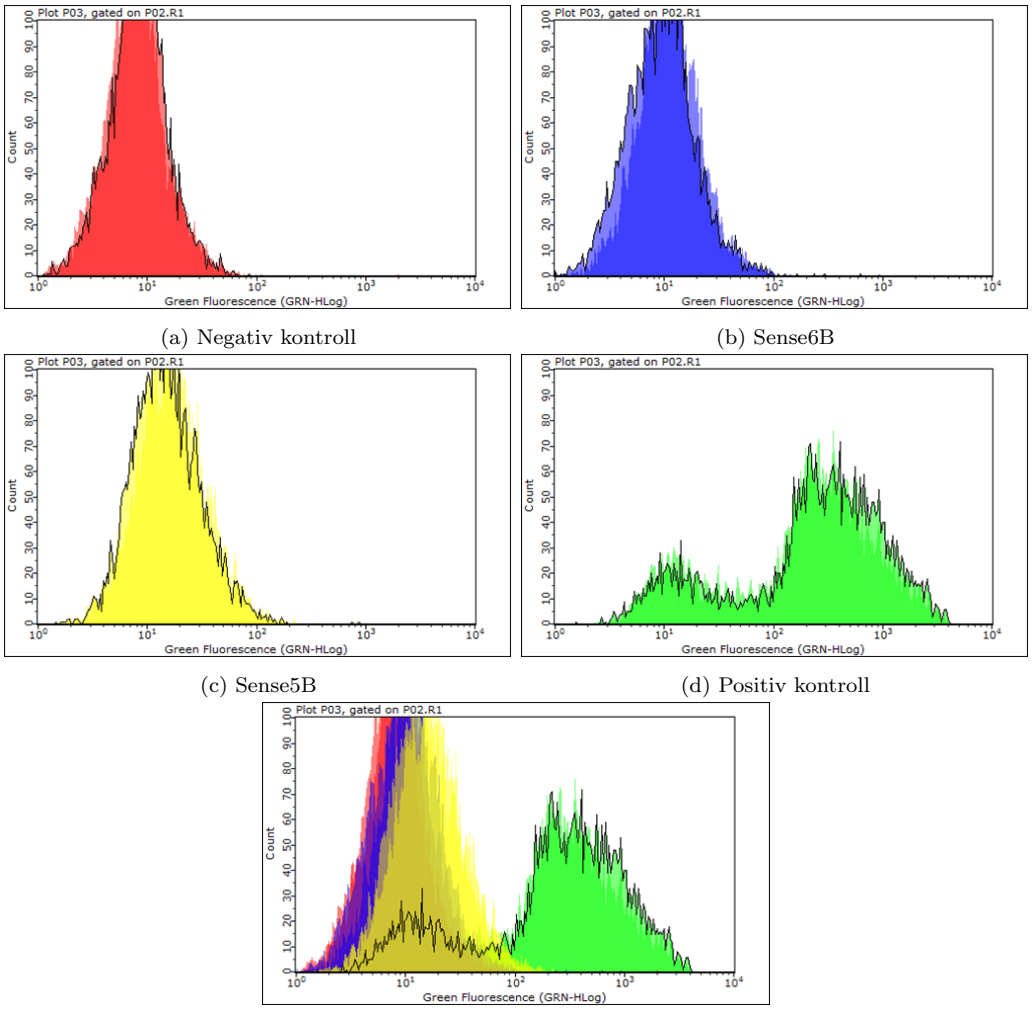


(b)

Figur 19: Två stapeldiagram över den första fluorescensmätningarna under glukosstadiet. I (a) illusteras skillnaden med den positiva kontrollen och i (b) utan den positiva kontrollen för att tydliggöra skillnaden mellan den negativa kontrollen, Sense6B och Sense5B. Inga mätningar för Sense(5B+9) erhölls under första försöket. Fluorescensen är enhetslös (arbitrary unit, a.u.)

I Figur 20 visas flödescytometriresultatet för första försöket under etanolstadiet. Resultatet följer samma mönster som i Figur 18. Det verkar finnas en något större varians hos cellerna i (a), (b) och (c) jämfört med innan, då pikarna inte är lika smala som innan. Den positiva kontrollen (d) visar liknande resul-

tat. I jämförelse med glukosstadiet syns en tydligare skillnad i överlappningen (e). Detta skulle kunna indikera på att syntetiseringen är mer optimal under etanolfasen. Dock så finns det en risk att första mätningarna under glukosstadiet skedde för tidigt, alltså att cellerna befann sig till viss del i lag-fasen. På grund av de misstankarna så fick cellerna växa ytterligare några timmar i det andra försöket innan glukosstadiemätningarna gjordes.



(a) Negativ kontroll

(b) Sense6B

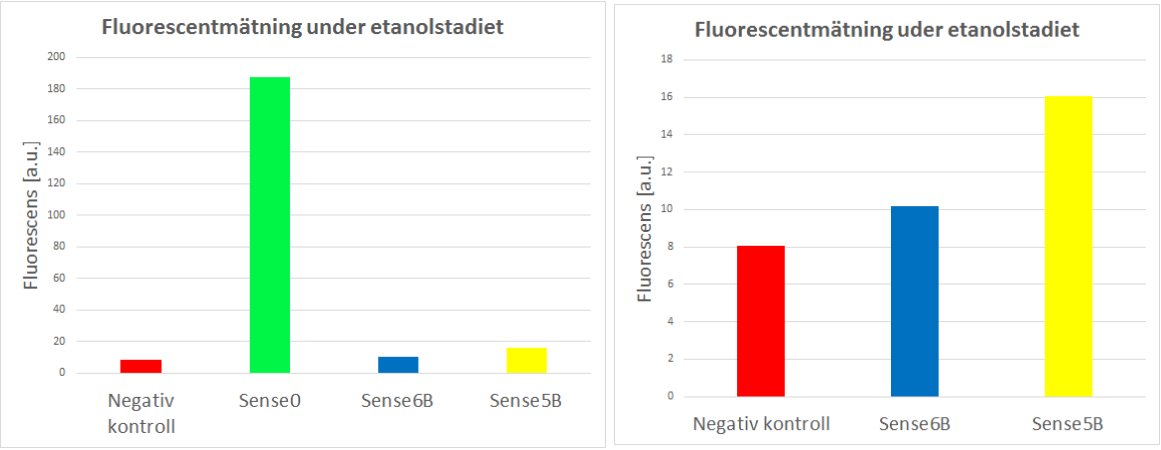
(c) Sense5B

(d) Positiv kontroll

(e) Alla mätningarna överlappande

Figur 20: Första fluorescensmätningarna under etanolstadiet illusterad i 5 olika bilder för respektive plasmid transformation. Kulturen Sense(5B+9) saknas i den här mätningen.

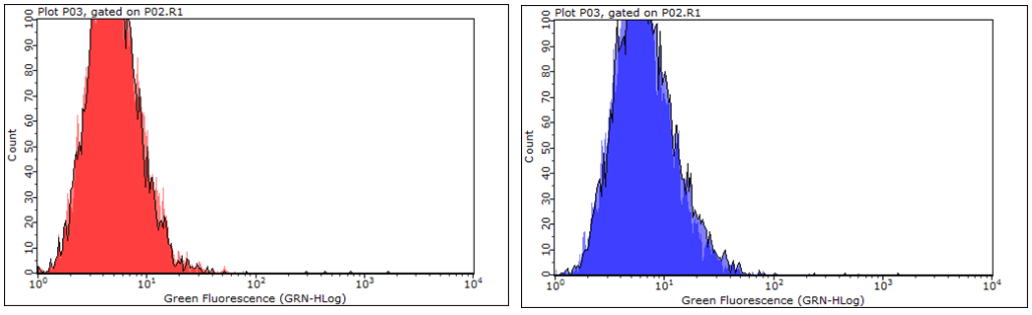
I stapeldiagrammet, Figur 21, syns precis som innan en klarare skillnad. En mer markant skillnad syns mellan negativa kontrollen, Sense6B och Sense5B, där Sense5B har ökat mest i skillnad. Skillnaden mellan negativa kontrollen och Sense6B samt Sense5B var ∼12.5% respektive ∼40% mer fluorescens än i glukosstadiet. I etanolstadiet är skillnaden mellan den negativa kontrollen och Sense6B ∼25% och för Sense5B var fluorescensuttryck dubbel så starkt.



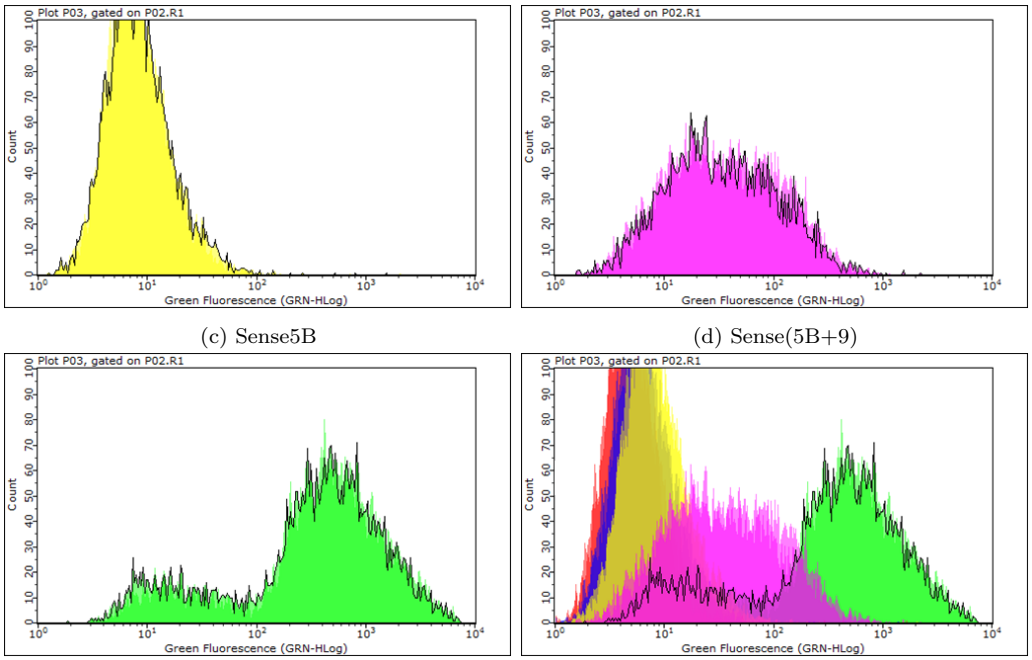
(a) (b)

Figur 21: Två stapeldiagram över den första fluorescensmätningarna under etanolstadiet. I (a) illusteras skillnaden med den positiva kontrollen och i (b) utan den positiva kontrllen för att tydliga göra skillnaden mellan den negativa kontrollen, Sense6B och Sense5B. Inga mätningar för Sense(5B+9) erhölls under första försöket. (arbitrary unit, a.u.)

På det andra försöket lät tillväxten ske under en längre tid, i 5 timmar istället för 3, för att verkligen säkerställa att log-fasen hade uppnåtts. Detta gjorde även att en tillväxt av cellerna från Sense(5B+9) syntes. Resultatet under glukosstadiet visas i Figur 22. Den negativa kontrollen (a), Sense6B (b), Sense5B (c) och positiva kontrollen (d) visar precis som innan ett liknande resultat. En något högre varians i fluorescensspektrat än förra glukosstadiet är noterbart, samt den positiva kontrollen verkar ha ett lägre bakgrundsbrus än tidigare. För kulturen Sense(5B+9) (e) förväntas resultatet vara lik den negativa kontrollen, då Yas3 enligt teorin bör fungera som en repressor. Resultatet förväntades dock inte vara exakt lika lågt som den negativa kontrollen, då en fullständig inbinding av Yas3 inte förväntas och därmed en viss fluorescensuttryck är möjlig. Det som syns i (e) avviker enligt vad som förväntades. Fluorescensen är mycket högre än de andra konstruktionerna, förutom den positiva kontrollen, vilket motsäger det teorin förespråkar. Precis som den positiva kontrollen så har även den här en väldig hög varians i fluorescensuttryck. Vid absorbansmätningarna, Tabell 19-24 i Bilaga B 9.3, så var koncentrationen mycket lägre för cellerna från Sense(5B+9), vilket den har varit i de tidigare fallen också, vilket har indikerat på att pSense9 kan vara närvarande. Vad som är möjligt till det här oväntade resultatet är att Yas3 har fungerat som en aktivator istället för repressor i systemet. I *Y. lipolytica* kanske systemet är mer komplext än det som testas i systemet med Yas1, Yas2 och Yas3. Kanske krävs det fler interagerande proteiner för att Yas3 ska fungera som en repressor. I och med att P_{TEF1} är en relativt starkt promotor, jämfört med de andra promotorerna som används så är koncentrationen av Yas3 troligtvis mycket högre än Yas1 och Yas2. Av den anledningen kan det ha påverkat dess interaktioner i cellen. Flödescytometrimätningarna tog betydligt längre tid för just de cellerna, och spridningen var mycket högre, då även den positiva kontrollen visade en tydligare pik. Vid granskning av den överlappande figuren (f), syns en tydligare skillnad mellan den negativa kontrollen, Sense6B och Sense5B än under det första försöket, vilket troligtvis innebär att cellerna med högre sannolikhet är inom log-fasen vid den här mätningen.



(a) Negativ kontroll (b) Sense6B

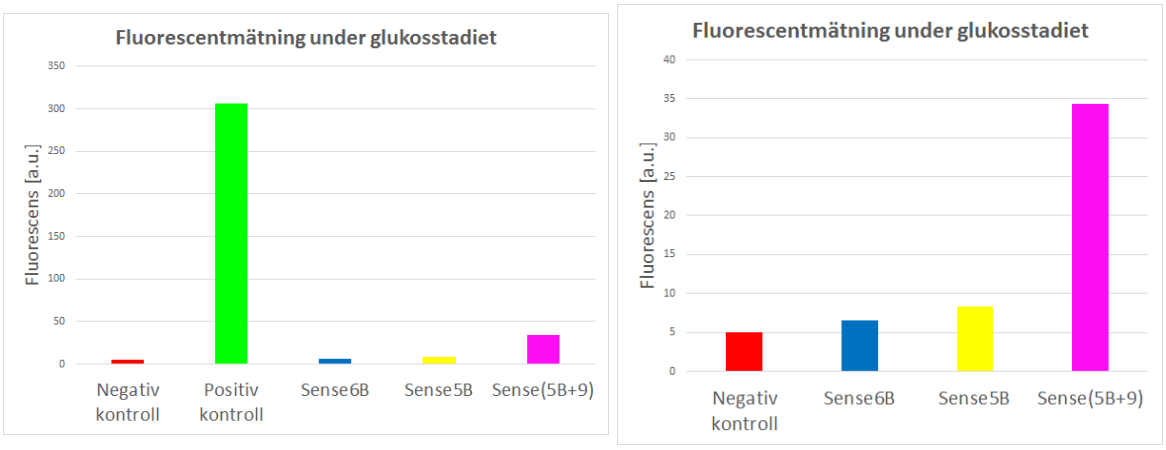


(c) Sense5B (d) Sense(5B+9)

(e) Positiv kontroll (f) Alla mätningarna överlappande

Figur 22: Andra fluorescensmätningarna under glukosstadiet illusterad i 6 olika bilder för respektive plasmid-transformation.

I stapeldiagrammet, Figur 23, syns den stora skillnaden mellan Sense(5B+9) och negativa kontrollen, Sense6B och Sense5B. I jämförelse med den positiva kontrollen är skillnaden fortfarande liten. Fluorescenesen är något lägre i dessa mätningarna jämfört med det första mätningsförsöket under glukosstadiet. Anledningen till det skulle kunna vara mediet, annan koncentration vid mätningen eller andra faktorer. Intressanta är dock förhållandet mellan de olika kulturerna. I första försöket så hade Sense5B ∼40% mer fluorescens än den negativa kontrollen, i det andra så var det ∼60% mer fluorescens. Likadant för Sense6B, då den i första försöket hade ∼13% mer fluorescens än den negativa kontrollen och i andra försöket så var det ∼30% mer, alltså en mycket klarare skillnad. Det här kan beror på att i andra försöket mättes fluorescensen 2 timmar senare under glukosstadiet än den första mätningen. Det kan har gjort att den har kommit längre in i log-fasen.

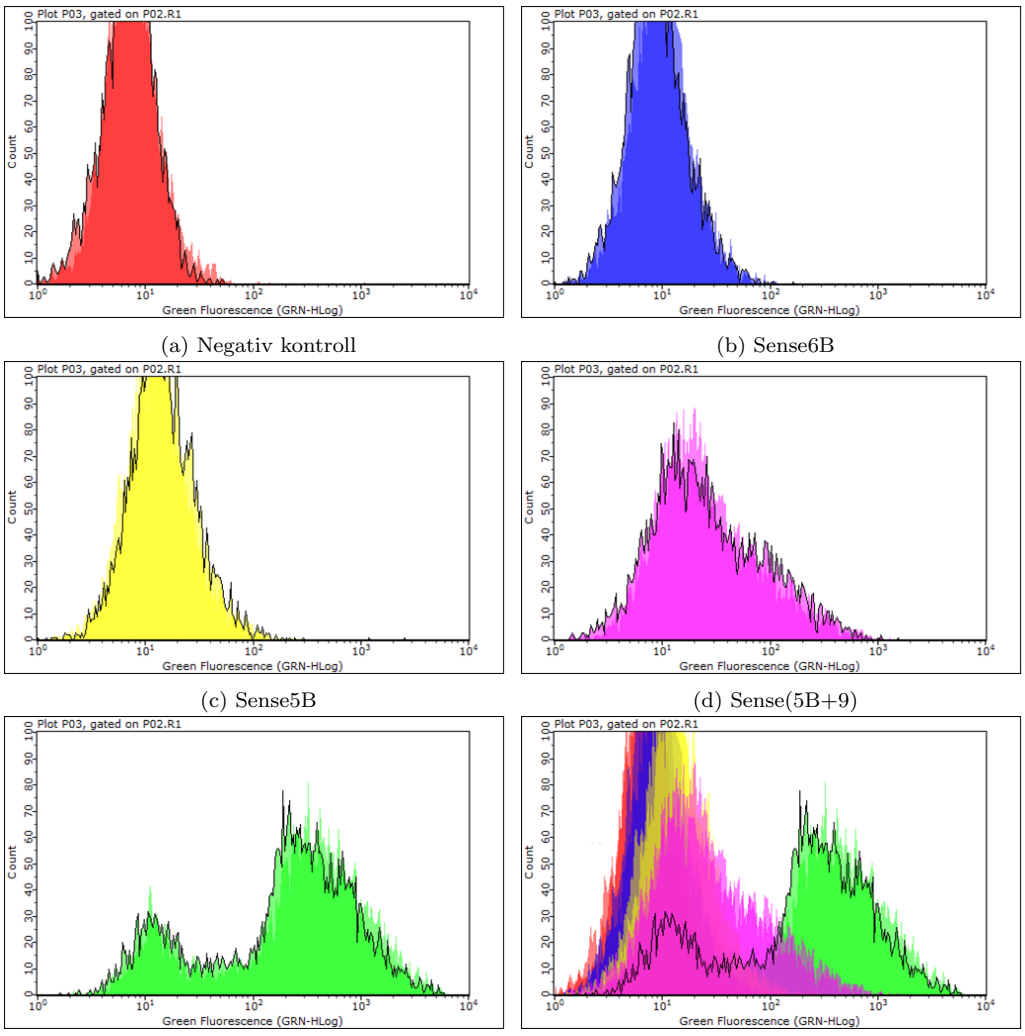


(a) (b)

Figur 23: Två stapeldiagram över den andra fluorescensmätningarna under glukosstadiet. I (a) illusteras skillnaden med den positiva kontrollen och i (b) utan för att tydliga göra skillnaden mellan den negativa kontrollen, Sense6B, Sense5B och Sense(5B+9). (arbitrary unit, a.u.)

Jämfört med de tidigare figurerna för resultaten (a), (b), (c) för flödescytometrin avviker inte Figur 24. Mätningen för Sense(5B+9) (d) verkar var något förskjuten till vänster, alltså något lägre fluorescensut-

tryck. Den positiva kontrollen (e) har en något högre topp vid 10^1 än i de tidigare fallen. Överlappningen i (f) liknar överlappningen hos de andra mätningarna och en skillnad ses mellan de olika stammarna.



(a) Negativ kontroll

(b) Sense6B

(c) Sense5B

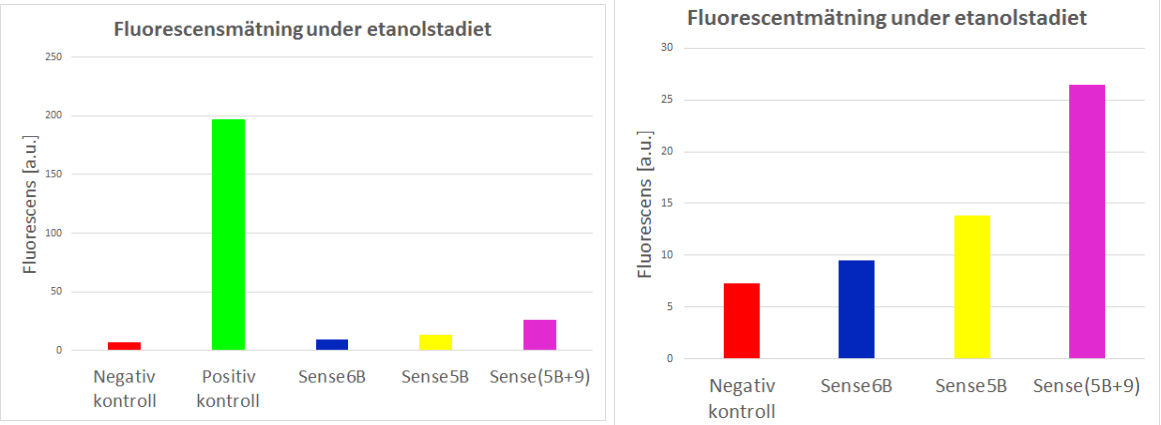
(d) Sense(5B+9)

(e) Positiv kontroll

(f) Alla mätningarna överlappande

Figur 24: Andra fluorescensmätningarna under etanolstadiet illusterad i 6 olika bilder för respektive plasmidtransformation.

Till skillnad från glukosstadiet så verkar Sense(5B+9) inte vara så markant mycket högre än den negativa kontrollen, Sense6B och Sense5B vilket syns i Figur 25. Vid närmare titt av datan så är skillnaden mellan negativa kontrollen och Sense6B, Sense5B och Sense(5B+9) ∼30%, ∼60% respektive ∼600% i glukosstadiet. I etanolstadiet så är skillnaden ∼30%, ∼90% samt ∼300%. Sense(5B+9) har nästan halverat sitt uttryck i förhållande till den negativa kontrollen under etanolstadiet. En annan noterbar sak är att absorbansen för Sense(5B+9), Tabell 24 i Bilaga B 9.3, är inte lägst utan högst av alla. Det här skulle kunna bero på att fler kolonier plockades till det mediet från Sense(5B+9) jämför med andra. Som tidigare observerat så har den behövt en längre tillväxt och därmed kanske inte hunnit komma in i log-fasen som de andra kulturerna. Därmed kanske en del celler fortfarande befann sig i lag-fasen under mätningen i glukosstadiet och med det påverkat fluorescensuttrycket.



(a) (b)

Figur 25: Två stapeldiagram över den andra fluorescensmätningarna under etanolstadiet. I (a) illusteras skillnaden med den positiva kontrollen och i (b) utan för att tydliga göra skillnaden mellan den negativa kontrollen, Sense6B, Sense5B och Sense(5B+9). (arbitrary unit, a.u.)

5 Slutsatser

Från resultatet kan ett antal slutsatser dras. Ryggradsplasmiderna, vilka användes som grund i skapandet av alla plasmider, visades med hjälp av restriktionsanalys och Sangersekvensering vara korrekta. Alla önskade plasmider skapades utan att några mutationer uppstod i viktiga delar av dem, även detta verifierades genom Sangersekvensering. Transformationen in i *E.coli* bekräftades med selektionsplattor och tillväxt fanns på samtliga. Koloni-PCR visade att transformationen in i *S. cerevisiae* lyckades för alla plasmider utom pSense(5B+9). Då andra faktorer tydde på en lyckad inkorporering av pSense9 drogs slutsatsen att själva koloni-PCR:en, och inte transformationen, misslyckats. Det kunde dock inte säkerställas att det faktiskt var pSense9 som inkorporerats.

Resultatet från flödescytometrin indikerar att *Y. lipolyticas* n-alkaninducerade system inte fungerar exakt likadant i *S. cerevisiae* som det gör i originalorganismen, samt att det till olika grader går att inducera originalpromotorn *ALK1*. I de tidigare studierna som gjorts angående det regulativa systemet i *Y. lipolytica* visade det att Yas3 fungerade som en repressor samt att Yas1 och Yas2 fungerade som aktivatorer. Eftersom att de celler som tagit upp pSense5B, vilken innehöll generna som kodar för Yas1 och Yas2, visade ett högre uttryck av fluorescens än de celler som inkorporerat pSense6B tyder det på att de två tidigare nämnda proteinerna fungerar som aktivatorer även i *S. cerevisiae*. Vad som däremot inte verkar ha samma funktion i *S. cerevisiae* är Yas3, då de celler som tagit upp både pSense5B och pSense9 visade ett högre uttryck av fluorescens än de som tagit upp pSense5B samt en ryggradsplasmid. Detta tyder på att under de förhållanden som mätningarna gjordes vid, fungerar även Yas3 som en aktivator i *S. cerevisiae*. Fenomenet kan kanske förklaras av att det möjligen finns ett antal viktiga proteiner i *Y. lipolytica*, som är väsentliga för att Yas3 ska fungera som en repressor, vilka saknas i *S. cerevisiae*.

Då transformationen av pSense5B, samt inkorporeringen av *YAS3* genom homolog rekombination, in till den n-alkanproducerande stammen inte lyckades, fanns det begränsade möjligheter att testa hur systemet fungerade i närvaro av n-alkan. Eftersom n-alkan har svårigheter att diffundera in till cellkärnan valdes det att inte utföra några experiment där n-alkan tillsattes externt, vilket resulterade i att systemet aldrig testades då n-alkan var närvarande.

Då resultatet tyder på att originalpromotorn induceras av Yas3 skulle det kunna vara möjligt att få ett fluorescensskifte vid tillsatts av n-alkan, men då inga fluorescensmätningar gjordes i närvaro av n-alkan kan inget definitivt sägas om hur vidare det går att använda den modifierade versionen av *Y. lipolyticas* n-alkaninducerade system, vilken skapades i projektet, som en biosensor i *S. cerevisiae*.

6 Framtida Studier

Fortsatta studier krävs för att kunna skapa en fungerande biosensor i *S. cerevisiae* med hjälp av det n-alkaninducerade systemet från *Y. lipolytica*. Intressanta aspekter att studera i framtiden är andra plasmidkombinationer, fluorescensmätningar i närvaro av n-alkan, proteininteraktioner samt proteinlokalisering.

Fluorescensmätningarna av plasmidkombinationen pSense5B+pSense9 gav ett annat uttryck än det förväntade, vilket innebär att framtida studier av pSense9 hade varit av intresse. Då det inte kunde bekräftas via koloni-PCR att pSense9 hade transfomerats in i *S. cerevisiae* tillsammans med pSense5B hade det varit intressant att testa metoden igen med andra primrar, tider samt temperaturer för att se om något resultat fås. Det hade även varit av intresse att testa plasmidkombinationen pSense6B+pSense9. Detta på grund av att undersöka hur Yas3 skulle interagera med P_{ALK1} utan Yas1 och Yas2.

På grund av tidsbrist gjordes inga mätningar i närvaro av n-alkan. Därför hade det varit av intresse att utföra mätningar med tillsats av n-alkan externt samt mätningar med en n-alkanproducerande jäststam för undersöka hur systemet reagerar i närvaro av n-alkaner. För att det ska vara möjligt att göra mätningar med en n-alkanproducerande jäststam behöver systemet implementeras. Det innebär att *YAS3* från konstruktionen p2055+*YAS3* behöver integreras korrekt med hjälp av homolog rekombination, för att sedan transformeras in i den n-alkanproducerande jäststammen tillsammans med plasmiden pSense5B.

Då systemet ursprungligen kommer ifrån *Y. lipolytica* är det okänt hur det fungerar i *S. cerevisiae*. Därför behövs fler studier av systemet utföras i *S. cerevisiae*. Interaktion mellan Yas1, Yas2 och Yas3 hade varit intressant att studera, vilket skulle kunna göras med FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). I *Y. lipolytica* lokaliseras Yas3 till det endoplasmatiska nätverkets membran vid närvaro av n-alkan medan Yas1 och Yas2 är lokaliserade i cellkärnan. Genom att koppla Yas1, Yas2 och Yas3 med GFP och göra ett så kallat fusionsprotein, hade det varit möjligt att undersöka proteinernas lokalisering i *S. cerevisiae* vid närvaro och frånvaro av n-alkan.

7 Referenser

Referenser

[1] Karl TR, Nicholls N, Gregory J. The Coming Climate. Scientific American. 1997;276:78–83.

[2] Coyle WT. Next-Generation Biofuels Near-Term Challenges and Implications for Agriculture. United States Department of Agriculture. 2010;8:20–27.

[3] Buijs NA, Zhou YJ, Siewers V, Nielsen J. Long-chain alkane production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering. 2015;112(6):1275–1279.

[4] Parekh S, Vinci VA, Strobel RJ. Improvement of microbial strains and fermentation processes. Applied Microbiology and Biotechnology. 2000;54(3):287–301.

[5] Schallmey M, Frunzke J, Eggeling L, Marienhagen J. Looking for the pick of the bunch: high-throughput screening of producing microorganisms with biosensors. Current Opinion in Biotechnology. 2014;26:148–154.

[6] Liu Y, Li Q, Zheng P, Zhang Z, Liu Y, Sun C, et al. Developing a high-throughput screening method for threonine overproduction based on an artificial promoter. Microbial cell factories. 2015;14:121.

[7] Sumita T, Lida T, Yamagami S, Horiuchi H, Takagi M, Ohta A. *YlALK1* encoding the cytochrome P450ALK1 in *Yarrowia lipolytica* is transcriptionally induced by n-alkane through two distinct cis-elements on its promoter. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2002;5(294):1071–1078.

[8] Bondesson I, Ericson E, Möller C, Nyblom M, Olmin A, Ortgren J. Utveckling av alkaninducerad biosensor i *Saccharomyces cereviciase*. Bachelor thesis at Chalmers University of Technology. 2016;.

[9] Endoh-Yamagami S, Hirakawa K, Morioka D, Fukuda R, Ohta A. Basic helix-loop-helix transcription factor heterocomplex of Yas1p and Yas2p regulates cytochrome P450 expression in response to alkanes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. American Society for Microbiology. 2007;6(4):734–743.

[10] Hirakawa K, Kobayashi S, Inoue T, Endoh-Yamagami S, Fukuda R, Ohta A. Yas3p, an Opi1 family transcription factor, regulates cytochrome P450 expression in response to n-alkanes in *Yarrowia lipolytica*. The Journal of Biological Chemistry. 2009;11(11):7126–7137.

[11] Kobayashi S, Tezaki S, Horiuchi H, Fukuda R, Ohta A. Acidic phospholipid-independent interaction of Yas3p, an Opi1-family transcriptional repressor of *Yarrowia lipolytica*, with the endoplasmic reticulum. Yeast. 2015;32(12):691–701.

[12] Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics. 1996;1(6):1–42.

[13] Yamagami S, Morioka D, Fukuda R, Ohta A. A basic helix-hoop-helix transcription factor essential for cytochrome P450 induction in response to alkanes in yeast *Yarrowia lipolytica*. The Journal of Biological Chemistry. 2004;279(21):22183–22189.

[14] TaKARa Bio, Inc.. Maximum Speed, Maximum Fidelity [Produktblad]; 2011. Hämtad 2017-05-08. Available from: `https://www.westburg.eu/products/genomics-research/pcr-and-rt-pcr/high-fidelity-pcr/primestar-max-dna-polymerase/$10706`.

[15] Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nature Methods. 2009;6:343–345.

[16] ThermoFisher Scientific. Molecular Biology, PCR reagents selection guide [Broschyr]; 2016. Hämtad 2017-05-08. Available from: `https://www.fishersci.ca/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/scientific/brochures-and-catalogs/guides/thermo-scientific-molecular-biology-pcr-reagents-selection-guide.pdf`.

8 Bilaga A

Bilaga A innehåller de bilagor som är kopplade till Metod och material.

8.1 Konstruktion av plasmider

8.1.1 Omfattande information om primrar och PCR:erna

Tabell 6: Sekvenser för de primrar som används för att konstruera respektive plasmid.

Namn	**Primer**	**Primrar Eurofins**
	pSense0	
A	GFP	TTTGTAATTAAAACTTAGATTAGATTGCTATG
B	p413TEF	ATGCGAATCCCCGGGTTAATTAAC
C	p413TEF	CTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATG
D	GFP	TCATGTAATTAGTTATGTCACGC
	pSense9	
E	4a	GGCCGGTACCCAATTCG
F	p416TEF	GCAAATTAAAGCCTTCGAGC
G	p416TEF	CAAAATGTTTCTACTC
H	4a	GAGCTCCAGCTTTTGTTC
	pSense6B	
I	P_{ALK1}	GAGCTCCAGCTTTTGTTC
J	pSense0	CAGTGATGAGGACACACTC
K	pSense0	AGTGCAGGAGTATTCTGGG
L	P_{ALK1}	ATGCGAATCCCCGGGTTAATTAAC
	pSense5B	
M	pSense6b	ACGCACAGATATTATAACATCTGC
N	pSense6b	CATGCCGGTAGAGGTGTG
O	4b	ACGCACAGATATTATAACATCTGC
P	4b	CATGCCGGTAGAGGTGTG
Q	4c	TTGACGTGGCTGAACAAC
R	4c	ATGCACTTATCCCATCCTC
S	P_{PGK1}	TTTGTTATATTTGTTGTAAAAAGTAGATAATTAC
T	P_{PGK1}	ACGCACAGATATTATAACATCTG
	p2055+*YAS3*	
a	4a	GTAGATACGTTGTTGACACTTCTAAATAAG
b	p2055	TCAGGCGTCACCCATTTC
c	p2055	ATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTTTTAC
d	4a	GATCGCGTCAGCTGAAGCTTC

Tabell 7: En övergripande tabell över alla PCR-amplifieringar som gjordes för att skapa konstruktionerna. Med primrar, polymeras, temperatur, tid samt förväntade storleken kopplad till varje konstruktion. Temperatur och tid är hybridiseringstemperatur och förlängningstid.

PCR	**Konstruktion**	**Primer**	**Polymeras**	**Temperatur**	**Tid**	**Fragmentstorlek [bp]**
1	p413TEF	A D	PrimeSTAR	Gradient 53-65°C	6 min	5591
2	p416TEF	E H	PrimeSTAR	Gradient 57-72°C	6 min	5528
3	GFP	B C	Phusion	67°C	1 min	738
4	4a	F G	Phusion	54°C	2 min	1923
5	pSense0 (utan P_{TEF1})	I L	PrimeSTAR	Gradient 58-68°C	7.5 min	5855
6	P_{ALK1}	J K	Phusion	56°C	1 min	600
7	4b	N M	Phusion	61°C	2 min	1356
8	4c	O P	Phusion	59°C	2 min	2447
9	P_{PGK1}	Q R	Phusion	60°C	2 min	750
10	p2055	a d	PrimeSTAR	Gradient 65-75°C	6 min	6071
11	4a	b c	Phusion	60°C	2 min	1923

8.1.2 Gelextraktion-protokoll

Extraktion av plasmider ur gel gjordes med hjälp av ThermoScientic™ GeneJET Gel Extraction Kit.

1. Geldelen innehållandes DNA-fragmentet från gelelektroforesen skärs ut med hjälp av en steril skalpell och placeras i en förvägd 1,5 ml tub. Väg och notera massan på den utskurna geldelen. Då DNA:t sedan ska användas till Gibsonkloning är det viktigt att gelen inte utsätts för UV-ljus som kan förstöra det.
2. Tillsätt 1:1 volym av Binding Buffer (volym:vikt)
3. Inkubera gelmixen på 50-60°C i 10 min tills gelen lösts upp helt och hållet. Vortexa och för sedan över lösningen till en GeneJET purification column. Lösningen ska vara gul för att indikera optimalt pH.
4. Centrifugera i 1 min. Släng det som flödat igenom. Om gellösningens volym översteg 800 μl så upprepades detta steg.
5. Tillsätt 700 μl Wash Buffer och centrifugera i 1 min. Släng det som har flödat igenom.
6. Centrifugera ytterligare 1 min för att se till så att all Wash Bufer är borttagen.
7. Överför GeneJET purification column till en ren 1,5 ml tub och tillsätt 50 μl Elution Buffer till mitten av kolumnen utan att nudda membranet. Centrifugera i 1 min.
8. Släng GeneJET purification column och förvara det renade DNAt i -20°C.

8.1.3 PCR-protokoll

Koncentrationen av DNA för primers samt templatet i båda protokollen bör ligga mellan 10-20 ng/μl för bästa resultat. Spädningar har därmed gjorts för att uppnå önskad koncentration.

Tabell 8: Mått för en TaKaRa PrimeSTAR® HS DNA Polymerase PCR-reaktion.

Komponent	**Volym**
Vatten	31.5 μl
5x PCR buffer	10 μl
2.5 mM dNTP	4μl
Primer 1	1.5 μl
Primer 2	1.5 μl
Templat	1 μl
PrimeSTAR	0.5 μl

Tabell 9: Mått för en ThermoScientic™ Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase PCR-reaktion.

Komponent	**Volym**
Vatten	32,5 μl
5x Phusion HF buffer	10 μl
10 mM dNTP	1 μl
10 μl Primer 1	2,5 μl
10 μl Primer 2	2,5 μl
Templat	1 μl
Phusion DNA Polymeras	0,5 μl

Tabell 10: Tid och temperatur för PCR-reaktionerna. Varialbelvärden för vardera reaktion kan ses i Tabell 7 under temperatur och tid.

	Temp	**Tid**
Initial:	98°C	3 min
	98°C	10 s
Cykel:	Variabel	30 s
	72°C	Variabel
Final:	72°C	10 min

8.1.4 Gibsonkloning

Fragmentet har molkvoten 4:1 mot ryggradsplasmiden. Volym för tillsatt ryggradsplasmidlösning beräknas från koncentrationen, enligt

$$V_{ryggradsplasmid} = \frac{100ng}{c_{ryggradsplasmid}} \tag{1}$$

där $V_{ryggradsplasmid}$ [μl] är volymen ryggradsplasmidlösning som behövs för att få 100 ng ryggradsplasmid vid koncentrationen, $c_{ryggradsplasmid}$ [mol/μl]. Volym för tillsatt fragmentlösning är beroende av molmängden av ryggradsplasmidlösningen och beräknas som en kvot av molmassan mellan fragment och ryggradsplasmid och koncentrationen av fragmentlösningen, enligt

$$V_{fragment} = \frac{4 * 100ng}{C_{fragment}} * \frac{[antal\, bp\, i\, fragment]}{[antal\, bp\, i\, ryggradsplasmid]} \tag{2}$$

där $V_{fragment}$ [μl] är volymen fragment som behövs för att få 100 ng fragment vid koncentrationen, $c_{fragment}$ [mol/μl]. 4:an är molkvoten.

Protokoll för Gibsonkloning redovisas i Tabell 11.

Tabell 11: Måtten som användes för Gibsonkloningarna.

Komponent	Volym
Gibson mastermix (2x)	10 μl
Fragment	Beräknad volym
Vatten	Fyll till 20 μl
Totalvolym	20 μl

Lösningen tillreds på is. Sedan inkuberas den i 50°C under 1h. Primers späddes ut till att inneha en DNA koncentration inom intervallet 10-20 ng/μl.

8.2 *E. coli*

8.2.1 Komposition LB-Amp medium

Mängden ampicillin i LB-Amp mediet beräknades enligt

$$c_{Amp} * V_{Amp} = c_{LB} * (V_{Amp} + V_{LB}) \tag{3}$$

där c_{Amp} [mg/ml] är koncentrationen på ampicillinet som tillsätts, V_{Amp} [ml] är volymen ampicillin som behövs tillsättas för att för att uppnå koncentrationen c_{LB} [mg/ml] och (V_{Amp}+V_{LB}) [ml] är den totala volymen på LB-mediet. Ekvation (4) är beräkningen med värden för respektive.

$$V_{Amp} = \frac{(0{,}1mg/ml * 300ml)}{(100mg/ml - 0{,}1mg/ml} = 0{,}3ml \tag{4}$$

Mediet förberedes i steril miljö.

8.2.2 Transformation av *E. coli*

Metod för att transformera *E. coli* med hjälp av värmechock.

1. Tillsätt 6 μl Gibsonprodukt och 3 μl av en uppklippt ryggradsplasmid utan insert (för kontroll) till varsin lösning med kompetenta celler.
2. Inkubera cellerna på is i 30 min och för sedan över till en värmeplatta på 42°C i 1 min, i detta steg inkorporeras plasmiderna in i *E.coli*.
3. Tillsätt 500 μl LB-medium till cellerna. Inkubera på 37°C i 1.5 h, detta för att cellerna ska få tid till att återhämta sig.
4. Stryk ut cellerna på varsin selektionsplatta, LB-Ampicillin (LB-Amp), och odla över natten i 37°C.

8.2.3 Plasmidrening

Plasmiderna renades fram från *E.coli* med hjälp av ThermoScientic™ GeneJET Plasmid Miniprep Kit.

1. Resuspendera cellpelleten i 250 μl av Resuspension Solution. Överför celllösningen till en micro-centrifugtub, vortexa eller blanda genom pipettering tills alla cellklumpar är upplösta.
2. Tillsätt 250 μl Lysis Solution, blanda lösningen genom att invertera tuben 4-6 gånger tills lösningen blir viskös och lätt genomskinlig.
3. Tillsätt 350 μl Neutralization Solution och blanda omedelbart genom att invertera tuben 4-6 gånger.
4. Centrifugera i 5 min för att samla cellmaterial och kromosomalt DNA i en pellet.
5. Överför supernatanten till en GeneJET spin column.
6. Centrifugera i 1 min. Släng det som flödat igenom.
7. Tillsätt 500 μl Wash Solution och centrifugera i 1 min. Släng det som flödat igenom.
8. Repetera steg 7. Centrifugera ytterligare 1 min för att få bort all Wash Solution.

9. Överför GeneJET spin column till en ny microcentrifugtub. Tillsätt 50 μl Elution buffer till mitten av spinnkolumnen utan att nudda membranet. Inkubera i 2 min i rumstemperatur och centrifugera därefter i 2 min.

10. Släng spinnkolumnen och förvara den renade plasmiden i - 20°C.

8.2.4 Verifikation av *E. coli*

Restriktionsenzym som användes med dess förväntade storlek för respektive plasmid.

Tabell 12: Tabell över restriktionsenzymerna som använts för vilka plasmider och förväntad fragmentstorlek efter klipp.

Plasmid	**Restriktionsenzym**	**Fragmentstorlek [bp]**
p413TEF (kontroll)	PvuII	4513, 1078
pSense0	PvuII	4513, 1325, 422
p416TEF (kontroll)	SspI	3464, 2064
pSense9	SspI	3322, 2064, 1345
pSense0 (kontroll)	KpnI	5306, 954
pSense6B	KpnI	3941, 1567, 954
pSense6B (kontroll)	KpnI	3951, 1567, 954
pSense5B	KpnI	5433, 3941, 1567

8.2.5 Thermo Scientific™ FastDigest™ Restriktions protokoll

1. Förbered reaktionsblandningen vid rumstemperatur enligt följande ordning:

Tabell 13: Thermo Scientic™ FastDigest™ protokoll över volymer och komponenter som användes.

Komponent	**Volym**		
	Plasmid DNA	**Orenat PCR produkt**	**Genomiskt DNA**
MilliQ vatten*	15 μl	17 μl	30 μl
10X FastDigest® buffer eller 10X FastDigest® Green buffer	2 μl	2 μl**	5 μl
DNA*	2 μl (upp till 1 μg)	10 μl (∼0.2 μg)	10 μl (5 μg)
FastDigest® enzym	1 μl	1 μl	5 μl
Total volym	20 μl	30 μl	50 μl

2. Blanda försiktigt och centrifugera ner med en bordcentrifug.

3. Inkubera vid 37° C i ett värmeblock eller en vattentermostat i 1 h. ***

4. Inaktivera enzymet (valfritt). ***

Notera:
* Vattenmängden bör korrigeras för att hålla den angivna totala reaktionsvolymen. Volymen av DNA kan skalas upp till 10 μl eller ner till 0.5 μl beroende på DNA-koncentrationen.

** Endast 2 μl 10X FastDigest®-buffert krävs för renad PCR-produkt i en reaktionsvolym av 30 μl.

***Se analyscertifikatet för enzym- och substratspecifik inkubationstid och enzyminaktiveringsförhållanden.

8.2.6 Sekvensering

Beskrivningen av positionen för varje sekvens samt dess riktning. **pSense0**
1. Start vid bp ∼2300 i riktning med P_{TEF1}.
2. Start vid bp ∼2900 i riktning med *GFP*.
Sekvenseringen täcker P_{TEF1}, *GFP* och T_{CYC1}.

pSense9
1. Start vid bp ∼2300 i riktning mot T_{CYC1}.
2. Start vid bp ∼2900 i riktning mot *YAS3*.
3. Start vid bp ∼3500 i riktning mot P_{TEF1}.
Sekvenseringen täcker T_{CYC1}, *YAS3* och P_{TEF1}.

pSense6B
1. Start vid bp ∼2900 i riktning med P_{ALK1}.
2. Start vid bp ∼3600 i riktning med *GFP*.
Sekvenseringen täcker, P_{ALK1}, *ARE1*, *ARE2*, *GFP* och T_{CYC1}.

pSense5B
1. Start vid bp ∼3200 i riktning med P_{PGK1}.
2. Start vid bp ∼4000 i riktning med *YAS1*.
3. Start vid bp ∼4600 i riktning mot T_{PDC6}.
4. Start vid bp ∼5400 i riktning mot *YAS2*.
5. Start vid bp ∼6200 i riktning mot *YAS2*.
6. Start vid bp ∼6900 i riktning mot P_{PGK1}.
Sekvenseringen täcker P_{PGK1}, *YAS1*, T_{ADH1}, P_{PDC6}, *YAS2* och P_{PGK1}.

p2055+*YAS3*
1. Start vid bp ∼2800 i riktning mot *YAS3*.
2. Start vid bp ∼3600 i riktning mot *YAS3*.
3. Start vid bp ∼4300 i riktning P_{TEF1}.
Sekvenseringen täcker T_{ADH1}, *YAS3*, P_{TEF1} och *KanMX*.

8.3 *S. cerevisiae*

8.3.1 Transformation av *S. cerevisiae*

Metod för att transformera *S. cerevisiae* enligt ”High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method”.

1. *S.cerevisiae* odlas i 3 ml YPD-lösning (yeast extract peptone dextrose) över natt i 30°C.
2. Späd ut cell-lösningen till OD_{600} = 0.1 med en slutvolym på 50 ml.
3. Odla cell-lösningen i 30°C tills den når OD_{600} = 0.6-1.0 (logfasen).
4. Centrifugera tuben i 1000 g i 5 min och avlägsna supernatanten.
5. Tvätta pelleten i 25 ml och resuspendera i 1 ml 0.1M LiAc (litiumacetat).
6. För över till 1.5 ml microcentrifugrör.
7. Centrifugera lösningen igen i 1000 g i 5 min och avlägsna supernatanten.
8. Tillsätt 0.1M LiAc för att slutvolymen skulle bli 0.5 ml.
9. Transformationslösningen blandas i ordning enligt:

Tabell 14: Transformationslösning inför värmechock.

Komponent	Volym
YPD-lösning	50 μl
PEG 3350 50% w/v (polyetylenglykol)	240 μl
LiAc 1M	36 μl
SS-carrier DNA	25μl
DNA + vatten (0.1-10μg)	50 μl

10. Skaka lösningen kraftigt och sätt i ett 42°C vattenbad i 30 min.
11. Centrifugera lösningen i 15 s på 6000 rpm och pipettera bort supernatanten.
12. Resuspendera peletten i 1 ml YPD och inkubera i 30°C i 90 min (recovery).
13. Centrifugera lösningen igen i 15 s på 6000 rpm och pipettera bort supernatanten.
14. Resuspendera pellet i 200 μl och för över till selektionsmedium.

8.3.2 Verifikation i *S. cerevisiae*

Förberedelse för koloni-PCR beskrivs i stegen nedan:

1. Lös upp ett antal kolonier i 100 μl 0.2M LiAc. Tillsätt 300 μl 96% etanol och blanda lösningen noggrant.
2. Centrifugera lösningen i 20000 rpm i 3 min och avlägsna supernatanten.
3. Resuspendera pelleten i 100 μl 70% etanol och centrifugera igen.
4. Avlägsna supernatanten och torka tuben i 37°C i 10 min.
5. Resuspendera pelleten i 100 μl vatten och centrifugera igen i 1 min.
6. Supernatanten används som templat till koloni-PCR.

Tabell 15: Tid och temperatur för koloni-PCR. Variabelvärdet för pSense0, P_{PGK1} och pSense6B är 1 min då dessa fragment är kortare. För pSense5B och pSense5B+pSense9 är variabelvärdet 2,5 min.

	Temp	Tid
Initial:	98°C	3 min
	98°C	10 s
Cykel:	60°C	30 s
	72°C	Variabel
Final:	72°C	10 min

8.4 Flödescytometri

8.4.1 Medium till övernattskulturen

Instruktionerna nedan är för SD(-HIS)(-URA) medium

Tabell 16: Följande tillsattes i 1 L-flaska.

Komponent	Mängd
YNB without aa	6.7 g
CSM -HIS, -URA	0.7 g
MilliQ vatten	500 ml

Tabell 17: Följande tillsattes i 1 L-flaska.

Komponent	**Mängd**
Glukos	20 g
MilliQ vatten	500 ml

Flaskorna autoklaverades och glukosmediet fördes över till YNB-mediet (innehållande CSM -HIS, -URA). Detta gjordes för att undvika Maillardreaktionen (aminosyror reagerar med glukos för att bilda ett komplex) under uppvärmingen.

8.4.2 Optisk Densitetsmätningar innan flödescytometrin

1. Överför cirka en koloni av odlade celler med upptagna plasmider till 5ml YNB-medium i falcontuber. Duplikat görs för alla plasmidkombinationer.
2. Inkubera falcontuberna i 30°C på skakinkubator (200 rpm) över natten för att växa förbi lag-fasen.
3. Gör OD-mätningar av alla prov nästkommande morgon.
4. Utifrån OD bestäms en volym av vardera falcontub som överförs till E-kolvar med en slutgiltig volym på 10ml och OD på 0.1. Volymen som överförs bestäms enligt.

$$V_{celler} = \frac{0.1 * 10ml}{OD_{celler}} \tag{5}$$

5. Inkubera E-kolvarna i 30°C på skakinkubator (200 rpm) mellan fyra och sju timmar.
6. Ännu en OD-mätning genomförs. Cellerna är nu i log-fasen.
7. Utifrån OD bestäms en volym av vardera E-kolv som överförs till brunnar som används vid flödescytometrin med en slutgiltig volym på 200μl och ett OD på 0.02. Volymen som överförs bestäms enligt

$$V_{celler} = \frac{0.02 * 0.2ml}{OD_{celler}} \tag{6}$$

8. Inkubera E-kolvarna över natten i 30°C på skakinkubator (200 rpm).
9. Genomför ännu en OD-mätning nästkommande dag och upprepa steg 7. Cellerna befinner sig nu i etanolfasen.

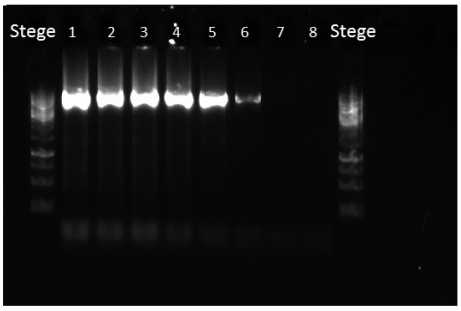
Dessa steg genomfördes vid två olika tillfällen, där bland annat inkuberingstiderna varierade mellan de två. Tillfällena och dess data visas i Tabell 19, 20, 21, 22, 23 och 24 i Bilaga B 9.3.

9 Bilaga B

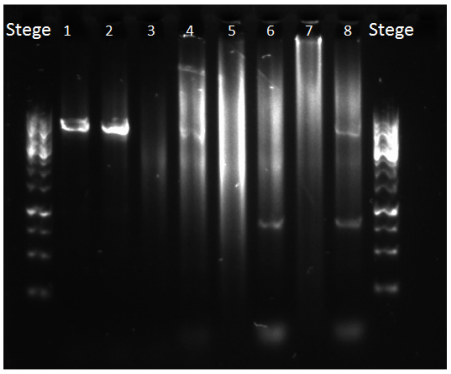
Bilaga B ät till för bilagorna kopplade till resultatet.

9.1 PCR

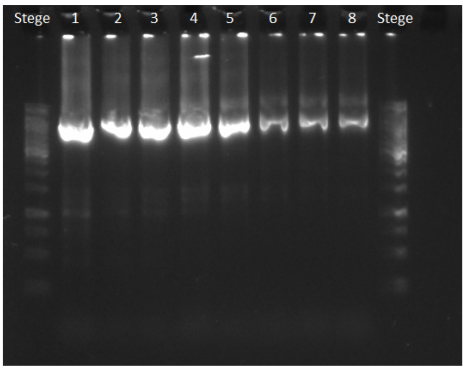
En temperaturgradient över p413TEF, p416TEF och pSense0 gjordes vid PCR-amplifieringen. De fem första banden visade som förväntat för p413TEF. De två första banden för p416TEF och alla för pSense0 visade förväntad längd, dock så är de första från pSense0 något tydligare.



(a) p413TEF



(b) p416TEF



(c) pSense0 utan P_{TEF1}

Figur 26: Resultatet för p413TEF (a) brunn 1-8, p416TEF (b) brunn 1-8 och pSense0 utan P_{TEF1} (c) brunn 1-8 med en temperaturgradient. Stegen som syns är GeneRuler^{TM} 1kb

9.2 Restriktionsanalys

9.2.1 Plasmidernas koncentration

De uppmätta koncentrationenerna från varje plasmidrening presenteras i Tabell 18. Proverna svarar mot gelbilderna i Figur 27. Anledningen till att koncentrationen varierar beror på hur lyckad miniprepen var, samt inockuleringen i LB-mediet.

Tabell 18: Koncentrationerna, c, är uppmätta med en spektrofotometer efter varje plasmidrening. Koncentrationen är mätt i ng/μl. Där data har utlämnats är på grund av att ingen koncentration mättes i dessa provrören. Det som är inringat är de plasmiderna som skickades på sekvensering.

pSense0		**pSense9**		**pSense6B**		**pSense5B**		**p2055+YAS3**	
Prov	**c [ng/μl]**	**Prov**	**c [ng/μl]**	**Prov**	**c [ng/μl]**	**Prov**	**c [ng/μl]**	**Prov**	**c [ng/μl]**
(1)	172,0	1	134,5	1	139,0	(1)	171,6	1	60,7
(2)	152,3	(2)	292,6	2	-	2	303,3	2	55,3
3	169,6	3	100,6	(3)	328,0	3	512,4	3	39,5
4	128,8	4	402,8	4	-	4	571,3	4	62,1
5	-	5	136,2	5	27,0	5	150,5	(5)	91,6
6	-	(6)	252,2	6	-	6	184,7	6	58,7
7	-	-	-	7	-	7	43,5	7	53,3
8	-	-	-	8	161,0	(8)	228,1	(8)	164,9

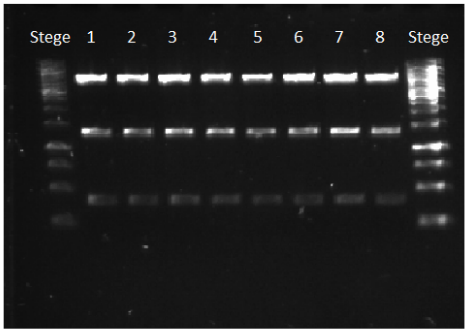
Vid den sammanställda gelelektroforesbilden beräknades en volym så att varje brunn skulle laddas med lika mycket DNA. Beräkningen gjordes enligt Ekvation 7.

$$V_{plasmider} = \frac{100ng}{c_{plasmid}} \tag{7}$$

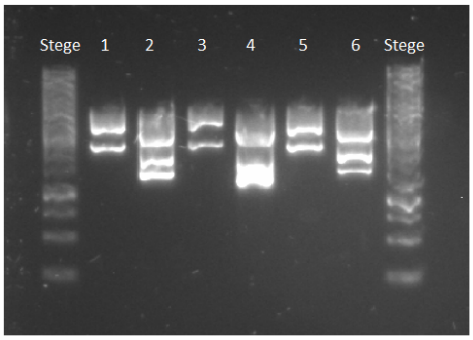
där $V_{plasmider}$ [μl] är volymen plasmider som skall tillsättas och $c_{plasmid}$ [ng/μl] är koncentrationen på plasmiden som tillsätts. Då en volym under 0.5 μl erhölls vid ett flertal fall så avrundades dess upp till 0.5 μl, då en lägre volym skulle innebära en osäkerhet i pippeteringen.

9.2.2 Gelelektroforesbilderna för alla plasmiderna

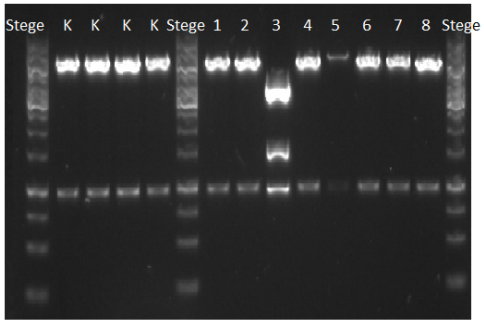
I Figur 27 presenteras gelelektroforesresultaten för alla proverna som testades för alla plasmider. Varje prov bestod av en koloni som ympats från de olika agarplattor med respektive plasmidtransformation gjord på. I (a) och (b) laddades ingen kontroll på gelen, utan resultatet jämfördes direkt med det förväntade resultatet enligt Benchling. I den sammanställda gelen visas däremot en kontroll för att lättare illustrera skillnaden.



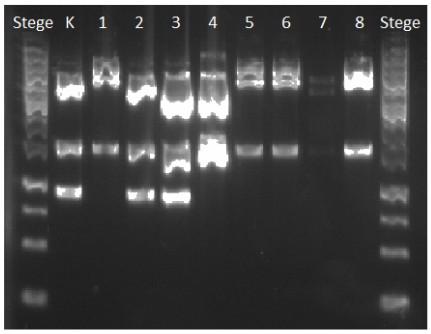
(a) Åtta testprover med transformation av pSense0 (1-8).



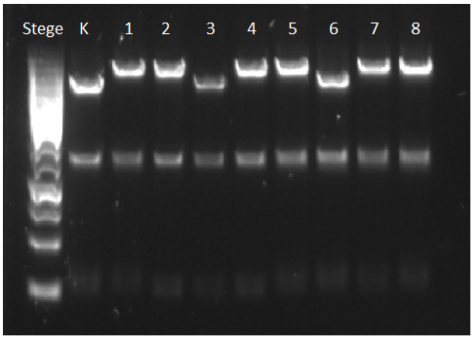
(b) Sex testprover med transformation av pSense9 (1-6).



(c) Åtta testprover med transformation av pSense6B (1-8). Kontrollen, K var pSense0.



(d) Åtta testprover med transformation av pSense5B (1-8). Kontrollen K var pSense6B.

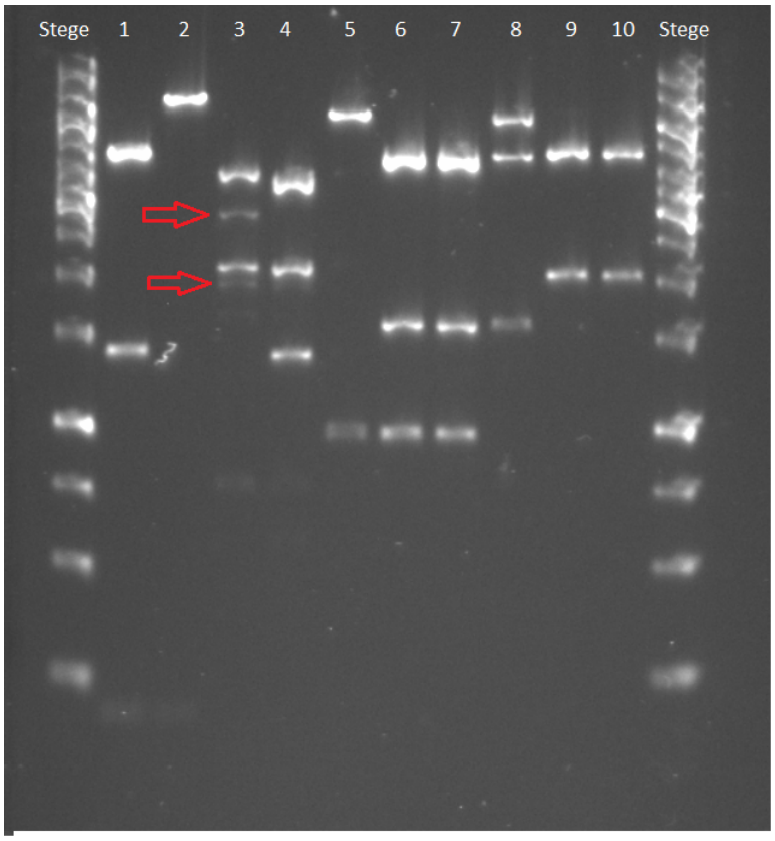


(e) Åtta testprover med transformation av p2055+*YAS3* (1-8). Kontrollen, K var p2055.

Figur 27: Restriktionsanalys resultatet för alla plasmiderna. Plasmiderna som sedan skickades på sekvensering och inte hade fått någon förändring sammanställdes och kördes på en gemensam gel som presenteras i resultatet, där även det förväntade resultatet visas. Till alla geler användes stegen GeneRuler^{TM} 1 kb.

9.2.3 Gelelektroforesbild av felklyvningen

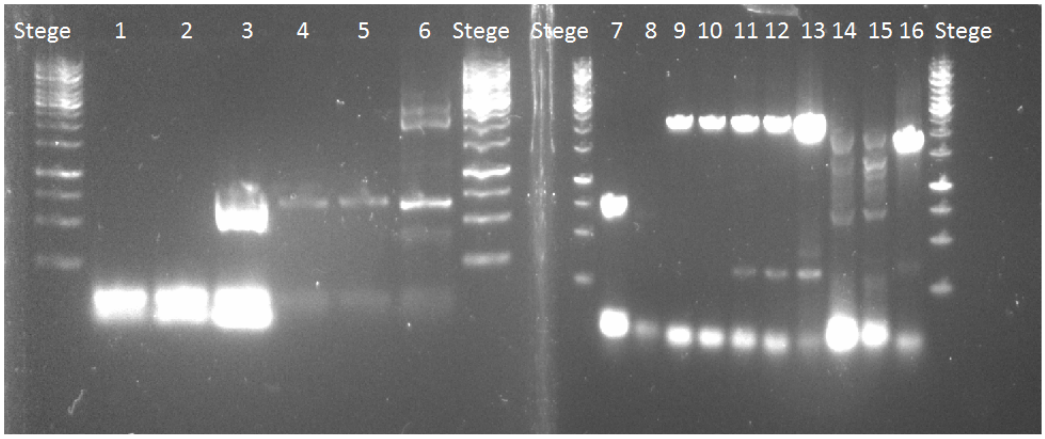
En felklyvning uppstod då alla plasmiderna kördes över samma gel. Ett nytt restriktionenzym fick användas för att få ett tydligt resultat som matchar mot det förväntade.



Figur 28: Alla plasmiderna klippt med restriktionsenzym enligt Figur 11 (b) med undantag för p416TEF och pSense9 som är klippta med restriktionsenzymet som användes vid första klyvningen, SspI. Ett vagt band är synligt mellan de förväntade banden samt något lägre ner. Se pilarna i figuren. Observera att p413TEF och pSense0 är klippta med HindIII i den här figuren det på grund av att oklara band dök upp mellan de förväntade. Försöktet gjordes om med de gamla plasmiderna och problemet försvann.

9.2.4 Gelbilder över alla tester för koloni-PCR:en

Två olika kolonier plockades för att se ifall det finns någon signifikans skillnad mellan kolonierna. Sense0 och Sense(5B+9) vid test av pSense9 verkar inte ha fungerat.



Stege	GeneRuler™ 1kb
1	Sense0 (Koloni 1)
2	Sense0 (Koloni 2)
3	pSense0 (Kontroll)
4	Sense6B (Koloni 1)
5	Sense6B (Koloni 2)
6	pSense6B (Kontroll)
7	P*PGK1* (Positiv kontroll)
8	P*PGK1* (Negativ kontroll)
9	Sense5B (Koloni 1)
10	Sense5B (Koloni 2)
11	Sense(5B+9) (Koloni 1)
12	Sense(5B+9) (Koloni 2)
13	pSense5B (Kontroll)
14	Sense(5B+9) (Koloni 1)
15	Sense(5B+9) (Koloni 2)
16	pSense9 (Kontroll

Figur 29: Första Koloni-PCR försöket. Vad varje gel innehåller står beskrivet under gelbilden.

9.3 Flödescytometri

I Tabell 19-24 presenteras alla absorbansmätningarna inför flödescytomerimätningarna.

Tabell 19: Tabell över OD-mätningarna vid lag-fasen, tillfälle 1. pSense9+pSense5B visade ingen eller minimal tillväxt, så valdes att inte överföras till E-kolvar. p2055+ *YAS3* inkuberades i felaktigt medium, och växte därmed inte.

Plasmidkombination	**OD, Volym[ml] lag-fas**	**Inkubationstid lag-fas [h]**
p413TEF+p416TEF	2.66, 0.5	17
p413TEF+p416TEF	2.14, 0.5	17
pSense0+p416TEF	2.3, 0.5	17
pSense0+p416TEF	2.69, 0.5	17
pSense6B+p416TEF	2.2, 0.5	17
pSense6B+p416TEF	2.1, 0.5	17
pSense5B+p416TEF	2.4, 0.5	17
pSense5B+p416TEF	2.7, 0.5	17
pSense5B+pSense9	0, -	17
pSense5B+pSense9	0, -	17
p2055+ *YAS3*	0, -	17
p2055+ *YAS3*	0, -	17

Tabell 20: Tabell över OD-mätningarna vid lag-fasen. Tillfälle 2. Längre tillväxttid på pSense9+pSense5B medförde tillväxt. p2055+ *YAS3* inkuberades separat vid annat tillfälle och togs därför inte med i denna mätning.

Plasmidkombination	**OD, Volym[ml] lag-fas**	**Inkubationstid lag-fas [h]**
p413TEF+p416TEF	2.4, 0.344	17.5
p413TEF+p416TEF	2.7, 0.476	17.5
pSense0+p416TEF	2.5, 0.4	17.5
pSense0+p416TEF	2.4, 0.42	17.5
pSense6B+p416TEF	2.3, 0.435	17.5
pSense6B+p416TEF	2.7, 0.37	17.5
pSense5B+p416TEF	1.8, 0.56	17.5
pSense5B+p416TEF	2.0, 0.5	17.5
pSense5B+pSense9	0.1, 5	21.5
pSense5B+pSense9	0.55, 1.8	21.5

Tabell 21: Tabell över OD-mätningarna vid log-fasen. Tillfälle 1.

Plasmidkombination	**OD, Volym[μl] log-fas**	**Inkubationstid log-fas [h]**
p413TEF+p416TEF	0.35, 11	4
p413TEF+p416TEF	0.35, 11	4
pSense0+p416TEF	0.262, 15.27	4
pSense0+p416TEF	0.309, 12.9	4
pSense6B+p416TEF	0.4, 10	4
pSense6B+p416TEF	0.357, 11.2	4
pSense5B+p416TEF	0.25, 16	4
pSense5B+p416TEF	0.35, 11	4

Tabell 22: Tabell över OD-mätningarna vid log-fasen. Tillfälle 2.

Plasmidkombination	**OD, Volym[μl] log-fas**	**Inkubationstid log-fas [h]**
p413TEF+p416TEF	0.46, 9	7
p413TEF+p416TEF	0.66, 6	7
pSense0+p416TEF	0.54, 7	7
pSense0+p416TEF	0.67, 6	7
pSense6B+p416TEF	0.51, 8	7
pSense6B+p416TEF	0.6, 7	7
pSense5B+p416TEF	0.64, 6	7
pSense5B+p416TEF	0.66, 6	7
pSense5B+pSense9	0.52, 7.7	7
pSense5B+pSense9	0.37, 1.8	7

Tabell 23: Tabell över OD-mätningarna vid etanolfasen. Tillfälle 1.

Plasmidkombination	**OD, Volym[μl] etanolfas**	**Inkubationstid etanolfas [h]**
p413TEF+p416TEF	5.4, 0.7	20
p413TEF+p416TEF	5, 0.8	20
pSense0+p416TEF	3.42, 1.2	20
pSense0+p416TEF	3.64, 1.1	20
pSense6B+p416TEF	5.36, 0.8	20
pSense6B+p416TEF	4.66, 0.9	20
pSense5B+p416TEF	4, 1	20
pSense5B+p416TEF	3.6, 1.1	20

Tabell 24: Tabell över OD-mätningarna vid etanolfasen. Tillfälle 2.

Plasmidkombination	**OD, Volym[μl] etanolfas**	**Inkubationstid etanolfas [h]**
p413TEF+p416TEF	4.4, 1	21
p413TEF+p416TEF	4.2, 1	21
pSense0+p416TEF	4.4, 1	21
pSense0+p416TEF	5.4, 0.7	21
pSense6B+p416TEF	5.6, 0.7	21
pSense6B+p416TEF	4, 1	21
pSense5B+p416TEF	5.6, 0.7	21
pSense5B+p416TEF	5, 0.8	21
pSense5B+pSense9	7.4, 0.5	21
pSense5B+pSense9	2, 2	21