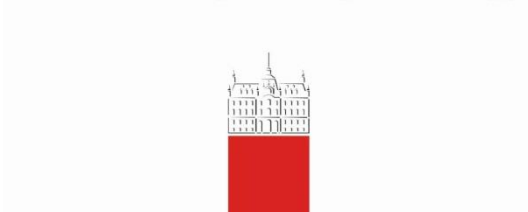


Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za kemijo in kemijsko tehnologijo*



Marko Dolinar in Vera Župunski

MOLEKULARNA BIOTEHNOLOGIJA

NAVODILA ZA VAJE

Ljubljana, 2019

MOLEKULARNA BIOTEHNOLOGIJA – navodila za vaje

Avtorja izr. prof. dr. Marko Dolinar in doc. dr. Vera Župunski

Recenzenta izr. prof. dr. Lea Pogačnik in doc. dr. Aleš Berlec

Izdala in založila Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
Ljubljana, 2019

Za založbo prof. dr. Jurij Svete

Jezikovni pregled mag. Alenka Klemenc

Oblikovanje izr. prof. dr. Marko Dolinar

Urednica doc. dr. Barbara Modec

1. spletna izdaja, 2019

Dostopna na <http://www.fkkt.uni-lj.si/sl/zalozba-ul-fkkt/spletna-knjigarna/>

© (2019) Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani
COBISS.SI-ID: 298804992
ISBN 978-961-6756-93-8 (pdf)

ZAHVALA

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

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

Za recenzijo teh navodil za vaje se zahvaljujema izr. prof. dr. Lei Pogačnik z Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in doc. dr. Alešu Berlecu z Inštituta »Jožef Stefan«.

PREDGOVOR

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

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

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

Gensko spreminjanje cianobakterij je s stališča biološke varnosti lahko problematično, a njihovo gojenje v zaprtih sistemih (fotobioreaktorjih) tveganja precej zmanjša. Naša katedra je sodelovala v mednarodnem projektu, katerega osnovni cilj je bil priprava gensko spremenjenih cianobakterij za proizvodnjo vodika; pomemben del projekta je predstavljala priprava sinteznobiološkega vezja za povečano biološko varnost. V zadnjih letih smo si nabrali precej znanja s tega področja, zato je smiselno, da med študijem spoznate cianobakterije, ki so precej drugačne od ostalih skupin bakterij.

Prvi dve vaji smo v podobni obliki izvajali že v okviru predmeta Kemija in biokemija živil (v predbolonjskem študijskem programu). Dodala sva samo alternativni postopek izolacije DNA za analizo sojine omake. Tretja vaja je nova, a je zastavljena dokaj preprosto in ne zahteva veliko časa v laboratoriju – nekaj več morda kasneje, pri analizi rezultatov. Zaradi počasne rasti cianobakterij bo uvodni del vaje opravil asistent, prav tako precep na selektivno gojišče.

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

Želiva vam uspešno delo na vajah!

Marko Dolinar in Vera Župunski

KAZALO

Seznam kratic in okrajšav	5
1. vaja: Preverjanje vrstne sestave mesnih izdelkov	7
2. vaja: Določanje prisotnosti gensko spremenjenih organizmov v hrani	15
3. vaja: Transformacija cianobakterij	25

Seznam kratic in okrajšav

bp	bazni par
Bt	toksin iz bakterije vrste <i>Bacillus thuringiensis</i>
C	kapacitivnost
cfu/pmol	število kolonij/pmol (colony forming units/pmol)
CTAB	cetiltrimetilamonijev bromid
dH ₂ O	deionizirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
GS	gensko spremenjen
GSO	gensko spremenjen organizem
kb	kilobazni par
min	minuta
PCC	zbirka cianobakterij na Pasteurjevem inštitutu (angl. Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PCR-RAPD	PCR z naključnim pomnoževanjem polimorfne DNA (angl. Randomly Amplified Polymorphic DNA)
PCR-RFLP	PCR s polimorfizmom dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism)
PCR-SSCP	PCR s polimorfizmom konformacij enojnih verig (angl. Single-Strand Conformation Polymorphism)
R	upornost
T	temperatura
TAE	tris/acetat/EDTA
TE	tris/EDTA
tris	tris(hidroksimetil)aminometan
V	volumen; napetost; volt

1. vaja: Preverjanje vrstne sestave mesnih izdelkov

Prehrana je pomemben del življenja vsakega posameznika. Živila predstavljajo tudi kulturno značilnost naroda. Od tega, kaj jemo in pijemo, je odvisno, kako se bomo počutili, kako zdravi bomo, celo to, če bomo dočakali visoko starost. Kakovostna živila so torej eden od pogojev zdravega življenja, skrb za njihovo kakovost pa bi morala biti pomemben element zdravstvene politike vsake družbe.

V današnjem času imamo kot potrošniki široko izbiro in od nas je odvisno, kakšne prehranske izdelke kupimo. Evropska unija je leta 1992 uzakonila označevanje izdelkov z deklaracijami, ki potrošnike informirajo o kakovosti in izvoru živil. Mnogi se danes odločajo za nakup lokalnih pridelkov in izdelkov, ker pustijo manjši ogljični odtis, imajo bolj tradicionalen okus in veljajo za bolj zdravo hrano. Lokalni pridelki imajo višjo hranilno vrednost, ker hitreje pridejo na police trgovin, hkrati pa je v EU sledljivo, na kakšen način je bila hrana, ali tudi krma, pridelana. Prav zato je zelo pomembno, da so prehranski izdelki v EU tudi geografsko zaščiteni. Živila višje kakovosti so dražja, zato jih proizvajalci pogosto zamenjajo s cenejšimi in hranilno revnejšimi. Menjava živil v izdelkih je zaradi možnih alergijskih reakcij ali okužb iz zdravstvenih razlogov lahko sporna. Znani so tudi primeri, da se v ponudbi pri gostincih znajde divjačina, ki izhaja iz krivolova, ali cenejše ribe, ki jih prodajajo kot prvovrstno belo ribo. Na kulturo prehranjevanja vpliva tudi versko prepričanje potrošnikov. Muslimani, budisti in hindujci iz prehrane izločajo določene vrste mesa.

Zaradi pomena posameznih živil za naše življenje so razvili standarde za preizkušanje njihovih lastnosti. Testiranja opravljajo proizvajalci ali predelovalci, pa tudi nadzorni organi, ki preverjajo, če kakovost izdelkov ustreza pravilnikom ter njihova sestava in izvor deklaraciji. Tudi v Sloveniji obstajajo natančni pravilniki o kakovosti živil in preverjanju kakovosti, ki jih izvajajo akreditirani laboratoriji. Prehranske izdelke analizirajo s fizikalnimi, kemijskimi, biokemijskimi ter mikrobiološkimi metodami in jim določijo tudi organoleptične lastnosti.

Vsebnost posameznih vrst mesa v živilih se določa z različnimi metodami: spektroskopijo, kromatografijo, imunološkimi metodami in metodami, ki temeljijo na analizi DNA. Metode morajo biti dovolj specifične in natančne, da je mogoča analiza tako surovega mesa kot procesiranih mesnih izdelkov, pri čemer mora biti mogoče zaznati tudi majhne količine določene vrste mesa. Enake količine mesa različnih živalskih vrst je lažje določiti, kot če je polovica mesnega izdelka po izvoru iz ene vrste (npr. svinjina), druga polovica pa iz druge (npr. govedina), vendar pri tem npr. svinjski delež predstavlja večinoma maščobo in vezivno

tkivo. Danes večina analiz poteka na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki je zelo specifična in hitra metoda. Najpogostejše tehnike za določanje sestave mesnih izdelkov so izpeljanke metode PCR: PCR-RAPD (naključno pomnoževanje polimorfne DNA), PCR-RFLP (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov), PCR-SSCP (polimorfizem konformacij enojnih verig) in PCR v realnem času.

Analize vsebnosti mesnih izdelkov temeljijo na osnovi ohranjenih zaporedij v jedrni in mitohondrijski DNA. Večinoma pomnožimo nukleotidno zaporedje delov mitohondrijske DNA, ker so geni prisotni v več kopijah na celico v primerjavi z jedrnimi geni, kjer sta največkrat prisotni le dve kopiji na celico. Najpogosteje analiziramo mitohondrijske gene za citokrom b, citokrom oksidazo I, rRNA 12 S in rRNA 16 S.

Izvedba vaje

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

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

Naprave in pribor:

- 1) termoblok;
- 2) mikrocentrifuga;
- 3) mikrocentrifugirke, 1,5 mL, 0,2 mL;
- 4) nastavljive avtomatske pipete;
- 5) PCR-aparatura.

Reagenti in sredstva:

Reagenti za točko a:

- 1) izopropanol;
- 2) 70-odstotni etanol;
- 3) komplet reagentov za izolacijo genomske DNA »Wizard Genomic DNA Purification Kit« proizvajalca Promega;
- 4) avtoklavirana dH₂O.

Reagenti za točko b:

- 1) reagenti za PCR in polimeraza *Taq* (Thermo Scientific, EP0402);
- 2) agaroz;
- 3) etidijev bromid;
- 4) pufer TAE;
- 5) 6-kratni nanašalni pufer za agrozno elektroforezo;
- 6) označevalec velikosti 100 bp;
- 7) avtoklavirana dH₂O.

a) Izolacija genomske DNA iz mesa

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

1. V 1,5-mL mikrocentrifugirko odpipetirajte 120 µL 0,5 M EDTA in 500 µL pufera za liziranje jeder (*Nuclei Lysis Solution*) in ohladite na ledu.
2. V novo mikrocentrifugirko dajte manjši košček mletega mesa (0,5 cm³) in dodajte 600 µL zgornje mešanice.
3. Dodajte še 17,5 µL proteinaze K s koncentracijo 20 mg/mL in inkubirajte prek noči pri 55 °C. Med tem večkrat dobro premešajte.

4. Dodajte 3 µL raztopine RNaze (konc. 4 mg/mL) in premešajte z 2–5-kratnim obračanjem mikrocentrifugirke. Raztopino inkubirajte 15 min pri 37 °C, nato vzorec še 5 min inkubirajte pri sobni temperaturi.
5. Vzorcju dodajte 200 µL pufera za obarjanje proteinov (*Protein Precipitation Solution*) in dobro premešajte z vibracijskim mešalnikom (20 s). Vzorec dajte na led za 5 min.
6. Nato centrifugirajte 4 min pri 13 000 g–16 000 g. Oborjeni proteini tvorijo belo oborino na dnu mikrocentrifugirke.
7. Previdno prenesite supernatant, ki vsebuje DNA, v mikrocentrifugirko, v katero ste predhodno odpipetirali 600 µL izopropanola (sobna T).
8. Z obračanjem mikrocentrifugirke nežno premešajte raztopino, da nastane nitasta oborina DNA.
9. Centrifugirajte 1 min pri sobni T, pri enaki hitrosti kot prej. DNA vidimo kot belo oborino, supernatant pa previdno odlijte ali odstranite s pipeto.

10. Dodajte 600 μL 70-odstotnega etanola (sobna T) in zopet nežno premešajte z obračanjem. S tem oborjeno DNA sperete, nato pa vzorec centrifugirajte 1 min.
11. S pipeto previdno odstranite raztopino, ker je usedlina le rahlo pritrjena na dno mikrocentrifugirke.
12. Obrnjeno mikrocentrifugirko za 3 min postavite na papirnate brisače, nato pa v termoblok na 37 °C, da se usedlina posuši.
13. Dodajte 100 μL rehidracijske raztopine (preverite, kaj je rehidracijska raztopina in kako vpliva na reakcijo PCR) in inkubirajte 1 h pri 65 °C, da se DNA rehidrira. DNA lahko tudi čez noč pustite pri 4 °C.
14. Izolirano genomsko DNA hranite pri 2 °C–8 °C ali pa jo takoj uporabite za PCR.

b) Določanje sestave mletega mesa z metodo PCR

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

- smerni oligonukleotid:

FOR: 5'-GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA

- protismerni oligonukleotidi za piščančje (PI), goveje (GO) in svinjsko (SV) meso:

PI: 5'-AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG

GO: 5'-CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG

SV: 5'-GCTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTA.

1. Reakcijsko mešanico za PCR lahko izjemoma pripravite pri sobni temperaturi, saj so vse sestavine temperaturno stabilne. V 0,2-mL mikrocentrifugirko odpipetirajte reagente iz spodnje tabele; pri tem encim vedno dodate na koncu (zakaj?).

Snov	Volumen v reakcijski mešanici	Končna koncentracija
genomska DNA	5 μL	0,1–1 μg
10 x pufer Taq s KCl	5 μL	1 \times
mešanica dNTP (vsak dNTP 2,5 mM)	4 μL	0,2 mM
25 mM MgCl ₂	3 μL	1,5 mM
začetni oligonukleotid FOR	5 μL	4 μM
začetni oligonukleotid PI	15 μL	4 μM
začetni oligonukleotid GO	3 μL	4 μM
začetni oligonukleotid SV	3 μL	4 μM
sterilna dH ₂ O (do 50 μL skupnega volumna)		
polimeraza Taq (konc. 0,5 U/ μL)	3 μL	

Eden od študentov naj pripravi pozitivno/e kontrolo/e, drugi študent pa negativno kontrolo PCR! Ugotovite, kaj morajo vsebovati ustrezne kontrole!

2. Reakcija PCR poteka v štirih korakih: začetna denaturacija DNA, sledi določeno število ciklov treh stopenj reakcije (denaturacija, prileganje in polimerizacija), dokončanje polimerizacije pri 72 °C in ohlajanje na 15 °C. Začetno denaturacijo DNA nekaj minut izvajamo pri vsaj 95 °C. Polimeraza *Taq* je dovolj robustna, da jo lahko dodamo v reakcijsko mešanico že na začetku in se pri višji temperaturi ne bo inaktivirala.

Pri drugih polimerazah preverite, kako obstojne so pri višji temperaturi – nekatere je zaradi manjše termične stabilnosti treba dodati šele po začetni denaturaciji. Prav tako preverite, pri kateri temperaturi je polimeraza najbolj aktivna. Nekateri encimi imajo temperaturni optimum pri nekoliko nižji temperaturi kot DNA-polimeraza *Taq*. Pri izbrani polimerazi vedno preverite, če ima oznako 'hot start', kar pomeni, da je nanjo vezan inhibitor. Taka polimeraza se aktivira šele pri visoki temperaturi (med začetno denaturacijo). Eksonukleazna aktivnost (npr. v smeri 3' proti 5', značilna za kontrolno branje) bi lahko delovala tudi na začetne oligonukleotide, zato encim dodajamo kot zadnjo sestavino reakcijske mešanice. Taka je na primer DNA-polimeraza Phusion, za katero proizvajalec navaja, da ima v odsotnosti dNTP eksonukleazno aktivnost na začetne oligonukleotide.

3. Na PCR-aparaturi nastavite program z naslednjimi koraki:

	Pogoji	Število ciklov
začetna denaturacija	95 °C, 5 min	1
denaturacija	95 °C, 30 s	35
prileganje	50 °C, 1 min	35
polimerizacija	72 °C, 30 s	35
končna polimerizacija	72 °C, 7 min	1
končna inkubacija	15 °C	∞

4. Produkta PCR bomo med seboj ločili z agarozno elektroforezo. Pripravite 1,8-odstoten agarozni gel z etidijevim bromidom (3 µL/100 mL gela). Po dogovoru z asistentom uporabite kadičko ustrezne velikosti in izberite primeren glavniček (število žepkov in debelina). Po končani reakciji PCR vzorcu dodajte 6-kratni nanašalni pufer. Na gel poleg vzorcev nanesite še pozitivno in negativno kontrolo ter označevalec velikosti (lestvica 100 bp). Elektroforeza naj poteka pri 100 mA, dokler prvo barvilo ne pripotuje do 2/3 gela. Gel si oglejte na transiluminatorju pri 310 nm.

Rezultati

Vzorec moje skupine je bil: _____. Opišite sliko elektroforeznega gela z obarvano DNA, ki jo boste dobili v spletni učilnici.

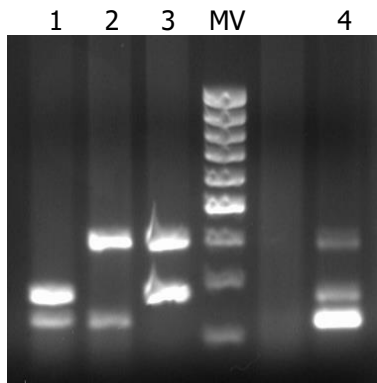
Slika gela in opis:

Kako veliki so fragmenti DNA, ki ste jih pomnožili na osnovi izolirane genomske DNA mletega mesa?

Katere vrste mesa so v vašem vzorcu in v vzorcih, ki so jih analizirali kolegi?

Vprašanja za ponavljanje in razmišljanje:

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



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

Viri:

Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Shibata K., Yamada J. in Shinmura Y.: A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*; 51(2): 143–148, 1999.

Farag Mayada Ragab, Alagawany Mahmoud, El-Hack Mohamed Ezzat Abd, Tiwari Ruchi in Dhama Kuldeep: Identification of different animal species in meat and meat products:trends and advances. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*; 3 (6): 334–346, 2015.

Spychaj Anita, Mozdziak Paul Edward in Pospiech Edward: PCR methods in meat species identification as a tool for the verification of regional and traditional meat products. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*; 8 (9): 5–20, 2009.

Girish P.S., Anjaneyulu A.S.R., Viswas K.N., Shivakumar B.M., Anand M.,Patel M. in Sharma B.: Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*; 70: 107–112, 2005.

Foong Chow Ming in Sani Norrakiah Abdullah: Identifying of meat species using polymerase chain reaction (PCR). *AIP Conference Proceedings* 1571: 680–686; 2013, <https://doi.org/10.1063/1.4858733>.

2. vaja: Določanje prisotnosti gensko spremenjenih organizmov v hrani

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

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

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

Nasprotniki GSO menijo, da gensko spremenjena hrana pomeni grožnjo za okolje in zdravje ljudi. Poleg tega nekatere moti, da večino svetovnega trga z gensko spremenjenimi semeni obvladuje le nekaj podjetij. Grožnja za okolje naj bi predstavljalo siromašenje rastlinskih vrst (manj plevelov), kar posledično lahko vpliva na ožjenje spektra žuželk, ki so navezane na te plevelce. Po drugi strani pa bi bakterijski toksin lahko deloval tudi na druge žuželke, ne samo na tiste, proti katerim je v prvi vrsti usmerjen. Gensko spremenjena hrana vsebuje nove antigene, proti katerim bi lahko ljudje razvili imunski odziv. Tudi zaužitje DNA, ki po svojem

izvoru ni rastlinska, se zdi nekaterim problematično. Površina kmetijskih zemljišč, ki so posejana z GS poljščinami, še vedno narašča. Nekateri menijo, da se potrošniki vse bolj negativno odzivajo na GSO, kar bo privedlo do usihanja pridelave gensko spremenjenih rastlin, vendar trenutni trendi tega še ne kažejo.

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

Evropski parlament in Evropski svet sta septembra 2003 sprejela uredbo 1829/2003, ki med drugim določa, da je treba ustrezno označiti vse izdelke, ki vsebujejo več kot 0,9 % GSO (predpis je treba izvajati od 18. 4. 2004 naprej). Za izdelke, ki vsebujejo več kot 0,9 % gensko spremenjenih sestavin, je treba pridobiti dovoljenje za dajanje na trg in jih ustrezno označiti. Vendar do danes na slovenskem trgu še ni izdelka, ki bi imel tako oznako. Občasna testiranja so pokazala, da tudi v resnici GSO le v zelo redkih primerih najdemo v izdelkih na naših tržnih policah. Proizvajalci prehrabnih izdelkov od dobaviteljev surovin zahtevajo certifikat o ustreznosti, uvozniki hrane pa večinoma skrbijo, da hrano, za katero ne morejo pridobiti ustreznega potrdila, predhodno testirajo. V Sloveniji sta dve akreditirani ustanovi, ki opravljata tovrstne analize, to sta Nacionalni inštitut za biologijo (NIB) in Kmetijski inštitut Slovenije (KIS).

Vsebnost GSO lahko preverjamo na več načinov. Specifične antigene lahko določamo z imunološkimi testi. Zaradi visoke občutljivosti metode pa večina postopkov temelji na PCR. Na ta način lahko preverjamo prisotnost posameznih značilnih komponent rastlinskih ekspresijskih sistemov. Med temi so na primer močni promotor CaMV 35S (CaMV = virus mozaika cvetače, angl. *cauliflower mosaic virus*) ali deli zapisa za insekticid iz talne bakterije *Bacillus thuringiensis* (Bt). Običajno hkrati z reakcijo, s katero dokazujemo prisotnost zaporedja DNA, ki je značilno za transgenske organizme (tako imenujemo večcelične evkariontske GSO z v genom vključenim tujim genom), pomnožujemo tudi del genomske DNA, ki vsebuje vrstno-specifična zaporedja. Tako bi na primer pri testiranju koruznih kosmičev pomnoževali segment, ki nosi zapis za Bt, hkrati pa del gena za zein, ki je značilen samo za koruzo. S tem bi preverili, ali je reakcija PCR sploh potekla, kar je še posebej pomembno v primerih, ko ne moremo dokazati prisotnosti produkta, ki bi kazal na gensko spreminjanje. Pomembno je, da sta

produkta pri takem hkratnem pomnoževanju različno dolga, da lahko po elektroforezni ločitvi produktov ugotovimo, katera območja genoma so se v resnici pomnožila.

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

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

Pri sojinem mleku boste preverjali tri vzorce: prvi je iz ZDA, kjer je verjetnost, da v trgovini kupite gensko spremenjeno hrano, največja (vzorec mA). Vendar na izdelku ni pisalo, da je pripravljen iz gensko spremenjenih rastlin, soja pa je bila ekološko pridelana. Drugi vzorec je bil izdelan iz kanadske soje v Maleziji (vzorec mM). Tretji vzorec je bil kupljen v eni od ljubljanskih veleblagovnic; na njem je pisalo, da je bila soja 'ekološko pridelana' (vzorec mE).

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

Kaže, da je postopek priprave tak, kot je značilen za japonske sojine omake. Te so fermentirane po daljšem postopku in so zaradi večje vsebnosti žit pogosto slajše v primerjavi s kitajskimi.

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

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

Izvedba vaje

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

Naprave in pribor:

- 1) vodna kopel 65 °C in 95 °C;
- 2) mikrocentrifuga;
- 3) mikrocentrifugirke, 1,5 mL, 0,2 mL;
- 4) nastavljive avtomatske pipete;
- 5) spektrofotometer z možnostjo analize UV-spektrov.

Reagenti

Reagenti za točko a:

- 1) absolutni etanol;
- 2) 70-odstotni etanol;
- 3) kloroform;
- 4) izopropanol;
- 5) pufer s CTAB (2 % cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB), 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA): za 100 mL potrebujete 2 g CTAB, 8,2 g NaCl, 1,58 g Tris/HCl in 0,75 g Na₂EDTA, dodajte 70 mL deionizirane vode, nastavite pH z 1 M NaOH in dopolnite do 100 mL z vodo; avtoklavirajte;
- 6) obarjalna raztopina (0,5 % CTAB, 40 mM NaCl): za 100 mL v vodi raztopite 0,5 g CTAB in 0,25 g NaCl in nastavite pH na 8,0 z 1 M NaOH; avtoklavirajte;
- 7) 1,2 M NaCl (7 g NaCl v 100 mL deionizirane vode; avtoklavirajte);
- 8) 3 M Na-acetat, pH 4,8;
- 9) reagenti za PCR in polimeraza *Taq* (Thermo Scientific, EP0402);
- 10) avtoklavirana dH₂O.

Reagenti za točko b:

- 1) absolutni etanol;
- 2) 70-odstotni etanol;
- 3) kloroform : izoamilalkohol (24 : 1);
- 4) izopropanol;
- 5) 25 mM NaOH;
- 6) 1 M Tris/HCl pH 7,0 (avtoklavirajte);
- 7) avtoklavirana dH₂O.

Reagenti za točko c:

- 1) agarna plošča z etidijevim bromidom;
- 2) DNA z znano koncentracijo.

Reagenti za točko d:

- 1) reagenti za PCR in polimeraza *Taq* (Thermo Scientific, EP0402);
- 2) avtoklavirana dH₂O.

Reagenti za točko e:

- 1) agaroz;
- 2) etidijev bromid;
- 3) pufer TAE;
- 4) 6-kratni nanašalni pufer za agrozno elektroforezo;
- 5) označevalec velikosti 100 bp.

a) Izolacija genomske DNA iz sojinega mleka

1. V 2 mikrocentrifugirki odpipetirajte po 100 µL sojinega mleka (zapišite si oznako vzorca za kasnejšo interpretacijo rezultatov).
2. Dodajte 500 µL pufra s CTAB in premešajte.
3. Inkubirajte 30 min v vodni kopeli pri 65 °C.
4. Centrifugirajte 8 min pri 15 000 g.
5. V svežo mikrocentrifugirko odpipetirajte 500 µL kloroforma in mu po centrifugiranju dodajte supernatant. *Pazite na kompakten flotant!*
6. Stresajte 30 s.
7. Centrifugirajte 5 min pri 15 000 g.
8. Zgornji (vodni) sloj prenesite v svežo centrifugirko in dodajte dvojni volumen (2 V) obarjalne raztopine. Premešajte s pipetiranjem.
9. Inkubirajte vsaj 60 min pri sobni T (ali več dni pri 4 °C).
-
10. Centrifugirajte 5 min pri 15 000 g.
11. Supernatant zavržite, usedlino pa raztopite v 175 µL raztopine NaCl (1,2 M) in raztopini iz obeh mikrocentrifugirk združite v eno samo.
12. Dodajte 350 µL kloroforma in stresajte 30 s.
13. Centrifugirajte 8 min pri 15 000 g.
14. Zgornji (vodni) sloj prenesite v svežo mikrocentrifugirko.
15. Dodajte 0,6 V izopropanola in dobro pretresite.
16. Centrifugirajte 8 min pri 15 000 g.
17. Odstranite supernatant (organsko fazo), usedlini pa dodajte 500 µL 70-odstotnega etanola.
18. Previdno stresajte, nato pa centrifugirajte 8 min pri 15 000 g.

- Supernatant zavržite (odpipetirajte do zadnjega μL), usedlino posušite v vakuumskem koncentradorju (2 min pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- DNA raztopite v $35\text{ }\mu\text{L}$ sterilne deionizirane vode.

b) Izolacija genomske DNA iz sojine omake

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

c) Določanje vsebnosti DNA v preparatu

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

Zaradi majhne koncentracije DNA v vzorcu spektrofotometrično določanje koncentracije ni izvedljivo, zato bomo določili koncentracijo semikvantitativno prek fluorescence vzorca na agarozni plošči z etidijevim bromidom. Na ploščo bomo na rob nanесли po $2\text{ }\mu\text{L}$ standardnih raztopin ($2\text{ }\mu\text{L}$ naj vsebujeta 2 ng , 4 ng , 8 ng , 16 ng , 32 ng , 64 ng in 128 ng DNA), v sredino pa $2\text{ }\mu\text{L}$ DNA, izolirane iz sojinih izdelkov. Po 20 min na transiluminatorju pri 312 nm primerjamo intenziteto lis in ocenimo, koliko DNA vsebuje naš vzorec.

d) Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR boste izvedli v dveh ločenih reakcijah: pomnožili boste del zapisa za sojin lektin in del vstavljenega promotorja E35S. Za posamezno reakcijo potrebujemo 50 ng – 100 ng DNA iz sojinih izdelkov (pričakujemo, da boste to količino imeli v največ $10\text{ }\mu\text{L}$ vzorca). Pripravimo reakcijo v skupnem volumnu $50\text{ }\mu\text{L}$:

Snov	PCR-L [μ L]	PCR-P [μ L]
vzorec (genomska DNA, 0,1–1 μ g)	x	x
10 x pufer za polimerazo <i>Taq</i> s KCl	5 μ L	5 μ L
25 mM MgCl ₂ (končna konc. 1,5 mM)	3 μ L	3 μ L
mešanica dNTP (vsak dNTP 2,5 mM)	4 μ L	4 μ L
začetni oligonukleotid GM01 (lektin) (končna konc. 0,2 μ M)	3 μ L	–
začetni oligonukl. GM02 (lektin/reverzni) (končna konc. 0,2 μ M)	3 μ L	–
začetni oligonukleotid GM05 (promotor) (končna konc. 0,2 μ M)	–	3 μ L
začetni oligonukl. GM06 (prom./reverzni) (končna konc. 0,2 μ M)	–	3 μ L
sterilna dH ₂ O (do 50 μ L skupnega volumna)		
polimeraza <i>Taq</i> (konc. 0,5 U/ μ L)	3 μ L	3 μ L

Na PCR-aparaturi nastavite program z naslednjimi koraki:

	PCR-L	PCR-P	Število ciklov
denaturacija	95 °C, 5 min	95 °C, 5 min	1
denaturacija	95 °C, 30 s	95 °C, 30 s	40
prileganje	57 °C, 30 s	62 °C, 30 s	40
polimerizacija	72 °C, 30 s	72 °C, 30 s	40
končna polimerizacija	72 °C, 7 min	72 °C, 7 min	1
končna inkubacija	15 °C	15 °C	

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

e) Elektroforezna analiza produktov PCR

Pripravimo 1,8-odstotni agarozni gel z etidijevim bromidom v pufru TAE (velikost kadičke, velikost in debelina glavnička). Reakcijski zmesi dodajte 6-kratni nanašalni pufer in vzorce nanesite na agarozni gel.

Če je volumen po končanem pomnoževanju prevelik, reakcijsko zmes oborite z dodatkom 0,1 V 3 M Na-acetata in 2,5 V etanola. Premešajte in 10 min centrifugirajte pri polnih obratih. Supernatant zavržite, oborino pa sperite s 50 μ L 70-odstotnega etanola. Centrifugirajte 3 min pri polnih obratih (> 14 000 g). Kvantitativno odstranite supernatant, oborino pa posušite v vakuumskem koncentradorju. Posušeni oborini dodajte 10 μ L pufru TE in 2 μ L nanašalnega pufru ter nanesite na agarozni gel.

Elektroforeza naj teče pri 80 V, dokler bromfenolmodro ne pripotuje do 2/3 dolžine gela. Na transiluminatorju detektirajte produkte PCR; če je potrebno, DNA še enkrat pobarvajte z etidijevim bromidom.

Rezultati

Vzorec naše skupine je bil označen s črko ____.

Iz 100 μL sojinega izdelka smo izolirali _____ ng genomske DNA.

Koncentracija je torej _____ ng/ μL .

Elektroforezno ločitev pomnoženih produktov predstavite s kopijo elektroferograma.

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

Če ste določili absorpcijski spekter, priložite kopijo izpisa!

Vprašanja za ponavljanje in razmišljanje:

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

Viri:

Rolf Meyer in Etienne Jaccaud: Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant soybeans. *Proceedings of Euro Food Chem IX Conference*, 24. –26. september 1997, Interlaken, Švica, Vol. 1, Swiss Society of Food and Environmental Chemistry, str. 23–28.

Yoshiteru Kakihara, Hiroshi Matsufuji, Makoto Chino, Mitsuharu Takeda: Extraction and detection of endogenous soybean DNA from fermented foods, *Food Control* 17: 808–813 (2006).

Markus Lipp, Anke Bluth, Fabrice Eyquem, Lothar Kruse, Heinz Schimmel, Guy Van den Eede, Elke Anklam: Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research and Technology* 212: 497–504 (2001).

3. vaja: Transformacija cianobakterij

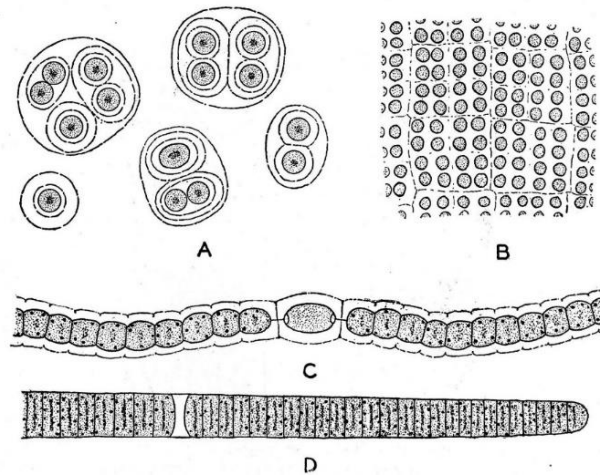
Cianobakterije so edini prokarionti, ki organsko snov lahko sintetizirajo s fotosintezo. To pomeni, da za svojo rast kot (običajno edini) vir ogljika uporabljajo CO₂, ki predstavlja okoljski problem. Edini pogoj je, da so celice izpostavljene sončni svetlobi in da sestava gojišča omogoča njihovo nemoteno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

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

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

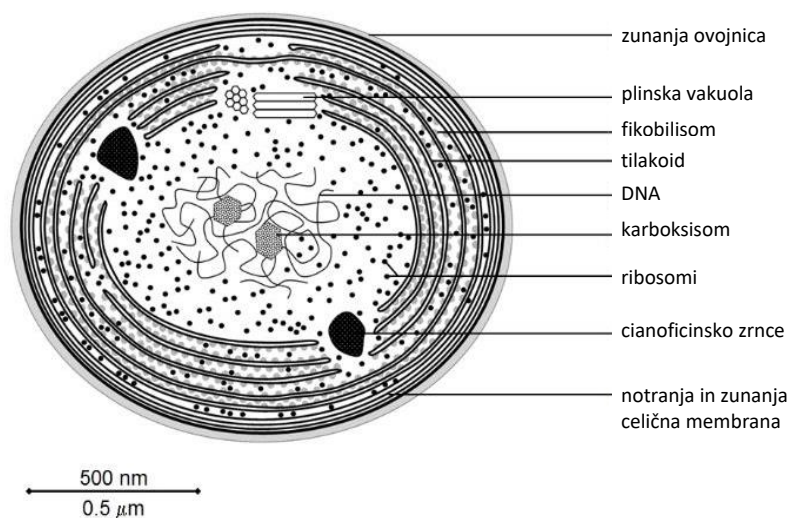
Življenjski prostor cianobakterij so predvsem sladke in slane vode, najdemo pa jih tudi na kopnem in v zgornji plasti zemlje. Zasedajo torej zelo raznolike ekološke niše. Znani okoljski pojav 'cvetenja' je najpogosteje posledica prekomerne rasti cianobakterij, ki lahko prekrijejo površino celih jezer,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

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



Slika 3.1: Nekateri tipi rasti cianobakterij. A in B: celice v skupnih ovojih; C in D: nitasta oblika. Klasična enocelična oblika je predstavljena levo spodaj med oblikami A. Vir: Haupt, Plant Morphology, McGraw-Hill, 1953.

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



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

Ekologi, limnologi (raziskovalci celinskih vod), oceanologi in fikologi (raziskovalci alg) iz okoljskih vzorcev izolirajo čiste kulture. Zanje pravijo, da so 'aksenične', torej ne vsebujejo drugih sevov ali vrst in omogočajo preučevanje samo tega organizma. Aksenične kulture vzdržujejo v svojih laboratorijih, ali pa jih v hrambo predajo mikrobiološkim zbirkam. Ena od teh, ki je specializirana za hrambo cianobakterij, je na Pasteurjevem inštitutu v Parizu. Vsi sevi, ki jih tam hranijo, imajo kataloško oznako, ki se začne s kratico PCC. Sledijo številke: prvi dve označujeta leto, ko je sev prispel v zbirko (npr. sev PCC 7812 so pridobili leta 1978), sledijo zaporedne številke pridobljenih sevov v tistem letu. Enak sev v drugi zbirki ima lahko drugačno oznako.

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

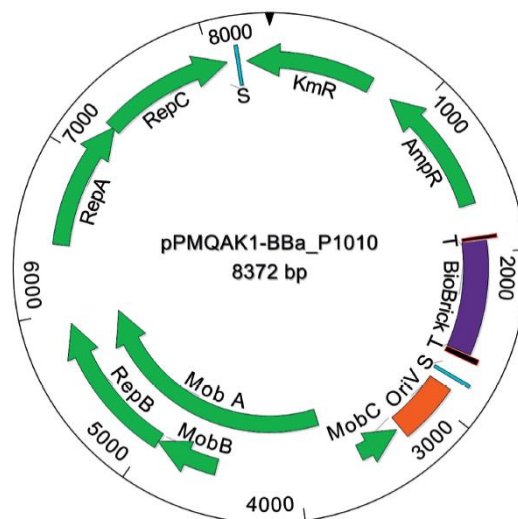
Cianobakterija PCC 6803 je modelna enocelična gramnegativna cianobakterija, ker je dokaj robustna (neobčutljiva za zmerna nihanja v pogojih gojenja) in naravno kompetentna za transformacijo. Bila je prvi fototrofni organizem, ki so mu določili genomsko zaporedje (1996). Njen krožni kromosom obsega 3 573 470 bp in je v celici prisoten v približno 20 identičnih kopijah. Poleg tega celice vsebujejo še 7 različnih plazmidov, velikih od 2,4 kb do 106 kb, vsakega v približno 10–20 kopijah. Genom zapisuje za okrog 3200 proteinov, od tega za skoraj tretjino ne vemo, kakšna je funkcija njihovih proteinskih produktov, čeprav je to eden najboljše preiskanih mikroorganizmov na Zemlji.

Gojenje cianobakterij je dokaj zamuden proces, delo z njimi pa zahteva natančnost, saj ne sme priti do okužb. Te bi se zelo hitro pokazale, saj cianobakterije rastejo počasneje od drugih bakterij, tudi od številnih alg in gliv. *Synechocystis sp.* PCC 6803 optimalno raste pri temperaturi 30 °C in visoki osvetljenosti. V našem laboratoriju uporabljamo 24-urno osvetljenost, v nekaterih drugih laboratorijih pa primerljivo rast opažajo tudi v pogojih, ko simulirajo dnevno-nočni cikel (običajno je obdobje teme 8 ur). Gojišče je raztopina različnih soli v zelo natančno določenih koncentracijah. Za hitrejše delo lahko kupimo koncentrat, ki ga pred uporabo redčimo 50-krat. Za pripravo plošč v vodi avtoklaviramo agar in dodamo ustrezen volumen koncentriranega gojišča BG-11. Dodatno uporabimo Na-tiosulfat, ki veže inhibitorne

snovi v agarju, in HEPES (4-(2-hidriksietil)piperazin-1-etansulfonska kislina) kot pufer. Če pripravljamo plošče z antibiotikom, tega dodamo, ko se gojišče ohladi pod 60 °C.

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

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



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

Elektroporacija je fizikalni način vnosa DNA v celice. Uporaben je z različnimi tipi celic, pogoji za izvedbo pa se razlikujejo glede na lastnosti celic in njihovih membran. Proizvajalci elektroporatorjev so nekatere protokole že zbrali v navodilih za uporabo, lahko pa jih prevzamemo tudi iz znanstvene literature. Tehnika temelji na permeabilizaciji celičnih membran pod vplivom visokonapetostnih električnih impulzov, ki povzročijo prehodni nastanek lukenj v celični ovojnici. DNA, ki je negativno nabita, pri tem iz raztopine potuje v smeri proti pozitivni elektrodi, zaradi velike gostote celic pa se lahko znajde znotraj njih. Za elektroporacijo je ključno, da so celice dobro sprane s tekočino, ki ne vsebuje elektrolitov. Običajno uporabimo sorbitol; pri cianobakterijah je to lahko sterilna deionizirana voda. Po elektroporaciji cianobakterije najprej regeneriramo v tekočem gojišču brez selekcijskega pritiska, kasneje pa jih prenesemo na trdno selekcijsko gojišče.

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

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

Izvedba vaje

Za en poskus potrebujete približno 5×10^7 celic *Synechocystis sp.* PCC 6803. Vse faze opravljajte na ledu, če ni drugače navedeno. Centrifugirajte vsakič 10 min pri 4 °C in 4500 g.

Protokol za elektroporacijo je prevzet iz Laboratorija za proteomiko in nanobiotehnologijo Kraljeve tehniške visoke šole v Stockholmu. Protokol za spontano transformacijo je iz članka JFG Williamsa (1988).

Naprave in pribor:

- 1) vodna kopel; 65 °C in 95 °C;
- 2) mikrocentrifuga;
- 3) mikrocentrifugirke, 1,5 mL, 0,2 mL;
- 4) nastavljive avtomatske pipete;
- 5) spektrofotometer z možnostjo analize UV-spektrov;

- 6) osvetljeni inkubator za 30 °C;
- 7) elektoporacijska naprava Gene Pulser XCell.

Reagenti:

Reagent za točko a:

- 1) gojišče BG-11.

Reagenti za točko b:

- 1) kultura cianobakterij v gojišču BG-11;
- 2) gojišče BG-11.

Reagenti za točko c:

- 1) ledenomrzla sterilna dH₂O;
- 2) vektor pPMQAK1;
- 3) gojišče BG-11;
- 4) led.

Reagenti za točko d:

- 1) trdno gojišče BG-11 z nizko koncentracijo kanamicina (12,5 µg/mL);
- 2) trdno gojišče BG-11 s povečano koncentracijo kanamicina (25 µg/mL).

Reagenti za točko e:

- 1) vektor pPMQAK1; ledenomrzla sterilna dH₂O;
- 2) kultura cianobakterij v gojišču BG-11;
- 3) gojišče BG-11;
- 4) led;
- 5) trdno gojišče BG-11 z nizko koncentracijo kanamicina (12,5 µg/mL);
- 6) trdno gojišče BG-11 s povečano koncentracijo kanamicina (25 µg/mL).

a) Priprava gojišč

Pripravite po 200 mL gojišča BG-11 za gojenje in precepljanje kulture.

b) Predpriprava cianobakterij za elektoporacijo in spontano transformacijo

(izvede tehnik ali asistent)

Z gojenjem cianobakterij v tekočem gojišču BG-11 začnite vsaj 2 tedna pred poskusom in spremljajte celično rast z merjenjem absorbanca pri 730 nm proti vodi (BG-11 ne absorbira v tem območju). Če je potrebno, celice precepljajte tako, da bo na dan poskusa njihova $A_{730} = 0,3-0,5$. Celice gojimo osvetljene v inkubatorju pri 30 °C.

c) Spiranje celic in elektoporacija

1. Če je $A_{730}=0,5$, odcentrifugirajte celice iz 1 mL kulture, če je $A=0,3$, pa iz 2 mL. Za vmesne vrednosti absorbanca upoštevajte, da je odvisnost linearna. Po centrifugiranju celice prenesite na led in odpipetirajte supernatant.

2. Celice resuspendirajte v 800 μL ledenomrzle sterilne deionizirane vode.
3. Odcentrifugirajte celice in jih resuspendirajte v 400 μL ledenomrzle sterilne deionizirane vode.
4. Odcentrifugirajte celice in jih resuspendirajte v 40 μL ledenomrzle sterilne deionizirane vode (gostota celic naj bi bila 10^9 /mL), v katero ste predhodno dodali 1 μg vektorja pPMQAK1. Vektor je raztopljen v dH_2O .
5. Vzorec postavite na led za 3 min.
6. Kiveto za elektroporacije z razmikom elektrod 2 mm ohladite na ledu in vanjo prenesite vzorec.
7. Kiveto nato vstavite v elektroporacijsko napravo (Gene Pulser XCell) in pritisnete na rdeč gumb, ki ga držite do zvočnega signala aparature. Pogoji za elektroporacijo so (nastavi asistent):

napetost:	$V = 2,5 \text{ kV}$
kapacitivnost:	$C = 25 \mu\text{F}$
upornost:	$R = 200 \Omega$
trajanje pulza:	$t = 5 \text{ ms}$

8. Takoj po elektroporaciji (v roku 10 s) v kiveto previdno dodajte 1 mL gojišča BG-11.
9. Celoten volumen raztopine sterilno prenesite v erlenmajerico, ki vsebuje 4 mL BG-11 (pipetirajte počasi!).
10. Inkubirajte 24 h pri običajnih rastnih pogojih.

d) Nacep na selekcijsko gojišče

1. Celoten vzorec enakomerno prelijete na trdno gojišče BG-11, ki vsebuje nizko koncentracijo kanamicina (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Odvečna tekočina bo počasi (po približno 1 tednu) izhlapela.
2. Ko kolonije zrastejo do ustrezne velikosti, jih precepate na trdno gojišče BG-11 s povečano koncentracijo antibiotika (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

e) Spontana transformacija

1. Izračunajte volumen raztopine vektorja za 2 μg vektorja pPMQAK1.
2. Optimalna začetna absorbanca kulture cianobakterij je $A_{730}=0,5-1$. Če je $A_{730}=0,5$, odcentrifugirajte celice iz 2 mL kulture, če je $A=1$, pa iz 1 mL. Za vmesne vrednosti absorbancc upoštevajte, da je odvisnost linearna.
3. Po centrifugiranju celice prenesite na led in odstranite supernatant.

4. Resuspendirajte celice v 200 μ L gojišča BG-11 in jih hranite na ledu.
5. K ustreznemu volumnu celic (izračunajte) takoj dodajte 2 μ g vektorja (končna koncentracija vektorja v celicah naj bo 10 μ g/mL).
6. Inkubirajte 4 h pri standardnih rastnih pogojih za PCC 6803.
7. Dodajte 900 μ L gojišča BG-11 in vse skupaj prenesite v erlenmajerico, ki vsebuje 4 mL BG-11 (pipetirajte počasi!).
8. Inkubirajte 24 h pri običajnih rastnih pogojih.
9. Kulturo nacepite na selekcijsko gojišče (točka d).

Rezultati:

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

Skupina	Število kolonij	Učinkovitost transformacije (cfu/pmol)
1		
2		
3		
4		
5		
kontrola		

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

Skupina	Število kolonij	Učinkovitost transformacije (cfu/pmol)
1		
2		
3		
4		
5		
kontrola		

Komentar:

Vprašanja za ponavljanje in razmišljanje:

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

Vira:

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

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