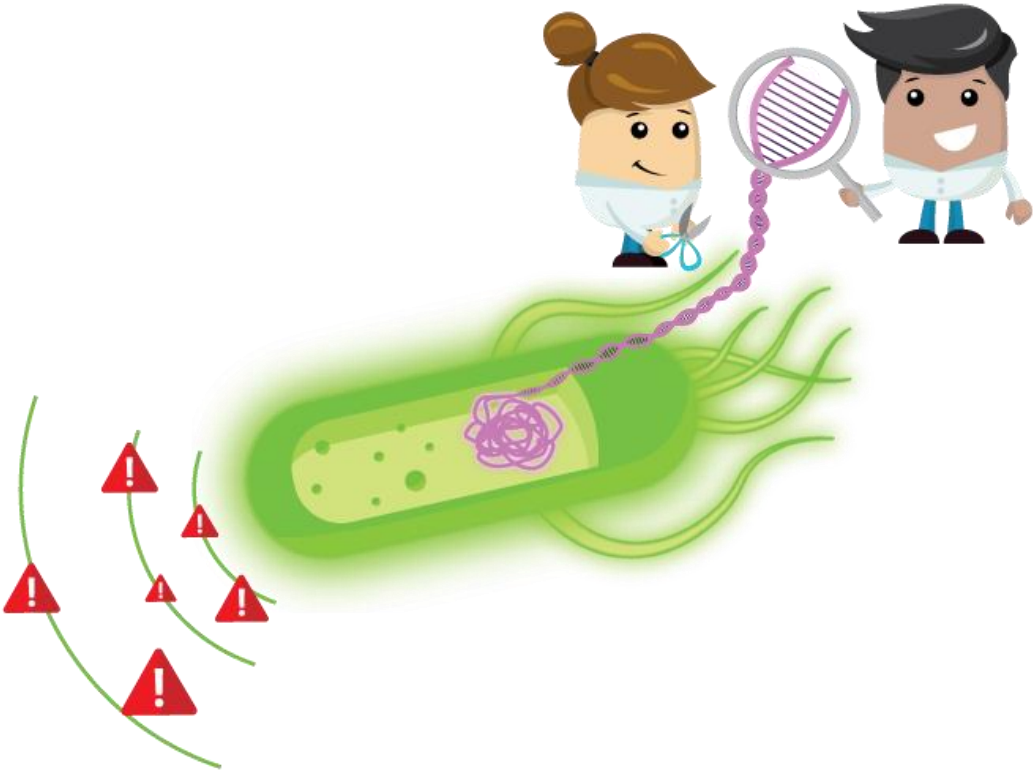
Biotech Academy

Teorikompendium

Camp 2020



Pelle Degnegaard Knudsen og Line Eliasson
d. 10. oktober til d. 17. oktober

Indholdsfortegnelse

1.1 Biotech Academy Camp 2020 2
2.1.1 Det genetiske udtryk 3
DNA – Livets molekyle 3
RNA – Det alsidige molekyle 4
Proteiner – Cellens håndlangere 4
2.1.1 Det Centrale Dogme 4
2.1.2 DNA Replikation i bakterier 5
2.1.3 Transskription: Fra DNA til RNA 7
Initiering 7
Elongering 8
Terminering 8
2.1.4 Translation: Fra mRNA til polypeptid 9
Initiering 10
Elongering 10
Terminering 10
2.2 Biosensorer 10
Biosensoren til Biotech Academy Camp 2020 12
2.3.1 Plasmid 14
2.3.2 Restriktionsenzymer 15
2.4.1 Polymerase Chain Reaction (PCR) 16
2.4.2 Extension PCR (ePCR) 19
2.5 Gelelektroforese 19
2.6 USER-kloning 21
Et korrekt lineariseret plasmid 21
Korrekte haler på det indsatte DNA-fragment 22
2.7 Kompetente celler 23
2.8 Vækstmedie 24
2.9 Markørassisteret selektion (MAS) 24
Litteraturliste: 26

1.1 Biotech Academy Camp 2020

Velkommen til Biotech Academy Camp 2020. Dette teorikompendium vil hjælpe dig med at forstå al den teori, der ligger bag det praktiske arbejde, som vi kommer til at lave i løbet af campens forløb.

I år vil Biotech Academy Camp sætte fokus på syntesebiologi. Syntesebiologi er én af de biologiske discipliner, der beskæftiger sig med re-design af mikroorganismers genom ved hjælp af genteknologi/genmanipulering, for at give organismerne nye fordelagtige færdigheder. Ved at manipulere DNA og kombinere genetiske elementer fra forskellige organismer kan man skabe nye biologiske maskiner, der kan hjælpe med at finde løsninger på komplekse problemer såsom: forurening, produktion af fremtidens råstoffer, detektion af sygdomme, udvikling af ny medicin samt alternativer til antibiotika og meget mere. På den måde kan syntesebiologi bidrage til at løse FN's verdensmål. Syntesebiologi havde sin start for omkring 50 år siden, men vi er først lige begyndt at kunne udnytte syntesebiologiske redskaber til at re-designe organismer inden for de seneste 20 år. Grunden til at syntesebiologi først lige er begyndt at blive interessant er på grund af udviklingen af nye genteknologiske redskaber såsom restriktions enzymer, PCR, USER-kloning samt CRISPR-systemer [1]. I forbindelse med denne nye udvikling er der sket en markant fremdrift med hensyn til mulighederne inden for syntesebiologi. Du vil gennem campens forløb blive kendt med nogle af forskellige teknologier, der ligger bag syntesebiologiens fremdrift.

Én af disse biologiske maskiner, der er skabt ved hjælp af syntesebiologi, er en biosensor. En biosensor kan være mange ting. Dette kan være en mekaniske sensor, der kan detektere tilstedeværelse af biologisk materiale i en prøve. I vores tilfælde er en biosensor en organisme, der kan mærke tilstedeværelsen af et bestemt stof og udsende et målbart signal. Vi kommer til at tale mere om biosensorer under teoriafsnittet.

Kompendiet er opdelt tre dele: vi starter med introduktionen, derefter vil der være et gennemgående teoretisk afsnit, hvor du vil blive introduceret til teorien bag campens emne, samt danne overblik over de bioteknologiske redskaber, som vi kommer til at bruge. Hvis du er ekstranysgerrig, kan du bagerst i teorikompendiet se en litteraturliste, hvor du kan læse artikler, der har relevans for campens emne. Artiklerne refererer vi løbende til i kompendiet. Forskellige steder i dette kompendie vil der også blive henvist til biostribens videoer. Biostriben er en del af Biotech Academys hjemmeside, der har en masse gode videoer om de emner, der bliver gennemgået i kompendiet. Vi anbefaler, at du ser disse videoer som en del af teorien.

God læsning!

Hilsen Pelle og Line

VILLUM FONDEN

Carlsberg Mindelegat

novozymes Rethink Tomorrow

Pearson

2.1.1 Det genetiske udtryk

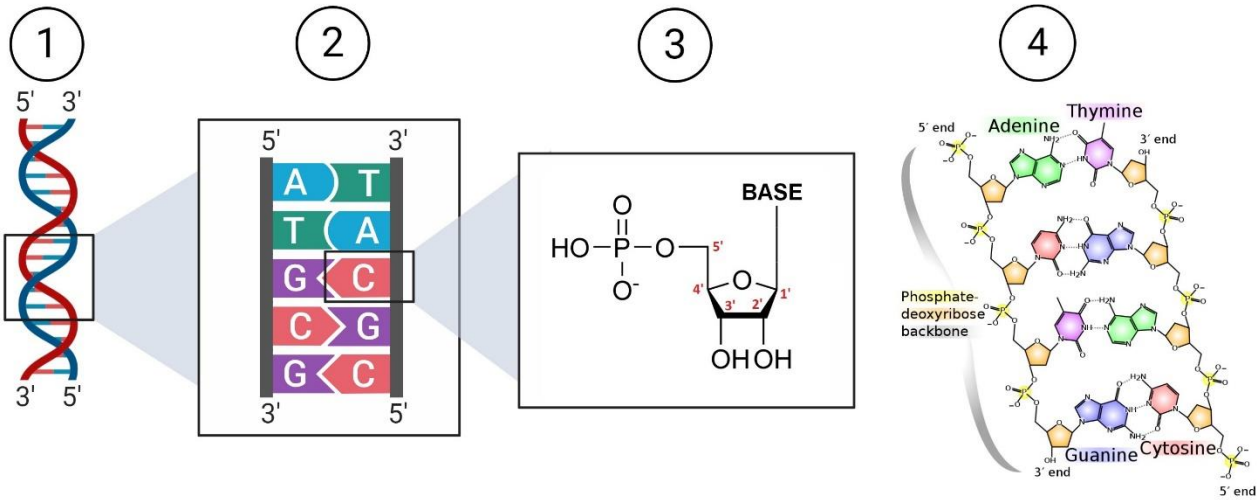
For at kunne forstå teorien bag syntesebiologi og biosensorer skal du have en fundamental forståelse for DNA, RNA og proteiner, da disse tre komponenter vil være inkorporeret overalt i teorikompendiets mange emner.

DNA – Livets molekyle

DNA er et molekyle, der bærer genetiske instruktioner til udvikling, funktion, vækst og reproduktion af alle kendte organismer og mange vira. DNA står for deoxyribonukleinsyre og består oftest af to DNA-strenge. Hver DNA-streng består af en masse **nukleotider**, der er kovalent bundet sammen. Et nukleotid består af en fosfatgruppe, et pentosesukkermolekyle (deoxyribose) samt en nitrogenholdig base. I DNA findes der fire forskellige baser; **cytosin** (C), **guanin** (G), **adenin** (A) og **thymin** (T).

Grundet DNA-strengens opbygning, har DNA-strengen også en retning. Det vil sige, at DNA-strengen har to ender, der adskiller sig fra hinanden. Disse to ender kaldes for henholdsvis **5'-enden** og **3'-enden** (se figur 1.4). 5'-enden bliver ofte beskrevet som DNA-strengens begyndelse, hvor det første nukleotid har en fosfatgruppen, som stikker ud fra pentosesukkerets 5. carbon atom. I modsætning til 5' –enden bliver 3'-enden kaldt for DNA-strengens afslutning. Her har det sidste nukleotid i DNA-strengen en hydroxylgruppe (--OH-gruppe) fra pentosesukkerets 3. carbon atom, der bliver eksponeret (figur 1.3). Når nye nukleotider skal tilføjes til DNA-strengen, vil det indgående nukleotid danne en binding mellem dens 5'-fosfat til DNA-strengens 3'-hydroxylgruppe. Dermed vokser strengen fra sin 5'-ende mod sin 3'-ende.

De to DNA-strenge er snoet omkring hinanden og danner en struktur, der minder om en snoet stige. Denne struktur kaldes for en **dobbelthelix**. På ydersiden af dobbelthelixen sidder DNA-strengenes fosfatgrupper og sukkermolekyler. Dette kaldes også for DNA'ets **backbone**. De fire forskellige typer baser findes på indersiden af helixen. De sørger for, at de to kæder sidder sammen, da baserne danner par med hinanden via hydrogenbindinger (figur 1.2, 1.4).



Figur 1: DNAs opbygning (1) Doblet strenget DNA helix der er opbygget af (2) komplimentærer nukleobaser. (3) Nukleobaser består af en sukkerdel en fosfor del og en nitrogenholdig base. Der er 5 carbon atomer i vores sukker, navngivet 1'-5', det er ud fra disse carbon atomer, vi navngiver enderne på vores DNA-kæde. (4) DNA's kemiske opbygning med nukleobaser, sukker og den negativt ladet fosfor samt DNA's 5' og 3' ender. Hentet fra Wikipedia (Madeleine Price Ball).

De fire forskellige baser laver en specifik pardannelse med hinanden. Cytosin (C) danner par med guanin (G), og adenin (A) danner par med thymin (T) (figur 1.2). De to DNA-strenge i dobbelthelixen løber i modsatte retninger. Det betyder, at 5'-enden af en streng er parret med 3'-enden af dens matchende streng. Man siger, at DNA-strenge er **antiparallelle** (figur 1.2, 1.4).

RNA – Det alsidige molekyle

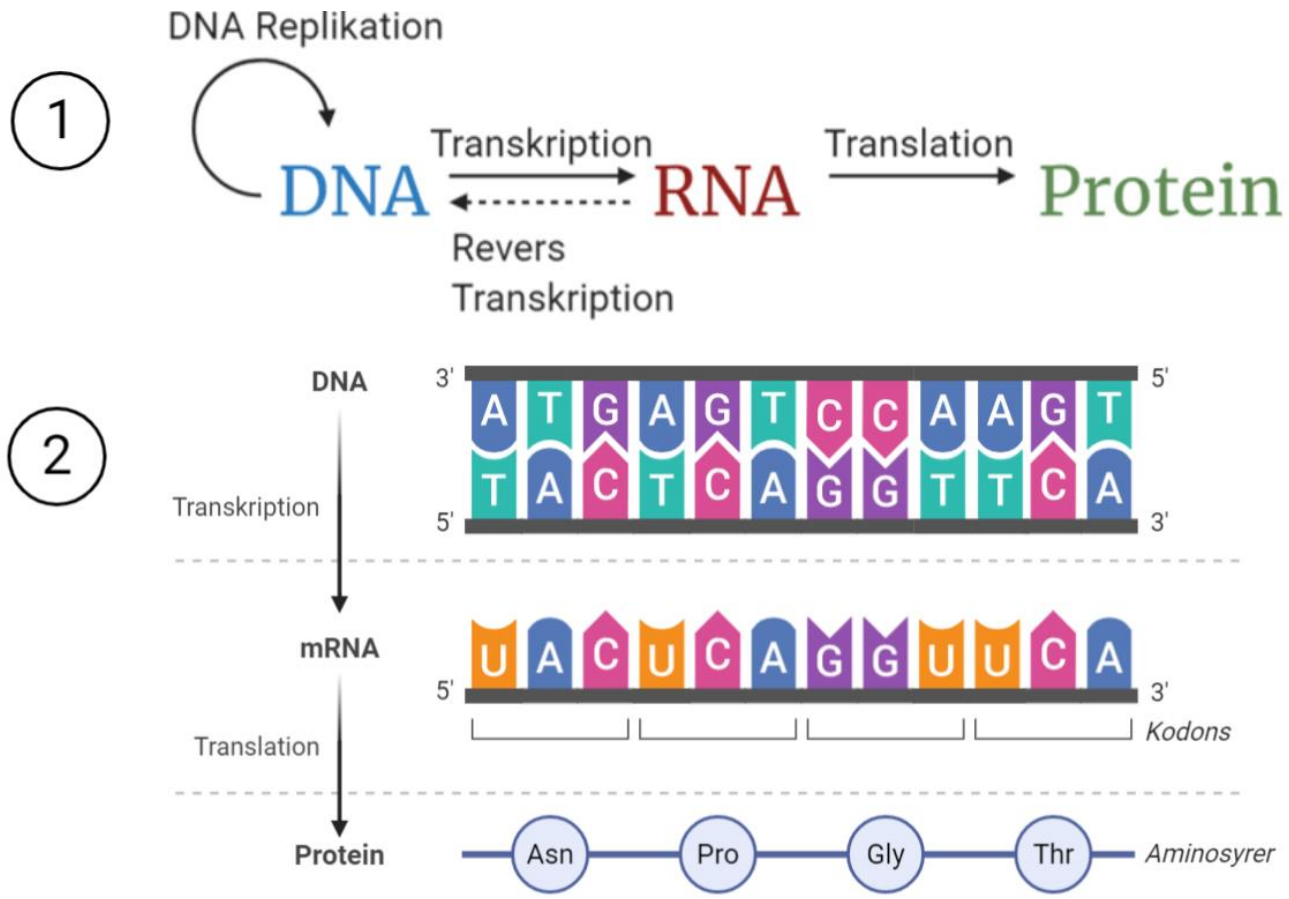
RNA består, ligesom DNA, af en kæde af nukleotider og har utrolig mange forskellige funktioner i cellen. I modsætning til DNA, er RNA enkeltstrenget og har små ændringer i sin sukkergruppe. En anden vigtig forskel mellem DNA og RNA er, at en af de fire nitrogenholdige baser i RNA er anderledes. Her erstattes basen thymin (T) med basen uracil (U). Der er mange forskellige typer RNA, herunder messenger RNA (mRNA), ribosomalt RNA (rRNA) og transfer-RNA (tRNA) samt primere. Disse fire typer vil blive introduceret undervejs i teorikompediet.

Proteiner – Cellens håndlangere

I én enkelt celle er der et utal af forskellige proteiner. Proteiner er opbygget af én eller flere kæder af **aminosyrer**. Disse kæder kaldes for **polypeptider**. Der er 20 forskellige slags aminosyrer, der kan bruges til at lave et protein, og hver aminosyre har forskellig struktur og kemisk adfærd. Antallet af aminosyrer på polypeptidet varierer fra protein til protein. Antallet er af polypetider, som et protein er opbygget af, varierer også. Proteiner kommer derfor i enhver størrelse, form og type, som du kan forestille dig, og hvert enkelt protein har et specifikt formål. Tilsammen er de livsnødvendige for cellens overlevelse.

2.1.1 Det Centrale Dogme

I 1956 opfandt Francis Crick en af de vigtigste koncepter i molekylærbiologiens historie, der blev betegnet **'Det Centrale Dogme'**. Det Centrale Dogme beskriver strømmen af genetisk information inde i en celle. DNA koder for RNA via transskription, og RNA koder for protein via translation (figur 2.1). DNA kan desuden kopiere sig og videregive sin genetiske information til en ny celle via replikation. Derimod har man aldrig i naturen observeret en strøm af genetisk information fra protein til protein, eller fra protein til RNA, eller fra protein til DNA. Med andre ord kan man sige, at når den genetiske information er videregivet til proteinniveau, så er den genetiske information fastlåst, og aminosyresekvenserne kan dermed ikke blive videregivet mellem generationerne.



Figur 2: Det Centrale Dogme. Figur 2.1: DNA kan blive kopieret ved hjælp af en proces, der kaldes for DNA-replikation. Dette er vigtigt for at en celle kan videregive sin genetiske information. DNA'et kan også blive udtrykt i celle ved hjælp af to processer kaldet transskription og translation. Der findes dog eksempler på overførsel af information fra RNA til DNA. Dette kaldes for revers transskription og forekommer f.eks. i retrovirusser såsom HIV. Figur.2.2: Når et gen skal udtrykkes, skal DNA-sekvensen først transskriberes til RNA. Den kodende region i RNA'et bliver dernæst lavet til et polypeptid med en korresponderende aminosyresekvens. Denne aminosyresekvens er er bestemt ud fra RNA'ets kodons. Denne proces kaldes for translation. Læg herunder mærke til at kodonsekvensen for mRNA'et er den samme for 5'-3'-DNA-strengen (den kodende DNA-streng). Den eneste forskel mellem dem er, at thymin (T) er blevet erstattet med uracil (U) i RNA-strengen.

2.1.2 DNA Replikation i bakterier

Under en celledeling skal en celle kopiere sit DNA, gennem en proces kaldet DNA replikation. Det kopierede DNA separeres derefter i to datterceller, der arver den samme genetiske information som modercellen. DNA-replikation er **semikonservativ**, hvilket betyder, at hver streng i en DNA-dobbelthelix fungerer som en skabelon til syntesen af en ny, komplementær streng. Det vil sige, at efter DNA-replikationen er færdig, er der to DNA-kopier, hvor hver dobbelthelix har en "gammel DNA-streng" og en hel ny DNA-streng. Da bakterier er nødt til at kunne kopiere deres DNA meget hurtigt og med meget få fejl, gør de brug af forskellige proteiner, der arbejder sammen for at sikre, at DNA-replikation udføres så nøjagtigt som muligt [2].

Før DNA'et kan blive kopieret, skal de to DNA-strenge adskilles fra hinanden. For at gøre dette, bruges specifikke enzymer kaldet **DNA-helikaser**. Disse enzymer binder til et kort segment i DNA'et, de adskiller derefter de to DNA-strengene fra hinanden og danner to Y-formede strukturer, der kaldes for **replikationsgafler** (figur 3). Disse to replikationsgafler udgør tilsammen et kompleks, der kaldes for en

replikationsboble. Segmentet kaldes for **"Origin of replication" (ORI)**, hvor syntesen af ny DNA også starter. E. coli har, som de fleste bakterier, en enkelt ORI-sekvens på dets kromosom (se figur 3). Denne sekvens har for det meste A / T-basepar (som holdes sammen af færre brintbindinger end G / C-basepar), hvilket gør DNA-strengene lettere at adskille. For at sikre, at de to adskilte strenge ikke genforenes, binder der sig en masse strukturstabiliserende proteiner til både de enkeltstrenget DNA-regioner i replikationsboblen og de dobbeltstrengede DNA-regioner udenfor replikationsboblen.

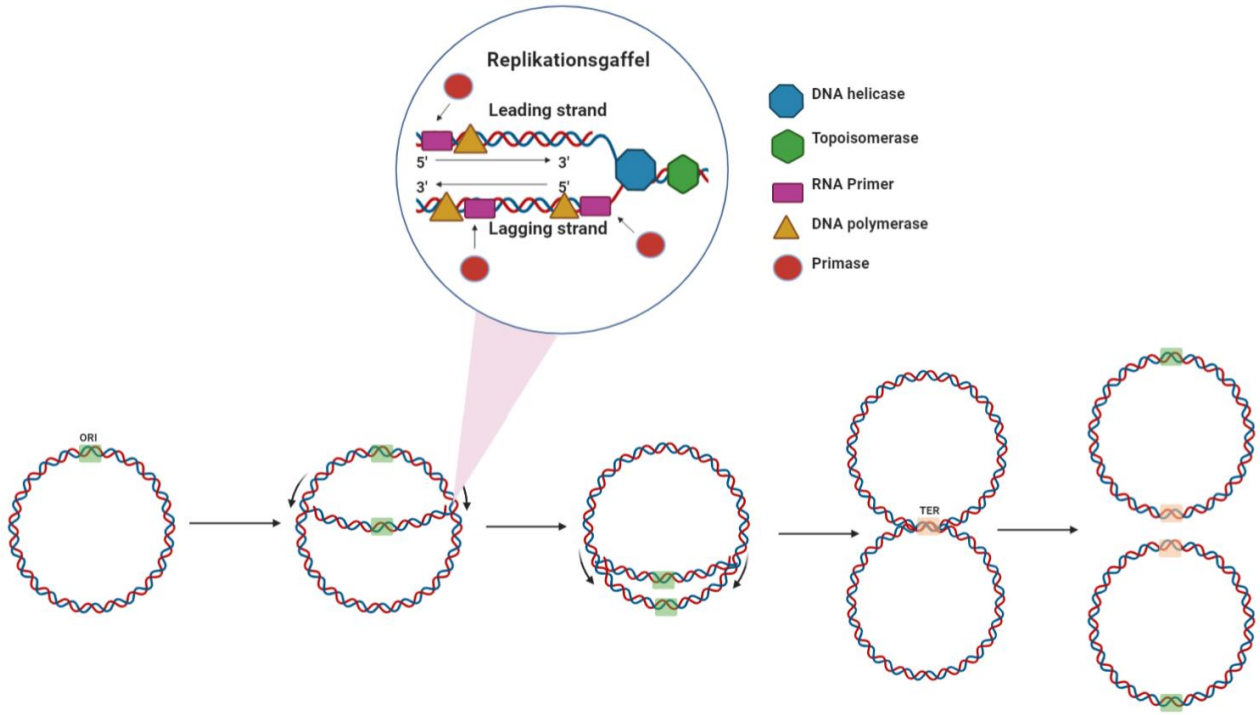
Når DNA-helikasen har adskilt de to DNA-strengene fra hinanden, og replikationsgaflerne er dannet, er DNA'et klar til at blive kopieret. Syntetiseringen af den nye DNA-streng bliver gjort hovedsageligt af specifikke enzymer kaldet **DNA-polymeraser**. Disse enzymer tilføjer hver især nukleotider en ad gangen til den voksende DNA-kæde. Dette gør DNA-polymerasen ved at bruge den ene DNA-streng som skabelon til at inkorporerer de nukleotider, der komplementere skabelonen. Disse nukleotider bliver altid tilføjet til 3'-enden af DNA-strengen.

Men DNA-polymeraser kan ikke starte en ny DNA-kæde fra bunden. De kan kun binde nye nukleotider til en forudgående eksisterende streng. Der er brug for en **primer,** som er et kort stykke RNA, der bliver sammensat af et enzym kaldet **primase**. Primerne sætter sig på DNA'et, så DNA-polymerasen har et sted at starte. Senere udskiftes primeren med DNA, og DNA-polymerasen kan herefter overtage DNA- syntesen (figur 3).

Det er dog vigtigt at pointere, at DNA-polymeraser kun kan syntetisere DNA i 5 'til 3' retning, og dette skaber et problem under replikation, da dobbeltstrenget DNA, som tidligere nævnt, altid er antiparallel. Det vil sige, at den ene streng løber i 5' til 3' retningen, mens den anden løber i 3' til 5' retningen.

Den nye streng, der kører fra 5' til 3' mod replikationsgaflen, er den lette. Denne streng fremstilles kontinuerligt, fordi DNA-polymerasen bevæger sig i samme retning som replikationsgaflen. Denne kontinuerligt syntetiserede streng kaldes for **leading strand**. Den anden nye streng, der løber fra 5' til 3' væk fra replikationsgaflen, er vanskeligere (figur 3). Denne streng bliver lavet i fragmenter, fordi DNA-polymerasen bevæger sig væk fra replikationsgaflen. Det betyder, at DNA polymerasen skal genmonteres på det nyligt eksponerede DNA, som replikationsgaflen har efterladt sig. Denne vanskelige streng, der er lavet i fragmenter, kaldes for **lagging strand** (figur 3). De små fragmenter kaldes for **Okazaki-fragmenter**. Leading strand kan syntetiseres ud fra én enkelt primer, hvorimod lagging strand har brug for en ny primer til hvert Okazaki-fragment.

Afslutning af DNA-replikation forekommer, når to modsat orienterede replikationsgafler mødes og smelter sammen for at skabe to separate og komplette dobbeltstrengede DNA-molekyler. I cirkulære bakteriekromosomer afslutter DNA-replikationen oftest i et område, der kaldes **terminusregionen (TER)**, beliggende omtrent modsat ORI-sekvensen (figur 3).



Figur 3: DNA-replikation af et kromosom. Replikationsgaflen indeholder både DNA'ets Leading- og lagging strand. På lagging strand syntetiserer primasen en masse primere. På leading strand er der kun brug for én enkelt primer. DNA-helikasen er ansvarlig for at separere de to DNA-strenge, og topoisomerase hjælper med at stabilisere DNA'et, når det bliver "lynet op" af helikasen. DNA-polymerasen sørger for at syntetisere den anden streng ved hjælp af primerne fra primasen. Replikationen starter i ORI og slutter i TER regionerne på kromosomet.

2.1.3 Transskription: Fra DNA til RNA

Ordet **transskription** beskriver en proces, hvori oplysninger skrives om. I biologiens verden beskriver transskription en proces, hvor en gensekvens bliver kopieret og oversat til den korresponderende RNA-kode. Transskription er det første led i at få et gen udtrykt, hvor information kodet i genet bruges til at konstruere et funktionelt produkt, såsom et protein. For et proteinkodende gen bærer RNA-kopien den information, der er nødvendig for at opbygge et polypeptid der senere folder sig til et funktionelt protein. Transskription af et gen foregår i tre trin: 1. Initiering, 2. Elongering og 3. Terminering (se figur 4). De færreste gener bliver transskriberet konstant. Cellerne regulerer i stedet omhyggeligt transskription af hvert gen individuelt eller for en lille klynge af gener, der bliver transskriberet samtidig.

Initiering

Når cellen gerne vil transskribere et gen, binder **RNA-polymerase** til en sekvens på DNA'et, der kaldes for en **promotor.** Denne sekvens findes i nærheden af genets begyndelse. Hvert gen har sin egen promotor. Når RNA polymerasen binder til promotoren, adskiller RNA-polymerase DNA-strengene, hvilket blotlægger den enkeltstrengede DNA-skabelon, der er nødvendig for transskription. For at de rette gener transskriberes er det derfor yderst vigtigt at RNA-polymerasen binder til den rette promotor. Dette gøres ved hjælp af et protein, der kaldes for en **sigmafaktor (σ-faktor)**. Dette protein muliggør specifik binding af RNA-polymerase til promotoren. Den specifikke σ-faktor, der bruges til at initiere transskription af et givet gen, vil variere

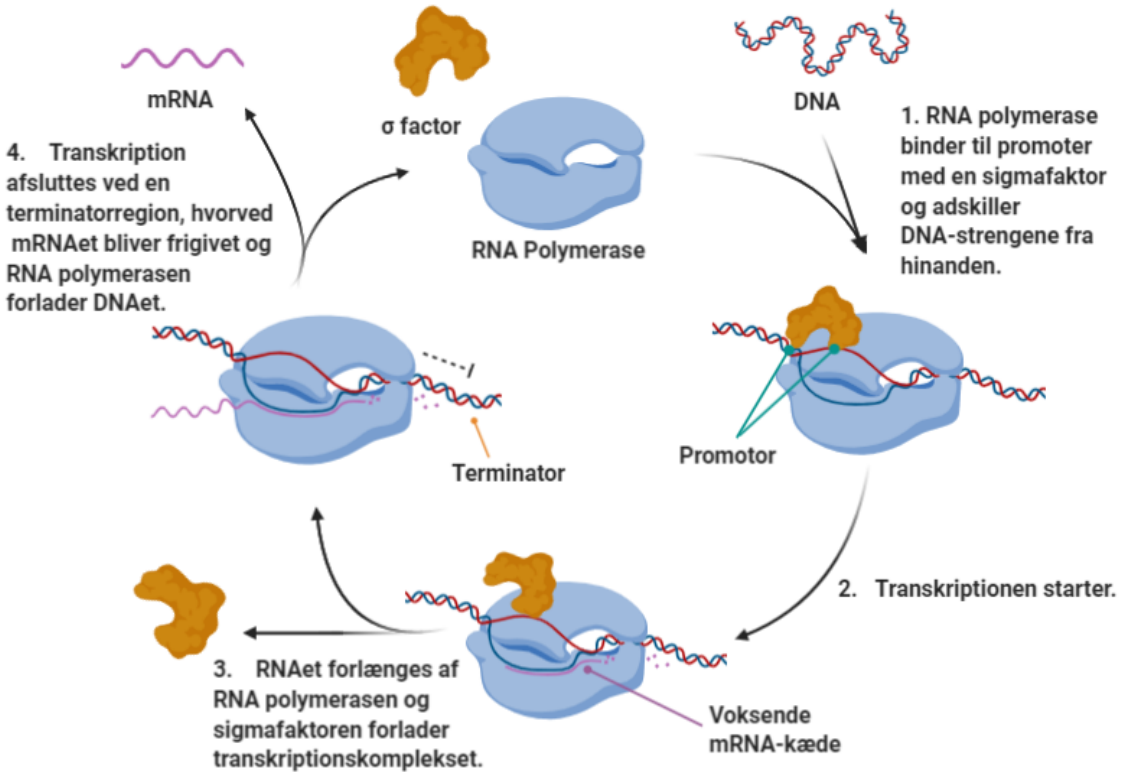
afhængigt af genet og af de miljømæssige signaler, der er nødvendige for at starte transskription af dette gen. Den valgte promotor for RNA-polymerasen afhænger derfor af den associerede σ-faktor (figur 4.1).

Elongering

Når RNA-polymerasen har bundet sig til promotoren sammen med σ-faktoren, bliver DNA-skabelonens sekvens herefter læst én base ad gangen (figur 4.2). Samtidig med at baserne bliver læst, bygger RNA-polymerasen en RNA-streng med komplementerende baser. Denne RNA-streng vokser i 5' → 3' - retningen. RNA-strengen bærer præcis den samme sekvens, som den DNA-streng, der ikke bruges som DNA-skabelon. Denne DNA-streng kaldes derfor også for den **kodende DNA-streng** (se figur 2). Den resulterende RNA-streng indeholder blot basen uracil (U) i stedet for thymin (T). Efter at de første par baser er lavet på den voksende RNA-streng dissocierer σ-faktoren sig fra **transskriptionskomplekset**, og RNA polymerasen fortsætter syntetiseringen af RNA-strengen på egen hånd (figur 4.3).

Terminering

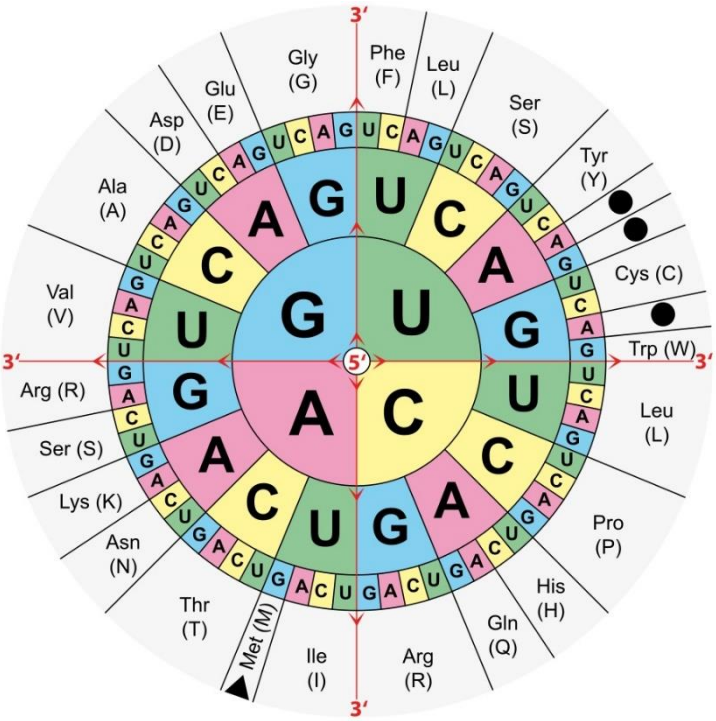
RNA-polymerasen fortsætter transskriptionen, indtil den møder en sekvens på DNA'et, der får den til at stoppe. Dette sker, når RNA polymerasen transskriberer en DNA-sekvens, der kaldes for en **terminator**. Når RNA-polymerasen møder en terminator, får det RNA-polymerasen til at stoppe transskriptionen, og RNA polymerasen falder af DNA-strengen (figur 4.4). Et RNA-produkt, der er klar til at blive oversat af ribosomet, kaldes et **messenger RNA (mRNA)**. I bakterier er den nye mRNA-streng klar til at blive oversat lige efter transskription. Translationen af mRNA'et kan faktisk starte, mens transskription stadig foregår, og mange ribosomer er ofte knyttet til mRNA-strengen, mens den bliver syntetiseret.



Figur 4: Transskriptionen af DNA til RNA udføres af enzymet RNA-polymerase, der binder til en specifik promotorregion på DNA'et, med hjælp fra en specifik sigma-faktor. Polymerasen er derefter i stand til at initiere transskription ved at åbne det spiralformede DNA, hvilket tillader at det enkeltstrengede DNA kan fungere som en skabelon. Efter inkorporering af de første få nukleotider begynder enzymets affinitet at falde, indtil sigma-faktoren frigøres fra komplekset. Transskriptionen fortsætter indtil den når en terminatorregion, hvorefter mRNA'et bliver frigivet og RNA polymerasen kobler sig fra DNA'et.

2.1.4 Translation: Fra mRNA til polypeptid

Ved translation bliver informationerne, der er gemt i mRNA'et, brugt til at opbygge et polypeptid, som er en kæde sammensat af aminosyrer ved hjælp af et cellulært kompleks, der kaldes for et ribosom. Et polypeptid kan herefter blive foldet til et fuldt funktionelt protein. mRNA indeholder instruktionerne til opbygningen af et polypeptid, læst i grupper af tre RNA-nukleotider (adenin (A), uracil (U), cytosin (C) og guanin(G)). Disse grupper kaldes for **kodons**. Et enkelt kodon koder for én specifik aminosyre. Et **startkodon,** med sekvensen AUG, koder for aminosyren methionin og beskriver, hvor i mRNA-sekvensen translationen skal begynde. Herfra afkodes mRNA-sekvensen kodon for kodon uden overlap eller mellemrum, indtil ribosomet møder et **stopkodon** (UAA, UAG og UGA), der markerer translationens afslutning. I forhold til alle andre slags kodons, så koder et stopkodon IKKE for en specifik aminosyre. Det generelle kodon-aminosyre oversættelse betegnes **den genetiske kode** (figur 5).



Figur 5: Den genetiske kode. Figuren viser hvilke aminosyrer, som de forskellige kodons koder for. For at finde ud af, hvilken aminosyre ens kodon repræsenterer, skal man starte fra midten og bevæge sig udad. Man vælger her fra de forskellige nukleotider, der findes i ens kodon. F.eks. hvis man har et kodon, der hedder GAG, starter man i det midterste G-felt, hvorefter man går videre til A-feltet og til sidst til det yderste G-felt. Ud fra dette kan man se, at kodon GAG koder for aminosyren Glu (E). Startkodon er AUG, hvilket også er anvist med en sort pil. Slutkodons er UAA, UAG og UGA. Dette er anvist med sorte prikker. Hentet fra Wikipedia (Robert Kohlmann).

Men hvordan bliver denne oversættelse formidlet af cellen? Cellen formidler translationen primært ved hjælp af transfer RNA og ribosomer.

Transfer RNA (**tRNA)** forbinder mRNA-kodons til den specifikke aminosyre, som de koder for. På den nederste del af hvert tRNA er der en sekvens på tre nukleotider, der kaldes for et **antikodon**, som kan binde til specifikke mRNA-kodons. Den øverste del af tRNA'et bærer den aminosyre, der er specificeret af det pågældende kodon. Der er derfor mange forskellige typer tRNA. Hver type læser én eller få kodons og bringer herefter den matchende aminosyre (figur 6.1).

Ribosomerne er de strukturer, hvorpå polypeptiderne bliver bygget. De består af protein og **ribosomalt RNA (rRNA)**. Hvert ribosom har to underenheder, en stor og en lille, der samles omkring mRNA'et, der skal oversættes. Ribosomet er udstyret med nogle vigtige domæner, hvor tRNA'et kan finde deres matchende kodons på mRNA-skabelonen og levere deres aminosyrer. Disse domæner benævnes **A-, P- og E-domænerne** (figur 6.1). Ribosomet fungerer samtidig også som et enzym, der forbinder aminosyrer sammen for at skabe en kæde.

Translationen kan inddeles i samme faser som transskriptionen: Initiering, elongering og terminering.

Initiering

Først samles ribosomet omkring mRNA'et, der skal læses, og det første tRNA binder sig på mRNA-strengen. Dette tRNA bærer aminosyren methionin, der matcher startkodonet AUG. Denne opsætning kaldes for initieringskomplekset, hvilket er nødvendigt for at oversættelsen kan komme i gang. Den allerførste aminosyre methionin sætter sig på ribosomets P-domæne (figur 6.1).

Elongering

Efter initeringskomplekset vil aminosyrekæden blive forlænget. Her oversætter ribosomet et kodon ad gangen, og den korresponderende aminosyre tilføjes til den voksende aminosyrekæde. Hver gang et nyt kodon oversættes, overføres et tRNA med den rette aminosyre til ribosomets A-site (figur 6.2). Når tRNA'et lander på A-sitet, vil dette starte en peptidbinding mellem den nye aminosyre og dens nabo i P-sitet (figur 6.3). Herefter mister den naboliggende tRNA sin aminosyre, og dette tRNA driver over i E-sitet, hvorefter den frigøres. Det tRNA, der nu har en ekstra aminosyre, driver herefter over i P-sitet og tRNA'et er nu klar til at give den voksende kæde videre til det næste tRNA (figur 6.4).

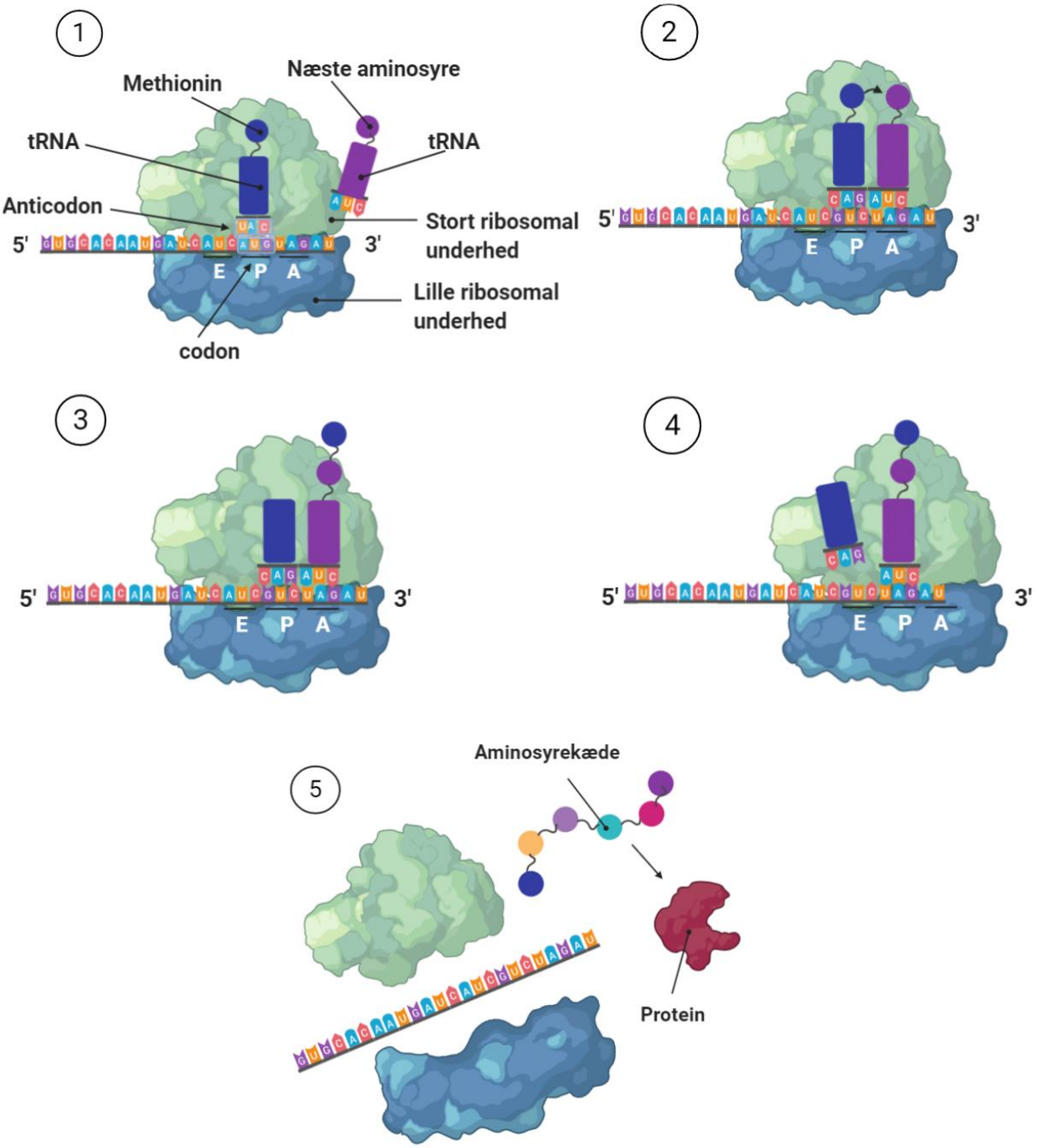
Terminering

Under den sidste fase skal det færdige polypeptid frigøres. Polypeptidet bliver frigjort, når et stopkodon bliver oversat af ribosomet. Sekvensen på dette stopkodon kan være UAG, UAA eller UGA. Disse kodonsekvensen udløser en række hændelser, der adskiller polypeptidkæden fra dens tRNA, og den kan herefter løsrive sig fra ribosomet og translationen er hermed afsluttet (figur 6.5). Efter translationens afslutning kan polypeptidet stadig være nødt til at gennemgå forskellige slags modifikationer for at blive foldet til et funktionelt protein. Det skal også ofte sendes til det rigtige sted i cellen eller kombineres med andre polypeptider, før det kan gøre sit job som et funktionelt protein.

Hvis du vil vide mere om molekylærbiologiens centrale dogme, anbefaler vi at du ser videoerne dedikeret til emnet på biostriben: https://bit.ly/3mupSnh

2.2 Biosensorer

En biosensor kan betegnes som en **molekylær transducer,** der modtager et input og responderer med et signal. En transducer er en komponent, som man typisk bruger i elektroniske systemer med henblik på måling, hvor de omdanner en bestemt form af energi (et **input**) f.eks. lys eller lyd, til en anden form for energi (et **output**) f.eks. elektricitet. En biosensor har samme funktion, men i stedet for elektroniske systemer er det biologiske systemer, og i stedet for at måle lys eller lyd, kan det måle kemiske eller biologiske stoffer.



Figur 6: Translation. (1) komponenterne der er nødvendige for at translationen af mRNA'en kan gennemføres. tRNA'en identificere de forskellige codons i mRNA'en og tilføjer de rigtige aminosyrer ud fra anticodone. (2) aminosyren der sidder på tRNA'en bliver overført til den næste tRNA der sidder i ribosomets A domæne. (3) Efter overførslen af aminosyren flytter tRNA'erne et domæne længere ned og (4) den tRNA uden aminosyre bliver tabt mens tRNA'en på P domænet er klar til at give den voksende aminosyre kæde videre til den næste tRNA i rækken. (5) Når alt mRNA'en er læst står man tilbage med en aminosyre kæde (polypeptid) der kan folde sig til det færdige protein.

Der findes forskellige former for biosensorer. Nogle består af en levende organisme (en **helcelle biosensor**). Andre består af proteiner, der er et produkt af en levende organisme, men ikke er forbundet til organismen længere (**cell-free biosensor**). Ofte er en helcelle biosensor en biosensor, der er kontrolleret på det **transskriptionelle niveau** (figur 7). Det vil sige, at hvis stoffet, som biosensoren genkender, er til stede, vil transskriptionen af **reportergenet** blive gennemført (figur 7.1). Hvis stoffet derimod ikke er til stede, vil der ikke ske en transskription af reporter genet (figur 7.2). Et reportergen er et gen, der koder for et protein, hvis karakteristika er let at identificere i en organisme. Eksempler på reportergener er **grønt fluorescerende protein (GFP)** [3], der får organismen til at lyse grønt, eller et **chromoprotein** (farvet protein) [4], der får organismen til at skifte farve. Funktionen med reportergener er, at man kan teste om sit genetiske design fungerer, ved at indsætte reportergenet. Hvis ens organisme efterfølgende lyser grønt eller skifter farve, ved man, at ens genetiske design fungerer. Hvis du vil læse mere om helcelle biosensorer og deres applikationer kan du læse referencerne: [5–7].

Cell-free biosensorer er kontrolleret på det **post-translationelle** niveau, dvs. når proteinerne er blevet lavet. Som sagt består disse biosensorer af proteiner, som genkender et specifikt stof. Dette stof aktiverer proteinerne til enten at ændre konfiguration eller associere sig til andre proteiner. Disse ændringer vil medføre, at biosensoren producere et målbart output såsom enzymatisk aktivitet eller fluorescens. Hvis du gerne vil læse mere om cell-free biosensorer så kan du læse referencerne [8,9].

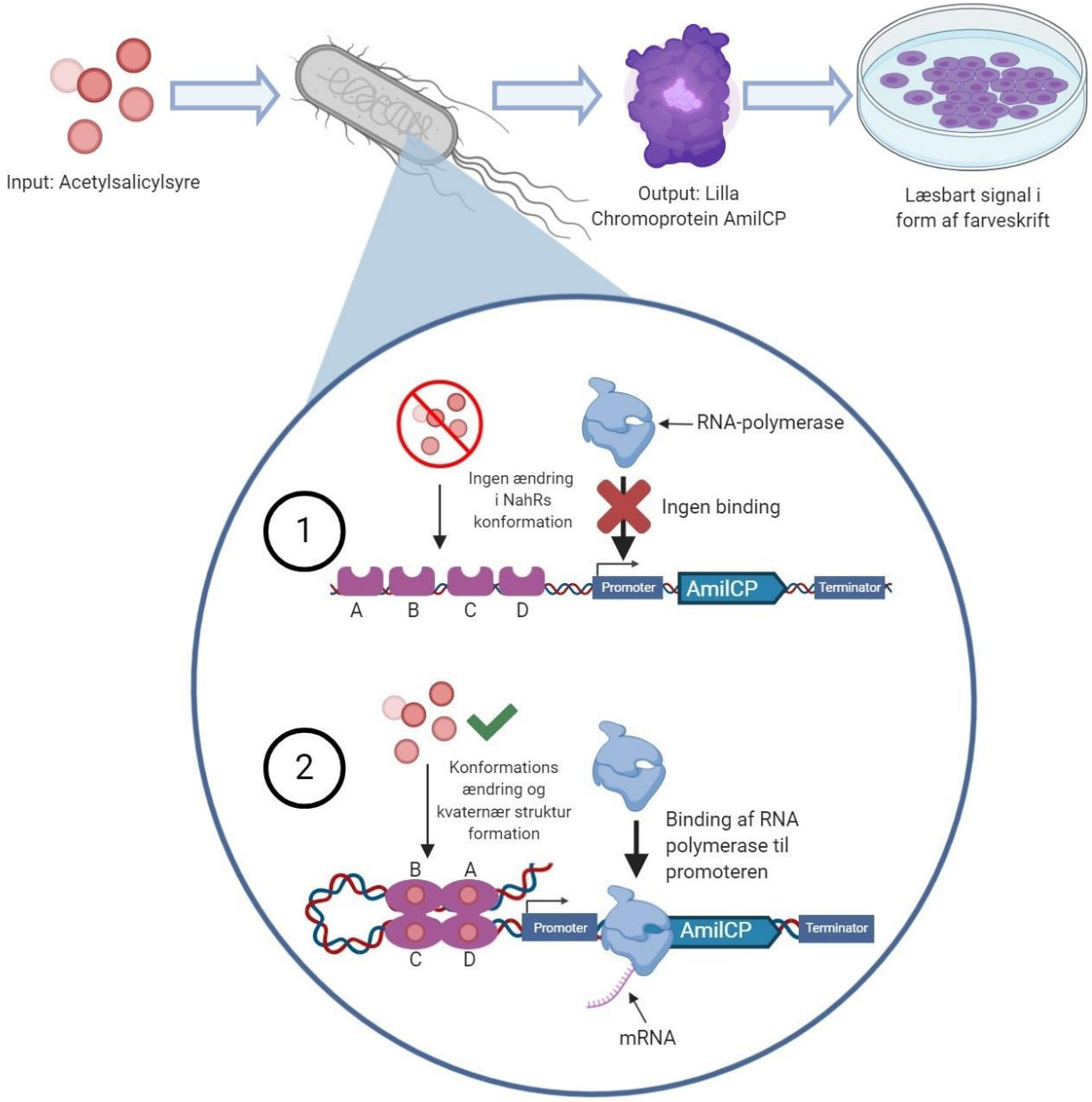
Biosensoren til Biotech Academy Camp 2020

Til Biotech Academy camp 2020 skal vi arbejde med en helcellebiosensor, der kan bruges til at detektere stoffet **acetylsalicylsyre**, der er det aktive stof i mange slags smertestillende medicin. I kan se hvordan jeres biosensor skal designes i figur 7.

Vores biosensor består af to gener, som er kodet på et **plasmid** (sektion 2.3.1), der bliver sat ind i en *E. coli* celle. De to gener hedder **NahR** og **AmilCP**, de koder henholdsvist for det regulatoriske protein NahR og reportergenet AmilCP, der koder for et chromoprotein med en lilla farve. Det regulatoriske protein sørger for at regulere transskriptionen af reportergenet.

NahR-proteinerne kan man se som fire lilla komponenter navngivet A, B, C og D i figur 7. Efter at NahR-proteinet bliver produceret af cellen, flyder de frit rundt i cellens cytoplasma, indtil de møder cellens DNA. NahR-proteinerne binder sig til cellens DNA på nogle meget specifikke steder kaldet **NahR-bindingssekvenser**. Der er fire af disse unikke bindingssekvenser, og de findes lige foran reporter genet. Når NahR proteinet er bundet til disse bindingssekvenser, fungerer de som en form for **repressor** af RNA-polymerase. En repressor er en komponent, der forhindrer RNA-polymerasen i at transskribere DNA'et. Dette gør repressoren ved at blokere RNA-polymerasens tilgang til promoteren (figur 7.1). Det modsatte af en repressor er en **aktivator**. Den assisterer RNA-polymerasens binding til promoteren, så transskriptionen kan forløbe.

NahR-proteinet fungerer både som en repressor og en aktivator. Den fungerer som en repressor, når acetylsalicylsyre ikke er til stede. Forskere er stadig usikre på, hvordan NahR ændre sig fra at være en repressor til en aktivator, men den generelle konsensus er, at når acetylsalicylsyre er til stede binder det sig til NahR (figur 7.2) og får proteinet til at ændre sin struktur. Denne strukturændring medfører, at NahR-proteinerne binder sig til hinanden og får en såkaldt **kvaternær struktur**. Da NahR-proteinerne stadig er



Figur 7: Vores biosensor. (1) Viser hvad der sker, hvis vores biosensor ikke bliver udsat for acetylsalicylsyre. Hvis acetylsalicylsyre ikke er tilstede sker der ingen konformationsændring i vores NahR-proteiner (A, B, C og D), hvilket medfører, at vores RNA-polymerase ikke binder sig til AmilCP'ens promoter. Der er derfor ingen ændring i farven på vores biosensor. (2) Viser hvad der sker i vores biosensor, hvis acetylsalicylsyre er til stede, Her vil NahR-proteinerne ændre deres konformation og binde til hinanden i en kvaternær struktur. Denne konformationsændring betyder, at vores RNA-polymerase kan binde sig til AmilCP'ens promoter og den kan fortsætte med transskriberingen af AmilCP. Når transskriberingen af AmilCP bliver gennemført, vil vi kunne se en ændring i farven af vores bakterie der befinder sig på vores Petri skåle.

bundet til DNA'et, betyder dette, at DNA'et skal bøje sig for at tillade, at alle fire NahR-proteiner binder sig til hinanden (figur 7.2).

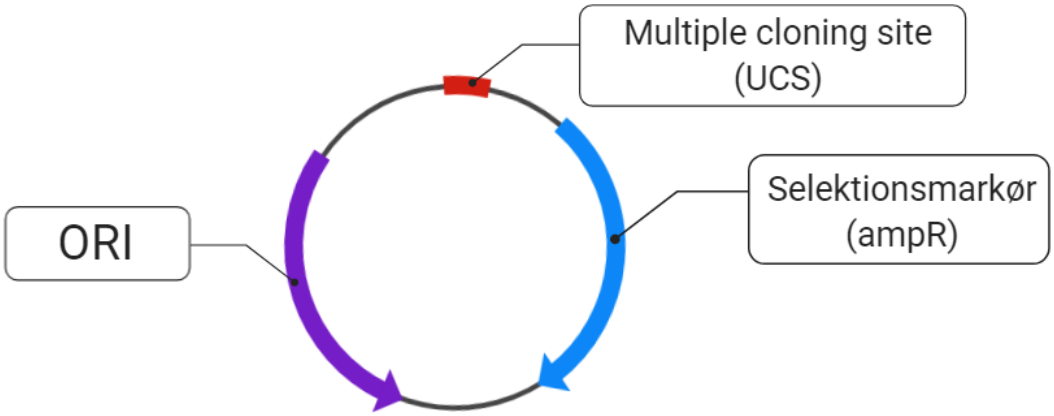
Når de fire NahR-proteiner er bundet sammen, hjælper de RNA-polymerasen med at binde sig til promoteren, og transskriptionen af efterfølgende gensekvenser kan dermed gennemføres. Denne transskription resulterer i dannelsen af mRNA for reportergenet AmilCP. Når denne mRNA-sekvens efterfølgende bliver translateret, resulterer dette i produktionen af chromoproteinet AmilCP. Produktionen af proteinet viser sig som et skift i farven på bakterierne.

2.3.1 Plasmid

For at lave vores biosensor skal I have et kendskab til plasmider. Et **plasmid** er et cirkulært dobbeltstrenget DNA-molekyle, der kopierer sig uafhængigt af cellens kromosom. Plasmider, ligesom kromosomer, bliver overført fra modercelle til dattercelle, når cellerne deler sig. Plasmider findes naturligt i bakterier og i visse eukaryotiske celler såsom gær. Organismerne indeholder ofte disse plasmider, da de kan indeholde gener, der koder for fordelagtige egenskaber. Plasmider kan også forlade cellerne og flyde frit rundt i miljøet og finde en ny celle, som de kan komme ind i. Den nye celle får nu glæde af de fordelagtige egenskaber, som plasmidet koder for. Denne udveksling af gener, der ikke stammer fra nedarvning fra modercelle til dattercelle, hedder **horisontal genoverførsel**[10]. Videnskabsfolk har fundet ud af, at man kan udnytte disse plasmider til at inkorporere nyt genetisk materiale i organismer. Dette kommer I også til at gøre under BA camp 2020.

For at plasmider kan overleve og være funktionelle i en celle, skal de indeholde 3 forskellige komponenter:

1. **Origin of replication** (**ORI**): Dette er en DNA-sekvens, der er ansvarlig for, at plasmidet bliver replikeret i cellen. ORI-sekvensen bestemmer hvor mange kopier af plasmidet, der er til stede i cellen.
2. En **selektionsmarkør:** Denne DNA-sekvens koder for et gen, der tillader selektion af cellerne. Dette er typisk et gen, der koder for antibiotikaresistens (vi kommer til at vende tilbage til selektionsmarkør i sektion 2.3.8).
3. Det sidste komponent er ikke et gen, men et område på plasmidet, hvorpå man kan indsætte sin DNA-sekvens. Dette område hedder **multiple cloning site (MCS)** og indeholder typisk en masse genkendelsessites for forskellige restriktionsenzymer (sektion 2.3.2)**.**



Figur 8: Et plasmid med origin of replication (ORI-sekvens), en selektionsmarkør og et multiple cloning site.

Det plasmid, som vi skal benytte os af under campen indeholder en ori-sekvens, en selektionsmarkør kaldet **ampR,** der koder for **antibiotikaresistens** over for antibiotikummet Ampicillin (sektion 2.3.8), og et MCS, der indeholder et **USER cloning site (UCS)** (sektion 2.3.5).

2.3.2 Restriktionsenzymer

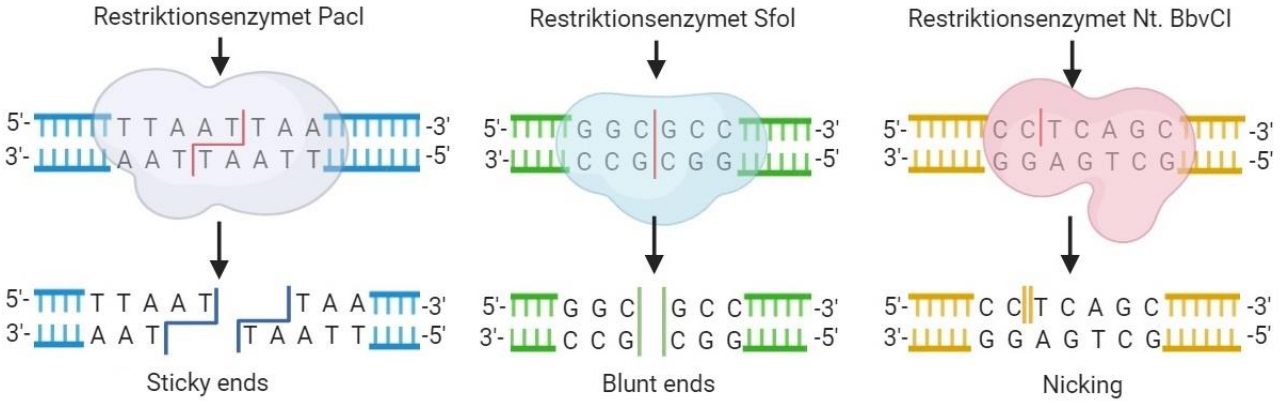
Restriktionsenzymer er enzymer, som klipper dobbelt strenget DNA ved specifikke sekvenser. Restriktionsenzymer bliver lavet af bakterier og arkæe som en form for forsvar mod en virusinfektion. En virusinfektion kan ramme mennesker, men de kan også ramme bakterier og arkæer. Under et angreb fra en virus, bliver virussens DNA injiceret ind i en værtsorganismes celler. Dette kan resultere i, at den injicerede celle dør. Dette vil værtsorganismen selvfølgelig helst undgå, så dens celler producere derfor restriktionsenzymer, der klipper virussens DNA strenge i stykker.

Restriktionsenzymerne genkender specifikke basesekvenser i den DNA, som de klipper i. Dette kaldes for restriktionsenzymets **genkendelsessites.** Disse genkendelsessites er ofte yderst præcise for hvert restriktionsenzym. Behovet for denne præcision kommer af at organismerne, der benytter sig af restriktionsenzymerne, skal være sikre på at restriktionsenzymerne ikke angriber organismens eget DNA, da dette kan medføre celledød. Genkendelsessites er derfor unikke for de forskellige restriktionsenzymer. Restriktionsenzymerne kan derudover klippe DNA'et på forskellige måder. Disse klippemønstre kaldes for **sticky ends**, **blunt ends** og **nicks** (figur 9).

Sticky ends er ender på DNA, hvor de to DNA-strenge er skåret over forskudt. Dette medfører, at den ene DNA-streng er længere end den anden. Den lange ende kaldes "**overhang**". Overhangs kan sætte sig sammen med andre overhangs, men dette kan kun lade sig gøre, hvis DNA-sekvensen matcher hinanden korrekt (se eksemplet i figur 10).

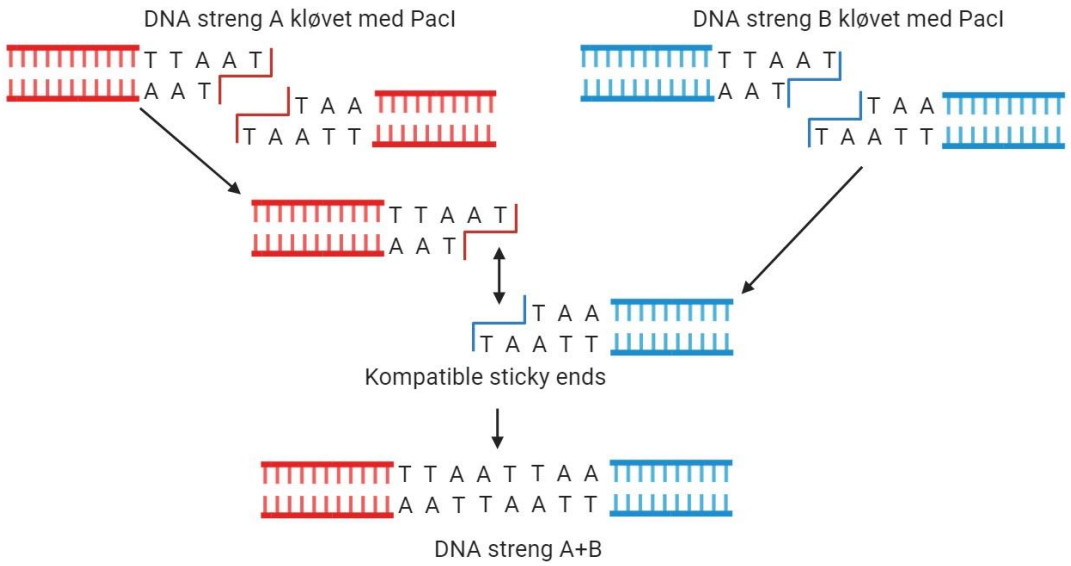
Blunt ends er ender på DNA-strengen, hvor begge strenge er skåret over på samme sted. Blunt ends indeholder ingen overhangs og er derfor svære at gensplejse, da der ikke er kompatible sticky ends (figur 9).

Nicking er resultatet af en overskæring af et restriktionsenzym, på kun den ene af de to DNA-strenge (figur 9). Nicking har nogle funktioner i syntesebiologi bl.a. i USER-kloning som vil blive forklaret i sektion 2.3.3.



Figur 9: Klippemønstre og genkendelsessites på tre forskellige restriktionsenzymer. Restriktionsenzymet PacI genkender sekvensen TTAATTAA og dens klippemønster resulterer i DNA ender med overhangs (sticky ends). Restriktionsenzymet SfoI genkender sekvensen GGCGAA og dens klippemønster resulterer i DNA med blunt ender, og restriktionsenzymet Nt.BbvCI genkender sekvensen CCTCAGC og dens klippemønster resulterer i DNA med et nicks mellem C og T i top strengen.

Overhangs kan blive brugt til at tilføje nye DNA-sekvenser på en værtsorganismes eksisterende DNA eller på et plasmid. Dette kan til gengæld kun lade sig gøre, hvis den nye DNA-sekvens har sticky ends, der matcher dét specifikke overhang, som den nye sekvens skal tilføjes til. I eksemplet i figur 10 er der to DNA-strenge (streng A og streng B), der begge er blevet klippet med restriktionsenzymet PacI. Da de to DNA-strenge er blevet klippet med samme restriktionsenzym, har de kompatible sticky ends, hvilket resulterer i, at de sætter sig sammen og danner DNA streng A+B, som er en kombination af de to strenge. Restriktionsenzymer er vigtige redskaber inden for bioteknologi og syntesebiologi, da de er pålidelige og lette at bruge.



Figur 10: Eksempel på genmanipulering med "sticky ends". Her har DNA streng A et overhang, der indeholder 5'-AT-3' og DNA streng B har et overensstemmende (komplementært) overhang 5'-TA-3'. Dette gør, at enderne kan klistre sig sammen, og derfor bliver disse overhangs kaldt for "sticky ends".

2.4.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en molekylærbiologisk teknik, der bliver brugt til at opformere specifikke DNA-sekvenser. PCR bliver brugt til detektion og identifikation af organismer eller biologisk materiale, der indeholder DNA. PCR bliver også hyppigt brugt som et vigtigt redskab til kloning og genmodificering.

PCR udnytter en af natures egne enzymer, som spiller en vigtig rolle i det centrale dogme, nemlig DNA-polymerasen. Til PCR bruges DNA-polymerasen til at opformere en specifik DNA-sekvens, der kaldes for vores **gene of interest (GOI)**. Vores GOI er en del af et længere stykke DNA, som kaldet for en **DNA-skabelon.** PCR gennemgår en række cyklusser, hvor hver DNA-sekvens bliver kopieret én gang per cyklus. Så hvis man starter med 2 ens DNA-strenge, vil man efter første cyklus have 4 DNA-strenge. Hvis man kører en PCR med 30 cyklusser, ender man ud med 1.073.741.824 ens strenge DNA, hvilket svarer til 2^{30}.

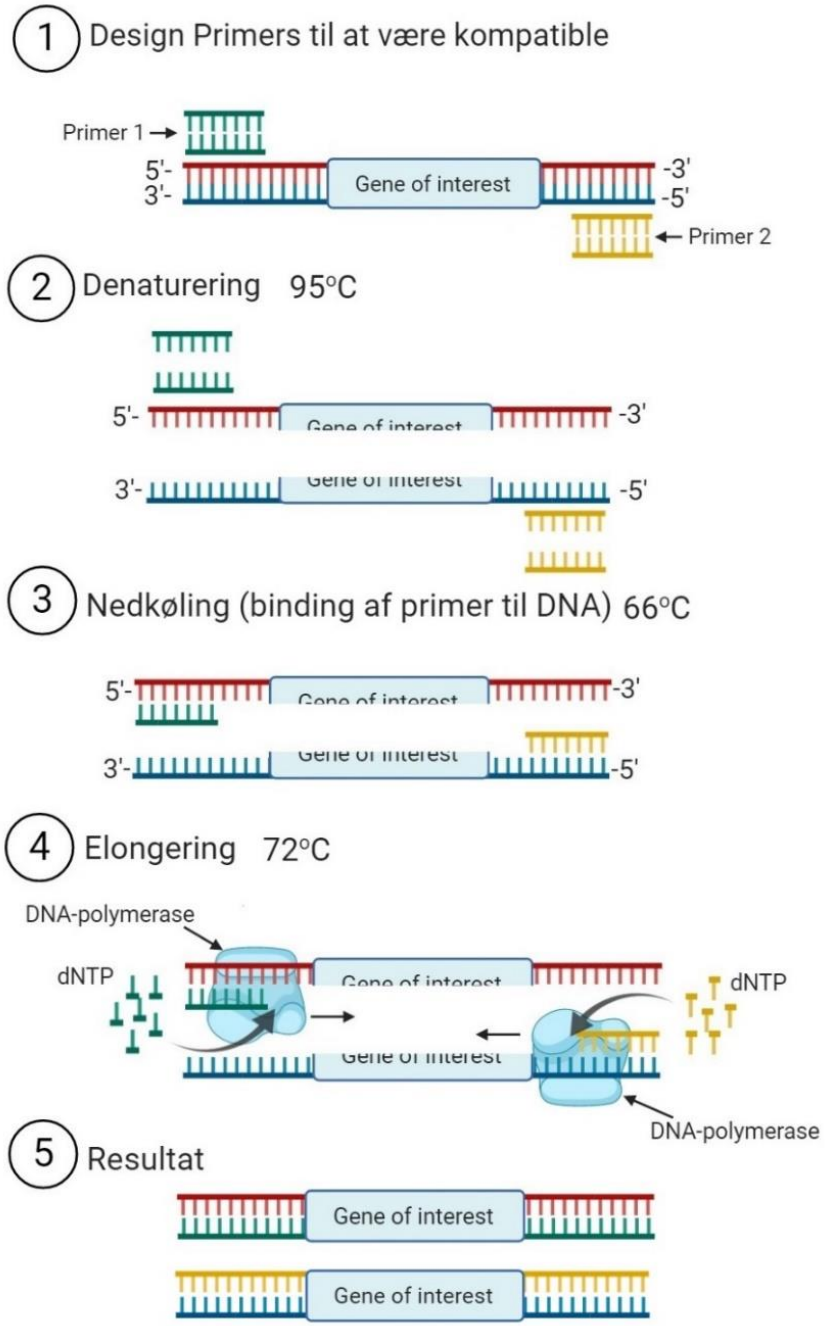
For at DNA-polymerasen kan kopiere DNA'et, skal den have en kort primer af komplementær DNA. Primerne bliver designet til at komplementere et enkelt sted på vores DNA-skabelon. På den måde undgår man, at primerne binder til de forkerte sekvenser. Når man laver primerne, er det vigtig, at man designer to primere til sit GOI. Der skal nemlig være en primer i hver ende af sit GOI. Når primerne er bundet til skabelonen, fungerer de som et startpunkt for DNA-polymerasen.

Det første skridt i en PCR er at skille DNA-strengene fra hinanden. Når strengene er blevet adskilt, binder DNA-polymerasen sig til primeren. Herefter begynder den at bygge den manglende DNA-streng. Dette gør den udelukkende i en 5'-3' retning. DNA-polymerasen læser DNA-skabelonen og tilføjer den korrekte nukleotid på den voksende kæde (figur 11). DNA-polymerasen tilføjer den passende nukleotid fra omgivelserne, da der tilføjes frie nukleotider i form af **deoxyribonucleotid trifosfat (dNTP)** til PCR-opløsningen. DNA-polymerasen bliver ved med at syntetisere ny DNA, indtil den enten løber tør for dit GOI, eller programmet skifter til næste skridt. Primere fungerer bedst, når de er mellem 15-25 bp lange. Primere er afbilledet i figur 11.1 som en gul og en grøn DNA-streng i starten og slutningen af DNA-skabelonen.

Når man har designet sine primere, skal man designe sit **PCR-program**. Et PCR-program indeholder de forskellige cyklusser, der skal til for at opformere DNA'et. Man starter med at denaturere DNA'et. Det vil sige, at man udsætter DNA'et for høj varme, hvilket medfører, at hydrogenbindingerne i det dobbeltstrengede DNA denaturere, og de to strenge splittes fra hinanden. De to adskilte DNA-strenge kan binde sig til primernes DNA, da primerne også er blevet denatureret (figur 11.3).

Et PCR-program indeholder seks trin, hvori trin 2, 3 og 4 bliver gentaget 25-30 gange, og de resterende bliver kun udført én enkelt gang. Temperaturerne og tiden for de forskellige trin er afhængige af forskellige faktorer såsom længde af DNA og smeltetemperaturen på vores designede primere.

Hvis du vil vide mere om PCR, anbefaler vi at du ser videoerne dedikeret til emnet på biostriben: https://bit.ly/35DMjjP

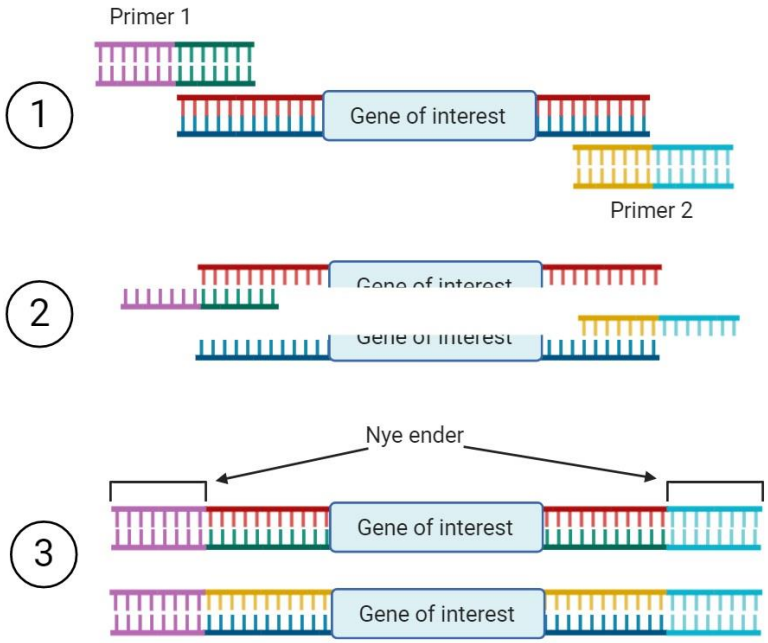


Figur 11: (1) Design af primere. Primer 1 (grøn) og primer 2 (gul). Primerne skal ligge på begge sider af sit gene of interest. (2) Første denaturering. Her bliver DNA'et udsat for en høj temperatur på omkring 98°C i 30 sekunder. Det er nok til at det dobbeltstrengede DNA splittes, og man står tilbage med to enkelte DNA-strenge. (2) Anden denaturering. Igen bliver DNA'et udsat for 98°C. Denne gang er det kun i 10 sekunder. (3) Nedkøling. Her får primerne og de adskilte DNA-strenge tid til at sætte sig sammen. Temperaturen for dette skridt kommer an på primernes sekvens, deres koncentration, og hvilken DNA-polymerase, som benyttes. (4) Elongering. Her sætter DNA-polymerasen sig ind på DNA'et, hvor der findes en primer. DNA-polymerasen bruger dNTP til at forlænge vores GOI. Temperaturen for elongering er typisk 72°C og tager op til 5 minutter alt efter længden af vores GOI. (4) Anden elongering. Dette skridt bliver gjort, efter vi har gentaget skridt 2-4 25-30 gange. Det er en gentagelse af skridt 4, nu i 5 minutter, og det er med til at sikre, at vores DNA-polymerase har haft tid nok til at syntetiserer alle DNA strengene. (5) Nedkøling og opbevaring. Her ændres temperaturen til 12 grader, og nu kan vores PCR produkt opbevares natten over, hvis det er nødvendigt.

2.4.2 Extension PCR (ePCR)

Ud over en standard PCR findes der også **extension PCR** (ePCR). Dette er en PCR-metode, hvorpå man kan tilføje ekstra nukleotider på begge ender af sit GOI. ePCR har samme fremgangsmåde som en normal PCR, men i stedet for at lave standard primere, laver man en "**hale**" på sine primere. Denne hale består af de ønskede nukleotider, der skal tilføjes til enden af sit GOI (figur 12.1).

Når man designer primere til ePCR, skal man stadig inkludere sekvenser, der er kompatible med sit GOI. På den måde kan man stadig være sikker på, at ens primers sætter sig fast i annealing skridtet (figur 12.2). DNA-polymerasen vil herefter sætte sig til primerne og forlænge DNA'et. Når den kommer til det stykke DNA, hvor vores primer "hale" befinder sig, forlænger den også halen (figur 12.3). På denne måde forlænges vores PCR-produkt og denne metode vil blive inkorporeret under USER-kloning (se del 2.3.5). Biostriben har lavet en video om PCR, som vi anbefaler du ser for bedre forståelse.



Figur 12: Extension PCR. Metoden fungere på samme måde som en normal PCR. ePCR primere er designet til at have en "hale", der sørger for, at vores GOI bliver forlænget.

2.5 Gelelektroforese

Gelelektroforese er en adskillelsesteknik, hvor man kan separere- og identificere forskellige DNA-strenge eller proteiner i en opløsning. Gelelektroforese er et nyttigt redskab, da adskillelsen af DNA kan bruges til at måle antallet af basepar i en DNA prøve eller bekræfte om ens forsøg, har resulteret i den korrekte DNA-længde. Efter man har kørt en gelelektroforese, vil man se millioner af DNA-fragmenter, som adskilte lysende bånd i forskellige længder. De korteste DNA strenge vil rejse længst igennem gelen.

Men hvordan separeres DNA'et i gelen? I gelelektroforese udnytter man DNA'ets naturlige negative ladning. Denne negative ladning kommer fra DNA'ets fosfatgrupper, der optræder i hvert nukleotid (figur 1.4). I en gelelektroforese bliver DNA'et udsat for et elektrisk spændingsfelt, der har en negativ pol og en positiv pol. Da DNA er negativt ladet, vil det blive tiltrukket af den positive pol.

Der skal syv vigtige komponenter, der indgår i at lave en gelelektroforese: DNA, en gel, et elektroforesekammer med et spændingsfelt, en DNA ladder, en loading dye, en DNA stainer og en buffer.

1. Når man laver en gelelektroforese, støber man først sin gel. En gel består af polysacchariden **agarose**, der er blandet sammen med vores buffer og en **DNA-stainer**, der er vigtigt for at kunne visualisere sine bånd under UV-lys. Gelen bliver først varmet op, og når den efterfølgende er kølet ned, vil agarosen størkne, og blandingen få en geléagtig tekstur. I den størknede gel er der en masse små **porer** (huller), der fungerer ligesom hullerne i en si. Disse huller gør, at bevægelsen gennem gelen bliver sværere for DNA'et, jo længere distancen i gelen er, og jo længere DNA'et er. Det er derfor, at de kortere DNA-strenge vandrer gennem gelen hurtigere end de længere strenge. Forskellen i DNA-strengenes egenskab til at vandre gennem gelen gør at, man kan sortere DNA'et alt efter dets størrelse.

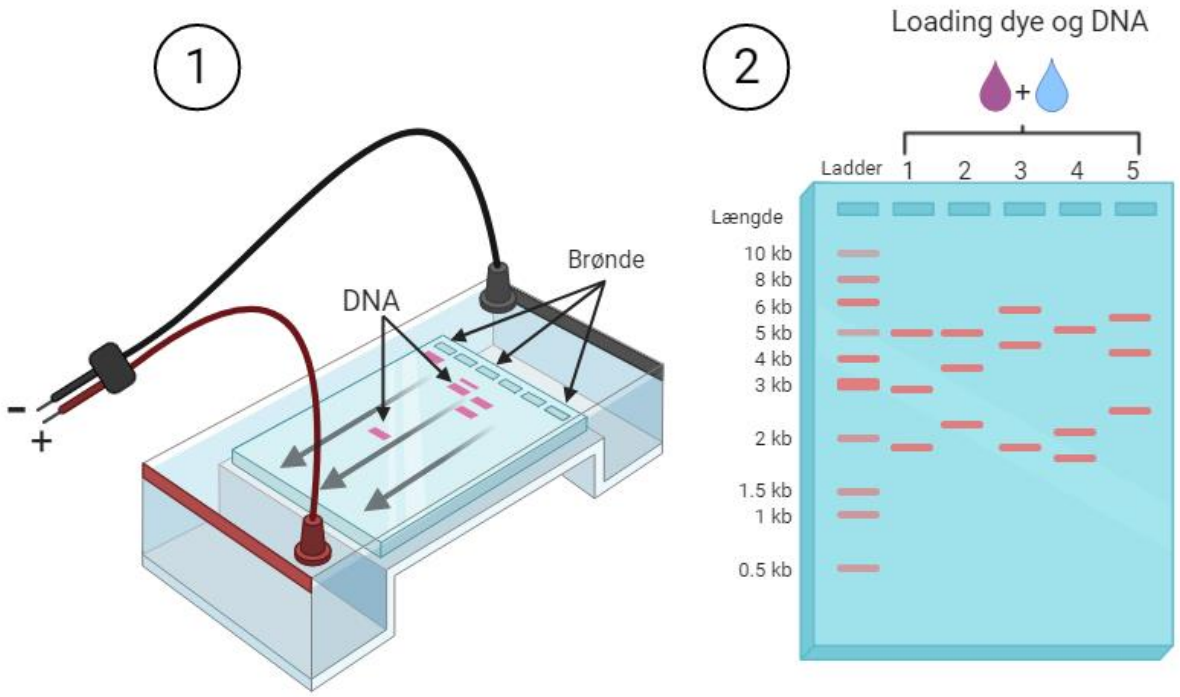
2. Gelen bliver herefter nedsænket i et elektroforesekammer, hvorefter en **buffer opløsning** hældes ned i elektroforesekammeret, så den lige akkurat dækker gelen. Buffer opløsningen er med til at holde pH'en stabil og beskytter gelen mod at udtørre. Ioner i bufferopløsningen er med til at lede strømmen under gelelektroforesen (figur 13.1).

3. De usynlige DNA-fragmenter bliver herefter blandet med en lille smule **loading dye,** der er farvet og indeholder en koncentreret sukkeropløsning. Dette er ofte glycerin**.** Dette gøres for at visualisere DNA'et.

4. Herefter placerer man sin DNA-prøve i nogle fordybninger (kaldet brønde), der er placeret for enden af sin gel. Glycerinen sørger for, at DNA'et synker lettere til bunds i brøndene. Udover at tilføje DNA'et i sine brønde, tilføjer man også en **DNA ladder**, der er en blanding af DNA-fragmenter i kendte længder (figur 13.2). Da vi kender længden på ladderens DNA-fragmenter, kan vi sammenligne de resulterende bånd fra vores egen DNA-prøve med båndende fra DNA ladderen og dermed få et godt overblik over hvor lange vores egne DNA-fragmenter er.

5. Efter at vores DNA-prøve og DNA ladderen er tilføjet til brøndene, starter man herefter sin gelelektroforese ved at tænde for spændingsfeltet. Når man tænder for spændingsfeltet, vil det negativt ladede DNA blive tiltrukket af den positive pol i elektroforesekammeret. Det betyder, at DNA'et vil vandre gennem gelen mod den positive pol. En gel fungerer som en filter, som DNA'et skal anstrenge sig for at komme igennem.

6. Efter at gelelektroforesen er gennemført, kan man ved hjælp af UV-lys se sit DNA som små bånd på gelen (figur 13.2). Grunden til at man bruger UV-lys er, at den tilføjede DNA stain binder sig til DNA'et og lyser op under UV-lys.



Figur 13: Gel elektroforese. (1) Gelen ligger nedsunket i vores bufferopløsning. DNA'et bliver tiltrukket af den positive elektrode og vandrer derfor i pilenes retning gennem gelen. (2) Man tilføjer sin DNA Ladder i den første brønd og sin loading dye og DNA i de resterende brønde. Vi kan herefter se, hvordan DNA-fragmenterne bliver vist efter gelen er kørt ved hjælp af UV-lys. I brønden til venstre er vores DNA ladder, hvor vi kender længderne på dens DNA-fragmenter. Vi kan ud fra DNA-ladderen se, hvor lange vores DNA-fragmenter er i prøverne, der er i brøndene navngivet 1-5.

Hvis du vil vide mere om gel elektroforese, anbefaler vi at du ser videoerne dedikeret til emnet på biostriben: https://bit.ly/3kp39XS

2.6 USER-kloning

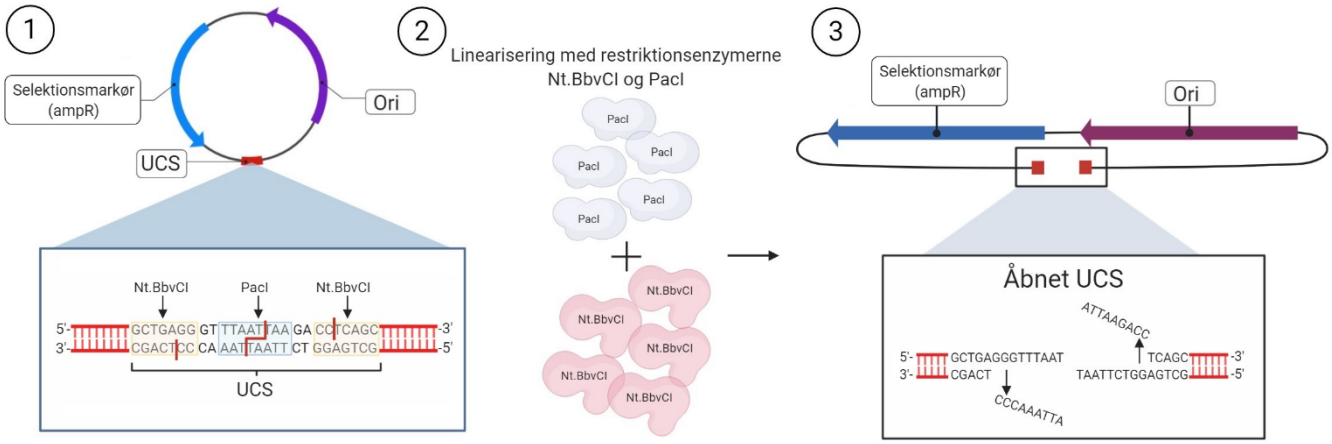
Uracile-Specific Excision Reagent (typisk forkortet til USER) er en kloningsmetode, hvor flere DNA-fragmenter kan klones ind på specifikke positioner i ens plasmid under én enkelt kloning. Det er derfor en yderst effektiv, hurtig og enkel kloningsmetode. En vellykket USER-kloning afhænger af to vigtige komponenter: 1. Et plasmid, der er blevet korrekt lineariseret. 2. Korrekte haler på det DNA-fragment, der skal indsættes i plasmidet. Disse haler laves ved hjælp af ePCR (se sektion 2.3.3). Begge komponenter vil blive uddybet i følgende afsnit.

Et korrekt lineariseret plasmid

Plasmidet, der skal bruges til en USER-kloning, skal indeholde et såkaldt **USER-kloningssite (UCS).** Dette UCS består af tre genkendelsessites for to restriktionsenzymer. Det første genkendelsessite er for restriktionsenzymet PacI og de to øvrige genkendelsessites er for restriktionsenzymet Nt.BbvCI. De tre genkendelsessites ligger ved siden af hinanden som afbilledet i figur 14.1.

Først lineariserer PacI plasmidet ved at klippe det dobbeltstrengede plasmid over ved dets genkendelsessite. Plasmidet har dermed fået to ender. Herefter klipper Nt.BbvCI kun en enkelt DNA-streng ved sit genkendelsessite. Dette fænomen har vi tidligere beskrevet som "nicking" (se sektion 2.3.2). Læg mærke til at de to genkendelsessites for Nt. bbcCI resulterer i nicking på hver sin DNA-streng. Dette betyder, at de nukleotiderne, der er placeret mellem de to restriktionsenzymers klippemønstre, bliver tabt. Dette resulterer

i et lineariseret plasmid, der indeholder sticky ends, der kan danne basepar med de haler, som vi tilføjer vores GOI (figur 14.3).



Figur 14: Linearlisering af vores USER plasmid. (1) Her ses de tre forskellige genkendelsessites for restriktionsenzymerne PacI og Nt.BbvCL. Her ses, at genkendelsessitet for PacI er i midten (2) De to restriktionsenzymer tilføjes. (3) Resultatet af lineariseringen er et åbent UCS med 5' overhangs. Vores plasmid er nu lineært.

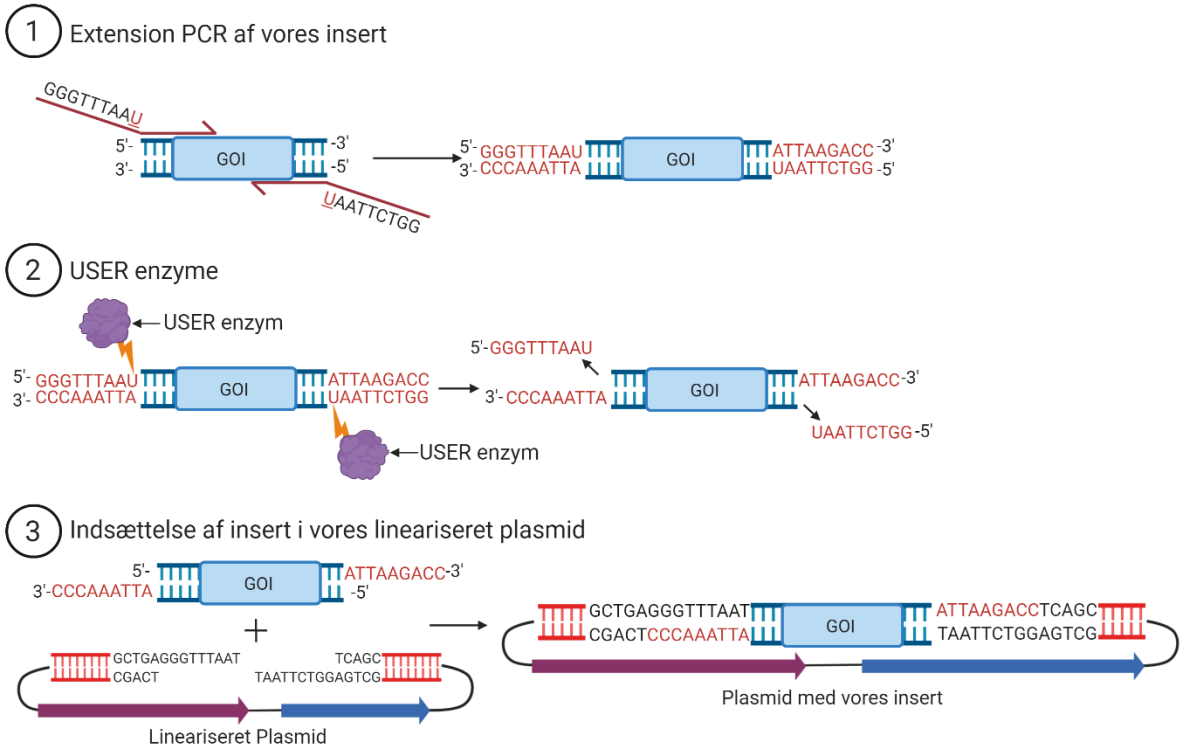
Korrekte haler på det indsatte DNA-fragment

Med en ePCR (sektion 2.3.3) kan man forlænge sit GOI, hvilket udnyttes i en USER-kloning. I USER-kloning laver man et PCR-fragment, der er blevet forlænget men en dobbeltstrenget hale, der er ni basepar lang på begge sider. Men vi ønsker en hale, der er enkeltstrenget, som kan danne basepar med de resulterende sticky ends, som der blev lavet i vores plasmid ved hjælp af PacI og Nt.BbvCL (figur 15.1). Men hvordan laver vi den enkeltstrenget?

For at kunne lave en enkeltstrenget hale, skal vi lave en unik primer, der komplementere den hale, som vi ønsker at lave. Denne primer skal indeholde nukleotidet uracil som det niende nukleotid fra 5' enden (se figur 15.1). Uracil er nøglen til at lave den enkeltstrengede hale. Hvis uracil ikke var en del af vores primer design, ville vores resulterende hale i stedet blive dobbeltstrenget. Men hvordan bidrager uracil til den enkeltstrengede hale?

Visse slags enzymer sørger for, at de forkerte baser i DNA'et bliver slettet, herunder et USER-enzym. Hvis USER-enzymet læser en DNA-sekvens og støder på basen uracil i stedet for thymin, fjerner den uracil, da dette nukleotid ikke findes naturligt i DNA. Når USER-enzymet har fjernet uracil fra halen på vores PCR-fragment, vil de resterende otte nukleotider på den pågældende DNA-streng gå tabt. Når de otte nukleotider går tabt, resulterer dette i en 3'-enkeltstrenget hale på hver side af vores DNA-fragment, der komplementere de 5' overhangs på vores plasmid. Det er derfor meget vigtigt, at de primere, som designes under ePCR, indeholder den rigtige sekvens, der resulterer i PCR-produkter med enkeltstrengede haler, der er kompatible med vores lineariserede plasmiders overhangs (figur 15.3).

Efter vi har brugt USER-enzymet på vores PCR-produkt, er vi klar til at blande DNA-fragmentet og plasmidet med hinanden. Dette vil resultere i, at vores insert bliver inkorporeret i vores plasmid. Man ender derfor med et funktionelt- og cirkulært plasmid, der har fået integreret vores insert (figur 15.3).



Figur 15: USER cloning. (1) Designet af vores primers. Det er vigtig, at primerne tilføjer den rigtige sekvens, og de indeholder en uracil-base, markeret med rød og understreget. Enderne tilføjet med ePCR er markeret med rød tekst. (2) Når vi tilføjer USER-enzymet vil det fjerne uracilbasen hvilket medfører, at nukleotiderne mellem uracilbasen og enden vil fjernes fra vores insert. (3) Når vi kombinere vores insert og vores lineariserede plasmid, resulterer det i et cirkulært og funktionelt plasmid, der indeholder vores GOI, hvor vi før havde vores UCS. Plasmidet indeholder nu også selektionsmarkør (lilla) og ORI (blå)

Videoen om gensplejsning fra biostriben giver et godt indblik i hvordan man bruger plasmider og hvordan man indsætter genet i vores plasmid: https://bit.ly/3iApYY8

2.7 Kompetente celler

En celles **kompetence** er dens evne og villighed til at optage fremmed DNA fra dens omgivelser. Denne proces kaldes for **transformation**. Transformationer forekommer også spontant i naturen, hvor en bakterie optager fremmed DNA og inkorporere det i dens genom eller som et plasmid. Dette kaldes for **horisontal genoverførsel.** Man kan til gengæld ikke regne med, at der vil ske en spontan transformation, hvis man blot blander celler med DNA. Man har i stedet udviklet en måde, som garanterer succesfuld transformation.

Kompetente celler er celler, hvis cellemembran er blevet gjort modtagelig for overførelsen af fremmed DNA. Cellerne kan blive kompetente, ved at lave små porer i cellemembranen og ved at neutralisere cellemembranens negative ladning. Du vil komme til at benytte dig af **kemisk kompetente celler**, dvs. celler der er gjort kompetente ved hjælp af kemiske midler. For at lave kemisk kompetente celler neutralisere man først cellemembranens negative ladning med et saltbad. Efterfølgende udsættes cellerne for et varmechok, der skaber små porer i cellemembranen. Grunden til, at man først neutraliserer cellemembranens negative ladning, er for at facilitere fæstningen af plasmidet (som jo er negativt ladet) på ydersiden af cellens

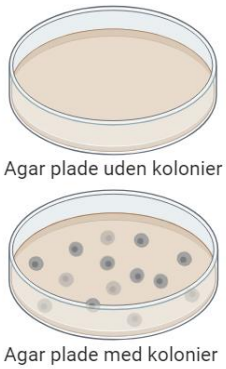
membran. De kemiske midler, som man bruger til dette, er saltet kalciumklorid. For at få DNA'et ind i cellens cytosol, udsætter man cellerne for et varme chok, der danner de små porer i cellens membran. Disse porer er store nok til, at plasmiderne kan blive transporteret gennem cellemembranen og komme ind i cellens cytosol, hvor cellen kan udtrykke plasmidets gener.

2.8 Vækstmedie

For at få vores bakterier til at gro, bliver vi nødt til at give dem de rigtige forhold. Bakterierne har brug for organiske stoffer, mineraler og salt for at kunne være i vækst. Hvis man blander alle disse stoffer i de rigtige proportioner, har man lavet et **vækstmedie**. Der findes en del forskellige vækstmedier, hvor indholdet afhænger af, hvilke organismer man vil gro.

Det medie, som vi vil benytte os af, er **LB-medie** (kort for Lysogeny Broth medie), da det er et simpelt og effektivt medie. For at lave 1 liter LB-medie skal man blande 10g/L **tryptone**, 5g/L **gærekstrakt** og 10g/L **natriumklorid** i 1 liter vand. Tryptonen er en blanding af peptider (proteiner), som er bakteriernes kilde til aminosyrer. Gærekstrakt består af gærcellens indhold efter cellevæggen er fjernet. Dette er bakteriens kilde til sukker, mineraler og anden næring. Natriumklorid er normalt køkkensalt, som celler også har brug for.

Udover flydende medie baseret på vand kan man også lave et solidt medie, som man bruger på petriskåle. Et solidt medie er stadig baseret på LB mediet, men udover tryptone, gærekstrakt og natriumklorid tilføjer man også 15g/L **agar**. Agar er en smagløs hvid substans, der kommer fra røde algers cellevægge. Agar smelter og bliver flydende ved 85°C og bliver solid igen ved 32-40°C. Disse karakteristika gør, at agar er optimalt at bruge til et solidt medie.



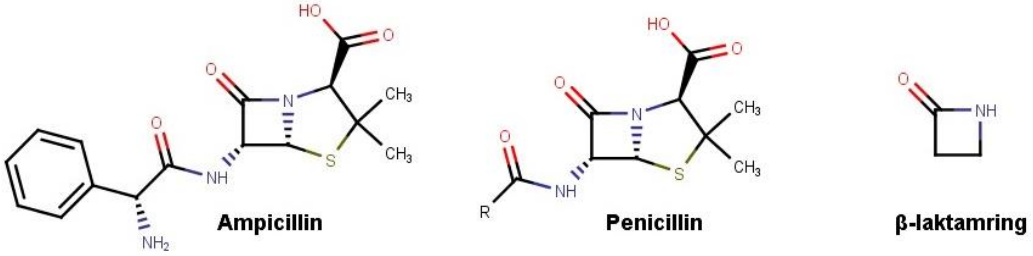
Figur 16: Agarplader

Agarplader er et andet navn for petriskåle, der indeholder et solidt medie baseret på agar. Agarplader bliver primært brugt til at sprede cellerne ud på en overflade. Celler, der bliver spredt ud på en agarplade og får lov til at gro, er lette at identificere, da de bliver synlige, som små farvede prikker (også kaldet **kolonier**). Hver koloni er et resultat af mange millioner af celler, der befinder sig på samme sted (figur 16). Det er vigtigt at kunne sprede cellerne ordentligt ud på en agarplade, da det er lettere at tælle de resulterende kolonier. Det er også vigtigt for at kunne lave en **selektion**. Ved en selektion identificerer og isolerer man bestemte kolonier, der har udvalgte karakteristika, såsom vækst mens der er antibiotika til stede eller farveskift. F.eks. vil de bakterier, der har optaget vores plasmid efter USER-kloning, gro på agarplader med Ampicillin. Dette skyldes, at vores bakterier er blevet resistente over for Ampicillin, da de har optaget vores plasmid.

2.9 Markørassisteret selektion (MAS)

Selektion betegner en udvælgelsesproces, hvorpå man målrettet udvikler en organisme til at have en bestemte **fænotype**. En organismes fænotype betegner dens synlige og fysiske karakteristika. Disse karakteristika opstår i et samspil mellem organismens genetiske egenskaber (genotype) og organismens miljø.

I bioteknologi er én af de mest brugte selektionsprincipper **markørassisteret selektion (MAS).** MAS bliver ofte brugt til at udvikle en organisme med **antibiotikaresistens**. Antibiotikaresistens bliver ofte brug til at udvælge de celler, der har optaget et plasmid, der indeholder en selektionsmarkør, der koder for én specifik type antibiotikaresistens (se sektion 2.3.1). Dette plasmid indeholder også ofte ens GOI-sekvens.



Figur 17: Beta-lactam antibiotikaerne ampicillin og penicillin og strukturen på beta-lactam ringen.

De celler, der er blevet transformeret succesfuldt og har fået optaget vores plasmid med vores GOI-sekvens og vores antibiotikamarkør, vil kunne overleve i et miljø, hvor antibiotikummet er til stede. De celler, der ikke har optaget plasmidet vil dø. Dette kaldes også for et **selektionspres**. Selektionspres gælder også i andre sammenhænge. F.eks. kan man undlade at tilføje én bestemt aminosyre i organismens medie, og derefter udvælge/selektere de celler, der kan syntetisere den manglende aminosyrer. De celler, der ikke kan syntetisere aminosyren, vil dø.

Til vores eksperimenter vil vi komme til at udvælge bakterier, der kan overleve i et medie med Ampicillin. Ampicillin er kategoriseret som en **β-laktamantibiotika,** der har en β-laktamring i deres kemiske struktur (figur 17). Penicillin er derfor karakteriseret, som en **β-laktamantibiotika**. Disse slags antibiotika svækker bakteriernes evne til at producere sin cellevæg ved at binde sig til vigtige synteseproteiner. Dette vil resultere i en svækket bakterievæg, hvor vand kan strømme ind i cellen. Bakterien vil over tid svulme så meget op, at den sprænger og dør.

Der er flere måder, hvorpå bakterier kan blive resistente over for disse typer antibiotika. F.eks. kan bakterierne udtrykke et enzym, der nedbryder antibiotikummets β-laktamring, så antibiotikummet uskadeliggøres. Bakterierne kan også ændre strukturen på de synteseproteiner, som antibiotikummet normalt ville binde sig til. Dette medfører, at antibiotikaene ikke længere kan finde synteseproteinerne og bakteriens cellevæg forbliver intakt.

Litteraturliste:

1. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science (80-). 2014;346. doi:10.1126/science.1258096

2. Schaaper RM. Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in Escherichia coli. J Biol Chem. 1993;268: 23762–23765.

3. Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure, and related photophysical behavior. Chem Rev. 2002;102: 759–781. doi:10.1021/cr010142r

4. Tafoya-Ramírez MD, Padilla-Vaca F, Ramírez-Saldaña AP, Mora-Garduño JD, Rangel-Serrano Á, Vargas-Maya NI, et al. Replacing Standard Reporters from Molecular Cloning Plasmids with Chromoproteins for Positive Clone Selection. Molecules. 2018;23. doi:10.3390/molecules23061328

5. Gui Q, Lawson T, Shan S, Yan L, Liu Y. The application of whole cell-based biosensors for use in environmental analysis and in medical diagnostics. Sensors (Switzerland). 2017;17: 1–17. doi:10.3390/s17071623

6. Cui Z, Luan X, Jiang H, Li Q, Xu G, Sun C, et al. Application of a bacterial whole cell biosensor for the rapid detection of cytotoxicity in heavy metal contaminated seawater. Chemosphere. 2018;200: 322–329. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.02.097

7. Kylilis N, Riangrungroj P, Lai HE, Salema V, Fernández LÁ, Stan GB V., et al. Whole-cell biosensor with tunable limit of detection enables low-cost agglutination assays for medical diagnostic applications. ACS Sensors. 2019;4: 370–378. doi:10.1021/acssensors.8b01163

8. Wen KY, Cameron L, Chappell J, Jensen K, Bell DJ, Kelwick R, et al. A Cell-Free Biosensor for Detecting Quorum Sensing Molecules in P. aeruginosa-Infected Respiratory Samples. ACS Synth Biol. 2017;6: 2293–2301. doi:10.1021/acssynbio.7b00219

9. Aye-Han NN, Ni Q, Zhang J. Fluorescent biosensors for real-time tracking of post-translational modification dynamics. Current Opinion in Chemical Biology. Elsevier Current Trends; 2009. pp. 392–397. doi:10.1016/j.cbpa.2009.07.009

10. Eugene V. Koonin, Kira S. Makarova and LA. Horizontal Gene Transfer in Prokaryotes: Quantification and Classification. Annu Rev Microbiol. 2001; 709–742. doi:https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.709