

CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA

INSTITUTIONEN FÖR BIOLOGI OCH BIOTEKNIK

PROJEKTRAPPORT

Utveckling av alkaninducerad
biosensor i
Saccharomyces cerevisiae

BBTX01-16-01

Författare:

Isabella BONDESSON

Emma ERICSON

Carl MÖLLER

My NYBLOM

Amanda OLMIN

Johanna ORTGREN

Handledare:

Verena SIEWERS

Florian DAVID

Laborationsassistent:

Raphael FERREIRA

Examinator:

Eva ALBERS

16 maj 2016



CHALMERS

Development of alkane-induced biosensor in *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

The increasing greenhouse effect requires new types of fuels and new ways to produce these. Using microbes as factories to produce fuels is a promising method and has been on the agenda for some years. n-Alkanes have a high similarity with diesel, among others, and can substitute today's fossil fuels. Strains of *Saccharomyces cerevisiae* that can produce n-alkanes have been developed. These strains are far from optimal and need improvement before they can be used on an industrial scale.

The aim of this project is to create a biosensor that can be used as a high throughput screening tool for optimizing the yield of n-alkanes in *S. cerevisiae*. A transcription system from *Yarrowia lipolytica* is, together with GFP, used to create the biosensor. The biosensor will be able to sense the presence of n-alkanes with fluorescence as the output signal. The system from *Y. lipolytica* is composed of three genes and a promoter motif, *YAS1*, *YAS2*, *YAS3* and ARE1. It has been confirmed that the system activates transcription in the presence of n-alkanes.

PCR-products were generated with success and were used to construct plasmids containing combinations of *YAS1*, *YAS2*, *YAS3*, ARE1-sequences and *GFP*. Verification of the constructed plasmids confirmed that the genes had been incorporated with few mutations. The biosensor was introduced into *S. cerevisiae* with a two-vector system. Flow cytometry was used to test the biosensor in both presence and absence of decane and a difference in output was confirmed. The results provide a proof of principle that indicates that the system from *Y. lipolytica* is transferable to *S. cerevisiae* with the aim to create a biosensor for n-alkanes.

Sammanfattning

Den ökande halten av växthusgaser i atmosfären kräver en utveckling av nya miljövänliga bränslen. Användning av mikrober vid bränsletillverkning är en lovande metod som har varit aktuell i flera år. n-Alkaner har en hög likhet med bland annat diesel och kan därför direkt ersätta nuvarande fossila bränslen. Stammar av *Saccharomyces cerevisiae* som kan producera n-alkaner har tagits fram. Dessa stammar är långt ifrån optimala och behöver utvecklas innan de kan nyttjas på industriell skala.

Målet med detta projekt är att skapa en biosensor som kan användas som ett screeningverktyg för att optimera utbytet av n-alkaner i *S. cerevisiae*. Ett transkriptionssystem från *Yarrowia lipolytica* tillsammans med *GFP* används för att skapa biosensorn. Systemet från *Y. lipolytica* består av tre gener, *YAS1*, *YAS2* och *YAS3*, samt promotorsekvensen ARE1. Detta systemet aktiverar transkription i närvaro av n-alkaner.

PCR-produkter genererades med framgång och användes för att konstruera plasmider innehållande kombinationer av *YAS1*, *YAS2*, *YAS3*, ARE1-sekvenser samt *GFP*. Verifikation av de konstruerade plasmiderna bekräftade att generna inkorporerats med få mutationer. Biosensorn introducerades i *S. cerevisiae* med ett två-vektorsystem. Flödescytometri användes för att testa biosensorn i närvaro och frånvaro av dekan och en skillnad i uttryck bekräftades. Resultaten indikerar på att det är möjligt att implementera systemet från *Y. lipolytica* i *S. cerevisiae* med målet att skapa en biosensor för n-alkaner.

Innehåll

1	Inledning	1
1.1	Bakgrund	1
1.2	Syfte	2
2	Teori	2
2.1	Alkaninducerat transkriptionssystem i <i>Y.lipolytica</i>	2
2.2	Konstruktion av biosensor	4
3	Avgränsningar	8
4	Metod och material	9
4.1	PCR	9
4.2	Plasmidkonstruktion	10
4.3	Transformation	11
4.4	Verifikation	12
4.5	Koloni-PCR	12
4.6	Fluorescensmätning	13
5	Resultat och diskussion	14
5.1	PCR	14
5.2	Verifikation	15
5.2.1	Verifiering av transformation till <i>E. coli</i>	15
5.2.2	Sekvensering	17
5.2.3	Verifikation av gener med koloni-PCR	20
5.3	Fluorescensmätning	22
6	Slutsatser	26
7	Framtida studier	27
8	Referenser	29
9	Appendix	31
9.1	Primersekvenser	31
9.2	Protokoll för PCR	33
9.2.1	ThermoScientific™Phusion™High-Fidelity DNA Polymeras	33
9.2.2	TaKaRa PrimeSTAR ^R HS DNA Polymeras	33
9.2.3	ThermoScientific™DreamTaq™DNA Polymeras	34
9.2.4	Fusions-PCR	35
9.2.5	Innehåll, inbindningstemperaturer, förlängningstider samt polymeras för PCR-produkter	37
9.3	Protokoll för restriktion	38
9.4	Protokoll för Gibsonkloning	38
9.5	Medium och odlingsplattor	39

9.5.1	LB-medium och LB-Amp-plattor	39
9.5.2	SD-URA-HIS-plattor	39
9.5.3	Delftmedium	40
9.6	Sekvensering	41

1 Inledning

Växthuseffekten ökar och användandet av fossila bränslen anses vara en bidragande orsak [1]. För att ersätta de fossila bränslena undersöks möjligheten att producera n-alkaner med mikrober, framförallt med jästen *Saccharomyces cerevisiae* som produktionsorganism [2]. n-Alkaner har en hög likhet med bland annat diesel och kan därför direkt ersätta nuvarande fossila bränslen [3]. Vid framtagandet av en högproducerande *S. cerevisiae*-stam saknas det i dagsläget ett verktyg som effektivt kan kvantifiera mängden producerade n-alkaner i slumpmässigt muterade stammar.

Projektets avsikt är att skapa en biosensor i *S. cerevisiae* som fluorescerar i närvaro av n-alkaner. Biosensorn baseras på ett n-alkaninducerat transkriptionssystem från jästen *Yarrowia lipolytica* som överförs till *S. cerevisiae*. För att erhålla en optisk signal är systemet kopplat till *GFP* (Green Fluorescent Protein).

1.1 Bakgrund

n-Alkaner är en grupp av mättade kolväten som vanligen utvinns ur petroleum och utnyttjas till bränsletillverkning där bensen, diesel och fotogen är de primära målprodukterna. Petroleum är en fossil bränslekälla, vilket innebär att användandet av den bidrar till en ökad mängd koldioxid i atmosfären [1]. Ökningen av koldioxid bidrar till växthuseffekten, vilket medför klimatförändringar [1].

Mycket forskning har lagts på att hitta alternativ till användandet av petroleum som bränslekälla. Med hänsyn till miljön och klimatet anses biobränslen vara de mest optimala ersättningarna då de är förnybara. I och med detta har en mikrobiell produktion av förnybara biobränslen, med bland annat *S. cerevisiae* som produktionsorganism [4], utvecklats under det senaste årtiondet. Produktion av etanol, med *S. cerevisiae*, har varit den mest framgångsrika [5].

Etanol är inget optimalt bränslealternativ på grund av sin låga energitäthet [2]. Det finns en begränsning av hur mycket etanol som kan blandas in i vanlig bensen, vilket hindrar en vidare utveckling av att använda etanol som biobränsle [6]. Istället har intresse lagts på att utveckla biobränslen som kan användas som substitut till dagens bränslen. Dessa substitut går under benämningen avancerade biobränslen.

En undergrupp inom de avancerade biobränslena är medellånga och långa alkaner, vilka har en hög likhet med fotogen och diesel [3]. Att kunna producera dessa n-alkaner på mikrobiell väg är av stort intresse då de möjliggör en produktion av biobränslen som direkt kan ersätta fossilt baserade transportbränslen [2].

Forskningsresultat har visat att det är möjligt att skapa en jäststam med förmågan att producera n-alkaner [5], men för att kunna använda jäststammen i större skala behöver den optimeras. För att uppnå en högre alkanproduktion i *S. cerevisiae* har effekten av att öka prekursorer, minska eller eliminera

produktionen av biprodukter, eliminera återbildningsreaktionsvägar samt introducera nya reaktionsvägar undersökts [7]. Trots dessa modifikationer har utbytet av n-alkaner i *S. cerevisiae* hittills varit lågt [7].

En möjlig utveckling för att öka utbytet av n-alkaner i *S. cerevisiae* är att kombinera tidigare modifikationer med slumpvis mutagenes. Detta skulle resultera i en stor mängd prov som i dagsläget tar lång tid att analysera. Att frystorka celler och analysera innehållet med hjälp av gaskromatografi och masspektrometri är en analysmetod som används idag. Processen är tidsödande och i praktiken näst intill omöjlig att applicera på ett stort antal prover [2]. Därav söks det ett verktyg i *S. cerevisiae* som möjliggör enkel kvantifiering av n-alkanproduktion.

1.2 Syfte

Syftet med projektet är att utveckla en biosensor i *S. cerevisiae* som baseras på ett alkaninducerat system från *Y. lipolytica* kopplat till *GFP*. Biosensorn ska ge en optisk detekterbar signal vid närvaro av n-alkaner och möjliggöra en enkel analys av stora mängder prov.

2 Teori

Teorin bakom biosensorn bygger på ett system i *Y. lipolytica* som aktiveras av n-alkaner. Systemet aktiverar transkription av gener som krävs för n-alkanassimilering via tre interagerande transkriptionsfaktorer. De sekvenser som krävs för att systemet ska fungera introduceras i *S. cerevisiae* med ett två-vektorsystem.

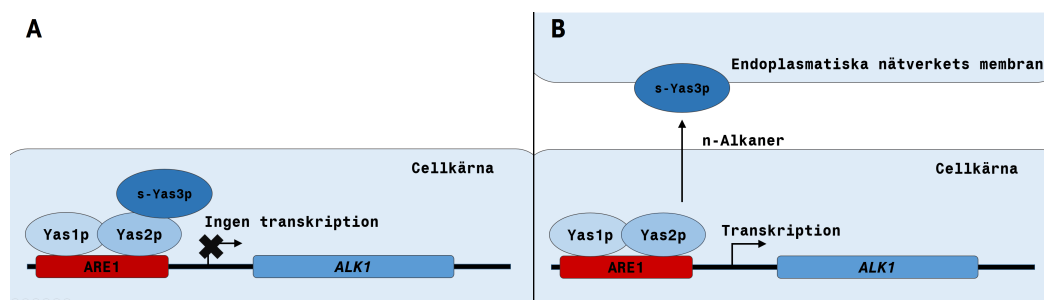
2.1 Alkaninducerat transkriptionssystem i *Y. lipolytica*

Många bakterier, svampar och jäster har tidigare visats kunna tillgodogöra sig n-alkaner [8]. En av de mest studerade jästarterna med förmågan att växa på hydrofoba kolkällor är *Y. lipolytica* [9]. Arten har påträffats i lipidrika miljöer och varit av intresse på grund av sin goda förmåga att ansamla lipider inuti cellen [9][10]. Nämnade egenskaper, i kombination med att *Y. lipolytica*s genom är sekvenserat, har gjort att *Y. lipolytica* studerats som modellorganism för nyttjandet av hydrofoba kolkällor [9].

Y. lipolytica har flera gener som kodar för n-alkanassimilerade proteiner. De identifierade generna benämns *ALK1-12* [11]. *ALK1* kodar för enzymet cytokrom P450_{ALK1} som är involverad i jästens assimilering av n-alkaner [12]. *Y. lipolytica* tillgodogör sig n-alkaner genom att cytokrom P450 i det endoplasmatiska nätverket katalyserar hydroxylering av n-alkaner till fettsyraalkoholer. Fettsyraalkoholerna bryts vidare ner till fettaldehyder antingen av ett dehydrogenas i det endoplasmatiska nätverket eller av ett oxidas i peroxisomen. Dessa fettaldehyder bryts sedan ner i en serie reaktionssteg för att slutligen användas i syntesen av lagringslipider eller i β -oxidationen [9].

Transkriptionen av *ALK1* aktiveras i närvaro av n-alkaner via en 24 bp lång sekvens i promotorn kallad ARE1 (Alkane Responsive Element 1)¹. Sekvensen är placerad uppströms i promotorn från *ALK1* [13]. Tre gener, *YAS1*, *YAS2* och *YAS3* (Yeast Alkane Signaling) kodar för tre proteiner som påverkar transkriptionen av *ALK1* genom interaktion med ARE1-sekvensen i promotorn [11]. Transkriptionen aktiveras genom inbindning av ett heterokomplex till ARE1-sekvensen där heterokomplexet består av de två basic helix-loop-helix-transkriptionsfaktorerna Yas1p och Yas2p [12]. Yas1p och Yas2p är konstant lokaliserade i cellkärnan [11].

YAS3 ger upphov till ett långt och ett kort protein (l-Yas3p respektive s-Yas3p) beroende på var transkriptionen initieras [11]. s-Yas3p har visats vara mest framträdande i regleringen av *ALK1* [11]. I frånvaro av n-alkaner är Yas3p tillsammans med Yas1p och Yas2p lokaliserat i cellkärnan. Det kortare proteinet s-Yas3p fungerar där som en repressor genom att interagera med Yas2p i heterokomplexet. Interaktionen förhindrar aktivering av transkription [11]. I närvaro av n-alkaner delokaliseras s-Yas3p till det endoplasmatiske nätverkets membran. Komplexet av Yas1p och Yas2p kan då aktivera transkription, vilket gör att *ALK1* transkriberas [11]. Transkriptionssystemet har visats aktiveras av 2% v/v n-dekan och 2% v/v n-hexadekan [12]. En illustration av systemet visas i Figur 1.



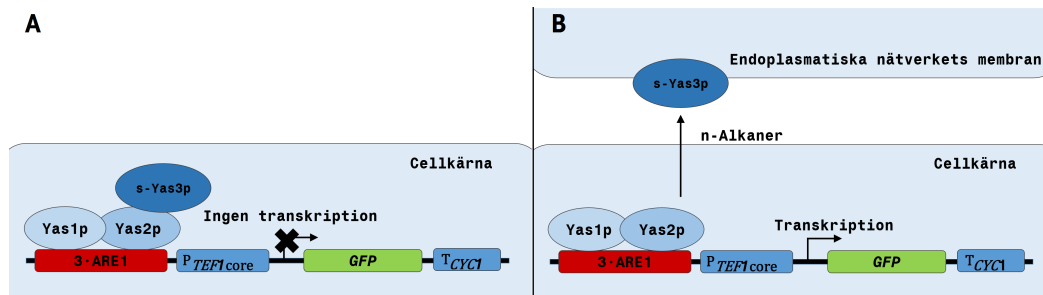
Figur 1: Schematisk illustrering av det n-alkaninducerade systemet i *Y. lipolytica* utan närvaro av n-alkaner, **A**, respektive vid närvaro av n-alkaner, **B**. Utan närvaro av n-alkaner befinner sig s-Yas3p i cellkärnan där det interagerar med Yas2p i aktiveringskomplexet bestående av Yas1p och Yas2p. s-Yas3p fungerar därmed som en repressor och *ALK1* transkriberas ej. Vid närvaro av n-alkaner delokaliseras s-Yas3p till det endoplasmatiske nätverkets membran. Komplexet av Yas1p och Yas2p kan då aktivera transkriptionen av *ALK1*.

Mekanismen för hur systemet känner av närvaron av n-alkaner, det vill säga orsaken till delokaliseringen av s-Yas3p, är i dagsläget okänd. En teori har föreslagits där s-Yas3p binder till det endoplasmatiske nätverkets membran via association med fosfatidinsyror och fosfatidylinositoler [14].

¹CACATGCTGTTGTCATCGCACAAG

2.2 Konstruktion av biosensor

Biosensorn ska baseras på det n-alkaninducerade transkriptionssystemet från *Y. lipolytica* där *ALK1* ersätts med *GFP*. I närvaro av n-alkaner ska transkriptionen av *GFP* aktiveras och ge en optiskt detekterbar signal. Detta illustreras i Figur 2.

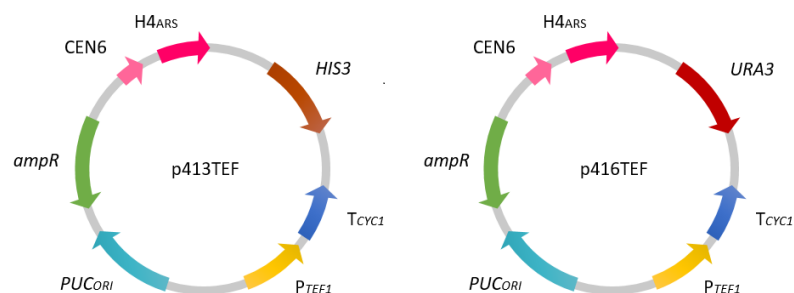


Figur 2: Det n-alkaninducerade systemet från *Y. lipolytica* introducerat i *S. cerevisiae*. Utan närvaro av n-alkaner, **A**, fungerar s-YAS3p som en repressor och förhindrar transkription av *GFP* i biosensorn. I närvaro av n-alkaner, **B**, delokaliseras s-YAS3p och transkription av *GFP* initieras i biosensorn.

De olika delarna av transkriptionssystemet konstrueras på två skyttelplasmider, p413TEF och p416TEF, som visas i Figur 3. Plasmiderna innehåller transkriptionsorigin för *Escherichia coli* (PUC_{ORI}) och *S. cerevisiae* (H4_{ARS}) samt selektionsmarkörer för respektive art. *E. coli* selekteras med hjälp av *ampR*, vilket är en gen som ger resistens mot ampicillin.

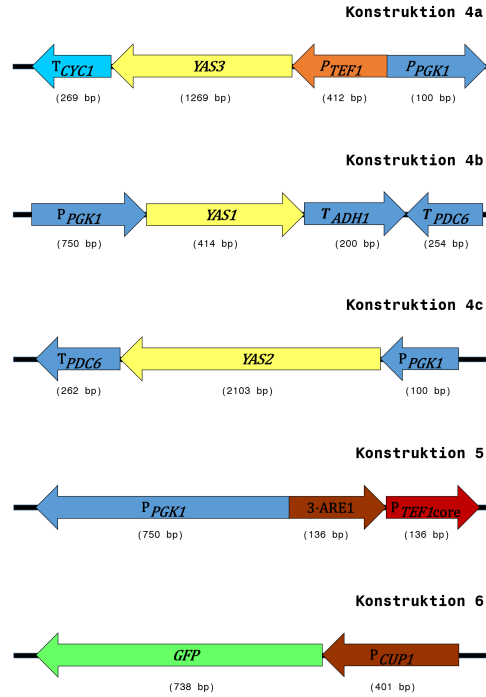
S. cerevisiae selekteras med hjälp av ett HIS/URA-system, där p413TEF innehåller genen *HIS3* och p416TEF innehåller genen *URA3*, se Figur 3. Detta innebär att de *S. cerevisiae*-celler som tar upp nämnda plasmider har förmågan att syntetisera histidin (*HIS3*) och uracil (*URA3*). Den *S. cerevisiae*-stam som systemet introduceras i har en *his3/ura3*-bakgrund vilket medför att den inte har förmågan att växa i ett medium utan histidin och uracil. Vid transformation av *S. cerevisiae* används medium utan histidin och uracil och enbart de *S. cerevisiae*-celler som tagit upp båda plasmiderna kommer att växa.

H4_{ARS} är ej stabil vid celldelning *in vivo*. Skyttelplasmiderna innehåller därför även en sekvens (CEN6) som i jäst fungerar som en centromer. Sekvensen känns igen av jästcellerna på samma sätt som kromosomerna känns igen och stabiliserar överföringen av plasmiderna vid celldelning. Plasmiderna replikeras då på samma sätt som det kromosomala DNA:t vid celldelning och det säkerställs att varje jästcell får en kopia av varje plasmid.



Figur 3: Schematisk bild över det genetiska innehållet av p413TEF och p416TEF. Båda plasmiderna innehåller PUC_{ORI}, *ampR*, CEN6, H4_{ARS}, promotorn P_{TEF1} och terminatorn T_{CYC1}. p413TEF innehåller *HIS3* och p416TEF *URA3*.

Innan projektet påbörjades genomfördes liknande studier vilket medför att det sedan tidigare fanns en strategi samt konstruktioner tillgängliga som startmaterial [15]. Transkriptionssystemet från *Y. lipolytica* fanns som fyra olika konstruktioner, 4a-c och 5, vilka illustreras i Figur 4. Konstruktionerna var syntetiserade av GenScript® och kodonoptimerade för *Y. lipolytica*. I Figur 4 illustreras även konstruktion 6 som innehåller *GFP*. Konstruktion 4a-c, 5 och 6 används som templat vid PCR-amplifiering och sammanfogas i olika kombinationer till önskade plasmider enligt Figur 5. Förutom konstruktionerna fanns även tidigare konstruerade plasmider att tillgå, dock ej fullständigt verifierade.

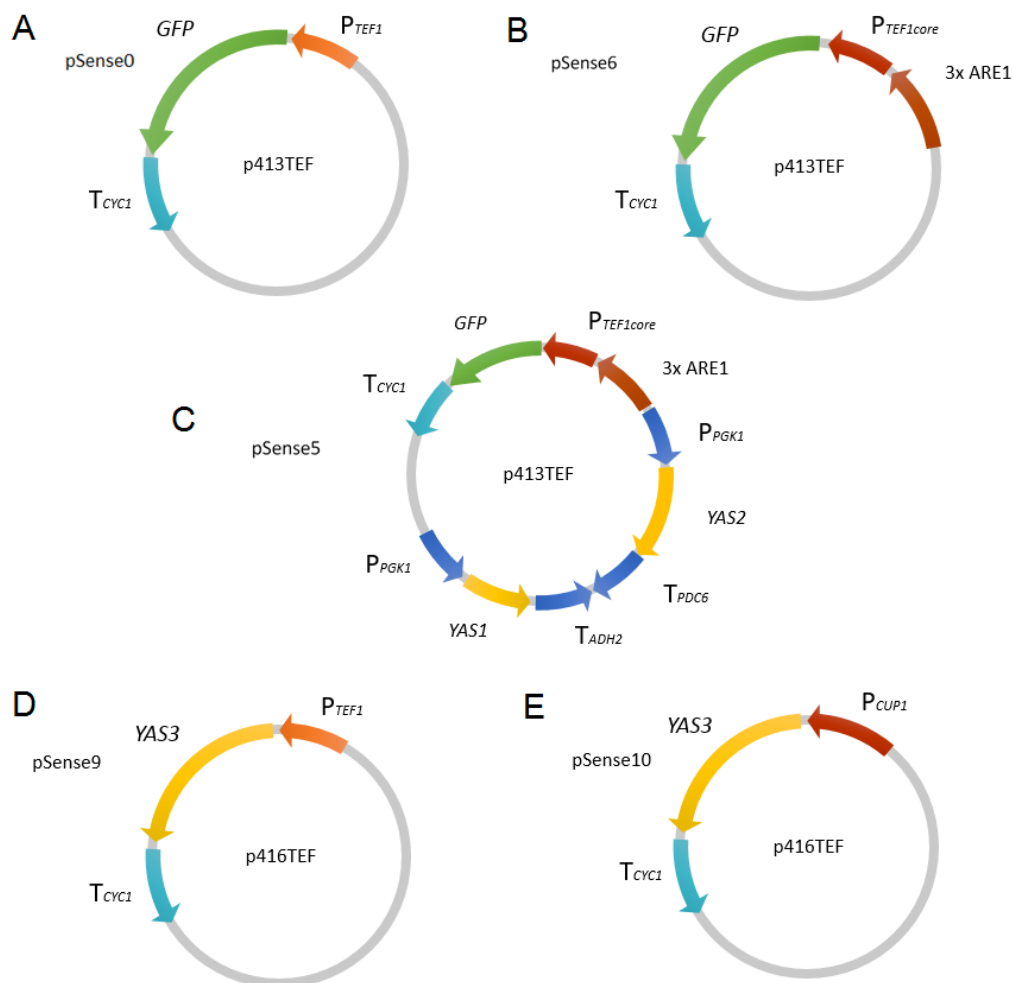


Figur 4: Schematisk bild över det genetiska innehållet i konstruktion 4a-c, 5 och 6. 4a innehåller *YAS3* (P_{TEF1} som promotor och T_{CYC1} som terminator) samt promotorn P_{PGK1} . 4b innehåller *YAS1* (P_{PGK1} som promotor och T_{ADH1} som terminator) samt promotorn T_{PDC6} . 4c innehåller *YAS2* (P_{PGK1} som promotor och T_{PDC6} som terminator). 5 innehåller promotorn $P_{TEF1core}$, 3x ARE1-sekvenser och promotorn P_{PGK1} . 6 innehåller *GFP* och promotorn P_{CUP1} . Under varje sekvens finns ungefärliga längder givna inom parentes.

Två plasmider, pSense5 och pSense9, konstrueras för att föra in *YAS1*, *YAS2*, *YAS3* och *GFP* under kontroll av tre ARE1-sekvenser i *S. cerevisiae*. Den förstnämnda, pSense5, använder p413TEF som utgångsplasmid och innehåller tre ARE1-sekvenser, en minimal $P_{TEF1core}$ -promotor, *GFP* (T_{CYC1} som terminator), samt generna *YAS1* (P_{PGK1} som promotor, T_{ADH1} som terminator) och *YAS2* (P_{PGK1} som promotor, T_{PDC6} som terminator) vilka kodar för respektive transkriptionsfaktor. Den andra, pSense9, använder p416TEF som utgångsplasmid och innehåller *YAS3* (P_{TEF1} som promotor, T_{CYC1} som terminator). Plasmiderna visas i Figur 5.

Tre olika plasmider, namngivna pSense0, pSense6 och pSense10 konstrueras för att utgöra kontroller. Den förstnämnda, pSense0, baseras på p413TEF och innehåller *GFP* (P_{TEF1} som promotor, T_{CYC1} som terminator) och konstrueras i syfte att utgöra kontroll för nollutslaget, det vill säga hur stort uttryck av *GFP* P_{TEF1} -promotorn ger. Den andra kontrollplasmiden, pSense6, baseras på p413TEF och innehåller tre ARE1-sekvenser, en minimal $P_{TEF1core}$ -promotor och *GFP* (T_{CYC1} som terminator). Med denna mäts hur stort uttryck den modifierade $P_{TEF1core}$ -promotorn tillsammans med de tre ARE1-sekvenserna ger. Detta används för att etablera ett basuttryck.

Den sista kontrollen, pSense10, baseras på p416TEF och innehåller *YAS3* (P_{CUP1} som promotor, T_{CYC1} som terminator). Konstruktionen används för att styra uttrycksnivån av Yas3p genom tillsats av kopparsulfat då P_{CUP1} är en kopparinducerad promotor. På så sätt fås data på hur mängden Yas3p påverkar uttrycket av GFP. Konstruktionerna för samtliga plasmider illustreras i Figur 5 och förväntat fluorescensuttryck av valda plasmidkonstruktioner redovisas i Tabell 1.



Figur 5: Illustration av de olika plasmidkonstruktionerna där **A** visar pSense0 innehållande *GFP*, **B** visar pSense6 med 3 *ARE1*-sekvenser, en minimal *TEF1*-promotor och *GFP*, **C** visar pSense5 som innehåller samma komponenter som pSense6 samt *YAS1* och *YAS2*, **D** visar pSense9 med *YAS3* och **E** visar pSense10 med *YAS3* under en kopparreglerad promotor. Figuren visar simplifierade versioner av de konstruerade plasmiderna utan utgångsplasmidernas innehåll.

Tabell 1: De olika plasmidkombinationerna och deras förväntade fluorescensuttryck.

Plasmidkombination	Innehåll	Fluorescens-uttryck
413+416	p413TEF, p416TEF	Inget
0+416	p416TEF, pSense0	Maximalt
6+416	p416TEF, pSense6	Basuttryck
5+416	p416TEF, pSense5	Högt
5+9	pSense5, pSense9	Lågt
5+10	pSense5, pSense10	Högt
0+416 +Cu	p416TEF, pSense0, Cu	Maximalt
5+9 +Cu	pSense5, pSense9, Cu	Högt
5+10 +Cu	pSense5, pSense10, Cu	Lågt

3 Avgränsningar

Det finns n-alkaninducerade system i andra organismer än det i *Y. lipolytica* som skulle kunna ha utnyttjats i syfte att skapa en biosensor i *S. cerevisiae*. I projektet användes endast systemet från *Y. lipolytica*. Valet av system grundades på att *Y. lipolytica* är en eukaryot precis som *S. cerevisiae* och de två organismerna delar därav grundläggande mekanismer för produktion av proteiner.

Gener som är nödvändiga för systemets funktion infördes i *S. cerevisiae* med hjälp av ett två-vektorsystem, även om andra metoder för införandet har varit tillgängliga. En annan möjlighet hade varit att införa generna direkt i det kromosomala DNA:t med hjälp av ett CRISPR-system. Med en sådan metod hade ett stabilare uttryck av generna erhållits. Metoden kräver dock mer komplicerade vektorer och har därför valts bort.

Som tidigare nämnt är orsaken till varför s-Yas3p delokaliseras vid närvaro av n-alkaner okänd. I ramen för detta projekt har det inte ingått att undersöka detta vidare. Antagandet har således varit att det antingen finns en liknande mekanism hos *S. cerevisiae* eller att det är s-Yas3p självt som känner av närvaron av n-alkaner.

Syftet är att biosensorn i framtiden ska kunna implementeras i en alkanproducerande stam av *S. cerevisiae*. I projektet har dock biosensorn som skapats introducerats och testats i en icke alkanproducerande stam av *S. cerevisiae*. Biosensorn har därav testats genom extern tillsats av n-alkaner, i motsats till att jästen skulle producera dessa.

4 Metod och material

Det n-alkaninducerade systemet från *Y. lipolytica* kopplat till *GFP* fördes in i *S. cerevisiae* med ett två-vektorsystem. Som utgångsplasmider till två-vektorsystemet användes skyttelplasmiderna p413TEF och p416TEF. Utifrån utgångsplasmiderna konstruerades totalt fem plasmider med syfte att skapa en *S. cerevisiae*-stam innehållande biosensorn samt kontroller.

De fem plasmiderna konstruerades med Gibsonkloning och selekterades i *E. coli*. Sekvenserade plasmider transformerades till *S. cerevisiae* och gener verifierades med koloni-PCR. Fluorescensmätning av erhållna kolonier genomfördes med flödescytometri. Biosensorn funktionstestades genom att dekan tillsattes till mediumet. De centrala metoderna som användes förklaras nedan.

4.1 PCR

Primer designades för att skapa överlapp till Gibsonkloning utefter sekvenser från konstruktionerna som visas i Figur 4 i Teori 2.2. Primer designades med de internetbaserade programmen Benchling från redBenchling Inc.[©] och NEBcutter[®] från New England BioLabs Inc.[©]. Sekvenser för primer och en illustration över inbindningspositioner är bifogat i Tabell 7 och Figur 23 i Appendix 9.1.

I Tabell 2 visas vilka konstruktioner och primer de olika PCR-produkterna amplifierades med. Samtliga PCR:er genomfördes med ThermoScientific[™] Phusion[™] High-Fidelity DNA Polymeras, TaKaRa PrimeSTAR[®] HS DNA Polymeras eller ThermoScientific[™] DreamTaq[™] DNA Polymeras. De nyttjade polymerasen samt beräknade inbindningstemperaturer och förlägningsstider för de tio olika PCR-produkterna redovisas i Tabell 22 i Appendix 9.2.5.

PCR:erna utfördes enligt tillverkarnas protokoll som återfinns i Appendix 9.2.1-3. För verifikation laddades PCR-produkterna tillsammans med GeneRuler[™] 1 kb DNA-stege på agarosgel. Efter rening med GeneJet[™] Gel Extraction Kit från ThermoFisher[™] Scientific mättes koncentration och renhet med Nanodrop 2000[™]. Koncentrationen användes till att bestämma vilken volym som behövdes i senare reaktioner.

Anledningen till att olika polymeras användes vid PCR är att deras egenskaper skiljer sig åt. Till exempel spelar fragmentens längd samt primernas inbindningsstyrka en viktig roll för vilket polymeras som är lämpligast.

PCR 4 och 5 samt PCR 6 och 7 fogades samman med hjälp av fusions-PCR för att underlätta Gibsonkloning för pSense5 då den innehåller flest fragment. PCR 4 och 5 sammanfogades i en fusions-PCR i två steg med TaKaRa PrimeSTAR[®] HS DNA Polymeras. PCR 6 och 7 sammanfogades i ett steg med ThermoScientific[™] DreamTaq[™] DNA Polymeras. Protokoll bifogas i Appendix 9.2.4.

Tabell 2: Tabell över vilka konstruktioner och med vilka primer de olika PCR-produkterna amplifierades med.

PCR	Konstruktion	Framåt-primer	Bakåt-primer	Beräknad längd [bp]
1	6	0-1-fw	0-1-rv	785
2	6	0-1-fw	6-1-rv	775
3	5	6-2-fw	6-2-rv	292
4	6	5-1-fw	5-1-rv	789
5	5	5-2-fw	5-2-rv	1062
6	4c	5-3-fw	5-3-rv	2139
7	4b	5-4-fw	5-4-rv	1663
8	4a	9-1-fw	9-1-rv	1316
9	4a	9-1-fw	10-1-rv	1305
10	6	10-2-fw	10-2-rv	436

4.2 Plasmidkonstruktion

Plasmiderna p413TEF och p416TEF ympades från *E. coli*-stammar till LB-medium (Luria-Bertani-medium) och inkuberades i 37 °C i skakinkubator över natten. Plasmiderna renades fram med GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit. Koncentration och renhet mättes med Nanodrop 2000™. Linjärisering av p413TEF och p416TEF genomfördes med FastDigest Green Buffer och enzym XhoI och XbaI eller XhoI och SacI enligt Tabell 3. Restriktionsenzymerna som användes var ThermoScientific™ FastDigest™-enzymer och restriktionerna utfördes enligt tillverkarens instruktioner, se Appendix 9.3.

I Tabell 3 visas även förväntade längder samt bonusfragment. Bonusfragment är sekvensen mellan restriktionsenzymerna som i Gibsonkloningen ersätts av önskat fragment. De fem linjäriserade plasmiderna i kombination med PCR-produkterna bildar samtliga konstruktioner enligt Tabell 4.

För Gibsonkloning av plasmiderna tillsattes 50 ng linjäriserad plasmid och 150 ng av vardera PCR-produkt till 10 µl Gibson Assembly Master Mix (2X) för respektive plasmid. Till kontroller, p413TEF och P416TEF, tillsattes 10 µl autoklaverat vatten till 50 ng linjäriserad plasmid och 10 µl Gibson Assembly Master Mix (2X) för vardera. Proven inkuberades i 50 °C på värmeblock i 45-60 minuter. För fullständigt protokoll se Appendix 9.4.

Tabell 3: Tabell över vilka restriktionsenzym respektive utgångsplasmid linjäriserades med, de förväntade fragmentlängderna samt bonusfragmentens längder. Bonusfragment är sekvensen mellan restriktionsenzymen som i Gibsonkloningen ersätts av önskat fragment.

Restriktion	Plasmid	RE 5'	RE 3'	Förväntad längd [bp]	Längd bonusfragment [bp]
R1	p413TEF	XhoI	XbaI	5528	63
R2	p413TEF	XhoI	SacI	5113	478
R3	p413TEF	XhoI	SacI	5113	478
R4	p416TEF	XhoI	XbaI	5465	63
R5	p416TEF	XhoI	SacI	5050	478

Tabell 4: Tabell över vilka PCR-produkter och linjäriserade utgångsplasmider som bildar pSense0, pSense5, pSense6, pSense9, pSense10 samt kontroller.

Konstruktion	PCR	Restriktion
pSense0	1	R1
pSense6	2, 3	R2
pSense5	4, 5, 6, 7	R3
pSense9	8	R4
pSense10	9, 10	R5
Kontroll p413TEF	-	R3
Kontroll p416TEF	-	R5

4.3 Transformation

Transformation till *E. coli* utfördes med värmeschock. Till 50 µl kompetenta *E. coli*-celler adderades 1 µl-12 µl Gibsonprodukt. *E. coli*-cellerna placerades på is i 15 minuter, följt av 40 sekunders värmeschock i 42 °C innan de placerades på is i ytterligare 2 minuter. 1 µl LB-medium tillsattes till cellerna och de placerades i 37 °C i 30 minuter. Renstrykning skedde på plattor med LB-medium och ampicillin (100 mg/l). Innehållet i LB-Amp-plattorna redovisas i Tabell 25 i Appendix 9.5.1.

S. cerevisiae-celler gjordes kompetenta och transformerades med Frozen-EZ Yeast Transformation II KitTM från Zymo Research enligt tillverkarens protokoll. Till 50 µl kompetenta celler adderades 500-1000 ng av varje plasmid enligt kombinationerna i Tabell 5. *S. cerevisiae*-cellerna ströks ut på SD-URA-HIS-plattor och inkuberades i 30 °C i 2-4 dygn. Innehållet i SD-URA-HIS-plattorna redovisas i Tabell 26 i Appendix 9.5.2. Tre kolonier från varje transformation ympades och ströks ut på nya plattor. Ytterligare en renstrykning från vardera koloni genomfördes.

Vid transformation med pSense5 användes en sedan tidigare tillgänglig plasmid samt en nykonstruerad. De namngavs pSense5 respektive pSense5.1.

Tabell 5: Plasmidkombinationer för transformation av jäst.

Plasmidkombination i jäst	Plasmid 1	Plasmid 2
5+9	pSense5	pSense9
5+10	pSense5	pSense10
5+416	pSense5	p416TEF
0+416	pSense0	p416TEF
6+416	pSense6	p416TEF
413+416	p413TEF	p416TEF

4.4 Verifikation

För att bekräfta att *E. coli* tagit upp produkterna från Gibsonkloningen genomfördes en verifikation med restriktionsenzym. En eller två av de plasmider som var korrekta enligt restriktionsverifikationen valdes ut för sekvensering hos Eurofins Genomics.

Verifikation genom restriktion utfördes med två restriktionsenzym vars specifika klippsekvens endast förekommer en gång per plasmid. Varje restriktion gav upphov till två fragment av olika längd. Restriktionsenzymen som användes var ThermoScientificTM FastDigestTM-enzymen och restriktionerna utfördes enligt tillverkarens instruktioner, se Appendix 9.3.

Plasmid, restriktionsenzym och förväntade fragmentlängder redogörs i Tabell 6. Vilka sekvenser i respektive plasmid som valdes för sekvensering anges i Appendix 9.6.

Tabell 6: Tabell över de restriktionsenzym som användes för verifikation av färdiga konstruktioner samt de förväntade fragmentlängderna.

Plasmid	Restriktionsenzym	Fragmentlängder [bp]
pSense0	PacI, PstI	1872, 4394
pSense6	PacI, PstI	1872, 4282
pSense5	Eco32I/EcoRV, PstI	6381, 4223
pSense5	PacI, PstI	8738, 2357
pSense9	BcuI, PstI	4031, 2703
pSense10	SalI, PstI	3873, 2851

4.5 Koloni-PCR

Tre jästkolonier per plasmidkombination innehållande pSense5, 5+9, 5+10 och 5+416, undersöktes med koloni-PCR. Samma kombinationer undersöktes även för pSense5.1. För negativ kontroll ympades en jästkoloni med plasmidkombinationen 413+416. Två Eppendorfrör förbereddes per renstrykt jästkoloni

för att kunna verifiera förekomsten av generna i de två olika plasmiderna separat. För att verifiera *YAS1* och *YAS2* i pSense5 samt pSense5.1 användes primer 5-3-fw och 5-4-rv. För att verifiera *YAS3* i pSense9 och pSense10 användes primer 9-1-fw och 9-1-rv, alternativt primer 9-1-fw och 10-2-rv, se Figur 23 i Appendix 9.1. Primersekvenserna redovisas i Tabell 7 i Appendix 9.1. Förväntad fragmentlängd för *YAS1* och *YAS2* beräknades till ~3700 bp och förväntad fragmentlängd för *YAS3* beräknades till ~1700 bp.

25 µl natriumhydroxid (20 mM) tillsattes tillsammans med glaskulor i Eppendorfrör, till vilka jästkolonier ympades. Eppendorfrören inkuberades på värmeblock i 96 °C under 15 minuter och omrördes i en vortexblandare för att mekaniskt, termiskt och kemiskt sönderdela cellerna. Proven centrifugerades och 1 µl supernatant tillsattes i PCR-rör tillsammans med komponenter enligt Tabell 14 i Appendix 9.2.3. Som positiv kontroll användes 0.5 µl av vardera ren plasmid; pSense5 eller pSense5.1 tillsammans med pSense9. PCR initierades enligt PCR-schema i Tabell 13 i Appendix 9.2.3 med 39 cykler istället för 30.

4.6 Fluorescensmätning

Fluorescensmätningar utfördes med en Guava[®]easyCyte flödescytometer från Merck Millipore. Flowcytometern låter cellerna flöda i en smal kapillär genom en laser kopplad till en detektor. Kapillären är designad så att cellerna passerar genom lasern en och en, vilket möjliggör enskild mätning av varje cell. Totalt mäts 5000 celler från varje prov. Inför varje mätning ympades 1-6 kolonier per plasmidkombination till 5 ml Delftmedium och kolonierna inkuberades i 30 °C över natten. Delftmedium förbereddes enligt Appendix 9.5.3.

För kolonier innehållande pSense10 förbereddes tre prover av vardera kombination. Till ett av proverna tillsattes kopparsulfat till en slutkoncentration på 0,4 mM och till ett annat till en slutkoncentration på 0,2 mM. Mätning av OD utfördes på alla prover dagen därpå och ympning skedde till nytt medium så att OD 0,1 erhöles. *S. cerevisiae* tilläts växa i 30 °C i 3 timmar innan fluorescens mättes i Guava[®]easyCyte flödescytometer. De kolonier som gav förväntat fluorescensuttryck testades igen enligt samma metod. Efter denna mätning tillsattes 2 % v/v dekan och fluorescens mättes i Guava[®]easyCyte flödescytometer efter 3 timmar.

5 Resultat och diskussion

Med mål att föra in transkriptionssystemet från *Y. lipolytica* kopplat till *GFP* i *S. cerevisiae* beskrivs nedan resultat från delmomenten som presenterats i avsnittet Metod och material. För att konstruera korrekta PCR-produkter genomfördes de 10 reaktionerna med olika polymeras, förlängningstider och inbindningstemperaturer. Produkterna sammanfogades med Gibsonkloning till plasmiderna pSense0, pSense6, pSense5, pSense9 och pSense10, se Figur 5 i Teori 2.2, innan de transformerades till *E. coli*. För att verifiera de slutgiltiga konstruktionerna skickades plasmiderna på sekvensering. Plasmiderna transformerades till jäst och de resulterande kolonierna studerades med flödescytometri.

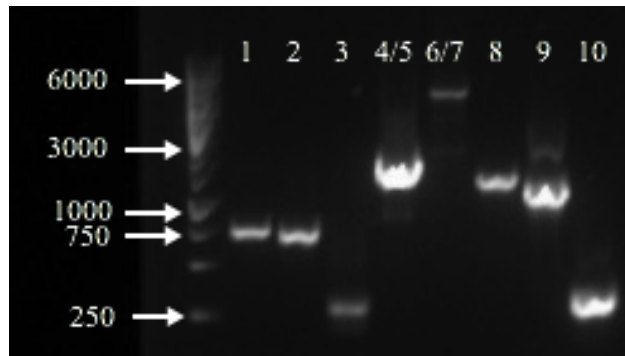
5.1 PCR

10 PCR-produkter skapades enligt de förhållanden som redovisas i Tabell 22 i Appendix 9.2.5 för att konstruera plasmiderna i Figur 5 i Teori 2.2. Samtliga reaktioners innehåll beskrivs i Tabell 8, 10 och 12 i Appendix 9.2. I Tabell 2 i Metod och material 4.1 visas fragmentens beräknade längder som användes för att verifiera att rätt PCR-produkter erhöles.

ThermoScientificTMPhusionTMHighFidelity DNA har minst felfrekvens av de tillgängliga polymerasen och var avsett att användas i samtliga reaktioner. Dock fungerade inte detta trots att inbindningstemperaturer och förlängningstider justerades. Att primerna ej band in specifikt till templatens och att vissa av fragmenten kan ha varit för långa är möjliga anledningar till att det inte fungerade. Andra polymeras användes därav för att uppnå bra resultat för samtliga PCR:er. De polymeras som även användes var TaKaRa PrimeSTAR[®] HS DNA Polymeras och ThermoScientificTMDreamTaqTM.

Samtliga PCR:er genomfördes först med ThermoScientificTMPhusionTMHighFidelity DNA Polymeras. Av dessa reaktioner lyckades PCR 1-3 samt 8, PCR-program återfinnes i Tabell 9 i Appendix 9.2.1 och framrenade produkter visas i Figur 6. Resterande PCR:er testades med TaKaRa PrimeSTAR[®] HS DNA Polymeras utan resultat.

ThermoScientificTMDreamTaqTM testades därefter med framgång för PCR 4-7 samt PCR 9-10. PCR-program användes enligt Tabell 13 i Appendix 9.2.3 och framrenade produkter visas i Figur 6. Fusions-PCR användes för att sammanfoga PCR 4 och 5 till PCR 4/5 samt PCR 6 och 7 till PCR 6/7. Fusions-PCR genomfördes enligt redovisade tabeller i Appendix 9.2.4. PCR 4/5 lyckades med TaKaRa PrimeSTAR[®] HS DNA Polymeras medan PCR 6/7 lyckades med ThermoScientificTMDreamTaqTM. Resultaten visas i Figur 6.



Figur 6: Bild från gelelektrofores tagen under UV-exponering. Framrenade PCR-produkter 1-10 markeras i bilden under respektive brunn. GeneRuler™ 1 kb DNA-stege visas till vänster.

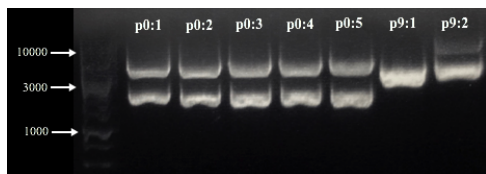
Flertalet försök för varje PCR krävdes för att erhålla en produkt. Att resultaten från PCR:erna inte var korrekta kan ha berott på primernas affinitet. Andra justeringar av PCR-parametrar än de som gjordes kunde ha testats, till exempel justering av saltkoncentration eller utbyte av buffer. Möjligtvis hade alla produkter då kunnat erhållas med ThermoScientific™ Phusion™ High Fidelity DNA Polymeras. Justeringarna begränsades på grund av projektets tidsram. Att primerna hybridiserade till varandra istället för till templet är också en möjlig, men mindre trolig, orsak till felaktiga resultat.

5.2 Verifikation

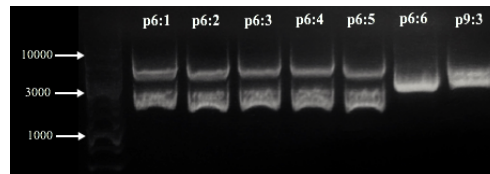
PCR-produkter och linjäriserade utgångsplasmider sammanfogades med Gibsonkloning, se Tabell 4 i Metod och material 4.2, innan transformation till *E. coli*. Plasmiderna renades fram och verifierades genom restriktion. Plasmider från lovande kolonier sändes för sekvensering och de mest korrekta plasmiderna transformerades till *S. cerevisiae*.

5.2.1 Verifiering av transformation till *E. coli*

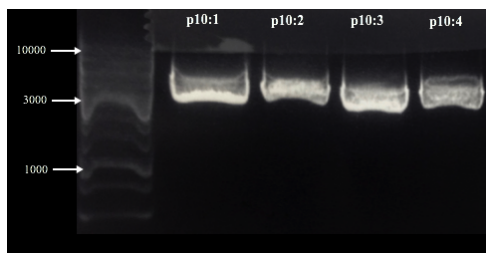
Produkterna från Gibsonkloning transformerades till *E. coli* enligt avsnitt 4.3 i Metod och material. För att verifiera att kolonierna innehöll önskade plasmider genomfördes restriktioner enligt Tabell 6 i Metod och material 4.4. Resultat från samtliga konstruktioner visas i Figur 7-11. Att resultaten visar två band av förväntad storlek tyder på att plasmiderna innehåller valda restriktionsställen och därmed de önskade generna. För de restriktionsresultat som inte visar två tydliga band blir det svårare att dra slutsatser. Genom att sänka koncentrationen på agarosgelen hade banden separerats mer och resultaten hade blivit lättare att tyda.



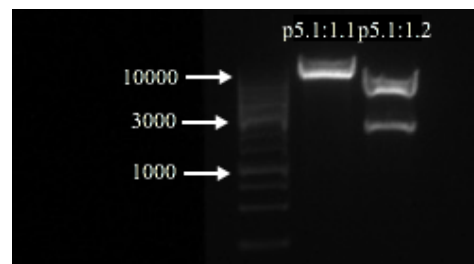
Figur 7: Bild från gelelektrofores tagen under UV-exponering. Restriktioner av pSense0 från koloni 1-5 samt pSense9 från koloni 1-2. GeneRulerTM 1 kb DNA-steg visas till vänster.



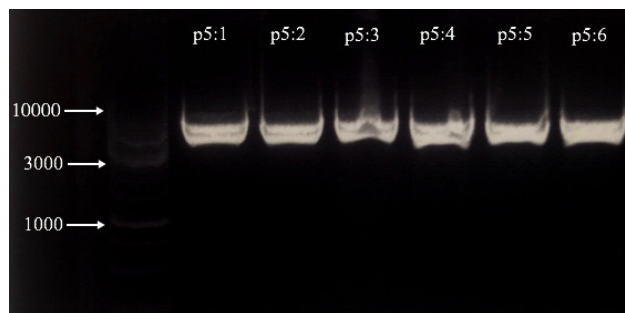
Figur 8: Bild från gelelektrofores tagen under UV-exponering. Restriktioner av pSense6 från koloni 1-6 samt pSense9 från koloni 3. GeneRulerTM 1 kb DNA-steg visas till vänster.



Figur 9: Bild från gelelektrofores tagen under UV-exponering. Restriktioner av pSense10 från koloni 1-4. GeneRulerTM 1 kb DNA-steg visas till vänster.



Figur 10: Bild från gelelektrofores tagen under UV-exponering. Restriktioner av pSense5.1 från koloni 1 klippt med två olika enzymer till p5.1:1.1 samt p5.1:1.2. GeneRulerTM 1 kb DNA-steg visas till vänster.



Figur 11: Bild från gelelektrofores tagen under UV-exponering. Restriktioner av koloni 1-6 från pSense5 samt GeneRulerTM 1 kb DNA-steg till vänster.

Flertalet kolonier av pSense0 och pSense6, se Figur 7 och 8, visar tydliga band med längderna ~ 4000 bp respektive ~ 2000 bp, vilket stämmer överens med de förväntade längderna i Tabell 6 i Metod och material 4.4. Koloni 1 och 2 från pSense0 respektive pSense6 skickades på sekvensering. Kolonierna av pSense9 visar något otydliga resultat, då det är svårt att urskilja två band. De förväntade längderna var ~ 4000 bp och ~ 2700 bp vilket skulle kunna stämma överens med bilderna på restriktioner från koloni 1 och 3 som visas i Figur 7 och 8. Dessa kolonier skickades därav på sekvensering. Förväntade längder för pSense10 var ~ 3900 bp och ~ 2900 bp vilket är något svårt att urskilja

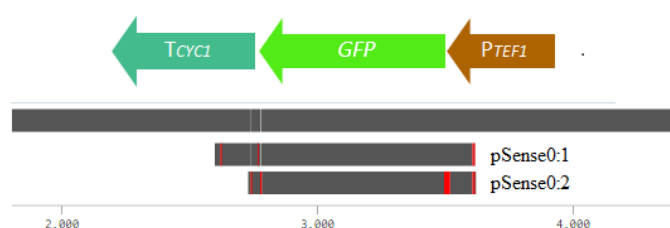
från figur 9. Koloni 1 och 2 ansågs mest korrekta och skickades därav på sekvensering.

Resultaten i Figur 10 motsvarar pSense5.1 där plasmider från en koloni studerades men verifierades med två olika enzymkombinationer, se Tabell 6 i Metod och material 4.4. p5.1:1.1 visar ingen tydlig restriktion medan p5.1:1.2 visar två band som kan motsvara de korrekta, ~ 8700 bp samt ~ 2350 bp. p5.1:1.2 beslutades därav att sekvenseras. Restriktion av plasmider från koloni 1-6 från den sedan tidigare tillgängliga plasmiden pSense5 visas i Figur 11. De förväntade längderna för fragmenten var ~ 4200 bp och ~ 6300 bp vilket kan urskiljas från samtliga kolonier av pSense5. Koloni 1 skickades vidare på sekvensering.

5.2.2 Sekvensering

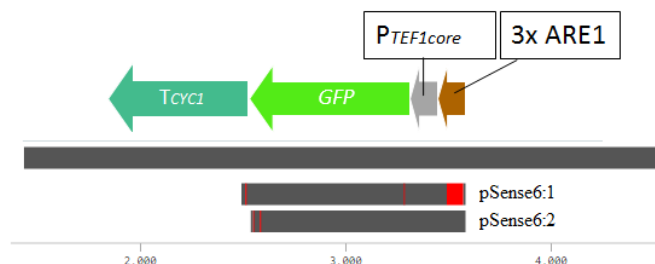
Framrenade plasmider från två kolonier vardera av pSense0, pSense6, pSense9 och pSense10 samt från en koloni vardera av pSense5 och pSense5.1 skickades på sekvensering. Sekvenseringsresultaten visas i Figur 12-16. Varje figur innehåller en schematisk bild av den del som sekvenserats hos plasmiden. Överst i varje figur finns en representation av de gener som återfinns i templatet. Under denna följer en linje som representerar templatet och de nästföljande linjerna representerar sekvenseringsresultaten. De röda partierna som syns på de sistnämnda linjerna är partier av sekvenser som inte stämmer överens med templatet. Röda partier i slutet av sekvenserna kan bero på att sekvenseringsmetodens kvalitet avtar mot slutet av den del som sekvenserats.

Resultatet från sekvensering av pSense0 redovisas i Figur 12 och bekräftade att *GFP* inkorporerats. Som syns i Figur 12 hade pSense0 koloni 2 en mutation i slutet av P_{TEF1} -promotorn. Koloni 1 hade, precis som koloni 2, mutation i primer-regionen. Koloni 1 saknade däremot, till skillnad från koloni 2, mutation i slutet av P_{TEF1} -promotorn vilket gjorde att koloni 1 från pSense0 användes för transformation till *S. cerevisiae*.



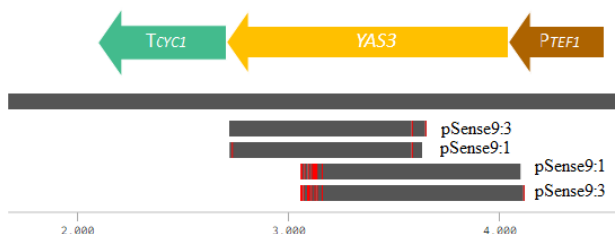
Figur 12: Sekvensering av pSense0:1 och pSense0:2. Samtliga sekvenser är sekvenserade från höger till vänster. Sekvenseringen täcker slutet av promotorn P_{TEF1} , *GFP* och början av terminatoren T_{CYC1} . Röda partier visar på avvikelser från templatets sekvens.

Resultatet från sekvensering av pSense6 redovisas i Figur 13 och bekräftade att *GFP* och de tre ARE1-sekvenserna inkorporerats hos pSense6:2. Det stora röda partiet som syns hos pSense6:1 beror på att de tre ARE1-sekvenserna saknas. Troligtvis hade ARE1-sekvenserna försvunnit med deletion på grund av homolog rekombination. pSense6 från koloni 2 var därav den plasmid som användes för transformation till *S. cerevisiae*.



Figur 13: Sekvensering av pSense6:1 och pSense6:2. Samtliga sekvenser är sekvenserade från höger till vänster. Sekvenseringen täcker de tre ARE1-sekvenserna, promotorn *P_{TEF1core}*, *GFP* och början av terminatorn *T_{CYC1}*. Röda partier visar på avvikelse från templatets sekvens.

Resultatet från sekvensering av pSense9 redovisas i Figur 14 och bekräftade att *YAS3* inkorporerats. Figur 14 visar att koloni 1 och 3 har ungefär lika stort antal mutationer. pSense9 från koloni 3 valdes för transformation till *S. cerevisiae* på grund av att mutationen i stopkodonet för *YAS3* som finns i koloni 1 inte finns i koloni 3.

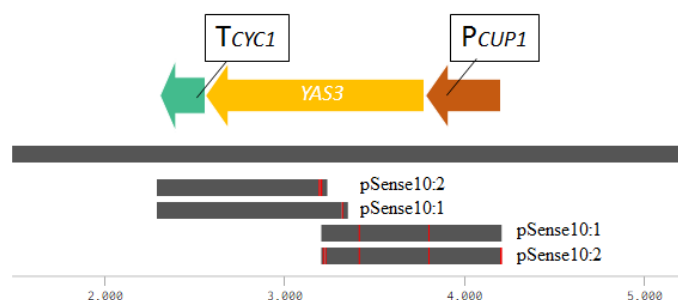


Figur 14: Sekvensering av pSense9:1 och pSense9:3. Samtliga sekvenser är sekvenserade från höger till vänster. Sekvenseringen täcker slutet av promotorn *P_{TEF1}*, *YAS3* och början av terminatorn *T_{CYC1}*. Röda partier visar på avvikelse från templatets sekvens.

Resultatet från sekvensering av pSense10 redovisas i Figur 15 och bekräftade att *YAS3* inkorporerats. De röda strecken i mitten av *YAS3* som återfinns i de två nedersta sekvenseringarna visar på att det har uppstått en mutation på exakt samma ställe hos båda kolonierna. Mutationen har konstaterats att inte leda till ett aminosyrautbyte efter en jämförelse i sekvensverktyget Blast[®]. Mutationen kan ha funnits i templatet eller uppstått i en tidig cykel i PCR-steget och därmed finnas med hos alla transformanter. De två röda strecken som syns mellan *YAS3* och *P_{CUP1}* är en mutation

som uppstått hos båda kolonierna. Mutationen ligger dock i en icke kodande region mellan gen och promotor och är därför ej av intresse. Troligtvis har mutationen uppkommit på grund av primer i PCR-steget.

Som framgår i Figur 15 var båda kolonierna från pSense10 annars korrekta och valdes därav att användas för transformation till *S. cerevisiae*.

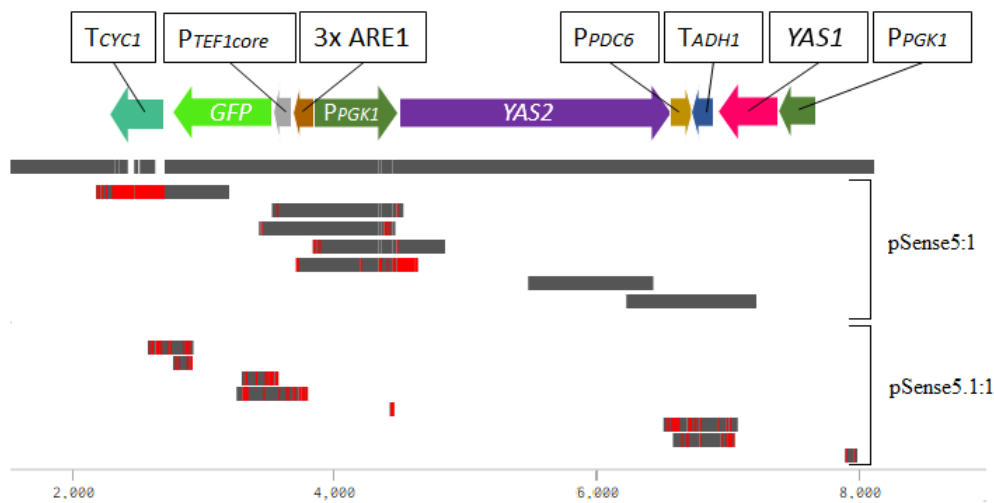


Figur 15: Sekvensering av pSense10:1 och pSense10:2. Samtliga sekvenser är sekvenserade från höger till vänster. Sekvenseringen täcker promotorn *P_{CUP1}*, *YAS3* och terminatorn *T_{CYC1}*. Röda partier visar på avvikelser från templatets sekvens.

Resultatet från sekvensering av pSense5:1 redovisas i Figur 16 och bekräftar att delarna *GFP*, promotorn *P_{TEF1core}*, de tre *ARE1*-sekvenserna, promotorn *P_{PGK1}*, *YAS2*, terminatorn *T_{PDC6}*, terminatorn *T_{ADH1}* och *YAS1* inkorporerats. Hela *YAS2* blev ej sekvenserad vilket lämnat utrymme för okända mutationer. Terminatorn *T_{CYC1}* innehåller ett stort rött parti som efter vidare undersökning med Blast[®] gav en exakt match med terminatorn *T_{FBA1}* i referensgenomet från *S. cerevisiae* S288c. Sekvenseringskromatogrammen tyder på att de mindre röda partierna beror av kvaliteten på sekvenseringen.

Sekvensering av pSense5.1 gav inga tydliga resultat, se Figur 16. En så hög mutationsgrad är osannolik och det är mer troligt att resultatet beror på felaktig plasmidkoncentration i det undersökta provet. Dock framställdes PCR-produkter till pSense5.1 genom användning av polymeraset ThermoScientific[™] DreamTaq[™], ett polymeras med låg grad av korrekturläsning. Det skulle kunna förklara att sekvenseringsresultatet visade på att pSense5.1 innehöll en högre andel mutationer än övriga plasmider. På grund av tidsbrist genomfördes ingen ytterligare sekvensering av pSense5.1, vilket annars hade varit av intresse. För transformation till *S. cerevisiae* valdes både pSense5 och pSense5.1.

Sekvensering av plasmidkonstruktionerna, med undantag för pSense5.1, bekräftar att samtliga gener av intresse inkorporerats. Mutationer i primerregionerna från PCR är återkommande för alla sekvenseringsresultat och tyder på bristfällig kvalitet av primer.



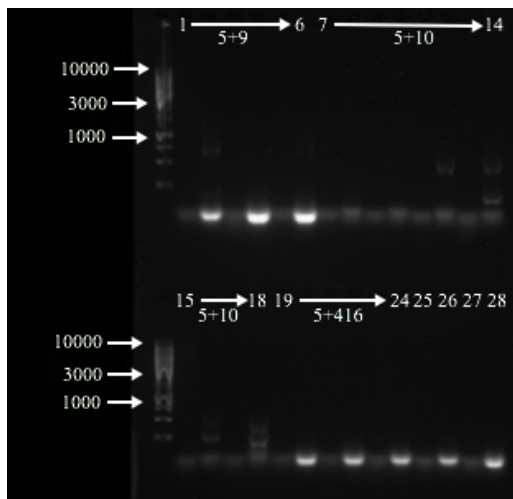
Figur 16: Sekvensering av pSense5:1 och pSense5.1:1. Samtliga sekvenser är sekvenserade från höger till vänster. Sekvenseringen täcker de tre ARE1-sekvenserna, promotorn $P_{TEF1core}$, större delen av *GFP*, terminatoren T_{CYC1} , promotorn P_{PGK1} , stor del av *YAS2*, terminatoren T_{PDC6} , *YAS1* och terminatoren T_{ADH1} . Röda partier visar på avvikelse från templatets sekvens.

5.2.3 Verifikation av gener med koloni-PCR

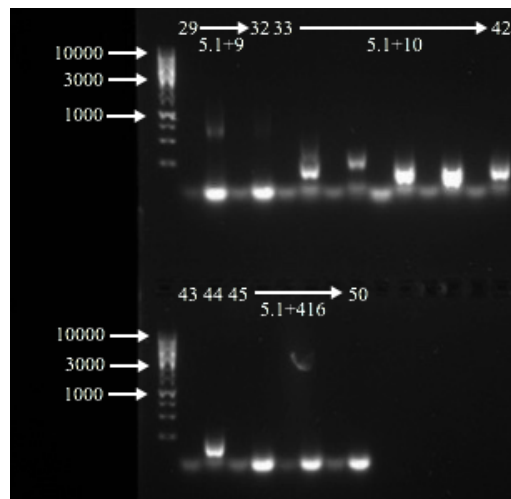
Valda sekvenserade plasmider transformerades till *S. cerevisiae* enligt de kombinationer som listas i Tabell 5 i Metod och material 4.3. För att verifiera generna i plasmiderna hos *S. cerevisiae* användes koloni-PCR. Resultat från gelelektrofores efter koloni-PCR visas i Figur 17-19. Banden i Figur 17-19 motsvarade inte beräknade fragmentlängder för verifikation av att generna *YAS1*, *YAS2* och *YAS3* inkorporerats hos de undersökta jästkolonierna. Förväntade fragmentlängder var ~ 3700 bp för *YAS1* och *YAS2* samt ~ 1700 bp för *YAS3*.

Varannan brunn i Figur 17-19 var laddad med PCR-produkter framställda med primer för verifikation av *YAS1* och *YAS2* samt varannan med primer för verifikation av *YAS3*. De undersökta plasmidkombinationerna markeras i bilden under respektive brunnnummer. Brunn 25-26 innehöll p413+p416, brunn 27-28 innehöll 5.1+9 och brunn 43-44 innehöll 5.1+10.

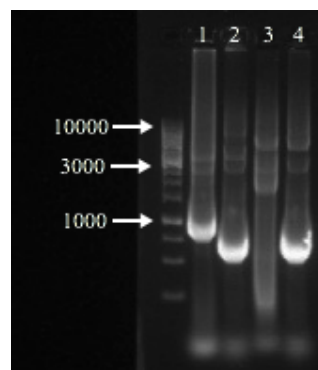
Några av de undersökta kolonierna visade band som kan vara amplifierade fragment, exempelvis brunn 14, 18 samt 32 i Figur 17 och 18. Av banden som erhöles i Figur 17 och 18 skulle exempelvis band från brunn 2 kunna motsvara band från brunn 2 i gelen för de positiva kontrollerna, se Figur 19. Detta kan tolkas som att *YAS3* inkorporerats eftersom att kontrollen var sekvenserad och hade bevisats innehålla denna gen. Fragmentlängderna stämmer dock inte överens med de förväntade och kolonierna kan inte med säkerhet konstateras innehålla varken *YAS1*, *YAS2* eller *YAS3* utifrån att enbart analysera resultat från koloni-PCR.



Figur 17: Bild från gelelektrofores tagen under UV-exponering där de undersökta plasmidkombinationerna markeras i bilden under respektive brunn. Brunn 25-26 innehöll koloni 413+416 och brunn 27-28 innehöll koloni 5.1+9. GeneRuler™1 kb DNA-stege visas till vänster.



Figur 18: Bild från gelelektrofores tagen under UV-exponering där de undersökta plasmidkombinationerna markerats i bilden under respektive brunn. Brunn 43-44 innehöll koloni 5.1+10. GeneRuler™1 kb DNA-stege visas till vänster.



Figur 19: Bild från gelelektrofores tagen under UV-exponering där positiva kontroller med renade plasmider visas i brunn 1-4 och GeneRuler™1 kb DNA-stege till vänster. Brunn 1-2 innehöll pSense5.1 och pSense9. Brunn 3-4 innehöll pSense5 och pSense9.

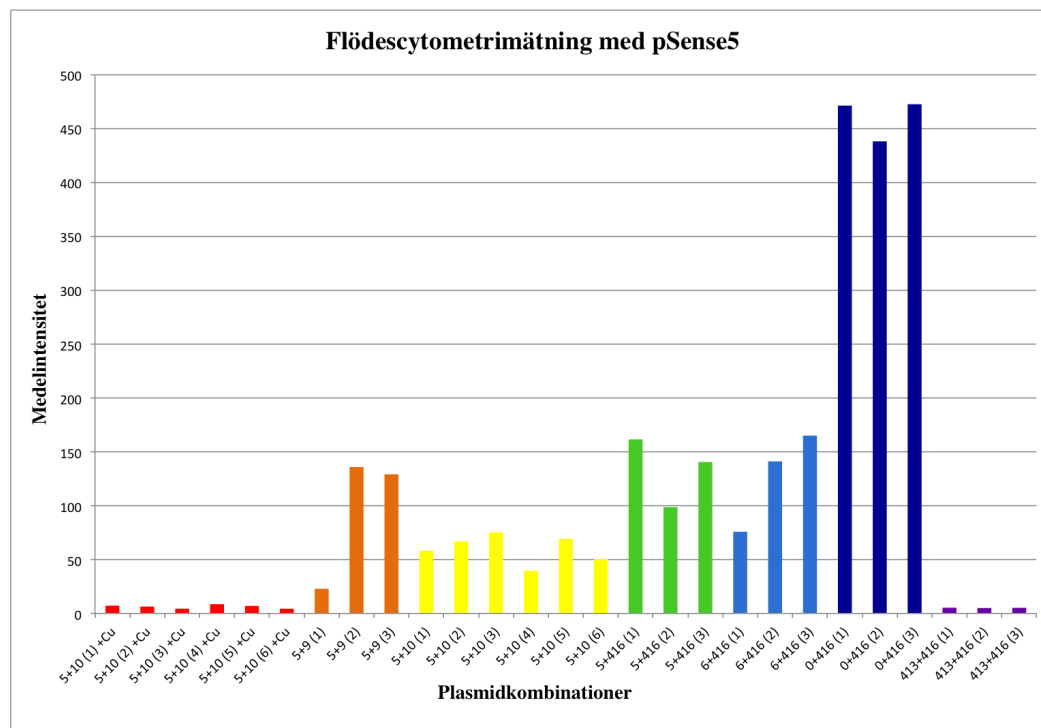
Resultatet från koloni-PCR:erna visar få tydliga band där majoriteten av dessa endast var primer. De få erhållna banden av annat än primer-storlek var av olika längd. Då det är samma gener som undersökts i varannan brunn borde dessa vara av samma storlek. Detta kan tyda på två saker; antingen att de gener som skulle verifieras inte fanns närvarande eller att PCR-parametrarna ej var optimala för att få reaktionen att fungera.

De positiva kontroller som genomfördes vid koloni-PCR, se Figur 19, var sekvenserade plasmider som med säkerhet innehöll rätt gener. Att kontroller-na gav band med fel storlekar pekar på att PCR-parametrarna hade behövts justeras. För att erhålla ett resultat som hade kunnat användas för att verifiera om kolonierna innehöll undersökta gener hade därmed koloni-PCR:erna som resulterade i Figur 17-19 behövts upprepas med justerade parametrar.

5.3 Fluorescensmätning

Medelintensiteten av de prov som testades i flödescytometrimätningar illustreras i histogrammen i Figur 20-22. De förväntade GFP-uttrycken för de olika plasmidkombinationerna beskrivs i Tabell 1 i Teori 2.2. Flera kolonier från varje kombination testades. Stor variation mellan medelintensiten hos kolonierna från samma plasmidkombination ledde till att inga medelvärden av kolonierna beräknades. Kombinationerna färgkodas för att enklare studera skillnader i GFP-uttryck för de olika plasmidkombinationerna.

I flödescytometrimätningen av pSense5, som visas i Figur 20, testades 3-6 kolonier av plasmidkombinationerna 5+10, 5+9, 5+416, 6+416, 0+416 samt 413+416. För plasmidkombination 5+10 testades 6 kolonier i Delftmedium med 0,4 mM kopparsulfatlösning och 6 kolonier i Delftmedium utan kopparsulfatlösning.



Figur 20: Medelintensiteten från flödescytometrimätning med plasmidkombinationerna 5+10, 5+9, 5+416, 6+416, 0+416, 413+416 samt 5+10 i kopparsulfatlösning.

De negativa kontrollerna med plasmidkombination 413+416 gav ingen fluorescens i enlighet med teorin. Plasmidkombinationen som förväntades ge maximalt uttryck var 0+416, då pSense0 har *GFP* under den helt bevarade P_{TEF1} -promotorn. I histogrammet visas tydligt att denna kombination ger högst uttryck. Kombinationen med 6+416 innehåller endast *GFP* under $P_{TEF1core}$ -promotorn och ARE1-sekvenser. Den förväntades därav ge en baslinje för hur mycket $P_{TEF1core}$ -promotorn aktiverar transkriptionen av *GFP* utan inverkan av de aktiverade ARE1-sekvenserna. pSense5 tillsammans med p416TEF innehöll *YAS1* och *YAS2* samt *GFP* under $P_{TEF1core}$ -promotorn och ARE1-sekvenser. Kombinationen förväntades ge ett högt uttryck av GFP då den inte innehåller repressorn *YAS3*.

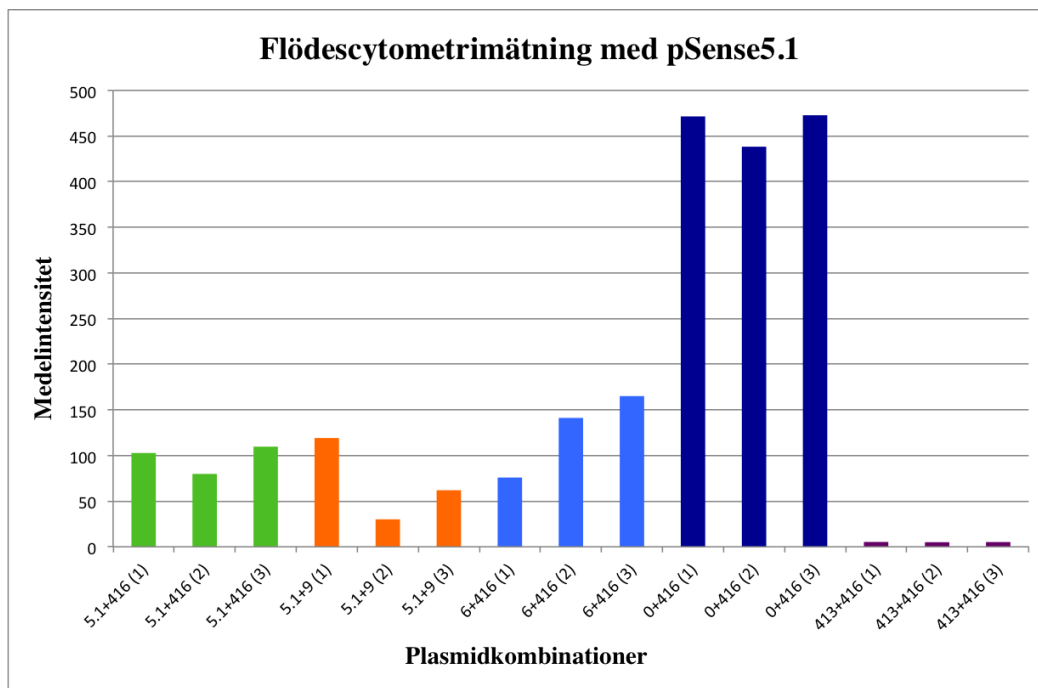
De två sistnämnda kombinationerna förväntades, enligt teori om att *YAS1* och *YAS2* aktiverar transkriptionen genom interaktion med ARE1-sekvenser, ge olika uttryck. Ett medelvärde av mätningarna visar inga större skillnader mellan kombinationen med 5+416 och kombinationen med 6+416. Dock studerades tre kolonier från vardera kombination som alla gav olika uttryck av fluorescens. Koloni 1 från 5+416 var den enda av de tre kolonierna som gav ett högre uttryck än kolonierna från kombinationen 6+416. Denna koloni valdes därför att testas vidare. Resultatet kan tyda på att aktiveringen från ARE1-sekvenserna inte är lika starkt som förutspått och att $P_{TEF1core}$ -promotorn utgör majoriteten av transkriptionen.

pSense5 och pSense9 innehöll tillsammans *YAS1*, *YAS2* och *YAS3*. Förväntat uttryck är därmed lägre än för kombinationen av 5+416, vilket stämmer för en av de tre testade, koloni 1 från 5+9. Koloni 1 från 5+9 testades därför vidare.

Fluorescensmätningar för kombinationen 5+10 genomfördes under två olika tillväxtförhållanden. 6 kolonier fick växa i närvaro av koppar (0,4 mM) och 6 kolonier i frånvaro av koppar. Mätningarna av de kombinationer som fått växa i närvaro av koppar förväntades ge låga uttryck av *GFP*. Detta då koppar aktiverar den kopparinducerade promotorn i pSense10 som kontrollerar transkriptionen av *YAS3*. Samtliga kombinationer med koppar genererade, som förväntat, låga uttryck. Detta kan dock även bero på att kopparkoncentrationen som användes var för hög, vilket kan ha hindrat celltillväxten och därmed uttrycket av GFP. Tillväxten hos alla de kolonier som hade vuxit i närvaro av koppar var lägre än för de kolonier som hade vuxit utan koppar.

Den tillväxthämmande effekten av koppar är troligtvis större än effekten av koppar på den kopparinducerade promotorn, P_{CUP1} , vilket gör att inga slutsatser om hur koppar har påverkat kolonierna kan dras. Halva kopparkoncentrationen (0,2 mM) testades men tillväxten var även då för låg för att kunna dra några slutsatser utifrån resultaten. Kombinationen med 5.1+10 med kopparsulfat i lösningen med både koncentrationen 0,4 mM och 0,2 mM testades, men tillväxten var i båda fallen för låg. På grund av tidsbegränsningar testades inga lägre kopparsulfatkoncentrationer. Inga vidare tester av kombinationen 5+10 utfördes då den innehöll den kopparinducerade promotorn.

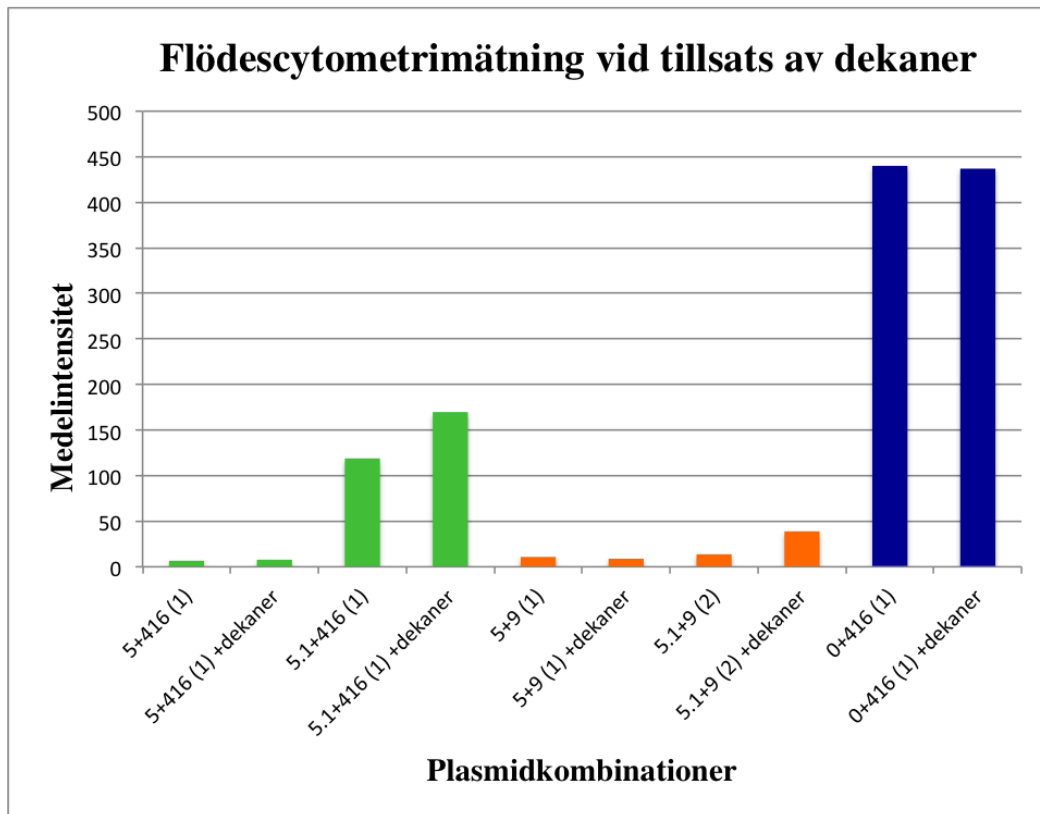
I flödescytometrimätningen med pSense5.1 testades 3 kolonier av plasmidkombinationerna 5.1+416 samt 5.1+9. För att enklare jämföra med kontrollerna har kombinationerna 6+416, 0+416 och 413+416 från flödescytometrimätningen av pSense5 lagts in i histogrammet. Resultatet visas i Figur 21.



Figur 21: Medelintensiteten från flödescytometrimätning med plasmidkombinationerna 5.1+416 samt 5.1+9. För enklare jämförelse har kontrollerna, 6+416, 0+416 samt 413+416, från flödescytometrimätningen av pSense5 lagts in i histogrammet.

5.1+416 innehåller *YAS1*, *YAS2* men inte *YAS3* och ger högt uttryck av GFP enligt teorin. Fluorescensuttrycket från koloni 2 och 3 från 5.1+9 som visas i Figur 21 stämmer överens med teorin om att *YAS3* sänker uttrycket för GFP i jämförelse med fluorescensuttrycket från alla kolonier av kontrollen 5.1+416. Då fluorescensuttrycket för koloni 2 från 5.1+9 minskade mest valdes denna koloni att testas vidare med tillsats av dekan.

Fluorescensuttrycket från de kolonier i Figur 20-21 som gav tydligast resultat ympades på nytt och testades med och utan tillsatts av 2 % v/v dekan. Kolonierna som testades var koloni 1 från 5+9, koloni 2 från 5.1+9, koloni 1 från 5+416, koloni 1 från 5.1+416 samt koloni 1 från 0+416. Resultaten visas i Figur 22.



Figur 22: Medelintensitet från flödescytometrimätning med plasmidkombinationerna koloni 1 från 5+9, koloni 2 från 5.1+9, koloni 1 från 5+416, koloni 1 från 5.1+416 samt koloni 1 från 0+416, vid tillsats av 2 % v/v dekan i Delftmedium.

Vid tillsatts av dekan förväntas *YAS3* enligt teorin att delokaliseras från cellkärnan till det endoplasmatiska nätverkets membran och därmed möjliggörs aktivering av transkription av *GFP*. De kolonier som inte innehåller *YAS3* ska inte påverkas vid närvaro av dekan.

Fluorescensnivån från koloni 1 från 5+9 i Figur 22 minskade marginellt vid tillsats av dekan, vilket inte stämmer överens med teorin. Kontrollerna koloni 1 från 0+416 och koloni 1 från 5+416 i Figur 22, påverkades inte vid närvaro av dekan vilket stämmer överens med teorin. För pSense5 kan inga direkta slutsatser dras då närvaro av dekan inte ökade fluorescensnivån för koloni 1 från 5+9 men gav förväntade resultat för kontrollerna. Koloni 1 från 5+9 fungerade därmed ej som den önskade biosensorn, detta kan bero på att plasmiderna pSense5 och pSense9 inte var korrekta. Vid sekvensering av pSense9, som visas i Figur 14, bekräftades att *YAS3* inkorporerats korrekt med undantag av några få mindre mutationer. Då en upprepade sekvensering av samma koloni från pSense9 gav ett annorlunda resultat finns det dock risk för ytterligare mutationer som inte visades i sekvenseringen. Som bekräftades vid sekvensering innehåller pSense5 en annan terminator, T_{FBA1} , vilket kan vara en anledning till att uttrycket för pSense5 skiljer sig från de för pSense5.1. Eftersom inte hela *YAS2* har blivit sekvenserad kan större mutationer ha uppstått även där. Det kan förklara varför koloni 1 från 5+9 inte fungerade som den önskade biosensorn.

Fluorescensnivån för koloni 2 från 5.1+9 i Figur 22 ökade vid tillsats av dekan i enlighet med teorin. En av kontrollerna, koloni 1 från 0+416 i Figur 22, påverkades inte vid närvaro av dekan medan fluorescensnivån för den andra kontrollen, koloni 1 från 5.1+416 i Figur 22, ökade vid tillsats av dekan. Biosensorn, koloni 2 från 5.1+9, reagerar enligt teorin och skulle kunna vara korrekt. Att kontrollen med koloni 1 från 5.1+416 påverkas vid en tillsats av dekan skulle kunna förklaras av att antingen kontrollen inte är korrekt eller att dekan påverkar transkriptionsfaktorerna. Fler tester för att verifiera påverkan av dekan på kontroller samt koloni 2 från 5.1+9 behöver utföras för att få säkra resultat. Det bör även genomföras ytterligare en sekvensering av pSense5.1 då resultatet från fluorescensmätningarna och sekvenseringen skiljer sig åt. Fluorescensmätningarna indikerar på att generna inkorporerats medan sekvenseringen tyder på det motsatta.

6 Slutsatser

PCR-produkter genererades med framgång och användes för att konstruera plasmider innehållande kombinationer av *YAS1*, *YAS2*, *YAS3*, *ARE1*-sekvenser samt *GFP*. Verifikation av de konstruerade plasmiderna bekräftade att generna inkorporerats med få mutationer. Flödescytometrimätningar visade att gener tagits upp vid transformation av *S. cerevisiae* och en av kolonierna visade på önskat resultat för den slutgiltiga biosensorn.

Den framtagna *S. cerevisiae*-kolonin, koloni 2 från 5.1+9, innehållande pSense5.1 och pSense9, visar på ett fluorescensskifte vid tillsatts av dekan. Möjligtvis sker detta på grund av en delokalisation av *YAS3* vilket medför att heterokomplexet bestående av *YAS1* och *YAS2* inducerar transkription av *GFP*. För att kunna använda systemet i koloni 2 från 5.1+9 som en n-alkaninducerad biosensor bör ytterligare verifikationer av att korrekta gener har inkorporerats genomföras. Det bör även utföras fler tester där effekten av mängden tillsatta n-alkaner studeras. Detta för att kunna dra ytterligare slutsatser kring sambandet mellan mängden tillsatta n-alkaner och fluorescensuttryck.

De presenterade resultaten stöder teorin om att det är möjligt att skapa en biosensor i *S. cerevisiae* genom implementering av det n-alkaninducerade transkriptionssystemet från *Y. lipolytica*.

7 Framtida studier

I syfte att skapa en biosensor i *S. cerevisiae* som bygger på det n-alkaninducerade transkriptionssystemet från *Y. lipolytica* krävs det ytterligare studier. Intressanta aspekter att studera i framtiden involverar sekvensering, eliminering av mutationer, kvantifiering av proteinuttryck samt test med andra promotorer.

De sekvenseringar som gjordes i projektet täckte ej alla delar av de konstruktioner som integrerades i utgångsplasmiderna, vilket lämnade utrymme för okända mutationer. Att utföra nya sekvenseringar med förändrad primerposition är ett önskat nästa steg för att med säkerhet veta att önskade fragment inkorporerats korrekt. För att minska risken av inkorrekta resultat på grund av aminosyrautbyten bör nya transformationer göras för de kolonier som visar på mutationer.

Koloni-PCR för verifikation av gener i de konstruerade plasmiderna som transformerats in i *S. cerevisiae* gav få resultat. Detta trots att mätningar av fluorescensuttryck antydde på att aktuella gener tagits upp. Att optimera parametrarna för koloni-PCR är av intresse för att i tidigt skede kunna avgöra om valda kolonier innehåller plasmider med inkorporerade gener.

Om proteinerna från *YAS1*, *YAS2* och *YAS3* uttrycks och hur de interagerar i *S. cerevisiae* är något som behöver undersökas. För att kvantifiera proteinuttrycket kan Western blotting-analys användas. En metod för att undersöka om proteinerna interagerar är FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

För att se en tydlig skillnad mellan kontrollens, 6+416, basuttryck och kolonier innehållande transkriptionsfaktorerna hade en förflyttning av ARE1-sekvenserna kunnat undersökas. Detta för att optimera avståndet mellan transkriptionsfaktorer och RNA-polymeras vid initiering av transkription.

Enligt resultatet har promotorn $P_{TEF_{core}}$ ett för starkt basuttryck för att en märkbar skillnad ska synas i jämförelse med de kolonier som uttrycker transkriptionsfaktorerna för ARE1-sekvenserna. Ett alternativ hade varit att byta ut $P_{TEF_{core}}$ mot en svagare minimal promotor för att se om transkriptionsfaktorernas aktivering av ARE1-sekvenserna ger någon effekt. $P_{TEF_{core}}$ hade kunnat bytas ut mot originalpromotorn för *ALK1* från *Y. lipolytica* då den med säkerhet ger korrekt interaktion mellan transkriptionsfaktorer och polymeras. Eftersom *Y. lipolytica* och *S. cerevisiae* är två olika jästarter är det inte säkert att det fungerar att använda originalpromotorn från *Y. lipolytica* i *S. cerevisiae*.

Alla kolonier där kopparsulfat tillsattes hade en för låg tillväxt för att undersökas vidare. Om den kopparinducerade promotorn fungerat hade mängden Yas3p som uttrycktes motsvarat kopparkoncentrationen. Därmed hade Yas3p:s effekt på transkriptionen av *GFP* samt om n-alkaner endast påverkar *YAS3* kunnat undersökas. Att göra om testerna med en gradient av en lägre kopparkoncentration som inte hindrar celltillväxt hade varit önskvärt.

Det n-alkaninducerade transkriptionssystemet från *Y. lipolytica* regleras av n-alkaner genom att Yas3p förflyttas mellan cellkärnan och det endoplasmiska nätverkets membran. För att undersöka om detta även är fallet i *S. cerevisiae* hade lokaliseringen kunnat undersökas genom inmärkning av Yas1p, Yas2p samt Yas3p med GFP. Detta hade även varit av intresse för att undersöka om det endast är Yas3p som påverkas av n-alkaner eller om Yas1p och Yas2p också påverkas.

På grund av tidsbrist utfördes endast en fluorescensmätning i närvaro av n-alkaner. Andra koncentrationer, inkuberingstider av dekan samt n-alkaner av andra längder hade varit intressanta att undersöka då systemet visats reagera på både n-dekan och n-hexadekan.

En faktor som ej undersöktes i projektet är hur resultaten påverkades av att n-alkaner tillsattes externt. För att säkerställa att transkriptionssystemet kommer i kontakt med n-alkaner skulle systemet kunna implementeras i en *S. cerevisiae*-stam som producerar n-alkaner.

YAS3 har visat ge upphov till två varianter av proteinet Yas3p, ett långt och ett kort. Den korta varianten av proteinet föreslås vara av störst betydelse för det n-alkaninducerade transkriptionssystemet. Att undersöka vilken variant av Yas3p som uttrycks i biosensorn hade varit av intresse för utvecklingen av en effektiv och funktionell biosensor.

8 Referenser

- (1) Karl, T. R.; Nichols, N.; Gregory, J. The coming climate. *Scientific American* **1997**, *276*, 78–83.
- (2) Buijs, N. A.; Zhou, Y. J.; Siewers, V.; Nielsen, J. Long-chain alkane production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* **2015**, *112*, 1275–1279.
- (3) Lennen, R. M.; Pfleger, B. F. Microbial production of fatty acid-derived fuels and chemicals. *Current opinion in biotechnology* **2013**, *24*, 1044–1053.
- (4) Coyle, W. T. Next-Generation Biofuels: Near-Term Challenges and Implications for Agriculture. *Amber Waves* **2010**, *8*, 20–27.
- (5) Buijs, N. A.; Siewers, V.; Nielsen, J. Advanced biofuel production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, *17*, 480–488.
- (6) Peplow, M. Cellulosic ethanol fights for life. *Nature* **2014**, *507*, 152–153.
- (7) Siewers, V. Lecture 19/1., Gothenburg, 2016.
- (8) Singh, S.; Kumari, B.; Mishra, S., *Microbial Degradation of Xenobiotics*; Springer: 2011; kap. Microbial Degradation of Alkanes, s. 439–469.
- (9) Fukuda, R. Metabolism of Hydrophobic Carbon Sources and Regulation of it in n-Alkane-Assimilating Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2013**, *77*, 1149–1154.
- (10) Chaillan, F.; Le Flèche, A.; Bury, E.; Phantavong, Y.-h.; Grimont, P.; Salot, A.; Oudot, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology* **2004**, *155*, 587–595.
- (11) Hirakawa, K.; Kobayashi, S.; Inoue, T.; Endoh-Yamagami, S.; Fukuda, R.; Ohta, A. Yas3p, an Opi1 Family Transcription Factor, Regulates Cytochrome P450 Expression in Response to n-Alkanes in *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 7126–7137.
- (12) Endoh-Yamagami, S.; Hirakawa, K.; Morioka, D.; Fukuda, R.; Ohta, A. Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Heterocomplex of Yas1p and Yas2p Regulates Cytochrome P450 Expression in Response to Alkanes in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Eukaryotic Cell* **2007**, *6*, 734–743.
- (13) Yamagami, S.; Morioka, D.; Fukuda, R.; Ohta, A. A basic helix-loop-helix transcription factor essential for cytochrome p450 induction in response to alkanes in yeast *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279*, 22183–22189.

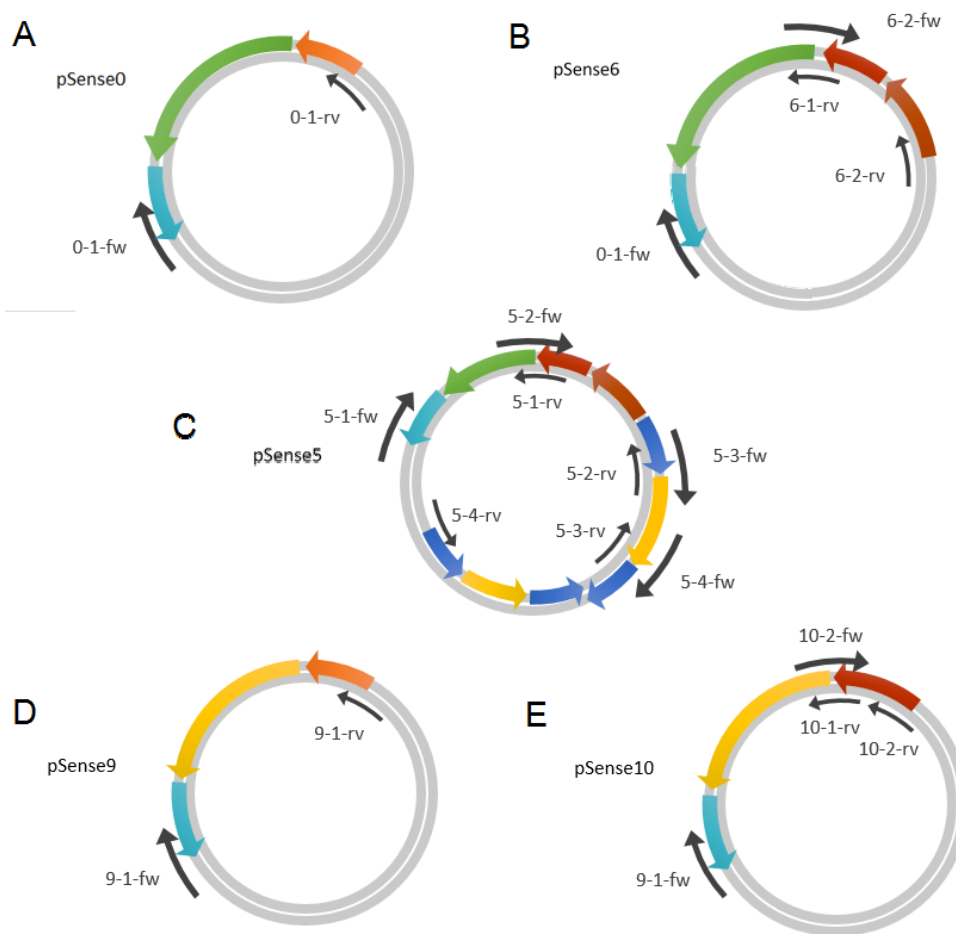
- (14) Kobayashi, S.; Hirakawa, K.; Horiuchi, H.; Fukuda, R.; Ohta, A. Phosphatidic acid and phosphoinositides facilitate liposome association of Yas3p and potentiate derepression of ARE1 (alkane-responsive element one)-mediated transcription control. *Fungal Genetics and Biology* **2013**, *61*, 100–110.
- (15) David, F. Personal communication., Gothenburg, 2016.

9 Appendix

9.1 Primersekvenser

Tabell 7: Primersekvenser till PCR:er för de konstruerade plasmiderna.

Plasmid	PCR	Namn	Sekvens
pSense0	1	0-1-fw	TGACATAACTAATTACATGACTA- TTTGTATAGTTCATCCATGCCATG
		0-1-rv	AATCTAAGTTTTAATTACAAAAA- AAACAATGCGAATCCCCGGGTTA
pSense6	2	0-1-fw	TGACATAACTAATTACATGACTA- TTTGTATAGTTCATCCATGCCATG
		6-1-rv	TTAATTACAAAAAACAAC- TGCGAATCCCCGGGTTA
	3	6-2-fw	GGATTCGCATTGTTTTTTTGT- AATTAAACTTAGATTAGATTGC
		6-2-rv	ACTAAAGGGAACAAAAGCTGT- GTGCAGATGTTATAATATCTGTG
pSense5 samt pSense5.1	4	5-1-fw	AATGTAAGCGTGACATAACTAATTACAT- GACTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATG
		5-1-rv	AGTTTTAATTACAAAAAAC- AATGCGAATCCCCGGGTTA
	5	5-2-fw	CCCGGGGATTCGCATTGTTTTTTTG- TAATTAAACTTAGATTAGATTGC
		5-2-rv	GGGATAAGTGCATTGTTTTTTTGTAT- ATTTGTTGTAAAAAGTAGATAATTAC
	6	5-3-fw	AACAAATATAACAAAAAAC- AATGCACTTATCCCATCCTC
		5-3-rv	TACACTACTAATGGC- TCATTCGTCGATCTTAGG
	7	5-4-fw	AAGATCGACGAATGAGCC- ATTAGTAGTGTA CTCAAAC
		5-4-rv	ATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAA- AGCTGACGCACAGATATTATAACATCTG
pSense9	8	9-1-fw	TGACATAACTAATTACATG- ATCAGGCGTCACCCATTTC
		9-1-rv	AATCTAAGTTTTAATTACAAAAA- ACAATGCCTAAGGCCTTGTCATC
pSense10	9	9-1-fw	TGACATAACTAATTACATGAT- CAGGCGTCACCCATTTC
		10-1-rv	ATCACATAAAAAACAAT- GCCTAAGGCCTTGTCATC
	10	10-2-fw	CCTTAGGCATTGTTCTTTTAT- GTGATGATTGATTGATTGATTG
		10-2-rv	ACTAAAGGGAACAAAAGCTGTTT- AAAACACTTTTGTATTATTTTCCTC



Figur 23: Positioner för primerna till PCR:er. **A** visar primerna för pSense0, **B** visar primerna för pSense6, **C** visar primerna för pSense5, **D** visar primerna för pSense9 och **E** visar primerna för pSense10. Figuren visar simplifierade versioner av de konstruerade plasmiderna utan utgångsplasmidernas innehåll och namn på de olika generna.

9.2 Protokoll för PCR

9.2.1 ThermoScientific™Phusion™High-Fidelity DNA Polymeras

Tabell 8: Volym av vardera komponent för PCR 1-10 med ThermoScientific™Phusion™High-Fidelity DNA Polymeras för reaktionsvolym på 25 µl eller 50 µl

Komponent	25 µl tot.vol. [µl]	50 µl tot.vol. [µl]
Vatten	till 25	till 50
5X Phusion HF Buffer	4	10
10 mM dNTP	0,4	1
10 µM Framåtprimer	1	2,5
10 µM Bakåtprimer	1	2,5
DNA-templat	0,5	1,25
Phusion DNA Polymeras	0,2	0,5

Tabell 9: Trestegs PCR-schema för PCR med ThermoScientific™Phusion™High-Fidelity DNA Polymeras.

Steg	Temperatur	Tid
Initial denaturering	98 °C	30 s
35 cykler	98 °C	10 s
	Beräknad inbindningstemp.	30 s
	72 °C	15-30 s/kb
Avslutande förlängningssteg	72 °C	10 min

9.2.2 TaKaRa PrimeSTAR^R HS DNA Polymeras

Tabell 10: Volym av vardera komponent för PCR med TaKaRa PrimeSTAR® HS DNA Polymeras för reaktionsvolym på 50 µl.

Komponent	50 µl tot.vol. [µl]
Vatten	till 50
5X PrimeSTAR GXL Buffer	10
2,5 mM dNTP	4
10 µM Framåtprimer	1,5
10 µM Bakåtprimer	1,5
DNA-templat	0,5
PrimeSTAR GXL DNA Polymeras	1

Tabell 11: Trestegs PCR-schema för PCR med TaKaRa PrimeSTAR[®] HS DNA Polymeras.

Steg	Temperatur	Tid
Initial denaturering	98 °C	30 s
30 cykler	98 °C	10 s
	55 °C	15 s
	68 °C	1 min/kb
Avslutande förlängningssteg	72 °C	10 min

9.2.3 ThermoScientific[™]DreamTaq[™]DNA Polymeras

Tabell 12: Volym av vardera komponent för PCR med ThermoScientific[™]DreamTaq[™]DNA Polymeras för total reaktionsvolym på 50 µl.

Komponent	50 µl reaktion [µl]
Vatten	till 50
10X DreamTaq Green Buffer	10
2,5 mM dNTP	4
10 µM Framåtprimer	2
10 µM Bakåtprimer	2
DNA-templat	1
DreamTaq DNA Polymeras	1

Tabell 13: Trestegs PCR-schema för PCR med ThermoScientific[™]DreamTaq[™]DNA Polymeras

Steg	Temperatur	Tid
Initial denaturering	98 °C	30 s
30 cykler	98 °C	10 s
	55 °C	15 s
	68 °C	1 min/kb
Avslutande förlängningssteg	72 °C	10 min

Tabell 14: Volym av vardera komponent för koloni-PCR med ThermoScientific™ DreamTaq™ DNA Polymeras för total reaktionsvolym på 20 µl.

Komponent	20 µl reaktion [µl]
Vatten	12,5
10X DreamTaq Green Buffer	2
10 mM dNTP	0,4
10 µM Framåtprimer	2
10 µM Bakåtprimer	2
DNA-templat	1
DreamTaq DNA Polymeras	0,1

9.2.4 Fusions-PCR

Tabell 15: Volym av vardera komponent för fusions-PCR för PCR 4 och 5 steg 1 med TaKaRa PrimeSTAR® HS DNA Polymeras för reaktionsvolymen 25 µl.

Komponent	25 µl reaktion [µl]
Vatten	till 25
5X PrimeSTAR HS Buffer	5
10 mM dNTP	3
PCR 4	100 ng
PCR 5	100 ng
PrimeSTAR HS DNA Polymeras	0,5

Tabell 16: PCR-schema för första steget, sammanfogning, i fusions-PCR med PCR 4 och 5 med TaKaRa PrimeSTAR® HS DNA Polymeras

Steg	Temperatur	Tid
Initial denaturering	95 °C	3 min
15 cykler	95 °C	10 s
	68 °C	1 min
Avslutande förlängningssteg	72 °C	10 min

Tabell 17: Volym av vardera komponent för fusions-PCR steg 2 för PCR 4 och 5 med TaKaRa PrimeSTAR[®] HS DNA Polymeras för reaktionsvolymen 50 µl.

Komponent	50 µl reaktion [µl]
Vatten	till 50
5X PrimeSTAR HS Buffer	5
10 mM dNTP	3
Produkt från steg 1	25
5-1-fw	1,5
5-2-rv	1,5
PrimeSTAR HS DNA Polymeras	0,5

Tabell 18: PCR-schema för andra steget, amplifiering, i fusions-PCR med PCR 4 och 5 med TaKaRa PrimeSTAR[®] HS DNA Polymeras

Steg	Temperatur	Tid
Initial denaturering	95 °C	3 min
30 cykler	98 °C	10 s
	56 °C	1 min
	72 °C	2 min
Avslutande förlängningssteg	72 °C	10 min

Tabell 19: Volym av vardera komponent för fusions-PCR för PCR 6 och 7 med ThermoScientific[™]Dream-Taq[™]DNA Polymeras för reaktionsvolymen 50 µl.

Komponent	50 µl reaktion [µl]
Vatten	till 50
10X DreamTaq Green Buffer	5
10 mM dNTP	1
PCR 6	100 ng
PCR 7	100 ng
5-3-fw	2
5-4-rv	2
DreamTaq DNA Polymeras	1

Tabell 20: PCR-schema för fusions-PCR med PCR 6 och 7 med ThermoScientific™DreamTaq™DNA Polymeras.

Steg	Temperatur	Tid
Initial denaturering	95 °C	3 min
35 cykler	95 °C	10 s
	55 °C	30 s
	72 °C	3:05 min
Avslutande förlängningssteg	72 °C	10 min

9.2.5 Innehåll, inbindningstemperaturer, förlängningstider samt polymeras för PCR-produkter

Tabell 21: Innehåll för 10 PCR-produkter samt beräknade inbindningstemperaturer och förlängningstider för fragmenten.

PCR	Innehåll	Inbindnings- temperatur [°C]	Förlängnings- tid [s]
1	<i>GFP</i>	61	22,5
2	<i>GFP</i>	61	22,5
3	3xARE1+P _{TEF1core}	61	22,5
4	<i>GFP</i>	61	22,5
5	P _{PGK1} +3xARE1+P _{TEF1core}	61	22,5
6	<i>YAS2</i>	56	60
7	<i>YAS1</i> +T _{ADH1} +T _{PCD6}	56	60
8	<i>YAS3</i>	61	22,5
9	<i>YAS3</i>	61	22,5
10	P _{CUP1}	61	22,5

Tabell 22: Slutliga inbindningstemperaturer, förlängningstider samt polymeras för PCR 1-10.

PCR	Polymeras	Inbindnings- temperatur [°C]	Förlängnings- tid [s]
1	Phusion TM	60	22,5
2	Phusion TM	60	22,5
3	Phusion TM	60	22,5
4	DreamTaq TM	72	60
5	DreamTaq TM	72	60
6	DreamTaq TM	72	120
7	DreamTaq TM	72	120
8	Phusion TM	60	30
9	DreamTaq TM	68	90
10	DreamTaq TM	68	30

9.3 Protokoll för restriktion

Tabell 23: Protokoll för restriktion med Thermo ScientificTMFastDigestTM. Restriktionstiden som användes var 30 minuter, enligt Thermo ScientificTM är dock 5-15 minuter tillräckligt för fullständig restriktion. Reaktionstemperaturen som användes för enzymen var 37 °C enligt Thermo ScientificTM.

Komponent	Mängd [µl]
Enzym 1	1
Enzym 2	1
10X FastDigest [®] Green Buffer	2
Plasmid-DNA	upp till 1 µg
H ₂ O	till 20

9.4 Protokoll för Gibsonkloning

1. Volymer för de olika reaktionerna beräknas med förhållandet 50 ng utgångsplasmid till 150 ng PCR-produkt.
2. 10 µl Gibson Assembly Master Mix (2X) tillsätts till vardera prov.
3. Vatten tillsätts så att en totalvolym på minst 20 µl uppnås.
4. Proverna inkuberas på 50 °C värmeblock i 15 minuter om 2-3 fragment ska sammanfogas eller 60 minuter om 4-6 fragment ska sammanfogas.

9.5 Medium och odlingsplattor

9.5.1 LB-medium och LB-Amp-plattor

Tabell 24: Innehållsförteckning LB-medium (Luria-Bertani-medium) med pH 7,0.

Komponent	Koncentration [g/l]
NaCl	10
Trypton (kaseinpepton)	10
Jästextrakt	5

Tabell 25: Innehållsförteckning LB-Amp-plattor med pH 7,0. Ampicillin (80 mg/l) tillsätts efter autoklavering.

Komponent	Koncentration [g/l]
NaCl	10
Trypton (kaseinpepton)	10
Jästextrakt	5
Agar	16

9.5.2 SD-URA-HIS-plattor

Tabell 26: Innehållsförteckning SD-URA-HIS-plattor med pH 5,5-6,0.

Komponent	Koncentration [g/l]
Glukos	20
Jästkvävebaser utan aa	6,9
CSM-HIS-URA	0,75
Agar	20

9.5.3 Delftmedium

Tabell 27: Lösningar och mängder av dessa till 1 l Delftmedium. Autoklaverad 20%-ig glukoslösning samt 1 ml sterilfiltrerad vitaminlösning tillsätts efter autoklavering och svalning.

Lösning	Volym [ml]	Slutkoncentration [g/l]
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (100 g/l)	75	7,5
KH_2PO_4 (120 g/l)	120	14,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (50 g/l)	10	0,5
Spårmetaller	1	-
Destillerat vatten	upp till 700	-

Tabell 28: Innehåll i 1 l lösning av spårmetaller.

Ämne	Mängd [g]
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	4,5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3
H_3BO_3	1
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,3
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,1
KJ	0,1
EDTA	15
Destillerat vatten	upp till 1 l

Tabell 29: Innehåll i 1 l lösning av vitaminer.

Ämne	Mängd [g]
Biotin,	0,05
p-aminobensoesyra	0,2
Nikotinsyra	1
Kalciumpantotenat	1
Pyridoxin, HCl	1
Tiamin, HCL	1
m-inositol	25
Destillerat vatten	upp till 1 l

9.6 Sekvensering

pSense0

1. Start vid bp ~ 3600 i riktning mot *GFP*.

Sekvensering täcker P_{TEF1} , *GFP* och T_{CYC1} .

pSense6

1. Start vid bp ~ 3780 i riktning mot ARE1-sekvenserna och *GFP*.

Sekvensering täcker 3xARE1-sekvenser, $P_{TEF1core}$ och *GFP*.

pSense5

1. Start vid bp ~ 8070 i riktning mot *YAS1*.
2. Start vid bp ~ 7210 i riktning mot *YAS2*.
3. Start vid bp ~ 6330 i riktning mot *YAS2*.
4. Start vid bp ~ 5500 i riktning mot *GFP*.
5. Start vid bp ~ 4620 i riktning mot *GFP*.
6. Start vid bp ~ 3740 i riktning mot *GFP*.
7. Start vid bp ~ 2860 i riktning mot T_{CYC1} .

Sekvensering täcker P_{PGK1} , *YAS1*, T_{ADH1} , T_{PDC6} , *YAS2*, P_{PGK1} , 3xARE1-sekvenser, $P_{TEF1core}$, *GFP* och T_{CYC1} .

pSense9

1. Start vid bp ~ 4100 i riktning mot *YAS3*.

Sekvensering täcker P_{TEF1} och *YAS3*.

pSense10

1. Start vid bp ~ 4230 i riktning mot *YAS3*.
2. Start vid bp ~ 3430 i riktning mot T_{CYC1} .

Sekvensering täcker P_{CUP1} , *YAS3* och T_{CYC1} .

pSense2

1. Start vid bp ~ 8070 i riktning mot *YAS1*.
2. Start vid bp ~ 7210 i riktning mot *YAS2*.
3. Start vid bp ~ 6330 i riktning mot *YAS2*.
4. Start vid bp ~ 5500 i riktning mot *GFP*.
5. Start vid bp ~ 3900 i riktning mot *GFP*.
6. Start vid bp ~ 3740 i riktning mot *GFP*.
7. Start vid bp ~ 2860 i riktning mot T_{CYC1} .

Sekvensering täcker P_{PGK1} , *YAS1*, T_{ADH1} , T_{PDC6} , *YAS2*, P_{PGK1} , 3xARE1-sekvenser, $P_{TEF1core}$, *GFP* och T_{CYC1} .