

## Opppg. 15 – Genteknologi

### Plasmid - kutting

Hvert lag kutter med 3 forskjellige enzymer

X  $\mu$ l plasmid løsning; 2 $\mu$ l buffer; 1 $\mu$ l enzym; 17-X  $\mu$ l MQ

Totalt 20 $\mu$ l løsning i hvert rør

Innkuberes i 2 timer ved 37°C

Etter 2 times kutting skal 20 $\mu$ l av hver kuttereaksjon sammen med 5 $\mu$ l OM appliseres på gel

Etter å ha tatt bilde av gelene skal restriksjons kart lages

Enzym	buffer
<i>HindIII</i>	R+
<i>PstI</i>	O+
<i>XbaI</i>	Y+
<i>HincII</i>	Y+

# GENTEKNOLOGI

## MEDISIN

Produksjon av medikamenter  
Søk etter genetiske sykdommer  
Genterapi

## MAT

Planter som er resistent mot insekter, bakterier, virus og mygg  
Stimulere vekst av planter under spesielle omgivelser

## INDUSTRI

Produksjon av enzymer for industrien, papir, detergenter mm.

## Kloningsvektorer:

- **plasmider**
- **bakteriofag og andre virus:** nyttig for kloning av større DNA fragmenter (opp til 45 kb). Ofte brukt til generering av genomiske DNA bibliotek (fig.14.15 i boka).
- **cosmider:** plasmider for kloning av store DNA fragmenter (opp til 50 kb). Inneholder cos sete, og kan pakkes i fag partikler.
- **kunstige kromosomer** (artificial chromosomes): YAC (yeast artificial chromosome) kan inneholde 100-2000 kb DNA, og inneholder alle nødvendige elementer for propagering som et vanlig kromosom i gjærceller.

## **Hva er et plasmid?**

- Ekstrakromosomalt molekyl av DNA, varierer i størrelse fra 1kb til >200kb
- Finnes naturlig i forskjellige bakterie arter
- Brukt aktivt i genteknologi til kloning av gener fra en art til en annen for sekvensering av DNA eller for produksjon av proteiner

## **Hva brukes plasmider til?**

- Oppamplifisering av ønskede DNA sekvenser ved transformering av bakterier
- Generering av DNA (cDNA) – bibliotek
- Orientering av DNA-sekvenser i ett genom
- Hybridisering
- Ekspresjon /ekspresjonskontroll av DNA sekvenser
- Sekvensering av ønskede DNA-sekvenser

## **Plasmider som klonings verktøy**

**Det ideelle kloningsverktøyet bør ha:**

- **Lav molekylær vekt**
- **En evne til å overføre en seleksjonsmarkør til et fenotypisk trekk i en vertscelle**
- **Et enkelt kuttesete for mange forskjellige restriksjonsenzymer**

## **Plasmider som klonings verktøy**

**"Low copy number" plasmid vektorer**

- Kloning av ustabile gener
- Kloning av store DNA sekvenser
- Når produkt dreper bakterien

**"High copy number" plasmid vektorer**

- "Arbeidshester" i molekylær kloning
- Brukt i all rutine manipulering av små segmenter av DNA < 15kb
- Har høy Ori-affinitet for bakteriens polymerase

# EKSPRESJONS PLASMIDER

(som vi skal bruke i oppg. 16)

Inneholder følgende elementer:

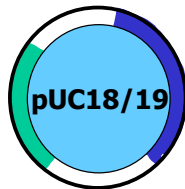
- Promotere for å kunne produsere store mengder mRNA. Ofte også enhancer regioner for stimulering av transkripsjon.
- Transkripsjon startsignaler.
- Transkripsjon stoppsignal, og polyadenyleringssete.
- Inneholder ofte forskjellige "merkelapper" / "tags" for deteksjon av rekombinant protein, eller for opprensing av denne.

## Kloning og transformering

Fremmed DNA



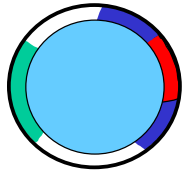
Kutter med restriksjonsenzym



Plasmid kuttes med samme restriksjonsenzym

Fremmed DNA liggeres inn Plasmid





## Rekombinant Plasmid

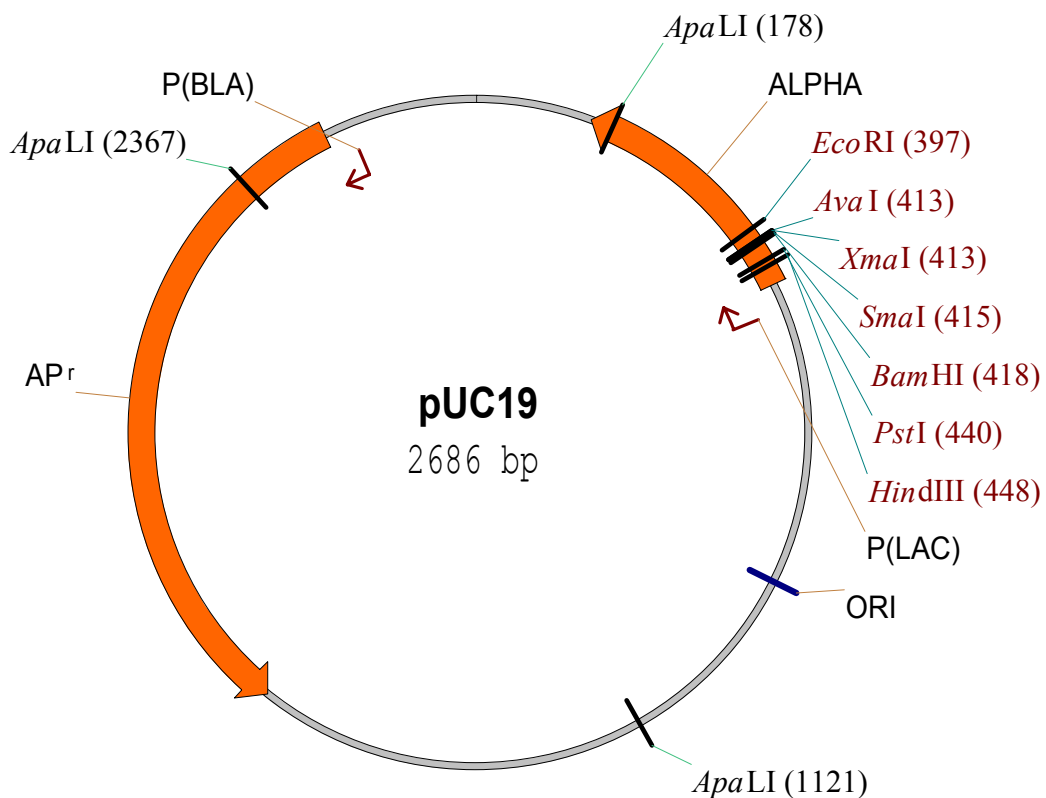
Det rekombinante plasmidet transformeres deretter inn i kompetente bakterieceller for oppformering, ved

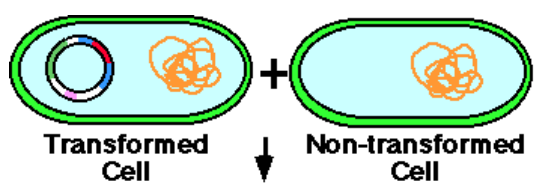
- varmesjokk (kjemisk kompetente celler)
- elektroporering (elektrokompetente celler)

Etter vekst av transformerte bakterier, kan plasmidene (nå mangedoblet i antall) igjen isoleres.

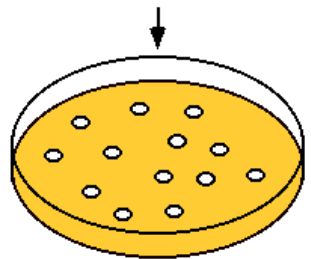
Ofte kontrolleres det rekombinante plasmidet ved kutting med restriksjonsenzymmer, for å sjekke innskuddstørrelse, orientering i plasmidet, mm.

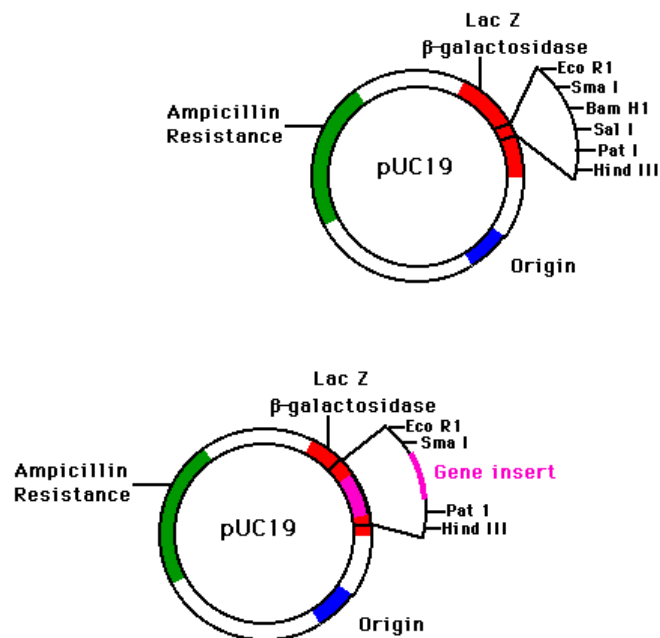
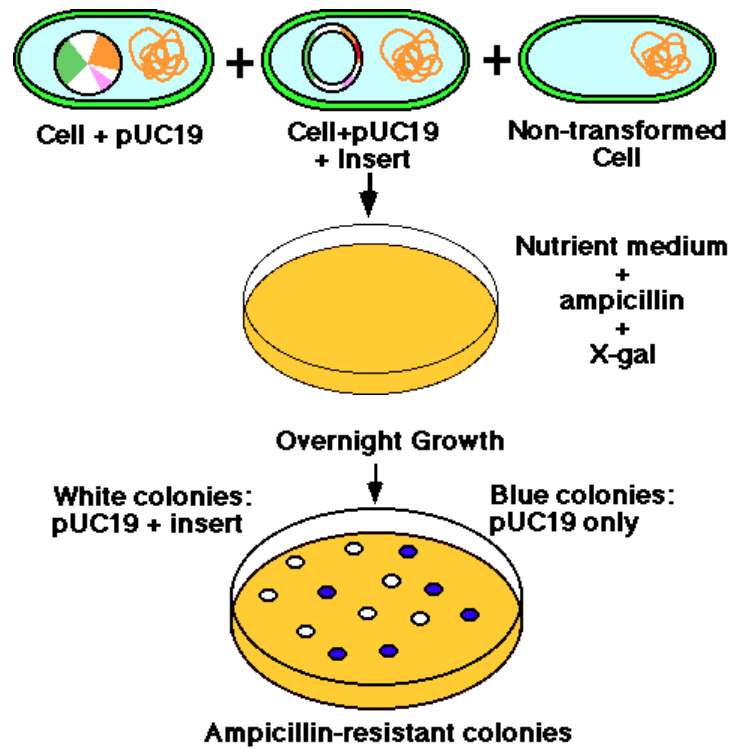
Vi skal utføre kuttinger for å lage et restriksjonskart.





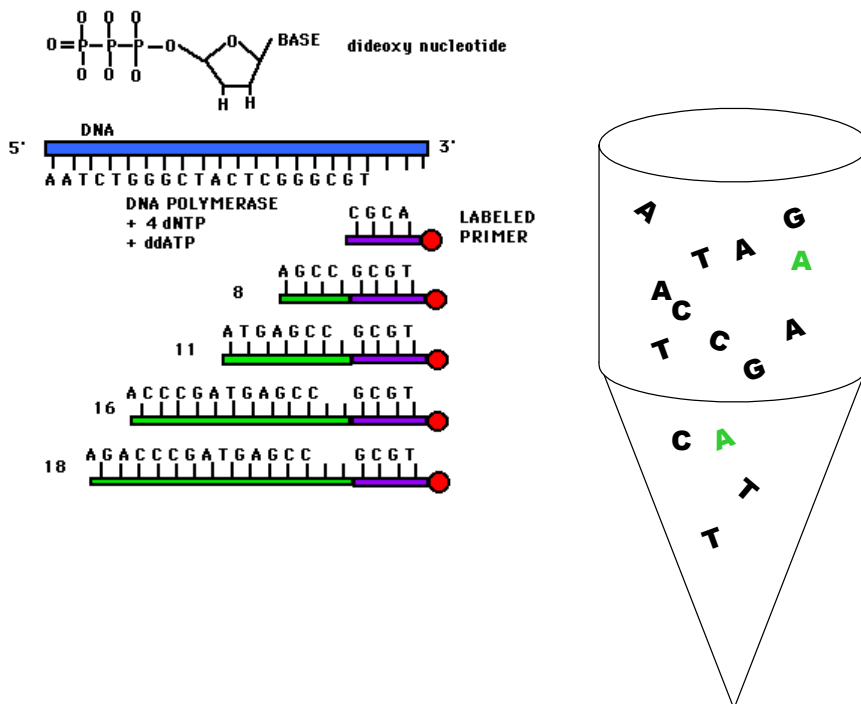
Overnight Growth

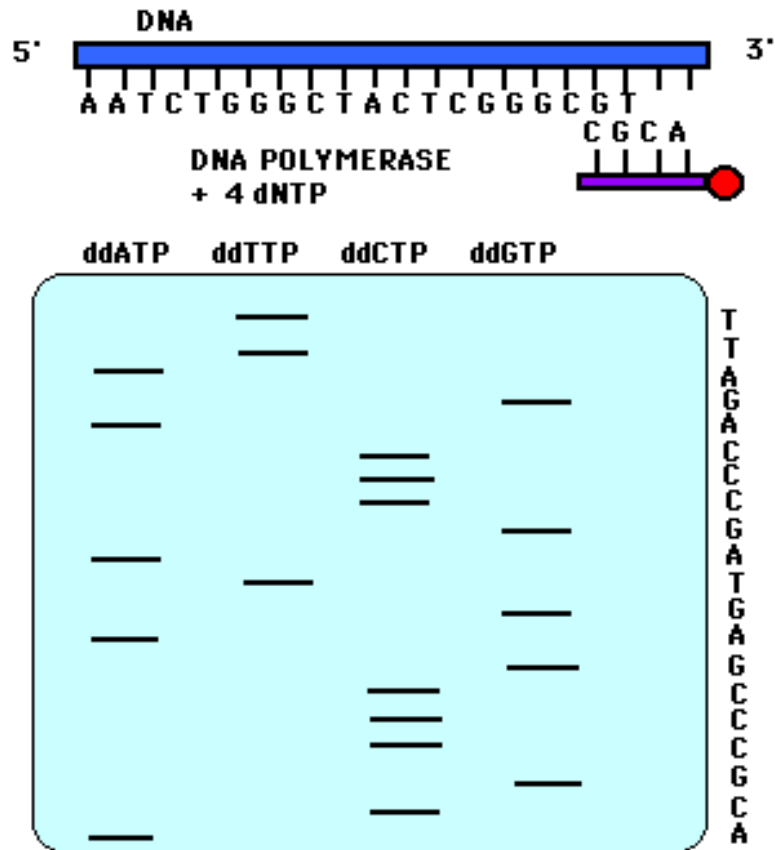






# SEKVENSERING AV DNA





**GATC**

Åpen leseramme:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>

BLAST

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

FASTA

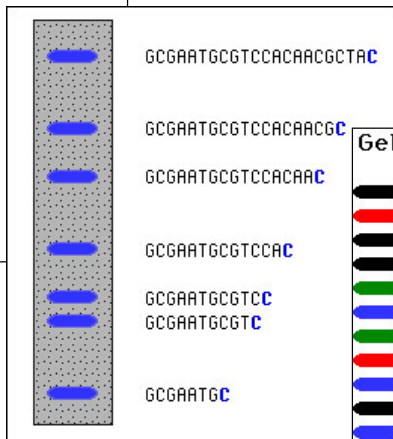
<http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/?request>

DNA Polymerase reads the template strand and synthesizes a new second strand to match:

5' - TACGCGGTACGGTATGTTGACCGTTTAGCTACCGAT  
 3' - ATGCGCCATTGCCATACAGCTGGCAATCGATGGCTAGCATCCAA - 5'

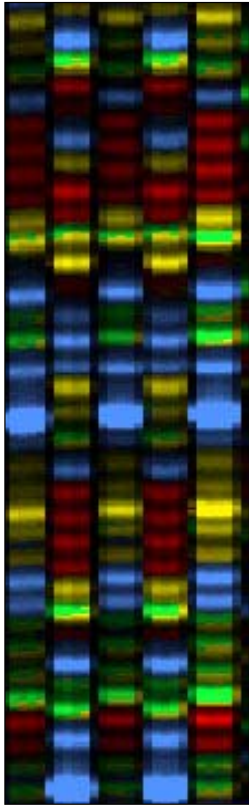
If 5% of the T nucleotides are actually dideoxy T, then each strand will terminate when it gets a ddT on its growing end:

5' - TACGCGGTACGGTATGTTGACCGTTTAGCTACCGAT•  
 5' - TACGCGGTACGGTATGTTGACCGTTTAGCT•  
 5' - TACGCGGTACGGTATGTTGACCGTTT•  
 5' - TACGCGGTACGGTATGTTGACCGGT•  
 5' - TACGCGGTACGGTATGTT•  
 5' - TACGCGGTACGGTATG•  
 5' - TACGCGGTACGGTAT•  
 5' - TACGCGGTACGGT•  
 5' - TACGCGGT•

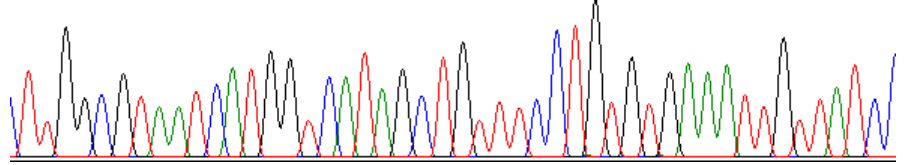


Gel:

	G	GCGAATGCGTCCACACGCTACAGGT
	T	GCGAATGCGTCCACACGCTACAGGT
	G	GCGAATGCGTCCACACGCTACAGG
	G	GCGAATGCGTCCACACGCTACAG
	A	GCGAATGCGTCCACACGCTACA
	C	GCGAATGCGTCCACACGCTAC
	A	GCGAATGCGTCCACACGCTA
	T	GCGAATGCGTCCACACGCT
	C	GCGAATGCGTCCACACGC
	G	GCGAATGCGTCCACACG
	C	GCGAATGCGTCCACAC
	A	GCGAATGCGTCCACAA
	A	GCGAATGCGTCCACA
	C	GCGAATGCGTCCAC
	A	GCGAATGCGTCCA
	C	GCGAATGCGTCC
	C	GCGAATGCGTC
	T	GCGAATGCGT
	G	GCGAATGCG
	C	GCGAATGC
	G	GCGAATG
	T	GCGAAT



1040 1120 1200 1280 1360 1440 1520 1600  
T T G G C G T A A T C A T G G T C A T A G C T G T T T C T G T G T G A A A T T G T T A T C C  
98 100 110 120 130



## Immunologi

Program for uken:

Tirsdag 16/3: Start på oppgave 16.1.1 : Blotting og inkubering med primær-antistoff over natt.

Onsdag 17/3: Oppgave 16.1.1 fortsetter: membran vaskes, og inkuberes med sekundær-antistoff i 1 time.

Start på oppgave 16.2: Støping av geler, applisering av prøver, inkubering i fuktekammer over natt.

Oppgave 16.1.1 gjøres ferdig: membranen vaskes igjen og inkuberes i > 1min i substratløsning.

Torsdag 18/3: Gruppe 1 : Oppgave 16.2 fortsetter: lang vaskeprosedyre startes.

Gruppe 2: Oppgave 16.2 gjøres ferdig: Kort vaskeprosedyre gjennomføres, samt farging og tørking av gelene. Oppgave 16.3 utføres.

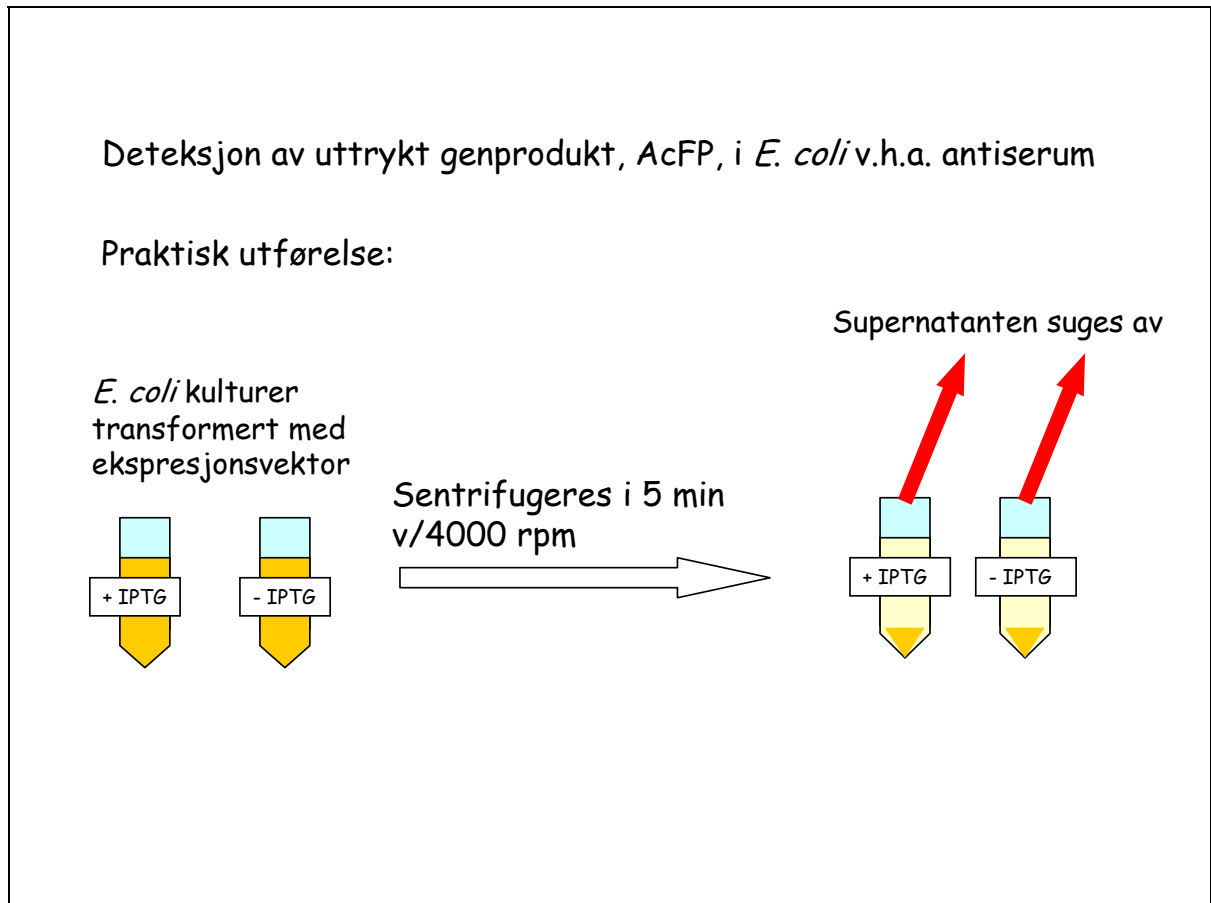
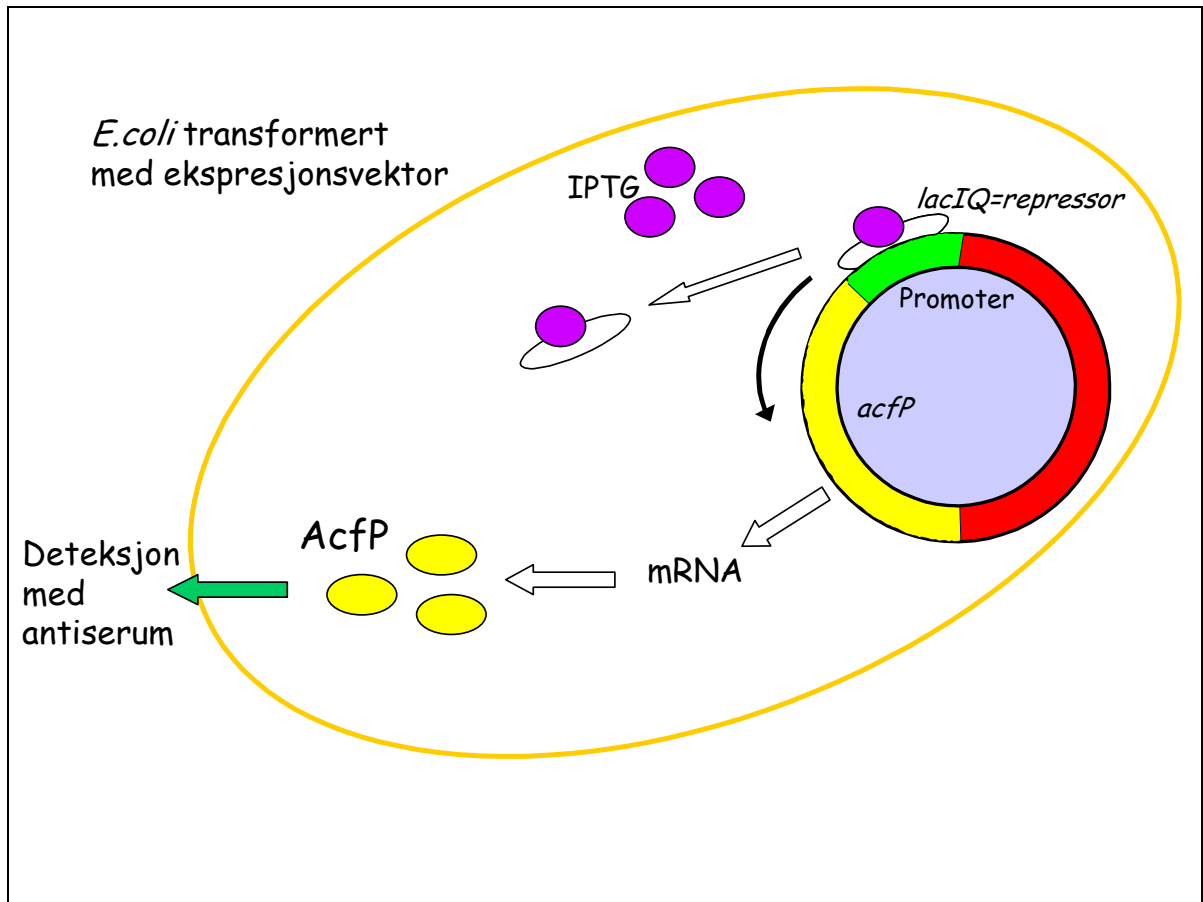
Fredag 19/3: Gruppe 1 : Oppgave 16.2 gjøres ferdig. Oppgave 16.3 utføres.

### 16.1.1 Immunoblotting

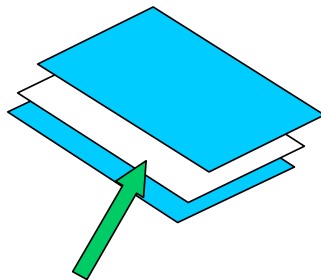
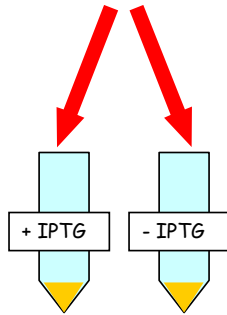
Vi skal bruke en blotting metode som kalles "dot blotting", hvor transformerte bakterier løst i SDS-prøvebuffer dryppes direkte på en fuktet membran, og blir trukket inn i denne membranen ved hjelp av væskestrøm.

Deretter skal vi sjekke om disse transformerte bakteriene har uttrykk/ekspressjon av genet fra *Neisseria gonorrhoeae*, ved å bruke et antiserum mot proteinet AcfP samt et negativt kontrollserum.

Ved deretter å inkubere membranen med et sekundært antistoff konjugert til enzymet alkalisk fosfatase, og tilsette et substrat for dette enzymet, kan vi direkte visualisere tilstedeværelse av proteinet.

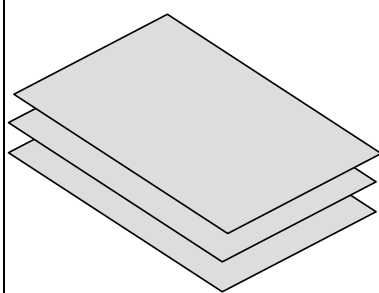
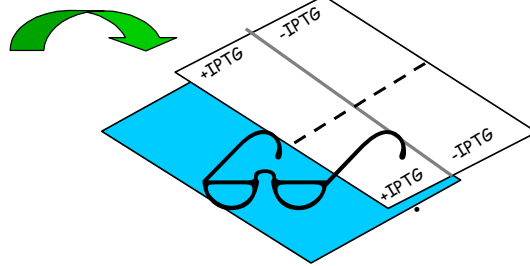


Reløs pelleten i 100  $\mu$ l  
SDS-prøvebuffer



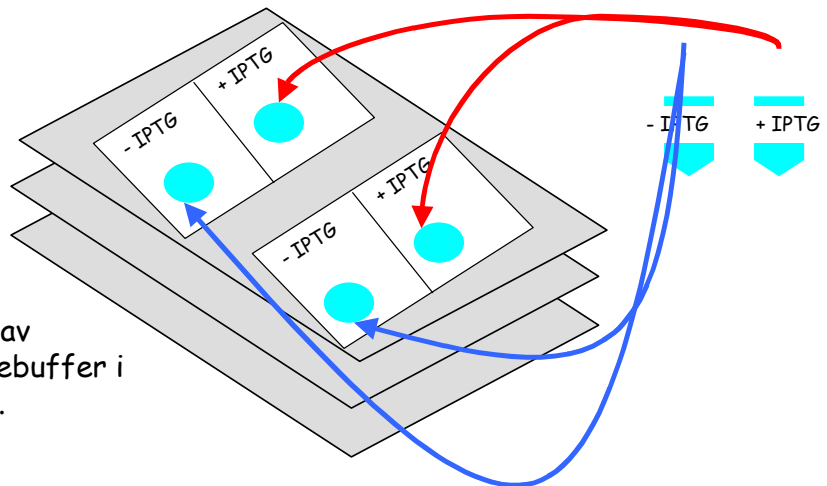
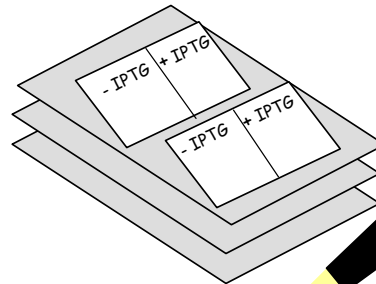
PVDF membran

Membranen klippes i to, og legges i metanol i en petriskål for å fuktet i 2 min. Membranene overføres med pinsett til et veiebeger og vaskes deretter 3X med dest. vann fra spruteflasken. Merk membrandelene med blyant.

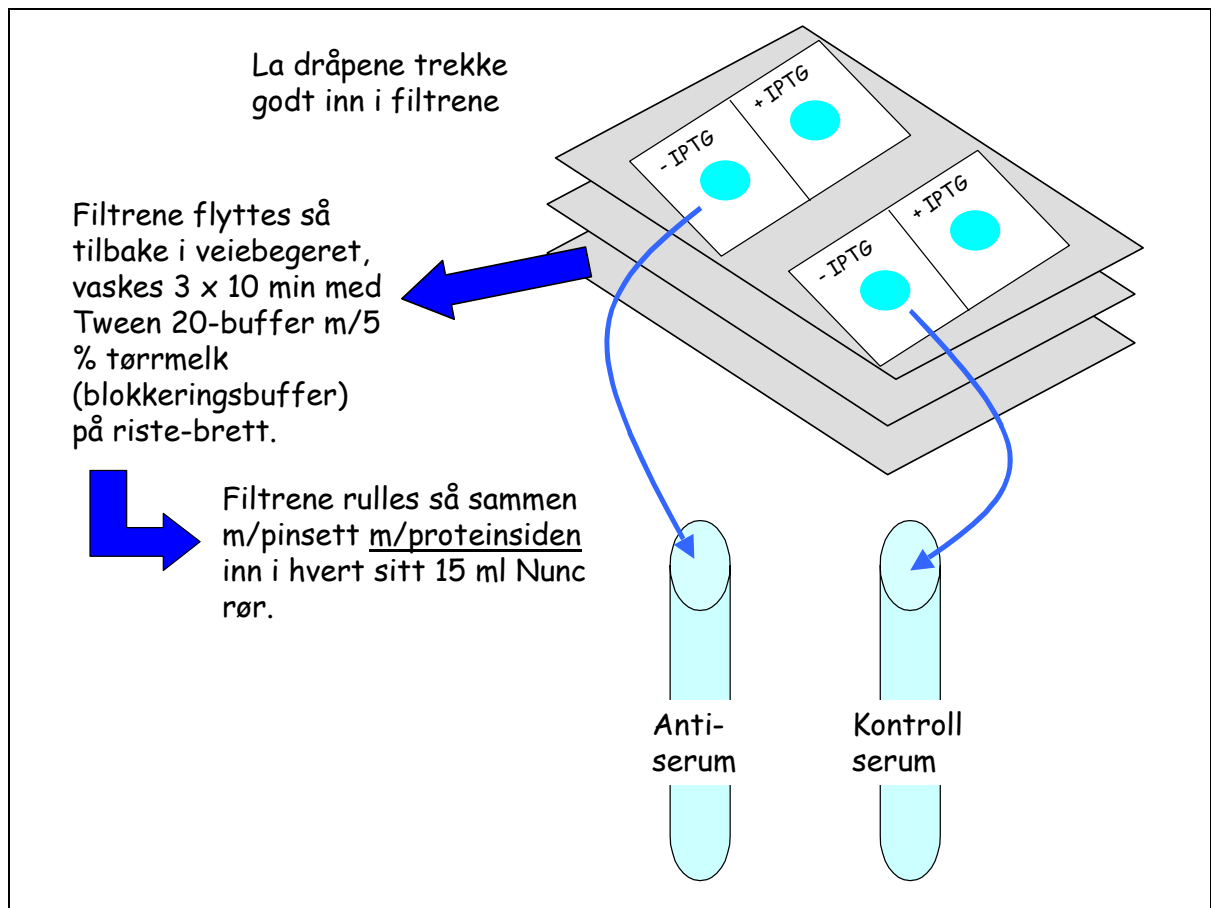


3MM papir  
fuktet med  
dest.vann

PVDF  
membranene  
legges m/pinsett  
oppå fuktet  
3MM papir 3 ark



Drypp deretter 50  $\mu$ l av  
bakteriene løst i prøvebuffer i  
de respektive feltene.



De to forskjellige test-seraene fortynnes 1:1000 i Tween 20-buffer (tilsett 1 ml buffer til røret som inneholder 1  $\mu$ l antiserum).

Overfør det fortynnede antiserumet (1 ml) til rør med membran. Merk røret godt med hvilket antiserum som tilsettes hvilket rør. Inkuberes på rulle ved 4°C til neste dag.



## Oppgave 16.1.1

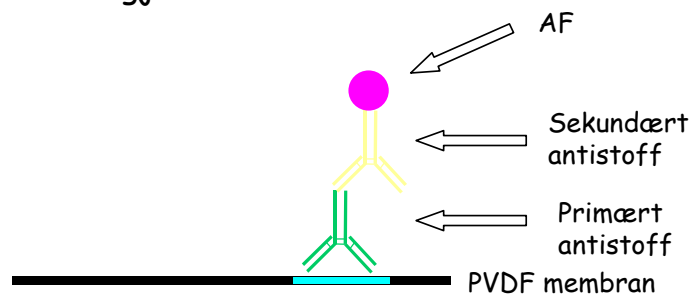
### Neste dag:

Antiserum-løsningen suges av og overføres tilbake til et eppendorf-rør.

Tilsett 2 ml Tween 20-buffer og vask i 10 min. på rulle. Gjenta dette 2 x.

Tilsett så sekundært antistoff (som er konjugert til enzymet alkalisk fosfatase = AF): fortynnes 1:3000 i Tween-20 buffer. Inkuber i 1 time på rulle.

Filteret vaskes igjen 3x 10 min med Tween-20 buffer.



Substratløsning tilsettes:

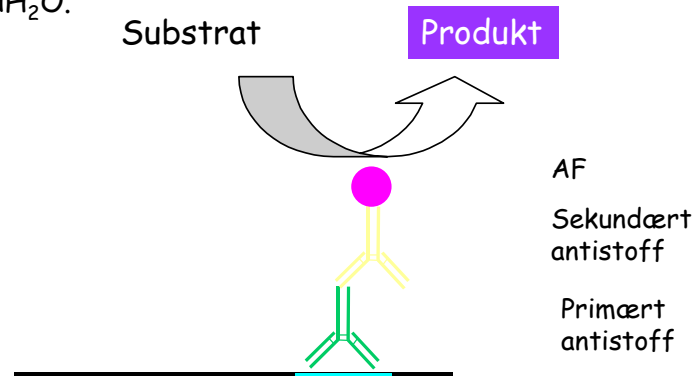
Dere har fått utlevert:

1 reagensrør (glass) med 50  $\mu$ l BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)

1 eppendorfrør med 50  $\mu$ l NBT (Nitroblue tetrazolium)

1 rør med 5 ml fremkaller-buffer

**NB! VIKTIG!** Bland alt sammen i røret som fra før inneholder BCIP, og overfør blandingen/substratløsningen til et veiebeger. Legg filteret i substratløsningen til utfelling skjer. Stoppes ved å helle av substratløsningen og tilsette  $\text{dH}_2\text{O}$ .



## 16.2 Presipitasjon

Vi skal ved hjelp av forskjellige presipitasjonsteknikker i gel undersøke innholdet av råmelk fra ku i to forskjellige halstabletter, ved å se på innholdet av immunoglobuliner, bovint serum albumin, og lactoferrin.

Morsmelk er tidligere vist å bl.a. beskytte spedbarn mot tarminfeksjoner ved innhold av IgA som er mer resistent enn andre immunoglobuliner mot det sure miljøet i tarmen. I tillegg inneholder morsmelk andre antimikrobielle proteiner.

Morsmelk består av : 10 % fett

90 % vandig løsning med proteiner.



Bl.a. IgA og IgG  
albumin  
lactoferrin

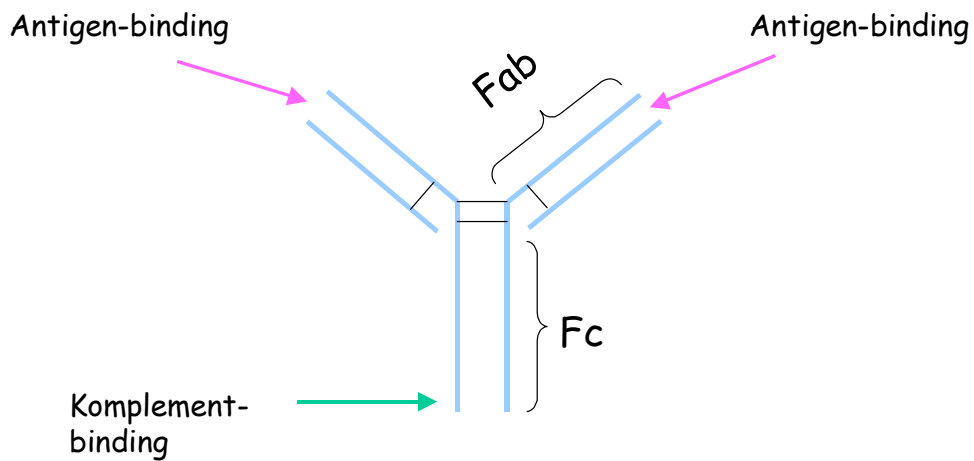
## Lactoferrin

- Lactoferrin er et jern-bindende glykoprotein som finnes i sekreter.
- Proteinet spaltes av enzymet pepsin i magen til flere mindre peptider med påvist antimikrobiell virkning.
- Ett av disse peptidene er lactoferricin B (46 aa), som er vist :
  - å binde til og ødelegge ytre membran hos Gram-negative bakterier, og dermed forstyrre essensielle membranfunksjoner.
  - å være effektivt også mot sopp og Gram-positive bakterier.
- En annen virkning av dette peptidet er induksjon av apoptose i leukemi cellelinjer.

En undersøkelse har også vist at lactoferricin fra ku er mer aktivt enn lactoferricin av annen opprinnelse, som for eksempel fra menneske, mus og kanin.

Det er derfor interessant å undersøke om disse halstablettene inneholder lactoferrin i tillegg til eventuelle antistoffer.

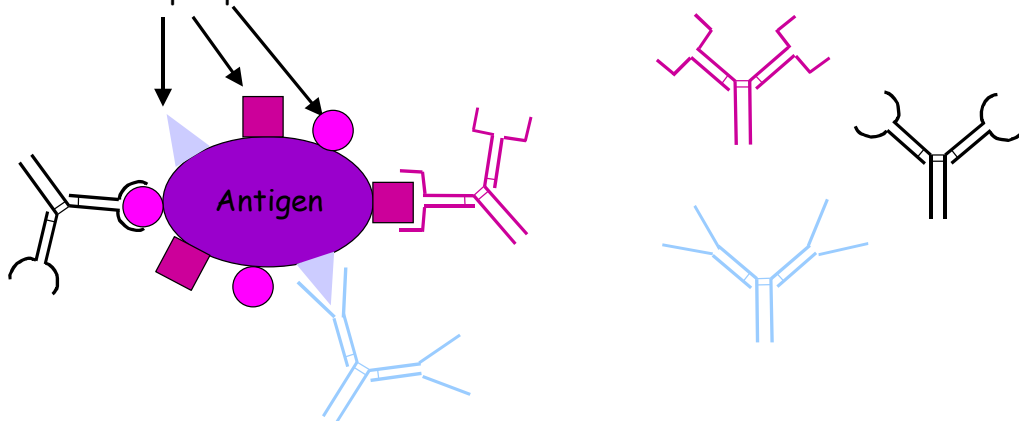
- Mange immunologiske metoder bygger på interaksjoner mellom antistoff og antigen, eller mellom komplementproteiner og antistoff.



## Polyklonale antistoff/antiserum

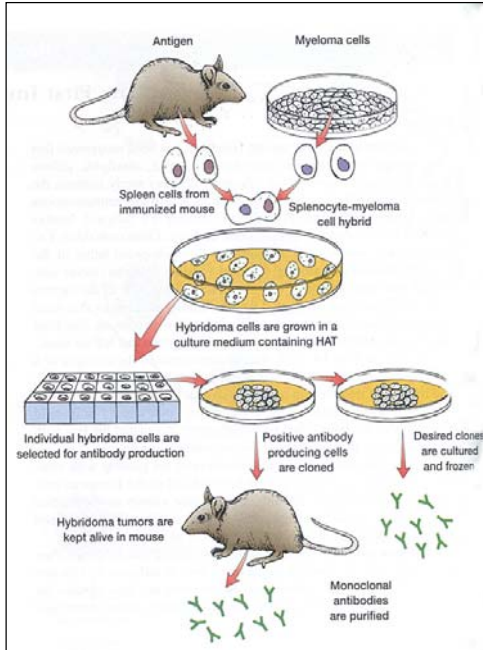
Polyklonale antisera blir laget ved at et peptid fra et bestemt protein injiseres i f.eks. en kanin, og etter en tid tappes så blod fra dyret som da inneholder mange forskjellige antistoff mot det injiserte antigenet.

Antigen  
determinanter/epitoper

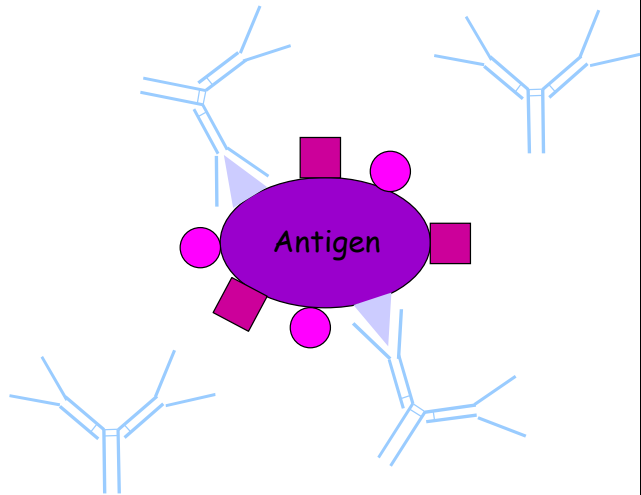


## Monoklonale antistoff

Lages ved fusjon mellom en miltcelle fra en immunisert mus og en myelom-celle (kreftcelle).



Hver av disse fusjonscellene sekreterer dermed en type "monoklonalt" antistoff.



## Immun kompleks dannelse.

Fordi antistoff har to antigen bindingssteder, kan de kryssbinde antigen i aggregater som kalles immunkomplekser.

Hvis immun-komplekset blir stort nok til å felle ut i løsning, får man en presipiteringsreaksjon.

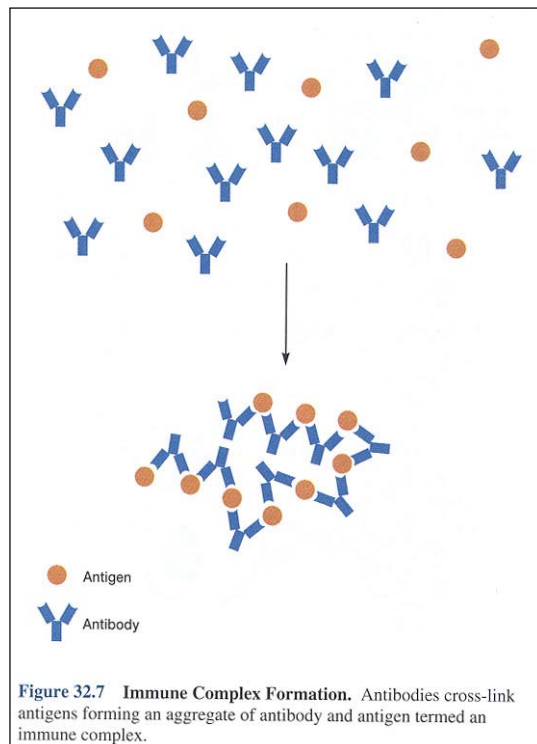
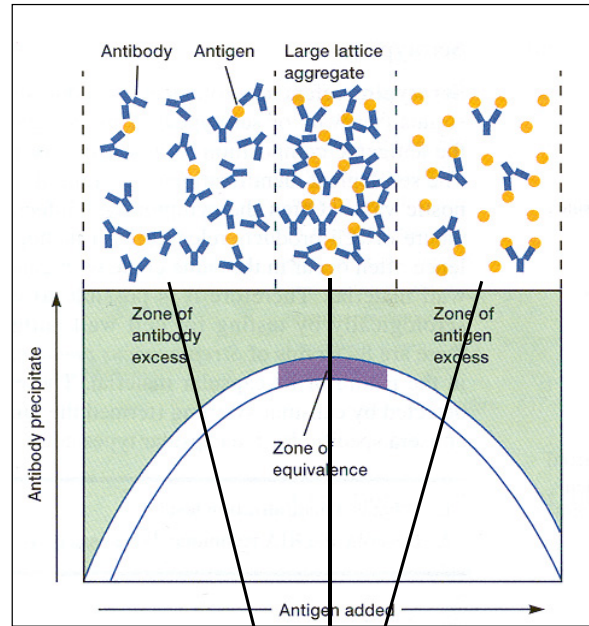
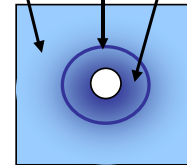
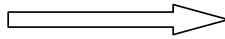
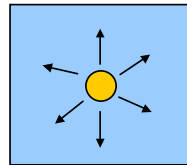


Figure 32.7 Immune Complex Formation. Antibodies cross-link antigens forming an aggregate of antibody and antigen termed an immune complex.

Graden av immun-kompleks dannelse har med forholdet mellom konsentrasjon av antistoff og konsentrasjon av antigen å gjøre.

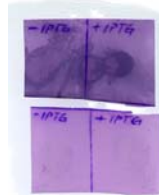
Prøven som appliseres i en brønn vil diffundere utover i gelen som her inneholder antistoff. I en viss avstand fra brønnen vil konsentrasjon av antistoff være i likevekt med kons. av antigen og immunkomplekser dannes.



Ting som kan ha gått galt:

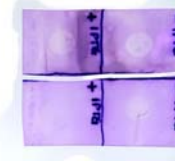
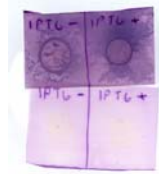
- Prøven har ikke trukket godt nok inn i filteret, og noe kan dermed blitt vasket av i blokkeringen.
- Fortynning av antistoffene har vært feil.
- Dårlig blokkering med Tween 20-buffer?
- Noe bakgrunnsuttrykk av AcfP uten IPTG tilstede  $\Rightarrow$  lite funksjonell repressor?
- Uspesifikk binding av både primært/sekundært antistoff.

Lag 2



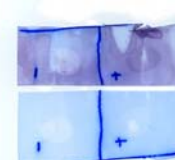
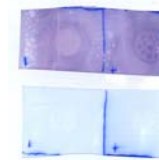
Lag 1

Lag 4



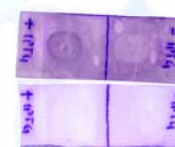
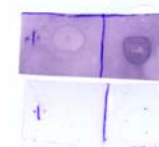
Lag 3

Lag 6



Lag 5

Lag 8



Lag 7