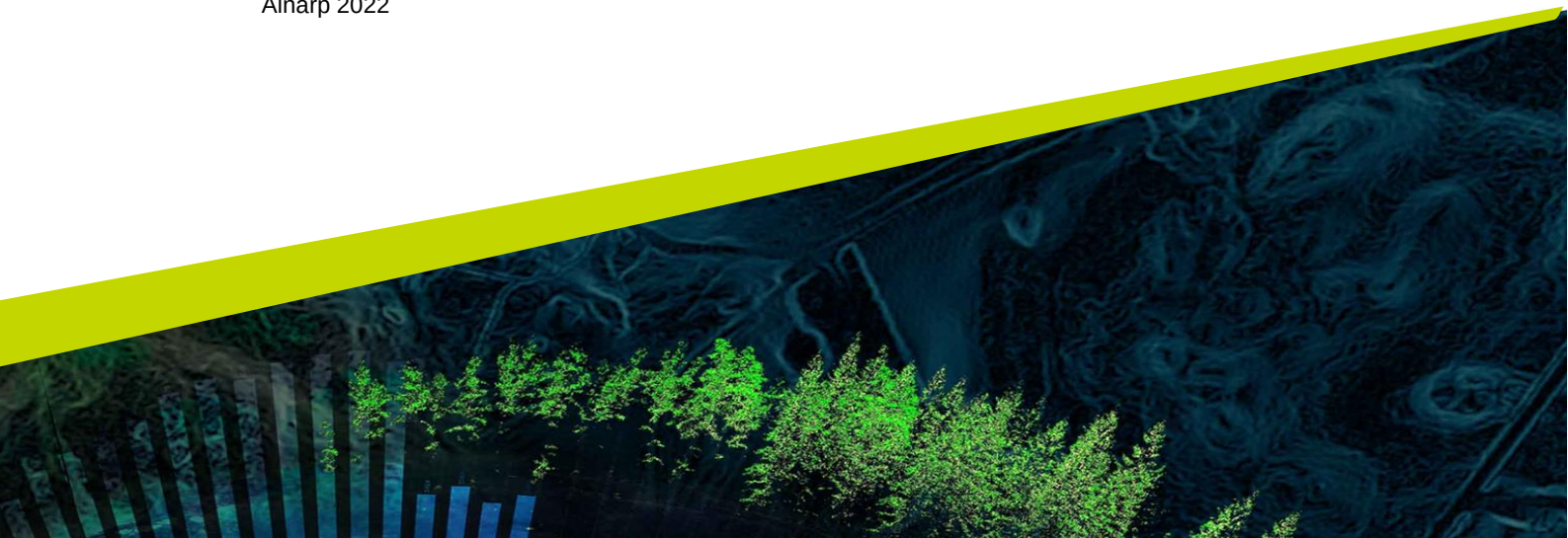




Biologisk framställning av insektsferomon med enzymer från japansk feberbuske

Felicia Edman

Självständigt arbete i Biologi • 15 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Institutionen för växtförädling
Trädgårdsingenjörsprogrammet - odling
Alnarp 2022



Biologisk framställning av insektsferomon med enzymer från japansk feberbuske

Biologically produced insect pheromone with enzymes from Japanese spicebush

Felicia Edman

Handledare:	Ida Lager, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för växtförädling
Bitr. handledare:	Kamil Demski, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för växtförädling
Examinator:	Cecilia Hammenhag, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för växtförädling
Omfattning:	15hp
Nivå och fördjupning:	Grundnivå, G2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i Biologi
Kurskod:	EX0855
Program/utbildning:	Trädgårdsingenjörsprogrammet – odling, Sveriges Lantbruksuniversitet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för biosystem och teknologi
Utgivningsort:	Alnarp
Utgivningsår:	2022
Upphovsrätt:	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.
Nyckelord:	Lindera obtusiloba, DGAT, PDAT, ovanliga fettsyror, fettsyrsyntes, transformation, Gateway-kloning, råolja

|

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap
Institutionen för växtförädling

Sammanfattning

Sedan klimatförändringarna fått större plats i dagens forskning har även kraven på förbättrade metoder i vår livsmedelsförsörjning ökat. Feromonfällor är idag en välkänd och uppskattad metod för att undvika användning av farliga insekticider. Trots det väljer många odlare bort att använda feromonfällor, fast de är mycket bättre för miljön, just för att den syntetiska framställningen från råolja gör slutprodukten för kostsam. Denna studie undersöker möjligheterna att biologiskt framställa feromon genom att uttrycka gener från japansk feberbuske (*Lindera obtusiloba*) i jäst. I försöket genomfördes kloning med syntetiskt cDNA som slutligen transformerades in i jäst.

Nyckelord: *Lindera obtusiloba*, DGAT, PDAT, ovanliga fettsyror, fettsyrasyntes, transformation, Gateway-kloning, råolja

Abstract

Since climate change got the main stage on the research agenda, recent development has raised demands for improved methods in food production. Pheromone traps, a well-known and appreciated invention, has long been used as an alternative to dangerous insecticides. However, a lot of farmers choose not to use them – despite being a lot better for the environment. The reason for this is that synthetically produced petrol-based pheromones are expensive to make, which makes them inaccessible to growers who cannot afford them. This study evaluates the possibility to develop a method for biologically produced pheromone by inserting genes from Japanese spicebush (*Lindera obtusiloba*) into yeast. The method contains cloning of synthetic cDNA and transformation in yeast.

Keywords: *Lindera obtusiloba*, DGAT, PDAT, unusual fatty acids, fatty acid synthesis, transformation, Gateway cloning, petroleum

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	5
Figurförteckning.....	5
Förkortningar	6
1. Introduktion	7
1.1 Inledning.....	7
1.2 Syfte	8
1.3 Hypotes	8
2. Bakgrund.....	8
2.1 Begreppet IPM	8
2.2 Insektsferomon.....	9
2.3 Fettsyror	9
2.3.1 DGAT1 och DGAT2	10
2.3.2 Japansk feberbuske (<i>Lindera obtusiloba</i>).....	11
3. Metod.....	12
3.1 Gateway®-kloning.....	13
3.1.1 BP-reaktion	13
3.1.2 <i>E. coli</i> -transformation.....	13
3.1.3 GeneJet Plasmid Miniprep.....	13
3.1.4 Kvalitetstest av miniprepar (pDONR221)	14
3.1.5 LR-reaktion	15
3.1.6 Sekvensering	16
3.1.7 Jästtransformation	16
4. Resultat	17
4.1 BP-reaktion	17
4.2 LR-reaktion.....	19
4.3 Sekvensering	19
4.4 Resultat av jästtransformering	21
5. Diskussion	21

4.5 Slutsats	22
Referenser.....	23
Tack	25

Tabellförteckning

Tabell 1 Använda genkonstrukt.....	12
Tabell 2 Passande restriktionsenzym för klyvning av plasmider	14
Tabell 3 Fördelning av expression clone vektor för varje gen	15
Tabell 4 Förväntad fragmentstorlek (pDONR221)	17
Tabell 5 DNA-prov i brunnar (figure1)	17
Tabell 6 DNA-prov i brunnar (figure 2)	17
Tabell 7 Koncentration DNA i minipreppar	19

Figurförteckning

Figure 1. DNA-analys genom elektrofores på agarosgel (brunn 1–12)	18
Figure 2 DNA-analys genom elektrofores på agarosgel (brunn 13–22)	18
Figure 3. Sekvens av LoDGAT1 (pDONR221)	20
Figure 4 Sekvens av LoPDCT-YO (pDEST52)	21

Förkortningar

cDNA	Complimentary DNA
DAG	Diacylglycerider
DNA	Deoxyribonucleic acid
IPM	Integrated Pest Management
RNA	Ribonucleic acid
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
TAE	Tri-Acetic-EDTA
TAG	Triacylglycerider
TLC	Thin Layer Chromatography (Tunnskiktskromatografi)

1. Introduktion

1.1 Inledning

I takt med att klimatförändringarna blir allt mer påtagliga världen över ökar pressen på jordbrukssektorn att minska sin åverkan på miljön. Samtidigt blir vi människor allt fler och kräver att jordbruket, trots att det behöver minska sitt klimatavtryck, inte bara behåller samma produktionsnivå utan dessutom höjer den.

För att komma runt problemet med att avkastning ställs mot klimatfrågan har flera kreativa lösningar tagits fram, en av dessa är användningen av insektsferomon. Feromonfällor är både enklare och miljövänligare för jordbrukare att använda i sina odlingar än bekämpningsmedel. Insekticider är väldigt giftiga, både för odlare genom långtidsexponering och för natur när dessa kemikalier sprids ut. Syntetiskt insektsferomon är dock ofta, på grund av sin krångliga framställningsprocess, för dyrt för odlare att använda – varför de vänder sig till insekticider trots att alternativ finns (Ding et al., 2014). Dessutom framställs syntetiskt insektsferomon ur råolja, en fossil naturresurs som genom sin höga efterfrågan har försatt mänskligheten i en klimatkris. Lösningen till denna problemställning blir då att, genom genmodifiering, i stället framställa syntetiskt insektsferomon på biologiskt sätt ur lämplig växt eller jäst i ”feromonfabriker”. Dessa feromoner kan sedan renas upp och användas i fällor.

Det har redan genomförts studier där målet har varit att överföra gener som svarar för produktion av lipider ur vedartade oljeväxter. Ett sådant försök har varit att ta gener för produktion av vaxestrar från jojoba-plantan (*Simmondsia chinensis*) som sedan transformerats in i en annan växt, vilken i vanliga fall producerar oljor i sina fröer (Zhu et al., 2016). Syftet med det försöket var enligt Zhu et al. (2016) att ersätta diverse mjukgörande och smörjande medel, som brukar framställas ur råolja eller från kaskelotvalar. Feromonframställning i växter har även tidigare gjorts i tobak (*Nicotiana benthamina*), men då med gener från bland annat vingbenved (*Euonymus alatus*) för att specifikt rikta sig till produktion av fjärilsferomon (Ding et al., 2014).

1.2 Syfte

Syftet med projektet är att utveckla en alternativ biologisk metod till att framställa insektsferomon så att råolja kan undvikas. Detta ska uppnås genom att identifiera enzym som effektivt kan syntetisera en omättad 12-kols fettsyra (12:1 Δ^4). Tidigare studier har fokuserats på att producera feromon prekursors med 14 eller 16 kol (Ding et al., 2014). Kandidaten i denna studie är japansk feberbuske (*Lindera obtusiloba*) eftersom den växten har höga halter av den önskade fettsyran i sin fröolja. Generna som kodar för lipidenzymerna ska först klonas och sedan testas i jäst och växter. I denna studie har fokus legat på att kлона dessa gener. Deras lämplighet för att kunna producera 12-kols fettsyror i jäst och växter hanns tyvärr inte undersökas eftersom projektet har en begränsad tid.

1.3 Hypotes

Hypotesen är att jäststam H1246, som normalt sätt inte kan producera olja, ska kunna göra detta om den transformerar med en funktionsduglig DGAT-gen från *L. obtusiloba*. Hypotesen är även att dessa gener som klonas ska kunna användas för att producera 12-kols feromoner i framtiden.

2. Bakgrund

2.1 Begreppet IPM

IPM, eller Integrated Pest Management, är en strategi framtagen för att finnas som guide för odlare i deras växtskyddsarbete. Syftet med strategin är i första hand att få så hög effektivitet som möjligt, med minsta möjliga påverkan på miljön. Detta innebär ett arbete att minska mängden kemikalier som används i situationer som kräver skadedjurskontroll (till exempel i odlingar) genom att ställa upp en tydlig handlingsplan över vilka åtgärder som ska tas in när, samt hur man undviker att stora problem uppstår. Den allra största vikten i strategin ligger vid att med hjälp

av tidig diagnostik och förebyggande arbete se till att skadegörare aldrig kan få överhanden. Inom odling implementeras detta praktiskt genom att i första hand nyttja olika ekosystemtjänster (ex. rovdjur och växtföljd), god hygien och välplanerad odlingsteknik. Feromonfällor (som även är godkända för ekologisk odling) är ett bra exempel på detta. Kemisk bekämpning sätts endast in som sista utväg, vilket minskar odlingarnas avtryck på omgivningen, samtidigt som effektiviteten ökar. Inom EU och många andra länder krävs det numera av odlare att följa IPM, även om de inte är ekologiskt klassade, eftersom det är en del av arbetet för hållbar utveckling (European Commission u.å.).

2.2 Insektsferomon

Insekter avger flyktiga doftämnen, feromoner, som ett väl utvecklat system för kommunikation på både korta och långa avstånd. Denna strategi används i allt från territoriemarkörer till självförsvar, men det är också en förutsättning för att flygande insekter ska hitta varandra under parning, då fertila honor avger könshormon för att locka till sig hanar. Inom odling används sådant könsferomon flitigt i bekämpning av skadeinsekter, med tanken att förvirra bestånden så mycket att parning inte sker i samma utsträckning (Ding et al., 2014). I kombinationen av klisterfällor kan feromon även aktivt sänka bestånden. Syntetiskt framställt insektsferomon används flitigt inom odling men, utöver att det är kostsamt, så är råvarorna ofta antingen av hälsovådliga kemiska substanser eller så avges miljöfarliga restprodukter vid framställning (Ding et al., 2014).

Feromoner, vilka är lipidbaserade, produceras av insekter i särskilda körtlar (Watanabe et al., 2011). Insekter producerar en mängd olika feromon av hög diversitet mellan arter, men generellt sett följer de en syntesväg som i korthet kan beskrivas att mättade fettsyror först produceras av acetyl CoA. Sedan bildas dubbelbindningar på vissa ställen och en del fettsyror kortas av eller förlängs. Slutligen bryts fettsyror ned tills de bildar aldehyder och alkohol (Watanabe et al., 2011).

2.3 Fettsyror

Även de mest primitiva organismer har förmågan att producera fettsyror (en grupp organiska molekyler) som tack vare sin höga diversitet kan ha en rad olika funktioner i allt från organismers energiförvaring till struktur. Fettsyror finns både

i lagringsorgan under stabila form som fetter och oljor, men även bundna till andra polära molekyler, exempelvis fosfolipider i membran (Moellering et al., 2019). Samtliga fettsyror skapas av organismer genom flera komplicerade syntesvägar, oftast av många olika enzymer. Fettsyror är de mest fundamentala byggstenarna i lipider vilka grupperas i olika indelningar, lipidklasser, baserat på deras egenskaper och hur de är bundna till varandra eller andra molekyler (Moellering et al., 2019). En av dessa lipidklasser är triacylglycerider (TAG), en slags estrar med en glycerol som binder till tre fettsyror. Fettsyror i TAG kan vara mättade (alla kolatomer bundna till varandra med enkelbindningar) eller omättade (att det längs kolkedjan finns en eller flera dubbelbindningar). Fettsyror får sin beteckning efter antal kol i kolkedjan (ex. 16C), om den har dubbelbindningar och hur många av dessa (ex. 16:0, 16:1, 16:2) samt ett "Δ" som anger vilket kol (räknat från α-kolet) en eventuell dubbelbindning sitter (ex. 18:1 9Δ har en dubbelbindning vid det 9:e kolet från karboxylgruppen).

Nyproduktion av fettsyror sker hos växter i kloroplasten där proteinet ACP (acyl carrier protein) förlänger kolkedjan med två kolatomer åt gången (Ding et al., 2014). När fettsyran har nått en viss förutbestämd längd, vilken hos växter tenderar att vara mellan 16 och 18 kol lång, transporteras de in i endoplasmiskt retikulum (ER) bundna till co-enzym A (CoA). I ER bildas triacylglycerider med hjälp av att enzymer, som kallas acyltransferaser, kopplar på fettsyror en efter en (Dahlqvist et al., 2000). På grund av sin hydrofoba natur passerar inte lipiderna ut ur membranet till cytoplasman utan bildar i stället en "bubbla" av fosfolipider runt sig, med de hydrofila fosfatgrupperna utåt. Till slut släpper denna, så kallade, vesikel från ER och lipider kan sedan transporteras ut i cellen där de behövs (Cagliari et al., 2011). Triacylglycerider följer en specifik syntesväg i växter och då i största utsträckning den så kallade Kennedys syntesväg (eng. Kennedy Pathway) (Cagliari et al., 2011). Denna syntesväg utgörs av ett flertal enzymer som i tur och ordning omvandlar och sätter ihop de fettsyror som bildats i kloroplasten. Kennedys syntesväg är, till skillnad från andra syntesvägar, beroende av acyl-CoA enzym – eftersom det bygger upp glycerolbasen i TAG. Själva syntesen inleds med att G3P (glyceraldehyd-3-fosfat) acyleras med enzymet *sn*-glycerol-3-fosfatacyltransferas (G3PAT) till LPA (lysofosfatidinsyra). Sedan nyttjas acyl-CoA ytterligare en gång när LPA acyleras vidare för att först bilda fosfatidinsyra (PA) som slutligen omvandlas till diacylglycerider (DAG). I sista skedet av syntesen katalyserar enzymet DGAT omvandlingen av DAG till TAG (Cagliari et al., 2011).

2.3.1 DGAT1 och DGAT2

I växter finns flera gener som svarar för hur syntes av fettsyror och lipider ska gå till, då dess sammansättning är artspecifik (Chen et al., 2008). De gener som styr syntesen kodar för tillverkning av de specifika enzymer som både bildar fettsyror *de*

novo och omvandlar förprodukter till mer komplicerade lipider. Olika växter har i studier visat sig bilda lipider med unik fettsyresammansättning, som är genetiskt reglerad (Dahlqvist et al., 2000). Enzymet DGAT katalyserar det sista steget i Kennedy syntesväg och finns i två varianter hos växter, DGAT1 och DGAT2, där båda katalyserar syntesen av triacylglycerider, men de kan ha olika roll i olika växter gällande vilka fettsyror som adderas (Cagliari et al., 2011). Att nyttja båda enzym i arbetet att styra lipidsyntes är därför fördelaktigt, eftersom önskad mängd av en särskild lipidklass lättare uppnås.

Kodonoptimering

Inom molekylärbiologi krävs ibland att man anpassar sig något till de organismer man nyttjar i sina försök, eftersom deras komplexitet ibland gör att vissa funktioner bara kan nyttjas under särskilda förutsättningar. En sådan sak är att olika organismklasser – i detta fall växter och jästsvampar – föredrar särskilda kodonkombinationer (kvävebatrippletter) vid avläsning för proteinsyntes (Lanza et al., 2014). I detta försök har genkonstrukt beställts i två upplagor – växtgener i originalutförande och växtgener som blivit jästkodonoptimerade. Dessa betecknas med "Yeast optimization (YO)", se exempel på LoPDCT och LoPDCT-YO i Bilaga 1. Kodonoptimeringen har ingen påverkan på det slutliga proteinets sammansättning då samtliga kodon fortfarande översätts till samma aminosyror (Bilaga 2).

2.3.2 Japansk feberbuske (*Lindera obtusiloba*)

Lindera obtusiloba Blume (Lauraceae) är en buske med ursprung i östra Asien från södra Kina bort till Korea och Japan (SKUD u.å.) där den trivs på rika och något sura jordar i tempererade skogar (RHS u.å.). *L. obtusiloba* är inte städsegrön utan fäller sina treflikiga, äggrunda löv under viloperioden. Arten är dioik (han- och honblommor finns inte på en individ samtidigt) vilket innebär att både han- och honplantor behöver befinna sig inom rimligt avstånd för att de gula blomställningarna ska bära sin röda och glansiga frukt (RHS u.å.).

Många vedartade oljeväxter har på senare tid fått uppmärksamhet som alternativ till petroleumbaserade produkter (Chen et al., 2008). Unikt hos *L. obtusiloba* jämfört med andra växter är att den i fröoljan (bland TAG) även producerar höga halter fettsyror bestående av 12 kolatomer, både omättade 12:1- (12C Δ 4) och mättade 12:0-fettsyror (Moellering et al., 2019). De flesta växter producerar fettsyror som är 16 eller 18 kol långa (Ding et al., 2014). Eftersom *L. obtusiloba* utmärker sig på detta sätt och dess fettsyror påminner om insektsferomon har denne valts ut som

kandidat i studien, med syftet att hitta lämpliga enzym som producerar fettsyran 12C Δ 4.

3. Metod

Arbetet med att undersöka *Lindera obtusilobas* möjlighet att passa som kandidat till att biologiskt framställa insektsferomon består av ett flertal steg. Nedan följer dessa i ordning av utförande.

Inför labbens början förbereddes, i två 1-litersflaskor, flytande och fast LB-medium (25g/liter) enligt recept:

2x

500 ml H₂O (MilliQ)

12,5 g LB-salt

7,5 g Bacto agar (endast i fast medium)

Lösningarna autoklaverades vid 120°C under tryck. I fast LB tillsattes Kanamycin (1000x) innan det hälldes upp i petriskålar.

Inför kloningsarbete inleddes spädades följande syntetiska genkonstrukt (cDNA *L. obtusiloba*) till önskad koncentration 10 ng/ μ l.

Tabell 1 Använda genkonstrukt. BnPDAT2sh.1 ej del av studien.

Gen		
LoPDCT	LoDGAT1	BnPDAT2sh1
LoPDCT-YO	LoDGAT1-YO	LoDGAT2-YO

Proven vortexades och ställdes sedan på värmeplatta (Eppendorf Thermomixer Comfort) att inkubera i 37°C under 30 min.

3.1 Gateway®-kloning

3.1.1 BP-reaktion

Under BP-reaktionen infogas en linjär gensekvens in i en transformationsvektor (pDONR221) med hjälp av enzym BP-Clonase™ Enzyme Mix II. BP-reaktionen får sitt namn av att de legerade fragmenten omgärdas av *att*-ändar, där önskad gen/PCR-produkt omgärdas av *attb1* och *attb2* medan transformationsvektorn (pDONR221) innehåller *att*-ändar *-p1* och *-p2*. Ändarna, som är en förutsättning för genen och vektorn att bindas samman, kan både ha ett överhäng med ett par baspar på ena DNA-strängen (sticky end) eller sluta jämnt (blunt end).

Laborationen följde protokoll från tillverkare med undantag att 7 µl (70 ng) cDNA tillsattes till lösningen och att TE-buffert helt uteslöts.

3.1.2 *E. coli*-transformation

Transformerings av *E. coli* med hjälp av värmechock är en enkel och praktisk metod som går att applicera på ligeringar av de allra flesta bakteriestammar som odlas i labbmiljö (Froger & Hall, 2007). I detta projekt används elektrokompetenta *E. coli* "One Shot™ TOP10" (Thermo Fisher), vilka har en hög transformerings effektivitet på 1×10^9 cfu/µg och en hög produktion av plasmider (Thermo Fisher).

Transformerings utfördes genom att, för varje genkonstrukt, tillföra 1 µl BP-reaktion (ligering med entry-clone) till 25 µl kompetenta celler som tinats långsamt på is. Efter inkubering på is 5 min (elektroporering ca 0°C) utsattes cellerna för en värmechock i 42°C vattenbad under 40 sekunder. Denna värmeökning får cellmembran att öppna sina porer och vektor med önskad gen kan ta sig in i cellerna. Direkt efter värmechock ställdes cellerna återigen på is i 2 min så att membranporer slöts. I varje rör tillsattes därefter 125 µl SOC (Super Optimal Broth -medium) och bakterierna inkuberades på värmeplatta Eppendorf Thermomixer Comfort i 37°C under 30 min med skak (300 rpm).

Selektering för önskad klon skedde på LB-platta (tillsatt Kanamycin). Plattorna lämnades i värmeskåp (37°C) över natt.

3.1.3 GeneJet Plasmid Miniprep

När kolonier vuxit på LB-plattor valdes tre kolonier ut av varje genkonstrukt för inokulering (inoculation loops 1 µl) och placerades i 18 provrör om 3 ml flytande LB-lösning med tillsatt Kanamycin (1000x). Provrören, som hade särskild luftgenomsläpplig kork, fick sedan stå att inkubera i 37°C över natt med skak (220 rpm). Nästkommande dag inleddes rening av plasmider till minipreppar enligt protokoll GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermofisher).

3.1.4 Kvalitetstest av minipreppar (pDONR221)

Om miniprepparna var positiva – alltså att rätt gen bundit in i plasmiderna – testades genom att samtliga replikat av alla DNA-prov kördes på gel i elektrofores. För att kunna köra DNA i elektrofores måste det vara linjärt, varför fragment klövs ut i de cirkulära plasmiderna med hjälp av restriktionsenzym. Vid val av restriktionsenzym togs tre parametrar i beaktning: dels skulle klyvningen gärna ske på två ställen i plasmiden för att ge fragment av lämplig storlek, dels fick det gärna göras med restriktionsenzym som redan fanns hemma på labb. Allra viktigast var att en klyvning skulle ske där den nya genen förväntades sitta. Med detta i åtanke valdes följande restriktionsenzym ut för DNA-proven:

Tabell 2 Passande restriktionsenzym för klyvning av plasmider. BnPDAT2sh.1 ej del av studie.

Gen	Restriktionsenzym
LoPDCT	EcoRV (klyver två ggr)
LoPDCTYO	EcoRV + EcoRI
LoDGAT1	EcoRV + EcoRI
LoDGAT1YO	EcoRV (klyver en gång)
LoDGAT2YO	EcoRV + EcoRI
BnPDAT2sh1	XhoI + EcoRV

För en av generna (LoDGAT1YO) fanns endast ett restriktionsenzym/klyvning att tillgå, varför det förväntade resultatet av elektroforesen för dessa snarare skulle representera plasmidens totala antal baspar. Däremot var detta ställe placerat i önskad gen, alltså om det blev en klyvning hade transformationen ändå lyckats.

Inför elektroforesen tillreddes 50 ml agarosgel (1%) enligt recept

0,5 g agaros 1 %

50 ml buffert TAE (Tris-Acetate-EDTA)

1,5 µl GelRed

GelRed binder in i DNA:t och användes för att göra det synligt under UV-ljus.

Elektroforesen genomfördes så fort agarosgelen stelnat genom att gelen försiktigt sänktes ner i elektrofores fylld med buffert (TAE) så att gelen täcktes helt. 10 µl av varje replikat pipetterades ned i brunnar (18st) och 1,5 µl stege "GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use" (bilaga 3) pipetterades ned i brunnar på var sida om miniprepparna (total fyra stycken för två rader). Elektroforesen kördes sedan under spänning 100 V i 20 min. Gelen extraherades därefter varsamt och fotograferades med UV-kamera.

3.1.5 LR-reaktion

Under LR-reaktion upprepas stora delar av protokoll från BP-reaktionen. Största skillnaden är först och främst att i stället för genkonstrukt används replikat 1 av varje miniprepp som tagit fram under tidigare laboration. Dessutom används två andra vektorer, anpassade till jäst- respektive växtexpression. Likt BP-reaktionen står "LR" för typen av *att*-ändar som används, där L-ändarna sedan tidigare funnits med i pDONR221 från BP-reaktionen, medan R-ändarna nu inkluderas i destinationsvektorn. Fördelningen av dessa vektorer blir enligt följande:

Tabell 3 Fördelning av expression clone vektor för varje gen. BnPDAT2sh.1 ej del av studie

Miniprepp	pDEST52 (jästvektor)	pXY2149 (växtvektor)
BnPDAT2sh1		X
LoPDCT		X
LoDGAT1		X
LoPDCTYO	X	
LoDGAT1YO	X	
LoDGAT2YO	X	

Kompetenta celler (*E. coli*) transformeras precis som efter BP-reaktion och sprids sedan ut på LB-plattor. LR-reaktion med växtvektor plattas på media med Spectinomycin och jästvektor plattas ut på media med Kanamycin, detta eftersom de olika vektorerna kräver olika selektion på transformerade kolonier. Dessutom minskar risken för kontaminering mellan de olika vektorerna.

Då LR-reaktion med jästvektor gav positivt resultat på selektionsmedia renades plasmiderna innan de klövs med restriktionsezym och kördes i elektrofores. Därefter skickades samtliga DNA-prov på sekvensering, som genomfördes trots att plasmiderna inte kunde klyvas med utvalda restriktionsezym. *E. coli* med växtvektor växte aldrig på selektionsmedia, varför de inte heller skickades för sekvensering.

3.1.6 Sekvensering

Ett replikat med minipreppar ur varje lyckad transformering (alltså växtgener med vektor PDONR221 och jästoptimerade gener för vektor pDONR221 och pDEST52) skickades till externt företag för sekvensering. Miniprepparna späddes till en av företaget bestämd koncentration.

När sekvensering var klar analyserades denna i datorprogram. Därefter beslutades vilka minipreppar som var lämpliga att transformera i jäst.

3.1.7 Jästtransformation

I försöket användes jäststam H1246 som har 4 gener tystade och därför inte producerar någon TAG. Negativ kontroll som inte transformerats skulle därför inte heller göra detta.

10 ml o/n kultur av jäststam späddes på morgonen ut till 0,1 OD och läts därefter växa till OD-värde på 0,6 (0,4–0,8 ok).

3 prover av 1,5 ml kultur tillsattes i 3 eppendorfrör vilka centrifugerades på högt varvtal (14 000 rpm, 30 s) så att pelletering bildades. Media dekanterades bort och pelleteringen tvättades genom att återupplösas (vortexas) i 1 ml MilliQ-vatten. Proverna pelleterades återigen och vattnet hölldes bort.

Till jästpellet tillsattes sedan 5 µl plasmid-DNA (av prover pDEST52: LoDGAT1-YO respektive LoDGAT2-YO) i två av rören. I negativ kontroll tillsattes endast 5 µl vatten. Förvämt single stranded DNA (ssDNA) (95°C, 5 min) tillsattes sedan i prover för att underlätta transformering, varefter samtliga prov vortexades kort. 500 µl PEG-lösning tillsattes i samtliga prov (se recept nedan), innan de inkuberades i rumstemperatur under 15 min.

PEG-lösning:

2,04 g LiAc (0,1 M)

80 g PEG 40% (3640 Mw)

2 ml 1M Tris med pH 7,5

Transformeringen avslutades med att proverna placerades i 42°C vattenbad under 15 min innan media avlägsnades genom pelletering och att PEG-lösningen pipetterades bort. Pelleten tvättades sedan efter samma metod som innan med MilliQ-vatten (500 ml). När det mesta av vattnet avlägsnats en sista gång, genom dekantering, vortexades pelleten upp tills proven blivit en homogen lösning, varefter de plattades ut på selektionsmedia utan aminosyra Uracil.

4. Resultat

4.1 BP-reaktion

Efter transformation av *E. coli*, plasmidutvinning och klyvning gjordes en analys av DNA (elektrofores) för att se om de stämde överens med genkonstrukt. Antal baspar i varje fragment kunde utläsas med hjälp av stegen "GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use" (bilaga 3). Vid val av restriktionsenzym bestämdes vilka fragmentsstorlekar som var väntade för positiva DNA-prov (tabell 4).

Tabell 4 Förväntad fragmentstorlek (pDONR221)

Gen	Restriktionsenzym	Storlek (n bp)
LoPDCT	EcoRV (klyver två ggr)	800
LoPDCTYO	EcoRV + EcoRI	600
LoDGAT1	EcoRV + EcoRI	760
LoDGAT1YO	EcoRV (klyver en gång)	4159 (hel plasmid)
LoDGAT2YO	EcoRV + EcoRI	<250
(BnPDAT2sh1)	XhoI + EcoRV	250

Samtliga resultat, bortsett från LoDGAT1-YO (figure 1), visade tydliga positivt resultat från transformationen. Detta resultat ansågs ändå blivit positivt som väntat, eftersom ccdB är giftigt för *E. coli* och att positiva kolonier är oftast det som växer till följd av denna selektion. I enstaka fall kan kolonier av *E. coli* med tomma plasmider (utan gen eller ccdB) växa, men denna risk ansågs tillräckligt låg för att använda LoDGAT1-YO i fortsatt försök, samt att proverna ändå skulle sekvenseras. På grund av lågt innehåll DNA i LoDGAT2-YO (3) undveks denna i vidare laborationer (figure 2). Schema över proverna kan ses enligt nedan:

Tabell 5 DNA-prov i brunnar (figure1)

Brunn	Gen/stege	Brunn	Gen/stege	Brunn	Gen/stege
1	GeneRuler	5	LoPDCT-YO (1)	9	LoDGAT2-YO (2)
2	LoPDCT (1)	6	LoPDCT-YO (2)	10	LoDGAT2-YO (3)
3	LoPDCT (2)	7	LoPDCT-YO (3)	11	BnPDAT2sh.1 (1)
4	LoPDCT (3)	8	LoDGAT2-YO (1)	12	GeneRuler

Tabell 6 DNA-prov i brunnar (figure 2)

Brunn	Gen/stege	Brunn	Gen/stege	Brunn	Gen/stege
13	GeneRuler	16	LoDGAT1 (1)	19	LoDGAT1-YO (1)
14	BnPDAT2sh.1 (2)	17	LoDGAT1 (2)	20	LoDGAT1-YO (2)
15	BnPDAT2sh.1 (3)	18	LoDGAT1 (3)	21	LoDGAT1-YO (3)
				22	GeneRuler

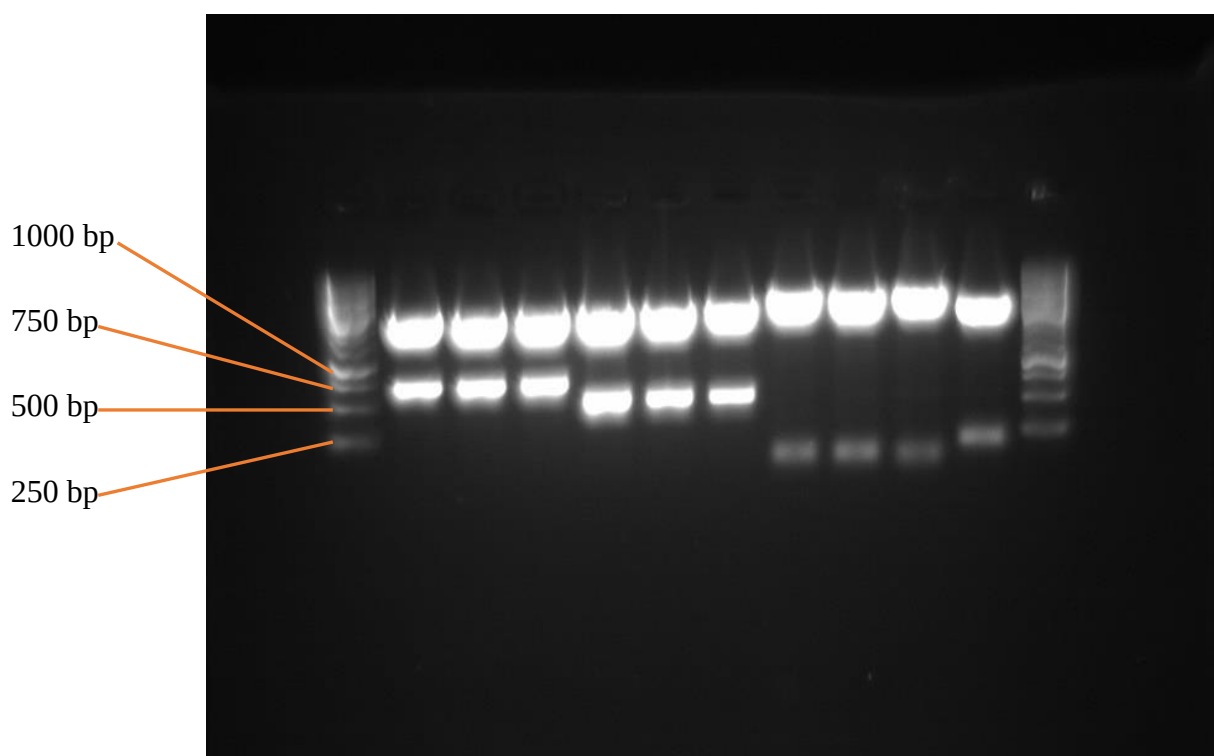


Figure 1. DNA-analys genom elektrofores på agarosgel (brunn 1–12).

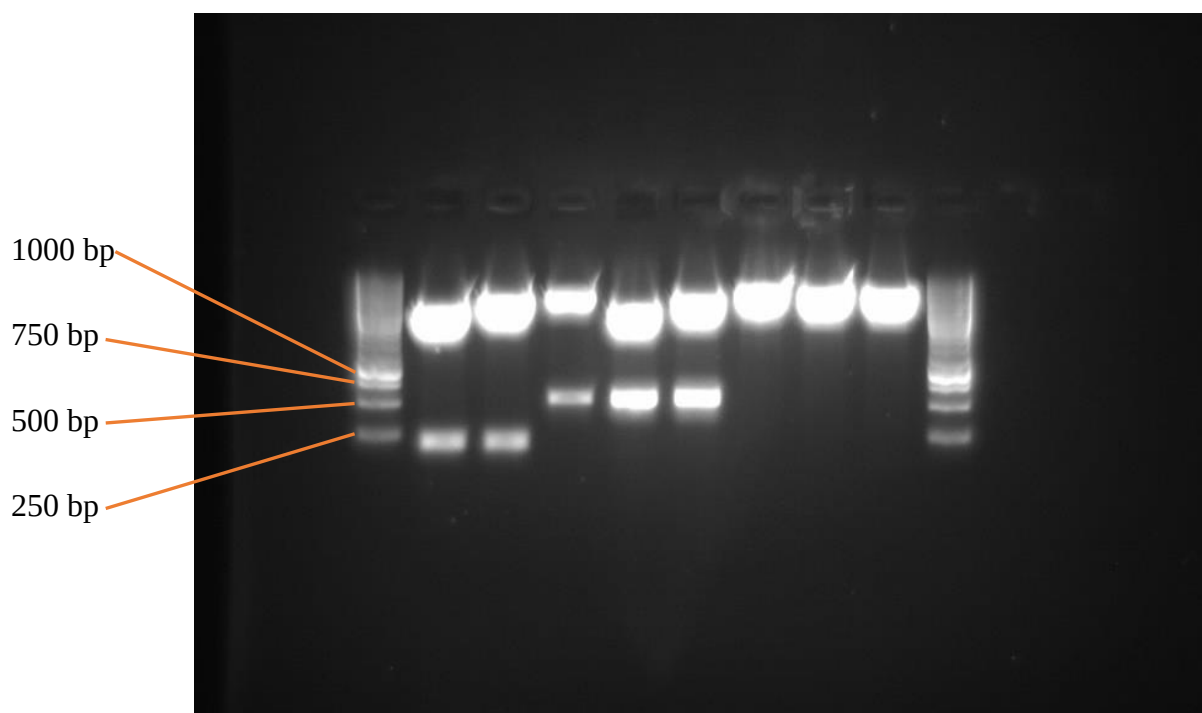


Figure 2 DNA-analys genom elektrofores på agarosgel (brunn 13–22). Resultat från LoDGAT1-YO saknas.

4.2 LR-reaktion

Sedan LR-reaktion gjorts på plasmid-minipreppar med pDONR221 och *E. coli* transformerats visade det sig att användning av växtvektor pXZP393 inte vuxit på Spectinomycinplattorna och därmed varit lyckad. Kontroll av DNA-koncentration gjordes med NanoDrop™ för att kunna göra en mer exakt beräkning av lämplig volym till upprepning av LR med annan plasmidprepp av vektor pXZP393 för genkonstrukt LoDGAT1 och LoPDCT.

Tabell 7 Koncentration DNA i minipreppar. BnPDAT2sh.1 ej del av studien

Genkonstrukt	Koncentration (ng/μl)	Använd volym (μl)
LoDGAT1	82,962	1,5
LoPDCT	125,535	1,0
BnPDAT2sh.1	145,629	1,0

Transformerad *E. coli* med LR-reaktion av växtvektor pXZP393 växte inte heller på agarplattor. Anledningen till att transformationen inte fungerat är oklar.

E. coli-transformation av LR-reaktion av jästvektor pDEST52 var däremot mer lyckad. Kolonier av samtliga jästoptimerade DNA-prover hade vuxit på selektionsmedia med Kanamycin samt var av rimlig storlek och mängd, varvid miniprepparna sedan klövs och kördes på gel. Ingen av provernas plasmider verkade dock ha klyfts, trots upprepat försök med restriktionsenzym.

4.3 Sekvensering

Då ingen av DNA-proven med jästvektor pDEST52 kunde klyvas med hjälp av lämpliga restriktionsenzym var det enda återstående alternativet att skicka proven till externt företag för sekvensering.

Av jästkodonoptimerade gener skickades prov på minipreppar med både pDONR221 och pDEST52, medan det för växtgener endast skickades minipreppar med vektor pDONR221. Vid kontroll av företagets inrapporterade resultat visade det sig att alla prover hade rätt gener i vektorn och att de stämde överens med hur generna skulle se ut, utom hos två:

- **LoDGAT1:** 14 baspar fattades vilket visade att det i vektorn har uppstått en frameshift-mutation, alltså att det tillkommit eller försvunnit kvävebaser så att avläsningen förflyttats något steg (figure 3). När avläsning av kvävebaser förskjuts kommer varje ny kvävebatriplett (kodon) att översättas till en annan aminosyra än tidigare – vilket leder till att proteinet efter mutationen blir helt annorlunda. Detta betyder att den här klonen inte kan användas utan fler miniprepar kommer att behöva sekvenseras för att hitta en som stämmer.

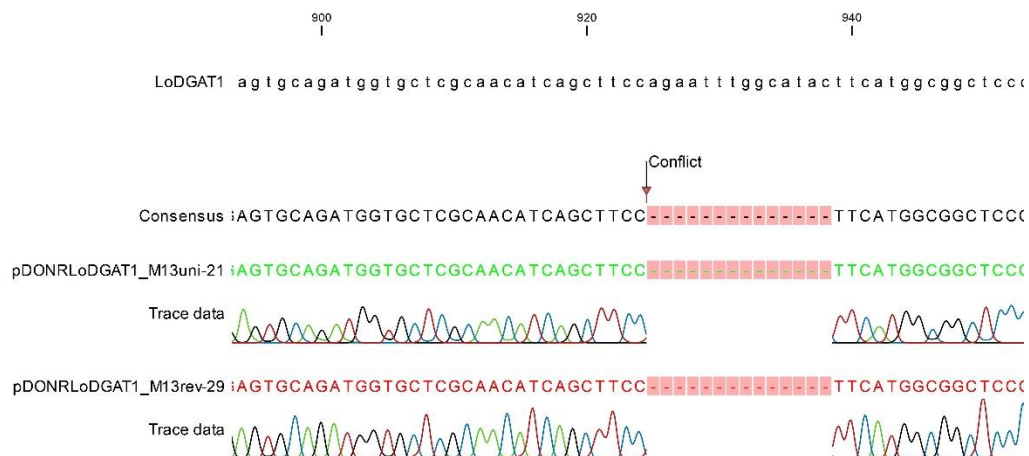


Figure 3. Sekvens av LoDGAT1 (pDONR221). 14 baspar saknas (röd markering) vilket syns i båda sekvenseringsreferenserna. Röd text avser avläsning i forward och grön text i reverse. Frameshift-mutation.

- **LoPDCT-YO:** när jästvektor pDEST52 undersöktes upptäcktes det att en kvävebas bytts ut (figure 4). Med hjälp av programmet kontrollerades om bytet i denna triplett(kodon) hade någon betydelse för det slutgiltiga proteinets sammansättning. Svaret var att det nu kodade för en helt annan aminosyra, vilket gör DNA:t från det replikatet helt obrukbart. Då genen är beställd från ett företag så har mutationen skett hos dem och har ingenting med metoden i försöket att göra, även om punktmutationer ej borde uppstå när cDNA tas fram syntetiskt. Detta betyder att de två andra replikaten av LoPDCT-YO (pDEST221) förmodligen har samma punktmutation, men då det varken fanns tid att vänta på ny beställning av cDNA och sedan göra om alla labbmoment användes endast LoDGAT1-YO och LoDGAT2-YO i slutskedet av projektet.

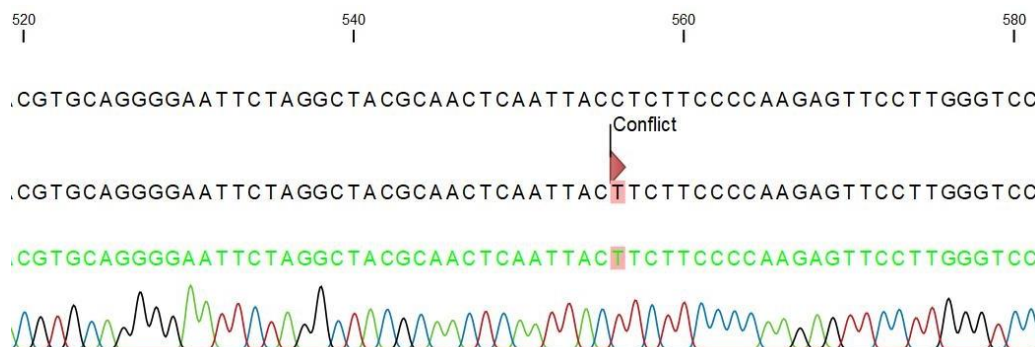


Figure 4 Sekvens av LoPDCT-YO (pDEST52) med punktmutation (röd flagga). Översta raden är rätt gen, andra raden är förmodad sekvens i provet och tredje raden är sekvenseringsreferens (grönt). Kurvor visar avläsningens tillförlitlighet. Endast en referens fanns att tillgå.

4.4 Resultat av jästtransformering

Jäst transformerades med LoDGAT1YO och LoDGAT2YO (pDEST52), men eftersom även den negativa kontrollen (ej transformerad jäst) växte på selekteringsplattor kunde ingen slutsats dras kring om jästen tagit upp DGAT-generna. På grund av tidsbrist kunde inte transformeringen upprepas och till följd av detta genomfördes aldrig någon lipidextraktion. Tanken med lipidextraktionen var att se om den transformerade jästen, till skillnad från den negativa kontrollen, kunde producera TAG.

5. Diskussion

Om hypotesen stämmer, att de klonade generna från *L. obtusiloba* kommer vara användbara för att framställa feromoner i framtiden, vet vi ännu inte. Tyvärr kunde inte heller deras funktion testas i jäst eftersom transformationen inte hann upprepas. En trolig anledning till kolonier på den negativa kontrollen är att den kontaminerats av positiv transformerad jäst innan den plattats. Skulle försökets slutstadium upprepas finns goda chanser att transformationen lyckas och en lipidextraktion kan ske på TLC-platta. Om man då skulle se att jäststammen kan producera olja så vet

man att enzymerna är aktiva och att de sannolikt kan användas för att transformera växter.

Oavsett vad resultatet visat är projektet fortsatt viktigt för forskningen och för att kunna minska användningen av insekticider. Även om användningen av bekämpningsmedel har en positiv inverkan på avkastning och produktkvalitet inom jordbruket, har de negativa konsekvenserna allt för stor inverkan. Som Aktar et al. (2009) beskriver stannar inte ett bekämpningsmedel kvar endast på platsen där man besprutat, utan föroreningar sprids långa sträckor med vind och vatten för att sedan tas upp och anrikas i organismer. Många bekämpningsmedel är inte bara giftiga för den skadegörare man vill få bort från fälten, utan påverkar även organismer som spelar en viktig roll i närliggande ekosystem. Bekämpningsmedel kan även vara farliga för människor. En del insekticider som har funktionen att verka hormonstörande har visat sig, med lång exponering i låga koncentrationer, ha allvarliga hälsoeffekter såsom cancer, immunsjukdomar och fertilitetsproblem (Aktar et al. 2009).

Att ta fram biologiska sätt att producera ersättare till insektferomon är ett viktigt steg i rätt riktning för ett hållbart jordbruk och en tillgång på friskt vatten. Eftersom biologisk framställning skulle göra denna giftfria bekämpningsmetod billigare och tillgänglig för fler odlare (Ding et al., 2014) kommer även den totala miljöpåverkan mildras. Projektet har hög potential, sett till vilka framsteg som redan gjorts för framställning av feromonproducerande växter (Ding et al., 2014).

4.5 Slutsats

Att framställa insektsferomon med hjälp av enzymer från *L. obtusiloba* har teoretiskt sätt en hög potential att kunna framställa feromoner baserade på 12-kols fettsyror. Trots att studien inte gav ett tydligt slutresultat finns inga direkta bevis för att detta beror på valet av genetiskt material, varför försöket bör göras om. Tidigare forskning baserat på liknande metoder har varit framgångsrika, vilket talar för att även detta projekt skulle kunna ge positivt resultat i framtiden.

Referenser

- Aktar, Md.W., Sengupta, D. & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2 (1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Cagliari, A., Margis, R., Dos, F., Maraschin, F., Andreia, Turchetto-Zolet, A.C., Loss, G. & Margis-Pinheiro, M. (2011). Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in plants and alga. *International Journal of Plant Biology*, 2. <https://doi.org/10.4081/pb.2011.e10>
- Chen, Y., Wang, Y., Zhou, G., Li, P. & Zhang, S. (2008). Key mediators modulating TAG synthesis and accumulation in woody oil plants. *African Journal of Biotechnology*, 7 (25). <https://doi.org/10.4314/ajb.v7i25.59666>
- Dahlqvist, A., Ståhl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H. & Stymne, S. (2000). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (12), 6487–6492
- Ding, B., Hofvander, P., Wang, H.-L., Durrett, T., Stymne, S. & Löfstedt, C. (2014). A plant factory for moth pheromone production. *Nature communications*, 5, 3353. <https://doi.org/10.1038/ncomms4353>
- Integrated Pest Management (IPM)* (u.å.). European Commission. https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/sustainable-use-pesticides/integrated-pest-management-ipm_en [2022-05-23]
- Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (6), 253. <https://doi.org/10.3791/253>
- Lanza, A.M., Curran, K.A., Rey, L.G. & Alper, H.S. (2014). A condition-specific codon optimization approach for improved heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Systems Biology*, 8, 33. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-33>

Moellering, E.R., Prince, V.L. & Prince, R.C. (2019). Fatty Acids: Introduction. I: Geiger, O. (red.) *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*. Cham: Springer International Publishing, 3–23. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50430-8_2

Lindera obtusiloba | *blunt-lobed spice bush* Shrubs/RHS Gardening (u.å.). <http://www.rhs.org.uk/plants/19593/blunt-lobed-spice-bush/details> [2022-05-16]

Svensk kulturväxtdatabas, SKUD (u.å.). SLU.SE. <https://skud.slu.se/> Sökord: *Lindera obtusiloba* [2022-05-16]

Watanabe, H., Matsui, A., Inomata, S., Yamamoto, M. & Ando, T. (2011). Bio-synthetic Pathway for Sex Pheromone Components Produced in a Plusiinae Moth, *Plusia festucae*. *Frontiers in Endocrinology*, 2. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2011.00074> [2022-05-24]

Zhu, L.-H., Krens, F., Smith, M.A., Li, X., Qi, W., van Loo, E.N., Iven, T., Feussner, I., Nazarenius, T.J., Huai, D., Taylor, D.C., Zhou, X.-R., Green, A.G., Shockey, J., Klasson, K.T., Mullen, R.T., Huang, B., Dyer, J.M. & Cahoon, E.B. (2016). Dedicated Industrial Oilseed Crops as Metabolic Engineering Platforms for Sustainable Industrial Feedstock Production. *Scientific Reports*, 6 (1), 22181. <https://doi.org/10.1038/srep22181>

Tack

Ett stort tack till min handledare Ida Lager som med stort tålamod och tilltro har låtit mig få vara en del av det här projektet vid Institutionen för växtförädling. Utan dig hade detta inte varit möjligt. Din fantastiska förmåga att lära ut till andra har hjälpt mycket när molekylärbiologin har varit abstrakt.

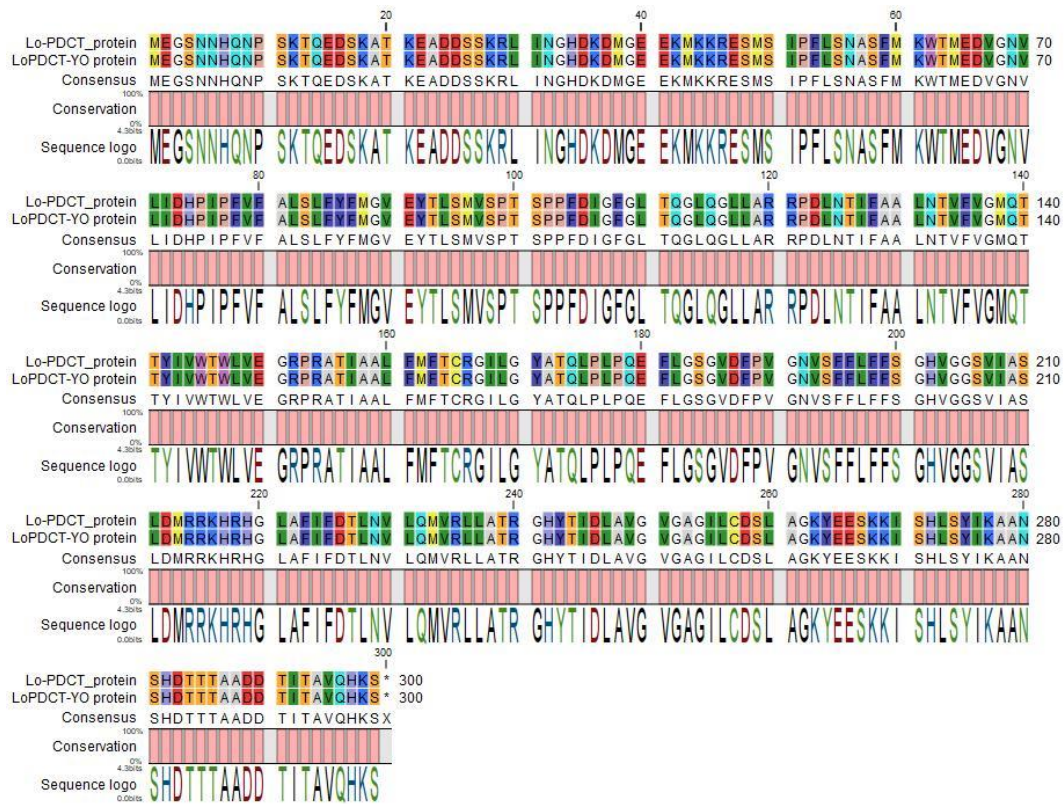
Tack också till Kamil Demsk som har svarat på frågor och hjälp mig lösa problem som dykt upp under labben.

Sist men inte minst tack till Lotta Nordmark som håller i kursen för kandidatarbetet och till mina medstudenter vid SLU som man kunnat diskutera sina arbeten med.

Bilaga 1

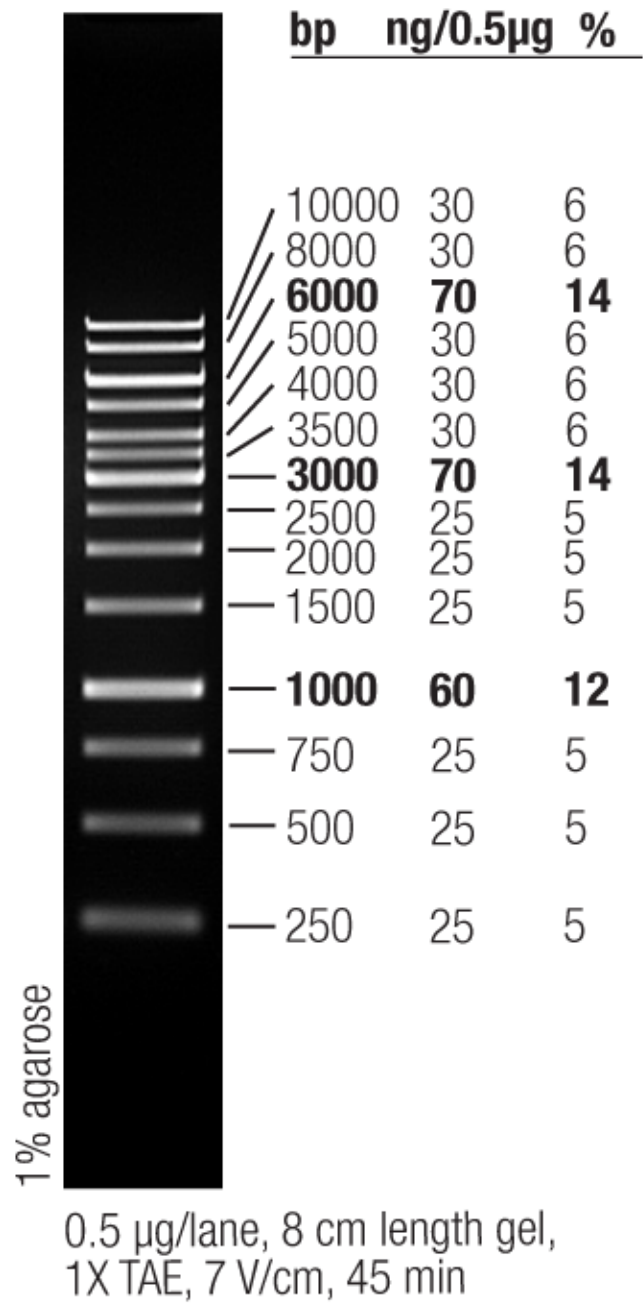


Bilaga 2



Bilaga 3

GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use



©Thermo Fisher Scientific

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

- <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.