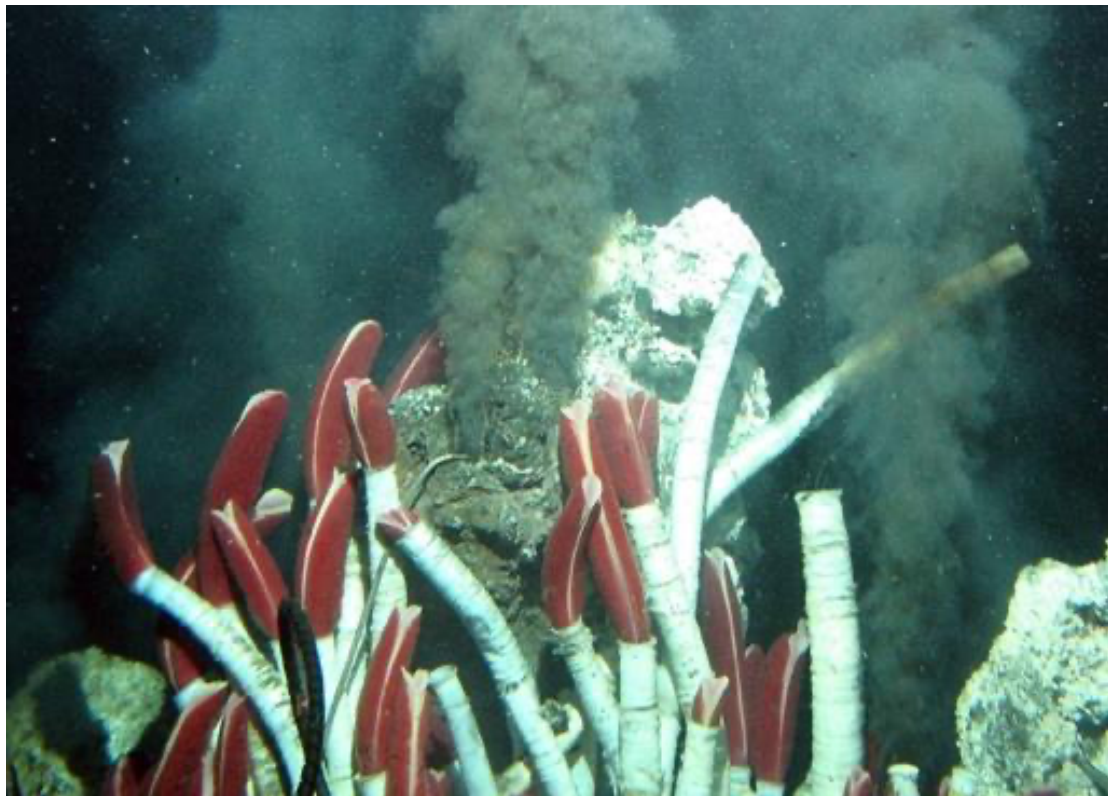


Projekt Forskerspirer 2022

NAT

*Udnyttelse af Rubisco RPE fra Candidatus Endoriftia
persephone til formindskelse af havets forsurening*



(1)

Fridda Elinor Cecillie Raft
Nordfyns Gymnasium

Indholdsfortegnelse

Indholdsfortegnelse	2
Indledning.....	3
Problemformulering og formål.....	3
Afgrænsning	4
Teori	4
<i>Rubiscos funktion i CO₂-fikseringen</i>	4
<i>Fotorespiration</i>	5
<i>Typer af Rubisco</i>	5
Metodevalg	6
<i>INTEGRATE</i>	6
<i>Koloni-PCR</i>	7
<i>Gelelektroforese</i>	7
Fremgangsmåde	8
<i>Del 1: Design af INTEGRATE-plasmid og andre køb</i>	8
<i>Del 2: Elektroporation og INTEGRATE</i>	8
<i>Del 3: Koloni-PCR</i>	9
<i>Del 4: Gelelektroforese</i>	9
Resultatbehandling.....	10
Forventet tidsramme	10
Budget.....	10
Konklusion.....	11
Kontakter/tak	12
Litteraturliste	13
Hjemmesider	16
Bilag.....	18

Indledning

I dag er klimaforandringerne en realitet, hvor konsekvenserne af øget udledning af drivhusgasser observeres på en lang række områder i naturen. Biodiversiteten falder, polernes is smelter og havene forsures. Den øgede mængde CO₂ i atmosfæren reagerer med havet og får havets pH til falde (se Bilag 1). Dette skyldes, at bikarbonatligevægten¹, reaktionen med CO₂ i havet, forskydes mod højre, hvorved koncentrationen af bl.a. hydroner (H⁺) stiger, hvilket får pH'en til at falde. Som følge af dette reager hydronerne med karbonat² (CO₃²⁻), hvorved koncentrationen af karbonat falder. Dette har alvorlige konsekvenser for kalkholdige dyr og organismer, som får sværere ved at danne kalk, da de netop behøver karbonat til at danne kalk (2). Klimaforandringerne er menneskeskabte, og kan på samme måde løses af menneskeheden. Et vigtigt redskab i denne krise er naturvidenskaben, hvor løsninger kan hentes fra naturen. Ved hydrotermiske væld lever gammaproteobakterien *Candidatus Endoriftia persephone*, i endosymbiose med den gigantiske rørorm *Riftia pachyptila* (vist på forsiden), hvis enzym til CO₂-fiksering, Form II Rubisco RPE, er en del mere effektivt end fotoautotrofe³ organismers Form I Rubisco-enzym (3).

Problemformulering og formål

I mit Forskerspireprojekt vil jeg undersøge, om man kan udnytte *Cand. Endoriftia persephones*⁴ Rubisco RPE til at optimere Rubisco-aktiviteten hos cyanobakterier. Nærmere betegnet er mit formål at undersøge muligheden for at indsætte genet for Rubisco RPE via INTEGRATE i cyanobakterien *Synechococcus sp. strain PCC 7002*, da denne cyanobakterie er ideel for in vivo forsøg grundet sin høje væksthastighed og høje tolerance for genteknologiske indgreb (4). Jeg vil undersøge muligheden for optimeringen af cyanobakteriers CO₂-fiksering, da disse bakterier står for 25% af den samlede primærproduktion på jorden, hvorved en optimering af fikseringsevnen, vil resultere i et mærkbart fald i CO₂-koncentrationen i havet (5).

Således er min problemstilling:

Kan cbbM-genet, kodende for Form II Rubisco RPE fra gammaproteobakterien Cand. Endoriftia persephone, indsættes via INTEGRATE i cyanobakterien Synechococcus sp. strain PCC 7002, og på sigt bidrage til at optimere CO₂-fikseringen fra havet i cyanobakterier?

¹ Bikarbonatligevægten: $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$ (2).

² Ligevægten mellem karbonat og bikarbonat: $H^+ + CO_3^{2-} \rightleftharpoons HCO_3^-$ (2).

³ Organismer, som opbygger organisk materiale fra CO₂ vha. sollys (25).

⁴ *Candidatus Endoriftia persephone* forkortes *Cand. Endoriftia persephone* (28).

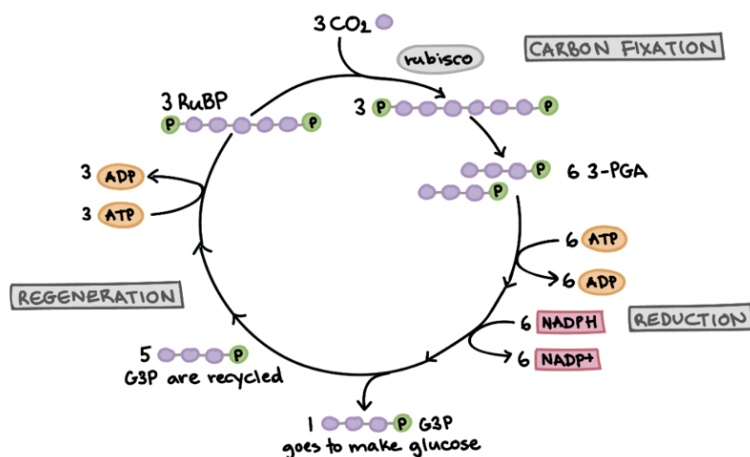
Afgrænsning

I mit projekt vælger jeg kun at fokusere på at indsætte i *cbbM*-genet i cyanobakterien, og inddrager ikke undersøgelsen af effekten af det nye gen. Dette gøres for at holde forsøget under 20.000dkk, og for at gøre forsøget mindre omfangsrigt. Derfor er komparative målinger mellem cyanobakterier fra indgrebet og kontrol-cyanobakterier ikke en del af forsøgsproceduren. Jeg vil i stedet bruge gelelektroforese, som et mål for et vellykket forsøg, da metoden er hurtigere og mindre omfangsrig. Valget af *Synechococcus sp. strain PCC 7002* er på baggrund af, at bakterien har en høj væksthastighed, grundet det faktum, at cyanobakteriens carboxyleringseffektivitet er høj (5). Carboxyleringseffektivitet er et mål for hvor god Rubisco er til at bruge CO_2 som substratmolekyle⁵ (3). Væksthastighed og carboxyleringseffektivitet er proportionale, hvorfor jeg argumenterer for at bruge denne cyanobakterie, trods den høje carboxyleringseffektivitet, for at forhindre, at forsøget tager lang tid. I dette projekt undersøger jeg altså muligheden for integration af *cbbM*-genet i cyanobakterier, og ikke den direkte optimering af den korrekte cyanobakterie *Synechococcus sp. strain PCC 7002*'s carboxyleringseffektivitet.

Teori

Rubiscos funktion i CO_2 -fikseringen

Enzymet Ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylate-oxygenase, forkortet Rubisco, katalyserer carboxyleringen⁶ i Calvin-cyklussen hos fotoautotrofe og kemoautotrofe⁷ organismer hvor CO_2 bindes til organisk materiale, nemlig molekylet RuBP⁸ (se Figur 1) (6) (7) (8). Rubisco udgør derfor en central rolle for livet på jorden, da enzymet gør bindingen



Figur 1: Calvin-cyklussen. Rubisco enzymet katalyserer carbon fikseringen (7).

af CO_2 mulig, og på den måde lægger grundlaget for foto- og kemosyntese. Selvom enzymet er et af

⁵ Substratmolekyler er de molekyler, hvis omdannelse enzymet katalyserer (15 s. 734).

⁶ Carboxyleringen er en konkret reaktion hvor CO_2 bindes, hvorimod carbon/ CO_2 -fiksering er en overordnet betegnelse for fænomenet (6).

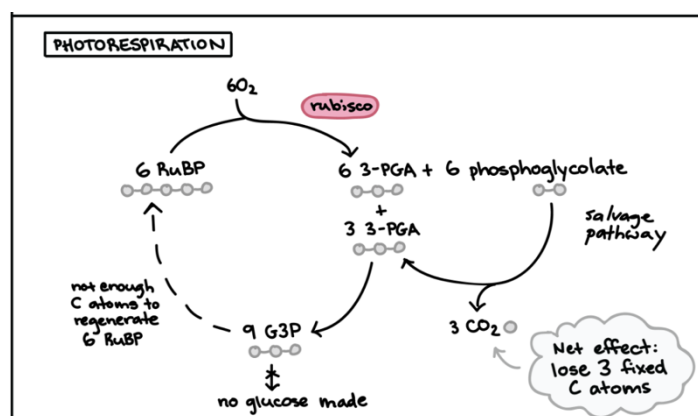
⁷ Organismer, som opbygger organisk materiale fra CO_2 vha. kemisk energi (25).

⁸ Ribulose-1,5-bisphosphate forkortes RuBP (6).

de mest udbredte enzymer på jorden, har Rubisco en ret lav enzymaktivitet, da enzymet kun omdanner ca. 1-10 substratmolekyler pr. sekund. Til sammenligning kan enzymet kulsyreanhydrase omdanne op til 1 mio. substratmolekyler pr. sekund (8). Rubisco er derfor ofte en begrænsende faktor for CO₂-fikseringen, hvilket er derfor jeg argumenterer for, at hvis enzymaktiviteten optimeres, vil havets forsurelse formindskes.

Fotorespiration

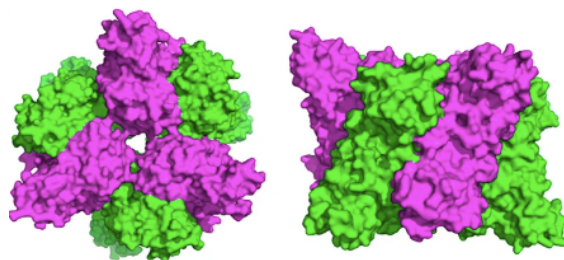
Rubiscos lave enzymaktivitet skyldes bl.a., at enzymet udover at bruge CO₂ som substrat også kan bruge O₂ gennem en proces kaldet fotorespiration (se Figur 2) (9) (10). Denne proces er ikke fordelagtig for enzymet, da der sker et tab af CO₂, når O₂ bruges som substratmolekyle. Her binder Rubisco O₂-molekylet til RuBP, hvorefter der dannes et 3-PGA-molekyle⁹ og et 2-PG-molekyle¹⁰. 2-PG kan ikke indgå i Calvin-cyklussen (se Figur 2), hvorfor der sker et tab af CO₂ gennem dette molekyle, og gassen derved frigives til miljøet igen (10).



Figur 2: Rubisco kan både bruge O₂ og CO₂ som substratmolekyle (10).

Typer af Rubisco

Rubisco enzymet findes i fire former, Form I, II, III og IV, hvor Form I og II benytter Calvin-cyklussen til CO₂-fiksering (11). Generelt har Rubisco Form I en højere carboxyleringseffektivitet end Form II, men forsøget af Zhang & et al i 2021 viste, at Rubisco Form II i *Cand. Endoriftia persephone* har en 50,5%



Figur 3: Afbildning af Form II Rubisco RPE (3).

højere carboxyleringseffektivitet end Rubisco Form I i cyanobakterien *Synechococcus sp. strain PCC 7002*, som anses for at have den højeste carboxyleringseffektivitet blandt Form I Rubisco (3) (11). Hvorfor Rubisco Form II fra *Cand. Endoriftia persephone* har en høj effektivitet er ikke helt klart for forskerne, men gammaproteobakterien lever i et CO₂ rigt miljø, hvilket kan være

⁹ 3-Phosphoglycerinsyre forkortes 3-PGA (6).

¹⁰ 2-Phosphoglycerinsyre forkortes 2-PG (6).

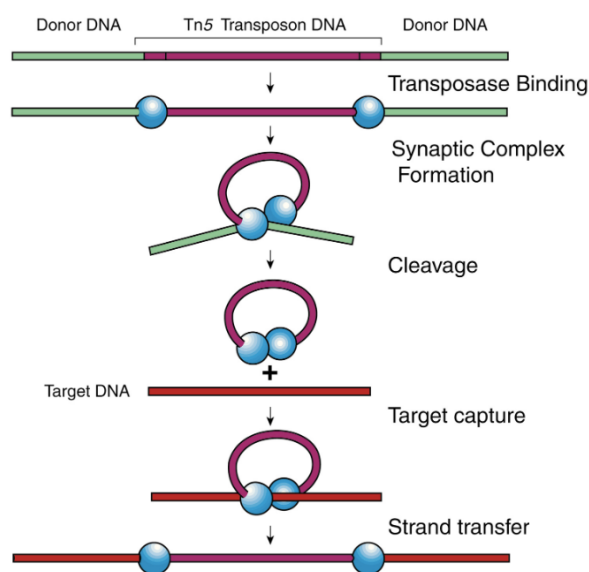
medvirkende til, at enzymet har udviklet sig til at være bedre til at bruge CO₂ som substrat fremfor O₂ (3).

Metodevalg

INTEGRATE

Metodisk vælger jeg at bruge genteknologien INTEGRATE type I-F til at indsætte det nye gen, da denne teknik integrer donor-DNA med længder op til 10kb¹¹ med ~100% succes (12). Den høje succesrate skyldes, at integreringsmekanismen ikke forløber ved et dobbeltstrengsbrud i DNA'et som ved traditionel CRISPR-Cas9, men via DNA-transposons. DNA-transposons består af proteiner, Tns, som flytter og integrer DNA-fragmenter tilfældigt rundt i genomet med en effektivitet på ~100%. DNA-transposons er naturligt forekommende i alle organismer, og har udviklet sig til at flytte DNA-sekvenser med denne høje

integrationssucces (13) (14). Forskerne Sam Sternberg og Sanne Klompe har udvundet et transposons-system fra kolerabakterien *Vibrio cholerae*, som kombinerer DNA-transposons med crRNA fra CRISPR-Cas9-teknikken, som derved gør integrationen præcis (13) (14). Ved CRISPR-Cas9 guider crRNA Cas-molekylet hen til spacer-området¹², da crRNA er komplementær til dette sted i genomet (15 s. 1063-1066). Problematikken ved CRISPR-Cas9 er, at Cas9-molekylet kun er ansvarlig for dobbeltstrengsbruddet og ikke indsættelsen af donor-DNA'et ved spacer-området, som ved DNA-transposons. Metoden afhænger derfor af, at HDR¹³ forløber ved reparationen af bruddet, hvor donor-DNA'et bruges som skabelon. HDR er dog langsommere end den anden reparationsmetode NHEJ¹⁴, hvor DNA'et genskabes tilfældigt, hvilket ofte forløber ved frameshift-mutationer, som sætter genet ud af funktion (16) (17). Grundet dette faktum argumenterer jeg for at



Figur 4: Et eksempel på DNA-transposons' virke. En DNA-sekvens flyttes fra donor-DNA'et og integreres i målcens DNA (13).

¹¹ 10 kilo basepar = 10.000 basepar (12).

¹² Spacer-området er stedet, hvor donor-DNA'et indsættes (15 s. 1063-1066).

¹³ Homology Directed Repair forkortes HDR (16).

¹⁴ Non-homologous end-joining forkortes NHEJ (16).

bruge INTEGRATE som integreringsmetode i forsøget. Udover at være ekstremt effektivt, er metoden også billig og nem (14).

Koloni-PCR

Efter brug af INTEGRATE skal indgrebets virke bestemmes via gelelektroforese. Inden gelelektroforesen benyttes koloni-PCR¹⁵, hvor et overlap fra hver ende af cbbM-genet til det omkringliggende DNA i cyanobakterien opformeres¹⁶ (Bilag 9; Figur 13, Figur 14). Der skal derfor designes primere fremadrettet og baglænsrettet til hver af overlappene, så PCR-reaktionen kan forløbe (Bilag 6). Teknikken gør brug af DNA-replikation, hvor primerne kickstarter replikationen af DNA'et, da de fungerer som skabelon for DNA-polymerasen til at kunne replikere det ønskede DNA (15 s. 1004-1006). For at opformere DNA-fragmentet, opvarmes DNA'et først til ca. 95°C, hvor hydrogenbindingerne mellem de to DNA-strengede detoneres, hvorved DNA'et bliver enkeltstrengt. Herefter sænkes temperaturen til primernes temperaturoptimum (i forsøget 52,5°C) for, at primerne kan binde til DNA-strengene, og til sidst hæves temperaturen til DNA-polymerases temperaturoptimum ved ca. 72°C. Denne cyklus gentages ca. 25-35 gange, hvor mængden af det ønskede DNA opformeres eksponentielt (15 s. 1004-1006) (18) (19).

Gelelektroforese

For at bestemme om donor-DNA'et er indsat, benyttes gelelektroforese, som er en metode, der adskiller DNA-fragmenter i forskellige størrelser på en gel af agarose-molekyler ved tilførsel af strøm. Da DNA-molekylet er negativt ladet, grundet phosphat-gruppen i molekylet, vil molekylerne vandre fra anoden¹⁷ til katoden¹⁸ i gelen. Molekylernes hastighed er omvendt proportional med størrelsen, da mindre DNA-molekyler møder lavere friktion i agarose-molekylerne end større DNA-molekyler. Derfor vandrer små molekyler hurtigere i gelen end større molekyler, hvilket gør, at DNA-fragmenterne adskilles efter størrelse. For at gøre DNA'et synligt tilsættes et fluorescerende eller farvet stof til prøven med DNA, som i forsøget kommer fra DreamTaq Green PCR-master mix 2X. Efter noget tid ses de opformede DNA-fragmenter fra koloni-PCR i gelen som bånd, som

¹⁵ Ved koloni-PCR behøver man ikke udtrække DNA'et som ved normal PCR. Her tages bare en prøve fra bakteriekulturen, hvor cellerne detoneres gennem indledende opvarmning, og DNA'et derved frigives (26).

¹⁶ Det ene overlap er 430bp langt og det andet er 654bp langt.

¹⁷ Negative elektrode (15 s. 1008).

¹⁸ Positive elektrode (15 s. 1008).

sammenlignes med DNA-stigen med kendte fragmentlængder, for at kunne bestemme længden af DNA-fragmenterne fra prøven (15 s. 1007-1010) (18) (19).

Fremgangsmåde

Forsøget udføres på SDU.

Del 1: Design af INTEGRATE-plasmid og andre køb

- INTEGRATE-plasmidet (pSL1142) købes fra Addgene.com (Bilag 2; Figur 5).
- Donor-DNA'et (Bilag 3; Figur 7, Figur 8 + Bilag 4) og oligonukleotider fremadrettet og baglænsrettet til crRNA (Bilag 5; Figur 9, Figur 10) klones ind i INTEGRATE-plasmidet gennem Genscript.com.
- Primere til PCR designes og købes fra Thermo Fisher Scientific (Bilag 6).
- Derudover købes cyanobakterier og andet udstyr/materiale online (læs yderligere under "Budget" og "Hjemmesider").

Del 2: Elektroporation og INTEGRATE

Efter levering af materialer og udstyr:

- Cyanobakterierne tøs op og kultiveres i demineraliseret vand med vækstmediet (Bilag 7) ved 26°C under 2000-3000 lux i et varmeskab til opløsningen har en koncentration på 1-2 mio. celler pr. ml (max 7-14 dage) (20).
- Elektroporation udføres for cyanobakterierne (21)¹⁹:
 - o 25µL af cyanobakterierne overføres til et mikrorør og cellerne vaskes med elektroporationsbuffer.
 - o 1µL af INTEGRATE-plasmiderne tilsættes mikrorøret.
 - o En elektrisk puls (100Ω, 25µF) tilsættes cyanobakterierne i ~2,6ms, så cyanobakterierne kan optage plasmiderne gennem cellemembranen²⁰.
 - o Cyanobakterierne overføres til vækstmediet igen og kultiveres i 1 dag.

¹⁹ Detaljeret forklaring til brug af elektroporation findes gennem linket fra bio-rad.com: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/AW10009178.PDF> og international.neb.com: <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/electroporation-protocol-c2986>

²⁰ Den elektriske puls medfører en forstyrrelse i cellemembranen, så bakterien kan optage plasmidet gennem cellemembranen (21).

Del 3: Koloni-PCR

- Der laves to PCR-forsøg²¹;
 - o En kontrol uden cyanobakterier markeret med "1" på PCR-røret.
 - o En reaktion med cyanobakterier markeret med "2" på PCR-røret.
- Rør "1" og "2": 25µL DreamTaq Green PCR-mastermix 2X tilføjes med mikropipetter, og rørene køres kort i vortexmaskinen.
- Rør "1" og "2": Med mikropipetter tilsættes 0,1-1µL af både fremadrettet og baglænsrettet primer, og nukleasefrit vand tilsættes, så opløsningen bliver 50µL. Herefter sættes rørene på is.
- En prøve af cyanobakterierne overføres til en petriskål, som undersøges i mikroskop. Er prøven levedygtig overføres 0,1-1µL af indholdet til rør "2" (15) (19) (22).
- Rør "1" og "2": Rørene overføres til thermal cycleren og følgende kommandoer gives til maskinen:
 - o 5 min. ved 95°C
 - o 25-35 gange af 30 sek. ved 95°C, 30 sek. ved 52,5°C, 1 min. ved 72°C
 - o 5-15 min. ved 72°C
- Prøverne sættes på is og afkøles, hvorefter de er klar til gelelektroforese (18) (19).

Del 4: Gelelektroforese

- 1g agarose og 100mL TBE-buffer hældes i en kolbe og opvarmes i mikrobølgeovnen.
- Opløsningen hældes i elektroforesekarret, hvor kammen er tilsat, og gelen størkner.
- Elektroforesekarret fyldes op med TBE-buffer.
- 5-15µL af DNA-stigen tilføjes til brønd²² nr. 1 med mikropipette.
- 5-15µL af rør "1" tilføjes til brønd nr. 2 med mikropipette.
- 5-15µL af rør "2" tilføjes til brønd nr. 3 med mikropipette.
- Strømmen tændes (120v) og gelelektroforesen kører i 20 min.
- Længderne af DNA-fragmenterne fra brønd nr. 3 aflæses ved at sammenligne med brønd nr. 1's længder (disse længder er kendte) (15) (18) (19).

²¹ For yderligere forklaring til koloni-PCR, følger denne brugervejledning med ved køb af DreamTaq Green PCR-master mix 2X:

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012704_DreamTaq_Green_PCR_MasterMix_K1081_UG.pdf

²² "Brønde" referer til de huller der laves i gelen med gelelektroforesekarret (15 s. 1008).

Resultatbehandling

Gelelektroforesens resultat vil vise om cbbM-genet blev indsat (Bilag 8, Figur 11, Figur 12) Ved at sammenligne med DNA-stigens bp-længder, forventer jeg at se et bånd ud for ca. 430-450bp og et ud for ca. 650-675bp ved brønd nr. 3, da de opformerede DNA-fragmenter, overlappene på hver side af cbbM-genets indsættelse, er 430bp og 654bp lange (Bilag 9; Figur 13, Figur 14). Da INTEGRATE har en succesrate på ~100%, forventer jeg at se dette resultat (12) (14). Opnås resultatet ikke, kan det skyldes, at cyanobakterierne ikke har optaget plasmidet ved elektroporation, opbrugt næringsmedium eller fejl ved PCR eller gelelektroforesen. Da brønd nr. 2 er kontrollen uden DNA fra cyanobakterierne, forventer jeg ikke at se nogle bånd ved denne brønd.

Forventet tidsramme

Afhænger af cyanobakteriernes vækst og leveringstid af materialer.

Procedure	Tid
Køb og levering af udstyr/materialer, plasmider og cyanobakterier	7-14 dage
Plasmider indsendes til Genscript.com som foretager kloning	14-20 dage
Plasmider leveres af Genscript.com	7 dage
Cyanobakterier kultiveres (opstart på kultivering)	7-14 dage
Elektroporation	2 dage
INTEGRATE-indgreb	1 dag
Cyanobakterier kultiveres med det nye plasmid	1 dage
PCR og gelelektroforese	1 dag
I alt	40-60 dage

Budget

Køb	Pris
Cyanobakterien <i>Synechococcus sp. strain PCC 7002</i>	2940,12 dkk (€346,00)
INTEGRATE-plasmid, pSL1142(pSPIN, pBBR1 backbone)	565,00 dkk (\$75)
Syntese og kloning af donor-DNA til crRNA ind i INTEGRATE-plasmidet af Genscript.com	4546,66 dkk (\$614,95)
Syntese og kloning af 2 oligonukleotider til crRNA ind i INTEGRATE-plasmidet af Genscript.com	1323,44 dkk (\$179)
4 primere til PCR	111,01 dkk (163,2sek)

DreamTaq Green PCR-master mix 2X <i>Indeholder:</i> <ul style="list-style-type: none"> • Buffer • dNTPs (frie nukleotider) • DNA-polymerase • Green electrophoresis tracking dye 	672,03 dkk (988sek)
Agarose	752,00 dkk
TBE-buffer	390,00 dkk
Pipettespidser til mikropipetterne 10 μ L, 200 μ L	562 dkk
PCR-rør 0,2mL	151 dkk
Mikrorør 0,5mL	356 dkk
Mikropipetter, 1 af 0,1-2 μ L og 1 af 10-100 μ L	1364,2 dkk
Moms ved køb fra Drifton.dk	743,75 dkk
DNA-stige	371,39 dkk (546,00sek)
Nukleasefrit vand	155,7 dkk (228,90sek)
Fragt fra køb hos Thermo Fisher Scientific	25,32 dkk (€2,98)
Is, kolbe, mikrobølgeovn, reagensglas, petriskåle	0 dkk - lånes af Nordfyns Gymnasium
Varmeskab, vækstmedium til cyanobakterierne, mikroskop, elektroportationsmaskine og -buffer, vortexmaskine, thermal cycler og elektroforesesystemet	0 dkk - lånes af SDU
I alt	Ca. 15.030,62 dkk

Konklusion

Da forsøget ikke inkluderer undersøgelsen af cbbM-genets effekt i *Synechococcus sp. strain PCC 7002*, vil yderligere tiltag være at udføre samme forsøgsprocedure for en cyanobakterie med lav carboxyleringseffektivitet, og herefter undersøge effekten af genet gennem komparative analyser som bl.a. CO₂-koncentration, væksthastighed og næringsindhold mellem cyanobakterier fra indgrebet og kontrol-cyanobakterier. Hvis genmodificeringen af cyanobakterierne bliver en succes, skal grundige analyser og observationer af organismerne laves inden de sættes ud i naturen. Det gælder bl.a. undersøgelser af cyanobakterierne i samspil med andre organismer, da bakterierne får en markant konkurrencefordel ved at få tilført cbbM-genet. Det er vigtigt at sikre, at der ikke sker negativ biomanipulation, hvis de genmodificerede organismer sættes ud i naturen, hvilket ville være det værste tænkelige scenarie, når udgangspunktet for projektet var at løse en miljøkrise. Kommer INTEGRATE-indgrebet til at virke på længere sigt, vil mere CO₂ blive bundet som organisk materiale, hvorved den biologiske pumpes aktivitet vil stige, så transporten af carbon til havbunden

i form af detritus²³ stiger. CO₂-koncentrationen i havet vil derfor falde, da gassen lagres som detritus i havets bundsediment i stedet for at være opløst i havet. Dette vil medføre en forskydning af bikarbonatligevægten, så der dannes færre hydroner, og havets pH vil stige, hvorved havets forsurelse formindskes (15 s. 1290-1291) (22 s. 93).

Kontakter/tak

Mange tak til min forskerkontakt Professor Donald E. Canfield fra Nordcee, SDU, for faglig indsigt og sparring gennem mit projekt. Mange tak til Postdoc Joshua Atkinson fra AU (gæsteforsker fra University of Southern California) for hjælp til metode og bilag. Mange tak til Professor Andreas Schramm og specialestuderende Theresa Hagen Van fra AU.

Mange tak til Beryl Cheng og Evan Fan fra Genscript.com og Kim Siebers fra Twistbioscience.com for information om priser på deres produkter. Mange tak til PhD. Amelia-Elena Rotaru og Dr. Carolin Löscher fra Nordcee, SDU, for hjælp med kultiveringen af cyanobakterier.

Mange tak til mine naturfagslærere fra Nordfyns Gymnasium Susan Guldberg Graungård Petersen, Katja Malene Thornhøj-Larsen og Kjeld Jørgensen for henholdsvis sparring, hjælp og materiale. Mange tak til min koordinator Sylvie Cifuentes for vejledning gennem mit projekt.

²³ Detritus er den latinske betegnelse for dødt organisk materiale (15 s. 1224).

Litteraturliste

1. **Mitchell, Jessie.** MICROBIAL MYSTERIES: LINKING MICROBIAL COMMUNITIES AND ENVIRONMENTAL DRIVERS THE DISCOVERY OF RIFTIA. *schmidtocean.org*. [Online] 2. Marts 2019. [Citeret: 24. Oktober 2022.] <https://schmidtocean.org/cruise-log-post/discovery-of-riftia/>.
2. **Berendt, Anne.** Forsuring. *undervisning.WWF.dk*. [Online] 24. Januar 2020. [Citeret: 29. September 2022.] <https://undervisning.wwf.dk/forsuring>.
3. **Zhang, Junli et al.** Discovery of a readily heterologously expressed Rubisco from the deep sea with potential for CO₂ capture. *SpringerOpen*. [Online] 07. September 2021. [Citeret: 03. September 2022.] <https://bioresourcesbioprocessing.springeropen.com/articles/10.1186/s40643-021-00439-6>.
4. **Bryant, Donald A. og Ludwig, Marcus.** Synechococcus sp. strain PCC 7002 transcriptome: acclimation to temperature, salinity, oxidative stress, and mixotrophic growth conditions. *frontiersin.org*. [Online] 11. Oktober 2012. [Citeret: 1. Oktober 2022.] <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00354/full>.
5. **Dai, Wei et. al.** Visualizing Individual RuBisCO and Its Assembly into Carboxysomes in Marine Cyanobacteria by Cryo-Electron Tomography. *ScienceDirect.com*. [Online] 19. Oktober 2018. [Citeret: 23. September 2022.] <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002228361830411X>.
6. **Khan Academy.** The Calvin cycle. *Khanacademy.org*. [Online] 20. Februar 2011. [Citeret: 18. Oktober 2022.] <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/photosynthesis/a/calvin-cycle>.
7. **Biotech Academy.** Fotosyntesen - Calvins cyklus | Biotech Academy. *www.youtube.com*. [Online] 30. Juni 2020. [Citeret: 18. Oktober 2022.] https://www.youtube.com/watch?v=b95VuzGul_o.
8. **Morot-Gaudry, Jean-François og Joyard, Jacques.** The path of carbon in photosynthesis. *encyclopedie-environnement.org*. [Online] 3. April 2020. [Citeret: 18. Oktober 2022.] <https://www.encyclopedie-environnement.org/en/life/path-carbon-photosynthesis/>.
9. **Canfield, Donald E.** CHAPTER 3: Evolution of Oxygenic Photosynthesis. *Oxygen: A Four Billion Year History*. 1. Princeton : Princeton University Press, 2014, s. 38-39.
10. **Khan Academy.** Photorespiration. *khanacademy.org*. [Online] 20. Februar 2011. [Citeret: 18. Oktober 2022.] <https://www.khanacademy.org/science/biology/photosynthesis-in-plants/photorespiration--c3-c4-cam-plants/a/c3-c4-cam-plants>.
11. **Berg, Ivan A.** Ecological Aspects of the Distribution of Different Autotrophic CO₂ Fixation Pathways. *journals.asm.org*. [Online] 10. Marts 2011. [Citeret: 18. Oktober 2022.] <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02473-10>.
12. **Vo, Phuc Leo H. et. al.** CRISPR RNA-guided integrases for high-efficiency, multiplexed bacterial genome engineering. *www.nature.com*. [Online] 23. November 2020. [Citeret: 20. Oktober 2022.] <https://www.nature.com/articles/s41587-020-00745-y>.

13. **Sternberg, Dr. Sam.** Targeted DNA integration without double strand breaks using CRISPR RNA guided transposons. *www.youtube.com*. [Online] 23. Juli 2021. [Citeret: 17. Oktober 2022.] <https://www.youtube.com/watch?v=rdVLeDNmjGc>.
14. **Vo, Leo.** INTEGRATE: Bacterial Genome Engineering Using CRISPR-Transposons. *addgene.org*. [Online] 7. December 2020. [Citeret: 17. Oktober 2022.] <https://blog.addgene.org/integrate-bacterial-genome-engineering-using-crispr-transposons>.
15. **Skadehede, Thomas et. al.** Genteknologi. [forfatter] Thomas Skadehede og et. al. *Yubio A.* 8. Randers : yubio Aps, 2020, s. 734+1004-1011+1050-1053+1063-1069+1224+1288-1292.
16. **Alexander, Mariko.** Improving CRISPR-Cas9 Gene Editing: Tackling the HDR Inefficiency Problem. *bioradiations.com*. [Online] 11. Marts 2020. [Citeret: 24. Oktober 2022.] <https://www.bioradiations.com/improving-crispr-cas9-gene-editingtackling-the-hdr-inefficiency-problem/>.
17. **Bio-Rad.** CRISPR-Cas Gene Editing Teaching Resources. *bio-rad.com*. [Online] 2022. [Citeret: 25. Oktober 2022.] <https://www.bio-rad.com/en-dk/applications-technologies/crispr-cas-gene-editing-teaching-resources?ID=Q58I0DWDLBV5>.
18. **Wang, Jack.** Polymerase Chain Reaction (PCR) & Gel Electrophoresis. *www.youtube.com*. [Online] 13. Februar 2022. [Citeret: 17. Oktober 2022.] <https://www.youtube.com/watch?v=dQoPINi3Es>.
19. **Thermo Fisher Scientific.** How to perform colony PCR. *www.youtube.com*. [Online] 3. Marts 2015. [Citeret: 17. Oktober 2022.] https://www.youtube.com/watch?v=Crv38J3_ZnM.
20. **Thermo Fisher Scientific .** How to culture, express and preserve Algae. *youtube.com*. [Online] 17. November 2014. [Citeret: 28. Oktober 2022.] <https://www.youtube.com/watch?v=D0IP4j6xmn0&t=58s>.
21. **Thermo Fisher Specific.** Electroporation. *thermofisher.com*. [Online] [Citeret: 28. Oktober 2022.] <https://www.thermofisher.com/dk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/electroporation.html>.
22. **Passow, U. og Rocha, C.L. De La.** 8.4 - The Biological Pump. [forfatter] Heinrich D. Holland og Karl K. Turekian. *Treatise on Geochemistry.* 2. Amsterdam : Elsevier Science, 2014, s. 93-122. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080959757006045>.
23. **Khan Academy.** Overview: DNA cloning. *khanacademy.org*. [Online] 6. Juni 2016. [Citeret: 26. Oktober 2022.] <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/overview-dna-cloning>.
24. **Rae, Benjamin D. et. al.** Functions, Compositions, and Evolution of the Two Types of Carboxysomes: Polyhedral Microcompartments That Facilitate CO₂ Fixation in Cyanobacteria and Some Proteobacteria. *PubMed Central.org*. [Online] September 2013. [Citeret: 18. Oktober 2022.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811607/>.
25. **Nielsen, Boy Overgaard.** autotrof. *denstoredanske.lex.dk*. [Online] 13. Juni 2012. [Citeret: 18. Oktober 2022.] <https://denstoredanske.lex.dk/autotrof>.

26. **It's Learnable.** Colony PCR Protocol. *www.youtube.com*. [Online] 21. Oktober 2021. [Citeret: 20. Oktober 2022.] <https://www.youtube.com/watch?v=kDGFkf70-AY>.

27. **Robinson, Jonathan J. et. al.** Cloning and Sequencing of a Form II Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from the Bacterial Symbiont of the Hydrothermal Vent Tubeworm *Riftia pachyptila*. *ncbi.nlm.nih.gov*. [Online] Marts 1998. [Citeret: 28. Oktober 2022.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC107066/>.

28. **Klose, Julia et. al.** Trophosome of the Deep-Sea Tubeworm *Riftia pachyptila* Inhibits Bacterial Growth. *journals.plos.org*. [Online] 5. Januar 2016. [Citeret: 30. Oktober 2022.] <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0146446>.

Hjemmesider

Atcc.org:

- Cyanobakterien *Synechococcus* sp. strain PCC 7002: <https://www.atcc.org/products/27264>

Addgene.com:

- INTEGRATE-plasmidet (pSL1142): <https://www.addgene.org/160730/>

Genscript.com:

- Donor-DNA og oligonukleotider til crRNA laves og klones ind i INTEGRATE-plasmidet (pSL1142) gennem bestilling: https://www.genscript.com/gene-cloning-subcloning.html?src=google&gclid=Cj0KCQjwteOaBhDuARIsADBqReh8U7qRWT_sf16a1rQJ_7t94meAxU_ZYmDTv9mFeZOR-KIZ6j_JGi8aAhi6EALw_wcB

Thermofisher.com:

- DreamTaq Green PCR-master mix 2X:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1081>
- DNA-stige: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0334>
- Nukleasefrit vand:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/J71786.XCR?SID=srch-srp-J71786.XCR>
- Primere: <https://www.thermofisher.com/order/custom-standard-oligo>
- Agarose: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16500100>
- TBE-buffer:
https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/J62788.K2?gclid=Cj0KCQjw--2aBhD5ARIsALiRlwCsy6DxiN-Nne6YpxmUry2CluCVnnroiIYeBEsoDDw1Em16oJq17LIaAje1EALw_wcB&cid=lcd_dig_sbu_r03_co_cp1517_pjt8642_col019235_0se_gaw_dy_pur_&ef_id=Cj0KCQjw--2aBhD5ARIsALiRlwCsy6DxiN-Nne6YpxmUry2CluCVnnroiIYeBEsoDDw1Em16oJq17LIaAje1EALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!603983824313!!!g!!!13092331560!127576879412
- Information om fragt og leveringstid:
<https://www.thermofisher.com/dk/en/home/global/shipping-handling-charges.html>

Drifton.dk:

- Pipettespidser til mikropipetterne: <https://drifton.dk/shop/115-pipettespidser-og-roer/2491-sterile-pipettespidser-rack/>

- Mikropipette 0,1-2 μ L: https://drifton.dk/shop/112-pipetter-og-flaskedispensere/2270-accumax-smart-pipetter-variabel-volumen/?variantId=1886&gclid=Cj0KCQjw--2aBhD5ARIsALiRlwBnpOZ9_v70JOe6ghwTNi75nQP6jWbcuT8bImnwpN-3UJwab3Vf9G8aAk_7EALw_wcB
- Mikropipette 10-100 μ L: <https://drifton.dk/shop/112-pipetter-og-flaskedispensere/2040-mikropipette-variabel-volumen/>
- PCR-rør 0,2mL: <https://drifton.dk/shop/115-pipettespidser-og-roer/2395-accumax-pcr-roer-02-ml-sterile/>
- Mikrorør 0,5 mL: <https://drifton.dk/shop/115-pipettespidser-og-roer/2389-accumax-mikroroer-sterile/>

Nordcee, SDU.dk:

- Varmeskab, vækstmedium til cyanobakterierne, mikroskop, elektroporationsmaskine og -buffer, vortex-maskine, thermal cyclus og elektroforese system: <https://www.nordcee.dk/>

Nordfynsgymnasium.dk:

- Is, kolbe, mikrobølgeovn, petriskåle, reagensglas: <https://nordfyns-gym.dk/>

Andre:

NCBI

- Accession numre for donor-DNA'et (cbbM-genet fra *Cand. Endoriftia persephone*) og *Synechococcus sp. strain PCC 7002* er hentet fra NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

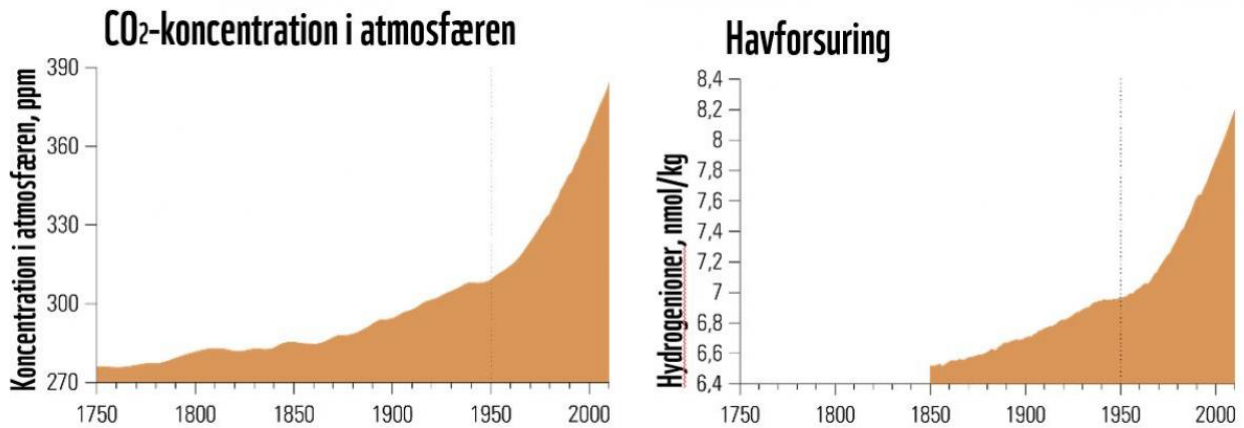
Benchling.com

- Onlineværktøjet Benchling.com bruges til at designe primere, oligonukleotider, og visualisere INTEGRATE-plasmidet (pSL1142) og indsættelsesstedet i *Synechococcus sp. strain PCC 7002*, <https://www.benchling.com>.

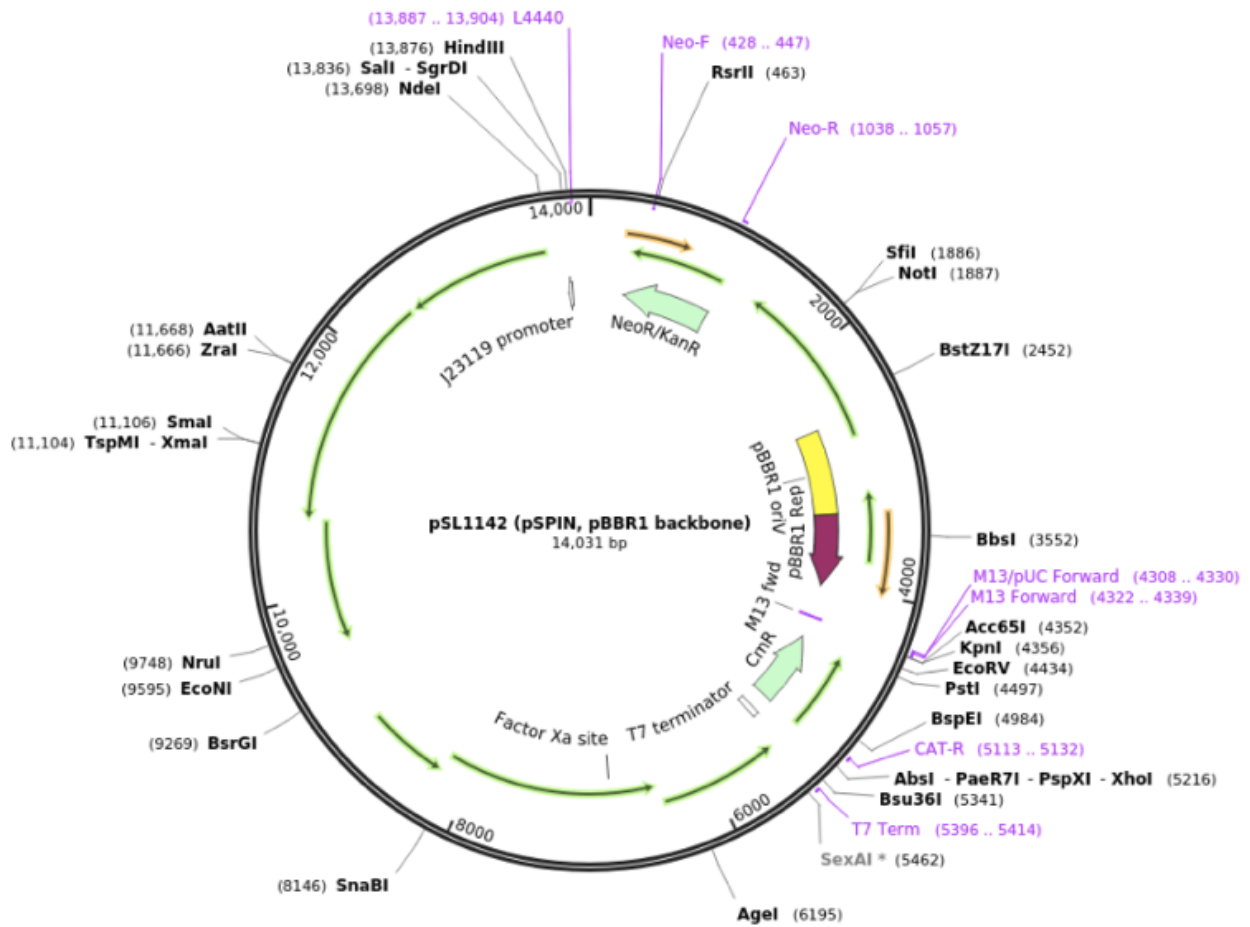
Bilag

Bilag 1: Sammenhængen mellem øget CO₂ udledning og havets forsuring.

I takt med at mere CO₂ udledes, stiger koncentrationen af hydroner i havet, hvilket får havets pH til at falde. pH er et mål for hvor stor koncentrationen af hydroner er i en opløsning. Sammenhængen mellem pH og koncentrationen af hydroner i en opløsning er omvendt proportional, hvilket betyder, at jo lavere pH'en er i opløsningen, desto højere er koncentrationen af hydroner i opløsningen (2).



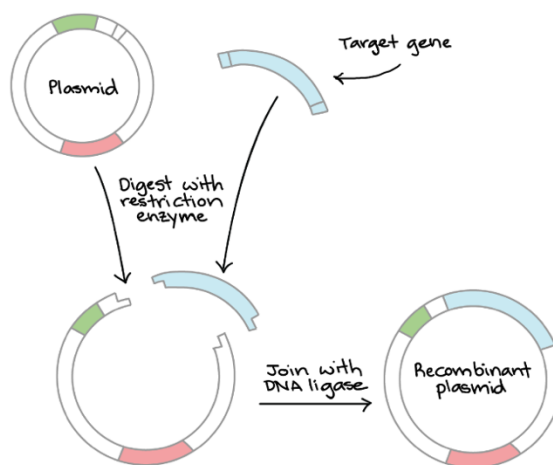
Bilag 2: INTEGRATE-plasmidet (pSL1142) fra Addgene.com



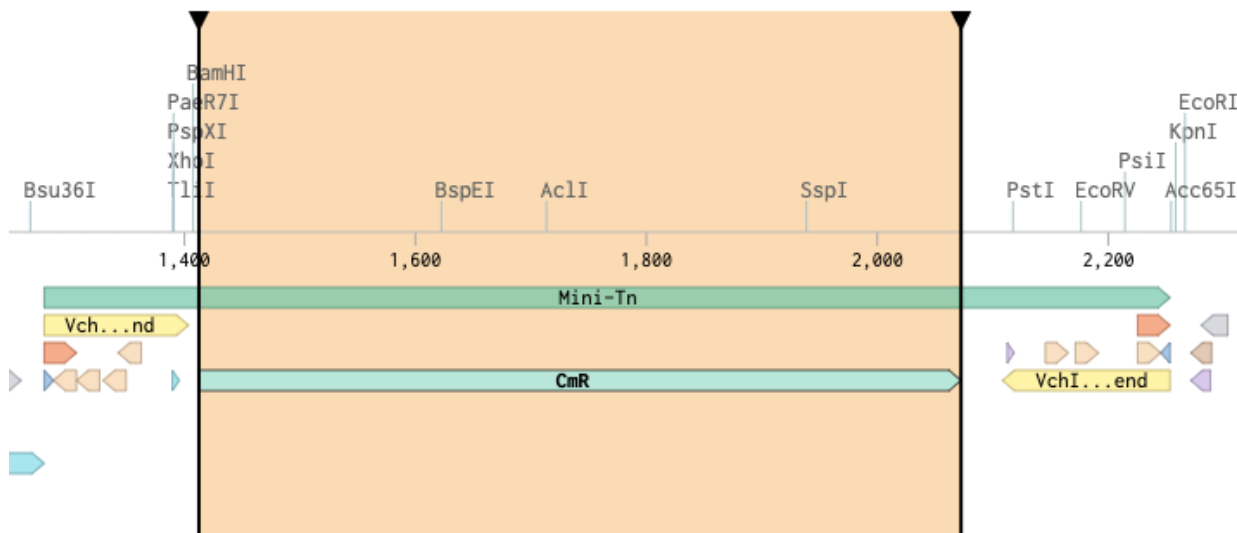
Figur 5: Plasmidet (pSL1142) fra Addgene.com.

Bilag 3: Kloning af cbbM i INTEGRATE-plasmidet (pSL1142)

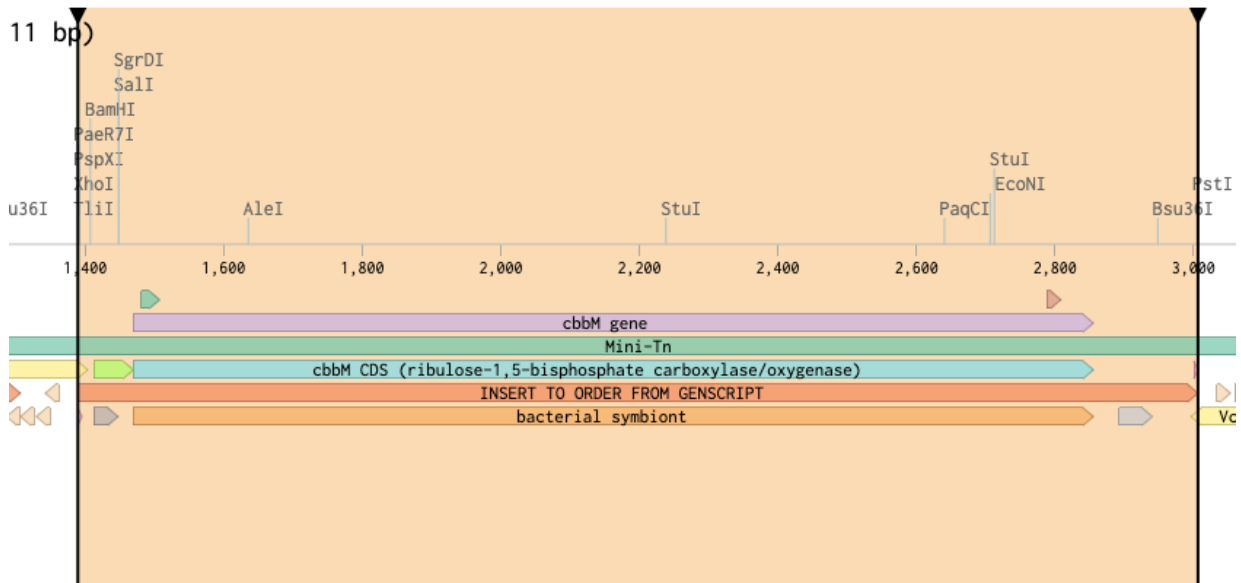
Ved bestillingen af kloningen hos Genscript.com oplyses det, at cbbM-genets (donor-DNA'et) accession-nummer er AF047688 (fra NCBI, se Bilag 4) og klones ved brug af restriktionsenzymene XhoI og PstI. Ved kloningen klipper restriktionsenzymene XhoI og PstI hver især et specifikt sted i cbbM-genet og INTEGRATE-plasmidet, så der skabes to åbninger i genet og plasmidet (se Figur 6). Da man bruger de samme restriktionsenzym, vil åbningerne i plasmidet og genet have et overlap af baser, som er komplementære til hinanden. Dette gør, at enderne i plasmidet og cbbM-genet danner baseparinger med hinanden. DNA-ligase forsejler bindingerne, og på den måde bliver cbbM-genet indsat i INTEGRATE-plasmidet (se Figur 6 og Figur 8) (15 s. 1050-1053) (23).



Figur 6: Kloning. Et bestemt gen overføres til et plasmid (23).



Figur 7: Hvor cbbM kloner ind i plasmidet (pSL1142) af Genscript.com. Optegnet i Benchling.com af Postdoc Joshua T. Atkinson.



Figur 8: *cbbM* (inkl. primer og terminator) klonet ind i plasmidet (*pSL1142*) af Genscript.com. Optegnet i Benchling.com af Postdoc Joshua T. Atkinson.

Bilag 4: cbbM genets sekvens (donor-DNA'et)

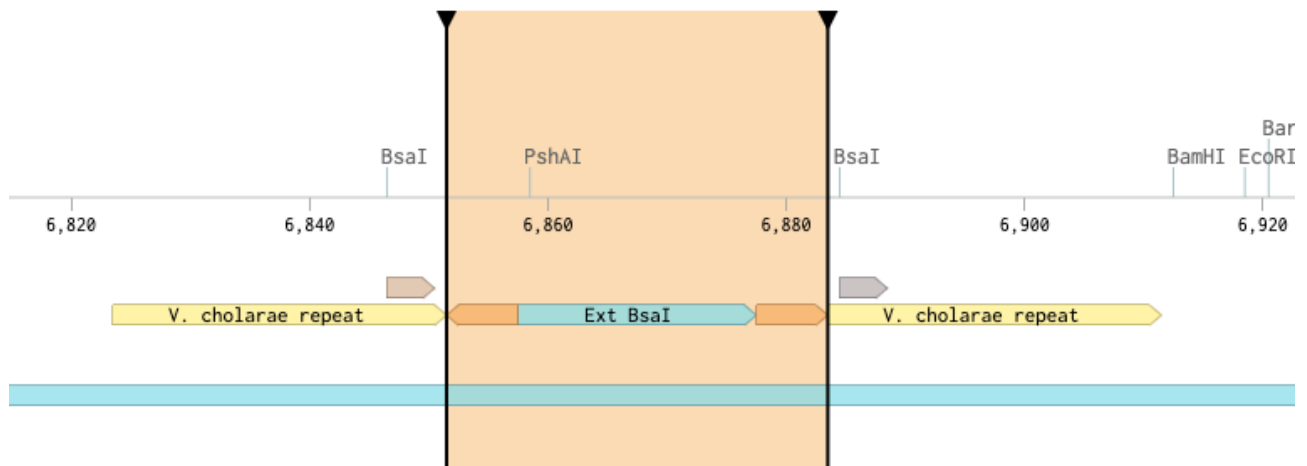
Sekvensen indeholder også promotor og terminator for genet, hvilket sikrer, at genet bliver udtrykt efter INTEGRATE-indgrebet i cyanobakterien.

Sekvensen (1617bp lang):

```
CTCGAGGTCATTTCCGGGGATCCttgacagctagctcagtcctaggtataataactagcgtcgacGTGGAGATATA  
CCATGatggcattagaccaaaccaatcgttattcagacctgagtttgaagaagacgagctgatcgcaagcggtgactacgtactttgcgcct  
acctgatgaagccaaagtccggctacggttacctggaagctgctgctcactttgcagctgagtcctccaccggcaccaactggaagtctctacc  
actgatgactcaccaaggggtgtgacgcgctggctctatgagatcgatgaagccaaagagctgatgaagatcgccctaccccggtgacttattcgat  
atcaacatcatcgacgggctgcatgctggcactgttctgacctgacctcggaataaccagggtatgggcgatcgaatacgccaaga  
tgctcgacttctacatgccaccaaaatactgcgcctgtacgacggctctgcggtaacatccaggatattggcgcattctggggcgtccaattg  
agaatggtggttacatgccggcaccatcatcaaacccaaactgggcctgcgtcccagcccttgctgaagcggcataaccagttctggtggg  
cggtgacttcattaagaacgacgagccccaggtaaccagcccttctccccatgaagaagaccatcccgctggtggcagacgccatgcgtcg  
cgcccaggatgagactggcgaagccaagcttctccgccaacatcaccgctgatgatccagccgagatgattgcccggtggtgagttcgtctc  
gaAacctcggttttgaggcctctcaggttgccttctggtgatggttacgtagccggctctaccgctgtgccaccgcccgtcgcaactcccc  
aaccagttctgcacttccatcgtgccggtcacggctcggctcaccttccccagagcaagcgtggttacaccgcttctgtacacatcaagatgac  
ccgtctgctgggtgcatccggtatgcacgtcggcaccatgggctacggcaagatggaaggcgaagccagcgacaaactgattgctacatgat  
cgagcgtgacagcggcagatggtccttctaccatcaggagtgggctggcatgaaaccaccaccccgatcatctccggcggcatgaacgcct  
gcgtctaccggcttctcgagaacctgggccacggcaacgtgatcaacaccgaggtggtggtacttacggtcacatcgacagcccggcgg  
ctggtgctgtcctcctgcgtcaggcctacgagtgtgaaagagggtgcagaccggctgagtagcgaagagcacaagagttcgtcgc  
gcctcagactccttcgcacgatgcggacgctatctccccggatggcgcgacaagctgggcgtacacaagtaaCCTAGGCTGCTG  
CGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTC  
TTGAGGGGTTTTTTGCTGAAACCTCAGGCATTTGTTTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCC  
CTTCTAGAGTCCTTACTGCAG
```

Bilag 5: crRNA i INTEGRATE-plasmidet (pSL1142)

crRNA kloneres ind i INTEGRATE-plasmidet af Genscript.com, på samme måde som cbbM-genet blev indsat. Her benyttes restriktionsenzymet BsaI til klipningen i plasmidet, og crRNA indsættes som oligonukleotider, dvs. kortere kæder af nukleotider (se Figur 10).



Figur 9: Hvor crRNA indsættes i plasmidet (pSL1142). Optegnet i Benchling.com af Postdoc Joshua T. Atkinson.

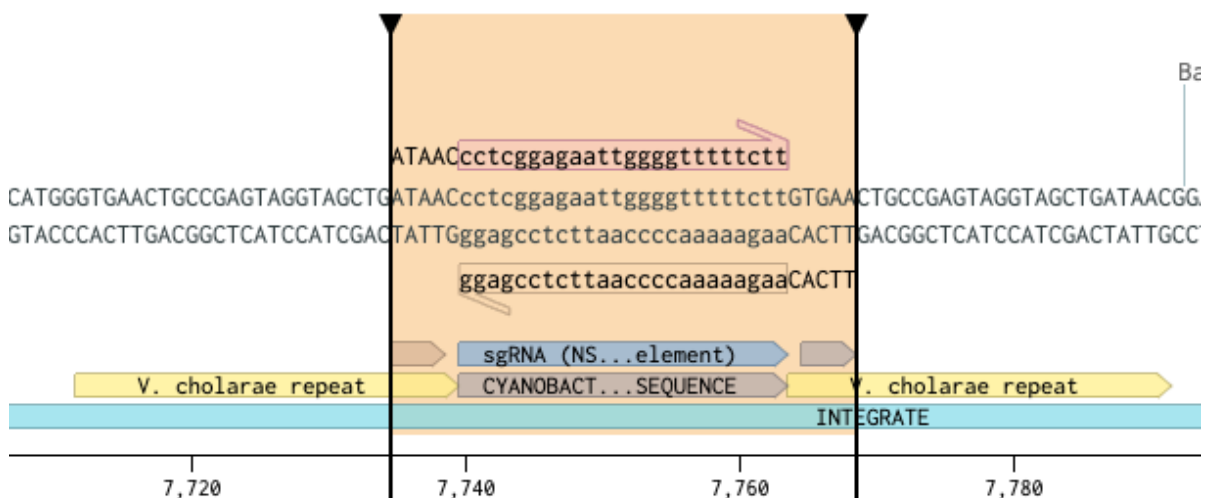
Følgende oplysninger gives ved bestillingen af kloningen:

Sekvens for den fremadrettede oligonukleotid kodende for crRNA:

5' ATAACcctcggagaattggggttttctt 3'

Sekvens for den baglænsrettede oligonukleotid kodende for crRNA:

5' TTCACaagaaaaacccaattctccgagg 3'



Figur 10: Oligonukleotider til crRNA optegnet i Benchling.com af Postdoc Joshua T. Atkinson.

Bilag 6: Primere til PCR

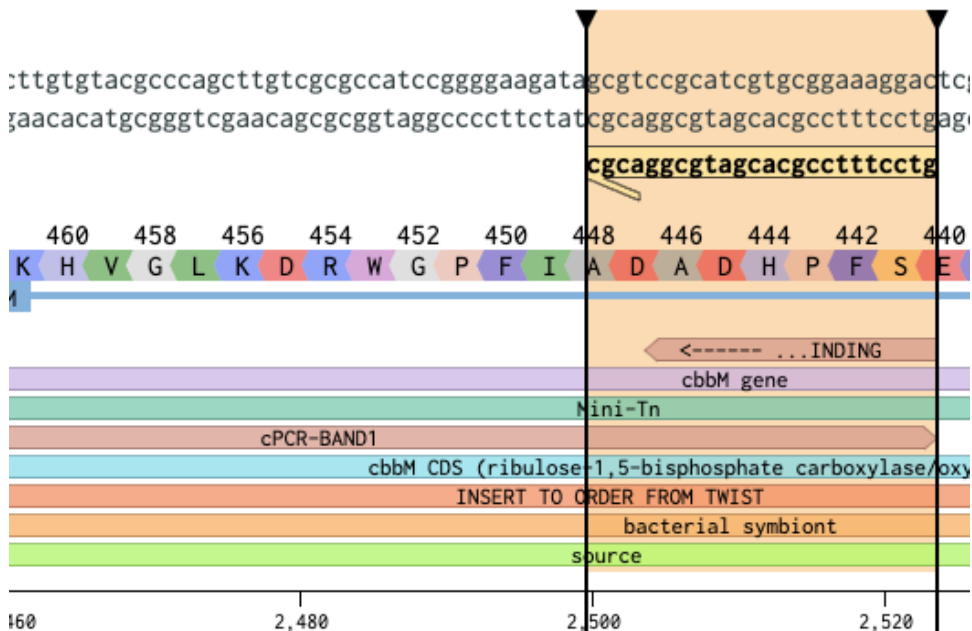
Primerne er optegnet i Benchling.com af Fridda Elinor Cecillie Raft i samarbejde med Postdoc Joshua T. Atkinson.

Ved bestilling af primere gennem Thermo Fisher Scientific indskrives følgende sekvenser (se under hvert billede).



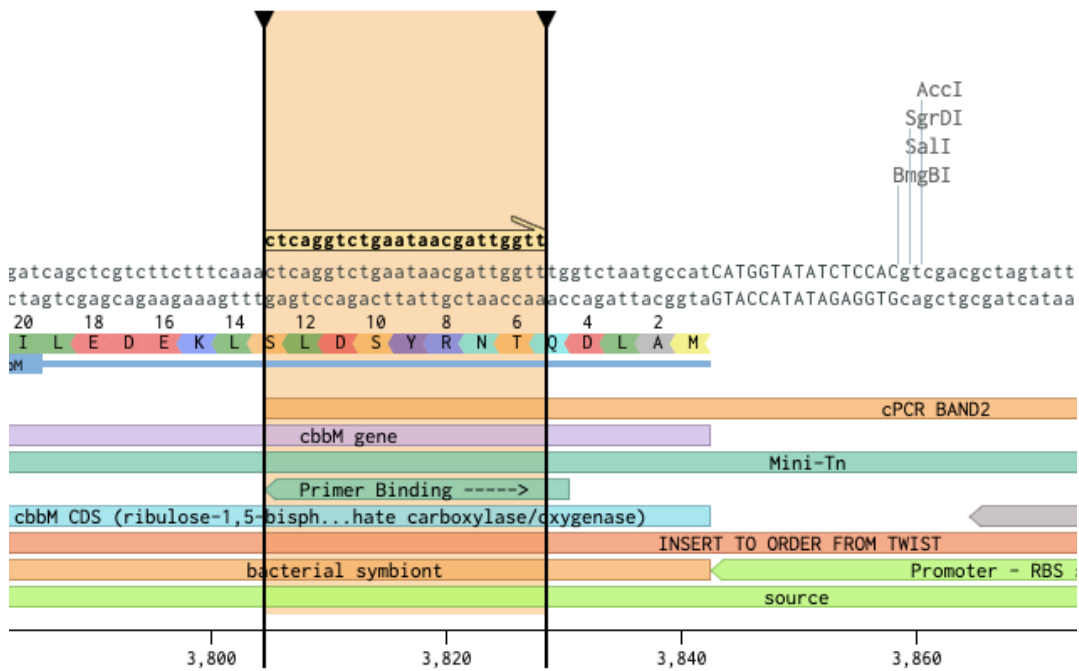
Primerens sekvens:

5' cggttaaccaagaccagccaaa 3'



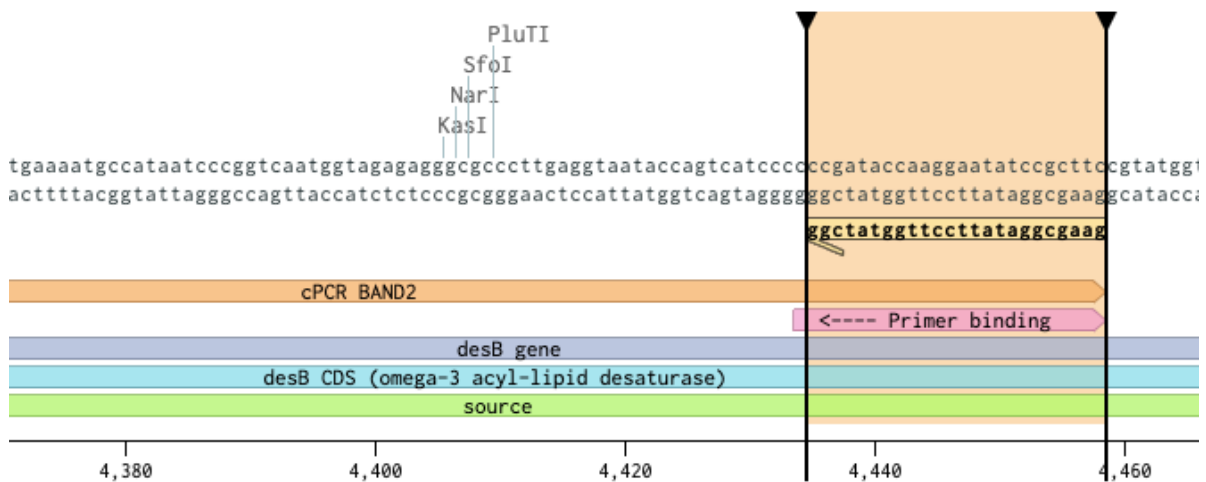
Primerens sekvens:

5' gtcctttccgacgatgcggagc 3'



Primerens sekvens:

5' ctcaggctctgaataacgattggtt 3'



Primerens sekvens:

5' gaagcggatattccttggtatcgg 3'

Bilag 7: Information omkring vækstmediet til cyanobakterierne

Vækstmediet til *Synechococcus sp. strain PCC 7002* laves efter denne procedure (hentet fra atcc.org, hvor bakterien købes) med kemikalier fra SDU:

ATCC medium: 1047 MN Marine medium (ATCC Medium 957) with 20 mcg/L of vitamin B12

ATCC Medium 957 (see below) with 20 mcg/L vitamin B12 added

ATCC Medium 957:

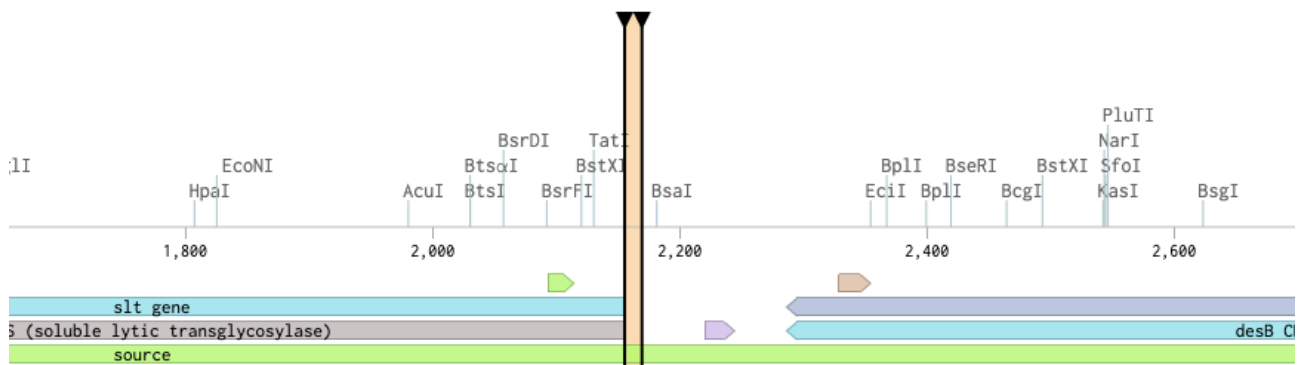
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.02 g
NaNO ₃	0.75 g
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.02 g
Citric acid	3.0 mg
Ferric ammonium citrate	3.0 mg
EDTA	0.5 mg
Na ₂ CO ₃	0.02 g
Trace Metals A-5 (see below)	1.0 ml
Agar Noble (Difco 0142) (if needed)	10.0 g
Distilled water	250.0 ml
Seawater	750.0 ml

Adjust pH after autoclaving to 8.5 with KOH.

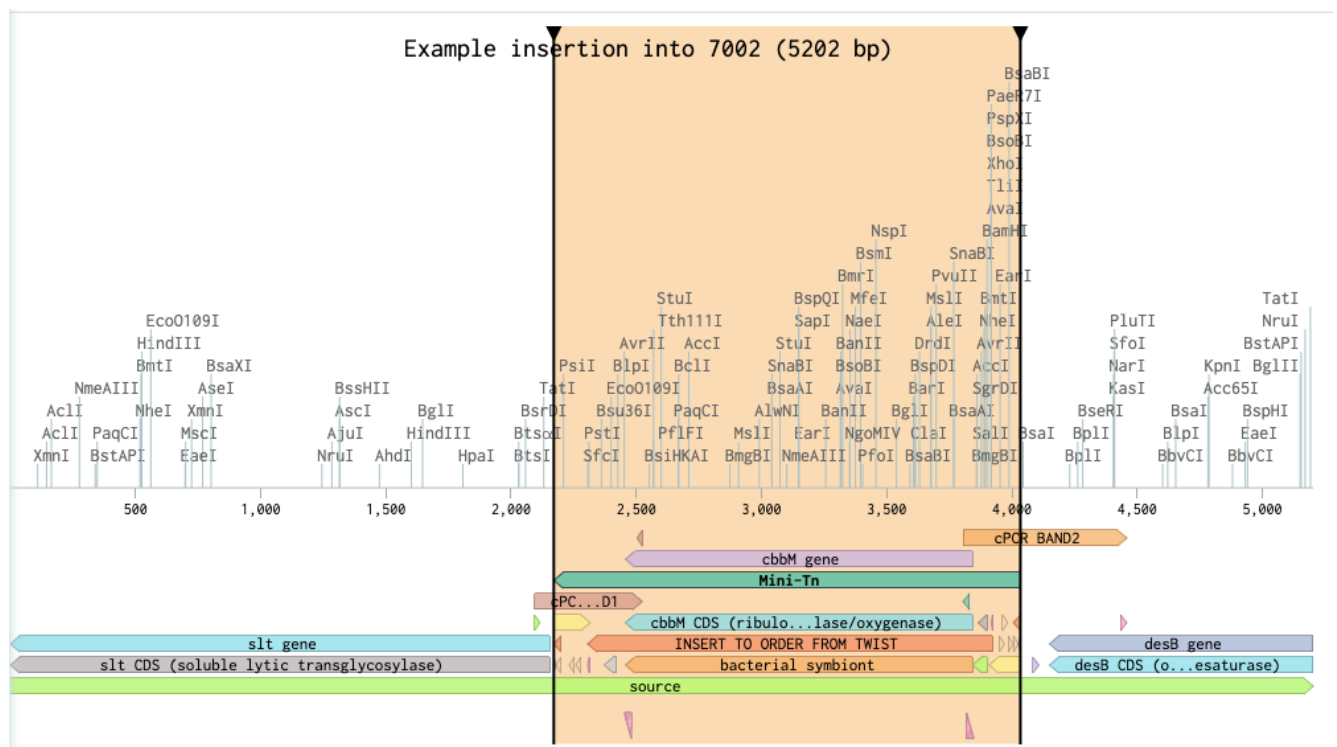
Trace Metals A-5:

H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.039 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079 g
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	49.4 mg
Distilled water	1.0 L

Bilag 8: cbbM indsættes i *Synechococcus* sp. strain PCC 7002



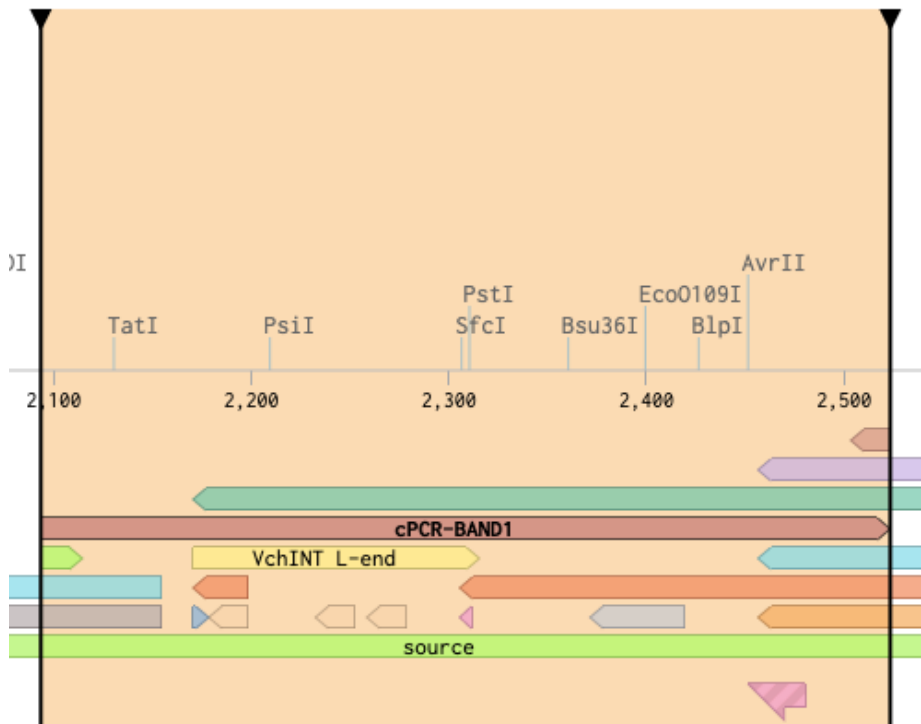
Figur 11: Stedet i *Synechococcus* sp. strain PCC 7002's genom, hvor *cbbM* indsættes ca. 50bp efter spacer-området (=target point) til *crRNA*, er markeret med den orange lodrette bjælke. Den lille trekant til højre for denne bjælke er spacer-området til *crRNA*. *Synechococcus* sp. strain PCC 7002's accession nummer er CP000951.1 (fra NCBI²⁴). Optegnet i Benchling.com af Postdoc Joshua T. Atkinson.



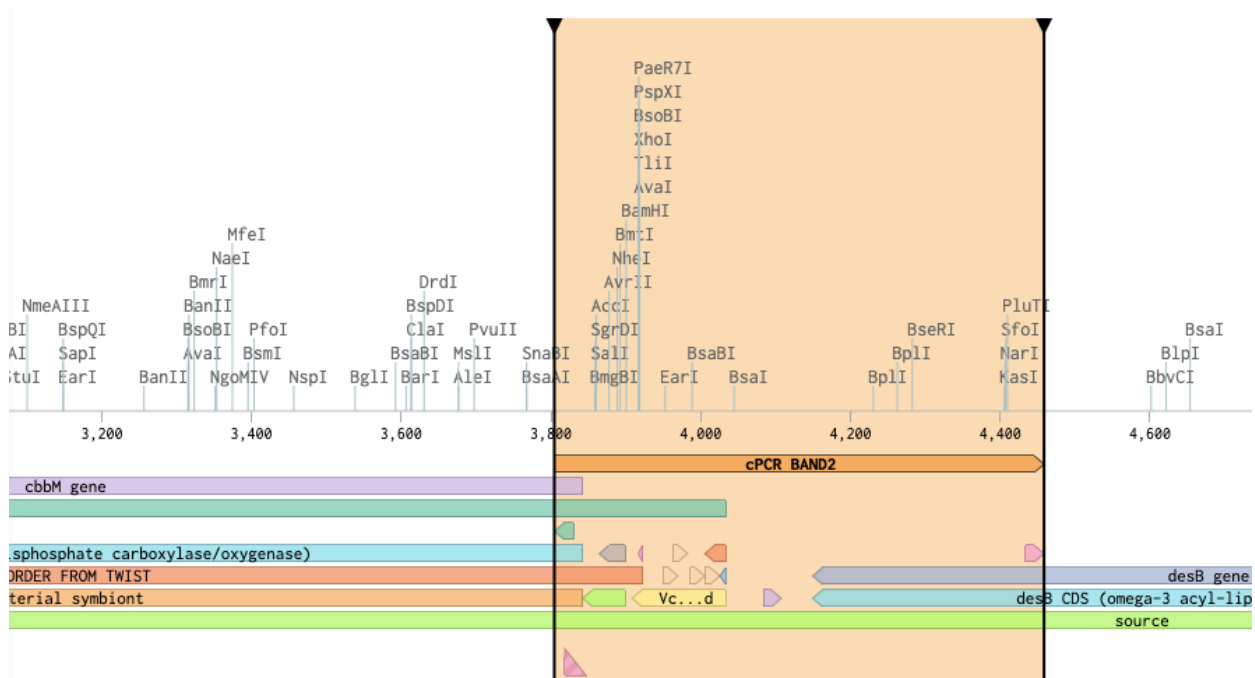
Figur 12: *cbbM*-genet indsat i *Synechococcus* sp. strain PCC 7002's genom ca. 50 bp efter spacer-området til *crRNA*. Optegnet i Benchling.com af Postdoc Joshua T. Atkinson.

²⁴ Det fulde genom af *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 findes via linket (på NCBI): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP000951.1>

Bilag 9: DNA-bånd, som ses ved PCR



Figur 13: DNA-bånd 1: Det ene overlap mellem *Synechococcus* sp. strain PCC 7002's genom og *cbbM*, som replikeres grundet primere fra *Synechococcus* sp. strain PCC 7002's genom hvor *cbbM* indsættes, og enden af *cbbM*. Overlappet er 430bp langt. Optegnet i Benchling.com.



Figur 14: DNA-bånd 2: Det andet overlap mellem *cbbM* og *Synechococcus* sp. strain PCC 7002's genom, som replikeres grundet primere fra *Synechococcus* sp. strain PCC 7002's genom hvor *cbbM* indsættes, og enden af *cbbM*. Overlappet er 654bp langt. Optegnet i Benchling.com af Postdoc Joshua T. Atkinson.