

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

DANIEL RAČICKI

Mikrobiologija

Magistro baigiamasis darbas

**Mielių ląstelių transformacijos integracinėmis plazmidėmis optimizavimas
naudojant impulsinį elektrinį lauką**

Prof., Dr., Eglė LASTAUSKIENĖ_____

Daniel Račicki_____

J. Asist. Justina VERSOCKIENĖ_____

Vilnius, 2022

Mielių ląstelių transformacijos integracinėmis plazmidėmis optimizavimas naudojant impulsinį elektrinį lauką

Darbas atliktas Biomokslų instituto Mikrobiologijos ir Biotechnologijos katedroje

Darbą atliko:

Daniel RAČICKI

/

/

Darbo vadovė:

Prof., Dr., Eglė LASTAUSKIENĖ

/

/

Darbo konsultantė:

J. Asist. Justina VERSOCKIENĖ

/

/

TURINYS

| | |
|---|----|
| SANTRUMPOS..... | 5 |
| ĮVADAS..... | 6 |
| 1. LITERATŪROS ANALIZĖ..... | 8 |
| 1.1. Mikroorganizmų privalumai ir jų panaudojimo galimybės..... | 8 |
| 1.1.1. <i>S. cerevisiae</i> privalumai ir jų panaudojimo galimybės..... | 8 |
| 1.2. Kompetentiškumas mielėse..... | 11 |
| 1.3. Transformacijos metodai..... | 13 |
| 1.3.1. Elektrotransformacija..... | 14 |
| 1.3.2. Kiti metodai..... | 16 |
| 1.4. Elektrotransformacijos efektyvumo sąlygos..... | 18 |
| 1.4.1. Elektros įtampa..... | 19 |
| 1.4.2. Elektros impulso trukmė..... | 20 |
| 1.4.3. DNR koncentracija..... | 21 |
| 1.4.4. Ląstelių augimo fazė..... | 22 |
| 1.4.5. Transformacija naudojant integracines plazmides..... | 23 |
| 2. MEDŽIAGOS IR METODAI..... | 27 |
| 2.1. Medžiagos..... | 27 |
| 2.1.1. Reagentai..... | 27 |
| 2.1.2. Rinkiniai..... | 27 |
| 2.1.3. Prietaisai..... | 27 |
| 2.1.4. Kultivavimo terpės ir jų priedai..... | 28 |
| 2.1.5. Tirpalai..... | 29 |
| 2.2. Metodai..... | 30 |
| 2.2.1. Tyrimo objektas..... | 30 |
| 2.2.2. Molekulinės biologijos metodai..... | 31 |
| 2.2.3. Mikrobiologijos metodai..... | 35 |

| | |
|--|----|
| 2.2.4. Duomenų vizualizacijos metodai..... | 36 |
| 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS..... | 38 |
| 3.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SP1 kamieno kolonijų atranka..... | 38 |
| 3.2. pNMG plazmidės skyrimas ir tikslinio fragmento nustatymas..... | 39 |
| 3.3. <i>S. cerevisiae</i> SP1 kamieno transformacijos optimizavimas pNMG plazmide..... | 40 |
| 3.4. Potencialių transformantų tikrinimas naudojant kolonijų PGR..... | 44 |
| 3.5. Transformacijos efektyvumas..... | 45 |
| IŠVADOS..... | 47 |
| SANTRAUKA..... | 48 |
| SUMMARY..... | 49 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS..... | 50 |
| PADĖKA..... | 60 |

SANTRUMPOS

2 μ – Endogeninė 2- μ m *Saccharomyces cerevisiae* plazmidė.

ARS – angl. *autonomously replicating sequence* – autonomiškai replikuojanti seka.

CEN – mielių centromerinė DNR.

DTT – angl. *1,4-Dithiothreitol* – 1,4-ditiotreitolis.

EDTA – Etilendiamintetraacto rūgštis.

EP – elektroporacija.

His – Histidinas.

YNB – angl. *Yeast nitrogen base* – mielių azoto bazė.

YPD – angl. *Yeast Extract–Peptone–Dextrose medium* – mielių ekstrakto-peptono-dekstrozės terpė.

KFV – kolonijas formuojantys vienetai

LB – angl. *Lysogeny broth medium* – lizogeninio buljono terpė.

LiAc – ličio acetatas.

OD – angl. *Optical density* – optinis tankis.

Ori – angl. *Origin of replication* – replikacijos pradžia.

PEG – polietilenglikolis.

PES – polieterio sulfonas

SC – angl. *Synthetic complete medium* – sintetinė pilna terpė.

TAE – TRIS-acetatas-EDTA.

TRIS – trisaminometanas.

IVADAS

Transformacija yra standartinė procedūra mikroorganizmų manipuliacijoje ir genų inžinerijoje, kurios metu egzogeninė DNR yra įvedama į ląstelę. Šios procedūros rezultatas – genetinė mikroorganizmo modifikacija. Transformacija gali būti vykdoma įvairiais metodais – ličio acetato, biolistiniu metodu, sferoplastų ir elektrotransformacijos būdu. Šių praktinių metodų pradžia skaitosi atradimai, atlikti 1944 metais – tuomet buvo pademonstruota, jog įmanoma transformuoti DNR. Vėliau, 1978 metais, buvo atrasta, kad PEG ir kalcio chloridas gali sukelti mielių sferoplastų transformaciją. Su laiku, buvo atrasti krioprotektantai, kurie leistų ilgam užšaldyti transformantus ir apsaugotų genetinę medžiagą nuo fizinių pažeidimų.

Lyginant su kitais metodais, elektroporacija yra labai efektyvi (iki 10^5 – 10^7 transformantų/ μg DNR). Sferoplastų metodas dažniausiai nėra naudojamas dėl to, kad vykdamas transformaciją su jais, procedūra užtrunka labai ilgai, bei gali kilti problemų su ląstelių sienelių regeneracija. Elektroporacija yra daug paprastesnis ir greitesnis metodas, kuris turi lengviau atkartojamus rezultatus. Tačiau, šis metodas taip pat priklauso nuo daugelio faktorių, pvz. ląstelių optinio tankio, naudojamos plazmidės koncentracijos ir tipo. Šiame darbe aprašytos transformacijos su integracinio tipo plazmide.

Transformacijai naudojamas mielių *Saccharomyces cerevisiae* SP1 kamienas. Šis mikroorganizmas pasirinktas dėl jo privalumų ir panaudojimo galimybių. Bandoma nustatyti optimalias transformacijos sąlygas, naudojant integracinio tipo plazmidę bei optimizuoti šias sąlygas tolimesniems transformacijos darbams. Manoma, kad transformacijos sąlygų optimizavimas būtų didelis žingsnis ties tam tikrų globalių problemų sprendimu.

Darbo tikslas: Nustatyti optimalias mielių *Saccharomyces cerevisiae* transformacijos integracine pNMG plazmide sąlygas naudojant impulsinį elektrinį lauką.

Darbo uždaviniai:

1. Išskirti integracinę pNMG plazmidę iš *Escherichia coli* DH5 α kamieno ląstelių, nustatyti jos koncentraciją ir linearizuoti restrikcijos endonukleaze.
2. Optimizuoti impulso trukmę *S. cerevisiae* SP1 kamieno transformacijoms integracine pNMG plazmide.
3. Optimizuoti pDNR koncentraciją *S. cerevisiae* SP1 kamieno transformacijoms pNMG plazmide.
4. Patvirtinti integracinės pNMG plazmidės integraciją į *S. cerevisiae* SP1 kamieno ląsteles.
5. Įvertinti mielių *S. cerevisiae* SP1 kamieno transformacijos integracine pNMG plazmide efektyvumą naudojant optimalius impulsinio elektrinio lauko parametrus.

1. LITERATŪROS ANALIZĖ

1.1. Mikroorganizmų privalumai ir jų panaudojimo galimybės

Su laiku tradiciniai ūkininkavimo būdai tampa vis mažiau efektyvūs žemės ūkio produktyvumui. Didėjant žmonijos populiacijos skaičiui, didėja ir maisto paklausa, mažėja tinkamos žemės plotas bei didėja ūkininkavimo išlaidos. Mikroorganizmų pritaikymas su biotechnologijų pagalba padeda palengvinti ir išspręsti šias problemas (Mosttafiz *et al.*, 2012). Mikroorganizmai yra pritaikę gyventi įvairiose aplinkose – vandenyje, maiste, karštosiose versmėse, ledynuose ir t.t. Plati gyvenviečių įvairovė atspindi begalę skirtingų biocheminių ir metabolinių bruožų, priklausančių nuo genetinės variacijos ir natūralios aplinkos mikroorganizmų populiacijose. Mikroorganizmų biotechnologijos, kartu su genomo tyrimais, leis mokslininkams išrasti geresnius ligų atpažinimo įrankius, kontroliuoti ir modifikuoti gyvūnų ir augalų patogenus, mažinant jų patogeniškumą, o taip pat ir išrasti naujus pramoninius katalizatorius dirvožemio ir vandens bioremediacijai. Maisto produktų apdorojimas pasitelkiant mikroorganizmus leidžia išgauti daugybę fermentuotų maistų, tokių kaip sūris, duona ir t.t.

1.1.1. *S. cerevisiae* privalumai ir jų panaudojimo galimybės

S. cerevisiae yra mielių rūšis, nuo senovės laikų tarnaujanti žmogaus reikmėms, neatsiejama kepimo ir alkoholio gamybos dalis. Tūkstančius metų šios mielės naudojamos duonos, alaus ir vyno gamybai, kadangi sugeba paversti cukrus į alkoholį ir anglies dioksidą. Šios mielės yra daugiausiai tyrinėjamas eukariotinis modelinis organizmas mikrobiologijoje. Pirmą kartą mielės, kaip eksperimentinis organizmas, buvo pasiūlytos 1935 metais (Manney & Manney, 1992), o 1960 metais mielės *S. cerevisiae* buvo pasiūlytos kaip molekulinės biologijos sistema. 1996 metais būtent šios mielės tapo pirmuoju eukariotiniu organizmu, kurio genomas buvo pilnai nusekvenuotas (Goffeau *et al.*, 1996). Dabar, *S. cerevisiae* yra geriausiai ištyrinėtas modelinis organizmas. Gauta informacija apie šio organizmo genomą yra pagrindas šių laikų tyrimams. *S. cerevisiae* genomą galima lyginti su kitų organizmų, pavyzdžiui, žmogaus arba gyvūnų DNR sekomis.

Fiziologiškai, *S. cerevisiae* ląstelės yra apvalios, kartais elipsės formos, ilgoji jų ašis 5–10 µm, o trumpoji – nuo 1 iki 7 µm. Jos yra lengvai randamos ant medžių, sunokusių vaisių, pavyzdžiui vynuogių paviršiaus. Optimali šių mielių augimo temperatūra yra 30 °C (Stefanini *et al.*, 2012), tad jas yra patogiu auginti laboratorinėmis sąlygomis, kadangi tokia temperatūra yra lengvai palaikoma.

Egzistuoja dvi mielių ląstelių formos, sugebančios augti ir daugintis: haploidinės ir diploidinės. Diploidinės mielių ląstelės streso metu gali vykdyti mejozę ir sporuliaciją, pagamindamos naują kartą aplinkai atsparesnių haploidinių sporų, galinčių daugintis tarpusavyje ir išgyventi kelis metus. Tai ypač naudinga laukiniams mikroorganizmams, kurie turi išbūti ilgus laiko periodus tarp vaisių derlių sezonų. Yra tyrimų, kurie rodo, kad mielių sporos taip pat yra atsparios *Drosophila* virškinimui, o tai rodo, kad sporas dažnai perneša vabzdžiai (Reuter *et al.*, 2007). Haploidinių ląstelių gyvenimo ciklas paprastesnis, jis susideda tik iš mitozės ir augimo. Aukšto streso lygio metu šios ląstelės miršta. Optimaliomis sąlygomis, ląstelių populiacija padvigubėja kas 100 minučių (Herskowitz, 1988).

Visi *S. cerevisiae* kamienai gali augti naudodami gliukozę, maltozę ir trehalozę, bet ne laktozę arba celobiozę. Kaip azoto šaltinis naudojamas amoniakas ir urėja, bet ne nitratai. Taip pat gali būti naudojami maži peptidai, dauguma amino rūgščių ir azoto bazės. Cistinas, glicinas, histidinas ir lizinas nėra naudojami kaip azoto šaltiniai. Užtikrinti augimui taip pat reikalingas fosforo ir sieros šaltinis (Arroyo-López *et al.*, 2009). *S. cerevisiae* yra labiau linkusios produkuoti alkoholį iš cukraus anaerobinėmis sąlygomis, net jei aplinkoje yra deguonies aerobiniam kvėpavimui. Šis reiškinys, vadinamas krabmedžio efektu (angl. *crabtree effect*) (Pronk *et al.*, 1996), yra adaptacija prie aplinkos, kurioje labai daug cukraus. Nors cukraus fermentacija 10 kartų metaboliškai mažiau efektyvesnė nei aerobinis kvėpavimas ATP generavimo atžvilgiu, ji suteikia organizmui naudos.

Pirmiausia, fermentacija išlaisvina energiją greičiau ir tuo pačiu leidžia mikroorganizmui augti greičiau nei jeigu augtų aerobinėmis sąlygomis. Populiacija, auganti greičiau, nukonkuruoja populiaciją, augančią lėčiau, net jei sunaudoja visus aplinkoje esančius resursus (MacLean & Gudelj, 2006). Fermentacijos metu į aplinką išskiriamas etanolis, anglies dioksidas ir šiluma. *S. cerevisiae* toleruoja tokias sąlygas, todėl turi privalumą lyginant su kitais mikroorganizmais. Taip

pat, tapus dominuojančiu mikroorganizmu savo aplinkoje ir išstūmus varžovus, *S. cerevisiae* pakeičia savo metabolizmą ir pradeda naudoti sukauptą etanolį kaip substratą aerobiniam kvėpavimui, taip atgaudamas dalį energijos, sunaudotos fermentacijai (Thomson *et al.*, 2005). Apibendrinus, bendra mikroorganizmo metabolinė kaina yra sumažinama dėl abiejų iš aukščiau išvardintų priešasčių (Piskur *et al.*, 2006).

Manoma, kad šis reiškinys atsirado tada, kai *Saccharomyces* genties protėvis perėjo viso genomą duplikacijos stadiją (Piskur *et al.*, 2006). Didžioji dalis padaugintų genų kopijų buvo prarastos, o daugelio iš likusių genų funkcija – dalyvauti cukraus metabolizme. Galimai dėl to šie genai nebuvo prarasti, nes jų abiejų išlaikymas lemia padidintą genų ekspresiją ir užtikrina geresnį metabolizmą (Kellis *et al.*, 2004). Taip pat, dviejų vieno geno kopijų išlaikymas leidžia vienai iš kopijų išlaikyti originalią savo funkciją, o kitai kopijai suteikiama laisvė „išmokti“ naujų funkcijų. Pavyzdys – duplikuotų *ADH1* ir *ADH2* genų pora (Thomson *et al.*, 2005). *ADH1* redukuoja acetaldehidą į etanolį anaerobinio kvėpavimo metu, o *ADH2* funkcija yra pakitusi – katalizuoja atvirkštinę reakciją, t.y. verčia etanolį į acetaldehidą, iš kurio gaminamas Acetyl-CoA, kuris keliauja į krebso ciklą. Ši neofunkcionalizacija leidžia *S. cerevisiae* ir toleruoti alkoholį, ir atgauti energiją, kuri kitaip būtų iššvaistyta fermentacijos metu.

S. cerevisiae tapo modeliniu organizmu dėl daugelio priešasčių. Kaip ir anksčiau minėta šiame darbe, ląstelių populiacija padvigubėja kas 100 minučių. Dauginasi mejozės būdu, todėl yra kandidatas lytinės genetikos tyrimams. Šios mielės yra lengvai transformuojamos pridedant naujus genus homologinės rekombinacijos būdu. Jų genomas sudarytas iš maždaug 12 milijonų bazių porų ir 6275 genų 16-oje chromosomų. Galimybė auginti šią rūšį kaip haploidus palengvina kamienų su neveikliais genais sukūrimą. Kaip eukariotas, *S. cerevisiae* turi tokią pačią kompleksinę struktūrą kaip aukštesnieji eukariotai, bet neturi tokio didelio kiekio nekoduojančios DNR (Goffeau *et al.*, 1996). Ši mielių rūšis taip pat yra svarbiausias ekonominis mikroorganizmas dėl savo plataus industrinio pritaikymo.

Apart plataus industrinio pritaikymo, *S. cerevisiae* naudojami kaip probiotikai žmonėse ir gyvūnuose. Klinikiniai tyrimai rodo, kad *S. cerevisiae var. boulardii* yra naudingas siekiant užkirsti kelią virškinimo trakto ligoms (Kelesidis & Pothoulakis, 2012). Taip pat yra tyrimų, rodančių, kad *S. cerevisiae var. boulardii* sumažina su antibiotikais susijusios diarėjos riziką tiek suaugusiems, tiek vaikams (Kelesidis & Pothoulakis, 2012; Szajewska & Kołodziej, 2015).

1.2. Kompetentiškumas mielėse

Norint sėkmingai transformuoti eukariotinę ląstelę, egzogeninė DNR turi ne tik pakliūti į ląstelės vidų, kaip yra prokariotuose, bet ir nukeliauti iki branduolio. Todėl, pakeliui į branduolį, DNR turi praeiti pro keturias natūralias kliūtis: ląstelės sienelę, ląstelės membraną, citoplazmą ir branduolinį apvalkalą. Prieš DNR integruojantis į recipientinę ląstelę, ji turi sudaryti tinkamą kontaktą su ląstelės paviršiumi. Kitaip tariant, pati DNR iš savęs, be pagalbiniu medžiagu, negali transformuoti ląstelės jei neprisijungia prie jos paviršiaus (Pham *et al.*, 2011). Kawai *et al.*, 2004 pasiūlė, kad DNR prisijungia prie ląstelės sienelės su PEG pagalba. PEG reikalingas ne tik cheminės transformacijos metu, bet ir naudojant kitus transformacijos metodus. Yra atliktų tyrimų, rodančių, kad PEG netgi padidina transformacijos efektyvumą, todėl yra begalo svarbus komponentas mielių kompetentiškume. Kompetentiškumas yra ląstelės gebėjimas prisiimti svetimą genetinę medžiagą. Išimtis, aišku, yra biolistinis ir elektroporacijos metodai, kur DNR neturi prisijungti prie sienelės, nes yra padaromos skylės sienelėje, per kurias DNR ir patenka į ląstelės vidų.

Plačiai manoma, kad ląstelės sienelė yra sunkiausias barjeras sėkmingai mielių transformacijai. Sienelė yra skersai pereinama per fizinius arba cheminius pažeidimus, arba pakeičiant jos sukibimą ir/ar pralaidumą. Laboratorijoje sukulto kompetentiškumo metu ląstelės sienelė fiziškai pažeidžiama, pavyzdžiui, fermentiškai skaidant norint išgauti sferoplastus, arba, alternatyviai, elektroporacija arba biolistinės transformacijos būdu norint padaryti plyšius, per kuriuos praeitų DNR. Cheminės ir fizikinės ląstelės sienelės pralaidumo savybės priklauso ir nuo tam tikrų genų (Kawai *et al.*, 2009), o ne tik nuo gerai žinomų aplinkos faktorių (PEG, katijonų ir t.t.).

DNR, sėkmingai įveikusi sienelės barjerą, atsiduria pozicijoje tarp sienelės ir membranos. Tai – sekantis, kritinis, žingsnis transformacijos link. DNR nėra tirpi membranoje ir turi neigiamą krūvį, todėl negali praeiti pro membraną be išorinės pagalbos. Didžiojoje dalyje transformacijos metodų, DNR skersai membraną pereina per endocitozę (arba į endocitozę panašaus proceso metu) arba kai membranos laidumas yra padidinimas (trumpalaikės poros membranoje). Vienas iš pavyzdžių trumpalaikių porų atveju – elektroporacija, kadangi elektro-difuzija varo egzogeninę DNR į ląstelės vidų būtent per laikinai susiformavusius plyšius (Neumann *et al.*, 1996). Aišku, nėra įrodymų, kad ir elektroporacijos metu DNR pasisavinti nepadedą į endocitozę panašus

procesas. Galėtų būti, kad elektrinis impulsas vis tik „prilipdo“ DNR prie membranos. Kita vertus, elektroporacija labiau panaši į biolistinį metodą, kai genetinė medžiaga yra tiesiog įšauinama į ląstelę, nepriklausomai nuo endocitozės.

Membranos pralaidumas priklauso nuo aplinkos faktorių (gali būti sukeltas žmogaus arba kaip naturalus reiškinys), o endocitozė reikalauja aktyvių, genome užkoduotų, ląstelės procesų. Aktino citoskeleto reorganizacija, endocitinis transportas, citokinezė ir membranos poliariškumas yra endocitozė užtikrinantys veiksniai (Kawai *et al.*, 2004; Neukamm *et al.*, 2002). Yra tikima, kad ląstelė į vidų priima medžiagas per nuo aktino priklausomą membranos invaginaciją, kurios metu susidaro pūslelė, kurioje internalizuojasi minėtosios medžiagos (Robertson *et al.*, 2009). Jei medžiaga, patekusi į ląstelės vidų yra DNR, tuomet ląstelė gali būti transformuota (Neukamm *et al.*, 2002).

Citozolis yra labai nepalanki aplinka laisvos formos DNR molekulėms. Į ląstelės vidų patekusi DNR turi išvengti būti sunaikinta iki įėjimo į norimos transformuoti ląstelės branduolį. Priklausomai nuo transformacijos strategijos, internalizuota DNR keliauja po citozolį arba laisvoje formoje, arba apsaugota membraniniu kaušeliu. Laboratorijoje sukeltos transformacijos metu labiau tikėtina, kad DNR bus laisvos formos. Smarkūs pH pokyčiai buvo aprašyti kaip kompetentiškumą užtikrinantis faktorius, kadangi pakitęs pH sutrikdo hidrolazių transportą ir apsaugo supakuotą DNR nuo degradacijos. Iki šiol mechanizmas, kaip DNR patenka į branduolio vidų ir kodėl ji paprasčiausiai nėra lizuojama citoplazmoje, yra neaiškus, todėl reikalingi papildomi tyrimai apie būtent šią DNR kelionės į branduolį dalį.

1 lentelė. Genai, susiję su egzogeninės DNR įsisavinimu *S. cerevisiae* (Mitrikeski, 2015).

| Genas | Geno funkcija | Kompetentiškumas |
|---|--|------------------|
| Ląstelės paviršiaus (sienelės/membranos) genai | | |
| <i>acr</i> mutantai | Atsparumas aculeacinui A, kuris inhibuoja β-gliukano sintezę | Padidėjęs |
| <i>SPFI</i> | Ca ²⁺ homeostazė | Padidėjęs |
| <i>PDE2</i> | cAMP lygis | Padidėjęs |
| <i>SRBI</i> | GDP-manozės sintezė ląstelės sienelėje | Padidėjęs |
| Nežinomas <i>SRB</i> genas | GDP-manozės sintezė ląstelės sienelėje | Padidėjęs |
| <i>SIN3</i> | Histonų deacetilimas | Sumažėjęs |
| Medžiagų transportas | | |
| <i>GCN5. NGGI. YAF9. EAF7</i> | Dalyvauja histono acetiltransferazių kompleksuose | Padidėjęs |

| | | |
|--------------------------------|---|-------------------------|
| <i>HST4, HDA2, HDA3</i> | Dalyvauja histono acetiltransferazių kompleksuose | Sumažėjęs |
| <i>GCN5, NGGI, EAF7</i> | Dalyvauja histono acetiltransferazių kompleksuose | Padidėjęs/ Sumažėjęs |
| <i>YAF9</i> | Involved in histone acetyltransferase-complexes | Sumažėjęs |
| <i>HDA3</i> | Involved in histone deacetylase-complexes | Padidėjęs |
| <i>SHE4</i> | Miozino funkcijos reguliavimas | Sumažėjęs |
| <i>ARC18</i> | Aktino integralumas | Sumažėjęs |
| <i>PDE2</i> | cAMP lygis | Padidėjęs |
| <i>SPFI, PMRI</i> | Ca ²⁺ arba Ca ²⁺ /Mn ²⁺ metabolizmas | Padidėjęs |
| <i>VPS21, VPS45, VAM6</i> | Endocitinis transportas | Padidėjęs |
| <i>YPT7, YPT51</i> | Endocitinis transportas | Padidėjęs |
| <i>STVI, VPH1, NHX1</i> | Kontroliuoja vakuolines pH sąlygas | Padidėjęs |
| <i>VPS17, APL5, VAC8, PEP4</i> | Dalyvauja autofagijoje | Padidėjęs |
| Kiti | | |
| <i>GSHI</i> | Gliutatio biosintezė | Sumažėjęs |
| <i>MAT</i> (Heterozygote) | Mating type locus | Padidėjęs |

Pagrindinis ląstelės kompetentiškumo faktorius, kaip jau minėta šiame darbe, yra jos paviršiaus charakteristika (sienelės ir/ar membranos). Daugelis genų produktų, paveikiančių transformaciją yra su tuo susiję (1 lentelė). Šie genų produktai yra atsakingi už endoplazminio tinklo reguliaciją, homeostazę, cAMP lygio palaikymą, GDP-manozės sintezę ląstelės sienelės biosintezės metu arba beta-gliukano sintezę (Kawai *et al.*, 2004; Pham *et al.*, 2011). Nors yra pastebėta tendencija, kad šių genų produktai arba padidina, arba sumažina kompetentiškumą, tačiau nėra tiksliai aiški jų funkcija kompetentiškumo procese.

1.3. Transformacijos metodai

Transformacija yra ląstelės genetinės medžiagos pakitimas, atsiradęs dėl egzogeninės genetinės medžiagos įsisavinimo per ląstelės membraną. Šis procesas bakterijose pirmą kartą buvo aprašytas *Streptococcus pneumoniae* 1928 m., o mielėse – 1978 m. Egzogeninės genetinės medžiagos internalizacija ir integracija į recipientinį genomą leidžia mikroorganizmams įgauti naujų genetinių savybių ir prisitaikyti prie aplinkos sąlygų, pavyzdžiui – atsparumas aplinkoje

esantiems antibiotikams. Tam, kad transformacija įvyktų, mikroorganizmas turi būti kompetentiškumo būsenoje. Yra tik tam tikras laiko tarpas, kiek ląstelės gali būti kompetentiškumo būsenoje ir priimti naują genetinę medžiagą. Natūralioje aplinkoje tai gali nutikti, kai ląstelės reaguoja į pakitusias aplinkos sąlygas, pvz. maisto medžiagų trūkumas. Kompetentiškumas taip pat sukliamas laboratorinėmis sąlygomis (C. Johnston *et al.*, 2014). Transformacijos metu, genetinė medžiaga pereina per aplinkoje esančias terpes, ir medžiagos pasisavinimas priklauso nuo recipiento (C. Johnston *et al.*, 2014). Transformacija vykdoma skirtingais metodais, kadangi skirtingoms mikroorganizmų rūšims išeiga kiekvienu metodu skiriasi.

Dažniausiai naudojamuose mielių transformacijos methoduose pasitelkiamas ličio acetatas, pernašinė viengrandė DNR, PEG. Įtariama, kad ličio jonai neutralizuoja neigiamą DNR molekulių krūvį ir generuoja mažas skylutes ant plazminės membranos, kad galėtų praeiti nukleino rūgštys. Viengrandė DNR veikia kaip plazmidinės DNR pernešėjas ir gali apsaugoti ją nuo endonukleazių. Kadangi pernešėjo DNR koncentracija naudojama didesnė nei plazmidinės DNR koncentracija, nėra svarbu, koks yra pernešančiosios DNR šaltinis. Tam dažnai naudojama lašių sperma. PEG, tuo tarpu, naudojamas DNR prisijungimui prie ląstelės sienelės.

DNR, naudojama transformacijos metu, turi turėti selektyvų žymenį, pagal kurį galima būtų atpažinti transformantus. Po transformacijos, ląstelės yra užsėjamos ant selektyvios terpės, kurioje gali augti tik transformuotos ląstelės (Gelperin *et al.*, 2005). Šiame darbe bus aprašyta transformacija su *URA3* selektyviu žymeniu.

1.3.1. Elektrotransformacija

Elektrotransformacija yra vienas plačiausiai naudojamų metodų mikrobiologijoje norint pernešti svetimą DNR į norimas ląsteles. Tai yra daroma paveikus ląsteles stipriu ir trumpu elektriniu lauku, taip padidinant ląstelės membranos pralaidumą (Aune & Aachmann, 2010; Neumann *et al.*, 1982). Elektrotransformacija naudojama įvesti DNR į įvairių bakterijų ir mielių ląsteles. Transformacijos metu, kelių tūkstančių (priklausomai nuo mikroorganizmo) voltų įtampa praleidžiama per vieną ar du milimetrus suspenduotų ląstelių elektroporacijos kiuvetėje. Po elektrinio impulso, ląstelės turi būti specifiskai apdorojamos taip, kad užsivertų ląstelės sienelėje esančios poros, o ląstelės turėtų galimybę daugintis ir išlaikyti įterptą genetinę informaciją.

Elektrotransformacija yra laikoma efektyviausiu transformacijos būdu ir net iki dešimt kartų efektyvesnė nei cheminė transformacija (Neumann *et al.*, 1982).

Pirmoji *S. cerevisiae* elektroporacija atlikta Hashimoto *et al.*, 1985. Delorme, 1989 bandė nustatyti optimalias transformacijos sąlygas elektroporacijai, suspenduodamas *S. cerevisiae* ląsteles YPD terpėje ir išsėdamas jas ant selektyvios terpės. Jo nustatytos optimalios sąlygos buvo: 900 V įtampa; elektraporuojamos ankstyvosios log-fazės ląstelės ($OD_{600} = 0,3 - 1,0$) kai ląstelių tankis $OD_{600} = 10-20$ ir aplinkoje yra mažiau nei $0,1 \mu\text{g DNR}$; pernešančios DNR nebuvimas. Delorme gavo $1000-4500 \text{ KFV}/\mu\text{g}$ plazmidinės DNR. Vėliau, šis efektyvumas buvo vis didinamas, Becker & Guarente, 1991 m. atrado, kad sorbitolis suteikia osmotinio palaikymo funkciją ir didina transformacijos efektyvumą. Jie gavo $2-5 \times 10^5$ transformantų/ $\mu\text{g DNR}$. Nuo tada, sorbitolis tapo standartu kuriant protokolus *S. cerevisiae* elektrotransformacijai. Atrasta, kad LiAc ir DTT sinergiškai taip pat didina transformacijos efektyvumą.

Elektrotransformacija dažnai naudojama ir labai efektyvi norint įvesti svetimus genus į audinių kultūrų ląsteles, ypač į žinduolių ląsteles (Bak *et al.*, 2018). Pavyzdžiui, šis metodas naudojamas sukuriant „knockout“ peles genų terapijoje, taip pat ir šalinant auglius. Svetimos DNR įvedimas į aukštesniųjų eukariotų ląsteles yra vadinamas transfekcija. Įrodyta, jog elektrotransformacija yra efektyvi *in vivo* panaudojimui audiniams, *in utero* ir *in ovo* transfekcijoms. Vienas neigiamas aspektas yra tas, kad po elektrotransformacijos gali būti paveikta genų ekspresija (Satkauskas *et al.*, 2002).

Elektrotransformacija vykdoma elektroporatoriais – prietaisais, kurie sukuria elektrinį pulsuojantį lauką. Ląstelių suspensija pipetuojama į elektroporacijos kiuvetę, kuri sudaryta iš stiklo arba plastiko ir turi du elektrodus šonuose. Bakterijų ir mielių transformacijai naudojamos kompetentinės ląstelės ir jos maišomos su $10-100 \text{ ng}$ plazmidžių. Mišinys yra įpipetuojamas į kiuvetę, nustatomos atitinkamos sąlygos elektroporatoriuje ir kiuvetė įstatoma į elektroporatorių. Iškart po elektroporacijos, įdedamas specialus tirpalas, kad ląstelės atsigautų po elektros šoko ir suspensija perkeliama į naują mėgintuvėlį. Mielių atveju naudojamas sorbitolio tirpalas. Baigus elektroporaciją, ląstelės perkeliama į reikiamą terpę ir auginamos (Thompson *et al.*, 1998).

Rezultatas priklauso nuo plazmidžių grynumo. Plazmidės su didele druskų koncentracija gali sukelti elektrinę iškrovą, o tai sumažina ląstelių išgyvenamumą. Norint optimizuoti rezultatus,

reikia atkreipti dėmesį į elektroporatoriaus nustatymus ir į pradinės suspensijos sudedamąsias dalis, pavyzdžiui anksčiau minėtą druskų koncentraciją. Kadangi ląstelės membrana beveik nėra pralaidi molekulėms, ji veikia kaip elektrinis kondensatorius. Paveikus membranas aukštos įtampos elektriniu lauku, jos laikinai sudaro poras, kurios yra pakankamo dydžio, kad praleistų makromolekules į ląstelę (Potter, 2003).

Ląstelių laikymas šaltai (prie 0 °C) dažniausiai padidina ląstelių išgyvenamumą, o tai lemia labiau efektyvią transformaciją, ypač kai elektroporuojama naudojant didelę įtampą (Potter *et al.*, 1984). Tačiau, Chu *et al.* (1991) atrado, kad naudojant mažą įtampą, kai kurios ląstelės transformuojasi efektyviau kambario temperatūroje. Kitas faktorius, prisidedantis prie ląstelių žūties yra pH pasikeitimas, kuris atsiranda dėl elektrolizės prie elektrodų. Problema gali būti išspręsta pridendant buferinio tirpalo, pvz. 20 mM HEPES, pH 7,5. Elektrotransformacijos metodu galima gauti 1×10^6 transformantų/ μg plazmidinės DNR (Suga & Hatakeyama, 2003).

1.3.2. Kiti metodai

1.3.2.1. Sferoplastų metodas

S. cerevisiae transformacija sferoplastų metodu pirmą kartą atlikta Hinnen *et al.*, 1978. Buvo transformuoti sferoplastai, kurie buvo paruošti fermentiškai apdorojant *S. cerevisiae leu2 3-112* mutantų ląsteles kartu su chimerine plazmidine DNR, kuri savyje turėjo *LEU2* žymenį. Transformacijos efektyvumas tebuvo 30-50 transformantų/ μg plazmidinės DNR. Plazmidinė DNR šio metodo metu turi integruotis į chromosominę DNR, kad gautume stabilius transformantus. Tais pačiais metais metodo efektyvumas buvo padidintas iki 10^4 transformantų/ μg plazmidinės DNR, naudojant DNR su endogenine ARS.

Metodo principas yra dalinis ląstelės sienelės suardymas fermentais, pavyzdžiui, litikaze. Aukščiausias šio metodo efektyvumas užfiksuotas 2×10^7 ir 5×10^6 transformantų/ μg viengrandės ir dvigrandės DNR, atitinkamai. Transformacija geriausiai vyko, kai sferoplastų koncentracija svyravo nuo 3×10^7 iki $3 \times 10^8/\text{ml}$ mišinio ir kai viengrandės plazmidinės DNR kiekis buvo 1–3 μg . Didinant sferoplastų ir DNR kieki, transformacijos efektyvumas mažėjo. Tai reiškia, kad tinkama sferoplastų koncentracija ir DNR kiekis yra kritiškai svarbus dideliame transformacijos efektyvumui.

Kai Hinnen *et al.*, 1978 straipsnio autoriai naudojo DNR pernešėją, transformacijos efektyvumas priklausė ir nuo pernešančiosios DNR koncentracijos. Šio metodo transformacija su dvigrande DNR yra kelis kartus mažiau efektyvesnė nei su viengrande. Lyginant su kitais metodais, šiame nereikalaujama LiAc ir termošoko. Nepaisant savo aukšto efektyvumo, šis metodas nėra populiarus dėl savo sunkumo ir tikriausiai todėl, kad transformantai tarsi įauga į agarą ir yra netinkami tolimesnei analizei. Šis metodas vis dar naudingas kai yra naudojamos 100–1000 kb dydžio mielių dirbtinės chromosomos arba kai yra dirbama su prionų tyrimais (Hinnen *et al.*, 1978).

1.3.2.2. Ličio metodas

Ličio metodas publikuotas 1983 metais (Ito *et al.*, 1983). Atrasta, kad vienvaleščiai katijonai, tokie kaip Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺ ir, ypač, Li⁺, bet ne dvieneščiai katijonai, tokie kaip Ca²⁺, padidina *S. cerevisiae* ląstelių transformacijos efektyvumą. Viena iš galimų priežasčių, kodėl monovalentiniai katijonai yra veiksmingi, yra jų sukeliamas lengvas chaotropinis efektas transformacijos metu. Originalus protokolas sukurtas Ito *et al.*, 1983, jame įvesti 4 pagrindiniai principai – būtinas PEG; būtinas LiAc; karščio šokas 42 °C padidina transformacijos efektyvumą (ne kaip sferoplastų metode); aukščiausias efektyvumas pasiekiamas, kai ląstelės yra vidurinėje eksponentinėje fazėje (OD₆₁₀ = 1,6). Galima naudoti ir LiCl, tačiau LiAc yra efektyvesnis beveik dvigubai. Šis metodas yra greitesnis, paprastesnis ir lengvesnis nei sferoplastų metodas. Originaliame protokole minėtajame 1983 metų straipsnyje buvo išgautas 450 transformantų/μg DNR efektyvumas. PEG buvo naudotas todėl, kad buvo žinomas jo efektyvumas sferoplastų metode, o litis pasirinktas todėl, kad yra žinomas jo efektyvumas eliuojant neorganinį polifosfatą – neigiamai įkrautą makromolekulę, panašią į DNR. Ličio metodas nereikalauja specialios įrangos ir regeneracinio agaro, kaip sferoplastų metodas. Gietz ir jo bendradarbiai sugebėjo padidinti efektyvumą iki 5×10^6 – 1×10^7 transformantų/μg plazmidinės DNR sumaišant sveikas ląsteles su PEG, LiAc, plazmidine DNR ir viengrande DNR bei inkubuojant jas 42 °C 40–60 minučių. (Daniel Gietz & Woods, 2002; Schiestl & Gietz, 1989). Gietz ir Schiestl taip pat sėkmingai užšaldė kompetentes ląsteles naudodami glicerolį ir DMSO.

Ličio metodas turi ir kitų variacijų, pavyzdžiui, 2-merkaptoetanolio, ditionitrolio (DTT), DMSO arba etanolio pridėjimas. Taip pat, galima keisti temperatūrą į 45 °C, arba nenaudoti LiAc

(Yamakawa *et al.*, 1985). Šio metodo rezultatai priklauso nuo transformuojamo kamieno, bet pats metodas yra paprastas.

1.3.2.3. Biolistinis metodas

Ląstelės gali būti transformuojamos DNR-padengtomis metalinėmis mikrodalelėmis, kurios šaunamos į ląsteles (Klein *et al.*, 1987). Armaleo *et al.* pademonstravo, kad *S. cerevisiae* ląstelės gali būti transformuojamos biolistiniu, kitaip vadinamu bombardavimo, metodu (Armaleo *et al.*, 1990). Jie atrado, kad ląstelės vidurinėje-stacionariojoje augimo fazėje yra efektyviausios šiam metodui, ne kaip kituose metoduose. Aukštam transformacijos našumui reikalingas osmotinis palaikymas 0,75 M sorbitoliu ir 0,75 M manitoliu. Tarp ištirtų metalų (W, Pt, Fe, Au ir Ir), volframas (W) yra efektyviausias. Stabilūs transformantai atsiranda vienai dalelei, 0,5–0,65 μm dydžio, patekus į ląstelę. Norint padengti volframą, reikalingas atitinkamas kiekis CaCl₂, tuo tarpu plazmidinei DNR reikalingas spermidinas. Optimaliomis sąlygomis gaunama tik 500 transformantų/μg plazmidinės DNR iš 10⁸ ląstelių. Nors transformacijos efektyvumas biolistiniu metodu yra mažas, tačiau mitochondrinė *S. cerevisiae* transformacija yra pavykusi tik šiuo metodu (S. Johnston *et al.*, 1988).

1.3.2.4. Stiklo rutuliukų metodas

Costanzo & Fox, 1988 m. pademonstravo, kad sveikos ir nepažeistos *S. cerevisiae* ląstelės gali būti transformuojamos jas agituojant stiklo rutuliukais. Agitavimui naudojama vorteksinė maišyklė. Transformacijos mišinyje turi būti pernešančioji DNR ir reikalingas 1 M koncentracijos sorbitolis osmotiniam palaikymui. Šis metodas labai žemo efektyvumo, gaunama tik 300 transformantų/μg plazmidinės DNR. Yra ir privalumų – nereikalingas specialus pasiruošimas, ląstelės gali būti transformuojamos bet kokioje augimo stadijoje ir užtenka ląsteles agituoti 15–45 sekundes.

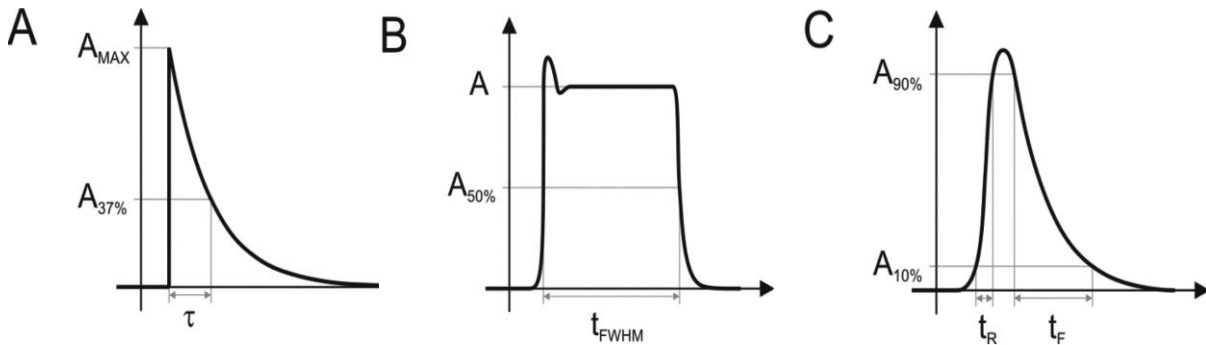
1.4. Elektrotransformacijos efektyvumo sąlygos

Transformacijos efektyvumas priklauso nuo daugelio skirtingų faktorių. Skirtingos mielių rūšys ir netgi kamienai skirtingai pasisavina skirtingą svetimos DNR kiekį. Didžioji dalis transformacijos protokolų sukurta būtent *S. cerevisiae* ir gali būti neoptimalūs kitoms rūšims. Net tarp tos pačios rūšies mikroorganizmų egzistuoja skirtingi kamienai, kurie turi skirtingus transformacijos efektyvumus. Transformacijos efektyvumas priklauso nuo daugelio faktorių, net

gi nuo to, kokios plazmidės yra naudojamos. Pagrindinės šiame darbe nagrinėjamos sąlygos yra: elektrinio lauko stiprumas (V/cm); elektros impulso trukmė (ms); DNR koncentracija ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Ląstelės ir medžiagos, naudojamos transformacijos metu, privalo būti laikomos šaltai. Pagal (Becker & Guarente, 1991) maža temperatūra ir sorbitolio buvimas transformacijos mišinyje užtikrina osmotinį balansą ir didina transformacijos efektyvumą. Centrifugavimui naudojami rotorai, apsisukimų greitis ir laikas nėra kritiškai svarbios sąlygos.

1.4.1. Elektros įtampa

Elektros įtampa laikoma svarbiausiu veiksniu norint sukurti aukšto efektyvumo *S. cerevisiae* elektroporacijos sistemą. Įtampa turi būti pakankamai didelė, kad atsivertų poros ląstelių sienelėse ir membranose, bet tuo pačiu ir pakankamai žema, jog išvengtume ląstelių žūtis. Optimalus įtampos tarpas yra neįtikėtinais siauras ir varijuoja tarp skirtingų kamienų (Delorme, 1989). Delorme tyrimuose egzistavo 100 V optimalus tarpas tarp efektyvios transformacijos ir padidėjusios ląstelių mirties. Tačiau reikia turėti omenyje, kad tais metais buvo naudojami kitokie elektroporatoriai ir kitoks transformacijos protokolas. Apart pačios įtampos, svarbus ir elektroporatoriaus generuojamas elektrinis impulsas (1 pav.).

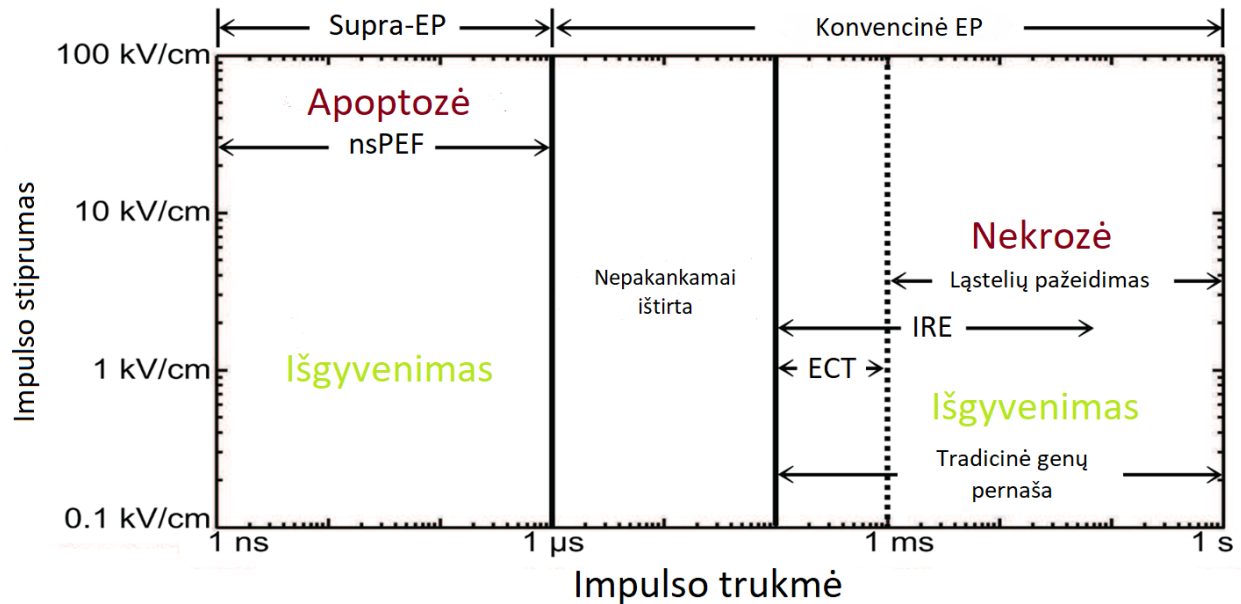


1 pav. Skirtingi generuojami elektriniai impulsai. (A) Ekspontinio mažėjimo elektrinis impulsas charakterizuojamas maksimalia amplitudute (A_{MAX}) ir laiko konstanta (τ). (B) Kvadratinis pulsas, charakterizuojamas amplitudute (A) ir pulso trukme (t_{FWHM}). (C) Varpo formos impulsas charakterizuojamas maksimalia amplitudute (A_{MAX}), įtampos didėjimo laiku (t_R) ir įtampos mažėjimo laiku (t_F) (Rebersek et al., 2014).

Šiame darbe naudojamas elektroporatorius, kuris generuoja impulsą, parodytą „B“ dalyje. Šis impulsas užtikrina pastovią norimą įtampą per nustatytą laiką, todėl yra pranašesnis už kitus pavaizduotus elektrinius impulsus.

1.4.2. Elektros impulso trukmė

Norint sudaryti poras eukariotų sienelėse ir/ar membranose, labai svarbi yra ne tik įtampa, bet ir paties elektrinio impulso trukmė. Kaip ir su įtampa, yra tik tam tikras diapazonas elektrinio impulso trukmės, kuomet susidaro poros. Jei impulsas per trumpas – nesudarys poros, o jeigu per ilgas, tai rizikuojama pražudyti ląsteles. Elektroporatoriai dažniausiai gali generuoti impulsą nuo 1 ns iki 1 s. Šio proceso metu taip pat generuojamas mažas šilumos kiekis, bet šis yra statistiškai nereikšmingas, kadangi naudojame atšaldytus tirpalus ir šaltą ląstelių kultūrą. 3 pav. nurodoma diagrama, kurioje matomos skirtingos pulso trukmės, įtampos dydis ir šių parametru įtaka ląstelių populiacijos išgyvenamumui bei transformacijos efektyvumui. Teigiama, kad nuo 1 ns iki 1 μ s esant aukštai įtampai vyksta apoptozė, o esant įtampai iki maždaug 30 kV/cm ląstelės išgyvena, bet nesitransformuoja. Konvencinė elektroporacija vyksta nuo 1 μ s iki 1 s, bet nuo 1 μ s iki maždaug 600 μ s yra neištirta zona, o nuo 600 μ s iki 1 s yra efektyvi genų pernaša. Diagramoje nurodoma, kad esant aukštai įtampai prie tokios impulso trukmės vyksta nekrozė, bet reikia turėti omenyje, kad rezultatai skiriasi priklausomai nuo elektroporatoriaus generuojamo impulso. Diagrama taip pat pritaikyta ne būtent mielėms, o bendrai eukariotų ląstelėms. Iki 1 ms trukmės taip pat vykdoma elektrochemoterapija. Šiame magistriniame darbe būtent ir nagrinėjamos sąlygos nuo 0,5 ms iki 1 ms. Bakalaurinio darbo metu buvo įrodyta, kad tokia trukmė yra efektyvi bakterijų ir mielių transformacijoms (Račicki, 2020).



2 pav. Diagrama numanomų elektroporacijos efektų ir aplikacijų priklausant nuo įtampos dydžio ir impulso trukmės. nsPEF – nanosekundinis pulsuojantis elektrinis laukas, IRE – negrįžtama elektroporacija, ECT – elektrochemoterapija, Supra-EP – trumpos trukmės ir labai didelio stiprumo elektroporacija (Weaver et al., 2012).

1.4.3. DNR koncentracija

Transformacijos efektyvumas gali būti apibūdinamas kaip transformantai/ μg DNR arba kaip bendras transformantų skaičius per vieną elektroporaciją. Dažniau naudojama transformantų/ μg DNR statistika. Weaver *et al.*, 2012 atrado, kad daugiausia transformantų/ μg DNR gaunama, kai naudojama 0,1 μg plazmidinės DNR. Norint gauti tiesiog daugiau transformantų, galima naudoti ir daugiau – iki 1 μg DNR. Didesnė DNR koncentracija transformacijos mišinyje nereiškia, kad užaugs daugiau KfV ant lėkštutės. 4 pav. nurodoma skirtingo DNR kiekio įtaka transformacijos efektyvumui. Weaver taip pat aprašo, kad transformantų skaičius priklauso ir nuo plazmidės konstrukcijos (žr. 1.4.5. skyrių), kaip pavyzdys pateikiamos plazmidės su *ura3* žymeniu – jas naudojant transformacijoms gaunamas mažesnis efektyvumas, nei naudojant plazmidės su *trp* žymeniu. (Becker & Guarente, 1991) teigia, kad optimaliausios sąlygos yra 100-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNR.

2 lentelė. Transformacijos efektyvumas naudojant skirtingą DNR kiekį (Weaver et al., 2012).

| DNR kiekis (μg) | 1 bandymas | | 2 bandymas | |
|---------------------------------|--------------|------------------------|--------------|------------------------|
| | KFV/lėkštutę | KFV/ μg DNR | KFV/lėkštutę | KFV/ μg DNR |
| 0.1 | 77 | 770 | 165 | 1,650 |
| 0.5 | 110 | 220 | - | - |
| 1.0 | 110 | 110 | 302 | 302 |
| 2.0 | 149 | 75 | 290 | 145 |
| 5.0 | 112 | 22 | 266 | 53 |
| 10.0 | 122 | 12 | 358 | 35 |

1.4.4. Ląstelių augimo fazė

Ląstelių augimo fazė yra dar vienas kritinis veiksnys norint atlikti sėkmingą transformaciją. Mielės esančios eksponentinio augimo fazėje lengviau transformuojasi nei mielės, esančios lag fazėje arba stacionariojoje augimo fazėje. Žūtis fazė atmetama, kadangi jau per vėlu bandyti jas transformuoti paprasčiausiai dėl to, kad jos ir taip žūsta, o elektrinis impulsas tiesiog paspartina šį procesą. Stacionariosios augimo fazės ląstelės turi jau pilnai susiformavusią, tvirtesnę sienelę, kurioje sunku sudaryti poras, per kurias galėtų praeiti genetinė medžiaga (Werner-Washburne & Singer, 1993). Na, o lag fazėje yra tiesiog per mažai ląstelių ir jos tik pradeda formotis, tad elektroporacija nėra įmanoma. Mums tinka eksponentinio augimo fazė, kurios metu ląstelės yra imlios aplinkos medžiagoms ir jau yra susiformavusi sienelė, kurią pakankamai lengva laikinai „atidaryti“. Becker & Guarente, 1991 siūlo, kad geriausias efektyvumas yra, kai pradinė kultūra užauga iki $OD_{600} = 0,3-1,0$. Palyginimui autorius pateikia transformacijos efektyvumą, kai kultūra auginama iki $OD_{600} = 6$ ir $OD_{600} = 11$. Efektyvumas sumažėja 4,5 karto ir 22,5 karto, atitinkamai.

Kalbant apie kompetentinių ląstelių optinį tankį, geriausi rezultatai gaunami, kai ląstelės sukonzentruojamos iki $OD_{600} = 10-20$ ($1,4 \times 10^8 - 2,8 \times 10^8$ KFV/ml) (Becker & Guarente, 1991). Kitame straipsnyje, (Wu & Letchworth, 2004), autoriai teigia nežinantys, kodėl didėja transformacijos efektyvumas didinant ląstelių OD_{600} , bet gauna panašius rezultatus, kaip Becker ir Guarente.

1.4.4. Transformacija naudojant integracines plazmides

Mielių integracinės plazmidės (YIp) yra įterpiamos į šeimininko ląstelės genomą. Kai jos integruojasi, plazmidės yra replikuojamos ir perduodamos į dukterines ląsteles kaip chromosomos dalis. Integracinės plazmidės taikosi į sekas, kurios yra homologinės genominiam lokusui. Priklausomai nuo mielių kamieno ir integracijos saito, net tokia maža homologinė seka kaip 30 bp yra pakankama naujai transformantų kartai. Tačiau, taikininės (homologinės) sekos (angl. *targeting sequences*) susideda iš kelių šimtų bazių porų, kad užtikrintų efektyvią integraciją (Manivasakam *et al.*, 1995).

Integracinės plazmidės integruojasi į šeimininko ląstelės genomą per homologinę rekombinaciją (Kowalczykowski, 2015; Symington *et al.*, 2014). Priklausomai nuo skaičiaus ir lokalizacijos taikininėse sekose, integracija vyksta per viengubo krosingoverio mechanizmą. Dažniausiai naudojamos integracinės plazmidės naudoja krosingoverio mechanizmą. Tokios plazmidės savyje turi vieną tęstiną taikininę seką.

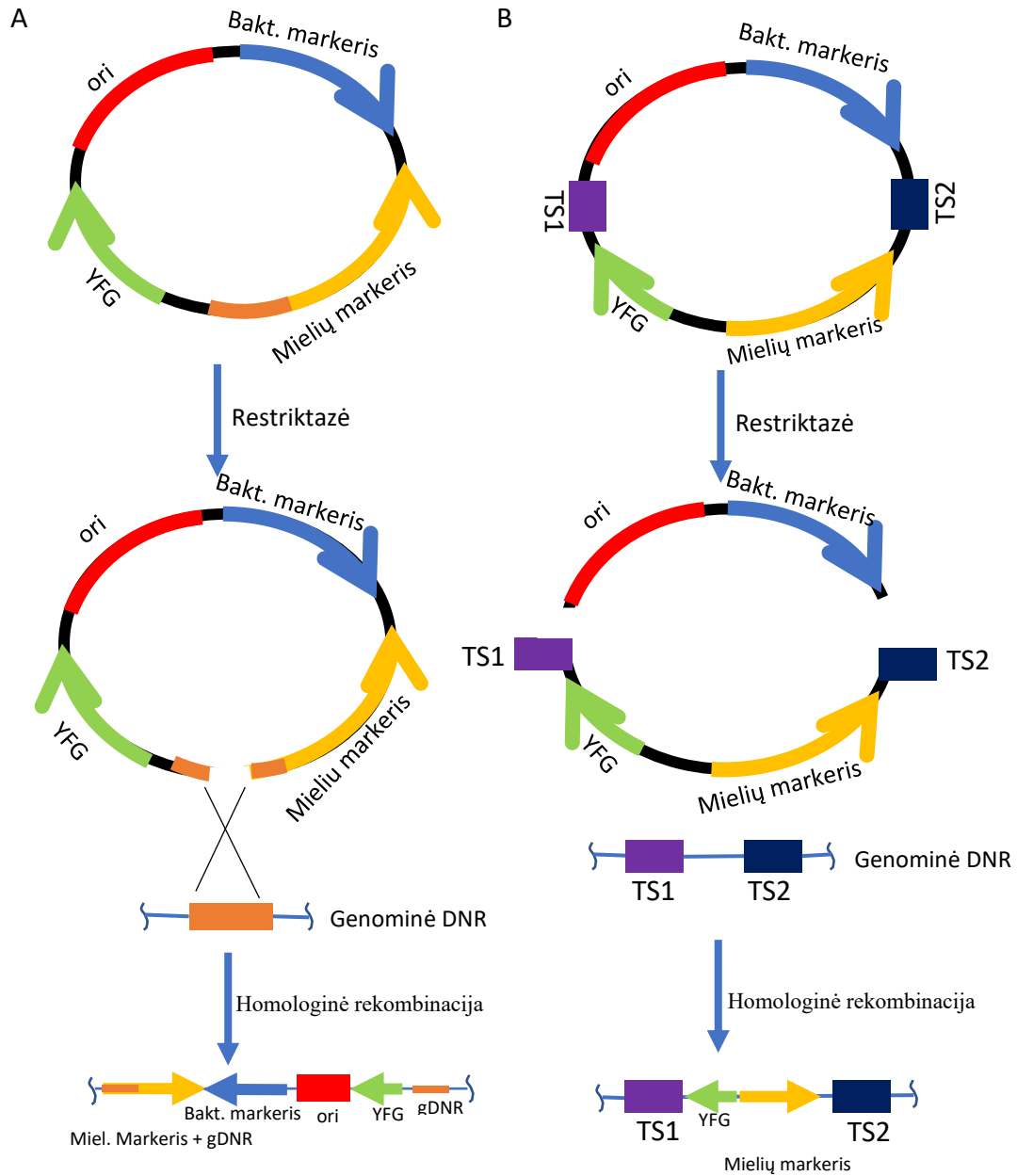
Transformantuose integruota plazmidės dalis yra padauginama. Iki transformacijos plazmidė yra paverčiama linijine tarp taikininės sekos naudojant atitinkamus restrikcijos fermentus. Tai padidina transformacijos efektyvumą ir apibrėžia genomines integracijos saitą (Orr-Weaver *et al.*, 1981). Jei integracinė plazmidė turi keletą sekų, kurios yra homologinės mielių genominiam lokusui, sekos artimiausios įkirpimui apibrėžia integracijos saitą (Hicks *et al.*, 1979; Orr-Weaver *et al.*, 1981). Taikininės sekos neturi būti linijinės plazmidės galuose, kad vyktų sklaidi integracija. Jei reikia, rekombinacijos faktoriai nukerpa nehomologines sekas, esančias galuose (Ma *et al.*, 1987; Svetec *et al.*, 2007). Integracinės plazmidės, kurios integruojasi dvigubo krosingoverio mechanizmu yra įterpiamos į šeimininko ląstelės genomą genų pakeitimo būdu (Rothstein, 1983). Jos savyje turi dvi taikininės sekas, kurios apsupa plazmidės dalį, kuri bus integruota (Gnügge *et al.*, 2016; F. W. F. Lee, 1997.; Taxis & Knop, 2006; Voth, 2001; Wosika *et al.*, 2016). Kirpimas taikininėse sekų išorėje išlaisvina integracinę plazmidės dalį. Todėl, nereikalingos plazmidės sekos gali būti pašalintos iš integracijos. Mielių integracinių plazmidžių integracija dvigubo krosingoverio mechanizmu lemia genomine konfigūraciją be tiesiogiai pasikartojančių sekų. Todėl, plazmidės integruojasi su viena plazmidine kopija ir yra segregaciškai stabilios (Taxis & Knop, 2006).

Plazmidžių integracija viengubo krosingoverio mechanizmu lemia genomine konfigūraciją kai integruota plazmidė apsupta tiesioginių integruotos plazmidės dalių pasikartojimais. Ši konfigūracija sumažina struktūrinį stabilumą, kadangi rekombinacija tarp tiesioginių pasikartojimų yra įmanoma (Rothstein, 1991). Tokios plazmidės gali būti prastos dažniu – 1 %/ląst. dalijimasis (Hinnen *et al.*, 1978; Hicks *et al.*, 1979). Plazmidinio žymens selekcija neužtikrina sveikų transformantų, nes dalis plazmidės gali būti išlindusi iš integracijos saito (angl. *looped out*), o selekcijos žymuo, tuo tarpu, išlieka integracijos saite. Juolab, viengubu krosingoveriu integruojančios plazmidės dažnai sukuria transformantus, turinčius keletą tandeminių pasikartojimų (Gnügge *et al.*, 2016; Orr-Weaver *et al.*, 1981). Kopijų skaičius gali būti pakeistas varijuojant transformuojančios plazmidės koncentracija (Plessis and Dujon, 1993).

Didesnis plazmidės kopijų skaičius gali būti pasiektas nukreipiant integraciją į saitus, kurių daug mielių genome, pvz. rDNR pasikartojimai (Szostak & Wu, 1979; Lopes *et al.*, 1989; Fujii *et al.*, 1990; Leite *et al.*, 2013) ir δ elementai (F. W. F. Lee, 1997.; Sakai *et al.*, 1990). Integracija į gausius genominius tikslinius saitus taip pat padidina transformacijos efektyvumą ir leidžia lengviau kurti industrinius mielių kamienus, kuriuos dažnai yra sunku transformuoti (Szostak & Wu, 1979; Wilson *et al.*, 1994).

Integracija naudojant viengubo krosingoverio mechanizmą lemia integruotų plazmidžių klasterių, pasikartojančių tandemų susidarymą (Lopes *et al.*, 1991), bet šios konfigūracijos – struktūriškai nestabilios. Per ilgą kultivacijos laiko tarpą, rekombinacijos gali sumažinti pradinį transformantų kopijų skaičių (Wang *et al.*, 1996).

Naudojant integracines plazmides, kopijų skaičius ląstelėje dažniausiai yra 1, tačiau gali nestipriai varijuoti. Transformantų skaičius šiuo atveju gaunamas iki 1×10^3 transformantų/ μg DNR. Nors efektyvumas nėra aukštas, tačiau transformantai būna stabilūs (Verachert & De Mot, 1989). Mielių transformacija naudojant integracines plazmides pavaizduota 3 pav.



3 pav. Autoriaus kurta schema. Mielių integracinės plazmidės ir jų integracijos mechanizmai. (A) Mielių integracinės plazmidės, kurios integruojasi viengubo krosingoverio mechanizmu neša vieną tęstiną taikininę seką (oranžinė), kuri yra markerinio geno (geltona) dalis. Integracinė plazmidė yra paverčiama linijine fragmentuojant taikininę seką. Po integracijos, integruota plazmidės dalis yra padauginama. (B) Mielių integracinės plazmidės, kurios integruojasi dvigubo krosingoverio mechanizmu turi dvi taikininės sekas (TS1 ir TS2), kurios apgaubia dalį

integruojamojo vektoriaus. Kirpimas už taikininių sekų išlaisvina integracinę plazmidės dalį. YFG – pasirinktai įvestas genas; TS – taikininės sekos. (Gnügge et al., 2016)

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

AppliChem, Vokietija

Ličio acetatas.

Carl Roth, Vokietija

Mielių ekstraktas, agaras, peptonas, gliukozė, YNB (be aminorūgščių), uracilas, adeninas, leucinas, triptofanas, TRIS, agarozė, sorbitolis, DTT, sterilūs švirkštiniai filtrai PVDF membrana (0,22 μm).

Merck, Vokietija

NaCl, acto rūgštis.

Sigma, JAV

Histidinas, EDTA, etidžio bromidas.

2.1.2. Rinkiniai

Thermo Scientific, Lietuva

Plazmidžių skyrimo rinkinys (GeneJet Plasmid Miniprep Kit); GeneRuler DNR molekulinės masės žymuo; DNR restrikcijos *StuI* restrikcijos endonukleaze rinkinys; Phusion™ Plus PGR rinkinys.

2.1.3. Prietaisai

Amersham Biosciences, JK

UV/Vis spektrofotometras (Ultrospec 5300 pro), elektroforezės srovės šaltinis (EPS 601).

Eppendorf, Vokietija

biofotometras (modelis 6131), mažo tūrio centrifuga (modelis 5424).

DNR Bio-Imaging Systems,
Izraelis

elektroforezės rezultatų fiksavimo sistema (MiniBIS Pro).

KERN ir Sohn, Vokietija

mažo svorio svarstyklės (ADB 600-C3).

| | |
|-----------------------------|---|
| B. Braun Biotech, Vokietija | rotacinė purtyklė (Certomat R 886302/4). |
| Thermo Scientific, Lietuva | didelio tūrio centrifuga (Jouan KR25i). |
| Consort, JK | elektros srovės šaltinis (E865). |
| Binder, Vokietija | termostatas (modelis 23). |
| OLYMPUS, Japonija | šviesinis mikroskopas (BX21). |
| Roth, Vokietija | 1 mm elektroporacijos kiuvetė. |
| ScanLAF, Danija | 2 biosaugumo klasės laminarinė spinta (MARS). |
| Scientific Industries, JAV | vorteksas (Genie 1). |
| VG TU, Lietuva | impulsinio elektrinio lauko generatorius. |

2.1.4. Kultivavimo terpės ir jų priedai

Kultivavimo terpės ir jų priedai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Mikroorganizmų kultivavimui naudotos terpės ir jų priedai.

| | | |
|--------------------------|---------------------|---------|
| <u>YPD</u> | gliukozė | 20 g/l |
| | peptonas | 20 g/l |
| | mielių ekstraktas | 10 g/l |
| | agaras | 20 g/l |
| <u>SC</u> | gliukozė | 20 g/l |
| | YNB | 6,7 g/l |
| | agaras | 15 g/l |
| <u>LB</u> | triptonas | 10 g/l |
| | NaCl | 10 g/l |
| | mielių ekstraktas | 5 g/l |
| | agaras | 20 g/l |
| <u>SC terpės priedai</u> | Adenino tirpalas | 15 ml/l |
| | Leucino tirpalas | 20 ml/l |
| | Histidino tirpalas | 3 ml/l |
| | Triptofano tirpalas | 10 ml/l |
| | Uracilo tirpalas | 10 ml/l |
| <u>LB terpės priedai</u> | Ampicilinas | 1 ml/l |

Skystų YPD, SC ir LB terpių gaminimui nenaudojamas agaras.

2.1.5. Tirpalai

- Kultivavimo terpėms naudojamų priedų tirpalai:

| | | |
|---------------------|-------------|--------|
| Adenino tirpalas | adeninas | 10 mM |
| Leucino tirpalas | L-leucinas | 100 mM |
| Histidino tirpalas | histidinas | 100 mM |
| Triptofano tirpalas | triptofanas | 40 mM |
| Uracilo tirpalas | uracilas | 20 mM |

- Kiti tirpalai:

| | |
|------------|------------------------|
| Sorbitolio | 1 M; 1,5 M sorbitolis. |
| Ampicilino | 100 mg/ml |

- Mielių ląstelių transformacijoje naudojami tirpalai

| | | |
|------------|------------------|------------|
| TE buferis | TRIS-HCl | 1,58 g/l |
| | EDTA | 0,0292 g/l |
| TE/LiAc | LiAc TE buferyje | 6,59 g/l |
| DTT | | 10 mM |

- DNR elektroforezei naudojami mišiniai:

| | | |
|-----------------------|-------------------|-------|
| Restrikcijos mišinys: | 10× Buffer B | 2 μl |
| | pNMG | 1 μl |
| | dH ₂ O | 16 μl |
| | StuI | 1 μl |

Elektroforezės

molekulinės masės

žymens mišinys:

| | |
|---------------------------|--------|
| GeneRuler DNR molekulinės | |
| masės žymuo | 0,5 μl |
| Užnešimo dažas | 2 μl |
| dH ₂ O | 7 μl |

Elektroforezės

| | | |
|-------------------------------|---------------------------------|-------------|
| mėginių mišiniai: | Užnešimo dažas | 2 μ l |
| | plazmidinė DNR | 5 μ l |
| | dH ₂ O | 3 μ l |
| PGR mišinys: | 2 \times Phusion Plus PCR Mix | 25 μ l |
| | Tiesioginis pradmuo 0,5 μ M | 2,5 μ l |
| | Grįžtamasis pradmuo 0,5 μ M | 2,5 μ l |
| | DNR matrica | 5 μ l |
| | dH ₂ O | 20 μ l |
| 1 \times TAE buferis: | TRIS | 40 mM |
| | Acto rūgštis | 20 mM |
| | EDTA | 1 mM |
| Elektroforezės gelio mišinys: | agarozė | 1 g |
| | 1 \times TAE buferis | 100 ml |

Visos kultivavimo terpės ir terpėms naudojamų priedų tirpalai yra autoklavuojami atskirai – 15 min, 0,5 atm slėgio, 112 °C. Kultivavimo terpių priedai yra steriliai įdedami į terpę po autoklavavimo. Kiti tirpalai yra filtruojami.

2.2. Metodai

2.2.1. Tyrimo objektas

Darbe naudojamas *E. coli* DH5 α kamienas ir *S. cerevisiae* SP1 kamienas. Dėl deoksiribozės sintezės *E. coli* DH5 α kamienas yra geras objektas didelių plazmidžių klonavimui (Hanahan, 1983). Darbe naudojama pNMG plazmidė – mielių integracinė plazmidė, koduojanti Sup35 N ir M domenus bei GFP valdomą TEF promotoriumi. GFP yra sulietas su Sup35 baltymo domenais. Plazmidė pagaminta mielių ekspresijos vektoriaus pRS306 pagrindu. Integracijai

kerpama StuI restrikcijos endonukleaze *URA3* srityje. Turi bakterinę ori sritį ir atsparumo ampicilinui geną. Plazmidė gauta iš S. Lindquist.

2.2.2. Molekulinės biologijos metodai

Plazmidinės DNR skyrimas iš bakterijų šarminės lizės būdu

E. coli DH5 α bakterijos augintos skystoje LB terpėje, 37 °C temperatūroje, 160 apsisukimų per minutę. Plazmidės išskyrimui naudotas GeneJET Plasmid Miniprep rinkinys. Šiuo rinkiniu, bakterijų kultūra lizuojama ir lizatas pašalinamas centrifuguojant. Supernatantas surenkamas ir užnešamas ant silicio pagrindo membranos. DNR molekulės selektyviai prisijungia prie silicio membranos esant aukštai druskų koncentracijai. DNR yra praplaunama nuo pašalinių medžiagų, tuomet plazmidinė DNR yra atkabinama nuo silicio membranos eliucijos buferiu ir yra tinkama naudoti tolimesniuose tyrimuose. Plazmidinės DNR skyrimas atliekamas pagal gamintojo rekomendacijas.

DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė atlikta naudojant 1 % agarozinį gelį su etidžio bromidu, 1 \times TAE buferiniame tirpale, 100 V srovėje. Gautų fragmentų dydžio nustatymui naudojamas DNR molekulinės masės žymuo GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Išsiskirsčiusi DNR stebima UV šviesoje fotovaizdo kameroje MiniBIS. Gautas gelio vaizdas fiksuojamas GelCapture gelių dokumentavimo sistema.

Kompetentinių mielių ląstelių paruošimas ir transformacija elektroporacijos būdu

Kompetentinių mielių ląstelių paruošimas ir transformacija elektroporacijos būdu atlikti pagal Gietz ir Woods 2001 m. metodiką su modifikacijomis (Gietz & Woods, 2001). *S. cerevisiae* SP1 kamienas atšviežinamas 48 valandas agarizuotoje YPD terpėje 30 °C temperatūroje. Viena kolonija perkeliama į kolbą su 25 ml skystos YPD terpės ir auginama rotacinėje purtyklėje 12 valandų. Vėliau kultūra vėl persėjama į sterilią 100 ml skystos YPD kolbą. Kultūra inkubuojama 3–6 val. iki kol pasiekiamas 0,3–0,6 OT (OT matuojamas spektrofotometru), kas nurodo kultūros ankstyvąją-viduriniąją eksponentinę augimo fazę. Pasiekus reikiamą optinį tankį, ląstelės

atvėsinašamos šaldytuve iki 4 °C temperatūros ir centrifuguojamos naudojant didelio tūrio centrifugą palaikant 4 °C temperatūrą. Ląstelės praplaunamos šaltu ~40 ml dH₂O 2 kartus ir inkubuojamos 30 °C temperatūroje įdėjus 20 ml 100 mM TE/LiAc 45 minutes rotacinėje purtyklėje. Vėliau įdedama 200 μl 10 mM DTT ir toliau inkubuojama 15 minučių rotacinėje purtyklėje aukščiau minėtais parametrais. Visi tolimesni žingsniai atliekami ląsteles laikant šaltai (4 °C) siekiant sulėtinti metabolinės reakcijas ir išvengti atsako į stresą. Ląstelės dar kartą praplaunamos šaltu distiliuotu vandeniu, o tada – 40 ml 1,5 M sorbitoliu. Ląstelės suspenduojamos sorbitolyje atskirame mėgintuvėlyje ir skiedžiamos santykiu 1:99, tuomet pamatuojamas OT. Vidutiniškai gaunamas 0,6 OT atlikus skiedimą.



4 pav. Šiame darbe naudojamas impulsinio elektrinio lauko generatorius, sukurtas VGTU mokslininkų (V. Novickij, A. Grainys).

Šaltuose mėgintuvėliuose sumaišoma 40 μl kompetentinės ląstelių kultūros ir 5 μl DNR bei kontrolė – 40 μl kompetentinių ląstelių kultūra. Mišiniai perkeliama į šaltas, sterilias 1 mm-gap elektroporacijos kiuvetes. Nustatomi aparato (5 pav.) parametrai: įtampa (U) – 9–12 kV/cm, 5 × 0,5–1 ms. Po kiekvieno mėginio elektroporacijos kiuvetė iš karto yra dedama į ledą ir į ją pridodama 1 ml šalto 1,5 M sorbitolio, suspenduojama ir 0,9 ml perkeliama į naują mėgintuvėlį. Toliau elektroporacija tęsiama su kitu mėginiu. Ląstelių suspensija išsėjama glaistymo būdu ant selektyvių (SC) terpių, bei ant kontrolinės (YPD) terpės, po 200 μl vienai lėkštei ir auginama 5–

7 paras termostate 30 °C temperatūroje. Skaičiuojamos užaugusios kolonijos. Eksperimentai kartoti 3 kartus.

Transformacijos parametrų optimizavimas

Mielių *S. cerevisiae* SP1 kamieno optimaliai transformacijai bandoma koreguoti transformacijos parametrus. Žemiau pateiktose lentelėse (3 lentelė; 4 lentelė; 5 lentelė) aprašomi skirtingų transformacijų parametrai. Elektroporacijoms buvo bandoma naudoti trijų skirtingų plazmidžių koncentracijas. 3 lentelėje aprašomos elektroporacijos sąlygos su integracine pNMG plazmide, kurios koncentracija buvo 2 ng/μl. Įtampa (U) varijuoja nuo 9 iki 12 kV, o impulso laikas – 5 × 0,5–1 ms. 4 lentelėje įtampa ir impulso laikas buvo naudojami tokie patys, kaip ir 3 lentelėje (įtampa (U) – 9–12 kV/cm, 5 × 0,5–1 ms), tačiau integracinės pNMG plazmidės koncentracija buvo 10 ng/μl. 5 lentelėje įtampa ir impulso laikas taip pat nesiskirė nuo 3 ir 4 lentelėje pateiktų parametrų, tačiau integracinės pNMG plazmidės koncentracija buvo 20 ng/μl. Šiuo optimizavimu bandoma atrasti, ar mielių *S. cerevisiae* ląstelės geriau įsisavina genetinę medžiagą, kuri yra mažesnės koncentracijos, ar atvirkščiai – didesnė koncentracija lemia geresnį DNR įsisavinimą.

3 lentelė. Pirmosios transformacijos parametrai

| Plazmidės pNMG koncentracija | Įtampa, laikas |
|------------------------------|-------------------|
| 2 ng/μl | 9 kV, 5 × 0,5 ms |
| 2 ng/μl | 9 kV, 5 × 1 ms |
| 2 ng/μl | 10 kV, 5 × 0,5 ms |
| 2 ng/μl | 10 kV, 5 × 1 ms |
| 2 ng/μl | 11 kV, 5 × 0,5 ms |
| 2 ng/μl | 11 kV, 5 × 1 ms |
| 2 ng/μl | 12 kV, 5 × 0,5 ms |
| 2 ng/μl | 12 kV, 5 × 1 ms |

4 lentelė. Antrosios transformacijos parametrai

| Plazmidės pNMG koncentracija | Įtampa, laikas |
|------------------------------|----------------|
|------------------------------|----------------|

| | |
|----------------|--------------------------|
| 10 ng/ μ l | 9 kV, 5 \times 0,5 ms |
| 10 ng/ μ l | 9 kV, 5 \times 1 ms |
| 10 ng/ μ l | 10 kV, 5 \times 0,5 ms |
| 10 ng/ μ l | 10 kV, 5 \times 1 ms |
| 10 ng/ μ l | 11 kV, 5 \times 0,5 ms |
| 10 ng/ μ l | 11 kV, 5 \times 1 ms |
| 10 ng/ μ l | 12 kV, 5 \times 0,5 ms |
| 10 ng/ μ l | 12 kV, 5 \times 1 ms |

5 lentelė. Trečiosios transformacijos parametrai

| Plazmidės pNMG koncentracija | Įtampa, laikas |
|------------------------------|--------------------------|
| 20 ng/ μ l | 9 kV, 5 \times 0,5 ms |
| 20 ng/ μ l | 9 kV, 5 \times 1 ms |
| 20 ng/ μ l | 10 kV, 5 \times 0,5 ms |
| 20 ng/ μ l | 10 kV, 5 \times 1 ms |
| 20 ng/ μ l | 11 kV, 5 \times 0,5 ms |
| 20 ng/ μ l | 11 kV, 5 \times 1 ms |
| 20 ng/ μ l | 12 kV, 5 \times 0,5 ms |
| 20 ng/ μ l | 12 kV, 5 \times 1 ms |

Kolonijų PGR

Kolonijų PGR atlikta naudojant Phusion Plus DNR polimerazę, kurios skiriamoji geba net iki 20 kb. Pasiruošiamos PGR reakcijos pagal 2.1 skyriuje nurodytus tūrius. Naudojami A. Rudžiansko sukurti Sup35GFP tiesioginis ir grįžtamasis pradmenys. Kaip teigiama kontrolė naudojami ITSf ir ITSr pradmenys, bei švaros kontrolės su skirtingais pradmenimis ir be ląstelių. Metodas naudojamas patikrinti, ar sėkmingai įvyko transformacija ir ar mielių kolonijose yra tikslinis fragmentas. Tikslinis fragmentas – Sup35NM, sulietas su GFP. PGR sąlygos parenkamos

remiantis pradmenų lydymosi temperatūra ir gaunasinamo geno dydžiu (2784 bp). PGR naudojami pradmenys ir jų lydymosi temperatūros pateikiami 6 lentelėje.

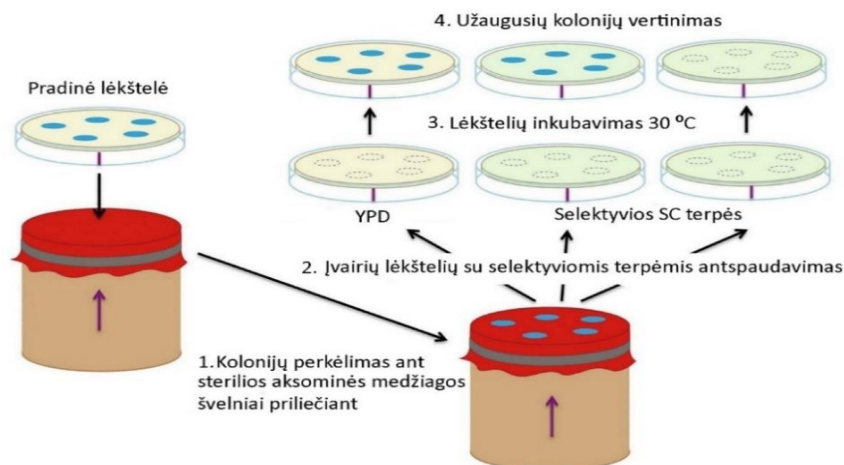
6 lentelė. PGR naudojami pradmenys. Naudojami tiesioginiai Sup35GFP ir ITS pradmenys ir grįžtamieji Sup35GFP bei ITS pradmenys.

| Pradmuo | T _m , °C |
|---------------|------------------------------------|
| Sup35GFP FORW | 67,9 |
| Seka | 5' – TCAATCAATCAGGATCCATGTCTG – 3' |
| Sup35GFP REW | 66,3 |
| Seka | 5' – TAGGGCGAATTGGAGCTCC – 3' |
| ITSF | 74 |
| Seka | 5' – TGTAGGTGAACCTGCTGCTGGATC – 3' |
| ITSR | 68 |
| Seka | 5' – CCTATTTAGTTTCTTTTCCTCCGC – 3' |

2.2.3. Mikrobiologijos metodai

Genotipavimas

S. cerevisiae mielių ląstelės mikrobiologiškai klonuojamos ir pavienės kolonijos auginamos ant YPD terpės 48 valandas 30 °C temperatūroje. Po 48 valandų, ląstelės perkeliamos ant sterilios aksomo medžiagos ir antspauduojamos ant naujų lėkštelių su selektyviomis SC terpėmis (5 pav.). SC terpės turi skirtingas aminorūgštis ir nukleorūgštis savo sudėtyje. Kolonijos, užaugusios ant terpės su norimu žymeniu ir neužaugusios ant kitų terpių su kitais žymenimis, yra tikslinės kolonijos (Lederberg & Lederberg, 1952).



5 pav. Genotipavimo antspaudų metodu schema (capricorn.bc.edu, 2018).

Mikroskopavimas

Po kompetentinių mielių ląstelių transformacijos elektroporacijos būdu, daromas gyvas preparatas: ant švaraus, sterilaus objekcinio stiklelio uždedamas lašas dH₂O. Nuo užaugusių transformantų steriliai paimama viena kolonija ir perkeliama į lašą vandens. Bandinys atsargiai uždengiamas dengiamuoju stikliuku, jog nesusidarytų oro burbuliukai. Naudojamas šviesinis mikroskopas OLYMPUS BX21. Vaizdas stebimas naudojant 100× ir 400× priartinimus ir vėliau, naudojant aliejinę imersiją, naudojamas 1000× priartinimas. Procesas kartojamas su kita, skirtingos morfologijos kolonija.

2.2.4. Duomenų vizualizacijos metodai

Kiekybinių duomenų vizualizacija

Visi kiekybiniai duomenys buvo kaupti Microsoft Office 365 ProPlus Excel elektroninėje lentelėje. Pateikti grafiniai ir susisteminti duomenys buvo sudaryti naudojantis Microsoft Office 365 ProPlus Excel ir Word įrankiais.

Elektroforezės gelio vizualizacija

Elektroforezės gelis fotografuojamas naudojantis elektroforezės rezultatų fiksavimo sistema MiniBis Pro. Agarozinio gelio nuotraukos apipavidalinimui pasitelktas Adobe Illustrator.

Šviesinio mikroskopo nuotraukų vizualizacija

Mėginiai, tirti šviesiniu mikroskopu, fotografuojami naudojantis telefono „iPhone 13 Pro Max“ kamera. Nuotraukos apipavidalinimui pasitelkta programa „ImageJ“.

Transformacijos efektyvumo skaičiavimas

Transformacijos efektyvumas (e) (KFV/ $\mu\text{g DNR}$) skaičiuotas pagal formulę:

$$e = \frac{\text{transformantų skaičius, KFV}}{c \cdot V \cdot \frac{V1}{V2}}$$

KFV – kolonijas formuojantys vienetai;

c – plazmidinės DNR koncentracija ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$);

V – plazmidinės DNR tūris transformacijos mišinyje (μl);

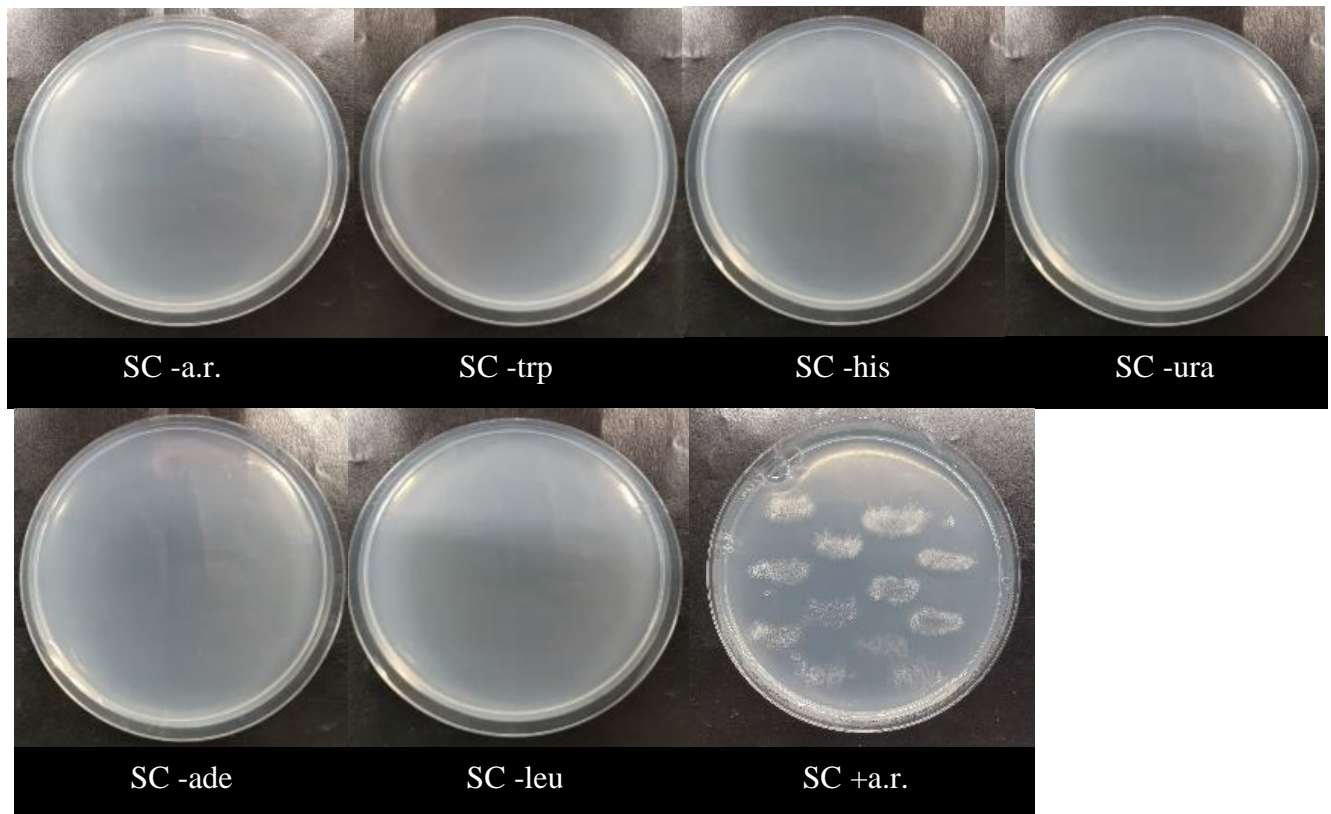
$V1$ – transformacijos mišinio tūris sėjamas į lėkšteles (μl);

$V2$ – transformacijos mišinio tūris prieš sėjant į lėkšteles (μl).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

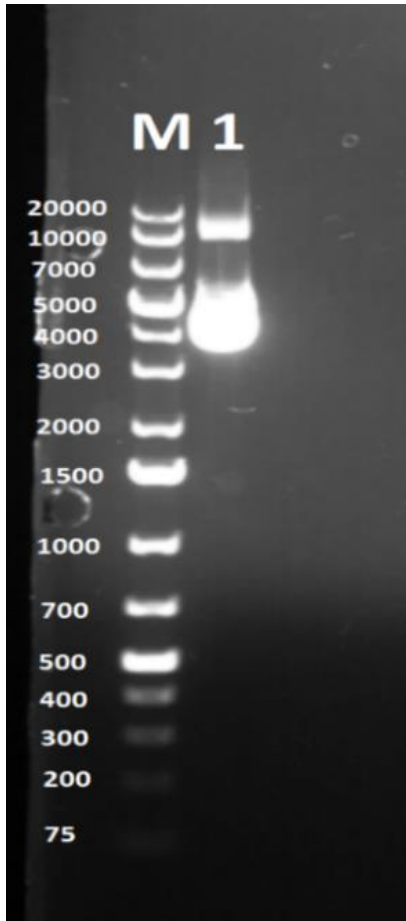
3.1. *S. cerevisiae* SP1 kamieno kolonijų atranka

Genotipuotas mielių *S. cerevisiae* SP1 kamienas. Atrinktos kolonijos, turinčios reikiamas auksotrofines mutacijas – kamieno genotipas lemia, kad ląstelės negali augti terpėje be papildomai pridėtų uracilo, triptofano, histidino, adenino ir leucino. Genotipavimas atliktas antspaudavimo metodu. Ant standartinės YPD terpės buvo auginamos 12 kolonijų. Kolonijos perkeliamos ant sterilaus aksomo pluošto ir antspauduojamos ant selektyvių terpių. Terpėse be pridėtų aminorūgščių ir nukleobazių nesimato augimo (6 pav.), todėl tolimesniems tyrimams gali būti naudojamos visos kolonijos.



6 pav. Mikrobiologinis *S. cerevisiae* SP1 kamieno genotipavimas. Ląstelės neauga minimalioje SC terpėje be papildomai pridėtų triptofano, histidino, uracilo, leucino, adenino ir auga terpėje su papildomai pridėtomis aminorūgštimis ir nukleobazėmis.

3.2. pNMG plazmidės skyrimas ir tikslinio fragmento nustatymas



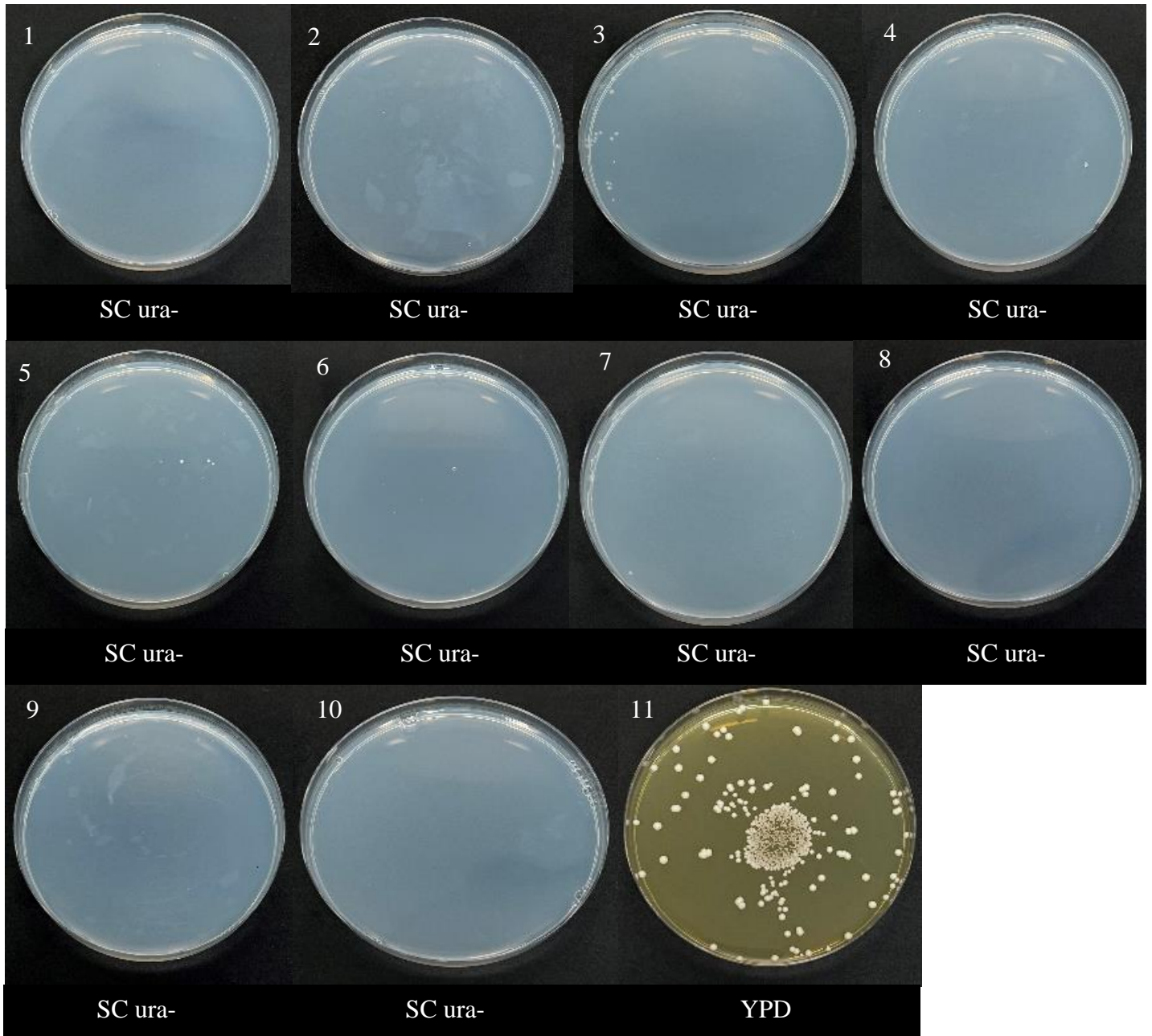
7 pav. pNMG plazmidės vaizdavimas agaroziniame gelyje. M – molekulinės masės žymuo, bp; 1 – 5 μ l pNMG plazmidės,

pNMG plazmidė išskirta iš *E. coli* DH5 α ląstelių šarminės lizės būdu naudojant rinkinį GeneJET Plasmid MiniPrep (2.2.2. poskyris). Rezultatai pateikiami 7 pav. Gaunama plazmidės koncentracija: pNMG C 800 ng/ μ l. Plazmidė šioje nuotraukoje nepaveikta restrikcine endonukleaze, todėl matoma labai ryški juosta ties 4000-5000 bp. Viršuje esantis brūkšnis yra kaip žymė dėl judėjimo (Willshaw *et al.*, 1979), o gaunamas plazmidės dydis maždaug atitinka duombazėje esantį dydį (6186 bp).

pNMG plazmidė linearizuojama per *URA3* sritį naudojant StuI (Eco147I) restrikcijos endonukleazę. Linearizavimui naudojama plazmidės koncentracija – 2

ng/ μ l. Norima linearizuoti plazmidę transformacijai.

3.3. *S. cerevisiae* SP1 kamieno transformacijos optimizavimas pNMG plazmide

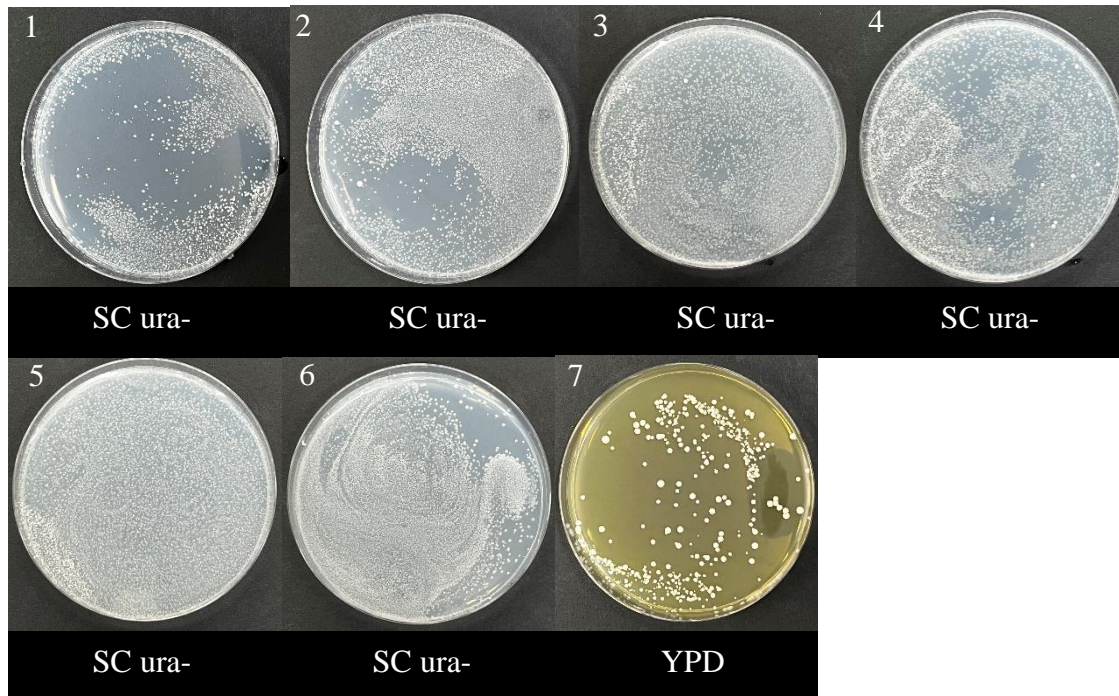


8 pav. Pirmosios elektroporacijos rezultatai su pNMG plazmide. 1 – 12 kV/cm, 0,5 ms; 2 – 12 kV/cm, 1 ms; 3 – 11 kV/cm, 0,5 ms; 4 – 11 kV/cm, 1 ms; 5 – 10 kV/cm, 0,5 ms; 6 – 10 kV/cm, 1 ms; 7 – 9 kV/cm, 0,5 ms; 8 – 9 kV/cm, 1 ms; 9–10 – Netransformuotos ląstelės; 11 – Patikrinimas, ar ląstelės gyvybingos po transformacijos

Mielių transformacijos optimizavimui integracine pNMG plazmide pasitelkiamas metodas, aprašomas 2.2.2. poskyryje. Elektroporacijai sąlygos pasirenkamos atsižvelgiant į jau atliktus tyrimus su mielių ląstelių transformacijos optimizavimu episominėmis ir centromerinėmis

plazmidėmis bakalaurinio darbo metu. Pagal jau atliktus tyrimus, optimalios sąlygos būtų 10 kV/cm, $5 \times 0,5$ ms arba 11 kV/cm, $5 \times 0,5$ ms. Pasirinkta naudoti 10 kV/cm, $5 \times 0,5$ ms ir šiek tiek varijuoti įtampą, impulso trukmę, plazmidės koncentraciją ir ląstelių tankį, norint nustatyti optimalias sąlygas, kuomet gaunama daugiausia transformantų.

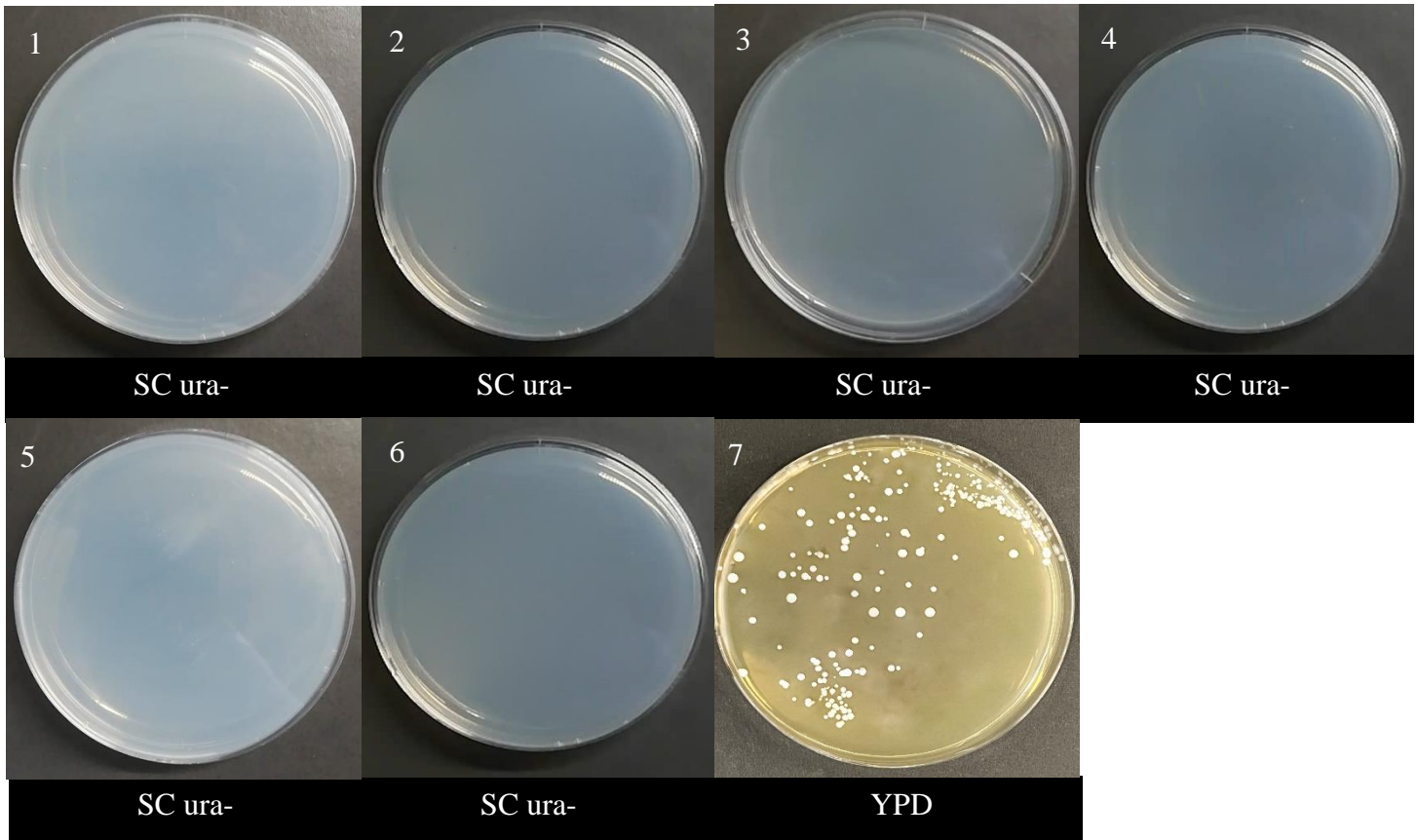
Šiai transformacijai buvo naudojama 2 ng/μl linearizuotos plazmidės koncentracija. Viso įnešta 10 ng DNR. 8 paveikslėlyje matomi transformacijos rezultatai su 9–10 mėginuose rodoma neigiama kontrolė, t.y. netransformuotos ląstelės. Ant šio mėginio neturėjo užaugti ląstelės, kadangi tik transformantai, sėkmingai gavę plazmidę su *URA3* markeriu, galėtų augti ant selektyvios terpės be uracilo. 1–2 ir 7–8 mėginuose taip pat neužaugo ląstelės. Optimalu transformuoti plazmides naudojant 10–11 kV/cm įtampą, tai nurodoma 3–6 mėginuose. 3 lėkštutėje, naudojant 11 kV/cm, 0,5 ms sąlygas užaugo 11 KFV. 4 lėkštutėje, naudojant 11 kV/cm, 1 ms sąlygas užaugo 1 KFV. 5 lėkštutėje, naudojant 10 kV/cm, 0,5 ms sąlygas užaugo 3 KFV. 6 lėkštutėje, naudojant 10 kV/cm, 1 ms sąlygas užaugo 1 KFV. Daugiausia potencialių transformantų gauta naudojant 10 kV/cm įtampą, tačiau jie dar tikrinami atliekant kolonijų PGR (3.3 skyrius). Pakartojus transformaciją du kartus KFV užaugo tik naudojant 10 ir 11 kV/cm įtampą. Naudojant 11 kV/cm įtampą ir 0,5 ms bei 1 ms sąlygas abu kartus užaugo po vieną KFV. Naudojant 10 kV/cm įtampą ir 1 ms sąlygas, užaugo taip pat po vieną KFV. Naudojant 10 kV/cm įtampą ir 0,5 ms sąlygas, antro pakartojimo metu gauti 2 KFV, o trečiojo pakartojimo metu gauti 4 KFV. Galimi transformantai taip pat nagrinėjami šviesiniu mikroskopu norint pagal morfologinius požymius nustatyti, ar užaugę mikroorganizmai yra mielės (11 pav.). Matomos apvalios, beveik elipsės formos ląstelės, kurios yra maždaug 5–10 μm dydžio. Savo morfologija šios ląstelės atitinka *S. cerevisiae* (Stefanini et al., 2012).



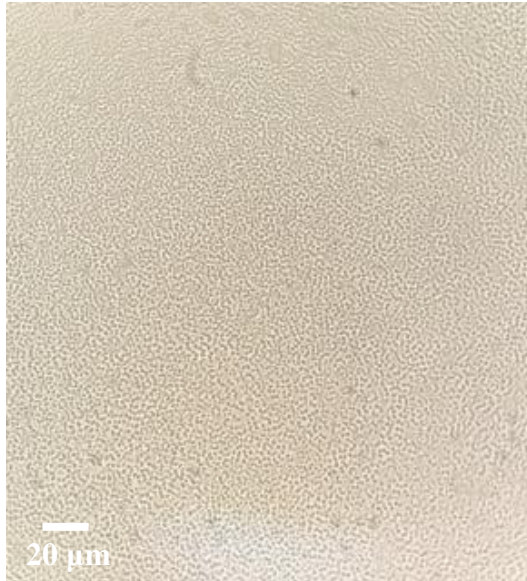
9 pav. Antrosios elektoporacijos rezultatai su pNMG plazmide. 1–4 – plazmidė įterpta skirtingomis sąlygomis ant SC terpės be uracilo. 1 – 11 kV/cm, 0,5 ms; 2 – 11 kV/cm, 1 ms; 3 – 10 kV/cm, 0,5 ms; 4 – 10 kV/cm, 1 ms. 5–6 – Netransformuotos ląstelės; 7 – Tikrinamas ląstelių gyvybingumas po transformacijos.

Šiai (9 pav.) transformacijai buvo naudojama 10 ng/μl plazmidės koncentracija. Iš viso įnešta 50 ng DNR. 9 paveikslėlyje matomi transformacijos rezultatai su pNMG plazmide. 5–6 mėginiuose rodomos netransformuotos ląstelės. Ant šio mėginio neturėjo užaugti ląstelės, kadangi tik transformantai, sėkmingai gavę plazmidę su *URA3* markeriu, galėtų augti ant selektyvios terpės be uracilo (Cohen & Engelberg, 2007), tačiau lėkštutėse matoma labai daug neaiškios kilmės mikroorganizmų. 1–4 mėginiuose taip pat užaugo labai daug neaiškios kilmės mikroorganizmų. Manoma, kad tai yra pašalinės bakterijos, kadangi visi šie mikroorganizmai yra ne lėkštučių paviršiuje, o pačioje terpėje (apart teigiamos kontrolės, kurioje visos kolonijos užaugo ant lėkštutės paviršiaus). Įtariama, kad galėjo pakliūti užkratas gaminant pačias terpes ir pridėdant aminorūgštis arba nukleobazes.

Bandant atlikti transformaciją, kai plazmidės koncentracija buvo 20 ng/μl, negauta rezultatų. Užaugo kolonijos tik ant teigiamos kontrolės lėkštutės su YPD terpe (10 pav.). Manoma, kad transformacija nepavyko dėl per didelės plazmidės koncentracijos (Becker & Guarente, 1991).

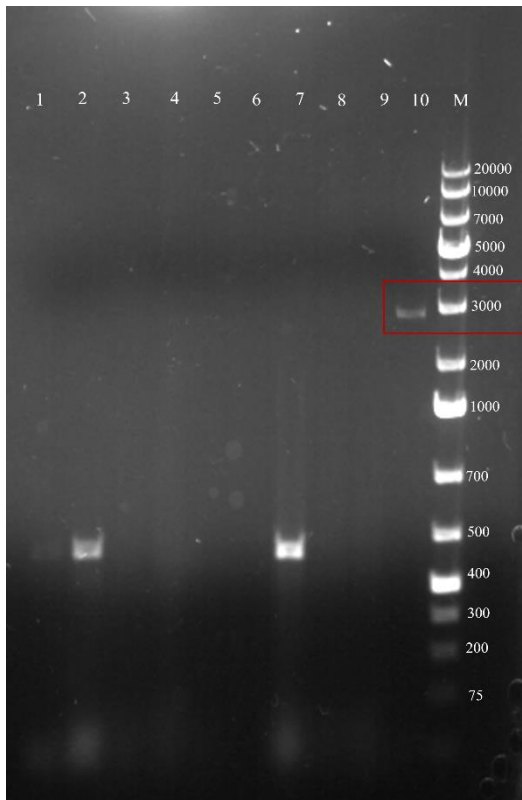


10 pav. Trečiosios elektoporacijos rezultatai su pNMG plazmide. 1–4 – plazmidė įterpta skirtingomis sąlygomis ant SC terpės be uracilo. 1 – 11 kV/cm, 0,5 ms; 2 – 11 kV/cm, 1 ms; 3 – 10 kV/cm, 0,5 ms; 4 – 10 kV/cm, 1 ms. 5–6 – Netransformuotos ląstelės; 7 – Tikrinamas ląstelių gyvybingumas po transformacijos.



11 pav. Galimi transformantai, rasti šviesiniu mikroskopu. Naudojama imersija ir 1000× priartinimas.

3.4. Potencialių transformantų tikrinimas naudojant kolonijų PGR



12 pav. Gautų potencialių transformantų analizė kolonijų PGR metodu. M – molekulinės masės žymuo, bp; 1;6 – PGR mišinys be DNR matricos (1 – NTC ITS, 6 – NTC Sup35GFP); 2 – 11 kV/cm transformantų biomasės mėginio su ITS pradmenimis; 3-5 – 11 kV/cm transformantų biomasės mėginio; 7 – 10 kV/cm transformantų biomasės mėginio su ITS pradmenimis; 8-10 – 10 kV/cm transformantų biomasės mėginio.

Kolonijų PGR atliekamas pagal 2.2.2 poskyryje aprašytą metodiką. Tikimasi gauti Sup35–GFP fragmentą, kuris pagal duombazę turėtų būti 2784 bp dydžio. 12 pav. nurodomi potencialių transformantų analizės kolonijų PGR metodu rezultatai. Buvo naudojamos ląstelės, užaugusios ant 8 pav. 3 ir 5 lėkštučių (11 kV/cm įtampa, $5 \times 0,5$ ms ir 10 kV/cm įtampa, $5 \times 0,5$ ms), kadangi ant jų užaugo pakankamas kiekis kolonijų. Ant 8 pav. 4 ir 6 lėkštučių užaugo po vieną koloniją, bet jos nebuvo naudojamos tolimesnei analizei. 3–5 ir 8–10 takeliuose naudojami skirtingi biomasių kiekiai PGR mišiniui pagal Horecka & Chu, 2017 aprašytą metodiką. 3 ir 8 takeliuose naudojama po apytiksliai 0,5 KfV, 4 ir 9 takeliuose po vieną KfV, o 5 ir 10 takeliuose – apytiksliai 1,5 KfV. 10 takelyje matosi ieškomas tikslinis fragmentas, tad galima teigti, kad transformacija pavyko naudojant 10 kV/cm įtampą, $5 \times 0,5$ ms impulso trukmę. Tikslinis fragmentas Sup35–GFP aptiktas tik 10 takelyje, nes buvo naudotas tinkamas biomasės kiekis, šiuo atveju, 1,5 KfV (Horecka & Chu, 2017). Įtariama, kad transformacija galėjo pavykti ir 11 kV/cm įtampa, $5 \times 0,5$ ms sąlygomis, tačiau tam trūksta pakartotinių tyrimų. Taip manoma todėl, kad ant lėkštės užaugo KfV, tačiau per klaidą galėjo nepavykti kolonijų PGR.

3.5. Transformacijos efektyvumas

Šiame darbe nustatyta optimali plazmidės koncentracija – 2 ng/μl. Didinant plazmidės koncentraciją, transformantų negauta. Pagal 2.2.4 poskyryje aprašoma transformacijos efektyvumo formulę, gautas transformacijos efektyvumas naudojant 10 kV/cm įtampą, $5 \times 0,5$ ms buvo $e = 1 \times 10^3$ transformantų/μg DNR. Transformacijos efektyvumas netgi sutampa su nagrinėtoje literatūroje užfiksuotu aukščiausiu transformacijos efektyvumu (1×10^3 transformantų/μg DNR (Verachert & De Mot, 1989). Manoma, kad gaunamas pakankamai aukštas transformacijos efektyvumas, nes naudojamos optimalios sąlygos. Ląstelių kultūros OD₆₀₀ buvo 0,378 (ankstyvoji-vidurinė eksponentinė augimo faze), o galutinis sukoncentruotas ląstelių, naudojamų transformacijai, OD₆₀₀ buvo 0,91. Naudojama plazmidės koncentracija – 2 ng/μl Naudojant 11 kV/cm įtampą, $5 \times 0,5$ ms, transformacijos efektyvumas gaunamas $e = 0$, kadangi atlikus kolonijų PGR nei viename takelyje negautas norimas Sup35–GFP fragmentas. Skaičiavimai parodyti 4 lentelėje.

4 lentelė. Transformacijos efektyvumo skaičiavimas

| Transformacijos Sąlygos | KFV | c | V | V1 | V2 |
|------------------------------------|------------|----------|----------|-----------|-----------|
| 10 kV/cm įtampa, 5 × 0,5 ms | 3 | 0,002 | 5 μl | 100 μl | 345 μl |
| 11 kV/cm įtampa, 5 × 0,5 ms | 11 | 0,002 | 5 μl | 100 μl | 345 μl |

IŠVADOS

1. Išskyrus pNMG plazmidę iš *E. coli* DH5 α kamieno ląstelių gauta plazmidės koncentracija: pNMG – 800 ng/ μ l. Plazmidė linearizuota StuI restrikcijos endonukleaze.
2. Naudojant impulsinį elektrinį lauką, nustatytos optimalios sąlygos mielių *S. cerevisiae* SP1 kamieno transformacijai integracine pNMG plazmide – 10 kV/cm įtampa, $5 \times 0,5$ ms.
3. Įvertinus mielių *S. cerevisiae* SP1 kamieno transformacijos integracine pNMG plazmide efektyvumą naudojant optimalius impulsinio elektrinio lauko parametrus, gaunamas transformacijos efektyvumas – 1×10^3 transformantų/ μ g DNR.
4. Optimizavus impulso trukmę *S. cerevisiae* SP1 kamieno transformacijoms integracine pNMG plazmide, gaunamas optimalus impulso laikas – $5 \times 0,5$ ms.
5. Optimizavus pDNR koncentraciją *S. cerevisiae* SP1 kamieno transformacijoms pNMG plazmide, gaunama optimali plazmidės koncentracija – 2 ng/ μ l.

Darbą atliko:

Daniel Račicki

Darbo vadovė:

Prof. Dr. Eglė Lastauskienė

Darbo konsultantė:

J. Asist. Justina Versockienė

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

DANIEL RAČICKI

Mielių ląstelių transformacijos integracinėmis plazmidėmis optimizavimas naudojant impulsinį elektrinį lauką

Magistrinis darbas

Darbas atliktas

VU GMC Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje

SANTRAUKA

Baigiamojo darbo tikslas buvo nustatyti mielių *S. cerevisiae* SP1 kamieno optimalias transformacijos integracinėmis plazmidėmis sąlygas naudojant impulsinį elektrinį lauką. Tyrimo metu buvo naudojami mikroorganizmų kultivavimo skirtingose mitybinėse terpėse, genotipavimo, transformacijos ir vaizdinimo metodai. Transformavus *S. cerevisiae* SP1 kamieno ląsteles nustatytos optimalios sąlygos – 10 kV/cm, $5 \times 0,5$ ms. Optimali plazmidės koncentracija – 2 ng/ μ l. Kiti nagrinėti veiksniai įtakos transformacijos efektyvumui neturėjo. Gautas transformacijos efektyvumas – 1×10^3 transformantai/ μ g DNR. Plazmidė sėkmingai linearizuota restrikcijos endonukleaze StuI (Eco147I). Nustatyta, kad transformacijai tikslingiausia naudoti ankstyvosios-vidurinės augimo fazės ląsteles ir jų OD600 – 0,91.

VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

Department of Microbiology and Biotechnology

DANIEL RAČICKI

Optimization of Yeast Transformation By Integrating Plasmids Conditions Using Pulsed Electric Field

Master's Thesis

Work was conducted in the Department of Microbiology and Biotechnology, Life Sciences Center, Vilnius University

SUMMARY

The main objective of this master thesis was to identify the optimal transformation by integrating plasmids conditions of *S. cerevisiae* SP1 strain cells using a pulsed electric field. In order to reach this objective certain experiments were conducted, including, but not limited to cultivation of microorganisms, genotyping, transformation, and visualisation. After transforming *S. cerevisiae* SP1 strain cells the optimal conditions were found to be 10 kV/cm, 5 × 0,5 ms. The achieved transformation efficiency was 1 × 10³ transformants/μg DNR. The plasmid was successfully linearised using a restriction endonuclease *StuI* (also known as *Eco147I*). It has been determined that it most appropriate to use early log phase cells and a final cell density of OD600 – 0,91.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Armaleo, D., Ye, G.-N., Klein, T. M., Shark, K. B., Sanford, J. C., & Johnston, S. A. (1990). Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Current Genetics*, *17*(2), 97–103. <https://doi.org/10.1007/BF00312852>
2. Arroyo-López, F. N., Orlić, S., Querol, A., & Barrio, E. (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, *131*(2–3), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.035>
3. Aune, T. E. V., & Aachmann, F. L. (2010). Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(5), 1301–1313. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2349-1>
4. Bak, R. O., Dever, D. P., & Porteus, M. H. (2018). CRISPR/Cas9 genome editing in human hematopoietic stem cells. *Nature Protocols*, *13*(2), 358–376. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.143>
5. Becker, D. M., & Guarente, L. (1991). [12] High-efficiency transformation of yeast by electroporation. In *Methods in Enzymology* (Vol. 194, pp. 182–187). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94015-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94015-5)
6. Cohen, R., & Engelberg, D. (2007). Commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains (e.g. BY4741, W303) are growth sensitive on synthetic complete medium due to poor leucine uptake. *FEMS Microbiology Letters*, *273*(2), 239–243. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00798.x>

7. Costanzo, M. C., & Fox, T. D. (1988). Transformation of yeast by agitation with glass beads. *Genetics*, *120*(3), 667–670. <https://doi.org/10.1093/genetics/120.3.667>
8. Daniel Gietz, R., & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. In *Methods in Enzymology* (Vol. 350, pp. 87–96). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50957-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50957-5)
9. Delorme, E. (1989). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(9), 2242–2246. <https://doi.org/10.1128/AEM.55.9.2242-2246.1989>
10. G418 Selection and stability of cloned genes integrated at chromosomal δ sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. (1996). *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, *49*(1), 7.
11. Gelperin, D. M., White, M. A., Wilkinson, M. L., Kon, Y., Kung, L. A., Wise, K. J., Lopez-Hoyo, N., Jiang, L., Piccirillo, S., Yu, H., Gerstein, M., Dumont, M. E., Phizicky, E. M., Snyder, M., & Grayhack, E. J. (2005). Biochemical and genetic analysis of the yeast proteome with a movable ORF collection. *Genes & Development*, *19*(23), 2816–2826. <https://doi.org/10.1101/gad.1362105>
12. Gietz, R. D., & Woods, R. A. (2001). Genetic Transformation of Yeast. *BioTechniques*, *30*(4), 816–831. <https://doi.org/10.2144/01304rv02>
13. Gnügge, R., Liphardt, T., & Rudolf, F. (2016). A shuttle vector series for precise genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: Shuttle Vectors for Precise Genetic Engineering of *S. cerevisiae*. *Yeast*, *33*(3), 83–98. <https://doi.org/10.1002/yea.3144>

14. Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), 546. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
15. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
16. Hashimoto, H., Morikawa, H., Yamada, Y., & Kimura, A. (1985). A novel method for transformation of intact yeast cells by electroinjection of plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 21(5). <https://doi.org/10.1007/BF00252714>
17. Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 52(4), 536–553. <https://doi.org/10.1128/MMBR.52.4.536-553.1988>
18. Hinnen, A., Hicks, J. B., & Fink, G. R. (n.d.). *Transformation of yeast*. 5.
19. Horecka and Angela M. Chu, J. (2017). *Yeast Colony PCR: It doesn't get any easier than this! v1* [Preprint]. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.gzwbx7e>
20. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153(1), 163–168. <https://doi.org/10.1128/JB.153.1.163-168.1983>
21. Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., & Claverys, J.-P. (2014). Bacterial transformation: Distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology*, 12(3), 181–196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>

22. Johnston, S., Anziano, P., Shark, K., Sanford, J., & Butow, R. (1988). Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science*, *240*(4858), 1538–1541. <https://doi.org/10.1126/science.2836954>
23. Kawai, S., Pham, T. A., Nguyen, H. T., Nankai, H., Utsumi, T., Fukuda, Y., & Murata, K. (2004). Molecular insights on DNA delivery into *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *317*(1), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.011>
24. Kawai, S., Phan, T. A., Kono, E., Harada, K., Okai, C., Fukusaki, E., & Murata, K. (2009). Transcriptional and metabolic response in yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells during polyethylene glycol-dependent transformation: Transcriptional and metabolic response in yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells during polyethylene glycol-dependent transformation. *Journal of Basic Microbiology*, *49*(1), 73–81. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800123>
25. Kelesidis, T., & Pothoulakis, C. (2012). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, *5*(2), 111–125. <https://doi.org/10.1177/1756283X11428502>
26. Kellis, M., Birren, B. W., & Lander, E. S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, *428*(6983), 617–624. <https://doi.org/10.1038/nature02424>

27. Kowalczykowski, S. C. (2015). An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(11), a016410. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016410>
28. Lederberg, J., & Lederberg, E. M. (1952). REPLICA PLATING AND INDIRECT SELECTION OF BACTERIAL MUTANTS. *Journal of Bacteriology*, 63(3), 399–406. <https://doi.org/10.1128/JB.63.3.399-406.1952>
29. Lee, F. W. F. (n.d.). *Improved efficiency and stability of multiple cloned gene insertions at the d sequences of Saccharomyces cerevisiae*. 7.
30. Ma, H., Kunes, S., Schatz, P. J., & Botstein, D. (1987). Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene*, 58(2–3), 201–216. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90376-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90376-3)
31. MacLean, R. C., & Gudelj, I. (2006). Resource competition and social conflict in experimental populations of yeast. *Nature*, 441(7092), 498–501. <https://doi.org/10.1038/nature04624>
32. Manivasakam, P., Weber, S. C., McElver, J., & Schiestl, R. H. (1995). Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 23(14), 2799–2800. <https://doi.org/10.1093/nar/23.14.2799>
33. Manney, T. R., & Manney, M. L. (1992). Yeast: A Research Organism for Teaching Genetics. *The American Biology Teacher*, 54(7), 426–431. <https://doi.org/10.2307/4449533>

34. Mitrikeski, P. T. (2015). Pathways and Mechanisms of Yeast Competence: A New Frontier of Yeast Genetics. In M. A. van den Berg & K. Maruthachalam (Eds.), *Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 1* (pp. 223–237). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10142-2_22
35. Mosttafiz, S., Rahman, M., & Rahman, M. (n.d.). *Biotechnology: Role Of Microbes In Sustainable Agriculture And Environmental Health*. 6.
36. Neukamm, B., Stahl, U., & Lang, C. (2002). Endocytosis is involved in DNA uptake in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1572(1), 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00279-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00279-9)
37. Neumann, E., Kakorin, S., Tsoneva, I., Nikolova, B., & Tomov, T. (1996). Calcium-mediated DNA adsorption to yeast cells and kinetics of cell transformation by electroporation. *Biophysical Journal*, 71(2), 868–877. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79288-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79288-3)
38. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal*, 1(7), 841–845. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>
39. Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W., & Rothstein, R. J. (1981). Yeast transformation: A model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(10), 6354–6358. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6354>
40. Pham, T. A., Kawai, S., Kono, E., & Murata, K. (2011). The Role of Cell Wall Revealed by the Visualization of *Saccharomyces cerevisiae* Transformation. *Current Microbiology*, 62(3), 956–961. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9807-y>

41. Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., & Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*, 22(4), 183–186.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.02.002>
42. Potter, H. (2003). Transfection by Electroporation. *Current Protocols in Molecular Biology*, 62(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0903s62>
43. Potter, H., Weir, L., & Leder, P. (n.d.). *Enhancer-dependent expression of human Kc immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation*. 5.
44. Pronk, J. T., Yde Steensma, H., & Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12(16), 1607–1633.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199612\)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4)
45. Rebersek, M., Miklavcic, D., Bertacchini, C., & Bertacchini, C. (n.d.). Cell Membrane Electroporation—Part 3: The Equipment. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 30(3), 11.
46. Reuter, M., Bell, G., & Greig, D. (2007). Increased outbreeding in yeast in response to dispersal by an insect vector. *Current Biology*, 17(3), R81–R83.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.059>
47. Robertson, A. S., Smythe, E., & Ayscough, K. R. (2009). Functions of actin in endocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(13), 2049–2065.
<https://doi.org/10.1007/s00018-009-0001-y>
48. Sakai, A., Shimizu, Y., & Hishinuma, F. (1990). Integration of heterologous genes into the chromosome of *Saccharomyces cerevisiae* using a delta sequence of yeast

retrotransposon Ty. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 302–306.

<https://doi.org/10.1007/BF00164526>

49. Satkauskas, S., Bureau, M. F., Puc, M., Mahfoudi, A., Scherman, D., Miklavcic, D., & Mir, L. M. (2002). Mechanisms of in Vivo DNA Electrotransfer: Respective Contributions of Cell Electroporation and DNA Electrophoresis. *Molecular Therapy*, 5(2), 133–140. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0526>
50. Schiestl, R. H., & Gietz, R. D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics*, 16(5–6), 339–346. <https://doi.org/10.1007/BF00340712>
51. Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J.-L., Calabretta, A., Di Paola, M., De Filippo, C., Viola, R., Capretti, P., Polsinelli, M., Turillazzi, S., & Cavalieri, D. (2012). Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), 13398–13403. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208362109>
52. Suga, M., & Hatakeyama, T. (2003). High-efficiency electroporation by freezing intact yeast cells with addition of calcium. *Current Genetics*, 43(3), 206–211. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0385-4>
53. Svetec, I.-K., Štafa, A., & Zgaga, Z. (2007). Genetic side effects accompanying gene targeting in yeast: The influence of short heterologous termini. *Yeast*, 24(8), 637–652. <https://doi.org/10.1002/yea.1497>
54. Symington, L. S., Rothstein, R., & Lisby, M. (2014). Mechanisms and Regulation of Mitotic Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 198(3), 795–835. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.166140>

55. Szajewska, H., & Kołodziej, M. (2015). Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *42*(7), 793–801. <https://doi.org/10.1111/apt.13344>
56. Taxis, C., & Knop, M. (2006). System of centromeric, episomal, and integrative vectors based on drug resistance markers for *Saccharomyces cerevisiae*. *BioTechniques*, *40*(1), 73–78. <https://doi.org/10.2144/000112040>
57. Thompson, J. R., Register, E., Curotto, J., Kurtz, M., & Kelly, R. (1998). *An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation*. 7.
58. Thomson, J. M., Gaucher, E. A., Burgan, M. F., De Kee, D. W., Li, T., Aris, J. P., & Benner, S. A. (2005). Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nature Genetics*, *37*(6), 630–635. <https://doi.org/10.1038/ng1553>
59. Voth, W. P. (2001). Yeast vectors for integration at the HO locus. *Nucleic Acids Research*, *29*(12), 59e–559. <https://doi.org/10.1093/nar/29.12.e59>
60. Weaver, J. C., Smith, K. C., Esser, A. T., Son, R. S., & Gowrishankar, T. R. (2012). A brief overview of electroporation pulse strength–duration space: A region where additional intracellular effects are expected. *Bioelectrochemistry*, *87*, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.02.007>
61. Werner-Washburne, M., & Singer, R. A. (1993). *Stationary Phase in the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. *57*, 19.
62. Willshaw, G. A., Smith, H. R., & Anderson, E. S. (1979). Application of Agarose Gel Electrophoresis to the Characterization of Plasmid DNA in Drug-resistant Enterobacteria.

Journal of General Microbiology, 114(1), 15–25. <https://doi.org/10.1099/00221287-114-1-15>

63. Wosika, V., Durandau, E., Varidel, C., Aymoz, D., Schmitt, M., & Pelet, S. (2016). New families of single integration vectors and gene tagging plasmids for genetic manipulations in budding yeast. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(6), 2231–2240. <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1249-1>
64. Wu, S., & Letchworth, G. J. (2004). High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques*, 36(1), 152–154. <https://doi.org/10.2144/04361DD02>
65. Yamakawa, M., Hishinuma, F., & Gunge, N. (1985). Intact Cell Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by Polyethylene Glycol. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(3), 869–871. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866817>
66. *Yeasts: Biotechnology and Biocatalysis*. (1989). Taylor & Francis. <https://books.google.lt/books?id=xRNXIWlkYJwC>

PADĖKA

Visų pirma noriu padėkoti savo darbo vadovei Prof., Dr., Eglei Lastauskienei už galimybę atlikti savo baigiamąjį darbą Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje. Didelis ačiū už paskirtą nuostabiąją darbo konsultantę J. Asist. Justiną Versockienę. Atskiras didelis ačiū Justinai už visą pagalbą ir paskatinimą darbo eigoje bei savo skirtą laiką diskusijoms. Ačiū už visus patarimus ir už moralinį palaikymą.

Taip pat ačiū visiems C378 Eukariotų molekulinės biologijos laboratorijoje dirbantiems studentams už gerą atmosferą laboratorijoje, patarimus, supratingumą ir pagalbą sprendžiant iškilusias problemas.

Ačiū visiems dėstytojams, kurie per šiuos du metus, nors ir dažniausiai nuotoliniu būdu, dalijosi savo patirtimi ir žiniomis. Taip pat dėkoju VU GMC alumnui Jonui Virkučiui už palaikymą, pagalbą ir draugišką ranką sunkiais momentais.