

AKSM2A en AKSM2B ensiemtoets optimalisering en rekombinante uitdrukking

P Venter



orcid.org 0000-0001-5566-9914

Verhandeling voorgelê ter gedeeltelike nakoming vir die graad
Magister Scientiae in Biochemie aan die Noordwes-
Universiteit

Studieleier:

Dr R Van der Sluis

Gradeplegtigheid Mei 2019

24174459

AKSM2A en AKSM2B ensiemtoets optimalisering en rekombinante uitdrukking

P Venter



orcid.org 0000-0001-5566-9914

Verhandeling voorgelê ter gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad *Magister Scientiae in Biochemie* aan die Noordwes-Universiteit

Die finansiële bystand van die Nasionale Navorsing Stigting (UID: 99323), die Mediese Navorsingsraad, die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns en die PUK-kanselierstrust tot hierdie navorsing word hiermee erken. Die opinies uitgedruk en die gevolgtrekkings wat bereik is, is die van die outeur en moet nie noodwendig aan die Nasionale Navorsing Stigting (UID: 99323), die Mediese navorsingsraad, die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns en die PUK-kanselierstrust toegeskryf word nie.

The financial assistance of the National Research Foundation (NRF) (UID: 99323), the Medical Research Council (MRC), the South African Academy for Science and Arts and the PUC chancellor's trust towards this research is hereby acknowledged. The opinions expressed and conclusions arrived at, are those of the author and are not necessarily to be attributed to the NRF, MRC, South African Academy for Science and Arts or the PUC-chancellor trust.

Studieleier: Dr R Van der Sluis

Gradeplegtigheid Mei 2019

24174459

BEDANKINGS

Aan ons almagtige God en hemelse Vader kom alle lof, eer en dank toe vir die geleentheid en vermoë om hierdie studie aan te pak.

Dankie aan my studie leier, dr. Rencia van der Sluis, vir al u ondersteuning, raad en opleiding in die laaste drie jaar. Ek het regtig baie by u geleer en sal altyd dankbaar wees daarvoor. Dankie vir al u moeite met beursaansoeke en dat u so ook vir u studente sorg en baie dinge vir ons moontlik maak. Dankie vir u geduld en verstaan en al die geleenthede wat u vir ons gebied het.

Dankie aan my mede-meestersgraadstudente in die molekulêre biologie laboratorium. Marno, Luan en Chantelle, julle het die jare hier so lekker gemaak en julle raad en motivering was van onskatbare waarde. Ek gaan julle vreeslik mis.

Dankie aan al die professors en dosente wat gehelp het met raad deur die loop van my meestersgraad, veral prof. Francois van der Westhuizen, prof. Albie van Dijk, mev. Mari van Reenen en prof. Roan Louw.

'n Spesiale woord van dank aan die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns vir die bydra van 'n beurs en die aanmoediging om die studie in Afrikaans uit te voer.

Baie dankie aan die Nasionale Navorsing Stigting (UID: 99323), die Mediese Navorsingsraad, en die PUK-kanselierstrust vir die fondse bygedra tot hierdie studie.

Dankie aan my familie en vriende vir julle verstaan en aanmoediging, veral my ouers wat my gedra het in hierdie tyd.

Dankie aan my verloofde, Christine Ferreira, jy is 'n helder lig wat die regte pad vir my aanwys.

OPSOMMING

Glisienkonjugasie is 'n Fase 2-biotransformasieweg wat verantwoordelik is vir die detoksifisering van xenobiotika soos bensoaat en salisilaat. Hierdie biotransformasieweg is gekonserveerd en speel 'n baie belangrike rol in die lewer se metabolisme. Dit, tesame met die feit dat daar nog geen defek in die glisienkonjugasieweg beskryf is nie, dui daarop dat hierdie weg noodsaaklik is vir oorlewing. Hierdie biotransformasieweg is in die verlede as 'n een-stap proses bestudeer, maar onlangse studies het die kritiese tekort ensimatiese inligting aangaande beide ensieme betrokke in die weg, naamlik die asiel-KoA-sintetase mediumketting 2B (AKSM2B) en glisienasieltransferase (GLIAT), uitgewys. Dit is belangrik om hierdie weg beter te karakteriseer veral in die lig van die groot hoeveelhede xenobiotika soos bensoaat en salisilaat wat in die moderne omgewing ingeneem word en die nuwe-effekte wat ervaar word as gevolg van hierdie toksiese stowwe. Die vermoë van 'n biotransformasieweg om effektief van xenobiotika ontslae te raak, is 'n som totaal van elke individuele ensiem wat betrokke is in die weg, se vermoë om optimaal te funksioneer. Die limiet van die hoeveelheid xenobiotika wat ingeneem kan word, sonder om die nuwe-effekte te ervaar, word deur hierdie vermoë aangedui. Indien die ensieme in hierdie weë nie gekarakteriseer is nie, soos AKSM2B, is dit nie moontlik om te bepaal of die hoeveelheid xenobiotika wat ingeneem word, veilig gedetoksifiseer word nie. Bensoaat en salisilaat word ten spyte hiervan steeds algemeen en in groot hoeveelhede gebruik. Dit word groot en deels toegelaat as gevolg van die feit dat toksisiteit studies die effek van blootstelling van hierdie stowwe slegs oor 'n kort termyn in diere modelle bestudeer. Om toekomstige navorsing in staat te stel om die AKSM2B-ensiem te karakteriseer word 'n ensiemtoets vir die AKSM2B-ensiem benodig en die AKSM2B-ensiem self word benodig. Die eerste hoof doelstelling van hierdie studie was dus om 'n ensiemtoets vir die AKSM2B-ensiem te optimaliseer. Die AKSM2B-ensiem word geproduseer in die mens se lewer en word nie uitgedruk in menslewer kanker sellyne nie. Dit is dus onprakties om die ensiem te probeer isoleer vanuit natuurlike bronne. Die tweede hoof doelstelling van hierdie studie was dus om die AKSM2B-proteïen rekombinant te produseer. Die *AKSM2B-geen* is gesintetiseer en in verskillende ekspressieplasmiede gekloneer.

Die *AKSM2B-geen* is 98.8% identies aan die *AKSM2A-geen*. Hierdie twee gene het ontstaan as gevolg van 'n chromosomale verdubbeling gebeurtenis van die *AKSM2-geen*. Die biologiese rol van die *AKSM2A-ensiem* is onbekend. Die hoë ooreenkoms tussen die twee ensieme laat die vraag ontstaan of hierdie twee ensieme by dieselfde weg betrokke is en of die ensieme se substraatspesifisiteit ooreenstem. Die karakterisering van die *AKSM2A-ensiem* is dus ook belangrik omdat dit ook 'n effek kan hê in glisienkonjugasie. Die *AKSM2A-geen* is dus saam met die *AKSM2B-geen* gekloneer en beide ensiem is rekombinant uitgedruk. 'n Ensiemtoets vir die

AKSM2-ensieme was geïdentifiseer, afgeskaal en geoptimaliseer om op 'n plaatleser te geskied. Verskillende bakteriële ekspressiemetodes is getoets vir oplosbare uitdrukking van AKSM2A- en AKSM2B-ensieme en 'n metode wat oplosbare AKSM2-ensieme produseer is geïdentifiseer en gedeeltelik geoptimaliseer.

Sleuteltermes: Asiel-KoA-sintetase (AKS); asiel-KoA-sintetase mediumketting 2A (AKSM2A); asiel-KoA-sintetase mediumketting 2B (AKSM2B); glisienkonjugase; Fase 2-biotransformasie; bensoaat; salisilaat, ekspressiesisteme, rekombinante ensiem uitdrukking.

ABSTRACT

Glycine conjugation is a Phase 2 biotransformation pathway that is responsible for the detoxification of xenobiotics such as benzoate and salicylate. This biotransformation pathway is conserved and plays an important role in the liver's metabolism. This alongside the fact that no defect in the glycine conjugation pathway has been described, indicates that this pathway is essential for survival. This biotransformation pathway has been studied as a one-step process in the past, but recent studies indicate the lack of enzymatic information on both enzymes in the pathway, namely the acyl-CoA synthetase medium chain 2B (ACSM2B) and the glycine acyl transferase (GLYAT). It is important to better characterise this pathway especially in light of the high volumes of xenobiotics such as benzoate and salicylate that are consumed in modern society and the side effects, which are experienced due to these toxic materials. The ability of a biotransformation pathway to eliminate xenobiotics is the sum of the individual participating enzymes' ability to function optimally. The amount of xenobiotic that can be ingested without experiencing side effects is indicated by this ability. If the enzymes in these pathways are not characterized, as it is with ACSM2B, then it is not possible to determine if the amount of xenobiotic that is consumed, is safely detoxified. Benzoate and salicylate are generally still consumed in high amounts despite this. This consumption is permitted mainly due to toxicity studies that only study the effect of the exposure to these toxic substances in animal models for short time periods. An enzyme test for the ACSM2B enzyme and the ACSM2B protein itself is therefore needed to enable future research to characterize the ACSM2B protein. The first aim of this study was therefore to optimize an enzyme test for the ACSM2B enzyme. The ACSM2B enzyme is produced in the human liver however, it is not expressed in human liver cancerous cell lines. It is therefore impractical to isolate the enzyme from natural sources. The second aim of this study was to recombinantly produce the ACSM2B protein. The *ACSM2B* gene was synthesized and cloned into various expression plasmids.

The *ACSM2B* gene is 98.8% identical to the *ACSM2A* gene. These two genes formed due to a chromosomal doubling event of the *ACMS2* gene. The biological role of the ACSM2A enzyme is unknown. The high similarity of these two enzymes begs the question if these two enzymes take part in the same enzymatic pathway and if these enzymes' substrate affinity overlaps. The characterization of the ACSM2A enzyme is therefore also important, because it can have an effect in glycine conjugation. The *ACSM2A* gene was cloned in the same manner as the *ACSM2B* gene and both enzymes were recombinantly expressed. An enzyme test for the ACSM2 enzymes were identified, downscaled and optimized to be performed on a plate reader. Various bacterial

expression methods were tested for the ability to produce soluble ACSM2A and ACSM2B proteins and a method that produced soluble ACSM2 enzymes was identified and partially optimized.

Key terms: acyl-CoA synthetase (ACS); acyl-CoA synthetase medium chain 2A (ACSM2A); acyl-CoA synthetase medium chain 2B (ACSM2B); glycine conjugation; phase two biotransformation; benzoate; salicylate, expression systems, recombinant enzyme production.

INHOUDSOPGAWE

BEDANKINGS	I
OPSOMMING	II
ABSTRACT	IV
HOOFSTUK 1 INLEIDING	1
1.1 Inleiding	1
1.2 Struktuur van hierdie verhandeling	2
HOOFSTUK 2 LITERATUURSTUDIE	3
2.1 Inleiding	3
2.2 Biotransformasie.....	3
2.3 Fase 2-biotransformasie: Glisienkonjugasie	5
2.3.1 Glisienkonjugasiesubstrate en substraatbronne.....	6
2.3.2 Kapasiteitbeperking en kompeterende substrate van glisienkonjugasie.....	8
2.3.2.1 Bensoaat as substraat vir glisienkonjugasie	8
2.3.2.2 Salisilaat as substraat vir glisienkonjugasie	10
2.3.2.3 Salisilaat en bensoaat toon kompeterende inhibisie van glisienkonjugasie	10
2.3.2.4 Metaboliese rol van Asiel-KoA-sintetase in vetsuurmetabolisme	11
2.3.3 Individuele variasie in die tempo van glisienkonjugasie	12
2.4 Asiel-KoA-sintetase	13
2.4.1 Klassifisering van Asiel-KoA-sintetases	13
2.4.2 Ligging van asiel-KoA-sintetase.....	13
2.4.3 Die rol van ko-ensiem A in asiel-KoA-sintetase funksie	15

2.5	AKSM2A en AKSM2B.....	15
2.5.1	Die <i>AKSM2A</i> en <i>AKSM2B</i> gene en hul genetiese variasie	16
2.5.2	Ensimaties inligting van AKSM2B	17
2.5.3	Rekombinante uitdrukking van AKSM2A en AKSM2B	18
2.5.3.1	AKSM2A.....	18
2.5.3.2	AKSM2B.....	19
2.6	Probleemstelling	19
2.6.1	Navorsingsvraag.....	20
2.7	Navorsingsdoelstellings en -doelwitte	21
2.7.1	Optimaliseer 'n ensiemtoets vir AKSM2A en AKSM2B	21
2.7.2	Formuleer 'n ekspressiesisteem wat oplosbare AKSM2A en AKSM2B produseer.....	21
HOOFSTUK 3 DIE OPTIMALISERING VAN 'n AKSM2-ENSIEMTOETS		22
3.1	Inleiding	22
3.2	Metodes en materiale	26
3.2.1	Vorbereiding van voorraadoplossings	26
3.2.2	Bewys van ensiemtoets konsep op Libra S12 spektrofotometer	27
3.2.2.1	Bevestig β -NADH absorpsie golflengte	27
3.2.2.2	Bevestiging van ensiemtoets	27
3.2.2.3	Ondersoek agtergrond van ensiemtoets	28
3.2.3	Afskaal van ensiemtoets.....	28
3.2.3.1	Identifisering van β -NADH se optimale golflengte van absorpsie	28
3.2.3.2	Molêre absorpsie koëffisiënt bepaling van β -NADH op plaatleser	28

3.2.3.3	Ensiemtoets uitvoering op plaatleser	30
3.2.4	Statistiese verwerking van ensiemtoets data	31
3.2.5	Berekening van positiewe kontrole se aktiwiteit	32
3.3	Resultate en bespreking	33
3.3.1	Bewys van ensiemtoets konsep op Libra S12 spektrofotometer	33
3.3.1.1	Bevestiging van β -NADH absorbansiegolflengte.....	33
3.3.1.2	Bevestiging van ensiemtoets	34
3.3.1.3	Ondersoek agtergrond van ensiemtoets	35
3.3.2	Afskaal van ensiemtoets.....	36
3.3.2.1	Identifisering van β -NADH se optimale golflengte van absorbansie op die plaatleser vir gebruik in molêre absorpsiekoëffisiënt bepaling.	36
3.3.2.2	Molêre absorpsiekoëffisiëntbepaling van β -NADH op die plaatleser	39
3.3.2.3	Ensiemtoets uitvoering op plaatleser	40
3.3.3	Statistiese verwerking van ensiemtoetsdata	43
3.3.4	Berekening van positiewe kontrole se aktiwiteit	47
3.3.5	Bespreking	50
HOOFSTUK 4 REKOMBINANTE UITDRUKKING VAN DIE AKSM2-ENSIEME		52
4.1	Inleiding	52
4.2	Metodes en materiale	55
4.2.1	Sagteware voorspelling van natranslasiemodifikasies, N-terminaal teikenvolgorde en N- en C-terminaal beskikbaarheid.	55
4.2.1.1	Disulfiedbindings	56
4.2.1.2	Mitochondriale N-terminaal teikenvolgorde	56

4.2.1.3	Glikosilasie	56
4.2.1.4	Bestudering van AKSM2A se kristal struktuur.....	57
4.2.2	Vorbereiding van voorraadoplossings	57
4.2.3	pET-32a+/AKSM2A en pET-32a+/AKSM2B	57
4.2.4	Grootskaalse plasmied ekstraksie	59
4.2.5	DNS kwantifisering	61
4.2.6	Agarose jel elektroforese	61
4.2.7	Bakteriële gliserol voorrade	62
4.2.8	Kleinskaalse plasmied ekstraksie	62
4.2.9	Restriksie ensiem snyding	63
4.2.10	Vorbereiding van kompetente M15[pREP4] <i>E. coli</i>	65
4.2.11	Vorbereiding van chemiese kompetente JM109 <i>E. coli</i>	65
4.2.12	Transformasie van aangekoopte plasmiede in chemies kompetente JM109 <i>E. coli</i> en bevestiging van plasmied grotes.....	66
4.2.13	Transformasie van aangekoopte kompetente sellyne	67
4.2.14	Sanger volgordebepaling	69
4.2.15	Voorvoeders ontwerp	71
4.2.16	Optimalisering van die polimerasie ketting reaksies (PKRs)	73
4.2.16.1	Die eerste PKR optimalisering stap: ses gekose voorvoerder pare se PKRs is getoets met 'n hitte gradiënt van die hibridiseringstemperatuur.	74
4.2.16.2	Die tweede PKR optimalisering stap: Voorvoerder pare se PKRs is verder geoptimaliseer deur die PKR se siklusse te verminder, die verlengtyd te verminder en 'n verdere hitte gradiënt uit te voer.	76

4.2.16.3	Die derde PCR optimalisering stap: Voorvoerder pare se PKRs is nog verder geoptimaliseer deur die PCR se verlengtyd nog meer te verminder en strenger uit te werk, die denaturering tyd is verminder, die optimale hoeveelheid templaats DNS is bepaal en 'n verdere hitte gradiënt is uitvoer.	77
4.2.17	Hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt van PKRs met voorvoerder pare 2 en 4 met die geoptimaliseerde PCR metodes as voorbeeld vir alle voorvoerder pare.....	79
4.2.18	Ontwerpte voorvoerder pare se geoptimaliseerde PKRs	79
4.2.19	Agarose jel ekstraksie.....	81
4.2.20	PCR produk/inlasstuk skoonmaak	81
4.2.21	Defosforilase van DNS 5' punte	82
4.2.22	DNS Ligerings	82
4.2.23	Kolonie PCR	84
4.2.24	Rekombinante konstruksie	85
4.2.24.1	pFLAG metode: Tradisionele restriksie ensiem klonering van inlasstukke in pFLAG-CTC plasmied.	85
4.2.24.2	pET28-metode: Tradisionele restriksie ensiem klonering van inlasstukke in pET28a(+) plasmied.....	87
4.2.24.3	PCR klonering metode wat gebruik is om inlasstukke in die pQE-30 en pcDNA3.1(+) plasmied te kloner.....	87
4.2.24.4	pQE-30-metode: PCR klonering van die inlasstukke in die pQE-30 plasmied.....	89
4.2.24.5	pcDNA-metode: PCR klonering van die inlasstukke in die pcDNA3.1(+) plasmied.....	90
4.2.24.6	pBAD-metode: TOPO klonering van die inlasstukke in die pBAD plasmied	92
4.2.25	Sellise en proteïen ekstraksie metodes.....	95

4.2.25.1	Sellise en proteïen ekstraksie deur sonifikasie.....	95
4.2.25.2	B-PER en Bugbuster se lise en proteïen ekstraksie reagense	95
4.2.26	Natriumdodesielsulfaat poliakrielamiedjelektroforese.....	96
4.2.27	Proteïenekspressie	97
4.2.27.1	Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pFLAG metode.....	97
4.2.27.2	Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pET28-metode	98
4.2.27.3	Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pQE-30-metode	99
4.2.27.4	Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pBAD-metode.	99
4.2.28	Gedeeltelike optimalisering van pBAD proteïenekspressiemetode	100
4.2.28.1	Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pBAD-metode met bygevoegde pantoteensuur	100
4.2.28.2	Toets van verskillende lise-metodes vir die AKSM2B-t proteïenekspressie in die pBAD-metode.	101
4.2.29	Westerseklad van AKSM2-proteïene wat deur die pBAD-metode uitgedruk is.....	102
4.3	Resultate en bespreking	103
4.3.1	Sagteware voorspelling van natranslasiemodifikasies, N-terminaal teikenvolgorde en N- en C-terminaal beskikbaarheid.	103
4.3.1.1	Disulfiedbindings	103
4.3.1.2	Mitochondriale N-terminaal teikenvolgorde	104
4.3.1.3	Glikosilasie	105
4.3.1.4	Bestudering van AKSM2A se kristalstruktuur.....	105
4.3.2	Grootskaalse plasmied ekstraksie van pET-32a+/AKSM2A en pET- 32a+/AKSM2B	106

4.3.3	Sanger volgorde bepaling van die <i>AKSM2A</i> en <i>AKSM2B</i> gene in die pET32a(+) plasmiede.....	108
4.3.4	Transformasie van aangekoopte plasmiede in chemies kompetente JM109 <i>E. coli</i> en bevestiging van plasmied grotes.....	111
4.3.5	Optimalisering van die polimerasie ketting reaksies (PKRs)	112
4.3.5.1	Die eerste PKR optimalisering stap: Hitte gradiënt van die hibridiseringstemperatuur.....	112
4.3.5.2	Die tweede PKR optimalisering stap: PKR siklus vermindering, vermindering van die verlengtyd en 'n verdere hitte gradiënt.....	115
4.3.5.3	Die derde PKR optimalisering stap: Verdere vermindering van verlengtyd, die denaturering tyd is verminder, die optimale hoeveelheid templaats DNS is bepaal en 'n verdere hitte gradiënt is uitvoer.....	116
4.3.6	Hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt van PKRs met voorvoerder pare 2 en 4 met die geoptimaliseerde PKR metodes.	118
4.3.7	Rekombinante konstrukte	119
4.3.7.1	pFLAG metode: Tradisionele restriksie ensiem klonering van inlasstukke in pFLAG-CTC plasmied.	119
4.3.7.2	pET28 sisteem tradisionele restriksie ensiem klonering.....	127
4.3.7.3	pQE-30-metode: PKR klonering van die inlasstukke in die pQE-30 plasmied.....	133
4.3.7.4	pcDNA-metode: PKR klonering van die inlasstukke in die pcDNA3.1(+) plasmied.....	139
4.3.7.5	pBAD-metode TOPO klonering.....	144
4.3.8	Proteïenekspressie	147
4.3.8.1	Proteïenekspressie van die <i>AKSM2</i> -ensieme met die pFLAG metode.....	147
4.3.8.2	Proteïenekspressie van die <i>AKSM2</i> -ensieme met die pET28-metode	149

4.3.8.3	Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pQE-30-metode	152
4.3.8.4	Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pBAD-metode.	154
4.3.9	Gedeeltelike optimalisering van pBAD proteïenekspressiemetode	155
4.3.9.1	Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pBAD-metode met bygevoegde pantoteensuur en met 15 µl monster gelaai op die NDS- PAGE	155
4.3.9.2	Optimalisering van pBAD sisteem lise-metode	159
4.3.10	Westerseklad van AKSM2-proteïene wat deur die pBAD-metode uitgedruk is.	164
4.3.11	Opsomming	166
HOOFSTUK 5 GEVOLGTREKKING.....		169
5.1	Inleiding	169
5.2	Gevolgtrekking.....	169
5.2.1	Optimalisering van 'n ensiemtoets vir AKSM2A en AKSM2B.....	169
5.2.2	Evaluering en optimalisering van 'n ekspressiesisteem wat oplosbare AKSM2A en AKSM2B produseer.	170
5.3	Beperkinge en tekortkoming van die studie	172
5.4	Toekomsvooruitsigte.....	172
BIBLIOGRAFIE.....		173
BYLAE.....		181

LYS VAN TABELLE

Tabel 2-1:	Die natuurlike konsentrasie van bensoaat in voedsel teenoor die konsentrasie limiete van bensoaat in geprosesseerde voedsel	9
Tabel 2-2:	Klassifikasie van asiel-KoA-sintetases (AKSs)	13
Tabel 2-3:	Klassifikasie van mediumketting vetsuur asiel-KoA-sintetases (AKSMs).....	15
Tabel 2-4:	Genetiese inligting van <i>AKSM2A</i> en <i>AKSM2B</i>	16
Tabel 2-5:	Relatiewe substraatspesifisiteit van <i>AKSM2B</i> wat deur Vessey <i>et al.</i> (1999) in 'n kru-sel ekstrak bepaal is.....	17
Tabel 2-6:	<i>AKSM2B</i> -variant ensimatiese inligting.....	18
Tabel 3-1:	Vorraadoplossings	26
Tabel 3-2:	β -NADH konsentrasie gradiënt vir bepaling van molêre absorpsie koëffisiënt.....	29
Tabel 3-3:	Die maksimum absorpsie en die golflengte van maksimum absorpsie van die β -NADH konsentrasiereeks op die plaatleser.....	38
Tabel 3-4:	Stuksgewyse regressietriplikaat en gemiddelde knakpuntlesings van 3 ensiemtoetsuitvoerings	44
Tabel 3-5:	Die berekende standaardafwyking en variasiekoëffisiënt van al drie ensiemtoetse se triplikate.....	45
Tabel 3-6:	Die standaardafwyking en variasiekoëffisiënt bereken tussen die verskillende uitvoerings.....	47
Tabel 3-7:	Aktiwiteit van een eenheid asiel-KoA-sintetase bereken deur elke ensiemtoets.....	50
Tabel 4-1:	Voordele en nadele van <i>E. coli</i> , gis, soogdierselle en inkselle as ekspressiegashere.....	52
Tabel 4-2:	Opsomming van die gekose <i>E. coli</i> en soogdier ekspressiemetodes.	54

Tabel 4-3:	Die antibiotika wat gebruik is vir seleksie van plasmiede en die finale selkultuurkonsentrasies.....	60
Tabel 4-4:	Restriksie ensieme.....	63
Tabel 4-5:	Thermo Scientific restriksie ensiem snyding.....	64
Tabel 4-6:	NEB restriksie ensiem snyding.....	64
Tabel 4-7:	Plasmiede wat aangekoop of beskikbaar was, wat gebruik is in die transformasie van JM109 <i>E. coli</i>	66
Tabel 4-8:	Kompetente sellyne.....	67
Tabel 4-9:	Spesifikasies van kompetente sellyne se transformasie metodes.	68
Tabel 4-10:	Volgordebepalingsvoorvoeders.....	70
Tabel 4-11:	Ontwerpte voorvoeders vir klonering.....	72
Tabel 4-12:	Ses ontwerpte voorvoerder pare, die ooreenstemmende templaats DNS, gewenste inlasstuk lengte en voorspelde hibridiseringstemperatuur.	75
Tabel 4-13:	PKR siklussering toestande.	76
Tabel 4-14:	Hibridiseer temperatuur hitte gradiënt wat in eerste optimalisering gebruik is.	76
Tabel 4-15:	Hibridiseer temperatuur hitte gradiënt wat in die tweede stap van PKR optimalisering gebruik is saam met voorvoerder pare 2 en 4.....	77
Tabel 4-16:	Hibridiseer temperatuur hitte gradiënt wat in die derde stap van PKR optimalisering gebruik is saam met voorvoerder pare 2 en 4.....	78
Tabel 4-17:	Die derde PKR optimalisering stap se siklussering van PKRs met voorvoerder pare 2 en 4.....	78
Tabel 4-18:	Finale hitte gradiënt vir PKRs met voorvoerder pare 2 en 4.	79
Tabel 4-19:	Siklussering gebruik in alle PKRs.....	80
Tabel 4-20:	Voorvoerder pare se PKR verlengtyd en hibridiseer temperatuur.....	80

Tabel 4-21:	Defosforilase reaksie samestelling	82
Tabel 4-22:	Ligeringsreaksies samestellings.....	83
Tabel 4-23:	Kolonie PKR siklussering.	84
Tabel 4-24:	PKR klonering ligeringsreaksie.....	88
Tabel 4-25:	Voorvoerder pare en reaksie kondisies gebruik in die pBAD-metode	93
Tabel 4-26:	Positiewe kontrole se PKR siklussering.....	93
Tabel 4-27:	Voorvoerder pare 15 -18 se PKR siklussering.....	93
Tabel 4-28:	pBAD/TOPO ligeringsreaksie samestelling.	94
Tabel 4-29:	Kolonie PKR van pBAD sisteem se siklussering.	94
Tabel 4-30:	<i>E. coil</i> en plasmiedkonstrukte gebruik in die AKSM2 proteïenekspressie in die pFLAG metode.	97
Tabel 4-31:	<i>E. coil</i> en plasmiedkonstrukte gebruik in die AKSM2 proteïenekspressie in die pET28-metode.....	98
Tabel 4-32:	<i>E. coil</i> en plasmiedkonstrukte gebruik in die AKSM2 proteïenekspressie in die pBAD-metode.	99
Tabel 4-33:	Cyscon voorspelling van disulfiedbindings tussen aminosure in AKSM2A en AKSM2B.	103
Tabel 4-34:	MitoFates se mitochondriale N-terminaal teikenvolgorde voorspelling.....	104
Tabel 4-35:	Aantal moontlike C-, N- en O-gekoppelde glikosilasie posisies op AKSM2A en AKSMB.	105
Tabel 4-36:	Resultate van pFlag sisteem ligering en transformasie.	124
Tabel 4-37:	Resultaat van klonering van <i>AKSM2B-t</i> in die pFLAG-CTS plasmied.....	126
Tabel 4-38:	Gebuike metodes en die suksesvol gekloneerde plasmiedkonstrukte se oplosbare uitdrukking.	166

LYS VAN FIGURE

Figuur 2-1:	Vier fases van biotransformasie. Die diagram stel die metaboliese weg in die lewer voor. RSP: Reaktiewe suurstof spesies. Aangepas vanuit (Liska <i>et al.</i> , 2006; Döring & Petzinger, 2014; van der Sluis <i>et al.</i> , 2015a).....	4
Figuur 2-2:	Skematiese voorstelling van die glisienkonjugasie van bensoaat. Aangepas vanuit (Badenhorst <i>et al.</i> , 2013). ATP: Adenosien trifosfaat. AMP: Adenosien monofosfaat. HS-KoA: Koënsiem A. PPI: pirofosfaat.	6
Figuur 2-3:	Die skematiese voorstelling van die vier hoof bronne van substrate vir die glisienkonjugasieweg asook die onderskeidelike stappe waar hierdie bronne die weg betree. In Stap 1 word die substrate geaktiveer deur AKSM2B en in Stap 2 word glisien aan die substrate gekonjugeer deur GLIAT. Die aktivering van mediumketting vetsure word aangedui. Aangepas uit (van der Sluis, 2018).	7
Figuur 2-4:	Metaboliese rol van asiel-KoA-sintetase (AKS). Aangepas uit (Watkins, 1997; Grevengoed <i>et al.</i> , 2014).....	12
Figuur 2-5:	Voorstelling van die ligging van asiel-KoA-sintetase in die mitochondria en hulle betrokkenheid by die metabolisme van vetsure en seker xenobiotika. KPT: Karnitienpalmitoïeltransferase. KT: Karnitien-asielkarnitien translokase. OKP: Ontkoppelingsproteïen. ODF: Opgeloste stof draer familie. MTE: Mitochondriale tioësterase. TAG: Triasielgliserol. Aangepas uit (Lopaschuk <i>et al.</i> , 2010; van der Sluis & Erasmus, 2016).....	14
Figuur 3-1:	Skematiese voorstelling van die twee halfreaksies van asiel-KoA-sintetase. In die eerste half-reaksie word die vetsuur gekoppel aan 'n adeniël groep wat geskenk word vanaf 'n ATP-molekule. Dit vorm 'n asiel-AMP en stel PPI vry. Die ensiem-gebonde intermediêr is daardeur geaktiveer en word dan aangeval deur 'n KoA-S ⁻ in die tweede half-reaksie . 'n Asiel-KoA en AMP molekule word geproduseer.	22

Figuur 3-2:	Uiteensetting van die verskeie AKS ensiemtoetse. Aangepas uit (Watkins, 1997). Kontinue en eindpunt ensiemtoetse wat in die literatuur gebruik is om asiel-KoA sintetases mee te toets word weergegee.	24
Figuur 3-3:	Skematiese voorstelling van die Gibson <i>et al.</i> ensiem gekoppelde asiel-KoA-sintetase toets (Gibson <i>et al.</i> , 1990). Die vorming van AMP deur enige asiel-KoA sintetase word deur gebruik van drie ensieme naamlik myokinase, piruvaat kinase en laktaat-dehidrogenase gekoppel aan die verbruik van β-NADH wat waargeneem kan word by 340 nm.	25
Figuur 3-4:	Grafiek van die golflengteskandering van β -NADH op Libra spektrofotometer. Op die x-as is die golflengtes van 200 nm tot 400 nm en op die y-as is die absorpsie.	33
Figuur 3-5:	Grafiek van die ensiemtoets reaksie verloop op die Libra spektrometer met 1 milli-eenheid asiel-KoA-sintetase. Die x-as dui die tydsverloop in sekondes aan en die y-as die absorpsie by 340 nm.	34
Figuur 3-6:	Grafiek van die ensiemtoets reaksie verloop op die Libra spektrometer met 10 milli-eenhede asiel-KoA-sintetase. Die x-as dui die tydsverloop in sekondes aan en die y-as die absorpsie by 340 nm.	34
Figuur 3-7:	Grafiek van die golflengte skandering van die volledige ensiemtoets (met β -NADH) op Libra spektrometer. Op die x-as is die golflengtes van 200 nm tot 400 nm en op die y-as is die absorpsie.	35
Figuur 3-8:	Grafiek van die golflengte skandering van die ensiemtoets sonder β -NADH op Libra spektrometer. Op die x-as is die golflengtes van 200 nm tot 500 nm en op die y-as is die absorpsie.	35
Figuur 3-9:	Plaatleser golflengte skandering grafiek van 173.26 μ M β -NADH in 'n 96-put plaat. Op die x-as is die golflengtes en op die y-as is die absorpsie. Die vertikale stippellyn by 337 nm dui die maksimale absorpsie aan.	37
Figuur 3-10:	Plaatleser golflengte skandering grafiek van 346.53 μ M β -NADH in 'n 96-put plaat. Op die x-as is die golflengtes en op die y-as is die absorpsie. Die vertikale stippellyn by 337 nm dui die maksimale absorpsie aan.	37

Figuur 3-11:	Plaatleser golflengte skandering grafiek van 519.80 μM $\beta\text{-NADH}$ in 'n 96-put plaat. Op die x-as is die golflengtes en op die y-as is die absorpsie. Die vertikale stippellyn by 337 nm dui die maksimale absorpsie aan.	38
Figuur 3-12:	Grafiek van die lineêre regressie van beide konsentrasiegradiënt herhalings van die $\beta\text{-NADH}$ teenoor die konsentrasies se absorpsie.....	39
Figuur 3-13:	Lineêre regressie van die twee $\beta\text{-NADH}$ konsentrasie gradiënt herhalings gekombineer.....	40
Figuur 3-14:	Ensiemtoets uitvoering 1. Op x-as is die tydsverloop in minute. Op die y-as is die optiese digtheid (OD). Die kontrole se stadige afname in OD dui die natuurlike degradasie van $\beta\text{-NADH}$ met tyd aan. Die drie triplikate se eenderse afwaartse kurwes dui die som van die natuurlike degradasie en die aktiwiteit van die ensiemtoets aan waar $\beta\text{-NADH}$ aktief deur laktaat-dehidrogenase geoksideer word na $\beta\text{-NAD}^+$	41
Figuur 3-15:	Ensiemtoets uitvoering 2. Op x-as is die tydsverloop in minute. Op die y-as is die optiese digtheid (OD). Die kontrole se stadige afname in OD dui die natuurlike degradasie van $\beta\text{-NADH}$ met tyd aan. Die drie triplikate se eenderse afwaartse kurwes dui die som van die natuurlike degradasie en die aktiwiteit van die ensiemtoets aan waar $\beta\text{-NADH}$ aktief deur laktaat-dehidrogenase geoksideer word na $\beta\text{-NAD}^+$	41
Figuur 3-16:	Ensiemtoets uitvoering 3. Op x-as is die tydsverloop in minute. Op die y-as is die optiese digtheid (OD). Die kontrole se stadige afname in OD dui die natuurlike degradasie van $\beta\text{-NADH}$ met tyd aan. Die drie triplikate se eenderse afwaartse kurwes dui die som van die natuurlike degradasie en die aktiwiteit van die ensiemtoets aan waar $\beta\text{-NADH}$ aktief deur laktaat-dehidrogenase geoksideer word na $\beta\text{-NAD}^+$	42
Figuur 3-17:	Uitvoering 3 se triplikaat gemiddeld se stuksgewyse regressie. Op die x-as is tydverloop in sekondes. Op die y-as is die absorpsie. Die stippellyn dui die gemiddeld van uitvoering drie se triplikaat kurwes en die soliede lyn dui die aangepasde paslyne aan. Die vierkant dui die snypunt van die aangepasde paslyne aan wat die berekende knakpunt is.....	43

Figuur 3-18:	Lineêre regressie van ensiemtoets 1 se triplikate. Op die x-as is tydsverloop in minute. Op die y-as is die absorbansie. Die drie triplikate se lineêre regressie word elk aangedui saam met hul vergelykings. 45	45
Figuur 3-19:	Die gemiddelde lineêre regressie lyne van die drie ensiemtoetse. Op die x-as is tydsverloop in minute. Op die y-as is die absorbansie. Die drie ensiemtoets uitvoerings se gemiddelde lineêre regressie lyne word elk aangedui saam met hul vergelykings. 46	46
Figuur 3-20:	Gemiddelde lineêre regressie van ensiemtoets 1 en ensiemtoets 1 se kontrole. Op die x-as is tydverloop in minute. Op die y-as is die absorbansie. Ensiemtoets 1 se gemiddelde lineêre regressie lyn en ensiemtoets 1 se kontrole word aangedui saam met hul vergelykings..... 48	48
Figuur 4-1:	Vloediagram wat die navorsingsmetode in hierdie studie opsom..... 55	55
Figuur 4-2:	Voorstelling van die pET-32a(+)/AKSM2A plasmied. Die restriksie ensiem snydingsplekke word aangedui by spesifieke base paar lengtes aan die buitekant van die plasmied kring. Verskillende eienskappe van die plasmied word aangedui in die vorm van pyle aan die binnekant van die plasmied kring. 58	58
Figuur 4-3:	Voorstelling van pET-32a(+)/AKSM2B plasmied. Die restriksie ensiem snydingsplekke word aangedui by spesifieke base paar lengtes aan die buitekant van die plasmied kring. Verskillende eienskappe van die plasmied word aangedui in die vorm van pyle aan die binnekant van die plasmied kring..... 59	59
Figuur 4-4:	pFLAG-CTS en pFLAG-CTC plasmied voorstellings wat die <i>Nde</i> I en <i>Sal</i> I restriksie ensiem sny plekke aandui..... 85	85
Figuur 4-5:	Verduideliking van verkeerde klonering van pcDNA3.1 sisteem. Skets A stel die resultaat van pcDNA3.1(+)/AKSM2A, pcDNA3.1(+)/AKSM2A-t en pcDNA3.1(+)/AKSM2B-t plasmied se Sanger volgorde bepaling voor. 'n Gedeelte van die pMiniT 2.0 plasmied se volgorde is verkeerdelik aan die 5 aksent punt van die inlasstukke geheg. Skets B stel die resultaat van pcDNA3.1(+)/AKSM2B plasmied se Sanger volgorde bepaling voor. 'n Gedeelte van die pMiniT 2.0 plasmied se volgorde is verkeerdelik aan	

	die 3 aksent punt van die pcDNA3.1(+) plasmied geheg en die inlasstuk se DNS rigting is verkeerd om in gekloneer.....	91
Figuur 4-6:	Kristalstruktuur van AKSM2A met die L64P SNP. Die N- en C-terminaal aangedui (Kochan <i>et al.</i> , 2009)	106
Figuur 4-7:	1% Agarose jel van die grootskaalse plasmied isolasie van pET32a(+)/AKSM2A en pET32a(+)/AKSM2B. Die superspiraal en fyngekeerde vorms van die sirkulêre plasmiede word aangetoon.	107
Figuur 4-8:	Die Sanger volgordebepaling van die <i>AKSM2A-geen</i> . Eerste lyn: Die <i>AKSM2A</i> verwysings volgorde. Tweede lyn: Die T7-afsluiter voorvoerder volgorde. Derde lyn: Die S-tag voorvoerder volgorde. Vierde lyn: Die pET32a(+) plasmied se 5' punt met die <i>Bam</i> HI restriksie ensiem sny plek (GGATCC) en 14 basisse van die <i>AKSM2A-geen</i> . Vyfde lyn: die pET32a(+) plasmied se 3' punt met die <i>Not</i> I restriksie ensiem sny plek (GCGGCCGC) en 19 basisse van die <i>AKSM2A-geen</i>	109
Figuur 4-9:	Die Sanger volgordebepaling van die <i>AKSM2B-geen</i> . Eerste lyn: Die <i>AKSM2B</i> verwysings volgorde. Tweede lyn: Die S-tag voorvoerder volgorde. Derde lyn: Die T7-afsluiter voorvoerder volgorde. Vierde lyn: Die pET32a(+) plasmied se 5' punt met die <i>Bam</i> HI restriksie ensiem sny plek (GGATCC) en 10 basisse van die <i>AKSM2B-geen</i> . Vyfde lyn: die pET32a(+) plasmied se 3' punt met die <i>Hind</i> III restriksie ensiem sny plek (AAGCTT) en 10 basisse van die <i>AKSM2B-geen</i>	110
Figuur 4-10:	1% Agarose jels van die lineêre en sirkulêre weergawes van pET32a(+)/AKSM2A, pET32a(+)/AKSM2B, pFLAG-CTC, pcDNA3.1(+), pQE-30 en pET28a(+). O: sirkulêre plasmied. –: lineêre plasmied.....	111
Figuur 4-11:	1% Agarose jel van die hitte gradient met voorvoerder paar 1 (pc+ <i>Fwd</i> en <i>Rev_stop_Sal</i> I) wat die <i>AKSM2A</i> inlasstuk produseer by 1922 bp. Die hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt (in °C) word aangedui. Die templaatsplasmiede is ook in hul sirkulêre vorms gelaai. –K: Negatiewe kontrole.	113
Figuur 4-12:	1% Agarose jel van hitte gradiënt met voorvoerder paar 2 (<i>Trunc_Bam</i> HI en <i>Rev_stop_Sal</i> I) wat <i>AKSM2A-t</i> produseer) 3 (<i>Trunc_Bam</i> HI en pc+ <i>Rev</i> wat <i>AKSM2A-t</i> produseer), 4 (<i>Trunc_Bam</i> HI en pc+ <i>Rev</i> wat	

	AKSM2B- <i>t</i> produseer), 5 (Flag_Fwd_Trunc en FLAG_Rev wat AKSM2A- <i>t</i> produseer) en 6 (Flag_Fwd_Trunc en FLAG_Rev wat AKSM2B- <i>t</i> produseer) se PKR inlasstuk resultaat. Die hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt (in °C) word aangedui. Die templaas plasmiede is ook in hul sirkulêre vorms gelaai. –K: Negatiewe kontrole.	114
Figuur 4-13:	1% Agarose jel van die PKR siklus vermindering, vermindering van die verlengtyd en 'n verdere hitte gradiënt met die voorvoerder paar 2 (Trunc_BamHI en Rev_stop_SalI wat AKSM2A- <i>t</i> produseer), en 4 (Trunc_BamHI en pc+Rev wat AKSM2B- <i>t</i> produseer) se PKR inlasstuk resultaat. Die hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt (in °C) word aangedui. Die templaas plasmiede is ook in hul sirkulêre vorms gelaai. –K: Negatiewe kontrole.	115
Figuur 4-14:	1% Agarose jel van die die PKRs wat uitgevoer is met 'n korter denatureer tyd, uitgewerkte verlengtyd, 'n verdere hitte gradiënt en 'n hoeveelheid templaas DNS reeks (1 ng, 5 ng en 10 ng) met voorvoerder paar 2 (Trunc_BamHI en Rev_stop_SalI wat AKSM2A- <i>t</i> produseer), en 4 (Trunc_BamHI en pc+Rev wat AKSM2B- <i>t</i> produseer) se PKR inlasstuk resultaat. Die hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt (in °C) word aangedui. Die templaas plasmied is ook in hul sirkulêre vorms gelaai. –K: Negatiewe kontrole.	117
Figuur 4-15:	1% Agarose jel van die hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt van PKRs met voorvoerder pare 2 (Trunc_BamHI en Rev_stop_SalI wat AKSM2A- <i>t</i> produseer), en 4 (Trunc_BamHI en pc+Rev wat AKSM2B- <i>t</i> produseer) uitgevoer is. Die hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt (in °C) word aangedui. –K: negatiewe kontroles.	118
Figuur 4-16:	1% Agarose jel van voorvoerder pare 5 (wat AKSM2A- <i>t</i> produseer), 6 (wat AKSM2B- <i>t</i> produseer), 8 (wat AKSM2A produseer) en 9 (wat AKSM2B- <i>t</i> produseer) se PKRs met hul ooreenstemmende negatiewe kontroles aangedui deur: -K.	120
Figuur 4-17:	1% Agarose jel ter bevestiging van die pFLAG metode se voorbereide inlasstukke se basispaar lengtes.	121
Figuur 4-18:	1% Agarose jel ter bevestiging van NdeI en SalI restriksie ensiem behandelde inlasstukke van die pFLAG metode.	122

Figuur 4-19:	1% Agarose jel van die pFLAG-CTS plasmied in sy drie vorme. O: sirkulêr. – : lineêr. DG: dubbeld gesny (<i>NdeI</i> en <i>SalI</i>).....	123
Figuur 4-20:	1% Agarose jel van <i>NdeI</i> en <i>SalI</i> restriksie ensiem snyding van gekloneerde pFLAG-CTC plasmiedkonstrukte ter bevestiging van inlasstuk klonering. Die getalle dui die kolonie nommer aan. Die bande met pFLAG-CTC plasmied en 'n inlasstuk is by 7000 bp, die band met pFLAG-CTC plasmied sonder 'n inlasstuk is by 5479 bp, die AKSM2A en AKSM2B inlasstuk bande is by 1746 bp en die AKSM2A-t inlasstuk band is by 1611 bp.....	124
Figuur 4-21:	1% Agarose jel van <i>NcoI</i> restriksie ensiem snyding van die pFLAG-CTC plasmiedkonstrukte ter bevestiging van grootte en teenwoordigheid die konstrunkte en teenwoordigheid van 'n enkele plasmied. Die getalle dui die kolonie nommer aan.....	125
Figuur 4-22:	1% Agarose jel van <i>NdeI</i> en <i>SalI</i> restriksie ensiem snyding ter bevestiging van regte inlasstuk in die pFLAG-CTC/AKSM2B-t plasmied. Die getalle dui die kolonie nommer aan.....	127
Figuur 4-23:	1% Agarose jel van die restriksie ensiem snyding van pET28a(+), pET32a(+)/AKSM2A en pET32a(+)/AKSM2B plasmiede. Die gebruikte restriksie ensieme word aangetoon in hakkies.	128
Figuur 4-24:	1% Agarose jel as bevestiging van jel ekstraksie van pET28a(+) plasmiede, <i>AKSM2A</i> en <i>AKSM2B</i> gene en voorvoerder pare 3 (wat <i>AKSM2A-t</i> produseer) en 4 (wat <i>AKSM2B-t</i> produseer) se PKR produkte. -K: negatiewe kontrole.....	129
Figuur 4-25:	1% Agarose jel ter bevestiging van basispaar lengtes van restriksie ensiem behandelde inlasstukke, <i>AKSM2A-t</i> en <i>AKSM2B-t</i>	130
Figuur 4-26:	1% Agarose jel van die kolonie PKR produkte van die getransformeerde pET28a(+) plasmiedkonstrukte se kolonies. -K: negatiewe kontrole. +K: positiewe kontrole.	131
Figuur 4-27:	1% Agarose jel van die verder kolonie PKR se produkte van die kolonies wat die pET28a(+)/AKSM2B-t konstruk kan besit. -K: negatiewe kontrole. +K: positiewe kontrole.	132

Figuur 4-28:	1% Agarose jel van die vier inlasstukke wat deur voorvoerder pare 1 (wat <i>AKSM2A</i> produseer), 7 (wat <i>AKSM2B</i> produseer), 2 (wat <i>AKSM2A-t</i> produseer) en 14 (wat <i>AKSM2B-t</i> produseer) se PKRs geproduseer is. -K: negatiewe kontrole.	133
Figuur 4-29:	1% Agarose jel as bevestiging van die vier geïsoleerde inlasstukke se basispaar grotes vir klonering in die pQE-30 plasmied.....	134
Figuur 4-30:	1% Agarose jel van die kolonie PKR van die pMiniT 2.0 plasmiedkonstrukte wat voorberei is vir die pQE-30-metode. -K: negatiewe kontrole. +K: positiewe kontrole.	135
Figuur 4-31:	1% Agarose jel van die restriksie <i>Bam</i> HI en <i>Sal</i> I restriksie ensieme snyding van die pMiniT 2.0 konstrunkte en die pQE-30 plasmied.....	136
Figuur 4-32:	1% Agarose jel van die kolonie PKR produkte van die pQE-30 plasmiedkonstrukte in M15[pREP4] <i>E. coli</i> kolonies. +K: positiewe kontrole. -K negatiewe kontrole.	137
Figuur 4-33:	1% Agarose jel van <i>Hind</i> III restriksie ensiem snyding van die pQE-30 plasmied konstrunkte ter bevestiging van pQE-30 konstruk plasmied grotes.....	138
Figuur 4-34:	1% Agarose jel van die produkte van die vier inlasstukke wat deur voorvoerder pare 10 (wat <i>AKSM2A</i> produseer), 11 (wat <i>AKSM2B</i> produseer), 12 (wat <i>AKSM2A-t</i> produseer) en 13 (wat <i>AKSM2B-t</i> produseer) se PKRs geproduseer het. -K: negatiewe kontrole.	139
Figuur 4-35:	1% Agarose jel van die kolonie PKR uit gevoer op die getransformeerde pMiniT 2.0 konstrunkte wat voorberei is vir die pcDNA3.1(+) plasmied. +K: positiewe kontrole. -K: negatiewe kontrole.	140
Figuur 4-36:	1% Agarose jel van die restriksie ensiem snyding van die pcDNA3.1(+) plasmied en die pMiniT 2.0 plasmiedkonstrukte.	141
Figuur 4-37:	1% Agarose van die kolonie PKR van die kolonies waarin die pcDNA3.1(+) plasmied se konstrunkte getransformeer is. +K: positiewe kontrole. -K: negatiewe kontrole.	142

Figuur 4-38:	1% Agarose jel van die kolonie PKR van die kolonies waarin die reggemaakte pcDNA3.1(+) konstrunkte is. +K: positiewe kontrole. -K: negatiewe kontrole.	143
Figuur 4-39:	1% Agarose jelle ter bevestiging van voorvoerder pare 15 en 17 se PKRs en die positiewe kontrole. -K: negatiewe kontrole.	144
Figuur 4-40:	1% Agarose jel ter bevestiging van die geïsoleerde inlasstukke en positiewe kontrole se basispaar grotes vir die pBAD plasmied.	145
Figuur 4-41:	1% Agarose jel van die kolonie PKR van die pBAD konstrunkte in die TOP10 <i>E. coli</i> se kolonies. -K: negatiewe kontrole.	146
Figuur 4-42:	NDS-PAGE van die BL21(DE3)RIL sellyn (1) en die BL21(DE3)RIL sellyn wat pFLAG-CTS bevat (2). NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.	147
Figuur 4-43:	NDS-PAGE van die BL21(DE3)RIL sellyn wat pFLAG-CTC/AKSM2A (3) en pFLAG-CTC/AKSM2B bevat (4). NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.	148
Figuur 4-44:	NDS-PAGE van die BL21(DE3)RIL sellyn wat pFLAG-CTC/AKSM2A-t (5) en pFLAG-CTC/AKSM2B-t bevat (6). NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.	149
Figuur 4-45:	NDS-PAGE van die BL21(DE3) sellyn (1), die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+)/AKSM2A bevat (3) en die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+) bevat (2). NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.	150
Figuur 4-46:	NDS-PAGE van die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+) plasmied bevat (2), die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+)/AKSM2A-t plasmied bevat (5) en die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+)/AKSM2B bevat (4). NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.	151
Figuur 4-47:	NDS-PAGE van die BL21(DE3) sellyn wat die pET28a(+)/AKSM2B-t plasmied bevat (6). NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.	152

Figuur 4-48:	NDS-PAGE van die M15[pREP] sellyn wat die pQE-30 plasmied bevat en die M15[pREP] sellyn wat die pQE-30/AKSM2A plasmied bevat. NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.....	153
Figuur 4-49:	NDS-PAGE van die M15[pREP] sellyn wat die pQE-30/AKSM2A plasmied bevat en die M15[pREP] sellyn wat die pQE-30/AKSM2A-t plasmied bevat. NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.....	153
Figuur 4-50:	NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2A-t plasmied bevat en die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2B-t plasmied bevat. NI: nie-geïnduseer. Persentasie arabinose gebruik vir induksie word aangetoon. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.....	154
Figuur 4-51:	NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die ekspressie kontrole plasmied bevat (+K) en die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2A plasmied bevat. NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. Die induksietydperke word aangedui. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.....	156
Figuur 4-52:	NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2A plasmied bevat en die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2B plasmied bevat. NI: nie-geïnduseer. Induksietydperk wat gebruik is word aangedui. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.....	157
Figuur 4-53:	NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2B plasmied bevat en die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2A-t plasmied bevat. NI: nie-geïnduseer. Die induksietydperke word aangedui. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.....	158
Figuur 4-54:	NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2A-t plasmied bevat en die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2B-t plasmied bevat. NI: nie-geïnduseer. Die induksie tye wat gebruik is word aangedui. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.....	159
Figuur 4-55:	NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die ekspressie kontrole plasmied bevat (+K) en die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2B-t plasmied bevat wat met die pBAD lise-metode behandel is. NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.....	160

- Figuur 4-56: NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2B-t plasmied bevat wat met die Bugbuster en B-PER lise w metodes behandel is. NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie..... 161
- Figuur 4-57: NDS-PAGE van die TOP10/pBAD AKSM2B-t sellyn wat met die oorspronklike pBAD lise-metode geliseer is met bygevoegde pantoteensuur. Een met imidasool en een sonder imidasool beide met bygevoegde pantoteensuur. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie..... 162
- Figuur 4-58: NDS-PAGE van die TOP10/pBAD AKSM2B-t sellyn wat met die pBAD lise-metode (5ml per gram presipitaat en met bygevoegde pantoteensuur en sonder imidasool) geliseer is. Die TOP10/pBAD AKSM2B-t sellyn wat met die B-PER metode geliseer is in afdeling 4.2.28.2 se monsters en die B-PER metode se sellise met. NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie. 163
- Figuur 4-59: Westerseklad van A: die oplosbare fraksie van die BL21(DE3)RIL/pBAD/AKSM2B-t selle wat met die oorspronklike pBAD ekspressie en lise-metode behandel is en B: oplosbare fraksies van die BL21(DE3)RIL selle wat die pBAD/AKSM2 plasmiede besit wat met die oorspronklike pBAD ekspressiemetode uitgedruk is, maar geliseer is met die geoptimaliseerde pBAD lise-metode. NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer..... 165

LYS VAN VERGELYKINGS

Vergelyking 1: Die Beer-Lambert-wet	29
Vergelyking 2: Herrangskikte Beer-Lambert-wet.....	30
Vergelyking 3: Standaardafwyking vir 'n monster	31
Vergelyking 4: Variasiekoëffisiënt.....	31
Vergelyking 5: Aktiwiteits bepaling.....	32
Vergelyking 6: Molbepaling.....	32
Vergelyking 7: Berekening van faktor van vermingvuldiging	33
Vergelyking 4-1: Verlengtyd.....	78
Vergelyking 4-2: DNS massa na pmol DNS punte	82
Vergelyking 4-3: Inlasstuk molêre oormaat bepaling.....	83

HOOFSTUK 1 Inleiding

1.1 Inleiding

Die vermoë van die menslike liggaam om ontslae te raak van die toksiese verbindings waaraan dit blootgestel word, beide eksogeen (xenobiotika) en endogeen (eindprodukte van metabolisme), word toegeskryf aan die proses van biotransformasie. Die mens word al hoe meer blootgestel aan hierdie toksiese verbindings en dit kan die biotransformasie proses oorweldig. Die gedagte dat hierdie toksiese verbindings kan ophoop in die mens se liggaam en kan lei na verskeie gesondheidsprobleme, is een van die aanvaarde leerstellings van die wêreld se gesondheidsorg sisteme (Liska *et al.*, 2006). Dit is verder duidelik uit die ontwikkeling van farmakogenetika dat mense verskillend op hierdie toksiese verbindings reageer en dat daar daarom 'n behoefte is aan die studie van die onderskeie detoksifiseringsgene (Mancinelli *et al.*, 2000).

Hierdie studie ondersoek een groep van hierdie detoksifiseringsgene, naamlik die asiel-KoA-sintetase (AKS) gene. Asiel-KoA-sintetase speel 'n belangrike rol in die metabolisme van vetsure. Vetsure is noodsaaklik vir verskeie funksies in die mens se liggaam. Dit is 'n groot bron van energie, stoor energie in die vorm van lipiede, speel strukturele rolle in selle en kan dien as sein molekules. Voor vetsure hierdie rolle kan uitvoer moet hulle eers geaktiveer word deur koënsiem-A om 'n asiel-KoA te vorm. 'n Asiel-KoA-sintetase verrig hierdie belangrike funksie (Watkins, 1997). Hierdie aktivering is nie net noodsaaklik vir vetsure nie, maar is ook noodsaaklik vir die detoksifisering van sekere xenobiotika deur die glisienkonjugasieweg. Die glisienkonjugasieweg maak deel uit van Fase 2 van biotransformasie en die hoofdoel van die weg is die detoksifisering van bensoaat. Die spesifieke asiel-KoA-sintetase wat by die glisienkonjugasieweg betrokke is, is die mens xenobiotika/mediumketting asiel-KoA-sintetase 2B (AKSM2B) (Badenhorst *et al.*, 2014).

Die literatuur het tot dusvêr die studie en karakterisering van mens xenobiotika/mediumketting asiel-KoA-sintetase 2B afgeskeep ten spyte van die feit dat xenobiotika soos bensoaat en salisilaat deur hierdie ensiem gedetoksifiseer word (van der Sluis & Erasmus, 2016). Die mens se verbruik van stowwe soos bensoaat het baie skerp toegeneem vergeleke met die oorspronklike inname van bensoaat in die natuur (Del Olmo *et al.*, 2017). Hierdie langdurige en gereelde blootstelling aan hoër konsentrasies bensoaat en ander xenobiotika soos salisilaat beklemtoon die noodsaaklikheid van ensimatisiese inligting en karakterisering van mens xenobiotika/mediumketting asiel-KoA-sintetase 2B.

Hierdie studie poog om die eerste stap te neem op weg na die langtermyn doelwit om menslike xenobiotika/mediumketting asiel-KoA-sintetase 2B geneties en ensimaties te karakteriseer. Die bereiking van hierdie doel berus op twee vermoëns, naamlik die vermoë om menslike

xenobiotika/mediumketting asiel-KoA-sintetase te verkry en te isoleer en die vermoë om hierdie ensieme se aktiwiteit te toets.

1.2 Struktuur van hierdie verhandeling

Die struktuur van hierdie verhandeling is soos volg. Hoofstuk 2 bied 'n literatuur oorsig en die probleemstelling, navorsingsvraag, doelstellings en doelwitte. Hoofstuk 3 beskryf die metodes en resultate van die optimalisering van 'n ensiemtoets vir die menslike xenobiotika/mediumketting asiel-KoA-sintetase 2B. Hoofstuk 4 beskryf die metodes en resultate van die rekombinante uitdrukking van menslike xenobiotika/mediumketting asiel-KoA-sintetase. Hoofstuk 5 gee die finale gevolgtrekkings, beperkings van die studie en die toekomsvooruitsigte weer.

HOOFSTUK 2 Literatuurstudie

2.1 Inleiding

Hierdie hoofstuk beskryf die relevante literatuur in die studieveld. Die studie word gekontekstualiseer deur te kyk na biotransformasie as 'n geheel. Die bespreking fokus daarna op Fase 2 van biotransformasie en 'n spesifieke proses in hierdie fase, naamlik glisienkonjugasie. Die glisienkonjugasieweg word bespreek met betrekking tot die fisiese prosesse, die substrate, kapasiteitbeperking, variasie en die relevante ensieme. Die ensieme wat in hierdie studie van belang is, naamlik die asiel-KoA-sintetases, word in diepte beskryf. Die laaste afdeling omskryf die menslike mediumketting asiel-KoA-sintetase 2A en 2B (AKSM2A en AKSM2B) die onderwerp van hierdie studie.

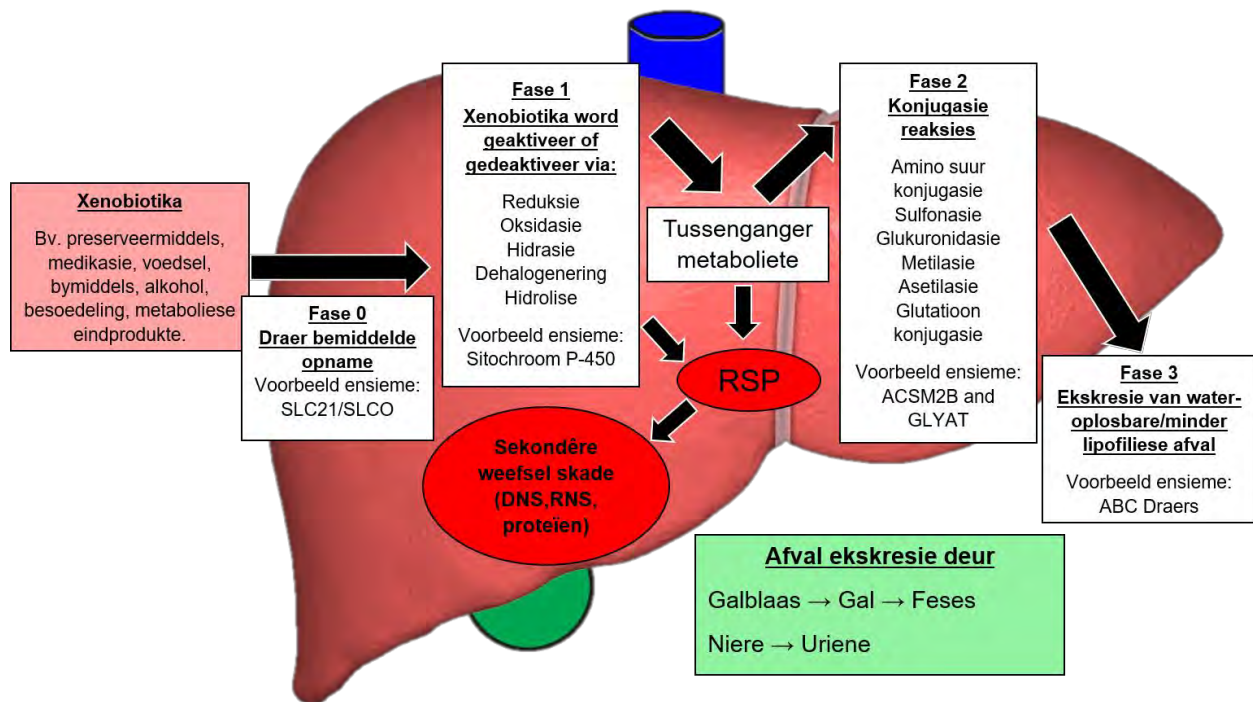
Die probleemstelling, navorsingsdoelstellings en -doelwitte word aan die einde van hierdie hoofstuk weergegee.

2.2 Biotransformasie

Die mens word daaglik blootgestel aan toksiese verbindings wat nie natuurlik deur ons liggame geproduseer word nie. Hierdie verbindings word xenobiotika genoem omdat dit as vreemd en skadelik beskou word. Die mens se liggaam detoksifiseer hierdie xenobiotika deur die prosesse van biotransformasie (Figuur 2-1) (Liska, 1998; Liska *et al.*, 2006).

Figuur 2-1 illustreer die vier fases van biotransformasie. Xenobiotika word deur ons liggame opgeneem deur die inname van voedsel, alkohol, preserveermiddels bymiddels en besoedeling. In fase 0 is die (SLC)21/SLCO proteïenfamilie verantwoordelik vir draer-bemiddelde opname van xenobiotika in die lewerselle. Hierdie ensieme word gevind op die basolaterale membraan, wat aan mens se bloed blootgestel word (Döring & Petzinger, 2014). In Fase 1 word die xenobiotika gebioaktiveer of gebiodeaktiveer deur reduksie, oksidasie, hidrasie, dehalogenering en hidrolise, hoofsaaklik gekataliseer deur die sitochroom P-450 ensieme. Hierdie aktivering of deaktivering lei na die ontbloting of byvoeging van 'n funksionele groep wat die verbinding voorberei vir Fase 2 konjugasiereaksies. Hierdie verbindings word tussenganger metaboliete genoem en is moontlik meer gevaarlik as die oorspronklike verbinding omdat hulle as reaktiewe suurstofspesies kan optree soos aangedui in Figuur 2-1. Fase 2 konjugasiereaksies verlaag in meeste gevalle die biologiese aktiwiteit van die xenobiotika, wat lei tot laer toksisiteit. Tydens hierdie fase word 'n polêre groep gekonjugeer aan die ontblote of bygevoegde funksionele groep, wat die xenobiotika meer water oplosbaar of minder lipofilies maak en dit makliker maak om uit te skei (Liska *et al.*, 2006; Badenhorst *et al.*, 2014). In Fase 3 vervoer die ABC-draers die minder toksiese, meer water

oplosbare of minder lipofiliese afval produkte na die stoelgang en urine (Döring & Petzinger, 2014).



Figuur 2-1: Vier fases van biotransformasie. Die diagram stel die metaboliese weg in die lewer voor. RSP: Reaktiewe suurstof spesies. Aangepas vanuit (Liska *et al.*, 2006; Döring & Petzinger, 2014; van der Sluis *et al.*, 2015a).

Oorbelaaiing of abnormale werking van hierdie biotransformasie weë lei tot opeenhoping van xenobiotika, en dit kan moontlik die oorsaak wees van verskeie siektetoestande soos kanker, kroniese moegheid, neurologiese siektes ens. Om die ware effek van xenobiotika te verstaan moet mens na die totale lading van xenobiotika kyk. Die konsep van totale lading verwys na die invloed wat verskillende xenobiotika wat gelyktydig ingeneem word, het op die biotransformasiesisteam (Liska *et al.*, 2006). Funksionele verandering vind plaas as gevolg van blootstelling aan 'n lae dosis van een xenobiotika, maar die effek van die xenobiotika kan vermenigvuldig as daar verskeie xenobiotika teenwoordig is. In die moderne omgewing is die waarskynlikheid groot dat mens gedurig aan veelvuldige xenobiotika blootgestel word (Liska *et al.*, 2006).

Meeste xenobiotika kan deur meer as een biotransformasieweg gedetoksifiseer word. 'n Spesifieke xenobiotika het onder goeie omstandighede affiniteit vir 'n sekere biotransformasie proses, maar in gevalle waar daar as gevolg van meerdere xenobiotika 'n bottelnek is of die weg onderontwikkel is, kompenseer die liggaam deur ander weë te gebruik. Hierdie alternatiewe weë is gewoonlik nie die hoofweg nie omdat daar onvolledige detoksifikasie is of omdat toksiese intermediêre in hierdie weg kan ophoop (Liska *et al.*, 2006).

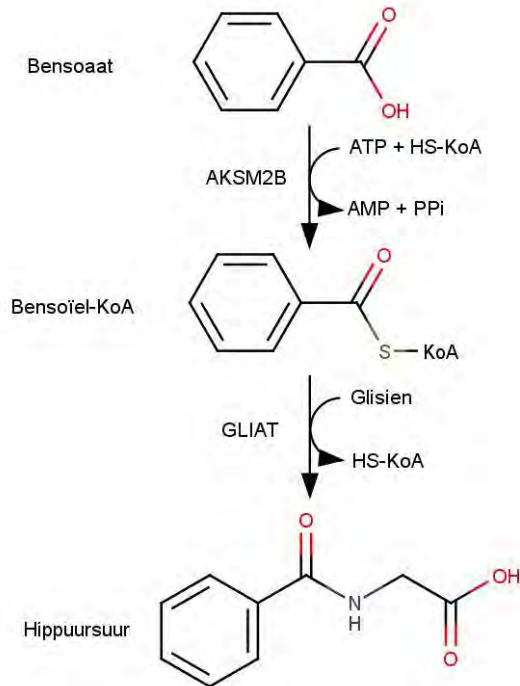
Liska *et al.* (2006) beklemtoon dat daar 'n deeglike begrip van die ensimatiese weë van biotransformasie moet wees voordat die wetenskap medisinaal ingryp.

2.3 Fase 2-biotransformasie: Glisienkonjugasie

Hierdie studie fokus op glisienkonjugasie wat deel vorm van die Fase 2-biotransformasieweg. Glisienkonjugasie is die heel eerste biotransformasieweg wat ontdek is. Die xenobiotika wat eerste bestudeer is, was bensoaat. Alexander Ure het ontdek dat die mens hippuursuur uitskei nadat bensoaat ingeneem is (Ure, 1841). Hierdie studie het aanleiding gegee tot die studie van die biotransformasie van medikasie in geheel. Dessaignes het daarna in 1845 hippuursuur vir die eerste keer in sy twee komponente geskei, naamlik bensoaat en glisien. Hy het ook die twee komponente gebruik om hippuursuur te sintetiseer (hersien deur Conti & Bickel, 1977).

Glisienkonjugasie geskied deur twee ensimatiese stappe in die mitochondria van lewer- en nier-selle. Die proses word uitgebeeld in Figuur 2-2. Figuur 2-2 gebruik bensoaat as voorbeeld en wys dat bensoaat eers geaktiveer word na 'n asiel-KoA verbinding deur die aanhegting van koënsiem A deur 'n asiel-KoA-sintetase. In die geval van bensoaat is dit die xenobiotika/mediumketting asiel-KoA-sintetase 2B (AKSM2B) (EC 6.2.1.2). Bensoiel-KoA word dan gekonjugeer aan glisien deur die menslike glisienasieltransferase (GLIAT) (EC 2.3.1.13) (Badenhorst *et al.*, 2013; van der Sluis *et al.*, 2013; Badenhorst *et al.*, 2014; van der Sluis *et al.*, 2015b; van der Sluis & Erasmus, 2016). GLIAT kan ook ander aminosure soos bv. alanien en glutamiensuur as die asiel-aanvaarders gebruik en aan bensoaat konjugeer, maar GLIAT se substraatspesifisiteit is so spesifiek vir glisien dat hierdie aminosure onder normale omstandighede nie 'n wesentlike rol sal speel nie (van der Westhuizen *et al.*, 2000).

Die glisienkonjugasie van bensoaat word as 'n detoksifiserings reaksie beskou, omdat glisienkonjugering bensoaat minder lipofilies maak en dit daarom makliker uitgeskei kan word (Badenhorst *et al.*, 2014).



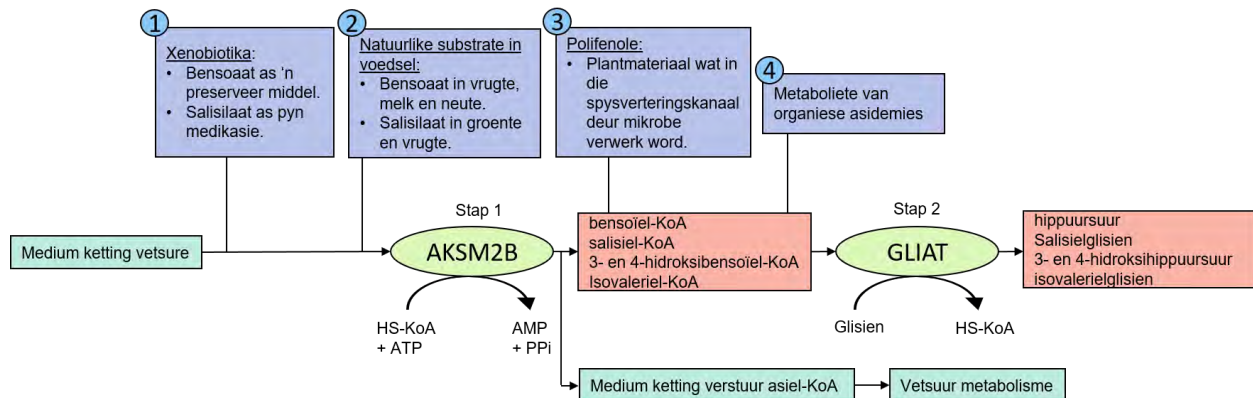
Figuur 2-2: Skematiese voorstelling van die glisienkonjugasie van bensoaat. Aangepas vanuit (Badenhorst *et al.*, 2013). ATP: Adenosien trifosfaat. AMP: Adenosien monofosfaat. HS-KoA: Koënsiem A. PPI: pirofosfaat.

Min xenobiotika word gemetaboliseer of gedetoksifiseer deur aminosuurkonjugasie, maar waar ander detoksifiseringsensieme 'n wye substraatspesifisiteit besit, besit aminosuur konjugasie ensieme 'n baie meer spesifieke substraatspesifisiteit. Hierdie spesifisiteit beklemtoon die belangrikheid van hierdie weë en impliseer dat die weë 'n kritieke rol speel in biotransformasie en in die totale sellulêre integriteit speel (Knights & Miners, 2011). Geen metaboliese defek van die glisienkonjugasieweg is al beskryf nie en die *AKSM2B* en *GLIAT* gene se ooplesrame (OLR) is hoogs gekonserveerd. Dit dui aan dat die glisienkonjugasieweg 'n noodsaaklike detoksifikasieweg is (van der Sluis *et al.*, 2015a; van der Sluis, 2018).

2.3.1 Glisienkonjugasiesubstrate en substraatbronne

Glisienkonjugasie het breedweg vier bronne van substrate. Hierdie bronne word uitgebeeld in Figuur 2-3 as die genommerde blokkies naamlik: 1) xenobiotika, 2) die natuurlike voorkoms van substrate in voedsel, 3) polifenole 4) die metaboliete van organiese asidemie. Die mediumketting vetsuur asiel-KoA-sintetase 2B (*AKSM2B*) aktiveer ook mediumketting vetsure na vetsuur asiel-KoA verbindings toe hoofsaaklik vir verdere vetsuurmetabolisme soos aangetoon in Figuur 2-3, maar kan ook as vir glisienkonjugasie dien. Figuur 2-3 toon ook by watter stap van glisienkonjugasie hierdie substrate die weg binnegaan. Bensoaat en salisilaat word ingeneem as

xenobiotika in preserveer middels en as pynmedikasie (hoof komponent van aspirien) onderskeidelik, maar kom ook in die natuur voor in byvoorbeeld vrugte, melk, groente en neute (van der Sluis, 2018). Sekere asiel-KoA verbindings soos isovaleriel-KoA wat ophoop tydens organiese asidemie dien ook as 'n substraat vir glisienkonjugasie (Tanaka & Isselbacher, 1967).



Figuur 2-3: Die skematiese voorstelling van die vier hoof bronne van substrate vir die glisienkonjugasieweg asook die onderskeidelike stappe waar hierdie bronne die weg betree. In Stap 1 word die substrate geaktiveer deur AKSM2B en in Stap 2 word glisien aan die substrate gekonjugeer deur GLIAT. Die aktivering van mediumketting vetsure word aangedui. Aangepas uit (van der Sluis, 2018).

Die natuurlike substrate vir glisienkonjugasie is bensoaat, bensoïel-KoA, salisilaat, 4-aminobensoaat, 3- en 4-hidroksibensoaat. Die hoofbron van substrate vir glisienkonjugasie is egter polifenole. Plantmateriaal wat uit die dieet van die mens ingeneem word bevat polifenole wat in die spysverteringskanaal deur bakterieë afgebreek word na fenielpropionaat en 3- en 4-hidroksiefenielpropionaat. Hierdie verbindings word dan verder in die liggaam gemetaboliseer na bensoïel-KoA en 3- en 4-hidroksibensoïel-KoA. Dit dien as substrate vir glisienkonjugasie en word uitgeskei as hippuraat (Rechner *et al.*, 2002; hersien deur Badenhorst *et al.*, 2014). Dit is ook die rede waarom hippuraat die volopste aminosuurkonjugaat is wat deur meeste soogdiere, insluitend die mens, uitgeskei word (Lees *et al.*, 2013; Badenhorst *et al.*, 2014).

Die hoofdoel van die glisienkonjugasieweg is om bensoaat te detoksifiseer (Badenhorst *et al.*, 2014). AKSM2B het ook die hoogste substraatspesifisiteit vir bensoaat (Vessey *et al.*, 1999; van der Sluis & Erasmus, 2016). 'n Studie van Bridges *et al.* (1970) toon dat as lae dosisse bensoaat ingeneem word, 99.4% daarvan uitgeskei word as hippuursuur, die glisienkonjugaat van

bensoaat. Met die oog op AKSM2B is mediumketting vetsure ook 'n baie belangrike substraat vir die ensiem en speel dit ook 'n rol in glisienkonjugasie.

2.3.2 Kapasiteitbeperking en kompeterende substrate van glisienkonjugasie

Die glisienkonjugasieweg se kapasiteit is beperk – dit beteken dat die glisienkonjugering van 'n substraat 'n maksimum bereik – groter hoeveelhede substraat word dus nie teen 'n hoër spoed gekonjugeer nie, maar bereik 'n maksimumtempo van konjugering en sal in die liggaam oorbly en ophoop totdat daardie tempo van konjugering die substraat elimineer (Amsel & Levy, 1969).

Hierdie kapasiteitbeperking van die glisienkonjugasieweg veroorsaak dat die gelyktydige inname van twee verskillende substrate ook lei tot kompeterende inhibisie tussen die twee substrate. As twee substrate vir die weg ingeneem word, sal die substraat waarvoor die ensieme in die weg meer affiniteit het, voorkeur geniet in die metabolisme deur die weg. Dit lei daartoe dat die metabolisme van een of beide van die substrate verminder. Die farmakologiese aktiwiteit van die substrate word daarom verhoog en dit kan lei tot onveilige blootstelling aan die substrate, newe-effekte en uiteindelik toksisiteit (Levy & Procknal, 1968)

Glisienkonjugasie is die hoof detoksifikasie weg van twee verbindings wat hierdie tipe substraat kompetisie toon, naamlik bensoaat en salisilaat (nommer 1 en 2 in Figuur 2-3). Hierdie twee substrate gaan verder ondersoek word.

2.3.2.1 Bensoaat as substraat vir glisienkonjugasie

Bensoaat of bensoësuur is ook bekend as fenielmieresuur, benseenkarboksielsuur, benseen mieresuur, karboksiebenseen of fenielkarboksielsuur. Dit kom natuurlik voor in dier- en plantmateriaal en word ook gevorm deur mikrobies wat plantmateriaal afbreek. Dit word gebruik as 'n bymiddel, stabiliseringsmiddel, preserveer- en geurmiddel in die kosmetiese, voedsel, higiëne en farmaseutiese bedrywe (Del Olmo *et al.*, 2017). Oorspronklik het mense bensoaat slegs in klein hoeveelhede uit voedsel ingeneem, maar as gevolg van veranderinge in die moderne dieet word baie groter hoeveelhede ingeneem. Die gebruik van bensoaat in voedsel as 'n preserveer middel word as veilig beskou as gevolg van 'n geskiedenis van gebruik sonder newe-effekte en die hoë vlakke van bensoaat wat deur proefdiere verdra kan word (Nair, 2001).

Tabel 2-1 dui die natuurlike konsentrasie van bensoaat in voedsel aan teenoor die konsentrasielimiete van bensoaat in geprosesseerde voedsel soos gestel deur die Voedsel- en Landbou-organisasie (VLO) en die Wêreldgesondheidsorganisasie (WGO). Hierdie tabel stel die vermeerdering van bensoaat in die mens se dieet in konteks. Die natuurlike konsentrasie aangetoon in groen wys die lae hoeveelhede van bensoaat wat natuurlik ingeneem sou word en

die konsentrasielimiete wat tans gestel is, aangetoon in rooi, wys die hoë konsentrasie van bensoaat wat in produkte toegelaat word.

Tabel 2-1: Die natuurlike konsentrasie van bensoaat in voedsel teenoor die konsentrasie limiete van bensoaat in geprosesseerde voedsel

Natuurlike voedsel		Geprosesseerde voedsel	
Voedsel	Konsentrasie (mg/kg of mg/L)	Voedsel	Konsentrasie limiete gestel deur VLO/WGO (mg/kg of mg/L)
Perske, lemoen, pampoer, spinasie en sojabone	1-2	Sjokolade en lekkers	1500
Aarbeie	29	Gaskoeldrank / waterbasis gegeurde drankies	1000
Grondboontjie en okkerneut	1-4	Vloeibare-eier produkte	5000
In ryp vrugte van die <i>Vaccinium spesie</i> (Bessies)	1300	Groentepulpe	3000
Natuurlike konsentrasie in melk	Tussen 2 en 5	Gekookte garnaal	6000
Kaneel	336	Tafelblad versoeters	2000
Rou koeimelk kaas by ses maande	250	Slaaie en broodsmere	1500
Vrugte	<1	Gedroogde vrugte	1500

Aangepas uit (Del Olmo *et al.*, 2017)

Bensoaat se aanvaarbare daaglikse inname (ADI) wat deur die VLO en WGO bepaal is, is 5 mg/kg liggaamsgewig/dag. Beraming van daaglikse inname (BDI) van bensoaat in gemeenskappe waar die gebruik van preserveermiddels algemeen is wys dat bensoaatinname veel meer as die ADI kan wees. Een studie het getoon dat die BDI van bensoaat 135% van die ADI in kinders is, 118% van die ADI in mans is en 124% van die ADI in vrouens is (Mischek & Krapfenbauer-Cermak, 2012; Del Olmo *et al.*, 2017). Ander studies het bewys dat 10% van mans en vrouens 'n lewenslange inname van bensoaat sal hê wat meer is as die ADI (Leth *et al.*, 2010).

Alhoewel bensoaat as veilig beskou word, is die gebruik daarvan as preserveermiddel gekoppel aan aandaggebrek-hiperaktiwiteitsindroom in kinders (Bateman *et al.*, 2004). Dit kan ook moontlik 'n tekort aan glisien veroorsaak wat 'n negatiewe impak kan hê op neuro-endokrinologie in die brein en in die sintese van nukleïensure, kolageen en porfiere. Indien bensoaat nie geredelik

gemetaboliseer word nie kan dit tot ernstige skade aan die mitochondria lei wat gepaard gaan met die tekort aan glisien. Hierdie mitochondriale skade kan lei na omstandighede soortgelyk aan Reye se sindroom waar toksiese skade aan die lewer mitochondria aangerig word (Badenhorst *et al.*, 2013; Piper & Piper, 2017).

2.3.2.2 Salisilaat as substraat vir glisienkonjugasie

Aspirien is wêreldwyd 'n voorkeur pynmedikasie en word as 'n niesteroïdale anti-inflammatoriese geneesmiddel (NSAIG) voorgeskryf om verskeie siektetoestande te behandel. Dit word so algemeen gebruik en voorgeskryf dat die oorspronklike eienaam, Aspirien, verander het na aspirien as 'n soortnaam (Lewis *et al.*, 1983; Levine *et al.*, 2005; Cheng, 2007). Salisilaat is die hoofkomponent van aspirien en kom ook voor in verskeie ander farmaseutiese produkte soos bismut-sub-salisilaat en wintergroenolie (Cheng, 2007; Parker *et al.*, 2017). Alhoewel salisilaat verligting van pyn wêreldwyd bring, is daar tog verskeie nuwe-effekte.

In 'n studie waar salisilaat as NSAIG gebruik is om 527 pasiënte te behandel vir artritis het 25.3% van die pasiënte nuwe-effekte ervaar tot in so 'n mate dat hulle mediese hulp nodig gehad het. Hierdie pasiënte het gastro-intestinale nuwe-effekte ervaar soos boonste maagderm bloeding, peptiese ulkuse, gastritis, duodenitis, dispepsie en sooi-brand (Bloom, 1988). 'n Studie wat die ongunstige nuwe-effekte van geneesmiddels (ONG) ondersoek het, het aangetoon dat salisilaat in die vorm van aspirien die geneesmiddel is wat die meeste gekoppel word aan ONG en opnames in die hospitaal as gevolg daarvan. Die data moet wel gesien word in die lig daarvan dat aspirien meer algemeen gebruik word as ander geneesmiddels. Dit het ook aangetoon dat selfs lae dosisse van aspirien ook kan lei na ongunstige nuwe-effekte, maar dat die gebruik daarvan steeds baie voordele inhou (Pirmohamed *et al.*, 2004). Salisilaat kan ook nie in kinders gebruik word nie omdat dit Reye se sindroom kan veroorsaak of kan vererger (Van der Sluis, 2015; Piper & Piper, 2017).

2.3.2.3 Salisilaat en bensoaat toon kompeterende inhibisie van glisienkonjugasie

Glisienkonjugasie is, buiten bensoaat, ook die hoofdetoksifikasieweg van lae dosisse van salisilaat en AKSM2B is die tempobepalende ensiem (Nelson *et al.*, 1966; Patel *et al.*, 1990).

Beide salisilaat en bensoaat se glisienkonjugasie is kapasiteitsbeperk, maar AKSM2B het die hoogste substraatspesifiteit vir bensoaat (Vessey *et al.*, 1999). Dit wil sê dat wanneer beide salisilaat en bensoaat ingeneem word, word die glisienkonjugering van salisilaat drasties verlaag, terwyl die glisienkonjugering van bensoaat soos normaal voortgaan (Amsel & Levy, 1969). Die kapasiteitsbeperkings van glisienkonjugering beteken ook dat by hoër dosisse van salisilaat (d.w.s. 2 of meer aspirien tablette) die tempo van 2-hidroksiehippuursuur (salisilaat se glisienkonjugaat)

ekskresie 'n maksimum sal bereik. Dit lei daartoe dat die halfleeftyd van salisilaat sal verhoog van sy gerapporteerde vlak van 2.4 – 19 ure na 22 ure (Levy, 1965). Dit beteken dat salisilaat en sy toksiese eienskappe vir langer in die mens se liggaam sal bly.

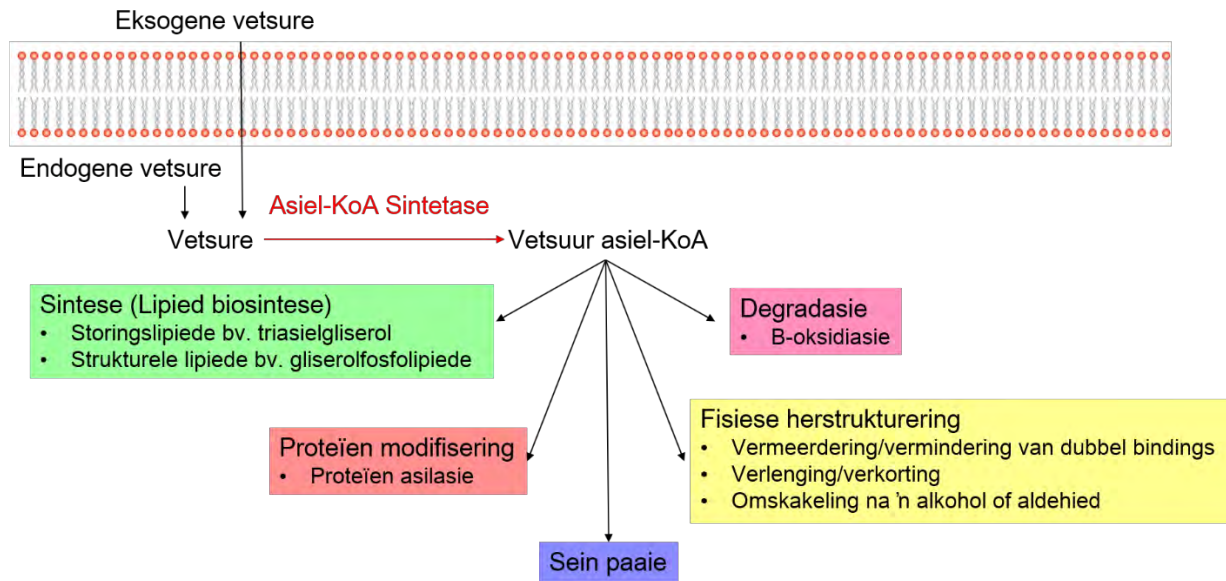
Selfs by normale voorgeskrewe dosisse salisilaat kan dit glisienkonjugasie se kapasiteit oorskry en dit is wanneer alternatiewe biotransformasie weë in werking tree. Hierdie alternatiewe weë is hoofsaaklik die vorming van 'n glukuronied, en in klein hoeveelhede die uitskeiding van onveranderde salisilaat (Levy, 1965; Levy & Procknal, 1968).

Hoë dosisse van bensoaat, alhoewel dit voorrang bo salisilaat geniet, oorskry ook glisienkonjugasie se kapasiteit en kan in die liggaam ophoop. Dit is slegs onder hierdie omstandighede dat 'n alternatiewe weg vir die detoksifisering van bensoaat intree. Hierdie alternatiewe weg is die sintese van bensoëilglukuronied. Hierdie sintese vind plaas in die sitoplasma deur die uridien 5'-difosfoglukoronosieltransferase-ensieme, en die bensoëilglukuronied wat gevorm word, word dan deur die urine uitgeskei (Badenhorst *et al.*, 2014).

2.3.2.4 Metaboliese rol van Asiel-KoA-sintetase in vetsuurmetabolisme

Asiel-KoA-sintetase speel 'n belangrike rol nie net in glisienkonjugasie nie, maar ook in vetsuurmetabolisme en hierdie rol kan ook 'n faktor wees in die kapasiteitbeperking van die glisienkonjugasieweg.

Vetsure is grotendeels biologies onaktief totdat hulle geaktiveer word deur die omskakeling na hulle koënsiem-A derivate. Dit word gedoen deur die asiel-KoA-sintetase ensiemfamilie. Die geaktiveerde vorm van vetsure kan deelneem aan verskeie prosesse wat wyd geklassifiseer word as lipiedbiosintese, degradasie deur β -oksidasie vir energie, fisiese herstrukturering, seinpaaie en in die modifisering van proteïene soos aangetoon in (Watkins, 1997).



Figuur 2-4: Metaboliese rol van asiel-KoA-sintetase (AKS). Aangepas uit (Watkins, 1997; Grevengoed *et al.*, 2014).

Daar is 'n wye verskeidenheid vetsure wat in die natuur voorkom. Mens kry verkillende koolstof kettinglengtes van vetsure, vanaf asetaat wat twee koolstowwe bevat tot by sekere plant wasse en lipiede wat koolstof kettings van oor die 30 koolstowwe bevat (Watkins *et al.*, 2007). Vetsure kan ook verskeie vorms aanneem, met byvoorbeeld 'n enkele dubbelbinding of veelvuldige dubbelbindings, asook verskeie metielbindings. Dit is daarom dat die mens 'n verskeidenheid asiel-KoA-sintetase ensieme het wat deelneem aan hierdie katabolisme of anabolisme van vetsure (Watkins *et al.*, 2007)..

2.3.3 Individuele variasie in die tempo van glisienkonjugasie

Glisienkonjugasie se kapasiteit varieer noemenswaardig tussen individue, maar die meganisme hier agter is onbekend (Temellini *et al.*, 1993). Verskillende individue toon byvoorbeeld, groot variasie in die hoeveelheid hippuursuur wat uitgeskei word na bensoaat toegedien is (Campbell *et al.*, 1988). Daar is ook groot variasie in die metabolisme van aspirien (salisilaat) tussen individue, geslagte en ook tussen etniese groepe. Die teenwoordigheid van variasie in glisienkonjugasie tussen etniese groepe dui aan dat genetiese variasie 'n faktor hierin kan speel (hersien deur van der Sluis & Erasmus, 2016). Die genetiese variasie in die vorm van enkelnukleotied polimorfisme van die *GLIAT*-geen is al ondersoek en daar is gevind dat hierdie genetiese variasie 'n invloed het op die *GLIAT*-ensiem se kinetiese eienskappe. Dit verduidelik tot in 'n mate die variasie van glisienkonjugasie se kapasiteit onder individue (van der Sluis *et al.*,

2013). Geen kennis oor die genetiese variasie van die *AKSM2B*-geen se invloed op glisienkonjugasie se kapasiteit is beskikbaar nie.

2.4 Asiel-KoA-sintetase

2.4.1 Klassifisering van Asiel-KoA-sintetases

Asiel-KoA-sintetase word geklassifiseer volgens die lengte van die koolstofketting van die vetsuur waarvoor hulle spesifisiteit het. Tabel 2-2 wys die klassifikasie van kort-, medium- en langketting vetsuur asiel-KoA-sintetases wat koolstofketting lengtes van onderskeidelik 2 tot 4, 4 tot 12 en 12 tot 20 aktiveer. Daar is baie ooreenstemming tussen die spesifisiteit van die verskillende sintetases en die klassifikasie word nie as rigied gesien nie (Watkins *et al.*, 2007). Die spesifisiteit van die asiel-KoA-sintetase word toegeskryf aan die groter van die hidrofobiese holte in die N-domein van die proteïen waar die vetsure gebind word. Hoe groter en dieper hierdie holte, hoe langer is die lengte van die vetsuur wat gebind en geaktiveer kan word (Kochan *et al.*, 2009).

Tabel 2-2: Klassifikasie van asiel-KoA-sintetases (AKSs)

AKS klassifikasie	Spesifisiteit/lengte van koolstof ketting
Kort-ketting (AKSK)	C2 – C4
Medium-ketting (AKSM)	C4 – C12
Lang-ketting (AKSL)	C12 – C20

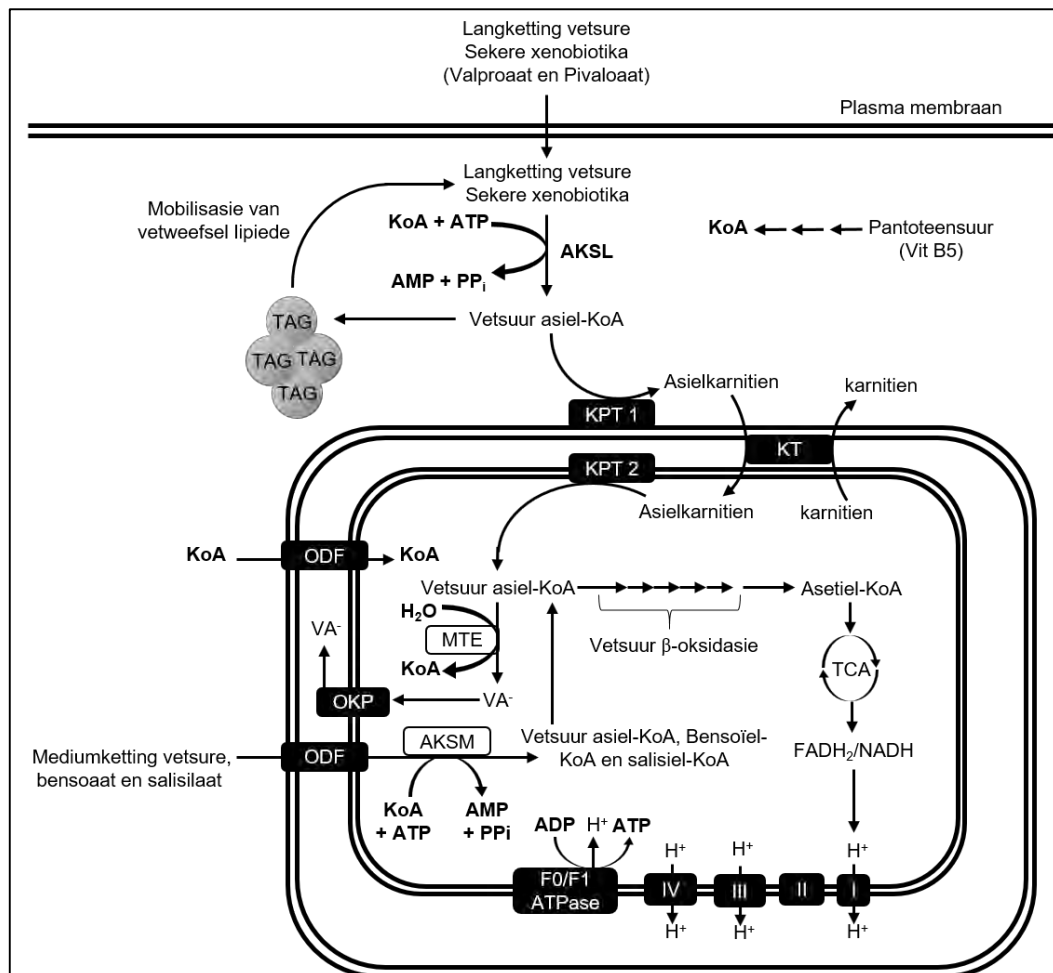
Saamgevoeg uit (Knights & Miners, 2011)

2.4.2 Ligging van asiel-KoA-sintetase

Verskeie weefsels in die menslike liggaam gebruik vetsure as hulle hoof bron van energie, bv. skeletspierweefsels. Hierdie vetsure word deur die dieet ingeneem of, in vastende omstandighede, word die vetsure vanaf die vetweefselvorrings bv. triasielgliserol gemobiliseer en deur die mitochondria omgeskakel na energie (Watkins, 1997). Die deel van die sel wat hierdie verskillende lengtes vetsure kan binnedring bepaal die ligging van die verskeie asiel-KoA-sintetases. Figuur 2-5 dui die AKS ensieme se ligging in die mitochondria aan en wys ook hulle betrokkenheid by die mitochondria se metabolisme.

Figuur 2-5 toon aan dat langketting vetsure eers geaktiveer moet word in die sitosol voordat hulle deur die karnitientransasilasieweg die mitochondria kan binnedring en β -oksidasie kan ondergaan. Dit is dus hier in die sitosol waar langketting asiel-KoA-sintetase (AKSL) gevind word. Mediumketting vetsure en sekere xenobiotika kan die mitochondria binnedring sonder om geaktiveer te word en sonder die hulp van die karnitientransasilasieweg. Hulle word binne in die

mitochondria geaktiveer deur die mediumketting asiel-KoA-sintetase (AKSM) wat daar gevind word (Watkins, 1997). Boomgaarden *et al.* (2009) het bewys dat die AKSM2A en AKSM2B-proteïene 'n N-terminaal mitochondriale teikenvolgorde besit en dat hulle wel in die mitochondria voorkom. Kortketting asiel-KoA-sintetase word gevind in die sitosol, waar hulle kort ketting vetsure aktiveer (Knights & Miners, 2011).



Figuur 2-5: Voorstelling van die ligging van asiel-KoA-sintetase in die mitochondria en hulle betrokkenheid by die metabolisme van vetsure en seker xenobiotika. KPT: Karnitienpalmitoïeltransferase. KT: Karnitien-asielkarnitien translokase. OKP: Ontkoppelingsproteïen. ODF: Opgeloste stof draer familie. MTE: Mitochondriale tioësterase. TAG: Triasielgliserol. Aangepas uit (Lopaschuk *et al.*, 2010; van der Sluis & Erasmus, 2016)

2.4.3 Die rol van ko-ensiem A in asiel-KoA-sintetase funksie

Die aktivering van vetsure deur asiel-KoA-sintetase ensieme is afhanklik van adenosientrifosfaat (ATP) en van ko-ensiem A (KoA) soos aangedui in Figuur 3-1 (Watkins, 1997). Ko-ensiem A word in die sitosol van selle gesintetiseer vanaf die noodsaaklike vitamien B₅, anders bekend as pantoteensuur, in vyf ensimatiese stappe. Pantoteensuur is geredelik beskikbaar in die mens se dieet, maar KoA is nie, en daarom is hierdie vyf ensimatiese stappe van KoA-sintese streng gekonserveerd (Daugherty *et al.*, 2002). Die byvoeging van pantoteensuur by die HepG₂ lewersellyn se media verhoog byvoorbeeld die selle se KoA konsentrasie (Palekar, 2000). Selfs in mikrobe sal die byvoeging van pantoteensuur by byvoorbeeld *E.coli* se groeimedium die interne konsentrasie van ko-ensiem A in die *E.coli* verhoog (Vadali *et al.*, 2004). KoA speel 'n belangrike rol in die metabolisme van die mitochondria soos aangedui in Figuur 2-5, en in die aktivering van vetsure neem KoA deel aan die katabolisme en anabolisme van vetsure soos gelys in Figuur 2-4. KoA word in die mitochondria in vervoer deur die opgelostestofdraerfamilie (ODF) van ensieme soos aangedui in Figuur 2-5 (Fiermonte *et al.*, 2009).

KoA kan gesekwestreer word indien daar te veel substrate deur asiel-KoA-sintetase geaktiveer word na asiel-KoA's toe en verdere metabolisme na byvoorbeeld 'n glisien konjugaat te stadig verloop. Dit kan lei na KoA-tekorte in die totale metabolisme van die sel. Die beskikbaarheid van ongeasileerde KoA kan ook direk die tempo van asiel-KoA-sintetase se aktiwiteit beïnvloed (Badenhorst *et al.*, 2014). Die verhoging van KoA deur die byvoeging van pantoteensuur by die HepG₂ sellyn se media het byvoorbeeld die vorming van hippuraat verhoog. Dit dui op die effek van die beskikbaarheid van KoA by asiel-KoA-sintetase (Palekar, 2000).

2.5 AKSM2A en AKSM2B

Hierdie studie fokus op mediumketting vetsuur asiel-KoA-sintetases, spesifiek AKSM2A en AKSM2B, as gevolg van hulle rol in die metabolisme van xenobiotika. Watkins *et al.* (2007) het gekonserveerde aminosuurmotiewe gebruik om die AKS-gene in die menslike genoom te identifiseer. Tabel 2-3 wys die verskillende mediumketting vetsuur asiel-KoA-sintetases wat geïdentifiseer is, hulle sinonieme, die liggaamsdeel waar hulle hoofsaaklik uitgedruk word en hulle nukleotied-verwysingsvolgorde.

Tabel 2-3: Klassifikasie van mediumketting vetsuur asiel-KoA-sintetases (AKSMs)

AKSM	Sinonieme	Uitdrukking	Nukleotied verwysingsvolgorder
AKSM1	BUCS1; MACS1; LAE; HXM-B		NM_052956

AKSM	Sinonieme	Uitdrukking	Nukleotied verwysingsvolgorder
AKSM2A	LOC123876; A923A4.1; MACS2	Niere en lewer	NM_001308172.1
AKSM2B	HXMA; HYST1046	Niere en lewer	NM_182617
AKSM3	SAH; SA	Niere en lewer	NM_005622
AKSM4	LOC341392	Testis	NM_001080454
AKSM5	FLJ20581; MACS3	Niere en lewer	NM_017888
AKSM6	C10orf129		NM_207321.2

Aangepas uit (van der Sluis & Erasmus, 2016).

2.5.1 Die *AKSM2A* en *AKSM2B* gene en hul genetiese variasie

Die *AKSM2*-geen word gevind op twee verskillende loki op chromosoom 16p12.3 as gevolg van 'n chromosomale verdubbelingsgebeurtenis. Hierdie twee gene se nukleotied volgordes is 98.8% identies en die volgorde van hulle aminosure is 97.6% identies. Die twee gene word onderskei deur die twee benamings *AKSM2A* en *AKSM2B*. Daar is wel genoegsame bewyse wat aantoon dat beide hierdie gene bestaan.

AKSM2A word gevind op die voorwaartse DNA-string op chromosoom 16, posisie 16p12 en *AKSM2B* op die terugwaartse string op chromosoom 16, posisie 16p12 (Watkins *et al.*, 2007). Daar is 21 nukleotied verskille in die koderende gedeeltes van die gene, 17 van die verskille is nie-sinonieme veranderinge (van der Sluis & Erasmus, 2016). Net een van hierdie nie-sinonieme veranderinge is in 'n gekonserveerde motief. Dit is residu 463, wat asparagien in *AKSM2A* en aspartiensuur in *AKSM2B* is (Watkins *et al.*, 2007).

AKSM2A en *AKSM2B* word hoofsaaklik uitgedruk in die mens se lewer en is gelokaliseer in die mitochondria. Van al die AKSM ensieme is *AKSM2A* die hoof transkrip in die lewer, gevolg deur *AKSM2B* (van der Sluis, 2018).

AKSM2A se biologiese funksie is nog nie gekarakteriseer nie (Watkins *et al.*, 2007), maar die kristal struktuur van *AKSM2A* is al toegelig in komplekse met en sonder substrate (Kochan *et al.*, 2009).

Tabel 2-4: Genetiese inligting van *AKSM2A* en *AKSM2B*

Kenmerk	<i>AKSM2A</i>	<i>AKSM2B</i>
Nukleotiede	36092	39160
Aminosure	577	577

Kenmerk	AKSM2A	AKSM2B
Eksons	14	15
Koderende eksons	13	13
Bekende SNPs*	10331	11386
Modifiserende SNPs	555	578

* COSMIC variante uitgesluit(www.ensembl.org, November 2018, ENST00000573854.5, ENST00000567001.5)

Alhoewel daar soveel SNPs in *AKSM2A* en *AKSM2B* opgeteken is, is die gene hoogs gekonserveer deur evolusie (van der Sluis, 2018). Daar is tans geen inligting beskikbaar oor die invloed van die genetiese variasie op die ensiemaktiwiteit nie. Van al die *AKSM* gene is *AKSM2A* die hoof transkrip in die lewer gevolg deur *AKSM2B* (van der Sluis, 2018)

2.5.2 Ensimaties inligting van AKSM2B

AKSM2B is ontdek en gekarakteriseer in 'n kru-sel ekstrak deur Vessey *et al.* (1999) en is oorspronklik HXM-A genoem. Die relatiewe substraatspesifisiteit van sewe verskillende substrate is bepaal en word aangetoon in Tabel 2-5. Daar word na die substraatspesifisiteit verwys as relatief omdat die ensiem net deels gesuiwer kon word.

Tabel 2-5: Relatiewe substraatspesifisiteit van AKSM2B wat deur Vessey *et al.* (1999) in 'n kru-sel ekstrak bepaal is.

Substraat	AKSM2B oënskynlike substraatspesifisiteit (V_{max}/K_m)
Bensoaat	7.92
Heksanoaat	7.92
Feniel asetaat	0.18
Dekanoaat	0.14
Salisilaat	0.1
Butiraat	0.033

Aangepas uit (van der Sluis & Erasmus, 2016)

Die lae relatiewe substraatspesifisiteit vir butiraat bevestig die gedagte dat *AKSM2B* 'n mediumketting vetsuur asiel-KoA-sintetase is, omdat dit nie spesifisiteit vir kort ketting vetsure besit nie.

'n Variant van AKSM2B was in COS-7 selle uitgedruk en die lisaat van hierdie selle is getoets vir aktiwiteit teenoor bensoaat en feniel asetaat. Hierdie ensimatiese inligting word gegee in Tabel 2-6 (Vessey *et al.*, 2003).

Tabel 2-6: AKSM2B-variant ensimatiese inligting

Substraat	AKSM2B variant aktiwiteit (pmol/min/mg totale proteïen)
Bensoaat	0.91
Feniel asetaat	0.71

Aangepas van (Vessey *et al.*, 2003)

2.5.3 Rekombinante uitdrukking van AKSM2A en AKSM2B

Daar is slegs drie studies waar AKSM2-ensieme rekombinant uitgedruk is. Die rekombinante uitdrukking is uitgevoer in mens- en insek selle.

Boomgaarden *et al.* (2009) het 'n menslike AKSM2-ensiem en 'n verkorte AKSM2-ensiem rekombinant uitgedruk in menslike hepatoma selle (HuH-7 selle). Hulle het aangetoon dat die vollengte AKSM2-proteïene gelokaliseer is tot die mitochondria. As die proteïene verkort word met 47 aminosure by die N-terminaal (dit is die minste gekonserveerde deel van die N-terminaal in vergelyking met ander AKSM proteïene), dan word die AKSM2-proteïene nie meer gelokaliseer tot die mitochondria nie en is dit versprei in die selle se sitoplasma.

Die geen volgordes is deur middel van polimerase ketting reaksie (PKR) vanaf HepG2 cDNA geamplifiseer, maar die voorvoeders wat gebruik is, was spesifiek vir beide AKSM2A en AKSM2B. Die volgordes wat uiteindelik verkry is, is nie vermeld nie, dus word daar slegs na 'n AKSM2-proteïen verwys. Die geamplifiseerde volgorde is in 'n pcDest47 vektor gekloneer wat 'n groen fluoresserende proteïen (GFP) aan AKSM2 bind, en is in HuH-7 selle getransfekteer. Die GFP is gebruik om die lokalisering van AKSM2 en verkorte AKSM2 in die selle te identifiseer. Die studie het bewys dat die AKSM2-proteïene 'n mitochondriale teiken-volgorde besit en dat hulle daarom ook gelokaliseer is in die mitochondria. Seker mitochondriale teiken-volgordes word afgekleef as die proteïene die mitochondria binnedring (Rehling *et al.*, 2004).

2.5.3.1 AKSM2A

Kochan *et al.* (2009) het rekombinante uitdrukking van AKSM2A uitgevoer in H5 inkselle deur infeksie met 'n rekombinante bakulovirus. Die AKSM2A-volgorde is in 'n pFastBac-afgeleide vektor gekloneer in die leesraam van 'n 6X-histidien etiket en 'n TEV-protease sny plek. Suiwering is deur nikkel-affiniteit, grootte-uitsluitel en anioon-ruiling chromatografie uitgevoer. Die geproduseerde

ensiem is gebruik om deur middel van kristallografie die strukturele eienskappe van AKSM2A op te klaar, asook die strukturele eienskappe van AKSM2A in kompleks saam met substrate.

2.5.3.2 AKSM2B

Vessey *et al.* (2003) het AKSM2B rekombinant in COS-7 selle uitgedruk. Hulle het na die proteïen as HXM-A verwys, maar die benaming is na hierdie studie na AKSM2B verander (van der Sluis & Erasmus, 2016). Die geenvolgorde is vanaf mens cDNA geamplifiseer deur middel van PCR en is in 'n p3xFLAG-CMV-7 vektor gekloneer en in COS-7 selle getransfekteer. Die lisaat van hierdie selle is getoets vir aktiwiteit teenoor enkele substrate.

2.6 Probleemstelling

Glisienkonjugasie is 'n belangrike en gekonserveerde detoksifikasie- of biotransformasieweg (van der Sluis *et al.*, 2015a; van der Sluis, 2018). Glisienkonjugasie is verantwoordelik vir die detoksifisering van xenobiotika soos bensoaat en salisilaat wat in al hoe groter hoeveelhede deur die mens ingeneem word (Badenhorst *et al.*, 2014; Del Olmo *et al.*, 2017). Die oorweldiging van biotransformasieweë kan lei tot ernstige newe-effekte en toksisiteit (Liska *et al.*, 2006). Die kapasiteitsbeperking van glisienkonjugasie maak dat die weg maklik oorweldig kan word en dat die substrate wat as gevolg daarvan langer in die mens agterbly, toksies kan wees (Amsel & Levy, 1969). Die moontlike gevare van die gelyktydige inname van bensoaat en salisilaat is duidelik in AKSM2B se voorkeur affiniteit vir bensoaat eerder as salisilaat en salisilaat se toksiese eienskappe (Bloom, 1988; Vessey *et al.*, 1999). Daar is groot variasie in die glisienkonjugasie vermoë van verkillende individue, geslagte en etniese groepe. 'n Ondersoek in die *GLIAT*-geen se genetiese variasie het al tot 'n mate hierdie variasie verduidelik (van der Sluis *et al.*, 2013), maar geen inligting oor die invloed van genetiese variasie in die *AKSM2A*- en *AKSM2B*-gene is beskikbaar nie (van der Sluis, 2018).

Daar is vanaf die eerste oënskynlike substraatspesifisiteit van AKSM2B wat bepaal is deur Vessey *et al.* (1999; 2003) geen verdere ondersoek ingestel oor die substraatspesifisiteit en kinetika van AKSM2B nie (van der Sluis, 2018). Hierdie inligting sal die kapasiteitsbeperking van glisienkonjugasie kan toelig. Dit sal verduidelik hoe die kapasiteitsbeperking van die glisienkonjugasieweg die kompetisie tussen bensoaat en salisilaat beïnvloed en watter effek dit vir die mens se welstand inhou. Daar is nie tans navorsing beskikbaar oor die metaboliese effek wat die wisselwerking tussen bensoaat en salisilaat as kompeterende substrate het nie en ook nie oor wat die effek is van die alternatiewe weë wat gevolg word as glisienkonjugasie se kapasiteit oorskry word nie. Die inhibisie van mediumketting vetsure se metabolisme deur 'n oormaat bensoaat kan ook die energieproduksie wat van mediumketting vetsure afhanklik is

affekteer. Die ensimatiese inligting van die AKSM2-ensieme is daarom noodsaaklik om te verseker dat salisilaat en bensoaat binne veilige perke gebruik word.

Die biologiese funksie van AKSM2A is nog nie ontdek nie. Die AKSM2-geen het wel deur 'n chromosomale verdubbelingsgebeurtenis die AKSM2A- en AKSM2B-gene gevorm en funksionele studies toon aan dat chromosomale verdubbelingsgebeurtenisse plaasvind om aanpassing van die 'n organisme te fasiliteer (Qian & Zhang, 2014). Dit beteken dat die verdubbeling van 'n geen kan help om die metaboliese las op die geen se ensiem te verminder of te diversifiseer om die organisme te help om aan te pas by 'n omgewing. Die feit dat AKSM2A en AKSM2B se aminosuurvolgordes so eenders is, saam met die hoë vlakke van transkripte van beide van hierdie ensieme in die lewer, laat vrae oor of die twee ensieme soortgelyke substraatspesifisiteit het en of hulle by dieselfde ensimatiese weg betrokke is. Die streng konservering van die glisienkonjugasieweg by beide die AKSM2-ensieme en GLIAT toon die belangrikheid van hierdie weg en beklemtoon die noodsaaklikheid van verdere studie en inligting oor die AKSM2-ensieme (van der Sluis, 2018).

Proteïene wat mitochondriale teikenvolgordes soos AKSM2A en AKSM2B besit, se teikenvolgordes kan moontlik af gekleef word as hulle die mitochondria binnedring en dit lei na volwasse wording van die ensieme (Rehling *et al.*, 2004; Boomgaarden *et al.*, 2009). Die ensimatiese aktiwiteit tussen die volledige ensiem en die verkorte ensiem (sonder die teikenvolgorde) kan dus moontlik verskil. Dit is daarom nodig om beide vollengte en verkortelengte ensieme te karakteriseer.

Dit sou gerieflik wees as hierdie ensieme wat in die mens se lewer geproduseer word, uit menslike lewerkankersellyne geïsoleer kon word, maar beide AKSM2A en AKSM2B word nie in menslike lewerkankersellyne uitgedruk nie (Boomgaarden *et al.*, 2009).

2.6.1 Navorsingsvraag

Die langtermyn navorsingsvraag wat hierdie studie dus wil aanspreek is die behoefte dat AKSM2A- en AKSM2B-ensieme rekombinant geproduseer en ensimaties gekarakteriseer moet word.

Om hierdie navorsingsvraag aan te spreek poog hierdie studie om 'n ensiemtoets vir hierdie ensieme te optimaliseer en om 'n rekombinante ekspressiesisteem vir AKSM2A en AKSM2B te formuleer. Hierdie inligting sal toekomstige navorsing in staat stel om die substraatspesifisiteit en kinetika van hierdie ensieme te bepaal.

2.7 Navorsingsdoelstellings en -doelwitte

Die navorsingsdoelstellings van hierdie studie is dus om 'n ensiemtoets vir AKSM2A en AKSM2B te optimaliseer en om 'n ekspressiemetode vir die vollengte en verkorte proteïene te formuleer wat oplosbare proteïene sal produseer.

2.7.1 Optimaliseer 'n ensiemtoets vir AKSM2A en AKSM2B

- (i) Identifiseer 'n toepaslike ensiemtoets vir AKSM2A en AKSM2B.
- (ii) Identifiseer en verkry 'n positiewe kontrole.
- (iii) Bevestig geldigheid van ensiemtoets met positiewe kontrole.
- (iv) Optimaliseer ensiemtoets vir gebruik op AKSM2A en AKSM2B deur reaksievolumes aan te pas, ensiemkonsentrasie te bepaal en tydsduur van die ensiemtoets te bevestig.

2.7.2 Formuleer 'n ekspressiesisteem wat oplosbare AKSM2A en AKSM2B produseer.

- (i) Identifiseer bakteriële ekspressiesisteme wat AKSM2A en AKSM2B oplosbaar sal kan produseer.
- (ii) Kloneer AKSM2A en AKSM2B se volledige en 5' verkorte gene in gekose ekspressie vektore.
- (iii) Voer ekspressiemetodes uit en toets of daar oplosbare ensieme geproduseer word.
- (iv) Optimaliseer suksesvolle metode.
- (v) Bevestig oplosbare ensieme se teenwoordigheid deur uitvoering van 'n westerseklad.

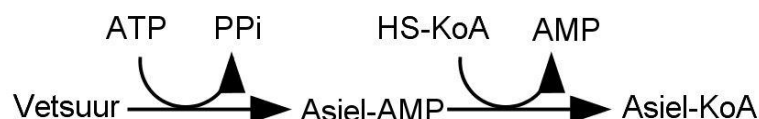
HOOFSTUK 3 Die optimalisering van 'n AKSM2-ensiemtoets

3.1 Inleiding

Die langtermyn doelwit om die AKSM2A- en AKSM2B-ensieme ensimaties te karakteriseer begin by die vermoë om hierdie ensieme se aktiwiteit te meet. Die beskikbare laboratorium het nie 'n geoptimaliseerde ensiemtoets vir hierdie ensieme nie en daar is dus 'n behoefte dat een ontwikkel word.

Daar is hoofsaaklik twee verskillende tipes ensiemtoetse. 'n Kontinue en 'n eindpunt ensiemtoets. Kontinue ensiemtoetse volg die ensiemreaksie soos tyd verloop en wys die reaksiekurwe. Dit maak dit moontlik om die reaksiesnelheid en kinetika te bereken. Dit gee ook duidelikheid oor die lineêre gedeelte van die reaksiekurwe waarop kinetika berekeninge gebaseer word. In eindpunt-ensiemtoetse moet die reaksie na 'n sekere tydperk gestop word en 'n enkele meting word geneem. Hierdie ensiemtoetse gee nie 'n geheelbeeld van die reaksiekurwe nie, slegs die helling van die lyn tussen die blanko en die enkele meting word gebruik om die reaksiesnelheid te bereken. Om te verhoed dat hierdie enkele meting nie in die nie-lineêre gedeelte van die reaksiekurwe val nie moet meerdere metings geneem word by verskeie reaksietye deur van verskillende reaksies gebruik te maak. Dit is meer moeisam as kontinue ensiemtoetse, maar in kwalitatiewe studies is dit baie effektief om slegs die teenwoordigheid van 'n sekere ensiem te bewys (Bisswanger, 2014). In hierdie studie is die doel om 'n ensiemtoets te optimaliseer vir AKSM2A en AKSM2B wat gebruik kan word om hierdie ensieme se ensiemaktiwiteit en kinetika te bepaal, en daarom is 'n kontinue ensiemtoets benodig.

Asiel-KoA-sintetase se asilering van vetsure gebeur in twee halfreaksies wat voorgestel word in Figuur 3-1. Hierdie twee halfreaksies volg 'n ping-pong meganisme. In die eerste half-reaksie word 'n adeniël oorgedra vanaf 'n ATP-molekule aan die vetsuur wat 'n asiel-AMP vorm en PPI vrystel. Die ensiem-gebonde intermediêr wat nou geaktiveer is, word dan aangeval deur die KoA-S⁻ wat gevolglik die asiel-KoA en die AMP produseer (Watkins, 1997).



Figuur 3-1: Skematiese voorstelling van die twee halfreaksies van asiel-KoA-sintetase. In die eerste half-reaksie word die vetsuur gekoppel aan 'n adeniël groep wat geskenk word vanaf 'n ATP-molekule. Dit vorm 'n asiel-AMP en stel PPI vry. Die ensiem-gebonde intermediêr is daardeur

**geaktiveer en word dan aangeval deur 'n KoA-S in die tweede half-reaksie.
'n Asiel-KoA en AMP molekule word geproduseer.**

Asiel-KoA-sintetase se aktiwiteit kan met verskeie metodes getoets word. Figuur 3-2 gee 'n uiteensetting van al die verkillende metodes. Die metode wat baie algemeen vir verskeie soorte AKSM-ensieme gebruik word, is die eindpunt-ensiemtoets waar 'n radioaktiewe isotoop van die substraat gebruik word i.p.v. die normale substraat. Nadat die reaksie uitgevoer is, word vloeistof ekstraksie uitgevoer om die oorblywende ongeasileerde radioaktiewe isotoop te skei van die geasileerde isotoop. Die geasileerde isotoomengsel word dan gemeet vir radioaktiwiteit (Bar-Tana *et al.*, 1975; Vessey *et al.*, 2003). Asiel-KoA-sintetase se aktiwiteit kan in suiwer en helder oplossings kontinuu gemeet word deur die vorming van die tioësterbinding by 'n sekere golflengte waar te neem. In hierdie metode beïnvloed die lengte van die vetsuur se syketting die golflengte waar die tioësterbinding waargeneem kan word. Die metode werk slegs vir vetsure wat se syketting van so aard is dat die golflengte goed genoeg geskei is van die normale agtergrond (Yates & Garland, 1969). 'n Ander kontinue ensiemtoets koppel die vorming van die AMP wat in Figuur 3-1 gesien kan word aan die oksidasie van NADH. Hierdie verandering van NADH na NAD⁺ kan waargeneem word by 340nm. Die ensiemtoets vereis minstens 'n gedeeltelike gesuiwerde proteïen (Gibson *et al.*, 1990).



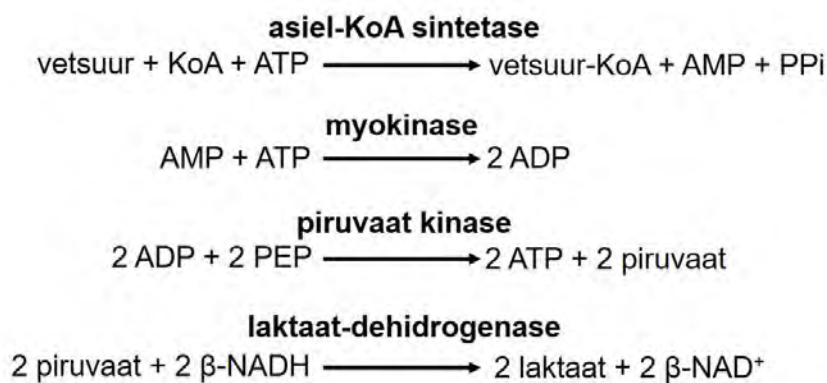
Figuur 3-2: Uiteensetting van die verskeie AKS ensiemtoetse. Aangepas uit (Watkins, 1997). Kontinue en eindpunt ensiemtoetse wat in die literatuur gebruik is om asiel-KoA sintetases mee te toets word weergegee.

Figuur 3-1 wys die reaksie meganisme van asiel-KoA-sintetase. Dit toon dat daar ses verbindings is wat gemeet kan word, naamlik die verbruik van die vetsuur, ATP en KoA, en die vorming van PPI, AMP en die asiel-KoA. Om seker te maak dat albei halfreaksies uitgevoer word kan slegs verbindings in die tweede halfreaksie gemeet word, naamlik die verbruik van KoA en die vorming van AMP en asiel-KoA. Figuur 3-2 verduidelik dat daar twee kontinue ensiemtoetse vir asiel-KoA-sintetase is wat die vorming van AMP en die asiel-KoA onderskeidelik meet.

Hierdie twee toetse is die metode van Yates en Garland wat die vorming van die asiel-KoA direk spektrofotometries meet (Yates & Garland, 1969) en die metode van Gibson *et al.* wat die AMP wat gevorm word ensimaties koppel aan die oksidering van β -NADH en dit spektrofotometries meet by 340 nm (Gibson *et al.*, 1990). Dit is belangrik in die Yates en Garland-metode dat die vetsuur-KoA wat gevorm word se absorpsie piek genoegsaam geskei is vanaf enige agtergrond. Hierdie toets werk goed vir vetsuur-KoA molekules wat absorpsie pieke bo 300 nm het, maar die vetsuur-KoA wat hoofsaaklik gevorm word deur AKSM2B is bensoïel-KoA wat 'n

absorbansiepiek by 261 nm tot 262 nm het (Webster *et al.*, 1974). Bensoaat self en ATP het beide absorbansiepieke wat oorvleuel met hierdie piek en daarom kan hierdie toets nie op AKSM2B toegepas word nie (Ungnade & Lamb, 1952; Bock *et al.*, 1956). Elke substraat wat deur hierdie metode getoets word sal 'n ander absorpsiepiek vorm en dit sal vir elke substraat bepaal moet word.

Die Gibson *et al.* ensiemgekoppelde asiel-KoA-sintetasetoets word uitgebeeld in Figuur 3-3. Die asiel-KoA-sintetase se asilering van enige vetsuur vorm 'n vetsuur-KoA, AMP en PPI. Die gevormde AMP dien as substraat vir myokinase saam met ATP om ADP te vorm. ADP dien as substraat vir piruvaatkinase saam met fosfo-enolpiruvaat (FEP) om ATP en piruvaat te vorm. Die piruvaat word gereduseer deur laktaat-dehidrogenase met β -NADH om laktaat en β -NAD⁺ te vorm. β -NADH besit 'n sterk absorbansie piek by 340 nm. Die reaksie word gevolg deur die afname in absorbansie by 340 nm te meet. Die reaksietempo word bereken deur die reaksie stoïgiometrie van 2 mol β -NADH geoksideer per mol vetsuur-KoA, te volg (Gibson *et al.*, 1990).



Figuur 3-3: Skematiese voorstelling van die Gibson *et al.* ensiem gekoppelde asiel-KoA-sintetase toets (Gibson *et al.*, 1990). Die vorming van AMP deur enige asiel-KoA sintetase word deur gebruik van drie ensieme naamlik myokinase, piruvaat kinase en laktaat-dehidrogenase gekoppel aan die verbruik van β -NADH wat waargeneem kan word by 340 nm.

Hierdie ensiemtoets stel ons in staat om enige asiel-KoA-sintetase, of selfs enige ensiem wat AMP produseer, se aktiwiteit te meet. Om hierdie ensiemtoets te toets en te optimaliseer is daar 'n asiel-KoA-sintetase wat van *Pseudomonas* sp. (Sigma, Saint Louis, VSA) geïsoleer is, aangekoop as positiewe kontrole. Hierdie asiel-KoA-sintetase gebruik oleaat, KoA en ATP en produseer oleaat-KoA, AMP en PPI. Die ensiem se teoretiese aktiwiteit is die vorming van 1 μ mol oleaat-KoA per minuut by pH 8.1 en 25°C. Al die ensiemtoetse in hierdie hoofstuk is dus op hierdie ensiem uitgevoer en geoptimaliseer.

Hierdie hoofstuk gee die metodes en materiale wat gebruik is en die resultate en bespreking, van die toepassing en optimalisering van die Gibson *et al.* ensiem gekoppelde asiel-KoA-sintetase toets weer.

3.2 Metodes en materiale

3.2.1 Voorbereiding van voorraadoplossings

Alle voorraadoplossings is met molekulêrebiologie-graad water en gliserol (Sigma, Saint Louis, VSA) opgemaak. Die pH is aangepas met 37% HCL (Merck, Wadeville, RSA). Die voorraadoplossings word gelys in Tabel 3-1.

Tabel 3-1: Voorraadoplossings

Reagens	Konsentrasie	Stoor temperatuur	Nota	Verskaffer
Tris (hidroksimetiel) – aminometaan - HCL buffer (Tris-HCl)	0.2 M (pH 8.0)	Vars opgemaak en op ys hanteer.		Melford, Ipswich, VK
Adenosientrifosfaat (ATP)	5 mM	-20°C	500 µl hoeveelhede is gealikhout en gestoor vir drie maande. Slegs eenmaal ontvries en gebruik.	Sigma, Saint Louis, VSA
Koënsiem A (KoA)	2.5 mM	-20°C	500 µl hoeveelhede is gealikhout en gestoor vir drie maande. Slegs eenmaal ontvries en gebruik.	Sigma, Saint Louis, VSA
Magnesium chloried (MgCl ₂)	50 mM	Kamer temperatuur.		Sigma, Saint Louis, VSA
Natriumoleaat	2.5 mM	Vars opgemaak en by kamertemperatuur hanteer.	By 37°C en 225 rpm opgelos.	Sigma, Saint Louis, VSA

Reagens	Konsentrasie	Stoor temperatuur	Nota	Verskaffer
Kaliumchloried (KCl)	100 mM	Vars opgemaak en by kamertemperatuur hanteer.		Sigma, Saint Louis, VSA
Fosfo-enolpiruvaat (FEP)	100 mM	Vars opgemaak en op ys hanteer.		Sigma, Darmstadt, Duitsland
β -NADH	3.5 mM	Vars met yskoue water opgemaak en op ys hanteer.	β -NADH is fotosensitief en is altyd toegedraai met foelie.	Roche, Indianapolis, VSA

0.147 M kaliumfosfaat (Sigma, Saint Louis, VSA) voorraadoplossing is voorberei. Myokinase ensiembuffer (0.05 M kalium fosfaat, 50% gliserol, pH 7.0) en asiel-KoA-sintetase ensiembuffer (0.01 M kalium fosfaat, 50% gliserol, 5 mM 2-mercaptoethanol, pH 8.0) is voorberei. Myokinase wat geïsoleer is uit gis (Merck, Billerica, VSA), is met die myokinase ensiembuffer opgemaak na 0.3 eenhede/ μ l en by -20°C gestoor. Asiel-KoA-sintetase van *Pseudomonas* sp. (Sigma, Saint Louis, VSA) (die positiewe kontrole) is opgemaak met asiel-KoA-sintetase ensiem buffer na 2 millieenhede/ μ l en by -20°C gestoor. Piruvaatkinase uit konynspiere (Sigma, Saint Louis, VSA) is aangekoop by 'n konsentrasie van 4.45 eenhede/ μ l en L-laktaat dehidrogenase uit konyn spiere (Roche, Mannheim, Duitsland) by 'n konsentrasie van 2.75 eenhede/ μ l en by 4°C gestoor. Nota – moet glad nie enige ensieme na die verval datum gebruik nie.

3.2.2 Bewys van ensiemtoets konsep op Libra S12 spektrofotometer

3.2.2.1 Bevestig β -NADH absorpsie golflengte

β -NADH se absorpsie golflengte is bevestig op die Libra S12-spektrofotometer (Biochrom, Cambridge, Engeland). 900 μ l H_2O en 100 μ l β -NADH voorraad is by 'n 2 ml kuwet wat UV spektrum geskik is (Lasec, Kaapstad, RSA) gevoeg en gemeng deur omkering. 1 ml H_2O is gebruik as blanko, en golflengte skandering van elke golflengte tussen 200 nm – 400 nm is uitgevoer.

3.2.2.2 Bevestiging van ensiemtoets

Gibson *et al.* (1990) se metode is gevolg. 100 μ l van elke voorraadoplossing (Tris-HCL buffer, ATP, KoA, MgCl_2 , natrium bensoaat, KCl, FEP en β -NADH) is by 'n kuwet gevoeg. Twee eenhede van elke koppelingsensiem (myokinase, piruvaatkinase en laktaat-dehidrogenase) is by die voorraadoplossings gevoeg en die volume is opgemaak na 1000 μ l met H_2O (vir die kontrole) en

na 999.5 μl vir die toets. Die kuvette is gekalibreer by 25°C . Die spektrofotometer is ingestel met die blanko. Een milli-eenheid asiel-KoA-sintetase is bygevoeg ($0.5 \mu\text{l}$) by die toets kuvet en gemeng met omkering. Die afname in absorbansie by 340 nm is vir 5 minute gevolg met lesings elke sekonde. Die ensiemtoets is herhaal met 10 milli-eenhede asiel-KoA-sintetase.

3.2.2.3 Ondersoek agtergrond van ensiemtoets

Die ensiemtoets is uitgevoer soos in afdeling 3.2.2.2, en daarna is 'n golflengte skandering uitgevoer vanaf 200 nm na 400 nm . 'n Golflengte skandering tussen 200 nm en 500 nm is ook uitgevoer op die ensiemtoets sonder die $\beta\text{-NADH}$ om die invloed van agtergrond geraas waar te neem.

3.2.3 Afskaal van ensiemtoets

Die Gibson *et al.* (1990) ensiemtoets is uitgevoer soos in afdeling 3.2.2.2, maar is afgeskaal en geoptimaliseer vir gebruik op die Synergy HT plaatleser (Biotek, Winooski, VSA) in Costar UV 96 put plate (Corning, New York, VSA) en is met die Gen 5 sagteware weergawe 1.11.5 (Biotek, Winooski, VSA) verwerk.

3.2.3.1 Identifisering van $\beta\text{-NADH}$ se optimale golflengte van absorbansie

Wanneer die Beer-Lambert-wet op die afname van $\beta\text{-NADH}$ toe toegepas word, moet die optimale golflengte waar die $\beta\text{-NADH}$ die meeste absorbansie toon geïdentifiseer word. Drie verskillende konsentrasies van $\beta\text{-NADH}$, naamlik $173.26 \mu\text{M}$, $346.53 \mu\text{M}$ en $519.80 \mu\text{M}$ is in 'n 96-put plaat opgemaak tot 'n volume van $202 \mu\text{l}$ met water. 'n Golflengte skandering tussen 300 nm en 400 nm is uitgevoer op elke oplossing. Die golflengte met die hoogste absorbansie by elke oplossing is deur die Gen 5 sagteware geïdentifiseer.

3.2.3.2 Molêre absorpsie koëffisiënt bepaling van $\beta\text{-NADH}$ op plaatleser

Om die Beer-Lambert-wet verder op hierdie ensiemtoets toe te pas moes die molêre absorpsie koëffisiënt van die $\beta\text{-NADH}$ in ons spesifieke omstandighede met ons instrumente en volumes bepaal word.

'n Hoër konsentrasie oplossing van $\beta\text{-NADH}$, 35 mM , is voorberei en verdun na 3.5 mM om 'n akkurate konsentrasie te verkry. 'n Konsentrasie gradiënt van $\beta\text{-NADH}$ is voorberei met die 3.5 mM oplossing in 'n 96-put plaat soos in Tabel 3-2. Elke put se finale volume is opgevul met water na $202 \mu\text{l}$. Die absorbansie is by 337 nm gemeet. Hierdie gradiënt is in triplikaat uitgevoer en is twee keer herhaal. Elke herhaling se triplikate is bestudeer en uitskieters is verwyder.

Tabel 3-2: β -NADH konsentrasie gradiënt vir bepaling van molêre absorpsie koëffisiënt.

Put getal	Konsentrasie β -NADH (μ M)
1	0
2	69,306
3	138,613
4	207,920
5	277,227
6	346,534
7	415,841
8	485,148
9	554,455
10	623,762
11	693,069
12	762,376

Lineêre regressie is uitgevoer op elkeen van die stelle data individueel en gesamentlik met behulp van GraphPad Prism weergawe 7.03 vir Windows (GraphPad Software, La Jolla, VSA).

Die molêre absorpsie koëffisiënt is met die Beer-Lambert-wet bepaal.

Vergelyking 1: Die Beer-Lambert-wet

$$A = \epsilon l$$

- A = Absorbansie
- ϵ = Molêre absorpsie koëffisiënt
- l = padlengte van die kuvette
- c = konsentrasie

Omdat die padlengte en molêre absorpsie koëffisiënt onbekend is, word die formule herrangskik na Vergelyking 2.

Vergelyking 2: Herrangskikte Beer-Lambert-wet

$$\frac{A}{c} = \epsilon l$$

As die absorbansie teenoor die konsentrasie gestip word en 'n lineêre regressielyn geskets word, sal die helling van daardie lyn gelyk wees aan ϵl . Hierdie gesamentlike padlengte en molêre absorpsiekoëffisiëntwaarde kan dan gebruik word om die konsentrasie van absorbansielesings te bepaal in die ensiemtoets.

3.2.3.3 Ensiemtoets uitvoering op plaatleser

Vorraadoplossings is opgemaak soos in afdeling 3.2.1. behalwe dat die koppelingsensieme verdun is met Tris-HCL-buffer na 0.404 eenhede/ μ l en dat die asiel-KoA-sintetase verdun is met die asiel-KoA-sintetase buffer na 2.02 millieenhede/ μ l. Die verdunde ensieme – ATP, KoA, β -NADH en FEP – is op ys gehou. Die Tris-HCL-buffer, $MgCl_2$, natriumoleaat en KCl is by kamertemperatuur gelaat en die reaksie is saamgestel by kamertemperatuur in 'n 96-put plaat.

'n Meestermengsel is voorberei op ys wat per reaksie bestaan het uit 20 μ l van elke voorraadoplossing en 0.404 eenhede van elke koppelingsensiem en water om die reaksie op te vul tot 198 μ l. 'n Multikanaal-mikroliterpipet is gebruik om in drie putte 4 μ l (8.08 millieenhede) asiel-KoA-sintetase en in 'n vierde put 4 μ l asiel-KoA-sintetase buffer (wat as negatiewe kontrole gebruik is) gelyk by te voeg. 198 μ l van die meestermengsel is in al vier putte gelyk gevoeg deur 'n multikanaal-mikroliterpipet. Die groter volume is tweede bygevoeg juis met die doel om die reaksie te meng.

Die ensiemtoets is uitgevoer in triplikaat saam met 'n kontrole en is drie keer herhaal.

Die metode wat op die Gen 5 sagteware opgestel was, is soos volg:

- Plaat uit, in (Teks: Sit plaat in)
- Temperatuur: Stelpunt by 25°C
- Skud: Vinnig vir 20 sekondes
- Begin kinetiese lesing [Hardloop vir 20 minute, interval van lesing elke 10 sekondes]. Lees absorbansie by 337 nm.

- Eindig kinetiese lesing

3.2.4 Statistiese verwerking van ensiemtoets data

Stuksgewyse lineêre minste-vierkante regressie (“piecewise linear least squares regression”) met ’n enkele infleksiepunt is gebruik om statisties te bepaal waar die knakpunt in die ensiemtoets data is. Die regressie is geprogrammeer en uitgevoer in “MATLAB and Statistics Toolbox” sagteware uitgawe 2016b (MathWorks, Natick, US). Elke triplikaat van die ensiemtoetse se knakpunt is bereken en die gemiddelde knakpunt vir elke ensiemtoets is bepaal.

Om ’n aanduiding te kry van die ensiemtoets se presisie en herhaalbaarheid is die variasiekoëffisiënt tussen die drie triplikate van elke ensiemtoets en die gemiddelde variasiekoëffisiënt tussen al drie ensiemtoetse soos volg bepaal:

Lineêre regressie van al drie triplikate van elke ensiemtoets, as ook die gemiddelde lineêre regressie lyn van al drie ensiemtoetse is afsonderlik met GraphPad bepaal. Die hellings van die lineêre regressie lyne is gebruik om die standaardafwyking (Vergelyking 3) en variasiekoëffisiënt (Vergelyking 4) te bereken.

Vergelyking 3: Standaardafwyking vir ’n monster

$$SD_{monster} = \frac{\sqrt{\sum |x - \bar{x}|^2}}{n - 1}$$

$SD_{monster}$ = Standaardafwyking

x = enkele monster

\bar{x} = gemiddeld van monsters

n = aantal monsters

Vergelyking 4: Variasiekoëffisiënt

$$Variasiekoëffisiënt = \left(\frac{\text{Standaardafwyking}}{\text{gemiddeld}} \right) \times 100$$

3.2.5 Berekening van positiewe kontrole se aktiwiteit

Die teoretiese aktiwiteit van een eenheid van die positiewe kontrole asiel-KoA-sintetase is $1 \mu\text{mol}\cdot\text{minuut}^{-1}$ by pH 8.1 en 25°C .

Die aktiwiteit van die positiewe kontrole is bereken met al drie ensiemtoetse se data en die resultate is vergelyk om 'n aanduiding van die ensiemtoets se herhaalbaarheid te verkry. Ensiemtoets een is gebruik as voorbeeld vir alle berekenings:

Die triplikate en die kontrole van die ensiemtoets se gemiddelde lineêre regressielyne is bepaal met GraphPad. Die verandering in absorbansie is gebruik om die verandering in konsentrasie van $\beta\text{-NADH}$ te bepaal. Vergelyking 2 is aangepas om te kompenseer vir die kontrole se verandering.

$$\frac{A}{c} = \epsilon l \quad \text{word dus} \quad \frac{\Delta A}{c} = \epsilon l$$

ΔA word (toetshelling – kontrolehelling) en die formule is herrangskik om Vergelyking 5 te verkry.

Vergelyking 5: Aktiwiteits bepaling

$$\frac{(\text{Toetshelling} - \text{kontrolehelling})}{\epsilon l} = c$$

Die konsentrasie wat verkry word in hierdie vergelyking se eenheid is $\text{M}\cdot\text{minuut}^{-1}$. $\text{Mol}\cdot\text{minuut}^{-1}$ is bereken deur gebruik te maak van Vergelyking 6.

Vergelyking 6: Molbepaling

$$C = \frac{n}{v}$$

$v = 0.000202 \text{ L}$ (Die volume in die 96 put plaat)

Figuur 3-3 se stoïgiometrie toon dat 2 mol $\beta\text{-NADH}$ afgebreek word vir elke 1 mol vetsuur-KoA wat gevorm word. Die aantal $\text{mol}\cdot\text{minuut}^{-1}$ $\beta\text{-NADH}$ is dus omgeskakel na die aantal $\text{mol}\cdot\text{minuut}^{-1}$ oleaat-KoA deur met twee te deel. Hierdie waarde dui die aktiwiteit van die hoeveelheid eenhede van die asiel-KoA-sintetase aan wat by die reaksie gevoeg is. Dit wil sê die aktiwiteit van 0.00808 eenhede. Om uit te vind wat die aktiwiteit van 1 eenheid sal wees, is die faktor van vermenigvuldiging bereken soos in Vergelyking 7.

Vergelyking 7: Berekening van faktor van vermenigvuldiging

$$\text{faktor van vermenigvuldiging} = \frac{1 \text{ eenheid}}{0.00808 \text{ eenhede}}$$

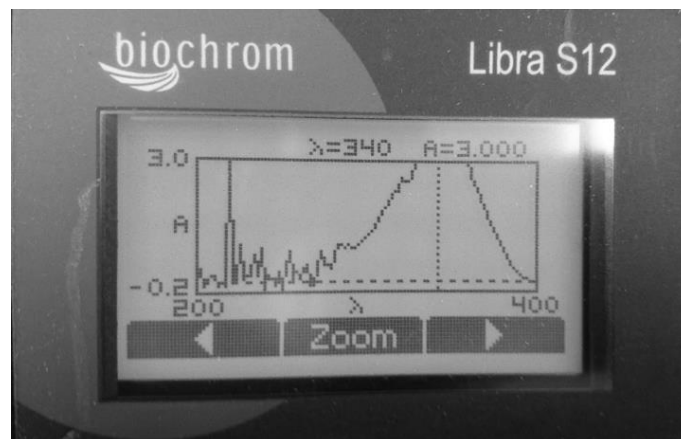
Hierdie berekende faktor is vervolgens vermenigvuldig met die berekende aktiwiteit om die aktiwiteit van 1 eenheid weer te gee. Die waardes is met mekaar vergelyk om aan te dui of die ensiemtoets akkuraat herhaalbaar is.

3.3 Resultate en bespreking

3.3.1 Bewys van ensiemtoets konsep op Libra S12 spektrofotometer

Die grootskaalse uitvoering van die ensiemtoets soos voorgeskryf in Gibson *et al.* (1990) in 'n spektrofotometer is gedoen om rofweg te bevestig of die konsep van die ensiemgekoppelde ensiemtoets sal werk. Om hierdie doel te bereik is eers bevestig of die β -NADH absorpsie toon by 340 nm, daarom is 'n golflengte skandering van die β -NADH uitgevoer (Figuur 3-4).

3.3.1.1 Bevestiging van β -NADH absorpsiegolflengte

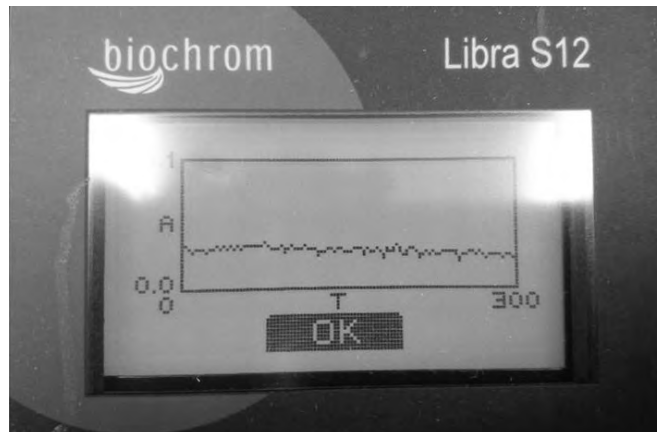


Figuur 3-4: Grafiek van die golflengteskandering van β -NADH op Libra spektrofotometer. Op die x-as is die golflengtes van 200 nm tot 400 nm en op die y-as is die absorpsie.

Die golflengteskandering van β -NADH in Figuur 3-4 toon dat die β -NADH optimaal by 340 nm lig absorbeer en goed geskei word van agtergrondgeraas. Die absorpsie is bo die spektrofotometer se limiet van bepaling, maar wanneer die β -NADH as kontrole gebruik word in die ensiemtoets sal die verskil in β -NADH absorpsie wel bepaal kan word.

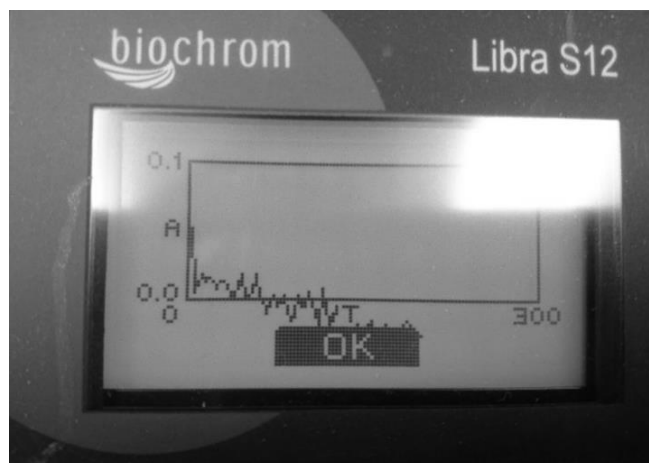
3.3.1.2 Bevestiging van ensiemtoets

Die metode van Gibson *et al.* (1990) skryf voor dat tussen 1 en 10 millieenhede van 'n asiel-KoA-sintetase gebruik word om die ensiem effektief te toets. Die ensiemtoets is uitgevoer met 1 en 10 millieenhede met die doel om te sien of 'n verskil in die tempo van afname in absorpsie by 340 nm waargeneem kan word en om te bewys dat die ensiemtoets in beginsel werk.



Figuur 3-5: Grafiek van die ensiemtoets reaksie verloop op die Libra spektrometer met 1 milli-eenheid asiel-KoA-sintetase. Die x-as dui die tydsverloop in sekondes aan en die y-as die absorpsie by 340 nm.

Die stadige afname in absorpsie by 340 nm in Figuur 3-5 toon dat die ensiemreaksie wel plaasvind.

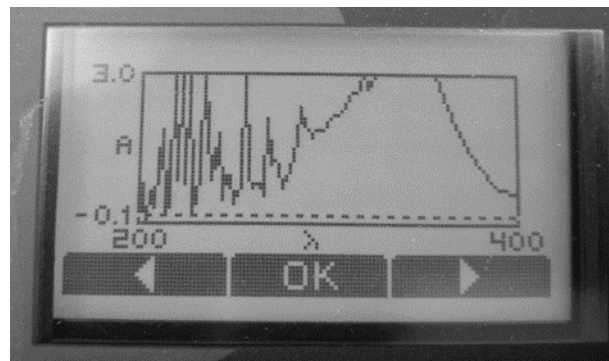


Figuur 3-6: Grafiek van die ensiemtoets reaksie verloop op die Libra spektrometer met 10 milli-eenhede asiel-KoA-sintetase. Die x-as dui die tydsverloop in sekondes aan en die y-as die absorpsie by 340 nm.

Die byvoeging van 10 milli-eenhede asiel-KoA-sintetase het die tempo van afname by 340 nm in Figuur 3-6 drasties verhoog en dit bevestig dat 'n vermeerdering in ensiem die reaksie tempo sal versnel.

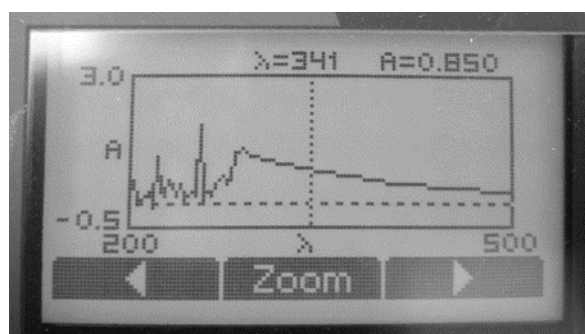
3.3.1.3 Ondersoek agtergrond van ensiemtoets

Om te bevestig dat die β -NADH se absorpsiepiek by 340 nm genoegsaam van die agtergrond geskei kon word, is 'n golflengte skandering van die volledige reaksiemengsel uitgevoer teenoor die hele reaksie mengsel sonder die β -NADH. Die verskil in hierdie spektrums dui aan of daar enige sterk agtergrond piek is wat die ensiemtoets kan belemmer.



Figuur 3-7: Grafiek van die golflengte skandering van die volledige ensiemtoets (met β -NADH) op Libra spektrometer. Op die x-as is die golflengtes van 200 nm tot 400 nm en op die y-as is die absorpsie.

Figuur 3-7 toon die agtergrond wat voor 300 nm voorkom. Dit toon ook die β -NADH piek by 340 nm. Die β -NADH piek is genoegsaam van die agtergrond geskei.



Figuur 3-8: Grafiek van die golflengte skandering van die ensiemtoets sonder β -NADH op Libra spektrometer. Op die x-as is die golflengtes van 200 nm tot 500 nm en op die y-as is die absorpsie.

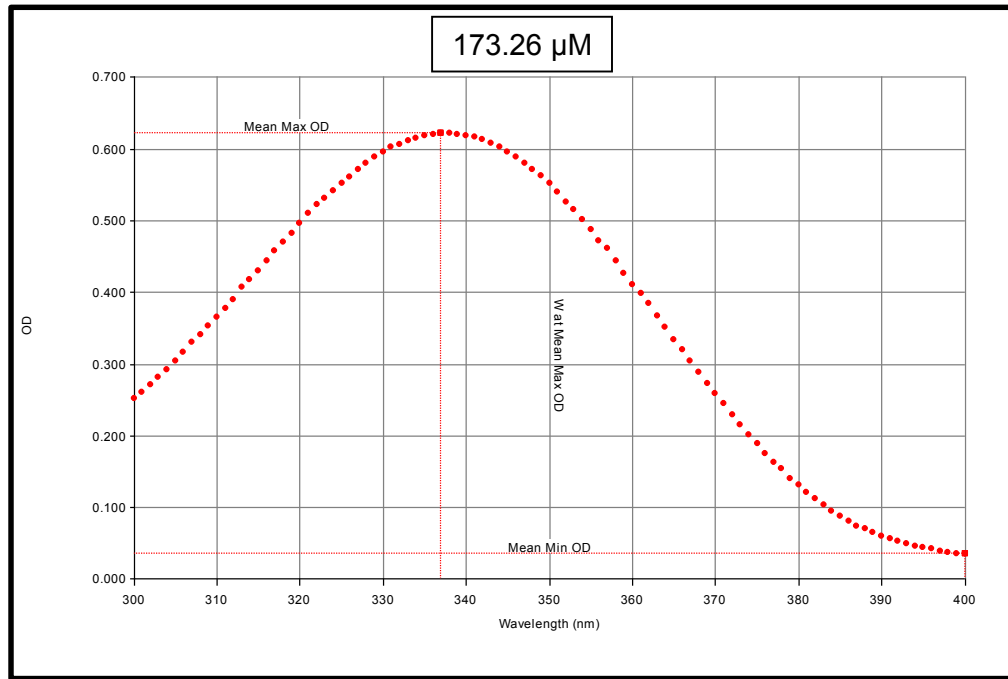
Figuur 3-8 toon dat daar 'n skouer van 'n absorpsiepiek is wat by 340 nm absorbeer, maar dat hierdie absorpsiepiek nie 'n skerp en hoë piek is nie. Die verskil in β -NADH absorpsie wat gemeet gaan word sal dus steeds akkuraat genoeg wees.

3.3.2 Afskaal van ensiemtoets

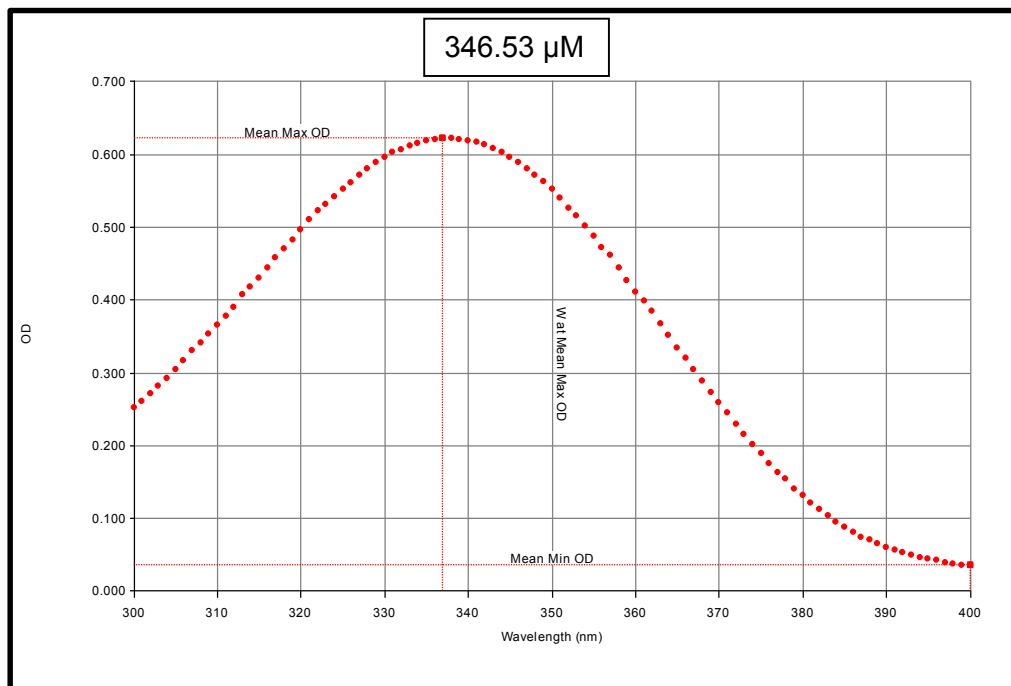
Om navorsers in staat te stel om akkurate ensiemaktiwiteit karakterisering te doen is die ensiemtoets afgeskaal vir gebruik op 'n plaatleser. 'n Plaatleser gee meer akkurate lesings as 'n standaard spektrofotometer en kan menigte reaksies gelyktydig meet. Hierdie voordele maak die karakterisering van ensieme moontlik.

3.3.2.1 Identifisering van β -NADH se optimale golflengte van absorpsie op die plaatleser vir gebruik in molêre absorpsiekoëffisiënt bepaling.

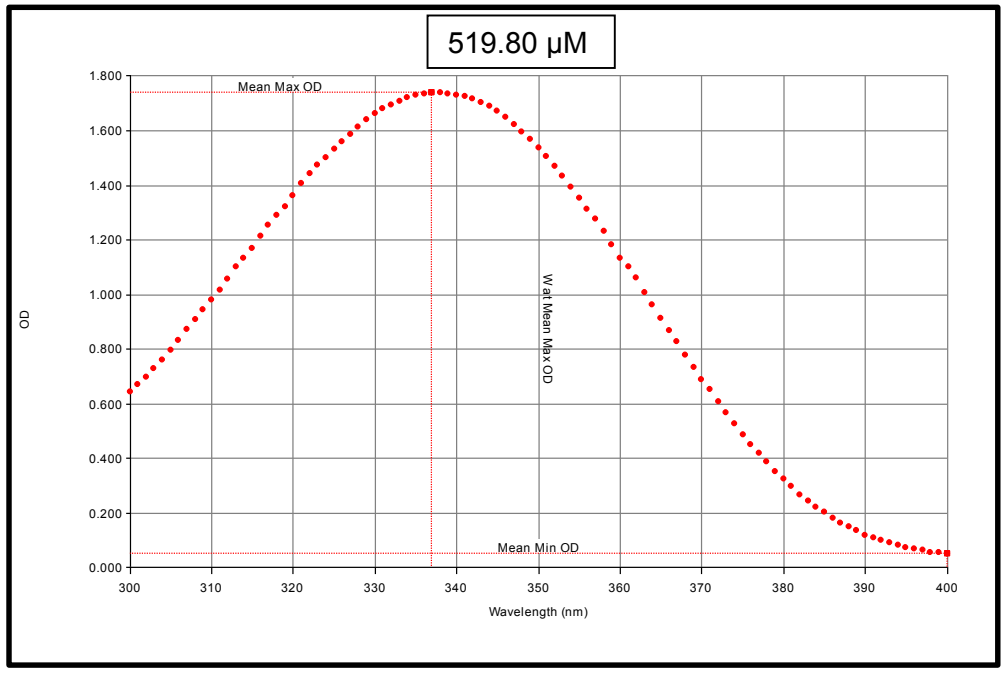
Die molêre absorpsiekoëffisiënt is afhanklik van die golflengte van die lig wat gebruik word om die β -NADH mee te meet en is die akkuraatste waar die absorpsie die hoogste is (Singh *et al.*, 2002). Die golflengte waar β -NADH die meeste absorpsie toon moet dus geïdentifiseer word om die Beer-Lambert-wet op hierdie ensiemtoets te kan toepas. Die plaatleser gee baie meer akkurate lesings as die spektrofotometer en as gevolg van instrumentele verskille moet daar weer bevestig word of 340 nm die optimale absorpsie golflengte van die β -NADH op hierdie plaatleser is. 'n Konsentrasiereeks is opgestel en 'n golflengte skandering van elke konsentrasie is uitgevoer om te bevestig wat die optimale golflengte van absorpsie is. Die golflengte skanderings word uitgebeeld in Figuur 3-9, Figuur 3-10 en Figuur 3-11. Die konsentrasie β -NADH wat in die ensiemtoets gebruik gaan word, is 346.53 μ M.



Figuur 3-9: **Plaatleser golflengte skandering grafiek van 173.26 µM β-NADH in 'n 96-put plaat. Op die x-as is die golflengtes en op die y-as is die absorpsie. Die vertikale stippellyn by 337 nm dui die maksimale absorpsie aan.**



Figuur 3-10: **Plaatleser golflengte skandering grafiek van 346.53 µM β-NADH in 'n 96-put plaat. Op die x-as is die golflengtes en op die y-as is die absorpsie. Die vertikale stippellyn by 337 nm dui die maksimale absorpsie aan.**



Figuur 3-11: Plaatleser golflengte skandering grafiek van 519.80 µM β-NADH in ’n 96-put plaat. Op die x-as is die golflengtes en op die y-as is die absorpsie. Die vertikale stippellyn by 337 nm dui die maksimale absorpsie aan.

Figuur 3-9, Figuur 3-10 en Figuur 3-11 dui die profiel van absorpsie van die β-NADH konsentrasiereeks aan. Die Gen 5 sagteware het die golflengtes waar die maksimale absorpsie is bepaal vanaf hierdie spektra en dit word in Tabel 3-3 weergegee.

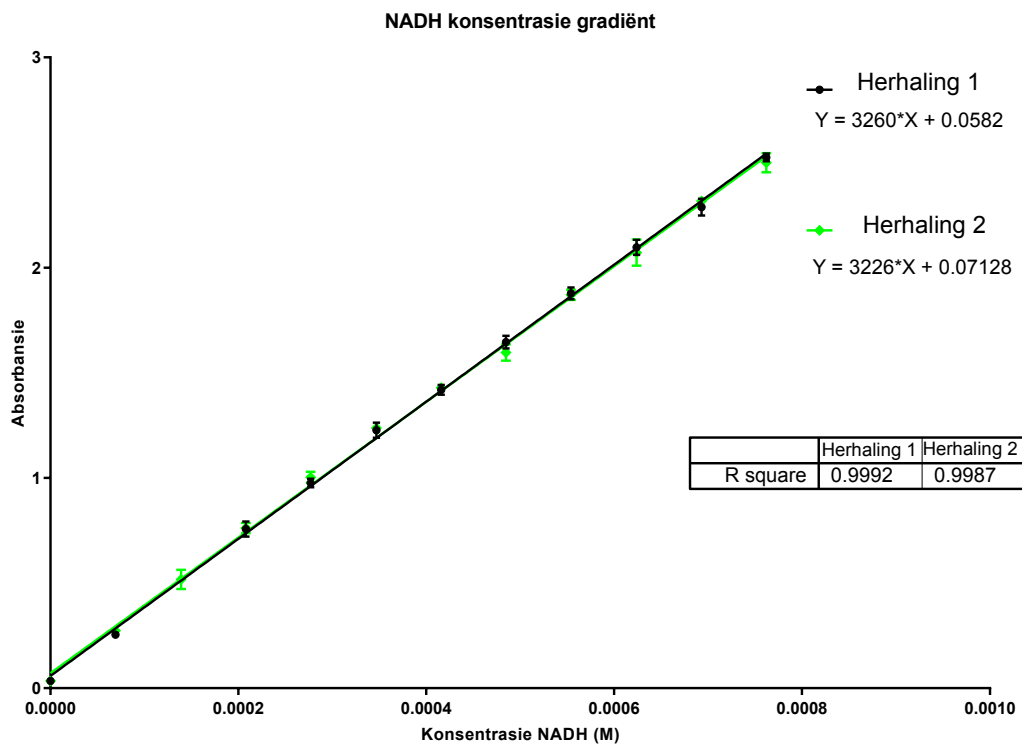
Tabel 3-3: Die maksimum absorpsie en die golflengte van maksimum absorpsie van die β-NADH konsentrasiereeks op die plaatleser

Konsentrasie β-NADH (µM)	Maksimum absorpsie	Golflengte by maksimum absorpsie (nm)
173.26	0.622	337
346.53	1.152	337
519.80	1.739	337

Die optimale golflengte van absorpsie vir β-NADH oor al drie punte van die konsentrasiereeks wat opgestel is, is 337 nm. Hierdie golflengte verskil van die 340 nm norm, maar word toegeskryf aan unieke toestande van die spesifieke plaatleser wat gebruik word (Kiiianitsa *et al.*, 2003). 337 nm is verder gebruik as die golflengte van maksimale absorpsie vir die optimalisering van die ensiemtoets op hierdie plaatleser.

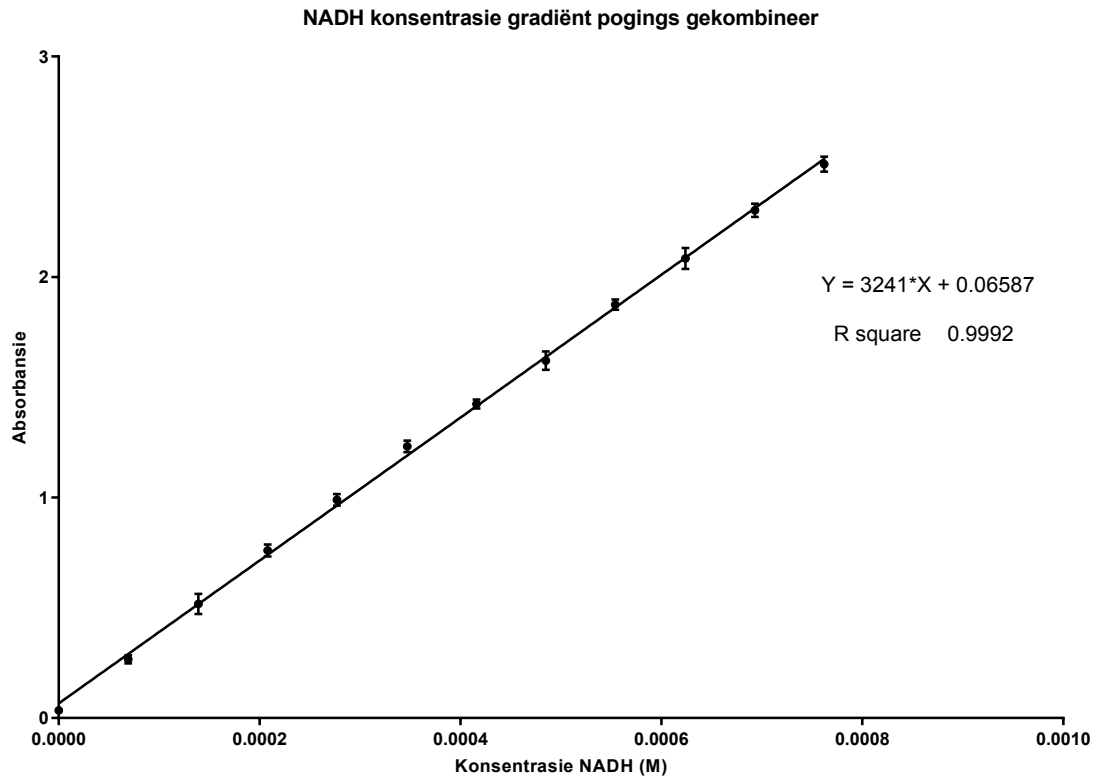
3.3.2.2 Molêre absorpsiekoëffisiëntbepaling van β -NADH op die plaatleser

Om die Beer-Lambert-wet verder akkuraat toe te pas op hierdie ensiemtoets is dit noodsaaklik dat die molêre absorpsiekoëffisiënt van β -NADH vir die unieke padlengte, volume van die reaksie (202 μ L) en plaatleser geïdentifiseer word. In Figuur 3-12 is die data van twee herhalings van 'n konsentrasiereeks van β -NADH. Die grafieke toon β -NADH konsentrasie gestip teenoor die absorpsie (by 337 nm) van elke konsentrasie β -NADH.



Figuur 3-12: Grafiek van die lineêre regressie van beide konsentrasiegradiënt herhalings van die β -NADH teenoor die konsentrasies se absorpsie.

In Figuur 3-12 is beide herhalings van die β -NADH konsentrasiegradiënt gestip met hulle fout grense en twee individuele lineêre regressielyne. Hierdie twee stelle data se foutgrense is baie klein en dit het baie goeie R^2 waardes wat aandui dat die regressielyne die data baie goed pas. Die twee stelle is so eenders dat die herhalings gekombineer is om 'n meer akkurate gemiddelde lineêre regressielyn te verkry in Figuur 3-13.

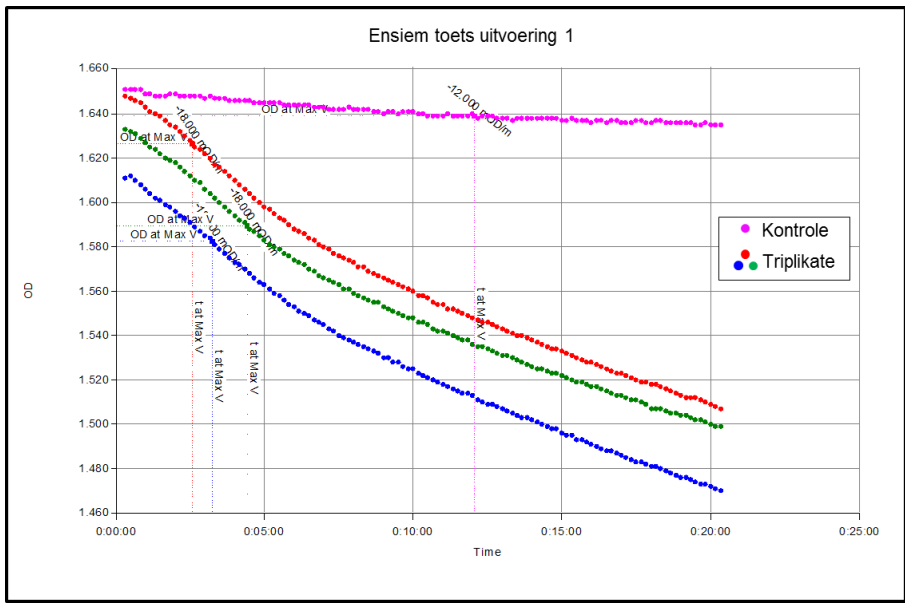


Figuur 3-13: Lineêre regressie van die twee β -NADH konsentrasie gradiënt herhalings gekombineer.

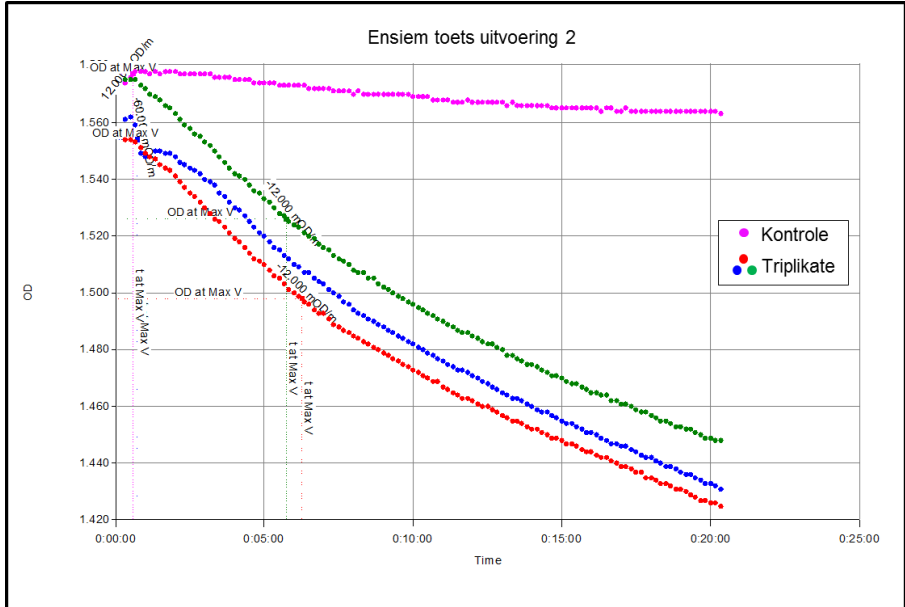
In Figuur 3-13 is die gekombineerde data stel met sy lineêre regressielyn, vergelyking en R^2 waardes. In die gekombineerde stel data is die foutgrense steeds baie klein en die regressielyn pas die data baie goed soos aangedui deur die goeie R^2 waarde (0.9992). Dit dui daarop dat die verdunnings van die konsentrasies akkuraat voorberei is. In die regressielyn se vergelyking stel die helling, $3241 \text{ OD}\cdot\text{M}^{-1}$, die gesamentlike molêre absorpsiekoëffisiënt/padlengte waarde voor. Hierdie waarde is baie goed vergelykbaar met soortgelyke molêre absorpsie koëffisiënt waardes wat in die literatuur bepaal is. Byvoorbeeld is die molêre absorpsiekoëffisiënt waarde wat Kiiantsa *et al.* (2003) vir 'n volume van $200 \mu\text{L}$ verkry het $3247.9 \text{ OD}\cdot\text{M}^{-1}$. $3241 \text{ OD}\cdot\text{M}^{-1}$ is dus die waarde wat as die molêre absorpsiekoëffisiënt/padlengte waarde vir die ensiemtoets gebruik is.

3.3.2.3 Ensiemtoets uitvoering op plaatleser

Die ensiemtoets is drie maal uitgevoer om te toets of die afskaal van die ensiemtoets werk en om te bepaal of die ensiemtoets gebruik kan word om die aktiwiteit van asiel-KoA-sintetase te meet. Die drie herhalings van die ensiemtoets word aangedui in Figuur 3-14, Figuur 3-15 en Figuur 3-16.

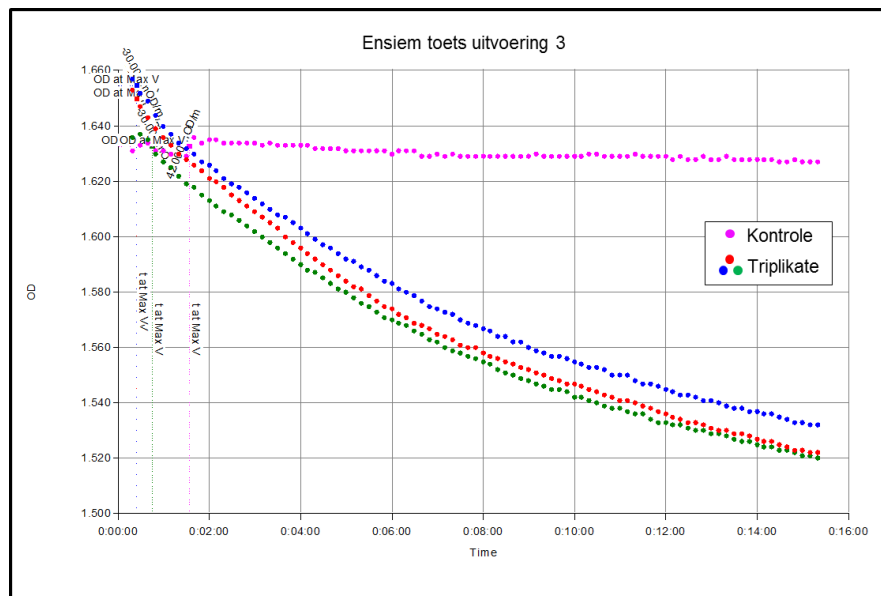


Figuur 3-14: Ensiemtoets uitvoering 1. Op x-as is die tydsverloop in minute. Op die y-as is die optiese digtheid (OD). Die kontrole se stadige afname in OD dui die natuurlike degradasie van β -NADH met tyd aan. Die drie triplikate se eenderse afwaartse kurwes dui die som van die natuurlike degradasie en die aktiwiteit van die ensiemtoets aan waar β -NADH aktief deur laktaat-dehidrogenase geoksideer word na β -NAD⁺.



Figuur 3-15: Ensiemtoets uitvoering 2. Op x-as is die tydsverloop in minute. Op die y-as is die optiese digtheid (OD). Die kontrole se stadige afname in OD dui die natuurlike degradasie van β -NADH met tyd aan. Die drie triplikate se

eenderse afwaartse kurwes dui die som van die natuurlike degradasie en die aktiwiteit van die ensiemtoets aan waar β -NADH aktief deur laktaat-dehidrogenase geoksideer word na β -NAD⁺.

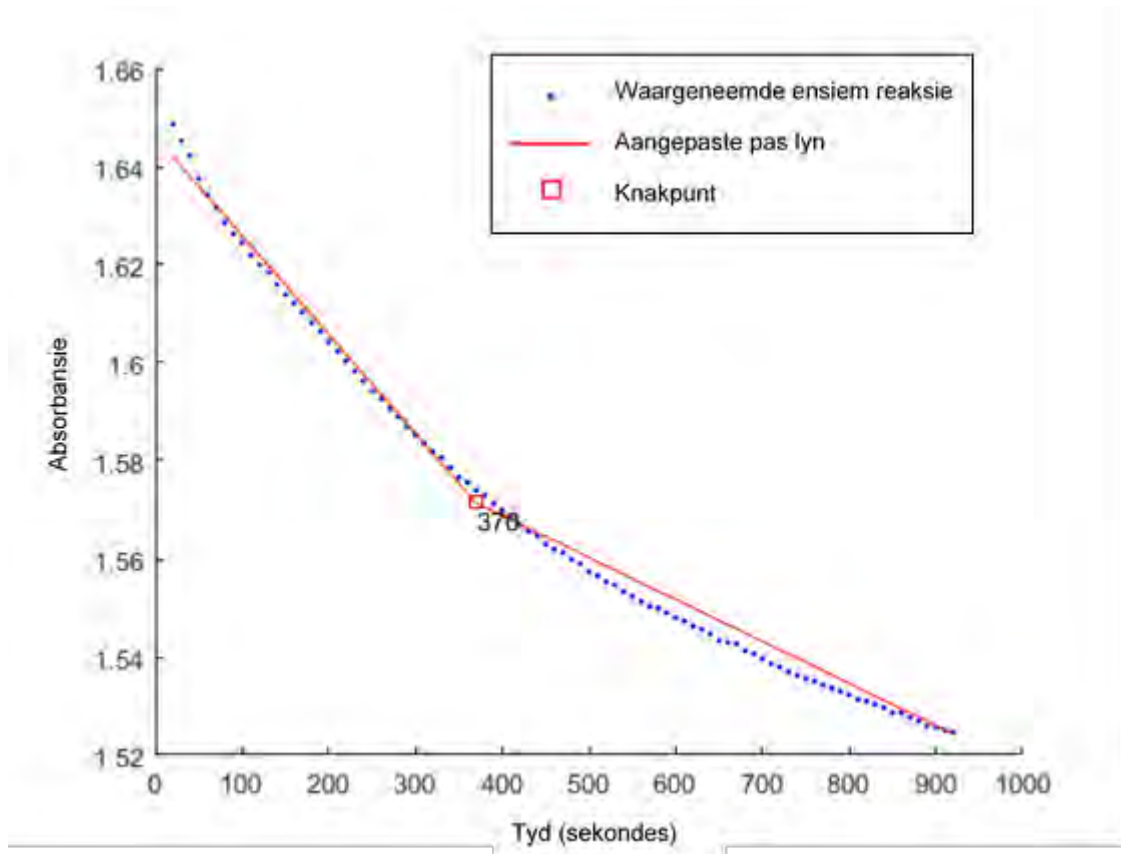


Figuur 3-16: Ensiemtoets uitvoering 3. Op x-as is die tydsverloop in minute. Op die y-as is die optiese digtheid (OD). Die kontrole se stadige afname in OD dui die natuurlike degradasie van β -NADH met tyd aan. Die drie triplikate se eenderse afwaartse kurwes dui die som van die natuurlike degradasie en die aktiwiteit van die ensiemtoets aan waar β -NADH aktief deur laktaat-dehidrogenase geoksideer word na β -NAD⁺.

Al drie herhalings is suksesvol uitgevoer en toon dat die ensiemtoets op die plaatleser suksesvol afgeskaal kon word. Die stadige afname wat in die kontrole se 337 nm absorbansie waargeneem word, is as gevolg van β -NADH se natuurlike afbrekingstempo. Daar sal vir hierdie tempo gekompenseer moet word as die ensiemtoets gebruik word om 'n asiel-KoA-sintetase se aktiwiteit te bepaal soos beskryf word in afdeling 3.2.5. Daar is by die aanvang van die uitvoerings 'n kort sloerfase. Hierdie sloerfase word waargeneem as gevolg van die feit dat dit 'n ensiemgekoppelde reaksie gebruik word wat uit drie verskillende ensieme bestaan. Die ensiemtoets vertoon die sloerfase totdat 'n ewewigstoestand in die vorming en omskakeling van die intermediêre bereik word (Bisswanger, 2014). Hierdie sloerfase word na 110 sekondes (1 min en 50 sekondes) nie meer opgemerk nie. Daar is in al drie uitvoerings 'n opmerkbare knakpunt by ongeveer 360 sekondes (6 minute). Die lineêre gedeelte van die ensiemreaksie geskied dus voor 360 sekondes.

3.3.3 Statistiese verwerking van ensiemtoetsdata

Om akkuraat te bepaal waar die knakpunt in die ensiemtoetse is, is stuksgewyse regressie op elke triplikaat van al drie uitvoerings uitgevoer soos in Figuur 3-17. Hierdie regressie dui aan waar twee hellings die beste die datastel pas. Die punt waar hierdie twee hellings kruis is die knakpunt en dui aan waar die lineêre gedeelte van die ensiemreaksie eindig.



Figuur 3-17: Uitvoering 3 se triplikaat gemiddeld se stuksgewyse regressie. Op die x-as is tydverloop in sekondes. Op die y-as is die absorbansie. Die stippellyn dui die gemiddeld van uitvoering drie se triplikaat kurwes en die soliede lyn dui die aangepaste paslyne aan. Die vierkant dui die snypunt van die aangpasde paslyne aan wat die berekende knakpunt is.

Die stuksgewyse regressie wat toegepas is op uitvoering 3 se triplikaatgemiddeld in Figuur 3-17 toon dat die gemiddelde knakpunt van hierdie uitvoering by 370 sekondes is. Tabel 3-4 toon die res van die knakpuntberekening aan.

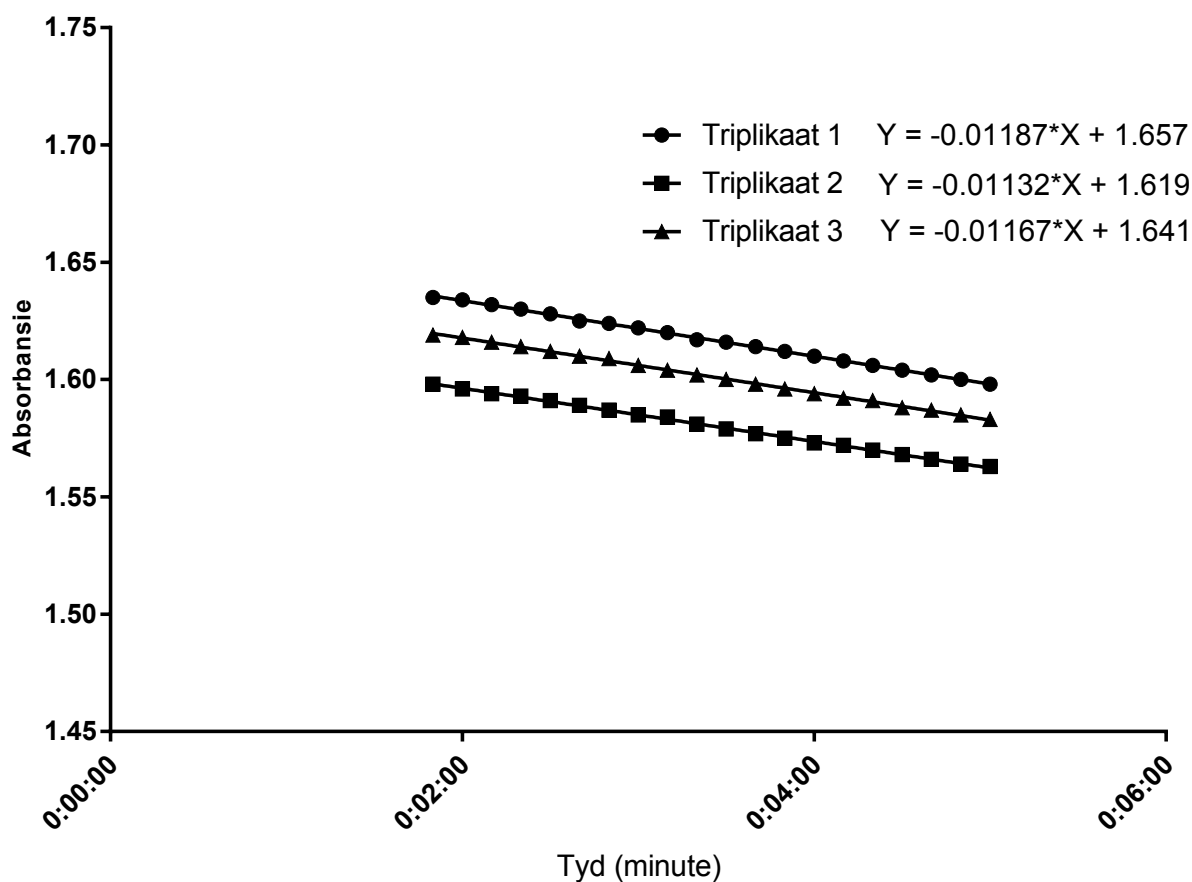
Tabel 3-4: Stuksgewyse regressietriplikaat en gemiddelde knakpuntlesings van 3 ensiemtoetsuitvoerings

Uitvoering	1	2	3
Triplikaat 1 knakpunt (sekondes)	400	420	360
Triplikaat 2 knakpunt (sekondes)	400	490	380
Triplikaat 3 knakpunt (sekondes)	380	430	390
Gemiddelde knakpunt (sekondes)	390	440	370

Die laagste knakpunt wat bereken is, was by 360 sekondes. Om slegs berekeninge in die lineêre gedeelte van die ensiemtoets uit te voer is alle verdere berekeninge slegs uitgevoer tussen 110 en 300 sekondes sodat die sloerfase aan die begin van die reaksie en die beperkende fase na 360 sekondes uitgesluit was.

Om 'n aanduiding te kry van die hoeveelheid variasie wat tussen die triplikate van die onderskeie ensiemtoetse plaasvind, is hulle variasiekoëffisiënte bepaal. Lineêre regressie is toegepas op al die triplikate van die drie ensiemtoetsuitvoerings, met GraphPad soos in Figuur 3-18.

Lineêre regressie van ensiemtoets 1 se triplikate



Figuur 3-18: Lineêre regressie van ensiemtoets 1 se triplikate. Op die x-as is tydsverloop in minute. Op die y-as is die absorbansie. Die drie triplikate se lineêre regressie word elk aangedui saam met hul vergelykings.

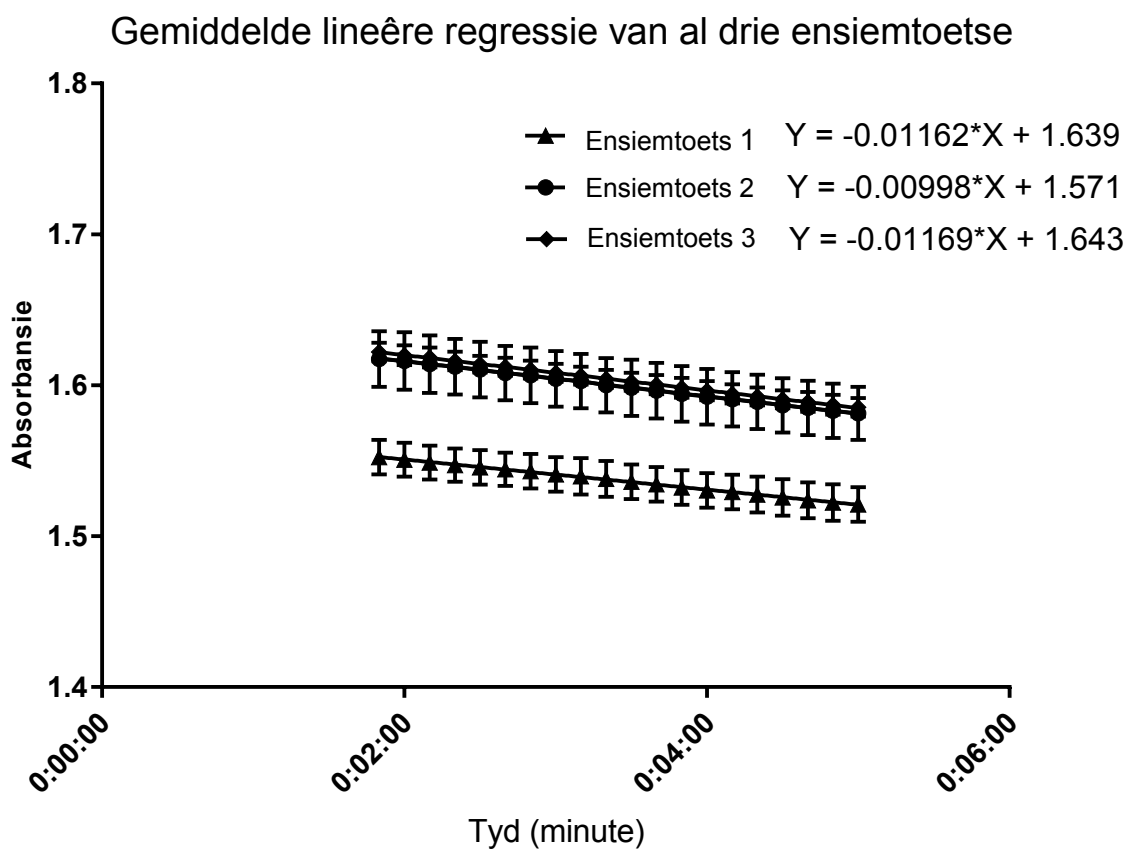
Vergelyking 3 en Vergelyking 4 is gebruik om die standaardafwyking en variasiekoëffisiënt van die triplikate te bepaal en dit word weergegee in Tabel 3-5.

Tabel 3-5: Die berekende standaardafwyking en variasiekoëffisiënt van al drie ensiemtoetse se triplikate

Ensiemtoets	Standaardafwyking	Variasiekoëffisiënt
1	0,000840972	2,39577
2	0,000621998	6,23286
3	0,000278388	7,19189

Die Verenigde Nasies van Amerika se Voedsel en Farmaseutiese administrasie riglyne vir metode validasie (2018) stel dat die presisie wat by elke konsentrasie vlak bepaal word nie 15% van die variasiekoëffisiënt mag oorskry nie. As 'n bepaalde variasiekoëffisiënt dus onder 15% val word dit in die algemeen aanvaar as 'n proses wat akkuraat geskied. Die variasiekoëffisiënt van die triplikate van elke ensiemtoets in Tabel 3-5 is onder 8% en dit gee 'n aanduiding dat die variasie wat in die triplikate waargeneem word baie min is en binne aanvaarbare perke geskied.

Om aan te dui of die ensiemtoets vergelykbaar is tussen verskillende herhalings, is die gemiddelde lineêre regressielyn van elke ensiemtoets bepaal in Figuur 3-19 en is die standaardafwyking en variasiekoëffisiënt tussen die drie ensiemtoetse se hellings bepaal.



Figuur 3-19: Die gemiddelde lineêre regressie lyne van die drie ensiemtoetse. Op die x-as is tydsverloop in minute. Op die y-as is die absorbansie. Die drie ensiemtoets uitvoerings se gemiddelde lineêre regressie lyne word elk aangedui saam met hul vergelykings.

Tabel 3-6: Die standaardafwyking en variasiekoëffisiënt bereken tussen die verskillende uitvoerings

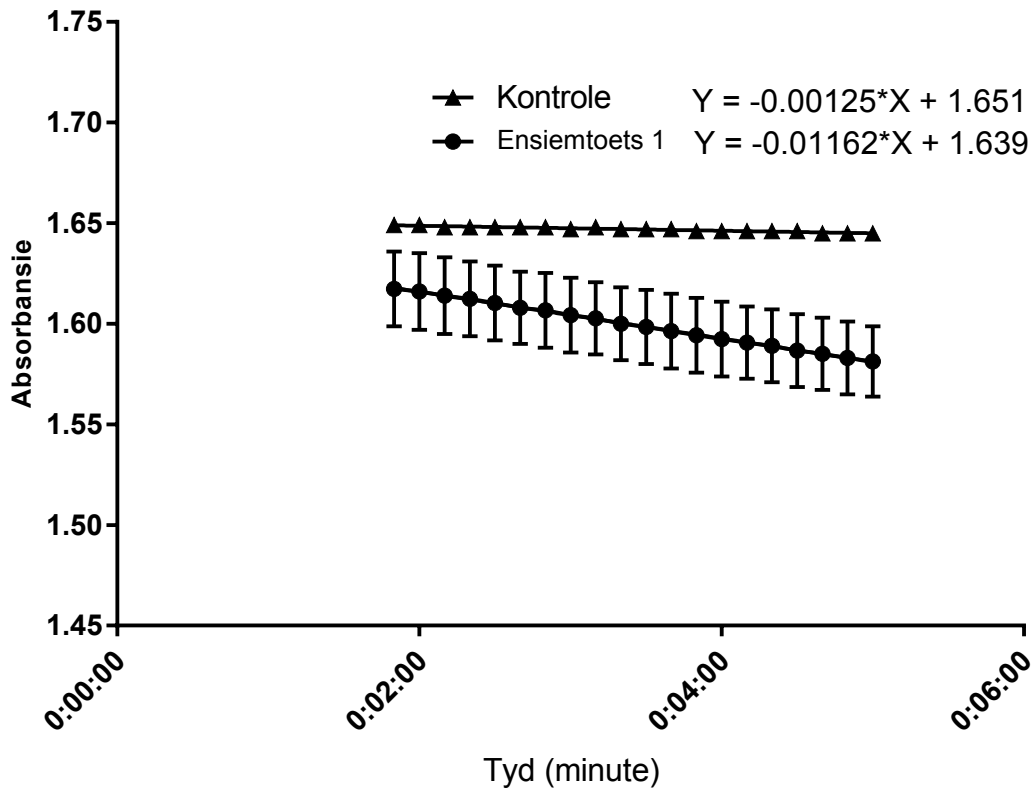
Standaardafwyking	Variasiekoëffisiënt
0,000967695	8,720

Die variasiekoëffisiënt tussen die verskillende uitvoerings is 8.720% en dit gee 'n aanduiding dat die ensiemtoets se variasie tussen verskillende herhalings min is en ook binne aanvaarbare perke geskied aangesien die algemeen aanvaarde maksimum variasiekoëffisiënt 15% is. Die triplikate van elke ensiemtoets is dus presies en die ensiemtoets is ook presies herhaalbaar.

3.3.4 Berekening van positiewe kontrole se aktiwiteit

Om die ensiemtoets te gebruik om die aktiwiteit van die asiel-KoA-sintetase in die drie ensiemtoetse te bepaal, is die verandering in absorpsie verwerk na die aantal mol vetsuur-KoA wat per minuut gevorm word. Ensiemtoets 1 word weergegee as 'n voorbeeld van die verwerkings.

Gemiddelde lineêre regressie van ensiemtoets 1



Figuur 3-20: Gemiddelde lineêre regressie van ensiemtoets 1 en ensiemtoets 1 se kontrole. Op die x-as is tydverloop in minute. Op die y-as is die absorbansie. Ensiemtoets 1 se gemiddelde lineêre regressie lyn en ensiemtoets 1 se kontrole word aangedui saam met hul vergelykings.

Die gemiddelde lineêre regressielyn van uitvoering 1 is bepaal met GraphPad in Figuur 3-20 en is soos volg in die berekening gebruik:

Vergelyking 5:

$$\frac{(Toets helling - kontrole helling)}{\epsilon l} = c$$

Die ensiemtoets volg die afname in β -NADH, maar dit dui die produsering van vetsuur-KoA aan. Daarom word die waardes van die hellings as positief gebruik

$$\frac{(0.01162 \text{ OD. minuut}^{-1} - 0.00125 \text{ OD. minuut}^{-1})}{3241 \text{ OD. M}^{-1}} = c$$

$$c = 0.000003199 \text{ M. minuut}^{-1}$$

Die aantal mol word bereken met Vergelyking 6:

$$C = \frac{n}{v}$$

$$0.000003199 \text{ M. minuut}^{-1} = \frac{n}{0.000202 \text{ L}}$$

$$n_{\beta\text{-NADH}} = 6.46325 \times 10^{-10} \text{ mol. minuut}^{-1}$$

Die aantal mol van die vetsuur-KoA, naamlik oleaat-KoA, word bereken deur die molêre stoïgiometrie van 2 mol β -NADH wat afgebreek is na 1 mol oleaat-KoA te gebruik:

$$n_{\text{oleaat-KoA}} = \frac{6.46325 \times 10^{-10} \text{ mol. minuut}^{-1}}{2}$$

$$n_{\text{oleaat-KoA}} = 3.23162 \times 10^{-10} \text{ mol. minuut}^{-1}$$

$$n_{\text{oleaat-KoA}} = 0.000323162 \text{ } \mu\text{mol. minuut}^{-1}$$

$0.000323162 \text{ } \mu\text{mol. minuut}^{-1}$ by pH 8.0 en 25°C is dus die aktiwiteit van die 8.08 millieenhede van die positiewe kontrole asiel-KoA-sintetase wat in die ensiemreaksie gebruik is.

Om hierdie waarde te verwerk na die aktiwiteit wat 1 eenheid sal hê is Vergelyking 7 gebruik:

$$\text{faktor van vermenigvuldiging} = \frac{1 \text{ eenheid}}{0.00808 \text{ eenhede}}$$

$$\text{faktor van vermenigvuldiging} = 123.7623762$$

$$\text{Berekende aktiwiteit van een eenheid} = 0.000323162 \text{ } \mu\text{mol. minuut}^{-1} \times 123.7623762$$

$$\text{Berekende aktiwiteit van een eenheid} = 0.039995297 \text{ } \mu\text{mol. minuut}^{-1}$$

Die berekende aktiwiteit van een eenheid asiel-KoA-sintetase van al drie ensiemtoetse word weergegee in Tabel 3-7.

Tabel 3-7: Aktiwiteit van een eenheid asiel-KoA-sintetase bereken deur elke ensiemtoets.

Ensiemtoets	Aktiwiteit vir 1 eenheid asiel-KoA-sintetase ($\mu\text{mol}\cdot\text{minuut}^{-1}$)
1	0.039
2	0.033
3	0.041

Die feit dat die drie waardes in Tabel 3-7 so eenders is, is 'n aanduiding dat hierdie ensiemtoets herhaalbaar is onder die omskryfde omstandighede in ons laboratorium.

3.3.5 Bespreking

Die verwagting is dat die berekende aktiwiteit van die werklike asiel-KoA-sintetase sal verskil van die teoretiese waarde. Dit gebeur om verskeie redes:

- Die asiel-KoA-sintetase verloor drasties aktiwiteit hoe langer dit gestoor word en die asiel-KoA-sintetase wat gebruik is in die ensiemtoets was al vir vier dae in oplossing gestoor.
- Die metode wat SIGMA gebruik het om die asiel-KoA-sintetase se teoretiese aktiwiteit te bepaal is onbekend en kan verskil van die metode wat hier gebruik word met betrekking tot pH, kofaktore en konsentrasies.
- Die opmaak en stoor van die verkrygte vastestof asiel-KoA-sintetase lei na hantering variasie en maak gebruik van 'n unieke buffer.

Die doel van die positiewe kontrole in die toepassing van die ensiemtoets is nie om 'n akkurate aktiwiteit vir die positiewe kontrole te bereken nie, maar om as positiewe kontrole te dien tydens die toets van 'n onbekende asiel-KoA-sintetase. Dit word gedoen sodat die positiewe kontrole sal bevestig dat daar nie 'n fout is by die ensiemtoets self indien geen verandering in die toets waargeneem word nie.

Hierdie geformuleerde ensiemtoets moes ontwikkel word om 'n metode te kry wat gebruik kon word om rekombinantgeproduseerde oplosbare asiel-KoA-sintetase mee te toets vir aktiwiteit. Die soort ensiemtoets was onbeskikbaar in ons laboratorium.

Hierdie berekening dui die metode aan wat gebruik sal word as 'n asiel-KoA-sintetase met hierdie ensiemtoets getoets word. Verdere metode validasie sal nog uitgevoer moet word, soos byvoorbeeld om die ensiemtoets op verskillende dae met vars voorbereide reagense uit te voer

om die herhaalbaarheid tussen verskillende toetsdae te bewys, maar die metode slaag in die doelwitte van hierdie navorsingsprojek om aktiwiteit van 'n asiel-KoA-sintetase te toon.

HOOFSTUK 4 Rekombinante uitdrukking van die AKSM2-ensieme

4.1 Inleiding

Hierdie studie se tweede hoof doelstelling is om 'n ekspressiesistiem te formuleer wat oplosbare AKSM2A- en AKSM2B-ensieme kan produseer.

Om hierdie doel te bereik is die literatuur en die ensiem databasis BRENDA (www.brenda-enzymes.org) deursoek vir al die verskillende ekspressiemetodes wat gebruik is om soogdier asiel-KoA-sintetase, van enige kettinglengte spesifisiteit, te produseer. Hierdie metodes is in vier hoof ekspressiegashere uitgevoer, naamlik soogdierselle, *E. coli*, insek selle en gis.

Om die soektog na 'n optimale ekspressiemetode te vereenvoudig is die voordele en nadele van die ekspressiegashere eerstens opgeweeg soos in Tabel 4-1.

Tabel 4-1: Voordele en nadele van *E. coli*, gis, soogdierselle en insekselle as ekspressiegashere.

Ekspressie gasheer	Voordele	Nadele
<i>E. coli</i>	Kort generasietydperk. Eenvoudige kultuuromstandighede. Gemak van groter skaal hantering. Vermoë om 'n hoë konsentrasie vreemde proteïene te hanteer (meer as 20% van totale proteïen inhoud). Lae kostes.	Beperkte natranslasiemodifikasie soos bv. glikosilasie en disulfiedbinding vorming. Onvermoë om sommige soogdier proteïene te produseer. Benodig soms proteïenspesifieke optimalisering.
Gis	Kort generasietydperk. Lae kostes. Meer natranslasiemodifikasie vermoëns as bakterieë. Die vermoë om na 'n groter skaal te neem.	Kort proteïenspesifieke optimalisering. Vereis fermentasie vir hoë proteïenopbrengs. Vereis 'n unieke sel kultuur laboratorium.
Soogdier selle	Natranslasiemodifikasie wat die mees gelyksoortig is aan mensselle.	Veeleisende kultuuromstandighede. Hoë kostes. Laer proteïenopbrengste. Groter skaal is moeisaam en moet in suspensiekulture geskied.

Ekspressie gasheer	Voordele	Nadele
Insek selle	Natranslasiemodifikasie wat meer gelyksoortig is aan mens selle.	Sterk protease aktiwiteit. Veeleisende kultuuromstandighede. Die maak van bakulovirus vektore is tydrowend. Laer proteïenopbrengste.

Aangepas vanaf (Schmidt, 2004; Rosano & Ceccarelli, 2014b)

Die voordele en nadele van die verskeie ekspressiegashere het dit duidelik gemaak dat *E. coli* die ekspressie gasheer is wat die meeste voordele inhou vir gebruik in ons laboratorium. Die gemak waarmee *E. coli* se sel kultuur volumes vermeerder kan word, die kort generasietydperk van *E. coli* en die lae kostes aan die metodes verbonde stel ons in staat om verskillende metodes in 'n kort tydperk te toets en optimalisering uit te voer. Gashere soos soogdier selle en inkselle het baie stadige generasietydperke, veeleisende selkultuuromstandighede en kan slegs in suspensiekulture genoegsame proteïene produseer. Die gebruik van hierdie gashere sou beteken dat die toets van verskillende ekspressiemetodes lank en moeisaam sou wees. Die beskikbare laboratoriums besit ook nie die toerusting om met gis kulture te werk nie.

Die een hoof nadeel van *E. coli* is die feit dat hierdie gasheer se natranslasiemodifikasies beperk is en indien die AKSM2A- en AKSM2B-ensieme se aktiwiteit en oplosbaarheid krities afhanklik is van natranslasiemodifikasies, soos disulfiedbindings en glikosilasie, sal *E. coli* nie 'n geskikte ekspressie gasheer wees nie (Rosano & Ceccarelli, 2014a). In hierdie studie is die twee moontlike natranslasiemodifikasies in die AKSM2A en AKSM2B-ensieme, naamlik disulfiedbindings en glikosilasie, met sagteware voorspel. Indien die AKSM2A en AKSM2B-proteïene wel onoplosbaar sou uitdruk in die bakteriële selle, is een soogdiersel ekspressieplasmied voorberei.

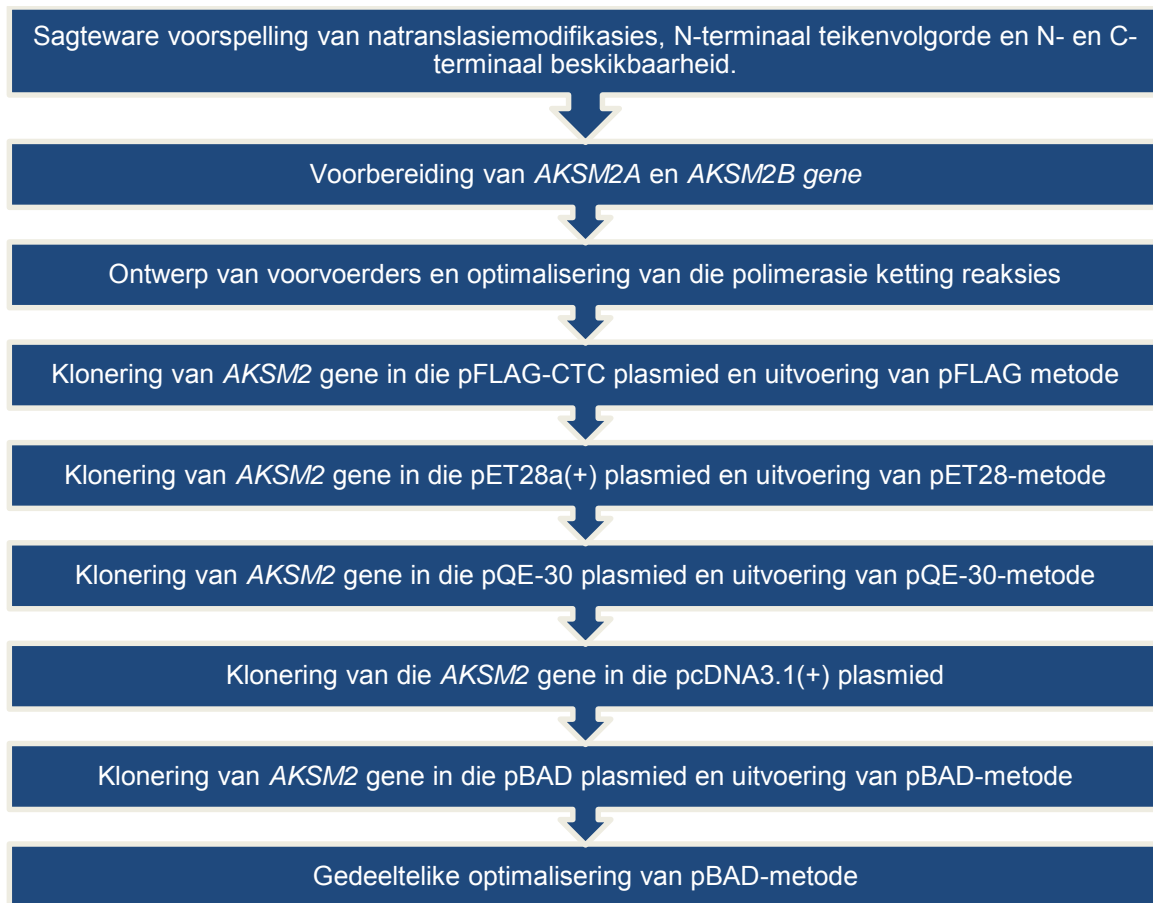
Die *E. coli* ekspressiemetodes in die literatuur, wat gebruik is om soogdier asiel-KoA-sintetases te produseer, is bestudeer en die vermoë van hierdie sisteme om oplosbare en aktiewe asiel-KoA-sintetase te produseer is bepaal. Drie metodes is geïdentifiseer en uitgekies wat die meeste oplosbare en ensimaties aktiewe proteïene geproduseer het. Die nuutste kommersieel beskikbare *E. coli* ekspressiemetodes is ook bestudeer en 'n ekspressiemetode is daaruit gekies. Die soogdiersel ekspressiemetodes is bestudeer en die mees onlangse metode wat suksesvol AKSM2-ensieme geproduseer het, is gekies. Hierdie metodes word weergegee in Tabel 4-2.

Tabel 4-2: Opsomming van die gekose *E. coli* en soogdier ekspressiemetodes.

Metode noemnaam	Asiel-KoA wat met hierdie metode geproduseer is.	Plasmied	Gasheersellyn	Metode van induksie	Metode verwysing
pET28-metode	Mens lang ketting asiel-KoA-sintetase 5	pET28a(+)	BL21 (<i>E. coli</i>)	IPTG	Malhotra <i>et al.</i> (1999)
pFLAG metode	Rot lang ketting asiel-KoA-sintetase isovorme 3 en 6	pFLAG-CTC	BL21-CondonPlus (DE3)-RIL (<i>E. coli</i>)	IPTG	Van Horn <i>et al.</i> (2005)
pQE-30-metode	Rot lang ketting asiel-KoA-sintetase	pQE-30 Xa	M15[pREP4] (<i>E. coli</i>)	IPTG	Bruggera <i>et al.</i> (2001)
pBAD-metode	Kommersiele sellyn	pBAD/TOPO	TOP 10 (<i>E. coli</i>)	Arabinose	pBAD/TOPO ThioFusion Expression Kit (Invitrogen, Carlsbad, VSA)
pcDNA-metode	Mens mediumketting asiel-KoA-sintetase 2	pcDNA3.1(+)	Hep2G (soogdier selle)		Boomgaarden <i>et al.</i> (2009)

Die *AKSM2A* en *AKSM2B* gene is in al die gekose ekspressieplasmiede gekloneer wat in Tabel 4-2 gelys word. Hierdie plasmiede is in hul ekspressie sellyn getransformeer en die ekspressiemetodes is een vir een uitgevoer met die doel om die eerste metode wat suksesvol oplosbare *AKSM2A* en *AKSM2B*-proteïene produseer te optimaliseer.

Die navorsingsmetode wat in hierdie studie gevolg is, word opgesom in Figuur 4-1.



Figuur 4-1: Vloeidiagram wat die navorsingsmetode in hierdie studie opsom.

4.2 Metodes en materiale

4.2.1 Sagteware voorspelling van natranslasiemodifikasies, N-terminaal teikenvolgorde en N- en C-terminaal beskikbaarheid.

Die moontlike natranslasiemodifikasie, naamlik disulfiedbindings en glikosilasie, wat in die AKSM2A- en AKSM2B-ensieme voorkom is voorspel deur voorspelling sagteware te gebruik.

Lokalisasie van die AKSM2-proteïene in die mitochondria is deur Boomgaarden *et al.* (2009) aangetoon. Hulle het bewys dat die vollengte AKSM2-proteïene gelokaliseer is tot die mitochondria, maar dat as die proteïene met 47 aminosure by die N-terminaal verkort word (hierdie 47 aminosure is die minste gekonserveerde deel van die N-terminaal in vergelyking met ander AKSM proteïene wat nie tot die mitochondria gelokaliseer is nie), dan vind daar geen lokalisering plaasvind nie. In hierdie studie is sagteware gebruik om die presiese volgorde van die mitochondriale teikenvolgorde te voorspel om te sien of dit ooreenstem met die 47 aminosure wat Boomgaarden *et al.* (2009) afgesny het. Sekere mitochondriale teikenvolgorde word vanaf

ensieme gekleef as hul die mitochondria binnedring. Die proteïene ondergaan dan eers die korrekte vouing of aktivering as dit deur die mitochondriale membraan beweeg (Rehling *et al.*, 2004). Dit wil sê dat indien die mitochondriale teikenvolgorde van die rekombinante proteïene gekleef word dit dieselfde effek kan hê wat die proteïen sou ondergaan as dit deur die mitochondriale membraan beweeg en kan lei tot korrekte vouing en aktivering. Indien die AKSM2-ensieme dus wel 'n N-terminaal teikenvolgorde besit, kan die teenwoordigheid van hierdie teikenvolgorde die vouing en daardeur die aktiwiteit en oplosbaarheid van die proteïen beïnvloed.

Suiwerings etikette moet aan die rekombinante proteïene gevoeg word sodat die proteïene gesuiver kan word nadat hul oplosbaar geproduseer is. Hierdie etikette word aan proteïene se N- of C-terminaal gekoppel. Om uit te vind of hierdie terminale weg van die ensiem wys en daarom beskikbaar is om 'n etiket aan te heg is die kristal struktuur van AKSM2A bestudeer. Indien hierdie terminale binne die proteïen ingevou word, sal 'n etiket aan die terminale nie geheg kan word nie.

4.2.1.1 Disulfiedbindings

Die disulfiedbindings in die AKSM2-ensieme is voorspel deur gebruik te maak van die Cyscon webwerf (www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cyscon/, Maart 2017) wat volgens die artikel van Yang *et al.* (2015) die aminosuur volgorde van 'n proteïen gebruik om sy disulfiedbindings te voorspel. Die verwysingsvolgordes van *AKSM2A* (NM_001308172.1) en *AKSM2B* (NM_182617) is vanaf Ensembl genoom blaaier (www.ensembl.org/index.html, Maart 2017) afgelaai en is getransleer na aminosuur volgordes met die ExPASy webwerf (<https://web.expasy.org/translate/>, Maart 2017). Hierdie aminosuur volgordes is in die Cyscon webwerf ingevoer vir modellering.

4.2.1.2 Mitochondriale N-terminaal teikenvolgorde

Die nuutste N-terminaal mitochondriale teikenvolgorde voorspelling sagteware, MitoFates (<http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi>, Maart 2017) is gebruik om die N-terminaal mitochondriale teikenvolgorde van die *AKSM2A* en *AKSM2B*-ensieme te voorspel. Hierdie sagteware is gebaseer op die artikel van Fukasawa *et al.* (2015). Die aminosuur volgorde is soos in afdeling 4.2.1.1 bepaal en op die webwerf ingevoer.

4.2.1.3 Glikosilasie

Moontlike glikosilasie posisies op *AKSM2A* en *AKSM2B* is voorspel met GlycoEP (<http://crdd.osdd.net/raghava/glycoep/submit.html>, Maart 2017). Die GlycoEP sagteware is gebaseer op die artikel van Chauhan *et al.* (2013). Die aminosuur volgordes is soos in afdeling 4.2.1.1 verkry en op die webwerf ingevoer.

Die aminosuur volgordes is getoets vir N- en C-gekoppelde glikosilasie met die gemiddelde oppervlakte toeganklikheid metode en die binêre profiel van patrone metode. O- gekoppelde glikosilasie is bepaal met die gemiddelde oppervlakte toeganklikheid metode en met die komposisie profiel van patrone metode. Die verskillende metodes is vergelyk en al die unieke posisie wat aangedui is, is as lesings geneem. Die aantal lesings is opgetel.

4.2.1.4 Bestudering van AKSM2A se kristal struktuur.

Die kristalstruktuur van AKSM2A met die L64P SNP (alleel frekwensie van 49%) wat deur Kochan *et al.* (2009) ontwikkel is, is bestudeer om die beskikbaarheid van die N- en C-terminale van die AKSM2-ensieme te bepaal. As die N- en C-terminale vry voorkom in die struktuur van die proteïen en nie in die voue van die proteïen weg gestek is nie, kan die terminale gebruik word vir fusie met suiweringsetikette en helper proteïene wat oplosbaarheid en translasie effektiwiteit kan verhoog.

Die proteïen databank toegang nommer vir AKSM2A wat in Kochan *et al.* (2009) weergegee word, 3B7W, is gebruik om die kristal struktuur te bestudeer op die Proteïen databank (<https://www.rcsb.org/structure/3B7W>, Augustus 2018). Die posisie van die N- en C-terminaal is daarvolgens bepaal.

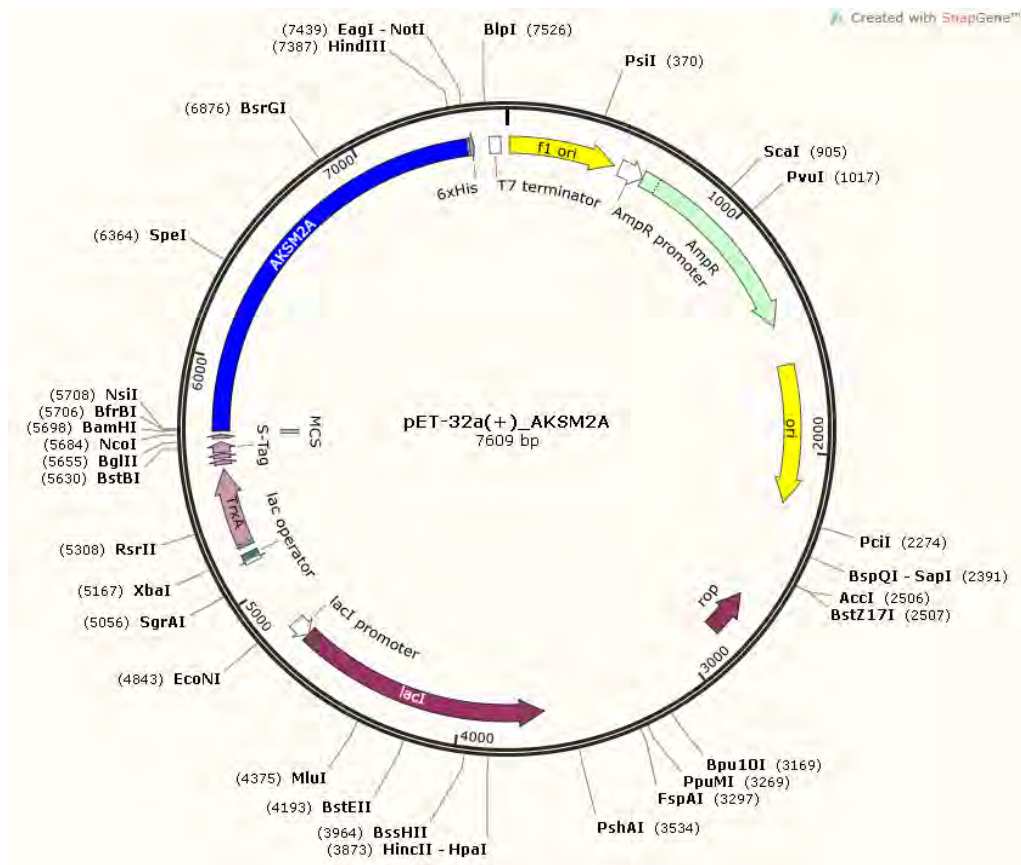
4.2.2 Voorbereiding van voorraadoplossings

Alle voorraadoplossings is met molekulebiologie-graad water opgemaak. 'n 80% (v/v) Gliserol voorraadoplossing is voorberei met water en gesteriliseer deur te outoklaveer vir 'n uur. 50 mg/ml Ampisillien (Melford, Ipswich, VK); 50 mg/ml karbenisillien (Melford, Ipswich, VK), 10 mg/ml kanamisien (Melford, Ipswich, VK), 20% arabinose (gewig/volume (g/v)) (Sigma, Saint Louis, VSA) en 0.8416 M isopropiëltio- β -D-galaktosied (IPTG) (Melford, Ipswich, VK) is voorberei met water, gefiltersteriliseer en gestoor by -20°C . Die IPTG is toegedraai in foelie. 34 mg/ml chlooramfenikol (Sigma, Saint Louis, VSA) is voorberei met 99.5% etanol (Merck, Wadeville, RSA), met foelie toegedraai en gestoor by -20°C .

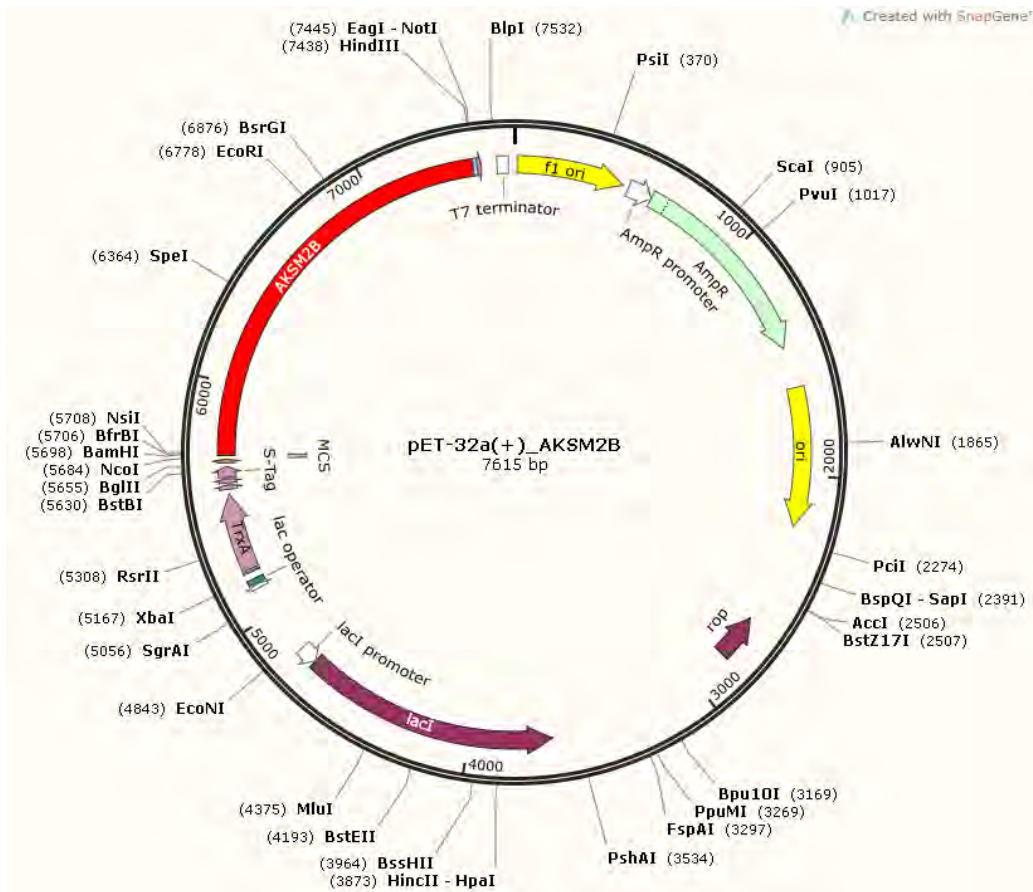
4.2.3 pET-32a+/AKSM2A en pET-32a+/AKSM2B

Die AKSM2A (NM_001308172.1) en AKSM2B (NM_182617) gene is gesintetiseer en in 'n pMAT plasmied gekloneer deur Genart (Invitrogen, Carlsbad, VSA). Die AKSM2A-gene is gesintetiseer met *Bam*HI en *Not*I restriksie ensiem sny plekke en die AKSM2B-gene is gesintetiseer met *Bam*HI en *Hind*III restriksie ensiem sny plekke aan hul 5' en 3' punte. Die gene is in vorige studies met hierdie restriksie ensieme gesubkloneer in die pET32a(+) plasmied (Merck, Wadeville, RSA) in.

DH5α gliserol voorrade wat afsonderlik pET-32a(+)/AKSM2A en pET-32a(+)/AKSM2B besit was dus beskikbaar in ons laboratorium. Hierdie gekloneerde plasmiede word voorgestel in Figuur 4-2 en Figuur 4-3 as SnapGene weergawe 1.1.3 (GSL Biotech, California, VSA) tekening.



Figuur 4-2: Voorstelling van die pET-32a(+)/AKSM2A plasmied. Die restriksie ensiem snydingsplekke word aangedui by spesifieke base paar lengtes aan die buitekant van die plasmied kring. Verskillende eienskappe van die plasmied word aangedui in die vorm van pyle aan die binnekant van die plasmied kring.



Figuur 4-3: Voorstelling van pET-32a(+)/AKSM2B plasmied. Die restriksie ensiem snydingsplekke word aangedui by spesifieke base paar lengtes aan die buitekant van die plasmied kring. Verskillende eienskappe van die plasmied word aangedui in die vorm van pyle aan die binnekant van die plasmied kring.

4.2.4 Groot skaalse plasmied ekstraksie

Plasmiede is op 'n groot skaal vanuit bakteriële selle geïsoleer met die PureYield Plasmid Midiprep sisteem (Promega, Madison, VSA). Hierdie sisteem gebruik silika-membraan tegnologie om plasmied DNS te isoleer.

Die *E. coli* wat die gewenste plasmiede besit, is opgegroeï in 250 ml bakteriële selkulture. Die selkulture is voorberei met lisogenie boeljon (LB) medium (1% proteose (g/v), 0.5% gisekstrak (g/v), 1% NaCl (g/v)), dit is gesteriliseer deur te outoklaveer en antibiotika is bygevoeg vir seleksie van die plasmiede. Die tipes antibiotika wat deurgaans in die hele studie gebruik is vir seleksie van plasmiede en die finale konsentrasie binne in die selkulture word weergegee in Tabel 4-3. Die kulture is in 1 liter Erlenmeyerflesse by 200 revolusies per minuut (r.p.m.) en 37°C vir

ongeveer 18 ure opgegroeï tot dat 'n optiese digtheid by 600 nm (OD_{600}) van tussen 2 en 4 bereik is. Die selle is gepresipiteer deur sentrifugering (5000 x g, 10 minute, kamer temperatuur), die supernatant is afgegooi en die buise is omgekeer op 'n papier handdoek om oorblywende supernatant te dreineer.

Tabel 4-3: Die antibiotika wat gebruik is vir seleksie van plasmiede en die finale selkultuurkonsentrasies.

Plasmiede	Antibiotika	Finale selkultuurkonsentrasie
pET32a(+) pFLAG-CTC pFLAG-CTS pQE-30 pcDNA3.1(+)	Ampisillien	50 µg/ml
pET32a(+) pFLAG-CTC pFLAG-CTS pQE-30 pcDNA3.1(+)	Karbenisillien	100 µg/ml
pET28a(+) p[REP4]	Kanamisien	30 µg/ml
pACYC	Chlooramfenikol	34 µg/ml

Die gepresipiteerde selle is opgelos in 6 ml resuspensie oplossing. 6ml Sellise oplossing is bygevoeg en die oplossings is gemeng deur die buis 5 maal om te keer. Die buise is vir 3 minute geïnkubeer. 10 ml Neutralisasie oplossing is bygevoeg en die buise is 10 maal gemeng deur omkering. Die sel oorblyfsels is gepresipiteer deur sentrifugering (15 000 x g, 15 minute, by 4°C).

Die PureYield opklaarkolomme is in PureYield bindingskolomme geplaas en op die vakuum apparaat opgestel. Die supernatant, wat die plasmied DNS bevat, is in die opklaarkolomme gegiet, die vakuum is geaktiveer en die supernatant het deur die kolom in die vakuum apparaat ingevloei. Die sel oorblyfsels wat nie gepresipiteer het nie is deur die opklaarkolomme verwyder en die bindingskolomme het die plasmied DNS gebind. Die bindingskolom is gewas met 5 ml endotoksien verwydering oplossing en 20 ml kolom was oplossing deur die oplossings apart in te giet, die vakuum te aktiveer en toe te laat dat die vloeistof deurvloei. Die kolom is gedroog deur die vakuum te aktiveer en toe te laat dat dit lug deur die membraan trek vir ongeveer 5 minute, totdat die membraan droog vertoon het en etanol reuke onopvallend was.

’n 1.5 ml Mikrosentrifuge buis is in die Eluator vakuüm eluering apparaat geplaas en die droë bindingskolom is bo op die apparaat ingepas. 600 µl Molekulêrebiologie-graad water is op die membraan van die bindingskolom gepipetteer. Die Eluator apparaat is op die vakuüm apparaat geplaas en die vakuüm is op maksimum gestel en geaktiveer totdat al die vloeistof in die 1.5 ml mikrosentrifuge buis gevloei het. Hierdie buise is by 4°C vir kort termyn en -20°C vir langtermyn gestoor.

4.2.5 DNS kwantifisering

DNS se konsentrasie en kwaliteit is met die NanoDrop One spektrofotometer (ThermoFisher Scientific, Madison, VSA) met weergawe 1.3.1 NanoDrop One sageware gemeet.

Voor elke stel konsentrasie bepaling is die instrument skoongemaak deur 5 µl molekulêrebiologie-graad water op die instrument te laai, dit vir 5 minute te inkubeer en met laboratorium handdoek papier af te vee.

Molekulêrebiologie-graad water (1-2 µl) of die oplossing wat gebruik is om die DNS te elueer of op te maak is gebruik as ’n blanko lesing. 1-2 µl van die DNS monster is op die instrument gelaai en ’n lesing is geneem. Na elke lesing is die DNS monster af gegee, 5 µl molekulêrebiologie-graad water gelaai en afgegee. Die NanoDrop One spektrofotometer gee die konsentrasie van die DNS in ng/µl en dui die kwaliteit van die DNS aan met twee lesings, naamlik die A_{260}/A_{280} en A_{260}/A_{230} lesings.

DNS absorbeer maksimaal by 260 nm en proteïene by 280 nm en die ideale verhouding gee ’n waarde van 1.8. ’n Laer A_{260}/A_{280} lesing gee dus ’n aanduiding van proteïen kontaminasie. Verskeie soute of oplosmiddels absorbeer maksimaal by 230 nm. Die A_{260}/A_{230} waarde gee dus ’n aanduiding van sout of oplosmiddel kontaminasie en moet ideaal ’n waarde van 2 wees.

4.2.6 Agarose jel elektroforese

Agarose jel elektroforese is gebruik om DNS op grond van grootte te skei en te visualiseer. ’n 1% (g/v) agarose (Melford, Cheltenham, VK) jel is voorberei met 1X TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM asynsuur (Merck, Darmstadt, Duitsland), 1 mM etileendiamientetra-asynsuur (EDTA) (Fluka, Steinheim, Duitsland)). Die agarose jels is op een van die volgende drie metodes gekleur vir DNS visualisering:

- Etidium bromied (EtBr) vooraf gegiet: 0.5 µg/ml EtBr (Sigma, Saint Louis, VSA) is by die agarose jel gevoeg voordat stolling plaasvind.

- GelRed vooraf gegiet: 'n 1X GelRed (Biotium, Fremont, VSA) en 1X TAE oplossing is voorberei met gedistilleerde water (dH₂O) en 3X GelRed en 50X TAE voorraadoplossings en is gebruik om agarose jels mee te giet.
- GelRed agterna kleuring: Nadat agarose jel elektroforese uitgevoer is, is die agarose jel in 'n 3X oplossing van GelRed geplaas en vir 30 minute geïnkubeer met stadige beroering.

DNS is in agarose jel putte gelaai deur dit te meng met 6X Oranje DNS laai kleurstof (Life Technologies, Carlsbad, VSA). 20 ng DNS is gewoonlik gelaai per mm van die agarose put lengte. O'GeneRuler DNS leer mengsel (Life Technologies, Carlsbad, VSA) #SM1163 en #SM1173 is gebruik om die DNS grotes te bepaal. Die agarose jel elektroforese is uitgevoer met die PowerPac Basic kragtoevoer (Bio-Rad, California, VSA) teen 8 V/cm totdat genoegsame skeiding deur die laai kleurstof aangetoon is. Die G:BOX EF2 jel beeld analise sisteem (Syngene, Cambridge, VK) is gebruik saam met die GeneSys beeld verkryging sagteware weergawe 1.1.2.0 (Syngene, Cambridge, VK) om die agarose jels te visualiseer.

4.2.7 Bakteriële gliserol voorrade

Bakteriële gliserol voorrade is gebruik om *E. coli* en plasmied draende *E. coli* langtermyn te stoor. Bakteriële gliserol voorrade is soos volg voorberei:

LB medium (5-7 ml) met antibiotika wat ooreenstem met die gewenste plasmied (Tabel 4-3) is met 'n enkel kolonie of gliserol voorraad geïnkuleer en oornag opgegroeï by 37°C en 225 r.p.m. 975 µl van die kultuur en 225 µl van die 80% gliserol voorraadoplossing was saam gevoeg in 'n 1.5 ml mikrosentrifuge buis vir 'n finale gliserol konsentrasie van 15%. Die buis was gemeng deur omkering en gestoor by -81°C.

4.2.8 Kleinskaalse plasmied ekstraksie

Plasmiede is op 'n klein skaal vanuit bakteriële selle geïsoleer met die NucleoSpin Plasmied sisteem (Macherey-Nagel, Düren, Duitsland). Hierdie sisteem gebruik silika-membraan tegnologie om plasmied DNS op 'n kleinskaal te isoleer. DNS isolasie is volgens die vervaardiger se handleiding uitgevoer. Twee verskillende protokolle is gevolg vir hoë-kopie en lae-kopie plasmiede. Die lae-kopie protokol se verskille word weergegee in hakkies.

5 ml (10 ml) *E. coli* LB kulture wat die plasmied se ooreenstemmende antibiotika bevat is oornag opgegroeï. Die selle is gepresipiteer deur middel van sentrifugering (11 000 x g, 30 sekondes, kamertemperatuur). Die supernatant is afgegooi en die selle is weer opgelos in 250 µl (500 µl) buffer A1, deur op en af te pipetteer of deur te vorteks. Die selle is geliseer deur 250 µl (500 µl)

buffer A2 by te voeg en gemeng deur die buise agt keer om te keer en is vir vyf minute by kamertemperatuur geïnkubeer. Die lisaat is geneutraliseer deur 300 µl (600 µl) buffer A3 by te voeg en die buise agt keer om te keer totdat die oplossing heeltemal kleurloos getoon het. Die sellulêre oorblyfsels is gepresipiteer deur sentrifugering (11 000 x g, vyf minute (tien minute), kamer temperatuur). Die supernatant wat die plasmied DNS besit is oorgedra aan die NucleoSpin Plasmied kolomme en die kolomme is gesentrifugeer (11 000 x g, een minuut, kamer temperatuur) om toe te laat dat die supernatant deur die kolomme se membraan kan beweeg. Die silika membraan bind dan die plasmied DNS in die teenwoordigheid van die choatropiese soute. Die membraan is gewas deur 500 µl buffer AW in die kolomme te laai en te sentrifugeer (11 000 x g, een minuut, kamer temperatuur) en deur 600 µl buffer A4 te laai en te sentrifugeer (11 000 x g, een minuut, kamer temperatuur). Die silika membraan is gedroog deur te sentrifugeer (11 000 x g, twee minute, kamer temperatuur) en deur dit te inkubeer by 70°C vir vyf minute. Na die laai, was en droog stappe is die deurvloei in die kolomme weggegooi.

Die plasmied DNS is geëluëer in 2 ml DNS lae binding buise deur twee keer 25 µl molekulêrebiologie-graad water op die membraan te laai, die buis vir vyf minute by 70°C te inkubeer en te sentrifugeer (11 000 x g, een minuut, kamer temperatuur). Hierdie buise is by 4°C vir kort termyn en -20°C vir langtermyn gestoor.

4.2.9 Restriksie ensiem snyding

Restriksie ensiem snyding is uitgevoer om inlasstukke en plasmiede los te sny vanaf skenker plasmied DNS en om klewerige eindpunte te vorm op plasmiede en inlasstukke vir ligering. Dit is ook gebruik om die grootte van plasmiede te bevestig.

Die restriksie ensieme van Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, Madison, VSA) en NEB (New England Biolabs, Ipswich, VSA) is gebruik soos gelys in Tabel 4-4. Die reaksies is opgemaak volgens die verskaffers se handleidings. Kortliks is reaksies opgestel soos in Tabel 4-5 en Tabel 4-6.

Tabel 4-4: Restriksie ensieme

Restriksie ensiem	Verskaffer	Buffer
FastDigest <i>Bam</i> HI	Thermo Scientific	10X FastDigest groen buffer
FastDigest <i>Hind</i> III	Thermo Scientific	10X FastDigest groen buffer
FastDigest <i>Nco</i> I	Thermo Scientific	10X FastDigest groen buffer
FastDigest <i>Nde</i> I	Thermo Scientific	10X FastDigest groen buffer
FastDigest <i>Not</i> I	Thermo Scientific	10X FastDigest groen buffer

Restriksie ensiem	Verskaffer	Buffer
FastDigest <i>PaeI</i>	Thermo Scientific	10X FastDigest groen buffer
FastDigest <i>SaI</i>	Thermo Scientific	10X FastDigest groen buffer
FastDigest BspTI	Thermo Scientific	10X FastDigest groen buffer
<i>Bam</i> HI	NEB	NEB buffer 3.1
<i>Hind</i> III	NEB	NEB buffer 2.1
<i>Not</i> I	NEB	NEB buffer 3.1
<i>Sa</i> I	NEB	NEB buffer 3.1
<i>Nde</i> I	NEB	NEB buffer CutSmart
<i>Afl</i> I	NEB	NEB buffer CutSmart

Tabel 4-5: Thermo Scientific restriksie ensiem snyding

Item	Plasmied DNS	PKR produk
10X FastDigest groen buffer	2 μ l	2 μ l
DNS	\leq 1 μ g	\leq 0.2 μ g
FastDigest ensiem/e	1 μ l/ 1 μ l van elke ensiem indien 'n dubbele snyding uitgevoer word	1 μ l/ 1 μ l van elke ensiem indien 'n dubbele snyding uitgevoer word
Molekulêrebiologie-graad water	Vul op tot 20 μ l	Vul op tot 30 μ l
Totale volume	20 μ l	30 μ l

Tabel 4-6: NEB restriksie ensiem snyding

Item	Plasmied DNS	PKR produk
10X NEBuffer	5 μ l	5 μ l
DNS	\leq 1 μ g	\leq 0.2 μ g
NEB restriksie ensiem/e	1 μ l/ 1 μ l van elke ensiem indien 'n dubbele snyding uitgevoer word	1 μ l/ 1 μ l van elke ensiem indien 'n dubbele snyding uitgevoer word
Molekulêrebiologie-graad water	Vul op tot 50 μ l	Vul op tot 50 μ l
Totale volume	50 μ l	50 μ l

Vir dubbele restriksie ensiem snyding met NEB ensieme is die dubbele snyding sagteware (<https://nebcloner.neb.com/#!/redigest>) op NEB se webwerf gebruik om die gepaste buffer vir albei ensieme te vind.

4.2.10 Voorbereiding van kompetente M15[pREP4] *E. coli*

'n Gliserol voorraad van die M15[pREP4] *E. coli* (MiaoLingBio, Wuhan City, China) is aangekoop en die *E. coli* is volgens die QIAexpressionist handleiding kompetent gemaak.

Die *E. coli* is uitgestreep op 'n LB agarose plaat wat 25 µg/ml kanamisien bevat om enkel kolonies te verkry. Die plaat is oornag by 37°C geïnkubeer. 'n Enkele kolonie is in 10 ml LB wat 25 µg/ml kanamisien bevat geïnkubeer en is oornag by 37°C en 225 r.p.m. geïnkubeer. 1 ml van hierdie kultuur is by 100 ml vooraf verhitte LB media wat 25 µg/ml kanamisien bevat gevoeg en by 37°C en 225 r.p.m. geïnkubeer totdat 'n OD₆₀₀ van 0.5 bereik is. Die kultuur is afgekoel op ys vir vyf minute en die *E. coli* is gepresipiteer deur sentrifugering (4000 x g, vyf minute, 4°C). Die supernatant is afgegooi en die selle is op ys gehou. Die selle is weer in oplossing gebring met 30 ml TFB 1 buffer (100 mM RbCl (Sigma, Saint Louis, VSA), 50 mM MnCl₂ (Sigma, Saint Louis, VSA), 30 mM kalium asetaat (Sigma, Saint Louis, VSA), 10 mM CaCl₂ (Sigma, Saint Louis, VSA), 15% gliserol (g/v), pH 5.8) wat gefiltersteriliseer is en is op ys geïnkubeer vir 90 minute. Die *E. coli* is weer gepresipiteer deur sentrifugering (4000 x g, vyf minute, 4°C). Die supernatant is afgegooi en die selle is weer op ys gehou. Die selle is versigtig in oplossing gebring met 4 ml yskoue TFB 2 buffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% gliserol, pH 6.8) wat gefiltersteriliseer is. Die kompetente selle is in 100 µl hoeveelhede in 1.5 ml mikrosentrifugebuise verdeel, gevries in vloeibare stikstof en by -81°C gestoor.

4.2.11 Voorbereiding van chemiese kompetente JM109 *E. coli*.

Die voorbereiding van chemiese kompetente JM109 *E. coli* is uitgevoer soos beskryf deur Chung and Miller (1988). LB agarose plate is voorberei deur 1.5% agarose (g/v) by LB medium te voeg. Die medium is dan geoutoklaveer om dit te steriliseer en die agarose op te los. Die medium is toegelaat om gedeeltelik af te koel en dit is gegiet in petribakkies in die steriele omgewing van 'n laminêre vloeikas. Geen antibiotika is by die plate gevoeg nie, omdat die JM109 *E. coli* nog nie 'n plasmied bevat wat weerstand bied teen antibiotika nie. 'n JM109 *E. coli* gliserol voorraad wat beskikbaar was in die laboratorium is uitgestreep op die LB agarose plate met die doel om 'n enkel kolonie te verkry. Die uitgestreepde plate is oornag by 37°C geïnkubeer. 5 ml LB medium is geïnkubeer met 'n enkele kolonie en is oornag by 37°C geïnkubeer. 50 ml LB medium is met die 5 ml kultuur geïnkubeer en is oornag by 37°C geïnkubeer totdat 'n OD₆₀₀ van ~0.5 (0.3-0.6) bereik is. Die 50 ml kultuur is gesentrifugeer (4000 revolusies per minuut (r.p.m.), tien minute, 4°C) om die *E. coli* te presipiteer. Die supernatant is afgegooi en die *E. coli* is met 5 ml yskoue transformasie storting buffer (TSB) (1.6% proteose (g/v), 1% gisekstrak (g/v), 0.5% NaCl (g/v), 10% poliëtileenglikol (PEG) (g/v), 5% dimetielsulfoksied (DMSO) (volume/volume) (v/v), 0.01 M MgCl₂, 0.01 M MgSO₄) weer in oplossing gebring en is vir 20 minute op ys geïnkubeer. Gliserol

is bygevoeg tot 'n finale konsentrasie van 15%. Die oplossing is verdeel in 200 µl hoeveelhede in yskoue 1.5 ml mikrosentrifuge buise, gevries in vloeibare stikstof (N₂) en gestoor by -81°C.

4.2.12 Transformasie van aangekoopte plasmiede in chemies kompetente JM109 *E. coli* en bevestiging van plasmied grotes

Vier verskillende plasmiede van die gekose ekspressie sisteme in Tabel 4-2 is aangekoop of was beskikbaar in die laboratorium en is in chemies kompetente JM109 *E. coli* getransformeer volgens Chung and Miller (1988) se metode.

Die plasmiede wat gebruik was, word weergee in Tabel 4-7.

Tabel 4-7: Plasmiede wat aangekoop of beskikbaar was, wat gebruik is in die transformasie van JM109 *E. coli*.

Plasmied	Aangekoop/beskikbaar	Antibiotika gebruik
pET28a(+)	Aangekoop (Merck, Billerica, VSA)	Kanamisien
pFLAG-CTC	Aangekoop (Sigma, Saint Louis, VSA)	Ampisillien/karbenisillien
pQE-30 Xa	Aangekoop ((Qiagen, Aarhus, Denemarke)	Ampisillien/karbenisillien
pcDNA3.1(+)	Beskikbaar	Ampisillien/karbenisillien

Die 1.5 ml mikrosentrifuge buise, wat 200 µl chemiese kompetente JM109 *E. coli* bevat (4.2.11), was op ys geplaas en gemeng met 100 ng van elke plasmied. Die transformasie reaksies was vir 30 minute op ys geïnkubeer. Glukose (Sigma, Saint Louis, VSA) was by TSB gevoeg tot 'n finale konsentrasie van 20 mM om TSBG te maak. 800 µl TSBG was by elke transformasie reaksie gevoeg en die reaksies was vir een uur by 37°C en 225 r.p.m. geïnkubeer. LB agarose plate was voorberei soos in afdeling 4.2.4, maar voordat die LB agarose gegiet is, was die ooreenstemmende antibiotika vir elke plasmied soos in Tabel 4-7 aangedui is, bygevoeg. Die getransformeerde JM109 *E. coli* was uitgeplaat op die ooreenstemmende LB agarose plate wat antibiotika bevat en oornag by 37°C geïnkubeer.

'n Enkel kolonie van elke transformasie was in 5 ml LB met die ooreenstemmende antibiotika geïnkuleer en opgegroeï oornag by 37°C en 225 r.p.m. 'n Bakteriële gliserol voorraad van elke kultuur is gemaak soos in afdeling 4.2.7. 'n Kleinskaalse plasmied ekstraksie is uitgevoer soos in afdeling 4.2.8. Elke nuut geïsoleerde plasmied asook pET32a(+)/AKSM2A en pET32a(+)/AKSM2B is met *Bam*HI gelineariseer soos in afdeling 4.2.9 en agarose jel elektroforese is uitgevoer (4.2.6) waarop die sirkulêre en lineêre weergawes van al die plasmiede gelaai is ter bevestiging van elke plasmied grote.

4.2.13 Transformasie van aangekoopte kompetente sellyne

Die kompetente sellyne wat aangekoop of kompetent gemaak is en gebruik is in hierdie studie word gelys in Tabel 4-8

Tabel 4-8: Kompetente sellyne

Sellyn	Verskaffer
Subcloning efficiency DH5 α	Invitrogen, Carlsbad, VSA
NEB 5-alpha	New England Biolabs, Ipswich, VSA
BL21(DE3)	New England Biolabs, Ipswich, VSA
One Shot TOP10	Invitrogen, Carlsbad, VSA
NEB 10-beta	New England Biolabs, Ipswich, VSA
BL21(DE3)RIL	Agilent Technologies, Santa Clara, VSA
M15[pREP4]	MiaoLingBio, Wuhan City, China

Elke kompetente sellyn se transformasie is uitgevoer volgens die verskaffer se handleidings. Al die transformasies is uitgevoer met die hittedkok metode.

Kortliks was die transformasies soos volg uitgevoer. Die selle was vanuit die -81°C vrieskas gehaal en dadelik op ys geplaas om te ontdooi. 'n Volume van die selle was oorgedra in 'n yskoue transformasie buis. Die plasmied of ligeringsreaksie wat getransformeer moes word was bygevoeg. 'n Positiewe kontrole reaksie waar 250 pg van die pUK19 plasmied bygevoeg is, was deurgaans gebruik. Die buise was saggies gemeng en op ys geïnkubeer. Hittedkok by 42°C was uitgevoer in 'n waterbad en die buise was daarna weer terug geplaas op ys vir 2-5 minute. 'n Groei medium was vooraf verhit na 37°C en bygevoeg by die buise. Die buise was dan by 37°C en 225 r.p.m. vir een uur geïnkubeer.

LB agarose plate met die antibiotika benodig vir plasmied seleksie soos aangedui in Tabel 4-3 was voorberei soos in afdeling 4.2.12 en was voor gebruik verhit tot 37°C. Twee hoeveelhede van elke transformasie was daarop uit geplaas en oornag by 37°C geïnkubeer. Die oorblywende transformasie oplossing was by 4°C gestoor om die volgende dag uit te plaas indien dit nodig was.

Die verskillende groeimedia wat gebruik was, is SOC medium (2% proteose (g/v), 0.5% gisekstrak (g/v), 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukose), NEB 10-

beta/stabiele uitgroe medium (New England Biolabs, Ipswich, VSA) en Psi medium (LB medium met 4 mM MgSO₄ en 10 mM KCl).

Die verskillende spesifikasies van elke kompetente sellyn se transformasie word weergegee in Tabel 4-9.

Tabel 4-9: Spesifikasies van kompetente sellyne se transformasie metodes.

Kompetente sellyn	Volume kompetente selle gebruik (µl)	Transformasie buise gebruik	Plasmied (ng) of ligerings-reaksie volume	Eerste ys inkubasie tydperk (min)	Hitteskok tydperk (s)	Volume en tipe groei-medium bygevoeg (µl)	Twee volumes wat uitgestreep is
Subcloning efficiency DH5α	50	1.5 ml mikrosentrifuge buise	Plasmied: 1 -10 ng Ligerings-reaksie: 5 µl	30	20	950 SOC medium	20 µl en 200 µl
NEB 5-alpha en BL21(DE3)	50	1.5 ml mikrosentrifuge buise	Plasmied: 1 pg -100 ng Ligerings-reaksie: 5 µl	30	30	950 SOC medium	50 µl en 100 µl
BL21(DE3)	50	1.5 ml mikrosentrifuge buise	Plasmied: 1 -10 ng Ligerings-reaksie: 5 µl	30	10	950 SOC medium	50 µl en 100 µl
One Shot TOP10	50	Selle kom in enkel transformasie buise	Ligerings-reaksie: 5 µl	30	30	250 SOC medium	20 µl en 200 µl
NEB 10-beta	50	Selle kom in enkel transformasie buise	Ligerings-reaksie: 2 µl	20	30	950 NEB 10-beta/stabiele uitgroe medium	50 µl en 50 µl van 'n 1:10 verdunning
BL21 (DE3)RIL	100	5 ml BD Flacon poli-propileen ronde punt buise	Plasmied: 50 ng	30	20	900 SOC medium	50 µl en 200 µl
M15 [pREP4]	100	1.5 ml mikro-	Ligerings-reaksie: 10 µl	20	90	500 Psi medium	50 µl en 200 µl

Kompetente sellyn	Volume kompetente selle gebruik (µl)	Trans-formasie buise gebruik	Plasmied (ng) of ligerings-reaksie volume	Eerste ys inkubasie tydperk (min)	Hitteskok tydperk (s)	Volume en tipe groei-medium bygevoeg (µl)	Twee volumes wat uitgestreep is
		sentrifuge buise					

Die BL21(DE3)RIL kompetente selle het vereis dat daar voor transformasie 2 µl van 1:10 verdunde XL10-Gold β- merkptoëtanol (Agilent Technologies, Santa Clara, VSA) by al die gealikkotte kompetente selle gevoeg word. Die buise is vir tien minute op ys geïnkubeer en elke twee minute gemeng deur dit te warrel (vorteks) voordat die plasmied DNS bygevoeg is. Hierdie sellyn het ook vereis dat 34 µg/ml chlooramfenikol by elke LB plaat en daaropvolgende groei-medium bygevoeg word omdat die sellyn die pACYC plasmied besit wat kodeer vir skaars tRNS en chlooramfenikol weerstand bied.

Die M25[pREP4] sellyn het ook standaard 25 µg/ml kanamisien in die LB agarose plate gehad saam met die antibiotika vir plasmied seleksie, om die pREP4 plasmied in die sellyn te behou. Die inkubasie stap na Psi medium bygevoeg is was 90 minute.

4.2.14 Sanger volgordebepaling

Sanger volgordebepaling is gebruik om die presiese nukleotied volgorde van DNS te bepaal. Die Sanger volgordebepaling is uitgevoer deur die Sentrale analitiese fasiliteite (SAF) van die Universiteit van Stellenbosch.

Die monsters is soos volg vir die SAF gestuur vir Sanger volgordebepaling: 15 µl van 'n suiwer plasmied oplossing teen 'n konsentrasie van ≥ 100 ng/µl is gestuur saam met 5 µl van elke voorvoerder (voorwaarts en terugwaarts) by 'n konsentrasie van 1.1 pmol/µl. Konsentrasie bepaling en Sanger volgordebepaling is by die SAF aangevra.

Die resultate van elke voorwaartse en terugwaartse kompliment volgordes kom in beide 'n "ABI" formaat chromatogram lêer, wat die chromatogram wat verkry is deur die Sanger volgordebepaling gee, en 'n "SEQ" lêer wat slegs die verkrygte volgorde bevat. Die "ABI" lêer is oop gemaak en bestudeer met FinchTV weergawe 1.4.0 (Geospiza, Seattle, VSA) om die kwaliteit van die chromatogram te bepaal. Die pieke wat duidelik onderskeibaar van die agtergrond in die chromatogram was, is geïdentifiseer en in die "SEQ" lêers is die data gesnoei om slegs die data met hoe kwaliteit pieke te bevat. ClustalX weergawe 2.1 (Conway Institute, Dublin, Ierland) is

gebruik om die gesnoeide “SEQ” lêers saam te voeg, te orden en in lyn te bring met die verwysings volgorde van die spesifieke geen wat bevestig word.

As daar enkele verskille in die Sanger volgordebepalings op ClustalX te voorskyn gekom het, is die ooreenstemmende chromatogramme ondersoek vir verkeerd geïdentifiseerde pieke. Die data is dan ooreenstemmend reggemaak indien daar 'n verkeerd geïdentifiseerde piek was, maar indien dit wel 'n enkel nukleotied polimorfisme (ENP) was, is die effek van die ENP in die aminosuur volgorde bepaal. Indien die ENP 'n stil mutasie tot gevolg gehad het, was die monster steeds aanvaar, maar as dit 'n aminosuur veranderende mutasie te voorskyn gebring het, is die monster verwerp.

Die Sanger volgordebepalingsdata wat ooreengestem het met die verwysingsvolgorde van die geen en die restriksie ensiem sny plekke korrek aan die punte van die geen en die plasmied aantoon, is aanvaar as bevestiging dat die plasmied die korrekte geen bevat.

Die volgordebepalingsvoorvoeders gebruik in hierdie studie word aangedui in Tabel 4-10.

Tabel 4-10: Volgordebepalingsvoorvoeders

Voorvoerder naam	Voorvoerder 5'-3' volgorde	Voorvoerder bron
S-tag	GAACGCCAGCACATGGACA	Integrated DNS Technologies, Illinois, VSA
T7-afsluiter	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Integrated DNS Technologies, Illinois, VSA
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	Integrated DNS Technologies, Illinois, VSA
N-26	CATCATAACGGTTCTGGCAAATATTC	Integrated DNS Technologies, Illinois, VSA
C-24	CTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTC	Integrated DNS Technologies, Illinois, VSA
Tiepe III/IV	CGGATAACAATTTACACAG	Integrated DNS Technologies, Illinois, VSA
pQE-30 terugwaarts	GTTCTGAGGTCATTACTGG	Integrated DNS Technologies, Illinois, VSA
BGH terugwaarts	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Inqaba Biotech, Pretoria, RSA
Klonering analise voorwaarts	ACCTGCCAACCAAAGCGAGAAC	New England Biolabs, Ipswich, VSA
Klonering analise terugwaarts	TCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG	New England Biolabs, Ipswich, VSA
Trx voorwaarts	TTCCTCGACGCTAACCTG	Invitrogen, Carlsbad, VSA

Voorvoerder naam	Voorvoerder 5'-3' volgorde	Voorvoerder bron
pBAD terugwaarts	GATTTAATCTGTATCAGG	Invitrogen, Carlsbad, VSA

4.2.15 Voorvoeders ontwerp

Vir al die tipe klonerings is daar spesifieke voorvoeders ontwerp om onder andere die gene te amplifiseer, restriksie ensiem snydingsplekke of suiwingsetikette aan die gene te koppel en om kolonie PKR mee uit te voer. Van die ontwerpte voorvoeders is ook gebruik as Sanger volgordebepalingsvoorvoeders.

Die ontwerp van voorvoeders was beperk deur elke voorvoerder se funksie, maar die reëls wat gevolg is vir die ontwerp van ideale voorvoeders was soos volg:

- Die smelttemperatuur (T_m) van die voorvoeders moet tussen 55-70°C wees.
- Die GC inhoud moet tussen 40-60% wees.
- Die lengte van die voorvoeders moet tussen 15-30 nukleotide wees, optimaal tussen 18-22 nukleotide.
- Haarnaald DNS strukture moet vermy word.
- Self bindende dimere moet vermy word.
- Volgorde herhalings moet vermy word. Die maksimum is 4 dinukleotide.
- Enkel nukleotied herhaling moet vermy word. Die maksimum is 4 nukleotide.
- Moet nie 3 of meer G's en/of C's aan die 3' punt hê nie d.w.s. GC ryk 3' punte moet vermy word, maar daar moet ten minste een G of C wees vir voorvoerder ankering.
- Geen T op die 3' punt nie – dit lei na verkeerde bindings.
- 4 ekstra spasieerder nukleotide moet aangeheg word as 'n restriksie ensiem sny plek aan die punt van 'n voorvoerder gevoeg word om restriksie ensiem binding te verseker.

Nadat die voorvoeders ontwerp is, volgens die stel reëls en saam met alle restriksie ensiem sny plekke en suiwingsetikette, is die voorvoeders oorgedra aan die CLC genomika werksbank sagteware weergawe 7.0.3 (Qiagen, Aarhus, Denemarke). Hierdie sagteware is gebruik om die

kwaliteit van die ontwerpde voorvoeders te bepaal deur 'n waarde te gee vir elkeen van die volgende eienskappe:

- G/C inhoud
- Smelttemperatuur
- Haarnaald DNS strukture (self bindend)
- Self bindende dimere
- Sekondêre strukture
- Voorvoerder pare binding

Hierdie waardes is in ag geneem en voorvoeders is aangepas totdat die optimale voorvoeders ontwerp is. Die finale ontwerpde voorvoeders is deur Integrated DNS technologies (Integrated DNS technologies, Illinois, VSA) gesintetiseer en word weergegee in Tabel 4-11.

Tabel 4-11: Ontwerpde voorvoeders vir klonering.

Voorvoerder naam	Voorvoerder volgorde 5'-3'
FLAG-Fwd	<u>TAGTCATATGCATTGGCTGCGA</u>
FLAG- Rev	<u>TATTGTCGACCTGCGCACGGGCTTTTC</u>
FLAG-Fwd-Trunc	<u>TGGGCATATGAGTGATGTGTTGGATC</u>
pc+-Fwd	<u>ACTACTTAAGGGTTCTGGTTCTGGCCAT</u>
pc+-Rev	<u>CTTCCTTTCGGGCTTTGTT</u>
pc+-Fwd-Trunc	<u>TGGGCTTAAGATGAGTGATGTGTTGGATC</u>
QE-Trunc	<u>TGGTGCATGCAGTGATGTGTTGGATC</u>
Fwd_AflI_6HIS	<u>TAGTCTTAAGATGCATCACCATCACC</u> <u>ATCACGGTTCTATGCATTGGCTGCGAAAAG</u>
Rev_stop_SalI	<u>TATTGTCGACCTCACTGCGCACGGGCTTTTC</u>
Trunc_AflI_6HIS	<u>TAGTCTTAAGATGCATCACCATCACC</u> <u>ATCACGGTTCTAGTGATGTGTTGGATC</u>
Trunc_BamHI	<u>TGCTGGATCCAGTGATGTGTTGGATC</u>
pBAD_FWD	<u>ATGCATTGGCTGCGA</u>
pBAD_TRUNC	<u>AGTGATGTGTTGGATC</u>
pBAD_REV	<u>CTGCGCACGGGCTTTTC</u>

¹ Kodes vir Tabel 4-11

4.2.16 Optimalisering van die polimerasie ketting reaksies (PKRs)

Die optimalisering van die PKRs is uitgevoer met die volgende metode.

Ses ontwerpte voorvoerder pare is in die begin van die optimalisering gekies om te toets of die ontwerpte voorvoeders suksesvol gebruik kan word in PKRs om die templaar DNS te amplifiseer. Hierdie PKRs is uitgevoer met 'n hittegradiënt van hul hibridiserings temperatuur om in die begin van die optimalisering 'n idee te verkry by watter hibridiserings temperatuur die voorvoeders suksesvol aan die templaar DNS sal bind.

Twee van hierdie voorvoerder pare is daarna gekies om verder die PKR te optimaliseer. Dit was duidelik vanuit die eerste toets dat die PKRs werk, maar dat hul nog nie optimaal is nie en daarom is foutopsporing uitgevoer. Drie aspekte is geïdentifiseer om te verbeter:

- Die hoeveelheid siklusse. As onspesifieke amplifisering in 'n klein hoeveelheid plaasvind kan die vermindering in siklusse die hoeveelheid onspesifieke amplifisering verminder.
- Die vermindering van die verlengtyd van die PKRs. Indien 'n oormaat verlengtyd gebruik word kan dit daartoe lei dat die polimerase nadat die korrekte amplifisering plaasgevind het, tyd het om verkeerde DNS volgordes te amplifiseer.
- Die hibridiseringstemperatuur van die PKRs. Indien die hibridiseringstemperatuur nie by die hoogste optimale temperatuur is vir templaar binding nie, is dit moontlik vir die

¹

Kode voorbeeld	Betekenis
<u>AGTGATGTGTTGGATC</u> (onderstreep)	Bind aan templaar DNS
TAGT	Spasieerder nukleotiedes
GTCGAC	<i>Sall</i> snydingsplek
CATATG	<i>NdeI</i> snydingsplek
CTTAAG	<i>AflII</i> snydingsplek
GCATGC	<i>PaeI</i> (SphI) snydingsplek
GGATCC	<i>BamHI</i> snydingsplek
ATG	Begin kodon
CATCACCATCACCATCAC	6X-histidien suiweringsetiket

voorvoeders om by onspesifieke en verkeerde DNS volgordes bind en daardeur onspesifieke amplifisering veroorsaak.

Die PKRs het verbeter met hierdie veranderinge, maar daar was steeds onspesifieke bande en smere. Die twee voorvoerder pare is dus weer gebruik en vier aspekte is geïdentifiseer om te verbeter:

- Die optimale hoeveelheid templaats DNS is getoets. Die PKR ensieme se handleidings gee 'n optimale templaats konsentrasie reeks wat ideaal is vir die ensiem mengsels. Drie van die konsentrasie punte is in die reeks gekies om te toets.
- Die verlengtyd is verder verminder.
- 'n Verdere hitte gradiënt van die hibridiseringstemperatuur van die PKRs is uitgevoer.
- Die denatureer tyd is verminder. Die denatureer tyd moet volgens die PKR ensieme se handleidings so kort as moontlik gehou word.

Hierdie verbetering het gelei tot optimalisering van die PKRs. Twee voorvoerder pare se PKR reaksies is tot op 'n fyner en hoër hitte gradiënt van die hibridiseringstemperatuur geoptimaliseer en dien as voorbeeld van hoe die res van die voorvoerder pare se PKRs se hibridiseringstemperatuur geoptimaliseer is.

Dieselfde protokol is gevolg om alle PKR reaksie te optimaliseer.

Twee verskillende tipes polimerases is gebruik om polimerase ketting reaksies mee uit te voer naamlik die Platinum SuperFi Groen PKR meester mengsel (Invitrogen, Carlsbad, VSA) en die Phusion hoë getrouheid PKR meester mengsel (Thermo Fisher Scientific, Madison, VSA). Dieselfde kwaliteit resultate is met beide bereik en die PKR metodes wat gebruik is, was deurgaans dieselfde met beide polimerase. Die T100 termiese siklusseerder (Bio-Rad, California, VSA) is vir die PKR siklussering gebruik.

4.2.16.1 Die eerste PKR optimalisering stap: ses gekose voorvoerder pare se PKRs is getoets met 'n hitte gradiënt van die hibridiseringstemperatuur.

Ses ontwerpte voorvoerder pare is gekies om te toets of die ontwerpte voorvoeders suksesvol gebruik kan word in PKRs om die templaats DNS te amplifiseer. Die ses gekose voorvoerder pare en die ooreenstemmende templaats DNS wat gebruik is, word weergegee in Tabel 4-12.

Die ThermoFisher hibridiseringstemperatuur berekening sagteware (<https://www.thermofisher.com/za/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html?CID=fl-we120377>) is gebruik om die optimale hibridiseringstemperatuur van die ses ontwerpte voorvoerder pare te voorspel en dit word ook weer gegee in Tabel 4-12.

Tabel 4-12: Ses ontwerpte voorvoerder pare, die ooreenstemmende templaats DNS, gewenste inlasstuk lengte en voorspelde hibridiseringstemperatuur.

Voorvoerder paar nommer	Vorentoe voorvoerder	Terugwaartse voorvoerder	Templaats DNS	Gewenste bp lengte van inlasstuk	Hibridiseringstemperatuur wat ThermoFisher voorspel
1	pc+-Fwd	Rev_stop_SalI	pET32a(+)/AKSM2A	1922	62.2
2	Trunc_BamHI	Rev_stop_SalI	pET32a(+)/AKSM2A	1614	53.1
3	Trunc_BamHI	pc+-Rev	pET32a(+)/AKSM2A	1671	53.1
4	Trunc_BamHI	pc+-Rev	pET32a(+)/AKSM2B	1677	53.1
5	FLAG-Fwd-Trunc	FLAG- Rev	pET32a(+)/AKSM2A	1611	53.1
6	FLAG-Fwd-Trunc	FLAG- Rev	pET32a(+)/AKSM2B	1611	53.1

Die voorvoerder pare sal van hieraf slegs na verwys word met die voorvoerder paar nommers in Tabel 4-12.

Die standaard PCR reaksie is opgestel soos deur die Platinum SuperFi handleiding voorgeskryf word: 25 µl reaksies is gemaak wat uit die Platinum SuperFi polimerase (1X), voorwaartse voorvoeders (0.5 µM), terugwaartse voorvoeders (0.5 µM) en templaats DNS (5 ng van pET32a(+)/AKSM2A of pET32a(+)/AKSM2B) bestaan en is opgevul met molekulebiologiegraad water. Negatiewe kontrole reaksies is opgemaak net soos die reaksies, maar sonder die templaats DNS. Die PCR siklussering is uitgevoer volgens die verskaffer se handleiding soos in Tabel 4-13

Tabel 4-13: PKR siklussering toestande.

Siklussering stap		Temperatuur (°C)	Tyd (sekondes)
Eerste denaturering		98	30
35 siklusse	Denaturering	98	10
	Hibridiseer	Sien Tabel 4-14	10
	Verleng	72	60
Finale verlenging		72	300
Konstant hou		4	hou

Om die hibridiseringstemperatuur te identifiseer waar die voorvoeders sal bind is 'n hitte gradiënt van die hibridiseringstemperatuur opgestel en uitgevoer. Die hitte gradiënt is opgestel om rondom die ideale hibridiseringstemperatuur, wat deur ThermoFisher se sagteware voorspel is, te wees. Vyf temperature is gebruik: ongeveer die temperatuur wat ThermoFisher voorspel het, ~5°C onder en bo die temperatuur en ~3°C onder en bo die temperatuur soos aangedui in Tabel 4-14.

Tabel 4-14: Hibridiseer temperatuur hitte gradiënt wat in eerste optimalisering gebruik is.

Hibridiseer temperatuur verduideliking	Hibridiseer temperature (°C) in voorvoerder paar 1 se PKR	Hibridiseer temperature (°C) in voorvoerder pare 2-6 se PKRs
~5°C onder voorspelling	57.3	47.6
~3°C onder voorspelling	59.7	50.1
~ThermoFisher voorspelling	62.6	53.4
~3°C bo voorspelling	65	55.4
~5°C bo voorspelling	67.6	58.1

5 µl van die voltooide PKR reaksies is op 'n 1% agarose jel gelaai en agarose jel elektroforese is uitgevoer soos in afdeling 4.2.6.

4.2.16.2 Die tweede PKR optimalisering stap: Voorvoerder pare se PKRs is verder geoptimaliseer deur die PKR se siklusse te verminder, die verlengtyd te verminder en 'n verdere hitte gradiënt uit te voer.

Voorvoerder pare 2 en 4 in Tabel 4-12 is gekies om verdere PKR optimalisering op te toets deur die PKRs se siklusse te verminder, die verlengtyd te verminder en 'n verdere hitte gradiënt uit te

voer. Die reaksies is opgestel en voorberei soos in afdeling 4.2.16.1 met die volgende aanpassings vir optimalisering:

In 'n poging om ontslae te raak van agtergrond en die onspesifieke hoë molekulêre gewig bande is die hoeveelheid siklusse na 25 verminder, die verlengtyd is verminder na 30 sekondes en 'n verdere hitte gradiënt soos in Tabel 4-15 is uitgevoer.

Tabel 4-15: Hibridiseer temperatuur hitte gradiënt wat in die tweede stap van PCR optimalisering gebruik is saam met voorvoerder pare 2 en 4.

Hibridiseer temperature (°C) in voorvoerder pare 2 en 4 se PKRs
58.1
60.2
62.8
65.7
68.1

5 µl van die voltooide PCR reaksies is op 'n 1% agarose jel gelaai en agarose jel elektroforese is uitgevoer soos in afdeling 4.2.6.

4.2.16.3 Die derde PCR optimalisering stap: Voorvoerder pare se PKRs is nog verder geoptimaliseer deur die PCR se verlengtyd nog meer te verminder en strenger uit te werk, die denaturering tyd is verminder, die optimale hoeveelheid templaats DNS is bepaal en 'n verdere hitte gradiënt is uitgevoer.

Voorvoerder pare 2 en 4 (sien Tabel 4-12) is verder geoptimaliseer deur 'n nog hoër hibridiserings hitte gradiënt uit te voer. Die minimum, 5 sekondes, denaturering tyd is in plaas van die maksimum, 10 sekondes, gebruik.

Die verlengtyd wat volgens die Platinum SuperFi polimerase handleiding tussen 15-30 sekondes per kilobasispare is, is in 'n wiskundige formule omgeskakel om die verlengtyd van elke inlasstuk wat geproduseer moet word presies uit te werk volgens sy bp lengte soos in

Vergelyking 4-1.

Die minimum, 15 sekondes, is gebruik en desimale getalle is op gerond, omdat die termiese siklusseerder nie in desimale sekondes geprogrammeer kan word nie. Dit is gedoen om die agtergrond nog verder te verminder en ook die eksperimentele tydsduur te optimaliseer.

Vergelyking 4-1: Verlengtyd

$$\text{Verlengtyd sekondes} = \frac{15 \text{ sekondes}}{1000 \text{ bp}} \times \text{Inlasstuk bp}$$

Die verdere hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt is uitgevoer soos in Tabel 4-16.

Tabel 4-16: Hibridiseer temperatuur hitte gradiënt wat in die derde stap van PKR optimalisering gebruik is saam met voorvoerder pare 2 en 4.

Hibridiseer temperatuur (°C) in voorvoerder pare 2 en 4 se PKRs
68.1
70
72

Saam met hierdie hitte gradiënt is 'n toets uitgevoer om die optimale hoeveelheid templaats DNS in die PKRs te plaas. Om dit te doen is drie PKR reaksies saam met voorvoerder paar 2 opgemaak (soos in afdeling 4.2.16.1) en al drie reaksies se hibridiseringstemperatuur was 68.1°C. Al verskil in die reaksies was dat elkeen onderskeidelik 1 ng, 5 ng en 10 ng templaats DNS bevat het.

Na aanleiding van die tweede PKR optimalisering stap (4.2.16.2) en die verkorte denaturering tyd en uitgewerkte verlengtyd is die nuwe siklussering uitgevoer soos in Tabel 4-17.

Tabel 4-17: Die derde PKR optimalisering stap se siklussering van PKRs met voorvoerder pare 2 en 4.

Siklussering stap	Temperatuur (°C)	Tyd (sekondes)
Eerste denaturering	98	30
25 siklusse	Denaturering	98
	Hibridiseer	Sien Tabel 4-16. Tabel 4-16

Siklussering stap		Temperatuur (°C)	Tyd (sekondes)
	Verleng	72	25 vir voorvoerder paar 2 26 vir voorvoerder paar 4
Finale verlenging		72	300
Konstant hou		4	hou

5 µl van die voltooiëde PCR reaksies is op 'n 1% agarose jel gelaai en agarose jel elektroforese is uitgevoer soos in afdeling 4.2.6.

4.2.17 Hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt van PKRs met voorvoerder pare 2 en 4 met die geoptimaliseerde PCR metodes as voorbeeld vir alle voorvoerder pare.

Die PCR optimalisering (4.2.16) het aangedui wat die optimale PCR toestand is. Hierdie toestand is gebruik om alle PKRs mee uit te voer, maar elke voorvoerder paar se optimale hibridiseringstemperatuur moet steeds bepaal word om so die optimale PKRs vir die voorvoeders te ontwikkel. Voorvoerder pare 2 en 4 (sien Tabel 4-12) se finale hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt word as voorbeeld gegee van hoe al die voorvoerder pare se hibridiseringstemperatuur bepaal is.

Die PCR reaksie is saamgestel soos in afdeling 4.2.16.1, maar met slegs 1 ng templaats DNS. Die siklussering is uitgevoer soos in Tabel 4-17, maar elke voorvoerder paar se verlengtyd is bepaal met Vergelyking 4-1. Die hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt is uitgevoer soos in Tabel 4-18.

Tabel 4-18: Finale hitte gradiënt vir PKRs met voorvoerder pare 2 en 4.

Hibridiseer temperatuur (°C) in voorvoerder paar 2 se PCR	Hibridiseer temperatuur (°C) in voorvoerder paar 4 se PCR
70	68.1
71	69

4.2.18 Ontwerpte voorvoerder pare se geoptimaliseerde PKRs

Alle PKRs was saamgestel soos in 4.2.16.1, maar met slegs 1 ng templaats DNS. Die siklussering is uitgevoer soos in Tabel 4-19. Elke voorvoerder paar se verlengtyd is uitgewerk met Vergelyking 4-1 en die optimale hibridiseer temperatuur is bepaal soos in afdeling 4.2.17. Al die voorvoerder pare, templaats DNS, optimale hibridiseer temperatuur en verlengtyd word weergegee in Tabel 4-20.

Tabel 4-19: Siklussering gebruik in alle PKRs.

Siklussering stap		Temperatuur (°C)	Tyd (sekondes)
Eerste denaturering		98	30
25 siklusse	Denaturering	98	5
	Hibridiseer	Sien Tabel 4-20	10
	Verleng	72	Sien Tabel 4-20
Finale verlenging		72	300
Konstant hou		4	hou

Tabel 4-20: Voorvoerder pare se PKR verlengtyd en hibridiseer temperatuur.

Voorvoerder paar nommer	Vorentoe voorvoerder	Terugwaartse voorvoerder	Templaat DNS: pET32a(+)/AKSM2A (A) of pET32a(+)/AKSM2B (B)	Optimale hibridiseer temperatuur (°C)	Optimale verlengtyd
1	pc+-Fwd	Rev_stop_Sall	A	72	27
2	Trunc_BamHI	Rev_stop_Sall	A	71	25
3	Trunc_BamHI	pc+-Rev	A	68.1	26
4	Trunc_BamHI	pc+-Rev	B	68.1	26
5	FLAG-Fwd-Trunc	FLAG- Rev	A	72	24
6	FLAG-Fwd-Trunc	FLAG- Rev	B	72	24
7	pc+-Fwd	Rev_stop_Sall	B	72	27
8	FLAG-Fwd	FLAG- Rev	A	72	26
9	FLAG-Fwd	FLAG- Rev	B	72	26
10	Fwd_AfII_6HIS	pc+-Rev	A	71	27
11	Trunc_AfII_6HIS	pc+-Rev	A	66	25
12	Fwd_AfII_6HIS	pc+-Rev	B	71	27
13	Trunc_AfII_6HIS	pc+-Rev	B	66	25
14	Trunc_BamHI	Rev_stop_Sall	B	71	25

4.2.19 Agarose jel ekstraksie

Agarose jel ekstraksie is gebruik om DNS vanuit agarosejelle te isoleer nadat agarose jel elektroforese uitgevoer is. Dit is gebruik om inlasstukke te isoleer en te suiwer nadat PCR reaksies uitgevoer is of nadat hul vanuit plasmiede met restriksie ensieme gesny is. Dit is ook gebruik om plasmiede te isoleer nadat hul restriksie ensiem snyding ondergaan het.

Die jel ekstraksie is uitgevoer met die NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up stel buffers en kolomme (Macherey-Nagel, Düren, Duitsland) volgens die vervaardiger se handleiding. Nadat agarose jel elektroforese uitgevoer is en voordat die agarose jel gevisualiseer en afgeneem is, is die agarose jel op die Dark Reader transilluminator apparaat (Clare Chemical Research, Dolores, VSA) geplaas. Hierdie apparaat gebruik langer golflengtes (tussen 400-500 nm) om die DNS te visualiseer en nie ultraviolet lig nie. Dit beskerm die DNS vir verdere gebruik.

'n Steriele lem is gebruik om 'n DNS band vanuit die agarose jel te sny. Die jel band is in 'n mikrosentrifuge buis geplaas en geweeg. 2 µl buffer NTI is per mg van die jel band by die buis gevoeg. Die agarose jel band is opgelos deur dit by 50°C te inkubeer en gedurig te vorteks vir 5-10 minute. Die oplossing is oorgedra na 'n spin kolom en gesentrifugeer (11 000 x g, 30 sekondes, kamer temperatuur) om die oplossing deur die silika membraan te forseer. Die DNS bind aan die silika membraan in die teenwoordigheid van choatropiese soute. Die silika membraan is twee keer gewas deur 700 µl buffer NT3 by te voeg en te sentrifugeer (11 000 x g, 30 sekondes, kamer temperatuur). Die membraan is gedroog deur vir een minuut te sentrifugeer (11 000 x g, kamer temperatuur) en die spin kolom vir vyf minute in 'n hitte blok te sit by 70°C om die laaste buffers en etanol te laat verdamp. Alle deurvloei na die oorspronklik laai, was en droog stappe is weg gegooi. Die DNS is geëlueer in 'n 2 ml DNS lae binding buis deur twee keer 15 µl molekulêrebiologie-graad water op die membraan te laai, die buis vir vyf minute by 70°C te inkubeer en te sentrifugeer (11 000 x g, 60 sekondes, kamer temperatuur).

4.2.20 PCR produk/inlasstuk skoonmaak

Die PCR produkte is skoon gemaak na die restriksie ensiem snyding van inlasstukke om die inlasstukke te suiwer vanuit die restriksie ensiem snyding buffers en om ontslae te raak van die DNS eindpunte wat vanaf die inlasstukke afgesny is tydens restriksie ensiem snyding.

Die PCR produkte is skoon gemaak met die die NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up stel buffers en kolomme (Macherey-Nagel, Düren, Duitsland) volgens die vervaardiger se handleiding. Kortliks is 2 volumes van die buffer NTI by 1 volume van restriksie ensiem snyding buffer of PCR reaksie mengsel gevoeg en is die laai, was, droog en elueer stappe van die spin kolomme uitgevoer presies soos in afdeling 4.2.8 agarose jel ekstraksie.

4.2.21 Defosforilase van DNS 5' punte

5' Defosforilase van lineêre plasmiede is uitgevoer om te verhoed dat die plasmiede weer aan hulself kan ligger en om te verseker dat slegs inlasstukke wat 5' fosfaat groepe besit, na restriksie ensiem snyding, aan lineêre plasmiede sal kan ligger.

5' Defosforilase is uitgevoer met garnaal alkaliese fosfatase (GAF) (New England Biolabs, Ipswich, VSA) volgens die verskaffer se handleiding. Die reaksie is saamgestel soos in Tabel 4-21.

Tabel 4-21: Defosforilase reaksie samestelling

Reagens	Hoeveelheid
DNS	1 pmol DNS punte
CutSmart buffer (10X)	2 µl
GAF	1 µl
Molekulêrebiologie-graad water	Tot 20 µl

Die hoeveelheid pmol DNS punte is bereken met Vergelyking 4-2.

Vergelyking 4-2: DNS massa na pmol DNS punte

$$\text{Mol DNS punte (pmol)} = \frac{\text{Massa van plasmied (g)}}{\left(\left(\text{lengte van DNS (bp)} \times 617.96 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) + 36.04 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)} \times 2$$

- 617.96 g/mol = die gemiddelde molekulêre massa van 'n basispaar
- 36.04 g/mol = die gewig van die -OH en -H aand die eindpunte van die DNS

Die saamgestelde reaksie is by 37°C vir 30 minute geïnkubeer. Die GAF ensiem is gedeaktiveer deur dit te inkubeer by 65°C vir vyf minute. Na die hitte deaktivering is die lineêre gedefosforileerde plasmied direk in die ligeringsreaksies bygevoeg.

4.2.22 DNS Ligerings

Ligerings is uitgevoer om inlasstukke in lineêre plasmiede in te voeg. Twee verskillende DNS ligerings sisteme is gebruik, naamlik die vinnige DNS ligerings pakket (Thermo Fisher Scientific, Madison, VSA) en die T4 DNS ligase pakket (New England Biolabs, Ipswich, VSA).

Die twee verskillende ligeringsreaksies is op ys opgestel soos in Tabel 4-22.

Tabel 4-22: Ligeringsreaksies samestellings.

Komponent	Vinnige DNS ligering stel	T4 DNS ligase
Gelineariseerde plasmied DNS	10-100 ng	50 ng
Inlasstuk	3:1 molêre oormaat teenoor plasmied	3:1 molêre oormaat teenoor plasmied
Buffer	4 µl van die 5X Vinnige ligeringsbuffer	2 µl van die 10X reaksie buffer
Ligase	1 µl	1 µl
Molekulêrebiologie-graad water	Tot 20 µl	Tot 20 µl

Die 3:1 inlasstuk molêre oormaat is bepaal deur van Vergelyking 4-3 gebruik te maak.

Vergelyking 4-3: Inlasstuk molêre oormaat bepaling.

$$\text{Inlasstuk massa (ng)} = \left(\frac{\text{Plasmied massa (ng)} \times \text{Kb lengte van inlasstuk}}{\text{Kb lengte van plasmied}} \right) \times 3$$

Die vinnige DNS ligering pakket se metode is uitgevoer volgens die verskaffer se handleiding:

Die vinnige DNS ligering pakket se reaksie samestelling is gemeng deur dit te vorteks en die druppels is af gespin deur dit vinnig te mikrosentrifugeer. Die reaksies is by 22°C vir vyf minute geïnkubeer. Die reaksies is op ys geplaas en 5 µl van die reaksie mengsel is gebruik vir transformasies.

Die T4 DNS ligase se metode is uitgevoer volgens die verskaffer se handleiding.

Die T4 DNS ligase se reaksie samestelling is gemeng deur dit op en af te pipetteer en die druppels is af gespin deur dit vinnig te mikrosentrifugeer. Die reaksie samestelling is dan geïnkubeer. Die inkubasie tyd vir oorvleuelende eindpunte was 16°C oornag of vir tien minute by kamertemperatuur (22.5°C). Die inkubasie tyd vir stomp eindpunte was 16°C oornag of vir twee ure by kamertemperatuur (22.5°C). Na die inkubasie tyd is die ensiem by 65°C vir tien minute geïnkubeer om dit te deaktiveer. Die reaksie buis is dan afgekoel deur dit op ys te sit en 5 µl van die reaksie mengsel is gebruik vir transformasies.

4.2.23 Kolonie PKR

Kolonie PKR is uitgevoer om korrek gekloneerde plasmiede binne in bakteriële kolonies na transformasie te identifiseer. Beide die Platinum SuperFi Groen PKR meester mengsel (Invitrogen, Carlsbad, VSA) en die Phusion hoë getrouheid PKR meester mengsel (Thermo Fisher Scientific, Madison, VSA) is gebruik vir kolonie PKR.

Die PKR reaksie is opgestel soos wat deur die Platinum SuperFi handleiding voorgeskryf word:

Vir die Platinum SuperFi polimerase is 20 µl reaksies gemaak wat die Platinum SuperFi polimerase (1X), voorwaartse voorvoeders (0.5 µM) en terugwaartse voorvoeders (0.5 µM) bevat en met molekulêrebiologie-graad water opgevul is. Enkele kolonies is dan met die punt van 'n 10-100 µl pipet punt opgepik, 'n meesterplaat is uitgestreep en in die 20 µl reaksies gedoop.

Vir die Phusion hoë getrouheid polimerase is die reaksies presies soos die Platinum SuperFi reaksie opgemaak, maar die kolonies wat opgepik is, is op 'n meesterplaat uitgestreep en in 20 µl molekulêrebiologie-graad water opgelos, gevorteks en 1 µl van hierdie oplossing is by die 20 µl PKR reaksie gevoeg.

Negatiewe kontrole reaksies is opgemaak vir elke voorvoerder paar, net soos die normale reaksies, maar sonder 'n kolonie. Positiewe kontrole reaksies is opgemaak vir elke voorvoerder paar. Die positiewe kontrole mengsel kry 1 ng pET32a(+)/AKSM2A of pET32a(+)/AKSM2B by en nie 'n kolonie nie.

Die PKR siklussering is uitgevoer soos in Tabel 4-23. Elke PKR voorvoerder paar se unieke hibridiseer temperatuur en verlengtyd is gebruik.

Tabel 4-23: Kolonie PKR siklussering.

Siklussering stap		Temperatuur (°C)	Tyd (sekondes)
Eerste denaturering		98	300
30 siklusse	Denaturering	98	5
	Hibridiseer	Spesifiek tot PKR reaksie	10
	Verleng	72	Spesifiek tot PKR reaksie
Finale verlenging		72	300
Konstant hou		4	hou

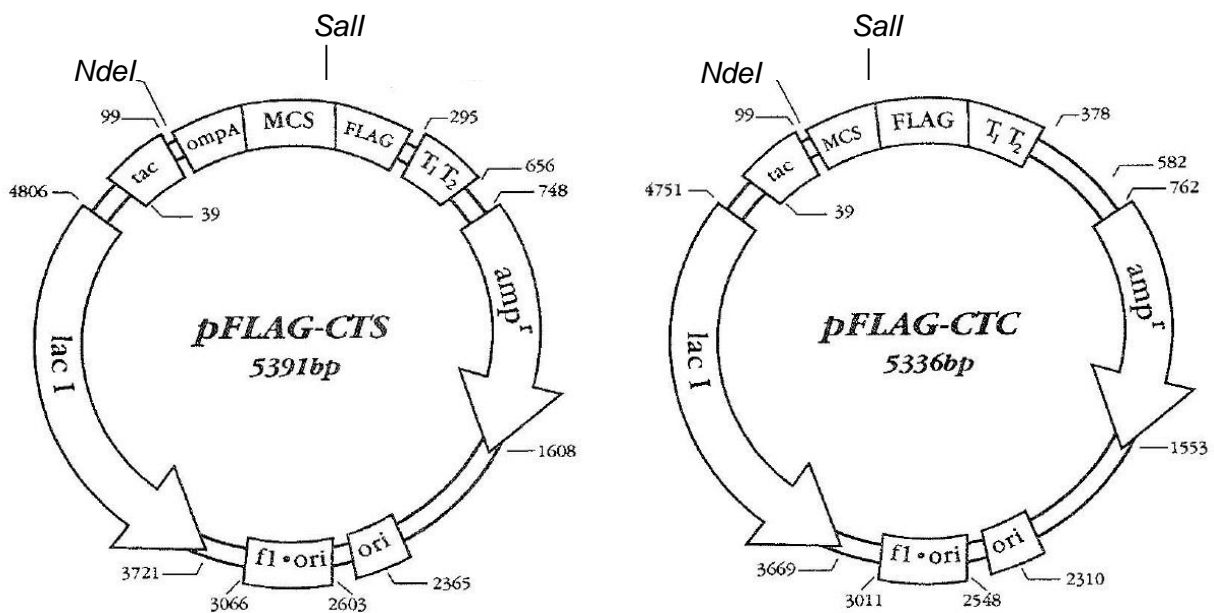
15 µl van die PKR reaksie is op 'n 1% agarose jel gelaai en agarose jel elektroforese is uitgevoer.

4.2.24 Rekombinante konstrunkte

4.2.24.1 pFLAG metode: Tradisionele restriksie ensiem klonering van inlasstukke in pFLAG-CTC plasmied.

Die inlasstukke is met tradisionele klonering in die pFLAG-CTC plasmied in gekloneer.

Van Horn et al. (2005) het die pFLAG-CTC plasmied gebruik vir die uitdrukking van aktiewe rot lang ketting asiel-KoA-sintetase isovorme 3 en 6. Die pFLAG-CTC plasmied is nie beskikbaar om aan te koop nie, maar die pFLAG-CTS plasmied is. Figuur 4-4 toon aan dat die enigste verskil tussen hierdie twee plasmiede 'n *ompA* volgorde is wat voor die veelvuldige kloneringsgebied in die pFLAG-CTS plasmied voorkom. Die *ompA* volgorde is 'n sein molekule wat sekresie in die periplasma veroorsaak. Dit kom nie voor in die pFLAG-CTC plasmied nie. Die pFLAG-CTS plasmied is aangekoop en hierdie *ompA* volgorde is verwyder deur van die *NdeI* en *SalI* restriksie ensieme gebruik te maak om die pFLAG-CTC plasmied te vorm



Figuur 4-4: pFLAG-CTS en pFLAG-CTC plasmied voorstellings wat die *NdeI* en *SalI* restriksie ensiem sny plekke aandui.

Die kloneringstrategie wat in die metode gebruik is, is soos volg:

Voorvoerder pare 5, 6, 8 en 9 se PKRs (sien Tabel 4-20, afdeling 4.2.18) is gebruik om *NdeI* en *SalI* restriksie ensiem sny plekke aan *AKSM2A* en *AKSM2B* se 5' en 3' punte onderskeidelik te heg en om hul verkorte weergawes *AKSM2A-t* en *AKSM2B-t* te vorm. Hierdie PKR reaksies is

ook ontwerp om die gene se natuurlike stop kodon te verwyder aangesien die pFLAG-CTC plasmied 'n flag etiket het vir suiwing aan die 3' punt. Die geproduseerde inlasstukke is deur jel ekstraksie geïsoleer (4.2.19), hul konsentrasies is bepaal (4.2.5) en 'n bevestigende agarose jel elektroforese (4.2.6) is uitgevoer.

NdeI en *SaI* restriksie ensiem snyding (4.2.9) is op die inlasstukke uitgevoer en die PCR produk/inlasstuk skoonmaak metode (4.2.20) is gebruik om die gesnyde inlasstukke te suiwer. Die gesnyde inlasstukke se konsentrasie is bepaal (4.2.5) en agarose jel elektroforese is uitgevoer ter bevestiging van die inlasstuk grotes.

Die pFLAG-CTS plasmied is met *NdeI* en *SaI* gesny (4.2.9), agarose jel ekstraksie (4.2.19) is uitgevoer en die konsentrasie van die gesnyde plasmied is bepaal (4.2.5). Die pFLAG-CTS plasmied is ook gelineariseer met *HindIII* (4.2.9) en geïsoleer deur die PCR produk/inlasstuk skoonmaak metode (4.2.20). Hierdie lineêre vorm is gebruik as 'n kontrole tydens DNS ligering en transformering in kompetente DH5 α *E. coli*.

DNS ligering is uitgevoer (4.2.22) en die konstrakte is in kompetente DH5 α *E. coli* getransformeer (4.2.13).

Gliserol voorrade van 6 kolonies van elkeen van die konstrakte is gemaak (4.2.7) (behalwe pFLAG-CTC/AKSM2B-t, omdat die plaat nie groei getoon het nie) en die plasmiede is op 'n klein skaal geïsoleer (4.2.8). Restriksie ensiem snyding met *NdeI* en *SaI* (4.2.9) is uitgevoer asook restriksie ensiem snyding met slegs *NcoI* (4.2.9) om te bevestig of die inlasstukke suksesvol in die pFLAG-CTS plasmiede in gekloneer is. Suksesvolle kolonies is gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14).

Die pFLAG-CTC/AKSM2B-t konstrak se klonering is weer aangepak, omdat die eerste klonering nie gewerk het nie. Voorvoerder paar 6 se PCR reaksie is uitgevoer (4.2.18). Die voorbereiding van die inlasstuk en die pFLAG-CTC plasmied is presies uitgevoer soos in afdeling 4.2.24.1. Die dubbeld gesnyde plasmied se 5' fosfate is gedefosforileer (4.2.21) en die plasmied en inlasstuk is geligeer en getransformeer in DH5 α *E. coli* (4.2.13).

Ses kolonies is opgegroeï, gliserol voorrade van gemaak (4.2.7), op 'n kleinskaal geïsoleer (4.2.8) en met *NdeI* en *SaI* restriksie ensieme behandel (4.2.9) om te bevestig dat die inlasstuk reg gekloneer is. Suksesvolle kolonies is gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14).

Die pFLAG-CTC plasmied en die vier gekloneerde en bevestigde plasmiede is in hul ekspressie gasheer, BL21(DE3)RIL *E. coli* getransformeer (4.2.13) en gliserol voorrade is voorberei.

4.2.24.2 pET28-metode: Tradisionele restriksie ensiem klonering van inlasstukke in pET28a(+) plasmied.

Die pET28a(+) plasmied se konstrakte is ook met tradisionele restriksie ensiem klonering gekloneer. Die kloneringstrategie wat gevolg was is soos volg:

Die pET28a(+) plasmied (Merck, Billerica, VSA) (sien bylaag B) besit die *Bam*HI, *Not*I en *Hind*III restriksie ensiem volgordes wat voorheen gebruik is om die *AKSM2A* en *AKSM2B* gene in die pET32a(+) plasmied in te kloneer. Die pET28a(+) plasmied is met hierdie restriksie ensieme, *Bam*HI en *Not*I vir *AKSM2A* en *Bam*HI en *Hind*III vir *AKSM2B*, behandel (4.2.9). Die *AKSM2A* en *AKSM2B* gene is ook vanuit die pET32a(+) plasmied met hierdie restriksie ensiem pare gesny (4.2.9). Agarose jel ekstraksie (4.2.19) van beide die restriksie ensiem gesnyde plasmied en inlasstukke is uitgevoer.

Die *AKSM2A-t* en *AKSM2B-t* geen weergawes is geproduseer deur middel van voorvoerder pare 3 en 4 se PKRs (4.2.18). Hierdie PKRs verkort die *AKSM2A* en *AKSM2B* gene, heg die restriksie ensiem sny plek *Bam*HI aan die 5' punt en behou die onderskeie restriksie ensiem sny plekke aan die 3' punte van die DNS (*Not*I vir *AKSM2A-t* en *Hind*III vir *AKSM2B-t*). Die PKR produkte is geïsoleer deur agarose jel ekstraksie (4.2.19), met die ooreenstemmende restriksie ensiem gesny (4.2.9) en weer geïsoleer met die PKR produk/inlasstuk skoonmaak metode (4.2.20).

Die pET28a(+) plasmied het 'n 6X-histidien etiket aan die 5' punt van die veelvuldige kloneringsgebied wat gebruik kan word vir suiwering en daarom is die natuurlike stop kodon aan die 3' punt van die *AKSM2*-gene behou tydens restriksie ensiem snydinge en PKRs.

Die vier inlasstukke is aan die pET28a(+) plasmied geligeer (4.2.22) en getransformeer in NEB 5-alpha *E. coli* (4.2.13). Om suksesvol gekloneerde kolonies te identifiseer is kolonie PKR uitgevoer (4.2.23) met die *Trunc_Bam*HI en *Rev_stop_Sal*I voorvoeders, omdat hulle spesifiek is vir al vier konstrakte.

Suksesvolle kolonies is opgegroeï en gliserol voorrade van gemaak (4.2.7). Die plasmiede is op 'n klein skaal geïsoleer (4.2.8) en gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14).

Suksesvol gekloneerde plasmiede is in NEB BL21(DE3) *E. coli* getransformeer (4.2.13).

4.2.24.3 PKR klonering metode wat gebruik is om inlasstukke in die pQE-30 en pcDNA3.1(+) plasmied te kloneer.

Die NEB PKR klonering pakket (New England Biolabs, Ipswich, VSA) is gebruik om die pQE-30 en pcDNA sisteme te kloneer volgens die verskaffer se handleiding.

Die pakket maak gebruik van 'n lineêre plasmied (pMiniT 2.0) en ligeringsmengsel wat geoptimaliseer is vir stomp punt ligering. Die pMiniT 2.0 plasmied besit 'n toksiese mini-geen. As die plasmied self ligering ondergaan, veroorsaak die plasmied dat die mini-geen oormatig geproduseer word en so die *E. coli* se sellulêre prosesse oorneem. Dit veroorsaak dat die *E. coli* sterf. Die plasmied moet dus 'n inlasstuk verkry om die toksiese mini-geen te verbreek. Die produksie van die inlasstuk se veel groter proteïen vind dan teen 'n stadiger pas plaas en wat die *E. coli* kan verdra. Dit verminder vals positiewe agtergrond kolonies na transformasie.

Die inlasstukke is geproduseer deur PKRs (4.2.18) en agarose jel ekstraksie (4.2.19) is gebruik om die inlasstukke te isoleer. Die konsentrasies is bepaal (4.2.5) en 'n bevestigende agarose jel elektroforese van die inlasstukke is uitgevoer (4.2.6). Die ligeringsreaksies is saamgestel soos in Tabel 4-24.

Tabel 4-24: PKR klonering ligeringsreaksie

Reagens	Hoeveelheid
Lineêre pMiniT 2.0 vektor (25 ng/μl)	1 μl (25 ng)
Inlasstuk	1-4 μl (3:1 molêre oormaat bereken soos in afdeling 4.2.22)
Molekulêrebiologie-graad water	Tot 5 μl
Kloon mengsel 1	4 μl
Kloon mengsel 2	1 μl
Totale volume	10 μl

'n Kloneringskontrole word saam met die reagens stel gegee by 15 ng/μl en 2 μl daarvan is in die bogenoemde ligeringsreaksie gebruik om as positiewe kontrole te dien. Die eerste drie reagense is eerste saamgevoeg, dan is die kloon mengsels 1 en 2 apart gemeng en saam by die reaksie bygevoeg. Dit is so gedoen sodat die vektor nie alleen in kontak is met die ligase voordat die inlasstuk bygevoeg is nie. Die ligeringsreaksie is by 25°C vir vyf minute geïnkubeer en daarna vir 2 minute op ys geplaas. Die ligerings is dan getransformeer in NEB 10-beta kompetente *E. coli* (4.2.13)

Kolonies wat suksesvol geligeerde en getransformeerde plasmiede besit is geïdentifiseer deur kolonie PKR (4.2.23) en dit is uitgevoer met die voorvoerders wat deur die pakket verskaf word, naamlik die klonering analise voorwaartse voorvoerder en die klonering analise terugwaartse voorvoerder. 'n Gliserol voorraad van elke suksesvolle kolonie is gemaak (4.2.7).

4.2.24.4 pQE-30-metode: PKR klonering van die inlasstukke in die pQE-30 plasmied.

Die kloneringstrategie wat gebruik is om die inlasstukke in die pQE-30 plasmied te kloner was soos volg:

Die pQE-30 plasmied (sien bylaag B) besit die *Bam*HI en *Sal*I restriksie ensiem sny plekke. Die vollengte *AKSM2A* en *AKSM2B* gene se *Bam*HI restriksie ensiem snyplek aan die 5' punt is behou deur van die pc+Fwd voorvoerder in voorvoerder pare 1 en 7 se PKRs gebruik te maak. Die *Bam*HI volgorde is aan hierdie gene se verkorte weergawes geheg deur van die *Trunc_Bam*HI voorvoerder gebruik te maak in voorvoerder pare 2 en 14 se PKRs. Die *Sal*I restriksie ensiem snyplek is aan al die gene se 3' punt geheg met die gebruik van die *Rev_stop_Sal*I voorvoerder in voorvoerder pare 1, 2, 7 en 14 se PKRs. Die pQE-30 plasmied besit 'n 6X-histidien etiket wat gebruik kan word vir suiwing aan die 5' punt van die veelvuldige kloneringsgebied en daarom is die natuurlike stop kodon in al hierdie gene behou.

Die vier inlasstukke is geproduseer met voorvoerder pare 1, 2, 3 en 7 se PKRs (4.2.18). Agarose jel ekstraksie (4.2.19) van die inlasstukke is uitgevoer en 'n bevestigende agarose jel elektroforese is uitgevoer (4.2.6).

PKR klonering in die pMiniT 2.0 plasmied is uitgevoer (4.2.24.3). Die suksesvolle gliserol voorrade wat deur die PKR klonering geproduseer is (4.2.24.3) se plasmiede en die pQE-30 plasmied is op 'n klein skaal geïsoleer (4.2.8) en met die *Bam*HI en *Sal*I restriksie ensieme behandel (4.2.9) om die inlasstukke vanaf die pMiniT 2.0 plasmied te verwyder en om die pQE-30 plasmied voor te berei vir ligering. Agarose jel ekstraksie (4.2.19) van al die inlasstukke en pQE-30 is uitgevoer. 5' defosforilase (4.2.21) is op die pQE-30 plasmied uitgevoer. Die inlasstukke en pQE-30 plasmied is geligeer (4.2.22) en getransformeer in kompetente M15[pREP4] *E. coli* (4.2.13).

M15[pREP4] *E. coli* is die ekspressie gasheer vir die pQE-30 plasmied en is ook die *E. coli* waarin die ligeringsreaksies van hierdie plasmied getransformeer moet word. Die pQE-30 plasmied besit 'n baie sterk T5 promotor wat onderdruk moet word voor ekspressie deur die *lac* onderdrukker proteïen kan plaasvind. As die proteïen wat uitgedruk word toksies is vir die *E. coli* en daar nie onderdrukking is deur die *lac* onderdrukker proteïen nie (of as daar klein hoeveelhede ekspressie plaasvind selfs in die teenwoordigheid van die *lac* onderdrukker proteïen), sal die uitdrukking van die proteïen selfs sonder induksie daartoe lei dat seleksie van deleisie mutante sal voorkom wat sal veroorsaak dat hierdie bakterieë vinniger sal groei as die bakterieë wat die korrekte plasmiede bevat. Dit is daarom dat transformasie in die M15[pREP4] *E. coli* plaasvind, omdat die pREP4 plasmied wat kanamisien weerstand bied, die *lac* onderdrukker proteïen produseer.

Nadat die transformasie uitgevoer is, is kolonie PKR uitgevoer (4.2.23) met die *Trunc_BamHI* en *Rev_stop_SalI* voorvoeders om suksesvolle kolonies te identifiseer. Drie suksesvolle kolonies van elke plasmied is opgegroeï en gliserol voorrade is gemaak (4.2.7). Die plasmiede is op 'n grootskaal geïsoleer (4.2.4) en gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14).

Al die plasmiede wat geïsoleer is, is met *HindIII* behandel (4.2.9) om te verseker dat die rekombinante vektor die korrekte basispaar lengtes het.

Sanger volgorde bepaling van hierdie konstrakte wat geïsoleer word vanuit die M15[pREP4] sellyn lewer baie slegte resultate omdat die pREP4 plasmied ook saam geïsoleer word en inmeng met die Sanger volgorde bepaling reaksie. Om die twee plasmiede te skei is die pQE-30/AKSM2A en pQE-30/AKSM2A-t plasmiede en die pREP4 plasmiede wat saam geïsoleer is, saam met *NcoI* behandel (4.2.9) om beide plasmiede te lineariseer. Die pQE-30 konstrakte is geïsoleer vanaf die pREP4 plasmiede na hierdie snyding met agarose jel ekstraksie (4.2.19). Die konstrakte is geligeer en getransformeer in JM109 *E. coli* (4.2.12), omdat hierdie *E. coli* ook natuurlik die *lac* onderdrukker proteïen produseer. Die plasmiede is op 'n kleinskaal geïsoleer (4.2.8) en gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14).

4.2.24.5 pcDNA-metode: PKR klonering van die inlasstukke in die pcDNA3.1(+) plasmied.

Die kloneringstrategie wat gebruik was om die pcDNA konstrakte te kloner was soos volg.

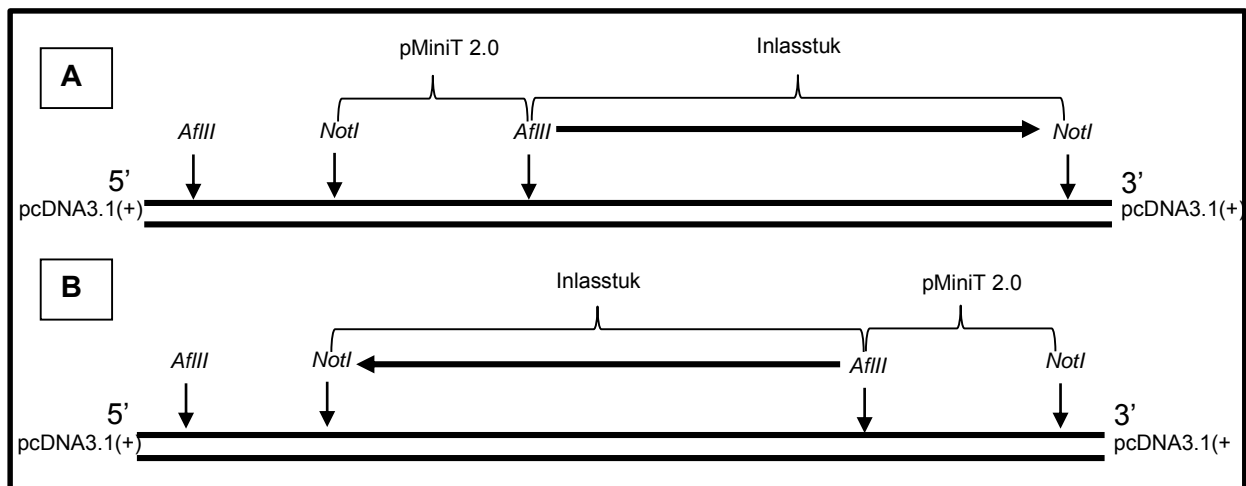
Die pcDNA3.1(+) plasmied (sien bylaag B) besit die *AflI* en *SalI* restriksie ensiem sny plekke, maar het geen suiweringsetiket nie. Die voorvoerder pare 10 (wat *AKSM2A* produseer) en 12 (wat *AKSM2B* produseer) (Tabel 4-20) se PKRs is ontwerp om 'n 6X-histidien suiweringsetiket en die *AflI* restriksie-ensiem sny plek aan die 5' punt van die vollengte konstrakte te heg en die *NotI* restriksie-ensiem sny plek wat reeds aan die 3' punte van die konstrakte in die pET32a(+) plasmied is, te behou. Die voorvoerder pare 11 (wat *AKSM2A-t* produseer) en 13 (wat *AKSM2B-t* produseer) (Tabel 4-20) se PKRs is ontwerp om 'n 6X-histidien suiweringsetiket en die *AflI* restriksie-ensiem sny plek aan die 5' punt van die verkorte konstrakte te heg en ook die *NotI* restriksie-ensiem sny plek wat reeds aan die 3' punte van die konstrakte is in die pET32a(+) plasmied te behou.

Die voorvoerder pare 10, 11, 12 en 13 se PKRs is uitgevoer (4.2.18). Die PKR produkte is geïsoleer met agarose jel ekstraksie (4.2.19) en PKR klonering in die pMiniT 2.0 plasmied is uitgevoer (4.2.24.3). Die suksesvolle gliserol voorrade wat deur die PKR klonering geproduseer is (4.2.24.3) se plasmiede (pMiniT 2.0/AKSM2A, pMiniT 2.0/AKSM2B, pMiniT 2.0/AKSM2A-t en pMiniT 2.0/AKSM2B-t) en die pcDNA3.1(+) plasmied is op 'n klein skaal geïsoleer (4.2.8). Die plasmiede is met die *AflI* en *NotI* restriksie ensieme behandel (4.2.9) om die inlasstukke vanaf

die pMiniT 2.0 plasmied te verwyder en om die pcDNA3.1(+) plasmied voor te berei vir ligering. Agarose jel ekstraksie (4.2.19) van al die inlasstukke en pcDNA3.1(+) is uitgevoer. 5' defosforilase is op die pcDNA3.1(+) plasmied uitgevoer (4.2.21). Die inlasstukke en die pcDNA3.1(+) plasmied is geligeeer (4.2.22) en getransformeer in kompetente DH5α *E. coli* (4.2.13).

Kolonie PKR is uitgevoer (4.2.23) met die Trunc_ *Bam*HI en Rev_stop_ *Sal*I voorvoeders om suksesvolle kolonies te identifiseer. Drie suksesvolle kolonies is opgegroeï en gliserolvoorrade van gemaak (4.2.7). Die plasmiede is op 'n klein skaal geïsoleer (4.2.8) en gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14).

Die resultaat van die Sanger volgorde bepaling het aangetoon dat die inlasstukke suksesvol in die pcDNA3.1(+) plasmied gekloneer is, maar dat daar 'n kort fragment van die pMiniT 2.0 plasmied se volgorde aan die punt van die inlasstukke en ook saam aan die pcDNA3.1 plasmied geligeeer is. Die pMiniT 2.0 plasmied besit ook 'n *Not*I restriksie ensiem sny plek. Onvolledige snyding het dus daartoe gelei dat die pMiniT 2.0 konstrakte nie by beide *Not*I restriksie ensiem volgordes gesny is, en daardeur korrek gekloneer is nie, maar aan die *Not*I restriksie ensiem volgorde in die pMiniT 2.0 plasmied se DNS. Die pcDNA3.1(+)/AKSM2A, pcDNA3.1(+)/AKSM2A-t en pcDNA3.1(+)/AKSM2B-t plasmied se Sanger volgorde bepaling het vertoon soos in skets A in Figuur 4-5 en die pcDNA3.1(+)/AKSM2B plasmied se Sanger volgorde bepaling het vertoon soos in skets B Figuur 4-5.



Figuur 4-5: Verduideliking van verkeerde klonering van pcDNA3.1 sisteem. Skets A stel die resultaat van pcDNA3.1(+)/AKSM2A, pcDNA3.1(+)/AKSM2A-t en pcDNA3.1(+)/AKSM2B-t plasmied se Sanger volgorde bepaling voor. 'n Gedeelte van die pMiniT 2.0 plasmied se volgorde is verkeerdelik aan die 5 aksent punt van die inlasstukke geheg. Skets B stel die resultaat van

pcDNA3.1(+)/AKSM2B plasmied se Sanger volgorde bepaling voor. 'n Gedeelte van die pMiniT 2.0 plasmied se volgorde is verkeerdlik aan die 3 aksent punt van die pcDNA3.1(+) plasmied geheg en die inlasstuk se DNS rigting is verkeerd om in gekloneer.

Die pcDNA3.1(+)/AKSM2A, pcDNA3.1(+)/AKSM2A-t en pcDNA3.1(+)/AKSM2B-t plasmiede is dus met die *Afl*I restriksie ensiem behandel (4.2.9) om die pMiniT 2.0 plasmied volgorde uit te sny. Die pcDNA3.1(+)/AKSM2B plasmied is met beide *Not*I en *Afl*I behandel (4.2.9) om die inlasstuk weer los te sny van die pcDNA3.1(+) plasmied en die pMiniT 2.0 plasmied volgorde. Die resultate van die snyding is geïsoleer deur agarose jel ekstraksie (4.2.19), weer geligeer (4.2.22) (aan die pcDNA3.1a(+) plasmied) en getransformeer in kompetente DH5α *E. coli* (4.2.13).

'n Kolonie PKR is uitgevoer (4.2.23) om te bevestig of die fragment van pMiniT 2.0 se DNS verwyder is by al die plasmiede en dat die pcDNA3.1(+)/AKSM2B plasmied se inlasstuk in die regte rigting gekloneer is. Om te verseker dat die pMiniT2.0 DNS verwyder is, is die Sanger volgorde bepalingsvoorvoeders gebruik vir kolonie PKR met 'n positiewe kontrole wat steeds die pMiniT 2.0 se DNS besit. Die verskil in bp lengte tussen die konstrakte wat die 100 bp lengte fragment van pMiniT2.0 se DNS bevat en die konstrakte waar die fragment verwyder is sal waargeneem kan word op 'n agarose jel omdat die geproduseerde bande ongeveer 100 bp van mekaar sal verskil. Om te verseker dat die rigting van die pcDNA3.1(+)/AKSM2B plasmied se inlasstuk reg is, omdat hy verkeerd om gekloneer was, is die voorwaartse *Trunc-Bam*HI voorvoerder saam met die terugwaartse Sanger volgorde bepalingsvoorvoerder gebruik. As die PKR reaksie dus nie werk nie, omdat beide voorvoeders terugwaarts wys, is die inlasstuk steeds verkeerd om gekloneer.

Suksesvolle kolonies is opgegroeï en gliserolvoorrade van gemaak (4.2.7). Die plasmiede is op 'n klein skaal geïsoleer (4.2.8) en gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14).

4.2.24.6 pBAD-metode: TOPO klonering van die inlasstukke in die pBAD plasmied

Die pBAD/TOPO ThioFusion ekspressie stel (Invitrogen, Carlsbad, VSA) is aangekoop en die verskaffer se handleiding is gevolg in die klonering van die inlasstukke in die pBAD plasmied.

In TOPO klonering is dit belangrik dat die polimerase wat gebruik word 'n enkel deoksieadenosien (A) nukleotied aan die 3' punte van die DNS heg. Dit is daarom dat die Invitrogen Platinum *Taq* DNS polimerase (Invitrogen, Carlsbad, VSA) vir die klonering gebruik is. Die voorvoerder pare 15 -18 in Tabel 4-25 is uitgevoer met hierdie polimerase volgens die vervaardiger se handleiding en

'n positiewe kontrole inlasstuk is ook geproduseer volgens die pBAD/TOPO ThioFusion ekspressie stel se handleiding. Die reaksies was soos volg.

Tabel 4-25: Voorvoerder pare en reaksie kondisies gebruik in die pBAD-metode

Voorvoerder paar nommer	Vorentoe voorvoerder	Terugwaartse voorvoerder	Templaat DNS: pET32a(+)/AKSM2A (A) of pET32a(+)/AKSM2B (B)	Hibridiseer temperatuur (°C)	Optimale verlengtyd
15	pBAD_FWD	pBAD_REV	A	55	101
16	pBAD_FWD	pBAD_REV	B	55	101
17	pBAD_TRUNC	pBAD_REV	A	55	93
18	pBAD_TRUNC	pBAD_REV	B	55	93

Die meester mengsels het 1X PKR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM van elke dNTP, 2 eenhede Invitrogen Platinum Taq DNS polimerase, 0.2 µM voorwaartse en terugwaartse voorvoeders, 1 ng templaats DNS en water tot by 50 µl bevat. Die positiewe kontrole se siklussering is uitgevoer soos in Tabel 4-26. Die inlasstuk se siklussering is uitgevoer soos in Tabel 4-27

Tabel 4-26: Positiewe kontrole se PKR siklussering.

Siklussering stap		Temperatuur (°C)	Tyd (sekondes)
Eerste denaturering		94	120
25 siklusse	Denaturering	94	60
	Hibridiseer	55	60
	Verleng	72	60
Finale verlenging		72	60
Konstant hou		4	hou

Tabel 4-27: Voorvoerder pare 15 -18 se PKR siklussering.

Siklussering stap		Temperatuur (°C)	Tyd (sekondes)
Eerste denaturering		94	120
25 siklusse	Denaturering	94	30
	Hibridiseer	55	30

Siklussering stap		Temperatuur (°C)	Tyd (sekondes)
	Verleng	72	101 (vir 15 en 17) 93 (vir 16 en 18)
Finale verlenging		72	420
Konstant hou		4	hou

Die PKRs van die inlasstukke en positiewe kontrole se produkte is bevestig met agarose jel elektroforese (4.2.6) en die inlasstukke en die positiewe kontrole is geïsoleer met agarose jel ekstraksie (4.2.19). 'n Bevestigende agarose jel elektroforese (4.2.6) van die geïsoleerde inlasstukke is uitgevoer.

Die pBAD plasmied en die inlasstukke se ligering is uitgevoer soos volgens die verskaffer se handleiding. Die reaksies is opgestel soos in Tabel 4-28.

Tabel 4-28: pBAD/TOPO ligeringsreaksie samestelling.

Reagens	Hoeveelheid
Inlasstuk	3.891 ng (AKSM2A en AKSM2B) 3.574 ng (AKSM2A-t en AKSM2B-t) 1.123 ng (Positiewe kontrole)
Sout oplossing (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl ₂)	1 µl
pBAD/TOPO plasmied	10 ng
Molekulêrebiologie-graad water	Tot 6 µl

Die reaksies is versigtig gemeng en vir vyf minute by kamertemperatuur geïnkubeer. Die reaksies is op ys geplaas en 2 µl daarvan is vir die transformasie van One Shot TOP10 selle gebruik soos in afdeling 4.2.13.

Kolonie PKR (4.2.23) is met die pBAD_TRUNC en pBAD_REV voorvoeders uitgevoer met siklussering soos in Tabel 4-29.

Tabel 4-29: Kolonie PKR van pBAD sisteem se siklussering.

Siklussering stap		Temperatuur (°C)	Tyd (sekondes)
Eerste denaturering		98	295
30 siklusse	Denaturering	98	5
	Hibridiseer	55	10

Siklussering stap		Temperatuur (°C)	Tyd (sekondes)
	Verleng	72	24
Finale verlenging		72	420
Konstant hou		4	hou

Vier suksesvolle kolonies is opgegroeï en gliserol voorrade van gemaak (4.2.7). Die plasmied DNS is op 'n kleinskaal geïsoleer (4.2.8) en gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14). Die positiewe kontrole wat ook as ekspressie kontrole dien is opgegroeï en 'n gliserol voorraad van gemaak (4.2.7).

4.2.25 Sellise en proteïen ekstraksie metodes

4.2.25.1 Sellise en proteïen ekstraksie deur sonifikasie

Sonifikasie is gebruik om *E. coli* te liseer sodat proteïen ekstraksie uitgevoer kan word. Die Bioruptor UCD-200 sonifikasie sisteem (Diagenode, Denville, VSA) is gebruik vir sonifikasie volgens die vervaardiger se handleiding met aanpassings.

E. coli wat gereed is vir sellise is in 100 µl hoeveelhede in 500 µl mikrosentrifuge buise verdeel. Die Bioruptor is aangeskakel en die waterbad is gevul met water en fyn ys. Die buise is in die 0.5 ml buis houer geplaas en driekwart in die yswater laat sak. Die krag stelling is op hoog gestel. Die sonifikasie siklus is gestel om tien minute lank te wees, 30 sekondes aan en 30 sekondes af.

Twintig (20) µl is as die totale fraksie geneem net nadat sonifikasie uitgevoer is. Die onoplosbare sel materiaal is gepresipiteer deur sentrifugering (16 000 x *g*, 20 minute, 4°C). 50 µl van die supernatant is geneem as die oplosbare fraksie.

4.2.25.2 B-PER en Bugbuster se lise en proteïen ekstraksie reagentse

Die B-PER (ThermoFisher Scientific, Madison, VSA) en Bugbuster (Merck, Darmstadt, Duitsland) proteïen ekstraksie reagentse is gebruik volgens hul verskaffers se handleidings.

Die *E. coli* is vanuit die *E. coli* kulture gepresipiteer deur sentrifugering (10 000 x *g*, 10 minute, kamer temperatuur). Die supernatant is afgegooi. In die B-PER metode is die presipitaat gevries by -20°C en is 'n finale konsentrasie van 1 mM EDTA by die B-PER reagentse gevoeg. Vyf milliliter van die B-PER reagentse is dan per gram van die gevriesde presipitaat gevoeg. In die Bugbuster metode is die presipitaat dadelik opgelos in vyf milliliter Bugbuster reagentse per gram van die presipitaat en 25 eenhede benzonase is per milliliter Bugbuster reagentse bygevoeg. Die Bugbuster en B-PER oplossings is vir 15 minute by kamertemperatuur geïnkubeer en die totale fraksies is

geneem. Die oplossing is gesentrifugeer (16 000 x g, 20 minute, 4°C) om die onoplosbare sel oorblyfsels te presipiteer en die supernatant is as die oplosbare fraksie geneem.

4.2.26 Natriumdodesielsulfaat poliakrielamiedjielektroforese

Natriumdodesielsulfaat poliakrielamiedjielektroforese (NDS-PAGE) is gebruik om gedensatureerde proteïene op grond van grootte te skei en daardeur proteïenekspressie en suiwering te monitor. Die TGX Stain-Free FastCast akrielamied sisteem (Bio-Rad, California, VSA) is gebruik volgens die verskaffer se handleiding.

Die 1 mm en 0.75 mm PAGE glas plaatjies is gebruik om poliakrielamiedjels mee te giet. Die glas plaatjies is in die Mini-PROTEAN tetra sel giet staanders (Bio-Rad, California, VSA) geplaas. Die oplossing (gelyke hoeveelhede van die oplosser buffers A en B, 0.05% TEMED (Sigma, Saint Louis, VSA) (v/v), 0.5% van 10% ammoniumpersulfaat (APS) (Sigma, Saint Louis, VSA) (v/v)) is in die glas plaatjies gegiet tot tussen 5-10 mm onder die tande van die kammetjie. Die glas plaatjies is volledig gevul met stapelaar oplossing (1 ml van stapelaar buffer A en B, 0.1% TEMED (v/v), 0.5% van 10% APS (v/v)) en die kammetjie is in die glas plaatjies geplaas. Die jel is toegelaat om te stol vir 30-45 minute. Die stapelaar jel is tydens die stollingstyd konstant by die punte van die kammetjie gevoeg om te verhoed dat die poliakrielamiedjel lug intrek.

Die NDS-PAGE jels is dadelik gebruik of in handdoek papier toegedraai en in 'n geslote plastiek sakkies gesit saam met Tris-glisien-NDS (TGN) buffer (25 mM Tris, 192 mM glisien, 0.1% NDS, pH 8.6) (Sigma, Saint Louis, VSA) by 4°C om dit vir tot en met vier weke te stoor.

Die NDS-PAGE jelle is in die elektroforese houers geplaas en die houers is gevul met TGN buffer. Die proteïen monsters is voorberei met 4X Laemmli monster buffer (Bio-Rad, California, VSA) volgens die verskaffer se handleiding. β -merkaptotoëtanol (Sigma, Saint Louis, VSA) is by 4X Laemmli monster buffer gevoeg tot 'n finale konsentrasie van 355 mM. 3 dele proteïen monster is verdun met 1 deel 4X Laemmli monster buffer (normaalweg 15 μ l proteïen monster verdun met 5 μ l 4X Laemmli monster buffer). Die monsters is geïnkubeer by 98°C vir 5 minute om denaturering te verseker en is gelaai op die NDS-PAGE jels. 4 μ l van die Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, California, VSA) proteïen leer is gelaai om die grootte van die proteïene te bepaal.

Die elektroforese is uitgevoer vir 40 minute teen 200 V. Die NDS-PAGE jels is uit die glas plaatjies verwyder en in Coomassie oplossing (0.25% Coomassie briljant blou (Sigma, Saint Louis, VSA) (g/v), 45% metanol (Sigma, Saint Louis, VSA) (v/v), 45% gedistilleerde water (v/v), 10% ysasynsuur (Sigma, Saint Louis, VSA) (v/v)) geplaas en by kamertemperatuur geïnkubeer met stadige roering vir twee tot vier ure. Die NDS-PAGE jels is afgespoel met gedistilleerde water en

in metanol:ysasynsuur oplossing (50% metanol, 40% gedistilleerde water, 10% ysasynsuur) geplaas en geïnkubeer vir vier tot twaalf ure met stadige roering om die oormaat bevlekking oplossing te verwyder. Hierdie metanol:ysasynsuur oplossing is twee tot drie keer vervang.

Die ChemiDoc MP Imaging sisteem met die Image Lab sagteware weergawe 5.2.1 (Bio-Rad, California, VSA) is gebruik om die NDS-PAGE jels mee af te neem.

4.2.27 Proteïenekspressie

4.2.27.1 Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pFLAG metode

Die vermoë van die pFLAG metode om oplosbare AKSM2A, AKSM2B, AKSM2A-t en AKSM2B-t te produseer is getoets deur proteïenekspressie uit te voer. Die *E. coli* en die verskillende plasmiedkonstrukte in die *E. coli* wat gebruik is in hierdie toets word weergegee in Tabel 4-30.

Tabel 4-30: *E. coli* en plasmiedkonstrukte gebruik in die AKSM2 proteïenekspressie in die pFLAG metode.

Proteïen toets nommer	<i>E. coli</i> en plasmiede gebruik	Antibiotika gebruik (50 µg/ml van elk)
1	BL21(DE3)RIL (negatiewe kontrole)	chlooramfenikol
2	BL21(DE3)RIL/pFLAG-CTS (agtergrond kontrole)	chlooramfenikol en ampisillien
3	BL21(DE3)RIL/pFLAG-CTS/AKSM2A	chlooramfenikol en ampisillien
4	BL21(DE3)RIL/pFLAG-CTS/AKSM2B	chlooramfenikol en ampisillien
5	BL21(DE3)RIL/pFLAG-CTS/AKSM2A-t	chlooramfenikol en ampisillien
6	BL21(DE3)RIL/pFLAG-CTS/AKSM2B-t	chlooramfenikol en ampisillien

Ses 5 ml alikwotte Terrific Broth (TB) (1.2% proteose (g/v), 2.4% gisekstrak (g/v), 0.4% gliserol (v/v), 0.17 M KH₂PO₄, 0.72 M K₂HPO₄) wat die antibiotika soos in Tabel 4-30 bevat is met die ses gliserol voorrade van die *E. coli* in Tabel 4-30 geïnkubeer en oornag by 37°C en 225 r.p.m. geïnkubeer. Die selle is gepresipiteer deur sentrifugering (4000 x g, vyf minute, kamer temperatuur) die supernatant is afgegooi en die selle is weer opgelos in 30 ml TB met die ooreenstemmende antibiotika en in twee 15 ml hoeveelhede verdeel (een om te induseer en een vir die nie-geïnduseerde kontrole). Die kulture is by 37°C en 206 r.p.m. geïnkubeer totdat 'n OD₆₀₀ van een bereik is. Een van die twee 15 ml hoeveelhede is geïnduseer met 1 mM IPTG en beide kulture is vir ses ure by 37°C en 206 r.p.m. geïnkubeer. Die selle is gepresipiteer deur sentrifugering (10 000 x g, 10 minute, kamer temperatuur) en die supernatant is afgegooi en vanaf

hierdie punt is alles verder op ys gesit. Die selle is weer opgelos in 500 µl HEPES buffer (10 mM HEPES (Sigma, Saint Louis, VSA), 0.5 mM EDTA (Sigma, Saint Louis, VSA)). Die opgeloste selle is geliseer deur sonifikasie (4.2.25.1) en NDS-PAGE is uitgevoer (4.2.26). Slegs 3 µl van die finale proteïen monster voorbereidings is op die poliakriëlamiedjels gelaai.

4.2.27.2 Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pET28-metode

Die vermoë van die pET28 sisteem om oplosbare AKSM2A, AKSM2B, AKSM2A-t en AKSM2B-t te produseer is getoets deur proteïenekspressie uit te voer. Die *E. coli* en die verskillende plasmiedkonstrukte in die *E. coli* wat gebruik is in hierdie toets word weergegee in Tabel 4-31.

Tabel 4-31: *E. coli* en plasmiedkonstrukte gebruik in die AKSM2 proteïenekspressie in die pET28-metode.

Proteïen toets nommer	<i>E. coli</i> en plasmiede gebruik	Antibiotika gebruik (30 µg/ml)
1	BL21(DE3) (negatiewe kontrole)	
2	BL21(DE3)/pET28a(+)(agtergrond kontrole)	kanamisien
3	BL21(DE3)/pET28a(+)/AKSM2A	kanamisien
4	BL21(DE3)/pET28a(+)/AKSM2B	kanamisien
5	BL21(DE3)/pET28a(+)/AKSM2A-t	kanamisien
6	BL21(DE3)/pET28a(+)/ALSM2B-t	kanamisien

Ses 5 ml alikwotte LB met die ooreenstemmende antibiotika (Tabel 4-31) is met die *E. coli* in Tabel 4-31 geïnkuleer en oornag by 37°C en 225 r.p.m. geïnkubeer. Die selle is gepresipiteer deur sentrifugering (4000 x g, vyf minute, kamer temperatuur) die supernatant is afgegooi en die selle is weer opgelos in 40 ml LB met die ooreenstemmende antibiotika en in twee 20 ml hoeveelhede verdeel (een om te induseer en een vir die nie-geïnduseerde kontrole). Die kulture is by 37°C en 225 r.p.m. geïnkubeer totdat 'n OD₆₀₀ van tussen 0.6 en 1.0 bereik is. Een van die twee 20 ml hoeveelhede is geïnduseer met 0.1 mM IPTG en beide kulture is vir 18 ure by 37°C en 200 r.p.m. geïnkubeer. Die selle is gepresipiteer deur sentrifugering (10 000 x g, 10 minute, kamer temperatuur) en die supernatant is afgegooi en vanaf hierdie punt is alles verder op ys gesit. Die selle is weer opgelos in 1 ml lise buffer (50 mM kalium fosfaat (Sigma, Saint Louis, VSA), 1 mM EDTA, 1 mM ditiotreitol (Sigma, Saint Louis, VSA), 10% gliserol (g/v), 1mM fenielmetaan sulfoniel floried (Sigma, Saint Louis, VSA), pH 7.4). Die opgeloste selle is geliseer deur sonifikasie (4.2.25.1) en NDS-PAGE (4.2.26) is uitgevoer. 20 µl van die finale proteïen monster voorbereidings is op die poliakriëlamiedjels gelaai.

4.2.27.3 Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pQE-30-metode

Die proteïenuitdrukking van die pQE-30 sisteem is volgens die QIAexpressionist handleiding uitgevoer.

10 ml LB medium (100 µg/ml karbenisillien, 25 µg/ml kanamisien) is geïnkuleer met M15[pREP4] *E. coli* wat die pQE-30 plasmied, die pQE-30/AKSM2A plasmied en die pQE-30/AKSM2A-t plasmied bevat en dit is oornag by 37°C en 225 r.p.m. geïnkubeer. 20 ml vooraf verhitte LB medium (100 µg/ml karbenisillien, 25 µg/ml kanamisien) is geïnkuleer met 1 ml van die oornag kultuur en is geïnkubeer by 37°C en 250 r.p.m. totdat 'n OD₆₀₀ van tussen 0.5-0.7 bereik is. Drie van hierdie kulture is voorberei vir die pQE-30/AKSM2A en die pQE-30/AKSM2A-t plasmied (twee om met verskillende konsentrasies IPTG geïnduseer te word en een nie-geïnduseerde kontrole) en twee vir die pQE-30 plasmied (een geïnduseer en een nie-geïnduseer). Twee van die pQE-30/AKSM2A en die pQE-30/AKSM2A-t plasmied kulture is onderskeidelik met 1 mM en 0.2 mM IPTG geïnduseer en een van die pQE-30 kulture is met 1 mM IPTG geïnduseer. Al die kulture is vir 'n verdere vier ure by 37°C en 250 r.p.m. geïnkubeer. Die selle is gepresipiteer deur sentrifugering (4000 x g, 20 minute, kamer temperatuur). Die supernatant is afgegooi en die selle is in oplossing gebring met 2 ml liserings buffer (50 mM NaH₂PO₄ (Sigma, Saint Louis, VSA), 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0). Die selle is gevries in 'n droë ys/ etanol bad, en ontdooi in yswater. Die selle is geliseer deur sonifikasie (4.2.25.1). Die totale fraksie is geneem net na sonifikasie. Die onoplosbare sel inhoud is gepresipiteer deur sentrifugering (10 000 x g, 30 minute, 4°C). Die supernatant is geneem as die oplosbare fraksie. NDS-PAGE is uitgevoer (4.2.26) en 6.66 µl van elke voorbereide monster is op die poliakrielamiedjel gelaai.

4.2.27.4 Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pBAD-metode.

Die pBAD-metode vir AKSM2 proteïenekspressie is uitgevoer volgens die verskaffer se handleiding. Al die gekloneerde konstrunkte asook die ekspressie kontrole is gebruik soos in Tabel 4-32.

Tabel 4-32: *E. coli* en plasmiedkonstrunkte gebruik in die AKSM2 proteïenekspressie in die pBAD-metode.

Proteïen toets nommer	<i>E. coli</i> en plasmiede gebruik	Antibiotika gebruik (100 µg/ml)
1	TOP10/pBAD/Ekspressie kontrole (positiewe kontrole)	Karbenisillien
2	TOP10/pBAD/ASKM2A	Karbenisillien
3	TOP10/pBAD/ASKM2B	Karbenisillien

Proteïen toets nommer	<i>E. coli</i> en plasmiede gebruik	Antibiotika gebruik (100 µg/ml)
4	TOP10/pBAD/ASKM2A-t	Karbenisillien
5	TOP10/pBAD/ASKM2B-t	Karbenisillien

Vir elke ekspressie met die *E. coli* in Tabel 4-32 is 2 ml LB (100 µg/ml karbenisillien) met 'n gliserol voorraad geïnokuleer en oornag by 37°C en 225 r.p.m. geïnkubeer. Vier 10 ml LB (100 µg/ml karbenisillien) hoeveelhede is met 0.1 ml van elke oornag kultuur geïnokuleer (sodat daar vier kulture van elkeen van die vyf sellyne in Tabel 4-32 is) en geïnkubeer by 37°C en 225 r.p.m. totdat 'n OD₆₀₀ van ~0.5 bereik is. Een van die 10 ml LB hoeveelhede is gebruik as die nie-geïnduseerde kontrole. Die drie wat oorbly is onderskeidelik met arabinose geïnduseer met 'n finale konsentrasie in die media van 0.00002%, 0.002% en 0.2%. Die konsentrasie gradiënt is uitgevoer om die ideale konsentrasie van arabinose induksie te vind. Al die kulture is geïnkubeer by 37°C en 225 r.p.m. vir vier ure. Een milliliter van elke kultuur is in 'n mikrosentrifugebuis geplaas en die selle is gepresipiteer deur sentrifugering (16 000 x g, 30 sekondes, kamer temperatuur). Die supernatant is afgegooi en die presipitaat is by -20°C gevries.

Die gevriesde selle is ontdooi op ys en weer in oplossing gebring met 500 µl liserings buffer (50 mM kalium fosfaat, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% gliserol, 0.5% Triton X-100 (Sigma, Saint Louis, VSA), 10 mM imidasool, pH 7.8). Die monsters is drie maal gevries in vloeibare stikstof en ontdooi by 42°C. Die monsters is verder op ys hanteer. Die totale fraksie is op hierdie punt geneem. Die monsters is dan gesentrifugeer (16 000 x g, 60 sekondes, 4°C.) om die onoplosbare sel inhoud te presipiteer. Die supernatant is geneem as die oplosbare fraksie. 5 µl van elke fraksie is voorberei vir NDS-PAGE en is op die poliakriëlamiedjel gelaai. NDS-PAGE is uitgevoer (4.2.26).

4.2.28 Gedeeltelike optimalisering van pBAD proteïenekspressiemetode

4.2.28.1 Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pBAD-metode met bygevoegde pantoteensuur

Proteïenuitdrukking van die pBAD sisteem is weer uitgevoer soos in afdeling 4.2.27.4, maar met die volgende veranderinge.

Indien die asiel-KoA-sintetase aktief en oplosbaar uitgedruk word in die TOP10 *E. coli* word die hipotese gestel dat die aktiwiteit van hierdie proteïene, naamlik om vetsure aan KoA te bind, die konsentrasie KoA in die *E. coli* drasties kan verminder. KoA moet gesintetiseer word vanaf pantoteensuur wat ingeneem word deur die *E. coli* (soos verduidelik in afdeling 2.4.3). In 'n poging

om die KoA konsentrasie in die *E. coli* te verhoog om die metaboliese las wat die AKSM2-proteïene moontlik kan uitoefen te verminder, is 5mM pantoteensuur by die LB medium gevoeg. 0.002% is deurgaans gebruik as die arabinose induksie konsentrasie en 15 µl van die monsters in plaas van 5 µl is op die poliakriëlamiedjels gelaai sodat die proteïenbande duideliker sigbaar is. 'n Tydgradiënt is ook uitgevoer om die ideale induksietyd te vind. Die tye wat gebruik is, is een uur, twee en 'n halwe ure en vier ure.

4.2.28.2 Toets van verskillende lise-metodes vir die AKSM2B-t proteïenekspressie in die pBAD-metode.

Die gebruik van die pBAD lise-metode (vries in vloeibare stikstof en ontdooi in 42°C) is prakties moeilik om effektief uit te voer met groter volumes as die 500 µl wat tot dusvêr gebruik was. Met die oog op grootskaalse isolasie is ander tipe lise-metodes getoets. Die AKSM2B-t proteïen het tot dusvêr die duidelikste resultate gewys en is dus gebruik om die optimalisering op uit te voer.

Drie alikwotte van die TOP10 *E. coli* wat die pBAD/AKSM2B-t plasmied bevat en een wat die pBAD/Ekspressie kontrole bevat is opgegroeï soos in afdeling 4.2.27.4 en is geïnduseer soos in afdeling 4.2.27.4, maar net met 0.002% arabinose. Die pBAD lise-metode in afdeling 4.2.27.4 is op die positiewe kontrole en op een alikwot van die TOP10 *E. coli* wat die pBAD/AKSM2B-t plasmied besit uitgevoer. Die B-PER en Bugbuster lise-metodes (afdeling 4.2.25.2) is uitgevoer op die twee ander alikwotte.

Die totale en oplosbare fraksies is op 'n poliakriëlamiedjel gelaai en NDS-PAGE is uitgevoer (4.2.26).

Die oorspronklike pBAD lise-metode en die B-PER metode het potensiaal getoon om oplosbare proteïene te produseer. Die twee probleme met die oorspronklike pBAD lise-metode is dat die volume waarin die gepresipiteerde *E. coli* weer opgelos moet word te veel is – elke een milliliter kultuur wat gebruik was se presipitaat moet in 500 µl pBAD lise buffer weer opgelos word – en dit maak dat die lise-metode van vries en ontvries oneffektief raak. Dit maak ook dat baie groot volumes lise buffer deur 'n suiweringskolom moet loop en dit verstop die kolomme (data nie getoon nie). Die tweede probleem is dat hierdie lise-metode 10 mM imidasool bevat. Imidasool kompeteer met die histidien etiket se binding aan die nikkol kolomme en dit is die verbinding wat gebruik word om proteïene in die kolomme te elueer. In die B-PER lise-metode word elke gram gepresipiteerde *E. coli* in 5 ml B-PER buffer opgelos, wat 'n baie meer hanteerbare volume is en die lise-metode is ook baie meer eenvoudig.

Om die oorspronklike pBAD lise-metode bruikbaar te maak vir histidien etiket suiwing is die metode uitgevoer (4.2.27.4) met en sonder imidasool. Om die pBAD lise-metode meer prakties

uitvoerbaar te maak is die lise buffer soos in afdeling 4.2.27.4 voorberei sonder imidasool en is die metode uitgevoer met die aanpassing dat elke gram van die presipitaat in 5 ml pBAD lise buffer (sonder imidasool) opgelos is. Dit verminder die hoeveelheid oplossing wat gevries en ontdooi moet word drasties en maak die metode meer uitvoerbaar.

5 mM Pantoteensuur is ook by al hierdie veranderinge aan die pBAD lise-metode en by die B-PER metode (4.2.25.2) gevoeg vir dieselfde redes as in (4.2.28). Hierdie metode is uitgevoer en 'n NDS-PAGE (4.2.26) het daarop gevolg.

4.2.29 Westerseklad van AKSM2-proteïene wat deur die pBAD-metode uitgedruk is.

Westerseklad is uitgevoer op poliakriëlamiedjelle van die oplosbare fraksies van die pBAD-metode se proteïenekspressie om met teenliggaampies, spesifiek vir die histidien etikette op die AKSM2-proteïene, te bevestig dat hierdie proteïene wel oplosbaar is.

Proteïenekspressie met die pBAD-metode en 'n NDS-PAGE is uitgevoer (4.2.26) met die een aanpassing dat die proteïen leer die Precision Plus Dubbele Kleur leer is (Bio-Rad, California, VSA). Die poliakriëlamiedjel se proteïene is op Westerseklad membraan oorgedra met die Trans-Bolt Turbo instrument (Bio-Rad, California, VSA) en die Trans-Blot oordra pakke (Bio-Rad, California, VSA) volgens die verskaffer se handleiding. Die Trans-Blot oordra pakke is oopgemaak. Die Westerseklad membraan pakkie is op die Trans-Bolt Turbo instrument se kasset gelaai en die poliakriëlamiedjel is op die Westerseklad membraan gesit. Die boonste ion reservoir vel is op die poliakriëlamiedjel gesit en enige lug is met 'n 1000 µl pipet punt uitgerol. Die kasset is gesluit en in die Trans-Bolt Turbo instrument geplaas. Die een mini-jel protokol is op die standaard metode op die Trans-Bolt Turbo instrument ingestel en Westerseklad is uitgevoer. Die Westerseklad membraan is direk na die Westerseklad in blok oplossing (1X TBS (Bio-Rad, California, VSA), 1% Casein (Bio-Rad, California, VSA)) geplaas en met stadige beroering by kamertemperatuur vir 'n uur en 'n half geïnkubeer. Die blok oplossing is afgegooi en 'n was stap is uitgevoer soos volg: 5 ml was buffer (1X TBS, 0.1% Tween20 (Sigma, Saint Louis, VSA) is bygevoeg en met stadige beroering by kamertemperatuur vir vyf minute geïnkubeer. Die was oplossing is uitgegooi en 6x-His etiket monoklonale teenliggaampies (Thermo Fisher Scientific, Madison, VSA) wat 1:15 000 verdun is met teenliggaampie oplosmiddel (1X TBS, 1% Casein) is in 'n klein bakkie saam met die Westerseklad membraan gevoeg totdat dit die membraan met stadige beroering heeltemal benat. Die klein bakkie is dig geseël en met stadige beroering oornag by 4°C geïnkubeer. Die teenliggaampie oplossing is afgegooi en drie was stappe is uitgevoer. Die Precision Plus Tactin-HRP konjugaat (Bio-Rad, California, VSA) is 1:10 000 verdun met teenliggaampie oplosmiddel en by die Westerseklad membraan gevoeg. Dit is geïnkubeer vir een uur by kamertemperatuur met stadige beroering. Dit is uitgevoer om die

Precision Plus Dual Color proteïene te visualiseer op die Westerseklad. Die konjugaat is afgegooi en drie was stappe is uitgevoer. Die membraan is een maal met 5 ml finale was buffer (1X TBS) geïnkubeer vir 5 minute by kamertemperatuur met stadige beroering.

Die ChemiDoc MP Imaging sisteem met die Image Lab sagteware weergawe 5.2.1 (Bio-Rad, California, VSA) is gebruik om die Westerseklad membrane te visualiseer. Die membraan is vanuit die finale was buffer op die ChemiDoc geplaas. Die Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad, California, VSA) is gebruik as substrate vir die teenliggaampie gebinde ensieme vir die Chemiluminesensie. Drie milliliter van die peroksidase oplossing is op die membraan gepipetteer en daarna is drie milliliter van die luminol oplossing op die membraan gepipetteer. Die membraan is vir vyf minute geïnkubeer terwyl die oplossing die heelyd oor die membraan gepipetteer is. Die Image Lab sagteware is gestel op Western blot, Chemi hoë resolusie mini-jel en die Westerseklad membraan is afgeneem.

4.3 Resultate en bespreking

4.3.1 Sagteware voorspelling van natranslasiemodifikasies, N-terminaal teikenvolgorde en N- en C-terminaal beskikbaarheid.

Die moontlike natranslasiemodifikasie, naamlik disulfiedbindings en glikosilasie, wat in die AKSM2A- en AKSM2B-ensieme voorkom is voorspel deur voorspelling sagteware te gebruik. Sagteware is ook gebruik om die presiese volgorde van die mitochondriale teikenvolgorde te voorspel om te sien of dit ooreenstem met die 47 aminosure wat Boomgaarden *et al.* (2009) afgesny het en om uit te vind of die C- en N-terminale van hierdie proteïene beskikbaar is vir suiweringsetikette en fusie proteïene is die kristal struktuur van AKSM2A bestudeer.

4.3.1.1 Disulfiedbindings

Die disulfiedbindings wat deur die Cyscon geïdentifiseer is, word in Tabel 4-33 aangedui. Die getalle wat aangedui word verwys na die nommer van die aminosuur in die aminosuur volgorde en die koppelteken dui aan dat die twee aminosure moontlik aan mekaar bind met disulfiedbindings.

Tabel 4-33: Cyscon voorspelling van disulfiedbindings tussen aminosure in AKSM2A en AKSM2B.

Disulfiedbindings	AKSM2A	AKSM2B
1	11-101	11-101
2	174-188	174-207

Disulfiedbindings	AKSM2A	AKSM2B
3	271-282	188-282
4	370-389	370-389

Die moontlike teenwoordigheid van disulfiedbindings beklemtoon dat natranslasiemodifikasie benodig kan word om hierdie proteïene te produseer. Die verskil in hierdie twee eenderse proteïene se disulfiedbindings is ook interessant. Binding 1 en 4 is dieselfde, maar daar is verskille in binding 2 en 3, alhoewel eenderse aminosuur getalle betrokke is. Hierdie lys aminosuur bindings is vergelyk met die kristal struktuur van AKSM2A wat deur Kochan *et al.* (2009) ontwikkel is om te sien of hierdie aminosure naby aan mekaar is vir disulfiedbindings om te vorm. In die kristal struktuur is hierdie aminosuur pare in elke geval in dieselfde algemene area, maar die proteïene se struktuur sal moet verstel vir die aminosuur pare om disulfiedbindings te kan vorm.

4.3.1.2 Mitochondriale N-terminaal teikenvolgorde

Die MitoFates webwerf se resultate word weergegee in Tabel 4-34.

Tabel 4-34: MitoFates se mitochondriale N-terminaal teikenvolgorde voorspelling.

Proteïen	AKSM2A	AKSM2B
Waarskynlikheid van teikenvolgorde	0.302	0.305
Voorspelling van teikenvolgorde	Geen teikenvolgorde nie	Geen teikenvolgorde nie

Die MitoFates sagteware kon nie 'n spesifieke teikenvolgorde identifiseer nie, al het Boomgaarden *et al.* (2009) in 'n vorige studie aangetoon dat die vollengte AKSM2-proteïene gelokaliseer is tot die mitochondria. Hulle het bewys dat as die proteïene met 47 aminosure by die N-terminaal verkort word (hierdie 47 aminosure is die minste gekonserveerde deel van die N-terminaal in vergelyking met ander AKSM proteïene wat nie tot die mitochondria gelokaliseer is nie), dan vind daar geen lokalisering plaas nie. Hierdie 47 aminosure sal dus verder eksperimenteel ondersoek moet word om die spesifieke teikenvolgorde te identifiseer. Aangesien die kleeft van die rekombinante ensieme se mitochondriale teikenvolgorde daartoe kan lei dat die proteïene korrekte vouing ondergaan, is met die *AKSM2A* en *AKSM2B* gene se vollengte, sowel as die gene wat met 141 basispare (47 aminosure) verkort is in die verskeie ekspressie sisteme se plasmiede gekloneer en uitgedruk. Hierdie verkorte weergawes van *AKSM2A* en *AKSM2B* word aangeteken as *AKSM2A-t* en *AKSM2B-t*.

4.3.1.3 Glikosilasie

Die aantal moontlike C-, N- en O-gekoppelde glikosilasie posisies op AKSM2A en AKSMB word weergee in Tabel 4-35.

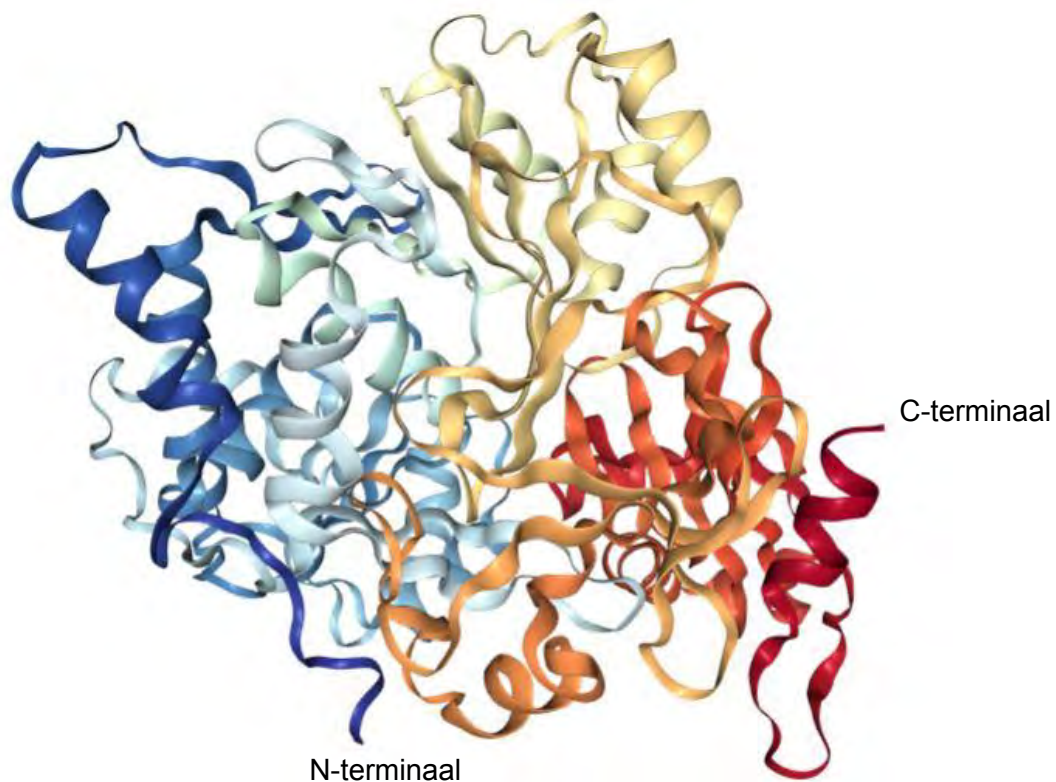
Tabel 4-35: Aantal moontlike C-, N- en O-gekoppelde glikosilasie posisies op AKSM2A en AKSMB.

AKSM2A			AKSM2B		
C-gekoppeld	N-gekoppeld	O-gekoppeld	C-gekoppeld	N-gekoppeld	O-gekoppeld
0	3	46	0	3	31

Die groot aantal moontlike glikosilasie posisies op AKSM2A en AKSM2B beklemtoon weereens dat natranslasiemodifikasie moontlik benodig kan wees om hierdie proteïene oplosbaar te produseer en bevestig die noodsaaklikheid van 'n soogdierselle ekspressiemetode indien die *E. coli* ekspressiemetodes nie suksesvol is nie.

4.3.1.4 Bestudering van AKSM2A se kristalstruktuur.

Om te bepaal of die N- en C-terminale van die AKSM2A en AKSM2B-ensieme beskikbaar is vir die aanheg van suiwerings etikette is die ASKM2A kristalstruktuur bestudeer.



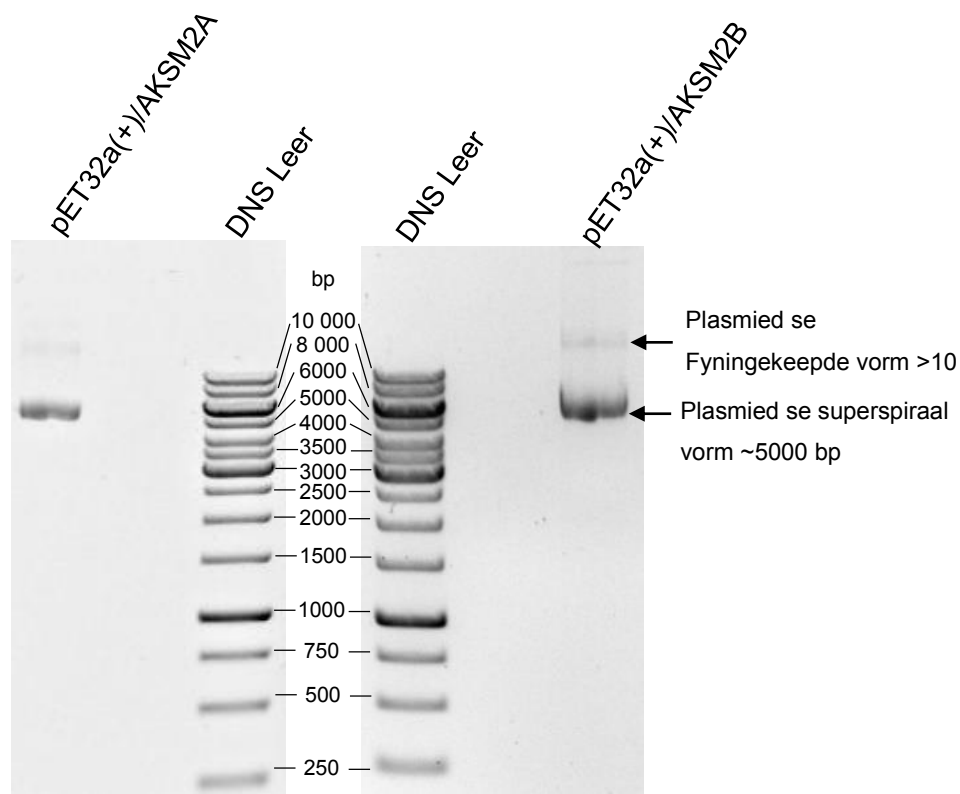
Figuur 4-6: Kristalstruktuur van AKSM2A met die L64P SNP. Die N- en C-terminaal aangedui (Kochan *et al.*, 2009)

Die AKSM2A-ensiem met die L64P SNP is die enigste kristalstruktuur van die AKSM2A en AKSM2B-ensieme wat beskikbaar is en dit is daarom dat dit ondersoek is. Die L64P SNP se alleel frekwensie is 49% en Ensembl genoom blaaier (www.ensembl.org/index.html, November 2018) voorspel dat aktiwiteit van die proteïene behou word tensypte van hierdie SNP.

Die kristalstruktuur van AKSM2A in Figuur 4-6 dui baie duidelik aan dat die N- en C-terminale ontbloot is en beskikbaar is vir fusie met suiweringsetikette en fusie proteïene. Dit het bevestig dat ekspressiemetodes wat etikette aan die N- en C-terminale bind wel gebruik kan word.

4.3.2 Groot skaalse plasmied ekstraksie van pET-32a+/AKSM2A en pET-32a+/AKSM2B

Die pET-32a+/AKSM2A en pET-32a+/AKSM2B plasmiede wat verkry is as DH5 α gliserol voorrade in die laboratorium en is in hierdie studie gebruik as die DNS bron van die AKSM2A en AKSM2B gene om alle klonerings mee uit te voer. 'n Groot skaalse plasmied isolasie van beide hierdie plasmiede is dus uitgevoer (4.2.4), hul konsentrasies is bepaal (4.2.5) en die grotes van die plasmiede is bevestig met agarose jel elektroforese (4.2.6) Figuur 4-7.



Figuur 4-7: 1% Agarose jel van die grootskaalse plasmied isolasie van pET32a(+)/AKSM2A en pET32a(+)/AKSM2B. Die superspiraal en fyningekeepde vorms van die sirkulêre plasmiede word aangetoon.

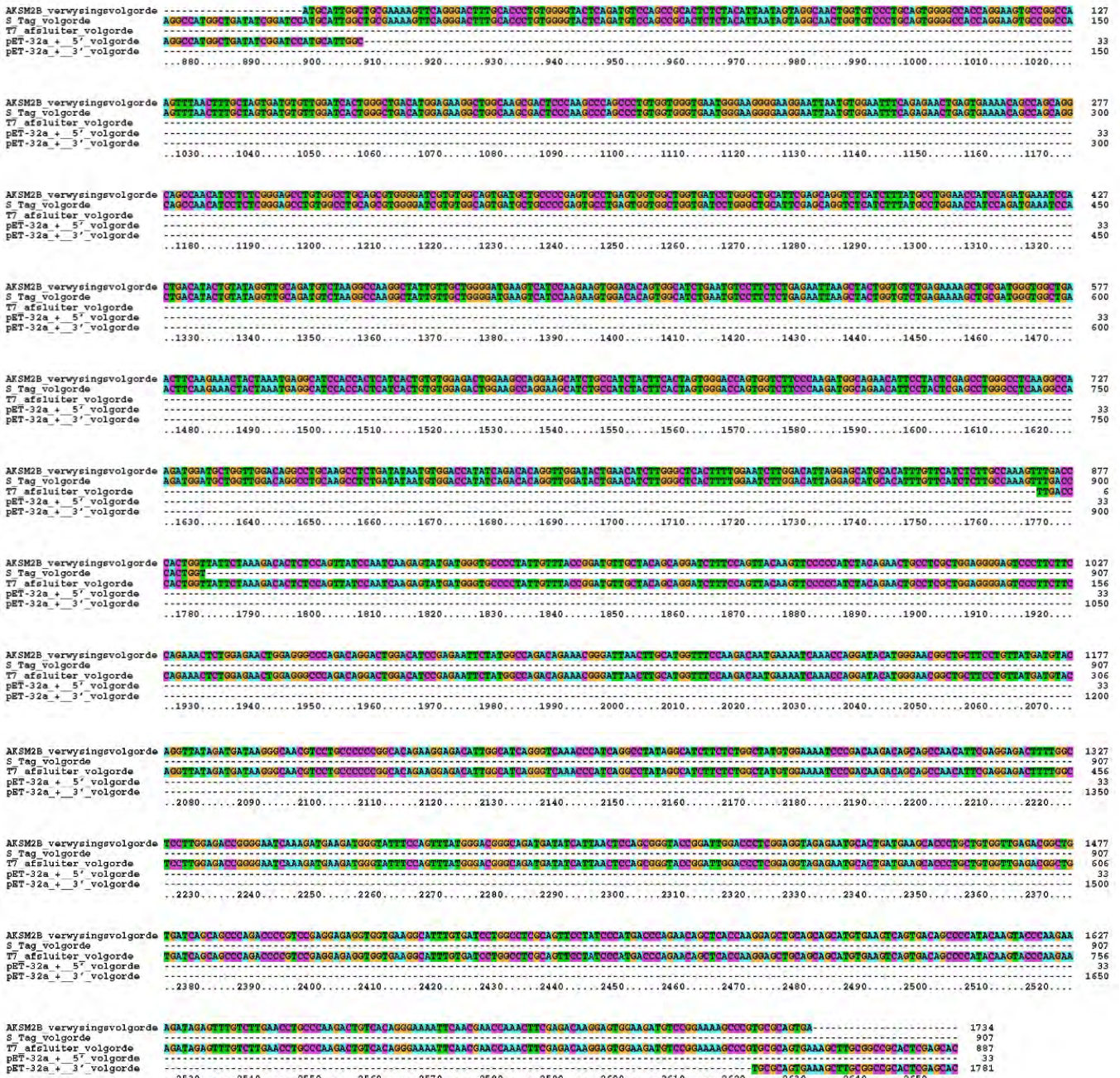
In Figuur 4-7 is die twee plasmiede, pET32a(+)/AKSM2A en pET32a(+)/AKSM2B, nog in hulle sirkulêre vorms. Die breë donker bande rondom 5000 basispare (bp) is die superspiraal vorm van die twee plasmiede. Die ligter band bo 10 000 bp is die fyningekeepde vorm van die plasmiede. Die bande stem ooreen met wat verwag word van sirkulêre pET32a(+)/AKSM2A en pET32a(+)/AKSM2B wat rondom 7600 bp verwag word en die agarose jel wat geen agtergrond of ander bande wys nie, toon aan dat slegs hierdie plasmiede geïsoleer is. Die konsentrasie van die twee plasmiede was 117.9 ng/μl vir pET32a(+)/AKSM2A en 100.3 ng/μl vir pET32a(+)/AKSM2B en daar was geen kontaminasie aangedui in die A_{260}/A_{280} en A_{260}/A_{230} waardes nie (afdeling 4.2.5). Om te bevestig dat die plasmiede wel korrek is, is Sanger volgorde bepaling uitgevoer (afdeling 4.3.3) en is die sirkulêre sowel as die lineêre weergawes van die plasmiede in afdeling 4.3.4 op 'n agarose jel elektroforese gelaai.

4.3.3 Sanger volgorde bepaling van die *AKSM2A* en *AKSM2B* gene in die pET32a(+) plasmiede

Die geen volgordes van die *AKSM2A* en *AKSM2B* gene in die pET32a(+) plasmiede moes bevestig word om te verseker dat die korrekte DNS gebruik word om alle klonerings mee uit te voer. Die verwysingsvolgordes van *AKSM2A* en *AKSM2B* soos aangedui in (2.5.1) moet altyd gebruik word sodat die data wat verkry word uit verskeie studies vergelykbaar is en omdat die twee gene so identies is. Die Sanger volgorde bepaling data is dus met hierdie verwysingsvolgordes vergelyk. Die S-tag voorwaartse voorvoerder en die T7-afsluiter terugwaartse voorvoerder is gebruik vir die Sanger volgorde bepalings en die resultate van die volgorde bepaling word in Figuur 4-8 en Figuur 4-9 weergegee.



Figuur 4-8: Die Sanger volgordebepaling van die *AKSM2A*-geen. Eerste lyn: Die *AKSM2A* verwysings volgorde. Tweede lyn: Die T7-afsluiter voorvoerder volgorde. Derde lyn: Die S-tag voorvoerder volgorde. Vierde lyn: Die pET32a(+) plasmied se 5' punt met die *Bam*HI restriksie ensiem sny plek (GGATCC) en 14 basisse van die *AKSM2A*-geen. Vyfde lyn: die pET32a(+) plasmied se 3' punt met die *Not*I restriksie ensiem sny plek (GCGGCCG) en 19 basisse van die *AKSM2A*-geen.

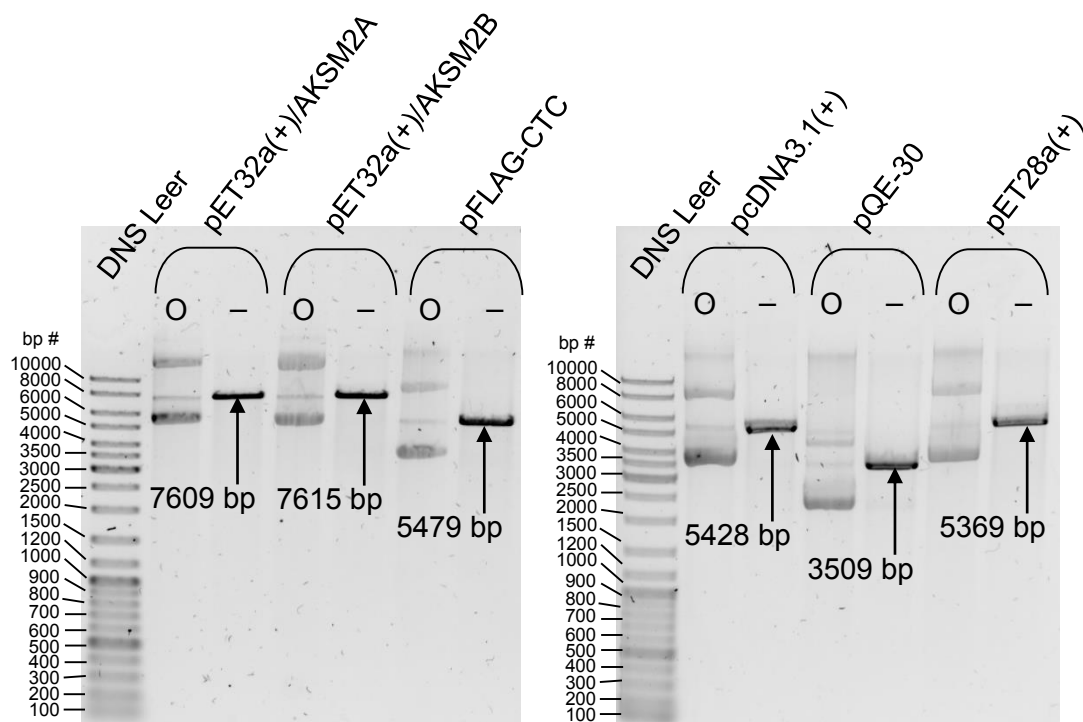


Figuur 4-9: Die Sanger volgordebepaling van die *AKSM2B*-geen. Eerste lyn: Die *AKSM2B* verwysings volgorde. Tweede lyn: Die S-tag voorvoerder volgorde. Derde lyn: Die T7-afsluiter voorvoerder volgorde. Vierde lyn: Die pET32a(+) plasmied se 5' punt met die *Bam*HI restriksie ensiem sny plek (GGATCC) en 10 basisse van die *AKSM2B*-geen. Vyfde lyn: die pET32a(+) plasmied se 3' punt met die *Hind*III restriksie ensiem sny plek (AAGCTT) en 10 basisse van die *AKSM2B*-geen.

Die resultate van die Sanger volgordebepaling in Figuur 4-8 en Figuur 4-9 toon aan dat die basispaar volgorde van die volledige geen verkry kon word deur die voorvoerder volgordes te gebruik en dat dit in ooreenstemming is met die verwysings volgordes van *AKSK2A* en *AKSM2B*. Die punte van die pET32a(+) plasmiede waarin die twee gene is, word ook deur die Sanger volgorde bepaling se data getoon. Dit toon aan dat die restriksie ensiem sny plekke wat gebruik is om die onderskeie gene in te kloner, korrek is en dat die gene in die korrekte leesraam is. Dit is dus aanvaar dat die DNS bronne van *AKSM2A* en *AKSM2B* korrek is en dat die plasmiede gebruik kan word om klonering mee uit te voer.

4.3.4 Transformasie van aangekoopte plasmiede in chemies kompetente JM109 *E. coli* en bevestiging van plasmied grotes

Om te bevestig dat die pET32a(+)/AKSM2A en pET32a(+)/AKSM2B plasmiede en die aangekoopte plasmiede (Tabel 4-7) wat in JM109 *E. coli* getransformeer (4.2.12) is die regte basispaar lengtes het, is die plasmiede na transformasie op 'n klein skaal geïsoleer (4.2.8), met *Bam*HI gelineariseer (4.2.9) en saam met hul lineêre weergawes op 'n agarose jel gelaai en agarose jel elektroforese is uitgevoer (4.2.6) Figuur 4-10.



Figuur 4-10: 1% Agarose jels van die lineêre en sirkulêre weergawes van pET32a(+)/AKSM2A, pET32a(+)/AKSM2B, pFLAG-CTC, pcDNA3.1(+), pQE-30 en pET28a(+). O: sirkulêre plasmied. -: lineêre plasmied.

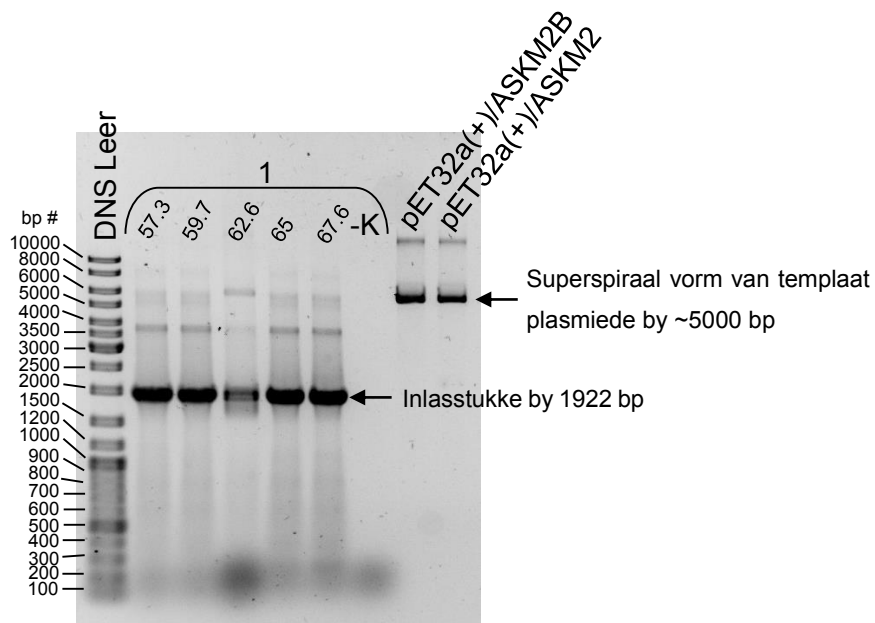
Figuur 4-10 toon die agarose jels waarop die lineêre en sirkulêre weergawes van pET32a(+)/AKSM2A, pET32a(+)/AKSM2B, pFLAG-CTC, pcDNA3.1(+), pQE-30 en pET28a(+) plasmiede gelaai is en geskei is met agarose jel elektroforese. Die sirkulêre plasmiede in die figuur toon die fyngekeerde, lineêre, superspirale en enkelstring sirkulêre vorms van die plasmied aan. Die gelineariseerde plasmiede wys slegs die lineêre vorm van die plasmied en dit is die vorm wat die akkuraatste aanduiding gee van die basispaar lengte van die plasmied op die agarose jel. Elke plasmied se liniêre vorm se bp lengte stem ooreen met die lengte wat die verskaffers aandui en daar is slegs een band by die gelineariseerde plasmiede wat aandui dat daar slegs een plasmied in elk van die *E. coli* gliserol voorrade is en dat hierdie voorrade en plasmiede verder gebruik kan word vir klonering.

4.3.5 Optimalisering van die polimerasie ketting reaksies (PKRs)

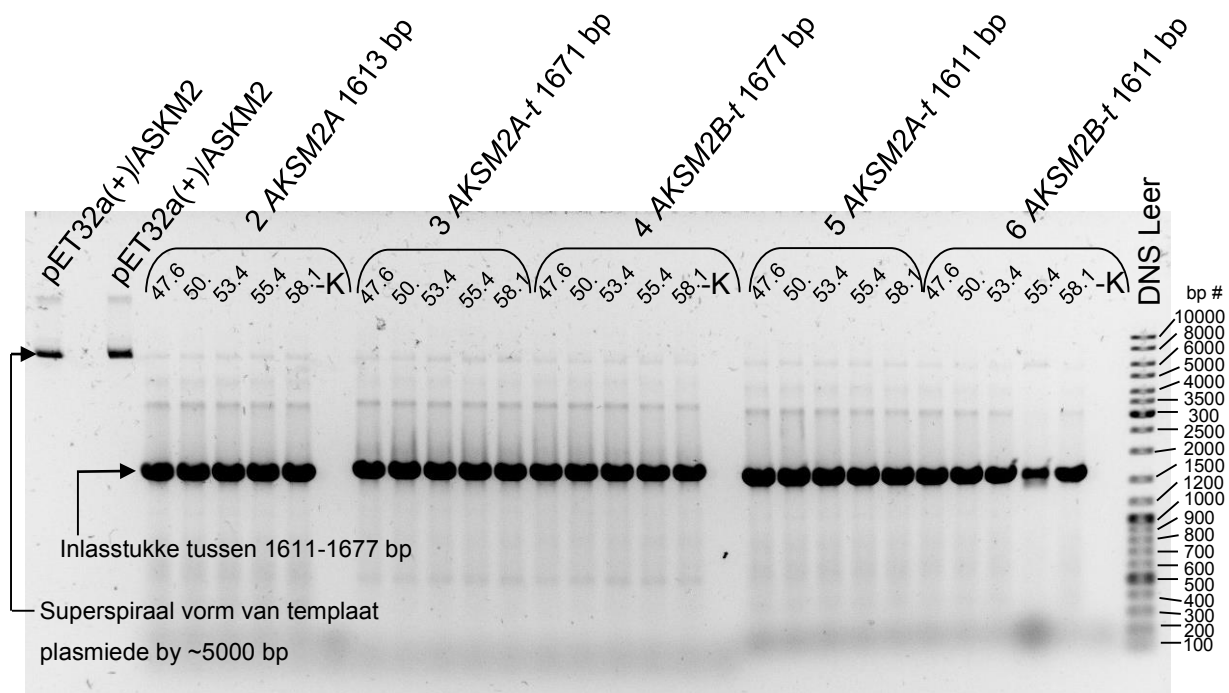
4.3.5.1 Die eerste PKR optimalisering stap: Hitte gradiënt van die hibridiseringstemperatuur.

Ses ontwerpte voorvoerder pare (Tabel 4-12) is in die begin van die optimalisering gekies om te toets of die ontwerpte voorvoeders suksesvol gebruik kan word in PKRs om die templaats DNS te amplifiseer. Hierdie PKRs is uitgevoer met 'n hittegradiënt van hul hibridiserings temperature om in die begin van die optimalisering 'n idee te verkry van watter hibridiserings temperatuur die voorvoeders suksesvol aan die templaats DNS sal bind (4.2.16.1).

Die resultate van die eerste PKR toetse en poging tot PKR optimalisering word gegee in Figuur 4-11 en Figuur 4-12.



Figuur 4-11: 1% Agarose jel van die hitte gradient met voorvoerder paar 1 (pc+-Fwd en Rev_stop_SalI) wat die AKSM2A inlasstuk produseer by 1922 bp. Die hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt (in °C) word aangedui. Die templaate plasmiede is ook in hul sirkulêre vorms gelaai. -K: Negatiewe kontrole.



Figuur 4-12: 1% Agarose jel van hitte gradiënt met voorvoerder paar 2 (Trunc_ *Bam*HI en Rev_stop_ *Sall* wat *AKSM2A-t* produseer) 3 (Trunc_ *Bam*HI en pc+Rev wat *AKSM2A-t* produseer), 4 (Trunc_ *Bam*HI en pc+Rev wat *AKSM2B-t* produseer), 5 (Flag_Fwd_Trunc en FLAG_Rev wat *AKSM2A-t* produseer) en 6 (Flag_Fwd_Trunc en FLAG_Rev wat *AKSM2B-t* produseer) se PKR inlasstuk resultaat. Die hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt (in °C) word aangedui. Die templaate plasmiede is ook in hul sirkulêre vorms gelaai. -K: Negatiewe kontrole.

Die inlasstukke was suksesvol geamplifiseer deur die toestande in afdeling 4.2.16.1 te gebruik. Reaksie 1 se inlasstuk (*AKSM2A*) moet by 1922 bp wees en hy verskyn net onder die 2000 bp DNS leer band in Figuur 4-11 en reaksies 2-6 se inlasstukke moet rondom 1640 bp wees en hulle verskyn net bo die 1500 bp DNS leer band in Figuur 4-12. Die negatiewe kontroles aan gedui deur die simbool -K is skoon in Figuur 4-11 en Figuur 4-12 en toon net die voorvoerder dimere. Dit bevestig dat daar geen kontaminasie was nie. Die PKR reaksies toon wel nog onspesifieke bande en smere rondom die inlasstukke en voorvoerder dimere kom voor by ~100 bp. Die hitte gradiënt wat gevolg is toon geen verskil by enige van die reaksies nie. Dit dui aan dat die optimale hibridiseringstemperatuur nog nie bereik is nie en dat die voorvoeders by al hierdie temperature

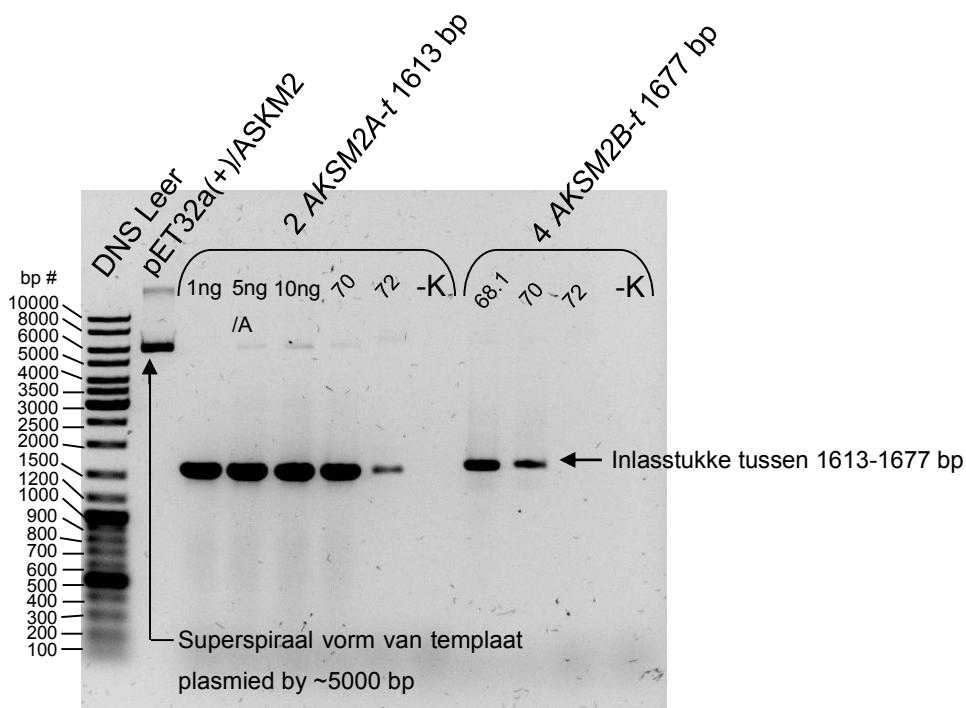
(Trunc_BamHI en pc+Rev wat AKSM2B-t produseer) se PKR inlasstuk resultaat. Die hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt (in °C) word aangedui. Die templaar plasmiede is ook in hul sirkulêre vorms gelaai. – K: Negatiewe kontrole.

Voorvoerder paar 2 in Figuur 4-13 se PKR produkte was dieselfde as in afdeling 4.3.5 se Figuur 4-12. Die optimale temperatuur en toestande is dus nog steeds nie bereik nie, maar omdat die reaksie ewe goeie resultate gee met die verminderde siklusse en korter verlengtyd kan dit voortaan gebruik word om sodoende die eksperimentele tydsduur te verkort. Voorvoerder paar 4 in Figuur 4-13 se PKR produkte het wel 'n afname in agtergrond, smere en onspesifieke bande getoon soos wat die hitte gradiënt hoër temperature bereik het.

Om die PKRs nog meer te optimaliseer is 'n verdere hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt op beide voorvoerder pare uitgevoer. Die verlengtyd is nog korter gemaak en strenger uitgewerk en die denaturering tyd is ook geïdentifiseer as iets wat ook kan verminder. Die optimale hoeveelheid templaar DNS is ook getoets soos in afdeling 4.2.16.3.

4.3.5.3 Die derde PKR optimalisering stap: Verdere vermindering van verlengtyd, die denaturering tyd is verminder, die optimale hoeveelheid templaar DNS is bepaal en 'n verdere hitte gradiënt is uitvoer.

In die derde PKR optimalisering stap is die verlengtyd presies uitgewerk om dit te optimaliseer. Die denaturering tyd is verminder. Die optimale hoeveelheid templaar DNS is uitgewerk en 'n verdere hitte gradiënt is uitgevoer soos in afdeling 4.2.16.3.. Die resultate van hierdie optimalisering word aangetoon in Figuur 4-14.



Figuur 4-14: 1% Agarose jel van die die PKRs wat uitgevoer is met 'n korter denatureer tyd, uitgewerkte verlengtyd, 'n verdere hitte gradiënt en 'n hoeveelheid templaas DNS reeks (1 ng, 5 ng en 10 ng) met voorvoerder paar 2 (*Trunc_BamHI* en *Rev_stop_SalI* wat *AKSM2A-t* produseer), en 4 (*Trunc_BamHI* en *pc+Rev* wat *AKSM2B-t* produseer) se PCR inlasstuk resultaat. Die hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt (in °C) word aangedui. Die templaas plasmied is ook in hul sirkulêre vorms gelaai. -K: Negatiewe kontrole.

Die verdere hitte gradiënt en vermindering van die verleng- en denatureertyd het die PCR reaksies drasties verbeter en geoptimaliseer. Die resultaat in Figuur 4-14 wys dat die onspesifieke bande wat voorheen bo die inlasstukke verskyn het nou afwesig is en dat die agtergrond smere ook drasties verminder het.

Die hitte gradiënt by die PKRs van voorvoerder paar 2 (Figuur 4-14) toon aan dat die optimale hibridiseer temperatuur tussen 70°C en 72°C lê. Die 72°C PCR se agtergrond is weg, maar die inlasstuk konsentrasie het ook drasties verminder en 70°C PCR se konsentrasie is hoog, maar daar is nog steeds effense agtergrondsmere. Op dieselfde manier toon die hitte gradiënt van die PKRs van voorvoerder paar 4 (Figuur 4-14) dat die optimale hibridiseer temperatuur tussen 68.1°C en 70°C is. Die 71°C hibridiseer temperatuur was te hoog vir die PCR met voorvoerder

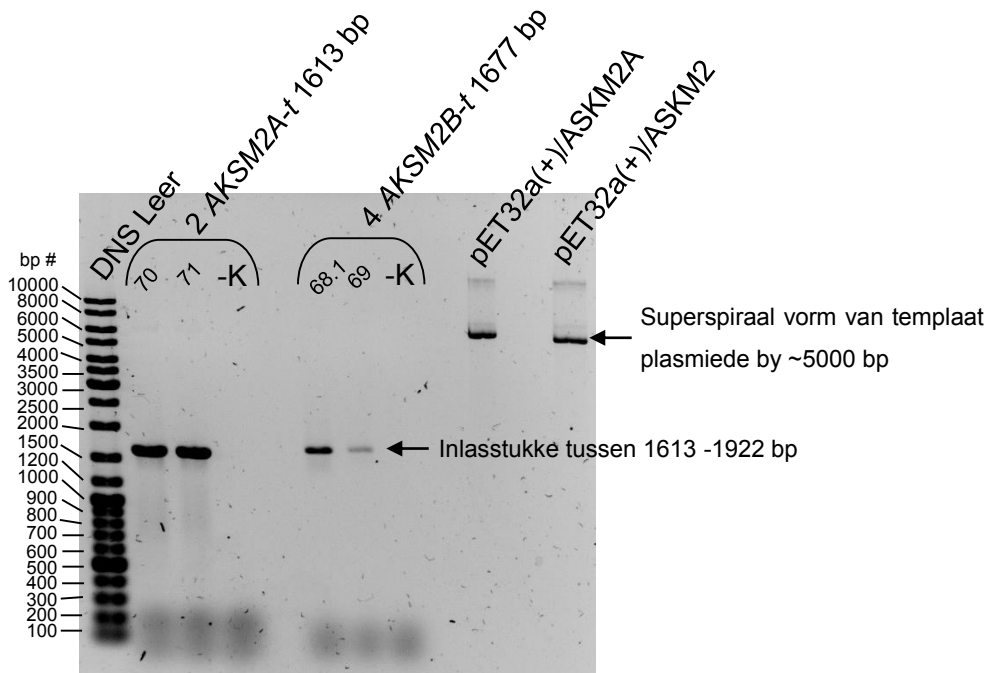
paar 4 en het nie toegelaat dat die voorvoeders met die templaats DNS hibridiseer nie, daarom is daar geen band nie. Die negatiewe kontroles aangedui deur -K in Figuur 4-14 was skoon en dui aan dat daar nie kontaminasie was nie.

Die gradiënt van templaats DNS toon aan dat die kleiner hoeveelheid templaats DNS (1 ng) lei tot ongeveer dieselfde konsentrasie inlasstukke, maar dat dit die agtergrondsmere, spesifiek by die inlasstukke by die hoër basispaar smere, verwyder en so die PKR reaksies nog meer optimaliseer. 1 ng templaats DNS is dus verder gebruik as die optimale hoeveelheid templaats DNS.

Die optimalisering van die van die PKR toestande soos in afdelings 4.2.16.1 - 4.2.16.3 is met hierdie bevindinge gestaak en as optimaal genoeg beskou vir die doel van die PKRs. Elke voorvoerder paar se PKRs is dus met hierdie toestande uitgevoer, maar elkeen se optimale hibridiseer temperatuur moet steeds bepaal word.

4.3.6 Hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt van PKRs met voorvoerder pare 2 en 4 met die geoptimaliseerde PKR metodes.

Die optimale PKR toestande soos in afdelings 4.2.16.1 - 4.2.16.3 bepaal is gebruik om 'n finale hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt vir voorvoerder pare 2 en 4 op te stel soos in afdeling 4.2.17. Die resultate daarvan word weergegee in Figuur 4-15.



Figuur 4-15: 1% Agarose jel van die hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt van PKRs met voorvoerder pare 2 (*Trunc_BamHI* en *Rev_stop_SalI* wat *AKSM2A-t*

produseer), en 4 (Trunc_ *Bam*HI en pc+Rev wat *AKSM2B-t* produseer) uitgevoer is. Die hibridiseringstemperatuur hitte gradiënt (in °C) word aangedui. –K: negatiewe kontroles.

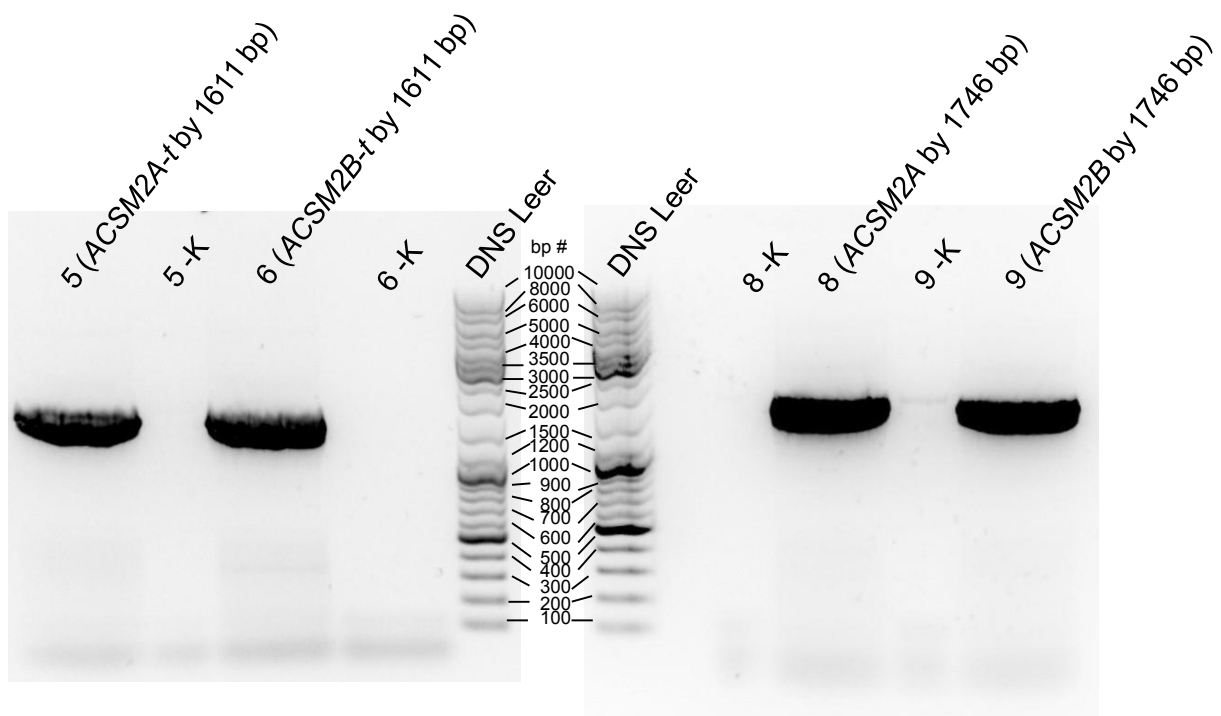
Die hitte gradiënt in Figuur 4-15 toon aan dat die PKR reaksie met voorvoerder pare 2 se optimale hibridiseer temperatuur by temperatuur 71°C is, omdat dit die hoogste temperatuur is waar die PKR reaksie steeds geskied. Hierdie reaksie is verder by hierdie temperatuur uitgevoer en gebruik. Die fyn agtergrondbereik onder die inlasstuk is as aanvaarbaar beskou omdat die inlasstuk uit die agarose jel geëkstraheer gaan word. Die temperatuur, 68.1°C, is die optimaal vir die PKR reaksie met voorvoerder paar 4, omdat die reaksie baie swakker geskied by 69°C Die skoon kontroles toon aan dat geen kontaminasie plaasgevind het nie.

Hierdie resultate dui aan hoe die inlasstukke wat geproduseer word met die geoptimaliseerde PKRs en optimale hibridiseer temperatuur lyk. Alle ontwerpte voorvoerder pare se PKRs is met hierdie metode geoptimaliseer en is geproduseer soos in afdeling 4.2.18.

4.3.7 Rekombinante konstruksie

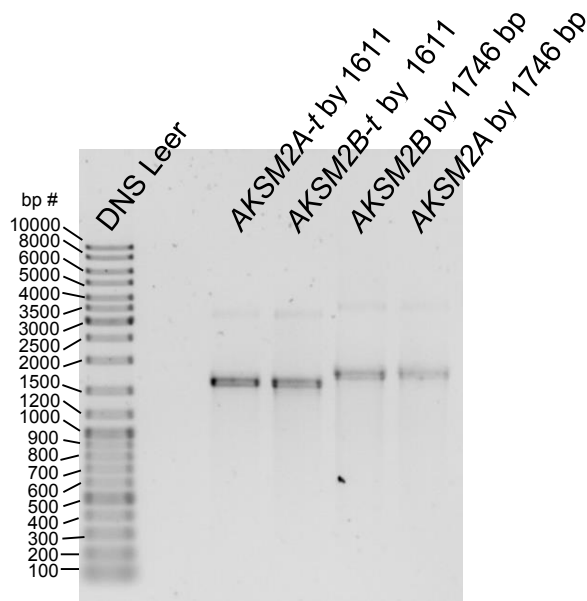
4.3.7.1 pFLAG metode: Tradisionele restriksie ensiem klonering van inlasstukke in pFLAG-CTC plasmied.

Voorvoerder pare 5, 6, 8 en 9 se PKRs soos in afdeling 4.2.18 is gebruik om die inlasstukke vir die pFLAG sisteem te produseer. Die volledige volume van die PKR reaksies is gelaai in Figuur 4-16 en toon aan dat die vier PKR reaksies suksesvol uitgevoer is. Die GelRed vooraf gegiet visualisering metode is gebruik in Figuur 4-16 en dit is daarom dat die DNS leer se bande smere gevorm het.



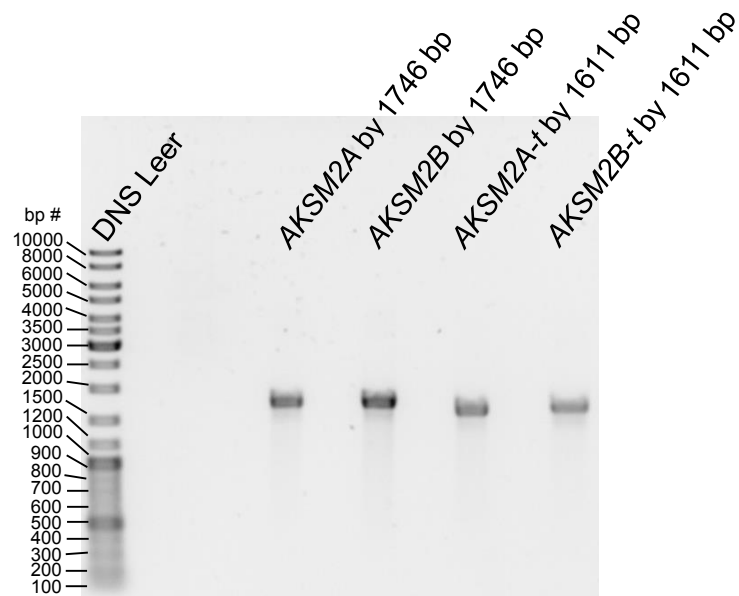
Figuur 4-16: 1% Agarose jel van voorvoerder pare 5 (wat *AKSM2A-t* produseer), 6 (wat *AKSM2B-t* produseer), 8 (wat *AKSM2A* produseer) en 9 (wat *AKSM2B-t* produseer) se PKRs met hul ooreenstemmende negatiewe kontroles angedui deur: -K.

Agarose jel ekstraksie (4.2.19) is op die bande in Figuur 4-16 uitgevoer, hul konsentrasie is bepaal en die inlasstukke is op 'n 1% agarose jel gelaai (4.2.6) ter bevestiging van hul basispaar lengtes. Sien Figuur 4-17.



Figuur 4-17: 1% Agarose jel ter bevestiging van die pFLAG metode se voorbereide inlasstukke se basispaar lengtes.

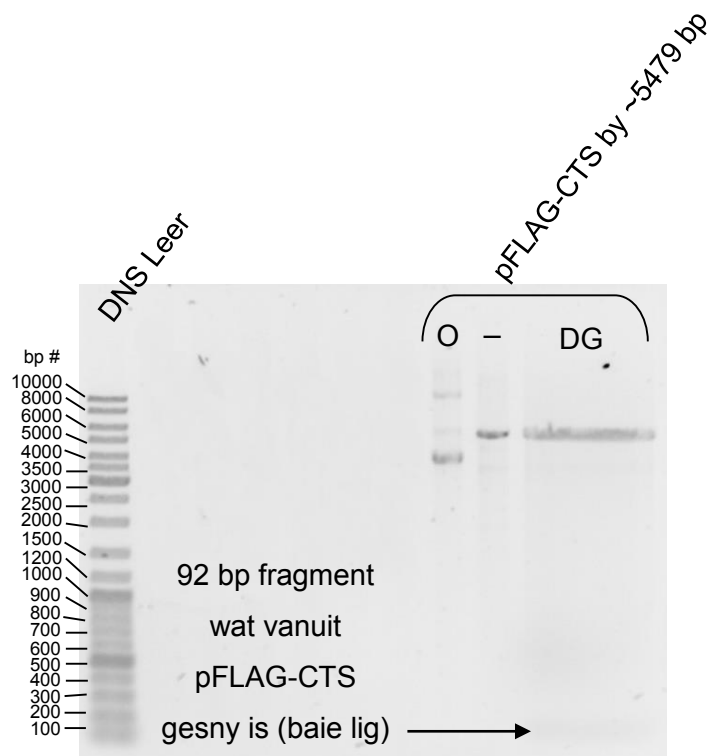
Figuur 4-17 toon aan dat die inlasstukke suksesvol met die agarose jel ekstraksie geïsoleer is. Daar is 'n baie fyn band bo elkeen van die inlasstukke wat saam oorgedra kon word van die jel ekstraksie of 'n aanduiding kan wees van kontaminasie of nuklease aktiwiteit. Daar is besluit om die *NdeI* en *SalI* restriksie ensiem snyding (4.2.9) en PKR skoonmaak (4.2.20) van die inlasstukke uit te voer, die konsentrasie te bepaal en 'n agarose jel elektroforese uit te voer om te bevestig of die agtergrond bande weer verskyn.



Figuur 4-18: 1% Agarose jel ter bevestiging van *NdeI* en *SalI* restriksie ensiem behandelde inlasstukke van die pFLAG metode.

Figuur 4-18 toon aan dat die restriksie ensiem behandelde inlasstukke steeds by die regte basispaar grotes verskyn en dat daar geen ander bande meer verskyn nie. Hierdie inlasstukke is gebruik in die ligering van die pFLAG sisteem.

Die pFLAG-CTS plasmied is met die *NdeI* en *SalI* restriksie ensieme gesny (4.2.9). Dit is ook gelineariseer met *HindIII* (4.2.9). Die sirkulêre, gelineariseerde en dubbeld gesnyde pFLAG-CTS plasmied is in Figuur 4-19 op 'n 1% agarose jel gelaai (4.2.6).



Figuur 4-19: 1% Agarose jel van die pFLAG-CTS plasmied in sy drie vorme. O: sirkulêr. - : lineêr. DG: dubbeld gesny (*NdeI* en *SaII*).

In Figuur 4-19 is die verwagte drie vorms van die sirkulêre pFLAG-CTS plasmied sigbaar. Die gelineariseerde weergawe stem ooreen met die verwagte 5479 bp en dat die dubbeld gesnyde pFLAG-CTS plasmied suksesvol snyding ondergaan het. Die dubbele snyding lei na die uitsny van 'n 92 basispare stuk DNS en dit word gesien as 'n baie ligte band wat ooreenstem met die 100 bp band in die DNS leer.

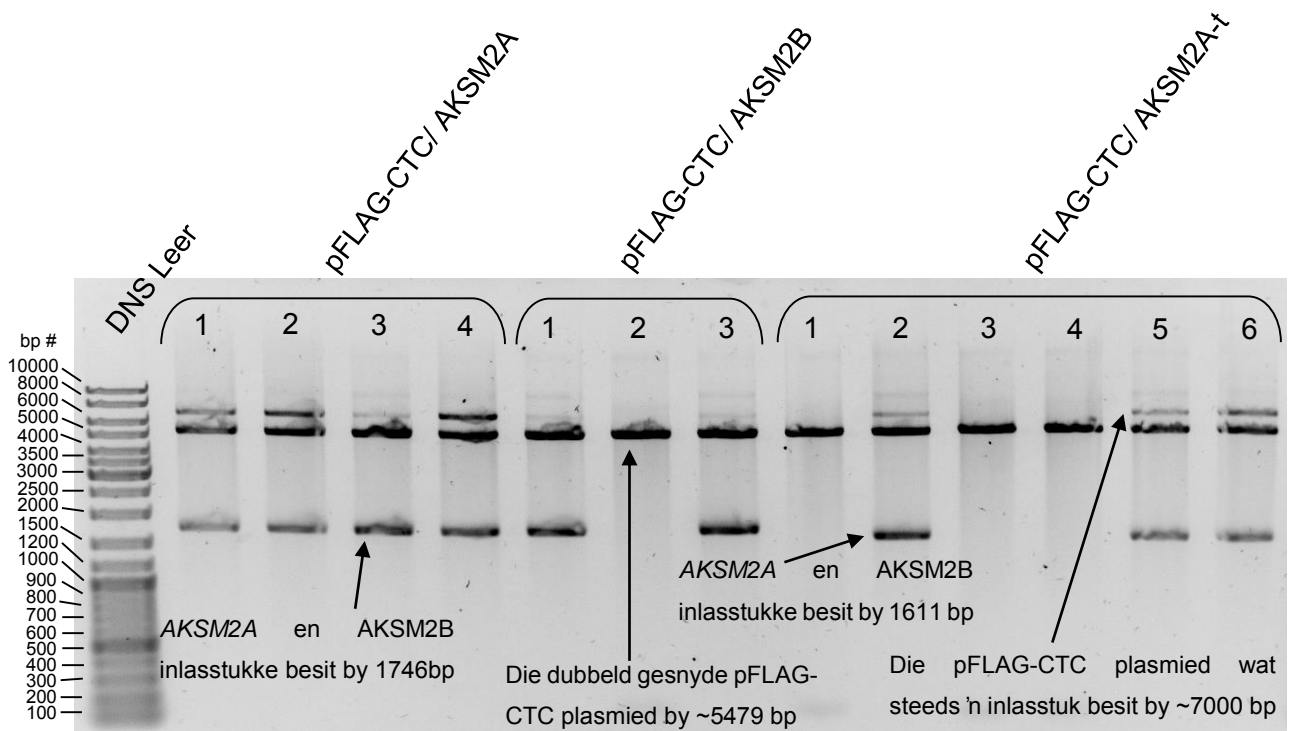
Die dubbeld gesnyde pFLAG-CTS plasmied is geïsoleer met agarose jel ekstraksie (4.2.19). Die gelineariseerde pFLAG-CTS plasmied is skoongemaak met PKR produk/inlasstuk skoonmaak en is gebruik as 'n kontrole in die ligering en transformasie.

Ligering (4.2.22) en transformasie (4.2.13) van pFLAG-CTS plasmied en die pFLAG sisteem inlasstukke in DH5α *E. coli* is uitgevoer en resultate word in Tabel 4-36 weer gegee.

Tabel 4-36: Resultate van pFlag sisteem ligering en transformasie.

Ligering en transformering reaksie	Aantal kolonies
pFLAG-CTS + AKSM2A	4
pFLAG-CTS + AKSM2B	3
pFLAG-CTS + AKSM2A-t	6
pFLAG-CTS + AKSM2B-t	0
Lineêre pFLAG-CTS (positiewe kontrole)	Baie kolonies
Sirkulêre pFLAG-CTS (positiewe kontrole)	Baie kolonies

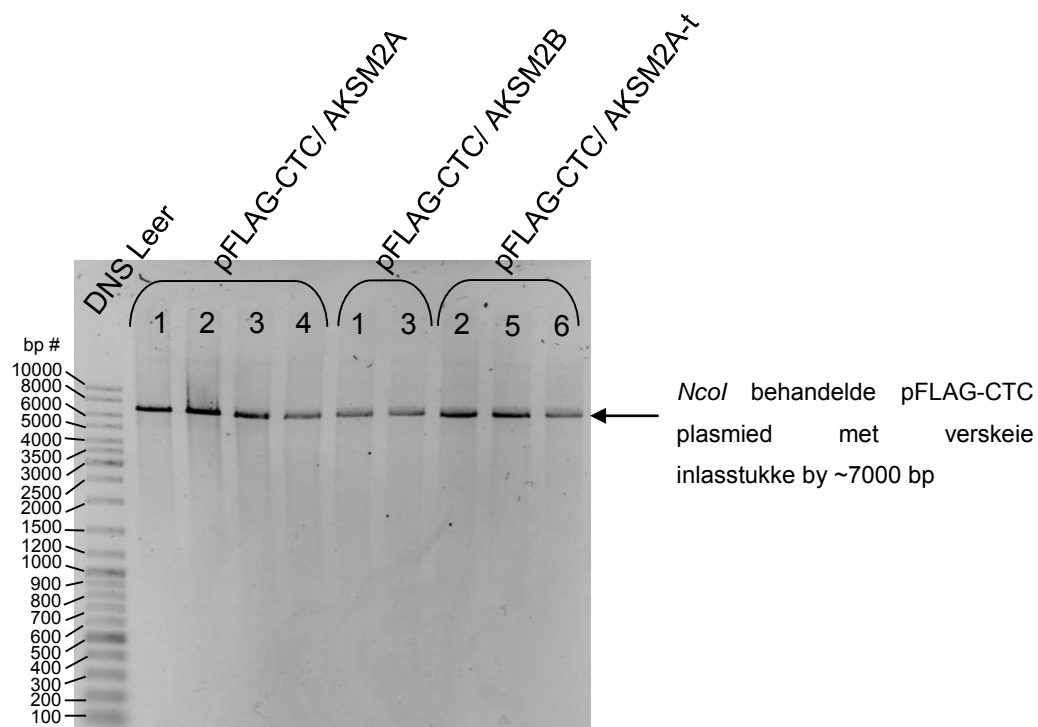
Die ses kolonies is opgegroeï, gliserol voorrade van gemaak (4.2.7) en op 'n kleinskaal geïsoleer (4.2.8). Die pFLAG-CTC/AKSM2B-t konstruk het geen kolonies gehad nie. Die konstruk se klonering is dus herhaal. Restriksie ensiem snyding met *NdeI* en *SalI* van die gekloneerde plasmiede is uitgevoer om te bevestig of die inlasstukke korrek gekloneer het (4.2.9). Sien Figuur 4-20.



Figuur 4-20: 1% Agarose jel van *NdeI* en *SalI* restriksie ensiem snyding van gekloneerde pFLAG-CTC plasmiedkonstrukte ter bevestiging van inlasstuk klonering. Die getalle dui die kolonie nommer aan. Die bande met pFLAG-CTC plasmied en 'n inlasstuk is by 7000 bp, die band met

pFLAG-CTC plasmied sonder 'n inlasstuk is by 5479 bp, die ASKM2A en AKSM2B inlasstuk bande is by 1746 bp en die AKSM2A-t inlasstuk band is by 1611 bp.

Die restriksie ensiem snyding in Figuur 4-20 het die plasmiede onvolledig gesny en daarom word drie bande waargeneem. Die boonste band is die plasmied met die inlasstuk, die middelste band is die plasmied sonder die inlasstuk en die onderste band is slegs die inlasstuk. Al drie bande is by die korrekte basispaar lengtes. Die band met pFLAG-CTC plasmied en 'n inlasstuk is by 7000 bp, die band met pFLAG-CTC plasmied sonder 'n inlasstuk is by 5479 bp, die ASKM2A en AKSM2B inlasstuk bande is by 1746 bp en die AKSM2A-t inlasstuk band is by 1611 bp. Kolonie 2 by pFLAG-CTC/AKSM2B en kolonies 3 en 4 by pFLAG-CTC/AKSM2A-t het nie die korrekte inlasstuk bevat nie. Om te bevestig dat dit slegs onvolledige snyding was in Figuur 4-20 en dat daar nie twee verskillende grote plasmiede in die *E. coli* is nie is die plasmiede gelineariseer met *NcoI* (4.2.9) in Figuur 4-21.



Figuur 4-21: 1% Agarose jel van *NcoI* restriksie ensiem snyding van die pFLAG-CTC plasmiedkonstrukte ter bevestiging van grootte en teenwoordigheid die konstrukte en teenwoordigheid van 'n enkele plasmied. Die getalle dui die kolonie nommer aan.

Die enkele restriksie ensiem snyding in Figuur 4-21 toon aan dat daar net een plasmied in die suksesvolle kolonies is en dat hierdie plasmiede gestuur kan word vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14) om finaal te bevestig dat hierdie plasmiede korrek is.

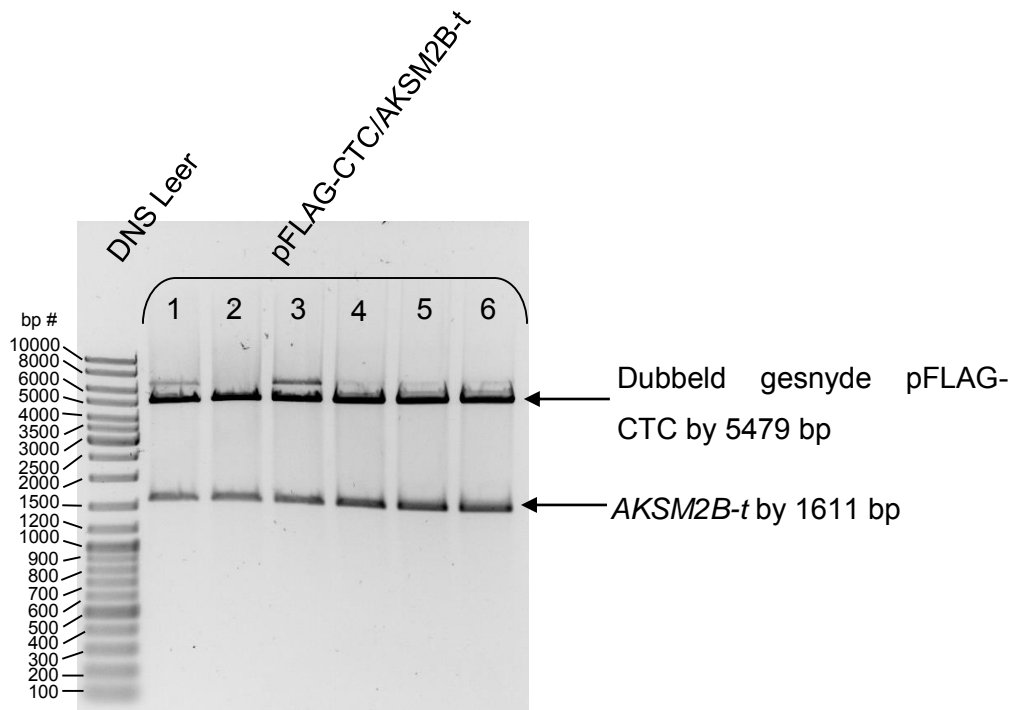
Die resultate van die Sanger volgorde bepaling (bylaag A) het aangetoon dat die drie plasmiede die korrekte inlasstukke bevat het en kan gebruik word om proteïenekspressie mee te toets.

Die pFLAG-CTC/AKSM2B-t konstruksie klonering is herhaal en die resultaat van die ligering (4.2.22) en transformering (4.2.12) van die *AKSM2B-t* inlasstuk in die pFLAG-CTS plasmied word weergegee in Tabel 4-37.

Tabel 4-37: Resultaat van klonering van *AKSM2B-t* in die pFLAG-CTS plasmied.

Ligering en transformering reaksie	Aantal kolonies
pFLAG-CTS + AKSM2B-t	>100
Dubbeld gesnyde pFLAG-CTS (negatiewe kontrole)	6
Lineêre pFLAG-CTS (positiewe kontrole)	>100
Sirkulêre pFLAG-CTS (positiewe kontrole)	>100

Alhoewel die negatiewe kontrole (die dubbeld gesnyde pFLAG-CTC plasmied) 6 kolonies geproduseer het, het die ligering van *AKSM2B-t* in pFLAG-CTS, baie meer kolonies en is die kans goed dat daar suksesvolle kolonies is. Self ligering kom dus wel voor, maar teen 'n baie lae konsentrasie. Ses suksesvolle kolonies is opgegroeï, geïsoleer (4.2.8) en met *NdeI* en *SalI* restriksie ensieme behandel (4.2.9) om te bevestig dat die inlasstukke korrek gekloneer het. Sien Figuur 4-22.



Figuur 4-22: 1% Agarose jel van *NdeI* en *SalI* restriksie ensiem snyding ter bevestiging van regte inlasstuk in die pFLAG-CTC/AKSM2B-t plasmied. Die getalle dui die kolonie nommer aan.

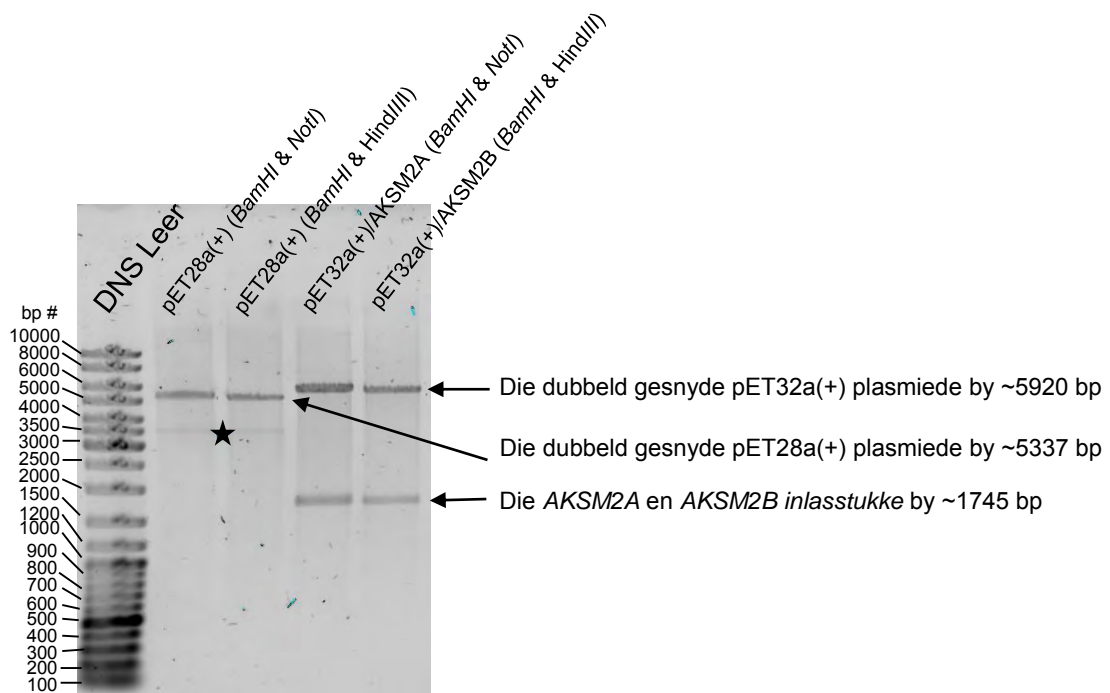
Al die kolonies se plasmiede besit die regte grote inlasstuk en is gestuur vir Sanger volgorde bepaling (bylaag A).

Die resultaat van die sanger volgorde bepaling het aangetoon dat die pFLAG-CTC/AKSM2B-t plasmied korrek gekloon is.

Die transformasie van die pFLAG-CTC plasmied en die vier gekloneerde en bevestigde pFLAG-CTC plasmiede konstrunkte in hul ekspressie gasheer, BL21(DE3)RIL *E. coli*, was suksesvol en gliserol voorrade is voorberei (4.2.7).

4.3.7.2 pET28 sisteem tradisionele restriksie ensiem klonering

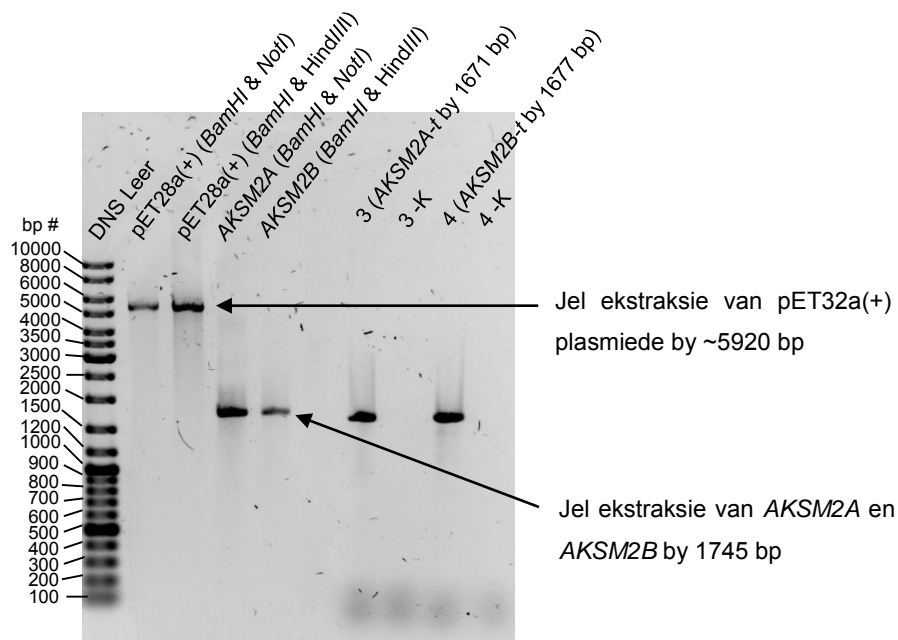
Die pET28a(+) plasmied is voorberei vir klonering deur behandeling met restriksie ensieme (4.2.9) soos aangetoon in Figuur 4-23. Die vollengte *AKSM2A* en *AKSM2B* gene is vanuit die pET32a(+) plasmied gesny snyding(4.2.9) soos in Figuur 4-23.



Figuur 4-23: 1% Agarose jel van die restriksie ensiem snyding van pET28a(+), pET32a(+)/AKSM2A en pET32a(+)/AKSM2B plasmiede. Die gebruikte restriksie ensieme word aangetoon in hakkies.

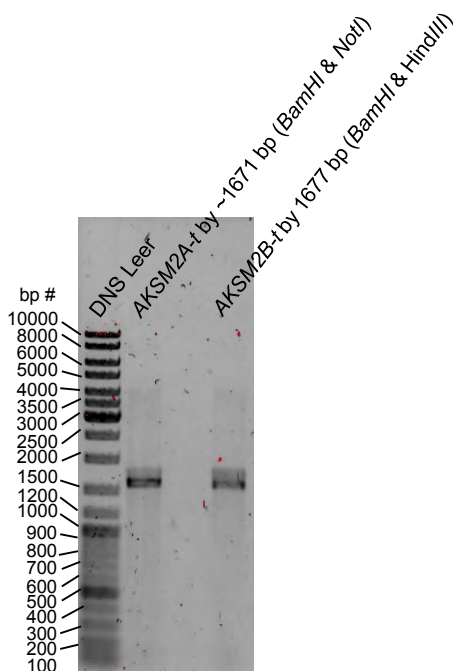
Figuur 4-23 toon aan dat die restriksie ensiem snyding van *AKSM2A* en *AKSM2B* vanuit die pET32a(+) plasmied suksesvol was. Die pET32a(+) plasmied band verskyn tussen 5000 bp en 6000 bp wat ooreenstem met die 5920 bp wat verwag word. Die *AKSM2A* en *AKSM2B* gene verskyn tussen 1500 bp en 2000 bp wat ooreenstem met die 1745 bp wat verwag word. Die restriksie ensiem snyding van die pET28a(+) plasmied was ook suksesvol, maar 'n baie fyn band verskyn by die ★ in Figuur 4-23 wat ooreenstem met die superspiraal vorm van die pET28a(+) plasmied. Dit is 'n aanduiding van onvolledige snyding en kan daartoe lei dat daar enkel gesnyde pET28a(+) plasmiede kan wees wat saam die lineêre band geïsoleer kan word en weer sal selfigeer tydens 'n ligeringsreaksie. Dit kan lei na vals positiewe resultate. Beide pET28a(+) plasmiede en die *AKSM2-gene* is geïsoleer met jel ekstraksie (4.2.19).

Voorvoerder pare 3 en 4 se PKRs (4.2.18) is uitgevoer en 'n bevestigende agarose jel is gemaak (4.2.6) van die PKR produkte en die jel ekstraksie van die pET28a(+) plasmiede en die *AKSM2A* en *AKSM2B* gene. Sien Figuur 4-24.



Figuur 4-24: 1% Agarose jel as bevestiging van jel ekstraksie van pET28a(+) plasmiede, AKSM2A en AKSM2B gene en voorvoerder pare 3 (wat AKSM2A-t produseer) en 4 (wat AKSM2B-t produseer) se PKR produkte. -K: negatiewe kontrole.

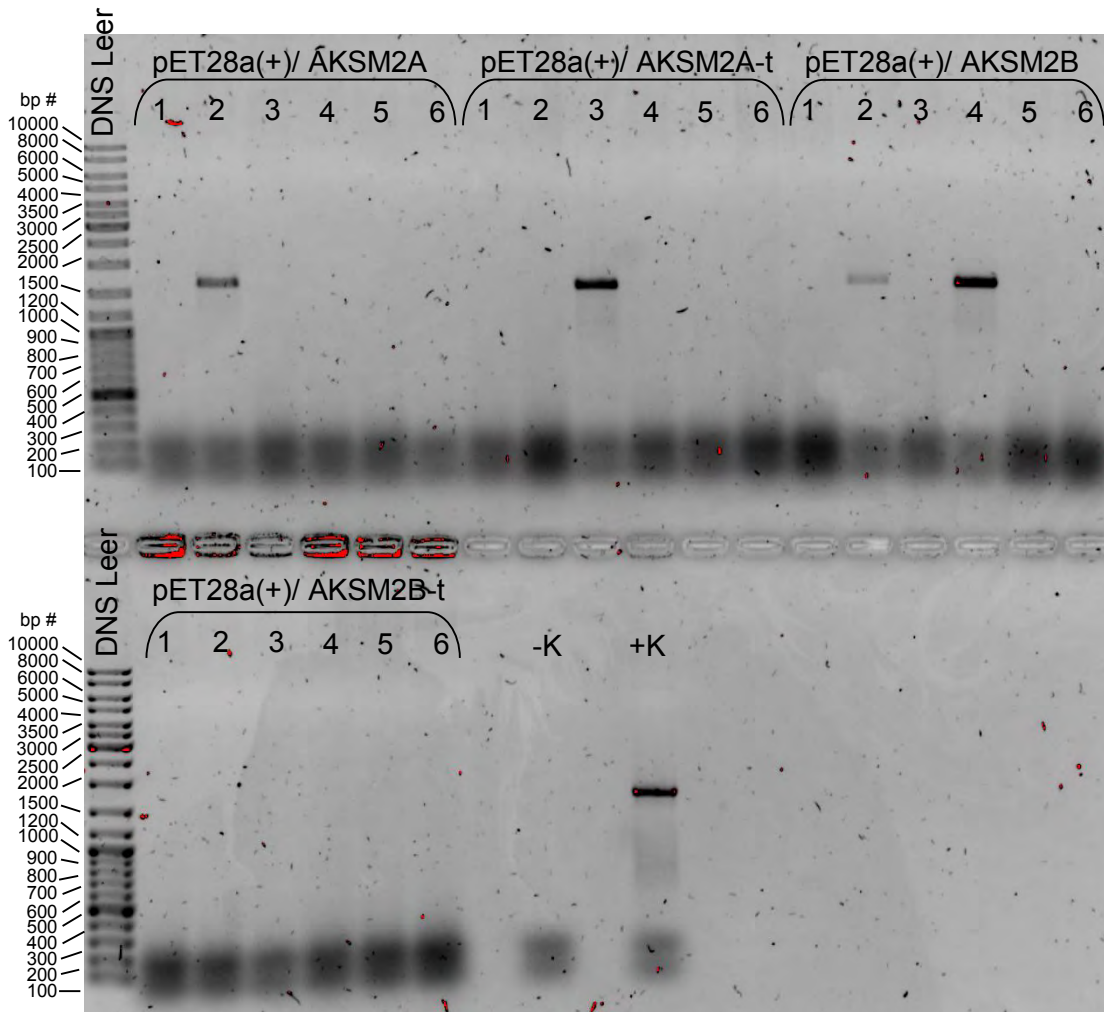
Figuur 4-24 toon aan dat die jel ekstraksie van die pET28a(+) plasmiede en die AKSM2A en AKSM2B gene suksesvol was en dat die voorvoerder pare 3 en 4 se PKRs (4.2.18) suksesvol uitgevoer is. Die geproduseerde AKSM2A-t en AKSM2B-t inlasstukke is geïsoleer deur jel ekstraksie en hul konsentrasie is bepaal. AKSM2A-t is met die restriksie ensieme BamHI en NotI behandel (4.2.9). AKSM2B-t is met die restriksie ensieme BamHI en HindIII behandel (4.2.9). Die restriksie ensiem behandelde inlasstukke is deur die PKR inlasstuk skoonmaak metode gesuiwer en geïsoleer (4.2.20). Hul konsentrasie is weer bepaal (4.2.5) en 'n bevestigende agarose jel is gedoen (4.2.6) om te sien of die inlasstukke steeds by die korrekte bp verskyn. Sien Figuur 4-25.



Figuur 4-25: 1% Agarose jel ter bevestiging van basispaar lengtes van restriksie ensiem behandelde inlasstukke, *AKSM2A-t* en *AKSM2B-t*.

Figuur 4-25 toon aan dat die inlasstukke korrek geïsoleer is en dat die inlasstukke steeds by die verwagte ~1671 en ~1677 bp verskyn.

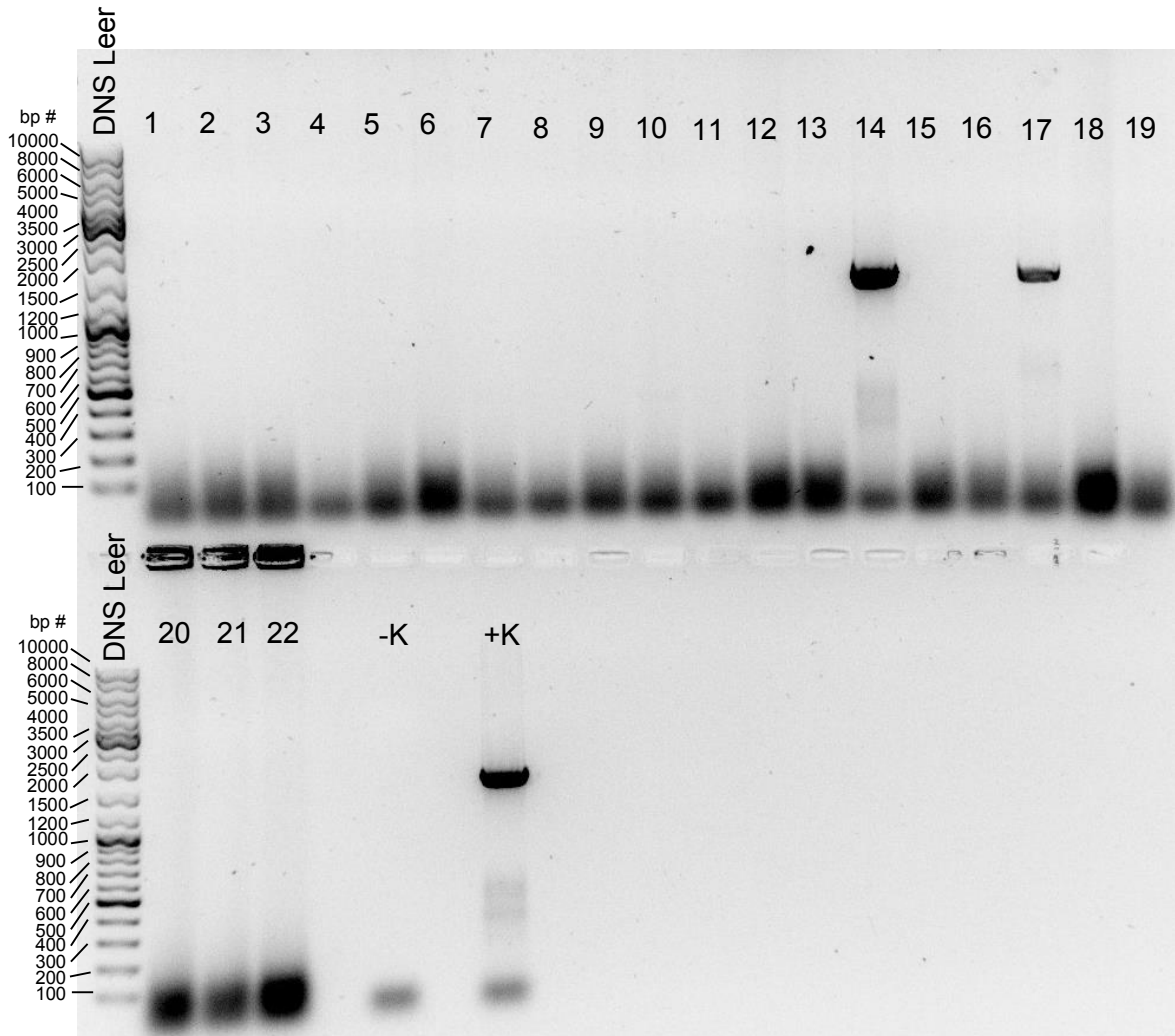
Ligering (4.2.22) en transformasie (4.2.13) van die pET28a(+) plasmied en die voorbereide inlasstukke in NEB 5-alpha *E. coli* is uitgevoer. Die kloneringstransformasie plate en die pUK19 kontrole plate het baie goeie groei getoon, maar die negatiewe kontroles (slegs die restriksie ensiem behandelde pET28a(+) plasmiede sonder inlasstukke) het ook groei getoon. Dit was opvallend dat die kloneringstransformasie plate dubbeld soveel kolonies as die negatiewe kontrole plate besit het. 'n Lae persentasie selfligering van die pET28a(+) plasmied het dus plaas gevind en daarom is besluit om 'n kolonie PKR uit te voer (4.2.23) om korrek gekloneerde kolonies te identifiseer. Ses kolonies van elke kloneringstransformasie is opgepik, op 'n meesterplaat uitgestreep en in 'n kolonie PKR mengsel gedoop soos beskryf in afdeling 4.2.23. Die kolonie PKR het gebruik gemaak van die voorvoeders Rev_stop_SalI en Trunc_BamHI, omdat die voorvoeders spesifiek is vir al vier klonerings. Sien Figuur 4-26



Figuur 4-26: 1% Agarose jel van die kolonie PCR produkte van die getransformeerde pET28a(+) plasmiedkonstrukte se kolonies. -K: negatiewe kontrole. +K: positiewe kontrole.

Figuur 4-26 toon die kolonie PCR produkte van die getransformeerde pET28a(+) plasmiedkonstrukte se kolonies. Die negatiewe kontrole wys slegs die voorvoerder dimere wat ver wag word en die positiewe kontrole (wat die pET32a(+)/AKSM2A plasmied as templaar gebruik) dui die band wat ver wag word as 'n kolonie se plasmied suksesvol gekloneer is. Daar is vier suksesvolle kolonies. By pET28a(+)/AKSM2A is dit nommer 2, By pET28a(+)/AKSM2A-t is die nommer 3 en by pET28a(+)/AKSM2B is die nommers 2 en 4. Hierdie suksesvolle kolonies is opgegroeï, gliserol voorrade van gemaak (4.2.7), die plasmiede is op 'n klein skaal geïsoleer (4.2.8) en gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14) sien bylaag A. Die resultate toon aan dat die inlasstukke korrek gekloneer is.

Daar was ongelukkig nie 'n suksesvolle konstruk in die kolonies wat die pET28a(+)/AKSM2B-t konstruk moet besit nie, maar die feit dat daar wel suksesvolle kolonies by die ander plasmiede gevind is, het aangetoon dat daar wel suksesvolle kolonies op die plaat kan wees. Daar is dus weer dieselfde kolonie PKR uitgevoer met 'n verder 28 kolonies van die pET28a(+)/AKSM2B-t konstruk transformasie. Figuur 4-27 toon 22 van hierdie kolonies se PKR produkte.



Figuur 4-27: 1% Agarose jel van die verder kolonie PKR se produkte van die kolonies wat die pET28a(+)/AKSM2B-t konstruk kan besit. -K: negatiewe kontrole. +K: positiewe kontrole.

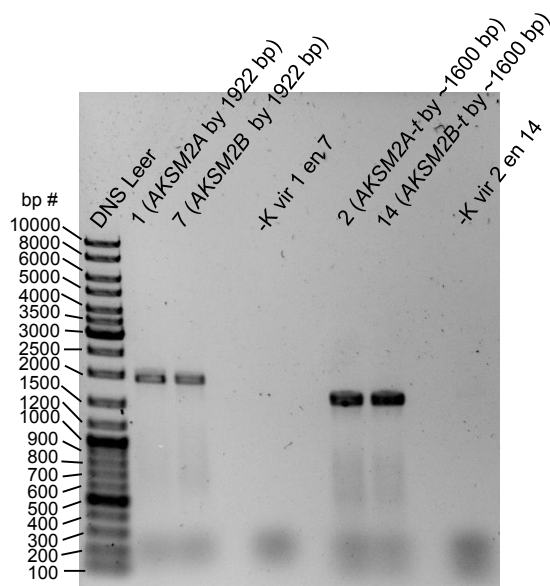
Die verdere kolonie PKR van die kolonies wat die pET28a(+)/AKSM2B-t konstruk kan besit se produkte wat aangetoon word in Figuur 4-27. Die figuur toon net soos in Figuur 4-26 dat die kontroles korrek is en dat daar twee positiewe kolonies is, naamlik kolonie nummer 14 en 17. Hierdie suksesvolle kolonies is opgegroeï, gliserol voorrade van gemaak (4.2.7), op 'n klein skaal

geïsoleer (4.2.8) en gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14). Die resultate (bylaag A) toon aan dat hierdie kolonies korrek gekloneer is.

Die vier suksesvol gekloneerde pET28a(+) plasmiede konstrukte is in NEB BL21(DE3) *E. coli* getransformeer (4.2.13). Die transformasie was suksesvol en die kolonies is opgegroeï en gliserol voorrade van gemaak (4.2.7).

4.3.7.3 pQE-30-metode: PKR klonering van die inlasstukke in die pQE-30 plasmied.

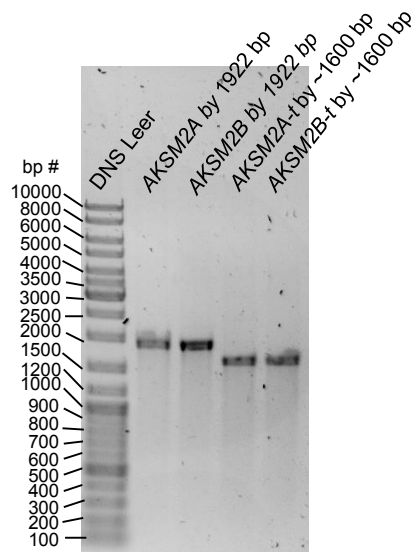
Die vier inlasstukke vir die pQE-30 plasmied is deur voorvoerder pare 1, 7, 2 en 14 se PKRs (4.2.18) geproduseer en agarose jel elektroforese is uitgevoer (4.2.6) om te bepaal of die PKRs suksesvol was. Sien Figuur 4-28.



Figuur 4-28: 1% Agarose jel van die vier inlasstukke wat deur voorvoerder pare 1 (wat *AKSM2A* produseer), 7 (wat *AKSM2B* produseer), 2 (wat *AKSM2A-t* produseer) en 14 (wat *AKSM2B-t* produseer) se PKRs geproduseer is. -K: negatiewe kontrole.

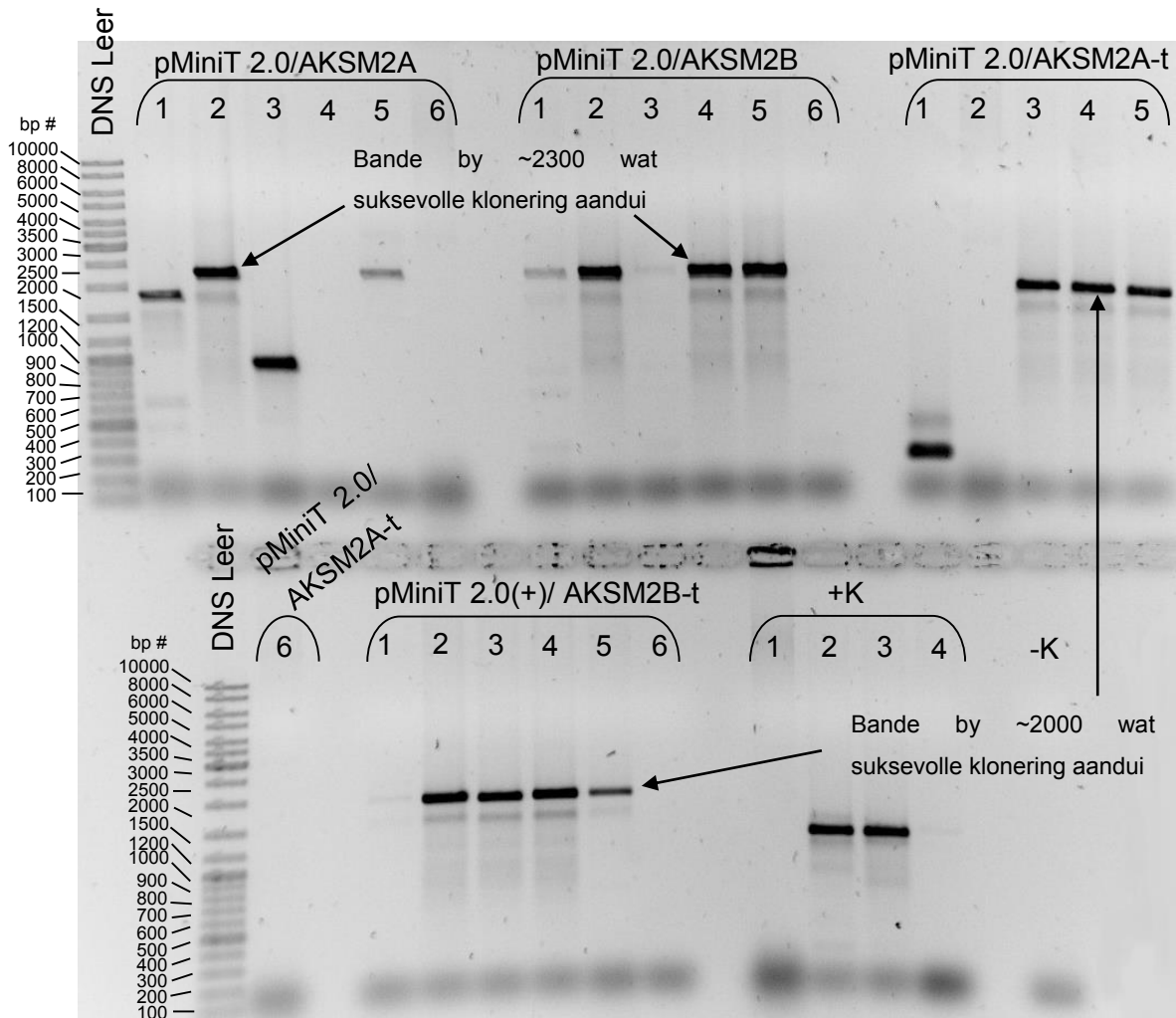
Figuur 4-28 toon aan dat die vier PKRs suksesvol uitgevoer is. Die inlasstukke is by die korrekte grotes geproduseer (~1922 bp vir *AKSM2A* en *AKSM2B* en ~1600 bp vir *AKSM2A-t* en *AKSM2B-t*) en die negatiewe kontroles is skoon. Dit dui aan dat daar geen kontaminasie was nie en dat die geproduseerde bande die gewenste inlasstukke is. Agarose jel ekstraksie (4.2.19) van al vier

inlasstukke is uitgevoer. Die konsentrasies is bepaal (4.2.5) en 'n bevestigende agarose jel elektroforese is uitgevoer (4.2.6) in Figuur 4-29.



Figuur 4-29: 1% Agarose jel as bevestiging van die vier geïsoleerde inlasstukke se basispaar grotes vir klonering in die pQE-30 plasmied.

Die vier inlasstukke in Figuur 4-29 is enkele bande wat aandui dat die inlasstukke suksesvol geïsoleer is. PKR klonering in die pMiniT 2.0 plasmied is uitgevoer (4.2.24.3). Al die kloneringsreaksies en die positiewe kontroles se LB agarose plate het goeie verspreiding van kolonies getoon. Daar was ook groei op die negatiewe kontrole (die liniêre pMiniT 2.0 plasmied) se plate wat weer 'n aanduiding is van 'n lae persentasie selfligering. Kolonie PKR, soos in afdelings 4.2.23 en 4.2.24.3, is uitgevoer om korrek gekloneerde plasmiede te identifiseer. Sien Figuur 4-30.

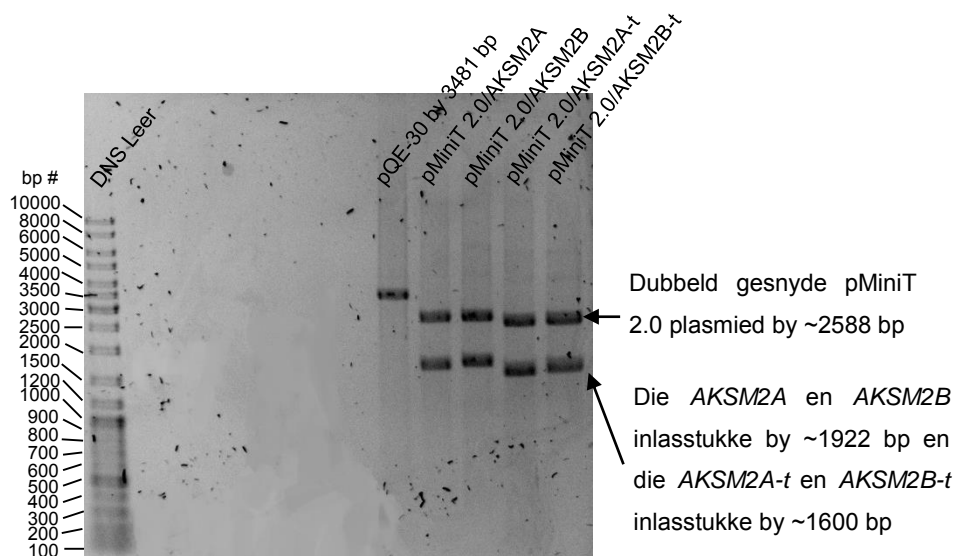


Figuur 4-30: 1% Agarose jel van die kolonie PKR van die pMiniT 2.0 plasmiedkonstrukte wat voorberei is vir die pQE-30-metode. -K: negatiewe kontrole. +K: positiewe kontrole.

Figuur 4-30 toon die kolonie PKR se produkte: die bande van *AKSM2A* en *AKSM2B* wat ~2300 bp lank is en die bande van *AKSM2A-t* en *AKSM2B-t* wat ~2000 bp lank is, toon aan dat die klonering suksesvol was. Die pMiniT 2.0/AKSM2A plasmied se kolonies 2 en 5, pMiniT 2.0/AKSM2B se kolonies 2, 4 en 5, pMiniT 2.0/AKSM2A-t se kolonies 3, 4 en 5, pMiniT 2.0/AKSM2B-t se kolonies 2, 3, 4 en 5 en die positiewe kontrole (wat 1500 bp kontrole fragment is saam met die PKR klonering pakket kom (4.2.24.3)) se kolonies 2 en 3 was suksesvol. Die positiewe kontrole se band basispaar lengte moet by ~1500 bp wees.

Hierdie suksesvolle kolonies is opgegroeï en gliserol voorrade van gemaak (4.2.7). Kleinskaalse isolering (4.2.8) van een van elke konstruk se suksesvolle plasmiede en die pQE-30 plasmied is

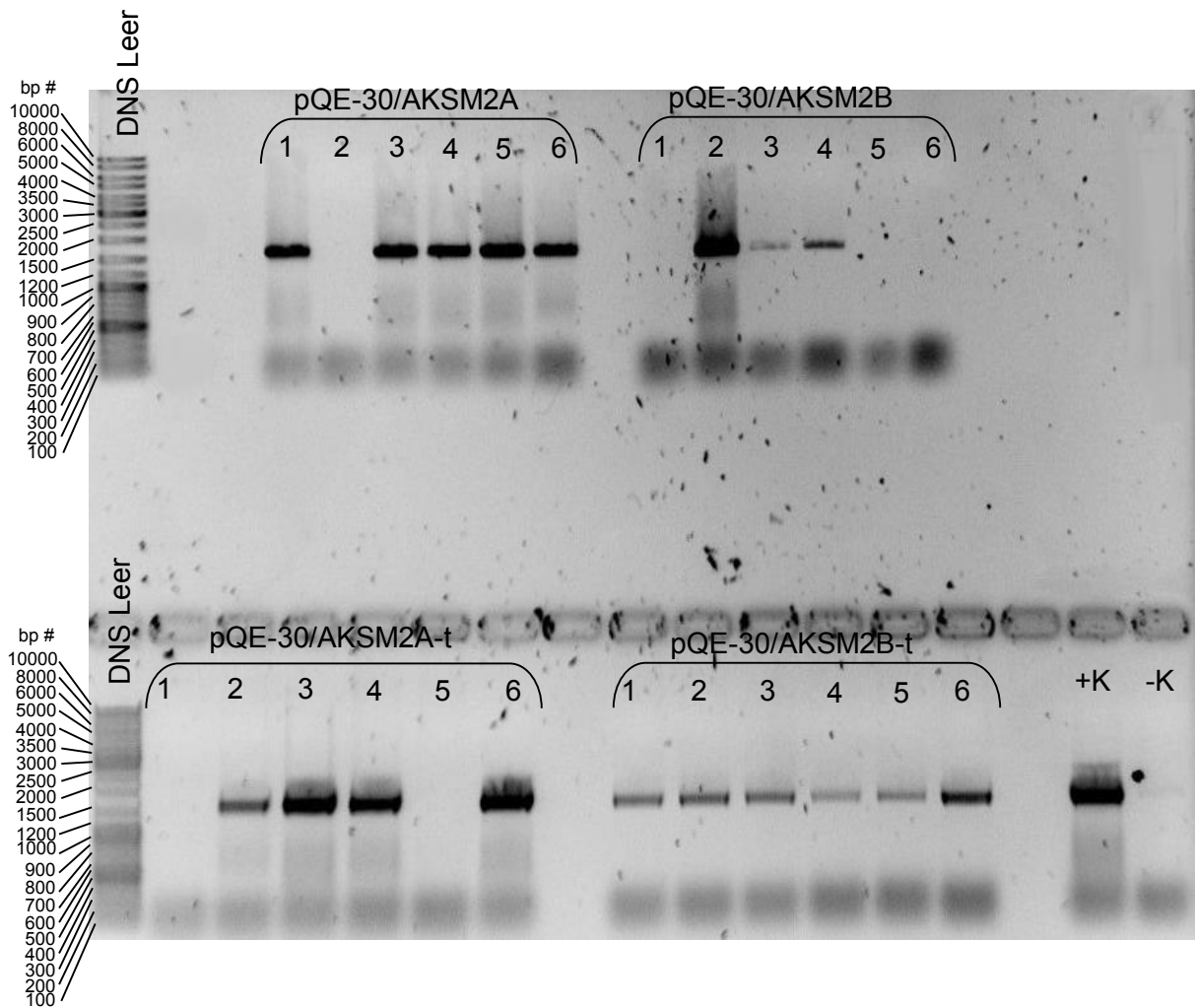
uitgevoer. Al die plasmiede is met *Bam*HI en *Sal*I restriksie ensieme behandel (4.2.9) en 'n agarose jel elektroforese is uitgevoer (4.2.6). Sien Figuur 4-31.



Figuur 4-31: 1% Agarose jel van die restriksie *Bam*HI en *Sal*I restriksie ensieme snyding van die pMiniT 2.0 konstrakte en die pQE-30 plasmied.

Figuur 4-31 toon aan dat daar suksesvolle snyding van al die plasmiede was. Die inlasstukke verskyn by die korrekte basispaar lengtes, die pMiniT 2.0 plasmiede is sigbaar by 2588 bp en die pQE-30 plasmied is sigbaar by 3481 bp. Die pQE-30 plasmied en die inlasstukke is geïsoleer deur jel ekstraksie (4.2.19). Die pQE-30 plasmied se 5' punte is gedefosforileer (4.2.21) en die pQE-30 sisteem is geligier (4.2.22) en getransformeer in M15[pREP4] *E. coli* (4.2.13). Die pQE-30 plasmied is ook in M15[pREP4] *E. coli* getransformeer (4.2.13) as kontrole vir die uitdrukking van die proteïene

Die pQE-30/AKSM2A en pQE-30/AKSM2A-t transformasie het baie goeie groei getoon. Die pQE-30/AKSM2B en pQE-30/AKSM2B-t transformasie het enkele kolonies getoon. Die positiewe kontrole (die PUK19 plasmied) het digte groei getoon en die negatiewe kontrole (slegs die pQE30 plasmied wat dubbeld gesny is) het enkele kolonies gehad. 'n Klein persentasie selfligering het dus plaasgevind. Kolonie PKR (4.2.23) is uitgevoer om korrek gekloneerde konstrakte in kolonies te identifiseer. Sien Figuur 4-31.

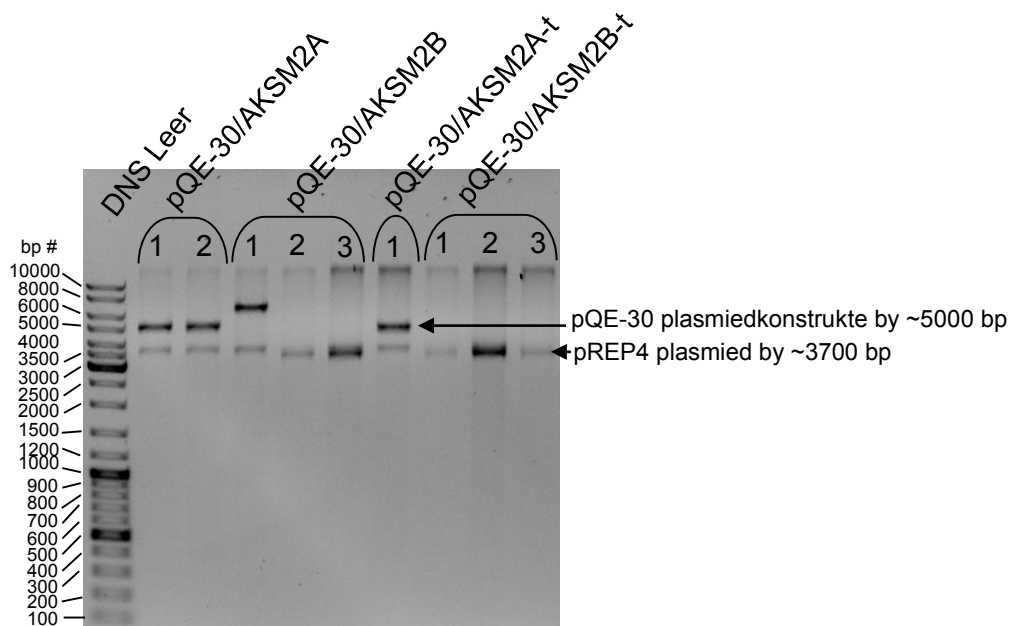


Figuur 4-32: 1% Agarose jel van die kolonie PCR produkte van die pQE-30 plasmiedkonstrukte in M15[pREP4] *E. coli* kolonies. +K: positiewe kontrole. -K negatiewe kontrole.

Die suksesvolle gekloneerde kolonies word aangedui deur 'n band by ~1600 bp in Figuur 4-32. Drie van elkeen van die plasmiede se suksesvolle kolonie is opgegroeï, gliserol voorrade van gemaak (4.2.7) en op 'n groot skaal geïsoleer. Die geïsoleerde plasmiede is gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14) resultate word nie vertoon nie.

Die Sanger volgorde bepaling se resultate was van baie swak gehalte en het sleg kort dele aan die begin en einde van die gene se volgordes gedek. Die rede vir hierdie swak resultate kan wees dat die volgorde bepalings voorvoeders hibridiseer met pREP4 plasmied, wat ook geïsoleer word saam met die pQE-30 konstrunkte en daarom inmeng met die volgorde bepalings reaksie. Dit was wel opmerklik dat slegs een kolonie van pQE-30/AKSM2A en pQE-30/AKSM2A-t se Sanger

volgorde van die gene se punte ooreen gestem het met die verwysingsvolgordes van die gene, maar al die ander kolonies se begin en eindpunte toon heeltemal verskillende of geskommelde DNS volgordes. Om te verseker dat die plasmiede op die regte bp lengtes sit, is beide die pREP4 plasmied en die pQE-30 konstrunkte gelineariseer met *Hind*III (4.2.9) in Figuur 4-33. Een kolonie by pQE-30/AKSM2A en twee kolonies by pQE-30/AKSM2A-t se DNS was te min om verder mee te werk en is uitgelaat.



Figuur 4-33: 1% Agarose jel van *Hind*III restriksie ensiem snyding van die pQE-30 plasmied konstrunkte ter bevestiging van pQE-30 konstrunkte plasmied groetes.

In Figuur 4-33 is die pQE-30 plasmiedkonstrukte (en pREP4 plasmiede) sigbaar wat met *Hind*III behandel is. Die band by ~3700 bp is die pREP4 plasmied wat in al die *E. coli* voorkom. Die pQE-30 konstrunkte behoort almal by ~5000 bp te verskyn, maar dit is net die pQE-30/AKSM2A en pQE-30/AKSM2A-t kolonies se plasmiede wat korrek verskyn. Kolonie 1 van pQE-30/AKSM2B se DNA sit by 'n veel hoër basispaar lengte en die res is afwesig. Dit ten spyte van die kolonie PKR wat spesifiek vir die inlasstukke was en oorspronklik suksesvol gewerk het in Figuur 4-23.

Die afleiding is gemaak dat hierdie plasmiede dalk steeds ten spyte van die *lac* onderdrukker proteïen 'n lae vlak van proteïenuitdrukking veroorsaak as gevolg van die sterk T5 promotor en dat die AKSM2B en AKSM2B-t proteïene wat geproduseer word dalk moontlik toksies is vir die *E. coli*. As gevolg daarvan is daar seleksie vir deleisie en of geskommelde mutante wat dan vinniger groei as die korrekte plasmiede. Dit sal verduidelik hoekom daar net na transformasie

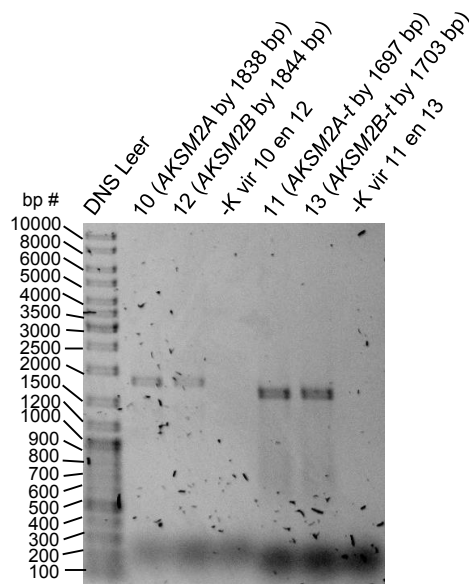
die korrekte plasmiede was, maar na hul op 'n groot skaal geïsoleer is (dus na 2 rondtes van innokulasie vanaf 'n gliserolvoorraad) verkeerde weergawes van die plasmiede bevat.

Die pQE-30/AKSM2A en pQE-30/AKSM2A-t plasmiede wat se eindpunte suksesvol met die verwysingsvolgordes ooreengestem het, is met *Nco*I behandel (4.2.9) om hul en die pREP4 plasmiede te lineariseer. Die gelineariseerde pQE-30 konstrukte is geïsoleer van die pREP4 plasmiede deur agarose jel ekstraksie (4.2.19). Die gelineariseerde pQE-30 konstrukte is geligeer (4.2.22) en in JM109 *E. coli* getransformeer (4.2.12). Hul is op 'n klein skaal geïsoleer (4.2.8) en gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14).

Die pQE-30/AKSM2A en pQE-30/AKSM2A-t plasmiede se Sanger volgorde bepaling (bylaag A) het met die verwysingsvolgordes ooreengestem en was dus suksesvol gekloneer. Die proteïenuitdrukking van hierdie twee konstrukte is direk hierna uitvoer en was onsuksesvol, daarom (en as gevolg van tydsbeperkinge) is die klonering van die pQE-30/AKSM2B en pQE-30/AKSM2B-t konstrukte nie weer aangepak nie.

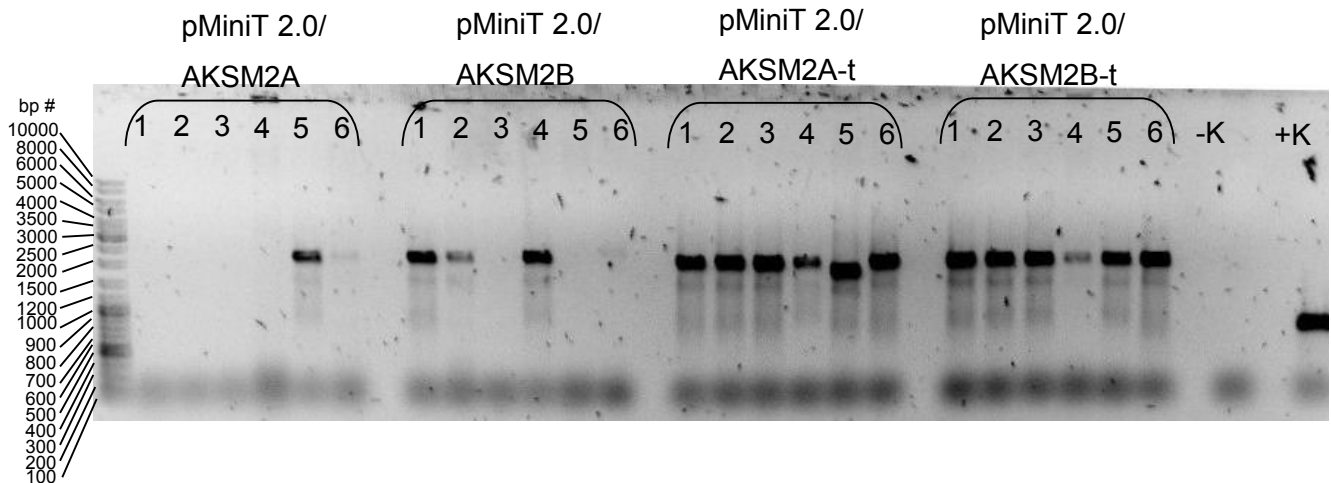
4.3.7.4 pcDNA-metode: PKR klonering van die inlasstukke in die pcDNA3.1(+) plasmied.

Die pcDNA sisteem inlasstukke is geproduseer deur voorvoerder pare 10, 11, 12 en 13 se PKRs (4.2.18) en 'n bevestigende agarose jel (4.2.6) is gemaak. Sien Figuur 4-34.



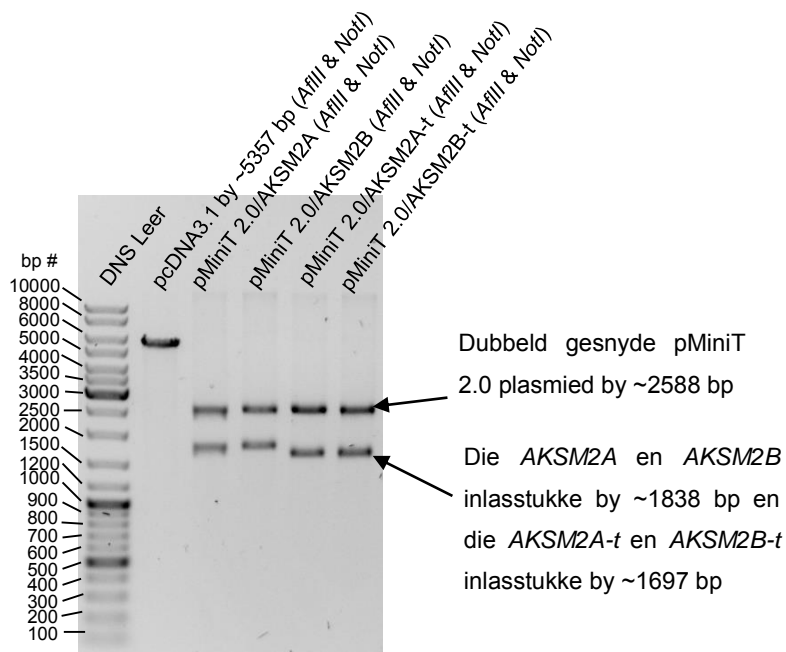
Figuur 4-34: 1% Agarose jel van die produkte van die vier inlasstukke wat deur voorvoerder pare 10 (wat *AKSM2A* produseer), 11 (wat *AKSM2B* produseer), 12 (wat *AKSM2A-t* produseer) en 13 (wat *AKSM2B-t* produseer) se PKRs geproduseer het. -K: negatiewe kontrole.

Figuur 4-34 toon die pcDNA sisteem se geproduseerde inlasstukke wat by die korrekte basispaar lengtes verskyn. Die PCR reaksies was suksesvol en die bandlose negatiewe kontroles dui aan dat daar nie kontaminasie was nie. Die inlasstukke is geïsoleer deur jel ekstraksie (4.2.19) en PCR klonering is uitgevoer (4.2.24.3). Kolonies wat korrek gekloneerde plasmiede besit is geïdentifiseer deur kolonie PCR (4.2.23) en die resultaat daarvan word gewys in Figuur 4-35.



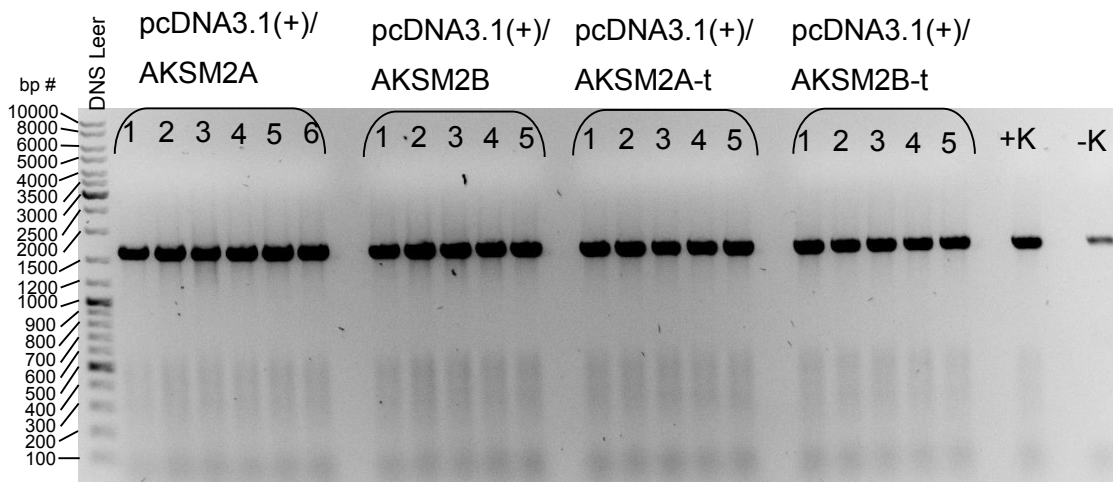
Figuur 4-35: 1% Agarose jel van die kolonie PCR uit gevoer op die getransformeerde pMiniT 2.0 konstrunkte wat voorberei is vir die pcDNA3.1(+) plasmied. +K: positiewe kontrole. -K: negatiewe kontrole.

Figuur 4-35 toon die resultaat van die kolonie PCR, uit gevoer na aanleiding van die pcDNA-metode se inlasstukke se ligering aan die pMiniT 2.0 plasmied en die transformasie daarvan in NEB 10-beta *E. coli*. Die positiewe kontrole band is 'n kontrole fragment vir die PCR klonering by ~1500 bp. Die kontroles was korrek en menigte kolonies van die klonerings het positief getoon deur bande wat by ~2300 bp vir die pMiniT 2.0/AKSM2A en pMiniT 2.0/AKSM2B plasmied vertoon het en bande wat by ~2000 bp vir pMiniT 2.0/AKSM2A-t en pMiniT 2.0/AKSM2B-t vertoon het. Een kolonie van elk van die klonerings is opgegroeï, 'n gliserolvoorraad van gemaak (4.2.7) en op 'n kleinskaal geïsoleer (4.2.8). Die pcDNA3.1(+) plasmied, is ook op 'n kleinskaal geïsoleer (4.2.8) en al die plasmiede is met restriksie ensieme gesny (4.2.9) soos aangetoon in Figuur 4-36.



Figuur 4-36: 1% Agarose jel van die restriksie ensiem snyding van die pcDNA3.1(+) plasmied en die pMiniT 2.0 plasmiedkonstrukte.

Figuur 4-36 toon aan dat daar suksesvolle snyding van al die plasmiede was. Die inlasstukke verskyn by die korrekte basispaar lengtes, die pMiniT 2.0 plasmiede rondom 2588 bp en die pcDNA3.1(+) plasmied rondom ~5357 bp. Die pcDNA3.1(+) plasmied en die inlasstukke is geïsoleer deur jel ekstraksie (4.2.19). Die pcDNA3.1(+) plasmied se 5' punte is gedefosforileer (4.2.21) en die pcDNA sisteem is geligeer (4.2.22) en getransformeer in DH5α *E. coli* (4.2.13). Die transformasie was suksesvol en kolonie PKR (4.2.23) is uitgevoer om suksesvol gekloneerde plasmiede in die kolonies te identifiseer. Sien Figuur 4-37.



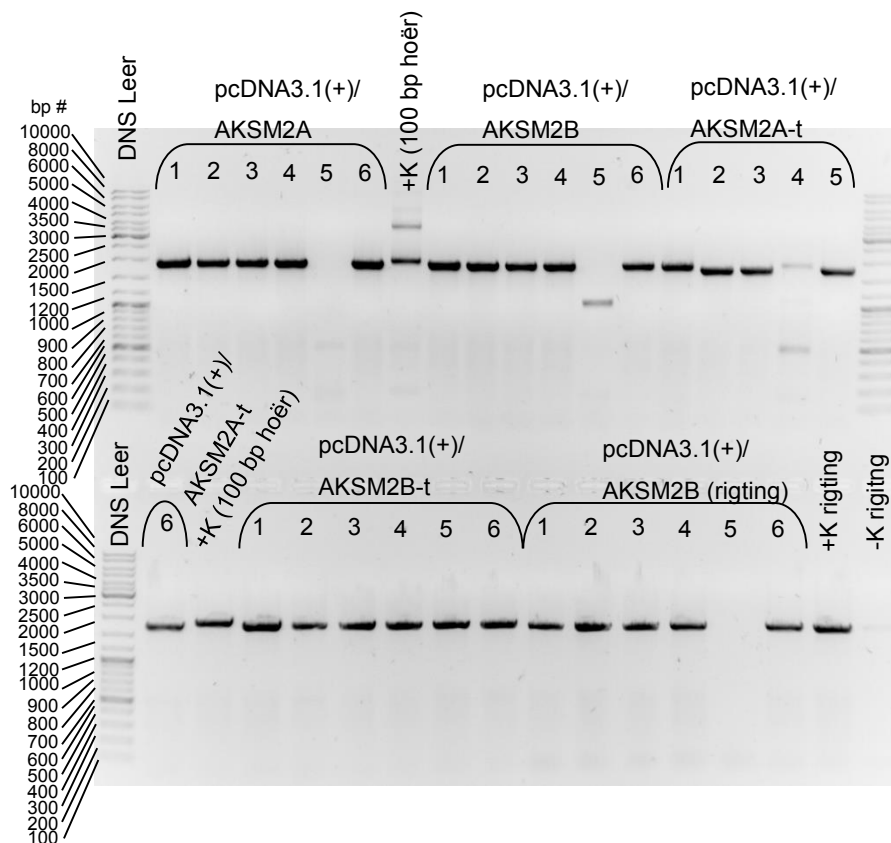
Figuur 4-37: 1% Agarose van die kolonie PKR van die kolonies waarin die pcDNA3.1(+) plasmied se konstrakte getransformeer is. +K: positiewe kontrole. -K: negatiewe kontrole.

Figuur 4-37 toon die kolonie PKR van die kolonies waarin die pcDNA3.1(+) plasmied se konstrakte getransformeer is. Die positiewe kontrole vertoon 'n band by ~1600 bp wat aandui dat die PKR gewerk het, maar die negatiewe kontrole vertoon ook 'n ligte band. Dit is 'n aanduiding van kontaminasie in die PKR reaksies, maar die verskil in dikte en helderheid van die negatiewe kontrole en die res van die reaksies se bande is redelik dominant en dui aan dat die reaksie wel steeds gewerk het. Al die kolonies se PKR reaksies het die korrekte bande getoon. Drie suksesvolle kolonies van elke konstrak is opgegroeï en gliserol voorrade van gemaak (4.2.7). Die plasmiede is op 'n klein skaal geïsoleer (4.2.8) en gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14).

Die resultaat van die Sanger volgorde bepaling (bylaag A) het aangetoon dat die inlasstukke suksesvol in die pcDNA3.1(+) plasmied gekloneer is, maar dat daar 'n kort stuk van die pMiniT 2.0 plasmied se volgorde aan die punt van die inlasstukke steeds sit en ook saam aan die pcDNA3.1 plasmied geligter is. Sien Figuur 4-5 en verduideliking in afdeling 4.2.24.5.

Die pcDNA3.1(+)/AKSM2A, pcDNA3.1(+)/AKSM2A-t en pcDNA3.1(+)/AKSM2B-t plasmiede is dus behandel met die *Afl*I restriksie ensiem om die pMiniT 2.0 plasmied volgorde uit te sny. Die pcDNA3.1(+)/AKSM2B plasmied is reggemaak deur met beide *Not*I en *Afl*I te sny en daardeur die inlasstuk weer los te sny van die pcDNA3.1(+) plasmied en die pMiniT 2.0 plasmied volgorde.

Die resultate van die snyding (nie vertoon) is geïsoleer deur agarose jel ekstraksie (4.2.19), weer geligter (4.2.22) en getransformeer (4.2.13). 'n Kolonie PKR (4.2.23) is uitgevoer om suksesvol gekloneerde plasmiede in die kolonies te identifiseer. Sien Figuur 4-38.



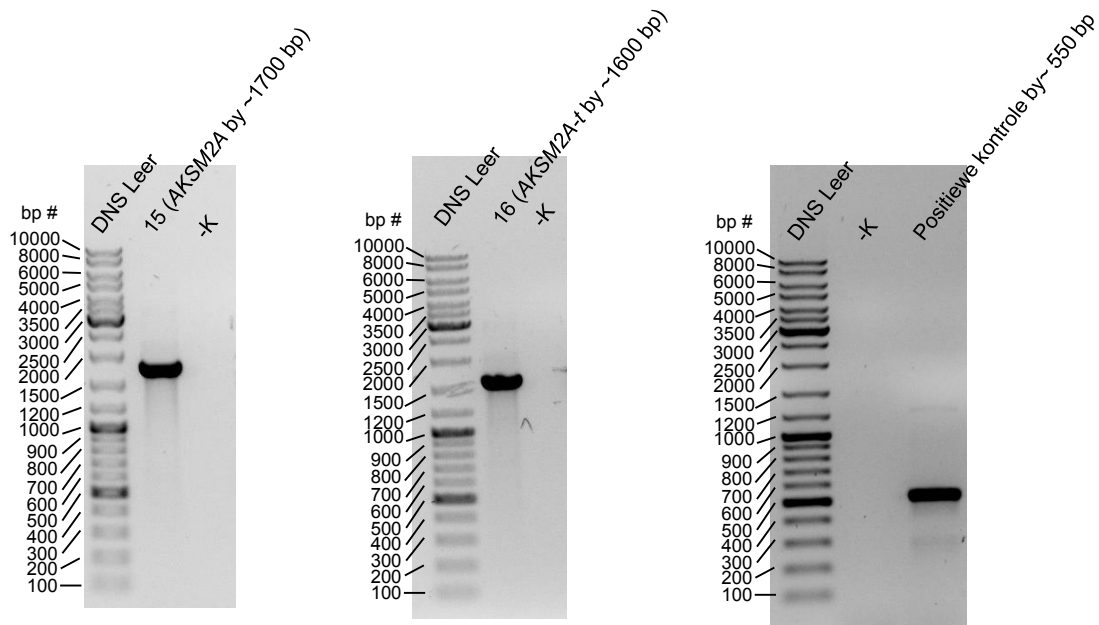
Figuur 4-38: 1% Agarose jel van die kolonie PKR van die kolonies waarin die reggemaakte pcDNA3.1(+) konstrunkte is. +K: positiewe kontrole. -K: negatiewe kontrole.

Figuur 4-38 toon die kolonie PKR van die reggemaakte konstrunkte in die pcDNA-metode. Die positiewe kontroles wat steeds die pMiniT 2.0 DNS stuk bevat vertoon hoër groottes op die agarose jel as die reggemaakte konstrunkte wat aandui dat die pMiniT 2.0 DNS stuk uit die konstrunkte verwyder is en dat die konstrunkte suksesvol gekloneer is. Die kolonie PKR wat die rigting van die inlasstuk in pcDNA3.1(+)/AKSM2B moes bepaal in Figuur 4-38 het ook aangetoon dat die suksesvol gekloneerde plasmiede se inlasstukke ook in die regte rigting gekloneer is (resultaat onder die etiket pcDNA3.1(+)/AKSM2B (rigting)).

Die suksesvolle kolonies is opgegroeï en gliserol voorrade van gemaak (4.2.7). Die plasmiede is op 'n kleinskaal geïsoleer (4.2.8) en gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14). Die resultate (nie vertoon) toon aan dat hierdie kolonies korrek gekloneer is.

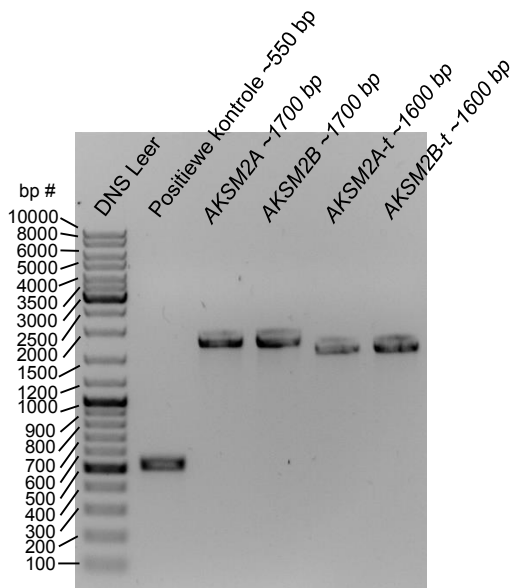
4.3.7.5 pBAD-metode TOPO klonering

Die voorvoerder pare 15 -18 (Tabel 4-27) se PKRs is saam met die positiewe kontrole (’n verskafde klonering en ekspressie fragment in die pBAD/TOPO klonering se pakket) se PKR uitgevoer en die resultate van voorvoerder paar 15 en 17 word in Figuur 4-39 weer gegee.



Figuur 4-39: 1% Agarose jelle ter bevestiging van voorvoerder pare 15 en 17 se PKRs en die positiewe kontrole. -K: negatiewe kontrole.

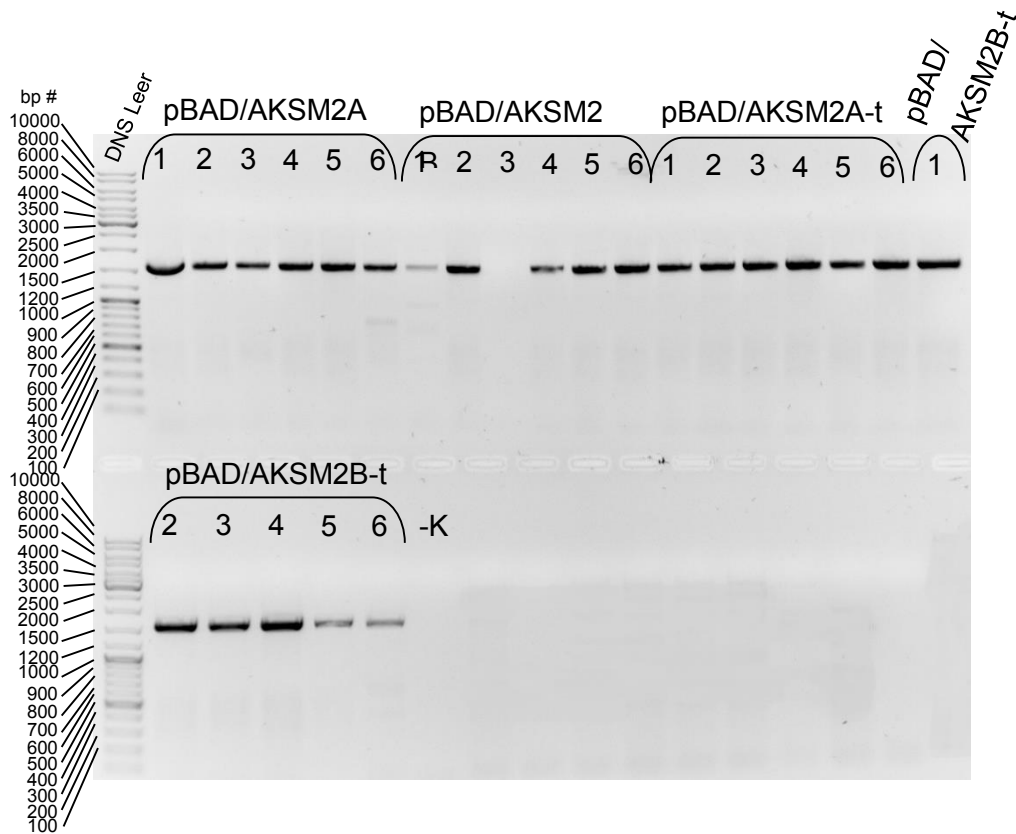
In Figuur 4-39 toon die enkel bande wat verkry is met die verskillende PKR reaksies en dat die PKR reaksies dus suksesvol uitgevoer is. Die voorvoerder pare 15 en 17 se PKRs en die voorvoerder pare 16 en 18 se PKRs lewer identiese bande, daarom is slegs een van elk as voorbeeld vertoon in Figuur 4-39. Die bande is by die gewenste basispaar lengtes en is geïsoleer deur agarose jel ekstraksies uit te voer (4.2.19). Die konsentrasies is bepaal (4.2.5) en ’n bevestigende agarose jel elektroforese is uitgevoer (4.2.6) om te bevestig dat die inlasstukke korrek geïsoleer is. Sien Figuur 4-40.



Figuur 4-40: 1% Agarose jel ter bevestiging van die geïsoleerde inlasstukke en positiewe kontrole se basispaar groetes vir die pBAD plasmied.

Figuur 4-40 bevestig dat die inlasstukke en positiewe kontrole korrek geïsoleer is en gebruik kan word vir ligering.

Die ligering (4.2.24.6) en transformasie (4.2.13) is uitgevoer. Die ligeringsplate en die positiewe kontrole het goed gegroei. Die negatiewe kontrole het enkele kolonies getoon wat 'n aanduiding was van klein hoeveelhede selfligering. 'n Kolonie PKR (4.2.23) is uitgevoer om korrek gekloneerde kolonies te identifiseer. Sien Figuur 4-41.



Figuur 4-41: 1% Agarose jel van die kolonie PKR van die pBAD konstrunkte in die TOP10 *E. coli* se kolonies. -K: negatiewe kontrole.

Figuur 4-41 toon die resultate van die kolonie PKR van die geligeerde en getransformeerde pBAD konstrunkte. Die negatiewe kontrole is heeltemal skoon en dui aan dat daar geen kontaminasie in die PKRs was nie. Meeste kolonies vertoon bande by die korrekte grote (~1600 bp) en dui aan dat die ligering en transformasie suksesvol was.

Vier suksesvolle kolonies is opgegroeï en gliserol voorrade van gemaak (4.2.7). Die plasmied DNS is op 'n kleinskaal geïsoleer (4.2.8) en gestuur vir Sanger volgorde bepaling (4.2.14). Een van die positiewe kontrole wat gebruik is in die ligering wat ook as ekspressie kontrole dien is opgegroeï en 'n gliserolvoorraad van gemaak (4.2.7).

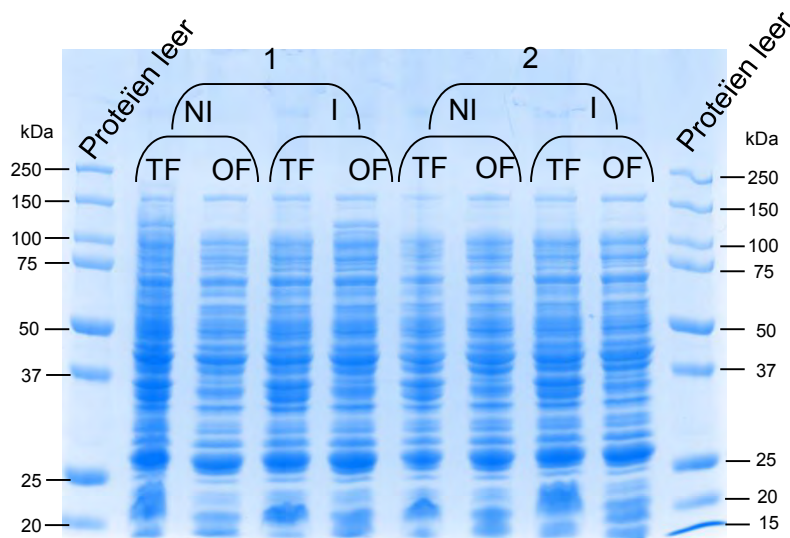
Die Sanger volgorde bepaling resultate (bylaag A) het getoon dat die plasmiede korrek gekloneer is. Een plasmied, pBAD/AKSM2B-t, besit 'n enkele stil mutasie, maar omdat die mutasie steeds die selfde aminosuur tot gevolg sal hê is die plasmied steeds gebruik.

4.3.8 Proteïenekspressie

Al die proteïenekspressiemetodes met die verskillende konstrunkte is eers getoets presies soos die oorspronklike metodes uitgevoer was.

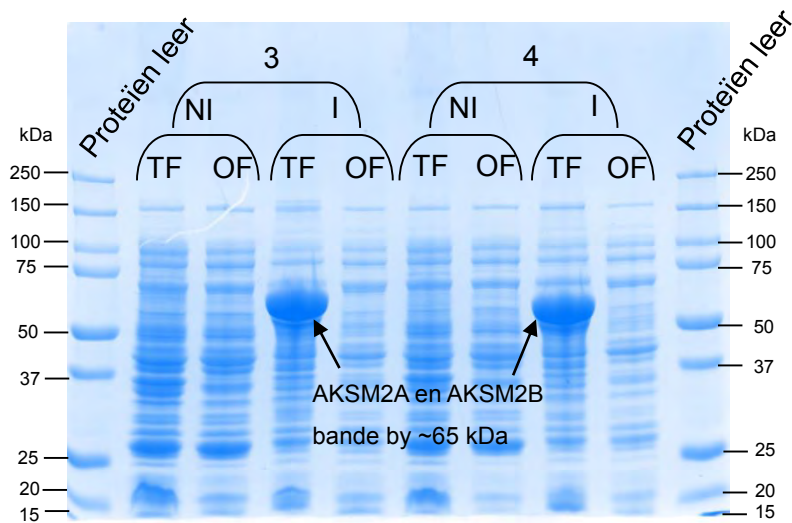
4.3.8.1 Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pFLAG metode

Proteïenuitdrukking deur van die pFLAG metode gebruik te maak (beskryf in afdeling 4.2.27.1), is uitgevoer en die NDS-PAGE resultate word weergegee in Figuur 4-42, Figuur 4-43 en Figuur 4-44.



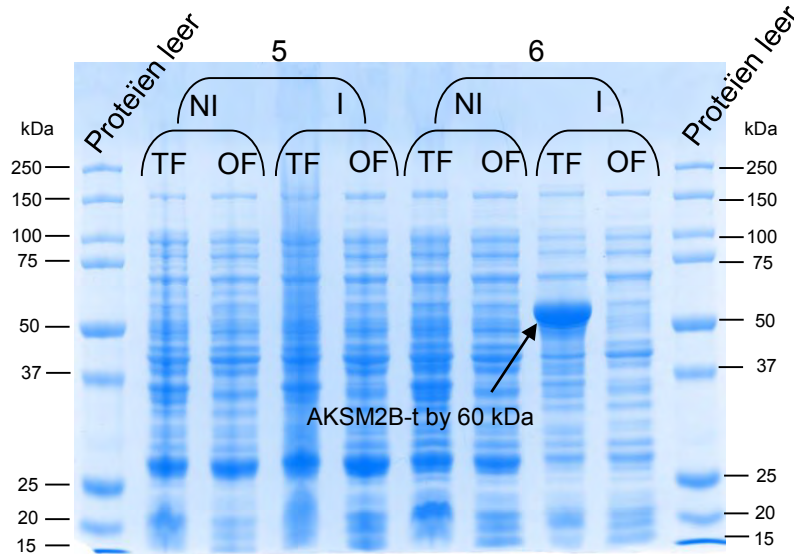
Figuur 4-42: NDS-PAGE van die BL21(DE3)RIL sellyn (1) en die BL21(DE3)RIL sellyn wat pFLAG-CTS bevat (2). NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

Figuur 4-42 toon die totale fraksies en die oplosbare fraksies van die BL21(DE3)RIL sellyn en die BL21(DE3)RIL sellyn wat die pFLAG-CTS plasmied bevat aan, met en sonder induksie. Hierdie poliakrielamiedjel dien as kontrole vir die res van die proteïen monsters en wys onderskeidelik die agtergrond van die BL21(DE3)RIL sellyn en die BL21(DE3)RIL sellyn wat die pFLAG-CTS plasmied bevat (geen waarneembare proteïenband word met die pFLAG-CTS plasmied sonder 'n inlasstuk geproduseer nie).



Figuur 4-43: NDS-PAGE van die BL21(DE3)RIL sellyn wat pFLAG-CTC/AKSM2A (3) en pFLAG-CTC/AKSM2B bevat (4). NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

Figuur 4-43 toon die totale fraksies en die oplosbare fraksies van die BL21(DE3)RIL sellyn wat pFLAG-CTC/AKSM2A (3) en pFLAG-CTC/AKSM2B (4) bevat, met en sonder induksie. Die nie-geïnduseerde fraksies van toets 3 lyk nes die BL21(DE3)RIL sellyn agtergrond. Die wat wel geïnduseer is toon in die totale fraksie 'n groot proteïenband by 65 kDa wat ooreenstem met die verwagte AKSM2A-proteïen grote van 65.3 kDa. Hierdie band verskyn nie in die oplosbare fraksie nie. Die proteïen is dus suksesvol geproduseer maar is onoplosbaar. Dieselfde word waargeneem by toets 4. Die AKSM2B-proteïen van 65.4 kDa is suksesvol geproduseer, maar onoplosbaar.



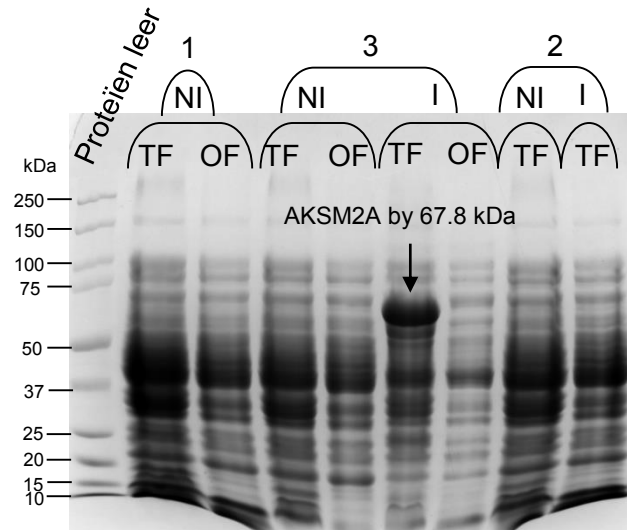
Figuur 4-44: NDS-PAGE van die BL21(DE3)RIL sellyn wat pFLAG-CTC/AKSM2A-t (5) en pFLAG-CTC/AKSM2B-t bevat (6). NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

Figuur 4-44 toon die totale fraksies en die oplosbare fraksies van die BL21(DE3)RIL sellyn wat pFLAG-CTC/AKSM2A-t (5) en pFLAG-CTC/AKSM2B-t (6) bevat, met en sonder induksie. Die nie-geïnduseerde en geïnduseerde fraksies van toets 5 lyk nes die BL21(DE3)RIL sellyn agtergrond. Daar moes dus 'n fout in die voorbereiding of induksie van die BL21(DE3)RIL sellyn wat pFLAG-CTC besit gebeur het. Die nie-geïnduseerde fraksies van toets 6 lyk nes die BL21(DE3)RIL sellyn agtergrond. Die wat wel geïnduseer is met IPTG toon in die totale fraksie 'n groot proteïenband by 60 kDa wat ooreenstem met die verwagte AKSM2B-t proteïen grote van 60 kDa. Hierdie band verskyn nie in die oplosbare fraksie nie. Die AKSM2B-t proteïen is dus suksesvol geproduseer maar is onoplosbaar. Die fout wat in reaksie 5 voorgekom het is nie verder ondersoek nie, omdat die resultate van die drie ander proteïene genoegsame bewys was dat hierdie sisteem nie hierdie proteïene oplosbaar produseer nie.

Die volgende proteïenekspressiesisteem is toe aangepak.

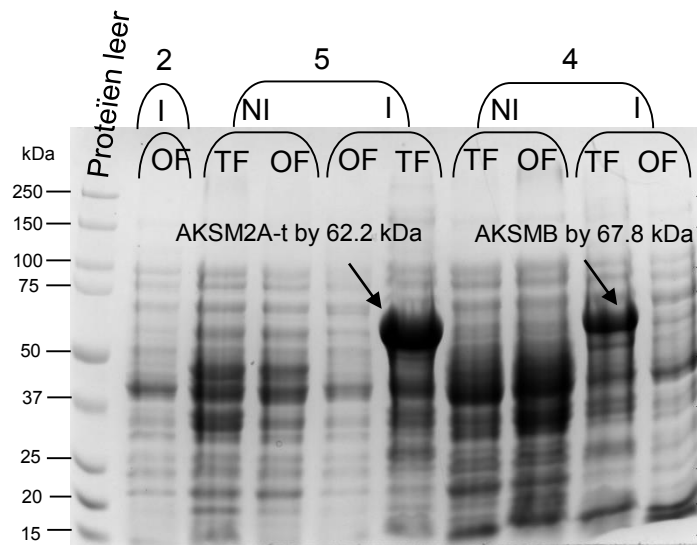
4.3.8.2 Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pET28-metode

Die resultate van die proteïenuitdrukking deur gebruik te maak van die pET28-metode (soos beskryf in afdeling 4.2.27.2) word weergegee in Figuur 4-45, Figuur 4-46 en Figuur 4-47.



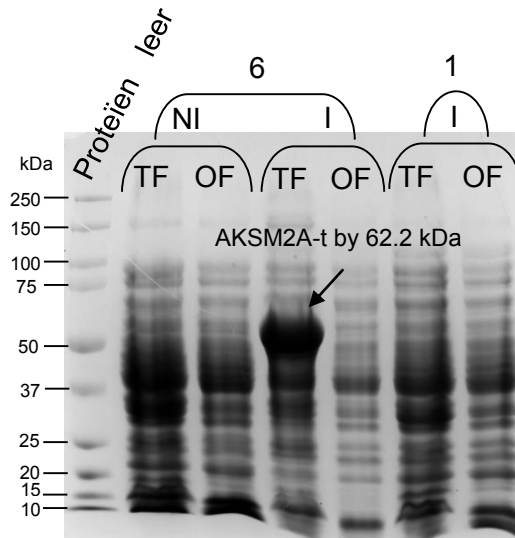
Figuur 4-45: NDS-PAGE van die BL21(DE3) sellyn (1), die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+)/AKSM2A bevat (3) en die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+) bevat (2). NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

Figuur 4-45 toon die totale en oplosbare fraksies van die BL21 sellyn (wat nie-geïnduseer is nie) (1) en die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+)/AKSM2A bevat (geïnduseer en nie-geïnduseer nie) (3). Dit toon ook die totale fraksies van die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+) bevat (geïnduseer en nie-geïnduseer nie) (2). 1 en 2 dien as kontroles vir die proteïen produserende plasmiede en toon aan hoe die agtergrond uitdrukking van die sellyne lyk (geen waarneembare proteïene word deur die oop leesraam geproduseer nie). Die totale en oplosbare fraksies van 3 wat nie-geïnduseer is nie vertoon net soos 1 en 2. Die wat wel geïnduseer is met IPTG toon in die totale fraksie 'n groot proteïenband by ~67 kDa wat ooreenstem met die verwagte AKSM2A-proteïen grote van 67.8 kDa. Hierdie band verskyn nie in die oplosbare fraksie nie. Die proteïen is dus suksesvol geproduseer maar is onoplosbaar.



Figuur 4-46: NDS-PAGE van die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+) plasmied bevat (2), die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+)/AKSM2A-t plasmied bevat (5) en die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+)/AKSM2B bevat (4). NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

Figuur 4-46 toon die totale en oplosbare fraksies van die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+)/AKSM2A-t bevat (geïnduseer en nie-geïnduseer nie) (5), die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+)/AKSM2B bevat (geïnduseer en nie-geïnduseer nie) (4). Dit toon ook die oplosbare fraksie van die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+) bevat (geïnduseer) (2). 2 dien as kontroles vir die proteïen produserende plasmiede en toon aan hoe die agtergrond uitdrukking van die sellyne lyk. Die totale en oplosbare fraksies van 5 en 4 wat nie-geïnduseer is nie vertoon net soos 1 en 2. Die geïnduseerde toets 5 (wat AKSM2A-t produseer) toon in die totale fraksie 'n groot proteïenband by ~62 kDa wat ooreenstem met die AKSM2A-t grote van 62.2 kDa. Die geïnduseerde toets 4 (wat AKSM2B produseer) toon in die totale fraksie 'n groot proteïenband wat ooreenstem met die verwagte AKSM2B grote van 67.8 kDa. Hierdie bande verskyn nie in die oplosbare fraksies nie. Die proteïene is dus suksesvol geproduseer maar is onoplosbaar.



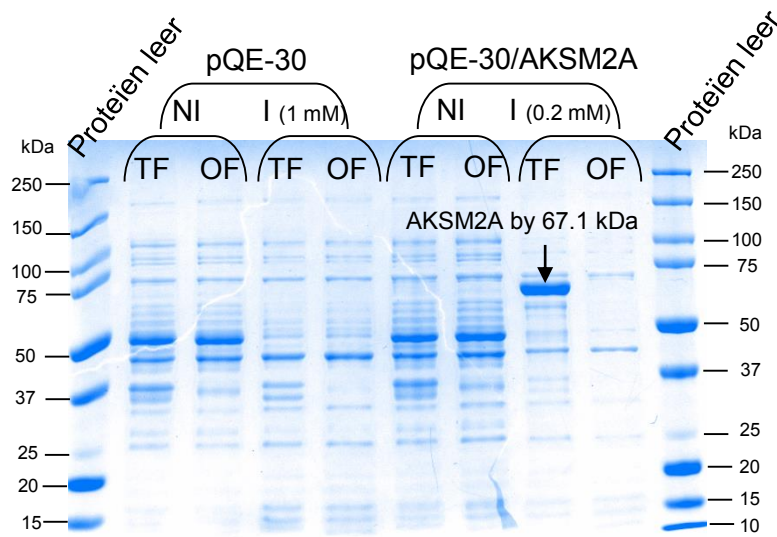
Figuur 4-47: NDS-PAGE van die BL21(DE3) sellyn wat die pET28a(+)/AKSM2B-t plasmied bevat (6). NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

Figuur 4-47 toon die totale en oplosbare fraksies van die BL21(DE3) sellyn wat pET28a(+)/AKSM2B-t bevat (geïnduseer en nie-geïnduseer nie) (6). Die totale en oplosbare fraksies van 6 wat nie-geïnduseer is nie vertoon net soos 1 en 2 in Figuur 4-45. Die wat wel geïnduseer is toon in die totale fraksie 'n groot proteïenband by ~62 kDa wat ooreenstem met die verwagte AKSM2B-t proteïen grote van 62.3 kDa. Hierdie bande verskyn nie in die oplosbare fraksie nie. Die proteïen is dus suksesvol geproduseer maar is onoplosbaar.

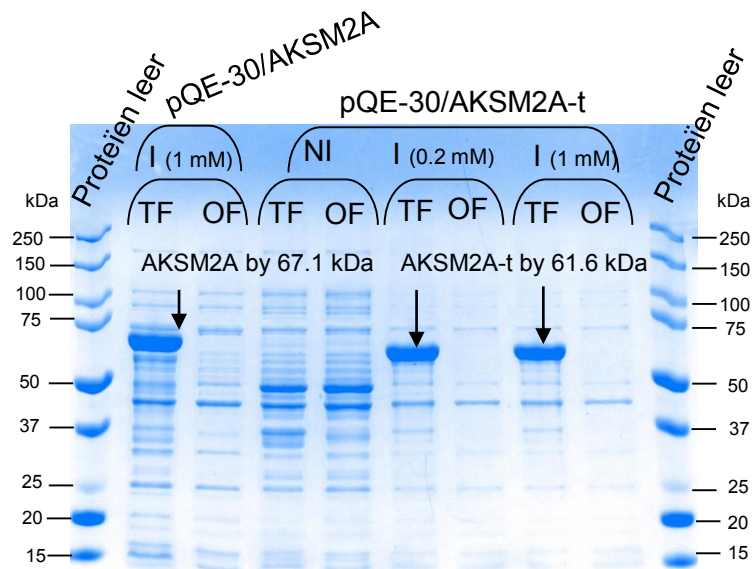
Die volgende proteïenekspressiesistiem is toe aangepak.

4.3.8.3 Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pQE-30-metode

Die resultate van die proteïenuitdrukking deur gebruik te maak van die pQE-30-metode (soos beskryf in afdeling 4.2.27.3) word weergegee in Figuur 4-48 en Figuur 4-49.



Figuur 4-48: NDS-PAGE van die M15[pREP] sellyn wat die pQE-30 plasmied bevat en die M15[pREP] sellyn wat die pQE-30/AKSM2A plasmied bevat. NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.



Figuur 4-49: NDS-PAGE van die M15[pREP] sellyn wat die pQE-30/AKSM2A plasmied bevat en die M15[pREP] sellyn wat die pQE-30/AKSM2A-t plasmied bevat. NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

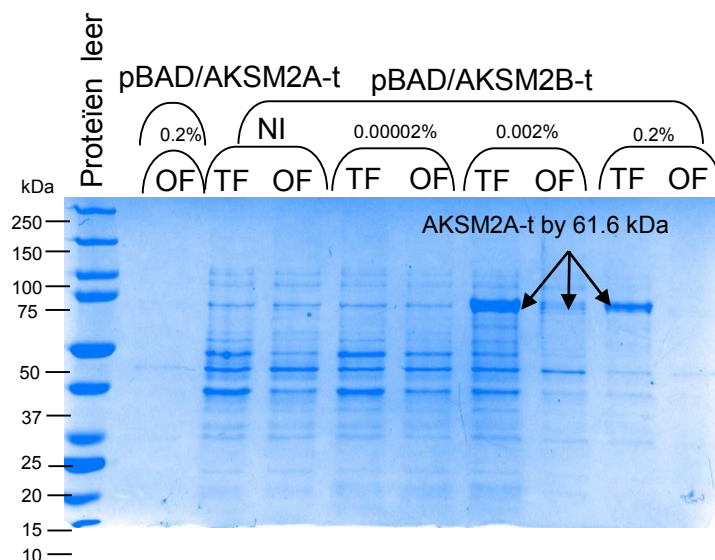
Figuur 4-48 en Figuur 4-49 toon die totale en oplosbare fraksies van die M15[pREP] sellyn wat onderskeie plasmiede bevat. Die sellyne is geïnduseer met onderskeidelik 0.2 mM en 1 mM IPTG.

Die M15[pREP] sellyn wat die pQE-30 plasmied bevat dien as kontrole en toon die agtergrond uitdrukking van hierdie sellyn en die pQE-30 plasmied. Die M15[pREP] sellyn wat die pQE-30/AKSM2A plasmied se totale en oplosbare fraksies wat nie-geïnduseer is nie lyk net soos die pQE-30 kontrole, die wat wel geïnduseer is toon 'n helder band by 67 kDa wat ooreenstem met die verwagte grote van AKSMA, 67.1 kDa, in die totale fraksies. Hierdie band verskyn nie in die oplosbare fraksie nie. Die proteïen is dus suksesvol geproduseer maar is onoplosbaar. Die M15[pREP] sellyn wat die pQE-30/AKSM2A-t plasmied se totale en oplosbare fraksies wat nie-geïnduseer is nie lyk net soos die pQE-30 kontrole, die wat wel geïnduseer is toon 'n helder band by 60 kDa wat ooreenstem met die verwagte grote van AKSM2A-t, 61.6 kDa, in die totale fraksies. Hierdie band verskyn nie in die oplosbare fraksie nie. Die proteïen is dus suksesvol geproduseer maar is onoplosbaar.

Dit is na aanleiding van hierdie sisteem dat die pBAD sisteem wat geoptimaliseer is vir toksiese proteïene aangekoop en gekloneer is.

4.3.8.4 Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pBAD-metode.

Proteïen produksie is uitgevoer deur gebruik te maak van die pBAD ekspressiemetode met 'n konsentrasie gradiënt van arabinose. Die vyf mikroliter van die monsters wat op die poliakrielamiedjels gelaai was, was te min om die proteïenbande duidelik te sien en daarom word slegs die pBAD/AKSM2B-t konstruksie se ekspressie resultate wat duideliker vertoon het in Figuur 4-50 weergegee.



Figuur 4-50: NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2A-t plasmied bevat en die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2B-t plasmied bevat. NI: nie-

**geïnduseer. Persentasie arabinose gebruik vir induksie word aangetoon.
TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.**

Figuur 4-50 toon die NDS-PAGE van die konsentrasie gradiënt ekspressie van die AKSM2A-t en AKSM2B-t proteïene deur die pBAD sisteem. Die nie-geïnduseerde fraksies van pBAD/AKSM2B-t lyk presies soos die kontrole agtergrond uitdrukking. 0.00002% arabinose induksie van pBAD/AKSM2B-t plasmied is te min om werklik die proteïen waar te neem en lyk presies soos die agtergrond uitdrukking. By die 0.002% arabinose induksie verskyn die AKSM2B-t proteïen net onder die 75 kDa band in die totale fraksie en dieselfde band verskyn ook in die oplosbare fraksies wat nie voorheen in die kontroles was nie. Die band stem ooreen met die AKSM2B-t proteïen. Dit dui aan dat die AKSM2B-t proteïen, al is dit tot in 'n baie min mate, oplosbaar uitgedruk is. Die 0.2% arabinose induksie van die AKSM2B-t proteïen vertoon omtrent net die proteïen se duidelike band in die totale fraksie, die res van die bande in die totale en oplosbare fraksies is te fyn en dof om waar te neem.

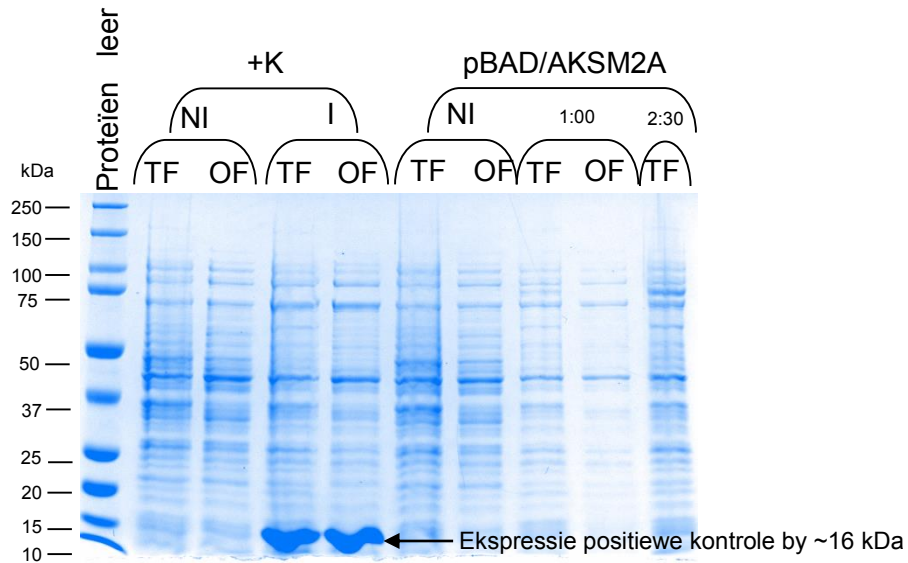
Die feit dat daar 'n oplosbare band verskyn by die AKSM2B-t proteïenuitdrukking met 0.02% arabinose, gee hoop dat hierdie sisteem wel die AKSM2-proteïene oplosbaar kan produseer. Die konsentrasie proteïene op die poliakriëlamiedjels was wel te min om 'n konkrete afleiding te maak.

Die effek van die arabinose induksie se konsentrasie gradiënt is deurgang dieselfde by al die proteïene. 0.00002% is te min vir proteïenuitdrukking, 0.002% produseer 'n duidelike band van die proteïen maar neem nie die proteïenuitdrukking van die sellyn oor nie en 0.2% vertoon 'n baie duidelike band, maar die agtergrond proteïene verminder drasties en dit kan negatiewe effekte op proteïenekspressie hê. 0.002% is dus as die beste induksie konsentrasie gekies.

4.3.9 Gedeeltelike optimalisering van pBAD proteïenekspressiemetode

4.3.9.1 Proteïenekspressie van die AKSM2-ensieme met die pBAD-metode met bygevoegde pantoteensuur en met 15 µl monster gelaai op die NDS-PAGE

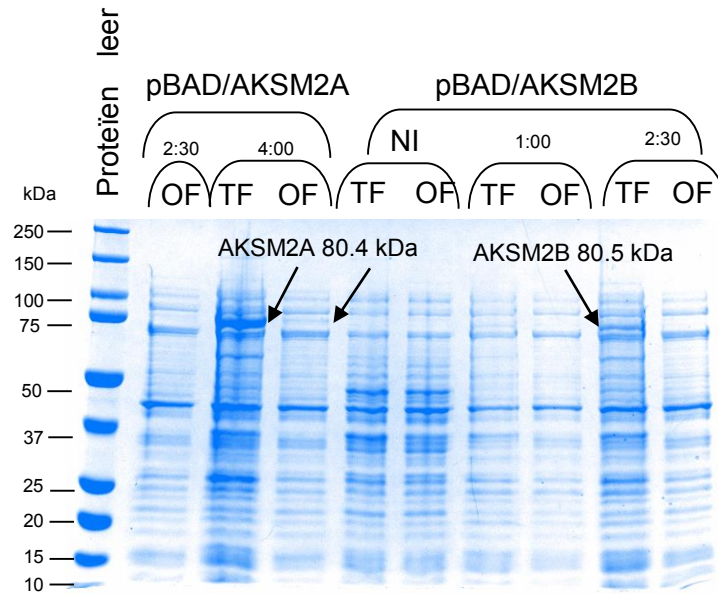
Proteïenuitdrukking met die pBAD ekspressiemetode en met bygevoegde pantoteensuur (soos beskryf in afdeling 4.2.28.1), 0.002% arabinose en 'n tydgradiënt word aangedui in Figuur 4-51, Figuur 4-52, Figuur 4-53 en Figuur 4-54. Die resultate van die tydgradiënt by al die ekspressies is dieselfde. Een uur se inkubering het min proteïen tot gevolg gehad, twee en 'n halwe ure het meer proteïen tot gevolg gehad, maar die vier ure het die optimale hoeveelheid gelewer wat oplosbare proteïene tot gevolg gehad het.



Figuur 4-51: NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die ekspressie kontrole plasmied bevat (+K) en die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2A plasmied bevat. NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. Die induksietydperke word aangedui. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

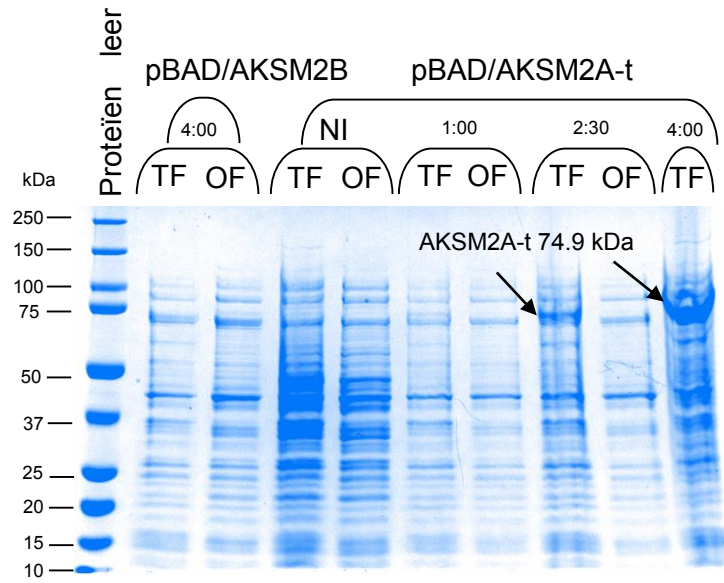
Figuur 4-51 toon die positiewe kontrole se nie-geïnduseerde agtergrond en die uitdrukking van die geïnduseerde kontrole proteïen in die totale en oplosbare fraksies. Die proteïen vertoon baie duidelik by ~16 kDa. Die laai van 15 µl van die monsters vertoon baie beter, maar meer kan steeds gelaai word.

Die AKSM2A-proteïen se nie-geïnduseerde fraksies lyk presies soos die kontrole. Die vier uur geïnkubeerde fraksies (Figuur 4-52) toon 'n helder AKSM2A-proteïenband by ~80.4 kDa (hierdie proteïen het 'n fusie proteïen by wat bydra tot 'n hoër molekulêre gewig) in die totale fraksie en ook 'n fyn maar sigbare band in die oplosbare fraksies. Die AKSM2A-proteïen word dus oplosbaar geproduseer.



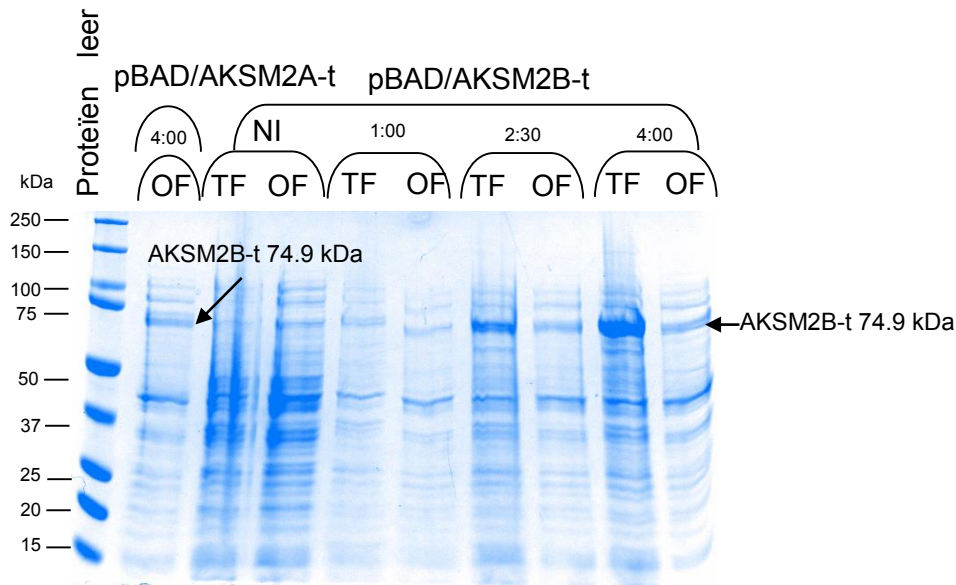
Figuur 4-52: NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2A plasmied bevat en die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2B plasmied bevat. NI: nie-geïnduseer. Induksietydperk wat gebruik is word aangedui. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

Die AKSM2B-proteïen wat verskyn in die twee en 'n half uur inkubasie fraksies by ~80.5 kDa verskyn nie in die vier uur geïnkubeerde fraksies (Figuur 4-53) nie. Die induksie van hierdie kultuur was moontlik nie uitgevoer nie en daarom verskyn die proteïen nie eers in die totale fraksie nie.



Figuur 4-53: NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2B plasmied bevat en die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2A-t plasmied bevat. NI: nie-geïnduseer. Die induksietydperke word aangedui. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

In Figuur 4-53 vertoon die nie-geïnduseerde agtergrond van die AKSM2A-t proteïen net soos die van die kontrole. Die vier uur induksie van die proteïen het ook gelei na 'n helder band in die totale fraksie by ~75 kDa en in die oplosbare band (Figuur 4-54) verskyn ook 'n dowwe band wat ooreenstem met die AKSM2A-t proteïen.

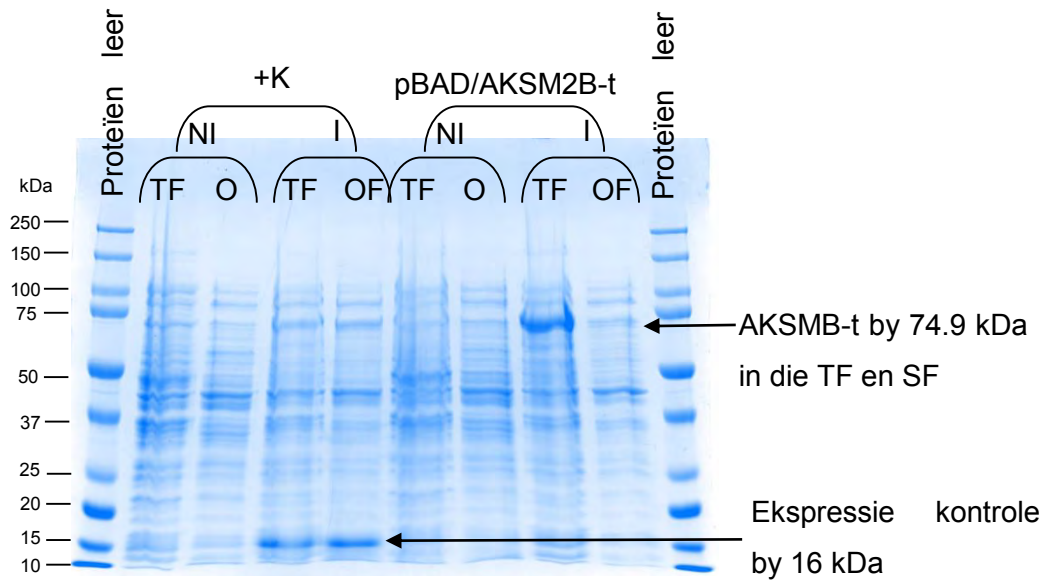


Figuur 4-54: NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2A-t plasmied bevat en die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2B-t plasmied bevat. NI: nie-geïnduseer. Die induksie tye wat gebruik is word aangedui. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

In Figuur 4-54 vertoon die AKSM2B-t proteïenuitdrukking. Die nie-geïnduseerde fraksies lyk presies soos die kontrole proteïene. Die vier uur lank geïnkubeerde fraksies vertoon die AKSM2B-t proteïene by ~75 kDa en 'n ooreenstemmende band vertoon ook in die oplosbare fraksie.

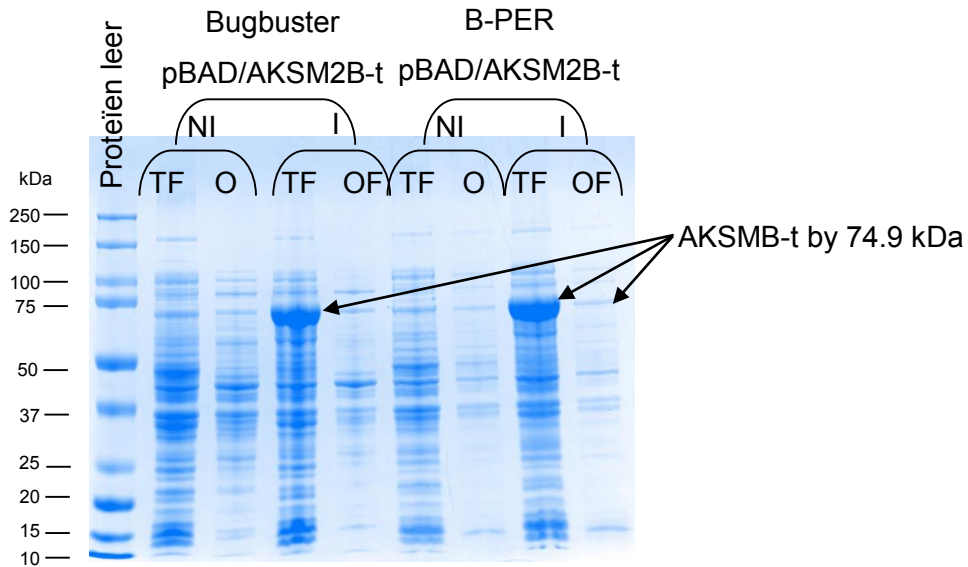
4.3.9.2 Optimalisering van pBAD sisteem lise-metode

Die gebruik van die pBAD lise-metode (vries in vloeibare stikstof en ontdooi in 42°C) is prakties moeilik om effektief uit te voer met groter volumes as die 500 µl wat tot dusvêr gebruik was. Met die oog op grootskaalse isolasie is die Bugbuster en B-PER lise-metodes getoets. Figuur 4-55 toon die TOP10/pBAD/AKSM2B-t *E. coli* en die ekspressie kontrole wat met die normale pBAD lise-metode behandel is. Figuur 4-56 toon die TOP10/pBAD/AKSM2B-t *E. coli* wat met die Bugbuster en B-PER lise-metodes behandel is.



Figuur 4-55: NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die ekspressie kontrole plasmied bevat (+K) en die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2B-t plasmied bevat wat met die pBAD lise-metode behandel is. NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

In Figuur 4-55 kan die ekspressie kontrole se 16 kDa proteïen duidelik in die TF en OF gesien word. Die AKSM2B-t proteïen by 74.5 kDa kan duidelik gesien word in die TF en 'n fyn band kan gesien word in die OF. Dit bevestig die resultate wat herhaalbaar verkry word met die pBAD lise-metode.

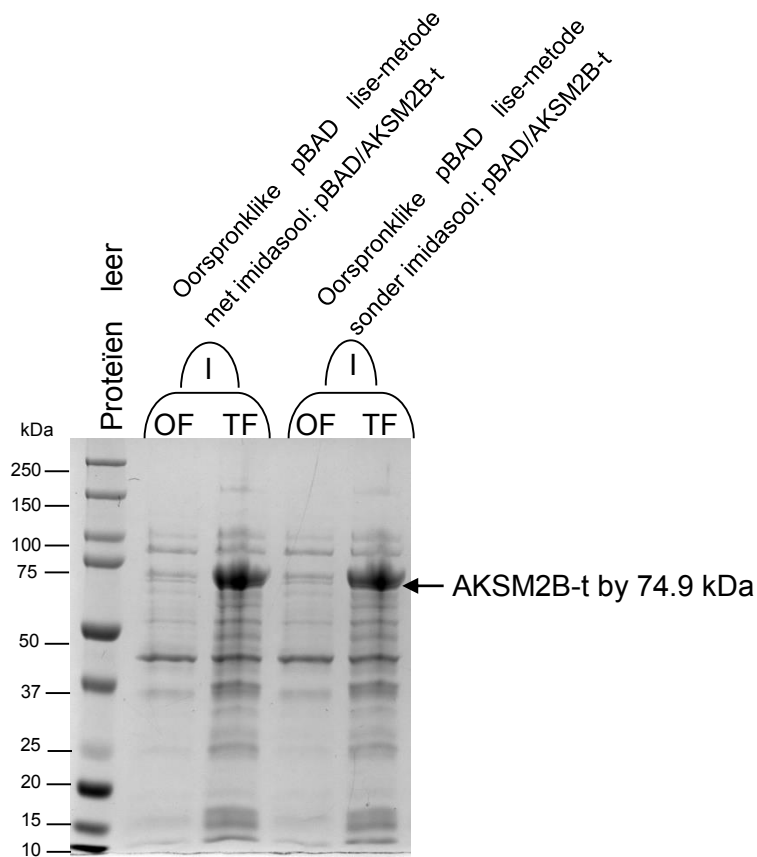


Figuur 4-56: NDS-PAGE van die TOP10 sellyn wat die pBAD/AKSM2B-t plasmied bevat wat met die Bugbuster en B-PER lise w metodes behandel is. NI: niegeïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

In Figuur 4-56 verskyn die AKSM2B-t proteïen duidelik in die TFs van die Bugbuster lise en B-PER lise-metode se resultate by 74.9 kDa, maar slegs 'n baie fyn oplosbare band word in die OF van B-PER gesien. Die resultate bevestig dat die Bugbuster lise-metode nie gepas is om oplosbare AKSM2B-t ensieme te isoleer nie en dat die B-PER metode wel kan. Die oorspronklike pBAD lise-metode produseer steeds die duidelikste oplosbare band.

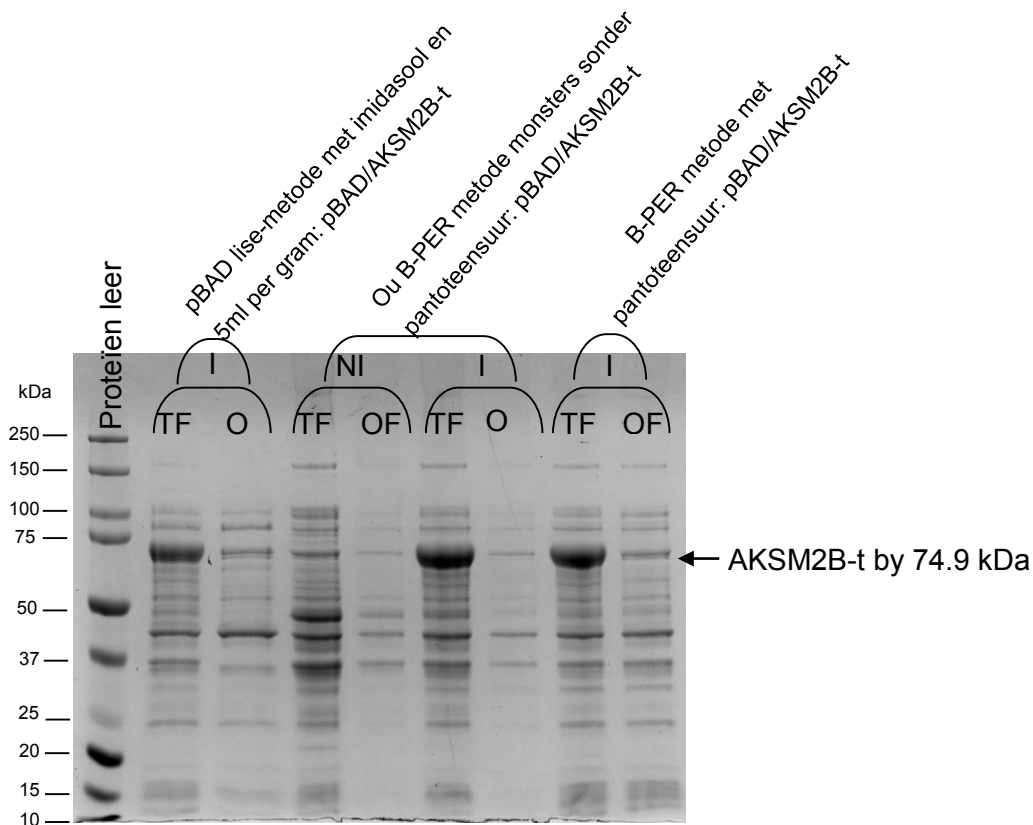
Die pBAD lise-metode en die B-PER lise-metode gaan nog verder vir optimalisering getoets word.

Met die doel om die pBAD lise-metode en die B-PER lise-metode te verbeter is pantoteensuur by beide gevoeg (soos beskryf in afdeling 4.2.28.1). Die pBAD lise-metode is uitgevoer soos in afdeling 4.2.27.4 maar een lise is gedoen met imidasool en een lise is gedoen met lise buffer wat nie imidasool bevat nie (Figuur 4-57). Die laasgenoemde metode wat nie imidasool bevat nie is ook met die volgende aanpassing uitgevoer (soos beskryf in 4.2.28.2), die *E. coli* presipitaat is in 5 ml pBAD lise buffer (sonder imidasool) opgelos per gram presipitaat. Hierdie metode saam met die B-PER metode (met bygevoegde pantoteensuur) word getoon in Figuur 4-58.



Figuur 4-57: NDS-PAGE van die TOP10/pBAD AKSM2B-t sellyn wat met die oorspronklike pBAD lise-metode geliseer is met bygevoegde pantoteensuur. Een met imidasool en een sonder imidasool beide met bygevoegde pantoteensuur. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

In Figuur 4-57 word die oorspronklike pBAD lise-metode uitgevoer met bygevoegde pantoteensuur. Een lise buffer het imidasool bevat en een het nie. Beide metodes se produsering van oplosbare AKSM2B by 74.9 kDa werk ewe goed. Dit beteken dat imidasool vanuit die pBAD lise buffer weggelaat kan word. Dit beteken dat hierdie lise-metode gebruik kan word saam met nikkel kolom chromatografie vir suiwing van die AKSM ensieme soos beskryf in afdeling 4.2.28.2.



Figuur 4-58: NDS-PAGE van die TOP10/pBAD AKSM2B-t sellyn wat met die pBAD lise-metode (5ml per gram presipitaat en met bygevoegde pantoteensuur en sonder imidasool) geliseer is. Die TOP10/pBAD AKSM2B-t sellyn wat met die B-PER metode geliseer is in afdeling 4.2.28.2 se monsters en die B-PER metode se sellise met. NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer. TF: totale fraksie. OF: oplosbare fraksie.

In Figuur 4-58 sien ons die pBAD lise-metode met bygevoegde pantoteensuur, sonder imidasool en met die metode waar 5ml lise buffer per gram presipitaat gebruik is. Die oplosbare AKSM2B-t band by 74.9 kDa is steeds teenwoordig. Dit beteken dat die pBAD-metode met kleiner volumes pBAD lise buffer uitgevoer kan word en daarom meer prakties uitvoerbaar is. Die ou B-PER monsters wat ook in Figuur 4-56 op die PAGE gelaai is, is weer gelaai op hierdie PAGE. Nuwe B-PER monsters waar pantoteensuur bygevoeg is, word ook getoon. Die byvoeging van die pantoteensuur het die oplosbare fraksie se konsentrasie van alle proteïene verhoog wat aandui dat die byvoeging van pantoteensuur wel die metaboliese las in die *E. coli* verminder, maar hierdie resultaat word nie as 'n absolute bewys daarvan gesien nie, omdat die gevaar bestaan dat die sel lise by hierdie nuwe monsters slegs beter geskied het en so gelei het na meer oplosbare

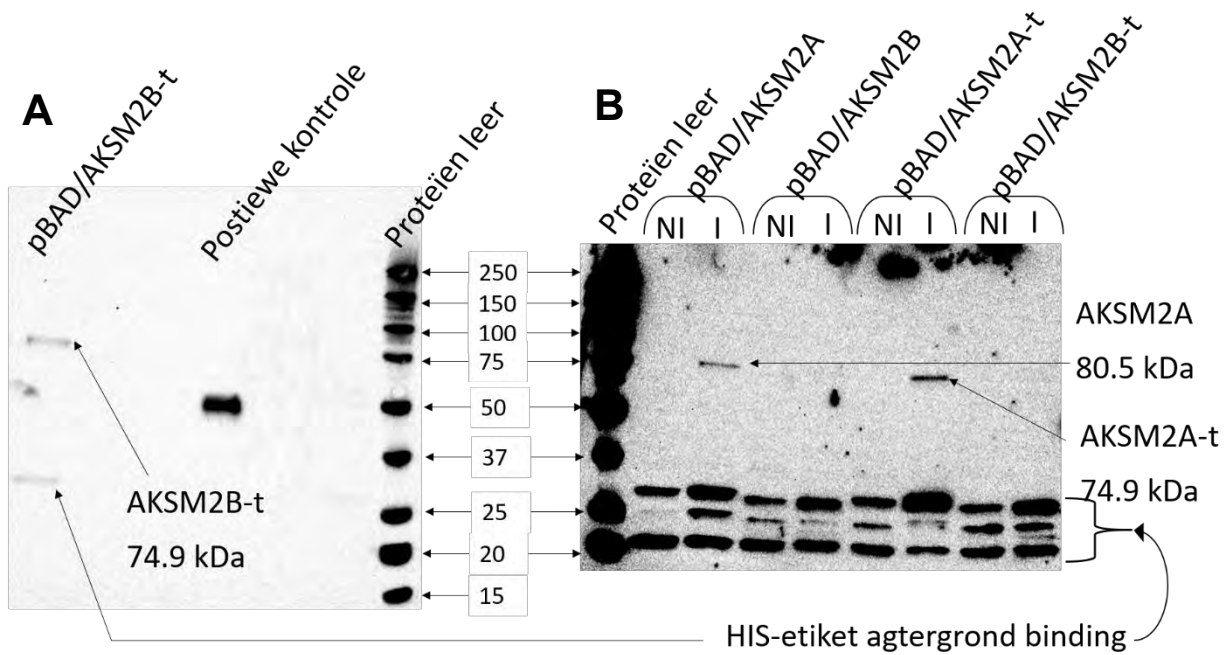
proteïene. Die oplosbare AKSM2B-t band is steeds teenwoordig in die oplosbare fraksies van geïnduseerde B-PER metode, maar in 'n mindere mate as in die pBAD lise-metode.

Die pBAD lise-metode, soos wat die tot op hierdie stadium geoptimaliseer is, is gebruik in Westerseklad eksperimente om te bevestig of die fyn oplosbare AKSM2 proteïenbande wat waargeneem word wel definitief hierdie proteïene is.

4.3.10 Westerseklad van AKSM2-proteïene wat deur die pBAD-metode uitgedruk is.

'n Westerseklad van die oplosbare fraksie van die BL21(DE3)RIL/pBAD/AKSM2B-t selle wat met die oorspronklike pBAD ekspressie en lise-metode (soos in afdeling 4.2.27.4) behandel is, is uitgevoer om te sien of die AKSM2B-t proteïenband wat waargeneem word, werklik hierdie proteïen is. 'n Suiwer proteïen (N156S GLIAT) wat 'n HIS-etiket bevat is as kontrole gelaai. Sien Figuur 4-59 A.

Die BL21(DE3)RIL selle wat die pBAD/AKSM2 plasmiede besit is met die oorspronklike pBAD ekspressiemetode uitgedruk, maar geliseer met die geoptimaliseerde pBAD lise-metode (soos in afdeling 4.2.28.2). 'n Westerseklad van die oplosbare fraksies is uitgevoer om te sien of dit die AKSM2-proteïene oplosbaar produseer. Sien Figuur 4-59 B.



Figuur 4-59: Westerseklad van A: die oplosbare fraksie van die BL21(DE3)RIL/pBAD/AKSM2B-t selle wat met die oorspronklike pBAD ekspressie en lise-metode behandel is en B: oplosbare fraksies van die BL21(DE3)RIL selle wat die pBAD/AKSM2 plasmiede besit wat met die oorspronklike pBAD ekspressiemetode uitgedruk is, maar geliseer is met die geoptimaliseerde pBAD lise-metode. NI: nie-geïnduseer. I: geïnduseer.

Die resultaat van die Westerseklad A was dat daar 'n band verskyn het by ~74.9 kDa in die oplosbare fraksie van die AKSM2B-t proteïenekspressie saam met HIS-etiket agtergrond binding (die HIS-etiket is onspesifiek in die sin dat dit aan enige proteïen sal bind wat 'n histidien ryke area het wat in die oplosbare fraksie is). Die suiwer positiewe kontrole se band vertoon helder by ~50 kDa en toon aan dat die Westerseklad wel suksesvol uitgevoer is. Hierdie eerste Westerseklad skiet tekort aan kontroles en daarom is Westerseklad B uitgevoer. Dit toon wel aan dat die AKSM2B-t proteïen oplosbaar uitgedruk is met die oorspronklike pBAD-ekspressie en pBAD-lise-metode. Die band is wel baie vaag en toon aan dat die proteïen baie swak oplosbaar geproduseer is.

Die resultaat van die Westerseklad B was dat daar 'n band verskyn het by ~80.5 kDa in die oplosbare fraksie van die geïnduseerde AKSM2A-proteïenekspressie en by ~74.9 kDa in die oplosbare fraksie van die geïnduseerde AKSM2A-t proteïenekspressie. Daar het nie bande in die nie-geïnduseerde fraksies verskyn nie en ook nie in die AKSM2B en AKSM2B-t geïnduseerde

fraksies nie. Die onspesifieke agtergrond binding van die HIS-etiket is deurgangs sigbaar in elke fraksie van die nie-geïnduseerde kontroles en geïnduseerde fraksies en dit toon aan dat dit wel onspesifieke agtergrond is. Dit beteken dat die AKSM2A en AKSM2A-t proteïene wel oplosbaar uitgedruk en geïsoleer is met die pBAD-ekspressiemetode en die geoptimaliseerde pBAD lise-metode, maar dat hierdie geoptimaliseerde lise-metode die AKSM2B en AKSM2B-t proteïene nie oplosbaar produseer nie.

4.3.11 Opsomming

Vier bakteriële ekspressiemetodes is gekies. Drie van die metodes het voorheen asiel-KoA-sintetases oplosbaar geproduseer. Die vierde metode is 'n nuwe kommersiële bakteriële ekspressiemetode. Die AKSM2A- en AKSM2B-gene se 5'-punt verkorte en vollengte weergawes is in die bakteriële ekspressieplasmiede gekloneer. 'n Soogdiersel ekspressiemetode is ook uitgekies en sy ekspressieplasmied is ook gekloneer. Indien die bakteriële ekspressiemetodes nie die AKSM2-proteïene suksesvol produseer nie, sou hierdie soogdiersel ekspressiemetode getoets word. Die metodes en hulle suksesvol gekloneerde plasmiedkonstrukte word weergegee in Tabel 4-38.

Tabel 4-38: Gebruikte metodes en die suksesvol gekloneerde plasmiedkonstrukte se oplosbare uitdrukking.

Metode se naam	Plasmiedkonstruk	Oplosbare uitdrukking	Metode se verwysing
pFLAG metode (Bakterieel)	pFLAG-CTC/AKSM2A	Nee	Van Horn et al. (2005)
	pFLAG-CTC/AKSM2B	Nee	
	pFLAG-CTC/AKSM2A-t	Nee	
	pFLAG-CTC/AKSM2B-t	Nee	
pET28-metode (Bakterieel)	pET28a(+)/AKSM2A	Nee	Malhotra et al. (1999)
	pET28a(+)/AKSM2B	Nee	
	pET28a(+)/AKSM2A-t	Nee	
	pET28a(+)/AKSM2B-t	Nee	
pQE-30-metode (Bakterieel)	pQE-30/AKSM2A	Nee	Bruggera et al. (2001)
	pQE-30/AKSM2A-t	Nee	
pcDNA-metode (Soogdierselle)	pcDNA3.1(+)/AKSM2A	Nee	Boomgaarden et al. (2009)
	pcDNA3.1(+)/AKSM2B	Nee	
	pcDNA3.1(+)/AKSM2A-t	Nee	
	pcDNA3.1(+)/AKSM2B-t	Nee	

Metode se naam	Plasmiedkonstruk	Oplosbare uitdrukking	Metode se verwysing
pBAD-metode (Bakterieel)	pBAD/AKSM2A	Ja (pBAD ekspressiemetode en geoptimaliseerde lise-metode)	pBAD/TOPO ThioFusion Expression Kit (Invitrogen, Carlsbad, VSA)
	pBAD/AKSM2B	Nee (nog nie bewys nie)	
	pBAD/AKSM2A-t	Ja (pBAD ekspressiemetode en geoptimaliseerde lise-metode)	
	pBAD/AKSM2B-t	Ja (pBAD ekspressiemetode oorspronklike pBAD lise-metode)	

Die gekloneerde bakteriële ekspressieplasmiede gelys in Tabel 4-38 is volgens hulle ekspressiemetodes in die ooreenstemmende gasheersellyne getransformeer en proteïenekspressie is uitgevoer. Die pFLAG-, pET28- en pQE-30-metodes het die AKSM2-proteïene suksesvol geproduseer. Dit was duidelik uit die groot proteïenbande wat saam met induksie van die ekspressie verskyn het, maar hierdie geproduseerde proteïene was almal onoplosbaar. Die proteïenbande het slegs in die totale fraksie van die geliseerde selle verskyn. Die pBAD-metode het na die eerste proteïenekspressietoets 'n baie fyn oplosbare band getoon vir die ekspressie van AKSM2B-t. In die eerste toets is daar ook induksiemiddel (arabinose) gradiënt uitgevoer om die optimale hoeveelheid te bepaal en die konsentrasie wat die oplosbare band by AKSM2B-t geproduseer het ('n finale konsentrasie van 0.002% arabinose) is verder as die optimale arabinose konsentrasie gebruik. Hierdie metode is weer uitgevoer met pantoteensuur bygevoeg as media bymiddel (vir die vermeerdering van interne koënsiem-A) en 'n groter hoeveelheid van die monsters is op die NDS-PAGE gelaai. Daar is ook 'n tydgradiënt van die induksietydperk gedoen, om die optimale induksietydperk te ondersoek. Hierdie eksperiment het aangetoon dat daar wel by die ekspressie van die AKSM2A, AKSM2B, AKSM2A-t en AKSM2B-t proteïene die ooreenstemmende proteïenbande in die oplosbare fraksies van die geliseerde selle verskyn. Dit het ook aangetoon dat vier ure die optimale tyd is vir proteïenekspressie induksie.

Die produksie van die oplosbare AKSM2B-t proteïen met die geoptimaliseerde toestande wat tot dusvêr bepaal is, is uitgevoer en 'n Westerseklad is uitgevoer wat spesifiek was vir die 6X-histidien

etiket wat aan die AKSM2B-t proteïen vasgeheg is. Hierdie Westerseklad het bewys dat die fyn oplosbare AKSM2B-t proteïenband wat waargeneem word, wel die AKSM2B-t proteïen is wat oplosbaar geproduseer word.

Die pBAD-metode se sellise-metode was onprakties om op 'n grootskaal uit te voer. Die metode is daarom geoptimaliseer en ekspressie van al die AKSM2-proteïene is uitgevoer. Oplosbare ekspressie van al die proteïene is weer getoets met 'n Westerseklad. Deur hierdie geoptimaliseerde lise-metode te gebruik kon slegs die AKSM2A en AKSM2A-t proteïene oplosbaar geproduseer. Al is die proteïene baie dieselfde sal elke proteïen se kondisies sal dus individueel geoptimaliseer moet word.

HOOFSTUK 5 Gevolgtrekking.

5.1 Inleiding

Die oormatige inname van toksiese verbindings kan die biologiese weë van biotransformasie oorweldig en lei na verskeie gesondheidsprobleme (Liska *et al.*, 2006). Glisienkonjugasie as 'n biotransformasieweg het 'n beperkte kapasiteit, maar die weg se hoofsubstraat, bensoaat, word in groot dele van die wêreldpopulasie bo aanvaarde limiete gebruik (Amsel & Levy, 1969; Mischek & Krapfenbauer-Cermak, 2012; Badenhorst *et al.*, 2014; Del Olmo *et al.*, 2017). Die glisienkonjugasieweg is nog baie swak gekarakteriseer ten spyte van hierdie oormatige inname van bensoaat en die algemene inname van salisilaat, wat ook hoofsaaklik deur glisienkonjugasie gedetoksifiseer word (Nelson *et al.*, 1966; Patel *et al.*, 1990). Een van die groot tekortkominge in die literatuur is ensimatieuse inligting rakende die eerste ensiem in die glisienkonjugasieweg, naamlik asiel-KoA-sintetase mediumketting 2B (AKSM2B). Die AKSM2B-proteïen speel ook 'n belangrike rol in die mediumketting vetsuurmetabolisme en dit is dus belangrik om die effek van 'n oormaat bensoaat inname op vetsuurmetabolisme te bepaal. Die hoofdoel van hierdie studie was om 'n ensiemtoets en proteïenuitdrukkings sisteem te evalueer en te optimaliseer sodat karakterisering van AKSM2B en die naby verwante AKSM2A in toekomstige navorsing moontlik kan wees.

5.2 Gevolgtrekking

5.2.1 Optimalisering van 'n ensiemtoets vir AKSM2A en AKSM2B

Die eerste doelstelling van hierdie studie was om 'n ensiemtoets vir AKSM2A en AKSM2B te optimaliseer om sodoende hierdie ensieme te kan karakteriseer. Om hierdie doel te bereik is al die moontlike asiel-KoA-sintetase ensiemtoetse ondersoek en twee kontinue ensiemtoetse is uitgesoek vir verdere ondersoek vir toepaslikheid om die ensiemaktiwiteit en kinetiese parameters van die AKSM2A en AKSM2B-ensieme te bepaal. 'n Gepaste positiewe kontrole vir die optimalisering van 'n ensiemtoets is geïdentifiseer en aangekoop, naamlik die Asiel-KoA-sintetase van *Pseudomonas* sp. Die Gibson *et al.* (1990) ensiemtoets is geïdentifiseer as die ensiemtoets wat moontlik die AKSM2A- en AKSM2B-ensieme die beste sal kan toets, omdat dit 'n kontinue toets is wat 'n enkele produk van enige asiel-KoA-sintetase, AMP, koppel aan die oksidering van NADH wat gevolg kan word by 337 nm. Die golflengte val in die ultraviolet lig se spektrum en is goed geskei van enige agtergrond wat waargeneem kon word. Hierdie ensiemtoets is met sy oorspronklike grootskaal metode en die aangekoopte positiewe kontrole op 'n spektrofotometer getoets (Gibson *et al.*, 1990). Hierdie grootskaalse ensiemtoets is suksesvol uitgevoer op die positiewe kontrole en daarom sal die ensiemtoets ook geldig wees vir die AKSM2A- en AKSM2B-

ensieme, omdat die AMP wat in beide die positiewe kontrole en die AKSM2-ensieme geproduseer word deur die ensiemtoets gemeet word. Die ensiemtoets is afgeskaal om uitgevoer te kan word in Costar UV 96 put plate op 'n Synergy HT plaatleser, omdat die plaatleser meer akkurate lesings weergee en menigte reaksies gelyktydig gemeet kan word wat ideaal is vir ensiemaktiwiteit en kinetiese parameter bepaling. Die afgeskaalde ensiemtoets is suksesvol op die positiewe kontrole uitgevoer, geoptimaliseer en kon akkuraat herhaal word. 'n Ensiemtoets was dus suksesvol geoptimaliseer vir die toekomstige toets van die AKSM2A- en AKSM2B-ensieme.

5.2.2 Evaluering en optimalisering van 'n ekspressiesisteem wat oplosbare AKSM2A en AKSM2B produseer.

Die tweede doelstelling van hierdie studie was om 'n ekspressiesisteem vir die AKSM2A- en AKSM2B-proteïene te ontwikkel wat die proteïene oplosbaar sal kan produseer. Al die ekspressiemetodes wat in die literatuur gebruik is om asiel-KoA-sintetases te produseer is nagevors. Die gashere van die verskillende tipes ekspressiemetodes is teen mekaar opgeweeg. *E. coli* is geïdentifiseer as die optimale gasheer vir produksie van die AKSM2-proteïene in die beskikbare laboratorium omstandighede en met die oog op produksie van die AKSM2-proteïene vir gebruik in ensiemtoetse. Vier bakteriële en een soogdiersel ekspressiemetode is uitgekies en hul ekspressieplasmiede is gekloneer met die *AKSM2A*, *AKSM2B*, *AKSM2A-t* en *AKSM2B-t* gene (4.2.24). Proteïenuitdrukking is met al die bakteriële metodes uitgevoer (4.3.8).

Die klonering van die pFLAG-CTC en pET28a(+) plasmiedkonstrukte is suksesvol uitgevoer. Proteïenuitdrukking met hierdie twee plasmiede het gelei na redelik hoeveelhede onoplosbare proteïene. Die klonering van die pQE-30 plasmied het slegs die pQE-30/AKSM2A en pQE-30/AKSM2B plasmiedkonstrukte was suksesvol geproduseer. Die pQE-30/AKSM2B en pQE-30/AKSM2B-t plasmiedkonstrukte is suksesvol na transformasie met 'n kolonie PKR geïdentifiseer, maar die *AKSM2B* en *AKSM2B-t* gene se Sanger volgorde resultate het aangetoon dat die gene keer op keer geskommel is en dat daar homoloë rekombinasie plaasgevind het. Die sterk T5 promotor in die pQE-30 plasmied kan veroorsaak dat effense proteïenekspressie plaasvind selfs as die onderdrukker proteïene geproduseer word. Hierdie effense proteïenekspressie kon daartoe gelei het dat dit vir die *E. coli* voordeliger was om mutante weergawes van die plasmiede te laat repliseer in plaas van die korrekte plasmiede, omdat die korrekte plasmiede se uitgedrukte proteïene miskien toksies is vir die *E. coli*, of omdat die proteïene se ekspressie die sellulêre prosesse in die *E. coli* oorweldig (Rosano & Ceccarelli, 2014a). Proteïenekspressie van die suksesvol gekloneerde pQE-30 plasmiede is uitgevoer. Dit het ook gelei na onoplosbaar geproduseerde proteïene. Die pBAD/TOPO ThioFusion ekspressie stel (Invitrogen, Carlsbad, VSA) is ontwerp om toksiese proteïene oplosbaar onder streng

ekspressie beheer te produseer. Die plasmied heg 'n tioredoksien proteïen aan die N-terminaal van die proteïene om translase effektiwiteit en oplosbaarheid van eukariotiese proteïene in bakterieë te verbeter en heg ook 'n 6X-histidien etiket aan die C-terminaal van die proteïene. Die plasmiedkonstrukte pBAD/AKSM2A, pBAD/AKSM2B, pBAD/AKSM2A-t en pBAD/AKSM2B-t se proteïenuitdrukking het fyn oplosbare proteïenbande van elke proteïen getoon. Die oplosbare uitdrukking van die AKSM2B-t proteïen volgens die pBAD/TOPO ThioFusion ekspressie stel se handleiding en 'n arabinose induksie konsentrasie van 0.002% is getoets deur 'n Westerseklad uit te voer met teenliggaampies wat spesifiek is vir die 6X-histidien etiket wat aan die AKSM2B-t proteïen geheg is. Hierdie Westerseklad het aangetoon dat die AKSM2B-t proteïen suksesvol oplosbaar geproduseer is.

Die lise-metode wat deur die pBAD/TOPO ThioFusion ekspressie stel vir kleinskaalse ekspressie toetse gegee word, is onprakties om op 'n groter skaal uit te voer, omdat die groot volume waarin sel presipitate opgelos moet word lei na groot hoeveelhede lise buffer. Hierdie groter volumes vries stadiger in vloeibare stikstof en verminder so die effektiwiteit van die lise-metode. Dit veroorsaak ook dat isolasie van die AKSM2-ensieme met nikkel kolom chromatografie onprakties is. Eerstens omdat die lise buffer imidasool bevat wat in die nikkel kolom chromatografie suiwerings metode gebruik word om die proteïene mee te elueer. Tweedens omdat baie groot volumes lise buffer deur die nikkel kolom moet vloei om genoegsame proteïene te isoleer, maar die groot volumes verstop die nikkel kolomme.

Verskillende lise buffers, naamlik die BugBuster en B-PER proteïen ekstraksie reagense is getoets en die pBAD/TOPO ThioFusion ekspressie stel se lise-metode is geoptimaliseer en bestudeer vir isolasie van oplosbare proteïene. Die pBAD/TOPO ThioFusion ekspressie stel se lise-metode het nogsteeds die hoogste hoeveelhede oplosbare proteïene geproduseer nadat hierdie metode aangepas is om kleiner volumes lise buffer te gebruik per gram sel presipitaat.

Die geoptimaliseerde pBAD/TOPO ThioFusion ekspressie stel se lise-metode is gebruik in die ekspressie van al die AKSM2-proteïene. 'n Westerseklad is uitgevoer om aan te toon of die proteïene oplosbaar geproduseer is. Slegs die AKSM2A en AKSM2A-t proteïene was met hierdie metode oplosbaar geproduseer. Die AKSM2B-t proteïen is oplosbaar geproduseer met die pBAD/TOPO ThioFusion ekspressie stel se oorspronklike lise-metode en die eendersheid van hierdie proteïen met AKSM2B-proteïen laat die hoop dat die AKSM2B-proteïen ook met die oorspronklike lise-metode oplosbaar geproduseer kan word.

5.3 Beperkinge en tekortkoming van die studie

Die tydsbeperking op hierdie studie het die optimalisering van die pBAD/TOPO ThioFusion ekspressie stel se lise-metode, ekspressie toestand en suiwing ingeperk. Dit word dus voorgestel dat hierdie faktore in toekomstige studies geoptimaliseer word aangesien dit die produsering van bruikbare hoeveelhede van die AKSM2-ensieme moontlik sou maak.

5.4 Toekomsvooruitsigte

Die ensiemtoets wat in hierdie studie geoptimaliseer is, bied nou die potensiaal om die AKSM2-proteïene in die toekoms ensimaties te karakteriseer in terme van ensiemaktiwiteit, substraatspesifisiteit, kompetisie tussen verskillende substrate (byvoorbeeld die kompetisie tussen bensoaat en mediumketting vetsure) en die effek van mutasies op ensiemaktiwiteit. Hierdie ensiemtoets se herhaalbaarheid tussen ensiemtoetse op dieselfde dag is bepaal om akkuraat te wees, maar die herhaalbaarheid tussen verskillende dae met verskillende reagense en ensieme moet nog bepaal word. Dit is krities dat ensieme in die ensiemtoets nie na hul verval datum gebruik moet word nie en dat al die reagense en ensieme korrek opgemaak, verdun en gestoor word.

Die pBAD ekspressiesisteen wat oplosbare AKSM2A, AKSM2A-t en AKSM2B-t ensieme geproduseer het, se lise-metode, ekspressietoestand en suiwing moet verder geoptimaliseer word om bruikbare hoeveelhede van die proteïene te produseer en om die AKSM2B-proteïen oplosbaar te produseer. Die voorstelle aangaande hierdie faktore wat geoptimaliseer kan word is soos volg:

- Die grootskaalse suiwing metode, die ProBond suiwing sisteem (Life Technologies, Carlsbad, VSA), wat die pBAD/TOPO ThioFusion ekspressie stel se handleiding voorstel kan gebruik word om die *E. coli* te liseer en om die proteïene te isoleer.
- Die ekspressie van die proteïene kan by laer temperature uitgevoer word vir langer periodes om die korrekte vouing van die proteïene te fasiliteer, byvoorbeeld by 28°C vir twaalf ure (Rosano & Ceccarelli, 2014a).
- Die chaperone plasmied stel van Takara Bio (Takara Bio Inc. California, VSA) kan gebruik word om die vouing van die AKSM2-proteïene te verbeter (Rosano & Ceccarelli, 2014a)

BIBLIOGRAFIE

Amsel, L.P. & Levy, G. 1969. Drug biotransformation interactions in man. II. A pharmacokinetic study of the simultaneous conjugation of benzoic and salicylic acids with glycine. *J Pharm Sci*, 58(3):321-326.

Badenhorst, C.P.S., Erasmus, E., van der Sluis, R., Nortje, C. & van Dijk, A.A. 2014. A new perspective on the importance of glycine conjugation in the metabolism of aromatic acids. *Drug Metabolism Reviews*, 46(3):343-361.

Badenhorst, C.P.S., van der Sluis, R., Erasmus, E. & van Dijk, A.A. 2013. Glycine conjugation: importance in metabolism, the role of glycine N-acyltransferase, and factors that influence interindividual variation. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 9(9):1139-1153.

Bar-Tana, J., Rose, G. & Shapiro, B. 1975. [15] Long-chain fatty acyl-CoA synthetase from rat liver microsomes. *Methods in Enzymology*. Academic Press. p. 117-122).

Bateman, B., Warner, J.O., Hutchinson, E., Dean, T., Rowlandson, P., Gant, C., Grundy, J., Fitzgerald, C. & Stevenson, J. 2004. The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. *Arch Dis Child*, 89(6):506-511.

Bisswanger, H. 2014. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1-6):41-55.

Bloom, B.S. 1988. Direct medical costs of disease and gastrointestinal side effects during treatment for arthritis. *Am J Med*, 84(2A):20-24.

Bock, R.M., Ling, N.S., Morell, S.A. & Lipton, S.H. 1956. Ultraviolet absorption spectra of adenosine-5'-triphosphate and related 5'-ribonucleotides. *Arch Biochem Biophys*, 62(2):253-264.

Boomgaarden, I., Vock, C., Klapper, M. & Doring, F. 2009. Comparative analyses of disease risk genes belonging to the acyl-CoA synthetase medium-chain (ACSM) family in human liver and cell lines. *Biochem Genet*, 47(9-10):739-748.

Bridges, J.W., French, M.R., Smith, R.L. & Williams, R.T. 1970. The fate of benzoic acid in various species. *Biochem J*, 118(1):47-51.

Bruggera, R., Reichel, C., Garcia Alia, B., Brune, K., Yamamoto, T., Tegeder, I. & Geisslinger, G. 2001. Expression of rat liver long-chain acyl-CoA synthetase and characterization of its role

in the metabolism of R-ibuprofen and other fatty acid-like xenobiotics. *Biochem Pharmacol*, 61(6):651-656.

Campbell, L., Wilson, H.K., Samuel, A.M. & Gompertz, D. 1988. Interactions of m-xylene and aspirin metabolism in man. *Br J Ind Med*, 45(2):127-132.

Chauhan, J.S., Rao, A. & Raghava, G.P. 2013. In silico platform for prediction of N-, O- and C-glycosites in eukaryotic protein sequences. *PLoS One*, 8(6):e67008.

Cheng, T.O. 2007. The history of aspirin. *Tex Heart Inst J*, 34(3):392-393.

Chung, C.T. & Miller, R.H. 1988. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res*, 16(8):3580.

Conti, A. & Bickel, M.H. 1977. History of drug metabolism: discoveries of the major pathways in the 19th century. *Drug Metabolism Reviews*, 6(1):1-50.

Daugherty, M., Polanuyer, B., Farrell, M., Scholle, M., Lykidis, A., de Crecy-Lagard, V. & Osterman, A. 2002. Complete reconstitution of the human coenzyme A biosynthetic pathway via comparative genomics. *J Biol Chem*, 277(24):21431-21439.

Del Olmo, A., Calzada, J. & Nunez, M. 2017. Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure, and controversy. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 57(14):3084-3103.

Döring, B. & Petzinger, E. 2014. Phase 0 and phase III transport in various organs: Combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metabolism Reviews*, 46(3):261-282.

Fiermonte, G., Paradies, E., Todisco, S., Marobbio, C.M. & Palmieri, F. 2009. A novel member of solute carrier family 25 (SLC25A42) is a transporter of coenzyme A and adenosine 3',5'-diphosphate in human mitochondria. *J Biol Chem*, 284(27):18152-18159.

Fukasawa, Y., Tsuji, J., Fu, S.C., Tomii, K., Horton, P. & Imai, K. 2015. MitoFates: improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites. *Mol Cell Proteomics*, 14(4):1113-1126.

Gibson, J., Geissler, J.F. & Harwood, C.S. 1990. [26] Benzoate-CoA ligase from *Rhodospseudomonas palustris*. *Methods in Enzymology*. Academic Press. p. 154-159).

- Grevengeod, T.J., Klett, E.L. & Coleman, R.A. 2014. Acyl-CoA metabolism and partitioning. *Annu Rev Nutr*, 34:1-30.
- Kiianitsa, K., Solinger, J.A. & Heyer, W.-D. 2003. NADH-coupled microplate photometric assay for kinetic studies of ATP-hydrolyzing enzymes with low and high specific activities. *Analytical Biochemistry*, 321(2):266-271.
- Knights, K.M. & Miners, J.O. 2011. Amino acid conjugation: a novel route of xenobiotic carboxylic acid metabolism in man. *Encyclopedia of drug metabolism and interactions*:1-16.
- Kochan, G., Pilka, E.S., von Delft, F., Oppermann, U. & Yue, W.W. 2009. Structural snapshots for the conformation-dependent catalysis by human medium-chain acyl-coenzyme A synthetase ACSM2A. *J Mol Biol*, 388(5):997-1008.
- Lees, H.J., Swann, J.R., Wilson, I.D., Nicholson, J.K. & Holmes, E. 2013. Hippurate: the natural history of a mammalian-microbial cometabolite. *J Proteome Res*, 12(4):1527-1546.
- Leth, T., Christensen, T. & Larsen, I.K. 2010. Estimated intake of benzoic and sorbic acids in Denmark. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 27(6):783-792.
- Levine, M., Wong, D., Brown, D.F. & Nadel, E.S. 2005. Chest pain and arthritis. *J Emerg Med*, 29(1):91-95.
- Levy, G. 1965. Pharmacokinetics of salicylate elimination in man. *J Pharm Sci*, 54(7):959-967.
- Levy, G. & Procknal, J.A. 1968. Drug biotransformation interactions in man. I. Mutual inhibition in glucuronide formation of salicylic acid and salicylamide in man. *J Pharm Sci*, 57(8):1330-1335.
- Lewis, H.D., Jr., Davis, J.W., Archibald, D.G., Steinke, W.E., Smitherman, T.C., Doherty, J.E., 3rd, Schnaper, H.W., LeWinter, M.M., Linares, E., Pouget, J.M., Sabharwal, S.C., Chesler, E. & DeMots, H. 1983. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med*, 309(7):396-403.
- Liska, D., Lyon, M. & Jones, D.S. 2006. Detoxification and biotransformational imbalances. *Explore (NY)*, 2(2):122-140.
- Liska, D.J. 1998. The detoxification enzyme systems. *Altern Med Rev*, 3(3):187-198.

- Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D., Jaswal, J.S. & Stanley, W.C. 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*, 90(1):207-258.
- Malhotra, K.T., Malhotra, K., Lubin, B.H. & Kuypers, F.A. 1999. Identification and molecular characterization of acyl-CoA synthetase in human erythrocytes and erythroid precursors. *Biochem J*, 344 Pt 1:135-143.
- Mancinelli, L., Cronin, M. & Sadée, W. 2000. Pharmacogenomics: the promise of personalized medicine. *Aaps Pharmsci*, 2(1):29-41.
- Mischek, D. & Krapfenbauer-Cermak, C. 2012. Exposure assessment of food preservatives (sulphites, benzoic and sorbic acid) in Austria. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 29(3):371-382.
- Nair, B. 2001. Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. *Int J Toxicol*, 20 Suppl 3:23-50.
- Nelson, E., Hanano, M. & Levy, G. 1966. Comparative pharmacokinetics of salicylate elimination in man and rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 153(1):159-166.
- Palekar, A. 2000. Effect of pantothenic acid on hippurate formation in sodium benzoate-treated HepG2 cells. *Pediatr Res*, 48(3):357-359.
- Parker, V., Goldberg, D. & King, M.A. 2017. Case 1: Mysteriously Rising Salicylate Levels in a 15-year-old Girl. *Pediatr Rev*, 38(6):280-281.
- Patel, D.K., Notarianni, L.J. & Bennett, P.N. 1990. Comparative metabolism of high doses of aspirin in man and rat. *Xenobiotica*, 20(8):847-854.
- Piper, J.D. & Piper, P.W. 2017. Benzoate and Sorbate Salts: A Systematic Review of the Potential Hazards of These Invaluable Preservatives and the Expanding Spectrum of Clinical Uses for Sodium Benzoate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5):868-880.
- Pirmohamed, M., James, S., Meakin, S., Green, C., Scott, A.K., Walley, T.J., Farrar, K., Park, B.K. & Breckenridge, A.M. 2004. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ*, 329(7456):15-19.
- Qian, W. & Zhang, J. 2014. Genomic evidence for adaptation by gene duplication. *Genome Res*, 24(8):1356-1362.

- Rechner, A.R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G.P., Moore, K.P. & Rice-Evans, C.A. 2002. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med*, 33(2):220-235.
- Rehling, P., Brandner, K. & Pfanner, N. 2004. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(7):519-530.
- Rosano, G.L. & Ceccarelli, E.A. 2014a. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Front Microbiol*, 5:172.
- Rosano, G.L. & Ceccarelli, E.A. 2014b. Recombinant protein expression in microbial systems. *Front Microbiol*, 5:341.
- Schmidt, F.R. 2004. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65(4):363-372.
- Singh, K., Sandhu, G., Lark, B. & Sud, S. 2002. Molar extinction coefficients of some carbohydrates in aqueous solutions. *Pramana*, 58(3):521-528.
- Tanaka, K. & Isselbacher, K.J. 1967. The isolation and identification of N-isovalerylglycine from urine of patients with isovaleric acidemia. *J Biol Chem*, 242(12):2966-2972.
- Temellini, A., Mogavero, S., Giulianotti, P.C., Pietrabissa, A., Mosca, F. & Pacifici, G.M. 1993. Conjugation of benzoic acid with glycine in human liver and kidney: a study on the interindividual variability. *Xenobiotica*, 23(12):1427-1433.
- Ungnade, H.E. & Lamb, R.W. 1952. The absorption spectra of benzoic acid and esters. *Journal of the American Chemical Society*, 74(15):3789-3794.
- Ure, A. 1841. On gouty concretions, with a new method of treatment. *Med Chir Trans*, 24:30-35.
- Vadali, R.V., Bennett, G.N. & San, K.Y. 2004. Cofactor engineering of intracellular CoA/acetyl-CoA and its effect on metabolic flux redistribution in Escherichia coli. *Metab Eng*, 6(2):133-139.
- Van der Sluis, R. 2015. Investigation and characterisation of the genetic variation in the coding region of the glycine N-acyltransferase gene: 2015.
- van der Sluis, R. 2018. Analyses of the genetic diversity and protein expression variation of the acyl: CoA medium-chain ligases, ACSM2A and ACSM2B. *Mol Genet Genomics*, 293(5):1279-1292.

- van der Sluis, R., Badenhorst, C.P., Erasmus, E., van Dyk, E., van der Westhuizen, F.H. & van Dijk, A.A. 2015a. Conservation of the coding regions of the glycine N-acyltransferase gene further suggests that glycine conjugation is an essential detoxification pathway. *Gene*, 571(1):126-134.
- van der Sluis, R., Badenhorst, C.P., van der Westhuizen, F.H. & van Dijk, A.A. 2013. Characterisation of the influence of genetic variations on the enzyme activity of a recombinant human glycine N-acyltransferase. *Gene*, 515(2):447-453.
- van der Sluis, R., Badenhorst, C.P.S., Erasmus, E., van Dyk, E., van der Westhuizen, F.H. & van Dijk, A.A. 2015b. Research paper: Conservation of the coding regions of the glycine N-acyltransferase gene further suggests that glycine conjugation is an essential detoxification pathway. *Gene*, 571:126-134.
- van der Sluis, R. & Erasmus, E. 2016. Xenobiotic/medium chain fatty acid: CoA ligase - a critical review on its role in fatty acid metabolism and the detoxification of benzoic acid and aspirin. *Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology*, 12(10):1169-1179.
- van der Westhuizen, F.H., Pretorius, P.J. & Erasmus, E. 2000. The utilization of alanine, glutamic acid, and serine as amino acid substrates for glycine N-acyltransferase. *J Biochem Mol Toxicol*, 14(2):102-109.
- Van Horn, C.G., Caviglia, J.M., Li, L.O., Wang, S., Granger, D.A. & Coleman, R.A. 2005. Characterization of recombinant long-chain rat acyl-CoA synthetase isoforms 3 and 6: identification of a novel variant of isoform 6. *Biochemistry*, 44(5):1635-1642.
- Vessey, D.A., Kelley, M. & Warren, R.S. 1999. Characterization of the CoA ligases of human liver mitochondria catalyzing the activation of short- and medium-chain fatty acids and xenobiotic carboxylic acids. *Biochim Biophys Acta*, 1428(2-3):455-462.
- Vessey, D.A., Lau, E., Kelley, M. & Warren, R.S. 2003. Isolation, sequencing, and expression of a cDNA for the HXM-A form of xenobiotic/medium-chain fatty acid:CoA ligase from human liver mitochondria. *J Biochem Mol Toxicol*, 17(1):1-6.
- Watkins, P.A. 1997. Fatty acid activation. *Prog Lipid Res*, 36(1):55-83.
- Watkins, P.A., Maiguel, D., Jia, Z. & Pevsner, J. 2007. Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *J Lipid Res*, 48(12):2736-2750.

Webster, L.T., Jr., Mieyal, J.J. & Siddiqui, U.A. 1974. Benzoyl and hydroxybenzoyl esters of coenzyme A. Ultraviolet characterization and reaction mechanisms. *J Biol Chem*, 249(8):2641-2645.

Yang, J., He, B.J., Jang, R., Zhang, Y. & Shen, H.B. 2015. Accurate disulfide-bonding network predictions improve ab initio structure prediction of cysteine-rich proteins. *Bioinformatics*, 31(23):3773-3781.

Yates, D.W. & Garland, P.B. 1969. [56] A spectrophotometric assay for acid: CoA ligases. *Methods in Enzymology*. Academic Press. p. 622-625).

Internet bronnen

BRENDA: The Comprehensive Enzyme Information System <https://www.brenda-enzymes.org> geraadpleegd op 1 Maart 2017

Cyscon: a consensus model for disulfide connectivity prediction <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cyscon/> geraadpleegd op 20 Maart 2017

Ensembl genome browser 95 <http://www.ensembl.org/ENST00000567001.5> geraadpleegd op 10 November 2018

Ensembl genome browser 95 <http://www.ensembl.org/ENST00000573854.5> geraadpleegd op 10 November 2018

Ensembl genome browser 95 <http://www.ensembl.org/index.html> geraadpleegd op 12 November 2018

RCSB: Protein data bank <https://www.rcsb.org/structure/3B7W> geraadpleegd op 20 Augustus 2018

ThermoFisher Scientific <https://www.thermofisher.com/za/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html?CID=fl-we120377> geraadpleegd op 6 November 2017

Standaarde

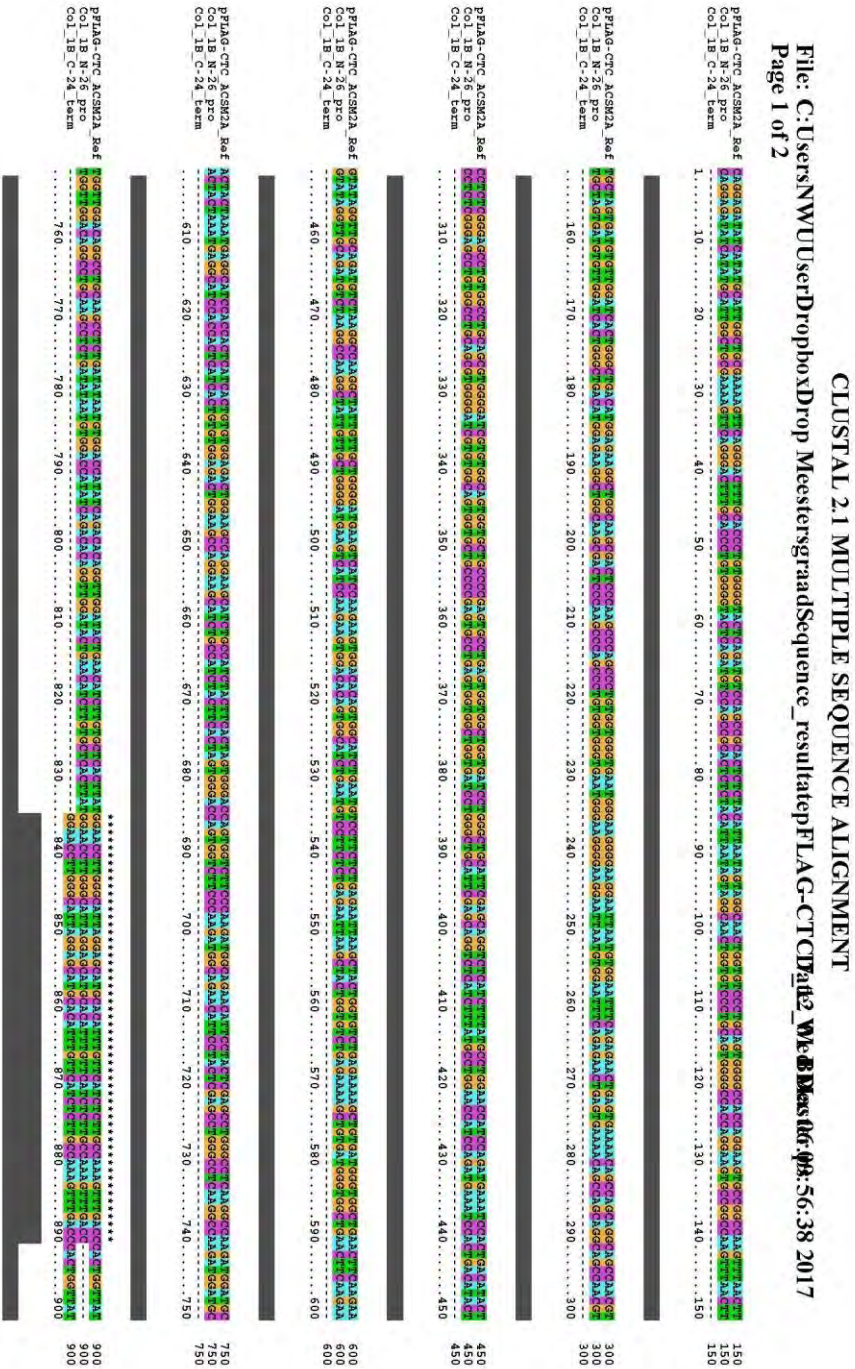
United States Department of Health and Human Food and Drug Administration 2018. Recommendations and Acceptance Criteria for Bioanalytical Method Validation and In-Study

Conduct. Silver Spring: Office of Communications, Division of Drug Evaluation and Research
Food and Drug Administration

BYLAE

Bylaag A

pFLAG-CTC/AKSM2A Sanger volgorde bepaling. Eerste lyn: Die AKSM2A verwysings volgorde. Tweede lyn: Die N-26 voorvoerder volgorde. Derde lyn: Die C24 voorvoerder volgorde.



CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: C:\Users\NWUUser\Dropbox\Drop Meesters\gradSequence_resultat\pFLAG-CTC\pand2_Med Mens 06-16-34:01 2017
Page 2 of 2

pFLAG-CTS_ACSM2B_Ref
Col_2A_N-26_pro
Col_2A_C-24_term
.....910.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980.....990.....1000.....1010.....1020.....1030.....1040.....1050

pFLAG-CTS_ACSM2B_Ref
Col_2A_N-26_pro
Col_2A_C-24_term
.....1060.....1070.....1080.....1090.....1100.....1110.....1120.....1130.....1140.....1150.....1160.....1170.....1180.....1190.....1200

pFLAG-CTS_ACSM2B_Ref
Col_2A_N-26_pro
Col_2A_C-24_term
.....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....1290.....1300.....1310.....1320.....1330.....1340.....1350

pFLAG-CTS_ACSM2B_Ref
Col_2A_N-26_pro
Col_2A_C-24_term
.....1360.....1370.....1380.....1390.....1400.....1410.....1420.....1430.....1440.....1450.....1460.....1470.....1480.....1490.....1500

pFLAG-CTS_ACSM2B_Ref
Col_2A_N-26_pro
Col_2A_C-24_term
.....1510.....1520.....1530.....1540.....1550.....1560.....1570.....1580.....1590.....1600.....1610.....1620.....1630.....1640.....1650

pFLAG-CTS_ACSM2B_Ref
Col_2A_N-26_pro
Col_2A_C-24_term
.....1660.....1670.....1680.....1690.....1700.....1710.....1720.....1730.....1740.....1750.....1760.....1770.....1780.....1790.....1800

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT
 File: C:\Users\NWU\serDropbox\Drop Meesters\grad\Sequence_result\atpFLAG-CTD\atp2_Web\Meesters\fig.1pk.48:24.2017
 Page 2 of 2

PFLAG-CTS_ACSM2A_t_RBP 1050
 Col_38_N-26_pro 885
 Col_38_C-24_term 396
 ..910.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980.....990.....1000.....1010.....1020.....1030.....1040.....1050

PFLAG-CTS_ACSM2A_t_RBP 1200
 Col_38_N-26_pro 885
 Col_38_C-24_term 546
1060.....1070.....1080.....1090.....1100.....1110.....1120.....1130.....1140.....1150.....1160.....1170.....1180.....1190.....1200

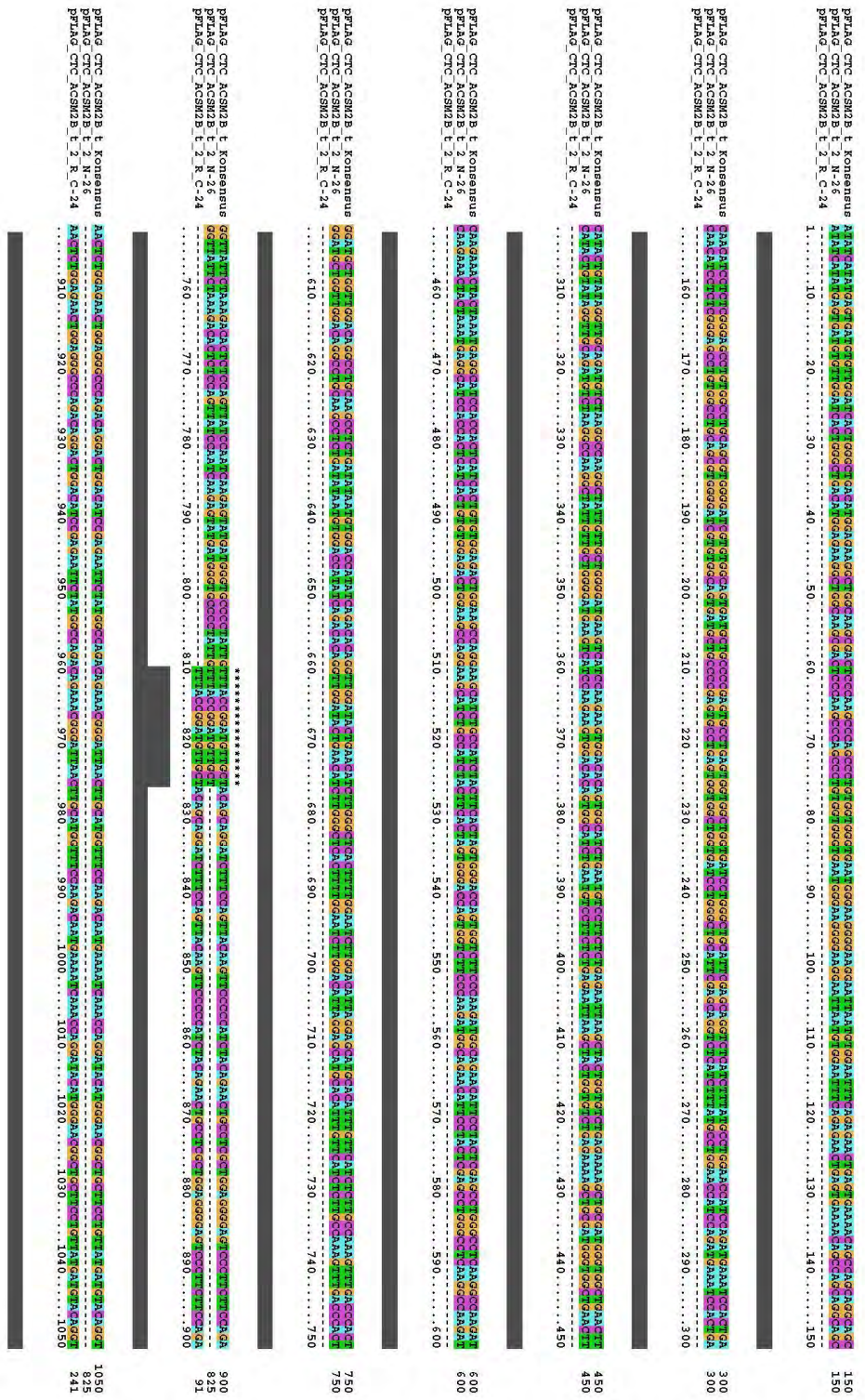
PFLAG-CTS_ACSM2A_t_RBP 1350
 Col_38_N-26_pro 885
 Col_38_C-24_term 696
1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....1290.....1300.....1310.....1320.....1330.....1340.....1350

PFLAG-CTS_ACSM2A_t_RBP 1500
 Col_38_N-26_pro 885
 Col_38_C-24_term 846
1360.....1370.....1380.....1390.....1400.....1410.....1420.....1430.....1440.....1450.....1460.....1470.....1480.....1490.....1500

PFLAG-CTS_ACSM2A_t_RBP 1622
 Col_38_N-26_pro 885
 Col_38_C-24_term 968
1510.....1520.....1530.....1540.....1550.....1560.....1570.....1580.....1590.....1600.....1610.....1620...

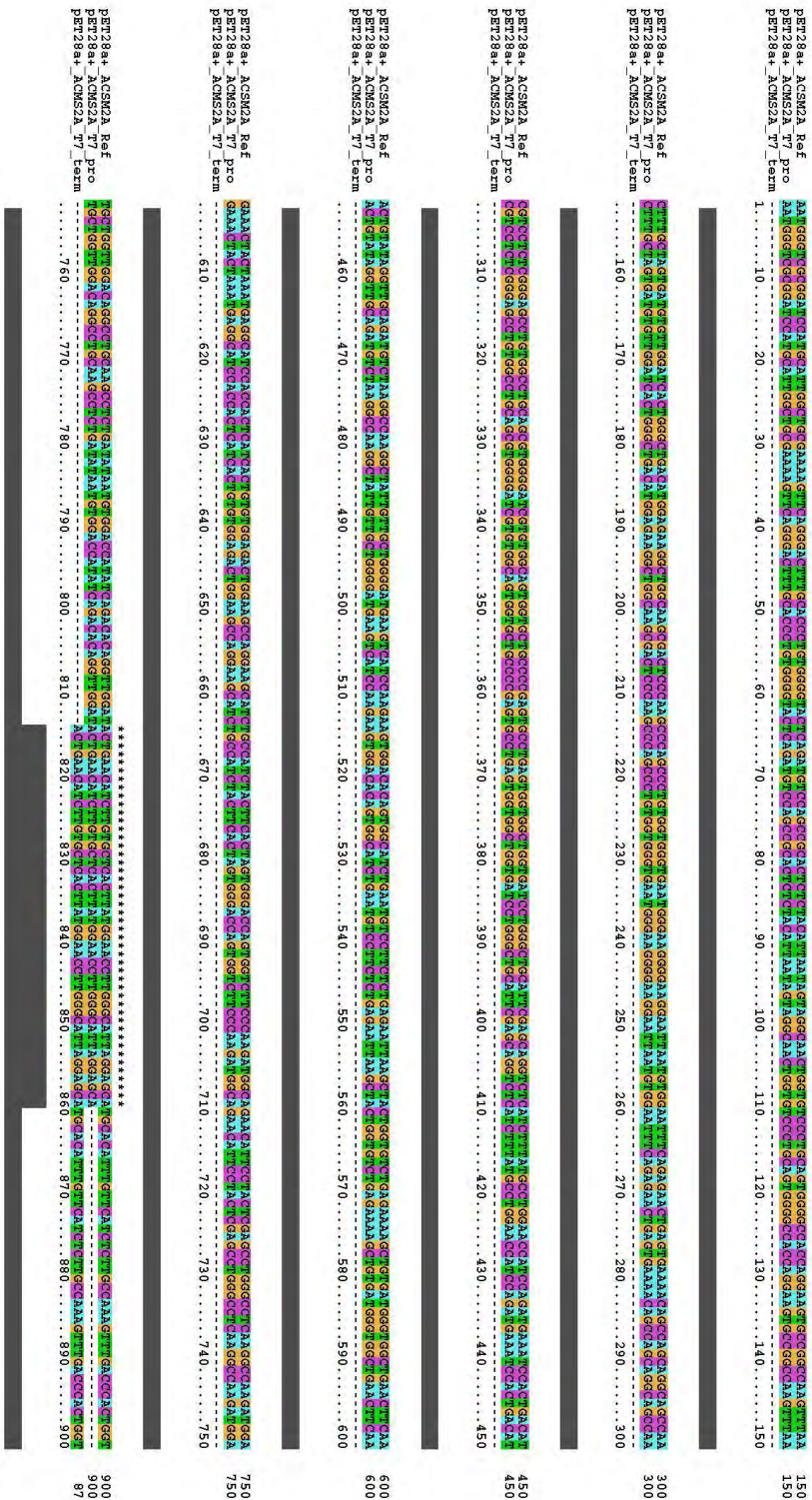
pFLAG/AKSM2B-t Sanger volgorde bepaling. Eerste lyn: Die AKSM2B-t verwysings volgorde.
 Tweede lyn: Die N-26 voorvoerder volgorde. Derde lyn: Die C24 voorvoerder volgorde.

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT
 File: C:\Users\NWUUser\Dropbox\Drop MeestersgradSanger Sequencing\Sequence_res\DNA\ref\The AKSM2B-AK-C7Q1P45A26_2018_ACSM2B_
 Page 1 of 2

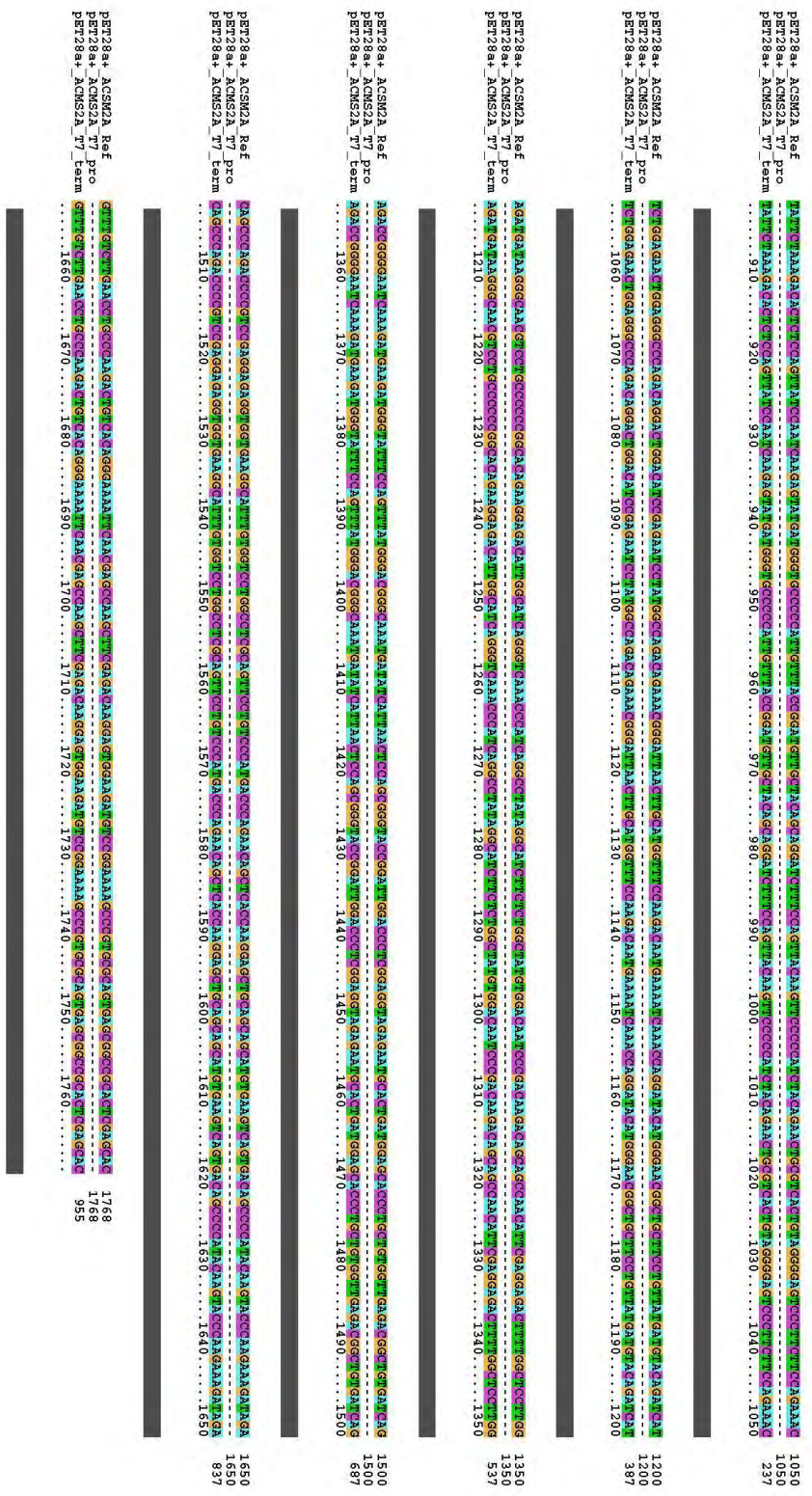


pET28a(+)/AKSM2A Sanger volgorde bepaling. Eerste lyn: Die AKSM2A verwysings volgorde. Tweede lyn: Die T7 voorwaartse voorvoerder volgorde. Derde lyn: Die T7 terugwaartse voorvoerder volgorde.

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT
 File: C:\Users\User\Desktop\Drop MeestersgradSequence_resultatepET28a+ 7_11_2016\Bla28TukOBV10A M94652 copy.ps
 Page 1 of 2



CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT
 File: C:\Users\User\Dropbox\Drop Meesters\grad\Sequence_result\stepET28a+7_11_20p\ET28a+7_11_20p\ET28a+7_11_20p\MSM02_M16552_2014Y.ps
 Page 2 of 2



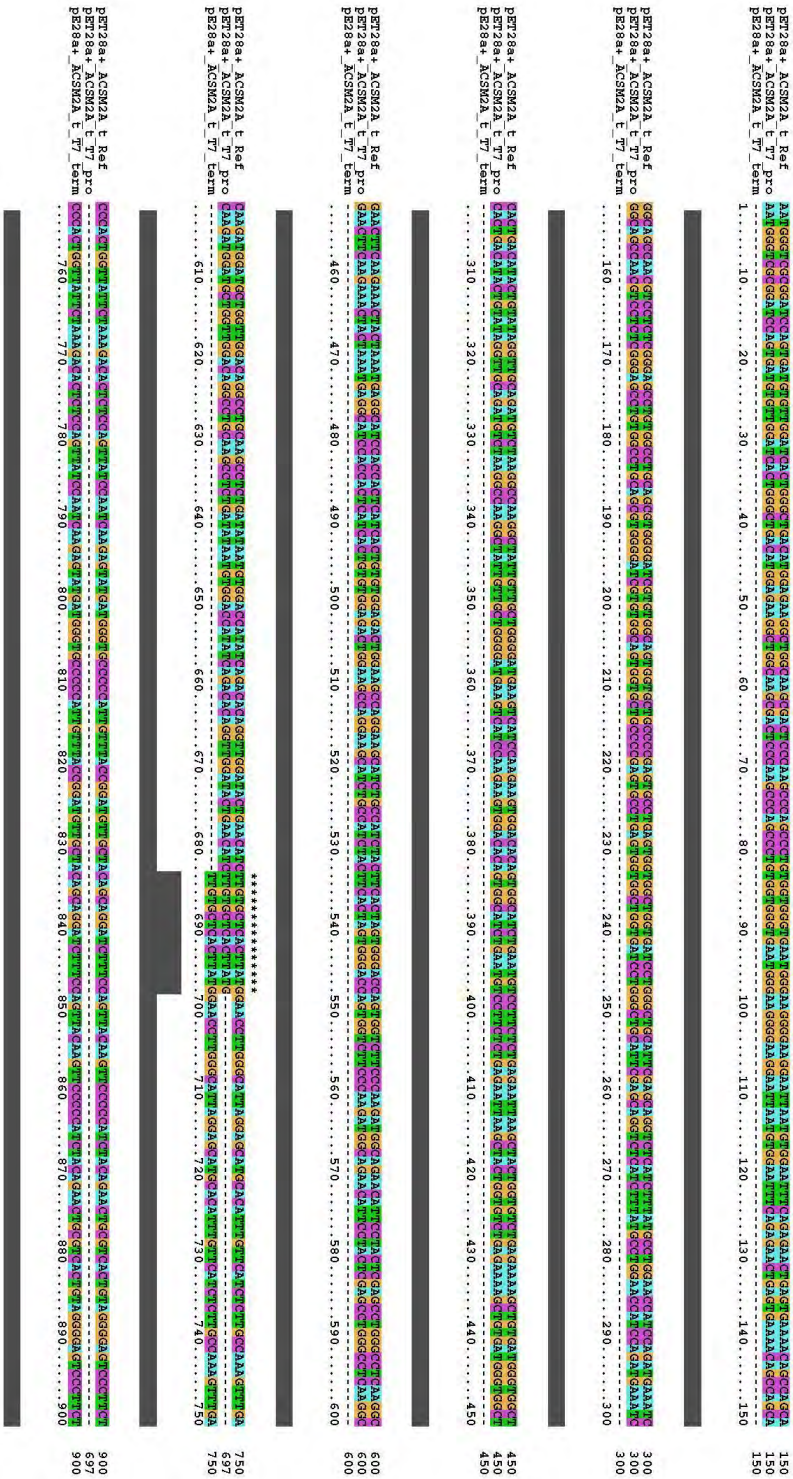
CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: C:\Users\User\Desktop\Drop MeestersgradSequence_resultate\pET28a+_7_11_20p\pET28a_FIA_N5M2B15.BR_4M13016f.ps
Page 2 of 2

```
pET28a+_ACSM2B_Ref 1200
pET28a+_ACSM2B_B_T7_pro 869
pET28a+_ACSM2B_B_T7_term 382
.....1060.....1070.....1080.....1090.....1100.....1110.....1120.....1130.....1140.....1150.....1160.....1170.....1180.....1190.....1200
TCTGGGAGACATCGAGGGCCCAAGACAGCATCGACATCCGCAAAATTCATAGCCCAAGACGAAACGGGGATTAACTTCGATAGCGTTCCAAAGACATGAAATTCATACCGAGATACATGGGAAAGCCGCGATGATGATGAGAGGAT
CTCGGAGAGACATCGAGGGCCCAAGACAGCATCGACATCCGCAAAATTCATAGCCCAAGACGAAACGGGGATTAACTTCGATAGCGTTCCAAAGACATGAAATTCATACCGAGATACATGGGAAAGCCGCGATGATGATGAGAGGAT
.....1060.....1070.....1080.....1090.....1100.....1110.....1120.....1130.....1140.....1150.....1160.....1170.....1180.....1190.....1200
AGATGAAATAGGGGAAACGATCCGATCGGCGCCCGCCGCGGAAAGAGAGCATCTAGCGATCAAGGCAATACCGCAATAGCCCAAGACGAAACGGGGATTAACTTCGATAGCGTTCCAAAGACATGAAATTCATACCGAGATACATGGGAAAGCCGCGATGATGATGAGAGGAT
AGATGAAATAGGGGAAACGATCCGATCGGCGCCCGCCGCGGAAAGAGAGCATCTAGCGATCAAGGCAATACCGCAATAGCCCAAGACGAAACGGGGATTAACTTCGATAGCGTTCCAAAGACATGAAATTCATACCGAGATACATGGGAAAGCCGCGATGATGATGAGAGGAT
.....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....1290.....1300.....1310.....1320.....1330.....1340.....1350
pET28a+_ACSM2B_Ref 1350
pET28a+_ACSM2B_B_T7_pro 869
pET28a+_ACSM2B_B_T7_term 532
.....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....1290.....1300.....1310.....1320.....1330.....1340.....1350
AGATCCGGGGAAATCAATGAAATGAAATGAGATGGGCAATTCGATAGCGTTCCAAAGACATGAAATTCATACCGAGATACATGGGAAAGCCGCGATGATGATGAGAGGAT
AGATCCGGGGAAATCAATGAAATGAAATGAGATGGGCAATTCGATAGCGTTCCAAAGACATGAAATTCATACCGAGATACATGGGAAAGCCGCGATGATGATGAGAGGAT
.....1360.....1370.....1380.....1390.....1400.....1410.....1420.....1430.....1440.....1450.....1460.....1470.....1480.....1490.....1500
pET28a+_ACSM2B_Ref 1500
pET28a+_ACSM2B_B_T7_pro 869
pET28a+_ACSM2B_B_T7_term 832
.....1360.....1370.....1380.....1390.....1400.....1410.....1420.....1430.....1440.....1450.....1460.....1470.....1480.....1490.....1500
CACCCCAAGCCCGATCCGACGAGAGATGGGCAATTCGATAGCGTTCCAAAGACATGAAATTCATACCGAGATACATGGGAAAGCCGCGATGATGATGAGAGGAT
CACCCCAAGCCCGATCCGACGAGAGATGGGCAATTCGATAGCGTTCCAAAGACATGAAATTCATACCGAGATACATGGGAAAGCCGCGATGATGATGAGAGGAT
.....1510.....1520.....1530.....1540.....1550.....1560.....1570.....1580.....1590.....1600.....1610.....1620.....1630.....1640.....1650
pET28a+_ACSM2B_Ref 1650
pET28a+_ACSM2B_B_T7_pro 869
pET28a+_ACSM2B_B_T7_term 948
.....1650.....1670.....1680.....1690.....1700.....1710.....1720.....1730.....1740.....1750.....1760.....1770.....1780.....1790.....1800
GTTTCGTCATGAAACCTCCGCAAGACATCGACATCCGCAAAATTCATAGCCCAAGACGAAACGGGGATTAACTTCGATAGCGTTCCAAAGACATGAAATTCATACCGAGATACATGGGAAAGCCGCGATGATGATGAGAGGAT
GTTTCGTCATGAAACCTCCGCAAGACATCGACATCCGCAAAATTCATAGCCCAAGACGAAACGGGGATTAACTTCGATAGCGTTCCAAAGACATGAAATTCATACCGAGATACATGGGAAAGCCGCGATGATGATGAGAGGAT
.....1650.....1670.....1680.....1690.....1700.....1710.....1720.....1730.....1740.....1750.....1760.....1770.....1780.....1790.....1800
```

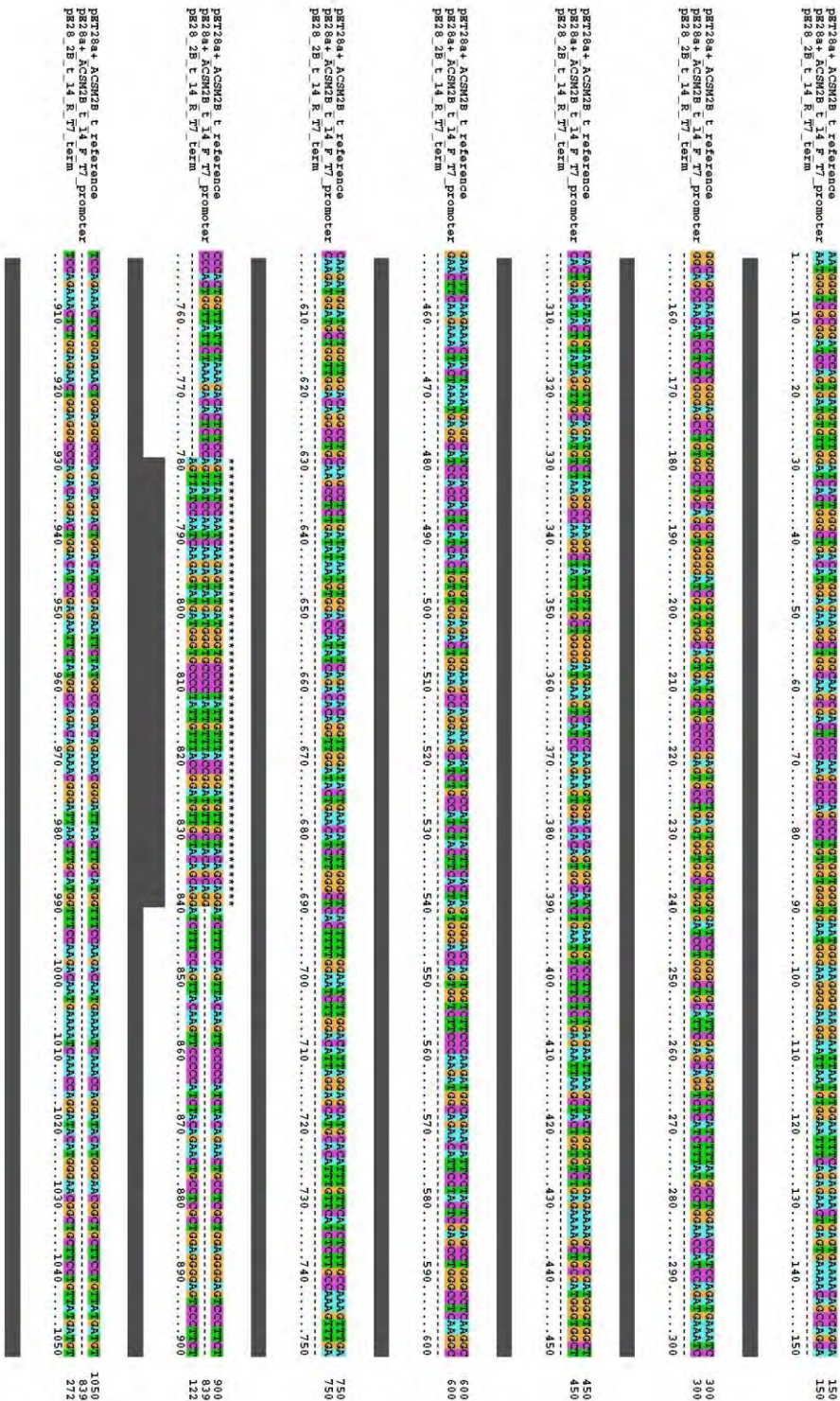
pET28a(+)/AKSM2A-t Sanger volgorde bepaling. Eerste lyn: Die AKSM2A-t verwysings volgorde. Tweede lyn: Die T7 voorwaartse voorvoerder volgorde. Derde lyn: Die T7 terugwaartse voorvoerder volgorde.

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT
 File: C:\Users\User\Desktop\Drop MeestersgrandSequence_resultate\pET28a+ 7_11_2018\pET28a+AKSM2A-t.MI
 Page 1 of 2



pET28a(+)/AKSM2B-t Sanger volgorde bepaling. Eerste lyn: Die AKSM2B-t verwysings volgorde. Tweede lyn: Die T7 voorwaartse voorvoerder volgorde. Derde lyn: Die T7 terugwaartse voorvoerder volgorde.

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT
 File: C:\Users\User\Desktop\Drop MeestersgraadSequence_resultatepET28a+ 7_11_2018\ET28a+AKSM2B-t-304MF304714.ps
 Page 1 of 2



CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: C:\Users\User\Dropbox\Drop Meesters\gradSequence_result\atpET28a+7_11_20p\BIRT28_FTA NSW\22B19_304\MS1204714.ps
 Page 2 of 2

```

Pz28a+ ACGM2B t Reference                               1200
Pz28a+ ACGM2B t 14 F T7 promoter                      839
Pz28_2B t_14_R_T7_term                                422
.....1060.....1070.....1080.....1090.....1100.....1110.....1120.....1130.....1140.....1150.....1160.....1170.....1180.....1190.....1200

```

```

Pz28a+ ACGM2B t Reference                               1350
Pz28a+ ACGM2B t 14 F T7 promoter                      839
Pz28_2B t_14_R_T7_term                                572
.....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....1290.....1300.....1310.....1320.....1330.....1340.....1350

```

```

Pz28a+ ACGM2B t Reference                               1500
Pz28a+ ACGM2B t 14 F T7 promoter                      839
Pz28_2B t_14_R_T7_term                                722
.....1360.....1370.....1380.....1390.....1400.....1410.....1420.....1430.....1440.....1450.....1460.....1470.....1480.....1490.....1500

```

```

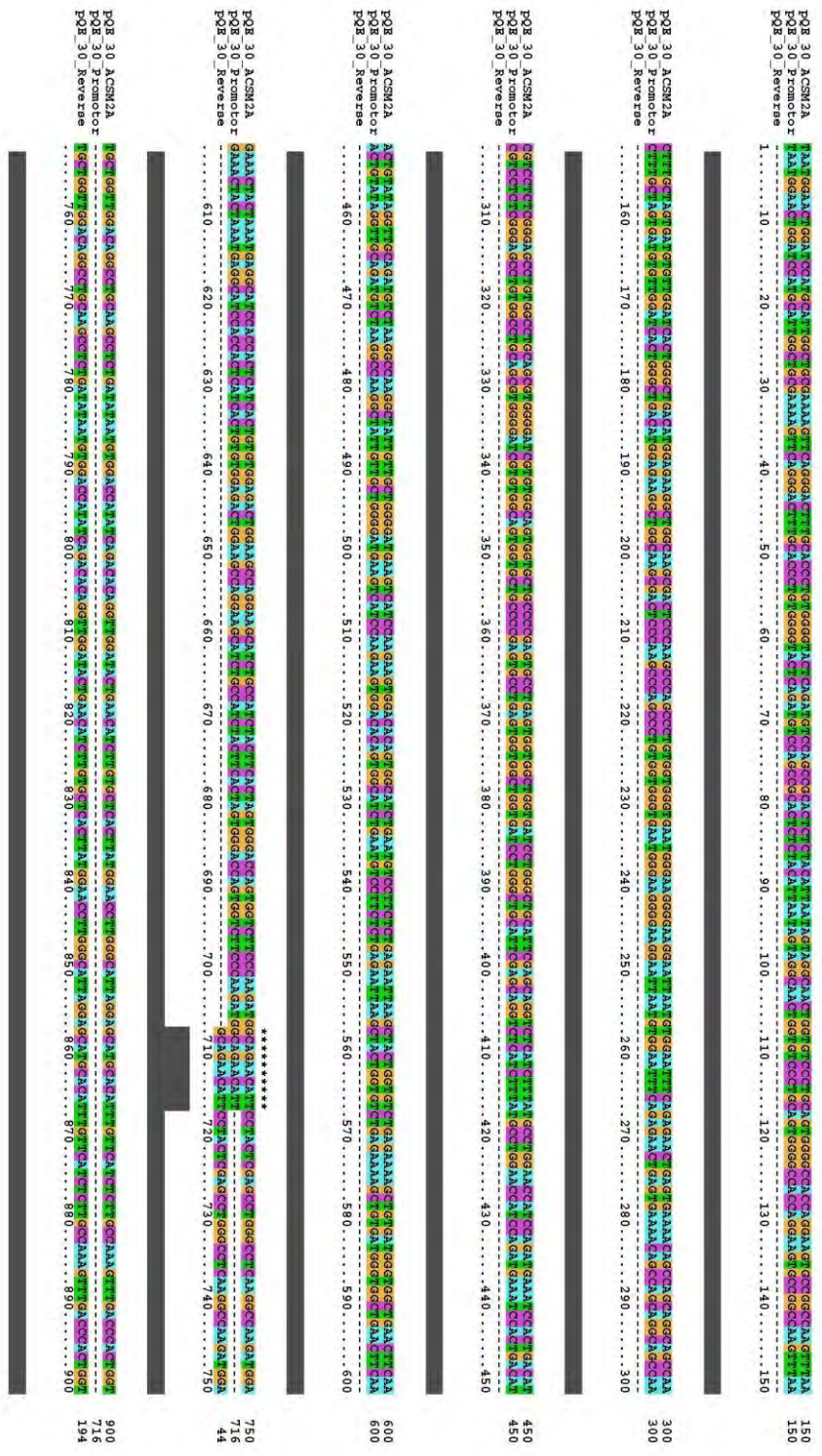
Pz28a+ ACGM2B t Reference                               1625
Pz28a+ ACGM2B t 14 F T7 promoter                      839
Pz28_2B t_14_R_T7_term                                847
.....1510.....1520.....1530.....1540.....1550.....1560.....1570.....1580.....1590.....1600.....1610.....1620

```

pQE-30/AKSM2A Sanger volgorde bepaling. Eerste lyn: Die AKSM2A verwysings volgorde. Tweede lyn: Die pQE-30 voorwaartse voorvoerder volgorde. Derde lyn: Die pQE-30 terugwaartse voorvoerder volgorde.

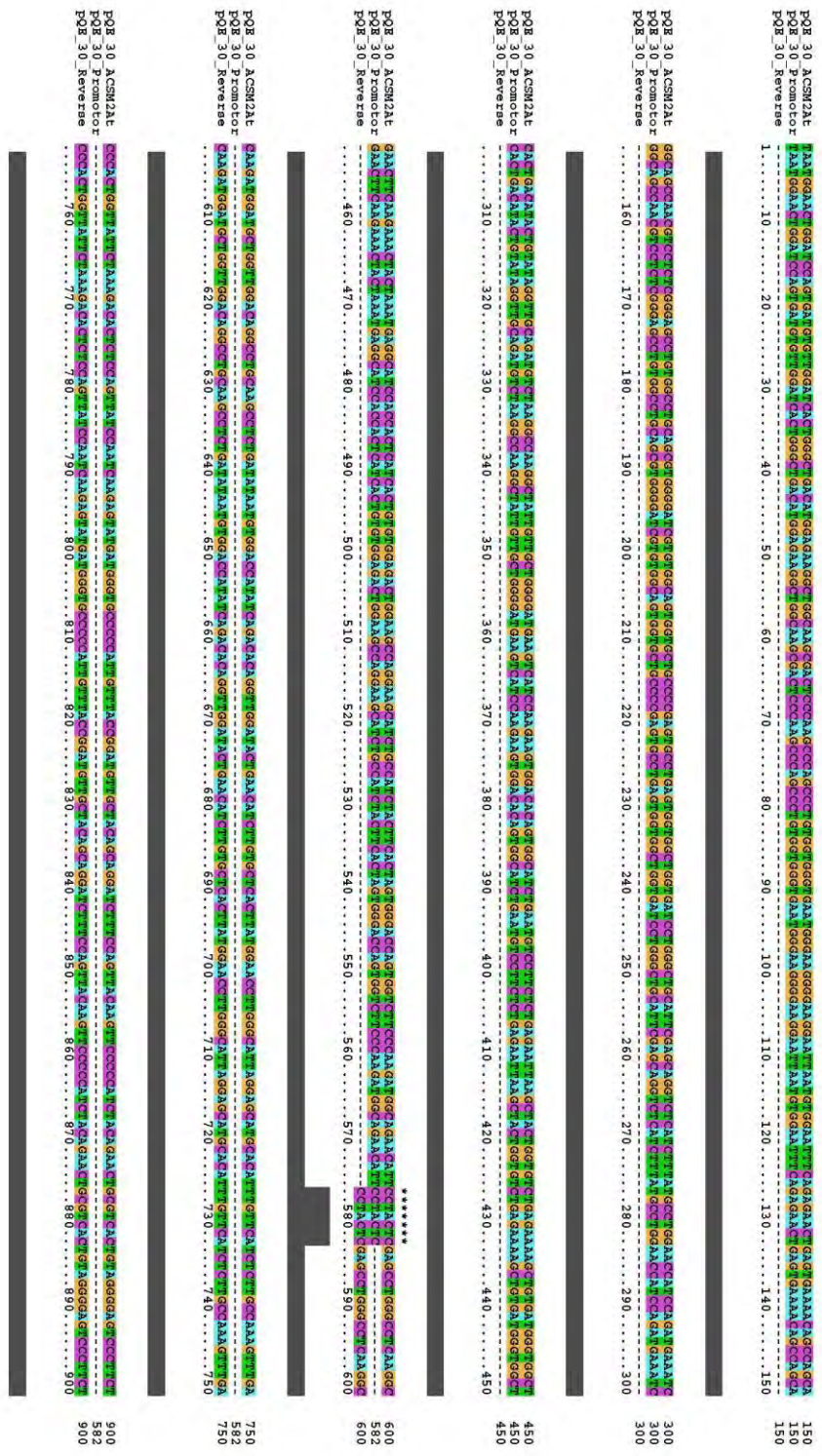
CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: C:\Users\User\Dropbox\Drop Meester'sgraadSanger Sequencing\Sequence_resultate\pQE30\AKSM2A\pQE30-AKSM2A.pqs
 Page 1 of 2



pQE-30/AKSM2A-t Sanger volgorde bepaling. Eerste lyn: Die AKSM2A-t verwysings volgorde. Tweede lyn: Die pQE-30 voorwaartse voorvoerder volgorde. Derde lyn: Die pQE-30 terugwaartse voorvoerder volgorde.

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT
 File: C:\Users\User\Dropbox\Drop MeestersgraadSanger Sequencing\Sequence_resultate\pQE30\AKSM2A\pQE30_AKSM2A_2.ps
 Page 1 of 2



CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT
 File: C:\Users\User\Dropbox\Drop MeestersgraadsSanger Sequencing\Sequence_resultat\seq60\007\ZANPQ_EU_30_3ACSM2A8 2.ps
 Page 2 of 2

```

POE 30 ACSM2A8  TCCGAAATCTCTGGAGAGATCTGGAGCCCGGAGACGAGGACCTGGACATCCGACATCCGACAGAGAAAGCGGATTAACCTGATGGCTTCCAAAGCAATGAAATTAACCAACCGAATAGGGAAACCGGCTCCCTCTGATGATGATG
POE 30 Promotor  TCCGAAATCTCTGGAGAGATCTGGAGCCCGGAGACGAGGACCTGGACATCCGACATCCGACAGAGAAAGCGGATTAACCTGATGGCTTCCAAAGCAATGAAATTAACCAACCGAATAGGGAAACCGGCTCCCTCTGATGATGATG
POE 30 Reverse  TCCGAAATCTCTGGAGAGATCTGGAGCCCGGAGACGAGGACCTGGACATCCGACATCCGACAGAGAAAGCGGATTAACCTGATGGCTTCCAAAGCAATGAAATTAACCAACCGAATAGGGAAACCGGCTCCCTCTGATGATGATG
.....910.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980.....990.....1000.....1010.....1020.....1030.....1040.....1050

```

```

POE 30 ACSM2A8  ACGAGTGAATGAGTGAATGAGGCGAAGCGTCCGCCCCCGGCGGAGCAAGAGAGATGTTGGCAATCCGACAGGCTGAAACCGGCTGATAGGCGATGCTGCTGGCTGATGAGGAGATCCCGACATAGATAGCGAATGATG
POE 30 Promotor  ACGAGTGAATGAGTGAATGAGGCGAAGCGTCCGCCCCCGGCGGAGCAAGAGAGATGTTGGCAATCCGACAGGCTGAAACCGGCTGATAGGCGATGCTGCTGGCTGATGAGGAGATCCCGACATAGATAGCGAATGATG
POE 30 Reverse  ACGAGTGAATGAGTGAATGAGGCGAAGCGTCCGCCCCCGGCGGAGCAAGAGAGATGTTGGCAATCCGACAGGCTGAAACCGGCTGATAGGCGATGCTGCTGGCTGATGAGGAGATCCCGACATAGATAGCGAATGATG
.....1060.....1070.....1080.....1090.....1100.....1110.....1120.....1130.....1140.....1150.....1160.....1170.....1180.....1190.....1200

```

```

POE 30 ACSM2A8  GCTCCCTTGGAGACCGGGGAGATCAAAAGATGATGATGGGTATTTCCAGCTTAAAGGGAACGGGCAATGATATCTCAAGGGGGTACCGGATTTGGACCCCTCCGAGGATAGAGATATCCATGATGATGATGATGATG
POE 30 Promotor  GCTCCCTTGGAGACCGGGGAGATCAAAAGATGATGATGGGTATTTCCAGCTTAAAGGGAACGGGCAATGATATCTCAAGGGGGTACCGGATTTGGACCCCTCCGAGGATAGAGATATCCATGATGATGATGATGATG
POE 30 Reverse  GCTCCCTTGGAGACCGGGGAGATCAAAAGATGATGATGGGTATTTCCAGCTTAAAGGGAACGGGCAATGATATCTCAAGGGGGTACCGGATTTGGACCCCTCCGAGGATAGAGATATCCATGATGATGATGATGATG
.....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....1290.....1300.....1310.....1320.....1330.....1340.....1350

```

```

POE 30 ACSM2A8  TGGGATGATGAGAGCCCGCAAGACCCCGTCCCGAGGATGATGATGGGATTTTGTGGCTCCAGGCTCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCG
POE 30 Promotor  TGGGATGATGAGAGCCCGCAAGACCCCGTCCCGAGGATGATGATGGGATTTTGTGGCTCCAGGCTCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCG
POE 30 Reverse  TGGGATGATGAGAGCCCGCAAGACCCCGTCCCGAGGATGATGATGGGATTTTGTGGCTCCAGGCTCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCG
.....1360.....1370.....1380.....1390.....1400.....1410.....1420.....1430.....1440.....1450.....1460.....1470.....1480.....1490.....1500

```

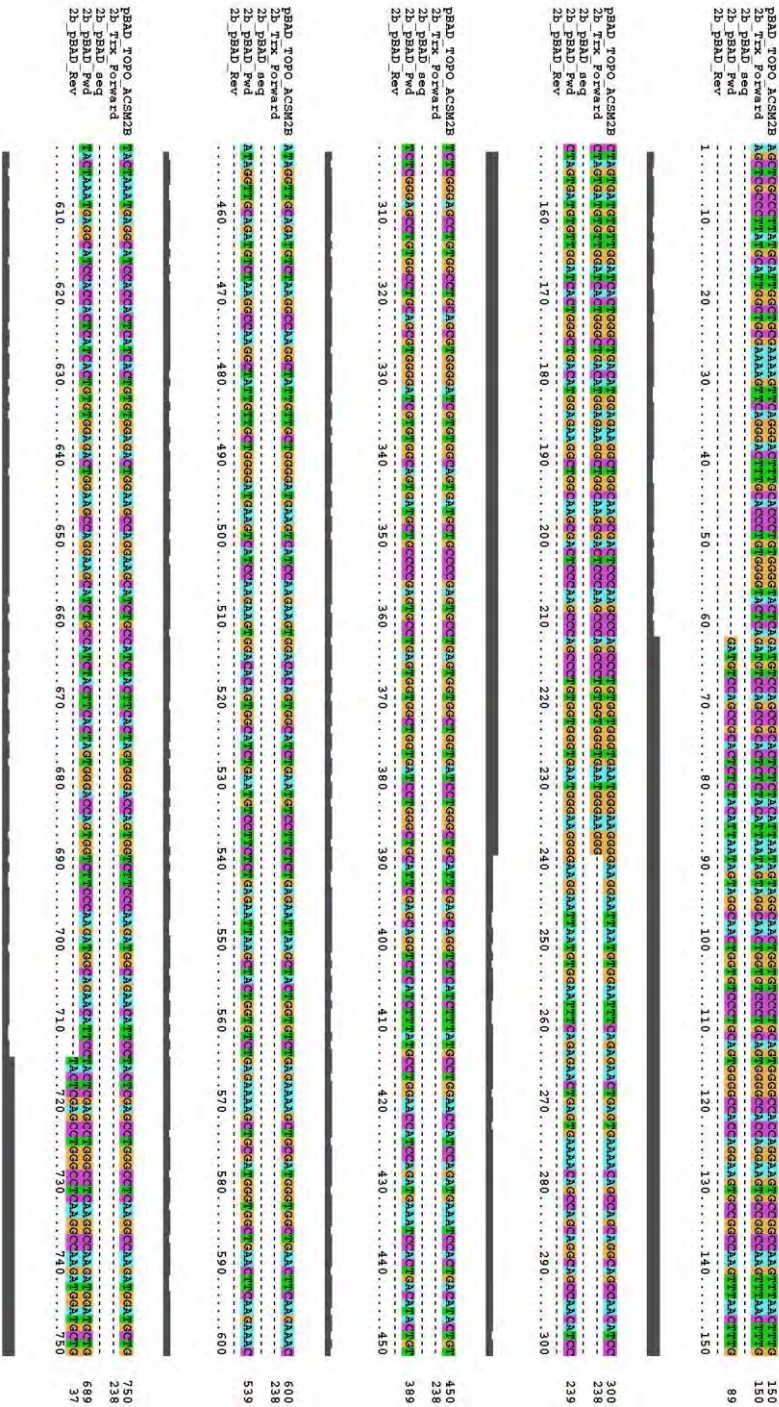
```

POE 30 ACSM2A8  AATGATGAGATTTGCTCTTGAATCCCTCCCAATGATCTCAATAGGGAAATTTCAATGATCCCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATG
POE 30 Promotor  AATGATGAGATTTGCTCTTGAATCCCTCCCAATGATCTCAATAGGGAAATTTCAATGATCCCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATG
POE 30 Reverse  AATGATGAGATTTGCTCTTGAATCCCTCCCAATGATCTCAATAGGGAAATTTCAATGATCCCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATGATCTCAATG
.....1510.....1520.....1530.....1540.....1550.....1560.....1570.....1580.....1590.....1600.....1610.....1620.....

```

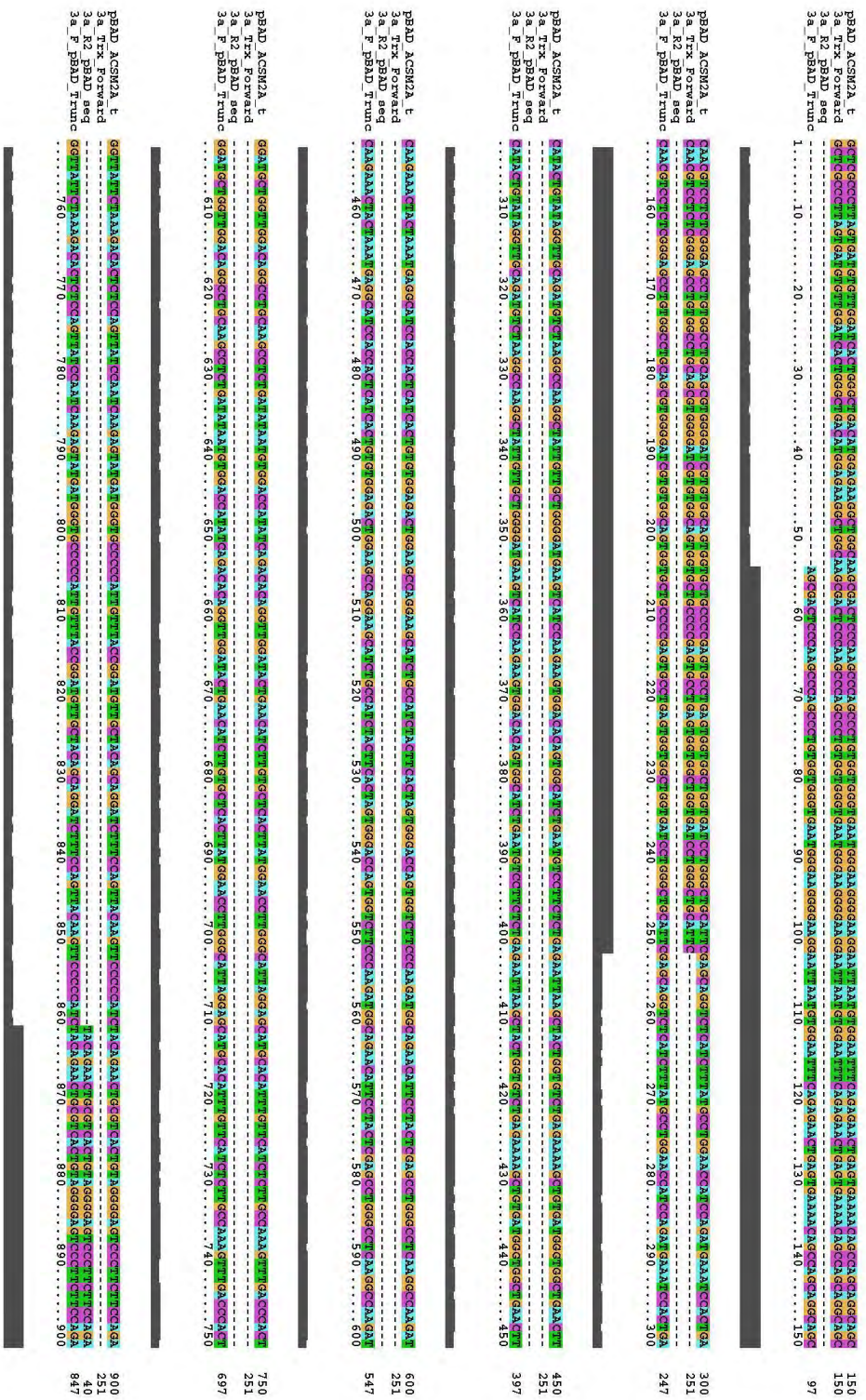

pBAD/AKSM2B Sanger volgorde bepaling bepaling. Eerste lyn: Die AKSM2B verwysings volgorde. Tweede lyn: Die Trx voorwaartse voorvoerder volgorde. Die derde lyn: pBAD volgorde bepaling voorvoerder. Vierde lyn: Die pBAD voorwaartse voorvoerder volgorde. Vyfde lyn: Die pBAD terugwaartse voorvoerder.

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT
 File: C:\Users\NWUUser\Dropbox\Drop Meestersgraad\Sanger Sequencing\Sequence_residues\pBAD\bliny\1514804_2018c_haie_slegpB.
 Page 1 of 3



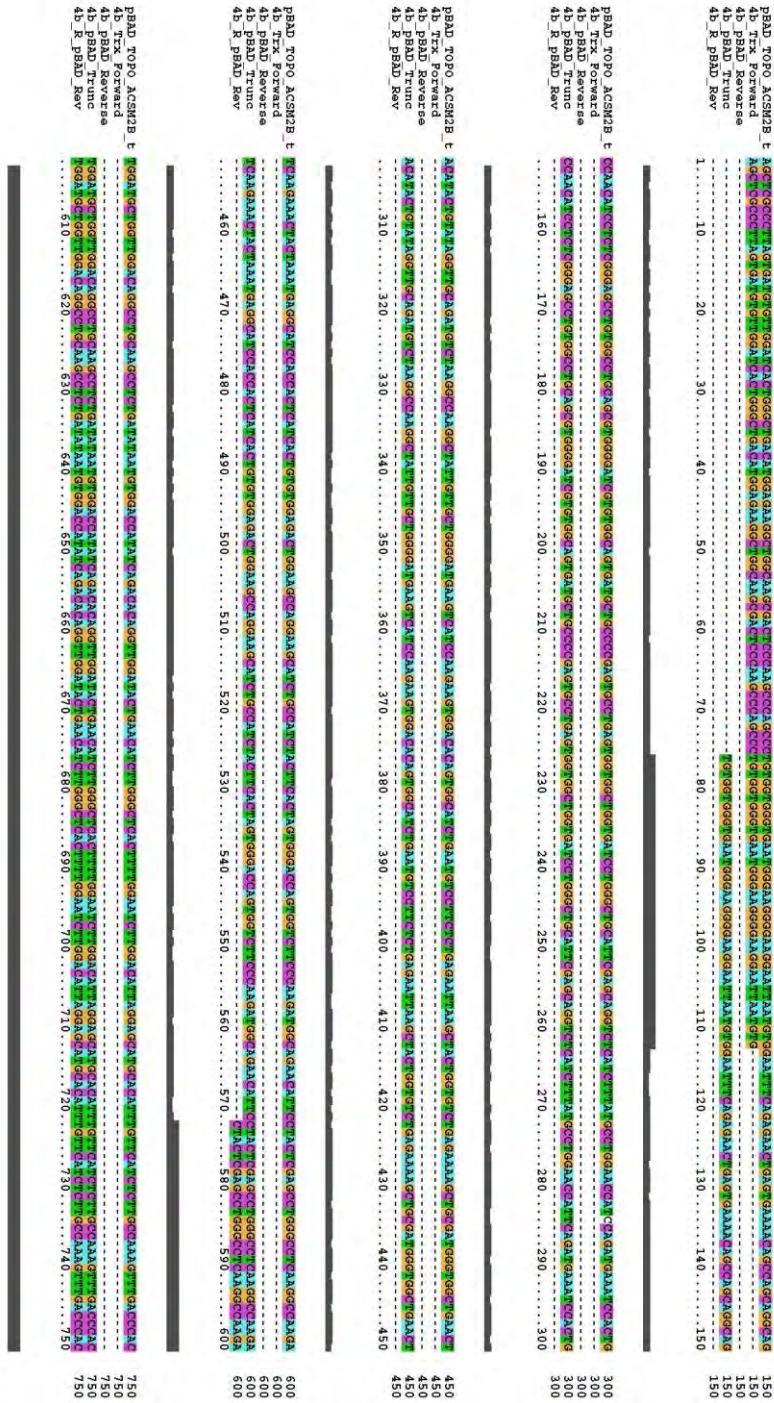
pBAD/AKSM2A-t Sanger volgorde bepaling. Eerste lyn: Die AKSM2A-t verwysings volgorde. Tweede lyn: Die Trx voorwaartse voorvoerder volgorde. Die derde lyn: Die pBAD volgorder bepaling voorvoerder volgorde. Vierde lyn: Die pBAD_Trunc voorvoerder.

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT
 File: C:\Users\NWU\serDropbox\Drop Meestersgraad\Sanger Sequencing\Sequence_res\pBAD\aksm2A\seq\pBAD_165\pBAD_2A\AKSM2A_t.ps
 Page 1 of 2



pBAD/AKSM2B-t Sanger volgorde bepaling. Eerste lyn: Die AKSM2B-t verwysings volgorde. Tweede lyn: Die Trx voorwaartse voorvoerder volgorde. Die derde lyn: Die pBAD terugwaartse voorvoerder volgorde. Vierde lyn: Die pBAD_Trunc voorvoerder. Die vyfde lyn: Die pBAD terugwaartse voorvoerder volgorde.

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT
 File: C:\Users\User\Desktop\Dropbox\Drop Meesters\graad\Sanger Sequencing\Sequence_resultate\pBAD Trunc on 24-02-18\pBAD Trunc pBAD Trunc ACSTM2E
 Page 1 of 3



CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT
 File: C:\Users\UserD\Dropbox\Drop MeestersgraadSanger Sequencing\Sequence_resultate\PBAD\TubS1 on DA seq\PBAD_210PO_ACSM2E
 Page 2 of 3

```

PBAD_TOPO_ACSM2B_t 1050
4b_Trx_Forward      900
4b_PBAD_Reverse     900
4b_PBAD_Trunc       900
4b_R_PBAD_Rev       900
-----
1050
900
900
900
900
-----
760.....770.....780.....790.....800.....810.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880.....890.....900

```

```

PBAD_TOPO_ACSM2B_t 1050
4b_Trx_Forward      1050
4b_PBAD_Reverse     1050
4b_PBAD_Trunc       1050
4b_R_PBAD_Rev       1050
-----
1050
1050
1050
1050
1050
-----
910.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980.....990.....1000.....1010.....1020.....1030.....1040.....1050

```

```

PBAD_TOPO_ACSM2B_t 1200
4b_Trx_Forward      1200
4b_PBAD_Reverse     1200
4b_PBAD_Trunc       1200
4b_R_PBAD_Rev       1200
-----
1200
1200
1200
1200
1200
-----
1060.....1070.....1080.....1090.....1100.....1110.....1120.....1130.....1140.....1150.....1160.....1170.....1180.....1190.....1200

```

```

PBAD_TOPO_ACSM2B_t 1350
4b_Trx_Forward      1350
4b_PBAD_Reverse     1350
4b_PBAD_Trunc       1350
4b_R_PBAD_Rev       1350
-----
1350
1350
1350
1350
1350
-----
1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....1290.....1300.....1310.....1320.....1330.....1340.....1350

```

```

PBAD_TOPO_ACSM2B_t 1500
4b_Trx_Forward      1500
4b_PBAD_Reverse     1500
4b_PBAD_Trunc       1500
4b_R_PBAD_Rev       1500
-----
1500
1500
1500
1500
1500
-----
1360.....1370.....1380.....1390.....1400.....1410.....1420.....1430.....1440.....1450.....1460.....1470.....1480.....1490.....1500

```

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

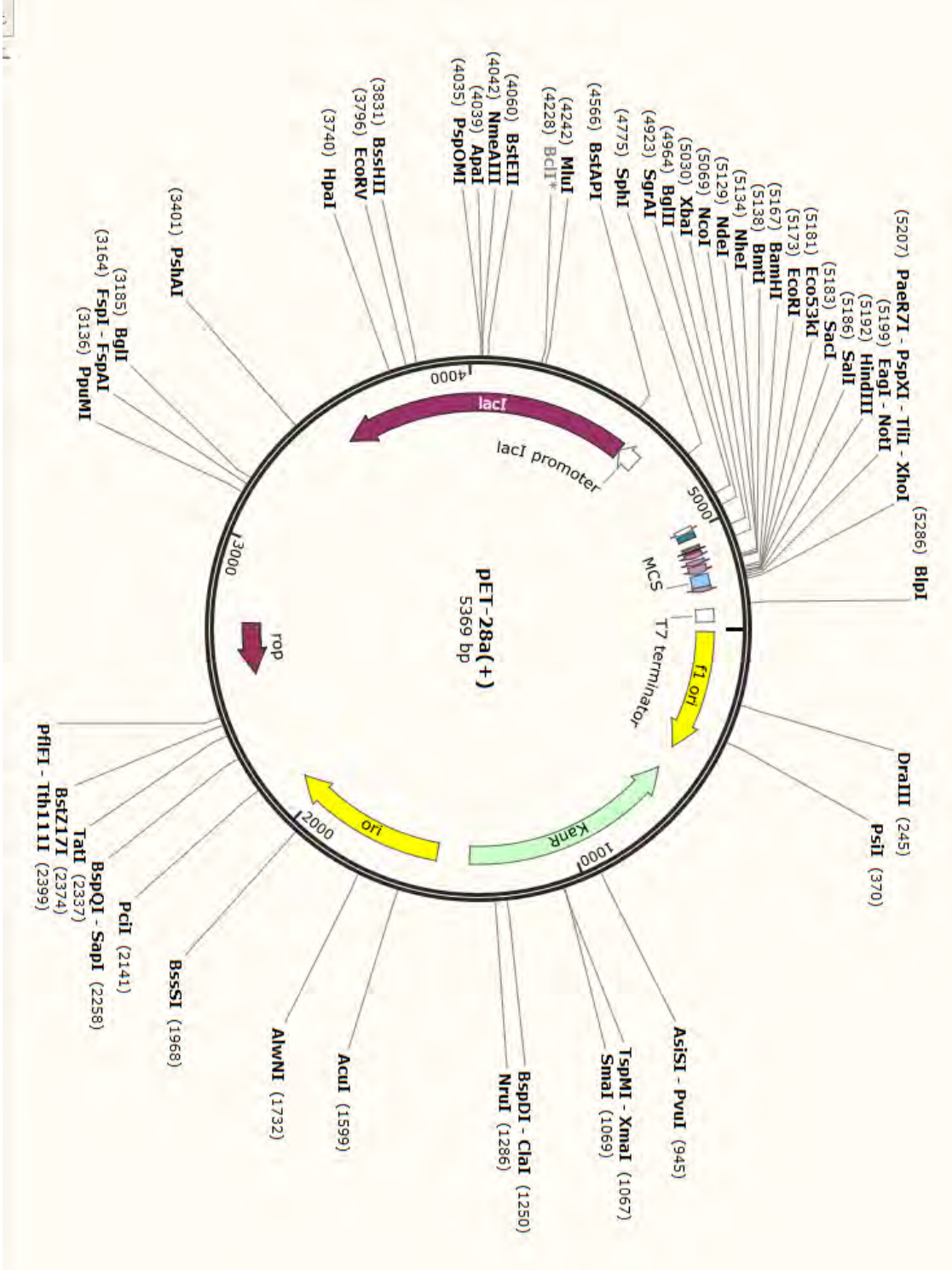
File: C:\Users\User\Dropbox\Drop Meesters\gradSanger Sequencing\Sequence_resultate\PBAD\Trust\on uwa 32\PBAD_2103PO_ACSM2E
Page 3 of 3

```
PBAD_TOPO_ACSM2E 1  
4b_15K_Forward 1612  
4b_PBAD_Rev 1612  
4b_PBAD_Prime 1612  
4b_PBAD_Rev 1612  
.....1510.....1520.....1530.....1540.....1550.....1560.....1570.....1580.....1590.....1600.....1610.....1612
```

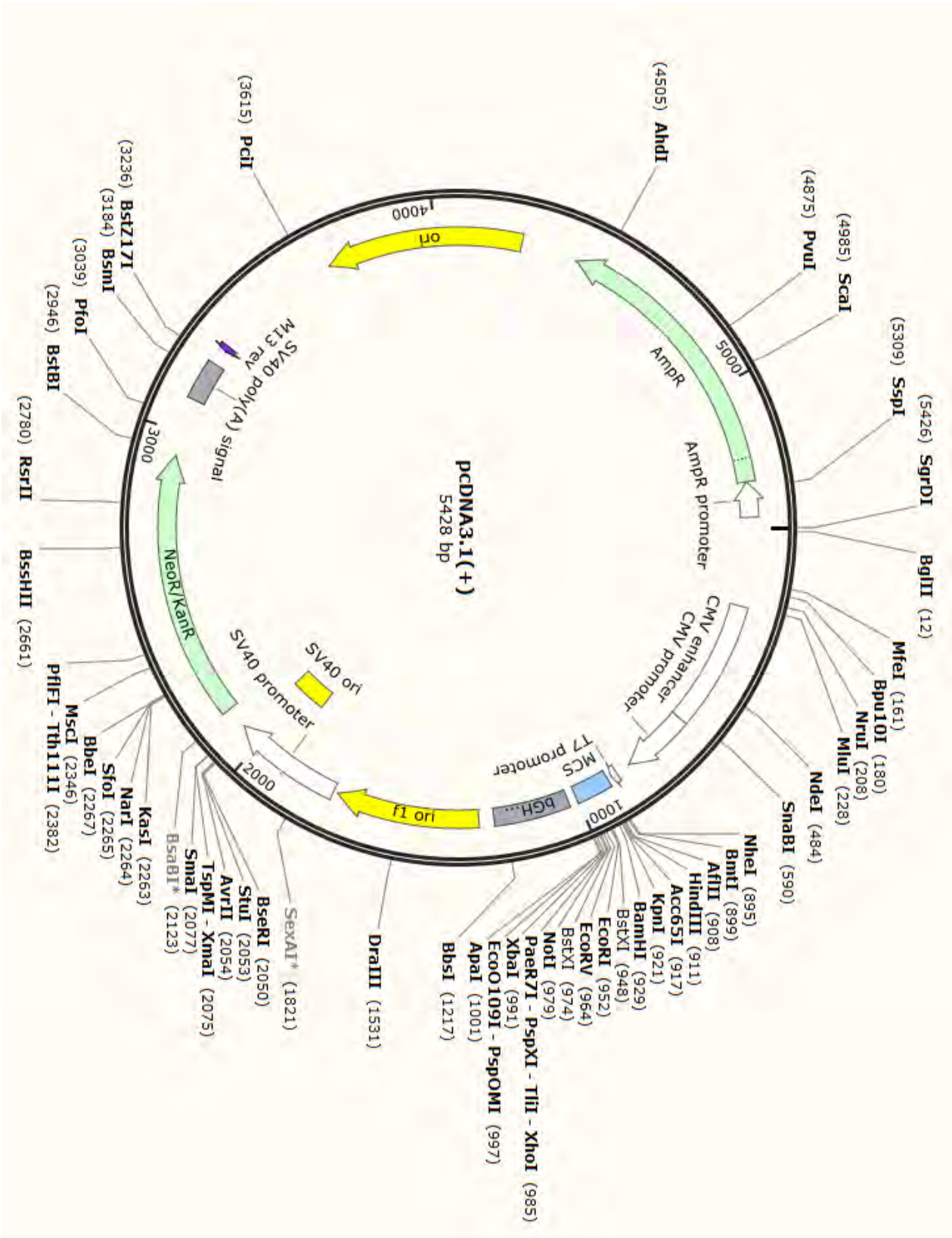


Bylaag B

pET28a(+) plasmied kaart



pcDNA3.1(+) plasmid kaart



pBAD linière plasmied kaart

