

Karakterisering av gener som påvirker
biosyntesen av alginat i *Azotobacter*
vinelandii

Margit Dagsdatter Haugsnes

Bioteknologi

Hovedveileder: Helga Ertesvåg, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi

FORORD

Dette prosjektet tok noe lengre tid enn jeg hadde trodd da jeg startet, men nå er jeg ferdig! Jeg må vel innrømme at jeg ikke har vært glødende engasjert hele tiden men spesielt i denne siste tiden har det vært svært spennende å utforske alginatsyntesens mysterier i *Azotobacter vinelandii*. En bakterie som viser seg å være overraskende fargerik, innfløkt og versatil under den beskjedne overflaten.

Det er mange jeg vil takke for hjelp og støtte gjennom de siste årene. Veilederne mine; Mali Mærk som fulgte meg gjennom den første tiden og Helga Ertesvåg som overtok meg og oppgaven min og har stilt opp, gitt meg gode råd og delt villig av sin vishet. Barna mine; Loke og Brage som nok har nydt godt av å ha en studentmor med lange frokoster, lange ferier og korte barnehagedager, men også har måttet utstå eksamensstress og periodevis noe mental fraværenhet. De gir meg utrolig mye og har vært en stor kilde til inspirasjon for å fullføre. Familie og venner har vist engasjement, forståelse og har kommet med mange gode ord og oppmuntringer.

De siste årene har vært fulle av opplevelser og utfordringer, ny kunnskap, innsikter og utsikter og jeg er nå klar for å vende om enda en side i livets bok.

SAMMENDRAG

For å undersøke faktorer som innvirker på alginat-produksjonen til *Azotobacter vinelandii* har det blitt laget et mutant-bibliotek med stammen *A. vinelandii* ATCC 12518 som utgangspunkt. Etter screeningsforsøk med henblikk på vekst- og alginatproduksjon av mutant-stammene ble det plukket ut et antall opp- og nedmutanter som ble undersøkt videre for å bestemme hvilke gener som var muterte og deres funksjon i forbindelse med alginatbiosyntesen i *A. vinelandii*.

Denne oppgaven startet med å undersøke 17 nedmutanter fra screeningundersøkelse av biblioteket. Det ble satt opp vekstforsøk med alginatassay i to runder. Da utvalgte mutanter ble sekvensert for å finne ut hvilke gener som var muterte viste det seg at transposon-vektoren pCAM140 var tilstede i alle stammene. Denne delen av oppgaven ble avbrutt og strategien for oppgaven noe endret. Det ble plukket ut to stammer som var kjente ned-mutanter fra screeningsforsøk og som allerede var sekvensert.

Stammene 20A6 og 21T3C ble undersøkt for å bekrefte fenotype og forsøkt komplementert for å bekrefte/undersøke videre funksjon av gener. 20A6 har mutasjon i genet for *sucA* (Avin_29770) som sannsynligvis kotranskriberes med *sucB* og *lpdA*. Denne stammen viste seg å ha både vill-type alleler og mutant-alleler tilstede, selv etter langvarig forsøk på seleksjon for mutant-alleler. Stammen 21C3T har mutasjon i Avin_13880, et gen som koder for en transkripsjonsregulator av IclR-klasse. Komplementering gav ikke stammene alginat-produksjon tilbake. Det ble også gjort bioinformatiske undersøkelser og litteraturstudier for å forsøke å klarlegge hvilken funksjon de ovennevnte genene har i alginatsyntesen i *A. vinelandii*.

SUMMARY

To investigate factors affecting the alginate synthesis of *Azotobacter vinelandii* it has been created a mutant library with *A. vinelandii* strain ATCC 12518 as a starting point. After screening tests regarding growth and alginate production of the mutant strains, a number of up-and down –mutants were selected and examined further to determine which genes were mutated and their functions related to alginate synthesis in *A. vinelandii*.

This thesis began by examining 17 down-mutants from the mutant library-screening. Two rounds of growth and alginate experiments was conducted. When selected mutants were sequenced to determine which genes were mutated it turned out that transposon vector pCAM140 was present in all strains. This part of the thesis was aborted and the strategy for the thesis slightly changed. Two strains that were known down-mutants from the screening tests and already sequenced, were selected for further investigation.

Strains 20A6 and 21T3C was investigated to confirm the observed phenotype and complemented with wildtype genes in attempt to verify and further investigate the function of the genes. 20A6 has a mutation in the *sucA*-gene (Avin_29770) that probably is co-transcribed with the genes *sucB* and *lpdA*. This strain was shown to have both wild-type and mutant alleles present, even after prolonged attempts at selecting for mutant alleles. The strain 21C3T has a mutation in Avin_13880, a gene that codes for a transcription regulator of the IclR-class. Complementation did not give the strains alginate production back. It was also carried out bioinformatic investigations and literature studies in an attempt to clarify the functions of the above mentioned genes in the *A. vinelandii* alginate production.

INNHold

Forord.....	i
Sammendrag.....	ii
Summary	iii
Innhold.....	iv
1 Innledning.....	1
1.1 Alginat.....	1
1.1.1 Bruksområder for alginat.....	4
1.2 <i>Azotobacter vinelandii</i> - taksonomi og biologi	5
1.3 Poly-beta-hydroxybutarat	6
1.4 Fra fruktose til alginat og PHB i <i>A. vinelandii</i>	7
1.4.1 Fra fruktose til fruktose-6-fosfat og pyruvat.....	8
1.4.2 Fra fruktose-6-fosfat til alginat	10
1.4.3 Fra pyruvat til poly-beta-hydroxybutarat.....	13
1.4.4 Sitronsyre-syklus.....	15
1.4.5 2-oxoglutarat dehydrogenase.....	17
1.5 Avin_13880.....	20
1.6 Formål for oppgaven.....	23
2 Materialer og metoder.....	25
2.1 Bioinformatikkverktøy.....	25
2.2 Medier og løsninger.....	26
2.3 Primersekvenser	32
2.4 Plasmider og bakteriestammer.....	33
2.5 Metoder	35
2.5.1 Oppdyrking og nedfrysing av bakteriestammer.....	35
2.5.2 DNA-isolering.....	35

2.5.3	Polymerase Chain Reaction (PCR)	40
2.5.4	Sekvensering	44
2.5.5	Restriksjonenzzymer.....	46
2.5.6	Gel-elektroforese	48
2.5.7	Rensing av DNA fra PCR og agarosegel	49
2.5.8	Ligering.....	51
2.5.9	Kjemisk transformering.....	52
2.5.10	Blå/hvit-screening.....	55
2.5.11	Konjugering	56
2.5.12	Transposonvektor.....	58
2.5.13	OD-måling av celletetthet.....	59
2.5.14	Assay for enzymatisk alginatanalyse.....	60
3	Resultater	62
3.1	Undersøkelse av 17 mutantstammer	62
3.2	Undersøkelse av stammene 20A6 og 21C3T	65
3.3	<i>A. vinelandii</i> 21C3T: videre undersøkelse	67
3.3.1	Renhetskontroll <i>A. vinelandii</i> 21C3T.....	67
3.3.2	Konstruksjon av transposonvektor MH13.....	68
3.3.3	Transposonvektor til komplementering av 21C3T.....	69
3.3.4	Komplementering av Avin_13880.....	72
3.3.5	Bioinformatisk undersøkelse av Avin_13880.....	73
3.4	<i>A. vinelandii</i> 20A6: videre undersøkelse	78
3.4.1	Renhetskontroll <i>A. vinelandii</i> 20A6	79
3.4.2	Transposonvektorer til komplementering av 20A6	81
3.4.3	Komplementering av <i>sucA</i> , <i>sucB</i> og <i>lpdA</i>	92
4	Diskusjon	94
4.1	Undersøkelse av 17 nedmutanter.....	94

4.2	Undersøkelse av Avin_13880	95
4.3	Undersøkelse av <i>sucA</i>	97
5	Konklusjon	101
6	Litteratur	102
	Vedlegg A: Undersøkelse av 17 stammer	I
	Vedlegg B: Undersøkelse 8 utvalgte stammer	VI
	Vedlegg C: Undersøkelse av stammene 21C3T og 20A6.....	VII
	Vedlegg D: DNA-standarder.....	XI
	Vedlegg E: Sekvens-sammenligning.....	XII
	Vedlegg F: Plasmidkart.....	XXV
	Vedlegg G: Vekstforsøk stamme 21C3T og komplementerte stammer.....	XXIX
	Vedlegg H: Vekstforsøk stamme 20A6 og komplementerte stammer	XXX

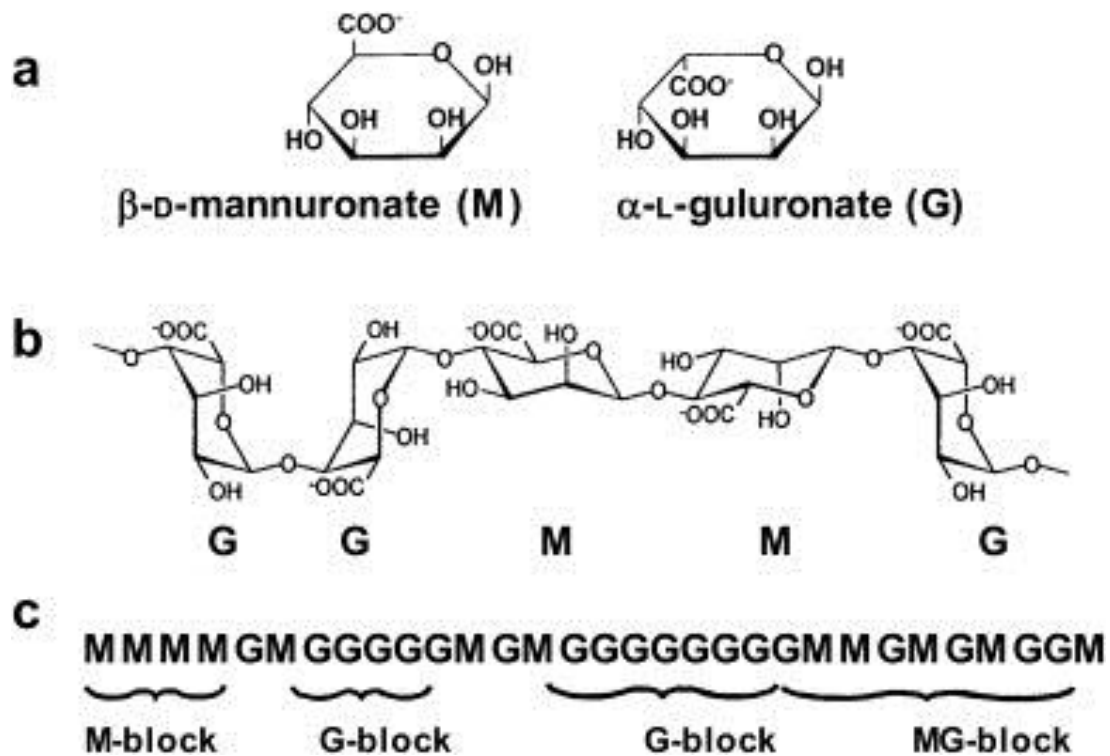
1 INNLEDNING

1.1 ALGINAT

Alginat ble først beskrevet av E. E. C. Stanford (1883) og finnes blant annet som strukturdannende komponent i celleveggen hos marine brunalger. Disse kan bestå av opptil 40 % alginat (tørrvekt) (Haug 1964). Alginat produseres også av enkelte *Pseudomonas* sp. og *Azotobacter* sp.. Disse bakteriene produserer begge alginat under vegetativ vekstfase, men biologisk funksjon er forskjellig:

Azotobacter sp. bruker alginat til å forme en cyste under vanskelige levekår og *Pseudomonas* sp. benytter alginat som del av en ekstracellulær matrix (biofilm) som eksempelvis vanskeliggjør fjerning av denne bakterien fra overflater (Draget & Taylor 2011).

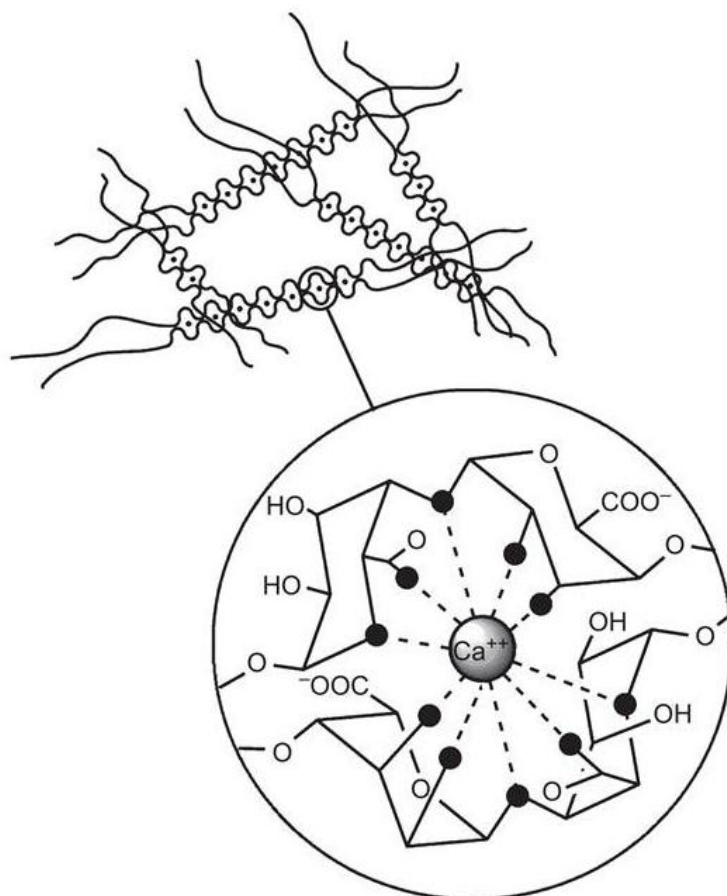
Alginat er lineære polysakkarider (Figur 1.1) som består av to monosakkarider; β -D- mannuronat (M) og dens C5 epimer α -L-guluronat (G). Alginat syntetiseres først som mannuronan, der noen mannuronsyre-enheter kan epimeriseres til guluronsyre-enheter. I motsetning til alginat fra alger er noen av mannuronsyre-enheter fra bakterier O-acetyllert i 2-og/eller 3-posisjon. Dette påvirker egenskaper som ionebinding og modifisering med mannuronan C-5 epimeraser, epimerasene kan ikke epimerisere O-acetyllerte M-enheter. (Remminghorst & Rehm 2006b)



Figur 1.1 Strukturell oppbygning av alginat. a) M- og G-alginat-monomerer, b) kjede-konformasjon av M- og G-monomerer c) blokk-distribusjon; M-blokk, G-blokker og MG-blokk. (Draget & Taylor 2011)

M og G-enhetene bindes sammen i 1-4 binding og kommer i tre forskjellige konfigurasjoner (Figur 1.1c); M-blokker, G-blokker og MG-blokker (Haug 1964). Disse finnes i alginat i varierende grad og lengde, avhengig av organisme og miljø. Alginatkjedene kan bestå av fra 50 til 200 000 enheter, kommersielle alginater har en kjedelengde på 100–1000 enheter (Indergaard 2010). Alginat er et polyanion ved fysiologisk pH. Alginsyre, som er protonert alginat, er uløselig i vann, men de fleste monovalente kationer gir vannløselige alginater. G-blokker gir alginat evne til å danne gel sammen med multivalente kationer. Alginat med høyt G-innhold kan utvinnes fra stivt algevev, som for eksempel stilk fra stortare (*Laminaria hyperborea*) (Draget & Taylor 2011).

Begrepet “eggekartong-modell” (Figur 1.2) ble tatt i bruk av Grant et al. (1973) for å illustrere hva som skjer når alginat danner ionegeler. Høyere konsentrasjon av multivalente kationer og høyere innhold av G-blokker gir sterkere geler. Årsaken til dette er at multivalente kationer katalyserer assosiasjoner mellom G-blokker i par av enkeltkjeder og stabiliserer disse assosiasjonene. (Smidsrød 2008)



Figur 1.2 “Eggekartong”-struktur på alginat-ionegel. Prikkede linjer representerer hydrogen-bindinger mellom oksygen-atomer på G-enhetene og divalent kation (Ca^{2+}). (Selimoglu & Elibol 2010)

Det er i hovedsak G-blokkene som står for den selektive bindingen til multivalente kationer eksempelvis Ca^{2+} . I tillegg til danning av kation-geler, kan alginat danne syre-geler, der også M-blokker og MG-blokker kan danne stabile bindinger. Dette forutsetter lav pH og MG-blokker (Draget et al. 2006)

1.1.1 BRUKSOMRÅDER FOR ALGINAT

Alginat er en marin ressurs som har blitt utnyttet og forsket på med stor entusiasme i Norge fra ca. 1950. I Norge høstes det hvert år i underkant av 150 000 tonn stortare og 15 000 tonn grisetang til produksjon av alginat (Steen 2009).

Alginat har mange bruksområder, i industrien brukes det som et avstivingsmiddel i bl.a. "skumliknende" produkter (eks; iskrem), slik at disse ikke faller sammen og mister konsistensen. Det brukes og som fortykningsmiddel i mange matvarer eksempelvis ketchup, vaniljekrem til wienerbrød, margarin med lavt fettinnhold, sauser og dressinger. Alginat brukes også til restrukturert mat, eksempler på dette er løkringer og paprikafyllet i oliven. Alginat påvirkes ikke av temperatur og er derfor gunstig for bruk i produkter som skal stekes/kokes eller fryses. (Draget & Taylor 2011; Indergaard 2010)

Alginat blir brukt i kosmetikkprodukter (bl.a. i hårgele) og i medisin-industrien; eksempelvis i depot-tabletter der virkemiddelet skal løse seg ut over tid, i surhetsregulerende midler der det legger seg på toppen av innholdet i magesekken for å hindre oppguling av magesyre, eller i plaster/sårromslag. Sanitetsbind og bleier inneholder ofte av alginat på grunn av alginats ekstreme væskebindingskapasitet. 1-3 % løsninger av alginat er en vanlig bruksløsning. Alginat kan brukes som en beskyttende hinne på en rekke produkter bla. slakteskrotter og spekepølser, da påføres først en alginatløsning og så en kalsiumkloridløsning på produktene. Hinnen vil virke som fuktbarriere og beskytte mot oksidasjon. (Draget & Taylor 2011; Indergaard 2010)

Fremtidige bruksområder: Forskning pågår for å få alginat i bruk i såkalte biokapsler som er en kapsel av alginat, fylt med enten kjemiske stoffer eller celler som settes inn i kroppen til et menneske og avgir stoffer over tid. Cellene kan være insulinproduserende celler som settes inn i personer med diabetes, cellene slipper ut insulin ved behov slik at pasienten får en godt regulert sykdom. Alginatlaget rundt cellene gjør at vertens immunforsvar ikke oppdager cellene og

går til angrep på dem. Vellykkede forsøk har vært gjort på store dyr og har også vært klinisk testet på mennesker. Produksjon av etanol, yoghurt og ekte champagne er eksempler på at gjær og melkesyrebakterier celler innstøpt i alginat har bidratt til en raskere, billigere og enklere produksjonslinje. (Draget & Taylor 2011; Indergaard 2010)

1.2 AZOTOBACTER VINELANDII- TAKSONOMI OG BIOLOGI

Azotobacter vinelandii er en strikt aerob gammaproteobakterie i familien *Pseudomonadaceae*. Den er gram-negativ og av størrelse ca 1-2 µm bred og 2-10 µm lang. *Azotobacter* lever i nøytral og lettere basisk jord, men ikke i jord med lav pH. *Azotobacter* kan benytte mange forskjellige karbonkilder; karbohydrater (fruktose, glukose, mannose m.fl.), alkoholer og salter av organiske syrer. *Azotobacter* har flere kopier av det sirkulære kromosomet i hver celle og det øker fra ca. 4 i tidlig stasjonær fase til potensielt over 100 i sen stasjonærfase. (Boone et al. 2001; Maldonado et al. 1994)

Setubal et al. (2009) har sekvensert hele genomet til stammen *A. vinelandii* DJ (ATTC BAA-1303), denne stammen har et genom på 5 365 kb. De beskriver også hvordan den alginat-produserende *A. vinelandii* DJ ble konstruert i 1984 med utgangspunkt i den ikke-mukoide stammen *A. vinelandii* UW (ATTC 13705) (Bush & Wilson 1959). UW-stammen (også kalt OP og CA) har en transposon-insersjon i *mucA*-genet og ble til etter forsøk på å isolere en ikke-mukoid stamme fra *A. vinelandii* O (Martínez-Salazar et al. 1996). *A. vinelandii* O (ATTC 12518) ble først beskrevet av Wilson og Knight (1952), da med navnet *Azotobacter agilis*.

Gorin og Spencer (1966) var de første som rapporterte at *A. vinelandii* produserte alginat. Ifølge Sadoff (1975) danner *A. vinelandii* cyster der alginat er en viktig komponent. Alginat og kapseldanning er en viktig beskyttelse mot O₂-påvirkning av cellulære funksjoner (blant annet nitrogenasene).

Azotobacter kan leve under diazotropiske forhold og har evnen til å fikse nitrogen direkte fra luft ved hjelp av tre ulike nitrogenase-systemer (Kennedy & Bishop 2005). Cystedanning og sammensetning av cysten er styrt av tilgang på næringsstoffer, tørke og annen fysisk eller kjemisk påvirkning. *A. vinelandii* har flere kopier av alginat-modifikasjonsgener som endrer alginatkomposisjonen avhengig av blant annet oksygen-tilgang. Høyt O₂-stress gir alginat med høyere molekylvekt og høyere innhold av L-guluronsyre, dette gir igjen en tykkere og tettere kapsel. (Sabra et al. 2000; Setubal et al. 2009)

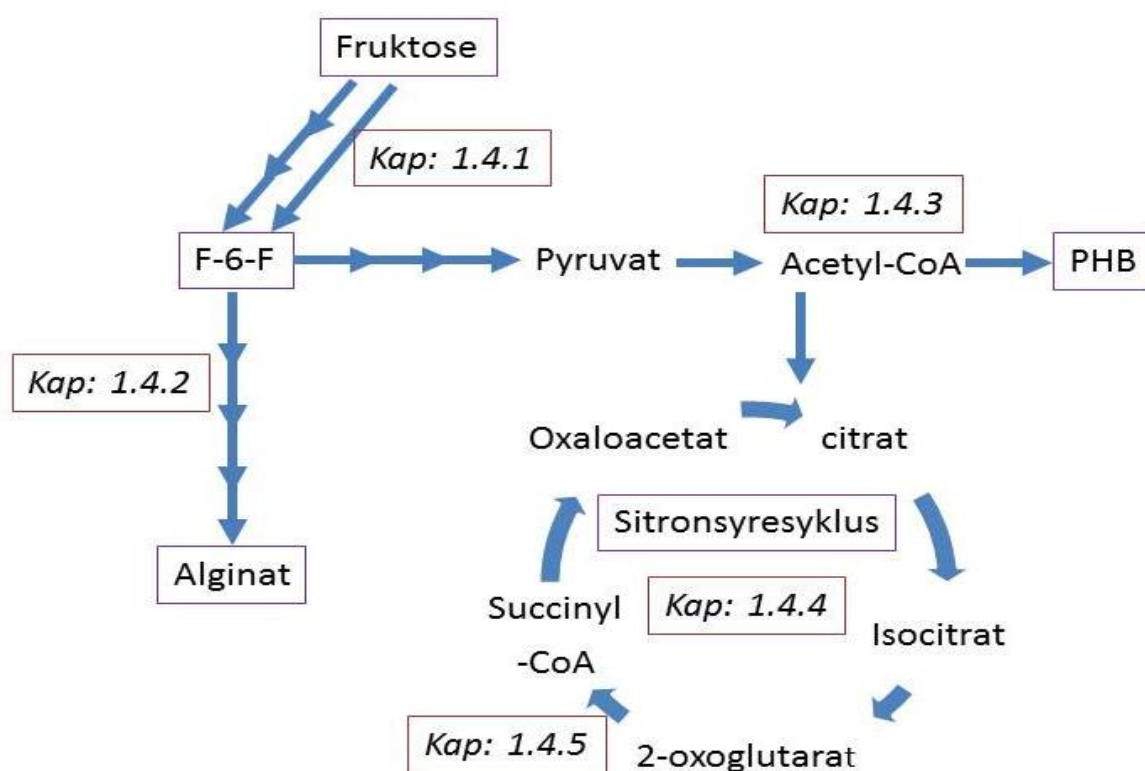
1.3 POLY-BETA-HYDROXYBUTARAT

I tillegg til å produsere alginat kan *A. vinelandii* også lage poly- β -hydroxybutarat (PHB), dette er en polymer av polyhydroxyalkanoat (PHA)-type. PHA er en gruppe av polyester som produseres av en rekke bakterier som respons på stress. PHA har stor kommersiell interesse som biologisk nedbrytbar plast. (Galindo et al. 2007)

I *A. vinelandii* har regulering av PHB-produksjon sammenheng med alginat-produksjon og cystedannelse, modne cyster inneholder store mengder PHB i intracellulære granuler som reservelager for energi og karbon (Stevenson & Socolofsky 1966). Forsøk har vist at *A. vinelandii* er i stand til å danne modne cyster selv med hemmet PHB-syntese (Segura et al. 2003). PHB har også en effekt på nitrogenfiksering i *A. vinelandii* (Segura & Espín 1998).

1.4 FRA FRUKTOSE TIL ALGINAT OG PHB I *A. VINELANDII*

I denne oppgaven blir fruktose brukt som karbonkilde i medium for å dyrke *A. vinelandii* og dette kapittelet går gjennom hvordan fruktose metaboliseres i *A. vinelandii* og omdannes via fruktose-6-fosfat til alginat, via pyruvat og acetyl-CoA til poly- β -hydroxybutarat (PHB), samt inngår sitronsyre-syklus hvor genproduktene fra *sucA*, *sucB* og *lpdA* er viktige komponenter.



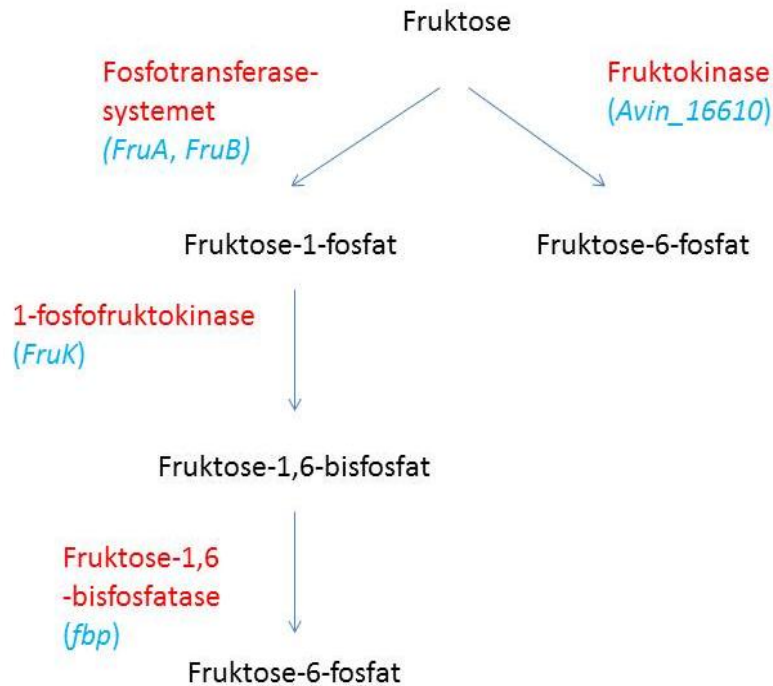
Figur 1.3 Prosessene som angår alginat og PHB-syntese i *A. vinelandii* og beskrives i delkapittel 1.4.1 - 1.4.5.

1.4.1 FRA FRUKTOSE TIL FRUKTOSE-6-FOSFAT OG PYRUVAT

En vanlig form for opptak av fruktose i bakterier via et phosphoenylpyruvat-avhengig fosfotransferasesystem. Reizer et al. (1999) har beskrevet et fruktose-spesifikt fosfotransferasesystem som kodes for av genene *fruA* og *fruB* i *Pseudomonas aeruginosa*. *fruB* koder for et fruktosespesifikt multifosforylering-overføringsprotein som består av enzym I, FPr (HPr) og enzym IIA, *fruA* koder for et membrantransportprotein bestående av enzym IIC og IIB.

Enzym I overfører fosfat fra fosfoenolpyruvat til FPr, FPr fosforylerer enzym I som overfører fosfat til enzym II som igjen fosforylerer D-fruktose. Fruktose-1-fosfat kan fosforyleres til fruktose-1,6-bisfosfat av 1-fosfofruktokinase (kodes av *fruK*-genet) ved bruk av ATP som fosfatdonor. Operonet bestående av *fruB*, *fruK* og *fruA* antas regulert av *fruR*. (Reizer et al. 1999) BLAST-søk av annoterte gener *fruA*, *fruK* og *fruB* fra *A. vinelandii* viser en høy (77-78 %) nuklotid-likhet med tilsvarende gener fra *P. aeruginosa*. Figur 1.4 viser en oversikt over dette sporet.

Anderson et al. (1987) påviste ikke tilstedeværelse av 1-fosfofruktokinase i *A. vinelandii*, men tilstedeværelse av en fruktose-6-fosfotransferase (kodes for av *Avin_16610* og *Avin_17670*) som direkte kan fosforylere fruktose til fruktose-6-fosfat med ATP som fosfatdonor (Figur 1.4).



Figur 1.4 To spor for omdanning av fruktose til fruktose-6-fosfat. Systemer/ enzymer i rødt, gener i blått, substrat og produkt i sort.

I pseudomonader omdannes fruktose-1,6-bisfosfat til pyruvat i hovedsak via hydrolisering til fruktose-6-fosfat av fruktose-1,6-bisfosfatase og videre metabolisme i Entner-Doudoroff-spoet. Et mindre brukt spor er Embden-Meyerhof der fruktose-1,6-bisfosfat aldolase spalter fruktose-1,6-bisfosfat til glyceraldehyd-3-fosfat og dihydroksyacetone fosfat i en reversibel reaksjon. Dihydroksyacetone fosfat isomeriseres (reversibelt) til glyceraldehyd-3-fosfat av triose fosfat isomerase-enzymene TpiA-1, TpiA-2 og TpiA-3 (som annotert i KEGG). (Lessie & Phibbs 1984)

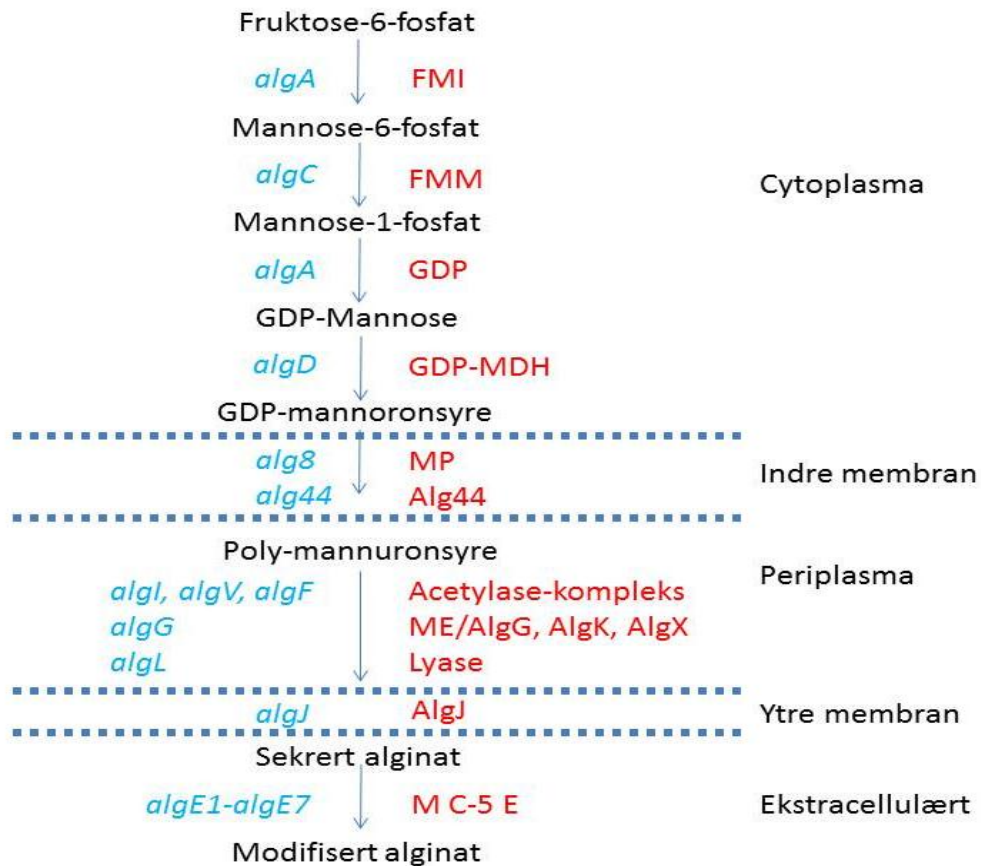
Glyceraldehyd-3-fosfat kan omdannes til pyruvat via glykolysen og inngå i sitronsyresyklus eller resirkuleres til heksosar via en syklisk form av Entner-Doudoroff-spoet som er vanlig i pseudomonader. Glyceraldehyd-3-fosfat omdannes til 6-fosfoglukonat via fruktose-1,6-bisfosfat, fruktose-6-fosfat og glukose-6-fosfat. (Lessie & Phibbs 1984)

1.4.2 FRA FRUKTOSE-6-FOSFAT TIL ALGINAT

Alginatsyntesen i bakterier består av flere trinn (Figur 1.5). Fruktose-6-fosfat isomeriseres til mannose-6-fosfat av fosfomannose isomerase/PMI som kodes av *algA*. Dette enzymet er bifunksjonelt og virker også som guanosin difosfomannose pyrofosforylase/GMP. Mannose-6-fosfat konverteres til mannose-1-fosfat av fosfomannomutase som kodes av *algC*. Guanosin difosfomannose pyrofosforylase katalyserer en endring av mannose-1-fosfat til GDP-mannose med GTP som fosfatdonor (May et al. 1994). GDP-mannose oksideres til GDP-mannuronsyre av GDP-mannose dehydrogenase/GMD som kodes av *algD*. (Galindo et al. 2007)

GDP-mannuronsyre polymeriseres til polymannuronsyre og fraktes gjennom den indre membranen av Alg8 og Alg44. Alg8 er en glykosyltransferase med flere transmembran-domener og delesjon i *alg8* har vist seg å hindre produksjon av alginat i *P. aeruginosa*. Innføring av flere kopier av *alg8* ga mangedoblet alginat-produksjon, dette tyder på at Alg8 er et regulerende trinn i alginatproduksjon. (Remminghorst & Rehm 2006c)

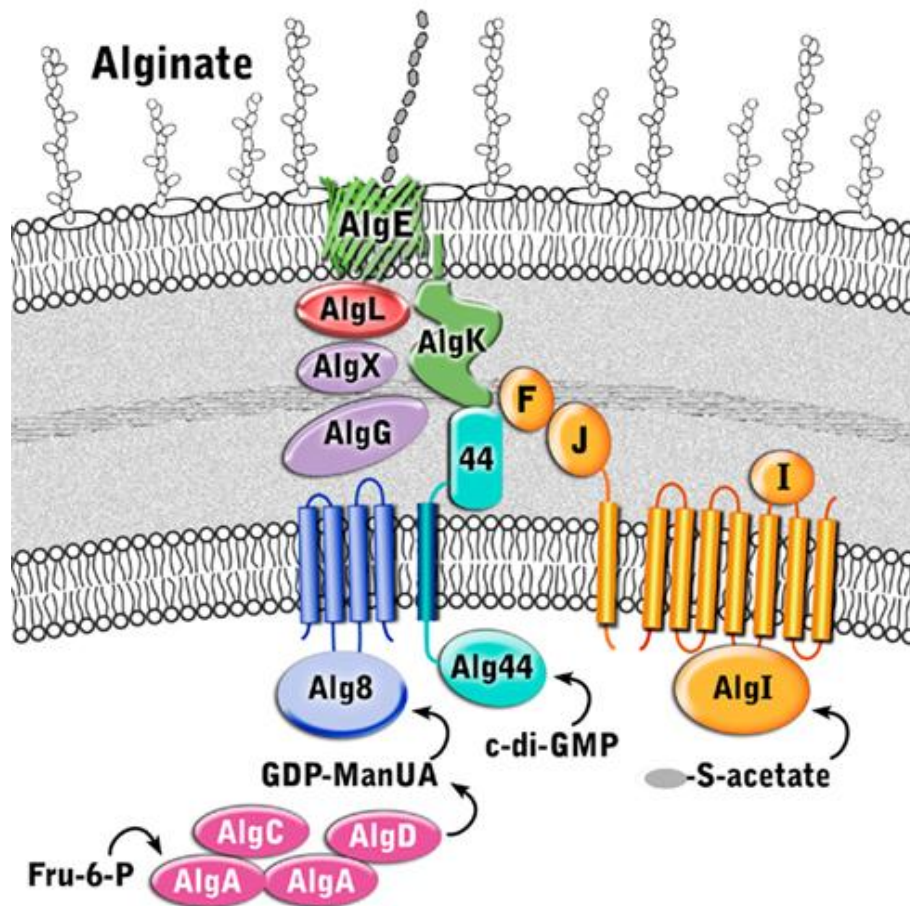
Delesjonsmutasjon av *alg44* har vist at også proteinet Alg44 er nødvendig for alginat-produksjon (Remminghorst & Rehm 2006a). Alg44 har et cytoplasmisk N-terminalt PilZ-domene (Merighi et al. 2007) som kan binde cyklisk diguanosin monofosfat (c-di-GMP). c-di-GMP er et kjent sekundær budbringer-protein i bakterier. C-terminalt periplasmisk domene av Alg44 antas å ha en strukturell rolle i sammensetning av et multi-protein kompleks (Figur 1.6). (Franklin et al. 2011; Galindo et al. 2007; Remminghorst & Rehm 2006a; Remminghorst & Rehm 2006b)



Figur 1.5 Fra fruktose-6-fosfat til modifisert alginat. Enzymer i rødt, gener i blått, substrat og produkt i sort. FMI: fosfomannose isomerase, FMM: fosfomannomutase, GDP: guanosin difosfomannose pyrofosforylase, GDP-MDH: GDP-mannose dehydrogenase, MP: mannuronsyre-polymerase, ME: mannuron-epimerase, MC-5E; mannuron-C-5-epimeraser. AlgI er plassert i indre membran (Figur 1.6), men acetylering skjer i periplasma.

Et acetylase-kompleks bestående av AlgI, AlgV og AlgF-proteiner acetylerer polymannuron-molekylet. Delesjonsmutasjoner av disse genene i *P. aeruginosa* viser at de ikke er essensielle for polymerisering av alginat eller et mulig multikompleks som beskytter alginat mot AlgL (Franklin et al. 2011). Det potensielle multi-protein komplekset (Figur 1.6) involverer cytoplasmiske membranproteiner (Alg8 og Alg44), periplasmiske proteiner (AlgG, AlgK, AlgX) og ytre membranproteiner (AlgJ). AlgG har to funksjoner, den har epimerase-aktivitet (noen ikke-acetylerede mannuron-enheter epimeriseres til guluronat) og danner sannsynligvis (sammen med AlgK og AlgX) et proteinkompleks som frakter alginat gjennom periplasma samt beskytter den mot å bli lysert av AlgL (Gimmestad et al. 2003; Jain et al. 2003; Robles-Price et al. 2004).

AlgK er i tillegg viktig for koordinering av alginat-biosyntese-komplekset (Keiski et al. 2010). AlgX har ingen kjent funksjon, men delesjonsmutasjon av genet gir sekresjon av depolymerisert alginat (Robles-Price et al. 2004) og AlgX har høy sekvenslikhet med AlgJ (AlgJ i *P. aeruginosa*, tilsvarer AlgV i *A. vinelandii*) og en mulig rolle i polymer modifikasjon av alginat har blitt beskrevet av Weadge et al. (2010).



Figur 1.6 Foreslått figur over alginat-syntese-komplekset i *P. aeruginosa* (Franklin et al. 2011). Alginat-syntese-komplekset i *A. vinelandii* har de samme komponentene, men to av proteinene har andre navn: AlgE = AlgJ og AlgJ = AlgV i *A. vinelandii*.

algL koder for et alginat lyase enzym som har som oppgave å fjerne alginat som ikke eksporteres ut av cellen (Boyd et al. 1993; Ertesvåg et al. 1998; Schiller et al. 1993). Delesjonsmutasjon i *algL* i *P. aeruginosa* førte til celledød og at periplasma fyltes opp med en polymer, sannsynligvis alginat (Jain & Ohman 2005).

I kontrast til undersøkelsene gjort av Jain og Ohman viste undersøkelser av AlgL i *A. vinelandii* utført av Trujillo-Roldan et. al. (2003) at delejonsmutasjoner i *algL* ikke påvirker cellevekst eller alginatproduksjon i større grad. Undersøkelser av AlgL i *Pseudomonas fluorescens* utført av Bakkevig et. al. (2005) tyder på at AlgL har en viktig rolle i degradering av alginat som ikke eksporteres ut av cellen, men at den ikke har en nødvendig rolle i alginatsyntese-komplekset.

Alginat eksporteres til yttermembran av et pore-formet protein (AlgI). *A. vinelandii* produserer 7 ulike ekstracellulære mannuron C-5 epimeraser (AlgE1-AlgE7) som kan modifisere alginat etter eksportering. Epimerasene kan epimerisere ikke acetylerede M-enheter til G-enheter (Ertesvåg 1995). AlgE7 kan også virke som alginat lyase (Svanem et al. 2001).

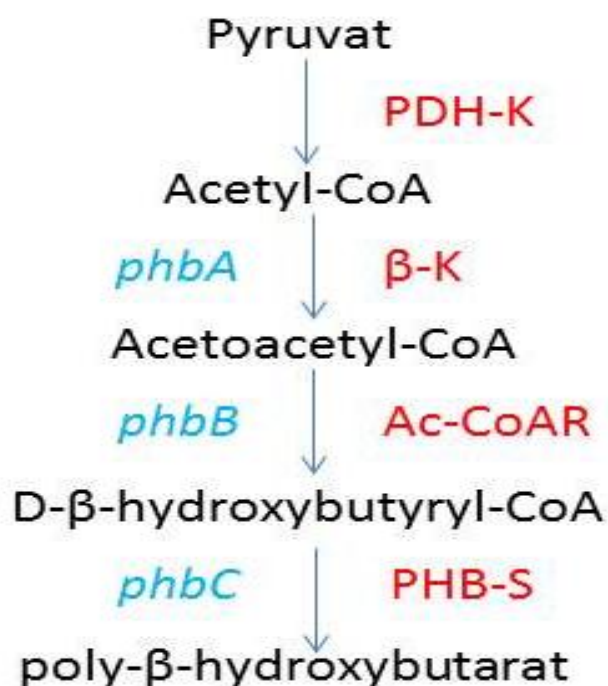
De fleste genene som koder for enzymene i alginat-biosyntesen i *A. vinelandii* ligger i en klynge, med *algC* som et unntak. Regulering av alginat- og PHB-syntese i *A. vinelandii* er kompleks og selv om mange involverte faktorer er beskrevet, er det sannsynligvis fortsatt sammenhenger som ikke er klarlagt. (Galindo et al. 2007)

1.4.3 FRA PYRUVAT TIL POLY-BETA-HYDROXYBUTARAT

Pyruvat omdannes til acetyl-CoA av pyruvat dehydrogenase- komplekset. To molekyler acetyl-CoA kan omdannes til acetoacetyl-CoA av β -ketothialase (kodes for av *phbA*). Acetoacetyl-CoA reduseres til D- β -hydroxybutyryl-CoA av acetoacetyl-CoA reduktase (kodes for av *phbB*) og polymeriseres til poly- β -hydroxybutarat av PHB-syntase (kodes for av *phbC*). Oversikt vises i figur 1.7.

Under normale vekstforhold går acetyl-CoA inn i sitronsyresyklus og β -ketothialase hemmes av CoA. Når bakterien går inn i stasjonær fase, og ved overskudd på karbon og oksygenstress, økes mengden NADH som hemmer citrat syntase og isocitrat dehydrogenase. Det blir en redusert fluks i sitronsyresyklus og forholdet mellom acetyl-CoA og CoA endres slik at CoA utkonkurreres som hemmer av β -ketothialase og PHB syntesen aktiveres. (Galindo et al. 2007; Segura & Espín 1998)

A. Vinelandii UWD er et eksempel på en stamme som overproduserer PHB på bekostning av fluks i sitronsyresyklus og alginatsyntese under aerobe forhold. UWD er hemmet i NADH oksidase slik at NADH akumuleres og hemmer flux i sitronsyresyklus. Syntese av PHB økes som en respons på økt tilgang til acetyl-CoA og fungerer som en buffer for oksidativt stress. Når mutanten overføres til lav-aerobe forhold vil denne mutantene igjen syntetisere alginat, nå med PHB som karbonkilde. (Page et al. 2001)

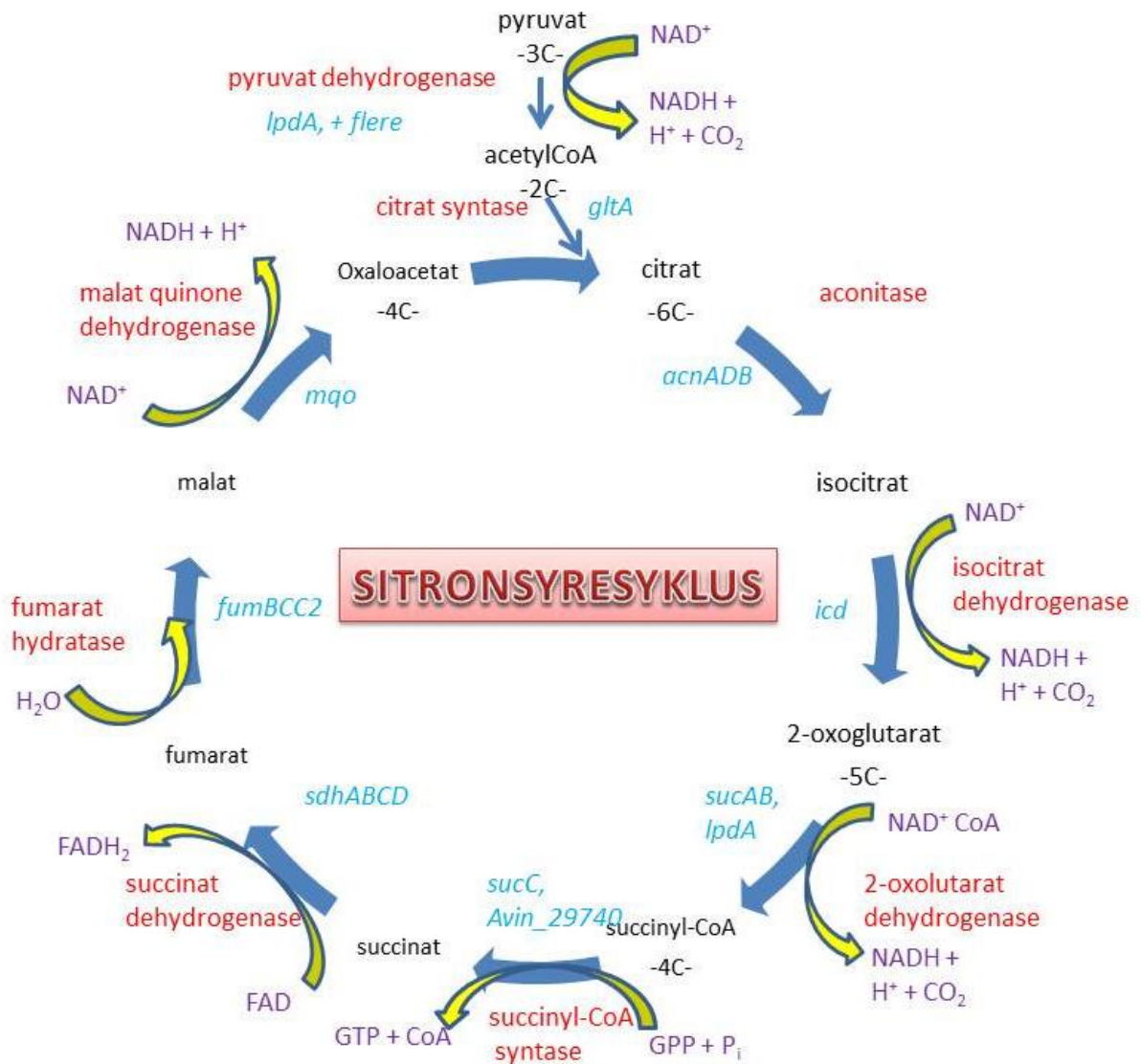


Figur 1.7 Omdanning av pyruvat til poly- β -hydroxybutarat. Enzymer i rødt, gener i blått, substrat og produkt i sort. PDH-K: pyruvat dehydrogenase-kompleks β -K: β -ketothialase Ac-CoAR: Acetoacetyl-CoA reductase PHB-S: poly- β -hydroxybutyrat syntase.

1.4.4 SITRONSYRE-SYKLUS

Sitronsyre-syklus (Figur 1.8) er også kjent som trikarboksylsyre-syklus (TCA) og Krebs syklus -etter Sir Hans Adolf Krebs som fikk nobelprisen i medisin i 1954 for å ha avdekket hovedelementene i denne prosessen.

Reaksjonen som linker glykolyse til sitronsyresyklus (Figur 1.8) er oksidativ dekarboxylering av pyruvat (3C) til acetyl-CoA (2C) av pyruvat dehydrogenase (PDH)-komplekset. Acetyl-CoA (2C) og oxaloacetat (4C) omdannes til citrat (6C) og CoA av citrat syntase.



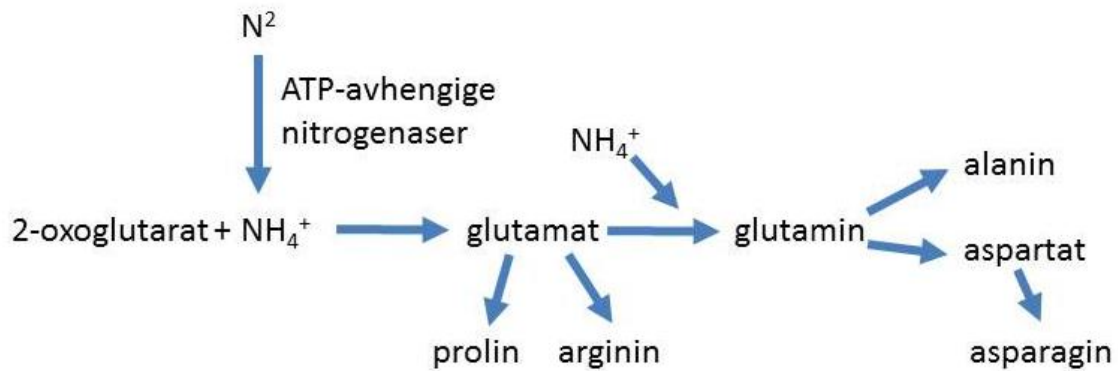
Figur 1.8 Sitronsyre-syklus. Enzymer er merket i rødt, gener i blått, substrat og produkt i sort.

Citrat isomeriseres til isocitrat før oksidativ dekarboksylering til 2-oxoglutarat (5C), et karbonatom skilles ut som CO_2 og en NAD^+ reduseres til NADH. 2-oxoglutarat gjennomgår oksidativ dekarboksylering av 2-oxoglutarat dehydrogenase (OGDH)-komplekset til succinyl-CoA (4C), -også her skilles det ut CO_2 og $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$. Succinyl-CoA syntetase omdanner succinyl-CoA til succinat og CoA og et molekyl GDP fosforyleres til GTP. GTP dannet her er en viktig komponent i alginatsyntesen (se 1.4.2). Succinat oksideres videre til fumarat ($\text{FAD} \rightarrow \text{FADH}_2$). Fumarat hydreres til malat og oksideres videre til oxaloacetat ($\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$). Oxaloacetat kan nå inngå i en ny runde i sitronsyresyklus eller tilbakedannes til sukker via glukoneogenesen. (Berg et al. 2007)

Segura and Espín (2004) viste at inaktivering av pyruvat karboksylase i *A. vinelandii* økte produksjonen av PHB i fast medium. De foreslo at dette kom av økt tilgang på acetyl-CoA som følge av nedsatt omsetning i sitronsyresyklus som igjen var en følge av nedsatt omdanning av pyruvat til oxaloacetat. I *Pseudomonas fluorescens*, som har høy fylogenetisk likhet med *A. vinelandii* (Rediers et al. 2004) viste Fuhrer et al. (2005) at malat i hovedsak omdannes til pyruvat av malic enzymet og videre til oxaloacetat av pyruvat karboksylase og ikke direkte til oksaloacetat som i mange andre bakterier.

Sitronsyre-syklus er andre trinn i en tre-trinns prosess (celleånding) for å hente energi fra nedbryting av karbohydrater, fettsyrer og aminosyrer. Første trinn er nedbryting av karbonkilder til acetyl-CoA. Det tredje trinnet er oksidativ fosforylering som oksiderer NADH, FADH og H^+ og fosforylerer ADP til ATP. ATP er lettere tilgjengelige energikilder enn NADH og FADH. (Berg et al. 2007)

A. vinelandii forbruker ATP blant annet ved fiksering av atmosfærisk nitrogen (N_2) som inngår i biosyntese av cellulære «bygggestener». Nitrogenaser reduserer N_2 til NH_3 . NH_4^+ og 2-oxoglutarat syntetiseres med hjelp av enzymet glutamat dehydrogenase. Glutamat kan omdannes videre til glutamin ved at glutamin syntetase inkorporer enda et ammonium-ion, glutamin kan omdannes videre til alanin og aspartat (\rightarrow asparagin). Glutamat kan også omdannes til prolin og arginin (Berg et al. 2007)

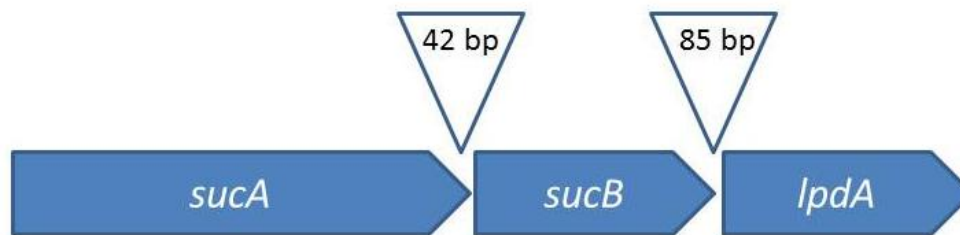


Figur 1.9 Atmosfærisk nitrogen tas opp og inkorporeres i *A. vinelandii*.

1.4.5 2-OXOGLUTARAT DEHYDROGENASE

SucA-genet (2832 bp langt) i *A. vinelandii* ble først sekvensert av Schulze et al. (1990). Genet koder for 2-oxoglutarat dehydrogenase, også kjent som α -ketoglutarat dehydrogenase. Westphal and de Kok (1990) sekvenserte genene nedstrøms for *sucA*. Der fant de *sucB* som koder for dihydrolipoamid succinyltransferase (1200 bp langt) og *lpdA* som koder for dihydrolipoamid dehydrogenase (1434 bp langt).

På bakgrunn av at det ikke er funnet terminator-sekvenser nedstrøms for *sucA*, men at det er funnet en slik sekvens nedstrøms for *lpdA* anslår Schulze et al. (1990) at genene *sucA*, *sucB* og *lpdA* transkriberes sammen i et operon (Figur 1.10). Området ca 100 bp oppstrøms for *sucA* ble undersøkt og det ble funnet et mulig ribosomalt bindingssete 10-16 bp oppstrøms for *sucA*, men promoterområde ble ikke lokalisert. I *Escherichia coli* (59 % likhet i genet) er det funnet et promoterområde som ligger 185 -215 bp oppstrøms for *sucA*. Westphal & de Kok (1988) fant et mulig ribosomalt bindingssete og promotersekvens i området oppstrøms for *lpdA* i *A. vinelandii*, dette tyder på at *lpdA* kan transkriberes uavhengig av de to andre genene i operonet.



Figur 1.10 Genene som koder for 2-oxoglutarate dehydrogenase-komplekset. Avstanden mellom genene (i bp) er også vist.

I *E. coli* er det funnet to promoter-områder som kontrollerer *SucABCD*-genene. *sucC* og *D* koder for henholdsvis β - og α -subenhetene av succinyl-CoA syntetase (SCS). Den ene promoteren ligger oppstrøms for *SucA* og sørger for et konstant, men lavt uttrykk av *sucABCD*-genene. Det andre promoter-området ligger oppstrøms for *sdhCDAB*-genene og regulerer både *sdhCDAB* og *sucABCD*-genene avhengig av blant annet oksygen- og karbontilgang. Systemet bak denne reguleringen synes å være blant annet at *sucABCD* uttrykkes i lav grad i anaerobe tilstander, men i langt høyere grad under aerobe forhold. Som i *E. coli* ligger også genene *shdCDAB* et stykke oppstrøms for *sucA*, nedstrøms for *sucAB* og *lpdA* finnes to gener for succinyl-COA syntetase. (Park et al. 1997; Trotter et al. 2011)

I KEGG er *sucC* i *A. vinelandii* annotert som en SCS α -subenhet (tilsvarende *sucD* i *E. coli*) og *Avin_29740* annotert som en SCS β -subenhet (tilsvarende *sucC* i *E. coli*). Gen-arrangementene vises i figur 1.11.

E. coli:

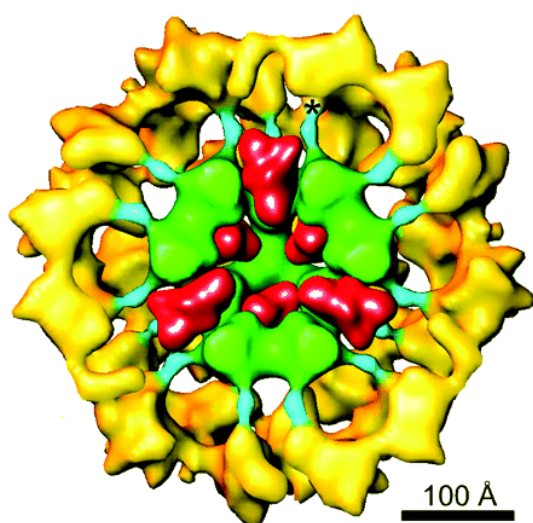


A. vinelandii:



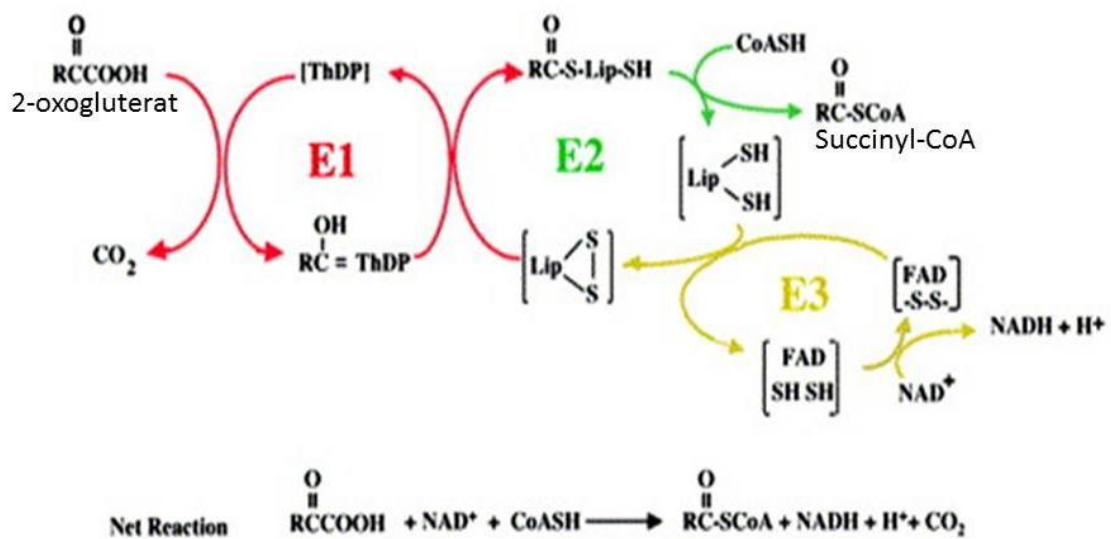
Figur 1.11 *sdhCDAB* og *sucABCD* i *E. coli* og tilsvarende område i *A. vinelandii*. *Avin_29720* koder for et protein med ukjent funksjon. (www.ncbi.nlm.nih.gov)

OGHD- og PDH-kompleksene er like både i struktur og komponenter og hører til i en familie med fem kjente 2-oxosyre dehydrogenase-komplekser som alle i hovedsak har samme struktur. OGHD-komplekset og PDH-komplekset deler også en komponent; E3-komponenten dihydrolipoamid dehydrogenase (*lpdA*), er den samme i begge kompleksene. PDH-komplekset i *E. coli* er bygget opp av 24 enheter E2p som danner en kjerne og binder flere enheter av E1p og E3p (Figur 1.12). Enhetene navngis som E1-3 og med en liten bokstav som angir hvilket kompleks det refereres til. O=OGDH og p=PDH.



Figur 1.12 Pyruvat dehydrogenase kompleks. E3p homodimer er i rødt, E2p i grønt og E1p i gult. S sammensatt fra ulike undersøkelser av ulike bakterier (Zhou et al. 2001).

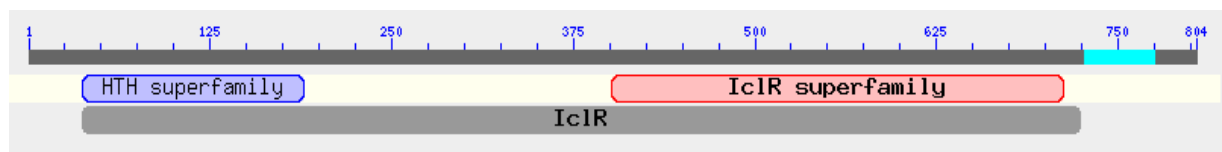
OGHD-komplekset konverterer 2-oxoglutarat, NAD^+ og CoA til succinyl-CoA, NADH, H^+ og CO_2 , (Figur 1.13) og reaksjonen står for et regulerende trinn i sitronsyresyklusen. 2-oxoglutarat dehydrogenase er et tiamin-avhengig protein som danner E1 komponenten i 2-oxoglutaratdehydrogenase-komplekset. I 2-oxosyre dehydrogenase-kompleksene i gram negative bakterier består E1-komponenten av en homodimer. I gram positive bakterier og mitokondrier består E1-komponenten av en heterodimer.(Bunik et al. 2000; Frank et al. 2007)



Figur 1.13 Reaksjonene som er katalyserte av enhetene i OGDH-komplekset. (Frank et al. 2007)

1.5 AVIN_13880

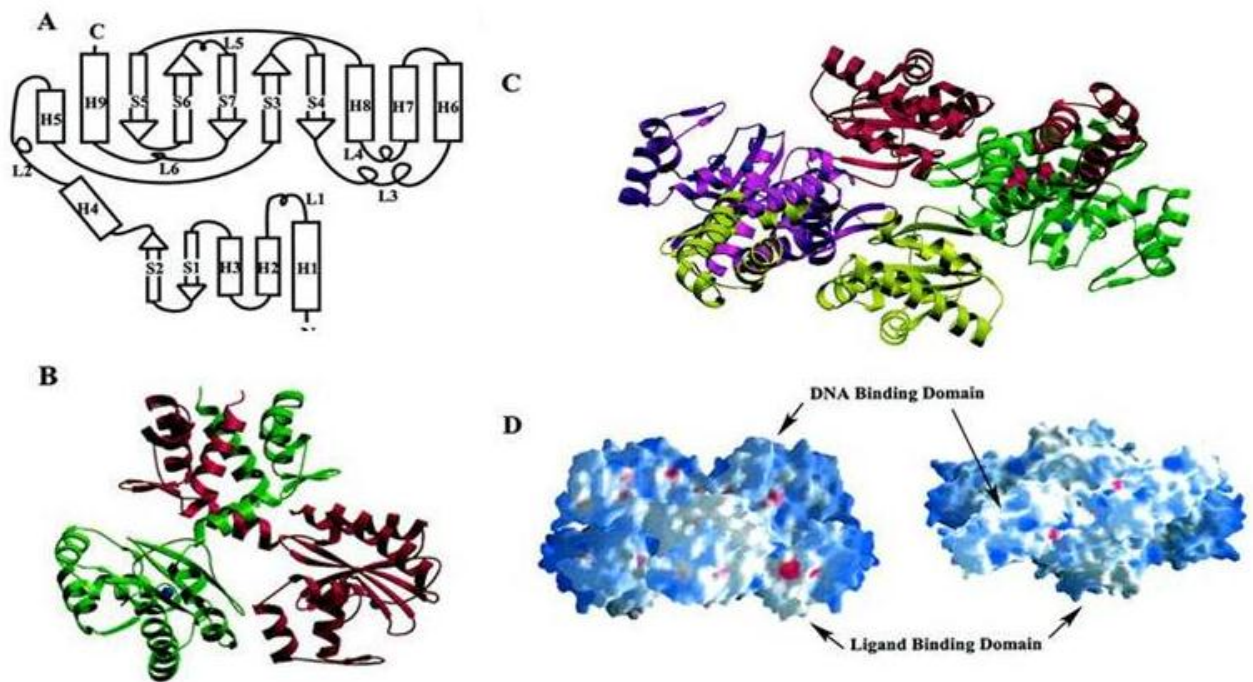
Avin_13880 er annotert i KEGG som en transkripsjonsregulator av IclR-type. BLASTX -søk i NCBI-databasen viste at Avin_13880 innehar to motiver, et som tilhører HTH superfamilien og et som tilhører IclR superfamilien (Figur 1.14)



Figur 1.14 BLASTX-søk av sekvensen i Avin_13880. Sekvensen innehar to kjente domener; HTH og Icl. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

N-terminalt domene i IclR har et helix-turn-helix (HTH) DNA-bindende sete (Figur 1.15A). C-terminalt finnes et signalmolekyl-bindende domene (Figur 1.15D). Binding av signal-molekyler fører til en endring i strukturen. HTH- DNA-bindende motiv binder seg i promoter til gener den regulerer. DNA-sekvensen IclR proteiner binder seg til varierer, både i struktur (repetisjoner, palindromer), lengde og lokasjon.

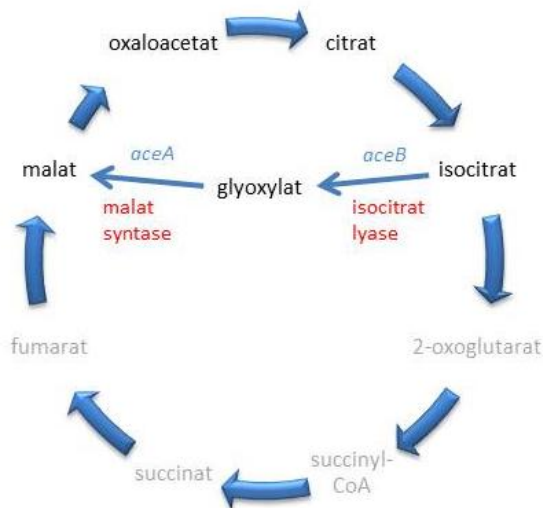
De fleste IclR-proteiner binder seg i sekvenser som overlapper med bindingssetet til RNA-polymerase/promoter, men ikke alle. IclR-proteiner opptrer som tetramerer, sammensatt av to asymetriske dimerer (Figur 1.15B og C). (Krell et al. 2006; Tropel & van der Meer 2004)



Figur 1.15 A) DNA-bindende domene (HTH). Dette består av tre α -helixer (H1–H3) og en β -hårnål som former en vinge. Det signal-bindende domenet består av tre små α -helixer og to lengre α -helixer. De to domenene er bundet sammen av en α -helix (H4). B) Asymetrisk dimer består av to monomerer, rød og grønn. C) Tetramer sett fra toppen, den er dannet av to dimerer, henholdsvis rød/grønn og gul/lilla. D) IclR-tetramer med DNA og ligand-bindende domene. (Zhang et al. 2002)

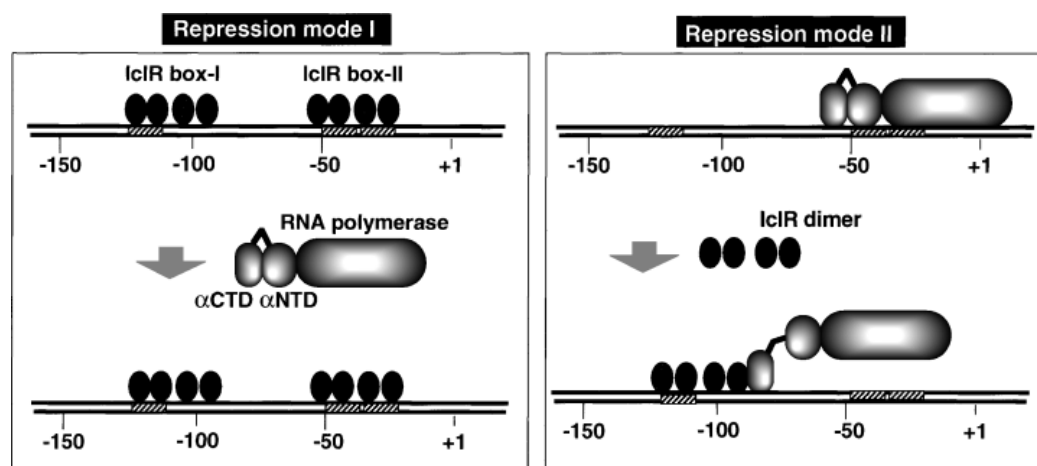
Det første undersøkte IclR-regulatoren var *iclR* (isocitrat lyase regulator) fra *E. coli*. Denne regulerer *aceBAK*-operonet som koder for enzymer som er nødvendig for glyoxylat-sporet (Figur 1.16). (Maloy & Nunn 1982)

Binding av glyoxylat i C-terminalt domene fører til en dimerisering av N-terminalt domene som gir et inaktivt HTH-sete. Binding av pyruvat gir en stabilisering av den aktive tetrameriske formen og HTH-domenet binder *aceBAK*-promoter og hemmer uttrykk av operonet samt sitt eget gen. (Lorca et al. 2007)



Figur 1.16 Glyoxylat-sporet i *E. coli*. Enzymer er merket i rødt, gener i blått, substrat og produkter involvert i glyoxylat-sporet vises i sort.

I *aceBAK*-promoter-regionen er det funnet to operatorsekvenser der IclR binder (Figur 1.17). Ved binding i den ene hindres binding av RNA polymerase til promoter. Ved binding i den andre operatorsekvensen kan IclR binde C-terminalt domene av α -subenhet til RNA polymerase og dermed hemme transkribering etter binding av RNA-polymerase til promoter. I *iclR*-promoter regionen er det funnet en operatorsekvens som overlapper promoter og dermed konkurrerer med RNA polymerase for DNA-binding. Sekvensene IclR gjenkjenner er ikke identiske, men deler et palindromisk motiv på 15 bp. (Yamamoto & Ishihama 2003)



Figur 1.17 viser binding av IclR til to ulike operatorsekvenser i *aceBAK*-operonet i *E. coli*. I mode I hindrer IclR binding av RNA-polymerase. I mode II binder IclR α -CTD (C-terminalt domene av α -subenhet) av RNA polymerase. (Yamamoto & Ishihama 2003)

Medlemmer av IclR-familien regulerer uttrykk av varierte gener; i *Erwinia chrysantemi* regulerer et IclR-protein degradering av polysakkarider fra planteceller (Reverchon et al. 1991). I *Corynebacterium glutamicum* finnes en IclR-regulator som kalles LtbR, denne regulerer uttrykk av blant annet leucin og tryptofan- biosyntese-gener. I tillegg til å regulere genene i umiddelbar nærhet (180 bp avstand fra *ltbR* start til *leuC/leuB* operon, men i motsatt retning), regulerer *ltbR* også gener som ligger andre steder i genomet; *rbsB/rbsC*, *leuA*, *leuB* m.fl.. Noen gener oppreguleres og andre nedreguleres ved nullmutasjon i *ltbR*-genet (Brune et al. 2007).

1.6 FORMÅL FOR OPPGAVEN

Alginat er en viktig industriell biopolymer med en rekke bruksområder (1.1.1). *A. vinelandii* har evne til å produsere store mengder alginat og i tillegg er det potensielt mulig å designe *A. vinelandii* stammer som produserer alginat med spesialisert komposisjon. For å få til dette må man ha kunnskap om hvilke faktorer som påvirker alginatproduksjon og komposisjon i *A. vinelandii*.

For å undersøke disse faktorene ble det laget et transposonmutant-bibliotek med stammen *A. vinelandii* ATCC 12518Tc som utgangspunkt. Denne stammen ble laget ved at villtypestamme *A. vinelandii* ATCC 12518 fikk innført *tetA-tetR*-gener (tetracyclin-resistens) som markør for å selekere bort *E. coli* etter konjugering. Denne stammen produserer ca. 80 % alginat sammenlignet med villtypen. (Mærk et al. manuskript)

For å lage mutant-biblioteket ble transposonvektor pCAM140 (Wilson et al. 1995) konjugert inn i *A. vinelandii* ATCC 12518Tc. pCAM140 inneholder spectinomycin-resistens som seleksjonsmarkør. Ca. 4000 transkonjuganter ble screenet med hensyn på vekst og alginat-produksjon og et antall mutanter ble selektert til videre undersøkelser på bakgrunn av fenotype med signifikant opp- eller nedgradert vekst og alginat- produksjon. (Mærk et al. manuskript)

Denne oppgaven startet med å undersøke 17 mutant-stammer fra dette biblioteket, dette ble gjort med tanke på å verifisere nedregulert produksjon av alginat. Etter innledende forsøk ble det plukket ut 8 stammer til videre undersøkelse. Videre undersøkelse betyr utvidet vekst og alginat-produksjon screening og sekvensering for å bestemme hvilket gen som har fått transposonet satt inn. BLAST-undersøkelser av stammene påviste tilstedeværelse av transposonvektor pCAM140. På dette tidspunktet ble det et lengre opphold i arbeidet med oppgaven grunnet barselpermisjon, ved ny oppstart ble det avklart at denne delen av oppgaven ble terminert.

Ny del av oppgaven startet med at det ble utlevert to mutant-stammer med kjent ned-regulert alginat-produksjon. Disse stammene var også sekvenserte, slik at inaktiverte gener var kjent og det var bekreftet at de ikke inneholdt transposonvektor. Genene som skulle undersøkes videre var; Avin_13880 (stamme 21C3T) og Avin_29770/*sucA* (stamme 20A6).

Bioinformatisk undersøkelse av genene viser at Avin_13880 koder for en transkripsjonsregulator av IclR-klasse. Avin_29770 (*sucA*) ligger i en klynge sammen med Avin_29760 (*sucB*) og Avin_29750 (*lpdA*). Disse koder for de tre ulike enzym-komponentene i 2-oxoglutarat dehydrogenase (OGDH)-komplekset: E1_o; 2-oxoglutarate dehydrogenase (*sucA*), E2_o; dihydrolipoamide succinyltransferase (*sucB*) og E3_o; dihydrolipoamide dehydrogenase (*lpdA*). OGDH-komplekset katalyserer konvertering fra 2-oxoglutarat til succinyl-CoA og CO₂ i sitronsyre-syklus.

I tillegg til bioinformatiske undersøkelser og litteraturstudier av genene, ble det forsøkt å komplementere mutant-stammene med villtype-gener underlagt en P_m-promoter for å gjenvinne evne til alginat-produksjon. Dette ble gjort for å verifisere at det var de påviste mutasjonene som forårsaket den observerte fenotypen og mulig overuttrykke genene for å se hva dette gjør med alginatproduksjonen. I stamme 20A6 ble det forsøkt å komplementere med tre forskjellige komposisjoner av villtype-gener; *sucA/sucB*, *lpdA* og *sucA/sucB/lpdA*. Dette ble gjort blant annet for å undersøke ko- eller individuell transkribering av genene.

2 MATERIALER OG METODER

2.1 BIOINFORMATIKKVERKTØY

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) er en integrert database bestående av 17 underdatabaser med oversikt over gener, proteiner og biokjemisk systeminformasjon. Alt dette er knyttet sammen så en enkelt kan gå fra genetisk informasjon til den korresponderende biologiske funksjonen, og vice versa. KEGG databaseprosjekt ble startet i 1995, det siste året av den første fem år lange fasen av det japanske Human Genome Project. (Kanehisa et al. 2012)

CloneManager Suite er et dataprogram som kan brukes til å designe og analysere primere, samt planlegge og simulere kloning. En kan også bruke programmet til å identifisere Open Reading Frames (ORF), potensielle startkodon, sammenligne sekvenser, lage kart over sekvenser med gener, kuttsetter ol. (www.scied.com)

BLAST/NCBI; i denne oppgaven ble Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) - tjenesten fra National Center for Biotechnology (NCBI) benyttet. BLAST er en algoritme utviklet av Altschul et. al (1990). BLAST algoritmen fungerer ved at den finner subsekvenser i databaser som er lik subsekvensen fra den sekvensen man undersøker.

Det finnes flere ulike BLAST-søk; BLASTN bruker en nukleotid-sekvens og søker i en nukleotidsekvens-database, BLASTP bruker en proteinsekvens og søker i en proteindatabase. BLASTX bruker en nukleotidsekvens som leses i alle seks leserammer og sammenlignes mot proteinsekvenser, TBLASTN bruker en proteinsekvens til å søke i en database med translaterede nukleotidsekvenser, TBLASTX bruker en translateret nukleotidsekvens til å søke i en database med translaterede nukleotidsekvenser. Det finnes også flere spesialiserte BLAST-søk. (www.ncbi.nlm.nih.gov)

2.2 MEDIER OG LØSNINGER

Til alle løsninger er det brukt destillert ionefritt H₂O dersom ikke annet er opplyst.

Gel loading buffer (10x)

70 % glyserol (Prolabo)

0,25 % bromfenolblått (Merck)

10 % Ficoll 400 (Pharmacia Fine Chemicals AB)

Blandingene ble varmet (60-65 °C) for å løse opp Ficoll 400 og bromfenolblått.

50 x TAE-buffer

242 g/l Tris base

57,1 ml/l Eddiksyre (100 %)

100 ml/l EDTA (0,5 M, pH 8)

1 M Tris-HCl (pH 8,0)

121 g/l Tris-base

pH justeres til 8,0 med kons. HCl

Autoklaveres.

0,05 M Tris-HCl, 1,5% NaCl (pH 7,5)

15 g/l NaCl (Merck)

6,072 g/l Tris-base

pH justeres til 7,5 med kons. HCl

Autoklaveres.

0,5 M EDTA (pH 8,0)

186 g/l EDTA

pH justeres til 8,0 med 5-10 M NaOH

Autoklaveres.

TE (pH 8,0)

10 ml/l 1 M Tris-HCl, autoklavert (pH 8,0)

2 ml/l 0,5 M EDTA, autoklavert (pH 8,0)

RA1 medium

RA1-basis, Fosfatløsning, 1 M CaCl₂, sukkerløsning og TMS1 ble laget hver for seg og blandet i steril beholder før bruk. Ved tillaging av faste medier ble det tilsatt 15 g agar i RA1-basis før autoklaving. Oppbevart i romtemperatur.

RA1 -basis

2 g MgSO₄·7H₂O (Merck)

1,5g NH₄NO₃

2 g pepton (Oxoid)

10,5 g MOPS

900 ml H₂O

pH ble justert til 7,0 med 5-10 M NaOH.

Løsningen ble autoklavert.

Fosfatløsning

50 g/l K₂HPO₄

Juster pH til 7,0 med HCl.

Løsningen ble autoklavert.

TMS1 (Trace Mineral Solution 1)

5 g/l FeSO₄·7H₂O

0,39 g/l CuSO₄·5H₂O

0,44 g/l ZnSO₄·7H₂O

0,15 g/l MnSO₄·H₂O

0,010 g/l Na₂MoO₄·2H₂O

0,020 g/l CoCl₂·6H₂O

50 ml konsentrert HCl

Løsningen ble sterilfiltrert.

RA1-bruksløsning

900 ml RA1-basis

100 ml 20 % fruktose, autoklaveres separat (Merck)

2 ml 1M CaCl₂

10 ml fosfatløsning

3 ml TMS1

Psi-medium

5 g/l gjærekstrakt (Oxoid)

20 g/l trypton (Oxoid)

5 g/l MgSO₄ (magnesiumsulfat) (Merck)

pH ble justert til 7.6 med KOH og autoklavert.

TFB1

2,94 g/l KAc (kaliumacetat)

12 g/l RbCl (rubidiumklorid)

1,5 g/l CaCl₂×2H₂O (kalsiumklorid)

10 g/l MnCl₂×4H₂O (mangan(II)klorid)

150 ml/l Glycerol

pH ble justert til 5.8 med fortynnet eddiksyre og løsningen ble sterilfiltrert.

TFB2

2,1 g/l MOPS

11 g/l CaCl₂×2H₂O

1,2 g/l RbCl

150 ml/l glycerol

pH ble justert til 6.5 med fortynnet NaOH og løsningen ble sterilfiltrert.

SOC-buffer

20 g/l trypton (Oxoid)

5 g/l gjærekstrakt (Oxoid)

0,5 g/l NaCl (Merck)

2,5 mM KCl (Merck)

3,6 g/l glukose (Merck)

5,08 g/l MgCl₂

H₂O til 50 ml.

Mediet ble sterilfiltrert gjennom 0,22 µm filter, alikvotert og fryst (-20°C).

Luria Broth (LB) -vekstmedium

10 g/l trypton (Oxoid)

5 g/l gjær-ekstrakt (Oxoid)

5 g/l NaCl (Merck)

Mediet ble autoklavert.

LA

LB tilsatt 15 g/l agar før autoklivering.

Burks vekstmedium:

Tillaging av Burks medium skjer ved fortykning av 5x Burks buffer, autoklivering av denne og tilsetting av autoklavert sukkerløsning og sterilfiltrerte saltløsninger før bruk. Ved tillaging av faste medier tilsettes 15 g/l agar i fortyntet Burks buffer før autoklivering.

5x Burks buffer

1 g/l MgSO₄·7H₂O (Merck)

3,2 g/l K₂HPO₄

0,8 g/l KH₂PO₄

1 g/l NaCl (Merck)

Denne ble ikke autoklavert, da autoklivering fører til utfellinger.

Lagret ved romtemperatur.

Burks buffer fortynnet

200 ml 5x Burks buffer

700 ml H₂O

Løsningen ble autoklavert.

10 000x stock-løsninger av salter

21 mg/ml Na₂MoO₄·2H₂O

500 mg/ml CaCl₂

150 mg/ml FeSO₄·7H₂O

Saltene ble løst i H₂O, sterilfiltrert og fryst (-20C).

Burks medium bruksløsning (BM)

900 ml/l Burks buffer fortynnet

100 ml/l 20 % fruktose, autoklaveres separat (Merck)

100 µl/l av hver av de tre 10 000x saltløsningene

Ferdig BM vil inneholde utfellinger og må blandes godt før bruk. Det vil også være vanskelig å oppdage bakterievekst i mediet, så det er ekstra viktig med forholdsregler for å unngå kontaminering. Mediet kan sterilfiltreres før bruk, men hvis dette gjøres for mange ganger vil mediet miste jernet. Dyrking i BM fungerer dårligere hvis mediet er 3-4 uker gammelt eller eldre.

Antibiotika

Alle: Løsningen ble sterilfiltrert, alikvotert og lagret ved -20 °C. Antibiotika ble tilsatt ved temperatur på under 60 °C for å unngå nedsettelse av funksjon.

Tetracyclin hydroklorid (Sigma)

Ble løst i 50 % etanol til 15mg/ml og tilsatt i medium til konsentrasjon 15 µg/ml.

Tetracyclin virker ved å binde til 30S subenheten av ribosomene og hemme proteinsyntese (Knox et al. 2011).

Ampicillin natriumsalt (Sigma)

Ble løst i H₂O til 200 mg/ml og tilsatt i medium til konsentrasjon 200 µg/ml. Virker ved å konkurrere ut enzymet transpeptidase som bakterier trenger for å bygge cellevegg. Det hemmer det tredje og siste steget av cellevegg syntesen i celledelingen og fører til cellelysis. Genet som gjør bakterier resistente ovenfor ampicillin koder for en β- laktamase. (Knox et al. 2011)

Apramycin

Ble løst i H₂O til 50 mg/ml og tilsatt i medium til konsentrasjon 50 µg/ml. Apramycin fungerer primært ved å hemme translokasjonstrinnet i proteinsyntese ved å binde til ribosomalt protein S12 som er et kontrollelement i ribosom-translokasjon (Knox et al. 2011).

Kanamycin sulfat

Ble løst i H₂O til 40 mg/ml og tilsatt i medium til konsentrasjon 40 µg/ml. Reagerer med 30s subenheten på prokaryote ribosomer og induserer feil i translasjon (Knox et al. 2011).

Spectinomycin hydrochloride

Ble løst i H₂O til 20 mg/ml og tilsatt i medium til konsentrasjon 20 µg/ml. Reagerer med 30s subenheten på prokaryote ribosomer og induserer feil i translasjon (Knox et al. 2011).

Nalidixinsyre

Ble løst i H₂O til 5 mg/ml og tilsatt i medium til konsentrasjon 5 µg/ml. Hemmer DNA-gyrase og topoisomerase IV som er nødvendige for å åpne dobbeltråden, samt for at dattertråden skal skilles fra den originale DNA-tråden (Knox et al. 2011).

2.3 PRIMERSEKVENSER

Primerne er designet ved hjelp av programmet CloneManagerSuite og bestilt fra Sigma Aldrich. Tabell 2.1 viser en oversikt over primere med sekvens.

Tabell 2.1 viser en oversikt over primere benyttet i denne oppgaven.

Primernavn	Primersekvens
lpdAF	ATTCCATATGAGCCAGAAGTTCGACGTGATTG
lpdAR	ATTACTAGTGCCGGGTATTGCCTTGTTGC
lpdARXho	GGCCTTGCTTGGTGAGAATC
SucAF	TAACATATGCAAGATAGCGTTATGCAGCGCATGTG
SucAR	TGCGAGAAGGCGTTAAACAG
SucBF	AGGAAGAGCCGATGAACCAG
SucBR	TAAACTAGTGTGCGGGCAGCTTGCG
SekpHM3 3051	TCCAGACGTGCGGAAGAGTG
SekvpHM3 4512C	GCACCAAGGAAGTCGTCATC
SekpHM3 4426	ACAGGTCGCGTGGATTCTTG
sekpHM8 896C	TGGCCGTCAATGGTCAGGTC
Avin13880F	GAGTGACCATATGACGGGTGAGCAAACGGAACG
Avin13880R	ATTACTAGTCGATGCCGACCCTGAAGTG
Pmsekv	AAGAAGCGGATACAGGAGTG
M13F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA

2.4 PLASMIDER OG BAKTERIESTAMMER

En oversikt over plasmider og bakteriestammer som er benyttet i oppgaven kan sees i Tabell 2.1. Kart over plasmidene benyttet i oppgaven finnes i vedlegg F.

Tabell 2.2 viser en oversikt over plasmider og bakteriestammer benyttet i oppgaven

Beskrivelse		Kilde
Stammer		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Stamme brukt til transformering, lacZ Δ M15, blå/hvit selektering	(Hanahan 1983)
S17.1 λ <i>pir</i>	Stamme brukt til transformering/konjugering, har λ <i>pir</i> gen og RP4-overføringsfunksjon	(Simon et al. 1983)
<i>A. vinelandii</i>		
ATTC 13705 (UW)	<i>AlgU</i> -mutant, ikke-mukoid, brukt som referanse i screen	(Bush & Wilson 1959)
MucA11	Nal ^r , Km ^r , <i>MucA</i> ⁻ høygradig alginatprodusent, brukt som referanse i screen	(Espín, ikke publisert)
ATCC 12518Tc	Tc ^r , utgangsstamme for mutant-bibliotek	(Mærk et al. manuskript)
20A6	ATTC 12518TcAvin29770:: <i>TnCAM140</i> , Tc ^r , Sp ^r ,	(Mærk et al. manuskript)
21C3T	ATTC 12518TcAvin13880:: <i>TnCAM140</i> , Tc ^r , Sp ^r ,	(Mærk et al. manuskript)
20A6:: <i>TnM</i> H10	20A6 med <i>lpdA</i> underlagt pm-promotor satt inn med <i>Tn5</i> -minitransposon fra pMH10, Tc ^r , Sp ^r , Apr ^r	Denne oppgaven
20A6:: <i>TnM</i> H11	20A6 med <i>sucA/sucB</i> underlagt pm-promotor satt inn med <i>Tn5</i> -minitransposon fra pMH11, Tc ^r , Sp ^r , Apr ^r ,	Denne oppgaven
20A6:: <i>TnM</i> H12	20A6 med <i>sucA/sucB/lpdA</i> underlagt pm-promotor satt inn med <i>Tn5</i> -minitransposon fra pMH10, Tc ^r , Sp ^r , Apr ^r ,	Denne oppgaven
21C3T:: <i>TnM</i> H5	21C3T med <i>Avin13880</i> underlagt pm-promotor satt inn med <i>Tn5</i> -minitransposon fra pMH5, Tc ^r , Sp ^r , Apr ^r ,	Denne oppgaven

Plasmider

pUC128	ColE1basert kloningsvektor, Amp ^r , høykopitall, <i>lacZα</i> for blå/hvit seleksjon	(Keen et al. 1988)
pHE278	Apr ^r , Tn5-minitransposon, lavkopitall	Helga Ertesvåg, ikke publisert
pYQ2	Apr ^r , lavkopitall	Yi-Qian Sun, ikke publisert
pYQ3	Apr ^r , lavkopitall	Yi-Qian Sun, ikke publisert
pMH13	Derivat av pHE278 og pYQ3, Tn5-minitransposon lavkopitall, Apr ^r , pm-promotor indusert av m-toluat	Denne oppgaven
pMH1	Derivat av pUC128 med PCR-amplifisert <i>Avin13880</i> , Amp ^r ,	Denne oppgaven
pMH2	Derivat av pUC128 med PCR-amplifisert <i>sucA</i> , Amp ^r ,	Denne oppgaven
pMH3	Derivat av pUC128 med PCR-amplifisert <i>lpdA</i> , Amp ^r ,	Denne oppgaven
pMH4	Derivat av pUC128 PCR-amplifisert <i>lpdA</i> og <i>sucB</i> , Amp ^r ,	Denne oppgaven
pMH5	Derivat av pMH13 med NdeI-NotI <i>Avin13880</i> -fragment	Denne oppgaven
pMH6	Derivat av pYQ2 med NdeI- Nsil <i>sucA</i> -fragment	Denne oppgaven
pMH7	<i>sucA+sucB</i> -derivat av pMH6 med Nsil- Spel <i>sucB</i> -fragment fra pMH3	Denne oppgaven
pMH8	<i>lpdA+sucB</i> -derivat av pMH4 med BstBi- Spel <i>sucB</i> -fragment fra pMH3	Denne oppgaven
pMH9	<i>sucB-sucA</i> -derivat av pMH7 med Nsil-Spel <i>sucB</i> -fragment fra pMH8	Denne oppgaven
pMH10	<i>lpdA</i> -derivat av pMH13 med NdeI-NotI <i>lpdA</i> -fragment fra pMH3	Denne oppgaven
pMH11	<i>sucA+sucB</i> -derivat av pMH10 med NdeI-Spel <i>sucA+sucB</i> -fragment fra pMH7	Denne oppgaven
pMH12	<i>sucA+sucB+lpdA</i> -derivat av pMH10 med NdeI-Spel <i>sucA+sucB</i> -fragment fra pMH9	Denne oppgaven

2.5 METODER

2.5.1 OPPDYR KING OG NEDFRYSING AV BAKTERIESTAMMER.

Levende bakteriestammer ble frosset ned ved å tilsette 60% glycerol til en godt utvokst flytende bakteriekultur, til endelig konsentrasjon 15% glycerol. Dette ble blandet godt og oppbevart på -80°C. Når stammene skulle dyrkes opp igjen ble de strøket ut på agarplater (RA1 eller Burks for *A. vinelandii* og LA for *E. coli*) og inkubert ved egnet temperatur (30°C for *A. vinelandii* og 37°C for *E. coli*) til de dannet synlige kolonier. Koloniene ble så inokulert i flytende medium eller videre på plater.

2.5.2 DNA-ISOLERING

I oppgaven er det brukt to forskjellige metoder for å rense ut kromosomalt DNA, den ene ble brukt i den tidlige delen av oppgaven, den andre ble brukt i den senere delen av oppgaven. Den siste er en nyere metode som er enklere å utføre og skal gi bedre kvalitet samt høyere konsentrasjon på det rensede DNAet. Virkningsmetoder for noen trinn/kjemikalier som er felles for flere av DNA-rensemetodene er beskrevet her;

EDTA brukes i rensing og oppbevaringsbuffer for DNA siden den har høy affinitet for divalente ioner som Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} . Disse er kofaktorer for active enzymer, blant annet DNAaser som bryter ned DNA-molekyler. EDTA binder kofaktorer og hindrer dermed nedbryting av DNA.

Tris-buffer bevarer en stabil pH, samt binder lipopolysakkarider i cellemembranen og gjør denne mer gjennomtrengelig. Denne effekten forsterkes av EDTA.

SDS (natrium-dodecyl-sulfat) er en anionisk detergent som ødelegger cellemembranen og destabiliserer hydrofobe interaksjoner som holder makromolekyler (proteiner og DNA) stabile.

RNase degraderer RNA som frigis i lyseringstrinnet.

Chaotropiske stoffer destabiliserer hydrogen-bindinger, van der Waals krefter og hydrofobiske interaksjoner. Dette betyr at proteiner (og nukleaser) brytes ned, DNA mister sin løselighet i vann og øker affinitet for binding til silika i kolonne-membran. Etanol, SDS, MgCl₂ og guanidium-HCl er eksempler på chaotropiske stoffer.

Isopropanol-felling av DNA; DNA løst i væske kan felles ut med isopropanol etter følgende prinsipp; DNA løses ikke i alkohol og vil derfor felle ut, salter vil i stor grad være løselig i alkohol. Ved sentrifugering vil DNA danne en pellet, mens salter blir igjen i supernatanten. DNA-pelleten vaskes med 70 % etanol for å fjerne siste rest av salter.

Isolering av genomisk DNA fra *A. vinelandii* med Bacterial Genomic DNA Purification Kit fra EdgeBio

Klargjøring av prøve:

Celler fra 10 ml godt utvokst kultur ble høstet ved sentrifugering ved 5000 rpm i 10 min. Cellene ble vasket ved å resuspendere pelleten i 10 ml 0,9% NaCl, 10 mM EDTA (pH 8,0) og spinne ned cellene ved sentrifugering 5000 rpm 10 min, supernatanten ble så fjernet.

Lysering/utfelling av proteiner vha Advamaxperler:

Pelleten ble resuspendert i 400 µl spheroblastbuffer ved kraftig pipettering og inkubert ved 37 C i 1 time. Spheroblastbuffer inneholder EDTA, Tris-HCl, NaCl, RNaseA, lysozym og sukrose. Lysozym bryter ned cellemembranen. 100 µl 10 % SDS og 100 µl 5M NaCl ble tilsatt for lysering av celler, løsningen blandet og inkubert ved 65 C i 10 min. 100 µl vortexede advamaxperler ble tilsatt sammen med 100 µl ekstraksjonsløsning (0,72 M MgCl₂).

Dette ble blandet og inkubert ved 30 °C (rysteinkubator) i 1,5 time. Blandingen ble sentrifugert ved 13000 rpm, 4 °C i 20 minutter, supernatanten inneholdende DNA ble overført til et nytt rør.

Utfelling av genomisk DNA med isopropanol:

750 µl isopropanol ble tilsatt og dette ble blandet ved å vende på røret til DNA felte ut. Blandingen ble sentrifugert ved 13 000 rpm i 25 min. Pelleten ble vasket med 300 µl 70 % etanol, og sentrifugert ved 13 000 rpm i 10 min. All supernatant ble fjernet og pelleten lufttørket i 1 time. 25 µl TE-buffer (pH 8,0) ble tilsatt og røret plassert i rysteinkubator, 37 °C over natt. Om pelleten fortsatt var uløst ble det tilsatt mer TE-buffer. Isolert DNA ble oppbevart ved -20 °C.

DNA-rensing med MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit fra EPICENTRE™

Preparering av prøve, lysering av celler og utfelling av proteiner:

Cellene ble pelletert ved sentrifugering og supernatanten fjernet, ca. 25 µl væske ble igjen. Cellepelleten ble vortexet 10 sek. for resuspendering. 300 µl Tissue and Cell Lysis Solution (inneholder SDS) med 1 µl Proteinase K ble tilsatt pelleten. Proteinase K er en serin protease som kan bryte ned keratin (derav nevnet), den bryter peptidbindinger og inaktiverer DNAsen og RNAsen. Siden ble pelleten inkubert ved 65 °C i 15 min (vortexet hvert 5. min). Prøvene ble så avkjølt til 37 °C og tilsatt 1 µl 5 µg/µl RNase A, dette ble blandet godt. Prøven ble så inkubert ved 37 °C i 30 minutter og siden satt på is 3-5 minutter. 150 µl MPC Protein Precipitation Reagent (en 5 M ammonium acetat-løsning) ble tilsatt til 300µl av lysert prøve og prøven ble vortexet i 10 sekunder. Proteiner (rester av cellene) felles ut og ble pelletert ved sentrifugering i 10 minutter ved 4 °C. Dersom pelleten var klar, liten eller løs ble det tilsatt 25µl MPC Protein Precipitation Reagent og sentrifugert på nytt. Supernatanten ble overført til et rent eppendorfrør og pelleten kastet.

Utfelling av genomisk DNA med isopropanol:

500 µl isopropanol ble tilsatt supernatanten. Røret ble vendt opp/ned 30-40 ganger for å felle ut DNA. DNAet ble så pelletert ved å sentrifugere 10 minutter ved 4 °C. Isopropanolen ble fjernet uten å ødelegge pelleten som så ble rensset to ganger med 70% etanol. Alle rester av etanol ble fjernet og DNAet resuspendert i TE-buffer og oppbevart ved -20 °C.

Isolering av plasmid-DNA med Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System fra Promega

Ved isolering av plasmid-DNA ble det benyttet en alkalisk lyseringsmetode som først ble beskrevet av Birnboim og Doly (1979). Metoden baserer seg på at DNA og proteiner denatureres ved alkalisk pH (pH 12-12,5). Dobbeltrådene i DNA skiller lag og når pH senkes igjen, vil lange DNA-tråder og proteiner ikke klare å finne tilbake til sin opprinnelige form. Sirkulært plasmid-DNA er kort og vil renaturere greit. (Birnboim & Doly 1979). Hovedsakelig forskjell på isolering av plasmid-DNA og kromosomalt DNA er trinnet som ved høy pH bryter ned kromosomalt DNA og at chaotropisk salt (her; guanidin HCl) som bidrar til at DNA binder seg i kolonna, tilsettes etter at cellene er lysert og store molekyler (kromosomalt DNA og proteiner) er fjernet. I denne oppgaven er kitet Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System fra Promega benyttet.

Preparering av prøve/ lysering av celler/utfelling av gen. DNA og proteiner:

E. coli med ønsket plasmid ble dyrket opp i 3 ml LB (med selekterende antibiotika) i 13 ml rør 16 timer (over natt) i 37 °C. 1,5 ml cellekultur ble sentrifugert, supernatanten fjernet og pelleten resuspender med 250 µl Cell Resuspension Solution som inneholder EDTA og RNase. 250 µl Cell Lysis Solution (inneholder SDS og NaOH) ble tilsatt hver prøve og røret vendt 4 ganger opp/ned for å blande. Deretter tilførtes 10 ml Alkaline Protease Solution i hver prøve, røret ble vendt 4 ganger for å blande og inkubert 5 min i romtemperatur.

Alkalisk protease har et virkningsoptimum på pH 9 og degraderer proteiner som kan influere på plasmid-DNAet. 350 µl Neutralization Solution ble tilført hver prøve, røret vendt 4 ganger for å blande og sentrifugert på topphastighet 10 min i romtemperatur. Nøytraliseringsløsningen inneholder eddiksyre og kaliumacetat som senker pH, slik at kromosomalt DNA renatureres, men danner et uløselig kompleks og felles ut sammen med protein-SDS komplekser og RNA med høy molekylvekt. Den inneholder også guanidin HCl (chaotropisk salt).

Isolering av DNA:

En Spin kolonne ble plassert i et oppsamlingsrør og supernatanten helt over i kolonna. Prøvene ble sentrifugert 1 min i romtemperatur. DNAet binder seg til en silikabasert resin-membran i kolonna ved tilstedeværelse av guanidin HCl (chaotropisk salt) som gjør at DNA mister sine vann-bindende egenskaper og selektivt binder silika-resiner i membranen. Oppsamlingsrøret ble tømt, kolonna satt tilbake og 750 µl Wash Solution ble tilsatt hver kolonne. Prøven ble sentrifugert på topphastighet 1 min i romtemperatur oppsamlingsrøret tømt og kolonna satt tilbake igjen. Vasketrinnet ble repetert, med 250 µl Wash Solution. Prøven ble sentrifugert på topphastighet 2 min i romtemperatur for å fjerne rester av vaskeløsning.

Vaskeløsningen inneholder EDTA, etanol og kaliumacetat og hensikten med trinnet er å fjerne eventuelle kontaminanter som salter og proteinrester. Etanol hindrer at DNA løser seg i vaskeløsningen. For å eluere plasmid-DNA ble kolonna ble så overført til et sterilt eppendorfrør og tilsatt 100 µl nuclease-fritt H₂O. Vannet løser DNA-et fra membranen. Prøven ble sentrifugert på topphastighet 1 min i romtemperatur. Kolonnen ble fjernet og eluert plasmid-DNA oppbevart ved -20 °C eller lavere.

Lavkopitalls-plasmider:

Fra lavkopitalls-plasmider ble samme protokoll som over fulgt, bortsett fra at det ble tatt ut 2x 1,5 ml kultur. Etter nøytraliseringsstrinnet ble først innholdet fra det ene røret overført til kolonna, sentrifugert gjennom og deretter innholdet fra det andre røret. Etter dette ble igjen protokollen over fulgt.

2.5.3 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

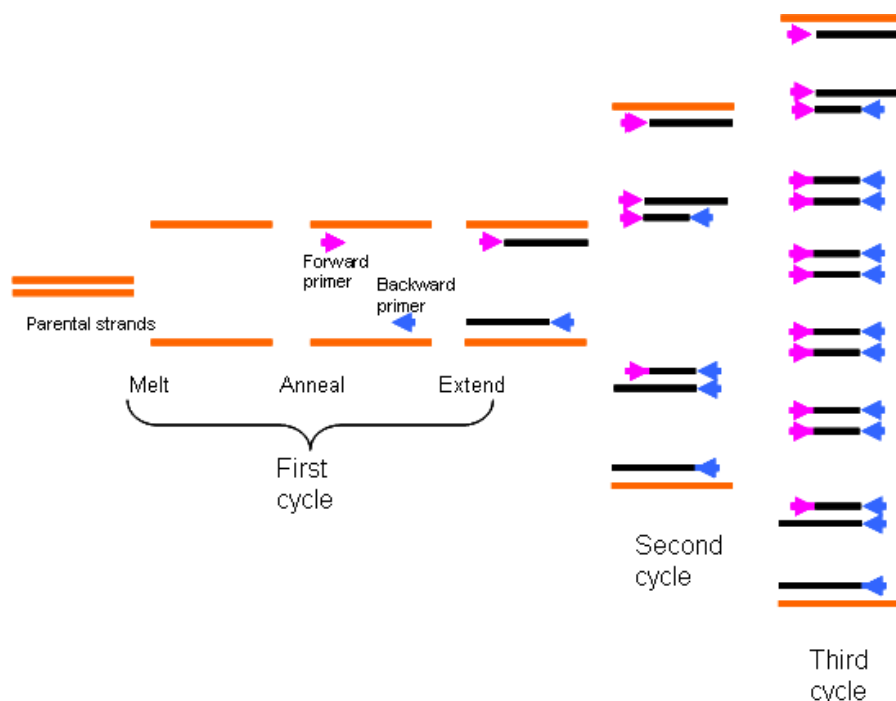
Prinsippet for PCR var det den norske biokjemikeren Kjell Kleppe som utviklet på 60-tallet (Kleppe et al. 1971), men bla. på grunn av at det ikke var noen termostabil DNA-polymerase tilgjengelig ble arbeidet med metoden ikke videreutviklet til den vi kjenner i dag. Metoden var tidkrevende da ny DNA-polymerase måtte tilsettes mellom hvert denatureringstrinn. Kary Mullis videreutviklet metoden og introduserte en termostabil DNA-polymerase. Dette var Taq DNA-polymerase fra bakterien *Thermophilus aquaticus* som ble oppdaget i varme kilder i Yellowstone nasjonalpark, dette også i 60-årene. Taq polymerase har et temperaturoptimum på ca 72 °C. Mullis fikk i 1993 Nobelprisen i kjemi for sitt arbeide med PCR-metoden. (Reece 2004)

PCR-metoden gjør at man kan starte med en liten mengde DNA og mangedoble antallet av et spesifikt DNA-fragment i løpet av kort tid. For å utføre PCR trenger man; et templat-DNA som inneholder sekvensen man ønsker å kopiere opp, og i tillegg; primere, deoxynukleotid trifosfater (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), DNA polymerase, magnesium og en buffer som sørger for optimale forhold hva gjelder saltinnhold og pH. Det er nødvendig å vite nukleotidsekvensen til det DNAet man ønsker oppkopierte (i alle fall sekvensen på endene slik at man kan designe passende primere til fragmentet en ønsker oppkopierte).

Primere er syntetisk fremstilte oligonukleotider (vanligvis 17-30 nt lange) som flankerer målsekvensen, disse konstrueres i et dataprogram og det må tas hensyn til flere faktorer (spesifisitet, GC-innhold, mulighet for selvligering og templatligering). Primerne må ligge på hver sin tråd av DNA. Magnesium (oftest i form av $MgCl_2$) må tilsettes for at polymerasen skal virke, men dersom konsentrasjonen blir for høy vil spesifisiteten av reaksjonen gå ned. (Reece 2004)

Prosessen er eksponensiell og for hver gjennomføring av de tre trinnene (Figur 2.1) vil man få to kopier av templatet (kopi av kopi osv.).

Templat-DNAet denatureres ved høy temperatur (>90 °C) til enkelt-tråder, temperaturen senkes slik at primerne kan binde seg med maksimal spesifisitet (denne temperaturen vil være avhengig av bl.a. GC-innholdet i primerne). Temperaturen i annealingsfasen ligger oftest mellom 45 -60 °C. Forlengingsfasen; DNA polymerase bindes til hver av de frie 3' endene av primerne og syntetiserer DNA i 5' til 3' retning. For å optimalisere er det vanlig å ha en lengre denaturering før den første syklusen og et lengre forlengingstrinn etter den siste syklusen. (Reece 2004)



Figur 2.1 viser de tre trinnene og tre sykluser av Polymerase Chain Reaction (PCR) (www.celebritygene.com)

PwoSuperYield DNAPolymerase, dNTPack fra Roche

Dette kitet er optimalisert for å gi maksimalt utbytte for DNA-fragmenter som er opp til 3 kb i lengde. Kitet baserer seg ikke på Taqpolymerase, men et rekombinant enzym; Pwo DNA polymerase og et optimalisert buffer-system. Forlengingstid er avhengig av lengden på DNA-fragmentet, anbefalt tid er ca 1 min pr kb. PCR-produkt fra denne reaksjonen kan benyttes direkte i blunt-end liggering.

Komponenter i kitet og volum brukt i PCR-reaksjoner:

μl	Ingredienser
11	H ₂ O
5	PwoSuperYield PCR Buffer 10x, m/Mg ²⁺
1	PCR Grade Nukleotide mix
0,2	av hver primer (0,3 μM)
4	GC-RICH Resolution Solution 5x.
0,2	PwoSuperYield DNA Polymerase (5 U/ μl)
2	templat DNA
20	totalt volum

Alle ingrediensene ble tilført en mikrotube på is. Det er viktig å tilsette Pwo DNA polymerase tilslutt da 3'-5' exonucleaseaktiviteten assosiert med denne i fravær av dNTPs, vil starte å bryte ned templat og primer-DNA. Mikrotuben ble satt i PCR-blokk når temperaturen var over 60 °C.

Program benyttet til PCR med PwoSuperYield DNAPolymerase:

Denaturering: 95 °C 2 min
60 sykluser: Denaturering: 95 °C 15 sek
 Annealing: Varierende °C 30 sek
 Forlenging: 72 °C ca 1 min/kb
Forlenging: 72 °C 7 min
Pause: 4 °C

Alle PCR ble i utgangspunktet kjørt ved samme temperatur på annealingen, reaksjonene som ikke gav produkt eller gav uspesifikke produkter, ble deretter kjørt på nytt med varierende temperatur og øket forlengingstid.

Expand Long Range PCR System fra Roche

Ble benyttet ved test for renhet i stammene. Dette er et PCR-kit som er optimalisert for å kopiere opp DNA-fragmenter som er over 5 kb lange.

Komponenter i kitet og volum brukt i PCR-reaksjoner:

μl	Ingredienser
16,7	H ₂ O
1	dNTP mix (10 mM av hver dNTP)
1	av hver primer (0,3 μM)
1	templat DNA
10	Expand Long Range buffer 5x m/ 12,5 mM MgCl ₂
0,3	Expand Long Range enzym mix
20	totalt volum

Løsningene ble blandet i PCR-rør på is, enzym-mixen tilsatt sist og rørene ble satt i PCR-blokk når temperaturen var over 60 °C.

Program benyttet til Expand Long Range PCR:

Denaturering:	94 °C 2 min
10 sykluser:	Denaturering: 94 °C 10 sek
	Annealing: 65 °C 30 sek
	Forlenging: 68 °C 5 min
20 sykluser:	Denaturering: 94 °C 15 sek
	Annealing: 65 °C 30 sek
	Forlenging: 68 °C 5 min + 20 sek for hver syklus
Forlenging:	68 °C 7 min
Pause:	4 °C

2.5.4 SEKVENSERING

Sekvenseringsmetoden benyttet i denne oppgaven baserer seg på et prinsipp som ble utviklet av Sanger et. al. og kalles Sanger-metoden (Sanger et al. 1977). Sekvensering foregår ved at man tilsetter merkede dideoxynucleotider (ddNTP) sammen med deoxyribonukleotider (dNTP) i forholdet 1:10, en må også kun benytte en primer i hver reaksjon. Deoxyribonukleotidene (ddNTP) vil, som i PCR, danne komplementære DNA-strenger. I ddNTP er det derimot byttet ut en hydroksylgruppe i 3' ende med den konsekvensen at neste nukleotid ikke kan binde seg. Dette fører til at vi får en rekke DNA-fragmenter i varierende lengder. Når reaksjonen har gått en stund vil vi få fragmenter som representerer alle mulige endepunkter (basene) i templat-DNAet.

Tidligere ble reaksjonene for de fire basene gjort hver for seg og analysert ved hjelp av en elektroforese-gel i fire brønner ved siden av hverandre. I dag er ddNTPene merket med fluorescens, en farge for hver av basene A, T, G og C. Ved å separere fragmentene gjennom en gel i et kapillærrør og avlese fargene etter hvert som fragmentene kommer ut vil vi kunne se hvilken rekkefølge basene ligger i. (Reece 2004)

I denne oppgaven ble BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit fra Applied Biosystems benyttet.

BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit fra Applied Biosystems

Dette kitet er basert på Sanger-metoden og utviklet for å gi optimale baseavlesninger ved bruk av sekvensatorer som ABI PRISM® 3-serien. BigDye Terminator Ready-reactionMix v1.1 inneholder det som trengs til reaksjonen og det må bare tilsettes primer, buffer og templat-DNA. Sekvensene i denne oppgaven er sekvensert ved institutt for Biologi, NTNU.

Ingredienser og volum brukt i reaksjon:

Mengde	Ingrediens
0,5 µl	Primer (3,2 pmol/µl)
2 µl	sequencing buffer
8 µl	BigDye Terminator Ready-reactionMix v1.1
150-300 ng	templat DNA
Til tot v 20µl	H2O
20	totalt volum

Program benyttet til sekvensering:

Denaturering: 95 °C 4 min
60 sykluser: Denaturering: 95 °C 30 sek
 Annealing: 52 °C 30 sek
 Forlenging: 60 °C 4 min
Pause: 4 °C

Prøvene ble oppbevart på is eller -20 til felling/rensing.

Felling av sekvenseringsprodukt:

I eppendorfrør ble det tilsatt 2 µl 3 M NaAcetat (pH 5,2), 50 µl 96 % etanol og sekvenseringsprodukt. Mixen ble blandet ved vortexing, inkubert ved romtemperatur i 15 minutter og sentrifugert 20 minutter ved 13 000 rpm. Alkoholene får DNA til å felle ut. Frie nukleotider, salter og annet vil være løst i supernatanten og vaskes ut. Supernatanten ble fjernet, pelleten vasket med 250 µl 70 % etanol, sentrifugert 5 min ved 13 000 rpm og supernatanten fjernet. Dette ble gjentatt for å få et ekstra rent produkt. Pelleten ble tørket godt evt. over natt og lagret ved -20 til sekvensering.

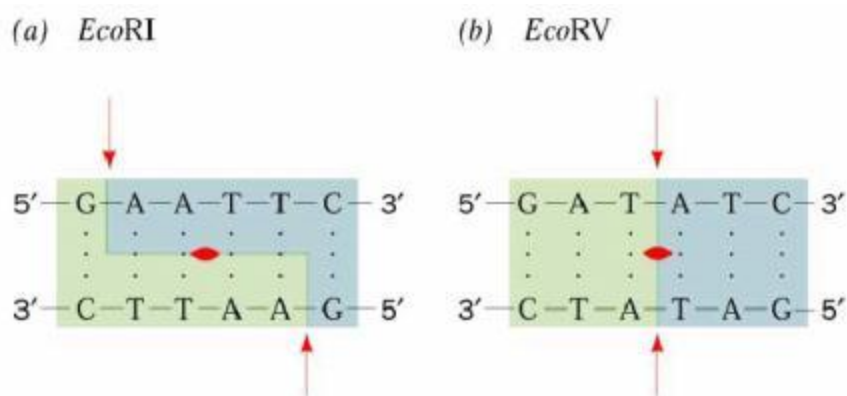
2.5.5 RESTRIKSJONENZYMER

Restriksjonsenzymmer (-endonukleaser) finnes i bakterier og fungerer blant annet som et forsvar mot fremmed DNA. Fremmed DNA kuttet ved gjenkjenningsseter (baserekkefølger) som er spesifikke for hvert enkelt enzym. Mg^{2+} er en nødvendig kofaktor for binding til og kutting av DNA. Bakteriene beskytter eget DNA ved ikke å ha sekvensen eller ved metylering. Gjenkjenningssetene er ofte palindromer. Et enzym med en kort gjenkjenningsssekvens vil kutte langt oftere enn et enzym med en lengre gjenkjenningsssekvens. En gjenkjenningsssekvens på 4 baser vil si at enzymet kutter ved ca hver 4^4 base mot ca hver 4^{12} base for et enzym med en gjenkjenningsssekvens på 12 baser (ved tilnærmet 50 % GC-andel). Det vanligste er en gjenkjenningsssekvens på mellom 4 og 8 baser. (Pingoud & Jeltsch 2001; Reece 2004)

Restriksjonsenzymmer finnes i tre hovedtyper: type I består av tre subenheter som kutter DNA litt tilfeldig opptil flere kb unna gjenkjenningssetet for enzymet. Enzymet kan også modifisere DNA; dersom den ene strengen i gjenkjenningssetet er metylert, vil ATP stimulere til metylering av den andre strengen. Type III består av to enzymer som deler en felles subenhet, disse gjenkjenner to speilvendte symetriske sekvenser og kutter den ene DNA-strengen 24-26 bp på 3'siden av bindingssetet.

Restriksjonsenzymmer av type II er de som hovedsakelig benyttes i genetisk manipulering. Disse kutter DNA i eller nær gjenkjenningssetet, og kutter alltid det samme setet og på samme måte. Gjenkjenningssetet er oftest palindromisk som betyr at sekvensen er lik på begge strengene, lest i 5' til 3'-retning. Noen enzymer har samme gjenkjenningssete, men kutter tråden mellom ulike baser. Noen enzymer kutter begge trådene på samme sted slik at vi får en butt ende, andre kutter de to trådene litt forskjøvet i forhold til hverandre slik at vi får overhengende ender (Figur 2.2).

Fordelen med en butt ende er at denne kan brukes til å ligere sammen to fragmenter som ikke har kuttsetter som passer sammen. Ulempen er at ligeringen vil være mer ustabil og ukontrollerbar. Restriksjonsenzymmer som gir overhengende ender gir mer effektiv og kontrollerbar ligering. En vektor og fragmentet som skal ligeres inn kan kuttes med ulike enzymer på hver side, slik at en har kontroll med hvilken vei fragmentet settes inn.



Figur 2.2 viser: a) Kuttasetet til *EcoRI* som gir overhengende ender b) Kuttasetet til *EcoRV* som gir butte ender (Voet 2001)

Kutting med restriksjonsenzymmer:

Mengden av DNA som brukes tilpasses DNA-konsentrasjonen i prøven og ønsket konsentrasjon på ferdig kuttet DNA. Det brukes noen ganger mer enn ett restriksjonsenzym i hver reaksjon, men maksimalt 1,5 µl total enzyemmengde. De fleste restriksjonsenzymene har temperaturoptimum ved ca. 37 °C og inkuberingstid fra 1 time til over natt ble benyttet.

Ingredienser og volum brukt i reaksjon:

3-17 µl DNA

2 µl 10 X NEB buffer (New England BioLabs)

0,5 µl NEB BSA

Destillert ionefritt H₂O til 19,5 µl

0,5-1,5 µl NEB restriksjonsenzym

Kuttet DNA ble tilsatt loading-buffer og separert på 0,8 % agarosegel sammen med en DNA-standard. Gelen ble analysert visuelt og eventuelt ble fragmenter kuttet ut og rensset med QIAquick Gel Extraction Kit Protocol fra QIAGEN, metoden er beskrevet i kap 2.5.7.

2.5.6 GEL-ELEKTROFORESE

DNA som kuttet med et restriksjonsenzym vil gi fragmenter av ulik lengde. Fragmentene kan separeres i henhold til størrelse ved hjelp av gel-elektroforese. DNA-fragmentene tilsettes gelen i små brønner, og elektrisk strøm settes på slik at de negativt ladede DNA-fragmentene vandrer fra den negative polen (katoden) mot den positive polen (anoden). Agarose løst i buffer vil danne en gel med større og mindre hull, høyere konsentrasjonen av agarose vil gjøre gelen tettere. De minste fragmentene vil møte minst motstand og dermed vandre forttere gjennom gelen enn de større DNA-fragmentene. Ved bruk av en DNA-molekylvektstandard er det mulig å bestemme størrelsen på de ulike fragmentene.

I denne oppgaven er det brukt 0,8 % agarose løst i 1xTAE buffer og prøvene tilsettes loading dye før de settes på gelen. Ved oppstart på denne oppgaven ble gelen med de separerte DNA-fragmentene farget med Etidiumbromid (EtBr), avfarget og det ble så tatt bilde av gelen. EtBr binder seg til DNA og har en fluorescerende effekt slik at DNA kan synliggjøres i UV-lys. EtBr er et mutagen og ble byttet ut med et annet fargestoff som er mindre farlig og i tillegg mer sensitivt.

I siste del av oppgaven ble agarosegelen tilsatt GelRed™ fra Biotium. Både 50 og 75 µl til 1000 ml 0,8 % agarose (løst i 1xTAE) ble brukt. GelRed er større molekyler som ikke så lett går inn i celler (og dermed er mindre skadelig), men størrelsen gjør også at den hemmer vandring på gel for DNA-prøver.

Tilsetning av fargestoff direkte i gel gjør at man slipper farging/avfargingstrinnet som brukes ved EtBr-farging (for å minske spredningen av EtBr i omgivelsene). I noen supplerende gel-elektroforeser er GelGreen™ fra Biotium benyttet.

I oppgaven er det benyttet 4 forskjellige DNA- standarder, disse er markert i figurtekst med A, B, C og D. A) Generuler™ 1kb plus DNA ladder. B) Generuler™ DNA ladder mix. C) 1 kb DNA ladder. D) Generuler™ 1 kb DNA ladder. Oversikt over standarder finnes i vedlegg D.

2.5.7 RENSING AV DNA FRA PCR OG AGAROSEGEL

Prinsippet for DNA-rensesprosedyrene er den samme som beskrevet for isolering av genomisk DNA; DNA binder til en silikamembran ved en pH på $\leq 7,5$ og tilstedeværelse av chaotropiske salter (buffer QG/PBI sørger for dette).

Kontaminanter som frie nukleotider, salter, enzymer, primere, agarose, fargestoffer (fra gelkjøring), oljer og vaskeløsninger bindes ikke i membranen og skylles gjennom kolonna. DNA elueres ved å tilsette buffer med lavt saltinnhold og pH på >7 . Alle sentrifugeringstrinn er på 13000 rpm i vanlig bordsentrifuge. Renset DNA oppbevares på -20°C .

QIAquick PCR Purifying Kit fra QIAGEN

PBI-buffer tilsettes i PCR-reaksjonsmixen i forhold 5+1. PBI-bufferen har en fargeindikator som gir gul farge på løsningen ved pH på $\leq 7,5$. Ved for høy pH ble løsningen orange eller lilla og det ble eventuelt tilsatt 3 M NaAcetat pH 5,0 for å senke pH.

En QIAquick kolonne ble plassert i et 2 ml oppsamlingsrør. Prøven ble overført til denne og sentrifugert i ett minutt. Oppsamlingsrøret ble tømt og kolonnen satt tilbake. For å rense kolonnen ble det tilsatt 750 μl PE-buffer (inneholder etanol), og sentrifugert i ett minutt.

Oppsamlingsrøret ble tømt og kolonnen satt tilbake og sentrifugert i ett minutt. Kolonnen ble satt i et rent eppendorfrør. For å eluere DNA ble kolonnen tilsatt 50 µl 5 % ligasebuffer. For å oppnå høyere DNA-konsentrasjon ble det noen ganger brukt 30 µl 5 % ligasebuffer, dette ble da tilsatt kolonnen og en ventet 1-2 minutter før sentrifugering i 1 minutt.

QIAquick Gel Extraction Kit Protocol fra QIAGEN

Etter elektroforese ble de ønskede DNA-fragmentene kuttet ut av gelen med en ren skalpell, overflødig gel ble trimmet bort. Gelen ble veiet og det ble tilsatt buffer QG i forholdet 3 + 1 til gelvolumet (100mg gel ≈ 100 µl, dvs. 300 µl QG til 100 mg gel). Buffer QG har en fargeindikator som gir gul farge på løsningen ved pH på ≤ 7,5. Ved for høy pH ble løsningen orange eller lilla og det ble eventuelt tilsatt 3 M NaAcetat pH 5,0 for å senke pH.

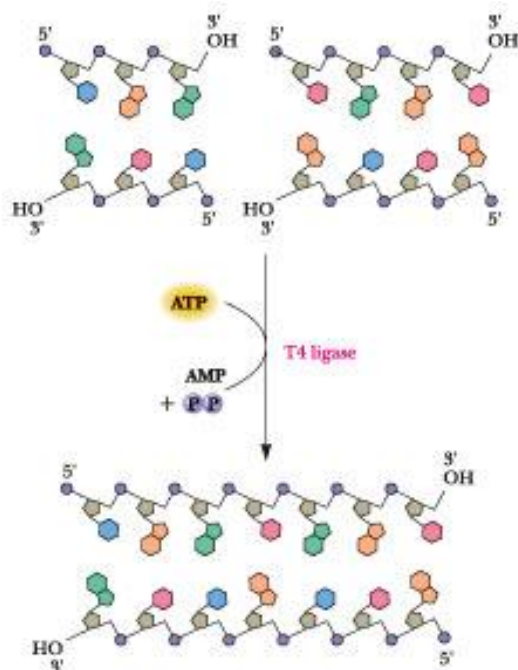
Gel og buffer ble inkubert ved 50 °C i til gelen var fullstendig oppløst (ca 10 min). Blandingen ble vortexet hver 2-3 minutt for å hjelpe til med å løse opp gelen. Når gelen var fullstendig oppløst, ble det sjekket at løsningen fortsatt var gul.

Isopropanol (tilsvarende 1x gelvolumet), ble tilsatt og løsningen blandet. Dette trinnet øker konsentrasjonen av DNA-fragmenter < 500 bp og > 4 kb. For DNA-fragmenter mellom 500 bp og 4 kb har tilsetning av isopropanol ingen betydning for konsentrasjonen. En QIAquick kolonne ble plassert i et 2 ml oppsamlingsrør. Prøven ble overført til kolonnen og sentrifugert 1 minutt. Oppsamlingsrøret ble tømt og kolonnen satt tilbake igjen. Det ble tilsatt 500µl Buffer QG og sentrifugert i ett minutt. Dette trinnet skal fjerne alle rester av agarose. For å rense kolonnen ble det tilsatt 750 µl PE-buffer (med etanol) og sentrifugert i ett min. For å fjerne væskerester ble oppsamlingsrøret tømt, kolonnen satt tilbake og sentrifugert ett minutt til. Dersom DNA skulle brukes til salt-sensitive reaksjoner som butt-ende ligering eller direkte sekvensering, ble kolonnen stående 2-5 minutt etter tilsetning av PE-buffer, før sentrifugering.

For eluering av DNA ble QIAquick kolonnen satt i et rent eppendorfrør og det ble tilsatt 50 μ l 5 % ligasebuffer. For høyere DNA-konsentrasjon ble det noen ganger brukt 30 μ l, dette ble tilsatt og kolonnen ble stående 1-2 minutter før sentrifugering.

2.5.8 LIGERING

Ligering av DNA-fragmenter gjøres ved hjelp av en DNA ligase. I cellen er DNA-ligasens rolle å reparere brudd i DNA. Brudd i DNA oppstår ved replikasjon (Okazaki-fragmenter), endogene skader (eksempelvis replikasjonsfeil) og eksogene skader (eksempelvis grunnet stråling eller kjemikalier). Ligasene aktiveres ved at det finnes en tilgjengelig 3'-OH-ende og en 5'-fosfat-ende. Det finnes forskjellige typer ligaser, noen kan kun ligere sammen fragmenter med overlappende ender og noen kan også lime sammen butte ender. T4 DNA ligase (Figur 2.3) som er benyttet i denne oppgaven har denne siste egenskapen, den krever i tillegg ATP som kosubstrat. (Reece 2004)



Figur 2.3 Ligering med T4 DNA ligase (Garrett & Grisham 2007).

Lav konsentrasjon av DNA i reaksjonsløsningen øker sannsynligheten for at to ender av det samme DNA-fragmentet liggeres sammen, dette kalles selvligering eller intramolekylær ligering. For å unngå dette problemet kan en bruke restriksjonsenzymmer som kutter DNA-fragmentene slik at en får overhengende ender. På denne måten kan en designe fragment-endene slik at de kun liggeres til det ønskede resultatet. Ved ligering av to fragmenter, eksempelvis vektor og insert bør det molare forholdet være mellom 1:3 og 3:1 ved overhengende ender. Ved butte ender bør forholdet være mellom 2:1 og 6:1.

Ligering med T4 DNA ligase:

Kuttet og rensset DNA fra plasmid og insert, med totalvolum på 17 µl, ble blandet i et PCR-rør (200 µl). Her ble det benyttet ca 3 x mer (molart) insert enn vektor. DNA-blandingen ble tilsatt 2 µl 10 X ligasebuffer og 1 µl ligase. Rørene ble satt på is i romtemperatur over natt.

2.5.9 KJEMISK TRANSFORMERING

Transformering er opptak av fritt DNA fra ekstracellulært miljø som fører til en endret genotype hos cellen. Prinsippet ble først oppdaget av Frederick Griffith i 1928, da han arbeidet med en patogen og en nonpatogen stamme *Streptococcus pneumoniae*. Han oppdaget at mus som ble infisert med en blanding av nonpatogen stamme og varmedrept patogen stamme, i flere tilfeller døde. Mus infisert bare med nonpatogent virus eller varmedrept patogent virus, døde ikke. Fenomenet ble undersøkt nærmere av Oswald Avery et al. (1944), de fant ut at komponenten som overførte genotypen var deoxyribonucleinsyrer (DNA). Hershey og Chase (1952) bekreftet dette funnet med sine undersøkelser der de undersøkte hva bakteriofagen T2 overførte til *E. coli*. De merket bakteriofagens DNA og proteiner med henholdsvis radioaktivt fosfor (^{32}P) og sulfur (^{35}S) og lot bakteriofagen infisere to cellekulturer.

Etter infisering ble celler og bakteriofagens skall separert og målinger av kulturene viste at ^{32}P -merket DNA ble overført til *E. coli* og ikke ^{35}S -merket protein.

Noen bakterier er naturlig kompetente, dvs. de kan ta opp nakent ekstracellulært DNA (som *S. pneumoniae*), andre (som *E. coli*) må behandles for å bli det. Mandel og Higa (1970) oppdaget at kjemisk behandling av *E. coli* med CaCl_2 gjorde cellene kompetente til å ta opp nakent bakteriofag-DNA. Cohen et al. (1972) var de første til å transformere plasmider inn i CaCl_2 -behandlede *E. coli*.

Prinsippet bak CaCl_2 -behandlingen er fortsatt ikke kjent, men det antas at divalente kationer affiserer cellemembranen og kanskje binder DNA til overflaten av cellen. CaCl_2 -behandlingen ble utviklet og undersøkt videre av Hanahan (1983), som blant annet viste at tilsetning av flere divalente kationer (eksempelvis Rb^{2+} , Mn^{2+} i tillegg til Ca^{2+}) og kuldebehandling øker effektiviteten av transformering. Etter kjemisk behandling og tilsetning av DNA som skal transformeres gis cellene et varmesjokk som antas å inducere opptak av DNA på overflaten av cellen (Figur 2.4). Kort sirkulært DNA vil tas opp i stor grad, lengre og/eller lineært DNA tas ikke opp i cella i særlig grad.



Figur 2.4 Kjemisk transformering med CaCl_2 og varmesjokk (Reece 2004).

Tillaging av RbCl -kompetente celler:

1 ml overnatts kultur av ønsket stamme (*E. coli* DH 5 α eller *E. coli* S17.1 λ pir) inokuler i 100 ml Psi-medium. Cellene ble så inkubert ved 37°C med risting til $\text{OD}_{600}=0.4$. Cellene ble satt på is i 15 minutter, og så sentrifugert ved 4500 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet og cellene ble resuspendert i 40 ml kald TFB1 (TFB-bufferene inneholder divalente kationer).

Cellene satt på is i 5 min, sentrifugert ved 4500 rpm i 5 minutter, supernatanten ble fjernet og cellene resuspendert i 3 ml kald TFB2. Cellene ble allikvotert i eppendorfrør (á 100 µl) og snapfryst umiddelbart på etanol/tørris. Siden ble de lagret ved -80°C til bruk.

Transformering:

Kompetente celler ble tint på is. Til 100 µl celler ble det tilsatt 10 µl reaksjonsmiks (for positiv kontroll 1 µl) fra ligase-reaksjonen (konstruerte plasmider), dette ble forsiktig blandet og inkubert på is i 30 minutter. I denne perioden fester plasmidene seg til overflaten av cellene. Cellene ble så utsatt for et varmesjokk (37°C i 5 min), før de ble inkubert på is i 2 minutter. Etter 2 minutter på is ble cellene tilsatt 1 ml SOC-medium som var forvarmet til 37°C. SOC-mediumet er et rikt medium som sørger for at cellene restiturerer etter den harde påkjenningen de har vært gjennom.

Cellene ble så inkubert ved 37°C med risting i 1-2 timer og platet ut på LA med antibiotikum (samt evt. IPTG og X-gal) som selekterte for det ønskede plasmidkonstruktet. Som negativ kontroll ble det brukt celler uten tilsatt plasmid og som positiv kontroll ble det benyttet celler tilsatt 1 µl donorplasmid med resistensgener.

For kontrollene ble 200 µl celleløsning platet ut. For de ligerte plasmidene ble først 200 µl celleløsning platet ut, deretter ble gjenværende celleløsning sentrifugert, en del supernatant fjernet ca 200 µl konsentrert celleløsning platet ut.

2.5.10 BLÅ/HVIT-SCREENING

Denne metoden baserer seg på et prinsipp kalt α -komplementering utviklet av Ullmann et. al, (1967) de oppdaget at *E. coli* med inaktivert (ved delesjon) β -galactosidase-gen (*lacZ*) fikk tilbake sin evne til å hydrolysere laktose ved komplementering med en sekvens som koder for α -peptidet som mangler i det inaktiverte *lacZ*-genet. Messing et. al (1977) konstruerte en vektor av bakteriofagen M13 som inneholdt de første 145 aa i *lacZ*-genet, denne ble brukt som vektor for å komplementere *E. coli* med inaktivert *lacZ*-gen. De påviste komplementering med spalting av X-gal som ga blå kolonier. Dette systemet ble utviklet videre til pUC-plasmider (Vieira & Messing 1982). pUC-plasmidene brukes som kloningsvektorer og transformeres inn i *E. coli* stammer som mangler sekvensen av *lacZ*-genet som koder for α -peptidet (eks *E.coli* DH5 α).

Inaktivt β -galaktosidase (ω -peptid) uttrykt av *E. coli* DH5 α komplementeres og danner et aktivt enzym når plasmider (pUC) med sekvensen til de 59 første aa av *lacZ*-genet (α -peptidet) innføres i bakterien. Dette gjør *E. coli* DH5 α med pUC-plasmid i stand til å hydrolysere laktose og spalte X-Gal (5-Bromo-4-kloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid). X-Gal er i utgangspunktet fargeløst, men når galaktose spaltes fra av β -galaktosidase vil 5-bromo-4-chloro-3-hydroxindole oksidere og danne en dimer som fører til en synlig blå farge.

I pUC128 er det en polylinker i starten av *lacZ* α -genet med multiple kuttsteder for restriksjonszymer, dette gjør det mulig å kjenne igjen bakterier som har fått satt inn et genfragment her (genet vil ikke lenger være funksjonelt og bakterien vil ikke kunne spalte X-Gal og frigi blåfarge). Plasmidet inneholder i tillegg et resistensgen for Ampicillin som gjør at kun bakterier med innsatt plasmid vil vokse på seleksjonsmedie tilsatt Ampicillin, X-Gal og IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). IPTG binder allosterisk til repressor av *lac*-operonet og fremmer således uttrykk av β -galaktosidase.

Blå/hvit seleksjon:

20 mg/ml X-Gal (fra Sigma) ble løst i DMSO, løsningen ble alikvotert og lagret mørkt (den er lyssensitiv) ved -20 °C. 40 µl X-gal og 7 µl IPTG ble spredt på LA plater med ampicillin, platene ble tørket litt før 200 µl cellesuspensjon (som beskrevet i 2.5.9 -Transformering) ble tilsatt og inkubert over natt. Celler med innsatt genfragment i *lacZα*-genet dannet hvite kolonier, de uten genfragment var blå. *E. coli* uten plasmid skal ikke vokse siden de manglet genet for ampicillin-resistens. *E. coli* med innsatt genfragment ble inokulert i flytende LA med antibiotika, samt prikket over på ny plate. Plasmid ble isolert fra godt utvokst kultur og testkuttet med restriksjonsenzymmer for å verifisere at plasmidkonstruktet var det forventede.

2.5.11 KONJUGERING

Celler kan overføre genetisk materiale ved vertikal overføring (arv fra mor til datter-celle) og også ved horisontal overføring (fra en celle til en annen). Den siste prosessen kan være kan foregå på tvers av bakteriestammer og kan være: transformering (beskrevet i 2.5.9), transduksjon (overføring via viral vektor) eller konjugering.

Konjugering er direkte overføring fra en donorcelle til en mottakercelle. For at en slik overføring skal kunne gjennomføres må donorcellen må ha *tra*-gener som koder for proteiner som er essensielle for prosessen og genene må være uttrykt slik at proteinene er tilstede. Plasmidet som skal overføres må i tillegg ha et startpunkt for overføring; *oriT* (origin of transfer) eller *mob* (mobility). Selve overføringen skjer ved at donorcellen danner en sexpilus som oppretter fysisk kontakt med mottaker-cellen. Det dannes en konjugasjonsbro mellom de to cellene og et enkeltrådig brudd i *oriT* induseres. En enkeltråd av plasmidet overføres til mottakercellen samtidig med at "rolling circle" replikasjonen av plasmidet foregår i donorcellen. Den overførte enkeltråden blir gjort dobbeltrådet og sirkularisert i mottakercellen. (Reece 2004)

Konjugering:

Kulturer av donorstammene og mottakerstammene ble dyrket opp i passende medium (*E. coli* i LB over natt, *A. vinelandii* i BM: 2-3 døgn.). For donorstammene (*E. coli*) ble det tilsatt apramycin i mediet for å hindre plasmidtap. 1 % av hver av overnatte-kulturene ble inokulert i nytt medium, og dyrket ved 30 °C (*A. vinelandii*) og 37 °C (*E. coli*) i ryste-inkubator til eksponentiell fase (OD₆₀₀ rundt 0,4). For *E. coli* tok dette ca 1,5-2 timer og for *A. vinelandii* ca 20-24 timer.

3 ml donorkultur og 3 ml mottakerkultur ble blandet i et 13 ml rør og sentrifugert i 5 minutter ved 5000 rpm og 4 °C. Supernatanten ble forsiktig helt av, og cellene resuspendert i væskeresten som ble igjen i røret (cirka 100 µl). Suspensjonen ble avsatt som en dråpe på en LA-plate uten antibiotika, og inkubert i varmeskap ved 30 °C over natt. Cellene ble skrapet av LA-platen med en steril spatel, overført til et sterilt eppendorfrør og resuspendert i 1 ml Burks medium.

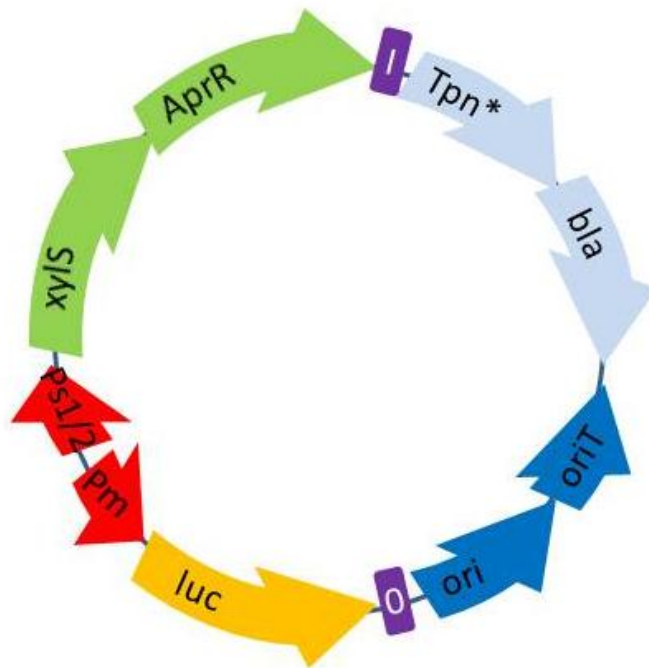
100 µl av ufortynnet og to fortyninger (10⁻¹ og 10⁻²) ble platet ut på agarplater med seleksjon, og inkubert ved 30 °C til synlige kolonier på platene, dette tok 3-5 dager. Synlige kolonier ble inkubert i flytende Burks medium med antibiotika samt prikket over på nye plater. Når stammene var godt utvokste ble de overført i nytt medium m/ selekterende antibiotika, dette ble gjentatt 5-6 ganger for å sikre at alle kromosomkopiene hadde fått transposonet innsatt.

2.5.12 TRANSPOSONVEKTOR

Transposable elementer ble oppdaget av Barbara McClintock, som forsket på mais og oppdaget delesjoner, translokasjoner og insersjoner som skyldtes disse elementene og blant annet ga fenotyper som fargevariasjoner på maiskorn. (McClintock 1950) Denne oppdagelsen var starten på kloningseventyret som siden har levd i beste velgående innen all genetisk basert forskning.

Transposonvektorene som ble brukt i denne oppgaven inneholder flere faktorer som er nødvendige for at ønskede DNA-fragmenter skal overføres fra plasmidet til kromosomalt DNA i mottakerstammen (Figur 2.5). DNA-fragmentet som skal overføres liggeres inn i et mini-Tn5 basert transposon (de Lorenzo et al. 1990). Transposonet inneholder to flankerende elementer på 19 bp; O (outer) og I (inner). Mellom O og I ligger et gen for apramycin-resistens, en Pm-promoter som induserer uttrykk av innsatt gen ved tilsats av m-toluat (Mermod et al. 1986), samt kutteseter for innsetting av element som skal overføres.

I vektoren utenfor transposonet finnes det blant annet et *tpn**-gen som uttrykker transposase, dette er nødvendig for at transposonet skal relokalisere seg. Det finnes også et «origin of replication» i transposonvektorene; R6K (Kolter et al. 1978). R6K er avhengig av Π -protein som uttrykkes av *pir*-genet i donorstammer. Når transposonvektoren er overført til mottakerstammen, vil ikke transposonvektoren kunne replikere siden denne stammen mangler *pir*-genet. Vektoren inneholder også et «origin of transfer» som er startstedet for overføring av plasmidet.



Figur 2.5 viser en oversikt over elementene i Transposonvektoren som er benyttet i oppgaven, MH13. Elementene i blått vil ikke overføres til bakteriens genom, *tpn**-genet (transposase), *bla*-genet (β -laktamase), origin of replikasjon samt origin of transfer. O og I er 19 bp lange flankerende transposonelementer. Gener som kan brukes til selektering (*XylS* og *AprR*) er merket i grønt, disse ligger under kontroll av Ps1/2 promoter. Pm-promoter styrer uttrykk av *luc*-genet. På hver side av *luc*-genet ligger det kuttsteder som kan benyttes til å bytte ut *luc* med et annet gen eller DNA-fragment.

2.5.13 OD-MÅLING AV CELLETETTHET

Celletetthet (vekst) ble undersøkt med OD –måling (optisk tetthet/absorbans) ved hjelp av et spektrofotometer. Her måles det hvor mye lys prøven tar opp, når lys av en bestemt bølgelengde sendes gjennom den. Dette målet er proporsjonalt med konsentrasjonen av bakterier i løsningen. Prøvene ble målt ved OD₆₆₀ som betyr at lyset har en bølgelengde på 660 nm (synlig lys har bølgelengder mellom 400 og 800 nm).

2.5.14 ASSAY FOR ENZYMATISK ALGINATANALYSE

For å undersøke alginatproduksjon i mutante stammer av *A. vinelandii*, ble forkultur overført i nytt vekstmedium med antibiotika. Prøver ble tatt ut til undersøkelse flere ganger i løpet av vekstperioden, samt at vekst (OD_{660}) ble målt.

Alginatkonsentrasjonen i prøvene ble målt ved hjelp av et assay utviklet av Østgaard (1992). Assayet baserer seg på alginatlyaser som bryter bindingene i alginatkjeden ved en β -eliminiseringsreaksjon og danner en ny umettet uronsyre på den ikke-reduserende enden. Umattede uronsyrer absorberer betydelige mengder lys med en bølglengde på 230 nm (Nakada & Sweeny 1967). Overskudd av enzym (lyaser) vil etter ca 3 timer ha brutt ned tilgjengelig substrat (alginat) og differansen på A_{230} før og etter tilsetning av enzym vil nå korrespondere med utgangsmengden av substrat. Alginatkonsentrasjonen i prøven kan dermed bestemmes med en standardkurve som lages samtidig av prøver med kjent utgangskonsentrasjon.

Det brukes både M- og L-lyase for å unngå at sammensetningen av M- og G-blokker har innvirkning på avmålt resultat. Bakterielle alginater kan også inneha acetylerede M-enheter, for å unngå at dette har innvirkning deacetyleres prøvene med en mild alkalisk behandling (Ertesvåg & Skjåk-Bræk 1999)

Uttak av prøve/forbehandling:

For bestemmelse av alginatproduksjon i kulturene ble det tatt ut 1200 μ l prøve flere ganger i løpet av vekstperioden. Viskøse prøver ble fortynnet (1:5 eller 1:10) med 0,2 M NaCl. Prøvene ble sentrifugert 10 minutter ved 13 000 rpm, 1000 μ l supernatant ble overført til et nytt eppendorfrør og tilsat 33 μ l 3 M NaOH. Prøven ble oppbevart ved -20 til måling. Før alginatanalyse ble prøvene tint og plassert på rørsnurrer i en time for deacetylering. Deretter ble prøvene sentrifugert ved 13 000 i 10 min og 100 μ l supernatant overført til et nytt eppendorfrør og fortynnet 1:3 med 0,05 M Tris-HCL, 1,5 % NaCl (pH 7,5).

Alginatassay:

Assayet ble utført i 96-brønns UV-plater. Det ble benyttet 3 paralleller av hver prøve, standard og blank. Standard (alginat LF10/60) ble løst i iH₂O til konsentrasjonene: 0,0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 mg/ml.

150 µl 0,05 M Tris-HCl, 1,5 % NaCl (pH 7,5) ble tilsatt hver brønn i platen, deretter ble 75µl blank (iH₂O), standard og prøve tilsatt i respektive brønner. Dette ble blandet med pipetten ved tilsetning. Absorbans ved 230 nm (A_{230}) ble avlest.

8 µl 1 U/ml M-lyase og 8 µl 1 U/ml G-lyase ble deretter tilsatt i alle brønner unntatt blankprøvene. Dette ble blandet med pipetten ved tilsetning, platen ble så inkubert ved romtemperatur og A_{230} ble avlest etter tre og fire timer. Ved økning i A_{230} fra tre til fire timer, ble absorbans avlest en gang til påfølgende dag. I beregning av alginat-konsentrasjon ble en avlesning benyttet.

Beregning av alginatkonsentrasjon i prøvene:

For å beregne konsentrasjonen av alginat i prøvene ble gjennomsnittet av blankprøvene (uten tilsats av lyaser) trukket fra alle målinger, både før (bakgrunnsverdi) og etter tilsats og inkubering med lyaser. Neste trinn er finne absorbansøkning i hver brønn, dette gjøres ved å trekke bakgrunnsverdi fra måleverdi etter inkubering med lyaser. Absorbansøkningen må korrigeres for absorbans som skyldes lyasene, dette gjøres ved å trekke fra verdiene for gjennomsnittet av nullprøver tilsatt lyaser.

Standardkurve plottes ved å bruke gjennomsnittet av de korrigerede standardprøvene langs Y-aksen og de kjente alginatkonsentrasjonene langs X-aksen. Når det legges en trendlinje kan formelen for denne brukes til å beregne alginat-konsentrasjonene ut fra gjennomsnittet av de korrigerede absorbansverdiene for prøvene.

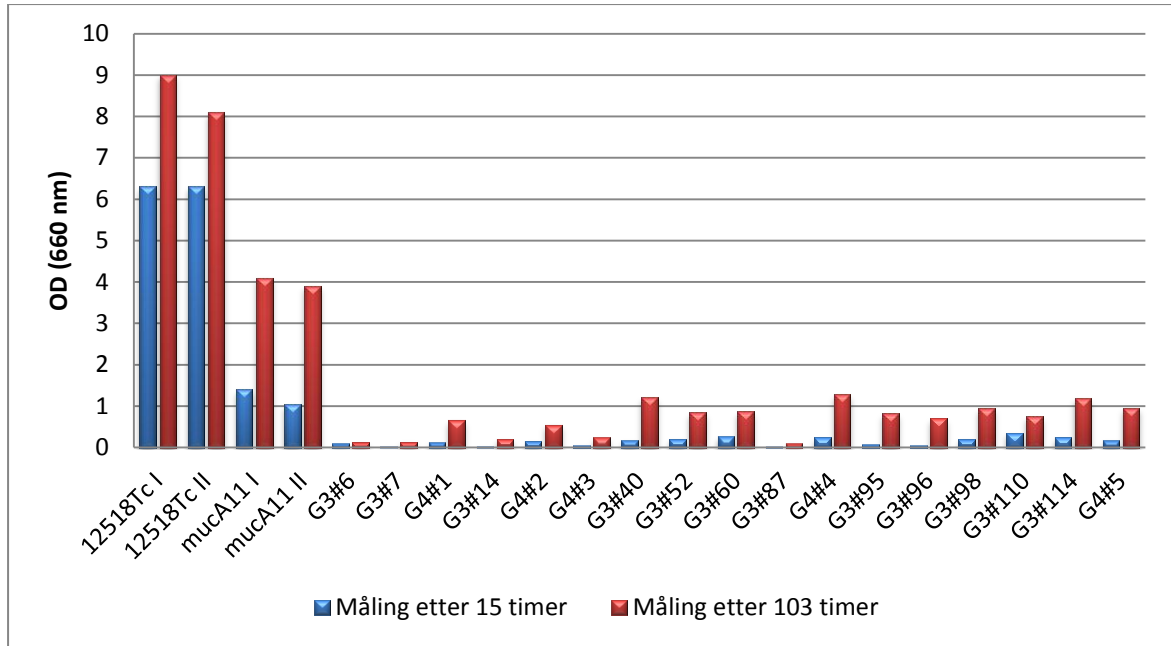
3 RESULTATER

3.1 UNDERSØKELSE AV 17 MUTANTSTAMMER

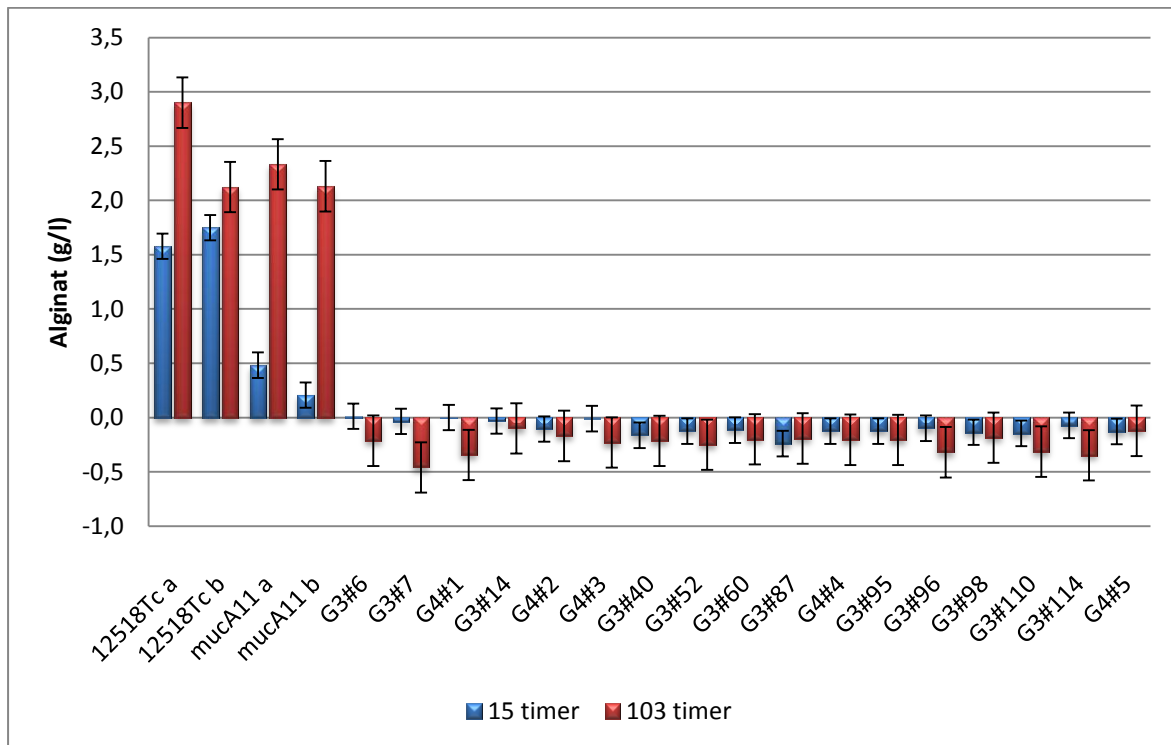
Det ble valgt ut 20 stammer fra transposon-mutant biblioteket som i tidligere screeningsforsøk hadde vist lavere produksjon av alginat enn utgangsstammen. Alle stammene ble dyrket opp på plater fra frosset tilstand. En koloni fra hver plate ble overført til inokulumkolber (10 ml medium i 100 ml kolber) og når stammene nådde stasjonær vekstfase ble de overført til forsøkskolber (50 ml medium i 250 ml kolber). Stammer ble dyrket i RA1-medium med antibiotika, Sp og Tc for mutant-stammene, Tc for kontrollstamme ATTC 12518Tc og Km for kontrollstamme mucA11. Tre av stammene vokste ikke opp og ble derfor utelatt fra forsøket.

Det ble tatt ut prøver fra kulturene med jevne mellomrom for å undersøke vekst og alginat-produksjon. Figur 3.1 viser vekst på 17 undersøkte stammer samt kontroller. Det kan observeres en betydelig forskjell i vekst på kontroll-stammer og mutant-stammer. En del av denne forskjellen kommer av at flere av mutant-stammene flokkulerte og at målt absorbans dermed ikke er et godt mål på reell celledetthet. Kontroll-stammene 12518Tc og MucA11 vokser som forventet.

Prøver tatt fra kulturene under screeningen ble analysert med alginat-assayet beskrevet i kapittel 2.5.14. Rådata og standardkurve brukt i beregning av alginatkonsentrasjon finnes i vedlegg A. Resultatene fra alginat-assayet bekreftet at stammene ikke produserer målbare mengder alginat (Figur 3.2).

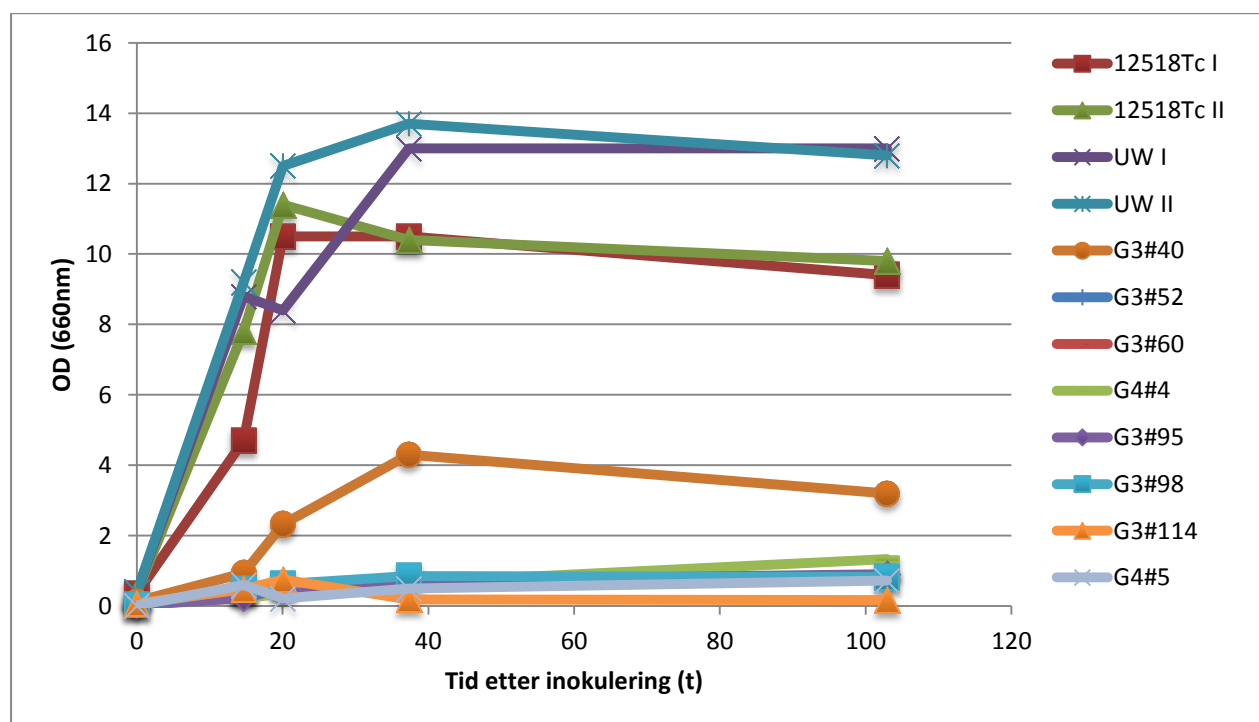


Figur 3.1 Celletetthet etter 15 og 103 timers vekst for 17 undersøkte *A. vinelandii* stammer. Kontroll-stammer 12518Tc og mucA11 i to paralleller. Alle stammene er dyrket i RA1-medium, mucA11 stammen med tilsats av Kn, 12518Tc med Tc, mutantstammer med Tc og Sp. Tabell finnes i vedlegg A.



Figur 3.2 Beregnet alginatkonsentrasjon etter 15 og 103 timer vekst for 17 *A. vinelandii* stammer. Kontroll-stammer 12518Tc og mucA11 i to paralleller. Alle stammene er dyrket i RA1-medium, mucA11 stammen med tilsats av Kn, 12518Tc med Tc, mutantstammer med Tc og Sp. Feilfeltet som er vist er beregnet standardfeil for hver serie. Tabell over avlest absorbans, beregnet alginatkonsentrasjon og standardkurve finnes i vedlegg A.

Mutantstammene i innledende forsøk vokste dårlig, men 8 av de stammene som vokste best ble plukket ut til videre undersøkelse. I dette forsøket ble *A. vinelandii* 12518Tc og UW (som ikke produserer alginat) benyttet som kontroller. Forsøket ble ellers utført på samme måte som screeningen for 17 stammer (beskrevet over). Figur 3.3 viser en oversikt over målt vekst på disse 8 stammene over tid. Tabell fra vekstforsøk finnes i vedlegg A. Kontroll-stammene 12518Tc og UW oppnår igjen en betydelig høyere celletetthet enn mutantstammene. For en del av stammene kan dette delvis forklare med flokkulering som gjør at OD-måling ikke er det beste målet på celletetthet i kulturene. En av mutantstammene (G3#40) har en noe høyere målt celletetthet enn resten av de undersøkte stammene. Figur 3.3 viser også at UW som forventet fra tidligere forsk når en høyere celletetthet enn 12518Tc og at de to parallellene av hver stamme har en tilnærmet lik vekst. Den ene UW-stammen har et noe avvikende punkt som kan tyde på en litt forlenget lag-fase, men mest sannsynlig skyldes dette et avvik i målingen.



Figur 3.3 Celletetthet over tid på 8 *A. vinelandii* stammer. Kontroll-stammer 12518Tc og UW i to paralleller. Alle stammene er dyrket i RA1-medium, UW stammen uten tilsats av antibiotika, 12518Tc med Tc, mutantstammer med Tc og Sp. Tabell finnes i vedlegg B.

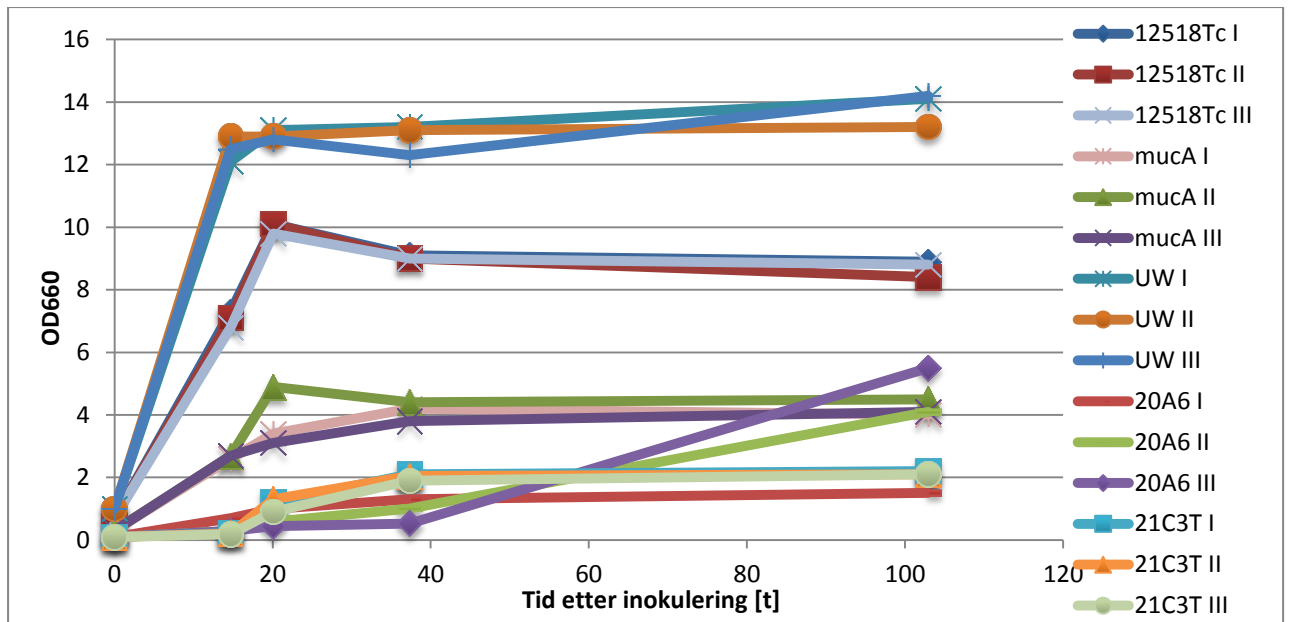
Parallelt med vekst-undersøkelsen ble det isolert DNA fra de åtte stammene. DNA fra stammene ble sekvensert ved hjelp av primere i endene av transposonet. Dette ble gjort for å bruke sekvensen til å bestemme hvor i bakterie-genomet transposonet hadde satt seg inn, og dermed hvilket gen som var inaktivert av transposon-mutasjonen. BLAST-søk av sekvensen fra stammene viste at denne var lik sekvensen til plasmidet som ble brukt til å sette transposonet inn i *A. vinelandii*. Det ble valgt å ikke gå videre med stammene fra denne undersøkelsen på bakgrunn av dette.

3.2 UNDERSØKELSE AV STAMMENE 20A6 OG 21C3T

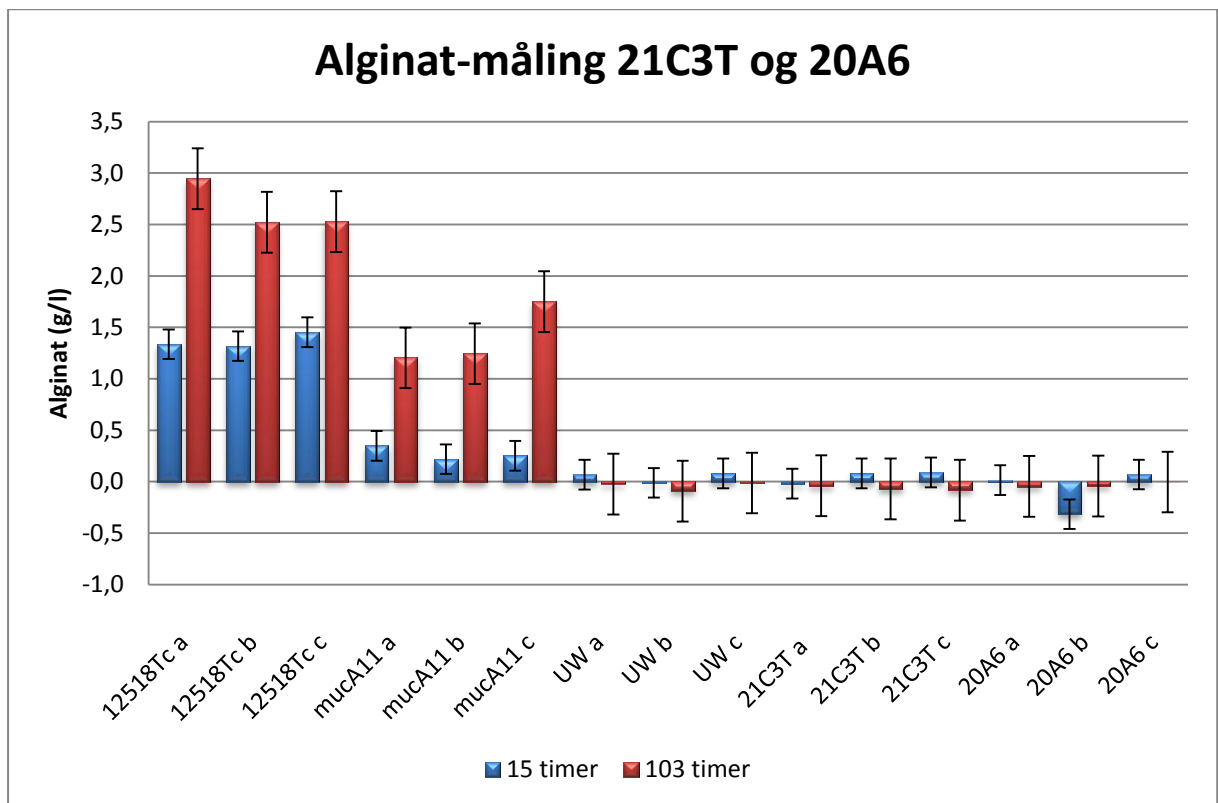
For videre undersøkelse av ned-mutanter ble det plukket ut to stammer fra et utvalg ned-mutanter som var sekvenserte for å utelukke kontaminering med plasmid. Siden stammene var sekvenserte var også genene identifiserte. Stamme 20A6 har transposon satt inn i genet *sucA* og stamme 21C3T i *Avin_13880*, et gen som koder for en IclR-lignende transkripsjonsregulator.

Det ble først satt opp en vekst- og alginatundersøkelse av stammene for å verifisere resultater fra tidligere screen. Denne ble utført på samme måte som beskrevet i 3.1. I denne screeningen ble både 12518Tc, UW og MucA11 benyttet som kontroller. Figur 3.4 viser at veksten i alle tre paralleller av stammene 21C3T og 20A6 er relativt lav. To av parallellene til stammen 20A6 viser tendenser til økt vekst etter en forlenget lag-fase. Kontrollen mucA11 vokser tilsvarende test-stammene og UW-stammen har høyest OD fra start til slutt. Kontrollene har et vekstmønster som forventet.

De undersøkte stammene 21C3T og 20A6 produserer lite eller ingen alginat (Figur 3.5). 21C3Tb og c viser en lav beregnet konsentrasjon av alginat etter 15 timer, det gjør også UWa og UWb. UWb er en kjent nullprodusent av alginat og det må tas høyde for at det er en usikkerhet i målingen som gjør at disse stammene viser en liten beregnet konsentrasjon av alginat.



Figur 3.4 Celletetthet over tid på *A. vinelandii*-stammene 20A6 og 21C3T. Kontrollstammer 12518Tc og mucA11 i to paralleller. Alle stammene er dyrket i RA1-medium, mucA11 stammen med tilsats av Kn, 12518Tc med Tc, mutantstammer med Tc og Sp. Tabell finnes i vedlegg C.



Figur 3.5 Beregnet alginate-konsentrasjon etter 15 og 103 timers vekst for *A. vinelandii* stamme 21C3T og 20A6. Kontrollstammer 12518Tc og mucA11 i to paralleller. Alle stammene er dyrket i RA1-medium, mucA11 stammen med tilsats av Kn, 12518Tc med Tc, mutantstammer med Tc og Sp. Feilfeltet som er vist er beregnet standardfeil til hver serie. Tabell over avlest absorbans, beregnet alginatekonsentrasjon og standardkurve finnes i vedlegg C.

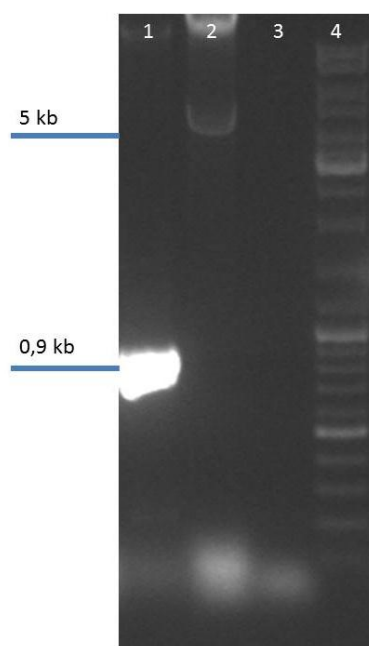
3.3 A. VINELANDII 21C3T: VIDERE UNDERSØKELSE

For å undersøke stamme 21C3T videre ble det satt opp en PCR for å sjekke at stammen kun inneholdt mutert versjon av genet Avin_13880 (se 3.3.1). Det ble konstruert en transposonvektor med pm-promoter og mulighet for apramycin-selektering (se 3.3.2) Med utgangspunkt i denne ble det konstruert en transposonvektor med villtype-genet under kontroll av en pm-promoter for å komplementere stammen (se 3.3.3). Dette gjøres for å verifisere at det er den detekterte mutasjonen som gir det observerte fenotypen og for potensielt å sjekke effekten av overuttrykk av genet. Plasmidkart finnes i vedlegg F. Komplementerte stammer ble undersøkt for alginat-produksjon (3.3.4).

Det ble også gjort bioinformatiske undersøkelser og litteraturstudier for å forsøke å avklare hvilken funksjon Avin_13880 har i *A. vinelandii*, samt mulige årsaker til hvorfor inaktivering av dette genet påvirker vekst og alginat-produksjon (3.3.5).

3.3.1 RENHETSKONTROLL A. VINELANDII 21C3T

A. vinelandii inneholder flere kopier av kromosomet og for å kontrollere at stamme 21C3T bare inneholder mutert versjon av genet Avin_13880 og ikke Avin_13880 av villtype, ble det satt opp en PCR med primere på hver side av insersjonssted for transposonet. Primerne som ble benyttet var Avin_13880F og Avin_13880R. Uten innsatt transposon vil disse gi et fragment på 0,9 kb. Transposonet er på 4,1 kb og ved en ren mutantstamme vil derfor PCR-fragmentet være på 5 kb. Figur 3.6 viser en gelelektroforese av PCR-produktet fra 21C3T og kontrollstamme *A. vinelandii* UW. I stamme 21C3T er det kun tilstedeværelse av fragmenter med en lengde på 5 kb. Det kan dermed antas at denne stammen kun inneholder mutert versjon av Avin_13880-genet.

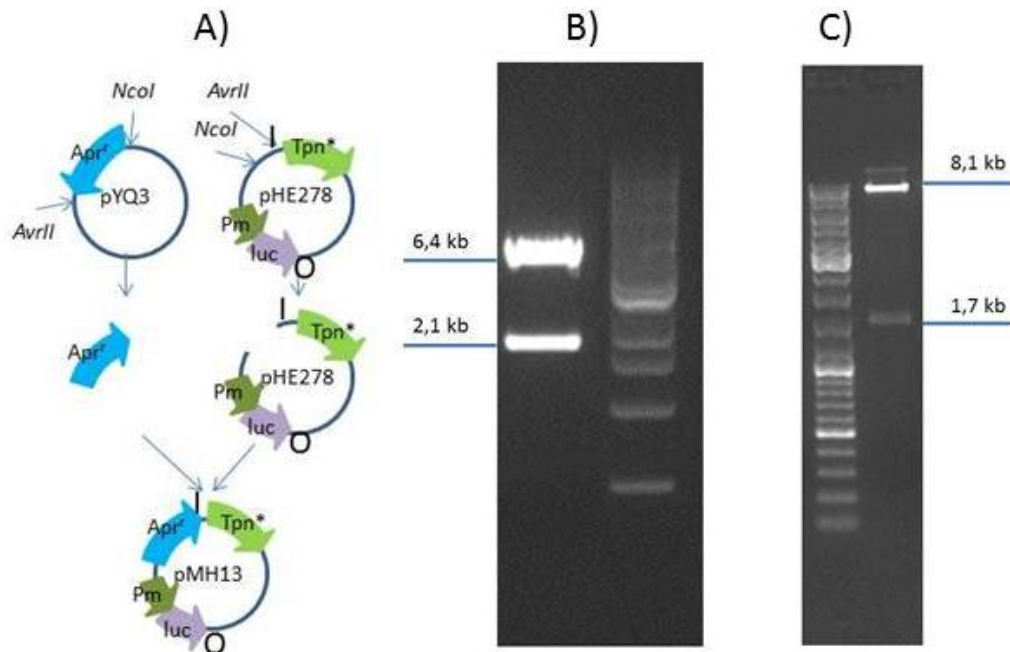


Figur 3.6 Gelelektroforese av PCR-produkt med primerpar Avin_13880F og Avin_13880R. 1: *A.vinelandii* UW. 2: 21C3T 3: H₂O 4: DNA-standard B.

3.3.2 KONSTRUKSJON AV TRANSPOSONVEKTOR MH13

For å komplementere stammen med et villtypegen under kontroll av en Pm-promoter måtte det konstrueres en transposonvektor som også hadde mulighet for selektering. Denne ble konstruert med utgangspunkt i transposonvektoren pHE278 der ønsket gen kan klones inn nedstrøms for en Pm-promotor. Et gen som koder for apramycin-resistens ble hentet fra pYQ3 og klonet inn i pHE278 (Figur 3.7A). Den nye transposonvektoren fikk navnet pMH13 og ble benyttet i konstruksjon av transposonvektorer for komplementering av stammene 21C3T og 20A6. Plasmidkart finnes i vedlegg F.

Et 2,1 kb AvrII, NcoI fragment (Figur 3.7B) som inneholder genet for apramycin-resistens ble kuttet ut fra pYQ3 og ligert inn i pHE278 kuttet med de samme restriksjonsenzymene (Figur 3.7C).

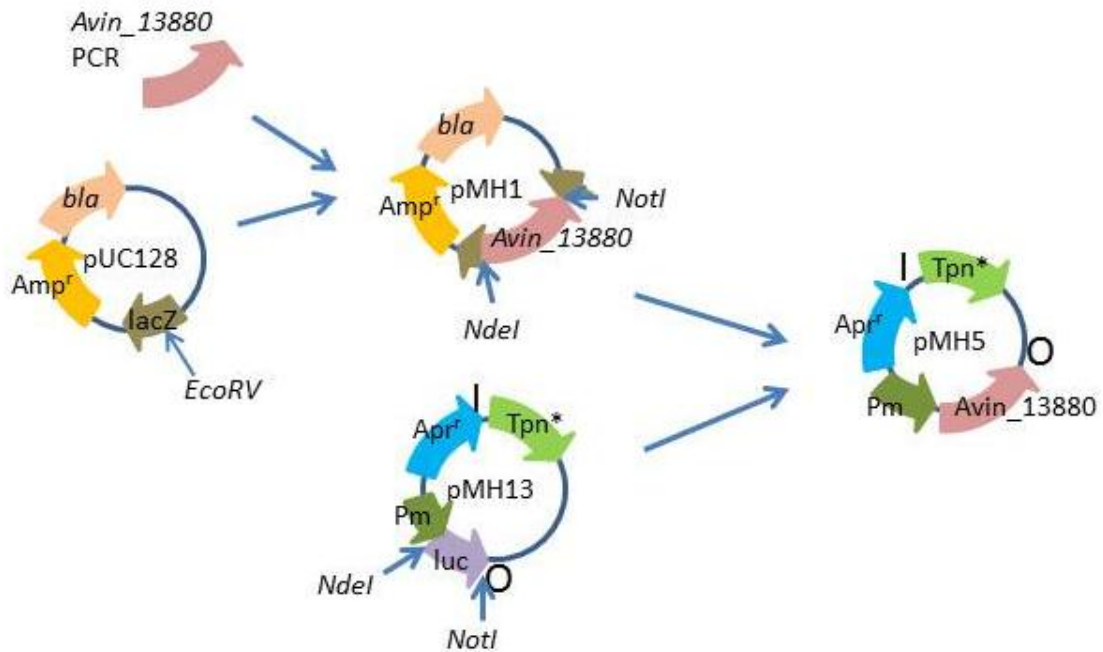


Figur 3.7 A) Konstruksjon av pMH13, fra pYQ3 og pHE278. Kutteteser for AvrII og NcoI, gen for apramycin-resistens, transposase og luc, Pm-promoter og transposonelementer O og I er vist. B) Kutting av pYQ3 med AvrII og NotI. Forventet kuttemønster (kb): 6,4 og 2,1. DNA- standard C. C) Kutting av pHE278 med AvrII og NotI. Forventet kuttemønster (kb): 8,1 og 1,7. DNA- standard B.

Det var noen avvikende resultater ved testkutting av transposonvektor pMH13 og pHE278 som ble benyttet som utgangspunkt (ikke vist). Resultatene tydet på at avviket lå utenfor selve transposonet eller eventuelt skyldtes uspesifikk kutting og vektoren ble benyttet videre.

3.3.3 TRANSPOSONVEKTOR TIL KOMPLEMENTERING AV 21C3T.

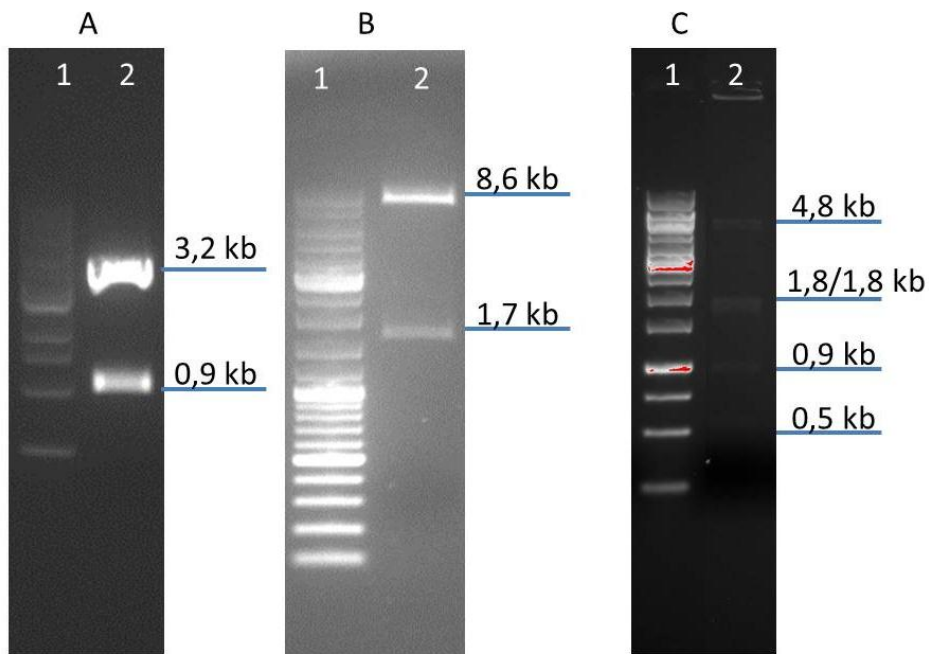
For å komplementere stamme 21C3T med villtype av Avin_13880 under kontroll av Pm-promoter ble genet klonet inn i transposonvektor pMH13, den nye transposonvektoren fikk navnet pMH5. En oversikt over konstruksjonen er vist i figur 3.8.



Figur 3.8 Konstruksjon av transposonplasmid pMH5. pMH5 inneholder Avin_13880 under kontroll av Pm-promoter samt gen for apramycin-resistens, disse er flankert av transposonelementer O og I. Vektoren inneholder også gen for transposase og andre elementer som er nødvendige for konjugering. pUC128 inneholder gener for ampicillinresistens og gener som muliggjør selektering av pMH1 med blå/hvit screening.

Konstruksjonen av transposonvektor pMH5 startet med PCR-amplifisering av fragmentet PCRAvin_13880, dette fragmentet ble ligert inn i pUC128 kuttet med EcoRV. Det konstruerte plasmidet ble transformert inn i *E. coli* DH5 α og transformanter ble selektert med blå/hvit-screening. Fem stammer som var hvite (indikasjon for at de inneholder PCR-fragmentet) ble dyrket opp.

Plasmidene ble isolert og kuttet med restriksjonsenzymene NdeI og NotI. Kutting med disse enzymene vil gi fragmenter på 3,2 kb og 0,9 kb for det ønskede konstruktet. Et konstrukt med PCR-fragmentet ligert inn feil vei vil gi fragmenter på 0,05 kb og 4,1 kb. Gelseparering av et plasmid med ønsket kuttemønster er vist i Figur 3.9A.



Figur 3.9 A) pMH1 kuttet med NdeI og NotI. 1: DNA-markør C. 2: pMH1, forventet kuttemønster (kb): 3,2+ 0,9. B) pMH13 kuttet med NdeI og NotI. 1: DNA- standard B. 2: pMH13, forventet kuttemønster (kb): 8,6 + 1,7. C) pMH5 kuttet med XhoI og NcoI. 1:DNA-standard D. 2: pMH5.

To isolerte plasmidstammer som viste forventet kuttemønster ble sekvensert med primerne M13F og M13R. Sekvensene ble sammenlignet med den forventede sekvensen i dataprogrammet Clone. Sekvens-sammenligning finnes i vedlegg E. De sekvenserte konstruktene viste forventet DNA-sekvens og plasmidet ble benyttet videre i konstruering av transposonvektor. Konstruktet av PCRAvin_13880 og pUC128 fikk navnet pMH1.

Etter sekvensering og verifisering av korrekt pMH1 ble et 0,9 kb NdeI-NotI fragment (figur 3.9A) fra pMH1 inneholdende Avin_13880 ligert inn i pMH13, også kuttet med NdeI-NotI (figur 3.9B). Konstruktet ble transformert inn i kompetente *E. coli* S17.1 λ pir, selektert på bakgrunn av apramycin-resistens og testkuttet med XhoI og NcoI for å sjekke for riktig insert (figur 3.9C). pMH5 vil gi et kuttemønster på (kb): 4,8 + 1,8/1,8 + 0,9 + 0,5. pMH13 kuttet med XhoI og NcoI vil gi (kb): 7,6 + 1,8 + 0,9.

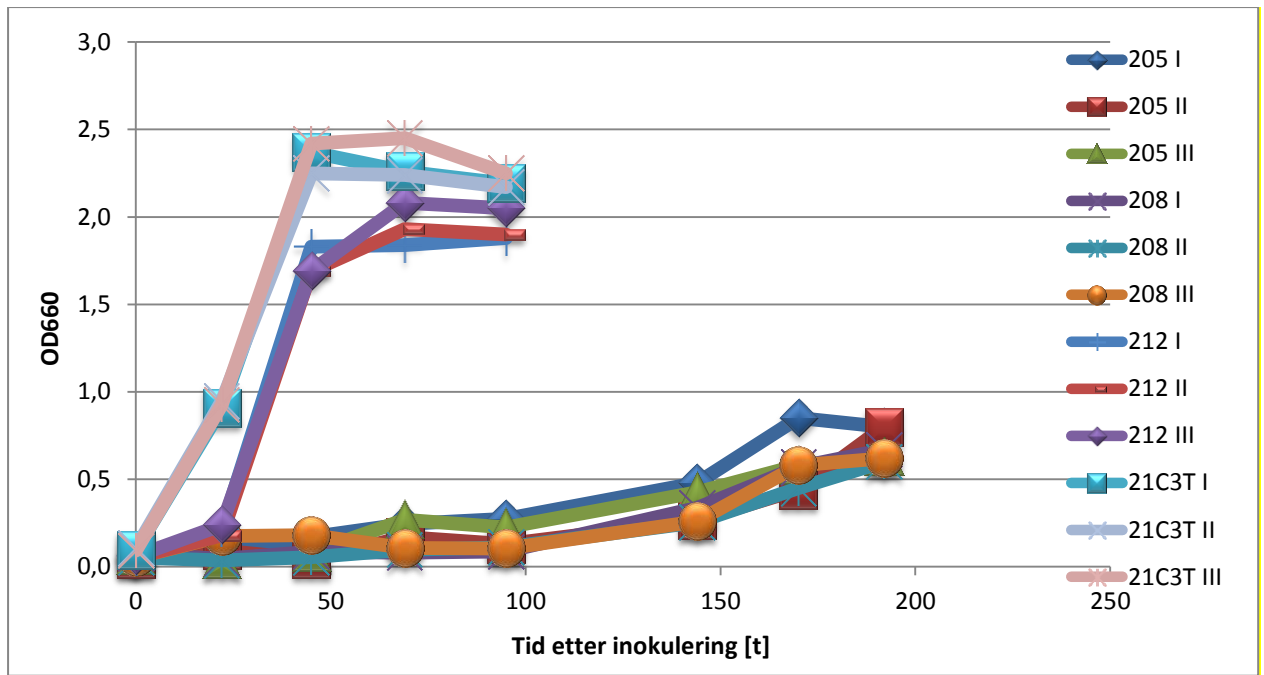
Et plasmid som viste korrekt kuttemønster fikk navnet pMH5, dette er en transposonvektor som inneholder Avin_13880-genet under kontroll av Pm-promoter. pMH5 ble konjugert inn i *A. vinelandii*-stammen 21C3T. 3 ulike stammer ble plukket ut til videre bruk på bakgrunn av Tc, Sp og Apr-resistens og kalt; MH205, MH208 og MH212. Stammene ble dyrket gjennom minst fem overføringer til nytt medium med selekterende antibiotika før de ble undersøkt for alginatproduksjon. Dette ble gjort for å selektere for kromosom med innsatt transposon.

3.3.4 KOMPLEMENTERING AV AVIN_13880

De komplementerte stammene MH205, MH208 og MH212 ble dyrket i kolber i flytende BM-medium tilsatt Tc, Sp og Apr. Det tok lang tid før stammene viste stabil og god vekst og de viste heller ingen tegn til øket vekst eller produksjon av alginat ved tilsats av 0,2 mM m-toluat. Under forsøket med tilsats av m-toluat ble det ikke tilsatt Tc i medium, dette for å minske stresset på stammene, Sp og Apr som selekterer for mutantstammer ble tilsatt. Figur 3.10 viser veksten på de komplementerte stammene sammenlignet med stammen 21C3T. Rådata for vekstundersøkelse finnes i vedlegg G.

Det ble ikke gjennomført kvantitative alginat-undersøkelser på disse stammene, kun kvalitative undersøkelser med tilsats av NaOH og utfelling med CaCl₂, med stammen 12518Tc som positiv kontroll. 12518Tc produserte betydelige mengder alginat, men det kunne ikke påvises produksjon av alginat i noen av de komplementerte stammene.

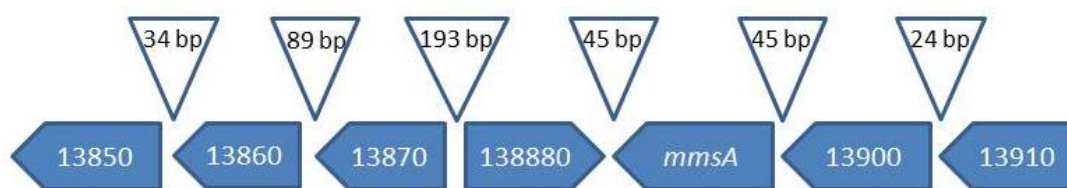
Stammene ble også undersøkt i mikroskop for verifisering av *A. vinelandii*-typisk utseende, dette ble gjort for å utelukke vekst av andre bakterier (eksempelvis konjugeringsdonor *E. coli*). Vekst av andre bakterier kunne ikke observeres og bakteriene i kulturene hadde alle visuelle observerbare trekk av *A. vinelandii*.



Figur 3.10 Celletetthet over tid på komplementerte stammer av *A. vinelandii* 21C3T. MH205, MH208 og MH212, samt utgangsstamme 21C3T. Stammene er dyrket i Burkes medium med Apr, Sp og m-toluat (0,2mM), kontrollstamme 21C3T med Tc og Sp. Tabell finnes i vedlegg G.

3.3.5 BIOINFORMATISK UNDERSØKELSE AV AVIN_13880

I *A. vinelandii* ligger Avin_13880 som koder for en IclR-transkripsjonsregulator (Figur 3.11) oppstrøms, men i motsatt retning av *mmsA*/ Avin_13890, et gen som koder for methylmalonat semialdehyd dehydrogenase (MSDH), Avin_13900, som koder for en jern-inneholdende alkohol dehydrogenase og Avin_13910 som koder for en integral membran permease/GntP-type/citrat transporter av citMHS type. På motsatt side av Avin_13880 ligger Avin_13870 som koder for en antatt hemmer av cystein peptidase, Avin_13860 og 13850 som koder for tRNA-metyltransferase og Avin_13840 som koder for et hypotetisk protein med ukjent funksjon.



Figur 3.11 En oversikt over genene i nærheten av Avin_13880. Avin_13850 og Avin_13860 koder for tRNA-metyltransferaser, Avin_13870 koder for et lipoprotein (hemmer for cystein peptidase), Avin_13880 koder for et IclR protein, *mmsA* koder for en methylmalonat semialdehyd dehydrogenase (MSDH), Avin_13900 koder for en jern-inneholdende alkohol dehydrogenase og Avin_13910 koder for et protein av citMHS-familien (D- β -hydroksybuterat permease).

BLAST-søk av sekvensen til Avin_13880 mot genomet til *A. vinelandii* viser at det finnes 6 andre transkripsjonsregulatorer av IclR-type. Tabell 3.1 viser en oversikt over disse med funksjon (informasjon hentet fra KEGG/NCBI).

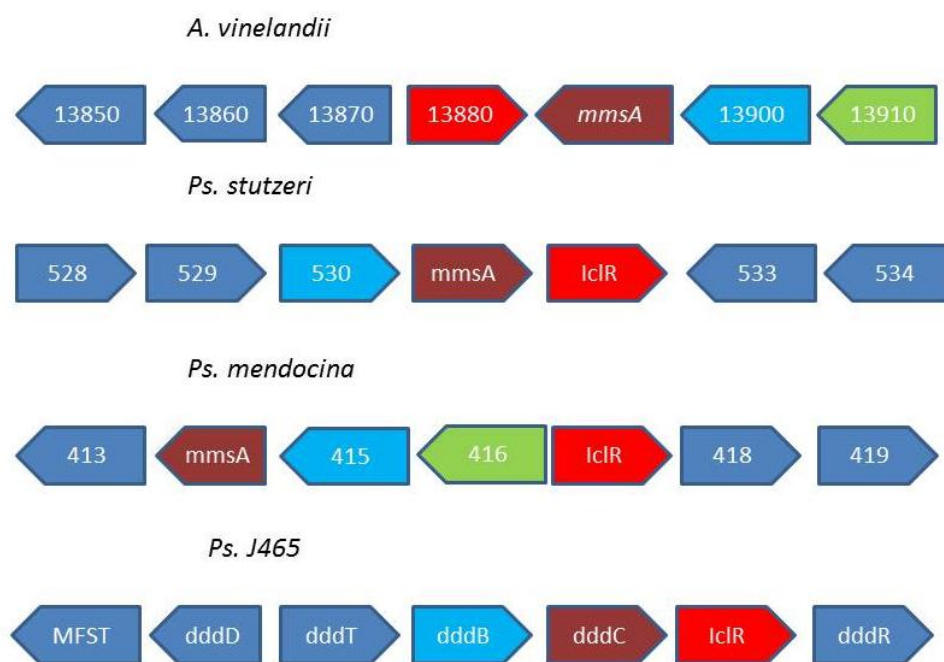
Tabell 3.1 Oversikt over gener i *A. vinelandii* som koder for IclR-protein.

Gen	Funksjon
Avin_15090 <i>mphR</i>	Aktivator i mph-operon, involvert i regulering av metabolisme av fenylalanin, benzoat, xylen og dioxin
Avin_20200	Mulig involvert i regulering av shikimat-S-dehydrogenase
Avin_30240	Ukjent
Avin_38230 <i>pcaR</i>	Ligger i klynge med <i>pca</i> -gener involvert i nedbryting av benzoate til succinyl-CoA og acetyl-CoA
Avin51350 <i>dgoR</i>	Ligger i klynge med gener som koder for enzymer involvert i DeLey Doudoroff-sporet
Avin_51530	Ukjent, ligger i klynge med gener for en «multidrug efflux pump».

BLASTN-søk av sekvensen i Avin_13880 viser stor likhet med gener som koder for IclR protein i *Pseudomonas stutzeri* (69 %), *Pseudomonas mendocina* (69 %) og *Pseudomonas J465* (67 %). Undersøkelser i KEGG viser at *Pseudomonas mendocina* har et liknende gen-arrangement som Avin_13880 til 13910 (Figur 3.12). I *Pseudomonas stutzeri* ligger det IclR-liknende genet i en klynge med gener for methylmalonat semialdehyd dehydrogenase (*mmsA*), jern-inneholdende alkoholdehydrogenase, Formiminotransferase-cyclodeaminase enzym og glyceraldehyd 3-fosfat-dehydrogenase (Figur 3.12).

A. vinelandii har flere citrat-transporter proteiner av Cit-MHS-familien; Avin_17120, Avin_18040 og Avin_49590. Disse ble ikke videre undersøkt.

I *Pseudomonas J465* ligger det *IclR*-lignende genet i en klynge med gener som antas å være involvert i nedbryting av dimetylsulfoniopropionat (DMSP) til dimetylsulfid (DMS). DMS er et viktig ledd i global svovelsyklus og fører svovel fra havet, til atmosfæren hvor det påvirker skydanning og siden føres tilbake til land. DMSP dannes hovedsaklig av fytoplankton og makroalger. Bakterier som omdanner DMSP til DMS finnes i stor utstrekning i områder som er rike på DMSP og har også blitt funnet i magen til fisk. *Ps. J465* er en slik bakterie. *dddD* koder for en CoA transferase som antas å overføre CoA til DMSP før denne spaltes til DMS og 3-hydroxypropionat. 3-hydroxypropionat omdannes så til malonat semialdehyd. *dddC*-genet her tilsvarer *mmsA* og *dddB* tilsvarer Avin_13890 (Figur 3.12). (Curson et al. 2009; Todd et al. 2007)



Figur 3.12 Gen-arrangement rundt *IclR*-liknende gen. *IclR*-liknende gen er merket i rødt, MDH*mmsA*-kodende gener i vinrødt, gener som koder for en jern-inneholdende alkohol dehydrogenase i lyseblått og citrat-transporter (CitMHS)-gen i grønt. Genene i *A. vinelandii* er beskrevet i figur 3.11. I *Ps. stutzeri* koder 529 for en glycerinaldehyd-3-fosfat dehydrogenase, 529 for et hypotetisk protein, 533 for en hemolysin og 534 for en ATP-avhengig DNA-helicase rep. I *Ps. mendocina* koder 413 for en adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase, 418 koder for cytochrome B561 og 419 koder for et hypotetisk protein. I *Ps. J465* koder MFST for en mulig MFS-transporter, *dddD* for en L-carnitine dehydratase, *dddT* for en cholin/carnitin/betin-transporter og *dddR* er en transkripsjonsregulator av LysR-familien.

Søk i Seedviewer-databasen (Overbeek et al. 2005) etter liknende gen-arrangementer som i *A. vinelandii* i området rundt Avin_13880 ga stort sett tilsvarende resultater som de som ble funnet ved hjelp av BLASTN-søk og undersøkelser i KEGG. Søket her viser også at *Marinomonas* sp. MWYL1 og *Acinetobacter johnsonii* SH046 har et liknende gen-arrangement med et gen som koder for jern-inneholdende alkohol dehydrogenase, et *mmsA*-gen, et gen kodende for en citrat transporter av citMHS type og et gen kodende for en IclR-transkripsjonsregulator.

Videre undersøkelser i KEGG viser at *A. vinelandii* har tre gener som koder for MSDH; Avin_13890 (*mmsA*), Avin_10720 (*mmsA*), og Avin_50080 (*iolA*), kun Avin_13890 ligger i nærheten av et IclR-regulator protein. Andre nært beslektede arter som *Ps. aeruginosa* og *Ps. fluorescens* har også flere *mmsA*-gener, men ikke i nærhet av et IclR-regulator protein. MSDH antas å være involvert i forskjellige metabolske spor i *A. vinelandii* og kan initiere forskjellige reaksjoner: (S)-metylmalonate og CoA til propanoyl-CoA, (S)-metylmalonate semialdehyd + CoA til (R)-metylmalonyl-CoA, 3-oxopropanoate og CoA til acetyl-CoA (Yamada & Jakoby 1960), 3-oxopropanoate til malonoyl-CoA. Tabell 3.2 viser en oversikt over hvilke spor MSDH antas å være involvert i i *A. vinelandii*.

Tabell 3.2 Metabolske spor i *A. vinelandii* der MSDH er involvert.

Spor	Reaksjoner	Kommentarer
Valine degradering	(S)-Metylmalonate semialdehyd + CoA + NAD ⁺ <=> Propanoyl-CoA + HCO ₃ ⁻ + NADH (S)-Metylmalonate semialdehyd + CoA + NAD ⁺ <=> (R)-Metylmalonyl-CoA + NADH + H ⁺	Undersøkt i <i>Ps. Aeruginosa</i> (Sokatch et al. 1968; Steele et al. 1992) Avin_10720 (<i>mmsA</i>) ligger i nærheten av gener som koder for nedbryting av Val, Ile og Leu. Tilsvarende gen-arrangement finnes også i <i>Ps. aeruginosa</i> .
beta-Alanine metabolisme	3-oxopropanoat + CoA + NAD(P) ⁺ = acetyl-CoA + CO ₂ + NAD(P)H	Vist eksperimentelt i <i>Ps. Fluorescens</i> (Hayaishi et al. 1961)
Inositol-fosfate metabolisme	3-oxopropanoat + CoA + NAD(P) ⁺ = acetyl-CoA + CO ₂ + NAD(P)H	Avin_50080 (<i>iolA</i>) er lokalisert sammen med med gener som koder for dette sporet.*
Propanoate metabolisme	3-Oxopropanoat + CoA + NADP ⁺ <=> Malonyl-CoA + NADPH + H ⁺ 3-oxopropanoate + CoA + NAD(P) ⁺ = acetyl-CoA + CO ₂ + NAD(P)H	

*Inositol-fosfat sporet er et viktig spor spesielt i nitrogenfikserende arter som lever i symbiose med planter (Resendis-Antonio et al. 2011) og det synes å være vanlig at et gen som koder for MSDH ligger i nærhet av gener som koder for dette sporet i bakterier som kan metabolisere inositol (Fry et al. 2001; Yoshida et al. 2008). Yebra et al. (2007) har undersøkt *Sinorhizobium meliloti* som er en nitrogenfikserende symbiont med alfalfa. I denne bakterien ligger *iolA* ikke i en klynge med resten av *iol*-genene og de viste at *iolA* ikke reguleres sammen med resten av genene.

For videre å lete etter sammenhenger mellom Avin_13880 og andre gener i *A. vinelandii* ble STRING databasen benyttet. Dette er en database som ser på flere parametre, blant annet beliggenhet i forhold til hverandre (lokasjon), gen-fusjon, om genene opptrer sammen i flere arter (co-occurrence), sekvenslikhet, eksperimentelle bevis, annotering i databaser m.m. (Jensen et al. 2009).

Tabell 3.3 viser en oversikt over beregnede sammenhenger mellom Avin_13880 og andre gener i *A. vinelandii* etter søk i STRING database. STRING oppgir score på 0,400 som en grense for medium konfidens og 0,700 som en grense for høy konfidens. For genene i *A. vinelandii* er det bare oppgitt score for co-occurrence og lokasjon, andre sammenhenger er ikke funnet/undersøkt.

Tabell 3.3 Sammenheng mellom Avin_13880 og andre gener i *A. vinelandii*. Beregnet score etter søk i STRING database.

Gen	Funksjon	Co-occurrence	Lokasjon	Total score
Avin_13870	Hypotetisk protein		0,571	0,571
<i>dgoR</i> (Avin_51350)	Transkripsjonsregulator protein DgoR	0,766		0,43
Avin_13840	Hypotetisk protein	0,365	0,165	0,427
<i>cmoA</i> (Avin_13860)	Metyltransferase		0,415	0,415
<i>cmoB</i> (Avin_13850)	Metyltransferase		0,415	0,415
Avin_5370	Celledelingsprotein FtsN	0,213*	0,297	0,409

*Ikke i *A. vinelandii*, men basert på homologe gener i andre arter.

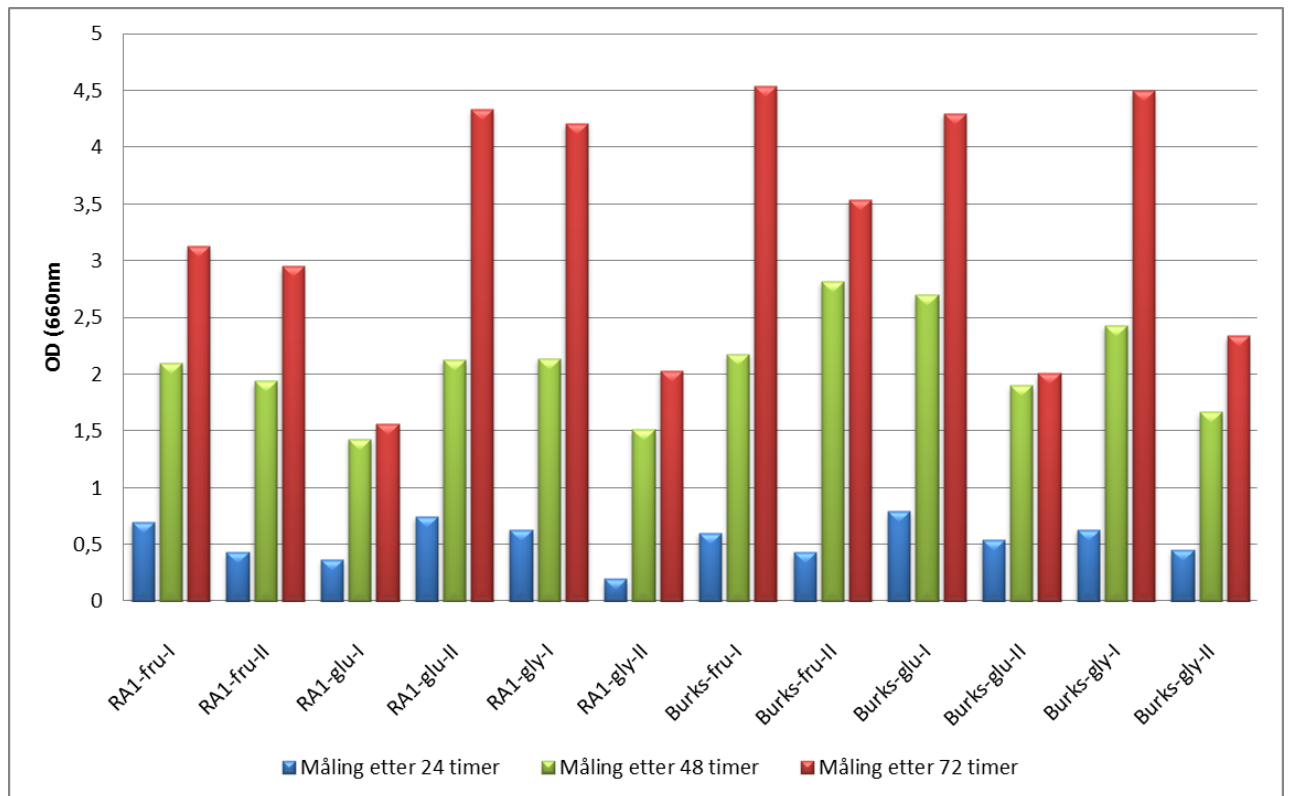
De fleste genene i tabellen havner i kategorien medium konfidens om man ser på total score. Avin_5370 skiller seg litt ut med at genene ikke er nært beliggende i *A. vinelandii* og nærmere undersøkelser viser at genene ligger nært hverandre i *Psycrobacter* sp. PRwf. *cmoA* og *cmoB* og Avin_13870 har nær beliggenhet til Avin_13880, men ikke betydelig co-occurrence i andre arter.

For *dgoR* er beregnet score for lokasjon ubetydelig, men beregnet score for co-occurrence er høy (0,766). Dette kan antyde en sammenheng mellom disse genene. *dgoR* koder for en IclR transkripsjons-regulator og ligger i en klynge med gener involvert i DeLey Doudoroff-sporet. Dette sporet metaboliserer galaktose via galaktonat → 2-keto-3-deoksy-D-galaktonat → 2-keto-3-deoksy-D-galaktonat-6-fosfat til glyceraldehyd-3-fosfat og pyruvat (Wong & Yao 1994). Genene i klyngen er: *dgoT* (D-galaktonat transporter), *galD* (galaktonat dehydratase), *dgoA* (2-keto-3-deoksy-6-fosfogalaktonat aldolase), *dgoK* (2-keto-3-deoksy-6-galaktono kinase) og *dgoR*.

3.4 *A. VINELANDII* 20A6: VIDERE UNDERSØKELSE

For å undersøke stamme 20A6 videre ble det satt opp en PCR for å undersøke at stammen kun inneholdt mutert/inaktivert versjon av *sucA*-genet (3.4.1). Videre ble det konstruert transposonplasmider for å komplementere stammen med villtype-gener (3.4.2) og komplementerte stammer ble så undersøkt for alginat-produksjon (3.4.3).

På grunn av tidvise problemer med å dyrke opp stamme 20A6 ble det gjort et forsøk på å benytte ulike karbonkilder og medium for å se om dette hadde en innvirkning på stammens vekst. Det ble forsøkt med RA1 og Burks medium og fruktose, glukose og glycerol som karbonkilder (figur 3,13, tabell i vedlegg H). Undersøkelsen ga ikke konklusive svar og Burks medium med fruktose som karbonkilde ble benyttet til videre undersøkelser av *A. vinelandii* 20A6.



Figur 3.13 Undersøkelse av *A. vinelandii* 20A6 i RA1 og Burks medium med varierende karbonkilde. Alle i to paralleller. Mediene er tilsatt Tc, Sp og varierende karbonkilde. fru-fruktose, glu-glukose, gly-glycerol.

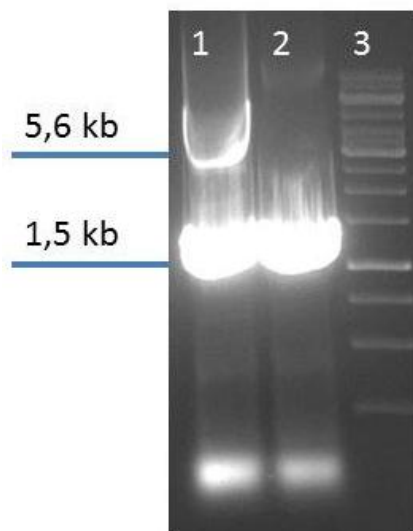
3.4.1 RENHETSKONTROLL *A. VINELANDII* 20A6

For å sjekke at stamme 20A6 kun inneholder kromosomer med mutert *sucA* og ikke villtypegener, ble det satt opp en PCR med primere på hver side av insersjonssted for transposonet. Primerne som ble benyttet var sekpmH3 3051 og sekvpHM3 4512C. Uten innsatt transposon vil disse gi et fragment på ca 1,5 kb. Transposonet er på 4,1 kb og ved en ren mutantstamme vil derfor fragmentet være på ca 5,6 kb. Stamme 20A6 viste seg å ha både mutant og villtype av *sucA*-genet.

3.4.1.1 FORSØK PÅ Å SEGREGERE FOR MUTERT *sucA*

A. vinelandii 20A6 hadde både villtype og mutante utgaver av *sucA*-genet og på bakgrunn av dette ble det gjort et forsøk på å dyrke stammen med økende mengde spectinomycin for å segregere for kromosom med mutert *sucA*. Stammen ble vurdert i mikroskop for å se etter typiske trekk for *A. vinelandii*, det vistes runde bakterier lå to og to (typisk for *A. vinelandii*). Startkonsentrasjonen var på 20 µg/ml Sp og denne ble øket med 5 µg for hver utvokst stamme som ble overført i nytt medium. Dette ble gjort helt til stammen viste en tydelig forsinket/reduert vekst, konsentrasjonen var da 50 µg/ml.

DNA fra stamme dyrket med 50 µg/ml Sp ble PCR-amplifisert med primerne sekpmH3 3051 og sekvpHM3 4512C. Også stammen som var dyrket for å forsøke å segregere for kromosom med mutert *sucA* viste seg å inneholde både villtype og mutert versjon av genet (Figur 3.14). En eventuell mindre økning i andel gener med mutasjon vil ikke være visuelt påvisbar siden PCR har mye høyere affinitet for de kortere fragmentene. Forholdet kunne vært vurdert med real time-PCR, men så lenge stammen inneholder begge versjoner av genet vil forholdet mellom disse kunne endres under dyrking.



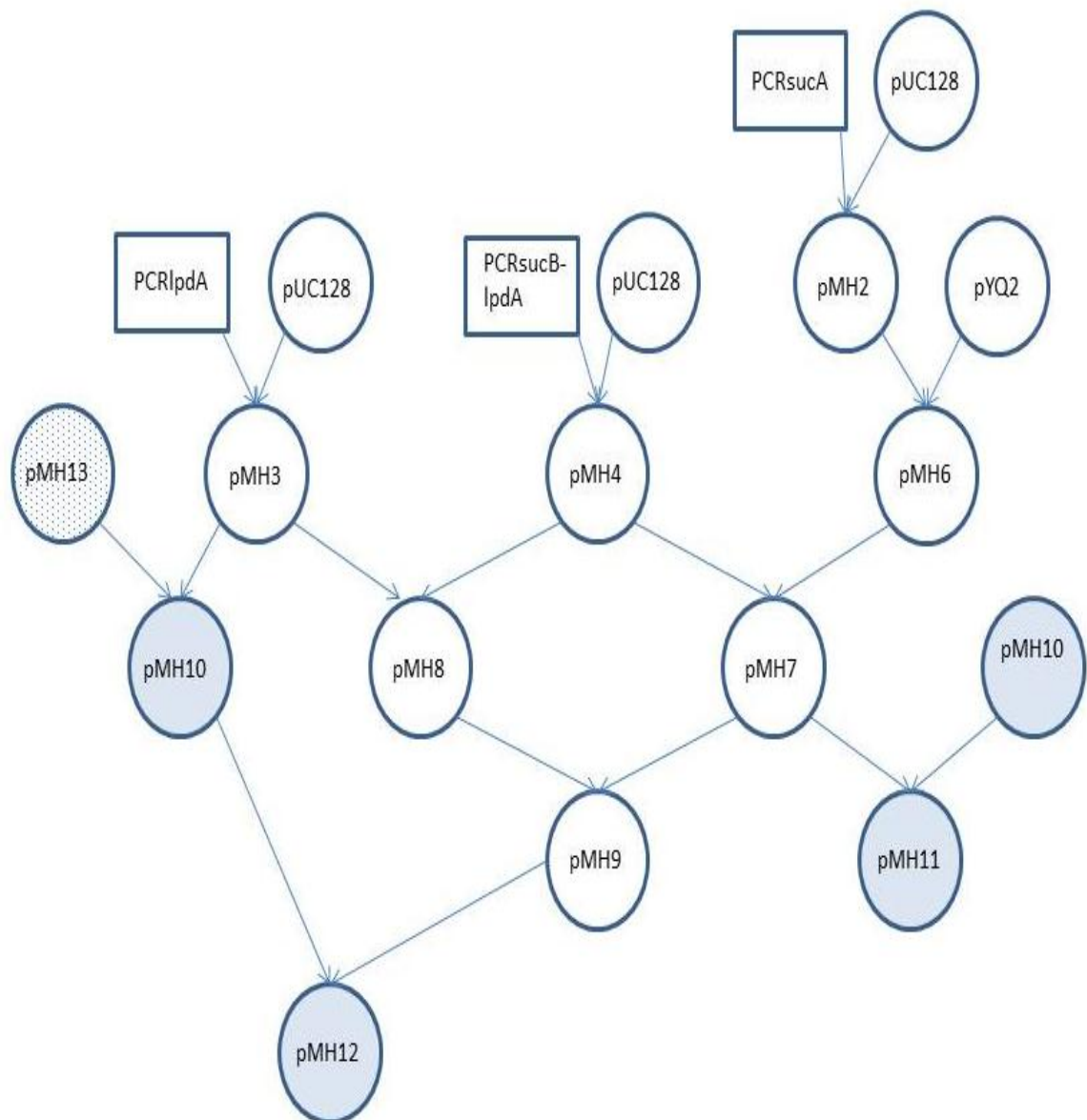
Figur 3.14 Gelelektroforese av PCR-produkt for kontroll av transposon-insersjon i *sucA* etter forsøk på seleksjon. 1: *A. vinelandii* 20A6. 2: *A. vinelandii* UW. 3: DNA- standard D.

Fermenteringsforsøk utført av SINTEF og undersøkelser i denne oppgaven har vist at 20A6 har endret fenotype sammenlignet med utgangsstammen, det ble derfor valgt å gå videre med stammen selv om den inneholder både mutert og villtype-versjon av *sucA*.

3.4.2 TRANSPOSONVEKTORER TIL KOMPLEMENTERING AV 20A6

For å komplementere stamme 20A6 som har mutasjon i *sucA*-genet, ble det laget tre forskjellige transposonvektorer som inneholdt villtype-gener under kontroll av en P_m-promoter. Det ble laget en transposonvektor som inneholdt *lpdA*-genet (pMH10), en som inneholdt genene *sucA* og *sucB* (pMH11) og en som inneholdt hele operonet bestående av *sucA*, *sucB* og *lpdA* (pMH12). Dette ble gjort for å undersøke om genene *sucA* og *sucB* (og eventuelt *lpdA*) transkriberes sammen i et operon. En slik oppdeling vil også kunne gi indikasjoner på om alle tre genene, eller eventuelt bare *SucAB* eller *lpdA* er nødvendig for alginatsyntese. Det vil også være mulig å undersøke for overuttrykk for de enkelte genkomponenten og en samlet genklynge.

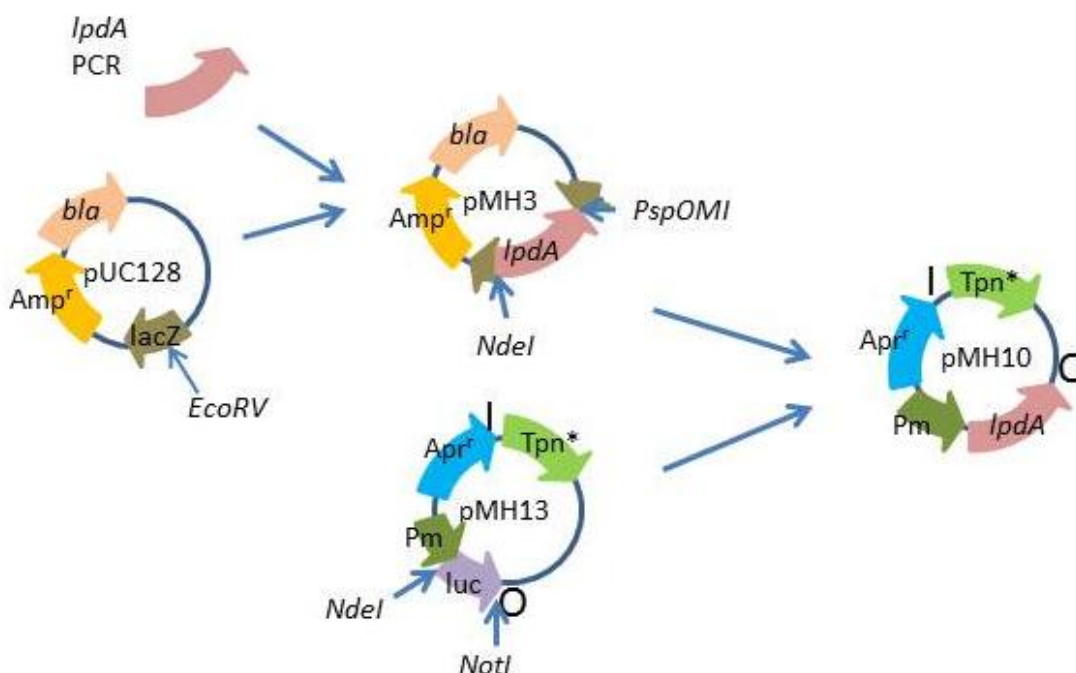
Et flytskjema for alle plasmidene laget i prosessen for komplementering er vist i Figur 3.15.



Figur 3.15 Oversikt over plasmider laget for å komplementere *A. vinelandii* 20A6. Plasmider i blått er transposonvektorer brukt i konjugering. Konstruksjon av transposonvektor pMH13 er vist i kap. 3.3.2

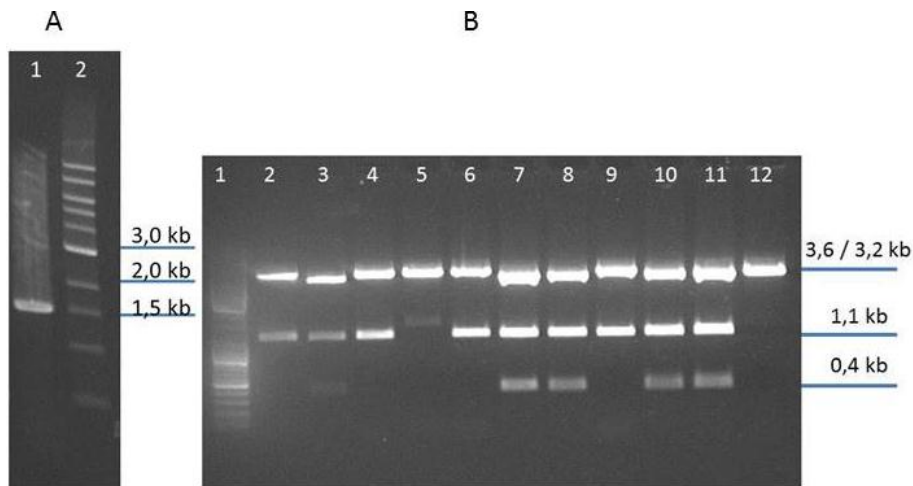
3.4.2.1 TRANSPOSONVEKTOR PMH10

For å komplementere stamme 20A6 med villtype av *lpdA* under kontroll av Pm-promoter ble genet klonet inn i transposonvektor pMH13, den nye transposonvektoren fikk navnet pMH10. En oversikt over konstruksjonen er vist i Figur 3.16.



Figur 3.16 Konstruksjon av transposonplasmid pMH10. Denne inneholder *lpdA* under kontroll av Pm-promoter samt gen for apramycin-resistens, genene er flankert av transposonelementer O og I. Vektoren inneholder også gen for transposase og andre elementer som er nødvendige for konjugering. pUC128 inneholder gener for ampicillin-resistens og gener som muliggjør seleksjon av pMH3 med blå/hvit screening.

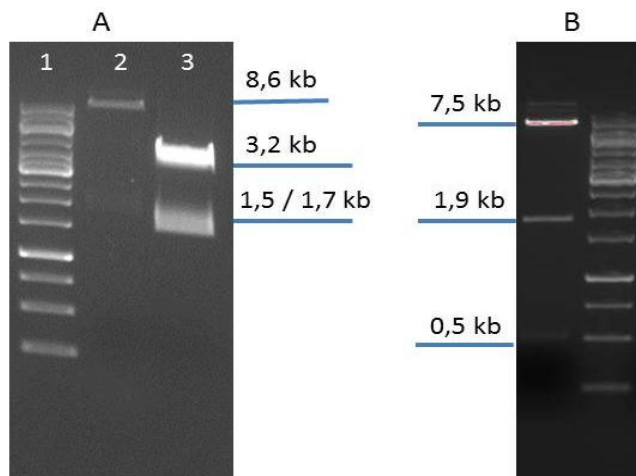
Et 1,5 kb fragment som dekket *lpdA*-genet ble PCR-amplifisert med primerne LpdAF og LpdAR (figur 3.17A). PCR $lpdA$ -fragment og pUC128 (kuttet med EcoRV) ble ligert sammen og transformert inn i RbCl-kompetente *E. coli* DH5 α . Bakteriene ble så selektert på bakgrunn av ampicillin-resistens og blå/hvit-screening. 11 kolonier med hvit farge ble dyrket opp, plasmidet ble rensset ut og kuttet med SpeI og BstBI (figur 3.17B). Korrekt kuttemønster er (kb): 3,2 + 1,1 + 0,4. Konstrukt med PCR-produkt satt inn feil vei vil gi (kb): 3,6 + 1,1 + 0,04.



Figur 3.17 A) PCR-fragment som inneholder *lpdA*. 1:PCR-fragment, 1,5 kb. 2) DNA-standard C. B) Konstrukt av PCR $lpdA$ og pUC128 kuttet med *SpeI* og *BstBI*. 1: DNA-standard B. 2-11: pMH3. 12: pUC128 uten insert (3,2 kb).

Plasmidene i brønn 3, 7,8,10 og 11 viser korrekt kuttemønster. Plasmid fra brønn 7 og 11 ble sekvensert med primerne P13F og M13R. Sekvensene ble sammenlignet med den forventede sekvensen i dataprogrammet Clone. Denne sammenligningen bekreftet at konstruktet var det ønskede. Sekvens-sammenligning finnes i vedlegg E. Plasmidet fikk navnet pMH3 og inneholder *lpdA*-genet.

Et 1,5 kb *NdeI*-*PspOMI*-fragment som inneholder *lpdA* fra pMH3 og et 8,6 kb *NotI*, *NdeI*-fragment fra pMH13 (Figur 3.18A) ble ligert sammen, transformert inn i kompetente *E. coli* S17.1 λ *pir* og selektert for apramycin-resistens.

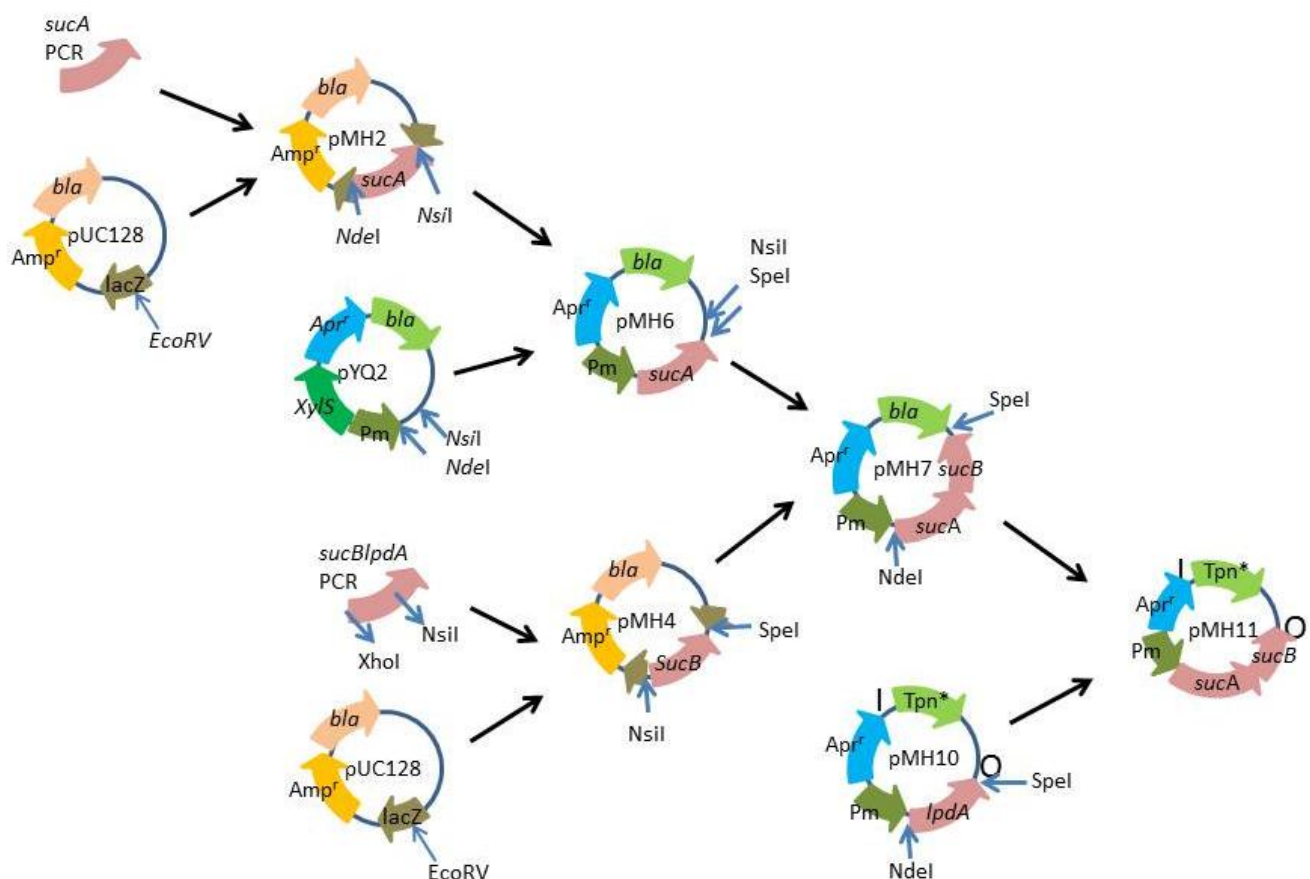


Figur 3.18 A) Gelelektroforese av kuttet pMH13 og pMH3. 1: DNA-standard D. 2: pMH13 kuttet med *NdeI* og *NotI*, forventede bånd (kb): 8,6 + 1,7. 3: pMH3 kuttet med *NdeI* og *PspOMI*, forventede bånd (kb): 3,2 + 1,5. B) Gelelektroforese av pMH10 kuttet med *NcoI*. 1:DNA-standard D. 2) pMH10 kuttet med *NcoI*, forventede bånd (kb): 7,5 + 1,9 + 0,5 + 0,1.

Konstruktet av pMH13 og pMH3 ble kuttet med NcoI for å verifisere riktig konstrukt (Figur 3.18B). Plasmid med korrekt kuttemønster fikk navnet pMH10 og er en transposonvektor som inneholder genet *lpdA* under kontroll av Pm-promoter. Denne ble konjugert inn i stammen 20A6 og navn på komplementærstamme er MH232.

3.4.2.2 TRANSPOSONVEKTOR PMH11

For å komplementere stamme 20A6 med villtype av *sucA/sucB* under kontroll av Pm-promoter ble genene klonet inn i transposonvektor pMH13, den nye transposonvektoren fikk navnet pMH11. En oversikt over konstruksjonen er vist i figur 3.18. Plasmidkart finnes i vedlegg F.



Figur 3.19 Konstruksjon av transposonplasmid pMH11. pMH11 inneholder *sucA* og *sucB* under kontroll av Pm-promoter samt gen for apramycin-resistens., disse er flankert av transposonelementer O og I. Vektoren inneholder også gen for transposase og andre elementer som er nødvendige for konjugering.

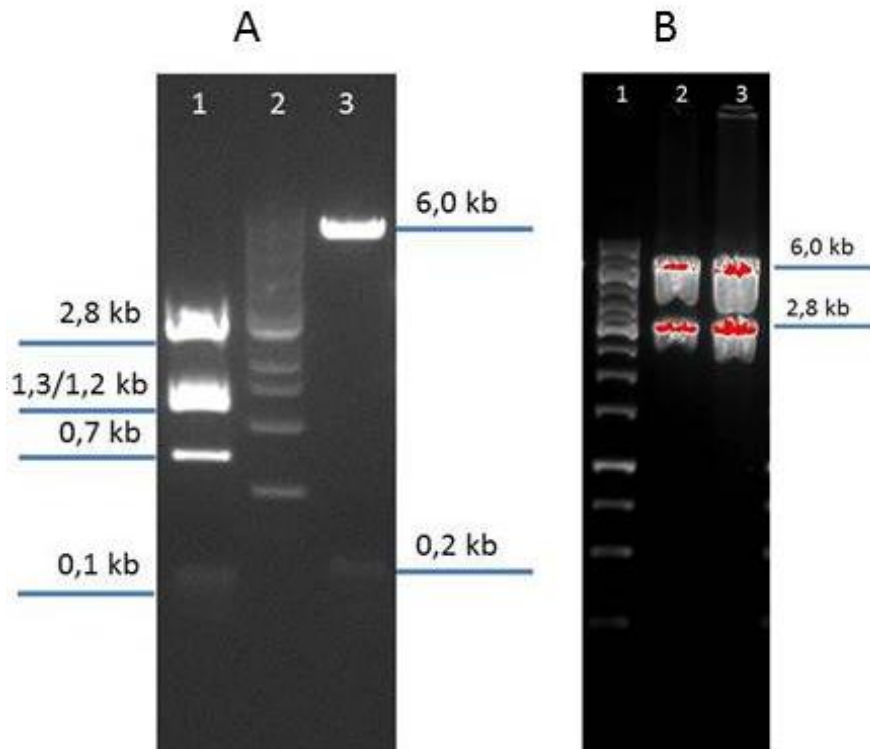
pMH2

Det ble forsøkt å lage et PCR-fragment med primerne AvinsucAF og AvinsucBR som ville dekket både *sucA* og *sucB*-genene, men PCR-reaksjonen var ikke vellykket og fragmentet utgikk derfor fra plasmidkonstruksjonen.

Et 2,9 kb fragment som dekket *sucA*-genet ble PCR-amplifisert med primerne sucAF og sucAR. PRCsucA-fragmentet og pUC128 (kuttet med EcoRV) ble ligert sammen, transformert inn i RbCl-kompetente *E. coli* DH5 α og selektert for ampicillin-resistens og blå/hvit-screening. 10 kolonier med hvit farge ble dyrket opp og kuttet for å se etter riktig insert (ikke vist). Ett plasmid som gav kuttemønster i samsvar med korrekt konstrukt ble sekvensert med primerne; pGEM, SekpHM3 3051, SekvpHM3 4512C, SekpHM3 4426 og M13rev. Sekvensene ble sammenlignet med den forventede sekvensen dataprogrammet Clone. En sekvens-sammenligning finnes i vedlegg E. Denne sammenligningen bekreftet at konstruktet var det ønskede og at det ikke fantes punktmutasjoner i PCR-fragmentet. Det nye plasmidet fikk navnet pMH2 og inneholder *sucA*.

pMH6

Et 2,8 kb NsiI-NdeI-fragment (som inneholder *sucA*) fra pMH2 og et 6 kb NsiI-NdeI-fragment fra pYQ2 (Figur 3.20A) ble ligert sammen, transformert inn i kompetente *E. coli* DH5 α og selektert for apramycin-resistens. Figur 3.20B viser pMH6 kuttet med NsiI og NdeI for å teste for korrekt insert, forventet kuttemønster er 6,0 kb og 2,8 kb. Plasmid uten insert ville gitt 6,0 kb og 0,2 kb. Nytt plasmid inneholder *sucA* og fikk navnet pMH6.

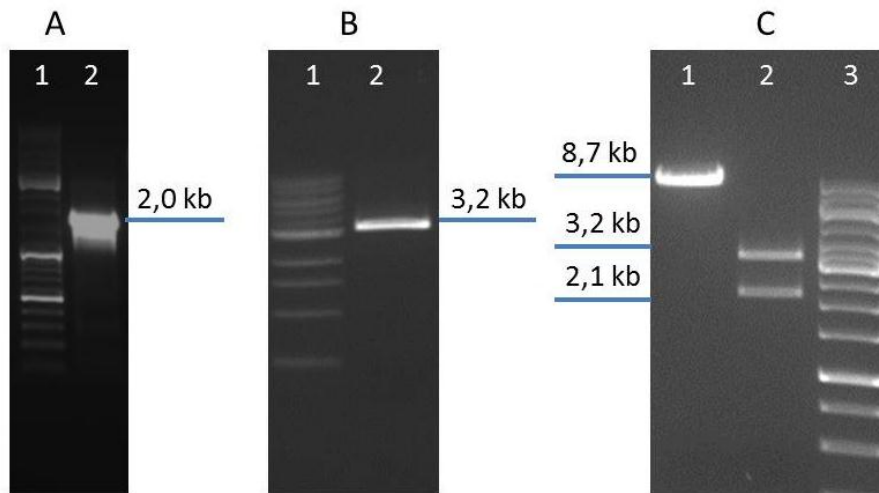


Figur 3.20 A) Gelelektroforese av kuttet pMH2 og pYQ2. 1: pMH2 kuttet med NsiI, NdeI og DraI. 2: DNA- standard C. 3: pYQ2 kuttet med NsiI og NdeI. B) pMH6 kuttet med NsiI og NdeI. 1: DNA- standard D. 2 og 3: pMH6.

pMH4

Et plasmid inneholdende *sucB*-genet ble forsøkt konstruert med et PCR-amplifisert 1,5 kb fragment av primerne *sucBF* og *sucBR*, men sekvensering etter liggering av fragmentet med pUC128 var ikke vellykket. Sekvenseringsresultater kunne tyde på at det var flere ulike produkter. Fragmentet utgikk av konstruksjonen og et 2,2 kb fragment amplifisert med primerne *LpdARXho* og *sucBF* ble benyttet. Dette fragmentet dekker både *sucB* og *lpdA*, men mye av *lpdA*-genet ble kuttet bort i konstruksjonen videre.

PCR-amplifisert *sucB**lpdA*-fragment ble kuttet med *XhoI* og *NsiI* for å fjerne deler av *lpdA*-genet. Deretter ble *XhoI*-*NsiI*-fragmentet på 2 kb inneholdende *sucB* ligert sammen med et 3,2 kb *XhoI*-*NsiI* fragment fra pUC128 (Figur 3.21A og B).



Figur 3.21 A) PCR-fragment *sucBlpdA* kuttet med *XhoI* og *NsiI*. 1: DNA- standard B. 2: Kuttet PCR fragment *sucBlpdA*. B) *pUC128* kuttet med *XhoI* og *NsiI*. 1: DNA-standard C. 2: Kuttet *pUC128*. C) *pMH6* og *pMH4* kuttet med *SpeI* og *NsiI*. 1: *pMH6*, forventede bånd (kb): 8,7 + 0,024. 2: *pMH4*, forventede bånd (kb): 3,2 + 2,1. 3: DNA-standard D.

Konstruktet ble transformert inn i *RbCl*-kompetente *E. coli* DH5 α og selektert på bakgrunn av ampicillin-resistens og blå/hvit-screening. 5 kolonier med hvit farge ble dyrket opp og plasmid rensset ut. Det ble satt opp en restriksjonskutting for verifisering av riktig konstrukt *pMH4* (Figur 3.21C, 2).

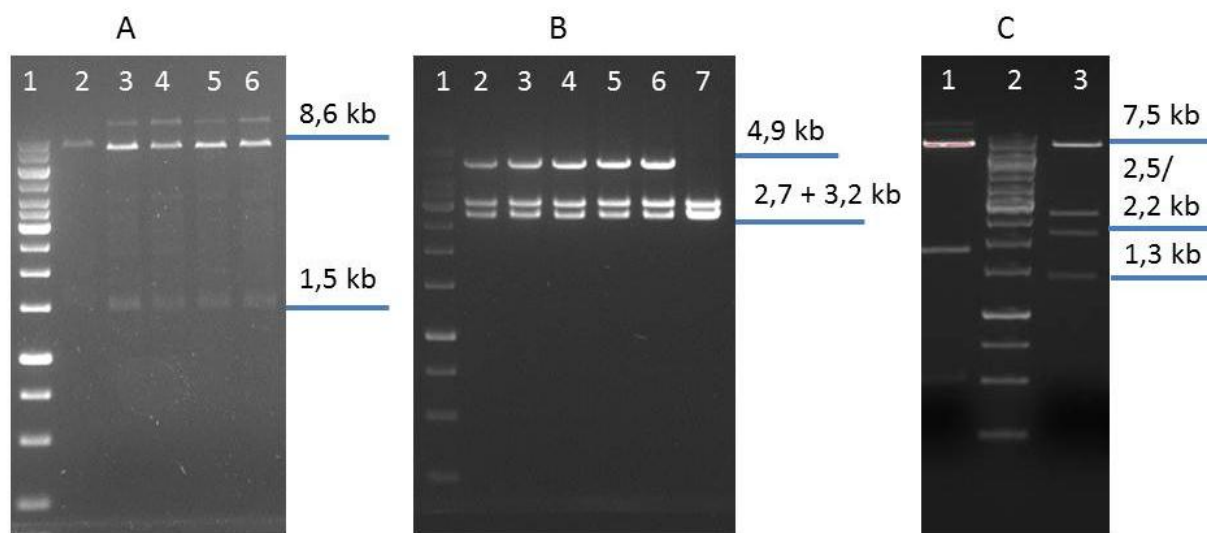
To plasmider som gav kuttemønster i samsvar med riktig konstrukt ble sekvensert med primerne; M13for, *sucBR*, *sekpHM8 896C*, M13rev. Sekvensene ble sammenlignet med den forventede sekvensen i dataprogrammet Clone. Sekvens-sammenligning finnes i vedlegg E. Denne sammenligningen bekreftet at konstruktet var det ønskede. Det nye plasmidet fikk navnet *pMH4* og inneholder *sucB*.

pMH7

Et 2,1 kb *NsiI-SpeI*-fragment fra *pMH4* (*sucB*) og et 8,7 kb *NsiI-SpeI*-fragment (3.21C) fra *pMH6* (*sucA*) ble ligert sammen, transformert inn i kompetente *E. coli* DH5 α og selektert for apramycin-resistens. Nytt plasmid inneholder *sucA* og *sucB* og fikk navnet *pMH7*. Kutting som verifiserer riktig plasmid finnes i Figur 3.24B.

pMH11

Et 4,9 kb SpeI, NdeI-fragment fra pMH7 som inneholder *sucA* og *sucB* (Figur 3.22B, 6) og et 8,6 kb SpeI, NdeI-fragment fra pMH10 (Figur 3.22A, 6) ble ligert sammen, transformert inn i kompetente *E. coli* S17.1 λ pir og selektert for apramycin-resistens. Konstruktet ble testkuttet for korrekt insert (Figur 3.22C)

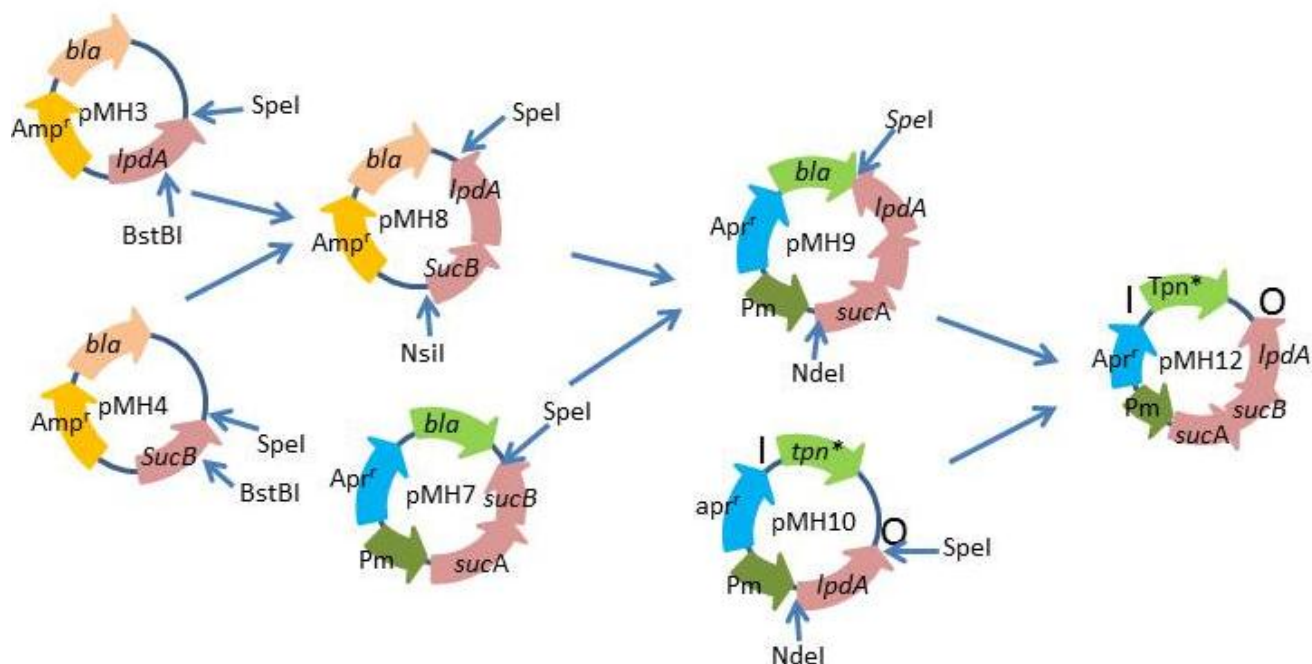


Figur 3.22 A) Kutting av pMH10 med SpeI og NdeI. 1: DNA-standard D. 2-6: pMH10, forventede bånd (kb): 8,6 + 1,5. B) Kutting av pMH7 med SpeI, NdeI og AvrII. 1: DNA-standard D. 2-6: MH7, forventede bånd (kb): 4,9 + 3,2 + 2,7. 7: MH6 (ktr.), forventede bånd (kb): 3,2 + 2,8/2,7. C) Kutting av pMH10 og pMH11 med NcoI. 1: pMH10, forventede bånd (kb): 7,5 + 1,9 + 0,5 + 0,1. 2: DNA-standard D. 3: pMH11, forventede bånd (kb): 7,5 + 2,5 + 2,2 + 1,3.

Nytt plasmid er transposonvektor pMH11 som inneholder genene *sucA* og *sucB* under kontroll av Pm-promoter. pMH11 ble konjugert inn i stammen 20A6 og navn på komplementærstammer er MH221 og MH222.

3.4.2.3 TRANSPONONVEKTOR PMH12

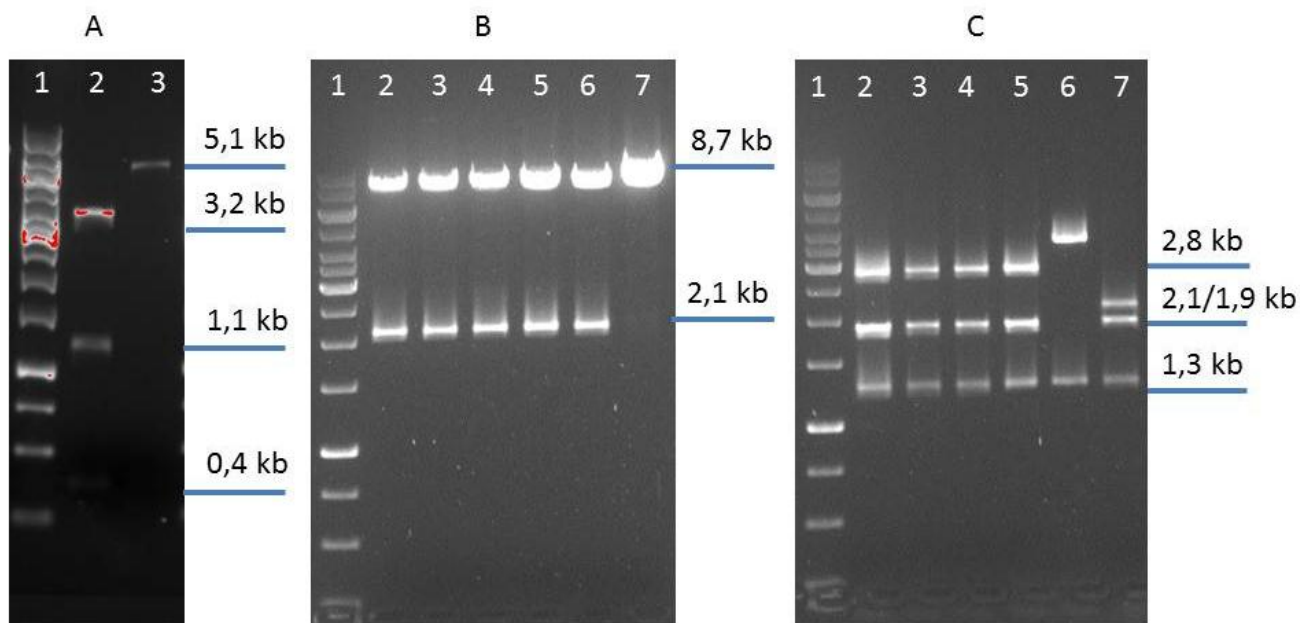
For å komplementere stamme 20A6 med villtype av *sucA/sucB/lpdA* under kontroll av Pm-promoter ble genene klonet inn i transposonvektor pMH13, den nye transposonvektoren fikk navnet pMH12. En oversikt over konstruksjonen er vist i Figur 3.23. Plasmidkart finnes i vedlegg F.



Figur 3.23 Konstruksjon av transposonplasmid pMH12. pMH12 inneholder *sucA*, *sucB* og *lpdA* under kontroll av Pm-promoter samt gen for Apr-resistens, disse er flankert av transposonelementer O og I. Vektoren inneholder også gen for transposase og andre elementer nødvendige for konjugering.

Et 1,1 kb BstBI-SpeI-fragment fra pMH3 som inneholder *lpdA*, og et 5,1 kb BstBI-SpeI-fragment fra pMH4 som inneholder *sucB* (Figur 3.24A) ble ligert sammen, transformert inn i kompetente *E. coli* DH5 α og selektert for ampicillin-resistens. Nytt plasmid pMH8 inneholder genene *sucB* og *lpdA*. Kutting som bekrefter riktig plasmid i Figur 3.24C.

Et 2,8 kb NsiI-SpeI-fragment fra pMH8 som inneholder *sucB* og *lpdA* (Figur 3.24C, 5) og et 8,7 kb NsiI-SpeI-fragment fra pMH7 som inneholder *sucAB* (3.24B, 1) ble ligert sammen, transformert inn i kompetente *E. coli* 17.1 λ pir og selektert for apramycin-resistens.

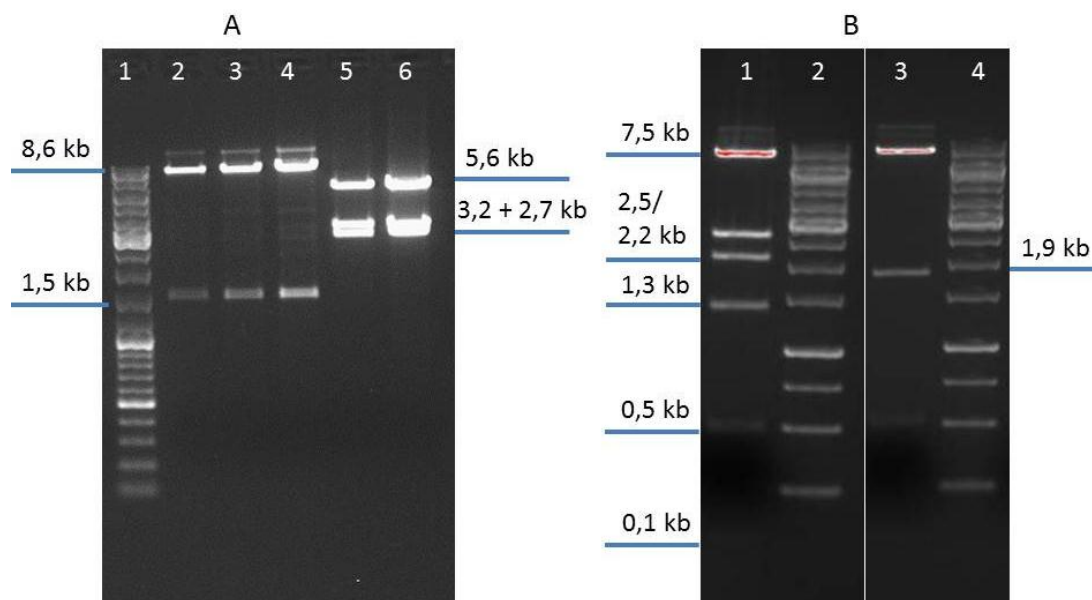


Figur 3.24 A) pMH3 og pMH4 kuttet med BstBI og SpeI. 1: DNA-standard D. 2: pMH3, forventede bånd (kb): 3,2 + 1,1 + 0,4. 3: pMH4, forventede bånd (kb): 5,1 og 0,4 (0,4 er lite synlig her, men verifisert på en annen gel). B) pMH7 kuttet med SpeI og NsiI. 1: DNA-standard D. 2-6: pMH7, forventede bånd (kb): 8,7 + 2,1. 7: pMH6 (ktr.), forventede bånd (kb): 8,7 + 0,024. C) pMH8 kuttet med SpeI, NsiI og XmnI. 1: DNA-standard D. 2-6: pMH8, forventede bånd (kb): 2,8 + 1,9 + 1,3 + 0,2. 7: pMH4 (ktr.), forventede bånd (kb): 2,1 + 1,9 + 1,3.

Konstruktet av pMH7 og pMH8 ble kuttet med SpeI, NdeI og AvrII for verifisering av korrekt insert. Kuttemønsteret tilsvarte det forventede (figur 3.25A, 5 og 6) og nytt plasmid som inneholder *sucA*, *sucB* og *lpdA* kalles pMH9.

Et 5,6 kb SpeI-NdeI-fragment fra pMH9 (figur 3.25A, 6) og et 8,6 kb SpeI-NdeI-fragment fra pMH10 (3.25A, 4) ble ligert sammen, transformert inn i kompetente *E. coli* S17.1 λ pir og selektert for apramycin-resistens.

Konstruktet av pMH9 og pMH10 (sammen med pMH10 for kontroll) ble kuttet med *NcoI* for verifisering av korrekt insert (Figur 3.25B). Kuttemønsteret tilsvarte det forventede og plasmidet fikk navnet pMH12, denne inneholder *sucA*, *sucB* og *lpdA* under kontroll av Pm-promoter. pMH12 ble konjugert inn i stammen 20A6, navn på komplementerte stammer er MH241 og MH242.

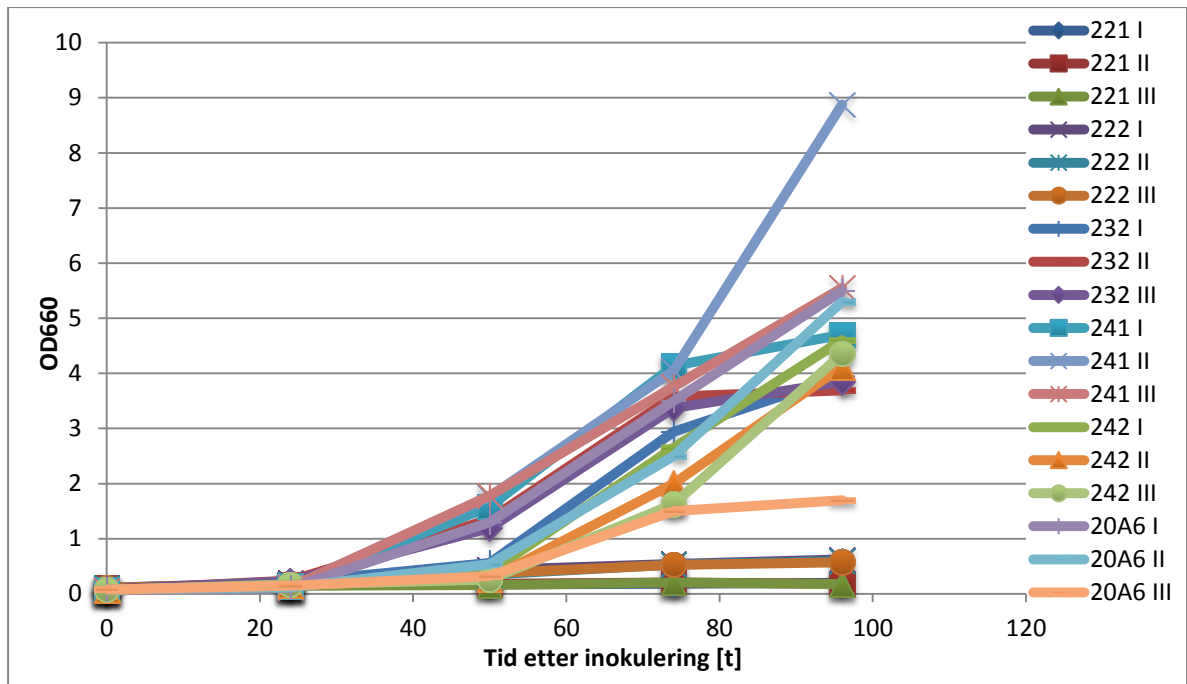


Figur 3.25 A) Gelelektroforese av kuttet pMH9 og pMH10. 1: DNA-standard B. 2-4: pMH10 kuttet med *SpeI* og *NdeI*, forventede bånd (kb): 8,6 + 1,5. 5, 6: pMH9 kuttet med *SpeI*, *NdeI* og *AvrII*, forventede bånd (kb): 5,6 + 3,2 + 2,7. B) Gelelektroforese av pMH12 og pMH10 kuttet med *NcoI*. 1: pMH12, forventet kuttemønster er (kb): 7,5 + 2,5 + 2,2 + 1,3 + 0,5 + 0,1. 2: DNA-standard D. 3: pMH10, forventet kuttemønster er (kb): 7,5 + 1,9 + 0,5 + 0,1. 4: DNA-standard D.

3.4.3 KOMPLEMENTERING AV *SUCA*, *SUCB* OG *LPDA*

De komplementerte stammene ble dyrket i kolber i flytende BM-medium tilsatt Tc, Sp og Apr, stammene ble overført i nytt medium med seleksjon 5-6 ganger for å selektere bort kromosomkopier uten innsatt transposon. Det tok lang tid før stammene viste stabil og god vekst og de viste heller ingen tegn til å produsere alginat ved tilsats av m-toluat.

Figur 3.26 viser veksten på de komplementerte stammene sammenlignet med stammen 20A6. Tabell fra vekstundersøkelse finnes i vedlegg H.



Figur 3.26 Celletetthet målt over tid på komplementerte stammer av *A. vinelandii* 20A6. MH221, MH222, MH232, MH241 og MH242, samt utgangsstamme 20A6. Stammene er dyrket i Burkes medium med Apr, Sp og m-toluat (0,2mM), kontrollstamme 20A6 med Tc og Sp. Tabell finnes i vedlegg H.

Det ble ikke gjennomført kvantitative alginat-undersøkelser på disse stammene, kun kvalitative undersøkelser, med stammen 12518Tc som positiv kontroll. 12518Tc produserte betydelige mengder alginat. Stammene ble også undersøkt i mikroskop for verifisering av *A. vinelandii*-typisk utseende for å utelukke vekst av andre bakterier, eksempelvis konjugeringsdonor *E. coli*. Vekst av andre bakterier kunne ikke observeres og bakteriene i kulturene hadde alle visuelle observerbare trekk av *A. vinelandii*.

4 DISKUSJON

4.1 UNDERSØKELSE AV 17 NEDMUTANTER

Veksten til de 17 stammene ble sammenlignet med veksten til kontroller som har en kjent vekstrate. Alle de undersøkte stammene vokser betydelig saktere enn kontrollene og i løpet av forsøket som varer i 103 timer er det ingen av stammene som nærmer seg celletettheten målt i kontrollstammene. En del av stammene flokkulerte og dette kan ha hatt innvirkning på målt celletetthet.

Utført alginat-assay viser at ingen av stammene produserer målbare mengder alginat, dette var som forventet på bakgrunn av foregående screeningundersøkelse. Kontrollene viser alginatproduksjon som forventet fra tidligere undersøkelser, noe som bekrefter at alginatmålingene er korrekte. De åtte utvalgte stammene ble sekvensert og det ble gjennomført et BLASTn-søk for å detektere inserjonsstedet for transposonet. Dette søket viste at stammene inneholdt transposonvektorsekvens. Transposonvektor skal ikke kunne replikere i *A. vinelandii* og dette kan indikere at stammene var kontaminerte med *E. coli* som ble benyttet som donorstamme for transposonvektoren. Dette kunne muligens vært unngått ved bruk av Burks medium og ikke RA1 som ble benyttet. RA1 er et rikere vekstmedium og dermed ikke like selektivt for *A. vinelandii* (pers. med. Helga Ertesvåg & Mali Mærk). RA1-medium har i tillegg høyere konsentrasjon av Mg^{2+} , høyt innhold av Mg^{2+} gir nedsatt opptak av tetracyklin i cellene og dermed lavere effekt av denne som seleksjonsmarkør (Sompolinsky & Samra 1972).

Det ble konkludert med at disse stammene ikke skulle undersøkes videre og denne delen av oppgaven ble terminert.

I vekst-undersøkelse av stamme 21C3T ble det funnet at stammen har en betydelig redusert vekst i forhold til utgangsstammen 12518Tc. Undersøkelse av alginatproduksjon viser en liten beregnet mengde alginat på to av parallellene etter 15 timers vekst, men assayet viser også en liten mengde alginat i to av parallellene til stammen UW, denne stammen er en kjent nullprodusent av alginat og det er sannsynlig at målingen har en usikkerhet som gjør at disse stammene viser produksjon av alginat. Alginatkonsentrasjon i prøveuttak to og tre (data ikke vist) og fire (103 timer) viser negative verdier for beregnet alginatkonsentrasjon. Dette er nok mer i overrenstemmelse med faktiske forhold, men det kan ikke utelukkes at stammen produserer en liten mengde alginat i begynnelsen av vekstforsøket. *A. vinelandii* produserer også ekstracellulære alginat-lyaser som kan degradere alginat (Gimmestad et al. 2009).

Det ble også satt opp en PCR med primere på hver side av insersjonsstedet for transposonet. Dette ble gjort med bakgrunn i at *A. vinelandii* har flere kopier av kromosomet og uten tilstrekkelig seleksjon for kromosom med innsatt transposon vil kromosom med villtype-gen kunne overleve og være tilstede i mutantstammen. Denne undersøkelsen viste kun tilstedeværelse av gen med innsatt transposon.

For å verifisere at det er inaktivering av Avin_13880 som gir den observerte fenotypen og for å kunne undersøke hva som skjer ved overuttrykk av dette genet ble det konstruert en transposonvektor med villtype av Avin_13880 satt under kontroll av en Pm-promoter. Stamme 21C3T fikk konjugert inn transposonvektor pMH5 og ble selektert på bakgrunn av antibiotikaresistens. Tre komplementerte stammer ble undersøkt og dyrket i medium med 0,2 mM m-tuloat. Den ene stammen (212) viste en vekstrate tilnærmet utgangsstammen 21C3T etter en litt forsinket lag-fase. To andre (205 og 208) vokste svært dårlig, men viste fortsatt vekst etter 200 timer. Det ble utført kvalitative alginat-

undersøkelser på stammene og disse undersøkelsene ga ingen indikasjoner på at stammene produserte målbare mengder alginat. Det var forventet at stammene skulle vise vekst tilnærmet eller høyere enn utgangsstammen og målbar alginatproduksjon. For å utelukke at stammene var kontaminerte med konjugeringsdonor *E. coli* ble det foretatt en mikroskopisk undersøkelse, men bakteriene i kulturen hadde alle visuelle trekk av *A. vinelandii*.

Det er flere mulige årsaker til at de komplementerte stammene ikke produserte målbare mengder alginat. Transposonet kan ha satt seg inn i et gen som er nødvendig for produksjon av alginat, det kan ha vært en feil i transposonvektoren som gjorde at villtype-genet ikke ble uttrykt som det skulle eller det ble produsert for lite alginat til at det var målbart. I og med at dette er et regulator-gen kan det også tenkes at genet som ble satt inn ble uttrykt i for stor grad og dermed hemmet vekst og syntese av alginat.

Det ble gjennomført bioinformatiske undersøkelser for å finne ut mer om funksjonen til *Avin_13880* og mulig innvirkning på syntesen av alginat. IclR-regulatorer kan regulere uttrykk av gener beliggende i nærheten, men også regulere gener som ligger plassert på andre steder i genomet. Dette gjør det vanskelig å bestemme hvilke cellulære funksjoner den regulerer bare med en bioinformatisk undersøkelse. Undersøkelsene som ble gjort kan tyde på at det er en sammenheng mellom regulatorgenet og genene i umiddelbar nærhet; *mmsA* og *Avin_13900*. Det ble gjort nærmere undersøkelser for å se om det kan være en sammenheng mellom *mmsA* og alginatsyntese. Undersøkelser av *P. Aeruginosa* som er resistent mot ciprofloxin viste at denne stammen hadde en økt fosforylering, dvs økt aktivitet av MSDH og succinat-semialdehyd dehydrogenase og et protein med ukjent funksjon (Su et al. 2010). Dette gir en oppregulert mengde ATP og NADH i cellen, noe som initierer redusert flux i sitronsyresyklus og øket syntese av PHB, dette gir mindre GTP og karbon tilgjengelig for alginat-syntese.

For å undersøke nærmere hvilke gener som reguleres av *Avin_13880* er det flere undersøkelser som kan gjøres. RT-PCR eller enzymatiske protein-analyser av uttrykk av gener beliggende i nærheten av *Avin_13880* kan gi en antydning om

disse genene blir regulert av IclR regulatoren, men en slik undersøkelse vil ikke dekke alle proteinene IclR kan regulere uttrykket av. En transkriptom-analyse av stamme 21C3T og villtype vil kunne vise hvilke gener som reguleres av denne IclR regulatoren.

Etter funn av regulerte gener vil det være mulighet for å søke etter bindings seter til HTH-DNA-bindende domene i IclR-regulatoren, slik kan en finne hvilke substrater som regulerer aktiviteten. En kan også undersøke for operator-sekvenser for regulatoren i promoter-regionen oppstrøms for Avin_13880 og nærliggende gener. Slike undersøkelser kan gjøres med dataprogrammer og databaser beregnet for dette.

4.3 UNDERSØKELSE AV *sucA*

Stamme 20A6 viser i undersøkelser lavere vekst enn utgangsstammen og ingen alginatproduksjon kan observeres. 20A6 viste seg å inneholde både villtype og mutant av *sucA*-genet og det ble forsøkt selektert for mutanttypen uten at dette var vellykket. Hvorfor stammen ikke vil la seg selekteres for mutert *sucA*, selv på høye konsentrasjoner av Sp, er usikkert. Dette kan indikere at mutasjonen ikke er forenlig med organismens overlevelse med fruktose som karbonkilde. Siden *A. vinelandii* har flere kopier av kromosomet kan den formodentlig finne en balansegang der den kan overleve med relativt høye konsentrasjoner av antibiotika og samtidig ha nok kopier av villtype-*sucA* til at den kan overleve. Problemene med å dyrke opp stammen samt at de varierende og inkonklusive veksttendensene stammen viser i dyrkningsforsøk kan henge sammen med dette. I noen tilfeller der stammen ikke vokste opp hadde den kanskje for få kopier av villtype *sucA* til å overleve.

Taylor and Anthony (1976) viste at *Pseudomonas* AM1 med inaktivert OGDH-kompleks (sannsynligvis mutasjon i *sucB*) kun vokste på C1- komponenter og oxalat som metaboliseres gjennom serin-sporet, dette kunne vært forsøkt for stamme 20A6 som i et ledd for å selektere for mutant *sucA*. Dette er også en indikator på at OGDH-komplekset er essensielt for at *A. vinelandii* skal overleve med fruktose som karbonkilde.

Mutanten har tidligere vært undersøkt i medietilsettingsforsøk hos Sintef med henblikk på at manglende alginat-produksjon kan skyldes mangel på succinyl-CoA og/eller dens derivater. Lysin, metionin og diaminopimelat ble brukt som tilsetninger i vekstmedium, biosyntesen av disse avhenger av succinyl-CoA. Ingen av tilsetningene hadde påviselig effekt på alginatproduksjonen, noe som indikerer at det ikke er mangel på disse derivatene som påvirker alginatsyntesen.

P. aeruginosa med inaktivert NDK er i stand til å produsere alginat i små mengder, noe som indikerer at det finnes andre kilder til GTP for alginatsyntese (Zaborina et al. 1999). En nonmukoid *P. aeruginosa* med mutasjon i *algR2* har nedregulert aktivitet av nukleosid difosfat kinase (NDK) og succinyl-CoA syntetase (SCS), men ikke i de andre enzymene i sitronsyresyklusen (Schlichtman et al. 1994). Disse funnene kan indikere at SCS-aktivitet bidrar med GTP til alginatsyntese.

Kapatral et al. (2000) undersøkte genene *sucCD* (koder for α og β -enhetene i SCS) i *P. aeruginosa* og fant at SCS danner NTP av korrelerende GTP, hovedsaklig GTP og ATP med enten GTP, ATP eller inorganisk P_i som fosfatdonor. SCS kan også omdanne succinat, CoA og ATP til succinyl-CoA, ADp og P_i . Kapatral et al. viste også at SCS sammen med et modifisert NDK (-dominerende form i stasjonær vekstfase) danner et kompleks som primært syntetiserer GTP og UTP (og ikke CTP). NDK i kompleks med andre proteiner (eks. pyruvat kinase) danner primært GTP med ATP som fosfat-donor. Undersøkelsene viste at SCS har en noe annen spesifisitet enn SCS i *E. coli* og genene er også noe ulikt arrangert i de to artene. På bakgrunn av dette er det en mulighet for at transkripsjon og regulering av genene i *P. aeruginosa* er lik den i *E. coli*.

Gen-arrangementet i *P. aeruginosa* ligner på det i *A. vinelandii* (Figur 1.11).

Videre litteraturstudier klarte ikke å finne en avklaring på regulering av genene i området eller om hvorvidt alginatsyntesen i *P. aeruginosa* er avhengig av GTP fra dette trinnet i sitronsyresyklus. I *A. vinelandii* ligger *lpdA*-genet plassert mellom *sucAB* og *sucCD*-genene. Westphal (1988) fant en sannsynlig promoter for *lpdA*-genet og det er derfor mulig å anta at denne kan transkriberes uavhengig for å danne pyruvat-dehydrogenase-komplekset.

Succinat inngår i sitronsyresyklus i trinnet etter succinyl-CoA og det kunne kanskje vært en idé å forsøke dette som karbonkilde til 20A6. Dersom stammen vokser på succinat, og lar seg selektere for mutant-*sucA*, men ikke produserer alginat kan dette indikere at GTP dannet i succinat-syntese er nødvendig for alginat-produksjon. Siden succinat kan inngå i syntese av succinyl-CoA, kan dette også bruke av cellens NTP og begrense mengden tilgjengelig GTP for alginatsyntese.

Siden 20A6 inneholder to versjoner av kromosomet, en med mutert *sucA* og en med villtype *sucA*, er det flere mulige grunner til at de komplementerte stammen ikke viser alginatproduksjon. Transposonet med villtype-gener kan ha satt seg inn i villtype-kromosomet i et gen som er nødvendig for alginat-produksjon, slik at disse har en utjevne effekt på hverandre, eller det blir fortsatt uttrykt for lite av villtype-genene på grunn av seleksjon for mutanttype-kromosomet slik at effekten av disse genene ikke er nok til å kompensere for mutantgenet.

Transposonet med villtype-gen kan ha satt seg inn i mutanttype-kromosomet i et gen som er nødvendig for alginatproduksjon og dermed utjevne effekten. Det kan også være en mulighet for at genene *sucC* og *sucD* ligger i en transkripsjons-/reguleringsenhet med *SucA* og *sucB*-genene (som i *E. coli*) og at det dermed er mangel på SCS som gir den nonmucoide fenotypen. Det kan heller ikke sees bort fra at det kan ha vært en feil i transposonvektoren eller tilsatt m-toluat som gjorde at genene ikke ble uttrykt, eller at genene ble uttrykt i for stor grad og satte i gang en annen hemmende effekt på alginatproduksjonen.

Walshaw et al. (1997) fant at mutasjon i *sucA* i *Rhizobium leguminosarum* vil føre til at mer 2-oxoglutarat vil ledes inn i glutamat syntese-sporet og transporteres ut av bakterien. *Rh. leguminosarum* er en diazotrof bakterie som lever i symbiose med planter og når villtype og *sucA*-mutanter ble satt sammen inn i rotknoller ble mutanten raskt utkonkurrert av villtypen. Også i *E. coli* er denne effekten observert (men i noe mindre grad), Li et al. (2006) har undersøkt *sucA*-inaktivering i *E. coli* og de fant, ikke overraskende, en redusert fluks gjennom sitronsyresyklus. OGDH-komplekset og SCS i *E. coli* var inaktiverte og glyoxylat-sporet var oppregulert. *A. Vinelandii* har også gener for en glyoxylat-shunt (figur 1.16). Isocitrat lyase (Avin_28420) kan omdanne isocitrat til glyoxylat og malat syntase (Avin_05920 og Avin_43290) kan omdanne glyoxylat, H₂O og acetyl-CoA til malat og CoA. Selv om dette sporet oppreguleres i *E. coli* vokser mutanten betydelig dårligere enn villtypen og ingen litteratur ble funnet om dette sporet i *A. vinelandii*.

I forbindelse med at 20A6 ikke produserer alginat kan det tenkes at akumulering av 2-oxoglutarat eller at tidligere intermediater induserer en nedregulering av alginat-produksjon. Det kan også finnes et system som «slår av» alginat-produksjonen ved akumulering av eksempelvis 2-oxoglutarat, dette kan forklare vanskelighetene med å komplementere stammen. Det kan også ligge et alginatsyntese-stimulerende trinn senere i sitronsyresyklus. En annen og noe enklere forklaring er at akkumulering av acetyl-CoA og NADH øker PHB-syntesen og at det dermed blir mindre karbon tilgjengelig for syntese av alginat. Det er heller ikke sikkert at det bare finnes en direkte årsak til manglende alginatproduksjon i 20A6. Alginat-syntesen er en innfløkt regulert prosess og det er sannsynlig at inaktivering av et sentralt kompleks som OGDH vil influere på flere hold.

5 KONKLUSJON

Undersøkelsene i denne oppgaven har bekreftet den tidligere observert fenotypen til stammene 21C3T og 20A6. Det er i tillegg vist at i alle fall *sucA* er relativt nødvendig for vekst med fruktose som karbonkilde. For å bekrefte at det kun er mutasjon i *sucA*-genet som gir fenotypen vil det være nødvendig å finne en karbonkilde denne mutanten kan vokse på, mulige alternativer kan være C1-kilder.

Det kan altså trekkes flere mulige hypoteser om inaktivering av *sucA*-genet på bakgrunn av funnene som er gjort i oppgaven. Alginatsyntesen kan være hemmet på grunn av akkumulering av mellomprodukter. Det er også en mulighet for at det er mangel på karbon til alginatsyntese fordi dette kanaliseres til PHB-syntese, PHB i mutanten kunne vært målt for å undersøke dette nærmere.

Det kan også være mangel på GTP til alginatsyntese, enten på grunn av manglende succinyl-CoA som kan omdannes til succinat eller ko-regulering av genene (er dette tilfelle kan også *lpdA*-genet være inaktivert/nedregulert). Det kunne vært interessant å undersøke denne hypotesen videre, særlig siden dette trinnet ikke danner NADH som vil hemme flux i sitronsyresyklus og trinnet gir i tillegg CoA som direkte hemmer PHB-syntese. Dette kan altså være et mulig spor for oppregulering av alginat-produksjon.

Siden IclR-proteiner ofte er involvert i regulering av karbonmetabolismen kan dette tyde på at alginatsyntesen er påvirket av fluks gjennom sentral karbonmetabolisme, men flere undersøkelser er nødvendige for å vise hvilke gener som blir regulert.

6 LITTERATUR

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215 (3): 403-10.
- Anderson, A. J., Hacking, A. J. & Dawes, E. A. (1987). Alternative pathways for the biosynthesis of alginate from fructose and glucose in *Pseudomonas mendocina* and *Azotobacter vinelandii*. *Journal of General Microbiology*, 133 (4): 1045-1052.
- Avery, O. T., Macleod, C. M. & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types : Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III. *J Exp Med*, 79 (2): 137-58.
- Bakkevig, K., Sletta, H., Gimmetstad, M., Aune, R., Ertesvåg, H., Degnes, K., Christensen, B. E., Ellingsen, T. E. & Valla, S. (2005). Role of the *Pseudomonas fluorescens* alginate lyase (AlgL) in clearing the periplasm of alginates not exported to the extracellular environment. *J Bacteriol*, 187 (24): 8375-84.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2007). *Biochemistry*. 6th utg. New York: W.H. Freeman.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7 (6): 1513-23.
- Boone, D. R., Castenholz, R. W. & Garrity, G. M. (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology / George M. Garrity, editor-in-chief*. 2nd utg. New York: Springer.
- Boyd, A., Ghosh, M., May, T. B., Shinabarger, D., Keogh, R. & Chakrabarty, A. M. (1993). Sequence of the *algL* gene of *Pseudomonas aeruginosa* and purification of its alginate lyase product. *Gene*, 131 (1): 1-8.
- Brune, I., Jochmann, N., Brinkrolf, K., Hüser, A. T., Gerstmeir, R., Eikmanns, B. J., Kalinowski, J., Pühler, A. & Tauch, A. (2007). The IclR-type transcriptional repressor LtbR regulates the expression of leucine and tryptophan biosynthesis genes in the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, 189 (7): 2720-33.
- Bunik, V., Westphal, A. H. & de Kok, A. (2000). Kinetic properties of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from *Azotobacter vinelandii* evidence for the formation of a precatalytic complex with 2-oxoglutarate. *Eur J Biochem*, 267 (12): 3583-91.

- Bush, J. A. & Wilson, P. W. (1959). A non-gummy chromogenic strain of *Azotobacter vinelandii*. *Nature*, 184 (4683): 381-381.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69 (8): 2110-4.
- Curson, A. R. J., Sullivan, M. J., Todd, J. D. & Johnston, A. W. B. (2009). Identification of genes for dimethyl sulfide production in bacteria in the gut of Atlantic Herring (*Clupea harengus*). *ISME J*, 4 (1): 144-146.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. & Timmis, K. N. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol*, 172 (11): 6568-72.
- Draget, K. I., Skjåk-Bræk, G. & Stokke, B. T. (2006). Similarities and differences between alginic acid gels and ionically crosslinked alginate gels. *Food Hydrocolloids*, 20 (2-3): 170-175.
- Draget, K. I. & Taylor, C. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids*, 25 (2): 251-256.
- Ertesvåg, H., Erlien, F., Skjåk-Bræk, G., Rehm, B. H. & Valla, S. (1998). Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. *J Bacteriol*, 180 (15): 3779-84.
- Ertesvåg, H. & Skjåk-Bræk, G. (1999). Modification of alginate using mannuronan C-5-epimerases. I: Bucke, C. (red.) *Methods in biotechnology 10: carbohydrate bio/technology protocols.*, s. 71-78. Totowa, N.J.: Humana Press, Inc.
- Ertesvåg, H., Høidal, H. K., Hals, I. K., Rian, A., Doseth, B. and Valla, S. (1995). A family of modular type mannuronan C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Microbiology*, 16: 719-731.
- Frank, R. A. W., Price, A. J., Northrop, F. D., Perham, R. N. & Luisi, B. F. (2007). Crystal structure of the E1 component of the *Escherichia coli* 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex. *J Mol Biol*, 368 (3): 639-651.
- Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T. & Howell, P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology*, 2.
- Fry, J., Wood, M. & Poole, P. S. (2001). Investigation of myo-inositol catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and its effect on nodulation competitiveness. *Mol Plant Microbe Interact*, 14 (8): 1016-25.
- Fuhrer, T., Fischer, E. & Sauer, U. (2005). Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J Bacteriol*, 187 (5): 1581-90.

- Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D. & Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 6.
- Garrett, R. & Grisham, C. M. (2007). *Biochemistry*. Updated 3rd utg. Southbank, Vic., Australia ; Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole.
- Gimmestad, M., Sletta, H., Ertesvåg, H., Bakkevig, K., Jain, S., Suh, S. J., Skjåk-Bræk, G., Ellingsen, T. E., Ohman, D. E. & Valla, S. (2003). The *Pseudomonas fluorescens* AlgG protein, but not its mannuronan C-5-epimerase activity, is needed for alginate polymer formation. *J Bacteriol*, 185 (12): 3515-23.
- Gimmestad, M., Ertesvåg, H., Heggeset, T. M., Aarstad, O., Svanem, B. I. & Valla, S. (2009). Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination. *J Bacteriol*, 191 (15): 4845-53.
- Gorin, P. A. J. & Spencer, J. F. T. (1966). Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Canadian Journal of Chemistry*, 44 (9): 993-998.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C. & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, 32 (1): 195-198.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166 (4): 557-80.
- Haug, A. S. O. (1964). *Composition and properties of alginates*. Trondheim: Norges tekniske høgskole.
- Hayaishi, O., Nishizuka, Y., Tatibana, M., Takeshita, M. & Kuno, S. (1961). Enzymatic studies on the metabolism of β -alanine. *Journal of Biological Chemistry*, 236 (3): 781-790.
- Hershey, A. D. & Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol*, 36 (1): 39-56.
- Indergaard, M. P. (2010). *Tang og tare – i hovedsak norske brunalger: Forekomster, forskning og anvendelse*. Trondheim. Tilgjengelig fra: <http://www.ntnu.no/ansatte/mentz.indergaard/tang-og-tare>.
- Jain, S., Franklin, M. J., Ertesvåg, H., Valla, S. & Ohman, D. E. (2003). The dual roles of AlgG in C-5-epimerization and secretion of alginate polymers in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 47 (4): 1123-33.
- Jain, S. & Ohman, D. E. (2005). Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 73 (10): 6429-36.
- Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., et al. (2009). STRING 8--a global view

- on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res*, 37 (Database issue): D412-6.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M. & Tanabe, M. (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res*, 40 (Database issue): D109-14.
- Kapatral, V., Bina, X. & Chakrabarty, A. M. (2000). Succinyl coenzyme A synthetase of *Pseudomonas aeruginosa* with a broad specificity for nucleoside triphosphate (NTP) synthesis modulates specificity for NTP synthesis by the 12-kilodalton form of nucleoside diphosphate kinase. *J Bacteriol*, 182 (5): 1333-9.
- Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D. & Trollinger, D. (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene*, 70 (1): 191-197.
- Keiski, C. L., Harwich, M., Jain, S., Neculai, A. M., Yip, P., Robinson, H., Whitney, J. C., Riley, L., Burrows, L. L., Ohman, D. E., et al. (2010). AlgK is a TPR-containing protein and the periplasmic component of a novel exopolysaccharide secretin. *Structure*, 18 (2): 265-73.
- Kennedy, C. & Bishop, P. (2005). Genetics of nitrogen fixation and related aspects of metabolism in species of *Azotobacter*: history and current status. I: Klipp, W., Masepohl, B., Gallon, J. & Newton, W. (red.) Nitrogen fixation: origins, applications, and research progress, b. 2 *Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria*, s. 27-52: Springer Netherlands.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. & Khorana, H. G. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*, 56 (2): 341-61.
- Knox, C., Law, V., Jewison, T., Liu, P., Ly, S., Frolkis, A., Pon, A., Banco, K., Mak, C., Neveu, V., et al. (2011). DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Res*, 39 (Database issue): D1035-41.
- Kolter, R., Inuzuka, M. & Helinski, D. R. (1978). Trans-complementation-dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid R6K. *Cell*, 15 (4): 1199-208.
- Krell, T., Molina-Henares, A. J. & Ramos, J. L. (2006). The IclR family of transcriptional activators and repressors can be defined by a single profile. *Protein Science*, 15 (5): 1207-1213.
- Lessie, T. G. & Phibbs, P. V., Jr. (1984). Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annu Rev Microbiol*, 38: 359-88.
- Li, M., Ho, P. Y., Yao, S. & Shimizu, K. (2006). Effect of *sucA* or *sucC* gene knockout on the metabolism in *Escherichia coli* based on gene expressions, enzyme activities, intracellular metabolite concentrations and metabolic fluxes

- by ¹³C-labeling experiments. *Biochemical Engineering Journal*, 30 (3): 286-296.
- Lorca, G. L., Ezersky, A., Lunin, V. V., Walker, J. R., Altamentova, S., Evdokimova, E., Vedadi, M., Bochkarev, A. & Savchenko, A. (2007). Glyoxylate and pyruvate are antagonistic effectors of the *Escherichia coli* IclR transcriptional regulator. *J Biol Chem*, 282 (22): 16476-91.
- Maldonado, R., Jimenez, J. & Casadesus, J. (1994). Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *J Bacteriol*, 176 (13): 3911-9.
- Maloy, S. R. & Nunn, W. D. (1982). Genetic regulation of the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 149 (1): 173-80.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, 53 (1): 159-62.
- Martínez-Salazar, J. M., Moreno, S., Nájera, R., Boucher, J. C., Espín, G., Soberón-Chávez, G. & Deretic, V. (1996). Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J Bacteriol*, 178 (7): 1800-8.
- May, T. B., Shinabarger, D., Boyd, A. & Chakrabarty, A. M. (1994). Identification of amino acid residues involved in the activity of phosphomannose isomerase-guanosine 5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase. A bifunctional enzyme in the alginate biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 269 (7): 4872-7.
- McClintock, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 36 (6): 344-55.
- Merighi, M., Lee, V. T., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Lory, S. (2007). The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 65 (4): 876-95.
- Mermod, N., Ramos, J. L., Lehrbach, P. R. & Timmis, K. N. (1986). Vector for regulated expression of cloned genes in a wide range of gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, 167 (2): 447-54.
- Messing, J., Gronenborn, B., Muller-Hill, B. & Hans Hopschneider, P. (1977). Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (9): 3642-6.
- Mærk, M., Ertesvåg, H., Valla, S., Klinkenberg, G., Sletta, H. & Tøndervik, A. (manuskript). *Identification of genes important for alginate biosynthesis in Azotobacter vinelandii*. Upublisert manuskript.

- Nakada, H. I. & Sweeny, P. C. (1967). Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas. *J Biol Chem*, 242 (5): 845-51.
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R. M., Choudhuri, J. V., Chuang, H. Y., Cohoon, M., de Crecy-Lagard, V., Diaz, N., Disz, T., Edwards, R., et al. (2005). The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Research*, 33 (17): 5691-5702.
- Page, W. J., Tindale, A., Chandra, M. & Kwon, E. (2001). Alginate formation in *Azotobacter vinelandii* UWD during stationary phase and the turnover of poly- β -hydroxybutyrate. *Microbiology*, 147 (2): 483-490.
- Park, S. J., Chao, G. & Gunsalus, R. P. (1997). Aerobic regulation of the *sucABCD* genes of *Escherichia coli*, which encode alpha-ketoglutarate dehydrogenase and succinyl coenzyme A synthetase: roles of ArcA, Fnr, and the upstream *sdhCDAB* promoter. *J Bacteriol*, 179 (13): 4138-42.
- Pingoud, A. & Jeltsch, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res*, 29 (18): 3705-27.
- Rediers, H., Vanderleyden, J. & De Mot, R. (2004). *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? *Microbiology*, 150 (Pt 5): 1117-9.
- Reece, R. J. (2004). *Analysis of genes and genomes*. UK: John, Wiley & Sons, Ltd.
- Reizer, J., Reizer, A., Lagrou, M. J., Folger, K. R., Stover, C. K. & Saier, M. H., Jr. (1999). Novel phosphotransferase systems revealed by bacterial genome analysis: the complete repertoire of pts genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1 (2): 289-93.
- Remminghorst, U. & Rehm, B. H. (2006a). Alg44, a unique protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett*, 580 (16): 3883-8.
- Remminghorst, U. & Rehm, B. H. (2006b). Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol Lett*, 28 (21): 1701-12.
- Remminghorst, U. & Rehm, B. H. (2006c). In vitro alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 72 (1): 298-305.
- Resendis-Antonio, O., Hernández, M., Salazar, E., Contreras, S., Batallar, G., Mora, Y. & Encarnación, S. (2011). Systems biology of bacterial nitrogen fixation: High-throughput technology and its integrative description with constraint-based modeling. *BMC Systems Biology*, 5 (1): 120.
- Reverchon, S., Nasser, W. & Robert-Baudouy, J. (1991). Characterization of *kdgR*, a gene of *Erwinia chrysanthemi* that regulates pectin degradation. *Mol Microbiol*, 5 (9): 2203-16.

- Robles-Price, A., Wong, T. Y., Sletta, H., Valla, S. & Schiller, N. L. (2004). AlgX is a periplasmic protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 186 (21): 7369-77.
- Sabra, W., Zeng, A. P., Lunsdorf, H. & Deckwer, W. D. (2000). Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Appl Environ Microbiol*, 66 (9): 4037-44.
- Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*, 39 (4): 516-539.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12): 5463-7.
- Schiller, N. L., Monday, S. R., Boyd, C. M., Keen, N. T. & Ohman, D. E. (1993). Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase gene (*algL*): cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 175 (15): 4780-9.
- Schlichtman, D., Kavanaugh-Black, A., Shankar, S. & Chakrabarty, A. M. (1994). Energy metabolism and alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: role of the tricarboxylic acid cycle. *J Bacteriol*, 176 (19): 6023-9.
- Schulze, E., Westphal, A. H., Hanemaaijer, R. & de Kok, A. (1990). The 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. 1. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the 2-oxoglutarate dehydrogenase component. *Eur J Biochem*, 187 (1): 229-34.
- Segura, D. & Espín, G. (1998). Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly-beta-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol*, 180 (18): 4790-8.
- Segura, D., Cruz, T. & Espín, G. (2003). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol*, 179 (6): 437-43.
- Segura, D. & Espín, G. (2004). Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65 (4): 414-8.
- Selimoglu, S. M. & Elibol, M. (2010). Alginate as an immobilization material for MAb production via encapsulated hybridoma cells. *Crit Rev Biotechnol*, 30 (2): 145-59.
- Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espín, G., Rubio, L. M., Valla, S., Almeida, N. F., Balasubramanian, D., Cromes, L., et al. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol*, 191 (14): 4534-45.

- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat Biotech*, 1 (9): 784-791.
- Smidsrød, O. M., S. T. (2008). *Biopolymer Chemistry*. Trondheim: Tapir Academic Press. 398 s.
- Sokatch, J. R., Sanders, L. E. & Marshall, V. P. (1968). Oxidation of methylmalonate semialdehyde to propionyl coenzyme a in *Pseudomonas aeruginosa* grown on valine. *Journal of Biological Chemistry*, 243 (10): 2500-2506.
- Sompolinsky, D. & Samra, Z. (1972). Influence of magnesium and manganese on some biological and physical properties of tetracycline. *J Bacteriol*, 110 (2): 468-476.
- Stanford, E. C. C. (1883). On Algin: a new substance obtained from some of the common species of marine algae. *Chemical News* (47): 254-267.
- Steele, M. I., Lorenz, D., Hatter, K., Park, A. & Sokatch, J. R. (1992). Characterization of the *mmsAB* operon of *Pseudomonas aeruginosa* PAO encoding methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 267 (19): 13585-92.
- Steen, H. (2009). Kyst og havbruk 2009. Kap 2: Kystressurser; Stortare. (lest 01.05.2010).
- Stevenson, L. H. & Socolofsky, M. D. (1966). Cyst formation and poly-beta-hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *J Bacteriol*, 91 (1): 304-10.
- Su, H. C., Ramkissoon, K., Doolittle, J., Clark, M., Khatun, J., Secret, A., Wolfgang, M. C. & Giddings, M. C. (2010). The development of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* involves multiple response stages and multiple proteins. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (11): 4626-4635.
- Svanem, B. I., Strand, W. I., Ertesvåg, H., Skjåk-Bræk, G., Hartmann, M., Barbeyron, T. & Valla, S. (2001). The catalytic activities of the bifunctional *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase and alginate lyase AlGE7 probably originate from the same active site in the enzyme. *J Biol Chem*, 276 (34): 31542-50.
- Taylor, I. J. & Anthony, C. (1976). A biochemical basis for obligate methylotrophy: properties of a mutant of *Pseudomonas* AM1 lacking 2-oxoglutarate dehydrogenase. *Journal of General Microbiology*, 93 (2): 259-265.
- Todd, J. D., Rogers, R., Li, Y. G., Wexler, M., Bond, P. L., Sun, L., Curson, A. R. J., Malin, G., Steinke, M. & Johnston, A. W. B. (2007). Structural and regulatory genes required to make the gas dimethyl sulfide in bacteria. *Science*, 315 (5812): 666-669.

- Tropel, D. & van der Meer, J. R. (2004). Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68 (3): 474-500.
- Trotter, E. W., Rolfe, M. D., Hounslow, A. M., Craven, C. J., Williamson, M. P., Sanguinetti, G., Poole, R. K. & Green, J. (2011). Reprogramming of *Escherichia coli* K-12 metabolism during the initial phase of transition from an anaerobic to a micro-aerobic environment. *PLoS One*, 6 (9): e25501.
- Trujillo-Roldán, M. A., Moreno, S., Segura, D., Galindo, E. & Espín, G. (2003). Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60 (6): 733-7.
- Ullmann, A., Jacob, F. & Monod, J. (1967). Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 24 (2): 339-43.
- Vieira, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19 (3): 259-68.
- Walshaw, D. L., Wilkinson, A., Mundy, M., Smith, M. & Poole, P. S. (1997). Regulation of the TCA cycle and the general amino acid permease by overflow metabolism in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology*, 143 (Pt 7): 2209-21.
- Weadge, J. T., Yip, P. P., Robinson, H., Arnett, K., Tipton, P. A. & Howell, P. L. (2010). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* AlgX. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 66 (Pt 5): 588-91.
- Westphal, A. H. & de Kok, A. (1988). Lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. Molecular cloning, organization and sequence analysis of the gene. *Eur J Biochem*, 172 (2): 299-305.
- Westphal, A. H. & de Kok, A. (1990). The 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. 2. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the succinyltransferase component. *Eur J Biochem*, 187 (1): 235-9.
- Wilson, K. J., Sessitsch, A., Corbo, J. C., Giller, K. E., Akkermans, A. D. & Jefferson, R. A. (1995). beta-Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of *rhizobia* and other gram-negative bacteria. *Microbiology*, 141 (Pt 7): 1691-705.
- Wilson, P. W. & Knight, S. G. (1952). *Experiments in bacterial physiology*. Minneapolis, MN: Burgess Publishing Co.

- Wong, T. Y. & Yao, X. T. (1994). The DeLey-Doudoroff Pathway of galactose metabolism in *Azotobacter vinelandii*. *Appl Environ Microbiol*, 60 (6): 2065-8.
- Yamada, E. W. & Jakoby, W. B. (1960). Aldehyde Oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 235 (3): 589-594.
- Yamamoto, K. & Ishihama, A. (2003). Two different modes of transcription repression of the *Escherichia coli* acetate operon by IclR. *Mol Microbiol*, 47 (1): 183-94.
- Yebra, M. J., Zuniga, M., Beaufils, S., Perez-Martinez, G., Deutscher, J. & Monedero, V. (2007). Identification of a gene cluster enabling *Lactobacillus casei* BL23 to utilize myo-inositol. *Appl Environ Microbiol*, 73 (12): 3850-8.
- Yoshida, K., Yamaguchi, M., Morinaga, T., Kinehara, M., Ikeuchi, M., Ashida, H. & Fujita, Y. (2008). myo-Inositol catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 283 (16): 10415-24.
- Zaborina, O., Misra, N., Kostal, J., Kamath, S., Kapatral, V., El-Idrissi, M. E., Prabhakar, B. S. & Chakrabarty, A. M. (1999). P2Z-Independent and P2Z receptor-mediated macrophage killing by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Infect Immun*, 67 (10): 5231-42.
- Zhang, R. G., Kim, Y., Skarina, T., Beasley, S., Laskowski, R., Arrowsmith, C., Edwards, A., Joachimiak, A. & Savchenko, A. (2002). Crystal structure of *Thermotoga maritima* 0065, a member of the IclR transcriptional factor family. *J Biol Chem*, 277 (21): 19183-90.
- Zhou, Z. H., McCarthy, D. B., O'Connor, C. M., Reed, L. J. & Stoops, J. K. (2001). The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (26): 14802-7.
- Østgaard, K. (1992). Enzymatic microassay for the determination and characterization of alginates. *Carbohydrate Polymers*, 19 (1): 51-59.

VEDLEGG A: UNDERSØKELSE AV 17 STAMMER

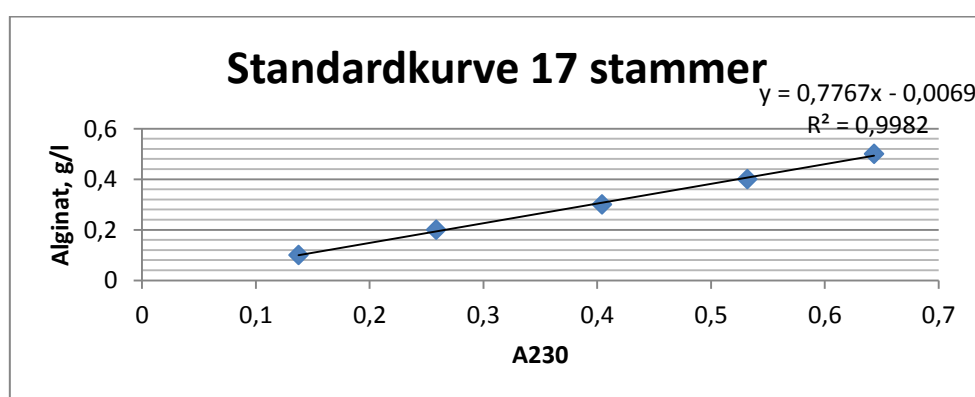
Tabell A.1: Avlesninger ved måling av OD₆₆₀ over tid ved undersøkelse av 17 stammer.

Stamme	OD ₆₆₀			
	15 timer	20 timer	37 timer	103 timer
12518Tc I	6,30	11,90	10,30	9,00
12518Tc II	6,30	10,70	10,40	8,10
mucA11 I	1,40	4,10	4,00	4,10
mucA11 II	1,03	3,50	4,10	3,90
G3#6	0,09	0,10	0,15	0,13
G3#7	0,03	0,08	0,07	0,14
G4#1	0,12	0,18	0,41	0,66
G3#14	0,04	0,05	0,04	0,20
G4#2	0,15	0,22	0,43	0,55
G4#3	0,05	0,11	0,41	0,24
G3#40	0,17	0,42	0,66	1,21
G3#52	0,20	0,31	0,58	0,84
G3#60	0,26	0,47	0,59	0,86
G3#87	0,02	0,03	0,05	0,10
G4#4	0,25	0,48	0,57	1,28
G3#95	0,07	0,13	0,51	0,82
G3#96	0,05	0,07	0,21	0,70
G3#98	0,20	0,48	0,67	0,94
G3#110	0,35	0,60	0,81	0,75
G3#114	0,24	0,45	0,63	1,18
G4#5	0,16	0,43	0,65	0,95

Tabell A.2: Rådata blankprøve og standarder til standardkurve for beregning av alginatkonsentrasjon for 17 stammer *A.vinelandii* som har nedregulert produksjon av alginat.

Standard og blankprøver		A ₂₃₀ før tilsats av lyaser	A ₂₃₀ etter inkubering m/lyaser	Korrigerede verdier
blank uten lyase	I	0,161	0,146	-
	II	0,165	0,151	-
	III	0,138	0,14	-
0	I	0,158	0,305	-
	II	0,16	0,315	-
	III	0,141	0,319	-
0,1	I	0,164	0,433	0,109
	II	0,153	0,619	0,306*
	III	0,145	0,471	0,166
0,2	I	0,164	0,573	0,249
	II	0,164	0,592	0,268
	III	0,169	0,796	0,467*
0,3	I	0,167	0,726	0,399
	II	0,162	0,715	0,393
	III	0,144	0,725	0,421
0,4	I	0,166	0,873	0,547
	II	0,167	0,845	0,518
	III	0,153	0,844	0,531
0,5	I	0,17	0,95	0,62
	II	0,171	0,976	0,645
	III	0,152	0,977	0,665

*utelatt fra beregning av standardkurve grunnet avvikende verdi.



Figur A.1: Standardkurve brukt til å beregne alginatkonsentrasjon etter absorpsjonsmåling.

Tabell A.3: Rådata til alginatmåling over tid for 17 *A. vinelandii*-stammer. Det ble også berenget alginatkonsentrasjon ved 20 og 37 timers vekst, men disse er ikke vist i oppgaven.

Stamme		A ₂₃₀ før tilsats av lyaser		A ₂₃₀ etter inkubering med lyaser	
		15 timer	103 timer	15 timer	103 timer
3 paralleller av hver					
12518Tc a	I	1,025	0,304	1,308	0,597
	II	1,005	0,294	1,335	0,59
	III	1,067	0,289	1,367	0,58
12518Tc b	I	1,038	0,274	1,351	0,55
	II	1,038	0,255	1,366	0,531
	III	1,034	0,338	1,35	0,566
mucA11 a	I	1,725	0,367	1,945	0,657
	II	1,781	0,37	1,992	0,635
	III	1,724	0,359	1,924	0,611
mucA11 b	I	1,68	0,381	1,857	0,643
	II	2,216	0,378	2,367	0,634
	III	1,756	0,398	1,988	0,661
G3#6	I	1,655	1,949	1,814	2,035
	II	1,753	1,971	1,914	2,06
	III	1,656	2,007	1,858	2,064
G3#7	I	1,634	2,157	1,801	2,101
	II	1,714	2,058	1,826	2,082
	III	1,738	2,179	1,92	2,127
G4#1	I	1,648	2,03	1,843	1,976
	II	1,701	2,125	1,841	2,159
	III	1,753	2,127	1,925	2,211
G3#14	I	1,729	2,064	1,919	2,148
	II	1,912	2,002	2,048	2,085
	III	1,705	2,077	1,844	2,289
G4#2	I	1,677	1,929	1,774	2,050
	II	1,767	1,916	1,894	2,051
	III	1,712	1,831	1,858	1,871
G4#3	I	1,712	2,13	1,858	2,18
	II	1,765	2,236	1,917	2,314
	III	1,729	2,231	1,926	2,313
G3#40	I	1,701	2,031	1,826	2,119
	II	1,705	1,927	1,827	1,999
	III	1,705	1,972	1,755	2,042
G3#52	I	1,702	1,847	1,769	1,926
	II	1,813	1,869	1,978	1,891
	III	1,771	1,874	1,885	1,958

G3#60	I	1,716	2,109	1,853	2,188
	II	1,797	2,003	1,895	2,101
	III	1,802	2,131	1,925	2,202
G3#87	I	1,676	2,128	1,734	2,227
	II	1,72	1,946	1,775	2,042
	III	1,811	2,235	1,896	2,298
G4#4	I	1,757	1,85	1,842	1,902
	II	1,755	1,879	1,885	1,979
	III	1,809	1,961	1,939	2,052
G3#95	I	1,693	1,985	1,782	2,053
	II	1,784	1,981	1,905	2,069
	III	1,783	1,84	1,918	1,925
G3#96	I	1,622	2,165	1,705	2,234
	II	1,729	2,196	1,89	2,256
	III	1,793	2,156	1,929	2,122
G3#98	I	1,74	1,98	1,855	2,041
	II	1,683	1,983	1,768	2,086
	III	1,819	2,048	1,951	2,152
G3#110	I	1,664	2,362	1,801	2,41
	II	1,81	2,244	1,911	2,273
	III	1,697	2,235	1,778	2,261
G3#114	I	1,591	1,852	1,732	1,934
	II	1,713	1,998	1,846	1,988
	III	1,705	2,03	1,845	2,017
G4#5	I	1,75	2,009	1,836	2,107
	II	1,837	2,114	1,974	2,264
	III	1,835	2,212	1,953	2,313

Tabell A.4: Beregning av alginat-konsentrasjon (g/l) etter 15 og 103 timer for 17 stammer *A.vinelandii*. Verdiene i denne tabellen er korrigert for blankprøve, bakgrunnsverdi, lyaseblank, gjennomsnitt av tre paralleller, beregning vha standardkurve og fortykning ved prøveuttak og i assay.

Beregnet mengde alginat i prøvene (g/l)		
Stamme	15 timer	103 timer
12518Tc a	1,578	2,900
12518Tc b	1,749	2,123
mucA11 a	0,483	2,333
mucA11 b	0,207	2,131
G3#6	0,012	-0,213
G3#7	-0,035	-0,459
G4#1	0,000	-0,344
G3#14	-0,032	-0,099
G4#2	-0,106	-0,164
G4#3	-0,009	-0,230
G3#40	-0,163	-0,215
G3#52	-0,125	-0,250
G3#60	-0,115	-0,201
G3#87	-0,240	-0,193
G4#4	-0,126	-0,205
G3#95	-0,126	-0,206
G3#96	-0,098	-0,320
G3#98	-0,136	-0,185
G3#110	-0,146	-0,314
G3#114	-0,072	-0,348
G4#5	-0,129	-0,122

VEDLEGG B: UNDERSØKELSE 8 UTVALGTE STAMMER

Tabell B.1: Avlesninger ved måling OD₆₆₀ i kultur av 8 utvalgte stammer + kontroller.

Stamme	OD ₆₆₀				
	0 timer	15 timer	20 timer	37 timer	103 timer
12518Tc I	0,35	4,70	10,50	10,50	9,40
12518Tc II	0,37	7,80	11,40	10,40	9,80
UW I	0,40	8,80	8,40	13,00	13,00
UW II	0,40	9,20	12,50	13,70	12,80
G3#40	0,14	0,94	2,33	4,30	3,20
G3#52	0,02	0,53	0,64	0,71	0,85
G3#60	0,03	0,41	0,55	0,73	0,83
G4#4	0,04	0,23	0,35	0,67	1,34
G3#95	0,03	0,23	0,51	0,74	0,91
G3#98	0,03	0,50	0,63	0,85	0,83
G3#114	0,08	0,48	0,75	0,19	0,18
G4#5	0,02	0,60	0,22	0,50	0,73

VEDLEGG C: UNDERSØKELSE AV STAMMENE 21C3T OG 20A6

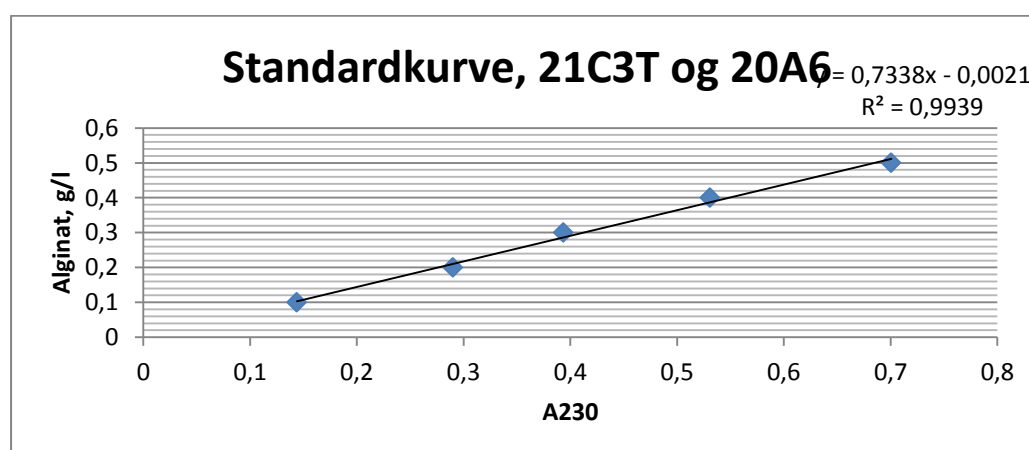
Tabell C.1: Avlesninger ved måling OD₆₆₀ over tid i *A.vinelandii* 21C3T og 20A6. Tallene for 0 timer er beregnet ut fra målt celletetthet i inokulumskolber og volum overført i forsøkskolber.

OD ₆₆₀					
Stamme	0 timer	15 timer	20 timer	37 timer	103 timer
12518Tc I	0,70	7,30	10,10	9,10	8,90
12518Tc II	0,70	7,10	10,10	9,00	8,40
12518Tc III	0,70	6,80	9,80	9,00	8,80
mucA I	0,30	2,60	3,40	4,20	4,00
mucA II	0,30	2,70	4,90	4,40	4,50
mucA III	0,30	2,70	3,10	3,80	4,10
UW I	1,00	12,10	13,10	13,20	14,10
UW II	1,00	12,90	12,90	13,10	13,20
UW III	1,00	12,50	12,80	12,30	14,20
20A6 I	0,10	0,70	1,00	1,30	1,51
20A6 II	0,10	0,29	0,59	1,01	4,10
20A6 III	0,10	0,29	0,44	0,53	5,50
21C3T I	0,10	0,23	1,20	2,10	2,20
21C3T II	0,10	0,21	1,30	2,05	2,10
21C3T III	0,10	0,19	0,90	1,90	2,10

Tabell C.3: Rådata blankprøve og standarder til standardkurve for beregning av alginatkonsentrasjon for *A.vinelandii* 20A6 og 21C3T.

Standard og blankprøver		A ₂₃₀ før tilsats av lyaser	A ₂₃₀ etter inkubering m/lyaser	Korrigerte verdier
blank uten lyase	I	0,1382	0,1488	-
	II	0,1347	0,1471	-
	III	0,1451	0,1463	-
0	I	0,159	0,302	-
	II	0,141	0,275	-
	III	0,149	0,284	-
0,1	I	0,155	0,427	0,140
	II	0,141	0,420	0,147
	III	0,147	0,504	0,224*
0,2	I	0,157	0,556	0,266
	II	0,147	0,581	0,302
	III	0,145	0,579	0,302
0,3	I	0,153	0,651	0,366
	II	0,148	0,693	0,413
	III	0,150	0,683	0,401
0,4	I	0,155	0,803	0,516
	II	0,149	0,836	0,555
	III	0,147	0,800	0,521
0,5	I	0,166	0,857	0,559*
	II	0,130	0,946	0,683
	III	0,152	1,002	0,718

*utelatt fra beregning av standardkurve grunnet avvikende verdi.



Figur C.4: Standardkurve brukt til å beregne alginatkonsentrasjon v/endemåling.

Tabell C.2: Rådata til alginatmåling etter 15 og 103 timer for *A.vinelandii* 21C3T og 20A6.

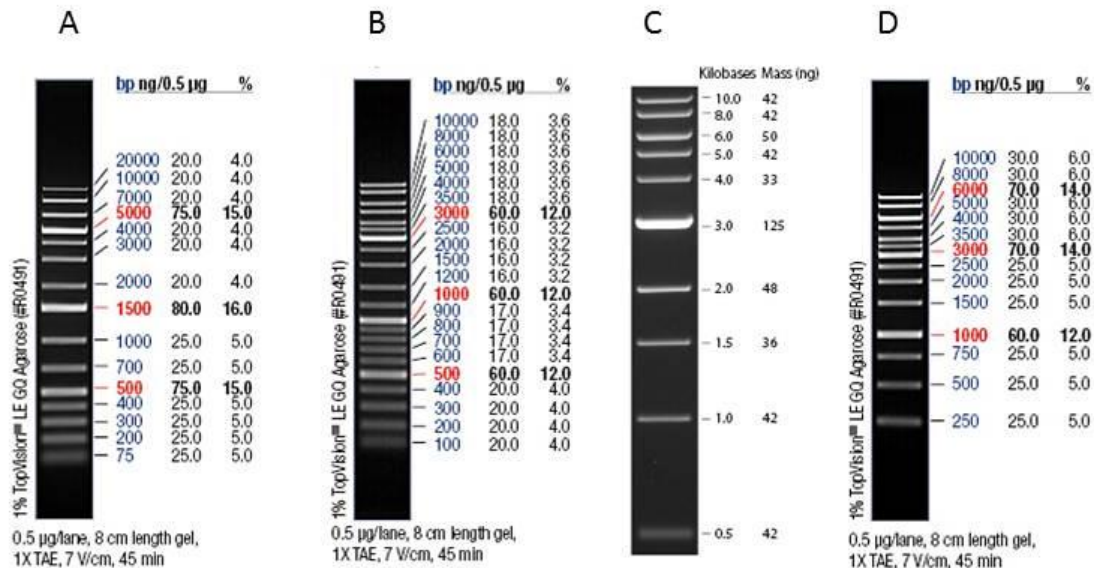
Stammer		A ₂₃₀ før tilsetning av lyaser		A ₂₃₀ etter inkubering med lyaser	
	Parallell	15 timer	103 timer	15 timer	103 timer
12518Tc a	I	0,913	0,391	1,368	0,620
	II	0,916	0,386	1,363	0,654
	III	0,922	0,401	1,335	0,711
12518Tc b	I	0,921	0,396	1,378	0,639
	II	1,018	0,385	1,460	0,645
	III	0,876	0,370	1,279	0,616
12518Tc c	I	0,941	0,395	1,453	0,657
	II	0,934	0,386	1,413	0,661
	III	1,056	0,424	1,460	0,636
mucA11 a	I	1,876	0,532	2,126	0,730
	II	1,867	0,523	2,184	0,719
	III	1,900	0,530	2,212	0,706
mucA11 b	I	1,911	0,518	2,162	0,705
	II	1,791	0,529	2,095	0,713
	III	1,731	0,536	1,880	0,739
mucA c	I	2,189	0,548	2,401	0,786
	II	1,685	0,564	1,994	0,755
	III	1,755	0,538	1,982	0,752
UW a	I	0,636	0,615	0,789	0,759
	II	0,639	0,642	0,817	0,745
UW b	I	0,621	0,700	0,740	0,751
	II	0,638	0,721	0,779	0,854
UW c	I	0,592	0,554	0,774	0,677
	II	0,640	0,560	0,801	0,695
20A6 a	I	1,589	0,809	1,757	0,927
	II	1,601	0,777	1,742	0,891
	III	1,643	0,791	1,712	0,898
20A6 b	I	1,549	0,905	1,773	0,990
	II	1,569	0,903	1,745	0,994
	III	1,608	0,917	1,723	1,050
20A6 c	I	1,542	0,996	1,758	1,126
	II	1,557	0,980	1,770	1,088
	III	1,623	0,992	1,721	1,046
21C3T a	I	1,090	0,861	1,265	0,977
	II	1,145	0,869	1,273	0,961
	III	1,133	0,868	1,256	1,002
21C3T b	I	1,170	0,851	1,280	1,052
	II	1,402	0,928	1,476	1,020
	III	1,408	0,924	1,199	0,978
21C3T c	I	1,125	0,756	1,279	0,907
	II	1,217	0,834	1,400	0,948
	III	1,167	0,859	1,330	0,995

Tabell A.2: Beregnet alginat-konsentrasjon (g/l) over tid for stammene 21C3T og 20A6.

Stamme	Beregnet mengde alginat i prøvene (g/l)	
	15 timer	103 timer
12518Tc a	1,337	2,946
12518Tc b	1,317	2,521
12518Tc c	1,453	2,529
mucA11 a	0,348	1,204
mucA11 b	0,219	1,244
mucA11 c	0,252	1,749
UW a	0,068	-0,024
UW b	-0,011	-0,093
UW c	0,081	-0,013
21C3T a	-0,020	-0,040
21C3T b	0,081	-0,070
21C3T c	0,089	-0,083
20A6 a	0,015	-0,045
20A6 b	-0,316	-0,042
20A6 c	0,070	-0,003

VEDLEGG D: DNA-STANDARDER

DNA-standarder er løsninger av DNA-fragmenter med kjente størrelser. Når DNA-fragmenter av ukjent størrelse separeres med gel-elektroforese sammen DNA-standard kan størrelsen på de ukjente DNA-fragmentene beregnes. Konsentrasjonen på DNA-fragmentene i standarden er også kjent slik at en kan anslå konsentrasjon på de ukjente DNA-fragmentene. Dette er visuelle vurderinger og feilvurderinger kan oppstå. I denne oppgaven er det benyttet forskjellige fargemetoder for å visualisere DNA i gelen, farging med ethitiumbromid, GelRed og noen supplerende gelbilder med GelGreen. Visualiseringsmetodene har hatt innvirkning på hvordan prøvene kontra DNA-markør har vandret på elektroforesegelen i tilfeller der prøvene har markant avvikende DNA-konsentrasjon i forhold til standarden. I denne oppgaven ble det brukt 4 forskjellige DNA-standarder for å bestemme størrelsen på de aktuelle DNA-fragmentene.



Figur D.1: DNA-markørene som er benyttet i oppgaven. A) Generuler™ 1kb plus DNA ladder (www.fermentas.com). B) Generuler™ DNA ladder mix (www.fermentas.com). C) 1 kb DNA ladder (www.NEB.com). D) Generuler™ 1 kb DNA ladder (www.fermentas.com).

VEDLEGG E: SEKVENSSAMMENLIGNING

For å verifisere at PCR og første trinn i kloningen var vellykket ble plasmidkonstruktene fra første trinn sekvensert og det ble gjort en multippel sammenligning av sekvenseringsresultatene mot det ønskede plasmidet. Sammenligningen ble gjort i CloneManager Suite.

Forklaring til figurene: Prikk betyr riktig base. Strek betyr ingen base. n betyr ukjent base. Fragmenter fra sekvensering er navngitt etter primeren som er brukt for å lage fragmentene. Start kodon er merket med **grønt** og stoppkodon er merket i **rødt**.

Multippel sammenligning av ønsket plasmid MH1 (Avin_13880) og sekvensert konstrukt av PCRAvin_13880 og pUC128, sekvensert med primerne M13F og M13R

```
pMH1      241 tccaccgcggtggcggccgctctagaactagtggatccccggg-ctgcaggaattcgat
M13R      1  -----.....-.....n..
M13F     1020 -----nnnnn.....nn...n...n.n.....

pMH1      300 attactagtcgatgccaccctgaagtgaaagcgcttccgcgctccgccttcgccgggc
M13R      30  .....n.....
M13F     980  ....nnnn...n.n.....nn.....

pMH1      360 ggtcgcggggcgcccaagccgatggcaggccgctcctgcggacgcgcttcgagcagcagct
M13R      90  .....
M13F     920  .nn.....n.n.....nn.....n.....

pMH1      420 cggccagttcgtccgcggcacgacgcaacagcggctccatcgcctcgagttcgtccaggt
M13R     150  .....
M13F     860  .....n.....

pMH1      480 tcctgcgcagcgtcggcgcgatgcacgaacaggcaggcatgcaggcggccttcggcccgc
M13R     210  .....
M13F     800  .n.....

pMH1      540 ggatgggcaccgagcaggccaccatgccgtcgatgaactcctcgttgtccacgcccaggc
M13R     270  .....n.....
M13F     740  .....

pMH1      600 cggtttcgpcgatcgactgcaggcagcctccagctcttgccgatcgggatggattgc
M13R     330  .....
M13F     680  .....n.....

pMH1      660 gcgacagccgctgagcggcagattgcgcaggatctgctggcggcgctgccctggagaagc
M13R     390  .....
M13F     620  .....

pMH1      720 tgctcaggtagagcttgccgctggccgaacaccacatcgggacatgggagccgaccggca
M13R     450  .....
M13F     560  .....
```

```

pMH1      780 gatgaatctgcagcggccagttgctctgcacccggtcgtaatagaccatgtcgatgccgt
M13R      510 .....
M13F      500 .....

pMH1      840 cggggatggcgataccgcaggtttcgccggtttccctcgccacgcgctgcaggatcgaac
M13R      570 .....nnnn.....nnn.....
M13F      440 .....n.....

pMH1      900 ggcgcagcgccttgtgcccgtggcgtagcagcaccatggcgatccgctgcaggcgggt
M13R      630 .....nn.....
M13F      380 .....

pMH1      960 cgctgggcagcagatcagcccgcagatccacctgcaggtagccgtcggcttgaactgct
M13R      690 .....n.n...nnn.....nnnn.n.....
M13F      320 .....

pMH1      1020 gcagcaggcagatggatgctgggtttggggatgtccagcatgaaggccagttcggccggcg
M13R      750 ...n.....
M13F      260 .....

pMH1      1080 atagcgcgccctccgactgcgcgacggcctcgacgatctccaggacgcgcgaaatggaag
M13R      792 -----
M13F      200 .....

pMH1      1140 accccttgctcctcgcttcggtttgctcaccggtcatatggtcactcatcaagcttatcg
M13R      792 -----
M13F      140 .....n.n.....nnn...n.....n.-.....n.nnn.....----

```

Multipel sammenligning av ønsket plasmid MH2 (sucA) og sekvensert konstrukt av PCRsucA og pUC128, sekvensert med primerne pGEM/plitmus, SekpHM3 3051, SekvpHM3 4512C, SekpHM3 4426, M13rev

```

MH2      1  tgcgagaaggcgttaaacagtgaaagcgtcctgcagcagtttttctgctgctcggcatg
pGEM      1  -----.....n..n.n..n...
sekpHM33051 1  -----
sekpHM34512 970 -----
sekpHM34426 1  -----
M13R      971 ---...n.n..-----

MH2      61  catcgacgcgtaaccgcaagccggagcggccgacgcctcgcgaccagcactgaggaa
pGEM      19  n..nnn.n.n.....n.n.n.....n.....
sekpHM33051 1  -----
sekpHM34512 970 -----
sekpHM34426 1  -----
M13R      963 -----

MH2      121 cagctccttcttgtgcgcgctggcgacgcgacgatgtgatgctgactgcagtaccaggc
pGEM      79  .n..n.....n.....n.n.n.....n.....
sekpHM33051 1  -----
sekpHM34512 970 -----
sekpHM34426 1  -----
M13R      963 -----

MH2      181 gccctggttcatcggctcttctgacaccagaccacatgcttgagggttggtgtacggcgc
pGEM     139  .nn..n...nn.....nn.....nn.....
sekpHM33051 1  -----
sekpHM34512 970 -----
sekpHM34426 1  -----
M13R      963 -----

MH2      241 catgacctcggccagttcctcttccgggaacggatagagctgctcgatacggacgatggc
pGEM     199  .....n.....n.nnnn.....n.....n.n.....a...n.....
sekpHM33051 1  -----
sekpHM34512 970 -----

```

```

sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2              301 gatgtcctcgcgaccttcggcatggcgcttgccagcaggtcgtagtagaccttgccgct
pGEM             259 .....n...nnn.....n.....nn.....n..nnnn.nnnn.....n...n.n.n..
sekpHM33051     1 -----
sekpHM34512     970 -----
sekpHM34426     1 -----
M13R            963 -----

MH2              361 gcacaggaccagacgctcgaccttcttcggatcgaggctatcgacctccggcaggaccgg
pGEM             319 .....n...n...n...n...n...n..nn.....n.....nn.....n.....n.....
sekpHM33051     1 -----
sekpHM34512     970 -----
sekpHM34426     1 -----
M13R            963 -----

MH2              421 atggaaggagccgagagccagatcttccaggggtggagatcgccgatttgtgacgcagcag
pGEM             379 n.....n.....n.....nnnnn..n...n...n...n...n...n...n..n
sekpHM33051     1 -----
sekpHM34512     970 -----
sekpHM34426     1 -----
M13R            963 -----

MH2              481 cgacttcggcgtcaaggccaccagcggcttgccagcggggcggatcacctggcgacgcag
pGEM             439 nnnn..nn.n...n.n...n...n..nn.....n.....nn.....n.....nn..n..n
sekpHM33051     1 -----
sekpHM34512     970 -----
sekpHM34426     1 -----
M13R            963 -----

MH2              541 catgtggtagacctgcgccgggtgggtcggcacgcagacctggatgttctgctcggcgca
pGEM             499 .....n.n.n...n...n...n...nnn.n..n.n...n.....n.nnnnn..
sekpHM33051     1 -----
sekpHM34512     970 -----
sekpHM34426     1 -----
M13R            963 -----

MH2              601 cagttgcaggtagcgcctccagacgtgcggaagagtgcctccggaccctggcctcgtagcc
pGEM             559 ..n.....nn.....n..n.nn.....nn.....n.....n.....n...n...n..
sekpHM33051     1 -----
sekpHM34512     970 -----
sekpHM34426     1 -----
M13R            963 -----

MH2              661 gtgcggcagcagcatgggtcaggccgcacagcgtccccacttggctcgcgcgctgctgat
pGEM             619 nn.....n...n...n...n...nn...n...n...n.....nn.....nn.....n.....
sekpHM33051     1 -----
sekpHM34512     970 -----
sekpHM34426     1 -----
M13R            963 -----

MH2              721 gaactggtcgatcaccacctgggcaccgttggcgaagtcgccaactgggcttccagat
pGEM             679 .....nn..n...n...n...n...n...n..nnnn.n...n...n...n...n..
sekpHM33051     33 .....n...n...n...n...n...n.....n.....n.....n.....n.....
sekpHM34512     970 -----
sekpHM34426     1 -----
M13R            963 -----

MH2              781 caccagcgcgttcggcgtggtggcatagccgtattcgaaggccagcagcgcctcttc
pGEM             739 n...n.....n...n...n...n...n...n...n...n...nnn...nnnn..n
sekpHM33051     93 .....n.....n.....n.....n.....n.....n.....n.....n.....
sekpHM34512     970 -----
sekpHM34426     1 -----
M13R            963 -----

MH2              841 cgagaggaaggaatcatacagctcgaacttcgg-ctgtccctcgtagaggttctgcagcg
pGEM             799 nnnn.....n.....n.....n...nn.n..nnn..n...n-----
sekpHM33051     153 .....n.....n.....n.....n.....n.....n.....n.....n.....

```

```

sekpHM34512      970 -----
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2              900 ggatgtagcggctggcatccttctggttgatgcagcgcggcatggcggcgagagaaggtgc
pGEM             847 -----
sekpHM33051     212 .....
sekpHM34512     970 -----
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2              960 cacggccgacgtcctgaccggtgatgcgtaccggatggccttcctcagcagagtggcgt
pGEM             847 -----
sekpHM33051     272 .....
sekpHM34512     970 -----
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2             1020 aggccagggtctcggcgcagccccagttgatcggcatggcgcggcagccccatgagg-cgg
pGEM             847 -----
sekpHM33051     332 .....
sekpHM34512     970 -----ng.nn.n.....n.....n.n...
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2             1079 cgatcctcgaggatcctggcaacctggcgctggaccacgaaacctcc-gggatctgcag
pGEM             847 -----
sekpHM33051     391 .....
sekpHM34512     921 ..n.....n.nn.....n.n.n.....
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2             1138 cagcttgcgcttcagttcctgcagggcttcagctcgaagctggtgctgacgagcggg
pGEM             847 -----
sekpHM33051     450 .....
sekpHM34512     861 .....-n.n.....n.....n
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2             1198 ccaggcatggcccagatagggggtccagtcgacgaacagctcgggtgctcggtccttgac
pGEM             847 -----
sekpHM33051     510 .....
sekpHM34512     802 .....
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2             1258 caggctcctgagcagtgctgaccgttatccagcgcggtaaggattcgtcgacctggc
pGEM             847 -----
sekpHM33051     570 .....
sekpHM34512     742 .....
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2             1318 ctggacttcttctcctggctcagggtgccctccttgaccagcgcgctcggcatacagctcgg
pGEM             847 -----
sekpHM33051     630 .....
sekpHM34512     682 .....
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2             1378 ggtggtgggctgcttggcgatccttctggtacatcagcggctgggtgccgctcggctcgtc
pGEM             847 -----
sekpHM33051     690 .....
sekpHM34512     622 .....
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2             1438 ggcctcgttgtgaccgcgacggcggttagcagaccagatcgatgactacgtcgcgcttga
pGEM             847 -----
sekpHM33051     750 .....nn.....
sekpHM34512     562 .....

```

```

sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2              1498 -ctgcatgcatagtcgacggccagttgggtcacgaacagcacggcttccggatcgtcgc
pGEM             847 -----
sekpHM33051     810 n.....n.....n.....
sekpHM34512     502 -.....
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2              1557 cgttgacgtgcagta-ccggcgccctgaatcatcttcgccggatcgggtgcagtactcggtc
pGEM             847 -----
sekpHM33051     870 .....n.....nn.....n.....
sekpHM34512     443 .....-.....
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2              1616 gaacgggtgctgacccgggttactggtggtgaagccgacctggtt-gttgaccacgatgtg
pGEM             847 -----
sekpHM33051     930 .....n.....n.n.....n.----
sekpHM34512     384 .....-.....
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2              1675 aatggtaccgcccttctttagcccggtatctgcgacatctggaaggtttccatcaccac
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512     325 -----
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2              1735 gccctgaccggcaaaggccagtcgccgtggatggagatcgggtaccaccttctcgccgg
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512     265 -----
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2              1795 agcgtcgacgcgacggtcctggcgggcacgcacggagccctcgaccaccggggagacgat
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512     205 -----
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2              1855 ttccaggtgaggggttgaacgccatggccaggtgcacttcgccaccggaggtcatcac
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512     145 -----
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----

MH2              1915 gttggaggagaagccctggtggttacttcacgtcaccgg-agcccagttcgaccagatgct
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512     85 .....-.....
sekpHM34426      1 -----
M13R             963 -----.....ng.nn.....n.....n.n.n.n.....

MH2              1974 tgccttcgaactcgtcgaacaggtcgcgtggattcttgcccagcgcgttgaccagcaggt
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512     26 .....-.....
sekpHM34426      1 -----
M13R             916 ..nn.....nnn.....nn.....n.

MH2              2034 tcagacggccggtgagccatgccgatgacgacttcttgggtgccgtagtagcctgagc
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512      0 -----

```

```

sekpHM34426      1 -----.....-.....nn...n.....n..n.....
M13R             856 .....n.....nnn....

MH2              2094 gctggatgatctcgtcgacgacccggcaccaggctctcgccgcttccaaaccgaagcgct
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512      0 -----
sekpHM34426     52 .....n.....
M13R            796 .....n.....

MH2              2154 tggtgcccggatatttggtgcccaggatattttccaggccttcggcagcgctcaggcgct
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512      0 -----
sekpHM34426     112 .....
M13R            736 .....

MH2              2214 cgagcagggtggcttttcgctccttggagtagacaccggacgaccgctacgctttccaggc
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512      0 -----
sekpHM34426     172 .....
M13R            676 .....

MH2              2274 gctgggccaaccagttgcgctgctcggaatcgacgatatgggtgaattcggcgccgatag
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512      0 -----
sekpHM34426     232 .....
M13R            616 .....

MH2              2334 tgcggcaatatgtctcctgcaatgcctgcaggatttcgctaggtgcctcttcttacc
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512      0 -----
sekpHM34426     292 .....
M13R            556 .....

MH2              2394 cgatgtagagctctccggtacggaaggggtatccagatcggcgttggtcagcccgtaat
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512      0 -----
sekpHM34426     352 .....
M13R            496 .....

MH2              2454 gggatgatcgacaggtcggaaggcgagtgctgctgccacagaccgagcggatccagttgcg
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512      0 -----
sekpHM34426     412 .....
M13R            436 .....

MH2              2514 aggcctgatggccgcgctgcggttaagcctggatcagacgcaggacttcgacctgcttct
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512      0 -----
sekpHM34426     472 .....
M13R            376 .....

MH2              2574 tctcgtgttcgggtgcttacgctggaggttgcgaccggctgtgcacgccgctggttcttgg
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512      0 -----
sekpHM34426     532 .....
M13R            316 .....

MH2              2634 ccagcagaacgaactggctcgggacgggagcgtgcggaacatcggtaggaggtaccggctt
pGEM             847 -----
sekpHM33051     986 -----
sekpHM34512      0 -----

```



```

sekpHM34426    592 .....
M13R           256 .....

MH2           2694 cggcgggcagcttctcgaaaataggtgcgccactcttcgggcacagcgttggggtcgtgca
pGEM           847 -----
sekpHM33051   986 -----
sekpHM34512     0 -----
sekpHM34426   652 .....
M13R           196 .....

MH2           2754 ggtaaagctcatagagctcttccacataagcagcatttccaccggaaaggtgggcactgt
pGEM           847 -----
sekpHM33051   986 -----
sekpHM34512     0 -----
sekpHM34426   712 .....
M13R           136 .....

MH2           2814 tccacatgcgctgcataacgctatcttgcatatggttaatcgaattcctgcagcccgggg
pGEM           847 -----
sekpHM33051   986 -----
sekpHM34512     0 -----
sekpHM34426   772 .....
M13R           76 .....n.....

MH2           2874 atccactagttctagagcggccaccggtggagctcgaattcgtaatcatggtcat
pGEM           847 -----
sekpHM33051   986 -----
sekpHM34512     0 -----
sekpHM34426   832 .....nn..-....
M13R           16 .....nnn.....

MH2           2934 agctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagccggaa
pGEM           847 -----
sekpHM33051   986 -----
sekpHM34512     0 -----
sekpHM34426   891 .....nn.....n
M13R           0 -----

MH2           2994 gcataaagtgtaaagcc-tgggggcctaagtgtgagtaactcacattaattgcgttg
pGEM           847 -----
sekpHM33051   986 -----
sekpHM34512     0 -----
sekpHM34426   951 n.....n.....n.....n.....n.....n.....
M13R           0 -----

MH2           3053 cgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggc
pGEM           847 -----
sekpHM33051   986 -----
sekpHM34512     0 -----
sekpHM34426  1011 .....n..-----
M13R           0 -----

```

Multipel sammenligning av ønsket plasmid MH3 (lpdA) og sekvensert konstrukt av PCRlpdA og pUC128, sekvensert med primerne M13F og M13R

```

MH3           181 ttgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgaattcgagc
M13F           960 -----
M13R            1 -----.....n...

MH3           241 tccaccgcggtggcggccgctctagaactagtgatccccgggctgcaggaattcgata
M13F           960 -----
M13R           10 n-nnnn.....nnnnnn.....nn.....n...

```

MH3 301 ttccat**atg**agccagaagttcgacgtgattgtgattggtgcaggccccggcggtacgtg
M13F 960 -----
M13R 69n.....

MH3 361 gctgccatcaagtctgccagcttggcctcaagaccgcctgatcgagaagtacaagggc
M13F 960 -----
M13R 129

MH3 421 aaggaaggcaagaccgcgcttggcggtacctgcctgaacgtgggctgcattccctccaag
M13F 960 -----
M13R 189

MH3 481 gcgctgctggacagctcctacaagttccacgaggcacacgagagcttcaagctccacggc
M13F 960 -----
M13R 249

MH3 541 atcagcaccggcgaagtcgccatcgacgtgccgacctgatcgcccgcaaggaccagatc
M13F 960 -----
M13R 309

MH3 601 gtcagaaacctcaccggcggggtcgectcgctgatcaaggccaatggcgtcacctgttc
M13F 960 -----
M13R 369

MH3 661 gaaggtcatggcaagctgctggccggcaagaaggtcgaagtcaccgctgccgacggcagc
M13F 960 -----
M13R 429

MH3 721 agccaggctactcgacaccgagaacgtcatcctcgcttccggtccaagccggtggaatt
M13F 960 -----
M13R 489

MH3 781 ccgccggctccggctgatcaggatgtcatcgctcgactccaccggcgcctggacttccag
M13F 960 -----
M13R 549

MH3 841 aacgttccgggcaaactcggcgtgatcggcgccggcgtgatcggcctggagctgggttcg
M13F 960 -----.....n.....
M13R 609

MH3 901 gtctgggctcgctgggtgccgaggtcaccgtgctcgaggccatggacaagttcctgccg
M13F 917 .n.....
M13R 669

MH3 961 gccgtcgatgaacaggtcgccaaggaagccagaagattctcaccaagcaaggcctgaag
M13F 857 -nnn.....n.....
M13R 729

MH3 1021 atcctgctgggtgcccgcgtcaccggcaccgaggtcaagaacaagcaggtcaccgtcaag
M13F 798 .-nnn.....
M13R 789n.....

MH3 1081 ttgctcgatgccgaaggcgcgagaagtcgcaggccttcgacaagctgatcgctcgggctcggc
M13F 739

M13R 849-nn.....-nn.....n.....

MH3 1141 cgccgcccgggtgactaccgacctgctggccgacagcggcgtgacctggacgagcgt
M13F 679

M13R 907n.....-----

MH3 1201 ggcttcatctatgtcgacgactactgcgccaccagcgtgccggcgtctatgccatcggc
M13F 619

```

M13R    957 -----

MH3     1261 gacgtggtccgcggtgccatgctggcccacaaggcctcggaagaaggtgtggtggtcgcc
M13F    559 .....
M13R    957 -----

MH3     1321 gagcgcatcgccggtcacaaggcccagatgaactatgacctgatcccggccgctcatctac
M13F    499 .....
M13R    957 -----

MH3     1381 acccaccggaaatcgccggcgtgggcaagaccgagcaggctctgaaggccgaaggcgtg
M13F    439 .....
M13R    957 -----

MH3     1441 gccatcaacgtcggcgtcttccccttcgctgccagcggccgcgccatggccgccaacgat
M13F    379 .....
M13R    957 -----

MH3     1501 accgcaggcttcgtcaaggtcatcgccgatgccaagaccgaccgctgctgggctccat
M13F    319 .....
M13R    957 -----

MH3     1561 gtgatcgcccgagcgcgccgaactggtccagcagggcgctatcgccatggagttcggc
M13F    259 .....
M13R    957 -----

MH3     1621 accagcgcgaagacctggcatgatggtttttgccaccggcgctgtccgaagcgctg
M13F    199 .....
M13R    957 -----

MH3     1681 cagcaggccgcctggcggtcagcggccacgcgattcacgttgccaaccgcaagaagTaa
M13F    139 .....
M13R    957 -----

MH3     1741 gcgagcaacaaggcaataaccggcactagtaatatcaagcttatcgataaccgtcgacctc
M13F    79  .n.n.....nnnn.n....n.nnnnn.....-n.nn
M13R    957 -----

MH3     1801 gagggggggcccggtaccgatgcatgcaagcttggcactggccgctcgttttacaacgtcg
M13F    20  n.....n.....nn.....-----
M13R    957 -----

```

Multipel sammenligning av ønsket plasmid MH4 (sucB) og sekvensert konstrukt av PCRsucBlpdA og pUC128, sekvensert med primerne M13F, sucBR, sekvHM8 896C, M13R

```

pMH4           1 agcgcccaatacgcgaaaccgcctctccccgcgcttggccgattcattaatgcagctggc
sucBR          1 -----
M13R          1 -----
sekvHM8896C   1041 -----
M13F          1004 -----

pMH4           61 acgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcgaacgcaattaatgtgagttagc
sucBR          1 -----

```

M13R	1	-----
sekvPHM8896C	1041	-----
M13F	1004	-----
pMH4	121	tcactcattaggcaccgccaggtttacactttatgcttccggctcgtatgttggtggaa
sucBR	1	-----
M13R	1	-----
sekvPHM8896C	1041	-----, nnn.n
M13F	1004	-----
pMH4	181	ttgtgagc--ggataacaatttcacacagg-aaacagctatgaccatgattacgaatt-c
sucBR	1	-----
M13R	1	-----, . . .
sekvPHM8896C	1031	n.nnnnagnn.n.nnn.nn. n.n. nn.-.nn. n.n.
M13F	1004	-----
pMH4	237	gagct-ccaccgcg-gtgccggcctctagaactagtggatccccgggctgcaggaat
sucBR	1	-----
M13R	4 -nnnn. . . . n. . nnnnnnn. . . . n-nnnn.
sekvPHM8896C	972	. . . nnn. . n. g. n.
M13F	1004	-----
pMH4	295	tcgat--c--cttgcttggtgagaatcttctgggcttccctggcgacctgttcacgcgc
sucBR	1	-----
M13R	60	nnnnn--ngn. nnnn.
sekvPHM8896C	912 nn.--. nn. n.
M13F	1004	-----
pMH4	351	gccggcaggaacttgccatggcctcgagcacggtgacctcggcaccagcgagcccag
sucBR	1	-----
M13R	118
sekvPHM8896C	854
M13F	1004	-----
pMH4	411	accgaaccagctccaggccgatcacgccggcgccgatcacgccgagtttgcccgaacg
sucBR	1	-----
M13R	178
sekvPHM8896C	794
M13F	1004	-----
pMH4	471	ttctggaagtccagggcgccgggtggagtcgacgatgacatcctgatcgaccggagccggc
sucBR	1	-----
M13R	238
sekvPHM8896C	734
M13F	1004	-----
pMH4	531	ggaatttccaccggcttggaaccggaagcgaggatgacgttctcgggtgctcagtagctctgg
sucBR	1	-----
M13R	298
sekvPHM8896C	674
M13F	1004	-----
pMH4	591	ctgctgccgtcggcagcgggtgacttcgaccttcttgccggccagcagcttgccatgacct
sucBR	1	-----
M13R	358
sekvPHM8896C	614
M13F	1004	-----
pMH4	651	tcgaacagggtagcaccattggccttgatcagcgaggcgacccccggcggtaggtttctg
sucBR	1	-----
M13R	418
sekvPHM8896C	554
M13F	1004	-----
pMH4	711	acgatctggtccttgccggcgatcatggtcggcacgctcgatggcgacttcgccggtgctg
sucBR	1	-----
M13R	478
sekvPHM8896C	494
M13F	1004	-----

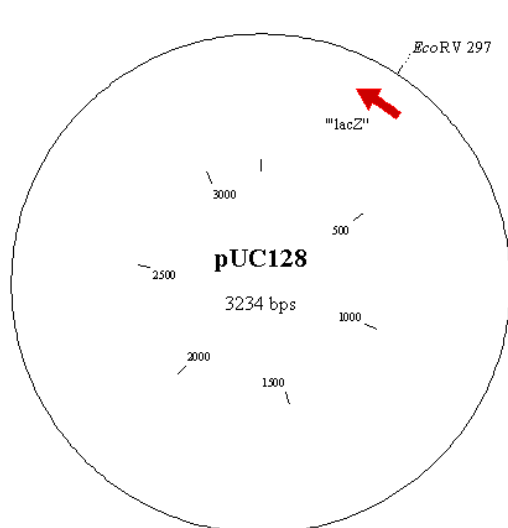
pMH4	771	atgccgtggagcttgaagctctcgtgtgcctcgtggaacttgtaggagctgtccagcagc
sucBR	1	-----
M13R	538
sekvPHM8896C	434
M13F	1004	-----
pMH4	831	gccttggaggggaatgcagcccacgttcaggcaggtaccgccaagcgcggtcttgccttcc
sucBR	1	-----
M13R	598
sekvPHM8896C	374
M13F	1004	-----
pMH4	891	ttgcccttgtacttctcgcacagggcggtcttgaggccaagctgggcagacttgatggca
sucBR	1	-----
M13R	658n.....
sekvPHM8896C	314
M13F	1004	-----
pMH4	951	gccacgtagccgccggggcctgcaccaatcacaatcacgtcgaacttctggctcatagcg
sucBR	1	-----
M13R	718
sekvPHM8896C	254
M13F	1004	-----
pMH4	1011	aatcctcttctttaaacggcgtaagcccgccggcacgggcttctctggaaaagcctgtg
sucBR	1	-----
M13R	778
sekvPHM8896C	194
M13F	1004	-----
pMH4	1071	cgggcagcttgcgatctcaga tca gacgtccagcagcagggcgagccgggtcttccaggag
sucBR	1	-----
M13R	838n.....
sekvPHM8896C	134n.....n..
M13F	1004	-----
pMH4	1131	atccttcatggtcaccaggaaggtaacggcctccttgccatcgatcaaacgggtgatcgta
sucBR	1	-----nnnnnn.n.....-nnnnnn.n.....n.....
M13R	898	...-----
sekvPHM8896C	74	nnnnnn.-nn.....nnnnnn.....nnnnn....-nnnnn..n.
M13F	1004	-----
pMH4	1191	ggacagggcaagatacatcatcggcaggatgacgacctgaccattgacggccatcggagc
sucBR	52	-----
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	16	.n..nn.....
M13F	1004	-----
pMH4	1251	ctcctggatcttgtgcatgccgaggatggcggtctgcccgggttgacgatcggagtcga
sucBR	112	-----
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	1004	-----
pMH4	1311	gagcagggaaaccgaacacgccaccggttgagatggtgaaggtgccgccggtcatttcctc
sucBR	172	-----
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	1004	-----
pMH4	1371	gatggtcagcttgccggccttggccttcttgccgaactcgttgatgccaccttcgatctc
sucBR	232	-----
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	1004	-----
pMH4	1431	ggccaggctcatgaactcggcgttgccgagcaccggcaccaccagaccacgatcgtgga
sucBR	292	-----
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	1004	-----

pMH4	1491	aacggccacgcccgatgtcctggtagccggtgtagacgatgtcgttaccgctcgatggaggc
sucBR	352
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	1004	-----
pMH4	1551	gttgacgcccggctggcgcttcagggcttcgacagcggccttgacgaagaaggacatgaa
sucBR	412
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	1004	-----.....n.....n.....
pMH4	1611	gcccaggcgcacgcccgttggtggtcttctcgaacagatcctt-gtacttggcgcgcagct
sucBR	472
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	956	-----.....n.n.....n
pMH4	1670	ccatgaccggcttcatggtgacttcggtgaaggctcgcagcatggccatggaggactggg
sucBR	531
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	896n.....nn.....n.....
pMH4	1730	cctcgaccaggcgcctcggcgaccttggcgcgagcgggtcatcggcacgcgcttctcga
sucBR	591
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	836
pMH4	1790	cgcgatcgccggccgcaaacagcggagcggcggtggcgggcgccggctggccggcag
sucBR	651
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	776
pMH4	1850	gagcggacttcttggttccgcggcgacccgcttctccttggtcacgcgaccgcct
sucBR	711n.....
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	716
pMH4	1910	tgccggtaccggatgatgctgctcggcagcagatggcggttttctcggcgatcttgccggcg
sucBR	771n.....
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	656
pMH4	1970	ccggggacaggatcggcgcttcggcagcggcggagcggcgccagccggagccggggcag
sucBR	831	n.....nn.....n.....
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	596
pMH4	2030	cagccggagcggcggtggccgcaccaccttcggtcagcttgccgagcagttcgccgctga
sucBR	863	-----
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	536
pMH4	2090	gcacggtgtcgccttcggttcttgacgatctcggcgatcacgccgtccgcttcagcaagca
sucBR	863	-----
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	476
pMH4	2150	cttccatcacgaccttgcggttctcgatgtcgcagatcagctcgtcacgcttgacggctt
sucBR	863	-----
M13R	901	-----
sekvPHM8896C	0	-----
M13F	416nn.....

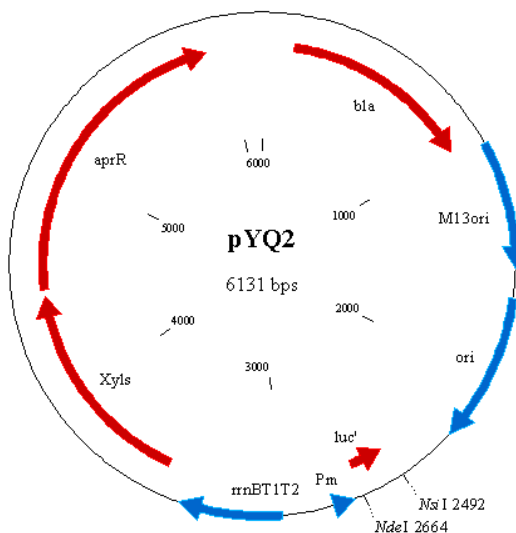
pMH4	2210	cgccgggctttttgtgccaggtggcgacggtgccgtccgcgatcgattccgggaaagtcg
sucBR	863	-----
M13R	901	-----
sekvpHM8896C	0	-----
M13F	356
pMH4	2270	gggctttgatatcgatagc cat tatctagagttcctattgattcgttgcttctgcgagaa
sucBR	863	-----
M13R	901	-----
sekvpHM8896C	0	-----
M13F	296
pMH4	2330	ggcgttaaacagtgaaagcgtcctgcagcagttttcctgctgctcggcatgcatcgacg
sucBR	863	-----
M13R	901	-----
sekvpHM8896C	0	-----
M13F	236
pMH4	2390	cgtaaccgcaagccggagcggccgacgcctcgcgaccagcatactggaggaaacagctcct
sucBR	863	-----
M13R	901	-----
sekvpHM8896C	0	-----
M13F	176
pMH4	2450	tcttgtgcgcgctggcgacgcgacgatgtgatgctgactgcagtaccaggcgccctggt
sucBR	863	-----
M13R	901	-----
sekvpHM8896C	0	-----
M13F	116n.nnn.....nnnnnnnnnn.....- .nnnn.
pMH4	2510	tcatacggctcttctctatcaagcttatcgataccgctcgacctcgagggggggcccggtacc
sucBR	863	-----
M13R	901	-----
sekvpHM8896C	0	-----
M13F	57nnnn.....n-nnnnn.nn.nn.n-.nnn.....n.....nn.-
pMH4	2570	gatgcatgcaagcttggcactggccgctcgttttacaacgctcgtgactgggaaaaccctgg
sucBR	863	-----
M13R	901	-----
sekvpHM8896C	0	-----
M13F	0	-----

VEDLEGG F: PLASMIDKART

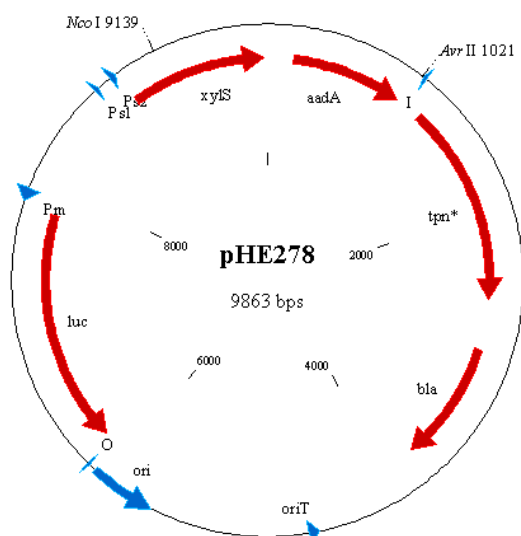
Figur F.1-17 viser oversikt over plasmider benyttet i oppgaven, gener er markert i rødt, andre elementer i blått og kuttsetter benyttet i kloningen er merket med navn.



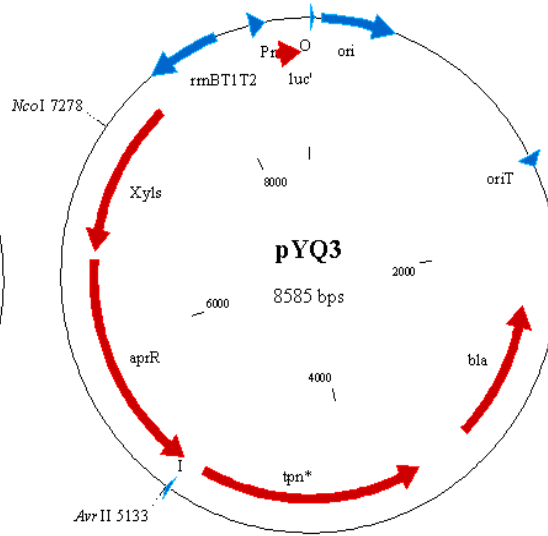
F.1: pUC128



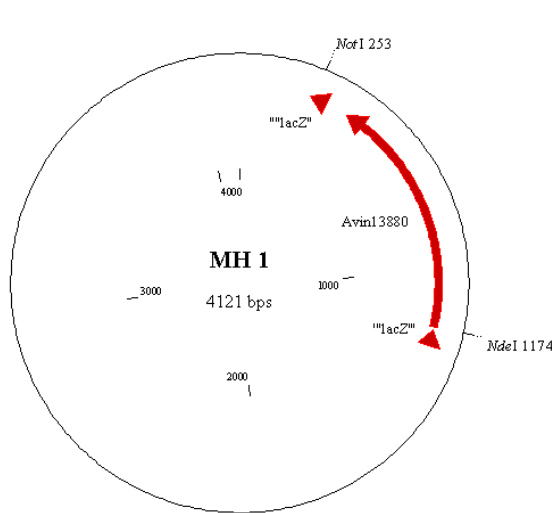
F.2: pYQ2



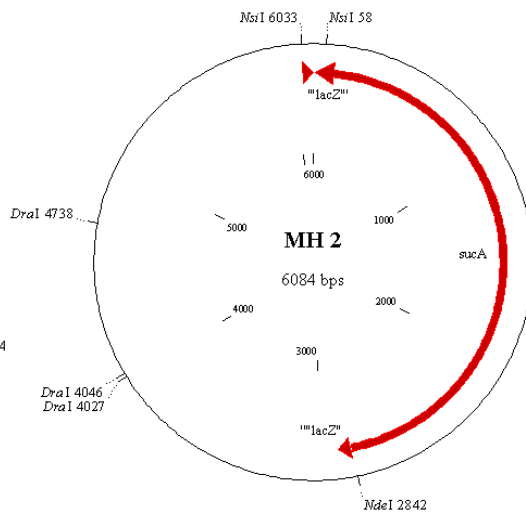
F.3: pHE278



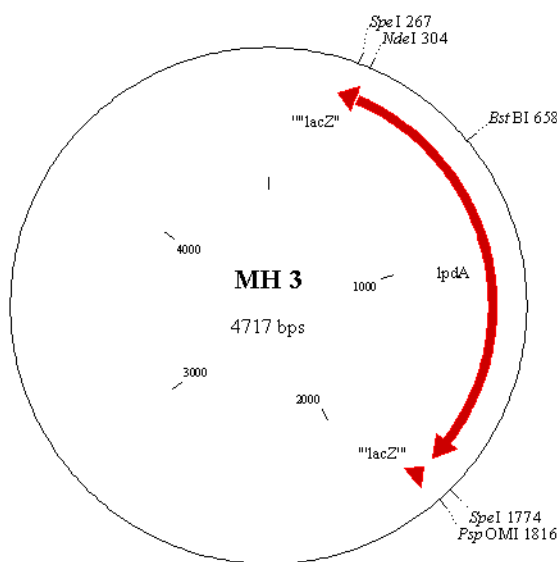
F.4: pYQ3



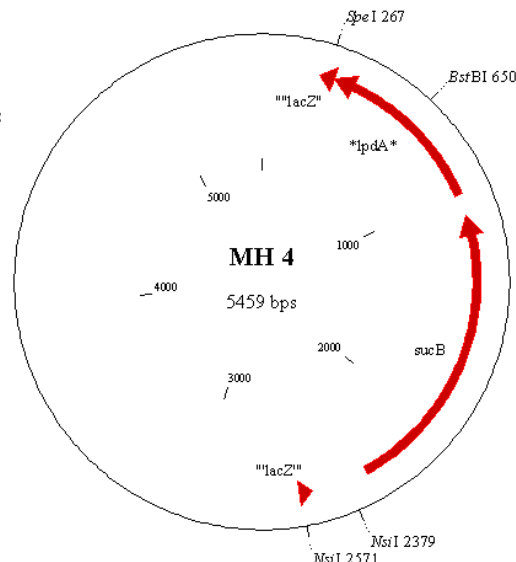
F.5: pMH1



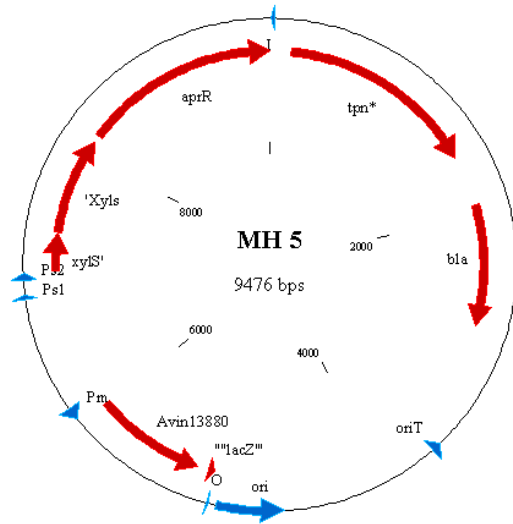
F.6: pMH5



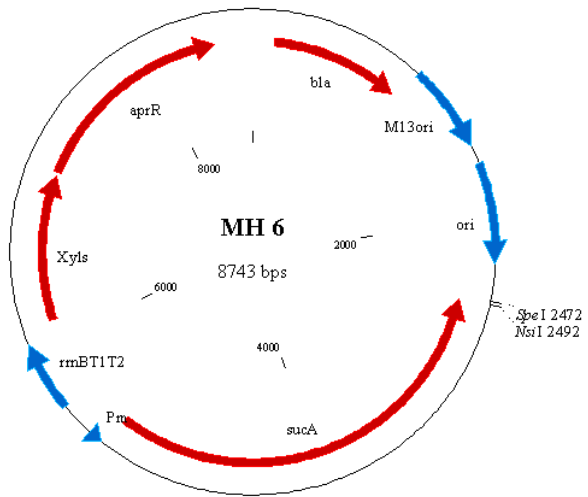
F.7: pMH3



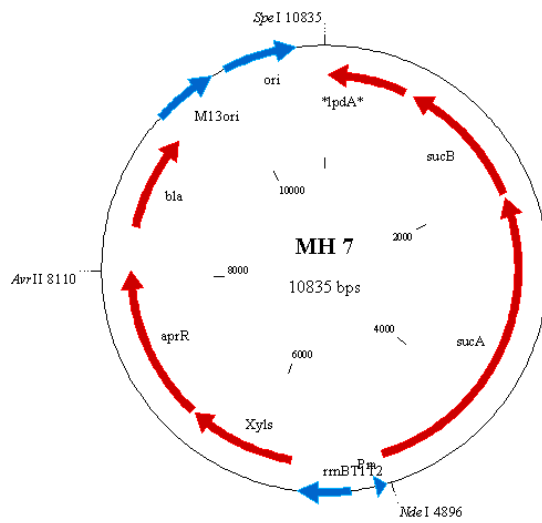
F.8: pMH4



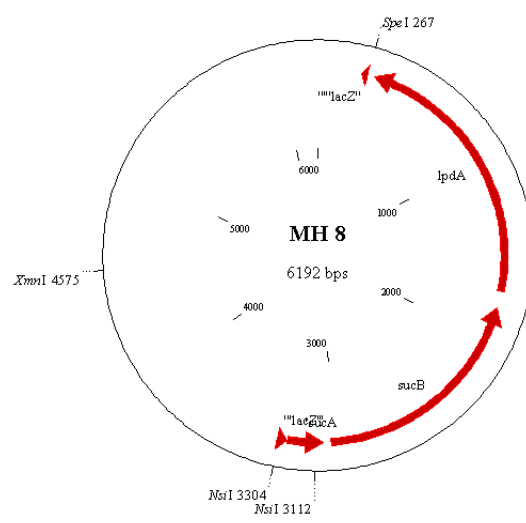
F.9: pMH5



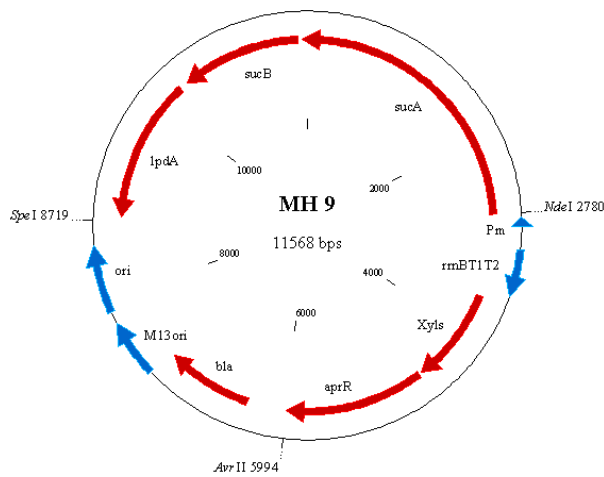
F.10: pMH6



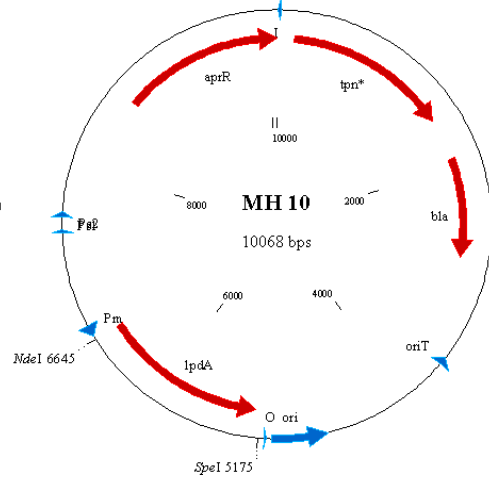
F.11: pMH7



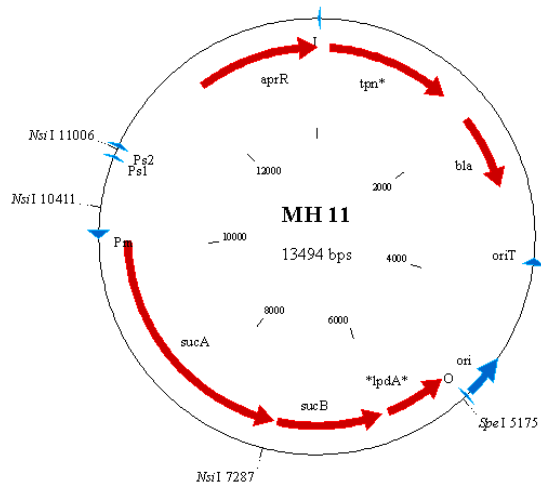
F.12: pMH8



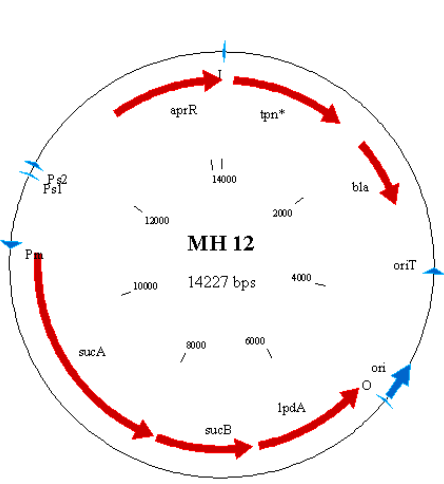
F.13: pMH9



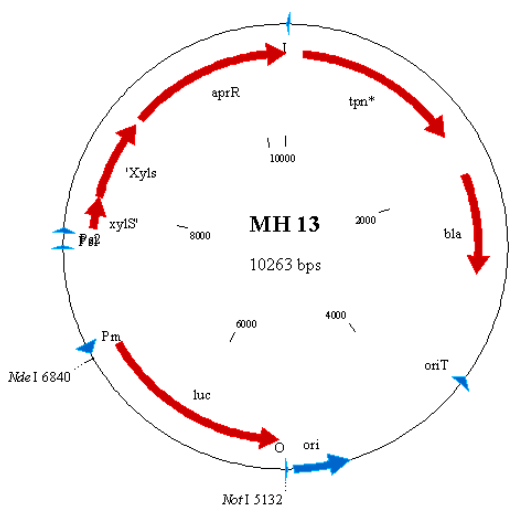
F.14: pMH10



F.15: pMH 11



F.16: pMH12



F.17: pMH13

VEDLEGG G: VEKSTFORSØK STAMME 21C3T OG KOMPLEMENTERTE STAMMER

Tabell G.1: Avlesninger ved måling OD₆₆₀ i stamme 21C3T og komplementerte stammer 205, 208, 212, alle i tre paralleller.

OD ₆₆₀					
Stamme	0 timer	22 timer	45 timer	69 timer	95 timer
205 I	0,067	0,085	0,169	0,245	0,275
205 II	0,044	0,093	0,041	0,169	0,129
205 III	0,064	0,041	0,082	0,268	0,225
208 I	0,075	0,046	0,085	0,081	0,088
208 II	0,052	0,037	0,055	0,097	0,112
208 III	0,053	0,175	0,181	0,108	0,104
212 I	0,048	0,213	1,830	1,840	1,880
212 II	0,054	0,179	1,690	1,930	1,900
212 III	0,061	0,238	1,690	2,080	2,050
21C3T I	0,094	0,905	2,370	2,960	2,190
21C3T II	0,106	0,946	2,250	2,240	2,170
21C3T III	0,093	0,925	2,420	2,450	2,250

Forts. fra over, kun MH205 og MH208 ble dyrket videre over 95 timer:

OD ₆₆₀			
Stamme	144 timer	170 timer	192 timer
205 I	0,480	0,850	0,800
205 II	0,265	0,440	0,800
205 III	0,426	0,580	0,630
208 I	0,337	0,570	0,670
208 II	0,255	0,450	0,600
208 III	0,259	0,580	0,620

VEDLEGG H: VEKSTFORSØK STAMME 20A6 OG KOMPLEMENTERTE STAMMER

Tabell H.1: Avlesninger ved måling OD₆₆₀ i medium/karbonkildedeforsøk for 20A6.

Medium	Karbonkilde	Parallell	OD ₆₆₀		
			24 timer	48 timer	72 timer
RA1	fruktose	I	0,7	2,1	3,13
		II	0,43	1,94	2,95
	glukose	I	0,37	1,43	1,56
		II	0,75	2,13	4,34
	glycerol	I	0,63	2,14	4,21
		II	0,2	1,51	2,03
Burks	fruktose	I	0,6	2,18	4,54
		II	0,43	2,82	3,54
	glukose	I	0,79	2,7	4,3
		II	0,54	1,9	2,01
	glycerol	I	0,63	2,43	4,5
		II	0,45	1,67	2,34

Tabell H.2: Avlesninger ved måling OD₆₆₀ i stamme 20A6 og komplementerte stammer.

Stamme	OD ₆₆₀				
	0 timer	24 timer	50 timer	74 timer	96 timer
221 I	0,09	0,15	0,17	0,18	0,20
221 II	0,09	0,16	0,18	0,21	0,18
221 III	0,09	0,15	0,16	0,20	0,18
222 I	0,11	0,20	0,43	0,54	0,62
222 II	0,11	0,17	0,35	0,53	0,60
222 III	0,11	0,18	0,37	0,53	0,57
232 I	0,08	0,21	0,56	2,94	3,95
232 II	0,08	0,24	1,35	3,58	3,69
232 III	0,08	0,23	1,19	3,37	3,85
241 I	0,06	0,14	1,58	4,14	4,70
241 II	0,06	0,13	1,76	4,05	8,88
241 III	0,06	0,12	1,78	3,76	5,55
242 I	0,07	0,17	0,40	2,65	4,60
242 II	0,07	0,16	0,27	2,00	4,12
242 III	0,07	0,16	0,26	1,63	4,35
20A6 I	0,08	0,11	1,30	3,50	5,50
20A6 II	0,08	0,12	0,53	2,50	5,30
20A6 III	0,08	0,15	0,32	1,50	1,70