

Transport av fenyl-lipid i *Azotobacter vinelandii*

Marianne Dalland

Bioteknologi (5 årig)

Innlevert: Mai 2013

Hovedveileder: Helga Ertesvåg, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi

Forord

Denne oppgaven er et resultat av en 5-årig mastergrad ved Institutt for bioteknologi på NTNU, og ble utført i perioden januar 2012 til mai 2013. Studiet ble veiledet av Dr. Scient. Helga Ertesvåg, som også har vært ansvarlig for utforming av selve oppgaven. Oppgaven presenterer arbeidet jeg har utført i denne perioden, hvor funksjonen til hypotetiske gener i bakterien *Azotobacter vinelandii* har blitt undersøkt. Arbeidet med oppgaven har vært ufattelig lærerikt, og gitt meg verdifull kunnskap som jeg vil ta med meg videre inn i yrkeslivet.

Først og fremst ønsker jeg å takke Helga for veiledning gjennom hele perioden. Da jeg var rådløs hjalp hun meg videre, og ved å dele av sin rike kunnskap har hun lært meg mye. Jeg vil også takke mine fantastiske studievenninner, Britta og Frida, som har motivert meg og vært avgjørende for min trivsel på (og utenfor) masterstudiet. En stor takk rettes også til Torstein og Bodhild for korrekturlesing av oppgaven.

De siste årene har vært fulle av opplevelser, kunnskap, oppturer og nedturer. Studiet har gitt meg en smakebit på genetikkens mysterier, og absolutt motivert meg for videre arbeid innenfor bioteknologi!

Trondheim, Mai 2013

Marianne Dalland

Sammendrag

Ved lav næringstilgang kan *Azotobacter vinelandii* gå inn i et cystestadium, hvor en del av fosfolipidene i yttermembranen erstattes med alkylresorcinoler og alkylpyroner. Gener involvert i syntese av alkylresorcinol og alkylpyron har tidligere blitt identifisert, og lokalisert i operonet *arsABCD*. Like nedstrøms for dette operonet ligger tre hypotetiske gener, Avin_29510, Avin_29500 og Avin_29490. Tidligere studier har vist at disse genene uttrykkes samtidig som *arsABCD*. Funksjonen av Avin_29510, Avin_29500 og Avin_29490 ble studert i denne oppgaven, genene fikk henholdsvis navnene *arsF*, *arsD* og *arsH*.

arsF, *arsG* og *arsH* ble isolert fra *A. vinelandii* ATCC 12518 (villtype) ved PCR, og inaktivert ved å klonere tetrasyklinresistens-genene *tetA* og *tetR* inn i genene. Tre muterte stammer av *A. vinelandii* ble konstruert, hvor villtype-genet ble erstattet med henholdsvis inaktivert *arsF*, *arsG* og *arsH*. Dette ble utført ved homolog rekombinasjon. Cystestadium ble induisert i de tre mutant-stammene, før uttrykk av alkylresorcinol kunne undersøkes ved en fargereaksjon. Det ble ikke detektert alkylresorcinol i cellemembranen til mutantene. Da tidligere studier har vist at verken *tetA* eller *tetR* fører med seg polare effekter av betydning, ble det konkludert med at både *arsF*, *arsG* og *arsH* er essensielle for uttrykk av alkylresorcinol. Resultatet representerer et nytt funn, som kan ha betydning for fremtidig genomkartlegging og forskning.

Ved en bioinformatisk undersøkelse hvor de hypotetiske genene blant annet ble sekvenssammenstilt mot gener i andre organismer, ble det vist at *arsF* koder for en ATP-bindende komponent i en ABC-transportør. Det ble også vist at *ArsG* har likheter med permease-proteiner i ABC-transportsystem, og at *ArsH* muligens også er del av en ABC-transportør. For samtlige av de undersøkte genene ble det funnet homologe gener involvert i eksport av lipoprotein. De samlede resultatene fører med seg sterke indikasjoner på at *arsF*, *arsG* og *arsH* er involvert i ABC-eksport av alkylresorcinol ved cystedannelse.

For å kunne verifisere at utslått *arsF*, *arsG* og *arsH* er årsaken til den observerte endringen i alkylresorcinol-produksjon hos muterte cyster, ble det laget transposonvektorer med villtype-gen under kontroll av en P_m-promotor. Disse kan senere benyttes til å komplementere mutantene.

Summary

Under adverse environmental conditions, *Azotobacter vinelandii* differentiates into metabolically dormant cysts. During this process, some of the phospholipids in the outer membrane is replaced by alkylresorcinols and alkylpyrones. The genes involved in synthesis of alkylresorcinols and alkylpyrones have previously been identified, and are localized in the *arsABCD* operon. Downstream of this operon three hypothetical genes, Avin_29510, Avin_29500 and Avin_29490, are located. Previous research has shown that these genes are expressed simultaneously with *arsABCD*. In this study, the function of Avin_29510, Avin_29500 and Avin_29490 has been examined. The genes were named *arsF*, *arsG* and *arsH*, respectively.

arsF, *arsG* and *arsH* were isolated from the wild-type strain of *A. vinelandii* by PCR, and inactivated by insertion of the tetracycline resistance genes *tetA* and *tetR*. Three mutant strains of *A. vinelandii* were constructed by replacing the wild-type genes with inactivated *arsF*, *arsG* and *arsH*, respectively. This was done through homologous recombination. After cyst formation had been induced, expression of alkylresorcinol was examined by a colour reaction. Alkylresorcinol was not observed in the cell membrane of the mutants. Previous studies have shown that neither *tetA* nor *tetR* leads to strong polar effects. The results therefore indicate that *arsF*, *arsG* and *arsH* all are essential for expression of alkylresorcinol. This is a new finding that may affect future research.

The hypothetical genes were further studied by the use of bioinformatics tools, in particular sequence alignments. From these examinations *arsF* was shown to encode an ATP-binding component of an ABC transporter. Similarities between ArsG and permeases from ABC transport systems was found, and the results indicated that ArsH might be involved in ABC transport as well. Gene homologues involved in lipoprotein export was found for all the examined genes. This result, together with the experimental findings, strongly suggest that *arsF*, *arsG* and *arsH* are involved in ABC export of alkylresorcinol in cysts.

Transposon vectors containing wild-type *arsF*, *arsG* and *arsH* under control of a Pm promoter was constructed. The transposon vectors can later be used to confirm the observed effect of the knock out genes by complementation.

Innhold

1. Introduksjon.....	1
1.1 <i>Azotobacter vinelandii</i>	1
1.2 Livssyklus og cystedannelse i <i>A. vinelandii</i>	1
1.3 Fosfolipider erstattes av resorcinoler og pyroner ved cystedannelse.....	3
1.4 Yttermembran i gram negative bakterier.....	5
1.5 ABC (ATP-binding cassette)-transportører.....	6
1.6 Bakgrunn for oppgaven.....	9
2. Materiale og metode.....	10
2.1 Vekstmedier, løsninger og antibiotika.....	10
2.1.1 Burks medium (BM).....	10
2.1.2 Psi-medium.....	10
2.1.3 TFB1.....	11
2.1.4 TFB2.....	11
2.1.5 SOC-medium.....	11
2.1.6 Luria Broth (LB).....	11
2.1.7 Luria agar (LA).....	12
2.1.8 CM medium.....	12
2.1.9 CM-agar.....	12
2.1.10 Burk-agar med tetrasyklin.....	12
2.1.11 Burk-agar med n-butanol.....	12
2.1.12 50 x TAE-buffer.....	12
2.1.13 Loading Dye.....	13
2.1.14 Ampicillin-bruksløsning.....	13
2.1.15 Tetrasyklin-bruksløsning.....	13
2.1.16 Fast Blue-løsning.....	13
2.2 Bakteriestammer og plasmid benyttet i oppgaven.....	14
2.3 Oppdyrking og nedfrysing av bakteriestammer.....	16
2.4 Isolering av DNA fra kultur.....	16
2.4.1 Isolering av kromosomalt DNA.....	17
2.4.2 Isolering av plasmid.....	17
2.5 PCR.....	19
2.5.1 Benyttede PCR-kit.....	20
2.5.2 Benyttede PCR-program.....	21
2.5.3 Klargjøring av templat-DNA brukt i PCR-reaksjoner.....	21

2.6 Agarose gelelektroforese	22
2.7 Rensing av DNA	23
2.7.1 DNA-rensing fra gel.....	23
2.7.2 DNA-rensing fra PCR-reaksjon.....	23
2.8 Restriksjonskutting	24
2.9 Ligering	25
2.10 Transformasjon.....	26
2.10.1 Kjemisk transformering av <i>E. coli</i>	26
2.10.2 Transformering og rekombinasjon hos <i>Azotobacter</i>	28
2.10.3 Blå/Hvit-screening.....	29
2.11 Sekvensering	31
2.12 Induksjon av cyster i <i>A. vinelandii</i>	32
2.13 Farging av alkylresorcinol.....	32
2.14 Komplementering av mutanter ved bruk av transposon.....	33
2.15 Bioinformatiske verktøy.....	34
2.15.1 BLAST	34
2.15.2 TCDB.....	35
2.15.3 KEGG	35
2.15.4 MicrobesOnline	36
2.15.5 Clone Manager Suite	36
3. Resultat.....	37
3.1 Bioinformatisk undersøkelse av <i>arsG</i>, <i>arsF</i> og <i>arsH</i>	37
3.1.1 Bioinformatisk undersøkelse av <i>arsF</i> (Avin_29510).....	38
3.1.2 Bioinformatisk undersøkelse av <i>arsG</i> (Avin_29500)	39
3.1.3 Bioinformatisk undersøkelse av <i>arsH</i> (Avin_29490)	41
3.2 Konstruksjon av mutanten <i>A. vinelandii</i>Δ<i>arsF</i>	43
3.2.1 Isolering av <i>arsF</i>	44
3.2.2 Konstruksjon av pMD101 og pMD104	45
3.2.3 Konstruksjon av pMD107	46
3.2.4 Inaktivering av <i>arsF</i> i <i>A. vinelandii</i>	49
3.3 Konstruksjon av mutanten <i>A. vinelandii</i>Δ<i>arsG</i>	50
3.3.1 Isolering av <i>arsG</i>	51
3.3.2 Konstruksjon av pMD102	51
3.3.3 Konstruksjon av pMD108	52
3.3.4 Inaktivering av <i>arsG</i> i <i>A. vinelandii</i>	55

3.4 Konstruksjon av mutanten <i>A. vinelandii</i>Δ<i>arsH</i>	56
3.4.1 Isolering av <i>arsH</i>	57
3.4.2 Konstruksjon av pMD103 og pMD106.....	58
3.4.3 Konstruksjon av pMD109.....	60
3.4.4 Inaktivering av <i>arsH</i> i <i>A. vinelandii</i>	62
3.5 Alkylresorcinol-produksjon hos <i>A. vinelandii</i>Δ<i>arsF</i>-, <i>A. vinelandii</i>Δ<i>arsG</i>- og <i>A. vinelandii</i>Δ<i>arsH</i>-cyster	63
3.6 Kloning av <i>arsF</i>	64
3.6.1 Isolering av <i>arsF</i>	65
3.6.2 Konstruksjon av pMD116.....	65
3.6.3 Konstruksjon av transposonvektoren pMD113.....	66
3.7 Kloning av <i>arsG</i>	68
3.7.1 Isolering av <i>arsG</i>	69
3.7.2 Konstruksjon av pMD117.....	69
3.7.3 Konstruksjon av transposonvektoren pMD114.....	70
3.8 Kloning av <i>arsH</i>	72
3.8.1 Isolering av <i>arsH</i>	73
3.8.2 Konstruksjon av pMD118.....	73
3.8.3 Konstruksjon av transposonvektoren pMD115.....	74
4. Diskusjon	76
4.1 Bioinformatisk undersøkelse av <i>arsF</i>, <i>arsG</i> og <i>arsH</i>	76
4.2 Alkylresorcinol-produksjon hos <i>A. vinelandii</i>Δ<i>arsF</i>-, <i>A. vinelandii</i>Δ<i>arsG</i>- og <i>A. vinelandii</i>Δ<i>arsH</i>-cyster	77
4.3 Videre arbeid	78
5. Konklusjon	80
6. Litteratur	81
Vedlegg A: DNA-standarder	I
Vedlegg B: Primere	II
Vedlegg C: plasmidkart	III
Vedlegg D: Sekvenseringsdata	VIII

1. Introduksjon

1.1 *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii er en gram negativ, obligat aerob gammaproteobakterie fra familien Pseudomonadaceae. Den er stavformet og relativt stor, ca 2 x 5 µm. Bakterien er frittlevende og finnes hovedsakelig i nøytral eller basisk jord, og er i stand til å fikse nitrogen asymbiotisk (Medigan 2009). Ved nitrogenfiksering bedres vekstvilkårene for planter i jorden, men *Azotobacter* forbedrer også jordkvaliteten ved å hemme patogene mikroorganismer, mobilisere fosfat i jorden, og ved å produsere plantehormoner og vitaminer (Martinez-Toledo *et al.* 1996). *A. vinelandii* har tidligere hatt en sentral rolle som modellorganisme ved biokjemiske og genetiske studier av nitrogenfiksering. Blant annet har det vist seg at polymeren alginat, som produseres av *A. vinelandii*, er med på å beskytte oksygensensitiv nitrogenase under aerobe forhold (Sabra *et al.* 2000).

A. vinelandii er en kjemoorganotrof bakterie, for å vokse benytter den seg av ulike typer sukker, alkoholer og uorganiske salter. Dersom næringstilgangen er lav, kan vegetative celler gå inn i et hvilestadium ved å danne cyster. Dette er nærmere beskrevet i kapittel 1.2. Bakterien vokser ved temperaturer mellom 10 og 50 °C, med optimaltemperatur på 34-35°C (Linewraver *et al.* 1932).

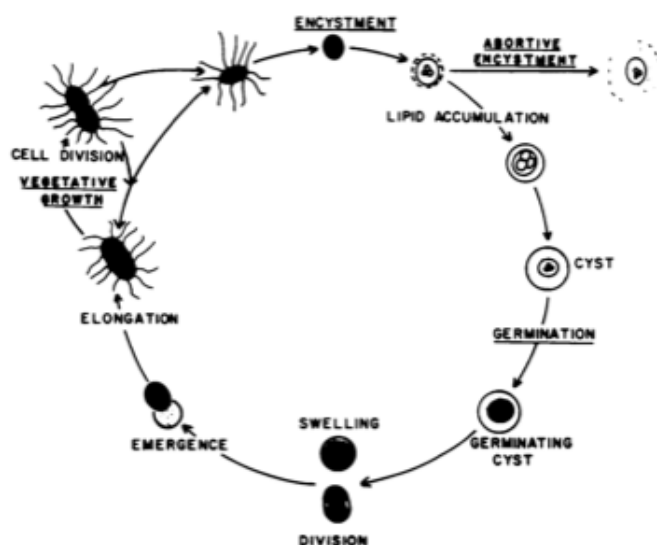
I 2009 ble genomet til *A. vinelandii* DJ ble sekvensert. Det består av et sirkulært kromosom på 5 365 318 bp, med 5050 proteinkodende gener (Setubal *et al.* 2009). I stasjonær vekstfase inneholder en celle flere kromosomkopier, opp mot 80 kromosomkopier er påvist (Nagpal *et al.* 1978; Sadoff *et al.* 1979).

1.2 Livssyklus og cystedannelse i *A. vinelandii*

Tilgjengeligheten på næringsstoffer påvirker metabolismen hos *A. vinelandii*. Dersom tilgangen på mineraler er lav, kan bakterien gå inn i et cystestadium. Cystedannelse induseres også dersom enkelte organiske stoffer som β-hydroksybutyrat (BHB) og n-butanol tilsettes, ved fravær av andre karbonkilder (Lin & Sadoff 1968).

En cyste er en hvilende struktur som har mange likhetstrekk med sporer. Blant annet er cystene mer resistente mot ultrafiolett og ioniserende stråling enn vegetative celler, og er mer motstandsdyktig mot tørke og nedbrytning. I motsetning til sporer, tåler ikke cystyter spesielt høye temperaturer. Organismen kan være i cystestadiet i flere år, og ved tilsats av næring omgjøres den til en vegetativ celle igjen (Medigan 2009). Livssyklusen til *A. vinelandii* er vist i figur 1.1. Cystedannelse induserer store strukturelle endringer i cellen. I startfasen av cystedannelsen, mister de vegetative cellene flageller og cellevolumet minker til omtrent halvparten av en vegetativ celledes volum. I cystestadiet har *A. vinelandii* en rund form, hvor man skiller mellom tre ulike strukturer. *Central body* utgjør den indre delen av cysten, og er en redusert form av den vegetative cellen. Denne er omgitt av et indre og et ytre skall, som henholdsvis er kalt *intine* og *exine* (Hitchins & Sadoff 1970). Alginat er en viktig komponent i disse skallene, dette polysakkaridet har vist seg å være essensiell for cystedannelse (Campos *et al.* 1996). En del av fosfolipidene i membranen erstattes med resorcinoler og pyroner, som er hovedkomponenter i exine (Reusch & Sadoff 1993). Dette er nærmere beskrevet i kapittel 1.3. Poly- β -hydroksybutyrat (PBH) akkumuleres i intracellulære granuler, denne polymeren benyttes som karbon- og energi-kilde under cystedannelsen (Stevenson & Socolofsky 1966).

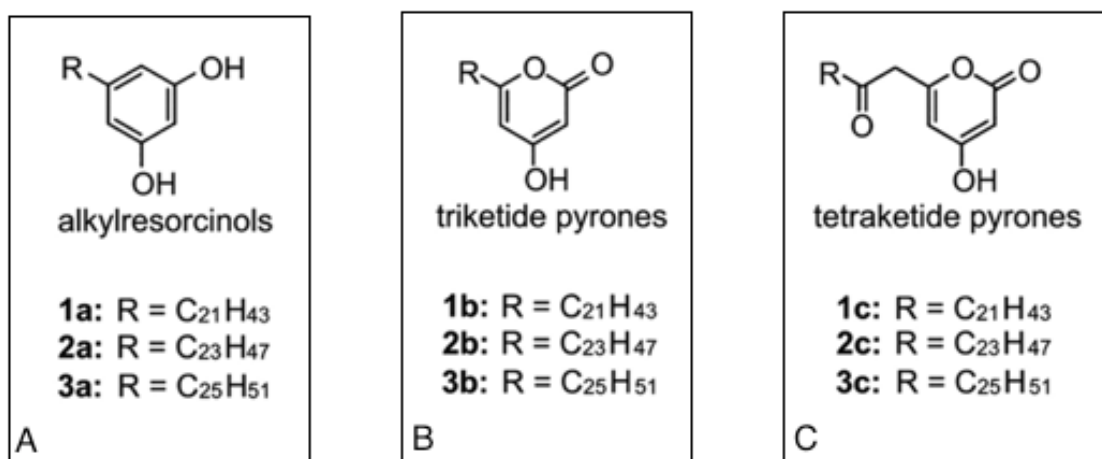
Når forholdene ligger til rette for det, kan cysten spire og omgjøres til en vegetativ celle igjen. Cellen vokser og deler seg, og exine brytes opp. Ved cystespining blir komponenter fra dette skallet etterlatt i løsningen (Wyss *et al.* 1961). Cellen får etter hvert tilbake flageller og andre vegetative egenskaper.



Figur 1.1, Livssyklus hos *A. vinelandii* (Sadoff 1975).

1.3 Fosfolipider erstattes av resorcinoler og pyroner ved cystedannelse

Når vegetative celler går inn i cystestadiet erstattes en del av fosfolipidene i membranen med 5-n-alkylresorcinoler og 6-n-alkylpyroner (Reusch & Sadoff 1983). Dette er amfifatiske fenol-lipider som består av fenolringer med lange alifatiske kjeder. Fenolringene i alkylresorcinol og alkylpyron inneholder hydroksylgrupper eller ketongrupper, hos alkylpyroner er et karbonatom i fenolringen substituert med et oksygenatom. De lange alifatiske kjedene på disse molekylene er sentral for inkorporering i cellemembraner. Struktur av alkylresorcinoler og alkylpyroner funnet i *A. vinelandii*-cyster er vist i Figur 1.2.

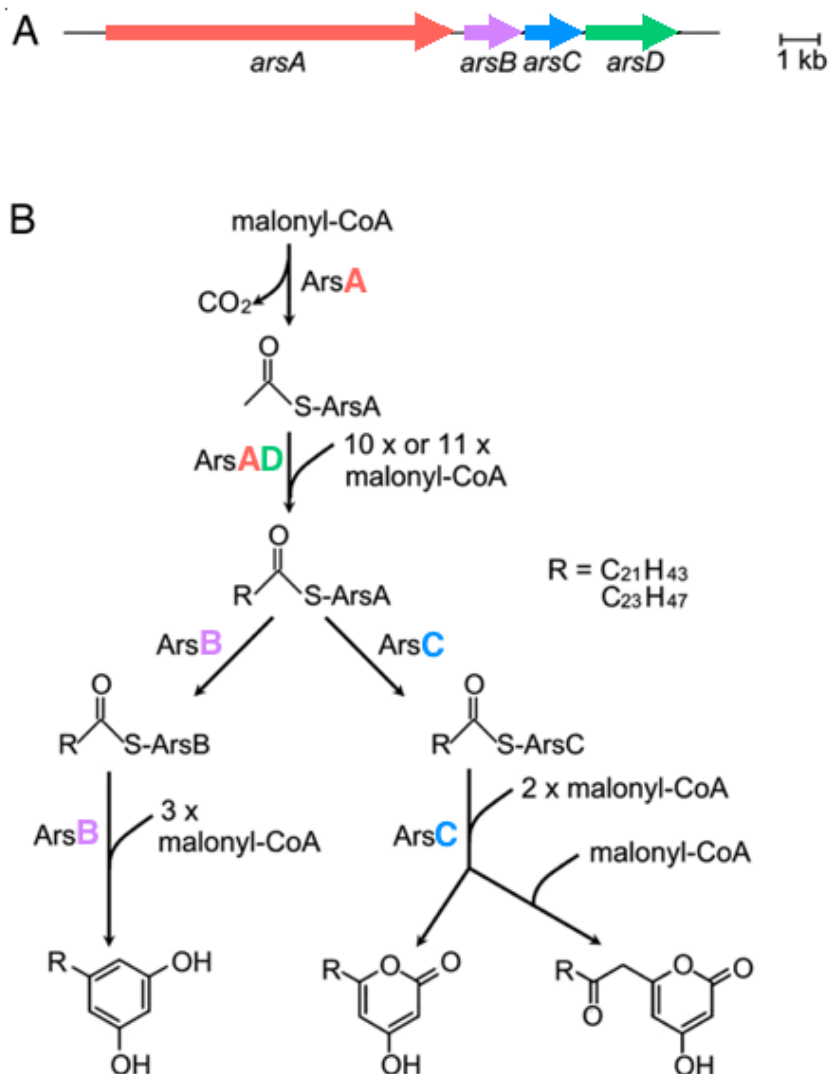


Figur 1.2, Struktur av alkylresorcinol (A) og alkylpyroner (B,C) i *A. vinelandii*-cyster . R indikerer alifatiske kjeder. Modifisert fra (Miyana *et al.* 2008).

Alkylresorcinol er det vanligste fenol-lipidet som forekommer i naturen, og produseres blant annet av kornsorter som rug, hvete og bygg, samt enkelte mosetyper, sopp, alger og bakterier. Dette fenol-lipidet har vist seg å ha mange betydningsfulle biologiske funksjoner, deriblant som antioksidant og mikrobe- og soppdrepende middel (Kozubek & Tyman 1999). Studier har også vist at alkylresorcinoler kan binde seg til og endre aktiviteten i enkelte enzymer (Kozubek 1995), samt øke cellers beskyttelse mot DNA-skader og kreft (Parikka *et al.* 2006).

Fenol-lipidene er viktige for dannelsen av funksjonelle exine-skall, og det antas at de er med på å gi cysten dens robuste egenskaper (Reusch & Sadoff 1983). Likevel er ikke alkylresorcinoler og alkylpyroner essensielle for verken cystedannelse eller cystenes tørkeresistens-egenskaper (Segura *et al.* 2009).

Operonet *arsABCD* inneholder gener som er ansvarlig for syntese av alkylresorcinol og alkylpyron i *A. vinelandii* (figur 1.3A). ArsB og ArsC er polyketid-syntaser, som henholdsvis syntetiserer alkylresorcinol og alkylpyron. ArsA og ArsD er fettsyresyntaser, disse syntetiserer fettsyrer som er substrat for ArsB og ArsC (Funa *et al.* 2006). Foreslått spor for denne prosessen er vist i figur 1.3B.

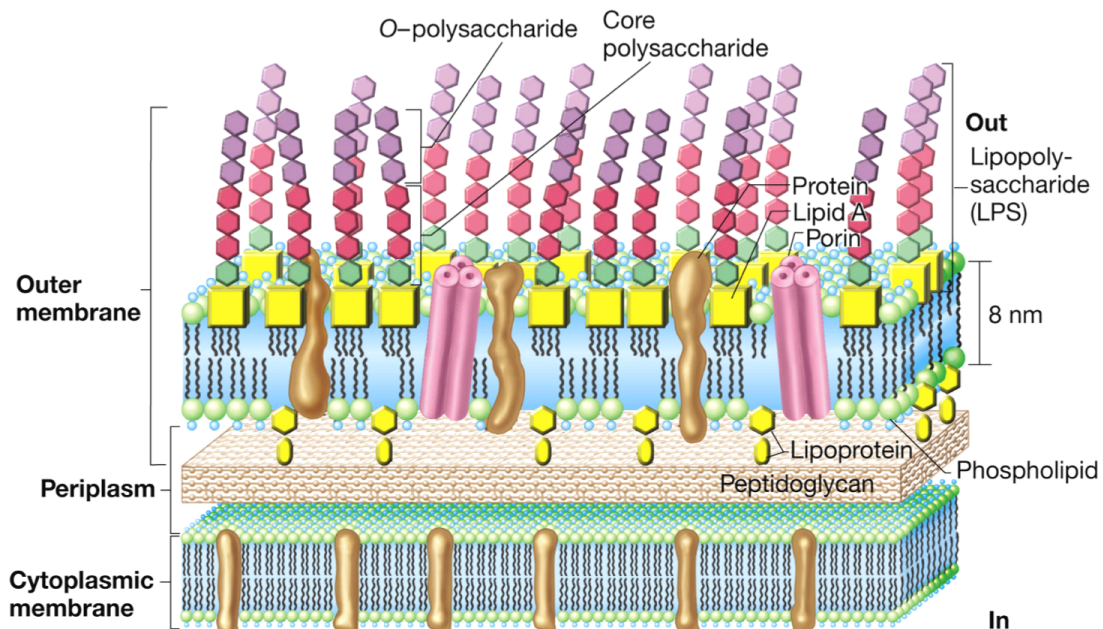


Figur 1.3, Syntese av fenol-lipider i *A. vinelandii*. A) *arsABCD*-operonet. B) Foreslått spor for syntese av alkylresorcinoler og alkylpyroner ved cystedannelse. Modifisert fra (Miyanaga *et al.* 2008).

Tilstedeværelse av alkylresorcinol kan påvises ved en fargereaksjon, hvor saltet Fast Blue B reagerer med 5-n-alkylresorcinol og produserer en rød forbindelse (Tluscik *et al.* 1981).

1.4 Yttermembran i gram negative bakterier

Celleveggen i gram negative bakterier består av to membraner; innermembranen og yttermembranen (figur 1.4). Disse er separert av periplasma som inneholder et tynt peptidoglykan-lag. Yttermembranen utgjør mesteparten av gram negative bakteriers cellevegg, dette er et asymmetrisk lipid bilag bestående av fosfolipider, lipopolysakkarider (LPS), lipoproteiner og ulike β -tønne-proteiner. LPS erstatter mesteparten av fosfolipidene i den ytre halvdel av yttermembranen, mens den indre halvdel hovedsakelig består av fosfolipider og proteiner (Medigan 2009). I tillegg til å påvirke gram negative bakteriers struktur, virker yttermembranen som en selektiv barriere som hindrer eksterne giftstoffer i å komme inn i cellen (Ruiz *et al.* 2006).



Figur 1.4, Struktur av cellevegg i gram negative bakterier (Medigan 2009).

Yttermembran-proteiner syntetiseres i cytoplasma, mens LPS og fosfolipider i yttermembranen dannes ved den cytoplasmiske siden av innermembranen. Videre transporteres disse komponentene til yttermembranen.

Mekanismen for transport av lipoproteiner er kjent på detaljnivå. Lipoproteinene translokeres fra cytosol til den periplasmiske siden av innermembranen via proteinet Sec, før de transporteres over periplasma og integreres i yttermembranen av ulike Lol-proteiner (Tokuda 2009). LolCDE-komplekset i innermembranen er en ABC-transportør som binder og overfører yttermembran-spesifikke lipoproteiner til det periplasmiske

chaperonet LolA. Et lipoprotein-LolA-kompleks dannes, som krysser periplasma til yttermembran-reseptoren LolB. LolB inkorporerer lipoproteinene i yttermembranen (Matsuyama *et al.* 1995). Andre yttermembranproteiner passerer også innermembranen via Sec-proteiner, men transportmekanisme gjennom periplasma er ukjent.

ABC-transportøren MsbA flipper LPS fra cytoplasmisk til periplasmisk side av innermembranen. Mekanisme for transport av LPS over periplasma er i stor grad ukjent, men involverer Lpt-proteiner (Sperandeo *et al.* 2007). Proteinkomplekset Imp/RlpB har vist seg å være essensielt for integrering av LPS i yttermembranen i *E. coli* (Wu *et al.* 2006).

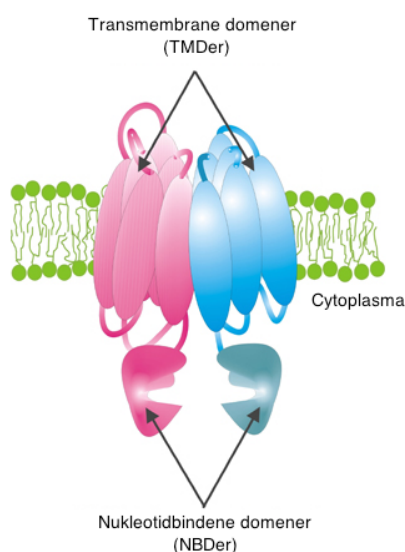
Det er foreløpig ukjent hvordan fosfolipid transporteres til yttermembranen. Resultater fra enkelte studier tyder på at også fosfolipider transporteres over innermembranen via MsbA (Doerrler *et al.* 2001). Dette er omdiskutert da forsøk har vist at fosfolipidtransport i *Neisseria meningitidis* ikke avhenger av MsbA (Tefsen *et al.* 2005).

1.5 ABC (ATP-binding cassette)-transportører

ABC-transportører er en gruppe membranproteiner som aktivt transporterer ulike stoffer over cellemembraner. Proteinene utgjør den største familien av membrantransportproteiner, de er høyt konserverte og har blitt påvist i organismer fra samtlige biologiske riker (Davidson *et al.* 2008). Transportørene kan deles inn i to grupper; importører og eksportører. Disse er henholdsvis involvert i import og eksport av spesifikke stoffer over membraner, blant annet karbohydrater, lipider, vitaminer og steroidhormoner. Mens eksportører finnes hos både prokaryote og eukaryote celler, er importører kun observert hos prokaryoter (Alberts *et al.* 2008). Det finnes også en tredje gruppe proteiner i ABC-system-familien, disse er involvert i transport-urelaterte prosesser som DNA reparasjon og transkripsjon.

ABC-transportører har dimerstruktur, hvor hver monomer karakteriseres av to kjernedomener; et hydrofobt transmembrant domene (TMD) og et konserverte nukleotidbindene domene (NBD) i cytoplasma (figur 1.5). I tillegg kan andre regulerende komponenter, som for eksempel substratbindene protein hos importører,

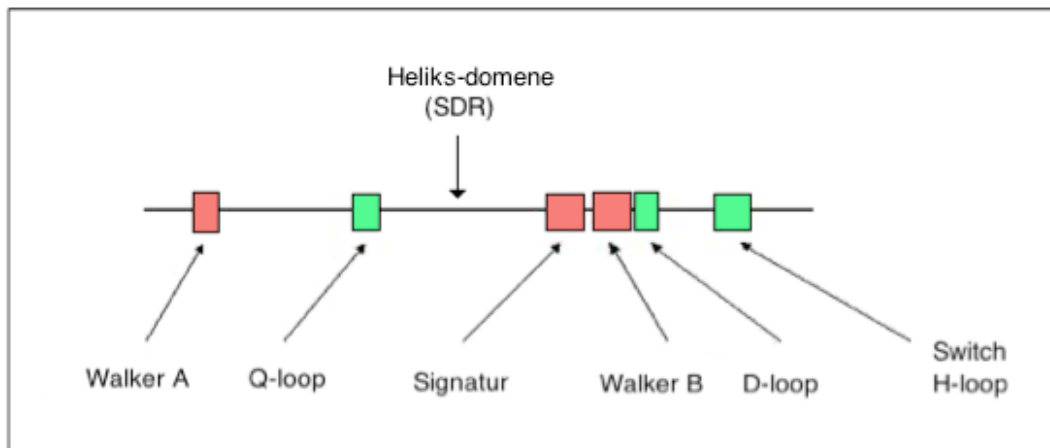
være bundet til kjernedomenene. Både homo- og hetero-dimeriske ABC-transportører er observert (Davidson *et al.* 2008).



Figur 1.5, Struktur av ABC-transportør. Hver monomer (vist i rosa og blått) består av kjernedomenene TMD og NBD, sammen danner de en funksjonell dimer. Modifisert fra (Cambridge U.o. 2012).

TMD består av α -helikser forankret i celledommen, disse domenene sørger for ligand-binding og utgjør selve kanalen for ligand-transport. TMD-strukturen bestemmer hvilke molekyler som kan transporteres gjennom ABC-transporteren. Siden disse domenene er ligand-spesifikke, varierer TMDer i både aminosyresekvens og struktur. Mens TMD i importører varierer mellom 5-10 α -helikser, består TMD-monomerene i eksportører oftest av 6 helikser (Davidson *et al.* 2008).

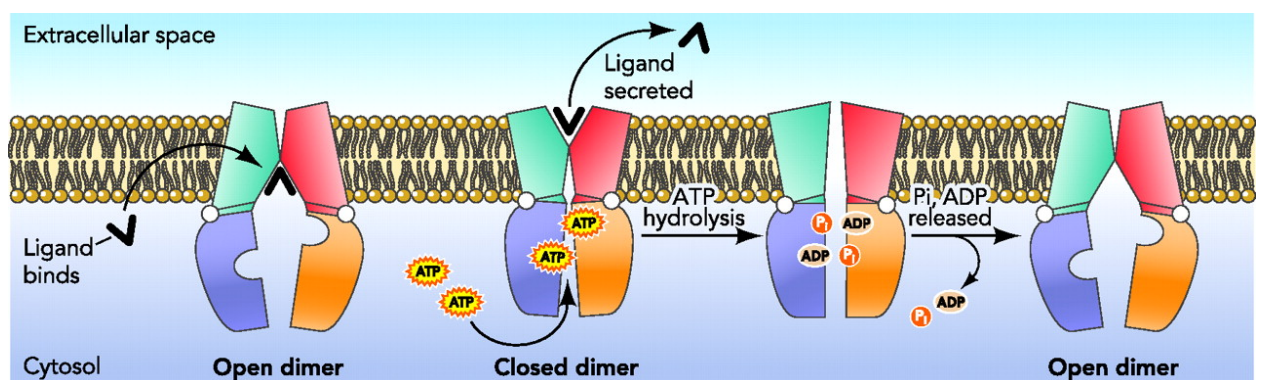
NBD er festet til cytoplasma-siden av TMD, og er sete for ATP-binding og hydrolyse. NBDer i samtlige ABC-system karakteriseres av Walker A-, Walker B- og signaturmotiv, som er høyt konserverte sekvenser. I tillegg inneholder NBD en Q-loop, en D-loop og en H-loop, som vist i figur 1.6.



Figur 1.6, Konserverte motiv i nukleotidbindene domene i et ABC-system. Domener vist i rødt er karakteristiske sekvenser for alle ABC ATPaser. Motivene vist i grønt inneholder høyt konserverte enkelt-aminosyrer som interagerer med γ -fosfatet i ATP. Modifisert fra (Davidson *et al.* 2008).

Både Walker A-, Walker B- og signaturmotivet i NBD utgjør ATP-bindene sete i ABC-transportører. Signaturmotivet er unikt for ATP-transportører, mens Walker A og B danner nukleotidbindene sete hos proteiner i P-loop ATPase-familien. Binding mellom Walker A-motiv fra en monomer og D-loop hos en annen, er med på å opprettholde transportørens dimer-struktur (Davidson *et al.* 2008).

ABC-transportører er energiavhengige, og må binde og hydrolysere ATP for å kunne transportere stoffer over membranen. Ligandbinding induserer konformasjonsendringer i NBD, slik at domenet får høyere affinitet for ATP. ATP-binding fører til at de to nukleotidbindene domene dimeriserer, mens hydrolyse fører til dimer-dissosiasjon. Konformasjonsendringene i NBDene overføres til TMDene, slik at molekyler kan transporteres over membranen (Linton 2007). Generell mekanisme for ABC-eksport er vist i figur 1.7.



Figur 1.7, Mekanisme for ABC-eksport. Spesifikt ligand binder TMD, som fører til at ATP binder NBD. ATP-binding endrer NBDenes, og videre TMDenes konformasjon, slik at ligand transporteres over cellemembranen. Ved ATP-hydrolyse og nukleotidfrigjøring gjendannes transportørens opprinnelige struktur (Linton 2007).

1.6 Bakgrunn for oppgaven

Tidligere har det ikke vært kjent hvordan alkylresorcinoler og alkylpyroner eksporteres til yttermembranen i *A. vinelandii*-cyster. Dette er en viktig prosess for dannelse av funksjonelle exine-skall i cysten. Nedstrøms for operonet *arsABCD*, som er involvert i syntese av alkylresorcinol og alkylpyron, ligger det en gensamling bestående av genene *Avin_29510*, *Avin_29500* og *Avin_29490*. Produktene fra disse genene har ukjent funksjon. Videre i oppgaven vil disse genene bli kalt *arsF* (*Avin_29510*), *arsG* (*Avin_29500*) og *arsH* (*Avin_29490*).

Et microarray-studium av cystedannelsen i *A. vinelandii* har tidligere blitt utført, hvor det ble vist at *arsFGH* uttrykkes samtidig som *arsABCD* (Ertesvåg, ikke publisert). I tillegg viser sekvenssammenstillinger og litteratursøk at proteinene som uttrykkes fra *arsFGH* ligner andre proteiner involvert i eksport av lipoprotein.

Mål for oppgaven har vært å undersøke om *arsFGH* er nødvendig for eksport av alkylresorcinol. Ved å lage *A. vinelandii*-mutanter med inaktivert *arsFGH*, for så å inducere cystedannelse i disse cellene, kan effekten genene har på eksport av alkylresorcinol detekteres ved en fargereaksjon. Dersom exine-laget i muterte cyster ikke inneholder alkylresorcinol, er *arsFGH* involvert i uttrykk av dette fenol-lipidet.

For å verifisere genproduktene effekt på alkylresorcinol-eksport, må mutantene komplementeres med *arsFGH* fra villtype. Dersom mutantene får tilbake villtype-fenotypen, får man bekreftet at *arsFGH* er involvert i alkylresorcinol-eksport.

2. Materiale og metode

2.1 Vekstmedier, løsninger og antibiotika

Ionefritt vann ble brukt i de følgende mediene og løsningene.

2.1.1 Burks medium (BM)

	Forbindelse	Mengde (g/L)
Saltløsning	MgSO ₄ ×7H ₂ O (magnesiumsulfat)	0,2
	NaCl (natriumklorid)	0,2
	K ₂ HPO ₄ (Dikaliumhydrogenortofosfat)	0,64
	KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenortofosfat)	0,16
	H ₂ O	900
Sukkerløsning	Glukose	20
	H ₂ O	100
Spormetaller	FeSO ₄	0,015
	CaCl ₂	0,05
	Na ₂ MoO ₄	0,0021

Saltløsning og sukkerløsning ble autoklavert, avkjølt og blandet. Spormetaller ble tilsatt.

2.1.2 Psi-medium

Forbindelse	Konsentrasjon (g/L)
Gjærekstrakt	5
Trypton	20
MgSO ₄ (magnesiumsulfat)	5

pH ble justert til 7,6 med KOH (Kaliumhydroksid), og mediet ble autoklavert.

2.1.3 TFB1

Forbindelse	Konsentrasjon
KAc (kaliumacetat)	30 mM
RbCl (rubidiumklorid)	100 mM
CaCl ₂ ×2H ₂ O (kalsiumklorid)	10 mM
MnCl ₂ ×4H ₂ O	50 mM
Glyserol	15 % v/v

pH ble justert til 5,8 med fortynnet eddiksyre, og løsningen ble sterilfiltrert.

2.1.4 TFB2

Forbindelse	Konsentrasjon
MOPS	10 mM
CaCl ₂ ×2H ₂ O (kalsiumklorid)	75 mM
RbCl (rubidiumklorid)	10 mM
Glyserol	15 % v/v

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

2.1.5 SOC-medium

Forbindelse	Konsentrasjon
Trypton	20 g/L
Gjærekstrakt	5 g/L
NaCl (natriumklorid)	0,5 g/L
KCl (kaliumklorid)	2,5 mM
Glukose	3,6 g/L
MgCl ₂ (magnesiumklorid)	5,08 g/L

Mediet ble sterilfiltrert.

2.1.6 Luria Broth (LB)

Forbindelse	Konsentrasjon (g/L)
Trypton	10
Gjærekstrakt	5
NaCl (natriumklorid)	5

Mediet ble autoklavert.

2.1.7 Luria agar (LA)

Før autoklaving av LB-medium, ble det tilsatt 15 g/L agar. Etter nedkjøling av LA-medium til ca 50 °C, ble eventuell antibiotika tilsatt.

2.1.8 CM medium

Burks medium (2.1.1) uten FeSO₄ og Na₂MoO₄.

2.1.9 CM-agar

CM medium (2.1.8) med 15 g agar pr L medium, tilsatt til saltløsning før autoklaving.

2.1.10 Burk-agar med tetrasyklin

Burks medium (2.1.1) med 15 g agar pr L medium, tilsatt til saltløsning før autoklaving. Ved ca 55 °C ble det tilsatt 10 mg tetrasyklin pr L medium.

2.1.11 Burk-agar med n-butanol

Burks medium (2.1.1) uten glukose, med 15 g agar pr L medium, tilsatt til saltløsning før autoklaving. Ved ca 55 °C ble det tilsatt 2 ml/L steriltfiltrert n-butanol.

2.1.12 50 x TAE-buffer

Forbindelse	Konsentrasjon
Tris base	242 g/L
Eddiksyre (100 %)	57,1 ml/L
EDTA (0,5 M, pH 8)	100 ml/L

Fortynnes til 1 x TAE-buffer.

2.1.13 Loading Dye

Forbindelse	Konsentrasjon (% volum)
Glyserol	70
Bromfenolblått	0,25
Ficoll 400	10

2.1.14 Ampicillin-bruksløsning

Antibiotikumet ampicillin virker ved å binde til penicillin-bindene proteiner inni bakterieveggen og hemmer dannelse av cellevegg. Ampicillinbinding fører til at autolytiske enzymer aktiveres, som lyserer cellen (Wishart *et al.* 2008).

Ampicillin ble løst i sterilt ione-fritt vann til konsentrasjon 200 mg/ml. Løsningen ble sterilfiltrert og lagret ved -20 °C. I medier ble det benyttet 1 µl bruksløsning pr ml medium, tilsatt ved <60 °C.

2.1.15 Tetrasyklin-bruksløsning

Tetrasyklin er et antibiotikum som hemmer translasjon. Det virker ved å binde til 30S subenheten på ribosomene, slik at tRNA ikke kan feste seg til ribosomets A-sete (Wishart *et al.* 2008).

Tetrasyklin ble løst i 70 % etanol til konsentrasjon 15 mg/ml. Løsningen ble sterilfiltrert og lagret ved -20 °C. I medier ble det benyttet 0,67 µl bruksløsning pr ml medium, tilsatt ved <60 °C.

2.1.16 Fast Blue-løsning

0,5 % Fast Blue B salt ble løst i 5 % eddiksyre. Løsningen ble laget like før bruk.

2.2 Bakteriestammer og plasmid benyttet i oppgaven

Bakteriestammene som ble benyttet i oppgaven er vist i tabell 2.1, mens benyttede plasmid er vist i tabell 2.2. Plasmidkart er vist i vedlegg C.

Tabell 2.1, Bakteriestammer benyttet i oppgaven.

Stamme	Kommentar	Kilde
<i>A. vinelandii</i> ATCC 12518	Villtype	American Type Culture Collection
<i>A. vinelandii</i> DJ	Sekvensert. Sekvenssammenstillinger og primere benyttet i oppgaven er basert på denne stammens genom	American Type Culture Collection
<i>A. vinelandii</i>Δ<i>arsF</i>	Variant av ATCC 12518, <i>arsF</i> slått ut. Tc ^r	Dette studiet
<i>A. vinelandii</i>Δ<i>arsG</i>	Variant av ATCC 12518, <i>arsG</i> slått ut. Tc ^r	Dette studiet
<i>A. vinelandii</i>Δ<i>arsH</i>	Variant av ATCC 12518, <i>arsH</i> slått ut. Tc ^r	Dette studiet
<i>E. coli</i> DH5α	Benyttet ved transformasjon. Optimalisert for transformering ved mutasjon i <i>recA</i> og <i>endA1</i> . Mulighet for blå/hvit-seleksjon	(Hanahan 1983)
<i>E. coli</i> S17.1 λ<i>pir</i>	Benyttet ved transformasjon. Inneholder <i>pir</i> -gen (λ <i>pir</i>) og gener nødvendig for konjugering av plasmid	(Simon <i>et al.</i> 1983)

Tabell 2.2, Plasmider benyttet i oppgaven.

Plasmid	Kommentar	Kilde
pHE179	ColeE1 kloningsvektor. Amp ^r , Tet ^r	Ertesvåg, ikke publisert
pUC128	Kloningsvektor med <i>lacZ</i> for blå/hvit seleksjon. Amp ^r	(Keen <i>et al.</i> 1988)
pHE319	Kloningsvektor. Avhengig av π -protein for RK6-replikasjon. Inneholder OriT for konjugering. Tn5-basert minitransposon med Pm-promotor. Amp ^r , Apr ^r	Ertesvåg, ikke publisert
pMD101	Derivat av pHE179 med SpeI+XhoI-kuttet <i>arsFA</i> innsatt. Amp ^r , Tet ^r	Dette studiet
pMD102	Derivat av pHE179 med PstI+BglII-kuttet <i>arsGA</i> innsatt. Amp ^r , Tet ^r	Dette studiet
pMD103	Derivat av pHE179 med SbfI+BglII-kuttet <i>arsHA</i> innsatt. Amp ^r , Tet ^r	Dette studiet
pMD104	Derivat av pHE179 med AgeI+Acc65I-kuttet <i>arsFB</i> innsatt. Amp ^r , Tet ^r	Dette studiet
pMD106	Derivat av pHE179 med NcoI+Acc65I-kuttet <i>arsHB</i> innsatt. Amp ^r , Tet ^r	Dette studiet
pMD107	Derivat av pMD101 med AgeI+Acc65I-kuttet pMD104 (inneholder <i>arsFB</i>) innsatt. Amp ^r , Tet ^r	Dette studiet
pMD108	Derivat av pMD102 med SpeI+EcoRV-kuttet pMD101 (inneholder <i>arsFA</i>) innsatt	Dette studiet
pMD109	Derivat av pMD103 med NcoI+Acc65I-kuttet pMD106 (inneholder <i>arsHB</i>) innsatt. Amp ^r , Tet ^r	Dette studiet
pMD113	Derivat av pHE319 med NdeI+NotI-kuttet pMD116 (inneholder <i>arsF</i>) innsatt. Amp ^r , Apr ^r	Dette studiet
pMD114	Derivat av pHE319 med NdeI+NotI-kuttet pMD117 (inneholder <i>arsG</i>) innsatt. Amp ^r , Apr ^r	Dette studiet
pMD115	Derivat av pHE319 med NdeI+NotI-kuttet pMD118 (inneholder <i>arsH</i>) innsatt. Amp ^r , Apr ^r	Dette studiet
pMD116	Derivat av pUC128 med PCR-amplifisert <i>arsF</i> innsatt i <i>lacZ</i> . Amp ^r	Dette studiet
pMD117	Derivat av pUC128 med PCR-amplifisert <i>arsG</i> innsatt i <i>lacZ</i> . Amp ^r	Dette studiet
pMD118	Derivat av pUC128 med PCR-amplifisert <i>arsH</i> innsatt i <i>lacZ</i> . Amp ^r	Dette studiet

2.3 Oppdyrking og nedfrysing av bakteriestammer

Nye bakteriestammer ble lagret ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ etter hvert som de ble dannet. For å beskytte cellene mot frostskafer fra iskrystaller ble det tilsatt $300\text{ }\mu\text{l}$ 60 % glyserol pr ml kultur, før blandingen ble nedfrost i cryorør.

Ved oppdyrking ble nedfrosne bakterier overført til flytende kultur og inkubert ved egnede forhold (*A. vinelandii*: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i ca 2 døgn, *E. coli*: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, over natt).

2.4 Isolering av DNA fra kultur

Det er utviklet mange ulike prosedyrer for isolering av DNA fra bakterier, metodevalg avhenger av hva DNAet skal brukes til senere. Ved isolering av DNA må cellene først lyses, til dette kan blant annet enzymer, detergenter og kaotropiske stoffer benyttes. Videre ekstraheres proteiner, før DNA felles ut. Komponentene og forhold som ofte inkluderes i DNA-isolering er beskrevet i det følgende.

Proteinase K er en serin protease som bryter ned proteiner og ødelegger bakteriens cellevegg (Ebeling *et al.* 1974). Da proteinase K inaktiverer nukleaser, er den også med på å bevare DNA. Detergenten natrium-dodecyl-sulfat (**SDS**) bryter opp lipidene i celle- og kjernemembranen, slik at DNA frigjøres. Ved lysing av celler benyttes ofte chelatdanneren etylen diamin tetra-eddiksyre (**EDTA**), som binder divalente kationer som Mg^{2+} , Ca^{2+} og Mn^{2+} . Disse ionene er med på å stabilisere cellemembranen, og er i tillegg kofaktorer for en del enzymer, blant annet DNase. Tris(hydroksymetyl)-aminometan (**Tris**) benyttes hovedsakelig som en buffer som holder pH stabil ved ca 8. I tillegg har Tris trolig en destabiliserende effekt på cellemembranen (Irvin *et al.* 1981). Enzymer som kan være skadelig for fritt DNA ødelegges ved å varme celleløsningen opp til $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, hvor de fleste proteiner denaturerer. DNA holdes intakt ved denne temperaturen, kromosomer hos *A. vinelandii* denaturerer først ved $84\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sadoff *et al.* 1979). Ved utfelling av DNA fra en løsning, kan alkoholer som **isopropanol** og **etanol** benyttes. DNA er uløselig i alkohol og vil derfor felles ut, mens salter løses opp i alkoholen. Dersom DNA isoleres ved bruk av kolonne med en silikabasert membran, er tilstedeværelse av **kaotropiske salter** nødvendig for at DNA skal binde (Chen &

Thomas 1980). Eksempler på slike salter er guanidin tiocyanat og guanidin hydroklorid. pH er også viktig ved DNA-binding til kolonnen, og bør være under 7.5. Eluering av DNA er derimot mest effektiv ved høyere pH og ved lav saltkonsentrasjon.

2.4.1 Isolering av kromosomalt DNA

I denne oppgaven ble kromosomalt DNA isolert ved bruk av *MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre Technologies).

En cellepellet ble dannet ved sentrifugering av 1,5 ml kultur, og supernatanten ble fjernet. Cellene ble lysert ved tilsats av 300 µl Tissue and Cell Lysis Solution (inneholder SDS) og 1 µl Proteinase K (i buffer som inneholder EDTA og Tris-HCl), før inkubering ved 65 °C i 15 minutter. Prøven ble tilsatt 1 µl RNase A ved 37 °C, inkubert i 30 minutter ved 37 °C og satt på is i 3 minutter. 150 µl MPC Protein Precipitation reagent ble satt til prøven, og utfelling med protein og andre cellerester ble fjernet ved sentrifugering. Supernatanten, som inneholder DNA, ble overført til et nytt eppendorfrør. 500 µl isopropanol ble tilsatt, som feller ut DNA. DNA-pellet ble dannet ved sentrifugering, og isopropanol ble fjernet. Prøven ble vasket med 70 % etanol, og lufttørket i 30 minutter. DNA ble resuspendert i 50 µl EB-buffer og oppbevart ved -20 °C.

2.4.2 Isolering av plasmid

Ved plasmid-isolering må plasmid-DNA skilles fra kromosomalt DNA. Dette kan gjøres ved å benytte seg av en alkalisk lyseringsprosedyre, som beskrevet av Birnboim og Doly (1979). Prosedyren utnytter prinsippet om at kromosomalt DNA og plasmid-DNA har ulik evne til å denaturere og renaturere. Ved alkalisk pH (>11) denatureres både kromosomalt DNA og plasmid-DNA. Når løsningen nøytraliseres vil sirkulært plasmid-DNA renaturere, mens kromosomalt DNA hybridiserer mer tilfeldig, og danner uløselige aggregat.

Plasmid-DNA ble isolert ved bruk av kolonne-kitet *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System* fra Promega (Promega Corporation 2007). Ved tilstedeværelse av kaotropiske salter vil DNA vil binde seg til en silikabasert membran i kolonnen, og kan

elueres av løsninger med lavt saltinnhold.

Isolering av høykopitalplasmid

En bakteriekultur på 3 ml ble sentrifugert (13 000 rpm i 5 minutter) og supernatanten ble fjernet. Cellepelletten ble resuspendert med 250 µl Cell Resuspension Solution (inneholder blant annet EDTA og RNase A). Cellene ble lysert ved tilsatt av 250 µl Cell Lysis Solution, og inkubert i 5 minutter. Lyseringsløsningen inneholder SDS og NaOH. NaOH fører til basisk pH slik at DNA og proteiner denaturere. Det ble tilsatt 10 µl Alkaline Protease Solution til de lyserte cellene, som fører til inaktivering av endronukleaser og andre proteiner som har blitt frigjort ved lysing av cellene (Promega Corporation 2007). Blandingen ble inkubert i 5 minutter, før 350 µl Neutralization Solution ble tilsatt. Neutralization Solution inneholder sur kaliumacetat som gjør at pH i blandingen nøytraliseres hurtig og DNA kan renaturere. Plasmidene vil rehybridisere, mens de kromosomale DNA-trådene vil, som følge av deres store størrelse, hybridisere delvis og danne "floker" (Birnboim & Doly 1979). Kaliumacetat feller SDS med lipider og proteiner, som sammen med kromosomalt DNA ble fjernet ved sentrifugering (13 000 rpm i 10 minutter).

Supernatanten med plasmid ble overført til en kolonne (Wizard SV minicolumn) og sentrifugert (13 000 rpm i 1 minutt), slik at DNA binder til membranen i kolonnen. Kolonnen ble vasket i to omganger (13 000 rpm i 1 minutt), med henholdsvis 750 µl og 250 µl Column Wash Solution med etanol, slik at kaotropiske salter og SDS-rester ble fjernet. Kolonnen ble tørket ved sentrifugering (13 000 rpm i 2 minutter). Plasmid-DNA ble eluert ved å tilsette 100 µl ionefritt vann til kolonnen (13 000 rpm i 1 minutt), og oppbevart ved - 20 °C.

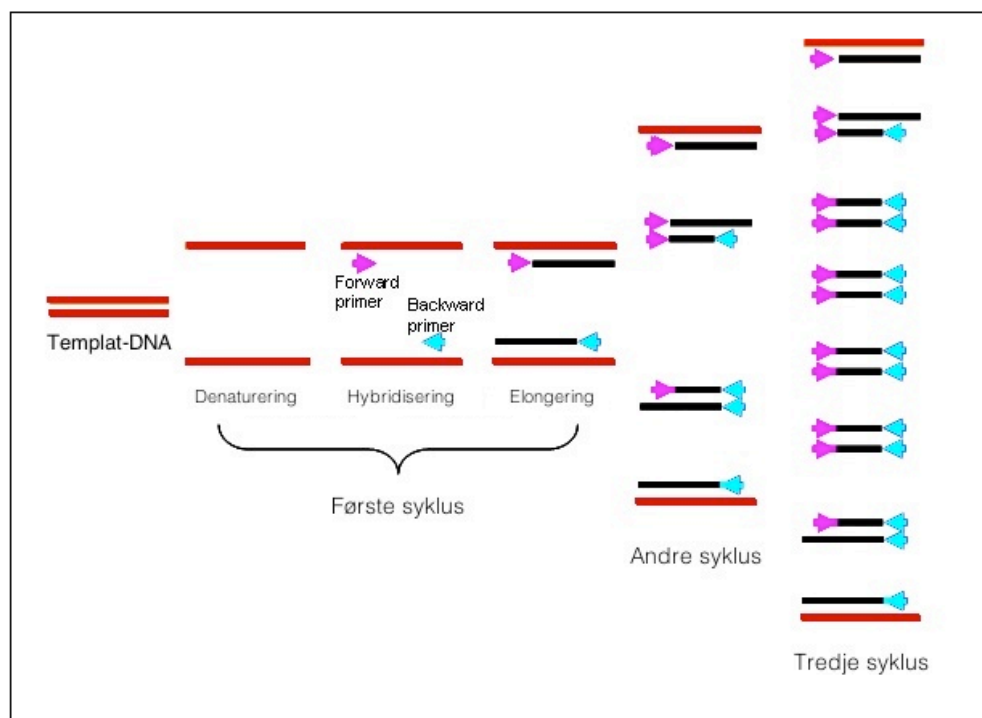
Isolering av lavkopitalplasmid

Ved isolering av lavkopitalplasmid ble det benyttet 10 ml kultur. Tilsvarende prosedyre som er beskrevet for isolering av høykopitalplasmid ble benyttet, med følgende unntak:

- Cellepellet ble resuspendert i 500 µl Cell Resuspension Solution, og fordelt på to eppendorfrør.
- Etter nøytralisering og sentrifugering i 10 minutter ble supernatanten med plasmid fra det ene eppendorfrøret overført til minikolonnen og sentrifugert (13 000 rpm i 1 minutt). Deretter ble supernatanten fra det andre eppendorfrøret satt til samme kolonne og sentrifugert, før vasking som beskrevet i forrige avsnitt.

2.5 PCR

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en *in vitro* metode for enzymatisk amplifikasjon av spesifikke DNA-fragmenter. Metoden ligner cellens naturlige replikasjon, prosessen er vist i figur 2.1.



Figur 2.1, Prinsipp for PCR, 3 sykluser. Dobbeltrådet Templat-DNA (rød) denaturerer ved å tilføre varme. Systemet avkjøles, slik at primere (rosa og blå) kan binde ssDNA. Nye DNA-tråder syntetiseres (svart) ved optimumstemperaturen til DNA polymerasen som benyttes. Syklusen gjentas til ønsket mengde DNA er syntetisert. Modifisert fra (www.obgynacademy.com).

Syntetiske oligonukleotid-primere hybridiserer med denaturert templat-DNA, og flankerer DNA-sekvensen som skal amplifiseres. Primerne fungerer som initierings seter for en varmestabil polymerase, som tilfører deoksynukleotider til 3'endene på primerne. Temperaturen heves og nye DNA-tråder, som er komplementær til templat-DNA,

syntetiseres. Prosessen gjentas, gjerne 20-30 ganger. De nye DNA-trådene som dannes fungerer som templat i neste syklus, derfor vil antall fragmenter som amplifiseres vokse eksponentielt.

2.5.1 Benyttede PCR-kit

PCR-amplifikasjon ble utført ved bruk av kitene *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) og *Phusion® High-Fidelity PCR Kit* (New England BioLabs (NEB)).

Reaksjonsmiksene er vist i tabell 2.3 og 2.4. Benyttede primere ble dannet fra *A. vinelandii* stamme DJ, og er vist i vedlegg B.

Tabell 2.3, 50 µl PCR reaksjonsmiks, *Expand High Fidelity PCR System* (Roche).

Komponent	Mengde (µl)
Nukleasefritt vann	39,5
Kromosomalt DNA	1
Forward primer	1
Revers Primer	1
dNTP (10mM)	2
Buffer 2	5
Enzymblanding	1

Enzymblandingen som ble benyttet inneholder varmestabil Taq DNA polymerase og Tgo DNA polymerase som er korrekturlesende. Buffer 2 inneholder Mg²⁺ som er kofaktor for Taq DNA polymerase.

Tabell 2.4, 50 µl PCR reaksjonsmiks, *Phusion® High-Fidelity PCR Kit* (NEB).

Komponent	Mengde (µl)
Nukleasefritt vann	31
Kromosomalt DNA	1
Forward primer	2,5
Revers primer	2,5
dNTP (10mM)	1
GC buffer	10
DMSO	1,5
Phusion DNA polymerase	0,5

GC-bufferen optimaliserer forholdene for Phusion DNA polymerase. DMSO øker hybridiseringsraten.

2.5.2 Benyttede PCR-program

Ønskede DNA-fragmenter ble amplifisert ved å benytte følgende PCR-programmer:

PCR-program for *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) reaksjonsmik

Initiell denaturering:	95 °C i 3 min.
35 sykluser:	
-Denaturering:	95 °C i 30 sek.
-Hybridisering:	55 °C i 30 sek.
-Elongering:	68 °C i 1 min/kb.
Avsluttende elongering:	68 °C i 10 min.

PCR-program for *Phusion[®] High-Fidelity PCR Kit* (NEB) reaksjonsmik

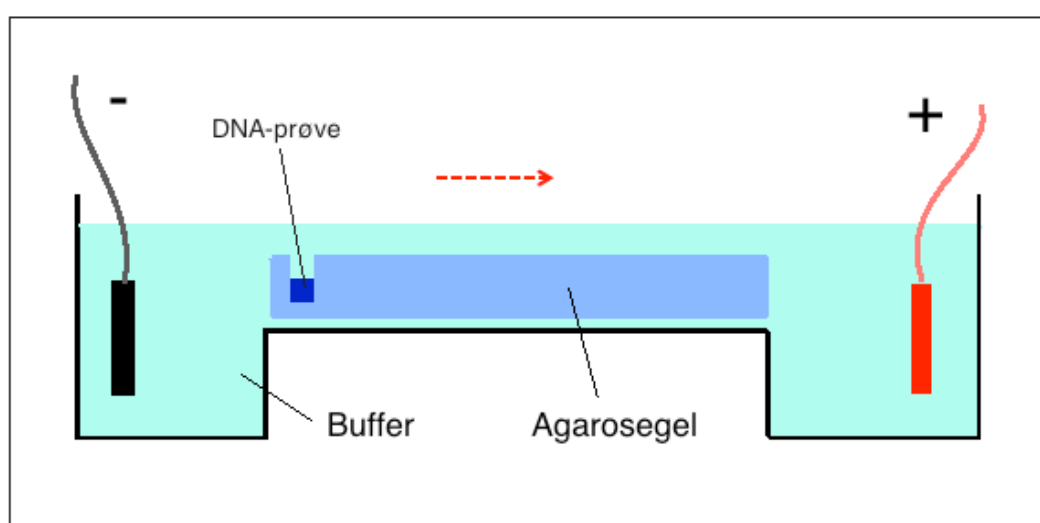
Initiell denaturering:	98 °C i 2 min.
35 sykluser:	
-Denaturering:	98 °C i 10 sek.
-Hybridisering:	55 °C i 30 sek.
-Elongering:	72 °C i 30 sek/kb.
Avsluttende elongering:	72 °C i 8 min.

2.5.3 Klargjøring av templat-DNA brukt i PCR-reaksjoner

Kromosomalt DNA fra *A. vinelandii*, som ble benyttet som templat-DNA i PCR-reaksjonene i denne oppgaven, ble frigitt ved to ulike metoder; ved isolering av kromosomalt DNA (som beskrevet i 2.4.1), og ved en kokeprosedyre hvor DNA ble frigitt uten fjerning av andre cellekomponenter. Ved sistnevnte metode ble cellepellet dannet ved sentrifugering av 1 ml kultur, og supernatanten ble fjernet. Cellene ble resuspendert i 100 µl sterilt ionefritt vann og inkubert ved 100 °C i 15 minutter. Løsningen ble avkjølt før bruk, og oppbevart ved -20 °C.

2.6 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese er en metode som benyttes for å separere DNA-fragmenter etter størrelse. Agarose er et nøytralt, lineært polysakkarid som kan utvinnes fra alger. Ved å smelte agarosepulver i en buffer, vil det dannes en løsning som geler ved avkjøling, og som danner et nettverk med porer av ulik størrelse. DNA-prøver settes i brønner på gelen, som utsettes for elektrisk spenning. De negativt ladde DNA-fragmentene vil da vandre mot katoden gjennom porene i gelen, slik at fragmentene separeres. Store fragmenter vil møte mer motstand i gelen enn små, derfor vil de korteste fragmentene vandre hurtigst gjennom gelen (Reece 2004). Prosessen er vist i figur 2.2.



Figur 2.2, Oppsett for gelelektroforese. Agarosegel med DNA settes i et elektrisk felt. DNA vandrer gjennom gelen mot katoden (i pilens retning). Fragmentene separeres etter størrelse. Små fragmenter møter mindre motstand i gelen, og vandrer dermed hurtigere enn store fragmenter.

I denne oppgaven ble det benyttet 0,8 % agarose med GelGreen™ (Biotium) i 1xTAE-buffer (2.1.12). Før DNA-prøvene ble satt i brønner i gelen, ble de blandet med Loading dye (10 % av prøvevolum, 2.1.13). Loading dye gir prøvene høyere tetthet enn bufferen, slik at DNAet synker ned i brønnene, og bromfenolblått gjør at migrasjonshastigheten kan observeres. Prøvene ble kjørt i et elektrisk felt på 80-125 V og visualisert ved UV-lys, da GelGreen™ bundet til DNA fluoresiserer ved utsettelse for UV-lys (Biotium 2012).

For å bestemme DNA-fragmentenes størrelse ble det kjørt en DNA-standard, bestående av DNA-fragmenter av kjent størrelse, parallelt med DNA-prøvene. Ved å sammenligne DNA-prøvene med standarden ble størrelsen på DNA-fragmentene bestemt. Benyttede DNA-standarder er vist i vedlegg A.

2.7 Rensing av DNA

DNA som skal benyttes videre etter gelelektroforese eller PCR-reaksjon må renses fra gel eller reaksjonsmiks. DNA ble renses fra agarosegel og PCR-reaksjon ved bruk av kolonne-kit fra QIAGEN, henholdsvis *QIAquick Gel Extraction Kit* og *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN 2008).

Prinsippet for prosedyrene er at DNA binder til en silikamembran i QIAquick-kolonnen ved tilstedeværelse av kaotropiske salter og pH under 7,5, mens kontaminanter fra gelelektroforese og PCR-reaksjon går gjennom membranen under disse forholdene (QIAGEN 2008). Ved lav saltkonsentrasjon og pH > 7 vil DNA elueres fra kolonnen. Samtlige sentrifugetrinn i prosedyrene beskrevet under ble utført ved 13 000 rpm i 1 minutt.

2.7.1 DNA-rensing fra gel

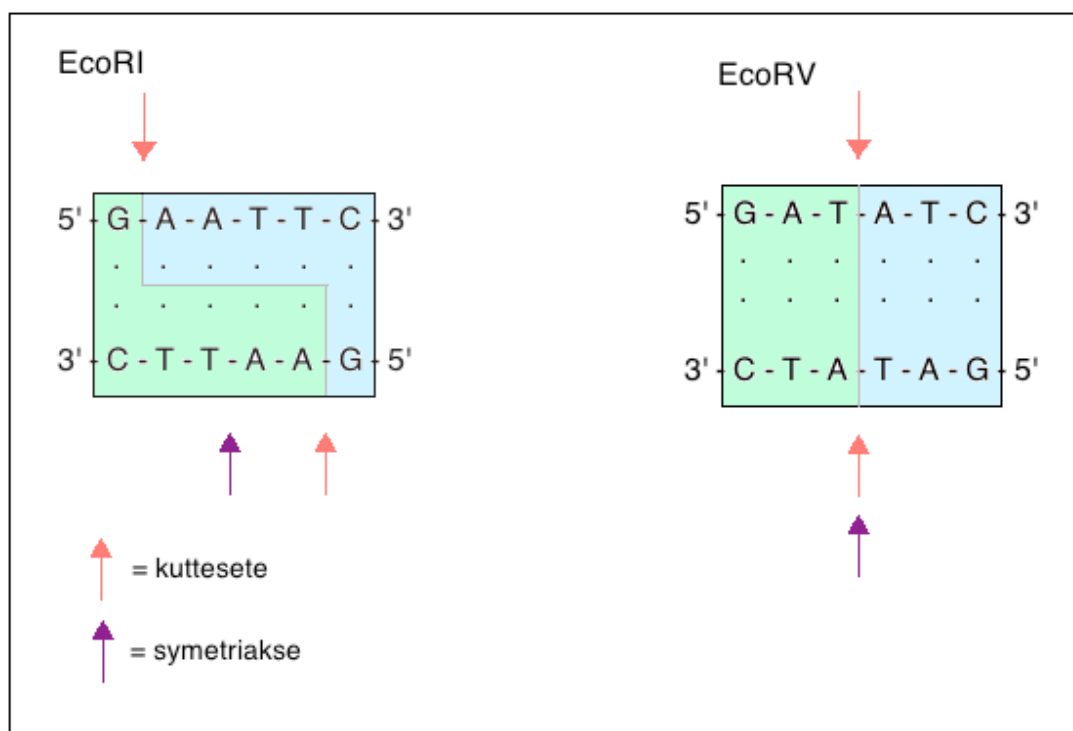
Ønskede fragmenter ble skjært ut fra gel etter gelelektroforese. Agarosegelen ble løst opp ved å tilsette 500 µl Buffer QG (inneholder blant annet guanidin tiocyanat), og blandingen ble inkubert i 10 minutter ved 50 °C. Prøven ble overført til en kolonne (QIAquick spin column) og sentrifugert, slik at DNA binder til membranen i kolonnen. For å fjerne alle agaroserester, ble det igjen tilsatt 500 µl Buffer QG til kolonnen, prøven ble sentrifugert. Kolonnen ble vasket med 750 µl buffer PE (inneholder etanol), og tørket ved sentrifugering. Renset DNA ble eluert ved å tilsette 50 µl Buffer EB (inneholder Tris) til kolonnen før sentrifugering. Dersom det rensede DNAet senere skulle limeres, ble elueringstrinnet utført ved å tilsette 30 µl tynn ligasebuffer til kolonnen. Renset DNA ble oppbevart ved -20 °C.

2.7.2 DNA-rensing fra PCR-reaksjon

Det ble tilsatt 5 µl Buffer PB (inneholder blant annet guanidin hydroklorid og isopropanol) pr µl PCR-reaksjonsmiks til PCR-reaksjoner med ønskede fragmenter. Videre ble tilsvarende prosedyre som beskrevet i 2.7.1 (fra prøven overføres til kolonne) benyttet.

2.8 Restriksjonskutting

Restriksjonsenzymmer er bakterieproduserte enzymer som kutter DNA. Enzymene er en naturlig del av bakteries forsvar mot fremmed DNA, som gjenkjennes og degraderes av enzymene. Restriksjonsenzymmer av klasse II er enzymer som gjenkjenner og kutter DNA ved spesifikke palindrom-sekvenser, enzymene av denne klassen er derfor mye brukt ved genetisk manipulering. Disse enzymene krever magnesiumioner for å binde og kutte DNA (Reece 2004). Ulike restriksjonsenzymmer gjenkjenner ulike DNA-sekvenser, ved kutting vil dette resultere i enten butte ender (dersom begge DNA-trådene klippes på samme sted) eller overheng (dersom DNA-trådene klippes på ulike steder). Eksempler på dette er vist i figur 2.3.



Figur 2.3, Gjenkjenningsssekvens og kuttsete til restriksjonsenzymene EcoRI og EcoRV. Bruk av EcoRI gir overhengende ender, mens EcoRV gir butte ender.

Passende enzym ble bestemt ved bruk av programvaren Clone Manager.

Reaksjonsmiksen som ble benyttet ved restriksjonskutting er vist i tabell 2.5.

Tabell 2.5, 20 µl restriksjonsmiks for restriksjonskutting. Enzymene og bufferen som ble benyttet er fra New England Biolabs. Buffertype (1-4) og tilsats av BSA avhenger av enzym.

Komponent	Mengde (µl)
DNA	3-17
10x NEB Buffer 1-4	2
Evt NEB BSA	0,5
Sterilt ionefritt vann	Til 19,5
NEB restriksjonsenzym	0,5-1,5

Volumet DNA-løsning som ble benyttet avhenger av DNA-konsentrasjon. Buffertype som ble benyttet avhenger av enzym, og sørger for optimale forhold for enzymet. Bufferen inneholder blant annet magnesiumioner. Noen av enzymene krever Bovin Serum Albumin (BSA) for å fungere optimalt. BSA hindrer enzymet i å feste seg til eppendorfrør og pipettespisser, og har en stabiliserende effekt på enkelte proteiner ved inkubering (New England Biolabs 2013).

Restriksjonsmiksen ble inkubert i 1 time til over natt ved enzymets optimale temperatur. Kuttete fragmenter ble separert ved agarose gelelektroforese.

2.9 Ligering

Lineære DNA-molekyler kan bindes sammen (ligeres) ved hjelp av enzymet DNA ligase. Ligasen katalyserer dannelse av en fosfodiester-binding mellom to DNA-molekyler, hvor det kreves at det ene fragmentet har en fri 3'OH-ende og at det andre har en 5' fosfat-ende. Reaksjonen benytter energi fra NAD^+ eller ATP, energimolekylet avhenger av ligase-type (Reece 2004). Ligering av to DNA-molekyler er mest effektiv dersom fragmentene har kompatible ender med overheng, men fragmenter med butte ender kan også ligeres (Ferretti & Sgaramella 1981). Dersom fragmentene som skal ligeres er kuttet med restriksjonsenzymmer som gir like overheng, kan de komplementære basene i overhengen danne hydrogenbindinger. Videre katalyserer ligasen dannelse av stabile, kovalente bindinger mellom fragmentene.

Reaksjonsmiksen som ble benyttet ved ligering av DNA-fragmenter er vist i tabell 2.6.

Tabell 2.6, 20 µl reaksjonsmiks for ligering.

Komponent	Mengde (µl)
DNA (plasmid + insert)	17
10 X T4 DNA Ligasebuffer (NEB)	2
T4 DNA Ligase (NEB)	1

DNA som ble benyttet ble på forhånd kuttet med passende restriksjonsenzymmer og rensset. Det ble brukt omtrent tre ganger mer (molar) insert enn vektor. Bufferen som ble benyttet optimaliserer forholdene for ligasen, og inneholder blant annet ATP.

2.10 Transformasjon

Transformasjon er en prosess hvor nakent, ekstracellulært DNA tas opp av en celle, og som fører til endring i cellens genotype. For at fremmed DNA skal bli værende i cellen etter transformering, må det enten integreres i vertsbakteriens kromosom ved rekombinasjon, eller kunne replikere på egenhånd. Noen bakterier er naturlig kompetente, disse kan som regel ta opp fremmed DNA i sen logaritmisk fase (Dale & Park 2010). Andre bakterier, som for eksempel *E. coli*, må behandles kunstig for å bli kompetente. I 1970 viste Mandel og Higa at kalsiumklorid-behandling av *E. coli* gjør cellene kompetente, dette kalles kjemisk transformasjon. Andre metoder som kan benyttes for transformasjon av celler er ved elektroporasjon og ved bruk av en genkanon (Reece 2004).

2.10.1 Kjemisk transformering av *E. coli*

Ved å overføre en selv-replikerende vektor med ønsket insert til kompetente *E. coli*-celler, vil målfragmentet amplifiseres av vertscellen. Siden *E. coli* ikke er naturlig kompetent, må kompetansen induseres.

Ved kjemisk transformasjon induseres kompetanse ved å behandle celler med kationer som Ca^{2+} , Rb^{+} og Mn^{2+} (Mandel & Higa 1970; Hanahan 1983). Mekanismen er uklar, men det antas at kationene øker permeabiliteten i bakterieveggen, samt danner forhold for at DNA kan binde seg til celleoverflaten.

Ved transformering inkuberes en blanding bestående av kompetente celler og DNA på is, slik at celleveggen stabiliseres, før blandingen utsettes for et varmesjokk.

Varmesjokket antas å stimulere opptak av DNA (Reece 2004).

Dannelse av Rubidiumklorid (RbCl)-kompetente *E. coli*-celler

1 ml av en overnatts *E. coli* DH5 α /S17-1 λ pir kultur ble inokulert i 100 ml Psi-medium (2.1.2) og inkubert med risting til logaritmisk fase, OD₆₀₀ = 0,4. Cellene ble inkubert på is i 15 minutter og høstet ved sentrifugering (4500 rpm i 7 minutter). Supernatanten ble fjernet, og cellepelletten ble resuspendert i 40 ml kald TBF1 (2.1.3, TBF1/2 inneholder kompetansestimulerende kationer). Cellene ble inkubert på is i 5 minutter og høstet ved sentrifugering (4500 rpm i 7 minutter). Supernatanten ble fjernet, før cellepelletten ble resuspendert i 3 ml kald TFB2 (2.1.4). Cellene ble fordelt på 100 μ l-alikvoter og hurtigfryst i flytende nitrogen. De kompetente cellene ble lagret ved -80 °C.

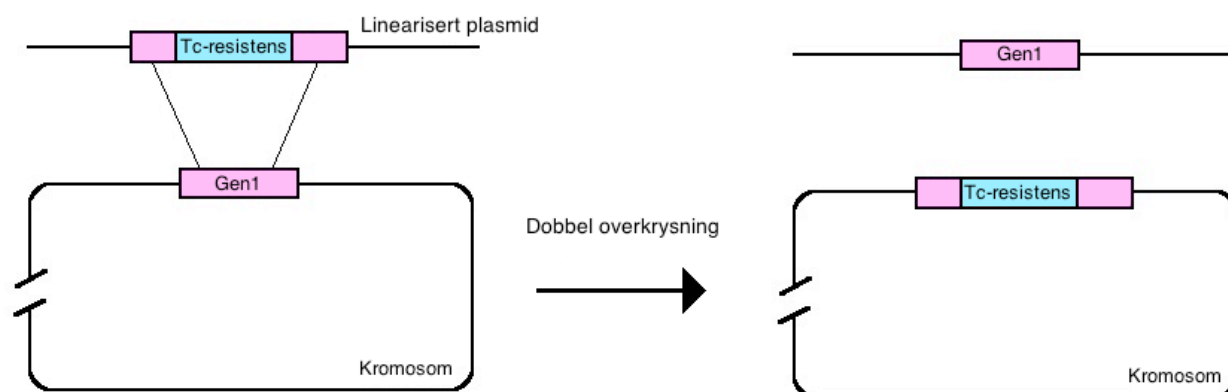
Heatshock-transformering av RbCl-kompetente celler

Dypfryste, RbCl-kompetente celler ble tint på is, og plasmid (1 μ l) eller ligeringsblanding (10 μ l) ble satt til cellene (100 μ l). DNA-celle-blanding ble inkubert på is i 45 minutter, før den ble utsatt for varmesjokk ved 37 °C i 5 minutter. Cellene ble inkubert på is i 2 minutter, slik at celleveggen stabiliseres. 1 ml SOC-medium (2.1.5), forhåndsvarmet til 37 °C, ble tilsatt. Blanding ble inkubert med risting i 1-2 timer ved 37 °C. Cellene, som er svekket etter den kjemiske behandlingen, vil da restitueres og dele seg. Videre ble cellene platet ut på LA (2.1.7) med antibiotika som selekterer for det transformerte plasmidet. Som negativ kontroll ble det benyttet kompetente celler uten DNA tilsatt, mens kompetente celler med 1 μ l kjent plasmid ble brukt som positiv kontroll.

2.10.2 Transformering og rekombinasjon hos *Azotobacter*

A. vinelandii er naturlig kompetent i sen logaritmisk fase, etter ca 48 timers vekst. Page og Tigerstrom viste i 1979 at optimale forhold for transformasjon av *A. vinelandii* foregår på Burk-agar med lavt jerninnhold og tilstedeværelse av magnesium, og at transformasjon er optimal ved pH mellom 6.0 og 8.0 og ved 30 °C. Det ble også vist at transformasjon av *A. vinelandii* i noen tilfeller er mer effektivt dersom cellene får vokse på et ikke-selektivt medium før de overføres til et medium som selekterer for fremmed DNA (Page & von Tigerstrom 1979).

Naturlig kompetente celler transformeres mer effektivt med lineært DNA enn med sirkulære plasmider (Dale & Park 2010). For at transformert DNA skal kunne replikere, må det integreres i vertscellens kromosom ved rekombinasjon. Dette krever homologe sekvenser mellom transformert DNA og vertskromosom. De homologe sekvensene legger seg parallelt med hverandre og overkrysser. Siden bakteriekromosomet er sirkulært må overkrysning mellom lineært DNA og kromosom skje på to steder for at deler av det lineære DNAet kan integreres i kromosomet. Dette kalles dobbel overkrysning, et eksempel er vist i figur 2.4.



Figur 2.4, Rekombinasjon ved dobbel overkrysning. Gen for antibiotika-resistens (blått) fra linearisert plasmid integreres i kromosom ved overkrysning ved to homologe sekvenser (rosa). Kromosomalt Gen1 blir slått ut.

For å studere genfunksjon, kan et ødelagt gen integreres i villtype-kromosomet ved homolog rekombinasjon (figur 2.4). Dette kalles gen-knockout. Ved å sette inn et gen som koder for antibiotika-resistens i målgenet, kan man selektere for knockout mutanter.

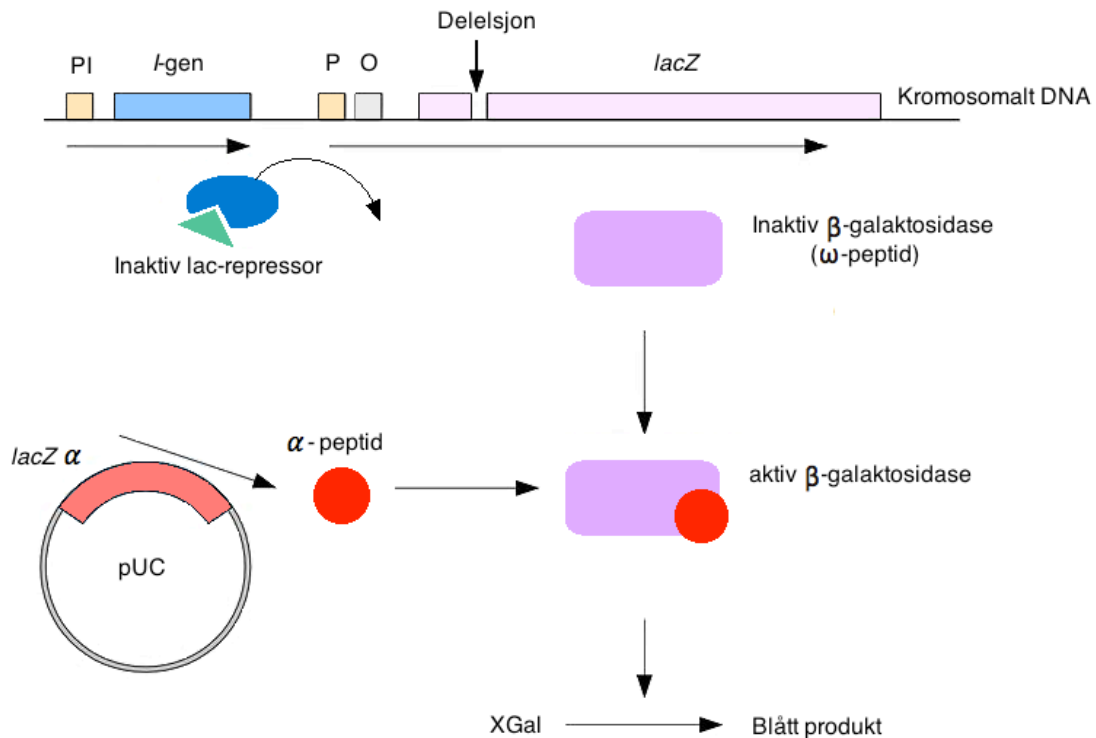
Dersom effekten av utslåtte gener skal studeres må samtlige kromosomkopier, opp mot 80 i *A. vinelandii* (Nagpal *et al.* 1989), være rekombinert. Transformerte bakterier må derfor vokse i flere generasjoner i et medium som selekterer for insertet.

I oppgaven ble en *A. vinelandii* ATTC 12518 kultur inokulert i CM-medium (2.1.8) og inkubert med risting i 48 timer. De kompetente cellene ble vasket og resuspendert i kald $MgSO_4$ (16mM, 1 % av originalvolum). Det ble tilsatt 10-20 μg linearisert (restriksjonskuttet) plasmid til 100 μl celler, og DNA-celle-blandingen ble inkubert ved 30 °C i 1 time. De transformerte cellene ble overført til CM-agar (2.1.9) som en stor dråpe på ca 2*2 cm, og inkubert i 48 timer. Cellene ble videre samlet opp og resuspendert i CM-medium, fortyninger ble platet ut på Burk-agar med tetrasyklin (2.1.10), som selekterer for insertet. Det ble gjort 5 overføringer av cellene på Burk-agar med tetrasyklin, for å sørge for at samtlige kromosomkopier hos *A. vinelandii* er rekombinante.

2.10.3 Blå/Hvit-screening

Blå/hvit-screening er en metode som benyttes for å undersøke om et insert har blitt satt inn i vektor ved kloning. Prinsippet bak metoden er kalt α -komplementering, og baserer seg på at enzymet β -galaktosidase spalter substratet XGal (5-bromo-4-kloro-3-indolyl- β -D-galaktosid) til galaktose og et 5-bromo-4-kloro-indoxyl-derivat som gir et blått produkt.

β -galaktosidase er produkt av genet *lacZ*, i aktiv form er dette enzymet en homo-tetramer. Inaktiv β -galaktosidase (ω -peptid) uttrykkes blant annet av *E. coli*-stammen DH5 α , hvor *lacZ*-genet inneholder en delesjon. pUC-plasmider inneholder sekvensen som koder for de første aminosyrene i *lacZ* (α -peptid), α -peptidet kan komplementere ω -peptidet og danne en funksjonell β -galaktosidase. På denne måten vil *E. coli* DH5 α transformert med pUC-plasmid kunne spalte XGal, og danne blå kolonier (Reece 2004). Prinsippet for α -komplementering er vist i figur 2.5.



Figur 2.5, α -komplementering. *lacZ* i kromosomalt DNA inneholder en deleksjon. IPTG (vist i grønt) fremmer uttrykk av *lacZ* ved å binde til *lac*-repressor (vist i blått), slik at repressoren ikke kan binde til operator (O). Produkt av *lacZ* med deleksjon er ω -peptid (vist i lilla), som er inaktiv β -galaktosidase. Dette kan komplementeres med α -peptid fra pUC-plasmid, slik at aktiv β -galaktosidase dannes. β -galaktosidase spalter XGal og danner et blått produkt.

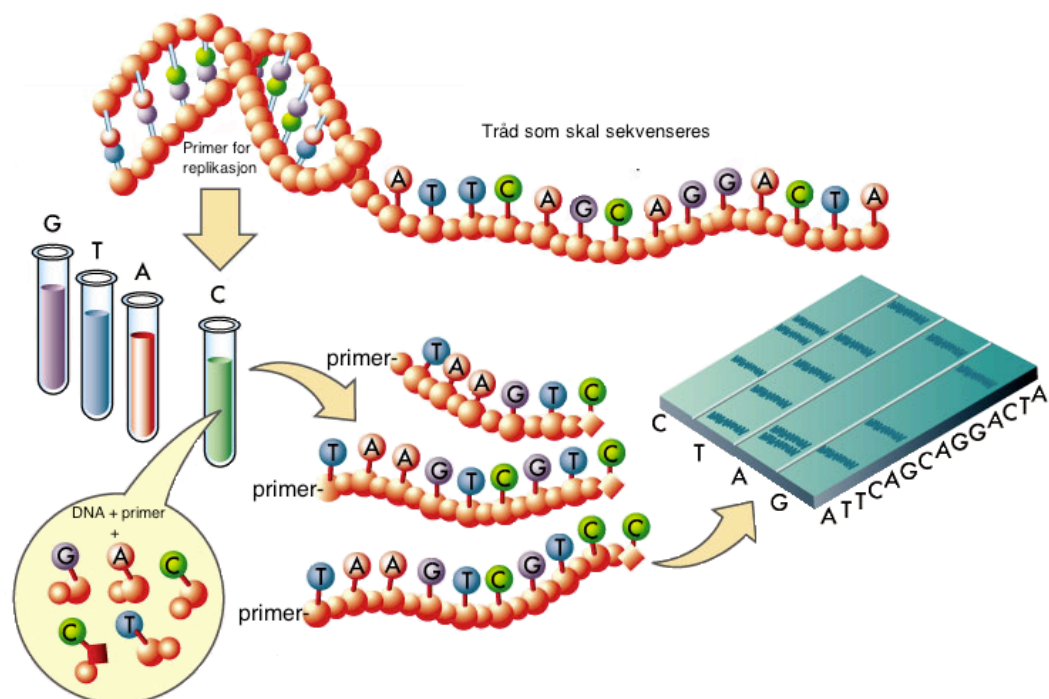
pUC128, som ble benyttet i denne oppgaven, inneholder en polylinker i *lacZ α* -genet (vedlegg C). Ved å sette inn ønsket fragment i dette setet, vil *lacZ α* ikke lenger danne et funksjonelt α -peptid. Dermed vil ikke bakterien være i stand til å danne funksjonell β -galaktosidase, og koloniene vil forbli hvite ved tilstedeværelse av XGal. pUC128 inneholder også gen for ampicillin-resistens, slik at det kan selekteres for transformerte celler med rekombinert plasmid (hvite kolonier) og ikke-rekombinert plasmid (blå kolonier).

I denne oppgaven ble LA-plater med ampicillin, XGal og IPTG (isopropyl β -D-thiogalaktopyranosid) benyttet ved blå/hvit-screening. IPTG induserer uttrykk av β -galaktosidase ved å binde til *lac*-repressor. 40 μ l XGal (20 mg/mL) og 7 μ l IPTG ble spredt på LA-plater med ampicillin. Platene ble inkubert ved 37 °C til XGal- og IPTG-løsning hadde tørket (3-4 timer). pUC128-transformerte *E. coli* DH5 α ble strøket på platene og inkubert ved 37 °C over natt.

2.11 Sekvensering

DNA-sekvensering er et samlebegrep for flere metoder, hvor nukleotidsekvensen av et DNA-molekyl blir bestemt. Siden den første DNA-sekvensen ble sekvensert i 1971 (Wu & Taylor 1971) har det blitt utviklet nye metoder og ny teknologi som gjør at DNA kan sekvenseres mer effektivt, i dag kan hele genom sekvenseres.

I denne oppgaven ble DNA-fragmenter sekvensert eksternt, ved å benytte *LightRun Sequencing service* fra GATC Biotech i Tyskland. Hos GATC Biotech ble DNA sekvensert ved den tradisjonelle Sanger-metoden. Sanger-sekvensering er en sekvenseringsmetode som baserer seg på replikasjon av DNA, hvor den ukjente sekvensen er templat for nytt DNA. Metoden inkluderer *in vitro* DNA-syntese hvor det benyttes deoksynukleotider og kjedeterminerende dideoksynukleotider (ddNTP) i forholdet 10:1. DNA-polymerase vil noen ganger sette inn en ddNTP i stedet for en dNTP, og siden dideoksynukleotidene mangler 3'OH-gruppe, vil DNA-syntesen stoppe. Mange slike reaksjoner vil føre til dannelse av fragmenter av alle mulige kjedelengder. Disse kan separeres etter størrelse, og baserekkefølgen kan bestemmes (Reece 2004). Prinsippet bak Sanger-sekvensering er vist i figur 2.6.



Figur 2.6, Sanger-sekvensering. Enkeltrådig DNA blandes med primer og fordeles på fire rør. Hvert rør inneholder DNA-polymerase, samtlige dNTPer og en av replikasjons-terminatorene (ddATP, ddTTP, ddCTP eller ddGTP). Polymerasen syntetiserer komplementær DNA-tråd, syntesen stopper dersom replikasjons-terminator inkorporeres. Fragmentene separeres ved gelelektroforese, hvor de fire reaksjonene kjøres i separate brønner. Baserekkefølgen til templat-DNA oversettes fra gelbildet. Modifisert fra (Winnick 2004).

Tidligere ble det kjørt fire parallelle reaksjoner ved sekvensering, hvor hver av reaksjonene inneholder en type ddNTP. Ved å separere fragmenter fra de fire reaksjonene i ulike gel-brønner, kan båndene som vises i gelen oversettes til baser. Metoden er i dag effektivisert. Ved å merke ddATP, ddGTP, ddCTP og dTTP med ulike fluoriserende stoffer, kan sekvenseringen kjøres i en reaksjon. Når fragmentene separeres detekteres fluoroforen, som oversettes til tilhørende base.

Prøver med 5 µl plasmid-DNA (80-100 ng/µl) og 5 µl sekvenseringsprimer (5 pmol/µl) ble tillaget før de ble sendt til GATC Biotech, hvor de ble sekvensert.

2.12 Induksjon av cyster i *A. vinelandii*

Cystedannelse i *A. vinelandii* kan induseres ved inkubering på Burks agar med n-butanol som eneste karbonkilde (Winogradsky 1938; Wyss *et al.* 1961). n-butanol induserer ikke cystedannelse direkte, men må omdannes til β -hydroksybutyrat (BHB), som har vist seg å være den cysteinduserende komponenten (Sadoff 1975). BHB fører til metabolske endringer i cellen, og blant annet produksjon av alkylresorcinoler.

I denne oppgavene ble cystedannelse indusert ved å dyrke vegetative *A. vinelandii*-celler på Burk-agar med n-butanol (2.1.11), før inkubering i 5 døgn ved 30 °C.

2.13 Farging av alkylresorcinol

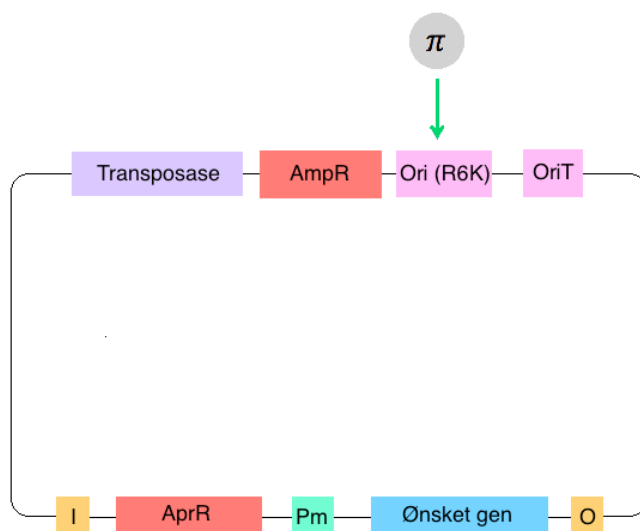
Produksjon av alkylresorcinol kan påvises ved en fargereaksjon, hvor en løsning med saltet Fast Blue B reagerer med alkylresorcinol og danner en rød forbindelse. Farging av alkylresorcinol ble utført som beskrevet av Segura *et al.*(2009).

Alkylresorcinolproduksjon i *A. vinelandii*-cyster ble påvist ved å tilsette Fast Blue-løsning (2.1.16) til cystene. Det ble benyttet 1 ml Fast Blue-løsning pr petriskål.

2.14 Komplementering av mutanter ved bruk av transposon

Gener påvirker hverandre på mange ulike måter, derfor betyr det ikke nødvendigvis at et utslått gen koder for proteinet som er direkte ansvarlig for den observerte fenotypendringen etter et knockout-forsøk. For å bekrefte at observert effekt hos en knockout-mutant faktisk skyldes det utslåtte genet, kan villtype-genet settes tilbake i mutanten. Dersom det utslåtte genet er ansvarlig for den observerte effekten, vil mutantene gjenopprette villtype-fenotypen. Dette kalles komplementering (Dale & Park 2010).

Transposoner er genetiske elementer som kan forflytte seg fra et sted til et annet i genomet. Hos bakterier kan disse elementene forflyttes innad i kromosomet eller mellom kromosom og plasmid (Snustad & Simmons 2010). Dermed kan transposoner benyttes ved komplementering. Transposonvektorene som ble konstruert i oppgaven er derivater av mini-Tn5-transosonvektoren pHE319, og inneholder nødvendige elementer for forflytning av ønsket gen fra donor-stamme til kromosomalt DNA i mottaker-stamme (figur 2.7).



Figur 2.7, Forenklet fremstilling av transposonvektor som ble benyttet i oppgaven.

Transposonet flankeres av en indre (I) og ytre (O) sekvens. Ønsket gen kan klones inn mellom disse sekvensene, under kontroll av en Pm-promotor som aktiveres ved tilstedeværelse av m-toluat. Utenfor selve transposonet, inneholder transposonvektorene som ble benyttet i oppgaven et gen som koder for enzymet transposase. Transposase binder til transposonendene og katalyserer transposonforflytningen ved en "klipp og lim"-mekanisme. Ori(R6K) sørger for at plasmidet kan replikere ved tilstedeværelse av Π -protein, pir-genet (*λ pir*) må derfor finnes i vertsbakterien for at plasmidet skal kunne

replikere (Inuzuka & Helinski 1978). Transposonvektorene som ble konstruert i oppgaven inneholder også gener som koder for ampicillin-resistens (AmpR) og apramycin-resistens (AprR). AmpR ligger utenfor fragmentet som ønskes settes inn i kromosomalt DNA, mens AprR ligger innenfor. Etter transposonoverføring kan man dermed selektere for stammer som har fått overført mini-transposonet med ønsket gen, ved å dyrke bakteriene på medium med apramycin. Siden mini-transposonet ikke inneholder transposase, vil elementet ikke kunne forflyttes videre etter integrering i kromosomalt DNA.

2.15 Bioinformatiske verktøy

Bioinformatikk benyttes til å finne, analysere og organisere biologiske data. I denne oppgaven ble ulike bioinformatiske verktøy benyttet for å identifisere gener og proteinprodukt, disse er beskrevet i det følgende.

2.15.1 BLAST

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) fra NCBI er et program som finner regioner med lokale likheter mellom ulike sekvenser. Programmet er basert på BLAST-algoritmen, hvor nukleotid- eller proteinsekvenser sammenlignes med lignende sekvenser fra ønskede databaser, og kalkulerer statistisk signifikans for at lignende gener har felles opphav. I tillegg til å sammenligne nukleotid- og proteinsekvenser, kan BLAST blant annet benyttes til å kartlegge DNA, lokalisere kjente proteindomener, og antyde funksjonelle og evolusjonære forhold mellom sekvenser (Altschul *et al.* 1990). Ulike typer BLAST-program er tilgjengelig på <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, disse er beskrevet i tabell 2.7.

Tabell 2.7, Ulike typer BLAST-program.

BLAST-program	Beskrivelse
BLASTN	Ønsket nukleotidsekvens søkes opp mot sekvenser fra nukleotid-databaser
BLASTP	Ønsket proteinsekvens søkes opp mot sekvenser fra protein-databaser
BLASTX	Nukleotidsekvens fra alle seks leserammer transleres og søkes opp mot sekvenser fra protein-databaser
TBLASTX	Nukleotidsekvens fra alle seks leserammer transleres og søkes opp mot sekvenser fra nukleotid-databaser
TBLASTN	Proteinsekvens søkes opp mot alle seks leserammer fra en nukleotidsekvens-database
PSI-BLAST	Benyttes for å finne fjernt beslektede arter. Først finnes nært beslektede sekvenser. Signifikante og konserverte deler av sekvensen benyttes til videre søk.

2.15.2 TCDB

Transporter Classification Database (TCDB) er en relasjonsdatabase som inneholder informasjon om transportproteiners sekvens, funksjon, struktur og evolusjon. For å finne lignende proteiner kan man blant annet foreta BLAST-søk i databasen, og videre finne informasjon om transportproteiner. Ved å foreta hydropati-analyser kan man også hente informasjon om proteinets konformasjon og funksjon. De ulike transportproteinene i databasen er koblet opp mot publiserte artikler, hvor man kan hente ytterligere informasjon om de aktuelle proteinene (Saier *et al.* 2009). Databasen er tilgjengelig på <http://www.tcdb.org>.

2.15.3 KEGG

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, www.genome.jp/kegg/) er et verktøy bestående av databaser med informasjon om genom og gener, proteiner, enzymatiske spor og biologiske kjemikalier. Databasene er knyttet sammen slik at man blant annet kan finne gener, homologe nukleotid- og proteinsekvenser, lignende genkluster og domener og motiv fra proteinsekvenser (Kanehisa *et al.* 2012). Verktøyet kan dermed indikere protein-funksjon fra en nukleotidsekvens.

2.15.4 MicrobesOnline

I 2003 ble MicrobesOnline utviklet av *The Virtual Institute for Microbial Stress and Survival*. Dette er et nettbasert bioinformatisk verktøy, hvor informasjon om mikroorganismers genom og genuttrykk er samlet. Ved å benytte MicrobesOnline kan man finne store mengder informasjon om et gen, blant annet homologe gener, domener i proteinprodukt, tilhørende proteinfamilie, metabolske kart hvor proteinprodukt inngår og sannsynligheten for at gener tilhører samme operon (Dehal *et al.* 2010). Verktøyet er tilgjengelig på www.microbesonline.org.

2.15.5 Clone Manager Suite

Ved bruk av programvaren Clone Manager Suite kan man planlegge kloningsprosesser og virkningen av enzymatiske prosesser, og lage kart over DNA-fragmenter og plasmider. Programmet kan blant annet benyttes til å designe og analysere primere, finne restriksjonssteder og planlegge restriksjonskutting, identifisere åpne leserammer (ORFs) og sammenstille sekvenser (www.scied.com).

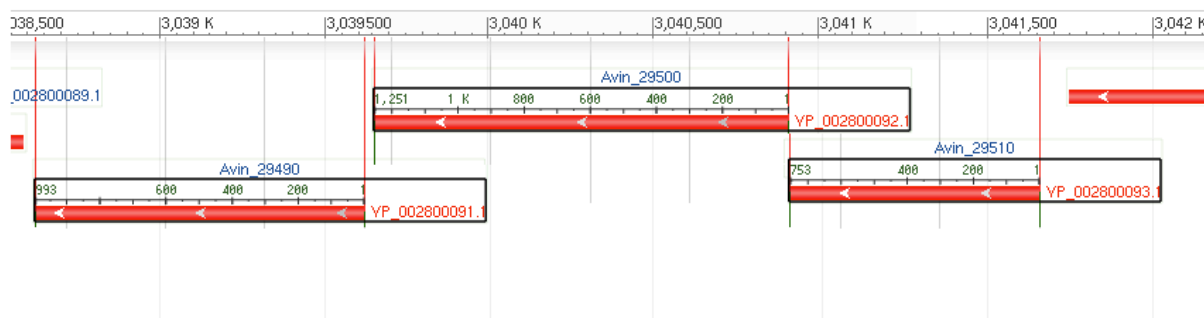
3. Resultat

Målet med dette studiet har vært å karakterisere funksjonen av genene *Avin_29510*, *Avin_29500* og *Avin_29490* i *A. vinelandii*. En bioinformatisk undersøkelse av genene er presentert i kapittel 3.1. Funksjonen av *Avin_29510*, *Avin_29500* og *Avin_29490* ble også undersøkt eksperimentelt. Dette ble gjort ved å konstruere mutanter med inaktiverte gener, for så å detektere endringer i mutantenes fenotype (kapittel 3.2-3.5). I tillegg ble det dannet transposonvektorer med villtype-gen, som senere kan benyttes til å komplementere mutantene og verifisere genenes funksjon (kapittel 3.6-3.8). På bakgrunn av funnene som presenteres i dette kapittelet, ble *Avin_29510*, *Avin_29500* og *Avin_29490* henholdsvis kalt *arsF*, *arsG* og *arsH*.

3.1 Bioinformatisk undersøkelse av *arsG*, *arsF* og *arsH*

Som et ledd for å karakterisere funksjonene til *arsF*, *arsG* og *arsH*, ble det gjennomført en bioinformatisk undersøkelse av genene. Informasjonen ble funnet gjennom søk i kunnskapsbasen KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), TCDB (Transporter Classification Database) og MicrobesOnline.

Størrelse, retning og lokasjon av *arsF* (*Avin_29510*), *arsG* (*Avin_29500*) og *arsH* (*Avin_29490*) er vist i figur 3.1. De tre genene har samme retning. *arsF* og *arsG* overlapper med tre nukleotider, mens avstanden mellom *arsG* og *arsH* er 41 nukleotider.

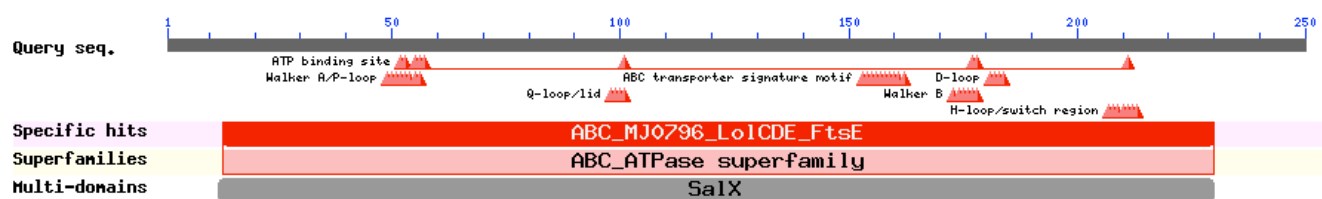


Figur 3.1, Gen-arrangement av *arsF* (*Avin_29510*), *arsG* (*Avin_29500*) og *arsH* (*Avin_29490*). Posisjon i *A. vinelandii*-genom er vist øverst, størrelsen på genene er vist over genene. Genenes retning er markert med piler (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Ifølge *operon prediction*-tjenesten til MicrobesOnline, ligger *arsF* og *arsG* i samme operon (99,8 % sannsynlig), mens *arsH* ikke ser ut til å tilhøre dette operonet (28,8 % sannsynlig). Algoritmen som benyttes for å finne denne sammenhengen tar høyde for distanse mellom genene, om gen-ortologer er konserverte nær hverandre i andre genom, om antatt funksjon av genprodukter er i samme kategori og om genene uttrykkes samtidig, dersom ekspresjons-data for de aktuelle genene er tilgjengelig. Disse faktorene må være tilgjengelig for programmet, og kan ikke lastes inn manuelt.

3.1.1 Bioinformatisk undersøkelse av *arsF* (Avin_29510)

arsF er et gen på 753 nukleotider, som gir et proteinprodukt på 250 aminosyrer. Genet er annotert som en *antimikrobiell peptid ABC-transportør ATPase*, og tilhører ABC ATPase-superfamilien. BLAST-søk av aminosyresekvensen til *arsF* viser at proteinet inneholder konserverte domener. Et ATP-bindende domene kan identifiseres, og er vist i figur 3.2. Proteinene inneholder motivene Walker A, Q-loop, Signaturmotiv, Walker B, D-loop og H-loop, som alle er høyt konserverte motiv i det nukleotidbindende domene hos ABC-transportører. BLAST-søket viser også *ArsF* ligner på proteiner involvert i eksport av lipoproteiner (LoID), samt proteiner involvert i celledeling (FtsE) og eksport av makrolider (MacAB).



Figur 3.2, Konserverte domener og homologe regioner i *ArsF* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

BLASTP-søk av aminosyresekvensen til *ArsF* viser at homologe proteiner forekommer i andre arter. Resultatene som viste høyest score ved sekvenssammenstilling av *ArsF* er vist i tabell 3.1.

Tabell 3.1, Treff fra sekvenssammenstilling av ArsF.

Gen	Art	Maks identitet (%)	E-verdi	Beskrivelse
Avin_29510	<i>Azotobacter vinelandii</i>	100	$1e^{-179}$	Antimikrobiell peptid ABC transportør ATPase
Slit_2575	<i>Sideroxydans lithotrophicus</i>	56	$3e^{-84}$	ABC transportør, ATP-bindene protein
MXAN_6402	<i>Myxococcus xanthus</i>	56	$3e^{-83}$	ABC transportør ATP-bindene protein
A176_2474	<i>Chondromyces apiculatus</i>	56	$4e^{-82}$	Antatt ATP-bindene komponent av ABC transportør
CV_3943	<i>Chromobacterium violaceum</i>	58	$2e^{-81}$	ABC transportør, ATP-bindene protein
STAUR_3228	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	56	$8e^{-78}$	ABC transportør, ATP-bindene protein

Samtlige av de beste treffene fra sekvenssammenstilling av ArsF inneholder de konserverte motivene som er karakteristisk for ATP-bindene domene i ABC-transportører, uten at det er spesifisert hvilke substrat proteinene transporterer. De homologe proteinene ble funnet i andre gram negative bakterier.

Ved søk i TCDB ble det funnet at ArsF har store likheter med proteinene LolD i *E. coli* (46 %) og YknY i *B.subtilis* (45 %). LolD binder og hydrolyserer ATP på innsiden av innermembranen, og er del av LolCDE-komplekset, som er en ABC-eksportør som transporterer lipoproteiner fra gram negative bakteriers innermembran til periplasma, før de inkorporeres i yttermembranen (Tokuda 2009). YknY er også en ATPase-komponent i et ABC-system, og uttrykkes som del av operonet *yknWXYZ*. Operonets tilhørende ABC-transportør eksporterer trolig antibiotikumet SdpC, som produseres av *B.Subtilis*, ut av cellen (Butcher & Helmann 2006).

3.1.2 Bioinformatisk undersøkelse av *arsG* (Avin_29500)

arsG er et gen på 1251 nukleotider som gir et proteinprodukt på 416 aminosyrer. Genet er annotert som et *hypotetisk protein*. Søk i KEGG viser at ArsG inneholder motiv fra proteinfamiliene *FtsX-lignende permeaser*, *MacB-lignende periplasmiske kjernedomener* og *ABC-2 transportør proteinfamilien*,. Egenskapene til proteiner i disse familiene er vist i tabell 3.2 (<http://www.genome.jp/kegg/>).

Tabell 3.2, Proteinfamilier hvor motiv i ArsG hører til.

Proteinfamilie	Beskrivelse
FtsX-lignende permeaser	Familien består av antatte permeaser og hypotetiske transmembrane proteiner. Inneholder tre transmembrane helikser. LolC, som er del av LolCDE-komplekset og involvert i eksport av lipoprotein, tilhører denne familien.
MacB-lignende periplasmiske kjernedomener	Representerer det periplasmiske kjernedomenet i ABC-transportører.
ABC-2 transportør-proteiner	Familien består av bakterielle ABC-transportssystemer involvert i eksport av toksiner og karbohydrater.

Ved BLASTP-søk ble ArsG sekvenssammenstilt med andre proteiner. Tabell 3.3 viser proteinene med høyest score fra sekvenssammenstillingen.

Tabell 3.3, Treff fra sekvenssammenstilling av ArsG.

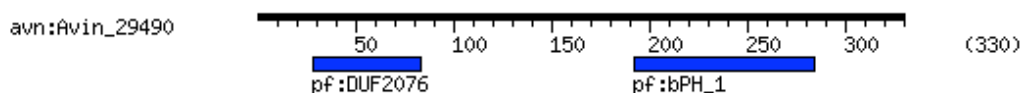
Gen	Art	Maks identitet (%)	E-verdi	beskrivelse
Avin_29500	<i>Azotobacter vinelandii</i>	100	0.0	Hypotetisk protein
Slit_2574	<i>Sideroxydans lithotrophicus</i>	42	7e-97	Hypotetisk protein, antatt permeaseprotein i ABC transportør
MXAN_6403	<i>Myxococcus xanthus</i>	37	9e-92	ABC-transportør permease
A176_2475	<i>Chondromyces apiculatus</i>	37	4e-85	Antatt LolC-protein, transmembrant, involvert i eksport av lipoprotein til yttermembran
MED121_04273	<i>Marinomonas sp. MED121</i>	34	7e-67	Hypotetisk protein
CV_3942	<i>Chromobacterium violaceum</i>	34	3e-62	Hypotetisk protein
DespoDRAFT_01903	<i>Desulfobacter postgatei</i>	31	5e-54	Antatt permease-komponent i ABC-transportør, involvert i frigjøring av lipoprotein

Treffene fra sekvenssammenstilling av ArsG stammer fra andre gram negative bakterier, og inneholder motiv fra de samme proteinfamiliene som ble funnet i ArsG.

BLAST-søk i TCDB viste at ArsG er homolog med de karakteriserte *E. coli*-proteinene LolE (23 %), LolC (25 %) og MacB (21 %). LolE og LolC har fire transmembrane segmenter hver, og er del av det beskrevne LolCDE-komplekset som er involvert i lipoprotein-eksport. MacB er del av ABC-transportøren MacAB, som er involvert i makrolid-eksportport (Kobayashi *et al.* 2001). En hydropati-analyse av ArsG som ble gjort i TCDB indikerer at proteinet inneholder fire transmembrane segmenter.

3.1.3 Bioinformatisk undersøkelse av *arsH* (Avin_29490)

arsH er et gen på 993 nukleotider som gir et proteinprodukt på 330 aminosyrer. Genet er annotert som et *hypotetisk protein*. Søk i KEGG viser at ArsH inneholder motiv fra domenene DUF2076 og bPH_1 (bakterielt PH-domene), som vist i figur 3.3.



Figur 3.3, Konserverte domener i ArsH (<http://www.genome.jp/kegg/>)

DUF2076 er et domene med ukjent funksjon, funnet i ulike ligandbindende sensorproteiner i periplasma. Bakterielt PH-domene er funnet i mange hypotetiske proteiner, og antas å være involvert i cellemembranens stress-respons (Xu *et al.* 2010).

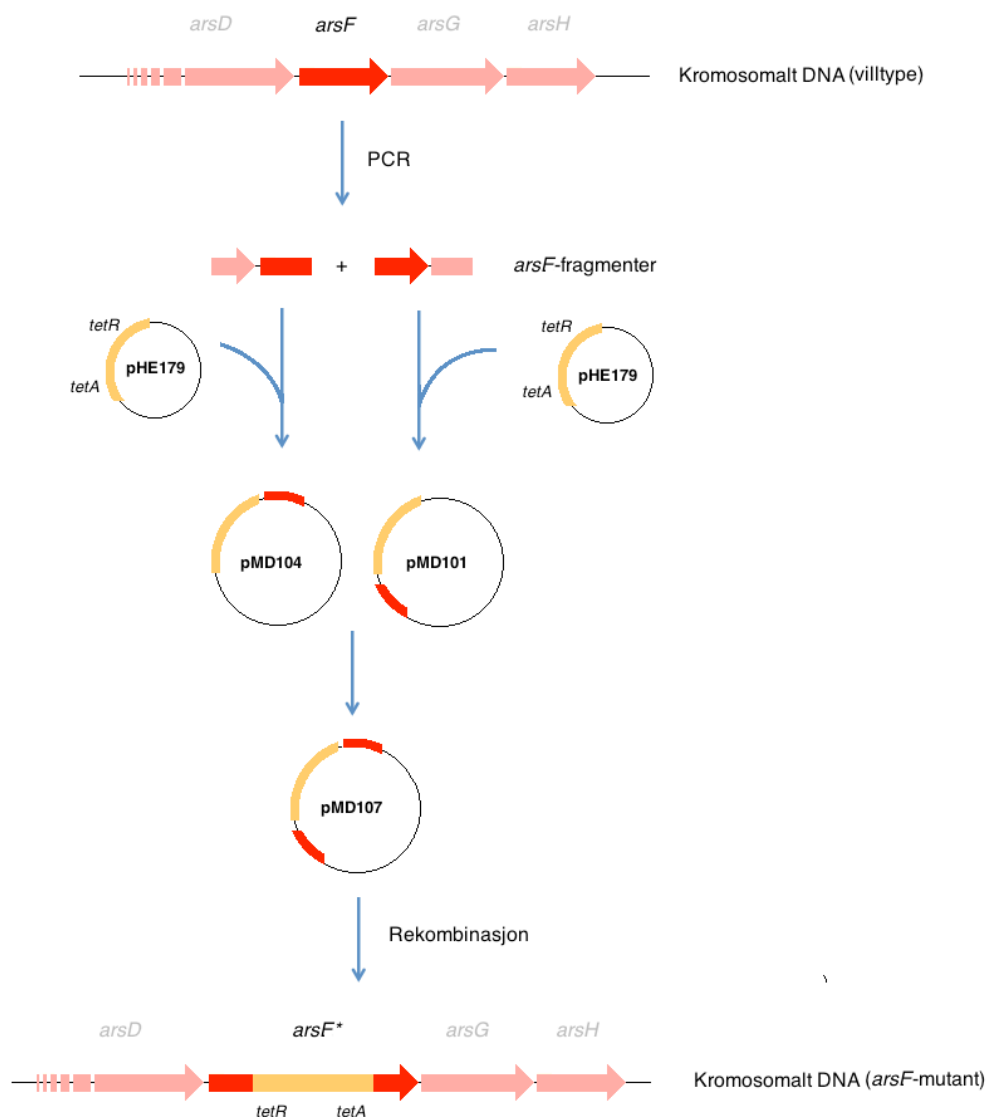
Ved BLASTP-søk ble ArsH sekvenssammenstilt med andre proteiner. De fleste proteinene som ligner ArsH er annotert som hypotetiske proteiner. Tabell 3.4 viser proteinene med høyest score fra sekvenssammenstillingen, samt proteiner med relativt høy score og kjent funksjon. De homologe proteinene fra sekvenssammenstilling av ArsH ble funnet i andre gram negative bakterier. Motiv fra domenene DUF2076 og pBH_1 ble ikke funnet i noen av treffene.

Tabell 3.4, Treff fra sekvenssammenstilling av ArsH.

Gen	Art	Maks identitet (%)	E-verdi	beskrivelse
Avin_29490	<i>Azotobacter vinelandii</i>	100	0.0	Hypotetisk protein
A176_2476	<i>Chondromyces apiculatus</i>	48	6e-55	Hypotetisk protein
CV_3941	<i>Chromobacterium violaceum</i>	43	1e-52	Hypotetisk protein
Slit_2573	<i>Sideroxydans lithotrophicus</i>	45	4e-52	Hypotetisk protein
MXAN_6404	<i>Myxococcus xanthus</i>	47	1e-51	Hypotetisk protein
STAUR_3227	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	35	3e-31	Antatt innermembran-komponent av ABC-eksportør
HRM2_20210	<i>Desulfobacterium autotrophicum HRM2</i>	33	4e-24	Antatt LolF-protein, involvert i sortering av lipoprotein til yttermembran

3.2 Konstruksjon av mutanten *A. vinelandii* Δ *arsF*

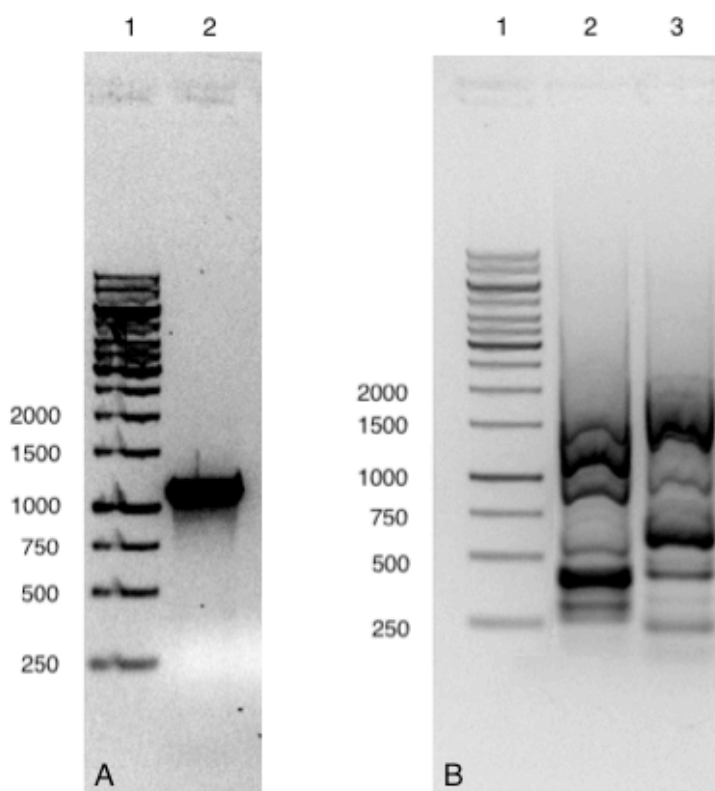
Mutanten *A. vinelandii* Δ *arsF* ble dannet ved å sette gene *tetA* og *tetR*, som koder for tetrasyklinresistens, inn i *arsF*. Ved bruk av PCR ble *arsF* isolert fra kromosomalt DNA som to overlappende fragmenter (3.2.1). Plasmidene pMD101 og pMD104 ble konstruert ved å klonere fragmentene inn i vektoren pHE179, som inneholder *tetA* og *tetR* (3.2.2). Videre ble *arsF*-fragmentet i pMD104 satt inn i pMD101, slik at de to *arsF*-fragmentene ligger på hver sin side av tetrasyklinresistens-gene. Dette plasmidet ble kalt pMD107 (3.2.3). pMD107 ble overført til *A. vinelandii* villtype-stammens genom, på denne måten ble *arsF* erstattet av *tetA*- og *tetR*-avbrutt *arsF* (3.2.4). En oversikt over prosessen er vist i figur 3.4.



Figur 3.4 Oversikt over konstruksjon av *A. vinelandii* Δ *arsF*. *arsF* (vist i rødt) blir inaktivert ved at gener for tetrasyklinresistens (vist i oransje) avbryter genet.

3.2.1 Isolering av *arsF*

Ved bruk av PCR ble *arsF* isolert og amplifisert fra *A. vinelandii* ATCC 12518 som to overlappende fragmenter, disse ble kalt arsFA og arsFB. arsFA inneholder nederste del av *arsF*, samt flankerende sekvenser nedstrøms for genet, mens arsFB utgjør første del av *arsF* med flankerende sekvenser oppstrøms for genet. Ved amplifikasjon av arsFA ble primerne Gen1FA og Gen1RA benyttet, mens primerne Gen1FB og Gen1RB ble benyttet ved amplifikasjon av arsFB-fragmentet (vedlegg B). PCR-produktene ble kontrollert og separert ved gelelektroforese, som vist i figur 3.5. Forventet størrelse på arsFA og arsFB er henholdsvis 1,1 kb og 1,5 kb.



Figur 3.5. PCR-amplifikasjon av *arsF*-fragmenter. A) PCR-amplifikasjon ved bruk av *Expand High Fidelity PCR system* (Roche). Brønn 2: arsFA (forv. 1,1 kb). B) PCR-amplifikasjon ved bruk av *Phusion® High-Fidelity PCR Kit* (NEB). Brønn 2: arsFA (forv. 1,1 kb). Brønn 3: arsFB (forv. 1,5 kb).

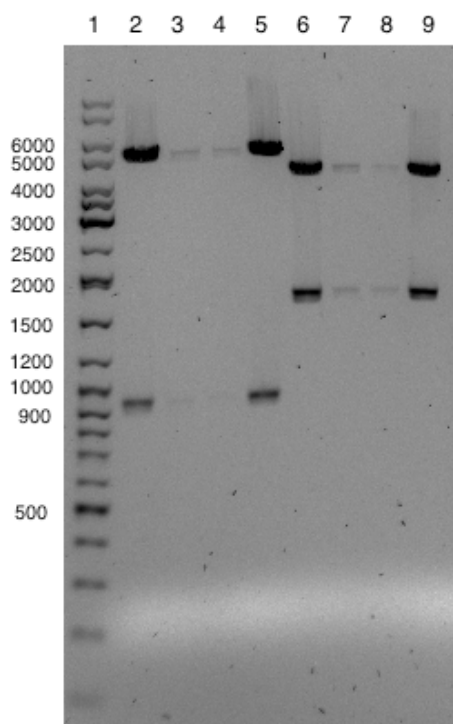
Fragmenter med forventet størrelse ble observert. arsFA (brønn 2, figur 3.5A) og arsFB (brønn 3, figur 3.5B) ble skjært ut fra gelen og renset.

3.2.2 Konstruksjon av pMD101 og pMD104

Som et første ledd for å avbryte *arsF* med *tetA* og *tetR*, ble *arsFA* og *arsFB* klonet inn i vektoren pHE179, som inneholder tetrasyklinresistens-genene. Dette ga opphav til to nye plasmider; pMD101 (inneholder *arsFA*) og pMD104 (inneholder *arsFB*).

pMD101

arsFA og pHE179 ble kuttet med restriksjonsenzymene *SpeI* og *XhoI*, slik at overhengene på vektor og insert er komplementære. Videre ble vektor og insert ligert og overført til kompetente *E. coli* DH5 α -celler ved kjemisk transformering. De transformerte *E. coli*-cellene ble dyrket på LA med ampicillin, som selekterer for transformerte celler. Plasmider fra oppvokste kolonier ble isolert og kontrollert ved *PstI*- og *Sall*-testkutting, vist i figur 3.6. Forventede fragmentstørrelser fra kuttene er henholdsvis 5,1 kb + 0,9 kb og 4,4 kb + 1,7 kb.



Figur 3.6, Verifisering av pMD101. Brønn 2-5: *PstI*-kuttet pMD101 (forv. 5,1 kb + 0,9 kb). Brønn 6-9: *Sall*-kuttet pMD101 (forv. 4,4 kb + 1,7 kb). Brønn 2-5 og 6-9 inneholder fragmenter fra samme plasmidprøver.

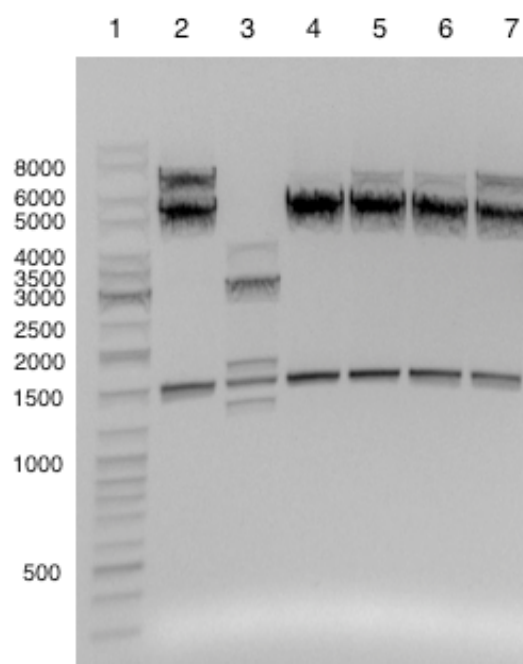
Fragmenter av forventet størrelse ble observert (brønn 2, 5, 6 og 9, figur 3.6). Disse plasmidene ble sekvensert med primerne M13rev og Gen1NotIR (vedlegg B).

Sekvenseringen bekreftet at insertet *arsFA* er inkorporert i vektor på ønsket måte, og at

arsFA ikke ble mutert ved PCR-amplifikasjon. Sekvenssammenstilling er vist i vedlegg D. Det nye plasmidet fikk navnet pMD101.

pMD104

AgeI-Acc56I-kuttet arsFB og pHE179 ble ligert og transformert inn i kompetente *E. coli* DH5 α -celler. Det ble selektert for transformerte celler ved oppdyrking på LA med ampicillin, før plasmid ble isolert og kontrollert ved BpmI-testkutting. Forventede fragmentstørrelser fra dette kuttet er 4,8 kb og 1,5 kb (figur 3.7).



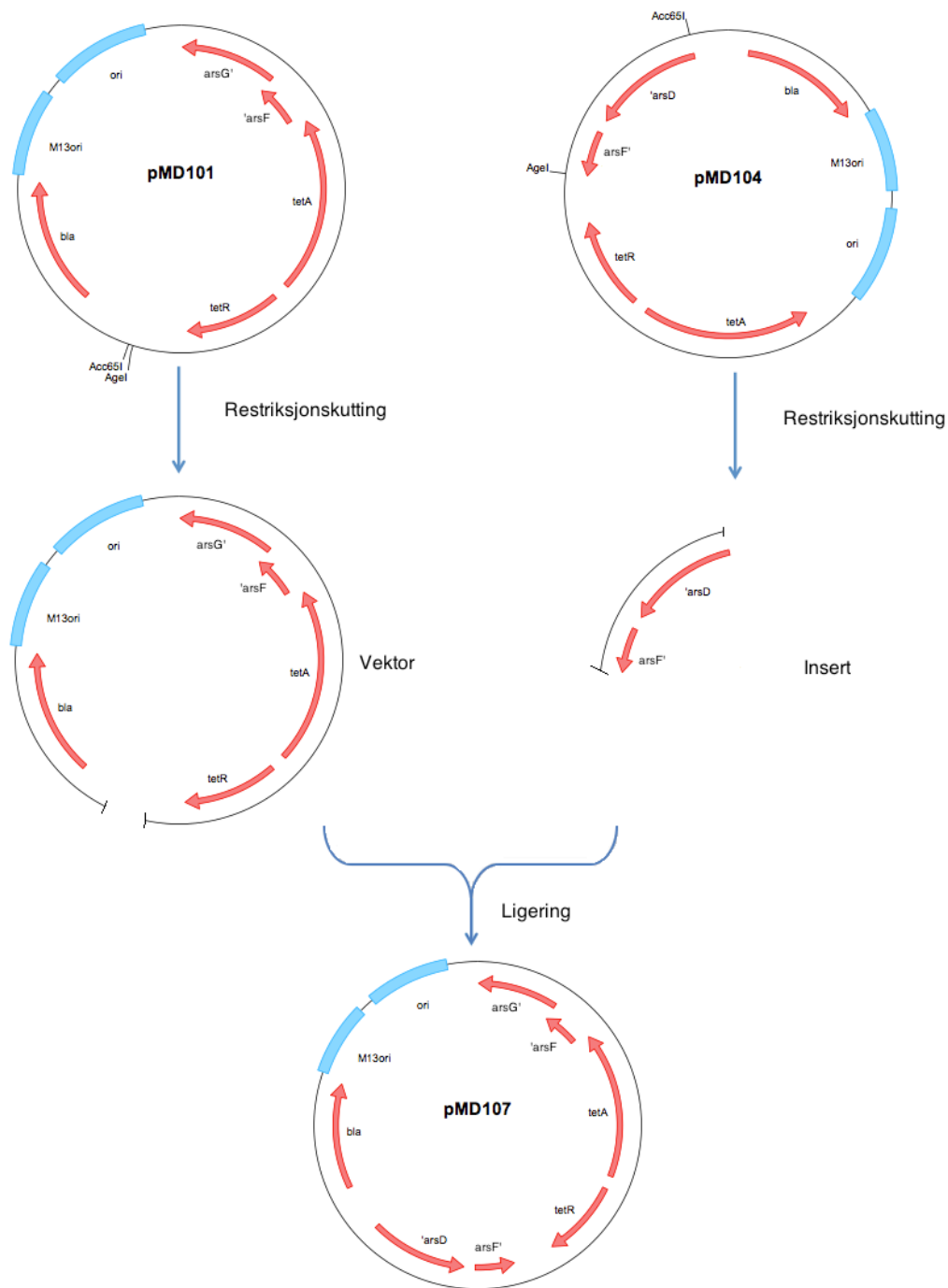
Figur 3.7, Verifisering av pMD104. Brønn 2-7: BpmI-kuttet pMD104 (forv. 4,8 kb + 1,5 kb).

Fragmenter av forventet størrelse ble observert (brønn 2, 4, 5, 6 og 7, figur 3.7). Sekvensering ved bruk av primerne Gen1RB og Gen2RB (vedlegg B) bekreftet at disse plasmidene inneholder arsFB. Sekvenssammenstilling er vist i vedlegg D. Det nye plasmidet fikk navnet pMD104.

3.2.3 Konstruksjon av pMD107

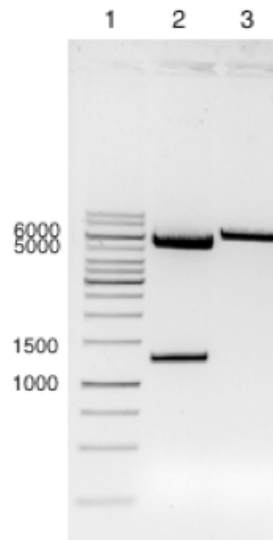
Med utgangspunkt i pMD101 og pMD104 ble plasmidet pMD107 konstruert. Dette plasmidet inneholder inaktivert *arsF*, hvor *arsFA* og *arsFB* ligger på hver sin side av

tetA og *tetR*. En oversikt over konstruksjonen er vist i figur 3.8, prosessen er nærmere beskrevet under.



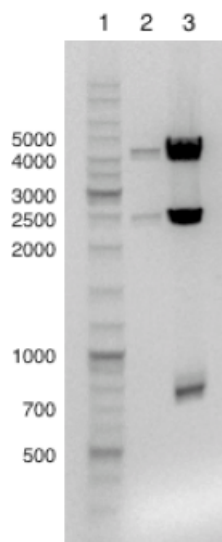
Figur 3.8. Konstruksjon av pMD107 ved ligering av kutteprodukt fra pMD101 (vektor) og pMD104 (insert). Enzymseter for benyttede restriksjonsenzymmer er markert i pMD101 og pMD104.

Ved konstruksjon av pMD107, ble pMD101 og pMD104 kuttet med AgeI og Acc65I. De kuttete plasmidene er vist i figur 3.9.



Figur 3.9, Fragment-separasjon for dannelse av pMD107. Brønn 2: AgeI-Acc65I-kuttet pMD104 (forv. 5,1 kb + 1,2 kb). Brønn 3: AgeI-Acc65I-kuttet pMD101 (forv. 6,0 kb + 0,01 kb).

Fragmentet på 1,2 kb fra kuttet pMD104 (brønn 2, figur 3.9) ble benyttet som insert (inneholder *arsFB*), mens fragmentet på 6,0 kb fra kuttet pMD101 (brønn 3, figur 3.9) ble brukt som vektor (inneholder *arsFA*, *tetA* og *tetR*). Vektor og insert ble ligert og overført til kompetente *E. coli* DH5 α -celler ved kjemisk transformering. Det ble selektert for transformerte celler, og plasmid fra disse ble cellene isolert. Plasmidene ble kontrollert ved testkutting, hvor enzymet HindIII ble benyttet. Forventede fragmentstørrelser er 4,2 kb, 2,3 kb og 0,7 kb. Testkuttet er vist i figur 3.10.

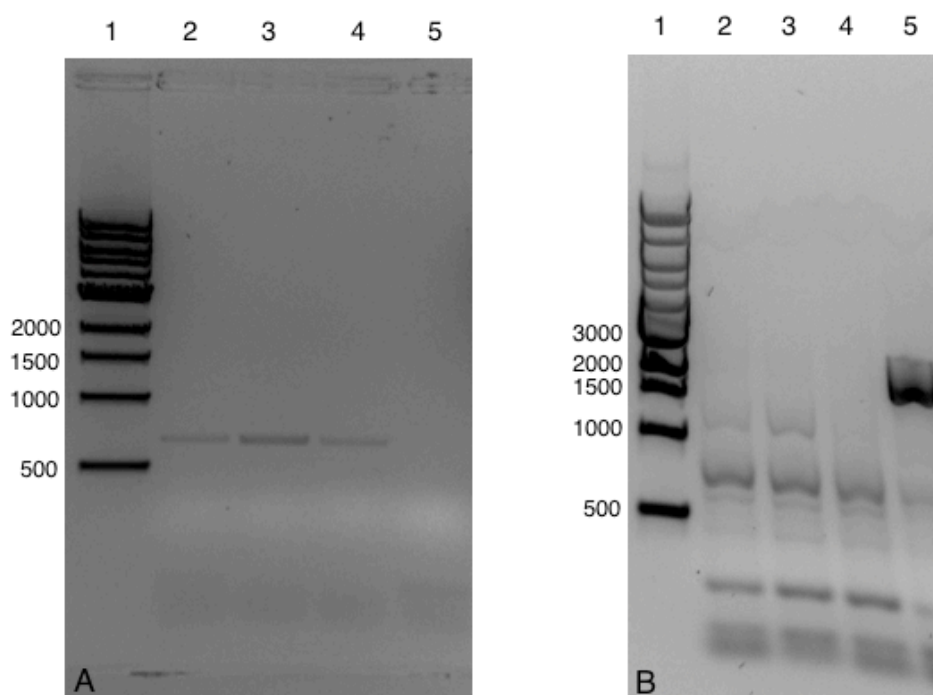


Figur 3.10, Verifisering av pMD107. Brønn 2-3: HindIII-kuttet pMD107 (forv. 4,2 kb + 2,3 kb + 0,7 kb).

Fragmenter av forventet størrelse ble observert (brønn 3, figur 3.10). Det nye plasmidet fikk navnet pMD107.

3.2.4 Inaktivering av *arsF* i *A. vinelandii*

Mutanten *A. vinelandii* Δ *arsF* ble dannet ved å transformere *A. vinelandii* ATCC 12518 med pMD107 (linearisert med BsaAI). Det ble gjort 5 overføringer av de transformerte cellene på Burk-agar med tetrasyklin, for sørge for at alle kromosomkopiene i cellene er rekombinert og inneholder utslått *arsF*. For å kontrollere at de nye mutantene ikke inneholder villtype-gen, ble kromosomalt DNA fra mutantene kontrollert ved PCR, som vist i figur 3.11. Primerparene Gen1NotIR-TcAR og Gen1NotIR-Gen2RB ble benyttet ved denne kontrollen (vedlegg B). Ved bruk av primerparet Gen1NotIR og TcAR forventes det PCR-fragmenter på 0,65 kb for *A. vinelandii* Δ *arsF*, og ingen PCR-produkt for villtype. PCR-reaksjon med primerparet Gen1NotIR og Gen2RB forventes å gi fragmenter på 3,8 kb for *A. vinelandii* Δ *arsF*, og 1,6 kb for villtype.



Figur 3.11, PCR-kontroll av *A. vinelandii* Δ *arsF*. A) Benyttede primere: Gen1NotIR + TcAR. Brønn 2-4: DNA fra *A. vinelandii* Δ *arsF* (forv. 0,65 kb). Brønn 5: DNA fra villtype (forv. ingen PCR-produkt). B) Benyttede primere: Gen1NotIR + Gen2RB. Brønn 2-4: DNA fra *A. vinelandii* Δ *arsF* (forv. 3,8 kb). Brønn 5: DNA fra villtype (forv. 1,6 kb).

I PCR-kontrollen ble det vist at pMD107-transformerte stammer inneholder utslått *arsF* (figur 3.11A, brønn 2-4), og at disse mutantene ikke inneholder villtype-gen (figur 3.11B). Muterte stammer som viste forventet fragmentstørrelse fra PCR-kontroll fikk navnet *A. vinelandii* Δ *arsF*.

3.3 Konstruksjon av mutanten *A. vinelandii* Δ *arsG*

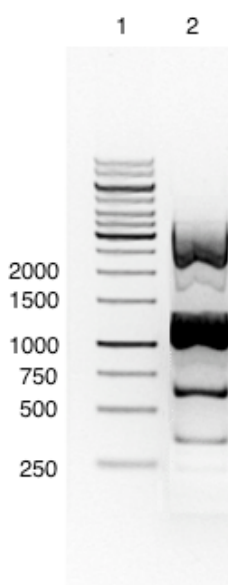
Mutanten *A. vinelandii* Δ *arsG* ble, på tilsvarende måte som *A. vinelandii* Δ *arsF*, dannet ved å sette tetrasyklinresistens-genene *tetA* og *tetR*, inn i *arsG*. *arsG* ble isolert fra kromosomalt DNA som to overlappende fragmenter (3.3.1). Fragmentene ble klonet inn i vektoren pHE179, som ga opphav til plasmidene pMD101 (beskrevet i kapittel 3.2.2) og pMD102 (3.3.2). *arsG*-fragmentet fra pMD101 ble satt inn i pMD102, slik at de to *arsG*-fragmentene ligger på hver sin side av tetrasyklinresistens-genene. Plasmidet som ble dannet i denne kloningsprosessen fikk navnet pMD108 (3.3.3). *arsG* i *A. vinelandii* ble inaktivert ved å overføre pMD108 til villtype-stammens genom, slik at *arsG* ble erstattet av *tetA*- og *tetR*-avbrutt *arsG* (3.3.4). En oversikt over denne prosessen er vist i figur 3.12.



Figur 3.12 Oversikt over konstruksjon av *A. vinelandii* Δ *arsG*. *arsG* (vist i rødt) blir inaktivert ved at gener for tetrasyklinresistens (vist i oransje) avbryter genet.

3.3.1 Isolering av *arsG*

Ved bruk av PCR ble *arsG* isolert og amplifisert fra *A.vinelandii* ATCC 12518 som to overlappende fragmenter, som ble kalt *arsGA* og *arsGB*. Sammen utgjør *arsGA* og *arsGB* hele *arsG*, samt flankerende sekvenser. *arsGB* er identisk med fragmentet *arsFA*, dette fragmentet inneholder deler av både *arsF* og *arsG*. Isolering og amplifikasjon av *arsFA* er beskrevet i kapittel 3.2.1. Ved PCR-amplifikasjon av *arsGA* ble primerne Gen2FA og Gen2RA benyttet (vedlegg B). PCR-produktet ble kontrollert ved gelelektroforese, med forventet størrelse på 1,2 kb (figur 3.13).



Figur 3.13 PCR-amplifikasjon av *arsGA* (forv. 1,2 kb).

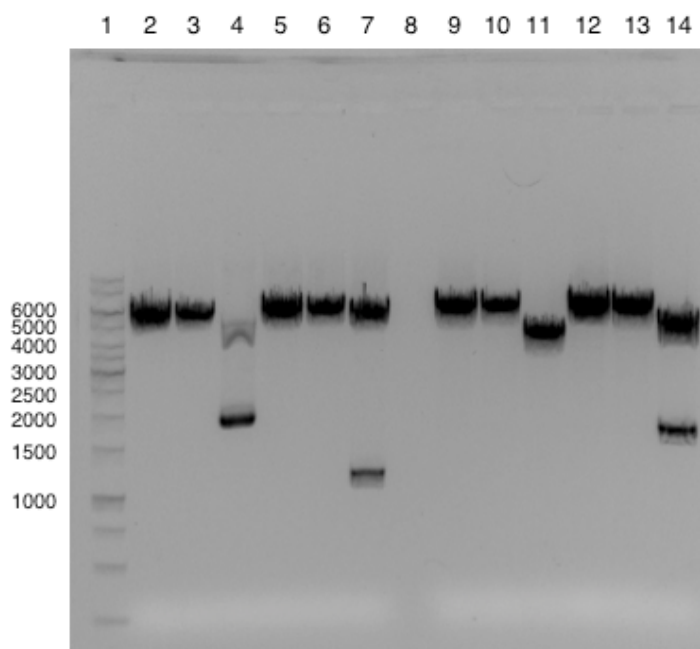
arsGA-fragmentet på 1,2 kb (figur 3.13) ble skjært ut fra gelen og rensset.

3.3.2 Konstruksjon av pMD102

Som et første ledd for å avbryte *arsG* med *tetA* og *tetR*, ble *arsGA* og *arsGB* klonet inn i vektoren pHE179. Innsetting av *arsGB* (= *arsFA*) i pHE179 førte til dannelse av plasmidet pMD101, som beskrevet i kapittel 3.2.2. Ved å klonere *arsGA* inn i pHE179 ble plasmidet pMD102 dannet.

pMD102

PstI-BglII-kuttet arsFA og pHE179 ble ligert og transformert inn i kompetente *E. coli* DH5 α -celler ved kjemisk transformering. Det ble selektert for transformerte ved ampicillin-seleksjon. Plasmid ble isolert og kontrollert ved SallI- og BsaAI-testkutting (figur 3.14). Forventede fragmentstørrelser for disse kuttene er henholdsvis 5,0 kb + 1,1 kb og 4,5 kb + 1,5 kb.



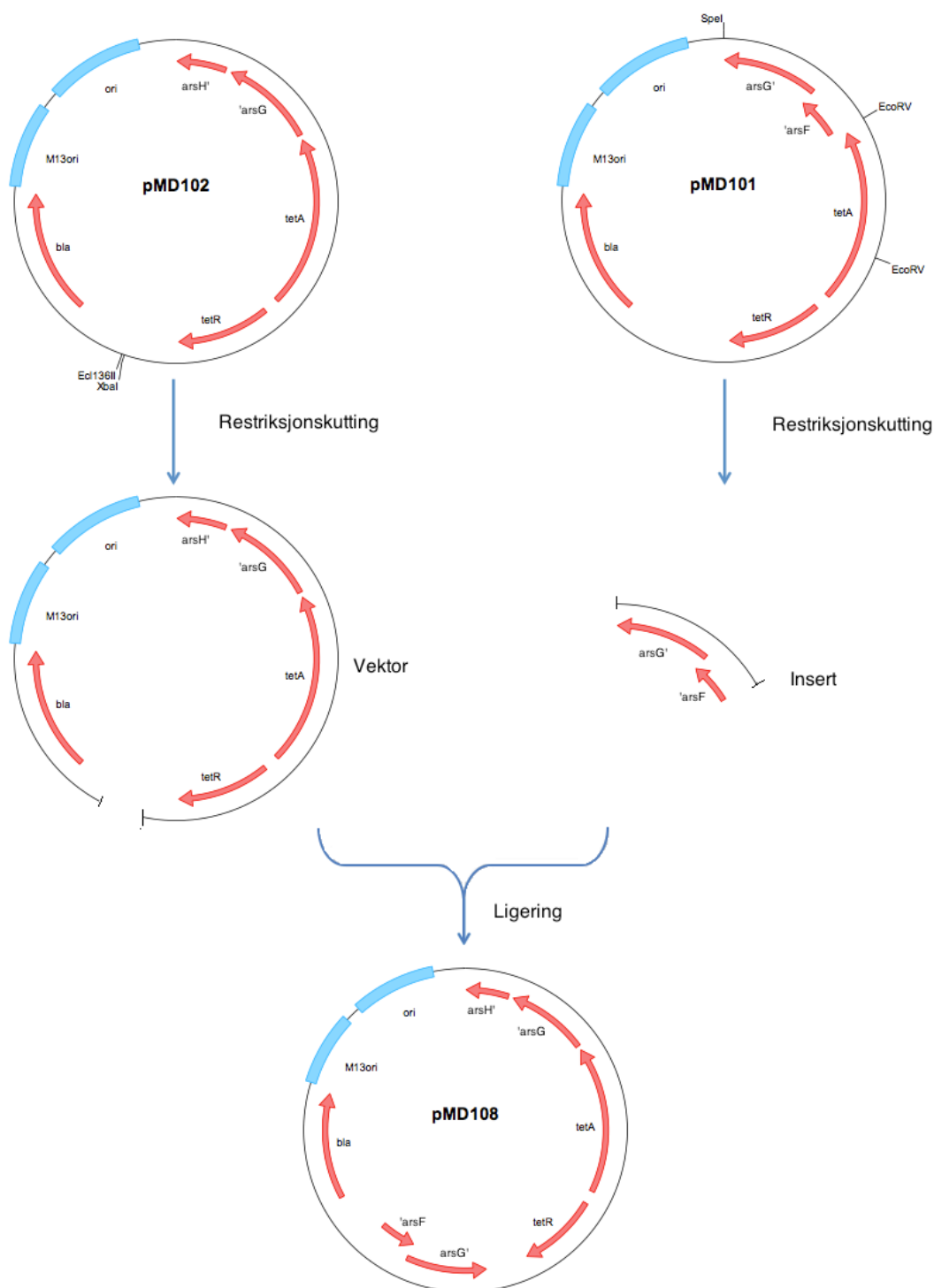
Figur 3.14, Verifisering av pMD102. Brønn 2-7: SallI-kuttet pMD102 (forv. 5,0 kb + 1,1 kb). Brønn 9-14: BsaAI-kuttet pMD102 (forv.4,5 kb + 1,5kb). Brønn 2-7 og 9-14 inneholder fragmenter fra de samme plasmidprøvene.

Fragmenter av forventet størrelse ble observert i brønn 7 og 14 (figur 3.14) som inneholder fragmenter fra samme plasmidprøve. Sekvensering ved bruk av primerne M13rev og Gen2NotIR (vedlegg B) bekreftet at dette plasmidene inneholder arsGA. Ved sekvenssammenstilling (vedlegg D) ble det funnet en punktmutasjon ved den siste basen i *arsH*-sekvensen som inngår i arsGA. Det nye plasmidet fikk navnet pMD102.

3.3.3 Konstruksjon av pMD108

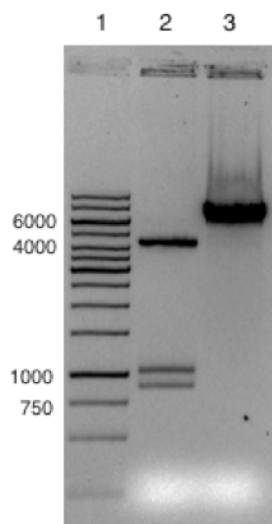
Ved å klonere deler av pMD101 inn i pMD102, ble plasmidet pMD108 konstruert. Dette plasmidet inneholder inaktivert *arsG*, hvor arsGA og arsGB ligger på hver sin side av

tetA og *tetR*. En oversikt over konstruksjonsprosessen er vist i figur 3.15 og nærmere beskrevet under.



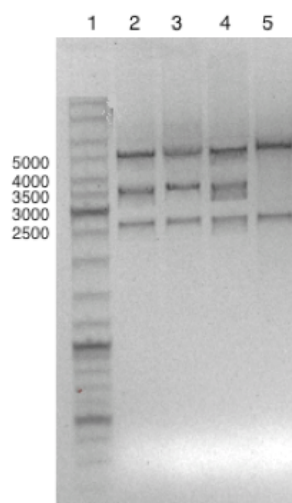
Figur 3.15, Konstruksjon av pMD108 ved ligering av kutteprodukt fra pMD102 (vektor) og pMD101(insert). Enzymseter for benyttede restriksjonsenzymmer er markert i pMD102 og pMD101.

Ved konstruksjon av pMD108 ble pMD101 kuttet med *SpeI* og *EcoRV*, mens pMD102 ble kuttet med *XbaI* og *Ecl136II*. *XbaI* og *SpeI* gir komplementære overheng, mens *EcoRV* og *Ecl136II* gir butte ender. De kuttede plasmidene er vist i figur 3.16.



Figur 3.16, Fragment-separasjon for dannelse av pMD108. Brønn 2: SpeI-EcoRV-kuttet pMD101 (forv. 4,2 kb + 1,0 kb + 0,8 kb). Brønn 3: XbaI-Ecl136II-kuttet pMD102 (forv. 6,1 kb + 0,01 kb).

Fragmentet på 1,0 kb fra kuttet pMD101 (figur 3.16, brønn 2) ble benyttet som insert (inneholder *arsGB*), mens fragmentet på 6,1 kb fra kuttet pMD102 (figur 3.16, brønn 3) ble brukt som vektor (inneholder *arsGA*, *tetA* og *tetR*). Vektor og insert ble ligert og overført til kompetente *E. coli* DH5 α -celler ved kjemisk transformering. Det ble selektert for transformerte celler, og plasmid fra disse ble cellene isolert. Plasmidene ble kontrollert ved testkutting, ved bruk av enzymet BspMI. Forventede fragmentstørrelser er 4,6 kb og 2,5 kb, kuttet er vist i figur 3.17.

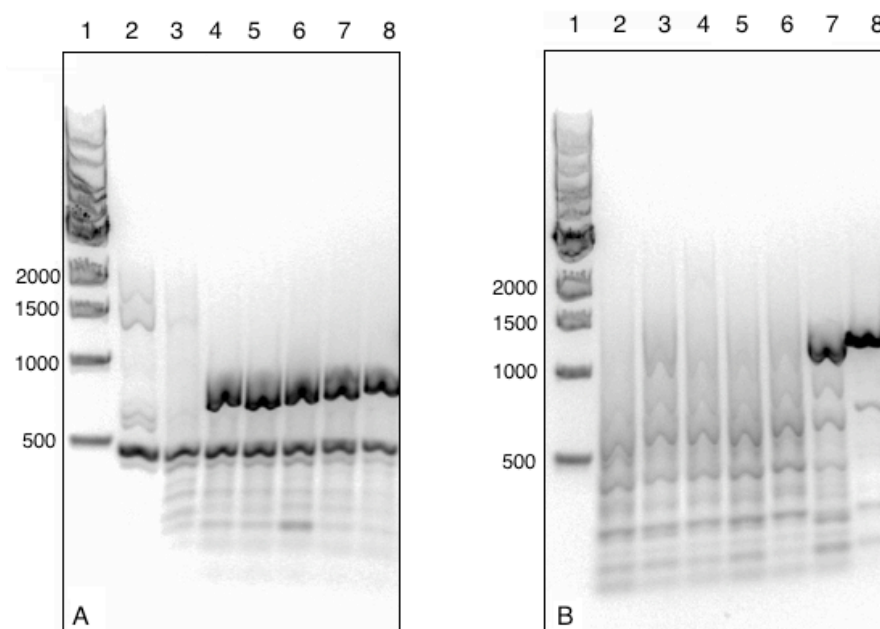


Figur 3.17, Verifisering av pMD108. Brønn 2-5: BspMI-kuttet pMD108 (forv. 4,6 kb + 2,5 kb).

Fragmenter av forventet størrelse ble observert (brønn 5, figur 3.17). Det nye plasmidet fikk navnet pMD108.

3.3.4 Inaktivering av *arsG* i *A. vinelandii*

Ved å transformere *A. vinelandii* ATCC 12518 med pMD108 (linearisert med PstI), ble mutanten *A. vinelandii* Δ *arsG* laget. Det ble gjort 5 overføringer av de transformerte cellene på Burk-agar med tetrasyklin, for sørge for at alle kromosomkopiene i cellene inneholder utslått *arsG*. For å kontrollere at de nye mutantene ikke inneholder villtype-gen, ble kromosomalt DNA fra mutantene kontrollert ved PCR, som vist i figur 3.18. Primerparene Gen2NotIR-TcAR og Gen2NotIR-Gen2NdelF ble benyttet ved denne kontrollen (vedlegg B). Ved bruk av primerparet Gen2NotIR og TcAR forventes det PCR-fragmenter på 0,9 kb for *A. vinelandii* Δ *arsG*, og ingen PCR-produkt for villtype. PCR-reaksjon med primerparet Gen2NotIR og Gen2NdelF forventes å gi fragmenter på 3,3 kb for *A. vinelandii* Δ *arsG*, og 1,3 kb for villtype.

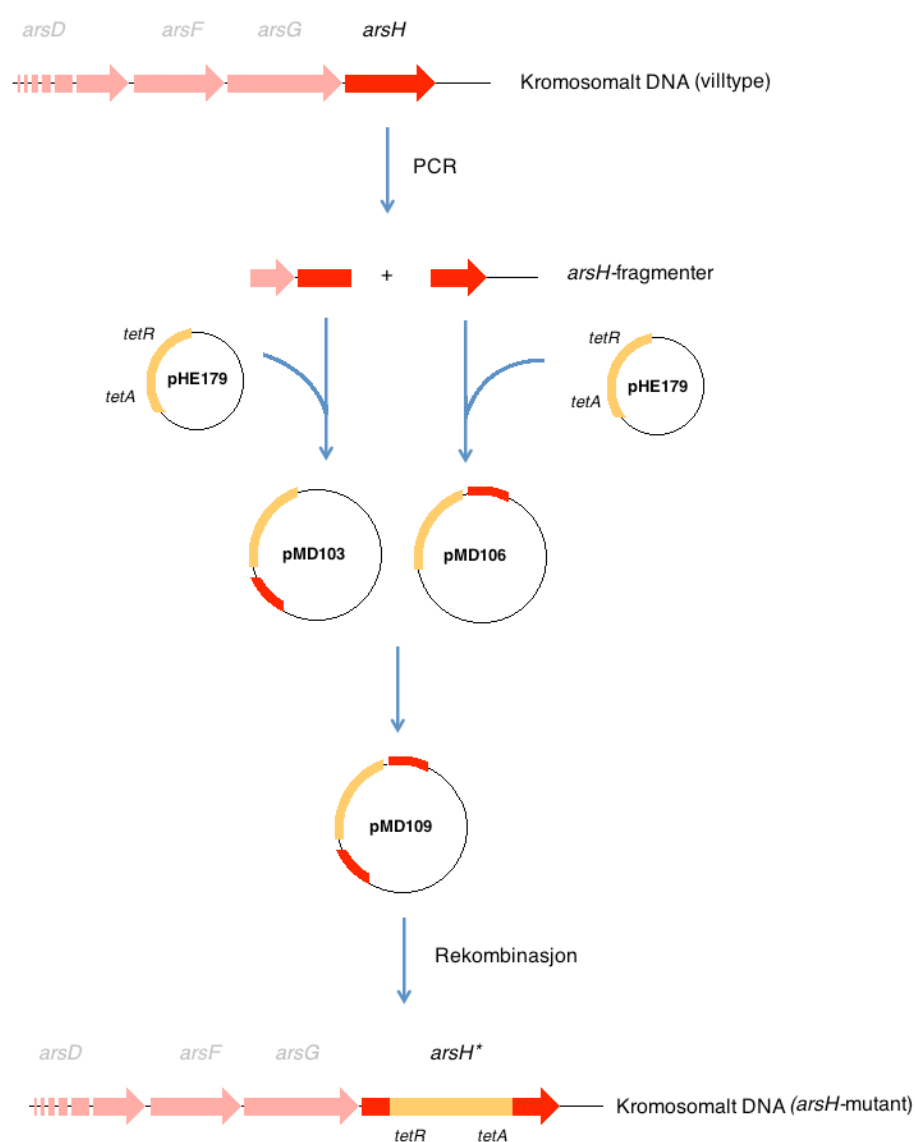


Figur 3.18, PCR-kontroll av *A. vinelandii* Δ *arsG*. A) Benyttede primere: Gen2NotIR + TcAR. Brønn 2-3: DNA fra villtype (forv. ingen PCR-produkt). Brønn4-8: DNA fra *A. vinelandii* Δ *arsG* (forv. 0,9 kb). B) Benyttede primere: Gen2NotIR + Gen2NdelF. Brønn 2-6: DNA fra *A. vinelandii* Δ *arsG* (forv. 3,3 kb). Brønn 7-8: DNA fra villtype (forv. 1,3 kb).

PCR-kontrollen viste at pMD108-transformerte stammer inneholder utslått *arsG* (figur 3.18A, brønn 4-8), og at disse mutantene ikke inneholder villtype-gen (figur 3.18B, brønn 2-6). Muterte stammer som viste forventet fragmentstørrelse fra PCR-kontrollen fikk navnet *A. vinelandii* Δ *arsG*.

3.4 Konstruksjon av mutanten *A. vinelandii* Δ *arsH*

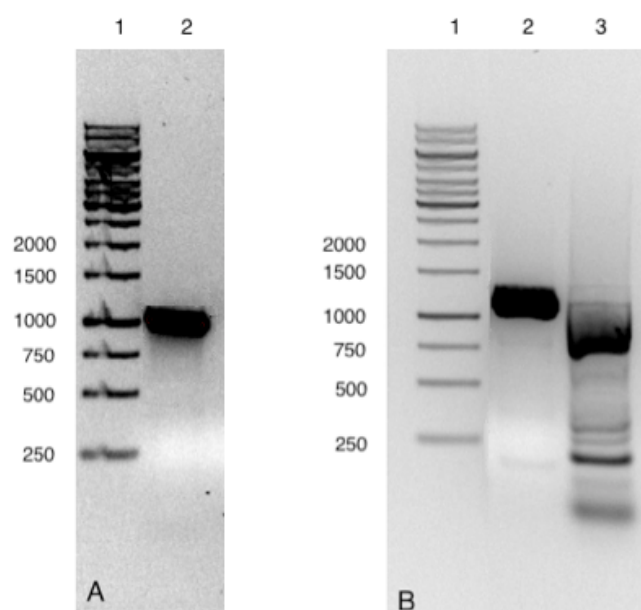
Mutanten *A. vinelandii* Δ *arsH* ble, på tilsvarende måte som *A. vinelandii* Δ *arsF* og *A. vinelandii* Δ *arsG*, dannet ved å sette tetrasyklinresistens-genene *tetA* og *tetR* inn i *arsH*. Ved bruk av PCR ble *arsH* isolert fra kromosomalt DNA som to overlappende fragmenter (3.4.1). Plasmidene pMD103 og pMD106 ble konstruert ved å klonere fragmentene inn i vektoren pHE179 (3.4.2). *arsH*-fragmentet fra pMD106 ble satt inn i pMD103, slik at de to *arsH*-fragmentene ligger på hver sin side av tetrasyklinresistens-genene. Dette plasmidet ble kalt pMD109 (3.4.3). pMD109 ble overført til villtype-stammens genom, hvor *arsH* ble erstattet av *tetA*- og *tetR*-avbrutt *arsH* (3.4.4). En oversikt over prosessen er vist i figur 3.19.



Figur 3.19, Oversikt over konstruksjon av *A. vinelandii* Δ *arsH*. *arsH* (vist i rødt) blir inaktivert ved at gener for tetrasyklinresistens (vist i oransje) avbryter genet.

3.4.1 Isolering av *arsH*

Ved bruk av PCR ble *arsH* isolert og amplifisert fra *A. vinelandii* ATCC 12518 som to overlappende fragmenter. Fragmentene ble kalt arsHA og arsHB, som sammen utgjør hele *arsH*, samt flankerende sekvenser. Ved amplifikasjon av arsHA ble primerne Gen3FA og Gen3RA benyttet, mens primerne Gen3FB og Gen3RB ble brukt for amplifikasjon av arsHB-fragmentet (vedlegg B). PCR-produktene ble kontrollert og separert ved gelelektroforese, som vist i figur 3.20. Forventet størrelse på arsHA og arsHB er henholdsvis 1,3 kb og 1,2 kb.



Figur 3.20, PCR-amplifikasjon av *arsH*-fragmenter. A) PCR-amplifikasjon ved bruk av *Expand High Fidelity PCR system* (Roche). Brønn 2: arsHB (forv. 1,2 kb). B) PCR-amplifikasjon ved bruk av *Phusion[®] High-Fidelity PCR Kit* (NEB). Brønn 2: ArsHA (forv. 1,3 kb). Brønn 3: arsHB (forv. 1,2 kb).

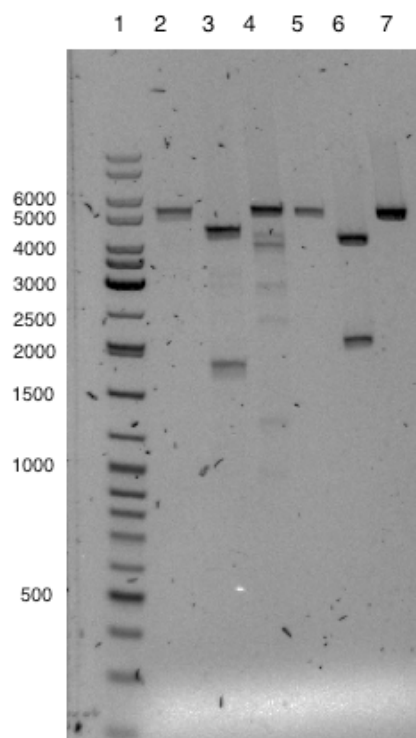
Fragmenter med forventet størrelse ble observert. arsHA (brønn 2, figur 3.20B) og arsHB (brønn 2, figur 3.20A) ble skjært ut fra gelen og rensset.

3.4.2 Konstruksjon av pMD103 og pMD106

Som et ledd i prosessen for å inaktivere *arsH* ved å sette inn *tetA* og *tetR*, ble *arsHA* og *arsHB* klonet inn i vektoren pHE179. Ved å klonere *arsH*-fragmentene inn i pHE179 ble plasmidene pMD103 (inneholder *arsHA*) og pMD106 (inneholder *arsHB*) dannet.

pMD103

arsHA og pHE179 ble kuttet med restriksjonsenzymene SbfI og BglII, ligert og overført til kompetente *E. coli* DH5 α -celler ved kjemisk transformering. Det ble selektert for transformerte celler ved å dyrke dem på LA med ampicillin. Plasmid ble isolert og kontrollert ved BsaAI- og Sall-testkutting (figur 3.21). Forventede fragmentstørrelser fra disse testkuttene er henholdsvis 4,3 kb + 1,7 kb og 4,1 kb + 1,9 kb.



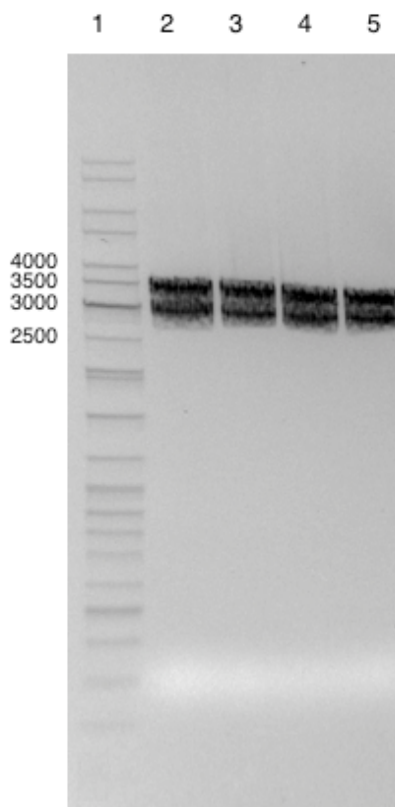
Figur 3.21, Verifisering av pMD103. Brønn 2-4: BsaAI-kuttet pMD103 (forv. 4,3 kb + 1,7 kb). Brønn 5-7: Sall-kuttet pMD103 (forv. 4,1 kb + 1,9 kb). Brønn 2-4 og 5-6 inneholder fragmenter fra de samme plasmidprøvene.

Fragmenter av forventet størrelse ble observert i brønn 3 og 6 (figur 3.21), som inneholder fragmenter fra samme plasmidprøve. Dette plasmidet ble sekvensert med primerne M13rev og Gen2R (vedlegg B). Sekvenseringen bekreftet at insertet *arsHA* er innsatt i vektor på ønsket måte. Tilstedeværelse av ukjente baser ved øverste del av

arsH-sekvensen fra *arsHA* ble observert fra sekvenseringen, men da målet med konstruktet likevel er å slå ut *arsH*, vil eventuelle mutasjoner i denne delen ikke være av betydning. Sekvenssammenstilling er vist i vedlegg D. Det nye plasmidet fikk navnet pMD103.

pMD106

På tilsvarende måte ble *arsHB* klonet inn i pHE179. NcoI-Acc56I-kuttet *arsHB* og pHE179 ble ligert sammen og transformert inn i kompetente *E. coli* DH5 α -celler. Transformerte celler ble selektert for ved ampicillin-seleksjon, og plasmid ble isolert og kontrollert ved PstI-testkutting (figur 3.22). Forventede fragmentstørrelser fra dette testkuttet er 3,3 kb og 2,9 kb.

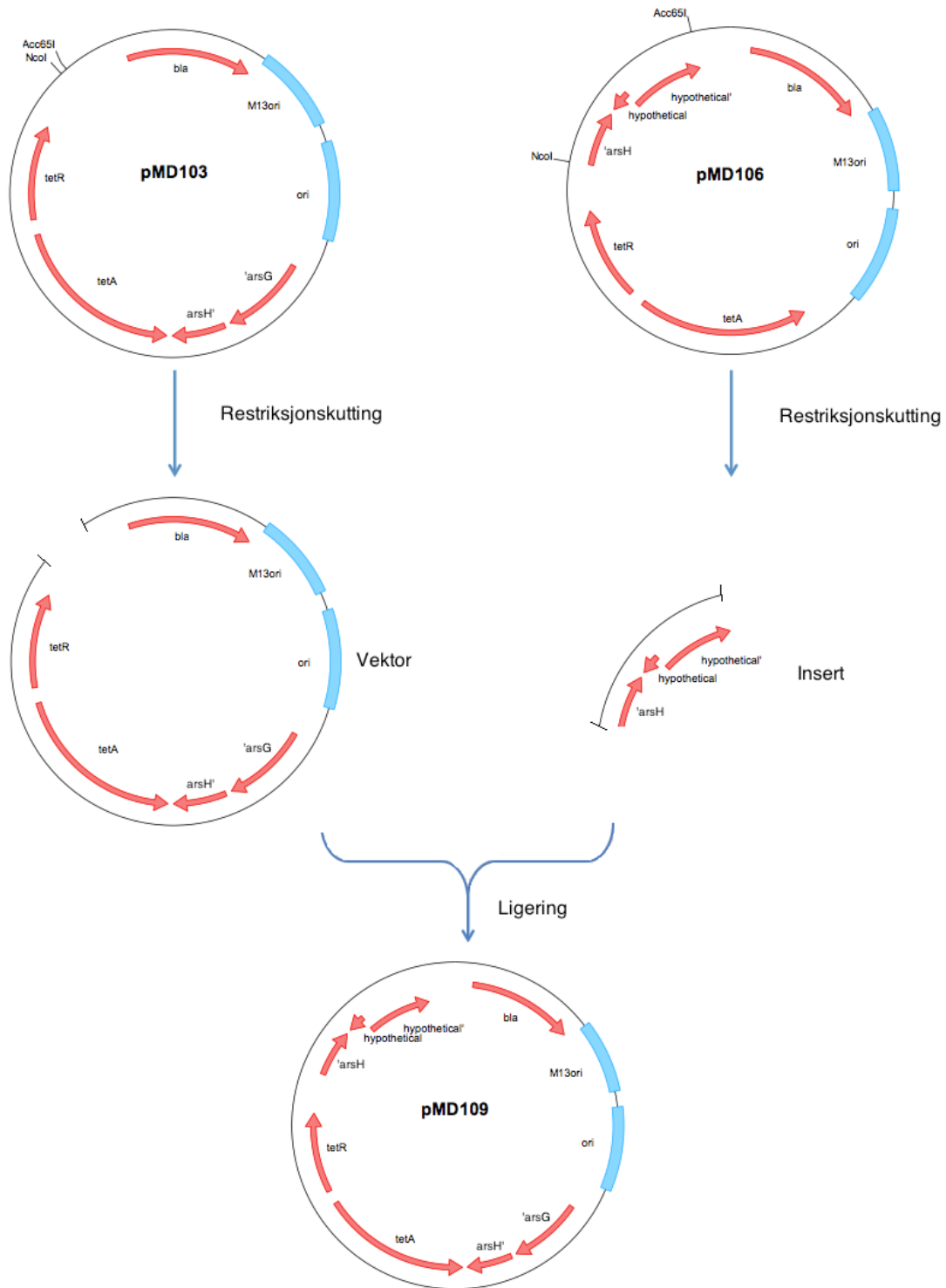


Figur 3.22, Verifisering av pMD106. Brønn 2-5: PstI-kuttet pMD106 (forv. 3,3 kb + 2,9 kb).

Fragmenter av forventet størrelse ble observert i samtlige brønner (figur 3.22). Disse plasmidene ble sekvensert ved bruk av primerne Gen3RB og Gen3FB (vedlegg B), sekvenssammenstilling (vedlegg D) bekreftet at plasmidet inneholder *arsHB*. Det nye plasmidet fikk navnet pMD106.

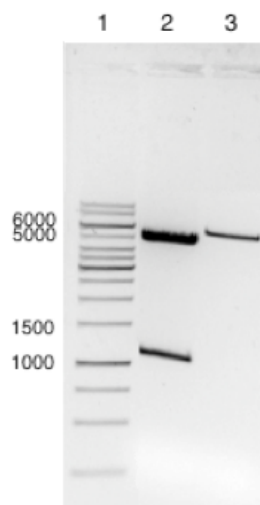
3.4.3 Konstruksjon av pMD109

Ved å klonere deler av pMD106 inn i pMD103, ble plasmidet pMD109 konstruert. pMD109 inneholder inaktivert *arsH*, hvor *arsHA* og *arsHB* ligger på hver sin side av *tetA* og *tetR*. En oversikt over pMD109-konstruksjonen er vist i figur 3.23, og nærmere beskrevet under.



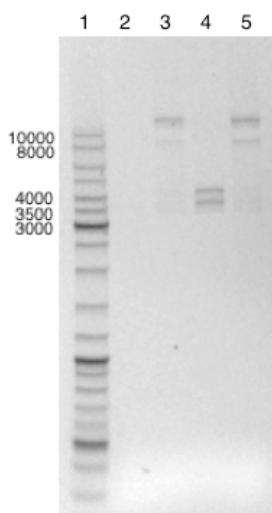
Figur 3.23, Konstruksjon av pMD109 ved ligering av kutteprodukt fra pMD103 (vektor) og pMD106 (insert). Enzymseter for benyttede restriksjonsenzymmer er markert i pMD103 og pMD106.

Ved konstruksjon av pMD109, ble pMD103 og pMD106 kuttet med NcoI og Acc65I. De kuttete plasmidene er vist i figur 3.24.



Figur 3.24, Fragment-separasjon for dannelse av pMD109. Brønn 2: NcoI-Acc65I-kuttet pMD106 (forv. 5,1 kb + 1,1 kb). Brønn 3: NcoI-Acc65I-kuttet pMD103 (forv. 6,0 kb + 0,04 kb).

Fragmentet på 1,1 kb fra kuttet pMD106 (figur 3.24, brønn 2) ble benyttet som insert (inneholder *arsHB*), mens fragmentet på 6,0 kb fra kuttet pMD103 (inneholder *arsHA*, *tetA* og *tetR*) ble brukt som vektor. Disse fragmentene ble skjært ut fra gelen og rensset. Vektor og insert ble ligert og overført til kompetente *E. coli* DH5 α -celler ved kjemisk transformering. Det ble selektert for transformerte celler, og plasmid fra disse cellene ble isolert. Plasmidene ble kontrollert ved PstI-testkutting, hvor forventede fragmentstørrelser er 3,9 kb og 3,3 kb. Testkuttet er vist i figur 3.25.

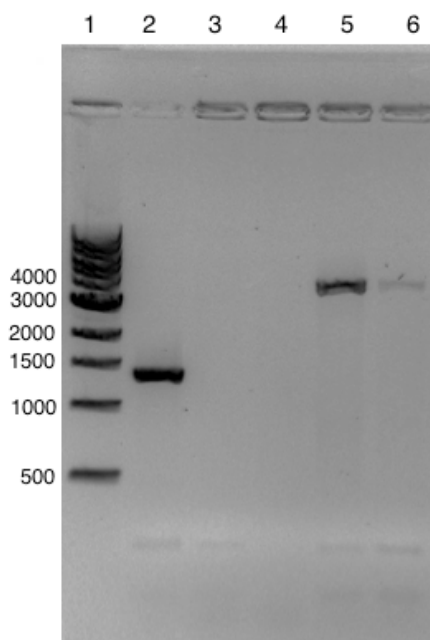


Figur 3.25, Verifisering av pMD109. Brønn 2-5: PstI-kuttet pMD109 (forv. 3,9 kb + 3,3 kb).

Fragmenter av forventet størrelse ble observert (brønn 4, figur 3.25). Det nye plasmidet fikk navnet pMD109.

3.4.4 Inaktivering av *arsH* i *A. vinelandii*

Mutanten *A. vinelandii* Δ *arsH* ble laget ved å transformere *A. vinelandii* ATCC 12518 med pMD109 (linearisert med DraIII). Det ble gjort 5 overføringer av de transformerte cellene på Burk-agar med tetrasyklin, for å sørge for at alle kromosomkopiene i cellene er rekombinert og inneholder utslått *arsH*. For å kontrollere at de nye mutantene ikke inneholder villtype-gen, ble kromosomalt DNA fra mutantene kontrollert ved PCR, som vist i figur 3.26. Primerne Gen3FA og Gen3RA ble benyttet ved denne kontrollen (vedlegg B). Begge disse primerne binder til villtype-sekvensen, men på hver sin side av de innsatte tetrasyklinresistens-genene. Bruk av disse primerne gir forventet PCR-produkt på 3,4 kb for *A. vinelandii* Δ *arsH* og 1,3 kb for villtype.

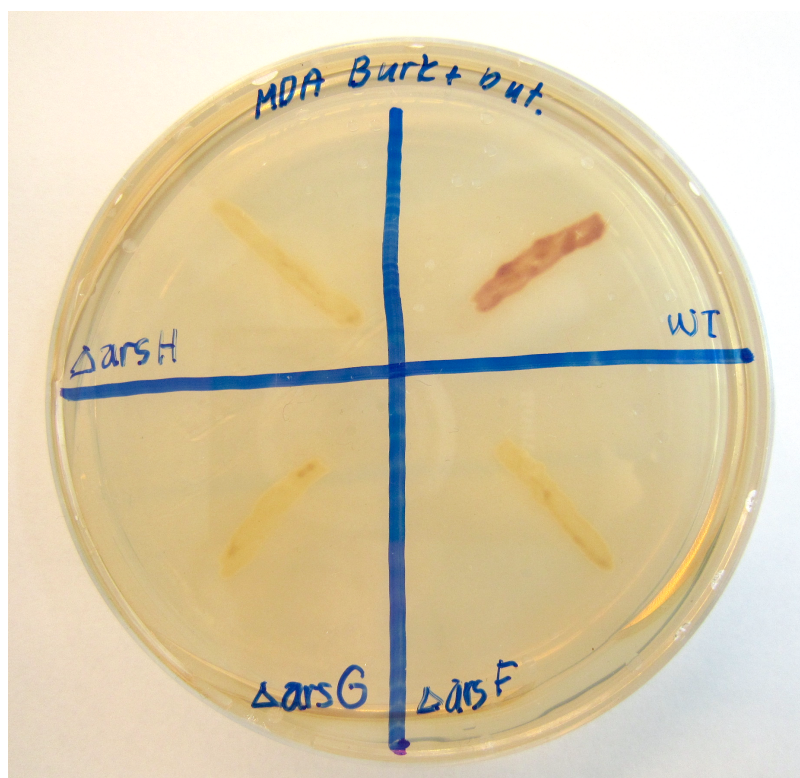


Figur 3.26, PCR-kontroll av *A. vinelandii* Δ *arsH*. Benyttede primere: Gen3FA + Gen3RA. Brønn 2 DNA fra villtype (forv 1,3 kb). Brønn 3-6: DNA fra *A. vinelandii* Δ *arsH* (forv. 3,4 kb).

PCR-kontrollen viste at mutantene inneholder utslått *arsH* (brønn 5 og 6, figur 3.26), i motsetning til villtype-stammen (brønn 2, figur 3.26). Muterte stammer som viste forventet fragmentstørrelse fra PCR-kontroll fikk navnet *A. vinelandii* Δ *arsH*.

3.5 Alkylresorcinol-produksjon hos *A. vinelandii* Δ *arsF*-, *A. vinelandii* Δ *arsG*- og *A. vinelandii* Δ *arsH*-cyster

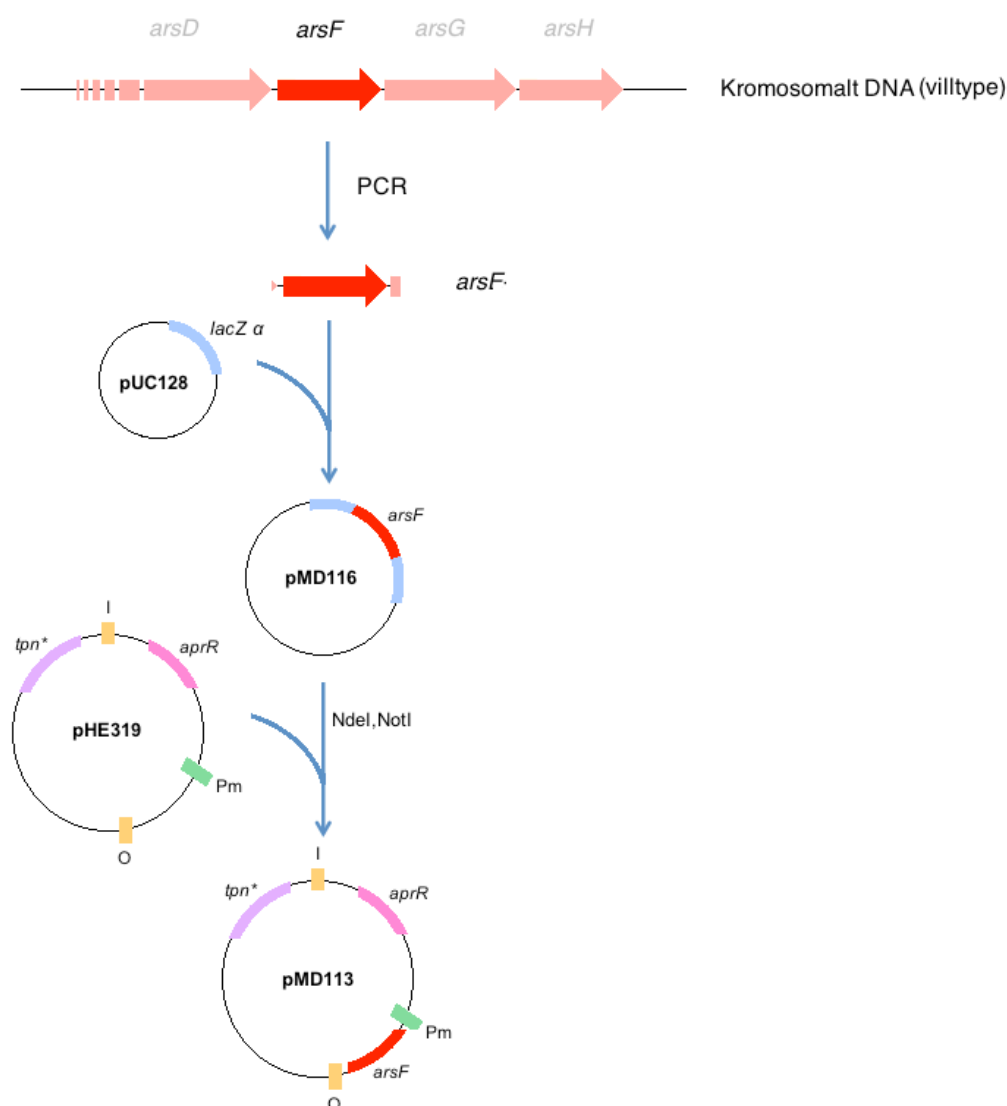
For å kartlegge effekten av de utslåtte genene, ble cystedannelse av mutantene samt villtypen induisert ved å dyrke cellene i 5 døgn på Burk-agar med n-butanol som eneste karbonkilde. Tilstedeværelse av alkylresorcinol ble vist ved å tilsette Fast Blue-løsning til cystene. Villtype-cystene ble farget røde i denne reaksjonen, som indikerer tilstedeværelse av alkylresorcinol. Mutantene forble derimot hvite, som betyr at alkylresorcinol ikke kunne detekteres i disse cystene. De fargede cystene er vist i figur 3.27.



Figur 3.27, Fast Blue-farging av alkylresorcinol hos cysteinduserte *A. vinelandii* ATCC 12518 (WT), *A. vinelandii* Δ *arsF* (Δ *arsF*), *A. vinelandii* Δ *arsG* (Δ *arsG*) og *A. vinelandii* Δ *arsH* (Δ *arsH*). Rødfarge indikerer tilstedeværelse av alkylresorcinol.

3.6 Kloning av *arsF*

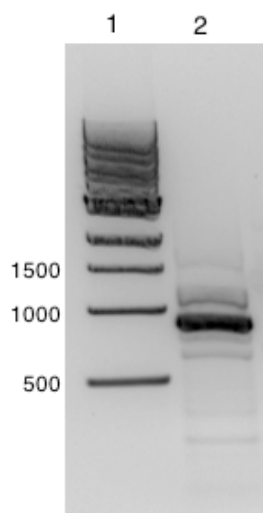
For å verifisere at utslått *arsF* er årsaken til den observerte endringen i alkylresorcinol-produksjon i *A. vinelandii* Δ *arsF*, må stammen komplementeres ved å sette villtype-genet tilbake i mutanten. I denne forbindelse ble det konstruert en transposonvektor med villtype-*arsF* under kontroll av en Pm-promotor. *arsF* ble isolert fra kromosomalt villtype-DNA ved PCR (3.6.1). Plasmidet pMD116 ble konstruert ved å klonere *arsF*-fragmentet inn i vektoren pUC128 (3.6.2). Videre ble *arsF*-fragmentet kuttet ut fra pMD116 og overført til mini-Tn5-transposonvektoren pHE319, som ga opphav til transposonvektoren pMD113 (2.6.3). Ved konjugering og transposonoverføring kan *arsF* fra pMD113 senere integreres i genomet til *A. vinelandii* Δ *arsF*, og dermed komplementere stammen. Grunnet tidsmangel ble dette arbeidet ikke ferdigstilt. En oversikt over prosessen er vist i figur 3.28.



Figur 3.28, Konstruksjon av transposonvektoren pMD113, som inneholder villtype-*arsF* (vist i rødt). pMD113 kan senere benyttes til komplementering av *A. vinelandii* Δ *arsF*.

3.6.1 Isolering av *arsF*

Ved bruk av PCR ble *arsF* isolert og amplifisert fra *A. vinelandii* ATCC 12518, hvor primerne Gen1NdeI_F og Gen1NotI_R ble benyttet (vedlegg B). PCR-produkt ble kontrollert ved gelelektroforese, med forventet størrelse på 0,9 kb (figur 3.29).

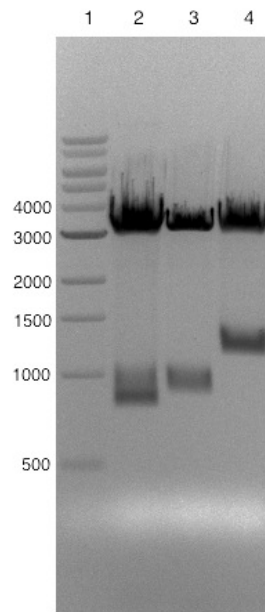


Figur 3.29, PCR-amplifikasjon av *arsF* (forv. 0,9 kb).

Fragment av forventet størrelse ble observert (figur 3.29). Fragmentet ble skjært ut fra gelen og renset.

3.6.2 Konstruksjon av pMD116

For å senere kunne konstruere en transposonvektor som kan overføre *arsF* til *A. vinelandii* Δ *arsF*, ble plasmidet pMD116 dannet. PCR-fragmentet med *arsF* ble ligert inn i EcoRV-kuttet pUC128, og overført til kompetente *E. coli* DH5 α -celler ved kjemisk transformering. De transformerte cellene ble dyrket på LA med ampicillin, XGal og IPTG, og selektert for ved blå/hvit-screening. Tre hvite stammer ble dyrket opp, og plasmid ble isolert og kontrollert ved NdeI-NotI-testkutting (figur 3.30). Forventede fragmentstørrelser fra dette kuttet er 3,2 kb og 0,9 kb.

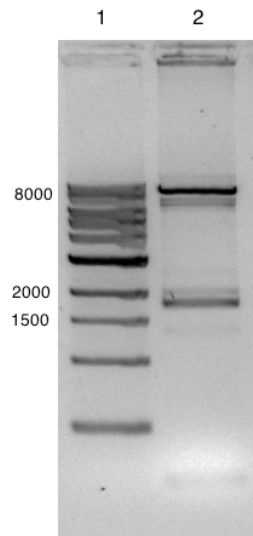


Figur 3.30, Verifisering av pMD116. Brønn 2-4: NdeI-NotI-kuttet pMD116 (forv. 3,2+ 0,9).

Fragmenter av forventet størrelse ble observert (brønn 2 og 3, figur 3.30). Disse plasmidene ble sekvensert med primerne pGEM/plitseqF og M13rev (vedlegg B). Sekvenseringen bekreftet at *arsF* er innsatt i vektor på ønsket måte, og at *arsF*-fragmentet ikke er mutert (vedlegg D). Det nye plasmidet fikk navnet pMD116.

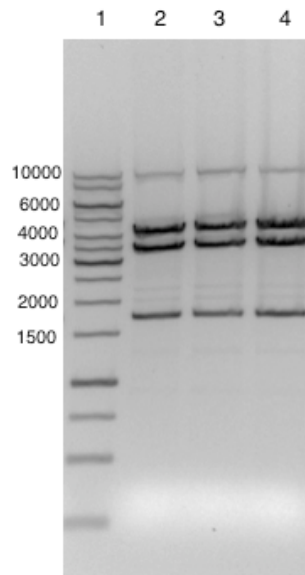
3.6.3 Konstruksjon av transposonvektoren pMD113

For å kunne komplementere *A. vinelandii*Δ*arsF* med villtype-*arsF*, ble det dannet en transposonvektor hvor *arsF* ble satt under kontroll av en Pm-promotor. Konstruksjon av transposonvektor startet med å kutte pMD116 og pHE319 med restriksjonsenzymene NdeI og NotI. Kutteproduktene ble separert ved gelelektroforese, som vist i figur 3.30 (kuttet pMD116) og figur 3.31 (kuttet pHE319).



Figur 3.31, NdeI-NotI-kuttet pHE319 (forv. 8,6 kb + 1,9 kb).

Fragmentene på 0,9 kb fra kuttet pMD116 (inneholder *arsF*) og på 8,6 kb fra kuttet pHE319 ble skjært ut fra gelen og rensset. Vektor og insert ble ligert, og transformert til kompetente *E. coli* S17.1 λ pir-celler. De transformerte *E. coli*-cellene ble dyrket på LA med ampicillin, hvor det ble selektert for transformerte celler. Plasmider fra disse koloniene ble isolert og kontrollert ved testkutting, ved bruk av restriksjonsenzymet AhdI. Testkuttet er vist i figur 3.32, med forventede fragment på 4,4 kb, 3,0 kb og 1,9 kb.

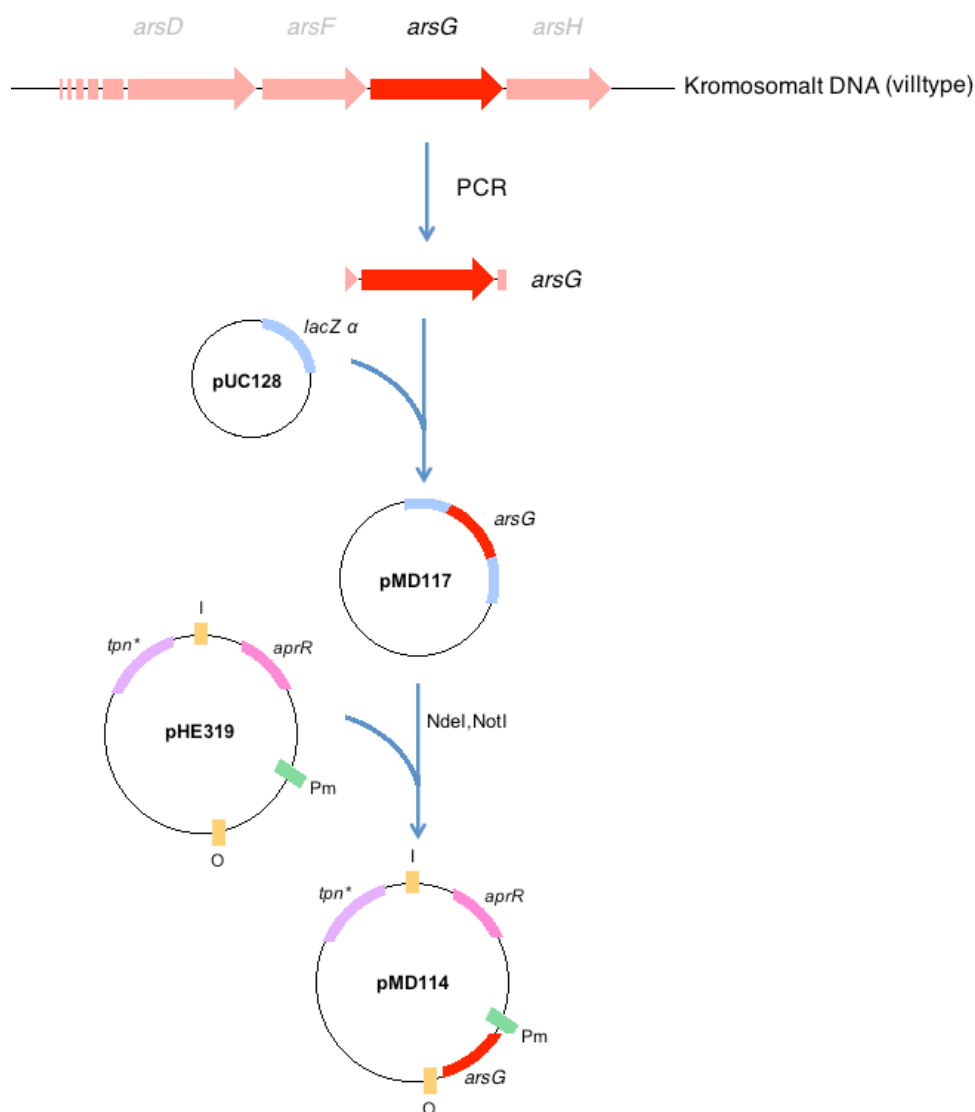


Figur 3.32, Verifisering av pMD113. Brønn 2-4: AhdI-kuttet pMD113 (forv. 4,4 kb, 3,0 kb og 1,9kb).

Fragmenter av forventet størrelse ble observert for samtlige plasmider som ble testkuttet (figur 3.32), plasmidet fikk navnet pMD113.

3.7 Kloning av *arsG*

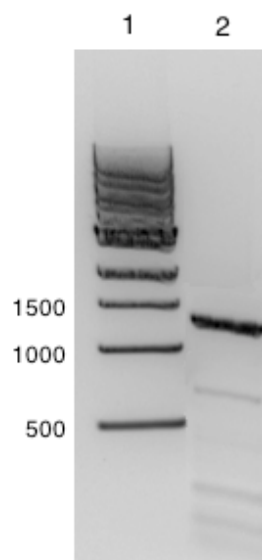
For å senere kunne komplementere *A. vinelandii* Δ *arsG* og verifisere at utslått *arsG* er årsaken til den observerte endringen i alkylresorcinol-produksjon, ble det konstruert en transposonvektor med villtype-*arsG* under kontroll av en Pm-promotor. Dette ble gjort på tilsvarende måte som for *arsF* (3.6). *arsG* ble isolert fra kromosomt villtype-DNA ved PCR (3.7.1). PCR-fragmentet ble videre klonet inn i vektoren pUC128, som ga opphav til plasmidet pMD117 (3.7.2). Transposonvektoren pMD114 ble konstruert ved å overføre *arsG* fra pMD117 til mini-Tn5-transposonvektoren pHE319 (2.7.3). Ved konjugering og transposonoverføring kan *arsG* fra pMD117 videre integreres i genomet til *A. vinelandii* Δ *arsG*. Grunnet tidsmangel ble dette arbeidet ikke ferdigstilt. En oversikt over prosessen er vist i figur 3.33.



Figur 3.33, Konstruksjon av transposonvektoren pMD114, som inneholder villtype-*arsG* (vist i rødt). pMD114 kan senere benyttes til komplementering av *A. vinelandii* Δ *arsG*.

3.7.1 Isolering av *arsG*

Ved bruk av PCR ble *arsG* isolert og amplifisert fra *A. vinelandii* ATCC 12518, hvor primerne Gen2NdeI-F og Gen2NotI-R ble benyttet (vedlegg B). PCR-produktet ble kontrollert ved gelelektroforese, med forventet størrelse på 1,3 kb (figur 3.34).

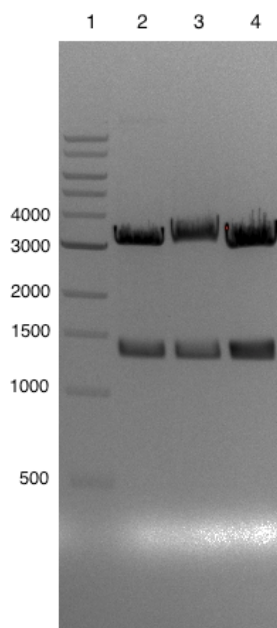


Figur 3.34, PCR-amplifikasjon av *arsG* (forv. 1,3 kb).

PCR-produkt med forventet størrelse ble observert (figur 2.30). Fragmentet ble skjært ut fra gelen og renset.

3.7.2 Konstruksjon av pMD117

Plasmidet pMD117 ble konstruert som et første ledd for å videre kunne danne en transposonvektor som kan komplementere *A. vinelandii*Δ*arsG* med villtype-*arsG*. PCR-fragmentet med *arsG* ble ligert inn i EcoRV-kuttet pUC128, og overført til kompetente *E. coli* DH5α-celler ved kjemisk transformering. Transformerte celler med innsatt PCR-fragment ble selektert for ved blå/hvit-screening. Tre hvite stammer ble dyrket opp, og plasmid ble isolert og kontrollert ved NdeI-NotI-testkutting (figur 3.35). Forventede fragmentstørrelser fra dette kuttet er 3,2 kb og 1,3 kb.

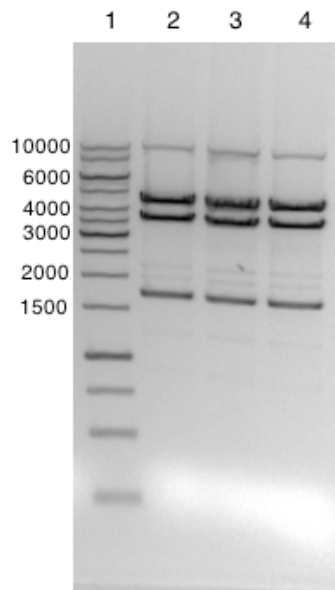


Figur 3.35, Verifisering av pMD117. Brønn 2-4: NdeI-NotI-kuttet pMD117 (forv. 3,2 kb + 1,3 kb).

Fragmenter av forventet størrelse ble observert i hos samtlige av de testkuttete plasmidene (figur 3.35). Plasmidene ble sekvensert med primerne pGEM/plitseqf og M13rev (vedlegg B). Sekvenseringen bekreftet at *arsG* er innsatt i vektor på ønsket måte, og fragmentet ikke inneholder mutasjoner (vedlegg D). Det nye plasmidet fikk navnet pMD117.

3.7.3 Konstruksjon av transposonvektoren pMD114

En transposonvektor med *arsG* under kontroll av en Pm-promotor ble konstruert, som senere kan komplementere *A. vinelandii*Δ*arsG* med villtype-*arsG*. Et 1,3 kb NdeI-NotI-fragment fra pMD117 (inneholder *arsG*, figur 3.35) ble ligert med et 8,6 kb NdeI-NotI-fragment fra pHE319 (figur 3.31). Konstruktet ble transformert til kompetente *E. coli* S17.1 λpir-celler, og dyrket på LA med ampicillin. Plasmider fra oppvokste kolonier ble isolert og kontrollert ved testkutting, ved bruk av restriksjonsenzymet AhdI. Testkuttet er vist i figur 3.36, med forventede fragment på 4,7 kb, 3,3 kb og 1,9 kb.

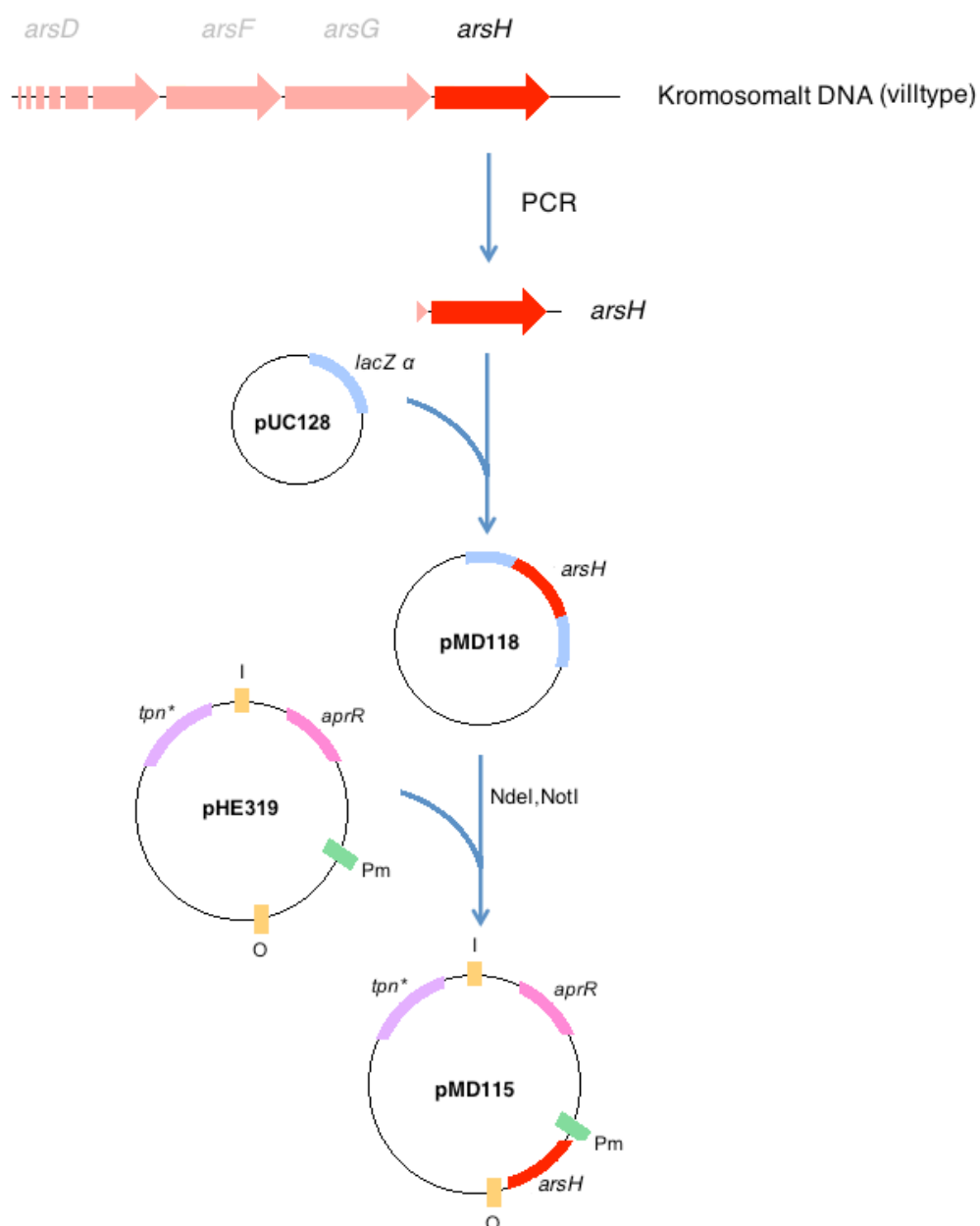


Figur 3.36, Verifisering av pMD114. Brønn 2-4: AhdI-kuttet pMD114 (forv 4,7 kb, 3,3 kb og 1,9 kb).

Fragmenter av forventet størrelse ble observert for samtlige plasmider som ble testkuttet (figur 3.36), plasmidet fikk navnet pMD114.

3.8 Kloning av *arsH*

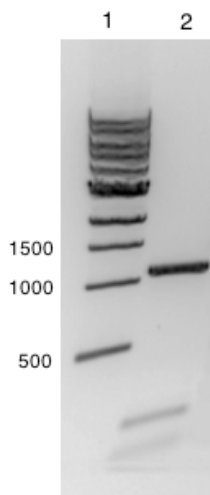
For å senere kunne komplementere *A. vinelandii* Δ *arsH* og verifisere at utslått *arsH* er årsaken til den observerte fenotype-endringen, ble det konstruert en transposonvektor med villtype-*arsH* under kontroll av en Pm-promotor. Dette ble gjort på tilsvarende måte som for *arsF* (3.6) og *arsG* (3.7). *arsH* ble isolert fra kromosomalt villtype-DNA ved PCR (3.8.1). Plasmidet pMD118 ble konstruert ved å klonere *arsH*-fragmentet inn i vektoren pUC128 (3.8.2). *arsH* ble videre overført fra pMD118 til pHE319, dette ga opphav til transposonvektoren pMD115 (2.8.3) som senere kan benyttes til komplementering av *A. vinelandii* Δ *arsH*. En oversikt over prosessen er vist i figur 3.37.



Figur 3.37, Konstruksjon av transposonvektoren pMD115, som inneholder villtype-*arsH* (vist i rødt). pMD115 kan senere benyttes til komplementering av *A. vinelandii* Δ *arsH*.

3.8.1 Isolering av *arsH*

Villtype-genet *arsH* ble isolert og amplifisert fra *A. vinelandii* ATCC 12518 ved PCR, hvor primerne Gen3NdeIF og Gen3NotIR ble benyttet (vedlegg B). PCR-produktet ble kontrollert ved gelelektroforese, som vist i figur 3.38. Forventet fragmentstørrelse er 1,1 kb.

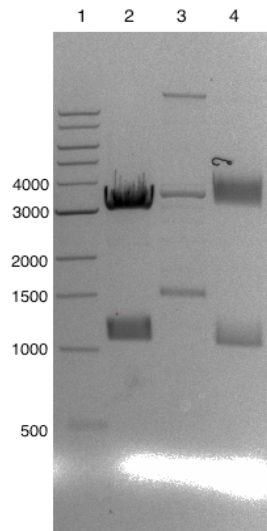


Figur 3.38, PCR-amplifikasjon av *arsH* (forv. 1,1 kb).

Fragment av forventet størrelse ble observert (figur 3.38). Fragmentet ble skjært ut fra gelen og rensset.

3.8.2 Konstruksjon av pMD118

For å senere kunne konstruere en transposonvektor som kan overføre *arsH* til *A. vinelandii*Δ*arsH*, ble plasmidet pMD118 dannet. PCR-fragmentet med *arsH* ble klonet inn i EcoRV-kuttet pUC128, og overført til kompetente *E. coli* DH5α-celler ved kjemisk transformering. Det ble selektert for transformerte celler med innsatt PCR-fragment ved blå/hvit-screening. Tre hvite stammer ble dyrket opp, og plasmid ble isolert og kontrollert ved NdeI-NotI-testkutting. Forventet fragmentstørrelse er 3,2 kb og 1,1 kb, testkuttet er vist i figur 3.39.

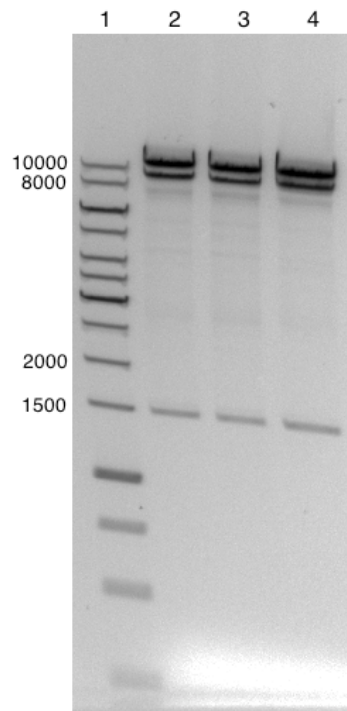


Figur 3.39, Verifisering av pMD118. Brønn 2-4: NdeI-NotI-kuttet pMD118 (forv. 3,2 + 1,1 kb).

Fragmenter av forventet størrelse ble observert (brønn 2 og 4, figur 3.39). Disse plasmidene ble sekvensert med primerne pGEM/plitseqf og M13rev (vedlegg B). Sekvenseringen bekreftet at *arsH* er innsatt i vektor på ønsket måte, og at *arsH*-fragmentet ikke er mutert (vedlegg D). Plasmidet fikk navnet pMD118.

3.8.3 Konstruksjon av transposonvektoren pMD115

En transposonvektor med *arsH* under kontroll av en Pm-promotor ble dannet, som senere kan benyttes for å komplementere *A. vinelandii* Δ *arsH*. Et 1,1 kb NdeI-NotI-fragment fra pMD118 (inneholder *arsH*, figur 3.39) ble ligert med et 8,6 kb NdeI-NotI-fragment fra pHE319 (figur 3.31). Konstruktet ble transformert til kompetente *E. coli* S17.1 λ pir-celler, og dyrket på LA med ampicillin. Plasmider fra koloniene ble isolert og kontrollert ved NcoI-SbfI-testkutting. Forventede fragment fra testkuttet er 8,0 kb og 1,7 kb, kuttet er vist i figur 3.40.



Figur 3.40, Verifisering av pMD115. Brønn 2-4: NcoI-SbfI-kuttet pMD115 (forv. 8,0 kb og 1,7 kb).

Fragmenter av forventet størrelse ble observert for samtlige plasmider som ble testkuttet (figur 3.40), plasmidet fikk navnet pMD115.

4. Diskusjon

4.1 Bioinformatisk undersøkelse av *arsF*, *arsG* og *arsH*

Resultater fra bioinformatisk undersøkelse av *arsF*, *arsG* og *arsH* indikerer at genene er involvert i ABC-eksport over cellemembran. Det ble funnet at *arsF* inneholder konserverte sekvenser som er karakteristiske for den ATP-bindende komponenten i ABC-transportører. *ArsG* inneholder motiv fra proteinfamilier involvert i ABC-transport, både sekvenssammenstilling og hydropatianalyse viser at dette genet antageligvis koder for en permease. De fleste treffene fra sekvenssammenstillingen som ble foretatt for *ArsH* viste andre hypotetiske proteiner, men også her ble det funnet resultater som indikerer at *ArsH* kan være involvert i ABC-transport.

For både *arsF*, *arsG* og *arsH* ble det funnet homologe *lol*-gener. *Lol*-proteiner deltar i ABC-eksport av lipoprotein. Lipoprotein er et kompleks bestående av både proteiner og lipider, og siden alkylresorcinol er et lipid er dette et interessant funn som underbygger at *arsF*, *arsG* og *arsH* kan være involvert i eksport av alkylresorcinol. Proteinet *LolF* hos *D. autotrophicum*, som ble funnet til å være en *ArsH*-homolog, kunne ikke lokaliseres i andre organismer. Proteinet er annotert til å være involvert i lipoprotein-sortering til yttermembranen, men BLAST-søk av *LolF* ga ingen treff for andre proteiner med denne funksjonen. Likevel er det interessant at *lolF* ligger like nedstrøms for *lolD* og *lolE* i kromosomet til *D. autotrophicum*.

Ifølge *Operon prediction*-tjenesten fra MicrobesOnline ligger *arsF* og *arsG* i samme operon, mens *arsH* ikke ser ut til å ligge i dette operonet. *Operon prediction*-algoritmen tar blant annet høyde for om antatt funksjon av genprodukter er i samme kategori og om genene uttrykkes samtidig. Ekspresjonsdata for *arsFGH* er ikke tilgjengelig for algoritmen, da dette materialet ikke er publisert. Genproduktenes konkrete funksjon er også ukjent, noe som gjør resultatet fra *Operon prediction*-tjenesten mindre pålitelig. For å sikkert kunne konkludere om genene tilhører samme operon, må dette vises eksperimentelt.

Ved sekvenssammenstilling ble det funnet homologe proteiner i andre gram negative bakterier. Vertsorganismer og kromosomal plassering av de homologe genene er interessante. Ortologer fra bakteriene *S. lithotrophicus*, *M. xanthus*, *C. apiculatus* og *C. violaceum* er blant de beste resultatene for sekvenssammenstilling av både *ArsF*, *ArsG* og *ArsH*. De respektive genene som ble funnet ved BLAST-søk av *arsF*, *arsG* og *arsH* ligger ved siden av hverandre i disse organismene. Siden samlinger med *arsF*-, *arsG*-, og *arsH*-lignende gener finnes i andre organismer, kan dette være en indikasjon på at proteinene fungerer sammen.

En annen interessant observasjon fra sekvenssammenstillingene er at både *M. xanthus* og *S. aurantiaca* produserer myxosporer, som har lignende egenskaper og struktur som *Azotobacter*-cyster (Ramsey & Dworkin 1968; Reichenbach *et al.* 1969). Produksjon av alkylresorcinol i *M. xanthus* er påvist, hvor polyketid syntasen FtpA er involvert (Hayashi *et al.* 2011). FtpA syntetiserer alkylresorcylliske syrer, som antas å omdannes til alkylresorcinoler ved ikke-enzymatiske prosesser. Gener nær MXAN_6402, MXAN_6403 og MXAN_6404 i *M. xanthus*, som er *arsFGH*-homologer, ble videre undersøkt for å finne mulige sammenhenger. Like oppstrøms for gensamlingen ble det funnet gener som koder for beta-ketoacyl transferase (MXAN_6401), 3-oxoacyl-ACP syntase (*fabF*, MXAN_6400) og 3-oxoacyl-ACP reduktase (MXAN_6399 og MXAN_6398). Samtlige av disse genene er involvert i biosyntese av fettsyrer, på tilsvarende måte som *arsABCD*. Lipidene som syntetiseres av genene oppstrøms for MXAN_6402, MXAN_6403 og MXAN_6404 i *M. xanthus* transporteres muligens av den *arsFGH*-homologe ABC-transporteren. Da alkylresorcinol og alkylpyron også er lipider, styrker dette funnet hypotesen om *arsF*, *arsG* og *arsH* kan være involvert i eksport av alkylresorcinol og alkylpyron.

4.2 Alkylresorcinol-produksjon hos *A. vinelandii*Δ*arsF*-, *A. vinelandii*Δ*arsG*- og *A. vinelandii*Δ*arsH*-cyster

Etter cysteinduksjon i *A. vinelandii* (villtype), *A. vinelandii*Δ*arsF*, *A. vinelandii*Δ*arsG* og *A. vinelandii*Δ*arsH* ble cystenes evne til å uttrykke alkylresorcinol undersøkt. Ved tilsats av Fast Blue-løsning ble villtype-cystene som forventet farget røde, mens mutantene forble hvite. Rødfargen som ble observert hos villtype-stammen bekrefter at disse

cystene uttrykker alkylresorcinol og at forholdene ligger til rette for cysteinduksjon. Resultatet viser at det ikke blir uttrykt alkylresorcinol i mutantene, og underbygger dermed hypotesen om at *arsF*, *arsG* og *arsH* er involvert i eksport av alkylresorcinol.

Ved sekvensering av pMD102 ble det funnet en punktmutasjon i *arsGA*-fragmentet, lokalisert ved den siste basen i *arsH*-sekvensen som inngår i *arsGA*. Mutasjonen er av typen missense, og fører til at en arginin (positiv ladning) blir erstattet med en prolin (nøytral). Dersom denne mutasjonen har blitt overført ved konstruksjon av *A. vinelandii*Δ*arsG*, kan aminosyre-endringen i *ArsH* være årsaken til den observerte endringen i alkylresorcinol-uttrykk for denne mutanten. Dette scenariet er likevel usannsynlig av flere grunner. For det første må rekombinasjon mellom pMD108 og kromosomalt DNA ha skjedd ved ytterste base av den homologe sekvensen. I tillegg må mutasjonen føre til defekt *ArsH*. Ved å komplementere *A. vinelandii*Δ*arsG* med villtype-*arsG*, vil effekten av punkt-mutasjonen kunne verifiseres.

Gimmestad *et al.* (2006) viste at innsetting av *tetA-tetR*-konstruktet som ble benyttet i denne oppgaven ikke fører med seg sterke polare effekter i *A. vinelandii*. Det ble foreslått at dette kan komme av mangel på transkripsjonsterminatorer nedstrøms for *tetA* og *tetR*. Dette betyr at gener som er del av et operon vil transkribes selv om ett av genene er avbrutt av *tetA* og *tetR*. Dermed kan det konkluderes med at både *arsF*, *arsG* og *arsH* er essensielle for uttrykk av alkylresorcinol. Resultatet representerer et nytt funn, som kan ha betydning for fremtidig genomkartlegging og forskning.

4.3 Videre arbeid

For å verifisere effekten av utslått *arsF*, *arsG* og *arsH* bør mutantene som ble konstruert i dette studiet komplementeres med korresponderende villtype-gen. Dersom mutantene gjenoppretter evnen til å uttrykke alkylresorcinol etter komplementering, bekreftes genenes essensielle rolle for uttrykk av alkylresorcinol.

I dette studiet ble transposonvektorene pMD113, pMD114 og pMD115 konstruert, som henholdsvis inneholder *arsF*, *arsG* og *arsH* under kontroll av en Pm-promotor (jf. figur 2.7). Ved videre arbeid kan disse transposonvektorene benyttes for å komplementere mutantene. I tillegg til villtype-gen, inneholder pMD113, pMD114 og pMD115

konjugativt start-sete for overføring (OriT), transposonvektorene kan dermed overføres fra *E. coli* S17.1 λ pir-celler til muterte *A. vinelandii*-celler ved konjugering. Mini-transposonene i pMD113, pMD114 og pMD115 inneholder gen for apramycin-resistens, i tillegg til *arsF*, *arsG* eller *arsH*. Følgelig kan det selekteres for stammer som har fått overført villtype-gen ved å dyrke cellene på medium med apramycin.

Transposonvektorene er avhengig av Π -protein for å kunne replikere, og siden *A. vinelandii* ikke produserer dette proteinet, vil vektorene raskt forsvinne fra mutantene etter konjugering. Da villtypegenene er lagt under kontroll av en Pm-promoter, vil disse aktiveres ved tilstedeværelse av m-toluat. Cystedannelse kan videre induseres i de komplementerte mutantene, før evne til å uttrykke alkylresorcinol i dette stadiet kan undersøkes.

5. Konklusjon

I dette studiet er det funnet sterke indikasjoner på at de hypotetiske genene Avin_29510, Avin_29500 og Avin_29490 er involvert i eksport av alkylresorcinol ved cystedannelse. På bakgrunn av funnene som ble gjort i oppgaven, fikk genene henholdsvis navnene *arsF*, *arsG* og *arsH*.

Ved bruk av ulike bioinformatiske verktøy ble det vist at *arsF* koder for en ATP-bindende komponent i en ABC-transportør. Det ble også vist at *ArsG* har likheter med permease-proteiner i ABC-transportsystem, og at *ArsH* muligens også er del av en ABC-transportør. For samtlige av de undersøkte genene ble det funnet homologe gener involvert i eksport av lipoprotein. *M.xanthus* og *S.aurantiaca*, som ble funnet til å inneholde *arsFGH*-homologer, produserer myxosporer som har lignende egenskaper og struktur som *Azotobacter*-cyster.

Studiet viste at *A. vinelandii*-mutanter med inaktivert *arsF*, *arsG* eller *arsH* ikke var i stand til å uttrykke alkylresorcinol i cystestadiet, og at samtlige gener er essensielle for uttrykk av alkylresorcinol.

For å verifisere effekten av utslått *arsF*, *arsG* og *arsH* bør mutantene som ble konstruert i dette studiet komplementeres med korresponderende villtype-gen. Transposonvektorer med villtypegen under kontroll av en P_m-promotor ble konstruert ved dette studiet, disse kan senere benyttes til å komplementering mutantene.

6. Litteratur

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. (2008) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 215, 403-10.
- Biotium (2012) GelGreen (™) Nucleic Acid Gel Stain. URL <http://www.biotium.com>.
- Birnboim H.C. & Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.
- Butcher B.G. & Helmann J.D. (2006) Identification of *Bacillus subtilis* sigma-dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by *Bacilli*. *Mol Microbiol* 60, 765-82.
- Cambridge U.o. (2012) ABC-structure. URL http://www-medchem.ch.cam.ac.uk/lab_rotations/images/van_veen_2.jpg
- Campos M., Martínez-Salazar J.M., Lloret L., Moreno S., Núñez C., Espín G. & Soberón-Chávez G. (1996) Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (algD) from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 178, 1793-9.
- Chen C.W. & Thomas C.A., Jr. (1980) Recovery of DNA segments from agarose gels. *Anal Biochem* 101, 339-41.
- Dale J.W. & Park S.F. (2010) *Molecular Genetics of Bacteria*. Wiley-Blackwell.
- Davidson A.L., Dassa E., Orelle C. & Chen J. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 317-64, table of contents.
- Dehal P.S., Joachimiak M.P., Price M.N., Bates J.T., Baumohl J.K., Chivian D., Friedland G.D., Huang K.H., Keller K., Novichkov P.S., Dubchak I.L., Alm E.J. & Arkin A.P. (2010) MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. *Nucleic Acids Res* 38, D396-400.
- Doerrler W.T., Reedy M.C. & Raetz C.R. (2001) An *Escherichia coli* mutant defective in lipid export. *J Biol Chem* 276, 11461-4.
- Ebeling W., Hennrich N., Klockow M., Metz H., Orth H.D. & Lang H. (1974) Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur J Biochem* 47, 91-7.
- Ferretti L. & Sgaramella V. (1981) Specific and reversible inhibition of the blunt end joining activity of the T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Res* 9, 3695-705.

- Funa N., Ozawa H., Hirata A. & Horinouchi S. (2006) Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6356-61.
- Gimmestad M., Steigedal M., Ertesvåg H., Moreno S., Christensen B.E., Espin G. & Valla S. (2006) Identification and characterization of an *Azotobacter vinelandii* type I secretion system responsible for export of the AlgE-type mannuronan C-5-epimerases. *J Bacteriol* 188, 5551-60.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-80.
- Hayashi T., Kitamura Y., Funa N., Ohnishi Y. & Horinouchi S. (2011) Fatty acyl-AMP ligase involvement in the production of alkylresorcylic acid by a *Myxococcus xanthus* type III polyketide synthase. *Chembiochem* 12, 2166-76.
- Hitchins V.M. & Sadoff H.L. (1970) Morphogenesis of cysts in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 104, 492-8.
- Inuzuka M. & Helinski D.R. (1978) Requirement of a plasmid-encoded protein for replication *in vitro* of plasmid R6K. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5381-5.
- Irvin R.T., MacAlister T.J. & Costerton J.W. (1981) Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer modification of *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J Bacteriol* 145, 1397-403.
- 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, D109-14.
- Keen N.T., Tamaki S., Kobayashi D. & Trollinger D. (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* 70, 191-7.
- Kobayashi N., Nishino K. & Yamaguchi A. (2001) Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 5639-44.
- Kozubek A. (1995) Interaction of alkylresorcinols with proteins. *Acta Biochim Pol* 42, 241-6.
- Kozubek A. & Tyman J.H. (1999) Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. *Chem Rev* 99, 1-26.
- Lin L.P. & Sadoff H.L. (1968) Encystment and Polymer Production by *Azotobacter vinelandii* in the Presence of β -hydroxybutyrate. *J Bacteriol* 95, 1336-43.
- Lineweaver H., Burk D. & Horner C.K. (1932) THE TEMPERATURE CHARACTERISTIC OF RESPIRATION OF *AZOTOBACTER*. *J Gen Physiol* 15, 497-505.
- Linton K.J. (2007) Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* 22, 122-30.

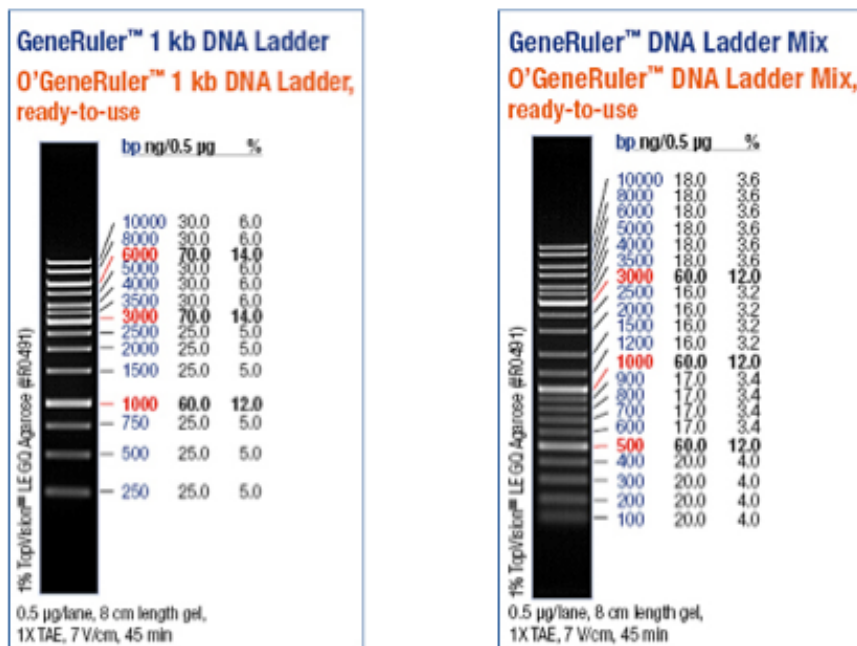
- Mandel M. & Higa A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53, 159-62.
- Martinez-Toledo M.V., Rodelas B., Salmeron V., Pozo C. & Gonzalez-Lopez J. (1996) Production of pantothenic acid and thiamine by *Azotobacter vinelandii* in a chemically-defined medium and a dialysed-soil medium. *Biology and Fertility of Soils* 22, 131-5.
- Matsuyama S., Tajima T. & Tokuda H. (1995) A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *EMBO J* 14, 3365-72.
- Medigan M., Dunlap, Clark (2009) *Biology of Microorganisms*. Pearson, San Francisco.
- Miyanaga A., Funa N., Awakawa T. & Horinouchi S. (2008) Direct transfer of starter substrates from type I fatty acid synthase to type III polyketide synthases in phenolic lipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 871-6.
- Nagpal P., Jafri S., Reddy M.A. & Das H.K. (1989) Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 171, 3133-8.
- New England Biolabs. (2013) BSA. URL <http://www.neb.com/products/B9001-BSA>.
- Page W.J. & von Tigerstrom M. (1979) Optimal conditions for transformation of *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 139, 1058-61.
- Parikka K., Rowland I.R., Welch R.W. & Wahala K. (2006) In vitro antioxidant activity and antigenotoxicity of 5-n-alkylresorcinols. *J Agric Food Chem* 54, 1646-50.
- Promega Corporation (2007) Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System. Madison, USA.
- QIAGEN (2008) QIAquick Spin Handbook. In: *The QIAquick Principle*.
- Ramsey W.S. & Dworkin M. (1968) Microcyst Germination in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 95, 2249-57.
- Reece R.J. (2004) *Analysis of Genes and Genomes*. John Wiley & Sons Ltd.
- Reichenbach H., Voelz H. & Dworkin M. (1969) Structural changes in *Stigmatella aurantiaca* during myxospore induction. *J Bacteriol* 97, 905-11.
- Reusch R.N. & Sadoff H.L. (1983) Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. *Nature* 302, 268-70.
- Ruiz N., Kahne D. & Silhavy T.J. (2006) Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat Rev Microbiol* 4, 57-66.
- 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, 4037-44.

- Sadoff H.L. (1975) Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol Rev* 39, 516-39.
- Sadoff H.L., Shimel B. & Ellis S. (1979) Characterization of *Azotobacter vinelandii* deoxyribonucleic acid and folded chromosomes. *J Bacteriol* 138, 871-7.
- Saier M.H., Jr., Yen M.R., Noto K., Tamang D.G. & Elkan C. (2009) The Transporter Classification Database: recent advances. *Nucleic Acids Res* 37, D274-8.
- Segura D., Vite O., Romero Y., Moreno S., Castaneda M. & Espin G. (2009) Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance. *J Bacteriol* 191, 3142-8.
- Setubal J.C., dos Santos P., Goldman B.S., Ertesvåg H., Espin G., Rubio L.M., Valla S., Almeida N.F., Balasubramanian D., Cromes L., Curatti L., Du Z., Godsy E., Goodner B., Hellner-Burris K., Hernandez J.A., Houmiel K., Imperial J., Kennedy C., Larson T.J., Latreille P., Ligon L.S., Lu J., Maerk M., Miller N.M., Norton S., O'Carroll I.P., Paulsen I., Raulfs E.C., Roemer R., Rosser J., Segura D., Slater S., Stricklin S.L., Studholme D.J., Sun J., Viana C.J., Wallin E., Wang B., Wheeler C., Zhu H., Dean D.R., Dixon R. & Wood D. (2009) Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol* 191, 4534-45.
- Simon R., Prierer U. & Pühler A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat Biotech* 1, 784-91.
- Snustad D.P. & Simmons M.J. (2010) *Principle of Genetics*. John Wiley & Sons, Inc.
- Sperandeo P., Cescutti R., Villa R., Di Benedetto C., Candia D., Dehò G. & Polissi A. (2007) Characterization of *lptA* and *lptB*, two essential genes implicated in lipopolysaccharide transport to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189, 244-53.
- Stevenson L.H. & Socolofsky M.D. (1966) Cyst formation and poly-beta-hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *J Bacteriol* 91, 304-10.
- Tefsen B., Bos M.P., Beckers F., Tommassen J. & de Cock H. (2005) MsbA is not required for phospholipid transport in *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem* 280, 35961-6.
- Thuscik F., Kozubek A. & Mejbaum-Katzenellenbogen W. (1981) Alkylresorcinols in rye (*Secale cereale* L.) grains. VI. Colorimetric micromethod for the determination of alkylresorcinols with the use of diazonium salt, Fast Blue B. . *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 50, 645-51.
- Tokuda H. (2009) Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 465-73.
- Winnick E. (2004) DNA Sequencing Industry Sets Sight on the Future. *The Scientist* 18, 44-48.

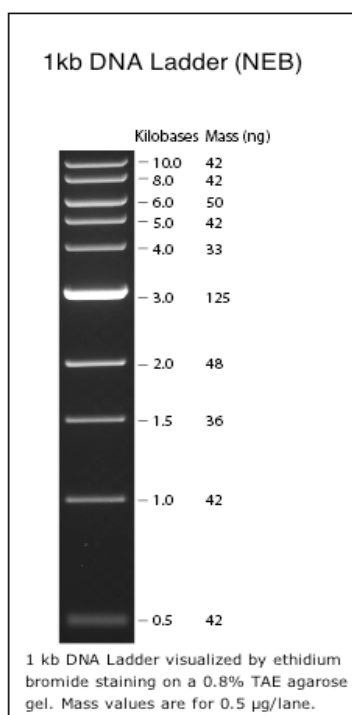
- Winogradsky S. (1938) Sur la morphologie et l'ecologie des *Azotobacter*. *Ann. Inst. Pasteur* 60, 351-400.
- Wishart D.S., Knox C., Guo A.C., Cheng D., Shrivastava S., Tzur D., Gautam B. & Hassanali M. (2008) DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res* 36, D901-6.
- Wu R. & Taylor E. (1971) Nucleotide sequence analysis of DNA. II. Complete nucleotide sequence of the cohesive ends of bacteriophage lambda DNA. *J Mol Biol* 57, 491-511.
- Wu T., McCandlish A.C., Gronenberg L.S., Chng S.S., Silhavy T.J. & Kahne D. (2006) Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11754-9.
- Wyss O., Neumann M.G. & Socolofsky M.D. (1961) Development and germination of the *Azotobacter* cyst. *J Biophys Biochem Cytol* 10, 555-65.
- Xu Q., Bateman A., Finn R.D., Abdubek P., Astakhova T., Axelrod H.L., Bakolitsa C., Carlton D., Chen C., Chiu H.J., Chiu M., Clayton T., Das D., Deller M.C., Duan L., Ellrott K., Ernst D., Farr C.L., Feuerhelm J., Grant J.C., Grzechnik A., Han G.W., Jaroszewski L., Jin K.K., Klock H.E., Knuth M.W., Kozbial P., Krishna S.S., Kumar A., Marciano D., McMullan D., Miller M.D., Morse A.T., Nigoghossian E., Nopakun A., Okach L., Puckett C., Reyes R., Rife C.L., Sefcovic N., Tien H.J., Trame C.B., van den Bedem H., Weekes D., Wooten T., Hodgson K.O., Wooley J., Elsliger M.A., Deacon A.M., Godzik A., Lesley S.A. & Wilson I.A. (2010) Bacterial pleckstrin homology domains: a prokaryotic origin for the PH domain. *J Mol Biol* 396, 31-46.

Vedlegg A: DNA-standarder

Ved separasjon av DNA-fragmenter ved agarose gelelektroforese ble DNA-standarder fra Fermentas og New England Biolabs benyttet. Disse er vist i henholdsvis figur A.1 og A.2.



Figur A.1, Benyttede DNA-standarder fra Fermentas: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder og GeneRuler™ DNA Ladder Mix (<http://www.fermentas.com>)



Figur A.2, Benyttet DNA-standard Fra NEB: 1kb DNA Ladder (www.neb.uk.com)

Vedlegg B: Primere

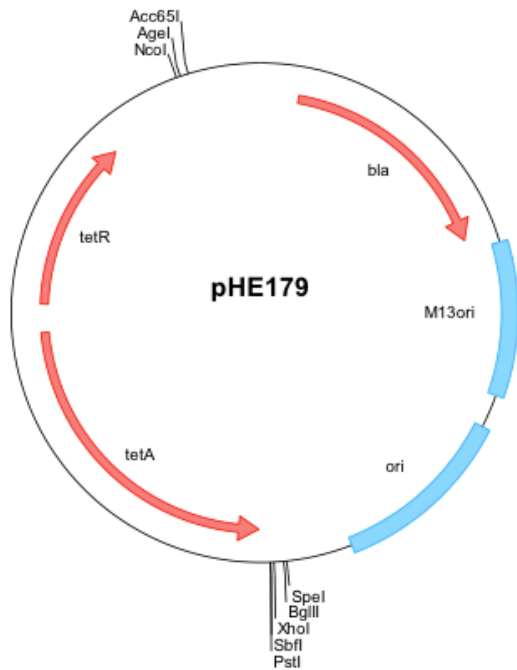
En oversikt over benyttede primere med sekvenser er vist i tabell B.1. Primerne ble levert av Sigma Aldrich.

Tabell B.1, primerne som ble benyttet i oppgaven.

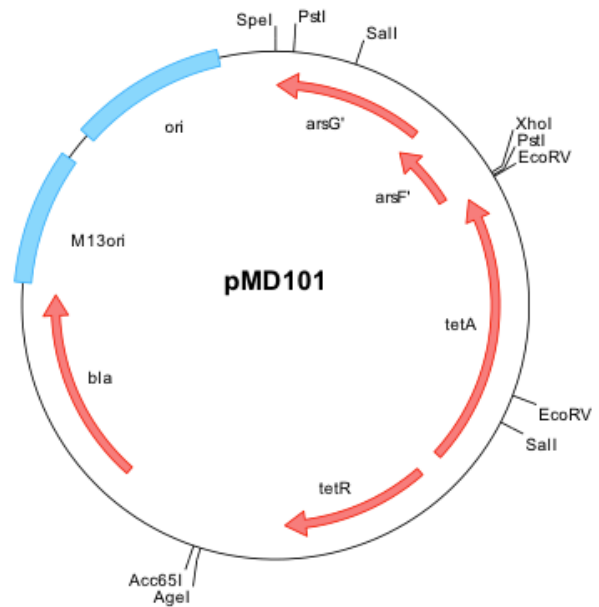
Primer	Sekvens (5'-3')
Gen1FA	TTAGACTAGTGGCGAACTCCAGGTTGACCAG
Gen1RA	GGACCATCGGCTTCGTCTTC
Gen1FB	GCTGGTCATGGGTCGAGAAG
Gen1RB	TAAGCGGTACCCGGCATCAAGTTCCGCCATC
Gen2FA	TACAGATCTCGCTTGAGGATCTGGTAAGG
Gen2RA	GGGCAACATGCAGTTGTTCG
Gen2FB	TAACCATGGACTGCATGTTGCCACCTTG
Gen2RB	TCTGGTACCCAGGCATTGGACGCATCAGG
Gen3FA	GTAGTCCTCGGCGTAGTTGG
Gen3RA	TATGAGATCTGCCAGAACCTCTACGACAC
Gen3FB	AACTGGTACCGTCGAGAGCGTCCAGGTTTC
Gen3RB	TCACCATGGACGTCGCCTCGACCAACTAC
Gen1F	TATTCCATGGTGCTGCTCGCTCGTCACTAC
Gen1NdeIF	AGGAAACCGCATATGAATACCATCACTTCGATAGG
Gen1NotIR	TAATGCGGCCGCGAAGATGTAGGCGGTGAAAC
Gen2R	TAATGAATTCCCGCCCGCTTGAGGATCTG
Gen2NdeIF	AGGGAGCCGCATATGATCACCTGGTTC
Gen2NotIR	TATAGCGGCCGCGGAAAGTCCGTTTCATC
Gen3NdeIF	ATTTGACATATGAACGGACTTTCCCGCATTTCG
Gen3NotIR	TTAAGCGGCCGCAAGTATGGAACGCTCCGTATCG
M13rev	AGCGGATAACAATTTACACACAGGA
TcAR	ACGGCGATCTATGCGGCTTC
pGEM/plitseqF	TGTAAAACGACGGCCAGT

Vedlegg C: plasmidkart

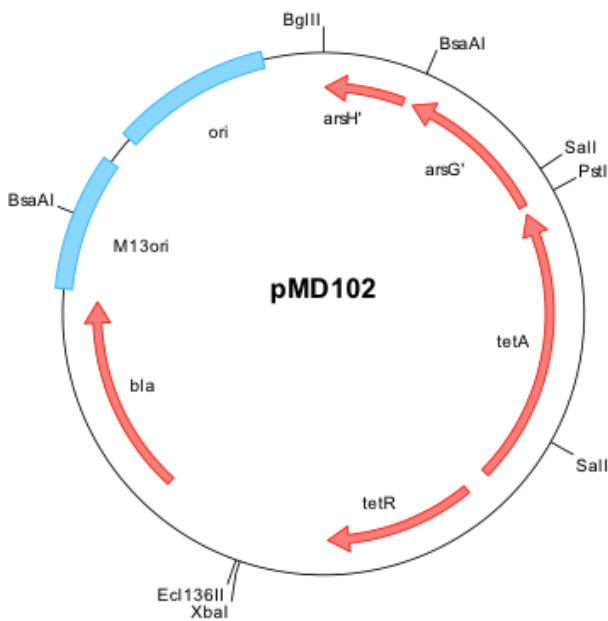
Plasmid og vektorer benyttet i oppgaven.



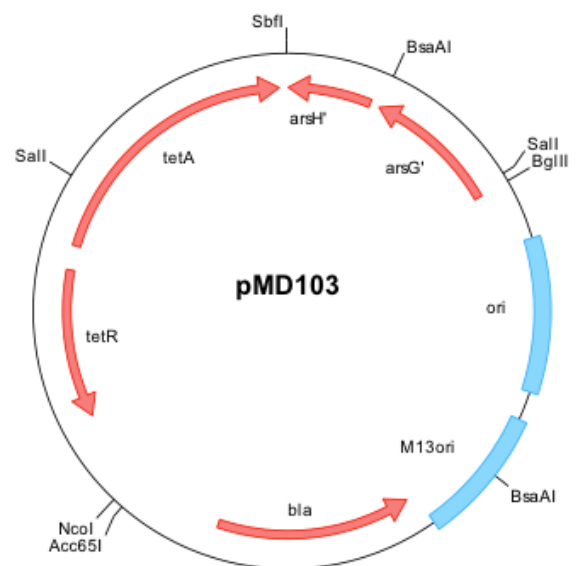
Figur C.1, pHE179 (5116 bp)



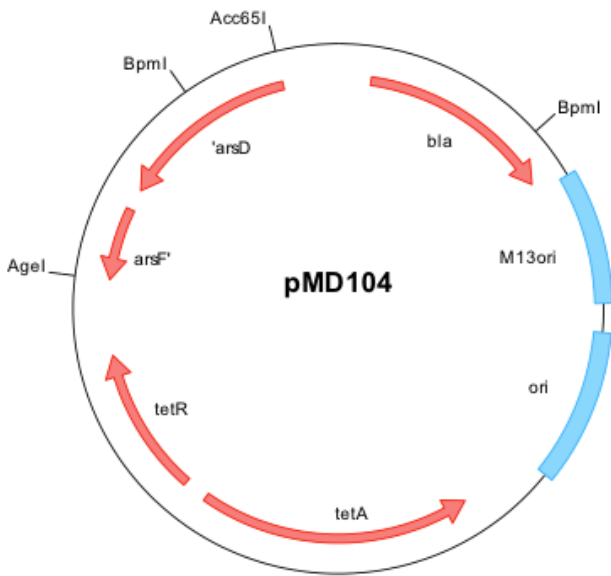
Figur C.2, pMD101 (6057 bp)



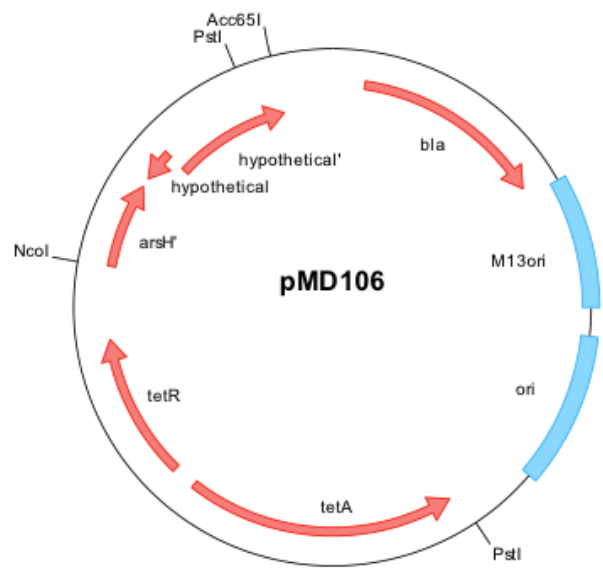
Figur C.3, pMD102 (6122 bp)



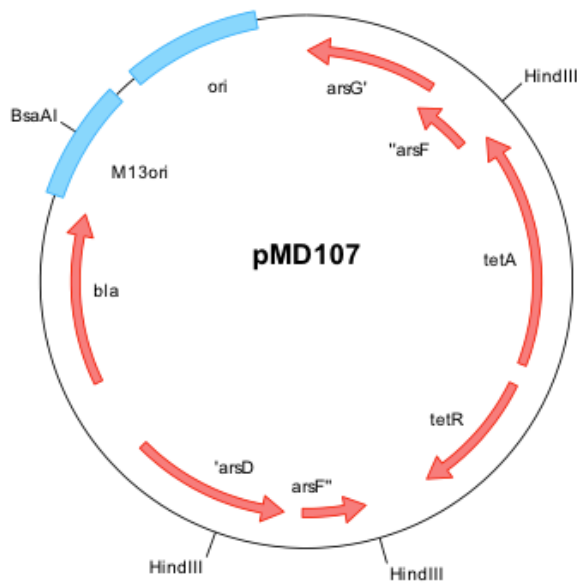
Figur C.4, pMD104 (6084 bp)



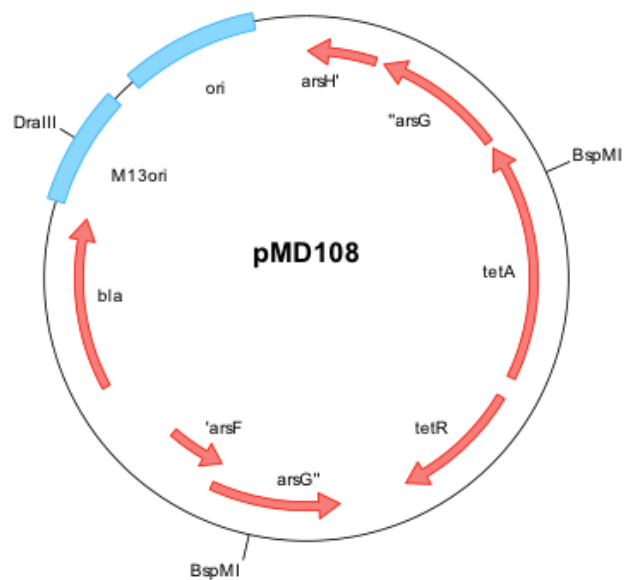
Figur C.5, pMD104 (6298 bp)



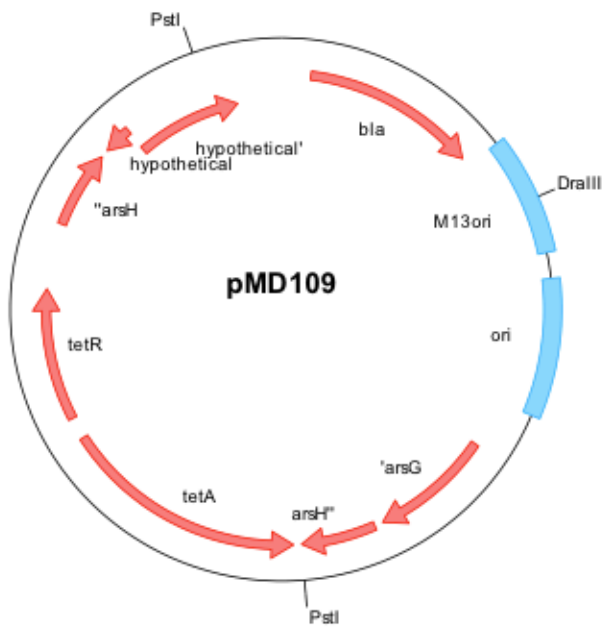
Figur C.6, pMD106 (6214 bp)



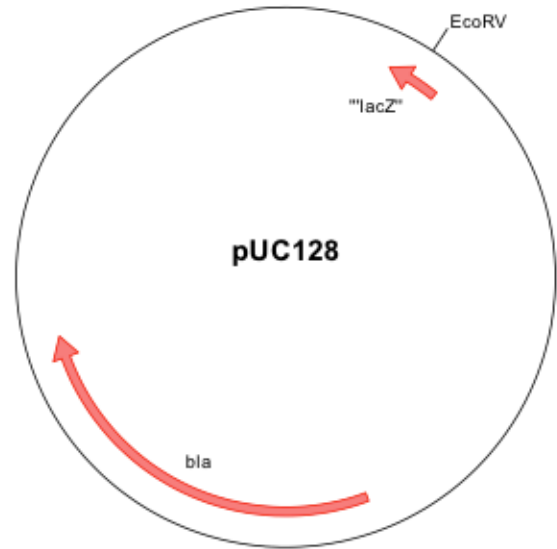
Figur C.7, pMD107 (7239 bp)



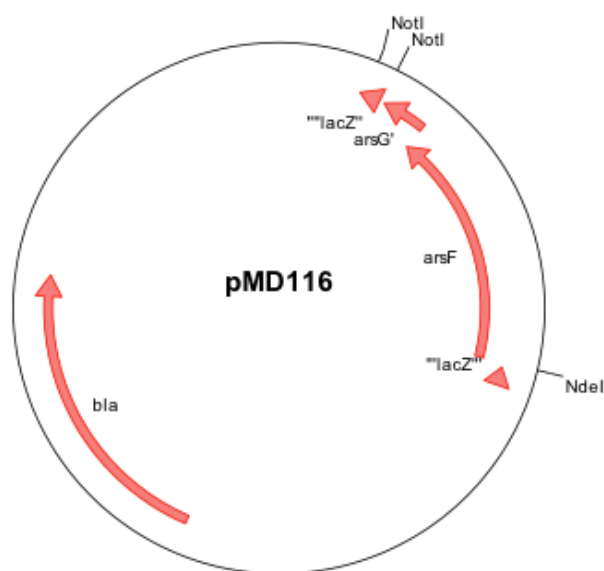
Figur C.8, pMD108 (7108 bp)



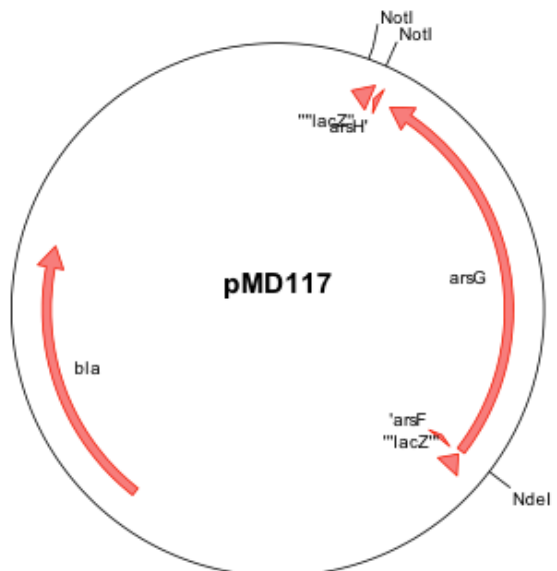
Figur C.9, pMD109 (7182 bp)



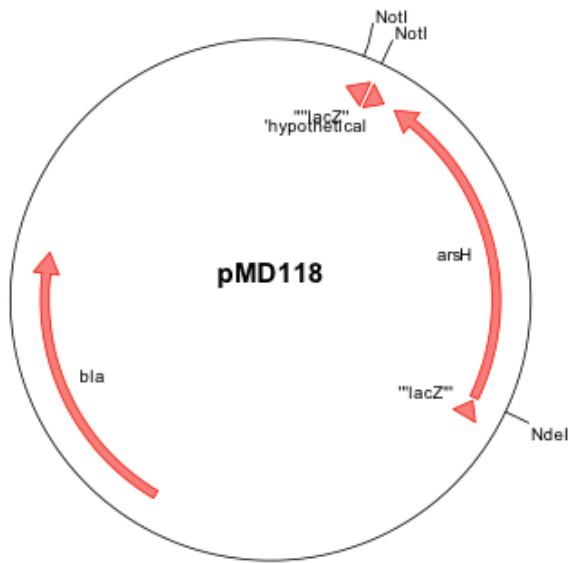
Figur C.10, pUC128 (3234 bp)



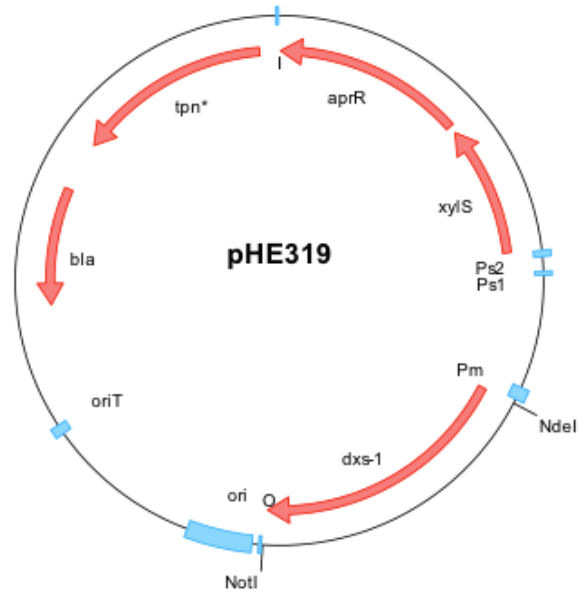
Figur C.11, pMD116 (4139 bp)



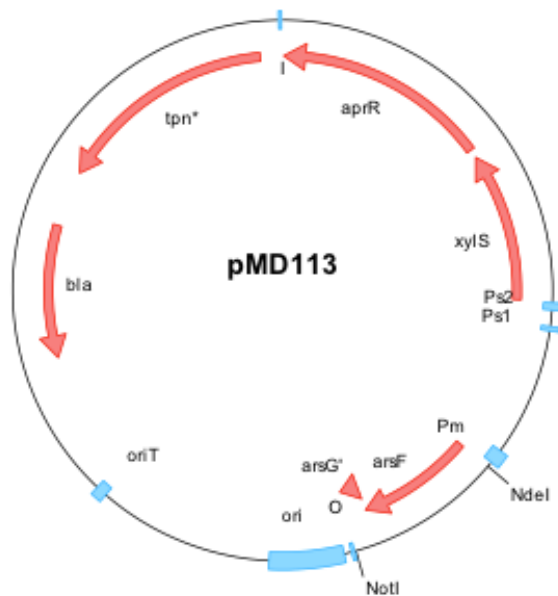
Figur C.12, pMD117 (4565 bp)



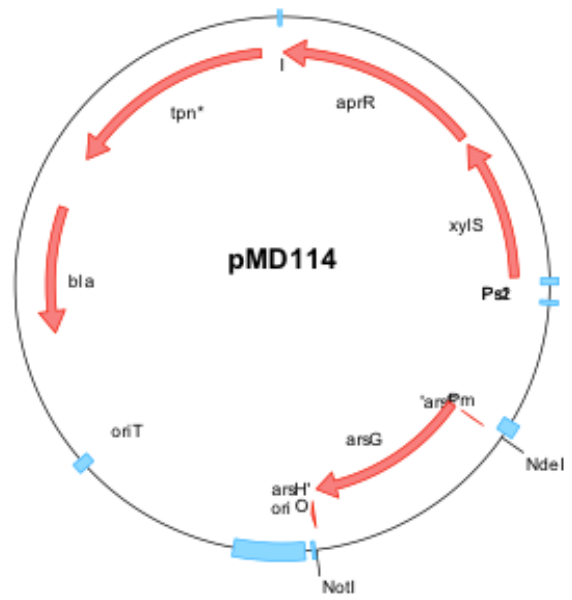
Figur C.13, pMD118 (4337 bp)



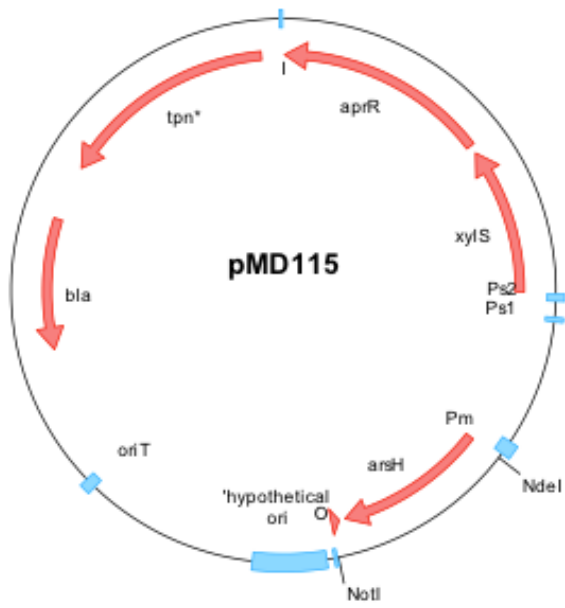
Figur C.14, pHE319 (10480 bp)



Figur C.15, pMD113 (9441 bp)



Figur C.16, pMD114 (9867 bp)



Figur C.17, pMD115 (9642 bp)

Vedlegg D: Sekvenseringsdata

For å kontrollere at PCR-fragmenter ikke inneholder mutasjoner, og at PCR-fragmenter er inkorporert i vektor på ønsket måte, ble plasmidene pMD101, pMD102, pMD103, pMD104, pMD106, pMD116, pMD117 og pMD118 sekvensert. Det ble utført en multipl sekvenssammenstilling av sekvenseringsresultater mot ønsket plasmid. Sekvenserte fragmenter er navngitt etter primeren som ble benyttet ved sekvenseringen. Prikk (.) indikerer riktig base, strek (-) indikerer ingen base og n indikerer ukjent base.

Sekvenssammenstilling for pMD101

arsFA/arsGB ligger mellom base 6 og 982 i pMD101. Sekvensene som er del av *arsF* og *arsG* i plasmidet er henholdsvis markert i blått og gult.

```
pMD101          1  -----ctagtg
M13rev          1  ctgatnacgccagctacttgcgccgcaagtaaatacactca.....
Gen1NotIR       1  -----

pMD101          7  gcgaactccaggttgaccagcatcagcttgtcctccagcgcctcgaccgg
M13rev          51  .....
Gen1NotIR       1  -----

pMD101          57  cgagttgaaggctcgcagcatctggccgtcgagggcgttgatctgccgc
M13rev          101  .....
Gen1NotIR       1  -----

pMD101          107 tcacggtcggcgccatgaccaccacggtgtcgccctgcttgaacctgagc
M13rev          151  .....
Gen1NotIR       1  -----

pMD101          157 tggtcggccagcccctggctcatgcccacgccgttggactgctcgtcgg
M13rev          201  .....
Gen1NotIR       1  -----

pMD101          207 catcggctggccgtcgaacaactgcatgttgccaccttggctccgcaac
M13rev          251  .....
Gen1NotIR       1  -----

pMD101          257 ggctcgggatgacatcgaccttggacgacacccggccgctggcgaggaag
M13rev          301  .....
Gen1NotIR       1  -----

pMD101          307 atggctcgcacacctcgccgttgctgaccaggccgaaatgttcagctcggg
M13rev          351  .....
Gen1NotIR       1  -----
```

pMD101	357	cgtcgagacgaggatttccgggtggcgccagcacttcgtcgatcgtgg
M13rev	401
Gen1NotIR	1	-----
pMD101	407	cgacctcctgctcgttgagcaggtagcgcgtcgggtcgagettgccctcg
M13rev	451
Gen1NotIR	1	-----
pMD101	457	tcgagaaagcccttcttgaagatcgacatgtgaccattgccctggatgtg
M13rev	501
Gen1NotIR	1	-----
pMD101	507	gatgtaggagtcctccaggctggtgaagatgtaggcgggtgaaaccgcca
M13rev	551
Gen1NotIR	1	----- .g...
pMD101	557	gggcggtgaccgcggcgaaacctaggccgatcgccatcacgggtgaacagc
M13rev	601
Gen1NotIR	6-.....--.....n.-...
pMD101	607	gagcggcggccggttgcggaacaggttgcgggtggcgagcttgaaccaggt
M13rev	651
Gen1NotIR	52
pMD101	657	gatcatgggcggctccctgcgatgcgggtctgcgctcccggacgcgcgg
M13rev	701
Gen1NotIR	102
pMD101	707	ctggctgtcgtgccgatctcggcctcctgcatcaggaccggcgcttga
M13rev	751
Gen1NotIR	152
pMD101	757	cgctctccagcaggcgtggtcatgggtcgagaagacgaaggcggtgccg
M13rev	801
Gen1NotIR	202
pMD101	807	tggctggcgttgatgtcgagcatcagctcgatgatccgtcgggcgttgc
M13rev	851
Gen1NotIR	252
pMD101	857	ggagtcgaggttggcgggtgggttcgtcggcgatcaccagggccgggtcgg
M13rev	901
Gen1NotIR	302
pMD101	907	tgaccagcggccggcgatggcgaccgctgctgctggccgcccgaagc
M13rev	951
Gen1NotIR	352
pMD101	957	ttggccggacgggtgggcgacgtgcttctcgaggaattcctgcaggatatac
M13rev	1001nn..
Gen1NotIR	402
pMD101	1007	tggatccgctccctatcgtttccacgatcagcgatcggctcgttgccctgc
M13rev	1051n
Gen1NotIR	452
pMD101	1057	gccgctccaaagcccgcgacgcagcgcggcaggcagagcaagtagaggg
M13rev	1101	n....-----
Gen1NotIR	502
pMD101	1107	cagcgcctgcaatccatgccaccggtccacgttggtatagaagccgca
M13rev	1106	-----
Gen1NotIR	552

pMD101	1157	tagatcgccgtgaagaggaggggtccgacgatcgaggtcaggctggtgag
M13rev	1106	-----
Gen1NotIR	602
pMD101	1207	cgccgccagtgagccttgacagctgccctggcgttcctcatccacctgcc
M13rev	1106	-----
Gen1NotIR	652a.....
pMD101	1257	tggacaacattgcttgacagcgccggcattccgatgccaccggaagcaagc
M13rev	1106	-----
Gen1NotIR	702
pMD101	1307	aggaccatgatcggaacgccatccatccccgtgtcgcgaaggcaagcag
M13rev	1106	-----
Gen1NotIR	752
pMD101	1357	gatgtagcctgtgccgtcggcaatcattccgagcatgagtgcccgccttt
M13rev	1106	-----
Gen1NotIR	802
pMD101	1407	cgccgagccgggcggtacagggccggtgatcattgctgggagagtgaa
M13rev	1106	-----
Gen1NotIR	852
pMD101	1457	tgcagaatgccaaatgcggcaagcgaatgccgatcgtggtcgcgtcca
M13rev	1106	-----
Gen1NotIR	902
pMD101	1507	gtgaaagcgatcctcgccgaaaatgacccaaagcgcggccggcacctgtc
M13rev	1106	-----
Gen1NotIR	946	-----

Sekvenssammenstilling for pMD102

arsGA ligger mellom base 6 og 1052 i pMD102. Sekvensene som er del av *arsG* og *arsH* i plasmidet er henholdsvis markert i gult og lilla.

pMD102	1	-----
M13Rev	1	actgatacgccagctacttgcgccgcaagtaatacgaactcactagtgg
Gen2NotIR	1	-----
pMD102	1	---gatctcgcttgaggatctggtgaagggccccggcgagccggcgagc
M13Rev	51	gca.....g.....
Gen2NotIR	1	-----
pMD102	48	gacaccggcacgctggccttgccacctgtggaaccgcttggcctctgg
M13Rev	101
Gen2NotIR	1	-----
pMD102	98	ctcggcgcgccggcgctcggcccggaggactggctggcgccggga
M13Rev	151
Gen2NotIR	1	-----

pMD102	148	cggccgcccgggctgctcgactcggccgctggccggaagtctcggcgcgc
M13Rev	201
Gen2NotIR	1	-----
pMD102	198	tcggcgggcttgctatcggccgccgaacagccggctgaagaagcctcg
M13Rev	251
Gen2NotIR	1	-----
pMD102	248	ctcctcctggactgccttcgcggtcggctcggcgttctgcgcgacggcca
M13Rev	301
Gen2NotIR	1	-----
pMD102	298	gggtactgatcagcagtgccagaccgaatgcggaaatgcgggaaagtccg
M13Rev	351
Gen2NotIR	1	-----
pMD102	348	ttcatctctcaaatctccgctcggttcgaaaatctgttcagcggctcata
M13Rev	401
Gen2NotIR	1	-----n.n.
pMD102	398	cgtgtcccagcgcgccgacgatctccatccgcgccgcttgccgcgccggc
M13Rev	451
Gen2NotIR	11
pMD102	448	aggctcgcgcgagcagggacagcaccatcagcgcagcaggctccagag
M13Rev	501
Gen2NotIR	61
pMD102	498	catttcccggggcaccaggtagacctccagcgggatgcgccgggtgatct
M13Rev	551
Gen2NotIR	111
pMD102	548	gcggcggaaatccaggtcggctccagggtgccgatgctcgaccacacggcg
M13Rev	601
Gen2NotIR	161
pMD102	598	agggtcagcagcaccgccagcagccgatcagcccagcagcatgct
M13Rev	651
Gen2NotIR	211
pMD102	648	ttccagggcgaacagcccagcagatcccgcgccgcttcacgcccagggcgc
M13Rev	701
Gen2NotIR	261
pMD102	698	gcagcgtgccgatctcccgggtgcgctccatgatcgccatgccacggtg
M13Rev	751
Gen2NotIR	311
pMD102	748	ttgatcacgctcatcaccacgatggtgaagacgatcaggaaggcgaacag
M13Rev	801
Gen2NotIR	361
pMD102	798	gaagatcacgtcgaacatggtcttgaccttggtgtagaaggctcgaagct
M13Rev	851
Gen2NotIR	411
pMD102	848	cgttccaggtcttgatttccacctccaggccacggggcggccagctcgttc
M13Rev	901
Gen2NotIR	461
pMD102	898	cgcagggtcgcgcgcacatcggtcggtagcatgccgtcaccgagcaggac
M13Rev	951
Gen2NotIR	511

pMD102	948	gttgatccggtcgcacgctggtggtgctgtagaggttctggcgaaactcca
M13Rev	1001n.....
Gen2NotIR	561
pMD102	998	ggttgaccagcatcagcttgtcctccagcgcctcgaccggcgagttgaag
M13Rev	1051nn.....nn.n...
Gen2NotIR	611
pMD102	1048	gtctgcaggatatctggatccgtccctatcgtttccacgatcagcgatcg
M13Rev	1101	.nn.....nn.....n.....n.....
Gen2NotIR	661
pMD102	1098	gctcgttgccctgcgcccgtccaaagcccgcgacgcagcgcggcgaggca
M13Rev	1151	.nn.....-----
Gen2NotIR	711
pMD102	1148	gagcaagtagagggcagcgcctgcaatccatgccacccttccacgttg
M13Rev	1164	-----
Gen2NotIR	761
pMD102	1198	ttatagaagccgcatagatcgccgtgaagaggaggggtccgacgatcgag
M13Rev	1164	-----
Gen2NotIR	811
pMD102	1248	gtcaggctggtgagcgcgccagtgagccttgacgctgccctggcgttc
M13Rev	1164	-----
Gen2NotIR	861a.....
pMD102	1298	ctcatccacctgcctggacaacattgcttgacgcgcggcattccgatgc
M13Rev	1164	-----
Gen2NotIR	911
pMD102	1348	caccogaagcaagcaggaccatgatcggaacgccatccatccccgtgtc
M13Rev	1164	-----
Gen2NotIR	961n.....
pMD102	1398	gcgaaggcaagcaggatgtagcctgtgcccgtcggcaatcattccgagcat
M13Rev	1164	-----
Gen2NotIR	1011	n.....cn.....c.....-----

Sekvenssammenstilling for pMD103

arsHA ligger mellom base 1 og 1007 i pMD103. Sekvensene som er del av *arsG* og *arsH* i plasmidet er henholdsvis markert i gult og lilla.

pMD103	1	-----ggttgccgcgcgac-
M13rev	1101	ggaancgatagggacggatcccaganntccnnca.....nn
Gen2R	1	-----
pMD103	15	tcgtccg-cccgttgaggatctggttaagggccccggcgagccggcga
M13rev	1051nn.....
Gen2R	1	-----

pMD103	64	gcgacaccggcagcgtggccttggccacctgtggaaccgccttggcctct
M13rev	1001
Gen2R	5	-----nn.....-
pMD103	114	ggctcggcgcgcgccggcgcgctcggcccgaggactggctggcggccgg
M13rev	951
Gen2R	43
pMD103	164	gacggccgcggg-ctgctcgactcggccgctggccgggaagtctcggcg
M13rev	901g.....
Gen2R	93-
pMD103	213	cgctcggcgggcttgcctatcgccgccgaacagccggctgaagaagcc
M13rev	851
Gen2R	142
pMD103	263	tcgctcctcctggactgccttcgcggtcggctcggcgttctgcgcgacgg
M13rev	801
Gen2R	192
pMD103	313	ccagggtactgatcagcagtgccagaccgaatgcggaaatgcgggaaagt
M13rev	751
Gen2R	242
pMD103	363	ccgttcattctctcaaattctccgtcggttcgaaaatctgttccagcggctc
M13rev	701
Gen2R	292
pMD103	413	atacgtgtcccagcgcgccgacgatctccatccgcgcgccttgcgcgcc
M13rev	651
Gen2R	342
pMD103	463	ggcaggctcgcgcgagcagggacagcaccatcagcgcgcagcaggctcca
M13rev	601
Gen2R	392
pMD103	513	gagcatttcccggggcaccaggtagacctccagcgggatgcgcgggtga
M13rev	551
Gen2R	442
pMD103	563	tctgcggcggaaatccaggtcggctccagggtgggcgatgctcgaccacag
M13rev	501
Gen2R	492
pMD103	613	gcgagggtcagcagcaccgccagcagccgatcagcccgagcagcat
M13rev	451
Gen2R	542
pMD103	663	gctttccagggcgaacagcccgacgatcccgcgcgccttcacgccagg
M13rev	401
Gen2R	592
pMD103	713	cgcgacagcgtgccgatctcccgggtgcgctccatgatcgccatgccacg
M13rev	351
Gen2R	642
pMD103	763	gtggtgatcacgctcatcaccacgatggtgaagacgatcaggaaggcgaa
M13rev	301
Gen2R	692

pMD103	813	caggaagatcacgtcgaacatgttcttgaccttgggtgtagaagggtcgaaa
M13rev	251
Gen2R	742
pMD103	863	gctcgttccagggtcttgatttccacctccaggccacgggcccagctcg
M13rev	201
Gen2R	792
pMD103	913	ttccgcagggtcgcgcgcatcggctcggtagcatgccgtcaccgagcag
M13rev	151
Gen2R	842
pMD103	963	gacgttgatccggtcgacgctgggtgggtgctcgtagaggttctgggcagatc
M13rev	101
Gen2R	892na.....
pMD103	1013	tgcccactagtgagtcgtattacttgcggccgcaa-gtagcttggcgtaa
M13rev	51a.....g.....
Gen2R	942-.....
pMD103	1062	tcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattggtatccgctcacaattcc
M13rev	1	.-----
Gen2R	991	..n.....nn.....nn.....-----

Sekvenssammenstilling for pMD104

arsFB ligger mellom base 4850 og 6057 i pMD104. Sekvensen som er del av *arsF* i plasmidet er markert i blått.

pMD104	4551	ctacagcagagccatgtagacaacatcccct--cccctttccaccgcgt
Gen1RB	782	-----
Gen2RB	598	-----.....ntn.....
pMD104	4599	cagagccccgtagc-gcccgctacgggctttttcatgccctgcctagcgc
Gen1RB	782	-----
Gen2RB	568cg.....a.....
pMD104	4648	tccaagcctcacg-ccgcgctcggcctctctggcggccttctggcgctcc
Gen1RB	782	-----
Gen2RB	518g.....
pMD104	4697	tgctgcggcgtccgctcgtgggccgcgcg--ggtccgcgcgccggcctc
Gen1RB	782	-----
Gen2RB	468t....cg.....
pMD104	4745	gtgcg-ctggcgtcgcgggcgaggtccaggcggccttctcacgttct
Gen1RB	782	-----
Gen2RB	418c.....
pMD104	4794	gccttgccgagatgagatagatcgacggatccacgaagcttcccatggtg
Gen1RB	782	-----
Gen2RB	368

pMD104	4844	acgtca	ccggtatcaggttgaagttctggaagacgaagccgatgggtccgg
Gen1RB	782	-----	-----
Gen2RB	318
pMD104	4894	ttgcgcagctcgctgcgggctgtccgacaggtcgtcgacctcccgcc	
Gen1RB	782	-----	-----
Gen2RB	268
pMD104	4944	gtcgatcagcacgctgcccaggtggcgagtcgagcatgccgatgaggt	
Gen1RB	782	-----	-----
Gen2RB	218
pMD104	4994	tgcacagggtcgacttgccggaccccaggggtccccagatagcgcacgaac	
Gen1RB	782	-----	-----
Gen2RB	168
pMD104	5044	tcgcgctcctggatgctgatgtcgatgcccttgaggcgatcaccggctt	
Gen1RB	782	-----	-----
Gen2RB	118
pMD104	5094	ttcgccgatctggtagtgttgggtggcccggcgcagctcgacgagcgggg	
Gen1RB	782	-----	-----
Gen2RB	68
pMD104	5144	ccatgcctatcgaagtgatggattcat	gtcgggtttcctgatgctcca
Gen1RB	782	-----	-----
Gen2RB	18nn.	-----
pMD104	5194	atgcctgaaatccccggtggccggcgaatccgggtgctccgggcccgcg	
Gen1RB	782	-----	-----,n...
Gen2RB	0	-----	-----
pMD104	5244	ggcccggacgcgcgcccgtcagcggccgatgcgccggcggtttcggtc	
Gen1RB	777
Gen2RB	0	-----	-----
pMD104	5294	gtcgcgtaggcgatgacgaaattcccgtcgcgcacgctgtgcacgccgat	
Gen1RB	727
Gen2RB	0	-----	-----
pMD104	5344	cagccggtcgcgctcgcggacctggatgatgaagttgccggcaccatcga	
Gen1RB	677
Gen2RB	0	-----	-----
pMD104	5394	cggcgatcgccctcgaagcgctgcaaagccccatccaggccgctgcccagc	
Gen1RB	627
Gen2RB	0	-----	-----
pMD104	5444	aacttgccggcggcctccttggcggaccacaggcgggtgatccactcgtc	
Gen1RB	577
Gen2RB	0	-----	-----
pMD104	5494	ccgcgcccgcgccctccgccaccagttcgtccagcagttcgcgctcgcgg	
Gen1RB	527
Gen2RB	0	-----	-----
pMD104	5544	ccgtgctgaagctttccaggaaaccggcggcgcggacggatctgctcg	
Gen1RB	477
Gen2RB	0	-----	-----
pMD104	5594	atgtcgatacccaccggcaattccgcggccagcgcaccgcccggtcctc	
Gen1RB	427
Gen2RB	0	-----	-----

pMD104	5644	gcagtgcgcgatgctgatcctcggcgtccgcgatgccctccagcgccg
Gen1RB	377
Gen2RB	0	-----
pMD104	5694	ccaccagcggtggccggccgcgctgtcgatggcgaaggccgcccggg
Gen1RB	327
Gen2RB	0	-----
pMD104	5744	tgcagcatgtccgcctgctcgcctgcgttcggcgagccaggcgcgaccgc
Gen1RB	277
Gen2RB	0	-----
pMD104	5794	gtccttcaccaccacccggccgagctgccattgctgctggcgcggcggga
Gen1RB	227
Gen2RB	0	-----
pMD104	5844	cggcggccttggcgggtaaggccggcatctcgtccgaatgcaggtagtga
Gen1RB	177
Gen2RB	0	-----
pMD104	5894	cgagcgagcagcagcggatcgaaccctgggtatcggccttggcgatctg
Gen1RB	127
Gen2RB	0	-----
pMD104	5944	gaaagccttcacgcccctggccagcagcggcagttcgaggggacggctca
Gen1RB	77
Gen2RB	0	-----
pMD104	5994	gcaggtggcgggtcggctggcggcgaaatcgagccccgggcccgatgg
Gen1RB	27	-----
Gen2RB	0	-----

Sekvenssammenstilling for pMD106

arsHB ligger mellom base 4841 og 5975 i pMD106. Sekvensen som er del av *arsH* i pMD106 er markert i lilla.

pMD106	4851	cgaccaactacgccgaggactacgatgcgaccctgctgcccgacgaaacc
Gen3RB	1	-----
Gen3FB	1012	-----
pMD106	4901	gtggagggcgtggactgctacgtcttcgacctgaaggcgcgcaactccaa
Gen3RB	23
Gen3FB	1012	-----
pMD106	4951	gaccacctacgacc-ggatcgtctactgggtggacaaggagcgcctgggtg
Gen3RB	73
Gen3FB	986
pMD106	5000	gggggtgaaggcggactactacacgctgtcggggcaagcgttcaagtcggc
Gen3RB	122
Gen3FB	936

pMD106	5050	gaacatgcagtacggcagcacggtgagtatcaatggcgaagcccgtccct
Gen3RB	172
Gen3FB	886
pMD106	5100	tcatttccgagatcgccatctacgaggaattgatgagcggcgacgtcacc
Gen3RB	222
Gen3FB	836
pMD106	5150	accctgagcatgagcaagccgaagctcgcgccactgccggacttcatctt
Gen3RB	272
Gen3FB	786
pMD106	5200	caatatcaacctgttcatgaagtgagccccgggtatggagcgctccggc
Gen3RB	322
Gen3FB	736
pMD106	5250	atgcggggatggtcacggacgacgagcccggcattgcctccgcatagcg
Gen3RB	372
Gen3FB	686
pMD106	5300	agcgttccatacttgcccacttgggctcgatgccccagggatattcaacg
Gen3RB	422
Gen3FB	636
pMD106	5350	aagtatggacgaattcggatatggcacggatggcagagatggcaaggatg
Gen3RB	472
Gen3FB	586
pMD106	5400	gcgcatcgtttgggactggcattgcctctggcgggcatggcgatccaggc
Gen3RB	522
Gen3FB	536
pMD106	5450	gggaatggcgggtgaggacgagcttcccagctgggcggggagcagccga
Gen3RB	572
Gen3FB	486
pMD106	5500	gcctggccgatgagctggcgagcggtttctattcgcgtgtcaacctcatg
Gen3RB	622
Gen3FB	436
pMD106	5550	gcctacaccctggtccaggaaacggaggagtcgaccctcaaccccgacaa
Gen3RB	672
Gen3FB	386
pMD106	5600	cgccgcccagataccgcgctaccagtgggtgctcaacccgcgggcgacc
Gen3RB	722
Gen3FB	336
pMD106	5650	tgaacctcagcttccgcaactgggagttcgcctcaagccgcgcgcccag
Gen3RB	772
Gen3FB	286
pMD106	5700	gcgatctgggagaaatgggaggacggcccgcgcgacggcgacgaccagga
Gen3RB	822
Gen3FB	236
pMD106	5750	cagttcggagctgttcctcaccgaaggctgggtgcgctaccggcccttcg
Gen3RB	872
Gen3FB	186
pMD106	5800	acgaactgaccctgtcctacgggcgggagaaacctgcagtggggaccgtcg
Gen3RB	922
Gen3FB	136

pMD106	5850	gtgatcctttcgtgtccaaccccttcacccgcgacaacggccgcaaaa
Gen3RB	972
Gen3FB	86
pMD106	5900	cccgcgctcgagggtgcccgccctggattactaccggg-cgatctggatc
Gen3RB	1022g.....
Gen3FB	36g.ct.ga.....-----
pMD106	5949	cccaacgaaacctggacgctctcgacggtaccctctagtcaaggccttaa
Gen3RB	1072-----
Gen3FB	0	-----

Sekvenssammenstilling for pMD116

arsF ligger mellom base 440 og 1192 i pMD116.

pMD116	201	cacacaggaaacagctatgaccatgattacgaattcgagctccaccgcg
M13rev	1	-----.....
pGEM/plitseq	984	-----
pMD116	251	tggcggccgctctagaactagtgatccccgggctgcaggaattcgatt
M13rev	7	n.....
pGEM/plitseq	984
pMD116	301	aatgcggccgcgaagatgtaggcggtgaaaccgcccagggcggtgaccgc
M13rev	57
pGEM/plitseq	934
pMD116	351	ggcgaaacctaggccgatcgccatcacggtgaacagcgagcggcggcgt
M13rev	107
pGEM/plitseq	884nn.....
pMD116	401	tgcggaacaggttgccgggtggcgagcttgaaccaggtgatcatggcg
M13rev	157
pGEM/plitseq	834
pMD116	451	tcctgcatgcccgtctgcatcaggaccggcgcttgacgctctccagcag
M13rev	207
pGEM/plitseq	784	...n.....
pMD116	501	ccgatctcgccgtcctgcatcaggaccggcgcttgacgctctccagcag
M13rev	257
pGEM/plitseq	734
pMD116	551	gcgctggtcatgggtcgagaagacgaaggcgggtgccgtggctggcgttga
M13rev	307
pGEM/plitseq	684
pMD116	601	tgtcgagcatcagctcgatgatccgtcggcgcttgccggagtcgaggtg
M13rev	357
pGEM/plitseq	634

pMD116	651	gcggtgggttcgctcggcgatcaccagggccgggtcggtgaccagcgcccg
M13rev	407
pGEM/plitseq	584
pMD116	701	ggcgatggcgacccgctgctgctggccgccgaaagcttggccggacggt
M13rev	457
pGEM/plitseq	534
pMD116	751	ggcgacgtgcttctcgaggccacctcggtcagccgctccagcgcccgc
M13rev	507
pGEM/plitseq	484
pMD116	801	tcccgggcgacgacggaggaagcgccggcgatctgcagcggcagcatgac
M13rev	557
pGEM/plitseq	434
pMD116	851	gttctccagcgccgagagcaccggtatcaggttgaagttctggaagacga
M13rev	607
pGEM/plitseq	384
pMD116	901	agccgatggtccggttgccgacgctcgtcgggcggttgcgacaggtcg
M13rev	657
pGEM/plitseq	334
pMD116	951	tcgacctcccggccgctcgatcagcacgctgcccaggtgggagtcgag
M13rev	707
pGEM/plitseq	284
pMD116	1001	catgccgatgaggttgccacagggtcgacttgccggaccccaggggtccc
M13rev	757
pGEM/plitseq	234
pMD116	1051	agatagcgacgaactcgcgctcctggatgctgatgctgatgcccttgagg
M13rev	807
pGEM/plitseq	184
pMD116	1101	gcgatcaccggcttttcgccgatctggtagtgccttggggcccgcgcgag
M13rev	857
pGEM/plitseq	134
pMD116	1151	ctcgacgagcggggccatgcctatcgaagtgatggtattcatatgcggtt
M13rev	907
pGEM/plitseq	84
pMD116	1201	tcctatcaagcttatcgataccgctcgacctcgagggggggcccggtaccg
M13rev	957
pGEM/plitseq	34
pMD116	1251	atgcatgcaagcttggcactggccgctcgttttacaacgctcgtgactggga
M13rev	1007
pGEM/plitseq	0	-----
pMD116	1301	aaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgagcacatccccctt-c
M13rev	1057nnnn.....t.
pGEM/plitseq	0	-----
pMD116	1350	gccagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgcccttccaaca
M13rev	1107	n.....n.-----
pGEM/plitseq	0	-----

Sekvenssammenstilling for pMD117

arsG ligger mellom base 368 og 1618 i pMD117.

pMD117	201	cacacaggaacacgctatgaccatgattacgaattcgagctccaccgcg
M13rev	1	-----.....-n.....n.....
pGEM/plitseq	1004	-----
pMD117	251	tggcgccgctctagaactagtgatcccccgggctgcaggaattcgatt
M13rev	24
pGEM/plitseq	1004	-----
pMD117	301	atagcggccgcgggaaagtccgttcattctctcaaattctccgtcggttcga
M13rev	74
pGEM/plitseq	1004	-----
pMD117	351	aaatctgttccagcggctcatacgtgtcccagcgcgcccagcagatctccat
M13rev	124
pGEM/plitseq	1004	-----
pMD117	401	ccgcgcccgccttgcgcgccggcaggctcgccgagcagggacagcacca
M13rev	174
pGEM/plitseq	1004	-----
pMD117	451	tcagcggccagcaggctccagagcatttcccggggcaccaggtagacctcc
M13rev	224
pGEM/plitseq	1004	-----
pMD117	501	agcgggatgcccgggtgatctgcccgggaatccaggtcggctccagggt
M13rev	274
pGEM/plitseq	1004	-----
pMD117	551	ggcgatgctcgaccacacggcgagggtcagcagcaccgaccagcgcgagc
M13rev	324
pGEM/plitseq	1004	-----
pMD117	601	cgatcagcccagcagcagcatgctttccagggcgaacagcccagcagatcccg
M13rev	374
pGEM/plitseq	1004	-----
pMD117	651	cgccgcttcacgcccagggcgcgagcgtgccgatctcccgggtgcgctc
M13rev	424
pGEM/plitseq	1004	-----.....n.....nn.
pMD117	701	catgatcgccatgccacgggtgttgatcacgctcatcaccacgatgggtga
M13rev	474
pGEM/plitseq	969
pMD117	751	agacgatcaggaaggcgaacaggaagatcacgtcgaacatggtcttgacc
M13rev	524
pGEM/plitseq	919
pMD117	801	ttggtgtagaaggctcgaagctcgttccaggtcttgatttccacctccag
M13rev	574
pGEM/plitseq	869n.....
pMD117	851	gccacgggcccagctcgttccgcagggctcgcgcatcggctcgggtga
M13rev	624
pGEM/plitseq	819

pMD117	901	gcatgccgtcaccgagcaggacggttgatccggtcgacgctggtggtgctg
M13rev	674
pGEM/plitseq	769
pMD117	951	tagaggttctgggCGAACTCCAGGTTGACCAGCATCAGCTTGTCTCTCCAG
M13rev	724
pGEM/plitseq	719
pMD117	1001	cgctcgcaccggcgagttgaaggtctgcagcatctggccgtcgagggcgt
M13rev	774
pGEM/plitseq	669
pMD117	1051	tgatctgcccgtcacggctcggcgccatgaccaccacgggtgtcgccctgc
M13rev	824n.....
pGEM/plitseq	619
pMD117	1101	ttgaacctgagctggtcggccagcccctggctcatgccacgccgttga
M13rev	874
pGEM/plitseq	569
pMD117	1151	ctgctcgtcggctcatcggctggccgtcgaacaactgcatgttgccacct
M13rev	924n.....n..
pGEM/plitseq	519
pMD117	1201	tggtccgcgaacggctgcggatgacatcgaccttgacgacacccggccg
M13rev	974	...n.....-----
pGEM/plitseq	469
pMD117	1251	ctggcgaggaagatggtcgcacacctcgccgttgcctgaccaggccggaat
M13rev	983	-----
pGEM/plitseq	419
pMD117	1301	gttcagctcgggctcgcagacgaggatttccgggtggcgccagcactt
M13rev	983	-----
pGEM/plitseq	369
pMD117	1351	cgtcgatcgtggcgacctcctgctcgttgagcaggtagcgcgtcgggtcg
M13rev	983	-----
pGEM/plitseq	319
pMD117	1401	agcttgccctcgtcgcagaaagcccttcttgaagatcgacatgtgaccatt
M13rev	983	-----
pGEM/plitseq	269
pMD117	1451	gccctggatgtggatgtaggagtcctccaggctggtgaagatgtaggcgg
M13rev	983	-----
pGEM/plitseq	219
pMD117	1501	tgaaaccgcccagggcggttgaccgcggcgaaacctaggccgatcgccatc
M13rev	983	-----
pGEM/plitseq	169
pMD117	1551	acgggtgaacagcgcgagcggcgccgttgcggaacaggttgcgggtggcgag
M13rev	983	-----
pGEM/plitseq	119
pMD117	1601	cttgaaccaggtgatcatatgcggctccctatcaagcttatcgataccgt
M13rev	983	-----
pGEM/plitseq	69
pMD117	1651	cgacctcgagggggggcccgtaccgatgcatgcaagcttggcactggcc
M13rev	983	-----
pGEM/plitseq	19-----

Sekvenssammenstilling for pMD118

arsH ligger mellom base 401 og 1393 i pMD118.

pMD118	201	cacacaggaaacagctatgaccatgattacgaattcgagctccaccgcgg
M13rev	1	-----
pGEM/plitseq	1162	-----
pMD118	251	tggcgccgctctagaactagtgatcccccgggctgcaggaattcgatt
M13rev	14
pGEM/plitseq	1162	----- .n.n.....
pMD118	301	taagcgccgcaagtatggaacgctccgtatcgcgaggcaatgccgggc
M13rev	64
pGEM/plitseq	1144n.....nn
pMD118	351	tcgtcgtccgtgaccatccccgatgccggagcgtccataccggcgggc
M13rev	114
pGEM/plitseq	1094
pMD118	401	tcacttcatgaacaggttgatattgaagatgaagtccggcagtgggcgga
M13rev	164
pGEM/plitseq	1044
pMD118	451	gcttcggcttgctcatgctcaggggtggtgacgtcgccgctcatcaattcc
M13rev	214
pGEM/plitseq	994
pMD118	501	tcgtagatggcgatctcggaaatgaaggacgggcttcgccattgatact
M13rev	264
pGEM/plitseq	944
pMD118	551	caccgtgctgccgtactgcatgttcgccgacttgaagcgttgccccgaca
M13rev	314
pGEM/plitseq	894
pMD118	601	gcgtgtagtagtccgccttcacccccaccaggcgtccttgtccaccag
M13rev	364
pGEM/plitseq	844
pMD118	651	tagacgatccggctcgtaggtggtccttgagttgcgcgcttcaggtcgaa
M13rev	414
pGEM/plitseq	794
pMD118	701	gacgtagcagtccacgccctccacggtttcgtcgggcagcagggtcgcat
M13rev	464
pGEM/plitseq	744
pMD118	751	cgtagtcctcggcgtagttggtcagggcgacgtcgccgtaggaggcctgg
M13rev	514
pGEM/plitseq	694
pMD118	801	cccatcagcttctggcgcagcgagatggggatcggttgcagccccgg
M13rev	564
pGEM/plitseq	644
pMD118	851	cttggtggaaccacatggtgctgctgagcatgagcagcttctgccccttgg
M13rev	614
pGEM/plitseq	594

pMD118	901	acttcggtggcgcgatggtgatgcccgaaatggtgaaaccgcgcgcttg
M13rev	664
pGEM/plitseq	544
pMD118	951	atgtcgtagagcatgggtgctcgggtcgggccctctcgttggettctgatctc
M13rev	714
pGEM/plitseq	494
pMD118	1001	cacgttccaggcgatgccctgcaggttgccgcgcgactcgtccgcccgt
M13rev	764
pGEM/plitseq	444
pMD118	1051	tgaggatctggtaagggccccggcggagccggcggagcgcacaccggcacg
M13rev	814
pGEM/plitseq	394
pMD118	1101	ctggccttgccacctgtggaaccgccttggcctctggctcggcgcgcg
M13rev	864
pGEM/plitseq	344
pMD118	1151	cggcgcgctcggccccggaggactg-gctggcggccgggacggccgcccgg
M13rev	914n.....
pGEM/plitseq	294-
pMD118	1200	ctgctcgactcggccgctggccgggaagtctcggcgcgctcggcgggctt
M13rev	964
pGEM/plitseq	245
pMD118	1250	gctatcgccgccgcccgaacagccggctgaagaagcctcgtcctcctgga
M13rev	1014
pGEM/plitseq	195
pMD118	1300	ctgccttcgcggtcggctcggcgttctgcgcgacggccagggtactgatc
M13rev	1064
pGEM/plitseq	145
pMD118	1350	agcagtgccagaccgaatgcggaaatgcgggaaagtccgttcataatgtca
M13rev	1114	...t....a.....n....n.-----
pGEM/plitseq	95
pMD118	1400	aatatcaagcttatcgataccgtcgcacctcgagggggggcccgggtaccga
M13rev	1140	-----
pGEM/plitseq	45-----