

Effekten av å aktivere en genklynge med potensiell kitin syntase aktivitet i *Erwinia carotovora*

Kjersti Næss Hagen

Bioteknologi

Oppgaven levert: Mai 2011

Hovedveileder: Svein Valla, IBT

Biveileder(e): Helga Ertesvåg, IBT

Forord

Denne oppgaven er gjennomført ved instituttet for bioteknologi ved NTNU i perioden februar 2010 til mai 2011, og markerer avslutningen på min mastergrad i bioteknologi.

Arbeidet med oppgaven har vært spennende og lærerikt, og jeg har fått mange gode erfaringer som jeg vil ta med meg videre.

Jeg vil takke ansvarlig veileder, professor Svein Valla som ga meg muligheten til å velge denne oppgaven, og en spesiell takk til min faglige veileder, forsker Helga Ertesvåg for god støtte og veiledning underveis i arbeidet, og for at du alltid har vært tilgjengelig for spørsmål. Du har vært tålmodig og motiverende og hjulpet meg videre når jeg har stått fast. Tilbakemeldingene dine underveis i arbeidet med oppgaven har vært verdifulle.

Jeg vil også takke forsker Anne Tøndervik som har gjort forstudiene til denne oppgaven, og dermed gjort det mulig for meg å arbeide med en så spennende oppgave.

Takk til forsker Marit Syversveen for hjelp til NMR-spektroskopi, og til professor Kjell Morten Vårum for god hjelp til å analysere NMR-spektrene.

Til slutt vil jeg takke familien for god støtte og oppmuntring gjennom hele studietiden. Takk til mine medstudenter for godt selskap på lesesalen og gode samtaler, vi har delt både glede og frustrasjon og dere har gjort studietiden ved NTNU uforglemmelig. Og ikke minst en stor takk til min samboer David som har vært svært tålmodig og støttende.

Sammendrag

Kitin er en langkjedet, nitrogenholdig polymer som er bygget opp av N-acetyl-glukosamin-enheter (GlcNAc), og finnes i blant annet det ytre skallet til leddyr, og i celleveggen til sopp. Biosyntese av kitin er katalysert av enzymet kitin syntase som overfører GlcNAc til den ikke-reduserende enden av den voksende polymeren via substratet UDP-GlcNAc. Når kitin deacetyleres dannes det kitosan, som består av en blanding av GlcNAc og GlcN. Kitin og kitosan har en rekke egenskaper som gjør at de har mange ulike bruksområder. De er blant annet biokompatible og biodegraderbare, noe som gjør de svært godt egnet til medisinske og farmasøytiske bruksområder, og kitosan er en effektiv flokkulant på grunn av positivt ladete aminogrupper, og kan brukes til rensing av drikkevann og avløpsvann.

Studier av genomsekvensen til *E. carotovora* har vist at det inneholder en genklynge hvor et gen (*ECA2046*) koder for en potensiell kitin syntase. Det kan se ut til at flere av genene i samme genklynge, inkludert *ECA2046* tilhører samme operon. Formålet med denne oppgaven var å aktivere transkripsjon av *ECA2046* ved hjelp av den induserbare *PmDI-8* promotoren, og undersøke om dette førte til produksjon av bakteriell kitin. Det var også ønskelig å forsøke å aktivere hele det antatte operonet dersom produktene fra de andre genene er nødvendig for produksjon av en aktiv kitin syntase. Det ble konstruert to ulike rekombineringsvektorer, pKNH25 og pKNH35. I disse vektorene er henholdsvis *ECA2046* og *ECA2048* klonet inn nedstrøms for *PmDI-8*. *ECA2048* er det første genet i det antatte operonet. Vektorene ble overført ved konjugering fra *E. coli* S17.1 til *E. carotovora*. De overførte plasmidene ble integrert i genomet til *E. carotovora* ved homolog rekombinering. Mutantene ble dyrket videre for å danne ønskede mutanter som hadde fått inkorporert *PmDI-8* og *xylS*, og mistet resten av plasmidet ved videre rekombinering. Det ble funnet en ønsket mutant etter rekombinering med pKNH25, denne ble kalt *E. carotovora* KNH25, og *PmDI-8* i denne mutanten vil kontrollere transkripsjon av *ECA2046* og eventuelt nedstrømsgenet *ECA2045* som koder for en mulig NAD avhengig epimerase/dehydratase. Ingen ønskede mutanter etter videre rekombinering av muntanten som hadde fått integrert pKNH35 ble funnet, og det var derfor ikke mulig å undersøke om aktivering av transkripsjon av hele det antatte operonet ville føre til produksjon av bakteriell kitin.

E. carotovora KNH25 ble dyrket i medium tilsatt induseren *m*-toluat for å aktivere transkripsjon fra *PmDI-8*. Analyser av flokkuleringsaktiviteten viste ingen aktivitet, og derfor

ingen merkbar produksjon av bioflokkulanter. ^1H NMR-analyser ga heller ingen tydelig indikasjon på at det var produsert noe kitosanlignende produkt. Ut ifra NMR-spekteret kan det se ut som det er en blanding av flere stoffer, og grunnet tydelige topper mellom 3,5 og 4 ppm kan det tyde på at det er en annen polymer til stede siden dette område ofte indikerer protoner på sukkermonomerne i polysakkarider. Ved dyrking av både villtypen og mutanten i samme medium, med og uten induser, ble det produsert like store mengder stoff som kan felles med etanol uavhengig av tilstedeværelse av induser.

Siden verken målingene av flokkuleringsaktiviteten eller ^1H NMR-spekteret gir noen indikasjon på at det er kitosan til stede, og det heller ikke viser seg noen økning i produsert stoff som felles med etanol ved aktivering av *PmDI-8* promotoren i *E.carotovora* KNH25, er det lite som tyder på at aktivering av transkripsjon av kun *ECA2046* og eventuelt *ECA2045* fører til produksjon av en aktiv kitin syntase, eller et annet aktivt enzym som katalyserer dannelsen av en eventuell polymer som kan felles med etanol.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Innholdsfortegnelse	IV
1. Introduksjon	1
1.1. Kitin og kitosan	1
1.1.1 Struktur	1
1.1.2. Egenskaper og bruksområder	2
1.1.2. Biosyntese av kitin	8
1.1.4. Bakterielle kitinderivater	9
1.2. RK2-plasmidet	10
1.3. XylS/ <i>Pm</i> regulator/promotor systemet	10
1.3.1 <i>PmDI-8</i> promotoren	11
1.4. <i>Erwinia carotovora</i>	12
1.4.1. Bruk av XylS/ <i>Pm</i> ekspresjonssystemet i <i>E. carotovora</i>	12
1.5. Formålet med oppgaven	13
2. Material og metode	15
2.1. Vekstmedier og løsninger	15
2.2. Primere	18
2.2.1. PCR-primere	18
2.2.2. Sekvenseringsprimere	18
2.3. Bakteriestammer og plasmider	19
2.4. Dyrking av bakteriekulturer	21
2.5. Måling av flokkuleringsaktivitet	21
2.6. PCR	22
2.7. Isolering av plasmid-DNA	24

2.8. Restriksjonskutting.....	25
2.9. Ligering av DNA-fragmenter med T4-ligase.....	26
2.10. Agarose gelelektroforese.....	26
2.11. Rensing av PCR-produkt med QIAquick PCR purification kit for mikrosentrifuge ..	27
2.12. Rensing av DNA-fragmenter fra gel med QIAquick gel extraction kit for mikrosentrifuge	28
2.13. Sekvensering	29
2.13.1. Sekvenseringsreaksjon	30
2.13.2. Rensing av sekvenseringsprodukt	31
2.14. Transformasjon av kompetente bakterieceller	31
2.14.1. Rubidiumklorid-kompetente celler	31
2.14.2. Elektrokompetente celler.....	32
2.14.3. ”Heat-shock”- transformasjon av RbCl-kompetente celler.....	32
2.14.4. Elektroporering.....	32
2.15. Bakteriell konjugering og homolog rekombinering	33
2.16. Utfelling og rensing av potensiell biopolymer	34
2.17. Kjernemagnetisk resonans (NMR) spektroskopi	34
2.17.1. ¹ H NMR.....	35
3. Resultater.....	37
3.1. Dyrking av <i>E.carotovora</i> i acetatmedium og måling av flokkuleringsaktivitet.....	37
3.2. Kloning av <i>ECA2046</i> nedstrøms for <i>PmDI-8</i> promotoren.....	38
3.2.1. Konstruksjon av pKNH1	38
3.2.2. Konstruksjon av pKNH21 og pKNH23	40
3.2.3. Konstruksjon av pKNH22	41
3.2.4. Konstruksjon av pKNH24	42
3.2.5. Konstruksjon av pKNH25	43
3.3 Kloning av <i>ECA2048</i> nedstrøms for <i>PmDI-8</i> promotoren.....	45

3.3.1. Konstruksjon av pKNH31 og pKNH33	45
3.3.2. Kontruksjon av pKNH32	48
3.3.3. Konstruksjon av pKNH34	49
3.3.4. Konstruksjon av pKNH35	50
3.4. Overføring av pKNH25 og pKNH35 til <i>E.carotovora</i>	51
3.4.1. Dyrking av <i>E. carotovora</i> på LA med X-gal	52
3.4.2. Elektroporering.....	53
3.4.3. Konjugering.....	54
3.4.4. Videre rekombinering for å få dannet ønskede mutanter	55
3.5. Aktivere transkripsjon fra <i>PmDI-8</i> og analyse av produsert stoff.....	57
3.5.1. Dyrking av bakteriekultur i medium med <i>m</i> -toluat	57
3.5.2. Måling av flokkuleringsaktivitet	57
3.5.3. Etanolfelling, dialyse og frysetørking	58
3.5.4. ¹ H NMR analyse av frysetørket stoff (utført av Marit Syversveen)	58
3.5.5. Sammenlikning av villtype og mutant	61
5. Diskusjon.....	62
6. Konklusjon	66
Referanser.....	67
Appendiks.....	71

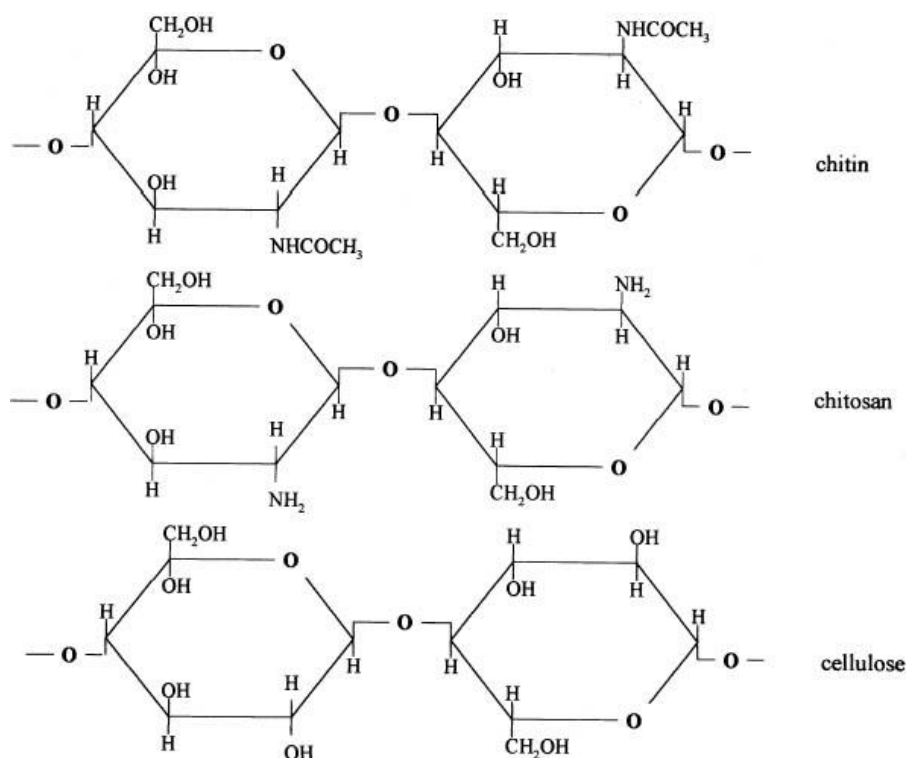
1. Introduksjon

1.1. Kitin og kitosan

Kitin er en langkjedet, nitrogenholdig polymer som finnes i blant annet det ytre skallet til leddyr og i celleveggen til sopp. Det har en sterk og fleksibel struktur, og kitin og derivater av kitin, som for eksempel kitosan er et viktig biomaterialer med ulike egenskaper som kan utnyttes industrielt. Disse biopolymerene er mye brukt i biomedisin på grunn av antibakterielle og sårhelende egenskaper, i tillegg til lav immunogenisitet. Kitinderivater er også effektive flokkulanter og kan derfor brukes til rensing av avløpsvann og drikkevann [1].

1.1.1 Struktur

Kitin er bygget opp av N-acetyl-glukosamin-enheter (GlcNAc) som er bundet sammen ved hjelp av β -1,4-glykosidbindinger, og inneholder 6-7 % nitrogen. Kitin forekommer i tre former: α -kitin, som består av antiparallele monomerer og er funnet i blant annet krabbe- og rekeskall og i celleveggen til sopp, β -kitin består av parallelle monomerer og er funnet i endoskjelettet til blekksprut, og γ -kitin består av en blanding av antiparallele og parallelle monomerer og finnes i magen til blekksprut og kokongfibre hos biller [1, 2]. Kitosan er et deacetyllert derivat av kitin, og består av en blanding av GlcNAc og glukosamin (GlcN), med varierende grad av acetyllerte enheter (F_A). GlcN-enhetene inneholder frie aminogrupeer, noe som gir kitosan en positiv ladning. Kitin og kitosan har en lignende struktur som cellulose, men istedenfor hydroksylgruppe på karbon nummer 2 på hver monomer har kitin en acetamidgruppe, mens kitosan som nevnt har en aminogruppe på GlcN-enhetene. [1, 3, 4]. Strukturene til kitin, kitosan og cellulose er vist i figur 1.1.



Figur 1.1. Strukturen til kitin, kitosan og cellulose [5]

1.1.2. Egenskaper og bruksområder

Acetylgruppene i kitin danner hydrogenbindinger mellom monomerene og dette gjør at den er uløselig i vann. Derivater av kitin, som for eksempel kitosan kan forekomme som vannløselige [1]. Graden av deacetylte enheter i kitosan varierer fra 40 – 100 %, og dette påvirker blant annet løseligheten og ladningstettheten [6]. Forskjellen på kitin og kitosan kan vises ut ifra løselighet. Kitosan vil løses i 0,1 M eddiksyrer, mens kitin vil være uløselig [7]. Kitin og kitinderivater blir hydrolysert av kitinaser, som er enzymer som er til stede i en rekke ulike organismer, deriblant virus, bakterier, sopp, insekter, planter og pattedyr [1]. Kitin og kitosan kan også degraderes av lysozym, som da gjør det mulig å degradere polymerene i menneskekroppen [8].

Kitin og kitosan er biokompatible, biodegraderbare, ikke toksiske, antibakterielle og hydrerende. Disse egenskapene gjør dem svært godt egnet for medisinsk bruk, og da spesielt for sårheling. Kitosan er også hemostatisk, og kan benyttes til naturlig blodkoagulering i tillegg til å blokkere nervetrådene i sår som forårsaker smerte. Kitosan depolymeriseres gradvis, og frigjør GlcNAc som initierer celledeling av fibroblaster som vil gi raskere

sårheling og forebygging av arr [9]. Kitosan kan danne hydrogeler med ulike egenskaper for blant annet medisinsk og farmasøytisk bruk. Ulike typer kitosanhydrogeler og deres bruksområder er beskrevet nærmere i seksjon 1.1.3.1. Fibre dannet av kitin og kitosan er oksygenpermeable, porøse, har varierende porestørrelse, stor overflate/volum-ratio og har morfologiske likheter med ekstracellulære matrix i hud. Disse egenskapene gjør disse fibrene svært godt egnet som skaffold for vevskonstruksjon av huderstatninger [9]. Studier av bandasjer laget av kitosanfibre for bruk på brannskader viste at disse bandasjene førte til en raskere regenerering av den skadete huden sammenliknet med tradisjonelle metoder for behandling av andre og tredje grads brannskader [10]. Kitosan benyttes også i hudkremer i kosmetisk industri på grunn av fuktighetsgivende egenskaper [11]. Kitosan er en effektiv flokkulant på grunn av deres positive ladning, og kan derfor binde negative partikler, og dermed benyttes til rensing av drikkevann og avløpsvann (se seksjon 1.1.3.2).

1.1.3.1. Kitosanhydrogeler

Hydrogeler er makromolekylære nettverk som sveller i vann eller biologiske væsker, og kan absorbere store mengder vann og øke volumet betraktelig [12, 13]. De har en tredimensjonal nettverksstruktur av polymerkjeder, og vann fyller rommet mellom makromolekylene. Hydrogeler kan klassifiseres som fysikalske eller kjemiske. I fysikalske hydrogeler er polymerkjedene koblet sammen ved hjelp av elektrostatiske krefter, hydrogenbindinger, hydrofobe interaksjoner eller kjeder som er viklet sammen. Disse er ikke permanente og kan derfor oppløses. Kjemiske geler er derimot permanente, og kjedene er koblet sammen av kovalente bindinger [14].

Kitosan kan danne hydrogeler med ulike egenskaper avhengig av måten de blir framstilt på. I pH-sensitive hydrogeler vil svellingen styres ved å forandre pH, den vil enten utvide seg eller krympe når pH endres. Hydrogeler laget av kitosan kan brukes i systemer for kontrollert levering av ulike legemidler til kroppen ("drug delivery systems"), i disse systemene vil det være hensiktsmessig om hydrogelen er pH-sensitiv, da dette gjør det mulig med stedsspesifikk frigjøring av legemidler [12, 13]. Kitosan-hydrogeler kan også benyttes som skaffold i cellekultur eller enzym immobilisering da de danner et nettverk som stabiliserer celler eller enzymer, og tillater diffusjon av substrater, produkter og hjelpestoffer for cellekulturer. For disse hydrogelene er mekanisk stabilitet en viktig egenskap. Noen hydrogeler kan også ha sårhelende egenskaper, og noen kan ha egenskaper som gjør de egnet til vevskonstruksjon.

Andre viktige egenskaper for kitosanhydrogeler som skal benyttes til medisinsk og farmasøytisk bruk er at de er biokompatible og biodegarterbare [12].

Kovalent kryssbundne kitosanhydrogeler

Kovalent kryssbundne kitosanhydrogeler er kjemiske hydrogeler dannet av irreversible kovalente bindinger. Det dannes en permanent nettverksstruktur som tillater absorpsjon av vann og bioaktive stoffer. For å danne disse hydrogelene er det nødvendig med kryssbindere. Dette er molekyler med minst to reaktive funksjonelle grupper som danner broer mellom polymerkjedene. I tillegg til å tillate fri diffusjon av vann, vil nettverkene dannet av kovalente kryssbindinger forsterke de mekaniske egenskapene til hydrogelen, og disse mekaniske egenskapene blir opprettholdt også i miljøer med ekstreme pH-verdier, og de vil ikke løses opp. Hydrogeler basert på kovalente kryssbindinger kan deles inn i tre grupper ut ifra strukturene. Den første er kitosan som er kryssbundet med seg selv, hvor kun kitosankjeder danner nettverket ved hjelp av kryssbindere. Den andre er et hybrid polymernetttverk (HPN), hvor det dannes kryssbindinger mellom kitosan og en annen polymer. Det siste er et delvis eller fullt gjennomtrengelig polymernetttverk (IPN), som inneholder en polymer som tilsettes løsningen med kitosan før det kryssbindes. Denne polymeren bindes ikke til kitosan, men blir fanget i nettverket når kitosan kryssbindes [12].

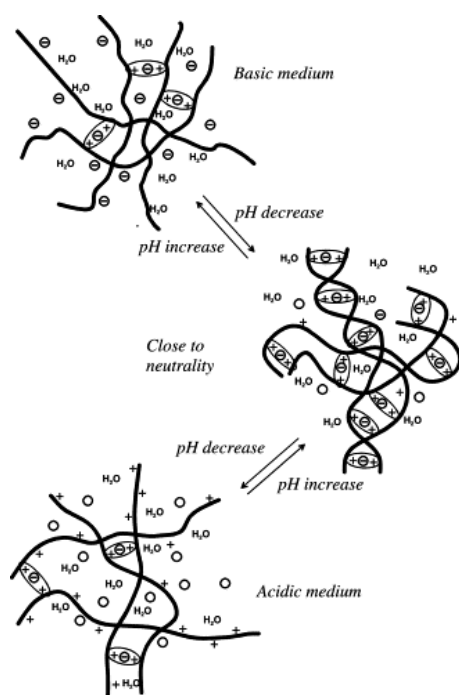
Potensielle anvendelsesområdene er i systemer for frigjørelse av legemidler, og permanente nettverk som kan brukes som skaffold i cellekultur. Problemet med disse hydrogelene er at kryssbinderne som brukes ofte er giftige, eller det er ukjent hvordan de opptrer i kroppen og det mangler da kunnskap om biokompatibiliteten. Kovalente kryssbundne hydrogeler kan kun svulle i sure miljøer, noe som begrenser deres bruksområde sammenlignet med andre hydrogeler som kan svulle i både surt og basisk miljø.

Dersom man finner en måte å fremstille helt sikre og biokompatible kovalent kryssbundne hydrogeler vil interessante bruksområder for disse være i fremstilling av implantater eller bandasjer, eller i hydrogelpartikler i orale legemidler hvor virkningsstoffene kan frigjøres i surt miljø [12].

Ionisk kryssbundne hydrogeler

Ionisk kryssbundne kitosanhydrogeler er eksempler på fysikalske hydrogeler. Enhetene som reagerer med kitosan er anioner eller anioniske molekyler. Disse har stort sett identiske

egenskaper ved dannelse av en hydrogel. Et nettverk dannes ved at de negativt ladede enhetene danner en bro mellom de positivt ladede kitosan polymerkjedene. Disse hydrogelene blir hovedsakelig benyttet i systemer for frigjørelse av legemidler. Fordeler med ioniske kryssbundne hydrogeler er at de er svært enkle å fremstille, de er stort sett biokompatible, og kan svulle i både surt og basisk miljø (figur 1.2). Dersom pH senkes vil ladningstettheten til kryssbinderne synke, som igjen fører til at kryssbindingstettheten til hydrogelen synker, og den vil svulle. Dersom pH heves vil kitosan bli mindre protonert, som igjen fører til lavere kryssbindingstetthet for hydrogelen, og den vil svulle. Den største ulempen med disse hydrogelene er at de mangler mekanisk stabilitet, og at det er høyere risiko for oppløsning, dette kan derimot være en fordel dersom det er ønskelig med rask frigjørelse av legemidler [12].



Figur 1.2. Ionisk kryssbundne kitosanhydrogeler som sveller i både surt og basisk miljø. Lav pH vil føre til færre ladninger på kryssbinderne, mens ved høy pH vil kitosankjedene bli mindre protonert. I begge tilfellene vil kryssbindingstettheten til hydrogelen synke [12].

Polyelektrolytiske komplekser (PEC)

PEC er hydrogeler dannet ved direkte interaksjoner mellom polymerkjedene, uten å bindes sammen av kryssbinderne. Disse dannes ved ioniske interaksjoner, men enhetene som reagerer med kitosan er polymerer med større molekylvekt enn kryssbinderene som benyttes i ionisk

kryssbundne hydrogeler. For å kunne danne en hydrogel må begge polymerene være ionisert og ha motsatte ladninger. To polyelektrolytter reagerer i vannløsning, og de elektrostatiske kreftene mellom kation aminogruppene på kitosan og de anioniske gruppene på en annen polyelektrolytt er de viktigste interaksjonene som fører til dannelse av PEC. De mest vanlige polyanionene inneholder en karboksylgruppe og kan være alginat, pektin og xantan. PEC-hydrogeler vil stort sett være biodegraderbare og biokompatible, avhengig av hvilken polyanionisk polymer som benyttes. PEC kan benyttes i systemer for frigjørelse av legemidler, i cellekulturer og enzym immobilisering, eller for vevskonstruksjon og sårheling. En fordel med disse hydrogelene er pH-sensitiv svelling i både surt og basisk miljø i likhet med ionisk kryssbundne hydrogeler. PEC er et interessant alternativ for kovalent kryssbundne hydrogeler da de ikke inneholder hjelpemolekyler eller kryssbindere som kan være giftige, i tillegg til at de også kan svulle i basiske løsninger. Ulempen er at oppløsning av komplekset kan forekomme siden det ikke er et permanent nettverk.

PEC og ionisk kryssbundne hydrogeler har liknende egenskaper, og har mange av de potensielt samme bruksområdene. Ioniske kryssbundne nettverk er enklere å framstille enn PEC, men den tilsatte polymeren i PEC-systemene kan likevel gjøre at disse hydrogelene er å foretrekke for spesifikke bruksområder. Et eksempel er ved bruk av glykosaminoglykan (GAG) som polyanion. GAG er en analog struktur av kitosan og finnes i blant annet brusk og hud som hyaluronsyre og kroitinsulfat, og hydrogeler med GAG som polyanion kan derfor brukes til bruskkonstruksjon og sårheling [15].

Kitosan/polyvinylalkohol (PVA) hydrogeler

Hydrogeler dannet av kitosan/PVA kompleks har en lignende struktur og egenskaper som PEC men dannes på en helt annen måte. Kitosan/PVA hydrogeler kan dannes ved autoklaving eller ved fryse/tine metoden. I kompleks dannet ved autoklaving er interaksjonene hydrogenbindinger mellom hydroksylgruppene på PVA og hydroksyl eller aminogruppene på kitosan. Ved fryse/tine metoden dannes det en krystallittforbindelse mellom PVA-kjedene i tillegg til hydrogenbindinger med kitosan. Kun kitosan og PVA er nødvendig for dannelse av disse hydrogelene, de vil derfor ikke inneholde noen toksiske hjelpemolekyler eller kryssbindere, og vil da være både biodegraderbare og biokompatible. Hydrogelene dannet ved autoklaving er lett løselig i surt miljø, og ikke egnet til frigjøring av legemidler, men kan brukes som skaffold i cellekultur [15]. Studier har vist at disse kompleksene egner seg svært godt som skaffold i fibroblastkulturer [16]. Hydrogelene dannet

ved fryse/tine metoden er mindre løselige, og kan derfor benyttes i systemer for frigjøring av legemidler. Svelling av disse hydrogelene kan ikke kontrolleres av pH, noe som gir dem et mer snevert bruksområde enn andre pH-sensitive hydrogeler. Likevel er medisinsk og farmasøytisk bruk av PVA godt dokumentert, så kitosan/PVA komplekser er et godt alternativ til PEC og ionisk kryssbundne hydrogeler for fremstilling av biokompatible systemer for frigjøring av legemidler dersom pH-kontrollert frigjøring ikke er nødvendig [15].

Podete kitosanhydrogeler

Kitosan har to reaktive grupper som kan podes; hydroksylgrupper på C₃ og C₆ på GlcN og GlcNAc og frie aminogrupper på GlcN. Ved poding av kitosan dannes det funksjonelle derivater ved kovalente bindinger av et molekyl (poden) til kitosan. Et nettverk dannes vanligvis ved at kitosan polymerkjeder bindes sammen via de podete gruppene. Sekundære interaksjoner mellom podete grupper kan være hydrogenbindinger eller hydrofobe interaksjonen, avhengig av egenskapene til podene. Eksempler på podere som kan benyttes til dannelsen av hydrogeler er alkylgrupper, aldehydgrupper, palmitinsyre og polyetylenglykol (PEG). Podete kitosanhydrogeler er pH- og ionesensitive, og kan swelle dersom pH eller ione konsentrasjonen endres. Dette gjør de godt egnet til systemer for frigjøring av legemidler. Disse hydrogelene er også interessante i forhold til sårheling, siden kitosanderivatene kan ha en forbedret bakteriostatisk aktivitet. Svelling av disse hydrogelene forgår kun i surt miljø, noe som begrenser bruksområdene sammenliknet med PEC og ionisk kryssbundne hydrogeler. I tillegg til kitosan og et podemolekyl kan det være nødvendig med hjelpemolekyler for å katalysere podingsreaksjonen. Hjelpemolekyler er ofte toksiske, og det kan være igjen rester av disse i hydrogelen. Disse hydrogelene har derfor ingen fordeler sammenliknet med kovalent kryssbundne hydrogeler med tanke på biokompatibilitet. Podete kitosanhydrogeler er også mer krevende å fremstille enn kjemiske og andre fysikalske hydrogeler, og vil derfor i utgangspunktet være et andrevalg ved fremstilling av hydrogeler. Likevel kan de være interessante for spesifikke medisinske eller farmasøytiske bruksområder dersom de kan fremstilles uten toksiske hjelpemolekyler, og podingen av kitosan samtidig vil gi forbedrede egenskaper som bakteriostatisk effekt eller bedre sårheling [15].

1.1.3.2. Kitosan som bioflokkulant

Kitosan kan som nevnt være en svært effektive flokkulant. Drikkevann og avløpsvann kan renses ved hjelp av kitosan, og det fjerner tungmetaller, sprøytemidler, fargestoffer og andre toksiske komponenter fra vann effektivt [7].

I løsning vil aminogruppene på GlcN protoneres, og gir dermed biopolymeren en positiv ladning, og siden de fleste bakterier, makromolekyler og andre kolloidale partikler er negativt ladet vil elektrostatiske interaksjoner føre til flokkulering [6]. Flokkuleringseffektiviteten til kitosan har ofte vist seg å øke ved høy grad av deactylering og lav pH, noe som fører til en økt ladningstetthet. Når det gjelder flokkulering av *Escherichia coli* viser derimot studier hvor det er brukt kitosan med ulik grad av deacetylering at høyere F_A gir bedre flokkulering enn lav F_A [17].

1.1.2. Biosyntese av kitin

Kitin syntase (CS) er et enzym som katalyserer syntese av kitin, og substratet i denne kjemiske reaksjonen er UDP-GlcNAc [1]. Biosyntesen av kitin foregår i membranbundne proteinkomplekser, hvor CS overfører GlcNAc til den ikke reduserende enden av den voksende polymeren via UDP-GlcNAc [18].

CS har blitt nøye studert i soppen *Saccharomyces cerevisiae*. Det er funnet tre ulike CS lokalisert i plasmamembranen til *S. cerevisiae*. *CHS1*-genet koder for den viktigste CS *in vitro*, men har liten CS-aktivitet *in vivo*. *CSI* har likevel en viktig funksjon i cellen, der den er delaktig i cytokinesen og reparerer kitinnettverket etter celledelingen. Produktet fra *CHS2* bidrar til dannelsen av en kitinplate som fysisk skiller dattercellen fra morcellen under celledelingen. *CSIII*, kodet av *CHS3*, er den syntasen i *S. cerevisiae* som står for dannelsen av den største mengden cellulært kitin (> 90 %). *CSIII* er avhengig av produktene fra *CHS4*, *CHS5*, *CHS6* og *CHS7* for å katalysere syntesen av kitin, disse produktene er regulator proteiner uten CS-aktivitet. De tre proteinene med CS-aktivitet inneholder signatursekvensen QRRRW som er essensiell for katalytisk aktivitet [19].

1.1.4. Bakterielle kitinderivater

Det har vist seg at biopolymerer med kitinlignende struktur og egenskaper også kan forekomme i bakterier. Ved dyrking av *Citrobacter* sp. TKF04 i acetat-propionat medium viste det seg at flokkuleringsaktiviteten økte parallelt med celleveksten. Dette indikerte at bioflokkulanter ble akkumulert ekstracellulært i mediet mens bakterien vokste, noe som betyr at flokkulantene ble produsert ved biosyntese og ikke via autolyse av cellene.

Bioflokkulantene ble analysert, og spektroskopiske analyser viste et lignende transmisjonsmønster som kitin og kitosan, og ved hjelp av tynnsjikt-kromatografi ble det vist at hovedkomponenten i bioflokkulanten var glukosamin, som også er hovedkomponenten i kitin og kitosan. Det viste seg også at flokkuleringsaktiviteten forsvant da det ble tilsatt kitinase, og at aktiviteten ble lavere i basiske løsninger. Disse resultatene indikerer at bioflokkulanten som produseres av TFK04 har en struktur som likner kitin eller et derivat av kitin, som for eksempel kitosan [20].

Son et al. har påvist en kationisk polyglukosamin biopolymer (PGB-1), som er en effektiv flokkulant og har flere likheter til kitinderivatet kitosan. Biopolymeren er produsert av *Enterobacter* sp. BL-2, en bakterie som ble funnet i kinakål. Analyser av biopolymeren viste at den inneholdt 5,9 % nitrogen og at hovedkomponenten var glukosamin (>95 %).

Molekylvekten ble målt til omtrent 106 kDa, som er lite sammenliknet med andre mikrobielle bioflokkulanter. Ved agarose gelelektroforese beveget PGB-1 seg mot katoden til tilnærmet samme posisjon som kitosan. Transmisjonsmønsteret for PGB-1 var svært likt mønsteret til kitosan, men FT-IR spekteret viste også at den antakeligvis inneholder en ukjent funksjonell gruppe som ikke er til stede i kitosan. NMR spekteret indikerte at biopolymeren er satt sammen av glukosamin enheter og (1,4)-glykosidbindinger. PGB-1 flokkulerer *S.cerevisiae* og den gram negative bakteriene *E.coli* mer effektivt enn kitosan, men er derimot mindre effektiv på den gram positive bakterien *Bacillus subtilis*. PGB-1 kan i tillegg flokkulere og bleke noen oppløste fargestoffer som kitosan ikke er i stand til. Denne egenskapen kan komme av den ulike funksjonelle gruppen, eller den svært lave molekylvekten sammenliknet med kitosan og andre mikrobielle bioflokkulanter. PGB-1 kan potensielt benyttes innefor flere av de samme feltene hvor kitosan er anvendt [21].

1.2. RK2-plasmidet

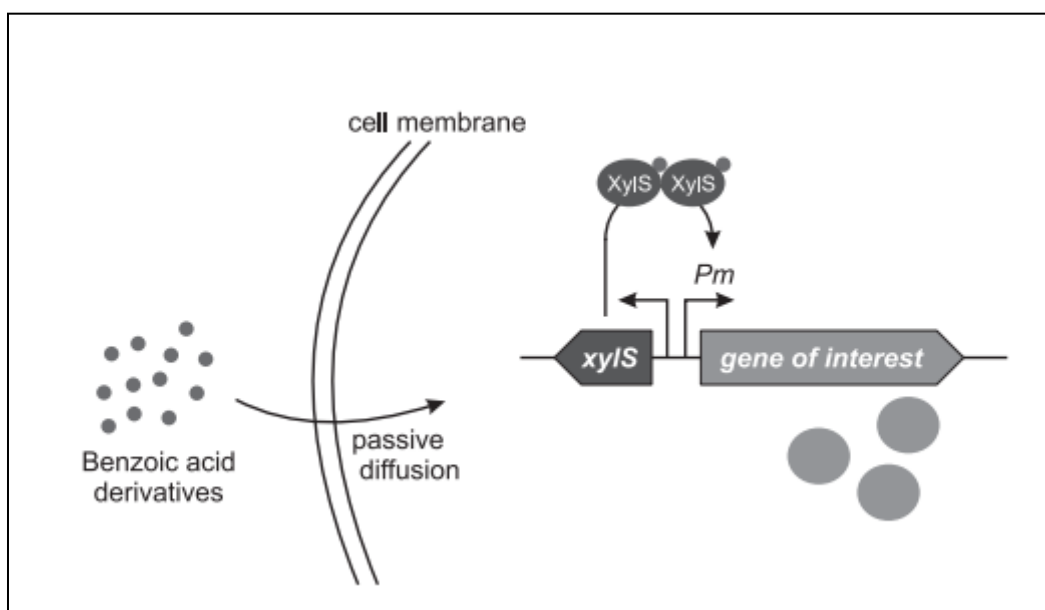
RK2 er et 60 kb plasmid som kan replikere i et stort antall ulike bakterier. RK2 inneholder *oriV* som er startpunktet for replikasjon av plasmidet. Proteinet kodet fra *trfA*-genet er det eneste proteinet som er essensielt for at plasmidet skal kunne replikere. *trfA*-genet koder for to replikasjonsinitierende proteiner; TrfA-44 som er et 44 kDa protein, og TrfA-33 som er et 33 kDa protein. Disse proteinene kommer fra samme åpne leseramme (ORF), men har ulike translasjonsstartpunkt. Ved konstruksjon av nye plasmider basert på RK2-plasmidet, er det kun *OriV* og genet *trfA* som er nødvendig for at plasmidet potensielt skal kunne replikere [22-24]. RK2 inneholder også *oriT* som er startpunktet for konjugativ overføring til andre bakterieceller [25].

En rekke studier, deriblant fra Blatny et al [24], har vist at vektorer konstruert ut ifra det minimale replikonet til RK2 kan benyttes i mange ulike bakterier. Men det kan i noen tilfeller oppstå utfordringer som for eksempel ustabile plasmid eller dårlig overføringsfrekvens. For å forbedre stabiliteten til plasmidene ble *parDE* sekvensen fra RK2 inkorporert. Denne sekvensen vil i noen verts bakterier være involvert i stabilisering av plasmidet. *oriT* ble også inkorporert i plasmidene for å muliggjøre konjugativ overføring [24].

1.3. XylS/*Pm* regulator/promotor systemet

XylS/*Pm* er et positivt regulator/promotor system som opprinnelig kommer fra TOL plasmidet pWWO til *Pseudomonas putida*. Dette plasmidet koder for et spor for nedbryning av xylener og toluener. Enzymene som er involvert i nedbrytningen er kodet av gener gruppert i et øvre-operon og et meta-operon. Genene i øvre-operon er transkribert fra *Pu*-promotoren som er positivt regulert av XylR. Genene i meta-operonet transkriperes fra *Pm*-promotoren som er positivt regulert av XylS, som aktiveres av substrater for enzymene kodet av meta-operonet [26, 27]. *xylS* genet kan transkriberes fra to ulike og individuelt regulerte promotorer kalt *Ps1* og *Ps2*. Dersom XylR er til stede i cellen kan det aktivere transkripsjon fra *Ps1*, mens transkripsjon fra *Ps2* er konstitutiv. Når XylS er produsert i store mengder kan det binde og aktivere *Pm*-promotoren uten induser til stede. Ved tilstedeværelse av induser kan XylS aktivere transkripsjon fra *Pm* ved lav proteinkonsentrasjon, som er tilfelle dersom XylS kun uttrykkes fra *Ps2* [26].

XylS/*Pm* regulator/promotor systemet har blitt brukt til konstruksjon av en rekke ulike ekspresjonssystemer med ulike egenskaper og bruksområder. XylS/*Pm* ekspresjonskassetten kan kombineres med de essensielle elementene for replikasjon fra RK2 plasmidet for å danne en ekspresjonsvektor som kan replikere i en rekke ulike bakterier. Den kan også konstrueres flere versjoner av plasmidet med ulike antibiotikamarkører, polylinker med ulike restriksjonssteder, og *oriT* fra RK2 for konjugal overføring av plasmidet til andre bakterieceller. Ved hjelp av rekombinant DNA-teknologi og med RK2 plasmidet og XylS/*Pm* som utgangspunkt kan det altså dannes mange ulike klonings- og ekspresjonsvektorer som kan benyttes i en rekke bakterier. Ønsket gen kan klones inn nedstrøms for *Pm*-promotoren, og transkripsjon av dette genet vil da være under kontroll av *Pm*. I alle vektorene vil XylS uttrykkes av den konstitutive *Ps2* promotoren, men vil ikke aktivere transkripsjon fra *Pm* uten inducer tilstede. Indusermolekyler er derivater av benzoesyre, som for eksempel *m*-toluat. Disse molekylene passerer passivt over cellemembranen og binder og aktiverer XylS. Aktivert XylS stimulerer transkripsjon fra *Pm* ved å binde til operatorsekvensen av promotoren (figur 1.3) [26].



Figur 1.3. Derivater av benzoesyre passerer passivt over cellemembranen og binder og aktiverer XylS som stimulerer transkripsjon fra *Pm* [26].

1.3.1 *PmDI-8* promotoren

Plasmidet pIB11 inneholder XylS/*Pm* regulator promotor systemet i tillegg til de essensielle elementene for replikasjon, *OriV* og *trfA* fra RK2-plasmidet. Mutanten DI-8 inneholder en

mutasjon i DNAet i *Pm* regionen som koder for den 5' utranslaterte regionen (UTR) av mRNAet. Denne mutasjonen har mest trolig en negativ påvirkning på translasjonseffektiviteten av mRNAet. Dette fører til at ekspresjon av gener uten induser til stede blir sterkt redusert samtidig som ekspresjon med induser til stede opprettholdes, men naturlig nok i mindre grad enn fra villtypen [28].

1.4. *Erwinia carotovora*

Erwinia carotovora går også under navnet *Pectobacterium carotovorum*, og er en stavformet, gram negativ enterobakterie som kan forårsake bløtråte i planter. Den angriper plantenes vaskulære systemer og produserer store mengder exoenzymer, blant annet pektinaser, cellulaser, og proteaser som fører til degradering av celleveggen til plantene i tillegg til frigjøring av næringsstoffer for bakteriell vekst. Tilgang på oksygen og nitrogen, temperatur, osmolaritet og jernmangel er noen av faktorene som påvirker patogene angrep fra bakterien. *E. carotovora* er fakultativt anaerob og mesofil med en optimumstemperatur mellom 27 og 30 °C. [29].

Genomet til *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*) har blitt sekvensert. Det har vist seg at omtrent en tredjedel av *Eca* genene skiller seg fra andre sekvenserte patogene enterobakterier. Noen av disse genene gir uventede metabolske egenskaper som for eksempel nitrogenfiksering og nedbrytning av opiner. Disse egenskapene gir bakterien en potensiell fordel for å overleve i jord og områder rundt planterøtter, risosfæren [30].

1.4.1. Bruk av XylS/*Pm* ekspresjonssystemet i *E. carotovora*

Studier at Mermod et al.[31] har vist at ekspresjonssystemet basert på XylS/*Pm* fra TOL plasmidet pWWO fra *P. putida* kan brukes for å regulere ekspresjon av klonede gener i en rekke gram negative bakterier, inkludert *E. carotovora*. Det ble konstruert en ekspresjonsvektor som inneholdt *Pm* og genet for XylS, og som kontrollgen ble *xylE* satt under kontroll av *Pm*. Vektoren ble overført til ulike gram negative bakterier, og dyrket i medium med og uten induseren *m*-toluate. Måling av ekspresjonsnivået fra *Pm*-promotoren viste at *E. carotovora* hadde blant de høyeste ekspresjonsnivåene med *m*-toluat tilgjengelig, samtidig som ingen ekspresjon ble observert uten induser [31].

1.5. Formålet med oppgaven

Kitin blir som regel utvunnet fra skallet fra rester av skalldyr som for eksempel reker eller krabbe, og kommersiell kitosan blir produsert ved deacetylering av utvunnet kitin. Produksjon av bakteriell kitin vil gi mange nye muligheter innen forskning på kitin og kitosan og deres anvendelsesområder. Bakteriell kitin kan også inneha andre egenskaper som kitin fra eukaryote organismer ikke har. Kitin og kitosan har svært mange egenskaper som egner seg godt til medisinske og farmasøytiske bruksområder. For personer som er allergiske mot skalldyr vil medisinske produkter som inneholder kitin utvunnet fra for eksempel rekeskall være lite gunstig, og bruk av bakteriell kitin i disse produktene vil kunne være et alternativ. Bruk av bakteriell kitin vil også være et bra alternativ for personer som av etiske eller religiøse grunner ikke ønsker å benytte seg av medisinske produkter som inneholder polymerer som er utvunnet fra høyere organismer.

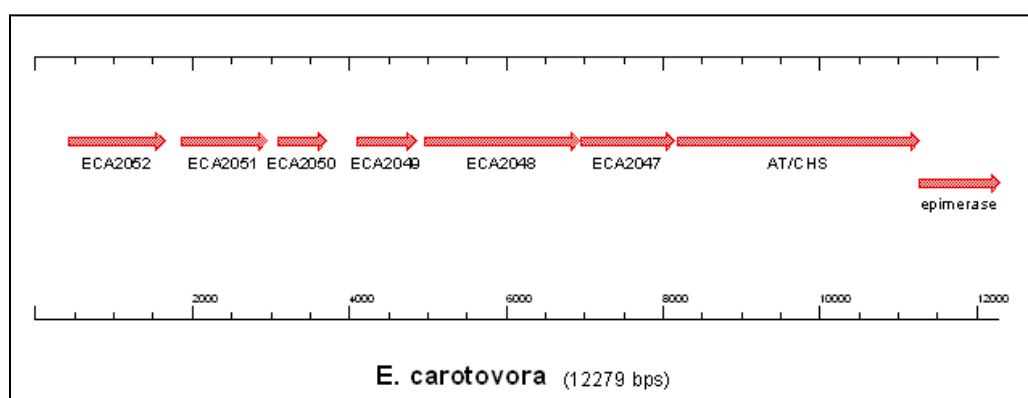
Studier av genomsekvensen til *E.carotovora* har vist at det inneholder en genklynge hvor et gen (*ECA2046*) koder for et antatt bifunksjonelt enzym med potensiell kitin syntase og aminotransferase aktivitet. Anne Tøndervik har gjennomført søk med CHS1 i NCBI databaser, og kommet fram til at produktet fra *ECA2046* har homologi med CSI fra *S.cerevisiae*. Proteinet inneholder også signatursekvensen QRRRW som er til stede i alle tre kitin syntasene i *S.cerevisiae*, og er essensiell for den katalytiske aktiviteten til enzymet. Det ble funnet at *ECA2046* fra *E. carotovora* (NCBI: YP_050141.1) har 47 % homologi med CSI (NCBI: CAA96086). *ECA2046* og CSI består henholdsvis av 1026 og 1131 aminosyrer. I *ECA2046* ligger signatursekvensen i første halvdel av proteinet, mens i CSI i *S.cerevisiae* er det lokalisert i andre halvdel (figur 1.4).

CHS1	733	ILKYCRSSYASTDVPERVPEFILQRRRWLNGSFFASVYSFCHFYRVWS-SGHNIGRKLLL	791
		++Y + +.....+D E + QRRRW+N + A ++S V + S + R+ +	
ECA2046	323	GVRVEQGATVRSDEPPTFIELLRQRRRWVNSTIAARLHLSRLPAVMTQSSLSPLRRCGI	382

Figur 1.4. Signatursekvensen QRRRW er aminosyre 756-760 i CHS1, og aminosyre 346-350 i ECA2046.

Genklynga i *E. carotovora* som inneholder den potensielle kitin syntasen er vist i figur 1.5. Nedstrøms for *ECA2046* ligger genet *ECA2045* som koder for et protein med antatt NAD-avhengig empimerase/dehydratase aktivitet. Oppstrøms for *ECA2046* ligger *ECA2047* som

koder for et mulig protein med helix-turn-helix motiv. *ECA2048* ligger oppstrøms for *ECA2047*, og dette genet koder for et konservert protein med ukjent funksjon. Det er stor sannsynlighet for at de nevnte genene, inkludert *ECA2046* tilhører samme operon da avstanden mellom disse genene er svært liten (< 35 basepar). Øvrige gener i genklynga vist i figur 1.5 er *ECA2049* som koder for et hypotetisk protein med likheter til et konservert hypotetisk protein i *Pseudomonas aeruginosa*, *ECA2050* som koder for et antatt treonin effluks protein, *ECA2051* som koder for en mulig ABC transportør, og *ECA2052* som koder for en transkripsjonsregulator i GntR-familien.



Figur 1.5. Genklynge i *E. carotovora* som inneholder genet *ECA2046* (merket AT/CHS) som koder for et enzym med potensiell kitin syntase og aminotransferase aktivitet. *ECA2045* (merket epimerase) ligger nedstrøms for *ECA2046* og koder for et protein med mulig NAD-avhengig epimerase/dehydratase aktivitet. Genene *ECA2048*, *ECA2047*, *ECA2046* og *ECA2045* tilhører trolig samme operon.

Det var ønskelig å aktivere transkripsjon av *ECA2046* ved å sette genet under kontroll av den induserbare *PmDI-8* promotoren, og undersøke om aktivering ville føre til produksjon av bakteriell kitin. Ved å sette inn promotoren oppstrøms for *ECA2046* kunne transkripsjon av dette genet, og sannsynligvis *ECA2045* kontrolleres. Ved å sette inn promotoren oppstrøms for *ECA2048* kunne transkripsjon av alle genene i det sannsynlige operonet, inkludert *ECA2046* kontrolleres, dersom det er tilfelle at de tilhører samme operon. Produksjon av en aktiv kitin syntase kan være avhengig av produktene fra andre gener i genklynga vist i figur 1.5, eller eventuelt andre co-regulerte gener i genomet. Produksjon av eventuell bakteriell kitin ble undersøkt ved måling av flokkuleringsaktivitet, og ved H^1 NMR-analyser.

2. Material og metode

2.1. Vekstmedier og løsninger

Acetatmedium

10 g/l NaAc
1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
1 g/l K_2HPO_4
0,05 g/l NaCl
0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,05 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,01 g/l FeCl_3
0,1 g/l Gjærekstrakt

Løst i sterilt ionefritt vann (SIV) og sterilfiltrert

Luria Broth (LB)

10 g/l Trypton
5 g/l Gjærekstrakt
5 g/l NaCl

Løst i SIV og autoklavert

Luria Agar (LA)

LB tilsatt 15 g/l agar. Autoklavert

Psi-medium

20 g/l Trypton
5 g/l Gjærekstrakt
5 g/l MgSO_4

Løst i SIV og autoklavert. pH ble justert til 7,6 med KOH før autoklaving.

TFB1

30 mM KAc

100 mM RbCl

10 mM CaCl₂ · 2H₂O

50 mM MnCl₂ · 4H₂O

15 % (v/v) Glyserol

Løst i SIV og sterilfiltrert. pH ble justert til 5,8 med fortynnet edikksyre før sterilfiltrering.

TFB2

10 mM MOPS

75 mM CaCl₂ · 2H₂O

10 mM RbCl

15 % (v/v) Glyserol

Løst i SIV og sterilfiltrert. pH ble justert til 6,5 med fortynnet edikksyre før sterilfiltrering.

SOC-medium

20 g/l Trypton

5 g/l Gjærekstrakt

0,5 g/l NaCl

2,5 g/l KCl

3,6 g/l Glukose

5,08 g/l MgCl₂

Løst i SIV og sterilfiltrert.

SOB-medium

20 g/l trypton

5 g/l gjærekstrakt

0,584 g/l NaCl

0,186 g/l KCl

Løst i SIV og autoklavert. pH ble justert til 7,0 før autoklaving.

50 x TAE buffer

242 g Tris

57,1 ml isedikksyre

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8)

SIV tilsatt til 1000 ml. 1 x TAE buffer lages ved å tilsette 50 volumenheter SIV.

Loading buffer

70 % Glyserol

0,25 % Bromfenolblått

10 % Ficoll

SIV tilsatt til 100 % totalvolum.

2.2. Primere

2.2.1. PCR-primere

PCR-primere ble bestilt fra Sigma-Aldrich.

Primere brukt for å amplifisere ønskede sekvenser fra genomet til *E.carotovora*:

ECA2046F: 5'-CACGCTTCATATGCAGAAAACAATGAC-3'

ECA2046R: 5'-ATTCGTACGTGGTACTGCGGCTCATAAAG-3'

oppECA2046F: 5'-TATAAGCTTTCCTGCCTTGCCGACTCACC-3'

oppECA2046R: 5'-TAACTGCAGATAGAAAGCGTGTCTGTAG-3'

ECA2048F: 5'-ATTCATATGCATAAACAGGATCGTTTTG-3'

ECA2048R: 5'-ATTCTGCAGTGGCGACAGTTTCCCACATC-3'

oppECA2048F: 5'-ATTAAGCTTGAATACCAAAGGCACCTCAC-3'

oppECA2048R: 5'-TAACTGCAGATGCATGATAGTAGATTATCC-3'

Primere benyttet til å undersøke mutantene:

EcPm2046F: 5'-GACTTCCGCTCGGTATATGC-3'

EcPm2046R: 5'-GCAAACGTTGCGGTAACTC-3'

EcPm2048F: 5'-ACCCTTGCCAGGGTCCAATC-3'

EcPm2048R: 5'-GCTTGCTCCCGCGTCATATC-3'

2.2.2. Sekvenseringsprimere

M13(-40)F: 5'-TTTTCCCAGTCACGAC-3'

M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

pGEM/plitseqF: 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'

2.3. Bakteriestammer og plasmider

Oversikt over bakteriestammer og plasmider brukt i oppgaven.

Tabell 2.1. Bakteriestammer benyttet i denne oppgaven

Bakteriestamme	Beskrivelse	Kilde
<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	Villtype	Bell et al. 2004 [30]
<i>E. coli</i> DH5 α	Derivat av DH1 med høy transformasjonseffektivitet.	Hanahan, 1983 [32]
<i>E. coli</i> S17.1	Derivat av <i>E. coli</i> 294. Inneholder derivat av RP4 med <i>trfA</i> integrert i kromosomet. Kan benyttes til konjugering.	Simon et al. 1983 [33]

Tabell 2.2. Plasmid benyttet i denne oppgaven

Plasmid	Beskrivelse	Kilde
pUC128	Derivat av pUC118. Inneholder M13 ori, gen for ampicillinresistens og polylinker i <i>lacZ</i> .	Keen et al. 1988 [34]
pHE264	Derivat av pHE179. Inneholder ori, M13 ori, <i>Pm/xylS</i> -kassetten og gener for ampicillin- og tetracyclinresistens.	H. Ertesvåg (upublisert)
pIB11 DI8	RK2-derivatet pIB11 med DI-8-mutasjon i <i>Pm</i> . Inneholder gen for kanamycinresistens.	Lale et al. 2011 [28]
pHE246	RK2 derivat med <i>oriT</i> for konjugering. <i>TrfA</i> -avhengig replikasjon. Inneholder <i>lacZ</i> og gener for ampicillin- og tetracyclinresistens.	H. Ertesvåg (upublisert)
pHE145	RK2 derivat med tetracyclinresistens.	H. Ertesvåg (upublisert)
pMS11	Inneholder genet for kanamycinresistens på et transposon.	Mona Senneset (upublisert)

Tabell 2.2 fortsetter

pKNH1	Derivat av pHE264 med 2,5 kb fragment fra pIB11 DI-8 (<i>BstEII-Acc65i</i>) som inneholder <i>PmDI-8</i> og <i>xylsS</i> .	Denne oppgaven
pKNH21	Derivat av pUC128 med PCR-produkt med <i>ECA2046</i> fra <i>E. carotovora</i> .	Denne oppgaven
pKNH22	Derivat av pKNH1 med 1,4 kb fragment fra pKNH21 (<i>NsiI-NdeI</i>)	Denne oppgaven
pKNH23	Derivat av pUC128 med PCR-produkt med <i>ECA2047</i> fra <i>E. carotovora</i> .	Denne oppgaven
pKNH24	Derivat av pKNH22 med 1,6 kb fragment fra pKNH23 (<i>HindIII-PstI</i>).	Denne oppgaven
pKNH25	Derivat av pHE246 med 4,8 kb fragment fra pKNH24 (<i>AvrII-NotI</i>). <i>trfA</i> -avhengig replikasjon	Denne oppgaven
pKNH31	Derivat av pUC128 med PCR-produkt med <i>ECA2048</i> fra <i>E. carotovora</i> .	Denne oppgaven
pKNH32	Derivat av pKNH1 med 1,5 kb fragment fra pKNH31 (<i>PstI-NdeI</i>).	Denne oppgaven
pKNH33	Derivat av pUC128 med PCR-produkt med <i>ECA2049</i> fra <i>E. carotovora</i> .	Denne oppgaven
pKNH34	Derivat av pKNH32 med 1,5 kb fragment fra pKNH33 (<i>HindIII-PstI</i>).	Denne oppgaven
pKNH35	Derivat av pHE246 med 4,9 kb fragment fra pKNH34 (<i>AvrII-NotI</i>). <i>trfA</i> -avhengig replikasjon	Denne oppgaven

2.4. Dyrking av bakteriekulturer

Bakteriekolonier eller frossen bakteriekultur ble inokulert i sterilt vekstmedium i autoklaverte kolber eller sterile rør. Antibiotika var tilsatt vekstmediet om nødvendig. Kulturen ble inkubert over natt i risteinkubator. *E.coli*-celler ble inkubert i 37 °C og *E.carotovora*-celler ble inkubert i 30 °C.

Antibiotikaene som ble brukt for selektering var ampicillin, kanamycin og tetracyclin. 200 µg/ml ampicillin, 40 µg/ml kanamycin og 15 µg/ml tetracyclin ble benyttet dersom ikke andre konsentrasjoner er oppgitt.

For å aktivere transkripsjon fra *PmDI-8* promotoren ble det tilsatt *m*-toluat til konsentrasjonene 0,1 mM, 0,25 mM og 0,5 mM.

2.5. Måling av flokkuleringsaktivitet

Kitinderivatet med positiv ladning er effektive flokkulanter, og kan flokkulerer blant annet *E.coli*. Det er mulig å identifisere flokkulanter i et medium ved å bruke mediet til å resuspendere *E.coli*-celler, for deretter å måle optisk tetthet (OD) etter 2 timer, og etter prøvene har stått over natt, og sammenlikne disse verdiene med en kontrollprøve med *E.coli*-celler resuspendert i medium uten flokkulanter. Flokkuleringsaktiviteten kan beregnes ved formel 1. Flokkuleringsaktivitet lavere enn 10 % defineres som ingen aktivitet.

$$\text{Flokkuleringsaktivitet} = \left(1 - \left(\frac{OD_{\text{prøve}}}{OD_{\text{kontroll}}} \right) \right) \cdot 100\% \quad (1)$$

15 OD₆₂₀-enheter fra overnattskultur av *E.coli* DH5α ble sentrifugert, og supernatanten ble fjernet. Cellene ble resuspendert i 5 ml supernatant fra *E.carotovora* som potensielt kan inneholde flokkulanter, og kontrollprøven ble tilsatt 5 ml rent dyrkningsmedium. Løsningene ble vortexet i 10 minutter. Det ble laget 3 paralleller og prøvene ble plassert i romtemperatur. Etter 2 timer ble OD₆₂₀ målt fra topplag, dagen etter ble OD₆₂₀ målt fra midten. Flokkuleringsaktiviteten ble regnet ut fra gjennomsnittsverdiene til de 3 parallellene og kontrollprøven.

2.6. PCR

PCR (polymerase chain reaction) er en metode for å amplifisere spesifikke DNA sekvenser in vitro. Ut ifra svært små mengde DNA kan det genereres store mengder av en ønsket DNA-sekvens ved hjelp av denne teknikken [35]

Viktige komponenter i en PCR reaksjon i tillegg til templat (DNA-molekyl) er to oligonukleotid primere, DNA polymerase, dNTPs (frie nukleotider) og buffer som blant annet inneholder magnesium ioner. Oligonukleotid primere er korte enkelttrådede DNA-sekvenser som er designet for å binde seg til hver ende av den DNA-sekvensen som er ønskelig å amplifisere. For at primerene kun skal binde seg til det ønskede stedet på templatet bør de ha en lengde på mellom 17 og 30 nukleotider. GC-innhold bør være på omtrent 50 %. Den ene primeren binder seg til den kodende DNA-tråden og initierer syntesen av den komplementære antisense-tråden, mens den andre primeren binder seg til den komplementære tråden og initierer syntese av sense-tråden. [36]

DNA-polymerase er et enzym som katalyserer syntese av nye DNA-tråder. Dette foregår ved at enzymet binder seg til 3'enden på primerene, og bruker dNTP til å syntetisere den komplementære tråden. Polymerasen må tåle høye temperaturer siden PCR er en termosyklisk reaksjon. Magnesium fungerer som en kofaktor for polymerasen, og er nødvendig for at den skal fungere. Bufferen som tilsettes PCR-blandingen inneholder magnesium, i tillegg til riktig saltkonsentrasjon og pH for at reaksjonen skal foregå under optimale forhold. [36]

En PCR syklus består av 3 steg som foregår ved ulike temperaturer; denaturering, hybridisering og polymerisering. Ved denaturering blir det dobbeltrådede DNA-molekylet separert til to enkelttråder. Dette skjer ved at hydrogenbindingene mellom nukleotidene blir brutt på grunn av høy temperatur, 90-95 °C. Ved hybridisering blir temperaturen senket, og oligonukleotid primerene kan binde seg til de enkelttrådede DNA-molekylene og fungere som et startpunkt for syntesen av nye DNA-tråder. Hybridiseringstemperaturen bestemmes ut i fra primerenes lengde og sekvens, og er vanligvis mellom 50 °C og 70 °C. Under polymeriseringen syntetiserer DNA-polymerasen de nye DNA-trådene i 5' til 3' retningen. Temperaturen i dette steget bestemmes av optimumstemperaturen til polymerasen [37].

Taq DNA-polymerase er den mest brukte polymerasen i PCR, og er et varmostabilt enzym som er isolert fra bakterien *Thermus aquaticus*. Enzymet tåler svært høye temperaturer, og ved 95 °C har den en halveringstid på 40 minutter som gjør den godt egnet for PCR siden den

da kan gjennomgå mange sykluser uten å degraderes under denaturering av dobbeltrådet DNA [38]

Expand High Fidelity PCR system ble brukt for å utføre PCR. Dette er godt egnet til å amplifisere DNA-sekvenser med en størrelse opptil 5 kb. Enzymblandingen inneholder i tillegg til Taq DNA polymerasen Tgo DNA polymerase som har ”proofreading”-egenskaper. Denne blandingen av enzymer fører til en nøyaktighet som er 3 ganger høyere enn med Taq polymerase alene (Roche).

0,2 ml PCR-rør ble satt på is og tilsatt reaksjonsblandingen:

1 µl cellekultur eller plasmid *
5 µl Expand High Fidelity buffer med 15 mM MgCl₂ **
1 µl forward primer
1 µl reverse primer
1 µl dNTP løsning
0,5 µl Expand High Fidelity enzymblanding
SIV til 50 µl totalvolum

* eventuelt bakteriekoloni overført med en pipettespiss. Dette regnes som 0,5 µl av totalvolumet

** eventuelt 5 µl Expand High Fidelity buffer uten MgCl₂ og nødvendig mengde 25 mM MgCl₂ stock-løsning for ønsket magnesiumkonsentrasjon

PCR-rørene ble hele tiden holdt på is, og den ferdige reaksjonsblandingen ble plassert i en termosyklus (VWR thermal cycler) når temperaturen nærmet seg 95 °C. Tabell 2.3 viser programinnstillingene på termosykleren ved PCR i dette forsøket dersom ikke annet er oppgitt.

Tabell 2.3. Programinnstilling på VWR thermal cycler for PCR. Temperaturer og tid for innledende denaturering, denaturering, hybridisering, polymerisering, avsluttende polymerisering og avkjøling.

		Temperatur	Tid
1	Innledende denaturering	95 °C	2 minutter
2	Denaturering	95 °C	30 sekunder
3	Hybridisering	55 °C	30 sekunder
4	Polymerisering	68 °C	2 minutter
5	Avsluttende polymerisering	68 °C	10 minutter
6	Avkjøling	4 °C	ubegrenset

Steg 2, 3 og 4 ble repetert 35 ganger før steg 5 og 6.

2.7. Isolering av plasmid-DNA

Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification system fra Promega ble brukt til å isolere plasmid fra bakterieceller [39].

For å klargjøre lysatet for isolering av høykopitallplasmid ble cellene høstet fra 3 ml overnattskultur ved sentrifugering i 5 minutter ved 13000 rpm. Supernatanten ble fjernet og cellene ble tilsatt 250 µl resuspenderingsløsning (50 mM Tris-HCl med pH 7,5, 10 mM EDTA og 100µg/ml RNase A), resuspendert ved vortexing og overført til ett mikrosentrifugerør. 250 µl lyseringsløsning (0,2 M NaOH og 1 % SDS) ble tilsatt, og løsningen ble blandet ved å snu røret 4 ganger. 10 µl basisk proteaseløsning (isolert fra *Bacillus licheniformi*) ble tilsatt lysatet for å få best mulig kvalitet på det isolerte DNAet. Løsningen inaktiverer endonukleaser og andre proteiner som blir frigjort under lysering av bakterieceller. Blandingen ble inkubert i 5 minutter i romtemperatur fra tidspunktet lyseringsløsningen ble tilsatt. 350 µl nøytraliseringsløsning (4,09 M guanidin hydroklorid, 0,759 M KAc og 2,12 M isedikksyre) ble tilsatt og blandet ved å snu røret 4 ganger før lysatet ble sentrifugert i 10 minutter ved 13000 rpm i romtemperatur.

For å isolere plasmid DNA fra lysatet ble supernatanten overført til en kolonne som var plassert i et 2 ml oppsamlingsrør og sentrifugert i 1 minutt ved 13000 rpm i romtemperatur for å binde DNAet til kolonnen. Oppsamlingsrøret ble tømt, og kolonnen ble deretter tilsatt 750 ml vaskeløsning (60 % etanol, 60 mM KAc, 8.3 mM Tris-HCl og 0,04 mM EDTA) og sentrifugert i 1 minutt før oppsamlingsrøret ble tømt. Vaskeprosedyren ble gjentatt med 250 µl vaskeløsning, og avsluttet ved å sentrifugere i 2 minutter for å sikre at all vaskeløsningen var fjernet fra kolonnen. Til slutt ble kolonnen overført til en et sterilt mikrosentrifugerør, og DNAet ble eluert ved å tilsette 100 µl nukleasefritt vann og sentrifugert i 1 minutt. Plasmid DNAet ble lagret i -20 °C.

For lavkopitalplasmid ble same prosedyre brukt, men bakteriecellene ble høstet fra 10 ml kultur og resuspendert i totalt 500 µl resuspenderingsløsning fordelt på to mikrosentrifugerør. Etter at cellene var lysert og sentrifugert ble supernatanten fra begge rørene sentrifugert gjennom samme kolonne før vaskeprosedyren startet.

2.8. Restriksjonskutting

DNA kan kuttes på ønskede steder i DNA sekvensen ved hjelp av enzymer kalt restriksjonsendonukleaser. Disse enzymene binder seg til spesifikke basesekvenser og kutter DNA-molekylet. Det finnes to hovedtyper av restriksjonsenzymmer. Type I restriksjonsenzymmer kutter DNA langt unna selve gjenkjenningssitet mens type II restriksjonsenzymmer kutter DNAet midt i gjenkjenningssitet. Type II enzymer er benyttet i denne oppgaven. Kutting med type II enzymer kan danne butte ender, dersom begge DNA-trådene kuttes på samme punkt, eller de kan danne overheng dersom de to trådene blir kuttet på ulike steder i gjenkjenningssitet. Disse restriksjonssetene er vanligvis 4-8 bp, og denne sekvensen har som oftest palindrom symmetri slik at sekvensen på begge DNA-trådene er like, men i motsatt retning [35].

For høykopitalplasmid ble 3 µl DNA blandet med 2 µl 10 x buffer (tilpasset restriksjonsenzymene), 0,5 µl BSA, sterilt ionefritt vann (SIV) til totalt 19,5 µl og 0,5 µl enzym (maksimalt 1,5 µl dersom det benyttes flere enzym samtidig). Prøvene ble inkubert i enzymenes optimumstemperatur fra minst 1 time til over natt. Dersom det ble benyttet flere

enzymmer med ulik optimumstemperatur ble prøvene først inkubert ved den laveste temperaturen i minst 1 time, og deretter ved den høyeste temperaturen.

For lavkopitallsplasmid ble det brukt samme prosedyre men med 17 µl DNA i blandingen.

Clone Manager 6 versjon 6.00 ble brukt for å finne hvilke restriksjonsenzymmer som kunne benyttes til å kutte de ulike plasmidene.

2.9. Ligering av DNA-fragmenter med T4-ligase

DNA ligase er et enzym som kan brukes til å danne kovalente bindinger mellom DNA-fragmenter. DNA ligase er naturlig til stede under DNA-replikasjon for å danne bindinger mellom Okazaki-fragmentene på lagtråden. DNA-fragmenter som har blitt kuttet med restriksjonsenzymmer som gir overheng vil ofte være bundet sammen. DNA-fragmenter med butte ender har ingen mulighet til å binde seg til hverandre, og det kreves større konsentrasjon av DNA-fragmenter og DNA-ligase. En ligase som er i stand til å koble sammen fragmenter med butte ender er T4-ligase som er isolert fra bakteriofag T4 [35].

Kuttet og rensset vektor-DNA og insert-DNA ble blandet til et totalvolum på 17 µl.

Konsentrasjonen av insertet var 3 ganger større enn for vektoren. 2 µl 10 x T4 ligasebuffer og 1 µl T4 ligase ble tilsatt DNA-blanding. Reaksjonsblandingen ble inkubert i vannbad over natt (fra ca 4 °C til 16 °C).

2.10. Agarose gelelektroforese

Gelelektroforese er en metode som blir brukt for å separere nukleinsyrer og proteiner.

Agarose gelelektroforese er mest brukt for å separere DNA. Nukleinsyrer er negativt ladet på grunn av fosfatgruppene på molekylet, og når de blir plassert i et elektrisk felt vil de derfor bli trukket mot den positive elektroden. Når DNA-molekyler blir applisert i brønner i en agarosegel vil de bli trukket gjennom et kryssbundet agarosenettverk i gelen når den elektriske spenningen er på. Små molekyler vil vandre raskere gjennom dette nettverket enn større molekyler, og på den måten kan fragmentere med ulik størrelse bli separert [35].

Agarosegelen lages ved at agarose løses i 1 x TAE buffer til en konsentrasjon på 0,8 % agarose. Løsningen varmes opp i mikrobølgeovn til det koker, inntil alt pulveret er løst i bufferen. Agaroseløsningen oppbevares i varmeskap.

Agaroseløsningen helles over i et støpekar, og en kam blir plassert i løsningen for å forme brønner når gelen stivner. Gelen plasseres i et elektroforesekar som har en positiv og en negativ elektrode i hver ende av karet med brønnene nærmest den katoden. 1 x TAE buffer tilsettes karet slik at det dekker gelen og kammen kan fjernes.

Prøvene med DNA ble tilsatt 10 % loading buffer og applisert i brønnene på gelen. En brønn tilsettes også en DNA-standard som inneholder en blanding av DNA-fragmenter med kjente størrelser. Den elektriske spenningen ble satt til 100 volt, og gelen ble kjørt fra 30 minutter til 2,5 time, avhengig av størrelsen på gelen og hvor langt det er ønskelig at DNA-fragmentene skal vandre.

DNA er utgangspunktet fargeløst, så for å kunne visualisere DNA-fragmentene i gelen er det nødvendig at de farges. Dette kan gjøres ved at GelRedTM tilsettes agaroseløsningen. GelRedTM er et stabilt og miljøvennlig fluorescerende fargestoff som bindes til nukleotidene i DNA og RNA [40].

Når gelen blir eksponert for UV-lys vil fargen som er bundet til DNAet fluorescere og fragmentene kan sees som bånd på gelen. Bio-Rad Gel DocTM 2000 ble brukt til å visualisere og fotografere disse båndene [41].

Båndene for de ulike DNA-prøvene kan sammenliknes med DNA-standardene, og størrelsen på fragmentene kan identifiseres. DNA-standardene brukt i denne oppgaven er vist i appendiks A.

2.11. Rensing av PCR-produkt med QIAquick PCR purification kit for mikrosentrifuge

PCR-produkter med en størrelse mellom 100 bp og 10 kb kan renses fra primere, frie nukleotider, polymeraser og salter ved hjelp av QIAquick spin-kolonne fra Qiagen [42].

5 ganger volumet til PCR-prøven av PB-buffer ble tilsatt prøven og blandet godt. Denne bufferen er tilsatt en pH-indikator som fører til at løsningen blir gul dersom den har en pH som er lavere enn 7,5. Hvis pH er høyere vil løsningen få en oransje eller lilla farge. Er pH for høy tilsettes 10 µl 3 M NaAc med pH 5.

En QIAquick spin-kolonne ble plassert i et 2 ml oppsamlingsrør og PCR-prøven ble tilsatt kolonnen og sentrifugert i 1 min i ved 13 000 rpm i romtemperatur. Kolonnen har en silikamembran som binder DNAer dersom saltkonsentrasjonen er høy og pH er lavere enn 7,5. For å vaske PCR-produktet ble oppsamlingsrøret tømt og 750 µl PE buffer ble tilsatt kolonnen og sentrifugert i 1 minutt ved 13000 rpm i romtemperatur. Oppsamlingsrøret ble igjen tømt og kolonnen ble sentrifugert i 1 minutt for å fjerne rester av etanol fra PE-bufferen. Kolonnen ble deretter plassert i et 1,5 ml sterilt mikrosentrifugerør og tilsatt 30 µl fortynnet ligasebuffer (5 %). Røret med kolonnen sto i 1 minutt i romtemperatur før det ble sentrifugert 1 minutt ved 13000 rpm.

Prøvene ble lagret ved -20 °C.

Oversikt over standardene brukt ved separering av DNA-fragmenter ved agarose gelelektroforese er vist i appendiks A.

2.12. Rensing av DNA-fragmenter fra gel med QIAquick gel extraction kit for mikrosentrifuge

QIAquick gel extraction kit kan brukes til å ekstrahere og rense DNA-fragmenter med størrelser fra 70 bp til 10 kb fra agarosegel i TAE eller TBE buffer [42].

Ønsket DNA-fragment ble skåret ut av agarosegelen med en ren og skarp skalpell og overført til et mikrosentrifugerør. 3 ganger volumet til gelbiten av buffer QG ble tilsatt, og røret ble inkubert i 50 °C til gelen var helt oppløst (ca 10 minutter). Under inkuberingen ble røret vortexet hvert 2-3 minutt for at gelen letter skulle løses opp. QG bufferen er også tilsatt en pH-indikator som fører til at løsningen blir gul dersom den har en pH som er lavere enn 7,5. Hvis pH er for høy tilsettes 10 µl 3 M natriumacetat med pH 5. Dersom DNA-fragmentet er mindre enn 500 bp eller høyere enn 4 kb tilsettes 1 gel volum av isopropanol til røret og for å

øke kvaliteten på DNA-fragmentene. Isopropanolen blandes godt med løsningen før den overføres til en QIAquick spin-kolonne som var plassert i et 2 ml oppsamlingsrør. For å binde DNAet til kolonnen ble den sentrifugert i 1 min i ved 13000 rpm i romtemperatur. Det maksimale volumet til kolonnen er 800 µl, så dersom volumet til løsningen oversteg dette ble resten av løsningen sentrifugert gjennom samme kolonne etter første sentrifugering. Oppsamlingsrøret tømmes mellom hver sentrifugering og alle sentrifugeringssteg ble gjort ved 13000 rpm i romtemperatur.

For å være sikker på at alle agaroserestene ble fjernet ble det tilsatt 500 µl QG buffer til kolonnen før den ble sentrifugert i 1 minutt.

For å vaske kolonnen med DNA-fragmentet ble det tilsatt 750 µl PE buffer. Kolonnen sto i romtemperatur i 2-5 minutter før den ble sentrifugert i 1 minutt. Kolonnen ble deretter sentrifugert i nok et minutt for å fjerne alle rester av etanol fra PE bufferen.

Kolonnen ble deretter plassert i et 1,5 ml sterilt mikrosentrifugerør og tilsatt 30 µl fortynnet ligasebuffer (5 %). Røret med kolonnen sto i 1 minutt i romtemperatur før det ble sentrifugert 1 minutt.

Prøvene ble lagret ved -20 °C.

2.13. Sekvensering

Ved sekvensering av en ønsket DNA-sekvens syntetiseres det fragmenter med ulike lengde som avsluttes på hver av de ulike basene i sekvensen.

Primere med komplementær sekvens til ønsket startsete, DNA polymerase, deoksynukleotider (dNTPs) og dideoxynukleotider (ddNTPs) brukes til å syntetisere den ønskede sekvensen. ddNTP skiller seg fra dNTP ved at den mangler 3'-hydroksylgruppe på ribosedelen. Ved innsetting av ddNTP i den voksende sekvensen er det ikke mulig for polymerasen å danne fosfodiesterbinding mellom ddNTP og nytt dNTP eller ddNTP, og syntesen vil termineres. Hver gang polymerasen setter inn ddNTP i den voksende sekvensen vil videre syntese stoppes, og dette fører til at det dannes fragmenter med ulike lengde. ddNTP er merket med fire ulike fluorescerende fargestoff, et for hver av basene. Fragmentene blir separert ved gelelektroforese eller kapillærelektroforese. DNA-fragmentene blir avlest

med en laserstråle etter hvert som de beveger seg mot anoden og en datamaskin registrerer fargestoffene som fluorescerer. På denne måten kan baserekkefølgen til DNA-sekvensen avleses [35].

2.13.1. Sekvenseringsreaksjon

0,2 ml PCR-rør ble satt på is og tilsatt reaksjonsblandingen:

150-300 ng plasmid-DNA

1 µl primer (3,2 pmol/µl)

4 µl fortynningsbuffer

4 µl BigDye Terminator Ready reaction mix

SIV til 20 µl totalvolum

BigDye ble tilsatt blandingen sist.

Konsentrasjonen av plasmid-DNA ble målt med NanoDrop og mengden tilsvarende 150-300 ng ble regnet ut. For hvert plasmid ble det laget to reaksjonsblandninger; ett som inneholdt forward primer, og ett som inneholdt reverse primer. Ferdige reaksjonsblandinger ble plassert i en termosyklus (VWR thermal cycler) når temperaturen nærmet seg 96 °C. Tabell 2.4 viser programinnstillingene på termosykleren for sekvenseringsreaksjonen.

Tabell 2.4. Programinnstilling på VWR thermal cycler for sekvenseringsreaksjonen. Temperaturer og tid for innledende denaturering, denaturering, hybridisering, polymerisering og avkjøling.

		Temperatur	Tid
1	Innledende denaturering	96 °C	4 minutter
2	Denaturering	96 °C	30 sekunder
3	Hybridisering	50 °C	15 sekunder
4	Polymerisering	60 °C	4 minutter
5	Avkjøling	4 °C	Ubegrenset

Steg 2 til 4 ble repetert 24 ganger før steg 5.

2.13.2. Rensing av sekvenseringsprodukt

Sekvenseringsproduktet ble overført til et 1,5 ml mikrosentrifugerør. 2 μ l NaAc og 50 μ l 96 % etanol ble tilsatt blandingen for utfelling. Blandingen ble vortexet og plassert i romtemperatur i 15 minutter, for så å bli sentrifugert i 20 minutter ved 13000 rpm i romtemperatur. Supernatanten ble deretter fjernet, og bunnfallet ble vasket med 250 μ l 70 % etanol. Blandingen ble vortexet og sentrifugert i 5 minutter ved 13000 rpm. Vaskeprosedyren ble repetert for å sikre at alle rester av primerene og nukleotidene er fjernet. Supernatanten ble fjernet, og rørene ble plassert i romtemperatur med åpent lokk over natt for tørking. Sekvenseringsproduktet ble deretter levert for separering. Separering av fragmentene fra sekvenseringsreaksjonen og avlesing av sekvensen ble gjennomført ved NTNU.

Sekvenseringsresultatene ble undersøkt og korrigert ved hjelp av Chromas versjon 2.33 før sekvensen ble sammenlignet med den forventede sekvensen i Clone Manager 6 versjon 6.00.

2.14. Transformasjon av kompetente bakterieceller

Kompetente bakterieceller er celler som er i stand til å ta opp DNA ved transformasjon. Noen typer bakterier er i stand til å gjøre dette naturlig, men de fleste er avhengig å få en behandling som endrer celleveggenes struktur for å gjøre de kompetente [35].

Kjemisk transformasjon og elektroporering er to måter å transformere nakent DNA. Ved kjemisk transformasjon kan DNA bli tatt opp ved at cellene blir behandlet med blant annet kalsiumioner for å gjøre cellene kompetente før de blir utsatt for et kort varmesjokk. Ved elektroporering blir cellene utsatt for et elektroshokk som danner små porer i celleveggen som DNA kan trenge gjennom [36].

2.14.1. Rubidiumklorid-kompetente celler

1 ml av en overnattskultur av *E.coli* DH5 α dyrket i LB ble innokulert i 100 ml sterilt Psi-medium og inkubert ved 37 °C i risteinkubator. OD ble målt med jevne mellomrom med SpectraMax Plus384 fra Molecular Devices. Da OD₆₀₀ var nøyaktig 0,4 ble kulturen inkubert på is i 15 minutter før de ble høstet ved sentrifugering i 5 minutter ved 4500 rpm i 4 °C. Supernatanten ble fjernet, og cellene ble resuspender t i 40 ml kald TFB1 og inkubert på is i 5 minutter. Cellene ble igjen høstet ved sentrifugering i 5 minutter ved 4500 rpm i 4 °C.

Supernatanten ble fjernet, og cellene ble resuspendert i 3 ml kald TFB2. Cellene ble fordelt i mikrosentrifugerør med 100µl i hvert rør og snapfryst på tørris og etanol. Alikvotene ble lagret i -80 °C.

2.14.2. Elektrokompetente celler

5 ml av en overnattskultur av *E. carotovora* dyrket i SOB ble innokulert i 500 ml SOB og inkubert i ved 30 °C i risteinkubator. OD ble målt med jevne mellomrom, og ved $OD_{600} = 0,8$ ble cellene høstet ved sentrifugering i 15 minutter ved 4000 rpm i 4 °C. Supernatanten ble fjernet, og cellene ble vasket ved at de ble resuspendert i 500 ml iskald 10 % glyserol og sentrifugert i 20 minutter ved 4000 rpm i 4 °C. Vaskesteget ble repetert, supernatanten ble fjernet og cellene ble resuspendert i 2 ml iskald 10 % glyserol før de ble fordelt i mikrosentrifugerør med 25 µl i hvert rør og snapfryst på tørris og etanol.

2.14.3. "Heat-shock"- transformasjon av RbCl-kompetente celler

RbCl-kompetente celler ble tint på is og tilsatt 10 µl ligeringsmiks og blandet forsiktig ved pipettering. 1 µl plasmid ble tilsatt ett rør med celler som positiv kontroll og ett rør med celler uten tilsatt DNA ble brukt som negativ kontroll. Blandingene ble inkubert på is i 30 minutter før det fikk et "heat-shock" i 42 °C vannbad i 45-55 sekunder. Blandingen ble deretter inkubert på is i 2 minutter før de ble tilsatt 1 ml SOC-medium som var forvarmet til 37 °C. Blandingene ble inkubert i 37 °C risteinkubator i 1-2 timer. 200 µl av cellekulturene og 200 µl konsentrerte celler ble platet ut på LA med antibiotika som selekterer for det ønskede plasmidet. Ved blå-hvit seleksjon ble LA platene tilsatt 40µl X-gal (20 µg/ml i DMSO) og 7 µl IPTG (20 %).

Platene ble inkubert i 37 °C varmeskap fra over natt til 2 døgn.

2.14.4. Elektroporering

25 µl elektrokompetente celler ble tint på is og tilsatt 1 µl DNA og blandet forsiktig ved pipettering. Blandingen ble overført til en 1mm elektroporeringskyvette (Bio-Rad) plassert på is. Cellene ble elektroporert ved hjelp av Gene Pulser Xcell fra Bio-Rad med følgende innstillinger; 25 µF kapasitans, 1,8 kV spenning og 200 Ω motstand. Etter elektroporering ble kyvetten tilsatt 1 ml SOC som ble blandet med cellene ved pipettering og overført til et

mikrosentrifugerør. Rørene ble inkubert i 30 °C risteinkubator i 40 minutter før de ble platet ut på LA med antibiotika for selektering.

2.15. Bakteriell konjugering og homolog rekombinering

Bakteriell konjugering er overføring av genetisk materiale fra en bakteriecelle til en annen. Plasmidet som skal overføres må inneholde et startpunkt for konjugativ overføring, kalt *oriT*. Donorbakterien må kode for gener som styrer syntesen av pili som fører til direkte kontakt mellom donor- og mottakercellen, og muliggjør overføring av DNA via en konjugeringsbro [35, 43]. Homolog rekombinering er overkryssninger som kan foregå mellom DNA-molekyler som har homologi i nukleotidsekvensen. Ønskede mutanter kan dannes ved homolog rekombinering mellom plasmidet som har blitt overført ved konjugering og villtypegenomet til mottakercellen [35].

3 ml av *E.carotovora* ::TnMS11 ble blandet med 3,5 ml *E.coli* S17.1 som inneholdt rekombineringsvektorene (tilnærmet samme konsentrasjon av begge bakteriekulturene) og sentrifugert i 5 minutter ved 8000 rpm. Det meste av supernatanten ble fjernet, og cellene ble resuspendert i resten. En dråpe av blandingen ble plassert på en LA plate uten antibiotika og inkubert i 30 °C varmeskap over natt for overføring av vektorene til *E.carotovora* ::TnMS11.

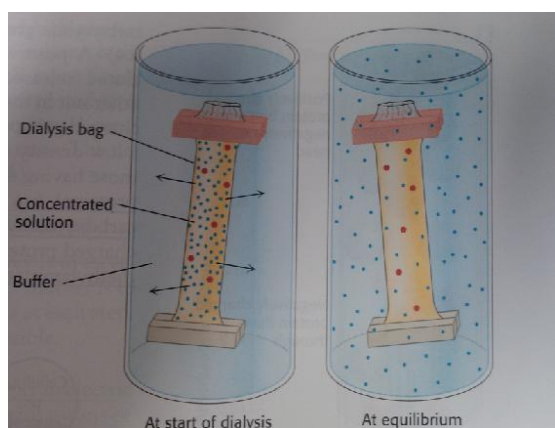
Bakteriecellene fra LA-platene ble overført til mikrosentrifugerør og resuspendert i 400 µl LB. De resuspenderte cellene ble platet ut på LA med kanamycin og tetracyclin for å selektere for de cellene som hadde fått overført og integrert plasmidene ved konjugering og homolog rekombinering. Platene ble innkubert i 30 °C varmeskap.

Kolonier fra platen med transkonjuganter ble overført til 10 ml LB med kanamycin og inkubert i 30 °C risteinkubator over natt. 10 µl av overnattskulturen ble overført til ny LB med kanamycin og inkubert i 30 °C risteinkubator. Overnattskulturen ble også fortynnet til 10^{-6} og 10^{-7} og platet ut på LA med kanamycin og inkubert i 30 °C over natt. Kolonier fra platen ble overført til en LA-plate med kanamycin og en LA-plate med tetracyclin og inkubert i 30 °C i to døgn. Prosedyren med overføring av overnattskultur til ny LB og utplating på LA ble gjentatt til det ble observert kolonier som kun vokste på kanamycin og ikke på tetracyclin.

Disse koloniene ble undersøkt ved hjelp av PCR for å finne ut om det har oppstått ønskede mutanter eller revertanter.

2.16. Utfelling og rensing av potensiell biopolymer

Utfelling av biopolymerer fra supernatant kan gjøres ved etanolfelling. Utfellingen kan så løses i vann og dialyseres gjennom en semipermeabel membran for å fjerne mindre molekyler og ioner (figur 2.1). Dialyserte produkter kan frysetørkes. Her fjernes vann fra frossen tilstand under vakuum.



Figur 2.1. Dialyse gjennom en semipermeabel membran. Røde partikler er store molekyler som ikke kan passere gjennom porene i membranen, og vil forbli på innsiden. Blå partikler er små molekyler (for eksempel salter) som kan diffundere gjennom porene i membranen [44].

Supernatanten fra dyrking av *E.carotovora* villtype og mutant ble tilsatt 3 volumenheter etanol og plassert i 4 °C over natt. Løsningen ble deretter sentrifugert. Bunnfallet ble løst i ionefritt vann og overført til en dialyseslange. Dialyseslangen med den løste utfellingen ble plassert i et kar med ionefritt vann i romtemperatur i 3 dager. Vannet i karet ble skiftet ut hver dag. Det dialyserte produktet ble fryst i -80 °C og frysetørket.

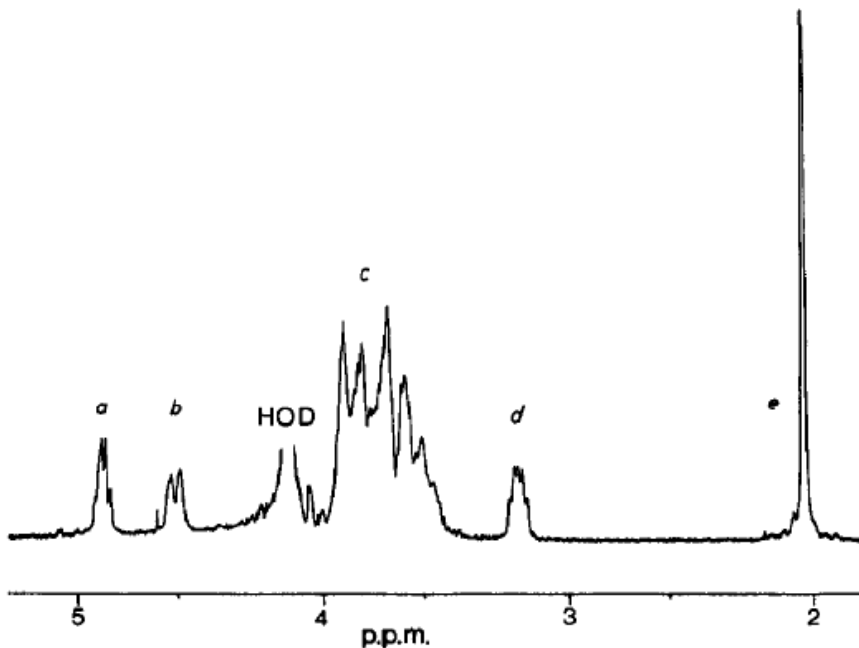
2.17. Kjernemagnetisk resonans (NMR) spektroskopi

NMR spektroskopi gjør det mulig å avdekke atomstrukturen til makromolekyler i løsning. Noen atomkjerner er magnetiske og kan spinne rundt sin egen akse, og denne egenskapene er utnyttet i NMR spektroskopi. Hydrogenkjernen (^1H) består av et proton, og er et eksempel på atomkjerner med denne egenskapen.

2.17.1. ^1H NMR

Et proton vil være i en bestemt energitilstand når det plasseres i et magnetfelt. Når det blir utsatt for elektromagnetisk stråling vil protonet eksiteres til en høyere energitilstand, og resonans oppstår. Et resonansspekter for et molekyl kan oppnås ved å plassere det i et magnetisk felt som holdes konstant, og påføre ulike frekvenser av elektromagnetisk stråling. Kjerner med ulike omgivelser vil ha forskjellig resonans ved ulik styrke på magnetfeltet eller ved ulik strålingsfrekvens. Et resonansspekter vil derfor gi informasjon om omgivelsene til de ulike protonene i molekylet [44].

Figur 2.2 viser et ^1H NMR-spekter av kitosan med 47 % deacetylte enheter. Et ^1H NMR-spekter for kitosan har vanligvis topper på ca 4,5 ppm og 4,85 ppm som indikerer H-1 på henholdsvis GlcNAc og GlcN, en topp på ca 3,15 ppm som indikerer H-2 på GlcN, og en topp på ca 2 ppm som indikerer acetyl-protonene på GlcNAc. Topper mellom 3,5 og 4 ppm indikerer H-3, H-4, H-5 og H-6 på både GlcNAc og GlcN, og H-2 på GlcN. Intensiteten til noen av toppene varierer med ulik acetyleringsgrad. Protoner fra vann har en topp på ca 4,3 ppm.



Figur 2.2. ^1H NMR-spekter av kitosan med 47 % deacetylte enheter.

Kitosan som skal undersøkes med ^1H NMR blir først brutt ned med NaNO_2 i $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$. Prøven løses i 99,9 % D_2O og tilsettes deretter DCl som senker pH i løsningen. NaNO_2 løst i 99,9 % D_2O blir deretter tilsatt, og prøven blir plassert mørkt. Etter 4 timer justeres pH til mellom 3 og 4 med NaOH i 99,9 % D_2O , og prøven er da klar til NMR.

^1H NMR ble utført av på frysetørket stoff fra dyrking av *E. carotovora* mutant av Marit Syversveen. Ved preparering av prøven ble det antatt at stoffet var kitosan.

3. Resultater

3.1. Dyrking av *E.carotovora* i acetatmedium og måling av flokkuleringsaktivitet

Dyrkningsmedium med acetat som karbonkilde har blitt brukt for å dyrke fram bakterier som produserer bioflokkulanter med kitosanlignende struktur og egenskaper [20, 45].

E.carotovora det ble derfor forsøkt dyrket i acetatmediet fra Jang et al.[45] for å undersøke om dette initierer produksjon av bakteriell kitin.

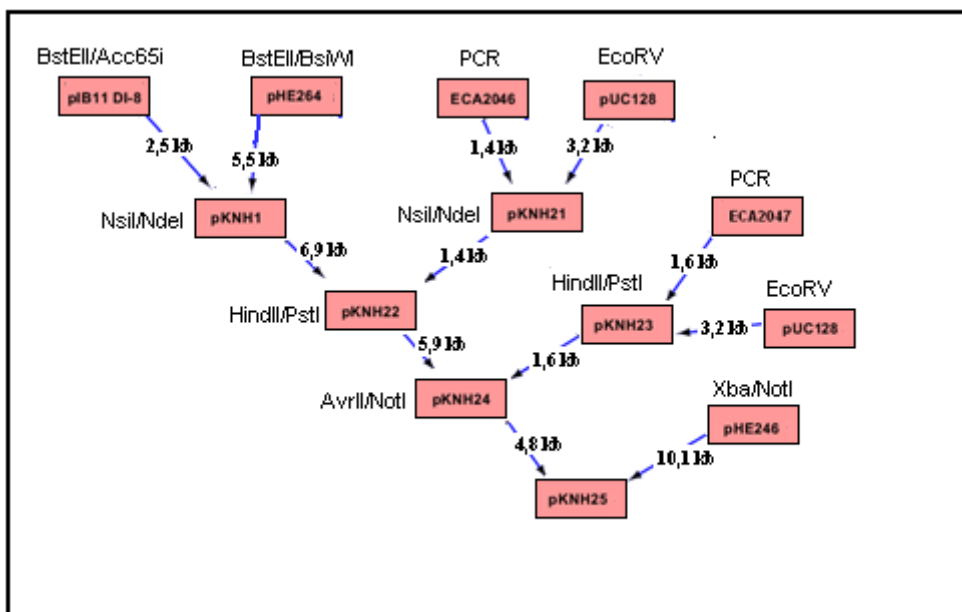
1 ml overnattekultur av *E.carotovora* i LB ble inokulert i 100 ml acetatmedium og inkubert i 30 °C i 36 timer. Bakteriekulturen ble sentrifugert i 20 minutter ved 6000 rpm for å fjerne cellene. Deretter ble supernatanten testet for flokkuleringsevne som beskrevet i seksjon 2.5. Resultatene (tabell 3.1) viste ingen flokkuleringsaktivitet.

Tabell 3.1. OD₆₂₀ fra *E.coli* resuspendert i supernatanten fra *E.carotovora*, sammenlignet med OD₆₂₀ fra kontrollprøven etter 2 timer og over natt. Flokkuleringsaktiviteten (1) er regnet ut fra gjennomsnittsverdien til de 3 prøvene og kontrollprøven.

	OD ₆₂₀ etter 2 timer	OD ₆₂₀ over natt
Kontroll	1,60	1,28
Prøve 1	1,62	1,32
Prøve 2	1,61	1,25
Prøve 3	1,60	1,21
Gjennomsnitt	1,61	1,26
Flokkuleringsaktivitet	0 %	1,6 %

3.2. Kloning av *ECA2046* nedstrøms for *PmDI-8* promotoren

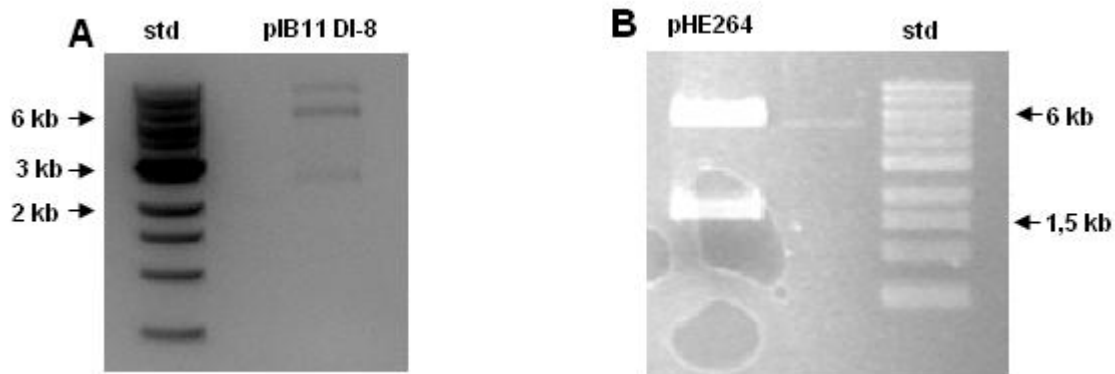
ECA2046 ble klonet inn nedstrøms for *Pm*-promotoren fra pIB11 DI 8 for å kunne aktivere transkripsjon av dette genet og eventuelt *ECA2045*, og undersøke om dette vil føre til produksjon av bakteriell kitin. *ECA2047* som ligger oppstrøms for *ECA2046* i samme genklynge ble klonet inn oppstrøms for *xyIS* for senere å kunne inkorporere *XylS/Pm* kassetten i genomet til *E. carotovora* ved homolog rekombinering. Kloningsforløpet er vist i figur 3.1. Oversikt over PCR-produktene og plasmidkart av plasmidene brukt til konstruksjon av pKNH25 er vist i appendiks B.



Figur 3.1. Konstruksjon av plasmid for innsetting av *PmDI-8* promotor foran *ECA2046*. Enzymene de ulike plasmidene er kuttet med, og størrelsen på fragmentene som blir brukt til konstruksjon av nye plasmider er vist.

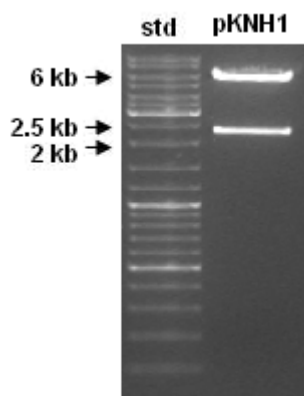
3.2.1. Konstruksjon av pKNH1

pIB11 DI-8 ble kuttet (se seksjon 2.8) med *BstEII* og *Acc65I* og separert på gel (se seksjon 2.10). Figur 3.2A viser de forventede fragmentstørrelsene på 5,7 kb og 2,5 kb. pHE264 ble kuttet med *BstEII* og *BsiWI* og separert på gel. Figur 3.2B viser de forventede fragmentstørrelsene på 5,5 kb og 1,6 kb. 2,5 kb fragmentet fra pIB11 DI-8 og 5,5 kb fragmentet fra pHE264 ble rensset fra gelen (seksjon 2.12), ligert (seksjon 2.9) og transformert til RbCl-kompetente *E. coli* DH5 α (seksjon 2.14). Cellene ble selektert på LA plater med ampicillin.



Figur 3.2. Restriksjonsanalyse av vektorene brukt til konstruksjon av pKNH1. A: pIB11 DI-8 kuttet med *BstEII* og *Acc65I*. Forventet størrelse på fragmentene var 5,7 og 2,5. B: pHE264 kuttet med *BstEII* og *BsiWI*. Forventet størrelse på fragmentene var 5,5 og 1,6. For begge gelene ble det brukt 1 kb DNA ladder (NEB) som standard.

Plasmider ble isolert fra koloniene på LA-platen (se seksjon 2.7), og kuttet med *BamHI*, som skulle gi forventede fragmentstørrelser på 5,7 kb og 2,3 kb ved separering på agarosegel. Transformant med forventet kuttemønster er vist i figur 3.3. Plasmidet fra denne transformanten ble kalt pKNH1 og ble brukt videre til konstruksjon av nye plasmider.



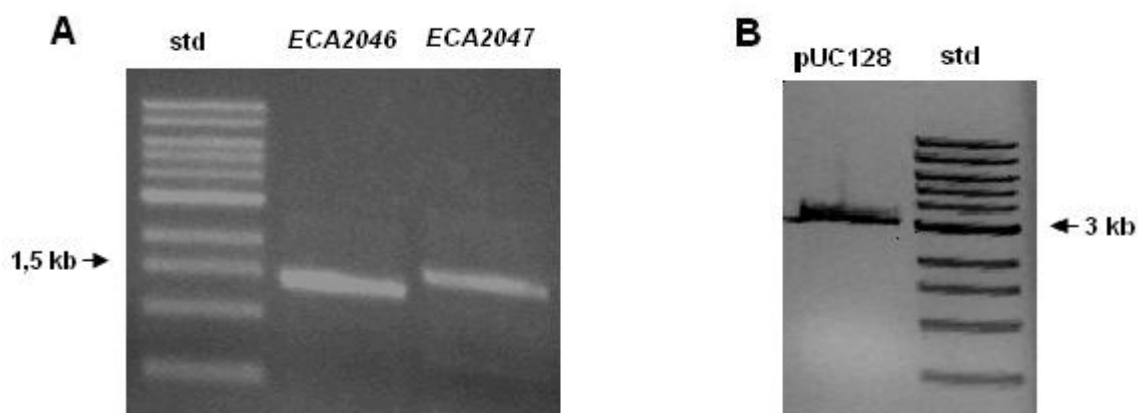
Figur 3.3. Restriksjonsanalyse av pKNH1 kuttet med *BamHI*. Forventet fragmentstørrelse var 5,7 kb og 2,3 kb.

pKNH1 inneholder *PmDI-8* promoteren og genen for XylS. Denne vektoren brukes til å sette sammen ønskede fragmenter, og den ønskede sekvensen kan senere kuttes ut av vektoren ved hjelp av enzymene *AvrII* og *NotI* og settes inn i pHE246 som er kuttet med *XbaI* og *NotI*.

3.2.2. Konstruksjon av pKNH21 og pKNH23

ECA2046 og *ECA2047* ble amplifisert ved hjelp av PCR (se seksjon 2.6) ved bruk av primerparene *ECA2046R* + *ECA2046F* og *oppECA2046R* + *oppECA2046F*. PCR-produktene ble analysert med agarose gelelektroforese, og figur 3.4A. viser at PCR-produktene hadde de forventede størrelsene på ca 1,4 kb for *ECA2046* og ca 1,6 kb for *ECA2047*.

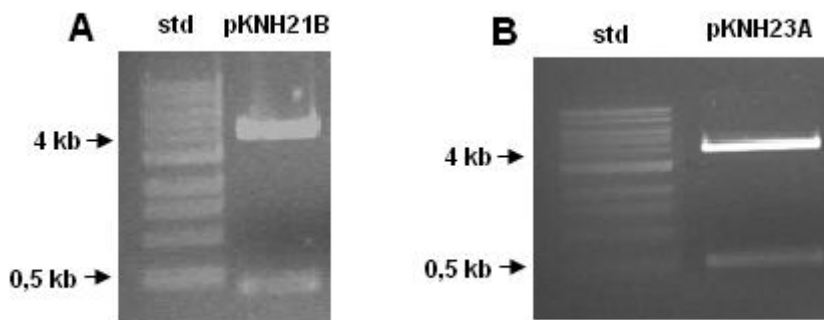
pUC128 ble kuttet med restriksjonsenzymet *EcoRV* og separert fra ukuttet plasmid med agarose gelelektroforese (figur 3.4B). *EcoRV* kutter pUC128 i genet for *lacZ*, og det er derfor mulig å bruke blå-hvit seleksjon for å undersøke om DNA er blitt satt inn i plasmidet. Det kuttete plasmidet hadde en forventet lengde på ca 3,2 kb. DNA-fragmentet ble skåret ut og renset fra gelen, og PCR-produktene som inneholder *ECA2046* og *ECA2047* ble renset (se seksjon 2.11) og ligert inn i plasmidet. Siden det dannes butte ender ved restriksjonskuttingen kan liggering av pUC128 og PCR-fragmentene gi to ulike ligeringsprodukter (A og B).



Figur 3.4. Analyse av PCR-produkter og kuttet pUC128 benyttet til konstruksjon av pKNH21 og pKNH23 A: PCR-produkter som inneholder *ECA2046* og *ECA2047*. Forventet størrelse for *ECA2046* var 1,4 kb, og forventet størrelse for *ECA2047* var 1,6 kb. B: pUC128 kuttet med *EcoRV*. Forventet størrelse på fragmentet var 3,2 kb. 1 kb DNA ladder (NEB) ble brukt som standard for begge gelene.

Ligeringsblandingen ble transformert til RbCl-kompetente *E.coli* DH5 α og platet ut på LA med ampicillin, X-gal og IPTG.

Plasmider fra de hvite koloniene etter transformering av ble isolert og undersøkt ved restriksjonskutting med *Bam*HI og separering på agarosegel (figur 3.5). Forventede fragmentstørrelser for ligeringsprodukt A som inneholder PCR-produkt med *ECA2046* er 3,6 kb og 1,0 kb, og forventede størrelser for ligeringsprodukt B er 4,2 kb og 0,4 kb. Forventede fragmentstørrelser for ligeringsprodukt A som inneholder PCR-produkt for *ECA2047* er 4,2 kb og 0,5 kb, og forventede størrelser for ligeringsprodukt B er 3,7 kb og 1,1 kb. Transformant med forventet kuttemønster for ligeringsprodukt B som inneholder PCR-produkt med *ECA2046* er vist i figur 3.5A, og transformant med forventet kuttemønster for ligeringsprodukt A som inneholder PCR-produkt med *ECA2047* er vist i figur 3.5B.



Figur 3.5. Restriksjonsanalyse av plasmidene pKNH21 og pKNH23 for å verifisere at det er riktige plasmider. A: pKNH21 kuttet med *Bam*HI. Forventede fragmentstørrelser for ligeringsprodukt B var 4,2 kb og 0,4 kb. B: pKNH23 kuttet med *Bam*HI. Forventede fragmentstørrelser for ligeringsprodukt A var 4,2 kb og 0,5 kb. 1 kb DNA ladder (NEB) ble brukt som standard for begge gelene

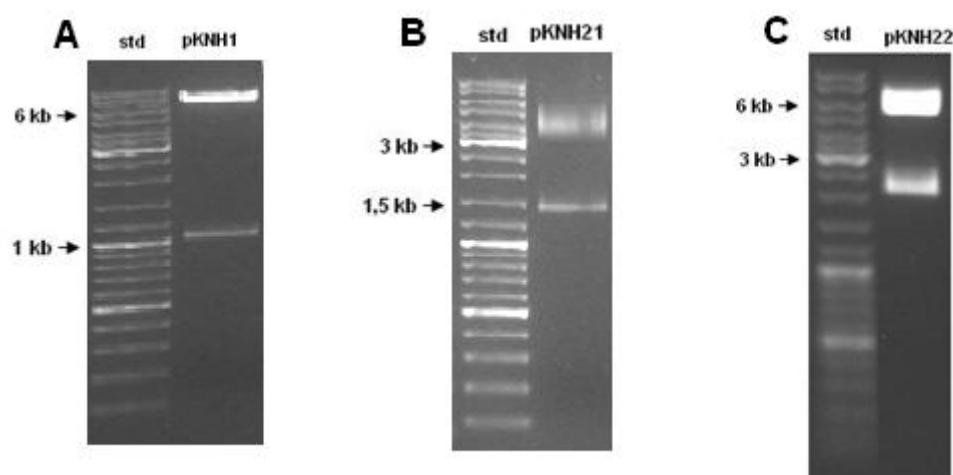
Det innsatte DNAet i plasmidene fra transformantene med riktige fragmentstørrelser ble sekvensert (se seksjon 2.13) for å kunne undersøke om sekvensen er korrekt, eller om det har forekommet noen mutasjoner under syntesen av DNA-trådene. Sekvensene ble sammenlignet med de forventede sekvensene til pKNH21B og pKNH23A, og det viste seg at det ikke hadde forekommet noen mutasjoner. Sammenlikningene av de sekvenserte produktene og forventet sekvens for pKNH21B og pKNH23A er vist i henholdsvis appendiks C.1 og appendiks C.2. De verifiserte plasmidene ble kalt pKNH21 og pKNH23.

3.2.3. Konstruksjon av pKNH22

pKNH1 ble kuttet med restriksjonsenzymene *Nsi*I og *Nde*I og separert på gel (figur 3.6A), og forventede fragmentstørrelser var 6,9 kb og 1,0 kb. pKNH21 ble kuttet med samme

restriksjonsenzymmer (figur 3.6B), og forventede størrelser på fragmentene var 3,3 kb og 1,4 kb. 1,4 kb-fragmentet fra pKNH21 og 6,9 kb-fragmentet fra pKNH1 ble renset fra gelen, ligert og transformert til *E.coli* DH5 α . Fragmentet fra pKNH21 inneholder *ECA2046* og ble ligert inn nedstrøms for *Pm*-promoteren i fragmentet fra pKNH1. De transformerte cellene ble selektert på LA-plater med ampicillin.

Plasmider ble isolert fra koloniene på LA-platene, og kuttet med *Hind*III og *Pst*I for å undersøke om det var ønsket plasmid. Forventede størrelse på fragmentene var 5,9 kb og 2,3 kb. Transformant med forventet kuttemønster er vist i figur 3.6C. Plasmidet fra denne transformanten ble kalt pKNH22 og ble brukt videre til konstruksjon av pKNH24.

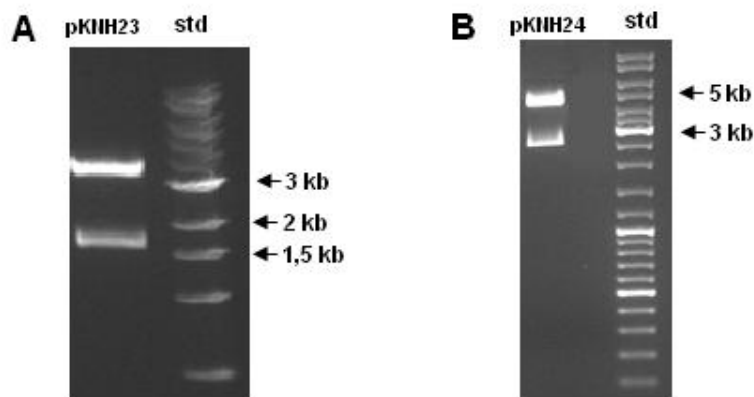


Figur 3.6. Restriksjonsanalyse av plasmidene pKNH1 og pKNH21 brukt til konstruksjon av pKNH22, og av ferdig konstruert pKNH22 for å verifisere at det er riktig plasmid. A: pKNH1 kuttet *Nsi*I og *Nde*I. Forventede fragmentstørrelser var 6,9 kb og 1,0 kb. B: pKNH21 kuttet med *Nsi*I og *Nde*I. Forventede fragmentstørrelser var 3,3 kb og 1,4 kb. C: pKNH22 kuttet med *Hind*III og *Pst*I. Forventet fragmentstørrelse var 5,9 kb og 2,3 kb. GeneRuler™ DNA Ladder mix ble brukt som standard alle tre gelene.

3.2.4. Konstruksjon av pKNH24

pKNH23 ble kuttet med *Hind*III og *Pst*I og separert på gel (Figur 3.7A). Forventede størrelser på fragmentene var 3,2 kb og 1,6 kb. 1,6 kb-fragmentet fra pKNH23 og 5,9 kb-fragmentet fra *Hind*III-*Pst*I-kuttingen av pKNH22 (figur 3.6C) ble renset fra gelen, ligert og transformert til *E.coli* DH5 α . Fragmentet fra pKNH23 inneholder *ECA2047* og ble ligert inn oppstrøms for

xyIS i pKNH22. De transformerte cellene ble selektert på LA-plater med ampicillin. Plasmider ble isolert fra koloniene på LA-platene og kuttet med *AvrII* og *NotI* (figur 3.7B). Forventet størrelse på fragmentene var 4,8 kb + 2,7 kb. Transformant med forventet kuttemønster er vist i figur 3.7B. Plasmidet fra transformanten ble kalt pKNH24 og ble brukt videre til konstruksjon av pKNH25.

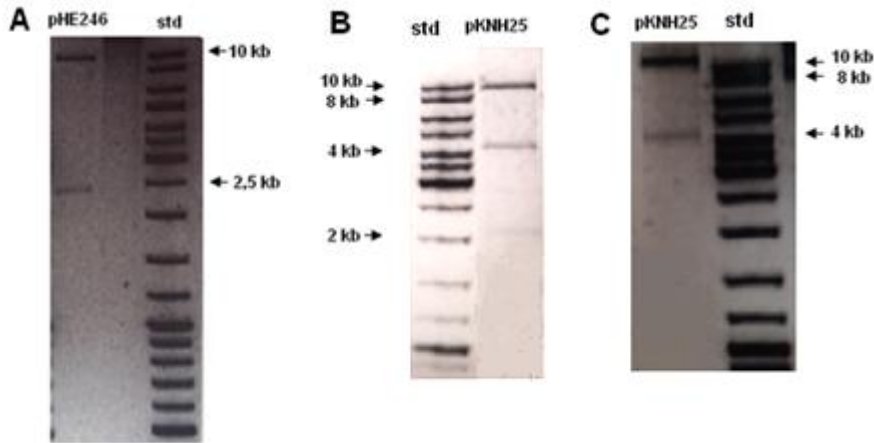


Figur 3.7. Restriksjonsanalyse av plasmidet pKNH23 brukt til konstruksjon av pKNH24, og av ferdig konstruert pKNH24 for å verifisere at det er riktig plasmid. **A:** pKNH23 kuttet med *HindIII* og *PstI*. Forventede størrelser på fragmentene var 3,2 kb og 1,6 kb. 1,6 kb fragmentet ble benyttet i videre konstruksjon av pKNH24. 1 kb DNA ladder (NEB) ble brukt som standard ved separasjon av pKNH23. **B:** pKNH24 kuttet med *AvrII* og *NotI*. Forventede størrelser på fragmentene var 4,8 kb og 2,7 kb. GeneRuler™ DNA Ladder mix ble brukt som standard.

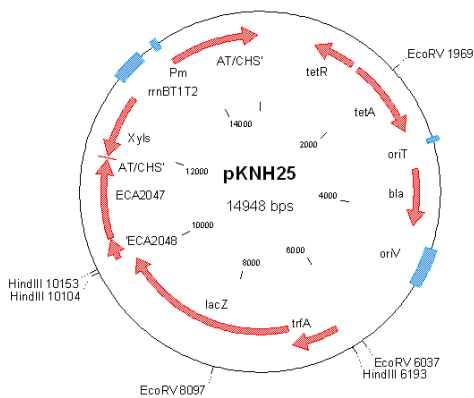
3.2.5. Konstruksjon av pKNH25

pHE246 ble kuttet med *XbaI* og *NotI* og separert på gel (figur 3.8A). De forventede størrelsene på fragmentene var 10,1 kb og 2,3 kb. 10,1 kb-fragmentet fra pHE246 og 4,8 kb-fragmentet fra *AvrII-NotI*-kuttingen av pKNH24 (figur 3.7B) ble rensset fra gelen, ligert og transformert til *E.coli* S17.1. Fragmentet fra pKNH24 inneholder *ECA2046*, *ECA2047*, *Pm* og *xyIS* og fragmentet fra pHE246 inneholder *oriV*, *oriT*, *lacZ* og gen for resistens mot tetracyclin og ampicillin. Cellene ble plattet ut på LA med ampicillin, og transformantene ble overført til en plate med LA med tetracyclin. Plasmider fra transformanter som vokste på tetracyclin ble isolert og kuttet med *EcoRV* som ville gi forventede fragmentstørrelser på 8,8 kb, 4,0 kb og 2,0 kb, og *HindIII* som ville gi forventede størrelse på 11 kb, 3,9 kb og 0,05 kb. Transformant med forventet kuttemønster er vist i figur 3.8B og 3.8C. 2 kb-fragmentet er noe utydelig i figur 3.8B, og 0,05 kb fragmentet er ikke synlig i figur 3.8C. Plasmidet fra

transformanten ble kalt pKNH25. Figur 3.9 viser plasmidkart av pKNH25 med restriksjonssetene for *EcoRV* og *HindIII*.



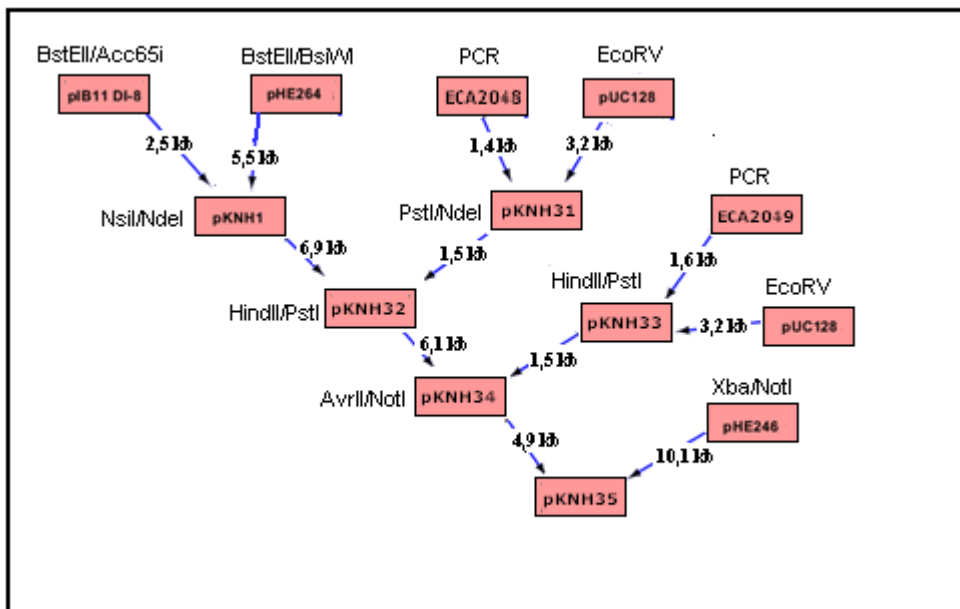
Figur 3.8. Restriksjonsanalyse av plasmidene pHE246 brukt til konstruksjon av pKNH25, og av ferdig konstruert pKNH25 for å verifisere at det er riktig plasmid. A: pHE246 kuttet med *XbaI* og *NotI*. Forventede fragmentstørrelser er 10,1 kb og 2,3 kb. 10,1 kb fragmentet ble renset fra gelen og brukt til konstruksjon av pKNH25. B: pKNH25 kuttet med *EcoRV*. Forventede fragmentstørrelser var 8,8 kb, 4,0 kb og 2,0 kb. C: pKNH25 kuttet med *HindIII*. Forventede fragmentstørrelser var 11 kb, 3,9 kb og 0,05 kb. 0,05 kb fragmentet er ikke synlig på bilde. GeneRuler™ DNA Ladder mix ble brukt som standard for begge gelene.



Figur 3.9. Plasmidkart for vektoren pKNH25 med restriksjonssetene for *EcoRV* og *HindIII*.

3.3 Kloning av *ECA2048* nedstrøms for *PmDI-8* promotoren

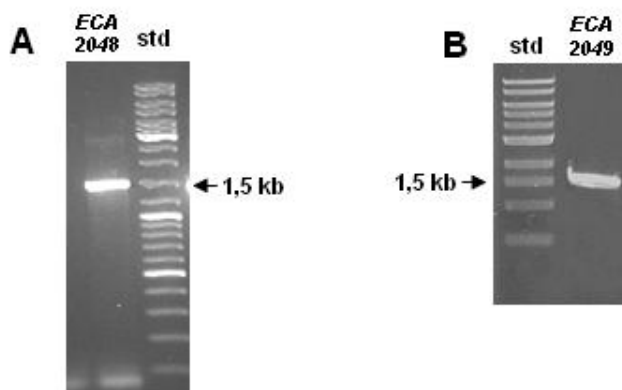
ECA2048 ble klonet inn nedstrøms for *PmDI8*-promotoren fra pIB11 DI 8 for å senere kunne aktivere transkripsjon av dette genet og nedstrømsgener, inkludert *ECA2046* dersom de tilhører samme operon, og undersøke om dette vil føre til produksjon av bakteriell kitin. *ECA2049* som ligger oppstrøms for *ECA2048* i samme genklynge ble klonet inn oppstrøms for *xylS* for senere å kunne inkorporer *XylS/Pm* kassetten i genomet til *E. carotovora* ved homolog rekombinering. Kloningsforløpet er vist i figur 3.10. Oversikt over PCR-produktene og plasmidene brukt til konstruksjon av pKNH35 er vist i appendiks B.



Figur 3.10. Konstruksjon av plasmid for innsetting av *Pm*-promotor foran *ECA2048*. Enzymene de ulike plasmidene er kuttet med, og størrelsen på fragmentene som blir brukt til konstruksjon av nye plasmider er vist.

3.3.1. Konstruksjon av pKNH31 og pKNH33

ECA2048 og *ECA2049* ble amplifisert ved hjelp av PCR ved bruk av primerparene *ECA2048R* + *ECA2048F* og *oppECA2048R* + *oppECA2048F*. PCR produktet ble undersøkt med agarose gelelektroforese, og figur 3.11 viser at produktet hadde den forventede lengden på ca 1,4 kb for *ECA2048* (figur 3.11A) og 1,6 for *ECA2049* (figur 3.11B).



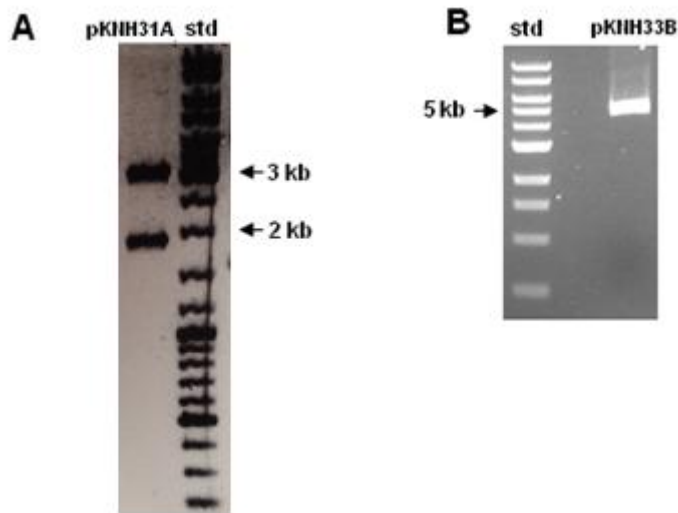
Figur 3.11. Analyse av PCR-produkter som inneholder *ECA2048* og *ECA2049*. A: *ECA2048* amplifisert ved hjelp av PCR og undersøkt med agarose gelelektroforese. Forventet størrelse for *ECA2048* var 1,5 kb. GeneRuler™ DNA Ladder mix ble brukt som standard. B: *ECA2049* amplifisert ved hjelp av PCR og undersøkt med agarose gelelektroforese. Forventet størrelse for *ECA2049* var 1,5 kb. 1 kb DNA ladder (NEB) ble brukt som standard. PCR-produktene ble benyttet til konstruksjon av pKNH31 og pKNH33.

PCR-produktene for *ECA2048* og *ECA2049* ble rensset og ligert inn i pUC128 kuttet med *EcoRV* (figur 4B). Som beskrevet i seksjon 3.2.2 kan det dannes to ligeringsprodukter (A og B) når PCR-fragmentene liggeres inn i pUC128.

Ligeringsblandingen ble transformert til RbCl-kompetente *E. coli* DH5 α og plattet ut på LA med ampicillin, X-gal og IPTG.

Plasmider fra de hvite koloniene etter transformering ble isolert og undersøkt ved restriksjonskutting og separering på agarosegel. Plasmidet som hadde fått ligert inn PCR-produktet med *ECA2048* ble kuttet med restriksjonsenzymet *XmnI* (figur 12A). Forventede fragmentstørrelser for ligeringsprodukt A er 2,9 kb og 1,8 kb, og forventede størrelser for ligeringsprodukt B er 2,4 kb og 2,3 kb. Plasmidet som hadde fått ligert inn PCR-produktet med *ECA2049* ble kuttet med restriksjonsenzymet *PstI* (figur 3.12B) Forventede fragmentstørrelser for ligeringsprodukt A er 3,2 kb og 1,5 kb, og forventede størrelse for ligeringsprodukt B er 4,8 kb og 0,02 kb. Transformant med forventet kuttemønster for ligeringsprodukt A som inneholder PCR-produkt med *ECA2048* er vist i figur 3.12A, og

transformant med forventet kuttemønster for ligeringsprodukt B som inneholder PCR-produkt med *ECA2049* er vist i figur 3.12B.



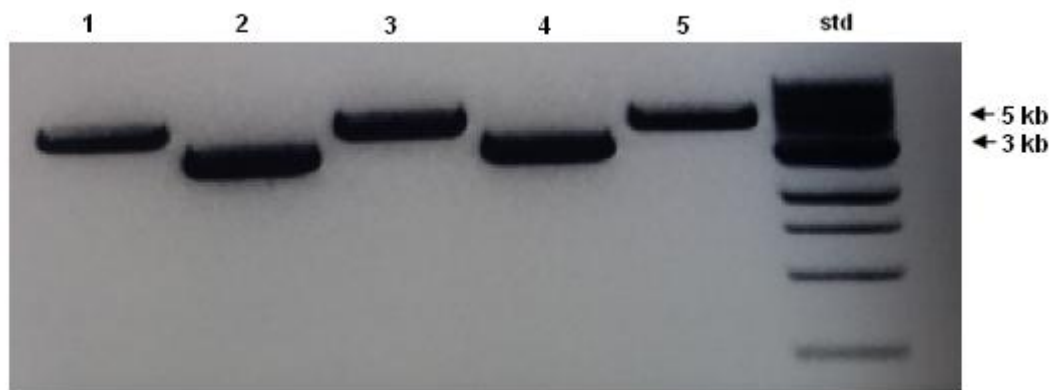
Figur 3.12. Restriksjonsanalyse av plasmidene pKNH31 og pKNH33 for å verifisere at det er riktige plasmider. A: pKNH31 kuttet med *XmnI*. De forventede fragmentstørrelser for ligeringsprodukt A er 2,9 kb og 1,8 kb. GeneRuler™ DNA Ladder mix ble brukt som standard. B: pKNH33 kuttet med *PstI*. De forventede fragmentstørrelser for ligeringsprodukt B er 4,8 kb og 0,02 kb. 0,02 kb fragmentet er ikke synelig på bilde. 1 kb DNA ladder (NEB) ble brukt som standard.

Det innsatte DNAet i plasmidene fra transformantene med riktige fragmentstørrelser ble sekvensert for å kunne undersøke om PCR-sekvensen er korrekt, eller om det har forekommet noen mutasjoner under syntesen av DNA-trådene. Sekvensene ble sammenlignet med de forventede sekvensene til pKNH31A og pKNH33B, og det viste seg at det ikke hadde forekommet noen mutasjoner. Sammenlikningene av de sekvenserte produktene og forventet sekvens for pKNH31A og pKNH33B er vist i henholdsvis appendiks C.3 og appendiks C.4. De verifiserte plasmidene ble kalt pKNH31 og pKNH33.

Problemer ved konstruksjon av pKNH31

Det oppsto noen problemer ved konstruksjon av pKNH31. I første omgang stemte ikke kutteproduktene overens med de forventede produktene. Ved kutting med *XmnI* viste separasjonen på gelen et produkt med en størrelse på ca 5 kb. Sekvensering av det innsatte DNAet i plasmidet viste at det ikke inneholdt *ECA2048*, men hadde samme sekvens som den forventede sekvensen til PCR-produktet med genet *ECA2049*. Kutting av dette plasmidet med

XmnI vil da gi et forventet kutteprodukt med størrelse 4,7. Figur 3.13 viser fem plasmider isolert fra hvite kolonier og kuttet med *XmnI*. Det var i utgangspunktet forventet å være plasmider som hadde fått ligert inn PCR-produktet med *ECA2048*. Plasmid 2 og 4 har en fragmentstørrelse på ca 3,2 og antas å være pUC128 som har blitt ligert uten innsatt fragment. Plasmid 1, 3 og 5 har en fragmentstørrelse på ca 5, noe som da tyder på at det er plasmid som har fått satt inn PCR-produkt med genet *ECA2049* amplifisert med primerparet ECAopp2048F + ECAopp2048R.



Figur 3.13. Restriksjonsanalyse av plasmider med PCR-produkt som inneholder *ECA2049*, og pUC128 uten innsatt fragment. Plasmidene er kuttet med *XmnI*. Forventet fragmentstørrelse for plasmid som inneholder PCR-produkt med *ECA2049* var 4,7 kb, og er vist i brønn 1, 3 og 5. Forventet fragmentstørrelse for pUC128 uten innsatt PCR-produkt var 3,2 kb, og er vist i brønn 2 og 4. Plasmidene var forventet å inneholde PCR-produktet med *ECA2048*, og forventede fragmentstørrelser ville da vært 2,9 kb og 1,8 kb (A), eller 2,4 kb og 2,3 kb (B). 1 kb DNA ladder (NEB) ble brukt som standard.

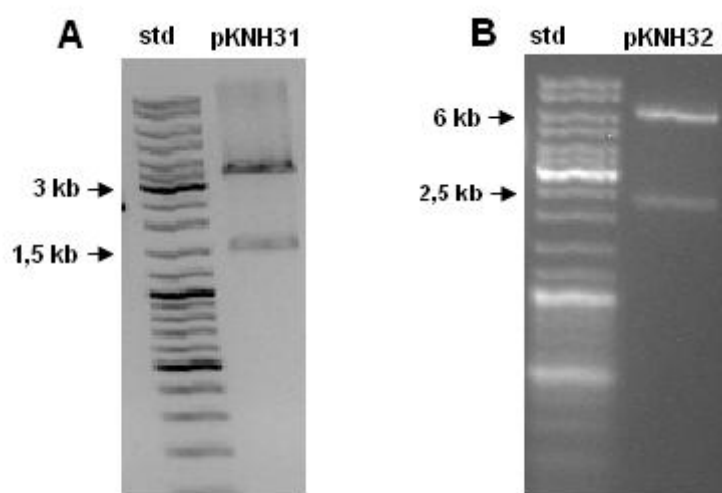
Primerparet som skulle amplifisert *ECA2048* var altså identisk med primerene ECAopp2048F og ECAopp2048R som amplifiserer produkt med genet *ECA2049*. Det gikk derfor med mye tid til å konstruere og undersøke plasmider som var forventet å inneholde PCR-produkt med genet *ECA2048*. Det ble bestilt nye primere, og med disse gikk konstruksjon av pKNH31 (beskrevet over) uten problemer.

3.3.2. Kontruksjon av pKNH32

pKNH31 ble kuttet med *PstI* og *NdeI* og separert på gel (figur 3.14A). Forventede størrelser på fragmentene var 3,2 kb og 1,5 kb. 1,5 kb-fragmentet fra pKNH31 ble rensset fra gelen og ligert sammen med 6,9 kb-fragmentet fra pKNH1 (figur 3.6A) før ligeringsblandingen ble

transformert til *E.coli* DH5 α . Fragmentet fra pKNH31 inneholder *ECA2048* og ble ligert inn nedstrøms for *Pm*-promoteren i fragmentet fra pKNH1. De transformerte cellene ble selektert på LA-plater med ampicillin.

Plasmider ble isolert fra koloniene på LA-platene, og kuttet med *Hind*III og *Pst*I for å undersøke om det var ønsket plasmid (figur 3.14B). Forventede størrelser på fragmentene var 6,1 kb og 2,3 kb. Transformant med forventet kuttemønster er vist i figur 3.14B. Plasmidet fra denne transformanten ble kalt pKNH32, og ble brukt videre til konstruksjon av pKNH34.

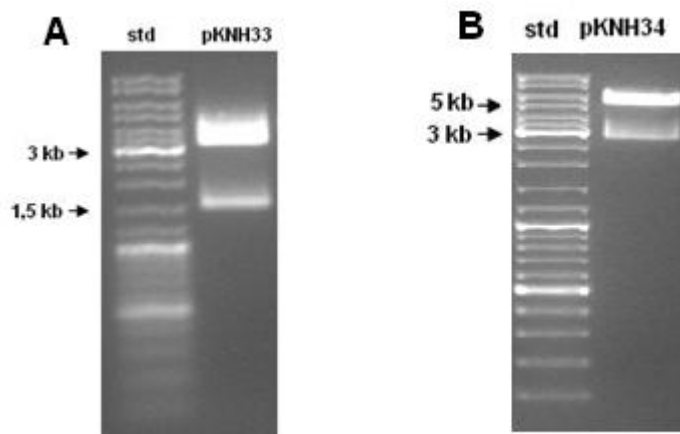


Figur 3.14. Restriksjonsanalysen av pKNH31 brukt til konstruksjon av pKNH32, og av ferdig konstruert pKNH32 for å verifisere at det er riktig plasmid. A: pKNH31 kuttet med *Pst*I og *Nde*I. Forventede fragmentstørrelser var 3,2 kb og 1,5 kb. 1,5 kb fragmentet ble benyttet til videre konstruksjon av pKNH32. B: pKNH32 kuttet med *Hind*III og *Pst*I. Forventet fragmentstørrelse var 6,1 kb og 2,3 kb. GeneRuler™ DNA Ladder mix ble brukt som standard for begge gelene.

3.3.3. Konstruksjon av pKNH34

pKNH33 ble kuttet med *Hind*III og *Pst*I og separert på gel (figur 3.15A). Forventede størrelser på fragmentene var 3,2 kb og 1,5 kb. 1,5 kb-fragmentet fra pKNH33 og 6,1 kb-fragmentet fra *Hind*III-*Pst*I-kuttingen av pKNH32 (figur 3.14B) ble rensset fra gelen, ligert og transformert til *E.coli* DH5 α . Fragmentet fra pKNH33 inneholder *ECA2049* og ble ligert inn oppstrøms for *xylS* i pKNH32. De transformerte cellene ble selektert på LA-plater med ampicillin. Plasmider ble isolert fra koloniene på LA-platene og kuttet med *Avr*II og *Not*I.

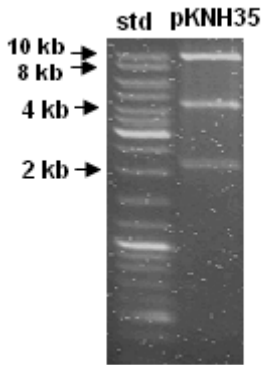
Forventet størrelse på fragmentene var 4,9 kb + 2,7 kb. Transformant med forventet kuttemønster er vist i figur 3.15B. Plasmidet fra denne transformanten ble kalt pKNH34, og ble brukt til videre konstruksjon av pKNH35.



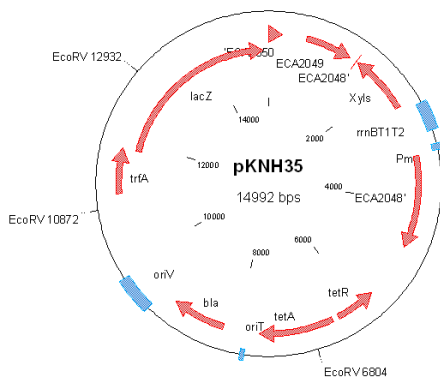
Figur 3.15. Restriksjonsanalysen av pKNH33 brukt til konstruksjon av pKNH34, og av ferdig konstruert pKNH34 for å verifisere at det er riktig plasmid. A: pKNH33 kuttet med *HindIII* og *PstI*. Forventede størrelser på fragmentene var 3,2 kb og 1,5 kb. 1,5 kb fragmentet ble benyttet i videre konstruksjon av pKNH24. B: pKNH34 kuttet med *AvrII* og *NotI*. Forventede størrelser på fragmentene var 4,9 kb og 2,7 kb. GeneRuler™ DNA Ladder mix ble brukt som standard for begge gelene.

3.3.4. Konstruksjon av pKNH35

4,9 kb-fragmentet fra *AvrII-NotI*-kuttingen av pKNH34 (figur 3.15B) ble rensset fra gelen og ligert sammen med 10,1 kb-fragmentet fra pHE246 (figur 3.8A) før ligeringsblandingen ble transformert til *E.coli* S17-1. Fragmentet fra pKNH34 inneholder *ECA2048*, *ECA2049*, *PmDI8* og *XylS*. Cellene ble platet ut på LA med ampicillin, og koloniene som vokste på LA-platen ble overført til en LA-plate med tetracyclin. Plasmider fra koloniene som vokste på tetracyclin ble isolert og kuttet med *EcoRV* som ville gi forventede fragmentstørrelser på 8,9 kb, 4,0 kb og 2,0 kb. Transformant med forventet kuttemønster er vist i figur 3.16. Plasmidet fra denne transformanten ble kalt pKNH35. Figur 5.17 viser plasmidkart av pKNH35 med restriksjonssetene for *EcoRV*.



Figur 3.16. Restriksjonsanalyse av pKNH35 for å verifisere at det er riktig plasmid. pKNH35 ble kuttet med *EcoRV*, og forventede fragmentstørrelser var 8,9 kb, 4,0 kb og 2,0 kb. GeneRuler™ DNA Ladder mix ble brukt som standard.

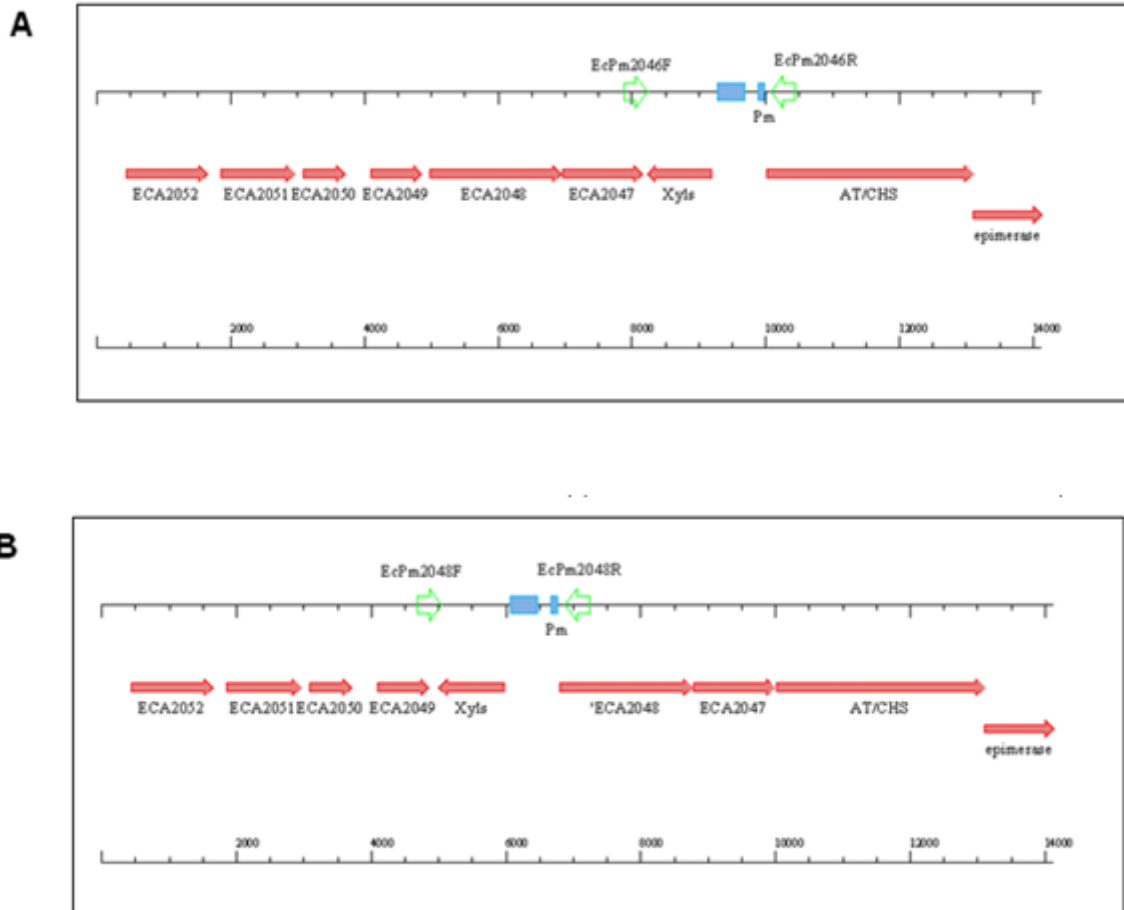


Figur 3.17. Plasmidkart for vektoren pKNH35 med restriksjonssteder for *EcoRV*.

3.4. Overføring av pKNH25 og pKNH35 til *E.carotovora*

Rekombineringsvektorene pKNH25 og pKNH35 kan brukes til å kontrollere ekspresjon av gener nedstrøms for *PmDI-8* promotoren. Dette kan gjøres ved overføring av vektorene til *E.carotovora* og rekombinering mellom homologe sekvenser. Vektorene er avhengig av TrfA for å kunne replikere, og kan derfor replikere i *E. coli* S17.1 som uttrykker dette proteinet, men de kan ikke replikere i *E.carotovora* uten å ha blitt integrert i kromosomet. pKNH25 inneholder *ECA2046* og *ECA2047* fra *E.carotovora*, og ønsket mutant etter rekombinering

med pKNH25 har fått innkorporert *PmDI-8* og *xyIS* oppstrøms for *ECA2046*, og samtidig mistet resten av plasmidet (figur 3.18A). pKNH35 inneholder *ECA2048* og *ECA2049* fra *E.carotovora*, og ønsket mutant etter rekombinering med pKNH35 har fått innkorporert *PmDI-8* og *xyIS* oppstrøms for *ECA2048* i tillegg til å ha mistet resten av plasmidet (figur 3.18B).



Figur 3.18. Genkart som viser ønskede mutanter etter rekombinering. A: *E.carotovora* rekombinert med pKNH25. *Pm* er innkorporert oppstrøms for *ECA2046* (merket AT/CHS). Primersettene for EcPm2046F/R er vist med grønne piler. B: *E.carotovora* rekombinert med pKNH35. *Pm* er innkorporert oppstrøms for *ECA2048*. Primersettene for EcPm2048F/R er vist med grønne piler.

3.4.1. Dyrking av *E. carotovora* på LA med X-gal

Det var ønskelig å undersøke om blå-hvit seleksjon kunne benyttes for å selektere for celler som har fått overført og innkorporert pKNH25 eller pKNH35, og senere mistet deler av plasmidet ved videre rekombinering. Disse vektorene inneholder genet for β -galactosidase

(lacZ) som spalter X-gal, og det blir dannet blå kolonier. Dersom dyrking av *E.carotovora* på LA med X-gal gir hvite kolonier, kan blå-hvit seleksjon benyttes.

Overnattskultur av *E.carotovora* ble platet ut på LA med 60 µl X-gal og inkubert i 30 °C. Etter et døgn ble det observert blå kolonier på platen. Dette tyder på at *E.carotovora* produserer β-galactosidase. Søk i NCBI databasen med lacZ i genomet til *E.carotovora* bekrefter at bakterien inneholder dette genet som koder for β-galactosidase (YP_049595.1).

Det kan ikke benyttes blå-hvit seleksjon for å selektere bakterier som har fått overført pKNH25 eller pKNH35. Vektorene inneholder også genet som koder for tetracyclinresistens, så det er mulig å benytte dette til seleksjon.

3.4.2. Elektroporering

pKNH25 og pKNH35 ble forsøkt overført til elektrokompente *E.carotovora* celler ved elektroporering (se seksjon 2.14) og platet ut på LA med tetracyclin. Det ble ikke observert vekst på platene. Dette kunne skyldes dårlig overføringsfrekvens, dårlig rekombineringsfrekvens, eller for høye konsentrasjoner av tetracyclin.

3.4.2.1. Undersøke hvilken tetracyclinkonsentrasjon som egner seg best til selektering

Plasmidet pHE145 ble overført til elektrokompente *E.carotovora* celler ved elektroporering. pHE145 inneholder genet for tetracyclinresistens, og er et bredspektret plasmid som skal kunne replikere i *E. carotovora*. 200 µl elektroporete cellene ble platet ut på LA med ulike konsentrasjoner av tetracyclin for å undersøke hvilken konsentrasjon som egner seg best til å selektere elektroporete *E.carotovora* celler. Konsentrasjonene av tetracyclin på de ulike platene var 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml og 15 µg/ml. Det ble også laget negative kontrollplater med *E.carotovora* uten pHE145. Platene ble inkubert i 30 °C varmeskap.

Etter et døgn var det vekst på platene med elektroporete celler med tetracyclinkonsentrasjonene 1 µg/ml, 2,5 µg/ml og 5 µg/ml. I tillegg var det vekst på kontrollplatene uten plasmid, med konsentrasjonene 1µg/ml og 2,5µg/ml tetracyclin. Etter 2 døgn var det også vekst på platen med celler med pHE145 og tetracyclinkonsentrasjon 10

µg/ml, og noen få kolonier på platen med 15 µg/ml. Antall kolonier med pHE145 på platen med 10 µg/ml tetracyclin var 1063. Ut ifra disse resultatene ble 10 µg/ml tetracyclin brukt videre for selektering av *E.carotovora* celler som har tatt opp pKNH25 og pKNH35 ved elektroporering.

3.4.2.2. Overføring av pKNH25 ved elektroporering

pKNH25 ble overført til tre paralleller av elektrokompetente *E.carotovora* celler ved elektroporering. Elektroporererte celler ble inkubert i 30 °C ristekubator i 40 minutter, 3 timer og over natt. 100 µl cellekultur fra de tre parallellene med ulik inkuberingstid ble platet ut ufortynnet og konsentrert på LA med tetracyclin og inkubert i 30 °C varmeskap. Overnattskulturen ble i tillegg fortynnet 1:1 og 1:10.

Det ble ikke observert vekst på noen av platene etter inkubering i 5 dager.

3.4.3. Konjugering

Resultatene tydet på lav elektroporeringsfrekvensen ved elektroporering til *E.carotovora*, som gjør det lite sannsynlig med rekombinering mellom vektorene og genomet til *E.carotovora*. For å løse dette var det ønskelig å forsøke å overføre vektorene via konjugering mellom *E. coli* S17.1 som inneholder vektorene, og *E. carotovora*. For å kunne benytte seg av konjugering var det nødvendig å kunne selektere mellom *E. carotovora* og *E. coli*. Det ble derfor laget kanamycinresistente *E. carotovora*-celler ved å sette inn et gen for kanamycinresistens på et transposon.

3.4.3.1. Tillaging av kanamycinresistente *E.carotovora*-celler for bruk til konjugering

Plasmidet pMS11 som inneholder genet for kanamycinresistens på et transposon ble overført til elektrokompetente *E.carotovora* celler ved elektroporering. Cellene ble platet ut på LA med kanamycin og inkubert i 30 °C varmeskap.

Etter to dager ble det observert 3 kolonier på platen. Den ene ble benyttet videre til konjugering med *E.coli*, og ble kalt *E.carotovora* ::TnMS11,

3.4.3.2. Overføring av pKNH25 og pKNH35 ved konjugering

100 µl overnattskultur av *E.carotovora* ::TnMS11 ble inokulert i 10 ml LB med kanamycin og inkubert i 30 °C risteinkubator i ca 5 timer. 100 µl av overnattskultur av *E.coli* S17.1 med pKNH25 eller pKNH35 ble innokulert i 10 ml LB med tetracyclin i 37 °C risteinkubator i ca 2 timer.

Konjugering mellom *E.carotovora* ::TnMS11 og *E.coli* S17.1 ble gjennomført som beskrevet i seksjon 2.15.

Koloniene som vokste på platene med både kanamycin og tetracyclin var *E.carotovora*-celler som sannsynligvis hadde fått overført og integrert pKNH25 eller pKNH35, og dermed genet for tetracyclinresistens. Det ble observert flere kolonier (>50) av tetracyclinresistente bakterier som trolig hadde fått overført pKNH25, og en koloni som trolig hadde fått overført pKNH35.

3.4.4. Videre rekombinering for å få dannet ønskede mutanter

Koloniene som vokste på både tetracyclin og kanamycin er *E.carotovora* ::TnMS11 som har fått integrert hele plasmidet (pKNH25 eller pKNH35) i genomet ved homolog rekombinering. For å få dannet mutantene vist i figur 3.18 er det nødvendig med videre rekombinering. Bakteriene med de integrerte plasmidene ble derfor dyrket videre, og det ble selektert for mutanter som har mistet det integrerte plasmidet slik at enten villtypekromosomet eller kromosom med mutasjon foran *ECA2046* eller *ECA2048* var blitt dannet. Disse mutantene har blant annet mistet genet for tetracyclinresistens, så selektering av disse kan gjøres ved å undersøke om det har blitt dannet noen kolonier som ikke vokser på tetracyclin. Kolonier uten tetracyclinresistens kan undersøkes ved PCR for å finne ut om *PmDI-8* og *xyIS* har blitt integrert.

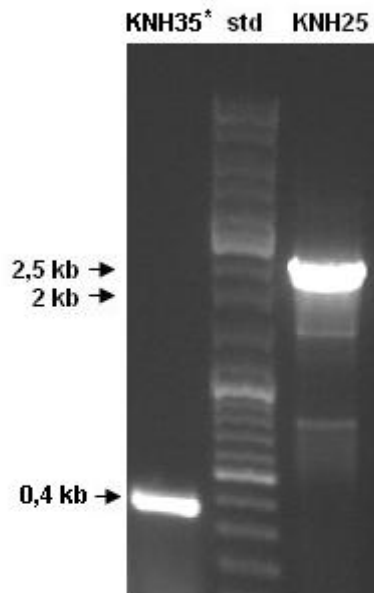
Videre rekombinering ble gjennomført som beskrevet i seksjon 2.15.

Kolonier uten tetracyclinresistens ble undersøkt ved PCR, og PCR-produktene ble separert med agarose gelelektroforese. Primerparet EcPm2046F + EcPm2046R ble brukt for å undersøke mutanter som hadde fått integrert pKNH25, og ville gitt et fragment med størrelse 2,2 kb for ønsket mutant etter videre rekombinering, og et fragment med størrelse 0,4 kb for

villtype eller revertant. Primerparet EcPm2048F + EcPm2048R ble brukt for å undersøke mutanter som hadde fått integrert pKNH35, og ville også gitt et fragment med størrelse 2,2 kb for ønsket mutant etter videre rekombinering, og størrelse 0,4 kb for villtype eller revertant. Primerssetene er merket med grønne piler i figur 3.18.

Det ble funnet 7 kolonier av mutantene som hadde fått integrert pKNH25 (*PmDI-8* foran *ECA2046*) som ikke vokste på tetracyclin etter videre rekombinering. Ved analyse av PCR-produktene fra disse koloniene på agarosegel viste det seg at en av koloniene hadde den forventede fragmentstørrelsen fra den ønskede mutant. Denne ble kalt *E. carotovora* KNH25, og er vist i figur 3.20.

For mutanten som hadde fått integrert pKNH35 (*PmDI-8* foran *ECA2048*) ble det funnet 26 kolonier som ikke vokste på tetracyclin. Disse ble undersøkt ved PCR, og ingen av koloniene hadde den forventede fragmentstørrelsen til den ønskede mutant. Analyse av PCR-produkt for en av mutantene som viste seg å ha forventet kuttemønster for revertanter er vist i figur 3.20 (merket KNH35*).



Figur 3.20. Analyse av PCR-produkter fra videre rekombinering av mutanten som hadde fått integrert pKNH35 (merket KNH35*), og fra mutanten *E. carotovora* KNH25. Forventet størrelse på fragmentene for begge de ønskede mutantene var 2,2 kb, og forventet størrelse for revertanter var 0,4 kb. GeneRuler™ DNA Ladder mix ble brukt som standard.

3.5. Aktivere transkripsjon fra *PmDI-8* og analyse av produsert stoff

Det var ønskelig å aktivere transkripsjon fra *PmDI-8*-promotoren i *E.carotovora* KNH25 for å undersøke om ekspresjon av *ECA2046* og eventuelt *ECA2045* fører til produksjon av bakteriell kitin. For å aktivere *PmDI-8* ble induseren *m*-toluat tilsatt ved dyrking av mutanten. For å undersøke om det var blitt produsert bioflukkulanter ble flokkuleringsaktiviteten målt som beskrevet i seksjon 2.5. Produsert stoff ble også felt med etanol, dialysert og frysetørket. Det frysetørkede produktet ble undersøket ved ^1H NMR.

3.5.1. Dyrking av bakteriekultur i medium med *m*-toluat

50 μl overnattskultur av *E.carotovora* KNH25 i LB ble overført til 50 ml LB tilsatt 2 % glukose og *m*-toluat til konsentrasjonene 0,1 mM, 0,25 mM og 0,5 mM og inkubert i 30 °C risteinkubator i to døgn. Bakteriekulturen ble sentrifugert i 20 minutter ved 6000 rpm for å fjerne cellene.

3.5.2. Måling av flokkuleringsaktivitet

Supernatanten fra dyrkingen av mutanten i 0,1 mM og 0,5 mM *m*-toluat ble brukt til å måle flokkuleringsevne som beskrevet i seksjon 2.5. Resultatene (tabell 3.2) viste ingen flokkuleringsaktivitet. Dette tyder da på at det ikke er produsert noen bioflukkulanter fra mutanten, eventuelt er det produsert i svært små mengder som ikke er målbare.

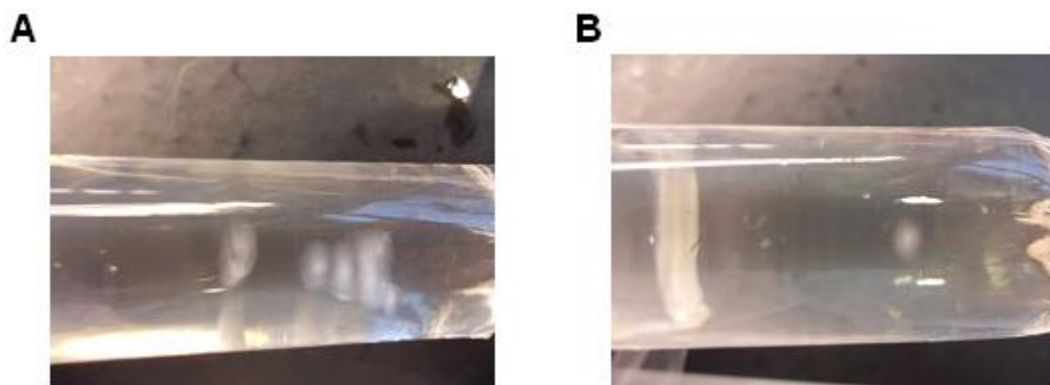
Tabell 3.2. OD_{620} fra *E.coli* resuspendert i supernatanten fra *E.carotovora* KNH25 dyrket i 0,1 mM og 0,5 mM *m*-toluat, sammenlignet med OD_{620} fra kontrollprøven etter 2 timer og over natt. Flokkuleringsaktiviteten (1) er regnet ut fra gjennomsnittsverdien til parallellene og verdiene til kontrollprøven.

	OD_{620} etter 2 timer		OD_{620} over natt	
	0,1 mM <i>m</i> -toluat	0,5 mM <i>m</i> -toluat	0,1 mM <i>m</i> -toluat	0,5 mM <i>m</i> -toluat
Kontroll	2,58		2,38	
Prøve 1	2,50	2,71	2,06	2,46
Prøve 2	2,49	2,60	2,41	2,24
Prøve 3	2,63	2,47	2,27	2,48
Gjennomsnitt	2,54	2,59	2,25	2,39
Flokkuleringsaktivitet	1,5 %	0	5,5 %	0

3.5.3. Etanolfelling, dialyse og frysetørking

Supernatanten fra *E.carotovora* KNH25 dyrket i 0,1 mM, 0,25 mM og 0,5 mM *m*-toluat, og supernatanten fra villtypen dyrket i acetatmedium ble felt med etanol og dialysert som beskrevet i seksjon 2.16. Alle fire prøvene felte ut med etanol.

Etter dialyse ble det observert udefinerbare klumper i dialyseslangene med de oppløste utfellingene fra supernatanten fra dyrkingen i 0,25 og 0,5 mM *m*-toluat (figur 3.21).



Figur 3.21. Observasjoner fra dialyseslangene med utfellingene fra supernatanten fra *E.carotovora* KNH25 dyrket i 0,5 mM *m*-toluat (A) og 0,25 mM *m*-toluat (B).

De dialyserte produktene ble frysetørket over tre netter. Det frysetørkede stoffet ble veid, og det var 36 mg stoff fra prøven dyrket i 0,1 mM *m*-toluat, 32 mg fra prøven dyrket i 0,25 mM *m*-toluat, 34 mg fra prøven dyrket i 0,5 mM *m*-toluat og kun 1 mg fra villtypen dyrket i acetatmedium.

3.5.4. ¹H NMR analyse av frysetørket stoff (utført av Marit Syversveen)

33 mg av stoffet fra prøven dyrket i 0,5 mM *m*-toluat ble tilsatt 3,3 ml 99,9 % tungtvann (D₂O). Kitosan kan være vanskelig å løse, dette er avhengig av kjedelengde og acetyleringsgrad. Stoffet løste seg straks det ble tilsatt D₂O, og dette tyder på at dersom stoffet er kitosan har det sannsynligvis kort kjedelengde. I dette tilfellet er det ikke nødvendig å bryte ned stoffet med NaNO₂ før NMR.

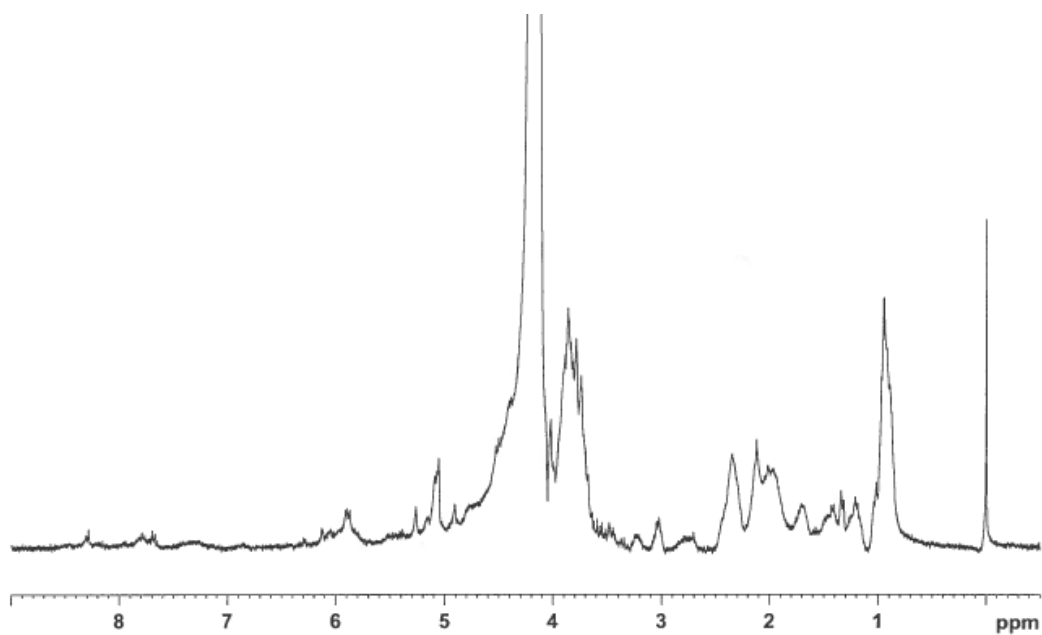
Da pH skulle senkes for klargjøring til NMR felte prøven ut ved pH 4,2. Dette tyder på at stoffet sannsynligvis ikke er kitosan. Løsningen ble oppjustert til ca 5 og analysert ved ^1H NMR. NMR-spekteret er vist i figur 3.22.

Et ^1H NMR-spekter for kitosan er vist i figur 2.2. Kitosan har vanligvis topper på ca 4,5 ppm og 4,85 ppm som indikerer H-1 på henholdsvis GlcNAc og GlcN, en topp på ca 3,15 ppm som indikerer H-2 på GlcN, og en relativt stor topp (sammenlignet med de andre toppene) på ca 2 ppm som indikerer acetyl-protonene på GlcNAc. Topper mellom 3,5 og 4 ppm indikerer H-3, H-4, H-5 og H-6 på både GlcNAc og GlcN, og H-2 på GlcN [46, 47]. Disse toppene er typisk for polysakkarider.

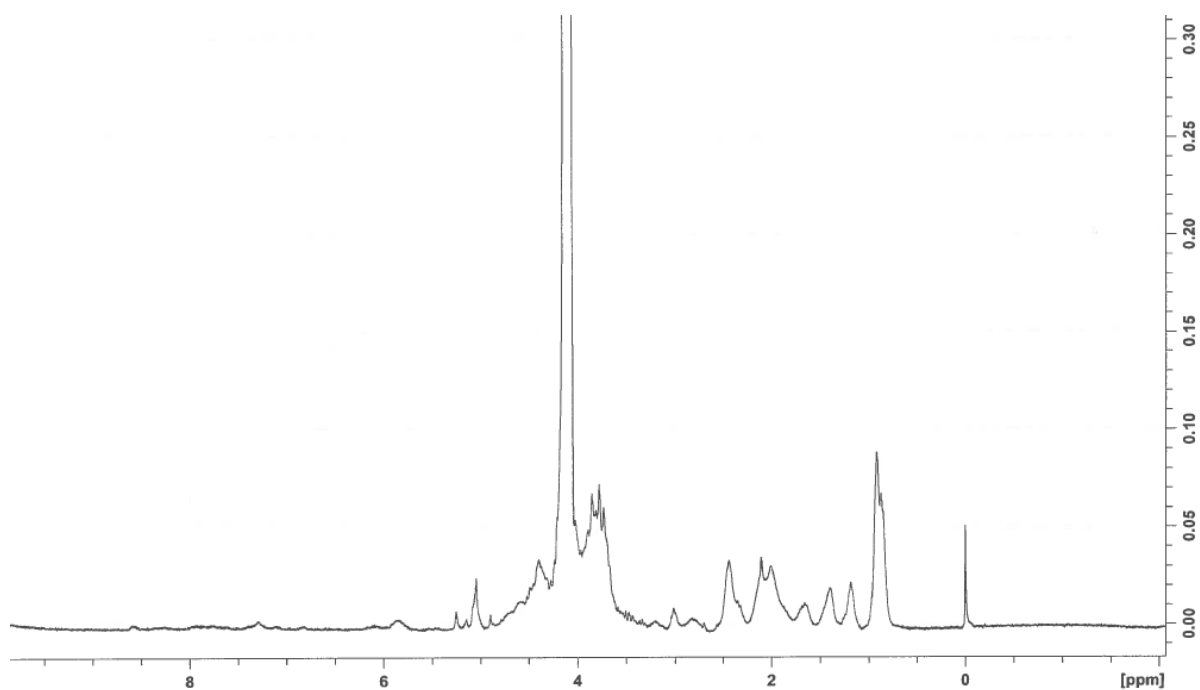
Spekteret i figur 3.22 viser mange ulike topper, og det tyder på at det er en blanding av flere ulike stoffer. Det likner ikke et typisk kitosan-spekter, men det kan likevel ikke utelukkes at det er små mengder kitosan til stede grunnet små topper ved de nevnte områdene. Det kan derimot se ut til at det kan være en annen polymer til stede i stoffet som felte ut med etanol, grunnet tydelige topper mellom 3,5 og 4 ppm.

Det var ønskelig å fjerne stoffene som felles ut ved senking av pH, og undersøke om det var andre stoffer igjen prøven som var løselige ved lav pH, og da gjøre en ny NMR-analyse for å se om det ville gi et mer tydelig spekter.

66 mg av det frysetørkede stoffet som var igjen fra prøvene dyrket med *m*-toluat til stede ble løst i 5 ml ionefritt vann og pH ble senket til 3,5 med 0,1 M HCl. pH til løsningen etter den var løst i ionefritt vann var 4,45, og ved pH 4,31 begynte prøven å felle ut (20 μl 0,1 M HCl tilsatt). Løsningen med pH 3,5 ble sentrifugert ved 6000 rpm i 30 minutter for å fjerne utfellingen. Supernatanten ble frysetørket og stoffet ble veid, og det viste seg at det var 35 mg igjen etter at utfellingen var fjernet (53 % av den totale mengden stoff). Stoffet ble klargjort for NMR og analysert (se seksjon 2.17). ^1H NMR-spekteret er vist i figur 3.23.



Figur 3.22. ^1H NMR-spekter av frysetørket stoff som ble felt ut med etanol fra supernatanten til *E.carotovora* KNH25.



Figur 3.23. ^1H NMR-spekter av frysetørket stoff som ble felt ut med etanol fra supernatanten til *E.carotovora* KNH25 etter å ha fjernet stoffer som felles ut ved pH 3,5-4,3.

Det ble ikke observert betydelige forskjeller på NMR-spektrene i figur 3.22 og 3.23, men spekteret i figur 3.23 er noe renere. Proteiner har ofte mange topper fordelt på hele spekteret grunnet protonene på de ulike aminosyrene [44], så det kan tyde på at det er proteiner som har blitt felt ut.

3.5.5. Sammenlikning av villtype og mutant

Det var ønskelig å undersøke om det også ble produksjon av stoffer som kan felles med etanol fra villtypen, eller om dette var kun tilfellet fra mutanten *E. carotovora* KNH25. Det var også interessant og finne ut om det var aktiveringen av *PmDI-8* promotoren, og dermed *ECA2046* og eventulet *ECA2045* ved tilsetning av *m*-toluat som førte til produksjon av det observerte stoffet, eller om dette ble produsert også uten induser til stede.

25 µl overnattskultur av *E. carotovora* KNH25 og villtypen ble inokulert i 25 ml LB tilsatt 2 % glukose. En kolbe med villtypen og en med KNH25 ble tilsatt 0,25 mM *m*-toluat, mens en kolbe med hver av stammene ble dyrket uten induser. Prøvene ble inkubert i 30 °C risteinkubator i to døgn. Bakteriekulturene ble sentrifugert i 20 minutter ved 6000 rpm for å fjerne cellene. Stoffer fra supernatantene ble felt med etanol, dialysert og frysetørket som beskrevet i seksjon 2.16. I dette tilfellet ble det ikke observert klumper i noen av dialyseslangene. Det tørkede stoffet ble veid og resultatene (tabell 3.3) viser at det blir produsert tilnærmet like mye stoff som felles med etanol fra både villtypen og mutanten, uavhengig av om induser var tilsatt.

Tabell 3.3. Mengde frysetørket stoff fra villtype og mutanten KNH25 dyrket i samme medium med og uten *m*-toluat.

<i>E.carotovora</i>	Med 0,25 mM <i>m</i> -toluat	Uten <i>m</i> -toluat
Villtype	14 mg	14 mg
KNH25	14 mg	13 mg

Ut ifra disse resultatene ser det ikke ut til at aktivering av *ECA2046* og eventuelt *ECA2045* fører til økt produksjon av noe stoff i supernatanten som kan felles ut med etanol.

5. Diskusjon

Ved overføring av pKNH25 og pKNH35 til *E. carotovora* ved elektroporering var trolig elektroporeringsfrekvensen svært lav, og det var dermed lite sannsynlig at plasmidene kunne integreres i genomet ved homolog rekombinering. Vektorene ble derfor forsøkt overført ved konjugering mellom *E. coli* S17.1 og *E. carotovora* ::TnMS11, noe som viste seg å være vellykket. Ved videre rekombinering ble det dannet en ønsket mutant, kalt *E. carotovora* KNH25 som hadde fått satt inn *PmDI-8* og *xylS* oppstrøms for. Ingen ønskede mutanter med *PmDI-8* og *xylS* oppstrøms for *ECA2048* ble funnet, og det var derfor ikke mulig å undersøke om aktivering av hele det antatte operonet ville føre til produksjon av bakteriell kitin.

Sannsynligheten for å finne ønskede mutanter hadde nok vært større ved bruk av et annet seleksjonssystem. Mye tid gikk med til å overføre kolonier til plater med og uten tetracyclin, i tillegg til at disse måtte innkuberes i to døgn før man kunne observere om koloniene vokste eller ikke. Det var i utgangspunktet tenkt å bruke blå-hvit seleksjon med X-gal som substrat for å unngå dette problemet, da ville aktuelle kolonier vært hvite ved utplating på LA med X-gal grunnet tap av *lacZ* genet. Dette var ikke mulig da det viste seg at dyrking av *E. carotovora* på plater med X-gal ga blå kolonier. Søk i NCBI databasen bekreftet også at genomet til *E. carotovora* inneholder *lacZ*. En løsning kunne vært og undersøkt om det hadde vært mulig å benytte seg av blå-hvit seleksjon med X-gluc som substrat. I dette tilfellet kunne rekombineringsvektorene inneholdt genet som koder for β -glukuronidase som hydrolyserer X-gluc og danner et blått produkt [48]. Et annet alternativ kunne vært sjekke om SacB-systemet ville fungert. *sacB* genet koder for enzymet levansucrase, som har vist seg å føre til lysesering av ulike gram negative bakterier eller inhibering av vekst dersom det dyrkes på medium som inneholder 5 % sukrose [49]. Ved å konstruere rekombineringsvektorer som inneholder *sacB* kunne celler som hadde mistet de ønskede delene av plasmidet ved videre rekombinering selekteres ved å plate ut kulturen på et medium som inneholder 5 % sukrose. Dersom en av disse seleksjonsmetodene kan benyttes i *E. carotovora* ville det vært svært tidsbesparende sammenliknet med tetracyclin-seleksjon, og det ville gitt muligheten til å undersøke mange flere kolonier med PCR.

E. carotovora villtypen ble forsøkt dyrket i medium med acetat som karbonkilde, da dette har vist seg å være effektivt for produksjon av kitosanlignende bioflokkulanter i andre bakterier [20, 21]. Resultatene fra målingene av flokkuleringsaktiviteten viste ingen aktivitet, noe som

tyder på at det ikke er noen produksjon av bioflokkulanter.. Undersøkelser av supernatanten fra mutanten *E. carotovora* KNH25 hvor transkripsjon fra *PmDI-8* var aktivert viste heller ingen flokkuleringsaktivitet. Dette tyder da på at det heller ikke har blitt produsert kitosan eller noen annen bioflokkulant fra mutanten, og at aktivering av kun *ECA2046* og eventuelt *ECA2045* da mest sannsynlig ikke fører til produksjon av en funksjonell kitin syntase.

Det ble utført etanolfelling av supernatanten fra *E. carotovora* KNH25 dyrket med tilstedeværelse av ulike konsentrasjoner av *m*-toluat, og fra supernatanten fra villtypen dyrket i acetatmedium for å undersøke om det ga utfelling. Det ble observert utfelling fra alle prøvene. Etter dialyse av det utfelte stoffet ble det observert klumper i dialyseslangene med utfellingen fra *E. carotovora* KNH25 dyrket i 0,25 og 0,5 mM *m*-toluat. Det er vanskelig å identifisere hva disse klumpene kan være, men det *kan* se ut som sopp. Som bildene i figur 3.20 viser er det dannet mest i prøven fra dyrkingen i 0,5 mM *m*-toluate, mens klumpen fra 0,25 mM *m*-toluat er vesentlig mindre. Ut ifra disse observasjonene kan det se ut til at konsentrasjonen av *m*-toluat påvirker dannelsen av disse udefinerbare klumpene, men dette kan selvfølgelig også være tilfeldigheter. Etter dyrking av villtypen og mutanten på nytt i samme medium med og uten *m*-toluat (0,25 mM) ble det ikke observert dannelse av klumper ved dialyse. Disse resultatene tyder da på at klumpene ikke er reproduerbare, og at de første observasjonene mest sannsynlig var tilfeldig. For å bekrefte dette bør mutanten og villtypen også forsøkes og dyrkes på nytt med 0,5 mM *m*-toluat for å undersøke om denne konsentrasjonen vil gi dannelse av klumper, og om det i så fall kun vil være fra mutanten eller også fra villtypen.

Ved veiing av det frysetørkede stoffet fra *E. carotovora* KNH25 dyrket med ulike konsentrasjoner av *m*-toluat viste det seg at det var liten variasjon av mengde stoff som kan felles ut med etanol (fra 32-36 mg). Dette tyder da på at produksjonen av dette stoffet ikke blir påvirket av ulike konsentrasjoner av *m*-toluat. Etter dyrking av både villtypen og mutanten i samme medium, og med og uten *m*-toluat viste det seg at det ble produsert like store mengder stoff som kan felles ut med etanol fra både mutanten og villtypen, uavhengig av tilstedeværelsen av *m*-toluat. Dette indikerer da at aktivering av transkripsjon fra *PmDI-8* i *E. carotovora* KNH25 ikke ga noen økt produksjon av stoffer som kan felles ut med etanol sammenliknet med villtypen.

Det frysetørkede stoffet fra mutanten ble undersøkt ved ^1H NMR. Da pH skulle senkes for klargjøring til ^1H NMR felte prøven ut. Kitosan er løselig ved lav pH, så stoffet som feller ut er sannsynligvis ikke kitosan eller en kitosanlignende polymer. pH ble oppjustert for at stoffet skulle løses før det ble gjennomført ^1H NMR-analyse. Etter fjerning av stoffene som felles ut ved pH ned til 3,5 fra resten av det frysetørkede produktet viste det seg at 53 % av den totale mengden etanolfelt stoff var løselig ved pH 3,5, og dette stoffet ble også undersøkt med ^1H NMR. NMR-spekterene i figurene 3.22 og 3.23 viser ingen stor forskjell etter fjerning av stoffene som felles ut ved lav pH, men spekteret i figur 3.23 som viser stoffet som kun var løselig ved lav pH er noe renere. Det er sannsynlig at det er proteiner som kan ha blitt felt ut siden disse kan ha topper fordelt utover hele spekteret grunnet protonene på de ulike aminosyrene. NMR-spekterene viste mange ulike topper, og det er vanskelig å identifisere hvilket stoff som er til stede, mest sannsynlig er det en blanding av flere stoffer. NMR-spekteret lignet ikke et typisk NMR-spekter for kitosan om er vist i figur 2.2. Resultatene fra NMR-analysen, og det faktum at ingen aktivitet ved måling av flokkuleringsaktivitet ble observert, virker det svært lite trolig at det er blitt produsert kitosan eller kitosanlignende polymerer. Det er derimot sannsynlig at det kan ha blitt produsert en annen polymer som felles med etanol og er løselig ved pH 3,5. Toppene i NMR-spekteret mellom 3,5 ppm og 4 ppm er typisk for mange polysakkarider, grunnet protonene på sukkermonomerene. Selv om det ikke tyder på at det er kitosan til stede hadde det vært interessant å undersøke produktet nærmere, og prøve å identifisere en mulig polymer.

Som nevnt tyder ikke målingene av flokkuleringsaktiviteten eller ^1H NMR-analysen på at det er produsert en kitosanlignende polymer. Når det heller ikke forekommer noen økning i produsert stoff ved aktivering av *ECA2046* og eventuelt *ECA2045*, er det ut ifra disse resultatene lite sannsynlig at aktivering av disse genene alene fører til en funksjonell kitin syntase. Det ser heller ikke ut til at produksjonen av en eventuelt annen polymer kommer av aktivering av transkripsjon fra *PmDI-8* i *E. carotovora* KNH25. Selv om resultatene ikke indikerer noen tilstedeværelse av kitin syntase kan enzymet likevel ha blitt dannet, men at enzymaktiviteten er avhengig av produktene fra *ECA2047* og/eller *ECA2048*, eller eventuelt produkt fra andre co-regulerte gen i samme genklynge eller andre steder i genomet som ikke er uttrykt. Dersom ekspresjon eller aktiviteten til den eventuelle kitin syntasen er avhengig av *ECA2047* og/eller *ECA2048* kan dette undersøkes med samme metoder benyttet i denne oppgaven dersom man får laget mutanten med *PmDI-8* foran *ECA2048*. Det kunne også vært

interessant å forsøke å aktivere *ECA2046 in vitro*, og undersøke om dette vil føre til produksjon av en aktiv kitin syntase. Det har vist seg at CSI i *S. cerevisiae* er den kitin syntasen med størst aktivitet *in vitro*, mens den ikke har noen stor aktivitet *in vivo* [19]. Dette kan også være tilfelle for den antatte kitin syntasen i *E. carotovora*. CSIII er den kitin syntasen i *S. cerevisiae* som står for produksjonen av over 90 % av cellulær kitin, men aktiviteten til dette enzymet er avhengig av produktene til flere andre gener [19]. Dette forsterker også sannsynligheten for at aktivering av kun *ECA2046* og eventuelt *ECA2045* ikke er tilstrekkelig for at det antatte enzymet er aktivt *in vivo*.

6. Konklusjon

Dannelsen av mutanten som inneholder *PmDI-8* og *xylS* oppstrøms for *ECA2046* var vellykket og mutanten ble kalt *E. carotovora* KNH25. Aktivering av transkripsjon fra *PmDI-8* promotoren i mutanten førte ikke til produksjon av bioflokkulanter, og ¹H NMR-analyser av stoffet som ble felt ut med etanol viste ikke noe tydelig spekter som er typisk for kitosan, men tyder på at det kan være en blanding av ulike stoffer. ¹H NMR-spektrene tyder derimot på at det kan være en annen polymer til stede. Det er likevel lite trolig at denne mulige polymeren blir produsert grunnet aktivering av transkripsjon av *ECA2046* og eventuelt *ECA2045* da det blir produsert like store mengder stoff som kan felles ut med etanol fra både villtypen og mutanten, uavhengig av tilstedeværelse av *m*-toluat.

Siden verken målingene av flokkuleringsaktiviteten eller ¹H NMR-spekteret gir noen indikasjon på at det er kitosan til stede, og det heller ikke viser seg noen økning i produsert stoff som felles med etanol ved aktivering av *PmDI-8* promotoren i mutanten, er det lite som tyder på at aktivering av transkripsjon av kun *ECA2046* og eventuelt *ECA2045* fører til produksjon av en aktiv kitin syntase eller et annet aktivt enzym som katalyserer dannelsen av en eventuell polymer som felles ut med etanol.

Referanser

1. Khoushab, F. and M. Yamabhai, *Chitin research revisited*. Mar Drugs, 2010. **8**(7): p. 1988-2012.
2. Kaplan, D., *Biopolymers from renewable resources*. Macromolecular systems, materials approach. 1998, Berlin ; New York: Springer, 417 p.
3. Kurita, K., *Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans*. Mar Biotechnol (NY), 2006. **8**(3): p. 203-26.
4. Lee, D.W., Lim, H., Chong, H.N. and Shim, W.S. , *Advances in chitosan material and its hybrid derivatives: a review*. The Open Biomaterials Journal, 2009. **1**: p. 10-20.
5. Ponce-Jiménez, M.d.P., Fernando López-Dellamary Toral, and Ezequiel Delgado-Fornué, *Antifungal protection and sizing of paper with chitosan salts and cellulose ethers. Part I, Physical effects*. Journal of the American Institute for Conservation, 2002. **41**(3): p. 243-254.
6. Strand, S.P., T. Nordengen, and K. Ostgaard, *Efficiency of chitosans applied for flocculation of different bacteria*. Water Res, 2002. **36**(19): p. 4745-52.
7. Dumitriu, S., *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*. 2005: Marcel Dekker.
8. Tomihata, K. and Y. Ikada, *In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives*. Biomaterials, 1997. **18**(7): p. 567-75.
9. Jayakumar, R., M. Prabakaran, P.T. Sudheesh Kumar, S.V. Nair, and H. Tamura, *Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications*. Biotechnology advances, 2011. **29**(3): p. 322-37.
10. Kossovich, L.Y., Y. Salkovskiy, and I.V. Kirillova, *Electrospun Chitosan Nanofiber Materials as Burn Dressing*, in *6th World Congress of Biomechanics (WCB 2010). August 1-6, 2010 Singapore*, C.T. Lim and J.C.H. Goh, Editors. 2010, Springer Berlin Heidelberg. p. 1212-1214.
11. Peter, M.G., *Applications and environmental aspects of chitin and chitosan*. 1995, Colchester, ROYAUME-UNI: Taylor & Francis. 317.
12. Berger, J., M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, and R. Gurny, *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*. Eur J Pharm Biopharm, 2004. **57**(1): p. 19-34.
13. Ravi Kumar, M.N.V., *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive and Functional Polymers, 2000. **46**(1): p. 1-27.

14. Rosiak, J.M., I. Janik, S. Kadlubowski, M. Kozicki, P. Kujawa, P. Stasica, and P. Ulanski, *Radiation Formation of Hydrogels for Biomedical Applications*. Institute of Applied Radiation Chemistry, Wien, 1996.
15. Berger, J., M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, and R. Gurny, *Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications*. Eur J Pharm Biopharm, 2004. **57**(1): p. 35-52.
16. Minoura, N., T. Koyano, N. Koshizaki, H. Umehara, M. Nagura, and K.-i. Kobayashi, *Preparation, properties, and cell attachment/growth behavior of PVA/chitosan-blended hydrogels*. Materials Science and Engineering: C, 1998. **6**(4): p. 275-280.
17. Strand, S.P., M.S. Vandvik, K.M. Varum, and K. Ostgaard, *Screening of chitosans and conditions for bacterial flocculation*. Biomacromolecules, 2001. **2**(1): p. 126-33.
18. Peter, M.G., *Chitin and Chitosan in Fungi*. Biopolymers Online. 2005: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
19. Roncero, C., *The genetic complexity of chitin synthesis in fungi*. Curr Genet, 2002. **41**(6): p. 367-78.
20. Fujita, M., M. Ike, S. Tachibana, G. Kitada, S.M. Kim, and Z. Inoue, *Characterization of a bioflocculant produced by Citrobacter sp. TKF04 from acetic and propionic acids*. J Biosci Bioeng, 2000. **89**(1): p. 40-6.
21. Son, M.-K., H.-D. Shin, T.-L. Huh, J.-H. Jang, and Y.-H. Lee, *Novel Cationic Microbial Polyglucosamine Biopolymer from New Enterobacter sp. BL-2 and Its Bioflocculation Efficacy*. 2005, The Korean Society for Applied Microbiology and Biotechnology.
22. Perri, S., D.R. Helinski, and A. Toukdarian, *Interactions of Plasmid-Encoded Replication Initiation Proteins with the Origin of DNA-Replication in the Broad Host Range Plasmid Rk2*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(19): p. 12536-12543.
23. Karunakaran, P., D.T. Endresen, H. Ertesvag, J.M. Blatny, and S. Valla, *A small derivative of the broad-host-range plasmid RK2 which can be switched from a replicating to a non-replicating state as a response to an externally added inducer*. Fems Microbiology Letters, 1999. **180**(2): p. 221-227.
24. Blatny, J.M., T. Brautaset, H.C. WintherLarsen, K. Haugan, and S. Valla, *Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(2): p. 370-379.
25. Guiney, D.G. and E. Yakobson, *Location and nucleotide sequence of the transfer origin of the broad host range plasmid RK2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(12): p. 3595-8.

26. Brautaset, T., R. Lale, and S. Valla, *Positively regulated bacterial expression systems*. Microb Biotechnol, 2009. **2**(1): p. 15-30.
27. Marques, S., A. Holtel, K.N. Timmis, and J.L. Ramos, *Transcriptional induction kinetics from the promoters of the catabolic pathways of TOL plasmid pWW0 of Pseudomonas putida for metabolism of aromatics*. J Bacteriol, 1994. **176**(9): p. 2517-24.
28. Lale, R., L. Berg, F. Stuttgen, R. Netzer, M. Stafsnes, T. Brautaset, T.E. Vee Aune, and S. Valla, *Continuous Control of the Flow in Biochemical Pathways through 5' Untranslated Region Sequence Modifications in mRNA Expressed from the Broad-Host-Range Promoter Pm*. Applied and Environmental Microbiology, 2011. **77**(8): p. 2648-55.
29. Toth, I.K., K.S. Bell, M.C. Holeva, and P.R. Birch, *Soft rot erwiniae: from genes to genomes*. Mol Plant Pathol, 2003. **4**(1): p. 17-30.
30. Bell, K.S., M. Sebaihia, L. Pritchard, M.T. Holden, L.J. Hyman, M.C. Holeva, N.R. Thomson, S.D. Bentley, L.J. Churcher, K. Mungall, R. Atkin, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, K. Clark, J. Doggett, A. Fraser, Z. Hance, H. Hauser, K. Jagels, S. Moule, H. Norbertczak, D. Ormond, C. Price, M.A. Quail, M. Sanders, D. Walker, S. Whitehead, G.P. Salmond, P.R. Birch, J. Parkhill, and I.K. Toth, *Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen Erwinia carotovora subsp. atroseptica and characterization of virulence factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(30): p. 11105-10.
31. Mermod, N., J.L. Ramos, P.R. Lehrbach, and K.N. Timmis, *Vector for regulated expression of cloned genes in a wide range of gram-negative bacteria*. Journal of bacteriology, 1986. **167**(2): p. 447-54.
32. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
33. Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler, *A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria*. Nat Biotech, 1983. **1**(9): p. 784-791.
34. Keen, N.T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger, *Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria*. Gene, 1988. **70**(1): p. 191-7.
35. Clark, D.P., *Molecular biology*. 2005, Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press. p.
36. Reece, R.J., *Analysis of genes and genomes*. 2004, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. xix, 469 p.
37. Klug, W.S. and S.M. Ward, *Concepts of genetics*. 9th ed. 2009, San Francisco: Pearson Benjamin Cummings. xxx, 779, 86 p.

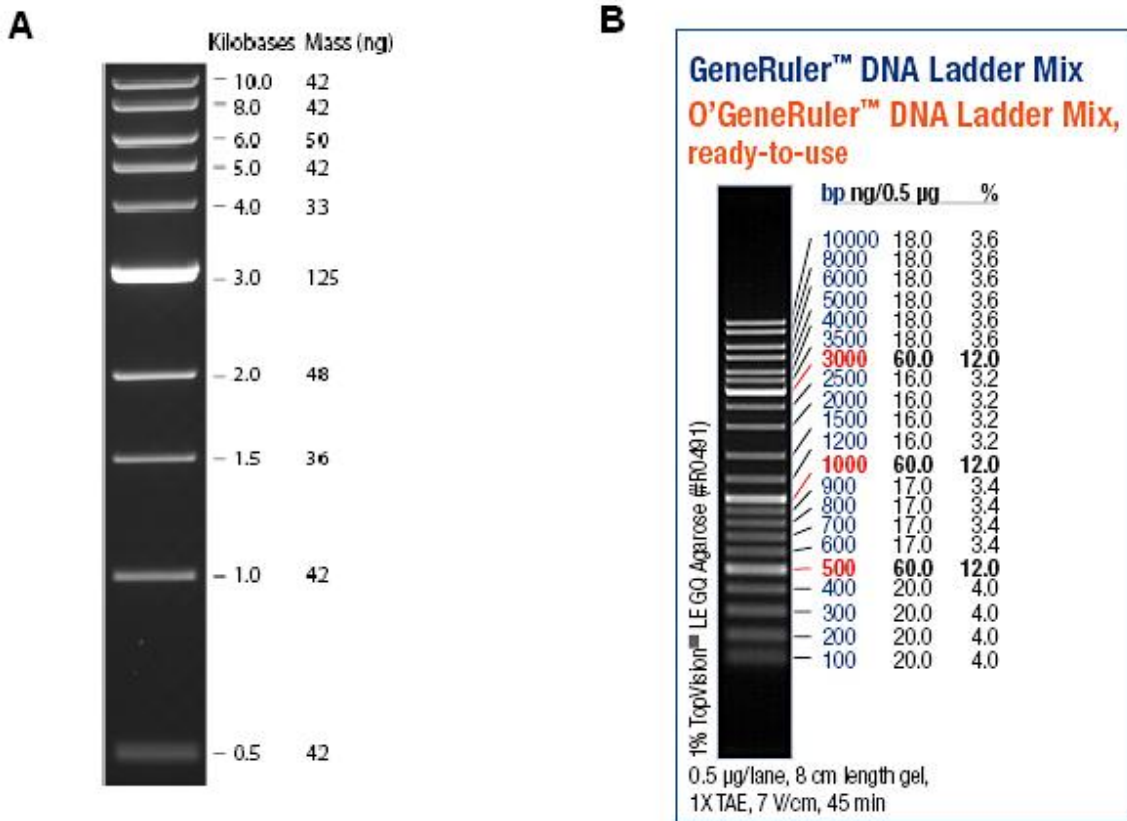
38. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd ed. 2001, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
39. Promega, *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*. 2010.
40. Biotium, H., CA, USA. *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain*. Available from: http://www.biotium.com/product/product_types/Nucleic_A/price_and_info.asp?item=41003&layer1=09;&layer2=09A;
41. Bio-Rad. *Instruction Manual, Gel Doc 2000 System*. Available from: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_9659.pdf.
42. Qiagen, *QIAquick® Spin Handbook*. 2002.
43. Griffiths, A.J.F., *An introduction to genetic analysis*. 7th ed. 2000, New York: W.H. Freeman. xvii, 860 p.
44. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*. 6th ed. 2007, New York: W. H. Freeman.
45. Jang, J.-H., M. Ike, S.M. Kim, and M. Fujita, *Production of a novel bioflocculant by fed-batch culture of Citrobacter sp.* Biotechnology Letters, 2001. **23**(8): p. 593-597.
46. Varum, K.M., M.W. Anthonsen, H. Grasdalen, and O. Smidsrod, *Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy*. Carbohydr Res, 1991. **211**(1): p. 17-23.
47. Kowapradit, J., P. Opanasopit, T. Ngawhiranpat, A. Apirakaramwong, T. Rojanarata, U. Ruktanonchai, and W. Sajomsang, *Methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan, a novel chitosan derivative, enhances paracellular permeability across intestinal epithelial cells (Caco-2)*. AAPS PharmSciTech, 2008. **9**(4): p. 1143-5
48. Howe, C.J., *Gene cloning and manipulation*. 2007: Cambridge University Press.
49. Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman, and C.I. Kado, *Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria*. Journal of bacteriology, 1985. **164**(2): p. 918-21.

Appendiks

A. DNA- standarder.....	A1
B. PCR-produkter og plasmidkart.....	A2
C. Sekvenssammenstilling.....	A6

A. DNA-standarder

1kb DNA ladder fra New England Biolabs (NEB) (figur A.1A) og GeneRuler™ DNA Ladder Mix fra Fermentas (figur A.1B) ble brukt som standard ved separasjon av DNA-fragmenter med agarose gelelektroforese.



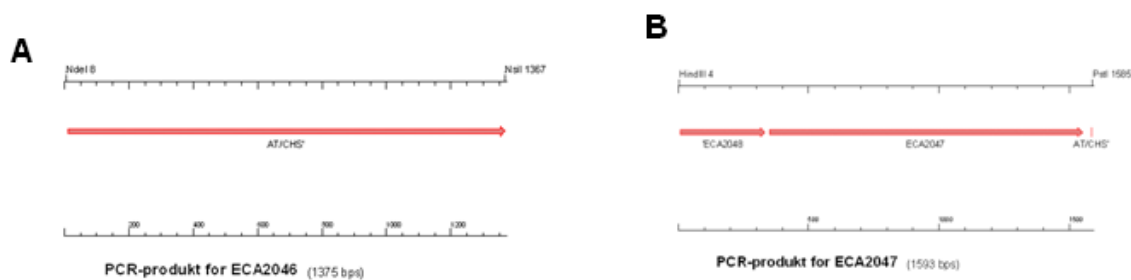
Figur A.1. Oversikt over standarder brukt ved separering av DNA-fragmenter med agarose gelelektroforese. A. 1kb DNA ladder fra NEB B. O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix fra Fermentas.

B. PCR-produkter og plasmidkart

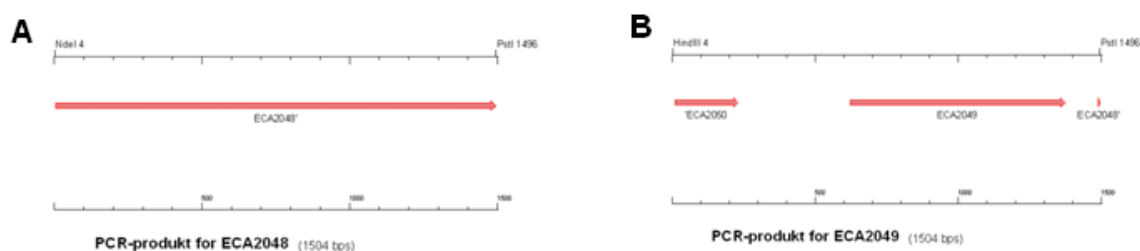
Genene som er blitt amplifisert ved PCR og brukt til konstruksjon av pKNH25 er *ECA2046* (merket AT/CHS) og *ECA2047* og er vist i figur B.1, og genene som er amplifisert og brukt til konstruksjon av pKNH35 er *ECA2048* og *ECA2049* og er vist i figur B.2.

Vektorene pHE264 og pIB11 DI-8 brukt til konstruksjon av pKNH1 er vist i figur B.3. pKNH1 brukes for å sette sammen ønskede fragmenter for både pKNH25 og pKNH35 og er vist i figur B.4A. Den ønskede sekvensen blir senere kuttet ut av vektoren og satt inn i pHE246 vist i figur B.4B.

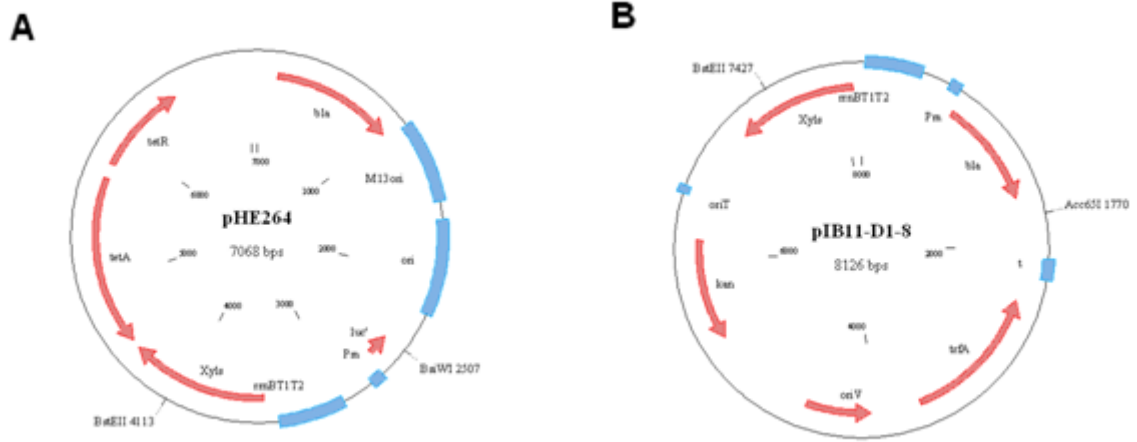
pKNH21B, pKNH23A, pKNH22 og pKNH24 blir brukt under kloningsforløpet av pKNH25 og er vist i figur B.5. pKNH31A, pKNH33B, pKNH32 og pKNH34 blir brukt under kloningsforløpet av pKNH35 og er vist i figur B.6.



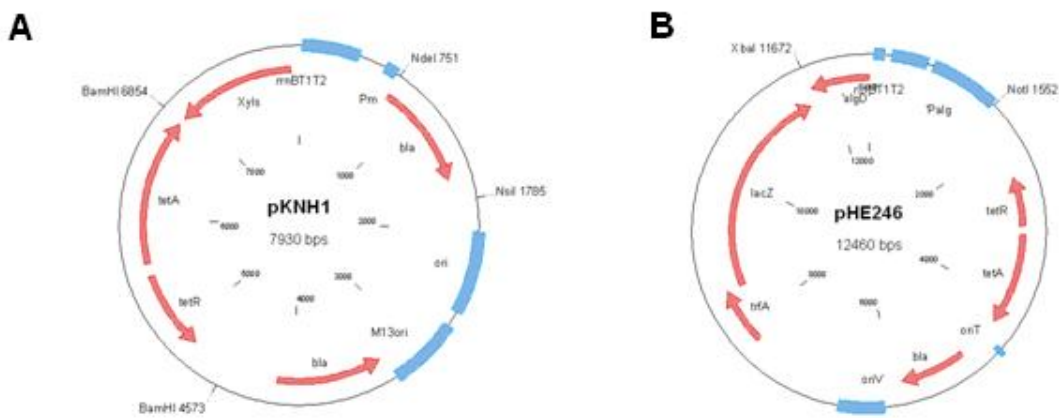
Figur B.1. A. PCR-produkt for *ECA2046* (merket AT/CHS) med restriksjonssetene for *NdeI* og *NsiI*. B. PCR-produkt for *ECA2047* med restriksjonssetene for *HindIII* og *PstI*.



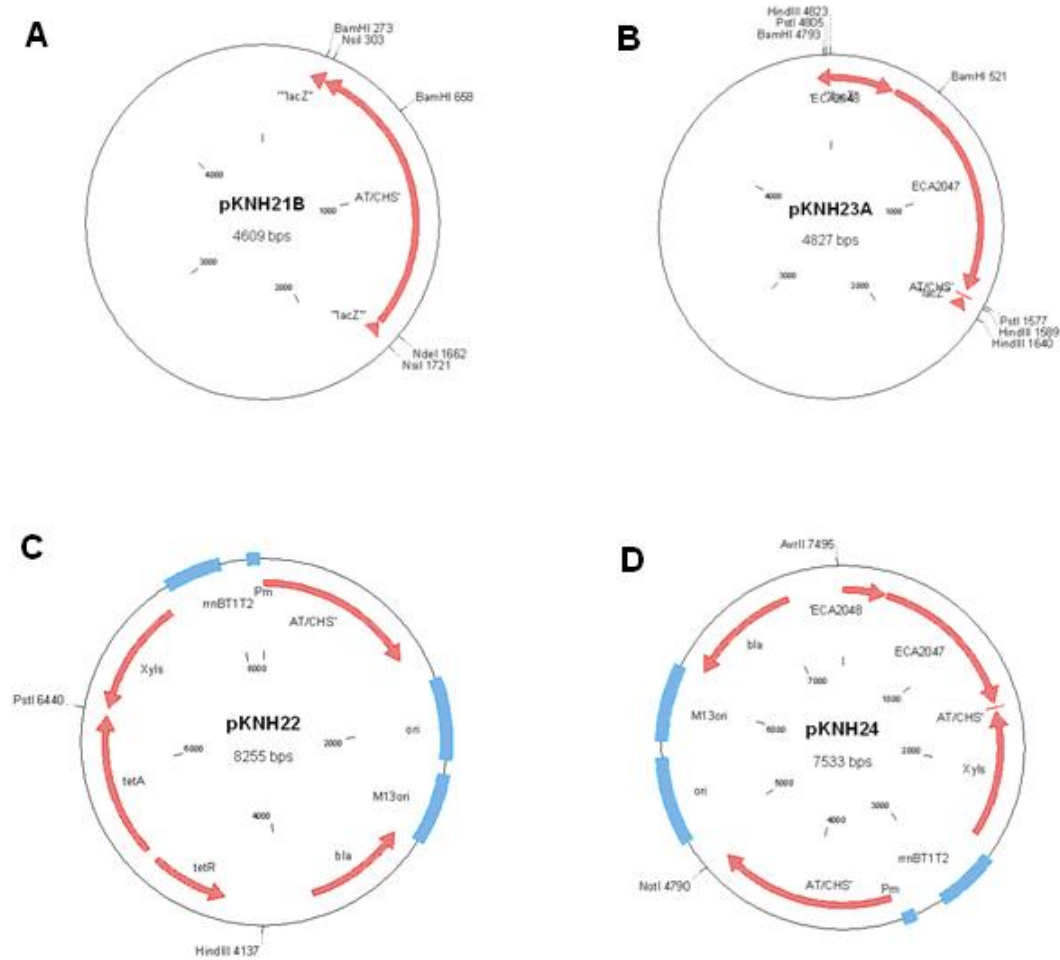
Figur B.2. A. PCR-produkt for *ECA2048* med restriksjonssetene for *NdeI* og *PstI*. B. PCR-produkt for *ECA2049* med restriksjonssetene for *HindIII* og *PstI*.



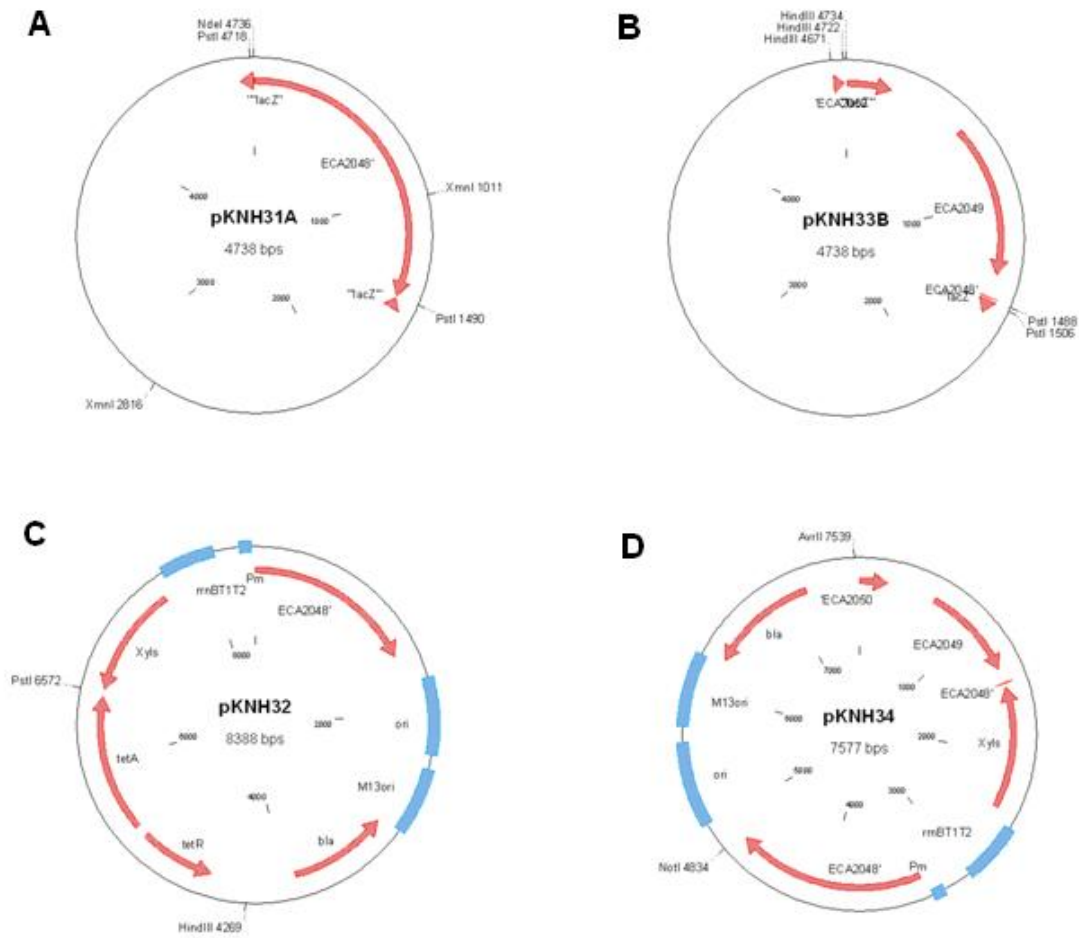
Figur B.3. Vektorer brukt til konstruksjon av pKNH1 A. Plasmidkart for pHE264 med restriksjonssetene for *BstEII* og *BsiWI*. B. Plasmidkart for pIB11 DI-8 med restriksjonssetene for *BstEII* og *Acc65I*



Figur B.4. Vektorer brukt under konstruksjon av både pKNH25 og pKNH35 A. Plasmidkart for pKNH1 med restriksjonssetene for *BamHI*, *NdeI* og *NsiI*. B. Plasmidkart for pHE246 med restriksjonssetene for *XbaI* og *NotI*.



Figur B.5. Plasmider som blir brukt under kloningsforløpet av pKNH25. A. Plasmidkart for pKNH21B med restriksjonssetene for *Bam*HI, *Nsi*I og *Nde*I. B. Plasmidkart for pKNH23A med restriksjonssetene for *Hind*III, *Pst*I og *Bam*HI. C. Plasmidkart for pKNH22 med restriksjonssetene for *Hind*III og *Pst*I. D. Plasmidkart for pKNH24 med restriksjonssetene for *Not*I og *Avr*II.



Figur B.6. Plasmidene som blir brukt under kloningsforløpet av pKNH35. A. Plasmidkart for pKNH31A med restriksjonssetene for *XmnI*, *PstI* og *NdeI*. B. Plasmidkart for pKNH33B med restriksjonssetene for *HindIII* og *PstI*. C. Plasmidkart for pKNH32 med restriksjonssetene for *HindIII* og *PstI*. D. Plasmidkart for pKNH34 med restriksjonssetene for *NotI* og *AvrII*.

C. Sekvenssammenstilling

Det innsatte DNAet i pKNH21B, pKNH23A, pKNH31A og pKNH33B ble sekvensert. Disse plasmidene inneholder sekvensene for henholdsvis *ECA2046*, *ECA2047*, *ECA2048* og *ECA2049* som ble amplifisert ved PCR. Sekvenseringsprimerene som ble benyttet var M13(-40)F og M13R for pKNH21B (figur C.1), pKNH23A (figur C.2) og pKNH33B (figur C.4), og pGEM/plitseqF og M13R for pKNH31A (figur C.3). Sekvenseringsresultatene ble undersøkt og korrigert ved hjelp av Chromas versjon 2.33 før sekvensen ble sammenlignet med den forventede sekvensen i Clone Manager 6 versjon 6.00.

C1. pKNH21B

128ECA2046B	1700	----aggtcgacgggtatcgataagcttgat	cacgcttcatatgcagaaaacaatgac	acc
pKNH21B_f	80	ctcg.....		
pKNH21B_r	1000	-----		
128ECA2046B	1644	aagccatcctccgacaacgacagacatgacagacagcaaaaactggcagatggttgcaaa		
pKNH21B_f	140		
pKNH21B_r	1000	-----		
128ECA2046B	1584	aatccgtcaatccttgcgtgataatatccatatcagtgagagctccccaccggacaaac		
pKNH21B_f	200		
pKNH21B_r	1000	-----		
128ECA2046B	1524	cgatattctggtttgcctcacgctgtataacgaacctgcgccatgcttgccgatacgct		
pKNH21B_f	260		
pKNH21B_r	1000	-----		
128ECA2046B	1464	ggcggggctggtgcgtaaccagcaagagttaaccgcaacgtttgccgatcgctccgcccaa		
pKNH21B_f	320		
pKNH21B_r	1000	-----		
128ECA2046B	1404	catcatcatttgcatcctgcttgatggcaccaacagtgctcacccatcaaccgtttact		
pKNH21B_f	380		
pKNH21B_r	1000	-----		
128ECA2046B	1344	tttagggtcgctaggggtgctgccaatgcaaatgccagagcggatagccagaataattc		
pKNH21B_f	440		
pKNH21B_r	1000	-----		
128ECA2046B	1284	actgacgcttcaggtcagcgaacagcccgcctcgcatattctgcgctgctgcgatcaatc		

Appendiks

pKNH21B_f	500
pKNH21B_r	1000	-----
128ECA2046B	1224	tgacgccattgaaaacgcgagcagagcattacgctacttcttgccaacaaacaccataa
pKNH21B_f	560
pKNH21B_r	1000	-----
128ECA2046B	1164	tgcaggaaagctggatagccacgcctggttttctggggcgttggaaagtgcgttaaagc
pKNH21B_f	620
pKNH21B_r	950
128ECA2046B	1104	cgagtttgctatgcagattgatgtcggttcggtgacagaatcagcatgtttgatacagtt
pKNH21B_f	680
pKNH21B_r	890
128ECA2046B	1044	gctacaacacatgtggcgagatccttattgtggggccatcacaacgcgcgttatgctccc
pKNH21B_f	740
pKNH21B_r	830
128ECA2046B	984	ggttcccacgaatgcaaacctgtctcagaattggcaatacgcgattttatctgggaaaa
pKNH21B_f	800-----
pKNH21B_r	770
128ECA2046B	924	agtcagtgattgggccatcggcagcgtctgcattatctggaagtggtccagggcaatg
pKNH21B_f	840	-----
pKNH21B_r	710
128ECA2046B	864	cagtatgattcgatggagccaattttgtgaaaaccacggacatttcgcacgcgcgctcga
pKNH21B_f	840	-----
pKNH21B_r	650
128ECA2046B	804	cgcctacctgctgggctaattcctcagagtttactggagcgcgaacctgtttctcgcgga
pKNH21B_f	840	-----
pKNH21B_r	590
128ECA2046B	744	ggatcgggttctgggatttgaactgaccaaaccataaaggaagcggagtacgttatga
pKNH21B_f	840	-----
pKNH21B_r	530
128ECA2046B	684	gcaagtgccatcgttcgttcggatcctgctcccacctcatagaacttctgcgccagcg
pKNH21B_f	840	-----
pKNH21B_r	470
128ECA2046B	624	acggcgcctgggtcaacagtaactattgccgctcgcttgcaactcactgtcccgattgctgc

pKNH21B_f	840	-----
pKNH21B_r	410
128ECA2046B	564	ggtgatgacacagtcttctctttcgccactgcggcgctgcggtattgcgctttctttgct
pKNH21B_f	840	-----
pKNH21B_r	350
128ECA2046B	504	ttggggaatggtgcagtttattgctcaatttatcatgccggcatttgcgccatcttgct
pKNH21B_f	840	-----
pKNH21B_r	290
128ECA2046B	444	cgccactggcgtagacaccacttgccagccatatcctgccagatgccgcaccgtctcttat
pKNH21B_f	840	-----
pKNH21B_r	230
128ECA2046B	384	caccgccgcagccataggtatggcgctgcttttccttgctcgatggataagcatcct ctt
pKNH21B_f	840	-----
pKNH21B_r	170
128ECA2046B	324	tatgagccgcagtagcca tgcataaatatcgaattcctgcagcccggggatccactagttc
pKNH21B_f	840	-----
pKNH21B_r	110
128ECA2046B	264	tagagcggccgccaccgcggtggagctcgaattcgtaatcatggatcatagctggt
pKNH21B_f	840	-----
pKNH21B_r	50nnannnn-----

Figur C.1. Sekvensen til det innsatte DNAet i pKNH21B sammenliknet med den forventede sekvensen (128ECA2046B). pKNH21B_f er sekvensen amplifisert med primeren M13(-40)F, og pKNH21B_r er sekvensen amplifisert med primeren M13R. De merkede delene av sekvensen indikerer flankene på PCR-produktet. Prikker (.) indikerer at sekvensen hadde samme nukleotid som 128ECA2046B, og streker (-) indikerer at det ikke er noe nukleotid i den aktuelle posisjonen.

C.2. pKNH23A

128oppECA204	1	ttcctgccttgccgactcaccg	gtaggatcttttactgtaacttaagtttatcttttgacctcaccacc
pKNH23A_R	88
pKNH23A_F	1030	-----	-----
128oppECA204	71	ccaatcaggagcgaagcagccagcctgatcgatcggcacgctccgctcaacgccaatatcgaatacggta	
pKNH23A_R	158
pKNH23A_F	1030	-----	-----
128oppECA204	141	cgggtcgcctgaggccgcaatttagccaatcgggaaaccgactccccgccagcatcacgccttatacccg	
pKNH23A_R	228
pKNH23A_F	1030	-----	-----
128oppECA204	211	catacctgttgattcactactggctaccacacctttcgggcagcccgtgccaccggataacagtgccacg	
pKNH23A_R	298
pKNH23A_F	1030	-----	-----
128oppECA204	281	gccttaagggcactgacgcttgatcccgcatttaactctgaaatagataaggacatctgcttatgtctaca	
pKNH23A_R	368
pKNH23A_F	1030	-----	-----
128oppECA204	351	ccatttacattgtcacggcgcgtgctcctcggcgggcttggcgcgggcctattaacagccatgcttcccc	
pKNH23A_R	438
pKNH23A_F	1030	-----	-----
128oppECA204	421	tgcgcgggtttgcccaaaacgccattcccacaacaagcatttgatcgtcatcgaattatttgggggaaa	
pKNH23A_R	508
pKNH23A_F	1030	-----	-----
128oppECA204	491	tgatgcattaaacacgctggttccctatcgggatccactctatcgacattatcgccctacgctggcggtta	
pKNH23A_R	578
pKNH23A_F	1030	-----	-----
128oppECA204	561	aacgctcacgaatatgcaccgttaagtgatgatctggcctttaatatcgtctggaaaaagctcgctaattg	
pKNH23A_R	648
pKNH23A_F	1030	-----	-----
128oppECA204	631	tatttcaaaagggggaattagcggtaatacaagatgttggctatccgtctccaatctgtctcatttttag	
pKNH23A_R	718
pKNH23A_F	1030	-----	-----
128oppECA204	701	ttccgccgaatctgggccaatggtgctgacaccccaacgctgaagtcaggctgggctggccgcgttctg	
pKNH23A_R	788
pKNH23A_F	1003	-----	-----
128oppECA204	771	agcacatcttcacgtgaggatcgctatcatgatactgacggcattattctctctggcgatcagtcctttac	
pKNH23A_R	858
pKNH23A_F	933	-----	-----
128oppECA204	841	tcatccatccggcgatccaggcactgacgcttcaggatagtcgcccctacttaatgccaatttcaccct	
pKNH23A_R	928
pKNH23A_F	863	-----	-----
128oppECA204	911	accctctgccacacgaatgataagaagtacgacggcagcacagcatatcctccggttaatggagagtacc	
pKNH23A_R	998	-----
pKNH23A_F	793	-----	-----
128oppECA204	981	agcacgataagtcgccgattcaaaataagctgcgcaatcagaaccatttcaccgctcgatttacacagg	
pKNH23A_R	1009	-----	-----
pKNH23A_F	723	-----	-----
128oppECA204	1051	acggctacattgaaccgcaaacgcgaagcggcaacgatactctggctgatagagaacaatgtccgttc	
pKNH23A_R	1009	-----	-----

pKNH23A_F	653
128oppECA204	1121	accactatataaaatcagtttgtctggcttcgatttgcatagccatttacgcggtgaacatgaacgccag
pKNH23A_R	1009	-----
pKNH23A_F	583
128oppECA204	1191	ctcagtaaagtagagacgttgctgcttgggctacggcaaggactcatcgatattggtgcctggcaggata
pKNH23A_R	1009	-----
pKNH23A_F	513
128oppECA204	1261	gcctgattatggtgcattcggagttcggccgtcggccaaaagagaatgcatcgggcggaaccgatcacgg
pKNH23A_R	1009	-----
pKNH23A_F	443
128oppECA204	1331	cacgtgcgggccgatgctgctagttggcggccaagtcgaggaggatctctgggaaatcgagcccactc
pKNH23A_R	1009	-----
pKNH23A_F	373
128oppECA204	1401	gataagttggataaacgacggcaacccttatttttcgaccgacttccgctcggtatatgccaccgtcgccg
pKNH23A_R	1009	-----
pKNH23A_F	303
128oppECA204	1471	aacgtttttggcgacttcccgccctcaggttagcggaacatcgctctccccgctgaatattcatcttta
pKNH23A_R	1009	-----
pKNH23A_F	233
128oppECA204	1541	accaccgccttatttctacaggacacgcttctatctgcagttatcaagcttatcgataccgtcgacc
pKNH23A_R	1009	-----
pKNH23A_F	163
128oppECA204	1611	tcgagggggggcccgggtaccgatgcatgca
pKNH23A_R	1009	-----
pKNH23A_F	93nnnnn.....

Figur C.2. Sekvensen til det innsatte DNAer i pKNH21B sammenliknet med den forventede sekvensen (128oppECA2046A). pKNH23A_F er sekvensen amplifisert med primeren M13(-40)F, og pKNH23A_R er sekvensen amplifisert med primeren M13R. De merkede delene av sekvensen indikerer flankene på PCR-produktet. Prikker (.) indikerer at sekvensen hadde samme nukleotid som 128oppECA2046A, og streker (-) indikerer at det ikke er noe nukleotid i den aktuelle posisjonen.

C.3. pKNH31A

128ECA2048A	1	-----atgcataaacaggatcgttttg	tatttagcgtatcgcccatcatttcacg
pKNH31A_R	71	ctgcangaattcnatattnat.....	
pKNH31A_F	1014	-----	
128ECA2048A	50	cccagcgaatctcaccgaccagtagaaaatcgctagtagtattcttttg	tatttcgcatgccttgctttct
pKNH31A_R	141	
pKNH31A_F	1014	-----	
128ECA2048A	120	cattctgctgtggacactcacattcagccccccaggtgttg	ccttaacgatcgcagaaacacgacatctg
pKNH31A_R	211	
pKNH31A_F	1014	-----	
128ECA2048A	190	atagatcgtaccggatttggcacaacccacaggatattgaacgttt	caacgatatgacggggagcaag
pKNH31A_R	281	
pKNH31A_F	1014	-----	
128ECA2048A	260	ccgtggactatctactgggcacgctcaatg	cgctttttacagcttccccgactttcgtgcagcaacc
pKNH31A_R	351	
pKNH31A_F	1014	-----	
128ECA2048A	330	tcatccagattactggcaggaaggttggcgagagcagaaaatg	attttttccgatcaacgaaattaac
pKNH31A_R	421	
pKNH31A_F	1014	-----	
128ECA2048A	400	cagctacaggcttgggtgggtacaggaaatgatccttactccc	actccttttgccgatcgtctcacgctgt
pKNH31A_R	491	
pKNH31A_F	1014	-----	
128ECA2048A	470	tctggcataaccatttcgtttcccggtttgacaataacctcat	caccg
pKNH31A_R	561	
pKNH31A_F	1014	-----	
128ECA2048A	540	gctatttcgtcaagcggtagtcagagctttgccttttg	cacgaaaaatactgcaagatcccatgatg
pKNH31A_R	631	
pKNH31A_F	1014	-----	
128ECA2048A	610	ctcagcgggttggataacacgtccaatacacgccaacatc	ctaataatgaaaatcttgctagagaattaatgg
pKNH31A_R	701	
pKNH31A_F	946	
128ECA2048A	680	agctctttaccctgggagagggttaactacagtgaaaatgat	gtcaaacaggttgccaagattctggcagg
pKNH31A_R	771	
pKNH31A_F	876	
128ECA2048A	750	gcacggtgtaaacgccacgcaacaatggcgttatcaattt	gacgccagcgcagcgggtatccggcgaaaaa
pKNH31A_R	841	
pKNH31A_F	806	
128ECA2048A	820	atgctgctcggccagaaaattcaaggaaccccgatgaaga	actcgatcaacttgtc
pKNH31A_R	881	-----	
pKNH31A_F	736	-----	
128ECA2048A	890	cgcaaccccaaacggcaacgcgtctggcggggaaattct	accgagcgtttatttcgttagaggacgacc
pKNH31A_R	881	-----	
pKNH31A_F	666	
128ECA2048A	960	tgaaacagtatcggatttagcgaagtgctacgcaatcat	gactatg
pKNH31A_R	881	-----	
pKNH31A_F	596	
128ECA2048A	1030	ttgctgctcagtc	cccgcttttggcacgaacaccatcgtggatcattgg
pKNH31A_R	881	-----	
pKNH31A_F		-----	

pKNH31A_F	526
128ECA2048A	1100	tcgtcggccttttctgcacgctgtcactgggtgttaccgatcaacacatcctactggattatctccaaaa
pKNH31A_R	881	-----
pKNH31A_F	456
128ECA2048A	1170	tttgggacagagcccgtttatggccccctccgtagcgggatgggaagaaggcaccgcctggcttgatggg
pKNH31A_R	881	-----
pKNH31A_F	386
128ECA2048A	1240	aagacactggtcgatcgtaccagagtgttaaccggctgtggtccgcgatagaaagctcggcctgactg
pKNH31A_R	881	-----
pKNH31A_F	316
128ECA2048A	1310	acaatacgaagctaatactgctgctttttcatccgaaagccgtggacttctctgcacgtttttatcgttaccgc
pKNH31A_R	881	-----
pKNH31A_F	246
128ECA2048A	1380	gaatgggcaacagcttgccagaattaccgccaagctcggagcagatacccggaagaacaagcgtccaac
pKNH31A_R	881	-----
pKNH31A_F	176
128ECA2048A	1450	gaaccgggaaatctgaaaccgatgtgggaaactgtcgccactgcagaat
pKNH31A_R	881	-----
pKNH31A_F	106nn

Figur C.3. Sekvensen til det innsatte DNAet i pKNH31A sammenliknet med den forventede sekvensen (128ECA2048A). pKNH31A_F er sekvensen amplifisert med primeren pGEM/plitseqF, og pKNH31A_R er sekvensen amplifisert med primeren M13R. De merkede delene av sekvensen indikerer flankene på PCR-produktet. Prikker (.) indikerer at sekvensen hadde samme nukleotid som 128ECA2048A, og streker (-) indikerer at det ikke er noe nukleotid i den aktuelle posisjonen.

C.4. pKNH33B

128oppECA204	1	----tgaataccaaaggcac	ctcacccgtgtcgcttgcgtcctacctaactcgctaccctacacattg
pKNH33BF	150	atct.....	
pKNH33B_R	1060	-----	
128oppECA204	67	taatgatgtcggcctggctgctattttcagcacagttacttatccgctcatcaggcagaatcaaccccat	
pKNH33BF	220	
pKNH33B_R	1060	-----	
128oppECA204	137	tcggttgaaaaaaagcattaatattggtggaggatcgctgctggttgttctgacactctctccctatatac	
pKNH33BF	290	
pKNH33B_R	1060	-----	
128oppECA204	207	tcaactatTTTTTactagagataatattcccgccgaagttaaggccatcgaccgaatcgatgtctactcg	
pKNH33BF	360	
pKNH33B_R	1060	-----	
128oppECA204	277	cgtcgccgtgattcagcagatggacagccccagcgttctctacgcgttaaccataatcgctttcctcact	
pKNH33BF	430	
pKNH33B_R	1060	-----	
128oppECA204	347	accatgcacaaacagcctgaagtttgacggatatatactggccttatttttaagcaataaaatataact	
pKNH33BF	500	
pKNH33B_R	1060	-----	
128oppECA204	417	aaaaaagcatcttgtggataaaaaaaaagcagccttatatgcatagtagtttttagataattccatgtatt	
pKNH33BF	570	
pKNH33B_R	1060	-----	
128oppECA204	487	ttttgaatagacaggaggaaactctcgttaaatgagggttttatttaccacagcaacaaccctgcacca	
pKNH33BF	640	
pKNH33B_R	1060	-----	
128oppECA204	557	tcgtaggatgaatccaaccagaaaataaaatagtaaaatgataaaaagggttttttcattatgctttcaaaa	
pKNH33BF	710	
pKNH33B_R	1060	-----	
128oppECA204	627	tataataaccgcccattataaaaaacattttatcgcccatcgaagtggctattcgggtggagtcatttaa	
pKNH33BF	780	
pKNH33B_R	991	

Appendiks

128oppECA204	697	tgtcgtcagaatctgaaatacttaaaaaactcgatgaagacccccctgttttttttacattacgcgtatca
pKNH33BF	850	nnn.....
pKNH33B_R	921
128oppECA204	767	aacatggccaaaattgtcgttaaatcaagaagagtgattgatgggcttatcaatggggaattgcgtcat
pKNH33BF	920
pKNH33B_R	851
128oppECA204	837	agcaaacgaggggttactagtttgacaccggtagacttaaacgatccagatttatctattcgacatgtcg
pKNH33BF	990
pKNH33B_R	781
128oppECA204	907	atctaaaaaactggatgatgtcatattatccgaacgaaaagcccgattttttatctcccagaagaacg
pKNH33BF	1060	-----
pKNH33B_R	711
128oppECA204	977	attaaccccgataacaataaacatgaattcggtgcaaatattgctagccgaattagaggtgatgcgtata
pKNH33BF	1070	-----
pKNH33B_R	641
128oppECA204	1047	aaaaataccgctcttgaagttcagcgaaataatataaaaagcgattatctttcactaaacgctacttacg
pKNH33BF	1070	-----
pKNH33B_R	571
128oppECA204	1117	catcagtgatgatgcaccctacacaaccataactcggggagcgtagtgaagtagctatctgacgattat
pKNH33BF	1070	-----
pKNH33B_R	501
128oppECA204	1187	tggcgcgttaatcagcctatataaccaacgctcacatcaggcaaggcctatacactttttaactctcag
pKNH33BF	1070	-----
pKNH33B_R	431
128oppECA204	1257	gacgctgtgatttctgccttaattgcgattatggcgataaaagaggatttccaaaagcacgcttgaaa
pKNH33BF	1070	-----
pKNH33B_R	361
128oppECA204	1327	gtaagttcgctcaggcaaacgccagctcaatggcacgtagttcctacccttgccagggtccaatccacc
pKNH33BF	1070	-----
pKNH33B_R	291
128oppECA204	1397	ccagtttaaggtgaaagccgtataactcttttttgcatagtagttatccgcatcattctattacgccatag
pKNH33BF	1070	-----
pKNH33B_R	221

128oppECA204	1467	ggataatctactatcatgcatctgcagttaa-
pKNH33BF	1070	-----
pKNH33B_R	151t

Figur C.4. Sekvensen til det innsatte DNAet i pKNH33B sammenliknet med den forventede sekvensen (128oppECA2048B). pKNH33BF er sekvensen amplifisert med primeren M13(-40)F, og pKNH33B_R er sekvensen amplifisert med primeren M13R. De merkede delene av sekvensen indikerer flankene på PCR-produktet. Prikker (.) indikerer at sekvensen hadde samme nukleotid som 128oppECA2048B, og streker (-) indikerer at det ikke er noe nukleotid i den aktuelle posisjonen.