

Genetiske verktøy i *Bacillus methanolicus*

Elisabeth Margrete Stien Andersen

Industriell kjemi og bioteknologi
Oppgaven levert: Juni 2011
Hovedveileder: Trond Ellingsen, IBT
Biveileder(e): Tonje Heggeset, SINTEF

Erklæring

Jeg vil med dette erklære at arbeidet i denne masteroppgaven er utført selvstendig og i samsvar med Reglement for sivilarkitekt- og sivilingeniøreksamen ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Arbeidet er utført i perioden fra januar 2011 til juni 2011.

Trondheim, 14.06.11

Elisabeth S. Andersen

Forord

Denne masteroppgaven ble utført våren 2010 ved Institutt for Bioteknologi, Norges Tekniske og Naturvitenskapelige Universitet i samarbeid med SINTEF Materialer og Kjemi avdeling Bioteknologi.

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere Forsker Tonje Marita B. Heggeset og Stipendiat Anne Krog for all støtte, gode råd og engasjement. Arbeidet med denne oppgaven har vært svært lærerikt og jeg har satt stor pris på deres hjelp gjennom denne perioden. Jeg vil også takke Tone Haugen og alle som har tatt seg til å hjelpe meg på de ulike labene.

Til slutt vil jeg takke familie og venner for god støtte gjennom hele studieperioden.

Trondheim, 14.06.11

Elisabeth S. Andersen

Sammendrag

Produksjon av aminosyrer ved hjelp av industriell bioteknologi er et voksende marked. I dag finnes det ingen kjente metylotrofe bakterier som benyttes til industriell produksjon av aminosyrer, men en attraktiv kandidat for framtidig produksjon er den termofile og metylotrofe bakterien *Bacillus methanolicus*.

For å kunne utvikle en konkurransedyktig produksjonsstamme av *B. methanolicus* er det nødvendig med genetiske verktøy. Et viktig verktøy er et reporter-gen som blant annet kan utnyttes for å analysere promotere. Et av hovedformålene med denne oppgaven var å teste reporter-genet *lacZ* som stammer fra den termotolerante bakterien *B. coagulans*, og deretter utvikle et assay for bestemmelse av aktiviteten til genproduktet β -galaktosidase. Dette reporter-genet ble også brukt til å analysere styrken til ulike promotere i *B. methanolicus* MGA3. Promotorene som ble undersøkt (som også stammet fra *B. methanolicus*) var promotere til viktige gen i metanolassimileringen (mdhp og pfpk) og den potensielle promoterregionen til et metanoldehydrogenase-gen (mdh2p). I tillegg ble det testet en kobberinduserbar promotor (Cup) fra *Lactobacillus sakei*. I denne oppgaven ble også det antatte replikasjonsproteinet til den potensielle vektoren pBM69 undersøkt. pBM69 ble oppdaget i *B. methanolicus* MGA3 etter at genomet ble sekvensert.

Det ble konstruert vektorer hvor de aktuelle Promotorene var lokalisert oppstrøms for reporter-genet *lacZ*, deretter ble *B. methanolicus* transformert med vektorene. Den første bekreftelsen på at reporter-genet var aktivt i *B. methanolicus* kom under transformasjon, hvor *B. methanolicus* transformert med vektorene pTH1mdhp-*lacZ* og pTH1Cup-*lacZ* ga opphav til blå kolonier da kulturene ble platet ut på fast medium tilsatt X-gal. *B. methanolicus* transformert med pTH1mdh2p-*lacZ* og pTH1pfpk-*lacZ* ga ikke blå kolonier.

Utvikling av assayet ble utført med celleekstrakt fra *B. methanolicus* MGA3 transformert med pTH1mdhp-*lacZ*. Aktiviteten ble undersøkt ved ulike betingelser for å optimere assayet. Det ble testet ulike pH-verdier for bufferen og det ble undersøkt hvordan preinkubering av enzymet påvirket aktiviteten. Den optimale pH-verdien for assayet viste seg å være rundt 7 og det ble funnet en signifikant økning i enzymaktiviteten når enzymet ble preinkubert i fem minutter ved temperaturene 45, 50 og 60 °C. Enzymaktiviteten holdt seg også stabil etter preinkubering med de gitte temperaturene i inntil 30 minutter. Etter etablering av assay ble det ved alle målingene benyttet buffer med pH 7,0 og enzymet ble preinkubert i 5 minutter ved 50 °C.

Den kobberinduserbare promotoren var aktiv i *B. methanolicus* MGA3. For å undersøke hvordan ulike konsentrasjoner av induseren CuSO₄ påvirket veksten til *B. methanolicus* pTH1Cup-*lacZ*, ble det utført forsøk hvor kulturene ble indusert med konsentrasjoner fra 0 μ M til 200 μ M av CuSO₄. Det var tydelig at veksten ble påvirket med økende konsentrasjon av CuSO₄ og ved 200 μ M døde cellene. De resterende kulturene ble høstet etter hvert som OD₆₀₀ = ca 1,5 og enzymaktiviteten til β -galaktosidase i hvert celleekstrakt ble bestemt. Aktiviteten for hver kultur økte med økt konsentrasjon av induser, men det var vanskelig å sammenligne aktivitetene ettersom kulturene ble høstet etter ulik

inkuberingstid. I celleekstrakt fra *B. methanolicus* transformert med vektorene pTH1pfpk-lacZ og pTH1mdh2p-lacZ var det ikke mulig å detektere aktiviteten til β -galaktosidase.

Reportergen *lacZ* som ble undersøkt i denne oppgaven er det første reportergen som har gitt gode resultater i *B. methanolicus*. Det etablerte assayet kan blant annet benyttes til å undersøke nye promotere i *B. methanolicus* og dermed øke kunnskapen om regulering av transkripsjon. Av Promotorene som ble undersøkt var mdhp den sterkeste, noe som var forventet på bakgrunn av tidligere eksperimenter. Kobberpromotoren var aktiv, men ga opphav til enzymaktivitet selv om den ikke var indusert. Det må dermed utføres flere forsøk med denne promotoren for å avgjøre hvor godt den er egnet til kontrollert ekspresjon i *B. methanolicus*. Replikasjonsproteinet til pBM69 ble undersøkt, men på grunn av ustabil DNA som førte til at deler av den amplifiserte sekvensen ble slettet etter transformasjon, var det ikke mulig å bekrefte om pBM69 faktisk er et plasmid.

Forkortelser

Forkortelse	Forklaring
act	Aktivatorprotein
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin trifosfat
Bp	Basepar
BSA	Bovine Serum Albumin
Cm	Kloramfenikol
Cup	Kobberpromotor
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksyribonukleotid trifosfat
LA	Luria Bertani Agar Medium
LB	Luria Bertani Medium
mcs	Multiple cloning site
mdh	Metanoldehydrogenase
mdh2	Metanoldehydrogenase2
mdh2p	Metanoldehydrogenase2-promotor
mdhp	Metanoldehydrogenase-promotor
NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid
NEB	New England Biolabs
ONP	O-nitrophenol
ONPG	o-nitrophenyl- β -D-galaktopyranoside
PCR	Polymerase chain reaction
pfk	Fosfofruktokinase
pfkp	Fosfofruktokinase-promotor
RNA	Ribonukleinsyre
RNase	Ribonuklease
RuMP	Ribulosemonofosfat-sporet
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranoside

Innholdsfortegnelse

ERKLÆRING	I
FORORD	II
SAMMENDRAG	III
FORKORTELSER	V
1. INTRODUKSJON	1
1.1 INDUSTRIELL BIOTEKNOLOGI - AMINOSYRER	1
1.2 <i>BACILLUS METHANOLICUS</i> – EN KANDIDAT FOR PRODUKSJON AV AMINOSYRER	3
1.3 GENTEKNOLOGI	5
1.4 GENETISKE VERKTØY I <i>BACILLUS METHANOLICUS</i>	7
1.5 FORMÅL	11
2 MATERIALER OG METODER	12
2.1 BAKTERIESTAMMER OG GENERELLE VEKSTBETINGELSER	12
2.2 GENERELLE METODER FOR KONSTRUKSJON AV PLASMIDER	13
2.2.1 TRANSFORMASJON AV <i>E. COLI</i> DH5A	13
2.2.2 ISOLASJON AV PLASMID	15
2.2.3 RESTRIKSJONSKUTTING AV DNA	18
2.2.4 AGAROSE GELELEKTROFORESE	20
2.2.5 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	20
2.2.6 EKSTRAKSJON AV DNA FRA GEL	24
2.2.7 LIGERING	24
2.2.8 SEKVENSERING	25
2.3 KONSTRUKSJON AV AKTUELLE PLASMIDER	26
2.3.1 PTH1MDHP-LACZ	26
2.3.2 PTH1PFKP-LACZ	26
2.3.3 PTH1MDH2P-LACZ	27
2.3.4 PGEM-T-MDH3P	27
2.3.5 PGEM-T-ACTP	27
2.3.6 PTH1CUP-LACZ	27
2.3.7 PGEM-T-PBM69ORI	28
2.4 TRANSFORMASJON AV <i>B. METHANOLICUS</i>	28
2.4.1 ELEKTROKOMPETENTE <i>B. METHANOLICUS</i>	28
2.4.2 TRANSFORMASJON AV <i>B. METHANOLICUS</i>	29
2.5 ETABLERING AV ENZYMASSAY	29
2.5.1 PREPARERING AV CELLEEKSTRAKT	29
2.5.2 BESTEMMELSE AV PROTEINKONSENTRASJON	30
2.5.3 ENZYMASSAY FOR B-GALAKTOSIDASE	30

2.5.4 OPTIMALISERING AV ASSAY	31
2.6 MEDIER OG LØSNINGER	33
2.6.1 MEDIER OG LØSNINGER TIL <i>E. COLI</i>	33
2.6.2 MEDIER OG LØSNINGER TIL <i>B. METHANOLICUS</i>	34
2.6.3 ANDRE LØSNINGER	35
3. RESULTATER	36
3.1 KONSTRUKSJON AV PLASMIDER	36
3.2 REPLIKASJONSPROTEINET TIL PBM69	37
3.3 TRANSFORMASJON AV <i>B. METHANOLICUS</i>	39
3.4 BESTEMMELSE AV ENZYMAKTIVITET OG OPTIMALISERING AV ASSAY	41
3.4.1 OPTIMALISERING AV ASSAY	41
3.4.2 ENZYMAKTIVITET MED ULIKE PROMOTERE	43
4. DISKUSJON	50
4.1 REPORTERGENET LACZ OG ETABLERING AV ASSAY	50
4.2 PROMOTERE I <i>B. METHANOLICUS</i>	51
4.3 DET POTENSIELLE PLASMIDET PBM69	54
4.4 VIDERE ARBEID	55
5. KONKLUSJON	57
REFERANSELISTE	58
VEDLEGG 1: STANDARDKURVER OG PROTEINKONSENTRASJON	62
PTH1MDHP-LACZ	62
PTH1PFKP-LACZ OG PTH1MDH2P-LACZ	64
PTH1CUP-LACZ	65
VEDLEGG 2 RÅDATA FOR FORSØK MED PTH1MDHP-LACZ	67
VEDLEGG 3 RÅDATA FOR FORSØK MED PTH1MDH2P-LACZ	72
VEDLEGG 4 RÅDATA FOR FORSØK MED PTH1PFK-LACZ	75
VEDLEGG 5 RÅDATA FOR FORSØK MED PTH1CUP-LACZ	79
VEDLEGG 6: UTLEDNING AV LIKNING FOR BESTEMMELSE AV ENZYMAKTIVITET	82
VEDLEGG 7 ALIGNMENT AV PGEM-T-PBM69ORI, DET TEORETISKE PCR- PRODUKTET OG SEKVENSERINGSFILENE	83

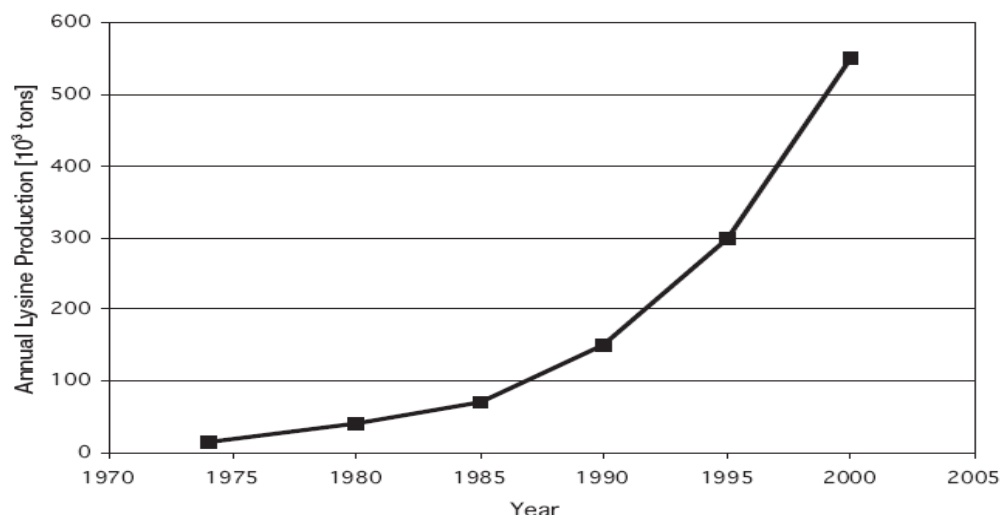
1. Introduksjon

1.1 Industriell bioteknologi - aminosyrer

Innenfor industriell bioteknologi produseres det kjemikalier, materialer og drivstoff ved hjelp av levende celler eller enzymer produsert av celler. Råstoffene som benyttes er ofte fornybare og produksjonsprosessen forbindes generelt med redusert forurensning og lavere energikrav (Tang and Zhao, 2009). Med samfunnets økende fokus på bærekraftig utvikling og miljøvern antas det at markedet for industriell bioteknologi fortsette og vokse.

Aminosyrer er et av produktene innenfor industriell bioteknologi og etterspørselen i verden er økende (Leuchtenberger et al., 2005). I 2008 ble den årlige produksjonen av aminosyrer estimert til over to millioner tonn, og de har en rekke anvendelsesområder. Blant annet benyttes aminosyrer som tilsetningsstoffer i mat, som utgangsmaterialer i kjemisk industri eller som tilskudd i dyrefor (Park and Lee, 2008). Mennesker og dyr kan produsere de fleste aminosyrene selv bortsett fra de essensielle aminosyrene, de må derfor tilføres via kosten. I 2004 utgjorde de essensielle aminosyrene L-lysin, L-metionin, L-treonin og L-tryptofan 56 % av det globale aminosyremarkedet, etterfulgt av de ikke essensielle L-aminosyrene L-glutamat, L-aspartat og L-fenylalanin (32 %, tilsetningsstoffer i mat) (Leuchtenberger et al., 2005).

Bakterier kan i motsetning til mennesker og dyr produsere alle aminosyrene selv, noe som gjør dem til kandidater for industriell produksjon av aminosyrer. Den viktigste bakterien som benyttes til dette formålet i dag er *Corynebacterium glutamicum*. Denne organismen har blitt utnyttet som produksjonsorganisme til produksjon av L-glutamat og L-lysin siden 1950-tallet (Pfefferle et al., 2003). Etterspørselen etter den essensielle aminosyren L-lysin har i de siste årene økt betraktelig, og en illustrasjon av lysinproduksjonen i verden er vist i figur 1.1. (Pfefferle et al., 2003)



Figur 1.1. Produksjon av aminosyren L-lysin ved fermentering på verdensbasis (Pfefferle et al., 2003).

Industriell produksjon av aminosyrer ved hjelp av mikroorganismer foregår i dag stort sett ved fermentering. Aminosyrer er produktet som det produseres tredje mest av i det globale markedet etter etanol og antibiotika (Leuchtenberger et al., 2005). Med den økende etterspørselen for aminosyrer vokser også interessen for å forbedre allerede etablerte produksjonsstammer for å oppnå økt lønnsomhet. Det er også en interesse for å finne nye produksjonsstammer som kan utnyttes samt finne alternative råstoffer. *C. glutamicum* benytter sukkerforbindelser som råstoff, men både prisen og tilgangen på sukker varierer og i de siste årene har prisen økt (Schrader et al., 2009). Et alternativt råstoff er da en-karbon forbindelser som for eksempel metanol, som kan utnyttes fullstendig av metylotrøfe bakterier. Metanol produseres fra blant annet syntesegass (som består av karbonmonoksid, karbondioksid og hydrogen) og prisen har i de siste årene vært tilnærmet lik prisen for sukkerforbindelser (Brautaset et al., 2007).

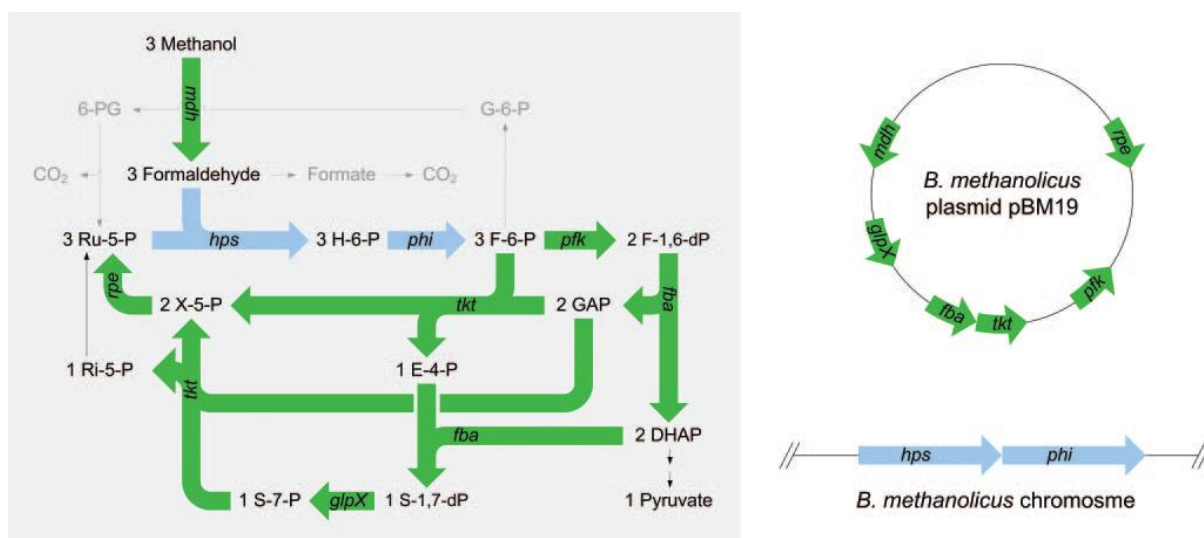
Generelt er produksjonen av aminosyrer nøye regulert i en organisme, men ved hjelp av genetiske verktøy har det blitt mulig å påvirke regulatoriske mekanismer for å utvikle stammer av for eksempel *C. glutamicum* til å overprodusere L-glutamat og L-lysin ved fermentering (Ikeda, 2003, Leuchtenberger et al., 2005). Nye stammer kan også utvikles til produksjon av aminosyrer og en aktuell kandidat er da den metylotrøfe bakterien *Bacillus methanolicus* (Brautaset et al., 2007).

1.2 *Bacillus methanolicus* – en kandidat for produksjon av aminosyrer

Bacillus methanolicus er en termotolerant, metyloτροφ og gram positiv bakterie som ble klassifisert som en egen art i 1992 (Arfman et al., 1992). Bakterier som hører til denne arten vokser ved temperaturer mellom 30-60 °C og kan isoleres fra ulike habitater som varme kilder, jord og avfallsvann (Brautaset et al., 2007). Metylotrofi er en viktig egenskap for denne arten, som betyr at de utnytter C₁-forbindelser som energi- og karbonkilde (metanol). I tillegg kan bakterien utnytte noen få andre karbonkilder som for eksempel mannitol (Brautaset et al., 2004). *B. methanolicus* er med dette en potensiell kandidat for produksjon av aminosyrer fra metanol, men foreløpig har det ikke lyktes å etablere en konkurransedyktig produksjonsstamme. Den største begrensningen ligger i at det finnes få genetiske verktøy som kan brukes til å etablere en overproduserende stamme som deretter kan utnyttes til industriell produksjon (Brautaset et al., 2007).

I 2004 ble det oppdaget at metylotrofi er plasmidavhengig i *B. methanolicus* MGA3. Det vil si at essensielle gener for assimilering av metanol befinner seg på det ca. 19 kb store naturlige plasmidet pBM19 (Brautaset et al., 2004). Et av disse er *mdh*-genet som koder for enzymet metanol dehydrogenase (MDH). Dette er et NAD⁺ avhengig enzym som katalyserer det første steget ved metanlassimilering; oksidering av metanol til formaldehyd (Brautaset et al., 2004, Arfman et al., 1989). Enzymet aktiveres ved hjelp av et aktivatorprotein kalt ACT (Arfman et al., 1997), men i motsetning til *mdh*-genet som er lokalisert på plasmidet er genet for ACT lokalisert på kromosomet (Brautaset et al., 2004).

Etter oksidering av metanol til formaldehyd fikserer *B. methanolicus* formaldehyd via ribulosemonofosfat-sporet (RuMP) (Brautaset et al., 2007). Formaldehyd er giftig for cellen ved høy konsentrasjon, så metanoltoleransen i *B. methanolicus* avhenger sterkt av gener som koder for enzymer til dette sporet. De fleste av de essensielle genene i RuMP-sporet som står for detoksifiseringen av formaldehyd ble også funnet på plasmidet pBM19 (figur 1.2.). (Brautaset et al., 2004). Et av disse RuMP-genene er *pfk* som koder for det ATP-avhengige enzymet fosfofruktokinase (PFK). Dette er et enzym som er nødvendig for omgjøringen av formaldehyd til pyruvat. En oversikt over metanlassimilering og lokalisering av viktige gener i *B. methanolicus* er vist i figur 1.2.



Figur 1.2. Oversikt over metabolske spor for oksidering og assimilering av metanol i *B. methanolicus* MGA3. Reaksjonene som er markert i grått viser lineær og syklisk dissimilering av formaldehyd. Grønne piler indikerer at genet er lokalisert på plasmidet pBM19, mens de blå er lokalisert på kromosomet (Jakobsen et al., 2006). Relevante gener for denne oppgaven i denne figuren er *mdh* og *pfk*.

Som figuren viser er flere viktige gener lokalisert på plasmidet, men to essensielle gener i RuMP-sporet finnes ikke på pBM19. Sammen med det nevnte aktivatorproteinet ACT befinner også genene for heksulosefosfatsyntase (HPS) og fosfoheksuloisomerase (PHI) seg på kromosomet. Etersom disse er nødvendige enzymer i RuMP-sporet vil *B. methanolicus* være avhengig av både kromosomale og plasmidlokaliserte gener ved assimilering av metanol (Jakobsen et al., 2006)

Genomet til *B. methanolicus* MGA3 ble nylig sekvensert (Heggeset, 2011a) og ved undersøkelser ble det oppdaget to mulige metanoldehydrogenase-gener (*mdh2* og *mdh3*) lokalisert på kromosomet. Sekvensen til disse to antatte *mdh*-genene har ca 96 % likhet seg imellom og ca 60 % likhet med sekvensen til *mdh*-genet lokalisert på pBM19 (Heggeset, 2011b). Imidlertid har real-time PCR-eksperimenter vist at transkripsjonen av *mdh*-genet er henholdsvis 250- og 10 000 ganger høyere enn *mdh2*- og *mdh3*-genet (Krog, 2011). I denne oppgaven ble de potensielle promotorregionene til disse genene undersøkt.

B. methanolicus er en attraktiv kandidat for produksjon av aminosyrer av flere grunner. I tillegg til at den kan utnytte metanol som karbon- og energikilde, er også den termotolerante fenotypen en viktig egenskap. Ved fermentering på metanol er det behov for økt tilførsel av oksygen og med dette stiger temperaturen. Da bakterien er termotolerant og

kan gro ved temperaturer opp til 60 °C, er behovet for avkjøling begrenset i forhold til mesofile (30-37 °C) metylotrofe bakterier. Dette er økonomisk gunstig ettersom behovet for kjølevann er lavere for termofile enn mesofile bakterier (Brautaset et al., 2007). En begrensning ved å benytte metanol som råstoff er at metanol er giftig ved høye konsentrasjoner. Ved for høy konsentrasjon av metanol vil også cellen kompensere slik at mer formaldehyd bli omgjort til CO₂ (se figur 1.2.), som igjen fører til at utbyttet av aminosyrer minker. Overvåking av metanolkonsentrasjonen og kontroll over oksygentilførselen er derfor essensielt for å oppnå optimal vekst og da høyere utbytte (Brautaset et al., 2007).

Dersom *B. methanolicus* skal utnyttes industrielt må det fortsatt utvikles flere genetiske verktøy til denne organismen. Genetiske verktøy er viktige for å kunne etablere en god produksjonsorganisme, og det er pågående forskning for å utvikle nye verktøy og forbedre lysinproduksjonen i *B. methanolicus*.

1.3 Genteknologi

Når mikroorganismer skal utnyttes til industriell produksjon av for eksempel aminosyrer, er det viktig å utvikle stammer som gir et høyt nok utbytte for å kunne oppnå økonomisk lønnsomhet. Ved metabolic engineering benyttes genteknologiske teknikker til å påvirke metabolismen for å fremme produksjonen av et bestemt produkt. Eksempler på hva som kan påvirke metabolismen er økt uttrykk av viktige gener ved hjelp av ekspresjonsvektorer eller endring i reguleringen av transkripsjon og translasjon (Madigan et al., 2009).

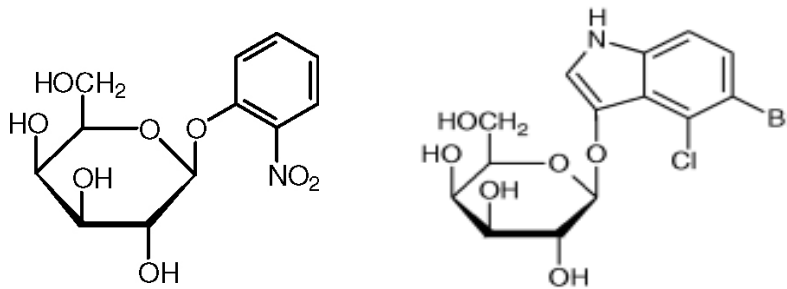
Plasmider og vektorer er nyttige verktøy innen genteknologi. Plasmider er selvreplikerende genetiske elementer, hvor genene som oftest ikke er essensielle for organismens vekst. Vektorer benyttes for å overføre genetisk materiale inn i en organisme og kan for eksempel være plasmider eller virus. Det genetiske materialet som vektoren overfører kan være et nytt gen som organismen ikke har fra før, eller det kan være gen som påvirker metabolismen for bestemte produkter (Madigan et al., 2009).

Innenfor genteknologi er det viktig å forstå en organisme bedre ved blant annet å ha kjennskap til hvordan reguleringen av viktige metabolske spor fungerer. En viktig del av regulering av metabolske spor ligger i transkripsjonsnivået til bestemte gener (Madigan et al., 2009). Før transkripsjon av et gen kan starte må RNA-polymerase binde seg til en spesifikk DNA-sekvens som er lokalisert oppstrøms for genet. Denne regionen kalles en promotor og blir først gjenkjent av sigmafaktoren før RNA-polymerase også binder seg til promotoren

(Madigan et al., 2009). Sekvensen i ulike promotere varierer, men to korte sekvenser innad i ulike promotere er konservert i høy grad mellom ulike bakteriearter. Sekvensene er AT-rik og den første ligger ca. 10 basepar før genets startkode og kalles pribnow-boks, mens den andre er ca. 35 basepar før startkodonet og kalles -35 regionen (Madigan et al., 2009).

Når det gjelder regulering av transkripsjon avhenger dette blant annet av promotorens affinitet for RNA-polymerase. Affiniteten kan være høy eller lav, samtidig som den kan reguleres i ulik grad. En sterk promotor har høy affinitet til RNA-polymerase, noe som kan føre til økt transkripsjon. Dermed er styrken til promotoren med på å avgjøre hvor mye genprodukt som produseres (Madigan et al., 2009). En promotors evne til å regulere genuttrykk kan også utnyttes i metabolic engineering. Et eksempel er en ekspresjonsvektor hvor et gitt gen er koblet opp mot en sterk promotor og det blir produsert mye genprodukt (Nelson and Cox, 2008). Før en promotor kan utnyttes i en vektor på denne måten må den analyseres, og en metode for promotoranalyse er å koble den opp mot et reporter-gen.

Ved bruk av en vektor med et reporter-gen som styres av en promotor er det mulig å analysere regulering av genuttrykk. Det som kjennetegner et reporter-gen er at proteinet som produseres ikke er uttrykt i organismen fra før og det må være forholdsvis enkelt å detektere eller måle aktiviteten til proteinet (Brown, 2010). Når reporter-genet er koblet opp mot en promotor, vil det være mulig å undersøke styrken til promotoren og undersøke hvordan genuttrykk reguleres ved ulike betingelser. Eksempler på ulike reporter-gen er grønt fluoriserende protein (GFP), β -galaktosidase (LacZ) eller et gen som gir resistens mot antibiotika (Madigan et al., 2009). GFP er et vanlig reporter-gen og stammer opprinnelig fra maneten *Aequorea victoria*. Proteinene avhenger ikke av et substrat og sender ut grønt fluoriserende lys når det belyses med blått lys (Tsien, 1998). β -galaktosidase er et protein hvor aktiviteten er forholdsvis lett å måle. Enzymet katalyserer hydrolyse av β -galaktosider. Eksempler på substrater som dette enzymet kan virke på er o-nitrophenyl- β -D-galaktopyranoside (ONPG) og 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranoside (X-gal) (Madigan et al., 2009). Illustrasjoner av disse substratene er vist i figur 1.3.



Figur 1.3. Venstre: ONPG. Høyre: X-gal. Begge kan benyttes som substrat for å måle aktiviteten til enzymet β -galaktosidase. β -galaktosidase katalyserer hydrolyse av β -galaktosider som i disse tilfellene vil gi opphav til galaktose og en substans som gir opphav til farge. ONPG vil gi gul løsning, mens X-gal vil gi blåfarge.

Når X-gal hydrolyseres av β -galaktosidase dannes galaktose og et indoksyli-produkt som videre oksideres til et uløselig indigofarget (blått) produkt. Dermed oppstår det blå kolonier dersom x-gal er tilsatt i mediet og organismen produserer β -galaktosidase (Janda et al., 1997). Hydrolyse av ONPG gir galaktose og o-nitrophenol (ONP), hvor ONP videre omdannes til en farget forbindelse (gul) som kan måles ved hjelp av et spektrofotometer ved bølglengde 410 nm.

1.4 Genetiske verktøy i *Bacillus methanolicus*

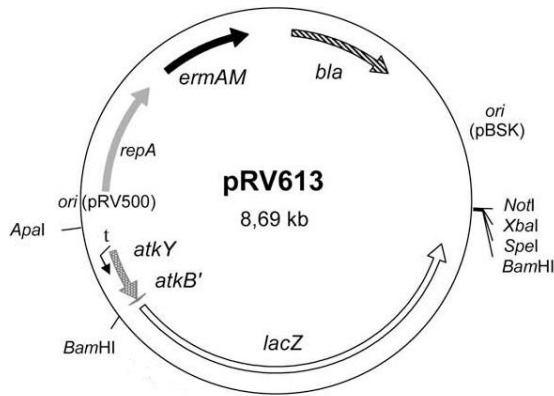
Det er få tilgjengelige genetiske verktøy for *B. methanolicus* sammenlignet med *C. glutamicum*. For å kunne undersøke metabolismen og utføre metabolic engineering i en organisme er det nødvendig å ha en etablert transformasjonsprotokoll. I 2006 ble det publisert en ny metode for å transformere *B. methanolicus* MGA3 ved elektroporering (Jakobsen et al., 2006). Vektoren som ble benyttet her var en *E. coli* - *B. subtilis* shuttlevektor: pHP13 (og derivater).

pHP13 som viste seg å virke som en *E. coli* - *B. methanolicus* shuttlevektor har senere blitt modifisert til en kassett-kloning og ekspresjonsvektor pTH1mdhp-lysC (Brautaset et al., 2010). Denne vektoren er en analog til vektoren pHP13mp-lysC (Jakobsen et al., 2009), hvor genet *lysC* som koder for enzymet aspartokinase II er under kontroll av promotoren til *mdh*-genet som er klonet fra plasmidet pBM19 (Brautaset et al., 2004). Forskjellen mellom pHP13mdhp-lysC og pTH1mdhp-lysC er et PciI restriksjonsenzym-sete som gjør det mulig å raskt kloner inn et hvilket som helst gen bak *mdh*-promotoren ved hjelp av PciI (Brautaset et al., 2010). Foreløpig finnes det få andre vektorer som replikerer i *B. methanolicus*. Da det ble

bevist at metylootrofi er plasmidavhengig, ble det konstruert en shuttlevektor (pTB1,9) basert på plasmidet pBM19 (Brautaset et al., 2004). *B. methanolicus* ble transformert med dette plasmidet, noe som førte til at bakterien mistet evnen til å vokse på metanol. Grunnen til dette var inkompatibilitet (*B. methanolicus* mistet plasmidet pBM19 fordi pBM19 og pBM1,9 hadde samme replikasjonssystem) (Brautaset et al., 2004). En konsekvens av dette er at det ikke er mulig å utnytte replikasjonsproteinet til det naturlige plasmidet pBM19 som utgangspunkt til nye vektorer.

For å uttrykke nye gener i en organisme er det viktig å ha flere vektorer. Da genomet til *B. methanolicus* ble sekvensert ble det oppdaget et potensielt megaplasmid kalt pBM69 (Heggeset, 2011a). Ved undersøkelse av det potensielle replikasjonsproteinet til pBM69 (pBM69ori), ble det oppdaget en 45 % likhet i aminosyresekvensen mellom pBM69ori og replikasjonsproteinet til et annet megaplasmid i *Bacillus thuringiensis* (*ori* 43) (Heggeset, 2011a, Baum et al., 1990). Likheten mellom pBM69ori og *ori* 43 gir grunn til å tro at pBM69 er et plasmid. Dersom det ikke finnes essensielle gener i dette antatte plasmidet, kan det potensielt utnyttes som et nytt genetisk verktøy i *B. methanolicus*.

I tillegg til få replikerende vektorer, eksisterer det heller ingen gode promotere som kan benyttes til kontrollert ekspresjon av ulike gener i *B. methanolicus*. *Mdh*-promotoren har vist seg å være veldig sterk ved vekst på både metanol og mannitol (Jakobsen et al., 2006). Denne promotoren gir derfor høyt genuttrykk, men den kan ikke kontrolleres (Brautaset et al., 2010). I bakterien *Lactobacillus sakei* er det blitt identifisert og testet en kobberinduserbar promotor. Denne promotoren er en del av et operon til en mulig P-type ATPase og fungerer som en kationpumpe i cellen (Stentz et al., 2000, Crutz-Le Coq and Zagorec, 2008). Da operonet ble oppdaget ble promotoren amplifisert ved PCR og analysert i *L. sakei* ved hjelp av reportergen *lacZ*. Det viste seg at promotoren ble induert av lave konsentrasjoner av CuSO₄ (30-40 µM) (Stentz et al., 2000). Senere ble promotoren klonet inn i vektoren pRV613 og benyttet til kontrollert ekspresjon i *L. sakei* (Crutz-Le Coq and Zagorec, 2008) Nok en gang viste det seg at promotoren ble induert ved lave konsentrasjoner av CuSO₄, men også at den initierer transkripsjon uten tilsatt induer. Da *E. coli* var transformert med pRV613 og plattet ut på agarplater med X-gal, ga det opphav til blå kolonier, noe som tyder på at promotoren starter transkripsjon selv om den ikke er induert av CuSO₄ (Crutz-Le Coq and Zagorec, 2008). En illustrasjon av vektoren pRV613 er vist i figur 1.4.



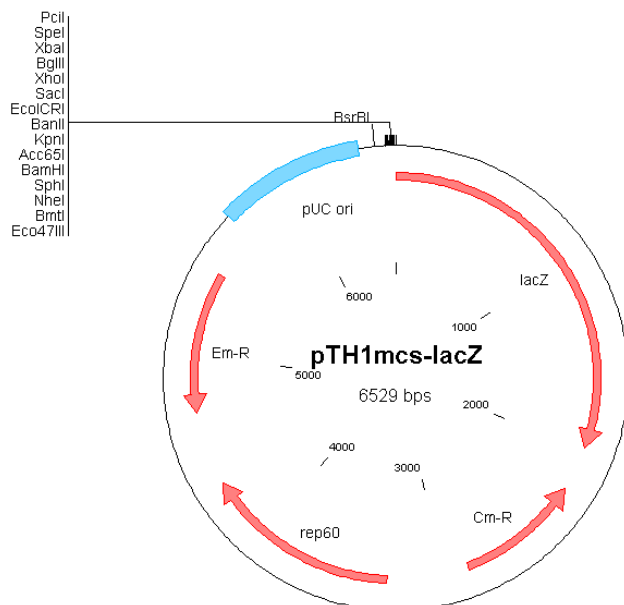
Figur 1.4. Vektoren pRV613 benyttet til kontrollert ekspresjon i *L. sakei*. Reporter-genet *lacZ* er kontrollert av den kobberinduserbare promotoren *aktYB*. Indusert med lave konsentrasjoner av CuSO_4 (Crutz-Le Coq and Zagorec, 2008).

Tidligere har det blitt testet en glyserol-induserbar promotor i *B. methanolicus*, men det lyktes ikke å oppnå kontrollert ekspresjon (Jor, 2010). Det er med dette svært interessant å få testet den kobber-induserbare promotoren i *B. methanolicus*. Denne vil kunne benyttes som et nytt verktøy i *B. methanolicus* og gjøre det mulig å delvis kontrollere ekspresjonen av gener under kontroll av denne promotoren. Det er også en stor fordel at kobberpromotoren er uavhengig av de metabolske sporene i *B. methanolicus*, noe som betyr at induksjon med CuSO_4 ikke vil påvirke prosessene i cellen.

For å undersøke om kobberpromotoren virker i *B. methanolicus* er det nødvendig med et reporter-gen. I dag eksisterer det ingen gode reporter-gen i denne organismen. Ved hjelp av et reporter-gen vil det også være mulig å undersøke promotere som allerede finnes i *B. methanolicus*. Regulering av transkripsjon er viktig for metanoltoleransen til *B. methanolicus*, det er derfor ønskelig å undersøke Promotorene i gener som har en viktig rolle i metanolassimileringen. Reporter-genet må (som nevnt i delkapittel 1.3) ikke finnes i organismen fra før og det må være lett å detektere genproduktet ved for eksempel aktivitetmålinger. Reporter-genet GFP (grønt fluorescerende protein) har tidligere blitt testet i *B. methanolicus*, men uten å lykkes (Jor, 2010). En viktig del av denne oppgaven har derfor vært å teste og utvikle et assay for uttesting av ulike promotere i *B. methanolicus* ved hjelp av reporter-genet *lacZ* som stammer fra *B. coagulans* (Kovacs et al., 2010).

I forbindelse med denne oppgaven ble det konstruert en vektor pTH1mcs-lacZ. Denne vektoren tar utgangspunkt i vektoren pTH1mdhp-lysC (Jakobsen et al., 2006) hvor *mdh*-promotoren er fjernet og erstattet med et multiple cloning site (mcs) (Heggeset, 2011a). Et

mcs er et DNA-segment som består av mange seter for ulike restriksjonsenzymmer. Dermed er det lett å ligere inn en promotor som vil kontrollere uttrykket av reportergen *lacZ* (Madigan et al., 2009). Vektoren pTH1mcs-lacZ er vist i figur 1.5.



Figur 1.5 Vektoren pTH1mcs-lacZ. Denne har et multiple cloning site (mcs) før *lacZ*-genet slik at det er lett å ligere inn ulike promotorer som kan kontrollere uttrykket av *lacZ*. Restriksjonssetene i mcs-regionen er vist i figuren.

1.5 Formål

Formålet med denne oppgaven var å teste og utvikle et assay for å måle aktiviteten til enzymet β -galaktosidase som dannes fra reporter-genet *lacZ*. Dette assayet ble deretter brukt for å undersøke ulike promotere i *Bacillus methanolicus*. Reporter-genet *lacZ* som ble benyttet i denne oppgaven stammer fra den termotolerante bakterien *Bacillus coagulans* (Kovacs et al., 2010). Promotorene som ble valgt til uttesting i denne oppgaven var Promotorene til gener som er essensielle i metanotassimileringen i *B. methanolicus* (*mdh* og *pfk*), de potensielle promotorregionene til *mdh2* og *mdh3* samt promotorregionen til aktivatorprotein-genet *act*. Det ble også testet en kobberinduserbar promotor (*atkYB'*) fra *Lactobacillus sakei* (Stentz et al., 2000). Den kobberinduserbare promotoren er interessant ettersom den potensielt kan utnyttes til kontrollert ekspresjon i *B. methanolicus*. Det var også en del av oppgaven å undersøke replikasjonsproteinet til pBM69. Dersom replikasjonsproteinet virket ville det potensielt gi opphav til en ny vektor for *B. methanolicus*. Formålene kan oppsummeres som følger:

1. Konstruere vektorer hvor gitt promotor var koblet opp mot reporter-genet *lacZ*, samt transformere *B. methanolicus* MGA3 med de konstruerte vektorene.
2. Etablere et assay for bestemmelse av enzymaktiviteten til β -galaktosidase, uttrykt under kontroll av gitt promotor.
3. Undersøke origin of replication i det potensielle plasmidet pBM69.

2 Materialer og metoder

2.1 Bakteriestammer og generelle vekstbetingelser

En oversikt over bakteriestammene og plasmidene benyttet i denne oppgaven er listet i tabell 2.1. Alle medier og løsninger som ble benyttet er beskrevet i tabeller i kapittel 2.6.

Kloning av plasmider ble utført ved hjelp av *E. coli* DH5 α , en generell kloningsvert. Dyrkingen av *E. coli* DH5 α ble utført i flytende eller fast Luria-Bertani medium (tabell 2.8 og 2.9). I flytende medium ble kulturen dyrket i risteinkubator ved 37 °C og 225 rpm, mens på agar ble platene inkubert i varmeskap ved 37 °C. Selektiv antibiotika ble tilsatt i konsentrasjonene; ampicillin (200 μ g/ml) eller kloramfenikol (20 μ g/ml) bestemt av det aktuelle plasmidets antibiotikaresistens.

Bacillus methanolicus ble dyrket ved 50 °C i varmeskap eller risteinkubator (200 rpm). To ulike flytende medier ble benyttet; SOBSuc (tabell 2.13), et medium bestående av SOB medium (difco) og 0,25 M sukrose som ble brukt ved transformasjon av *B. methanolicus*; MvCM (tabell 2.16), et minimalmedium som alltid ble tilsatt følgende før inkubering: 100 μ l MgSO₄ (1,0M, steriltfiltrert), 100 μ l spormetaller (tabell 2.17), 100 μ l komplett vitaminløsning (tabell 2.18), 5 μ g/ml kloramfenikol og enten 30 mM metanol (ved transformasjon) eller 200 mM metanol (ved dyrking av etablerte *B. methanolicus* stammer). Ved transformasjon av *B. methanolicus* ble konsentrasjonen av metanol økt fra 30 mM til 200 mM etter seks timers vekst. Når *B. methanolicus* ble inkubert på fast medium ble det benyttet regenerasjonsplater (tabell 2.19).

Tabell 2.1. Oversikt av bakteriestammer og plasmider i denne oppgaven

Bakteriestamme eller Plasmid	Beskrivelse	Referanse
<i>E. coli</i> DH5 α	Generell kloningsvert	Bethesda Research Laboratories
<i>B. methanolicus</i> MGA3	Villtype	Schendel 1990
pGEM-T	Kloningsvektor for <i>E. coli</i> , Amp ^r	Promega
pRV613	Templat for kobber-induserbar promotor <i>atkYB'</i>	(Crutz-Le Coq and Zagorec, 2008)

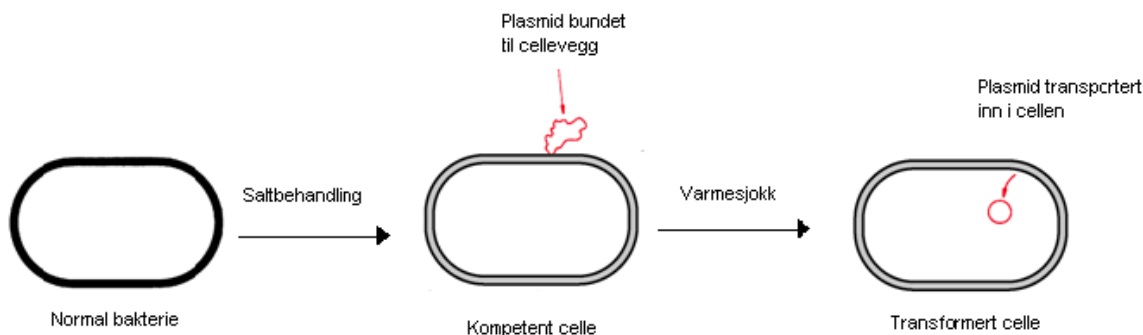
pGEM-T- <i>lacZ</i>	Genet <i>lacZ</i> er klonet fra pNZ <i>lacZ</i> og ligert inn i pGEM-T. <i>LacZ</i> stammer fra <i>B. coagulans</i> . Amp ^r	(Heggeset, 2011a) (Kovacs et al., 2010)
pHP13	<i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector. Cm ^r	(Haima et al., 1987)
pTH1mp- <i>lysC</i>	Derivat av pHP13, promotor: metanol dehydrogenase. Reporter-gen: Aspartokinase II. Cm ^r	(Jakobsen et al., 2006)
pTH1pfpk- <i>yclm</i>	Derivat av pHP13 med fosfofruktokinase promotor og reporter-genet aspartokinase III. Cm ^r	(Heggeset, 2011a)
pTH1mdhp- <i>lacZ</i>	Med utgangspunkt i pTH1mp- <i>lysC</i> , hvor <i>lysC</i> er byttet ut med reporter-genet <i>lacZ</i> (β -galaktosidase) fra pGEM-T- <i>lacZ</i> . Cm ^r	Denne studien
pTH1mcs- <i>lacZ</i>	Promotor-probe-vektor for uttesting av promotere i <i>B. methanolicus</i> . Med utgangspunkt i pTH1mp- <i>lysC</i> , metanol dehydrogenase promotor er erstattet med multiple cloning site (mcs) og <i>lysC</i> er erstattet med <i>lacZ</i> . Cm ^r	(Heggeset, 2011a)
pGEM-T-Cup	PCR-produktet Cup ligert inn i pGEM-T for sekvensering.	Denne studien
pTH1Cup- <i>lacZ</i>	Plasmid med kobberinduserbar promotor og reporter-genet <i>lacZ</i> . Cm ^r	Denne studien
pGEM-T-actp	Plasmid med promotoren til genet <i>act</i> (proteinet ACT aktiverer proteinet metanoldehydrogenase (MDH). Promotoren er ligert inn i pGEM-T. Amp ^r .	Denne studien
pTH1pfpk- <i>lacZ</i>	Med utgangspunkt i pTH1pfpk- <i>lysC</i> , hvor <i>lysC</i> er byttet ut med <i>lacZ</i> . Cm ^r	Denne studien
pGEM-T-mdh2p	PCR-produktet mdh2p ligert inn i pGEM-T for sekvensering. Amp ^r	Denne studien
pTH1mdh2p- <i>lacZ</i>	Promotoren mdh2p er ligert inn i pTH1mcs- <i>lacZ</i> . Cm ^r	Denne studien
pGEM-T-mdh3p	Promotoren mdh3p er ligert inn i pGEM-T. Amp ^r .	Denne studien
pGEM-T-pBM69ori	Origin of replication er klonet fra pBM69 inn i pGEM-T for sekvensering. Amp ^r	Denne studien

2.2 Generelle metoder for konstruksjon av plasmider

2.2.1 Transformasjon av *E. coli* DH5 α

Transformasjon er en prosess hvor DNA taes opp av en levende celle, men for at en bakterie effektivt skal kunne ta opp DNA må den gjennomgå en kjemisk og/eller fysisk behandling. Celler som har gjennomgått denne prosessen kalles kompetente celler (Brown, 2010). Dette ble oppdaget på 70-tallet og i 1979 ble det publisert en metode for å danne kompetente *E. coli* ved å inkubere cellene i iskald saltløsning (Dagert and Ehrlich, 1979). Den eksakte mekanismen som ligger til grunn for opptak av DNA er ikke kjent, men en teori er at saltet påvirker celleveggen slik at DNA binder seg, mens selve transformasjonen hvor DNA taes

opp i cellen trigges ved blant annet varmesjokk (Brown, 2010). Salter som benyttes er vanligvis CaCl_2 eller RbCl (Brown, 2010). En illustrasjon av hvordan transformasjon av en celle kan foregå er vist i figur 2.1.



Figur 2.1. Illustrasjon av hvordan transformasjon av en bakterie kan foregå. Her dannes kompetente celler ved kjemisk behandling (salt), DNA binder celleveggen til den kompetente cellen og DNA transporteres inn i cellen ved varmesjokk.

Kjemisk kompetente E. coli DH5 α

Kompetente celler av *E. coli* DH5 α ble inokulert i 10 ml LB medium uten antibiotika og inkubert over natt i risteinkubator ved 37 °C. Neste dag ble 1 ml av kulturen reinokulert i 100 ml RB-medium (tabell 2.10). Den optiske tettheten til kulturen ble fulgt nøye. Når OD₆₀₀ målte 0,4 ble kulturen inokulert på is i 15 minutter for å stoppe veksten. Kulturen ble fordelt i to 50 ml plastrør og sentrifugert ved 5000 rpm og 4 °C i fem minutter. Supernatanten ble kastet mens pelleten i hvert plastrør ble resuspendert i 20 ml TFB1 (tabell 2.11). De resuspenderte cellene ble kombinert i ett rør og inkubert på is i fem minutter. Cellene ble igjen sentrifugert ved 5000 rpm og 4 °C i fem minutter og deretter resuspendert i 4 ml TFB2 (tabell 2.12). Løsningen ble så inkubert på is i 15-60 minutter og fordelt i sterile eppendorfrør (100 μ l per rør) før de ble snappfryst ved hjelp av flytende nitrogen eller med tørris og etanol, deretter lagret ved -80 °C.

Transformasjon av E. coli DH5 α

Et rør med kompetente *E. coli* DH5 α ble tint på is og tilsatt 10 μ l av aktuell ligeringsmik (se kapittel 2.2.7). Blandingen ble holdt på is i 30-60 minutter. Cellene ble så utsatt for varmesjokk i vannbad ved 42 °C i 35 sekunder og deretter satt på is igjen i 2 minutter. Det ble tilsatt 1 ml RB medium til blandingen (uten antibiotika) og cellene ble inkubert på risting (250 rpm) ved 37 °C i 1-1,5 timer. Etter inkubering ble det platet ut 2x100 μ l på LA-plater tilsatt

selektivt antibiotikum bestemt av plasmidets resistens mot antibiotika. Platene ble inkubert i varmeskap ved 37 °C over natt. Etter inkubering over natt ble det plukket kandidater fra platen. Hver kandidat ble inkubert på en ny plate og i flytende LB-medium, deretter ble plasmid ble isolert. Dersom kandidatens plasmid ga riktig kuttemønster med valgte enzymer ble *E. coli* med det riktige plasmidet lagret ved -80 °C.

2.2.2 Isolasjon av plasmid

Ved isolering av plasmid fra celler er det viktig å separere plasmid DNA fra det bakterielle kromosomet. Den største forskjellen mellom plasmid- og kromosomalt DNA er størrelsen og denne forskjellen kan derfor utnyttes for å oppnå god separasjon. Metoden som benyttes i denne oppgaven er alkalisk lysis. Først behandles cellene med EDTA som trigger delvis nedbrytning av celleveggen uten at cellen sprekker (Brown, 2010). I dette trinnet brytes også RNA ned ved enzymet RNase A (MACHEREY-NAGEL, 2011). Lysis utføres deretter ved å tilsette sodium dodecyl sulfat (SDS), ved samtidig å øke pH med NaOH slik at kromosomalt- og plasmid DNA denaturerer (Brown, 2010, Ehrt and Schnappinger, 2003). Når pH senkes med kaliumacetat etter dette steget, vil plasmidene renaturere mens kromosomalt DNA forblir denaturert og feller ut med kalium og SDS samt celledetritus (Ehrt and Schnappinger, 2003). Etter påfølgende sentrifugering vil plasmid DNA befinne seg i supernatant, mens kromosomalt DNA og uønskede komponenter befinner seg i pellet (Ehrt and Schnappinger, 2003, Promega, 2010). For oppkonsentrering av plasmid DNA fra supernatant benyttes sentrifugering. Supernatanten overføres til en kolonne (følger med Promega Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System). Ved sentrifugering bindes DNA til kolonnen. Deretter vaskes kolonnen og DNA elueres til slutt ved ionefritt vann (Promega, 2010).

Miniprep

E. coli DH5 α med aktuelt plasmid ble dyrket over natt ved 37 °C og 250 rpm i 3 ml LB medium tilsatt antibiotika bestemt av plasmidets antibiotikaresistens. Kulturen ble sentrifugert ved 8000rpm i 5 minutter og plasmid ble isolert fra cellene ved hjelp av Promega Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System etter produsentens protokoll.

1. Pelleten etter sentrifugering ble resuspendert i 250 μ l Cell Resuspension Solution (inneholder EDTA).

2. Cellene ble så lysert ved å tilsette 250 µl Cell Lysis Solution (inneholder SDS og NaOH). Løsningen ble blandet ved å vende røret fire ganger, deretter inkubert til suspensjonen var klar (maks fem minutter).
3. Etter fem minutter med lysering ble det tilsatt 10 µl Alkaline Protease Solution. Løsningen ble blandet ved å vende røret fire ganger, deretter inkubert i fem minutter. Dette steget er for å inaktivere endonukleaser og deaktivere proteiner for å redusere forurensninger i lysatet (Promega, 2010). Alkaline Protease Solution er aktiv fra pH 9 og opp, mens aktiviteten reduseres kraftig når løsningen nøytraliseres (steg 4) (Promega, 2010).
4. For nøytralisering ble det tilsatt 350 µl Neutralization Solution (inneholder kaliumacetat). Løsningen ble blandet ved å vende røret fire ganger og deretter sentrifugert ved 13000 rpm i ti minutter.
5. Supernatanten ble overført til spinnkolonne og sentrifugert ved 13000 rpm i ett minutt. Væsken som hadde gått gjennom kolonnen ble kastet.
6. Tilsatte 750 µl Column Wash Solution til spinnkolonnen, sentrifugerte deretter ved 13000 rpm i ett minutt og kastet væsken som hadde gått gjennom kolonnen.
7. Samme steg som 6 ble utført på nytt, men med 250 µl Column Wash Solution og sentrifugering i to minutter. Spinnkolonnen ble deretter overført til et sterilt eppendorfrør.
8. Plasmid DNA bundet til kolonnen ble eluert ved å tilsette 50-100 µl ione-fritt vann og deretter sentrifugere ved 13000 rpm i ett minutt. Eluert plasmid DNA ble lagret ved -20 °C.

Midiprep

E. coli DH5α med aktuelt plasmid ble dyrket i 100 ml LB medium over natt. Neste dag ble kulturen fordelt i 50 ml plastrør og sentrifugert ved 5500rpm i 15 minutter. Plasmid ble deretter isolert ved hjelp av NucleoBond® Xtra Midi Plasmid DNA Purification i henhold til produsentens protokoll.

1. Pelleten ble resuspendert ved å tilsette 8 ml Resuspension Buffer RES.
2. 8 ml Cell Lysis Buffer LYS ble tilsatt de resuspenderte cellene og løsningen ble blandet ved å vende røret fem ganger. Løsningen ble inkubert ved romtemperatur i fem minutter.

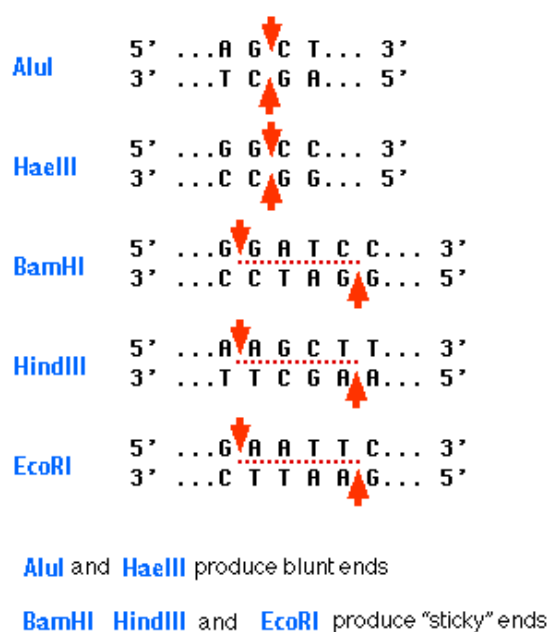
3. 12 ml Equilibration Buffer EQU ble tilsatt kolonnefilteret. Kolonnefiltret og kolonnen ble tømt ved å la løsningen dryppe gjennom ved hjelp av tyngdekraften.
4. 8 ml Neutralization Buffer NEU ble tilsatt prøven i punkt 2, løsningen ble blandet ved å vende røret 10-15 ganger.
5. Løsningen ble nå tilsatt kolonnefiltret (punkt 3). Kolonnefiltret skiller nå løsningen med plasmid DNA fra det utfelte kromosomale DNA og celledetris. Plasmid DNA binder kolonnen. Kolonnen tømmes ved hjelp av tyngdekraften.
6. Kolonnefiltret og kolonnen vaskes ved å tilsette 5 ml Buffer EQU ved samme metode som vist i figur 2.2. Når bufferen har passert gjennom kolonnen, kastes kolonnefiltret.
7. Kolonnen med bundet plasmid DNA vaskes ved å tilsette 8 ml Buffer Wash. Tømmes ved hjelp av tyngdekraften.
8. Plasmid DNA elueres ved å tilsette 5 ml ionefritt vann til kolonnen. Eluatet samles opp i et sterilt rør.
9. For å oppkonsentrere plasmid DNA tilsettes 3,5 ml romtemperert isopropanol for å felle ut plasmid DNA. Prøven sentrifugeres ved 8500 rpm i tretti minutter ved 4 °C. Supernatanten fjernes forsiktig.
10. Pelleten vaskes med 2 ml romtemperert 70 % etanol. Deretter sentrifugeres prøven ved 8500 rpm i fem minutter. Etanolen fjernes fra prøven med en pipette.
11. Pelleten løses så i 30-100 µl ionefritt vann. Lagres ved -20 °C.

Bestemmelse av konsentrasjon

Konsentrasjon av plasmidene ble målt med Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Saveen & Werner). For bestemmelse av konsentrasjonen måles absorbansen ved 260 nm og videre beregnes konsentrasjonen ved hjelp av Lambert-Beers Lov. Beregningene blir utført automatisk i programvaren som medfølger instrumentet.

2.2.3 Restriksjonskutting av DNA

For konstruksjon og verifisering av de aktuelle plasmidene ble DNA kuttet med restriksjonsenzymmer. Restriksjonsenzymmer binder seg til spesifikke nukleotidsekvenser og kutter begge DNA-trådene i denne spesifikke sekvensen (som ofte er et palindrom) (Klug et al., 2009). Ved kutting av DNA gir det opphav til butte ender eller ender med overheng, hvordan resultatet blir avhenger av det spesifikke enzymet (Brown, 2010). Figur 2.2 illustrerer hvordan ulike enzymer kutter DNA (The NTNU Cell and Molecular Biology, 2011)



Figur 2.2 Illustrasjon av hvordan ulike restriksjonsenzymmer kutter DNA ved å gjenkjenne spesifikke sekvenser (The NTNU Cell and Molecular Biology, 2011). AluI og HaeIII gir butte ender, mens BamHI, HindIII og EcoRI gir overhengende (sticky) ender.

Restriksjonsenzymmer produseres av bakterier som en forsvarsmekanisme mot bakteriofager (Brown, 2010). Innenfor genteknologi utnyttet disse enzymene til å kutte ut spesifikke deler av DNA (kan være et gen) som deretter kan liggeres sammen med en vektor kuttet med det samme restriksjonsenzymet. Enzymene kan også benyttes til å analysere vektorer ved å kutte med spesifikke enzymer, som gir opphav til restriksjonsfragmenter. Deretter kan størrelsene på disse fragmentene analyseres ved agarose-gelelektroforese (Brown, 2010).

For å oppnå maksimal effektivitet av restriksjonskuttingen er ionestyrken i løsningen og temperaturen viktig (Brown, 2010). I denne oppgaven ble enzymene og buffere levert av New England Biolabs (NEB). Oppskriften for optimal kutting for hvert enkelt enzym var gitt

av NEB. Den generelle kuttemiksen vises i tabell 2.2. Kuttemiksen ble inkubert i vannbad ved 37 °C (eller annen optimal temperatur gitt for enzymet) og tiden for inkuberingen varierte fra 30 minutter til over natt. Volumet av DNA i kuttemiksen var avhengig av prøvens konsentrasjon og bakgrunnen for kuttingen. Ved verifisering kunne konsentrasjonen holdes lav, mens ved konstruksjon av plasmid hvor fragmenter måtte isoleres fra gel var det ønskelig med høyere konsentrasjon. Bovine Serum Albumin (BSA) kan stabilisere noen proteiner under inkubering og hindrer at enzymene kleber seg til overflater (New England Biolabs Inc, 2011). Proteinet ble tilsatt kuttemiksen dersom det var anbefalt av produsenten (NEB) for det aktuelle enzymet. Totalt volum for kuttemiks var 20 µl.

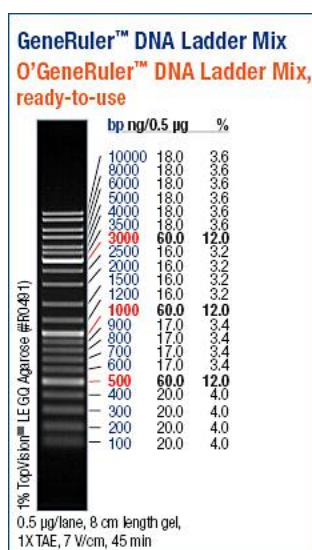
Tabell 2.2. Kuttemiks ved enzymatisk kutting av DNA.

Innhold	Volum [µl]	Referanse
10x New England Biolabs buffer	2	New England Biolabs
Bovine Serum Albumin (BSA) ^a	0,5	New England Biolabs
DNA	1-5	
Restriksjonsenzym	0,5-1 ^b	New England Biolabs
Ionefritt H ₂ O	opp til 20	

a) BSA ble tilsatt dersom det var oppgitt av New England Biolabs.

b) DNA ble kuttet med ett eller to enzymer, 0,5µl av hvert enzym.

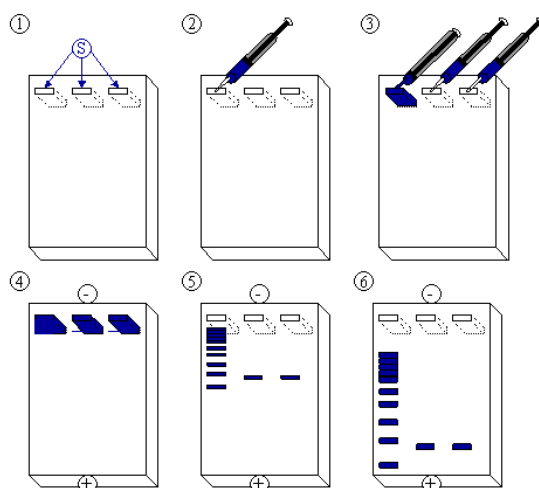
Kuttingen ble stoppet ved å tilsette 2 µl loading dye (farge til prøven, levert av Fermentas) og prøven ble deretter analysert ved agarose-gelelektroforese. Hele prøven ble overført til en brønn i gelen og gelen ble kjørt ved 90-100 V i 1-2 timer. GeneRuler™ 1kb DNA laddermiks (Fermentas) ble benyttet som størrelsesmarkør og er vist i figur 2.3



Figur 2.3 GeneRuler DNA Ladder mix ble benyttet som størrelsesmarkør ved agarose-gelelektroforese (Thermo Scientific, 2011)

2.2.4 Agarose gelelektroforese

Ved hjelp av gelelektroforese er det mulig å separere DNA ut fra størrelsen. DNA er negativt ladete molekyler som kan vandre mot den positive polen i et elektrisk felt. For å gi motstand til vandringen utføres elektroforesen i en gel. Gelen som benyttes i denne oppgaven er laget av 0,8 % agarose (tabell 2.21), som gir opphav til porer hvor DNA kan vandre gjennom (Brown, 2010). Hastigheten til et DNA-molekyl avhenger av størrelsen, jo mindre molekylet er dess raskere vandrer det i gelen. For å bestemme størrelsen på båndene etter gelelektroforese ble båndene fra prøven sammenlignet med en størrelsesmarkør; DNA ladder, med kjente størrelsesbånd (Brown, 2010). En oppsummering av gelelektroforese er vist i figur 2.4 (The NTNU Cell and Molecular Biology, 2011).



Figur 2.4 Oppsummering av gelelektroforese. 1) gelen støpes og det lages brønner til prøvene. Punkt 2) og 3): prøve og størrelsesmarkør tilsettes brønnene. 4) og 5) spenningen skrues på og prøvene begynner å vandre fra negativ til positiv pol. 6) Spenningen skrues av og båndene visualiseres ved hjelp av UV-lys. (The NTNU Cell and Molecular Biology, 2011).

2.2.5 Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) er en metode for å amplifisere DNA *in vitro*. For å gjennomføre PCR utnyttes enzymet DNA-polymerase som generelt syntetiserer DNA. For å kjøre PCR er det nødvendig å ha et templat (som bærer den delen av DNA som skal amplifiseres) og to primere. En primer er et oligonukleotid, som igjen er et kort entrådet DNA-molekyl (Brown, 2010). I tillegg trengs det DNA-polymerase og de fire deoksyribonukleotidene (dATP, dCTP, dGTP og dTTP). Stegene i PCR for amplifisering av DNA deles inn i fire;

1. Mastermiksen (tabell 2.4) varmes til 93 °C og dobbeltrådet DNA (templat) denaturerer. **(Denaturering)**
2. Miksen kjøles ned til 45-60 °C og primerne binder seg til templat DNA. Den optimale temperaturen for binding av primere til templat DNA avhenger av smeltepunktet til primerne som benyttes. **(Primer binding)**
3. Temperaturen økes til 72 °C og DNA-polymerase syntetiserer DNA fra enden av en primer i 5' til 3' retningen. **(DNA syntese)**
4. Etter en bestemt tid med syntese ved 72 °C økes temperaturen på nytt til 93 °C slik at dobbeltråd DNA denatureres, og ny syklus av punkt 1-4 kan utføres. **(Denaturering)**

I PCR benyttes en varmestabil DNA-polymerase som stammer fra bakterien *Thermus aquaticus*. Enzymet har fått navnet *Taq* DNA-polymerase og er stabilt opp til 95 °C. (Madigan et al., 2009). I denne oppgaven ble protokollen Expand High Fidelity PCR System (Roche) benyttet.

Amplifisering av promotere

Noen av Promotorene undersøkt i denne oppgaven måtte amplifiseres fra DNA før de kunne liggeres inn i vektoren pTH1mcs-lacZ (se tabell 2.1). De aktuelle Promotorene ble dermed amplifisert ved hjelp av PCR. De aktuelle primerne og hvor stor del som skulle amplifiseres var forhåndsbestemt. En oversikt over PCR-reaksjonene utført i denne oppgaven finnes i tabell 2.3.

Tabell 2.3. Oversikt over PCR utført i denne oppgaven og de tilhørende primerne. Primerne ble levert av Eurofins MWG Operon.

Promotor	Templat	Primer	Basesekvens
Actp	MGA3 <i>B. methanolicus</i> genomisk DNA	actp_fwd	CCTCTAGATTCACCTCGATTCATGTG
		actp_rev	CACATGTTTACACTCCTTTTCTATTAAC
mdh2p	MGA3 <i>B. methanolicus</i> genomisk DNA	mdh2p_fwd	AACGGATCCTTCTTAATATTGTTATATTGTC
		mdh2p_rev	AACACATGTACATCCTCCTCATTTTGATAG
mdh3p	MGA3 <i>B. methanolicus</i> genomisk DNA	mdh3p_fwd	AAAGAGCTCTCGGCAGATAAAATTGG
		mdh3p_rev	AACACATGTACATCCCCTTTGTTTGG
Cup	pRV13 stammer fra Lactobacillus	Cu_fwd	AAGAGCTCTAGTCGAAGATTTTATGAAAG
		Cu_rev	AACACATGTGTTCCACCACCTTTTCC
pBM69ori	MGA3 <i>B. methanolicus</i> genomisk DNA	69-ori_Fwd	TATAGGCAGCATAACCTTC
		69-ori_rev	CGGCAACAAATGATATCTC

Primere levert av Eurofins MWG Operon ble løst opp i ionefritt H₂O til en konsentrasjon på 100 pmol/μl (volum ionefritt H₂O for å oppnå bestemt konsentrasjon var oppgitt av produsenten). Deretter ble det laget en arbeidsløsning av hver primer med en konsentrasjon på 20 pmol/μl. Det ble også laget en dNTP (Roche) stokkløsning med en endelig konsentrasjon på 10 mM av hvert nukleotid. For hver PCR ble det satt opp en mastermiks med totalvolum på 49,25 μl, vist i tabell 2.4.

Tabell 2.4 Mastermiks for PCR

Innhold	Volum [μl]	Referanse
10x Expand High Fidelity Buffer with 15 mM MgCl ₂	5	Roche
Forward primer (20 pmol/μl)	1	Eurofins
Reverse primer (20 pmol/μl)	1	Eurofins
dNTP stokkløsning (10 mM)	1	
Templat DNA (0,1-250 ng)	0,5-2	
Ionefritt H ₂ O	49,25 – (5+1+1+1+templat DNA)	

Mastermiksen ble preparert på is, satt i PCR maskinen og programmet ble startet. 0,75 μl av enzymet Expand High Fidelity Enzyme Mix ble tilsatt etter initiell denaturering. Se nærmere beskrivelse av PCR programmet i tabell 2.5. For å verifisere om PCR var vellykket ble 5 μl av prøven blandet med 1 μl loading dye (Fermentas) og analysert ved agarose-

gelelektroforese. Dersom gelen viste kun ett bånd i riktig størrelse var PCR vellykket. Fragmentet kunne isoleres fra gel (kapittel 2.2.6) eller direkte fra prøven ved hjelp av QIAquick PCR Purification Kit i henhold til produsentens protokoll.

Tabell 2.5 Oversikt over generelt PCR program. Stegene denaturering-annealing-elongasjon ble gjentatt 35 ganger.

Beskrivelse	Temperatur [°C]	Tid	Kommentar
Initiell denaturering	94	3 min.	
Hold	80		0,75 µl Expand High Fidelity Enzyme Mix tilsatt
Denaturering	94	40 sek.	
Primer binding	Ca. $T_m - 10$	1 min.	Bestemmes ut fra smeltepunkt til templatet og primerne, avhenger av G/C ratio.
DNA syntese	72	Ca. 2 min.	2 minutter opp til 3 kb, tid økes dersom templatet er lengre.
DNA syntese	72	10 min.	Siste syntesesteg
Oppbevaring	4	-	Prøven holdes stabil ved gitt temperatur.

35x

Rensing av PCR produkt

Som nevnt ble PCR produktene enten rensset fra gel eller ved hjelp av QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Her er protokollen for rensing av PCR-produktet direkte fra prøven.

1. Det ble tilsatt 5 volumenheter PB buffer til 1 volumenet PCR-løsning.
2. Løsningen ble overført til en spinnkolonne og sentrifugert ved 13000 rpm i ett minutt. Filtratet ble kastet.
3. Kolonnen ble vasket ved 750 µl PE buffer, sentrifugert ved samme betingelser og filtratet ble kastet.
4. Den tomme spinnkolonnen ble sentrifugert på nytt ved samme betingelser, og kolonnen ble overført til et sterilt eppendorfrør.
5. DNA ble eluert med 20-50 µl ionefritt vann og sentrifugering (samme betingelser som steg 2). Prøven ble lagret ved -20 °C.

2.2.6 Ekstraksjon av DNA fra gel

Kuttet DNA eller DNA fra PCR ble separert ved hjelp av agarose-gelelektroforese og aktuelle fragmenter ble skåret ut av gelen for så og renses. Rensingen ble utført ved hjelp av QIAquick Gel Extraction Kit i følge produsentens (QIAGEN) protokoll:

1. DNA-fragment ble skjært ut av gelen og overført til et sterilt eppendorfrør.
2. Det ble tilsatt 500 µl QG buffer. Prøven ble inkubert ved 42 °C til gelen var oppløst.
3. 100 µl isopropanol ble tilsatt, og prøven ble overført til en spinnkolonne.
4. Spinnkolonna med prøven ble sentrifugert ved 13000 rpm i ett minutt. Filtratet ble kastet.
5. 500 µl QG buffer ble tilsatt spinnkolonna, prøven ble sentrifugert ved 13000 rpm i ett minutt, og filtratet ble kastet.
6. For å vaske kolonna ble det tilsatt 750 µl PE buffer, prøven ble sentrifugert som tidligere og filtratet kastet. Deretter den tomme spinnkolonna sentrifugert på nytt ved samme betingelser, og kolonna ble overført til et sterilt eppendorfrør.
7. DNA ble eluert ved å tilsette 20-50 µl ionefritt vann, deretter sentrifugert ved samme betingelser som i steg 4.

Konsentrasjon ble bestemt av Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Saveen & Werner) og prøven ble lagret ved -20 °C.

2.2.7 Ligerings

Det siste steget i konstruksjon av plasmidene var ligering av vektorfragment med isolert insert (promotor- eller reporter gen renses fra PCR-miks eller gel). Ligeringsreaksjonen ble katalysert av enzymet T4 DNA ligase (New England Biolabs). Enzymet finnes naturlig i bakterier og katalyserer dannelsen av fosfodiesterbindinger slik at fragmenter "limes" sammen (Klug et al., 2009). Det molare forholdet mellom vektorfragmentet og insert i ligeringsmiksen skal optimalt være 1:3. Den generelle ligeringsmiksen benyttet i denne oppgaven hadde et totalt volum på 20 µl og er vist i tabell 2.6. Miksene ble inokulert ved 4 °C over natt.

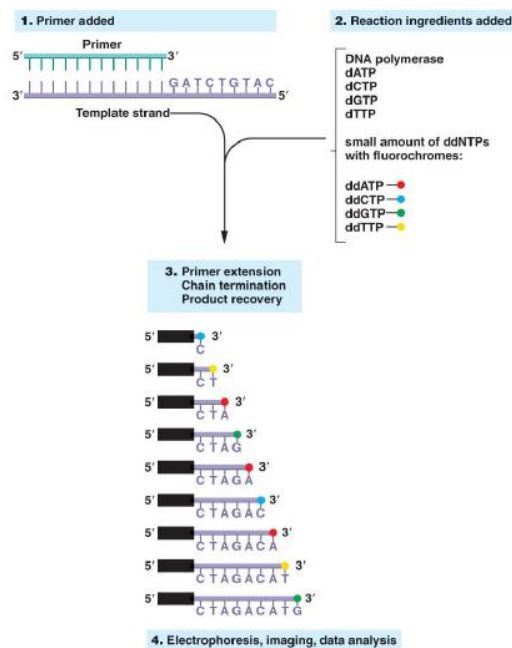
Tabell 2.6 Generell ligeringsmiks for konstruksjon av plasmid

Innhold	Mengde [μ l]	Referanse
T4 DNA ligase reaction buffer 10x	2	New England Biolabs
Vektorfragment DNA	x^1	
Insert DNA	y^1	
Ionefritt H ₂ O	$20-(x+y+3)$	
T4 DNA ligase	1	New England Biolabs

1) Mengde bestemt av konsentrasjonene: $x:y = 1:3$.

2.2.8 Sekvensering

Alle PCR produktene generert i denne oppgaven ble ligert inn i den generelle kloningsvektoren pGEM-T (se tabell 2.1) og sendt til sekvensering. Sekvenseringen ble utført av Eurofins MWG Operon. For hver sekvensering ble det preparert prøver med ca. 100 ng/ μ l plasmid løst i ionefritt vann og med et totalt volum på 15 μ l. Metoden for sekvensering kalles sanger-sekvensering og første steg er denaturering av DNA for å oppnå enkelttrådet DNA. Deretter tilsettes primere (som binder seg til komplementær sekvens i 3'-enden av DNA), DNA-polymerase og de fire deoksyribonukleotidene (Klug et al., 2009). I tillegg tilsettes det en analog til hver av deoksynukleotidene som kalles dideoksynukleotid. Denne har en –H i stede for –OH og hindrer at det kan dannes en binding til det neste deoksynukleotidet, som dermed stopper videre DNA syntese. Dideoksynukleotidene er merket med hver sin fluorescerende farge og gjør det derfor mulig å bestemme basen ved hver ende og til slutt oppnå hele sekvensen (Klug et al., 2009). En oppsummering av metoden vises i figur 2.5.



Figur 2.5 Beskrivelse av metoden for sekvensering av DNA ved metoden Sanger-sekvensering (Klug et al., 2009)

2.3 Konstruksjon av aktuelle plasmider

2.3.1 pTH1mdhp-lacZ

pTH1mp-lysC og pGEM-T-lacZ ble produsert i *E. coli* ved dyrking. Plasmidene ble isolert og kuttet med enzymene PciI og EcoRI. Dette ga opphav til vektorfragmentet pTH1mp (5813 bp) og reportergenene lacZ (2002 bp) som ble isolert fra gel og ligert sammen for å gi vektoren pTH1mdhp-lacZ. *E. coli* ble transformert med pTH1mdhp-lacZ og kandidater ble verifisert ved restriksjonsanalyse.

2.3.2 pTH1pfkp-lacZ

pTH1pfkp-yclM og pGEM-T-lacZ ble produsert i *E. coli* ved dyrking. Plasmidene ble isolert og kuttet med enzymene PciI og EcoRI for å få vektorfragmentet pTH1pfp (5426 bp) og reportergenene lacZ (2002 bp). Fragmentene ble isolert fra gel og ligert sammen. *E. coli* ble transformert med ligeringsmiksen og kandidat med riktig kuttemønster ble lagret ved -80 °C.

2.3.3 pTH1mdh2p-lacZ

Promotoren *mdh2p* (470 bp) ble amplifisert ved PCR med genomisk DNA fra *B. methanolicus* MGA3 som templat. Primere som ble benyttet er vist i tabell 2.3. PCR-produktet ble ligert inn i den lineariserte vektoren pGEM-T (3001 bp), og sendt til sekvensering. PCR-produktet *mdh2p* og vektoren pTH1mcs-lacZ (Heggeset, 2011) ble kuttet med enzymene PciI og BamHI og isolert fra gel. Fragmentene (458 bp og 6496 bp) ble ligert sammen og *E. coli* DH5 α ble transformert. Kandidater ble analysert ved kutting av restriksjonsenzymer.

2.3.4 pGEM-T-mdh3p

Promotoren *mdh3p* (655 bp) ble amplifisert ved PCR med genomisk DNA fra *B. methanolicus* MGA3 som templat. Primerne benyttet er vist i tabell 2.3. PCR fragmentet ble ligert inn i pGEM-T og sendt til sekvensering. PCR-produktet *mdh3p* og pTH1mcs-lacZ ble kuttet med enzymene PciI og SacI, fragmentene (647 og 6512 bp) ble isolert fra gel og ligert sammen. *E. coli* ble transformert med ligeringsmiksen og kandidater ble undersøkt. Det lyktes ikke å finne riktige kandidater for pTH1mdh3p-lacZ på grunn av tidsbegrensning. pGEM-T-mdh3p ble lagret ved -80 °C.

2.3.5 pGEM-T-actp

Promotoren *actp* ble amplifisert fra genomisk DNA fra *B. methanolicus* MGA3 med primerne *actp_fwd* og *actp_rev* vist i tabell 2.3. PCR-fragmentet (242 bp) ble ligert inn i pGEM-T og sendt til sekvensering. Vektoren pTH1mcs-lacZ og PCR-produktet ble kuttet med enzymene XbaI og PciI. Fragmentene (6518 bp og 233 bp) ble isolert fra gel og ligert sammen. Ligeringsmiksen ble transformert inn i *E. coli* og kandidater ble undersøkt. Det lyktes ikke å finne riktige kandidater for pTH1actp-lacZ på grunn av tidsbegrensning. pGEM-T-actp ble lagret ved -80 °C.

2.3.6 pTH1Cup-lacZ

Kobberpromotoren *Cup* stammer fra *Lactobacillus sakei* (Crutz-Le Coq and Zagorec, 2008) og er nærmere beskrevet i kapittel 1.4. Promotoren ble amplifisert ved PCR med primere vist i tabell 2.3 og plasmidet pRV613 (figur 1.4.) som templat. PCR-produktet (705 bp) ble ligert inn i vektoren pGEM-T og sekvensert. PCR-produktet *Cup* og pTH1mcs-lacZ ble kuttet med

enzymene SacI og PciI. Fragmentene (694 bp og 6512 bp) ble isolert fra gel, ligert sammen og *E. coli* ble transformert med ligeringsmiksen. Riktig kandidat ble lagret ved -80 °C.

2.3.7 pGEM-T-pBM69ori

Det potensielle replikasjonssetet ble amplifisert fra genomisk DNA av *B. methanolicus* MGA3 med primerne vist i tabell 2.3. PCR-produktet på 3377 bp ble analysert og ligert inn i pGEM-T. Vektoren ble sendt til sekvensering.

2.4 Transformasjon av *B. methanolicus*

B. methanolicus transformeres ved hjelp av en fysisk teknikk kalt elektroporering. Dette er en metode som ofte benyttes på organismer som er vanskelig å transformere (Madigan et al., 2009). Prinsippet er å føre en kort elektrisk puls med høy volt gjennom løsningen bestående av celler og DNA. Den elektriske pulsen skaper porer i cellemembranen slik at DNA kan taes opp gjennom disse (Madigan et al., 2009). Den benyttede protokollen for transformasjon av *B. methanolicus* i denne oppgaven er utarbeidet av Jakobsen et. al (Jakobsen et al., 2006).

2.4.1 Elektrokompetente *B. methanolicus*

200 µl av *B. methanolicus* MGA3 stokkløsning ble inokulert i 100 ml SOBSuc medium uten tilsatt antibiotika. Kulturen ble inkubert i risteinkubator ved 200 rpm og 50 °C i ca. 16 timer (over natt). Neste dag ble kulturen reinokulert i 100 ml SOBSuc medium til $OD_{600} = 0,05$. Kulturen ble inkubert videre ved samme betingelser til OD_{600} målte ca. 0,25 (maks 0,4). Da ønsket OD_{600} var nådd ble kulturen overført til 50 ml plastrør (to rør) og sentrifugert i 10 minutter ved 5000 rpm og 25 °C. Supernatanten ble kastet og cellene i hvert rør ble resuspendert i 4,5 ml EPB (tabell 2.14) og deretter kombinert i ett rør. Løsningen ble sentrifugert i 10 minutter ved 5000 rpm og 25 °C. Igjen ble supernatanten kastet, cellene resuspendert i 9 ml EPB og sentrifugert ved samme betingelser som tidligere. Nesten all supernatant ble helt av og cellene resuspendert i den gjenværende supernatanten (ca. 1 ml). Cellene ble fordelt i sterile eppendorfrør (100 µl), snappfryst med etanol og tørris, deretter lagret ved -80 °C.

2.4.2 Transformasjon av *B. methanolicus*

Rør med elektrokompetente *B. methanolicus* ble tint på is og tilsatt ca 1 µg av aktuelt plasmid (plasmid ble isolert ved hjelp av midiprep (kapittel 2.2.2) for å oppnå høy konsentrasjon). Blandingen ble inkubert på is i 15-40 minutter. Deretter ble prøven overført til en iskald elektroporeringskyvette (0,2 cm, Bio-Rad Laboratories) og elektroporert med en elektrisk puls (200Ω; 25 µF; 2,5 kV). Fra et 50 ml rør med 5 ml SOBSuc (tabell 2.13) uten antibiotika ble 1 ml overført til kyvetten med de elektroporete cellene. Løsningen i kyvetten ble blandet ved pipettering og overført tilbake til 50 ml røret. Cellene ble så inkubert i risteinkubator i ca 16 timer. Neste dag ble kulturen (5 ml) overført til 100 ml forvarmet SOBSuc tilsatt kloramfenikol (5 µg/ml). Etter inkubering i 6 timer ble det platet ut 100 µl ukonsentrert og 100 µl konsentrert kultur (1,5 ml kultur konsentrert ved sentrifugering) på regenerasjonsplater (tabell 2.19) med 5 µg/ml kloramfenikol. Platene ble inkubert i varmeskap over natt. Single kolonier fra platen ble plukket og overført til 100 ml MvCM medium med 30 mM MeOH, kloramfenikol (5 µg/ml) og standard stokkløsninger (se kapittel 2.1). Etter 6-8 timers vekst ble konsentrasjonen av metanol i mediet økt til 200 mM og inkuberingen fortsatte over natt. Kulturen ble reinokulert i forvarmet MvCM medium med kloramfenikol (5 µg/ml) 100 µl spormetaller (tabell 2.17), 100 µl vitaminløsning (tabell 2.18), 100 µl MgSO₄ (1 M) og 200 mM metanol, deretter dyrket til OD₆₀₀=1. 20 ml kultur ble blandet med 4 ml glyserol (87 %) og lagret i cryorør ved -80 °C.

2.5 Etablering av enzymassay

2.5.1 Preparering av celleekstrakt

B. methanolicus celler med aktuelt plasmid ble dyrket i MvCM (200 mM MeOH) medium til OD₆₀₀=1,5. 50 ml kultur ble sentrifugert ved 5000 x g i 10 minutter ved 4 °C, supernatanten ble kastet og cellene ble resuspendert i 5 ml kalium fosfat buffer (100 mM, pH 7,0, tabell 2.22). Cellene ble deretter sonikert på is i 10-15 minutter (Branson Sonifier 250, output control=3 og duty cycle=30 %). Sonikering er en metode hvor ultralyd benyttes for å ødelegge cellevegg og cellemembran slik at cellens indre komponenter havner i løsningen (Brown and Audet, 2008). Celledebris ble fjernet ved sentrifugering ved 8500 rpm, 4 °C i 45 minutter. Celleekstraktet (supernatanten) ble samlet i et sterilt rør. Videre fulgte bestemmelse av proteinkonsentrasjon i celleekstraktet og bestemmelse av aktivitet for enzymet β-galaktosidase.

2.5.2 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon

Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved Bio-Rad Protein Assay, som er basert på en metode av Bradford (Bio-Rad Laboratories, 2011). Prinsippet for bestemmelsen av proteinkonsentrasjonen er at et fargestoff endrer farge ved ulike konsentrasjoner av protein. Fargestoffet som benyttes er Coomassie® Brilliant Blue G-250 dye, hvor maks målbar absorbans skifter fra 465 nm til 595 nm når fargestoffet binder seg til protein. Konsentrasjonen er proporsjonal med absorbansen (Bio-Rad Laboratories, 2011).

En standardkurve ble etablert ved bruk av proteinet bovine serum albumin (BSA, New England Biolabs). Fire fortyninger med kjent konsentrasjon ble preparert. En kyvette (1 ml) ble tilsatt 800 μ l fortynt BSA-løsning og 200 μ l fargereagens Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) deretter blandet ved vortex. Prøven ble inkubert ved romtemperatur i ca 10 minutter før absorbansen ved 595 nm ble målt i et spektrofotometer (Perkin Elmer Lambda 35). Med utgangspunkt i standardkurven ble proteinkonsentrasjon i celleekstraktprøvene bestemt (800 μ l fortynt celleekstrakt og 200 μ l fargereagens). BSA-løsningen og celleekstraktene var begge løst i kalium-fosfat buffer (100 mM, pH 7,0, tabell 2.22). Måling av proteinkonsentrasjon ble utført i triplikater. Standardkurve og regneeksempel for bestemmelse av proteinkonsentrasjon er vist i vedlegg 1.

2.5.3 Enzymassay for β -galaktosidase

Enzymaktiviteten for β -galaktosidase ble bestemt ved en modifisert metode fra Sigma Aldrich (Enzymatic assay of β -galaktosidase EC 3.2.1.23). Prinsippet for metoden er at enzymet β -galaktosidase katalyserer hydrolyse av substratet o-nitrophenyl- β -D-galaktopyranoside (ONPG) til galaktose og o-nitrophenol (ONP) (se figur V6.1 i vedlegg 6). ONP gir opphav til gul farge i løsningen som kan måles spektrofotometrisk. Løsninger som ble benyttet i dette assayet er 100 mM kalium fosfat buffer (se tabell 2.22) (pH 7,0), 68 mM ONPG, 30 mM $MgCl_2$ og celleekstrakt. Tabell 2.7 viser volum av de ulike løsningene tilsatt til kyvetten for hver måling. Det ble benyttet 1 ml kyvetter.

Tabell 2.7 Mastermiks for bestemmelse av enzymaktivitet. Tabellen viser volum av de aktuelle løsningene som ble benyttet i dette assayet.

Løsning	Prøve volum [μ l]	Blank u/ONP-G volum [μ l]	Blank u/enzym volum [μ l]
Kalium fosfat buffer 100 mM	850	875	950
MgCl ₂ 30 mM	25	25	25
Enzymløsning / celleekstrakt	100	100	-
ONP-G	25	-	25

For hver prøve ble det målt kinetikk i 3 eller 6 minutter med bølgelende 410 nm i programmet SoftMax Pro 4.7.1 koblet til spektrofotometeret SpectraMax PLUS 384 (Molecular Devices). Dersom ikke annet er oppgitt ble prøvene inkubert i fem minutter ved 50 °C. Temperaturen i inkubatoren til kyvetten i spektrofotometeret var satt til 45 °C (maks temperatur) hvor kyvetten med reagensene oppgitt i tabell 2.7 utenom enzymet også ble inkubert i fem minutter. Målinger ble utført i triplikater.

2.5.4 Optimalisering av assay

Det ble undersøkt ulike betingelser for enzymet og assayet. For optimalisering av assay ble celleekstrakt fra *B. methanolicus* med plasmidet pTH1mdhp-lacZ benyttet på grunn av promotorens styrke og dermed høy konsentrasjon av β -galaktosidase.

Assay ved ulik pH

Kalium fosfat buffer (tabell 2.22) med ulik pH ble benyttet for å bestemme optimal pH for assayet. Celleekstrakt ble preparert som beskrevet i kapittel 2.5.1 men buffer med ulik pH ble tilsatt i kyvetten. Følgende pH verdiene ble testet; 6,5, 7,0, 7,5 og 8,0.

Assay med preinkubering ved ulik temperatur og tid

Ettersom *lacZ* genet stammer fra en termotolerant bakterie *Bacillus coagulans* (Kovacs et al., 2010) ble det undersøkt om preinkubering av enzymet ved ulik temperatur og tid påvirket aktiviteten. Celleekstrakt fra *B. methanolicus* med plasmidet pTH1mdhp-lacZ ble benyttet. Som en forundersøkelse ble enzym preinkubert i fem minutter ved temperaturene 45 °C, 50 °C, 55 °C og 60 °C og kyvetten med alt bortsett fra enzymet (se tabell 2.7) ble inkubert i spektrofotometeret ved 45 °C i 5 minutter. Deretter ble enzymet tilsatt kyvetten og det ble kjørt kinetikk i 3 minutter ved 410 nm. For å undersøke stabiliteten til enzymet ble enzym

inkubert ved de samme temperaturene, men i ulik tid før det ble kjørt kinetikk i 3 minutter ved 410 nm. Følgende preinkuberingstider ble undersøkt; ingen preinkubering, 1 minutt, 5 minutter, 15 minutter, 30 minutter og 60 minutter. Alle målingene ble utført i triplikater.

Bestemmelse av enzymaktivitet Units/ml enzym

Dataene fra kinetikkanalysen ble bearbeidet i Excel. Stigningstallet ble bestemt og enzymaktiviteten ble beregnet ut fra følgende likning;

$$U / ml \text{ enzym} = \frac{(\Delta A_{410nm} / \text{min prøve} - \Delta A_{410nm} / \text{min blank}) \times V_{tot} \times (df)}{\epsilon \times V_{enz}} \quad (1)$$

U = Mengde enzym nødvendig for å katalysere hydrolyse av 1,0 μmol o-nitrophenyl- β -D galaktopyranosid til o-nitrophenol og D-galaktose.

V_{tot} = Totalt volum i kyvetten [ml], for hver måling var denne verdien 1 ml

(df) = Fortynningsfaktor

ϵ = millimolar ekstinksjonskoeffisient for ONP ved 410 nm, denne verdien er bestemt av Sigma.

Verdien er 3,5.

V_{enz} = Volum enzym i kyvetten [ml], for hver måling var denne verdien 0,1 ml.

Spesifikk enzymaktivitet ble også bestemt:

$$U / mg \text{ protein} = \frac{U / ml \text{ enzym}}{mg \text{ protein} / ml \text{ enzym}} \quad (2)$$

I likning (2) er konsentrasjonen [mg protein/ml enzym] bestemt etter prosedyren beskrevet i kapittel 2.5.2.

Nærmere beskrivelse av likningen for beregning av enzymaktivitet er vist i vedlegg 6.

2.6 Medier og løsninger

Alle vekstmedier og agarmedium ble autoklavert. Antibiotika ble steriltfiltrert og tilsatt i gitte konsentrasjoner etter autoklaving og avkjøling til ca 50 °C.

2.6.1 Medier og løsninger til *E. coli*

Tabell 2.8 Luria-Bertani medium, vekstmedium for *E. coli*.

Innhold	Mengde [g/L]	Referanse
Trypton	10	Difco
Gjærekstrakt	5	OXOID
NaCl	5	BDH AnalaR

Tabell 2.9 Luria-Bertani agar medium, agarplater for *E. coli*.

Innhold	Mengde [g/L]	Referanse
Trypton	10	Difco
Gjærekstrakt	5	OXOID
NaCl	5	BDH AnalaR
Agar	15	Difco

Tabell 2.10 RB-medium, benyttet ved tillaging av kjemisk kompetente celler av *E. coli* DH5 α .

Innhold	Mengde	Referanse
Trypton	10 g/l	Difco
Gjærekstrakt	5 g/l	OXOID
NaCl	5 g/l	BDH AnalaR
NaOH 1 N	2 ml/l	
MgSO ₄	20 mM	Sigma Aldrich

Tabell 2.11 TFB1 benyttet ved tillaging av kompetente *E. coli* DH5 α

Innhold	Mengde [g/L]	Referanse
Kac	2,94	Merck
RbCl	12,1	Sigma Aldrich
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,945	Merck
MnCl ₂ ·4H ₂ O	15,73	Riedel De Haen
Glyserol	150	VWR
pH justert til 5,8 med eddiksyre		

Tabell 2.12 TFB2 benyttet ved tillaging av kompetente *E. coli* DH5 α

Innhold	Mengde [g/L]	Referanse
MOPS	2,1	Applichem
CaCl ₂ ·2H ₂ O	11,0	Merck
RbCl	1,21	Sigma Aldrich
Glyserol	150	VWR
pH justert til 6,5 med fortennet KOH		

2.6.2 Medier og løsninger til *B. methanolicus***Tabell 2.13** SOB_{suc} medium, vekstmedium for *B. methanolicus*.

Innhold	Mengde [g/L]	Referanse
SOB	28	Difco
Sukrose	85	VWR
pH justert til 7,2 ved HCl eller NaOH		

Tabell 2.14 EPB løsning for tillaging av kompetente *B. methanolicus*

Innhold	Mengde [g/L]	Referanse
HEPES	0,42	Applichem
PEG 8000	250	Merck
pH justert til 7		

Tabell 2.15 MvCM high salt buffer 10x, til vekstmediet MvCM medium for *B. methanolicus*.

Innhold	Mengde [g/L]	Referanse
K ₂ HPO ₄	40,93	Sigma-Aldrich
NaH ₂ PO ₄	12,96	MERCK
(NH ₄) ₂ SO ₄	21,14	Sigma-Aldrich
pH justert til 7,2		

Tabell 2.16 Hovedkomponenter til MvCM medium, vekstmedium til *B. methanolicus*.

Innhold	Mengde [g/L]	Mengde [ml/L]	Referanse
MvCM high salt buffer 10x		100	Tabell 2.15.
Gjærekstrakt	0,25		OXOID
Ionefritt vann		890	
pH justert til 7,2 med HCl eller NaOH. 100 ml medium fordelt i 500 ml risteflasker.			

Ved transformasjon: Før inokulering av *B. methanolicus* i MvCM medium ble 100 ml MvCM medium tilsatt følgende: 100 µl MgSO₄ (1,0M, sterilfiltrert), 100 µl spormetaller (tabell 2.17), 100 µl komplett vitamin løsning (tabell 2.18), 5 µg/ml kloramfenikol og 121,5 µl metanol. Etter 6 timers vekst av *B. methanolicus* ble det tilsatt 689,5 µl metanol for å gi den endelige metanolkonsentrasjonen på 200 mM.

Tabell 2.17 Spormetaller, 1000x til MvCM medium for *B. methanolicus*.

Innhold	Mengde [g/L]	Referanse
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,56	Riedel-de-Haën
CuCl ₂ ·H ₂ O	0,027	MERECK
CaCl ₂ ·2H ₂ O	7,35	Riedel-de-Haën
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,04	Riedel-de-Haën
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9,90	Riedel-de-Haën
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,29	MERECK
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,047	Riedel-de-Haën
H ₃ BO ₃	0,031	MERECK
Løst i 80 ml konsentrert HCl, sterilfiltrert		

Tabell 2.18 Komplet vitaminløsning, 1000x til MvCM medium for *B. methanolicus*.

Innhold	Mengde [g/L]	Referanse
d-Biotin	0,10	Sigma-Aldrich
Thiamin·HCl	0,10	
Riboflavin	0,10	
Pyridoxin·HCl	0,10	
Pantotentat	0,10	
Niacinamid	0,10	
p-Amino benzosyre	0,02	
Folsyre	0,01	
Vitamin B12	0,01	
Liponsyre	0,01	
Løst i 80 ml konsentrert HCl, steriltfiltrert		

Tabell 2.19 Regenereringsplater til *B. methanolicus*.

Innhold	Mengde [g/L]	Referanse
Bacto Soyton	2,50	Difco
Gelatin	10,0	Difco
NaCl	2,51	Apotekerproduksjonen AS
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2,01	Riedel-de Haën
Bacto Trypton	7,50	Difco
Gjærekstrakt	1,0	Difco
Sukrose	85,6	VWR
Bacto Agar	10,0	Difco
pH justert til 6,7 ved HCl eller NaOH. Etter autoklaving ble kloramfenikol (5 µg/ml) tilsatt, og ved blå/hvit seleksjon ble 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid (X-gal) (40-60 mg/ml) tilsatt.		

2.6.3 Andre løsninger

Tabell 2.20 TAE-buffer benyttet til gelelektroforese.

Innhold	Konsentrasjon [mM]	Referanse
Tris-acetat	40,0	
EDTA	0,25	MERCK

Tabell 2.21 Agarose løsning til gelelektroforese.

Innhold	Mengde [g/l]	Referanse
TAE-buffer	100	Tabell 2.20
Agarose	0,008	LONZA
Gel Red (Biotium) tilsettes i mengden 20 eller 30 µl/400 ml		

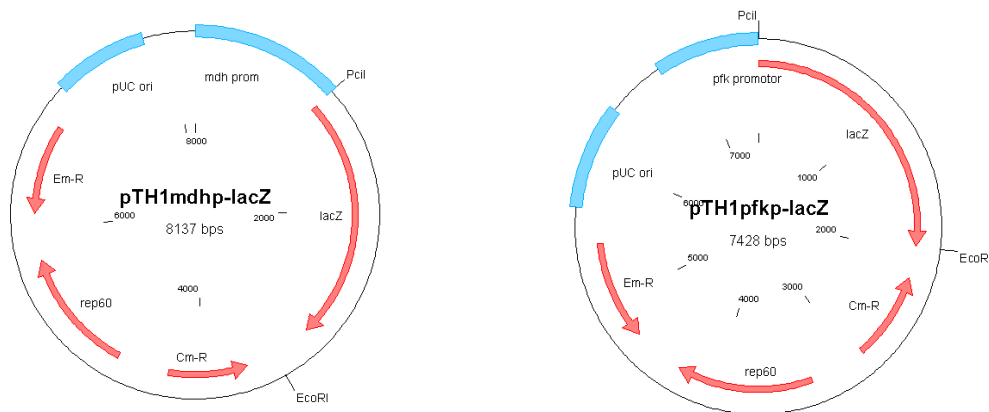
Tabell 2.22 Kalium fosfat buffer. Det lages to ulike løsninger, deretter tilsettes løsningen av KH₂PO₄ til løsningen med K₂HPO₄ til ønsket pH var oppnådd.

Innhold	Mengde [g/l]	Referanse
K ₂ HPO ₄	0,176	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	0,136	Sigma-Aldrich
Tilsett 100 mM KH ₂ PO ₄ til 100 mM K ₂ HPO ₄ til ønsket pH (6,5, 7,0, 7,5 eller 8,0)		

3. Resultater

3.1 Konstruksjon av plasmider

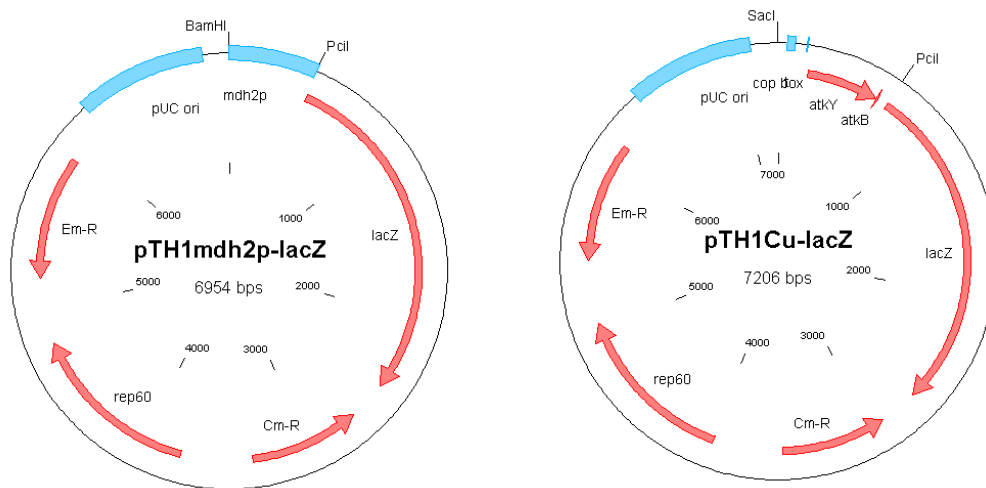
I dette prosjektet ble det konstruert plasmider for å undersøke ulike promotere i *B. methanolicus* MGA3, en uavhengig promotor fra en annen bakterie ble også undersøkt. Promotorene ble koblet opp mot et kjent reporter-gen *lacZ* som gir opphav til proteinet β -galaktosidase. Plasmidene pTH1mdhp-lysC (Brautaset et al., 2010) og pTH1pfk-yclm (Heggeset, 2011a) var tilgjengelig fra tidligere eksperimenter. I denne oppgaven ble *lysC*-genet og *yclm*-genet erstattet med *lacZ*. Transkripsjonen av *lacZ* er i disse plasmidene under kontroll av henholdsvis *mdh*-promotor og *pfk*-promotor. Oversikt over plasmidene pTH1mdhp-lacZ og pTH1pfpk-lacZ med aktuelle restriksjonssteder er vist i figur 3.1. En mer detaljert beskrivelse av konstruksjonen av disse plasmidene finnes i henholdsvis kapittel 2.3.1 og 2.3.2.



Figur 3.1: Plasmidene pTH1mdhp-lacZ (til venstre) og pTH1pfpk-lacZ (til høyre). *LacZ* genet er her kontrollert av henholdsvis promotoren til metanoldehydrogenase-genet og fosfofruktokinase-genet. Begge Promotorene er i utgangspunktet lokalisert på plasmidet pBM19 i *B. methanolicus* MGA3 (Jakobsen et al., 2006)

I tillegg til plasmidene over ble det også undersøkt promotere som ikke eksisterte i vektorer fra før, disse måtte da amplifiseres ved hjelp av PCR (tabell 2.3). For å undersøke disse Promotorene ble det konstruert en ny vektor fra pTH1mdhp-lysC. Der ble *mdh*-promotoren fjernet, multiple-cloning-site klonet inn og *lysC* ble erstattet med *lacZ*. Dette ga vektoren pTH1mcs-lacZ (Heggeset, 2011a) som videre ble benyttet som utgangspunkt for konstruksjon av nye vektorer med nye promotere (se også kapittel 1.4, figur 1.5). I denne vektoren var det mulig å ligere inn en hvilken som helst promotor som da ville være koblet

opp mot *lacZ*. Ved konstruksjon av vektorene pTH1mdh2p-*lacZ* og pTH1Cup-*lacZ* ble promotorregionene mdh2p og Cup først amplifisert ved PCR og ligert inn i vektoren pGEM-T for sekvensering. Deretter ble Promotorene klonet inn i pTH1mcs-*lacZ* (se kapittel 2.3.3 og 2.3.4). pTH1mdh2p-*lacZ* og pTH1Cup-*lacZ* ble senere introdusert i *B. methanolicus*. Promotornemdh3p og actp ble også amplifisert ved hjelp av PCR. PCR-produktene ble klonet inn i vektoren pGEM-T og sekvensert. Promotorregionene ble klonet inn i promotor-probevektoren pTH1mcs-*lacZ*, men på grunn av tidsbegrensning ble det ikke identifisert riktige kandidater av henholdsvis pTH1mdh3p-*lacZ* og pTH1actp-*lacZ*. pGEM-T-mdh3p og pGEM-T-actp med riktig sekvens ble lagret. Oversikt over de konstruerte plasmidene pTH1mdh2p-*lacZ* og pTH1Cu-*lacZ* er vist i figur 3.2.

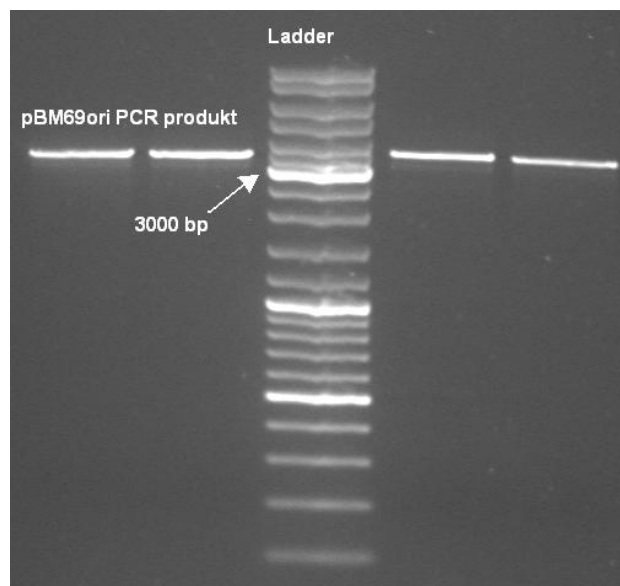


Figur 3.2: Plasmidene pTH1mdh2p-*lacZ* (til venstre) og pTH1Cu-*lacZ* (til høyre). *LacZ*-genet er kontrollert av henholdsvis den potensielle promotoren til metanoldehydrogenase2-genet lokalisert på kromosomet til *B. methanolicus* MGA3 og kobberpromotoren som stammer fra *Lactobacillus sakei*. Vektorene ble senere introdusert i *B. methanolicus*.

3.2 Replikasjonsproteinet til pBM69

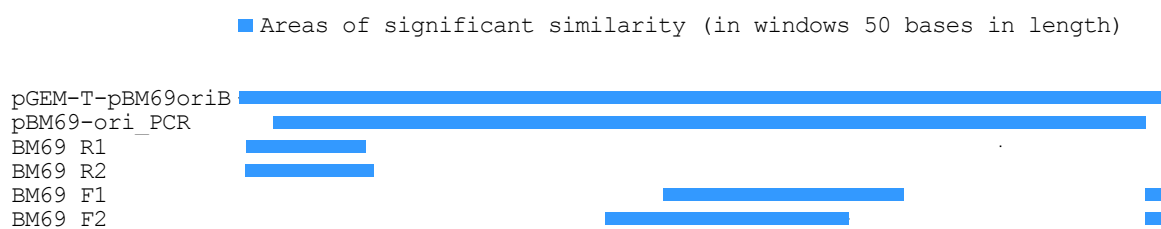
Replikasjonsproteinet til det potensielle megaplasmidet pBM69 i *B. methanolicus* MGA3 ble undersøkt i denne oppgaven. pBM69ori ble amplifisert ved PCR (se tabell 2.3) fra *B. methanolicus* MGA3 genomisk DNA og ligert inn i vektoren pGEM-T. Analyse av PCR-produktet ble utført ved hjelp av agarose-gelelektroforese. Erfaring med agarose-gelelektroforese (tilsatt Gelred for visualisering) her ved laboratoriet på NTNU har vist at ladderens vandrer raskere i gelen sammenlignet med prøvene. Årsaken for dette er uvisst. Figur 3.3 viser bilde av PCR-produktet pBM69ori i ulike fortyninger. Størrelsen på båndene til størrelsesmarkøren er vist i figur 2.3. De to størrelsesmarkørbåndene over 3000 bp tilsvarer

3500 bp og 4000 bp. Med informasjonen om ulik gelvandringshastighet mellom prøve og ladder, viste det seg at størrelsen på PCR-produktet for pBM69ori samsvarte med den forventede størrelsen på 3377 bp. PCR-produktet pBM69ori ble ligert inn i den lineariserte vektoren pGEM-T og sendt til sekvensering.



Figur 3.3. Bilde av PCR-produktet pBM69ori analysert ved agarose-gелеlektroforese. PCR-produktet har en teoretisk størrelse på 3377 bp. Men erfaring har vist at ladder (GeneRuler™ DNA Ladder mix, Thermo Science) vandrer raskere i gelen i sammenlignet med prøven, resultatet er derfor tilfredsstillende. De to båndene over 3000 bp på størrelsesmarkøren tilsvarer 3500 og 4000 bp (vist i figur 2.3). De to andre sterke båndene i ladder tilsvarer 500 bp og 1000 bp. De fire båndene som tilsvarer PCR-produktet er ulike fortyninger av samme prøve.

Sekvenseringsresultater av pBM69ori viste derimot at fragmentet var mer enn 1000 bp for kort. Dette kan skyldes ustabil DNA. Sekvensen for origin of replication (ori) inneholder direkte og indirekte repeterende sekvenser. Disse sekvensene kan gjøre DNA ustabil og deler av DNA kan slettes ved å rekombinere i *E. coli*. Dermed er det fortsatt uvisst om det antatte plasmidet pBM69 faktisk er et plasmid. Figur 3.4 viser en illustrasjon av sekvenseringsresultatet. Primerne som ble benyttet for sekvensering av produktet binder seg til vektordelen av plasmidet før sekvensering starter (binder seg til pGEM-T-delen) slik at det vil være overlapp mellom vektoren og PCR-produktet i sekvenseringsresultatet.



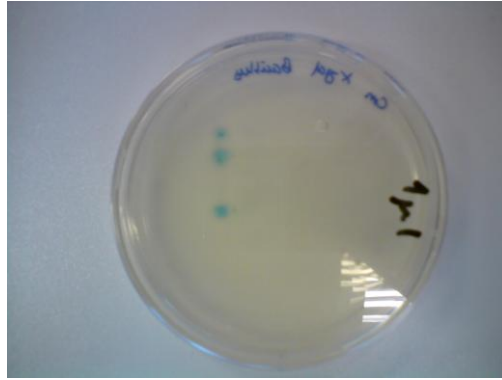
Figur 3.4 Sammenligning av vektoren med PCR-produktet (øverst), etterfulgt av det teoretiske PCR produktet og sekvenseringsfilene R1, R2, F1 og F2 fra Eurofins. Sekvensene er sammenlignet i Clone Manager. Som det kommer fram i figuren er sekvenseringsresultatene kortere enn den teoretiske sekvensen, altså var det sekvenserte PCR-produktet ca 1000 bp for kort. Alignment av sekvenseringsresultatet og pGEM-T-pBM69ori er vist i vedlegg 7.

Figur 3.4 viser at sekvensen etter sekvensering er for kort. Det mangler to store områder i sekvensen. Sammenligningen av sekvensene kan studeres videre i vedlegg 7.

3.3 Transformasjon av *B. methanolicus*

B. methanolicus MGA3 ble transformert med de konstruerte plasmidene pTH1mdhp-lacZ, pTH1pfpk-lacZ, pTH1mdh2p-lacZ og pTH1Cup-lacZ. Som en indikasjon på om *lacZ* genet var aktivt i cellene, ble den selektive SOBsuc kulturen med transformerte celler (se kapittel 2.4.2) platet ut på regenererasjonsplater som var tilsatt 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galakopyranosid (X-gal) (60 mg/ml). Celler med aktiv β -galaktosidase ville da gi opphav til blå kolonier (se kapittel 1.3) og styrken på blåfargen vil gi en indikasjon på konsentrasjonen av β -galaktosidase i cellen.

B. methanolicus transformert med plasmidet pTH1mdhp-lacZ ga opphav til blå kolonier på regenerasjonsplatene vist i figur 3.5, mens *B. methanolicus* transformert med plasmidet pTH1pfpk-lacZ ikke ga blå kolonier (ikke vist i figur). Dette kan være et tegn på at promotoren *pfpk* er mye svakere enn promotoren *mdhp*. For å være sikker på at transformasjonen av *B. methanolicus* med pTH1pfpk-lacZ var vellykket, ble plasmid isolert fra *B. methanolicus* og deretter retransformert inn i *E. coli*. Plasmidet pTH1pfpk-lacZ som nå var retransformert inn i *E. coli* ble så verifisert ved hjelp av restriksjonsanalyse og sekvensering. Dette beviste at det plasmidet var riktig og at det ikke hadde skjedd noe med plasmidet i prosessen.



Figur 3.5: *B. methanolicus* transformert med pTH1mdhp-lacZ plattet ut på regenerasjonsplater tilsatt X-gal (60 mg/ml). Blå koloni bekrefter at β -galaktosidase finnes i cellen.

Da *B. methanolicus* ble transformert med plasmidet pTH1Cup-lacZ var det ikke tilsatt induser i det flytende mediet. Hele transformasjonsprosessen ble utført under betingelsene beskrevet i kapittel 2.4.2. Ved utplating av selektiv SOBsuc kultur på regenerasjonsplater tilsatt X-gal, ble det også plattet ut kultur på regenerasjonsplater tilsatt CuSO_4 . Figur 3.6 viser bilde av regenerasjonsplaten for *B. methanolicus* transformert med pTH1Cup-lacZ, platen er tilsatt 100 μl 0,02 M CuSO_4 (i 30 ml fast medium tilsvarer dette ca 60 μM etter diffusjon). Platen uten tilsatt induser fikk også svakt blå kolonier, noe som kan indikere at promotoren lekker. Det ble også forsøkt å inkubere celler på plater tilsatt 100 μl 0,2 M CuSO_4 , men da ble det ikke observert vekst på platen, noe som indikerer celledød pga. for høy konsentrasjon av CuSO_4 .



Figur 3.6: Regenerasjonsplate for *B. methanolicus* transformert med pTH1Cup-lacZ. Bildet viser en plate tilsatt x-gal (60 mg/ml) og 100 μl 0,02 M CuSO_4 . Her er det lett å se at koloniene har en relativt sterk blåfarge.

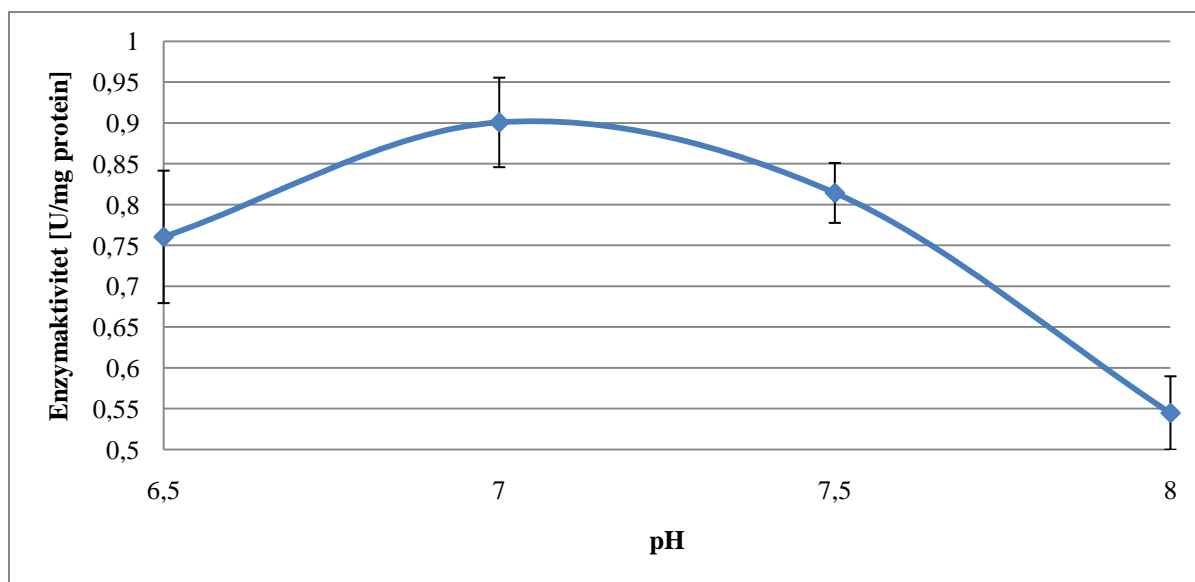
Det ble ikke observert blå kolonier for *B. methanolicus* transformert med pTH1mdh2p-lacZ.

3.4 Bestemmelse av enzymaktivitet og optimalisering av assay

3.4.1 Optimalisering av assay

For optimalisering av assay ble *B. methanolicus* transformert med pTH1mdhp-lacZ benyttet. Dette fordi metanoldehydrogenasepromotoren (mdhp) ga opphav til høy konsentrasjon av β -galaktosidase (indikert ved utplating på regenerasjonsplater tilsatt x-gal). Denne promotoren finnes naturlig i *B. methanolicus* MGA3 og er kontinuerlig på ved vekst på metanol (Brautaset et al., 2007). I alle forsøk for optimalisering av assay ble samme celleekstrakt benyttet. Mellom forsøkene var celleekstraktet lagret ved -80°C . Beregningseksempel for bestemmelse av proteinkonsentrasjon er vist i vedlegg 1. Rådata for optimalisering av assay og beregningseksempel for enzymaktivitet finnes i vedlegg 2.

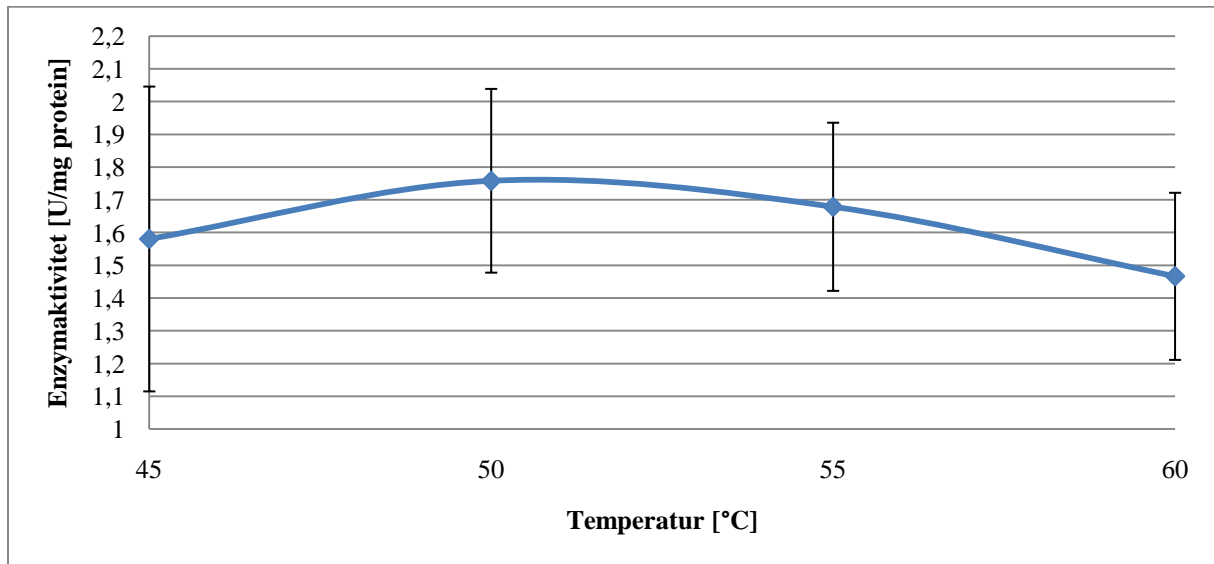
Det ble undersøkt hvilken pH som ga best aktivitet til β -galaktosidase. Forsøket ble utført som beskrevet i kapittel 2.5.3, men uten preinkubering. Alle reagenser ble oppbevart og overført til kyvetten ved romtemperatur. Selve målingen av enzymaktiviteten (3 minutter) ble utført ved 45°C . Figur 3.7 viser enzymaktivitetene ved de ulike pH verdiene som ble testet. Som figuren viser er aktiviteten stabil ved pH rundt 7. pH verdien som ble benyttet videre i alle forsøk var pH 7,0.



Figur 3.7. Beregnet enzymaktivitet for celleekstrakt fra *B. methanolicus* transformert med pTH1mdhp-lacZ ved ulike pH. Her er ikke prøvene preinkubert. pH rundt 7 ser ut til å gi høyest aktivitet. Til alle forsøk etter dette ble buffer med pH 7,0 benyttet.

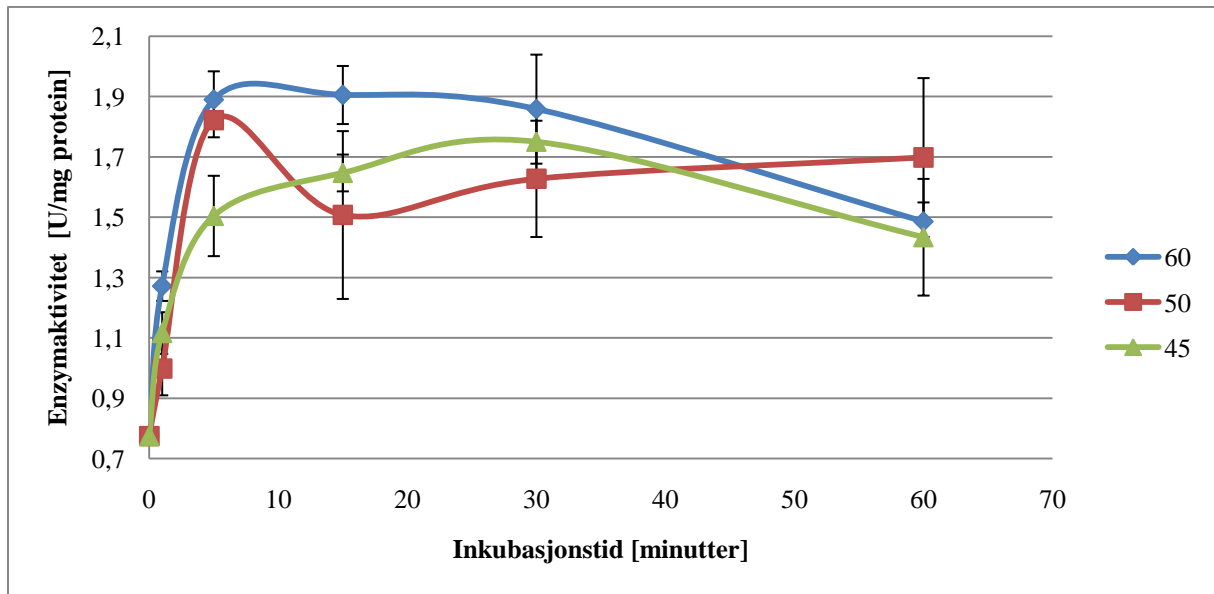
Det ble utført et forstudium for å undersøke hvordan enzymaktiviteten ble påvirket med preinkubering i fem minutter ved ulike temperatur. Etersom *lacZ*-genet stammer fra en

termotolerant bakterie var det sannsynlig at enzymet ville holde seg stabilt ved høyere temperaturer. Figur 3.8. viser hvordan enzymaktiviteten endret seg med preinkubering. Når enzymaktivitetene i figur 3.8. sammenlignes med enzymaktivitetene i figur 3.7 (forsøkene her er utført ved romtemperatur) ser en at aktiviteten stiger med nesten 1 unit. Dette viser at preinkubering øker aktiviteten til enzymet.



Figur 3.8. Forstudium for hvordan aktiviteten endrer seg ved 5 minutters preinkubering ved ulike temperaturer. Enzymet er preinkubert ved gitt temperatur, kyvette med reagenser (uten enzym) ble preinkubert ved 45 °C i 5 minutter og assayet ble også kjørt ved 45 °C. 45 °C var den maksimale temperaturen til inkubasjonskammeret i spektrofotometeret.

Da forstudiet med preinkubering viste at aktiviteten til β -galaktosidase økte med preinkubering, var det også interessant å undersøke stabiliteten til β -galaktosidase. Celleekstrakt ble preinkubert ved temperaturene 45, 50 og 60 °C og aktiviteten ble målt etter tidene; 0, 1, 5, 15, 30 og 60 minutter. Figur 3.9. viser hvordan enzymaktiviteten endrer seg ved ulike tider med preinkubering. Som tidligere indikert er det stor effekt på preinkubering relatert til ingen preinkubering. Det viste seg at enzymet holder seg relativt stabilt etter lang preinkuberingstid. Kurven for preinkubering ved 50 °C faller mellom målingen etter fem minutter og målingen etter ti minutter. Dette skyldes at løsningen med substratet ONPG hadde krystallisert seg. Krystalliseringen ble ikke oppdaget før etter målingene var utført. Målinger etter denne undersøkelsen, som da innebærer målinger for pTH1mdh2p-lacZ, pTH1pfpk-lacZ og pTH1Cup-lacZ, ble utført med preinkubering i fem minutter ved 50 °C.



Figur 3.9. Enzymaktiviteten ved ulike preinkubasjonstemperatur og tid. Målingene er utført med celleekstrakt fra *B. methanolicus* transformert med pTH1mdhp-lacZ. β -galaktosidase holder seg relativt stabilt ved inkubering over lengre tid. Den lave aktiviteten for prøven som er preinkubert ved 50 °C (10 minutter og 30 minutter) skyldes at substratløsningen med ONPG hadde krystallisert. Dette ble ikke oppdaget før etter målingene var utført. Aktivitetsmålingene etter dette forsøket (*pfkp*, *mdh2p* og *Cup*) ble utført med preinkubering i 5 minutter ved 50°C.

3.4.2 Enzymaktivitet med ulike promotere

B. methanolicus ble transformert med plasmidene oppgitt i kapittel 3.1. Hver kultur ble dyrket over natt i MvCM medium tilsatt 200 mM metanol. Over nattkulturen ble reinokulert i MvCM (200 mM metanol) og 50 ml kultur ble høstet ved $OD_{600} \approx 1,5$. Proteinkonsentrasjonen til celleekstraktet ble bestemt som beskrevet i kapittel 2.5.2 før det ble kjørt enzymassay for bestemmelse av enzymaktiviteten. Enzymaktiviteten bestemmes av konsentrasjonen av β -galaktosidase i celleekstraktet og konsentrasjonen av β -galaktosidase indikerer styrken på promotoren.

Promotornemdh2p og pfpk

Fra *B. methanolicus* MGA3 ble det klonet et segment på 470 bp oppstrøms til det potensielle metanoldehydrogenase-genet *mdh2* lokalisert på kromosomalt DNA. Promotoren ble koblet til reporter-genet *lacZ* og ga vektoren pTH1mdh2p-lacZ. Uttrykket av β -galaktosidase var nå styrt av *mdh2p*. Som en negativ kontroll ble aktiviteten fra *mdh2p*-prøven sammenlignet med aktiviteten til den negative kontrollen pHP13 (produserer ikke β -galaktosidase). *B.*

methanolicus ble transformert med *E. coli*-*B. methanolicus* shuttlevektoren pHP13, som ikke har genet *lacZ* og dermed ingen aktivitet. I tillegg ble aktiviteten undersøkt i blankprøver uten substratet ONPG og i blankprøver uten enzymløsning. Dette for å få konstatert hva som kan karakteriseres som støy. For å beregne enzymaktiviteten må en finne stigningstallet (se likning 1 i kapittel 2.5.4), som ble funnet ved hjelp av lineær regresjon i Excel. Stigningstallet for *mdh2p*-prøvene var veldig lave sammenlignet med målinger av celleekstrakt med den sterke promotoren *mdhp* (se vedlegg 3 og positiv kontroll i tabell 3.1). Faktisk var stigningstallet for *mdh2p*-prøven i samme størrelsesorden som stigningstallet for pHP13-prøven og blankprøve uten enzym. En oversikt over stigningstallene er vist i tabell 3.1. Rådata for forsøkene med *mdh2p* er vist i vedlegg 3.

Tabell 3.1. Oversikt over stigningstall for prøvene *mdh2p*, pHP13.1, pHP13.2 (alle prøvene er uforynnede) og blankprøve uten enzym. Alle aktiviteter ble målt i triplikater. Prøver med negativt stigningstall ble neglisjert. Positiv kontroll (pTH1mdhp-lacZ) ble kun målt en gang. Resultatene viser at aktiviteten målt for *mdh2p*-prøven ikke er signifikant når den sammenlignes med de negative kontrollene og blankprøvene. Se rådata i vedlegg 3.

Prøve:	Stigningstall [OD/sekund]	Standardavvik
<i>mdh2p</i>	$4 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
pHP13.1	$3 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$
pHP13.2	$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$
Uten enzym	$1,8 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-7}$
<i>Mdh2p</i> uten ONPG	$2,5 \cdot 10^{-6}$	-
Positiv kontroll mdhp	$2,78 \cdot 10^{-3}$	-

Enzymet fosfofruktokinase er viktig for metanolassimilering i *B. methanolicus*. Ved assimilering av metanol katalyserer fosfofruktokinase fosforylering av fruktose-6-forfat til fruktose-1,6-difosfat, som videre kan omgjøres til pyruvat (se figur 1.2). Da det i 2004 ble oppdaget at metylotrofi er plasmidavhengig i *B. methanolicus* MGA3 ble det kjent at *pfk*-genet også var lokalisert på det naturlige plasmidet pBM19 (Brautaset et al., 2004) og i denne oppgaven ble promotoren *pfkp* undersøkt.

Promotoren var klonet inn i en vektor ved en tidligere anledning (Heggeset, 2011a), dermed ble den allerede etablerte vektoren pTH1pfk-yclM utnyttet videre ved å erstatte genet *yclM* med *lacZ*. *B. methanolicus* transformert med vektoren pTH1pfpk-lacZ ble dyrket i

MvCM medium tilsatt 200 mM metanol. Etter vekst over natt ble kulturen reinokulert i to nye kulturer og dyrket til $OD_{600} = ca. 1,5$. Enzymaktiviteten ble målt i celleekstrakt fra de to kulturene og sammenlignet med den celleekstrakt fra den negative kontrollen *B. methanolicus* transformert med pHP13.1. Det ble også målt aktiviteter for blankprøve uten enzym og blankprøve uten substratet ONPG. Som nevnt over er stigningstallet avgjørende for beregningen av enzymaktiviteten (se likning 1 i kapittel 2.5.4). Dersom stigningstallet for prøver med *lacZ*-genet er i samme størrelsesorden som for prøver med pHP13 eller prøver uten enzym, vil ikke enzymaktiviteten være signifikant (ved de bestemte målebetingelsene; 5 minutter preinkubering av enzym ved 50°C, 3-6 minutter kontinuerlig måling av absorbansen ved 410 nm og 45°C). Stigningstallene for målingene av *pfkp*-prøvene og kontrollprøver er vist i tabell 3.2. Rådata er vist i vedlegg 4.

Tabell 3.2. Oversikt over stigningstall for prøvene *pfkp.1*, *pfkp.2*, pHP13.1 (de er alle fortynnet ti ganger) og blankprøve uten enzym og uten substratet ONPG. Alle aktiviteter ble målt i triplikater. Prøver med negativt stigningstall ble neglisjert. Positiv kontroll (pTH1mdhp-*lacZ*) ble kun målt en gang. Resultatene viser at aktivitetene målt for *pfkp*-prøvene ikke er signifikant når de sammenlignes med den negative kontrollen og blankprøver. Se rådata i vedlegg 4

Prøve	Stigningstall [OD/sekund]	Standardavvik
<i>pfkp.1</i>	$4 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
<i>pfkp.2</i>	$4 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
pHP13.1	$3,0 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-7}$
Uten enzym	$5,3 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-7}$
<i>pfkp.1</i> uten ONPG	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$
<i>pfkp.2</i> uten ONPG	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$
Positiv kontroll mdhp	$2,78 \cdot 10^{-3}$	-

Som tabell 3.1 og 3.2 viser er stigningstallene for aktivitetsmålingene av celleekstrakt fra MGA3-pTH1pfkp-*lacZ* og MGA3-pTH1mdh2p-*lacZ* ikke er større enn stigningstallene for de negative prøvene med pHP13 samt blankprøvene uten enzym. Det er derfor ikke mulig å beregne aktivitetene i mdh2p-prøven og *pfkp*-prøvene. Som det vises i likning 1 (kapittel 2.5.4) skal stigningstallet til blankprøven trekkes fra stigningstallet til prøven som inneholder β -galaktosidase, deretter kan enzymaktiviteten beregnes. Ettersom stigningstallene i disse eksperimentene alle er i samme størrelsesorden, er det ikke mulig å detektere enzymaktiviteten under disse betingelsene. I vedlegg 3 og 4 vises rådata for henholdsvis *mdh2p* og *pfkp*. I forsøket med *pfkp* er alle prøvene (*pfkp.1*, *pfkp.2* og pHP13.1) fortynnet ti

ganger, mens i forsøket med *mdh2p* var ingen av prøvene (*mdh2p*, pHP13.1 og pHP13.2) fortynnet. Prøve pHP13.1 stammer fra det samme celleekstraktet i begge forsøkene (*mdh2p* og *pfkp*). Ettersom det ikke er målbar aktivitet påvirker ikke fortynningen stigningstallet. Stigningstallet til den positive prøven i begge forsøkene er ca. 1000 ganger større enn de resterende prøvene. Det er derfor en signifikant aktivitet i celleekstrakt med pTH1mdhp-lacZ sammenlignet med celleekstrakt med pTH1mdh2p-lacZ og pTH1pfkp-lacZ.

Det ble utført et forsøk hvor mastermiksen for assayet (med alle reagenser og enzymløsning) ble preparert i triplikater i eppendorfrør og inkubert ved 50 °C over natt (ca 17 timer). Målinger ved tiden $t = 0$ ble utført for prøve pfkp.1. Absorbansen (410 nm) ble målt ved tiden $t = 0$ og var $0,0117 \pm 0,006$. Det er antatt at alle prøvene hadde samme nullverdi. Etter inkubering over natt ble det OD₄₁₀ målt for alle prøvene. Spektrofotometeret ble nullstilt mot en prøve med vann. Resultatene som er framstilt i tabell 3.3 viser deltaverdier ($OD_{t=17} - OD_{t=0}$). Den beregnede nullverdien på 0,0117 er benyttet i for alle prøvene.

Tabell 3.3 OD₄₁₀ målinger av enzymassayprøver inkubert over natt ved 50°C. Det var antatt at alle prøvene hadde samme nullverdi ($t = 0$), denne nullverdien ble bestemt med prøven pfkp.1. Deretter ble triplikater av hver prøve inkubert over natt. Verdiene i tabellen viser endringen i absorbans etter inkubering. De lave verdiene indikerer at det ikke finnes β -galaktosidase-aktivitet i pfkp-prøvene og mdh2p-prøven.

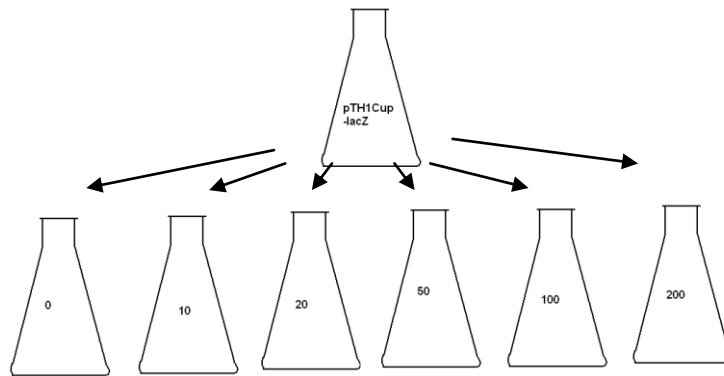
Prøve	Gjennomsnitt av ΔOD_{410}	Standardavvik
mdh2p	0,006	0,003
pfkp.1	0,0099	0,0006
pfkp.2	0,006	0,0020
pHP13.1	0,0391	0,0009
Uten enzym	0,0015	0,0005
Positiv kontroll mdhp	1,92	0,0200

OD-målingene for pfkp.1, pfkp.2 og mdh2p viser at det ikke er detekterbar aktivitet i disse prøvene. I forhold til den positive kontrollen mdhp som hadde en sterk gul farge, var det ingen antydning til gul farge på pfkp- og mdh2p-prøvene.

Promotoren Cup

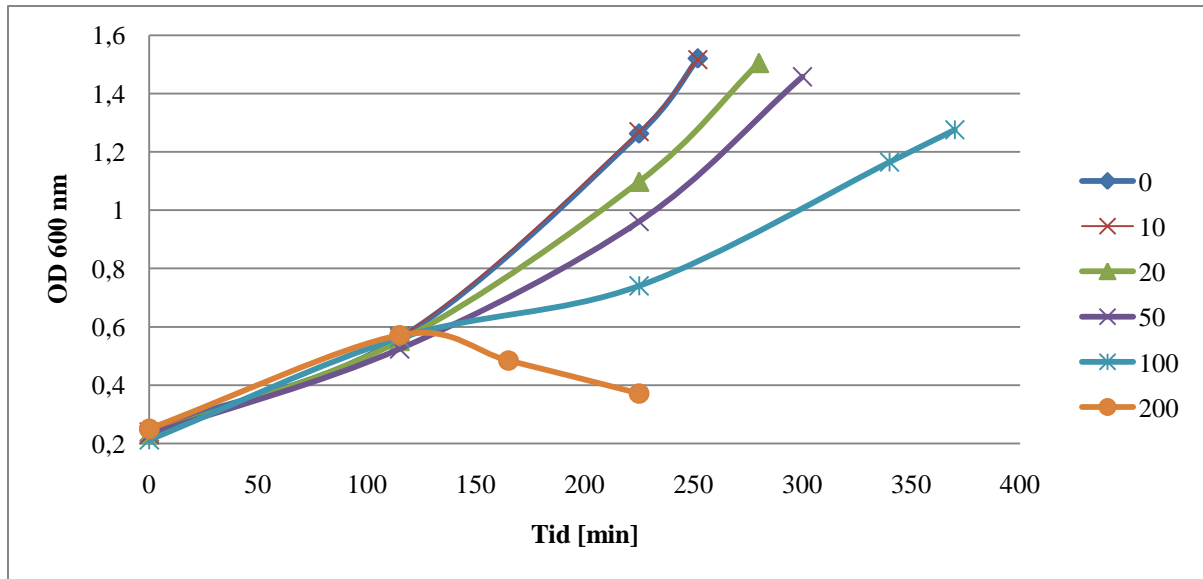
En kobberinduserbar promotor ble funnet i genomet til *Lactobacillus sakei*. Promotoren viste seg å være induserbar ved lave konsentrasjoner av CuSO_4 (Stentz et al., 2000).

I denne oppgaven ble denne kobberinduserbare promotoren undersøkt i *B. methanolicus* transformert med den konstruerte vektoren pTH1Cup-lacZ. Kobberpromotoren ble amplifisert fra vektoren pRV613 (se figur 1.4). PCR-produktet på 705 bp ble ligert inn i vektoren pTH1mcs-lacZ (se kapittel 1.4, figur 1.5), og *B. methanolicus* ble transformert. En kultur av denne stammen ble dyrket over natt i MvCM medium med 200 mM metanol. Kulturen ble så reinokulert i 6 nye kulturer (som vist i figur 3.10) og kulturene ble indusert med ulike konsentrasjoner av CuSO_4 ved $\text{OD}_{600} = \text{ca. } 0,5$. Følgende konsentrasjoner ble tilsatt kulturene; 10, 20, 50, 100 og 200 μM , i tillegg var det en kultur uten tilsatt CuSO_4 .



Figur 3.10. Illustrasjon av reinokulering av startkultur med *B. methanolicus* transformert med pTH1Cup-lacZ (MvCM-medium med 200 mM metanol). Tallet på kolbene indikerer konsentrasjonen [μM] av CuSO_4 . OD_{600} for reinokulerte kulturer var ca. 0,2, og de ble indusert ved $\text{OD}_{600} = \text{ca. } 0,5$. Kulturene ble høstet ved $\text{OD}_{600} = \text{ca. } 1,5$.

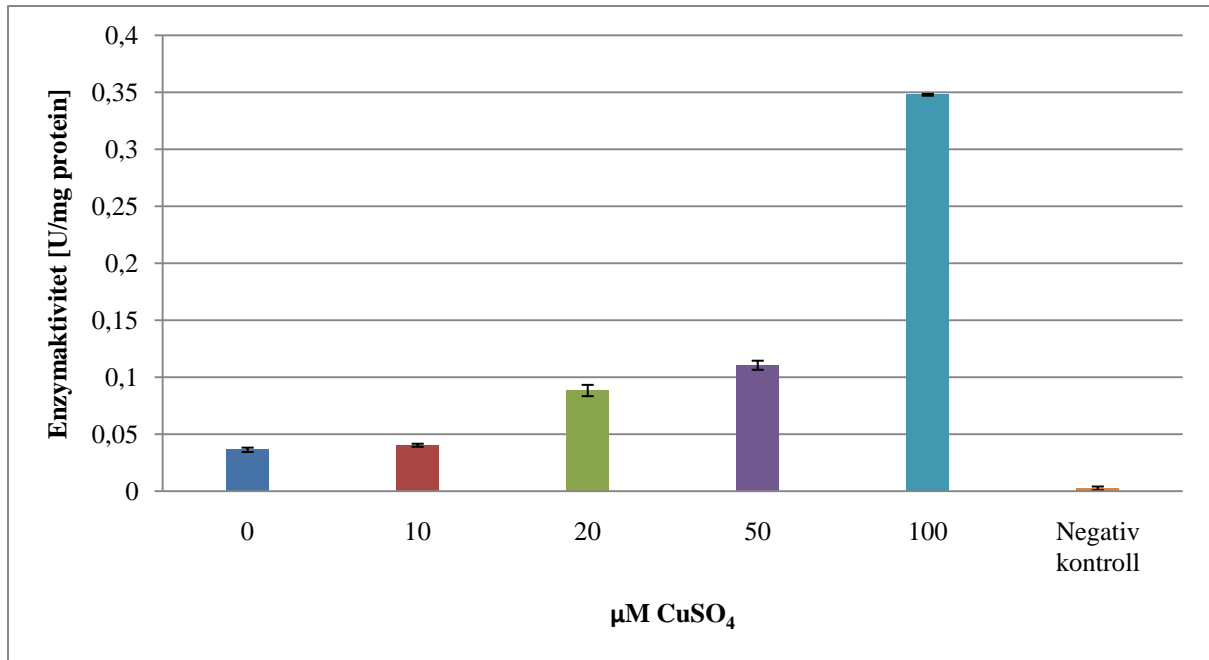
Ettersom CuSO_4 er giftig ved for høye konsentrasjoner ble veksten etter indusering overvåket ved å måle OD_{600} . Det viste seg at veksten ble hemmet ved økende konsentrasjon av CuSO_4 , og ved 200 μM døde cellene. Dette illustreres i figur 3.11. Vekstkurven for 0 og 10 μM overlapper hverandre.



Figur 3.11. OD₆₀₀-målinger av kulturer med *B. methanolicus* transformert med vektoren pTH1Cup-lacZ. Navnet på de ulike kurvene indikerer konsentrasjonen [μM] av CuSO₄ den kulturen ble induisert med. Alle kulturene ble dyrket i MvCM medium med 200 mM metanol, og de ble induisert etter ca. 100 minutter (OD₆₀₀= ca 0,5). Kulturene ble høstet ved OD₆₀₀ = ca. 1,5. Den siste målingen for kulturen med 100 μM CuSO₄ (OD₆₀₀= ca. 1,5) er ikke vist i figuren, da eksakt tidspunkt for høstingen ikke ble registrert. Kurvene med 0 og 10 μM CuSO₄ overlapper hverandre.

Etter høsting av kulturene ble celleekstrakt preparert og enzymaktiviteten til β -galaktosidase bestemt. Det ble observert en økning i målt aktivitet ved økende konsentrasjon av CuSO₄. Aktiviteten i kulturen hvor det ikke var tilsatt induser ble målt til 0,02 U/mg protein og aktiviteten for kulturen induisert med 100 μM CuSO₄ ble målt til 0,35 U/mg protein (se figur 3.12). Som vist i figur 3.11 har kulturen med 100 μM CuSO₄ vokst mer enn 100 minutter lengre enn den uinduserte kulturen, noe som vil påvirke den produserte mengden av β -galaktosidase. Det er derfor vanskelig å sammenligne de ulike aktivitetene direkte i dette forsøket. For å få undersøkt i hvor stor grad uttrykket av *lacZ* avhenger av tiden må det utføres et nytt forsøk hvor alle kulturene høstes samtidig (uavhengig av OD₆₀₀). I dette prosjektet strakk ikke tiden til for å få utført dette forsøket.

I beregningen av enzymaktivitetene er hver enkelt enzymaktivitet korrelert mot proteinkonsentrasjonen. Det vil si at den beregnede enzymaktiviteten er dividert med den beregnede proteinkonsentrasjonen for hvert celleekstrakt. Aktivitetene for kulturene med pTH1Cup-lacZ er vist i figur 3.12.



Figur 3.12. Aktivitetsmålinger av celleekstrakt fra *B. methanolicus* transformert med pTH1Cup-lacZ. Alle målinger er korrelert mot proteinkonsentrasjonen. Ulike kulturer ble indusert med ulike konsentrasjoner av CuSO₄ angitt under hver stolpe. De ulike kulturrene har blitt høstet til ulik tid (se figur 3.11). Derfor er direkte sammenligning av de ulike aktivitetene ikke riktig. Det ble også målt aktivitet for *B. methanolicus* transformert med pHP13 som en negativ kontroll. Rådata og beregninger er vist i vedlegg 5.

Den uinduserte kulturen og den indusert med 10 µM CuSO₄ ble høstet til samme tid. Likevel er forskjellen mellom aktivitetene til de to kulturrene ikke signifikant. Det ble allerede ved transformasjon og utplating av uindusert kultur (se kapittel 3.3) vist at kobberpromotoren gir transkripsjon når den er uindusert. Med denne transkripsjonen vil det ikke være mulig å ha fullstendig kontroll på uttrykket. Flere forsøk med kulturer indusert med ulike konsentrasjoner av CuSO₄ vil gi svar på hvor godt denne promotoren vil egne seg til kontrollert ekspresjon i *B. methanolicus*.

4. Diskusjon

I denne oppgaven ble det etablert et assay for reporter-genet *lacZ* som kan benyttes i *Bacillus methanolicus*. Dette er det første reporter-genet som har gitt gode resultater i denne organismen. Reporter-genet ble benyttet til å undersøke styrken på promotere i *B. methanolicus*. Det ble også undersøkt en kobberinduserbar promotor fra *Lactobacillus sakei* (Crutz-Le Coq and Zagorec, 2008)

4.1 Reporter-genet *lacZ* og etablering av assay

Genet som ble benyttet i denne oppgaven var et *lacZ*-gen som stammer fra *Bacillus coagulans* (Kovacs et al., 2010). *B. coagulans* er i likhet med *B. methanolicus* en termotolerant bakterie, noe som er hovedgrunnen til at dette genet ble valgt til uttesting. En fordel med *lacZ* er at det er et godt dokumentert reporter-gen og det er lett å bestemme aktiviteten til produktet (β -galaktosidase). Tidligere har reporter-genet grønt-fluoriserende-protein (GFP) blitt undersøkt (Jor, 2010). Dette er også et godt etablert reporter-gen, men det var ikke aktivt i *B. methanolicus*. Årsaken til dette var antakelig den høye veksttemperaturen for *B. methanolicus* (Jor, 2010). Ettersom det ikke finnes et brukbart reporter-gen-assay i *B. methanolicus* fra tidligere, var det viktig å optimere assayet for *lacZ* ved å teste aktiviteten av β -galaktosidase under ulike betingelser.

Som nevnt stammer reporter-genet fra en termofil bakterie som vokser ved 50 °C og i denne oppgaven uttrykkes genet i *B. methanolicus* som også vokser ved 50°C. Ettersom genet uttrykkes ved høy temperatur, var det interessant å teste hvordan aktiviteten til β -galaktosidase ble påvirket ved varmebehandling (høyere temperatur enn romtemperatur). I denne forbindelse ble det derfor testet hvordan preinkubering av enzymet ved ulike temperaturer påvirket aktiviteten. Stabiliteten til enzymet ble også undersøkt ved å preinkubere ved ulike temperaturer i ulik tid. Interessant nok var den målte aktiviteten til β -galaktosidase etter preinkubering signifikant høyere enn uten preinkubering. Uten preinkubering (romtemperatur) ble aktiviteten målt til ca 0,8 U/mg protein, men etter preinkubering i fem minutter ved 60 °C økte aktiviteten til ca 1,9 U/mg protein. Dermed er det tydelig at aktiviteten til β -galaktosidase som stammer fra *B. coagulans* er temperaturavhengig. Det ble også vist at aktiviteten til enzymet holder seg forholdsvis stabilt i inntil 30 minutter preinkubering ved temperaturene 45, 50 og 60 °C, men samtidig kommer det frem at det holder å preinkubere enzymet i fem minutter for å oppnå full aktivitet. Aktiviteten ble også målt ved ulik pH for å få en indikasjon på hvilken pH som var best,

optimal pH ble funnet til å være rundt 7. Selv om den høyeste aktiviteten ble målt med preinkubering ved 60 °C, ble det valgt å preinkubere ved 50 °C i alle målinger etter at assayet var etablert. Grunnen til dette var at forskjellen mellom aktivitetene ved 50 °C og 60 °C ikke var signifikant, i tillegg er 50 °C også veksttemperaturen til *B. methanolicus*.

Med det nå etablerte reporter-gen-assayet vil det være mulig å undersøke flere promotere i *B. methanolicus*, som vil gi økt kunnskap om regulering av transkripsjon i organismen. Ved å finne styrken til promotere vil det også være mulig å finne flaskehalsen i metanol assimilering og formaldehyd detoksifisering.

4.2 promotere i *B. methanolicus*

Bacillus methanolicus er en potensiell kandidat for industriell produksjon av aminosyrer fra metanol, men for å utvikle en konkurransedyktig stamme trengs det mer kunnskap om metabolismen i bakterien og det må utvikles flere genetiske verktøy (Brautaset et al., 2007). I denne oppgaven ble det utviklet et reporter-gen-assay som så ble benyttet for å undersøke ulike promotere i *B. methanolicus*. Promotere er med på å regulere transkripsjon og derfor vil kunnskap om promotere gi en bedre forståelse for genregulering av de aktuelle genene.

Fire ulike promotere ble testet i denne oppgaven, av disse fire stammer tre fra genomet til *B. methanolicus* MGA3 (*pfkp*, *mdhp*, *mdh2p*) mens den siste stammer fra *Lactobacillus sakei* (Cup). Fosfofruktokinase er et enzym som fosforylerer fruktose-6-fosfat ved hjelp av ATP (se figur 1.2) og danner fruktose-1,6-bifosfat, som til slutt blir omgjort til pyruvat. Genet for fosfofruktokinase (*pfk*) finnes på det naturlige plasmidet pBM19 i *B. methanolicus* og promotoren til *pfk* (*pfkp*) ble analysert i denne oppgaven. Den potensielle promotoren *mdh2p* til det nyoppdagede *mdh2*-genet (Heggeset, 2011a) lokalisert på kromosomet til *B. methanolicus* (se kapittel 1.2) ble også undersøkt.

Det var ikke mulig å måle aktiviteten til β -galaktosidase i prøvene hvor *lacZ*-genet var under kontroll av Promotorene *pfkp* og *mdh2p*. Stigningstallene (funnet ved lineær regresjon i Excel) som skulle benyttes til å beregne aktiviteten til β -galaktosidase var i samme størrelsesorden som negativ kontroll pHP13 (har ikke genet *lacZ*) og blankprøver uten tilsatt enzymløsning. Tidligere eksperimenter ved hjelp av real-time-PCR har vist at transkripsjonen til *pfk*-genet er 40 ganger oppregulert ved vekst på metanol sammenlignet med vekst på mannitol, noe som indikerer at *pfk*-genet har en viktig rolle i metanolassimileringen og formaldehyd detoksifisering (Jakobsen et al., 2006). Det var derfor forventet å få en høy

aktivitet (relativt til pHP13 og blankprøver) når *lacZ*-genet var under kontroll av *pfkp*. Aktiviteten for β -galaktosidase under kontroll av promotoren *mdh2p* var forventet å være lav. Dette på grunn av tidligere undersøkelser ved hjelp av real-time-PCR, som viste at transkripsjonen av *mdh*-genet var 250 ganger høyere enn transkripsjonen av *mdh2*-genet (Krog, 2011).

Et forsøk hvor mastermiksen til assayet (med enzym) ble inkubert over natt ved 50 °C ble også utført med *pfkp*- og *mdh2p*-prøvene. Igjen var det ikke mulig å detektere aktiviteten til β -galaktosidase. Med denne lange inkuberingen er det antatt at β -galaktosidase ville ha blitt detektert dersom enzymet hadde vært tilstede i celleekstraktene, resultatet for prøvene indikerer dermed at promotorregionene ikke er aktive. En årsak til dette kan være at de klonede promotorregionene er for korte og at det er nødvendig å ta med mer omliggende DNA når Promotorene kloneres. Ved analyse av genomet til *B. methanolicus* MGA3 ble det funnet en kromosomal kopi av *pfk*-genet som ble kalt *pfk2* (Heggeset, 2011a). Dette genet har ikke blitt analysert, men det kan være en mulighet at *pfk*-genet som er lokalisert på plasmidet pBM19 ikke er det essensielle genet i RuMP-sporet. Hvis det viser seg at *pfk*-genet på pBM19 ikke er essensielt, kan dette også være en forklaring på hvorfor *pfk*-promotoren ikke gir opphav til β -galaktosidase i denne oppgaven.

Den kobberinduserbare promotoren Cup fra *Lactobacillus sakei* (Stentz et al., 2000) er uavhengig av de metabolske sporene i *B. methanolicus*. Denne promotoren kan potensielt utnyttes til kontrollert ekspresjon i *B. methanolicus* dersom den er aktiv. Det ble først bekreftet at promotoren var aktiv i *B. methanolicus* ved utplating på regenerasjonsplater tilsatt x-gal. Ved utplating ga koloniene opphav til en svak blåfarge når de var uinduserte og sterk blåfarge når de var indusert med CuSO₄. Dette indikerer at kobberpromotoren vil gi opphav til genprodukt selv om den ikke er indusert. I dyrkningsforsøk med *B. methanolicus* pTH1Cup-lacZ ble kobberpromotoren indusert med ulike konsentrasjoner av CuSO₄. Ved måling av veksten etter indusering, viste det seg at veksten hemmes ved økt konsentrasjon av CuSO₄. Ettersom veksten ble observert ble de ulike kulturene høstet ved OD₆₀₀ = ca 1,5 og kulturen indusert med 100 μ M CuSO₄ nådde denne absorbansen ca 100 minutter etter den uinduserte kulturen. Mens veksten for kulturen med 10 μ M CuSO₄ var upåvirket. På grunn av ulik inkuberingstid mellom kulturene, er det i dette eksperimentet ikke reelt å direkte sammenligne de ulike aktivitetene. Promotoren har tidligere vært undersøkt med ulike konsentrasjoner av CuSO₄ (Crutz-Le Coq and Zagorec, 2008). I denne artikkelen ble aktiviteten målt en time etter at kulturene ble indusert. Da viste det seg at aktivitetene i kulturer med varierende

konsentrasjoner av CuSO₄ (fra 20 µM til 60 µM) var relativt like. Aktiviteten for kulturen induert med 30 µM ble også undersøkt over lengre tid, her fordoblet aktiviteten seg mellom inkubering i 60 minutter og 120 minutter (Crutz-Le Coq and Zagorec, 2008). Eksperimentene utført av Crutz-Le Coq og Zagorec som viser at aktivitetene øker med økt inkuberingstid er dermed med å bekrefte at aktivitetene målt med kobberpromotoren i denne oppgaven ikke kan sammenlignes direkte. Imidlertid er det interessant at aktivitetene målt av Crutz-Le Coq og Zagorec viste liten variasjon mellom ulike konsentrasjoner av CuSO₄. Et forsøk hvor kulturene indueres og høstes til samme tid må utføres ved videre undersøkelser av kobberpromotoren i *B. methanolicus*.

Ved sammenligning av aktiviteten til den uinduserte kulturen med pTH1Cup-lacZ og den induert med 10 µM CuSO₄ er det liten forskjell mellom dem. Aktiviteten for kulturen med 10 µM ble målt til 0,041 U/mg protein, mens den uinduserte ble målt til 0,037 U/mg. Det må påpekes at kulturene for måling av aktivitet ble dyrket i MvCM medium, som er tilsatt spormetaller og inneholder kobber. Dette påvirker sannsynligvis aktiviteten til den uinduserte prøven. Samtidig ble det bekreftet i denne oppgaven (blå kolonier på fast medium) og tidligere eksperimenter (også blå kolonier på fast medium) (Crutz-Le Coq and Zagorec, 2008) at promotoren gir oppgav til genprodukt selv om den ikke er induert. Hvor godt kobberpromotoren egner seg til kontrollert ekspresjon i *B. methanolicus* er ikke helt klart. Spesielt begrensende er det initielle uttrykket som måles når kulturen er uindusert (spor av kobber i mediet påvirker mest sannsynlig dette). Samtidig gir forsøk utført av Stentz et al. (2000) og Crutz-Le Coq & Zagorec (2008) grunn til å tro at promotoren gir økt transkripsjon når den er induert med høyere konsentrasjon enn den som initielt finnes i mediet til *B. methanolicus*. Utvidede forsøk med denne promotoren vil derfor gi et klarere svar på hvordan transkripsjonen påvirkes med ulike konsentrasjoner av CuSO₄, men konsentrasjonen bør holdes under 100 µM CuSO₄ ettersom denne konsentrasjonen hemmer veksten til *B. methanolicus* betraktelig. Denne oppgaven viser også at det ikke mulig å kontrollere uttrykket fullstendig ettersom promotoren gir en initieell transkripsjon når den er uindusert. Kobberpromotoren kan allikevel være nyttig dersom det er ønskelig med mindre genprodukt sammenlignet med gen som kontrolleres av *mdh*-promotoren. Aktiviteter målt med *mdh*-promotoren er ca 52 ganger høyere enn aktiviteten for den uinduserte kulturen med kobberpromotoren.

Som forventet var *mdh*-promotoren sterkest av de Promotorene som ble testet. Den høyeste spesifikke aktiviteten som ble målt for *mdhp* var 1,9 U/mg protein. Denne promotoren

er ikke mulig å kontrollere ettersom den er aktiv både ved vekst på metanol og mannitol (Jakobsen et al., 2006), men den kan benyttes som promotor i en ekspresjonsvektor for å påvirke metabolismen. Dette har allerede blitt utført for å øke produksjonen av lysin (Brautaset et al., 2010).

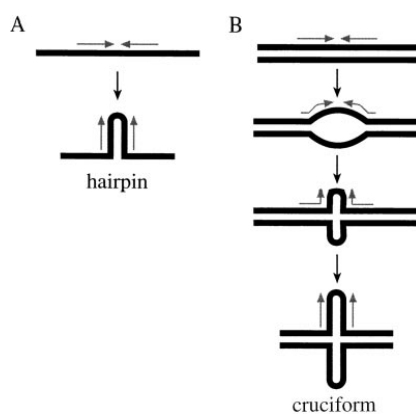
Med det etablerte reporter-gen-assayet er det også mulig å teste flere induserbare promotere. Et eksempel er den maltose-induserbare promotoren Pglv-M1 (Ming et al., 2010). Denne promotoren er utviklet fra en operon promotor Pglv som eksisterer i *B. subtilis*. Promotoren induseres av maltose med undertrykkes av glukose. Ved hjelp av site-directed mutagenese ble promotoren Pglv-M1 etablert, hvor styrken til promotoren var forbedret og den var mindre undertrykt av glukose (Ming et al., 2010). Denne promotoren kan være interessant å teste i *B. methanolicus* ettersom den induseres av et stoff som ikke er giftig. Ettersom kobberpromotoren som ble testet i denne oppgaven stammer fra en mesofil bakterie og virker i termotolerante *B. methanolicus*, viser dette generelt at høy temperatur ikke nødvendigvis er en begrensning for promotere, slik at nye promotere kan testes selv om de stammer fra mesofile bakterier.

4.3 Det potensielle plasmidet pBM69

Som nevnt i introduksjonen er det et behov for flere replikerende vektorer som kan benyttes som genetiske verktøy i *B. methanolicus*, men det lyktes ikke å verifisere replikasjonsproteinet til pBM69 i denne oppgaven da sekvenseringsresultater viste at sekvensen var ca 1000 bp for kort.

Replikasjonsområdet for pBM69ori kjennetegnes av direkte og indirekte repeterende sekvenser som også er vist i den homologe sekvensen til ori43 (Baum and Gilbert, 1991). Det er kjent at repeterende sekvenser kan føre til at deler av DNA slettes på grunn av rekombinasjon, samtidig er det også kjent at rekombinasjon som oftest skjer ved hjelp av et protein RecA som finnes i *E. coli* (Madigan et al., 2009, Kurnit, 1989). En måte å redusere risikoen for homolog rekombinasjon i *E. coli* kan dermed være å benytte en mutant *E. coli* stamme som ikke har et aktivt RecA-gen til kloning, noe som har vist seg å fungere (Kurnit, 1989). Samtidig har senere forskning vist at det ofte er RecA-uavhengige mekanismer som er årsaken til at deler av DNA med direkte og indirekte repeterende sekvenser slettes (Bi and Liu, 1994, Lovett, 2004, Oliveira et al., 2009).

RecA-uavhengig sletting av DNA skjer som oftest under replikasjon (Bzymek and Lovett, 2001). DNA kan ha mange ulike konformasjoner og eksempler på sekvenser som gir opphav til ulike konformasjoner er direkte og indirekte repeterende sekvenser (Oliveira et al., 2009). En illustrasjon av strukturer som kan dannes er vist i figur 4.1 (Bzymek and Lovett, 2001). Når det dannes slike konformasjoner kan DNA som er lokalisert i en loop slettes under replikasjon, noe som da vil være RecA-uavhengig. Det er flere faktorer som avgjør hvordan DNA påvirkes av repeterende sekvenser, disse faktorene kan være lengden på de repeterende sekvensene, avstanden mellom dem og grad av homologi (Bzymek and Lovett, 2001). For å forbedre kloning av plasmider med ustabil DNA finnes det stammer som er utviklet til dette formålet (eksempler er Stbl2™ og Stbl4™ fra Invitrogen), men disse kan fortsatt ikke forhindre mutasjoner 100 % (Oliveira et al., 2009).



Figur 4.1 Eksempel på formasjoner som kan dannes i DNA dersom et er direkte og indirekte repeterende sekvenser (Bzymek and Lovett, 2001). Ettersom PCR-fragmentet for pBM69ori består av mange repeterende sekvenser, er det mulig at deler av sekvensen er slettet på grunn av formasjon av strukturene ovenfor.

4.4 Videre arbeid

Med et etablert reporter-gen-assay vil det nå være mulig å undersøke og analysere flere promotere i *B. methanolicus*. Dette vil kunne gi økt kunnskap om regulative mekanismer i organismen som videre kan være nyttig for å utvikle en effektiv produksjonsstamme. Promotorene som ikke rakk å bli testet i dette prosjektet er selvfølgelig interessant å få analysert. Dette gjelder da promotoren til aktivatorproteinet ACT som aktiverer metanoldehydrogenase (*mdh*) og promotoren til *mdh3*, begge er lokalisert på kromosomet til

B. methanolicus MGA3. Genuttrykket av *mdh3* har i likhet med *mdh2* også blitt undersøkt ved hjelp av real-time-PCR. Da kom det fram at *mdh*-genet er uttrykt 10 000 ganger mer enn *mdh3*-genet (Krog, 2011), noe som begrenser muligheten for å detektere β -galaktosidase under kontroll av promotoren *mdh3p* ved hjelp av assayet utviklet i denne oppgaven.

Det er også interessant å fortsette undersøkelsen av det potensielle replikasjonsproteinene til pBM69. Det er viktig å finne flere plasmider som kan replikere i *B. methanolicus* for å kunne utvikle stammen videre. Fordelen med pBM69 (hvis det viser seg å være et plasmid) er at det allerede finnes naturlig i *B. methanolicus*. Men for at det potensielle plasmidet skal kunne utnyttes som en vektor er det viktig at det ikke innehar essensielle gener for metabolismen til *B. methanolicus*.

Utvidede forsøk med den kobberinduserbare promotoren *atkYB* vil gi et klarere svar på hvor godt promotoren egner seg til kontrollert ekspresjon. Konsentrasjonene av inducer CuSO_4 bør holdes under 100 μM og over 10 μM . Dette kommer fram i denne oppgaven som viser at 100 μM CuSO_4 hemmer veksten av *B. methanolicus* betraktelig og at forskjellen mellom uindusert og 10 μM ikke er signifikant. Et mål for videre undersøkelser av kobberpromotoren er dermed å finne ut i hvor stor grad indusering påvirker transkripsjonen i forhold til å ikke inducere, uten å hemme veksten i stor grad ved å inducere med for høye konsentrasjoner av CuSO_4 . Det vil også være en mulig å teste helt nye promotere med den etablerte promotor-probe vektoren pTH1mcs-lacZ som ble konstruert i forbindelse med denne oppgaven.

5. Konklusjon

Reportergenet *lacZ* som stammer fra *B. coagulans* ble testet i *B. methanolicus*. Genet viste seg å være aktivt. Ved hjelp av celleekstrakt fra *B. methanolicus* transformert med vektoren pTH1mdhp-lacZ ble det i denne oppgaven utviklet et assay for bestemmelse av enzymaktiviteten til genproduktet β -galaktosidase. Under utviklingen av assayet ble det funnet at aktiviteten til β -galaktosidase økte signifikant ved preinkubering av enzymet ved 45, 50 og 60 °C i 5 minutter, det ble også funnet at optimal pH for assayet var rundt 7. Målinger med det etablerte assayet ble utført med preinkubering av enzym i fem minutter ved 50 °C samtidig som kyvette med reagenser nødvendige for aktivitetmålingen også ble inkubert i fem minutter ved 45°C. pH for bufferen benyttet under målingene var 7,0. Kinetikkmålingene ble utført i 3-6 minutter.

Reportergenet ble videre brukt til å analysere promotere i *B. methanolicus*. Følgende vektorer ble konstruert og introdusert i *B. methanolicus*: pTH1mdhp-lacZ, pTH1pfpk-lacZ, pTH1mdh2p-lacZ og pTH1Cup-lacZ. Det lyktes ikke å identifisere riktige kandidater av vektorene pTH1actp-lacZ og pTH1mdh3p-lacZ etter kloning. Vektoren pTH1mdhp-lacZ ga opphav til relativt høy konsentrasjon av β -galaktosidase på grunn av den sterke promotoren, og ble benyttet til utvikling av assayet. Den høyeste aktiviteten målt i celleekstrakt fra MGA3 pTH1mdhp-lacZ var 1,9 U/mg protein. Under de etablerte betingelsene for assayet var det i denne oppgaven ikke mulig å detektere aktiviteten til β -galaktosidase i celleekstrakt fra *B. methanolicus* MGA3 med vektorene pTH1mdh2p-lacZ og pTH1pfpk-lacZ. Den kobberinduserbare promotoren i pTH1Cup-lacZ var aktiv i *B. methanolicus*. Veksten til *B. methanolicus* ble hemmet ved økende konsentrasjon av CuSO₄ og cellene døde ved en konsentrasjon på 200 μ M. Forskjellen mellom aktivitetene for celleekstrakt fra MGA3 med pTH1Cup-lacZ uten tilsatt induser og indusert med 10 μ M CuSO₄ var ikke signifikant. For å avgjøre hvor godt denne promotoren egner seg til kontrollert ekspresjon i *B. methanolicus* må det utføres flere forsøk.

Replikasjonsproteinet til det potensielle plasmidet pBM69 ble ikke verifisert i denne oppgaven. Det lyktes å amplifisere sekvensen til replikasjonsproteinet ved hjelp av PCR, men deler av sekvensen ble slettet da *E. coli* ble transformert med vektoren pGEM-T-pBM69ori. Dette ble vist etter sekvensering av PCR-produktet og sekvensen var ca 1000 bp for kort.

Referanseliste

- ARFMAN, N., DIJKHUIZEN, L., KIRCHHOF, G., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. H., BULYGINA, E. S., CHUMAKOV, K. M., GOVORUKHINA, N. I., TROTSENKO, Y. A., WHITE, D. & SHARP, R. J. 1992. *Bacillus-methanolicus* sp-nov, a new species of thermotolerant, methanol-utilizing, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 439-445.
- ARFMAN, N., HEKTOR, H. J., BYSTRYKH, L. V., GOVORUKHINA, N. I., DIJKHUIZEN, L. & FRANK, J. 1997. Properties of an NAD(H)-containing methanol dehydrogenase and its activator protein from *Bacillus methanolicus*. *European Journal of Biochemistry*, 244, 426-433.
- ARFMAN, N., WATLING, E. M., CLEMENT, W., VANOOSTERWIJK, R. J., DEVRIES, G. E., HARDER, W., ATTWOOD, M. M. & DIJKHUIZEN, L. 1989. Methanol metabolism in thermotolerant methylotrophic *Bacillus* strains involving a novel catabolic NAD-dependent methanol dehydrogenase as a key enzyme. *Archives of Microbiology*, 152, 280-288.
- BAUM, J. A., COYLE, D. M., GILBERT, M. P., JANY, C. S. & GAWRONBURKE, C. 1990. NOVEL CLONING VECTORS FOR *BACILLUS-THURINGIENSIS*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3420-3428.
- BAUM, J. A. & GILBERT, M. P. 1991. CHARACTERIZATION AND COMPARATIVE SEQUENCE-ANALYSIS OF REPLICATION ORIGINS FROM 3 LARGE *BACILLUS-THURINGIENSIS* PLASMIDS. *Journal of Bacteriology*, 173, 5280-5289.
- BI, X. & LIU, L. F. 1994. RECA-INDEPENDENT AND RECA-DEPENDENT INTRAMOLECULAR PLASMID RECOMBINATION - DIFFERENTIAL HOMOLOGY REQUIREMENT AND DISTANCE EFFECT. *Journal of Molecular Biology*, 235, 414-423.
- BIO-RAD LABORATORIES. 2011. *Bio-Rad Protein Assay* [Online]. Available: http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9004.pdf [Accessed 31.05.11].
- BIOTEK MICROPLATE INSTRUMENTATION & SOFTWARE SOLUTION. *Kinetic Analysis of β -Galactosidase Activity using PowerWave™ HT Microplate Spectrophotometer and Gen5™ Data Analysis Software* [Online]. Available: <http://www.biotek.com/resources/articles/kinetic-analysis-beta-galactosidase.html> [Accessed 04.06.11].
- BRAUTASET, T., JAKOBSEN, O. M., DEGNES, K. F., NETZER, R., NAERDAL, I., KROG, A., DILLINGHAM, R., FLICKINGER, M. C. & ELLINGSEN, T. E. 2010. *Bacillus methanolicus* pyruvate carboxylase and homoserine dehydrogenase I and II and their roles for l-lysine production from methanol at 50A degrees C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87.
- BRAUTASET, T., JAKOBSEN, O. M., FLICKINGER, M. C., VALLA, S. & ELLINGSEN, T. E. 2004. Plasmid-dependent methylotrophy in thermotolerant *Bacillus methanolicus*. *Journal of Bacteriology*, 186, 1229-1238.

- BRAUTASET, T., JAKOBSEN, O. M., JOSEFSEN, K. D., FLICKINGER, M. C. & ELLINGSEN, T. E. 2007. *Bacillus methanolicus*: a candidate for industrial production of amino acids from methanol at 50 degrees C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 22-34.
- BROWN, R. B. & AUDET, J. 2008. Current techniques for single-cell lysis. *Journal of the Royal Society Interface*, 5, S131-S138.
- BROWN, T. A. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*, West Sussex, Wiley - Blackwell.
- BZYMEK, M. & LOVETT, S. T. 2001. Evidence for two mechanisms of palindrome-stimulated deletion in *Escherichia coli*: Single-strand annealing and replication slipped mispairing. *Genetics*, 158, 527-540.
- CRUTZ-LE COQ, A.-M. & ZAGOREC, M. 2008. Vectors for Lactobacilli and other Gram-positive bacteria based on the minimal replicon of pRV500 from *Lactobacillus sakei*. *Plasmid*, 60, 212-20.
- DAGERT, M. & EHRlich, S. D. 1979. PROLONGED INCUBATION IN CALCIUM-CHLORIDE IMPROVES THE COMPETENCE OF *ESCHERICHIA-COLI*-CELLS. *Gene*, 6, 23-28.
- EHRT, S. & SCHNAPPINGER, D. 2003. Isolation of plasmids from *E. coli* by alkaline lysis. *Methods Mol Biol*, 235, 75-8.
- HAIMA, P., BRON, S. & VENEMA, G. 1987. THE EFFECT OF RESTRICTION ON SHOTGUN CLONING AND PLASMID STABILITY IN *BACILLUS-SUBTILIS* MARBURG. *Molecular & General Genetics*, 209, 335-342.
- HEGGESET, T. M. B. 2011a. *Upublisert*.
- HEGGESET, T. M. B. 2011b. mdh2p og mdh3p. *Upublisert*.
- IKEDA, M. 2003. Amino acid production processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 79, 1-35.
- JAKOBSEN, O. M., BENICHO, A., FLICKINGER, M. C., VALLA, S., ELLINGSEN, T. E. & BRAUTASET, T. 2006. Upregulated transcription of plasmid and chromosomal ribulose monophosphate pathway genes is critical for methanol assimilation rate and methanol tolerance in the methylotrophic bacterium *Bacillus methanolicus*. *Journal of Bacteriology*, 188, 3063-3072.
- JAKOBSEN, O. M., BRAUTASET, T., DEGNES, K. F., HEGGESET, T. M. B., BALZER, S., FLICKINGER, M. C., VALLA, S. & ELLINGSEN, T. E. 2009. Overexpression of Wild-Type Aspartokinase Increases L-Lysine Production in the Thermotolerant Methylotrophic Bacterium *Bacillus methanolicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 652-661.
- JANDA, K. D., LO, L. C., LO, C. H. L., SIM, M. M., WANG, R., WONG, C. H. & LERNER, R. A. 1997. Chemical selection for catalysis in combinatorial antibody libraries. *Science*, 275, 945-948.
- JOR, H. P. 2010. Trondheim.

- KLUG, W. S., CUMMINGS, M. R., SPENCER, C. A. & PALLANDINO, M. A. 2009. *Concepts of Genetics*, San Francisco, Pearson Benjamin Cummings.
- KOVACS, A. T., VAN HARTSKAMP, M., KUIPERS, O. P. & VAN KRANENBURG, R. 2010. Genetic Tool Development for a New Host for Biotechnology, the Thermotolerant Bacterium *Bacillus coagulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 4085-4088.
- KROG, A. 2011. Analysis of *mdh2* and *mdh3* in *Bacillus Methanolicus* MGA3. *Upublisert*.
- KURNIT, D. M. 1989. ESCHERICHIA-COLI RECA DELETION STRAINS THAT ARE HIGHLY COMPETENT FOR TRANSFORMATION AND FOR INVIVO PHAGE PACKAGING. *Gene*, 82, 313-315.
- LEUCHTENBERGER, W., HUTHMACHER, K. & DRAUZ, K. 2005. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 1-8.
- LOVETT, S. T. 2004. Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences. *Molecular Microbiology*, 52, 1243-1253.
- MACHEREY-NAGEL, G. C. K. 2011. *Plasmid DNA Purification User Manual* [Online]. Düren: MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG. Available: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NuBoXtra.pdf [Accessed 31.05.11].
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., DUNLAP, P. V. & CLARK, D. P. 2009. *Biology of Microorganisms*, San Francisco, Pearson Benjamin Cummings.
- MING, Y. M., WEI, Z. W., LIN, C. Y. & SHENG, G. Y. 2010. Development of a *Bacillus subtilis* expression system using the improved P_{glv} promoter. *Microbial Cell Factories*, 9.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. 2008. *Principles of Biochemistry*, New York, W.H. Freeman and Company.
- NEW ENGLAND BIOLABS INC. 2011. *BSA* [Online]. Available: <http://www.neb.com/nebecomm/products/productB9001.asp> [Accessed 31.05.11].
- OLIVEIRA, P. H., PRATHER, K. J., PRAZERES, D. M. F. & MONTEIRO, G. A. 2009. Structural instability of plasmid biopharmaceuticals: challenges and implications. *Trends in Biotechnology*, 27, 503-511.
- PARK, J. H. & LEE, S. Y. 2008. Towards systems metabolic engineering of microorganisms for amino acid production. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 454-460.
- PFEFFERLE, W., MOCKEL, B., BATHE, B. & MARX, A. 2003. Biotechnological manufacture of lysine. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 79, 59-112.
- PROMEGA, C. 2010. *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* [Online]. Promega. Available: <http://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/wizard-plus-sv-minipreps-dna-purification-system-protocol/> [Accessed 31.05.11].

- SCHRADER, J., SCHILLING, M., HOLTMANN, D., SELL, D., VILLELA, M., MARX, A. & VORHOLT, J. A. 2009. Methanol-based industrial biotechnology: current status and future perspectives of methylotrophic bacteria. *Trends in Biotechnology*, 27, 107-115.
- STENTZ, R., LOIZEL, C., MALLERET, C. & ZAGOREC, M. 2000. Development of genetic tools for *Lactobacillus sakei*: Disruption of the beta-galactosidase gene and use of lacZ as a reporter gene to study regulation of the putative copper ATPase, AtkB. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4272-4278.
- TANG, W. L. & ZHAO, H. 2009. Industrial biotechnology: Tools and applications. *Biotechnology Journal*, 4.
- THE NTNU CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, G. 2011. *Kapittel 8: Recombinant DNA Technology* [Online]. Available: http://boneslab.bio.ntnu.no/old_root/bi211_kap8.htm [Accessed 31.05.11].
- THERMO SCIENTIFIC. 2011. *GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use, 100-10,000 bp* [Online]. Available: <http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis/generuler-dna-ladders/sm0333-generuler-mix> [Accessed 07.06.11].
- TSIEN, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 509-544.

Vedlegg 1: Standardkurver og proteinkonsentrasjon

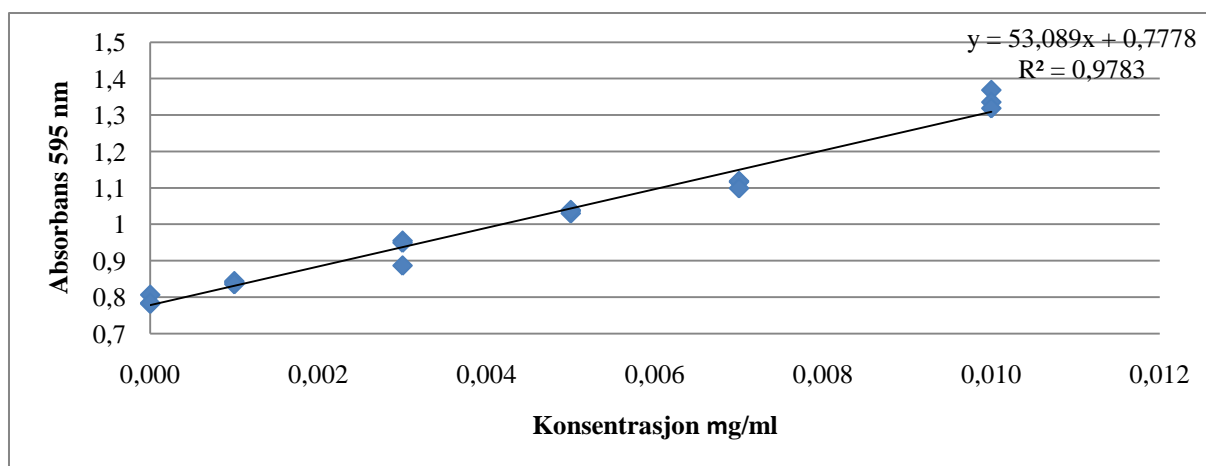
For hvert celleekstrakt som ble preparert ble proteinkonsentrasjonen bestemt ved Bio-Rad protein assay (se kapittel 2.5.1 og 2.5.2). Først måtte standardkurven etableres, da ble BSA (New England Biolabs) med kjent konsentrasjon benyttet. Alle målinger ble utført i triplikater og beregningene ble utført i Excel. For hver standardkurve ble likningen bestemt ved lineær regresjon og konsentrasjonen til celleekstraktene ble beregnet ut fra likningen. Alle standardkurvene er vist i figur V1.1, V1.2 og V1.3. Standardavvik ble beregnet i Excel ved hjelp av den innebygde funksjonen STDEV.

Absorbansmålingene for celleekstraktene er vist i tabell V1.1, V1.2 og V1.3, alle målingene ble utført ved 595 nm. Først ble konsentrasjonen beregnet ved hjelp av likningen. Deretter ble det tatt hensyn til alle fortyningene. Hver prøve var fortynt 10 ganger før målingen og for hver måling var enzymløsningen fortynt 100 ganger i kyvetta (10 μ l enzymløsning og totalt volum 1000 μ l i kyvetta).

Celleekstraktet ble videre benyttet i enzymassayet for å bestemme enzymaktiviteten til β -galaktosidase. Proteinkonsentrasjonen ble benyttet til å beregne spesifikk enzymaktivitet. Beregningseksempel er utført for pTH1mdhp-lacZ.

pTH1mdhp-lacZ

pTH1mdhp-lacZ er en vektor hvor reporter-genet *lacZ* er kontrollert av den sterke promotoren til metanoldehydrogenase. *B. methanolicus* transformert med denne vektoren ble benyttet til forsøk for optimalisering av reporter-gen-assayet. Standardkurven etablert ved bruk av proteinet BSA (New England Biolabs) er vist i figur V.1. Tabell V.1 viser absorbansmålinger og resultat av beregningene for å finne konsentrasjonen i celleekstraktet. Alle målinger ble utført i triplikater.



Figur V1.1. Standardkurven for bestemmelse av proteinkonsentrasjon av crude celleekstrakt. Protein for etablering av standardkurve: BSA (New England Biolabs).

Tabell V1.1. Absorbansmålinger og beregninger for å bestemme proteinkonsentrasjonen til celleekstrakt fra *B. methanolicus* transformert med plasmidet pTH1mdhp-lacZ. Original prøve var fortynnet 10 ganger før måling, og prøven var fortynnet 100 ganger i kyvetta.

Prøve	Absorbans 595 nm	Kons. i kyvetta fra regresjonslikning [mg/ml]	Kons. før fortynning i kyvetta [mg/ml]	Kons. før fortynning av originalprøve [mg/ml]	Kons. [mg/ml]	Standardavvik
mdhp	0,9145	0,002575	0,2575	2,575	2,4	0,2
mdhp	0,8921	0,002153	0,2153	2,153		
mdhp	0,9163	0,002609	0,2609	2,609		

Eksempel på beregning av konsentrasjon for den første absorbansmålingen:

Som likning i figur V1.1 viser: Stigningstall = 53,089 og konstant = 0,7778

$$C_{\text{proteiner}} = \frac{(Abs_{595} - Konst.)}{Stigningstall} = \frac{(0,9145 - 0,7778)}{53,089} = 0,002575 \text{ mg / ml}$$

Tar hensyn til fortynningen i kyvetten: 10 µl prøve i 1000 µl totalt:

$$0,002575 \text{ mg / ml} \times 100 = 0,2575 \text{ mg / ml}$$

Tar hensyn til den siste fortynningsfaktoren: den originale prøven var fortynnet 10 ganger før den ble tilsatt kyvetten:

$$0,2575 \text{ mg / ml} \times 10 = 2,575 \text{ mg / ml}$$

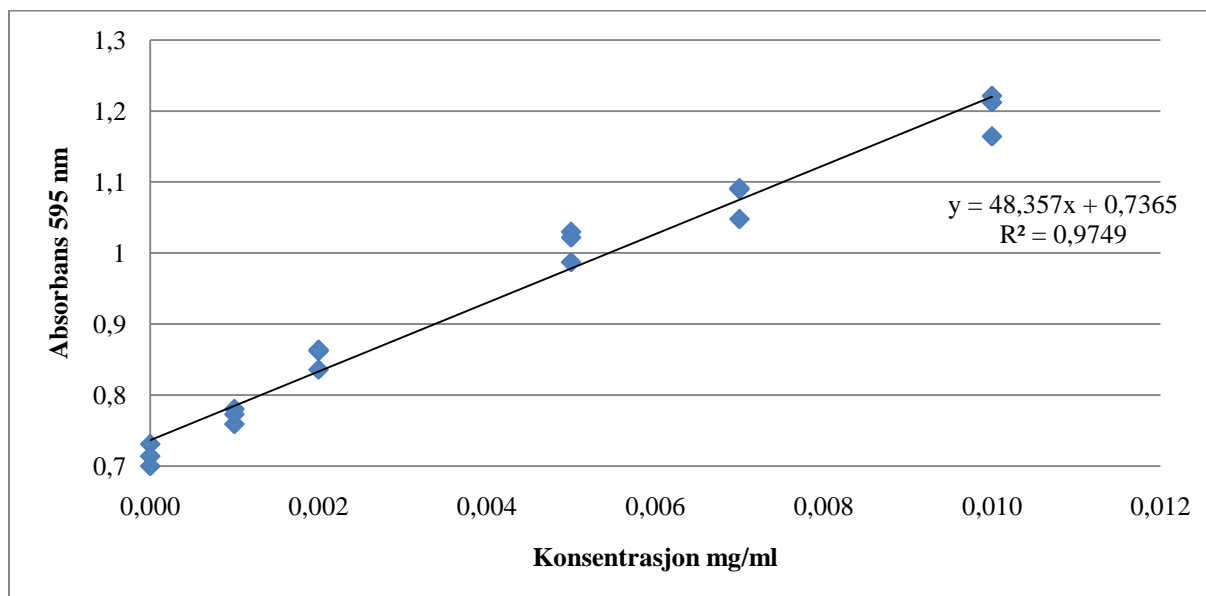
Gjennomsnitt konsentrasjon \pm standardavvik:

$$\underline{2,4 \pm 0,2 \text{ mg / ml}}$$

Konsentrasjonene ble beregnet på samme måte for alle prøver.

pTH1pfk-lacZ og pTH1mdh2p-lacZ

pTH1pfk-lacZ er en vektor hvor reportergener styres av promotoren til genet *pfk*. Dette genet gir opphav til enzymet fosfofruktokinase som er viktig i metabolismen til *B. methanolicus* (se figur 1.4). I vektoren pTH1mdh2p-lacZ kontrolleres uttrykket av *lacZ* av promotoren *mdh2p*. Dette er promotorregionen til det nylig oppdagede genet *mdh2p* lokalisert på kromosomet til *B. methanolicus* MGA3 (Heggeset, 2011a). Standardkurven for å beregne proteinkonsentrasjonen til celleekstrakt fra *B. methanolicus* transformert med de respektive vektorene er vist i figur V1.2. Absorbansmålingene og de beregnede konsentrasjonene er vist i tabell V1.2.



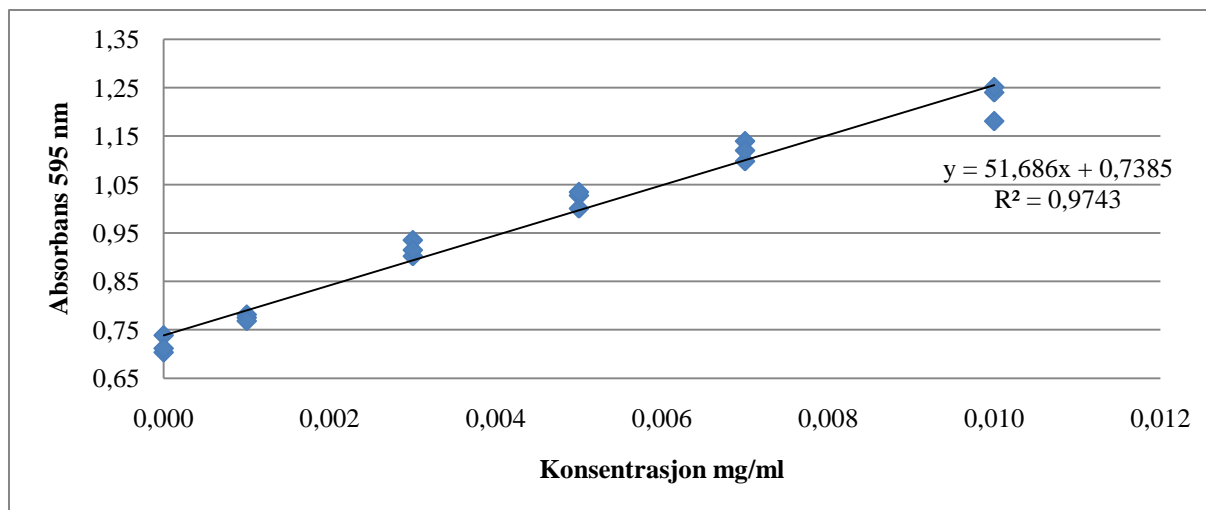
Figur V1.2 Standardkurven for bestemmelse av proteinkonsentrasjon av crude celleekstrakt. Protein for etablering av standardkurve: BSA (New England Biolabs).

Tabell V1.2 Absorbansmålinger og beregninger for å bestemme proteinkonsentrasjonen til celleekstrakt fra *B. methanolicus* transformert med plasmidet pTH1mdh2p-lacZ, pHP13.2, pTH1pfpk-lacZ, pHP13.1.

Prøve	Absorbans 595 nm	Kons. i kyvetta fra regresjonslikning [mg/ml]	Kons. før fortynning i kyvetta [mg/ml]	Kons. før fortynning av original prøve [mg/ml]	Kons. [mg/ml]	Standardavvik
mdh2p	0,8028	0,001371	0,1371	1,371	1,4	0,1
mdh2p	0,8105	0,00153	0,153	1,53		
mdh2p	0,8021	0,001356	0,1357	1,357		
pHP13.2	0,8349	0,002035	0,2035	2,035	1,8	0,2
pHP13.2	0,8168	0,001661	0,1661	1,661		
pHP13.2	0,8202	0,001731	0,1731	1,731		
pfpk1	0,8246	0,001822	0,1822	1,822	1,7	0,2
pfpk1	0,8079	0,001477	0,1477	1,477		
pfpk1	0,8165	0,001654	0,1654	1,654		
pfpk2	0,8147	0,001617	0,1617	1,617	1,72	0,09
pfpk2	0,8214	0,001756	0,1756	1,756		
pfpk2	0,8229	0,001787	0,1787	1,787		
pHP13.1	0,7958	0,001226	0,1226	1,226	1,5	0,6
pHP13.1	0,8458	0,00226	0,226	2,26		
pHP13.1	0,7899	0,001104	0,1104	1,104		

pTH1Cup-lacZ

I vektoren pTH1Cup-lacZ kontrolleres uttrykket av *lacZ* av en kobberinduserbar promotor som stammer fra *L. sakei* (Stentz et al., 2000). Kulturer med *B. methanolicus* transformert med denne vektoren ble dyrket og indusert av ulike konsentrasjoner med CuSO₄. Proteinkonsentrasjonen i celleekstraktet fra de ulike kulturene ble bestemt. Figur V1.3 viser standardkurven som ble etablert med proteinet BSA (New England Biolabs) og tabell V1.3 viser absorbansmålingene til prøvene med celleekstrakt og de beregnede konsentrasjonene.



Figur V1.3 Standardkurven for bestemmelse av proteinkonsentrasjon av crude celleekstrakt. Protein for etablering av standardkurve: BSA (New England Biolabs).

Tabell V1.2 Absorbansmålinger og beregninger for å bestemme proteinkonsentrasjonen til celleekstrakt fra *B. methanolicus* transformert med plasmidet pTH1Cup-lacZ. Prøvens navn indikerer konsentrasjonen av induseren CuSO₄.

Prøve	Absorbans 595 nm	Kons. i kyvetta fra regresjonslikning [mg/ml]	Kons. før fortynning i kyvetta [mg/ml]	Kons. før fortynning av original prøve [mg/ml]	Kons. [mg/ml]	Standardavvik
0	0,836	0,001886	0,1886	1,886	1,89	0,01
0	0,8366	0,001898	0,1898	1,898		
10	0,8373	0,001912	0,1912	1,912	2	0,3
10	0,8275	0,001722	0,1722	1,722		
10	0,8563	0,002279	0,2279	2,279		
20	0,8207	0,00159	0,159	1,59	1,8	0,3
20	0,8239	0,001652	0,1652	1,652		
20	0,8448	0,002057	0,2057	2,057		
50	0,8119	0,00142	0,142	1,42	1,3	0,3
50	0,7849	0,000898	0,0898	0,898		
50	0,8156	0,001492	0,1492	1,492		
100	0,8077	0,001339	0,1339	1,339	1,1	0,3
100	0,7985	0,001161	0,1161	1,161		
100	0,7767	0,000739	0,0739	0,739		

Vedlegg 2 Rådata for forsøk med pTH1mdhp-lacZ

Celleekstrakt fra *B. methanolicus* transformert med pTH1mdhp-lacZ ble benyttet i forsøkene for optimalisering av assay. I samtlige forsøk var den originale celleekstraktprøven (proteinløsningen) fortynnet 10 ganger (df i likning V2.1 = 10), i hver måling ble det tilsatt 100 µl proteinløsning i kyvetten (tilsvarer V_{enz} under nevneren i likning V2.1), totalt volum i kyvettene ved alle målinger var 1 ml (tilsvarer V_{tot} over nevneren i likning V1.1) og proteinkonsentrasjonen i celleekstraktet var beregnet til 2,4 mg/ml (se vedlegg 1). Enzymaktiviteten ble beregnet ut fra følgende likning:

$$Units / ml \ enzyme = \frac{(\Delta A_{410nm} / sec \text{ pr\o}ve - \Delta A_{410nm} / sec \text{ blank}) \times V_{tot} \times (df)}{\epsilon \times V_{enz}} \times 60 \frac{sec}{min} \quad (V2.1)$$

Ettersom stigningstallet til blankprøve ikke var signifikant i forhold til stigningstallet til prøven ble det ikke trekt fra slik som likning V2.1 indikerer. Se eksempel på plott av blankprøve uten enzym i figur V2.2. Enzymaktivitet ble dividert på den beregnede proteinkonsentrasjonen, se likning V2.2.

$$Units / mg \ protein = \frac{Units / ml \ enzyme}{mg \ protein / ml \ enzyme} \quad (V2.2)$$

En utledning og nærmere beskrivelse av likningen for bestemmelse av enzymaktivitet finnes i vedlegg 6.

Beregning av proteinkonsentrasjonen er vist i vedlegg 1. Rådata for assayet er vist i tabellene som følger. Figur V2.2 viser et eksempel på hvordan plottene for enzymaktivitetsmålingene med pTH1mdhp-lacZ ser ut. Figuren viser et plott over absorbansmålingene for prøve pH 7 fra tabell V2.1. For hver måling er det utført lineær regresjon hvor stigningstallet er benyttet for å beregne enzymaktiviteten. Alle standardavvik er beregnet i Excel med den innebygde funksjonen STDEV.

Beregningseksempel:

Her følger et beregningseksempel på den første målingen med pH 7 i tabell V2.1.

Som tidligere nevnt: $V_{tot} = 1 \text{ ml}$, $V_{enz} = 0,1 \text{ ml}$,

$\epsilon = 3,5$ millimolar ekstinksjonskoeffisient [μmol^{-1}], som tabellen viser: $A_{410\text{nm}} = 1,34 \cdot 10^{-3}$

$$U / \text{mg protein} = \frac{(\Delta A_{410\text{nm}} / \text{sec pr\o{v}e} - \Delta A_{410\text{nm}} / \text{sec blank}) \times V_{\text{tot}} \times (df)}{\epsilon \times V_{\text{enz}} \times C_{\text{protein}} [\text{mg} / \text{ml}]} \times 60 \frac{\text{sec}}{\text{min}}$$

$$U / \text{mg protein} = \frac{1,34 \times 10^{-3} \times 1 \times 10}{3,5 \times 0,1 \times 2,4} \times 60 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right]$$

$$U / \text{mg protein} = 0,95$$

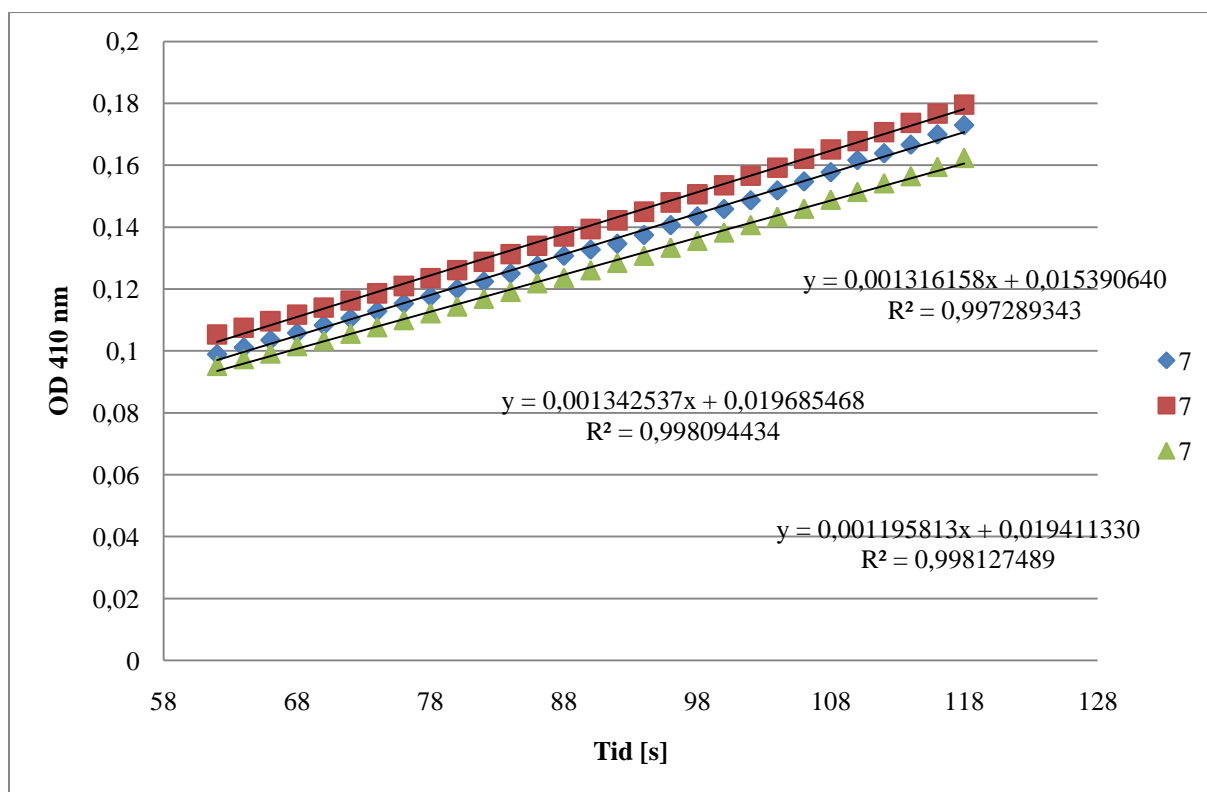
Svaret her avviker litt fra svaret i tabell V2.1, dette skyldes avrundinger.

Tabell V2.1. Rådata for beregning av enzymaktivitet ved ulike pH. Enzymaktivitet er beregnet ut fra likning V2.1 og V2.2. Parametere som var like ved alle forsøk og ikke er oppgitt i tabellen er gitt i teksten over. Prøven 7,5 som er merket grå er ikke med i beregningen pga. krystallisering av ONPG-løsningen.

Prøve:	Stigningstall [OD/sekund]:	Enzymaktivitet [U/mg]:	Average enzym aktivitet [U/mg]:	Standardavvik:
6,5	$9,93 \cdot 10^{-4}$	0,6958		
6,5	$1,21 \cdot 10^{-3}$	0,8514		
6,5	$1,05 \cdot 10^{-3}$	0,7341	0,76	0,08
7	$1,34 \cdot 10^{-3}$	0,9411		
7	$1,32 \cdot 10^{-3}$	0,9226		
7	$1,20 \cdot 10^{-3}$	0,8382	0,9	0,05
7,5	$2,51 \cdot 10^{-4}$	0,1759		
7,5	$1,12 \cdot 10^{-3}$	0,8402		
7,5	$1,12 \cdot 10^{-3}$	0,7883	0,81	0,04
8	$8,17 \cdot 10^{-4}$	0,5729		
8	$8,11 \cdot 10^{-4}$	0,5685		
8	$7,03 \cdot 10^{-4}$	0,4929	0,55	0,05

Tabell V2.2. Rådata for bestemmelse av enzymaktivitet med preinkubering i fem minutter ved ulike temperaturer. Enzymaktivitet er beregnet ut fra likning V2.1 og V2.2. Parametere som var lik ved alle forsøk og ikke er oppgitt i tabellen er gitt i teksten over.

Prøve:	Stigningstall [OD/sekund]:	Enzymaktivitet [U/mg]:	Average enzym aktivitet [U/mg]:	Standardavvik:
45	$2,652 \cdot 10^{-3}$	1,859		
45	$2,255 \cdot 10^{-3}$	1,581		
45	$2,398 \cdot 10^{-3}$	1,681		
45	$1,713 \cdot 10^{-3}$	1,201	1,6	0,5
50	$2,793 \cdot 10^{-3}$	1,958		
50	$2,741 \cdot 10^{-3}$	1,921		
50	$1,924 \cdot 10^{-3}$	1,349		
50	$2,574 \cdot 10^{-3}$	1,804		
50	$1,811 \cdot 10^{-3}$	1,269	1,7	0,3
55	$2,682 \cdot 10^{-3}$	1,88		
55	$2,519 \cdot 10^{-3}$	1,766		
55	$1,982 \cdot 10^{-3}$	1,39	1,7	0,3
60	$2,349 \cdot 10^{-3}$	1,647		
60	$1,834 \cdot 10^{-3}$	1,286	1,5	0,3



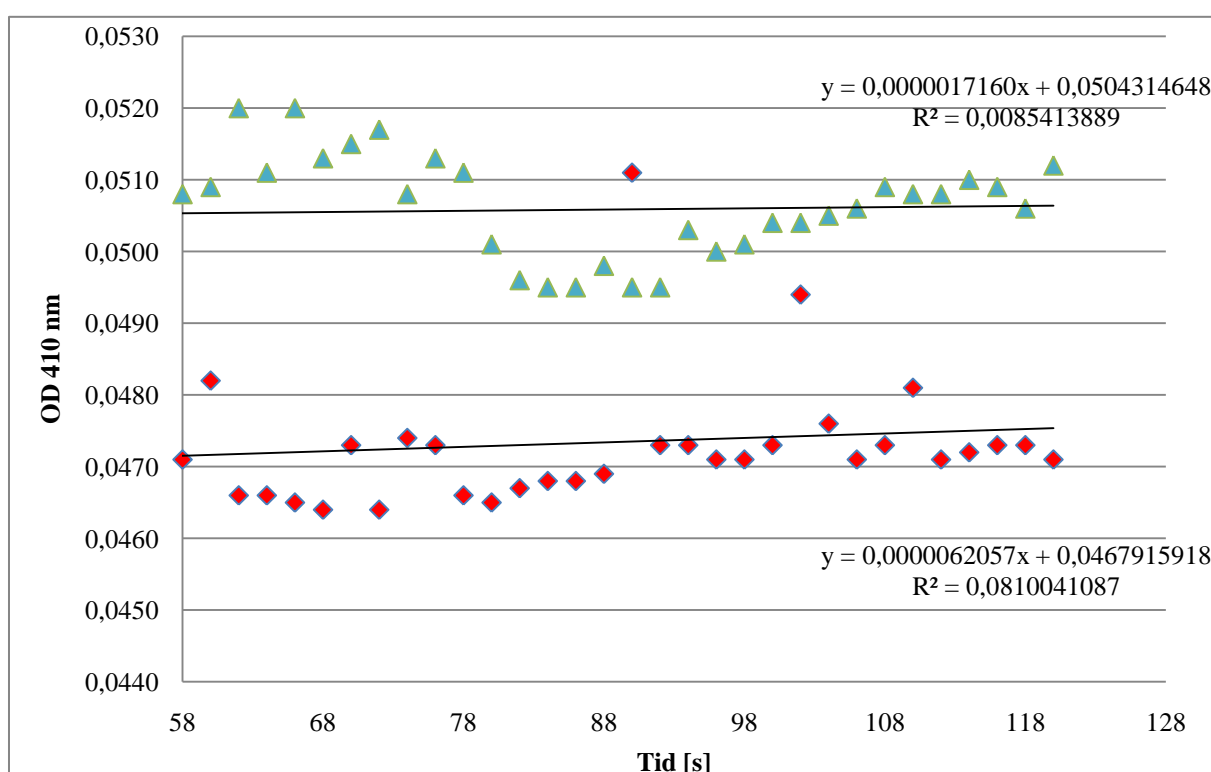
Figur V2.1. Lineær regresjon for absorbansmålinger av celleekstrakt med pTH1mdhp-lacZ og pH 7. Beregningene er vist i tabell V2.1.

Tabell V2.3. Rådata for bestemmelse av enzymaktivitet med preinkubering ved ulike temperaturer og ulike tider. Enzymaktivitet er beregnet ut fra likning V2.1 og V2.2. Parametere som var lik ved alle forsøk og ikke er oppgitt i tabellen er gitt i teksten over.

Prøve, temperatur:	Tid	Stigningstall [OD/sekund]:	Enzymaktivitet [U/mg]:	Average enzym aktivitet [U/mg]:	Standardavvik:
60	60	$2,126 \cdot 10^{-3}$	1,491		
60	60	$2,025 \cdot 10^{-3}$	1,42		
60	60	$2,206 \cdot 10^{-3}$	1,547	1,49	0,06
60	30	$2,891 \cdot 10^{-3}$	2,026		
60	30	$2,684 \cdot 10^{-3}$	1,882		
60	30	$2,378 \cdot 10^{-3}$	1,667	1,9	0,2
60	15	$2,792 \cdot 10^{-3}$	1,957		
60	15	$2,803 \cdot 10^{-3}$	1,965		
60	15	$2,559 \cdot 10^{-3}$	1,794	1,9	0,1
60	5	$2,605 \cdot 10^{-3}$	1,826		
60	5	$2,850 \cdot 10^{-3}$	1,998		
60	5	$2,632 \cdot 10^{-3}$	1,845	1,89	0,09
60	1	$1,827 \cdot 10^{-3}$	1,281		
60	1	$1,876 \cdot 10^{-3}$	1,315		
60	1	$1,738 \cdot 10^{-3}$	1,219	1,27	0,05
50	60	$2,837 \cdot 10^{-3}$	1,989		
50	60	$2,324 \cdot 10^{-3}$	1,629		
50	60	$2,106 \cdot 10^{-3}$	1,476	1,7	0,3
50	30	$2,264 \cdot 10^{-3}$	1,587		
50	30	$2,080 \cdot 10^{-3}$	1,458		
50	30	$2,621 \cdot 10^{-3}$	1,837	1,6	0,2
50	15	$2,566 \cdot 10^{-3}$	1,798		
50	15	$2,111 \cdot 10^{-3}$	1,479		
50	15	$1,775 \cdot 10^{-3}$	1,244	1,5	0,3
50	5	$2,664 \cdot 10^{-3}$	1,867		
50	5	$2,508 \cdot 10^{-3}$	1,758		
50	5	$2,624 \cdot 10^{-3}$	1,839	1,82	0,06
50	1	$1,447 \cdot 10^{-3}$	1,014		
50	1	$1,538 \cdot 10^{-3}$	1,078		
50	1	$1,288 \cdot 10^{-3}$	0,903	0,99	0,09
45	60	$1,730 \cdot 10^{-3}$	1,213		
45	60	$2,164 \cdot 10^{-3}$	1,517		
45	60	$2,242 \cdot 10^{-3}$	1,572	1,4	0,2
45	30	$2,662 \cdot 10^{-3}$	1,866		
45	30	$2,439 \cdot 10^{-3}$	1,71		
45	30	$2,388 \cdot 10^{-3}$	1,674	1,8	0,1
45	15	$2,274 \cdot 10^{-3}$	1,594		
45	15	$2,445 \cdot 10^{-3}$	1,714		
45	15	$2,329 \cdot 10^{-3}$	1,632	1,65	0,06
45	5	$2,338 \cdot 10^{-3}$	1,639		
45	5	$1,959 \cdot 10^{-3}$	1,373		
45	5	$2,141 \cdot 10^{-3}$	1,5	1,5	0,1

Fortsettelse av tabell V2.3 Rådata for bestemmelse av enzymaktivitet med preinkubering ved ulike temperaturer og ulike tider. Enzymaktivitet er beregnet ut fra likning V2.1 og V2.2. Parametere som var lik ved alle forsøk og ikke er oppgitt i tabellen er gitt i teksten over.

Prøve, temperatur:	Tid	Stigningstall [OD/sekund]:	Enzymaktivitet [U/mg]:	Average enzym aktivitet [U/mg]:	Standardavvik:
45	1	$1,652 \cdot 10^{-3}$	1,158	1,12	0,07
45	1	$1,479 \cdot 10^{-3}$	1,037		
45	1	$1,647 \cdot 10^{-3}$	1,154		
Romtemp.	0	$1,079 \cdot 10^{-3}$	0,7567	0,78	0,02
Romtemp.	0	$1,131 \cdot 10^{-3}$	0,7931		
Romtemp.	0	$1,104 \cdot 10^{-3}$	0,7739		



Figur V2.2 Aktivitetsmålinger for blankprøve uten enzym. Som regresjonslikningene viser er stigningstallet her ca. 1000 ganger mindre enn for prøve med pTH1mdhp-lacZ vist i figur V2.1.

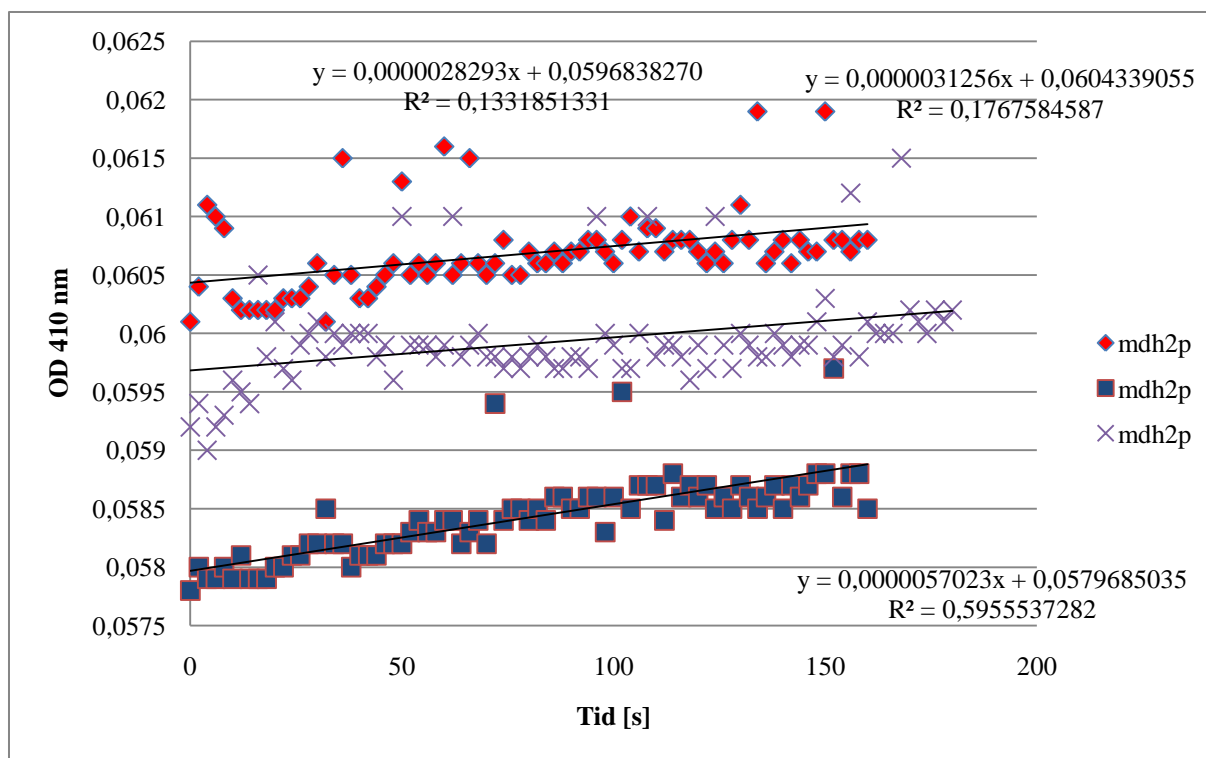
Vedlegg 3 Rådata for forsøk med pTH1mdh2p-lacZ

Promotorregionen til det potensielle genet *mdh2p* lokalisert på kromosomalt DNA fra *B. methanolicus* MGA3 ble undersøkt. Et segment på 470 bp oppstrøms for *mdh2p* ble klonet og koblet mot reportergen *lacZ*, dette ga vektoren pTH1mdh2p-lacZ. Enzymaktiviteten til β -galaktosidase ble målt i celleekstrakt fra *B. methanolicus* transformert med pTH1mdh2p-lacZ. Som en negativ kontroll ble enzymaktiviteten målt i celleekstrakt fra *B. methanolicus* transformert med pHP13. Stigningstallet ble bestemt ved lineær regresjon i Excel.

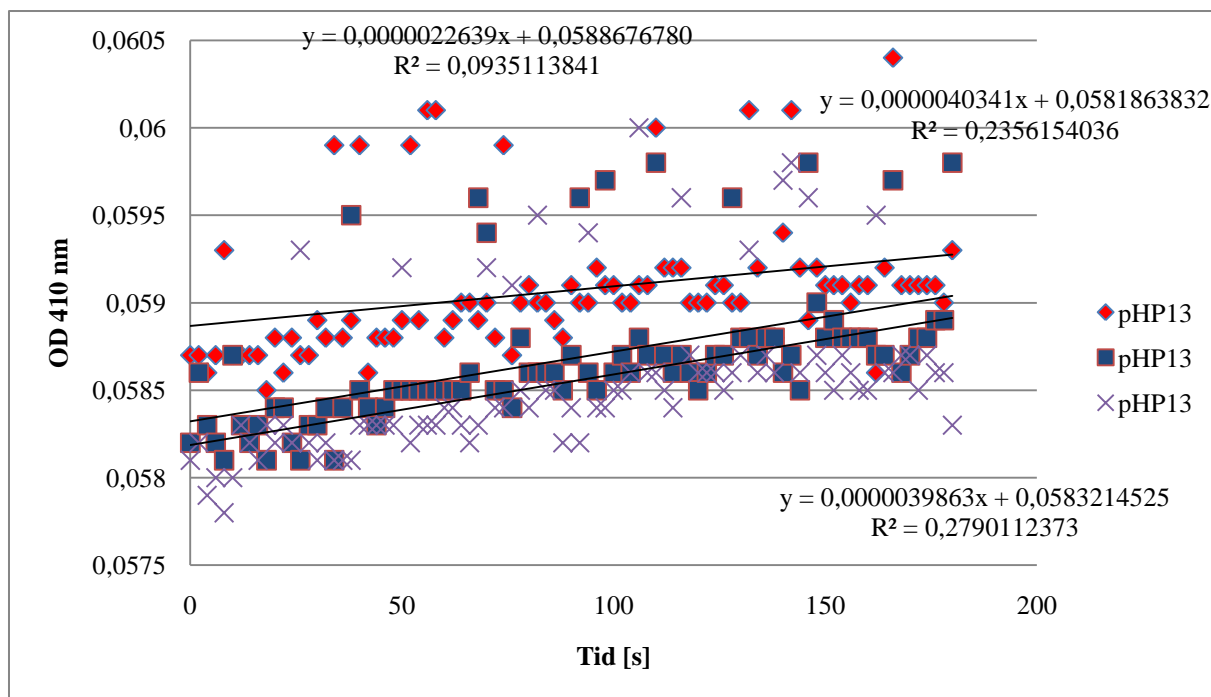
Figur V3.1, V3.2, V3.3 og V3.4 viser aktivitetmålingene for prøvene. Av dataene skal stigningstallet benyttes for å beregne enzymaktiviteten (se vedlegg 6). Det er ikke med plott for blankprøver uten substratet ONPG fordi disse hadde negativt stigningstall, og ble derfor neglisjert. Stigningstallene for de negative prøvene pHP13.1 og pHP13.2, samt blankprøven uten enzym er i samme størrelsesorden som stigningstallet for pTH1mdh2p-lacZ. Dermed er det ikke nødvendig å beregne aktiviteten for β -galaktosidase i pTH1mdh2p-lacZ. En oversikt over stigningstallene for hver regresjon er vist i tabell V3.1.

Tabell V3.1. Stigningstallene for rådata av enzymaktivitetene. Plott av rådata er vist i figurene under. Stigningstall ble funnet ved hjelp av lineær regresjon i Excel.

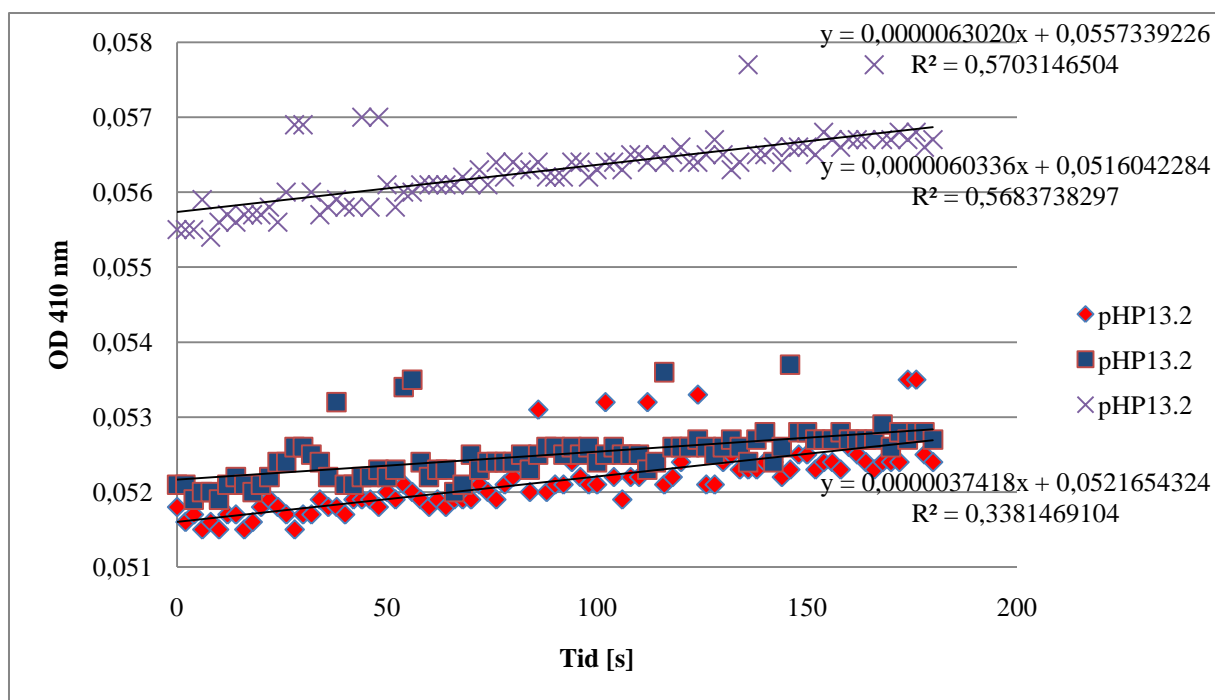
Prøve:	Stigningstall [OD/sekund]:	Gjennomsnitt stigningstall [OD/sekund]:	Standardavvik:
mdh2p	$3,126 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
mdh2p	$2,829 \cdot 10^{-6}$		
mdh2p	$5,702 \cdot 10^{-6}$		
pHP13.1	$2,264 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$
pHP13.1	$4,034 \cdot 10^{-6}$		
pHP13.1	$3,986 \cdot 10^{-6}$		
pHP13.2	$6,302 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$
pHP13.2	$6,034 \cdot 10^{-6}$		
pHP13.2	$3,742 \cdot 10^{-6}$		
u.e.	$1,662 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
u.e.	$2,012 \cdot 10^{-6}$		



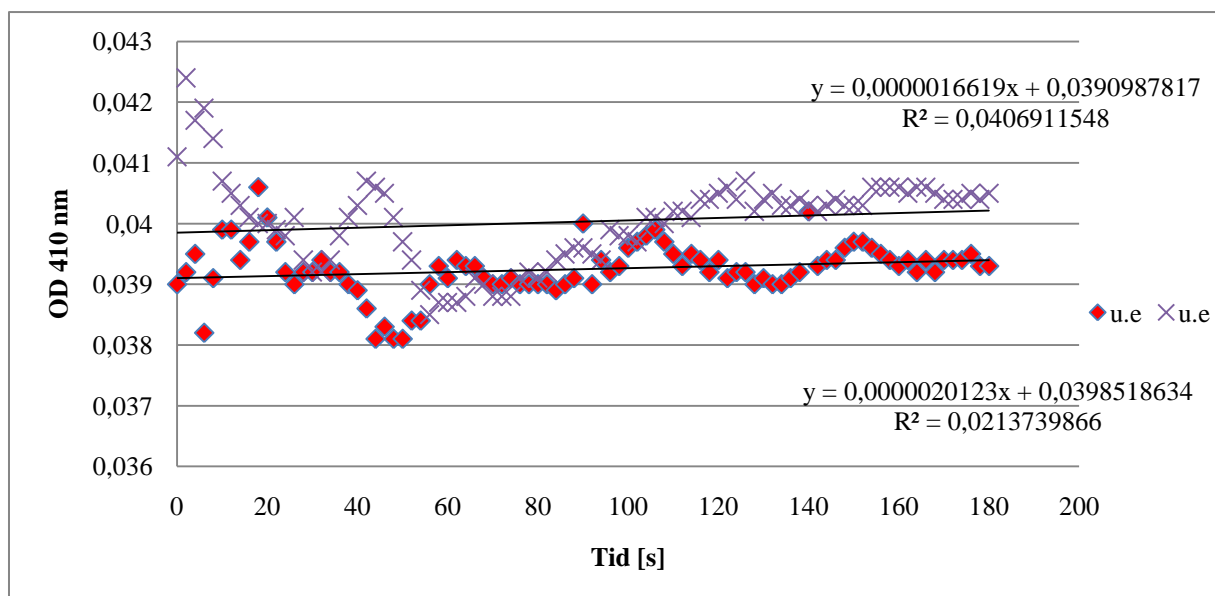
Figur V3.1. Aktivitetsmålinger av celleekstrakt med pTH1mdhp-lacZ.



Figur V3.2. Aktivitetsmålinger for celleekstrakt med pHP13.1.



Figur V3.3. Aktivitetsmålinger for celleekstrakt med pH13.2.



Figur V3.4. Aktivitetsmålinger for blankprøver uten enzym.

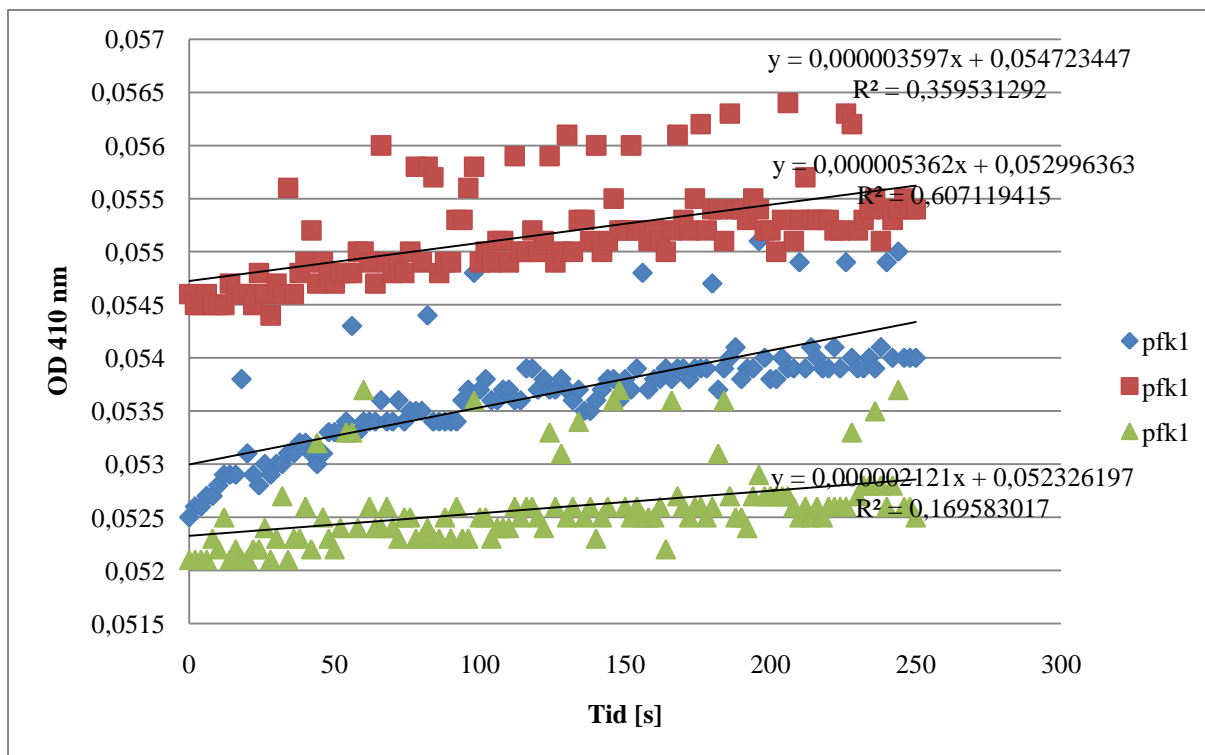
Vedlegg 4 Rådata for forsøk med pTH1pfk-lacZ

Promotoren til genet *pfk* var klonet fra tidligere. I denne oppgaven ble promotoren koblet opp mot reportergen *lacZ* og aktiviteten til β -galaktosidase i celleekstraktet ble bestemt. Det ble dyrket opp en over natt-kultur med *B. methanolicus* transformert med pTH1pfpk-lacZ, kulturen ble reinokulert i to nye kulturer som ble dyrket til OD₆₀₀ målte ca 1,5. Enzymaktiviteten til de to celleekstraktene ble målt og som negativ kontroll ble celleekstrakt fra *B. methanolicus* pHP13 benyttet.

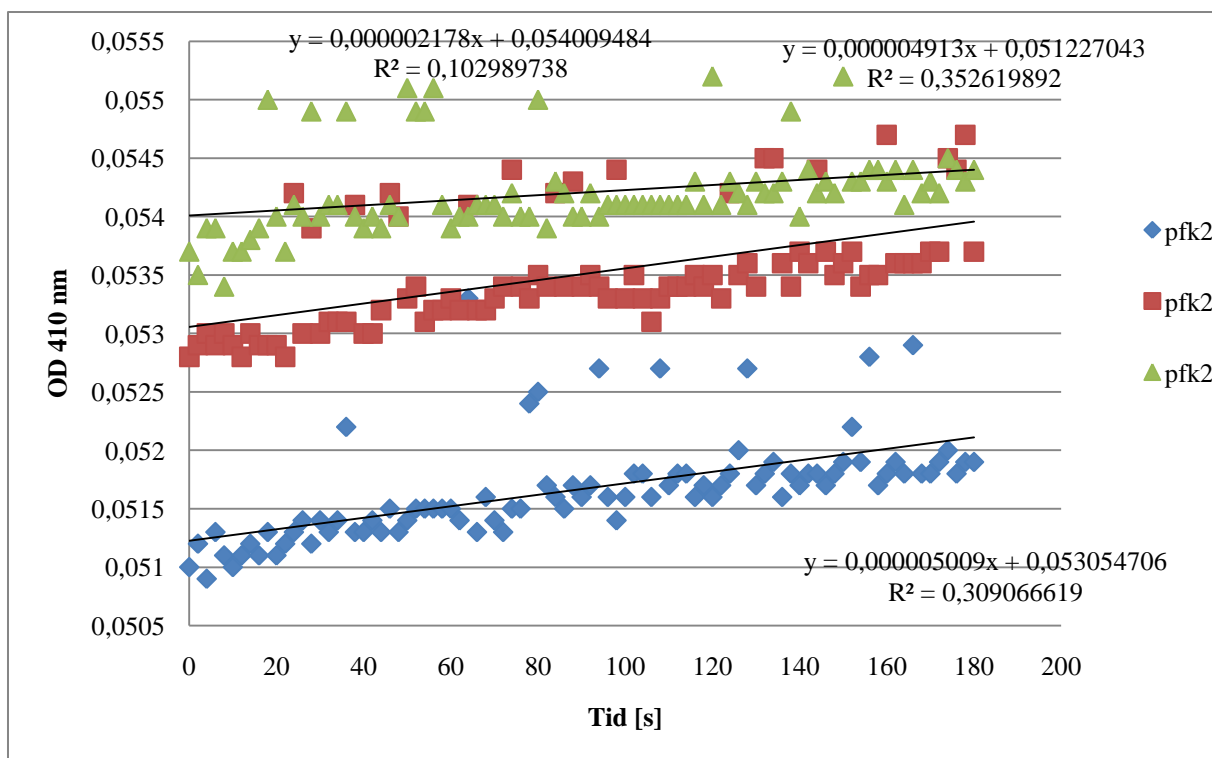
Figur V4.1, V4.2, V4.3 og V4.4 viser aktivitetsmålingene for prøvene. Av dataene skal stigningstallet benyttes for å beregne enzymaktiviteten (se vedlegg 6). Stigningstallene for den negative prøven pHP13.1 og blankprøven uten enzym er i samme størrelsesorden som stigningstallet for pTH1pfpk-lacZ. Dermed er det ikke nødvendig å beregne aktiviteten for β -galaktosidase i pTH1pfpk-lacZ. En oversikt over stigningstallene for hver regresjon er vist i tabell V4.1.

Tabell V4.1. Rådata for målingene av prøver med pTH1mdh2p-lacZ. Som negativ kontroll er aktiviteter målt for prøver med pHP13.

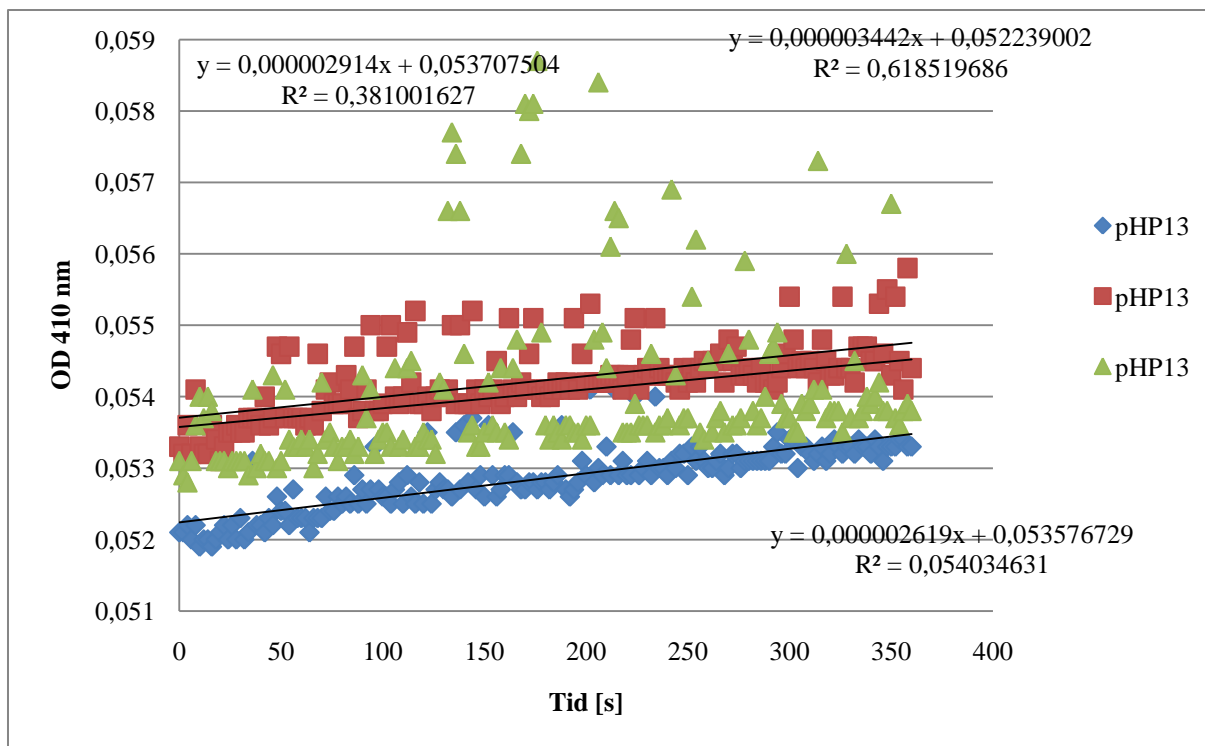
Prøve:	Stigningstall [OD/sekund]:	Gjennomsnitt stigningstall [OD/sekund]	Standardavvik
pfk1	$5,36 \cdot 10^{-6}$		
pfk1	$3,60 \cdot 10^{-6}$		
pfk1	$2,12 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
pfk2	$4,91 \cdot 10^{-6}$		
pfk2	$5,01 \cdot 10^{-6}$		
pfk2	$2,18 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$
pHP13.1	$3,44 \cdot 10^{-6}$		
pHP13.1	$2,91 \cdot 10^{-6}$		
pHP13.1	$2,62 \cdot 10^{-6}$	$3,0 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$
u.e.	$5,71 \cdot 10^{-6}$		
u.e.	$4,78 \cdot 10^{-6}$		
u.e.	$5,40 \cdot 10^{-6}$	$5,3 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$
pfk1 u/ONPG	$2,34 \cdot 10^{-6}$		
pfk1 u/ONPG	$5,55 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$
pfk2 u/ONPG	$2,61 \cdot 10^{-6}$		
pfk2 u/ONPG	$4,94 \cdot 10^{-6}$		
pfk2 u/ONPG	$1,04 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$



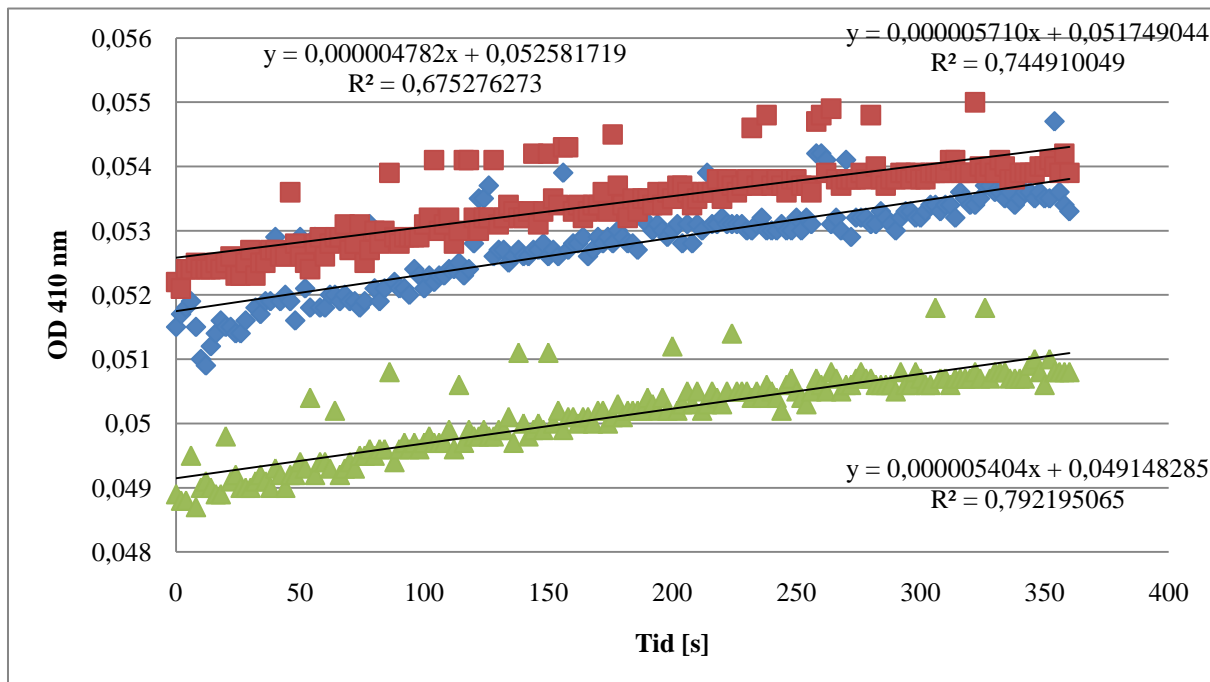
Figur V4.1. Enzymaktivitet til celleekstrakt med pTH1pfkp-lacZ. Prøve pfk1.



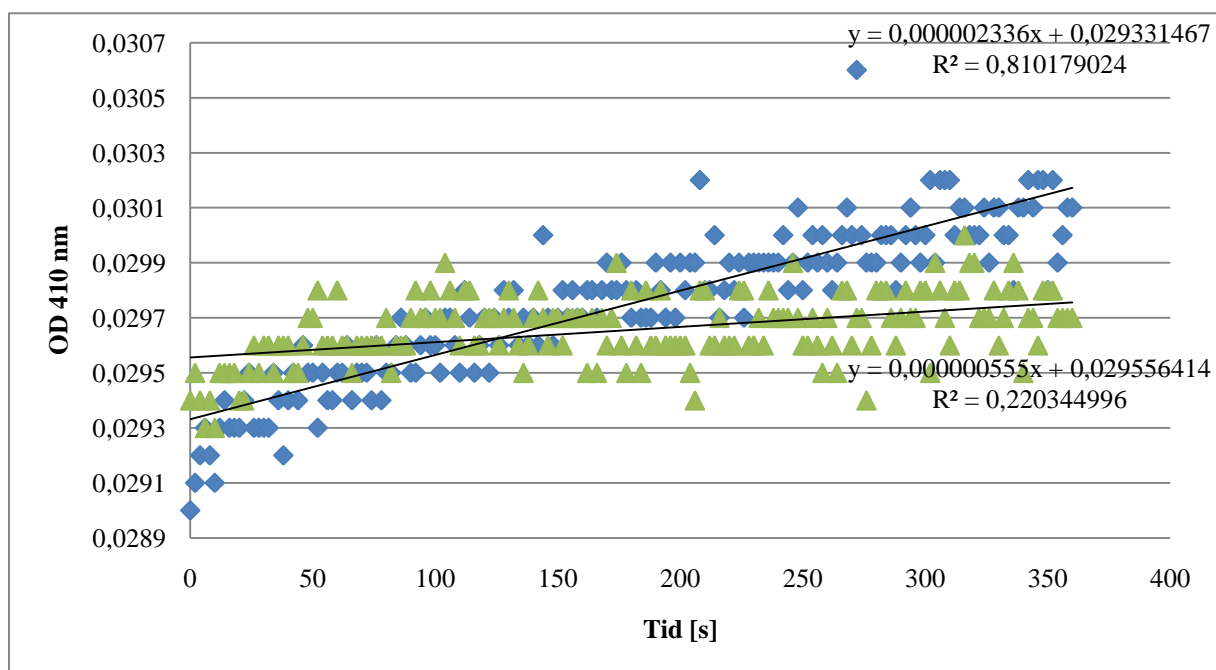
Figur V4.2. Enzymaktivitet til celleekstrakt med pTH1pfkp.lacZ. Prøve pfk2.



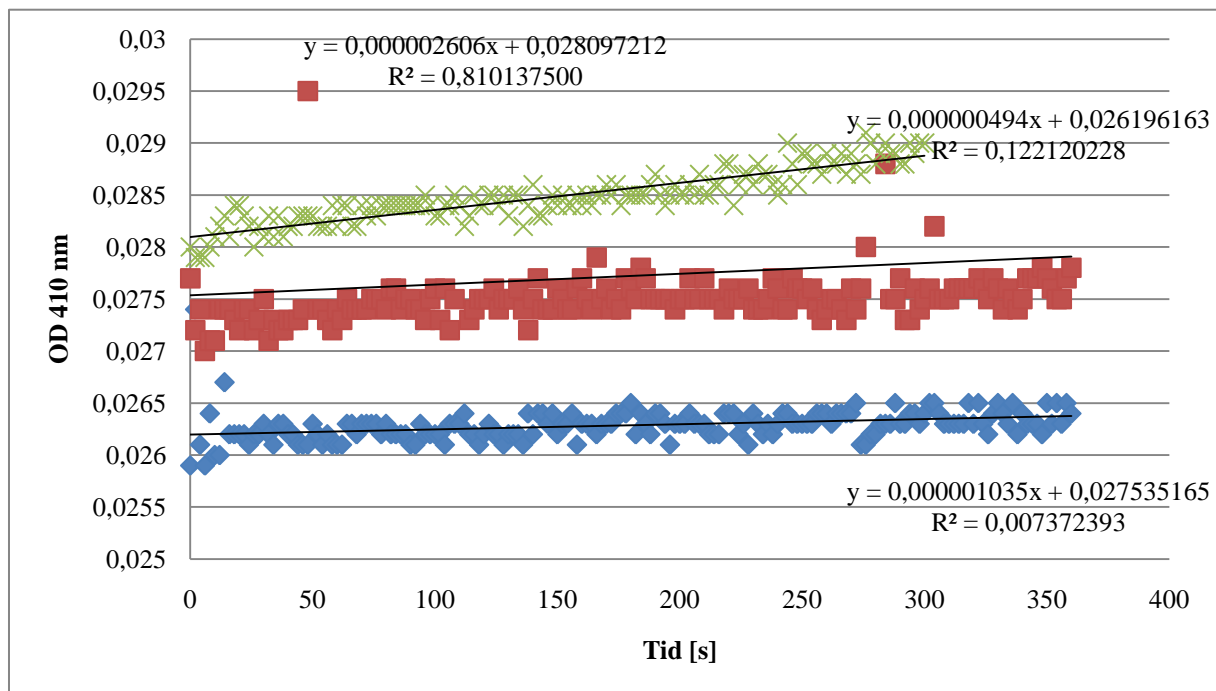
Figur V4.3. Aktivitetsmålinger for negativ kontroll, celleekstrakt med pHP13.1.



Figur V4.4. Blank måling av blankprøve uten enzym.



Figur V4.5 Aktivitetsmålinger for celleekstrakt pfkp.1 uten substratet ONPG.



Figur V4.6 Aktivitetsmålinger for prøve pfkp.2 uten substratet ONPG.

Vedlegg 5 Rådata for forsøk med pTH1Cup-lacZ

Kobberpromotoren fra *Lactobacillus sakei* ble amplifisert med PCR og koblet sammen med reporter-genet *LacZ*. *B. methanolicus* transformert med pTH1Cup-lacZ ble dyrket opp i en over nattkultur (MvCM medium, 200 mM metanol). Over nattkulturen ble reinokulert til 6 nye kulturer. En kultur ble ikke indusert, mens de 5 resterende kulturer ble indusert med følgende konsentrasjoner av CuSO₄: 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM og 200 µM. Da kulturene nådde OD₆₀₀ = ca. 1,5 ble de høstet og sonikert. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt i hver kultur og er vist i tabell V5.1, og finnes også i vedlegg 1.

Tabell V5.1. Proteinkonsentrasjon i celleekstrakt fra prøver. Prøvenavn indikerer konsentrasjonen av induser CuSO₄ i µM.

Prøve	Konsentrasjon [mg/ml]	Standardavvik
0	1,89	0,008
10	2	0,3
20	1,8	0,3
50	1,3	0,3
100	1,1	0,3

I disse forsøk var de originale celleekstraktprøvene fortynnet 10 ganger (df i likning V4.1 = 10), i hver måling ble det tilsatt 100 µl proteinløsning i kyvetten (tilsvarer (0,1) under nevneren i likning V5.1) og totalt volum i kyvettene ved alle målinger var 1 ml (tilsvarer (1) over nevneren i likning V5.1).

$$\text{Units / ml enzyme} = \frac{(\Delta A_{410nm} / \text{sec}(\text{sample})) \times (1) \times (df)}{(3,5) \times (0,1)} \times 60 \text{sec} \quad (\text{V5.1})$$

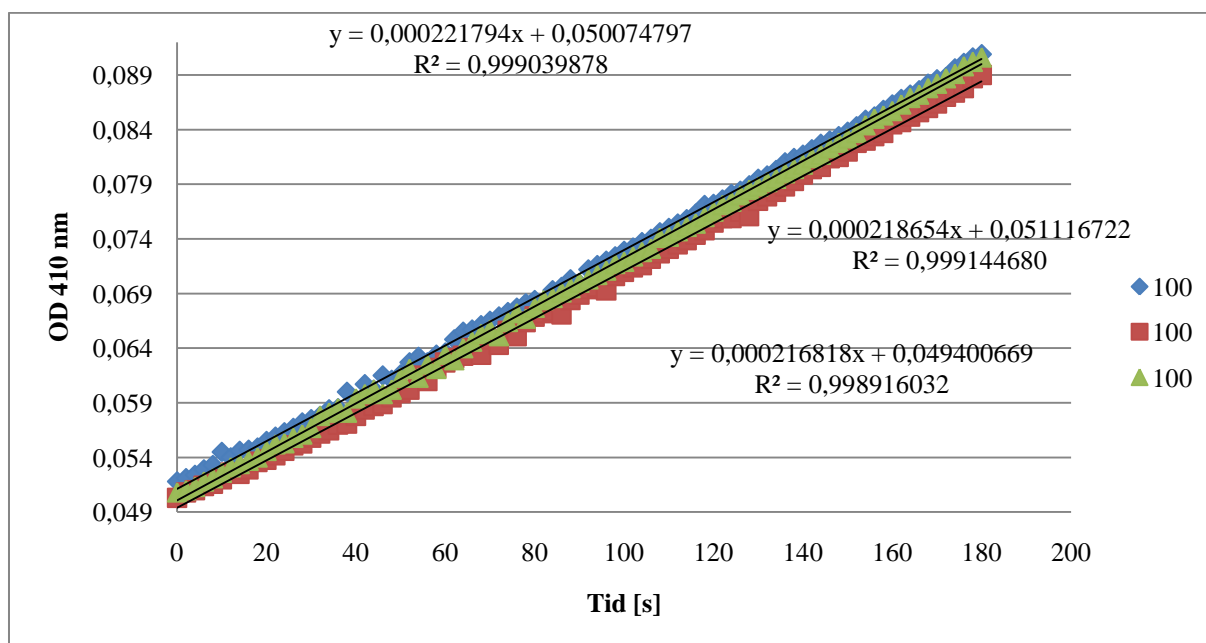
Enzymaktivitet ble dividert på den beregnede proteinkonsentrasjonen, se likning V5.2.

$$\text{Units / ml enzyme} = \frac{\text{Units / ml enzyme}}{\text{mg protein / ml enzyme}} \quad (\text{V5.2})$$

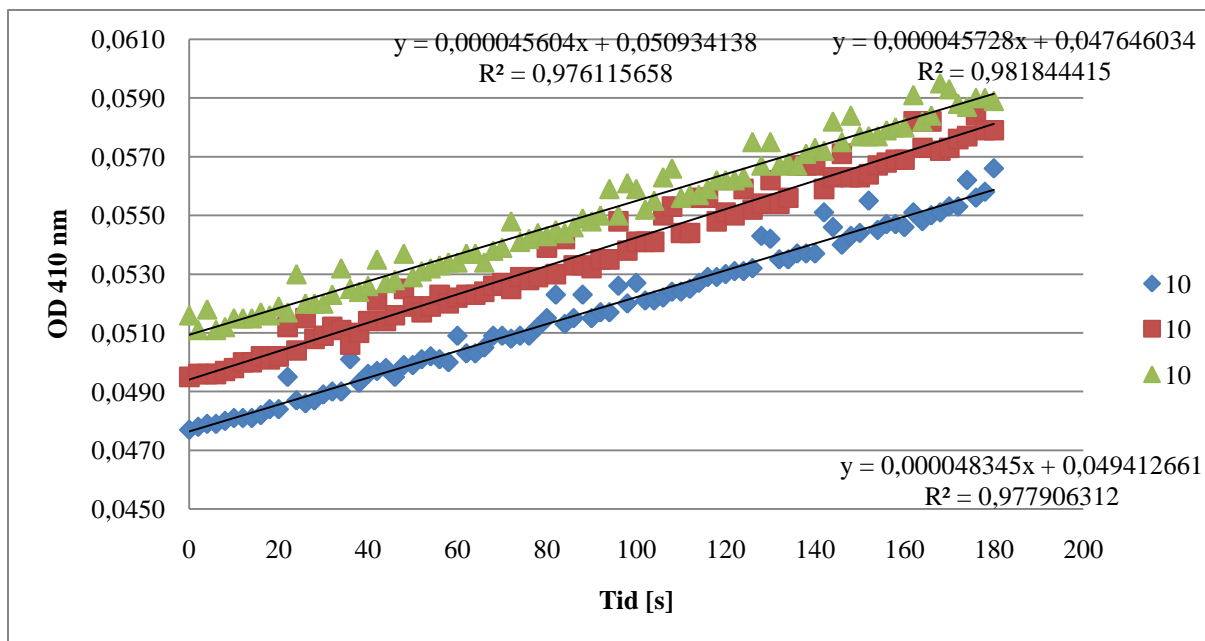
Rådata for beregninger av enzymaktivitet er vist i tabell V5.2. Plott av aktivitetene for prøven tilsatt 100 µM CuSO₄ er vist i figur V5.1 og for prøven tilsatt 10 µM CuSO₄ er vist i figur V5.2. Aktiviteter for negativ kontroll av prøve pHP13 er vist i figur V5.3. Blankprøvene er neglisjert på grunn av negativt stigningstall.

Tabell V5.2. Rådata for beregninger av enzymaktivitet for prøver med pTH1Cup-lacZ. Prøvenes navn indikerer konsentrasjonen av induser CuSO₄ i µM.

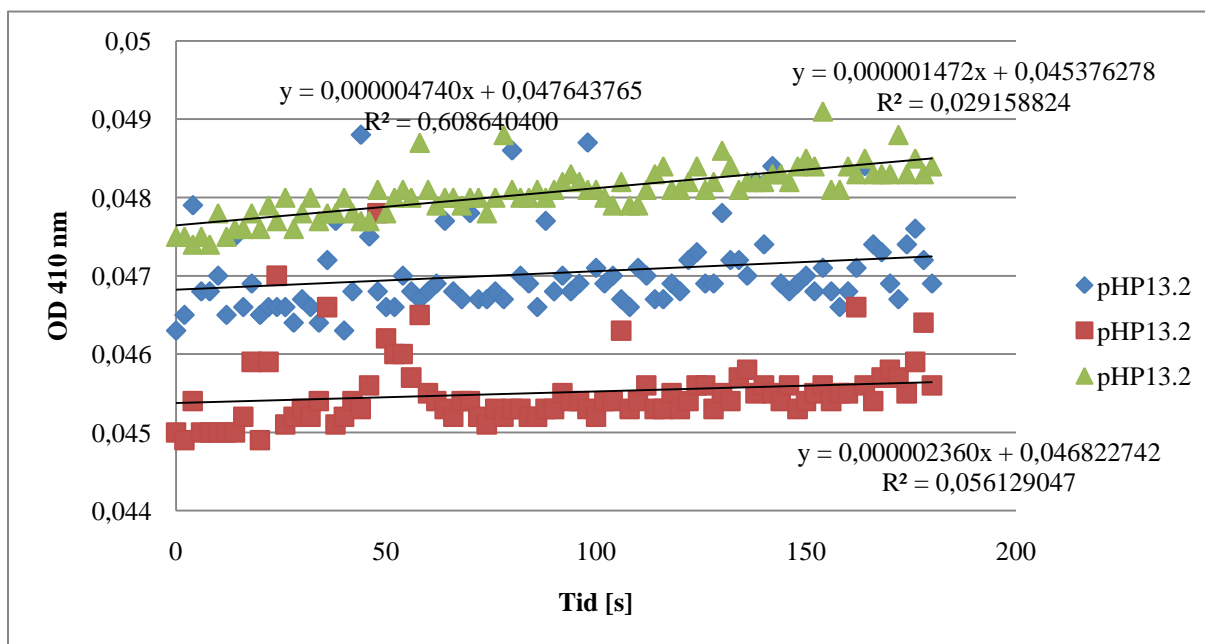
Prøve:	Stigningstall [OD/sekund]:	Enzymaktivitet [U/mg]:	Average enzym aktivitet [U/mg]:	Standardavvik:
0	$4,117 \cdot 10^{-5}$	0,03723	0,037	0,002
0	$3,785 \cdot 10^{-5}$	0,03429		
0	$4,178 \cdot 10^{-5}$	0,03785		
10	$4,560 \cdot 10^{-5}$	0,03967	0,041	0,001
10	$4,573 \cdot 10^{-5}$	0,03978		
10	$4,835 \cdot 10^{-5}$	0,04205		
20	$9,375 \cdot 10^{-5}$	0,09098	0,089	0,005
20	$8,534 \cdot 10^{-5}$	0,08282		
20	$9,452 \cdot 10^{-5}$	0,09173		
50	$7,784 \cdot 10^{-5}$	0,10509	0,11	0,01
50	$7,671 \cdot 10^{-5}$	0,10356		
50	$9,137 \cdot 10^{-5}$	0,12336		
100	$2,218 \cdot 10^{-5}$	0,35219	0,348	0,004
100	$2,187 \cdot 10^{-5}$	0,3472		
100	$2,168 \cdot 10^{-5}$	0,34428		



Figur V5.1. Enzymaktivitet av celleekstrakt med pTH1Cup-lacZ, induisert med 100 µM CuSO₄.



Figur V5.2. Enzymaktivitet for celleekstrakt med pTH1Cup-lacZ, indusert med 10 μM CuSO_4 .



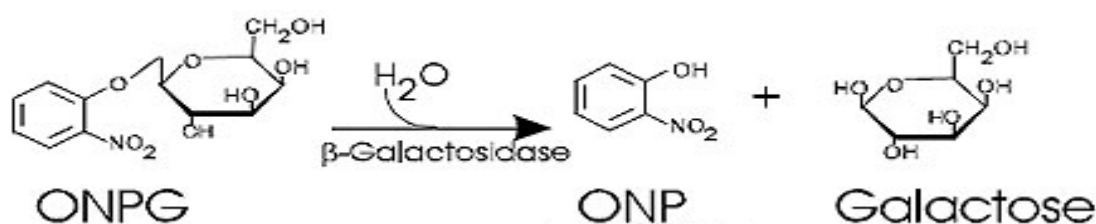
Figur V5.3. Enzymaktivitet for celleekstrakt med negativ kontroll pHP13.

Vedlegg 6: Utledning av likning for bestemmelse av enzymaktivitet

I dette vedlegget er det vist en utledning for likningen som benyttes for å beregne enzymaktiviteten til β -galaktosidase i assayet. Enzymaktiviteten betegnes som Units (U) og definisjonen av en Unit er som følger:

Definisjon av Unit:

En unit hydrolyserer 1,0 μmol av o-nitrofenyl β -D-galaktopyranosid (ONPG) til o-nitrofenol og D-galaktose per minutt. Reaksjonen er vist i figur V6.1.



Figur V6.1 Reaksjonen som katalyseres av β -galaktosidase med ONPG som substrat (BioTek Microplate Instrumentation & Software Solution)

$$U / ml \text{ enzym} = \frac{(\Delta A_{410nm} / \text{min prøve} - \Delta A_{410nm} / \text{min blank}) \times V_{tot} \times (df)}{\epsilon \times V_{enz}}$$

Utledning for benevningene:

$$\begin{aligned}
 & \frac{\text{Stigningstall}[\text{min}^{-1}] \times \frac{V_{tot}[\text{ml}]}{V_{enz}[\text{ml}]}}{3500(\text{molar ekstinksjonskoeffisient})[M^{-1}] \times \text{proteinkonsentrasjon}[\text{mg} / \text{ml}]} \\
 \Rightarrow & \frac{\frac{St}{3500} \left[\frac{M}{\text{min}} \right] \times \frac{V_{tot}[\text{ml}]}{V_{enz}[\text{ml}]}}{\left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]} \Rightarrow \frac{St}{3500} \left[\frac{\text{mol} / \cancel{\text{L}}}{\text{min} \cdot \text{mg} / \cancel{\mu\text{L}} \cdot 1000 \cancel{\mu\text{L}} / \cancel{\text{L}}} \right] \times \frac{V_{tot}[\text{ml}]}{V_{enz}[\text{ml}]} \\
 \Rightarrow & \frac{St}{3,500 \times 1000} \left[\frac{\text{mol} \cdot 10^6 \mu\text{mol} / \cancel{\text{mol}}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right] \times \frac{V_{tot}[\text{ml}]}{V_{enz}[\text{ml}]} \Rightarrow \frac{St}{3,5} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right] \times \frac{V_{tot}[\text{ml}]}{V_{enz}[\text{ml}]} \\
 \Rightarrow & \frac{St}{3,5} \times \frac{V_{tot}[\text{ml}]}{V_{enz}[\text{ml}]} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right] = \left[\frac{U}{\text{mg}} \right]
 \end{aligned}$$

Vedlegg 7 Alignment av pGEM-T-pBM69ori, det teoretiske PCR-produktet og sekvenseringsfilene

Alignmentet er konstruert i Clone Manager. De som er markert i gult viser riktig sekvens sammenlignet med pGEM-T-pBM69ori. De markerte feltene starter før og slutter etter det teoretiske PCR-produktet (pBM69-ori_PC).

pGEM-T-pBM69	200	aatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagctatttagg
pBM69-ori_PC	1	-----
BM69_R1	1	-----c.....-.....
BM69_R2	1	-----gc.....-.....
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	250	tgacactatagaataactcaagctatgcatccaacgcggtgggagctctcc
pBM69-ori_PC	1	-----
BM69_R1	21	-----
BM69_R2	22	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	300	catatggctcgacctgcaggcggccgcactagtgattcggcaacaaatgat
pBM69-ori_PC	1	-----
BM69_R1	71	-----
BM69_R2	72	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	350	atctcaaacgtctcctccctccttccattctcaatttaaaaaaccacatt
pBM69-ori_PC	15	-----
BM69_R1	121	-----
BM69_R2	122	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	400	cttaattacacaaaactcactttttctttctcaaacctcttaaaactacttc
pBM69-ori_PC	65	-----
BM69_R1	171	-----
BM69_R2	172	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	450	actaatcactctcttttttcatcctacactaaaactttcttacactt
pBM69-ori_PC	115	-----
BM69_R1	221	-----
BM69_R2	222	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	500	ttttctttcttctccacttacctttttcacttactccctctctcttactt
pBM69-ori_PC	165	-----
BM69_R1	271	-----
BM69_R2	272	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----

Vedlegg 7

pGEM-T-pBM69	550	acctacactcacttacttacttacttacttctctaacattctaactctccc
pBM69-ori_PC	215
BM69_R1	321
BM69_R2	322
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	600	tcaatcactcagtattcaccaactttacaacatttcaattaaatctggta
pBM69-ori_PC	265
BM69_R1	371c.....
BM69_R2	372
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	650	agtagattatatatactaaaggctctggcaaatggtcacggaacagaagtat
pBM69-ori_PC	315
BM69_R1	421-
BM69_R2	422-
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	700	ggagttccgtgaccatttgccaggaccggcctccattccaagcaccctaaa
pBM69-ori_PC	365
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	471
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	750	ccgtaaattaattgtaaagatggggaatacatcatttttacatcaatttt
pBM69-ori_PC	415
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	800	acacctatcttacttcaattttactaaataataaccataatggaaatctta
pBM69-ori_PC	465
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	850	tacaagatacttattacccgatttttgaaatataaaaacatatattcgca
pBM69-ori_PC	515
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	900	ttagaacattagtaattaaggactgcttttgctaaaaaataactaaatatt
pBM69-ori_PC	565
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----

Vedlegg 7

pGEM-T-pBM69	950	cctcaaaattaactaacatattttcaaccaaactcattttccaaaaaaaagg
pBM69-ori_PC	615
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	1000	gattttcatccgccacctaatactataacttcaaaatcattaacctctttt
pBM69-ori_PC	665
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	1050	atgtaaattctattattccaacaaaaactagtaaaataacaaaaccacaat
pBM69-ori_PC	715
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	1100	ctactaccgataggtaatatagttactgttacggcacattaaaatttgtca
pBM69-ori_PC	765
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	1150	ttaaatccatttttatccatcgggttcgaagggtgtcatcctttcgatttt
pBM69-ori_PC	815
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	1200	gaactgttcttttggaacacagaacaacggggttctcactaaattgagac
pBM69-ori_PC	865
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	1250	gtttctgcgacacctattttctttgtttgaacaaaagctttcatcatggc
pBM69-ori_PC	915
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	1300	tttatggctttttaccaggatgttacgacaagtaataaagtttttagcat
pBM69-ori_PC	965
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----

Vedlegg 7

pGEM-T-pBM69	1350	tcttaccacggccaaatgtttttttgataatcttttttagaccgtttaaga
pBM69-ori_PC	1015
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	1400	acagcttgaaaagtttgtttgccatccccaaaagctttgctaactcacg
pBM69-ori_PC	1065
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	1450	gatggaaccttgatatataaggttcattggccgtgcaatgtacttcaagat
pBM69-ori_PC	1115
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	1500	attcgataatatcttgttcacgctcatataaatgacttctctttcgctcc
pBM69-ori_PC	1165
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	1550	tcacgcgggttttttaggtgtacgaatacaaaaatctgtattccattttcac
pBM69-ori_PC	1215
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	-----
pGEM-T-pBM69	1600	accggccaattcctcaacataggccttacctggagctttatagtcagatt
pBM69-ori_PC	1265
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	1016	----- .c.t.....
pGEM-T-pBM69	1650	tcatggcacttttaataatcgctcggacctcccgatccgaaatgggatgc
pBM69-ori_PC	1315
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	987	-----
pGEM-T-pBM69	1700	ttcagttgtgaattccattcatccatctgattatagatttcttcttctgt
pBM69-ori_PC	1365
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	937	-----

Vedlegg 7

pGEM-T-pBM69	1750	tttaccctcatatttcatggctaagaagcgtaaaaatcgcgttattac
pBM69-ori_PC	1415
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	887
pGEM-T-pBM69	1800	gccctaatacaccttttgaacctttaatcatcacgttttgaataatggct
pBM69-ori_PC	1465
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	1001	-----
BM69_F2	837C.....
pGEM-T-pBM69	1850	tgaatcgctggatcatccataataaccagcttgtccaataatttggtttg
pBM69-ori_PC	1515
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	997
BM69_F2	787
pGEM-T-pBM69	1900	atgtttcccttttactgcagctggctcttttggcttgtcgggaacgatctt
pBM69-ori_PC	1565
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	947
BM69_F2	737
pGEM-T-pBM69	1950	tcgcccagtgagtaaccattctgtgttcaccggcttagcatggaaaaat
pBM69-ori_PC	1615
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	897
BM69_F2	687
pGEM-T-pBM69	2000	tcaatgggtgtcttctgttggaaaacgaaaataacctaaggattcgcacc
pBM69-ori_PC	1665
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	847
BM69_F2	637
pGEM-T-pBM69	2050	agcatctgctcctacagcgttaacaaaagcttgttttacctcttcagcaa
pBM69-ori_PC	1715
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	797
BM69_F2	587
pGEM-T-pBM69	2100	caaattttccggctcgacgtgctttatgacttccaacaaaacggcgatgat
pBM69-ori_PC	1765
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	747
BM69_F2	537

Vedlegg 7

pGEM-T-pBM69	2150	aaaacataaaaaccattgcatgccgcgaggtggtgatagaatcaagttagg
pBM69-ori_PC	1815
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	697
BM69_F2	487
pGEM-T-pBM69	2200	agaaggtaaaccgaccatagcagccgcataatggatttcttgataactaa
pBM69-ori_PC	1865
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	647
BM69_F2	437
pGEM-T-pBM69	2250	tctttttatcaatttcaacgcccgcatacaagtaataaagcgtaaattctct
pBM69-ori_PC	1915
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	597
BM69_F2	387
pGEM-T-pBM69	2300	atattccggccggcattggttacggtttaccccacatataaacttggtggtgt
pBM69-ori_PC	1965
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	547
BM69_F2	337
pGEM-T-pBM69	2350	ccaatggctgaagcgatccatctgacgctcaagcgctccaaaaactactaa
pBM69-ori_PC	2015
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	497
BM69_F2	287
pGEM-T-pBM69	2400	caacgatcgattggccggttcacatcagatgctccttactatatgtaacatgg
pBM69-ori_PC	2065
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	447
BM69_F2	237
pGEM-T-pBM69	2450	actaccccaacttcacgtgccttttcccgtcctttttctcttttccggttc
pBM69-ori_PC	2115
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	397
BM69_F2	187
pGEM-T-pBM69	2500	ttcaatactccaatgccaaggatccccttcaaacaagctccatgtatca
pBM69-ori_PC	2165
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	347
BM69_F2	137

Vedlegg 7

pGEM-T-pBM69	2550	taaaacgaacaatatccattggagtataatctactctttcatcaatgatt
pBM69-ori_PC	2215
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	297
BM69_F2	87	-----
pGEM-T-pBM69	2600	ttcagtgccttccatggttttgttccccctttccaggacaaacaaaaagacc
pBM69-ori_PC	2265
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	247
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	2650	gtttagcaagccaactcttgccccgggtctatctgcactgaaaacgccgaa
pBM69-ori_PC	2315
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	197
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	2700	aaagctatatttttacaagaaaaaccttgcacatccccaaaaatatatgt
pBM69-ori_PC	2365
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	147
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	2750	tattattaagccatgaaatggctataataataatattgggatttttgatc
pBM69-ori_PC	2415
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	97
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	2800	atggttggcgcgaacatgatctggcgttttcaagctagttggttggcg
pBM69-ori_PC	2465
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	2850	accgagagagggctagcttgatattttttaaatgatcgtggtggcgcacg
pBM69-ori_PC	2515
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	2900	atcattttatttttttgtcttttttttgtctttttttgtttgtcaatttt
pBM69-ori_PC	2565
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----

Vedlegg 7

pGEM-T-pBM69	2950	ttaactaatctataaaaatgatgggcaatatttgctagtacttcttctttta
pBM69-ori_PC	2615
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3000	attaaaactatacactagtttcaatttggagtaaaccgccgaattttcggg
pBM69-ori_PC	2665
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3050	gtttttatttgcgatgcaatttgcgatgcgaatcaaaatttagattgacttt
pBM69-ori_PC	2715
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3100	tgcatacaaaaagcatacaaattggggtgagaagaaaaattaaccatttta
pBM69-ori_PC	2765
BM69_R1	463	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3150	attaaggagagattttccatggatctaagattagctgctattgatattgg
pBM69-ori_PC	2815
BM69_R1	465-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3200	aatgatgcgggtcaaagcatatctaggaaacttagagaattctatttata
pBM69-ori_PC	2865
BM69_R1	469	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3250	ttcccaatgtaatcgcagaagtaaaaaatcgagacattattgaaatggag
pBM69-ori_PC	2915
BM69_R1	469	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3300	aaagatccattaagtgtctctacatgtagagattacttcatcagcattaaa
pBM69-ori_PC	2965
BM69_R1	469	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----

Vedlegg 7

pGEM-T-pBM69	3350	acaaaaacatgggttattatgcggttgaaaacttgctgccaataaccaa
pBM69-ori_PC	3015
BM69_R1	469	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3400	ataacgatgagctaacgccagatgtagataaatctgaaagtgaccaacct
pBM69-ori_PC	3065
BM69_R1	469	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3450	gttattttggttattaacgacacttgcttatgatgcagtaaaacattttcc
pBM69-ori_PC	3115
BM69_R1	469	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3500	tgaaaaagatggcgtgatagaagctacatatcttttatctactggtttac
pBM69-ori_PC	3165
BM69_R1	469	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3550	cactagatgaaacaaaaagaggaaaaacgaaaaatttccgaaaaaaacta
pBM69-ori_PC	3215
BM69_R1	469	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3600	aaaactgcacagcatgagggtcaaattccttaciaaactcctaattctcaagg
pBM69-ori_PC	3265
BM69_R1	469	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3650	gaaaactgttcacattaaatttgagcaagtacttgtgaacacggaaggtt
pBM69-ori_PC	3315
BM69_R1	469	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3700	atgctgcctataaatcccgcggccatggcggccgggagcatgcgacgtcg
pBM69-ori_PC	3365
BM69_R1	469	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	72	-----
BM69_F2	72	-----
pGEM-T-pBM69	3750	ggcccaattcgccctatagtgagtcgtatacaattcactggccgctcgttt
pBM69-ori_PC	3378	-----
BM69_R1	469	-----
BM69_R2	494	-----
BM69_F1	34	-----
BM69_F2	34	-----