

Marinobacter algicola - en ny alginatprodusent?

Kamilla Heddeland
Instefjord

Bioteknologi (5 årig)

Innlevert: Mai 2013

Hovedveileder: Helga Ertesvåg, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi

Forord

Denne oppgaven er et resultat av en 5-årig mastergrad i bioteknologi ved NTNU, Trondheim. Arbeidet ble gjennomført ved Institutt for Bioteknologi med Dr. scient. Helga Ertesvåg som veileder.

Jeg ønsker å takke Helga for all praktisk hjelp på laboratoriet og for gode tilbakemeldinger på manuskriptet. Hun sitter på mye kunnskap og har alltid et forslag til løsning på problemene jeg kommer med.

Jeg vil også takke mamma som alltid forteller meg hvor flink jeg er, uansett hvor mye jeg strever. Medstudentene mine vil jeg takke for utveksling av frustrasjoner. Det er alltid godt å høre at det er flere i samme situasjon som seg selv.

Mest av alt vil jeg takke Terje for å ha vært min psykolog og fysioterapeut gjennom hele perioden. Han har spilt en stor rolle i å støtte og oppmuntre meg. Jeg vil også takke ham for grundig korrekturlesing.

Sammendrag

Alginat er et polysakkarid bredt utnyttet i industrien, og består av β -D-mannuronsyre (M) og α -L-guluronsyre (G). Disse monomerene er gruppert sammen i blokker av M, G eller MG. Under biosyntesen av alginat hos bakterier produseres det først en polymer av mannuronsyre. Enzymet mannuronan C5 epimerase omdanner deretter noen av monomerene til guluronsyre. Et annet enzym, alginat lyase, deler opp alginatet som ikke transporteres ut av cellen. Industrielt brukes sekreterte mannuronan C5 epimeraser til å skreddersy alginatmolekyler *in vitro* og alginat lyase er et nyttig verktøy ved analyse av blokk lengder.

Pseudomonas aeruginosa og *Azotobacter vinelandii* er eksempler på kjente alginatproduserende bakterier, foruten produksjon av alginat fra brunalger. Sekvenssammenligninger tyder på at også *Marinobacter algicola* har genene nødvendig for å produsere alginat. *M. algicola* en marin bakterie isolert fra dinoflagellaten *Gymnodinium catenatum*. Bakterien ble beskrevet for første gang i 2006 og tilhører samme klasse (gammaproteobakterier) som *P. aeruginosa* og *A. vinelandii*. Det har ikke blitt funnet andre arter fra *Marinobacter* slekten med alginatklynge.

Bioinformatiske analyser ble brukt til å finne arter med proteiner nærmest beslektet proteinene kodet for i alginatklyngen til *M. algicola*. Generelt ble det funnet at dette er arter fra slekten *Pseudomonas*. Det ble også funnet potensielle alginatklynger i artene *Alcanivorax borkumensis*, *Alcanivorax hongdengensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium albertimagni*, *Tolumonas auensis*, *Dinoroseobacter shibae* og *Asticcacaulis biprosthecum*. Organiseringen av genene i alginatklyngene til disse artene ble sammenlignet med rekkefølgen hos *M. algicola*. Det ble funnet at alginatklyngene til *A. borkumensis* og *A. hongdengensis* (begge marine arter) har mest lik organisering av genene i forhold til *M. algicola*. Dersom *M. algicola* har fått alginatgenene via horisontal genoverføring er *A. borkumensis* og *A. hongdengensis* de beste kandidatene til genes opprinnelse. Det ble også funnet at *M. algicola* har to gener som koder for fosfomannose mutase, ett i alginatklyngen og ett øvrig i genomet. Sekvenssammenligninger tyder på at bakterien har duplisert genet.

Det har tidligere ikke blitt beskrevet noe molekylærbiologisk arbeid eller øvrig rekombinant arbeid på *M. algicola* i litteraturen. Dette ble et av fokusene for oppgaven. Ved å dyrke *M. algicola* på ulike antibiotika ble det funnet at villtypen er resistent mot gentamicin. Det ble også funnet at ampicillin, tetracyclin, nalidiksinsyre, triclosan og kloramfenikol kan benyttes som seleksjonsmarkør ved overføring av nytt genetisk materiale til *M. algicola*. I tillegg kan genet *lacZ* brukes som seleksjonsmarkør. Forsøk på å overføre nytt genetisk materiale til *M. algicola* ved elektroporering og konjugering viste negative resultater. Det ble gjennomført en suksessfull overføring av nytt genetisk materiale til *M. algicola* i arbeidet med denne oppgaven, men mekanismen er ukjent.

Alginatproduksjon ble forsøkt oppnådd ved å mutagenisere *M. algicola* og screene etter mukoide varianter. Av 158 700 undersøkte kolonier var ingen mukoide. To av

gene i alginatklyngen, *algG* og *algL*, ble forsøkt uttrykt i *Escherichia coli*. Resultatene ga lite uttrykk. For *algG*, som koder for en potensiell mannouronan C5 epimerase, ble det ikke funnet aktivitet. Genet *algL* ble vist å kode for en fungerende alginat lyase med spesifikk kutting av M-blokker. Når arbeidet med denne oppgaven ble avsluttet var det fortsatt ukjent hvorvidt *M. algicola* kan produsere alginat eller ikke.

Summary

Alginate is a polymer which is widely used for industrial purposes, and is composed of the monomers β -D-mannuronic acid (M) and α -L-guluronic acid (G). These monomers are grouped together in blocks of M, G or MG. Firstly, in the alginate biosynthesis in bacteria, a mannuronic polymer is produced. The enzyme mannuronan C5 epimerase then converts some of the M-units to G-units. Another enzyme, alginate lyase, cuts the alginate polymers that has not been exported out of the cell. The industry uses secreted mannuronan C5 epimerases to tailor alginate molecules *in vitro*, and alginate lyase proves a useful tool for block length analysis.

Pseudomonas aeruginosa and *Azotobacter vinelandii* are examples of known alginate producing bacteria, other than brown algae. Comparison of sequences indicate that also *Marinobacter algicola* has the genes necessary to produce alginate. This is a marine bacteria isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. The bacterium was described for the first time in 2006 and belongs to the same class (gammaproteobacteria) as *P. aeruginosa* and *A. vinelandii*. No other species of the genus *Marinobacter* is found to have an alginate gene cluster.

Bioinformatic analyses were used to find species with closely related proteins to those encoded by the alginate genes in *M. algicola*. The results showed that those most closely related were species of the *Pseudomonas* genus. There were also found potential alginate gene clusters in the species *Alcanivorax borkumensis*, *Alcanivorax hongdengensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium albertimagni*, *Tolomonas auensis*, *Dinoroseobacter shibae* and *Asticcacaulis biprosthecum*. The organization of the alginate genes in these species were compared with the order in *M. algicola*. It was found that the alginate genes of *A. borkumensis* and *A. hongdengensis* (both marine species) have the most similar organization to *M. algicola*. If *M. algicola* acquired the alginate genes via horizontal gene transfer, are the best candidates for the origin of the genes *A. borkumensis* and *A. hongdengensis*. It was also found that *M. algicola* has two genes encoding phosphomannomutase, one gene in the alginate gene cluster, and one another place in the genome. Sequence comparison suggests that the bacterium has duplicated the gene.

There has not been any previously published work regarding molecular biology and recombinant technology on *M. algicola*. This became one of the foci for this thesis. By growing *M. algicola* on various antibiotics, it was found that the wild type is resistant to gentamicin. It was also found that ampicillin, tetracycline, nalidixic acid, triclosan and chloramphenicol may be used as selection marker for transferring new genetic material to *M. algicola*. In addition, *lacZ* may be used as a selection marker. Attempts to transfer new genetic material to *M. algicola* by electroporation and conjugation showed negative results. It was conducted a successful transfer of new genetic material to *M. algicola*, but the mechanism behind this is unclear.

Alginate production was sought after by mutagenesis *M. algicola* and screening for mucoid variants. Out of the estimated 158,700 screened colonies, none were mucoid. It was attempted to express two of the genes in the alginate gene cluster, *algG* and *algL*, in *Escherichia coli*. The results showed little expression. For *algG*, that encodes a potential mannouronan C5 epimerase, no activity was found. The gene *algL* was shown to code for a functional alginate lyase, that specifically cleave M-blocks. When the work on this thesis was concluded, it was still unknown whether *M. algicola* is able to produce alginate or not.

Innhold

Forord.....	i
Sammendrag.....	iii
Summary.....	v
Innhold.....	vii
1. Introduksjon.....	1
1.1 <i>Marinobacter algicola</i>	1
1.2 Alginat.....	3
1.3 AlgC sin rolle i syntesen av lipopolysakkarider.....	9
1.4 RK2-baserte vektorer og <i>Pm/xylS</i> ekspresjonssystemet.....	11
1.5 Formålet med oppgaven.....	12
2. Material og metode.....	14
2.1 Bioinformatikkverktøy.....	14
2.2 Vekstmedier og løsninger.....	15
2.3 Bakteriestammer og plasmider.....	17
2.4 Dyrking av bakterier.....	18
2.5 Isolering av total-DNA.....	18
2.6 Polymerase kjedereaksjon.....	19
2.7 Primere.....	20
2.8 Rensing av PCR produkt.....	20
2.9 Plasmid isolering.....	21
2.10 Restriksjonskutting.....	22
2.11 Gelelektroforese.....	22
2.12 Rensing av DNA fra agarosegel.....	23
2.13 Ligering.....	23
2.14 Gibson ligering.....	23
2.15 Innføring av nytt genetisk materiale i <i>E. coli</i> og <i>M. algicola</i>	25
2.16 Utvelgelse av transformanter og kontroll av plasmider.....	26
2.17 Sekvensering.....	27
2.18 Mutagenese.....	28
2.19 Måling av mCherry.....	29
2.20 Assay.....	30
2.21 SDS-PAGE.....	31
2.22 Rensing av protein ved bruk av ionebytterkolonne.....	32

3. Resultat.....	33
3.1 Alginatgenene i genomet til <i>M. algicola</i>	33
3.2 Utvikling av verktøy til arbeid med <i>M. algicola</i>	48
3.3 Alginatproduksjon	62
3.4 Heterolog ekspresjon av <i>algG</i> i <i>E. coli</i>	72
3.5 Heterolog ekspresjon av <i>algL</i> i <i>E. coli</i>	80
4. Diskusjon.....	89
4.1 Bioinformatisk analyse av alginatklyngen i <i>M. algicola</i>	89
4.2 Verktøy for arbeid med <i>M. algicola</i>	93
4.3 Alginatproduksjon	94
4.4 Heterolog ekspresjon av <i>algG</i> og <i>algL</i>	95
4.5 Videre arbeid.....	96
5. Konklusjon.....	98
Referanser.....	99
Vedlegg A. Forkortelser	I
Vedlegg B. Plasmidkart.....	II
Vedlegg C. Gjenkjennelsesseter for restriksjonsendonukleaser.....	VI
Vedlegg D. Standarder.....	VII
Vedlegg E. Sekvenssammenligning.....	IX
Vedlegg F. Beregninger til bestemmelse av antibiotika resistensnivå.....	XXVII
Vedlegg G. Rådata og beregninger for mutagenese av <i>M. algicola</i>	XXVIII
Vedlegg H. Rådata og beregninger for konjugering av <i>M. algicola</i> og uttrykk av <i>Pm</i> -promotor i <i>M. algicola</i>	XXXII
Vedlegg I. Rådata til sammenligning av alginatklynger	XXXIV

1. Introduksjon

1.1 *Marinobacter algicola*

Slekten *Marinobacter* ble første gang beskrevet i 1992 ved modellarten *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* [1]. Totalt har det blitt beskrevet 36 arter innenfor denne slekten (Tabell 1-1). *Marinobacter* er stavformede (med unntak av *M. segnicrescens* som har en ellipsoidisk form), Gram-negative, aerobe (noen unntak), halofile gammaproteo-bakterier. Alle *Marinobacter* er isolert fra marine miljø og fåtallet klarer å vokse i fravær av NaCl (sjøvann har en saltholdighet på ca. 3,5 % (w/v)). Generelt trives *Marinobacter* best ved temperaturer rundt 20-35 °C, NaCl konsentrasjon på rundt 5 % (w/v) og pH 7-9.

Tabell 1-1 Artene i slekten *Marinobacter*. Vekstbetingelser (temperatur, NaCl konsentrasjon og pH) er vist til venstre, etter artens navn. Til høyre er en kolonne med alternative navn for modellstammen til de ulike artene og en kolonne med kildene hvor artene ble beskrevet for første gang. Noen av artene skiller seg ut fra den generelle beskrivelsen av *Marinobacter* (stavformet, bevegelig og Gram-negativ), disse er markert med en stjerne (*), * ubevegelig, ** ellipsoidisk formet, *** svakt bevegelig.

Art	Temp. (optimum)	NaCl (optimum)	pH (optimum)	Modellstamme	Kilde
<i>M. adhaerens</i>	4-45°C (34-38°C)	0,5-20 % (2-6 %)	5,5-10,0 (7,0-9,0)	HP15 (=DSM 23420 =CIP 110141)	[2]
<i>M. algicola</i>	5-40°C (25-30°C)	1-12 % (3-6 %)	5-10 (7,5)	DG893 (=DSM 16394 =NCIMB 14009)	[3]
<i>M. alkaliphilus</i>	10-50°C (30-35°C)	0-21 % (2,5-3,5 %)	6,5-11,4 (8,5-9,0)	ODP1200D-1,5 (= JCM 12291 = ATCC BAA-889)	[4]
<i>M. antarcticus</i>	4-35°C (25°C)	0-25 % (3,0-4,0 %)	5,0-10,5 (7,0)	ZS2-30 (=CGMCC 1.10835 =KCTC 23684)	[5]
<i>M. arcticus</i>					[1]
<i>M. aquaeolei</i>	13-50°C (30°C)	0-20 % (5 %)	5-10 (7,3)	VT8	[6]
<i>M. bryozorum</i>	7-42°C	1,0-18,0 %		KMM 3840 (= 50-11 = DSM 15401)	[7]
<i>M. daepoensis</i>	4-45°C (30-37°C)	0-20 % (2-6 %)	5,5- ? (7,0-8,0)	SW-156 (= KCTC 12184 = DSM 16072)	[8]
<i>M. daqiaonensis</i>	10-45°C (35°C)	1-15 % (5-10 %)	5-9 (7,5)	YCSA40 (=CGMCC 1.9167T =NCCB 100308 =LMG 25365)	[9]
<i>M. excellens</i>	10-41°C (20-25°C)	1-15 %	6,0-10,0 (7,5)	KMM 3809	[10]
<i>M. flavimaris</i>	4-45°C (37°C)	0-20 % (2-6 %)	5,5-? (7,0-8,0)	SW-145 (= KCTC 12185 = DSM 16070)	[8]
<i>M. goseongensis</i> *	10-37°C (25-30°C)	1-25 % (4-5 %)	5,3-9,3 (7,5)	En6 (=KCTC 12515 =DSM 19471)	[11]
<i>M. gudaonesis</i>	10-45°C	0-15 % (2,0-3,0 %)	6,0-9,5 (7,5-8,0)	SL014B61A (=DSM 18066T =LMG 23509T =CGMCC 1.6294T)	[12]

Tabell 1-1. Fortsettelse.

<i>M. guineae</i>	4-42°C	1-15 %	5,0-9,5	M3B (=LMG 24048 = CECT 7243)	[13]
<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	10-45°C (32°C)	0,08-3,5 M (~0,6 M)	6-9,5 (7-7,5)	ATCC 49840	[1]
<i>M. koreensis</i>	10-45°C	1-20 %	5-9	DD-M3	[14]
<i>M. lacisalsi</i>	20-40°C (30-35°C)	3-15 % (7,5 %)	5,0-9,0 (7,0)	FP2.5 (=CECT 7297 =LMG 24237)	[15]
<i>M. lipolyticus</i>	15-40°C (37°C)	1-15 % (7,5 %)	5,0-10,0 (7,5)	SM19 (=DSM 15157 =NCIMB 13907 =CIP 107627 =CCM 7048)	[16]
<i>M. litoralis</i>	4-46°C (30-37°C)	0,5-18 % (2-7 %)	(7,0-8,5)	SW-45 (= KCCM 41591 = JCM 11547)	[17]
<i>M. lutaoensis</i>	25-50°C (45°C)	0,5-12 % (3-5 %)	5-9 (7)	T5054 (= CCRC 17087 = JCM 11179)	[18]
<i>M. maritimus</i>	4-37°C (22°C)	1-13 % (4 %)	6,5-10,5 (8,5)	CK 47 (= JCM 12521 = MTCC 6519)	[19]
<i>M. mobilis</i>	15-42°C (30-35°C)	0,5-10,0 % (3,0-5,0 %)	6,5-9,0 (7,0-7,5)	CN46	[20]
<i>M. oulmenesis</i>	30-45°C (37-40°C)	1-15 % (5-7,5 %)	5,5-9,0 (6,5-7,0)	Set74 (=CECT 7499 =DSM 2359)	[21]
<i>M. pelagius</i>	4-48°C (25-30°C)	0,5-15 % (5,0 %)	6,0-9,0 (7,0-8,0)	HS225 (= CGMCC 1,6775 = JCM 14804)	[22]
<i>M. psychrophilus</i>	0-22°C (16-18°C)	2-8 %	5,0-10,0 (6,0-9,0)	20041 (= CGMCC 1,6499 = JCM 14643)	[23]
<i>M. salicampi</i>	4-39°C (30°C)	0<-16 % (8 %)	5,5-? (7,0-8,0)	ISL-40 (= KCTC 12972 = CCUG 54357)	[24]
<i>M. salsuginis</i>	10-45°C (35-37°C)	1-20 % (~5 %)	6,5-9,5 (7,5-8,0)	SD-14B	[25]
<i>M. santoriniensis</i>	(35-40°C)	0,5-16 % (5-10 %)	5,5-9,0 (7,0-8,0)	NKSG1 (= DSM 21262 = NCIMB 14441)	[26]
<i>M. sediminum</i>	4-42°C	0,5-18,0 %		KMM 3657 (= R65 = DSM 15400)	[7]
<i>M. segnicrescens</i> **	15-45°C (30-37°C)	1-15 % (4-8 %)	6,0-10,0 (7,5-8,0)	SS011B1-4 (= LMG 23928 = CGMCC 1,6489)	[27]
<i>M. squalenivorans</i>				2A sq64 (= DSMZ 15125 =ATCC BAA-792)	[28]
<i>M. szutsonensis</i>	10-50°C (35-40°C)	0-20 % (5 %)	6-8,5 (7,0-8,0)	NTU-104 (=BCRC 17809 =CGMCC 1.7011 =JCM 15751)	[29]
<i>M. vinifirmus</i> ***	15-45°C (25°C)	0-20 % (3-6 %)	>5 (6,5-8,4)	FB1T (=DSM 17747T =CCUG 52119T)	[30]
<i>M. xestospongiae</i>	15-42°C (28-36°C)	0,5-6,0 % (2 %)	5,0-10,0 (7,0-8,0)	UST090418-1611 (=JCM 17469 =NRRL B-59512)	[31]
<i>M. zhanjiangensis</i>	4-35°C (25-30°C)	1-15 % (2-4 %)	6,5-10,0 (7,5)	JSM 078120 (= CCTCC AB208029 = DSM 21077 = KCTC 22280)	[32]
<i>M. zhejiangensis</i>	15-42°C (30-35°C)	0,5-10,0 % (1,0-3,0 %)	6,0-9,5 (7,0-7,5)	CN74	[20]

Marinobacter algicola er en art innenfor *Marinobacter* slekten, som igjen hører inn under familien Alteromonadaceae. Figur 1-1 viser full oversikt over klassifiseringen. *Marinobacter* tilhører samme klasse som de alginatproduserende slektene *Pseudomonas* og *Azotobacter* (gammaproteobakterier).

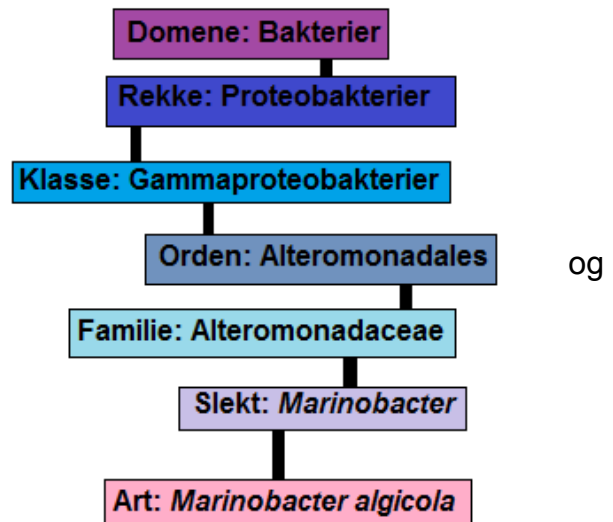
Modellstammen til *M. algicola*, DG893^T, ble isolert fra den giftige dinoflagellaten *Gymnodinium catenatum* (fra Yellow Sea i Korea) i 2006 [3, 33]. Stammen DG1136 ble isolert fra samme art (fra Ria de Vigo i Spania) [3]. En tredje stamme, ATM407-13, ble isolert fra *Alexandrium tamarens* (fra Jericho Beach i Canada), en annen giftig dinoflagellat [3, 34]. Bakteriece llene er stavformet og har en polar flagell som gjør dem bevegelige. Green et al. [3] fant også ut at DG893^T har optimum vekst ved 3-6 % NaCl, 25-30 °C og pH 7,5. Bakterien vokser aerobt, men kan også vokse anaerobt i nærvær av nitrat og acetat [3]. Blant artene i *Marinobacter* slekten er *M. algicola* en av dem som kan utnytte flest ulike organiske forbindelser som karbon- og energikilde [3, 11, 14, 22]. Av undersøkte forbindelser fant Green et al. [3] ut at *M. algicola* kan utnytte Tween 40 og 80, glycerol, dextrin, glykogen, glukose, metylpyruvat, acetat, citrat, α - og β -hydroxybutyrat, DL-laktat, propionat, suksinat, bromosuksinat, D-alanin, L-glutamat, L-leucin, L-prolin og L-pyroglutamat.

I den eksperimentelle delen av denne oppgaven ble *M. algicola* DG893 benyttet. Genomet til denne stammen har blitt sekvensert og sekvensen er tilgjengelig via internett. Sekvenssammenligninger tyder på at den har alle genene som er nødvendige for alginatsyntese, se 1.2.3.

1.2 Alginat

1.2.1 Oppbygging av, og kilder til, alginat

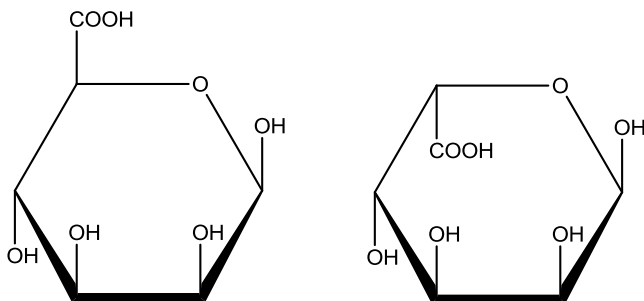
Alginat finnes naturlig i celleveggen til brunalger og produseres av noen bakterier. To arter fra *Azotobacter* slekten (*A. vinelandii* og *A. chroococcum*) og flere *Pseudomonas*-arter (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. mendocina*, *P. putida* og *P. syringae*) produserer alginat [35, 36]. Alginat er en polymer bygd opp av underenhetene β -D-mannuronsyre (M) og α -L-guluronsyre (G) (se Figur 1-2). Underenhetene er bundet sammen (1 \rightarrow 4) til en lineær polymer. Det er vanlig å dele inn i M-, G- og MG-blokker hvor M-blokker består av flere M bundet sammen



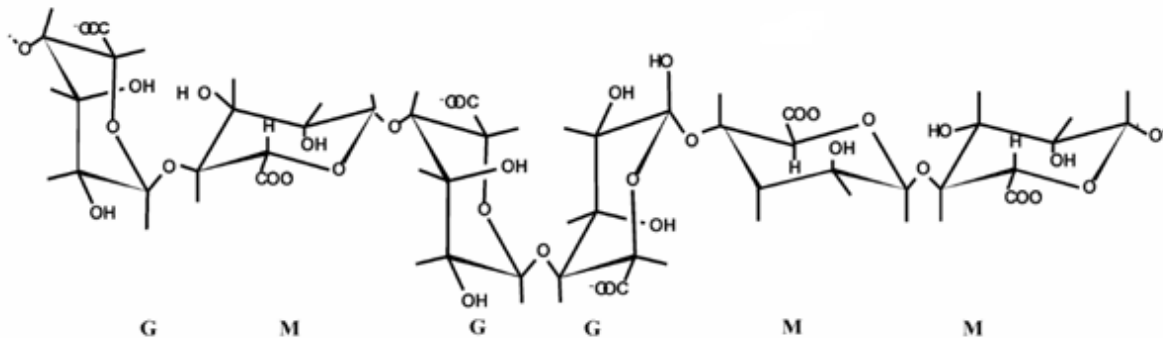
Figur 1-1 Skjematisk fremstilling av taksonomien til *M. algicola*.

(MMMMM), tilsvarende for G-blokker (GGGGG), mens MG-blokker er bygd opp av alternerende M og G (MGMGM) (Figur 1-3). Hvilke blokker som dominerer, og dermed andel M og G, varierer. Sammensetningen varierer ikke bare mellom ulike arter, men også i alginater fra samme art. Bakterielle alginater har i tillegg O-acetylering på M-enheter, enten på O₂, O₃ eller begge. Alginater fra alger er aldri acetylerede. Økt acetylering gir økt vannbindingsevne og dermed økt viskositet. [35-38]

Under biosyntesen av alginat dannes det først en homogen polymer bestående av bare M-enheter. Aktiviteten til en C5 epimerase sørger deretter for introdusering av G enheter [36, 39]. Epimerisering er endring av konfigurasjonen på et kiralt karbonatom i et sukker [35]. Det følger da at G er C5 epimeren til M. Dette ses i Figur 1-2 hvor eneste forskjell på M og G er posisjonen til –COOH (karboksylgruppen) på karbon nr. 5 (C5). Avhengig av type epimerase fører epimerisering til dannelse av G-blokker eller MG-blokker [37].



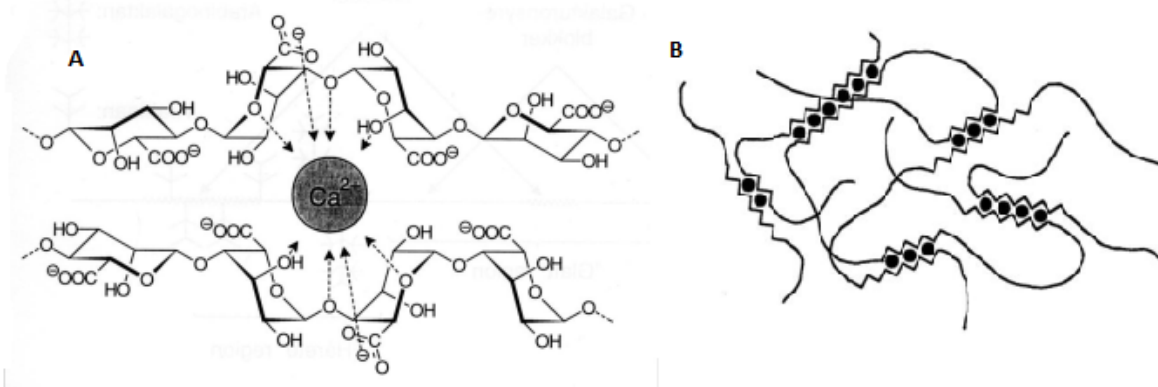
Figur 1-2 Byggesteiner i alginat. Alginat består av underenhetene β -D-mannuronsyre (venstre) og α -L-guluronsyre (høyre).



Figur 1-3 G-, M- og MG-blokker [36]. Et utsnitt av et alginat molekyl. Til venstre er det en MG-blokk, i midten en G-blokk og til høyre er det en M-blokk.

En viktig egenskap hos alginater er evnen til å danne geler i nærvær av toverdige kationer, for eksempel kalsium. G-enhetene i alginat er i ¹C₄ konformasjon, noe som skaper en sikksakkliggende struktur (se Figur 1-3 og Figur 1-4). I hulrommet som dannes mellom enhetene kan kalsiumioner binde. Som vist i Figur 1-4 A, kan et kalsiumion binde til totalt fire G-enheter, to på hvert alginatmolekyl. Når flere kalsiumioner binder seg til alginat på denne måten danner de et nettverk kalt "egg-box" (Figur 1-4 B). Det er disse kompleksbindingene som gjør at alginat kan danne

geler. Hvor hard eller stiv gelen blir avhenger av lengden på G-blokkene og hvor mange det er av dem. Jo flere G-blokker, desto tettere nettverk kan dannes og gir dermed en hardere gel. [35, 37]



Figur 1-4 Kompleksbinding mellom kalsiumioner og alginatmolekyler [35]. A) Et kalsiumion binder til to G-enheter på hvert alginatmolekyl. B) "Egg-box" modellen.

Hos brunalger varierer sammensetningen av G og M fra art til art, men også etter hvilke deler av algen det ekstraheres fra. Variasjon innad i algen skyldes den strukturelle rollen til alginat i algene, hvor høyere G-innhold er nødvendig for å gi mer stive deler som stengelen, mens blader som må være mer fleksible har høyere innhold av M-enheter [37]. Hos *P. aeruginosa* er alginat involvert i dannelsen av biofilmer. Dette er vanlig i lunger til pasienter med cystisk fibrose infisert av *P. aeruginosa* [40]. I *A. vinelandii* har alginat en viktig rolle ved cystedannelse [39, 41]. Alginat fra alger og *A. vinelandii* er bygd opp av M-, G- og MG-blokker, mens alginat fra *P. aeruginosa* (og andre *Pseudomonas*) har bare M- og MG-blokker [42].

1.2.2 Anvendelser av alginat

Alginat har mange industrielle anvendelser. Polymeren benyttes som fortykningsmiddel i stofftrykk og som bindemiddel i sveisetråd [37]. I keramikkproduksjon brukes alginat til å binde vann og i vannrensing brukes alginat på grunn av sine filmdannende egenskaper [36]. Alginater brukes også i mange matvarer til å øke viskositet, danne geler eller stabilisere dispersjoner og emulsjoner [37]. Eksempler på typer matvarer er drikkevarer, is krem og sauser [36]. Et spesifikt eksempel er paprika-fyll i oliven [37]. I farmasøytisk industri benyttes alginater som middel mot sure oppstøt, i sårheling og for kontrollert frigjøring av virkestoff fra tabletter [36, 37]. Også i tannpleie benyttes alginat, her for å ta avtrykk av tenner [36].

Innkapsling i kuler av kalsium-alginat har blitt en mye brukt metode for immobilisering av celler og enzymer. Prosedyren kan gjøres i et trinn under milde betingelser ved å blande celler eller enzymer med natrium-alginat i en løsning med kalsium (eller andre gel-dannende ioner). Gel-kulene dannes øyeblikkelig. Cellene kan på denne måten beskyttes mot mekanisk stress samtidig som næringstoffer og metabolitter kan diffundere inn og ut. Anvendelsen av slike systemer varierer fra produksjon av etanol fra gjær, til produksjon av monoklonale antistoff fra hybridoma celler. Et viktig

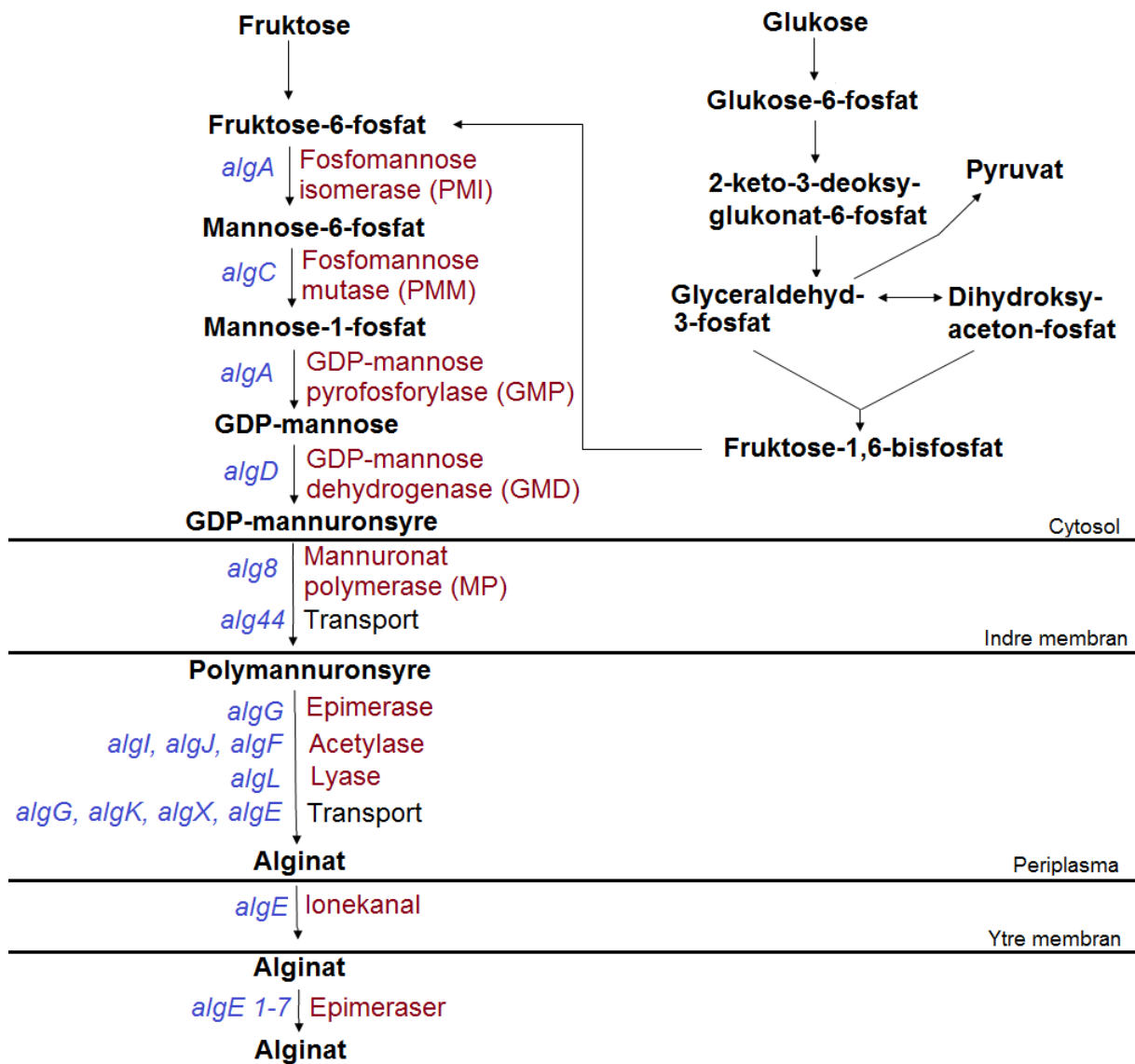
bruksområde er i celletransplantasjon. For eksempel gjøres det forsøk på å lage kunstige bukspyttkjertler som behandling mot Type I diabetes. Her innkapsles insulinproduserende celler i alginat/poly-L-lysin for å hindre immunforsvaret i kroppen i å drepe cellene. [36, 37]

1.2.3 Biosyntese av alginat i bakterier

I bakterier er det funnet 13 gener som er direkte involvert i biosyntesen av alginat [36]. Figur 1-5 viser hvordan enzymene kodet av disse genene omdanner fruktose-6-fosfat til alginat. Første enzym, AlgA, omdanner fruktose-6-fosfat til mannose-6-fosfat. Videre omdannelse til mannose-1-fosfat skjer via AlgC. AlgA har deretter enda en oppgave, dannelsen av GDP-mannose fra mannose-1-fosfat. En GDP-mannose dehydrogenase (AlgD) gjør GDP-mannose om til GDP-mannuronsyre. Flere GDP-mannuronsyrer settes sammen til en polymer. Dette er katalysert av Alg8 i samarbeid med Alg44 [43]. Genene *algK* og *algX* koder for periplasmiske proteiner som sikrer riktig polymerproduksjon [36, 42]. Videre har AlgG og AlgE1-7 ansvaret for å epimerisere noen av mannuronsyrene til guluronsyre. AlgG utfører dette i periplasma til bakterien, mens AlgE1-7 (kun funnet i *A. vinelandii* [44]) sekreteres og utfører epimerisering etter at polymeren er transportert ut av cellen. AlgI, AlgJ (AlgV i *A. vinelandii*) og AlgF acetylerer noen av monomerene og polymeren transporteres ut av bakterien gjennom en ionekanal kodet for av *algE* (*algJ* i *A. vinelandii*). AlgL er en lyase som kutter opp alginatmolekyler som ikke blir transportert ut av bakterien. [36, 39, 45-47]

Organiseringen av alginatgene i genomet har så langt vært lignende i alle de tidligere undersøkte bakterieartene (*P. aeruginosa*, *P. syringae* og *A. vinelandii*) [39]. Tolv av genene er i en klynge, som eksemplifisert med *A. vinelandii* i Figur 1-6 og *P. aeruginosa* i Figur 1-7, mens *algC* er lokalisert en annen plass i genomet. I *P. syringae* er det funnet en promotor i tilsvarende avstand fra *algD* som promotoren oppstrøms for *algD* til *P. aeruginosa* [42]. Som indikert i Figur 1-6, transkriberes alginatklyngen i *A. vinelandii* fra flere promotorer [42]. Nylig er det også funnet bevis på to indre promotorer i alginatklyngen til *P. aeruginosa* (Figur 1-7) [48].

Hos *P. aeruginosa* induseres uttrykk av hele alginatklyngen fra *algD* promotoren av AlgU (Figur 1-8) [42]. AlgU er en sigma faktor som også induserer uttrykk av AlgB, AlgZ og AlgR som alle er positive regulatorer av *algD* transkripsjon [42]. Muc proteinene (MucA, MucB, MucC og MucD) regulerer AlgU negativt [42]. Dette ved at blant annet MucA, som er en anti-sigma faktor, binder til AlgU og dermed nedregulerer alginatproduksjon [42]. Alginatproduksjon reguleres på en tilsvarende måte i *A. vinelandii* [49].



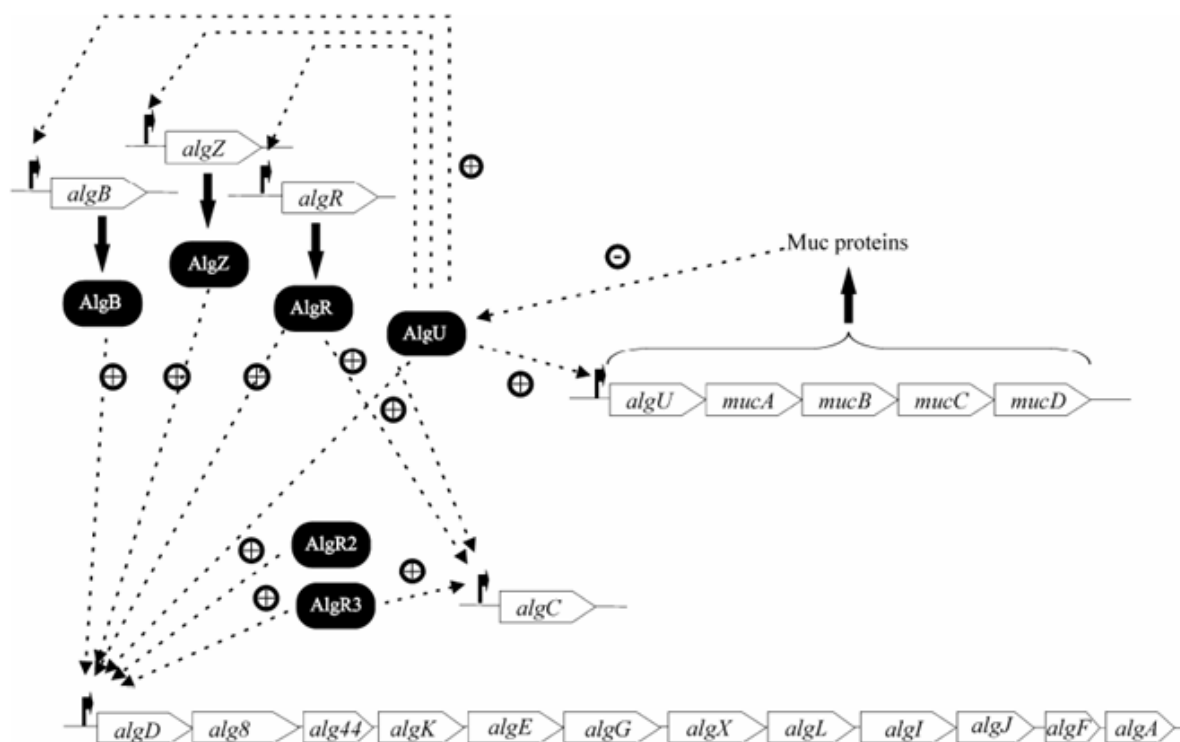
Figur 1-5 Biosyntese av alginat i bakterier, fritt etter [36, 46, 50]. Blått indikerer genene som er involvert, navnene i rødt er enzymene genene koder for og svart viser at proteinene kodet for er involvert i transport. Genene indikert finnes i både *Pseudomonas* og *Azotobacter*, bortsett fra *algE 1-7* som kun er funnet i *A. vinelandii*. I tillegg kalles *algE* for *algJ* og *algJ* for *algV* i *A. vinelandii*.



Figur 1-6 Alginatklyngen hos *A. vinelandii* [50]. Organisering av alginatgenene til *A. vinelandii*. *P. aeruginosa* og *P. syringae* har tilsvarende organisering, men ikke de samme promotorene. Gener er indikert med piler, mens rektanglene indikerer promotorer.



Figur 1-7 Alginatklyngen hos *P. aeruginosa* [48]. Organisering av alginatgenene til *P. aeruginosa*. Gener er indikert med pilene *algD* til *algA*, mens pilene markert *PalgD*, *PalgG* og *PalgI* indikerer promotorer.



Figur 1-8 Regulering av alginatklyngen til *P. aeruginosa* [42]. Hvite piler: gener, svarte piler oppstrøms for gener: promotorer, svarte bokser: proteiner, minus-tegn: negativ regulering, pluss-tegn: positiv regulering.

1.2.4 Anvendelse av alginat-modifiserende enzymer

Alginater ekstrahert fra alger har veldig varierende sammensetning av M og G, og har derfor smal anvendelse i farmasøytisk industri. For eksempel stilles det store krav til gel-styrke og homogenitet ved innkapsling av celler til implantasjon. Ved å bruke de ulike sekreterte mannuronan C-5 epimerasene fra bakterier er det derimot mulig å skreddersy alginater *in vitro*. Hver av AlgE1-AlgE7 epimerasene gir et unikt epimeriseringsmønster. AlgE4 danner alternerende MG blokker, mens de resterende danner G blokker av ulike lengder. For å lage mikrokapsler til celletransplantasjoner er det for eksempel funnet ut at en totrinns omdannelse av poly-mannuronan med

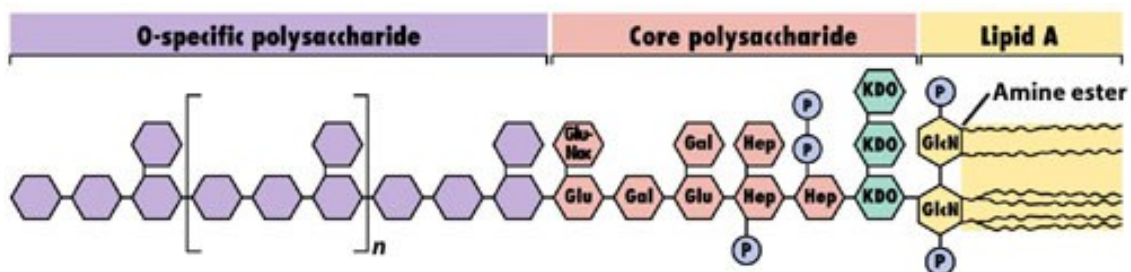
AlgE4 og AlgE1 gir de ønskete egenskapene. Resultatet er en type alginat som består av G-blokker med MG blokker innimellom. [38, 44, 50]

Alginat lyaser har også vist seg å være nyttige verktøy. I kombinasjon med massespektrometri og NMR kan alginat lyaser brukes til å analysere lengdene på G-, M- og MG- blokker, og fordelingen av blokker. I tillegg har de blitt brukt til å lage rene oligo-G-blokker som kan påvirke egenskapene til alginat-geler. [38, 51]

1.3 AlgC sin rolle i syntesen av lipopolysakkarider

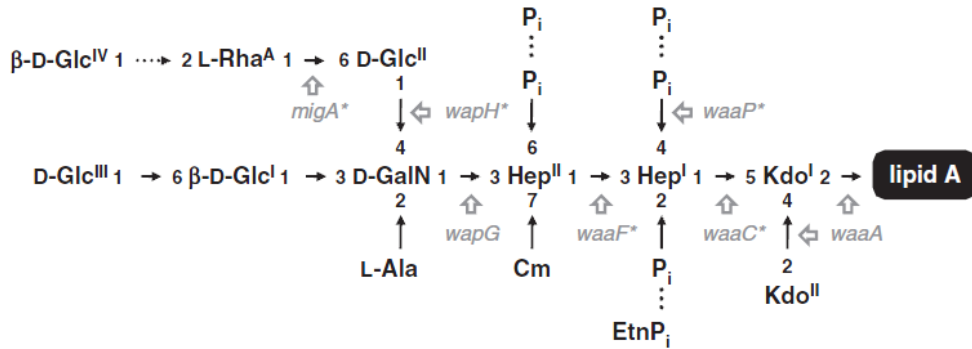
I tillegg til sin funksjon i biosyntesen av alginat (Figur 1-5) har AlgC en rolle i syntesen av lipopolysakkarider (Figur 1-11). Dette har blitt vist hos *P. aeruginosa* [52-54].

Lipopolysakkarider er en viktig del av den ytre membranen til Gram-negative bakterier [55] og er bygd opp av tre ulike deler kalt lipid A, kjernen ("the core") og O side kjeder/O polysakkarid (Figur 1-9) [52, 55]. Lipid A består av fettsyrer festet til glukosamin gjennom amingruppene [55]. Hvilke sukkerer som inngår i kjernen varierer fra art til art [55]. I *P. aeruginosa* er det vanlig å dele inn i indre og ytre kjerne [52]. Den indre kjernen består av to ketodeoxyoktonat (KDO) enheter og to L-glysero-D-manno-heptose (Hep) enheter [52]. Ytre kjerne er bygd opp av sukkerne D-glukose (Glc), L-rhamnose (L-Rha) og D-galakotosamin (GalN) [52]. I *P. aeruginosa* produseres kjernen til lipopolysakkarider i to forskjellige former [52]. Den ene formen (glykoform 1) har aldri O side kjeder, mens den andre (glykoform 2) kan være substituert med O polysakkarider (Figur 1-10) [52]. O polysakkarider er bygd opp av forskjellige sukkerer som galaktose, glukose, rhamnose og mannose [55]. I *P. aeruginosa* kan O polysakkaridene deles inn i to grupper, de som består av kun D-rhamnose ("A-band"/vanlig polysakkarid antigen/vanlig O polysakkarid), og de som er heteropolymerer av ulike sukkerer organisert til repeterende enheter ("B-band"/O-spesifikk antigen/O antigen) [52, 53].

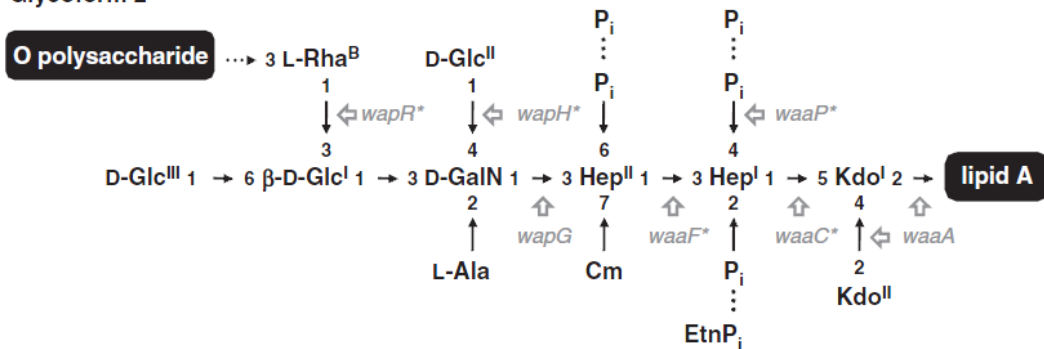


Figur 1-9 Generell oppbygning av et lipopolysakkarid [55]. KDO, ketodeoxyoktonat; Hep, heptose; Glu, glukose; Gal, galaktose; GluNac, N-acetylglukosamin; GlcN, glukosamin; P, fosfat.

Glycoform 1

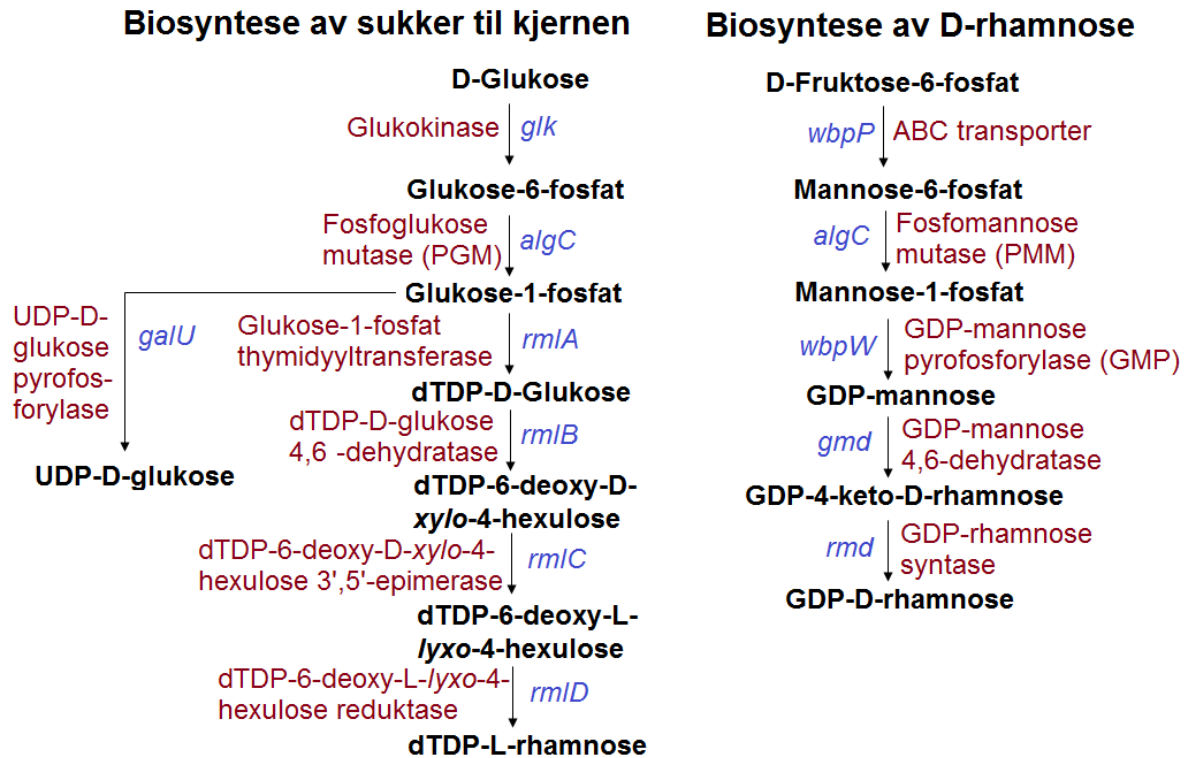


Glycoform 2



Figur 1-10 De to ulike glykoformene til kjernen av lipopolysakkarider hos *P. aeruginosa* [52]. Begge glykoformene har samme indre kjerne (KdoI, KdoII, HepI og HepII) og fire like sukkerer (GalN og GlcI-GlcIII) i ytre kjerne. Sukkerne har α konfigurasjon dersom ikke annet er indikert. Ala, alanin; Cm, carbamoyl; Etn, etanolamin; GalN, D-galakotsamin; Glc, glukose; Hep, L-glysero-D-mannoheptose; Kdo, ketodeoxyoktonat; Rha, rhamnose.

AlgC inngår både i syntesen av UDP-D-glukose og dTDP-L-rhamnose til kjernen av LPS og i syntesen av D-rhamnose til "A-band" (Figur 1-11) [52, 53]. I disse to sporene bruker AlgC to ulike substrat, glukose-6-fosfat og mannose-6-fosfat (siste er samme som i biosyntesen av alginat) [52, 53]. Fordi AlgC kan katalysere to ulike reaksjoner kalles det for et bifunksjonelt enzym som har både fosfomannose mutase (PMM) og fosfoglukose mutase (PGM) aktivitet [52].



Figur 1-11 *algC* har to roller i syntesen av lipopolysakkarider Venstre del av figuren er et foresått biosyntesespor for UDP-D-glukose og dTDP-L-rhamnose, mens høyre er for GDP-D-rhamnose syntese [52]. Blått indikerer genene som er involvert og navnene i rødt er enzymene genene koder for.

1.4 RK2-baserte vektorer og *Pm/xyIS* ekspresjonssystemet

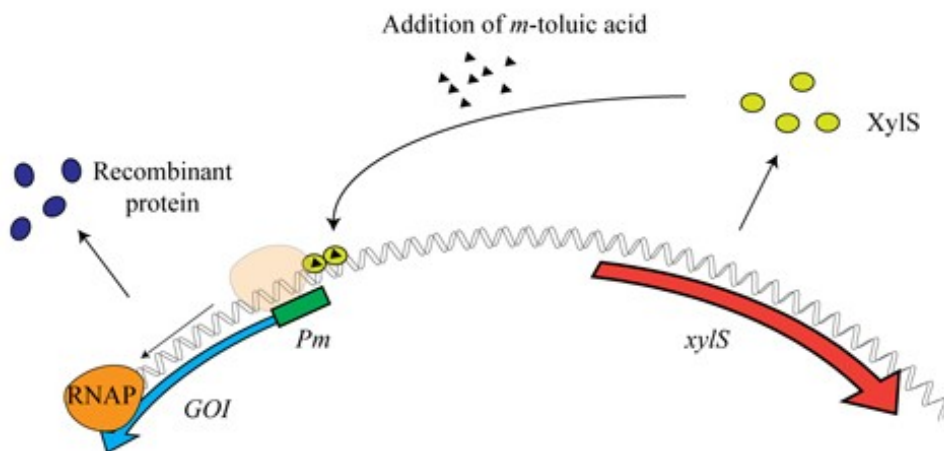
RK2-baserte vektorer:

RK2 er ett 60 kb, selv-overførbart plasmid [56, 57] funnet til å replikere i en rekke Gram-negative bakterier, samt Gram-positive bakterier, gjær og pattedyrceller [58]. RK2 replikoner har med andre ord en bred verts-rekkevidde [57, 59]. Et gen som koder for replikasjonsproteinet TrfA og origin for vegetativ replikasjon, *oriV*, er tilstrekkelig for replikasjon [56, 57, 59]. TrfA virker i *trans* [56] og binder til iteroner i *oriV* [56, 57, 59]. *OriV* er *cis*-fungerende [56] og ved binding av TrfA initieres replikasjon [59].

I *Escherichia coli* er kopitallet til RK2 estimert til å være 5 til 7 per kromosom [57]. Studier har vist at mutasjoner i *trfA* kan øke kopitallet med opp til 24 ganger [57, 59]. Dette er en av fordelene med RK2 replikoner, de kan manipuleres til å gi ulike antall kopier i flere arter [58]. En annen viktig fordel med RK2-baserte vektorer er at de effektivt kan overføres fra *E. coli* til mange ulike verter ved konjugering [58].

Pm/xylS ekspresjonssystemet:

Pm/xylS ekspresjonssystemet (Figur 1-12) kommer opprinnelig fra *Pseudomonas putida* TOL-plasmidet pWW0 [59-61]. Det har blitt vist at *Pm/xylS* ekspresjonssystemet fungerer i mange Gram-negative bakterier [59, 60] og at *m*-toluat er en effektiv inducer [60]. Uttrykk fra *Pm*-promotoren induseres ved at aktivatoren XylS binder seg til en region oppstrøms for bindingsetet til RNA polymerasen [59, 60, 62]. En inducer, for eksempel *m*-toluat [60] (Figur 1-12) eller 3-metylbenzoat [62], gjør at XylS dimeriserer og får høyere affinitet for *Pm* operator regionen [60]. Ved overuttrykk kan XylS binde seg til operator og inducere transkripsjon uten tilstedeværelse av inducer [59]. Når XylS har bundet seg til operator regionen rekrutterer den RNA polymerasen som igjen starter transkripsjon [60].



Figur 1-12 Regulering av *Pm* promotoren ved tilsetning av *m*-toluat i vekstmediet [60]. Binding av *m*-toluat til XylS fører til indusering av transkripsjon fra *Pm*-promotoren. RNAP, RNA polymerase; GO1, gen som blir transkribert.

1.5 Formålet med oppgaven

Genomet til *M. algicola* har blitt sekvensert og sekvenssammenligninger tyder på at bakterien har genene som kreves for alginatproduksjon. Ettersom både alginat og alginat-modifiserende enzymer er industrielt interessante er det av interesse å finne ut hvorvidt genene koder for de antatte proteinene og hvorvidt det er mulig å få arten til å produsere alginat. Dette er også interessant å finne ut i og med at det ikke er funnet andre marine alginat-produserende bakterier.

Sekvensering av *M. algicola* DG893 er tilgjengelige fra:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/149359740>

Ønsket om å få *M. algicola* til å produsere alginat la grunnlaget for denne oppgaven. I tillegg er det ikke publisert noe om hvordan rekombinant arbeid kan utføres i denne bakterien. En viktig del av oppgaven ble derfor å finne metoder for å overføre plasmid på, undersøke antibiotikaresistens og prøve ut promotorer.

Formålet med oppgaven kan deles inn i fire deler. Første mål var å undersøke alginatklyngen til *M. algicola* ved bioinformatisk analyse for å prøve å forutsi hvorvidt arten har fått genene ved horisontal eller vertikal genoverføring. Det var ønskelig å finne likheter og forskjeller mellom kjente alginatoperon og alginatklyngen til *M. algicola*. I tillegg var det et mål å finne ut hvorvidt andre arter har en alginatklynge. Mål nummer to var å utvikle verktøy for å kunne arbeide med *M. algicola*. Deriblant kartlegge mulige seleksjonmarkører for og mot bakterien, samt finne en metode for innføring av nytt genetisk materiale. Tredje målsetning var å få *M. algicola* til å produsere alginat. Siste delmål gikk ut på å uttrykke genene *algG* og *algL* fra *M. algicola* i *E. coli* for å undersøke om de kunne uttrykkes der og eventuelt måle enzymaktivitet.

2. Material og metode

2.1 Bioinformatikkverktøy

2.1.1 BLAST

"Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) er en søkemotor hvor målsekvens sammenlignes med alle sekvensene i en database. Et BLAST søk forteller noe om sannsynligheten for at sekvensen har samme funksjon som et allerede karakterisert protein. Etter endt søk lister BLAST opp de beste treffene, det vil si de proteinene med sekvenser mest homologe til målsekvensen ("query"). Tabellen består av navn på proteiner, hvilken art de er isolert fra og fem forskjellige verdier ("e-value", "max score", "total score", "query coverage" og "max identity") som alle sier noe om hvor lik målsekvensen er til det angitte proteinet. "Total score" og "max score" er ikke benyttet i denne analysen. [63]

"E-value" ("expect value") er den forventete verdien av antall treff som kommer av en tilfeldighet. At et treff kommer av en tilfeldighet betyr at selv om sekvensene er like, har ikke proteinene samme funksjon selv om sammenligningen tyder på det. Desto lavere og nærmere null "e-value" er, desto mer signifikant er den. Av dette følger det at desto lavere "e-value" er, jo større er sannsynligheten for at målsekvensen har samme funksjon som proteinet den sammenlignes med. BLAST sorterer automatisk etter "e-value", men det er mulig å velge å sortere etter en av de andre verdiene. [63]

"Max identity" er maksimalt prosentvis likhet av HSPene ("High-scoring segment pairs"). Denne verdien viser til andelen av aminosyrer som er like, og i samme posisjon, i de to sekvensene. "Query coverage" er prosentvis dekningsgrad av målsekvensen. Det vil si hvor stor andel av målsekvensen som har samme aminosyrer, og/eller aminosyrer med sidegrupper med samme kjemi (f.eks. positivt ladet), som sekvensen. [63]

Tabell 2-1 viser en oversikt over standardprogrammene til BLAST. I denne analysen ble det kun benyttet BLASTP hvor BLAST sammenligner en aminosyresekvens med aminosyresekvenser til proteiner i en database.

Tabell 2-1 Standardprogrammene til BLAST [63].

Program	Søkesekvens	Databasesekvens
BLASTN (nukleotid blast)	Nukleotid	Nukleotid
BLASTP (protein blast)	Protein	Protein
BLASTX	Translatert nukleotid	Protein
TBLASTN	Protein	Translatert nukleotid
TBLASTX	Translatert nukleotid	Translatert nukleotid

2.1.2 Clone Manager Professional Suite

Clone er en programpakke som har en samling av ulike verktøy. Programmet kan brukes til å simulere kloning, designe primere, identifisere åpne leserammer (ORF'er, "open reading frames") i en sekvens og utføre sekvenssammenligninger. Det er også mulig å endre og translaterer sekvenser, lage fylogenetiske trær og søke etter spesifikke sekvenser, som f.eks. start og stopp kodon.

2.2 Vekstmedier og løsninger

Antibiotika stock løsninger

200 g/L ampicillin løst i SIV
25 g/L apramycin løst i SIV
20 g/L gentamicin løst i SIV
50 g/L kanamycin løst i SIV
12,5 g/L kloramfenikol løst i 50 % etanol
20 g/L nalidixinsyre løst i SIV
50 g/L spectinomycin løst i SIV
10 g/L tetracyclin løst i 50 % etanol
20 g/L triclosan løst i 50 % etanol

Alle antibiotika sterilfiltreres.
Oppbevaring: - 20 °C

Luria Broth (LB)

10 g/L Trypton (OXOID)
5 g/L Gjærekstrakt (OXOID)
10 g/L, 30 g/L eller 60 g/L NaCl

Løst i SIV og autoklavert.
Oppbevaring: romtemperatur

3 X LB

30 g/L Trypton (OXOID)
15 g/L Gjærekstrakt (OXOID)
5 g/L NaCl

Løst i SIV og autoklavert.
Oppbevaring: romtemperatur

Luria Agar (LA)

LB tilsatt 15 g/L agar (OXOID) og autoklavert.
Oppbevaring: kjøleskap

Marine Broth

37,4 g/L Marine Broth (Difco™)
Løst i SIV og autoklavert.
Oppbevaring: romtemperatur

Marine Agar

Marine Broth tilsatt 15 g/L agar (OXOID) og autoklavert.
Oppbevaring: kjøleskap

Nitrosoguanidin i TM-buffer

2,5 g/L nitrosoguanidin
Løst i TM-buffer.
Varmes i vannbad (40 °C, 15 min) og settes på rotator (30 min) for å få fullstendig oppløsning.

SOC

20 g/L trypton (OXOID)
5 g/L gjærekstrakt (OXOID)
3,6 g/L glukose
0,5 g/L NaCl (natriumklorid)
2,5 mM KCl (kaliumklorid)
5,08 g MgCl₂ (magnesiumklorid)

Løst i SIV og sterilfiltrert.
Oppbevaring: - 20 °C

Psi-medium

5 g/L gjærekstrakt
20 g/L trypton
5 g/L MgSO₄ (magnesiumsulfat)

Løst i SIV, pH justert til 7,6 med KOH
og autoklavert.
Oppbevaring: romtemperatur

Tris-Maleat (TM) buffer (50 mM)

6,057 g/L Trizma base
5,805 g/L Maleat

Løst i SIV, pH justert til 7 med NaOH,
og sterilfiltrert.
Oppbevaring: romtemperatur/ kjøleskap

TFB1

2,94 g/L KAc (kaliumacetat)
12,1 g/L RbCl (rubidiumklorid)
1,47 g/L CaCl₂ x 2H₂O (kalsiumklorid)
10 g/L MnCl₂ x 4H₂O (mangan(II)klorid)
150 ml/L glycerol

Løst i SIV, pH justert til 5,8 med
fortynnet eddiksyre, og sterilfiltrert.
Oppbevaring: romtemperatur/ kjøleskap

TFB2

2,1 g/L MOPS
11 g/L CaCl₂ x 2H₂O (kalsiumklorid)
1,21 g/L RbCl (rubidiumklorid)
150 ml/L glycerol

Løst i SIV, pH justert til 6,5 med fortynnet
NaOH, og sterilfiltrert.
Oppbevaring: romtemperatur/kjøleskap

Tris buffer

Tris løst i SIV.

pH justert til 7,5 med HCl.
Fortynnet til ønsket konsentrasjon,
eventuelt tilsatt salt, og filtrert.
Oppbevaring: romtemperatur/kjøleskap

SDS Run buffer

50 mL stock (ClearPAGE™)
950 mL SIV

Oppbevaring: romtemperatur

4x proteinbuffer

80 µL Tris (pH 6,8)
140 µL glyserol (100 %)
160 µL 20 % SDS (natriumdodecylsulfat)
400 mM DTT (dithioeritriol)
20 µL bromfenolblå (10 %)

Oppbevaring: -20 °C

**Phage Lambda DNA PstI digest
ladder**

10 µL λ-DNA
10 µL NEBuffer 3
1 µL BSA
78 µL SIV
1 µL PstI

Settes i vannbad ved 37 °C i minst 1
time. 3-5 µL per gel.

2.3 Bakteriestammer og plasmider

Oversikt over bakteriestammer og plasmider benyttet i denne oppgaven er gitt i henholdsvis Tabell 2-2 og Tabell 2-3. Figurer av alle plasmidene er gitt i Vedlegg B.

Tabell 2-2 Bakteriestammer benyttet i oppgaven.

Bakteriestamme	Beskrivelse	Kilde
<i>E. coli</i> DH5 α	Stamme av <i>E. coli</i> brukt til heat-shock transformering. <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> .	[64]
<i>E. coli</i> S17.1	Stamme av <i>E. coli</i> brukt til heat-shock transformering av suicide-vektor. Har plasmid RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integert i kromosomet (inneholder <i>tra</i> -gener og <i>trfA</i>).	[65]
<i>M. algicola</i> DG893	<i>M. algicola</i> villtype	[3]
<i>M. algicola</i> DG893 KmR	DG893 variant med KmR. Mutasjon ble innført ved mutagenisering med NTG.	Denne oppgaven

Tabell 2-3 Plasmider benyttet i oppgaven.

Plasmid	Beskrivelse	Kilde
pUC128	Kloningsvektor med bakteriofag M13 origin. LacZ (α -del), AmR. Høykopitallsplasmid.	[66]
pKI6	Derivat av pUC128 hvor 1 kb før <i>algD</i> fra <i>M. algicola</i> , Pm/ <i>xylS</i> fra pHH100_mcherry og første kb av <i>algD</i> er satt inn. Lavkopitallsplasmid.	Denne oppgaven
pHE246	RK-basert vektor med TrfA-avhenig replikasjon fra oriV. AmR, TcR, <i>lacZ</i> . Lavkopitallsplasmid.	Helga Ertesvåg (upublisert)
pKI7	Derivat av pHE246 hvor "PalgD-Pm/ <i>xylS</i> - <i>algD</i> " fra pKI6 er satt inn. Lavkopitallsplasmid.	Denne oppgaven
pKI1	Derivat av pUC128 hvor <i>algG</i> er satt inn i restriksjonssetet EcoRV, AmR. Høykopitallsplasmid.	Denne oppgaven
pKI2	Derivat av pUC128 hvor <i>algL</i> er satt inn i restriksjonssetet EcoRV, AmR. Høykopitallsplasmid.	Denne oppgaven
pMV23	RK2-basert vektor med TrfA-avhenig replikasjon fra oriV. Identisk til pJBphOx-271d, men med Pm-mutasjon. AmR, Pm-promotor. Lavkopitallsplasmid.	[67, 68]
pHE218	Derivat av pMV23 som uttrykker Av AlgB. Lavkopitallsplasmid.	Helga Ertesvåg (upublisert)
pKI3	Derivat av pHE218 hvor Av <i>algB</i> er byttet ut med <i>algG</i> . Lavkopitallsplasmid.	Denne oppgaven
pKI4	Derivat av pHE218 hvor Av <i>algB</i> er byttet ut med <i>algL</i> . Lavkopitallsplasmid.	Denne oppgaven
pHH100-mcherry	RK-basert vektor med TrfA-avhenig replikasjon fra oriV. KnR, Mcherry. Lavkopitallsplasmid.	Hanne Jørgensen (upublisert)
pHE80	RK-basert vektor med TrfA-avhenig replikasjon fra oriV. TcR. Lavkopitallsplasmid	Helga Ertesvåg (upublisert)
pKI5	Derivat av pHH100-mcherry hvor <i>kanR</i> er byttet ut med <i>tcR</i> . Lavkopitallsplasmid.	Denne oppgaven

2.4 Dyrking av bakterier

2.4.1 Flytende kultur

Bakteriekoloni fra plate, frosset bakteriekultur eller forkultur ble inokulert i sterilt vekstmedium i autoklaverte kolber eller sterile rør. Det ble benyttet LB (3 % NaCl) som vekstmedium dersom ikke annet er oppgitt. Antibiotika ble tilsatt dersom det var nødvendig. Cellene ble inkubert i risteinkubator (225 rpm), *E. coli* ved 37 °C over natt og *M. algicola* ved 30 °C i to døgn.

2.4.2 Utplating

Fra flytende kultur ble 100 µl platet ut på agar plater, dersom ikke annet er oppgitt. Platene ble laget av sterilisert LA (3 % NaCl) i sterile petriskåler (vanligvis 9 cm i diameter), dersom ikke annet er oppgitt. Antibiotika ble tilsatt dersom det var nødvendig. Platene ble inkubert i varmeskap, *E. coli* ved 37 °C over natt og *M. algicola* ved 30 °C i to døgn.

2.4.3 Blå-hvit seleksjon

40 µL X-Gal og 7 µL IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid) ble tilsatt og strykt utover en LA plate. Inkubert i romtemperatur i 1 time for å tørke. Forkultur, i ønsket konsentrasjon, ble platet ut og inkubert som beskrevet over.

2.5 Isolering av total-DNA

MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification kit fra EPICENTRE ble brukt til å isolere DNA fra bakterieceller. Dette er en prosedyre som baserer seg på å lysere cellene for deretter å fjerne proteiner og RNA med ulike reagenser.

Fremgangsmåte:

For å isolere DNA ble celler høstet fra 1 mL cellekultur ved sentrifugering. Supernatanten ble fjernet. Cellene ble resuspendert i 1 µl Proteinase K og 300 µl "Tissue and Cell Lysis Solution" for å lysere cellene og bryte ned proteiner. Prøven ble inkubert på varmeblokk ved 65 °C i 15 min. Røret ble snudd opp-ned for å blande hvert 5 min. Prøven ble avkjølt til 37 °C på vannbad. 1 µl 5 µg/µL RNase A ble tilsatt for å kutte opp enkelttrådet RNA. Deretter ble røret snudd opp-ned for å blande og inkubert i vannbad ved 37 °C i 30 min. Inkuberte prøven på is i 4 min. 150 µL "MPC Protein Precipitation Reagent" ble tilsatt for å felle ut proteiner. Det ble blandet ved å snu røret opp-ned. Utfelling ble gjort ved å sentrifugere i 10 min ved 10 000 rpm og 4 °C. Supernatanten ble overført til et nytt rør.

I det nye røret ble supernatanten tilsatt 500 µl isopropanol og røret ble snudd opp-ned 30-40 ganger for å blande. Røret ble sentrifugert ved 4 °C i 10 min. Ettersom DNA er uløselig i isopropanol felles DNAet ut. Isopropanolen ble fjernet. DNAet ble vasket to ganger med etanol (70 %). Hvis pelleten løsnet under vaskingen ble det utført et sentrifugeringstrinn før etanolen ble fjernet. Lufttørket DNAet i 30 min og resuspenderte det i 50 µL "EB buffer". DNAet ble lagret ved -20 °C.

2.6 Polymerase kjedereaksjon

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er *in vitro* amplifisering av korte DNA sekvenser [69]. I en syklus på tre trinn blir DNA eksponentielt amplifisert ved at DNAet denatureres slik at primere kan hybridisere til templatet og til slutt forlenges av en DNA polymerase [69]. I denne oppgaven er PCR brukt til amplifisering av fragmenter fra både genomisk DNA og plasmider. Primere benyttet er gitt i Tabell 2-6.

Fremgangsmåte:

PCR Protocol for Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (M0530) ble fulgt ved utførelse av PCR.

Komponenter som ble blandet er vist i Tabell 2-4 sammen med mengdene brukt for både 20 µL og 50 µL reaksjon. DMSO ble tint på vannbad ved 37 °C før bruk. Mengde templat DNA varierer med hvor god kvalitet det er på DNAet, dvs. hvor godt renset det er. Blandingen ble blandet forsiktig i et PCR-rør og røret ble sentrifugert for å få ned væske fra kantene. Røret ble flyttet fra is til en PCR-maskin forvarmet til 98 °C og varmesyklusen (Tabell 2-5) ble startet.

Tabell 2-4 Mengde av komponentene i en PCR.

Komponent	20 µL reaksjon	50 µL reaksjon	Sluttkonsentrasjon
Nukleasefritt vann	til 20 µL	til 50 µL	
5x Phusion HF eller GC buffer	4 µL	10 µL	1x
10 mM dNTP	0,4 µL	1 µL	200 µM
10 µM Forward primer	1 µL	2,5 µL	0,5 µM
10 µM Reverse primer	1 µL	2,5 µL	0,5 µM
Templat DNA	variabel	variabel	< 250 ng
DMSO (valgfritt)	(0,6 µL)	(1,5 µL)	3 %
Phusion DNA polymerase	0,2 µL	0,5 µL	1,0 enhet/50 µL PCR

Tabell 2-5 Generelt PCR-program (oppgitt i PCR Protocol (M0530)).

Trinn	Temperatur	Tid
1. Innledende denaturering	98 °C	30 s
2. Denaturering	98 °C	5-10 s
3. Hybridisering av primere	45-72 °C	10-30 s
4. Elongering	72 °C	15-30 s/kb
Repeter trinn 2-4 i 25-35 sykluser		
5. Avsluttende elongering	72 °C	5-10 min
Oppbevaring	4 °C	Hold

2.7 Primere

For å amplifisere et fragment ved PCR eller ved sekvensering ble det brukt primere. Primere er små oligonukleotider som ble designet slik at de er komplementære til målsekvensen som amplifiseres. Disse fungerer som startpunkt for videre forlengelse utført av polymerasen i en PCR. I Tabell 2-6 er sekvensene til alle primere benyttet i denne oppgaven gjengitt.

Tabell 2-6 Oversikt over primersekvenser benyttet i oppgaven.

Primernavn	Sekvens
algDF	5'-ATGTACAATAATAATGGAGT CATGAACAATGCGAGTCAGTATTTTTGGTTTG-3'
algDR2	5'-AGGTCGACGGTATCGATAAGC TTGAGGGCTTTCCCGCAGATC-3'
M13for	5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3'
M13rev	5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'
MaalgGF	5'-GCGGTTCTGAGGAGAGCATATGATAGCC-3'
MaalgGR	5'-GTTACTAGTCTGCCGATCAGGATAACCAGAG-3'
MaalgLF	5'-GGATTCATATGCGAATCCAACAACGCTCTG-3'
MaalgLR	5'-TTAACTAGTGGCCCGTTAGAACCGTTTAC-3'
PalgDF	5'-CCCGGGCTGCAGGAATTCGA TAGAAGGGCGGCGTGGTGTC-3'
PalgDR	5'-TAGCCGAAGAAGGGATGGGT ATCCTTTACTCCCCTGACTGTCATCCA-3'
pGEM/pLit-seq-f	5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'
PmF	5'-TGGATGACAGTCAGGGGAG TAAAGGATACCCATCCCTTCTTCGGCTA-3'
PmR	5'-CAAACCAAAAATACTGACTCG CATTGTTTCATGACTCCATTATTATTGTACAT-3'
pUC128Fny	5'-GATCTGCGGGAAAGCCCTCA AGCTTATCGATACCGTCGACCT-3'
pUC128R	5'-GACACCACGCCCTTCTA TCGAATTCCTGCAGCCCGGG-3'
Sekvens 1100	5'-AAAGGCGCATCAGGGCAACG-3'
Sekvens 2000	5'-TCCGGATTGAGCAGCAATAG-3'
Sekvens 2900	5'-CAGCAGGTACATCAGAACAG-3'

2.8 Rensing av PCR produkt

Ved rensing av PCR produkt ble "QIAquick PCR Purification Kit Protocol" fra QIAGEN benyttet. Dette er en metode for å fjerne gjenværende nukleotider, primere, polymerase og salt.

Til 45 µL PCR produkt ble det brukt 225 µL "Buffer PB" (5 ganger så mye buffer som PCR produkt). 150 µL av bufferen ble blandet med PCR produkt og tilsatt til en QIAquick spin kolonne. Resten av bufferen ble tilsatt direkte på kolonnen. Kolonnen ble sentrifugert ved 13 000 rpm i 1 min. for binding av DNA til kolonnen. Eluatet ble

kastet. Det ble tilsatt 750 μL "Buffer PE" og sentrifugert ved 13 000 rpm i 1 min. for å vaske kolonnen. Eluatet ble kastet. Det ble deretter sentrifugert på nytt ved 13 000 rpm i 1 min for å være sikker på at all væske ble fjernet. Kolonnen ble overført til et sterilt mikrosentrifugerør og tilsatt 50 μL "Buffer EB". Sentrifugerte ved 6000 rpm i 2 min for å eluere PCR produkt. Lagret produktet ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.9 Plasmid isolering

"Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" fra Promega ble brukt til å isolere plasmid fra bakterieceller. Dette er en metode for å isolere plasmid DNA som baserer seg på å lysere cellene for deretter å binde plasmidet til en kolonne, vaske plasmidet med buffer og til slutt eluere det ut av kolonnen igjen.

Fremgangsmåte:

For å isolere plasmid fra lavkopitallplasmid ble celler høstet fra 10 mL kultur ved sentrifugering i 5 min ved 6000 rpm. Supernatanten ble fjernet. Bunnfallet, bestående av bakterieceller, ble resuspendert i 500 μL resuspenderingsbuffer ved pipettering og vortexing. Løsningen ble fordelt på to mikrosentrifugerør, 250 μL i hvert. Resten av prosedyren ble utført for hvert rør.

Ved isolering av plasmid fra høykopitallplasmid ble celler fra 3 mL kultur høstet på samme måte som for lavkopitallplasmid. Forskjellen fra lavkopitallplasmid var at for høykopitallplasmid ble det resuspendert i 250 μL resuspenderingsbuffer og alt ble beholdt i samme rør. Resten av prosedyren ble utført likt for både høy- og lavkopitallplasmider.

250 μL lyseringsløsning ble tilsatt for å lysere cellene. Røret ble snudd 4 ganger for å blande. 10 μL basisk proteaseløsning ble tilsatt for å spalte proteiner. Røret ble snudd 4 ganger for å blande og inkubert ved romtemperatur i 5 min. 350 μL nøytraliserings-løsning ble tilsatt og blandet ved å snu 4 ganger. Lysatet ble sentrifugert ved 13 000 rpm og romtemperatur i 10 min.

En kolonne som binder plasmid DNA ble satt i et oppsamlingsrør og supernatanten fra et mikrosentrifugerør ble overført til kolonnen. Sentrifugering ved 13000 rpm og romtemperatur i 1 min ble gjort for å binde plasmid til kolonnen. Eluatet ble kastet og for lavkopitallplasmid ble supernatanten fra det andre røret overført til kolonnen og sentrifugert. Etter å ha fjernet eluatet ble det tilsatt 750 μL vaskebuffer til kolonnen og sentrifugert ved 13 000 rpm i 1 min. Vasketrinnet ble gjentatt med 250 μL og sentrifugering i 2 min. Vaskebuffer brukes for å få et renere produkt. Kolonnen ble deretter overført til et sterilt mikrosentrifugerør og tilsatt 100 μL nukleasefritt vann og sentrifugert ved 9000 rpm i 2 min for å eluere ut DNAet. Plasmid DNA ble lagret ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.10 Restriksjonskutting

Restriksjonsenzymmer gjenkjenner spesifikke sekvenser i et DNA-molekyl og kutter bindingen mellom to nukleotider i hver tråd [69]. Dette gjør at DNA-molekylet blir delt i to. Produktet av kuttingen gir enten butte ender, 5' overheng eller 3' overheng, avhengig av enzymet [69]. DNA-fragmenter som skulle klones ble kuttet fra plasmid eller genomisk DNA. Restriksjonsenzymmer ble også brukt for å sjekke vellykket kloning. De ulike restriksjonsenzymene benyttet i denne oppgaven er vist med gjenkjenningssekvens i Vedlegg C.

Fremgangsmåte:

3-17 μL DNA (mye ved lavkopitalplasmid, lite ved høykopitalplasmid) ble blandet med 2 μL 10 x buffer (NEB 1-4, avhengig av enzym), 0,5 μL BSA og SIV til 19,5 μL . 0,5-1,5 μL enzym (0,5 μL av et enzym) ble tilsatt. Satt i vannbad ved 37 °C i minst 1 time.

2.11 Gelelektroforese

Ved bruk av gelelektroforese ble DNA fragmenter separert basert på størrelse i en agarose gel. Ved $\text{pH} > 2$ er DNA negativt ladet på grunn av fosfatgruppene ($\text{pK}_a = 1$) [35], noe som gir en jevn negativ lading over hele fragmentet [69]. Dette gjør at det ved gelelektroforese kun er størrelsen som avgjør hvor raskt fragmentet vil vandre mot katoden [69]. Jo lengre fragment desto vanskeligere er det for DNAet og snirkle seg gjennom nettverket av agarose [69]. Dermed vandrer korte DNA fragmenter raskere enn lange.

Fremgangsmåte:

Prøvene med fragmentene som skal skilles ved bruk av gelelektroforese ble tilsatt loading dye i forholdet 1 μL loading dye til 10 μL prøve. Det ble blandet ved å knipse på røret. Lett sentrifugering ble utført ved væske opp etter kanten på røret. Prøvene ble applikert i hver sin brønn på en agarosegel tilsatt GelGreen for å farge DNAet. I tillegg til prøvene ble en DNAstandard (se Vedlegg D) tilsatt en eller flere av brønnene.

Avhengig av størrelse på gelen, og hvor nøye separering som var nødvendig, ble det brukt ulike kombinasjoner av spenning og tidslengde. Vandring av loading dye kan observeres med det blotte øyet. Dette ble derfor brukt som en indikasjon på hvor langt fragmentene hadde vandret under gelelektroforesen ettersom loading dye'en i seg selv vandrer raskere enn DNA fragmenter.

2.12 Rensing av DNA fra agarosegel

"QIAquick Gel Extraction kit Protocol" fra QIAGEN ble brukt til å isolere DNA fra gel. Dette er et kit laget for å rense DNA fra agarosegel.

Fremgangsmåte:

Etter å ha kuttet ønsket DNA ut av agarosegelen ble 300 µL "Buffer QG" tilsatt. Mikrosentrifugerøret, med gel og buffer, ble inkubert på varmeblokk ved 50 °C til gelen var smeltet (ca. 10 min). 100 µL isopropanol ble tilsatt og blandet med oppløst gel. Hele innholdet ble overført til en QIAquick spin kolonne og sentrifugert ved 13000 rpm i 1 min. I dette trinnet fester DNAet seg til kolonnen. Det ble tilsatt 750 µL "Buffer PE" og sentrifugert ved 13000 rpm i 1 min for å vaske produktet. Eluert væske ble kastet. Det ble deretter sentrifugert på nytt ved 13000 rpm i 1 min for å være sikker på at all væske ble fjernet. Kolonnen ble overført til et sterilt mikro-sentrifugerør og tilsatt 50 µL "Buffer EB". Sentrifugerte ved 6000 rpm i 2 min for å eluere PCR produkt. Lagret ved -20 °C.

2.13 Ligering

Ligering baserer seg på at to fragmenter med komplementære ender, dvs. ender som kan basepare med hverandre [69], eller fragmenter med butte ender (ingen overheng) kan kobles sammen ved å blande dem med et ligaseenzym. Komplementære overheng dannes ved å kutte fragmentene som skal ligeres sammen med de samme restriksjonsenzymene.

Fremgangsmåte:

Kuttet insert DNA og vektor ble blandet, totalt 17 µL. Det ble brukt tilnærmet tre ganger mer (i molar) insert enn vektor. 2 µL 10 x ligasebuffer og 1 µL T4 DNA ligase ble tilsatt. Ligering skjer ved å sette rør på is over natten (4 °C til romtemp.).

2.14 Gibson ligering

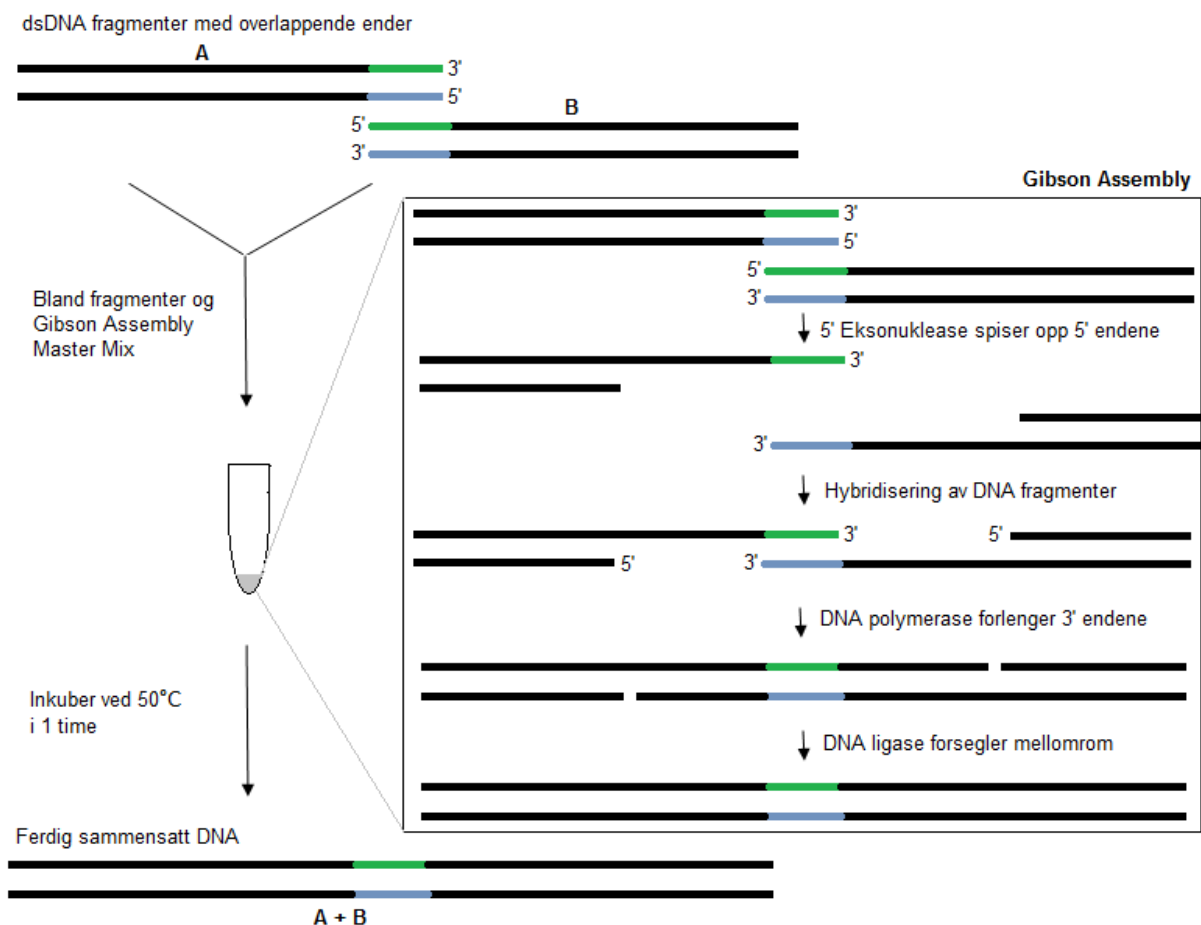
Gibson ligering baserer seg på samme prinsippet som standard ligering (se over). Forskjellen er at ved Gibson ligering brukes PCR til å lage like ender på fragmentene som skal ligeres sammen (Figur 2-1). En eksonuklease spiser opp 5' endene slik at de like endene blir frie til hybridisering. Videre forlenger en DNA polymerase 3' endene og en ligase forsegler siste mellomrom. Ettersom mer enn to fragmenter kan tilsettes i samme reaksjon er Gibson ligering mye raskere enn standard ligering ved ligering av mer enn to fragmenter.

Fremgangsmåte:

Fragmenter som skulle liggeres sammen ble amplifisert ved PCR med primere designet slik at endene til nærliggende fragmenter overlappet. PCR produktene ble separert ved gelelektroforese og korrekte fragment ble isolert fra gel. Mengde DNA ble målt med Nanodrop.

For ligering av 4-6 fragmenter ble det brukt 0,2-1 pmol total mengde DNA, maks 10 µL. Antall pmol ble beregnet fra denne formelen: $\text{pmol} = (\text{vekt i ng}) \times 1000 / (\text{basepar} \times 650 \text{ dalton})$. Det ble brukt 2-3 ganger mer (i ng) insert enn vektor. Fragmentene ble blandet med 10 µL "Gibson Assembly Master Mix" (2X) og SIV til totalt 20 µL. Positiv kontroll ble laget ved å blande 10 µL "Positive Control" og 10 µL "Gibson Assembly Master Mix" (2X). "Gibson Assembly Master Mix" inneholder eksonuklease, polymerase og ligase.

Reaksjonen skjer ved å inkubere prøvene i en termosyklus ved 50 °C i 60 min. Figur 2-1 viser en skjematisk oversikt over hvordan forsøket settes opp og hva som skjer under inkuberingstrinnet. Prøvene ble deretter lagret på is eller ved -20°C før transformering.



Figur 2-1 Oversikt over Gibson ligering. To fragmenter, A og B, har overlappende sekvenser som gjør at de blir komplementære til hverandre når eksonukleasen spiser opp 5' enden.

2.15 Innføring av nytt genetisk materiale i *E. coli* og *M. algicola*

2.15.1 Kjemisk transformering av *E. coli*

Transformering er en metode for å tilføre celler nytt genetisk materiale [69]. For å transformere plasmid DNA til *E. coli* celler ble de først gjort kjemisk kompetente. Dette er en behandling som gjør cellene mottakelig for å ta opp DNA. Alle plasmid laget i forbindelse med dette arbeidet ble transformert inn i kompetente *E. coli* celler. Dette var nødvendig for å oppkopiere plasmidene til videre bruk og/eller lagring.

Tillaging av RbCl-kompetente celler

Fra overnatts kultur i Psi-medium ble 1 % *E. coli* (DH5 α eller S17.1) inokulert i 100 mL Psi-medium. Kultur ble inkubert i risteinkubator ved 37 °C til OD₆₀₀ var lik 0,4. Inkubert på is i 15 min for å stoppe vekst. Cellene ble høstet ved sentrifugering ved 4500 rpm i 5 min. Supernatanten ble fjernet og cellene resuspendert i 40 mL kald TFB1. Inkubert på is i 5 min. Cellene ble igjen høstet ved sentrifugering ved 4500 rpm i 5 min. Supernatanten ble fjernet og cellene resuspendert i 3 mL kald TFB2. Prøven ble fordelt i porsjoner på 100 μ L og fryst raskt på flytende nitrogen. Cellene ble lagret ved -80 °C.

Heat-shock transformering av RbCl-kompetente celler

RbCl-kompetente celler ble tint på is. Til 100 μ L celler ble det tilsatt 10 μ L ligeringsblanding eller 1 μ L plasmid og blandet forsiktig. Prøven ble inkubert på is i 30 min. Heat-shock ble utført ved å sette prøvene i vannbad ved 37 °C i 5 min. Inkuberte på is i 2 min. 1 mL SOC-medium, forvarmet til ca. 37 °C, ble tilsatt. Inkuberte ved 37 °C og risting (225 rpm) i 1-2 timer. Cellene ble platet ut på LA med antibiotika som slekterte for plasmidet.

2.15.2 Elektroporering

Elektroporering er en metode som regnes for å være mer effektiv enn heat-shock transformering til å tilføre celler nytt genetisk materiale. I denne oppgaven ble det laget elektrokompetente *M. algicola* ved bruk av en fremgangsmåte som har fungert bra for *A. vinelandii* [70].

Fremgangsmåte:

Fra forkultur ble 2 % *M. algicola* inokulert i Marine broth og inkubert til OD₆₂₀ var på 0,4-0,5. Cellene ble høstet ved 5000 rpm i 10 min ved 0 °C. Supernatanten ble fjernet og pellet resuspendert i iskald 10 % steril glyserol (samme volum som opprinnelig mengde kultur). Dette trinnet (fra høsting av celler til resuspendering) ble repetert tre ganger ved å først bruke ½ av volumet, deretter ¼ av volumet glyserol og til slutt 2-4 mL glyserol. Cellene ble fordelt i mikrosentrifuge rør (40 μ L alikvoter) og fryst raskt ved bruk av tørris og etanol. Lagret ved 80 °C.

Elektrokompetente celler ble tint på is og blandet med 1 μ L plasmid i en steril elektroporeringskuvette med en interelektrode avstand på 1 mm. Deretter ble cellene utsatt for en puls på ca. 1800 V/mm i ca. 5 ms. Det ble raskt tilsatt 1 mL LB og

overført til mikrosentrifugerør. Inkuberte ved 30 °C og 225 rpm i ca. 4 timer. Det ble platet ut på antibiotika som selekterte for plasmidet.

2.15.3 Konjugering

Konjugering er en vanlig metode for å overføre genetisk materiale fra en donor-celle til mottaker-celle. For at et plasmid skal overføres kreves det et sete hvor overføringen initieres, oriT ("origin of transfer") [69]. I denne oppgaven ble konjugering forsøkt brukt til å overføre plasmid-DNA fra *E. coli* til *M. algalicola* og til å inkorporere DNA i *M. algalicola* via homolog rekombinering.

Fremgangsmåte:

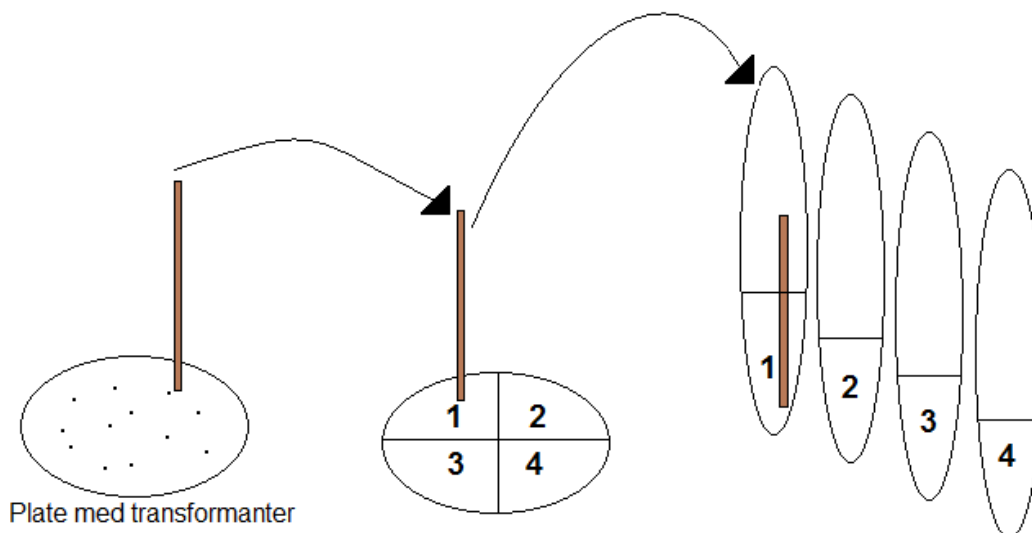
For å konjugere plasmid til *M. algalicola* ble først både *E. coli*, inneholdene plasmidet, og *M. algalicola* dyrket opp hver for seg. På dag 1 ble *M. algalicola* inokulert i 10 mL LB. Videre ble 1 % *M. algalicola* reinokulert i 10 mL LB på dag 3. Samme dag ble *E. coli* inokulert i 10 mL LB med antibiotika som selekterte for plasmidet. På dag 4 ble 1 % *E. coli* reinokulert i 10 mL LB og inkubert i 2-3 timer. Totalt 6 mL *M. algalicola* og *E. coli* ble blandet i et 13 mL sentrifugerør slik at det var størst konsentrasjon av *M. algalicola*. Som kontroll ble et annet rør fylt med 6 mL kultur *M. algalicola*. Begge rør ble sentrifugert ved 5000 rpm i 5 min. Pellet ble resuspendert i 1-200 µL LB. Dråpene ble satt på hver sin plate LA uten antibiotika. Inkuberte i varmeskap ved 30°C til neste dag. Oppveksten av bakterier ble skrapet av platene og resuspendert i 1 mL LB. Det ble laget en fortynningsrekke og platet ut 100 µL på plater som selekterte for *M. algalicola* med plasmid. Platene ble inkubert i varmeskap ved 30°C i to døgn.

2.16 Utvelgelse av transformanter og kontroll av plasmider

Alle plasmid som ble konstruert og transformert til kompetente celler ble kontrollert for å sjekke at konstruktet var korrekt før det ble brukt i videre arbeid. Dette ble gjort ved å plukke transformanter med steril tannpirker, sette koloni på ny plate og inokulere i et rør (3 mL medium) eller rysteflaske (10 mL medium) (Figur 2-2). Plate og flytende kultur ble inkubert over natten ved hhv. 37 °C uten risting og 37 °C med risting (225 rpm).

Etter endt inkubering ble plasmid isolert og kuttet med restriksjonsenzymer. Clone Manager ble brukt til å finne enzymer som kuttet slik at nye og gamle plasmid ville gi ulike fragmentlengder ved separasjon på agarosegel. Det ble alltid kuttet for å oppnå minst to bånd, slik at det ikke var noen tvil om plasmidet ble kuttet eller ikke.

Dersom flere av de utvalgte koloniene inneholdt korrekt plasmid ble en av dem valgt til å dyrkes opp for å fryse ned ved -80°C. I tilfeller hvor ingen av koloniene inneholdt korrekt plasmid ble det utført en ny runde utvelgelse, eventuelt transformert på nytt dersom det var få transformanter.



Figur 2-2 Utvelgelse av transformanter. Tannpirker ble brukt til å overføre sammen koloni til ny plate og videre til flytende medium.

2.17 Sekvensering

Sekvensering basert på Sanger metoden ble brukt til å bestemme nukleotid-sekvensen til DNA fragmenter. Et templat, oppnådd ved PCR eller kloning, kan sekvenseres ved å generere fragmenter med alle mulige lengder fra templatet [71]. Dette oppnås ved bruk av dideoxynukleotid-analoger til å terminere syntesen av DNA [71]. Dideoxynukleotider (ddNTP) mangler hydroksylgruppen på 3' enden som er nødvendig for videre forelengelse [71]. En blanding av dNTP og ddNTP i reaksjonen fører dermed til ulike lengder på fragmentene. Ved å merke de fire ulike ddNTP med hver sin fluorescerende farge er det kun nødvendig med en reaksjon for hvert templat [71]. Fragmentene separeres ved kapillærelektroforese samtidig som en laser skanner båndene [71]. En datamaskin registrerer fargen på hvert bånd og setter det sammen til en sekvens [71].

I denne oppgaven ble noen prøver sekvensert ved BigDye og noen sendt til GATC.

2.17.1 BigDye-prosedyren

Følgende komponenter ble blandet i et PCR-rør: 150-300 ng plasmid DNA, 1 μ L primer, 4 μ L fortynningsbuffer, 4 μ L BigDye og SIV til 20 μ L. BigDye ble tilsatt til slutt. Røret ble satt i en PCR-maskin og programmet i Tabell 2-7 ble kjørt. Prøvene ble enten fryst ned for senere bruk eller brukt videre i neste punkt.

Produktet ble overført fra PCR-rør til et mikrosentrifugerør. 2 μ L NaAc (natriumacetat, 3 M, pH 5,2) og 50 μ L etanol (96 %) ble tilsatt for å få utfelling av DNA. Det ble blandet godt og inkubert i romtemperatur i presis 15 min. Sentrifugerte ved 13000 rpm i 20 min. Supernatanten ble fjernet. Produktet ble vasket ved å tilsette 250 μ L etanol (70 %), blande godt og sentrifugere i 5 min. Vasketrinnet ble utført to ganger

for å være sikker på at alle primere og nukleotider ble fjernet. Prøven ble tørket i romtemperatur over natten.

Røret ble levert til "Institutt for biologi" for separasjon av sekvenseringsproduktene.

Tabell 2-7 Varmesyklus benyttet til sekvensering.

Trinn	Temperatur	Tid
1. Innledende denaturering	96 °C	4 min
2. Denaturering	96 °C	30 s
3. Hybridisering av primere	50 °C	15 s
4. Elongering	60 °C	4 min
Repeteer trinn 2-4 i 24 sykluser		
Oppbevaring	4 °C	Hold

2.17.2 GATC-prosedyren

Følgende komponenter ble blandet i et mikrosentrifugerør: 5 µL plasmid DNA (80-100 ng/µL) og 5 µL primer (5 µM). Total prøve på 10 µL ble merket med kode og sendt til GATC Biotech AG for sekvensering.

2.18 Mutagenese

Mutasjoner kan føre til store fenotypiske endringer eller ingen synlige endring i det hele tatt [69]. Enkeltmutasjon kan gi endret kodon, men flere kodon gir samme aminosyre [69]. Dersom aminosyrer endres, men har lik kjemi (f.eks. positivt ladet) gir det ikke nødvendigvis endret funksjon til et protein [72]. Enzymer har gjerne noen få aminosyrer som er veldig avgjørende for aktivitet, mens andre er av liten betydning [72].

Fremgangsmåte:

Fra nedfrost stock ble 225 µL *M. algicola* inokulert i 50 mL LB. OD₆₀₀ ble målt i todagers forkultur og kultur ble overført til ny kolbe med 100 mL LB slik at OD₆₀₀ i ny kultur var ca. 0,1. Bakteriene ble dyrket videre til OD₆₀₀ på ca. 0,5 var nådd.

2 x 35 mL av kulturen ble overført til to 50 mL sentrifugerør. Celler ble høstet ved sentrifugering ved 4000 rpm i 10 min og resuspendert i 17,5 mL TM-buffer (romtemp.). OD₆₀₀ i kulturen ble dermed på ca. 1,0.

Mutagenese ble utført ved å slå sammen kulturene og deretter tilsette 5 mL til 50 mL sentrifugerør. Sentrifugerørene var på forhånd tilsatt nitrosoguanidin (NTG) til ønsket konsentrasjon og TM-buffer, totalt 200 µL. Rørene ble satt på skrå i risteinkubator ved 30 °C og risting (225 rpm) i 30 min. Rørene ble deretter satt på våt is og lett risting for å avkjøle.

Etter mutagenese ble det platet ut på LA for å bestemme overlevelsesfrekvens. Det ble tatt ut 100 µL fra hvert rør og tilsatt til rør med 10 mL iskald LB-medium. Fra disse rørene ble det laget en fortynningsrekke ved å blande 500 µL og 4,5 mL NaCl (0,9 %). Det ble blandet kraftig på vortexer mellom hver overføring. 100 µL ble platet ut på LA plater.

Etter utplating til bestemmelse av overlevelse ble rørene med resterende kultur sentrifugert ved 3500 rpm i 3 min for å høste cellene. Hver av pelletene ble deretter resuspendert i 5 mL iskald TM-buffer, sentrifugert på nytt ved 3500 rpm i 3 min og resuspendert i 5 mL iskald LB. Dette ble gjort for å fjerne nitrosoguanidin fra cellene. Kulturen ble sentrifugert på nytt og resuspendert i 5 mL romtemperert LB. Rørene ble deretter inkubert ved 30 °C og risting (225 rpm). Det ble fortsatt benyttet 50 mL sentrifugerør for å sikre oksygenering.

Etter to timer ble rørene tatt ut, OD₆₀₀ målt og cellene høstet ved 3500 rpm i 3 min. Cellene ble resuspendert i 5 mL LB medium og OD₆₀₀ ble igjen målt. Fortsatte inkuberingen (30 °C, 225 rpm) over natten.

På morgene neste dag ble OD₆₀₀ målt og cellene ble høstet ved 3500 rpm i 3 min. Resuspenderte cellene i LB til OD₆₀₀ = 3,5 (volum beregnet fra målt OD₆₀₀). Steril glycerol ble tilsatt til 15 % og prøvene ble fordelt på cryorør og lagret ved -80 °C. Under denne prosessen ble OD₆₀₀ dermed først økt på grunn av redusert volum, for deretter å bli litt lavere igjen ved tilsetning av glycerol. OD₆₀₀ i nedfryste prøver ble beregnet til å være på ca. 2,6.

Til bestemmelse av kimtall i nedfryste prøver ble det tatt opp en alikvot av hver prøve og tint i romtemperert vannbad. En fortynningsrekke ble laget ved å blande 500 µL prøve til 4,5 mL NaCl (0,9 %) og blande kraftig på vortexer mellom hver overføring. Det ble platet ut 100 µL på LA plater.

2.19 Måling av mCherry

mCherry er et fluorescerende molekyl som emitterer rødt lys. Som et relativt mål på mCherry konsentrasjon ble fluorescens fra bakteriekultur målt ved bruk av en mikroplate leser. Programvaren Tecan i-control ble brukt til å sette opp målingen hvor en laser sender ut lys med bølgelengde på 584 nm og detekterer lys ved 620 nm. Økt deteksjon i forhold til blankprøve ble brukt som et mål på mengde mCherry uttrykt i prøven.

Fremgangsmåte:

mCherry ble målt ved å tilsette 100 µL fra hver prøve til en svart 96 brønnsplate. Det ble brukt en svart plate ettersom detektor er over platen og måler emittert lys.

Tabell 2-8 viser hvilke verdier som ble brukt for de ulike parameterene. Celletettheten ble også målt. Dette ble gjort ved å tilsette 100 µL fra hver prøve til en 96

brønnsplate og måle absorbans ved OD₆₀₀. Her ble det brukt en gjennomsiktig plate ettersom det skal måles hvor mye lys som kommer gjennom prøven. Det ble fortynnet dersom nødvendig. Tecan i-control parameterene for disse målingene er vist i Tabell 2-9.

Tabell 2-8 Verdier benyttet ved måling av mcherry ved hjelp av Tecan i-control.

Parameter	Input
Shaking Duration	15 s
Shaking Amplitude	3 mm
Mode	Fluorescence Top Reading
Excitation Wavelength	584 nm
Emission Wavelength	620 nm
Excitation Bandwidth	9 nm
Emission Bandwidth	20 nm
Gain	180
Number of Flashes	10
Integration Time	20 µs
Lag Time	0 µs
Settle Time	0 ms
Z-Position (Manual)	18043 µm

Tabell 2-9 Verdier benyttet ved måling av OD ved hjelp av Tecan i-control.

Parameter	Input
Shaking Duration	60 s
Shaking Amplitude	3 mm
Mode	Absorbance
Wavelength	600 nm
Bandwidth	9 nm
Number of Flashes	10
Settle Time	0 ms

2.20 Assay

2.20.1 Lyaseassay

Lyaser kutter opp alginat i mindre biter. Dette fører til dannelse av umettete uronsyrer som kan måles. De umettete endene absorberer sterkt ved 230 nm [73, 74]. Lyaseaktivitet kan dermed måles som en økning i absorpsjon som følge av at alginat blir kuttet.

Fremgangsmåte:

En blanding av alginat, buffer (Tris [pH 7,5]) og salt (NaCl) ble tilsatt brønner i en 96-brønns UV plate. Lyaseekstrakt blandet med buffer (Tris [pH 7,5]) ble deretter tilsatt til brønnene. Totalvolumet i hver brønn var på 150 µL og mengdene av komponentene ble justert slik at sluttkonsentrasjoner av alginat var på 4 mg/mL, Tris

på 50 mM og NaCl på 200 mM. Raskt etter ble målingene av absorbans målt kontinuerlig ved 230 nm.

2.20.2 Epimeraseassay

Epimerisering av alginat fører til omdannelse av mannuronsyre til guluronsyre. Ved å tilsette epimerasen til ren mannuronan for deretter å kutte alginatet med en G-spesifikk lyase kan epimerase aktivitet måles på samme måte som lyase aktivitet.

Fremgangsmåte:

En blanding av mannuronan (M-blokk alginat), buffer (Tris [pH 7,5]) og salt (NaCl, MgCl₂, eller CaCl₂) ble tilsatt brønner i en 96-brønns UV plate. Epimeraseekstrakt ble deretter tilsatt til brønnene. Totalvolumet i hver brønn var 200 µL og mengdene av komponentene ble justert slik at sluttkonsentrasjoner av alginat var 1,33 mg/mL og Tris 50 mM. Salt-konsentrasjonen ble variert. Prøvene ble inkubert i varmeskap ved 37 °C over natten. Neste dag ble OD₂₃₀ målt og kalt Abs1. Dette ble 8 µL 10 u/µL G-lyase tilsatt til prøvene og OD₂₃₀ ble målt på nytt etter inkubering i romtemperatur over natt, kalt Abs2. Abs2 minus Abs1 ble brukt som et mål på epimeraseaktivitet.

2.21 SDS-PAGE

Natrium dodekyl sulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) er en metode for å separere proteiner basert på molekylær vekt. SDS tilsettes prøven for å denaturere proteinene. I tillegg festes SDS til aminosyrene og gir molekylene en netto negativ ladning. Denne negative ladningen maskerer proteinets opprinnelige ladning. Dette gjør at proteinene kan separeres basert på ladning som for elektroforese av DNA. Etersom proteiner generelt er mye mindre enn DNA er det nødvendig med mindre porestørrelser. Det brukes derfor en gel laget av polyakrylamid i stedet for agarose. [71, 72]

Fremgangsmåte:

Sonikert prøve, både rett fra sonikering og ræktrakt (sentrifugert og filtrert), ble blandet med SIV og 4x proteinprøvebuffer. Prøvene ble applikert på en polyakrylamid gel (8 %) og elektroforese ble kjørt ved 150 V i ca. 1 time. Deretter ble gelen vasket med vann i 3x5 min (byttet vann hvert 5 min) på risting. For å farge gelen ble det tilsatt Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain til gelen var dekket. Lot stå på lett risting i 1 time. Vasket deretter med vann igjen. Først i 5 min (forsatt lett risting), byttet vann og latt stå over natt på lett risting. Byttet vann igjen dagen etter og latt stå på lett risting til ferdig avfarget. Gelen ble til slutt avbildet.

2.22 Rensing av protein ved bruk av ionebytterkolonne

Ionebytterkolonner er en kromatografisk metode for separasjon av proteiner på bakgrunn av deres ladning. Kolonnen kan enten bestå av et materiale med negativ ladning (kationebytter) eller positiv ladning (anionebytter). Aminosyrer med motsatt ladning av materialet vil binde til kolonnen. En elueringsvæske tilsettes med økende saltkonsentrasjon eller pH for å gradvis eluere ut proteiner som er blitt bundet til kolonnen. For en kationebytter vil proteinene med lavest positiv ladning elueres ut først, motsatt for anionebytter. [35, 72]

Fremgangsmåte:

Det ble brukt en kationebytter, HiTrap Q HP, til separering av proteiner. Systemet og kolonnen ble først vasket med buffer (50 mM Tris [pH 7,5]). Deretter ble 40 mL fortynnet råekstrakt tilført kolonnen. Eluert væske ble samlet opp i et rør. 10 mL buffer ble deretter kjørt gjennom kolonnen og samlet opp i et nytt rør. En økende gradient av NaCl (50 mM Tris [pH 7,5], 1 M NaCl) ble deretter kjørt gjennom kolonnen. Det ble byttet oppsamlingsrør for hver 5 ml.

3. Resultat

Arbeidet med denne oppgaven kan deles i fire deler. I første del av arbeidet ble alginatgenene til *M. algicola* undersøkt ved bioinformatisk analyse. Etersom det er lite dokumentert informasjon om bakteriestammen var det nødvendig å bruke tid på å utvikle verktøy for å jobbe med *M. algicola*. I denne delen (del to) ble det først kartlagt mulige seleksjonsmarkører for og mot *M. algicola*. Videre ble det dannet en stamme av *M. algicola* som kan selekteres for ved konjugering med *E. coli*. Den nye stammen ble testet for å kartlegge fenotype. Videre ble stammen brukt til å finne ut om *Pm*-promotoren fungerer i bakterien for senere å sette denne inn oppstrøms for alginatklyngen ved homolog rekombinering.

I del tre ble alginatproduksjonen til *M. algicola* studert. Dette ble gjort både ved å screene etter mukoide kolonier etter mutagenisering og forsøke å sette inn *Pm*-promotoren oppstrøms for alginatklyngen. I siste del ble genene *algG* og *algL* klonet og satt inn i *E. coli*. Videre ble genene uttrykt og aktiviteten til proteinene målt.

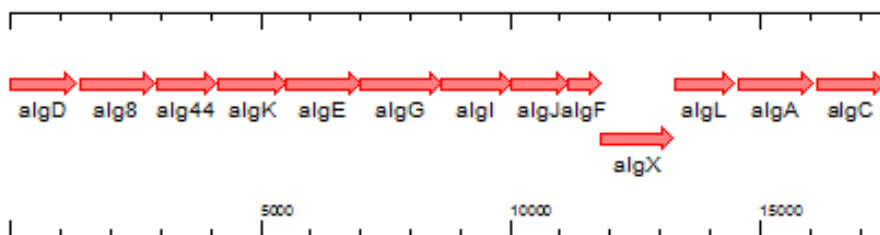
3.1 Alginatgenene i genomet til *M. algicola*

M. algicola er den eneste arten i *Marinobacter* slekten hvor det har blitt funnet en alginatklynge. Det er derfor interessant å studere disse nærmere. Resultatene fra sekvensering av *M. algicola* DG893 er tilgjengelig via internett. Det ble tatt utgangspunkt i den predikterte alginatklyngen til bakterien (Figur 3-1). Av denne Figur 3-1 kan det observeres en annen interessant ting, nemlig at *M. algicola* har *algC* med i alginatklyngen sin. Dette har ikke noen av de andre kjente alginatproduserende bakterieartene (se Figur 1-6 og Figur 1-7 for sammenligning).

3.1.1 Undersøkelser for å finne ut om alginatklyngen består av et eller flere operon

I første del av analysen ble det forsøkt å finne ut om alle genene så ut til å uttrykkes i samme operon. Til dette ble det sammenlignet med alginatklyngene til *A. vinelandii* DJ og *P. aeruginosa* PA01. For både *A. vinelandii* og *P. aeruginosa* er det funnet to indre promotorer i operonet, men dette er så langt ikke vist i andre alginatproduserende *Pseudomonas*. Det er derfor interessant å prøve forutsi hvorvidt alginatklyngen til *M. algicola* (Figur 3-1) tilhører samme operon eller ikke. En indikasjon på at gener er i samme operon er at det er kort avstand mellom dem, dvs. mindre enn 100 baser.

Ved å se på avstandene mellom alginatgenene hos *A. vinelandii* og *P. aeruginosa* kan det derimot observeres at det ikke nødvendigvis er en ny promotor dersom avstanden er større enn 100 baser (Tabell 3-1). Sammenlignes disse tallene med avstandene hos *M. algicola* er det vanskelig å anslå verken flere promotorer eller felles operon.



Figur 3-1 Alginatklyngen i genomet til *M. algicola*. Linjalen indikerer lengde i antall basepar.

Tabell 3-1 Avstand mellom genene i alginatklyngene til *Marinobacter algicola* DG893, *Azotobacter vinelandii* DJ og *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Fet skrift på noen av avstandene hos *A. vinelandii* DJ og *P. aeruginosa* PAO1 indikerer at det er funnet promotorer i mellomrommet mellom disse genene [48, 50].

Par av gener i alginatklyngen	<i>M. algicola</i> DG893 (bp)	Par av gener i alginatklyngen	<i>A. vinelandii</i> DJ (bp)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (bp)
algD til alg8	84	algD til alg8	113	139
alg8 til alg44	60	alg8 til alg44	36	82
alg 44 til algK	14	alg 44 til algK	13	13
alg K til algE	5	alg K til algE	8	-4
alg E til algG	9	alg E til algG	29	20
algG til algI	1	algG til algX	20	12
algI til algJ	11	algX til algL	8	3
algJ til algF	11	algL til algI	192	241
algF til algX	-4	algI til algJ	12	14
algX til algL	33	algJ til algF	35	72
algL til algA	81	algF til algA	96	196
algA til algC	85			

3.1.2 GC-innholdet til genene i alginatklyngen sammenlignet med GC-innholdet i hele genomet og andre alginatklynger

I neste del av den bioinformatiske analysen ble det sett på GC-innhold i hele genomet til *M. algicola* versus GC-innholdet i alginatklyngen. Et veldig ulikt GC-innhold kan være en indikasjon på horisontal genoverføring. Tilnærmet likt GC-innhold utelukker verken horisontal eller vertikal genoverføring, ettersom horisontal overføring kan stamme fra en art som har tilnærmet likt GC-innhold som *M. algicola*. "Science buddies" sin "Genomics % G-C Content Calculator" (tilgjengelig via internett) ble brukt til å beregne GC-innhold. I tillegg til å se på alginatklyngen som en helhet ble GC-innhold for hvert enkelt gen beregnet og sammenlignet med tilsvarende for *A. vinelandii* DJ og *P. aeruginosa* PAO1.

GC innholdet i alginatklyngen, med ikke-kodende områder, er på 59,3 % mens for hele genomet til *M. algicola* er GC innholdet på 57 %. Ettersom det er lite ikke-kodende områder i alginatklyngen er gjennomsnittlig GC-innhold for kodende

sekvens i alginatklyngen er tilnærmet lik det med ikke-kodende områder (Tabell 3-2). Genene til *M. algicola* har generelt litt lavere GC innhold enn de tilsvarende for *A. vinelandii* og *P. aeruginosa*, gjennomsnittet er også lavere (Tabell 3-2). Derimot er GC innholdet i *algC*, som er lokalisert en annen plass i genomet, omtrent likt i alle tre stammene.

Tabell 3-2 Prosentvis GC-innhold i alginatgenene til *Marinobacter algicola* DG893, *Azotobacter vinelandii* DJ og *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. * Dette genet er lokalisert en annen plass i genomet enn i alginatklyngen.

Gen	<i>M. algicola</i> DG893	<i>A. vinelandii</i> DJ	<i>P. aeruginosa</i> PAO1
algD	57,6 %	63,9 %	62,9 %
alg8	59,7 %	60,6 %	64,8 %
alg 44	58,8 %	66,2 %	68,1 %
alg K	61,2 %	66,5 %	70,7 %
alg E	60,4 %	65,3 %	67,9 %
algG	58,5 %	63,6 %	66,3 %
algI	58,9 %	63,0 %	65,3 %
algJ	60,3 %	67,0 %	68,8 %
algF	59,3 %	64,5 %	69,0 %
algX	59,1 %	64,2 %	66,8 %
algL	59,7 %	67,5 %	67,8 %
algA	59,4 %	63,8 %	66,4 %
algC	58,9 %		
Gjennomsnitt	59,37 %	64,68 %	67,07 %
algC *	45,0 %	46,4 %	45,5 %

3.1.3 Sammenligning av proteinene kodet for i alginatklyngen med lignende proteiner

I neste del av analysen ble BLASTP benyttet til å sammenligne genene i alginatklyngen til *M. algicola* med andre proteiner. Her var målet å se på hvilke arter som har proteiner mest homologe til sekvensene funnet hos *M. algicola*. Ettersom sekvensene allerede har fått en predikert funksjonen var ikke dette en del av målet ved analysen. Etter søket ble det sett etter arter og stammer som dukket opp flere ganger på toppen av trefflistene (se kap. 3.1.4). Vurderingen av muligheten for horisontal genoverføring ble vurdert på grunnlag av "Max identity" og hvorvidt arter dukket opp flere ganger eller ikke.

Ved BLASTing av de ulike genene ble det notert ned de fem beste treffene for hvert av genene (Tabell 3-3). Her tyder "query coverage" og "e-value" på at genene koder for de respektive proteinene. "Max identity" (viser andel av aminosyrer som er helt like og i samme posisjon) verdiene som ble funnet viser at ingen av proteinene er mer enn 78 % identiske med proteiner fra andre stammer.

78 % likhet er funnet for AlgC hos ulike arter fra *Marinobacter* slekten. AlgC koder for fosfomannose mutase som katalyserer isomerisering av D-mannose 6-fosfat til D-

mannose 1-fosfat, og motsatt. Av treffene funnet for AlgC dukker det også opp en ekstra kopi av genet hos *M. algicola*. Beste "Max identity" oppnådd sett bort i fra AlgC, er for AlgD hvor både *Pseudomonas* sp. GM60 og GM67 sine nukleotid sukker dehydrogenaser gir en "Max identity" verdi på 71 %. Nukleotid sukker dehydrogenase er en familie av proteiner hvor også GDP-mannose 6-dehydrogenase (AlgD) hører inn under.

Tabell 3-3 Topp fem treff ved BLAST søk for alle alginatproteinene til *M. algicola*. P.:
Pseudomonas, M.: Marinobacter. (Tabell fortsetter på neste side.)

AlgD				
Protein treff	Art	Query coverage	E-value	Max identity
"Nucleotide sugar dehydrogenase	<i>P. sp.</i> GM60	100 %	0.0	71 %
"Nucleotide sugar dehydrogenase	<i>P. sp.</i> GM67	100 %	0.0	71 %
"GDP-mannose 6-dehydrogenase AlgD"	<i>P. aeruginosa</i> PA7	100 %	0.0	70 %
"GDP-mannose 6-dehydrogenase AlgD"	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	100 %	0.0	69 %
"GDP-mannose 6-dehydrogenase"	<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	100 %	0.0	70 %
Alg8				
Protein treff	Art	Query coverage	E-value	Max identity
"Hypothetical protein PMI38_04991"	<i>P. sp.</i> GM84	97 %	0.0	68 %
"Glycosyl transferase Alg8"	<i>P. putida</i> W619	97 %	0.0	68 %
"Alginate biosynthesis protein Alg8"	<i>P. syringae</i> pv. <i>oryzae</i> str. 1_6	97 %	0.0	68 %
"Alginate biosynthesis protein Alg8"	<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> str. M302091	97 %	0.0	68 %
"Alginate biosynthesis protein Alg8"	<i>P. avellanae</i> BPIC 631	97 %	0.0	68 %
Alg44				
Protein treff	Art	Query coverage	E-value	Max identity
"Alginate biosynthesis protein Alg44"	<i>A. vinelandii</i> DJ	98 %	2,00E-86	41 %
"Alginate biosynthesis protein Alg44"	<i>A. vinelandii</i>	98 %	2,00E-82	39 %
"PilZ domain-containing protein"	<i>P. sp.</i> GM67	96 %	5,00E-82	39 %
"PilZ domain-containing protein"	<i>P. sp.</i> GM60	96 %	5,00E-82	39 %
"Alginate biosynthesis protein Alg44"	<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	98 %	1,00E-80	39 %
AlgK				
Protein treff	Art	Query coverage	E-value	Max identity
"Alginate biosynthesis protein AlgK precursor"	<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	92 %	6,00E-65	35 %
"Alginate biosynthesis protein AlgK"	<i>P. sp.</i> M1	92 %	3,00E-64	35 %
"Sel1 domain-containing protein"	<i>P. mendocina</i> DLHK	94 %	1,00E-63	34 %
"Alginate biosynthesis protein AlgK"	<i>P. fuscovaginae</i> UPB0736	95 %	1,00E-63	34 %
"Alginate biosynthesis protein AlgK"	<i>P. sp.</i> HYS	98 %	2,00E-63	35 %

Tabell 3-3 Fortsettelse. (Tabell fortsetter på neste side.)

AlgE				
Protein treff	Art	Query coverage	E-value	Max identity
"Alginate production protein algE"	<i>P. putida</i> BIRD-1	96 %	1,00E-74	37 %
"Outer membrane protein AlgE"	<i>P. putida</i> F1	96 %	2,00E-74	37 %
"Outer membrane protein AlgE"	<i>P. putida</i> ND6	96 %	4,00E-74	37 %
"Membrane protein AlgE"	<i>P. putida</i> GB-1	96 %	5,00E-74	37 %
"Hypothetical protein A471_09129"	<i>P. mendocina</i> DLHK	89 %	8,00E-74	37 %
AlgG				
Protein treff	Art	Query coverage	E-value	Max identity
"Carbohydrate binding and sugar hydrolysis"	<i>P. fragi</i> A22	96 %	2,00E-162	48 %
"Parallel beta-helix repeat (two copies)"	<i>P. sp.</i> GM33	94 %	2,00E-161	48 %
"Parallel beta-helix repeat (two copies)"	<i>P. sp.</i> GM74	95 %	2,00E-160	48 %
"Poly(beta-D-mannuronate) C5 epimerase precursor"	<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	88 %	2,00E-160	51 %
"Carbohydrate binding and sugar hydrolysis"	<i>P. putida</i> CSV86	92 %	2,00E-160	48 %
AlgI				
Protein treff	Art	Query coverage	E-value	Max identity
"Membrane bound O-acyl transferase"	<i>P. sp.</i> S9	100 %	0.0	65 %
"Putative poly(beta-D-mannuronate) O-acetylase"	<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	100 %	0.0	68 %
"Membrane bound O-acyl transferase"	<i>P. mendocina</i> DLHK	97 %	0.0	67 %
"Membrane bound O-acyl transferase"	<i>P. mendocina</i> NK-01	100 %	0.0	67 %
"Membrane bound O-acyl transferase"	<i>P. mendocina</i> ymp	100 %	0.0	68 %
AlgJ				
Protein treff	Art	Query coverage	E-value	Max identity
"Alginate biosynthesis protein AlgJ"	<i>P. sp.</i> UW4	94 %	7,00E-104	45 %
"Hypothetical protein PMI26_01738"	<i>P. sp.</i> GM33	99 %	1,00E-103	44 %
"Hypothetical protein PMI28_04387"	<i>P. sp.</i> GM48	94 %	2,00E-103	45 %
"Hypothetical protein G1E_17378"	<i>P. sp.</i> TJI-51	91 %	2,00E-102	47 %
"Hypothetical protein PMI29_00676"	<i>P. sp.</i> GM49	94 %	3,00E-102	45 %
AlgF				
Protein treff	Art	Query coverage	E-value	Max identity
"Hypothetical protein Pmen_1021"	<i>P. mendocina</i> ymp	90 %	5,00E-30	37 %
"Hypothetical protein A471_09099"	<i>P. mendocina</i> DLHK	90 %	6,00E-30	38 %
"Alginate o-acetyltransferase AlgF"	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	91 %	2,00E-29	37 %
"Alginate o-acetyltransferase AlgF"	<i>P. aeruginosa</i> PA7	91 %	2,00E-29	37 %
"Alginate o-acetyltransferase AlgF"	<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14	91 %	2,00E-29	37 %

Tabell 3-3 Fortsettelse

AlgX				
Protein treff	Art	Query coverage	E-value	Max identity
"Hypothetical protein A471_09119"	<i>P. mendocina</i> DLHK	97 %	1,00E-132	44 %
"Hypothetical protein A471_09119"	<i>P. mendocina</i> ymp	97 %	2,00E-132	44 %
"Hypothetical protein"	<i>P. mendocina</i> NK-01	95 %	1,00E-128	43 %
"Alginate biosynthesis protein AlgX"	<i>P. sp.</i> S9	99 %	5,00E-124	41 %
"Alginate biosynthesis protein AlgX"	<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	93 %	2,00E-122	42 %
AlgL				
Protein treff	Art	Query coverage	E-value	Max identity
"Poly(beta-D-mannuronate) lyase"	<i>P. sp.</i> S9	89 %	3,00E-74	36 %
"Poly(beta-D-mannuronate) lyase"	<i>P. putida</i> CSV86	84 %	3,00E-72	39 %
"Poly(beta-D-mannuronate) lyase"	<i>P. sp.</i> HYS	90 %	3,00E-72	38 %
"Alginate lyase"	<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421	84 %	4,00E-72	38 %
"Alginate lyase precursor"	<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	86 %	6,00E-72	40 %
AlgA				
Protein treff	Art	Query coverage	E-value	Max identity
"Phosphomannose isomerase / guanosine 5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase"	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	96 %	0.0	63 %
"Phosphomannose isomerase / guanosine 5'-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase"	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888	96 %	0.0	63 %
"Mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6-phosphate isomerase"	<i>P. aeruginosa</i> PA7	96 %	0.0	63 %
"Phosphomannose isomerase"	<i>P. aeruginosa</i>	96 %	0.0	62 %
"Phosphomannose isomerase"	<i>P. stutzeri</i> A1501	96 %	0.0	63 %
AlgC				
Protein treff	Art	Query coverage	E-value	Max identity
"Phosphomannomutase"	<i>M. adhaerens</i> HP15	97 %	0.0	78 %
"Phosphomannomutase"	<i>M. aquaeolei</i> VT8	97 %	0.0	78 %
"Phosphomannomutase"	<i>M. hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840	97 %	0.0	78 %
"Phosphomannomutase"	<i>M. manganoxydans</i> Mnl7-9	97 %	0.0	78 %
"Phosphomannomutase"	<i>M. algicola</i> DG893	97 %	0.0	78 %

3.1.4 Sammenligning av alginatklyngene til *M. algicola* DG893 og *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707

Etter BLAST søk med alle sekvensene fra alginatklyngen ble det sett nærmere på stammen som dukket opp flest ganger på de øverste fem treffene. Alle proteinene fra alginatklyngen til *M. algicola* ble sammenlignet med de tilsvarende proteinene hos denne stammen. Her ble "Max identity"-verdiene brukt til å prøve å forutsi sannsynligheten for at hele alginatklyngen til *M. algicola* kan ha stammet fra denne bakterien.

Generelt er proteinene fra alginatklyngen til *M. algicola* nærmest beslektet proteiner fra arter i *Pseudomonas* slekten. For noen av proteinene er flere av treffene fra samme art. Dette er indikert i Tabell 3-4 ved at det angitte genet er ganget med 2, 3 eller 4. Av artene som dukker opp flest ganger i Tabell 3-3 er *P. mendocina* og *P. aeruginosa* på topp (se Tabell 3-4). Av disse to er det *P. mendocina* som dukker opp på flest ulike proteiner (seks stykker). *P. pseudoalcaligenes* slår dette ved at den dukker opp på listene til sju ulike proteiner. Også flere spesifikke stammer dukket opp mer enn en gang på topp fem listene (se Tabell 3-4). Ettersom *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 skilte seg ut i denne analysen ble det utført sammenligning for hvert gen mot denne stammen. Resulterende BLAST verdier er vist i Tabell 3-5.

Tabell 3-4 Antall ganger ulike arter og stammer dukket opp på topp fem listene ved BLASTing av alle genene i alginatklyngen til *M. algicola*.

Art	Antall	Gener
<i>Pseudomonas mendocina</i>	10	<i>algK</i> , <i>algE</i> , <i>algI</i> x3, <i>algF</i> x2, <i>algX</i> x3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	<i>algD</i> x2, <i>algF</i> x3, <i>algA</i> x4
<i>Pseudomonas putida</i>	7	<i>alg8</i> , <i>algE</i> x4, <i>algG</i> , <i>algL</i>
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	7	<i>algD</i> , <i>alg44</i> , <i>algK</i> , <i>algG</i> , <i>algI</i> , <i>algX</i> , <i>algL</i>
<i>Azotobacter vinelandii</i>	2	<i>alg44</i> x2
<i>Pseudomonas syringae</i>	2	<i>alg8</i> x2
Stamme	Antall	Gener
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF707	7	<i>algD</i> , <i>alg44</i> , <i>algK</i> , <i>algG</i> , <i>algI</i> , <i>algX</i> , <i>algL</i>
<i>Pseudomonas mendocina</i> DLHK	5	<i>algK</i> , <i>algE</i> , <i>algI</i> , <i>algF</i> , <i>algX</i>
<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp	3	<i>algI</i> , <i>algF</i> , <i>algX</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. S9	3	<i>algI</i> , <i>algX</i> , <i>algL</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	3	<i>algD</i> , <i>algF</i> , <i>algA</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7	3	<i>algD</i> , <i>algF</i> , <i>algA</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. GM67	2	<i>algD</i> , <i>alg44</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. GM60	2	<i>algD</i> , <i>alg44</i>
<i>Pseudomonas putida</i> CSV86	2	<i>algG</i> , <i>algL</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. HYS	2	<i>algK</i> , <i>algL</i>
<i>Pseudomonas mendocina</i> NK-01	2	<i>algI</i> , <i>algX</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. GM33	2	<i>algG</i> , <i>algJ</i>

Tabell 3-5 Likhet mellom alginatklyngene i *M. algicola* og *P. pseudoalcaligenes* KF707. Søk i BLAST med translerte gener fra *M. algicola* ga følgende verdier for protein treff hos *P. pseudoalcaligenes*.

Gen	Protein treff	Query coverage	E-value	Max identity
<i>alg8</i>	Alginate biosynthesis protein Alg8	97 %	0.0	67 %
<i>alg44</i>	Alginate biosynthesis protein Alg44	98 %	2e-84	39 %
<i>algA</i>	Mannose-6-phosphate isomerase/ Mannose-1-phosphate guanylyltransferase (GDP)	97 %	0.0	62 %
<i>algC</i>	Phosphomannomutase Phosphoglucomutase	92 %	1e-56	33 %
<i>algD</i>	GDP-mannose 6-dehydrogenase	100 %	0.0	70 %
<i>algE</i>	Outer membrane protein AlgE	93 %	8e-76	38 %
<i>algF</i>	Alginate o-acetyltransferase AlgF	88 %	1e-27	32 %
<i>algG</i>	Poly(beta-D-mannuronate) C5 epimerase precursor	88 %	5e-164	51 %
<i>algI</i>	Putative poly(beta-D-mannuronate) O-acetylase	100 %	0.0	68 %
<i>algJ</i>	Alginate biosynthesis protein AlgJ	94 %	3e-100	44 %
<i>algK</i>	Alginate biosynthesis protein AlgK precursor	92 %	1e-68	35 %
<i>algL</i>	Alginate lyase precursor	86 %	1e-75	40 %
<i>algX</i>	Alginate biosynthesis protein AlgX	93 %	5e-126	42 %

3.1.5 Sammenligning av hele alginatklyngen til *M.algicola* med andre alginatklynger

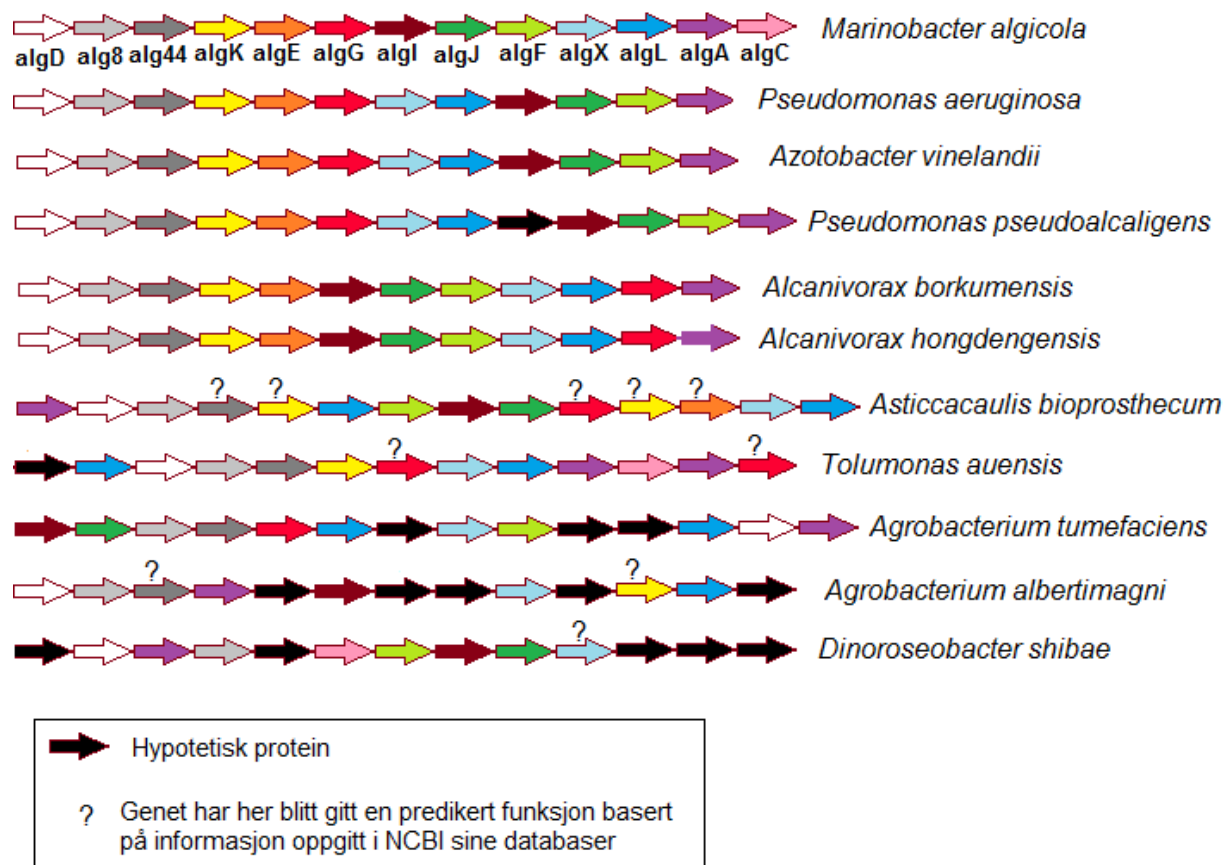
BLAST-søk i alle databaser med gener fra alginatklyngen som 'query' ga *Pseudomonas* og *Azotobacter* på toppen av alle listene (bortsett fra AlgC). Det ble derfor valgt å gjøre et nytt søk hvor *Pseudomonas* og *Azotobacter* slektene ble utelukket fra søket. Dette ble gjort for å prøve å finne andre arter med alginatklynger. BLASTP ble igjen benyttet til å sammenligne proteinene kodet for i alginatklyngen til *M. algicola* med andre proteiner.

Etter søket ble arter som ga treff med "Max identity" høyere enn 30 % undersøkt for om de hadde hele alginatklyngen eller ikke. Dersom det var mer enn 10 av treffene for et gen som hadde 30 % eller høyere "Max identity" ble kun de 10 øverste treffene undersøkt. Det ble heller ikke sett på treff med "E-value" over 1 ettersom disse antakelig ikke er samme protein. Fordi AlgC og AlgA har funksjoner i andre biosyntese-spor enn alginatsyntese ble det ikke søkt med disse proteinene som "query". Sammen med de mulige operonene funnet i søket ble alginatklyngene til *P. aeruginosa*, *A. vinelandii* og *P. pseudoalcaligenes* sammenlignet med alginatklyngen til *M. algicola*.

Resultatet (Figur 3-2) viste at *Alcanivorax borkumensis* og *Alcanivorax hongdengensis* også har fullstendige alginatklynger tilsvarende *P. aeruginosa* og *A. vinelandii*, bare en annen rekkefølge på genene. Basert på prediksjoner ut i fra at proteinene inneholder samme domener (se Tabell I-1 i Vedlegg I for mer detaljer) tyder resultatet også på at *Asticcacaulis biprosthicum* har en alginatklynge. Denne arten har en ekstra kopi av genene for både alginat lyase og AlgK i klyngen sin.

Tolomonas auensis mangler *algE*, *algI*, *algJ* og *algF*, men har to kopier av både *algL*, *algG* og *algA*. I tillegg har denne klyngen en kopi av *algC*. *Agrobacterium tumefaciens* mangler *algE* og *algK* i sin genklynge, har to kopier av *algL* og tre hypotetiske proteiner, mens *Agrobacterium albertimagni* mangler *algE*, *algG*, *algJ* og *algF*. *A. albertimagni* har fem gener hvor produktet er hypotetiske proteiner. Til slutt, *Dinoroseobacter shibae* med fem hypotetiske proteiner, og mangler *alg44*, *algK*, *algE*, *algG*, og *algL*. Denne arten har derimot et gen som koder for en fosfomannose mutase.

Når det gjelder rekkefølgen på genene i alginatklyngene i forhold til rekkefølgen funnet hos *M. algicola* er det *A. borkumensis* og *A. hongdengensis* som er mest lik. Disse klyngene har flyttet *algG* fra mellom *algE* og *algI* (*M. algicola*) til mellom *algL* og *algA* (begge *Alcanivorax* artene) og mangler *algC*. Forskjellen fra *M. algicola* til *P. aeruginosa* og *A. vinelandii* er at alle genene involvert i acetylering (*algI*, *algJ* og *algF*) er flyttet fra mellom *algG* og *algX* til mellom *algL* og *algA*. Disse to mangler også *algC* i genklyngen.



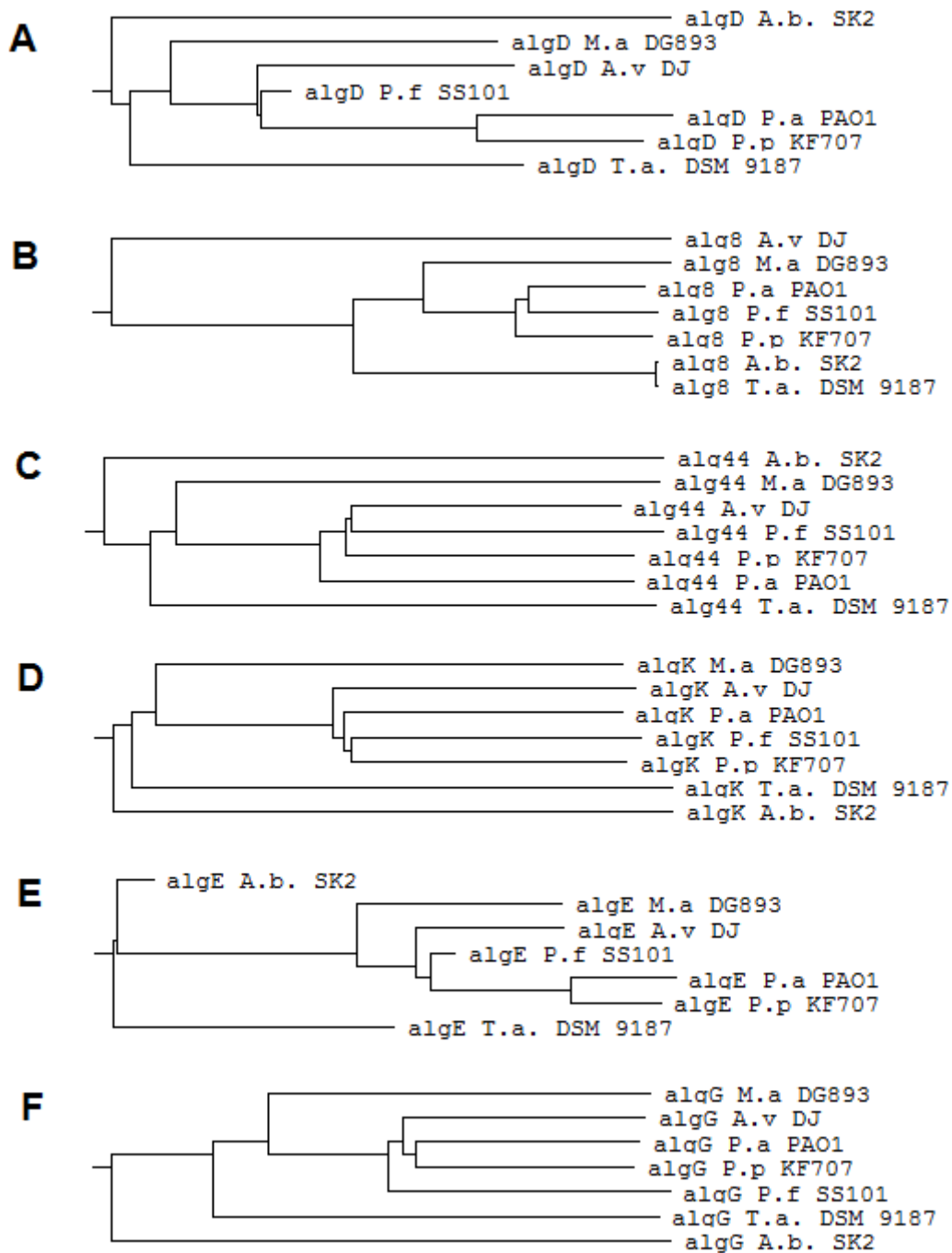
Figur 3-2 Alginatklyngen til *M. algicola* sammenlignet med alginatklynger i andre arter. Genene er gitt fargekodene vist for *M. algicola*. (Se Tabell I-1 i Vedlegg I for mer detaljer om utgangspunktet for illustrasjonen.)

3.1.6 **Fylogenetisk slektskap mellom alginatklyngen til *M. algicola* og andre stammer med alginatgener**

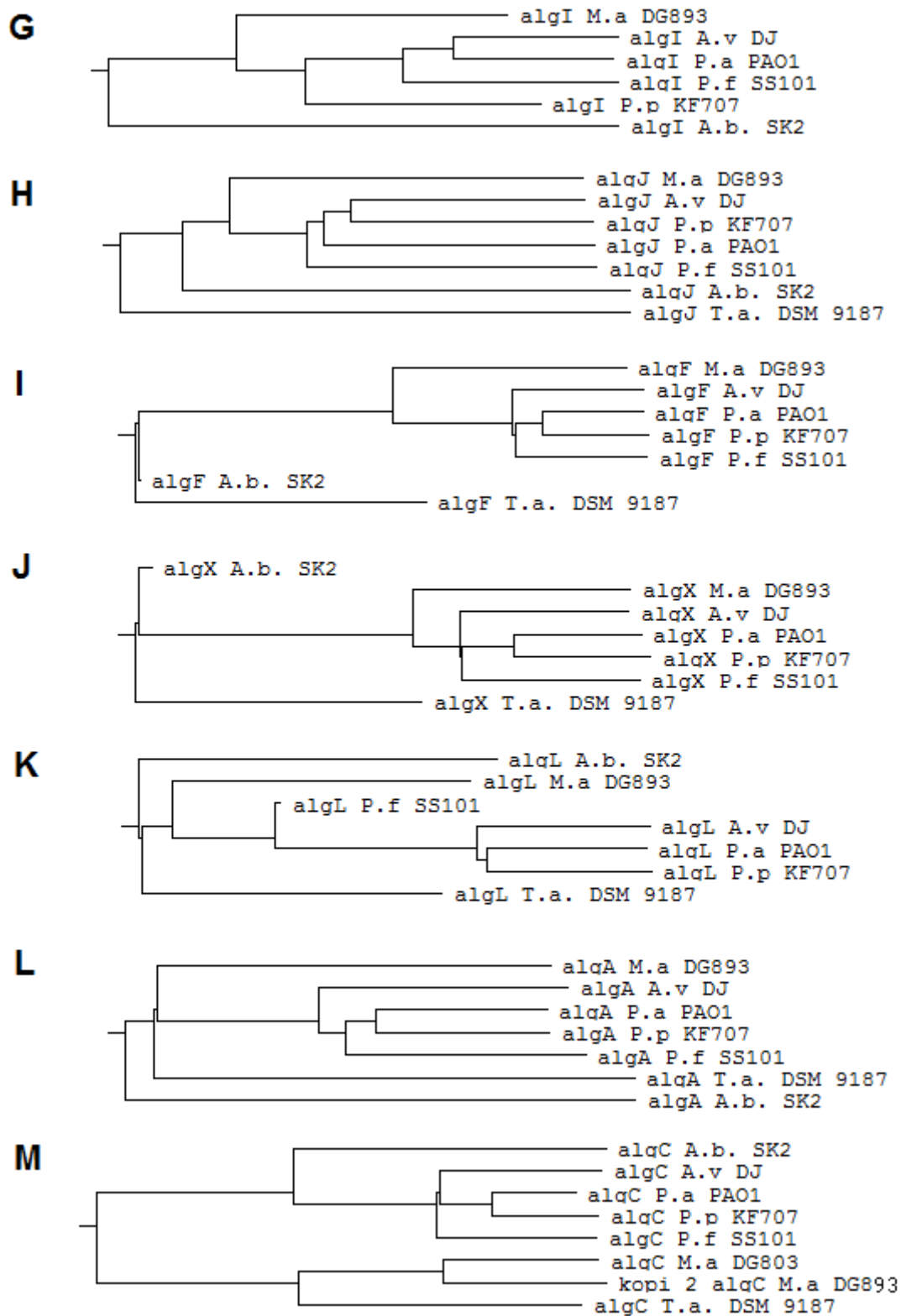
For å gi et bilde av hvor like genene i alginatklyngen til *M. algicola* er i forhold til andre alginatklynger ble det laget fylogenetiske trær ved hjelp av Clone for hvert av genene. Det ble valgt ut tre kjente stammer som produserer alginat (*P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* SS101 og *A. vinelandii* DJ), samt den stammen som ga flest topp treff i BLAST (*P. pseudoalcaligenes* KF707). I tillegg ble stammene *T. auensis* DSM 9187 og *A. borkumensis* SK2 tatt med. Dette fordi disse stammene ser ut til å ha henholdsvis nesten fullstendig og fullstendig alginatklynge, men proteinene er ikke så nært beslektet proteinene fra *M. algicola*.

De beste treffene for hvert gen ved BLASTP søk på den spesifikke stammen ble brukt til å lage fylogenetisk trær for hvert protein (Figur 3-3). I Clone ble "Align Multiple Sequences" brukt og det ble valgt "Multi-Way" som alignment type (bruker "Neighbor-Joining" fylogeni), "Amino acid" for hva sekvensene skulle sammenlignes som og "BLOSUM 62" ble valgt som "Scoring matrix". Sekvensene ble lagt inn med *M. algicola* DG893 øverst for hvert gen og under ble det valgt å sortere stammene alfabetisk. For hver analyse spurte programvaren om den skulle endre rekkefølgen på sekvensene i det originale oppsettet til å matche rekkefølgen i treet. Det ble valgt å beholde den originale rekkefølgen.

Trærne viser at for de fleste genene er alle *Pseudomonas* stammene og *A. vinelandii* nærmere beslektet hverandre enn de tre andre stammene. Unntaket er for Alg8 hvor *A. vinelandii* er mest ulik de andre. Videre gjenspeiler de fylogenetiske trærne det som ble funnet i BLAST-søkene, nemlig at proteinene kodet for i alginatklyngen til *M. algicola* er nærmest beslektet proteiner fra *Pseudomonas* slekten. Unntaket er AlgC (Figur 3-3 M), hvor den andre kopien av AlgC i *M. algicola* er nærmest beslektet. Videre er det *T. auensis* som har proteinet som er nest mest likt AlgC hos *M. algicola*. Generelt er *T. auensis* og *A. borkumensis* sine proteiner i ytterkanten av trærne.



Figur 3-3 Fylogenetiske træer for hvert protein kodet for i alginatklyngen til *M. algicola*. **A)** AlgD. **B)** Alg8. **C)** Alg44. **D)** AlgK. **E)** AlgE. **F)** AlgG. **G)** AlgI. **H)** AlgJ. **I)** AlgF. **J)** AlgX. **K)** AlgL. **L)** AlgA. **M)** AlgC. Forkortelser: A.b. SK2, *Alcanivorax borkumensis* SK2; M.a DG893, *Marinobacter algicola* DG893; A.v DJ, *Azotobacter vinelandii* DJ; P.f SS101, *Pseudomonas fluorescens* SS101; P.a PAO1, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; P.p KF707, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707; T.a. DSM 9187, *Tolomonas auensis* DSM 9187. (Figur fortsetter på neste side.)



Figur 3-3 Fortsettelse.

3.1.7 Nærmere undersøkelse av *algC* genet lokalisert utenfor alginatklyngen

Ettersom det ble funnet to kopier av *algC* i *M. algicola* (se kap. 3.1.3 og Tabell 3-3) ble det valgt å se nærmere på den kopien som ikke var lokalisert i alginatklyngen. Fosfomannose mutase/fosfoglukose mutase har en rolle i syntesen av lipopoly-sakkarider (kap. 1.3) i tillegg til sin fosfomannose mutase oppgave i biosyntesen av alginat (kap. 1.2.3). Det ble derfor undersøkt om genene rundt den andre kopien av *algC* kunne være involvert i lipopolysakkarid-syntese.

Fosfomannose mutase ble lokalisert i genomet til *M. algicola* ved bruk av BLAST og genene/proteinene før og etter ble undersøkt. Tabell 3-6 gjengir proteinproduktene funnet ved åtte ORF før og etter genet for fosfomannose mutase. Av disse produktene er det bare fosfolipase A i ytre membran som muligens kan være i et operon med genet for fosfomannose mutase. Her ser det altså ikke ut til at *algC* er en del av et LPS-operon. Ved å gjøre det samme for *P. aeruginosa* PAO1 og *A. vinelandii* DJ viste det seg at heller ikke disse har *algC* i et operon sammen med andre LPS-gener.

Tabell 3-6 Proteiner kodet for i nærheten av genet for fosfomannose mutase i genomet til *M. algicola*. Fosfomannose mutase er skravert.

Locus tag	Protein
MDG893_14860	"Transcriptional accessory protein"
MDG893_14865	"EAL domain protein"
MDG893_14870	"ATP-dependent DNA helicase Rep"
MDG893_14875	"Hypothetical protein"
MDG893_14880	"Hypothetical protein"
MDG893_14885	"Cytochrome c5"
MDG893_14890	"Hypothetical protein"
MDG893_14895	"Outer membrane phospholipase A"
MDG893_14900	"Phosphomannomutase"
MDG893_14905	"Bacterioferritin"
MDG893_14910	"BFD-like (2Fe-2S)-binding region"
MDG893_14915	"Proline dipeptidase"
MDG893_14920	"Transcriptional regulator, LysR family protein"
MDG893_14925	"Oligopeptide/dipeptide ABC transporter,
MDG893_14930	"Oligopeptide/dipeptide ABC transporter,ATP-binding protein-like protein"
MDG893_14935	"Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component"
MDG893_14940	"Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component"

Videre ble det sett på *algC* i *T. auensis* DSM 9187 og *A. borkumensis* SK2. *A. borkumensis* har to gener som potensielt koder for fosfomannose mutase/fosfoglukose mutase, mens *T. auensis* har tre. Dette ble funnet ved BLASTP søk med *M. algicola algC* som "query" og valg av DSM 9187 og SK2 som organismer det ble søkt mot. Tabell 3-7 viser alle treffene fra BLASTP-søket og hvor i genomet genene er funnet hos *T. auensis* DSM 9187 og *A. borkumensis* SK2.

Av treffene for *T. auensis* er det proteinet med "locus tag" Tola_1415 som ligger i alginatklyngen (Figur 3-2). På bakgrunn av dette antas det at det er dette proteinet som vil uttrykkes ved en eventuell alginatproduksjon hos *T. auensis*. For *A. borkumensis* er det ingen av treffene som er med i alginatklyngen.

Tabell 3-7 BLASTP søk mot *T. auensis* DSM 9187 og *A. borkumensis* SK2 med AlgC til *M. algicola* DG893 som query.

<i>T. auensis</i> DSM 9187			Sammenlignet med AlgC til <i>M. algicola</i>			
Gen	Locus tag	Protein	Query coverage	E-value	Max identity	Treff nr.
Ikke navngitt	Tola_1415	Fosfomannose mutase	95%	0.0	58%	1
Ikke navngitt	Tola_2049	Fosfomannose mutase	95%	0.0	59%	2
<i>glmM</i>	Tola_2250	Fosfoglukosamin mutase	96%	2e-28	26%	5
Ikke navngitt	Tola_2855	Fosfoglukosamin mutase	94%	9e-21	25%	7
Ikke navngitt	Tola_0862	Fosfoglukose mutase	79%	3e-04	22%	8
<i>A. borkumensis</i> SK2			Sammenlignet med AlgC til <i>M. algicola</i>			
Gen	Locus tag	Protein	Query coverage	E-value	Max identity	Treff nr.
<i>algC</i>	ABO_0937	Fosfomannose mutase	93%	1e-50	32%	3
<i>pgm</i>	ABO_0211	Fosfomannose mutase/ fosfoglukose mutase	94%	3e-46	31%	4
<i>glmM</i>	ABO_0324	Fosfoglukosamin mutase	95%	7e-26	27%	6

Tabell 3-8 Proteiner kodet for i nærheten av Tola_2049 i *T. auensis*. Tola_2049 koder for fosfomannose mutase (skravert) i genomet til *T. auensis*.

Locus tag	Produkt
Tola_2041	"Glucose-1-phosphate thymidyltransferase"
Tola_2042	"dTDP-4-dehydrorhamnose reductase"
Tola_2043	"O-antigen polymerase"
Tola_2044	"UDP-phosphate galactose phosphotransferase"
Tola_2045	"Family 2 glycosyl transferase"
Tola_2046	"Polysaccharide biosynthesis protein"
Tola_2047	"Hypothetical protein"
Tola_2048	"Family 2 glycosyl transferase"
Tola_2049	"Phosphomannomutase"
Tola_2050	"Mannose-1-phosphate guanylyltransferase/ mannose-6-phosphate isomerase"
Tola_2051	"NUDIX hydrolase"
Tola_2052	"NAD-dependent epimerase/dehydratase"
Tola_2053	"GDP-mannose 4,6-dehydratase"
Tola_2054	"Polysaccharide biosynthesis protein"
Tola_2055	"Lipopolysaccharide biosynthesis protein"
Tola_2056	"UDP-glucose 4-epimerase"
Tola_2057	"DNA polymerase beta domain-containing protein"

Det ble valgt å se på genene rundt Tola_2049 i *T. auensis* og rundt både *algC* og *pgm* i *A. borkumensis* ettersom alle disse er potensielle fosfomannose mutaser. (Tola_1415 ble sett på tidligere og funnet til å være i en alginatklynge.) Som for *M. algicola*, ble proteinproduktene for åtte ORF før og etter de angitt genene undersøkt. Tola_2049 ser ut til å være i et operon for produksjon av et polysakkarid, muligens lipopolysakkarid ettersom det ene proteinproduktet er predikert å være et "lipopolysaccharide biosynthesis protein" (

Tabell 3-8). *algC* (Tabell 3-9) ser ut til å være i en genklynge som koder for proteiner involvert i syntesen av et komplekst polysakkarid ettersom det er flere typer transferaser. I tillegg er det et par produkter som indikerer assosiasjon med celleveggen (produktene til ABO_0939 og ABO_0941). *Pgm* ble funnet til å ha noen av de samme genene rundt seg som genet for fosfomannose mutase i *P. aeruginosa* og *A. vinelandii* (Tabell 3-9). Disse er *argB* (acetylglutamat kinase), *dut* (deoxyuridine 5'-trifosfat nukleotidohydrolase), *coaBC/coaC* (bifunksjonell fosfopantotenoylcystein dekarboksylase/ fosfopantotenat syntase) og *radC* (DNA reparasjon protein RadC).

Tabell 3-9 Proteiner kodet for i nærheten av *algC* og *pgm* i *A. borkumensis*. *AlgC* koder for fosfomannose mutase (skravert) i genomet til *A. borkumensis*. *Pgm* koder for fosfomannose mutase/ fosfoglukose mutase (skravert) i genomet til *A. borkumensis*. Uthevete gen og produkt er gener også funnet i nærheten av genet for fosfomannose mutase i *P. aeruginosa* og *A. vinelandii*. (Tabell fortsetter på neste side.)

Proteiner kodet for i nærheten av <i>algC</i>		
Gen	Locus tag	Produkt
	ABO_0929	"Sodium/sulfate symporter"
<i>apsK</i>	ABO_0930	"Adenylylsulfate kinase"
	ABO_0931	"Hypothetical protein"
<i>ugd1</i>	ABO_0932	"UDP-glucose 6-dehydrogenase"
	ABO_0933	"Hypothetical protein"
<i>galU</i>	ABO_0934	"UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase"
<i>ugd2</i>	ABO_0935	"NDP-sugar dehydrogenase like UDP-glucose dehydrogenase"
<i>pgi</i>	ABO_0936	"Glucose-6-phosphate isomerase"
<i>algC</i>	ABO_0937	"Phosphomannomutase"
<i>galE</i>	ABO_0938	"UDP-galactose 4-epimerase"
	ABO_0939	"Cell surface polysaccharide transporter"
	ABO_0940	"Hypothetical protein"
	ABO_0941	"Glycosyltransferases involved in cell wall biogenesis"
	ABO_0942	"Glycosyl transferase family protein"
	ABO_0943	"Hypothetical protein"
<i>tRNA-Asn</i>	ABO_0944	"tRNA-Asn"
<i>aspC</i>	ABO_0945	"Aspartate aminotransferase"

Tabell 3-9 Fortsettelse.

Proteiner kodet for i nærheten av <i>pgm</i>		
Gen	Locus tag	Produkt
	ABO_0203	"FAD-dependent oxidoreductase"
	ABO_0204	"Hypothetical protein"
	ABO_0205	"Hypothetical protein"
<i>rph</i>	ABO_0206	"Ribonuclease PH"
<i>pyrE</i>	ABO_0207	"Orotate phosphoribosyltransferase"
	ABO_0208	"Hypothetical protein"
<i>slmA</i>	ABO_0209	"Nucleoid occlusion protein"
<i>argB</i>	ABO_0210	"Acetylglutamate kinase"
<i>pgm</i>	ABO_0211	"Phosphoglucomutase/phosphomannomutase"
<i>dut</i>	ABO_0212	"Deoxyuridine 5-triphosphate nucleotidohydrolase"
<i>coaBC</i>	ABO_0213	"Bifunctional phosphopantothencysteine decarboxylase/ phosphopantothenate synthase"
<i>radC</i>	ABO_0214	"DNA repair protein RadC-like protein"
<i>rpmB</i>	ABO_0215	"50S ribosomal protein L28"
<i>rpmG</i>	ABO_0216	"50S ribosomal protein L33"
	ABO_0217	"Hypothetical protein"
	ABO_0218	"Hypothetical protein"
	ABO_0219	"Type II secretion system protein"

3.2 Utvikling av verktøy til arbeid med *M. algicola*

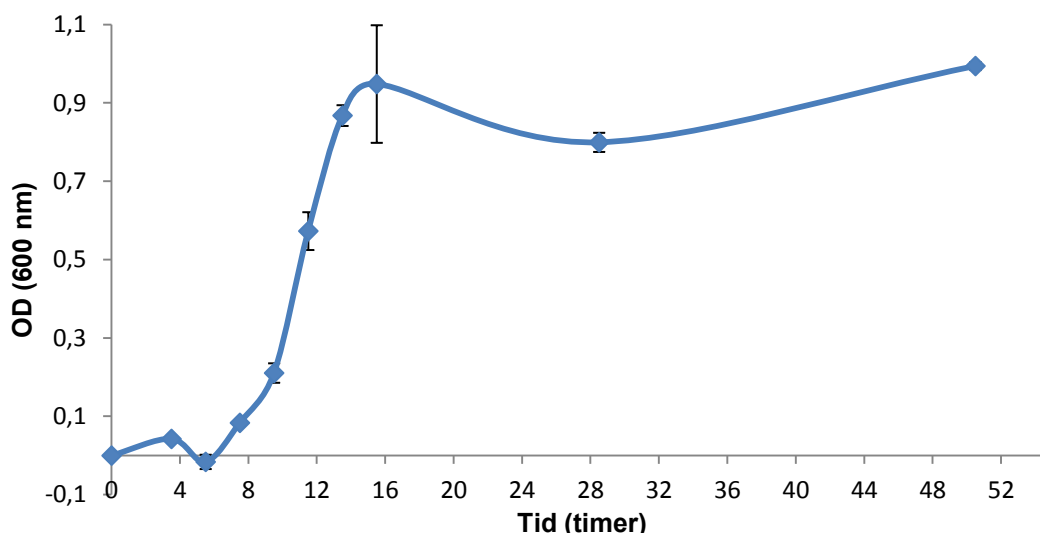
Ettersom lite er publisert om arbeid med *M. algicola* var det en nødvendighet å bli mer kjent med bakterien. I denne delen av oppgaven ble det sett på hvor raskt *M. algicola* vokser, hvor godt den vokser på ulike antibiotika for å finne mulige seleksjonsmarkører og forsøkt å overføre nytt genetisk materiale til arten.

3.2.1 Måling av veksthastighet

Ved å måle optisk tetthet (OD) til en bakteriekultur over tid er det mulig å lage en vekstkurve. En vekstkurve viser hvor lenge en voksende bakteriepopulasjon er i de ulike fasene lag, eksponentiell og stasjonær [55]. Vekstraten til *M. algicola* ble derfor undersøkt.

Det ble laget 10 mL forkultur av *M. algicola* i Marine Broth, tre paralleller. 2 % todagers forkultur ble inokulert i 50 mL Marine Broth og inkubert i risteinkubator ved 30 °C. Første prøve ble tatt ut etter 3,5 timer, deretter hver 2. time i 12 timer, totalt 7 målinger av hver parallell. Ved uttak av prøve ble OD₆₀₀ målt. Marine Broth ble brukt som blank prøve. Kulturen ble fortynnet med Marine Broth om nødvendig, dvs. ved OD₆₀₀ over 0,4. Det ble også tatt en måling én og to dager senere.

En vekstkurve ble laget fra gjennomsnittet av parallellene (Figur 3-4). Feil-skrankene på vekstkurven tilsvarer et standardavvik. Resultatene viser at *M. algicola* går inn i eksponentiell vekstfase mellom 8 og 10 timer etter inokulering og når stasjonærfase etter ca. 16 timer. Bakteriecelleene er fortsatt i stasjonær fase etter 51,5 timer.



Figur 3-4 Vekstkurven til *M. algicola*. Optisk tetthet målt ved 600 nm av *M. algicola* dyrket i Marine Broth plottet som funksjon av veksttiden etter inokulering. Baktericellene når stasjonær vekstfase etter ca. 16 timer.

3.2.2 *M. algicola* og *E. coli* i ulike vekstmedium

Det ble forsøkt å finne ett enkelt medium hvor *M. algicola* vokser, men ikke *E. coli*, for å enkelt kunne selekttere bort *E. coli* celler. Forsøket ble utført ved å inokulere 1 % *E. coli* i 10 mL Marine Broth og i 10 mL LB tilsatt 3, 6 og 9 % NaCl. Kolonier av *M. algicola* ble inokulert i 10 mL LB tilsatt 1, 3, 6 og 9 % NaCl. Ettersom det fra før var kjent at *M. algicola* vokser i Marine Broth og at *E. coli* vokser i LB tilsatt 1 % NaCl ble disse ekskludert. Etter inkubering ble kolbene sjekket for vekst. Observasjonene viste at begge bakteriene vokser i Marine Broth og i LB tilsatt 1, 3, 6 og 9 % NaCl.

3.2.3 Antibiotika resistensnivå til *M. algicola*

Antibiotika kan brukes som seleksjonsmarkør for å for eksempel identifisere transformerte celler [75]. For senere å ha muligheten til å selekttere for, eller mot, *M. algicola* er det nødvendig å vite hvilke antibiotika den er resistent mot og nivået av resistens. Resistensnivå mot ni ulike antibiotika ble derfor testet for *M. algicola*.

Antibiotikaene benyttet var ampicillin (Am), kanamycin (Km), tetracyclin (Tc), apramycin (Ap) og spectinomycin (Sp) i fire konsentrasjoner hver, og gentamicin (Gn), nalidiksinsyre (Na), triclosan (Tr) og kloramfenikol (Cm) i tre konsentrasjoner hver (Tabell 3-10). *M. algicola* ble inokulert i 10 mL LB og inkubert over natten. Ufortynnet, 10^{-4} , 10^{-5} og 10^{-7} fortynnet kultur (eller kun ufortynnet og 10^{-4} fortynning, se Tabell 3-10) ble platet ut på LA tilsatt de forskjellige antibiotikaene i ulike konsentrasjoner og på LA plate uten antibiotika (kontroll). Etter inkubering ble platene undersøkt for vekst og antall kolonier observert ble notert. Hele forsøket ble gjennomført to ganger.

Resultatet (Tabell 3-10) viste ingen resistent mot Amp, Tc, Na, Tr eller Cm. *M. algicola* er resistent mot 1 µg/mL Km, men ved fortynnet kultur klarer den ikke å vokse ved 10 µg/mL. For både Ap og Sp ble det observert vekst opp til 5 µg/mL. For høyere konsentrasjoner av Ap og Sp ble det for fortynnet kultur observert lite eller ingen vekst. For Gn er det ingen nedgang i kimtall før ved 5 µg/mL, men også dette takler *M. algicola* bra.

I forsøket ble det beregnet prosentvis overlevelse med usikkerhet for hver antibiotika-konsentrasjon. Den ene konsentrasjonen av spectinomycin hadde større usikkerhet enn selve verdien (Tabell 3-10). Dette gjør at tallet ikke er signifikant, men trenden viser likevel at det blir mindre overlevelse ved økt antibiotika-konsentrasjon. Usikkerheten til prosentvis overlevelse i tilfellene hvor kimtallet kun er beregnet fra en plate er svært unøyaktige ettersom det ikke var mulig å beregne et standardavvik for kimtallet (indikert med ND i Tabell 3-10). Prosent overlevelse for 10 µg/µL Km er også unøyaktig ettersom ingen av platene var tellbare. For noen av antibiotikaene var variasjonen mellom paralleller store. Derfor burde det gjøres flere paralleller for å få mer nøyaktige resistentnivå for de ulike antibiotikaene. I tillegg burde terskelen for hvor høy konsentrasjon *M. algicola* takler av de ulike antibiotikaene bestemmes. KmR stamme (se kap. 3.2.5) burde også testes på samme måte. Dersom *M. algicola* KmR har utviklet resistens mot andre antibiotika kan dette bli et problem ved seleksjon og bør derfor testes. I et forsøk ikke beskrevet i oppgaven ble det observert at stammen også så ut til å ha blitt AprR.

3.2.4 Undersøkelse av hvorvidt *lacZ* kan benyttes som seleksjonsmarkør

β-galaktosidase enzymet spalter X-Gal (BCIG, 5-bromo-4-kloro-indolyl-β-D-galaktopyranosid) til galaktose og 5-bromo-4-kloro-3-hydroxyindol. Sistnevnte reagerer spontant og oksideres til 5'5-dibromo-4'4-dikloro-indigo som har en blå farge som kan observeres i bakteriekolonier på agar [69]. β-galaktosidase kan benyttes som seleksjonsmarkør ved overføring av nytt genetisk materiale dersom bakteriestammen ikke har enzymet fra før. Det er derfor av interesse å teste *M. algicola* for dette enzymet. I tillegg var en konstruert suicidevektor for homolog rekombinering som bruker blå/hvit seleksjon som markør tilgjengelig fra før. Det ville derfor vært praktisk dersom dette kan benyttes som seleksjonsmarkør.

M. algicola ble platet ut på LA med X-Gal og IPTG for å finne ut om bakterien har *lacZ* genet. Resultatet viste bare hvite kolonier.

Tabell 3-10 Vekst av *M. algicola* på ulike antibiotika. Verdiene er gjennomsnitt av to forsøk hvor antall kolonier er telt. Ulike antibiotika og konsentrasjoner, samt ulike fortyninger av cellekulturen er indikert. Usikkerhetene er oppgitt til et standardavvik. Rosa farge, >0-5 % overlevelse; blå farge, 5-15 % overlevelse; grønn farge, >70 % overlevelse. ND, her er kimtall kun beregnet fra en plate, det var derfor ikke mulig å beregne et standardavvik. Se Vedlegg F for beregninger av tallene.

Antibiotika	[Antibiotika] (µg/mL)	U-fortynnet	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	Kimtall	Overlevelse (%)
Ingen	-	Slør	>500	556	4	$5,56 \cdot 10^8 \pm 0,08 \cdot 10^8$	100
Ampicillin	1	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0
Kanamycin	1	Slør	>500	46,5	0	$5 \cdot 10^7 \pm 2 \cdot 10^7$	5 ± 4
	10	>500	0	0	0	$5,0 \cdot 10^3 \pm ND$	$8,90 \cdot 10^{-4} \pm 0,14 \cdot 10^{-4}$
	50	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0
Tetracyclin	1	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0
Spectinomycin	1	Slør	>500	70	0	$7,0 \cdot 10^7 \pm 0,8 \cdot 10^7$	$11,4 \pm 1,5$
	5	Slør	439	46,5	0	$5 \cdot 10^7 \pm 4 \cdot 10^7$	3 ± 8
	20	40	0	7	0	$400 \pm ND$	$2,491103 \pm 0,000011$
	50	9	0	0	0	90 ± 14	$1,4 \cdot 10^{-5} \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$
Apramycin	1	Slør	467	59,5	0	$5,9 \cdot 10^7 \pm 5,3 \cdot 10^7$	4 ± 9
	5	Slør	240	13	0,5	$1,8 \cdot 10^7 \pm 1,2 \cdot 10^7$	2 ± 2
	25	540	0	0	0	$5,4 \cdot 10^3 \pm ND$	$9,61 \cdot 10^{-4} \pm 0,15 \cdot 10^{-4}$
	50	0	0	0	0	0	0
Ingen	-	-	-	>500	1048	$1,1 \cdot 10^{11} \pm 0,3 \cdot 10^{11}$	100 ± 50
Gentamicin	1	Slør	>1000	>500	1253	$1,25 \cdot 10^{11} \pm 0,08 \cdot 10^{11}$	120 ± 40
	3	Slør	>1000	>500	1081	$1,1 \cdot 10^{11} \pm 0,5 \cdot 10^{11}$	100 ± 60
	5	Slør	>1000	>500	831	$8,3 \cdot 10^{10} \pm 0,5 \cdot 10^{10}$	80 ± 30
Nalidiksinsyre	1	1	0			0	0
	5	0	0			0	0
	10	0	0			0	0
Triclosan	1	0	0			0	0
	3	0	0			0	0
	5	0	0			0	0
Kloramfenikol	1	Slør	0			0	0
	5	0	0			0	0
	10	0	0			0	0

3.2.5 Dannelse av KmR *M. algicola* stamme ved mutagenisering

Nitrosoguanidin (NTG) er et mutagent stoff som tidligere har blitt brukt til å introdusere kanamycinresistens (KmR) i bakterier [76]. Det ble derfor forsøkt å mutagenisere *M. algicola* med NTG i håp om å fremkalle antibiotikaresistens. Det var ønskelig og lage en KmR stamme ettersom det på dette tidspunktet ikke var funnet noen antibiotika som *M. algicola* var resistent mot. (Først etter dette forsøket var startet ble det funnet at *M. algicola* er resistent mot gentamicin.)

Først ble fire fortyngninger av *M. algicola* platet ut på LA fra en to dagers forkultur (OD₆₀₀ målt til 1,743). Dette ble gjort for å beregne tilnærmet kimtall ved OD₆₀₀ = 1 for senere å kunne anta hvilke fortyngninger som ville gi best resultat. Etter to dager ble antall kolonier telt. Resultatet ga et kimtall på $35 \cdot 10^7$ celler/mL·OD. Se Vedlegg G for rådata og beregninger. Dette betyr at ved en OD₆₀₀ = 1 kan det forventes å få opp ca. 35 kolonier fra en 10⁻⁶ fortykning, når det plates ut 100 µL.

Mutagenese ble utført som beskrevet i kap. 2.18 med 5 forskjellige konsentrasjoner NTG (10, 20, 40, 60 og 80 µg/mL) og en kontroll uten nitrosoguanidin. Tabell 3-11 viser mengdene NTG-stock og TM-buffer som ble blandet i de forskjellige prøvene.

Tabell 3-11 Nitrosoguanidin konsentrasjon i de ulike prøvene. Mengde stockløsning og mengde TM-buffer tilsatt til 5 mL kultur for å oppnå de gitte konsentrasjonene er vist i kolonnene til høyre.

Prøve	NTG konsentrasjon (µg/mL)	Mengde NTG-stock (µL)	Mengde TM-buffer (µL)
P0	0	0	200
P1	10	20,8	179,2
P2	20	41,6	158,4
P3	40	83,2	116,8
P4	60	124,8	75,2
P5	80	166,4	33,6

Overlevelse:

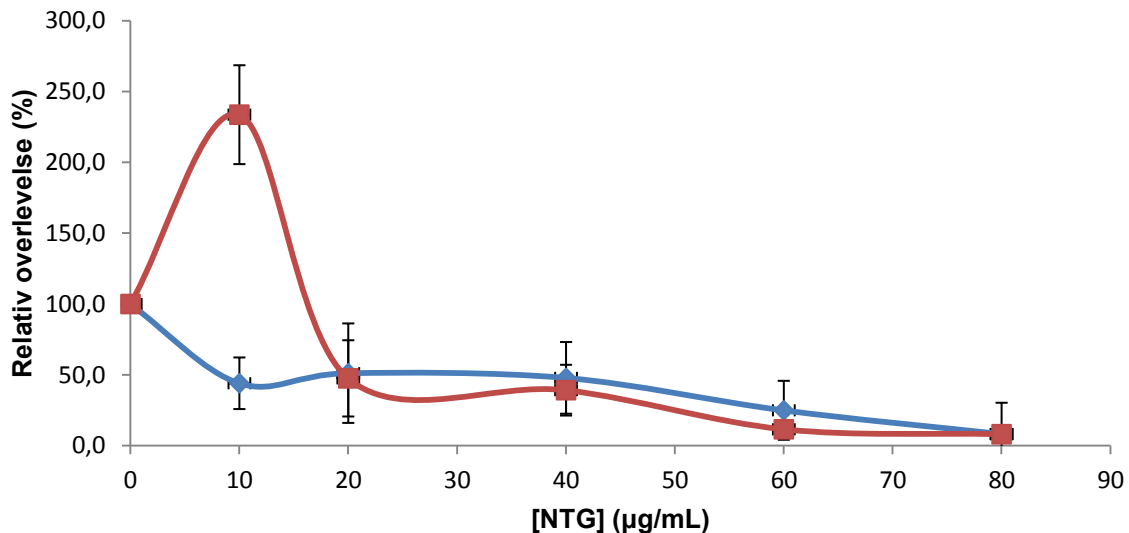
Til bestemmelse av overlevelse ble det valg fortyngninger på bakgrunn av at det var forventet å få opp 35 kolonier ved en 10⁻⁶ fortykning for prøven uten nitrosoguanidin og færre desto høyere konsentrasjon nitrosoguanidin.

Kolonier ble telt opp etter 43 timer inkubering ved 30 °C. Gjennomsnittet av parallellene fra fortyngningen som ga et tellbart antall kolonier (50-300) ble brukt til å beregne kimtall i hver prøve og prosentvis overlevelse (rød graf i Figur 3-5). Se Vedlegg G for rådata og beregninger som førte frem til grafen i Figur 3-5.

Kimtall i nedfryste prøver:

Til bestemmelse av kimtall i prøvene som ble fryst ned ble det valgt fortynninger på bakgrunn av 1) tidligere beregninger hvor det ble funnet at ved $OD_{600} = 1$ kan det forventes å få opp ca. 35 kolonier fra en 10^{-6} fortynning, når det plates ut 100 μL , og 2) OD_{600} i nedfryste prøver ble beregnet til å være på ca. 2,6.

Gjennomsnittet av 5 paralleller fra 10^{-6} fortynningen for prøve P0-P4 og 10^{-5} for P5 ble brukt til å beregne kimtall og relativt kimtall per OD (blå graf i Figur 3-5). Se Vedlegg G for rådata og beregninger.



Figur 3-5 Prosentvis overlevelse i forhold til kultur uten tilsatt NTG som funksjon av konsentrasjon NTG tilsatt. Rød graf viser relativ overlevelse mens blå graf viser relativt kimtall i nedfryste prøver.

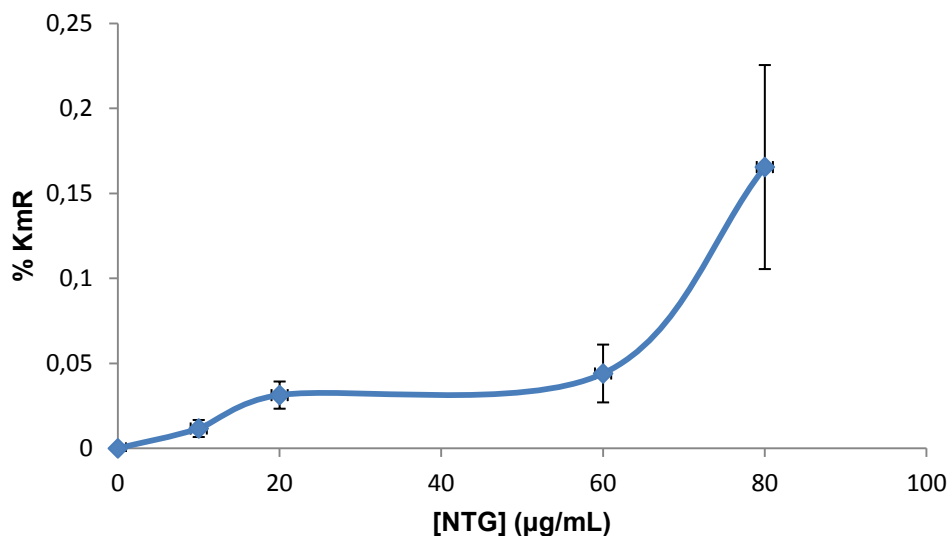
Frekvens kanamycinresistente:

Fordi det var ønskelig å oppnå en KmR stamme *M. algicola* ble en frekvens KmR bakterier funnet. Ettersom tidligere resultater (Tabell 3-10) viste at *M. algicola* ikke var resistent mot mer enn 10 $\mu\text{g/mL}$ Km, ble det benyttet LA med 40 $\mu\text{g/mL}$ Km.

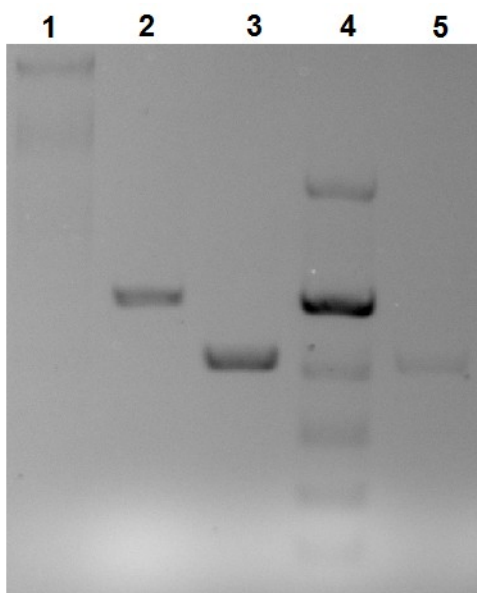
Til bestemmelse av frekvens KmR i nedfryste prøver ble det fulgt samme prosedyre som for betemmelse av kimtall. Det ble også platet ut på LA uten antibiotika for å sikre riktig frekvens KmR.

Antall kolonier ble telt etter 46 og 100 timer inkubering. Ettersom det kom opp et betydelig antall flere kolonier etter 100 enn etter 46 timer, ble det valgt å bruke tallene fra 100 timer inkubering. En frekvens i prosent av totalt kimtall ble beregnet fra et gjennomsnitt av 3 paralleller (Figur 3-6). Platene fra P3 var kontaminerte og er derfor ikke tatt med. Se Vedlegg G for rådata og beregninger.

En av de KmR koloniene ble kontrollert ved PCR ved bruk av primerparene MaalgGF/R og MaalgLF/R (Tabell 2-6). Som kontroll ble det brukt en koloni kjent å være *M. algicola*. Koloniene ble resuspendert i PCR blandingen i stedet for å isolere DNAet først. Gelelektroforesen (Figur 3-7) viste en suksessfull amplifisering ved bruk av begge primerparene. For amplifisering med primerparet MaalgGF/R ble det for den KmR kolonien oppnådd flere bånd enn forventet. Det antas at dette skyldes mutasjoner som har ført til at primene binder uspesifikt til andre steder i genomet. Den kontrollerte kolonien ble dyrket opp og fryst ned ved -80 °C. Stammen ble kalt *M. algicola* DG893 KmR.



Figur 3-6 Prosentvis KmR bakterier i nedfryste prøver som funksjon av konsentrasjon NTG i prøven.



Figur 3-7 Kontroll av KmR koloni. Brønn 1: ladder (uleselig). Brønn 2 og 3: *M. algicola* koloni med hhv. primerpar MaalgGF/R og MaalgLF/R. Brønn 4 og 5: *M. algicola* KmR koloni med hhv. primerpar MaalgGF/R og MaalgLF/R.

3.2.6 Elektroporering av *M. algicola*

Ettersom det ikke er publisert noe om rekombinant arbeid i *M. algicola* ble det forsøkt å lage elektrokompetente *M. algicola* og tilføre plasmid ved elektroporering iht. protokoll i kap. 2.15.2. Det ble brukt et plasmid med et gen for KmR og et annet med gen for AmR. For hver av disse to plasmidene ble det utført to paralleller. Som kontroll ble det brukt en alikvot celler kun tilsatt vann og en annen ikke utsatt for elektroporering. Det ble platet ut iht. Tabell 3-12.

Etter to døgn inkubering ble det ikke observert vekst på noen av platene.

Tabell 3-12 Fortynninger av ulike prøver elektroporete *M. algicola* platet ut på ulike antibiotika.

Prøve	Antibiotika	Fortynninger
Vann	Ingen	Ufortynnet, 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} ,
Ikke elektroporert	Ingen	10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}
KmR plasmid	Ingen	Ufortynnet
	50 µg/mL Km	Ufortynnet, 10^{-1} - 10^{-9}
	100 µg/mL Am	Ufortynnet, 10^{-6} , 10^{-9}
AmR plasmid	Ingen	Ufortynnet
	50 µg/mL Km	Ufortynnet, 10^{-6} , 10^{-9}
	100 µg/mL Am	Ufortynnet, 10^{-1} - 10^{-9}

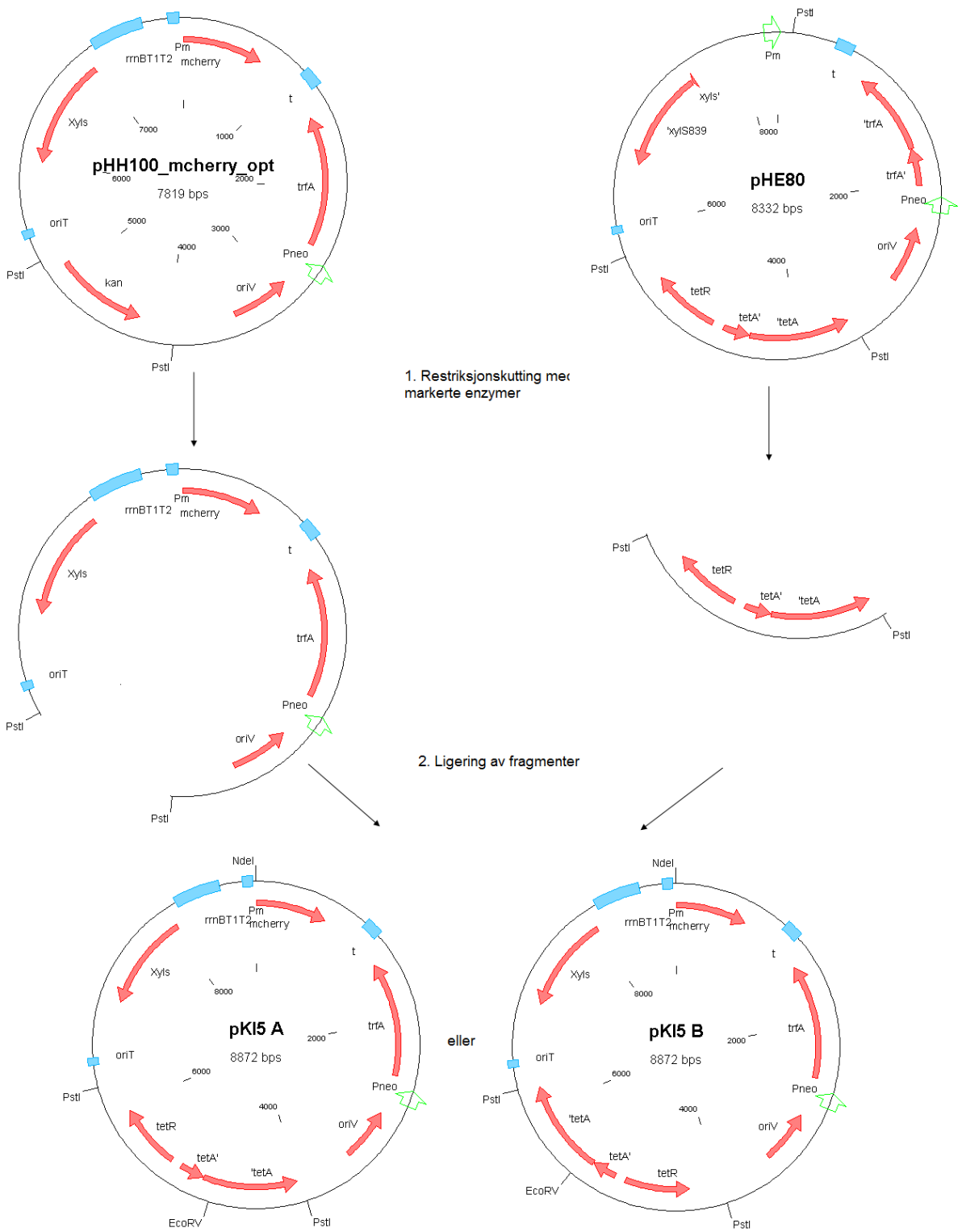
3.2.7 Konjugering av *M. algicola* og uttrykk av *Pm*-promotoren

Ettersom å lage elektrokompetente celler av *M. algicola* var mislykket, ble det forsøkt å konjugere bakterien for å se om dette var mulig. Det ble brukt et plasmid inneholdende *Pm*-promotoren for å samtidig finne ut om denne ville uttrykkes i *M. algicola*. Plasmidet pHH100-mcherry har *mcherry* satt inn under kontroll av *Pm*-promotoren og inneholder gen for KmR. mCherry er et fluorescerende molekyl som emitterer rødt lys. Genet for dette proteinet kan derfor brukes som et reporter-gen. pHH100-mcherry har også en "origin of transfer" (*oriT*) region som er nødvendig for at et plasmid skal kunne overføres fra en bakterie til en annen via konjugering.

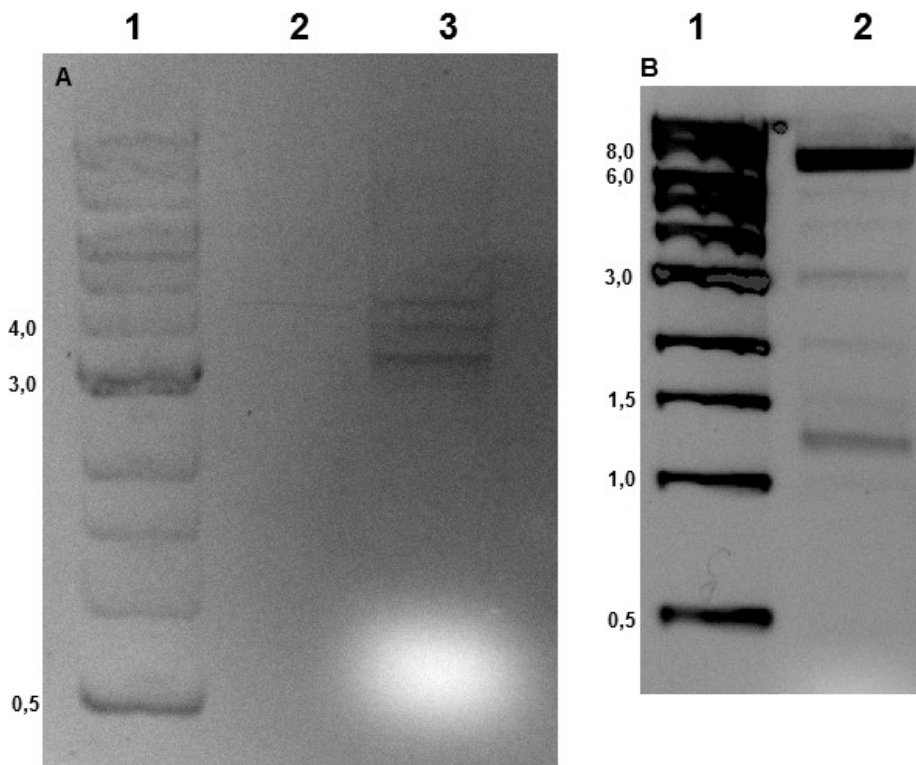
Uttbytting av KmR med TcR i pHH100-mcherry:

Ettersom det skulle benyttes KmR *M. algicola* til konjugeringen var det nødvendig å bytte ut KmR i pHH100-mcherry med resistent for et annet antibiotikum. Til dette ble det valgt TcR hentet fra pHE80. Figur 3-8 viser hvordan dette ble gjort.

pHH100-mcherry og pHE80 ble kuttet med PstI og gelelektroforese ble brukt til å separere båndene (Figur 3-9). Båndene tilsvarende 6,6 kb fra pHH100-mcherry og 2,3 kb fra pHE80 ble ligert sammen til å gi et plasmid kodende for mCherry og TcR. Ved heat-shock ble pKI5 transformert til *E. coli* DH5α. Det ble brukt LA med 10 µg/mL Tc for seleksjon av transformanter.



Figur 3-8 Ligering av pHH100_mcherry og pHE80 til å gi pK15 A eller B.

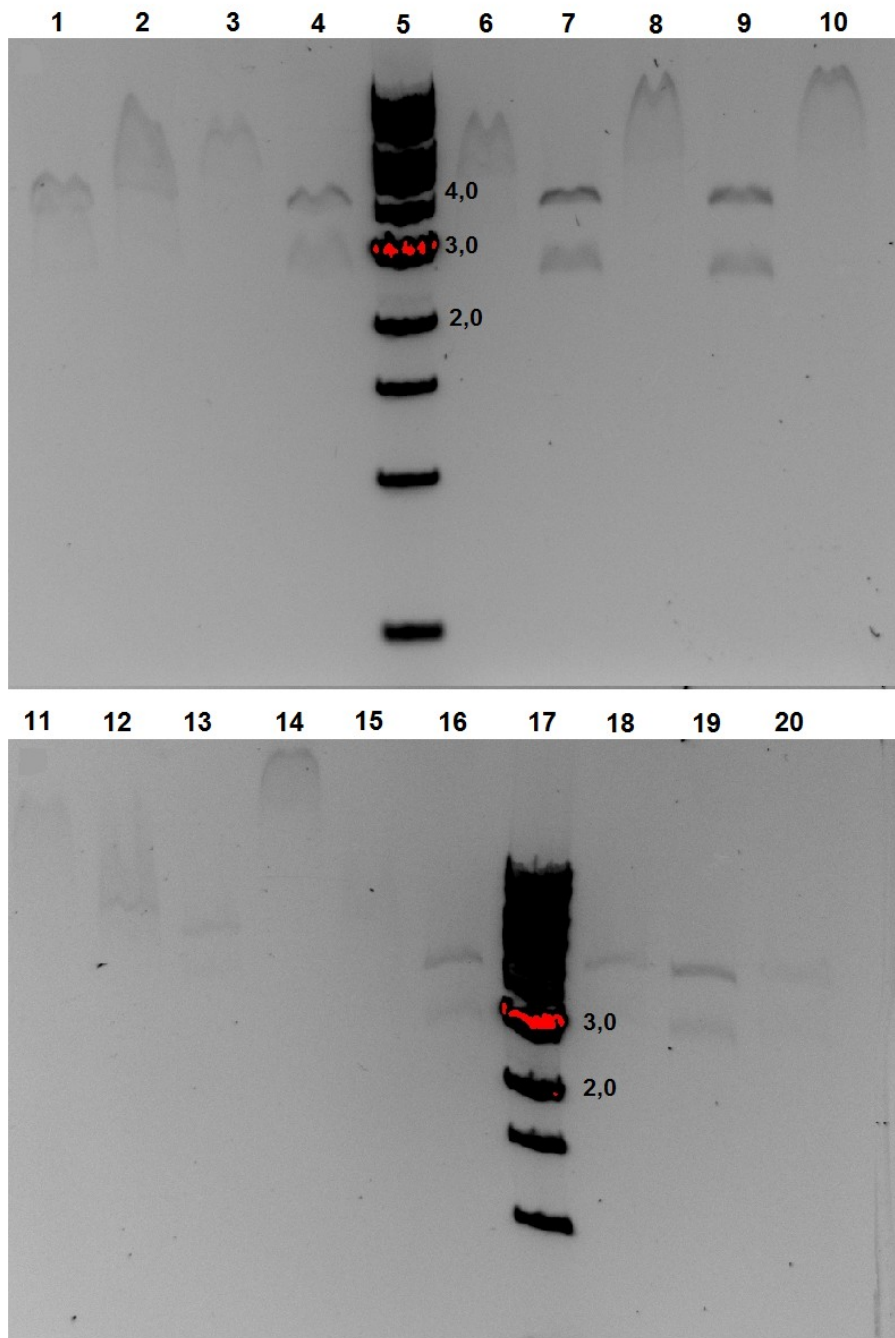


Figur 3-9 Separering av fragmenter fra pHE80 (A) og pHH100-mcherry (B) kuttet med PstI. A) Brønn1: Ladder (1 kb DNA Ladder, BioLabs), brønn 2: ikke tilsatt prøve, brønn 3: pHE80. Forventede lengder var 2,3 + 2,7 + 3,3 kb. B) Brønn 1: Ladder (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Fermentas), brønn 2: pHH100-mcherry forventede lengder var 1,2 + 6,6 kb. Tallene på sidene indikerer fragmentstørrelse i kb.

Det ble kontrollert at transformanter faktisk inneholdt plasmidet ved å plukke ti kolonier (A-J). Plasmid ble isolert og kuttet med restriksjonsenzymene EcoRV og NdeI. De forventede fragmentlengdene ved gelelektroforese er vist i Tabell 3-13. Resultatene (Figur 3-10) tyder på at koloni B (Figur 3-10 brønn 3 og 4), C (brønn 6 og 7), D (brønn 8 og 9), G (brønn 15 og 16) og H (brønn 18 og 19) inneholder ønsket plasmid. Plasmid fra koloni C ble valgt og kalt pKI5.

Tabell 3-13 Forventet lengde til ulike plasmider etter kutting med enzymet EcoRV og NdeI.

Plasmid	Forventet lengde (kb)
pHE80	0,9 + 3,2 + 4,1
pHH100-mcherry	7,8
pHH100-mcherry uten <i>KmR</i>	6,6
pKI5 (A orientering)	4,0 + 4,85
pKI5 (B orientering)	3,45 + 5,4



Figur 3-10 Verifisering av pKI5. Brønn 5 og 17: ladder (1 kb DNA Ladder, BioLabs), brønn 1 og 2: A, brønn 3 og 4: B, brønn 6 og 7: C, brønn 8 og 9: D, brønn 10: I, brønn 11 og 12: E, brønn 13 og 14: F, brønn 15 og 16: G, brønn 18 og 19: H, brønn 20: J. Tallene indikerer fragmentlengde i kb.

Konjugering:

Til konjugeringen ble det benyttet en påvist transformant av *E. coli* DH5 α med pKI5 og en KmR stamme av *M. algicola* (oppnådd ved mutagenese). Konjugeringen ble utført en gang som beskrevet i kap. 2.15.3 og en gang til med lengre inkuberingstid for konjugeringstrinnet. I forsøket med lengre inkuberingstid ble platene med dråpene først inkubert i et døgn ved 30 °C, deretter ett døgn ved 20 °C.

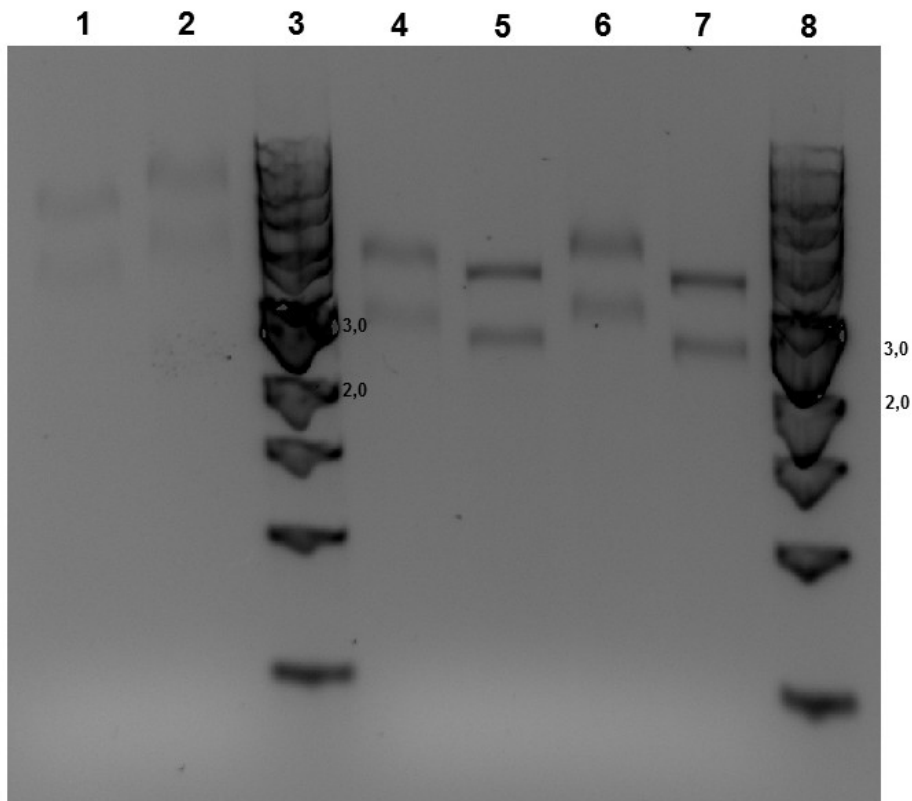
Etter konjugering ble det platet ut på LA uten antibiotika, LA med Km, LA med Tc og LA med Km + Tc. Km ble brukt for å selektere bort *E. coli*, mens Tc ble brukt for å selektere for bakterier med pKI5. Etter to døgn inkubering ble antall kolonier telt opp. Kimtall og konjugeringsfrekvens (Tabell 3-14) for begge forsøkene ble beregnet (se Vedlegg H).

For å verifisere at korrekt plasmid var blitt tatt opp i *M. algicola* ble det plukket tre kolonier, satt på plate og dyrket opp 10 mL LB. Både plate og kultur ble tilsatt 50 $\mu\text{g/mL}$ Km og 10 $\mu\text{g/mL}$ Tc. Plasmid ble isolert og kuttet med EcoRV og NdeI. Fragmenterte ble separert gelelektroforese (Figur 3-11). Forventede lengder er vist i Tabell 3-13. Koloni 2 (brønn 4 og 5 i Figur 3-11) ble valgt til videre bruk, dyrket opp og fryst ned ved -80 °C.

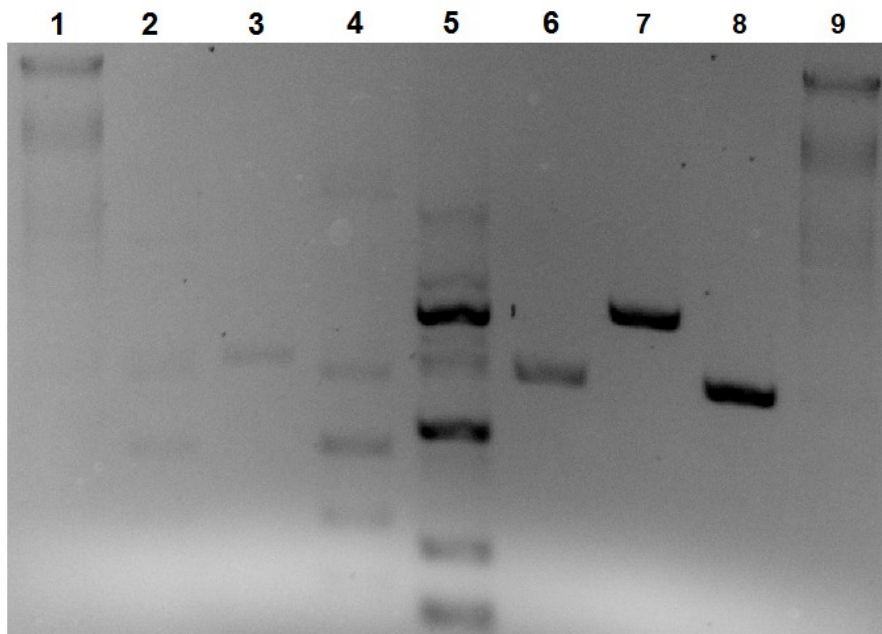
Det ble også kontrollert at den valgte kolonien faktisk var *M. algicola* KmR ved å kjøre PCR på kolonien. Kjent koloni av *M. algicola* ble brukt som positiv kontroll og prøver uten DNA tilsatt som negativ kontroll. Det ble kjørt PCR med primerparene MaalgGF/R og med MaalgLF/R. Resultatet (Figur 3-12) viste at kolonien var *M. algicola* KmR.

Tabell 3-14 Resultater fra konjugering, ett og to døgn konjugeringstrinn. Se Vedlegg H for rådata og beregninger.

Antibiotika	Kimtall ett døgn konjugering		Kimtall to døgn konjugering	
	<i>M. algicola</i>	<i>M. algicola</i> + <i>E. coli</i>	<i>M. algicola</i>	<i>M. algicola</i> + <i>E. coli</i>
Uten	$1,83 \cdot 10^9$	$1,72 \cdot 10^9$	$2,78 \cdot 10^9$	$1,39 \cdot 10^9$
50 $\mu\text{g/mL}$ Km	$9,70 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^8$	$1,96 \cdot 10^9$	$5,50 \cdot 10^8$
10 $\mu\text{g/mL}$ Tc	0	$2,07 \cdot 10^8$	0	$3,05 \cdot 10^8$
50 $\mu\text{g/mL}$ Km + 10 $\mu\text{g/mL}$ Tc	0	16750	0	20850
Frekvens transkonjuganter		$8,4 \cdot 10^{-5}$		$3,8 \cdot 10^{-5}$



Figur 3-11 pKI5 isolert fra *M. algicola* kuttet med EcoRV + NdeI. Brønn 3 og 8: ladder (1 kb DNA Ladder, BioLabs), brønn 1 og 2: pKI5-1, brønn 4 og 5: pKI5-2, brønn 6 og 7: pKI5-3. Tallene på siden indikerer fragmentlengde i kb.



Figur 3-12 Kontroll av koloni inneholdende pKI5. Brønn 1 og 9: ladder (uleselig). Brønn 2 og 4: prøve uten DNA med primerpar MaalgGF/R. Brønn 3: prøve uten DNA med primerpar MaalgLF/R. Brønn 5 og 6: *M. algicola* KmR pKI5 koloni med hhv. primerparene MaalgGF/R og MaalgLF/R. Brønn 7 og 8: *M. algicola* koloni med hhv. primerparene MaalgGF/R og MaalgLF/R.

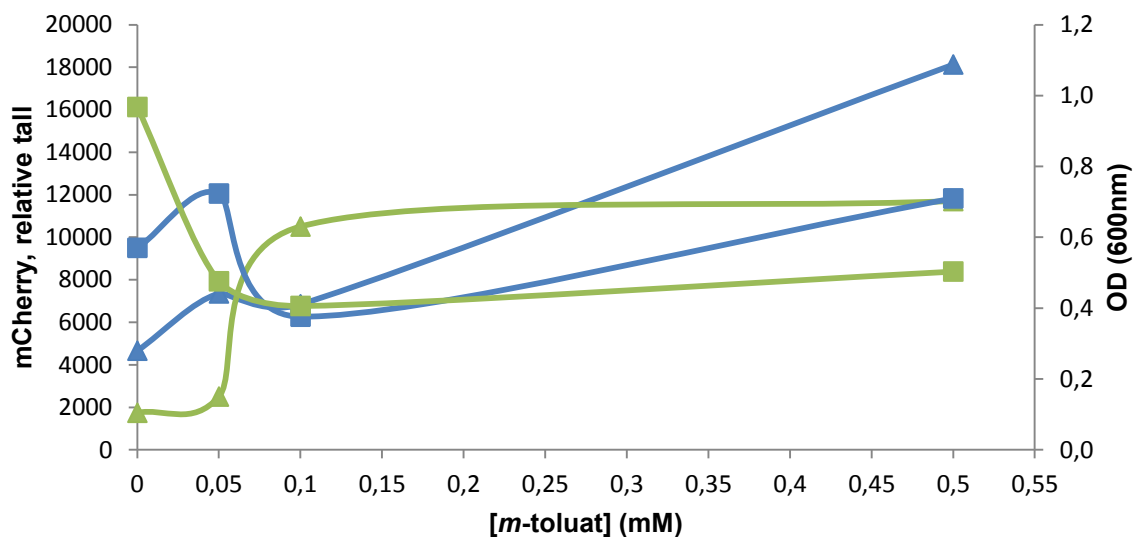
Påvisning av uttrykt *Pm*-promotor ved måling av mCherry:

Påvist *M. algicola* KmR med pKI5 ble dyrket opp i 10 mL 3xLB tilsatt 10 µg/mL Tc. Det ble utført to paralleller. Fra todagens forkultur ble 1 % inokulert i 4 kolber med 10 mL 3xLB (totalt 8 kolber). Etter ca. 8 timer inkubering ble det tilsatt *m*-toluat iht. Tabell 3-15. Inkuberte videre til en total inkuberingstid på 48-50 timer.

Etter inkuberingen ble mCherry målt som beskrevet i kap. 2.19. Som blank ble det benyttet 3xLB. Resultatet (Figur 3-13) viste at *Pm*-promotoren ble uttrykt. Rådata er vist i Vedlegg H.

Tabell 3-15 Mengder *m*-toluat brukt ved uttrykk av *Pm*-promoter i *M. algicola*.

Sluttkonsentrasjon <i>m</i> -toluat	Mengde 0,5 M <i>m</i> -toluat tilsatt
0 mM	0 µL
0,05 mM	1 µL
0,1 mM	2 µL
0,5 mM	10 µL



Figur 3-13 mCherry per OD₆₀₀ og OD₆₀₀ plottet mot konsentrasjon *m*-toluat (mM). Blå grafer viser parallell A, grønne grafer viser parallell B. Grafer med trekant-symboler er mCherry/OD og leses av på venstre y-akse. Grafer med firkant-symboler er OD₆₀₀ og leses av på høyre y-akse.

3.3 Alginatproduksjon

Utgangspunktet for denne oppgaven var indikasjoner på at *M. algicola* kan produsere alginat. Det ble derfor gjort forsøk på å oppnå dette ved å modifisere stammen ved mutagenese og homolog rekombinering.

3.3.1 Screening etter mukoide varianter av muterte *M. algicola*

Etter å ha påvist endret fenotypiske egenskaper hos *M. algicola* ved mutagenese ble det forsøkt å finne bakterier hvor mutasjon hadde ført til produksjon av alginat. Tidligere har det blitt produsert mukoide varianter av *P. fluorescens* ved mutagenese [76].

Det er også tidligere vist at Am kan trigge alginatproduksjon [76]. Det ble derfor først funnet en passende Am-konsentrasjon til utplating. Dette ble gjort ved å plate ut fra todagens forkultur *M. algicola* (ikke-mutagenisert) på ulike konsentrasjoner Amp. Ettersom det tidligere er vist at *M. algicola* ikke tåler 1 µg/mL Am ble det valgt å teste 0,1 og 0,5 µg/mL. 100 µL av fortyningene ufortynnet, 10^{-5} , 10^{-6} og 10^{-7} ble platet ut.

Resultatet (Tabell 3-16) viste at 0,5 µg/mL Am ikke ga noen kolonier og 0,1 µg/mL Am ga mange. Forsøket ble gjentatt med 0,2, 0,3 og 0,4 µg/mL Am. Basert på resultatene (Tabell 3-16) ble det valgt å bruke LA med 0,2 µg/mL Am ettersom dette ga en overlevelse på 0,36 %.

Fra nedfryste alikvoter etter mutagenese ble det laget fortynningsrekker ved å fortynne med NaCl (0,9 %). Deretter ble det platet ut på 14 cm LA med 0,2 µg/mL Am iht. Tabell 3-17. Valgte fortyninger og mengde kultur platet ut er basert på andel ikke-mutageniserte *M. algicola* som vokste opp på 0,2 µg/mL Am og bestemt kimtall i nedfryste ampuller.

En av platene det ble observert færrest kolonier på (P4 10^{-4} fortykning) ble telt til å ha 227 kolonier på $\frac{1}{4}$ av platen. I beregningen av antall kolonier det ble sett på er det derfor antatt at alle plater med 10^{-4} fortykning hadde 900 kolonier. For 10^{-3} fortykning er det teoretisk 10 ganger så mange kolonier som i en 10^{-4} fortykning. Her ble det kun ganget med 8, noe som gir 7200 kolonier på plater med 10^{-3} fortykning.

Tabell 3-16 Antall kolonier på plater med forskjellig konsentrasjon ampicillin.

Antibiotika	Ufortynnet	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Ingen	Slør	> 500	203	7
0,1 µg/mL Am	Slør	> 500	122	16
0,5 µg/mL Am	Slør	0	0	0
Antibiotika	Ufortynnet	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Ingen	Slør	> 500	195	21
0,2 µg/mL Am	Slør	7	0	0
0,3 µg/mL Am	Slør	1	0	0
0,4 µg/mL Am	Slør	0	0	0

Tabell 3-17 Utplating av mutageniserte stammer på 0,2 µg/mL Am.

Prøve (NTG-kons.)	Overlevelse i fryste prøver	KmR frekvens	Fortynning	# Plater	Mengde platet ut
P1 (10 µg/mL)	44 %	0,012 %	10 ⁻³	20	100 µL
			10 ⁻⁴	32	
P2 (20 µg/mL)	50 %	0,031 %	10 ⁻³	10	100 µL
			10 ⁻⁴	16	
P4 (60 µg/mL)	48 %	0,044 %	10 ⁻³	10	70 µL
			10 ⁻⁴	16	
P5 (80 µg/mL)	25 %	0,165 %	10 ⁻³	10	200 µL
			10 ⁻⁴	15	

Det ble observert at ca. halvparten av koloniene hadde en annen farge enn det *M. algicola* normalt har. Noen av disse ble testet ved PCR for å sjekke om de var *M. algicola* eller ikke. Det viste seg at de ikke var det. Tatt dette i betraktning er det videre antatt at kun 1/3 av alle kolonier på platene var *M. algicola*. Dette gir 300 kolonier per plate med 10⁻⁴ fortynning og 2400 kolonier per plate med 10⁻³ fortynning. Totalt ble det sett på 158 700 kolonier.

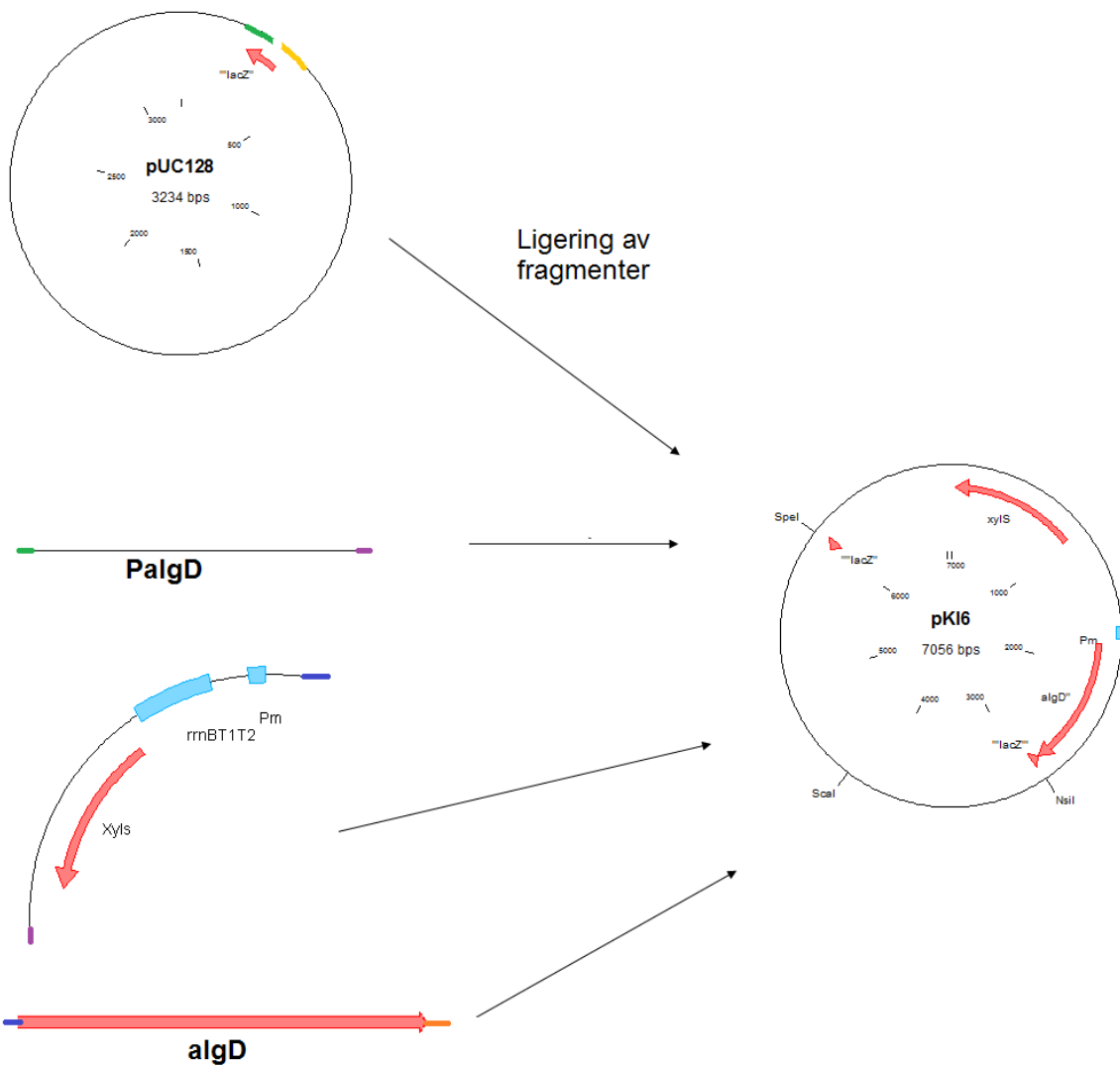
Platene ble først inkubert ved 30 °C i to døgn for deretter å inkuberes i romtemperatur. Med jevne mellomrom ble platene undersøkt for mukoide varianter. Det ble ikke funnet noen mukoide varianter av *M. algicola*.

3.3.2 Innsetting av *Pm*-promotor oppstrøms for alginatklyngen i *M. algicola*

Etter å ha fått til å overføre plasmid til *M. algicola* og påvist at *Pm*-promotoren uttrykkes i bakterien, ble neste mål å lage et konstrukt som via homolog rekombinering kunne sette *Pm*-promotoren inn oppstrøms for alginatklyngen. Figur 3-14 viser en skjematisk oversikt av konstruksjonen.

Kloning av *Pm*-promotoren mellom *PalgD* og *algD* ved bruk av Gibson Assembly

Først ble primere designet for å amplifisere pUC128 til å gi et lineærisert produkt med start og slutt inne i *lacZ* (kalt pUC128). Det ble også designet primere for amplifisering av 1 kb fra startkodonet til *algD* (kalt algD) og 1 kb oppstrøms for startkodonet til *algD* (kalt PalgD) fra genomet til *M. algicola*, samt til amplifisering av *Pm*-promotor og *xylS* fra pHH100-mcherry (kalt Pm). I prosessen med å designe disse primerene ble "Gibthon" sin "Primer Calculator" benyttet (tilgjengelig via internett). Dette programmet hjelper til med å lage primerne slik at fragmentene som skal ligeres sammen får overlappende like sekvenser. Dette er en nødvendighet ved bruk av Gibson liggering (se kap. 2.14). I tillegg måtte primere som skulle brukes i samme PCR ha tilnærmet likt GC-innhold i delen av primeren som var spesifikk for fragmentet som skulle amplifiseres. Dette for at samme hybridisering temperatur skulle fungere. Etersom "Gibson assembly" forgår ved 50 °C måtte også totalt smeltepunkt for primerene være høyere enn dette slik at ikke DNA-tråden begynte å denaturere under reaksjonen.



Figur 3-14 Gibson ligering av fire fragmenter til å gi plasmidet pK16. Fargede ender på fragmentene indikerer overlappende like sekvenser.

De designede primerene (Tabell 2-6) ble brukt i reaksjoner for å amplifisere de ulike fragmentene. Det ble kjørt 50 μ L reaksjoner (se kap. 2.6) med spesifikasjonene indikert i Tabell 3-18. Det ble brukt samme program for pUC128 og PalgD. For Pm og algD ble det brukt et program med lavere hybridiseringstemperatur. Lengde på forlengingstrinnet ble beregnet ut fra det lengste fragmentet som skulle amplifiseres med samme program.

Etter PCR ble det ved bruk av gelelektroforese kontrollert at de ønskete fragmentene var blitt amplifisert. 5 μ L PCR-produkt ble blandet med 5 μ L SIV og 1 μ L loading dye og applisert på gel. De forventede lengdene er vist i Tabell 3-18. Resultatet (Figur 3-15) viste flere bånd enn de tilsvarende de forventete lengdene. På grunn av dette ble det valgt å isolere de korrekte fragmentene ut fra gelen til bruk i Gibson ligation i stedet for å rense PCR-produktene direkte.

Etter at fragmentene var isolert fra gelen ble DNA-mengden i prøvene målt ved bruk av Nanodrop (Tabell 3-19). Verdiene ble deretter regnet om til pmol for å beregne mengder som skulle brukes til Giboson liggering (se Tabell 3-19). Giboson liggering (se kap. 2.14) ble satt opp ved å blande totalt 9 μL av fragmentene med 1 μL SIV og 10 μL Giboson Assembly Master Mix (2X). En skjematisk oversikt over liggeringen av pUC128, PalgD, Pm og algD til å gi plasmidet pKI6 er vist i Figur 3-14.

Tabell 3-18 PCR spesifikasjoner for amplifisering av fragmenter for konstruksjon av pKI6 og forventet lengde til de ulike fragmenter etter amplifisering.

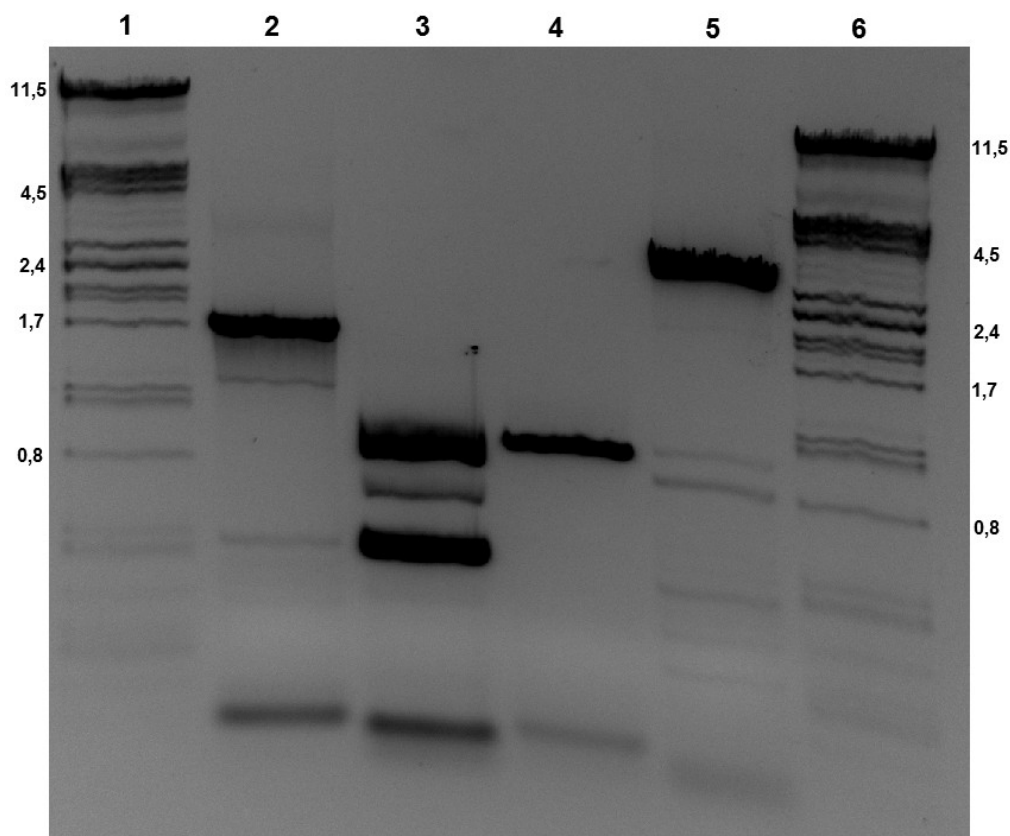
Fragment	Templat	Primerpar	DMSO	Hybridisering temperatur	Forventet lengde (kb)
Pm	pHH100/mcherry	PmF PmR	1 μL	53 °C	1,8
algD	<i>M. algicola</i> DNA	algDF algDR2	-	53 °C	1,0
PalgD	<i>M. algicola</i> DNA	PalgDF PalgDR	-	63 °C	1,0
pUC128	pUC128	pUC128Fny pUC128R	-	63 °C	3,2

Tabell 3-19 Nanodropmåling av ulike fragmenter og mengdene av de samme prøvene brukt til Giboson liggering.

Fragment	Nanodropmåling	Picomol/ μL	Mengde brukt	Picomol
Pm	2,75 ng/ μL	0,002	4 μL	0,008
algD	5,35 ng/ μL	0,008	1 μL	0,008
PalgD	2,55 ng/ μL	0,004	2 μL	0,008
pUC128	4,05 ng/ μL	0,002	2 μL	0,004
		Totalt:	9 μL	0,028

Reaksjonsblanding og positiv kontroll ble heat-shock transformert til *E. coli* DH5 α . Det ble brukt 100 μL celler og 5 μL prøve. iGEM anbefaler å fortynne liggeringsblandingene 1:4 med vann. Dette ble derfor gjort i tillegg til å ta 5 μL direkte fra både pKI6 prøven og positiv kontroll (totalt fire transformeringer). Det ble brukt LA med 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Am for seleksjon.

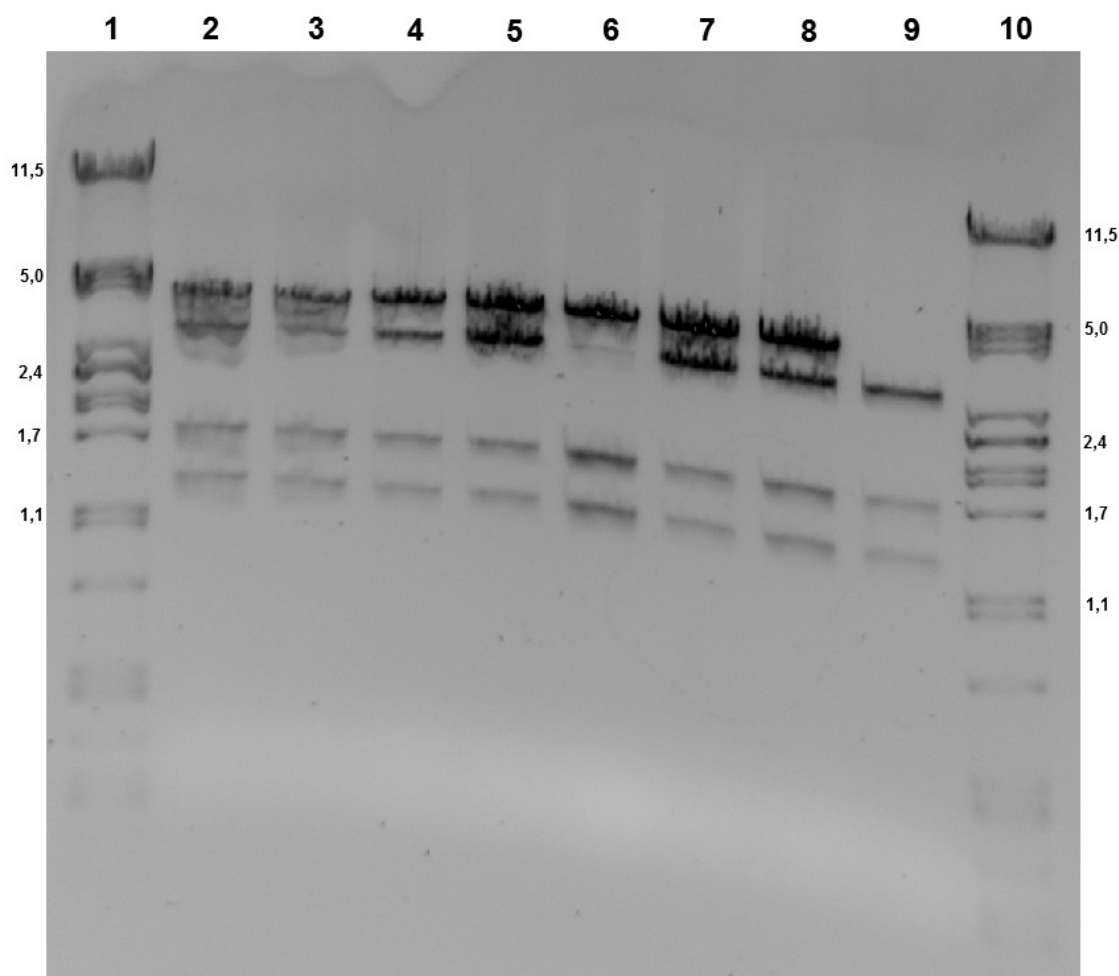
Etter inkubering ble kolonier på platene telt (Tabell 3-20). Tolv transformanter ble plukket for kontroll av plasmid. Det ble dyrket i 3 mL LB og 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Am ble brukt til seleksjon. Plasmid ble deretter isolert fra alle kulturene og kuttet med SpeI, NsiI og ScaI. Som kontroll ble pUC128 kuttet med de samme enzymene. Fragmentene ble deretter separert ved gelelektroforese. Resultatet (Figur 3-16, kun 7 av 12 plasmider er vist) viste at alle de isolerte plasmidene var kandidater til å være pKI6.



Figur 3-15 Resultat av PCR av fragmenter til konstruksjon av pKI6. F.v.: Ladder (5 μ L λ -DNA PstI), Pm, algD, PalgD, pUC128, ladder (7 μ L λ -DNA PstI). Tallene på sidene indikerer fragmentlengde i kb.

Tabell 3-20 Antall kolonier etter heat-shock transformering av pKI6 og positiv kontroll på Giboson ligering.

Prøve	Antall kolonier fra utplating av 200 μ L	Antall kolonier fra utplating av konsentrert prøve
pKI6	3	31
pKI6 fortynnet 1:4	1	20
Positiv kontroll	234	>500
Positiv kontroll fortynnet 1:4	18	254



Figur 3-16 Verifisering av pKI6. Brønn 1 og 10: ladder (λ -DNA PstI), brønn 2-8: isolert pKI6-kandidater kuttet med SpeI, NsiI og ScaI. I brønn 9: pUC128 kuttet med SpeI, NsiI og ScaI. Forventede lengder var på 3,9 + 1,8 + 1,4 kb for pKI6 og 1,8 + 1,4 + 0,08 kb for pUC128. Tallene på sidene indikerer lengder i kb.

Sekvensering av pKI6:

Tre av de isolerte plasmidene som etter kutting og gelelektroforese så ut til å være pKI6 (brønn 5, 7 og 8 i Figur 3-16) ble sekvensert ved bruk av GATC-prosedyren (se kap. 2.17.2) Dette ble gjort for å sikre at det ikke var noen mutasjoner i PalgD-Pm/xylS-aldD delen av pKI6 som ble brukt videre. Nanodrop ble brukt til å måle mengde DNA i prøvene som ble sekvensert. Primerene brukt var M13 rev, pGEM/pLit-seq-f, Sekvens 1100, Sekvens 2000 og Sekvens 2900.

Resultatene ble sammenlignet med den faktiske sekvensen til pKI6. Det ble funnet at to av tre var helt lik målsekvensen. Der hvor sekvenser fra ulike primere overlappet, ble det antatt at sekvensert sekvens var lik målsekvensen dersom den ene sekvensen var korrekt. I Vedlegg E er sekvenssammenligningen vist for det plasmidet det ble valgt å gå videre med. Dette plasmidet ble kalt pKI6.

Kloning av PalgD-Pm/xylS-algD fra pKI6 til suicidevektor:

For å senere bruke PalgD-Pm/xylS-algD til å sette *Pm*-promotoren inn i genomet til *M. algicola* ved homolog rekombinering er det en fordel å bruke en suicidevektor. Til dette ble plasmidet pHE246 brukt. Grunnen til at ikke pHE246 ble brukt med en gang i Gibson liggering er at det er mye større enn pUC128 (12,5 kb versus 3,2 kb) og derfor vanskeligere å amplifisere ved PCR.

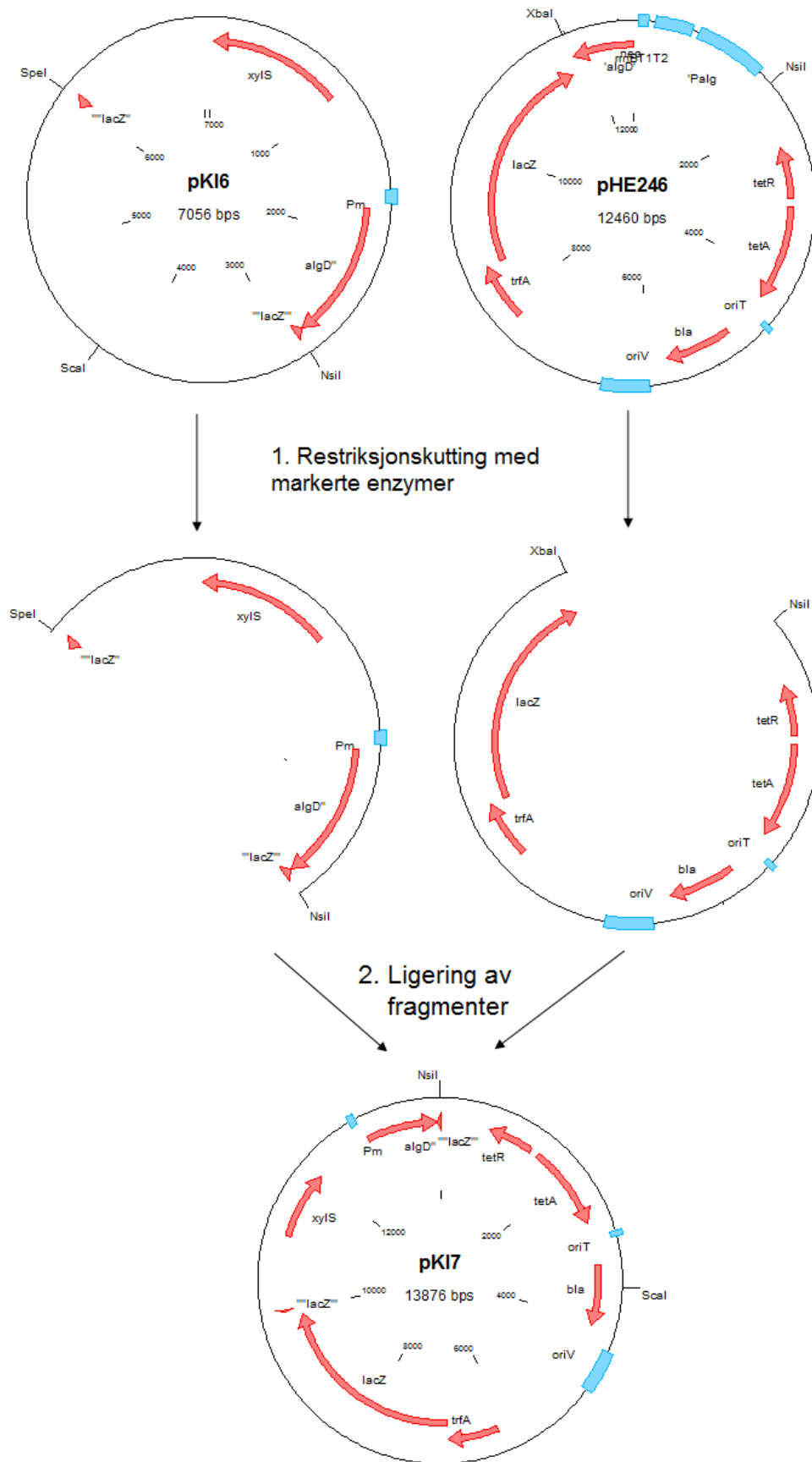
pHE246 har TrfA-avhengig replikasjon fra *oriV*. Dette betyr at dersom verten ikke produserer TrfA vil ikke plasmidet kunne replikere og på den måten fjernes ved at nye datterceller ikke får tilført plasmidet. Andre RK2 baserte vektorer (ikke suicide) inneholder selv genet for TrfA og kan derfor replikere i vertceller uten dette proteinet. Figur 3-17 viser en skjematisk fremstilling av flyttingen av PalgD-Pm/xylS-algD fra pKI6 til pHE246.

Restriksjonsenzymmer ble valgt slik at et enzym kuttet i pKI6 oppstrøms for PalgD og et annet nedstrøms for algD. De samme enzymene måtte også kutte på hver sin side av PalgD og algD som var i pHE246 fra før. Til dette ble enzymene SpeI, XbaI og NsiI valgt. pKI6 ble kuttet med SpeI, NsiI og ScaI, og pHE246 ble kuttet med XbaI og NsiI. Fragmentene ble separert ved gelelektroforese (Figur 3-18) og båndene tilsvarende 3,9 kb fra pKI6 og 10,0 kb fra pHE246 ble rensset fra gelen og ligert sammen (Figur 3-17).

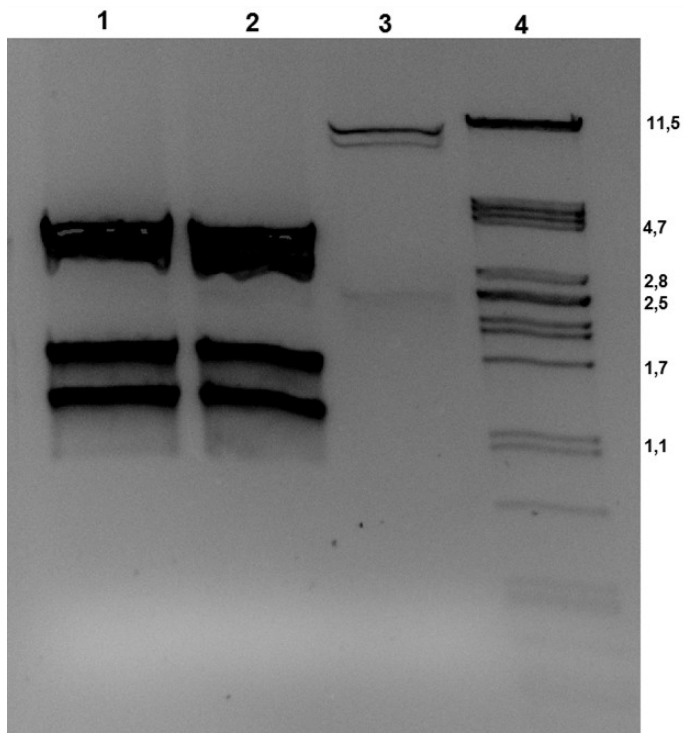
Ligeringsblandningene ble transformert til *E. coli* S17.1, en stamme som har en kopi av *trfA* på kromosomet, og plattet ut på LA med 200 µg/µl Am og 10 µg/µl Tc. Se 2.15.1 for protokoll. Det vokste opp 6 kolonier på platen med konsentrert kultur, ingen på den andre. Alle koloniene ble plukket for kontroll av plasmid, se kap. 2.16.

Plasmid ble isolert fra 10 mL kultur og kuttet med ScaI og NsiI. Som en kontroll på kuttingen ble pKI6 kuttet med de samme enzymene. Resultatet av gelelektroforesen (Figur 3-19) viste fragmenter av ulike størrelser. De forventede lengdene for pKI7 var 10,3 og 3,5 kb. Prøvene i både brønn 2 og 3 ser ut til å ha disse to båndene. Det ble valgt å gå videre med prøven i brønn 3 på bakgrunn av at intensiteten på båndet indikerte en større DNA mengden i denne prøven. Dette plasmidet ble kalt pKI7.

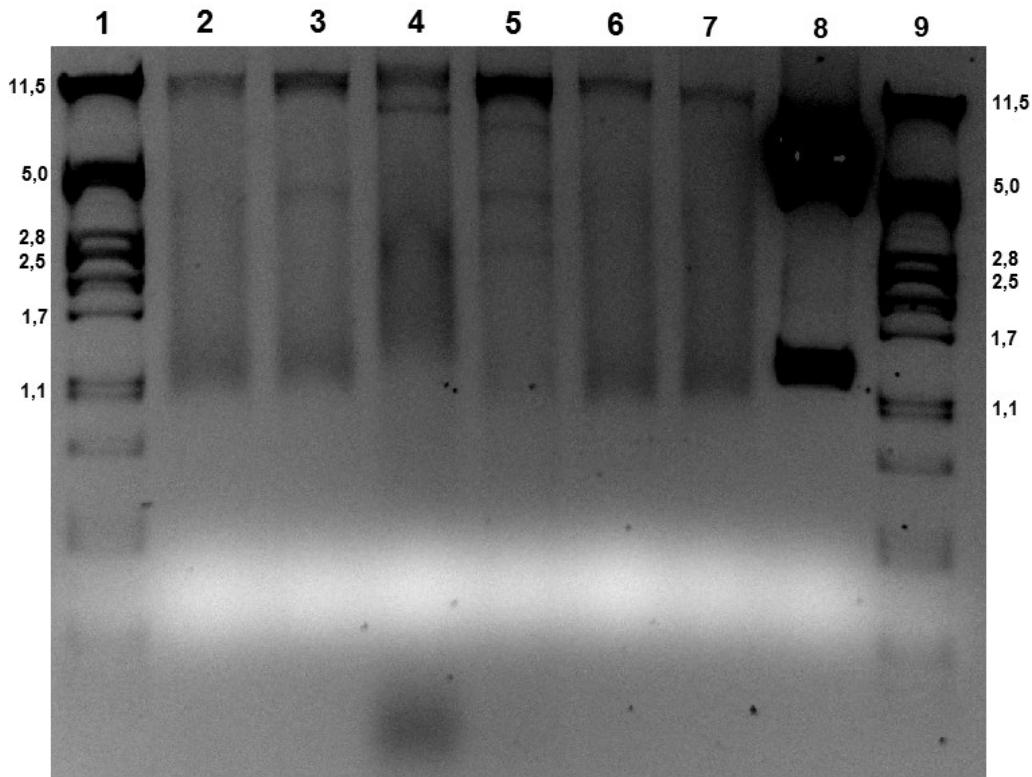
Prøven i brønn 4 ser ut som den har tre fragmenter. Det stemmer ikke overens med det forventet for verken pKI6, pHE246 eller pKI7 kuttet med ScaI og NsiI. I brønn 5 er det fire bånd. Det ser ut som den har båndene forventet for pKI7, men også to til, et på mellom 5,0 og 11,5 kb og ett på ca. 2,5 kb. Dette stemmer heller ikke med noen av de forventede lengdene. Prøvene i brønn 6 og 7 ser akkurat like ut. De har ett bånd på rundt 11,5 kb. Dette kan skyldes dårlig kutting slik at dette er et helt plasmid. Sannsynligvis er det pHE246 ettersom dette plasmidet har en størrelse på 10,0 kb etter fjerning av fragmentet med PalgD og algD og 12,5 kb før kuttingen (Figur 3-18 og Figur 3-17). I brønn 8 var prøven pKI6 kuttet med de samme enzymene. Her var lengdene som forventet.



Figur 3-17 Restriksjonskutting og ligering av pKI6 og pHE246 til å gi plasmidet pKI7.



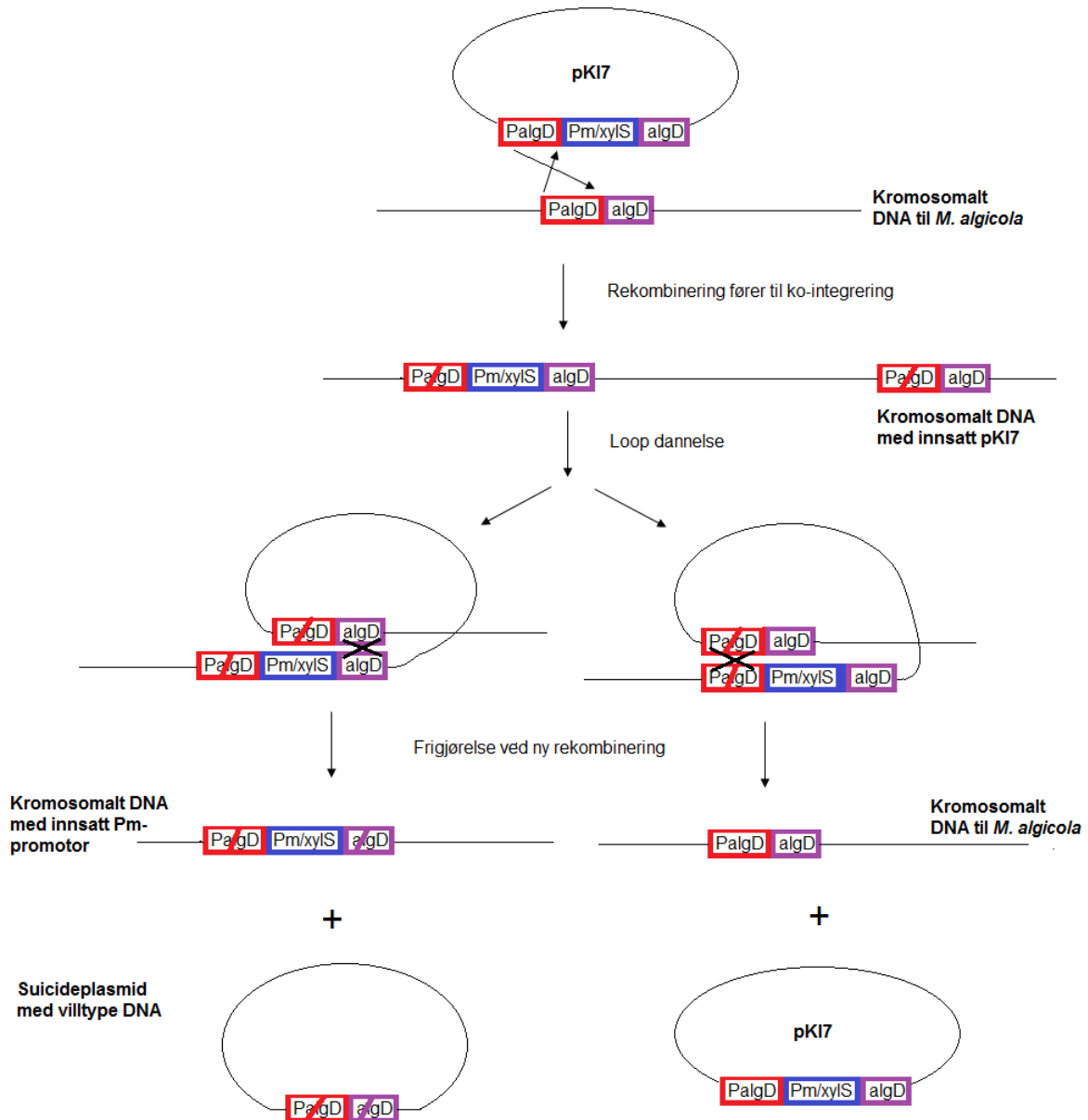
Figur 3-18 Separering av fragmenter fra pKI6 og pHE246 kuttet med hhv. SpeI + NsiI + ScaI og XbaI + NsiI. Brønn 1 og 2: pKI6, brønn 3: pHE246, brønn 4: ladder (λ -DNA PstI). Tallene på siden indikerer lengder i kb. Forventede lengder var på 3,9 + 1,7 + 1,4 kb for pKI6 og 10,0 + 2,5 kb for pHE246.



Figur 3-19 Verifisering av pKI7. Brønn 1 og 9: ladder (λ -DNA PstI), brønn 2-7: prøve 1-6 kuttet med ScaI og NsiI, brønn 8: pKI6 kuttet med ScaI og NsiI. Tallene på siden indikerer lengder i kb. Forventet lengder: pKI6, 5,7 + 1,4 kb; pHE246, 6,4 + 3,5 + 1,9 + 0,6 kb; pKI7, 10,3 + 3,5 kb.

Konjugering og homolog rekombinering:

pKI7 inneholder *Pm*-promotoren flankert av to sekvenser som er homologe til sekvens oppstrøms for alginatklyngen i *M. algicola* og første genet i klyngen, *algD*. Dette gjør det mulig for homolog rekombinering mellom genomet til *M. algicola* og pKI7. Figur 3-20 viser en skjematisk oversikt over rekombineringen.



Figur 3-20 Homolog rekombinering mellom kromosomt DNA til *M. algicola* og pKI7. *PalgD* og *algD* sekvensene er homologe slik at det kan forekomme rekombinering mellom dem. Første rekombinering vil føre til integrering av pKI7 i genomet til *M. algicola*. En ny rekombinering vil enten føre til frigjørelse av pKI7 med deleksjon i *Pm/xyIS*, som da er satt inn i *M. algicola*, eller til frigjørelse av pKI7 med *Pm/xyIS* dersom rekombineringen skjer mellom de samme sekvensene begge gangene. [77]

Først ble pKI7 overført fra *E. coli* S17.1 til *M. algicola*. Påvist transformant av *E. coli* S17.1 med pKI7 ble brukt til konjugering av pKI7 til en KmR stamme av *M. algicola*. Fremgangsmåten er beskrevet i kap. 2.15.3. For å selektere for transkonjuganter ble det platet ut på LA med Tc, Km og X-Gal + IPTG. Se Tabell 3-21 for full oversikt over hvilke fortyninger som ble platet ut på de ulike platene.

Etter 2 dager inkubering ble kolonier på platene telt (se Tabell 3-21). Det ble ikke observert noen vekst på LA med Km, Tc og X-Gal+IPTG. Disse ble derfor inkubert videre. Etter 5 dager inkubering ble det funnet en blå koloni på 10^{-1} fortyning. Denne kolonien ble kontrollert ved PCR ved bruk av primerparene MaalgGF/R og MaalgLF/R. Resultatet (ikke vist) viste at kolonien ikke var *M. algicola*. Forsøket ble derfor avsluttet.

Tabell 3-21 Fortyninger av to bakteriekulturer platet ut på ulike antibiotika og vekst observert etter 2 døgn inkubering. En strek betyr at denne kombinasjonen ikke ble platet ut.

Antibiotika konsentrasjoner	Fortynninger	<i>M. algicola</i>	<i>M. algicola</i> + <i>E. coli</i>		
Ingen antibiotika	Ufortynnet	Slør	Slør		
	10^{-6}	>>500	>500		
	10^{-7}	>500	74		
100 µg/mL Km	Ufortynnet	Slør	Slør		
	10^{-6}	>500	~500		
	10^{-7}	>500	53		
100 µg/mL Km + 10 µg/mL Ttc + X- Gal + IPTG	Ufortynnet	0	0		
	10^{-1}	-	0	0	0
	10^{-2}	-	0	0	0
	10^{-3}	-	0	0	0

3.4 Heterolog ekspresjon av *algG* i *E. coli*

Heterolog ekspresjon vil si å uttrykke et gen for et protein i en celle som normalt ikke lager det angitte proteinet. For å finne ut om genene *algG* og *algL* i *M. algicola* faktisk koder for hhv. mannuronan C5-epimerase og lyase ble det forsøkt å sette disse inn i hver sin vektor med en induserbar promotor, transformere til *E. coli*, uttrykke proteinene og måle aktivitet.

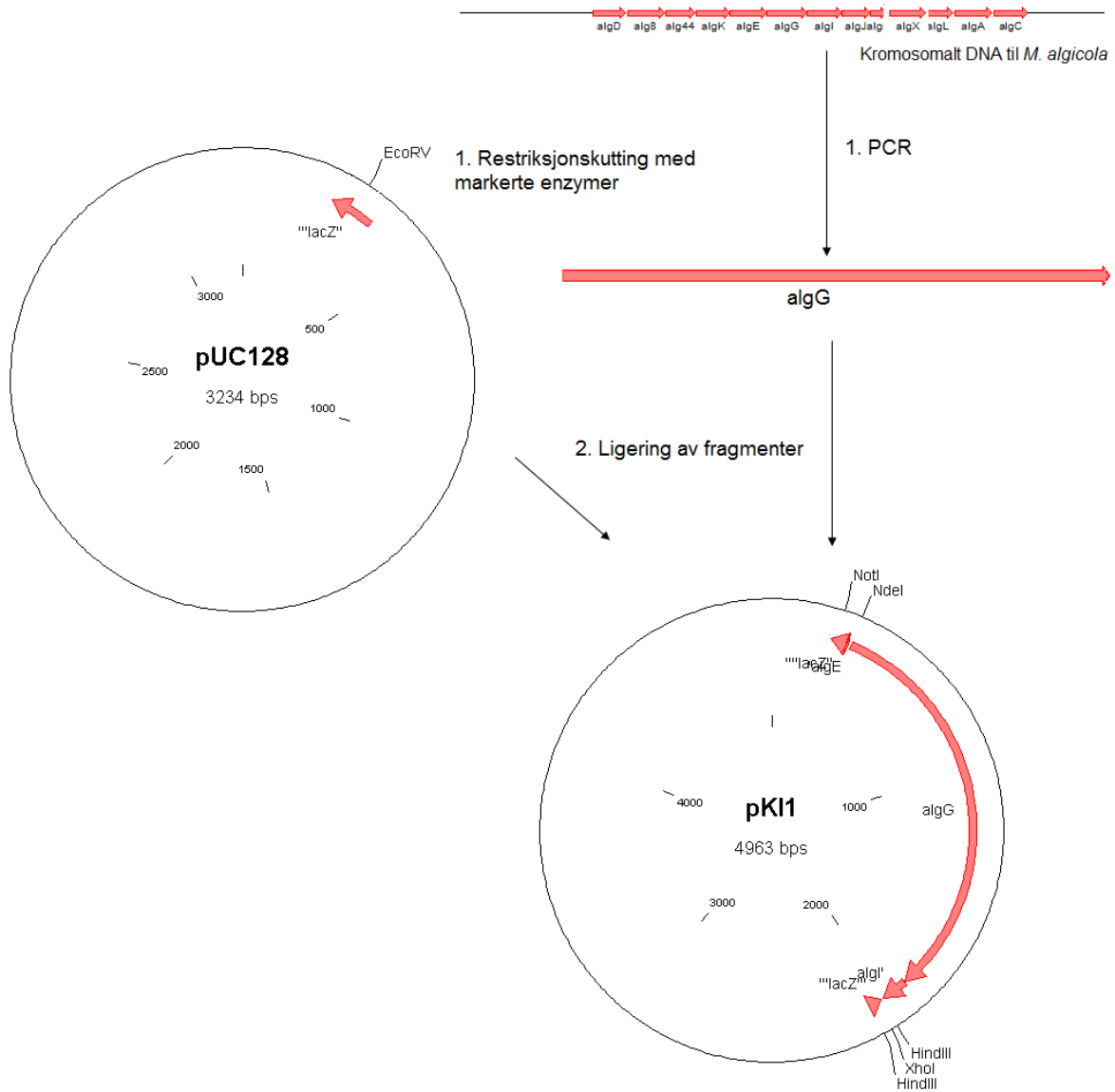
3.4.1 Kloning av *algG* inn i pUC128

For å uttrykke *algG* i *E. coli* var det nødvendig å sette *algG* inn i en vektor. pUC128 ble valgt til dette formålet. Figur 3-21 viser skjematisk hvordan *algG* ble satt inn i pUC128.

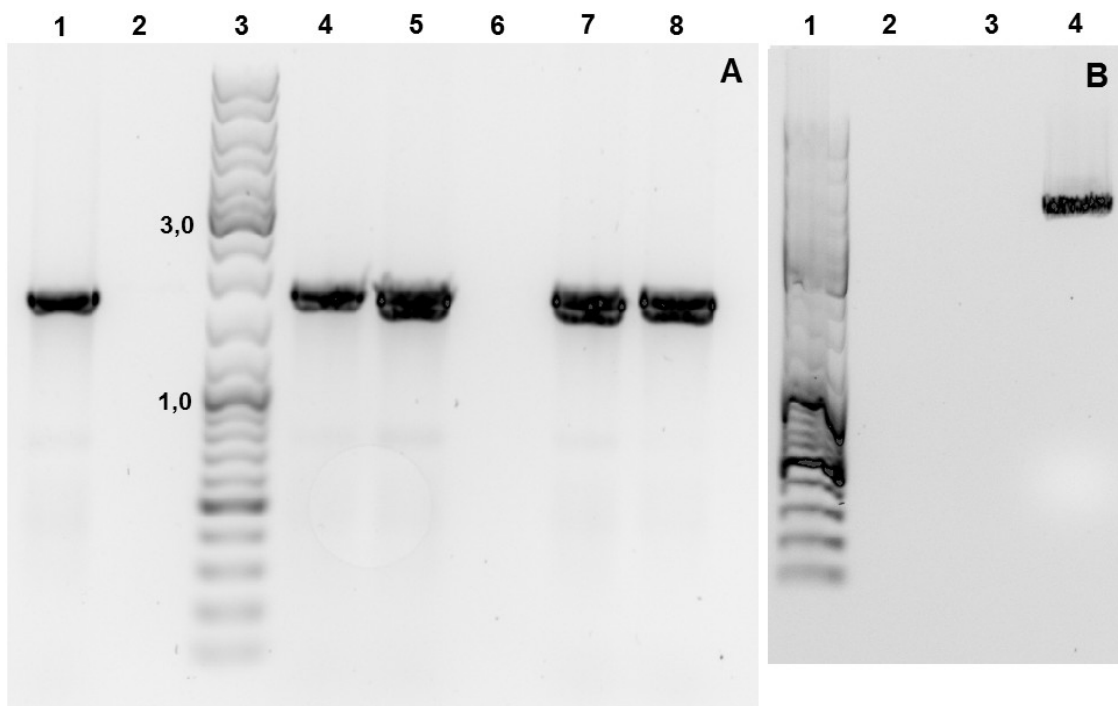
Først ble DNA fra *M. algicola* isolert. Deretter ble *algG* amplifisert ved bruk av PCR. Her ble primerparet MaalgGF/R benyttet (Tabell 2-6). Det ble kjørt en 50 µL reaksjon med ulike mengder DMSO (0 µL, 0,5 µL, 1,0 µL, 1,5 µL og 2,0 µL) og det ble brukt 50 °C som hybridiseringstemperatur. Se kap. 2.6 for fullstendig protokoll.

Gelelektroforese ble benyttet for å verifisere vellykket PCR. Her ble 5µL av produktet,

kalt PCRMaalgG, blandet med 5 μ L nukleasefritt vann og 1 μ L loading dye. Forventet lengde til PCR-fragmentet var på 1,7 kb. Resultatet (Figur 3-22 A) viste amplifisering av *algG* i alle reaksjonene. PCR produktene ble deretter renset i henhold til protokoll i kap. 2.8



Figur 3-21 Ligering av pUC128 og *algG* til å gi plasmidet pKI1.

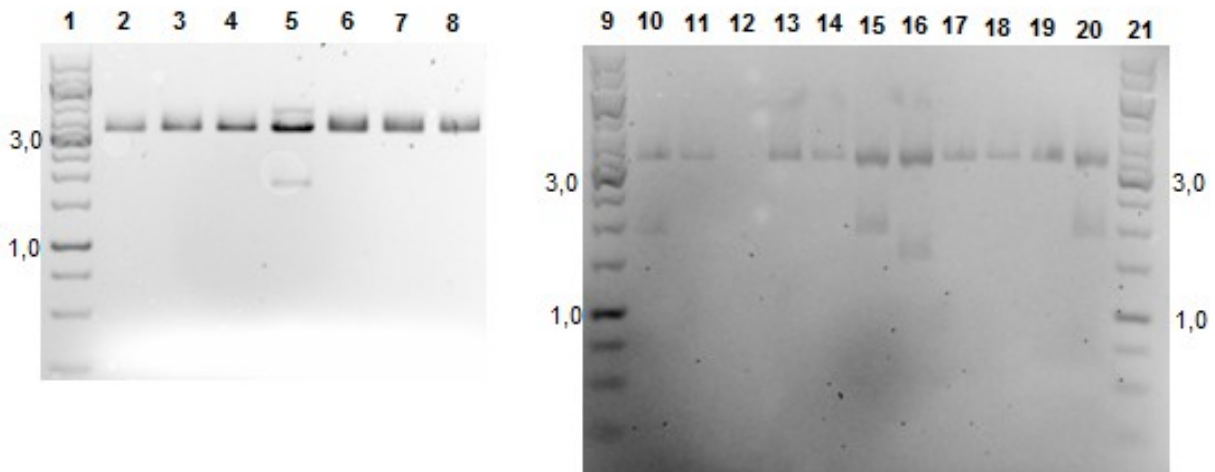


Figur 3-22 PCRMaalgG og pUC128. A) Ladder (GeneRuler DNA Ladder Mix) og produkter fra PCR av *algG* er synlig. Brønn 2 og 6 er ikke tilsatt prøve. DMSO mengder: brønn 1, 0 μ L; brønn 4, 0,5 μ L; brønn 5, 1,0 μ L; brønn 7, 1,5 μ L og brønn 8, 2,0 μ L. B) Lineærisert pUC128 er vist sammen med ladder (GeneRuler DNA Ladder Mix). Brønn 2 og 3 er ikke tilsatt prøve. Tallene ved ladder indikerer antall baser i kb.

Plasmidet pUC128 ble isolert fra *E. coli* DH5 α og kuttet med EcoRV. 200 μ g/mL Am var tilsatt i mediet under dyrkingen. Gelelektroforese ble benyttet for å sjekke om kuttingen var vellykket. Et bånd på 3,2 kb var forventet og ble funnet, se Figur 3-22B. Lineærisert plasmid ble isolert fra gelen (kap. 2.12).

Renset PCRMaalgG ble ligert inn i pUC128 til å gi plasmidet pK11 (Figur 3-21). Ligeringsmiksen ble heat-shock transformert til *E. coli* DH5 α og platet ut på 200 μ g/mL Am og X-gal + IPTG. Resultatet viste blå kolonier på kontroll-platen med *E. coli* transformert med pUC128 og hvite kolonier på platene transformert med pK11.

Transformanter ble plukket for kontrollering av plasmid og isolerte plasmid ble kuttet med NotI og XhoI. Fragmentene ble separert ved gelelektroforese (Figur 3-23). Av de isolerte plasmidene ble det gått videre med de fra brønn 5, 10, 15, 16 og 20 i Figur 3-23.



Figur 3-23 Verifisering av pKI1. Brønn 1, 9 og 21: ladder (GeneRuler 1 kb DNA Ladder), brønn 2-8 10, 11 og 13-20: kandidater til pKI1 kuttet med NotI og XhoI. Brønn 12: ikke tilsatt prøve. Tallene på sidene indikerer antall baser i kb. Forventede lengder var 3,2 og 1,8 kb for pKI1 og 3,2 og 0,07 kb for religert pUC128.

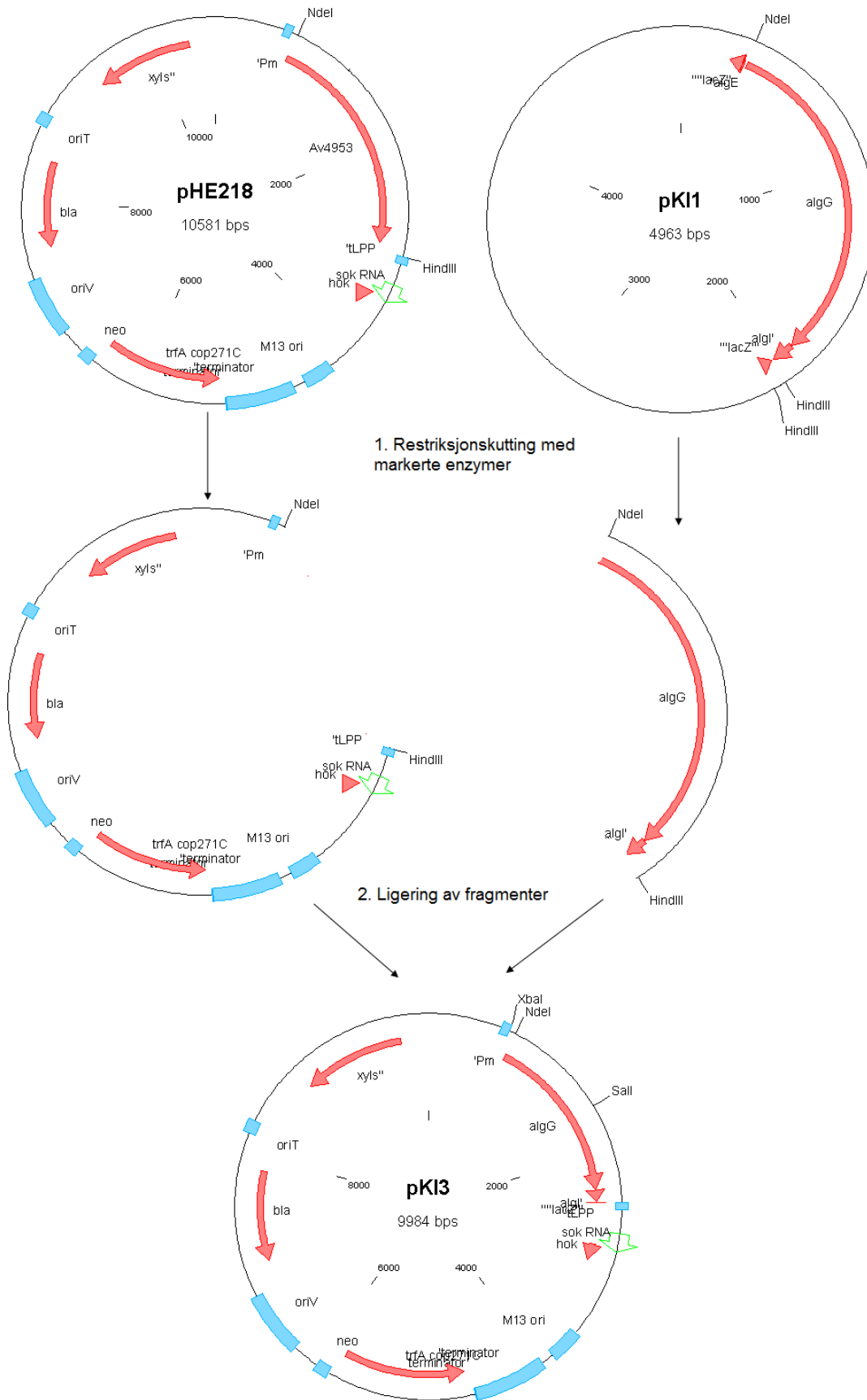
3.4.2 Sekvensering av pKI1

De isolerte plasmidene som etter kutting og gelelektroforese var kandidater til pKI1 ble sekvensert ved bruk av BigDye-prosedyren (se 2.17.1). Dette for å sikre at det ikke var noen mutasjoner i *algG* genet som ble brukt videre, i tillegg til å sjekke orientering av genet i plasmidet. Nanodrop ble brukt til å måle mengde DNA i prøvene som ble sekvensert. Der DNA mengden var stor nok ble det benyttet 300 ng plasmid DNA. Hvis konsentrasjonen ikke var høy nok ble det brukt 11 μ L plasmid DNA og 0 μ L SIV. Primere brukt var M13F/R (Tabell 2-6).

Resultatene ble sammenlignet med faktiske sekvenser til *algG*. Der hvor sekvenser fra ulike primere overlappet, ble det antatt at sekvensert sekvens var lik målsekvensen dersom den ene sekvensen var korrekt. Det ble funnet en sekvens som var identisk. Dette plasmidet ble kalt pKI1. I Vedlegg E er sekvenssammenligningen vist for plasmidet det ble valgt å gå videre med.

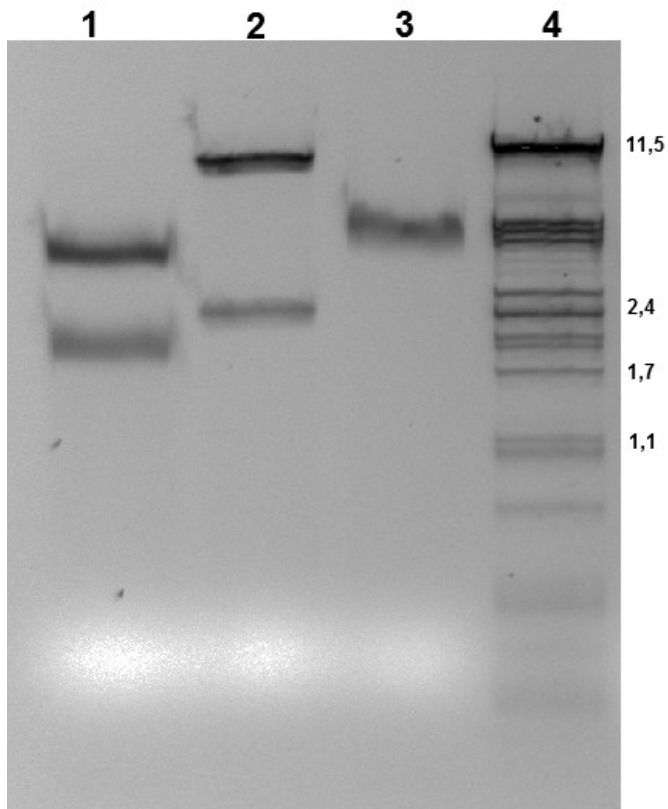
3.4.3 Kloning av *algG* fra pKI1 til ekspresjonsvektor pHE218

For å senere kunne styre uttrykk av *algG* ble det valgt å sette genet under kontroll av *Pm*-promotoren, i dette tilfellet i plasmidet pHE218. Grunnen til at genet ikke ble satt direkte inn i pHE218 var for å sikre rett orientering i forhold til *Pm*-promotoren. Ved først å sette genene inn i pUC128 kunne orienteringen velges ved å kutte med like par av restriksjonszymer (dvs. kutte begge plasmidene med enzym A og B). Figur 3-24 viser en skjematisk oversikt over utbyggingen av *algB* fra *A. vinelandii* i pHE218 med *algG* fra pKI1.



Figur 3-24 Ligering av *algG* fra pKI1 inn i pHE218 til å gi plasmidet pKI3.

Først ble pKI1 og pHE218 kuttet med de samme enzymene (NdeI og HindIII). Som kontroll ble også pUC128 kuttet med NdeI og HindIII. Fragmentene ble separert ved gelelektroforese (Figur 3-25) og DNA-fragmentene tilsvarende 1,7 kb fra pKI1 og 8,3 kb fra pHE218 ble deretter kuttet ut av gelen og renset (kap. 2.12). Fragmentene ble ligert og RbCl-kompetente *E. coli* DH5 α celler ble transformert med ligeringsmiksen. LA med 200 μ g/mL Am ble brukt til seleksjon.

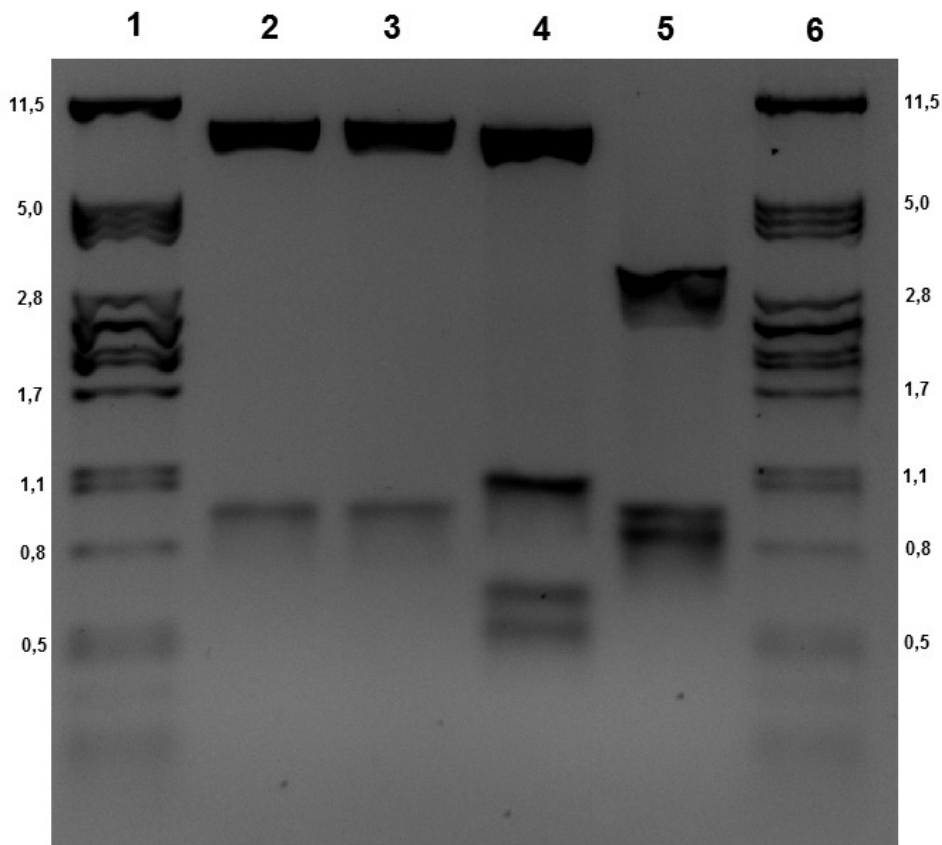


Figur 3-25 Separering av fragmenter fra pKI1, pHE218 og pUC128 kuttet med NdeI og HindIII.

Brønn 1: pKI1, brønn 2: pHE218, brønn 3: pUC128, brønn 4: ladder (λ -DNA PstI). Tallene på siden indikerer fragmentlengde i kb. Forventede lengder for pKI1 var på 3,2 + 1,7 + 0,05 kb, for pHE218 8,3 + 2,3 kb og for pUC128 var det 3,2 + 0,05 kb.

Resultatet ga 464 kolonier på plate med ukonsentrert kultur og over 500 på konsentrert plate. Plate med negativ kontroll hadde ingen vekst, positiv kontroll hadde vekst tilnærmet lik forsøks-platene.

Det ble plukket 4 transformanter for kontrollering av plasmidet. Isolerte plasmid ble kuttet med XbaI og Sall. Gelelektroforese ble brukt til å separere fragmentene (Figur 3-26, kun to av fire transformanter er vist). Valgte ut plasmidet i brønn 2 i Figur 3-26 og kalte det pKI3.



Figur 3-26 Verifisering av pKI3. Brønn 1 og 6: ladder (λ -DNA PstI), brønn 2 og 3: pKI3-kandidater kuttet med XbaI og Sall, brønn 4: pHE218 kuttet med XbaI og Sall, brønn 5: pKI1 kuttet med XbaI og Sall. Tallene på sidene indikerer fragmentlengde i kb. Forventet lengder: pKI1, 3,1 + 0,9 + 0,8 kb; pKI3, 9,0 + 0,9 kb; pHE218, 8,5 + 1,0 + 0,6 + 0,5 kb; pUC128, 3,2 + 0,06 kb.

3.4.4 Måling av aktiviteten til AlgG

E. coli DH5 α som inneholdt verifisert pKI3 ble dyrket opp i 10 mL LB 200 μ g/mL Am. Dagen etter ble 1 % forkultur inokulert i 100 mL LB 200 μ g/mL. Etter 3 timer inkubering ble OD₆₀₀ ble målt til 0,366 og *m*-toluat tilsatt til 0,5 mM. Inkubering ble fortsatt til totalt 8 timer inkubering. OD₆₀₀ ble målt til 0,740 og cellene ble høstet ved 8000 rpm i 15 min. Supernatant ble fjernet og pellet ble fryst ned.

Neste dag ble pelleten resuspendert i 10 mL kald buffer (50 mM Tris [pH 7,5]). Løsningen ble sonikert ved bruk av TM spiss, 20 % Cycle duty og 7 Output Control i 10 min. Deretter ble det sentrifugert ved 15 000 rpm og 4 °C i 30 min. Supernatanten ble filtrert og kalt algG-rækstrakt.

1 μ L algG-rækstrakt og 50 μ L algG-rækstrakt ble blandet med 150 μ L 50 mM Tris i 96-brønns plate. OD₂₃₀ ble målt til hhv. 0,18 og >1,0. Dette ble gjort for å se hvor høy absorbans rækstraktet i seg selv hadde. Ettersom 50 μ L ga høy absorbans ble det valgt å bruke 1 μ L til epimerase assay (se 2.20.2). Det ble satt opp et assay med 7 ulike prøver. En prøve uten salt, to med hver av saltene NaCl, CaCl₂ og MgCl₂. For alle tre salttypene var det en prøve med 0,5 M og en med 1,0 M.

Målingene av absorbans etter en time ga Abs2 minus Abs1 tilnærmet lik null for alle prøvene. Det ble målt igjen en gang senere på dagen og morgen dagen etter. Abs2 minus Abs1 var fortsatt tilnærmet lik null for alle prøvene. Resultatet (ikke vist) viste med andre ord ingen epimerase aktivitet.

3.4.5 Proteingel med AlgG

Ettersom det ikke ble funnet noen epimerase aktivitet ble det utført SDS-PAGE for å verifisere proteinuttrykk. pMV23 ble brukt som kontroll. Ettersom proteinene kan være både løselig og uløselige ble det kjørt SDS-PAGE på både sonikert prøve (usentrifugert og ufiltrert) og på ræktrakt.

Til proteingel ble det inokulert 1 % *E. coli* RV308 pMV23 i 50 mL 3x LB med 200 µg/mL Am og 1% *E. coli* DH5α pKI3 i 50 mL 3x LB med 200 µg/mL Am. Etter 6 timer inkubering ble OD₆₀₀ målt (Tabell 3-22) og *m*-toluat tilsatt til 0,5 mM. Inkubering ble fortsatt til totalt 9 timer inkubering. OD₆₀₀ ble målt på nytt (Tabell 3-22), og cellene ble høstet ved 8000 rpm i 15 min. Supernatant ble fjernet og pellet ble fryst ned.

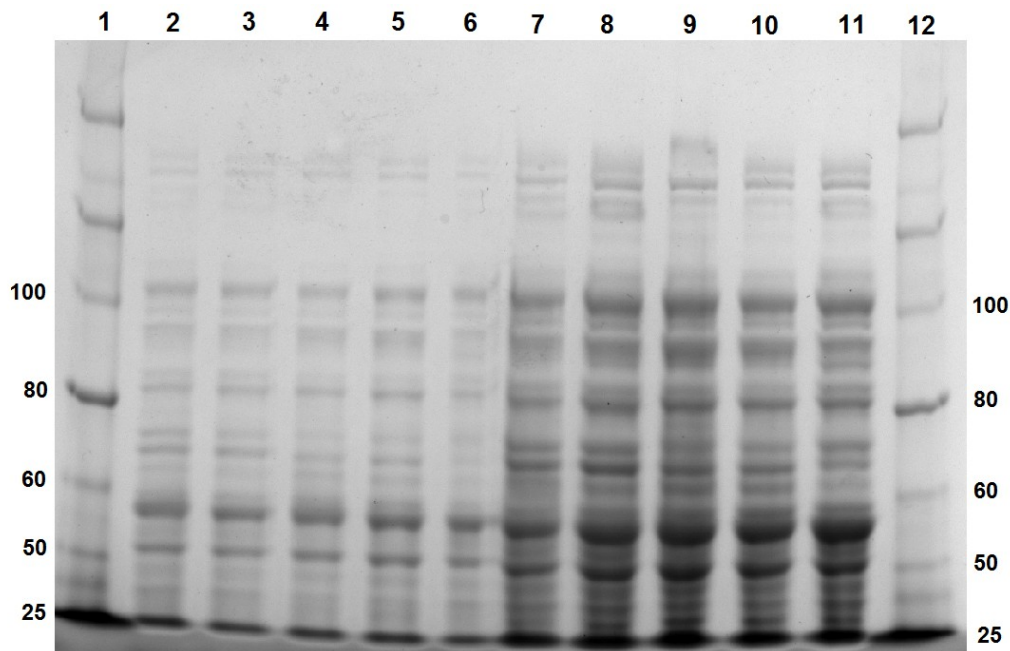
Tabell 3-22 OD målt ved 600 nm ved to forskjellige tidspunkt.

Bakteriekultur	OD ₆₀₀ ved tilsetning av <i>m</i> -toluat	OD ₆₀₀ ved høsting
<i>E. coli</i> RV308 pMV23	6,640	7,680
<i>E. coli</i> DH5α pKI3	4,928	6,860

Neste dag ble pelletene resuspendert i 5 mL kald buffer (50 mM Tris [pH 7,5]). Løsningen ble sonikert ved bruk av TM spiss, 30 % Cycle duty og 5 Output Control i 10 min. 4 mL av hver ble deretter sentrifugert ved 15 000 rpm og 4 °C i 30 min. Supernatantene ble filtrert og kalt algG-rækstrakt og pMV-rækstrakt. Resten (usentrifugert og ufiltrert) ble kalt algG-usent og pMV-usent. Prøvene ble blandet iht. Tabell 3-23 og separert på SDS-PAGE som beskrevet i kap. 2.21. Forventet størrelse på AlgG var 59,1 kDa. Av resultatet (Figur 3-27) er det ikke mulig å se at AlgG blir uttrykt. Kodonbruk i AlgG versus kodonbruk i *E. coli* ble derfor sjekket, men det var ingen store forskjeller.

Tabell 3-23 Mengder prøve, SIV og buffer blandet til SDS-PAGE.

Prøve	Mengde prøve (µL)	Volum SIV (µL)	Volum buffer 4x (µL)	Totalt (µL)
algG-rækstrakt, algG-usent, pMV-rækstrakt, pMV-usent og algL-rækstrakt	5	6,3	3,7	15
	1	9,3		
Standard	5	6,3		



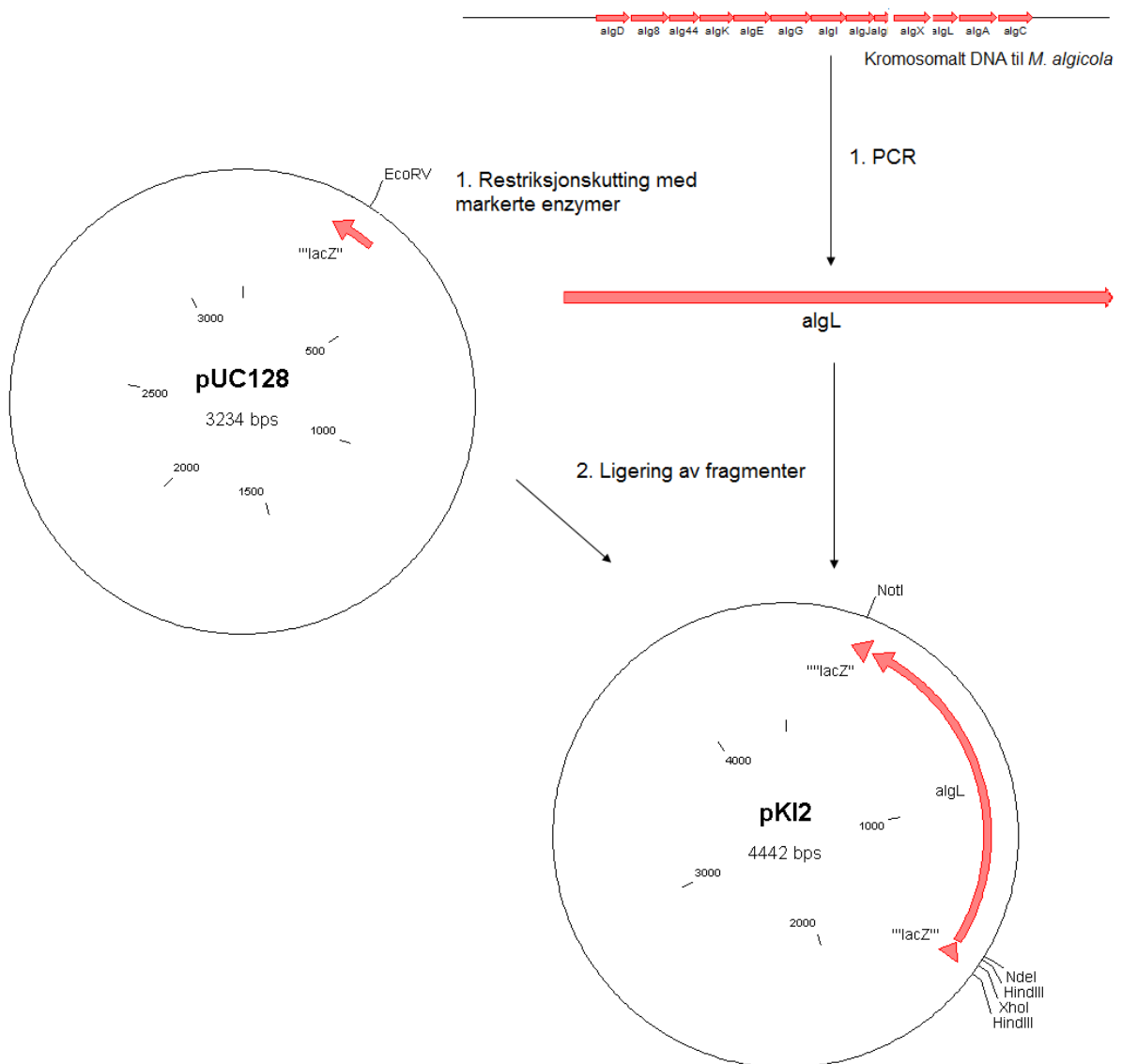
Figur 3-27 Proteingel av AlgG og AlgL. Brønn 1 og 12: Standard (Prestained Protein Ladder, Broad Range, NEB), brønn 2 og 7: algG-uset (1 μ L og 5 μ L), brønn 3 og 8: algG-råekstrakt (1 μ L og 5 μ L), brønn 4 og 9: pMV-uset (1 μ L og 5 μ L), brønn 5 og 10: pMV-råekstrakt (1 μ L og 5 μ L), brønn 6 og 11: 1 algL-råekstrakt (1 μ L og 5 μ L). Tallene på siden indikerer proteinstørrelse i kDa.

3.5 Heterolog ekspresjon av *algL* i *E. coli*

3.5.1 Kloning av *algL* inn i pUC128

For å uttrykke *algL* i *E. coli* var det nødvendig å sette *algL* inn i en vektor. Det ble valgt å sette genene inn i pUC128 for deretter å flytte det til pHE218. Figur 3-28 viser skjematisk hvordan *algL* ble satt inn i pUC128.

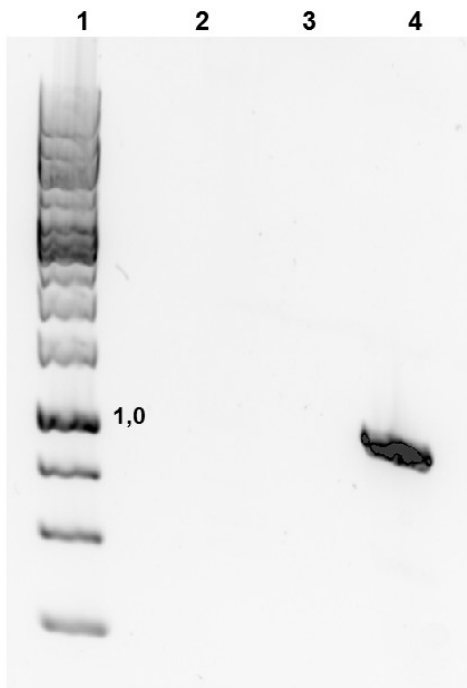
Først ble DNA fra *M. algicola* isolert. Deretter ble primerparet MaalgLF/R brukt for amplifisering av *algL* ved PCR. Det ble kjørt en 50 μ L reaksjon uten DMSO og det ble brukt 55 °C under hybridiseringstrinnet. Se kap. 2.6 for protokoll. Gelelektroforese ble benyttet for å verifisere vellykket PCR (Figur 3-29). 5 μ L av produktet, kalt PCRMaalgL, ble blandet med 5 μ L nukleasefritt vann og 1 μ L loading dye. Forventet lengde til PCR-fragmentet var på 1,2 kb. PCR produktet ble rensset fra gel i henhold til protokoll i kap. 2.8.



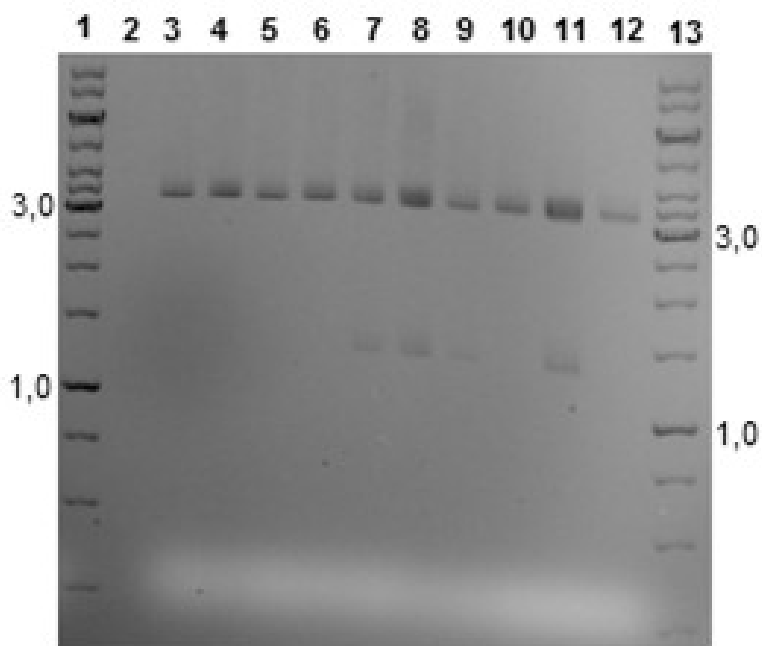
Figur 3-28 Ligering av pUC128 og *algL* til å gi plasmidet pKI2.

Renset PCRMaalgL ble ligert inn i plasmidet pUC128 kuttet med EcoRV (samme som for *algG*) til å gi plasmidet pKI2 (Figur 3-28). Ligeringsmiksen ble heat-shock transformert til *E. coli* DH5 α og platet ut på 200 μ g/mL Am og X-gal + IPTG. Som for *algG*, viste resultatene blå kolonier på kontroll-platen (*E. coli* transformert med pUC128) og hvite kolonier på platene transformert med pKI2.

Hvite transformanter ble plukket for kontrollering av plasmidet. Det ble kuttet med NotI og XhoI for å verifisere korrekt plasmid. Fragmentene ble deretter separert ved gelelektroforese (Figur 3-30). Det ble gått videre med plasmidene i brønn 7, 8, 9 og 11.



Figur 3-29 Verifisering av PCRMaalgL. PCR produkt av *algL* er vist sammen med ladder (GeneRuler 1kb DNA Ladder). Brønn 2 og 3 er ikke tilsatt prøve.



Figur 3-30 Verifisering av pKI2. Brønn 1 og 13: ladder (GeneRuler 1 kb DNA Ladder),brønn 3-12: pKI2 kuttet med NotI og XhoI. Brønn 2: ikke tilsatt prøve. Tallene på sidene indikerer antall baser i kb. Forventede lengder var 3,2 + 0,07 kb for pUC128 og 3,2 + 1,3 kb for pKI2.

3.5.2 Sekvensering av pKI2

De isolerte plasmidene som etter kutting og gelelektroforese så ut til å være pKI2 ble sekvensert ved bruk av BigDye-prosedyren (se kap. 2.17.1). Dette for å sikre at det ikke var noen mutasjoner i *algL* genet som ble brukt videre, i tillegg til å sjekke orientering av genet i plasmidet. Nanodrop ble brukt til å måle mengde DNA i prøvene som ble sekvensert. Det ble benyttet 300 ng plasmid DNA (dersom det var mulig) eller 11 µL plasmid DNA og 0 µL SIV. Primere brukt var M13F/R (Tabell 2-6).

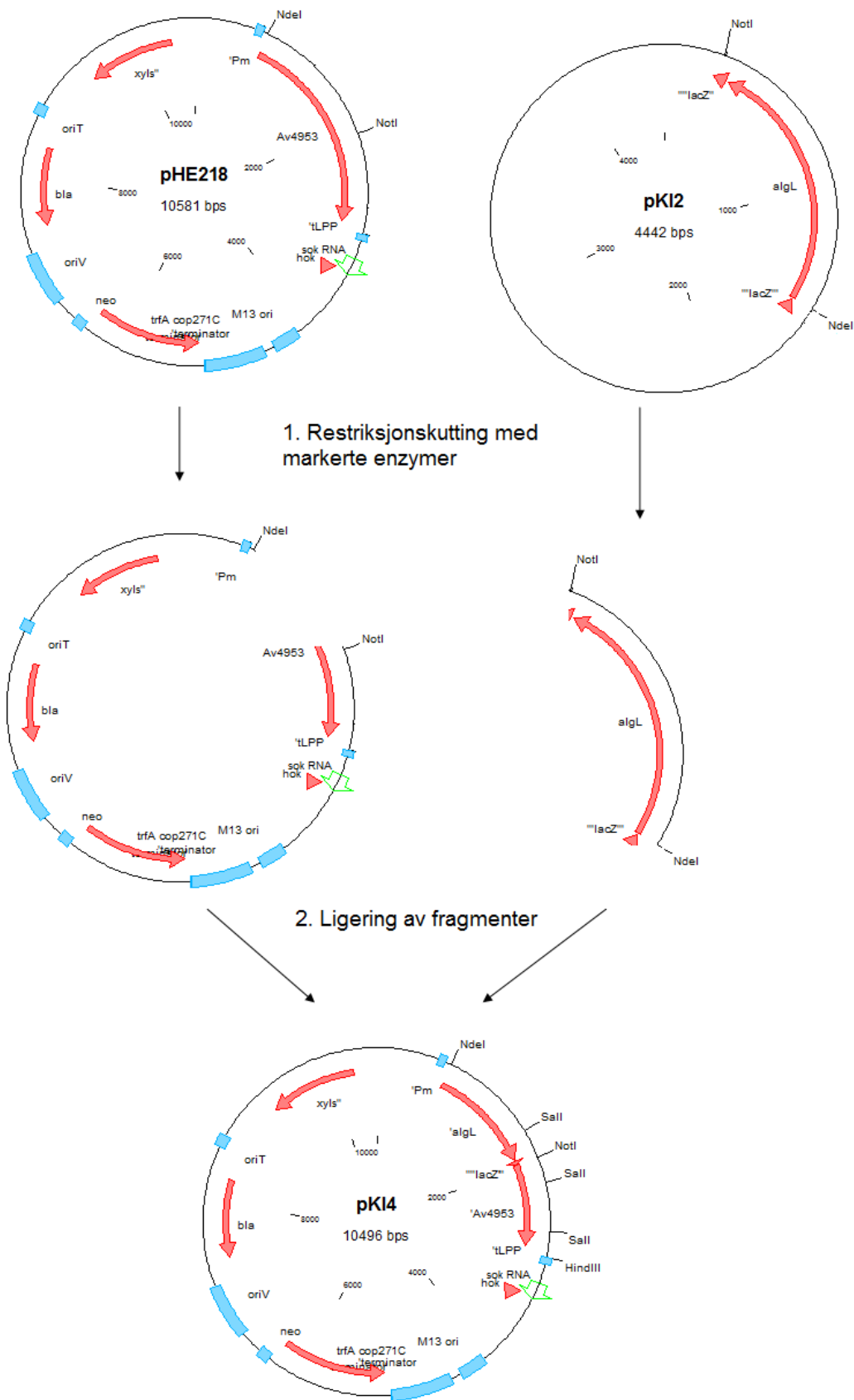
Resultatene ble sammenlignet med den faktiske sekvensen til *algL* og en sekvens som var identisk ble valgt ut. Dette plasmidet ble kalt pKI2. I Vedlegg E er sekvenssammenligningen vist for plasmidet som ble valgt til videre bruk. Der hvor sekvenser fra ulike primere overlappet, ble det antatt at sekvensert sekvens var lik målsekvensen dersom den ene sekvensen var korrekt.

3.5.3 Kloning av *algL* fra pKI2 til ekspresjonsvektor pHE218

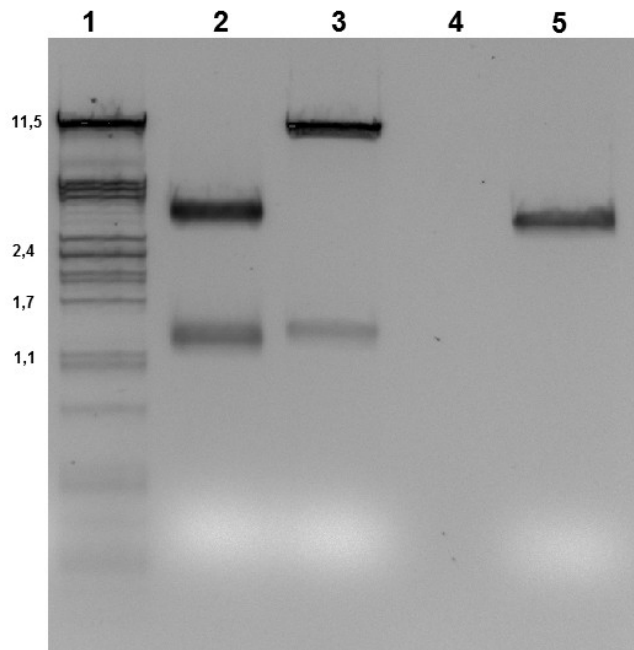
For å uttrykke *algL* ble det valgt å sette genet under kontroll av *Pm*-promotoren, i dette tilfellet i plasmidet pHE218. Grunnen til at genet ikke ble satt direkte inn i pHE218 var for å sikre rett orientering i forhold til *Pm*-promotoren. Ved først å sette genet inn i pUC128 kunne orienteringen velges ved å kutte med like par av restriksjonsenzymmer. Figur 3-31 viser en skjematisk oversikt over flyttingen av *algL* fra pKI2 til pHE218.

AlgL ble kuttet ut av pKI2 for å bli satt inn i ekspresjonsvektoren pHE218. Det ble kuttet med NdeI og NotI. pHE218 ble kuttet med de samme enzymene. Som kontroll ble pUC128 kuttet med de samme enzymene tatt med. Fragmentene ble separert på agarosegel (Figur 3-32). Båndene tilsvarende 1,2 kb fra pKI2 og 9,2 kb fra pHE218 ble rensset fra gelen (kap. 2.12) og ligert sammen (Figur 3-31).

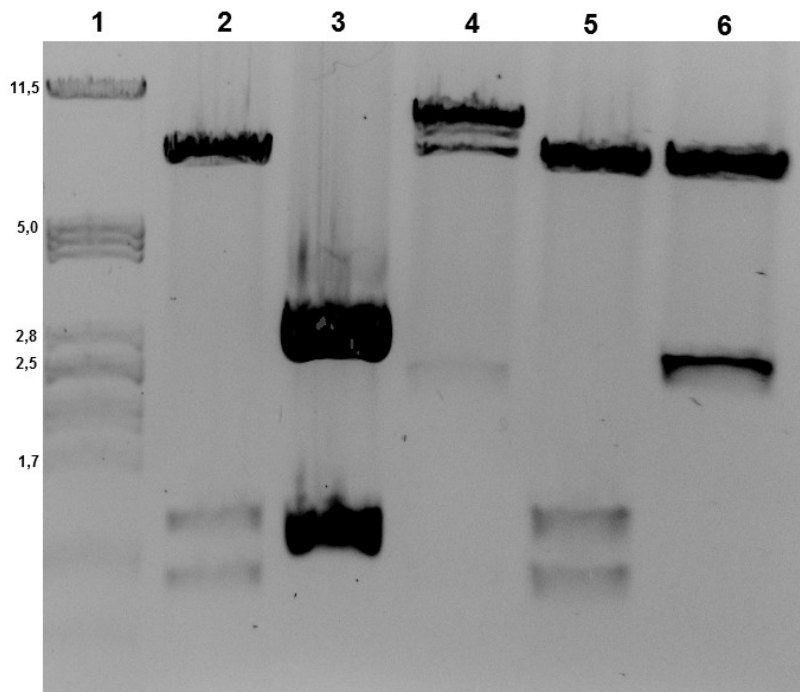
Ligeringsblandingen ble transformert til *E. coli* DH5α og platet ut på 200 µg/mL Am. Fire transformanter (A-D) ble plukket og dyrket opp for verifisering av plasmid. Det ble kuttet med HindIII og XbaI og utført gelelektroforese. Resultatet (Figur 3-33) viste at transformant A og D inneholdt korrekt plasmid. Plasmidet fra transformant D (brønn 5 i Figur 3-33) ble valgt til videre bruk og kalt pKI4.



Figur 3-31 Ligering av *algL* fra pKI2 inn i pHE218 til å gi plasmidet pKI4.



Figur 3-32 Separering av fragmenter fra pKI2, pHE218 og pUC128 kuttet med NdeI + NotI. Brønn 1: ladder (λ -DNA PstI), brønn 2: pKI2, brønn 3: pHE218, brønn 4: ikke tilsatt prøve, brønn 5: pUC128. Tallene på siden indikerer fragmentlengde i kb. Forventede lengder: pUC128, 3,2 kb; pKI2, 1,2 + 3,2; pHE218, 1,3 + 9,2 kb.



Figur 3-33 Separering av fragmenter fra pKI4 og pHE218 kuttet med HindIII og XbaI. Brønn 1: ladder (λ -DNA PstI), brønn 2-5: pKI4 A, B, C, og D, brønn 6: pHE218. Tallene på siden indikerer fragmentlengde i kb. Forventede lengder: pKI4, 8,2 + 1,3 + 0,9 kb; pKI2, 3,1 + 1,3 + 0,05 kb; pHE218, 8,2 + 2,4 kb; pUC128, 3,1 + 0,05 + 0,04 kb.

3.5.4 Måling av aktiviteten til AlgL

E. coli DH5 α som inneholdt verifisert pK14 ble dyrket opp i 10 mL LB 200 μ g/mL Am. Dagen etter ble 1 % forkultur inokulert i 500 mL LB 200 μ g/mL. Etter 6 timer inkubering ble OD₆₀₀ målt til 4,300 (20x fortytning målt til 0,125) og *m*-toluat tilsatt til 0,5 mM. Inkubering ble fortsatt til totalt 9 timer inkubering. OD₆₀₀ ble målt til 8,120 (40x fortytning målt til 0,203), og cellene ble høstet ved 8000 rpm i 15 min. Supernatant ble fjernet og pelleten ble fryst ned.

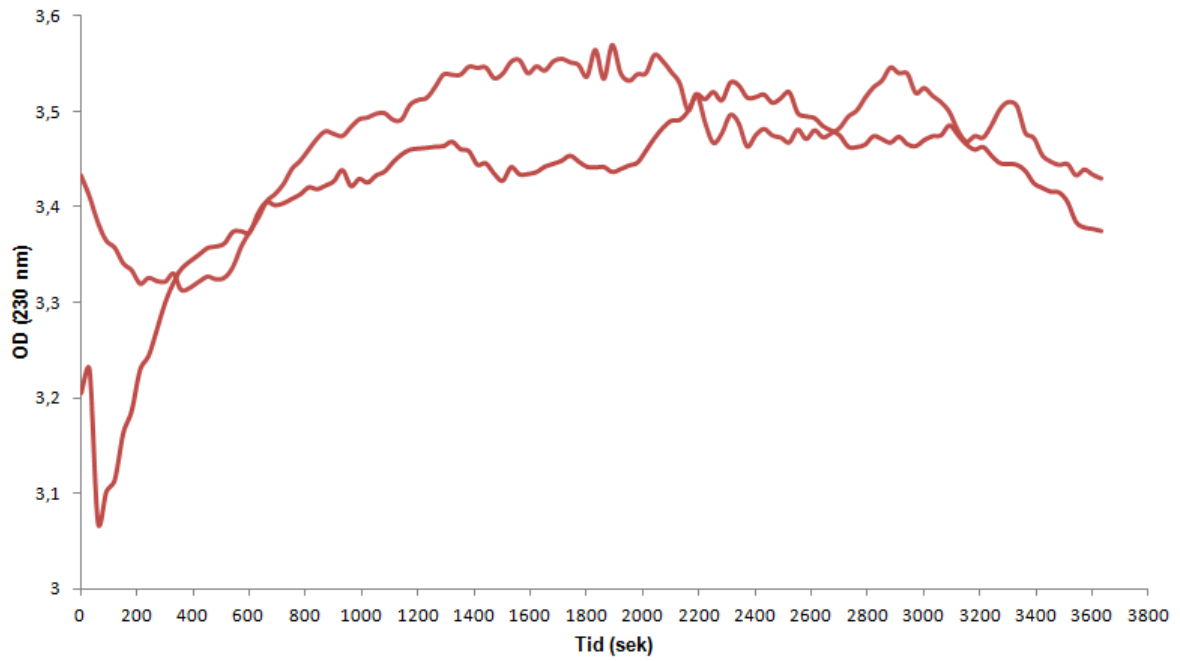
Neste dag ble pelleten resuspendert i 50 mL kald buffer (50 mM Tris [pH 7,5]). Løsningen ble fordelt på fire rør og sonikert ved bruk av TM spiss, 30 % Cycle duty og 5 Output Control i 10 min. Deretter ble det sentrifugert ved 15 000 rpm og 4 °C i 30 min. Supernatanten ble filtrert og kalt algL-rækstrakt.

Aktivitet ble målt i rækstraktet ved bruk av et lyaseassay (se kap. 2.20.1). Det ble brukt 3 ulike alginat, M-blokk, G-blokk og MG-blokk alginat. På grunn av en feil ble ikke konsentrasjonene av buffer, alginat, NaCl og enzym likt i alle prøvene. Sluttkonsentrasjonene for de forskjellige prøvene er derfor oppgitt i Tabell 3-24. Målingene ble startet raskt etter at mastermixen med enzymet var tilsatt til alginatet. Det ble målt hvert 30 sekund kontinuerlig i 1 time ved 230 nm.

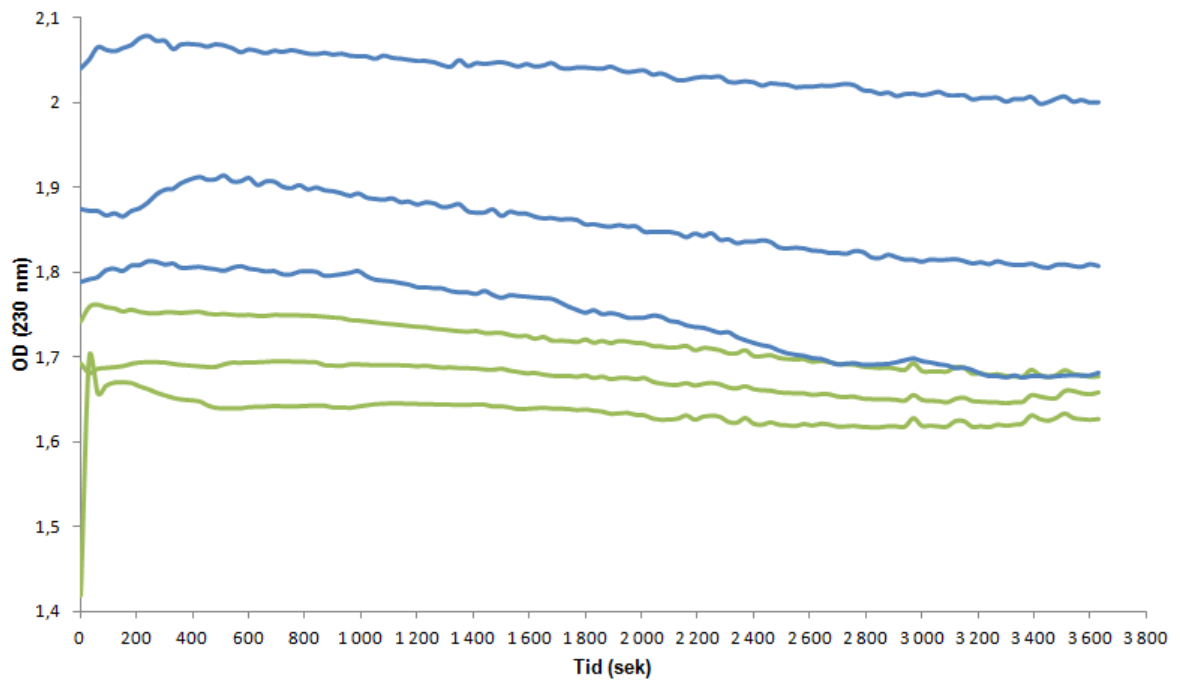
Tabell 3-24 Sluttkonsentrasjoner i brønnene ved måling av lyaseaktivitet.

	M-alginat (5 mg/mL) parallell 1 og 2	G-alginat (10 mg/mL) (parallell 1-3)	MG-alginat (10 mg/mL) (parallell 1-3)
Alginat	3,1 mg/mL	4 mg/mL	4 mg/mL
NaCl	156 mM	200 mM	200 mM
Tris	68,4 mM	50 mM	50 mM
Enzym/rækstrakt	8,75 μ L	5 μ L	5 μ L
Total mengde i brønnen	192 μ L	150 μ L	150 μ L

Resultatet viste en svak aktivitet for M-blokk (Figur 3-34), men ingen aktivitet for G- eller MG-blokk (Figur 3-35). For parallell 1 (M-blokk) er laveste OD-måling på 3,31 og høyeste på 3,57, mens for parallell 2 er tilsvarende hhv. 3,07 og 3,53. For parallell 1 tok det 25,5 min fra laveste til høyeste måling, mens for parallell 2 tok det 37,5 min.



Figur 3-34 Lyaseaktivitet på M-blokk alginat. To parallelle målinger av OD₂₃₀ målt over tid.



Figur 3-35 Lyaseaktivitet på G-blokk og MG-blokk alginat. Tre parallelle målinger av hver type alginat. OD₂₃₀ målt over tid. Blå grafer er MG-blokk paralleller, grønne grafer er G-blokk paralleller.

3.5.5 Rensing av AlgL og måling av aktivitet i fraksjonene

For å prøve å oppnå høyere aktivitet ble proteiner fra algL-råekstrakt separert ved bruk av kationebytter. 20 mL råekstrakt ble blandet med 20 mL buffer (50 mM Tris) og deretter satt på kolonnen. Fremgangsmåten beskrevet i kap. 2.22 ble fulgt.

Etter endt separasjon ble det kjørt et lyaseassay på alle fraksjonene sammen med råekstrakt, totalt 35 prøver. 5 µL av hver fraksjon ble tilsatt til 96-brønns platen. Deretter ble 100 µL av en blanding med 4 mg/mL alginat, 50 mM Tris og 200 mM NaCl tilsatt. Målingene ble startet raskt etter. Resultatene viste størst aktivitet i råekstraktet. De enkelte fraksjonene hadde svært liten eller ingen aktivitet og var ikke mulig å skille fra hverandre.

3.5.6 Proteingel med AlgL

Ettersom det ble funnet lite aktivitet av lyasen ble det utført SDS-PAGE for å sjekke uttryktet til proteinet. Det ble brukt algL-råekstrakt fra samme prøve som det ble målt aktivitet på (kap. 3.5.4). Dette forsøket ble gjennomført samtidig som proteingel med AlgG. Henviser derfor til kap. 3.4.5 for mengder blandet til applisering på gelen. Forventet størrelse på AlgL var 44,3 kDa. Figur 3-27 viser bildet av gelen etter elektroforese og farging. Av resultatet er det ikke mulig å se at AlgL blir uttrykt. Kodonbruk i AlgL versus kodonbruk i *E. coli* ble derfor sjekket, men det var ingen store forskjeller.

4. Diskusjon

4.1 Bioinformatisk analyse av alginatklyngen i *M. algicola*

4.1.1 Er alginatklyngen til *M. algicola* et operon?

I starten av arbeidet med *M. algicola* ble alginatklyngen analysert vha. bioinformatiske verktøy. På bakgrunn av avstanden mellom genene (Tabell 3-1) ble det forsøkt å finne ut om alle genene transkriberes som et operon. Ingen av genene er avskilt med mer enn 100 baser, det er derfor mulig at alle genene er under kontroll av samme promotor. Dette utelukker derimot ikke muligheten for flere promotorer. En annen mulighet er at hele alginatklyngen transkriberes i sin helhet fra en promotor oppstrøms for klyngen og samtidig har andre promotorer til stede for å kunne uttrykke bare deler av operonet. Der hvor avstanden kun er 11 baser eller mindre er det lite sannsynlig at det vil være en promotor. Det er derimot tilstrekkelig plass til promotorer når avstanden er over 60 baser. For eksempel er det funnet en promotor i alginatklyngen til *P. aeruginosa* mellom *algE* og *algG* hvor avstanden mellom genene kun er 20 baser (Tabell 3-1).

4.1.2 Har flere arter alginatklynger?

I analysene i denne oppgaven ble det funnet flere arter med potensielle alginatklynger (Figur 3-2). Resultatet viste at i tillegg til *M. algicola*, *P. aeruginosa* og *A. vinelandii* har også *P. pseudoalcaligenes*, *A. borkumensis* og *A. hongdengensis* fullstendige alginatklynger med et gen for hvert protein i biosyntesen av alginat.

For *A. bioprosthecum* er fem av genene i klyngen her gitt en predikert funksjon basert på at proteinet de koder for inneholder samme domener som proteinene i alginatklyngene til kjente alginatproduserende arter. Dersom disse antakelsene var korrekte har også *A. bioprosthecum* alle genene for proteinene i biosyntesen av alginat. Dessuten har denne arten to kopier av *algL* og *algK*. *T. auensis* mangler *algE*, *algI*, *algJ* og *algF*. Bakteriene trenger ikke proteinene involvert i O-acetyleringen av alginat (AlgI, AlgJ og AlgF) for å produsere alginat. Mer kritisk er mangelen på *algE*. Dette genet koder for en ione-kanal ansvarlig for transport av alginat ut av cellen. Dersom den mangler *algE*, men produserer alginat, må bakterien kutte opp alginatet igjen for å ikke dø. Arten har to kopier av alginat lyase, så det er mulig den kan gjøre dette. *T. auensis* har også to kopier av *algA*. Mellom kopiene av *algA* har arten også et gen kodende for fosfomannose mutase. Dette gjør at genene i denne delen av klyngen er arrangert i samme rekkefølge som de trengs i biosyntesen, AlgA-AlgC-AlgA. Dette kan gjøre det enklere å samle proteinene på samme sted for å gi effektiv produksjon av monomerer. *T. auensis* ser også ut til å ha to kopier av genet som koder for C5 mannuronan epimerase. *A. tumefaciens* mangler genene *algE* og *algK* som begge koder for proteiner nødvendige for eksport. Dette fører til samme problemet som for *T. auensis*, dvs. polymeren vil forbli inne i cellen. Også denne arten har to kopier av *algL*. Neste art, *A. albertimagni*, mangler genene for to proteiner involvert i eksport (AlgE og AlgG). I tillegg mangler den to av genene som koder for proteiner involvert i acetylering (*algJ* og *algF*). Den har fortsatt mulighet til å produsere polymeren, men

vil ikke få den eksportert ut av cellen. Genklyngen til *D. shibae* mangler enda flere av genene involvert i biosyntesen av alginat. Denne arten mangler *alg44* som er antatt å være nødvendig polymerisering. Den mangler også gener for mange av proteinene nødvendig for eksport (*algK*, *algE* og *algG*). I tillegg mangler den alginat lyase. Dersom den får til å produsere alginat vil den verken få molekylet eksportert ut eller få kuttet det opp til monomerer igjen.

At en bakterie har flere kopier av et gen kan skyldes flere årsaker. Grunnen til å ha to alginat lyaser kan være at de har ulik spesifisitet og dermed kutter ulike substrat [78]. Lignende for *algA* kan det hende den har en kopi for hver av reaksjonene proteinet utfører i biosyntesen til alginat, nemlig omdannelsen fra fruktose-6-fosfat til mannose-6-fosfat og dannelsen av GDP-mannose fra mannose-1-fosfat. Dersom en art har to C5 mannuronan epimeraser er det mulig at den ene danner G-blokker mens den andre danner MG-blokker. Mer generelt kan det hende at bakterien har duplisert genet ved rekombinering og ikke nødvendigvis benytter seg av begge kopiene.

Der bakteriene ser ut til å mangle noen av de essensielle genene for alginatproduksjon kan arten ha løst dette ved å ha disse genene en annen plass i genomet. Det er også mulig at bakterien har hatt genene tidligere, men at den ikke bruker dem og derfor har mistet dem. Dersom det er tilfellet at bakteriene ikke bruker genene til å produsere alginat vil den antakelig over tid miste resten av genene også. En annen mulighet er at proteinene som er igjen har fått andre funksjoner og derfor fortsatt benyttes av bakterien.

4.1.3 Horisontal eller vertikal overføring av alginatgenene

Det er så langt ikke funnet alginatklynger hos noen andre arter av *Marinobacter* slekten enn hos *M. algicola*. GC-innholdet i alginatklyngen til *M. algicola* ble funnet til å være tilnærmet lik den i resten av genomet. Dette kan tyde på vertikal genoverføring, men utelukker ikke horisontal genoverføring. Videre ble GC-innholdet i hvert gen sammenlignet med GC-innholdet i de samme genene hos *A. vinelandii* DJ og *P. aeruginosa* PAO1. Det faktum at GC-innholdet i kodende sekvens til alginatgenene er lavere hos *M. algicola* enn hos *A. vinelandii* og *P. aeruginosa* kan tyde på at det ikke har skjedd en horisontal genoverføring fra disse artene. Dersom *M. algicola* skulle ha fått alginatgenene fra en av disse to artene må dette ha skjedd langt tilbake i tid. Dette fordi det tar tid å få mange nok mutasjoner til å gi store endringer i GC-innholdet.

Generelt er proteiner kodet for i alginatklyngen til *M. algicola* nært beslektet proteiner fra alginatklynger hos *Pseudomonas* slekten. Hvorvidt *M. algicola* kan ha fått alginatgenene sine fra denne slekten er vanskelig å si. Ettersom ingen andre *Marinobacter* har de samme genene er det lett å tro at *Pseudomonas* har gitt genene til *M. algicola*, selv om GC-innholdet er ulikt. Dersom dette er tilfellet er mysteriet om når marine *M. algicola* har vært i kontrakt med jordbakterier fra *Pseudomonas* slekten.

I BLASTP søket etter proteiner nærmest beslektet de fra alginatklyngen til *M. algicola* ble det også funnet at flere stammer fra samme art dukket opp på trefflistene for samme protein (Tabell 3-4). At et protein er nært beslektet flere proteiner med samme funksjon, funnet hos samme art (bare ulike stammer), er ingen sikker indikasjon på at genet har kommet fra den arten. Det er naturlig at proteiner hos ulike stammer fra samme art er svært like og derfor vil havne i nærheten av hverandre på en liste av treff i BLAST. I denne analysen ble det spesielt sett på *P.*

pseudoalcaligenes ettersom denne arten hadde flest proteiner som var mest lik proteinene fra alginatklyngen til *M. algicola*. Ved å se på de ulike "Max identity" verdiene (Tabell 3-5) ser det ikke ut som *M. algicola* har fått alle alginatgenene fra *P. pseudoalcaligenes*, i hvert fall ikke samtidig. Verdiene er svært ulike, noe som indikerer at dersom *M. algicola* har fått alginatklyngen sin herfra har de ulike genene vært utsatt for svært forskjellig mutasjonsrate. Det kan likevel ikke utelukkes, men variasjonen går helt fra 33 % til 70 % og er derfor lite sannsynlig.

En mulighet er at alle artene som er kjent å ha en alginatklynge har fått denne fra en felles donor som ikke er funnet enda. Det er fortsatt mange bakterielle genom som ikke har blitt sekvensert. Derfor er det umulig å vite om en slik donor kan ha eksistert. Det er også mulig at flere *Marinobacter* har alginatgener, men at denne informasjonen ikke er tilgjengelig enda.

Ved å se på alginatklyngen som en helhet ble det funnet at *A. borkumensis* og *A. hongdengensis* var artene som hadde en rekkefølge på genene mest like rekkefølgen i genomet til *M. algicola*. Disse to artene er også marine, akkurat som *M. algicola*. Selv om proteinene i seg selv er mer ulike for disse artene enn for *Pseudomonas* slekten og *A. vinelandii* gjør disse funnene at det virker mer sannsynlig at *M. algicola* kan ha fått alginatgenene sine fra *A. borkumensis* eller *A. hongdengensis*. Av de andre artene funnet til å ha potensielle alginatklynger er *Agrobacterium* artene jordbakterier mens *D. shibae*, *A. bioprosthecum* og *T. auensis* lever i ferskvann. Alle artene funnet til å ha potensielle alginatklynger hører inn under proteobakterier. Videre er de fordelt på gammaproteobakterier og alfaproteobakterier. *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Alcanivorax* og *Tolomonas* slektene tilhører gammaproteobakteriene, mens *Agrobacterium*, *Asticcacaulis* og *Dinoroseobacter* tilhører alfaproteobakteriene. Det er kun *Pseudomonas* og *Azotobacter* som er nærmere beslektet enn dette. Disse tilhørere samme familie (Pseudomonadaceae). At det ikke er funnet flere slekter innen samme familie eller orden som har en alginatklynge er uventet når de samme slektene tilhører samme klasse. Dersom bakteriene har fått alginatklyngene sine ved vertikal genoverføring, kan dette tyde på at det finnes flere uoppdagete alginatklynger.

4.1.4 Analyse av genene som koder for fosfomannose mutase

I BLASTP søket etter proteiner nærmest beslektet de fra alginatklyngen til *M. algicola* var det et protein som skilte seg ut med tanke på hvilke arter som dukket opp på trefflisten. For AlgC ble det funnet større likhet med et annet protein (78 % "Max identity") i databasen enn for noen av de andre proteinene. Dette skyldes at fosfomannose mutase er nødvendig for glykosylering og dukker derfor opp hos arter som er nærmere beslektet *M. algicola* enn det arter fra *Pseudomonas* og *Azotobacter* slektene er.

Under analysen ble det også funnet at *M. algicola* har to kopier av *algC*, en i alginatklyngen og en lokalisert et annet sted i genomet. Dette kan tyde på at *M. algicola* har duplikert genet. Sekvenssammenligninger viser også at de to kopiene er mer lik hverandre enn tilsvarende gener i kjente alginat-produserende arter (se Figur 3-3 M). Hvilket av genene som er det opprinnelige er vanskelig å si. Det faktum at alginatklynger hos andre arter ikke inneholder *algC*, men bare en annen plass i genomet, kan tyde på at det er det frittstående *algC* genet som var det opprinnelige. Her kan det være interessant å finne ut om *M. algicola* uttrykker begge kopiene. En annen mulighet er at bakterien har funnet ut at det var en fordel å kopiere genet til en annen plass i genomet, men ikke mistet den gamle kopien enda.

Det ble også sett på hvor i genomet det frittstående genet for fosfomannose mutase var lokalisert i forhold til hos andre arter. Her ble det ikke funnet noen likheter mellom *M. algicola* og de andre undersøkte. Andre *Marinobacter* ser derimot ut til å ha lokalisert sitt gen for fosfomannose mutase på samme sted i genomet som *M. algicola*. Dette gjør det mer sannsynlig at det var det frittstående genet som ble duplisert.

I analysen ble det funnet at også *T. auensis* og *A. borkumensis* har to kopier av genet for fosfoglukose mutase. *T. auensis* hadde i tillegg ett tredje gen som var mer ulik de andre to (Tabell 3-7). Det kan tenkes at dette proteinet er spesifikt for glukose og derfor er mer ulik de andre. Undersøkelse av genene rundt sistnevnte gen ble ikke gjort, men det kan være interessant å gjøre senere. Genet *pgm* (koder for fosfoglukose mutase/ fosfomannose mutase) hos *A. borkumensis* er omgitt av noen av de samme genene som de funnet rundt genet for fosfomannose mutase hos *P. aeruginosa* og *A. vinelandii*. Dette kan tyde på at det er en fordel å ha disse genene samlet. Samme genene er også funnet rundt et gen for fosfomannose mutase hos *M. adhaerens*, som også har to kopier av genet. Dette gjør det interessant å se nærmere på alle *Marinobacter* sine gener for fosfomannose mutase. Det vil da være interessant å finne ut om flere arter har to kopier og hvilke gener som ligger rundt dem i genomet.

4.2 Verktøy for arbeid med *M. algicola*

4.2.1 Kartlegging av seleksjonsmarkører for og mot *M. algicola*

Første trinn i arbeidet med å undersøke hvordan det kan gjøres rekombinant arbeid i *M. algicola* var å finne seleksjonsmarkører som kan selektere for eller mot *M. algicola*. Det ble funnet at *M. algicola* og *E. coli* vokser like godt i Marine Broth og LB med ulike saltkonsentrasjoner og derfor ikke kunne brukes til å selektere mellom disse to bakteriene. Videre ble *M. algicola* testet for resistensnivå mot ulike antibiotika. På bakgrunn av resultatene fra dette forsøket ble det funnet at det ved overføring av genetisk materiale til *M. algicola*, kan benyttes resistens mot ampicillin, tetracyclin, nalidiksinsyre, triclosan eller kloramfenikol som seleksjonsmarkør. Dette fordi villtype *M. algicola* ikke vokser på disse antibiotikaene. *M. algicola* vokser derimot godt på gentamicin, dermed kan denne antibiotikaen brukes ved seleksjon for *M. algicola*.

Ingen av antibiotikaene først testet (Am, Km, Tc, Sp og Apr) kunne brukes som seleksjonsmarkør ved tilføring av nytt genetisk materiale til *M. algicola*. Det ble derfor parallelt med testing av flere antibiotika (Gm, Na, Tr og Ka) også utført mutagenisering av stammen. Ved mutagenisering ble det dannet en KmR stammen av *M. algicola*. Denne kan også brukes som mottaker ved konjugering.

Det ble også undersøkt om X-Gal kunne benyttes til seleksjon. *M. algicola* ga kun hvite kolonier ved utplating på X-Gal + IPTG. Dette viser at villtypen ikke har *lacZ* genot som koder for β -galaktosidase. Ved seleksjon for *M. algicola* tilført nytt genetisk materiale er dermed *lacZ* også en mulig seleksjonsmarkør.

4.2.2 Innføring av nytt genetisk materiale i *M. algicola* og uttrykk av *Pm*-promotoren

En viktig del av arbeidet med å utvikle verktøy for å kunne arbeide med *M. algicola* er å finne metoder for å overføre genetisk materiale til bakterien. *M. algicola* overlevde ikke elektroporeringsprotokollen som ble brukt. Derfor ble det forsøkt å overføre plasmid ved konjugering. Dette ble gjort ved å blande *E. coli*, transformert med et plasmid med TcR (pKI5), med KmR *M. algicola* (se kap. 2.15.3 og kap. 3.2.7). Kontroll ved utplating av bare *M. algicola* viste at ikke alle *M. algicola* cellene vokste opp på LA med Km. Det kan tenkes at noen har mutert tilbake og mistet KmR. Etersom overlevelsesraten av *M. algicola* på LA med Gm er høyere ville det kanskje vært tryggere å brukt dette i stedet.

I etterkant av konjugeringsforsøket ble det oppdaget at det var brukt en stamme av *E. coli* (DH5 α) som mangler nødvendige proteiner for å kunne overføre RK2-baserte vektorer. Dette betyr at koloniene som vokste opp ikke er transkonjuganter. Det ble derimot bevist at en koloni *M. algicola* KmR hadde fått tilført pKI5. Det er mulig at *E. coli* celler har sprukket og at *M. algicola* deretter har klart å ta opp plasmidet selv.

Dersom *M. algicola* er naturlig kompetent vil det kunne være en måte å tilføre DNA på. På grunn av tidsmangel ble det ikke sett nærmere på dette.

Pm/xyIS ekspresjonssystemet er et induserbart system og derfor et nyttig verktøy til rekombinant arbeid. Av den grunn var det ønskelig å finne ut om *Pm*-promotoren fungerer i *M. algicola* eller ikke. Dette ble gjort ved å bruke en TcR RK2 basert vektor hvor mCherry kontrolleres av dette systemet (pKI5). Målingene av mCherry viste at *Pm*-promotoren ble uttrykt i *M. algicola*. Uttrykket var derimot ganske lavt. En mulig forklaring kan være at *M. algicola* oppfattet mCherry som fremmed og derfor degraderte proteinet. Måling av OD ble ikke gjort ved tilsetting av *m*-toluat. Dette kunne vært lurt å gjøre for å se om veksten ble endret avhengig av *m*-toluat konsentrasjonen. Dersom *M. algicola* vokser dårligere eller dør ved tilsetting av *m*-toluat vil det føre til mindre induisert uttrykk fra *Pm*-promotoren. Det ble observert dårlig vekst i noen av kulturene, men det så ikke ut til å samsvare med *m*-toluat konsentrasjon. Dette virker derfor er lite sannsynlig, men kan være en idé å teste.

4.3 Alginatproduksjon

4.3.1 Screening etter mukoide varianter i mutagenisert stamme

I mutageniseringsforsøket viste resultatene en økt dødsrate ved økende konsentrasjon NTG (Figur 3-5). Dette tyder på en økt mutasjonsrate ved økende NTG konsentrasjon ettersom flere mutasjoner gir økt sannsynlighet for mutasjon i gener essensielle for overlevelse. Unntaket var for prøven med 10 µg/mL NTG hvor resultatene viste mye mer vekst i forhold til prøven uten NTG. Hva dette skyldes er vanskelig å si. En mulighet er at det har skjedd en eksperimentell feil. Dette virker mest sannsynlig ettersom det i nedfrosne prøver ble funnet lavere overlevelse for prøven med 10 µg/mL NTG enn for den uten uten NTG. Ettersom villtype *M. algicola* var funnet til å ikke overleve mer enn 10 µg/mL Km, er oppvekst på 40 µg/mL et tegn på at mutasjon har ført til KmR. Det ble funnet en økende frekvens KmR bakterier ved økende NTG konsentrasjon (Figur 3-6). Dette gjenspeiler også at det skjer flere mutasjoner ved økt NTG konsentrasjon.

For *Pseudomonas* er det tidlig vist at mutasjon i *mucA* fører til alginatproduksjon [49]. I *A. vinelandii* derimot, er alginatproduksjon konstitutivt på, men mutasjon i *mucA* fører til økt produksjon [49]. *M. algicola* har både AlgU og MucA. Etter å ha bevist at fenotypen til *M. algicola* kan endres ved mutagenisering ble de mutageniserte stammene undersøkt for alginatproduksjon ved å plate ut på 0,2 µg/mL Am. Dette ble gjort i håp om at en enkelt mutasjon kunne føre til uttrykk av alginatgenene. Dersom alginatproduksjon reguleres slik som hos *Pseudomonas* (Figur 1-8) kan en mutasjon i *mucA* føre til uttrykk. Etter å ha sett på anslagsvis 158 700 kolonier *M. algicola* uten å finne noen mukoide varianter ble det antatt at en enkelt mutasjon ikke er tilstrekkelig for å fremtvinge alginatproduksjon. Dette kan tyde på at *M. algicola* sin alginatklynge reguleres på en annen måte. En annen mulighet er at det skal flere mutasjoner til før MucA ikke lengre klarer å binde AlgU.

I denne oppgaven ble det valgt å teste prøver fra ulike NTG-nivå. Etersom økt NTG-nivå ga økt mutasjonsrate kunne det ha vært en fordel å se på en større andel bakterier fra prøvene med høyest NTG konsentrasjon.

4.3.2 Innsetting av *Pm*-promotor i genomet til *M. algicola*

Et alternativ til å mutere *M. algicola* for å oppnå alginatproduksjon var å regulere uttrykket med *Pm/xylS* ekspresjonssystemet. Dette har vært vist å gi uttrykk av alginatproduksjon i *P. fluorescens* [76]. En suicide-vektor (pKI7) ble konstruert for å sette inn *Pm*-promotoren ved homolog rekombinering i *M. algicola*. pKI7 ble forsøkt konjugert til *M. algicola*. Dette var ikke vellykket. På grunn av tidsmangel ble det ikke gjort et nytt forsøk på å overføre pKI7 til *M. algicola* KmR.

4.4 Heterolog ekspresjon av *algG* og *algL*

Konstrukt for uttrykk av *algG* og *algL* i *E. coli* ble laget. Det ble vist ved SDS-PAGE at uttrykket var dårlig for begge genene. Måling av aktivitet til epimerasen viste ingen aktivitet. Det er derfor ikke kjent hvorvidt *algG* ble uttrykt. For lyasen ble det registrert aktivitet, *algL* ble derfor uttrykt. Lav aktivitet kan skyldes at optimale betingelser ikke ble funnet eller at uttrykket er for lite.

Det kan være flere grunner til at et gen ikke blir uttrykt. Dersom kodonbruk er ulikt i genet i forhold det *E. coli* bruker kan det føre til lite uttrykk fordi bakterien mangeler spesifikke tRNAer. Dette ble sjekket for både *algG* og *algL*. Det ble ikke funnet noen store forskjeller og antas derfor å ikke være grunnen til det svake uttrykket. Dannelse av sekundærstrukturer i mRNAet, f.eks. hårnålstrukturer, kan hindre translasjon av genet. Det er mulig å prøve å bytte ut signalsekvensen i genene i håp om at dette gir andre sekundærstrukturer i mRNAet som gjør translasjon mulig. En annen mulighet er at proteinet blir uttrykt, men at det blir degradert igjen, f.eks. på grunn av feil folding. Det kan også hende at *E. coli* oppfatter proteinet som fremmed og derfor degraderer, eller ikke uttrykker, det. For *algL* ble det observert at tilsetning av *m*-toluat for tidlig under dyrkingen førte til at bakterien sluttet å vokse eller døde. Dette kan tyde på at *E. coli* ble hemmet av å uttrykke genet. En annen mulighet er at det kan ha oppstått mutasjoner i genet under dyrkingen. Kanskje er det en mutant som ikke utøver lyase eller epimerase-funksjonen som blir uttrykt. For *algG* til *A. vinelandii* har det tidligere blitt vist at selv om genet ble uttrykt i *E. coli* hadde proteinet lav aktivitet [79]. Mutasjoner kan også ha ført til feil folding og dermed degradering. Det kan også hende at betingelsene under dyrkingen ikke er optimale. For eksempel kan det prøves ut forskjellige saltkonsentrasjoner i mediet og/eller ulike pH.

Etersom det ble registrert aktivitet for alginat lyasen med M-blokk alginat som substrat, men ikke med G-blokk eller MG-blokk alginat, kan enzymet trolig kun kutte mellom to M-enheter. Det ble også vist med SDS-PAGE at uttrykket var lavt ettersom det ikke ble funnet et klart bånd tilsvarende størrelsen på alginat lyasen. Hos *A.*

vinelandii er det funnet flere alginat lyaser [80] hvor den som sitter i alginatklyngen er vist å kutte M-M og M-G bindinger [81]. Det kan tenkes at også AlgL til *M. algicola* kan kutte M-G bindinger, men at aktiviteten er for svak til å måle kutting mellom M- og G-enheter. Her vil det være aktuelt å prøve å optimalisere betingelsene eller endre buffer for å påvirke aktiviteten. Det ble for eksempel ikke prøvd å tilsette Ca^{2+} i reaksjonen. For en alginat lyase hos *Klebsiella pneumoniae* (AlyA) ble dette vist å økte aktiviteten for kutting av G-M bindinger [82].

4.5 Videre arbeid

I denne oppgaven ble det funnet at hele alginatklyngen til *M. algicola* kanskje transkriberes fra en promotor alene, men det er ikke indikasjoner som utelukker flere promotorer. En naturlig fortsettelse her å se etter spesifikke promotorsekvenser for å se på muligheten for flere startpunkter for transkripsjon. Dette er veldig vanskelig ettersom det finnes mange ulike promotorsekvenser og lite er kjent om hvilke sekvenser *M. algicola* bruker. En annen mulighet er å analysere RNA ved revers transkripsjon PCR og på denne måten se om noen av genene uttrykkes mer enn andre. Dette vil kunne gi en indikasjon på at det er flere startpunkter for transkripsjon.

Analysene i arbeidet med å prøve å forutsi om *M. algicola* har fått alginatgenene sine ved vertikal eller horisontal genoverføring viste at GC-innhold i genene til *M. algicola* var ulikt det hos *P. aeruginosa* og *A. vinelandii*. Ettersom det senere ble funnet alginatklynger hos andre arter vil det være interessant å sammenligne med GC-innhold i genene til disse artene også. Da spesielt *Alcanivorax* artene ettersom disse hadde mest lik rekkefølge på genene i forhold til *M. algicola* og i tillegg er marine. Noen av artene som ble funnet å ha potensielle alginatklynger manglet noen av de essensielle genene for syntese. Det ville vært interessant å søke etter disse genene andre steder i genomet.

Det ble funnet at *M. algicola* har to relativt like kopier av fosfomannose mutase. Ettersom det ikke er kjent om bakterien bruker begge kopiene kunne det vært interessant å slå ut begge kopiene hver for seg og se om det gir ulike utfall. Dette vil kanskje kunne vise om *M. algicola* bruker begge genene, og om de bruker de til forskjellige oppgaver, f.eks. alginatsyntese og lipopolysakkaridsyntese.

Denne oppgaven har ikke kommet frem til en metode for å overføre genetisk materiale til *M. algicola*. Dette er derfor et viktig punkt som må studeres videre. Konjugering bør prøves på nytt. Siden resultater i denne oppgaven tyder på at *M. algicola* klarer å ta opp plasmid av seg selv burde dette undersøkes nærmere. For eksempel ved å blande *M. algicola* kultur med plasmid, inkubere slik som under konjugeringstrinnet (dråpe på plate) og se om bakteriene tar opp plasmidet. Ettersom konjugering er mer tidkrevende enn elektroporering er det ønskelig å få til elektroporering. Det ble kun forsøkt en gang med en fremgangsmåte i arbeidet med denne oppgaven. Ettersom det er mulig at noe gikk galt under forsøket, kan det være verd bryet å prøve en gang til eller prøve andre protokoller.

Målingene av uttrykk fra *Pm*-promotoren i *M. algicola* viste lavt uttrykk. Det er ønskelig å prøve å forbedre dette. Ulike betingelser som temperatur, pH og saltkonsentrasjon kan testes. I tillegg kan inkuberingstid før og etter tilsetning av *m*-toluat justeres for å se om dette gir økt uttrykk. Andre promotorer kan også prøves ut.

Dersom det blir funnet en måte å overføre genetisk materiale til *M. algicola* på, bør rekombinering for innsetting av *Pm*-promotoren forsøkes på nytt. Dersom dette lykkes, men ikke gir alginatproduksjon, kan rekombinering brukes til spesifikk mutasjon av genomet til *M. algicola*. Dette kan åpne for mutasjoner som kan gi alginatproduksjon. I forkant bør det gjøres videre bioinformatisk analyse for å prøve å finne ut hvilke aminosyrer som bør endres i forsøk på å frembringe alginatproduksjon. Ved en eventuell suksessfull produksjon av mukoide varianter av *M. algicola* blir neste steg å isolere alginatet og karakterisere det.

Ved heterolog ekspresjon av *algL* og *algG* ble det vist at uttrykket var lavt. Videre arbeid kan gjøres for å forsøke å øke uttrykket. En mulighet er å prøve ut ulike betingelser under dyrkingen eller uttrykke genene i en annen art. Det er mulig å sjekke om genene har mutert ved å plate ut etter dyrking og sekvensere plasmid fra flere kolonier for å se etter mutasjoner. Dersom problemet er dannelse av hårnålstrukturer som hindrer translasjon kan det være en idé å prøve å bytte ut signalsekvensen til genene.

I denne oppgaven ble det funnet en svak aktivitet for alginat lyasen og at denne var spesifikk for M-blokker. Det vil være interessant å finne optimale betingelser for aktivitet ved å variere saltkonsentrasjon, pH og temperatur. Dersom lyasen skal kunne brukes industrielt må også uttrykket forbedres. For AlgG ble det i denne oppgaven ikke detektert aktivitet. Videre undersøkelser kan gjøres med et radioaktivitetsassay som er mer sensitivt enn epimeraseassayet brukt i denne oppgaven. Dersom dette ikke virker vil det neste være å prøve om genet komplementerer en algG-defekt versjon i for eksempel *P. fluorescens*.

5. Konklusjon

GC-innhold tyder på at *Marinobacter algicola* ikke har fått alginatgenene sine fra *Azotobacter vinelandii* eller *Pseudomonas aeruginosa* selv om alle genene generelt er nærmest beslektet gener hos *Pseudomonas* slekten. Analysene i denne oppgaven viser at *Alcanivorax borkumensis* og *Alcanivorax hongdengensis* kan være bedre kandidater til å være genenes opprinnelse enn *A. vinelandii* og *Pseudomonas* slekten. Disse to artene har fullstendige alginatklynger med relativt lik rekkefølge på genene som *M. algicola*, og er i tillegg marine arter, i motsetning til *A. vinelandii* og alginatproduserende arter fra *Pseudomonas* slekten. Det er derimot fortsatt uklart hvorvidt *M. algicola* har fått genene sine ved horisontal eller vertikal genoverføring.

Sekvenssammenligninger viser at *M. algicola* har to versjoner av AlgC som er nærmere beslektet hverandre enn nesten alle andre protein-sekvenser i NCBI sine databaser. Dette tyder på at *M. algicola* har duplisert dette genet.

Villtype *M. algicola* er resistent mot gentamicin og i arbeidet med denne oppgaven ble det dannet en kanamycinresistent stamme ved mutagenisering. Ved overføring av nytt genetisk materiale til arten kan ampicillin, tetracyclin, nalidiksinsyre, triclosan, kloramfenikol og/eller *lacZ* benyttes som seleksjonsmarkør. Det er ikke funnet en effektiv metode å overføre nytt genetisk materiale til *M. algicola* på, men observasjoner tyder på at det er mulig å gjennomføre.

Basert på resultatene oppnådd i denne oppgaven er det ikke mulig å konkludere med hvorvidt *M. algicola* kan produsere alginat eller ikke. Det har derimot blitt vist at *M. algicola* har et gen som koder for en fungerende alginat lyase som er spesifikk for M-blokker.

Referanser

1. M. J. Gauthier, B. Lafay, R. Christen, L. Fernandez, M. Acquaviva, P. Bonin og J. C. Bertrand, *Marinobacter-Hydrocarbonoclasticus Gen-Nov, Sp-Nov, a New, Extremely Halotolerant, Hydrocarbon-Degrading Marine Bacterium*. Int J Syst Bacteriol, 1992. **42**: s. 568-576.
2. E. C. Kaeppel, A. Gardes, S. Seebah, H. P. Grossart og M. S. Ullrich, *Marinobacter adhaerens sp nov., isolated from marine aggregates formed with the diatom Thalassiosira weissflogii*. Int J Syst Evol Microbiol, 2012. **62**: s. 124-128.
3. D. H. Green, J. P. Bowman, E. A. Smith, T. Gutierrez og C. J. Bolch, *Marinobacter algicola sp. nov., isolated from laboratory cultures of paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellates*. Int J Syst Evol Microbiol, 2006. **56**: s. 523-7.
4. K. Takai, C. L. Moyer, M. Miyazaki, Y. Nogi, H. Hirayama, K. H. Nealson og K. Horikoshi, *Marinobacter alkaliphilus sp nov., a novel alkaliphilic bacterium isolated from subseafloor alkaline serpentine mud from Ocean Drilling Program Site 1200 at South Chamorro Seamount, Mariana Forearc*. Extremophiles, 2005. **9**: s. 17-27.
5. C. Liu, C. X. Chen, X. Y. Zhang, Y. Yu, A. Liu, G. W. Li, X. L. Chen, B. Chen, B. C. Zhou og Y. Z. Zhang, *Marinobacter antarcticus sp nov., a halotolerant bacterium isolated from Antarctic intertidal sandy sediment*. Int J Syst Evol Microbiol, 2012. **62**: s. 1838-1844.
6. N. B. Huu, E. B. M. Denner, D. T. C. Ha, G. Wanner og H. Stan-Lotter, *Marinobacter aquaeolei sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well*. Int J Syst Bacteriol, 1999. **49**: s. 367-375.
7. L. A. Romanenko, P. Schumann, M. Rohde, N. V. Zhukova, V. V. Mkhailov og E. Stackebrandt, *Marinobacter bryozoorum sp nov and Marinobacter sediminum sp nov., novel bacteria from the marine environment*. Int J Syst Evol Microbiol, 2005. **55**: s. 143-148.
8. J. H. Yoon, S. H. Yeo, I. G. Kim og T. K. Oh, *Marinobacter flavimaris sp nov and Mannobacter daepoensis sp nov., slightly halophilic organisms isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea*. Int J Syst Evol Microbiol, 2004. **54**: s. 1799-1803.
9. L. Y. Qu, F. L. Zhu, J. X. Zhang, C. L. Gao og X. Q. Sun, *Marinobacter daqiaonensis sp nov., a moderate halophile isolated from a Yellow Sea salt pond*. Int J Syst Evol Microbiol, 2011. **61**: s. 3003-3008.
10. N. M. Gorshkova, E. P. Ivanova, A. F. Sergeev, N. V. Zhukova, Y. Alexeeva, J. P. Wright, D. V. Nicolau, V. V. Mikhailov og R. Christen, *Marinobacter excellens sp. nov., isolated from sediments of the Sea of Japan*. Int J Syst Evol Microbiol, 2003. **53**: s. 2073-8.
11. S. W. Roh, Z. X. Quan, Y. D. Nam, H. W. Chang, K. H. Kim, S. K. Rhee, H. M. Oh, C. O. Jeon, J. H. Yoon og J. W. Bae, *Marinobacter goseongensis sp nov., from seawater*. Int J Syst Evol Microbiol, 2008. **58**: s. 2866-2870.
12. J. Gu, H. Cai, S. L. Yu, R. Qu, B. Yin, Y. F. Guo, J. Y. Zhao og X. L. Wu, *Marinobacter gudaonensis sp nov., isolated from an oil-polluted saline soil in a Chinese oilfield*. Int J Syst Evol Microbiol, 2007. **57**: s. 250-254.

13. M. J. Montes, N. Bozal og E. Mercade, *Marinobacter guineae* sp nov., a novel moderately halophilic bacterium from an Antarctic environment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008. **58**: s. 1346-1349.
14. B. Y. Kim, H. Y. Weon, S. H. Yoo, J. S. Kim, S. W. Kwon, E. Stackebrandt og S. J. Go, *Marinobacter koreensis* sp. nov., isolated from sea sand in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006. **56**: s. 2653-6.
15. M. Aguilera, M. L. Jimenez-Pranteda, K. Kharroub, A. Gonzalez-Paredes, J. J. Durban, N. J. Russell, A. Ramos-Cormenzana og M. Monteoliva-Sanchez, *Marinobacter lacisalsi* sp nov., a moderately halophilic bacterium isolated from the saline-wetland wildfowl reserve Fuente de Piedra in southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009. **59**: s. 1691-1695.
16. S. Martin, M. C. Marquez, C. Sanchez-Porro, E. Mellado, D. R. Arahal og A. Ventosa, *Marinobacter lipolyticus* sp nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003. **53**: s. 1383-1387.
17. J. H. Yoon, D. Y. Shin, I. G. Kim, K. H. Kang og Y. H. Park, *Marinobacter litoralis* sp nov., a moderately halophilic bacterium isolated from sea water from the East Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003. **53**: s. 563-568.
18. W. Y. Shieh, W. D. Jean, Y. T. Lin og M. Tseng, *Marinobacter lutaensis* sp nov., a thermotolerant marine bacterium isolated from a coastal hot spring in Luta, Taiwan. *Can J Microbiol*, 2003. **49**: s. 244-252.
19. S. Shivaji, P. Gupta, P. Chaturvedi, K. Suresh og D. Delille, *Marinobacter maritimus* sp nov., a psychrotolerant strain isolated from sea water off the subantarctic Kerguelen islands. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005. **55**: s. 1453-1456.
20. Y. Y. Huo, C. S. Wang, J. Y. Yang, M. Wu og X. W. Xu, *Marinobacter mobilis* sp nov and *Marinobacter zhejiangensis* sp nov., halophilic bacteria isolated from the East China Sea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008. **58**: s. 2885-2889.
21. K. Kharroub, M. Aguilera, M. L. Jimenez-Pranteda, A. Gonzalez-Paredes, A. Ramos-Cormenzana og M. Monteoliva-Sanchez, *Marinobacter oulmenensis* sp nov., a moderately halophilic bacterium isolated from brine of a salt concentrator. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2011. **61**: s. 2210-2214.
22. X. W. Xu, Y. H. Wu, C. S. Wang, J. Y. Yang, A. Oren og M. Wu, *Marinobacter pelagius* sp. nov., a moderately halophilic bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008. **58**: s. 637-40.
23. D. C. Zhang, H. R. Li, Y. H. Xin, Z. M. Chi, P. J. Zhou og Y. Yu, *Marinobacter psychrophilus* sp nov., a psychrophilic bacterium isolated from the Arctic. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008. **58**: s. 1463-1466.
24. J. H. Yoon, M. H. Lee, S. J. Kang og T. K. Oh, *Marinobacter salicampi* sp. nov., isolated from a marine solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007. **57**: s. 2102-5.
25. A. Antunes, L. Franca, F. A. Rainey, R. Huber, M. F. Nobre, K. J. Edwards og M. S. da Costa, *Marinobacter salsuginis* sp. nov., isolated from the brine-seawater interface of the Shaban Deep, Red Sea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007. **57**: s. 1035-40.
26. K. M. Handley, M. Hery og J. R. Lloyd, *Marinobacter santoriniensis* sp. nov., an arsenate-respiring and arsenite-oxidizing bacterium isolated from hydrothermal sediment (vol 59, pg 886, 2009). *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009. **59**: s. 1850-1850.

27. B. Guo, J. Gu, Y. G. Ye, Y. Q. Tang, K. Kida og X. L. Wu, *Marinobacter segnicrescens* sp. nov., a moderate halophile isolated from benthic sediment of the South China Sea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007. **57**: s. 1970-4.
28. J. F. Rontani, A. Mouzdahir, V. Michotey, P. Caumette og P. Bonin, *Production of a polyunsaturated isoprenoid wax ester during aerobic metabolism of squalene by Marinobacter squalenivorans* sp nov. *Appl Environ Microbiol*, 2003. **69**: s. 4167-4176.
29. C. Y. Wang, C. C. Ng, W. S. Tzeng og Y. T. Shyu, *Marinobacter szutsaonensis* sp nov., isolated from a solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009. **59**: s. 2605-2609.
30. P. P. Liebgott, L. Casalot, S. Paillard, J. Lorquin og M. Labat, *Marinobacter vinifirmus* sp nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a wine-barrel-decalcification wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006. **56**: s. 2511-2516.
31. O. O. Lee, P. Y. Lai, H. X. Wu, X. J. Zhou, L. Miao, H. Wang og P. Y. Qian, *Marinobacter xestospongiae* sp nov., isolated from the marine sponge *Xestospongia testudinaria* collected from the Red Sea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012. **62**: s. 1980-1985.
32. D. C. Zhuang, Y. G. Chen, Y. Q. Zhang, S. K. Tang, X. L. Wu, Z. C. Tan, W. J. Li og X. L. Cui, *Marinobacter zhanjiangensis* sp nov., a marine bacterium isolated from sea water of a tidal flat of the South China Sea. *Anton Leeuw Int J G*, 2009. **96**: s. 295-301.
33. M. Samsur, T. Takatani, Y. Yamaguchi, T. Sagara, T. Noguchi og O. Arakawa, *Accumulation and elimination profiles of paralytic shellfish poison in the short-necked clam *Tapes japonica* fed with the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum**. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 2007. **48**: s. 13-18.
34. N. Estrada, M. de Jesus Romero, A. Campa-Cordova, A. Luna og F. Ascencio, *Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus**. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2007. **146**: s. 502-10.
35. Olav Smidsrød og Størker T. Moe, *Biopolymerkjemi*. 2. utgave. 1995, Trondheim: Tapir
36. H. Ertesvåg og S. Valla, *Biosynthesis and applications of alginates*. *Polym Degrad Stabil*, 1998. **59**: s. 85-91.
37. Knut Ingar Draget, Olav Smidsrød og Gudmund Skjåk-Bræk, *Alginates from Algae, in Polysaccharides and polyamides in the food industry: properties, production and patents*. , A. Steinbüchel and S.K. Rhee, Editors. 2005, Wiley-Blackwell
38. Helga Ertesvåg, Svein Valla og Gudmund Skjåk-Bræk, *Enzymatic alginate modification*, in *Alginates: Biology and Applications*, B.H.A. Rehm, Editor. 2009
39. F. Clementi, *Alginate production by *Azotobacter vinelandii**. *Crit Rev Biotechnol*, 1997. **17**: s. 327-61.
40. D. E. Nivens, D. E. Ohman, J. Williams og M. J. Franklin, *Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms*. *J Bacteriol*, 2001. **183**: s. 1047-1057.
41. H. L. Sadoff, *Encystment and Germination in *Azotobacter-Vinelandii**. *Bacteriol Rev*, 1975. **39**: s. 516-539.

42. Magnus Steigedal, *The Azotobacter vinelandii mannuronan C5-epimerases : their biological functions and new tools useful for their future in vivo biotechnological application*, in *Institutt for bioteknologi2006*, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet: Trondheim.
43. R. Maharaj, T. B. May, S. K. Wang og A. M. Chakrabarty, *Sequence of the Alg8 and Alg44 Genes Involved in the Synthesis of Alginate by Pseudomonas-Aeruginosa*. *Gene*, 1993. **136**: s. 267-269.
44. M. Steigedal, H. Sletta, S. Moreno, M. Maerk, B. E. Christensen, T. Bjerkan, T. E. Ellingsen, G. Espin, H. Ertesvåg og S. Valla, *The Azotobacter vinelandii AlgE mannuronan C-5-epimerase family is essential for the in vivo control of alginate monomer composition and for functional cyst formation*. *Environ Microbiol*, 2008. **10**: s. 1760-70.
45. Muhammadi og N. Ahmed, *Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria*. *Curr Genomics*, 2007. **8**: s. 191-202.
46. B. H. Rehm og S. Valla, *Bacterial alginates: biosynthesis and applications*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997. **48**: s. 281-8.
47. U. Remminghorst og B. H. Rehm, *Bacterial alginates: from biosynthesis to applications*. *Biotechnol Lett*, 2006. **28**: s. 1701-12.
48. J. L. Paletta og D. E. Ohman, *Evidence for Two Promoters Internal to the Alginate Biosynthesis Operon in Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol*, 2012. **65**: s. 770-775.
49. C. Nunez, R. Leon, J. Guzman, G. Espin og G. Soberon-Chavez, *Role of Azotobacter vinelandii mucA and mucC gene products in alginate production*. *J Bacteriol*, 2000. **182**: s. 6550-6556.
50. E. Galindo, C. Pena, C. Nunez, D. Segura og G. Espin, *Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by Azotobacter vinelandii*. *Microb Cell Fact*, 2007. **6**: s. 7.
51. T. E. Jorgensen, M. Sletmoen, K. I. Draget og B. T. Stokke, *Influence of oligoguluronates on alginate gelation, kinetics, and polymer organization*. *Biomacromolecules*, 2007. **8**: s. 2388-2397.
52. J. D. King, D. Kocincova, E. L. Westman og J. S. Lam, *Lipopolysaccharide biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immunity*, 2009. **15**: s. 261-312.
53. R. W. Ye, N. A. Zielinski og A. M. Chakrabarty, *Purification and Characterization of Phosphomannomutase/Phosphoglucomutase from Pseudomonas-Aeruginosa Involved in Biosynthesis of Both Alginate and Lipopolysaccharide*. *J Bacteriol*, 1994. **176**: s. 4851-4857.
54. J. B. Goldberg, K. Hatano og G. B. Pier, *Synthesis of Lipopolysaccharide-O Side-Chains by Pseudomonas-Aeruginosa Pao1 Requires the Enzyme Phosphomannomutase*. *J Bacteriol*, 1993. **175**: s. 1605-1611.
55. Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V. og Clark D.P., *Brock Biology of Microorganisms*. 12. 2009, San Francisco: Pearson Benjamin-Cummings
56. Kåre Haugan, Ponniah Karunakaran, Anne Tøndervik og Svein Valla, *The Host range of RK2 minimal replicon copy-up mutants is limited by species-specific differences in the maximum tolerable copy number*. 1995, [San Diego, Calif.]: Academic Press
57. Janet M. Blatny, *Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon*. 1997, [Washington]: American Society for Microbiology

58. T. Aakvik, K. F. Degnes, R. Dahlsrud, F. Schmidt, R. Dam, L. H. Yu, U. Volker, T. E. Ellingsen og S. Valla, *A plasmid RK2-based broad-host-range cloning vector useful for transfer of metagenomic libraries to a variety of bacterial species*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **296**: s. 149-158.
59. H. C. Winther-Larsen, J. M. Blatny, B. Valand, T. Brautaset og S. Valla, *Pm Promoter Expression Mutants and Their Use in Broad-Host-Range RK2 Plasmid Vectors*. Metab Eng, 2000. **2**: s. 92-103.
60. Vectron Biosolutions AS. *The Pm/xylS expression system*. 2008; Tilgjengelig fra: <http://vectronbiosolutions.com/info.php?id=13>.
61. R. Lale, L. Berg, F. Stuttgen, R. Netzer, M. Stafsnes, T. Brautaset, T. E. V. Aune og S. Valla, *Continuous Control of the Flow in Biochemical Pathways through 5' Untranslated Region Sequence Modifications in mRNA Expressed from the Broad-Host-Range Promoter Pm*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**: s. 2648-2655.
62. S. Marques, M. Manzanera, M. M. Gonzalez-Perez, M. T. Gallegos og J. L. Ramos, *The XylS-dependent Pm promoter is transcribed in vivo by RNA polymerase with sigma(32) or sigma(38) depending on the growth phase*. Mol Microbiol, 1999. **31**: s. 1105-1113.
63. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers og D. J. Lipman, *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**: s. 403-10.
64. D. Hanahan, *Studies on Transformation of Escherichia-Coli with Plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**: s. 557-580.
65. R. Simon, U. Priefer og A. Puhler, *A Broad Host Range Mobilization System for In vivo Genetic-Engineering - Transposon Mutagenesis in Gram-Negative Bacteria*. Bio-Technology, 1983. **1**: s. 784-791.
66. N. T. Keen, S. Tamaki, D. Kobayashi og D. Trollinger, *Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria*. Gene, 1988. **70**: s. 191-7.
67. H. Sletta, A. Tondervik, S. Hakvag, T. E. V. Aune, A. Nedal, R. Aune, G. Evensen, S. Valla, T. E. Ellingsen og T. Brautaset, *The presence of N-terminal secretion signal sequences leads to strong stimulation of the total expression levels of three tested medically important proteins during high-cell-density cultivations of Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**: s. 906-912.
68. I. Bakke, L. Berg, T. E. V. Aune, T. Brautaset, H. Sletta, A. Tondervik og S. Valla, *Random Mutagenesis of the Pm Promoter as a Powerful Strategy for Improvement of Recombinant-Gene Expression*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**: s. 2002-2011.
69. D. Peter Snustad og Michael J. Simmons, *Principles of genetics*. 5. 2010: John Wiley & Sons, Inc.
70. P. Koranyi, K. Burg og M. Berenyi, *Stable electrotransformation of symbiont candidate diazotrophic bacterium with plasmids carrying selectable and screenable marker genes*. Res Microbiol, 1998. **149**: s. 361-72.
71. David P. Clark, *Molecular biology 2010*, Amsterdam: Academic Press/Elsevier
72. David L. Nelson, Michael M. Cox og Albert L. Lehninger, *Lehninger principles of biochemistry*. 5th. 2008, New York: Freeman
73. H. Ertesvåg, F. Erlien, G. Skjåk-Bræk, B. H. A. Rehm og S. Valla, *Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced Azotobacter vinelandii alginate lyase*. J Bacteriol, 1998. **180**: s. 3779-3784.
74. K. Østgård, *Enzymatic Microassay for the Determination and Characterization of Alginates*. Carbohydrate Polymers, 1992. **19**: s. 51-59.

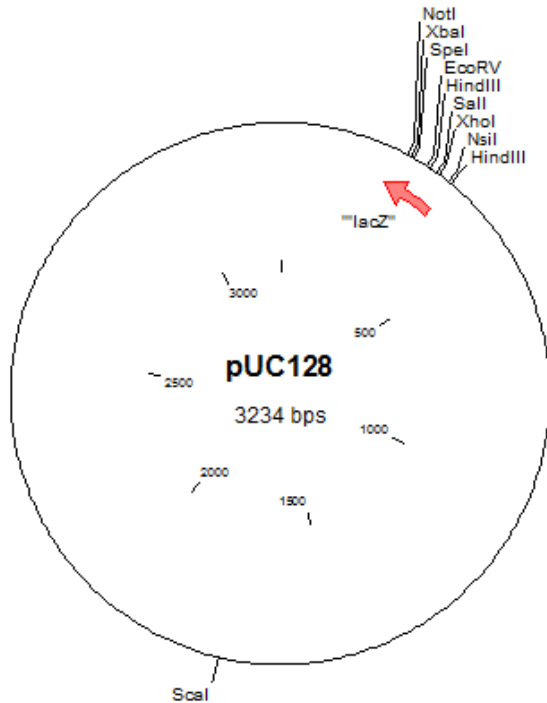
75. Richard J. Reece, *Analysis of genes and genomes*. 2004, Chichester: Wiley
76. Martin Gimmestad, Håvard Sletta, Karuna Ponniah Karunakaran, Karianne Bakkevig, Helga Ertesvåg, Trond Ellingsen, Gudmund Skjåk-Bræk og Svein Valla, *New mutant strains of Pseudomonas fluorescens and variants thereof, methods for their production, and uses thereof in alginate production*, 2002.
77. N. Heintz, *Bac to the future: The use of bac transgenic mice for neuroscience research*. Nature Reviews Neuroscience, 2001. **2**: s. 861-870.
78. T. Y. Wong, L. A. Preston og N. L. Schiller, *Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications*. Annu Rev Microbiol, 2000. **54**: s. 289-340.
79. B. H. Rehm, H. Ertesvåg og S. Valla, *A new Azotobacter vinelandii mannuronan C-5-epimerase gene (algG) is part of an alg gene cluster physically organized in a manner similar to that in Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 1996. **178**: s. 5884-9.
80. M. Gimmestad, H. Ertesvag, T. M. B. Heggset, O. Aarstad, B. I. G. Svanem og S. Valla, *Characterization of Three New Azotobacter vinelandii Alginate Lyases, One of Which Is Involved in Cyst Germination*. J Bacteriol, 2009. **191**: s. 4845-4853.
81. H. Ertesvåg, F. Erlien, G. Skjåk-Bræk, B. H. Rehm og S. Valla, *Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced Azotobacter vinelandii alginate lyase*. J Bacteriol, 1998. **180**: s. 3779-84.
82. A. Tondervik, G. Klinkenberg, O. A. Aarstad, F. Drablos, H. Ertesvag, T. E. Ellingsen, G. Skjak-Braek, S. Valla og H. Sletta, *Isolation of Mutant Alginate Lyases with Cleavage Specificity for Di-guluronic Acid Linkages*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**: s. 35284-35292.

Vedlegg A. Forkortelser

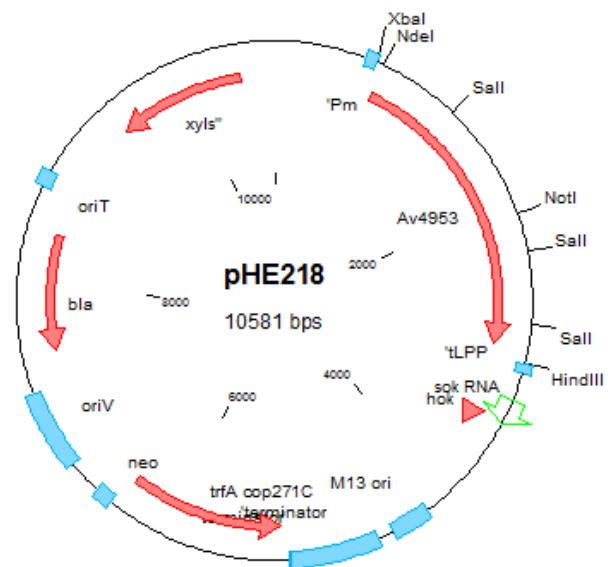
Am	Ampicillin
AmR	Ampicillinresistent
Ap	Apramycin
ApR	Apramycinresistent
DMSO	Dimetyl sulfoksid
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
G	Guluronsyre
Gn	Gentamicin
GnR	Gentamicinresistent
iGEM	International Genetically Engineered Machine
Km	Kanamycin
KmR	Kanamycinresistent
Cm	Kloramfenikol
CmR	Kloramfenikolresistent
kb	Kilobaser
M	Mannuronsyre
Na	Nalidiksinsyre
NaR	Nalidiksinsyreresistent
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
NTG	Nitrosoguanidin
OD _λ	Optisk tetthet ved bølgelengde λ
PCR	Polymerase kjedereaksjon (Polymerase chain reaction)
SDS-PAGE	Natrium dodekyl sulfat polyacrylamid gelelektroforese
Sp	Spectinomycin
SpR	Spectinomycinresistent
SIV	Ionefritt vann
Tc	Tetracyclin
TcR	Tetracyclinresistent
Tr	Triclosan
TrR	Triclosanresistent

Vedlegg B. Plasmidkart

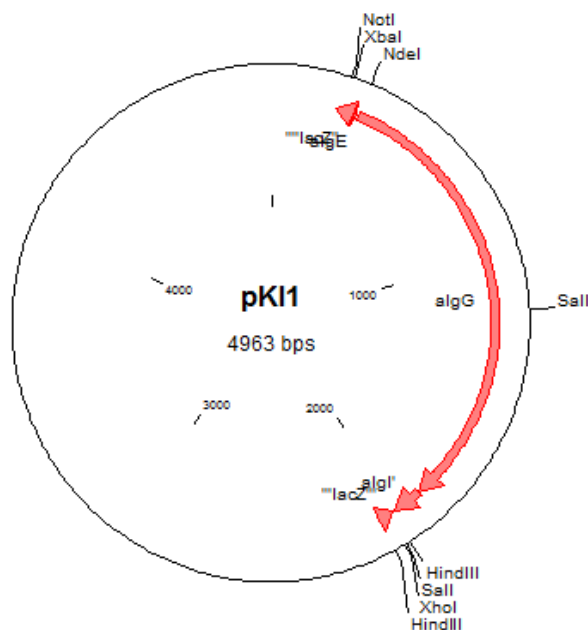
I dette vedlegget er alle plasmidene benyttet i oppgaven presentert i Figur B-1 til Figur B-14. Gjenkjennelsesseter for restriksjonsenzymene benyttet til kloning eller kontroll av plasmid er avmerket på kartene.



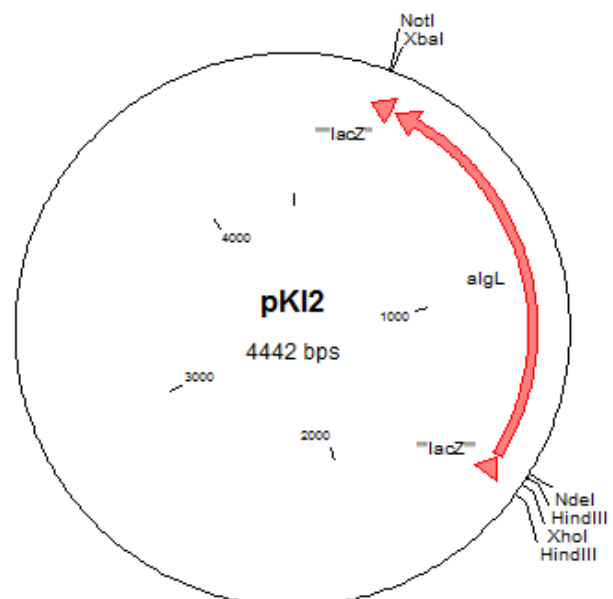
Figur B-1 pUC128



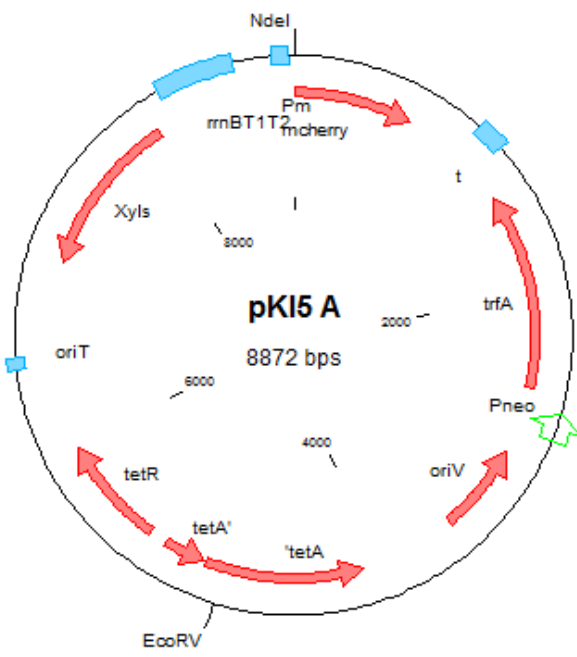
Figur B-3 pHE218



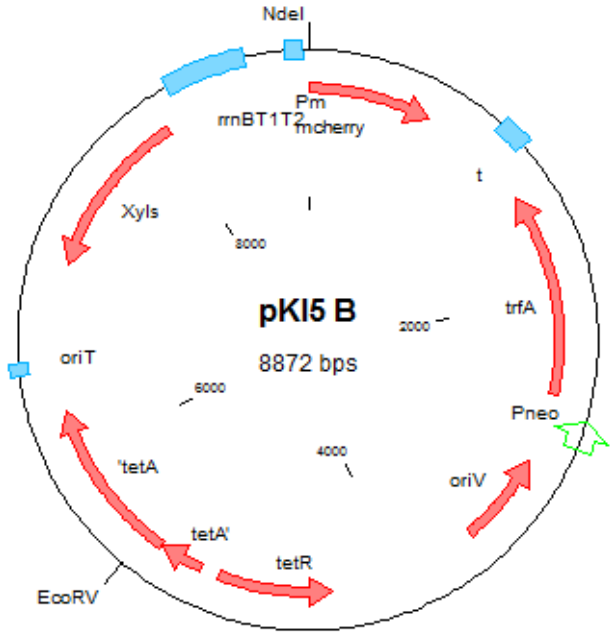
Figur B-2 pKI1



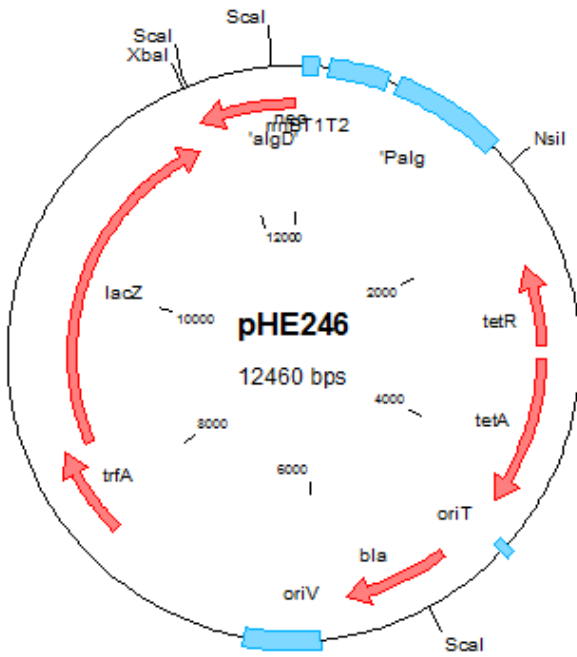
Figur B-4 pKI2



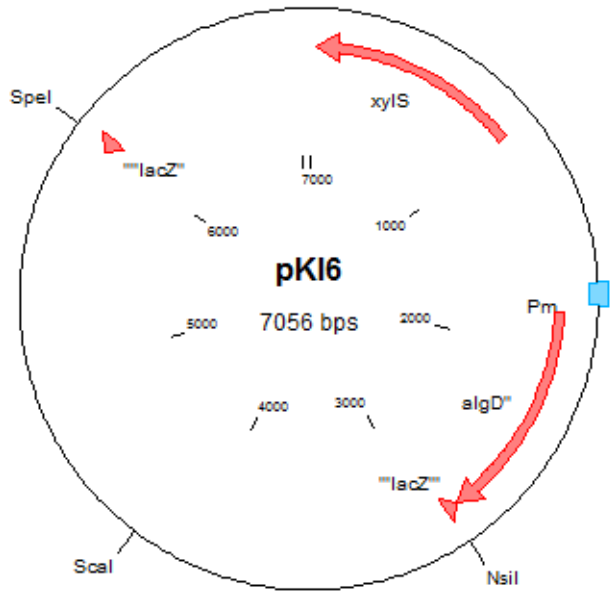
Figur B-9 pKI5 A



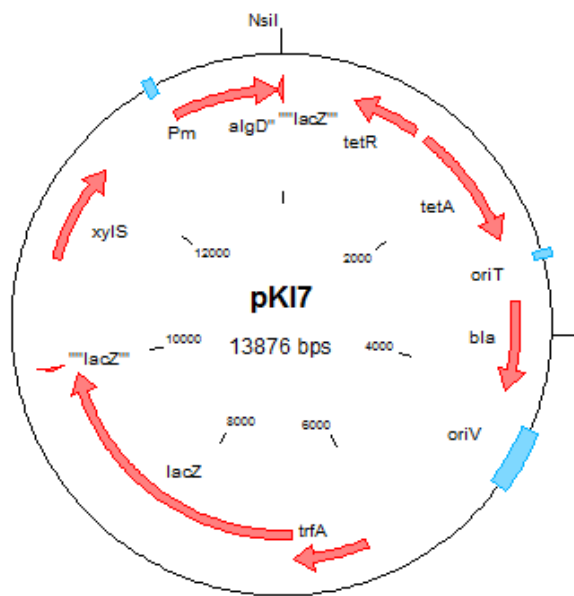
Figur B-11 pKI5 B



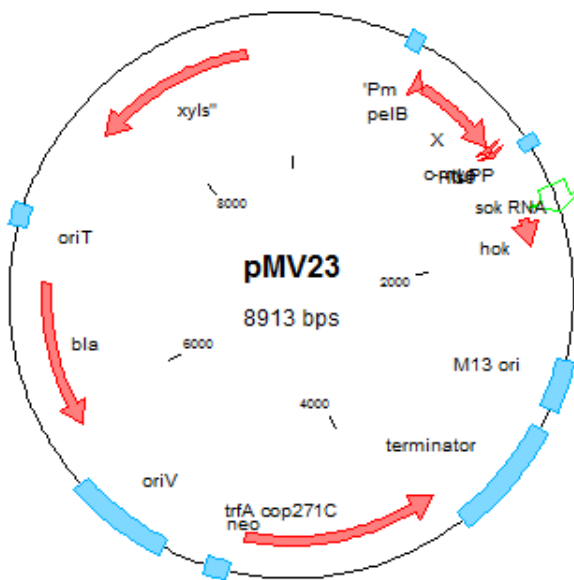
Figur B-10 pHE246



Figur B-12 pKI



Figur B-13 pKI7



Figur B-14 pMV23

Vedlegg C. Gjenkjennelseseter for restriksjonsendonukleaser

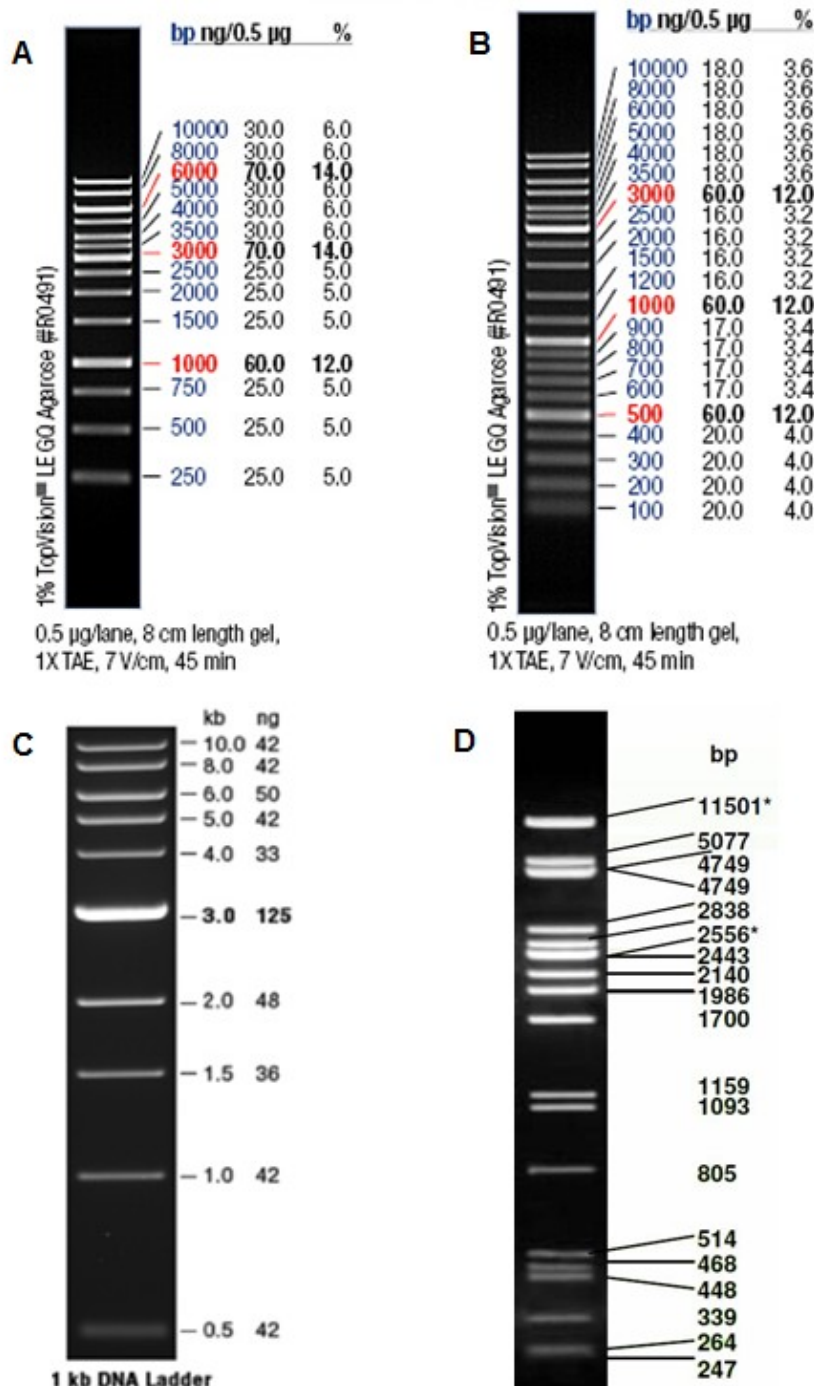
I Tabell C-1 er gjenkjennelsesetene og kuttemønsteret til alle restriksjonsenzymene benyttet i arbeidet med denne oppgaven oppgitt.

Tabell C-1 Gjenkjennelseseter til ulike restriksjonsendonukleaser. Kuttemønsteret til de ulike enzymene er angitt ved bruk av endret farge på skriften.

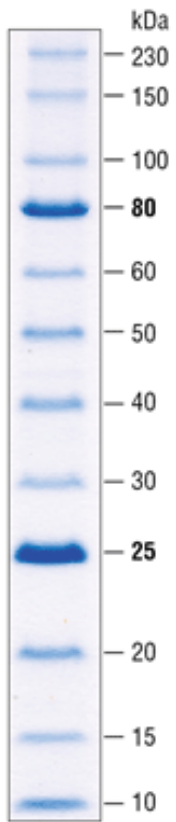
Restriksjonsenzym	Gjenkjennelsesekvens
EcoRV	5'-GATATC-3' 3'-CTATAG-5'
HindIII	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'
NdeI	5'-CATATG-3' 3'-GTATAC-5'
NotI	5'-GCGGCCGC-3' 3'-CGCCGGCG-5'
NsiI	5'-ATGCAT-3' 3'-TACGTA-5'
PstI	5'-CTGCAG-3' 3'-GACGTC-5'
SalI	5'-GTCGAC-3' 3'-CAGCTG-5'
Scal	5'-AGTACT-3' 3'-TCATGA-5'
SpeI	5'-ACTAGT-3' 3'-TGATCA-5'
XbaI	5'-CTAGA-3' 3'-AGATCT-5'
XhoI	5'-CTCGAG-3' 3'-GAGCTC-5'

Vedlegg D. Standarder

For å kunne bestemme hvilke lenger fragmenter separert ved gelelektroforese tilsvarte ble det benyttet ulike DNA standarder (Figur D-1). På samme måte ble det benyttet en protein standard for å bestemme størrelser på proteiner ved SDS-PAGE (Figur D-2).



Figur D-1 DNA standarder benyttet i arbeidet med oppgaven. A: GeneRuler 1 kb DNA Ladder fra Fermentas B: GeneRuler DNA Ladder Mix fra Fermentas. C: 1 kb DNA Ladder fra New England BioLabs. D: Phage Lambda DNA PstI digest.



Figur D-2 Protein standard benyttet i arbeidet med oppgaven. Prestained Protein Ladder, Broad Range fra NEB.

Vedlegg E. Sekvenssammenligning

Dette vedlegget gjengir sammenligninger av målsekvens med sekvenseringsresultater for kontroll av innført DNA i tre ulike plasmider. Øverste sekvens er målsekvensen, de andre er resultat oppnådd med forskjellige primere (se Tabell 2-6 for primersekvenser). En strek indikerer mellomrom, prikk indikerer lik base som i målsekvens og bokstaver indikerer at basene i sekvensene er ulike på de angitte posisjonene. Restriksjonssteder benyttet til videre kloning er indikert i målsekvens ved grå bakgrunn.

Sammenligning av korrekt *algG*-sekvens med sekvensert pKI1

- *algG* = *algG* genot hentet fra sekvens i clone
- GeF = sekvens oppnådd ved bruk av M13 forward primer
- GeR = sekvens oppnådd ved bruk av M13 reverse primer
- GeF er blitt revers-komplementert

<i>algG</i>	1	-----
GeF	1156	-----
GeR	1	nttangnatcaggtatacgatatccgagtcaccaccgcggtggctggccgct
<i>algG</i>	1	-----
GeF	1156	-----
GeR	51	ctagaactagtggtatccccgggctgcaggaattcgatgcggttctgagg
<i>algG</i>	1	-----atgatagcccagagaaaacatgtgggtcctgagcctgctgatca
GeF	1156	-----
GeR	101	agagcat.....
<i>algG</i>	44	ccacgctgacattgccggtacaggggtgctcgtgcaggtaatgcaggcgct
GeF	1156	-----nnn.nnn.nnn.nnn.-----
GeR	151
<i>algG</i>	94	ggcagaacggcgacgcccgcagcattgccccttgatggaagacta
GeF	1136	-----,aact..c.-----
GeR	201
<i>algG</i>	144	cgacatcgagataaagcccgggtgaggaactgtacctgccggagccggaac
GeF	1121	-----
GeR	251
<i>algG</i>	194	tgccggatgtgtcagcgtatagccgcgatgccatcgagtcacggctggcc
GeF	1121	-----
GeR	301
<i>algG</i>	244	ggccgaccagacacggcgcccaacgtgacggttgagcggatcggcggagt
GeF	1121	-----
GeR	351
<i>algG</i>	294	cagcgcattgggggatttcgctcgatgaaggccgagcgcgtgaatgggtgg
GeF	1121	-----
GeR	401

```

algG      344 tgcgccagttttcacatccccaggcgatcctgggtcaacagtggaagtc
GeF      1121 -----...-----
GeR      451 .....

algG      394 acgctggaggacgtctatcgtcagggtgaatgaccgccgctacatggagcg
GeF      1117 -----
GeR      501 .....

algG      444 caacgaggatggcagctacatcatccggttgccgcttgccggtccgccagg
GeF      1117 -----
GeR      551 .....

algG      494 acgccacgctgggtgatgcgatcagaccctgcggttgctcggaggaacgg
GeF      1117 -----...t...-----
GeR      601 .....

algG      544 ggcgcctttattgccaacgatggctggctggttgccatcgacagcgagat
GeF      1110 -----
GeR      651 .....

algG      594 tatcggctggcgtgaacaggccaatggcccggcgaccttcagaaaaagg
GeF      1110 ---...g.-----...n..gg.a
GeR      701 .....

algG      644 aaaacttccggccattctatgtgggctggggcggtagcgagaacttcatc
GeF      1090 .....tttca.....-----
GeR      751 .....

algG      694 ctcggcaccaccatggccaacctcgggtatctgcagagtaaat-cctacg
GeF      1072 t....ncn.c.....c.....ntntgc..a.....t.....
GeR      801 .....-.....

algG      743 gcttcacggtggcccagatattccgagtagcacaacgcacgcctgcagcgc
GeF      1022 .....
GeR      850 .....

algG      793 agtgcgccccatgcctggctgggtggagtccaccttcgaggatcttacta
GeF      972 .....
GeR      900 .....

algG      843 cgggttttactgctacg-aagcgggaagacggttgccatcgtcgacaacctg
GeF      922 .....-.....
GeR      950 .....cc.....n...n....t-----

algG      892 taccgcgacaacatcggtgtacgggatcgacccccacgactattccagcgg
GeF      873 .....
GeR      986 -----

algG      942 gctgatcattgccaataacgagggtgatggcactcgcgagaaacacggaa
GeF      823 .....
GeR      986 -----

```

algG	992	tcatcatttcccgtgaggtgaataacagctggatcatcggcaaccggagc
GeF	773
GeR	986	-----
algG	1042	tataacaacggcctctccggcatcggttcttgaccgtcagagctccaacaa
GeF	723
GeR	986	-----
algG	1092	cgtggtggccaacaacgtgtcctttgacaaccagggcgatggatcgggc
GeF	673
GeR	986	-----
algG	1142	tctatgaatcccctgacaacctgctatggggcaatcgctgatgagcaac
GeF	623
GeR	986	-----
algG	1192	ctgcgcaatggcatccgggtgcgtaacagcagcaacgtcgatgtttacca
GeF	573
GeR	986	-----
algG	1242	caacgtggcggtgctcaacggcacctggggcatttacggccagctcaaag
GeF	523
GeR	986	-----
algG	1292	acctgtcagccacggaccgcaacttcaaggaagatttctacgattacgaa
GeF	473
GeR	986	-----
algG	1342	gtgtcgatgagagtggtgggcgaggtggcctccaacgccagtggccc
GeF	423
GeR	986	-----
algG	1392	cctgtccaccgacaatcctgcctatatcgccttgacgatgtgggcatgc
GeF	373
GeR	986	-----
algG	1442	gattcccacgctcggacgtgggtatccatthttgaaggagtgctgggcaa
GeF	323
GeR	986	-----
algG	1492	taccagaggcagatcttcgatgctctgaggaaccagagccgagcggtgca
GeF	273
GeR	986	-----
algG	1542	tattgaaccttcggccggttgatcgggccaggtaacgcaggcggagaact
GeF	223
GeR	986	-----
algG	1592	ga-----
GeF	173	..catggttttttcatccaatatcttctgtttctcttctcctgccagcgtt
GeR	986	-----

```

algG      1594 -----
GeF       123  tttggggctgtattacctgacaccggttcaggcaccgctctctggttatcc
GeR       986  -----

algG      1594 -----
GeF        73  tgatcggcagactagtaacatcaagcttatcgataccgtcgacctcgaga
GeR       986  -----

algG      1594 -----
GeF        23  ggggggcccggaccgntgancnn
GeR       986  -----

```

Sammenligning av korrekt *algL*-sekvens med sekvensert pKI2

- *algL* = *algL* genet hentet fra sekvens i clone
- L7F = sekvens oppnådd ved bruk av M13 forward primer
- L7R = sekvens oppnådd ved bruk av M13 reverse primer
- L7R er blitt revers-komplementert

```

algL      1  -----
L7F       1  nnnngtcagtcancggtnaccgggccccccctcgaggctcgacggtatcga
L7R      718 -----

algL      1  -----atgcgaatccaacaacgctctgaacatcggc
L7F      51  taagcttgatcggattcat.....
L7R      718 -----

algL      32  aatggggccgggtgctgctgtctgcggcgatcactgccgtctttggtgta
L7F     101  .....
L7R      718 -----

algL      82  agcagcgtgcacgcgggcagtgccctgaacggagaactgcgagccccggt
L7F     151  .....
L7R      718 -----

algL     132  gggttattaccagacgccgcaagaacaggatggcggcgactacgactgcg
L7F     201  .....
L7R      718 -----

algL     182  agcgggttgagccgcacgtcggctcgctgctgaccagcaagtacaag
L7F     251  .....
L7R      718 -----

algL     232  ggcagtgacagcgcctcgcaacaatctgaacaagcaggcctatgaggagta
L7F     301  .....
L7R      718 -----

algL     282  caaaaaggccaccagcaacgtgcgtgatttcgagaaggctgttatcgtg
L7F     351  .....
L7R      718 -----

```

```

algL      332 cgcgcatgactaccaggttgatggcgatggctcctgcagcgtggattgc
L7F      401 .....
L7R      718 -----

algL      382 gtgctggacaacctcgacgcatgggctcatcggaggccctgttgacgga
L7F      451 .....
L7R      718 -----

algL      432 ggacgtcaaccacgtcggtcaggcggtagcgaatgggactggcagccg
L7F      501 .....
L7R      718 -----

algL      482 ctgcgaacgcctatctcaggatgtggacgtcggcgccggaggccgcatg
L7F      551 .....
L7R      718 -----

algL      532 gacctggagcgggcgccgaattgaggactggtttctgcgcttgagcga
L7F      601 .....
L7R      718 -----.....

algL      582 tggggt--ccgcgatta-ctacacgg-atcgaaaa-gccaagaaggtcaa
L7F      651 .....-.....-.....-.....-.....
L7R      713 .....gtg.....g.....g.....a...n.....

algL      627 caaccatgactactgggcgccctgggccgtgatgtcggcatcggaggcaa
L7F      696 .....a.....
L7R      663 .....n.....

algL      677 cccaggactgcgacgactggaactggtcgctggccaagttcgatgaagcc
L7F      746 .....
L7R      613 .....

algL      727 atggggcagatcaatgaggacggttacctgccaaggaactcagccggga
L7F      796 .....n.....
L7R      563 .....

algL      777 aactcgggccttggaatatatgaactacgccatgcagcccctgaccatga
L7F      846 .....
L7R      513 .....

algL      827 tcgctgtgttgccgaggtcaatggcaa-ctctgtttacgagcgttacca
L7F      896 .....-.....n.....n.....n.....
L7R      463 .....-.....

algL      876 ggaccaatttacgaagatggccggaatgtcgtcgcggggctggatgatc
L7F      945 .....-..n...n...n.....c.....n.....
L7R      414 .....

algL      926 cggaacgaattgaagacatcaccggaga---cgagcagattgtcgacggg
L7F      994 .c...n..n...n.....g..aca.n.n.n...g...n...
L7R      364 .....---.....

```

```

algL      973 ctttat-aaagcctggtcacctggcctggatggaac---cctggcaggcgg
L7F      1044 n....nn.....n...c--t...nnnn.nnnnnn..nnnnn.nnn
L7R      317 .....-.....-...-.....

algL      1019 cctggggcccgggttgaggggaatgcccgacctttctggacgaacttcggccg
L7F      1092 nnn...n.--nnnnn...nnnnnnnnnnnnn..nnn.nnn.nnn.n
L7R      271 .....

algL      1069 atgaaatccaccctgtctgggtggcgatatttcctatctgtacggcattaa
L7F      1139 nnn-----
L7R      221 .....

algL      1119 cccgctgtggcccggggcgcgcagccggatccaccagcaacatcacc
L7F      1142 -----
L7R      171 .....

algL      1169 taagtaaacggttctaa-----
L7F      1142 -----
L7R      121 .....cgggccgactagttaaatcgaattcctgcagcc

algL      1186 -----
L7F      1142 -----
L7R      71 cgggggatccactagtgctagagcggccgaccaccgcggtggngactcg

algL      1186 -----
L7F      1142 -----
L7R      21 gatatcgtatacagtnctaan

```


Sammenligning av ønsket sekvens med sekvensert pKI6

- insert_i_pKI6 = målsekvens hentet fra sekvens i clone
- A6_M13_rev = sekvens oppnådd ved bruk av primer M13 reverse
- A6_1100 = sekvens oppnådd ved bruk av primer Sekvens 1100
- A6_2000 = sekvens oppnådd ved bruk av primer Sekvens 2000
- A6_2900 = sekvens oppnådd ved bruk av primer Sekvens 2900
- A6_pGEM = sekvens oppnådd ved bruk av primer pGEM/pLit-seq-f
- A6_pGEM er blitt revers-komplementert

```

insert_i_pKI6      1  cacacaggaaacagctatgaccatgattacgaattcgagctccaccgcgg
A6_M13_rev        1  -----..a....---.....-.....-.....
A6_1100           1  -----
A6_2000           1  -----
A6_2900           1  -----
A6_pGEM_(reversed) 1  -----

```

```

insert_i_pKI6      51  tggcgggccgctctagaactagtgatcccccgggctgcaggaattcgata
A6_M13_rev        33  .....
A6_1100           1  -----
A6_2000           1  -----
A6_2900           1  -----
A6_pGEM_(reversed) 1  -----

```

```

insert_i_pKI6     101  gaagggcgggcgtgggtgctgctgacacttcaggccgcccgcgagcttgccc
A6_M13_rev        83  .....
A6_1100           1  -----
A6_2000           1  -----
A6_2900           1  -----
A6_pGEM_(reversed) 1  -----

```

```

insert_i_pKI6     151  gggaaaggtattcgggtaaacaccattgctccgggaattttcatgacgccg
A6_M13_rev       133  .....
A6_1100           1  -----
A6_2000           1  -----
A6_2900           1  -----
A6_pGEM_(reversed) 1  -----

```

```

insert_i_pKI6     201  atgatggcggggtatgccgcaggaagtgcaggacagcctcgctgccacgct
A6_M13_rev       183  .....
A6_1100           1  -----
A6_2000           1  -----
A6_2900           1  -----
A6_pGEM_(reversed) 1  -----

```

```

insert_i_pKI6     251  gcctttccccaagcgggttgggcaaggccgaggagtttggcatgttggtgg
A6_M13_rev       233  .....
A6_1100           1  -----
A6_2000           1  -----
A6_2900           1  -----
A6_pGEM_(reversed) 1  -----

```

```

insert_i_pKI6      301 atcagatggtgcgcaaccccatcctcaacggtgaggttattcgactggac
A6_M13_rev        283 .....
A6_1100           1 -----
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      351 tgtgcgctgcgcatggcgcctaaataaagtgggtggctcgttaacgcgaat
A6_M13_rev        333 .....
A6_1100           1 -----
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      401 ctcgtctcttttgtaaggctaagtgggtgagggttcagagggtggaactcagt
A6_M13_rev        383 .....
A6_1100           1 -----
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      451 cggtgatcggtgagtttcgctggttttgagcgggtatTTTTctcgatacg
A6_M13_rev        433 .....
A6_1100           1 -----
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      501 accctgtataacgacgaaagattcaaattgggttccatacgaaaaaatcgc
A6_M13_rev        483 .....
A6_1100           1 -----
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      551 gtttgattcgatTTTataatatcgatTTTTTTTTtgcgattacgaaa
A6_M13_rev        533 .....
A6_1100           1 -----
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      601 tagaaaagcgcactccttctctcatatgtgccttatcgggtgcatgctct
A6_M13_rev        583 .....
A6_1100           1 -----
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

```

```

insert_i_pKI6      651 gatgatttcctttttcatttcttctgcggtgtcaggccactagggttttta
A6_M13_rev        633 .....
A6_1100           1 -----
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      701 ctgtctttcataaatgcacaccaagacagagacatgtatctcctgacta
A6_M13_rev        683 .....
A6_1100           1 -----
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      751 tagttgaaattatcttttcgtaacaggatatttaacgtttcgttacgatag
A6_M13_rev        733 .....
A6_1100           1 -----
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI       801 ttttctggctggttggaaacgctgtggacgacgtagatcgcttgccggtgat
A6_M13_rev        783 .....
A6_1100           1 -----.t.t....-----
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      851 ttgtccgtcttctgtgttcccccaactcaaactggatactcaaaaggcgca
A6_M13_rev        833 .....
A6_1100           12 -----
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      901 tcagggcaacgtttctgttgagcttgccctgttcgtaatcagacaccggt
A6_M13_rev        883 .....
A6_1100           12 -----...-----
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      951 cgcggggaaaagttcaaaaaagaacctcttcccgattcgggggttgctgtt
A6_M13_rev        933 .....
A6_1100           29 .....
A6_2000           1 -----
A6_2900           1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

```

```

insert_i_pKI6      1001 ccgagccttttgagtgtcaccagtcaaccagtagtcagtcggttgattca
A6_M13_rev        983 .....
A6_1100           79 .....
A6_2000            1 -----
A6_2900            1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      1051 tggaggctcccgggtgggagtcgctggatgacagtcaggggagtaaagga
A6_M13_rev        1033 .....a.....
A6_1100           129 .....
A6_2000            1 -----
A6_2900            1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      1101 taccatcccttcttcggctacgttcgtaataagccacttccttttgc
A6_M13_rev        1083 .....
A6_1100           179 .....
A6_2000            1 -----
A6_2900            1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      1151 attgacgcaggggtgctggaaggcaactcgccgaacgcgctcctatagttt
A6_M13_rev        1133 .....g..
A6_1100           229 .....
A6_2000            1 -----
A6_2900            1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      1201 tcagcgaagcgtcccaaataagaagccgtagtctagggtatctcagt
A6_M13_rev        1183 .....C.....-.....
A6_1100           279 .....
A6_2000            1 -----
A6_2900            1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      1251 tatactacgcacattggcactgggatcggtcaagcaggcgcggatgcttt
A6_M13_rev        1232 ..-.....-.....g.....g.-.....
A6_1100           329 .....
A6_2000            1 -----
A6_2900            1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      1301 cgagcttgcggttgcggatgtagttcttcggcgtggtgccggcatgcttc
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           379 .....
A6_2000            1 -----
A6_2900            1 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

```

```

insert_i_pKI6      1351  tcgaacaaattgtagagcgagcgtggactcatcatcgccagctccgctaa
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           429  .....
A6_2000            1  -----
A6_2900            1  -----
A6_pGEM_(reversed) 1  -----

insert_i_pKI6      1401  ccgctcaaggctgatattccgtttgagattctcctcaatgaattgaacga
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           479  .....
A6_2000            1  -----
A6_2900            1  -----
A6_pGEM_(reversed) 1  -----

insert_i_pKI6      1451  ctcgctcgaaagacgggttacctttgctgaaaatttcacggctgacattg
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           529  .....
A6_2000            1  -----
A6_2900            1  -----
A6_pGEM_(reversed) 1  -----

insert_i_pKI6      1501  ctgcccagcatttcgagcagcttgggaagcgatgatccccgcatagtgctc
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           579  .....
A6_2000            1  -----
A6_2900            1  -----
A6_pGEM_(reversed) 1  -----

insert_i_pKI6      1551  ttggaccocgagggcatcgactttgtatggtccgcttcgtcacaaactaacc
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           629  .....
A6_2000            1  -----
A6_2900            8  -----
A6_pGEM_(reversed) 1  -----

insert_i_pKI6      1601  cgagtagattgataaagccatcgagttgctggagattgtgtcgcgcgcg
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           679  .....
A6_2000            1  -----
A6_2900            8  -----
A6_pGEM_(reversed) 1  -----

insert_i_pKI6      1651  aaacggataccctccctcggcttgtgccaattgttgactgcatgcccg
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           729  .....
A6_2000            5  -----
A6_2900            8  -----
A6_pGEM_(reversed) 1  -----

```

```

insert_i_pKI6      1701 atcaaggaccactgagggcaatttaacgataaatttctcgcaatcttctg
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           779 .....
A6_2000            10 -----
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      1751 aataggtcaggtcggcttggtcatccggattgagcagcaatagttcgccc
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           829 .....
A6_2000            10 -----
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      1801 ggcgcaaaatagtgctcctggccatggccacgccacaggcaatggccttt
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           879 .....
A6_2000            10 -----
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      1851 gagtattatttgcagatgataacaggtctctaataccaggcgagattaccc
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           929 .....
A6_2000            46 .....
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      1901 tcacgctaccgcccgtagctgattcgacacaggtcgaggcatccgaagatt
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           979 .....
A6_2000            96 .....
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      1951 ctgtggtgcagcctgcctgccggcgcccgcccttgggcaggcgaataga
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100          1029 .....
A6_2000           146 .....
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      2001 gtgcgtaccgacatactggttaacataatcggagactgcata-gggctcg
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100          1079 .....a.....
A6_2000           196 .....-.....
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

```

```

insert_i_pKI6      2050 gcgtgga-cgaagatctgacttttctcgttcaataagcaaaaatccatag
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100          1129 .....a....a.....
A6_2000           245 .....-.....
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      2099 ttcacgg-ttctcttattttaatgtgggc-tgcttggtgtg-atgtagaa
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100          1179 .....g.....g....c.....g...g...g.a..
A6_2000           294 .....-.....-.....-.....
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      2146 a--ggcgccaagtcgatgaaaa-tgcacg-aattaattcgagatcccccc
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100          1229 .ag...c.....c.....a....a.g.....c.a.at.....
A6_2000           341 .--.....-.....g.-.....
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      2192 ctggcgggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgc
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100          1279 .-----
A6_2000           387 .....
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      2242 agaagcggctctgataaaacagaatgtgcctggcggcagtagcgcggtggt
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100          1280 -----
A6_2000           437 .....
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      2292 cccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgcgcatg
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100          1280 -----
A6_2000           487 .....
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

insert_i_pKI6      2342 gtagtgtggggtctcccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaat
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100          1280 -----
A6_2000           537 .....
A6_2900            8 -----
A6_pGEM_(reversed) 1 -----

```

```

insert_i_pKI6      2392  aaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgtt
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1280  -----
A6_2000           587  .....
A6_2900            8  -----
A6_pGEM_(reversed)  1  -----

insert_i_pKI6      2442  tgtcgggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttg
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1280  -----
A6_2000           637  .....
A6_2900            8  -----
A6_pGEM_(reversed)  1  -----

insert_i_pKI6      2492  aacgttgcaagcaacggccccggagggtggcgggcaggacgcccgcata
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1280  -----
A6_2000           687  .....
A6_2900            8  -----
A6_pGEM_(reversed)  1  -----

insert_i_pKI6      2542  aactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggccttt
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1280  -----
A6_2000           737  .....
A6_2900            8  -----
A6_pGEM_(reversed)  1  -----

insert_i_pKI6      2592  ttgcgtagatccggctcgaggccggtagcggagctatccaacggcgggtata
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1280  ----- .ct.....a..-----
A6_2000           787  .....
A6_2900            8  -----
A6_pGEM_(reversed)  1  -----

insert_i_pKI6      2642  ccaggaaaacacacagcagggtacatcagaacagtaccatgactgaagaac
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1292  ----- .....a
A6_2000           837  .....
A6_2900            8  -----
A6_pGEM_(reversed)  1  -----

insert_i_pKI6      2692  aaatagtttttctgatccataaagcagaacggcctgctccatgacaaa
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1299  ...----- .....-----
A6_2000           887  .....
A6_2900            8  .....-.....
A6_pGEM_(reversed)  1  -----

```



```

insert_i_pKI6      2742 tctggctccccaactaatgccccatgcagccagcataaccagcataaacg
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000            937 .....
A6_2900             57 .....
A6_pGEM_(reversed) 1 -----..c..

insert_i_pKI6      2792 tgtccggttt-gatagggataagtccagccttgcaagaagcggatacagg
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000            987 .....-.....a.....a.....
A6_2900            107 .....-.....
A6_pGEM_(reversed) 6 .....t.....a.....

insert_i_pKI6      2841 agtgcaaaaaa-tggctatctctagaaaggcctacccc-ttaggctttat
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1036 ..g..-----
A6_2900            156 .....-.....-.....
A6_pGEM_(reversed) 56 .....a.....t....c.....

insert_i_pKI6      2889 gcaacatgtacaataataatggagtcacgaacaatgcgagtcagtatTTTT
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900            204 .....
A6_pGEM_(reversed) 106 .....

insert_i_pKI6      2939 tggtttgggttatgtcggggcgggtgtgtaccgccagtctggcccagcggg
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900            254 .....
A6_pGEM_(reversed) 156 .....

insert_i_pKI6      2989 ggcacacgtggctcgggtgtggatgtgtcgcccatcaaaattgatctgatc
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900            304 .....
A6_pGEM_(reversed) 206 .....

insert_i_pKI6      3039 aacagcggcaggtctcctatcgtggagccggggctggaggaactgctccg
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900            354 .....
A6_pGEM_(reversed) 256 .....

```

```

insert_i_pKI6      3089 gagcggggcgcgagaaacggatttatcaacggcggttaccgacggtcacatcg
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900           404 .....
A6_pGEM_(reversed) 306 .....

insert_i_pKI6      3139 cggttcaggagagcgaactgtcgcgatgatctgcgtgggcacgcccagcaag
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900           454 .....
A6_pGEM_(reversed) 356 .....

insert_i_pKI6      3189 ccgaatggcgatcttgacctgcagtttgcgaaaaagtgtgtggcgacat
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900           504 .....
A6_pGEM_(reversed) 406 .....

insert_i_pKI6      3239 cgggaatgctctgaaggacaagggtgactggcacctggtggcggttcgca
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900           554 .....
A6_pGEM_(reversed) 456 .....

insert_i_pKI6      3289 gcacggctcctgcccggaaaccggttcgcgaggtggtcatccccgctctggag
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900           604 .....
A6_pGEM_(reversed) 506 .....

insert_i_pKI6      3339 aaggcgtctggaaaacgcgcccggcggttgatttcggtgtctgtgtgaacc
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900           654 .....
A6_pGEM_(reversed) 556 .....

insert_i_pKI6      3389 ggagttcctgcgggaaagcacggcaatcaaggattatgatcacctccga
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900           704 .....
A6_pGEM_(reversed) 606 .....

```

```

insert_i_pKI6      3439  tgacgggtcattggtgaactcgacgaacgctctggcgagttcctggcacga
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1308  -----
A6_2000           1041  -----
A6_2900           754   .....
A6_pGEM_(reversed) 656   .....

insert_i_pKI6      3489  atctaccaggaccttgatgcgctatcatccgcaagcccatcgaagtggc
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1308  -----
A6_2000           1041  -----
A6_2900           804   .....
A6_pGEM_(reversed) 706   .....

insert_i_pKI6      3539  tgagatgatcaagtacacctgcaacatctggcacgcgaccaaagtcaagct
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1308  -----
A6_2000           1041  -----
A6_2900           854   .....
A6_pGEM_(reversed) 756   .....

insert_i_pKI6      3589  ttgccaacgaaatcggcaatattgccaagtcgatgggctggacggccgg
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1308  -----
A6_2000           1041  -----
A6_2900           904   .....
A6_pGEM_(reversed) 806   .....

insert_i_pKI6      3639  gatgtcatggatgtggtctgccaggacaagaagctgaacatctcacgcta
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1308  -----
A6_2000           1041  -----
A6_2900           954   .....
A6_pGEM_(reversed) 856   .....

insert_i_pKI6      3689  ctacatgcgccctggcttcgccttcggcggttctgcctacccaaagacg
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1308  -----
A6_2000           1041  -----
A6_2900           1004  .....
A6_pGEM_(reversed) 906   .....

insert_i_pKI6      3739  tgcgcgctctgacctaccgggccaatcagatggacgtgaagcaccactg
A6_M13_rev        1258  -----
A6_1100           1308  -----
A6_2000           1041  -----
A6_2900           1054  .....
A6_pGEM_(reversed) 956   .....

```

```

insert_i_pKI6      3789 ctgagctccatcatgagcagcaacaatgagcaggttgccacgcgttcaa
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900           1104 .....
A6_pGEM_(reversed) 1006 .....

insert_i_pKI6      3839 gatcctcaccagctatggctgccgaaggtgagcatgctgggcctgagct
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900           1154 .....
A6_pGEM_(reversed) 1056 .....

insert_i_pKI6      3889 tcaagtccaacaccgacgatctgcgggaaagccctcaagcttatcgatac
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900           1204 ..-----
A6_pGEM_(reversed) 1106 .....

insert_i_pKI6      3939 cgtcgacctcgagggggggcccggtaccgatgcatgcaagcttggcactg
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1308 -----.....a.-----
A6_2000           1041 -----
A6_2900           1206 -----
A6_pGEM_(reversed) 1156 .....-.....--.....-----....ca

insert_i_pKI6      3989 gccgctcgtttta
A6_M13_rev        1258 -----
A6_1100           1318 -----
A6_2000           1041 -----
A6_2900           1206 -----
A6_pGEM_(reversed) 1189 c.-----

```

Vedlegg F. Beregninger til bestemmelse av antibiotika resistensnivå

For å undersøke resistensnivå i *M. algicola* for ulike antibiotika ble bakteriekultur platet ut på LA med ulike konsentrasjoner av ni forskjellige antibiotika. Platene ble inkubert og kolonier som vokste opp ble telt.

Kimtall ble beregnet ved å ta gjennomsnittet av to paralleller av en fortytning som ga tellbart antall kolonier. Tallene som ble brukt til å beregne kimtallet er indikert med skraveret rute i Tabell 3-10. Før gjennomsnittet ble beregnet ble det ganget opp for fortytningen, f.eks. ganget med 10^5 for en 10^{-5} fortytning, og ganget med 10 for å få kimtall i 1 mL (det ble platet ut 100 μ L, $100 \mu\text{L} \times 10 = 1 \text{ mL}$). Standardavviket til kimtallene ble beregnet ut i fra (F-1).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (\text{F-1})$$

hvor x er en verdi, \bar{x} er gjennomsnittet av x -verdiene og n er totalt antall verdier.

Prosentvis overlevelse ble beregnet ved å ta prosent kimtall for hver prøve (X i formel F-2) av kimtallet til prøvene platet ut på LA uten antibiotika (Y i formel F-2). Standardavviket til disse prosentverdiene ble funnet ved å bruke Gauss' feilforplantningslov (F-3).

$$\% = \frac{x}{y} \cdot 100 \quad (\text{F-2})$$

$$S_{\%}^2 = \left(\frac{\partial\%}{\partial X}\right)^2 \cdot S_X^2 + \left(\frac{\partial\%}{\partial Y}\right)^2 \cdot S_Y^2 \quad (\text{F-3})$$

hvor S_x er standardavviket til kimtallet for prøve X og S_y er standardavviket til prøven uten antibiotika. $S_{\%}$ blir standardavviket til prosentvis overlevelse. Etter partell-derivering blir (F-3) til (F-4).

$$S_{\%} = \sqrt{\left(\frac{1}{y} \cdot 100\right)^2 \cdot S_X^2 + \left(-\frac{x}{y^2} \cdot 100\right)^2 \cdot S_Y^2} \quad (\text{F-4})$$

Vedlegg G. Rådata og beregninger for mutagenese av *M. algicola*

Før mutagenese ble *M. algicola* platet ut på LA for å beregne tilnærmet kimtall ved $OD_{600} = 1$ (Tabell G-1). Platen med 10^{-6} fortynning ble benyttet til å beregne kimtallet.

Tabell G-1 *M. algicola* platet ut på LA. Antall kolonier av *M. algicola* som vokste opp på LA uten tilsatt antibiotika, ved utplating av 100 μ L av de ulike fortynningene.

Fortynning	Antall kolonier
Ufortynnet	Slør
10^{-5}	>500
10^{-6}	61
10^{-7}	3

Etter mutagenese av *M. algicola* med NTG, ble overlevelse, kimtall og frekvens KmR bestemt ved å telle antall kolonier (Tabell G-2 til Tabell G-4) etter utplating av 100 μ L kultur på LA, eller LA med Km, i ulike konsentrasjoner.

Kimtall ble beregnet ved å ta gjennomsnittet av parallellene av en fortynning som ga tellbart antall kolonier. I tabellene er tallene som ble brukt til å beregne kimtallet indikert. Det ble ganget opp for fortynningen på samme måte som beskrevet i Vedlegg F. Standardavviket til kimtallene ble beregnet ut i fra (F-1).

Prosentvis overlevelse, for både overlevelse og kimtallbestemmelse, ble beregnet ved bruk av (F-2). Standardavviket til disse prosentverdiene ble funnet ved å bruke Gauss' feilforplantningslov (F-4). Frekvens KmR er beregnet ved å ta prosent kimtall KmR av totalt kimtall for hver prøve. Standardavviket ble beregnet ved bruk av Gauss' feilforplantningslov (F-3).

Tabell G-2 Overlevelse. Antall kolonier observert etter utplating av 100 µL kultur av de ulike prøvene og fortyningene. Kimtall er beregnet fra de skraverte rutene for hver prøve og er gitt som kimtall i 1 mL kultur ($OD_{600} = 1$). Prosentvis overlevelse er beregnet fra de samme skraverte rutene. Tomme ruter betyr at denne kombinasjonen ikke ble plattet ut.

Prøve	Parallell	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	Kimtall	Overlevelse (%)
P0	A		264	34	$3,1 \cdot 10^8$ $\pm 0,4 \cdot 10^8$	100,0
	B		308	25		
	C		306	44		
	D		359	31		
P1	A		>500	61	$7,2 \cdot 10^8$ $\pm 1,4 \cdot 10^8$	230 ± 50
	B		>500	85		
	C		>500	83		
	D		>500	60		
P2	A	>500	95	2	$1,5 \cdot 10^8$ $\pm 0,4 \cdot 10^8$	48 ± 14
	B	>500	181	11		
	C	>500	141	24		
	D	>500	171	22		
P3	A	>500	102	5	$1,2 \cdot 10^8$ $\pm 0,2 \cdot 10^8$	39 ± 8
	B	>500	146	6		
	C	>500	131	17		
	D	>500	106	15		
P4	A	364	10		$3,59 \cdot 10^7$ $\pm 0,17 \cdot 10^7$	$11,6 \pm 1,6$
	B	375	26			
	C	361	49			
	D	335	42			
P5	A	192	25		$2,5 \cdot 10^7$ $\pm 0,5 \cdot 10^7$	8 ± 2
	B	226	43			
	C	322	33			
	D	266	27			

Tabell G-3 Kimtall i nedfryste prøver. Antall kolonier observert etter utplating av 100 µL kultur av de ulike prøvene og fortynningene. Kimtall er beregnet fra de skraverne rutene for hver prøve og er gitt som kimtall i 1 mL kultur ($OD_{600} = 2,6$). Prosentvis overlevelse er beregnet fra de samme skraverne rutene. Tomme ruter betyr at denne kombinasjonen ikke ble plattet ut.

Prøve	Parallell	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	Kimtall	Kimtall/OD	Overlevelse (%)
P0	A	>500	146	10	$1,32 \cdot 10^9$ $\pm 0,19 \cdot 10^9$	$5,1 \cdot 10^8$ $\pm 0,7 \cdot 10^8$	100
	B	>500	142	15			
	C		104	7			
	D		45*				
	E		136				
P1	A	>500	47	3	$5,8 \cdot 10^8$ $\pm 1,0 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$ $\pm 0,4 \cdot 10^8$	44 ± 9
	B	>500	68	7			
	C		63	8			
	D		48				
	E		65				
P2	A	>500	51	8	$6 \cdot 10^8$ $\pm 2 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^8$ $\pm 0,9 \cdot 10^8$	50 ± 20
	B	>500	83	5			
	C	>500	91				
	D	>500	77				
	E	>500	36				
P3	A	>500	55	3	$6,3 \cdot 10^8$ $\pm 1,5 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^8$ $\pm 0,6 \cdot 10^8$	48 ± 13
	B	>500	62	5			
	C	>500	68				
	D	>500	86				
	E	>500	45				
P4	A	394	27		$3,3 \cdot 10^8$ $\pm 0,7 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$ $\pm 0,3 \cdot 10^8$	$25,0 \pm 6,3$
	B	282	42				
	C	342	27				
	D	262	31				
	E	312	38				
P5	A	139	11		$1,09 \cdot 10^8$ $\pm 0,08 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^7$ $\pm 0,3 \cdot 10^7$	$8,3 \pm 1,3$
	B	100	15				
	C	103	13				
	D	106	26				
	E	98	4				

Tabell G-4 Kanamycinresistens. Antall kolonier observert etter utplating av 100 µL kultur av de ulike prøvene og fortyningene. Frekvens KmR er beregnet i forhold til totalt kimtall. (NB: her er det ikke tatt hensyn til at OD i prøvene er på tilnærmet 2,6.) Tomme ruter betyr at denne kombinasjonen ikke ble platet ut.

Prøve	Parallell	LA 10 ⁻⁶	Kimtall	40 µg/mL Km, 10 ⁻²	Kimtall	Frekvens KmR (%)
P0	A	66	7,4 · 10 ⁸ ± 1,1 · 10 ⁸	0	0	-
	B	82		0		
	C			0		
P1	A	85	8 · 10 ⁸ ± 8 · 10 ⁸	138	9 · 10 ⁴ ± 4 · 10 ⁴	0,012 ± 0,005
	B	74		78		
	C			63		
P2	A	54	6,5 · 10 ⁸ ± 1,6 · 10 ⁸	233	2,0 · 10 ⁵ ± 0,3 · 10 ⁵	0,031 ± 0,008
	B	76		179		
	C			199		
P3	A	2*	3 · 10 ⁸ ± 0	Kontaminert	-	-
	B	31				
	C					
P4	A	21	1,6 · 10 ⁸ ± 0,6 · 10 ⁸	73	7,3 · 10 ⁴ ± 0,7 · 10 ⁴	0,044 ± 0,017
	B	12		80		
	C			65		
P5	A	6	5,5 · 10 ⁷ ± 0,7 · 10 ⁷	123	9 · 10 ⁴ ± 3 · 10 ⁴	0,165 ± 0,06
	B	5		63		
	C			87		

Vedlegg H. Rådata og beregninger for konjugering av *M. algicola* og uttrykk av *Pm*-promotor i *M. algicola*

E. coli transformert med pKI5 ble brukt til å konjugere plasmidet over til *M. algicola*. Det ble gjort to parallelle forsøk med forskjellig lengde på konjugeringstrinnet, hhv. ett og to døgn. De skraverte rutene i Tabell H-1 ble brukt til å beregne kimtall. For begge forsøkene ble det beregnet prosentvis antall transkonjuganter ut i fra kimtall *M. algicola* + *E. coli* på 50 µg/mL Km + 10 µg/mL Tc i forhold til kimtall *M. algicola* + *E. coli* på 50 µg/mL Km (se formel F-2). Frekvensen i 1 døgn forsøket var på $8,4 \cdot 10^{-5}$, mens for 2 døgn forsøket var den på $3,8 \cdot 10^{-5}$.

Som et mål på uttrykk av *Pm*-promotoren var *mcherry* satt under kontroll av denne promotoren i pKI5. Målinger av mCherry er vist som relative tall i Tabell H-2 og måling av celletetthet for de samme prøvene er vist i Tabell H-3. Fra disse verdiene ble det beregnet mengde mCherry per OD for de ulike konsentrasjonene *m*-toluat (Tabell H-4).

Tabell H-1 Resultater fra konjugering, ett og to døgn konjugeringstrinn. Antall kolonier observert etter utplating av 100 µL kultur av de ulike prøvene og fortyningene. Tomme ruter betyr at denne kombinasjonen ikke ble platet ut.

Antibiotika	Fortynning	Ett døgn konjugering		To døgn konjugering			
		<i>M. algicola</i>	<i>M. algicola</i> + <i>E. coli</i>	<i>M. algicola</i>	<i>M. algicola</i> + <i>E. coli</i>		
Uten	Ufortynnet	Slør	Slør	Slør	Slør		
	10 ⁻⁵	-	> 500	-	> 500		
	10 ⁻⁶	183	172	278	139		
	10 ⁻⁷	21	-	23	-		
50 µg/mL Km	Ufortynnet	Slør	Slør	Slør	Slør		
	10 ⁻³	-	~Slør	-	>>500		
	10 ⁻⁴	-	~2000	-	>500		
	10 ⁻⁵	-	-	-	~500		
	10 ⁻⁶	97	-	196	55		
	10 ⁻⁷	6	-	13	-		
10 µg/mL Tc	Ufortynnet	-	Slør	0	Slør		
	10 ⁻¹	0	-	0	-		
	10 ⁻⁵	-	207	-	305		
	10 ⁻⁶	-	26	-	28		
50 µg/mL Km + 10 µg/mL Tc	Ufortynnet	0	>500	0	>500	-	
	10 ⁻¹	-	156	179	-	220	197
	10 ⁻²	-	3	7	-	10	14
	10 ⁻³	-	0	1	-	0	1
	10 ⁻⁴	-	-	0	-	0	0

Tabell H-2 Måling av mcherry-uttrykk for to paralleller av *M. algicola* og fire ulike konsentrasjoner *m*-toluat. Gjennomsnitt av tre blankprøver (15475) er trukket fra verdiene.

[<i>m</i> -toluat] (mM)	Parallell A	Parallell B
0	4661	1741
0,05	7356	2504
0,1	6846	10 502
0,5	18 127	11 701

Tabell H-3 Måling av OD₆₀₀ for åtte prøver *M. algicola*. Gjennomsnitt av tre blankprøver (0,043) er trukket fra verdiene.

[<i>m</i> -toluat] (mM)	Parallell A	Parallell B
0	0,5701	0,9676
0,05	0,7234	0,4756
0,1	0,3757	0,4060
0,5	0,7096	0,5032

Tabell H-4 mCherry per OD₆₀₀. mCherry-verdiene fra Tabell H-2 delt på celletetthet fra Tabell H-3.

[<i>m</i> -toluat] (mM)	Parallell A	Parallell B
0	8176	1799
0,05	10 169	5265
0,1	18 222	25 867
0,5	25 545	23 253

Vedlegg I. Rådata til sammenligning av alginatklynger

Tabell I-1 viser informasjon funnet i NCBI sine databaser og hvilke gener i biosyntesen av alginat disse er antatt å ha på bakgrunn av denne informasjonen. Dette er brukt til å lage Figur 3-2 som sammenligner rekkefølgen på genene i forskjellige alginatklynger.

Tabell I-1 Informasjon funnet i NCBI sine databaser for ulike arter om proteiner som muligens har en funksjon i biosyntesen av alginat. * BLAST søk med sekvens til produktet som query gir indikasjoner om at dette kan være den korrekte funksjonen.

Produkt oppgitt i NCBI sine databaser	Gen	Produkt oppgitt i NCBI sine databaser	Gen
<i>Alcanivorax borkumensis</i>		<i>Alcanivorax hongdengensis</i>	
"GDP-mannose 6-dehydrogenase"	<i>algD</i>	"GDP-mannose 6-dehydrogenase"	<i>algD</i>
"alginate biosynthesis protein Alg8"	<i>alg8</i>	alginate biosynthesis protein Alg8"	<i>alg8</i>
"alginate biosynthesis protein Alg44"	<i>alg44</i>	"alginate biosynthesis protein Alg44"	<i>alg44</i>
"alginate biosynthesis regulator"	<i>algK</i>	"alginate biosynthesis regulator"	<i>algK</i>
"outer membrane alginate export protein"	<i>algE</i>	"outer membrane alginate export protein"	<i>algE</i>
"alginate O-acetyltransferase AlgI"	<i>algI</i>	"alginate o-acetyltransferase AlgI"	<i>algI</i>
"alginate O-acetylation protein AlgJ"	<i>algJ</i>	"alginate O-acetylation protein AlgJ"	<i>algJ</i>
"alginate O-acetyltransferase"	<i>algF</i>	"alginate O-acetyltransferase"	<i>algF</i>
"alginate biosynthesis protein AlgX"	<i>algX</i>	"alginate biosynthesis protein AlgX"	<i>algX</i>
"poly(beta-D-mannuronate) lyase"	<i>algL</i>	"poly(beta-D-mannuronate) lyase"	<i>algL</i>
"poly(beta-D-mannuronate) C5 epimerase"	<i>algG</i>	"poly(beta-D-mannuronate) C5 epimerase"	<i>algG</i>
"mannose-6-phosphate isomerase"	<i>algA</i>	"mannose-6-phosphate isomerase"	<i>algA</i>
Produkt oppgitt i NCBI sine databaser	Gen	Produkt oppgitt i NCBI sine databaser	Gen
<i>Astccacaulis bioprosthecum</i>		<i>Tolumonas auensis</i>	
"alginate biosynthesis protein algA"	<i>algA</i>	"hypothetical protein"	
"GDP-mannose 6-dehydrogenase"	<i>algD</i>	"alginate lyase"	<i>algL</i>
"glycosyl transferase Alg8"	<i>alg8</i>	"nucleotide sugar dehydrogenase"	<i>algD</i>
"type IV pilus assembly PilZ"	<i>alg44</i>	"alginate biosynthesis protein Alg8"	<i>alg8</i>
"tetratricopeptide repeat family protein"	<i>algK</i>	"type IV pilus assembly PilZ"	<i>alg44</i>
"alginate lyase"	<i>algL</i>	"Sel1 domain-containing protein repeat-containing protein"	<i>algK</i>
"alginate biosynthesis protein algF"	<i>algF</i>	"carbohydrate-binding protein"	<i>algG</i>
"algI"	<i>algI</i>	"hypothetical protein"	<i>algX</i> *
"alginate o-acetyltransferase AlgJ"	<i>algJ</i>	"poly(beta-D-mannuronate) lyase"	<i>algL</i>
"carbohydrate-binding and sugar hydrolysis"	<i>algG</i>	"mannose-1-phosphate guanylyltransferase/ mannose-6-phosphate isomerase"	<i>algA</i>
"sel1 repeat family protein"	<i>algK</i>	"phosphomannomutase"	<i>algC</i>
"putative membrane protein"	<i>algE</i>	"mannose-6-phosphate isomerase"	<i>algA</i>
"alginate biosynthesis protein algX"	<i>algX</i>	"hypothetical protein /note="KEGG: pap:PSPA7_1600 alginate-C5-mannuronan-epimerase AlgG"	<i>algG</i>
"alginate lyase"	<i>algL</i>		

Tabell I-1 Fortsettelse.

Produkt oppgitt i NCBI sine databaser	Gen	Produkt oppgitt i NCBI sine databaser	Gen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		<i>Agrobacterium albertimagni</i>	
"membrane bound O-acyl transferase, MBOAT family protein"	<i>algI</i>	"nucleotide sugar dehydrogenase"	<i>algD</i>
"alginate biosynthesis protein AlgJ"	<i>algJ</i>	"alginate biosynthesis protein Alg8"	<i>alg8</i>
"alginate biosynthesis protein Alg8"	<i>alg8</i>	"type IV pilus assembly PilZ"	<i>alg44</i>
"alginate biosynthesis protein Alg44"	<i>alg44</i>	"mannose-1-phosphate guanylyltransferase (GDP)"	<i>algA</i>
"Mannuronan C-5-Epimerase"	<i>algG</i>	"hypothetical protein"	
"poly(beta-D-mannuronate) lyase"	<i>algL</i>	"membrane bound O-acyl transferase, MBOAT family protein"	<i>algI</i>
"hypothetical protein"		"hypothetical protein"	
"alginate biosynthesis protein AlgX"	<i>algX</i>	"hypothetical protein"	
"alginate o-acetyltransferase AlgF"	<i>algF</i>	"alginate biosynthesis protein AlgX"	<i>algX</i>
"hypothetical protein"		"hypothetical protein"	
"hypothetical protein"		"Sel1 domain-containing protein"	<i>algK</i>
"poly(beta-D-mannuronate) lyase"	<i>algL</i>	"poly(beta-D-mannuronate) lyase"	<i>algL</i>
"nucleotide sugar dehydrogenase"	<i>algD</i>	"hypothetical protein"	
"Mannose-1-phosphate guanylyltransferase (GDP)"	<i>algA</i>		
Produkt oppgitt i NCBI sine databaser			Gen
<i>Dinoroseobacter shibae</i>			
"hypothetical protein"			
"GDP-mannose 6-dehydrogenase"			<i>algD</i>
"alginate biosynthesis protein" /note="SWISSPROT P07874: Alginate biosynthesis proteinalgA; TIGRFAM: TIGR01479 mannose-1-phosphate guanylyltransferase/ mannose-6-phosphate isomerase; COG: COG0836 - Mannose-1-phosphate guanylyltransferase; PFAM: PF01050, PF00483"			<i>algA</i>
"putative glycosyltransferase alg8"			<i>alg8</i>
"hypothetical protein"			
"phosphomannomutase"			<i>algC</i>
"hypothetical protein" /note="SWISSPROT Q887Q8: alginate biosynthesis protein algF (precursor). No evidence at protein level and low similarity but the colocation with algC, algA and algD indicates an involvement in alginate biosynthesis.; similar to alginate biosynthesis protein algF"			<i>algF</i>
"putative poly(beta-D-mannuronate) O-acetylase"			<i>algI</i>
"putative alginate biosynthesis protein algJ"			<i>algJ</i>
"hypothetical protein" /note="SWISSPROT Q88NDO; similar to alginate biosynthesis protein algX"			<i>algX</i>
"hypothetical protein"			
"hypothetical protein"			
"hypothetical protein"			
"hypothetical protein"			