

Produksjon og transport av alkylresorcinol i *Azotobacter vinelandii*

Ole Andreas Gresholt

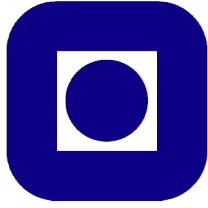
Bioteknologi

Innlevert: august 2014

Hovedveileder: Helga Ertesvåg, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi

NTNU



NTNU

Fakultet for naturvitenskap og teknologi

Institutt for bioteknologi

28.8.2014

Produksjon og transport av alkylresorcinol i *Azotobacter vinelandii*

Av: Ole Andreas Gresholt

Forord

Denne oppgaven fullfører en 2-årig mastergrad ved Institutt for bioteknologi på NTNU, og ble utført i perioden januar 2013 til august 2014. Prosjektet ble veiledet av Dr. Scient. Helga Ertesvåg, som også utformet hypotesen for denne oppgaven. Oppgaven tar for seg 5 hypotetiske gener i bakterien *Azotobacter vinelandii* med mål om å undersøke deres funksjon. Arbeidet har vært veldig lærerikt og gitt meg verdifull kunnskap for min videre karriere.

Jeg vil rette en spesiell takk til Helga Ertesvåg for veiledning, korrekturlesning og ikke minst får forståelse og tålmodighet rundt en vanskelig livssituasjon som førte til en utsettelse i masterprosjektet.

Sammendrag

A. vinelandii er kjent for sin evne til å danne cyster ved mangel på en tilstrekkelig næringskilde. Under cystedannelsen blir mange av fosfolipidene i yttermembranen erstattet med alkylresorcinoler og alkylpyroner. Et system tilstrekkelig for syntese av disse er blitt funnet å være kodet av operonet *arsABCD*. Nedstrøms for dette operonet finnes flere hypotetiske gener, hvorav 5 av dem blir sett nærmere på i dette prosjektet. Disse er Avin_29510 (*arsF*), Avin_29500 (*arsG*), Avin_29490 (*arsH*), Avin_29460 (*gly*), Avin_29450 (*mal*). *arsFGH* er tenkt å være involvert i dannelsen av en ABC-transportør med evne til å transportere alkylresorcinol gjennom cellemembranen.

Avin_29450 (*mal*) er tenkt å kode for et enzym kalt malonyl-CoA-transferase, enzymet katalyserer en reaksjon med malonylCoA som er essensiell for biosyntesen av alkylresorcinol.

Avin_29460 (*gly*) er tenkt å kode for enzymet glykosylase som kan være involvert i produksjonen av alkylresorcinol i *A. vinelandii*. Dette baseres på at noe av alkylresorcionolene produsert i *A. vinelandii* har blitt vist til å inneholde en galaktose gruppe.

Strategien for å undersøke funksjonen av samtlige av disse gene var å konstruere separate delesjonsmutanter for hvert gen og analysere hvordan dette påvirket *A. vinelandii* sin evne til å produsere eller transportere alkylresorcinol. Delesjonsmutanter og transposonvektorer til *arsFGH* var allerede produsert ved starten av dette prosjektet. Disse mutantene skulle i dette prosjektet verifiseres ved komplementering. Pm-promotoren brukt til å uttrykke villtype genet i transposonvektorerne til *arsFGH* blir under dette prosjekt vist til og ikke fungere etter hensikt ved cystedannelse og tilsatts av m-toluat. Det blir derfor konstruert nye transposonvektorer for disse gene med villtype-gen under kontroll av *palgD*. For deteksjon av alkylresorcinol ble det i dette prosjektet etablert en metode ved reaksjon med en løsning inneholdende Fast Blue B. Saltet Fast blue B og 5-n-alkylresorcinol / Orcinol(standard) reagerer med hverandre i nærvær av aceton og danner et rødt presipitat. Fargeomslag som følger av dette kan måles spektrofotometrisk ved 520nm.

Under dette prosjektet ble det konstruert en delesjonsmutant for Avin_29460 (*gly*) og funnet tegn på at dette genet kan påvirke vekstraten til *A. vinelandii*. Et knockout-plasmid for Avin_29450 (*mal*) ble også ferdigstilt, men en delesjonsmutant ble funnet til å være vanskelig å produsere. Dette kan tyde på at genet er viktig for veksten av *A. vinelandii* til den grad at villtypen tar over kulturen. Avin_29460 (*gly*) og Avin_29450 (*mal*) ble klonet som første trinn i prosessen med å lage vektor for å uttrykke disse i *A. vinelandii* mutanter.

Summary

A. vinelandii is known for its ability to form cysts in the absence of an adequate nutritional source. During cyst formation, many of the phospholipids in the outer membrane is replaced with alkylresorcinols and alkylpyrones. A system sufficient for the biosynthesis of these lipids has been found to be encoded by the operon *arsABCD*. Downstream of this operon are several hypothetical genes, 5 of which will be looked at in this project. These are Avin_29510 (*arsF*), Avin_29500 (*arsG*), Avin_29490 (*arsH*), Avin_29460 (*gly*), Avin_29450 (*mal*). *arsFGH* is thought to be involved in the formation of an ABC-transporter capable of transporting alkylresorcinol through the cell membrane.

Avin_29450 (*mal*) is thought to encode an enzyme called malonyl-CoA transferase, the enzyme catalyzes a reaction with malonylCoA which is essential for the biosynthesis of alkylresorcinol.

Avin_29460 (*gly*) is thought to code for the enzyme glycosylase that may be involved in the production of alkylresorcinol in *A. vinelandii*. This is based on some of the alkylresorcionol produced in *A. vinelandii* has been shown to contain a galactose group.

The strategy for investigating the function of all of these genes was to construct separate deletion mutants for each gene and analyze how this affected *A. vinelandii*'s ability to produce or transport alkylresorcinol. Deletion mutants and transposonvectors to *arsFGH* had already been produced at the start of this project. In this project these mutants will be attempted verified by complementation. The P_m-promoter used to express the wild-type gene in the transposonvectors to *arsFGH* are in this project shown not to work as intended during cyst formation and with added m-toluate. It was there for constructed new transposonvectors for these gene with the wild-type gene under the control of palgD. To detect alkylresorcinols in this projects *A. vinelandii* cysts a new method was developed. The method is based on the reaction between Fast Blue B salt dissolved in acetone and 5-n-alkylresorcinol / orcinol (standard). This reaction creates a red precipitate that is measurable at 520nm in a spectrophotometer.

During this project it was constructed a deletion mutant of Avin_29460 (*gly*) and the results suggests that this gene may affect the growth rate of *A. vinelandii*. A knockout plasmid for Avin_29450 (*mal*) was also completed, but a deletion mutant was found to be difficult to produce. This suggests that the gene is important for the growth of *A. vinelandii* to the extent that the wild type takes over the culture. Avin_29460 (*gly*) and Avin_29450 (*mal*) was cloned as a first step in the process of making a vector to express these in *A. vinelandii* mutants.

Innholdsfortegnelse

| | |
|---|------------|
| FORORD | I |
| SAMMENDRAG | II |
| SUMMARY | III |
| INNHALDSFORTEGNELSE | IV |
| 1. INNLEDNING | 1 |
| 1.1 AZOTOBACTER VINELANDII | 1 |
| 1.2 CYSTEDANNELSE I A. VINELANDII | 3 |
| 1.3 SYNTSE AV ALKYLRESORCINOL OG ALKYLPYRONER I A. VINELANDII | 5 |
| 1.4 ALKYLRESORCINOL TRANSPORT OVER CELLEMEMBRAN | 8 |
| 1.5 BAKGRUNN FOR OPPGAVE | 10 |
| 2. MATERIALE OG METODE | 12 |
| 2.1 MEDIUM OG LØSNINGER | 12 |
| 2.1.1 VEKSTMEDIUM | 12 |
| 2.1.2 FAST BLUE-LØSNING: | 15 |
| 2.1.3 ANTIBIOTIKUM | 15 |
| 2.2 PLASMID OG BAKTERIESTAMMER | 16 |
| 2.3 METODER | 18 |
| 2.3.1: INOKULERING PÅ VEKSTFLASKE/AGAR | 18 |
| 2.3.2: ISOLERING AV PLASMID-DNA VED PROMEGAS WIZARD® PLUS MINIPREPS DNA PURIFICATION SYSTEM | 18 |
| 2.3.3: POLYMERASE CHAIN REACTION | 21 |
| 2.3.4: GEL-ELEKTROFORESE | 22 |
| 2.3.5: RENSING AV DNA | 23 |
| 2.3.6: RESTRIKSJONSKUTTING | 24 |
| 2.3.7: LIGERING | 25 |
| 2.3.8: TRANSFORMASJON | 26 |
| 2.3.9: PLASMIDSYSTEMET, PHE326. | 28 |
| 2.3.10 BLÅ/HVIT-SCREENING | 29 |
| 2.3.11: FRYSING OG OPPTINING AV BAKTERIESTAMMER | 30 |
| 2.3.12: FAST BLUE B METODE FOR PÅVISNING AV ALKYLRESORCINOL | 31 |
| 2.3.13: SEKVENSERING | 32 |
| 2.3.14: BIOINFORMATISK VERKTØY | 32 |
| 3. RESULTATER | 33 |
| 3.1 KOMPLEMENTERING AV A. VINELANDII STAMMER MED MUTERT ALKYLRESORCINOL TRANSPORT. | 33 |
| 3.1.1 INNØRING AV VILLTYPE GEN ARSF,G,H UNDER KONTROLL AV PM-PROMOTOR | 33 |
| 3.1.2 CYSTEINDUKSJON OG TEST AV RESTAURERING TIL VILLTYPE. | 35 |
| 3.1.3 KONSTRUKSJON AV NYE VEKTORER TIL KOMPLEMENTERING. | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2 INAKTIVERING AV GEN SOM KODER FOR GLYKOSYL-TRANSFERASE | 40 |
| 3.2.1 KONSTRUKSJON AV VEKTOR POG3 | 40 |
| 3.2.2 KONSTRUKSJON AV STAMME <i>A. VINELANDII</i> Δ GLY | 46 |
| 3.2.3 ETABLERING AV METODE FOR Å KVANTIFISERE PRODUKSJONEN AV ALKYLRESORCINOL | 47 |
| 3.2.4 ANALYSE AV ALKYLRESORCINOL I <i>A. VINELANDII</i> Δ GLY CYSTER | 49 |
| 3.3 INAKTIVERING AV GEN SOM KODER FOR MALONYL-COA-TRANSFERASE | 51 |
| 3.3.1 KONSTRUKSJON AV VEKTOR POG4 | 51 |
| 3.3.2 KONSTRUKSJON AV STAMME <i>A. VINELANDII</i> Δ MAL | 53 |
| 3.4 KOMPLEMENTERING AV MUTANTER Δ GLY/MAL. | 55 |
| 3.4.1 KONSTRUKSJON AV KOMPLEMENTERINGSVEKTOR FOR <i>GLY</i> OG <i>MAL</i> DELESJONSMUTANTER | 55 |
| 4. DISKUSJON | 60 |
| 4.1 KOMPLEMENTASJONS ANALYSE AV ARSF, ARSG OG ARSH -MUTANTER | 60 |
| 4.2 ALKYLRESORCINOL PRODUKSJON I <i>A. VINELANDII</i> CYSTER MED DELESJON I <i>GLY</i> /MAL | 61 |
| 4.2.1 METODEETABLERING AV KVANTIFISERING AV TOTAL ALKYLRESORCINOL VED FAST BLUE B | 61 |
| 4.2.2 ANALYSE AV <i>A. VINELANDII</i> Δ GLY | 61 |
| 4.2.3 KONSTRUKSJON AV <i>A. VINELANDII</i> Δ MAL | 62 |
| 4.3 VIDERE ARBEID | 63 |
| 5. REFERANSER | 64 |
| 6. VEDLEGG | 67 |
| VEDLEGG 1: Λ PstI KUTTET <i>E. COLI</i> LADDER. | 67 |
| VEDLEGG 2: DNA LADDER FRA THERMOSCIENTIFIC, GENE RULER. | 67 |
| VEDLEGG 3: SEKVENSERING POG1 | 68 |
| VEDLEGG 4: SEKVENSERING POG2 | 74 |
| VEDLEGG 5: SEKVENSERING POG5 | 84 |
| VEDLEGG 5: SEKVENSERING POG 6 | 87 |
| VEDLEGG 6: VEKSKURVE DATA | 91 |
| VEDLEGG 7: PLASMIDKART | 91 |
| VEDLEGG 8: PRIMERE | 94 |

1. Innledning

1.1 *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii (*A. vinelandii*) er en gram-negativ stavbakterie tilhørende Pseudomonadaceae familien. *A. vinelandii* DJ har et sekvensert genom bestående av et sirkulært kromosom på 5 365 318 bp, hvorav 5050 proteinkodende gener. *A. vinelandii* gror fritt som jordsbakterie i nøytral eller basisk jord og har muligheten til å fikse atmosfærisk nitrogen i et aerobt miljø ved å omgjøre nitrogenet til ammoniakk (NH₃). Prosessen foregår i *A. vinelandii* uten behov for et symbiotisk forhold [42]. Nitrogenfikseringen er avhengig av det oksygen-sensitive enzymet nitrogenase, *A. vinelandii* beskytter nitrogenasen i aerobt miljø ved hjelp av sitt komplement av respiratoriske proteiner. Under høyt oksygenstress kan *A. vinelandii* produsere et beskyttende 2Fe-2S protein som sammen med nitrogenasen danner et oksygenstabil kompleks. Komplekset er inaktivt, men beskyttet mot skade fra oksygen[42]. Andre mekanismer er også på plass i *A. vinelandii* for å beskytte denne prosessen. Hvorav en av de viktigste er alginat. Alginat er et linært copolymer satt sammen av β -1,4 linkede d-mannuronsyre molekyler som hjelper med å beskytte organismen mot oksygen. *A. vinelandii* har også flere versjoner av alginat genet som gjør at alginatets komposisjon kan endres etter mengden oksygen i miljøet [42]. Dette sørger for at nitrogenasen opplever et nært oksygenfritt miljø.

A. vinelandii har evne til å danne cyster ved mangel på en tilstrekkelig næringskilde. På denne måten beskytter den seg fra ytterligere skade. I cysteform er cellene også høyt resistente mot de fleste skadelige fysiske og kjemiske forhold[37].

A. vinelandii har også egenskaper som gjør den spesielt interessant for en rekke bedrifter og foretak. Alginat er av interesse til industriell bruk som et stabiliserende, fortykkende eller gel dannende stoff til bruk i matproduksjon eller i farmasøytiske produkter[33].

A. vinelandii produserer også et annet stoff av spesiell interesse for industriell bruk, Poly- β -hydroksybutyrat (PHB). Dette stoffet er en polyester som er biologisk nedbrytbar og kan brukes som et alternativ til polyetylen og polypropylen i plastikk produkter[33].

Alginat og PHB i *A. vinelandii* produseres fra forbindelser som inngår i den sentrale karbonmetabolismen, dette fører til villtype *A. vinelandii* som produksjonsorganisme for en av disse stoffene er lite effektiv. Ved å hindre det ene produktet fra å dannes kan det

konkurrerende stoffets produksjon forsterkes kraftig. Det er gjort er blitt gjort arbeid med å optimalisere *A. vinelandii* som produksjons organisme og ved å slå ut gener viktige for syntetisering av alginat/PHB har man oppnådd opp til 4-5 ganger økt produksjon[40].

A. vinelandii produserer også fenol-lipider som alkylresorcinol under cystedannelsen. Disse stoffene kan ha forskjellige potensielle bruksområder. Eksempelvis har Alkylresorcinol funnet i en stamme av *Pseudomonas* sp. blitt funnet til å ha anti-bakteriell og anti-fungal effekt [15].

De vanligste kildene til alkylresorcinoler finner man blant plantearter[17]. Eksempelvis i kornplantene rug, hvete og bygg finnes alkylresorcinoler i de ytre delene av disse plantene[17]. I denne sammenhengen har et alkylresorcinol også blitt foreslått som en biomarkør i plasma for inntak av fullkorns produkter i matkosten[18]. Slike matprodukter har vist seg å redusere risiko for hjertesykdom og diabetes 2[38]. En slik markør kan da brukes til å undersøke spørsmål rundt ernæringsmessig epidemiologi i gruppe mennesker vis den viser seg å være nøyaktig nok[18, 49].

Muligheten for å bruke *A. vinelandii* som en form for biogjødsel har også vært undersøkt og økt vekst ved inokulasjon med stammen har i noen tilfeller blitt observert [5]. *A. vinelandii* har flere egenskaper som gjør den interessant for denne typen bruk, som for eksempel Nitrogen fiksering, evne til å produsere vekstfremmende vitaminer under riktige C:N forhold, samt hindre andre bakterier med mulig patogen effekt på plantene fra å vokse. Det er indikasjoner på at det er hovedsakelig vitaminproduksjonen som ved riktige C:N forhold er signifikant nok til å resultere i den observerte økte veksten i plantene [24].

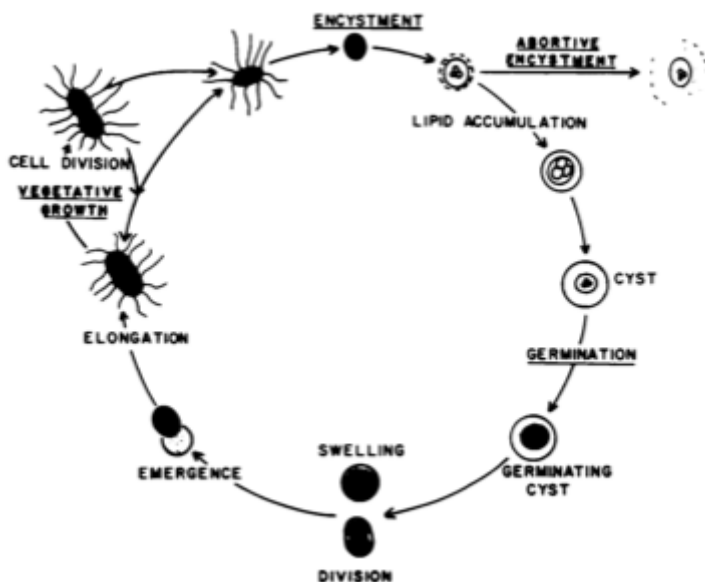
A. vinelandii har grunnet sine spesielle egenskaper vært viktig som modellorganisme for biokjemiske og genetiske studier av nitrogenfiksering, samt for produksjon av alginat, fenol-lipider og Poly- β -hydroksybutyrat(PHB)[36, 40].

1.2 Cystedannelse i *A. vinelandii*

Ved mangel på tilgang til en næringskilde vil *A. vinelandii* kunne beskytte seg ved at vegetative celler gjennomgår en differensierings prosess for å danne mikrobielle cyster. Som en del av denne prosessen må cellens metabolisme endres fra å være karbohydratbasert til å bli lipid basert. I cysteform inneholder cellene dobbelt så mye lipid som i sin vegetative form (tørrvekt) [21].

Cystedannelsen kan induseres ved tilsats av β -hydroksybutyrat (BHB) eller n-butanol i et karbonfattig vekstmedium[37]. Cysteinduksjonen er et resultat av akkumulering av PHB og en overgang til syntetisering av alkylresorcinoler i cellene. Dette påvirker cellens metabolisme til å gå over til lipider[20].

En cyste er et hvilestadium hvor cellene ikke lenger utfører celledeling. Cystene er høyt resistente mot de fleste skadelige fysiske og kjemiske forhold eksempelvis tørke og ioniserende stråling. De er derimot ikke spesielt egnet for å motstå høy varme[37]. Under laboratorieforhold kan cystene holde seg i mer en 10 år og fortsatt kunne reverseres til sin vegetative tilstand ved tilgang på ny næring[51]. Cystedannelsens plass i *A. vinelandii*'s livssyklus er vist i Figur 1.

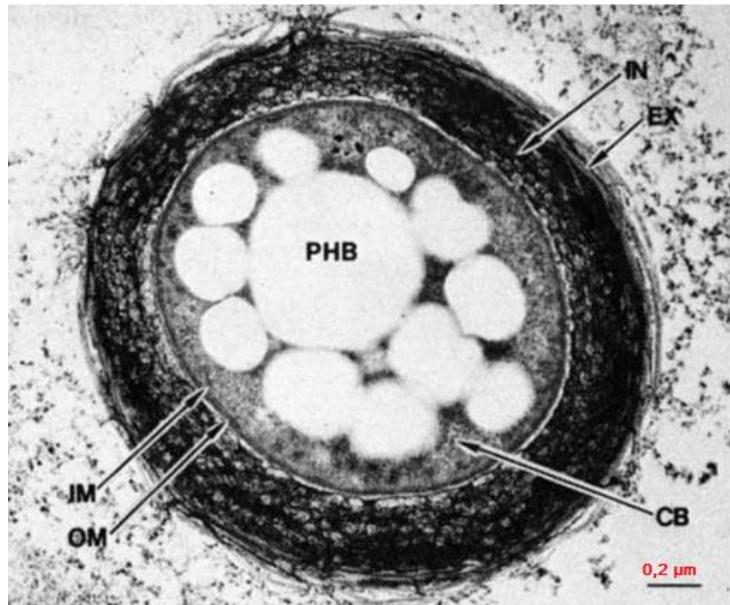


Figur 1: Livssyklusen til *A. vinelandii* [37]

Ved differensiering til cystestadiet vil *A. vinelandii* gjennomgå store strukturelle endringer. Cellene mister flagellene fra overflaten og endrer form fra en stavform til en sfærisk, mer kompakt form. Samtidig vil også membranen bli tykkere og danne en kapsel som beskytter

cellens sentrale kropp som inneholder de essensielle celleorganene. Kapselen har distinkte lag som består av et tykt indre lag kalt "intine" og et tynnere ytre lag kalt "exine" [13].

De forskjellige lagene i en cyste, samt granulene av PHB i kjernen kan tydelig sees i et elektronmikroskop, se figur 2.



Figur 2: Micrograf bilde av *A. vinelandii* cyste [35].

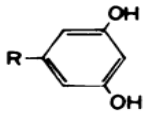
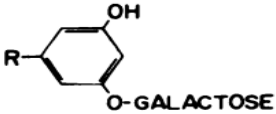
EX= exine lag, IN= intine lag, IM= indre membran, OM= ytre membran, CB= sentral kroppen, PBH= akkumulert PHB i intracellulære granuler.

Alginate, PHB og alkylresorcinoller er alle stoffer *A. vinelandii* produserer under cystedannelsen. Polysakkaridet alginate er en komponent i både det intine og det exine laget[27]. Alkylresorcinolene (lipider) bytter ut fosfolipidene i membranen under cysteformasjonen og er en komponent av det exine lag (mer om dette i 1.3)[34]. Mens i den sentrale cellekroppen av cysten finner man granuler som inneholder lager av PHB som brukes som karbon og energi kilde under cystedannelsen [46]. Likevel er PHB-syntese blitt vist under laboratorieforhold til ikke å være essensiell for dannelsen av modne cyster[39].

Når PHB-syntesen hindres ved mutasjon i *phb* er det derimot blitt observert et skift til lipid metabolisme lignende den man finner ved katabolisme av de cysteinduserende stoffene *n*-butanol og β -hydroxybutyrate (BHB). Dette er da tenkt å legge til rette for produksjon av mer alkylresorcinol enn normalt ved at blant annet acetyl-CoA mengden i cellen øker og legger forholdene til rette for alkylresorcinol produksjon. Mutantstammene er observert å danne et tykkere exine lag med høyere innhold av alkylresorcinol enn villtypen og fører til produksjon av alkylresorcinoler selv under ikke induserende forhold [39].

1.3 Syntese av alkylresorcinol og alkylpyroner i *A. vinelandii*

Som en del av cystedannelsen blir en betydelig del av fosfolipidene i membranens exine lag byttet ut med alkylresorcinoler og alkylpyroner [35]. Disse består av polare aromatiske fenolringer og hydrofobe alkylkjeder[47]. Fenolringene i alkylresorcinol og alkylpyron inneholder hydroksylgrupper eller ketongrupper, hos alkylpyroner er et karbonatom i fenolringen substituert med et oksygenatom. Alkylkjedene til fenol-lipidene som forekommer i *A. vinelandii* har fra 22-26 carbon atomer [25]. De amfifiliske egenskapene er viktig for å kunne danne stabile monomolekylære lag i for eksempel cellemembraner[17]. Fenol-lipidene er blitt vist å ha en viktig strukturell rolle i det exine lag av en *A. vinelandii* cyste[35]. Derimot er de ikke essensielle for selve cysteformasjonen eller resistansen mot uttørking slik som tidligere rapportert [41]. I *A. vinelandii* syntetiseres det flere former av fenol lipider med forskjellige kjemiske egenskaper. Ut av disse er derimot 5-n-heneicosylresorcinol, 5-n-tricosylresorcinol (AR₁) og dens galaktose derivater(AR₂) de mest vanlige[47]. Struktur av disse kan sees i figur 5.

| Laboratory designation | Chemical structure | R | Abundance (%) | Melting point (°C) |
|------------------------|---|--|---------------|--------------------|
| AR ₁ |  | C ₂₁ H ₄₃ C ₂₃ H ₄₇ | 87 13 | 90–92 |
| AR ₂ |  | C ₂₁ H ₄₃ C ₂₃ H ₄₇ | 86 14 | 100–101 |

Figur 3: Struktur og egenskaper av de vanligste alkylresorcinol formene i *A. vinelandii* cyster. Modifisert fra [47].

Genklyngen hvor man finner genene ansvarlige for produksjon av alkylresorcinoler er organisert slik det kommer fram av tabell 1. Informasjonen i denne tabellen er hentet fra KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Tabell 1: Fenol-lipid genklyngen.

| ID | Funksjon | Start-stop bp |
|--------------------------|---|-------------------|
| Avin_29560 arsA | type I fettsyre syntase ArsA | 3053697-3046186 C |
| Avin_29550 arsB | type III polyketide syntase | 3046102-3044882 C |
| Avin_29530 arsC | type III polyketide syntase | 3044885-3043656 C |
| Avin_29520 arsD | type I fettsyre syntase ArsD | 3043659-3041749 C |
| Avin_29510 (arsF) | antimikrobiell peptid ABC transporter ATPase; K02003 antatt ABC transport system ATP-bindende protein | 3041657-3040905 C |
| Avin_29500 (arsG) | hypotetisk protein; K02004 antatt ABC transport system permease protein | 3040908-3039658 C |
| Avin_29490 (arsH) | hypotetisk protein, tenkt å være involvert i ABC transport system[43]. | 3039617-3038625 C |
| Avin_29480 | hypotetisk protein | 3038444-3038587 |
| Avin_29470 | hypotetisk protein | 3038452-3037220 C |
| Avin_29460 (gly) | gruppe 1 glykosyl transferase | 3037156-3035801 C |
| Avin_29450 (mal) | Malonyl CoA-acyl bærende protein transacylase | 3035748-3034372 C |
| Avin_29440 | hypotetisk protein | 3034375-3033926 C |

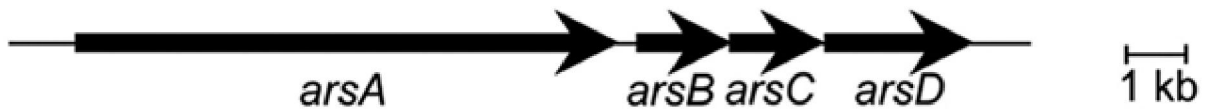
I tabell 1 er farger brukt til å annotere gener som er tenkt å være i operon. Samtlige av disse gene blir uttrykt ved samme tid under cystedannelse (Ertesvåg, Upublisert).

Blått markerer et operon tenkt å være involvert med transport system av alkylresorcinol over membranen (ATP-binding cassette (abc) system). Avin_29490 (arsH) er også tenkt å være involvert i denne prosessen selv om den ikke prediktert til å være en del av operonet. Dette til tross for at avstanden bare er på 41bp [7].

Markert med grønt er et tenkt operon involvert i produksjonen av alkylresorcinoler i *A. vinelandii*. Dette baseres på at gene er nærmere en ca. 50 bp til andre kodene gener med mulig relatert funksjon.

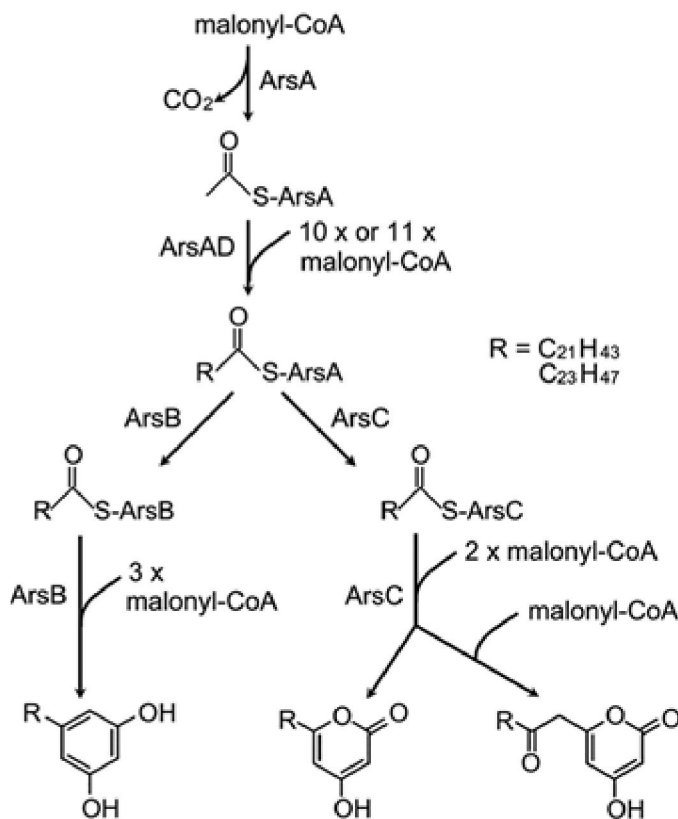
Operonet *arsABCD* er kjent å kode for et polyketidesynthase system (PKS) som er ansvarlig for biosyntese av alkylresorcinol og alkylpyron [11]. Operonet er merket med rødt i tabell 1 og er også vist i figur 3.

Det er også vært å merke at Avin_29480 overlapper med både *arsH* og Avin_29470, men går i motsatt retning til disse gene. Dette kan tyde på at Avin_29480 ikke er et reelt gen.



Figur 4: organiseringen av operonet arsABCD. Modifisert fra [25].

arsB koder for en alkylresorcinol-syntase og *arsC* koder for en alkylpyron-syntese. *arsA* og *arsD* koder for to type 1 fettsyre-synteser (FAS), disse er ansvarlig for å danne fettsyrer med 22-26 karbon fra substratet malonyl-CoA. Malonyl-CoA fungerer også som transportør av byggeblokker (syrederivater) til konstruksjonen av nye fettsyrer [25]. Enzymet som fasiliteter denne overføringen av byggeblokker er malonyl-CoA-transferase (også kalt Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase). Enzymet kodes for av *fabD* og proteinet kodet for i *Avin_29450* er også tenkt å være malonyl-CoA-transferase. *fabD* har høyere aktivitet under normale vekstforhold mens *Avin_29450* viser høyere aktivitet under cystedannelsen (Ertesvåg, upublisert). Et mulig spor for syntetisering av fenol-lipider i *A. vinelandii* kommer fram av figur 5.



Figur 5: Tenkt spor for syntetisering av fenol-lipider i *A. vinelandii*. Modifisert fra [25].

1.4 Alkylresorcinol transport over cellemembran

ABC(ATP-binding cassette)-transport systemet bestående av en gruppe membranproteiner som ved tilførsel av energi i form av ATP kan transportere en rekke forskjellige stoffer over en cellemembran. ABCsystem-familien er høyt konservert og kan finnes igjen i mange organismer. ABC-transportører er involvert i mange forskjellige funksjoner en bakteriers fysiologi. De deles ofte i 3 grupper etter funksjonen de har i cellen. De 2 første gruppene er importører og eksportører. Disse ABC transportørene er involvert i import av næringsmidler og eksport av potensielt giftige molekyler[8]. Av de mange stoffgruppene ABC-transportørene er involvert med kan det blant annet nevnes aminosyrer, peptider, metaller, lipider, toxiner og vitaminer. [1].

Den tredje gruppen er ikke involvert med transport og er tenk involvert i blant annet protein syntese, DNA vedlikehold og DNA reparasjon. Denne gruppen av ABC proteinene utøver sin funksjon i cytoplasma og/eller nukleus til motsetning fra cellemembranen som de 2 andre gruppene[1].

ABC-transportørene har dimerstruktur bygd opp av monomerer med 2 kjernedomener. Disse er et hydrofobt transmembran-domene (TMD) og et høyt konservert nukleotidbindende domene(NBD). Figur av strukturen kan sees av figur 6.

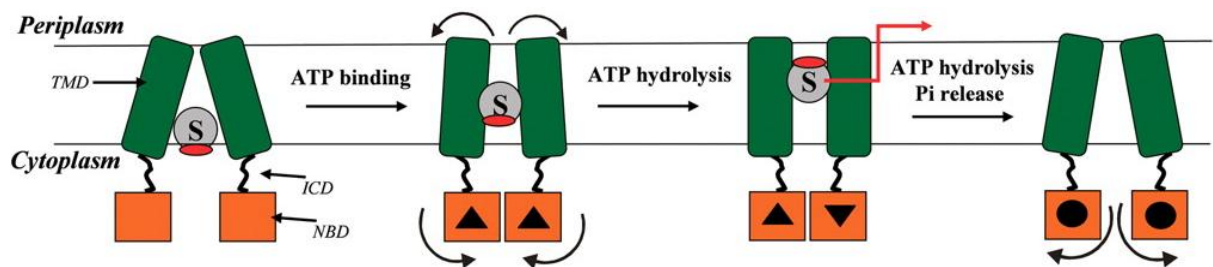
TMD delen består av α -helikser forankret i cellemembranen og danner en kanal gjennom cellemembranen for selve transporten av substratet. Denne kanalen er også spesifikk for substratet den skal transportere ved å ha forskjellig struktur og aminosyresekvens. Antallet α -helikser vil variere etter typen ABC transportør, Importører kan variere mellom 5-10 og eksportører ligger rundt 6[8].

NDB vil binde seg til TMD i cytoplasma-siden og karakteriseres av noen høyt konserverte sekvenser kalt Walker A-, Walker B- og signaturmotiv. Disse er deler av NDB sitt ATP-bindinge sete. Binding med ATP er vitalt for at ABC-transportøren skal kunne utføre transport over membranen[8]. Andre strukturer unike for hvilken gruppe av ABC-transportører de hører til kan ha andre komponenter i tillegg feste seg i kjernedimerstrukturen[8].

Importørene har en for eksempel et høy-affinitet bindings protein som er spesifikk for en type substrat fra periplasma. Dette bidrar til å regulere hva som transporteres inn i cellen[32].

Eksportørene har et intracellulært domene/loops (ICD) som kobler sammen TMD og NDB inne i cellen. Dette domenet er tenkt å ha en rolle i struktur og kommunikasjon mellom TMD og NDB[8].

Transport ved ABC-system er en energikrevende prosess som krever ATP. Når substratet binder til TMD vil dette føre til en strukturell endring i NBD slik at den nå vil binde ATP. Ved binding til ATP vil nok en konfigurasjons endring forekomme som hindrer binding av nytt substrat og ATP vil starte og hydrolysere. Konfigurasjonsendringen dette fører til gjør at substratet føres gjennom TMD og over cellemembranen. Når substratet er frigitt vil ADP og Pi frigis og ABC-system vil gjendanne sin opprinnelige konfigurasjon. Prosessen er vist av figur 6[9].



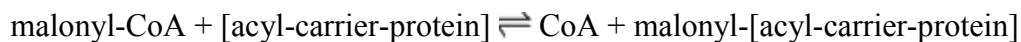
Figur 6:Mekanisme for eksport ved ABC-systemet. S: substrat, TMD: transmembrant domene, NBD: Nukleotidbindende domene, ICD: intracellulært domene. **Modifisert fra [9].**

De 3 genene nedstrøms for *arsABCD* som har blitt kalt *arsF* (Avin_29510), *arsG* (Avin_29500) og *arsH* (Avin_29490) er blitt koblet til lipid transport ved et mikroarray-studium av cystedannelsen i *A. vinelandii*. Resultatet av denne viste at *arsFGH* uttrykkes samtidig som *arsABCD* (Ertesvåg, ikke publisert). En bioinformatisk sammenligning ga så grunn til å tro at proteinene kodet i *arsFGH* var proteiner som kunne være involvert i å danne en ABC-transportør cellemembran med evne til å transportere alkylresorcinol under cyste formasjon. Fremgangsmåten som ble valgt for å undersøke denne hypotesen var delesjonsmutanter og resultatene av dette arbeidet virker til å underbygge denne hypotesen. Samtlige av mutantstammene som hadde utslått et av *arsFGH* genene hadde mistet evnen til føre alkylresorcinol til overflaten av cystene. Det kan derfor tenkes at disse gene er alle essensielle for transporten over cellemembranen. Det ble også vist at *ArsG* har likheter med permeaseproteiner i ABC-transportsystem, og at *ArsH* muligens også er del av en ABCtransportør [7].

1.5 Bakgrunn for oppgave

I denne oppgaven vil arbeidet som ble startet av Marianne Dalland på *arsF*, *arsG* og *arsH* videreføres. Delesjonsmutantene ferdigstilt i Dallands prosjekt skulle verifiseres ved bruk av transposonvektorer inneholdende villtype *arsF*, *arsG* og *arsH* fra *A. vinelandii*. Disse var laget av Dalland og kalt pMD113, pMD114 og pMD115. Villtype gene i disse vektorene var under kontroll av en Pm-promotor [7]. Se metode 2.2 for liste av plasmider og bakteriestammer. Dersom mutantene får tilbake villtypefenotypen etter komplementasjon ville dette tyde på at de observerte endringene i genuttrykk kommer av delesjon av disse genene.

Videre skulle denne oppgaven starte å undersøke funksjonen til proteinene kodet for av Avin_29450 og Avin_29460. Den åpne leserammen Avin_29450 som er å finne nedstrøms for *arsABCD* operonet og den synes å kode for enzymet malonyl-CoA-transferase (Malonyl CoA-acyl carrier protein). Videre i denne oppgaven vil dette teoretiske genet refereres til som *mal*. Malonyl-CoA-transferase katalyserer følgende reaksjon i det fosfopantetine thiol (R-SH) området av acylbærer proteinet (ACP) [25]:



Som vist i figur 4 er malonyl-CoA essensiell for biosyntesen av alkylresorcinol. Grunnet at reaksjonen dette enzymet katalyserer er viktig for overføringen av fettsyrederivatene til ACP er det mulig at det kan ha en effekt på alkyresorcinol produksjonen om dette genet ikke opererer normalt.

Nedstrøms for *arsABCD* finnes videre en annen åpen leseramme Avin_29460 som er tenkt å kode for et glykosylase enzym som kan være involvert i produksjonen av alkylresorcinol i *A. vinelandii*. Dette baseres på at noe av alkylresorcinol produsert i *A. vinelandii* har blitt vist til å inneholde galaktose [47]. Struktur av de vanligste formene av alkylresorcinol, med og uten galaktose gruppe kan sees ut fra figur 5. Det teoretiske genet i Avin_29460 vil videre i denne oppgaven bli referert til som *gly*. En endring i mengden alkylresorcinol med galaktose kan muligens gi endrede egenskaper til cysten.

Gjennom transkriptom analyse av *A. vinelandii* cystedannelsesprosess har det blitt vist at *gly* og *mal* ble uttrykt ved samme tidspunkt som *arsABCD* operonet (Ertesvåg, upublisert). Dette gir grunnlag for en hypotese om at disse genene er involvert i produksjonen av

alkylresorcinol i *A. vinelandii*. Prosjektet tok dermed sikte på å utforske denne hypotesen nærmere gjennom å lage delesjonsmutanter for disse genene. Mutantene skulle så bli undersøkt etter cysteinduksjon for produksjon av alkylresorcinoler, samt mulige strukturelle endringer og/eller tap av galaktose gruppen.

Delesjonsmutantene fra dette arbeidet kan så verifiseres ved bruk av transposonvektorer inneholdende villtype *gly* og *mal* fra *A. vinelandii*. Dersom mutantene får tilbake villtypefenotypen etter komplementasjon vil dette tyde på at de observerte endringene i genuttrykk kommer av delesjon av disse genene.

2. Materiale og metode

2.1 Medium og løsninger

2.1.1 Vekstmedium

Luria Broth (LB):

| | |
|---------------|--------|
| Trypton | 10 g/L |
| Gjær-ekstrakt | 5 g/L |
| NaCl | 10 g/L |

Autoklaveres.

Luria Agar (LA):

| | |
|---------------|--------|
| Trypton | 10 g/L |
| Gjær-ekstrakt | 5 g/L |
| NaCl | 10 g/L |
| Agar | 15 g/L |

Autoklaveres.

Luria Agar med m-toluat (LA+m-tol):

Lages på samme måte som ordinær LA, men med tilsatts av m-toluat til 0.5mM etter nedkjøling til ca 55 °C.

Burks medium (BM):

| | |
|--------------------------------------|----------|
| MgSO ₄ *7H ₂ O | 0.2 g/L |
| NaCl | 0.2 g/L |
| K ₂ HPO ₄ | 0.64 g/L |
| KH ₂ PO ₄ | 0.16 g/L |
| H ₂ O | 900 g/L |

Autoklaveres.

+Glukose: 20 g glukose løst i 100 mL vann, autoklaveres separat og tilsettes etter avkjøling.

+Salter fra frosen stock (10000x); FeSO₄ (15 mg/L medium), CaCl₂ (50 mg/L medium), Na₂MoO₄ (2.1 mg/L medium)

Burks agar (BA):

| | |
|--------------------------------------|----------|
| MgSO ₄ *7H ₂ O | 0.2 g/L |
| NaCl | 0.2 g/L |
| K ₂ HPO ₄ | 0.64 g/L |
| KH ₂ PO ₄ | 0.16 g/L |
| H ₂ O | 900 g/L |
| Agar | 15 g/L |

Autoklaveres.

+Glukose: 20 g glukose løst i 100 mL vann, autoklaveres separat og tilsettes etter avkjøling.

+Salter fra frossen stock (10000x); FeSO₄ (15 mg/L medium), CaCl₂ (50 mg/L medium), Na₂MoO₄ (2.1 mg/L medium)

Burks Medium med uten karbonkilde (BM-C):

Laget som normal BM, med unntak av at glukosen aldri blir tilsatt. I stedet tilsettes mer vann for å oppnå samme volum.

Burks Medium med 5% v/w sucrose (BM + Suc):

Laget som normal BM, med unntak av at glukosen (karbonkilden) byttes med 5% v/w sucrose

Burks Medium med β-hydroksybutyrat (βHB) (BM + βHB):

Laget som normal BM, ingen glukose (karbonkilde), men med tilsatt av sterilfiltrert βHB til 0,2% v/v.

Burks agar med 5% v/w sucrose (BA + Suc):

Laget som normal BA, med unntak av at glukosen (karbonkilden) byttes med 5% v/w sucrose

Burks agar med n-butnaol (BA + n-but):

Laget som normal BA, med unntak av at glukosen (karbonkilden) byttes med n-butanol.

Burks agar med n-butnaol og m-toluat (BA + n-but + m-tol):

Laget som normal BA, med unntak av at glukosen (karbonkilden) byttes med n-butanol og tilsatt av m-toluat til 0,5 mM etter nedkjøling.

**Notat: Noe om m-tol i forbindelse med gpm promotor i lavtallkopi plasmidet.

SOC medium:

| | |
|-------------------|-----------|
| Tryptone | 20 g/L |
| Gjær-ekstrakt | 5 g/L |
| NaCl | 0.5 g/L |
| KCl | 0.186 g/L |
| Glukose | 3.6 g/L |
| MgCl ₂ | 5.08 g/L |
| Løst i vann | |

Steriliseres ved filtrering og lagres ved -20 °C.

TFB1:

| | |
|---------------------------------------|----------|
| KAc | 2.94 g/L |
| RbCl | 12.1 g/L |
| CaCl ₂ x 2H ₂ O | 1.47 g/L |
| MnCl ₂ x 4H ₂ O | 10 g/L |
| Glyserol | 15 % v/v |

pH justeres til 5.8 ved bruk av fortynnet eddiksyre.

Steriliseres ved filtrasjon og lagres ved 4-8 °C.

TFB2:

| | |
|---------------------------------------|----------|
| MOPS | 2.1 g/L |
| CaCl ₂ x 2H ₂ O | 11 g/L |
| RbCl | 1.21 g/L |
| Glyserol | 15% v/v |

pH justeres til 6.5 ved bruk av fortynnet NaOH.

Steriliseres ved filtrasjon og lagres ved 4-8 °C.

Psi-medium:

| | |
|-------------------|--------|
| Tryptone | 20 g/L |
| Gjær-ekstrakt | 5 g/L |
| MgSO ₄ | 5 g/L |

2.2 Plasmid og bakteriestammer

Tabell 3: Bakteriestammer

| ID | Kommentar | Kilde |
|------------------------------------|--|----------------------------------|
| <i>A. vinelandii</i> ATCC 12518 | Villtype | American Type Culture Collection |
| <i>A. vinelandii</i> Δmal | <i>A. vinelandii</i> ATCC 12518 med utslått <i>Avin_29450</i> gen | Dette studie |
| <i>A. vinelandii</i> Δgly | <i>A. vinelandii</i> ATCC 12518 med utslått <i>Avin_29460</i> gen | Dette studie |
| <i>A. vinelandii</i> $\Delta arsF$ | <i>A. vinelandii</i> ATCC 12518 med utslått <i>Avin_29510</i> gen, Tetracyclin resistant. | Dalland, M. [7] |
| <i>A. vinelandii</i> $\Delta arsG$ | <i>A. vinelandii</i> ATCC 12518 med utslått <i>Avin_29500</i> gen, Tetracyclin resistant. | Dalland, M. [7] |
| <i>A. vinelandii</i> $\Delta arsH$ | <i>A. vinelandii</i> ATCC 12518 med utslått <i>Avin_29490</i> gen, Tetracyclin resistant. | Dalland, M. [7] |
| <i>Av</i> $\Delta arsF$::TnMD113 | <i>A. vinelandii</i> $\Delta arsF$ Komplementert ved pMD113 | Dette studie |
| <i>Av</i> $\Delta arsG$::TnMD114 | <i>A. vinelandii</i> $\Delta arsG$ Komplementert ved pMD114 | Dette studie |
| <i>Av</i> $\Delta arsH$::TnMD115 | <i>A. vinelandii</i> $\Delta arsH$ Komplementert ved pMD115 | Dette studie |
| <i>E. coli</i> DH5 α | Superkompetente celler optimalisert for transformering ved mutasjon i <i>recA</i> og <i>endA1</i> . Mulighet for blå/hvit-seleksjon. | Hanahan, D. [12] |
| <i>E. coli</i> S17.1 λpir | Superkompetente celler for brukt i transformasjon. Inneholder λpir og andre gener nødvendig for konjugering av plasmid. | Simon, R. [45] |

Tabell 4: Plasmider

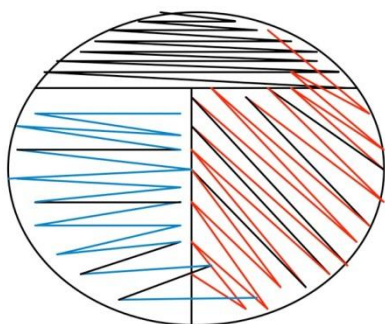
| ID | Kommentar | Kilde |
|--------|---|--------------------------|
| pHE179 | ColE1 kloningsvektor, Amp ^r , Tet ^r . | Ertesvåg, ikke publisert |
| pHE326 | Kloningsvektor, Amp ^r , Tet ^r . <i>OriT</i> for konjugering, Pm-promotor. | Ertesvåg, ikke publisert |
| pHE324 | Inneholder promotoren <i>algD</i> , kuttes ut med Acc65i og NdeI for så og overføres til pMD113-115. Bytter ut Pm-promotor i nevnte plasmider. | Ertesvåg, ikke publisert |
| pUC128 | Kloningsvektor med <i>lacZ</i> for blå/hvit Seleksjon, Amp ^r . | Keen, N. T. [16] |
| pMD113 | Transposonvektor, inneholder <i>arsF</i> kontrollert av Pm-promotor. Amp ^r , Apr ^r . | Dalland, M. [7] |
| pMD114 | Transposonvektor, inneholder <i>arsG</i> kontrollert av Pm-promotor. Amp ^r , Apr ^r . | Dalland, M. [7] |
| pMD115 | Transposonvektor, inneholder <i>arsH</i> kontrollert av Pm-promotor. Amp ^r , Apr ^r . | Dalland, M. [7] |
| pOG113 | Derivat av pMD113 promotor pm kuttet ut ved NdeI og BsiWI. Ny promotor <i>algD</i> kuttet fra pHE324 med acc65i og NdeI liggeres inn i pMD113. Amp ^r , Apr ^r . | Dette studie |
| pOG114 | Derivat av pMD114 promotor pm kuttet ut ved NdeI og BsiWI. Ny promotor <i>algD</i> kuttet fra pHE324 med acc65i og NdeI liggeres inn i pMD114. Amp ^r , Apr ^r . | Dette studie |
| pOG115 | Derivat av pMD115 promotor pm kuttet ut ved NdeI og BsiWI. Ny promotor <i>algD</i> kuttet fra pHE324 med acc65i og NdeI liggeres inn i pMD115. Amp ^r , Apr ^r . | Dette studie |
| pOG11 | Derivat av pHE179 med XbaI+PstI kuttet ”utslått <i>gly</i> ” innsatt. Amp ^r , Tet ^r . Sekvensering viste at ned delen av utslått <i>gly</i> ikke var etter intensjon. | Dette studie |
| pOG1 | Derivat av pOG11 med Sall+AgeI kuttet ”ned <i>gly</i> ” innsatt. Amp ^r , Tet ^r . | Dette studie |
| pOG2 | Derivat av pHE179 med XbaI+EcoRI kuttet ”utslått <i>mal</i> ” innsatt, Amp ^r , Tet ^r . | Dette studie |
| pOG3 | Derivat av pHE326 med AvrII+NotI-HF kuttet pOG1 (inneholder ”utslått” <i>gly</i>) innsatt. Tet ^r | Dette studie |
| pOG4 | Derivat av pHE326 med AvrII+NotI-HF kuttet pOG2 (inneholder ”utslått” <i>mal</i>) innsatt. Tet ^r | Dette studie |
| pOG5 | Derivat av pUC128 kuttet med smaI, PCR produkt av villtype gen <i>gly</i> klonet inn ved blunt-end liggering, Amp ^r . | Dette studie |
| pOG6 | Derivat av pUC128 kuttet med smaI, PCR produkt av villtype gen <i>mal</i> klonet inn ved blunt-end liggering, Amp ^r . | Dette studie |

2.3 Metoder

2.3.1: Inokulering på vekstflaske/agar

Bakterier ble høstet og tilsatt til ny vekstflaske eller agar-plate med passende medium. For *E. coli* ble det brukt LB/LA og 37 °C, inkubasjonstid var over natt. For *A. vinelandii* ble det brukt BM/BA og 30 °C, inkubasjonstid var 2 netter. Eventuelle tilsetninger ble satt til før inokulering med bakterier. Ved lite material eller opptining fra -80 °C-fryser hendte det at inkubasjonstiden ble noe lenger.

Agarer ble spred i 3 soner slik som vist av figur 7



Figur 7: Spredningsteknikk

Ved å spre i 3 soner oppnår man forskjellige fortyninger på samme plate. Dette gjør det lettere å finne enkeltkolonier i agarer med raskt voksende bakterier og kan i noen tilfeller spare tid og utstyr når dette kan gjøre nye spredninger overflødig.

2.3.2: Isolering av plasmid-DNA ved Promegas Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System

Prinsipp:

Kittet benytter seg av SDS (natrium dodecyl sulfat (detergent)) alkalisk denaturerings metode [4]. for å separere plasmid DNA fra andre nukleinsyrer (kromosomalt DNA og RNA). Metoden bidrar også til å rense og oppkonsentrere plasmid DNA i prøven. Hovedprinsippet bak denne metoden er at DNA og proteiner vil denaturere under alkaliske betingelser (ved pH 11) [29]. Når pH senkes igjen med en høy-salt buffer (kalium-acetat) vil ikke kromosomalt DNA kunne renaturere normalt, lange enkelttråder vil danne basepar med seg selv. Dette gir en uløselig utfelling som kan sentrifugeres ned. Det samme gjelder RNA med høy

molekylvekt. Proteinene vil danne komplekser med SDS fra lyserings bufferen og deretter felles ut [29].

Et kort kovalent lukket sirkulært plasmid vil derimot kunne renature normalt og derfor forbli løselig. Dette gjør at vi ender opp med meget rent plasmid-DNA i supernatanten. Ved deretter å sentrifugere prøven vil man kunne oppnå god separasjon av kromosomalt og plasmid DNA [29].

Utførelse:

Preparering av prøver foregikk ved at *E. coli* ble dyrket i 3 mL LB og inkubert over natt. Bakteriekulturen blir så pipettert ut i et eppendorfrør. Denne sentrifugeres i 10 minutter ved 13200 RPM for å få dannet en pellet(dette og følgende sentrifugeringssteg utføres ved romtemperatur og 13200 RPM om ikke annet er oppgitt). Supernatanten fjernes og pelleten resuspenderes i 250 µl Celle Resuspensjons løsning (Inneholder EDTA og RNase). Den resuspenderte prøven blir så tilsatt i det andre røret fra samme bakteriekultur og blandet med pipetten. Videre blir 250 µl celle lyserings løsning tilsatt (Inneholder SDS og NaOH) og prøvene vendes 4 ganger. Ved dette steget i prosessen startes en 5 minutter nedtelling. Mens nedtellingen går tilsettes 10 µl alkalinsk protease løsning til hver prøve, rørene vendes 4 ganger.

Etter 5 minutter har gått tilsettes 350 µl nøytraliseringsløsning (kalium-acetat). Prøvene vendes 4 ganger.

Deretter følger en ny sentrifugering i 10 minutter. Plasmid DNAet vil befinne seg i supernatanten som videre pipetteres over i spinnkolonnen med tilhørende oppsamlingsrør.

Kolonnen sentrifugeres i 1 minutt. Plasmid DNAet vil bli selektivt bunnet til den silica baserte membranen i spinnkolonnen ved nærværet av khaotropiske salter. DNAet mister sine vannbindene egenskaper under disse forholdene. Væsken i oppsamlingsrøret dekanteres. Prøvene ble så rensset ved å tilsette 750 µl vaskeløsning (tilsatt etanol som hindrer at DNA løser seg fra membranen) til hver kolonne og sentrifugert 1 minutt. Væsken i oppsamlingsrøret dekanteres. Dette steget ble gjentatt med 250 µl vaskeløsning. For å fjerne siste rest av vaskeløsningen sentrifugeres kolonnene 2 min. Deretter ble kolonnen overført til et sterilt eppendorfrør. 100 µl nuklease fritt vann ble tilsatt kolonnen. Lar kolonnen stå på benk 1 minutt før sentrifugering for å bedre mengden DNA eludert. Sentrifugering i 1 min følger. Når eppendorfrørene settes på sentrifugen passes det på at lokkene ligger i samme

retning som sentrifugen spinner slik at de ikke rives av under sentrifugering. Plasmid DNAet befinner seg nå i eppendorfrøret, prøven lagres ved -20 °C.

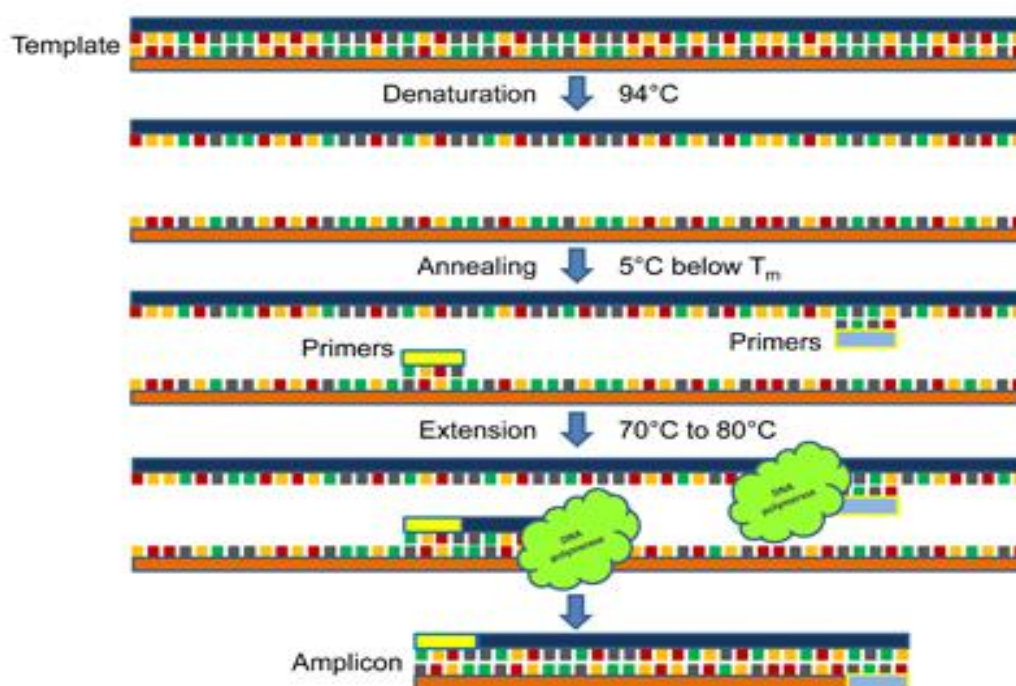
Lavkopitall plasmider:

Når prøver med lavkopitalls plasmider ble isolert gjelder i hovedsak protokollen skissert over, men noen tilpasninger blir gjort. Disse er som følger: E. coli stammen med lavkopitalls plasmidet ble dyrket i 10 mL LB med antibiotika. I resuspensjon trinnet ble cellene samlet i 2x eppendorfrør med celler fra ca. 5 mL LB i hvert rør. Begge rørene sentrifugeres så gjennom samme spinnkolonne. Alt annet ble behandlet etter protokollen over.

2.3.3: Polymerase chain reaction

Prinsipp:

Prinsippet bak PCR er at en dobbel DNA tråd denatureres til to enkeltråder, dette eksponerer basesekvensene for primerne og DNA polymerasen som så vil kopiere opp en ny DNA tråd med området mellom primerne som templat. Dette gjør at vi får doblet mengden aktuelt DNA materiell i prøven. Prosessen repeteres til ønsket mengde er oppnådd[22]. Prosessen er illustrert i Figur 8.



Figur 8: Eksempel på PCR reaksjon. Modifisert fra [49].

Utførelse:

Hvis genomisk DNA var nødvendig ble dette ekstrahert fra de gram negative bakterie stammene ved koking. Dette ble utført ved først å sentrifugere et passende volum (basert på vekst) av flytende medium ved $13,200 \times g$ for 10 min. Den resulterende pelleten ble så resuspendert i 100µl PCR gradert-vann og plassert i en varmeblokk (med vann) som holdt 100 °C for 10 min. Prøven ble så kjølt ned og sentrifugert på nytt ved $13,200 \times g$ for 10 min. Supernatanten inneholdende DNA ble så pipettert av og rensset ved Promegas wizard® kit. Konsentrasjon av DNA ble målt på et nanodrop spektrofotometer og lagret ved -20 °C.

Expand High Fidelity PCR System (Roche) program:

Lokk holder 103 °C

Denaturering: 95 °C i 5 min (ved bruk av hot start enzymer)

35 Sykler: 95 °C i 30 sec (denaturering)

55 °C i 30 sec (annealing)

72 °C i 2 min (forlenging)

Hold 72 °C i 7 min

Hold 4 °C på ubestemt tid.

Phusion® High-Fidelity PCR Kit (NEB) program:

Lokk holder 103 °C

Denaturering: 98 °C i 3 min

35 Sykler: 98 °C i 10 sec (denaturering)

60 °C i 15 sec (annealing)

72 °C i 60 sec (forlenging)

Hold 72 °C i 7 min

Hold 4 °C på ubestemt tid.

2.3.4: Gel-elektroforese

Prinsipp:

Gel-elektroforese ble i dette prosjektet brukt for å skille DNA fragmenter med ulike lengder. Denne metoden benytter seg av et elektrisk felt og en agarose gel som bidrar motstands mot diffusjon ved å danne en matrise struktur. Størrelsen av DNA molekylet vil påvirke hastigheten molekylet kan bevege seg gjennom matrisen. DNA molekylet drives gjennom matrisen ved at den har en negativ ladning som tiltrekkes den positive polen. Dermed vil størrelsen av molekylet bestemme hvor langt hvert enkelt fragment vandrer i gelen[19].

Utførelse:

Ideell mengde agarose er avhengig av forventet lengde på DNA fragmentene. I dette prosjektet ble det brukt 0,8 % agarose med GelGreen™. Dette gir god oppløsning/separasjon for fragmenter i størrelsesorden 5-10 kb. Bufferen brukt i utførelsen var 1xTAEbuffer. Før prøven ble tilsatt gel-brønnene, ble de blandet med "Loading dye" lik 10 % av prøvevolumet.

De fleste gjennomføringer ble utført med 20 µl prøvevolum og tilsatt 2 µl loading dye. Tilsatts av Loading dye gir prøvene høyere tetthet enn bufferen, slik at DNAet vil legge seg i brønnene. Loading dye inneholder også Bromfenolblått som er en indikator. Ved pH 6,8 har den et fargeomslag (gul-blå). Dette gjør at prøven kan sees på gelen uten UVlys. Styrken av det elektriske feltet brukt var 90-120 V, som her ble funnet optimalt. styrken av det elektriske feltet bestemmes ut fra lengden mellom elektrodene (5 V/cm). Når prøven hadde vandret tilstrekkelig langt i gelen ble den tatt ut av karet og visualisert ved blått lys[19]. GelGreen™ bundet til DNA fluoriserer ved utsettelse for UV-lys og/eller blått lys. GelGreen har tilstrekkelig absorpsjon mellom 250-300 nm og en sterk absorpsjon topp på rundt 500 nm[3].

For å bedømme størrelse ble prøvene sammenlignet med λ -PstI kuttet *E.coli* ladder(vedlegg 1) eller Generuler 1kb DNA ladder fra Thermo-scientific (vedlegg 2).

2.3.5: Rensing av DNA

Prinsipp:

Til rensing av DNA ble det i denne oppgaven brukt QIAquick Gel Extraction Kit og QIAquick PCR Purification kit. Disse inneholder en silika-membran for binding av DNA i nærvær av en høy-saltbuffer og pH under 7.5, nukleinsyrene adsorberes på silika-membranen i et miljø rikt på kaotropiske salter. Urenheter blir så vasket bort med en vaskebuffer inneholdende etanol. Vaskingen fjerner primere, nukleotider, enzymer, mineral-oljer, salter, agarose, etidiumbromid, og andre urenheter fra DNA-prøvene. Eluering av rent DNA utføres ved tilsatts av lav-saltbuffer med pH over 7 eller vann[30].

Utførelse:

Ved rensing fra gel kuttes ønsket bånd fra gelen med en skalpell. Så lite overflødig gel som mulig er ideelt. Agarosegelen ble så løst ved å tilsette 300 µl Buffer QG (inneholder guanidin tiocyanat med mer) per 100 mg agarosegel. Prøven inkuberes så 10 min ved 50°C og vortexes ved behov. Etter prøven er fullstendig løst ble den overført til QIAquick spin kollene og sentrifugert ved 13000 rpm i 1min for å binde DNA til silika-membranen[30].

Ved rensing av PCR produkt tilsettes 5µl Buffer PB (inneholder guanidin hydroklorid og isopropanol med mer) per 1 µl PCRreaksjonsmik. Prøven ble så overført til QIAquick spin kollene og sentrifugert ved 13000 rpm i 1min for å binde DNA til silika-membranen[30].

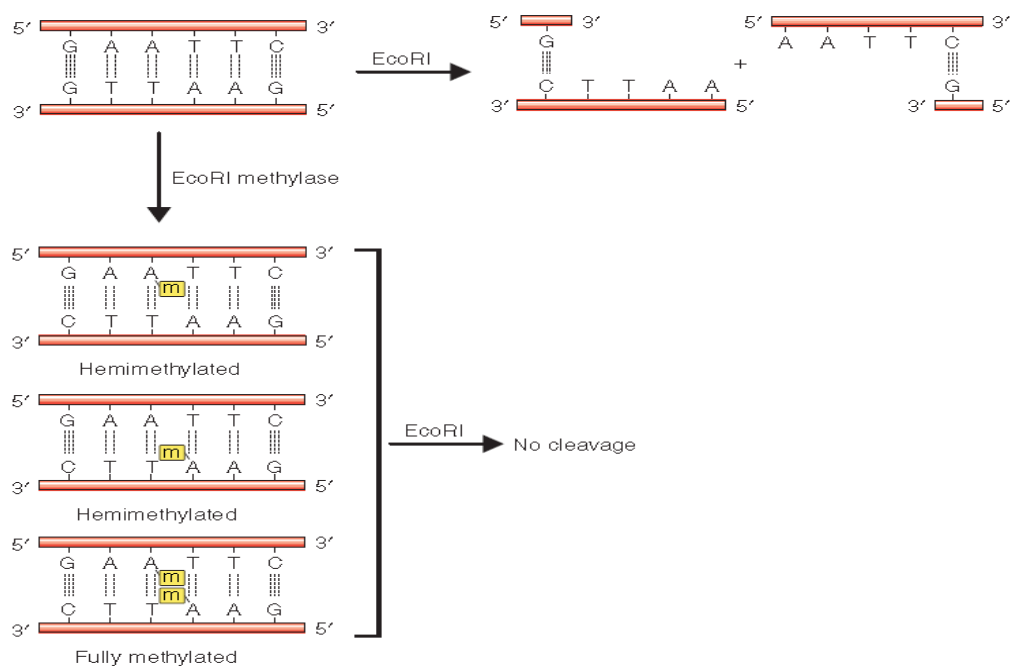
Kolonnen ble vasket med 750 µl buffer PE (med tilsatt etanol), sentrifugert ved 13000 rpm i 1 min. dette steget ble gjentatt med 250 µl buffer PE (med tilsatt etanol). Renset DNA ble

eluert ved å tilsette 50 µl Buffer EB (Tris-buffer) til kolonnen før ny sentrifugering. Vis det rensede DNAet skulle liggeres ble buffer EB byttet ut med tilsette 30 µl 0,5x ligasebuffer. Renset DNA ble lagret på -20 °C[30].

2.3.6: Restriksjonskutting

Prinsipp:

Restriksjonsenzymmer (Klasse II) gjenkjenner spesifikke palindrom DNA sekvenser på 6-8 baser og lager et kutt i DNA tråden ved disse områdene. For at enzymene skal utføre denne operasjonen kreves det at magnesiumioner er til stedet. Restriksjonsenzymmer er en del av mange bakteriers naturlige forsvar mot fremmed DNA, slik DNA kan introduseres av for eksempel et virus. Bakteriens eget DNA er beskyttet sine egne restriksjonsenzymmer ved at dens eget arvemateriale er metylert. Hvis bare en av DNA strengene har en metylgruppe i gjenkjennelsesområde vil dette hindre at enzymet binder og kutter DNAet. Dette er vist i figur 9. Mer enn 900 restriksjonsenzymmer er blitt oppdaget og isolert fra over 230 stammer av bakterier som gjenkjenner en rekke forskjellige sekvenser. Dette gir et kraftig verktøy i arbeidet med genetisk material[31].



Figur 9: Eksempelvis restriksjonskutting, samt beskyttelse ved metylering. Figur fra[31].

Utførelse:

| Komponent | Volum (μl) |
|------------------------|----------------------------------|
| DNA | 3-17 |
| 10x NEB Buffer | 2,0 |
| Evt NEB BSA | 0,5 |
| NEB restriksjonsenzym | 0,5-1,0 |
| Sterilt ionefritt vann | til 20 μ l |

NEB buffer 1,2,3,4 eller cutsmart ble brukt etter enzymets behov. Noen enzymer krever tilsats av BSA. BSA forhindrer adhesjon av enzymet til reaksjonsrørene og til pipettespisser. BSA stabiliserer også noen proteiner under inkubasjon [2].

Inkuberingstid ble bestemt ut fra enzymets aktivitet i blandingen (ved flere enzymer brukt samtidig) og mengde DNA. Vanligst for de fleste gjennomføringene ble det brukt 1 time inkubasjon ved optimal temperatur.

Hvilket enzym(er) som ble brukt ble bestemt av analyse i Clone manager Suitetm v6 (se 2.3.10).

2.3.7: Ligering

Prinsipp:

DNA ligase kan danne bindinger mellom dobbeltrådige DNA-fragmenter ved å danne fosfodiester-bindinger mellom dem. Denne prosessen er kalt ligering og er en energikrevende prosess. Energien kan komme fra NAD^+ eller ATP etter hvilken type DNA ligase det er snakk om. I bakterier er det NAD^+ som brukes som energikilde, mens dyreceller og bakteriofager benytter ATP. For at DNA ligase skal kunne binde DNA fragmenter må det ene fragmentet ha en fri 3'OH-ende og at det andre ha en 5'fosfat-ende[31]. Når DNA tiltenkt ligering skal kuttet med restriksjonsenzym er ønsket kutt som gir kompatible overheng når dette gir betydelig høyere effektivitet enn ligering av butte ender[10].

Utførelse:

Ligeringer ble utført ved å blande rensset DNA sekvens (insert) med en passende vektor. I blandingen ble det tatt sikte på å oppnå tre ganger så høy molar ratio av insert sekvens i forhold til vektor. Totalt volum for DNA er 17 μ l. 2 μ l 10X T4 ligasebuffer (NEB) samt 1 μ l T4 DNA ligase enzym (NEB) tilsettes så miksen før den ble innkubert over natt på isbad.

DNA ligase optimum temperatur er 37°C, men ved denne temperaturen er hydrogenbindingene i overhengene (laget ved restriksjonkutting) ustabile. Det er blitt funnet at temperaturer mellom 4–20 °C er et godt kompromiss mellom enzym rate og dannelse av bindinger mellom DNA fragmentene[43]. Isbad holder temperaturen i dette området.

2.3.8: Transformasjon

Prinsipp:

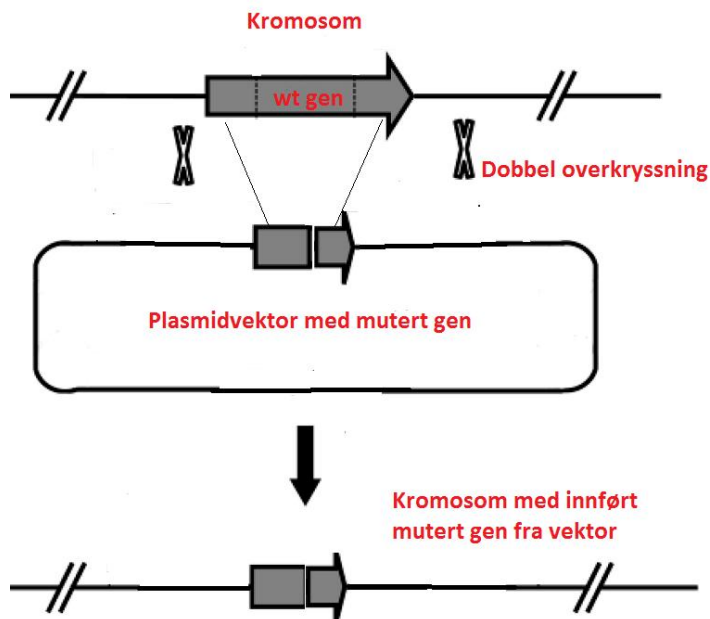
En celle som tar opp nakent DNA fra omgivelsene og får en endret genotype vil man si har gjennomgått transformasjon. De cellene som kan ta opp DNA fra omgivelsene sier man er kompetente. *A. vinelandii* er naturlig kompetente i sen logaritmisk vekstfase[28]. Ikke alle bakteriestammer har denne egenskapen naturlig og kompetanse må da induseres for å oppnå transformasjon. Dette er tilfellet i for eksempel *E. coli*[31]. Kompetanse kan oppnås ved og kjemisk behandle cellene med kationer som Ca^{2+} , Rb^+ og Mn^{2+} [12, 23]. Denne behandlingen antas å øke permeabiliteten for DNA i bakterieveggen, samt bidrar muligens til forhold hvor DNA kan binde seg til celleveggen[31].

For å få en varig endring i genotype må det fremmede DNAet bli integrert i cellens eget genom (rekombinasjon) eller kunne replisere sitt eget DNA i vertscellen. Dersom DNAet som introduseres ikke naturlig har mulighet for autonom replikasjon av fremmed DNA kan dette oppnås ved feste den til et passende replikon. Dette kan for eksempel være et lite plasmid eller bakteriofag[31]. Størrelse av plasmidet brukt som replikon er viktig når effektiviteten av transformasjon avtar lineært med økende størrelse[12].

Rekombinasjon krever at det eksisterer homologe sekvenser mellom transformert DNA og cellens genom. Siden det her er involvert med sirkulært DNA må overkrysningen skje på 2 homologe steder. Dette kalles en dobbel overkrysning. De homologe sekvensene vil kunne initiere overkrysning ved at de legger seg parallelt med hverandre. Videre kan det forekomme en utbytning av sekvenser mellom vektor og mål kromosomet.

Rekombinasjon kan benyttes for å undersøke et gens funksjon ved for eksempel en teknikk kalt gen-knockout. Her benytter man en vektor innehold homologe sekvenser for området rundt genet man ønsker å inhibere, disse sekvensene er deler av genet man ønsker å slå ut. De brukte gen fragmentene kan ikke utføre normal funksjon. Det er også mulig å innføre et antibiotikum resistens gen eller annet gen for selektering i den endrede sekvensen. Ved bruk av denne metoden er det viktig at alle kromosomkopiene, opp mot 80 i *A. vinelandii* blir slått ut for å gi et sikkert resultat[26]. Når gen-knockout utføres på *A. vinelandii* gis det 5

oppdyrkinger på selektivt media for å gi tid til at samtlige kromosomkopier skal bli slått ut. Rekombinasjon og gene-knockout er vist av figur 10.



Figur 10:Rekombinering og gen-knockout

Utførelse:

Produksjon av RbCl-kompetente *E. coli*-celler:

Prosedyren ble startet ved og innokulerer 1 ml fra en over natt prekultur av *E. coli* i 100 ml Psi-medium. Psi-kulturen ble så inkubert ved 37°C til OD₆₀₀ (optical density, ved 600 nm) nådde 0,4. Kulturen settes på is i 15 min før cellene ble høstet ved sentrifugering, 4500 rpm i 5 min. Psi-mediet, nå separert fra cellene, ble fjernet og tilsatt 40 ml kaldt TFB1 medium fulgt av 5 min inkubasjon på is. Cellene ble igjen høstet ved sentrifugering (4500 rpm i 5 min) og resuspendert i 3ml kaldt TFB2. Deretter ble cellene (suspendert i TFB2) fordelt på 100 µl- alikvoter og umiddelbart fryst ved -80°C.

Heat-shock transformasjon:

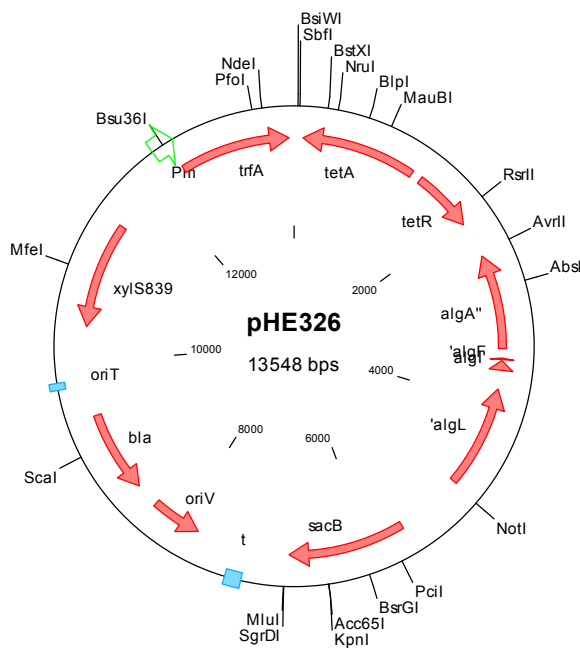
100 µl RbCl-kompetente *E. coli* celler ble tint på is og tilsatt 1-10 µl rensed DNA. Prøven ble så inkubert på is i 30-60 minutter, før den ble utsatt for varmesjokk (vannbad) ved 37 °C i 2 minutter. Cellene ble så inkubert på is i 2 minutter, for at celleveggen skulle stabiliseres. 1 ml SOC-medium (forhåndsvarmet til 37 °C) ble så tilsatt prøven. Deretter ble den inkubert

ved risting i 1-2 timer ved 37 °C. Under inkubasjon vil cellene gjenoppta normal funksjon og starte ny celledeling. Etter inkubasjonen ble bakteriecellene plattet ut på et selektivt media (LA + antibiotika) egnet for det transformerte plasmidet. Brukte et kjent plasmid, ofte plasmidvektoren uten insert, som positiv kontroll. Som negativ kontroll ble det brukt RbCl-kompetente *E. coli* celler uten tilsats av DNA.

Transformanter ble bekreftet ved bruk av dyrkning på selektivt agar (f.eks. antibiotika) og restriksjonskutting (forklart i 2.2.6).

2.3.9: Plasmidsystemet, pHE326.

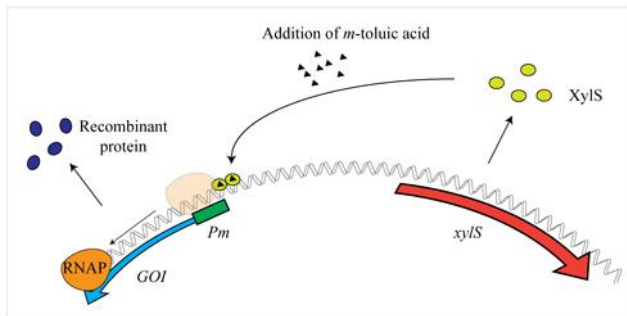
Plasmidet pHE326 ble valgt som knockout vektor til bruk i *A. vinelandii* for dette prosjektet. Plasmidet har en rekke egenskaper som gjør den egnet til dette formålet. pHE326 kan sees i figur 12.



Figur 11: pHE326, valgt plasmidvektor for gen-knockout i *A. vinelandii*.

I dette arbeidet var det ønsket å bruke konjugering og valgt plasmid måtte derfor være passende til dette. pHE326 har et konjugativt start-sete (OriT), som gjør at den kan brukes som i konjugering mellom *E. coli* S17-1 λ pir til *A. vinelandii*-celler.

For at plasmidet skal kunne replikere er den avhengig av at TrfA binder OriV, TrfA er under kontroll av en Pm-promotor. Denne promotoren er igjen avhengig av at xylS induseres av *m*-toluat. xylS koder for en dimer som kan binde seg til Pm. Denne dimeren er nødvendig for å rekruttere RNA-polymerasen til Pm[50]. Dette kan brukes til å regulere ny dannelse av plasmidet i mutantstammene etter konjugering. Mekanismen for Pm/xylS systemet kommer fram av figur 12.



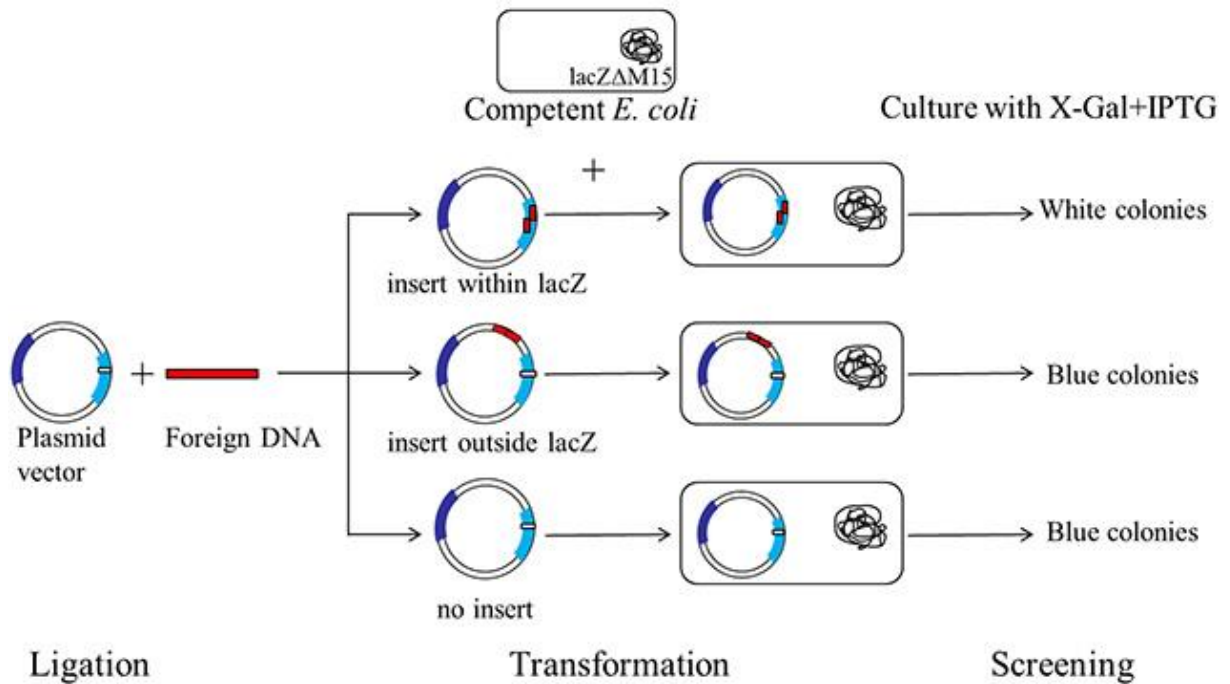
Figur 12: Pm/xylS ekspressjons system[50]

Plasmidet inneholder også *sacB* som induseres av sukrose. Når dette genet er induisert vil det føre til produksjon av polymere levan som er giftig for *A. vinelandii*. Dette sammen med Pm-systemet og tetracylin resistens genene (*tetA*, *tetR*) gir gode muligheter for regulering og seleksjon i *A. vinelandii* og ble derfor funnet egnet for dette prosjektet.

2.3.10 Blå/Hvit-screening

Prinsipp:

Blå/hvit screening er metode for å verifisere at det har blitt satt inn et insert i en vektor etter kloning. Metoden benytter seg av et prinsipp kalt α -komplementering. Dette fungerer ved at enzymet β -galaktosidase spalter substratet XGal (5-bromo-4kloro-3-indolyl- β -D-galaktosid) til galaktose og et 5-bromo-4-kloro-indoxyl-derivat, dette gir et blått produkt som gjør koloniene synlig blå på agaren. β -galaktosidase er kodet i genet *lacZ*, E.coli stammen DH5 α inneholder en versjon av dette genet som mangler sekvens for de 146 første aminosyrene. Dette forkortede genet er kalt *lacZ* Δ M15. pUC-plasmider inneholder sekvensen som koder for de manglende aminosyrene i *lacZ* Δ M15. Dette gjør at pUC-plasmidet kan komplementere det forkortede genet slik at et fungerende β -galaktosidase kan bli produsert [44]. Et kart av hvordan blå/hvit selektering fungerer i praksis kan sees fra figur 13.



Figur 13: Oversikt for blå/hvit screening [44].

Utførelse:

I denne oppgaven blir det benyttet plasmidet pUC128 som har en polylinker i den komplementære *lacZ* sekvensen. Denne polylinkeren ble brukt til å klonne inn ønsket insert. Dette fører til at det komplementære genet mister funksjonen sin og kolonier av celler inneholdende rekombinant plasmid vil da ikke se en restaurering av funksjon til β -galaktosidase.

Det blir i tillegg tilsatt IPTG (isopropyl β -D-thiogalaktopyranosid) er et ikke-metaboliserende analog av galaktose som inducerer uttrykket av *lacZ* genet ved å binde til *lac*-repressor. For selektering blir det benyttet at pUC128 har et gen for ampicillin resistens, når ampicillin da tilsettes agarene hindres celler uten plasmid fra å vokse.

40 μ l XGal (20 mg/mL) og 7 μ l IPTG ble tilsatt LA+amp, de ble så inkubert ved 37 °C i 3-4 timer for at XGal- og IPTGløsning skulle tørke. *E. coli* DH5 α transformert med pUC128 baserte vektorer ble så inokulert på platene og inkubert ved 37 °C over natt.

2.3.11: Frysing og opptining av bakteriestammer

Bakteriestammer som ble planlagt lagret lenger enn et par dager ble fryst ved -80 °C så fort som mulig. Hvert fryserør rommer 1 ml av flytende bakteriekultur sammen med 300 μ l 60 % glyserol. Glyserolen forhindrer formasjonen av potensielt skadelige iskrystaller ved lave temperaturer.

Ved opptining ble bakteriene overført til nytt flytende medium og dyrket ved passende temperatur for bakterien. Ved opptining fra -80 °C fryser opplevdes det fra tid til annen noe saktere oppvekst, derfor ble det ved behov gitt ekstra dyrkningstid.

2.3.12: Fast Blue B metode for påvisning av alkylresorcinol

Prinsipp:

Metoden benytter en reaksjon mellom saltet Fast blue B og 5-n-alkylresorcinol / Orcinol(standard) som i nærvær av aceton danner rødt presipitat. Dette gir et fargeomslag som kan måles spektrofotometrisk ved 520nm [48]. For å finne total alkylresorcinol blir fenollipidene ekstrahert fra kultur ved hjelp av aceton for *A. vinelandii*. Ekstraksjon metoden ble basert på artikkelen fra Segura 2003 hvor fenollipidene ble ekstrahert med aceton over to steg[39]. Det er viktig å merke seg at ved denne metoden egentlig måler mengden av aromatringer. Så dersom målt alkylresorcinol er tyngre eller lettere enn orcinol standarden vil man undervurdere eller overvurdere mengden i prøven. Det er mulig å løse dette hvis man har relativ mengde og struktur på alle alkylresorcinoler i prøven[48].

Fast blue B løsningen kan også tilsettes direkte på cyster i petriskål for å undersøke etter alkylresorcinoler på overflatene[7, 41].

Utførelse:

Alle dyrkninger av *A. vinelandii* blir gjort ved 30 °C i denne utførelsen. Det ble først satt opp forkulturer av ønsket *A. vinelandii* stamme, fra disse ble 1 ml overført til 100 ml nytt Burks medium(BM). Etter ny dyrkning på 2 døgn ble OD₆₀₀ målt i kulturen, fulgt av at cellene ble vasket for gammelt medium. Dette ble gjort ved å sentrifugere kulturen i 8 min ved 7000 rpm, gammelt medium fjernes og 100 ml BM + βHB tilsettes. Dette steget repeteres 2 ganger og utføres på sterilbenk for å unngå kontaminasjon. OD₆₀₀ vil så måles i kultur før kulturen får inkubere i 5 dager med daglig OD₆₀₀ målinger for å overvåke vekst.

Cellene fra kulturen vil så splittes i 25 ml alikvoter, disse sentrifugeres i 8 min ved 7000 rpm. BM + βHB fjernes fra cellene og vær alikvot blir så resuspendert i 1 ml 10mM MgSO₄. Hvert rør sentrifugeres så ved 14000 rpm i 2 min og supernatant fjernes.

Cellepelletten resuspenderes i 1 ml aceton for å ekstrahere alkylresorcinolene. Prøvene vortexes og inkuberes 1 time beskyttet fra lys (uten risting) i romtemperatur. Deretter følger en ny sentrifugering ved 14000 rpm i 2 min. Supernatanten av aceton som nå inneholder alkylresorcinol fra cellene pipetteres av og lagres mørkt ved -4 °C. Cellepelletten blir igjen resuspendert i 1ml aceton for en ny ekstraksjon av alkylresorcinoler. Vortexes og inkuberes

lys beskyttet (uten risting) over natt i romtemperatur. Følges så av ny sentrifugering ved 14000 rpm i 2 min. Aceton supernatanten pipetteres av og cellepelletten kastes. De to aceton ekstraksjonene fra samme cellepellet blandes før tørking i Savant™ Universal SpeedVac™ Vacuum System.

Før kvantifisering av prøvens alkylresorcinol lages det en orcinol(3,5-Dihydroxytoluene) standard. Orcinol løses i aceton for å oppnå en 1mg/ml stock løsning. Fra denne stocken brukes nødvendige µl verdier for å oppnå en standard kurve med følgende inkremitter når 1 ml Propanol fast blue B løsning (se 2.1.2) tilsettes: 1,5,10, 25, 50, 100 µg/ml.

Tilsettes samtidig 1 ml Propanol fast blue B løsning til de tørre alkylresorcinol prøvene. Standarden og prøvene inkuberes så mørkt i 1 time. Prøvene og standarder leses av ved 520nm. Det er viktig at prøvene leses av så fort som mulig når inkubasjonen er over når fargereaksjonen vil fortsette etter dette punktet og ved rundt 90-120 min vil prøvene begynne å danne presipitat som forstyrrer spektrofotometer avlesningen.

2.3.13: Sekvensering

Sekvensering ble håndtert av GATC BIOTECH AG sitt "LIGHTrun" program. GATC bruker sangersekvensering i tjenestene sine. Følgende protokoll ble brukt for prøve forberedelse:

- 400-500 ng Plasmid DNA
- 25 pmol primer
- 10 µl Total volum, løst i vann.

Mer informasjon om dette programmet kan finnes på selskapets nettsider: <http://www.gatc-biotech.com/>

2.3.14: Bioinformatisk verktøy

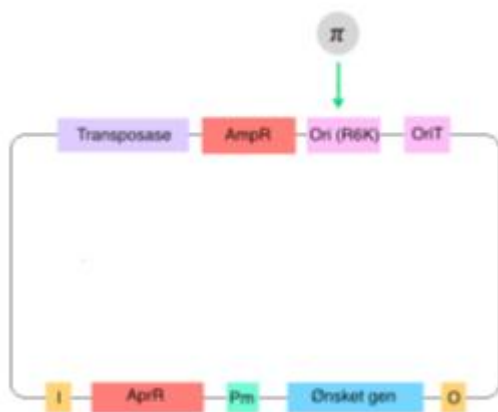
Clone manager Suite™ v6 er et bioinformatisk verktøy som kan brukes til å behandle informasjon om DNA sekvenser, primere, restriksjonssteder, åpne leserammer (ORFs) mm. Organisering og planlegging av eksperimentene for denne oppgaven ble gjort i dette programmet. Clone manager Suite™ v6 er egnet til dette når det lar brukeren simulere prosesser som for eksempel enzymatiske reaksjoner, restriksjonskutting og kloning. Programmet ble også brukt til å danne kart av DNA-fragmenter og plasmider brukt i prosjektet. Mer informasjon om dette programmet kan bli funnet på programmets hjemmeside (<http://www.scied.com/>).

3. Resultater

3.1 Komplementering av *A. vinelandii* stammer med mutert alkylresorcinol transport.

3.1.1 Innføring av villtype gen *arsF,G,H* under kontroll av Pm-promotor

Ved et tidligere prosjekt forsøkte Marianne Dalland å vise at ArsFGH er proteiner som er involvert i å danne en ABC-transportør som transporter alkylresorcinol til cellemembranen. Dalland klonet villtype genene, kontrollert av en Pm-promotor til transposonvektorer for senere å brukes til komplementering (pMD113, 114, 115). På grunn av manglende tid rakk hun ikke å teste sine muterte stammer med transposonvektorene. Transposonvektorene som ble konstruert i Dallands prosjekt (pMD113/114/115) er derivater av mini-Tn5-transposonvektoren pHE319[7]. Disse vektorene inneholder nødvendige elementer for å overføre villtype-genet fra donor-plasmidet til *A. vinelandii* kromosomet for restaurering av villtype.



Figur 14: Forenklet fremstilling av transposonvektor brukt for å lage pMD113/114/115[7].

Transposonet er flankert av en indre (I) og ytre (O) sekvens. Villtype gener har blitt satt inn i område merket "ønsket gen" for pMD113/114/115. Villtype genene er underlagt kontroll av en Pm-promotor som aktiveres ved tilstedeværelse av m-toluat[7].

Transposonvektorene inneholder et gen som koder for enzymet transposase. Transposase binder til transposon-endene og katalyserer transposon forflytningen ved at transposon området kuttes fra plasmidet (donor) og limes inn i mål kromosomet. Transposonvektoren inneholder også genet *Ori(R6K)* som er nødvendig for replikasjon av vektoren. *Ori(R6K)* er bare aktivt i nærvær av π -protein, λpir må derfor finnes i vertsbakterien for at plasmidet skal

kunne replikere [14]. *E. coli* stammen s-17- λ pir ble derfor brukt til arbeid med denne vektoren.

Transposonet inneholder ikke selv transposase, dette gjør at elementet ikke vil forflyttes videre etter integrering i kromosomalt DNA.

Dallands delesjonsstammer ble etter oppdyrking fra frossen kultur (-80 °C) oppsatt til konjugering mot *E. coli* (S17.1 λ pir) inneholdende pMD113, 114 eller 115. Oversikt over konjugerings oppsett kan sees av tabell 5.

Tabell 5: Oversikt konjugering

| | pMD113 | pMD114 | pMD115 |
|------------------------------------|--------|--------|--------|
| <i>A. vinelandii</i> Δ arsF | X | | |
| <i>A. vinelandii</i> Δ arsG | | X | |
| <i>A. vinelandii</i> Δ arsH | | | X |

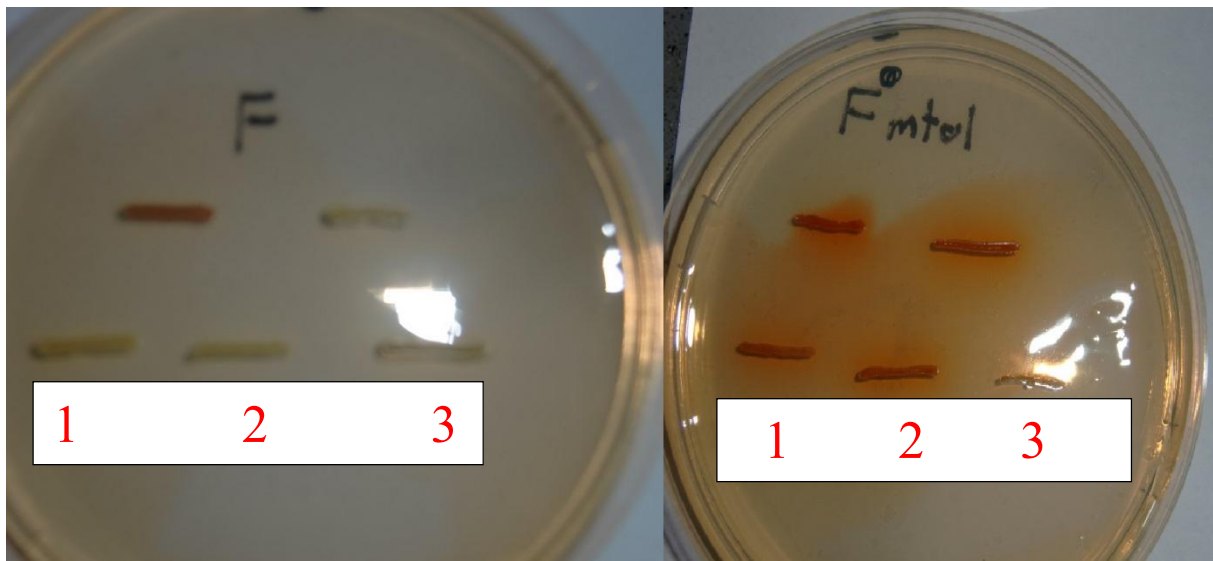
For alle tre konjugeringene ble Apr resistente transkonjuganter funnet. De resulterende stammene ble så dyrket over 5 overføringer på selektivt medium (BM+Apr) for å oppnå stammer der alle kromosomene inneholder transposonet. De resulterende stammene fikk navnene *Av* Δ arsF::TnMD113, *Av* Δ arsG::TnMD114 og *Av* Δ arsH::TnMD115.

3.1.2 Cysteinduksjon og test av restaurering til villtype.

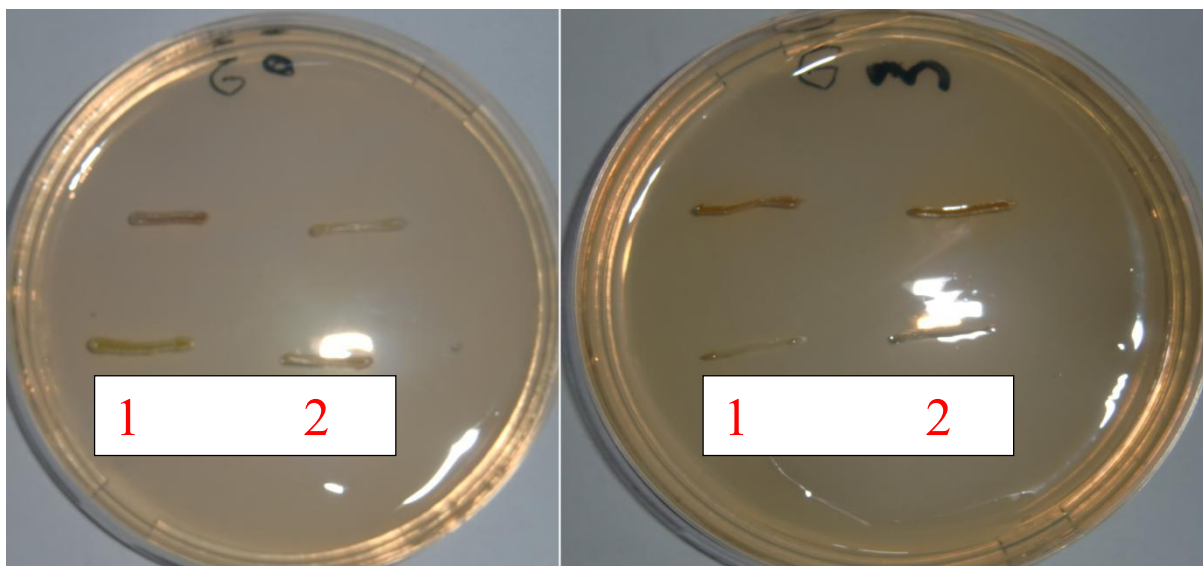
Transkonjugantene og villtype kontroll ble strøket på BA inneholdende butanol som eneste karbonkilde for å indusere cyste dannelsen. Samtidig ble paralleller av stammene strøket ut på BA+but+m-tol. m-tol ble tilsatt noen av platene for å undersøke om man fikk uttrykt villtype genet fra Pm-promotoren.

Videre ble platene pakket i plast for å hindre uttørking og inkubert 5 døgn i 30°C. Etter inkubasjonen ble en løsning av Fast blue B salt og eddiksyre (se 2.1.2 og 2.3.12) tilsatt på agar platene. Dette skulle etter hensikt føre til en fargereaksjon mellom alkyresorcinol i membranen og fast blue B i villtype stammer og stammer med transposon. Mutanter skal forbli hvite ved denne metoden når disse har en hindret evne til transport av alkyresorcinol ut i membranen[7].

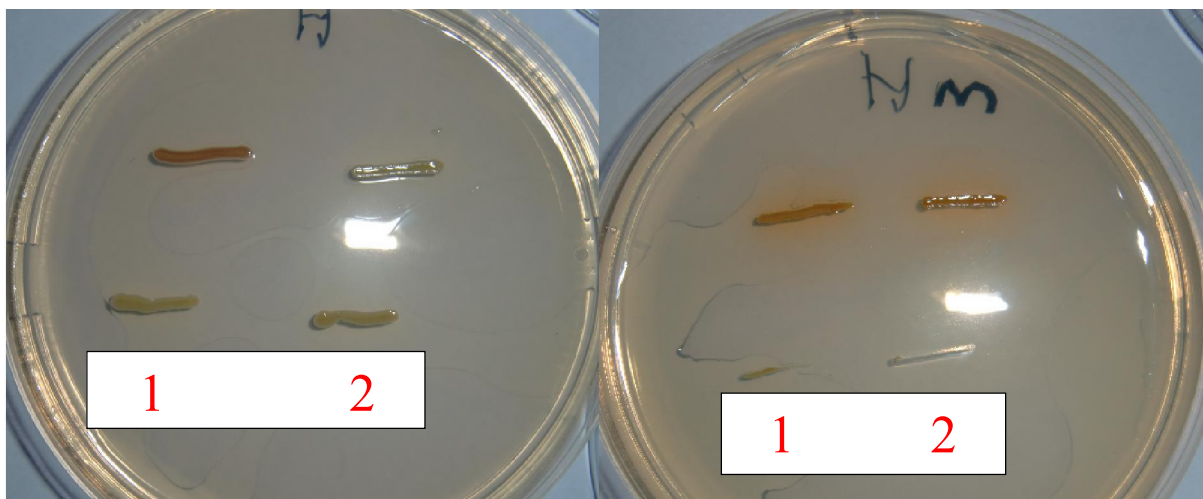
Tre separate forsøk ble gjort for dette eksperimentet uten å få ventet fargeomslag i stammer med transposon. Resultatet fra et av forsøkene er vist i figur 15 til 17.



Figur 15: Komplementasjon av *arsF* mutanter (cyster). Venstre plate er BA+n-but. Høyre plate er BA+n-but+m-tol. Øverst til høyre er wt kontroll (pos kontroll), øverst til venstre er *arsF* mutant (neg kontroll). Under er mutantstammer behandlet med transposon.



Figur 16: Komplementasjon av arsG mutanter (cyster). Venstre plate er BA+n-but. Høyre plate er BA+n-but+m-tol. Øverst til høyre er wt kontroll (pos kontroll), øverst til venstre er arsF mutant (neg kontroll). Under er mutantstammer behandlet med transposon.



Figur 17: Komplementasjon av arsH mutanter (cyster). Venstre plate er BA+n-but. Høyre plate er BA+n-but+m-tol. Øverst til høyre er wt kontroll (pos kontroll), øverst til venstre er arsF mutant (neg kontroll). Under er mutantstammer behandlet med transposon.

Tabell 6: Resultater etter komplementasjon (arsFGH). Neg.:Hvite stammer, +:Røde stammer, %:Redusert/ingen vekst.

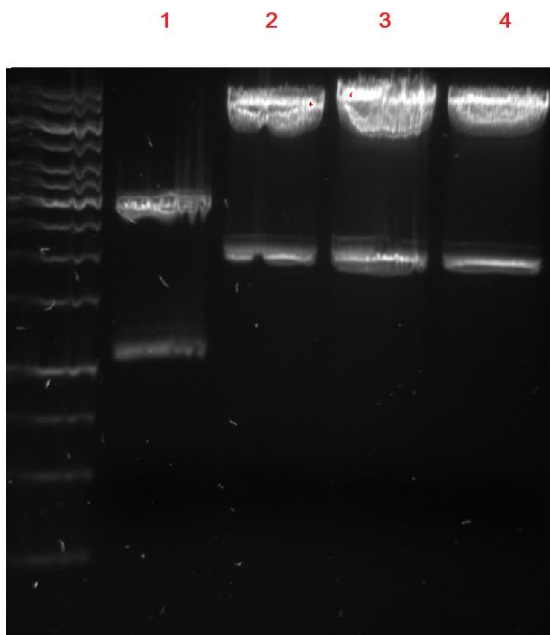
| | arsF | arsF-tol | arsG | arsG-tol | arsH | arsH-tol |
|------------------------|------|----------|------|----------|------|----------|
| Wt (pos. kontroll) | + | + | + | + | + | + |
| Mutant (neg. kontroll) | Neg. | + | Neg. | + | Neg. | + |
| Behandlet stamme 1 | Neg. | + | Neg. | % | Neg. | % |
| Behandlet stamme 2 | Neg. | + | Neg. | % | Neg. | % |
| Behandlet stamme 3 | Neg. | % | n/a | n/a | n/a | n/a |

Fra figur 15,16,17 og tabell 6 ser man at positiv kontroll som forventet ble farget rød i alle gelene. Negativ kontroll (*arsFGH* mutanter) ble hvite som forventet på platen uten m-tol, men ser ikke ut til å oppføre seg som forventet på gel med m-tol tilsatt. Ingen stammer behandlet med transposonvektoren ga den røde fargen assosiert med reversjon til wt, unntaket var *arsF*+m-tol platen. Men når denne platen også ga positivt svar på neg kontroll vil *arsF* utslaget her kunne være en falsk positiv. Når eksperimentet ikke gikk etter hensikt ble det undersøkt etter mulige problemer som kunne forårsake dette.

Erfaring fra andre arter kan indikere at Pm-promotoren ikke virker ved stasjonærfase (Ertesvåg, upublisert?), og dermed trolig heller ikke virker slik den skal under cystedannelse. Det er også mulig at den dårlige veksten på m-tol tyder på at promotoren virker, men påvirker transkripsjon på en uventet måte. Siden *arsFGH*-mutantene ble røde på plater med m-tol, synes det også som om dette kjemikalie i seg selv påvirker mengden av alkylresorcinol eksponert på overflaten av cellene. Det ble besluttet å bytte ut Pm-promotoren i transposon plasmidene laget av Dalland byttet ut med *palgD* fra pHE324.

3.1.3 Konstruksjon av nye vektorer til komplementering.

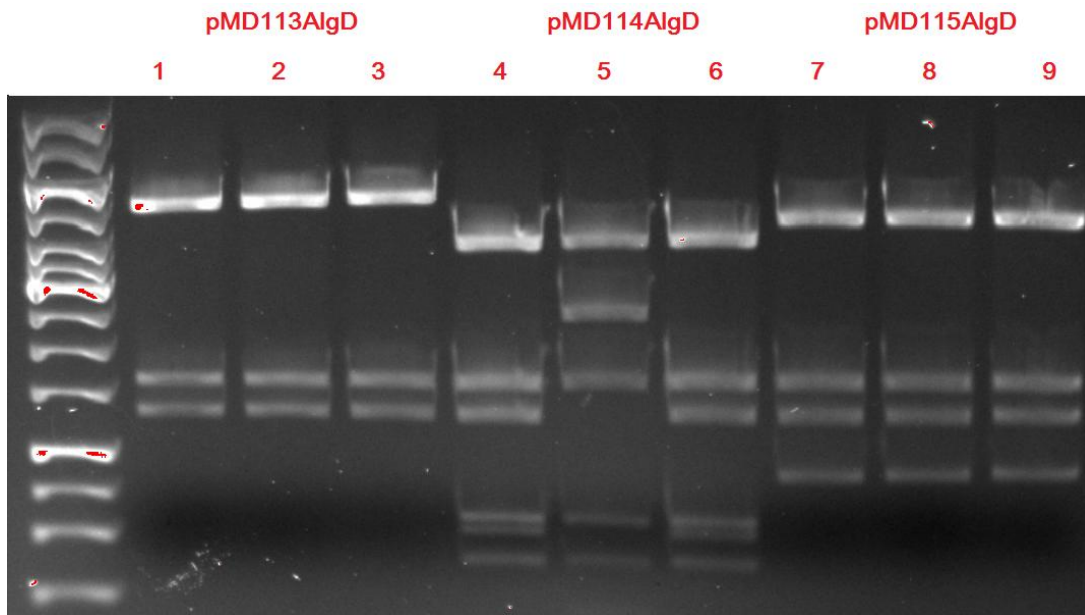
For å bytte ut Pm-promotoren i pMD113, pMD114 og pMD115 ble den først kuttet ut ved restriksjonskutting. Dette ble gjort i to steg, først ble plasmidene kuttet med NdeI over natt ved 37 °C. Parallelt med denne første kutting ble *palgD* kuttet ut av pHE324 med Acc65i og NdeI over natt ved 37 °C. Ved den følgende dagen ble pMD plasmidene kuttet med BsiWI i 1 time ved 55°C. Resultatet av restriksjonskuttingen kommer fram av figur 18



Figur 18: Restriksjonskutting av promotorer (palgD). Brønn 1: pHE324. Brønn 2:pMD113. Brønn 3:pMD114. Brønn 4:pMD115. PstI ladder.

Fra pHE324 ble båndet på størrelsen 1,1kb inneholdende palgD, båndet ble kuttet fra gel og DNAet rensset. pMD Plasmidene uten Pm-promotor fra brønn 2 (7,1kb), brønn 3 (7,5kb) og brønn 4 (7,3kb) ble også kuttet fra gel og så rensset. Det ble så satt opp en ligering mellom disse produktene med forholdet 1del vektor til 3 deler insert.

Etter ligeringen ble de resulterende plasmidene transformert inn i *E. coli* (S-17-1 λ -pir) celler. Det ble valgt ut 3 kandidatkolonier for hvert plasmid (pMD113,114,115) fra transformasjonen som videre ble dyrket på selektivt medium (LA/LB+Apr). Plasmidene ble isolert fra mediet og kontrollert ved restriksjonkutting med AflIII ved 37 °C over natt. Gelelektroforesen av kontrollen vises i figur 19 og forventede kuttemønster kan leses fra tabell 7.



Figur 19: Kontroll av pMD plasmid med AlgD promotor. PstI ladder.

Tabell 7:Kontroll ved restriksjonskutting med AflIII

| Plasmid: | Båndlengder (kb): | Endelige navn: |
|------------|-------------------------|----------------|
| pMD113 | 4,8+2,9+1,4 | |
| pMD113AlgD | 5,1+1,7+1,4 | pOG113 |
| pMD114 | 3,9+2,4+1,7+0,7+0,4 | |
| pMD114AlgD | 3,9+1,7+1,4+0,7+0,6+0,4 | pOG114 |
| pMD115 | 4,4+2,9+1,7+0,7 | |
| pMD115AlgD | 4,4+1,7+1,4+1,0. | pOG115 |

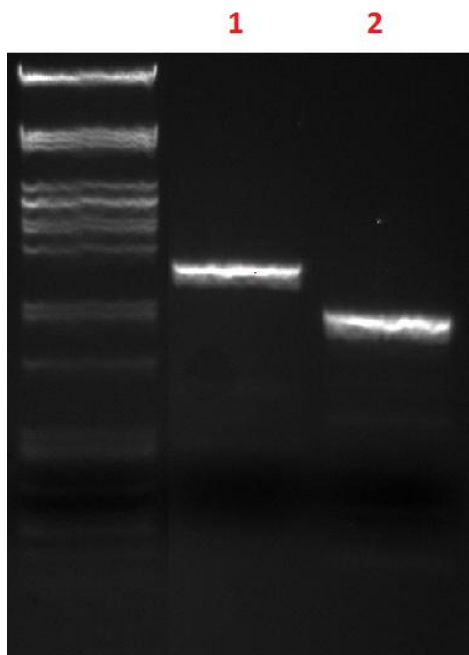
Alle kandidater kontrollert i dette oppsettet, med unntak av brønn 5, viser forventet kuttemønster. Kandidatene fra brønn 1,4 og 9 ble valgt ut og gitt navnene pOG113, pOG114, pOG115. Disse ble fryst ved -80°C.

3.2 Inaktivering av gen som koder for glykosyl-transferase

3.2.1 Konstruksjon av vektor pOG3

For å kunne slå ut *gly* måtte det først lages en vektor som inneholdt en forkortet versjon av genet. Fra genets originale lengde på 1355bp ble 885bp fra midten av genet fjernet. Total lengde av det forkortede genet er 470bp. Når vektoren blir konjugert til *A. vinelandii* vil det skje en dobbel rekombinasjon mellom plasmidvektoren (som inneholder det forkortede genet) og *A. vinelandii* cellens kromosom (se 2.3.8). Det forkortede genet vil ikke kunne utføre oppgaven villtype (wt) genet gjør i *A. vinelandii*. Ved å bytte ut alle forekomstene av wt genet i *A. vinelandii* sitt genom kan man da oppnå ”gene knockout”.

For å konstruere dette plasmidet ble først genomisk DNA fra *A. vinelandii* ATCC 12518 genomet isolert fra flaske kultur. Videre ble det utført en PCR reaksjon (se 2.3.3) med 2 primerpar designet for å isolere fragmenter av genene *gly*. Primerne brukt for *gly* genet fikk navnet Opp glykosyl F, Opp glykosyl R, Ned glykosyl F, Ned glykosyl R (vedlegg 8). PCR produktet ble kontrollert ved gel elektroforese, resultatet av kontrollen vises i figur 20.



Figur 20: Gel elektroforese av PCR-produkter (*gly*). Brønn 1: Opp *gly* (1,4 bp), Ned *gly* (1,1 bp). PstI ladder.

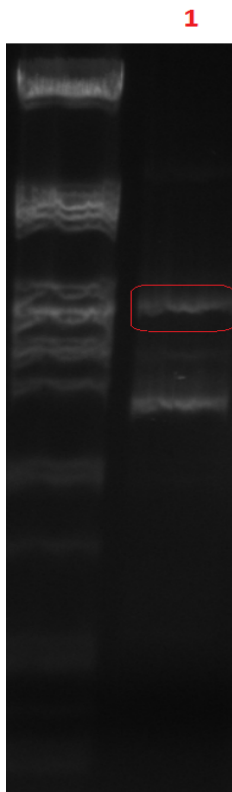
Videre ble fragmentene rensset fra reaksjonsmiksen i forberedelse av ny phusion PCR reaksjon. I denne reaksjonen benyttes forward primeren til ”opp” fragmentet (Opp glykosyl F) og revers primeren til ”ned” fragmentet (Ned glykosyl R) for å sette sammen de to

fragmentene av genet. Kvantifiseringen av gen fragmentene brukt i PCR reaksjonen kommer fram av tabell 9.

Tabell 8:Kvantifisering av gen fragmenter til PCR *gly*

| ID | Kons. (Nanodrop) | Kopi nr. | pmol | Tilsatt mengde i PCR mix |
|-----------------------|------------------|----------------------|------|--------------------------|
| Opp <i>gly</i> | 49.1 ng/ μ l | $3.14 \cdot 10^{10}$ | 1.05 | 1 μ l |
| Ned <i>gly</i> | 43.9 ng/ μ l | $1.28 \cdot 10^9$ | 1.45 | 0.8 μ l |

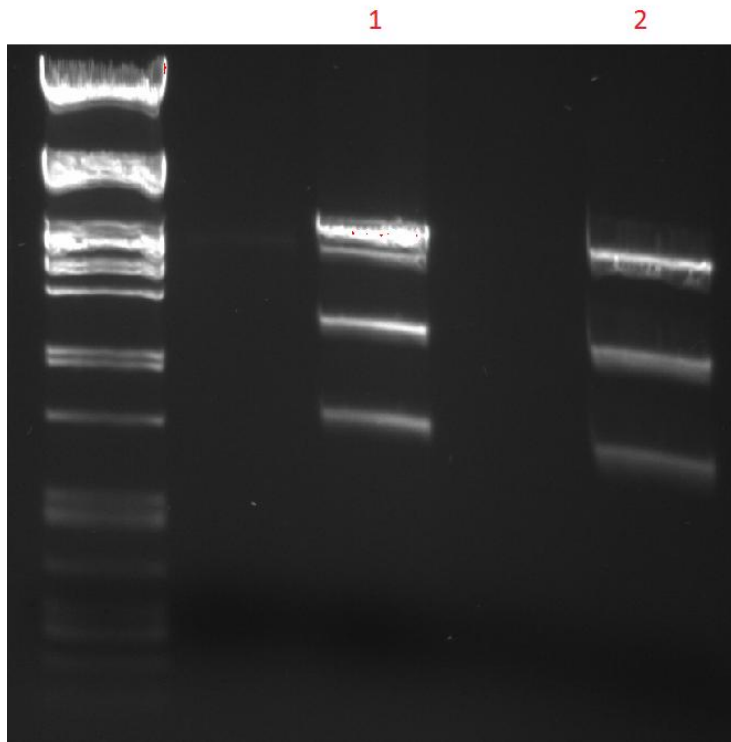
Det resulterende PCR-fragmentet ble en forkortet versjon av *gly* som har en delesjon i midten av genet. Fragmentet med mutert *gly* renses fra gel vist i figur 21. Leserammen til DNA fragmentet er den samme som i wt genet.



Figur 21: Gel elektroforese av mutert *gly* (2,5 kb) etter phusion PCR. PstI ladder.

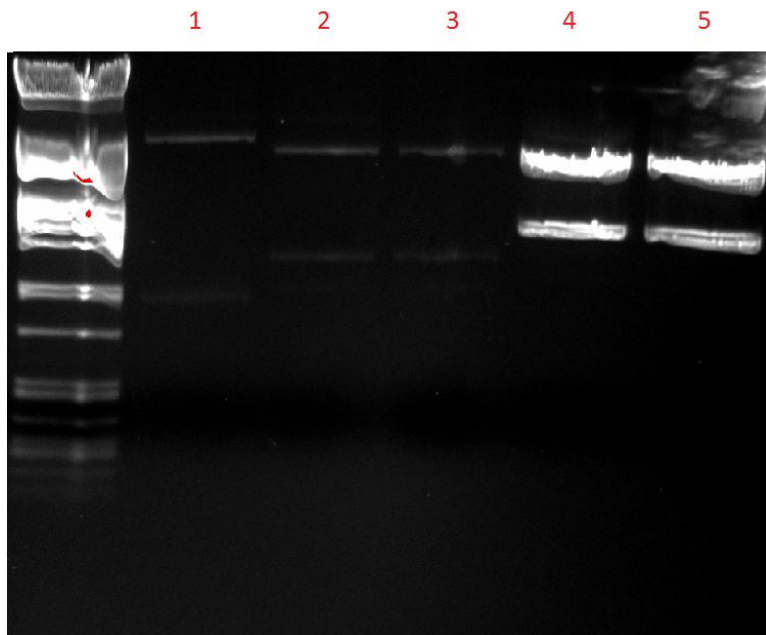
Neste steg i konstruksjonen av knock-out vektoren ble da å ligere de forkortede genene inn i en passende plasmidvektor. Initielt ble plasmidet pHE179 valgt til dette. Dette plasmidet inneholder gener for resistens (Amp^r , Tet^r) som kan brukes til seleksjon senere. Plasmidet er et høykopitalls plasmid, dette gjør at man oppnår høyre konsentrasjon av plasmidet i vær celle. Denne egenskapen gjorde den lettere å arbeide med i denne fasen. Ved hjelp av restriksjonskutting og ligering ble det forkortede genet satt inn i pHE179 (se 2.3.6 og 2.3.7).

Både den forkortede versjonen av gly og pHE179 ble kuttet med enzymene AgeI-HF, PstI og EcoRV. pHE179 kuttet med disse vises i figur 20, brønn 1.



Figur 22: Gel elektroforese av Kuttet pHE179 til bruk som kloningsvektor. Brønn 1: pHE179 kuttet med AgeI-HF, PstI og EcoRV (2,8kb), Brønn 2: pHE179 kuttet med XbaI, EcoRI og EcoRV (2,8kb). PstI ladder.

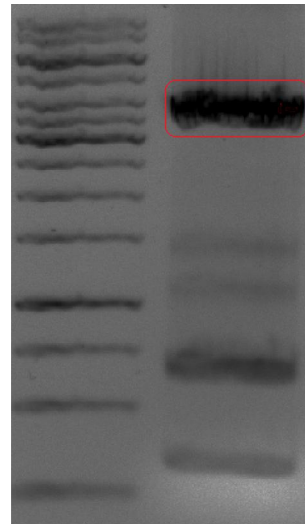
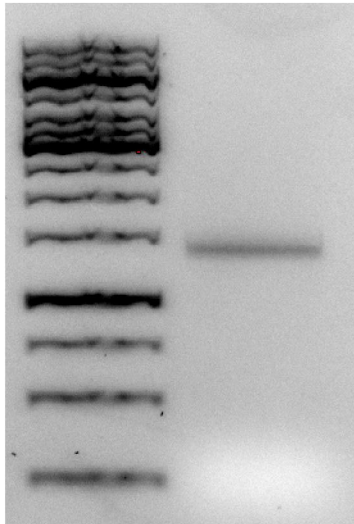
Det forkortede genet av *gly* ble så ligert inn i pHE179. Plasmidet ble transformert inn i *E. coli* (DH5 α) for oppreplikasjon (se 2.3.8). Etter seleksjon på LA+Amp ble plasmidet kontrollert ved restriksjonskutting. Enzymet PshAI ble benyttet ved kontrollen, det forventes et kuttemønster av to fragmenter på 3,8kb og 1,0kb (se figur 23). Plasmidet som utviste riktig mønster ble gitt navnet pOG11 og sendt til sekvensering hos GATC-BIOTECH i Tyskland. Primerne brukt til sekvensering var M13R, Opp glykosyl F, Opp malonyl F og pGem/Plit F. Se primer liste i vedlegg 8 for primersekvenser.



Figur 23: Kontroll ved Gel elektroforese av restriksjonskuttet pHE179 innsatt mutert gen. Brønn 1-3: pHE179 med mutert *gly* insert, kuttet med PshAI. Brønn 1 viser forventet kuttemønster (3,8kb og 1,0kb). Brønn 4-5: pHE179 med forkortet *mal* insert, kuttet med BssSI. Brønn 4 og 5 viser forventet kuttemønster (1,9kb og 3,5kb). PstI ladder.

Ved sekvensering viste det seg at pOG11 ikke var korrekt, bare ”opp-*gly*” delen (sekvensert av M13 og Opp glykosyl R) av PCR produktet ga rett sekvens. Det ble derfor bestilt opp et nytt primerpar for bruk i PCR for ”ned” delen. De nye primerparene fikk navnene Ned glykosyl F2 og Ned Glykosyl R2 (vedlegg 8). Dette primerparet ble brukt til å isolere et nytt fragment fra *A. vinelandii* ved PCR (phusion 2.3.3). Dette fragmentet ble så brukt til å bytte ut område som inneholdt feilen i pOG11.

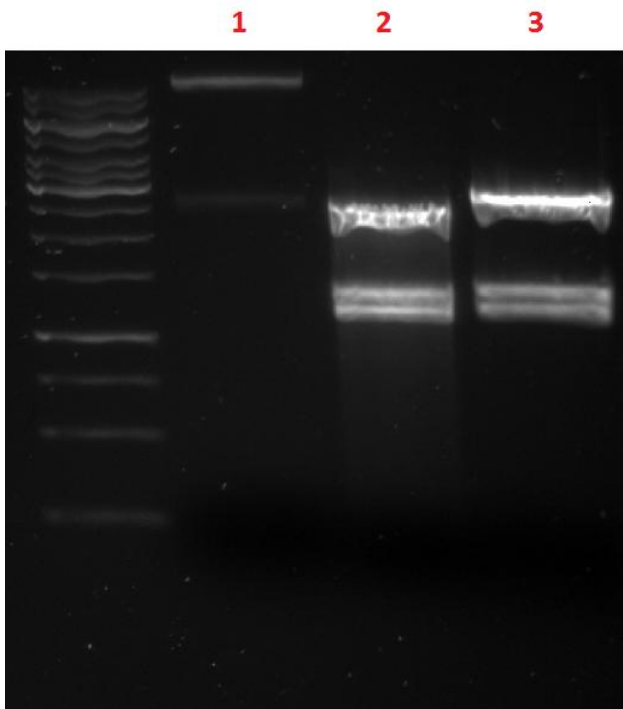
PCR fragmentet Ned gly2 og pOG11 ble så kuttet med Sal I-HF og AgeI-HF (se figur 24 og 25). Fragmentet av pOG11 (3,9 kb) og de ønskede fragmentene fra Ned gly2 (1,3 kb) ble etter gel ekstraksjon, ligert sammen og transformert inn i *E. coli* DH5 α . Det resulterende plasmidet ble så sendt til ny sekvensering med primerne Ned glyosyl F2 og PlitGem F (se vedlegg 2). Sekvenseringsdata viste at plasmidet nå var etter intensjon, plasmidet ble da gitt navnet pOG1.



Figur 24: Ned gly2 kuttet med Sal I-HF og AgeI-HF. GeneRuler ladder. Figur 25: pOG11 kuttet med Sal I-HF og AgeI-HF. GeneRuler ladder.

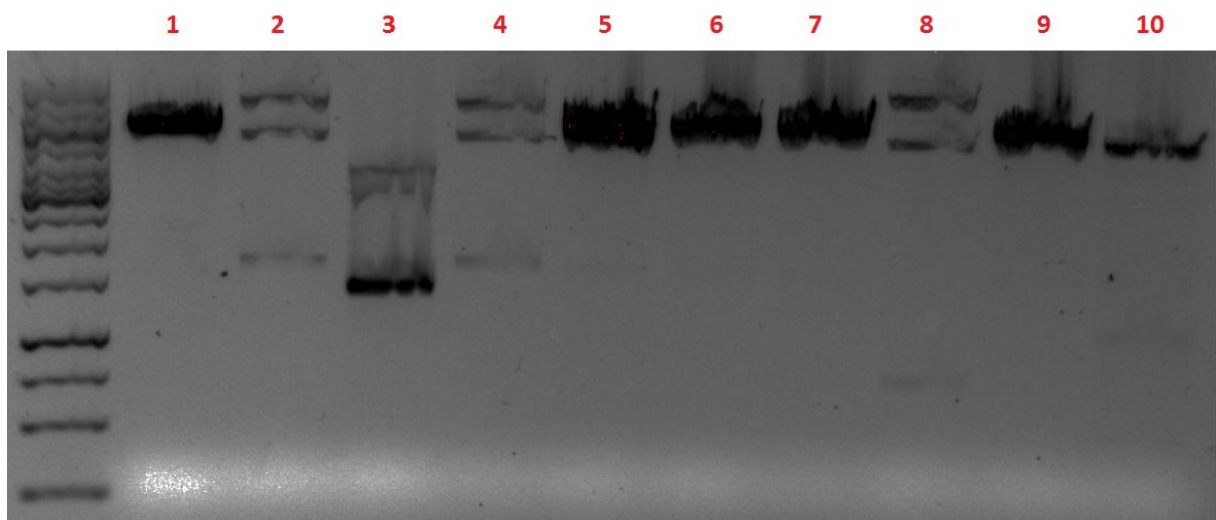
Etter bekreftelse av plasmidet ved sekvensering ble neste steg å overføre det forkortede genet til en vektor som har nødvendige gener for konjugering (OriT) til *A. vinelandii*. Plasmidet pHE326 ble valgt til dette. Grunnlag for dette valget kommer fram av metode 2.3.9. Plasmidet inneholder også gener for resistens (Amp^r , Tet^r) som kan brukes til seleksjon. Dette er et lavtalls-kopi plasmid og vil derfor forekomme i mye lavere antall per celle. Spesielle hensyn dette medbringer ved isolering er belyst i metode (2.3.2).

pOG1 ble kuttet med AvrII, Not I-HF og PsiI. Båndet på 2,5 kb inneholder da genet som skal overføres til pHE326. pHE326 ble kuttet med AvrII og Not-HF, dette gir et bånd på 11kb og 2,5kb (figur 26). Båndet på 11kb er da den ønskede vektoren. Ønskede bånd ble kuttet fra gelen og DNA ekstrahert som forklart i metode (2.3.5).



Figur 26: Overføring til ny vektor pHE326. Brønn 1: pHE326 kuttet med AvrII og Not-HF. Brønn 2: pOG1 kuttet med AvrII, Not I-HF og PstI. Brønn 3: pOG2 kuttet med AvrII, Not I-HF og PstI. GeneRuler ladder.

Produktene ble ligert sammen for å danne et nytt plasmid. Dette ble videre transformert inn i *E. coli* (S-17-1 λ -pir). Etter transformasjonen ble 10 kolonier fra selektivt medium (LA+Amp) valgt ut og dyrket i kultur (LB+Amp). Plasmidene ble rensset og kontrollert ved restriksjonskutting (NcoI), se figur 27. Ønsket plasmid vil ha kuttete fragmenter på størrelse 1,7kb, 4,9kb og 7,0kb.



Figur 27: Kontroll ved restriksjonskutting (NcoI). Brønn 1-5: pHE326 med forkortet *gly* insert. Brønn 6-10: pHE326 med forkortet *mal* insert. GeneRuler ladder.

Plasmidene kontrollert i brønn 2 og 4 utviste forventete restriksjonsmønster. Plasmid kontrollert i brønn 2 ble valgt ut og gitt navnet pOG3.

3.2.2 Konstruksjon av stamme *A. vinelandii* Δ gly

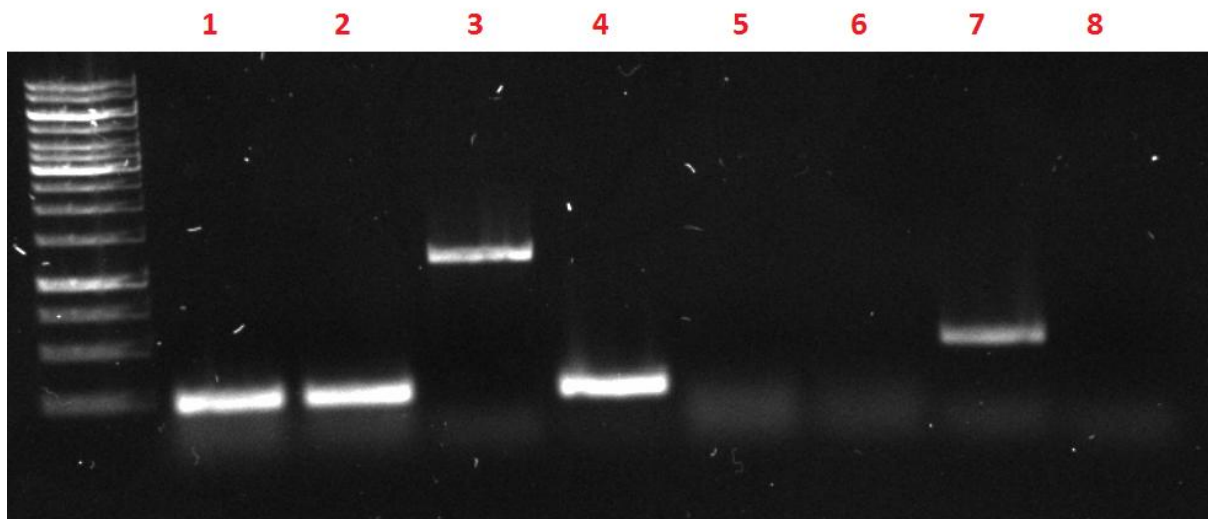
pOG3 ble så overført fra *E. coli* stammene til *A. vinelandii* ATCC 12518 ved konjugering. pOG3 er avhengig av at TrfA binder OriV for å replisere. *trfA* er underlagt en Pm-promotor som er avhengig av tilstedeværelsen av m-toluat. Dette gjør at ved å dyrke de muterte stammene uten m-toluat vil plasmidet ikke lenger bli replisert. Etter en tid vil de færreste av cellene i kulturen inneholde plasmidet. Denne egenskapen benyttes for å skille konjugasjon og rekombinering i tid. Ved dette oppnår man at det forkortede *gly* blir satt inn *A. vinelandii* sitt genom ved dobbel overkryssning mellom plasmidet og bakteriens genom (se 2.3.8).

Etter første oppdyrking på BM+Tc+m-toluat fulgte 5 oppdyrkinger på BM+Tc før stammen ble overført en siste gang til nytt medium BM uten andre tilsetninger. Det ble så fryst backuper av stammen i -80 fryser.

Fra BM kulturen ble stammene overført til BM med 6% Sukrose (suc). Samtidig ble det platet ut en fortyningsserie av kulturen på BA plater med 6% suc. Sukrosen er giftig for stammene som fortsatt har hele plasmidet. Dette grunnet at genet *sacB* (indusert av sukrose) vil være inkludert i kromosomet. Når dette genet er indusert vil det føre til produksjon av polymere levan (giftig for *A. vinelandii*). Etter oppvekst i 3 dager og 30 °C på sukrose ble det tatt enkeltkolonier fra BA+Suc 6% platene, disse ble spredd videre til nye BA+Suc 6% plater og BA+Tc plater. Tc er giftig for wt og ønsket rekombinant. Ved å sammenligne de to platene kan man da finne kolonier som ikke inneholder plasmidet(Tc/Suc test).

Kolonier konjugert med pOG3 vil ha vekst på suc medium og ingen vekst på Tc medium, stammer som utviste disse vekstegenskapene ble valgt ut til kontroll ved PCR.

Kandidatkolonier ble dyrket opp i flaske kultur med BM+Suc6% og frosset ned ved -80°C. Videre ble kromosomalt DNA ekstrahert ved koking og renset i forberedelse PCR (se 2.3.3). Kontroll ved PCR ble utført med Expand kit og primerparene «del gly F» og «del gly R», samt «del gly F» og «gly wt». Som kontroller ble Villtype *A. vinelandii* og pOG3 brukt. Villtypen vil gi bånd i størrelsen 1,1 kb (del gly F+R) og 0,4 kb (del gly F+gly wt). Ved korrekt insert vil primerparene vise et bånd ved 0,2 kb (del gly F+R) og intet produkt for del gly F+gly wt paret, Se figur 28.



Figur 28: PCR kontroll av insert gly. Brønn 1-4: del gly F+R, Brønn 5-8: del fly F+gly wt
 Brønn 1 og 5 er kandidat koloni 1. Brønn 2 og 6 er kandidat koloni 2. Brønn 3 og 7 er wt *A. vinelandii*.
 Brønn 4 og 8 er plasmid pOG3. GeneRuler ladder.

Begge kandidatene ble bekreftet å være korrekte i denne PCR kontrollen. Disse ble så gitt navnet *A. vinelandii* Δ gly 1 og 2.

3.2.3

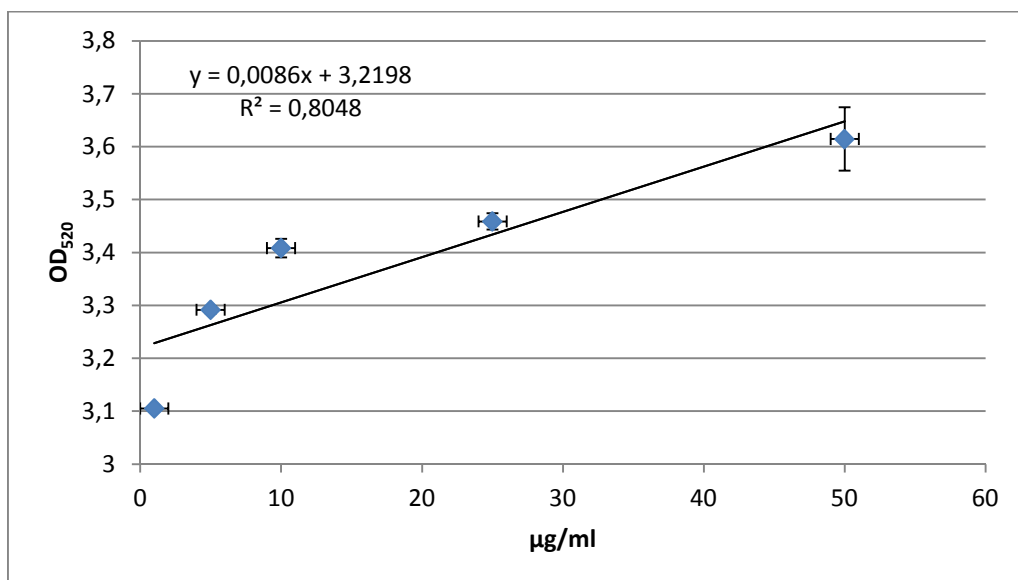
Etablering av metode for å kvantifisere produksjonen av alkylresorcinol

For å kunne kvantifisere de muterte stammenes alkylresorcinol produksjon var det nødvendig å etablere en metode som kunne måle mengden av total alkylresorcinol i cellen. Det ble tatt utgangspunkt i reaksjonsprinsippet beskrevet i Tlusciks artikkel fra 1981 [48]. Metoden benytter en reaksjon mellom saltet Fast blue B og 5-n-alkylresorcinol / Orcinol som i nærvær av aceton danner rødt presipitat. Dette gir et fargeomslag som kan måles spektrofotometrisk ved 520nm [48].

Ekstraksjonsmetoden for *A. vinelandii* ble basert på artikkelen fra Segura et al. [39]. Fenollipidene ble ekstrahert med aceton over to steg (se 2.3.12). Siden både prøven og reagensene er lyssensitive var det viktig å begrense eksponeringen til lyskilder gjennom utføringen. Grunnet venting på at utstyr ble ledig ble prøvene fryst mørkt i 2 døgn før de ble tørket for aceton og videre analysert for alkylresorcinol.

Det ble først utført et oppsett med bare et begrenset antall paralleller av villtype *A. vinelandii* cyster og *A. vinelandii* Δ gly cyster for å teste metodens variabler. Første gjennomføringene ble gjort med full brønn (200 μ l) etter 1 time inkubasjon for både prøver og orcinol standard. Etter avlesning ved 520nm ble det klart at 200 μ l prøve i microtiter-brønnene ga for høy absorbans slik at målingene ikke var ideelle for vurdering av konsentrasjon. Det

ble derfor satt opp et nytt oppsett med 50µl i vær brønn. Dette ga bedre absorbans avlesninger, men på dette tidspunktet hadde prøvene stått på benk i 2 timer og hadde dannet presipitat. Resultatet av dette var veldig høyt standardavvik (11-17 %) som gjorde denne avlesning vanskelig å vurdere. Videre i metodeetableringen ble derfor første avlesning med 200µl brukt. Data fra denne avlesningen kan sees i figur 29 og tabell 8.



Figur 29: Orcinol standard. Hvert datapunkt vist her er et gjennomsnitt av 3 parallelle målinger.

Tabell 9: Metodeetablering Alkylresorcinol

| <i>A. vinelandii</i> ATCC 12518 | | | | | <i>A. vinelandii</i> Δgly | | | | |
|---------------------------------|--------|----------------|------------|-----------------|---------------------------|--------|----------------|------------|-----------------|
| Prøve ID. | Abs. | \bar{x} Abs. | Std. avvik | Kons.* (µg/ml): | Prøve ID. | Abs. | \bar{x} Abs. | Std. avvik | Kons.* (µg/ml): |
| A1 | 3,3042 | | | | D1 | 3,3165 | | | |
| A2 | 3,3661 | 3,3454 | 4 % | 15,0 | D2 | 3,3050 | 3,3070 | 1 % | 10,5 |
| A3 | 3,3659 | | | | D3 | 3,2994 | | | |
| B1 | 3,2821 | | | | E1 | 3,4239 | | | |
| B2 | 3,2943 | 3,2920 | 1 % | 8,8 | E2 | 3,4477 | 3,4285 | 2 % | 24,7 |
| B3 | 3,2997 | | | | E3 | 3,4140 | | | |
| C1 | 3,3881 | | | | F1 | 3,5531 | | | |
| C2 | 3,4053 | 3,3921 | 1 % | 20,4 | F2 | 3,5721 | 3,5510 | 2 % | 38,9 |
| C3 | 3,3828 | | | | F3 | 3,5277 | | | |
| \bar{x} kons: | | | | | \bar{x} kons: | | | | |
| 14,7 | | | | | 24,7 | | | | |

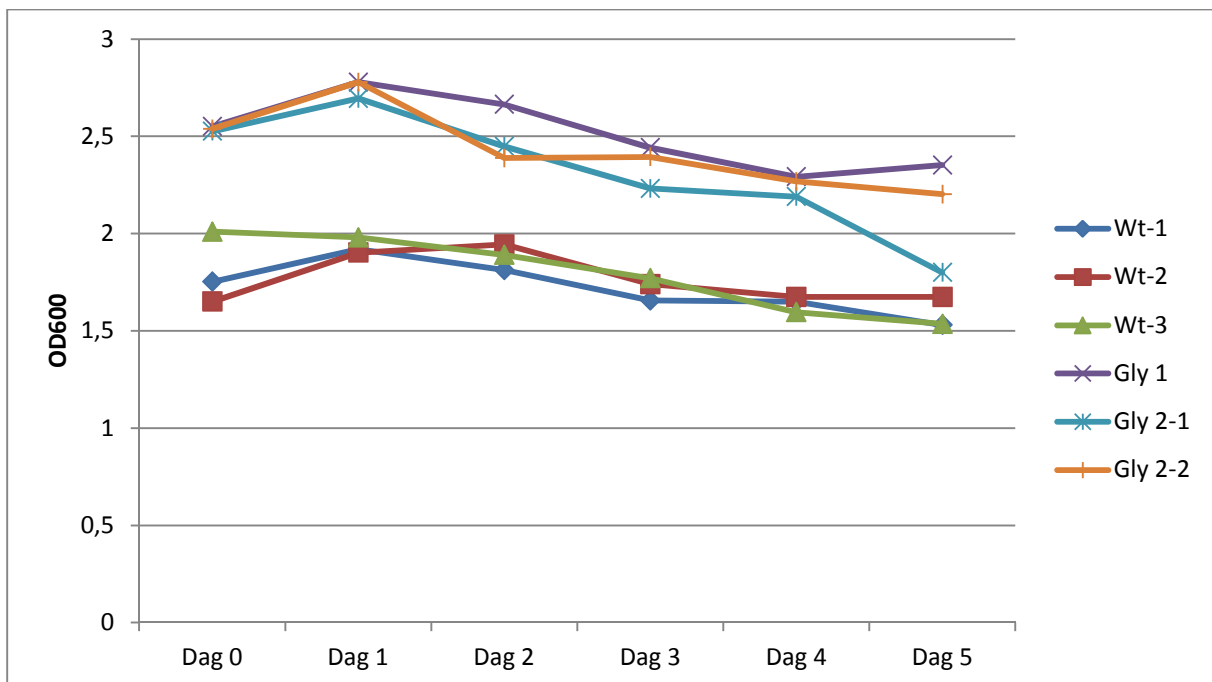
*Konsentrasjonstall relativt mot orcinol standarden, se metode 2.3.12.

Dataene i tabell 8 kommer fra 3 tekniske paralleller fra hver kultur (A-C), 3 *A. vinelandii* ATCC 12518 og 3 *A. vinelandii* Δgly -kulturer. De tekniske parallellene ble utført ved å tilsette samme mengde prøve fra en kultur til 3 forskjellige microtiter-brønner og deretter avlest ved 520nm. Forskjellen mellom prøvene av samme stamme kan muligens komme av feil ved pipettering og/eller at prøvene ble avlest ved høyere absorbans enn instrumentet er ment for.

Selv om målingene ikke er optimale kan man fortsatt se en vis tendens mot at *A. vinelandii* Δgly stammene har høyere konsentrasjon av alkylresorcinol. Ved nye gjennomføringer må et mindre prøvevolum benyttet (50 μ l). Metoden ser ut til å fungere etter hensikt.

3.2.4 Analyse av alkylresorcinol i *A. vinelandii* Δgly cyster

A. vinelandii Δgly ble så videre analysert ved metoden etablert i resultat 3.2. Det ble satt opp forkulturer av *A. vinelandii* Δgly 1, 2 og av *A. vinelandii* wt på 500 ml BM kulturer. Det ble satt opp 3 biologiske paralleller av Wt. *A. vinelandii* Δgly 2 ble satt opp i 2 kolber slik at det ble 3 paralleller totalt av *A. vinelandii* Δgly også. Etter oppvekst i 2 døgn ble kulturene overført til nytt medium uten glukose og med tilsatt β -hydroxybutarat for å indusere cystedannelse. Kulturene ble inkubert ved 30 °C i 5 døgn hvor OD₆₀₀ ble avlest i kolbene en gang daglig. For avlesningsdata, se figur 30. Tall rådata for vekstkurven finnes i vedlegg 6.



Figur 30: Vekstkurver for OD₆₀₀ gly og Wt.

Etter 5 dagers dyrkning ble alkylresorcinol ekstrahert som forklart i Resultat 3.2 og metode 2.3.12.

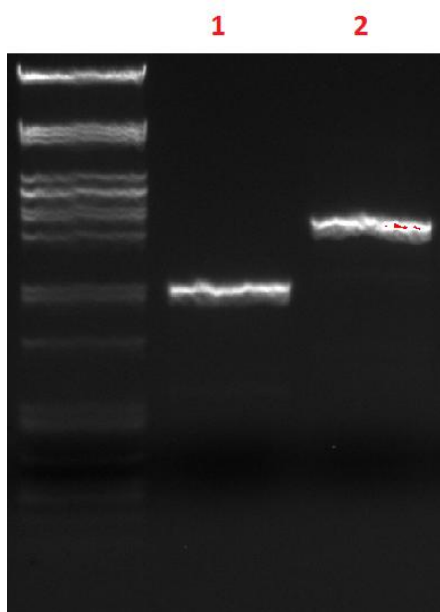
Grunnet venting på at utstyr og parallelle forsøk ble ledig ble prøvene fryst mørkt i 5 døgn før de ble tørket for aceton og videre analysert for alkylresorcinol.

Før måling av alkylresorcinol ble også 0,1 ml fra alle paralleller satt av som backup. Måling av alkylresorcinol ble så utført slik som forklart i Resultat 3.2 og metode 2.3.12. Under dette eksperimentet viste seg at reagensene trengte å være dagsferske, dette gjorde at det første oppsettet ikke ga forventet fargeomslag. Etter dette ble oppdaget ble alle reagenser byttet ut med nye reagenser og eksperimentet repetert med tidligere avsatte backups. Ved denne utførelsen ble det heller ikke produsert noen lesbare data for prøvene, bare standardkurven virket etter intensjon. Dette betyr at noe må ha gått galt tidligere i utførelsen. Grunnet manglende tid ble ikke dette eksperimentet repetert under dette prosjektet.

3.3 Inaktivering av gen som koder for malonyl-CoA-transferase

3.3.1 Konstruksjon av vektor pOG4

Konstruksjon av vektoren for inaktivering av malonyl-CoA-transferase følger tilsvarende strategi som forklart i 3.3.1. Fra *mal* genets originale lengde på 1376bp ble 1135bp fra midten av genet fjernet. Total lengde av det forkortede genet er 241bp. Fra *A.vinelandii* ATCC 12518 isoleres fragmenter av *mal* ved phusion PCR. Følgende primere ble brukt til dette: Opp malonyl F og Opp malonyl R, Ned malonyl F og Ned malonyl R. (vedlegg 8). De resulterende PCR fragmentene kan sees i figur 31.



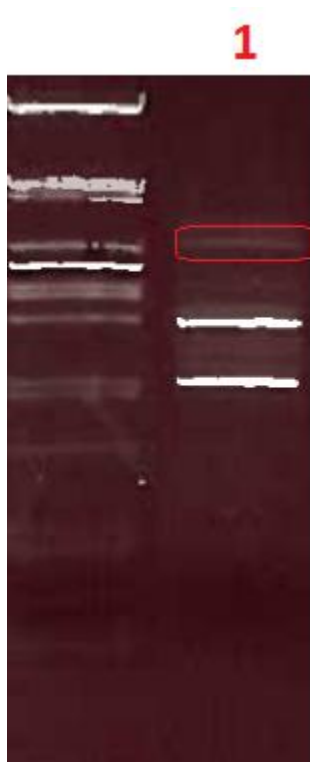
Figur 31: Gel elektroforese av PCR-produkter (*mal*). Brønn 1: Opp *mal* (1,1 kb). Brønn 2: Ned *mal* (1,8 kb). PstI ladder.

Fragmentene fra PCR reaksjonen ble så renset i forberedelse ny phusion PCR reaksjon. Mengde brukt av DNA fragment til ny PCR kommer fram av tabell 10.

Tabell 10: Kvantifisering av gen fragmenter til PCR *mal*

| ID | Kons. (Nanodrop) | Kopi nr. | pmol | Tilsatt mengde i PCR mix |
|-----------------------|------------------|----------------------|------|--------------------------|
| Opp <i>mal</i> | 41.3 ng/ μ l | $3.46 \cdot 10^{10}$ | 1.38 | 1 μ l |
| Ned <i>mal</i> | 55.3 ng/ μ l | $2.87 \cdot 10^{10}$ | 0.85 | 1.21 μ l |

Reaksjonen benytter Opp malonyl F og Ned malonyl R primerne for å oppnå konstruksjon av forkortet gen *mal*. Genet ble videre renset fra gel vist i figur 32.



Figur 32: Gel elektroforese av Mutert *mal* (2,9 kb) etter phusion PCR. PstI ladder.

Forkortet *mal* ble videre innført i kloningsvektoren pHE179. Dette ble gjort ved restriksjon kutting på vektor pHE179 og på forkortet *mal*, til dette ble enzymene XbaI, EcoRI og EcoRV brukt. pHE179 kuttet med disse kan sees i figur 22.

Det forkortede genet av *mal* ble så ligert inn i pHE179. Plasmidet ble transformert inn i *E. coli* (DH5 α) (se 2.3.8). Etter seleksjon på LA inneholdende Amp ble plasmidet kontrollert ved restriksjonskutting. Enzymet BssSI ble benyttet ved kontrollen, det forventes et kuttemønster på 1,9kb og 3,5kb. Resultatet av kontrollen kan sees i figur 23, brønn 4-5. Plasmid i brønnene som utviste riktig mønster ble så sendt til sekvensering hos GATC-BIOTECH i Tyskland.

pHE179 med forkortet *mal* insert ble sekvensert med følgende primere: M13R, Opp malonyl R, Ned malonyl F, PGgem/Plit F og malonyl sekvensering 3756.

Sekvensering viste at plasmidet var etter intensjon (se vedlegg 4). pHE179 plasmidet med forkortet *mal* insert fikk nå navnet pOG2.

pOG2 ble så kuttet med AvrII, Not I-HF og PsiI. Båndene på 2kbp inneholder da genet som skal overføres til pHE326. pHE326 ble kuttet med AvrII og Not-HF, dette gir et bånd på 11kbp og 2,5kbp. Båndet på 11kbp er da den ønskede vektoren. Se figur 26.

Produktene ble ligert sammen for å danne et nytt plasmid. Det resulterende plasmidet ble så transformert inn i *E. coli* (S-17-1 λ -pir). En kontroll ved restriksjonkutting utføres for å bekrefte resultatet. 10 kolonier ble valgt ut til dette. Kuttingen ble gjort ved enzymet NcoI,

det forventes et kuttemønster på 8,1kb, 4,8kb og 700kb, se figur 23. Plasmidet i brønn 8 viser dette mønsteret og fikk navnet pOG4.

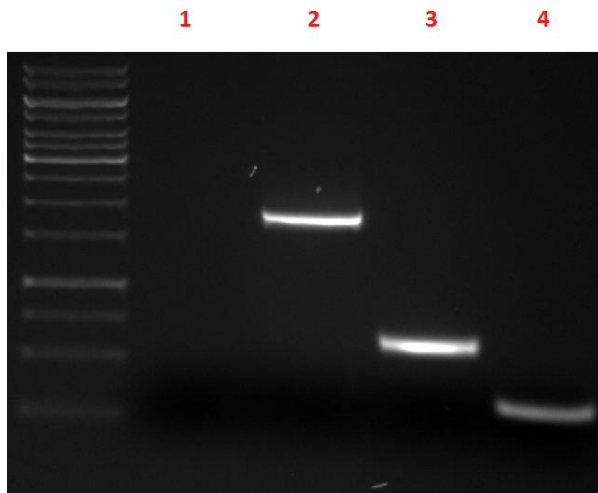
3.3.2 Konstruksjon av stamme *A. vinelandii* Δ mal

Konstruksjon av stamme *A. vinelandii* Δ mal følger samme strategi som forklart i 3.3.2 og ble utført parallelt til konstruksjonen av *A. vinelandii* Δ gly 1 og 2.

pOG4 ble så overført fra *E. coli* stammene til *A. vinelandii* ATCC 12518 ved konjugering.

Konjugerte stammer ble så overført til nytt media. Etter første oppdyrking på BM+Tc+m-toluat fulgte 5 oppdyrkinger på BM+Tc før stammen ble overført en siste gang til nytt medium BM uten andre tilsetninger. Det ble så fryst backuper av stammen i -80 fryser.

Fra BM kulturen ble stammene overført til BM med 6% Sukrose (suc). Samtidig ble det platet ut en fortyningsserie av kulturen på BA plater med 6% suc. Etter oppvekst i 3 dager og 30 °C på sukrose ble BA+Suc 6% platene undersøkt for kolonier, men når de pOG4 muterte *A. vinelandii* stammen ble dyrket på BM+6% suc viste den seg derimot til å vokse dårlig. Dette ble på tidspunktet tenkt til å kunne skyldes at en enkelt dyrkning ikke var nok for at majoriteten av cellene i stammen ikke lenger inneholdt plasmid (pOG4). Det ble dermed satt opp 4 nye dyrkninger på BM uten Tc, 2-3 dager inkubasjon ved 30°C. Etter hver overføring til ny BM kultur ble det også satt opp en flaske BM+6% suc og BA og BA+6% suc av samme kultur. Selv etter fjerde overføring på BM var oppnådd vekst med sukrose dårlig. Vekstflaskene med 6% suc fikk kun et lett turbid utsende og BA+6% suc agarene fikk få eller ingen synelige kolonier. Samtlige kolonier som hadde ingen vekst på Tc og pos vekst på 6% suc ble testet med onetaqPCR. Til denne kontrollen ble følgende primerpar brukt: del mal f1 og del mal r1 (brønn 1-3), del mal f1 og malwt (brønn 4) (vedlegg 8). PCR testen viste at ingen av de testede kandidatene var slik som forventet. Et utvalg av de testede kandidatene kan sees i figur 33.



Figur 33: OneTaq PCR kontroll. Brønn 1-2: Kandidat stammer 1 og 2. Brønn 3: pOG4. Brønn 4: WT *A.vinelandii*. GeneRuler ladder.

Forventet båndlengde vil være for wt *A.vinelandii* vil være 0,3kb (del mal f1 og malwt) og 1,5kb (del mal f1 og del mal r1). Ønsket mutant ville ikke gi noe bånd med primerene del mal f1 og malwt, men gi et bånd av størrelse 0,4kb med del mal f1 og del mal r1.

Av de testede stammene i figur 33 var prøven i brønn 1 muligens en kontaminant, brønn 2 inneholder DNA fra en wt *A. vinelandii* stamme.

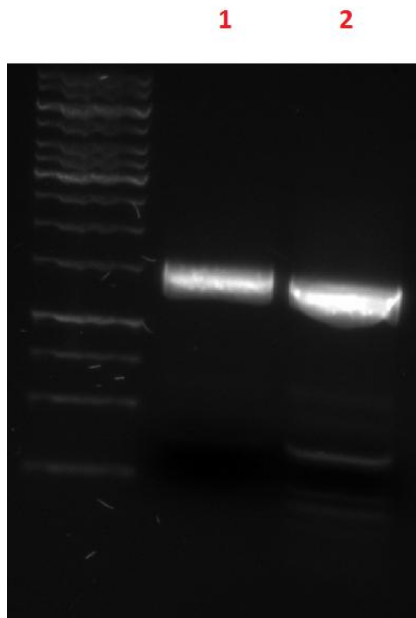
Etter den fjerde oppdyrkingen på BM og BM+6% suc ble det satt opp en siste oppdyrking med parallelt voksende kulturer av BM, BM+6% suc og BM+Tc. Stammen på dette tidspunktet hadde fått replisere i 5 oppdyrkinger uten noen tilsetninger som selekterte for pOG4 holdige celler. Det ble observert at det var BM+Tc kulturen som vokste raskets, mens BM kulturen også hadde sterk vekst, ingen til minimal vekst var å finne i BM+6% suc kulturen.

3.4 Komplementering av mutanter Δ gly/mal.

3.4.1 Konstruksjon av komplementeringsvektor for *gly* og *mal* delesjonsmutanter

For å kunne ha mulighet til å stadfeste at evt. observert fenotype skyldes innført mutasjon trengs det at man ved komplementering får restaurering av wt fenotype. Første steg i konstruksjonen av komplementeringsvektoren var å klonere wt genene fra *A. vinelandii*. Til dette ble det brukt Q5 PCR-kit med følgende primere: *gly*: *gly*-AvrII og *gly*-Nde, *mal*: *mal*-AvrII og *mal*-Nde (vedlegg 8).

Forventet båndlengde for *gly*-wt er 1455 og for *mal*-wt 1412. Resultat av PCR kontrolleres ved gelelektroforese i figur 34.



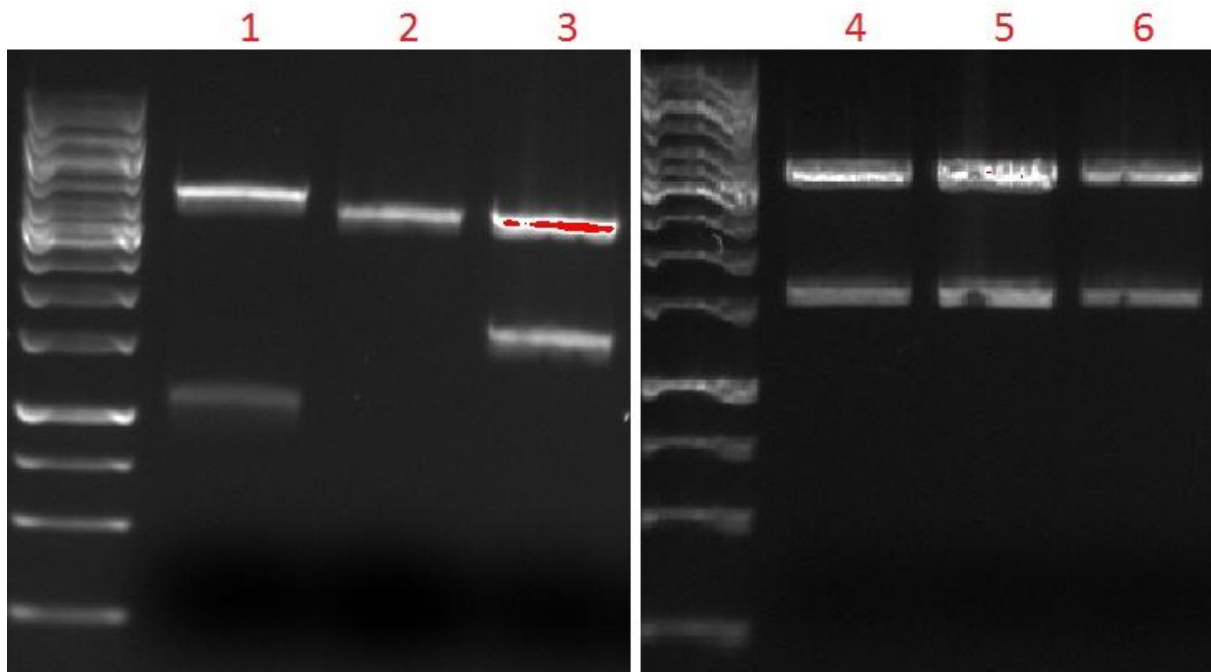
Figur 34: Gel elektroforese av wt gener *gly*/*mal*. Brønn 1: *gly*-wt, Brønn 2: *mal*-wt. GeneRuler ladder.

PCR produktene ble så videre rensset med QIAquick PCR purification kit (se 2.3.5). Etter rensing ble wt genene *gly*/*mal* satt inn i *Sma*I kuttet pUC128 (høykopitalls plasmid) ved blunt-end ligering. Blunt-end ligering følger normal prosedyre for ligering (se 2.3.7), men benytter seg av lavere temperatur (25 °C) og inkubasjon over natt. De resulterende produktene ble så transformert inn i *E. coli* DH5 α (se 2.3.8). LA+amp platene brukt etter heat-shock transformasjon var tilsatt X-gal og IPTG for blå/hvit seleksjon (se 2.3.10). Hvite kolonier ble valgt ut fra disse platene for videre testing. Seks stammer med pUC128-*gly* og seks stammer med pUC128-*mal* ble utvalgt til testing. Insertet ble rensset og så testet ved restriksjonskutting.

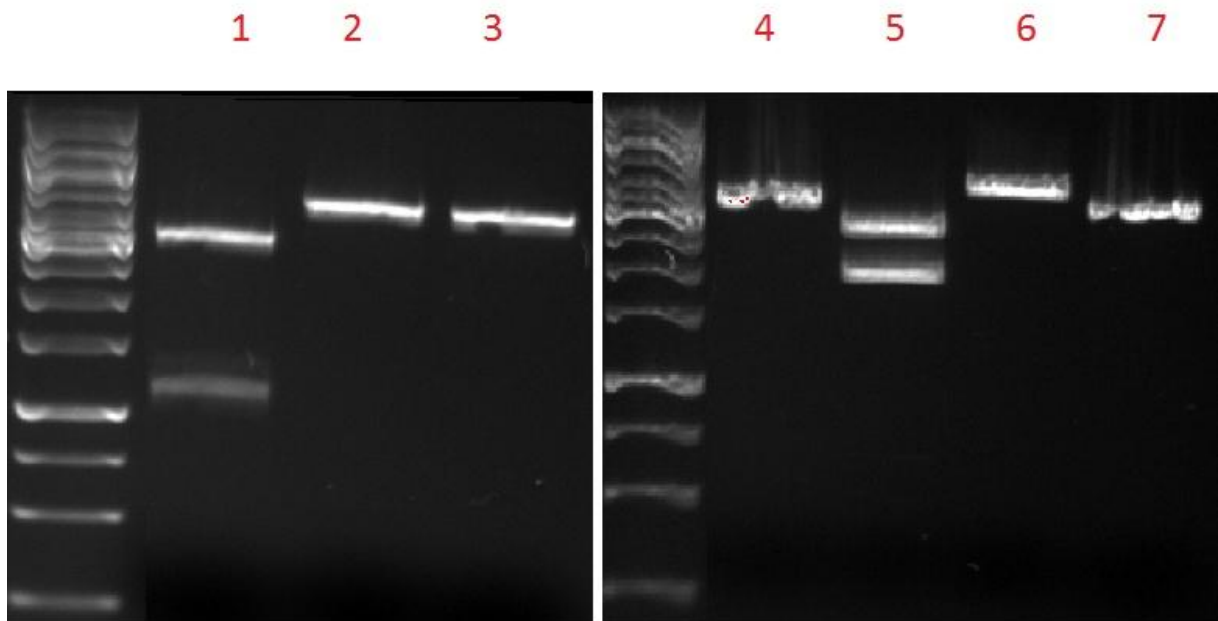
Insertet har mulighet til å sette seg inn i plasmidet med to forskjellige orienteringer og dette gir to ulike kuttemønstre. I orientering A vil insert sekvensen følge tallrekkefølge (1→2), i orientering B vil det motsatte være sant (2→1). Detaljene rundt restriksjonskuttingen kommer fram av tabell 11 og resultatet kan sees av figur 35 og 36.

Tabell 11: PUC128 med gly/mal insert restriksjonskontroll.

| Plasmid (enzym) | Kuttemønster A (kb) | Kuttemønster B (kb) |
|--------------------|---------------------|---------------------|
| PUC128-gly (BsaAI) | 1,5+3,2 | 1,0+3,7 |
| PUC128-mal (AccI) | 0,4+4,3 | 1,0+3,7 |
| PUC128-mal (BsaAI) | 1,9+2,8 | 0,6+4,0 |



Figur 35: Restriksjons kontroll (BsaAI) av DH5α stammer (PUC128-gly) etter transformasjon og blå/hvit seleksjon.



Figur 36: Restriksjons kontroll (brønn1-3:AccI, brønn4-7:BsaAI) av DH5 α stammer (PUC128-*mal*) etter transformasjon og blå/hvit seleksjon

Fra figur 35 ser brønn 1 ut til å inneholde material fra en stamme med PUC128 hvor *gly* er satt inn i orientering B. Brønn3-6 tenkes å være PUC128 med *gly* innsatt med orientering A.

Fra figur 36 ser brønn 1 ut til å inneholde material fra en stamme med PUC128 hvor *mal* er satt inn i orientering B. Brønn 5 tenkes å være PUC128 med *mal* innsatt med orientering A.

Plasmidene med lovende kontroller ble plukket ut til sekvensering (se metode 2.3.9). Etter sekvenseringen ble da et plasmid for hvert gen der sekvensen var stadfestet å være korrekt (se vedlegg 4 og 5) valgt ut og gitt designasjonen pOG5 for PUC128 med *gly* insert (figur 35) og pOG6 for PUC128 med *mal* insert (figur 36).

Grunnet tidsbegrensing på prosjektet var dette siste punktet som ble utført. Strategien videre var tenkt å benytte tidligere konstruert palgD vektorer; pOG113/114/115. Disse var tenkt å brukes ved og bytte ut *arsF/G/H* villtypegenene med villtypegene av *gly/mal*. For å utføre dette var det planlagt å bruke enzymene NdeI og NotI.

4. Diskusjon

4.1 Komplementasjons analyse av *arsF*, *arsG* og *arsH* -mutanter

Dallands resultater tyder på at *ArsF*, *ArsG* og *ArsH* er involvert i transport av alkylresorcinol, men dette må verifiseres ved komplementering. De opprinnelige transposonvektorene laget i Dallands prosjekt ble funnet til og ikke å være egnet for bruk under cysteformasjonen. Dette kommer fram av resultatet i tabell 6 hvor ingen restaurasjon til villtype ble observert. Det viser seg at *A. vinelandii* $\Delta arsF / \Delta arsG / \Delta arsH$ gir konsekvent utslag med Fast Blue B løsningen når dyrket på m-toluat. Dette kan muligens indikere at ved slike forhold vil stammen gjenoppta transport eller lekke alkylresorcinol til cysteoverflaten. *Av* $\Delta arsG::TnMD114$ og *Av* $\Delta arsG::TnMD114$ vokste svært dårlig i nærvær av m-toluat på plata. Dette kan tyde på at *Pm*-promotoren har vært aktiv i cellene på dette mediet. En mulighet er da at overproduksjon av disse proteinene er skadelige for *A. vinelandii* til den grad at vekst hindres.

Dette første oppsettet av komplementerings eksperimentet er da ikke alene tilstrekkelig til å verifisere at mutasjonen av *arsF/G/H* er etter intensjon. Det anbefales at en ny komplementering settes opp med *pOG113/114/115* transposonvektorene produsert i denne oppgaven. Det er kjent at *palgD* virker under cystedannelse, og det vil ikke være nødvendig og tilsette m-toluat. Dette bør slik gi et mer pålitelig resultat.

4.2 Alkylresorcinol produksjon i *A. vinelandii* cyster med delesjon i gly/mal

4.2.1 Metodeetablering av kvantifisering av total alkylresorcinol ved Fast Blue B

Ut fra prøveoppsettet i resultatet 3.2.3 ble metoden funnet til å kunne detektere alkylresorcinol fra *A. vinelandii* cyster etter ekstraksjon med aceton. Selv om metoden fungerte etter intensjon er det fortsatt en god del som kan gjøres med tanke på optimalisering av metoden. Fra gjennomføringene gjort i dette prosjektet ble det lært at dags ferske løsninger, og et redusert prøvevolum ($200\mu \rightarrow 50\mu$) i hver mikrotiterbrønn var nødvendig for å oppnå gode resultater. Mulig at et ytterligere lavere volum vil være mer optimalt for avlesning. Optimalisering av tidsbruken er også viktig når prøven etter tilsetning av reagensene vil produsere presipitat som gjør avlesning vanskelig etter rundt 90-120 min i romtemperatur. Det anbefales derfor at ved store antall prøver at de deles opp i mindre batcher slik at hver prøve ikke blir stående for lenge før avlesning. Dette er detaljer som bør finjusteres før et nytt oppsett med metoden. Dette kan gjøres med å lage flere orcinol standarder med forskjellige variabler til optimale forhold blir funnet.

4.2.2 Analyse av *A. vinelandii* Δ gly

pOG3 plasmidet ment til å slå ut *gly* i *A. vinelandii* ble verifisert ved sekvensering før konjugering (se vedlegg 2). Etter konjugering og dyrkning ble delesjonen verifisert med PCR som forklart i resultatet 3.2.2. Det ble observert gjennomsnittlig høyere OD₆₀₀ tall av *A. vinelandii* Δ gly i burks medium enn hva villtype stammen viste, men vekst mønsteret lignet fortsatt på wt. Se figur 30 for vekstkurven. Dette kan tyde på at *gly* kan påvirke vekstraten til cellene.

Når prøvene ble analysert med Fast blue B metoden tidligere etablert resulterte dette i ingen lesbare data. Når orcinol standarden fungerte etter intensjon og vekst ble påvist i kulturen ser det ut som noe har gått galt under ekstraksjon eller tørking. Ved gjennomførelsen av analysen ble det avviket fra tidligere etablert metode kun etter ekstraksjon ved aceton. Grunnet manglende tilgang på savant apparatet og parallelt arbeid med andre analyser ble alkylresorcinol prøvene fryst på -20 °C og med lysbeskyttelse i 5 døgn. Det er en mulighet at

lagring på aceton i plast rør uten beskyttelse for oksidering var grunnen til manglende resultater. Mulige tilsatts av antioksidanter og/eller forsegling av prøverørene kunne hjelpet for å hindre eventuell skadelig oksidasjon under lagringen. Lipid ekstrakter kan også beskyttes mot autoksidasjon ved frysing på lavere temperaturer[6]. Det er mulig at frysing ved -80 °C ville hjelpet å bevare prøven. Acetonløsningen lagret på eppendorf plastrør kan også muligens ha forårsaket forstyrrende urenheter i prøven ved dette oppsettet. Dette eksperimentet bør repeteres ved en anledning hvor lengre lagring ikke blir nødvendig.

Siden data fra hoved oppsettet er manglende og tiden ikke tillater et nytt oppsett vil det bli sett på data fra metodeetableringen. Dette er ikke optimale data men det viser en viss trend mot at det produseres mer alkylresorcinol i *A. vinelandii* Δ gly enn i villtypen. Grunnet at alkylresorcinol er normalt en viktig del av det exine lag er det mulig at dette laget er tykkere i *A. vinelandii* Δ gly. Dette kunne blitt undersøkt med avbildning i elektronmikroskop. Den økte produksjonen av alkylresorcinol kombinert med den høyere veksten av kulturen viser til en endret fenotypen i mutant stammen. Nøyaktig hvilken effekt dette har på cellen trengs å undersøkes nærmere.

4.2.3 Konstruksjon av *A. vinelandii* Δ mal

Etter konjugering med pOG4 var det vanskelig å finne muterte stammer med de egenskapene som var ønsket. Dette kan potensielt skyldes at genet (*mal*) kan være viktig for at bakterien i den grad at vekstraten av mutantene reduseres så mye at villtypen tar over kulturen. Dette vil i så fall føre til at det blir vanskelig å selektere for mutanten. Det kan forsøkes en ny konjugering for å utelukke feil ved gjennomføringen. Vis det fortsatt ikke er mulig å selektere for mutanten vil man måtte se etter alternative metoder for å undersøke dette genets funksjon.

4.3 Videre arbeid

Det har i dette prosjektet blitt konstruert transposonvektorer for å komplementere *arsFGH*. Villtype gene i disse transposonvektorene er underlagt *palGD*. Disse kan da brukes til å undersøke komplementasjon uten bruk av *m-toluat*. Det er også blitt etablert en metode for ekstraksjon og måling av intracellulær alkylresorcinol. Metoden er vist til å fungere, men for å oppnå høyere nøyaktighet kan protokollen ytterligere optimaliseres.

Gjenstående arbeid på *A. vinelandii* Δ *arsF*/ Δ *arsG*/ Δ *arsH* vil da være å utføre ny komplementering med *parSD* transposonvektorene og undersøke stammens evne til å produsere alkylresorcinol. Intracellulær alkylresorcinol vil kunne verifisere at det er transporten over cellemembranen som har blitt hindret ved knockout mutasjon og ikke selve produksjonen.

Under dette arbeidet har mutantstammen *A. vinelandii* Δ *gly* blitt laget. Videre arbeid med denne stammen vil være å ekstrahere og måle alkylresorcinoler med metoden etablert i dette prosjektet. Analyse ved massespektrofotometri av sukkermolekylene på ekstrahert alkylresorcinol vil også være viktig for å undersøke om mutanten fortsatt kan sette på galaktoseenheten på alkylresorcinolen, eller ikke.

Det vil også være nødvendig å ferdigstille transposonvektoren omtalt i 3.4.1 og dermed oppfølge med en komplementasjon for å verifisere at endringen i fenotype skyldes den innførte mutasjonen.

Resultatet fra oppdyrking av *mal* mutanter kan tyde på at genet er viktig for bakterien og det kan vise seg vanskelig å finne en *mal* mutant ved denne metoden. Det kan være et interessant alternativ å undersøke om hvordan overproduksjon av proteinet påvirker evne til å produsere alkylresorcinol under cystedannelse. Dette kan oppnås ved å klonе genet inn i en passende ekspressjonsvektor til *A. vinelandii*.

5. Referanser

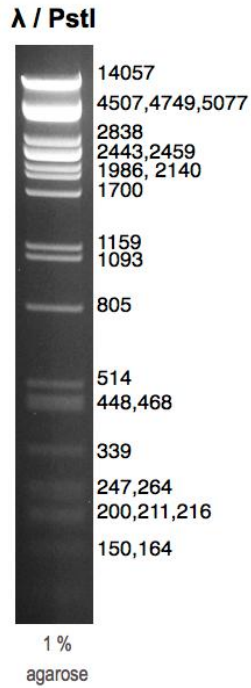
1. **Biemans-Oldehinkel E, Doeven MK, Poolman B.** 2006. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Letters* **580**:1023-1035.
2. **Biolabs NE** Last Update 2013. BSA, Molecular Biology Grade. <https://www.neb.com/products/b9000-bsa-molecular-biology-grade>. [Online.]
3. **Biotium** Last Update 2012. GelRed & GelGreen nucleic acid gel stains. <http://biotium.com/technology/gelred-gelgreen-nucleic-acid-gel-stains/>. [Online.]
4. **Birnboim HC.** 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in enzymology* **100**:243-255.
5. **Brown ME.** 1982. Nitrogen Fixation by Free-Living Bacteria Associated with Plants- Fact or Fiction? Academic Press, London.
6. **Christie W** Last Update 1993. PREPARATION OF LIPID EXTRACTS FROM TISSUES. <http://lipidlibrary.aocs.org/topics/extract2/index.htm#C>. [Online.]
7. **Dalland M.** 2013. Transport av fenyl-lipid i *Azotobacter vinelandii*. Institutt for bioteknologi.
8. **Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J.** 2008. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**:317-364.
9. **Dong J, Yang G, McHaourab HS.** 2005. Structural basis of energy transduction in the transport cycle of MsbA. *Science* **308**:1023-1028.
10. **Ferretti L, Sgaramella V.** 1981. Specific and reversible inhibition of the blunt end joining activity of the T4 DNA ligase. *Nucleic acids research* **9**:3695-3705.
11. **Funa N, Ozawa H, Hirata A, Horinouchi S.** 2006. Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proc Natl Acad Sci* **103**:6356-6361.
12. **Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**:557-580.
13. **Hitchins VM, Sadoff HL.** 1970. Morphogenesis of cysts in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **104**:492-498.
14. **Inuzuka M.** 1985. Plasmid-encoded initiation protein is required for activity at all three origins of plasmid R6K DNA replication in vitro. *FEBS Letters* **181**:236-240.
15. **Kanda N, Ishizaki N, Inoue N, Oshima M, Handa A.** 1975. DB-2073, a new alkylresorcinol antibiotic. I. Taxonomy, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **28**:935-942.
16. **Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D.** 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* **70**:191-197.
17. **Kozubek A, Tyman JHP.** 1998. Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. *Chemical Reviews* **99**:1-26.
18. **Landberg R, Kamal-Eldin A, Andersson A, Vessby B, Aman P.** 2008. Alkylresorcinols as biomarkers of whole-grain wheat and rye intake: plasma concentration and intake estimated from dietary records. *Am J Clin Nutr* **87**:832-838.
19. **Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH.** 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE*.
20. **Lin LP, Sadoff HL.** 1968. Encystment and Polymer Production by *Azotobacter vinelandii* in the Presence of β -Hydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology* **95**:2336-2343.
21. **Lin LP, Sadoff HL.** 1969. Chemical Composition of *Azotobacter vinelandii* Cysts. *Journal of Bacteriology* **100**:480-486.

22. **Lorenz TC.** 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. JoVE:e3998.
23. **Mandel M, Higa A.** 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. Journal of molecular biology **53**:159-162.
24. **Martinez-Toledo M, Rodelas B, Salmeron V, Pozo C, Gonzalez-Lopez J.** 1996. Production of pantothenic acid and thiamine by *Azotobacter vinelandii* in a chemically defined medium and a dialysed soil medium. Biol Fert Soils **22**:131-135.
25. **Miyanaga A, Funa N, Awakawa T, Horinouchi S.** 2008. Direct transfer of starter substrates from type I fatty acid synthase to type III polyketide synthases in phenolic lipid synthesis. Proc Natl Acad Sci **105**:871-876.
26. **Nagpal P, Jafri S, Reddy MA, Das HK.** 1989. Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol **171**:3133-3138.
27. **Page WJ, Sadoff HL.** 1975. Relationship between calcium and uroinic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol **122**:145-151.
28. **Page WJ, Sadoff HL.** 1976. Physiological factors affecting transformation of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol **125**:1080-1087.
29. **Promega-corporation** Last Update 2012. DNA Purification Protocols and applications guide. promega corporation. <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/PAGuide/Letter/chap9.as>. [Online.]
30. **QIAGEN** Last Update 2012. QIAquick® Spin Handbook. <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/>. [Online.]
31. **R.J. R.** 2004. Analysis of Genes and Genomes. John Wiley & Sons Ltd.
32. **Rees DC, Johnson E, Lewinson O.** 2009. ABC transporters: the power to change. Nat Rev Mol Cell Biol **10**:218-227.
33. **Rehm BH, Valla S.** 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. Appl Microbiol Biotechnol **48**:281-288.
34. **Reusch RN, Sadoff HL.** 1981. Lipid metabolism during encystment of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol **145**:889-895.
35. **Reusch RN, Sadoff HL.** 1983. Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. Nature **302**:268-270.
36. **Sabra W, Zeng AP, Lunsdorf H, Deckwer WD.** 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. Applied and environmental microbiology **66**:4037-4044.
37. **Sadoff HL.** 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. Bacteriol Rev **39**:516-539.
38. **Sahyoun NR, Jacques PF, Zhang XL, Juan W, McKeown NM.** 2006. Whole-grain intake is inversely associated with the metabolic syndrome and mortality in older adults. The American Journal of Clinical Nutrition **83**:124-131.
39. **Segura D, Cruz T, Espin G.** 2003. Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis. Arch Microbiol **179**:437-443.
40. **Segura D, Guzmán J, Espín G.** 2003. *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly-β-hydroxybutyrate or alginate. Appl Microbiol Biotechnol **63**:159-163.
41. **Segura D, Vite O, Romero Y, Moreno S, Castaneda M, Espin G.** 2009. Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance. J Bacteriol **191**:3142-3148.

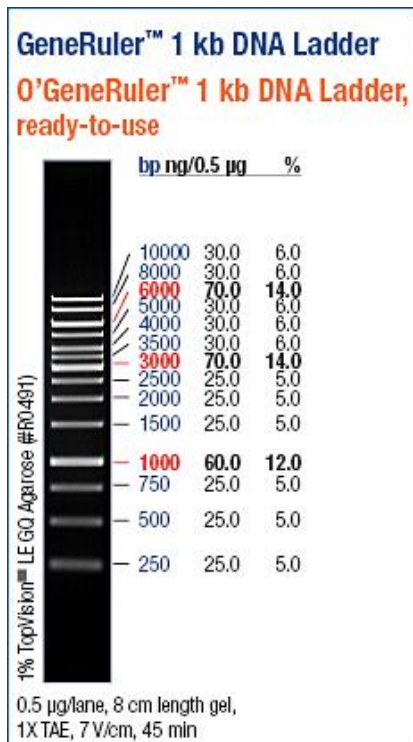
42. **Setubal J, dos Santos P, Goldman BS, Ertesvåg H, Espin G, Rubio LM, Valla S, Almeida NF, Balasubramanian D, Cromes L, Curatti L, Du Z, Godsy E, Goodner B, Hellner-Burris K, Hernandez JA, Houmiel K, Imperial J, Kennedy C, Larson TJ, Latreille P, Ligon LS, Lu J, Maerk M, Miller NM, Norton S, O'Carroll IP, Paulsen I, Raulfs EC, Roemer R, Rosser J, Segura D, Slater S, Stricklin SL, Studholme DJ, Sun J, Viana CJ, Wallin E, Wang B, Wheeler C, Zhu H, Dean DR, Dixon R, Wood D.** 2009. Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J. Bacteriol* **191**:4534-4545.
43. **Sgaramella V, Ehrlich SD.** 1978. Use of the T4 polynucleotide ligase in the joining of flush-ended DNA segments generated by restriction endonucleases. *European journal of biochemistry / FEBS* **86**:531-537.
44. **Sigma-Aldrich** Last Update 2014. Introduction to Blue-White Screening – Background and Protocols for Colony Selection. Sigma-Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/blue-white-screening.html>. [Online.]
45. **Simon R, Prierer U, Puhler A.** 1983. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nature* **1**:784 - 791.
46. **Stevenson LH, Socolofsky MD.** 1966. Cyst formation and poly-beta-hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. *J Bacteriol* **91**:304-310.
47. **Su C, Reusch RN, Sadoff HL.** 1981. Isolation and characterization of several unique lipids from *Azotobacter vinelandii* cysts. *J. Bacteriol* **147**:80-90.
48. **Tłuścik FK, A. Mejbaum-Katzenellenbogen, W.** 1981. Alkylresorcinols in rye (*Secale cereale* L.) grains. VI. Colorimetric micromethod for the determination of alkylresorcinols with the use of diazonium salt, Fast Blue B. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **50**:645-651.
49. **van Dam RM, Hu FB.** 2008. Are alkylresorcinols accurate biomarkers for whole grain intake? *The American Journal of Clinical Nutrition* **87**:797-798.
50. **VectronBiosolutions** Last Update 2014. The Pm/xylS expression system. <http://www.vectronbiosolutions.com/info.php?id=13>. [Online.]
51. **Wyss O, Smith DD, Pope LM, Olson KE.** 1969. Endogenous Encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **100**:475-479.

6. Vedlegg

Vedlegg 1: λ PstI kuttet E.coli ladder.



Vedlegg 2: DNA ladder fra Thermoscientific, GeneRuler.



Vedlegg 3: sekvensering pog1

Tallkoder under prøve ID referer til sekvenseringsfil.

```

                2430      2440      2450      2460      2470
                *        *        *        *        *
pOG1 (gly)      agctatgaccatgattacgccaaagctacttgcgggccgcaagtaatacgaactcactagtgg
11259754        -..a.....--.....C.....
11260012        -----
11533218        -----
11533296        -----

```

```

                2490      2500      2510      2520      2530
                *        *        *        *        *
pOG1 (gly)      gcagatcttcgaatgcacgcgcgaccgtacgtctcgaggaattcctgcagtgggggacc
11259754        .....
11260012        ----- .c...c.....g..
11533218        -----
11533296        -----

```

```

                2540      2550      2560      2570      2580      2590
                *        *        *        *        *        *
pOG1 (gly)      -gtcgggtgat--cctttcgcgtgt-ccaaccctt-cacccgcga-caacgg-ccgcaaca
11259754        -.....-.....-.....-.....-.....
11260012        c....g..atc....t....t....t....g.gg....g.....
11533218        -----
11533296        -----

```

```

                2600      2610      2620      2630      2640
                *        *        *        *        *
pOG1 (gly)      a-cccgcgcgt-cgaggtgcccg--cctggattactacc-gggcgatctggatccccaa
11259754        .-.....-.....-.....-.....
11260012        .a....g....t....gt...c.gc.....t..c.....
11533218        -----
11533296        -----

```

```

                2650      2660      2670      2680      2690      2700
                *        *        *        *        *        *
pOG1 (gly)      cg-aaacctggacgctctcgacgatctacaactacggtccgggacggtccgacgacgctcg
11259754        ..-.....
11260012        ..g.....t....t....a.....
11533218        -----
11533296        -----

```

```

                2710      2720      2730      2740      2750      2760
                *        *        *        *        *        *
pOG1 (gly)      aaagctacatgtcgggacagcccacgctgggcggcgccaggtggcgaggacgagttcg
11259754        .....
11260012        .....
11533218        -----
11533296        -----

```

```

                2770      2780      2790      2800      2810      2820
                *        *        *        *        *        *
pOG1 (gly)      agaagatctacgggtcaagctcgactacaccggctcctcgggctatgcctcgatcatcc
11259754        .....
11260012        .....
11533218        -----
11533296        -----

```

2830 2840 2850 2860 2870 2880
 * * * * * *
 pOG1 (gly) actcctaccgggagagcgaccagcaccagaccggcttcttcgccggctggaacgcctcgg
 11259754
 11260012
 11533218 -----
 11533296 -----

2890 2900 2910 2920 2930 2940
 * * * * * *
 pOG1 (gly) acgccctgctgctgtacaccgagggcaacatcaagcacgagggcaagaccggctaccagt
 11259754
 11260012
 11533218 -----
 11533296 -----

2950 2960 2970 2980 2990 3000
 * * * * * *
 pOG1 (gly) tcggcgcttctctacaccctggagatcgggcccgaccgtcaacgctcgagtacctgcgcgaca
 11259754
 11260012
 11533218 -----
 11533296 -----

3010 3020 3030 3040 3050 3060
 * * * * * *
 pOG1 (gly) acaacggctgcgacgacgggccgatgatcggctgctacctggacggcaagatcaacaccc
 11259754
 11260012
 11533218 -----
 11533296 -----

3070 3080 3090 3100 3110 3120
 * * * * * *
 pOG1 (gly) ggagcgttctctaccggcagagctacgcgatgatccaggtcaccgacaacacctcgatcc
 11259754
 11260012
 11533218 ..tt.c.....
 11533296 -----

3130 3140 3150 3160 3170 3180
 * * * * * *
 pOG1 (gly) cggatctcgaatacaacatccgctacctgaggaaacctcgacgacgagtcccagcgtttca
 11259754
 11260012
 11533218 -----
 11533296 -----

3190 3200 3210 3220 3230 3240
 * * * * * *
 pOG1 (gly) ccggcattctcgaatacgaagtgaccgatcacgtccaggcctatttcaactggaacattt
 11259754
 11260012
 11533218 -----
 11533296 -----

3250 3260 3270 3280 3290 3300
 * * * * * *
 pOG1 (gly) tcaccggcgggcgacgacgacgagttcgggacggttgctgcgctattcgggtgttcaccggcg
 11259754
 11260012

```

11533218 -----
11533296 -----

3310      3320      3330      3340      3350      3360
  *        *        *        *        *        *
pOG1 (gly) ttagctacaccttctgagcgttcactgaacga-ggaaggacgcggcaggacccgcgtcct
11259754   .....a.....
11260012   .....-.....
11533218   -----
11533296   -----

3370      3380      3390      3400      3410      3420
  *        *        *        *        *        *
pOG1 (gly) ttcccatggaccggaggcagcatgaacaagccgactttcgcattcgtcaccatt-ggtag
11259754   .....t.....
11260012   .....-.....
11533218   -----
11533296   -----

3430      3440      3450      3460      3470      3480
  *        *        *        *        *        *
pOG1 (gly) tggttcttatcttggctccaccgttcgcgacctgaccctcgccaatatcctccaccgacg
11259754   .....
11260012   .....
11533218   -----
11533296   -----

3490      3500      3510      3520      3530      3540
  *        *        *        *        *        *
pOG1 (gly) cggctac-aaggtggtggtctactgga-tgatgg-agtggaatcccgaactggccgatcc
11259754   .....c.....a...a..g.....
11260012   .....-.....-.....-.....
11533218   -----
11533296   -----

3550      3560      3570      3580      3590      3600
  *        *        *        *        *        *
pOG1 (gly) cggtatcgagcaccggctgctctgtcacggcacgcgctaccagttccgacgaccctcggc
11259754   .....g.....
11260012   .....
11533218   -----
11533296   -----

3610      3620      3630      3640      3650
  *        *        *        *        *
pOG1 (gly) gttcatgg-atcaggtggtc-ggttcagccgccttctctgctcccgcgtgcgcttgccgggtg
11259754   .....g..a.....g.c.....c.....t...g.....c....g.....
11260012   .....-.....-.....
11533218   -----
11533296   -----

*        3670      3680      3690      3700      3710
*        *        *        *        *
pOG1 (gly) caggtcaccaggatcaacggcttcgctcgacgaggtactgctggcgaatgcgctcgtc
11259754   g.....-.....g..t..a..-----
11260012   .....
11533218   -----
11533296   -----

*        3730      3740      3750      3760      3770
*        *        *        *        *

```

pOG1 (gly) caccgcgaactggcgggaaatgcccgcccgcctggcggagcgcttcacggccgagcgcgatg
 11259754 -----
 11260012 -----
 11533218 -----
 11533296 -----

* 3790 3800 3810 3820 3830
 * * * * *

pOG1 (gly) accgaccgcggttctgcaacatctgggcgtcatagaccggcaggggcattcgccggcggac
 11259754 -----
 11260012 -----
 11533218 -----
 11533296 -----

* 3850 3860 3870 3880 3890
 * * * * *

pOG1 (gly) ggcggcatgtccagggtggcatgaagggccggcgctgcccggtgctcgatccatta
 11259754 -----
 11260012 -----
 11533218 -----
 11533296 -----

* 3910 3920 3930 3940 3950
 * * * * *

pOG1 (gly) cagggagagtttttccatgagcc-aggtttcc-agtcccaa-catca-tgttcgt-cttt
 11259754 -----
 11260012 -----
 11533218 -----
 11533296 -----

3960 3970 3980 3990 4000
 * * * * *

pOG1 (gly) cccgga-cagggct-cgcagtagctggg-catgggca-gcgacatccatcgccg-ttttt
 11259754 -----
 11260012 -----
 11533218 -----
 11533296 -----

* 4020 4030 4040 4050 4060
 * * * * *

pOG1 (gly) cctgctgctgcgcgacctgtacgagcgcgagcagccaggcaatgggcttcgacgtggcggaac
 11259754 -----
 11260012 -----
 11533218 -----
 11533296 -----

* 4080 4090 4100 4110 4120
 * * * * *

pOG1 (gly) tgtccttccaggggcccgaagagcggctcaatggcaccgagttcaccagatcgcgctgc
 11259754 -----
 11260012 -----
 11533218 -----
 11533296 -----

* 4140 4150 4160 4170 4180
 * * * * *

pOG1 (gly) tcaccattccatcgctgctggcggcattccgcgaactcaccggcggaggcctggacgc
 11259754 -----
 11260012 -----
 11533218 -----
 11533296 -----

```

          4200      4210      4220      4230      4240
          *        *        *        *        *
pOG1 (gly)  cgaatgtgctggccgggacagcctgggccaatactccgcgctggtggccgcccggcgctcc
11259754    -----
11260012    -----
11533218    .....
11533296    .....

```

```

          4260      4270      4280      4290      4300
          *        *        *        *        *
pOG1 (gly)  tggccttcgaggacgcgctgcggtgatccgcatgcgcggccggctgatgtcggagtccg
11259754    -----
11260012    ----- .t.-----
11533218    .....
11533296    .....

```

```

          4320      4330      4340      4350      4360
          *        *        *        *        *
pOG1 (gly)  ggcgcggggcggatggccgccttcgcctcgatctcgactcgatcaggccgctcgcggagg
11259754    -----
11260012    ----- .....t.-----
11533218    .....
11533296    .....

```

```

          4380      4390      4400      4410      4420
          *        *        *        *        *
pOG1 (gly)  cgcgctactgcggcatcggcggctgcaacctgcccgaccagaccgtggtctgcggtttcg
11259754    -----
11260012    -----
11533218    .....
11533296    .....

```

```

          4440      4450      4460      4470      4480
          *        *        *        *        *
pOG1 (gly)  agcgcgatctggaggcgctcatggaggacgtggccgcgcttccggccgctccagggctg
11259754    -----
11260012    ----- .....
11533218    .....
11533296    .....

```

```

          4500      4510      4520      4530      4540
          *        *        *        *        *
pOG1 (gly)  ggcgctacctgaagaccgaagggccttcacacctacctgatgatcggcgcggcggagc
11259754    ----- .....
11260012    -----
11533218    .....
11533296    .....

```

```

          4560      4570      4580      4590      4600
          *        *        *        *        *
pOG1 (gly)  gctaccgtccgcatctcgacgccgccctggcggctccgcggggcagggtcctctcca
11259754    -----
11260012    ----- .....
11533218    .....
11533296    .....

```

```

          4620      4630      4640      4650      4660
          *        *        *        *        *
pOG1 (gly)  actacaccggcgactatcacgccgacgatcccgagcagatgcgcgccgcctgttcttcc
11259754    -----

```



```

11260012 -----.....-----
11533218 .....
11533296 .....

          4680      4690      4700      4710      4720
          *         *         *         *         *
pOG1 (gly) agatgttccatccgggtcaagtggatgggggtctgcgccgggcgatcgacgacggagtga
11259754 -----
11260012 -----.....c.....-----
11533218 .....
11533296 .....

          4740      4750      4760      4770      4780
          *         *         *         *         *
pOG1 (gly) acctgggtcgtcgaattcggcgggtggcatcggccgcgaccagccgggccgcgtgcatgctc
11259754 ---.....-----
11260012 -----
11533218 .....
11533296 .....

          4800      4810      4820      4830      4840
          *         *         *         *         *
pOG1 (gly) cggagagccgcgaagcccaacctggagggcatcatgcgcaaggcctatgccgcctccgg-c
11259754 -----.....c.....-----.....c.....-----
11260012 -----.....t-----
11533218 .....a.....g.....
11533296 .....-.....-.....

4850      4860      4870      4880      4890      4900
*         *         *         *         *         *
pOG1 (gly) cgccgcgggcctgtacctgccggccatcaaccggg-cgacctggagc-gggcggcgcgta
11259754 -----
11260012 .....-----
11533218 .....g.....a.c.....
11533296 .....-.....-.....

4910      4920      4930      4940      4950      4960
*         *         *         *         *         *
pOG1 (gly) ccctgga-gctgctgcgcagcgcct-cgccgatggagcc-ggtatgggtgg-acgagcgg
11259754 -----
11260012 -----.....-.....-----
11533218 .....a.....tgc..a.....t.c.....a..c.....g.....c.....
11533296 .....-.....-.....-.....-.....-.....

          4970      4980      4990      5000      5010
          *         *         *         *         *
pOG1 (gly) catttct--ccctgcacc-tgccaccggttcta-gataccta--ggtgagctctggtac
11259754 -----
11260012 -----
11533218 gc....ctc.....c...ac.....a..a....agg..a..ct.tg..a..
11533296 .....-.....-.....-.....-.....-.....

```

Vedlegg 4: Sekvensering pog2

Tallkoder under prøve ID referer til sekvenseringsfil.

| | 2140 | 2150 | 2160 | 2170 | 2180 |
|--------------|---|------|------|------|------|
| | * | * | * | * | * |
| 179delMalony | gagcgcacgagggagcttccaggggaaacgcctggtatctttatagtcc | | | | |
| 11259884 | | | | | |
| 11260020 | ----- | | | | |
| 11260088 | ----- | | | | |
| 11260003 | ----- | | | | |
| 11260058 | ----- | | | | |
| 11559393 | ----- | | | | |

| | 2190 | 2200 | 2210 | 2220 | 2230 |
|--------------|--|------|------|------|------|
| | * | * | * | * | * |
| 179delMalony | tgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatTTTTgtgatgctcgt | | | | |
| 11259884 | | | | | |
| 11260020 | ----- | | | | |
| 11260088 | ----- | | | | |
| 11260003 | ----- | | | | |
| 11260058 | ----- | | | | |
| 11559393 | ----- | | | | |

| | 2240 | 2250 | 2260 | 2270 | 2280 |
|--------------|--|------|------|------|------|
| | * | * | * | * | * |
| 179delMalony | caggggggaggagcctatggaaaaacgccagcaacggcctTTTTacgg | | | | |
| 11259884 | | | | | |
| 11260020 | ----- | | | | |
| 11260088 | ----- a . . ----- | | | | |
| 11260003 | ----- | | | | |
| 11260058 | ----- | | | | |
| 11559393 | ----- | | | | |

| | 2290 | 2300 | 2310 | 2320 | 2330 |
|--------------|---|------|------|------|------|
| | * | * | * | * | * |
| 179delMalony | ttcctggcctTTTTgctggcctTTTTgctcacatgtaatgtgagtttagctca | | | | |
| 11259884 | | | | | |
| 11260020 | ----- | | | | |
| 11260088 | ----- | | | | |
| 11260003 | ----- . . a ----- | | | | |
| 11260058 | ----- | | | | |
| 11559393 | ----- | | | | |

| | 2340 | 2350 | 2360 | 2370 | 2380 |
|--------------|---|------|------|------|------|
| | * | * | * | * | * |
| 179delMalony | ctcattaggcaccacagggctttacactttatgcttccggctcgtatggtg | | | | |
| 11259884 | | | | | |
| 11260020 | ----- | | | | |
| 11260088 | ----- | | | | |
| 11260003 | ----- | | | | |
| 11260058 | ----- | | | | |
| 11559393 | ----- | | | | |

| | 2390 | 2400 | 2410 | 2420 | 2430 |
|--------------|--|------|------|------|------|
| | * | * | * | * | * |
| 179delMalony | tgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgacca | | | | |
| 11259884 | | | | | |
| 11260020 | ----- | | | | |
| 11260088 | ----- | | | | |

11260003 -----
11260058 -----..a.....--
11559393 -----

2440 2450 2460 2470
* * * *

179delMalony tgatt-acgccaagctacttgcgggccgcaagtaatacgactcactagtgg
11259884-.....
11260020 -----
11260088 -----.....-
11260003 -----
11260058t.....c.....
11559393 -----

2490 2500 2510 2520
* * * *

179delMalony gcagatcttcgaatgcatcgcgccgacccgtacgtctcgaggaattcctcg
11259884
11260020 -----
11260088 -----
11260003 -----
11260058
11559393 -----

2540 2550 2560 2570
* * * *

179delMalony aagtggtcaccggcctctggaacagttgggtccgacaacgccatcgtcgac
11259884
11260020 -----
11260088 -----
11260003 -----
11260058
11559393 -----

2590 2600 2610 2620
* * * *

179delMalony gatccagccagcggcctgttccctcgaaacctcgctcatccgcgccatcga
11259884
11260020 -----
11260088 -----
11260003 -----
11260058
11559393 -----

2640 2650 2660 2670
* * * *

179delMalony tcaccagggcgcccacttccgcgtcaaaggcccgcgtgaacgtgccgcgct
11259884
11260020 -----
11260088 ---...a.g.g...t..t..-.....-g...a.g...-...
11260003 -----
11260058
11559393 -----

2690 2700 2710 2720
* * * *

179delMalony cgccccagggctaccgggtgctgttccaggccggctcttccgccgggggc
11259884
11260020 -----
11260088 t.....t.c.g.g.--.....-.....-t.....g.....
11260003 -----

11260058
11559393 -----

2740 2750 2760 2770
* * * *

179delMalony cagcgtttcgcgcccgcctacgccgagggcggtattcaccgcgcagccgga
11259884
11260020 -----
11260088 ..-a....tc.....cg.....-....c...gc..a.....
11260003 -----
11260058
11559393 -----

2790 2800 2810 2820
* * * *

179delMalony tcttgccctccgcgcaagccttctaccgaagcctcaaggagcagacggtcg
11259884
11260020 -----
11260088 .t....t....g.....-...t...g.....a.....
11260003 -----
11260058
11559393 -----

2840 2850 2860 2870
* * * *

179delMalony ccgcccggccggcgcaaggaagacatcgccatcctgccgggaatcagcccg
11259884
11260020 -----
11260088gc.....
11260003 -----
11260058
11559393 -----

2890 2900 2910 2920
* * * *

179delMalony gtcacgcgccagcgcaccgcgagggccgatgccctgtggcgagagctgaa
11259884
11260020 -----
11260088-.....
11260003 -----
11260058
11559393 -----

2940 2950 2960 2970
* * * *

179delMalony cgagctgacggccgtggaaaccggactggcccgcctgtcgaatcgtttcg
11259884
11260020 -----
11260088
11260003 -----
11260058
11559393 -----

2990 3000 3010 3020
* * * *

179delMalony gcggccacgacttcagccatctgccgctggaccggccgctcagcgtcgac
11259884
11260020 -----
11260088
11260003 -----
11260058

```

11559393 -----
                3040      3050      3060      3070
                *        *        *        *
179delMalony gactttcccgatccgcacggggtgcaggcggcgcaaagccgtgccgtggt
11259884 .....
11260020 -----
11260088 .....
11260003 -----
11260058 .....
11559393 -----

```

```

                3090      3100      3110      3120
                *        *        *        *
179delMalony catcaccgatctggtccggcaacagcggccgacgctgcgcgagctgctgc
11259884 .....
11260020 -----
11260088 .....
11260003 -----
11260058 .....
11559393 -----

```

```

                3140      3150      3160      3170
                *        *        *        *
179delMalony accggttggcggcgcccgcggccatttcaccctggccggcagcccggag
11259884 .....
11260020 -----
11260088 .....
11260003 -----
11260058 .....
11559393 -----

```

```

                3190      3200      3210      3220
                *        *        *        *
179delMalony cggatcgccgacaccatccagacctggttcgaagaaggcggcggacgg
11259884 .....
11260020 -----
11260088 .....
11260003 -----
11260058 .....
11559393 -----

```

```

                3240      3250      3260      3270
                *        *        *        *
179delMalony cttcaacctgatgccgccatcctgccggccctgctggagaccttcgtcg
11259884 .....
11260020 -----
11260088 .....
11260003 -----
11260058 .....
11559393 -----

```

```

                3290      3300      3310      3320
                *        *        *        *
179delMalony aagaggtcgtcccgtgctgcagaagcggggctgttccgcacccactac
11259884 .....
11260020 -----
11260088 .....
11260003 -----
11260058 .....
11559393 -----

```

```

          3340      3350      3360      3370
          *        *        *        *
179delMalony gaaggcacgacgctgcgcgatcgctatggcctgaaacgaccgtccaatcc
11259884 -----
11260020 -----
11260088 .....
11260003 -----
11260058 .....
11559393 -----

```

```

          3390      3400      3410      3420
          *        *        *        *
179delMalony ctatttctgacgccaggacagtggcggacttcaggggccgctcgacccggt
11259884 -----
11260020 -----
11260088 .....
11260003 -----
11260058 .....
11559393 -----

```

```

          3440      3450      3460      3470
          *        *        *        *
179delMalony accaggtgcgcgctctcgccgatcaggggagtaccgatgaagccgcgacc
11259884 -----
11260020 -----
11260088 .....
11260003 -----
11260058 .....
11559393 -----

```

```

          3490      3500      3510      3520
          *        *        *        *
179delMalony tgcagttgccgccccgcttcccgcagggtcaggcggcagtcgtatacctt
11259884 -----
11260020 -----
11260088 .....
11260003 -----
11260058 .....
11559393 -----

```

```

          3540      3550      3560      3570
          *        *        *        *
179delMalony gccgctgtccgggtcgaggatttcccgcgtcttcgtagacctcgccccgcc
11259884 -----
11260020 -----
11260088 .....
11260003 -----
11260058 .....
11559393 -----

```

```

          3590      3600      3610      3620
          *        *        *        *
179delMalony gcttcacaccgctgaggatgggtcatgccgagcagcggcttgccgcgacgt
11259884 -----
11260020 -----
11260088 .....
11260003 -----
11260058 .t....-.....a.....a....a.....cg.....
11559393 -----

```

```

          3640      3650      3660      3670
          *        *        *        *
179delMalony  tcgccctcgcagttgtcgcagta-gggcgattcggcggttcggccccgcgca
11259884      -----
11260020      -----
11260088      .....-.....
11260003      -----
11260058      .....c..a..a...a...c.....cgc..
11559393      -----

```

```

          3680      3690      3700      3710      3720
          *        *        *        *        *
179delMalony  ggcccttctcgatggtgccccggctactcgtcgccctgccggtcgatgcgg
11259884      -----
11260020      -----
11260088      .....
11260003      -----
11260058      .....c.....ta.atg..
11559393      -----

```

```

          3730      3740      3750      3760      3770
          *        *        *        *        *
179delMalony  accagcgcgcgcggct-cgccggtccgctggtcgcggatcatccacagtc
11259884      -----
11260020      -----
11260088      .....-.....
11260003      -----
11260058      .a..ag.....g.t...g....cg...gtcg...at...aca....
11559393      -----

```

```

          3780      3790      3800      3810      3820
          *        *        *        *        *
179delMalony  cgctcagcggatcgccggatgcccggctggcggccggcaagaccgccagg
11259884      -----
11260020      -----
11260088      .....
11260003      -----
11260058      ..t...ag....tc.....-cg....tg....c.g..a...-a...
11559393      -----

```

```

          3830      3840      3850      3860      3870
          *        *        *        *        *
179delMalony  gcgcagcagaggcacagccatcgcacgctcatccggcgaggcctccgccg
11259884      -----
11260020      -----
11260088      .....
11260003      -----
11260058      .g...-a.....-
11559393      .....

```

```

          3880      3890      3900      3910      3920
          *        *        *        *        *
179delMalony  acggcggccccggatggccggggccgggctccaggcgtgcgtgcagggc
11259884      -----
11260020      -----
11260088      .....
11260003      -----
11260058      -----
11559393      .....

```

```

          3930      3940      3950      3960      3970

```

```

      *           *           *           *           *
179delMalony  ggccagctcatggcgggatggcgtcgccgcgatagtgcaaggaaggcgccgg
11259884      -----
11260020      -----
11260088      .....g.....
11260003      -----
11260058      -----
11559393      .....

```

```

      3980       3990       4000       4010       4020
      *         *         *         *         *
179delMalony  tttccccgccgaccacgacttcgagatagggctcggcgctcgctatcccc
11259884      -----
11260020      -----
11260088      .....
11260003      -----
11260058      -----
11559393      .....

```

```

      4030       4040       4050       4060       4070
      *         *         *         *         *
179delMalony  tcgtcgcaataggt-cttgagggtcagc-aggccc-tgtcc-gggaaaga
11259884      -----
11260020      -----.t.....a.c.....c.....c.....
11260088      ....-.....
11260003      -----
11260058      -----
11559393      .....-.....-.....-.....

```

```

      4080       4090       4100       4110       4120
      *         *         *         *         *
179delMalony  cgaac-atgatggtgggactggaaacctggct-catggaaaaactct-cc
11259884      -----
11260020      .....c.....g.t.....t..
11260088      -----
11260003      -----
11260058      -----
11559393      .....-.....-.....-.....

```

```

      4130       4140       4150       4160       4170
      *         *         *         *         *
179delMalony  ctgtaatggatcgagcaccgggcagcgcgcccgcccttcatgccaccc
11259884      -----
11260020      -----
11260088      -----
11260003      -----
11260058      -----
11559393      .....

```

```

      4180       4190       4200       4210       4220
      *         *         *         *         *
179delMalony  tggacatgccgccgtccgccggcgaatgcccttgcgggtctatgacgcc
11259884      -----
11260020      -----
11260088      -----
11260003      -----
11260058      -----
11559393      .....

```

```

      4230       4240       4250       4260       4270
      *         *         *         *         *

```


179delMalony agatggtgcagaacgcgggtcggtcatgcgctcggccgtgaagcgctccgc
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393

4280 4290 4300 4310 4320
 * * * * *

179delMalony cagcggggcgggcatttcccggccagttcgcgggtggagcgcgacgcattcgcca
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393

4330 4340 4350 4360 4370
 * * * * *

179delMalony gcagtacctccagttgccggggccagatcgccgctgtcccaggccttgaag
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393

4380 4390 4400 4410 4420
 * * * * *

179delMalony gtcaggccgcgggtcgctcgccgctcgcgcatcacttcgggtgatgccgcc
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393

4430 4440 4450 4460 4470
 * * * * *

179delMalony gtagtcggggcaccagcaccggcggtgccatggcccatcgcctcggccacca
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393

4480 4490 4500 4510 4520
 * * * * *

179delMalony ccaggccgaaagcctcgcgggttcaccgagggatagaccacgcagtggtg
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393

4530 4540 4550 4560 4570
 * * * * *

179delMalony tgggcgagcaggggtgctcgcggtatctcccggatacggctcccgcctgatg

11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393

4580 4590 4600 4610 4620
 * * * * *

179delMalony gatcggcaggccgaggtgggcgggcgagatcggcgacgaccctcttgacagg
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393

4630 4640 4650 4660 4670
 * * * * *

179delMalony attcgcccttggcgggtggcgccgcagaccaccagttgcagctcgacgccca
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393

4680 4690 4700 4710 4720
 * * * * *

179delMalony cgcgccttcagcaggcggcgggcggtagagcagcaggatcccttctc
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393

4730 4740 4750 4760 4770
 * * * * *

179delMalony ggcttctcggcggccgaagtaggtgacgatggggaggatcctcgcgacgac
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393

4780 4790 4800 4810 4820
 * * * * *

179delMalony ccgggaagagttgacctgagccgcgcgctggcgccctggccgatggcggg
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393

4830 4840 4850 4860 4870
 * * * * *

179delMalony gacagctcgatgccgtttagaggacgctcatgcggtcccgcggaacttc
 11259884 -----

11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393a.....

4880 4890 4900 4910 4920
 * * * * *

179delMalony cagctcgtcggcgatccgttcgaggtagtcgctgctgactagcagggccg
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393a.....

4930 4940 4950 4960
 * * * *

179delMalony gccagcgcgagcc-ggcgacggcctc-gttgagggcgttgccg-taggcc
 11259884 -----
 11260020-.....-.....-.....
 11260088 -----
 11260003-.....-.....-.....
 11260058 -----
 11559393c.a.a..c...a.....c.....g.....

4970 4980 4990 5000 5010
 * * * * *

179delMalony tcgaacaggtcgcctccgcgcgcg-tagtcggcgaactgctcgtcgcctc
 11259884 -----
 11260020-.....
 11260088 -----
 11260003-.....
 11260058 -----
 11559393 ..a...ca...c.....cg...g..tc.....c....

5020 5030 5040 5050 5060
 * * * * *

179delMalony ggaaggtcagcacgtagtcgaaatcgagcccgcctggcgcttgcccgc
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058-.....
 11559393g..c...a...a...t.g.....t.-----

5070 5080 5090 5100 5110
 * * * * *

179delMalony agggcgagcgtaccgagggagggcgaactcatcatcaggtgactgacttc
 11259884 -----
 11260020
 11260088 -----
 11260003
 11260058 -----
 11559393 -----

5120 5130 5140 5150 5160
 * * * * *

179delMalony gtccctggcgatgaaatggcgcagggcgctctagatacctaggtgagctct
 11259884 -----
 11260020

```

11260088 -----
11260003 .....
11260058 -----
11559393 -----

          5170      5180      5190      5200      5210
          *        *        *        *        *
179delMalony ggtaccctctagtcaaggccttaagtgagtcgtattacggactggccgctc
11259884 -----
11260020 .....
11260088 -----
11260003 .....
11260058 -----
11559393 -----

```

Vedlegg 5: sekvensering pOG5

Tallkoder under prøve ID referer til sekvenseringsfil.

```

          210      220      230      240      250
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p cacacaggaaacagctatgaccatgattacgaattcgagctccaccgcgg
13514518 -----
13514825 -----.....

          260      270      280      290      300
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p tggcggccgctctagaactagtggatcccccttcaacatatgaacaagc
13514518 -----
13514825 -----.....

          310      320      330      340      350
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p cgactttcgcattcgtcaccattggtagtggttcttatcttggctccacc
13514518 -----
13514825 -----.....

          360      370      380      390      400
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p gttcgcgacctgaccctcgccaatatcctccaccgacgcggctacaaggt
13514518 -----
13514825 -----.....

          410      420      430      440      450
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p ggtggtctactggatgatggagtggaatcccgaactggccgatcccggta
13514518 -----
13514825 -----.....

          460      470      480      490      500
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p tcgagcaccggctgctctgtcacggcacgcgctaccagttccgacgaccc
13514518 -----
13514825 -----.....

          510      520      530      540      550

```

```

          *           *           *           *           *
"pOG5" Gly p t c g g c g t t c a t g g a t c a g g t g g t c g g t t c a g c c g c c t t c c t g c t c c c g c t
13514518 -----
13514825 .....

          560         570         580         590         600
          *           *           *           *           *
"pOG5" Gly p g c g c t t g c g g g t g c a g g t c a c c c a g g g c a t c a a c g g c t t c g t c g a c c g c a
13514518 ----- . . . . g . . c c . . . -----
13514825 .....

          610         620         630         640         650
          *           *           *           *           *
"pOG5" Gly p t g c t c a c c c a c c t c a t c c g t c g c t g c a t g c g a c g c c g g a t t c c g a c g c c
13514518 ----- . . . . . g c . . . . . -----
13514825 .....

          660         670         680         690         700
          *           *           *           *           *
"pOG5" Gly p g g c c t g g t c c g g c g c c t g c g c c a t t t c a t c g c c a g g g a c g a a g t c a g t c a
13514518 ..-.....c.....c.....-.....t.....
13514825 .....

          710         720         730         740         750
          *           *           *           *           *
"pOG5" Gly p c c t g a t g a t g a g t t t c g c c t c c c t c g g t a c g c t c g c c c t g g c g g c c a a g c
13514518 g.a.-----gc...t.....-.....
13514825 .....

          760         770         780         790         800
          *           *           *           *           *
"pOG5" Gly p g c c a g g g c g g g c t c g a t t t c g a c t a c g t g c t g a c c t t c c a g g g c g a c g a g
13514518 -----
13514825 .....

          810         820         830         840         850
          *           *           *           *           *
"pOG5" Gly p c a g t t c g c c g a c t a c g c g c g g g a g c g a c c t g t t c g a g g c c t a c c g c a a
13514518 -----
13514825 .....

          860         870         880         890         900
          *           *           *           *           *
"pOG5" Gly p g c g c c t c a a c g a g g c c g t c g c c g g t c g c g c t g g c c g g c c c t g c t a g t c a
13514518 -----
13514825 .....

          910         920         930         940
          *           *           *           *
"pOG5" Gly p g c a g c g a c t a c c t c g a a c g g a t c g c c g a c - g a g c t g g a a - g t g c c g c g g g
13514518 ----- . . c . . . . . g . c . . . . . a . . . . .
13514825 .....

          950         960         970         980         990
          *           *           *           *           *
"pOG5" Gly p a a c g c a t g a g c g t c c t c t a c a a c - g g c a t c g a g c t g t c c c c g c c a t c g g c
13514518 .....t.t.cg.c...c...g.....t.....
13514825 .....

          1000        1010        1020        1030        1040
          *           *           *           *           *

```

```

"pOG5" Gly p caggccgccacgcgcgcggtcaggcaactcttcccgggactgcgcgagg
13514518 .c.....c.....
13514825 .....

          1050      1060      1070      1080      1090
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p acctcccc-atcgtcacctacttcggccgccaggaagccgagaa-gggga
13514518 .....c.....-.....
13514825 .....-.....a.....

          1100      1110      1120      1130      1140
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p tcgacctg-ctgctctacgcc-gcccgcctgctgaaggcgctggcgctcg
13514518 .....-.....-.....
13514825 ....a...g.....c.....-

          1150      1160      1170      1180      1190
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p agctgcaactgggtggtctgcggcgccaccgccaagggcgaatcctgcaag
13514518 .....
13514825 -----

          1200      1210      1220      1230      1240
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p agggtcgctcgccgatctcgcgcgccacctcggcctgcccgatccatcaggc
13514518 .....
13514825 -----

          1250      1260      1270      1280      1290
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p gggagccgtatccggggagatccgcgcacaccctgctcgcccacagccact
13514518 .....
13514825 -----

          1300      1310      1320      1330      1340
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p gcgtggtctatccctcgggtgaaccgcgaggctttcggcctggtggtggcc
13514518 .....
13514825 -----

          1350      1360      1370      1380      1390
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p gaggcgatgggcatggcacgcgggtgctggtgcccgactacggcggcat
13514518 .....
13514825 -----

          1400      1410      1420      1430      1440
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p caccgaagtgatgcgcgacggcgagcgagccggcggcctgaccttcaagg
13514518 .....
13514825 -----g....gg...tc.a...tt..-----....

          1450      1460      1470      1480      1490
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p cctgggacagcggcgatctggcccggcaactggaggtactgctggcgaat
13514518 .....
13514825 -----g..t...c....g....

          1500      1510      1520      1530      1540
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p gcgtcgtccaccgcgaactggcgggaaatgcccgcccgctggcggagcg

```

```

13514518 .....
13514825 -----..C....-----

          1550      1560      1570      1580      1590
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p cttcacggccgagcgcgatgaccgaccgcggttctgcaacatctgggcgtca
13514518 .....
13514825 -----

          1600      1610      1620      1630      1640
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p tagaccggcaggggcattcgccggcgacggcgccatgtccaggggtggca
13514518 .....
13514825 -----

          1650      1660      1670      1680      1690
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p tgaagggccggggcgctgcccgggtgctcgatccattacagggagagtt
13514518 .....
13514825 -----

          1700      1710      1720      1730      1740
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p tttccatgagccagggtttccagtcccaacatcatcctaggtatgggctgc
13514518 .....
13514825 -----.....-----

          1750      1760      1770      1780      1790
          *        *        *        *        *
"pOG5" Gly p aggaattcgatatcaagcttatcgataccgctcgacctcgagggggggccc
13514518 .....C..-
13514825 -----.....-

```

Vedlegg 5: sekvensering pOG 6

Tallkoder under prøve ID referer til sekvenseringsfil.

```

          1790      1780      1770      1760      1750
          *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p acgttgtaaaacgacggccagtgccaagcttgcatgcatcggtaccgggc
13512886.seq -----...
13514772.seq -----

          1740      1730      1720      1710      1700
          *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p cccccctcgaggtcgacgggtatcgataagcttgatcgaattcctgcag
13512886.seq .....
13514772.seq -----

          1690      1680      1670      1660      1650
          *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p ccctaacctaggcacagccatcgacgctcatccggcgaggcctccgccg
13512886.seq .....
13514772.seq -----

          1640      1630      1620      1610      1600
          *        *        *        *        *

```

```

"pOG6" Mal p acggcggcccgatggccggggccgggctccaggcgtgcgtgcagggc
13512886.seq .....
13514772.seq -----

                1590      1580      1570      1560      1550
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p ggccagctcatggcggatggcgtcgccgcgatagtgcaaggaaggcgcgg
13512886.seq .....
13514772.seq -----

                1540      1530      1520      1510      1500
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p tttccccgccgaccacgacttcgagatagggctcggcgctcgtatcccc
13512886.seq .....
13514772.seq -----

                1490      1480      1470      1460      1450
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p tcgtcgcaataggtcttgagggctcagcaggctgtcgtcgtcctcctcgat
13512886.seq .....
13514772.seq -----

                1440      1430      1420      1410      1400
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p ctcggtttccacgaccgcctgagccccagttcctggaccagcctgccc
13512886.seq .....
13514772.seq -----

                1390      1380      1370      1360      1350
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p atcccaggctgtcctcgtcgacgggtgccctgggtgcaggggcaggtgcagg
13512886.seq .....
13514772.seq -----

                1340      1330      1320      1310      1300
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p gagaaatgccgctcgtccaccataccggctccatcgggcagggcgctgcg
13512886.seq .....
13514772.seq -----

                1290      1280      1270      1260      1250
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p cagcagctccagggtacgcgcgcccgtccagggtcgcccggttgatgg
13512886.seq .....
13514772.seq -----

                1240      1230      1220      1210      1200
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p ccggcaggtacaggccgcggcggccggaggcggcataggccttgcgcatg
13512886.seq .....
13514772.seq -----

                1190      1180      1170      1160      1150
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p atgccctccaggttgggcttgcggtctccggagcatgcacgcggcccgg
13512886.seq .....
13514772.seq -----

                1140      1130      1120      1110      1100
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p ctggctcggccgatgccaccgccgaattcgacgaccaggttactccgt

```



```

13512886.seq .....
13514772.seq -----.....nn.....

          1090      1080      1070      1060      1050
          *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p cgtcgatcgccccggcgcagacccccatccacttgaccggatggaacatc
13512886.seq .....
13514772.seq .....

          1040      1030      1020      1010      1000
          *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p tggaagaacagggcggcgcgcacatctgctcgggatcgtcggcgtgatagtc
13512886.seq .....
13514772.seq .....

          990      980      970      960      950
          *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p gccggtgtagttggagaggacctcgcccggagccgccagggcggcgg
13512886.seq .....
13514772.seq .....

          940      930      920      910      900
          *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p cgtcgagatgcgggacggttagcgctccgcggcgccgatcatcaggtaggtg
13512886.seq .....nn.....-----
13514772.seq .....

          890      880      870      860      850
          *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p tggaaggcccccttcggtcttcaggtagcgcccagccctggagcggccgaa
13512886.seq -----
13514772.seq .....

          840      830      820      810      800
          *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p acgcgcgccacgctcctccatgagcgcctccagatcgcgctcgaaaccgc
13512886.seq -----
13514772.seq .....

          790      780      770      760      750
          *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p agaccacggtctggtcgggcaggttgacagcccgccgatgccgcagtagcgc
13512886.seq -----
13514772.seq .....

          740      730      720      710      700
          *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p gcctcggcgcgagcggcctgatcgagtcgagatcgaggcggaaggcggccat
13512886.seq -----
13514772.seq .....

          690      680      670      660      650
          *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p ccgcccgcgcccgaactccgacatcagccggccgcgcacatgaggatcagcc
13512886.seq -----
13514772.seq .....

          640      630      620      610      600
          *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p gcagcgcgtcctcgaaggccaggacgcccggcggccaccagcgcggagtat
13512886.seq -----

```

```

13514772.seq .....
                590      580      570      560      550
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p  tcgcccaggctgtgcccggccagcacattcggcgtccaggcctcgccggt
13512886.seq -----
13514772.seq .....

                540      530      520      510      500
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p  gagttcgcggaatgccgccaggcaggcgatggaatgggtgagcagcgca
13512886.seq -----
13514772.seq .....

                490      480      470      460      450
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p  tctgggtgaactcggtgccattgagccgctcttccggcccctggaaggac
13512886.seq -----
13514772.seq .....

                440      430      420      410      400
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p  agttccgccacgtcgaagcccattgcoctggctcgctcgctcgctacaggtc
13512886.seq -----
13514772.seq .....

                390      380      370      360      350
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p  gcgcacgcaggaaaaacggcgatggatgtcgctgcccatgccacgtact
13512886.seq -----
13514772.seq .....

                340      330      320      310      300
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p  gcgagccctgtccgggaaagacgaacatgatggtgggactggaaacctgg
13512886.seq -----
13514772.seq .....

                290      280      270      260      250
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p  ctcatatgctaactcgggggatccactagttctagagcgccgccaccgc
13512886.seq -----
13514772.seq .....

                240      230      220      210      200
                *        *        *        *        *
"pOG6" Mal p  ggtggagctcgaattcgtaatcatggatcatagctgtttcctgtgtgaaat
13512886.seq -----
13514772.seq .....

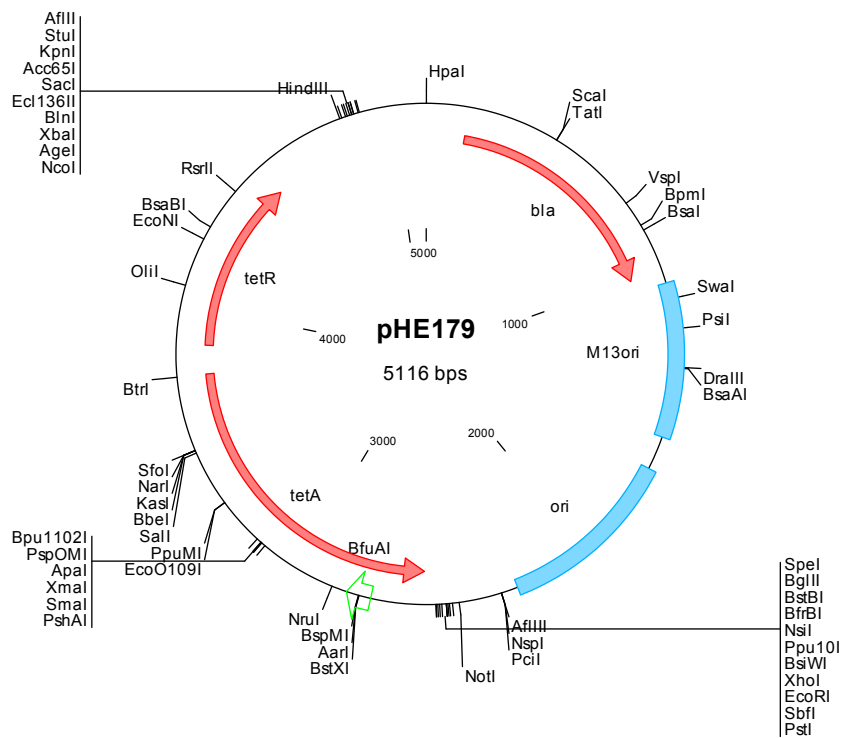
```

Vedlegg 6: vekskurve data

Tabell 12: OD₆₀₀ målinger

| Prøve ID | Dag 0 | Dag 1 | Dag 2 | Dag 3 | Dag 4 | Dag 5 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Wt-1 | 1,752 | 1,920 | 1,812 | 1,656 | 1,650 | 1,530 |
| Wt-2 | 1,650 | 1,902 | 1,944 | 1,740 | 1,674 | 1,674 |
| Wt-3 | 2,010 | 1,980 | 1,890 | 1,770 | 1,596 | 1,536 |
| Gly 1 | 2,550 | 2,778 | 2,664 | 2,442 | 2,292 | 2,352 |
| Gly 2-1 | 2,526 | 2,694 | 2,448 | 2,232 | 2,190 | 1,800 |
| Gly 2-2 | 2,538 | 2,778 | 2,388 | 2,394 | 2,268 | 2,202 |

Vedlegg 7: Plasmidkart



Vedlegg 8: Primere

Primerne ble levert av Sigma Aldrich. Primersekvenser er å finne i separat vedlegg (Primer.7z).