

Utforskning av faktorer som kan påvirke vekst  
hos *Francisella noatunensis*  
subsp. i laboratoriet og kloning av clpB for  
funksjonsanalyser av  
proteinet ClpB hos *F. noatunensis* subsp  
*noatunensis*.

Ida Marie Thrane



Masteroppgave i Farmasi  
Farmasøytisk Institutt  
Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet  
UNIVERSITETET I OSLO

Juni 2013



**Utforsking av faktorer som kan påvirke  
vekst hos *Francisella noatunensis*  
subsp. i laboratoriet og kloning av clpB  
for funksjonsanalyser av  
proteinet ClpB hos *F. noatunensis* subsp  
*noatunensis*.**

Ida Marie Thrane

Masteroppgaven ble utført ved  
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap og  
Farmasøytisk institutt ved  
Universitetet i Oslo  
i perioden februar 2012 til mai 2013

Veiledere:

Førsteamanuensis Hanne Cecilie Winther-Larsen  
Stipendiat Elisabeth Opsjøn Lampe

© Forfatter

2013

Utforsking av faktorer som kan påvirke vekst hos *Francisella noatunensis* subsp. i laboratoriet og kloning av *clpB* for funksjonsanalyser av proteinet ClpB hos *F. noatunensis* subsp *noatunensis*.

Ida Marie Thrane

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Sammendrag

*Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* er en Gram-negativ bakterie som forårsaker systemisk infeksjon hos torsk i oppdrettsnæringen i Norge. Forskjellige stammer av *F. noatunensis* gir også sykdom hos andre arter fisk både i ferskvann og saltvann i oppdrettsanlegg rundt om i verden. Sykdom forårsaket av *F. noatunensis* har fått navnet francisellose. Den gir fisken granulomer hovedsakelig i lever, milt og hjerte.

*F. noatunensis* tilhører samme genus som *F. tularensis* som er en svært infeksjøs bakterie. *F. tularensis* gir sykdom hos dyr, deriblant menneske og er et potensielt biologisk våpen.

*F. noatunensis* er en relativt nyoppdaget bakterie, og det finnes foreløpig ingen effektiv behandling mot francisellose. Bakterien er en fakultativ intracellulær bakterie, noe som gjør utvikling av effektiv antibiotika og vaksiner utfordrende.

Bakterien vokser sakte og trenger næringsrikt medium. I denne oppgaven ble det sett på mulige faktorer som kan påvirke veksten av bakterien i laboratoriet. Påvirkningen av antibiotikumet ampicillin, sonikering, mediene PBS og L-15 ble undersøkt for tre forskjellige stammer av *F. noatunensis*. Det ble også undersøkt om antall pipetteringer per overføring påvirket CFU når det ble laget fortynningsrekker. Ampicillin hemmet veksten av *F. noatunensis* subsp. *orientalis* stammen, men ikke de to *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* stammene. CFU ble ikke endret av sonikering, PBS, L-15 eller antall pipetteringer.

pKK214 og pDMK2 er plasmider som brukes i arbeid med *Francisella*. Disse ble sekvensert og det ble etablert hva slags restriksjonsenzymmer som kan brukes i videre arbeid.

En mutasjon i genet som koder for stressproteinene clpB er en mulig vaksine mot *F. tularensis*. I forbindelse med funksjonsanalyser av clpB hos *F. noatunensis*, ble det laget et histidinmerket *clpB* konstrukt. En *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* *clpB* delesjonsmutant ble komplementert med en ekspresjonsvektor som uttrykker clpB. Etter komplementeringen av *clpB*-delesjonsmutanten ble det gjennomført vekstforsøk for å se om clpB kan ha innvirkning på veksten til bakterien. Det ble ikke sett registrert noen forskjell.



# Forord

# Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	11
1.1	Slekten <i>Francisella</i> .....	11
1.1.1	Egenskaper .....	11
1.1.2	Klassifisering.....	11
1.1.3	Tularemi .....	12
1.1.4	<i>Francisella noatunensis</i> .....	13
1.2	<i>Francisellas</i> rolle i oppdrett .....	14
1.3	Behandlinger.....	15
1.3.1	Vaksiner i oppdrett .....	15
1.3.2	Antibiotika.....	15
1.3.3	Intracellulæritet .....	16
1.3.4	Utfordringer ved behandling av francisellose .....	17
1.4	Muligheter .....	18
1.4.1	ClpB .....	18
1.5	Mål for oppgaven.....	19
2	Materialer .....	20
2.1	Bakteriestammer .....	20
2.2	Vektorer .....	20
2.3	Antibiotika .....	20
2.4	Enzymer.....	21
2.5	Primere.....	21
2.6	Kjemikalier .....	22
2.7	Laborarieutstyr .....	23
2.8	Diverse engangsutstyr.....	24
2.9	Kit .....	25
2.10	Dataprogrammer .....	25
2.11	Medier .....	25
2.12	Buffere og løsninger .....	26
3	Metoder .....	28
3.1	Lagring og kultivering .....	28
3.1.1	Langtidslagring av bakterier.....	28



3.1.2	Kultivering av bakterier .....	28
3.2	CFU-telling av <i>Fnn</i> , <i>Fno</i> Og <i>Fn AL</i> .....	29
3.2.1	Vekst av <i>Fnn</i> , <i>Fno</i> og <i>Fn AL</i> med Ampicillin.....	29
3.2.2	Effekten av ultralydbad på CFU.....	31
3.2.3	Effekten av antall pipetteringer på CFU .....	31
3.2.4	Effekten av fortynningsmedie på CFU.....	31
3.3	Plasmidisolering fra <i>E. coli</i> .....	32
3.4	Polymerase kjede reaksjon (PCR) .....	32
3.4.1	Screening av <i>Fnn:pKK289clpB</i> og <i>Fnn<math>\Delta</math>clpB:pKK289clpB</i> .....	33
3.4.2	Kloning av <i>clpB</i> med Histag .....	34
3.5	Agarose gelelektroforese .....	35
3.6	Måling av DNA-konsentrasjon.....	36
3.7	Transformerings av <i>F. noatunensis</i> ssp. <i>Noatunensis</i> .....	37
3.8	Veksthastighetsbestemmelse av <i>Fnn</i> og <i>Fnn</i> mutanter.....	39
3.9	TOPO kloning.....	39
3.9.1	TOPO® TA Cloning® Kit.....	39
3.9.2	Transformasjon av <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pir .....	41
3.9.3	Verifisering av <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pir:pCR4clpBHis.....	42
3.9.4	Klonanalyse .....	42
3.10	Sekvensering .....	43
4	Resultater.....	45
4.1.1	CFU av <i>Francisella</i> stammen <i>Fnn</i> , <i>Fno</i> og <i>Fn AL</i> og virkningen av ampicillin på CFU 45	
4.1.2	Aggregering av bakterier.....	47
4.1.3	Effekten av antall pipetteringer på CFU .....	48
4.1.4	Effekten av ultralydbad på CFU.....	49
4.1.5	Effekten av vekstmedium på CFU .....	51
4.2	pKK214 og pDMK2 .....	52
4.2.1	pKK214 .....	52
4.2.2	pDMK2.....	54
4.3	Introduksjon av pKK289 <i>clpB</i> i <i>Fnn</i> .....	56
4.3.1	Vekststudier av <i>clpB</i> -delesjonsmutant og <i>clpB</i> -transformanter.....	58
4.4	Konstruksjon av Histidin merket ClpB .....	59

4.4.1	clpBHis-pCR4 TOPO kloning .....	61
5	Diskusjon.....	64
5.1	CFU av Fnn, Fno og Fn AL.....	64
5.2	Plasmidene.....	68
5.3	ClpB.....	68
5.4	Konklusjon.....	69
	Litteraturliste .....	70
6	Vedlegg 1 .....	77
7	Vedlegg 2 .....	5
8	Vedlegg 3 .....	9
9	Vedlegg 4 .....	13
10	Vedlegg 5 .....	18

# 1 Innledning

## 1.1 Slekten *Francisella*

### 1.1.1 Egenskaper

Medlemmer av Francisellagenuset er obligat aerobe, fakultativt intracellulære, ikke-bevegelige, og korte stavformede/ kokkoide gramnegative bakterier. Bakteriene finnes naturlig i miljøet og har mange forskjellige vertsorganismer, alt fra amøber til mennesker. Genuset inneholder blant annet *F. tularensis*, som gir tularemi hos mennesker og *F. noatunensis* som kan gi francisellose hos en rekke fiskearter.

*Francisella* subsp. krever et rikt medie for å vokse (Birkbeck *et al.*, 2011). For eksempel krever *F. tularensis* agarskåler tilsatt cystein, glukose og blod. På chocolate agar vil de forme grønne til hvite, runde, glatte og noe mukoide kolonier og det vil ofte dannes en liten sone av  $\alpha$ -haemolyse rundt koloniene når de blir dyrket på medie som inneholder blod (Oyston, 2008).

### 1.1.2 Klassifisering

*Francisella* er den eneste slekten under familien Francisellaceae. Familien tilhører ordren Thiotrichales og subklassen Gammaproteobacteria. En annen familie som tilhører orden Thiotrichales er Piscirickettsiaceae. Denne familien inneholder *Piscirickettsia salmonis* som er en viktig fiskepatogen (Birkbeck *et al.*, 2011).

*Francisella*-stammene kan klassifiseres etter hvor humanvirulente de er (Sridhar *et al.*, 2012). Underartene *F. tularensis* subsp. *tularensis* og *F. tularensis* subsp. *holartica* er humanvirulente. *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* er moderat virulent. *F. novicida* og *F. philomiragia* regnes ikke som virulente hos mennesker, men kan likevel gi sykdom hos personer med sterkt svekket immunforsvar. *F. philomiragia* er assosiert med vann og i tillegg til personer med nedsatt immunforsvar ser en også infeksjon hos pasienter som nesten har druknet. *F. noatunensis* er ikke humanvirulente blant annet fordi de ikke vokser ved 37 °C. Videre er *F. noatunensis* delt inn i to underarter, subsp. *noatunensis* og subsp. *orientalis*.

*Francisella*-stammene kan også deles inn i metabolsk kompetente eller ikke metabolsk kompetente. Om en stamme er metabolsk kompetent eller ikke bestemmes ut i fra antall

intakte metabolske gener som finnes i genomet. Metabolsk kompetente stammer har blitt funnet i miljø stammer, mens de metabolsk ukompetente er de stammene som er avhengig av en vert å vokse i. Eksempler på metabolske kompetente stammer er *F. philomiragia* og *F. novicida* mens alle *F. tularensis* subsp. er ukompetente. (Sridhar *et al.*, 2012).

Det er publisert studier om *Francisella*-liknende bakterier som har blitt funnet under analyse av prøver fra vann og jord (Barns *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2009), i tillegg er det funnet en rekke *Francisella*-liknende endosymbionter i flått. En av disse endosymbiontene ble betegnet som *Wolbachia persica*, som feilaktig plasserer den i subgruppen alfaproteobakteria. Det er funnet en endosymbiont hos et marint flimmerdyr (Schrallhammer *et al.*, 2011) og det er isolert en bakterie fra et air-conditionsystem som også tilhører genuset *Francisella* (Qu *et al.*, 2009).

De siste årene er det kommet mye ny kunnskap om varieteten til genuset. For ti år siden kjente man bare til to arter, *F. tularensis* og *F. philomiragia*. Ved genomsekvensering av flere av artene og underartene har en mulighet til å få mer informasjon om artenes fylogenetiske forhold. Ved å sammenlikne 45 *Francisella*-stammer fant man ut at genuset er delt i to hovedklader(grupper). Den ene gruppen inneholdt *F. tularensis*, *F. novicida*, *F. hispaniensis* og *W. persica*. Den andre inneholdt *F. noatunensis* og *F. philomiragia* (Sjödén *et al.*, 2012).

### 1.1.3 Tularemi

Tularemi er en zoonotisk sykdom som er forårsaket av *F. tularensis*. Det er en sykdom som i all hovedsak rammer smågnagere. Utbrudd av sykdommen hos mennesker vil ofte skje i sammenheng med utbrudd hos dyrene. Hvor alvorlig sykdommen blir, avhenger av hvilken stamme som forårsaker infeksjonen, dosen av bakterier og av infeksjonsruten. Det er hovedsakelig *F. tularensis* subsp. *tularensis* (type A) og *holarctica* (type B) som gir sykdom hos mennesker. Infeksjon av de mest virulente stammene (type A) vil kunne føre til dødsfall hos opp til 30 % hvis sykdommen ikke behandles. Med antibiotikabehandling blir dødeligheten redusert til 2 % (Oyston, 2008).

*F. tularensis* har lenge vært ansett for å være et potensielt biologisk våpen fordi den kan forårsake alvorlig sykdom ved inhalasjon av så få som 10 CFU. Flere land som USA, tidligere Sovjetunionen og Japan har hatt *F. tularensis* med i sitt biologiske våpenprogram. Etter en internasjonal avtale i 1972, ble utviklingen av biologiske våpen stanset og interessen for

biologiske våpen falt. Dette endret seg i 2001, da det etter terrorangrepene 11. september ble sendt flere brev som inneholdt sporer av *Bacillus anthracis* (Spencer, 2003) som i likhet med *F. tularensis* blir ansett som et potensielt biologisk våpen. Etter dette har det vært en fornyet interesse også for *Francisella* og spesielt i USA har det blitt bevilget midler til økt forskningsarbeid på patogenet (Oyston, 2008).

#### **1.1.4 *Francisella noatunensis***

Tidlig på 90-tallet ble det rapportert om en systemisk granulomatøs tilstand hos oppdrettstilapia i Taiwan. Liknende sykdom ble senere beskrevet i tilapia på Hawaii, USA, Costa Rica og Storbritannia. De ansvarlige patogener ble lagt under betegnelsen *rickettsia*-like organisms (RLO). Bakteriene ble senere indentifisert som *Francisella* subsp. (Birkbeck *et al.*, 2011). Forskjellige stammer av *F. noatunensis* har blitt dokumentert å gi francisellose hos flere ulike oppdrettsfisk over hele verden (Birkbeck *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2006; Kamaishi *et al.*, 2005; Mauel *et al.*, 2007; Nylund *et al.*, 2006). I Norge rammes torsk av en stamme av *F. noatunensis* subsp. *noatunensis*, mens en annen stamme har blitt isolert fra laks i Chile (Birkbeck *et al.*, 2007). *F. noatunensis* subsp. *orientalis* rammer fisk i varmere vann i store deler av verden.

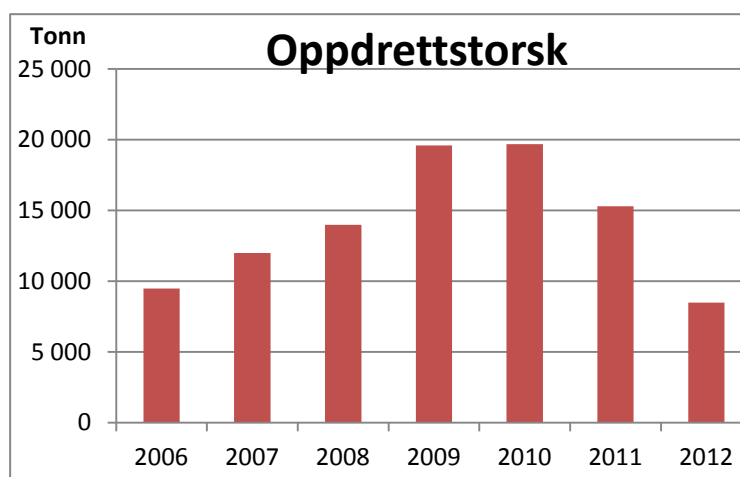
Francisellose er en kronisk og svært smittsom sykdom, og når fisk dør av sykdommen har den vært syk lenge. I Norge har sykdommen høyere dødelighet om sommeren enn om vinteren, på grunn av den økte temperaturen i vannet, som gir en mer optimal temperatur for vekst av *F. noatunensis* (Colquhoun *et al.*, 2011). Høy temperatur stresser fisken, hvilket kan redusere dens immunforsvaret. Dette kan være en mulig årsak til økt dødelighet ved høyere vanntemperatur eller svingninger i temperatur. Ut i fra en syks ytre tegn er det vanskelig å se at det er francisellose. Fisken blir sløv, mister appetitten og bli mørkere i fargen. Ved obduksjon sees mange granulomer (betennelsesknuter) for det meste i milt, hjerte og lever. Lever og milt kan være forstørret. Granulomer blir også sett i nyrer, øyne, tarmslimhinner, hud og skjelettmuskulatur (Colquhoun *et al.*, 2011). Ved nærmere studier av vevet i granulomene er det mulig å identifisere nekrose, degenerasjon, inflammasjon og proliferasjon (Nylund *et al.*, 2006). For å få en sikker diagnose er det nødvendig å foreta videre tester som isolering av bakterien på medie og histologiske undersøkelser. Det kan også være nødvendig med sekvensen av bakteriens 16S rRNA (Colquhoun *et al.*, 2011).

## 1.2 *Francisellas* rolle i oppdrett

*F. noatunensis* rammer flere forskjellige fiskearter som er viktig i oppdrettsnæringen. Tilapia er en av de viktigste oppdrettsartene i verden, og i 2005 ble det rapportert om produksjon på 2,5 millioner tonn på verdensbasis. Fisken produseres svært mange steder i tropiske strøk. Store produksjonsland er Kina, Ecuador, Egypt, Israel, Indonesia, Singapore, Filippinene og Thailand. I Latin-Amerika har det også vært stor økning i produksjonen de siste årene (Josupeit, 2007). Francisellose har svært høy dødelighet hos tilapia (Colquhoun *et al.*, 2011), og oppdretterne vil få høye økonomiske tap.

Selv om *F. noatunensis* har blitt isolert i villtorsk (Alfjord *et al.*, 2006) er det i all hovedsak i oppdrettssammenhenger at bakterien er et problem. I oppdrettsanlegg lever fisken så tett at hvis det først kommer sykdom blir fort all fisken rammet, og dette vil naturligvis føre til store tap for oppdretteren.

Torskeoppdrett i Norge er i sterk nedgang og mange oppdrettere må gi opp på grunn av store økonomiske tap, og francisellose er hovedproblemet (Veterinærinstituttet, 2006-2012). Optimismen rundt torskeoppdrett er knyttet til lakseoppdrettens suksess, men mange forskjeller mellom markedene gjør at torskeoppdrett er vanskeligere. Torsken har stor



Figur 1.2 Oversikt over mengde produsert torsk fra oppdrettsnæringen. Tallene er hentet fra Fiskehelse rapportene (Veterinærinstituttet, 2006-2012).

konkurransen fra villtorsken, spesielt siden bestanden har tatt seg opp og fiskekvotene deretter har økt. I tillegg må torsken konkurrere mot andre hvite fiskearter fra andre land, som er billigere. Resultatene av finanskrisen og samtidige store utbrudd av francisellose samt konkurransen kan en se i figur 1.2, som viser et anslag for produsert torsk fra oppdrettsnæringen i Norge. Produksjonene av torsk hadde jevn økning frem til 2009, og i 2012 er mengden produsert torsk lavere enn det var i 2006 (Veterinærinstituttet, 2006-2012).

## 1.3 Behandlinger

### 1.3.1 Vaksiner i oppdrett

De fleste vaksiner for fisk i Norge med markedsføringstillatelse er utviklet for laks, men det finnes også noen vaksiner utviklet for regnbueørret og en type vaksine for torsk (Legemiddelverket, 2013b). Siden det har vært lakseoppdrett i over 40 år (Hallenstvedt, 2009) er det naturlig at det finnes flere vaksiner for laks. For å unngå at fisken må injiseres flere ganger, er vaksinene satt sammen i kombinasjonsvaksiner som kan beskytte for opp til fem forskjellige bakterier og virus. Vibriose var lenge den vanligste sykdommen hos torsk. Et av hovedpatogenene var *Listonella anguillarum*. Vaksinen for torsk, Alpha Marine Vibrio inneholder tre forskjellige serotyper av *Listonella anguillarum* (Legemiddelverket, 2013b). Vaksinen er en dyppvaksine, hvor fisken blir vaksinert ved å dyppe fisken i ferdigblandet vaksine i 30 sekunder (PHARMAQ, 2012). Alle vaksinene med markedsføringstillatelse består av bakterier og virus som er inaktivert med formalin (Felleskatalogen, 2013).

### 1.3.2 Antibiotika

Når det ikke finnes noen egnet vaksine, vil ofte antibiotika bli brukt for å beskytte fisk mot bakterielle infeksjoner. På det norske markedet finnes det tre ulike antibiotikapreparater for fisk. Preparatene florfenikol og oksolinsyre indisert til laks og kombinasjonspreparatet med sulfadiazin og trimetoprim som kan brukes til all oppdrettsfisk (Legemiddelverket, 2013a).

Det finnes flere måter å administrere antibiotika på. Det er mulig å gi fisken legemidlet via injeksjon, men dette er en dyr og tidkrevende prosess. Fisken må fanges og bedøves og dette vil være stressende for fisken. Injeksjon er derfor en administrasjonsform som forbeholdes akvariefisk og stamfisk (fisk som brukes til kunstig befruktning). En annen måte er badebehandling hvor antibiotika er løst i vannet. Begrensningene er at antibiotikumet må være godt løselig i vann og saltinnholdet i vannet vil kunne endre løseligheten. Metoden er ofte brukt på mindre fisk på grunn av størrelsen på tanken som fiskene bades i. Den vanligste administrasjonsruten spesielt for voksen fisk er oralt. Det blir gitt med fiskeforet og fisken slipper å bli håndtert. Et vanlig sykdomstegn hos syk fisk er mangel på appetitt. Oral behandling blir derfor brukt for å hindre spredning av infeksjonen og ikke til å behandle den

allerede infiserte fisk. For at et antibiotikum skal være egnet til å gis oralt må det kunne absorberes fra tarmen (Samuelsen *et al.*, 2006).

### 1.3.3 Intracellulærhet

En mikroorganisme er patogen hvis den har utviklet egenskaper som gjør det mulig for den å unngå eller å nøytralisere vertens immunforsvar. En strategi er å gjemme seg inne i vertens egne celler. Mikroorganismene blir da intracellulære patogener. For å komme inn i vertscellen må det intracellulære patogenet enten bli tatt opp av en fagocyterende celle eller har evnen til å invadere celler som vanligvis ikke er fagocyterende. For å indusere fagocytose hos normalt ikke-fagocyterende celler blir det brukt bakterielle overflateproteiner til å indusere en actin rearrangering som etterlikner det som skjer i fagocyterende celler. Actin rearrangeringen er en viktig del av det å lage pseudopodformasjoner som kan ta opp bakterien. For intracellulære patogener som blir tatt opp av fagocytter er det nødvendig å overleve fagocytose. Vanligvis når en bakterie blir tatt opp ved fagocytose er den fanget i endocytiske vesikler som heter fagosomer. Etter at bakteriene er tatt opp vil fagosomene fusjonere med lysosomer.

Lysosomer inneholder inaktive antibakterielle proteiner som aktiveres i fagosomets sure miljø. For å overleve må bakterien enten være resistent mot angrepene fra vertscellen, kunne hindre at fagosomet og lysosomet fusjonerer eller den må unnsnippe fagosomet. (Wilson *et al.*, 2011).

*Francisella tularensis* blir i mennesker tatt opp av makrofager via unike og asymmetriske pseudopodløkker. Opptaket er avhengig av komplement faktor D3 og D3-reseptoren. Inne i cellen vil fagosomet med *Francisella* modnes og miljøet i fagosomet vil få en lav pH. Så vil fagosomet sprekke og bakteriene vil gå ut i cytosol hvor de replikerer. Det er usikkert om *F. tularensis* aktivt hemmer fusjon av lysosomene eller om de unnslipper før fusjonen. Mange gener som koder for overlevelse i fagosomer er plassert i *Francisella* pathogenicity island (FPI). Spesielt viktig er genene i intracellulær growth locus *iglA*, *iglB*, *iglC* og *iglD* (Santic *et al.*, 2010). FPI finnes i alle arter av *Francisella*, også i *F. noatunensis* (Soto *et al.*, 2009a).

For *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* er intracellulær lokalisasjon studert i fagocytter. Monocytene og makrofagene ble mest infisert og leukocytene fra nyrene var oftere infisert enn leukocytter fra perifert blod eller milt (Bakkemo *et al.*, 2011; Furevik *et al.*, 2011).



### 1.3.4 utfordringer ved behandling av francisellose

Siden *F. noatunensis* er en fakultativt intracellulær bakterie gjør dette behandling med antibiotika vanskelig. Antibiotikum må virke intracellulært. Dette stiller store krav til legemiddelet. Det må blant annet ha evne til å penetrere og akkumuleres inne i cellen (Sandberg *et al.*, 2009). I tillegg vil *F. noatunensis* ha stor utbredelse i den infiserte fisken og være svært smittsom. Alvorlig syk fisk vil også lide av appetittmangel. Det er derfor lite trolig at antibiotika vil gi en god og varig effekt hos en infisert populasjon. Til tross for dette er det rapportert om vellykkede behandlinger av tilapia og hybrid stripet havabbor med tetrasyklin (Colquhoun *et al.*, 2011). I MIC-studier av *F. noatunensis subsp. noatunensis* har det blitt sett at bakterien er følsom for florfenikol, oksolinsyre, flumequin og rifampicin, og lite følsom ovenfor sulfadiazin/trimetoprim (Isachsen *et al.*, 2012). Florfenikol har vist god effekt mot *F. noatunensis subsp. orientalis* i tilapia når legemiddelet var administrert 1 og 3 dager etter at fisken var blitt utsatt for bakterien. Det var nedsatt mortalitet blant fisken, men florfenikol greide ikke å fjerne den bakterielle infeksjonen. Hos fisk som hadde fått legemiddelet etter 6 dager så man ingen effekt (Soto *et al.*, 2010).

Det finnes for øyeblikket ingen kommersielt tilgjengelige vaksiner mot francisellose hos fisk. Utviklingen av en god nok vaksine mot *F. noatunensis* kan bli utfordrende, da dette har vært tilfelle ved andre intracellulære bakterier som *Renibacterium salmoninarum* and *Piscirickettsia salmonis*. En annen god indikasjon er at det enda ikke finnes en god nok vaksine mot *F. tularensis* for mennesker, til tross for at en på dette feltet har mye kunnskap om interaksjonene mellom patogenen og vertens immunforsvar. Det beste alternativet for å stimulere en beskyttende immunrespons synes å være en levende attenuert vaksine, i stedet for en komponentvaksine (Colquhoun *et al.*, 2011). Det har blitt laget en attenuert stamme av *F. noatunensis subsp. orientalis* hvor *iglC* har blitt mutert som gir økt beskyttelse mot francisellose hos tilapia (Soto *et al.*, 2009a). Dette kan være et viktig grunnlag for videre vaksineutvikling.

## 1.4 Muligheter

### 1.4.1 ClpB

I 2002 ble det identifisert fem forskjellige lokus i *F. novicida* som var viktig for den intracellulære veksten, ved bruk av transposon mutagenese. Et transposon er et stykke DNA som kan forflytte seg inn i kromosomer og når de setter seg inn i et aktiv gen skaper de en mutant. Når de flankerende regionene til transposonet i et av transposonmutantene ble analysert, ble det funnet et gen som kodet for et protein som liknet med 60 % på et stress responsprotein i *E. coli*. Proteinene er en del av et system av ATP-avhengige proteaser og kalles ClpB (caseinolytic protease) (Gray *et al.*, 2002).

Under en infeksjon er patogene bakterier utsatt for skadelige forhold med lav pH, degraderende enzymer og reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser. Økende dokumentasjon tyder på at patogene bakterier danner stress- og varmesjokkproteiner, som f. eks. ClpB, når de skal tilpasse seg det intracellulære miljøet. Det er vist at *Mycobacterium tuberculosis* og *Listeria monocytogenes* har økt ekspresjon av ClpB og andre stress- og varmesjokkproteiner når de befinner seg i musmakrofager. ClpB tilhører hsp100/clp som er en familie av proteiner involvert i kontroll av proteinkvalitet i prokaryote celler. De fleste medlemmene av familien bidrar til nedbrytning av proteiner sammen med en protolytisk subenhet. ClpB er ikke assosiert med en protolytisk subenhet. I stedet samarbeider clpB med DnaK-chaperon systemet om deaggregering og reaktivering av sterkt aggregerte proteiner (Meibom *et al.*, 2008).

ClpB er også en av åtte proteiner som har vist å gi høy spesifikk immungjenkjennelse hos både mus og mennesker. Det er derfor mulig å studere ClpB videre i musmodeller med tanke på å utvikle en human vaksine (Havlasová *et al.*, 2005).

ClpB har vist seg å spille en viktig rolle hos *F. tularensis* i å tolerere cellulært stress, spesielt høye temperaturer. *F. tularensis* er også avhengig av ClpB for å kunne vokse og dele seg i vevet til forskjellige verter *in vitro* og forårsake sykdom hos mus (Meibom *et al.*, 2008). Det har blitt laget eksperimentelle vaksiner av *Francisella* stammene LVS (live vaccine strain) og SchuS4 hvor genet som koder for clpB har blitt fjernet. De muterte stammene har vist seg å være svekket ved intradermal, intraperitoneal og oral administrasjon i mus. Når musene senere ble infisert med villtypen har vaksineringsen gitt dem beskyttelse (Conlan *et al.*, 2010;

Meibom *et al.*, 2008; Twine *et al.*, 2012). I museforsøk har *F. tularensis* LVS $\Delta$ *clpB* blitt fjernet raskere enn LVS, men har likevel induisert en solid IFN- $\gamma$  formidlet immunrespons som ga beskyttelse ved en sekundær infeksjon (Barrigan *et al.*, 2013). IFN-  $\gamma$  stimulerer dannelsen av cytotoksiske T-celler, som dreper celler som signaliserer at de er infisert av virus eller bakterier. Dette viser de ved å presentere fremmede antigen i et MHC-I kompleks på overflaten sin.

## 1.5 Mål for oppgaven

For å studere vert-patogen interaksjonsmekanismer og for videre infeksjonsstudier med *F. noatunensis* er det viktig å vite hvor mange CFU som tilsettes ved infeksjon i både cellekultur og i ulike modellsystem. Et av målene for denne oppgaven er derfor å etablere representativt antall CFU per OD.

Det er også tidligere observert at *F. noatunensis* lett kan aggregere under ulike forhold og det var derfor av interesse å finne ut om dette kunne påvirke antall CFU og om det var mulig å løse dette ved enkle metoder i laboratoriet. Vi velger her å teste sonikering og utvidet antall pipettering som mulig løsninger.

Videre benyttes ulike vekst- og cellemedier og buffret løsninger under infeksjonsstudier. Hvordan påvirker disse vekst og viabilitet hos *F. noatunensis*?

Under kloningsarbeid, ekspresjonsstudier og mutasjonskonstruksjon hos *F. noatunensis* benyttes ulike plasmidvektorer adaptert fra *F. tularensis*-feltet. For enkelte av disse vektorene er ikke fullstendig sekvens kjent noe som kan gjøre dette arbeidet problematisk. Et delmål i denne oppgaven er derfor å sekvensere plasmidene pKK214 og pDMK2.

For visse studier av vaksinekandidat og chaperonet ClpB bør først genetisk verktøy utvikles. Som et ledd i dette arbeidet skal ClpB merkes med en 6xhistidin som igjen skal klones inn i ekspresjonsvektoren pKK289 for senere uttrykk av ClpBHis i Fnn. En Fnn *clpB* mutant er tidligere utviklet og det er ønskelig å konstruere en komplementeringsmutant, og en ClpB overuttrykker i Fnn.

## 2 Materialer

### 2.1 Bakteriestammer

Tabell 2.1

Art	Stamme	Forkortelse	Opprinnelse
<b>F.n. subsp noatunensis</b>	Fn 5330	Fnn	(Mikalsen <i>et al.</i> , 2007)
<b>F.n. orientalis</b>	Fo 5409	Fno	(Mikalsen <i>et al.</i> , 2009)
<b>F.n. noatunensis</b>	NVI 5888	Fn AL	(Mikalsen <i>et al.</i> , 2009)
<b>F.n. noatunensis</b>	Fn5330 $\Delta$ <i>clpB</i>	Fnn $\Delta$ <i>clpB</i>	E. O. Lampe
<b>F.n. noatunensis</b>	Fn5330:pKK289 <i>clpB</i>	Fnn:pKK289 <i>clpB</i>	Dette arbeidet
<b>F.n. noatunensis</b>	Fn5330 $\Delta$ <i>clpB</i> :pKK289 <i>clpB</i>	Fnn $\Delta$ <i>clpB</i> :pKK289 <i>clpB</i>	Dette arbeidet
<b>E. coli</b>	S17.1:pKK214 <i>gfp</i>		
<b>E. coli</b>	HB101:pKK289 <i>gfp</i>		
<b>E. coli</b>	DH5 $\alpha$ pir:pKK289 <i>clpB</i>		
<b>E. coli</b>	S17.1 $\lambda$ pir:pDMK2 <i>iglC</i>		

### 2.2 Vektorer

Tabell 2.2

Navn	Antibiotikaresistens
<b>pKK289</b>	Kanamycin
<b>pKK214</b>	Tetrasyklin
<b>pDMK2</b>	Kanamycin
<b>pCR4</b>	Kanamycin

### 2.3 Antibiotika

Tabell 2.3

Antibiotika	Stamløsning	Løsningsmiddel	Produsent
<b>Kanamycin</b>	50mg/ml	MQ-vann	Sigma-Aldrich
<b>Ampicillin</b>	100mg/ml	MQ-vann	Sigma-Aldrich
<b>Tetrasyklin</b>	12mg/ml	MQ-vann	Sigma-Aldrich

## 2.4 Enzymer

Tabell 2.4

Enzym	Produktnummer	Produsent
Dynazyme II DNA polymerase	F-501L	Thermo scientific
PfuUltra <sup>TM</sup> II Fusion HS DNA Polymerase	600670-51	Agilent
SacI-HF	R156L	BioLabs
NdeI	R011L	BioLabs

## 2.5 Primere

Tabell 2.5

Primer	Sekvens	Produsent
nygroEL F	5'-CATAAGACCAGCGATTGATGC-3'	Invitrogen
nygroEL R	5'-AAAAGATCGTGTGGATGATGC-3'	Invitrogen
indre clpB F	5'-GATCTCGCTCCGGATTATCA-3'	Invitrogen
pKK289km R	5'-CTATCCCATATCACCAGCTCAC-3'	Invitrogen
C1F clpB	5'-GCTAAGCAAGTTAATACTAGCTA-3'	Invitrogen
ytre clpB R	5'-GCTGAAGAAGAGCACCATCC-3'	Invitrogen
M13 F	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'	
M13 R	5'-TCTGTGATCTCTCTGGCTATC-3'	
EOL Fnoa clpB indre F	5'-GATCTCGCTCCGGATTATCA-3'	Invitrogen
EOL Fnoa clpB indre F	5'-GCATTGCATCCTCATCATCA-3'	Invitrogen
sekv ktrl clpB 1 F	GTAGAGGGCTTAGCTCAACG-3'	Invitrogen
gfp F <sup>1</sup>	5'-TTGAAGGTGATGCCCTTGTT-3'	
gfp R <sup>1</sup>	5'-AAAGGGCAGATTGTGTGGAC-3'	
pKK214_F2 sek	5'-CGCCGAAAATGACCCAGA-3'	Invitrogen
pKK214_R2 sek	5'-TAAGCCATTTCGCTCGCC-3'	Invitrogen
pKK214_F3 sek	5'-AGGATGACGATGAGCGCA-3'	Invitrogen
pKK214_R3 sek	5'-CCCAATTCTCCAAGTATCATC-3'	Invitrogen
pDMK2_F1 sek -1	5'-AGGTTTAACGGTTGTGGACA-3'	Invitrogen

<sup>1</sup> (Bakkemo, Mikkelsen et al. 2011)

pDMK2_R1 sek -1	5'-ATTGCTGAAGAGCTTGGCG-3'	Invitrogen
pDMK2_F1 sek -2	5'-ATCAACATCCCCAACCTTATCT-3'	Invitrogen
pDMK2_F1 sek -3	5'-ACCATCTTCCCCAACATATCCT-3'	Invitrogen
pDMK2_R1 sek -1 nr2	5'-GGCCGCTTTTCTGGATTC-3'	Invitrogen
pDMK2_R1 sek -1 nr3	5'-TGGACGAAGAGCATCAGGG-3'	Invitrogen
clpB_tr_HIS_clpB_R(SacI)	5'-CACTGAGAGCTCTTAGTGGTGATGGTGAT GATGTTTAGAAAAACTATATTGTGGTCACT ATCTACATCAACAACACTATTTTATCTTC-3'	Invitrogen
clpB tr F(NdeI)	5'-TCT GCA CAT ATG ATG GAT ATA AAT AAA TTT ACA ATA AAA CTA CAG GAA GCA TTA GCA GA-3'	Invitrogen

## 2.6 Kjemikalier

Tabell 2.6

Kjemikalium	Produktnummer	Produsent
Acetic acid (glacial) 100%	1.00063.1000	Merck
Agar Bacteriological	LP0011	Oxoid
Agarose	A95539-250G	Sigma
Bacto <sup>TM</sup> Eugon Broth	259010	BD
Di-natriumhydrogenfosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.06580.1000	Merck
EDTA (Etylendiamintetraeddiksyre)	431788-100G	Aldrich
Etidiumbromid (EtBr)		
Glukose	1.08342.1000	Merck
Iron(III) chloride hexahydrate	44944-250G	Sigma-Aldrich
HCl		
Kalium-di-hydrogenfosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.04873.0250	Merck
Kaliumklorid (KCl)	1.04936.0250	Merck
L-15	BER-700F	Lonza
Lutperler (NaOH)	6498	Merck
Natriumklorid (NaCl)	1.06404.1000	Merck
Nöt blod i natrumcitratløsning		Håtunalab AB
Tris Base(Trizma® base)	T1503-5KG	Sigma

<b>Tryptone</b>	LP0042	Oxoid
<b>Tørrmelk</b>	0032-17-3	Difco
<b>Yeast Extract</b>	LP0021	Oxoid
<b>6X DNA Loading Dye</b>	# R 0611	Thermo scientific
<b>1 kb DNA ladder molekylvektstandard</b>	# SM 0313	Thermo scientific

## 2.7 Laborarieutstyr

Tabell 2.7.

<b>Utstyr</b>	<b>Modell</b>	<b>Produsent</b>
<b>Autoklav</b>		
<b>Elekroporator</b>	GenePulser <sup>®</sup> II	BioRad
<b>Elektroforesekar, liten</b>	Easy-Cast <sup>™</sup> Model #B1	
<b>Elektroforesekar, stor</b>	Easy-Cast <sup>™</sup> Model #B2	
<b>Erlenmeyerkolber div. størrelser</b>		
<b>Gel Doc</b>	Gel Doc 1000	Bio Rad
<b>Inkubator med orbital risting (20 °C)</b>	Innova 4230	New Brunswick Scientific
<b>Inkubator med orbital risting (37 °C)</b>	Innova 4200	New Brunswick Scientific
<b>Makropipette</b>		Brand <sup>®</sup>
<b>Mikrobølgeovn</b>	M401	Whirlpool
<b>PCR-maskin</b>	GeneAmp PCRsystem 2700	Applied Biosystems
<b>PCR-maskin</b>	PXE 0.2 Thermal Cycler	Thermo
<b>Pipette (0,5 – 10µl)</b>		Eppendorf
<b>Pipette (10 – 100µl)</b>		Thermo scientific

<b>Pipette (100 – 1000µl)</b>		Thermo scientific
<b>Sentrifuge (10 000 rpm)</b>	Spectrafuge 7M	Labnet
<b>Sentrifuge (15 000 rpm)</b>	Mikro 200R	Hettich zentrifugen
<b>Sentrifuge (4 500 rpm)</b>	Rotina 420R	Hettich zentrifugen
<b>Sentrifuge (25 000 rpm)</b>	Avanti™ J-25	Beckman
<b>Spektrofotometer</b>	Bio Photometer	Eppendorf
<b>Ultralydbad</b>	Sonorex RK100	Bandelin
<b>Vekt</b>	HF-200G	AND
<b>Vortex</b>	MS 3 basic	IKA

## 2.8 Diverse engangsutstyr

Tabell 2.8.

<b>Utstyr</b>	<b>Produsent</b>
<b>Elektroporeringskyvetter</b>	
<b>Engangskyvetter (1,5 ml)</b>	Brand®
<b>Eppendorfrør</b>	Eppendorf
<b>Petriskåler</b>	
<b>Pipetter 1, 2, 5 , 10 og 25ml</b>	Corning®
<b>Pipettespisser</b>	
<b>Podeøse 1µl og 10µl</b>	Nunc™
<b>Sentrifugerør 15 og 50ml</b>	Corning®
<b>96-brønners mikrotiterplate</b>	Nunc™

Tabell . Oversikt over diverse engangsutstyr benyttet i arbeidet.





## LB(Luria Bertani)-medie/agar 1L

Trypton	10	g
Gjærekstrakt	5	g
Natriumklorid (NaCl)	10	g
Evt. Bactoagar	12,5	g

MQ-vann ad1000 ml

Autoklaveres

Oppbevares uåpnet ved 4 °C

## 2.12 Buffere og løsninger

### PBS (Phosphate Buffered Saline)

Natriumklorid (NaCl)	8	g
Kaliumklorid (KCl)	0,2	g
Di-natriumhydrogenfosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,44	g
Kalium-di-hydrogenfosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,14	g
Løses i MQ-vann	800	ml
Juster volum med MQ-vann	Ad 1000	ml
Juster pH med hydroklorid (HCl) til	7,4	
Autoklaves		

### 50xTAE Tris/Acetat-buffer

Tris Base	242	g
Iseddiksyre	57,1	ml
0,5M EDTA pH 8	100	ml
Destillert vann	Ad 1000	ml

### **0,5M EDTA pH 8,0**

EDTA	186,1	g
Destillert vann	800	ml
NaOH lutperler til pH 8 ca:	21	g
Juster volum med destillert vann	Ad 1000	ml

Autoklaveres

### **Glukose**

Glukose	90	g
Løses i MQ-vann	ad 1000	ml

# 3 Metoder

## 3.1 Lagring og kultivering

### 3.1.1 Langtidslagring av bakterier

#### ***Francisella noatunensis***

Til langtidslagring ble det laget frysestocker. Løsning besto av 900µl Eugon Broth og 200µl 95 % glyserol hvor det så ble tilsatt en full 10 µl podeøse med bakterier fra en ECA-skål. Bakteriene ble frosset ned og lagret ved -80 °C.

For raskere tilgang på bakterier ble det også laget tørrmelksampuller. En full podeøse med bakterier fra skål ble suspendert i 800µl 10 % tørrmelk. Suspensjonen ble fordelt på 15 til 16 ampuller med 50µl i hver. Bakteriene ble frosset ned og lagret ved -80 °C.

#### ***Escherichia coli***

Frysestocker besto av 1ml overnattskultur tilsatt 250µl 87 % glyserol. Bakteriene ble frosset ned og lagret ved -80 °C

### 3.1.2 Kultivering av bakterier

#### ***Francisella noatunensis* subsp.**

*F. noatunensis* stammene ble dyrket opp på ECA-skåler i inkubator på 20 °C. Det var store variasjon hvor lang tid det tok for bakteriene å vokse opp. Alt fra 2 dager til en uke. Den store forskjellen skyldes de forskjellige stammenes egenskaper og om bakteriene er sådd ut fra glyserolstock eller tørrmelksampull. I tillegg kan skålenes alder påvirke veksten.

Når bakteriene ble dyrket i flytende kultur ble det brukt Eugon Broth tilsatt 2mM FeCl<sub>3</sub>. Kulturene ble dyrket i erlenmeyerkolber, hvor toppen var dekket til med aluminiumsfolie, ved 20 °C og 100 rpm i Innova 4230.

## ***Escherichia coli***

*E. coli* ble dyrket opp på LA-skåler over natt i 37 °C eller over helgen i romtemperatur. Ved behov for flytende kulturer ble det brukt LB-medie. Kulturene ble satt i 37 °C og 220 rpm over natten.

## **Antibiotika**

For noen stammer var det behov for antibiotika i mediet. Dette var for seleksjon av bakterier som inneholdt plasmid med ulike antibiotikaresistens markører. Se tabell 3.1 for oversikt over hvilke antibiotika og hvilke konsentrasjoner som ble brukt.

Tabell 3.1

<b>Art og Stamme</b>	<b>Medie</b>	<b>Antibiotika</b>	<b>Konsentrasjon</b>
<b><i>F.n. noatunensis</i></b>			
<b>Fn5330:pkk289clpB</b>	ECA og Eugon b.	Kanamycin	15 µl/ml
<b>Fn5330ΔclpB:pkk289clpB</b>	ECA og Eugon b.	Kanamycin	15 µl/ml
<b><i>E. coli</i></b>			
<b>S17.1:pKK214gfp</b>	LA og LB	Tetrasyklin	12 µl/ml
<b>HB101:pKK289gfp</b>	LA og LB	Kanamycin	50 µl/ml
<b>DH5αλpir:pKK289clpB</b>	LA og LB	Kanamycin	50 µl/ml
<b>S17.1λpir:pDMK2iglC</b>	LA og LB	Kanamycin	50 µl/ml

## **3.2 CFU-telling av *Fnn*, *Fno* Og *Fn AL***

### **3.2.1 Vekst av *Fnn*, *Fno* og *Fn AL* med Ampicillin**

For å måle veksten til de tre isolatene av *Francisella noatunensis* ble det brukt optisk tetthet (optical density(OD)) og CFU-telling. Veksten ble målt med og uten 49 µl ml<sup>-1</sup> ampicillin tilsatt i kulturen.

## **OD**

Etterhvert som en bakteriekultur vokser øker turbiditeten. Turbiditet kan måles i som optisk tetthet (optical density), som forkortes til OD. OD måles med et spektrofotometer og dette gjøres ved at man sender lys med en bestemt bølgelengde gjennom en løsning og OD

beregnes ut fra differansen mellom mengden lys som blir sendt inn og hvor mye som kommer igjennom. Dette skjer fordi cellene sprer lyset som går gjennom løsningen. Jo flere bakterier i løsningen, jo mer spres lyset. Dette kan brukes til å måle veksten til bakteriekultur. Vanlige bølgelengder for å måle bakterie konsentrasjon er 480, 540, 600 og 660nm. De korteste bølgelengdene er de mest sensitive, mens de lengste er mer nøyaktige. I forsøkene gjort i denne oppgaven har 600nm blitt brukt. Fra en klar løsning og opp til en viss tetthet vil turbiditeten og antall celler være proporsjonale. Ved høye konsentrasjoner vil lyset kunne treffe flere celler og brytes gjentatte ganger slik at spektrofotometerets fotocelle registrer dette som ubrutt lys og OD blir unøyaktig. (Michael T. Madigan, 2008)

### Protokoll vekstkulturer

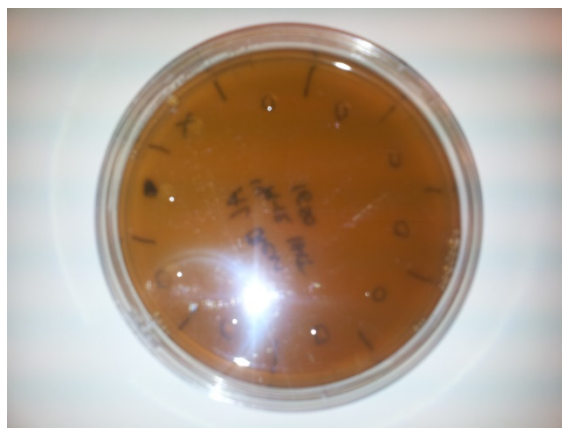
1. Startkulturer på 13ml ble inkubert ved 20 °C og 100rpm i ca. et døgn.
2. To vekstkulturer blir laget av 50ml Eugon Broth med 2mM FeCl<sub>3</sub> og 1ml startkultur.
3. Den ene av vekstkulturene ble tilsatt 25µl 100mg/ml Ampicillin.
4. Kulturene ble inkubert ved 20 °C og 100rpm.
5. OD 600nm ble målt tre ganger i løpet av dagen fra 5-8 dager avhengig av *F. noatunensis* subsp.

### CFU

CFU står for colony-forming unit og brukes til å estimere hvor mange levedyktige bakterier- eller soppceller som finnes i en prøve. De levedyktige cellene kan dele seg og danne flere celler. Ved utstryking på en agarplate med egnet vekstmedie vil de kunne vokse til kolonier som kan sees med det blotte øye. Det er da mulig å finne antall levedyktige bakterier som finnes i den opprinnelige kulturen. For at en skal kunne telle et representativt antall CFU er det viktig at det ikke er for få eller for mange kolonier. Det anbefalte antallet per agarplate er mellom 30 og 300 kolonier. Er det for få kan tallene være unøyaktig og er det for mange kan koloniene vokse i hverandre. For å sikre seg mot dette lages det en rekke fortyninger hvor løsningen blir fortynt dekadisk ned til et tellbart antall kolonier på agarskålen. I denne oppgaven har alle fortyningene blitt satt av på samme skål ved å dryppe dråper på 10 µl av hver fortykning. Skålene settes til optimal veksttemperatur og telles når koloniene har vokst opp.

## Protokoll CFU

1. Vekstkulturene ble fortynnet dekadisk 8 ganger med Eugon Broth
2. 10 $\mu$ l av referanseløsning (Eugon broth med 2 mM FeCl<sub>3</sub>), 10 $\mu$ l av ufortynnet kultur og 10 $\mu$ l av alle fortynningene ble avsatt på en ECA-skål. Fordelingen av dråpene kan sees i figur 3.1.
3. Skålene ble inkubert ved 20 °C og avlest etter 1 til 4 uker.



Figur 3.1: Fordeling av dråper ved utplating

### 3.2.2 Effekten av ultralydbad på CFU

Det ble gjort undersøkelser på tre forskjellige stammer, *Fnn*, *Fno* og *Fn AL*, som hver ble sonikert i et ultralydbad i 5, 10, 15 og 30 min. Hver stamme ble dyrket opp på skål. Det ble laget en startkultur på 13 ml. Kulturene ble inkubert i 20 °C i 1-2 dager. OD<sub>600</sub> ble justert til 1 før sonikering. To ml kultur ble overført til 15mls rør. Etter at rørene ble utsatt for hhv 5, 10, 15 og 30min sonikering ble det straks laget fortynningsrekke før utplating (se protokoll CFU under 3.2.1.) av prøvene og en referansekultur som ikke hadde blitt sonikert.

### 3.2.3 Effekten av antall pipetteringer på CFU

Overnattskulturer av *Fnn*, *Fno* og *Fn AL* ble fortynnet ved en dekadisk fortynningsrekke ned til 10<sup>-8</sup> (se protokoll CFU under 3.2.1.). Hver fortynnet bakteriekultur i fortynningsrekkene ble blandet henholdsvis 7 og 20 ganger før 10  $\mu$ l kultur ble avsatt på ECA plater og inkubert ved 20 °C til tydelig kolonidannelse på platene. Forsøket ble gjentatt fire ganger med to paralleller

### 3.2.4 Effekten av fortynningsmedie på CFU

Overnattskulturer av *Fnn*, *Fno* og *Fn AL* ble fortynnet til OD<sub>600</sub> = 1.0 (se protokoll for CFU under 3.2.1.). Videre ble kulturene fortynnet i tre forskjellige medier, henholdsvis Eugon

Broth, L-15 og PBS med to paralleller for hver stamme, før 10 ul kultur ble avsatt på ECA plater og inkubert ved 20 C til tydelig kolonidannelse på platene.

### 3.3 Plasmidisolering fra *E. coli*

Plasmidene pKK289*gfp*, pKK289*clpB*, pKK214*gfp*, pDMK2*iglC* og pCR4*clpBhis* ble rensset fra *E. coli* med E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit I (Protokoll se vedlegg 1). For pKK289 plasmid derivatene ble protokoll for lavkopi-plasmider brukt i henhold til produsentens anvisninger. For de resterende plasmidene ble standard «spin»-protokoll brukt.

Konsentrasjonen ble etterpå målt med Picodrop og visualiser på en 1 % agarosegel.

### 3.4 Polymerase kjede reaksjon (PCR)

Polymerase kjede reaksjon (engelsk; polymerase chain reaction forkortet til PCR) er en metode for å kopiere opp et stort antall av en bestemt DNA-sekvens. Avhengig av polymerasen er lengden til den oppamplifiserte DNA-sekvensen som regel begrenset til noen tusen basepar. Til arbeid hvor det bare kreves kortere DNA sekvenser er dette en verdifull metode. PCR er en sensitiv metode som ikke krever høye konsentrasjoner DNA som utgangspunkt, og kan i løpet av få timer gi milliarder av nye kopier. Målsekvensen som blir kopiert opp og kan for eksempel være et gen en ønsker å undersøke. Målsekvensen blir kopiert fra et større DNA-molekyl, kalt templat (Michael T. Madigan, 2008).

De nye DNA trådene blir bygget opp av nukleotidene, ATP, TTP, GTP og CTP, ved hjelp av en DNA polymerase. DNA polymerase er et enzym og en naturlig katalysator som legger til nukleotider til enket trådet DNA. For at polymerasen skal virke trenger den en allerede eksisterende tråd som den kan bygge på. Derfor blir det tilsatt primere for å indusere DNA syntesen. Primere er korte DNA sekvenser som er komplementære til flankene til målsekvensen. I hver PCR-reaksjon trengs det to primere, en til hver flanke. Det tilsettes også en polymerase-spesifikk buffer for å gi optimal aktivitet og stabilitet for polymerasen.

PCR-syklusen består av tre trinn. Først denatureres dobbeltrådet DNA ved å øke temperaturen til 94-96 °C slik at det dannes enkeltrådet DNA. Deretter senkes temperaturen slik at de to primerne hybridiserer til templatet. En primer vil legge seg inntil hver komplementære enkeltråd. Den optimale temperaturen til dette trinnet blir valgt på bakgrunn av primernes smeltetemperatur. Temperaturen som ble brukt i dette arbeidet var 55 °C. I siste



trinn økes temperaturen til 72 °C, hvor polymerasen har høy og effektiv aktivitet. Polymerasen vil kopiere målsekvensen ved å forlenge primerne fra 3'enden. Hvor lang tid polymerasen trenger på å lage den nye sekvensen kommer an på hvor raskt polymerasen arbeider og lengde på målsekvensen.(Kolmodin *et al.*, 2002)

Etter hver syklus har antall sekvenser doblet seg. De nye sekvensene vil bli tatt i bruk som templat i neste syklus. Dette vil gi en eksponentiell økning i antall oppkopierte DNA-tråder. Vanligvis kjøres 25-30 sykluser etter hverandre for å få nok DNA amplifisert (Michael T. Madigan, 2008).

### **3.4.1 Screening av Fnn:pKK289clpB og FnnΔclpB:pKK289clpB**

Ved etablering av nye bakteriestammer og derivater av disse må verifiseres. Dette kan gjøres ved å screene transformantene for både stammen/derivatet og plasmidet i en PCR-syklus. Transformantene blir derfor testet med to sett primere hver. Det ene primerparet er spesifikt for Fnn (nygroEL F og nygroEL R), ClfclpB og Ytre clpB R er spesifikk for clpB delasjonsmutasjonen og primerpar Pkk289km R og indre clpB F er spesifikt for pKK289clpB. Til screening ble polymerasen Dynazyme II brukt.

Dynazyme II DNA polymerase er isolert fra en *E. coli* stamme som inneholder et plasmid som koder for Dynazyme II DNA polymerasegenet. Genet kommer opprinnelig fra den Gramnegative bakterien *Thermus brockianus*. *Thermus brockianus* er en termofil bakterie, og derfor tåler Dynazyme II de høye temperaturene i PCR-prosedyren. Dynazyme II DNA polymerase har 5'→3' DNA polymeraseaktivitet og 5'→3' eksonukleaseaktivitet. Den egner seg godt til screening siden den er rask, stabil og billig. Arbeidshastigheten til Dynazyme II polymerase er 40 sekunder per kilobase, og den har en halveringstid på 2 og en halv time ved 96°C(Thermo-Scientific, 2011).

For å hindre DNA polymerase og 3'-5' eksonuklease aktivitet før PCR-syklusene lages reaksjonsblandingen på is.

Reaksjonsblanding				Tid	Temperatur	
for Dynazyme						
10xbuffer	2,5µl			5min	95°C	
10mM dNTP	0,5µl	Denaturering	30sek	95°C	} 30	
F primer	0,625µl	Hybridisering	30sek	55°C		
R primer	0,625µl	Forlengelse	4 min 30sek	72°C		
MQ-vann	20µl			7min	72°C	
Polymerase	0,25µl			∞	4°C	
DNA/bakterier	1µl					
Totalvolum	25µl					

Tab. 3.2. Oppsett av reaksjonsblandingen og PCR-program for screening av Fnn:pkk289clpB og FnnΔclpB:pkk289clpB.

### 3.4.2 Kloning av *clpB* med Histag

Til kloningsarbeid er PfuUltra<sup>TM</sup> II Fusion HS DNA Polymerase brukt. Polymerasen har en lav feilinnkorporeringsrate, og den er i tillegg svært rask og kan generere lange templatere. PfuUltra<sup>TM</sup> II Fusion HS DNA Polymerase er en modifisert versjon av Pfu DNA polymerasen som ble isolert fra den hypertermofile arkebakterien, *Pyrococcus furiosus* (Pfu)(Lundberg *et al.*, 1991). Et dsDNA-bindingsprotein har blitt fusjonert med polymerasen for å øke affiniteten til templatet, dette forhindrer polymerasen fra for tidlig dissosiasjon. Den økte affiniteten vil øke antall inkorporerte nukleotider per bindingshendelse. Polymerasen har stor nøyaktighet og feilinnkorporeringsraten er 1 av 2,5 millioner som er 20 ganger lavere enn Taq DNA Polymerase. Polymerasens arbeidshastighet er på 15 sekunder per kilobase(Agilent, 2012b). For å hindre DNA polymerase og 3'-5' eksonuklease aktivitet før PCR-syklusene har startet er det tilsatt monoklonale antistoffer. Antistoffene vil binde polymerasen, og de vil først slippe tak når PCR syklusene har startet og den høye temperaturen har inaktivert dem. I løpet av en PCR prosess vil nukleotiden dUTP akkumuleres. dUTP dannes ved at en aminogruppe fjernes fra dCTP. Polymerasen vil bli hemmet hvis den prøver å inkorporere dUTP, for å løse dette har produsentene tilsatt en dUTPase. dUTPase heter ArchaeMaxx og kløyver dUTP til dUMP, som ikke på virker polymerasen(Agilent, 2012a). Tilsetningen av ArchaeMaxx senker forlengelsetiden, gir høyere utbytte og gjør det mulig å oppamplifisere sekvenser på opptil 19 kilobaser.

<b>Reaksjonsblanding</b>			
<b>for pfu ultra II HS</b>		Tid	Temperatur
<b>10xbuffer</b>	5µl	2min	95°C
<b>10mM dNTP</b>	0,8µl	Denaturering	30sek 95°C
<b>F primer</b>	0,5µl	Hybridisering	30sek 55°C
<b>R primer</b>	0,5µl	Forlengelse	3min 72°C
<b>MQ-vann</b>	40,4µl		10min 72°C
<b>Polymerase</b>	1µl		∞ 4°C
<b>Genomisk DNA, Fnn</b>	1,8µl		
<b>Totalvolum</b>	50µl		

} 20

Tab. 3.3. Oppsett av reaksjonsblandingen og PCR-program for Kloning av *clpBHis*- konstrukt

### 3.5 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese blir brukt til å verifisere tilstedeværelsen av DNA og til å bestemme DNA fragmentenes lengde og konsentrasjon. Gelelektroforese kan separere ladete molekyler mens de migrerer i et ladet felt. Migreringshastigheten blir bestemt av molekylets ladning, størrelse og form. Gelen blir laget av agarose som har blitt løst i en buffer under oppvarming. Når gelen stivner vil agarosen, som er et polysakkarid, danne et porennettverk. Nettverket gjør at små DNA-fragmenter beveger seg raskere enn store og lange fragmenter. Ved å endre konsentrasjonen av agarose endrer en også tettheten til nettverket. En velger derfor en konsentrasjon som passer til hvilke fragmenter en skal separere og verifisere. I dette arbeidet ble det brukt agarosegel med en konsentrasjon på 1 %. Når en elektrisk spenning ble satt over en gel, som er tilsatt DNA, vil fragmentene migrere gjennom gelen mot den positive elektroden. Dette er fordi DNA inneholder fosfatgrupper som er negativt ladet ved nøytral pH. For å kunne se båndene med DNA tilsettes etidiumbromid (EtBr) til gelen. EtBr er en interkalerende forbindelse som gjør at den vil legge seg mellom baseparene i DNA. EtBr er også fluoriserende og lyser ekstra sterkt i det hydrofobe miljøet inne i DNA og når gelen blir bestrålt med UV-lys vil DNA-båndene lyse opp (Michael T. Madigan, 2008).

For å kunne si noe om størrelsen på fragmentene må en sammenlikne med en standard. I dette arbeidet har molekylvektsmarkøren GeneRuler 1 kb DNA Ladder fra Thermo scientific blitt brukt. Molekylvektsmarkøren går fra 250 til 10 000 basepar.

Når det bare var noen få prøver som skulle undersøkes på gel ble det laget en middels stor gel på 9x11 cm med 14 brønner. I tilfeller hvor mange prøver skulle kjøres på gel ble en ekstra stor agarosegel på 12x14 cm med 20 brønner laget.

### **Protokoll**

1. 0,75g agarose ble tilsatt 75ml 1xTAE-buffer, som ble kokt i mikrobølgeovn til en homogen løsning
2. Løsningen ble avkjølt til ca. 60 °C før EtBr ble tilsatt. Det ble tilsatt 7,5 µl 1mg/ml EtBr.
3. Løsningen ble helt over i en støpeform med brønnekam, og eventuelle bobler ble fjernet.
4. Etter at gelen hadde stivnet ble brønnekammen fjernet og gelen plassert i et elektroforesekar med 1xTAE-buffer.
5. 5µl 1kb molekylvektsmarkør ble satt av i første brønn. Deretter ble prøvene, som var tilsatt 1 µl markørfarge, satt av i de neste brønnene.
6. Gelen ble kjørt på 90 volt. Og etter at de minste båndene i molekylvektsmarkøren hadde vandret 2/3 av gelens lengde ble gelen tatt ut og fotografert i et BioRads Multi-Analyst.

## **3.6 Måling av DNA-konsentrasjon**

I forbindelse med at isolerte plasmider og PCR produkter skal brukes videre til forsøk kan det være viktig å vite DNA-konsentrasjonen. I dette arbeidet har Picodrop blitt brukt. Dette er et spektrofotometer som er spesielt egnet til å måle DNA-, RNA- og proteinkonsentrasjoner. Prøvevolumet er bare 2µl og programvaren regner selv ut konsentrasjonen i ng/µl og viser

absorpsjonsdifferansen ved 260 og 280 nm. Absorpsjonsdifferansen viser renheten til plasmidrepet og for DNA bør 260/280 ligge rundt 1,8.

### **3.7 Transformering av *F. noatunensis* ssp. *Noatunensis***

For at transformasjon skal være mulig må bakteriecellene som benyttes være kompetente. Hvis ikke de er naturlig kompetente, må dette induseres. Det finnes to alternativer, og hvilken som velges kommer an på hva som egner seg for den aktuelle bakterien. Ved kjemisk induert kompetanse blir bakteriene behandlet med iskald saltløsning som inneholder kalsiumklorid for deretter å bli varmet opp i en kort stund. Den metoden som har vist seg egnet for *F. noatunensis* er elektroporering (Maier *et al.*, 2004). Bakteriecellene blir gjort kompetente ved at de utsettes for en elektrisk puls med høy spenning (Michael T. Madigan, 2008).

Når pKK289*clpB* blir transformert inn i *F. noatunensis*, vil bakteriene bli kanamycinresistente, siden plasmidet pKK289 inneholder et kanamycinresistengen. Ved optimal antibiotikaseleksjon vil bakteriene som vokser opp være positive transformanter. Det kan likevel ikke utelukkes at visse bakterier kan utvikle spontan resistens eller at platen inneholder utilstrekkelig seleksjon, slik at det er viktig å ha en negativ kontroll for å adressere dette. Den negative kontrollen består av elektrokompetente bakterieceller som ikke får tilsatt plasmid. For å kontrollere at cellene er gjort kompetente og at elektroporeringen fungerer, gjennomføres også en positiv kontroll med et plasmid som tidligere har gitt vellykkede transformanter. Her har plasmidet pKK289tdtomato blitt brukt

#### **Protokoll for etablering av elektrokompetente *F. noatunensis* bakterieceller**

1. Fnn og *clpB*-delesjonsmutanten ble kultivert i to dager i hver sin kultur på 10ml Eugon Broth med 2mM FeCl<sub>3</sub>.
2. Kulturene ble fortynnet etter to dager til OD ble 0,2 i 50ml flytende Eugon medie,
3. Dagen etter ble kulturene høstet ved å sentrifugere ved 7500 x g i 10min. Supernatanten ble fjernet.

Videre gjennomføres på is:

4. Pelletene resuspendert i 30ml 0,5M sukrose og sentrifugert med 22 500xg i 20 min. Supernatanten ble fjernet.
5. Pelletene resuspendert i 15ml 0,5M sukrose og sentrifugert med 22 500xg i 20 min.
6. Supernatanten ble fjernet til det var ca. 1ml igjen av sukrosen og pelleten ble resuspendert i restvolumet

### **Protokoll for elektroporering**

1. 1µg av plasmid blandes med 200µl elektrokompetente celler. Løsningen inkubert i 10 min på is.
2. Løsningen blir overført forsiktig til en 2mm elektroporeringskyvette. Unngå luftbobler i løsningen.
3. Innstillingene for elektroporeringen var 2,5kV, 25µF og 600Ω.
4. Straks etter elektroporeringen ble cellene resuspendert i 900µl Eugon Broth med 2mM FeCl<sub>3</sub>. Det ble overført til et eppendorfrør og satt i en risteinkubator på 20 °C og 100rpm i 4 timer.
5. For å sikre enkeltkolonier ble det laget fortynningsrekker til 10<sup>-4</sup>.
6. 100µl av de forskjellige fortyningene ble støket ut på ECA skåler med 15µg/ml kanamycin.
7. Kolonier ble plukket og strøket ut på nye plater. De ble samtidig testet for at det var riktig bakterie med riktig plasmid ved å utføre kontroll-PCR. (Se avsnitt 3.6.1.)
8. PCR-produktene ble kjørt på gel. Ut ifra lengden på PCR-produktene ble det avgjort om transformasjonen var vellykket.
9. To transformanter av Fnn og Fnn delesjonsmutant ble valgt ut. Bakteriene ble strøket ut på en hel skål og ble så frosset ned som glyserolstockløsning og i tørrmelksampuller.

## 3.8 Veksthastighetsbestemmelse av Fnn og Fnn mutanter.

### For veksthastighetsbestemmelser av villtype Fnn og dens derivater ble følgende prosedyre fulgt:

1. Fnn og Fnn derivater ble sådd ut fra tørrmelksampulle på ECA-skåler 2-3 dager før forsøket og inkubert ved 20 C.
2. 13ml startkultur ble satt i inkubator på 20 °C og 100rpm i ca. et døgn.

For startkulturene hvor bakteriene inneholdt plasmid ble det tilsatt kanamycin til konsentrasjonen 15µl/ml.

3. Vekstkulturene var på totalt 50 ml Eugon Broth tilsatt 2mM FeCl<sub>3</sub> og eventuelt kanamycin(15µl/ml). Vekstkulturene ble tilsatt startkulturer slik OD = 0,02 og inkubert i 20 °C ved 100rpm.
4. OD ble målt to ganger daglig i 7 til 8 dager(se avsnitt 3.2.1.).

## 3.9 TOPO kloning

### 3.9.1 TOPO® TA Cloning® Kit

TOPO TA Cloning Kit ble brukt til å ligere inn PCR-produkter (se avsnitt 3.4.2) i pCR®4 vektor. TOPO pCR4 blir brukt som et mellomtrinn i kloningen av pKK289*clpB*His. Metoden er rask og enkel å utføre.





<b>Ligeringsmiks</b>	
Saltløsning	1µl
PCR-produkt	4µl
pCR®4	1µl
<b>Totalt</b>	<b>6µl</b>

Tabell 3.4: Ligeringsmiks for TOPO-kloning.

Ligeringsmiksen ble inkubert i 30 minutter ved romtemperatur. Transformasjonen av *E. coli* celler ble gjort umiddelbart etterpå.

### 3.9.2 Transformasjon av *E. coli* DH5αpir

I dette arbeidet har kjemisk kompetente DH5αpir-celler blitt brukt til TOPO kloning. DH5αpir-cellene var blitt gjort kompetente med Rubidiumklorid metoden. Her er cellene blitt vasket i en iskald løsning som inneholdt kalsiumklorid, kaliumacetat, rubidiumklorid, manganklorid og glyserol. (utført av E. O. Lampe).

#### Protokoll

1. Ampuller med kjemisk kompetente DH5αpir-cellene ble tatt opp av fryseren (-80 °C) og cellene tint på is.
2. 3µl ligeringsmiks (fra 3.7.2.) og 50µl celler ble overført til et eppendorfrør og rørt sammen med en pipettespiss.
3. Parallelt lages en positiv og en negativ kontroll. Positiv kontroll ble tilsatt 0,5µl pKK289:*gfp*. Den negative kontrollen inneholder bare kjemisk kompetente *E. coli* celler.
4. Rørene ble inkubert på is i 10 min.
5. Rørene ble inkubert i varmeblokk (42 °C) i 45-50 sek. Deretter ble rørene umiddelbart overført til is i 2 min.
6. Rørene ble tilsatt 900µl Eugon broth med 2mM FeCl<sub>3</sub>, og ble inkubert i 37 °C med 220 rpm i 1 time.
7. 100µl fra hvert rør ble strøket ut på LA-skåler som inneholder 50µg/ml kanamycin.

8. Det resterende innholdet i rørene ble sentrifugert ned på 4000 rpm i 2 min. supernatanten ble sugd av til det bare er 100µl igjen. Pelleten ble resuspendert og strøket ut på LA-skåler med 50µg/ml kanamycin.
9. Skålene ble inkubert i 37 °C over natten.

### 3.9.3 Verifisering av *E. coli* DH5αλpir:pCR4clpBHis

Kolonier ble plukket fra primær transformasjonskål og strøket over på en ny samleskål med kanamycin. Plasmid ble isolert fra *E. coli* transformantene ble undersøkt ved klonanalyse (avsnitt 3.9.3). Transformantene med riktig størrelse på innskudd ble så sekvensert (avsnitt 3.10). Frysestocker ble laget av transformantene med rett innskudd.

### 3.9.4 Klonanalyse

Restriksjonszymer gjenkjenner spesifikke basesekvenser, kalt restriksjonsseter i DNA og når de kjenner igjen setet kan de kutte dobbeltrådet DNA. I prokaryoter fungerer restriksjonsenzymene som et forsvar mot fremmed DNA som virus. Restriksjonszymer er delt inn i tre forskjellige klasser. Type I og III kutter ikke i restriksjonssete, derfor er det oftest type II som benyttes ved DNA manipulering. Type II restriksjonszymer gjenkjenner som regel 4 til 8 basepar palindrome sekvenser (like når trådene leses fra 5'-3'). Noen restriksjonszymer som for eksempel SacI trenger bovint serum albumin (BSA) i kuttemiksen for å holde seg stabil.

Det ble laget to mikser for hvert plasmidprep, en med og en uten restriksjonsenzym.

<b>Kuttemiks med</b>		<b>Kuttemiks uten</b>	
<b>Restriksjonsenzym</b>		<b>Restriksjonsenzym</b>	
<b>10xBSA</b>	2 $\mu$ l	<b>10xBSA</b>	2 $\mu$ l
<b>10xNEbuffer 4</b>	2 $\mu$ l	<b>10xNEbuffer 4</b>	2 $\mu$ l
<b>PlasmidPrep</b>	1 $\mu$ g	<b>PlasmidPrep</b>	1 $\mu$ g
<b>MQ-vann</b>	Ad 20 $\mu$ l	<b>MQ-vann</b>	Ad 20 $\mu$ l
<b>Restriksjonsenzym,</b>			
SacI-HF	0,5 $\mu$ l		
<b>Restriksjonsenzym,</b>			
NdeI	0,5 $\mu$ l		

Tabell 3.5: Viser kuttemikser med og uten restriksjonsenzym.

Kuttemiksen ble inkubert i 1 time ved 37 °C, som er optimaltemperaturen for restriksjonsenzymene som ble brukt i arbeidet. Kuttemiksene ble separert på agarosegel og vektorene ble undersøkt om de hadde innskudd av DNA med forventet størrelse.

For videre analyse og bruk ble eventuelle innskudd kuttet ut av gelen, renset med EZNA gelrensekit «Spin Protocol» (se vedlegg 2) og igjen undersøkt på agarosegel.

## 3.10 Sekvensering

Selve sekvenseringen ble gjort på ABI-laben på Institutt for Biovitenskap av de ansatte der. Analyse av sekvensene ble utført med programmet CLC Main Workbench. ABI-lab har to Applied Biosystems 3730 DNA analyzers til rådighet. Metoden som blir brukt er Sanger sekvensering. Til metoden trengs det et DNA-templat, en primer, en polymerase, de fire forskjellige dNTPene, fire ddNTP som er merket med fluorescens i hver sin farge og en buffer. Alt bortsett fra templat og primer blir tilsatt på ABI-laben ved å bruke BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

Først kjøres det en PCR reaksjon, men siden det bare er en primer tilstede blir bare en av trådene i DNAet kopiert. Polymerasen vil forlenge primeren helt til den stopper opp fordi den tilfeldigvis har inkorporert et ddNTP istedet for et dNTP. ddNTP er anderledes fra dNTP ved at den mangler en 3'-hydroksylgruppe. Denne hydroksylgruppen brukes til å lage et

fosfodiesterbånd som er nødvendig for å binde nukleotidene sammen. ddNTP er tillsatt i mye lavere konsentrasjoner enn dNTP, dette gjør at DNATrådene kan bli så lange som 950 basepar før et ddNTP blir innkorporert (Chan, 2005). Etter at det har blitt kjørt mellom 25 til 40 sykluser (alt etter hvor langt templatet er), vil det ha blitt dannet veldig mange DNA tråder i forskjellige størrelser. PCR produktet renses for det som er overflødig av primere, dNTP, ddNTP og salter og er så klar for å bli sekvensert i ABI 3730. PCR-produktet separeres ved å bruke kapillær elektroforese. De negativt ladete molekylene vil migrere mot anoden etter størrelse, og de minste vil migrere raskest. Etterhvert som molekylene kommer igjennom kapillæren vil de bli utsatt for en lyskilde, da vil den fluoruserende ddNTP nukleotiden sende ut et signal som blir registret. Resultatet er et kromatogram i fire forskjellige farger.

### **Protokoll**

Følgene ble blandet sammen og sendt til ABI-lab:

<b>Plasmid (30ng/μl)</b>	<b>8μl</b>
<b>Primer (5μM)</b>	<b>2μl</b>

## 4 Resultater

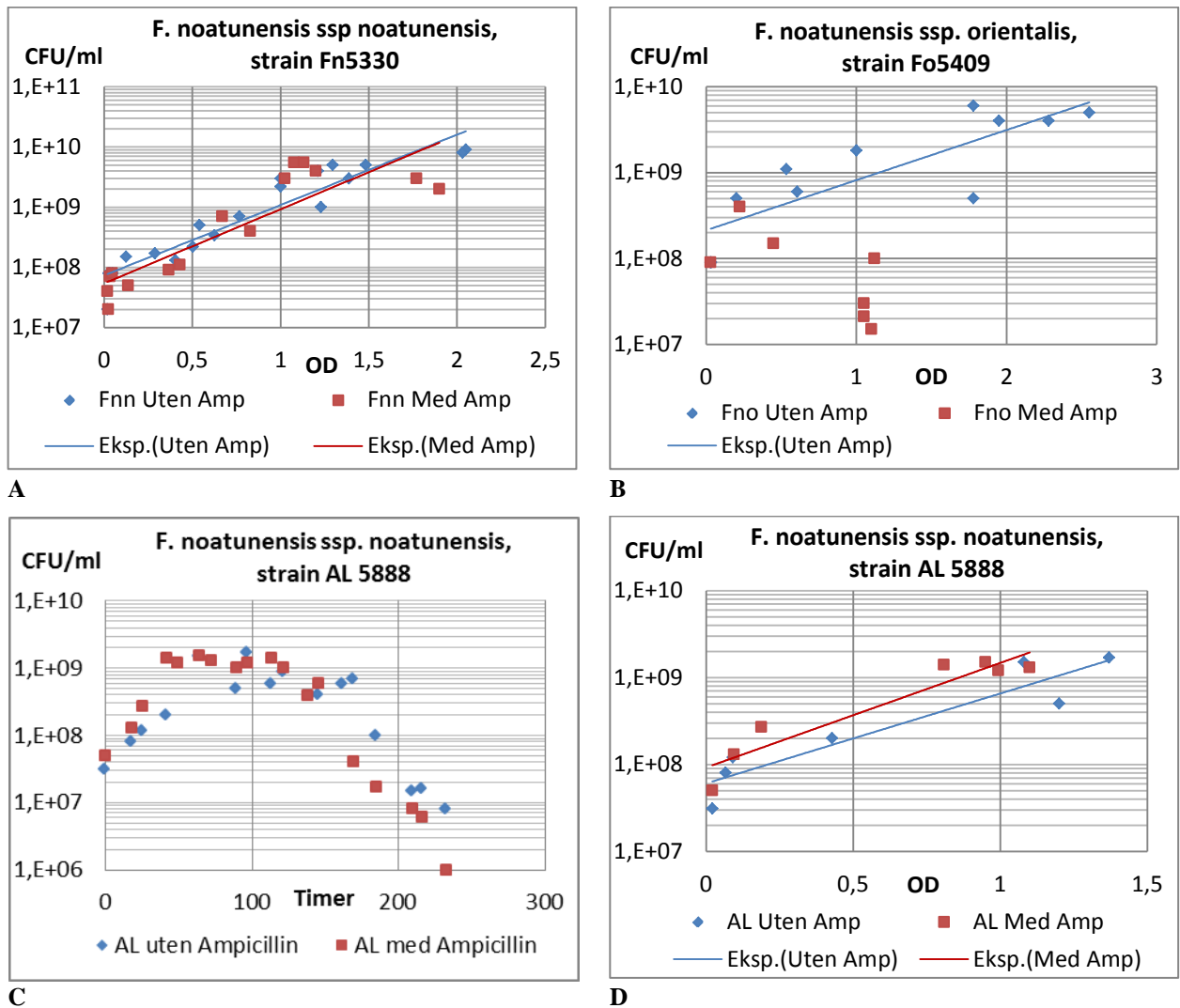
### 4.1.1 CFU av *Francisella* stammen Fnn, Fno og Fn AL og virkningen av ampicillin på CFU

Vekstkurver for ulike *F. noatunensis* stammer er tidligere publisert (Brudal *et al.*, 2013). Derimot er koloniformene enheter (colony forming units; CFU) per OD ikke kjent, men vil være et nyttig redskap for videre infeksjonsstudier. Det er tidligere gjennomført preliminarære forsøk med CFU av stammene Fnn NVI 5330 og Fno NVI 5409. Disse målingene var til likhet med forsøkene beskrevet i dette studiet tatt ut fra en vekstkultur (utført av Anne P. Hope). Det har også gjort CFU-tellinger av Fnn NVI 5330 suspendert i PBS (utført av Espen Brudal), men en tallgrunnlaget var lite og bakteriene var ikke utsatt for antibiotikaseleksjon.

*F. noatunensis* subsp. blir dyrket i det svært næringsrike mediet Eugon Broth. *F. noatunensis* er en saktevoksendebakterie og har en generasjonstid på 20 timer (Brudal *et al.*, 2013; Hope, 2011), derfor er det stor fare for at kulturene blir forurenset av andre mikroorganismer med kortere generasjonstid. I arbeid med *Francisella* er det vanlig at antibiotikumet ampicillin blir tilsatt som seleksjon for uønskede mikroorganismer med en konsentrasjon på  $50\mu\text{g ml}^{-1}$  (Furevik *et al.*, 2011), (Soto *et al.*, 2009b) Den var derfor ønskelig å få et større tallgrunnlag og å få vite mer om hva som påvirker CFU-tallene. Vi ønsker å undersøke om ampicillin påvirket vekstkurvene og CFU-antallet til ulike stammene av *F. noatunensis*. Stammene som ble benyttet her var *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* NVI 5330 og NVI 5888 fra hhv Norge og Chile og *F. noatunensis* subsp. *orientalis* NVI 5409 fra Costa Rica. For å undersøke dette ble det laget vekstkurver hvor bakteriesuspensjon ble tatt ut på ulike tidspunkt slik at CFU kunne sammenlignes med OD (figur 4.1)

Hvor ofte det ble tatt ut prøver til skål ble endret i underveis i arbeidet. I starten ble OD måling og fortynningsrekker gjort fortløpende gjennom arbeidsdagen. Dette ble endret til å måle OD tre ganger daglig og lage fortynningsrekker til CFU-telling to ganger daglig. Forsøkene lengde varierte også. I utgangspunktet var det meningen at OD og CFU målinger skulle utføres til vekstkurven kom i dødsfasen. Dette var ikke alltid mulig å utføre da en del av vekstkulturene begynte å danne flokkuleringer (grums) etter å ha nådd stasjonærfasen. Etter å ha utført forsøket en del ganger ble det klart at det ville være vanskelig å finne en god korrelasjon mellom OD og CFU fra og med stasjonærfasen. Derfor er tallene i figur 4.1

ramme A, B og C hentet fra den eksponentielle fasen. Unntaket er CFU-tallene for Fno-kulturen som var tilsatt ampisillin. I de to forsøkene som ble utført i dette arbeidet vokste *F.noatunensis* subsp *orientalis* dårlig ved tilstedeværelsen av ampisillin. Dette var overraskende da ampisillin har blitt brukt før til seleksjon for Fno (Soto *et al.*, 2009b).



**Figur 4.1:** Grafene viser sammenhengen mellom CFU/ml og OD for Fnn, Fno og Fn AL og sammenhengen mellom timer og CFU/ml for Fn AL. **A, B og D:** viser sammenhengen mellom CFU/ml og OD i medium(Eugon Broth m/2mM FeCl<sub>3</sub>) med og uten ampisillin. **C** viser CFU/ml i forhold til timer i medium(Eugon Broth m/2mM FeCl<sub>3</sub>) med og uten ampisillin for Fn AL. Blåfarget markører står for vekstmedie uten tilsatt ampisillin og rød står for tilsatt ampisillin. **A og B** er basert på to forsøk, mens **C og D** er basert på ett.

Forsøket med Fnn, Fno og Fn AL er ikke repetert tre ganger, for Fno og Fn AL har dette resultert i et for lite tallgrunnlag. Det burde gjennomføres flere forsøk av Fno og Fn AL for å få en sikrere kurve.

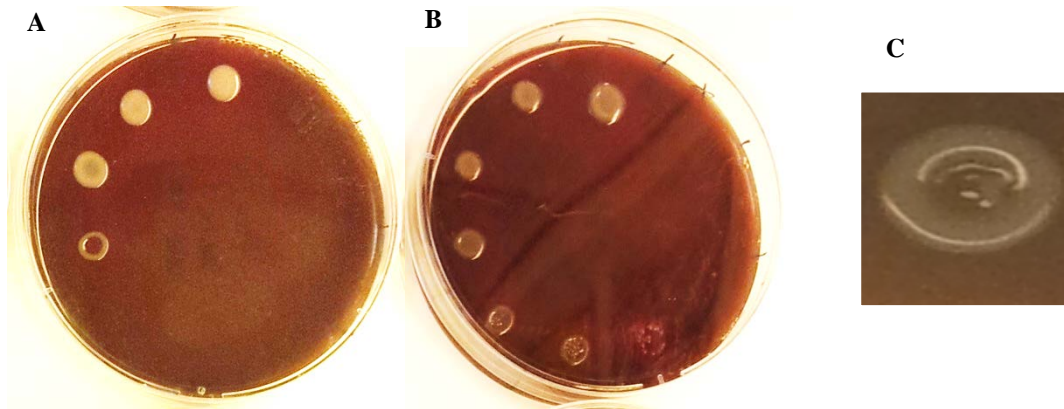
Ved infeksjon av ulike cellekulturer blir det tilsatt bakterier fra suspensjoner med kjent OD for å si noe om mengde bakterier tilsatt i forhold til celler. I gruppen som jobber med *Francisella noatunensis* ved UiO benyttes ofte bakteriesuspensjoner med OD 1 som utgangspunkt for inokulum, hvilket tilsvarer rundt  $10^9$  CFU/ml. Det ser ut som sammenhengen mellom CFU/ml og OD er lik for de forskjellige *F. noatunensis* stammene.

#### 4.1.2 Aggregering av bakterier

Under CFU-tellingene over ble det observert at når kultur blir avsatt i dråper vil det være mest vekst langs kanten på dråpen. Når det bare er en dråpe som er avsatt er arealet som skal telles svært lite. Lite areal gjør at antall CFU kan bli usikkert da stikkprøven igjen er liten. Antall kolonier bør ikke overstige 30 for at det skulle være mulig å telle. Men når en svært stor del av koloniene var samlet langs kanten av dråpen skulle det ikke så mange kolonier til før platen var vanskelig å telle (figur 4.2.B). Agarplatens fuktighet hadde mye å si for hvor stort arealet dråpen dekte. Var agarplaten litt for tørr ble arealet mindre. En annen utfordring med CFU-telling var at CFUene i de mest fortynnede dråpene ikke alltid vokste opp (Figur 4.2.A). Foruten bakterienes mulige aggregering så ECA platenes alder og utgangspunktet til bakterien vekstfase ut til å være en medvirkende faktor.

Noen bakteriearter samler seg i klynger. Dette gjør at en ikke kan vite om en CFU har opphav i en eller flere enkelt bakterier (Joyce *et al.*, 2003b). Dette kan også være tilfelle med *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* og *F. noatunensis* subsp. *orientalis*. I forskningsgruppen er det observert at bakteriene er slimete på agarplater. Aggregering av bakterier er også observert ved arbeid knyttet til utviklingen av zebrafisk som infeksjonsmodellsystem der injeksjonsnålen raskt tetter seg med bakteriesuspensjonen. Dette kan i stor grad påvirke CFU målingene beskrevet over.

I genomssekvensen av *F. noatunensis* subsp. *orientalis* og *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* er det indentifisert gener som koder for type 4 pili (Sridhar *et al.*, 2012) og ulike kapselgener, som for andre bakterier har vist å ha effekt på aggregering (Winther-Larsen).



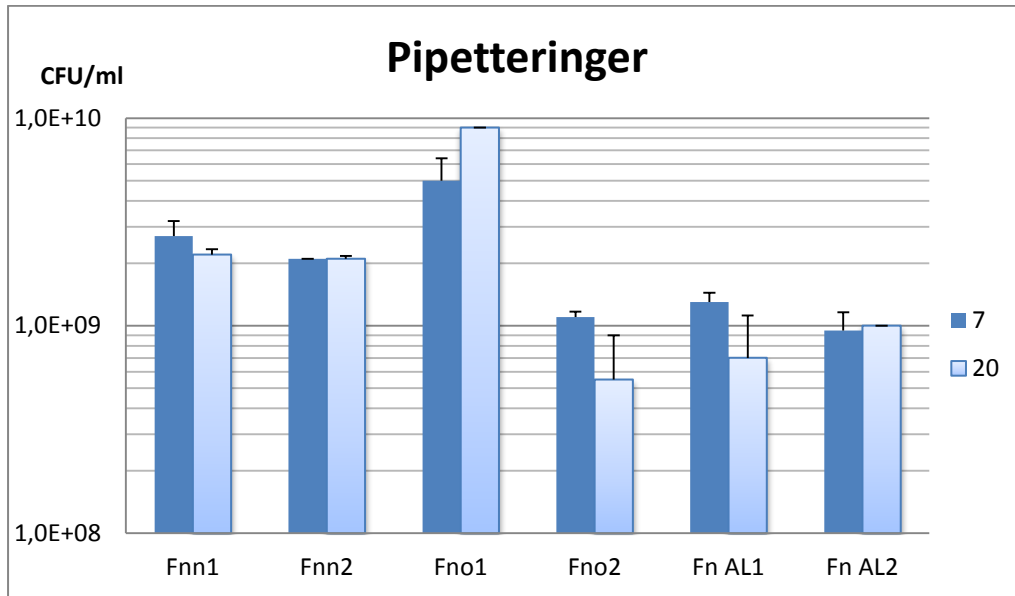
**Figur: 4.2: Kolonimorfologi av *F. noatunensis* vekst på ECA skåler.** 10µl bakteriekultur er avsatt i dråper på ECA skåler etter en dekadisk fortykning. Figurene **A**, **B** og **C** er hentet fra forsøket med ultralydbad (se avsnitt 4.1.4). På plate **A** vil ingen ting vokse i dråpene med  $10^{-4}$  og  $10^{-8}$ . På plate **B** vokser koloniene opp, men de aller fleste ligger i ytterkanten av dråpen. Bilde **C** er hentet fra en agarplate med Fnn som hadde blitt sonikert i 15 min. Her kan en tydelig se ringen som er dannet.

### 4.1.3 Effekten av antall pipetteringer på CFU

Under dette arbeidet når det lages en fortynningsrekke og under avsetting på skål ble det pipettert rundt 7 ganger for hver fortykning. I enkelte laboratorier i forskningsfeltet på *F. tularensis* og *F. novicida* blir alle bakteriekulturer pipettert opp og ned 20 ganger før avsetting på skål for å forhindre klumping (personlig erfaring og kommunikasjon fra Anders Sjøsteds gruppe i Umeå). For å undersøke om økning i antall pipettering hadde en effekt på antall CFU ble det satt opp to parallelle forsøk der en kultur og fortynningsrekke ble pipettert 7 ganger og den andre 20 ganger.

Det ble laget fortynningsrekke av de tre stammene, Fnn, Fno og Fn AL. Fortynningsrekkene ble gjort ved OD 1 og for hver stamme ble det fortynnet fire ganger. Det ble gjennomført tre forsøk, men bare to av forsøkene resulterte i vekst av CFU i de sterkeste fortynnende dråpene. Resultatet av de to parallelle forsøkene er vist i figur 4.3. Siden OD i utgangskulturen varierte fra 0,9 til 1 er hvert av de to forsøk for hver stamme satt opp for seg selv.





**Figure 4.3: Påvirkning av antall pipetteringer på CFU hos *F. noatunensis*.** Start konsentrasjon for alle bakteriekulturene var  $OD_{600} = 0,9-1$ . Mørkeblå stolper viser antall CFU når det ble pipettert 7 ganger, og lyseblå stolper viser CFU når det ble pipettert 20 ganger. Hvert sett med stolper er basert på et forsøk med to paralleller. Fnn1 refererer til første forsøk med Fnn og Fnn2 til det andre forsøket.

Bare første forsøk av Fno viser et økt antall CFU ved 20 gangers pipettering og her kan det være rene tilfeldighet da bare en av parallellene for 20 ganger vokste opp. Det andre forsøket med Fno viser det motsatte, antallet CFU er mindre ved 20 pipetteringer. CFU tallene for Fnn og Fn AL var i forhold svært jevne. Resultatene i figur 4.3 baserer seg på 2 parallelle forsøk som er lite tallgrunnlag til å si noe sikkert om hvordan antall pipetteringer kan påvirke antall CFU. Likevel, resultatene viser at det ikke er noen tydelig gevinst i å pipettere hele 20 ganger.

#### 4.1.4 Effekten av ultralydbad på CFU

Ultralyd har evnen til å drepe og til å løse opp klumper av bakterier. Dette skjer via akustisk kavitasjon som påvirker bakteriene gjennom fysikalske, mekaniske og kjemiske effekter (Joyce *et al.*, 2003a). Denne metoden blir blant annet benyttet for å løse aggregater hos *N. gonorrhoeae* før utplating på agarskå (Winther-Larsen)l. Det er derfor interessant å finne ut om ultralydbad kan brukes som et redskap i å løse eventuelle klumpingseffekter hos *F. noatunensis* for å finne mer presise CFU tall med levende bakterie celler i en suspensjon.

*F. noatunensis* stammene ble utsatt for sonikering i forskjellige lengde, deretter ble det laget fortynningsrekker og antall CFU ble registret ved utplating på ECA. Oversikt over resultatene kan sees i tabell 4.1

	0 min.	5 min.	10 min.	15 min.	30 min.
<b>Fnn</b>	2,2E+9	2,3E+9	1,5E+9	-	2,6E+9
<b>Fno</b>	1,7E+9±7,1E+8	1,4E+9±4,0E+8	1,8E+9±4,9E8	1,6E+9±5,5E+8	1,2E+9±1,2E+9
<b>Fn AL</b>	1,1E+9±4,2E+8	4,5E+8±3,3E+8	3,9E+8±3,1E+8	3,4E+8±2,0E+8	2,8E+8±1,7E+8

**Tabell 4.1: Tabellen viser gjennomsnittsverdiene for ulike sonikeringstider for de forskjellige stammene.** Tallene for Fno og Fn AL er fra tre forskjellige forsøk mens tallene fra Fnn bare er basert på et forsøk.

Det som ikke kommer tydelig frem i tabellen er at CFU-tallene er jevnt over stabile til og med 15 min. sonikering. Ved 30 min sonikering ble CFU tallene varierende. For Fn AL var tallene jevne i første og tredje forsøk, mens i det andre forsøket ble antall CFU tydelig påvirket av ultralydbehandlingen. Det var ikke vekst i de mest fortynnede dråpene, men ufortynnet prøve viste at det var færre levedyktige bakterier til stede. I første forsøk med Fno var det en stor forskjell på 15 min. og 30 min. Ved 30 min var CFU/ml så lavt som  $4E+5$  i motsetning til  $1,2E+9$ . I andre forsøk var det bare en svak nedgang i CFU tall til  $3E+8$  og i det siste forsøket ble ingen nedgang i CFU/ml observert. Den sterke reduksjonen av CFU/ml i 30 min. sonikering hos Fno ved første forsøk var så forskjellig av det ble utelukket fra grunnlaget til tabell 4.1.

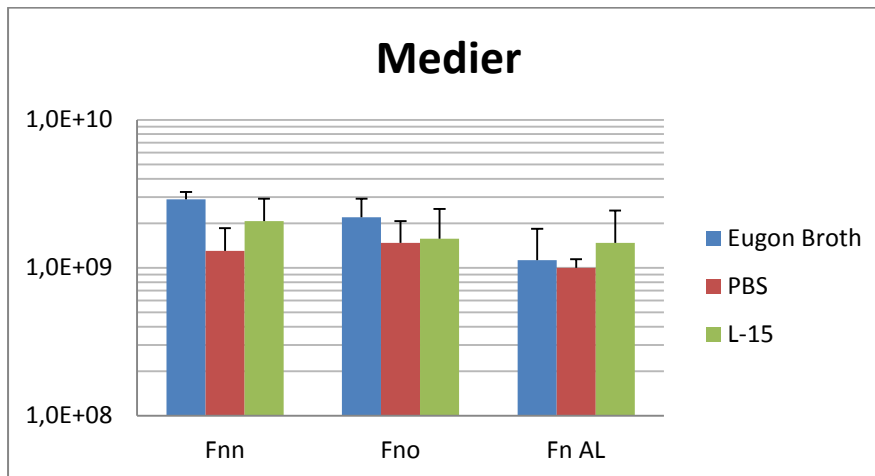
Også under disse forsøkene var det en utfordring med mangel av vekst i sterkt fortynnende dråper. I forsøk med Fnn gav f. eks. bare ett av tre forsøk vekst. Vannet i ultralydbadet blir oppvarmt når det har stått på i 30 min. For å sikre at det ikke er varmen som gir færre CFU ble ett sett med forsøk gjennomført med is i vannbadet. Dette ga ikke flere CFU tallene, men det ble ikke observert noen nedgang i vekst ved 30 min. Verdiene fra forsøket ble lagt sammen med de andre resultatene fra sonikeringsforsøket (se tabell 4.1.).

Sett i sammenheng viser resultatene at alle tre stammene med *F. noatunensis* tåler å bli sonikert i minst 15 minutter uten noen reduksjon i CFU tall. Samtidig viser de og at ultralydbadet som finnes på laboratoriet, navn, ikke egner seg til å separere bakteriene i suspensjon.

### 4.1.5 Effekten av vekstmedium på CFU

I forbindelse med infeksjon forsøk av celler, må bakteriene fortynnes i cellemediet L-15, derfor er det interessant å se om hvor godt bakteriene ville tåle det. Bakteriene suspenderes i PBS når de skal injiseres i fiskeforsøk. Vi ville også se hvordan PBS vil påvirke CFU hvis bakteriene blir fortynnet i det.

Fortynningsrekker med Fnn, Fno og Fn AL ble satt opp i PBS, L-15 og sammenlignet med vekst i Eugon broth før de ble avsatt på ECA plater for CFU telling. Figur 4.4 vi ser CFU/ml for de forskjellige stammene i de forskjellige mediene. Ut fra gjennomsnittet kan det se ut som at PBS og L-15 har en liten negativ virkning på CFU-tallet.



**Figur 4.4:** Diagrammet viser CFU/ml etter at Fnn, Fno og Fn AL har blitt fortynnet i L-15, PBS og Eugon broth. Viser gjennomsnittet av minst 3 forsøk.

## 4.2 pKK214 og pDMK2

Redusert tilgjengelighet av genetiske verktøy i *Francisella* gjør kloningsarbeid utfordrende. pKK289, pKK214, og pDMK2 er noen av de ulike genetiske verktøy som er tilgjengelig hos *Francisella*. pKK-vektorene brukes til ekspresjon av gener i *Francisella*. pDM vektoren brukes til konstruksjon av delesjonsmutantet ved dobbel homolog rekombinasjon.

Da det ikke er tilgjengelig informasjon om de fullstendige sekvensene til plasmidene pKK214 og pDMK2, vanskeliggjør dette kloningsarbeid. Valg av riktig restriksjonssetene som kan benyttes i arbeid kan bli utfordrende.

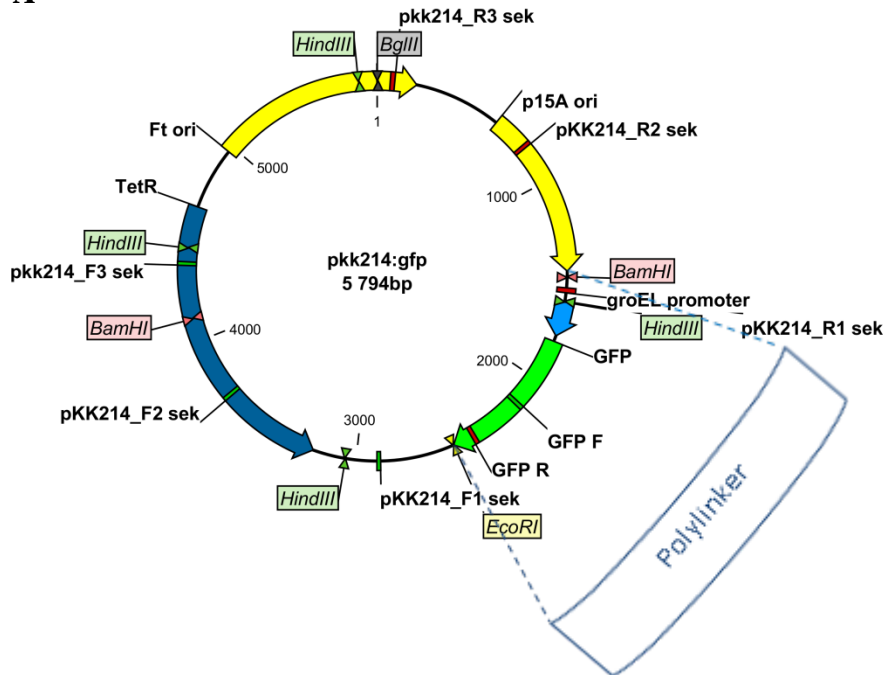
Alternativt kan uttrykk av gener gjøres ved innkorporeres inn i genomet, in cis, men denne metoden har ennå ikke blitt etablert hos *F. noatunensis*.

### 4.2.1 pKK214

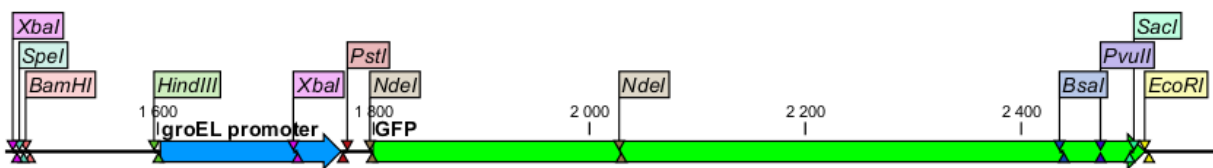
pKK214 ble konstruert på universitetet i Umeå for å lage et promotorbibliotek for *F. tularensis*. Plasmidene pKK202 og pKK101 ble brukt som basis for konstruksjonen av dette plasmidet(Kuoppa *et al.*, 2001). pKK202 ble laget ved at replikasjonsorigo fra pACYC184, et *E. coli* plasmid ble introdusert inn i et derivat av pFNL200 som er et plasmid som bare kan replikere i *Francisella*(Norqvist *et al.*, 1996).

I pKK214 finnes p15a replikasjonsorigo også replikasjon i *E. coli*. pKK214 har et resistensgen for tetracyklin, en polylinker regio og et *cat*-gen(kloramfenikolresistens) uten promoter som ble brukt til å lage promotorbibliotek. En mutasjon er introdusert inne i *cat* genet så dette er derfor ikke lenger funksjonelt. Videre er promoteren *groEL* blitt ligert inn og pKK214 kan dermed benyttes som en ekspresjonsvektor. I pKK214*gfp* derivatet som er sekvensert i dette arbeidet er genet *gfp*(green fluorescent protein) klonet inn nedefor *groEL* promotor regionen. Fig. 4.5. viser en oversikt av pKK214*gfp* plasmidet.

A



B Polylinker regionen



**Figur 3.5: Oversikt over ekspresjonsplasmidet pKK214.** Figur A viser plasmidets oppbygning, aktuelle restriksjonssteder og primere som er brukt i sekvenseringen. Gule markører viser plasmidets to origoer, det er et for *Francisella* (Ft ori) og et for *E. coli* (p15a ori). Tetracyklinresistens gen er vist i mørkeblått. Primerne er vist i grønt og rødt, grønne primere er «forward» og røde er «reverse». Innskuddet *gfp* og promoteren er vist i hhv. lysegrønt og lyseblått. Innskuddet er også vist i figur B som er en oversikt av polylinker regionen. Polylinkeren er vist med restriksjonssteder som kan brukes til manipulering av plasmidet, unntakene er setene for BamHI og HindIII som ikke er unike ellers i plasmidet.

Polylinker regionen har endret seg noe etter innsettelsen av *groEL* og *gfp*, men siden det er pKK214*gfp* plasmidet vi har tilgjengelig er det dette som ble sekvensert. For selve sekvenseringen ble GFP primere (Bakkemo *et al.*, 2011) ble brukt som utgangspunkt, deretter ble ny primere designet i CLC Main Workbench. Alle primerne som ble brukt fungerte bra og som det er mulig å se ut i fra figur 4.5 er de plassert jevnt gjennom hele plasmidet. Hele sekvensen av pKK214*gfp* er vist i vedlegg 3.

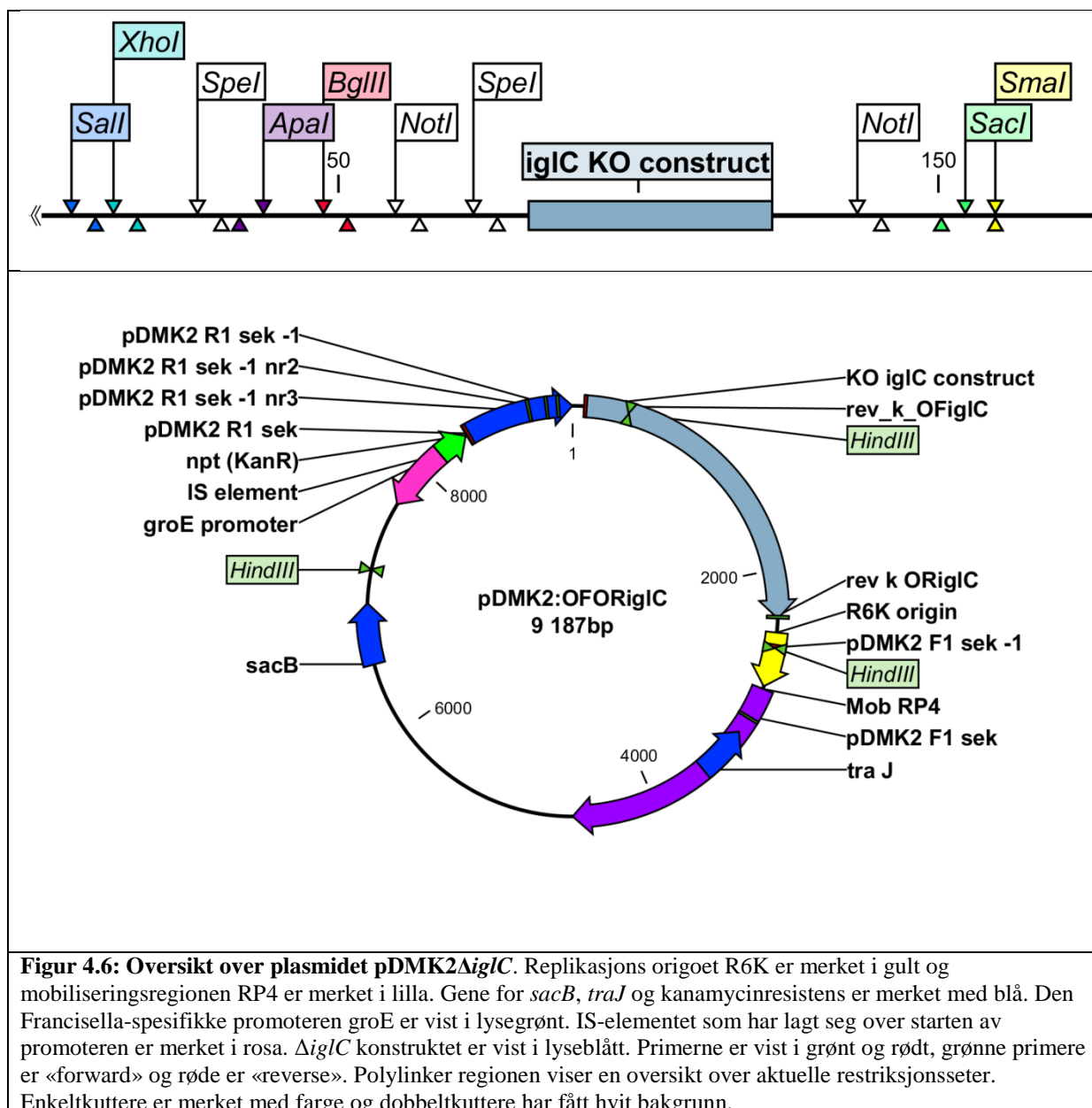
## 4.2.2 pDMK2

pDMK2 er utviklet på Umeå Universitet og har blitt benyttet til konstruksjon av delesjonsmutanter. pDMK2 er et derivat av pDM4 (Milton *et al.*, 1996), pDMK2 er endret slik at resistensgenet for kloramfenikol er byttet ut med resistensgenet for kanamycin. Det er også lagt til flere nye restriksjonssteder. pDM4 er et plasmid som ble laget for å konstruere mutasjoner for virulensstudier i *Vibrio anguillarum*.

Plasmider som pDMK2 blir ofte kalt selvmordsplasmider fordi de ikke kan replikere i målbakteriene. Dette er nødvendig for at plasmidet skal egne seg til å lage mutanter ved dobbel homolog rekombinasjon. Grunnen til at pDMK2 ikke kan replikere er at den inneholder R6K, som er et origo som er avhengig av aktivering. For at origoet skal fungere må vertsbakterien ha et *pir* gen som gjør at proteinet Pir produseres og stimulerer til replikasjon. Dette har ikke *F. noatunensis*. Konjugasjon blir brukt til å føre inn plasmidet i målbakterien ved å bruke *E. coli* med *pir* gen som donorer. Plasmidet inneholder en mobilitetsregion fra plasmidet RP4 som gjør at plasmidet kan bli konjugert mellom ulike bakterier. RP4 inneholder også TraJ, som aktiverer promoteren for transfer operonet (Lu *et al.*, 2012).

Når pDMK2 blir benyttet til dobbel homolog rekombinering har dette blitt gjort med en to stegs prosedyre. Etter at cellene har blitt transformert med et pDMK2-plamid, som inneholder et delesjonskonstrukt, blir det selektert med kanamycin. Resistensgenet for kanamycin vil bare bli uttrykt hvis plasmidet er inkorporert i genomet. Dermed selekterer kanamycin for den første homologe rekombinasjonen hvor plasmidet blir integrert i målgenet på kromosomet. *sacB* er et gen i plasmidet som blir induisert av sukrose og som er dødelig for Gramnegative bakterier. Disse egenskapene blir utnyttet til motseleksjon. Når bakterien blir grodd i nærvær av sukrose vil dette indusere den andre homologe rekombinasjonen. Da vil bakterien fjerne plasmidet som inneholder *sacB*. I prosessen vil bakterien enten miste hele det originale plasmidet eller så vil sekvensen som fjernes være målgenet og deler av plasmidet, mens delesjonskonstruktet vil være igjen i kromosomet (Zogaj *et al.*, 2010).

I dette arbeidet har pDMK2 $\Delta$ *iglC* blitt sekvensert ettersom pDMK2 ikke er tilgjengelig uten innskudd i vårt laboratorium. pDMK2 $\Delta$ *iglC* er et plasmid med et delesjonskonstrukt av *iglC*. Et plasmidkart med genetiske elementer, polylinker region og primere brukt til sekvensering er vist i figur 4.6. under. Hele sekvensen er lagt til i Vedlegg 4.



**Figur 4.6: Oversikt over plasmidet pDMK2 $\Delta$ iglC.** Replikasjons origoet R6K er merket i gult og mobiliseringsregionen RP4 er merket i lilla. Gene for *sacB*, *traJ* og kanamycinresistens er merket med blå. Den *Francisella*-spesifikke promoteren *groE* er vist i lysegrønt. IS-elementet som har lagt seg over starten av promoteren er merket i rosa.  $\Delta$ iglC konstruktet er vist i lyseblått. Primerne er vist i grønt og rødt, grønne primere er «forward» og røde er «reverse». Polylinker regionen viser en oversikt over aktuelle restriksjonssteder. Enkeltkuttere er merket med farge og dobbeltkuttere har fått hvit bakgrunn.

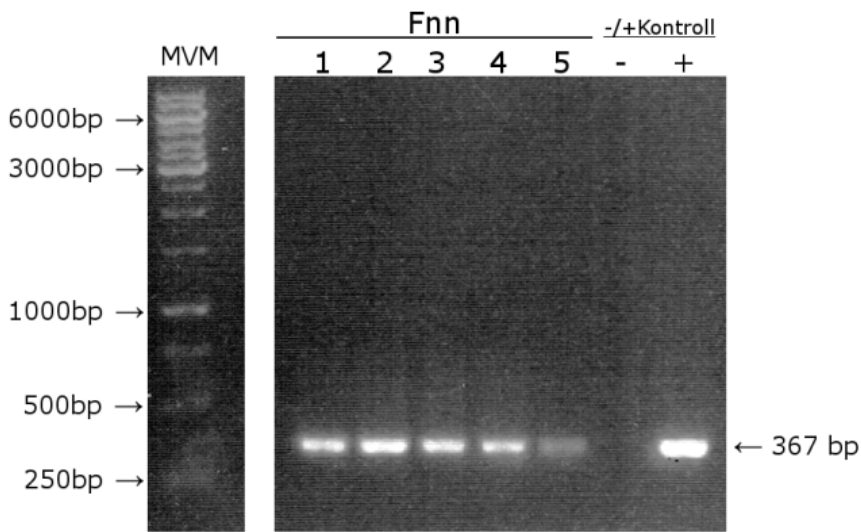
Sekvensering viser at 65 basepar fra starten av *groE* promoteren i pDMK2 ved sammenligning med den annoterte promoteren oppgitt for pDMK3. Forskjellen er forårsaket av et IS element som er satt inn i plasmidet. Plasmidet har blitt brukt i homolog rekombinasjon (E. O. Lampe) og ser ut til å fungere fint. Etter å ha undersøkt den aktuelle manglende sekvensen i BLAST kom det mange treff i diverse *Francisella* sekvenser. Treffene var beskrevet som hypotetiske proteiner. Det er derfor mulig at den første delen av den annoterte promoteren ikke er så viktig for funksjonen.

### 4.3 Introduksjon av pKK289*clpB* i Fnn

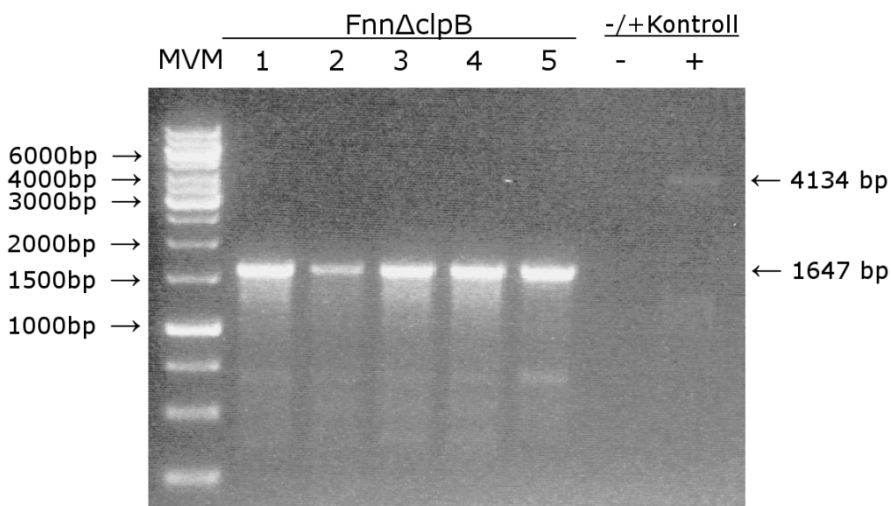
ClpB er et varmesjokk protein som er en del av et chaperon system som bryter opp og reaktiverer sterkt aggregerte proteiner. Varmesjokkproteiner hjelper bakterien å takle stress relaterte forhold. (Meibom *et al.*, 2008) Siden proteinet er viktig for *Francisella virulens* er det aktuelt å få bedre kjennskap til om en *clpB* delesjonsmutant vil være attenuert også hos fisk.. Det har tidligere blitt laget en Fnn *clpB* delesjonsmutan (E. O. Lampe), og en ekspresjonsvektor som kan utrykke *clpB*, pKK289*clpB* (E. O. Lampe). Her ble *clpB* komplementert i Fnn *clpB* mutanten for å verifisere at eventuelle phenotyper skyldes mutasjonen i *clpB* og ikke er forårsaket av en endring et annet sted i genomet.

I tillegg til *clpB*-delesjonsmutanten ble også villtype Fnn transformert med pKK289*clpB*. Dette fungerer som en kontroll for transformasjonen, ettersom villtype Fnn har blitt transformert tidligere med pKK289 plasmid derivatet pKK289*gfp* (Bakkemo *et al.*, 2011). I tillegg vil transformasjon av villtype Fnn med pKK289*clpB* teoretisk gi et overuttrykk av *clpB*. pKK289*clpB* ble introdusert i Fnn ved elektroporering og de kanamycin resistente transformantene vokste opp som kolonier langs kanten av agarskålen. Koloniene hadde vokst i hverandre og ble derfor plukket og støket ut på ny agarskål med kanamycin. Det at bakteriene bare vokste opp langs kanten av skålen kan ha sammenheng med det som ble sett under avsnitt 4.1.2. Sekundær utstryk av transformantene ble verifisert ved PCR. Alle koloniene ble testet med to primerpar; et sett primere for å verifisere at det er Fnn og et sett for å teste innskudd av plasmidet pKK289*clpB*. Som positiv kontroll for plasmidet ble pKK289*clpB* benyttet. Genomisk DNA fra Fnn ble brukt som positiv kontroll for Fnn og delesjonsmutanten. Resultatene fra PCR verifiseringen er vist i figurene 4.7, 4.8 og 4.9. Alle koloniene som ble testet var positive. Ved kontroll av villtype-transformantene (Fnn pKK289*clpB*) ga alle et bånd på 367 bp som var likt den positive kontrollen. *ClpB* er 2600 basepar langt, dette gir store forskjeller i båndene for koloniene av delesjonsmutanten og genomisk DNA fra Fnn, som ble brukt som positive kontrollen. Kolonien av Fnn $\Delta$ *clpB* pKK289*clpB* fikk alle bånd rett over merket for 1500 bp, og den forventete lengden er på 1647 bp. Alle de ti transformantene som ble testet ga positive bånd for plasmid på 879 bp.

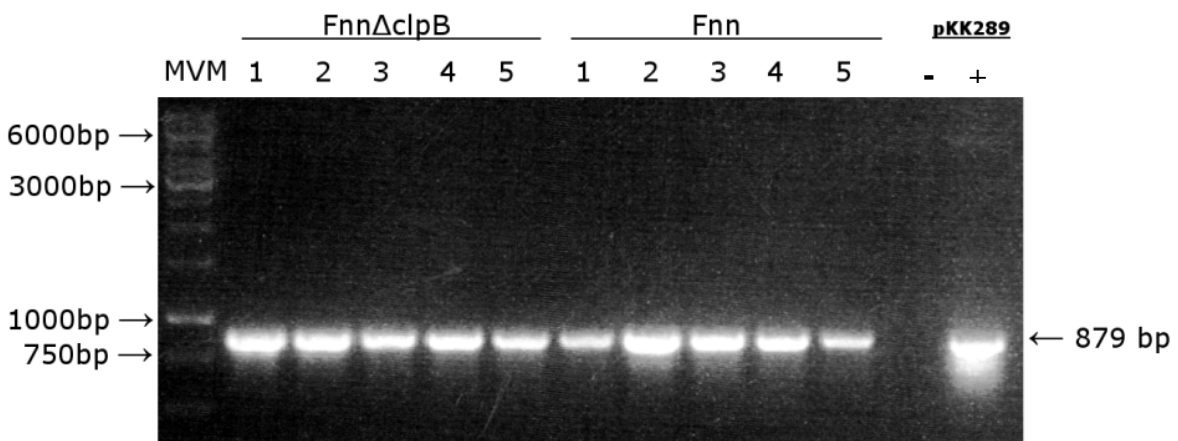




**Figur 4.7: Kontroll-PCR av Fnn transformert med pKK289clpB.** PCR-reaksjonen er kjørt med primerne nygroEL F og nygroEL R. Brønn 1-5 viser til koloniene 1-5. Genomisk DNA er brukt som positiv kontroll i brønn 7. Bildet viser at alle 5 kolonier er Fnn. PCR-produktene er av forventet størrelse på 367 bp (som pilen viser).



**Figur 4.8: Kontroll-PCR av FnnΔclpB transformert med pKK289clpB.** PCR-reaksjonen er kjørt med primerne C1FclpB og ytre clpB R. Brønn 1-5 viser til koloniene 1-5. Genomisk DNA er brukt som positiv kontroll i brønn 7. Bildet viser at alle 5 kolonier er FnnΔclpB. PCR-produktene er av forventet størrelse på 1647 bp (som nederste pil viser).

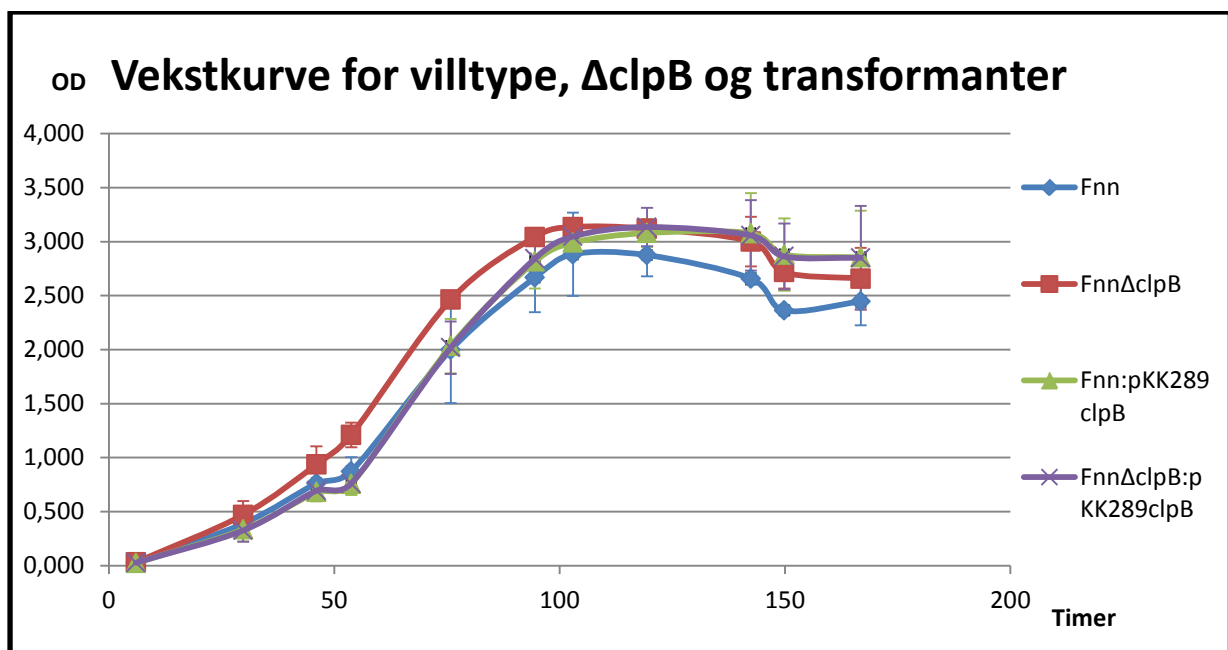


**Figur 4.9: Kontroll-PCR av FnnΔclpB og Fnn transformert med pKK289clpB.** PCR-reaksjonen er kjørt med primerne pKK289km R og indre clpB F. Koloniene er de samme som vises med andre primere i figur 4.7 og 4.8. Bildet viser at alle de ti koloniene inneholder pKK289clpB. Pilen viser PCR-produktet av forventet størrelse på 879 bp.

### 4.3.1 Vekststudier av *clpB*-delesjonsmutant og *clpB*-transformanter

Det er interessant å se på om *clpB* påvirker normal vekst, for dette vil gi oss større informasjon om proteinets egenskaper og være viktig av praktiske årsaker når *clpB*-delesjonsmutantet og transformantene skal brukes til f. eks. infeksjonsforsøk ved en senere anledning. Når en ser på en mutant under infeksjon kan redusert vekst være et mål for attenuering. Det er viktig å kunne skille mellom veksthemming generelt og veksthemming i forbindelse med infeksjon. Før infeksjonsstudier er det viktig å ha etablert bakteriens og mutantenes veksthastighet.

Veksthastigheten ble målt for Fnn, Fnn $\Delta$ *clpB* og transformantene Fnn:pKK289*clpB* og Fnn $\Delta$ *clpB*:pKK289*clpB* over åtte dager. OD ble målt to ganger daglig, med noen unntak. Vekstkurven vist i figur 4.10 er et gjennomsnitt av tre forsøk. Det første forsøket ble gjort alene, mens de to siste ble gjort samtidig. Vekstkurvene til de ulike stammene var veldig like hverandre. Ut fra kurvene i figur 4.10 ser det ut som det kan være en liten forskjell i veksten til de ulike bakteriene. Sannsynligvis observeres denne forskjellen av andre grunner enn tilstedeværelsen av *ClpB*-genet (se avsnitt under figur 4.10.).



**Figur 4.10: Vekst av Fnn ved ulike ekspresjon av *clpB*.** Grafene viser OD<sub>600</sub> av vekstkulturer med Fnn, Fnn $\Delta$ *clpB*, Fnn:pKK289*clpB* og Fnn $\Delta$ *clpB*:pKK289*clpB* over tid.

De største standardavvikene blir sett hos villtypen. Årsaken til dette kan være forskjell OD i startkulturene. Som en kan se i grafen i figur 4.10 kommer ikke bakteriene i eksponentiellfase

før OD er noe over 1. I de to siste forsøkene var  $OD_{600}$  i startkulturene mellom 1,6 og 2 før kulturene ble fortynnet og vekstforsøkene startet. Veksten i disse vekstforsøkene er svært like. I det første forsøket var variasjonen i OD for startkulturene større, fra 0,9 til 1,4 før fortynning. I vekstkurven har villtypen et standardavvik på 0,49 ved 76 timer mens *clpB* delsjonsmutanten har et standardavvik på 0,06 ved samme tidspunkt.

## 4.4 Konstruksjon av Histidin merket ClpB

For videre funksjonstudier av proteinet ClpB kan det være nyttig å merke med en epitop. En epitop er en del av et protein som kan gjenkjennes av immunforsvaret og derfor også kan merkes med et antistoff. Eksempler på dette er histidine-merket eller Flag-merket.

ClpB ble merket med en histidin, og det nye proteinet ble kaldt ClpBHis. Merkingen består av 6 histidinkodon(6xHis) etter hverandre som er lagt til i enden av *clpB* genet. I motsetning til andre mulige proteinmerkinger som f.eks. Grønn fluoriserende protein (GFP) er 6x His-merkingen en relativt liten epitop. Dette kan være gunstig fordi den sannsynligvis ikke vil bidra til noen stor forandring i strukturen til proteinet som forhåpentligvis beholder sin funksjon i cellen

Histidin merkingen kan brukes til å rense, lokalisere og å påvise utrykte proteiner. Størrelse og lokasjon kan bli konstatert med western-blotting og immunofluoresens. Histidinkjeden gir proteinet egenskapen å kunne binde seg til flere forskjellige metallioner under spesifikke bufferforhold. De mest vanlige metallene en kan bruke er nikkell, kobolt og kobber.

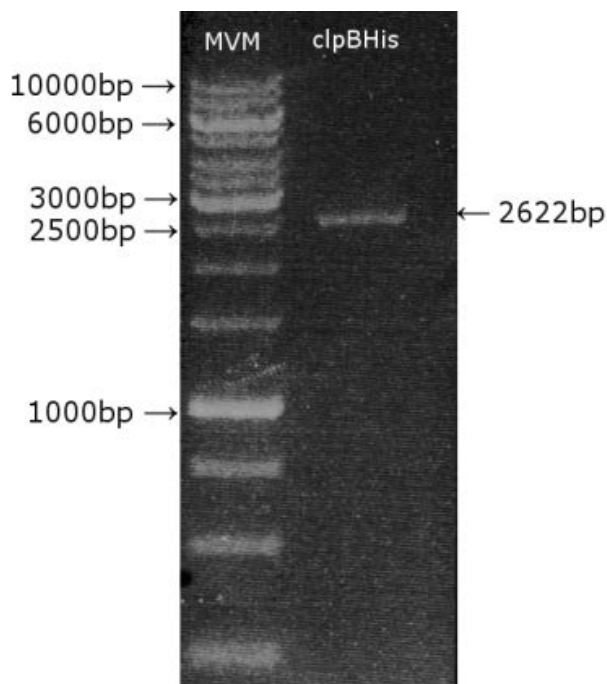
Histidinmerking er en vanlig metode å bruke ved protein rensing fra f. eks. et bakterielysats. Den vanligste metoden er basert på «immobilised metal affinity chromatography(IMAC)». Videre kan His-merking også benyttes i analyser av protein-protein interaksjoner (Sambrook *et al.*, 2001).

I cellen samarbeider ClpB med andre proteiner i et chaperon system og det kan derfor være interessant å finne ut hvilke proteiner ClpB kan binde seg til. Dette kan undersøkes med en pull-down assay. Da blir IMAC brukt. Først tilsettes lysat fra bakterier som produserer his-merket ClpB og denne vil binde seg til kolonnen. Når en så tilsette lysat fra samme bakterie som ikke har noen proteiner his-tagget vil proteinene som binder til ClpB bli igjen i kolonnen. Tilslutt kan sammen proteinene eluderes ut av kolonnen og analyseres. Alternativt vil

ClpBHis i kompleks med andre proteiner binder seg til kolonnen i et et-steps prosess før eluering.

Første skritt i å lage en ekspresjonsvektor med histedinmerket *clpB* som kan uttrykkes i Fnn, var å lage konstruktet *clpB*His ved hjelp av PCR. Primerne som ble brukt hadde begge et egnet restriksjonssete, et sete for NdeI var inkorporert i forward primer mens setet for SacI var i reverse primer. I den reverse primeren (3'-enden) var også 6-His merkingen inkorporert. For å sikre at det ble et feilfritt konstrukt ble det valgt en polymerase med høy proofreading egenskaper (navn inn her). PCR produktet kan så kuttes med RE setene å klones inn i pKK289 kuttet med de samme setene.

*clpB* med 6xHis utgjør til sammen 2622 bp. PCR-produktet er ganske stort som resulterte i et dårlig utbytte og det var ikke mulig å sjekke konsentrasjonen med Picodrop. Agarosegeler ble derfor brukt til å få en indikasjon på konsentrasjonen. Figur 4.11. viser PCR-produktet på agarosegel etter at det har blitt rensset med E.Z.N.A. gel extraction Kit. PCR produktet hadde et bånd på gelen av forventet størrelse på 2622 pb.



**Figur 4.11:** Agarosegelbilde som viser PCR-produktet *clpB*His. Primerne som ble brukt var *clpB* tr F(NdeI) og *clpB* tr HIS *clpB* R(SacI). Genomisk DNA av *F. noatunensis subsp. noatunensis* ble brukt som templat. PCR-produktet har en størrelse på 2622 basepar.

Direkte kloning av *clpB*His direkte inn i pKK289 for konstruksjon av pKK289*clpB*His viste seg å gi problemer. Etter at pKK289*clpB*His ble forsøk transformert vokste det bare opp en

koloni. Etter plasmidisolasjon fra denne kolonien ble plasmidet klippet med restriksjonsenzymene, NdeI og SacI og analysert på gel. Ut fra hvilke restriksjonszymer som ble brukt er det forventet at innsuddet fra pKK289 skulle bli kutte ut. Resultatet er avbildet i figur 4.12. og i brønnen er det tre bånd isteden for to. Dette kan være fordi plasmidet er kuttet flere steder en ønsket eller et resultat av ufullstendig kutting. Siden det bare hadde vokst opp en koloni og den i tillegg oppførte seg uventet, valgte vi å se bort ifra denne.

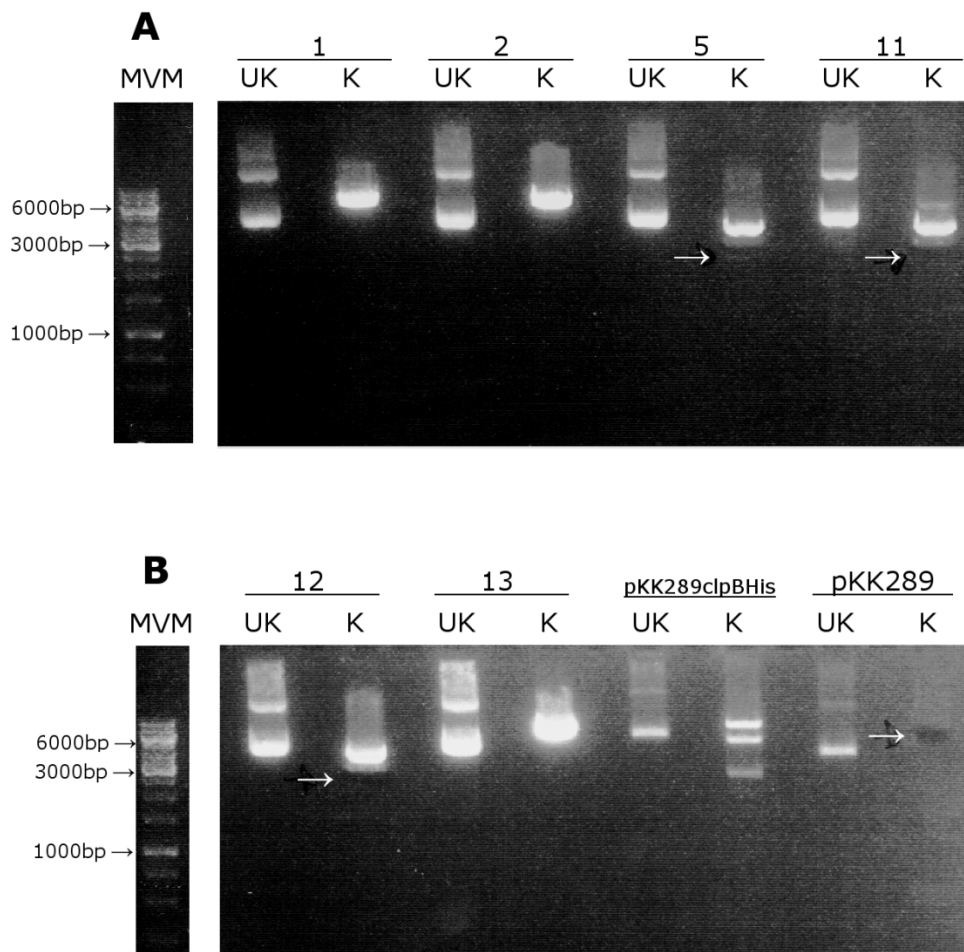
#### 4.4.1 *clpBHis*-pCR4 TOPO kloning

For å øke sjansene for en vellykket kloning ble *clpBHis* konstruert inkorporert i pCR4 TOPO. pCR4 TOPO designet til enkel kloning av PCR-produkter og den kan brukes som et mellomledd å inkorporere *clpBHis* inn i pKK289.

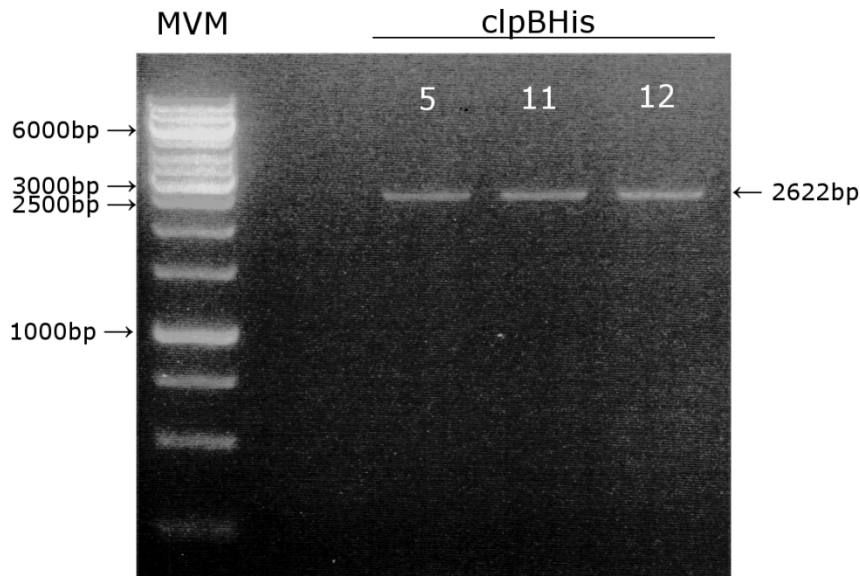
PCR-produktet *clpBHis* ble ligert inn i pCR4 TOPO-vektor og transformert inn i kjemisk kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ pir-celler. *E. coli* bakterier ble brukt som mellomvert underveis i kloningen for å oppamplifisere og lagring av plasmid.

Siden konstruert skulle brukes videre til å kloner inn i pKK289, ble det ikke foretatt en kontroll-PCR direkte på koloniene. I stedet ble det laget plasmidprep av 10 kolonier, ved hjelp av E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit, hvor det igjen ble valgt ut 6 plasmidprep ut i fra konsentrasjon og renhet. Disse plasmidene ble kuttet med restriksjonsenzymene, NdeI og SacI, slik at *clpBHis*-innskuddet ble klippe ut. Kuttemiksen ble analysert på agarosegel (figur 4.12). Hvert plasmid ble plassert etter en kontroll med ukuttet plasmid. pKK289 ble også kuttet med de samme restriksjonsenzymene. Kuttet pKK289 ble kjørt på gel (Figur 4.12.B) og ble rensert slik at den kunne brukes videre til ligering med *clpBHis*. Det var 3 positive rekombinante plasmider, klon 5, 11 og 12. pCR4 inneholder et letalt gen, *ccDB*, som skal bli uttrykt i bakterien hvis plasmidet ikke inneholder et DNA-innskudd. Dette er en funksjon som tydeligvis ikke fungerer 100 %, noe som gir seg utslag i at 3 av de 6 klonene som ble testen ikke inneholdt PCR-produktet.

*ClpBHis*-konstruert ble skåret direkte ut av gelen og rensert med E.Z.N.A. gel extraction Kit. Pilene i figur 4.12 viser hvor båndene for *clpBHis* og pKK289 har vært før de ble kuttet ut. Hullet etter utskåret gel er lettest å se for pKK289 i figur 4.12.B. *ClpBHis*-konstruert etter rensing er vist i figur 4.13.



**Figur 4.12: Plasmidprep av pCR4clpBHis kuttet med SacI og NdeI.** Bildet viser plasmidprep fra 6 forskjellige pCR4clpBHis transformanter. I tillegg er plasmidprep av pKK289clpBHis og pKK289 vist. UK står for ukuttet og K står for kuttet med NdeI og SacI. Piler viser hvor bånd i gelen er skåret ut for å brukes videre. Pilene til brønnene med kuttet plasmidprep fra klonen 5, 11 og 12, viser til bånd av clpBHis på 2622 basepar.



**Figur 4.13:** Agarosegel med *clpBHis* etter det er klippet ut av pCR4 med *NdeI* og *SacI* og rensert fra gel.

Renset *clpBHis* ble sekvensert med fem ulike primere for å dekke hele sekvensen. Dette var sekv ktrl *clpB* 1 F, EOL *Fnoa clpB* indre F og R som var spesifikke for *clpB* og M13 F og R som er spesifikke for sekvensene ved siden av innskuddet i pCR4(se figur 3.2.).

*clpBHis*-sekvens er vist i vedlegg 5. *ClpBHis*-konstruktet fra pCR4*clpBHis* ble senere satt inn i pKK289 (E. O. Lampe).

# 5 Diskusjon

## 5.1 CFU av Fnn, Fno og Fn AL

Under forsøkene hvor CFU skulle relateres til OD ble det observert en gjentakende effekt at bakterier i avsatte dråpene fra de høyeste fortyningene ikke vokste opp, mens det var vanlig vekst i dråpene fra samme kultur som fra lavere fortyning. På skåler hvor dette skjedde vil det i de første dråpene være full vekst mens i de mer fortynnende dråpene ville koloniene vokste tettere i kanten av den avsatte dråpen slik at det dannet en ring. I de mest fortynnende dråpene ville det ikke antydning til vekst. Det er flere mulige grunner til dette. Det har blitt observert at *Francisella noatunensis* vokser dårligere på eldre ECA agarplater. Det kan virke som *F. noatunensis* under noen forhold er avhengig av å være i et visst antall for å vokse. At bakterier påvirker hverandre avhengig av celletetthet er godt kjent, og interbakteriell kommunikasjon er kjent som quorum sensing (QS) (Wilson *et al.*, 2011). QS er signalisering mellom bakterier. Bakteriene produserer og frigjør kjemiske signalstoffer kalt autoinducers som øker i konsentrasjon som funksjon av celletettheten.. Bakteriene bruker autoinducerne til kunne vite hvor tett dens egen populasjonen er og hvor mange det er av andre bakteriearter (Wilson *et al.*, 2011). I *F. tularensis* har det blitt identifisert gener som koder for histidin kinasene, *qseC* og *kdpD* (Weiss *et al.*, 2007). Disse genene er ikke sett hos *F. noatunensis* enda. Funksjonen til *qseC* og *kdpD* i *F. tularensis* er ikke kjent, men de kan være deler av to-komponent systemer (TCS) slik de er i andre bakterier. TCS er regulatoriske systemer som bakterier bruker til å regulere cellefunksjoner for å tilpasse bakterien til miljøet rundt seg. Stimuli som reseptorene i systemene kan reagere på kan være pH, osmoloritet, nivåer av næringsstoffer og quorum signaler.(Freeman *et al.*, 2013). Autoinducere kan være involvert i bakterieveksten. Et eksempel er noradrenalin-induserte autoinducere, som blir laget av en rekke forskjellige bakterier og som stimulerer vekst (Freestone *et al.*, 1999). For *F. tularensis* (LVS) er det sett at det trenges en konsentrasjon på over  $10^5$  for starte vekst (Halmann *et al.*, 1967). Ved lav tilgang på jern er *F. tularensis* avhengig av at en siderofor (jernbærer) akkumuleres for å begynne å vokse (Sullivan *et al.*, 2006). Det er også observert for den marine bakterien, *Pelagibacter* at sideroforer og autocinducer stimulerer vekst (Onuki *et al.*, 2000).



Når CFU telles fra avsatte dråper fordeles ikke CFU utover en like stor flate som en hel 9 cm agarplate. Dette gjør i noen tilfeller antall kolonier vanskelig å telle. En av grunnene til at dråpemetoden brukes er at den er tidsbesparende, mer effektiv og reduserer materiell bruk. Det er mulig at en hadde fått mer korrekte og lesbare resultater hvis et større volum hadde blitt strøket ut på en hel plate. Samtidig er det usikkert om dette vil fungere siden CFU ikke alltid vokser opp når de er sterkt fortynnet og spredd. Ved tidligere forsøk på sammenhengen mellom OD og CFU ble det brukt hele plater (utført av Hope og Brudal). Da resultatene i disse forsøkene i stor grad sammenfaller med resultatene i dette arbeidet, kan dråpemetoden vurderes som en god nok metode for å finne CFU antall.

Vekstforsøkene viser med påfølgende CFU telling at korrelasjonen mellom CFU og OD er sammenfallende for de forskjellige subsp av *F. noatunensis* subsp. Sammenheng mellom OD og CFU for ulike bakterie arter vil variere og er avhengig av bakteriestørrelse. Undersøkelser med ulike mikroskoperingsteknikker her vist at de forskjellige Fn stammene har lik størrelse (sett i upubliserte undersøkelser av E. O. Lampe og E. Brudal med TEM, AFM og IFM) For å få bekreftet at korrelasjonen mellom OD og CFU er lik for Fnn, Fno og Fn AL, er det nødvendig å utføre noen ekstra vekstforsøk for Fno og Fn AL. For å begrense mengden arbeid vil det være aktuelt å bare følge vekstkuren til og med den eksponentielle fasen. For Fno vil det være aktuelt å foreta OD-målinger og CFU-prøver oftere enn to ganger daglig.

Når Fnn skal brukes i undersøkelser i cellekulturer og zebrafiskforsøk er det viktig å vite hvordan miljøet påvirker bakterien. Når bakteriene ble fortynnet i mediene L-15 (medie til cellekulturer) og PBS (injeksjonsløsning i zebrafiskforsøk) ble det sett at mediet ikke hadde noen tydelig negativ virkning på CFU. Men i cellekultur og zebrafiskforsøk vil bakteriene utsatt for det uegnede medie/løsning over lengre tid enn det som er gjort her (tiden det tar å lage en fortynningsrekke). Det kunne derfor være interessant å undersøke CFU-tall etter at bakteriene har vært utsatt for mediene i en tilsvarende tidsperiode som de vil bli utsatt for i et reelt infeksjonsforsøk. For PBS kan det være aktuelt å teste CFU etter en time for å dekke tiden det tar å resuspendere bakteriene i PBS og injisere fisk. For L-15 må CFU tallet testes etter mye lengre tid, da infiseringsforsøk i cellekultur varer over flere dager. Det er indikasjoner på at *F. noatunensis* overlever lenge i L-15. Det er utført CFU telling etter endt infeksjonsforsøk i cellekultur som har gitt vekst av *F. noatunensis*.

I vekstforsøkene med Fnn, Fnn $\Delta$ clpB, Fnn:pKK289clpB og Fnn $\Delta$ clpB:pKK289clpB ble det først vist store forskjeller i når vekstkulturene kom i eksponentiell fase, selv om start OD var justert så den skulle være lik for alle kulturene. Vekstkulturene med villtypen var overraskende lav i forhold til de andre. Når forsøket ble gjentatt nådde alle kulturene den eksponentielle fasen samtidig. Ulikhetene i vekstforsøkene ser ut til å stamme fra startkulturenes OD og hvor startkulturene var i vekstkurven før de ble overført til vekstkulturene. Det kan egne seg for videre forsøk hvor det før har blitt brukt overnatte kulturer og å heller bruke startkulturer med en viss OD. Forsøkene viser at Fnn kommer raskere i eksponentiell fase når bakteriene som ble overført også var i eksponentiell fase. Det er også en indikasjon på at jo høyere OD i startkulturen jo raskere kommer vekstkulturen i eksponentiell fase men at forskjellene blir mindre over en OD på 1,35. Den eneste av vekstkulturene fra første forsøk som var lik vekstkulturen i de to siste forsøkene hadde en OD på 1,35. For fremtidige forsøk vil det muligens kunne egne seg å bruke startkulturer med en OD på 1,4 opp mot stasjonær fasen.

I vekststudiene hvor medie var tilsatt ampicillin ble det observert veksthemming av Fno. Dette ble ikke observert for Fnn eller Fn AL. I vekstforsøkene med Fno (figur med resultater er ikke vist i oppgaven), vokser bakteriene som har ampicillin tilsatt i mediet mye saktere og når en mye lavere maksimal OD. Ampicillin vil derfor ikke stoppe vekst av Fno helt. Dette var ikke forventet siden ampicillin har blitt testet i MIC-studier for Fno og bakteriestammen viste seg å være resistent for konsentrasjoner fem ganger så høye som konsentrasjonen av ampicillin som er brukt til forsøkene i dette arbeidet (Soto *et al.*, 2012). I tillegg har ampicillin også blitt benyttet som seleksjonsmiddel mot forurensende mikroorganismer både for Fno og Fnn (Furevik *et al.*, 2011; Soto *et al.*, 2009b). Hos *F. noatunensis* er antibiotikaresistens og relaterte gener involvert i ampicillinresistens lite studert. Hos andre arter i Francisellagenuset som *F. tularensis* og *F. philomiragia* finnes flere genetiske elementer som involvert resistens mot beta-laktamer (Biswas *et al.*, 2008; Toth *et al.*, 2012). Mulige årsaker til forskjellen i resistens mellom Fno og Fnn og Fn AL kan være i at de ikke uttrykker de samme resistensgenene. Det kan derfor være interessant å undersøke forskjeller i resistensgener for *F. noatunensis* subsp. nærmere.

Ampicillin vil ikke egne seg i vekstforsøk for Fno og en burde unngå å bruke ampicillin som seleksjonsmiddel i cellekulturer og vekststudier. Vekstforsøkene gjort her med ampicillin illustrerer godt at det er viktig å ikke anta at de ulike subsp vil oppføre seg likt.

For ingen av *F. noatunensis* subsp. studert her ble det observert noen effekt på CFU etter å ha utsatt bakteriene for enten sonikering eller ekstra pipettering. Mulige årsaker til dette kan være at sonikering og ekstra pipettering ikke fungerer som metode for å løse aggregerte bakterieceller eller at bakteriene ikke aggregerer så mye som en først har trodd. I det siste tilfelle vil CFU tallene observert her være et reelt bilde på antall bakterier.

Det foregår prosjekter i forskningsgruppen hvor *F. noatunensis* uttrykk av gener involvert i ekspresjon av type 4 pili (tfp) og kapsel gener som *wbtA* undersøkes nærmere.

Delesjonsmutanter er konstruert i flere gener involvert i uttrykk av tfp. Det samme er forsøkt for genklusteret *wbt*, men til nå uten hell. Det vil derfor være mulig å studere *F. noatunensis* om Tfp og videre *wbt* gen clusteret kan ha effekt på aggregering og biofilmdannelse.

Av praktiske årsaker ble det bare testet om sonikering kan ha effekt på CFU med et ultralydbad, fordi det kun var et tilgjengelig på laboratoriet. Ultralydbadet som ble brukt til sonikeringen hadde en frekvens på 35 kHz. For *Bacillus subtilis* har det ultralyd blitt undersøkt nærmere som metode (Joyce *et al.*, 2003a). Det har blitt testet ut ultralyd for forskjellige volumer, tidslengde og forskjeller i ultralyd intensitet. Ultralydbadene som ga høy dearrangering og lite celledød hos *B. subtilis* var badene med høy frekvens (512 og 850 kHz). Mens ultralydbadet som hadde en frekvens på 38 kHz ga i større grad celledød. I forsøkene med *B. subtilis* ble det brukt betydelig større volum enn det som er brukt i denne oppgaven. Volumene var på 100 til 200 ml, mens i forsøkene med *F. noatunensis* ble bare 1 ml utsatt for sonikering. I forsøket med *B. subtilis* ga 100 ml større dødelighet enn 200 ml. Det er mulig at badet og oppsette som ble brukt i denne oppgaven ikke egnet seg til å deaggregere *F. noatunensis*. Men hvor en har sett stor nedgang i CFU hos *B. subtilis* i løpet av 15 minutter ble det ikke observert noen nedgang hos *F. noatunensis*. Disse resultatene tyder på at *F. noatunensis* er mer resistent mot sonikering enn *B. sub.*, med det er heller ikke sikkert at optimale betingelse for *B. subtilis* kan benyttes for *F. noatunensis*. Det kunne vært mulig å benytte et annet ultralydbad med høyere frekvens til sonikering av *F. noatunensis*. Skal sonikering brukes hver gang *F. noatunensis* skal utplates må det enten kjøpes inn et nytt ultralydbad eller det må bruke et annet laboratorie, og dette er ikke ønskelig. Med utstyret som er tilgjengelig viser sonikering ingen effekt.

## 5.2 Plasmidene

I dette arbeidet her nå hele pKK214 har blitt sekvensert og hvilke restriksjonssteder som kan brukes til videre kloningsarbeid er etablert. Dette vil gjøre videre bruk av pKK214 som ekspersjonsvektor enklere. pKK214 uten innskudd i polylinker regionen er ikke tilgjengelig i vårt laboratorie så pKK214*gfp* blir benyttet som utgangspunkt for videre kloninger. Unike restriksjonszymer som kan brukes for å kutte ut *gfp* er PstI eller NdeI og SacI, BsaI, PvuII eller EcoRI. PstI og NdeI vil kunne kutte mellom *gfp* og *groEL* promoterer

For pDMK2 ble polylikerregionen og området rundt sekvensert For så fullstendig sekvens som mulig av pDMK2 ble pDMK3 ref også brukt som templat. Ut i fra tidligere plasmidkart har polylinkerregionen har blitt forandret og unike restriksjonssteder en kan bruke i videre arbeid er kartlagt. Kunnskap om restriksjonssetene i plasmidet vil gjøre kloningsarbeid letter der det nå er mulig å unngå oppklipping eller forsøk på bruk av RE som ikke kutter. Uventet og av interesse var at det finnes IS elementet kan muligens ha kommet inn i plasmidet via E. coli S17.1 som plasmidet er isolert fra.

## 5.3 ClpB

Etter at dette arbeidet var avsluttet har clpBHis konstrukt blitt flyttet fra pCR4 og klonet inn i pKK289 (av E. O. Lampe). pKK289clpBHis skal transformeres inn i Fnn for videre funksjonelle analyser av ClpB., men først må uttrykk av clpBHis konstruktet verifiseres. Dette vil bli utført med Western blotting ved bruk av anti-His antistoff.

I cellen samarbeider ClpB med andre proteiner i et chaperon system og det kan derfor være interessant å finne ut hvilke proteiner ClpB kan binde seg til. Dette kan undersøkes med en pull-down assay. Da blir IMAC brukt. Først tilsettes lysat fra bakterier som produserer his-merket ClpB og denne vil binde seg til kolonnen. Når en så tilsette lysat fra samme bakterie som ikke har noen proteiner his-tagget vil proteinene som binder til ClpB bli igjen i kolonnen. Tilslutt kan proteinene sammen eluderes ut av kolonnen og analyseres. Alternativt vil ClpBHis i kompleks med andre proteiner binder seg til kolonnen i et et-steps prosess før eluering.

## 5.4 Konklusjon

- Ampicilin er ikke et egnet seleksjonsmiddel for Fno, men kan brukes for Fnn og FnAL
- OD 1 tilsvarer  $10^9$  CFU/ml, dette målet kan brukes for alle de tre stammene som ble testet.
- Det er ikke nødvendig å endre pipetteringsprosedyren til 20 ganger per fortytning.
- Ultralydbadet som er tilgjengelig egner seg ikke til å løse eventuelle aggregater hos *F. noatunensis*.
- Korte opphold i PBS og L-15 gir ingen negativ virkning på vekst av *F. noatunensis* subsp.
- Vekst av CFU på plate er uregelmessig ved lave konsentrasjoner.
- pKK214 og pDMK2 har blitt sekvensert
- Det har blitt laget genetiske verktøy for funksjonsanalyse av ClpB
  - *ClpB*His-konstrukt
  - Fnn $\Delta$ *clpB*:pKK289*clpB*
  - Fnn:pKK289*clpB*

# Litteraturliste

Agilent (2012a). Pfu Ultra DNA Polymerases & PCR Master Mixes - Details & Specifications.

Agilent (2012b). PfuUltra II HotStart Fusion DNA Polymerase - Details & Specifications.

Alfjord A, Jansson E, Johansson K (2006). A systematic granulomatous inflammatory disease in wild Atlantic cod, *Gadus morhua*, associated with a bacterium of the genus *Francisella*. *DipNet Newsletter* 44. *DipNet Newsletter* **44**.

Bakkemo KR, Mikkelsen H, Bordevik M, Torgersen J, Winther-Larsen HC, Vanberg C, *et al.* (2011). Intracellular localisation and innate immune responses following *Francisella noatunensis* infection of Atlantic cod (*Gadus morhua*) macrophages. *Fish & Shellfish Immunology* **31**(6): 993-1004.

Barns SM, Grow CC, Okinaka RT, Keim P, Kuske CR (2005). Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples. *Applied and environmental microbiology* **71**(9): 5494-5500.

Barrigan LM, Tuladhar S, Brunton JC, Woolard MD, Chen C-j, Saini D, *et al.* (2013). Infection with *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain clpB leads to an altered yet protective immune response. *Infection and immunity*.

Birkbeck T, Bordevik M, Frøystad M, Baklien Å (2007). Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *Journal of fish diseases* **30**(8): 505-507.

Birkbeck T, Feist S, Verner-Jeffreys D (2011). *Francisella* infections in fish and shellfish. *Journal of fish diseases* **34**(3): 173-187.

Biswas S, Raoult D, Rolain J-M (2008). A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. *International journal of antimicrobial agents* **32**(3): 207-220.

Brudal E, Winther-Larsen HC, Colquhoun DJ, Duodu S (2013). Evaluation of reference genes for reverse transcription quantitative PCR analyses of fish-pathogenic *Francisella* strains exposed to different growth conditions. *BMC Research Notes* **6**(1): 76.

Chan EY (2005). Advances in sequencing technology. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **573**(1): 13-40.

Colquhoun DJ, Duodu S (2011). *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Vet Res* **42**(45): 1-15.

Conlan JW, Shen H, Golovliov I, Zingmark C, Oyston PC, Chen W, *et al.* (2010). Differential ability of novel attenuated targeted deletion mutants of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* strain SCHU S4 to protect mice against aerosol challenge with virulent bacteria: Effects of host background and route of immunization. *Vaccine* **28**(7): 1824-1831.

Felleskatalogen (2013). QI10 Immunologiske midler til fisk.

Freeman ZN, Dorus S, Waterfield NR (2013). The KdpD/KdpE Two-Component System: Integrating K<sup>+</sup> Homeostasis and Virulence. *PLoS pathogens* **9**(3): e1003201.

Freestone PP, Haigh RD, Williams PH, Lyte M (1999). Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. *FEMS microbiology letters* **172**(1): 53-60.

Furevik A, Pettersen EF, Colquhoun D, Wergeland HI (2011). The intracellular lifestyle of *Francisella noatunensis* in Atlantic cod (*Gadus morhua*L.) leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology* **30**(2): 488-494.

Gray CG, Cowley SC, Cheung KK, Nano FE (2002). The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS microbiology letters* **215**(1): 53-56.

Hallenstvedt A (2009). Fiskeoppdrett. In: *Store norske leksikon*.

Halmann M, Benedict M, Mager J (1967). Nutritional requirements of *Pasteurella tularensis* for growth from small inocula. *Journal of General Microbiology* **49**(3): 451-460.

Havlasová J, Hernychová L, Brychta M, Hubálek M, Lenco J, Larsson P, *et al.* (2005). Proteomic analysis of anti-*Francisella tularensis* LVS antibody response in murine model of tularemia. *Proteomics* **5**(8): 2090-2103.

Hope AP Characterisation of the fish pathogen Francisella in cells and zebrafish. Master of Science Degree, University of Oslo, 2011.

Hsieh C, Tung M, Tu C, Chang C, Tsai S (2006). Enzootics of visceral granulomas associated with Francisella-like organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture* **254**(1): 129-138.

Invitrogen™ pCR®4-TOPO®.

Isachsen CH, Vågnes Ø, Jakobsen RA, Samuelsen OB (2012). Antimicrobial susceptibility of *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* strains isolated from Atlantic cod *Gadus morhua* in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms* **98**(1): 57.

(2007). World tilapia trade. *INFOFISH Tilapia Conference, Kuala Lumpur*.

Joyce E, Phull S, Lorimer J, Mason T (2003a). The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. *Ultrasonics sonochemistry* **10**(6): 315-318.

Joyce E, Phull S, Lorimer J, Mason T (2003b). The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. *Ultrasonics sonochemistry* **10**(6): 315-318.

Kamaishi T, Fukuda Y, Nishiyama M, Kawakami H, Matsuyama T, Yoshinaga T, *et al.* (2005). Identification and pathogenicity of intracellular *Francisella* bacterium in three-line grunt *Parapristipoma trilineatum*. *Fish Pathology* **40**(2): 67-72.

Kolmodin LA, Birch DE (2002). Polymerase Chain Reaction. *RNA* **2**: 5.

Kuoppa K, Forsberg Å, Norqvist A (2001). Construction of a reporter plasmid for screening in vivo promoter activity in *Francisella tularensis*. *FEMS microbiology letters* **205**(1): 77-81.

Legemiddelverket (2013a). Pharmaceuticals for fish, holding marketing authorisation in Norway.

Legemiddelverket (2013b). Vaccines for fish, holding marketing authorisation (MA) in Norway. [www.legemiddelverket.no/Veterinaarmedisin/produksjonsdyr\\_legemidler/Fish\\_medicine/](http://www.legemiddelverket.no/Veterinaarmedisin/produksjonsdyr_legemidler/Fish_medicine/).



Life (2013a). pCR®4-TOPO® vector.

Life (2013b). TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing Product Information.

Life (2012). TOPO®TA Cloning®Kit for Sequencing User Manual.

Lu J, Peng Y, Arutyunov D, Frost LS, Glover JM (2012). Error-prone PCR mutagenesis reveals functional domains of a bacterial transcriptional activator, TraJ. *Journal of bacteriology* **194**(14): 3670-3677.

Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**(1): 1-6.

Maier TM, Havig A, Casey M, Nano FE, Frank DW, Zahrt TC (2004). Construction and characterization of a highly efficient *Francisella* shuttle plasmid. *Applied and environmental microbiology* **70**(12): 7511-7519.

Mauel M, Soto E, Moralis J, Hawke J (2007). A piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. *Journal of aquatic animal health* **19**(1): 27-34.

Meibom KL, Dubail I, Dupuis M, Barel M, Lenco J, Stulik J, *et al.* (2008). The heat-shock protein ClpB of *Francisella tularensis* is involved in stress tolerance and is required for multiplication in target organs of infected mice. *Molecular microbiology* **67**(6): 1384-1401.

Michael T. Madigan JMM, Paul V. Dunlap, David P. Clark (2008). *Brock Biology of Microorganisms*. 12 edn. Benjamin Cummings.

Mikalsen J, Colquhoun DJ (2009). *Francisella asiatica* sp. nov. isolated from farmed tilapia (*Oreochromis* sp.) and elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* to species rank as *Francisella noatunensis* comb. nov., sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*.

Mikalsen J, Olsen A, Tengs T, Colquhoun D (2007). *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(9): 1960-1965.

Milton DL, O'Toole R, Horstedt P, Wolf-Watz H (1996). Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* **178**(5): 1310-1319.

Norqvist A, Kuoppa K, Sandström G (1996). Construction of a shuttle vector for use in *Francisella tularensis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **13**(3): 257-260.

Nylund A, Ottem KF, Watanabe K, Karlsbakk E, Krossøy B (2006). *Francisella* sp.(Family Francisellaceae) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming. *Archives of microbiology* **185**(5): 383-392.

Onuki H, Kamino K (2000). Bacterial growth stimulation with exogenous siderophore and synthetic N-acyl homoserine lactone autoinducers under iron-limited and low-nutrient conditions. *Applied and environmental microbiology* **66**(7): 2797-2803.

Oyston PC (2008). *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *Journal of medical microbiology* **57**(8): 921-930.

Petersen J, Carlson J, Yockey B, Pillai S, Kuske C, Garbalena G, *et al.* (2009). Direct isolation of *Francisella* spp. from environmental samples. *Letters in applied microbiology* **48**(6): 663-667.

PHARMAQ (2012). *Pakningsvedlegg for ALPHA MARINE® Vibrio*.

Qu P, Deng X, Zhang J, Chen J, Zhang Q, Xiao Y, *et al.* (2009). Identification and characterization of the *Francisella* sp. strain 08HL01032 isolated in air condition systems]. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica sinica* **49**(8): 1003.

Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Volume 1–3: Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Samuelsen OB, Nerland AH, Jorgensen T, Schroder M, Svasand T, Bergh Ø (2006). Viral and bacterial diseases of Atlantic cod *Gadus morhua*, their prophylaxis and treatment: a review. *Diseases of aquatic organisms* **71**(3): 239-254.

Sandberg A, Hessler JH, Skov RL, Blom J, Frimodt-Møller N (2009). Intracellular activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a mouse peritonitis model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**(5): 1874-1883.

Santic M, Al-Khodori S, Abu Kwaik Y (2010). Cell biology and molecular ecology of *Francisella tularensis*. *Cellular microbiology* **12**(2): 129-139.

Schrallhammer M, Schweikert M, Vallesi A, Verni F, Petroni G (2011). Detection of a novel subspecies of *Francisella noatunensis* as endosymbiont of the ciliate *Euplotes raikovi*. *Microbial ecology* **61**(2): 455-464.

Sjödin A, Svensson K, Öhrman C, Ahlinder J, Lindgren P, Duodu S, *et al.* (2012). Genome characterisation of the genus *Francisella* reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish. *BMC genomics* **13**(1): 268.

Soto E, Endris RG, Hawke JP (2010). In vitro and in vivo efficacy of florfenicol for treatment of *Francisella asiatica* infection in tilapia. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**(11): 4664-4670.

Soto E, Fernandez D, Hawke JP (2009a). Attenuation of the Fish Pathogen *Francisella* sp. by Mutation of the *iglC\** Gene. *Journal of aquatic animal health* **21**(3): 140-149.

Soto E, Griffin M, Wiles J, Hawke JP (2012). Genetic analysis and antimicrobial susceptibility of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (syn. *F. asiatica*) isolates from fish. *Veterinary microbiology* **154**(3): 407-412.

Soto E, Hawke J, Fernandez D, A Morales J (2009b). *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *Journal of fish diseases* **32**(8): 713-722.

Spencer RC (2003). *Bacillus anthracis*. *Journal of clinical pathology* **56**(3): 182-187.

Sridhar S, Sharma A, Kongshaug H, Nilsen F, Jonassen I (2012). Whole genome sequencing of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* Toba04 gives novel insights into *Francisella* evolution and pathogenicity. *BMC genomics* **13**(1): 598.

Sullivan JT, Jeffery EF, Shannon JD, Ramakrishnan G (2006). Characterization of the siderophore of *Francisella tularensis* and role of *fslA* in siderophore production. *Journal of bacteriology* **188**(11): 3785-3795.

Thermo-Scientific (2011). DyNAzyme II DNA Polymerase Product Information

Toth M, Vakulenko V, Antunes NT, Frase H, Vakulenko SB (2012). Class A carbapenemase FPH-1 from *Francisella philomiragia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**(6): 2852-2857.

Twine S, Shen H, Harris G, Chen W, Sjostedt A, Ryden P, *et al.* (2012). BALB/c mice, but not C57BL/6 mice immunized with a  $\Delta$ clpB mutant of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* are protected against respiratory challenge with wild-type bacteria: Association of protection with post-vaccination and post-challenge immune responses. *Vaccine*.

Veterinærinstituttet (2006-2012). *Fiskehelsesrapporten*.

Weiss DS, Brotcke A, Henry T, Margolis JJ, Chan K, Monack DM (2007). In vivo negative selection screen identifies genes required for *Francisella* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(14): 6037-6042.

Wilson BA, Salyers AA, Whitt DD, Winkler ME (2011). *Bacterial pathogenesis: A molecular approach*. edn. American Society for Microbiology (ASM).

Winther-Larsen H.

Zogaj X, Klose KE (2010). Genetic manipulation of *Francisella tularensis*. *Frontiers in microbiology* **1**.

# 6 Vedlegg 1



Innovations in nucleic acid isolation

## **E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I**

D6942-00	5 preps	Q - Spin
D6942-01	50 preps	Q - Spin
D6942-02	200 preps	Q - Spin
D6943-00	5 preps	V - Spin
D6943-01	50 preps	V - Spin
D6943-02	200 preps	V - Spin

## **E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit II**

D6945-00	5 preps	V - Spin
D6945-01	50 preps	V - Spin
D6945-02	200 preps	V - Spin

**August 2012**

*For research use only. Not intended for diagnostic testing.*



## E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit I Protocol - Spin Protocol

All centrifugation should be performed at room temperature unless otherwise noted. For low copy number plasmids refer to Page 21. This protocol is designed to isolate plasmid DNA from *E. coli* grown in an overnight 1-5 mL LB culture.

### Materials and Equipment to be Supplied by User:

- 100% ethanol
- Microcentrifuge capable of at least 13,000 x *g*
- Nuclease-free 1.5 mL or 2 mL microcentrifuge tubes
- Culture tubes
- Optional: sterile deionized water
- Optional: Water bath or incubator capable of 70°C

### Before Starting:

- Preheat Elution Buffer to 70°C if plasmid DNA is >10 kb
- Prepare DNA Wash Buffer and Solution I according to the instructions in the Preparing Reagents section on Page 6

1. Isolate a single colony from a freshly streaked selective plate, and inoculate a culture of 1- 5 mL LB medium containing the appropriate selective antibiotic. Incubate for ~12-16 hours at 37°C with vigorous shaking (~ 300 rpm). Use a 10-20 mL culture tube or a flask with a volume of at least 4 times the volume of the culture. It is strongly recommended that an endA negative strain of *E. coli* be used for routine plasmid isolation. Examples of such strains include DH5a<sup>®</sup> and JM109<sup>®</sup>.

2. Centrifuge at 10,000 x *g* for 1 minute at room temperature.

3. Decant or aspirate and discard the culture media.

4. Add 250 µL Solution I/RNase A. Vortex or pipet up and down to mix thoroughly. Complete resuspension of cell pellet is vital for obtaining good yields.

Note: RNase A must be added to Solution I before use. Please see the instructions in the Preparing Reagents section on Page 6.

5. Transfer suspension into a new 1.5 mL microcentrifuge tube.

6. Add 250 µL Solution II. Invert and gently rotate the tube several times to obtain a clear lysate. A 2-3 minute incubation may be necessary.

Note: Avoid vigorous mixing as this will shear chromosomal DNA and lower plasmid purity. Do not allow the lysis reaction to proceed more than 5 minutes. Store Solution II tightly capped when not in use to avoid acidification from CO<sub>2</sub> in the air.

7. Add 350 µL Solution III. Immediately invert several times until a flocculent white precipitate forms.

Note: It is vital that the solution is mixed thoroughly and immediately after the addition of Solution III to avoid localized precipitation.

8. Centrifuge at maximum speed ( $\geq 13,000 \times g$ ) for 10 minutes. A compact white pellet will form. Promptly proceed to the next step.
9. Insert a HiBind® DNA Mini Column into a 2 mL Collection Tube.
10. Add 100 µL Equilibration Buffer.
11. Centrifuge at maximum speed for 30-60 seconds.
12. Discard the filtrate and reuse the collection tube.
13. Transfer the cleared supernatant from Step 8 by CAREFULLY aspirating it into the HiBind® DNA Mini Column. Be careful not to disturb the pellet and that no cellular debris is transferred to the HiBind® DNA Mini Column.
14. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
15. Discard the filtrate and reuse the collection tube.
16. Add 500 µL HB Buffer.
17. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.
18. Discard the filtrate and reuse collection tube.
19. Add 700 µL DNA Wash Buffer.

Note: DNA Wash Buffer must be diluted with 100% ethanol prior to use. Please see Page 6 for instructions.



20. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.

21. Discard the filtrate and reuse the collection tube.

Optional: Repeat Steps 19-21 for a second DNA Wash Buffer wash step.

22. Centrifuge the empty HiBind® DNA Mini Column for 2 minutes at maximum speed to dry the column matrix.

Note: It is important to dry the HiBind® DNA Mini Column matrix before elution. Residual ethanol may interfere with downstream applications.

23. Transfer the HiBind® DNA Mini Column to a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.

24. Add 30-100 µL Elution Buffer or sterile deionized water directly to the center of the column membrane.

Note: The efficiency of eluting DNA from the HiBind® DNA Mini Column is dependent on pH. If using sterile deionized water, make sure that the pH is around 8.5.

25. Let sit at room temperature for 1 minute.

26. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.

Note: This represents approximately 70% of bound DNA. An optional second elution will yield any residual DNA, though at a lower concentration.

27. Store DNA at -20°C.

## E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit Protocol - Low Copy Number Plasmid and BAC DNA Protocol

Low copy number plasmids generally give 0.1-1 µg DNA per mL overnight culture. For the isolation of plasmid DNA from low copy number plasmids (0.1-1 µg/mL culture) or low copy number plasmid (1-2 µg/mL culture) bacteria, use the following modified protocol.

Note: The E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I and the E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit II come with enough Solution I, Solution II, and Solution III to perform the standard protocols. Additional Solution I, Solution II, and Solution III are needed to perform the Low Copy Number Plasmid and BAC DNA Protocol. These buffers can be purchased separately. See Page 24 for ordering information.

1. Increase the volume of starting culture from that of high copy number plasmids. Use 5-10 mL bacterial culture for the E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I or 20-30 mL bacterial culture for E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit II.
2. Pellet the bacterial cells by centrifugation.
3. Decant or aspirate and discard the culture media.
4. Perform Steps 4-8 in the standard protocols with double the volumes of Solution I, Solution II, and Solution III.
5. Continue with Step 9 of the standard protocols by following the wash, drying, and elution steps. There is no need to increase the volumes of HB Buffer, DNA Wash Buffer, or Elution Buffer.

# 7 Vedlegg 2

## E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit - Spin Protocol

### Materials and Equipment to be Supplied by User:

- Heat block or water bath capable of 60°C
- Microcentrifuge capable of at least 13,000 x g
- Vortexer
- Nuclease-free 1.5 mL microcentrifuge tubes
- 100% ethanol
- Optional: 5M Sodium Acetate, pH 5.2
- Optional: Sterile deionized water

### Before starting:

- Prepare SPW Wash Buffer according to the “Preparing Reagents” section on Page 5
- Set heating block or water bath to 60°C

Note: The yellow color of the Binding Buffer (XP2) signifies a pH of  $\leq 7.5$ .

1. Perform agarose gel/ethidium bromide electrophoresis to fractionate DNA fragments. Any type or grade of agarose may be used. However, it is strongly recommended that fresh TAE buffer or TBE buffer be used as running buffer. Do not reuse running buffer as its pH will increase and reduce yields.
2. When adequate separation of bands has occurred, carefully excise the DNA fragment of interest using a wide, clean, sharp scalpel. Minimize the size of the gel slice by removing extra agarose.
3. Determine the appropriate volume of the gel slice by weighing it in a clean 1.5 mL microcentrifuge tube. Assuming a density of 1 g/mL, the volume of gel is derived as follows: a gel slice of mass 0.3 g will have a volume of 0.3 mL.
4. Add 1 volume Binding Buffer (XP2).
5. Incubate at 60°C for 7 minutes or until the gel has completely melted. Vortex or shake the tube every 2-3 minutes.

Important: Monitor the pH of the Gel/Binding Buffer mixture after the gel has completely dissolved. DNA yields will significantly decrease when the pH > 8.0. If the color of the mixture becomes orange or red, add 5  $\mu$ L 5M sodium acetate

(pH 5.2) to bring the pH down. After this adjustment, the color of the Gel/Binding Buffer mixture should be light yellow.

6. Insert a HiBind® DNA Mini Column in a 2 mL Collection Tube.
7. Add no more than 700  $\mu$ L DNA/agarose solution from Step 5 to the HiBind® DNA Mini Column.
8. Centrifuge at 10,000  $\times g$  for 1 minute at room temperature.
9. Discard the filtrate and reuse collection tube.
10. Repeat Steps 7-9 until all of the sample has been transferred to the column.
11. Add 300  $\mu$ L Binding Buffer (XP2).
12. Centrifuge at maximum speed ( $\geq 13,000 \times g$ ) for 1 minute at room temperature.
13. Discard the filtrate and reuse collection tube.
14. Add 700  $\mu$ L SPW Wash Buffer.  
Note: SPW Wash Buffer must be diluted with 100% ethanol prior to use. Please see Page 5 for instructions.
15. Centrifuge at maximum speed for 1 minute at room temperature.
16. Discard the filtrate and reuse collection tube.  
Optional: Repeat Steps 14-16 for a second SPW Wash Buffer wash step. Perform the second wash step for any salt sensitive downstream applications.
17. Centrifuge the empty HiBind® DNA Mini Column for 2 minutes at maximum speed to dry the column matrix.  
Note: It is important to dry the HiBind® DNA Mini Column matrix before elution. Residual ethanol may interfere with downstream applications.
18. Transfer the HiBind® DNA Mini Column to a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.
19. Add 30-50  $\mu$ L Elution Buffer or deionized water directly to the center of the column membrane.  
  
Note: The efficiency of eluting DNA from the HiBind® DNA Mini Column is dependent on pH. If eluting DNA with deionized water, make sure that the pH is around 8.5.
20. Let sit at room temperature for 2 minutes.
21. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.

Note: This represents approximately 70% of bound DNA. An optional second elution will yield any residual DNA, though at a lower concentration.

22. Store DNA at -20°C.

## E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit Protocol - Purification of DNA from Enzymatic Reactions

The following protocol is designed for DNA recovery from enzymatic reactions such as PCR and probe labeling reactions.

### Materials and Equipment to be Supplied by User:

- Microcentrifuge capable of at least 13,000 x *g*
- Vortexer
- Nuclease-free 1.5 mL microcentrifuge tubes
- 100% ethanol

### Before starting:

- Prepare SPW Wash Buffer according to the “Preparing Reagents” section on Page 5

Note: The yellow color of the Binding Buffer (XP2) signifies a pH of  $\leq 7.5$ .

1. Determine the volume of the enzymatic reaction.
2. Transfer the sample into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.
3. Add 1 volume Binding Buffer (XP2).
4. Vortex or invert the sample to mix thoroughly.
5. Briefly centrifuge the tube to collect any drops from the inside of the lid.
6. Insert a HiBind® DNA Mini Column into a 2 mL Collection Tube.
7. Transfer the sample to the HiBind® DNA Mini Column.

8. Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature.

Discard the filtrate and reuse the collection tube.

10. Add 700  $\mu$ L SPW Wash Buffer.

Note: SPW Wash Buffer must be diluted with 100% ethanol prior to use. Please see Page 5 for instructions.

11. Centrifuge at maximum speed ( $\geq 13,000$  x g) for 1 minute at room temperature.

12. Discard the filtrate and reuse collection tube.

13. Repeat Steps 10-12 for a second SPW Wash Buffer wash step.

14. Centrifuge the empty HiBind® DNA Mini Column for 2 minutes at maximum speed to dry the column matrix.

Note: It is important to dry the HiBind® DNA Mini Column matrix before elution. Residual ethanol may interfere with downstream applications.

15. Transfer the HiBind® DNA Mini Column to a clean 1.5 mL microcentrifuge tube.

16. Add 30-50  $\mu$ L Elution Buffer or deionized water directly to the center of the column membrane.

Note: The efficiency of eluting DNA from the HiBind® DNA Mini Column is dependent on pH. If eluting DNA with deionized water, make sure that the pH is around 8.5.

17. Let sit at room temperature for 2 minutes.

18. Centrifuge at maximum speed for 1 minute.

Note: This represents approximately 70% of bound DNA. An optional second elution will yield any residual DNA, though at a lower concentration.

19. Store DNA at -20°C.

## 8 Vedlegg 3

>pKK214: gfp

AGATACTAAAAATAAAGAGGATTACATACCAATCGAAGCATCTGAAAGACTTAG  
AGAAGTTGTGTTAAGTGATGAACTAGACCTAGATCTGTATTATGTCAGATCAATA  
TTAGACATCATCATTTACATGATATTGAAAGGGTTTGTGATGATACTTGGAGGA  
ATTGGGACAATAAAAAAATCAAAGATAGAAAAAGAGTTTTTATTGCAAATATAA  
AAAAATTAGAAAAGAAACCAGAAGAGAATCATAAGCTACCATTTGGATTTGAGG  
AAGTGTAGGAATGAATATAGAAATATTTAAATTTTCAAAAAAACATAAAAAAAT  
AAATAAGAAGTTAATAGATTTAACAAAAGTAAAACAGGTTGTTACTACTGGCTAT  
AGCTTTATTGTTGTATATCAAAGAGGTCGAAAGATAGAGTTAAGTTATGAAAGTT  
CTTACTGGCATGCTAAAAAAGATTTGGATAATAGTAATAGTGACGTTGGAATAAC  
ATATAGTTACATTA AAAAAGATAAAAAGAGGCCCTGTCACAAAGATAACTATTTA  
CGAGACTCTAAAGGTAGACTATTAAGGACTGGGGAAAAATAGAAGAGCTTCAT  
GAAAAGTATCCTAAAATAGGTAAAATTTGGTACATTTCTAGCTGTCCCTCCTGTTC  
AGCTACTGACGGGGTGGTGCCTAACGGCAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTA  
GCGGAGTGTATACTGGCTTACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGTGTCAGTGAAGTGC  
TTCATGTGGCAGGAGAAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATA  
CAGGATATATTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTACGCTCGGTTCGTTCCGACTGC  
GGCGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGAGATTTCCCTGGAAGATGCCAGGA  
AGATACTTAACAGGGAAAGTGAGAGGGCCGCGGCAAAGCCGTTTTTCCATAGGCT  
CCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAAC  
CCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCGTGCCT  
CTCCTGTTCCCTGCCTTTTCGGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGT  
CTCATTCCACGCCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACT  
GTATGCACGAACCCCCGTTTCAGTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCG  
TCTTGAGTCCAACCCGAAAGACATGCAAAGCACCCTGGCAGCAGCCACTGG  
TAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGGTTAAGGCTAAACTGA  
AAGGACAAGTTTTGGTGACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAG  
TTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTTCGTTTTT  
AGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAA  
TCAGATAAAATATTTCTAGAACTAGTGGATCCCCCAAACATCGCAAAGGTGTAA  
ATATTATAATGCCAAAAAACTCAAATCCTATTGTATGGATTAGTCGAGCTAAAAA

GCTCATATTTTTTATATTCAAACCTATATACCCTTCAAGCTTTGAAAAATAAACTTA  
ATTATTATATATGTTATTTAGCTAGTTTTTTTAATTAAGTTAAAATCGAGAGCTT  
GTTTGACAAAAAAACAAAAAAATTTCTTGAAAATTTTTTTTTTTGACTCAATATCTA  
GACTTGCAAGAGCTTGGAACCTTTGAGATTGTTCTAAGATGCACTGCAGATTTAAG  
AAGGAGATATACATATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAAT  
TCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAG  
GGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTG  
GAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTTCGCGTATGGTCTTCAA  
TGCTTTGCGAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCA  
TGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTTCAAAGATGACGGGAACTA  
CAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATGCCCTTGTTAATAGAATCGAG  
TTAAAAGGTATTGATTTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAAT  
ACAACCTATAACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAA  
TCAAAGTTAACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGC  
AGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGAC  
AACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAG  
ACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGA  
TGAGCTCTACAAATAGAATTCCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATAT  
GGGATAGTGTTACCCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTCA  
TCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGC  
AAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGA  
GAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAA  
ACGTGGCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCGTTTTTACCATGGGCAAATATTAT  
ACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAGGTTTCATCATGCCGTTT  
GTGATGGCTTCCATGTCCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGA  
GTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCT  
GGTTGCTACGCCTGAATAAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGTCTG  
AAGCTTATCGCCGAGATGCGCCGCGTGCGGCTGCTGGAGATGGCAGGACGCGATG  
GATATGTTCTGCCAAGGGTTGGTTTGCGCATTCACAGTTCTCCGCAAGAATTGATT  
GGCTCCAATTCTTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGGCTTCCATTC  
AGGTCGAGGTGGCCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCGGGGAGGCAGACAA  
GGTATAGGGCGGCGCCTACAATCCATGCCAACCCGTTCCATGTGCTCGCCGAGGC  
GGCATAAATCGCCGTGACGATCAGCGGTCCAATGATCGAAGTTAGGCTGGTAAG



AGCCGCGAGCGATCCTTGAAGCTGTCCCTGATGGTCGTCATCTACCTGCCTGGAC  
AGCATGGCCTGCAACGCGGGCATCCCGATGCCGCCGGAAGCGAGAAGAATCATA  
ATGGGGAAGGCCATCCAGCCTCGCGTCGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCCCAGC  
GCGTCGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGG  
CGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAA  
GCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCTGCCGAAAATGA  
CCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCAT  
AAGTGCGGGCAGGATAGTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTT  
GAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGG  
AAGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGT  
GCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATA  
CCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCAT  
CGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCC  
GGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGAT  
CGCGTAGTCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGGCGGCC  
AAAGCGGTCCGACAGTGCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGC  
ATATAGCGCTAGCAGCACGCCATAGTACTGGCGATGCTGTCGGAATGGACGAT  
ATCCCGCAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCC  
AGGGTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTTCATACACGGTG  
CCTGACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGATAAAATACCGCATTAAAGCTTTAAAAT  
CCTCTAACGACATCATAACAACCTGCTTCTTTTTTTGAACCTCTAGTTACAATCATA  
GGACTATGATTTTTTGTACTCTATCCATTGAATCAGATAGTTCATTTCTAAAAGT  
TGAATAATTAACGGTTTGCATAATCYAAATCCMTGTACTIONTAAATAAGTACTTAAA  
GTATAGTTTCTAGGATTTAAAAAGTCAAAAAGTCTTTGAGTCTGTGGGATTTTTT  
TAAAATCCCCTAAGATATTCTCTTTATATATTCTCTTTATATATTGTCAGATTTTTT  
TTAATCCTCTGTAAGTATTGCTACATAAAGGCTTTGAAGCACTTTTTTAAAAAATT  
TAAAACACTTTTTTGTATCACTTTTTGAATTTAAAACACTTTTTTGTATCACTTTTT  
GAATTTAAAACACTTTTTTGTATCGTTAAAACACTTTTTTTTTATGAAGTAGTTGTT  
TTACTAATAGAAGTTTTATAGAATTTGTATATCGAGATAATGACTCTAGTTCTATG  
AAAGAAGTTAAAAATGTAAATGCTGGCAAAGAAATAGCTATGTCTAATACTCTTG  
TTGCAGGAAAGTATAGCCTTACAAAAGAAGAACAACAACTTAATATTCTTAGTTGC  
CTCAATGGTTAAAAGAGAAGATAAAGAGTTTCACAGGTATAAGATAAGCCTATCT  
GATCTTGAAAAAGCTACAGGGGTTAAGCATAACAGAGTGAGATTGAAGCAATTA

ATGCACTCAATAATGTCTAAGCCAGTATGGCTGAATAAAGAACAAACGAAGATA  
GCTAACTGGTTTGCATATATTGAAGCAGACCCTAAAAGCAGTGCTTTAATTTGCG  
AGTTTCATTGGTCATTAATGCCACACATGATACAACACTACAAGAGTACTTTACTAA  
AGCAGAAAGACAGTTACTATTTTCATTTAAAAGTAAGTATTCAAGCAGATTATAC  
TTACTTCTCAAAGCAAATTAGGCGAACAAGCAGGGTATGCTAATATAGTTGATT  
GCGTATTGTATGTCGATGATATGATTAATGATTTTGATTTACCTAAAAGTTACAGC  
AACAGATATTCAAATTTTAAAAATAAGTTCCTATTACCAGCACTAGAAGAGATTA  
ATCAATTATCGGATATTTTTGTAACCTATGATGACAAGGATCATCACAGAAAACA  
TGGTCGTAAGATTACAAATATCAAGTTTACAGTTAGTAAGGTAGCAGAGACAGA  
AGAAGAATTTAAGCAAAGCTTTT

## 9 Vedlegg 4

>pDMK2:OFORiglC

AATTGTCGACCCTCGAGTACGCGTCACTAGTGGGGCCCTTCTAGATAGATCTTGC  
ATGCGGCCGCGAATTCAGTACTAGTGGTGGTGAACCATATGGCGCAATACTCGG  
CTTGTATAATTTTGAACACTACAAATGATATAATTTGGTTGACAGGGATGGGC  
ATGGTGGCAAAGAATTCTCATGCGCCATTTATAGCATCAATAGACAAGTCATTTT  
TTGGTGTAAAGATCTATCAGAAATAACTCACATAAAGAGTTTTGAATCCTTGTT  
AGAACATCCTAGATATAAAGAGTGAATGACTTTAGAAACCTAGATGTAGCTGC  
ATATATCGGTTTGACTATCGGAGATTTTATGTTACGTCAGCCATATAATCCTGAGA  
ATAACCCAGTTCAGTATAAGCTTATGGAAGGCTTTAACGAGTTTGTGGATCATAA  
GAATAATGATAGCTACTTATGGGGACCCTCATCTATTCAGTTAGTTAAAAATATG  
GTGAGATCATATGATAAACTAGATGGTTTCAATACATAAAGAGGTGTTGAAAGTG  
GTGGTTATGTAAGAACTTAGTGTCATGTGTTTATGATAATAAAGGTGTCTTAGA  
AACAAAGCCGCCACTGAATGCTTTATTTGCAGATTATATGGAGCTATCACTTACA  
AATATTGGTTTAATACCATTTGTAAGTGAAAAAGGTACAAGTAATGCTTGTTTTTT  
TAGTGTGAACTCAGCTAAGAAAGTTGAAGAGTTTGTAGATAGTTTTGATTCTGCT  
AATCAATGTTGATTGCTAATCTTTCTTATACTATGTGTATATCCAGAATTTACA  
TTATATTAAGTGTGTTATCAGAGATAAGATAGGAAGTGTGTAGGTGCTGAGCAA  
ATTCAAAATATTCTTTCAGATTGGATATCAGAGTTTGTACTACTGTATATCAACC  
AACGCCTTTAGAGATGGCAAGATATCCTTTTAGGAATGTTTCTATTGATGTTAAA  
ACTATACCGGGTAAACCAGGGTGGTATTCATGTAATAAATGTGATTCCTCACA  
TTCAATTTGAAGGTATGGATACTACAATGACTATTGATACTAGGTTAGAACCAGA  
ATTATTTGGCGCGAATAAATACTAAAACAAGGAGAATGATTATGAACGAGATG  
ATAACAAGACAGCAAGTTGCTAGAATAGGGTACATAGCAGCTGTATAGTAAATA  
GGAGTTATATTATAAATGTTTCTCGAAAGGATATGTTGGGAAGATGGTCTAAG  
ATTAGACAAAGGTATCTTAGACAAATCAAATTTGTCTATTTTAGAAAGGTCAAAG  
TCTGCAAATTATTTGCCAGCTAATCTTAATAAAGGTATCGTTAGTTTCGATTTAGA  
TATGGAGAGTTTGCAGACGGGACTTATTCTAATAAAAGATCTTGTATTGTACTTA  
GATGAAAAACATTTATTTTTTATGATAAATGCTATCCTCTGTCTTTGCAGGTAAT  
GACAGATGAGTTAACTAATGATATCCCTCTATTCTTGAATGTTAAGGAGAAGATA  
GTTGAAAAAGAAGGTGTTAAGTACATATATAATCAACTATCACTTTCATTAGAGT  
ATGATTATAGTGTTAAGTATAGTACGCAAATTGCATTATTTAAGTTAGATAGAGG  
CAAGTTAGTATCAGATACATATGATTTTCTTTACTAACTCTTAATCACTATTTGA  
TGCATGATACTTTTATAAAGCTCAATAGAATGGTTTCTGAATTAATAATCTTTCAAT  
CGTTTTGTTTTCTCAACCTCAAGATCATATGCTGCAATTTTACTTGTATTCTTAATT  
AATAAATTAGAAAGAGAACTTAAATTTGCTGAATCTAATAAGTTAAATAGTTCTC  
CTAAGCAAATATTTGATCTAATTCATGATATTTATAGTTTAATCCAGCTTAACTTA  
GATAAGGTTGGGGATGTTGATAATATTGAGTTTGTATTTTATAAATCTATAAGGA  
AGATAAATTTATTGGCTGATAGATTATTGACTCTTTGTGAATATAGAAAAATTA  
TAACTTTATTAATTTGAACTGCAAGGAAAAAATATTTATGTGAAAACTTCCCC  
GAAGAGTTTTTCGTTGCTACTAGGTATTATCTTTTCATCAAAAGAAAGGCAATAG

CTCCAGCTAATGTAAAATTTGAAAATAAAAAAGCTATGAGAATAACAAGTATAA  
GTAGAAATAAAAACGTTGTAACCTCTCTCTTTCTGGAGTGAAACTCGTTGAAGT  
TGAGTATTCTATGATGAATTTTACAACACGGGTTGATAATATTGATGCAATATAT  
GAAATTCAAAAAGGCTCGGAATGGGACTTTAAATCGAATTCCTCGCGGCCGCGTA  
ACCTGAGCTCTCCCGGGAATTCCACAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACATGTG  
GAATTCCACATGTGGAATTCATGTCAGCCGTTAAGTGTTCTGTGTCACTCAA  
ATTGCTTTGAGAGGCTCTAAGGGCTTCTCAGTGCGTTACATCCCTGGCTTGTGTC  
CACAACCGTTAAACCTTAAAAGCTTTAAAAGCCTTATATATTCTTTTTTTTCTTAT  
AAAACCTTAAAACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGATTTATATTAATTTTATTGTT  
CAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAAACATGAGAGCTTAGTACGTTAGCCATGAG  
AGCTTAGTACGTTAGCCATGAGGGTTTAGTTCTGTTAAACATGAGAGCTTAGTACG  
TTAAACATGAGAGCTTAGTACGTGAAACATGAGAGCTTAGTACGTACTATCAACA  
GGTTGAACTGCTGATCTTCAGATCCTCTACGCCGACGCATCGTGGCCGGATCCA  
GCCGACCAGGCTTTCCACGCCCGCGTGCCGCTCCATGTCGTTTCGCGCGGTTCTCG  
GAAACGCGCTGCCGCGTTTCGTGATTGTCACGCTCAAGCCCGTAGTCCCGTTCGA  
GCGTCGCGCAGAGGTCAGCGAGGGCGCGGTAGGCCCGATACGGCTCATGGATGG  
TGTTTCGGGTTCGGGTGAATCTTGTTGATGGCGATATGGATGTGCAGGTTGTCGGT  
GTCGTGATGCACGGCACTGACGCGCTGATGCTCGGCGAAGCCAAGCCCAGCGCA  
GATGCGGTCTCAATCGCGCGCAACGTCTCCGCGTCGGGCTTCTCTCCCGCGCGG  
AAGCTAACCAGCAGGTGATAGGTCTTGTCGGCCTCGGAACGGGTGTTGCCGTGCT  
GGGTCCGCATCACCTCGGCCATGACAGCGGGCAGGGTGTTTGCTCGCAGTTCTG  
GACGCGCACGTGACCCAGGCGCTCGGTCTTGCTTGCCTGCTCGTTCGGTGTACTTC  
ACCAGCTCCGCGAAGTCGCTCTTCTTGATGGAGCGCATGGGGACGTGCTTGGCAA  
TCACGCGCACCCCCCGGCCGTTTTAGCGGCTAAAAAGTCATGGCTCTGCCCTCG  
GGCGGACCACGCCATCATGACCTTGCCAAGCTCGTCCTGCTTCTCTTCGATCTTC  
GCCAGCAGGGCGAGGATCGTGGCATCACCGAACC GCGCCGTGCGCGGGTTCGTCG  
GTGAGCCAGAGTTTCAGCAGGCCGCCAGGCGGCCAGGTCGCCATTGATGCGG  
GCCAGCTCGCGGACGTGCTCATAGTCCACGACGCCCGTGATTTTGTAGCCCTGGC  
CGACGGCCAGCAGGTAGGCCGACAGGCTCATGCCGGCCGCGCCGCTTTTCCTC  
AATCGCTCTTCGTTTCGTCTGGAAGGCAGTACACCTTGATAGGTGGGCTGCCCTTC  
TGGTTGGCTTGGTTTCATCAGCCATCCGCTTGCCCTCATCTGTTACGCCGGCGGTA  
GCCGGCCAGCCTCGCAGAGCAGGATTCCTCGTTGAGCACCGCCAGGTGCGAATAA  
GGGACAGTGAAGAAGGAACACCCGCTCGCGGGTGGGCCTACTTCACCTATCCTGC  
CCGGCTGACGCCGTTGGATACACCAAGGAAAGTCTACACGAACCTTTGGCAA  
ATCCTGTATATCGTGCGAAAAAGGATGGATATACCGAAAAAATCGCTATAATGAC  
CCCGAAGCAGGGTTATGCAGCGGAAAAGCGCTGCTTCCCTGCTGTTTTGTGGAAT  
ATCTACCGACTGGAAACAGGCAAATGCAGGAAATTACTGAACTGAGGGGACAGG  
CGAGAGACGATGCCAAAGAGCTACACCGACGAGCTGGCCGAGTGGGTTGAATCC  
CGCGCGGCCAAGAAGCGCCGGCGTGATGAGGCTGCGGTTGCGTTCTTGGCGGTG  
AGGGCGGATGTCGAGGGCGGCGTTAGCGTCCGGCTATGCGCTCGTCACCATTTGGG  
AGCACATGCGGGAAACGGGGAAGGTCAAGTTCTCCTACGAGACGTTCCGCTCGC  
ACGCCAGGCGGCACATCAAGGCCAAGCCCGCCGATGTGCCCGCACCGCAGGCCA  
AGGCTGCGGAACCCGCGCCGGCACCCAAGACGCCGGAGCCACGGCGGCCGAAGC

AGGGGGGCAAGGCTGAAAAGCCGGCCCCCGCTGCGGCCCCGACCGGCTTCACCT  
TCAACCCAACACCGGACAAAAAGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGC  
ATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATG  
GGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTAT  
GGTGGCAGGCCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCTGCCTCGC  
GCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTC  
ACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCA  
GCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGC  
GGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTACTGAGAGTGCA  
CCATAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGC  
TTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGC  
CTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC  
AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAA  
TAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCG  
CCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGT  
TAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGCCAAGCTAGACCTAGGCCTT  
AAGATCCTTTTTTAACCCATCACATATACCTGCCGTTCACTATTATTTAGTGAAATG  
AGATATTATGATATTTTCTGAATTGTGATTA AAAAGGCAACTTTATGCCCATGCA  
ACAGAACTATAAAAAATACAGAGAATGAAAAGAAACAGATAGATTTTTTTAGTT  
CTTTAGGCCCGTAGTCTGCAAATCCTTTTATGATTTTCTATCAAACAAAAGAGGA  
AAATAGACCAGTTGCAATCCAACGAGAGTCTAATAGAATGAGGTGCAAAAAGTA  
AATCGCGCGGGTTTGTACTGATAAAGCAGGCAAGACCTAAAATGTGTAAAGGG  
CAAAGTGTATACTTTGGCGTCACCCCTTACATATTTTAGGTCTTTTTTTATTGTGCG  
TAACTA ACTTGCCATCTTCAAACAGGAGGGCTGGAAGAAGCAGACCGCTAACAC  
AGTACATAAAAAAGGAGACATGAACGATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAACAAG  
CAACAGTATTAACCTTTACTACCGCACTGCTGGCAGGAGGCGCAACTCAAGCGTT  
TGCGAAAGAAACGAACCAAAAAGCCATATAAGGAAACATAACGGCATTTCATAT  
TACACGCCATGATATGCTGCAAATCCCTGAACAGCAAAAAAATGAAAAATATCA  
AGTTCCTGAATTCGATTCGTCCACAATTA AAAATATCTCTTCTGCAAAAAGGCCTG  
GACGTTTGGGACAGCTGGCCATTACAAAACGCTGACGGCACTGTGCAAACTATC  
ACGGCTACCACATCGTCTTTGCATTAGCCGGAGATCCTAAAAATGCGGATGACAC  
ATCGATTTACATGTTCTATCAAAAAGTCGGCGAAACTTCTATTGACAGCTGGAAA  
AACGCTGGCCGCGTCTTTAAAGACAGCGACAAATTCGATGCAAATGATTCTATCC  
TAAAAGACCAAACACAAGAATGGTCAGGTTTCAGCCACATTTACATCTGACGGAA  
AAATCCGTTTATTCTACACTGATTTCTCCGGTAAACATTACGGCAAACAAACT  
GACAACTGCACAAGTTAACGTATCAGCATCAGACAGCTCTTTGAACATCAACGGT  
GTAGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGTGACGGAAAAACGTATCAAAATGTAC  
AGCAGTTCATCGATGAAGGCAACTACAGCTCAGGCGACAACCATACGCTGAGAG  
ATCCTCACTACGTAGAAGATAAAGGCCACAAATACTTAGTATTTGAAGCAAACAC  
TGGA ACTGAAGATGGCTACCAAGGCGAAGAATCTTTATTTAACAAGCATACTAT  
GGCAAAGCACATCATTCTCCGTCAAGAAAGTCAAAA ACTTCTGCAAAGCGATA  
AAAAACGCACGGCTGAGTTAGCAAACGGCGCTCTCGGTATGATTGAGCTAAACG  
ATGATTACACACTGAAAAAAGTGATGAAACCGCTGATTGCATCTAACACAGTAAC

AGATGAAATTGAACGCGCGAACGTCTTTAAAATGAACGGCAAATGGTACCTGTTC  
ACTGACTCCCGCGGATCAAAAATGACGATTGACGGCATTACGTCTAACGATATTT  
ACATGCTTGGTTATGTTTCTAATTCTTTAACTGGCCCATACAAGCCGCTGAACAAA  
ACTGGCCTTGTGTTAAAAATGGATCTTGATCCTAACGATGTAACCTTTACTTACTC  
ACACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAAGGAAACAATGTCGTGATTACAAGCTATATG  
ACAAACAGAGGATTCTACGCAGACAAACAATCAACGTTTGCGCCAAGCTTCCTGC  
TGAACATCAAAGGCAAGAAAACATCTGTTGTCAAAGACAGCATCCTTGAACAAG  
GACAATTAACAGTTAACAAATAAAAACGCAAAAAGAAAATGCCGATATCCTATTG  
GCATTTTCTTTTATTTCTTATCAACATAAAGGTGAATCCCATATGAACTATATAAA  
AGCAGGCAAATGGCTAACCGTATTCCCTAACCTTTTGGTAATGACTCCAACCTATT  
GATAGTGTFTTATGTTTCAGATAATGCCCGATGACTTTGTTCATGCAGCTCCACCGAT  
TTTGAGAACGACAGCGACTTCCGTCCCAGCCGTGCCAGGTGCTGCCTCAGATTCA  
GGTTATGCCGCTCAATTCGCTGCGTATATCGCTTGCTGATTACGTGCAGCTTTCCC  
TTCAGGCGGGATTCCATACAGCGGCCAGCCATCCGTCATCCATATCACCACGTCAA  
AGGGTGACAGCAGGCTCATAAGACGCCCCAGCGTCGCCATAGTGCGTTCACCGA  
ATACGTGCGCAACAACCGTCTTCCGGAGACTGTCATACGCGTAAAACAGCCAGCG  
CTGGCGCGATTTAGCCCCGACATAGCCCCACTGTTTCGTCCATTTCCGCGCAGACG  
ATGACGTCACTGCCCGGTGTATGCGCGAGGTTACCGACTGCGGCCTGAGTTTTT  
TAAGTGACGTAAAATCGTGTTGAGGCCAACGCCATAATGCGGGCTGTTGCCCGG  
CATCCAACGCCATTCATGGCCATATCAATGATTTTCTGGTGCGTACCGGGTTGAG  
AAGCGGTGTAAGTGAAGTGCAGTTGCCATGTTTTACGGCAGTGAGAGCAGAGAT  
AGCGCTGATGTCCGGCGGTGCTTTTGCCGTTACGCACCACCCCGTCAGTAGCTGA  
ACAGGAGGGACAGCTGATAGAAACAGAAGCCACTGGAGCACCTCAAAAACACCA  
TCATACTAAATCAGTAAGTTGGCAGCATCACCCTTTGAAAAATAAACTTAAT  
TATTATATATGTTATTTAGCTAGTTTTTTTAAATTAAGTTAAAATCGAGAGCTTGT  
TTGACAAAAAAACAAAAAAATTTCTTGAAAATTTTTTTTTTACTCAATATCTAGA  
CTTGCAAGAGCTTGGAGCTTTGAGATTGTTCTAAGATGCACACAAATTCAAAACG  
CTTAAACAAAAAACTTAATTTAACAAAGGAGTAAGAGGATCCATGATTGAACAA  
GATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATG  
ACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGC  
GCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAA  
CTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCG  
CAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGA  
AGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCCCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCC  
ATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCAT  
TCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTIONCGGATGGAAGCCG  
GTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCG  
AACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGAC  
CCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGA  
TTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGG  
CTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGT  
GCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTG  
ACGAGTTCTTCTG



# 10 Vedlegg 5

>clpBhis (kodende sekvens)

ATGATGGATATAAATAAATTTACAATAAAACTACAGGAAGCATTAGCAGAAGCT  
CAATCTTATGCTTTTCAGCAAAAAGCTACTGAGTTTACATCAGCACACATGGTAA  
AAGCTATTTTGGAGCAAAAATGATAGTGTTGTTGCATCAATTCTTAGTGTTTGTGGT  
GTTAATATACAAAACCTTTATAAAAGCTGTAAATGATATGGTGGATGGTGTGCGG  
TACTATCAGGAGAAGGTAATCCTCAAGTAGCTCCATCTAGAGATTTGATAGCTAC  
ATTACATAAGATGCAAGAGCTTGCTAATAAAAATGGCGATGAGTTTATTTCAAGT  
GAAGTTTTCTTGTTAGCCTCTTTAGAAGACAAAAGTTTAACTGGACTATATAACA  
AGTTTGGTATTACAAAAGAAAACTGACAAAAGCAGTCAATGATTATCGCGGAG  
GAGAGAAAGTGAGTAGTCAAAATCAAGAAGATATGAAAGGCGCATTAGATAAAT  
ATACAGTGGATCTGACAGATTTAGCGAGAAAAGGAAAAATTGATCCAATTATAG  
GTAGAGATAGTGAGATCCGTAGAGCTATAACAAGTATTACAAAGAAGA ACTAAGA  
ACAACCCTGTGTTTATAGGTGAGCCAGGTGTTGGTAAACTGCTATTGTAGAGGG  
CTTAGCTCAACGAATAGTTAATGATGAAGTACCAGAAGGTGTCAAAGGCCAAAA  
AGTATTATCTTTAGATATGGGTGCATTATTAGCTGGTGCTAAATTTAGAGGAGATT  
TTGAAGAGAGATTA A AATCTGTTTTAAAGAATTATCAAACAAGAAGGTAATGT  
GATTCTATTTATAGATGAGTTACATACTATGGTTGGTGCTGGTAAAGCAGAAGGC  
TCTATGGATGCTGGTAACATGCTTAAGCCTGCTTTGGCTAGAGGTGAGCTAAAT  
GTGTTGGTGCAACGACTTTAGATGAGTATCGTGAGTATGTTGAAAAGATTCCGC  
ACTTGAAAGAAGATTCCAAAAAGTGCTAGTTGATGAACCAACTGTTGAAGATACT  
ATTGCTATACTTAGAGGTCTGAAAGAAAGATATGAGTTGCACCATGGTGTAATA  
TTACAGACTCTGCTATTGTGAGTGCTGCTACATTATCACATAGATATATCACAGAT  
AGACA ACTACCTGATAAAGCTATTGATTTAGTGGATGAAGCAGCTAGCCAAATTC  
GTATGGAAATAGACTCTAAACCTGAAAAAATGGAGAGCTTGTACCGTAGAATTAT  
TCAGCTAAAAATGCAACGTGAGCAGTTAAAAAAGAAAAAGATGATGCTGCCAA  
GAAGCGTTTAGAAATATTAGAGGCTGAAATCAAAGGCTTAGAATCTGAGTATCA  
AGGCTTTGAGGAACTTTGGAAAGCTGAGAAGCTTAAATGCAAGATACAAGTAA  
GCTAAAAGAAGAGCTGGAGAAAGCTAAGTTTGAGCTGGAGAAATACCAAAGAGC  
TGGTGATTTGAGCAAAATGGCTGAACTACAATACGGTAAAATACCAGA ACTTGA  
AGCTCAAATTAACAAATTGAAAATACTGAAGCAGAACCCTCTGAAAATAA ACT  
TGTAAGA ACATCTGTTACAGAAAATGAAATAGCTGATGTAGTTTCTAAAGCTACT  
GGCATAACCAGTTTCTAAGATGATGGAAGGAGAAAAAGATAAGCTTCTAAACATG  
GAAAGCTTCCTACATAAGAGAGTAATTGGCCAAGATCAAGCTATAAAAGCAGTA  
TCGAATGCTGTGAGAAGATCTCGCTCCGGATTATCAGATCCAAATAGACCTATAG  
GTTCAATTTATGTTCTTAGGTCCAACAGGTGTAGGTAAACTGAGCTTACAAAAGC  
ATTAGCAGAATTCTTATTTGATGATGAGGATGCAATGCTTAGAGTAGATATGTCT  
GAGTTTATGGAGAAACTCTGTAGCTAGATTGATAGGTGCTCCTCCAGGATATG  
TGGGTTATGAGCAAGGCGGTTATCTAACTGAACATGTTAGAAGAAAACCTTATTC  
TGTAATCTTATTAGATGAGGTTGAAAAAGCTCACGCAGATGTATTTAACATCTTG  
CTACAAGTATTAGATGATGGGCGACTAACTGATGGTCAAGGCAGAACAGTTGACT



TTAAAAATACTGTAATAGTTATGACTTCTAACCTTGGTTCGCATAGAATCCAAGA  
AATGCAAGGTCAAGACTATGACACAGTCAAAGATGCTGTAATGGAAATGGTACT  
TAGCCACTTCAGACCTGAGTTTGTAAATAGGATTGATGATGCTATTGTGTTTGAAC  
CTCTAAACAAAGAGATGATAACTGAAATAGCTATGATACAGATTAAGCGCTTAG  
AAAAACGTCTAAGAGATCTAAATATAGGTTTAGAAGTAACTGCTAAAGCTATGG  
ATAAATTAGCTGATGCTGGTTTTGATCCTGTATTTGGTGCTAGACCACTTAAACGA  
GCTATCCAAAGCAACTTAGAAAATCCTCTAGCACTTAACTACTAGATGGAGAGT  
TTAAAGCAGAAGATAAAATAGTTGTTGATGTAGATAGTGACCACAATATAGTTTT  
TTCTAAACATCATCACCATCACCCTAA