

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP





## Abstract

Arbeidet i denne masteroppgaven ble utført ved laboratoriet for mikrobiell genteknologi (LMGT), institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Universitetet for miljø- og biovitenskap.

Jeg ønsker å takke Prof. Dzung B. Diep for muligheten til å gjennomføre min masteroppgave ved LMG og for god veiledning gjennom hele arbeidet . Jeg ønsker å takke Dr. Morten Kjos og Christina Gabrielsen for flott veiledning under prosjektet. May-Britt Hovet fortjener en takk for autoklivering og tillaging av medier.. Videre fortjener alle medlemmer på LMG laboratoriet takk for støtte, sosial hygge og faglige innspill under prosjektet. Jeg ønsker til slutt å takke min familie og samboer for god støtte, interesse og flotte hurra rop, som har kommet godt med under hele prosjektet.

Ås 13. desember 2012

Live Aamodt Roscher-Nielsen

## **Abstract**

Bacteriocins are antimicrobial peptides produced by bacteria, and inhibit closely related bacteria. A defence mechanism is required by bacteriocin producing bacteria, an immunity gene serves as this mechanism. The immunity gene is located in the same operon as the genes encoding the bacteriocin peptides. The antimicrobial effect of bacteriocin and the increasing antibiotic resistance makes bacteriocin interesting for use as antibiotics. Bacteriocins can also be used in the food industry as a natural preservative. The understanding of bacteriocins mode of action is therefore needed. This work has focused on the bacteriocin thermophilin 13, and its presumed immunity gene *orf-C*. Thermophilin 13 is produced by *S. thermophilus*. The thermophilin gene cluster consists of three genes, *thmA*, *thmB* and *orf-C*. *thmA* and *thmB* are the coding genes for the bacteriocin peptides. A cloning strategy was developed to gain understanding of the function of *orf-C*. Three constructs were developed, construct (1) *thmA* + *thmB*, (2) *thmB* + *orf-C* and (3) *orf-C* alone. Construct 2 and 3 were developed to clarify if the presumed immunity gene can work alone, or need the help from *thmB*. Construct 1 was developed to clarify if the bacteriocin producing bacteria need an additional protein to give immunity against the produced bacteriocin thermophilin 13. The three constructs were transformed into a sensitive strain. The sensitive strain chosen was *L. lactis* IL1403. The transformation was executed using two different vectors, pMSP3545 and pMG36e\_ABC. Two vectors were used when the transformation of the constructs with the vector pMSP3545 did not show a reduction of sensitivity. When transformed with pMG36e\_ABC, construct 2 and 3 revealed that *orf-C* is the immunity gene, and construct three revealed that *orf-C* can work alone. As little is known about thermophilin 13, a kinetic analysis of the mode of action was done. The analysis discovered that thermophilin 13 works bactericidal. A bactericidal effect will make it more difficult for sensitive strains to develop resistance against the bacteriocin thermophilin 13, since they will not be able to grow when the bacteriocin is present. The vector pMG36e\_ABC has capability with the strain *Lb. sakei* NCDO 7414 and, construct 1 (*orf-C* alone) was transformed into the strain. The transformation gave rise to immunity for the sensitive strain *Lb. sakei* against the bacteriocin thermophilin 13.

## Sammendrag

Bakteriosiner er antimikrobielle peptider produsert av bakterier. Bakteriosiner virker ofte inhiberende på nært beslektede bakterier. Bakteriosinproduserende bakterier har derfor en forsvarsmekanisme i form av et immunitetsgen. Immunitetsgenet er lokalisert på samme operon som kodende gener for bakteriosinpeptidene. Den antibakterielle effekten til bakteriosiner har gjort dem interessante for benyttelse som antibiotika, med bakgrunn for stadig økende grad av antibiotikaresistente bakterier. For å kunne benytte bakteriosiner som antibiotikum eller i samarbeid med antibiotika kreves det mer kunnskap om hvordan bakteriosiner virker. Bakteriosiner kan og benyttes i matindustrien, for å forlenge holdbarheten til matprodukter, som naturlig konserveringsmiddel. Under dette arbeidet fokuseres det på bakteriosinet thermophilin 13, og det antatte immunitetsgenet *orf-C*. Thermophilin 13 produseres av *S. thermophilus*. Thermophilin genklusteret består av tre gener, *thmA*, *thmB* og *orf-C*. *thmA* og *thmB* er kodende gener for bakteriosinpeptidene som danner bakteriosinet thermophilin 13. For tilegnelse av informasjon om egenskapen til *orf-C*, ble det utført fremstilling av tre konstrukter, (1) *thmA* + *thmB*, (2) *thmB* + *orf-C* og (3) *orf-C* alene. Konstrukt 2 og 3 fremstilles for å kunne undersøke om *orf-C* kan virke alene eller er avhengig av *thmB*. Konstrukt 1 fremstilles for å kunne avklare om bakterien krever et tilleggsprotein for immunitet. Forsøket ble utført ved å ligere de tre konstruktene inn i en vektor, med påfølgende transformasjon til en sensitivstamme for deretter å avgjøre eventuelle endringer i sensitiviteten. Den sensitive stammen valgt var *L. lactis* IL1403. Det ble benyttet to vektorer, pMDP3545 og pMG36e\_ABC, dette da den transformasjon med pMSP3545 ikke gav endring i sensitivitet. Benyttelsen av pMG36e\_ABC avdekket egenskapen til *orf-C* som immunitetsgenet mot thermophilin 13, og at genet kan virke alene. Videre ble virkningsmetoden til bakteriosinet undersøkt. Kinetisk analyse av thermophilin 13 viser at bakteriosinet har en celledrepende virkning. En celledrepende effekt vil gjøre det vanskelig for sensitive bakterier og utvikle resistens mot bakteriosinet, da de ikke vil ha muligheten til å vokse opp igjen ved tilstedeværelse av thermophilin 13. pMG36e\_ABC viste seg å ha kompatibilitet og til *Lb. sakei* NCDO 7414. konstrukt 1 (*orf-C* alene) ble transformert til denne stammen og *orf-C* gav opphav til immunitet, mot bakteriosinet thermophilin 13.

## **Innhold**

Abstract .....	II
Sammendrag .....	III
Innhold .....	IV
Ordforklaring.....	VIII
Prefikser .....	IX
1 Innledning.....	1
1.1 Melkesyrebakterier.....	1
1.2 Bakteriosiner .....	1
1.2.1 Bakteriosiner fra Gram-negative bakterier.....	2
1.2.2 Bakteriosiner fra Gram-positive bakterier.....	3
1.3 Klassifisering av LAB bakteriosiner .....	3
1.3.1 Klasse I.....	4
1.3.2 klasse II .....	5
1.3.3 Klasse III .....	5
1.3.4 Klasse Iib bakteriosiner.....	5
1.4 Thermophilin 13 .....	7
1.5 Ekspresjonssystemer .....	9
1.6 Vektorer.....	9
1.6.1 pMSP3545.....	9
1.6.2 pMG36e.....	10
1.7 Mål med oppgaven .....	11
1.8 Kloningsstrategi .....	12
2 Materialer .....	15
2.1 Bakteriestammer og plasmider.....	15
2.1.1 Bakteriestammer.....	15
2.1.2 Vektorer.....	16

## Innhold

2.2 Buffere.....	16
2.3 vekstmedier .....	16
2.4 Primere .....	17
2.5 Kjemikalier.....	18
2.6 kommersielle kit.....	19
2.7 Enzymer .....	20
2.8 Andre løsninger .....	21
2.9 Annet utstyr.....	22
2.10 Teknisk utstyr.....	23
2.11 Bioinformatiske verktøy.....	24
2.11.1 CLC workbench .....	24
2.11.2 BLAST .....	24
2.11.3 ClustalW.....	24
2.11.4 Jalview 2.8.....	25
3 Metoder .....	26
3.1 Kultivering og lagring av bakterier .....	26
3.1.1. Kultivering av bakterier .....	26
Kultivering av <i>E.coli</i> .....	26
Kultivering av <i>Lactococcus lactis</i> .....	26
Kultivering av <i>Lactobacillus sakei</i> .....	26
3.1.2Lagring av bakterier .....	26
3.2 Isolering av DNA .....	26
3.2.1 Isolering av plasmid DNA.....	26
3.2.2 Isolering av genomisk DNA.....	27
3.2.3 Amplifisering av DNA sekvenser for kloning .....	28
3.3 Oppkonsentrering av Bakteriosinet Termophilin 13 .....	28
3.4 Bakteriosinassay.....	29

## Innhold

3.4.1 Softagarassay.....	29
3.4.2 Proteinase K .....	29
3.4.3 Mikrotitterassay.....	29
3.5 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	30
Tabell 3.1 PCR syklus .....	31
3.7 Zero Blunt® TOPO® PCR cloning kit .....	32
3.8 Restriksjonskutting.....	33
3.9 Ligering og dialyse.....	34
3.9.1 Ligering .....	34
3.9.2 Dialyse.....	35
3.10 Elektrokompetente celler.....	35
3.10.1 Elektrokompetente <i>E.coli</i> DH5α celler .....	35
3.10.2 Elektrokompetente <i>L. lactis</i> .....	36
3.10.3 Elektrokompetente <i>Lactobacillus sakei</i> NCDO 2714 .....	36
3.11 Transformering ved elektroporering .....	37
3.11.1. Transformering til <i>E.coli</i> .....	37
3.11.2. Transformering til <i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> .....	37
3.11.3 Transformering til <i>Lb. sakei</i> NCDO 2714.....	38
3.12 Direkte PCR av kolonier .....	39
3.13 Sekvensering .....	39
3.14 Vekstkurve av <i>S. thermophilus</i> SFi13 .....	39
3.15 Kinetisk analyse av thermophilin 13 .....	40
4 Resultater.....	42
4.1 Vekstkurve av <i>S. thermophilus</i> SFi13 .....	42
4.2 Bakteriosin aktivitet .....	42
4.3 Screening av bakteriestammer for sensitivitet.....	43
4.4 Kontroll med agarose gel elektroforese.....	46



## Innhold

4.4.1 Ligeringskontroll .....	46
4.4.2 Kontroll av transformanter .....	48
4.4 Transformering av tre ulike genkonstrukter til <i>E. coli</i> DH5a .....	49
4.5.1 Transformering av tre ulike genkonstruktert til <i>L. lactis</i> IL1403.....	49
4.5.2 Transformering av genkonstrukt pMG36e_C til <i>Lb. sakei</i> NCDO 2714 .....	50
4.6 Bakteriosinassay .....	50
4.6.1 Softagarassay.....	50
4.6.2 Mikrotitterassay.....	51
4.7 Kinetisk inhiberingsanalyse av thermophilin 13 .....	52
4.8 Homologi.....	53
5 Diskusjon.....	55
5.1 Sensitivestammer for thermophilin 13 .....	55
5.2 Immunitet mot thermophilin 13 .....	55
5.2.1 pMSP3545.....	55
5.2.2 pMG36e_ABC .....	56
5.3 Kinetisk inhiberingsanalyse av thermophilin 13 .....	57
5.4 Homologi.....	58
5.5 Videre arbeid .....	58
Referanseliste .....	60

## Ordforklaring

BLAST	Basic Logical Alignment Search Tool
bp	Basepar
CFU	Colony-forming Unit/ kolonidannende enhet
CIP	calf intestinal alkaline phosphatase
cm	centimeter
Da	Dalton
ddNTP	dideoxynukleotider
dH <sub>2</sub> O	destillert vann
dNTP	deoxynukleotidtrifosfat
DNA	Deoksyribonukleinsyre
EDTA	Etylen Diamin Tetra Acetat
em <sup>r</sup>	erytromycin resistens
RNA	Ribonukleinsyre
LAB	Melkesyrebakterier
LMGT	Laboratoriet for Mikrobiell Genteknologi
M	molar
mg	milligram
min	minutt
ml	milliliter
mm	millimeter
m/s	meter per sekund
NCDO	National Samling av Meieri Organismer
NEB	New England Biolabs inc.
NICE	nisin indusert ekspresjonssystem
OD	optisk tetthet
ORF	åpen leseramme
PCR	Polymerase kjedereaksjon
s	sekund
t	timer
V	volt (enhet for elektrisk potensiale)
(w/v)	(vekt/volum)
Ω	ohm (SI enhet for elektrisk motstand)

Enkelte engelske ord eller uttrykk har ingen korrekt oversettelse på norsk. Derfor er det fremstilt en tabell med oversettelse fra norsk-engelsk. Der det har vært hensiktsmessig er norsk oversettelse benyttet.

Norsk	Engelsk
Sammenstilling	Alignment
Butte ender	Blundt ends
Ryggrad	Backbone
DNA tråd	DNA strand
Residu/restenhet	Residue
Kartlegging	Screening
Brutte ender	Recessed ends
Standarder	Ladder
Analyse	Assay
Drepeassay	Killingassay
Konvolutt	envelope
forlengelse	elongering
Rask prep	Fast prep

## Prefikser

k	kilo ( $10^3$ )
m	milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
n	nano ( $10^{-9}$ )

## 1 Innledning

### 1.1 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier er Gram-positive bakterier. Av det engelske navnet «lactic acid bacteria» kommer forkortelsen LAB. De har et lavt GC-innhold og tåler lav pH.

Melkesyrebakterier har ikke respirasjon og danner ikke sporer. Det er to grupper av LAB: homofermentative, hvilket produserer ett fermenteringsprodukt, melkesyre. Den andre gruppen er heterofermentativ og produserer to fermenteringsprodukter, hovedsakelig etanol og karbondioksid (Madigan & Martinko 2006). I denne oppgaven benyttes kun homofermentative bakterier. Melkesyrefermentering gjør omgivelsen sur. LAB assosieres derfor med matfermentering, da de sørger for lenger holdbarhet på melkeprodukter, ved å utkonkurrere andre bakterier. LAB er tilstedeværende i den naturlige bakteriefloraen i slimhinnen hos mennesker og ansett som ufarlige (van de Guchte et al. 1990).

Melkesyrebakterier består av *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* (Stiles & Holzapfel 1997). Melkesyrebakterier er rod-formet Basiller og kokker (Stiles & Holzapfel 1997). Alle melkesyrebakterier vokser anaerobisk, og de fleste er ikke sensitive for oksygen; aerotollerante anaerobe bakterier. Lave pH som dannes naturlig ved melkesyre fermentering, utkonkurrerer andre bakterier, påvirker ikke melkesyrebakterier. Derfor er det nødvendig med en annen mekanisme for å utkonkurrere andre melkesyrebakterier. Og det kan være dette som har gitt opphavet til deres evne til å generere bakteriosiner (Garneau et al. 2002)

### 1.2 Bakteriosiner

Bakteriosiner er karakterisert som ribosomalt syntetiserte antimikrobielle peptider (Dobson et al. 2012), produsert av Gram-positive og Gram-negative bakterier, som ofte dreper bakterier beslektet til bakteriosinprodusenten (Desriac et al. 2010). De ulike bakteriosinprodusentene har ulikt spekter av på Gram-positive bakterier. F.eks er pediocin AcH bredspektret, mens lactococcin A er smalspektret. Den positive ladningen til bakteriosinet forenkler interaksjon med negativt ladede bakteriell fosfolipid membran, eller sur bakteriell cellevegg.

Bakteriosinets amfifiliske egenskap muliggjør membran gjennomtrenging (Nissen-Meyer & Nes 1997). Den første dokumentasjonen av bakteriosiner var i 1925 da Gratia beviste at

## 1 Innledning

*Escherichia coli* (*E. coli*) hadde egenskapen til å inhibere vekst av andre *E. coli* stammer, ved substansen kalt colicin (Gratia 2000). Siden dette har mange antimikrobielle peptider blitt karakterisert og identifisert, både i Gram-positive og Gram-negative bakterier. Begrepet «bakteriosin» var originalt dekkende for antimikrobielle proteiner med coliciner, men omfatter i dag ikke-colicin antimikrobielle peptider produsert av Gram-positive bakterier (Tagg et al. 1976).

### 1.2.1 Bakteriosiner fra Gram-negative bakterier

Bakteriosiner produsert av Gram-negative bakterier er store proteiner (> 20kDa) (Nissen-Meyer & Nes 1997) og varierer i størrelse fra rundt 200-800 aminosyre residuer (Riley & Wertz 2002). Det mest studerte bakteriosinet produsert av Gram-negative bakterier er colicin produsert av *E. coli* ved stress (Bonsor et al. 2008). De er enkel-polypeptider og translasjonsproduktet har ingen posttranslasjons modifiseringer, eventuelt tap av N-terminal metionin residuer (Braun et al. 1994). Colicin genklusteret består av tre gener. Colicin genet hvilket koder for det antimikrobielle peptidet, immunitetsgenet koder for et protein med spesifikk immunitet til produsentcellen ved binding og inaktivering av toksin proteinet. Det tredje genet, lyseringsgenet koder for et protein involvert i colicin frigjørelse og cellelysering (Riley & Wertz 2002). Bakteriosinproduksjonen til Gram-negative bakterier er dermed dødelig for produsentcellen og nærliggende celler gjenkjent av colicinet. Colicin inhiberingsmetode varierer fra membran poredannelse (colicin A) til nuklease aktivitet mot DNA (colicin E2, E7, E8 og E9), rRNA (colicin E3, E4, og E6) og tRNA (colicin D og E5) hos målcellen (Cascales et al. 2007; Riley & Wertz 2002). Colicin binder til en spesifikk reseptor på den ytre membranen hos målcellen, og translokerer gjennom celleenvelope (Kleanthous 2010). Målet for translokasjon er indremembran for ion-pore coliciner og cytoplasma for nuklease coliciner (Cascales et al. 2007). Immunitetsproteinene fungerer ulikt for poredannende coliciner og nuklease coliciner. Hos poredannende coliciner er immunitetsproteinene lokalisert i den indremembranen og blokkerer colicin etter translokering i cellen (Weaver et al. 1981). Immunitetsproteinene hos nuklease coliciner danner kompleks med angripende colicin, cellen selv har mulighet til å produsere (Cascales et al. 2007). Til tross for at colicin er representativt for Gram-negative bakteriosiner er det store ulikheter mellom coliciner og microciner. Microciner (produsert av *E. coli*) er lavmolekylærvekt antimikrobielle peptider (Cascales et al. 2007), syntetiseres enten som små peptider (6 kDa) eller fremstilt fra store proteiner og modifisert posttranslasjonelt (finn kilde).

## 1 Innledning

### 1.2.2 Bakteriosiner fra Gram-positive bakterier

Bakteriosiner produsert av Gram-positive bakterier er små peptider, mindre enn 10 kDa (Garneau et al. 2002), og har større diversitet enn Gram-negative bakterier (Riley & Wertz 2002). Bakteriosiner produsert fra LAB har fått mye fokus på grunn av deres potensiale i matindustrien som naturlig konserveringsmiddel (Ennahar et al. 1999). Bakteriosinproduksjon hos Gram-positive bakterier skjer ved skifte mellom log-fasen og stasjonær-fasen (Riley & Wertz 2002). Bakteriosinassosierte gener er karakteristisk arrangert i fler-gen operon-lignende strukturer, der det første genet som regel koder for strukturelt gen (Klaenhammer 1993). Gram-positive bakterier krever minst fire gener for å danne et aktivt bakteriosin, (i) strukturelt gen for peptidet (ii) immunitets gen (iii) gen for ABC-transportøren, (iv) gen som koder for tilleggsprotein for eksternalisering av bakteriosinet (Garneau et al. 2002). ABC-transportøren fører bakteriosinet over cellemembranen (Nissen-Meyer et al. 2010). Celleveggen til Gram-positive bakterier gir mulighet for passering av relativt store molekyler, dermed er det mulig å ikke benytte bakteriosinreseptor, hvilket det er et krav for hos Gram-negative celler (Jack et al. 1995). Smalspekter bakteriosiner kan kreve interaksjon med cytoplasmamembran reseptorer (van Belkum et al. 1991).

Bakteriosiner kan benyttes med medisinsk og bioteknologisk hensikt. Da det finnes mange antibiotikaresistente bakteriestammer, er bakteriosiner ansett som et godt alternativ til å bekjempe patogene infeksjoner (Soliman et al. 2011) utvikling av bakteriosinresistente patogene mikroorganismer krever resistens mot to ulike peptider samtidig (Diep et al. 2007). Innsikt i den tredimensjonale strukturen kreves, da bakteriosiner fungerer gjennom strukturell interaksjon (Soliman et al. 2011).

Bakteriosiners mekanisme for gjenkjennelse av mål-celler er ikke i ønsket grad kjent, og mer kunnskap kreves på området før utvikling og benyttelse av bakteriosiner som antimikrobiell agent (Diep et al. 2007).

### 1.3 Klassifisering av LAB bakteriosiner

Det er tre ulike klasser av bakteriosiner produsert av melkesyrebakterier (McCormick et al. 1996).

## 1 Innledning

**Tabell 1.1** Klassifisering av LAB bakteriosiner, tabellen er tatt fra (Driders et al. 2006).

Klasse	Karakterisering	Undergrupper	Eksempel	Referanser
<b>Klasse I</b>	Lantioniner: inneholder lantionin og $\beta$ - lantionin	Type A	NisinA NisinZ Subtilin Epidemin	(Buchman et al.) (Mulders et al.) (Banerjee & Hansen) (Schnell et al.)
		Type B	Mersacidin Actagardin Mutacin II	(Brötz et al.) (Kettenring et al.) (Woodruff et al.)
<b>Klasse II</b>	Ikke modifiserte varmestabile bakteriosiner  <10 kDa	Klasse IIa	Leucocin C	(Papathanasopoulos et al.)
		Klasse IIb	Planetaricin EF Plantaricin JK	(Anderssen et al.) (Anderssen et al.)
		Klasse IIc	Lactococcin 972	(Martinez et al.)
		Klasse IId	Lactococcin A	(Holo et al.)
<b>Klasse III</b>	Protein bakteriosin  <30 kDa		Helveticin J Millericin B	(Joerger & Klaenhammer) (Beukes & Hastings)

Tabell 1.1 viser en oversikt over klassifiseringen av LAB bakteriosiner. Tabellen er modifisert fra Driders (2006) Tabell, da den originalt ikke inneholdt klasse IId, utenom dette unntaket er tabellen fremstilt på bakgrunn av den originale tabellen. Tabellen gir en enkel oversikt over de ulike klassene, med informasjon om klassekarakteristikk, undergrupper og eksempler på bakteriosiner som tilhører de ulike undergruppene og derav klassene.

### 1.3.1 Klasse I

Klasse I; undergår posttranslasjons modifisering for å inneholde aminosyre residuene lantionin og  $\beta$ -metyllantion, klassen refereres derfor til lantioniner (Guder et al. 2000).

Klassen deles i A og B basert på struktur og inhiberingsmetode (Riley & Wertz 2002). Type A lantionin inhiberer målceller ved depolarisering av cytoplasmamembranen (Schuller et al. 1989), de er fra 21-38 aminosyrer og større enn type B. Det mest studerte bakteriosinet Nisin tilhører type A (Kaur et al. 2011). Type B er mindre enn type A mindre enn 19 aminosyrer lang, og fungerer gjennom enzymatisk inhibering (Brotz et al. 1995).

## 1 Innledning

Nisin anvender lipid II, som dokking molekyl. Lipid II er forgjenger i celleveggsyntese. Ødeleggelsen av sensitive celler er en kombinasjon av to mekanismer (i) inhibering av peptidoglykan syntesen, ved interaksjon med lipid II og (ii) dannelse av dødelige porer i cytoplasma membranen (Diep et al. 2007).

Det er foreslått at det kreves en spesifikk membran reseptor for sensitivitet mot bakteriosiner (Kjos et al. 2011).

### 1.3.2 klasse II

Klasse II består av peptider uten lantionin, og inneholder umodifiserte residuer (Nes et al. 1996). De er små og varierer fra 30-60 aminosyrer i lengden . Klasse II kan deles inn i fire underklasser, klasse IIa, IIb, IIc og IId (Cotter et al. 2005). Klasse IIa er den største gruppen bestående av en-peptid pediosin-lignende antilisteria bakteriosiner, med konservert aminoterminal sekvens (YGNGVXaaC) (Soliman et al. 2011). Klasse IIa danner porer i cytoplasmamembranen hos målceller (Riley & Wertz 2002). Klasse IIb består av to-peptid bakteriosiner. Begge peptidene må være til stede i lik mengde for antimikrobiell aktivitet (Cotter et al. 2005). Klasse IIc er sirkulære bakteriosiner (Nissen-Meyer et al. 2010), da deres N- og C- terminale ender er kovalent sammenkoblet (Kawai et al. 2004). Klasse IId er sykliske en-peptid bakteriosiner, hvilket ikke har aminosyresekvenslikhet med klasse IIa (Cotter et al. 2005).

### 1.3.3 Klasse III

Klasse III bakteriosiner er store varmelabile protein bakteriosiner (Barefoot & Klaenhammer 1984). Klasse III bakteriosiner har domenestruktur, der ulike domener har ulike funksjoner, som translokasjon og reseptorbinding (Cotter et al. 2005).

### 1.3.4 Klasse IIb bakteriosiner

Her vil klasse IIb bakteriosiner bli beskrevet, da bakteriosinet thermophilin 13 undersøkt under dette arbeidet tilhører klasse IIb.

Et klasse-IIb bakteriosin består av to bakteriosin peptider. Peptidene er kodet av gener i samme operon (Oppegard et al. 2007).

Peptidene har unike strukturer og varierende inhiberings mekanismer. Kun ett immunitetsgen



## 1 Innledning

kreves, og ligger i samme operon for bakteriosin peptidene (Garneau et al. 2002). Peptidene syntetiseres ribosomalt som inaktive peptider og aktiveres ved posttranslasjonell kløyving av N-terminal ledersekvens, ledersekvensen består av 15-30 residuer dobbel-glysin (Garneau et al. 2002). ABC-transportøren kutter av leder sekvensen og transporterer peptidene over cellemembranen (Havarstein et al. 1995). Posttransjonal modifisering som kutting av leder sekvensen gjør et umodent peptid moden for den oppgaven den skal utføre (Nissen-Meyer et al. 2010). Modne bakteriosiner er generelt kationiske, amfifilske (Garneau et al. 2002). ABC-transportør genene ligger i et nærliggende operon i forhold til operonet som inneholder gener kodende for bakteriosin peptidene og immunitet (Nissen-Meyer et al. 2010). Bakteriosinene viser kun antimikrobiell aktivitet når de komplementære peptidene er kombinert (Oppegard et al. 2007). De kan også vise antimikrobiell aktivitet når ett peptid er kombinert med et homologt peptid fra ett annet to-peptid bakteriosin (Garneau et al. 2002). Peptidene må være tilstede i tilsvarende lik mengde for optimal antimikrobiell aktivitet (Nissen-Meyer et al. 2010). Når to komplementære peptider er sammen vil de være aktive ved pikomolar til nanomolar konsentrasjon. Individuelt, ved mikromolare konsentrasjoner viser de ingen aktivitet (Soliman et al. 2011).

Alle to-peptid bakteriosiner identifisert så langt, inneholder GxxxG motiver. Motivet er signifikant overrepresentert i transmembrane helikser. For å minimere fri energi vil polypeptider som krysser membranen danne heliks sekundærstruktur (Engelman & Steitz 1981). Helikser danner tett pakkede kontaktflater med hverandre og stabiliseres hovedsakelig av van der Waal interaksjoner (Schneider & Engelman 2004). GxxxG lignende motiver medierer helix-helix interaksjon med membranproteiner. Sannsynligvis vil glysin residuene være lokalisert på samme side i  $\alpha$ -heliksen (Oppegard et al. 2008). Dette danner et flatt interaksjonssete, hvilket muliggjør tett kontakt mellom de to ulike  $\alpha$ -heliksene, dette gir interheliks van der Waals interaksjoner (Russ & Engelman 2000) og stabiliserende hydrogenbånd (Soliman et al. 2011). Post-translasjon modifisering er sjeldent hos ikke-lantibiotiske bakteriosiner, med unntak av disulfid-broer (Garneau et al. 2002).

Klasse-IIb bakteriosiner gjør cellemembranen til sensitive bakterier gjennomtrengbar for små molekyler. Dette gjøres ved at bakteriosinet danner en pore med spesifikk transport av små molekyler (Nissen-Meyer et al. 2010). Gjenkjennelsen av sensitive bakterier er uvisst da membranassosiert mål for klasse-IIb bakteriosiner ikke er identifisert (Soliman et al. 2011).

## 1 Innledning

### 1.4 Thermophilin 13

Thermophilin 13 er et to-peptid-bakteriosin produsert av *Streptococcus thermophilus* SFi13. Bakteriosinet består av peptidene ThmA, ThmB og Orf-C. Genene *thmA* og *thmB* og *orf-C* er kodet for av samme operon, funksjonen til *orf-C* er ikke kjent.

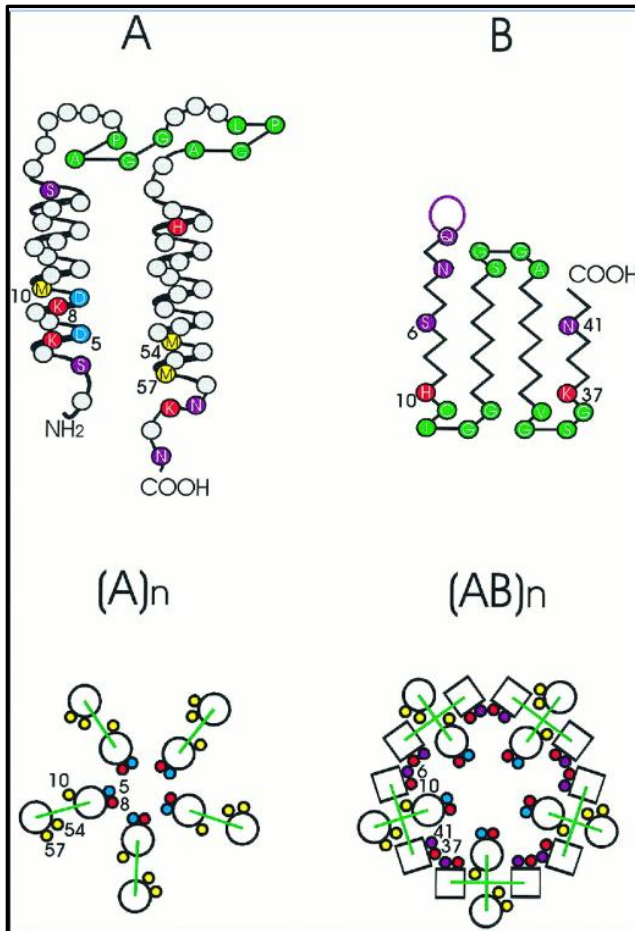
**Tabell 1.2** Aminosyresekvens til Orf-C, ThmA, ThmB.

Peptid	Aminosyresekvens
<b>Orf-C:</b>	<b>MDYKSLLSLLLFIIPLVVILIGLRKNNQKLIAGVAPLIYLLCSYLLDWIFD</b>
<b>ThmA:</b>	<b>MNTITICKFDVLD AELLSTVEGGYSGKDCLKDMGGYALAGAGSGALWGAPAGGVGALPGAFVGAHVGAIAAGGFACMGGMIGNKFN</b>
<b>ThmB:</b>	<b>MKQYNGFEVLHELDLANVTGGQINWGSVVGHCIIGGAIIGGAFSGGAAAGVGC CLVGS GKAIINGL</b>

N-terminal ledersekvens er markert i blå, med de to glysin residuene i grønt. Moden peptidsekvens er vist i svart, med glysin residuer i GxxxG-motiver er vist i rødt.

Orf-C peptidet er hydrofobisk, og ønsker en orientering vekk fra vandige omgivelser. *thmA* alene vil være begrenset aktivitet, *thmB* alene vil ikke inhibere vekst av sensitive stammer. Der *thmA* og *thmB* er sammen er aktiviteten økt, *thmB* øker aktiviteten til *thmA* ~40 ganger (Marciset et al. 1997). Thermophilin 13 er et bredspektret bakteriosin, med poredannelse (Marciset et al. 1997). Både ThmA og ThmB syntetiseres med en signalsekvens typisk for LAB bakteriosiner, f.eks. det prosesserte sete (ledersekvensen) kommer før ett dobbeltglysin motiv. Etter prosessering av ThmA og ThmB vil de modne peptidene inneholde respektivt 62 og 43 residuer. Translasjon av ThmB er koblet med translasjon av Orf-C. Marciset et al. (1997) arbeid fant at antatt promotor, ribosom bindesete og rho-uavhengig terminator strukturer omgav de åpne leserammene til *thmA*, *thmB* og *orf-C*. Verken ThmA eller ThmB inneholder antilisteria konsensus sekvensen YGNGV-C (Marciset et al. 1997).

## 1 Innledning



**Figur 1.1** Modellertstruktur av ThmA og ThmB og poredannelse, figuren er tatt fra (Marciset et al. 1997). Sekundærstruktur av ThmA (A), ThmB (B). fugleperspektiv av poredannelse av ThmA (A)<sub>n</sub>, og av ThmA og ThmB sammen (AB)<sub>n</sub>. (Marciset et al. 1997) Kation residuer representeres i rødt, anion residuer illustreres i blått. Hydrofile aminosyrer vises i lilla. Metionin residuer (Met<sup>10</sup>, Met<sup>54</sup> og Met<sup>57</sup>) hvilket sannsynligvis vil danne metoksidier fremstilles i gult. Tetrapeptider predikert til å danne β-turns vises i grønt. I figur 1.4.1 (A)<sub>n</sub> og (AB)<sub>n</sub> er helikser representert av sirkler og to β-tråder symboliseres av firkanter.

Figur 1.1 viser en modellert struktur av bakteriosinpeptidene ThmA, ThmB, og poredannelse ved tilstedeværelse av kun ThmA og både ThmA og ThmB. Figuren viser at ThmA danner to α-helikser sammenbundet av en β-vending. ThmB har modellert struktur til to α-helikser, en i N-terminal ende og en i C-terminal ende. Sammenbundet av β-turn.

Thermophilin 13 benytter både transmembran elektrisk potensialet og pH-gradient for inhibering av sensitive celler (Marciset et al. 1997). Spesifisiteten til hvilke molekyler som føres over membranen er ikke studert (Nissen-Meyer et al. 2010).

ThmA og ThmB er begge produsert med en ledersekvens som inneholder dobbel glysin,.

## 1 Innledning

Modent ThmA viser homologi til NImA peptidet til mutacin IV, og ThmB viser homologi til LafA komponenten til lactacin F. De to peptidene til thermophilin 13 viser ikke likhet med hverandre (Garneau et al. 2002).

### 1.5 Ekspresjonssystemer

Det finnes ulike systemer for protein ekspresjon i bakterier. Systemer der genekspresjonen er slått på konstant: konstitutive systemer, og induserbare systemer der genekspresjonen reguleres ved tilsetning av f.eks peptider til vekstmediet. Det induserbare systemet som er mest kjent hos LAB er «nisinkontrollert uttrykkelse» (NICE) hvilket benytter det autoregulatoriske systemet som kontrollerer nisin ekspresjon i *L.lactis*.

Nisin er et post-translasjonelt modifisert antimikrobiell peptid, bredt brukt i mat-industrien, som naturlig konserveringsmiddel (Kleerebezem et al. 1997). *NisA* er et strukturelt gen, som koder for biosyntese av det antimikrobielle peptidet nisin (de Ruyter et al. 1996). Nisin er et signal-molekyl og kan inducere transkripsjon nedstrøms for *nis*-promotoren ved signal transduksjon mediert av et to-komponent regulatorisk system, hvilket består av histidin kinase *NisK* og respons regulator *NisR* (de Ruyter et al. 1996). Ekspresjonen kontrolleres ved tilsatt mengde nisin.

I denne oppgaven er det benyttet to ulike vektorer, pMSP3545 hvilket er nisinindusert, og pMG36e\_ABC der genekspresjonen er slått på konstant.

### 1.6 Vektorer

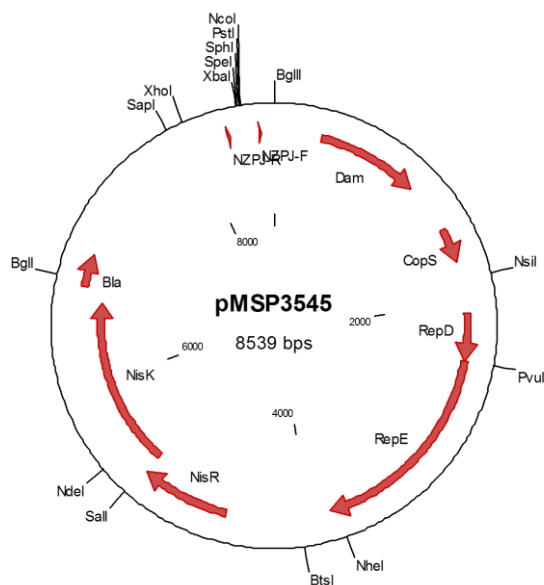
Plasmider benyttet for genetisk konstruksjon kalles vektorer. De inneholder et multippelt kloningssete og spesifikk antibiotika resistens, f.eks. erytromycin. Deretter ligeres ønsket gen inn i vektoren, og vektoren transformeres inn i en bakteriestamme. Stammen dyrkes opp med tilsvarende antibiotika vektoren har resistens for, og kun bakterier med vektoren vil kunne overleve tilstedeværelsen av antibiotika.

#### 1.6.1 pMSP3545

Arbeidet med å fremstille vektoren pMSP3545 ble utført av Bryan et al. 2000. Her forklares det hvordan vektoren ble fremstilt, på bakgrunn av Bryans et al. arbeid i 2000.

## 1 Innledning

Vektor pMSP3545 ble fremstilt ved å bytte ut *PnisA* og polylinkerfragment fra pMSP3535 med *Bgl*III- og *Xho*I- fordøyd *PnisA* og polylinkerfragment fra pNZ8048. Polylinker er en kort DNA sekvens som inneholder to eller flere restriksjonsenzym kuttseter. Polylinkeren forenkler liggering av DNA til plasmidet, der DNA fragmentet er kuttet med to ulike restriksjonsenzymmer. pMSP3545 inneholder *Nco*I kløyvingssete umiddelbart nedstrøms for *nisA* ribosomal bindingssekvens. pNZ8048 fragmentet sørger for rho-uavhengig terminator mellom *Xba*I og *Xho*I setene til polylinkeren. Vektoren pMSP3535 ble designet for å inneholde elementer av nisin-induserbar to-vektor system i én vektor (Bryan et al. 2000). Vektoren pMSP3535 inneholder ColE1 replikasjonsstart (*E. coli*) fra pSP73, *PnisA* fra pNZ8020 og *nisRK* gener og  $Em^r$  fra pNZ9531. NisA (Kim & Mills 2007).



**Figur 1.2** Vektoren pMSP3545. Vektoren er fremstilt med bakgrunn på vektoren pMSP3535 (Bryan et al. 2000).

### 1.6.2 pMG36e

Arbeidet med å fremstille vektoren pMG36e ble utført av Van de Guchte et al. I 1989. Her forklares fremstillingen av vektoren pMG36e, på bakgrunn av arbeidet utført i 1989.

pMG36e\_ABC er vektoren pMG36e med thermophilin cluster fra *S. thermophilus*.

pMG36e ble utviklet med basis fra vektoren pWV01( fra *L.lactis* sbsp. *cremoris* Wg2), replikasjonsstarten fra pWV01 er hentet fra pGK11. Dette ble utført ved å kutte med *Sau*3A,

## 1 Innledning

og innfylling av brutte ender med Klenow enzym. Kanamycin-resistens markøren (fra *Streptococcus faecalis* vektoren pJH1), ble hentet ut som et *HindIII* fragment fra plasmidet pPJ1. De to fragmentene ble ligert og transformert inn i *E.coli* MC1000 med seleksjon for kanamycin resistens. To *HindIII* seter lokalisert i terminering regionen av kanamycin resistens genet ble kuttet ut ved hjelp av *HindIII*. De brutte endene ble fylt inn med Klenow enzym og religert. Ligeringen ble transformert til *B.subtilis* protoplast. *ClaI* setet ble benyttet for å introdusere pUC18 multippelt kloningssete og den foreslåtte termineringssekvensen for proteinase genet til *L.lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Introduksjon av termineringssekvensen ble utført da det er fordelaktig med en transkripsjons termineringssekvens nedstrøms for kloningssete der det skal inkorporeres fremmede gener. Under vektorkonstruksjonen ble *E.coli* benyttet som kloningsvert. Deler av det multiple kloningssete ble utskiftet med *EcoRI-SalI* fragment fra pGKV432, som inneholder en promotor, ett ribosomalt bindingssete og starten på en åpen leseramme isolert fra *L.lactis* subsp. *cremoris* Wg2. Dette gav opphav til uttrykkelsesvektoren pMG36 (van de Guchte et al. 1989).

Kanamycin selektering gav problemer med høy bakgrunns støy i ikke-transformerte celler i *L.lactis*, størsteparten av kanamycin-resistens genet ble kuttet ut med hjelp av *EcoRV* fra pMG36. Kanamycin-resistens fragmentet ble erstattet med 1kbp fragment fra pUC7e, hvilket inneholder erytromycin-resistensgenet fra *Streptococcus aureus* plasmid pE194. pMg36 med erytromycin-resistens ble transformert til *L.lactis* subsp. *lactis* IL1403. Det resulterende plasmidet fikk navnet pMG36e (van de Guchte et al. 1989).

Plasmidet benyttet under denne masteroppgaven er pMG36e\_ABC. Det konstitueres av plasmidet pMG36e der thermophilinklusteret fra *S. thermophilus* SFi13 er satt inn. Klusteret består av tre gener, og ble benyttet for undersøkelse av hvilke av de tre genene som resulterer i immunitet mot bakteriosinet thermophilin 13 produsert av *S. thermophilus* SFi13.

### 1.7 Mål med oppgaven

Bakteriosinproduserende bakterier må kunne motstå aktiviteten til sitt eget inhiberingsprodukt gjennom spesifikk immunitet (Tagg et al. 1976), det er derfor ønskelig å vite hvilket gen som sørger for immuniteten for thermophilin 13. Da det kreves fire gener for et aktivt bakteriosin (Garneau et al. 2002), og immunitetsgenet ligger i samme operon som kodendegener for bakteriosin peptidene,

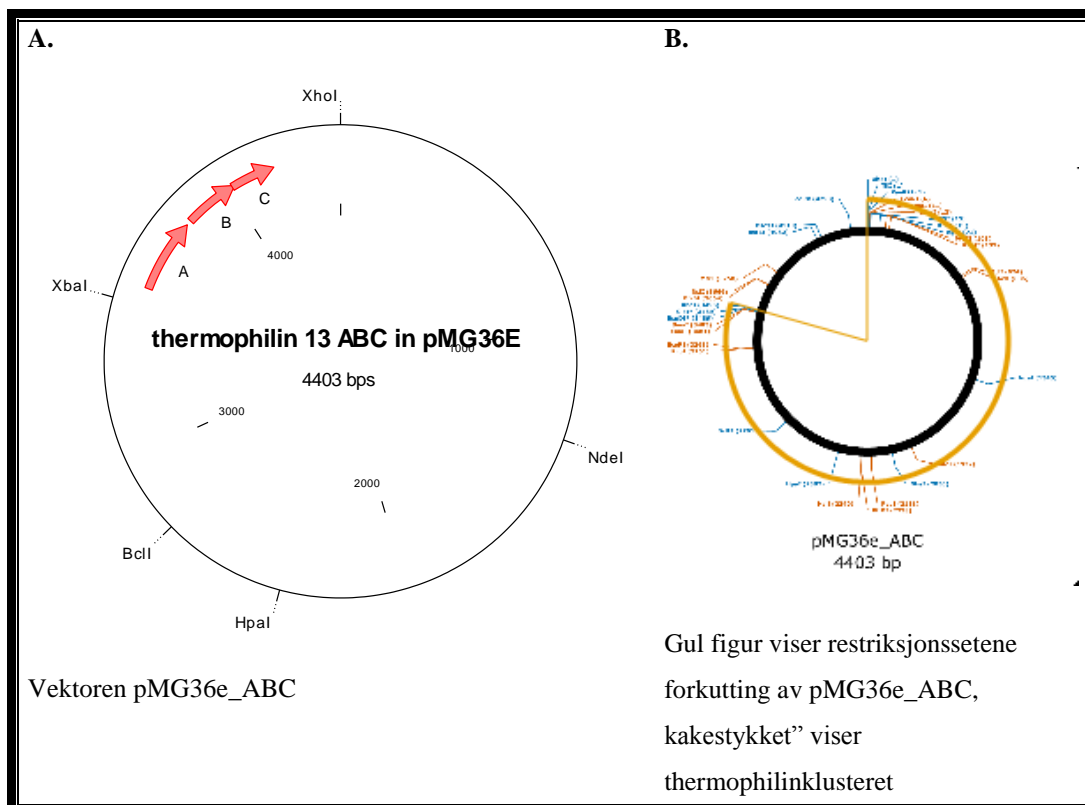
Målet med oppgaven er å prøve å påvise at *orf-C* er det kodede genet for immunitet mot

## 1 Innledning

thermophilin 13 hos *S. thermophilus* SFi13. Basert på at immunitetsgenet ligger i samme operon som kodende gener for peptidene til bakteriosinet er det stor sannsynlighet for at *orf-C* vil være immunitetsgenet. Det er mulig at *orf-C* ikke kan gi opphav til immunitet når det står alene, derfor skal det undersøkes om *thmB* og *orf-C* sammen vil gi opphav til immunitet. Utførelsen av oppgaven baserer seg på kloning av genene inn i en sensitiv stamme. Sensitiv stamme valgt er *L. lactis subsp lactis* IL1403, da det er den mest sensitive stammen, med vekst på GM17 medium. Det fremstilles tre ulike konstrukter med ulik kombinasjon av genene i operonet. Konstrukt 1 består av *thmA* og *thmB*. Konstrukt 2 består av *thmB* og *orf-C*, og konstrukt 3 består kun av *orf-C*. Hvis *L.lactis subsp lactis* viser immunitet der konstrukt 3 er satt inn, vil *orf-C* være opphav til immuniteten mot bakteriosinet thermophilin 13. Hvis IL1403 viser immunitet der konstrukt 2 er transformert inn, vil *orf-C* være avhengig av *thmB* for å gi immunitet mot thermophilin 13.

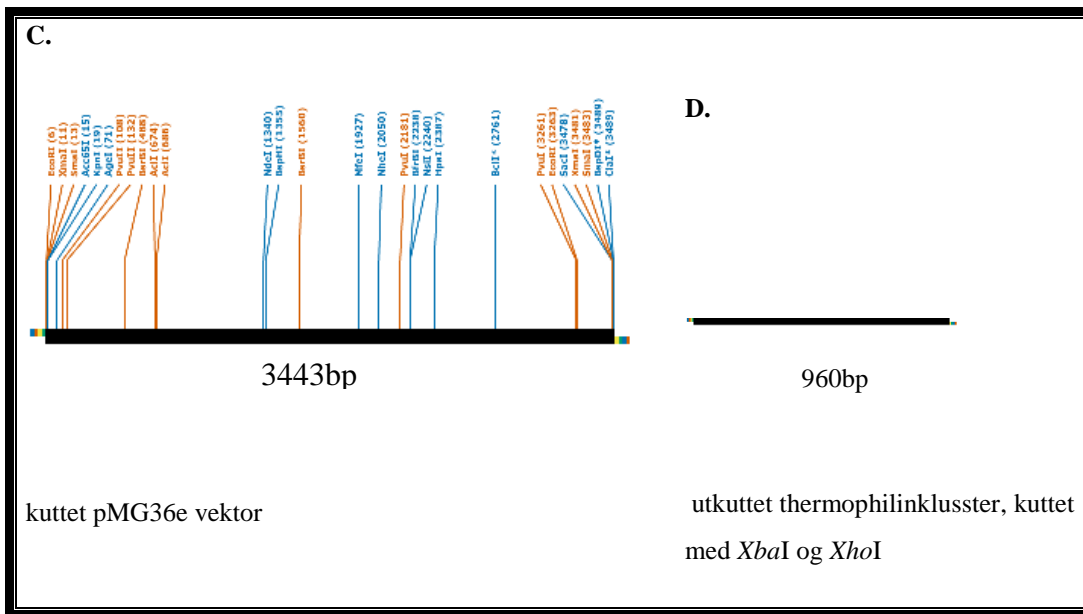
### 1.8 Kloningsstrategi

For å klonе tre konstrukter til den sensitive stammen LMGT 3394 ble det satt opp en kloningsstrategi. Under arbeidet ble det benyttet to vektorer for transformasjon til LMGT 3394. her fremlegges en kloningsstrategi spesifikk for vektoren pMG36e\_ABC. Prinsippet for kloning er tilsvarende for kloning ved benyttelse av vektoren pMSP3545



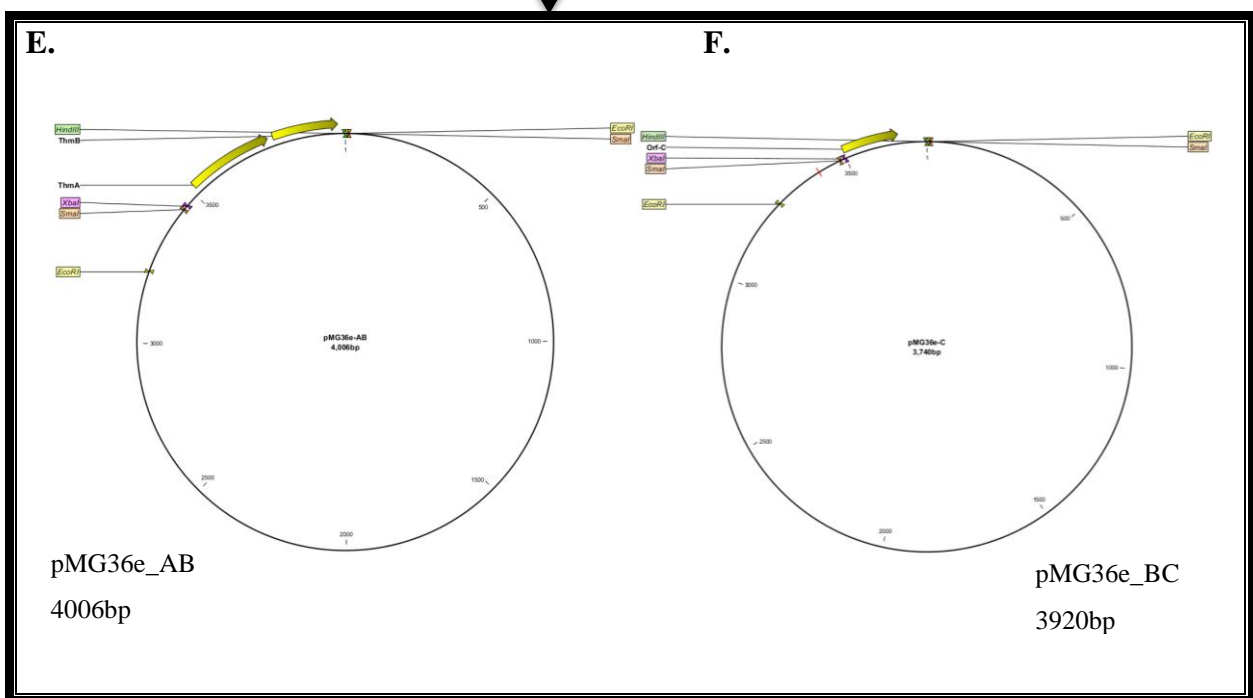
# 1 Innledning

## Restriksjonskutting av pMG36e\_ABC med *Xba*I og *Xho*I

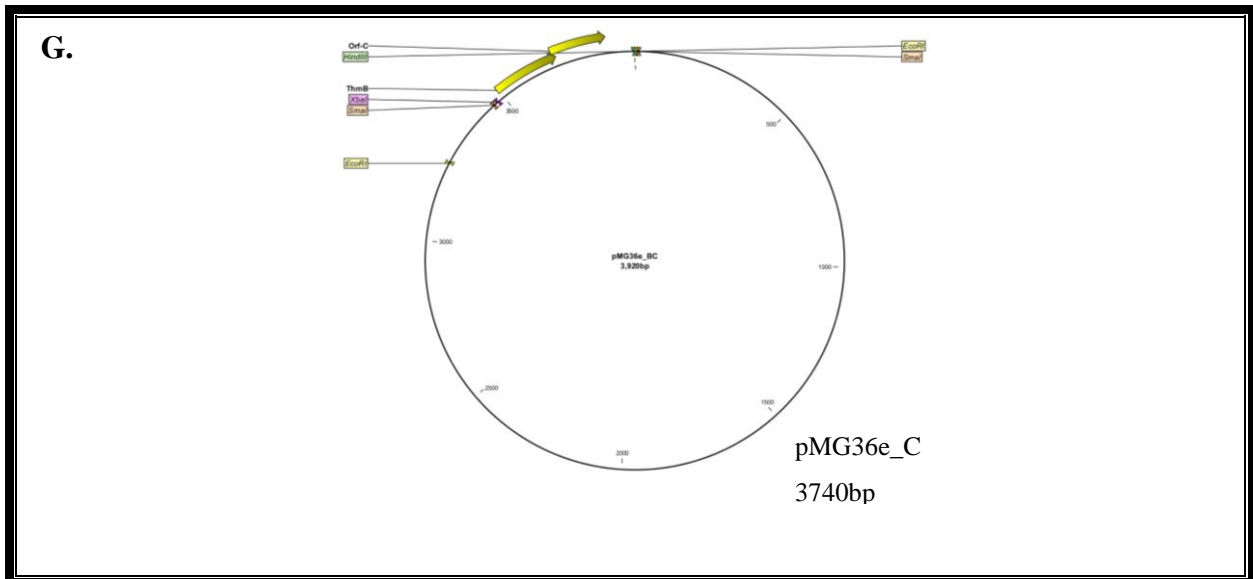


PCR amplifikasjon av thermophilin klusteret for fremstilling av tre konstrukter

Ligering







**Figur 1.3** kloningsstrategifigur. Figur (A) viser vektoren pMG36e\_ABC, figur B viser hvordan vektoren blir kuttet av XbaI og XhoI. Figur (C) viser den kuttete vektoren pMG36e\_ABC, figur (D) viser ut kuttet thermophilinklusteret. For å fremstille de tre konstruktene benyttes PCR amplifikasjon av thermophilinklusteret for fremstilling av riktige konstrukter. Etter kontroll av riktig vektor og konstrukter, utføres ligering, og tre ny vektorer fremstilles, vist i figur (E): pMG36e\_AB, (F): pMG36e\_BC og figur (G): viser pMG36e\_C.

## 2 Materialer

### 2.1 Bakteriestammer og plasmider

#### 2.1.1 Bakteriestammer

Bakteriestammene benyttet under arbeidet fremlegges i Tabell 2.1.1. Tabellen gir informasjon om hvordan de ulike stammene kultiveres, med tanke på medium, antibiotikum og temperatur.

**Tabell 2.1** Bakteriestammer benyttet og fremstilt under dette arbeidet  
kildereferansen refererer til hvor stammene er anskaffet, LMG refererer til stammekolleksjonen til LMG, og fremstilt refererer til at stammen er fremstilt under arbeidet.

Bakteriestamme	Stamme	Antibiotikum	Medium	Temperatur	Kilde
LMGT 3555	<i>S. thermophilus</i> SFi13 <sup>+</sup>		SM17 <sup>#</sup>	42°C	LMG
B1136	<i>L. lactis</i> IL1403-F1 <sup>*</sup>		GM17	30°C	LMG
B1121	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ -F1		LB	37°C	LMG
LMGT 3394	<i>L. lactis</i> IL1403		GM17	30°C	LMG
LMGT	<i>L. lactis</i> NZ9000		GM17	30°C	LMG
B4	<i>L. lactis</i> pMG36e_tomt plasmid		GM17	30°C	LMG
LMGT 2313	<i>Lb. sakei</i> NCDO 2714		MRS	30°C	LMG
LRN01	pMSP36e_C i <i>L. lactis</i>	Erytromycin	GM17	30°C	Fremstilt
LRN02	pCR-BluntII-TOPO_AB	Kanamycin	LB	37°C	Fremstilt
LRN03	pCR-BluntII-TOPO_BC	Kanamycin	LB	37°C	Fremstilt
LRN04	pCR-BluntII-TOPO_C	Kanamycin	LB	37°C	Fremstilt
LRN05	pMG36e_AB i DH5 $\alpha$	Erytromycin	LB	37°C	Fremstilt
LRN06	pMG36e_BC i DH5 $\alpha$	Erytromycin	LB	37°C	Fremstilt
LRN07	pMG36e_C i DH5 $\alpha$	Erytromycin	LB	37°C	Fremstilt
LRN08	pMG36e_AB i <i>L. lactis</i> IL1403	Erytromycin	GM17	30°C	Fremstilt
LRN09	pMG36e_BC i <i>L. lactis</i> IL1403	Erytromycin	GM17	30°C	Fremstilt
LRN10	pMG36e_C i <i>L. lactis</i> IL1403	Erytromycin	GM17	30°C	Fremstilt
LRN11	pMG36e_C i <i>Lb. sakei</i> NCDO 2714	Erytromycin	MRS	30°C	Fremstilt

<sup>#</sup> SM17 henviser til M17 medium tilsatt 1 % sukrose.

<sup>+</sup>LMGT 3555 kan vokse på GM17 medium ved 37 grader for å dyrke opp stammen. Der det er ønske om innhøsting av bakteriosin fra stammen må henvisning fra tabell 2.1.1 følges for å oppnå optimal bakteriosinaktivitet. <sup>\*</sup>F1= plasmid pMG36e med thermophilinkluster bak P32 promotor. Ved screening av bakteriestammer for sensitivitet mot bakteriosinet, Thermophilin 13, ble det benyttet flere stammer. Stammene er satt opp i tabell for det spesifikke forsøket, og fremstilles ikke i tabell 2.1.1.

## 2 Materialer

### 2.1.2 Vektorer

Vektorer benyttet under arbeidet fremstilles i tabell 2.2

**Tabell 2.2** Vektorer benyttet under arbeidet

Plasmid/vektor	ekspressjonssystem	Størrelse	Kilde
<b>pMSP3545</b>	NICE	8539 bp	(Bryan et al. 2000)
<b>pMG36e</b>	Konstitutivt	4403 bp	(van de Guchte et al. 1989)

## 2.2 Buffere

6x loading buffer for agarose gel elektroforese

Inneholder 40 % (w/v) sukrose, 5 mM EDTA og noen korn bromfenylblå

PBS (Phosphate Buffered Saline) buffer

Inneholder 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. pH ble justert til 7,4

TEA (Tris Acetic ADTA) buffer

Inneholder 4,84 g/L Trizma Base, 1 mM EDTA pH 8,0 og 1,1 % iskald eddiksyre

TEN (Tris EDTA NaCl) buffer

Inneholder 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl og 1mM EDTA

TBS (Tris Buffer Saline) buffer

Inneholder 0,8 % (w/v) NaCl, 0,02 % (w/v) KCl og 25 mM Tris-HCl

GTE buffer

Inneholder 50 mM glukose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 og 10 mM EDTA

## 2.3 vekstmedier

Vekstmedier sørger for tilstrekkelig og riktig næring for kultivering av bakterier.

M17 medium

Inneholder 37,25 g/L M17 buljong (Oxoid). Løsningen autoklaveres i 15 min. Etter autoklaving tilsettes glukose til en sluttkonsentrasjon på 0,4 % (w/v) for å lage GM17. For å lage SM17 tilsettes sukrose til en sluttkonsentrasjon på 1% (w/v) For å lage GM17 agar ble det tilsatt 15 g/L agar før autoklaving.

## 2 Materialer

### MRS (deMan-Rogosa-Sharpe) medium

Inneholder 52 g/L MRS buljong (Oxoid). Løsningen autoklaveres i 15 min. For å lage MRS agar ble det tilsatt 15 g/L agar før autoklaving. 2xMRS medium inneholder 104 g/L MRS buljong.

### MRSSM

Inneholder 52 g/L MRS buljong, 0,5M sukrose og 10  $\mu$ M  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

### BHI (Brain Heart Infusion) medium

Inneholder 37 g/L BHI buljong (Oxoid). Løsningen ble autoklavert i 15 min. For å lage BHI agar tilsettes 15 g/L agar før autoklaving.

### LB (Lysogeny Broth) medium

Inneholder 10 g/L trypton (Oxoid), 5 g/L gjærekstrakt (Oxoid) og 10 g/L NaCl. Løsningen autoklaveres i 15 min. For å lage LA (Lysogeny Agar) ble det tilsatt 15 g/L agar før autoklaving.

### SOC (Super Optimal Catabolite Repression Broth)

Inneholder 20 g/L Bacto Trypton (Oxoid), 5 g/L gjærekstrakt (Oxoid) 10  $\mu$ M NaCl og 2,5  $\mu$ M glukose. Løsningen ble sterilfiltrert.

## 2.4 Primere

Primere benyttes da de er sekvens-spesifikke, og binder seg til sekvensen. Dette muliggjør å amplifisere ønskede sekvenser, for å gjøre analyser eller undersøkelser som sekvensering. I primerne er det lagt inn HindIII og XbaI for å få sekvenser med overheng, for å få sekvenser som kan limeres inn i tomt plasmid ved kloning.

## 2 Materialer

**Tabell 2.3** Primeroversikt

Primer	Sekvens	Posisjon	Temperatur
<b>Forover AB</b>	<b>TCTAGA</b> *CTTGTC AAGGTTGCAACCCG	23-44	62
<b>Revers AB</b>	<b>AAGCTT</b> <sup>+</sup> AAGCGATAAAAGACTTTTATAATCC	563-539	64
<b>Forover BC</b>	<b>TCTAGA</b> *TAATAAGTTTAACTAAGGAAGGAG	381-404	62
<b>Revers BC</b>	<b>AAGCTT</b> <sup>+</sup> GTCTTGATAATTTTTGGGGGAGG	770-750	66
<b>Forover C</b>	<b>TCTAG</b> *TGTTGGGAGCGGAAAGGC	511-528	58

*Xba*I markert i rødt, <sup>+</sup>*Hind*III markert i grønt

Tabell 2.3 Viser primerne benyttet i oppgaven. Tabellen viser nukleotidsekvens, posisjon og temperatur for primerne. Posisjonen for primerene vises i vedlegg.

## 2.5 Kjemikalier

**Tabell 2.4** Kjemikalier benyttet under arbeidet.

Kjemikalier	Produsent
Agar	Merck
Agarose Ultra Pore	Invitrogen
Ammoniumsulfat	Sigma
Bakto-agar	Saveen Werner AB
Bovine serum albumin	New England BioLab
Bromfenol blå	Sigma
Buffer for restriksjonskutting	New England BioLab
CIP	New England BioLab
CIP buffer	New England BioLab
dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Amersham Bioscience
Eddiksyre	Merck
EDTA	Sigma
Erytromycin	Sigma
Etanol	Arcus

## 2 Materialer

Etidium bromid	Sigma
Gjærekstrakt	Oxoid
Glasskuler $\leq 106 \mu\text{m}$	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycin	Merck
Isopropanol	Arcus
Magnesium diklorid heksahydrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Merck
MRS buljong	Oxoid
Natriumklorid (NaCl)	Merck
Nisin	Sigma
Sukrose	Merck
Trizma base	Sigma
T4 DNA-ligase buffer	New England BioLabs
T4 DNA-ligase	New England BioLabs
Tryptone	Oxoid
Natrium klorid	Merck
Magnesium klorid	Merck

### 2.6 kommersielle kit

**Tabell 2.5** Kommersielle kit benyttet under arbeidet

Kommersielle Kit	Produsent
Plasmid Mini Kit 1	Omega bio-tek
NucleoSpin® Gel and PCR clean up	Macherey-Nagel
Quiagen® Plasmid Midi Kit 25	Quiagen

## 2 Materialer

### 2.7 Enzymer

**Tabell 2.6** Restriksjonsenzymer benyttet under arbeidet

Enzym	Gjenkjenningsskvens	NEBuffer	Optimal temperatur	Inaktiverings temperatur
<i>NcoI</i>	C/CATGG	3	37	65
<i>PstI</i>	CTGCA/G	3	37	80
<i>XhoI</i>	C/TCGAG	2	37	65
<i>XbaI</i>	T/CTAGA	2	37	65

#### **1X NEBuffer 3:**

50 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM Dithiothreitol

pH 7.9

#### **1X NEBuffer 2:**

50 mM NaCl

10 mM Tris-HCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM Dithiothreitol

pH 7.9

## 2 Materialer

**Tabell 2.7** Andre enzymer benyttet under arbeider

<b>Enzym</b>	<b>Aktivitet</b>	<b>Buffer</b>	<b>Leverandør</b>
<b>Lysozym</b>	Kløyving av peptidoglykan i celleveggen til Gram-positive bakterier		Sigma
<b>Mutanolysin</b>	Kløyving av peptidoglykan i celleveggen til Gram-positive bakterier		Sigma
<b>Phusion DNA Polymerase</b>	DNA polymerase	5x Phusion Polymerase buffer	Finnzymes
<b>Proteinase K</b>	Bryter ned proteiner		Sigma
<b>RnaseA</b>	Kløyver fosfodiester bindinger mellom 5' ribose og 3' ribose		Invitrogen
<b>Taq Polymerase</b>	DNA polymerase	10x Taq Polymerase buffer	Invitrogen
<b>T4 DNA ligase</b>	Danner fosfodiester bindinger mellom 5' fosfat og 3' hydroksyl ender i DNA	10x Ligase buffer	New England BioLabs

## 2.8 Andre løsninger

### Agarose gel

Avhengig av fragmentstørrelsen som ble analysert ble det benyttet 0,75 %, 1 % eller 1,5 % (w/v) agarose gel. For fremstilling av 1 % TAE-agarose gel ble 0,5 g agarose løst i 50 ml TAE-buffer. Agarosen ble løst ved oppvarming i mikrobølgeovn til homogen løsning. Den homogene løsningen ble tilsatt 3 µl etidiumbromid.



## 2 Materialer

### Ammoniumsulfat 30 %

Ammoniumsulfat ble benyttet for oppkonsentrering av bakteriosin. 30 g ammoniumsulfat ble løst i 1L dH<sub>2</sub>O.

### 20 % glysin

Fremstilling av 20 % glyserol ble utført ved å tilsette 20 g glysin i 100 ml dH<sub>2</sub>O, med påfølgende autoklaving i 15 min.

### MgCl<sub>2</sub> 1M

Fremstilling av 1M MgCl<sub>2</sub> ble utført ved å tilsette 203,3 g MgCl<sub>2</sub> i 100 ml dH<sub>2</sub>O, med påfølgende autoklaving i 15 min.

### NaCl (5M)

Fremstillingen av 5M natriumklorid ble utført ved å tilsette 29,22 g NaCl til 100 ml dH<sub>2</sub>O, med påfølgende autoklaving i 15 min.

### PEG<sub>1500</sub> (30 %)

Fremstillingen av PEG<sub>1500</sub> (30 %) ble utført ved å tilsette 60 g PEG<sub>1500</sub> i 200 ml dH<sub>2</sub>O, med påfølgende sterilfiltrering.

### Tris-HCl (1M)

Fremstillingen av Tris-HCl 1M ble utført ved å tilsette 12,1 Tris Base i 100 ml dH<sub>2</sub>O, pH ble justert til 8,0 med HCl, med påfølgende sterilfiltrering.

## 2.9 Annet utstyr

1,5 ml eppendorfrør

Nitril hansker

Vinyl hansker

Nunch-rør

Reagensrør (20 ml)

Reagensrørstativ

Glassflasker 100 ml-1000 ml

0,025 µm membran

inkuberingsboks

Pipettespisser 5 ml, 1 ml, 200µl, 10µl

Glassflasker

## 2 Materialer

### 2.10 Teknisk utstyr

**Tabell 2.8:** teknisk utstyr benyttet under arbeidet

<b>Utstyr</b>	<b>Versjon</b>	<b>Produsent</b>
Autoklav	SC 500	Matachara
Automatpipetter		Eppendorf
Bildeprinter	UP-897MD	Sony
Bioscreen	Bioscreen C	Bioscreen
Fryser		Integra Biociences
Fryser		BEKO
Gen pulser	1652077	Bio-Rad
Gen pulser kontroll	1652098	Bio-Rad
Inkubator (30°C)		Termaks
Inkubator (37 °C)		Termaks
Ismaskin	KF85	Porkka
Kamera	500D	Canon
Kjøleskap		Electrolux
Magnetrører	Hotplate	Stuart Scientific
Mikrobølgeovn	M1727N	Samsung
Mikrotiterplateleser	Ascent Multiscan	Thermo Scientific
koloniteller		Gallenkamp
kolorimeter		Ciab-corning
Nanodrop	ND-1000	Saveen & Werner
Termosykler	Mastercycler gradient	Eppendorf
Sentrifuge	Microfuge <sup>®</sup> 16 (bordsentrifuge)	Beckman Coulter
Sentrifuge	5804R	Eppendorf
Sentrifuge	J-26 XP	Beckman Coulter
Sterilbenk	2472	Holten
Vannbad		Julabo
Varmeblokk	Test tude heater SHT1	Stuart Scientific
Vekt		Salter-electroscale

## 2 Materialer

### 2.11 Bioinformatiske verktøy

Bioinformatiske verktøy er blitt benyttet under dette arbeidet for tilegnelse av informasjon både for planlegging av laboratoriearbeidet og analysering av data skaffet fra laboratoriearbeidet. I tillegg ble det benyttet programvarer på ulike laboratorieinstrumenter, de ulike programvarene blir ikke omtalt i dette avsnittet.

#### 2.11.1 CLC workbench

CLC workbench er en programvare som kan analysere DNA sekvenser. Programmet har en rekke funksjoner for å tilegne seg informasjon, om ønskede sekvenser. Noen av funksjonene er søkemotor opp mot andre databaser på internett, planlegging av kloning, og sekvenssammenstilling I dette arbeider er CLC workbench benyttet til analyse av DNA sekvenser, sekvenssammenstilling og tillaging av figurer. For sekvenssammenstillinger er det benyttet søk i BLAST for tilskaffing av referansesekvens.

#### 2.11.2 BLAST

Basic Local Search Tool (BLAST) er et program som benyttes for å søke etter homologe sekvenser. Dette utføres ved å søke etter regioner med lokal likhet mellom enten nukleotidsekvenser eller aminosyresekvenser. BLAST består av ulike søkemotorer avhengig av type sekvens du søker med og type sekvens du søker mot. BLAST beregner den statistisk signifikansen ved alle treff, og kan benyttes for å finne funksjonelle og evolusjonære forhold mellom sekvenser. BLAST er tilgjengelig på internett ved adressen:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

#### 2.11.3 ClustalW

ClustalW (2007) er et verktøy for å sammenstille sekvenser, med hensikt for å finne likheter for å identifisere konserverte områder. Konserverte områder kan benyttes for klassifisering av sekvenser . I dette arbeidet ble ClustalW benyttet for å identifisere potensielle homologe sekvenser (Larkin et al. 2007).

## 2 Materialer

### 2.11.4 Jalview 2.8

Jalview 2.8 er et gratisprogram for multiple sekvenssammenstilling analyse og visualisering. Den gir tilgang på konsensussekvens og enkel visualisering av likhetstreff (Waterhouse et al. 2009).

## 3 Metoder

### 3.1 Kultivering og lagring av bakterier

#### 3.1.1. Kultivering av bakterier

Det er ulike vekstvilkår for ulike mikroorganismer. De viktigste påvirkningene for vekst er temperatur, oksygen, pH og tilgang på vann. For en spesifikk mikroorganisme er det definert en minimumstemperatur der bakterien begynner å vokse. Veksthastigheten øker frem til den når den optimale temperaturen for vekst, hvilket er det punktet der bakterien har den korteste generasjonstiden. Den øverste temperaturen der bakterien har mulighet for vekst er definert som den maksimale temperaturen. Temperaturene er karakteristiske hos en spesifikk mikroorganisme, og vil kunne bli påvirket av ytre faktorer.

#### Kultivering av *E.coli*

*E.coli* stammer ble dyrket opp i LB-medium ved 37°C, flytene kulturer ble kultivert på 250 rpm risting. Erytromycinresistente (em<sup>r</sup>) stammer ble dyrket med 300 µg/ml erytromycin.

#### Kultivering av *Lactococcus lactis*

*Lactococcus* stammer ble kultivert i GM17 medium ved 30°C uten risting. Em<sup>r</sup> stammer ble kultivert med 10 µg/ml erytromycin.

#### Kultivering av *Lactobacillus sakei*

*Lb. Sakei* stammer ble kultivert i MRS medium ved 30°C utan risting. Em<sup>r</sup> stammer ble kultivert med 10 µg/ml erytromycin

#### 3.1.2 Lagring av bakterier

Bakterier ble tilsatt glyserol-løsning til en sluttkonsentrasjon på 15 %, for å unngå at vann krystalliseres i cellen, som vil føre til at celleveggen sprekker, og lagret ved -80°C.

### 3.2 Isolering av DNA

#### 3.2.1 Isolering av plasmid DNA

Plasmid DNA ble isolert ved å benytte E.Z.N.A<sup>TM</sup> Plasmid Mini Kit I eller QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Midi kit, protokoll fra forhandler (Omega 2009; QIAGEN 2005).

E.Z.N.A<sup>TM</sup> Plasmid Mini Kit 1 protokollen benyttet en alkalisk-SDS lysing av cellene. Cellene ble overført til HiBind matriks hvilket spesifikt binder DNA reversibelt. To vaskesteg

### 3 Metoder

med buffer HB og Vaskebuffer ble utført for fjerning av kontaminanter. Det ble tilsatt elueringsbuffer, hvilket reverserte HiBind matriks bindingen av DNA.

QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Midi kit protokollen baserer seg på alkalisk lyserings-prosedyre etterfulgt av binding av plasmid DNA under lave salt- og pH forhold til QIAGEN anion-byttet membran (resin). Ved medium saltvask, ble RNA, proteiner og lav molekylærvækt kontaminanter fjernet. Plasmid DNA ble eluert i en høy saltbuffer. saltet ble fjernet og DNA ble oppkonsentrert ved isopropanol presipitering. Prosedyren er basert på gravitasjonskraft.

#### 3.2.1.1 Isolering av plasmid DNA fra *E.coli*

#### 3.2.1.2 Isolering av plasmid DNA fra melkesyrebakterier

Isolering av plasmider fra Gram-positive melkesyrebakterier ble utført ved benyttelse av en modifisert utgave av E.Z.N.A<sup>™</sup> Plasmid Mini kit I.

Fremgangsmåte:

1. Celle pellet fra 3-5ml bakteriekultur dyrket over natt (ON) ble tilsatt TES-buffer. For enzymatisk lysering ble det tilsatt GTE buffer med 5mg/ml lysosym og 100 µg/ml RNase.  
Løsningen ble inkubert på 37°C vannbad i 10 min.
2. Den resterende isoleringen ble utført som angitt i manual fra E.Z.N.A<sup>™</sup> Plasmid Mini kit I (omega 2009). Volumet av elueringsbuffer eller dH<sub>2</sub>O benyttet var 30 µl.  
Eluert plasmid ble analysert på 0,75 % (w/v) agarose gel, og DNA konsentrasjonen ble kontrollert spektrofotometrisk på Nanodrop-ND1000 (saveem&Werner).

#### 3.2.2 Isolering av genomisk DNA

For å isolere genomisk DNA fra *S. thermophilus* ble E.Z.N.A<sup>™</sup> Plasmid Mini kit benyttet i kombinasjon av Fast prep, hvilket lyserer cellene mekanisk.

Forarbeid: Satt opp ON-kultur av *S. thermophilus*

### 3 Metoder

Tilsatte 0,5g glassperler til et fast prep rør.

1. 3-5 ml ON-kultur ble sentrifugert: 1 min ved 13000 rpm, kast supernatanten
2. Cellepelleten ble vasket i 500µl TBS-buffer
3. Pelleten ble resuspendert i 250 ml kald Solution 1 (Omega 2008)
4. Løsningen ble overført til et Fast-prep rør med 0,5 g glasskuler med diameter  $\leq 106$  nm.
5. Fragmenteringen og lyseringen av genomisk DNA ble utført på Fastprep 120 ved 4 m/s i 3·20sekunder ved 4°C
6. Lysatet ble sentrifugert i 1 min ved 11000g og overført til ett nytt eppendorfrør
7. Resterende steg ble utført i henhold til protokoll fra E.Z.N.A<sup>TM</sup> Plasmid Mini kit (Omega 2008). Elueringen ble utført med 30 µl dH<sub>2</sub>O. konsentrasjonen av DNA ble bestemt spektrofotometrisk ved Nanodrop ND-1000 og ved å kjøre 1 % (w/v) agarose gel, der fragmentstørrelsen ble sammenlignet med en 1 kb størrelsesmarkør fra NEB.

#### 3.2.3 Amplifisering av DNA sekvenser for kloning

For amplifisering av DNA sekvenser for kloning, ble først plasmidet med ønsket DNA sekvens amplifisert ved å benytte enten E.Z.N.A<sup>TM</sup> Plasmid Mini kit eller QIAGEN® Plasmid Midi kit benyttet.

### 3.3 Oppkonsentrering av Bakteriosinet Termophilin 13

Dyrket opp ON-kultur av *Streptococcus thermophilus* SFi13. Bakteriosinet har høyest aktivitet ved innhøsting to timer inn i stasjonærfasen, hvilket er ti timer (Marciset et al. 1997). Etter sentrifugering på 6000g i ti minutter ble pelleten avkjølt og tilsatt 30 % ammoniumsulfat. Løsningen ble ristet ved 4°C til løsningen var homogen. Deretter ble løsningen sentrifugert: 30 min ved 20.000g. Pelleten ble løst i 5 ml dH<sub>2</sub>O, og fordelt i passende mengde i eppendorfrør. Rørene ble plassert på varmeblokk som holdt 95°C i ti minutter. Bakteriosinet lagres ved -20°C frem til bruk. Prosedyren skal utføres på is, og ved temperatur på 4°C.

### 3 Metoder

Det ble utført innhøsting av bakteriosin ved to ulike temperaturer (37°C og 42°C) og med to ulike karbohydrater (sukrose og glukose)

#### 3.4 Bakteriosinassay

I forsøket ble det benyttet både softagarassay og mikrotitterassay. Mikrotitterassay benyttes der mer nøyaktige målinger er nødvendige.

##### 3.4.1 Softagarassay

Bakteriosin softagarassay ble benyttet for å teste bakteriosin-aktiviteten ved inokulering med ulike karbohydrater og ved ulike temperaturer. Bakteriosin softagarassay ble og utført for å undersøke ulike bakteriestammer som viser sensitivitet eller immunitet for bakteriosinet. 4 ml softagar (50°C) ble tilsatt 340 µl indikatorkultur og passende antibiotika ved nødvendighet. Softagaren ble overført på en romtemperert agarplate. Softagarplaten stod til tørking før påføring av 3µl bakteriosin. Det ble tilsatt tre ulike konsentrasjoner med bakteriosin: uforynnet, 10 og 50 ganger fortynt. Platene ble tørket før ON-inkubering på 30°C. Bakteriosin-aktiviteten uttrykkes som hemmingssoner på agaren hos sensitive stammer. For immune stammer vil det oppstå antydning til eller ingen soner.

##### 3.4.2 Proteinase K

Thermophilin 13 er proteinase K sensitiv, egenskapen kan benyttes for å påvise at hemmingen skyldes kun bakteriosin-aktivitet. Det settes opp en vanlig softagarassay med IL1403 som viser sensitivitet for thermophilin 13. ca. 0,5 cm fra bakteriosinet appliseres proteinase K. Proteinase K bryter ned proteiner, deriblant også bakteriosiner, og vil hindre bakteriosin-hemming, der den er applisert. Positiv proteinase K test viser en halvmåne der bakteriosinet prøver å hemme indikatorkulturen. Hemmingssonen viser en halvmåne, da bakteriosinet hemmer bakterieveksten, og thermophilin 13 blir selvbrutt ned av proteinase K.

##### 3.4.3 Mikrotitterassay

Mikrotitterassay har blitt benyttet for kvantitativt å undersøke i hvilke konsentrasjoner bakteriosinet virker hemmende på ulike indikatorstammer. Mikrotitterassay ble og benyttet til å prøve å påvise immunitetsgenet. For de ulike mikrotitterassay forsøkene ble det benyttet



### 3 Metoder

mikrotitterassay plater, med 8 rader (A-H) og 12 brønner (1-12) per rad. Bakteriosinet benyttet under forsøkene er ammoniumsulfat løst thermophilin 13, ufortynnet. Alle stammene som ble undersøkt ble satt opp med 4 ulike paralleller og hvert forsøk ble gjentatt 3 ganger, for å konkludere med at resultatene var reproducerbare og konkluderende.

Fremgangsmåte:

1. Tilsatte 100 µl vekstmedium i brønn 2-12
2. Tilsatte 200 µl bakteriosin i brønn 1
3. Fremstilte fortynningsrekke av bakteriosin: overførte 100 µl bakteriosin fra brønn 1 til brønn 2, blandet godt og gjentok, fra brønn to til tre. Det ble overført bakteriosin på lik måte til og med brønn 11
4. Benyttet 6 ml mediet, tilsatte passende antibiotika og 120 µl indikatorkultur (1:50 fortynning)
5. Tilsatt 100 µl 50x fortynnet indikatorkultur til alle tolv brønnene
6. Tilsatte blankprøve (benyttet medium)
7. Leste av mikrotitterplaten

Innstillinger for mikrotitterleseren: Bølgelengde: 620 nm, antall sykluser: 65, syklustid: 900s

Temperatur avhenger av indikatorkultur

#### 3.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR er en metode for DNA sekvens amplifisering uten å benytte levende organismer (Saiki et al. 1988). Prinsippet er konstruksjon av to spesifikke primere, hvilket komplementært annelerer til endene på DNA-sekvens som skal analyseres. Sekvensen amplifiseres i 3 etterfølgende sykluser. En varmestabil DNA polymerase, leser av sekvensen i 3'-5' retning, setter på komplementære baser og lager en ny sekvens i 5'-3' retning. Amplifiserte produkter benyttes som templat i etterfølgende sykluser og det dannes mer enn 10 millioner kopier av ønsket DNA-sekvens (Saiki et al. 1988).

### 3 Metoder

Hver PCR syklus består av tre trinn: denaturering av DNA, annealing av primere og elongering ved DNA polymerase. Temperatur og tid for hver syklus varierer avhengig av flere faktorer, f.eks. elongeringstiden avhenger av lengden på sekvensen. En siste elongerings-syklus utføres til slutt for forsikring om fullstendig elongering av ny syntetiserte PCR-produkter.

Det ble benyttet to DNA polymeraser under prosjektet. Phusion polymerase ble benyttet da den har både 3'-5' kontroll-lesning og 5'-3' kontroll-lesning, hvilket gir bedre nøyaktighet enn f.eks. DyNAzyme polymerase. Der PCR-produkt ikke skal benyttes videre benyttes Taq polymerase, som mangler 3'-5' eksonuklease kontroll-lesning, da den er rimeligere enn Phusion polymerasen.

10 µl 5x Phusion buffer	10µl Taq polymerase
2,5 µl fremlengs primer 10 µM	2,5 µl fremlengs primer 10 µM
2,5 µl revers primer 10 µM	2,5 µl revers primer 10 µM
1 µl dNTP 10 µM	1 µl dNTP 10 µM
20-100 ng/µl templat DNA	20-100 ng/µl template DNA
0,5 µl Phusion polymerase	0,5 µl Taq polymerase
dH <sub>2</sub> O til totalt volum på 50 µl	dH <sub>2</sub> O til totalt volum på 50 µl

PCR syklus for kloningsreaksjonen av *S. thermophilus* SFi13 genomisk DNA. Benyttet primer spesifikke for de tre konstruktene AB, BC og C.

Tabell 3.1 PCR syklus

Temperatur	Tid	Funksjon	Antall sykluser
95°C	5 minutter	Denaturering	1
95°C	30 sekunder	Denaturering	30
60°C	30 sekunder	Anneling	
72°C	20 sekunder	Elongering	
72°C	7 minutter	Elongering	1
4°C	∞	kjøling	1

DNA ekstraksjon fra gel elektroforese ble utført ved å benytte Nucleospin® Gel and PCR clean up (Machery-Nagel 2012). Ekstraheringen muliggjøres ved NucleoSpin® silika membran som spesifikt binder DNA reversibelt. Dette tillater at kontaminanter som f.eks proteiner, fjernes da de ikke bindes til membranen.

### 3 Metoder

Agarose gel prøven blir tilsatt bindings buffer NT1 (pH <7.0) og varmet opp til 50°C, for å løse agarose gelen. Silika membranen i NucleoSpin® kolonnen vil ha optimal bindeevne til nukleinsyrer ved den hydrofobiske omgivelsen som skapes av tilstedeværelse av kaotropisk salt. Kaotropisk-salt denaturerer proteiner (i dette tilfellet cellulære proteiner) da saltet har evne til å oppløse hydrofobiske interaksjoner, men denaturerer ikke DNA eller RNA. Høy saltkonsentrasjon tilrettelegger for binding av DNA/RNA til silikamembranen i kolonnene. Kontaminanter som proteiner og primere vil ikke binde til silikamembranen, og vaskes dermed ut av prøven med vaskebuffer NT3. Nukleinsyrene elueres ut av membranen ved lavt saltforhold og en noe alkalisk elueringsbuffer NE (5mM Tris/HCl, pH 8.5). To repetisjoner av elueringssteget øker gjenervervelsen av DNA.

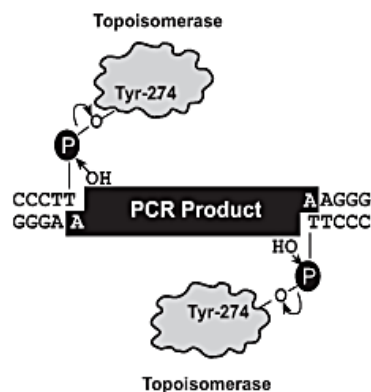
#### 3.7 Zero Blunt® TOPO® PCR cloning kit

Zero Blunt Topo PCR kloning kit ble benyttet da det er vanskelig å transformere direkte inn i pMG36e\_ABC.

Zero blunt Topo PCR klonings kit er en et-steg klonings strategi som benytter kjemisk kompetente *E.coli* celler, med direkte inkorporering av blunt ende PCR produkt inn i en plasmidvektor.

Protokollen benytter seg av egenskapene til topoisomerase I fra *Vaccinia* virus.

Topoisomerase I binder til spesifikke bindingssteder på dobbeltrådet DNA, og kløyver fosfodiester backbone etter 5'-CCCTT på den ene DNA tråden. Energien fra kløyvingen konserveres ved dannelse av kovalent bånd mellom 3' fosfat, på den kløyvede tråden, og et tyrosyl residue (Tyr-274) på topoisomerase I. Fosfo-tyrosyl båndet kan angripes av 5' hydroksyl, fra den kløyvede tråden, og reversere reaksjonen og frigjøre topoisomerasen.



Figur 3.1 Illustrerer topoisomerase I funksjonalitets metode.



**Figur 3.2** vektoren pCR<sup>®</sup>-Blunt II TOPO<sup>®</sup>. Direkte seleksjon av positive rekombinanter illustreres. Plasmid vektoren (pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>) er linearisert med *vaccina* virus DNA topoisomerase I kovalent bundet til 3'enden på hver an DNA trådene. Vektoren kan transformeres inn i kjemisk kompetente celler, eller direkte elektroporert til elektrokompetente celler. (I denne protokollen ble kjemisk kompetente celler benyttet). Vektoren inneholder det dødelige *E.coli* genet, *ccdB* som er overlappende med *LacZα*-fragmentet på C-terminal ende av *LacZα*-fragmentet. Når PCR produktet liggeres inn i vektoren forstyrres uttrykkelsen av *lacZα-ccB* genet, hvilket tillater vekst kun hos positive rekombinanter.

### 3.8 Restriksjonskutting

Det ble satt opp fire ulike prøver for kutting. En for å fremstille plasmidet pMG36e\_ABC uten thermophilinklusteret (\_ABC). Tre prøver ble satt opp, en for hver av konstruktene som ble fremstilt.

For å oppnå kuttet plasmid pMG36e\_ABC uten thermophilinkluster ble stamme B1121 en *E.coli* (DH5α) – F1 stamme (F1= pMG36e\_ABC, der thermophilinklusteret er bak P32 promotoren). For å fremstille de tre konstruktene ble stamme B1136 (*L.lactis* IL1403-F1) benyttet.

Hensikten med restriksjonskutting av plasmidet pMG36e\_ABC var todelt. Både å få fremstilt

### 3 Metoder

de tre konstruktene AB, BC og C og å oppnå tom vektor slik at de ulike gen-konstruktene kunne bli ligert inn. Deretter kunne det undersøkes hvilket av genene som forårsaker immunitet for bakteriosinet thermophilin 13.

For å kutte pMG36e\_ABC, for fremstilling av pMG36e\_tomt og de tre konstruktene ble restriksjonsenzymene *XhoI* og *XbaI* benyttet. CIP fungerer ved å kutte av fosfat i kuttingssete. Dette utføres kun på vektoren slik at ligering vil fungere. Etter kutting benyttes agarose gel-elektroforese. De tre ulike konstruktprøvene ble satt på 0,75 % (w/v) agarose gel, og kuttet plasmid ble satt på 1,5 % (w/v) agarose gel.

Restriksjonskutting:

- 1 µl *XhoI*
- 1 µl *XbaI*
- 3 µl 10x Buffer 2
- 3 µl BSA 10 ganger fortynnet
- 1 µg DNA
- dH<sub>2</sub>O til totalt volum på 20 µl

Prøvene ble satt på vannbad på 37°C i 2 timer. De siste 45 minuttene ble det tilsatt 1µl CIP og 1µl CIP buffer til prøven der det var ønskelig å kutte ut thermophilinklusteret og oppnå tomt pMG36e\_ABC.

### 3.9 Ligering og dialyse

Plasmidet pMG36e\_ABC ble benyttet. Der thermophilinklusteret var kuttet ut før ligering. Det ble fremstilt tre ulike genkonstrukt ved PCR amplifisering, ligering av PCR konstruktene inn i plasmidet. Det fremstilles pMG36e\_AB, pMG36e\_BC og pMG36e\_C.

Under fremlegges en oversikt over hvordan ligering og dialyse ble utført for alle de tre ulike konstruktene.

#### 3.9.1 Ligering

1. 600 ng PCR konstrukt
2. 200 ng kuttet pMG26e\_ABC
3. 2 µl T4 ligase buffer

### 3 Metoder

4. 1  $\mu\text{l}$  T4 ligase
5.  $\text{dH}_2\text{O}$  opp til 20  $\mu\text{l}$

**Tabell 3.2:** Ligeringscyklus

Tid	Temperatur
16 timer	16°C
20 minutter	72°C
$\infty$	4°C

Tabell 3.2 viser tid og temperatur for ligering.

Steg nummer to, 20 minutter på 72 grader, ble utført for inaktivering av ligasen.

#### 3.9.2 Dialyse

Drop dialyse ble utført på et 0,025  $\mu\text{m}$  filter på 0,1X TE buffer. Kontroller at det ikke kommer buffer på oversiden av filteret. Dialysen trekker ut salter i ligeringsblandingen, dette er nødvendig da elektrisitet skal tilføres prøven under transformering ved elektroporering. Ligeringsblandingen ble plassert på filteret og står til dialyse i 60 min. Deretter er ligeringen klar for Elektroporering.

#### 3.10 Elektrokompente celler

Elektrokompente celler benytter elektrisk strøm, som danner porer i cellene. Porene gjør det mulig for genetisk materialet å gjennomtrengne cellemembranen for inkorporering til plasmidet.

##### 3.10.1 Elektrokompente E.coli DH5 $\alpha$ celler

Hvert vaske-steg tilsvarende, resuspantering, sentrifugering: 4000g, 15 min, 4°C

1. Inokulerte LB-medium med 1/100vol ON-kultur DH5 $\alpha$
2. Inkuberte ved 37°C, risting til  $\text{OD}_{600}=0,5-1,0$
3. Avkjøl på is, sentrifugerte: 4000g, 15min, 4°C
4. Vask med 1vol  $\text{dH}_2\text{O}$

### 3 Metoder

5. Vask med 1/2vol dH<sub>2</sub>O
6. Vask med 1/50vol 10% glyserol
7. Resuspender i 1/500vol 10% glyserol

#### 3.10.2 Elektrokompetente *L. lactis*

1. Fortynnet ON-kultur av *L. lactis subsp lactis* 100x i SGM17 medium
2. Inkuberte, 30°C til OD<sub>600</sub>=0,3 – 0,4
3. Fortynnet *L.lactis subsp lactis* 100x i SGM17 medium
4. Satt opp glysin gradient: 1,2 %, 1,4 %, 1,8 % og 2,0 % Glysin konsentrasjon
5. inkuber ON til OD<sub>600</sub> = 0,2 - 0,7
6. Sentrifugerte: 6500g, 5min, 4°C
7. Tilsatte 15 ml kald 0,5M sukrose til pelleten, sentrifugerte: 6500g, 5 min, 4°C
8. Steg 6 ble gjentatt to ganger
9. Tilsatte pelleten 1 ml 0,5M sukrose og 10 % glyserol
10. Løste pelleten forsiktig
11. Lagret cellene ved -80°C

#### 3.10.3 Elektrokompetente *Lactobacillus sakei* NCDO 2714

1. Forbered en 5 ml ON-kultur *Lb. sakei* i MRS
2. Inokulerte 50 ml kultur og dyrk ON
3. Fortynnet kulturen 20 ganger i MRS med 1,5 % glysin, inkuberte 2,5 t.
4. Høstet cellene ved sentrifugering: 6000g, 4°C i 10 min. Fjern supernatanten forsiktig
5. Vasket cellene i ¼ vol. kald TES-buffer, sentrifugerte: 6000g, 4°C i 10 minutter. Fjern supernatanten forsiktig

### 3 Metoder

6. Vasket cellene i 1 vol.  $MgCl_2$ , sentrifugerte: 6000g, 4°C i 10 min. Fjern supernatanten forsiktig
7. Vasket cellene i ½ vol. 30 % PEG<sub>1500</sub>, sentrifugerte: 6000g, 4°C i 10 min. fjern supernatanten forsiktig
8. Resuspenderte celle pelleten i 1/100 vol. 30 % PEG<sub>1500</sub>
9. Elektroporer eller oppbevar: -80°C

#### 3.11 Transformering ved elektroporering

Benytter elektrokompetente celler for å transformere genetisk materialet. DNA blir inkorporert til plasmidet og vil dermed kunne uttrykkes i elektrokompetente celler.

##### 3.11.1. Transformering til *E.coli*

Fire transformeringer ble utført. En kontroll transformering med tomt plasmid og en transformering for hver av de tre konstruktene. Det ble og utført en kontroll med kun elektrokompetente *E.coli* celler uten tilsetning av DNA.

1. Tilsette 1 µl DNA til 40 µl elektrokompetente celler, la det står 1 min på is
2. Overførte blandingen til is-kald 1 mm elektroporeringskyvette
3. Benytt innstillingene 2,5 kV, 200Ω og 25 µF, elektrisk ladning ble tilsatt
4. Tilsatte 250 µl S.O.C medium øyeblikkelig
5. Cellene ble inkubert 1 t ved 37°C
6. Utplatingen ble utført på LA-skåler med 10µg/ml Erytromycin i tre ulike volumer: 20 µl, 50 µl og 200 µl. Inkuberen ON på 37°C

##### 3.11.2. Transformering til *L. lactis* subsp *lactis*

Elektrokompetente *L. lactis* subsp *lactis* cellene ble benyttet for transformering hadde 1,8 % glycin konsentrasjon. Det ble utført fire transformeringer. En kontrolltransformering med



### 3 Metoder

tomt plasmid, og en transformering for hver av de tre ulike konstruktene. Det ble og benyttet en kontroll med kun elektrokompetente *L. lactis subsp lactis* celler.

1. Tilsatte 2 µl DNA til 40µl elektrokompetente *L. lactis subsp lactis* celler, blandet forsiktig med en pipettespiss
2. Overførte blandingen til en is-kald 2 mm elektroporeringskyvette
3. Benytt innstillingene 2 kV, 200 Ω og 25 µF, elektrisk ladning ble tilsatt
4. Øyeblikkelig ble 960 µl SGM17 medium tilsatt. Kyvettens innhold ble overført til et kulturrør
5. Cellene inkubertes: 2 t ved 30°C
6. Utplatingen utførtes på GM17-agar plater med 10 µg/ml Erytromycin i tre ulike volumer: 20 µl, 50 µl og 200 µl. Inkuber 2 dager på 30°C

#### 3.11.3 Transformering til *Lb. sakei* NCDO 2714

Elektrokompetente *Lb. sakei* celler ble benyttet ble kultivert i MRS medium med 1,5% glycin. Det ble utført to transformeringer. En kontrolltransformering med tomt plasmid, og en transformering av genkonstruktet med *orf-C*. Det ble og benyttet en kontroll med kun elektrokompetente *Lb. sakei* celler.

1. Tilsatte 0,8 µg plasmid DNA til 40 µl elektrokompetente celler, blandet forsiktig med pipettespissen
2. Overførte Blanding til en is-kald 2 mm elektroporeringskyvette
3. Benytt innstillingene: spenning 1.5 kV, kapasitans 25µF og motstand 400Ω. Elektrisk ladning ble tilført
4. 960 µl MRSSM ble tilsatt øyeblikkelig, løsningen overføres til kulturrør
5. Cellene inkubertes: 4 timer ved 30°C
6. Utplating utførtes på MRS agarplater med 10 µg/ml erytromycin i tre ulike volumer: 20µl, 50µl og 200 µl. Inkubert i 2 dager på 30°C

### 3.12 Direkte PCR av kolonier

Utføringen av utvelgelse av kolonier er tilsvarende uavhengig om det er *E.coli* celler, *L.lactis subsp lactis* celler eller *Lb. sakei*. Ulikheten består i vekstmedium, antibiotika og temperatur for inkubering. Arbeidet utføres i sterilbenk. For effektivisering lages PCR master-blanding, fordeles i antall PCR-rør tilsvarende antall kolonier som skal plukkes. Det er hensiktsmessig å plukke mer enn en koloni da det er mulighet for at ikke alle koloniene inneholder ønsket DNA. Kun single kolonier ble valgt, og plukket ved å føre en tannpirker, hold av en pinsett, på kolonien. Tannpirkeren dyppet i PCR-rør og overført til det respektive reagensrøret. Reagensrøret inneholdt LB-medium ved arbeid med *E. coli*, GM17-medium ved arbeid med *L. lactis* og MRS-medium ved arbeid med *Lb. sakei*. Alle reagensrørene var tilsatt 10 µg/ml Erytromysin. Reagensrørene ble inkubert ON ved 37°C for *E.coli* og 30°C for *L.lactis subsp lactis* og *Lb. sakei*.

PCR-produktet ble plassert på 1,5 % agarose gel elektroforese w/v ved 75V. Deretter ble gelen kontrollert for hvilke av koloniene som inneholdt korrekt konstrukt. Korrekte kolonier ble benyttet videre.

### 3.13 Sekvensering

Det ble benyttet plasmid-DNA 100 ng/µl. primere benyttet var spesifikke for konstruktene og hadde 5 µM konsentrasjon. Da plasmid-DNA sekvenseres vil returnerte sekvenser være lenger enn lengden på gen-sekvensen. Dette da primeren ikke gjenkjenner hvor genet stopper og plasmidet starter.

### 3.14 Vekstkurve av *S. thermophilus* SFi13

For å skape vekstkurven til bakteriosin-produsenten *S. thermophilus* ble det satt opp en 5 ml ON-kultur av *S. thermophilus*. Det ble utført tre fortyntninger av ON-kulturen med to paralleller per fortyntning. Fremstilte fortyntninger var 10, 100 og 1000 ganger fortyntning av *S. thermophilus* ON-kulturen. Fortyntningen ble overført på en bioscreen-plate, der 10 ganger fortyntningen parallell 1 ble plassert i brønn 01, parallell 2 i brønn 02. 100 ganger fortyntning parallell 1 i brønn 03 osv. I brønn 07 og 08 ble det tilsatt to paralleller av blankprøven (M17 1 % sukrose).

### 3 Metoder

Målingene på bioscreen C ble utført med «600nm brown», 24 timer målingsavlesning, måling hvert 30 minutt, risting 10 sekunder før hver måling.

#### 3.15 Kinetisk analyse av thermophilin 13

For å få informasjon om hvordan bakteriosinet thermophilin 13 fungerer ble det satt opp en drepekurve. For å danne denne kurven ble den sensitive indikatorstammen IL1403 benyttet.

Metoden vil vise om bakteriosinet fungerer bakteriostatisk eller bakteriosidalt. Dersom thermophilin 13 er celledrepende vil celletallet bli redusert over tid. Er bakteriosinet derimot bakteriostatisk vil celletallet holde seg omtrentlig stabilt over tid.

For å danne en kurve ble det tatt ut prøver ved tidspunkt 0,2,4,8 og 24 timer. Det ble satt opp fem ulike prøver, en negativ kontroll og fire prøver med ulik konsentrasjon av ammoniumsulfat-felt thermophilin 13: 100BU/ml, 200BU/ml, 500BU/ml og 800BU/ml.

Fremgangsmåte:

1. Fem prøver med volum på 5 ml ble satt opp, en negativkontroll uten bakteriosin og fire prøver med definert bakteriosinkonsentrasjon: 100 BU/ml, 200 BU/ml, 500 BU/ml og 800 BU/ml. En Bakteriosinenhet (BU) er definert som den resiproke verdien av den høyeste fortynningen som gir 50 % hemming
2. Alle prøvene ble tilsatt 100µl ON kultur av IL1403
3. Ved tidspunkt 0,2,4,8, og 24 timer ble det tatt ut 20µl av hver av de fem prøvene
4. En mikrotitterplate ble tilsatt 180µl GM17-medium i brønn 1-8, i rekke A-E.
5. Hvert uttak (20µl) ble overført til en mikrotitterplate, i brønn 1, i hver sin rad (A-E)
6. Fra brønn 1 ble det utført en fortynning til og med brønn 8. Fortynningen utføres ved god blanding og bytte av pipettespiss mellom hver brønn for å unngå overføring av for høy konsentrasjon.
7. Det ble benyttet en GM17-agarskål per prøve. Skålen markeres inn i åtte seksjoner.
8. Det ble spottet 5µl fra hver fortynning på de respektive markerte områdene på agarskålen.

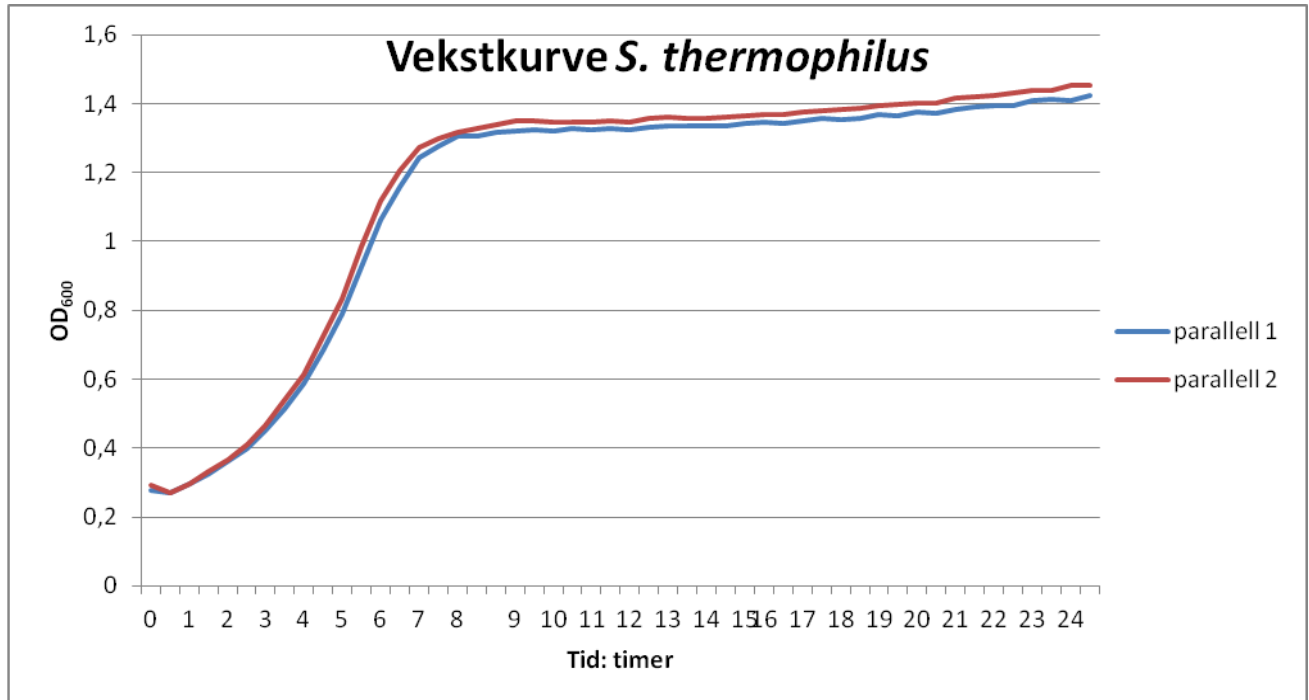
### 3 Metoder

9. platene inkuberes ON på 30°C.
10. For hver (prøve) bakteriosinkonsentrasjon ble CFU/ml beregnet for hver tid og hver fortynning

## 4 Resultater

### 4.1 Vekstkurve av *S. thermophilus* SFi13

En vekstkurve av bakteriosinprodusenten *S. thermophilus* ble utført for å undersøke når den går over til stasjonærfasen.

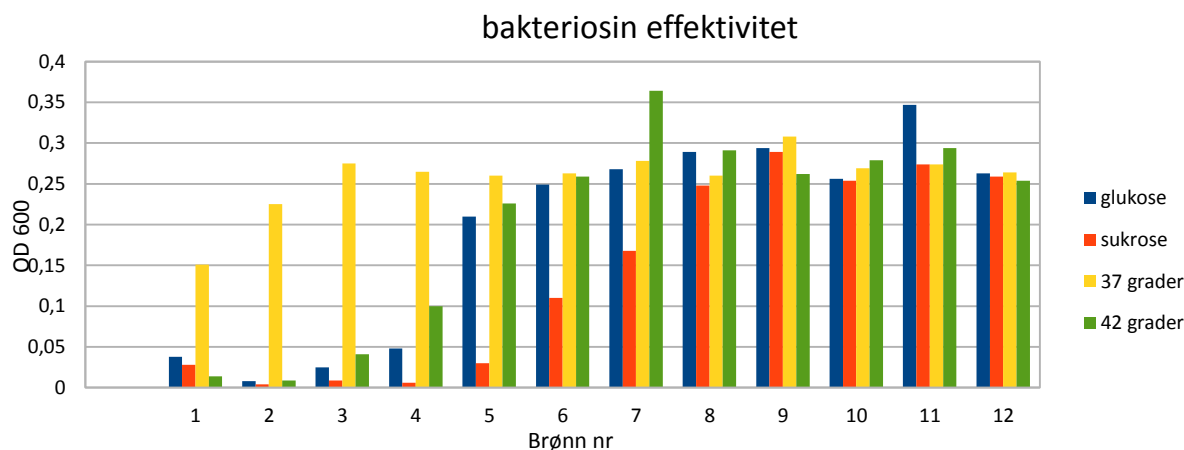


**Figur 4.1** Vekstkurve av *S. thermophilus* SFi13

Vekstkurven er utarbeidet med Bioscreen C over 24 timer. Bioscreen måler turbiditet (lysspredning), den måler ikke hvor mye partikler av organisk materialet tilstede i prøven, men måler hvordan partiklene sprer lyset. Dette er mer nøyaktig enn måling av absorbansen. Prøven målt er en 100 ganger fortynning av ON-kultur, det er målt to paralleller av prøven for kontroll at vekstkurven er korrekt. Kurven viser at *S. thermophilus* går inn i stasjonærfase ved tid 8 timer.

### 4.2 Bakteriosin aktivitet

For å kontrollere når bakteriosinet thermophilin 13 har høyest aktivitet ble det satt opp mikrotitterassay med fire ulike prøver. To med ammoniumsulfat løst bakteriosin, der produsent bakterien har vokst på 42°C. En prøve vokste på GM17 medium, og en prøve vokste på M17 medium, tilsatt 1 % glukose tilsatt. De to resterende prøvene var kontroll for optimal temperatur, bakteriosinet benyttet var fremstilt fra supernatant.



**Figur 4.2** Mikrotittarassay kontroll for optimale vekstforhold.

De optimale vekstforholdene for bakteriosinprodusenten *S. thermophilus* ble kontrollert, ved å benytte to ulike karbohydrater tilsatt vekstmediet, og to ulike inkubasjonstemperaturer.

Figur 4.2 viser at ved vekst på sukrose ligger  $Mic_{50}$  i brønn seks. Ved vekst på glukose ligger  $Mic_{50}$  mellom brønn fem og fire. Bakteriosinet benyttet for optimal temperatur er mindre effektivt da det ikke er ammoniumsulfat, men fremstilt ved enkel sentrifugering. Ved vekst på  $37^{\circ}C$  viser er inhiberingen veldig svak og det er ingen definert  $Mic_{50}$ . Bakteriosinet thermophilin 13 viser høyest aktivitet når det blir høstet inn på M17-medium tilsatt 1 % sukrose og inkubert på  $42^{\circ}C$ . Den høyeste aktiviteten av bakteriosin blir oppnådd når det innhøstes etter ti timer, da er vekststadiet to timer inn i stasjonær fasen. De optimale vekstvilkårene blir benyttet ved innhøsting av bakteriosinet thermophilin 13.

### 4.3 Screening av bakteriestammer for sensitivitet

Resultat for screening av bakteriestammer med ulike vekstmedier. Tabellene er utarbeidet ved softagarassay, Diameteren av hemmingssonene ble målt i millimeter for å kunne gjøre en sammenligning av hvor sensitivitet hos de ulike stammene. Bakteriosinet benyttet for dette forsøket var thermophilin 13. Det ble kontrollert med proteinase K at inhiberingen er forårsaket av bakteriosinaktivitet. Proteinase degraderer proteiner, slik at bakteriosinpeptidene mister aktiviteten. Bildet er ikke vist.

I de tre tabellene nedenfor henviser «ufortynnet», «10 x» og «50x» til fortynningskonsentrasjoner av bakteriosin tilsatt softagarassayet. «1/10» er 10 ganger fortdynnet bakteriosin og «1/50» refererer til 50 ganger fortdynnet bakteriosin. De tre ulike konsentrasjonene ble benyttet for tilegnelse av mer informasjon om sensitivitetsgrad.

**Tabell 4.1** Screening for sensitivitet hos GM17-dyrkede bakteriestammer

Bakteriestamme		ufortynnet	1/10	1/50
Streptococcus thermophilus ST20B	LMGT 2726	6 mm	6 mm	-
Streptococcus thermophilus ST 112 B	LMGT 2727	-	-	-
Streptococcus thermophilus 1-2	LMGT 3174	4 mm	-	-
Streptococcus pneumoniae TIGR4	LMGT 3249	-	-	-
Streptococcus bovis JB1	LMGT 2927	-	-	-
Lactococcus lactis IL 1403	LMGT 3394	11 mm	9 mm	8 mm
Lactococcus lactis NZ9000	LMGT 2917	8 mm	7 mm	5 mm
Lactococcus lactis SK11	CG 90	8 mm	7 mm	-
Lactococcus lactis MG 1363	LMGT 2144	8 mm	7 mm	5 mm
Enterococcus faecalis OG 1 RF	LMGT 2381	-	-	-
Enterococcus faecalis JH2-2	LMGT 3400	-	-	-
Enterococcus faecalis V583	LMGT 3088	-	-	-
Enterococcus faecalis NCDO 942	LMGT 2601	-	-	-
Listeria innocua	LMGT 2785	-	-	-
Listeria monocytogens EDG-e	LMGT 2604	4 mm	2 mm	-

markerer at stammen ikke er sensitiv til thermophilin 13 og dermed har vekst

Tabell 4.1 viser oversikt over bakteriestammer med vekst på GM17 vekstmediet. Tabellen gir en oversikt over stammenes sensitivitet eller immunitet mot bakteriosinet thermophilin 13.

Av tabell 4.1 kommer det frem at LMGT 3394 er den mest sensitive stammen mot bakteriosinet thermophilin 13. Det er totalt 7 sensitive stammer, og kun tre av disse er sensitive for 50 ganger fortynnet bakteriosin. Stammen LMGT 3174 er kun sensitiv mot ufortynnet bakteriosin. Tabellen viser at LMGT 2604 stammen er sensitiv mot thermophilin 13 ned til 10 ganger fortynnet bakteriosin.

**Tabell 4.2** Screening av sensitivitet hos MRS-dyrkede bakteriestammer

Bakteriestamme		ufortynnet	1/10	1/50
Lactobacillus sakei NCDO 7414	LMGT 2313	13 mm	7 mm	6 mm
Lactobacillus sakei Lb790	LMGT 2799	-	-	-
Lactobacillus plantarum NCDO 1869	LMGT 2329	13 mm	7 mm	-
Lactobacillus curvatus NCDO 2739	LMGT 2310	-	-	-
Lactobacillus acidophilus NCDO 860	LMGT 2302	-	-	-

Lactobacillus viridescens NCDO 1655	LMGT 2314	-	-	-
Pediococcus damnosus 4749	LMGT 3241	15 mm	10 mm	6 mm
Pediococcus pentosaceus NCDO 990	LMGT 2315	6 mm	3 mm	-
Pediococcus acidilactici NCDO 1859	LMGT 2316	-	-	-
Leuconostoc mesenteroides NCDO 529	LMGT 2083	6 mm	-	-
Leuconostoc cremoris DB 1275	LMGT 2724	-	-	-

markerer at stammen ikke er sensitiv til thermophilin 13 og dermed har vekst.

Tabell 4.2 viser oversikt over bakteriestammer med vekst på MRS vekstmediet. Tabellen gir en oversikt over stammens sensitivitet eller immunitet mot bakteriosinet thermophilin 13.

Tabell 4.2 viser at LMGT 3241 er den mest sensitive stammen. Man ser at LMGT 3213 er den mest sensitive Lactobacillus stammen. De to overnevnte stammene er de eneste stammene med sensitivitet mot 50 ganger fortynnet bakteriosin. LMGT 2329 og 2313 viser tilsvarende sensitivitet mot uforynnet og 10 ganger fortynnet bakteriosin, men LMGT 2329 viser ikke sensitivitet mot bakteriosinet fortynnet 50 ganger. Stammen LMGT 2724 viser kun sensitivitet mot uforynnet thermophilin 13. Det er kun LMGT 2313 og LMGT 3241 som viser hemming av vekst ved tilstedeværelse av 50 ganger fortynnet thermophilin 13.

Sammenlignet med tabell 4.1. og 4.3. er tre av hemmingssonene i tabell 4.2 ved uforynnet bakteriosin større enn i de to andre tabellene. Det er to hemmingssoner på 13mm og en på 15 mm. I tabell 4.1 er den største hemmingssonen 11 mm.

**Tabell 4.3** Screening for sensitivitet av BHI-dyrkede bakteriestammer

Bakteriestamme		uforynnet	1/10	1/50
Bacillus cereus ATCC 9139	LMGT 2711	5mm	4mm	-
Bacillus subtilis OG1	LMGT 2706	3mm	-	-
Bacillus coagulans 1761	LMGT 2784	7mm	-	-
Clostridium tyrobutyricum NCDO 1715	LMGT 2511	8mm	6mm	-
Clostridium sporogenes NCDO 1719	LMGT 2515	-	-	-

markerer at stammen ikke er sensitiv til thermophilin 13 og dermed har vekst

Tabell 4.3 viser oversikt over bakteriestammer med vekst på BHI vekstmediet. Tabellen gir en oversikt over stammens sensitivitet eller immunitet mot bakteriosinet thermophilin 13.

Av tabell 4.3 kommer det frem at kun LMGT 2515 ikke viser sensitivitet mot thermophilin 13. Den mest sensitive stammen er LMGT 2511. Ved sammenligning med tabell 4.1 og 4.2 er



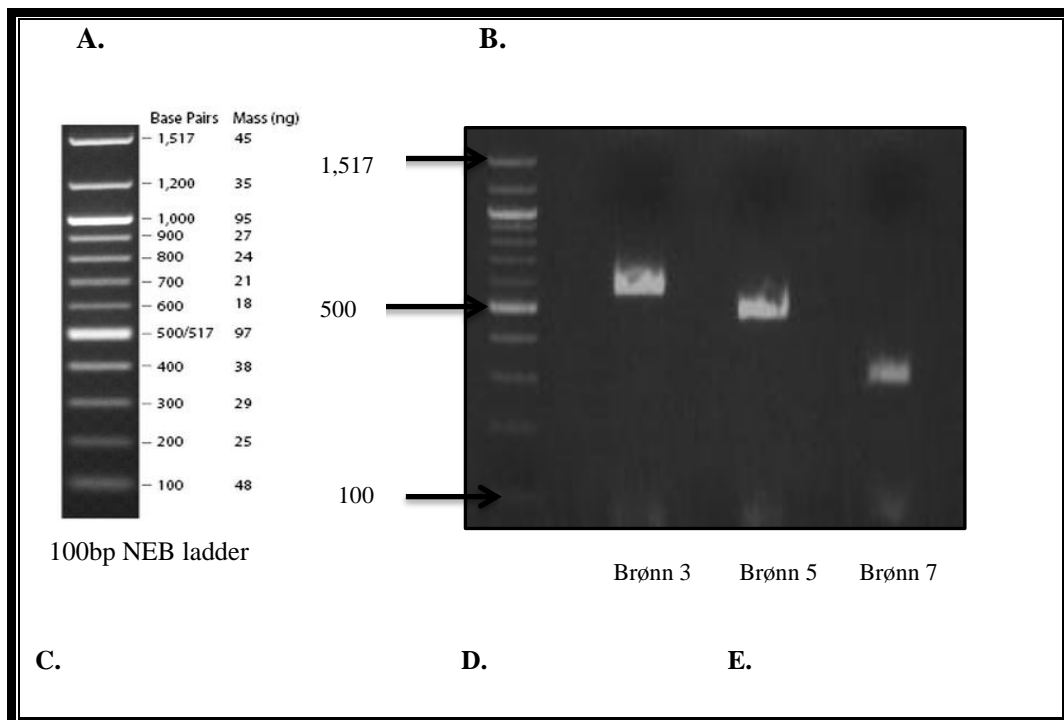
stammene i tabell 4.3 mindre sensitive da ingen av stammene viser hemming ved 50 ganger fortynnet bakteriosin. Den største hemmingssonen ved ufortynnet bakteriosin i tabell 4.3 er LMGT 2511 med 8 mm i diameter.

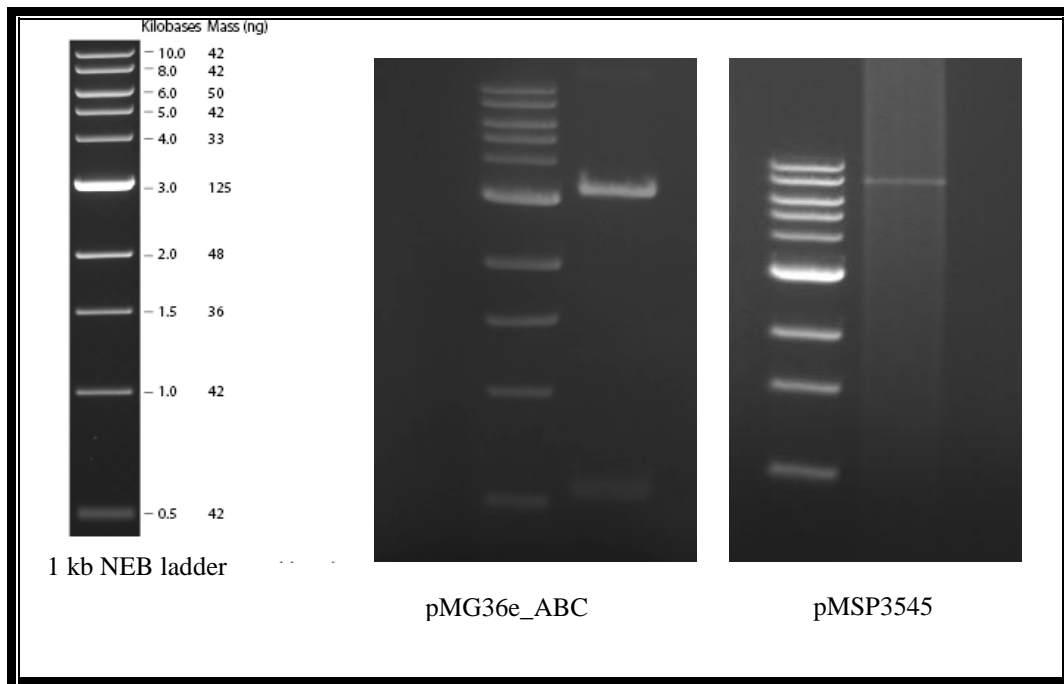
#### 4.4 Kontroll med agarose gel elektroforese

Det ble utført to kontrollsteg med agarose gel elektroforese. En kontroll før ligering, for å kontrollere at konstruktene kuttet ut av vektoren var korrekte før ligering. Den andre kontrollen var direkte PCR, eller vanlig PCR ved behov, av transformantene. Denne kontrollen ble utført for forsikring om at transformantene inneholdt ønsket konstrukt, før testing for sensitivitet og endring i sensitivitet.

##### 4.4.1 Ligeringskontroll

Ligeringskontrollen ble utført før ligering inn i vektoren pMSP3545 og pMG36e\_ABC, i figur 4.4.1. er det kun lagt ved ett bilde, med bakgrunn for at gelbildene er identiske. Ved ligering i vektoren pMSP3545 ble ett konstrukt ligert inn, *orf-C*. Ved ligering i vektoren pMG36e\_ABC ble det utført tre separate ligeringer, en ligering per konstrukt. Ligeringskontrollene ble utført med 1,5 % (w/v) agarose gel.



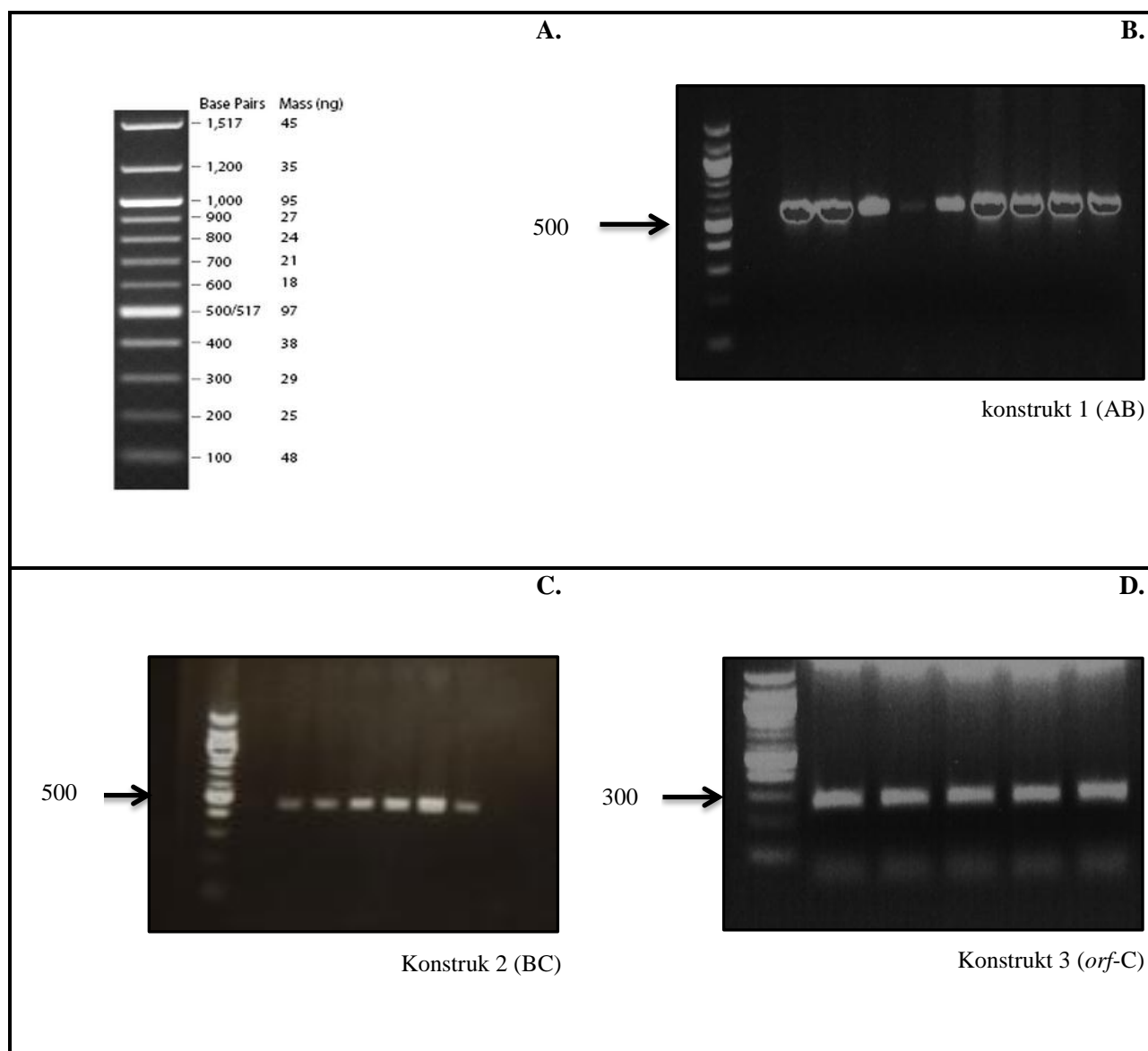


**Figur 4.3** (B) har tre pilmarkører, markørene illustrerer størrelsen, definert i basepar (bp), på de tre konkrete båndene merket. Konstruktene kontrolleres ved 1,5 % agarose gel elektroforese (w/v) før ligering. Konstrukt AB ligger mellom bånd 500 og 600 bp. Konstrukt BC ligger rett under båndet, på størrelsesmarkøren, 500 bp. Konstrukt C ligger rett under båndet hvilket refererer til 300 bp. Figur (D) viser vektoren pMG36e\_ABC og figur (E) viser vektoren pMSP3545

Figur 4.3 B konkluderer med at båndstørrelsen er korrekt. Korrekt båndstørrelse betyr at sannsynligheten for innhold av ønskede gener er så stor at konstruktene kan benyttes for ligering. Figur 4.3 D viser pMG36e\_ABC restriksjonskuttet, slik at thermophilinklusteret er kuttet ut, og tomt pMG36e\_ABC er oppnådd. Gelbildet i tabell 4.3 D viser tre bånd. Det øverste båndet er meget utydelig, og representerer ukuttet plasmid, dette er naturlig, da ikke alt plasmidet blir kuttet. Mellom størrelsen 3.0 og 4.0 kb ligger et sterkt bånd som representerer kuttet pMG36e\_ABC, vektoren pMG36e\_ABC uten thermophilinklusteret vil ha en størrelse på 3.4 kb, og båndstørrelsen er korrekt. Figur (E) viser kuttet pMSP3545 mellom polylinkeren og vil ha tilsvarende størrelse som ukuttet plasmid. Dermed kan ligering utføres. Det nederste båndet har en vesentlig kortere lengde og ligger over 0,5 bp, dette er thermophilinklusteret som er kuttet ut av vektoren. Thermophilinklusteret har en lengde på 960 bp. Båndet burde ligge noe høyere, men det kan komme av at fragmentet er vesentlig kortere enn de to andre båndene, og prøven er kjørt på 0,75 % (w/v) agarose gel. Dermed kan det være at fragmentet har kunnet bevege seg litt for raskt gjennom gelen. Da hensikten med gelkontrollen er å undersøke om vektoren har korrekt fragmentstørrelse og kan benyttes for ligering, ansees noe lav båndstørrelse på thermophilinkluster fragmentet, ikke kritisk.

#### 4.4.2 Kontroll av transformanter

Det ble utført Direkte PCR transformantene der det var mulig. Det er vanskeligere å utføre direkte PCR hos Gram positive celler på grunn av celleveggs struktur. Derfor ble det utført vanlig PCR av Gram positive celler. Ved benyttelse av vektoren pMSP3545 ble det utført transformasjon av konstruktet *orf-C* til *E. coli* og *L. lactis*. Ved benyttelse av vektoren pMG36e\_ABC ble de tre konstruktene transformert til *E. coli*, *L. lactis* og *Lb. sakei*. Da gelbildene er identiske med bakgrunn av at de samme konstruktene ble benyttet til flere transformasjoner er kun ett gelbilde per konstrukt fremlagt, for illustrasjon av alle transformeringene. Kontroll av transformanter ble utført med 1,5 % (w/v) agarose gel.



**Figur 4.4** Gelbilde: (A) Størrelsesmarkøren benyttet i de tre gelbildene, (B) PCR av transformanter med konstrukt AB, (C) PCR av transformanter med konstrukt BC, (D) PCR av transformanter med konstrukt C.

Figur 4.4 viser direkte PCR av transformanter av de tre ulike konstruktene fremstilt. En pilmarkør er lagt inn i figur B,C og D, Markørene refererer til båndstørrelse definert i bp. I figur C og D er det tydelig bakgrunnsfarge (smear) i brønnene tilsatt PCR produkt. Dette kommer fra genomisk DNA, tilstedeværende i prøven, da direkte PCR er utført ved å tilsette en plukket koloni til PCR løsningen. Figur 4.4 B viser at det er utført direkte PCR på ti kolonier. Brønn 2 inneholder ikke konstrukt AB, og brønn 5 viser vesentlig lavere mengde DNA. De resterende brønnene (uten om brønn 1, ladder) viser korrekt båndstørrelse, i henhold til størrelsen på konstruktet AB. Figur 4.4 C viser at det er benyttet syv kolonier til direkte PCR. Brønn to viser ett meget svakt bånd med riktig båndstørrelse, de resterende seks brønnene med PCR produkt viser korrekt båndstørrelse og høy konsentrasjon DNA. I figur D er det benyttet fem kolonier for direkte PCR. Figuren viser korrekt båndstørrelse for innsatt genkonstrukt. Med størrelse på under 100 bp er det svake bånd i figur 4.4.2 D, båndene er høyst sannsynlig primerskygge.

#### 4.4 Transformering av tre ulike genkonstrukt til *E. coli* DH5 $\alpha$

For å kontrollere at de tre genkonstruktene ble inkorporert til kompetente DH5 $\alpha$  cellene ble det utført sekvensering. Alle sekvensene ble nøye gjennomgått og kontrollert. Der det har oppstått en konflikt er det kun gjort endringer der konflikten er forårsaket av ukorrekt avlesning på kromatogrammet. Ingen av sekvensene har vist konflikter forårsaket av mutasjoner.

Sekvensene ligger i vedlegg.

##### 4.5.1 Transformering av tre ulike genkonstrukt til *L. lactis* IL1403

For å kontrollere at de tre genkonstruktene ble inkorporert i transformantene ble samme prosedyre som i 4.2 benyttet. Med samme nøyaktighet og kontroll. Ingen av sekvensene viser konflikter forårsaket av mutasjoner. Sekvensene ligger i vedlegg. Sekvenseringen ble utført for og ikke å etterlate noen tvil om at sekvensene var korrekte. For å kunne konstatere hvilke av de tre genkonstruktene som gir opphav til immunitet ble det ansett som korrekt å utføre sekvensering. Sekvensene ligger i vedlegg.

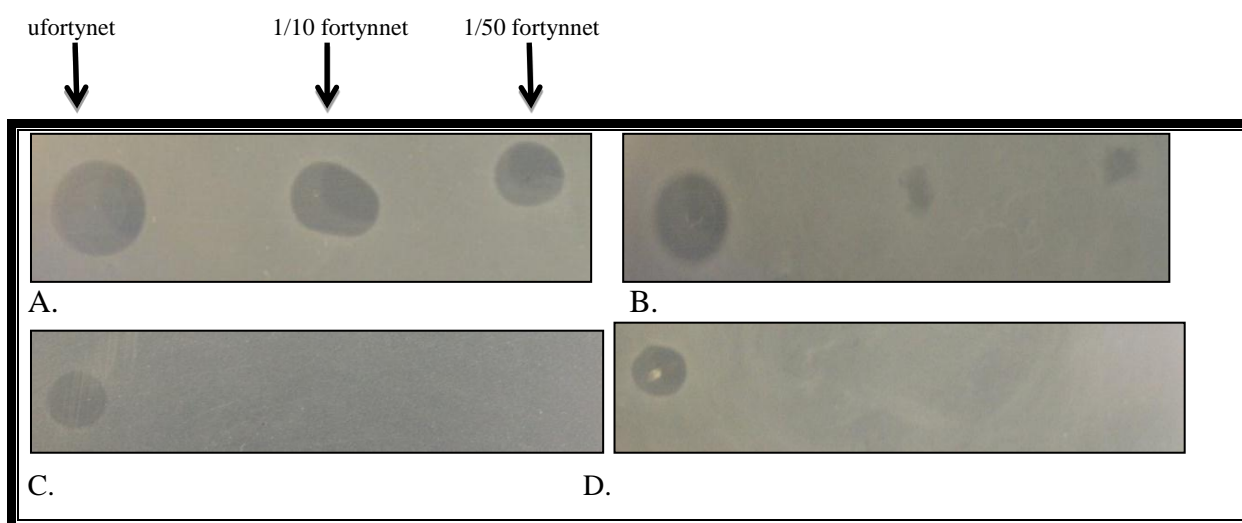
#### 4.5.2 Transformering av genkonstrukt pMG36e\_C til *Lb. sakei* NCDO 2714

Konstruktet pMG36e\_C ble sekvensert etter transformering til *E. coli*. Etter transformering til *Lb. sakei* ble transformantene kontrollert ved å kjøre PCR amplifisering av genkonstruktet, for videre kontroll på agarose gel elektroforese. Hvis genkonstruktet viser riktig størrelse er sannsynligheten for mutasjon i konstruktet så liten at sekvensering ikke ble ansett som nødvendig.

#### 4.6 Bakteriosinassay

##### 4.6.1 Softagarassay

Bildene som fremlegges viser resultater fra softagarassay. Alle prøvene er behandlet identisk og tilsatt nøyaktig samme konsentrasjoner av bakteriosin. Bilde A viser hvordan softagarassayet er satt opp. Teksten over bildet refererer til bakteriosin-konsentrasjonen tilsatt på alle utførte softagarassay.



**Figur 4.5** Softagarassay: Viser endring i hemmingssoner fra villtypen IL1403 (A) LMG 3394, til de tre fremstilte stammene (B) IL1403-pMG36e\_AB, (C) IL1403-pMG36e\_BC, (D) IL1403-pMG36e\_C

Figur 4.5 viser at villtypen IL1403 er sensitiv mot thermophilin 13 ved både ufortynnet bakteriosin 10 og 50 ganger fortdynnet bakteriosin. LRN08 som inneholder de to genene som koder for bakteriosinpeptidene ThmA og ThmB viser og sensitivitet ved de tre ulike bakteriosin konsentrasjonene. Stammene IL1403-pMG36e\_BC inneholder kodende gener for

*thmB* og *orf-C*, og viser sensitivitet kun ved tilstedeværelse av ufortynnet bakteriosin.

Tilsvarende er det for stammen IL1403-pMG36e\_C som kun inneholder *orf-C*. resultatene er ikke konkluderende med at IL1403-pMG36e\_BC og IL1403-pMG36e\_C er blitt immune da det fremdeles er sensitivitet mot thermophilin 13.

#### 4.6.2 Mikrotitterassay

For kvantitativ analyse ble mikrotitterassay benyttet.

**Tabell 4.3 Resultater fra mikrotitterassay**

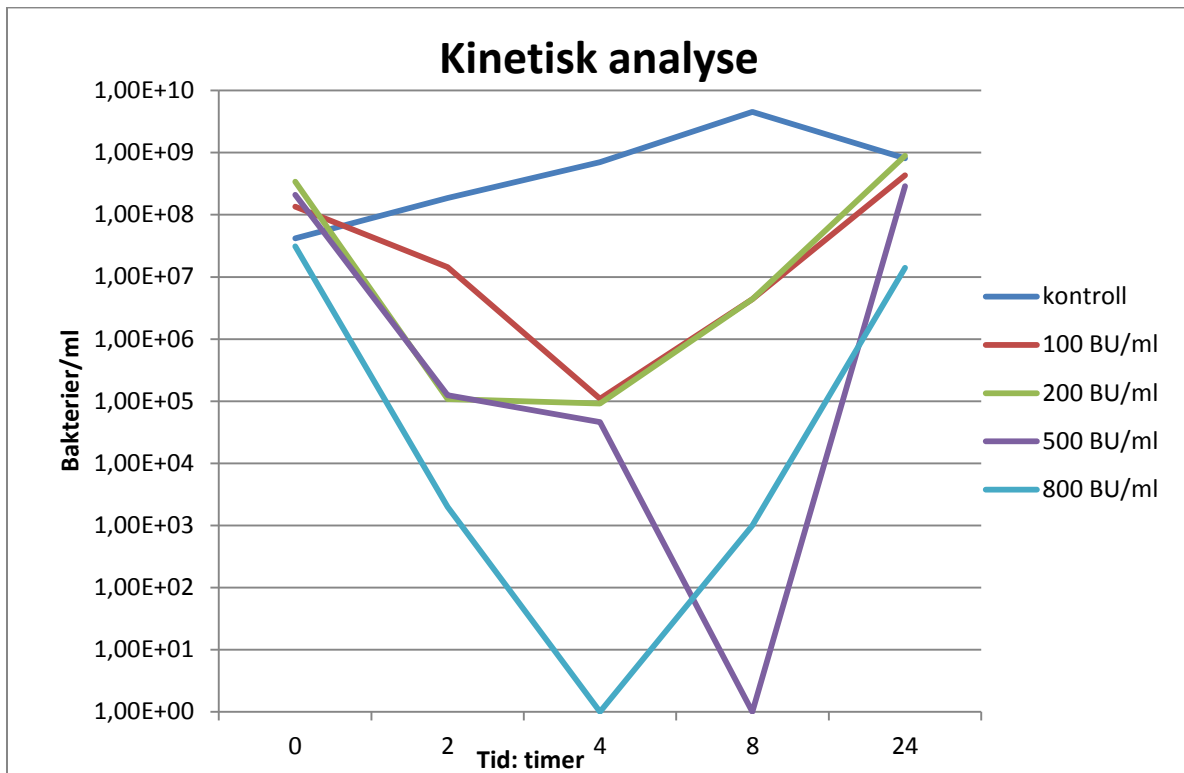
Stamme	Mic <sub>50</sub>	BU/ml
LMGT 3394	Brønn 6	217,2
B1136	Brønn 2	27,2
IL1403-pMG36e_AB	Brønn 6	217,2
IL1403-pMG36e_BC	Brønn 2	27,2
IL1403-pMG36e_C	Brønn 2	27,2
LMGT 2313	Brønn 6	217,2
Lb. sakei-pMG36e_C	Brønn 2	27,2

**Tabell 4.3** viser Mic<sub>50</sub> for ulike stammer benyttet under forsøk for påvisning av immunitetsgenet

Verdien til BU/ml er tilsvarende i prøver med lik inhibering, da initial konsentrasjon av bakteriosin er lik i alle mikrotitterassayene.

Tabell 4.3 viser at villtypen IL1403 (LMGT 3394) og IL1403-PMG36E\_AB har mic<sub>50</sub> i brønn 6, hvilket betyr at de er begge sensitive mot thermophilin 13. B1136 hvilket inneholder alle tre genene i thermophilinklusteret har mic<sub>50</sub> i brønn 2. Den har dermed 16 ganger lavere sensitivitet i sammenlignet med LMGT 3394. IL1403-PMG36E\_BC-11 viser en tilsvarende reduksjon av sensitivitet villtypen IL1403.

## 4.7 Kinetisk inhiberingsanalyse av thermophilin 13



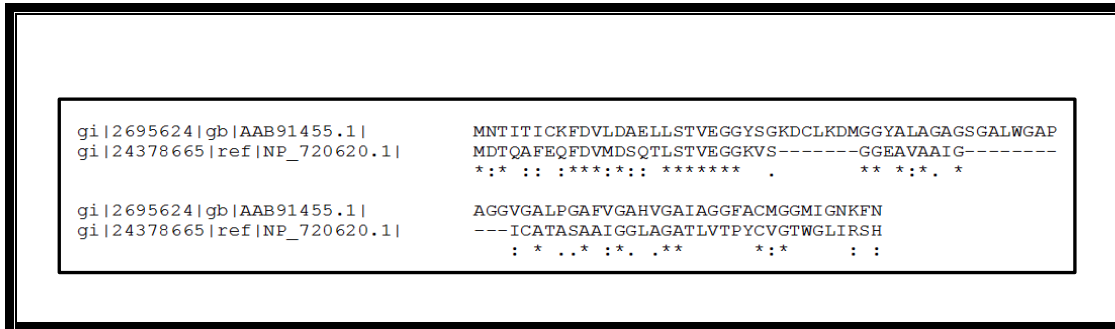
**Figur 4.6** Kinetisk inhiberingsanalyse av thermophilin 13. logaritmisk skala av bakterier/ml i fem ulike prøver, ved fem ulike tidspunkter.

Figur 4.6 illustrerer hvordan bakteriosinet thermophilin 13 fungerer over tid.

Figuren viser at kontroll prøven, uten tilsetning av bakteriosinet thermophilin 13, vokser frem til tid 8 timer, og reduseres etter 24 timer. Prøven tilsatt 100 BU/ml viser en reduksjon i bakterier/ml der det er ferrest bakterier etter 4 timer, og økning etter 8 timer, og god vekst etter 24 timer. Prøven tilsatt 200 BU/ml viser reduksjon i bakterier/ml ved time 2, 4 og 8, og vekst ved time 24. Prøvene tilsatt 500 BU/ml og 800 BU/ml viser stor nedgang i bakterier/ml ved tidspunkt 2, 4 og 8. prøve tilsatt 500 BU/ml viser vekst etter 24 timer. Prøven tilsatt 800 BU/ml viser den laveste veksten ved 24 timer. Det ble ikke detektert vekst ved tidspunkt 4 i prøve 800 BU/ml, og ved time 8 i prøve 500 BU/ml. Det ble derfor satt inn verdien 1, ved de to tidspunktene, for å få logaritmisk skala til å godta verdiene. Da det er vekst i etterfølgende tidspunkter, er det vekst i prøvene, men den har ikke blitt detektert. Redusering av bakterier/ml over tid viser at thermophilin 13 fungerer ved celledreping og ikke bakteriostatisk.

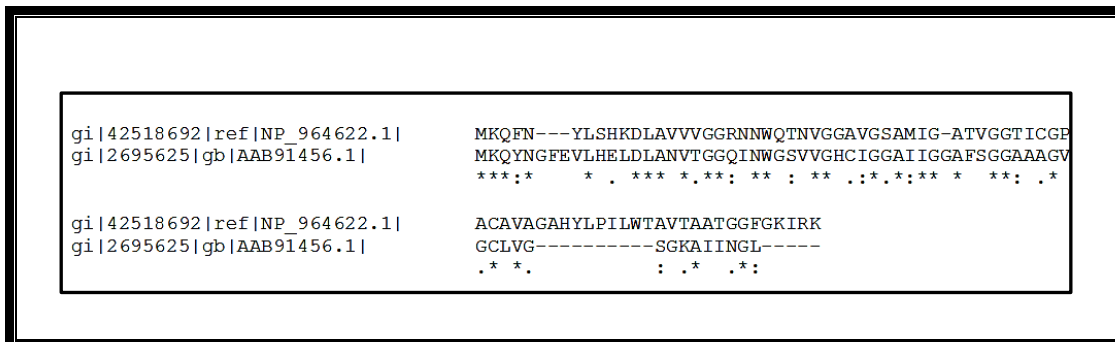
## 4.8 Homologi

De tre peptidene i thermophilinklusteret ble undersøkt for homologe peptider. For dette ble BLASTp benyttet for å søke etter homologe peptider basert på proteinsekvens. Der det ble funnet aminosyresekvenser med likhet ble det utført alignment ved benyttelse av Clustal W, eller Jalwiev 2.8.



**Figur 4.7** Clustal 2.1 multipel sekvens sammenstilling av ThmA og Nlma .

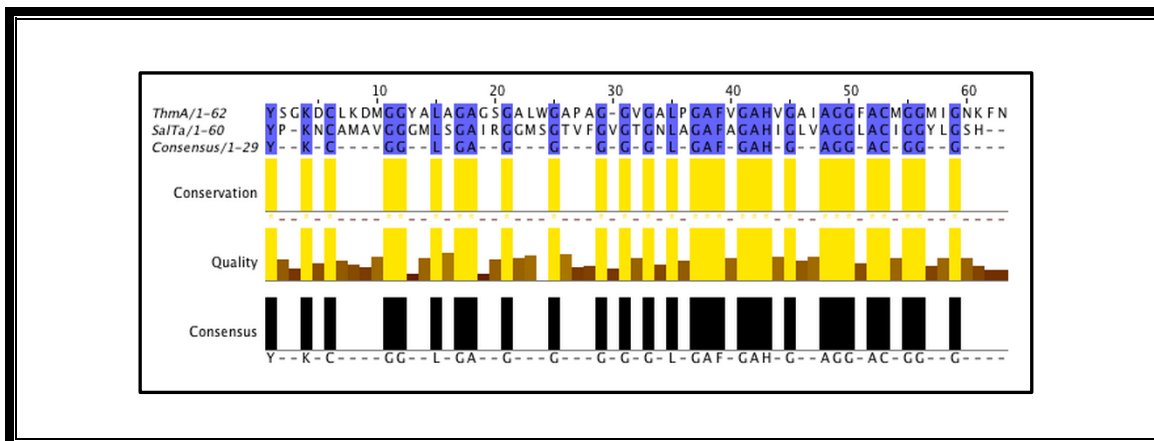
Figur 4.7 viser sammenstilling mellom proteinsekvensen til ThmA fra thermophilin 13 og Nlma fra mutacin IV. Sammenstillingen viser liten sekvenslikhet med kun 25 av 62 residuers likhet.



**Figur 4.8** Custal 2.1 multipel sekvens sammenstilling av ThmB og NafA.

Figur 4.8 viser sammenstilling mellom proteinsekvensen til ThmB fra thermophilin 13 og NafA fra lactacin F. I sammenstillingen står NafA øverst og ThmB nederst. Sammenstillingen viser nesten ingen likhet, kun 27 av 43 residuer viser likhet (Garneau et al. 2002). Av treffene identifisert er det mange glysin residuer, som ser ut til å kunne være involvert i GxxxG motiver. Dermed er nok påstanden om homologi fra Garneau (2002) basert på motivhomologi.

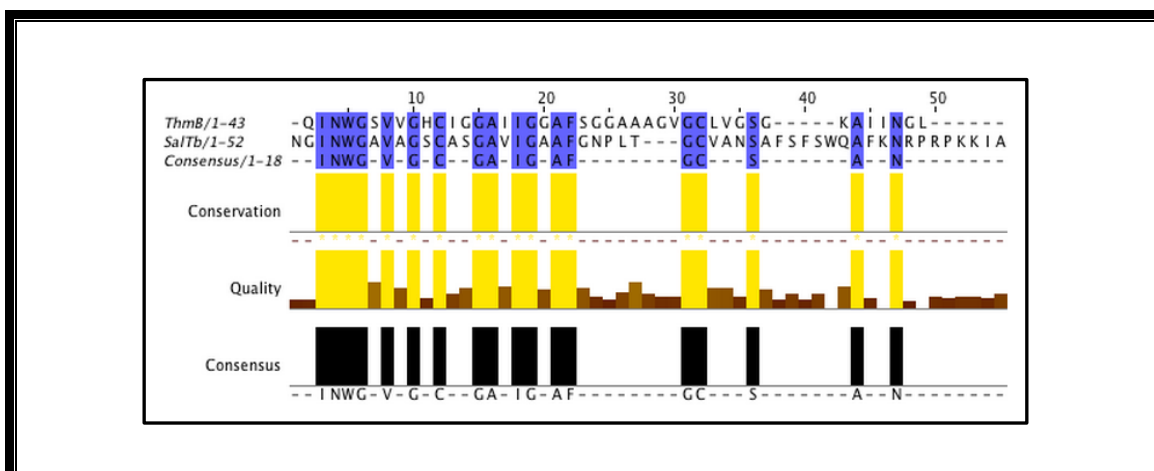




**Figur 4.9** sekvenssammenstilling utført i Jalview 2.8 benyttet Muscle.

Sekvenssammenstilling av ThmA fra thermophilin 13 og SalTα fra salivaricin T.

Sekvenssammenstillingen viser like aminosyrer markert i blått. Sammenstillingen viser 29 residuers likhet av 62 residuer i ThmA og 60 residuer i SalTα hvilket gir en likhet på 46,7 %. Blast treffet viste en likhet på 46%. O’Shea et al (2011), fant en likhet på 47%.



**Figur 4.10** sekvenssammenstilling utført i Jalview 2.8 benyttet Muscle.

Sekvenssammenstilling av ThmB fra thermophilin 13 og SalTβ fra salvaricin T.

Figur 4.8.4. viser like aminosyrer i blått. Det er 18 like treff i sammenstillingen av 52 residuer, hvilket gir en likhetsprosent på 41,8 %. Blastsøk viste en likhet på 48 % likhet. arbeidet til O’Shea et al. (2011) fikk et resultat på 43 % likhet, De har og tatt med ledersekvensen i sammensetningen, som gir et noe høyere resultat. Leder sekvensen er ikke tatt med i dette arbeidet, da den kløyves av for å danne et aktivt protein.

Det ble utført BLAST søk med aminosyresekvensen til Orf-C, søket gav ingen signifikante treff.

## 5 Diskusjon

Hovedvekten av tiden under dette arbeidet ble benyttet for undersøkelse om *orf-C* var immunitetsgenet for thermophilin 13. Først ble vektor pMSP3545 benyttet. *orf-C* kunne ikke uttrykkes i pMSP3545. Derfor ble vektor pMG36e\_ABC benyttet for å fremstille IL1403\_pMG36e\_AB, IL1403\_pMG36e\_BC og IL1403\_pMG36e\_C. Etter fremstilling av de tre stammene var videre forsøk tidsbegrenset. Derfor ble det valgt å undersøke hva slags type effekt thermophilin 13 har på sensitive stammer. Det ble og undersøkt om det var mulig å uttrykke *orf-C* i *Lb. sakei* i tillegg til *L. lactis*.

### 5.1 Sensitivestammer for thermophilin 13

Undersøkelser utført av Marciset (1997) viste at thermophilin 13 har et bredt inhiberingsspekter. For undersøkelse av dette ble softagarassay utført på flere ulike bakteriearter og ulike stammer av de arter. Resultatene er fremvist i tabell 4.1-4.3. Resultatene viste at thermophilin 13 inhiberer flere ulike arter, og bekrefter dermed resultatene til Marciset (Marciset et al. 1997). Poredannende bakteriosiner har vanligvis et smalt inhiberingsspekter. Dette argumentet benyttet Marciset (1997) for undersøkelser om thermophilin 13 fungerer uten reseptor, resultatet Marciset fant var at thermophilin 13 ikke krever reseptor. Dette har ikke blitt undersøkt under dette arbeidet, og ingen konklusjoner om krav om reseptor blir trukket.

### 5.2 Immunitet mot thermophilin 13

#### 5.2.1 pMSP3545

Undersøkelse av endring i sensitivitet for thermophilin 13 ved benyttelse av pMSP3545 viste ingen endring av sensitiviteten hos LMGT 3394. Ved transformering til *E.coli* var plasmidet med inkorporert *orf-C* intakt. Det ble kontrollert ved sekvensering at vektoren transformert til LMGT 3394 inneholdt *orf-C*. pMSP3545 er nisinindusert og det ble benyttet 0,5 ng/ml – 10 ng/ml nisin. Forsøkets manglende resultater gjorde at vektoren pMG36e\_ABC benyttet. Årsaken til manglende resultater ved benyttelse av pMSP3545 er trolig at *orf-C* ikke ble uttrykket, årsaken til manglende uttrykkelse er ikke klar. Da *orf-C* uttrykkes ved benyttelse av pMG36e\_ABC er liten sannsynlighet for at faktorer i cellen som hindrer uttrykkelse. Det kan være prosessering, produksjon eller problem med sekreering. Ukorrekt folding eller at proteinet

## 5 Diskusjon

blir trunkert vil gjøre at proteinet ikke blir uttrykket korrekt, og dermed ikke vil gi opphav til immunitet mot thermophilin 13. Da nødvendige kontroll for at *orf-C* var inkorporert i plasmidet og at plasmidet ble transformert til LMGT 3394 er det naturlig å tro at manglende uttrykkelse av *orf-C* er årsaken til at benyttelse av pMSP3545 ikke gav resultater. Men da det ikke er mulig å finne den nøyaktige årsaken til manglende uttrykkelse, blir ingen konklusjon trukket.

### 5.2.2 pMG36e\_ABC

For å undersøke hvilket gen(er) i thermophilinklusteret som gir opphav til immunitet mot bakteriosinet thermophilin 13 ble det fremstilt tre ulike konstrukter, konstrukt 1 (*thmA* + *thmB*), konstrukt 2 (*thmB* + *orf-C*) og konstrukt 3 (*orf-C* alene). De ble utført transformering av hver av de tre konstruktene inn i den sensitive stammen LMGT 3394. For undersøkelse av transformantenes sensitivitet for thermophilin 13 ble det satt opp softagarassay og mikrotitterassay. For å ha et sammenligningsgrunnlag av sensitivitet for thermophilin 13, ble det utført softagarassay og mikrotitterassay, både av en sensitiv stamme (LMGT 3394) og en immun stamme (B1136). Resultatene er gitt i tabell 4.3. *S. thermophilus* ble dyrket opp ved 42°C med M17 medium med 1 % sukrose for å oppnå optimal effektivitet. Dette resultatet ligger i figur 4.2.

IL1403\_pMG36e\_AB viser lik sensitivitet som villtypen IL1403. Dette er et forventet resultat da IL1403-PMG36E\_AB inneholder konstrukt 1. ThmA og ThmB danner bakteriosinet thermophilin 13, og av teorien krever Gram-positive bakterier fire gener for å danne et aktivt bakteriosin (Garneau et al. 2002). De strukturelle genene for bakteriosinet vil ikke i seg selv gi opphav til immunitet, men de vil være assosiert i samme operon med immunitetsgenet. Det ble ikke fremstilt konstrukter av *thmA* alene og *thmB* alene, med bakgrunn for at de to peptidene fungerer sammen som en enhet.

Av den teoretiske bakgrunnen er det derfor antatt at det tredje genet i thermophilinklusteret, *orf-C*, er immunitetsgenet. IL1403-pMG36e\_C ble fremstilt for å undersøke om *orf-C* gir opphav til immunitet mot thermophilin 13. IL1403-pMG36e\_BC ble fremstilt for å kontrollere om *orf-C* vil kunne gi opphav til immunitet alene, eller om *orf-C* er avhengig av andre gener for funksjon som immunitetsgen.

Resultatene viser at  $Mic_{50}$  er i brønn 2 der *orf-C* er uttrykket. Det er vanskelig å kunne argumentere for at brønn 1 har bakteriell vekst da  $OD_{600}$  i brønn 1 er svært høy ved alle

## 5 Diskusjon

tidspunkter. Dette skyldes at bakteriosinet ikke har en klar farge, men har en brunfarge. Mikrotitterleseren avleser absorbert lys i prøvene, brunfargen i bakteriosinet thermophilin 13 vil dermed absorbere lys og gi falsk verdier der den er lite fortynnet. Høye verdiene i brønn 1 kan komme av bakteriosinet tilstedeværelse. Dermed blir det kun ansett som vekst fra brønn 2, da det er det eneste som kan bekreftes av  $OD_{600}$ . Fra softagar resultatene ble det funnet en liten hemmingssone der ufortynnet ammoniumsulfatløst thermophilin 13 er applisert til IL1403-pMG36e\_BC og IL1403-pMG36e\_C.

B1136, IL1403-pMG36e\_BC og IL1403-pMG36e\_C viser lik vekst ved tilstedeværelse av thermophilin 13. B1136 er ansett som immun mot thermophilin 13, derfor kan det konkluderes med at IL1403-pMG36e\_BC og IL1403-pMG36e\_C er immune mot thermophilin 13. IL1403-pMG36e\_BC og IL1403-pMG36e\_C viser en 16 ganger reduisering i sensitivitet, da  $Mic_{50}$  går fra brønn 6 til brønn 2 ved uttrykkelse av *orf-C* i sensitive stammer. Resultatene viser at *orf-C* kan fungere alene og er genet hvilket gir opphav til immunitet mot thermophilin 13. Resultatet er støttet av bakgrunnsteorien, og ansees derfor som troverdig.

### 5.3 Kinetisk inhiberingsanalyse av thermophilin 13

Det er gjort få undersøkelser på hvordan thermophilin 13 fungerer, og det ble derfor utført en analyse av hvordan bakteriosinet påvirker vekst av sensitive stammer. Dette ble utført ved en drepeanalyse. Drepeanalysen viser at celleantallet reduseres over tid, dette da thermophilin 13 fungerer bakteriosidal, og ikke bakteriostatisk. Thermophilin 13 klarer ikke å drepe alle cellene, slik at etter 24 timer vil de bli en oppblomstring av cellene, da thermophilin 13 aktiviteten reduseres over tid.

For tilegnelse av informasjon om inhiberingsmetoden til thermophilin 13 ble det satt opp kinetisk inhiberingsanalyse. Resultatet vises i figur 4.6

Resultatet viser at thermophilin 13 virker ved celledreping. Celledrepingen er bakteriosindose-avhengig. Bakterier produserer bakteriosiner for utkonkurrering.

Bakteriosiner kan fungere antimikrobielt ved direkte inhibering av konkurrerende stammer (Majeed et al. 2011). Bakteriosiner kan fungere koloniserende, ved å gjøre introduksjon eller kolonisering av produsentcellen lettere av en okkupert nisje (Dobson et al. 2012). Resultatene i figur 4.6 viser at cellene vokser opp igjen etter 24 timer, da bakteriosinaktiviteten reduseres over tid. Resultatet avviker fra naturlig produksjon av bakteriosin, da *S. thermophilus* vil

## 5 Diskusjon

kontinuerlig produsere bakteriosin. Alle *S. thermophilus* cellene vil ikke produsere bakteriosinet ved samme tidspunkt, men produksjonen av bakteriosin vil være kontinuerlig ved behov. Under inhiberingsanalysen av thermophilin 13 ble det tilsatt ammoniumsulfat-løst thermophilin 13, og ikke produserende celler.

Ved celledreping vil ikke sensitive stammer utvikle resistens mot bakteriosinet, som de ville hatt muligheten for ved bakteriostatisk inhibering. For å benytte bakteriosinet i matindustrien, spesielt i meieriindustrien, er hindring av resistensutvikling essensielt. Derfor er dette resultatet interessant. For å kunne benytte bakteriosiner som alternativ for antibiotika, er hindring av resistensutvikling et viktig argument. Det kreves imidlertid videre undersøkelser på om bakteriosiner kan benyttes som virkemiddel mot infeksjoner hos mennesker.

### 5.4 Homologi

For å kunne konkludere med homologi med bakgrunn av sekvenssammenstilling i 4.7 og 4.8 burde en struktursammenligning utføres. Ved søk i Protein Data Bank ble ikke strukturen til hverken mutacin IV eller lactacin F funnet. Dermed kan dette ikke gjøres, og ingen konklusjon om homologi mellom ThmA og NImA, ThmB og LafA blir derfor trukket.

Salivaricin T er et klasse IIb bakteriosin som produseres av *Lactobacillus salivarius*, og består av de to peptidene SalT $\alpha$  og SalT $\beta$ . Dette bakteriosinet viser likhet med de to peptidene til thermophilin 13 (O'Shea et al. 2011). Det ble gjort et søk i Protein Data Bank på strukturen til salivaricin T, men da denne ikke ble funnet kan det heller ikke her utføres en struktursammenligning mellom salivaricin T og den modellerte strukturen til thermophilin 13, utført under arbeidet til Marciest et al. (1997).

aminosyresammenstillingen mellom ThmA og SalT $\alpha$  og ThmB og SalT $\beta$  viser likhet, men ingen konklusjon om homologi blir trukket.

Aminosyresekvensen til OrfC gav ingen signifikante treff ved søk i BLASTp. Søket ble gjentatt 12.12.2012, ingen signifikante treff ble funnet.

### 5.5 Videre arbeid

Under arbeidet ble egenskapen, til det tidligere ukjente genet *orf-C*, identifisert som immunitetsgenet mot thermophilin 13. Det ble og bevist at *orf-C* kan fungere uten hjelp av *thmB*. Transkripsjon av *thmB* fører og til transkripsjon av *orf-C*. Thermophilin 13 viste seg å fungere ved celledreping av sensitive stammer. Det er mulig å uttrykke *orf-C* i både *L. lactis*

IL1403 og *Lb. sakei* NCDO 7414, og gjør de to sensitive stammene immune mot thermophilin 13, dette gjør pMG36e\_ABC kompatibel med begge stammene. Denne kompatibiliteten vil potensielt forenkle fremtidig arbeid med å identifisere hvordan *orf-C* påvirker produsentcellen av thermophilin 13, og gjør den immun mot produsert bakteriosin, da det eksisterer to ulike vertsceller å utføre arbeidet i. Metoden benyttet av Diep et al. (2006) ved å skape ulike mutasjoner eller modifiseringer av proteinene som bygger opp reseptoren, vil kunne benyttes for å kontrollere om *orf-C* fremdeles vil kunne gi opphav til immunitet mot thermophilin13 i vertscellen. Ved tilegnelse av informasjon om hvordan bakteriosinet fungerer vil man kunne komme nærmere muligheten til å benytte bakteriosinet mot infeksjoner. Da bakteriosinet fungerer ved celledreping er muligheten for utvikling av resistens redusert, hvilket er en viktig egenskap ved benyttelse for bekjempelse av infeksjon.

## Referanseliste

- Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G. & Nissen-Meyer, J. (1998). Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl Environ Microbiol*, 64 (6): 2269-72.
- Banerjee, S. & Hansen, J. N. (1988). Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *J Biol Chem*, 263 (19): 9508-14.
- Barefoot, S. F. & Klaenhammer, T. R. (1984). Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob Agents Chemother*, 26 (3): 328-34.
- Beukes, M. & Hastings, J. W. (2001). Self-protection against cell wall hydrolysis in *Streptococcus milleri* NMSCC 061 and analysis of the millericin B operon. *Appl Environ Microbiol*, 67 (9): 3888-96.
- Bonsor, D. A., Meenan, N. A. & Kleanthous, C. (2008). Colicins exploit native disorder to gain cell entry: a hitchhiker's guide to translocation. *Biochem Soc Trans*, 36 (Pt 6): 1409-13.
- Braun, V., Pilsl, H. & Gross, P. (1994). Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Arch Microbiol*, 161 (3): 199-206.
- Brotz, H., Bierbaum, G., Markus, A., Molitor, E. & Sahl, H. G. (1995). Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism? *Antimicrob Agents Chemother*, 39 (3): 714-9.
- Bryan, E. M., Bae, T., Kleerebezem, M. & Dunny, G. M. (2000). Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. *Plasmid*, 44 (2): 183-90.
- Brötz, H., Bierbaum, G., Markus, A., Molitor, E. & Sahl, H. G. (1995). Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism? *Antimicrob Agents Chemother*, 39 (3): 714-9.
- Buchman, G. W., Banerjee, S. & Hansen, J. N. (1988). Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J Biol Chem*, 263 (31): 16260-6.
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duche, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S. & Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71 (1): 158-229.

ClustalW. *Multiple Sequence Alignment*. Tilgjengelig fra:

<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>: (lest: 28/11-12).

- Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*, 3 (10): 777-88.
- de Ruyter, P. G., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol*, 62 (10): 3662-7.
- Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P. & Fleury, Y. (2010). Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar Drugs*, 8 (4): 1153-77.
- Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H. & Nes, I. F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (7): 2384-9.
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P. & Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol*, 78 (1): 1-6.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M. & Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70 (2): 564-82.
- Engelman, D. M. & Steitz, T. A. (1981). The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis. *Cell*, 23 (2): 411-22.
- Ennahar, S., Sonomoto, K. & Ishizaki, A. (1999). Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J Biosci Bioeng*, 87 (6): 705-16.
- Garneau, S., Martin, N. I. & Vederas, J. C. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84 (5-6): 577-92.
- Gratia, J. P. (2000). Andre Gratia: a forerunner in microbial and viral genetics. *Genetics*, 156 (2): 471-6.
- Guder, A., Wiedemann, I. & Sahl, H. G. (2000). Posttranslationally modified bacteriocins--the lantibiotics. *Biopolymers*, 55 (1): 62-73.
- Havarstein, L. S., Diep, D. B. & Nes, I. F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol*, 16 (2): 229-40.
- Holo, H., Nilssen, O. & Nes, I. F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J Bacteriol*, 173 (12): 3879-87.



## Referanseliste

- Jack, R. W., Tagg, J. R. & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*, 59 (2): 171-200.
- Joerger, M. C. & Klaenhammer, T. R. (1990). Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *J Bacteriol*, 172 (11): 6339-47.
- Kaur, G., Malik, R. K., Mishra, S. K., Singh, T. P., Bhardwaj, A., Singroha, G., Vij, S. & Kumar, N. (2011). Nisin and class IIa bacteriocin resistance among *Listeria* and other foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Microb Drug Resist*, 17 (2): 197-205.
- Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J. & Saito, T. (2004). The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Curr Protein Pept Sci*, 5 (5): 393-8.
- Kettenring, J. K., Malabarba, A., Vekey, K. & Cavalleri, B. (1990). Sequence determination of actagardine, a novel lantibiotic, by homonuclear 2D NMR spectroscopy. *J Antibiot (Tokyo)*, 43 (9): 1082-8.
- Kim, J. H. & Mills, D. A. (2007). Improvement of a nisin-inducible expression vector for use in lactic acid bacteria. *Plasmid*, 58 (3): 275-83.
- Kjos, M., Nes, I. F. & Diep, D. B. (2011). Mechanisms of Resistance to Bacteriocins Targeting the Mannose Phosphotransferase System  $\nabla$ . *Appl Environ Microbiol*, 77 (10): 3335-42.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 12 (1-3): 39-85.
- Kleanthous, C. (2010). Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation. *Nat Rev Microbiol*, 8 (12): 843-8.
- Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M. M., Vaughan, E. E., de Vos, W. M. & Kuipers, O. P. (1997). Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 63 (11): 4581-4.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21): 2947-8.
- Madigan, M. T. & Martinko, J. M. (2006). *Brock Biology of microorganisms*, b. 11. United States of America: Pearson Education Inc.
- Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B. & Riley, M. A. (2011). Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *ISME J*, 5 (1): 71-81.

- Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M. C., Mollet, B. & Poolman, B. (1997). Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J Biol Chem*, 272 (22): 14277-84.
- Martinez, B., Fernandez, M., Suarez, J. E. & Rodriguez, A. (1999). Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiology*, 145 ( Pt 11): 3155-61.
- McCormick, J. K., Worobo, R. W. & Stiles, M. E. (1996). Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. *Appl Environ Microbiol*, 62 (11): 4095-9.
- Mulders, J. W., Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J. & de Vos, W. M. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur J Biochem*, 201 (3): 581-4.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. & Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70 (2-4): 113-28.
- Nissen-Meyer, J. & Nes, I. F. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol*, 167 (2/3): 67-77.
- Nissen-Meyer, J., Oppegard, C., Rogne, P., Haugen, H. S. & Kristiansen, P. E. (2010). Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2 (1): 52-60.
- O'Shea, E. F., O'Conner, P. M., Raftis, E. J., O'Toole, P. W., Stanton, C., Cotter, P. D., Ross, R. P. & Hill, C. (2011). Production of multiple bacteriocins from a single locus by gastrointestinal strains of *Lactobacillus salivarius*. *J. Bacteriol*
- Oppegard, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P. E., Fimland, G. & Nissen-Meyer, J. (2007). The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 13 (4): 210-9.
- Oppegard, C., Schmidt, J., Kristiansen, P. E. & Nissen-Meyer, J. (2008). Mutational analysis of putative helix-helix interacting GxxxG-motifs and tryptophan residues in the two-peptide bacteriocin lactococcin G. *Biochemistry*, 47 (18): 5242-9.
- Papathanasopoulos, M. A., Dykes, G. A., Revol-Junelles, A. M., Delfour, A., von Holy, A. & Hastings, J. W. (1998). Sequence and structural relationships of leucocins A-, B- and C-TA33a from *Leuconostoc mesenteroides* TA33a. *Microbiology*, 144 ( Pt 5): 1343-8.

- Riley, M. A. & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol*, 56: 117-37.
- Russ, W. P. & Engelman, D. M. (2000). The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol*, 296 (3): 911-9.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839): 487-91.
- Schneider, D. & Engelman, D. M. (2004). Motifs of two small residues can assist but are not sufficient to mediate transmembrane helix interactions. *J Mol Biol*, 343 (4): 799-804.
- Schnell, N., Entian, K. D., Gotz, F., Horner, T., Kellner, R. & Jung, G. (1989). Structural gene isolation and prepeptide sequence of gallidermin, a new lanthionine containing antibiotic. *FEMS Microbiol Lett*, 49 (2-3): 263-7.
- Schuller, F., Benz, R. & Sahl, H. G. (1989). The peptide antibiotic subtilin acts by formation of voltage-dependent multi-state pores in bacterial and artificial membranes. *Eur J Biochem*, 182 (1): 181-6.
- Soliman, W., Wang, L., Bhattacharjee, S. & Kaur, K. (2011). Structure-activity relationships of an antimicrobial peptide plantaricin s from two-peptide class IIb bacteriocins. *J Med Chem*, 54 (7): 2399-408.
- Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*, 36 (1): 1-29.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S. & Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev*, 40 (3): 722-56.
- van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N. & Abee, T. (1991). The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J Bacteriol*, 173 (24): 7934-41.
- van de Guchte, M., van der Vossen, J. M., Kok, J. & Venema, G. (1989). Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 55 (1): 224-8.
- van de Guchte, M., Kodde, J., van der Vossen, J. M., Kok, J. & Venema, G. (1990). Heterologous gene expression in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: synthesis, secretion, and processing of the *Bacillus subtilis* neutral protease. *Appl Environ Microbiol*, 56 (9): 2606-11.

## Referanseliste

- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M. & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25 (9): 1189-91.
- Weaver, C. A., Redborg, A. H. & Konisky, J. (1981). Plasmid-determined immunity of *Escherichia coli* K-12 to colicin Ia is mediated by a plasmid-encoded membrane protein. *J Bacteriol*, 148 (3): 817-28.
- Woodruff, W. A., Novak, J. & Caufield, P. W. (1998). Sequence analysis of mutA and mutM genes involved in the biosynthesis of the lantibiotic mutacin II in *Streptococcus mutans*. *Gene*, 206 (1): 37-43.

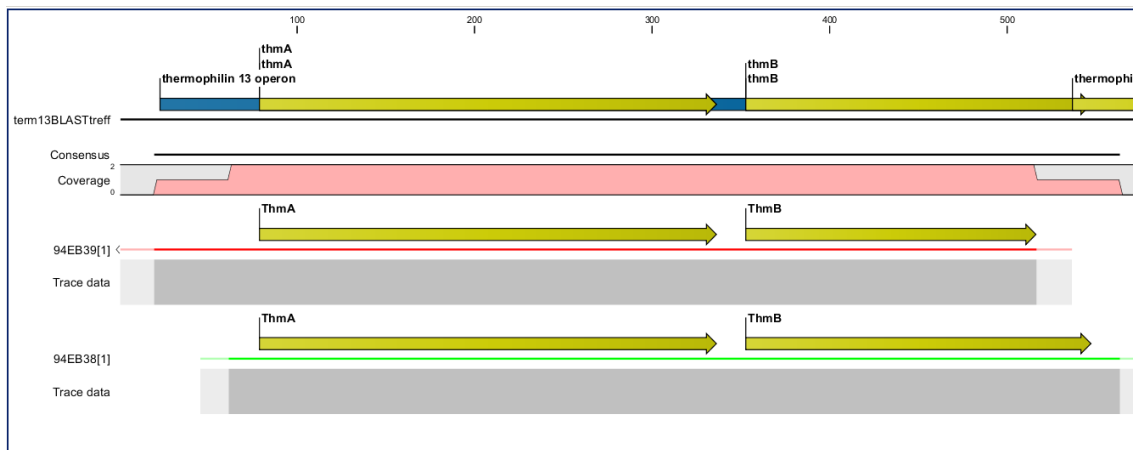
## Vedlegg

**Tabell V1** Aminosyrene, med enkode og trekode

Enkode	Trekode	Aminosyre
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsyre
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Fenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histedin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Metionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Treonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptofan
Y	Tyr	Tyrosin

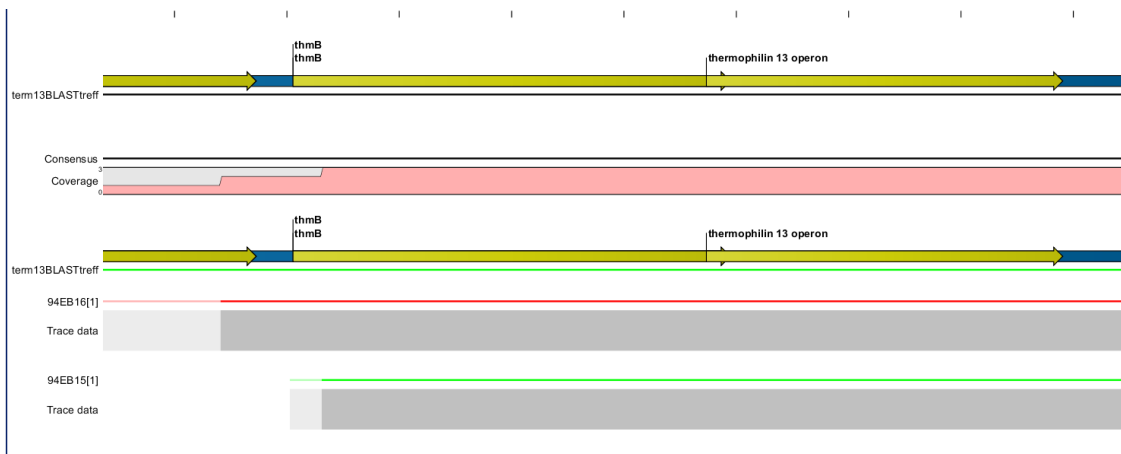
Tabell V2 Basene

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	tymin
U	Uracil



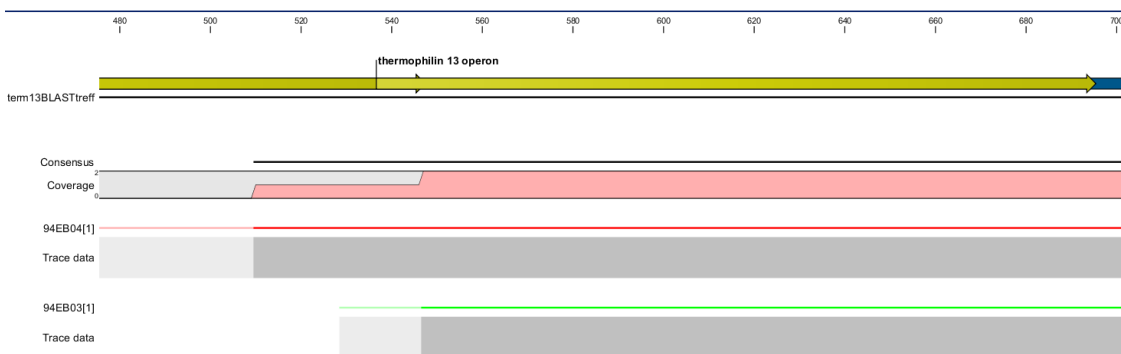
**Figur V1 Konstrukt AB i *L.lactis***

Figur 1 viser sekvenssammenstilling av IL1403-pMG36e\_AB mot referanse sekvens av Termofilin 13 fra BLAST. Sekvenssammenstillingen viser ingen konflikter mellom konstruktet og referanse sekvensen.



**Figur V2 Konstrukt BC i *L.lactis***

Figur V2 viser sekvenssammenstilling av IL1403-pMG36e\_BC mot referanse sekvens av Termofilin 13 fra BLAST. Sekvenssammenstillingen viser ingen konflikter mellom konstruktet og referanse sekvensen.



**Figur V3 genkonstrukt C i *L.lactis***

Figur V3 viser sekvenssammenstilling av IL1403-pMG36e\_C mot referanse sekvens av Termofilin 13 fra BLAST.  
Sekvenssammenstillingen viser ingen konflikter mellom konstruktet og referanse sekvensen

Thermophilinkluster (insert)

```
TTTTGAAGTAGTGCTATTCTAGACTTGTC AAGGTTGCAACCGACAAAATAAAAATATT
AGGTAGGAGATATTTACAATGAATACAATAACTATTTGTAAATTTGATGTTTTAGATGCT
GAACTTCTTTGACAGTTGAGGGTGGATACTCTGGTAAGGATTGTTTAAAAGACATGGGA
GGATATGCATTGGCAGGAGCTGGAAGTGGAGCTCTGTGGGGAGCTCCAGCAGGAGGTGTT
GGAGCACTCCAGGTGCATTTGTCGGAGCTCATGTTGGGGCAATTGCAGGAGGCTTTGCA
TGTATGGGTGGAATGATTGGTAATAAGTTTAACTAAGGAAGGAGTTTATATCATGAAGCA
GTATAATGGTTTTGAGGTTCTACATGAACTTGACTTAGCAAATGTAAGTGGCGGTCAAAT
TAATTGGGGATCAGTTGTAGGACTGTATAGGTGGAGCTATTATCGGAGGTGCATTTTC
AGGAGGTGCAGCGCTGGAGTAGGATGCCTTGTGGGAGCGGAAAGGCAATCATAAATGG
ATTATAAAAGTCTTTTATCGCTTTATTATTATAATTCCCCTGTAGTTATACTAATCG
GTCTTCGAAAGAATAATCAGAACTAATCATTGCTGGGGTAGCTCCTCTTATCTATCTAT
TATGCAGTTATCTTTTAGACTGGATTTTTGATTGAGAAATTCGATTTTGGTCTATTTGTA
GATTTTCAAAGTATGCTAAATGTTTTAACCTCCCCAAAATTATCAAGTCAAGTACAGC
AAAGTATTCATCTTGAACGGTTGAATAGTTATACAAAAGATATCTCATGATAAAAAACAG
ACATAGGAAATAAATTTGGAGGCTGATATTGATATGAAATTTGATAAACATATTGAATT
AAATACCTTCGTCTTGAAGAAATTCCTCGAGGAAACCCAAATTGGGGGTTTCAGTATTTG
```

Forward AB primer

revers AB primer

Forward BC primer

Revers BC primer

Forward C primer

**Plasmid Mini Spin Protocol**

All centrifugation should be performed at room temperature unless otherwise noted. For low copy plasmids refer to page 16. This protocol is designed to isolate plasmid from E. coli grown in a 1-5 mL LB culture.

**User Supplied Equipment:**

- 96-100% Ethanol (Do not use denatured alcohol)
- Microcentrifuge capable of 15,000 x g
- 1.5 ml or 2 ml Centrifuge Tubes
- Appropriate Centrifuge Tube for step 1

**Things to do before starting:**

- Preheat Elution Buffer to 70°C if Plasmid DNA is > 10kb
- Prepare DNA Wash Buffer and Solution 1 according to directions 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 hr 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. Decant or Pellet bacterial cells by centrifugation at 10,000 x g for 1 min at room temperature.
3. Resuspend the bacterial pellet by adding **250 µl of Solution I/RNase A solution**, and vortexing (or pipetting up and down). Complete re-suspension (no visible cell clumps) of cell pellet is vital for obtaining good yields. Transfer suspension into a new 1.5 ml microcentrifuge tube.
4. **Add 250 µl of Solution II** and gently mix by inverting and rotating tube several times to obtain a clear lysate. A 2-3 minute incubation may be necessary. Avoid vigorous mixing as this will shear chromosomal DNA and lower plasmid purity.  
**Note: Do not allow the lysis reaction to proceed more than 5 min.**  
(Store Solution II tightly capped when not in use to avoid acidification of Solution II from CO<sub>2</sub> in the air.)
5. **Add 350 µl of Solution III** and mix immediately by inverting 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.

6. Centrifuge at 13,000 x g for 10 min at room temperature. A compact white pellet will form. Promptly proceed to the next step.
7. Prepare a **HIBind DNA Mini Column** by placing into a 2 ml collection tube. **Add 100 µl of Equilibration Buffer.** Centrifuge at 13,000 x g for 30-60 seconds. Discard the flow-through liquid and place the HIBind DNA Mini Column back into the same collection tube.
8. **Add the cleared supernatant from step 6** by CAREFULLY aspirating it into the HIBind DNA Mini Column. Ensure that the pellet is not disturbed and that no cellular debris has carried over into the HIBind DNA Mini Column. Centrifuge at 13,000 x g for 1 min at room temperature to completely pass lysate through the HIBind DNA Mini Column. Discard the flow-through liquid and place the HIBind DNA Mini Column back into the same collection tube.
9. **Add 500 µl of Buffer HB** and centrifuge at 13,000 x g for 30 to 60 seconds at room temperature to wash the HIBind DNA Mini Column. Discard the flow-through liquid and place the HIBind DNA Mini Column back into the same collection tube.  
  
This step ensures that residual protein contaminations are removed, thus ensuring high quality DNA that will be suitable for downstream applications.
10. **Add 700 µl of DNA Wash Buffer** (diluted with absolute ethanol) and centrifuge at 13,000 x g for 30 to 60 seconds at room temperature to wash the HIBind DNA Column. Discard the flow-through liquid and place the HIBind DNA Mini Column back into the same collection tube.  
  
**NOTE:** DNA Wash Buffer Concentrate must be diluted with absolute ethanol before use. See label for directions. If refrigerated, DNA Wash Buffer must be brought to room temperature before use.
11. **OPTIONAL:** Repeat wash step 10 with another 700 µl of DNA Wash Buffer (diluted with absolute ethanol).
12. Centrifuge the empty HIBind Mini Column at 13,000 x g for 2 min to dry the column  
**IMPORTANT: Do not skip this step - it is critical for good yields**
13. Place the HIBind DNA Mini Column into a new/clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not supplied). Depending on desired concentration of final product, **add 30-100 µl of Elution Buffer** (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) or sterile deionized water directly onto the center of the column matrix. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge for at 13,000 x g for 1 min to elute DNA. An optional second elution will yield any residual DNA, though at a lower concentration.



**Things to do before starting**

- Add the provided RNase A solution to Buffer P1 before use. Use one vial of RNase A (centrifuge briefly before use) per bottle of Buffer P1, to give a final concentration of 100 µg/ml.
- Check Buffer P2 for SDS precipitation due to low storage temperatures. If necessary, dissolve the SDS by warming to 37°C.
- Pre-chill Buffer P3 at 4°C.
- **Optional:** Add the provided LyseBlue reagent to Buffer P1 and mix before use. Use one vial LyseBlue (centrifuge briefly before use) per bottle of Buffer P1 to achieve a 1:1000 dilution. LyseBlue provides visual identification of optimum buffer mixing thereby preventing the common handling errors that lead to inefficient cell lysis and incomplete precipitation of SDS, genomic DNA, and cell debris. For more details see "Using LyseBlue reagent" on page 14.

**Procedure**

1. **Pick a single colony from a freshly streaked selective plate and inoculate a starter culture of 2–5 ml LB medium containing the appropriate selective antibiotic. Incubate for approx. 8 h at 37°C with vigorous shaking (approx. 300 rpm).**  
Use a tube or flask with a volume of at least 4 times the volume of the culture.
2. **Dilute the starter culture 1/500 to 1/1000 into selective LB medium. For high-copy plasmids, inoculate ▲ 25 ml or ● 100 ml medium with ▲ 25–50 µl or ● 100–200 µl of starter culture. For low-copy plasmids, inoculate ▲ 100 ml or ● 500 ml medium with ▲ 100–200 µl or ● 250–500 µl of starter culture. Grow at 37°C for 12–16 h with vigorous shaking (approx. 300 rpm).**  
Use a flask or vessel with a volume of at least 4 times the volume of the culture. The culture should reach a cell density of approximately 3–4 × 10<sup>8</sup> cells per milliliter, which typically corresponds to a pellet wet weight of approximately 3 g/liter medium.
3. **Harvest the bacterial cells by centrifugation at 6000 × g for 15 min at 4°C.**  
⊗ If you wish to stop the protocol and continue later, freeze the cell pellets at –20°C.
4. **Resuspend the bacterial pellet in ▲ 4 ml or ● 10 ml Buffer P1.**  
For efficient lysis it is important to use a vessel that is large enough to allow complete mixing of the lysis buffers. Ensure that RNase A has been added to Buffer P1.  
If LyseBlue reagent has been added to Buffer P1, vigorously shake the buffer bottle before use to ensure LyseBlue particles are completely resuspended. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain.

5. **Add ▲ 4 ml or ● 10 ml Buffer P2, mix thoroughly by vigorously inverting the sealed tube 4–6 times, and incubate at room temperature (15–25°C) for 5 min.**

Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. The lysate should appear viscous. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min. After use, the bottle containing Buffer P2 should be closed immediately to avoid acidification from CO<sub>2</sub> in the air.

If LyseBlue has been added to Buffer P1 the cell suspension will turn blue after addition of Buffer P2. Mixing should result in a homogeneously colored suspension. If the suspension contains localized colorless regions or if brownish cell clumps are still visible, continue mixing the solution until a homogeneously colored suspension is achieved.

6. **Add ▲ 4 ml or ● 10 ml of chilled Buffer P3, mix immediately and thoroughly by vigorously inverting 4–6 times, and incubate on ice for ▲ 15 min or ● 20 min.**

Precipitation is enhanced by using chilled Buffer P3 and incubating on ice. After addition of Buffer P3, a fluffy white material forms and the lysate becomes less viscous. The precipitated material contains genomic DNA, proteins, cell debris, and KDS. The lysate should be mixed thoroughly to ensure even potassium dodecyl sulfate precipitation. If the mixture still appears viscous, more mixing is required to completely neutralize the solution.

If LyseBlue reagent has been used, the suspension should be mixed until all trace of blue has gone and the suspension is colorless. A homogeneous colorless suspension indicates that the SDS has been effectively precipitated.

7. **Centrifuge at ≥20,000 × g for 30 min at 4°C. Remove supernatant containing plasmid DNA promptly.**

Before loading the centrifuge, the sample should be mixed again. Centrifugation should be performed in non-glass tubes (e.g., polypropylene). After centrifugation the supernatant should be clear.

**Note:** Instead of centrifugation steps 7 and 8, the lysate can be efficiently cleared by filtration using a QIAfilter Kits or Cartridges (see [www.qiagen.com/products/plasmid/LargeScaleKits](http://www.qiagen.com/products/plasmid/LargeScaleKits)).

8. **Centrifuge the supernatant again at ≥20,000 × g for 15 min at 4°C. Remove supernatant containing plasmid DNA promptly.**

This second centrifugation step should be carried out to avoid applying suspended or particulate material to the QIAGENtip. Suspended material (causing the sample to appear turbid) can clog the QIAGENtip and reduce or eliminate gravity flow.

Remove a ▲ 240 µl or ● 120 µl sample from the cleared lysate supernatant and save for an analytical gel (sample 1) in order to determine whether growth and lysis conditions were optimal.

9. **Equilibrate a ▲ QIAGEN-tip 100 or ● QIAGEN-tip 500 by applying ▲ 4 ml or ● 10 ml Buffer QBT, and allow the column to empty by gravity flow.**  
Flow of buffer will begin automatically by reduction in surface tension due to the presence of detergent in the equilibration buffer. Allow the QIAGEN-tip to drain completely. QIAGEN-tips can be left unattended, since the flow of buffer will stop when the meniscus reaches the upper frit in the column.
10. **Apply the supernatant from step 8 to the QIAGEN-tip and allow it to enter the resin by gravity flow.**  
The supernatant should be loaded onto the QIAGEN-tip promptly. If it is left too long and becomes cloudy due to further precipitation of protein, it must be centrifuged again or filtered before loading to prevent clogging of the QIAGEN-tip.
- ☞ Remove a ▲ 240  $\mu$ l or ● 120  $\mu$ l sample from the flow-through and save for an analytical gel (sample 2) in order to determine the efficiency of DNA binding to the QIAGEN Resin.
11. **Wash the QIAGEN-tip with ▲ 2 x 10 ml or ● 2 x 30 ml Buffer QC.**  
Allow Buffer QC to move through the QIAGEN-tip by gravity flow. The first wash is sufficient to remove all contaminants in the majority of plasmid DNA preparations. The second wash is especially necessary when large culture volumes or bacterial strains producing large amounts of carbohydrates are used.
- ☞ Remove a ▲ 400  $\mu$ l or ● 240  $\mu$ l sample from the combined wash fractions and save for an analytical gel (sample 3).
12. **Elute DNA with ▲ 5 ml or ● 15 ml Buffer QF.**  
Collect the eluate in a 15 ml or 50 ml tube (not supplied). Use of polycarbonate centrifuge tubes is not recommended as polycarbonate is not resistant to the alcohol used in subsequent steps.
- Note:** For constructs larger than 4.5–5.0 kb, prewarming the elution buffer to 65°C may help to increase yield.
- ☞ Remove a ▲ 100  $\mu$ l or ● 60  $\mu$ l sample of the eluate and save for an analytical gel (sample 4).
- ☒ If you wish to stop the protocol and continue later, store the eluate at 4°C. Storage periods longer than overnight are not recommended.

13. **Precipitate DNA by adding ▲ 3.5 ml or ● 10.5 ml (0.7 volumes) room-temperature isopropanol to the eluted DNA. Mix and centrifuge immediately at  $\geq 15,000 \times g$  for 30 min at 4°C. Carefully decant the supernatant.**

All solutions should be at room temperature in order to minimize salt precipitation, although centrifugation is carried out at 4°C to prevent overheating of the sample. Alternatively, disposable conical bottom centrifuge tubes can be used for centrifugation at 5000  $\times g$  for 60 min at 4°C. Isopropanol pellets have a glassy appearance and may be more difficult to see than the fluffy, salt-containing pellets that result from ethanol precipitation. Marking the outside of the tube before centrifugation allows the pellet to be more easily located. Isopropanol pellets are also more loosely attached to the side of the tube, and care should be taken when removing the supernatant.

14. **Wash DNA pellet with ▲ 2 ml or ● 5 ml of room-temperature 70% ethanol, and centrifuge at  $\geq 15,000 \times g$  for 10 min. Carefully decant the supernatant without disturbing the pellet.**

Alternatively, disposable conical-bottom centrifuge tubes can be used for centrifugation at 5000  $\times g$  for 60 min at 4°C. The 70% ethanol removes precipitated salt and replaces isopropanol with the more volatile ethanol, making the DNA easier to redissolve.

15. **Air-dry the pellet for 5–10 min, and redissolve the DNA in a suitable volume of buffer (e.g., TE buffer, pH 8.0, or 10 mM Tris-Cl, pH 8.5).**

Redissolve the DNA pellet by rinsing the walls to recover all the DNA, especially if glass tubes have been used. Pipetting the DNA up and down to promote resuspension may cause shearing and should be avoided. Overlying the pellet will make the DNA difficult to redissolve. DNA dissolves best under slightly alkaline conditions; it does not easily dissolve in acidic buffers.

#### Determination of yield

To determine the yield, DNA concentration should be determined by both UV spectrophotometry at 260 nm and quantitative analysis on an agarose gel. For reliable spectrophotometric DNA quantification,  $A_{260}$  readings should lie between 0.1 and 1.0.

#### Agarose gel analysis

We recommend removing and saving aliquots during the purification procedure (samples 1–4). If the plasmid DNA is of low yield or quality, the samples can be analyzed by agarose gel electrophoresis to determine at what stage of the purification procedure the problem occurred (see page 41).